НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

НІКОЛАЄВ РОМАН ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 577.112.7:[577.113.3+577.113.5]+577.336

ДИСЕРТАЦІЯ
ОСОБЛИВОСТІ БІЛОК-ЛІГАНДНИХ ВЗАЄМОДІЙ МОНО- ТА ОЛІГОРИБОНУКЛЕОТИДІВ З ІНТЕРФЕРОНОМ α-2b

091 – біологія та біохімія
09 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів має посилання на відповідні джерела

_____ (Ніколаєв Р. О.)

Науковий керівник: Ткачук Зеновій Юрійович, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Київ – 2026

АНОТАЦІЯ

Ніколаєв Р.О. **«Особливості білок-лігандних взаємодій моно- та олігорибонуклеотидів з інтерфероном α-2b»*:* кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія та біохімія (09 – Біологія). – Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, Київ, 2026.

Дисертаційна робота присвячена встановленню фізико-хімічних закономірностей нековалентної взаємодії рекомбінантного інтерферону α-2b (ІНФ α-2b) з 5′-олігорибонуклеотидами (ОРН), 5′-нуклеотидрибомонофосфатами (НМФ) та їхніми композиціями з D-манітолом залежно від молекулярної структури нуклеотиду, препаративної кислотної або натрієвої форми, протиіонного та гідратаційного оточення, а також структурного стану білкової мішені.

Робоча гіпотеза полягає в тому, що зв’язування 5′-олігорибонуклеотидів і 5′-рибонуклеозидмонофосфатів з інтерфероном (ІНФ α-2b) може змінювати його конформацію. Характер такої модуляції визначається взаємозалежністю локального протонного й іонного стану фосфатної групи, природи азотистої основи та рибозофосфатного фрагмента, катіонного оточення, гідратації, взаємодії з D-манітолом і електростатичної топології поверхні білка. Реалізація різних комбінацій цих факторів здатна формувати відмінні термодинамічні режими нековалентного зв’язування та зміщувати рівновагу між близькими конформаційними станами ІНФ α-2b, створюючи фізико-хімічні передумови для модифікації його рецепторного розпізнавання.

Актуальність дослідження визначається тим, що взаємодії білків із нуклеотидами та короткими нуклеїновими кислотами є важливим компонентом молекулярного розпізнавання, тоді як для ІНФ α-2b систематичні дані щодо впливу структури нуклеотиду, його іонної форми, протиіонів і гідратаційного середовища на

зв’язування та конформаційний стан білка залишаються обмеженими. Особливий інтерес становить порівняння препаративно визначених кислотних і динатрієвих форм ОРН і нуклеотидмонофосфатів, оскільки їхні відмінності не зводяться до формальної наявності або відсутності заряду. За експериментальних значень pH фосфатні групи значною мірою іонізовані, тому спостережувані відмінності відображають комплексний вплив локального протонного стану, іонного парування, екранування електростатичного потенціалу, гідратації та енергетичних витрат на десольватацію.

Для перевірки робочої гіпотези застосовано комплекс взаємодоповнювальних методів: стаціонарну та часороздільну флуоресцентну спектроскопію і флуоресцентну анізотропію; круговий дихроїзм, інфрачервону (ІЧ), ультрафіолетову-, видиму та ^{1}H ЯМР-спектроскопію; ізотермічну титраційну й одноразову інжекційну калориметрію; розділення багатокомпонентних сигналів методом чергування найменших квадратів (MCR-ALS), термофлуоресцентний і агрегаційний аналіз; оцінювання електронних дескрипторів і молекулярний докінг. Таке поєднання дало змогу простежити систему на кількох взаємопов’язаних рівнях — від формування білок-лігандного комплексу й перебудови мікрооточення ароматичних залишків до термодинамічних рушійних сил, конформаційного ансамблю та рецептор-залежного розпізнавання.

При вивченні стаціонарної флуоресценції ми підтвердили концентраційно залежну взаємодію всіх основних класів досліджених лігандів з ІНФ α-2b, однак амплітуда гасіння не була прямим еквівалентом афінності. За сукупністю оцінених констант дисоціації для більшості кислотних препаративних форм НМФ була характерна вища спостережна афінність, тоді як динатрієві форми збільшували K_d у кілька разів; найменше значення K_d у серії прямої взаємодії з ІНФ α-2b визначено для ГМФ + D-манітолу (0,20 ± 0,03 мкМ). Часороздільні вимірювання виявили скорочення часу життя флуоресценції ІНФ α-2b у присутності нуклеотидних лігандів, що свідчить про появу додаткових шляхів деактивації збудженого стану та є сумісним зі змішаним механізмом гасіння. Калориметричні дані виявили переважно від’ємні значення ΔH для кислотних форм НМФ та істотно слабші або додатні теплові ефекти для динатрієвих форм у простому буфері. Разом зі спектральними даними ^{1}H ядерного магнітного резонансу (ЯМР) це свідчить про те, що кислотно-сольові відмінності

відображають не лише відмінності протонного стану, а й комплексний внесок іонного парування, гідратації, десольватації та структури азотистої основи. Незначні кислотно-сольові зміни смуг абсорбційного поглинання за виразніших змін флуоресцентної та конформаційної відповіді узгоджуються з різною чутливістю цих спектроскопічних методів до станів системи. Отже, основною закономірністю є залежність спостерігаємої афінності та термодинамічного режиму взаємодії від молекулярної структури нуклеотиду та його іонно-гідратаційного оточення; внесок Na^+ пов'язаний з електростатичним екрануванням, іонним паруванням і зміною гідратації та десольватації фосфатного фрагмента.

D-манітол виявився селективним, а не універсальним модифікатором нуклеотидно-білкової взаємодії. У частині систем, переважно з кислотними формами нуклеотидів, його присутність посилювала флуоресцентну відповідь, підвищувала видиму афінність і збільшувала за модулем екзотермічний внесок, проте напрям і величина цих змін залежали від природи нуклеотиду, його препаративної форми та стану білкової мішені. Узгоджені результати ІЧ-спектроскопії, MCR-ALS та інших спектральних підходів свідчать, що D-манітол здатний перебудовувати гідратаційне, воднево-зв'язувальне та донорно-акцепторне мікрооточення нуклеотидів ще до безпосереднього контакту з білком. З огляду на це, можна припустити, що в білоквмісних системах такі зміни сольватаційного та іонно-гідратаційного стану ліганда можуть модифікувати характер його подальшої взаємодії з поверхнею білка. Таким чином, спостережуваний ефект D-манітолу доцільно інтерпретувати не як однакове пряме підсилення зв'язування в усіх застосованих нами модельних системах, а як непряму модифікацію фізико-хімічного стану ліганда і його мікрооточення, наслідки якої залежать від конкретної системи «нуклеотид–протиіон–розчинник–білок».

Для кислотної форми OPH компонент MCR-ALS, віднесений до спектрально зміненого стану в присутності D-манітолу, був виразнішим, ніж для OPH-Na. Водночас його амплітуду не інтерпретували як пряму молярну частку комплексу, показник його стехіометрії або доказ кооперативності. Тому результати MCR-ALS підтримують висновок про відмінності у спектральному та сольватаційному стані кислотних і

динатрієвих форм ОРН у присутності D-манітолу, але самі по собі не встановлюють механізм його впливу на білок/нуклеотидне зв'язування.

Сукупність отриманих даних обмежує надмірно широке трактування D-манітолу як самостійного підсилювача афінності та вказує на необхідність оцінювати його ефект окремо для кожної конкретної молекулярної системи. Зміна оціненої частки α-спірального компонента відносно нативного ІНФ α-2b охоплювала діапазон приблизно від −12,2 до +11,9 %: кислотні форми НМФ і ОРН частіше зменшували α-спіральний компонент і збільшували вміст невпорядкованої структури, тоді як натрієві форми частіше зберігали або збільшували частку структурованих компонентів. Ці зміни трактували як перерозподіл конформаційного ансамблю, а не як однозначний доказ глобальної денатурації або універсальної стабілізації білка.

Термофлуоресцентний і тіофлафін Т-аналіз також не підтримали спрощеної залежності «кислотна форма дестабілізує — динатрієва стабілізує». $T_{плавлення}$ нативного ІНФ α-2b 68,54 °C, в присутності лігандів перебувала в межах 65,32–71,10 °C; у 17 із 20 випадків відхилення не перевищувало 2 °C. У вибірці з 20 лігандів вираженого зв'язку між $T_{плавлення}$ і агрегаційною відповіддю не виявлено ($r_{Pearson}$=-0,19, $\rho_{Spearman}$=0,04). Отже, нуклеотиди модулюють конформаційний стан, термічний перехід і ThT-відповідь ІНФ α-2b як пов'язані, але не взаємозамінні характеристики системи. Розбіжності абсолютних оцінок вторинної структури між алгоритмами деконволюції враховано під час інтерпретації: доказовими вважали насамперед відтворювані напрями змін і їх узгодженість між методами, а не окремі абсолютні частки структурних компонентів.

Порівняння ізольованих ІНФ α-2b і субодиниці А рецептора інтерферону 1 (ІНФАР 1) із системою, одержаною після попередньої інкубації ІНФ α-2b з ІНФАР 1, виявило перерозподіл видимої афінності до окремих лігандів. Характер нуклеотидного розпізнавання залежав від структурного стану комплексу ІНФ α-2b/ІНФАР 1 та порядку його складання. Водночас флуоресцентна анізотропія показала перехід від переважно односайтових профілів за прямого титрування до негіперболічних або слабкосигмоїдальних залежностей за послідовного складання системи. Статистичне порівняння багатовимірних моделей найчастіше підтримувало Кошланда–Неметта–

Філмера (KNF) або Адаїр: серед 100 проаналізованих кривих найнижче значення індекса Аїка AICc для моделі KNF було отримано у 48 випадках, а для Адаїр-1 — у 43, тоді як складніші моделі мали інформаційну перевагу лише в окремих випадках.

Разом із тим, недостатня ідентифікованість окремих мікроскопічних параметрів не дає підстав розглядати таке співвідношення параметру Аїка AICc як доказ конкретного механізму кооперативного зв'язування. Для окремих лігандів субмікромолярні значення K_d спостерігали саме після попередньої інкубації двох білкових компонентів; зокрема, для АМФ + D-манітолу значення K_d, розраховане за моделлю Hill, становило 0,17 мкМ. Оскільки частку фактично асоційованих молекул ІНФ α-2b та ІНФАР 1 у цих умовах незалежно не визначали, таку систему надалі коректніше розглядати як попередньо інкубовану суміш ІНФ α-2b/ІНФАР 1, а не як кількісно охарактеризований рецепторний комплекс. Молекулярний докінг локалізував потенційні ділянки контакту нуклеотидів у N-кінцевій та інших поверхневих областях ІНФ α-2b, а також у субдоменах SD1–SD2 ІНФАР 1, що узгоджується з можливістю багатокомпонентного характеру взаємодій. Сукупність результатів свідчить, що наявність рецепторного компонента та порядок складання системи можуть змінювати доступність, геометрію й електростатичне оточення потенційних ділянок розпізнавання. Водночас функціональне значення цих ефектів для повного рецепторного комплексу інтерферону потребує окремої перевірки із залученням ІНФАР 2 та прямими тестами активації JAK–STAT-сигналювання.

На основі сукупності результатів запропоновано трирівневу модель нуклеотидного впливу на ІНФ α-2b. На першому рівні молекулярне розпізнавання визначається безпосередніми контактами: фосфатний залишок забезпечує електростатичний і воднево-зв'язувальний потенціал, азотиста основа — додаткові водневі, дисперсійні та ароматичні взаємодії, а рибоза визначає просторову геометрію цих груп. На другому рівні оточення — локальний протонний стан і гідратація визначають доступність контактів та енергетичну вартість десольватації. На третьому рівні ОРН впливає на ІНФ α-2b, що реєструється за змінами флуоресценції, КД- та ІЧ-спектрів, анізотропії, термостійкості та інших параметрів. D-манітол передусім

модифікує іонно-гідратаційний рівень і через нього може впливати на формування білок-лігандного комплексу та конформаційну відповідь білка.

Таким чином, у роботі експериментально обґрунтовано фізико-хімічну частину центральної гіпотези: 5′-рибоолігонуклеотиди та 5′-рибонуклеозидмонофосфати здатні виступати не лише лігандами, а й молекулярними мікромодуляторами конформаційної пластичності ІНФ α-2b. Їхня дія визначається не одним параметром, а взаємозалежністю молекулярної структури, стану фосфатної групи, іонного оточення, гідратації, D-манітолу та електростатичної топології білкової поверхні. Найбільш відтворюваними закономірностями є вища афінність і вираженіший ентальпійний внесок для більшості кислих лігандів, селективна дія D-манітолу, залежність взаємодії від структури азотистої основи та стану ІНФ α-2b/ІНФАР 1, а також відсутність універсальної відповідності між окремими спектральними, термодинамічними та структурними дескрипторами.

Виявлена залежність афінності нуклеотидів від стану системи ІНФ α-2b/ІНФАР 1 створює фізико-хімічні передумови для припущення, що зміна конформаційного ансамблю ІНФ α-2b може впливати на його рецепторне розпізнавання. Водночас ця частина гіпотези не може вважатися функціонально доведеною, оскільки досліджена система не містила ІНФАР 2 і не включала безпосереднього визначення JAK–STAT-сигналювання або експресії інтерферон-стимульованих генів. Подальша перевірка має включати повний рецепторний комплекс ІНФАР 2/ІНФ α-2b/ІНФАР 1, незалежні функціональні тести, фізіологічне іонне середовище та верифікацію стехіометрії комплексів.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у системному встановленні взаємозв’язку між молекулярною структурою 5′-рибонуклеотидів, їх кислотною або натрієвою формою лігандів, іонно-гідратаційним оточенням і характером взаємодії з ІНФ α-2b. Показано, що зміна хімічної форми ліганда може одночасно змінювати афінність, ентальпійно-ентропійний баланс та конформаційний стан білка, який реєструється спектроскопічно. Встановлено селективну роль D-манітолу як модифікатора гідратаційного та воднево-зв’язувального мікрооточення нуклеотидів. Продемонстровано залежність нуклеотидного розпізнавання від стану системи ІНФ α-

2b/ІНФАР 1 та порядку її складання. На основі взаємопов'язаних спектроскопічних, термодинамічних, структурних і розрахункових даних запропоновано концепцію вливу нуклеотидів як молекулярних мікромодуляторів конформаційної пластичності ІНФ α-2b.

Практичне значення роботи полягає у формуванні фізико-хімічних критеріїв для прогнозування та контролю взаємодії нуклеотидних компонентів з білками інтерферонової системи. Одержані закономірності можуть бути використані під час подальшого конструювання багатокомпонентних нуклеотид-білкових систем, оптимізації складу препаратів, що містять ОРН, НМФ і поліоли, а також під час планування досліджень їхнього впливу на стабільність, рецепторне розпізнавання та функціональну активність ІНФ α-2b.

Ключові слова: нуклеїнові кислоти; рекомбінантний білок; енергія зв'язування; афінність зв'язування; сайт зв'язування; внутрішньоклітинна сигналізація; білок-білкові взаємодії; круговий дихроїзм; конформація білка; мультибілковий комплекс; утворення комплексу; молекулярний докінг; гасіння флуоресценції; квантово-хімічне моделювання; молекулярна структура.

Публікації автора за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях

1. The Natural Oligoribonucleotides Functionalized by D-Mannitol Affected Interactions of Hemagglutinin with Glycan Receptor Indicating Anti-Influenza Activity / Tkachuk Z. Yu., Melnichuk N. S., **Nikolaiev R. O.**, Szutkowski K., Zhukov I. *Membranes*. 2021. Vol. 11, No. 10. Art. 757. DOI: 10.3390/membranes11100757. (Q2, Impact Factor 4,2). *Особистий внесок здобувача – докінг ОРН та ОРН-D-M, підготовка статті до друку.*

2. Вплив олігорибонуклеотидів на конформацію та стабільність інтерферону / **Ніколаєв Р. О.**, Вівчарик М. М., Черних С. І., Ткачук З. Ю. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2019. Т. 17, № 2. С. 165–171. DOI:

10.7124/visnyk.utgis.17.2.1217. *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, обробка результатів, написання статті та підготовка її до друку.*

3. π-Електронна афінність азотистих основ нуклеїнових кислот / Оберніхіна Н. В., **Ніколаєв Р. О.**, Качковський О. Д., Ткачук З. Ю. *Доповіді НАН України.* 2019. № 6. С. 75–81. DOI: 10.15407/dopovidi2019.06.075. (Impact Factor 0,345). *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, обробка результатів, написання статті та підготовка її до друку.*

4. **Nikolaiev R. O.,** Tkachuk Z. Yu. Interaction of 5′-ribonucleoside monophosphates with Interferon α-2b. *Biopolymers and Cell.* 2024. Vol. 40, No. 4. P. 264–277. DOI: 10.7124/bc.000B03. (Q4, Impact Factor 0,34). *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, обробка результатів, написання статті та підготовка її до друку.*

5. **Nikolaiev R. O.**, Tkachuk Z. Yu. Comparative analysis of the interaction of INF, INFAR1 and the

INF-INFAR1 complex with ribonucleotides by spectroscopic methods and docking. *ScienceRise: Biological Science.* 2026. No. 3 (47). P. 11–24. DOI: 10.15587/2519-8025.2026.368056. (Q4). *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, обробка результатів, написання статті та підготовка її до друку.*

Патент

Спосіб отримання біологічно активних сполук з використанням пуринових і піримідинових нуклеотидів та їх композицій : пат. 164333 Україна, U : МПК A61K 31/00, C07H 19/00, A61K 31/7072 / Мельнічук Н. С., Ніколаєв Р. О., Ткачук З. Ю. № a 202402297 ; заявл. 06.06.2024 ; опубл. 23.09.2026, *Бюл*. № 31. Т. 1.

Тези наукових доповідей

1. Conformational changes of secondary and tertiary structures of interferon under the influence of oligoribonucleotides-based drugs / **Nikolaiev R. O.**, Vivcharyk M. M., Levchenko S. M., Chernykh S. I., Obernikhina N. V., Tkachuk Z. Yu. *Proceedings of the 4th*

International Electronic Conference on Medicinal Chemistry. MDPI, 2018. Art. 5629. DOI: 10.3390/ecmc-4-05629.

2. **Nikolaiev R. O.**, Stepanenko Ye. Yu., Tkachuk Z. Yu. Conformational, fluorescence and energy parameters of Interferon α2b under the influence of mono and oligoribonucleotides-based drug. *Proceedings of the 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry.* MDPI, 2019. Art. 6328. DOI: 10.3390/ecmc2019-06328.

3. **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Tkachuk Z. Yu. Analysis of amyloidogenic potential, stability and fluorescence properties of insulins and interferons of different purity. VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement "Science and modern pharmaceutical manufacturing" (Kyiv, Ukraine, November 21, 2019). *Український медичний часопис.* 2019. № 6 (134), XI/XII. С. 41.

4. Fluorescence and circular dichroism spectroscopy studies of interactions between Interferon α2b and yeast oligoribonucleotides / **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Obernikhina N. V., Tkachuk Z. Yu. The 44th FEBS Congress "From molecules to living systems" (Krakow, Poland, 6–11 July 2019). Posters. *FEBS Open Bio*. 2019. Vol. 9, Suppl. 1. P. 215. DOI: 10.1002/2211-5463.12675.

5. **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Tkachuk Z. Yu. Fluorescence and circular dichroism spectroscopy studies of an interaction between interferon α2β, oligoribonucleotides and amp. XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists. *Biopolymers and Cell.* 2019. Vol. 35, No. 5. P. 406. DOI: 10.7124/bc.000A14.

6. **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Tkachuk Z. Yu. Spectroscopy and thermodynamic studies of an interaction between interferon a2b, oligoribonucleotides and ribonucleotides. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу (м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р.). *Медична та клінічна хімія.* 2019. Т. 21, № 3. С. 227–228.

7. Interaction of Interferon α-2b with different forms of oligonucleotides / **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Stepanenko Ye. Yu., Tkachuk Z. Yu. *XIV Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України* : electronic abstract book. 2020. P. 19.

8. Fluorescence properties interaction Interferon a2b with oligo- and monoribonucleotides / **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Stepanenko Ye. Yu., Tkachuk Z. Yu. *12th International Conference "Electronic Processes in Organic and Inorganic Materials" ICEPOM-12* (Kamianets-Podilskyi, June 1–5, 2020). 2020. P. 251.

9. **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S., Tkachuk Z. Thermodynamics of interaction of interferon alpha-2b with different forms of oligonucleotides. The 45th FEBS Congress "Molecules of life: Towards new horizons" (online event, 3–8 July 2021). *FEBS Open Bio.* 2021. Vol. 11, Suppl. 1. P. 126. DOI: 10.1002/2211-5463.13205.

10. Conformational, Fluorescence and Energy Parameters of Interferon α2b with Different Forms of Adenosine Monophosphate / **Nikolaiev R. O.**, Stepanenko Ye. Yu., Chernykh S. I., Melnichuk N. S., Tkachuk Z. Yu. *Proceedings*. 2021. Vol. 78, No. 1. Art. 16. DOI: 10.3390/IECP2020-08697.

11. **Nikolaiev R. O.**, Spivak M. Ya., Tkachuk Z. Yu. Spectral studies of ligand-protein interactions of oligoribonucleotides. The Conference of Young Scientists within the framework of the XVIII International Conference "Factors in Experimental Evolution of Organisms", dedicated to the 50th anniversary of the foundation of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the NASU. *Biopolymers and Cell.* 2023. Vol. 39, No. 4. P. 315. DOI: 10.7124/bc.000AA8.

12. **Nikolaiev R. O.**, Tkachuk Z. Yu. Interaction of 5′-monoribonucleotides with Interferon α-2b. BioGENext Conference "Shaping the future of medicine through biomedical R&D" (Kyiv, September 17–20, 2024). *Biopolymers and Cell*. 2024. Vol. 40, No. 3. P. 175. DOI: 10.7124/bc.000AB9.

13. The effect of oligonucleotides, mononucleotides and their complexes with mannitol on the conformational stability of Interferon α2b / **Nikolaiev R. O.**, Tkachuk Z. Yu., Obernikhina N. V., Dotsenko M. A., Stepanenko Ye. Yu. *Proceedings of the 1st International Electronic Conference on Medicinal Chemistry and Pharmaceutics* (1–30 November 2025). ECMC-P Book of Abstracts 2025. Basel, Switzerland : MDPI, 2025. P. 28. URL: https://sciforum.net/paper/25661 (дата звернення: 01.10.2026). URL збірника: https://sciforum.net/event/ECMC-P2025/abstract-book (дата звернення: 01.10.2026).

14. Біологічна афінність мононуклеотидів в різних значеннях pH середовища / **Ніколаєв Р. О.**, Оберніхіна Н. В., Качковський О. Д., Ткачук З. Ю. *Чаргаффські читання* : матеріали XX Міжнародної наукової конференції, присвяченої 150-річчю Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича та 120-річчю від дня народження Ервіна Чаргаффа (м. Чернівці, Україна, 27–30 жовтня 2025 р.). Чернівці : Чернівец. нац. ун-т ім. Ю. Федьковича, 2025. С. 57–58.

15. **Ніколаєв Р. О.**, Оберніхіна Н. В., Ткачук З. Ю. Теплові ефекти при взаємодії 5′-мононуклеотидів з біологічними середовищами. *Чаргаффські читання* : матеріали XX Міжнародної наукової конференції. 2025. С. 53–54.

16. **Nikolaiev R. O.**, Tkachuk Z. Yu. Interaction of the INF-INFAR1 complex with ribonucleotides and D-mannitol : prospects for the development of next-generation interferon-based therapeutics. *Biopolymers and Cell.* 2026. Vol. 42, Special Issue. P. 10. DOI: 10.7124/bc.000b43.

SUMMARY

Nikolaiev R.O. **"Features of protein-ligand interactions of mono- and oligoribonucleotides with interferon α-2b" – Qualification scientific work as a manuscript.**

The dissertation is submitted in fulfilment of the requirements for the scientific degree of Doctor of Philosophy (091 Biology and biochemistry) – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2026.

The dissertation work is devoted to establishing the physicochemical regularities of the non-covalent interaction of recombinant interferon α-2b (IFN α-2b) with 5′-oligoribonucleotides (ORNs), 5′-nucleotide ribose monophosphates (NMPs), and their complexes with D-mannitol. The study examines how this interaction depends on the nucleotide's molecular structure, its acid or sodium form, the counterion, the hydration environment, and the structural state of the protein target.

The working hypothesis is that binding of 5′-oligoribonucleotides and 5′-ribonucleoside monophosphates to interferon (IFN α-2b) can change its conformation. This modulation depends on the local proton and ionic state of the phosphate group, the nature of the nitrogenous base and ribose-phosphate fragment, the cationic environment, hydration, interaction with D-mannitol, and the electrostatic topology of the protein surface. These factors can create distinct thermodynamic modes of non-covalent binding and shift the equilibrium between IFN α-2b conformational states, creating physicochemical prerequisites for modifying its receptor recognition.

The study is relevant because protein interactions with nucleotides and short nucleic acids are a key component of molecular recognition. However, systematic data on how nucleotide structure, ionic form, counterions, and hydration environment affect protein binding and conformational state remain limited for IFN α-2 b. Of particular interest is comparing the preparatively determined acid and disodium forms of ORNs and nucleotide monophosphates, since their differences are not reduced to the formal presence or absence of

charge. At experimental pH values, the phosphate groups are largely ionised; therefore, the observed differences reflect the combined influence of local proton state, ion pairing, electrostatic shielding, hydration, and desolvation costs.

To test the working hypothesis, a set of complementary methods was used: stationary and time-resolved fluorescence spectroscopy and fluorescence anisotropy; circular dichroism, infrared (IR), ultraviolet, visible, and ^{1}H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy; isothermal titration and single injection calorimetry; multicomponent signal separation by the method of alternating least squares (MCR-ALS), thermofluorescence and aggregation analysis; evaluation of electronic descriptors and molecular docking. This combination enabled analysis at several connected levels, from protein-ligand complex formation and reorganisation of the aromatic-residue microenvironment to thermodynamic driving forces, the conformational ensemble, and receptor-dependent recognition.

Steady-state fluorescence confirmed concentration-dependent interactions of all major ligand classes with IFN α-2b, but quenching amplitude did not directly reflect affinity. According to the estimated dissociation constants, most acidic preparative forms of NMPs showed higher observed affinity, while disodium forms increased Kd several times; the lowest Kd in direct interactions with IFN α-2b was found for GMP + D-mannitol (0.20 ± 0.03 μM). Time-resolved measurements showed a reduction in IFN α-2b fluorescence lifetime in the presence of nucleotide ligands, indicating additional excited-state deactivation pathways and a mixed quenching mechanism. Calorimetric data showed predominantly negative ΔH values for acid forms of NMPs and weaker or positive thermal effects for disodium forms in a simple buffer. Together with 1H NMR spectral data, this suggests that acid-salt differences reflect not only proton state, but also ion pairing, hydration, desolvation, and nitrogenous-base structure. The slight acid-salt shifts in absorption bands, together with more pronounced changes in fluorescence and conformational response, are consistent with the differing sensitivities of these methods to system state. Thus, observed affinity and thermodynamic mode depend on nucleotide molecular structure and the ion-hydration environment; Na^+ contributes through electrostatic shielding, ion pairing, and changes in phosphate hydration and desolvation.

D-mannitol acted as a selective, rather than universal, modifier of nucleotide-protein interactions. In some systems, mainly with acidic nucleotide forms, it enhanced the fluorescent response, increased apparent affinity, and increased the exothermic contribution to the modulus; however, the direction and magnitude of these changes depended on the nucleotide's nature, its preparative form, and the state of the protein target. Consistent results from IR spectroscopy, MCR-ALS, and other spectral approaches indicate that D-mannitol can rearrange the hydration, hydrogen-bonding, and donor-acceptor microenvironment of nucleotides even before direct contact with the protein. Accordingly, in protein-containing systems, changes in the ligand's solvation and ion-hydration state can modify its subsequent interaction with the protein surface. Thus, the observed effect of D-mannitol should be interpreted not as a direct enhancement of binding in all model systems, but as an indirect modification of the physicochemical state of the ligand and its microenvironment, with consequences that depend on the specific “nucleotide–counterion–solvent–protein” system.

For the acidic form of ORNs, the MCR-ALS component attributed to the spectrally altered state in the presence of D-mannitol was more pronounced than for ORNs-Na. We did not interpret its amplitude as a direct molar fraction of the complex, an indicator of stoichiometry, or evidence of cooperativity. Therefore, the MCR-ALS results support the conclusion that the spectral and solvation states of the acidic and disodium forms of ORNs differ in the presence of D-mannitol. Still, they do not by themselves establish the mechanism of its influence on protein/nucleotide binding.

Taken together, the data limit an overly broad interpretation of D-mannitol as an independent affinity enhancer and indicate the need to evaluate its effect separately for each molecular system. The estimated proportion of the α-helical component relative to native IFN α-2b ranged from approximately −12.2 to +11.9 %: acid forms of NMPs and ORNs more often reduced the α-helical component and increased disordered content, while sodium forms more often preserved or increased structured components. We interpreted these changes as a redistribution of the conformational ensemble, not as unambiguous evidence of global denaturation or universal stabilisation of the protein.

Thermofluorescence and ThT assays also did not support the simplified relationship “the acid form destabilises — the disodium form stabilises”. The Tmelt of native IFN α-2b

was 68.54 °C; in the presence of ligands, it ranged from 65.32–71.10 °C; in 17 out of 20 cases, the deviation did not exceed 2 °C. In a sample of 20 ligands, no pronounced relationship between Tmelt and the aggregation response was found ($r_{Pearson} = -0.19$, $\rho_{Spearman} = 0.04$). Therefore, nucleotides modulate the conformational state, thermal transition, and ThT response of IFN α-2b, which are related but not interchangeable characteristics of the system. We accounted for discrepancies in absolute secondary-structure estimates between deconvolution algorithms during interpretation: we treated the reproducible directions of change and their consistency across methods as evidence, rather than the absolute proportions of structural components.

Comparison of isolated IFN α-2b and interferon receptor 1 (IFNAR 1) with the system obtained after preincubation of IFN α-2b with IFNAR 1 revealed a redistribution of apparent affinity for individual ligands. The nature of nucleotide recognition depended on the structural state of the IFN α-2b/IFNAR 1 complex and the order of its assembly. At the same time, fluorescence anisotropy shifted from single-site profiles during direct titration to non-hyperbolic or weakly sigmoidal dependencies during sequential assembly. Statistical comparison of multivariate models most often supported Koshland–Nemeth–Filmer (KNF) or Adair: among the 100 analysed curves, the lowest AICc index for the KNF model was obtained in 48 cases, and for Adair-1 in 43, while more complex models had an information advantage only in isolated cases. However, the insufficient identifiability of individual microscopic parameters does not provide grounds to use the AICc ratio as evidence for a specific cooperative binding mechanism.

For individual ligands, we observed submicromolar Kd values after preincubation of the two protein components; in particular, for AMP + D-mannitol, the Kd calculated by the Hill model was 0.17 μM. Since the fraction of actually associated IFN α-2b and IFNAR 1 molecules under these conditions was not independently determined, such a system is more correctly considered a preincubated IFN α-2b/IFNAR 1 mixture rather than a quantitatively characterised receptor complex. Molecular docking localised potential nucleotide contact sites in the N-terminal and other surface regions of IFN α-2b, as well as in the SD1–SD2 subdomains of IFNAR 1, consistent with the possibility of a multicomponent nature of the interactions. Collectively, the results indicate that the receptor component and the system's

assembly order can alter the accessibility, geometry, and electrostatic environment of potential recognition sites. However, the functional significance of these effects for the full interferon receptor complex requires separate verification involving IFNAR-2 and direct tests of JAK–STAT signalling activation.

Based on the totality of the results, we propose a three-level model of the nucleotide's effect on IFN α-2b. At the first level, molecular recognition is governed by direct contacts: the phosphate residue provides electrostatic and hydrogen-bonding interactions; the nitrogenous base provides additional hydrogen-bonding, dispersion, and aromatic interactions; and the ribose determines the spatial geometry of these groups. At the second level, the environment — the local proton state and hydration — determines the accessibility of these contacts and the energy cost of desolvation. At the third level, ORNs affect IFN α-2b, as recorded by changes in fluorescence, CD and IR spectra, anisotropy, thermal stability, and other parameters. D-mannitol primarily modifies the ionic-hydration level and, through this, can affect protein-ligand complex formation and the protein's conformational response.

Thus, the work experimentally supports the physicochemical component of the central hypothesis: 5′-ribooligonucleotides and 5′-ribonucleoside monophosphates can act not only as ligands but also as molecular micromodulators of IFN α-2b conformational plasticity. Their action depends not on a single parameter but on the interdependence of molecular structure, phosphate-group state, ionic environment, hydration, D-mannitol, and the electrostatic topology of the protein surface. The most reproducible patterns are higher affinity and a more pronounced enthalpic contribution for most acidic ligands, selective action of D-mannitol, dependence of the interaction on the structure of the nitrogenous base and the state of IFN α-2b/IFNAR 1, and the absence of a universal correspondence between individual spectral, thermodynamic, and structural descriptors.

The revealed dependence of nucleotide affinity on the state of the IFN α-2b/IFNAR 1 system provides physicochemical support for the assumption that changes in the conformational ensemble of IFN α-2b may affect receptor recognition. However, this part of the hypothesis cannot be considered functionally proven, as the system studied did not include IFN 2 and did not directly measure JAK–STAT signalling or expression of interferon-stimulated genes. Further verification should include the complete IFNAR 2/IFN α-

2b/IFNAR 1 receptor complex, independent functional tests, a physiological ionic environment, and verification of the stoichiometry of the complexes.

The scientific novelty of the results lies in systematically establishing the relationship between the molecular structure of 5′-ribonucleotides, their acidic or sodium ligand forms, the ionic-hydration environment, and their interaction with IFN α-2b. We show that changing the ligand's chemical form can simultaneously alter affinity, the enthalpy-entropy balance, and the protein's conformational state, as observed spectroscopically. We have established the selective role of D-mannitol in modifying the hydration and hydrogen-bonding microenvironment of nucleotides. The dependence of nucleotide recognition on the state of the IFN α-2b/IFNAR 1 system and the order of its assembly has been demonstrated. Based on interrelated spectroscopic, thermodynamic, structural, and computational data, we propose that nucleotides act as molecular micromodulators that influence the conformational plasticity of IFN α-2b.

The practical significance of the work lies in establishing physicochemical criteria for predicting and controlling interactions between nucleotide components and proteins of the interferon system. The observed patterns can inform the design of multicomponent nucleotide-protein systems, the optimisation of preparations containing ORNs, NMPs, and polyols, and studies of their effects on the stability, receptor recognition, and functional activity of IFN α-2b.

Keywords: nucleic acids; recombinant protein; binding energy; binding affinity; binding site; intracellular signaling; protein-protein interactions; circular dichroism; protein conformation; multiprotein complex; complex formation; molecular docking; fluorescence quenching; quantum chemical modeling; molecular structure.

List of scientific papers published on the topic of the dissertation

Articles

1. The Natural Oligoribonucleotides Functionalized by D-Mannitol Affected Interactions of Hemagglutinin with Glycan Receptor Indicating Anti-Influenza Activity /

Tkachuk Z. Yu., Melnichuk N. S., **Nikolaiev R. O.**, Szutkowski K., Zhukov I. *Membranes*. 2021. Vol. 11, No. 10. Art. 757. DOI: 10.3390/membranes11100757.

2. Influence of Oligoribonucleotides on the Conformation and Stability of Interferon / **Nikolaiev R. O.,** Vivcharyk M. M., Chernykh S. I., Tkachuk Z. Yu. *Bulletin of the Ukrainian Society of Geneticists and Breeders.* 2019. Vol. 17, No. 2. pp. 165–171. DOI: 10.7124/visnyk.utgis.17.2.1217.

3. π-Electron Affinity of Nucleic Acid Nitrogenous Bases / Obernikhina N. V., **Nikolaiev R. O.,** Kachkovsky O. D., Tkachuk Z. Yu. *Reports of the national Academy of Sciences of Ukraine.* 2019. No. 6. pp. 75–81. DOI: 10.15407/dopovidi2019.06.075.

4. **Nikolaiev R. O.,** Tkachuk Z. Yu. Interaction of 5′-ribonucleoside monophosphates with Interferon α-2b. *Biopolymers and Cell.* 2024. Vol. 40, No. 4. P. 264–277. DOI: 10.7124/bc.000B03.

5. **Nikolaiev R. O.**, Tkachuk Z. Yu. Comparative analysis of the interaction of INF, INFAR1 and the INF-INFAR1 complex with ribonucleotides by spectroscopic methods and docking. *ScienceRise: Biological Science.* 2026. No. 3 (47). P. 11–24. DOI: 10.15587/2519-8025.2026.368056.

Patent

Method for obtaining biologically active compounds using purine and pyrimidine nucleotides and compositions thereof : Pat. 164333 Ukraine, U : IPC A61K 31/00, C07H 19/00, A61K 31/7072 / Melnichuk N. S., Nikolaiev R. O., Tkachuk Z. Yu. No. a 202402297 ; filed 06.06.2024 ; publ. 23.09.2026, *Bull.* No. 31. Vol. 1.

Abstract of scientific presentations

1. Conformational changes of secondary and tertiary structures of interferon under the influence of oligoribonucleotides-based drugs / **Nikolaiev R. O.**, Vivcharyk M. M., Levchenko S. M., Chernykh S. I., Obernikhina N. V., Tkachuk Z. Yu. *Proceedings of the 4th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry.* MDPI, 2018. Art. 5629. DOI: 10.3390/ecmc-4-05629.

2. **Nikolaiev R. O.**, Stepanenko Ye. Yu., Tkachuk Z. Yu. Conformational, fluorescence and energy parameters of Interferon α2b under the influence of mono and oligoribonucleotides-based drug. *Proceedings of the 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry.* MDPI, 2019. Art. 6328. DOI: 10.3390/ecmc2019-06328.

3. **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Tkachuk Z. Yu. Analysis of amyloidogenic potential, stability and fluorescence properties of insulins and interferons of different purity. VII Annual conference "Science and modern pharmaceutical manufacturing" (Kyiv, Ukraine, November 21, 2019). *Ukrainian Medical Journal.* 2019. № 6 (134), XI/XII. С. 41.

4. Fluorescence and circular dichroism spectroscopy studies of interactions between Interferon α2b and yeast oligoribonucleotides / **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Obernikhina N. V., Tkachuk Z. Yu. The 44th FEBS Congress "From molecules to living systems" (Krakow, Poland, 6–11 July 2019). Posters. *FEBS Open Bio.* 2019. Vol. 9, Suppl. 1. P. 215. DOI: 10.1002/2211-5463.12675.

5. **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Tkachuk Z. Yu. Fluorescence and circular dichroism spectroscopy studies of an interaction between interferon α2β, oligoribonucleotides and amp. XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists. *Biopolymers and Cell.* 2019. Vol. 35, No. 5. P. 406. DOI: 10.7124/bc.000A14.

6. **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Tkachuk Z. Yu. Spectroscopy and thermodynamic studies of an interaction between interferon a2b, oligoribonucleotides and ribonucleotides. Proceedings of the XII Ukrainian Biochemical Congress (Ternopil, September 30 – October 4, 2019). *Medical and Clinical Chemistry.* 2019. Vol. 21, No. 3. Pp. 227–228.

7. Interaction of Interferon α-2b with different forms of oligonucleotides / **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Stepanenko Ye. Yu., Tkachuk Z. Yu. *XIV All-Ukrainian Conference of Young Scientists of the IMBG of the NAS of Ukraine* : electronic abstract book. 2020. P. 19.

8. Fluorescence properties interaction Interferon a2b with oligo- and monoribonucleotides / **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Stepanenko Ye. Yu., Tkachuk Z. Yu. *12th International Conference "Electronic Processes in Organic and Inorganic Materials" ICEPOM-12* (Kamianets-Podilskyi, June 1–5, 2020). 2020. P. 251.

9. **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S., Tkachuk Z. Thermodynamics of interaction of interferon alpha-2b with different forms of oligonucleotides. The 45th FEBS Congress

"Molecules of life: Towards new horizons" (online event, 3–8 July 2021). *FEBS Open Bio.* 2021. Vol. 11, Suppl. 1. P. 126. DOI: 10.1002/2211-5463.13205.

10. Conformational, Fluorescence and Energy Parameters of Interferon α2b with Different Forms of Adenosine Monophosphate / **Nikolaiev R. O.**, Stepanenko Ye. Yu., Chernykh S. I., Melnichuk N. S., Tkachuk Z. Yu. *Proceedings*. 2021. Vol. 78, No. 1. Art. 16. DOI: 10.3390/IECP2020-08697.

11. **Nikolaiev R. O.**, Spivak M. Ya., Tkachuk Z. Yu. Spectral studies of ligand-protein interactions of oligoribonucleotides. XVIII International Conference "Factors in Experimental Evolution of Organisms". *Biopolymers and Cell.* 2023. Vol. 39, No. 4. P. 315. DOI: 10.7124/bc.000AA8.

12. **Nikolaiev R. O.**, Tkachuk Z. Yu. Interaction of 5′-monoribonucleotides with Interferon α-2b. BioGENext Conference "Shaping the future of medicine through biomedical R&D" (Kyiv, September 17–20, 2024). *Biopolymers and Cell.* 2024. Vol. 40, No. 3. P. 175. DOI: 10.7124/bc.000AB9.

13. The effect of oligonucleotides, mononucleotides and their complexes with mannitol on the conformational stability of Interferon α2b / **Nikolaiev R. O.**, Tkachuk Z. Yu., Obernikhina N. V., Dotsenko M. A., Stepanenko Ye. Yu. *Proceedings of the 1st IECMCP* (1–30 November 2025). ECMC-P Book of Abstracts 2025. Basel, Switzerland : MDPI, 2025. P. 28. URL: https://sciforum.net/paper/25661 (accessed: 26.10.2026).

14. Biological Affinity of Mononucleotides at Various pH Values of the Medium / **Nikolaiev R. O.**, Obernikhina N. V., Kachkovskyi O. D., Tkachuk Z. Yu. *Chargaff Readings*: (Chernivtsi, Ukraine, October 27–30, 2025). Chernivtsi: Yuriy Fedkovych Chernivtsi national University, 2025. P. 57–58.

15. **Nikolaiev R. O.**, Obernikhina N. V., Tkachuk Z. Yu. Thermal Effects During the Interaction of 5′-Mononucleotides with Biological Media. *Chargaff Readings*: Proceedings of the XX International Scientific Conference. 2025. P. 53–54.

16. **Nikolaiev R. O.**, Tkachuk Z. Yu. Interaction of the INF-INFAR1 complex with ribonucleotides and D-mannitol : prospects for the development of next-generation interferon-based therapeutics. *Biopolymers and Cell.* 2026. Vol. 42, Special Issue. P. 10. DOI: 10.7124/bc.000b43.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 25
ВСТУП 26
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 36
1.1. Конформаційна мікромодуляція як робоча концепція опису слабких структурних змін білків 36
1.1.1. Конформаційний ансамбль замість єдиної статичної структури 36
1.1.2. Малі природні ліганди як регулятори конформаційної пластичності 37
1.1.3. Три рівні молекулярної мікромодуляції 38
1.2. Фізико-хімічні детермінанти мікромодуляторної дії 39
1.2.1. Нековалентні контакти та термодинамічний баланс 39
1.2.2. Протонування, pH та іонна сила 41
1.2.3. Гідратація та осмоліти як компоненти механізму білок-лігандної взаємодії 43
1.3. ІНФ α-2b як модель конформаційно пластичного сигнального білка 44
1.3.1. Структурна організація та поверхнева неоднорідність 44
1.3.2. Рецепторне розпізнавання як процес 45
1.3.3. Стабільність, агрегація та вплив препаративного середовища 47
1.4. Нуклеотиди як молекулярні мікромодулятори білкової пластичності 47
1.4.1. Структурна багатокомпонентність нуклеотидного ліганда 47
1.4.2. Іонне оточення та форма препарату 49
1.4.3. Від мононуклеотиду до олігорибонуклеотиду: багатовалентність і кооперативність 50
1.4.4. D-манітол у нуклеотидних композиціях 50
1.4.5. Наявні дані про взаємодію нуклеотидів з інтерферонами 51
1.5. Критерії доказовості конформаційної мікромодуляції 52
1.5.1. Від факту контакту до зміни конформаційного ансамблю 52
1.5.2. Моделі зв’язування та межі механістичних висновків 54
1.5.3. Функціональна інтерпретація та необхідні обмеження 55
1.6. Узагальнення літературних даних та обґрунтування робочої гіпотези 55

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ 57
2.1. Загальний дизайн дослідження 57
2.2. Використані реактиви, біологічні препарати та обладнання 58
2.3. Приготування розчинів і формування експериментальних систем 58
2.4. Спектроскопічні методи дослідження 60
2.4.1. Флуорометрія 60
2.4.2. Часороздільна флуоресценція та Фьорстерівський перенос енергії 62
2.4.3. Анізотропія флуоресценції 64
2.4.4. Термостійкість і агрегаційний відгук ІНФ α-2b 72
2.4.5. Спектроскопія кругового дихроїзму 74
2.4.6. Інфрачервона спектроскопія та MCR-ALS 76
2.5. Термодинамічні методи дослідження 77
2.5.1. Ізотермічна титраційна калориметрія 77
2.5.2. Одноразова інжекційна калориметрія та спостережна теплова релаксація .. 78
2.6. Обрахункові методи дослідження 79
2.6.1. Молекулярний докінг 79
2.6.2. Квантово-хімічний аналіз електронної структури 81
2.7. Статистичний аналіз і контроль якості моделей 83
Узагальнення методологічного підходу 82
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ 83
3.1. Спектроскопічна характеристика взаємодії ІНФ α-2b з нуклеотидними лігандами та їх впливу на структурно-функціональний стан білка 83
3.1.1. Визначення параметрів зв’язування ІНФ α-2b з оліго- та мононуклеотидами і їх комплексами з D-манітолом методом флуоресцентної спектроскопії прямою нелінійною апроксимацією 83
3.1.2. Визначення параметрів зв’язування ІНФ α-2b з оліго- та мононуклеотидами і їх комплексами з D-манітолом методом флуоресцентної спектроскопії за лінеаризованими моделями 90
3.1.3. Дослідження часу життя збудженого стану флуоресценції ІНФ α-2b у присутності оліго- та мононуклеотидів і їх комплексів з D-манітолом 97

3.1.4. Дослідження взаємодії мононуклеотидів з ІНФ α-2b, ІНФАР 1 та попередньо сформованим комплексом ІНФ α-2b/ІНФАР 1 методом стаціонарної флуоресцентної анізотропії 100
3.1.5. Аналіз термічної стабільності та агрегації ІНФ α-2b у присутності мононуклеотидів 108
3.1.6. Дослідження вторинної структури ІНФ α-2b та її змін при взаємодії з лігандами методом спектроскопії кругового дихроїзму 110
3.1.7. Дослідження конформаційного стану ІНФ α-2b та спектральна ідентифікація мононуклеотидів методом інфрачервоної спектроскопії 118
Висновки до підрозділу 3.1 127
3.2. Термодинамічна та термокінетична характеристика взаємодії ІНФ α-2b з нуклеотидними лігандами 131
3.2.1. Термодинамічна характеристика комплексоутворення ІНФ α-2b з нуклеотидними лігандами методом ізотермічної калориметрії титрування 131
3.2.2. Дослідження терморелаксаційних процесів нуклеотидних лігандів методом одноразової інжекційної калориметрії 135
Висновки до підрозділу 3.2 141
3.3. Теоретичне моделювання молекулярних властивостей нуклеотидних лігандів та їх взаємодії з ІНФ α-2b і ІНФАР 1 143
3.3.1. Квантово-хімічна характеристика НМФ і комплексів із D-манітолом 143
3.3.2. Молекулярний докінг НМФ до ІНФ α-2b, ІНФАР 1 та комплексу ІНФ α-2b/ІНФАР 1 151
Висновки до підрозділу 3.3 159
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ 160
ВИСНОВКИ 169
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 170
ДОДАТОК А 185
ДОДАТОК Б 189
ДОДАТОК В 197

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АМФ — аденозин-5′-монофосфат

$АМФNa_2$ — динатрієва сіль аденозин-5′-монофосфату

АТФ — аденозинтрифосфат

ГМФ — гуанозин-5′-монофосфат

$ГМФNa_2$ — динатрієва сіль гуанозин-5′-монофосфату

ІНФ — інтерферон

ІНФ α — інтерферон альфа

ІНФ α-2b — інтерферон альфа-2b

ІНФАР 1 — рецепторна субодиниця 1 інтерферонів I типу

ІНФАР 2 — рецепторна субодиниця 2 інтерферонів I типу

КД — круговий дихроїзм (circular dichroism)

НМФ — 5′-рибонуклеозидмонофосфат (5′-ribonucleoside monophosphate)

$НМФNa_2$ — динатрієва форма 5′-рибонуклеозидмонофосфату

ОРН — 5′-рибоолігонуклеотиди

ОРН-Na — натрієва форма олігорибонуклеотидів

РНК — рибонуклеїнова кислота

УМФ — уридин-5′-монофосфат

$УМФNa_2$ — динатрієва сіль уридин-5′-монофосфату

ЦМФ — цитидин-5′-монофосфат

$ЦМФNa_2$ — динатрієва сіль цитидин-5′-монофосфату

D-M — D-манітол

MCR-ALS — багатовимірне розділення кривих методом альтернативних найменших квадратів (multivariate curve resolution–alternating least squares)

ThT — тіофлавін T (thioflavin T)

ВСТУП

Актуальність теми. Створення інноваційних комбінованих біопрепаратів на основі інтерферонів та нуклеотидних комплексів є одним із пріоритетних завдань сучасної біотехнології та фармації. Рекомбінантний інтерферон α-2b (ІНФ α-2b) є базовим противірусним та імуномодулюючим протеїном, проте його широке клінічне застосування часто обмежене терапевтичною дозозалежною токсичністю, нестабільністю білкової молекули та швидким виведенням з організму. Використання олігорибонуклеотидів та мононуклеотидів, як недеструктивних модифікаторів білка дозволяє створити синергічні композиції з посиленою противірусною дією. Системне дослідження фізико-хімічних закономірностей нековалентних взаємодій у таких складних багатокомпонентних системах, включаючи допоміжні речовини-кріопротектори (наприклад, D-манітол), є критично важливим для раціонального конструювання стабільних лікарських форм із контрольованими фармакокінетичними властивостями.

На теперішній час доведено здатність коротких ланцюгів ОРН та окремих нуклеотидів виступати в ролі алостеричних та просторових модуляторів біологічної активності білків, підвищуючи їхню стабільність і пролонгуючи дію. Досліджено плив D-манітол як ефективний ліпопротектор і структуроутворювач, який запобігає агрегації та денатурації білкових молекул під час дегідратації і зберігання. Відомо, що нековалентні взаємодії (електростатичні сили, водневі зв'язки, гідрофобні ефекти та стейкінг-взаємодії) відіграють вирішальну роль у формуванні стійких супрамолекулярних комплексів «білок–нуклеїнова кислота».

Проте, відсутні систематичні дані про те, як саме тонкі зміни у молекулярній структурі нуклеотиду (довжина ланцюга, специфіка азотистих основ) та його препаративна форма (вільна кислота чи натрієва сіль) впливають на константу зв'язування та термодинаміку взаємодії з ІФН α-2b. Залишається невідомим молекулярний механізм впливу протиіонів та ступеня гідратації середовища на конформаційну рухливість білка при його комплексоутворенні з нуклеотидами в присутності D-манітолу. Не з'ясовано, як структурний стан самого IFN α-2b(нативний,

частково розгорнутий або індукований спіральний стан) модулює топографію та енергетику центрів нековалентного зв'язування лігандів.

Функціональні властивості білка залежать від розподілу та взаємних переходів між його конформаційними станами [1–3]. Малі природні ліганди здатні вибірково стабілізувати окремі стани цього конформаційного ансамблю, змінювати рухливість поверхневих ділянок і доступність центрів молекулярного розпізнавання без утворення високоафінного комплексу або глобальної денатурації білка. У роботі терміном «конформаційна мікромодуляція» позначено невеликі зміни конформаційного ансамблю білка, що залежать від складу середовища. Її дослідження є актуальним для розуміння того, як природні низькомолекулярні компоненти клітини та короткі біополімерні фрагменти можуть регулювати властивості сигнальних білків.

Інтерферон α-2b є зручною моделлю для перевірки цієї концепції. Сигналізація інтерферонів I типу відбувається за участю ІНФАР 1 та ІНФАР 2, які формують комплекс із цим лігандом. Ефективність цього процесу залежить не лише від амінокислотної послідовності ІНФ α-2b, а й від просторової організації, електростатичних властивостей, гідратації та рухливості його рецепторних зв’язувальних поверхонь. Тому навіть незначне зміщення локального конформаційного ансамблю може впливати на зміни рецепторного розпізнавання, хоча функціональний наслідок такого впливу потребує окремого експериментального підтвердження.

Особливий інтерес як потенційні природні мікромодулятори становлять 5′-рибонуклеозидмонофосфати та короткі олігорибонуклеотиди. Поєднання зарядженого фосфатного залишку, полярної рибози та гетероциклічної азотистої основи надає їм кілька взаємодоповнювальних способів взаємодії з білковою поверхнею. Фосфатний фрагмент забезпечує електростатичний і воднево-зв’язувальний потенціал, азотиста основа — водневі, дисперсійні й ароматичні взаємодії, а рибоза визначає геометрію цих центрів. Для олігорибонуклеотидів додаткове значення мають мультивалентність, багатоточкове зв’язування, стекінг і колективна перебудова гідратаційної оболонки. Зв’язування нуклеотидів може зміщувати рівновагу між конформаційними станами білка.

Здатність нуклеотиду до такої мікромодуляції визначається не одним параметром. Вона залежить від структури азотистої основи, локального протонного стану функціональних груп, протиіонів, іонної сили, активності води та організації гідратаційних оболонок. У цій логіці кислотні й натрієві форми використано як контрольовані варіанти іонно-гідратаційного оточення, а не як центральний предмет дослідження чи просту пару «протонована–депротонована молекула».

D-манітол — ще один інструмент для перевірки оточення. Поліоли можуть змінювати стабільність білків через вплив на властивості розчинника. У цій роботі перевіряється, як додавання D-манітолу впливає на нуклеотидно-білкові системи. Тому його роль розглянуто не як універсальне підсилення зв'язування, а як селективну перебудову молекулярного мікрооточення, ефект якої залежить від складу конкретної системи.

Передумовою роботи стали дослідження комплексоутворення РНК з D-манітолом, спектральних характеристик і біологічної активності цих систем. Молекулярні причини цих відмінностей залишаються недостатньо з'ясованими. Однією з можливих ланок може бути безпосередня взаємодія ОРН або продуктів їх деградації з білковими компонентами інтерферонової системи, однак сам факт зв'язування ще не пояснює напрям структурної чи функціональної відповіді білка.

Принципова прогалина в знаннях полягає у відсутності цілісної моделі, яка пов'язувала б структуру природного нуклеотидного ліганда та стан його мікрооточення з афінністю, термодинамікою контакту, конформаційною відповіддю ІНФ α-2b і залежністю цієї відповіді від рецепторного оточення. Тому проблема роботи сформульована не як пошук найсильнішої зв'язувальної препаративної форми, а як встановлення можливості та механізмів конформаційної мікромодуляції ІНФ α-2b нуклеотидами. У роботі зіставлено результати досліджень зв'язування, гідратації, теплових ефектів і спектральних змін із розрахованими молекулярними контактами, щоб оцінити можливий вплив нуклеотидів на конформаційний стан ІНФ α-2b та його комплексу з ІНФАР 1.

Центральна гіпотеза дослідження. Центральна гіпотеза дисертаційної роботи полягає в тому, що олігорибонуклеотиди та рибонуклеотидмонофосфати є не лише лігандами ІНФ α-2b, а й молекулярними мікромодуляторами його конформаційної пластичності, дія яких визначається взаємозалежністю локального протонного та іонного стану фосфатної групи, молекулярної структури нуклеотиду, катіонного оточення, гідратації, взаємодії з D-манітолом та електростатичної топології поверхні білка.

Реалізація різних комбінацій цих факторів має формувати відмінні термодинамічні режими нековалентного зв'язування та зміщувати рівновагу між близькими конформаційними станами ІНФ α-2b. Такі локальні або глобальні перебудови потенційно можуть змінювати доступність його рецептор-зв'язувальних поверхонь і тим самим створювати фізико-хімічні передумови для модуляції рецепторного розпізнавання та подальшої сигнальної відповіді. Остання складова гіпотези розглядається як функціональна перспектива, оскільки її остаточне підтвердження потребує дослідження повного комплексу ІНФАР 2–ІНФ α-2b–ІНФАР 1 та клітинного JAK–STAT-сигналювання.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами та темами. Зміст дисертації відповідає основному плану науково-дослідних робіт групи молекулярної фармакології відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Робота виконувалася в рамках теми «Вивчення впливу олігонуклеотидів на сигнальні білки та експресію генів вродженого імунітету» (шифр теми – 2.2.4.15, номер державної реєстрації 0113U002779, 2014-2018 рр.); пошукова тема «Вивчення природних та синтетичних олігонуклеотидів як потенційних інгібіторів системи рецептор PD1- ліганд PD-L1» (шифр теми – 2.2.4.15, номер державної реєстрації 0118U004955, 2019-2020 рр.); конкурсна тема «Комбіновані тест-системи для діагностики та аналізу експресії генів вродженого імунітету при особливо небезпечних вірусних інфекціях» Національного фонду досліджень України «Наука для безпеки людини та суспільства» (шифр теми – 2020.01/0091, номер державної реєстрації 0120U104574, 2020-2021 рр.); відомча тема «Вивчення експресії генів вродженого імунітету та їх регуляції при особливо небезпечних вірусних

захворюваннях» (шифр теми – 2.2.4.15, номер державної реєстрації 0121U112029, 2021-2025 рр.); конкурсна тема «Визначення клінічно-значущих мутацій генів у зразках злоякісних новоутворень українських пацієнтів для розроблення діагностикумів та встановлення фармакологічної резистентності пухлин до ліків» Національного фонду досліджень України «Наука для безпеки і сталого розвитку України» (шифр теми – 10/0024, номер державної реєстрації 0123U103186, 2023-2025 рр.); відомча тематика «Вивчення противірусної і протипухлинної активності продуктів розпаду природніх олігорибонуклеотидів та механізм їх дії» (шифр теми – 2.2.4.15, номер державної реєстрації 0125U002946, 2026-2030 рр.); програмно-цільова та конкурсна тематика НАН України «Розробка тест-системи для визначення збудника сибірки на основі ПЛР» (шифр теми – 1/9, номер державної реєстрації 0125U001098, 2025-2026 рр.). Робота була підтримана грантами FEBS Bursary Grant 2019 (FEBS, Cambridge, England), Simons Foundation (Award #1030279), Simons Support Grant 1290589 та IMBG Simons Foundation Grant for Ukrainian institutions № SFI-PD-Ukraine-00017453 (Simons Foundation, New York, US).

Мета та завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи — встановити молекулярні механізми взаємодії моно- та олігорибонуклеотидів з ІНФ α-2b шляхом визначення спектральних, термодинамічних і структурних властивостей цього білка та його здатності взаємодіяти з рецептором ІНФАР 1.

Відповідно до мети роботи було визначено наступні завдання:

1. Дослідити зв’язування моно- та олігорибонуклеотидів з ІНФ α-2b методами флуоресцентної спектроскопії, визначити параметри взаємодії та встановити їх залежність від природи азотистої основи, кислотної або натрієвої форми лігандів, а також присутності D-манітолу.

2. Визначити термодинамічні характеристики взаємодії нуклеотидів з ІНФ α-2b методами калориметрії, оцінити особливості теплових ефектів та їхньої часової релаксації, а також встановити вплив D-манітолу й компонентів середовища на ці процеси.

3. Охарактеризувати конформаційні зміни та агрегаційну стійкість ІНФ α-2b за взаємодії з кислотними й натрієвими формами моно- та олігорибонуклеотидів,

визначити зміни компонентів вторинної структури та їхній взаємозв'язок зі стабільністю білка.

4. Дослідити особливості взаємодії нуклеотидів з ІНФ α-2b, ІНФАР 1 та їхнім комплексом методами флуоресцентної анізотропії і молекулярного докінгу, оцінити вплив стану рецепторної системи та порядку формування комплексів на характер зв'язування й визначити ймовірні ділянки локалізації лігандів.

5. Узагальнити експериментальні та розрахункові результати для встановлення взаємозв'язку між структурою нуклеотидів, їхнім іонним станом, гідратаційним оточенням і конформаційною відповіддю ІНФ α-2b та розробити фізико-хімічну модель молекулярної мікромодуляції білка нуклеотидними лігандами.

Об'єкт дослідження — процеси нековалентної взаємодії рекомбінантного інтерферону α-2b (ІНФ α-2b) з моно- та олігорибонуклеотидами та їхніми композиціями з D-манітолом, що супроводжуються змінами структурно-конформаційного стану білка у вільній формі та в системі ІНФ α-2b/ІНФАР 1.

Предмет дослідження — фізико-хімічні закономірності взаємодії ІНФ α-2b з нуклеотидними лігандами, взаємозв'язок їхньої молекулярної будови та іонного стану з термодинамічними параметрами зв'язування і конформаційними змінами білка, а також вплив протиіонів, D-манітолу та взаємодії з рецептором ІНФАР 1.

Методи дослідження: Для послідовного дослідження зв'язування, молекулярного мікрооточення, конформаційної відповіді та структурного стану системи застосовано взаємодоповнювальні методи: стаціонарну й часороздільну флуоресцентну спектроскопію, флуоресцентну анізотропію, круговий дихроїзм, УФ-видиму, ІЧ- та ^{1}H ЯМР-спектроскопію, ізотермічну титраційну й одноразову інжекційну калориметрію, термофлуоресцентний і тіофлавін Т (ThT)-аналіз, MCR-ALS, математичне моделювання зв'язування, аналіз електронних дескрипторів, молекулярний докінг і статистичне порівняння моделей.

Наукова новизна одержаних результатів. Наукова новизна роботи полягає у встановленні фундаментальних фізико-хімічних критеріїв керованого нековалентного кон'югування білків із нуклеотидними матрицями. Вперше розроблено цілісну термодинамічну та конформаційну модель формування потрійних систем ІНФ α-

2b/оліго/мононуклеотид/D-манітол. Це дозволить виявити ключові фактори (іонна сила, pH, природа солі, конформація білка), що визначають архітектуру та термостабільність створюваних біокомплексів без хімічної модифікації амінокислотних залишків білка. Головний науковий результат роботи полягає в експериментальному обґрунтуванні концепції нуклеотидів як молекулярних мікромодуляторів конформаційної пластичності ІНФ α-2b. Виявлені зміни вимірюваних характеристик білка узгоджуються з припущенням про вплив лігандів на його конформацію. Характер відповіді залежить від складу досліджуваної системи.

Уперше в межах єдиної експериментальної системи концепцію конформаційної мікромодуляції перевірено для чотирьох основних 5′-рибонуклеозидмонофосфатів, олігорибонуклеотидів та їх композицій з D-манітолом із використанням взаємодоповнювальних підходів, чутливих до зв’язування, збудженого стану, гідратації, теплових ефектів, вторинної структури й рецептор-залежного стану білка.

Запропоновано трирівневу модель нуклеотидної мікромодуляції ІНФ α-2b. Перший рівень охоплює безпосередні електростатичні, водневі, дисперсійні та ароматичні контакти; другий — регуляцію доступності цих контактів протиіонами, локальним протонним станом і гідратацією; третій — зміщення локального конформаційного ансамблю білка.

Порівняння кислотних і динатрієвих лігандів використано як модель зміни іонно-гідратаційного оточення. Встановлено, що природа нуклеотида може одночасно змінювати спостерігаєму афінність, ентальпійно-ентропійний баланс і напрям спектрально реєстрованої конформаційної відповіді, але не задає універсальної залежності «кислотна форма дестабілізує — динатрієва стабілізує».

Встановлено селективний характер дії D-манітолу та обґрунтовано його роль як модифікатора гідратаційного й воднево-зв’язувального мікрооточення нуклеотидної системи. Показано, що ефект D-манітолу залежить від природи рибонуклеотиду, його іонного стану та білкової мішені, і тому не може трактуватися як універсальне посилення афінності.

Показано, що характер нуклеотидного розпізнавання залежить від стану білкової мішені: ізольовані ІНФ α-2b та ІНФАР 1, а також комплекс ІНФ α-2b/ІНФАР 1

формують відмінні профілі спостерігаємої афінності. Встановлено також залежність відповіді від порядку складання багатокомпонентної системи, що узгоджується зі стан-залежним перерозподілом конформаційного ансамблю.

Інформаційне порівняння альтернативних моделей зв'язування дало змогу зіставити якість опису експериментальних концентраційних залежностей різними математичними моделями та визначити межі ідентифікації їхніх параметрів.

Під час інтерпретації результатів враховували, що розрахований постійний дипольний момент, абсорційного поглинання, флуоресцентні характеристики, спектри кругового дихроїзму та ^{1}H ЯМР відображають різні фізико-хімічні аспекти стану рибонуклеотидів і тому не можуть розглядатися як взаємозамінні дескриптори. Їх зіставляли лише на рівні узгодженості тенденцій, без прямого ототожнення змін окремих спектральних параметрів із конкретними електронними, сольватаційними або конформаційними перебудовами.

Таким чином, наукова новизна полягає в переході від опису окремих констант і спектральних змін до цілісного уявлення про нуклеотид-керовану мікромодуляцію білкового ансамблю, у якому прямі контакти, молекулярне середовище та стан рецепторної системи розглядаються як взаємопов'язані рівні одного процесу.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані закономірності стануть фізико-хімічним підґрунтям для спрямованого підбору оптимальних співвідношень компонентів, pH середовища та сольового складу при створенні стабільних рідких та ліофілізованих форм препаратів на основі інтерферону. Створення стабільних комплексів ІФН α-2b з ОРН.

ОРН дозволить зменшити терапевтичну дозу білка в готовому лікарському засобі завдяки синергічному ефекту компонентів, що знизить побічні ефекти для пацієнтів.

Результати роботи можуть бути безпосередньо впроваджені в технологічні регламенти фармацевтичних підприємств для виробництва вітчизняних противірусних препаратів нового покоління з подовженим терміном придатності та покращеною біодоступністю.

Система взаємодоповнювальних спектроскопічних, термодинамічних і модельних критеріїв може бути використана під час доклінічного дослідження

нуклеотид-білкових композицій та планування подальших експериментів із визначення рецепторного зв'язування, сигнальної активності й залежності ефекту від складу молекулярного середовища.

Особистий внесок здобувача. Основні результати, викладені в дисертаційній роботі, одержано здобувачем особисто або за його безпосередньої участі під час проведення експериментів. Автор брав участь у плануванні досліджень, підготовці зразків, проведенні спектроскопічних і біофізичних вимірювань, обробці та статистичному аналізі експериментальних даних, зіставленні результатів різних методів, побудові та інтерпретації моделей білок-лігандної взаємодії, аналізі літератури та підготовці результатів до публікації.

Головну ідею та завдання дослідження сформульовано спільно з науковим керівником — к.б.н., с.н.с. Ткачуком З. Ю. Результати роботи обговорено та опубліковано у спільних наукових працях.

Апробація результатів дисертації. Основні положення та результати дисертаційної роботи було представлено й обговорено на наукових конференціях, конгресах та симпозіумах, зокрема на 4th та 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, MDPI, VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement «Science and modern pharmaceutical manufacturing» (November 21, 2019, «Farmak» JSC, Kyiv, Ukraine), 44th FEBS Congress, "From molecules to living systems," ICE Kraków Congress Centre, Krakow (Poland), 6–11 July 2019 та 45th FEBS Congress, "Molecules of life: Towards new horizons" Online event, 3–8 July 2021, XII, XIII та XIV IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists, XII Ukrainian Biochemical Congress, Ternopil, September 30 - October 4, 2019, 12th International Conference "Electronic Processes in Organic and Inorganic Materials" ICEPOM-12 (June 1 - 5, 2020, Kamianets- Podilskyi), 2020, Conference of Young Scientists within the framework of the XVIII International Conference «Factors in Experimental Evolution of Organisms», dedicated to the 50th anniversary of the foundation of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the NASU, 2023, BioGENext Conference ("Shaping the future of medicine through biomedical R&D"), Kyiv, September 17–20, 2024, 1st International Electronic Conference on Medicinal Chemistry and Pharmaceutics, 1–30

November 2025. Basel, Switzerland: MDPI; Chargaff readings, October 27–30, 2025, Chernivtsi, Ukraine.

Публікації. Результати дисертаційного дослідження представлено у наукових статтях та матеріалах міжнародних і всеукраїнських конференцій, присвячених взаємодії 5′-рибонуклеозидмонофосфатів і олігорибонуклеотидів з ІНФ α-2b, спектральним характеристикам білок-лігандних комплексів, термодинаміці комплексоутворення та впливу нуклеотидних систем на конформаційний стан інтерферону. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 16 тез, 1 патент та 5 статтей у наукових виданнях, 4 з них проіндексовані у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus, одна з яких опублікована у виданні, що належить до 2 квартиля (Q2), сумарний імпакт-фактор становить 4,885 (Додаток А).

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота складається з анотації, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури (розділ 1), опису матеріалів і методів дослідження (розділ 2), опису результатів експериментальних та розрахункових досліджень (розділ 3), їх обговорення й узагальнення (розділ 4), висновків, списку використаних джерел та 3 додатків. Загальний обсяг дисертації – 212 сторінок. Робота містить 52 рисунки і 35 таблиць. Список використаної літератури охоплює 151 найменування.

Автор висловлює щиру вдячність науковому керівникові Ткачуку З. за підтримку, цінні поради та допомогу в осмисленні результатів дисертаційного дослідження. Черних С. за наданий препарат рекомбінантного ІНФ α-2b. Дякую колегам Марчишак Т., Мельнічук Н., Шалаку В., Лукашову С., Оберніхіній Н., Тугай Т., Степаненку Є., Терещенко Ю., Тукалу М., Скиданович О., Нужному О., Доценку М., Скоробагатову О., Вівчарик М. та колективу ІМБіГ НАНУ за сприяння у проведенні експериментів, обговорення результатів і конструктивні зауваження, які допомогли вдосконалити роботу. Особливу вдячність висловлюю коханій дружині, рідним і близьким за розуміння, терпіння та підтримку протягом усього періоду навчання й підготовки дисертації, а також Силам Оборони, які дали можливість виконати роботу у вільній Україні.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Конформаційна мікромодуляція як робоча концепція опису слабких структурних змін білків

1.1.1. Конформаційний ансамбль замість єдиної статичної структури. У класичному структурному описі білок часто подають як одну переважну просторову форму. Однак у водному середовищі навіть стабільний глобулярний білок існує як ансамбль близьких за енергією мікростанів, між якими відбуваються теплово зумовлені переходи. Ці мікростани відрізняються положенням бічних ланцюгів, рухливістю петель, доступністю порожнин, організацією води та взаємною орієнтацією структурних елементів. Тому функціональний стан білка визначається не лише усередненою структурою, а й розподілом і швидкістю обміну між конформаціями [1–3]. Функціонально релевантна білкова динаміка охоплює широкий часовий діапазон і може змінюватися без помітної перебудови середньої структури [4]. Конформаційне спряження та механізм індукованої відповідності розглядають як взаємопов’язані режими одного кінетичного ландшафту, у якому первинний відбір стану може доповнюватися локальною адаптацією [5, 6]. Ансамблеві моделі алостерії також допускають регуляцію через перерозподіл популяцій і динаміку без необхідного значного структурного переходу [7–12].

Ансамблеве уявлення принципово змінює трактування слабкого зв’язування. Ліганд із помірною або низькою афінністю не обов’язково спричиняє значну перебудову чи утворює довготривалий комплекс. Він може селективно стабілізувати вже наявний мікростан, зменшити або збільшити амплітуду локальних рухів і, тим самим, змістити статистичну рівновагу. У такому разі структурний ефект є малим за абсолютною величиною, але відтворюваним і потенційно значущим для доступності

функціональних ділянок. Саме цей механізм лежить в основі сучасного ансамблевого трактування алостерії та конформаційного відбору [2, 3, 13, 14].

Для опису малих, оборотних і контекстно залежних зсувів доцільно використовувати поняття конформаційної мікромодуляції. Воно відрізняє такі ефекти від денатурації, глобального фолдингу або класичної високоафінної алостеричної регуляції. Мікромодуляція означає зміну населеності близьких конформаційних станів без обов'язкового руйнування нативного каркаса. Її проявами можуть бути невеликі зміни вторинної структури, рухливості флуорофорів, гідратації, термостійкості, схильності до агрегації або доступності рецепторних епітопів.

1.1.2. Малі природні ліганди як регулятори конформаційної пластичності. До низькомолекулярних компонентів клітинного та технологічного середовища належать метаболіти, нуклеотиди, амінокислоти, цукри, поліоли, органічні кислоти та неорганічні іони. Для багатьох метаболітів характерні мікромолярні–мілімолярні внутрішньоклітинні концентрації, причому сумарна концентрація метаболітного пулу може бути значною; наприклад, для *Escherichia coli* експериментально оцінений пул понад 100 кількісно визначених метаболітів становив близько 300 мМ [1]. Поряд зі специфічним високоафінним зв'язуванням описано численні низькоафінні й транзиєнтні білок–метаболітні взаємодії, які можуть бути складними для виявлення за допомогою традиційних біохімічних методів [2,3]. Для осмолітів і косольвентів за достатньо високих концентрацій показано також можливість зміни переважної гідратації білка, хімічного потенціалу компонентів розчинника та стабільності різних конформаційних станів білкової молекули [4–6].

У цій роботі наведені літературні закономірності не екстраполювалися безпосередньо на досліджувані мікромолярні умови. Робоче припущення полягало в тому, що слабке нековалентне зв'язування нуклеотидів із ІНФ α-2b та ІНФАР 1 може локально змінювати електростатичне і сольватаційне оточення доступних ділянок білкової поверхні та, відповідно, положення рівноваги між близькими конформаційними станами. Внесок такого ефекту оцінювали з урахуванням концентрацій компонентів, стехіометрії використаної моделі зв'язування та чутливості

конкретного експериментального показника. Зміни об’ємної активності води за використаних концентрацій окремо не визначали, тому їх не розглядали як експериментально доведений механізм. Універсальної кількісної залежності між афінністю слабкого зв’язування, концентрацією ліганда та функціональним ефектом білка також не припускали.

Принциповою рисою мікромодулятора є залежність ефекту від стану системи. Одна й та сама молекула може стабілізувати білок за одних значень pH та іонної сили, майже не впливати за інших або сприяти частковій дестабілізації, якщо змінюється протонування, гідратація чи конкуренція за поверхневі ділянки. Тому універсальним є не напрямок ефекту, а сам механізм: слабкі контакти та перебудова мікрооточення змінюють розподіл конформаційних станів.

Фізіологічна правдоподібність слабких взаємодій визначається не лише величиною константи дисоціації. Метаболіти й осмоліти можуть бути присутні у значних концентраціях, а локальне накопичення біля зарядженої поверхні підвищує їхню ефективну активність. За таких умов помірна афінність може забезпечувати помітну зайнятість поверхневих мікросайтів без формування стабільного стехіометричного комплексу. Для білкових препаратів аналогічну роль відіграє склад композиції: допоміжна речовина, буферний іон присутній в надлишку й здатний систематично зміщувати ансамбль. Тому низькоафінну взаємодію слід оцінювати разом із концентраційним діапазоном, матеріальним балансом і можливістю множинних поверхневих контактів, а не відкидати лише через її слабкість.

1.1.3. Три рівні молекулярної мікромодуляції. Для систематизації результатів у цій роботі запропоновано авторську схему з трьох взаємопов’язаних рівнів: контактного, середовищного та ансамблевого. Перший, контактний, рівень охоплює безпосередні електростатичні, водневі, гідрофобні взаємодії між лігандом і поверхнею білка.

Другий, середовищний, включає протонування, іонну атмосферу, вивільнення або залучення води, конкуренцію буферних компонентів і дію осмолітів. Третій, ансамблевий, відображає зміщення популяцій білкових мікростанів, яке реєструється

як зміна спектральних, термодинамічних, агрегаційних або рецепторних характеристик.

Для систем взаємодії інтерферону α /ІНФ α-2b з моно- та олігорибонуклеотидами описано як безпосереднє зв'язування, оцінене за змінами власної флуоресценції білка, так і пов'язані з ним конформаційні та термодинамічні ефекти. Зокрема, для 2′,5′-олігоаденілатів досліджували флуоресцентні ознаки їх взаємодії з інтерфероном α, тоді як для АМФ, ОРН, їх сольових форм і комплексів із D-манітолом надалі було застосовано поєднання флуоресцентної спектроскопії, аналізу конформаційних змін та ізотермічної калориметрії. Водночас у межах саме системи ІНФ α-2b–НМФ/ОРН залишається недостатньо визначеним, якою мірою параметри слабкого зв'язування узгоджуються зі змінами локального мікрооточення та конформаційного стану білка і за якими критеріями такі відтворювані зміни можна відрізнити від неспецифічних ефектів складу середовища. Тому в цій роботі робочим підходом було паралельне оцінювання параметрів контакту ліганд–білок, спектрально чутливих характеристик мікрооточення та конформаційної відповіді за зіставних експериментальних умов, без припущення про однозначний причинний зв'язок між цими рівнями спостереження.

1.2. Фізико-хімічні детермінанти мікромодуляторної дії

1.2.1. Нековалентні контакти та термодинамічний баланс. Білок-лігандний інтерфейс формується сукупністю контактів, кожен із яких є відносно слабким і залежить від геометрії та середовища. Електростатичне притягання діє на більшій відстані, але сильно екранується іонами. Водневі зв'язки забезпечують напрямленість, проте їхній внесок залежить від компенсації зв'язків із водою. Гідрофобні взаємодії часто пов'язані не зі «зв'язком» як таким, а зі зменшенням площі неполярної поверхні, доступної для води.

Для експериментального розділення ентальпійної та ентропійної складових особливе значення має ізотермічна титраційна калориметрія. Проте вимірювана ізотермічною нанокалориметрією (ІТК) ентальпія є умовною величиною: вона може містити внесок протонного обміну з буфером, що продемонстровано для білок-

лігандних реакцій із пов’язаним протонуванням [15]. Це безпосередньо стосується нуклеотидів, для яких стан фосфатної групи, азотистої основи та поверхневих кислотно-основних груп білка може змінюватися під час утворення комплексу.

Класична робота Wiseman та співавторів заклала основу для прямого визначення стехіометрії, константи асоціації та теплоти зв’язування за титраційною калориметрією [16]. Подальший розвиток методу показав, що ІТК найбільш інформативна тоді, коли дизайн концентрацій відповідає очікуваній афінності, а дані аналізують з урахуванням матеріального балансу, теплоти розведення та параметричної кореляції [17–21]. Особливо важливе застереження стосується слабких систем: низьке значення K_d не робить експеримент автоматично непридатним, але істотно зменшує ідентифікованість окремих параметрів [19]. Тому в дисертаційній моделі знак ΔH і його відмінність між препаративними формами є механістично інформативнішими, ніж спроба надмірно точно інтерпретувати кожну стехіометричну константу.

Утворення іонної пари може бути ентальпійно сприятливим, але потребуватиме десольватації заряджених груп (табл. 1.1).

Таблиця 1.1.

Основні типи взаємодій у системі «малий природний ліганд — білок» [17-26]

Тип взаємодії	**Фізична основа**	**Приклад для нуклеотидів**	**Ключова залежність**
Електростатичні	Притягання протилежно заряджених груп; іонні пари	Фосфат ліганда — Lys/Arg; участь протиіонів	Сильно залежать від pH та іонної сили
Водневі	Напрямлені контакти донорів і акцепторів	Фосфат, рибоза або основа — полярні залишки білка	Залежать від геометрії та конкуренції з водою
Гідрофобні	Зменшення контакту неполярної поверхні з водою	Неполярні фрагменти основи — гідрофобні ділянки	Часто мають сприятливий ентропійний внесок

Тому близькі значення вільної енергії можуть виникати за різних співвідношень ΔH і TΔS. Ентальпійно-ентропійна компенсація є особливо очікуваною для слабких поверхневих комплексів, у яких прямі контакти тісно пов’язані з перерозподілом води

та іонів [22, 24–26]. Вільна енергія зв’язування є сумою ентальпійного та ентропійного внесків. Сприятлива ентальпія може відображати утворення водневих або іонних контактів, тоді як сприятлива ентропія часто виникає через вивільнення впорядкованої води або протиіонів. Водночас фіксація гнучкого ліганда та обмеження рухливості білка створюють ентропійні витрати. Через ентальпійно-ентропійну компенсацію подібні значення спорідненості можуть відповідати різним механізмам, а однакова амплітуда спектральної відповіді — різним термодинамічним режимам [22, 23]. Ентальпійні та ентропійні внески не є незалежними характеристиками окремих контактів.

1.2.2. Протонування, pH та іонна сила. pH одночасно змінює протонний стан білка та ліганда. На білковій поверхні найбільш чутливими є карбоксильні групи Asp і Glu, імідазольна група His та аміногрупи Lys і Arg. У нуклеотидах іонізуються фосфатні групи та окремі центри азотистих основ. Локальні значення pKa можуть відрізнятися від довідкових через гідратацію, водневі зв’язки, близькість заряджених груп і конформацію [27, 28].

Фізична картина іонної атмосфери нуклеїнових кислот суттєво складніша, ніж модель фіксованих іонних пар. Draper розділяє дифузно асоційовані, переважно гідратовані катіони та локально хелатовані іони, для яких часткова дегідратація є частиною енергетичної ціни зв’язування [29]. Для РНК співвідношення між дифузним екрануванням, локальними контактами та зміною гідратації визначає стабільність фолдингу й реакцію на різні солі [30].

Теорія контріонної конденсації Manning формалізувала зв’язок між високою лінійною густиною заряду полінуклеотидів і накопиченням протиіонів поблизу поліаніонного остова [31]. Експериментальне кількісне визначення іонної атмосфери підтвердило, що електронейтральність біополімеру реалізується розподіленою популяцією катіонів і дефіцитом аніонів, а не лише невеликою кількістю дискретних «сайтів» [32]. Роботи з РНК додатково показують, що Mg^{2+} та інші катіони можуть стабілізувати структуру як через дифузну атмосферу, так і через специфічніші контакти [33–36]. Звідси випливає, що порівняння кислотної та натрієвої форм

препаратів у цій дисертації слід трактувати як зміну початкового іонно-гідратаційного ансамблю, а не як просте перемикання формального заряду молекули.

Іонна сила зменшує дальність електростатичних взаємодій і змінює протиіонну атмосферу навколо нуклеїнових кислот. Одновалентні катіони переважно забезпечують дифузне екранування, тоді як двовалентні катіони можуть утворювати локалізовані контакти або іонні містки. Вивільнення протиіонів під час асоціації з позитивною білковою поверхнею може створювати сприятливий ентропійний внесок; надлишок солі, навпаки, послаблює видиму спорідненість електростатично керованого комплексу [24–26]. Для порівняння кислотних та динатрієвих форм препаратів нуклеотидів критично важливо розділити щонайменше 5 факторів: фактичний pH суміші, сумарну іонну силу, природу й кількість протиіонів та концентрацію активного нуклеотиду (табл. 1.2).

Таблиця 1.2.

Вплив pH та іонного складу на компоненти білок-нуклеотидної системи [24-32]

Фактор	**Білок**	**Нуклеотид**	**Очікуваний наслідок**
Зниження pH	Протонування Asp/Glu/His/Arg; зміна сольових містків	Зміна стану фосфату й основ; можливе зменшення ефективного заряду	Може як посилювати, так і послаблювати контакт
Підвищення pH	Депротонування кислотних груп; зміна поверхневого потенціалу	Зростання частки депротонованих станів	Посилення відштовхування або поява нових H-зв’язків
Зростання іонної сили	Екранування заряджених ділянок; інколи зменшення агрегації	Стиснення іонної атмосфери, конкуренція катіонів	Зазвичай послаблює електростатичний внесок
Двовалентні катіони	Можливі локальні сайти зв’язування або містки	Сильніша координація фосфатів	Можуть змінювати стехіометрію та конформацію ліганда
Буферні іони	Конкуренція за катіонні/полярні ділянки білка	Зміна протонування і теплоти іонізації	Можуть викривляти дослідні параметри

Навіть невелике зміщення pH може змінити заряд гістидинових або карбоксильних груп на білковій поверхні, тоді як додатковий Na^+ змінює екранування та активність води. Тому коректний експеримент потребує вимірювання pH після змішування, однакового буфера, компонентних контролів і, за можливості, вирівнювання іонної сили. Лише після такого контролю залишкову різницю можна обережно пов’язувати зі специфікою форми препарату нуклеотиду.

1.2.3. Гідратація та осмоліти як компоненти механізму білок-лігандної взаємодії. Вода є активним компонентом білок-лігандної взаємодії. Гідратаційні оболонки визначають ефективний розмір і заряд частинок, екранують полярні групи та формують енергетичну ціну зближення. Під час комплексоутворення можуть змінюватися сольватація поверхонь і організація води на інтерфейсі; такі ефекти слід враховувати під час інтерпретації зв’язування [26]. Через це локальна перебудова води здатна змінити термодинамічний режим навіть без значної зміни кількості безпосередніх контактів.

Термодинаміка осмолітів добре описується концепцією переважних взаємодій. За Timasheff компонентний склад розчинника поблизу білкової поверхні може відрізнятися від об’ємного розчину; переважне виключення косолвенту з поверхні термодинамічно сприяє станам із меншою доступною площею, тоді як переважне зв’язування може стабілізувати інші конформації [37, 38]. Осмофобний ефект, описаний Bolen і Baskakov, підкреслює, що сумісні осмоліти можуть зсувати рівновагу згортання без потреби у високоафінному специфічному сайті [39].

Молекулярне пояснення стабілізації осмолітами включає одночасні зміни гідратації пептидного остова, бічних ланцюгів і властивостей води [40–42]. Біологічна різноманітність природних осмолітних систем додатково демонструє, що захист макромолекул від водного й осмотичного стресу є універсальною, але хімічно неоднорідною стратегією [43]. Для цукрів і поліолів показано, що навіть сполуки з подібною кількістю гідроксильних груп можуть різнитися за ефективністю через геометрію, гідратацію та взаємодію з білковою поверхнею [44–46].

У білково-нуклеотидній системі D-манітол може діяти не як самостійний високоафінний ліганд, а як модифікатор гідратаційного та воднево-зв'язувального мікрооточення нуклеотиду. Його ефект має бути селективним щодо структури основи, стану фосфату та білкової поверхні; тому універсальне твердження «манітол підсилює зв'язування» є недостатньо точним. Коректніше перевіряти, чи змінює він константу взаємодії, тепловий профіль, конформаційний відгук або лише оптичні властивості системи. Така контекстна дія узгоджується з даними про поліоли й манітол як концентраційно- та стан-залежні модифікатори білкового мікрооточення [47–50].

1.3. ІНФ α-2b як модель конформаційно пластичного сигнального білка

1.3.1. Структурна організація та поверхнева неоднорідність. Інтерферон α-2b (ІНФ α-2b) належить до інтерферонів I типу та проявляє противірусну, антипроліферативну й імуномодулювальну активність (табл. 1.3).

Таблиця 1.3.

Структурні особливості ІНФ α-2b, релевантні для конформаційної мікромодуляції [51-52]

Структурний елемент	Характеристика	Значення для мікромодуляції
α-Спіральний каркас	П'ять спіралей; чотири утворюють антипаралельний пучок	Зберігає глобальну нативну топологію за малих локальних зсувів
Дисульфідні зв'язки	Cys1–Cys98 і Cys29–Cys138	Обмежують глобальне розгортання, але не усувають поверхневу динаміку
Петлі та кінцеві ділянки	AB/CD-петлі, N- і C-кінці	Підвищена рухливість і потенційна чутливість до слабких лігандів
Заряджені поверхневі кластери	Неоднорідний розподіл Lys/Arg та Asp/Glu	Створюють ділянки для електростатично керованого зближення
Рецепторні епітопи	Просторово розділені поверхні для ІНФАР 2 та ІНФАР 1	Дають змогу перевіряти стан-залежність і потенційну функціональну модуляцію

Молекула містить 165 амінокислотних залишків і має переважно α-спіральну будову. Просторовий каркас утворений п’ятьма спіралями, з яких чотири формують антипаралельний пучок; дисульфідні зв’язки підтримують нативну топологію, а кінцеві ділянки та петлі залишаються рухливішими [51, 52].

Така архітектура поєднує відносно стабільне ядро з пластичною поверхнею, придатною для слабких нековалентних взаємодій. Розподіл заряду на поверхні ІНФ α-2b є неоднорідним. Кластери Lys і Arg створюють потенційні ділянки притягання аніонних лігандів, тоді як Asp і Glu формують негативні області та сольові містки. Полярні незаряджені залишки можуть утворювати водневі зв’язки, а ароматичні — дисперсійні або π-контакти. Наявність сприятливої ділянки ще не доводить біологічної специфічності, але створює структурну основу для перевірки мікромодуляторної дії нуклеотидів.

1.3.2. Рецепторне розпізнавання як процес. Біологічний сигнал формується після послідовного складання комплексу ІНФ α-2b з рецепторними субодиницями ІНФАР 2 та ІНФАР 1. Високоафінний первинний контакт із ІНФАР 2 полегшує залучення ІНФАР 1, після чого стабільність і тривалість потрійного комплексу визначають інтенсивність і якість сигналу JAK–STAT [53–56]. Поверхні зв’язування з двома субодиницями просторово розділені, але функціонально пов’язані через конформаційну динаміку цитокіна та рецептора.

Ширший біологічний контекст підтверджує, що рецепторна відповідь на інтерферони визначається не лише структурою самого цитокіну. Розподіл і регуляція ІНФ -рецепторів між клітинними типами створюють додатковий рівень контролю чутливості до сигналу [57], тоді як тривалість та інтенсивність відповіді залежать від негативних регуляторів, стану JAK–STAT-системи та попередньої активації клітини [58]. Це важливо для меж інтерпретації: навіть фізично реальна мікромодуляція ІНФ α-2b не дозволяє автоматично прогнозувати біологічний ефект *in vivo*.

Функції інтерферонів I типу є контекстними навіть на рівні інфекційної біології: одна й та сама сигнальна система може бути захисною при гострій вірусній інфекції та сприяти імунопатології або імуносупресії в інших умовах [59]. Порівняння

інтерферонів I та III типів показує, що частково спільні транскрипційні програми можуть давати відмінні фізіологічні наслідки через різну тканинну локалізацію рецепторів і кінетику сигналу [60]. Отже, зв'язок «афінність рецептора – біологічний ефект» принципово не є лінійним.

Структурно-кінетичні моделі ІНФАР підтримують послідовне складання комплексу та важливість геометрії й тривалості життя рецепторного ансамблю [61, 62]. Дослідження параметрів цитокін-рецепторного зв'язування показали, що спорідненість, швидкості асоціації/дисоціації та щільність рецепторів разом визначають силу й якість сигналу [63]. Канонічний JAK–STAT-контекст і класичні огляди інтерферонової біології [64–67] є необхідним фоном для інтерпретації моделі ІНФ α-2b/ІНФАР 1: вона перевіряє розпізнавання, але не замінює повного клітинного функціонального тесту.

Мутаційні, структурні й кінетичні дослідження показали, що біологічну відповідь не можна передбачити лише за афінністю до однієї рецепторної субодиниці. Посилення взаємодії ІНФ α2 з ІНФАР 1 може змінювати функціональний профіль, а тривалість існування потрійного комплексу часто є більш інформативною, ніж окремі рівноважні константи [68, 69]. Для мікромодуляції це означає, що слабкий ліганд може мати різні спострежні афінності до ізольованого ІНФ α-2b, ІНФАР 1 і попередньо сформованого комплексу.

Дослідження ІНФАР 1 також свідчать, що зв'язування ліганда супроводжується перебудовою рецепторної субодиниці, яка поширюється на мембранно-проксимальний домен [70]. Отже, стан білкової мішені є повноправною детермінантою відповіді: одна й та сама молекула нуклеотиду може розпізнавати різні поверхні як до, так і після складання комплексу. Це робить систему ІНФ α-2b/ІНФ AR придатною для перевірки універсального принципу стан-залежної конформаційної мікромодуляції.

Звідси випливає важливе обмеження для модельних досліджень. Порівняння ІНФ α-2b, ізольованого ІНФАР 1 та попередньо сформованої системи ІНФ α-2b/ІНФАР 1 дає інформацію про залежність зв'язування від стану білкової мішені, але не відтворює повністю мембранний рецепторний комплекс. Такі дані слід трактувати як

біофізичну перевірку стан-залежності, а не як прямий доказ зміни JAK–STAT-сигналювання.

1.3.3. Стабільність, агрегація та вплив препаративного середовища. Терапевтичні білки чутливі до температури, заморожування-відтавання, механічного стресу, контакту з поверхнями, світла та складу розчину. Для ІНФ α-2b ці фактори можуть змінювати рухливість петель, експозицію гідрофобних ділянок і схильність до асоціації. Формуляційні підходи — пегілювання, білкові фузії, інкапсуляція й підбір допоміжних речовин — демонструють, що модифікація білкової поверхні та мікрооточення впливають на стабільність і фармакокінетику [71].

ІНФ α-2b поєднує стабільний спіральний каркас, динамічні поверхневі ділянки та стан-залежне рецепторне розпізнавання. Невирішеним залишається питання, чи можуть малі природні ліганди зміщувати його ансамбль без глобального розгортання і чи змінюється таке розпізнавання після формування комплексу з ІНФАР 1. Відповідь потребує паралельного аналізу ізольованих компонентів і складеної білкової системи.

1.4. Нуклеотиди як молекулярні мікромодулятори білкової пластичності

1.4.1. Структурна багатокомпонентність нуклеотидного ліганда. 5′-нуклеозидмонофосфат (НМФ) складається з фосфатної групи, рибози та пуринової або піримідинової основи. Кожен компонент робить неоднаковий внесок у розпізнавання. Фосфат визначає основний заряд і сильну гідратацію; рибоза задає взаємне положення фосфату й основи та додає гідроксильні групи; гетероцикл формує специфічний набір донорів, акцепторів і ароматичну поверхню. Тому АМФ, ГМФ, ЦМФ і УМФ мають спільний електростатичний мотив, але різну контактну геометрію.

Структурний аналіз білок–РНК-інтерфейсів показує, що розпізнавання нуклеїнових кислот рідко зводиться до одного типу контакту. На інтерфейсах одночасно представлені водневі зв’язки з основами й фосфатами, електростатичні контакти, ароматичне стекування та водно-опосередковані взаємодії [72, 73]. Це підтримує дисертаційне трактування НМФ як багатокомпонентного ліганда, в якому

фосфат є важливим електростатичним елементом, але хімічна природа основи визначає додаткову селективність.

Огляди механізмів РНК-білкового впізнавання підкреслюють поєднання структурної комплементарності та конформаційної адаптації обох партнерів [74, 75]. Для класичних РНК-зв'язувальних білків така специфічність часто реалізується модульними доменами [76], але навіть для одноланцюгової РНК універсального «коду» розпізнавання не існує: контекст послідовності, доступність основ і локальна структура істотно змінюють контактний патерн [77]. Статистичний аналіз атомних контактів на РНК-білкових інтерфейсах також демонструє значну роль води та геометрично специфічних контактів [78]. Ширші протеомні дослідження показують, що неканонічні РНК-зв'язувальних білків значно численніші за класичний набір білків із RRM/KH-доменами, що підтримує біофізичну правдоподібність слабких поверхневих контактів РНК із різними білками [79, 80].

Пуринові основи є двокільцевими на відміну від піримідинів, однак це не означає автоматично вищої афінності до будь-якого білка. Гуанін містить розвинений донорно-акцепторний патерн, аденін — інший розподіл електронної густини, а цитозин та урацил відрізняються карбонільними й амінними групами. Квантово-хімічні та експериментальні роботи Н. В. Оберніхіної та співавторів показали, що донорно-акцепторні характеристики азотистих основ і кон'югованих гетероциклів можуть бути описані за допомогою електронної афінності та споріднених параметрів [81–83]. Для білкового зв'язування ці дескриптори є не прямими предикторами, а характеристиками потенціалу до полярних і дисперсійних контактів.

Спектральний відгук нуклеотиду також не слід прямо ототожнювати зі спорідненістю. УФ-поглинання переважно характеризує дозволені переходи основного стану, флуоресценція — випромінювальну релаксацію збудженого стану, а електронний круговий дихроїзм залежить від хіральної організації та обертальної сили переходів. Зміна постійного дипольного моменту або положення протиіона може суттєво перебудувати електронну густину, але не зобов'язана пропорційно змінювати сигнал кругового дихроїзму (КД) чи константу зв'язування. Саме розбіжності між методами можуть вказувати на різні рівні мікромодуляції.

1.4.2. Іонне оточення та форма препарату. За близького до нейтрального pH фосфатні групи моно- й олігонуклеотидів переважно перебувають в дисоційованому стані. Тому відмінність між визначеними виробником кислотною та натрієвою формами препаратів не можна пояснювати простою схемою «нейтральна молекула — заряджена сіль». Після розчинення обидві форми формують рівноважний набір протонованих станів та іонну атмосферу, на яку впливають концентрація, pH, тип протиіона й буфер.

Вихідна форма препарату нуклеотиду визначала склад розчину на етапі його приготування, однак за однакового кінцевого pH її не розглядали як доказ існування стабільно відмінних зарядових станів нуклеотиду. У водному середовищі для фосфатних груп можливі динамічні контактні та розділені молекулами води асоціати з Na^+, здатні локально впливати на сольватацію і геометрію взаємодій фосфатної групи. Водночас за використаних у цій роботі концентрацій внесок додаткового Na^+ у макроскопічну іонну силу був незначним: для 10 мкМ динатрієвого НМФ він не перевищував приблизно 20 мкМ Na^+, тобто близько 0,04 % від концентрації 50 мМ буферної системи. Тому відмінності між зразками не можна кількісно пояснювати зміною об’ємного електростатичного екранування.

Порівняння кислотних і динатрієвих форм препаратів у цій роботі використовували як експериментальне зіставлення способів введення нуклеотиду в систему, а не як пряме порівняння двох незмінних іонних форм. Можливий внесок локального іонного парування або відмінностей початкового сольватаційного стану розглядали лише як робочу інтерпретацію. Для однозначного віднесення спостережуваних ефектів саме до цих чинників необхідний окремий контроль фактичного іонного складу, іонної сили, способу корекції pH, часу врівноваження та хімічної чистоти препаратів.

Термінологічно доцільно розмежовувати препаративну назву та реальний протонний стан у розчині. Позначення «кислотна форма» вказує на спосіб одержання або склад вихідного препарату, але не означає, що всі фосфатні групи залишаються повністю протонованими за експериментального pH. Аналогічно, динатрієва форма не є незмінною контактною парою нуклеотиду з певною кількістю Na^+. Після розчинення

формується динамічна рівновага, залежна від pH, буфера та концентрації. Таке уточнення запобігає надмірному приписуванню відмінностей лише протонуванню та переводить порівняння форм у площину комплексного іонно-гідратаційного ефекту [24–28].

1.4.3. Від мононуклеотиду до олігорибонуклеотиду: багатовалентність і кооперативність. Олігорибонуклеотид містить повторюваний фосфодіефірний остов і кілька гетероциклічних хромофорів. Зі збільшенням довжини зростає кількість потенційних контактів і може виникати авідність, коли одночасне зв’язування кількох фрагментів зменшує ймовірність повної дисоціації. Однак довший ланцюг має вищу конформаційну ентропію, сильніше залежить від іонної атмосфери й може приховувати основи через стекування. Тому довжина не повинна давати лінійного зростання спорідненості.

Власна супрамолекулярна поведінка ліганда додає складності. Для ГМФ продемонстровано концентраційно- та іонозалежне формування впорядкованих асоціатів, чутливих до кругового дихроїзму [84]. У системах з олігонуклеотидами міжосновні екситонні взаємодії можуть змінювати спектр без участі білка. Тому сигнали суміші мають порівнюватися з компонентними контролями, а відмінність спектра — перевірятися на відповідність моделі зв’язування.

1.4.4. D-манітол у нуклеотидних композиціях. Комплексоутворення РНК з D-манітолом і зміни спектральних властивостей таких композицій описані М. М. Вівчарик та співавторами [85]. Подальші дослідження взаємодії поліолів із полінуклеотидами підтримують припущення про участь водневих зв’язків і гідратаційного оточення [86]. Ці дані створюють передумову для аналізу D-манітолу не лише як фармацевтичної допоміжної речовини, а й як компонента, здатного змінювати стан нуклеотидного ліганда.

У технології білкових препаратів D-манітол може виконувати роль наповнювача або кріо-/ліопротектора, але його ефект залежить від фізичного стану, кристалічності та співвідношення компонентів [49, 50]. У водному розчині пряме перенесення

висновків із ліофілізованих систем є некоректним. Для дисертаційної моделі важливішим є питання, чи змінює D-манітол гідратацію та протон-донорно-акцепторний баланс нуклеотиду настільки, щоб це відбилося на взаємодії з білком.

1.4.5. Наявні дані про взаємодію нуклеотидів з інтерферонами. Прямі дані про нековалентну взаємодію ІНФ α-2b з моно- та олігорибонуклеотидами залишаються обмеженими. У попередніх роботах ми показали, що олігорибонуклеотиди й АМФ змінюють флуоресцентні та конформаційні параметри рекомбінантного ІНФ α-2b [87, 88]. Подальше систематичне порівняння чотирьох 5′-нуклеотидрибомонофосфатів підтвердило, що характер відповіді залежить від природи основи та форми ліганда [89]. Ці результати підтримують перехід від опису «зв’язування аніона» до концепції структурно-селективної мікромодуляції.

Власні попередні публікації лабораторії, що сформували експериментальну основу дисертації, охоплюють конформаційно-флуоресцентні характеристики ІНФ α-2b у присутності оліго- та мононуклеотидів, а також спектральні характеристики систем РНК–D-манітол [87-89]. Для рецепторного контексту важливими залишаються роботи про структурне розпізнавання ІНФАР 1, функціональне значення зміни спорідненості ІНФ α2 до ІНФАР 1 та тривалість потрійного комплексу [90–95]. Класичні дані про іонні ефекти Na^+ та його вивільнення під час асоціації білка з ДНК [96] додатково пояснюють, чому форма ліганда може змінювати спостережну взаємодію без потреби вводити окремий специфічний механізм для кожної солі.

Важливим зовнішнім аналогом є дослідження інгібувальних олігодезоксинуклеотидів, які змінювали конформацію ІНФ-γ [97]. Хоча ІНФ-γ структурно й рецепторно відрізняється від ІНФ α2b, ця робота демонструє принципову можливість прямого впливу коротких нуклеїнових кислот на конформаційний стан цитокіну. Вона не доводить тотожного механізму, але розширює універсальність гіпотези за межі одного інтерферону.

Водночас нуклеїнові кислоти модулюють інтерферонову систему переважно через TLR, RIG-I, MDA5, OAS та інші спеціалізовані сенсори. Індукцію синтезу ІНФ, регуляцію експресії цитокінів і пряме зв’язування вже синтезованого ІНФ α-2b слід

чітко розмежовувати. Предметом цієї дисертації є третій механізм; дані про вроджене розпізнавання нуклеїнових кислот формують біологічний контекст, але не замінюють доказів прямого комплексу [98, 99].

1.5. Критерії доказовості конформаційної мікромодуляції

1.5.1. Від факту контакту до зміни конформаційного ансамблю. Доведення мікромодуляції потребує послідовного розмежування трьох тверджень: ліганд контактує з білком; контакт змінює конформаційний ансамбль; зміна ансамблю впливає на функцію. Жоден окремий спектральний метод не встановлює всіх трьох рівнів. Концентраційно залежне гасіння флуоресценції може свідчити про зближення з флуорофором. Зміна кругового дихроїзму вказує на перебудову хірального середовища, проте потребує компонентного контролю та перевірки якості короткохвильових даних [100–102].

Для кругового дихроїзму принципово важливим є не один алгоритм деконволюції, а узгодження кількох підходів із різними еталонними наборами: BeStSel, K2D3, CAPITO та нейромережеві методи мають різні припущення й систематичні похибки [103–107]. Сучасні методичні огляди додатково рекомендують оцінювати якість короткохвильової ділянки, внесок буфера та власний спектр ліганда [100–102, 108–110].

Флуоресцентні методи також характеризують різні фізичні рівні. Фьстерівський перенос енергії є дистанційно залежним явищем і потребує коректного спектрального перекриття та контролю інших шляхів переносу енергії [111]. Інфрачервоний спектр чутливий до пептидного остова, бічних груп і водневих зв’язків [112–114], а MCR-ALS дозволяє розкладати серії спектрів на математичні компоненти, проте без додаткових обмежень їх не можна автоматично трактувати як окремі хімічні види або молярні частки [115]. Калориметрія, включно з кінетичними розширеннями ІТК, доповнює спектроскопію незалежним тепловим каналом [116, 117].

Окремо необхідно розрізняти конформаційну та колоїдну стабільність. Термальна флуоресценція дає операційний параметр переходу, тоді як тіофлавін Т

(ThT) чутливий до певних упорядкованих агрегатних мотивів і може зазнавати інтерференції з боку добавок [118, 119]. Загальна теорія агрегації терапевтичних білків показує, що агрегація є багатошляховим процесом, який залежить від частково розгорнутих станів, поверхневих контактів, механічного стресу та складу розчину [120–129]. Тому невелика зміна Тплавлення, сигналу кругового дихроїзму або ThT-агрегації не повинна самостійно називатися «стабілізацією» без узгодження з іншими методами.

Часороздільна флуоресценція доповнює стаціонарні вимірювання, оскільки зміни часу життя флуорофора дають змогу відрізняти процеси, що впливають на швидкості дезактивації збудженого стану, від випадків, коли зниження стаціонарної інтенсивності зумовлене переважно утворенням невипромінювальної популяції у основному стані [130, 131]. Флуоресцентна анізотропія власних ароматичних хромофорів білка є чутливою до їх локальної рухливості, обертальної динаміки та змін молекулярного оточення, пов’язаних зі зв’язуванням ліганда. У цій роботі зовнішні флуоресцентні мітки не використовували, тому вимірюваний сигнал визначався власною флуоресценцією білків. Відповідно, у зразках, що містили одночасно ІНФ α-2b та ІНФАР 1, зареєстрована емісія й анізотропія являли собою сумарний, зважений внесок флуоресцентних хромофорів обох білкових компонентів і не могли бути однозначно віднесені лише до ІНФ α-2b або лише до ІНФАР 1 без додаткового спектрального розділення або селективного мічення.

Ізотермічна титраційна калориметрія безпосередньо реєструє тепловий ефект процесу, однак експериментально визначена ентальпія може включати внески зв’язування, протонування або депротонування, розведення та взаємодії компонентів із буферною системою. Круговий дихроїзм, інфрачервона спектроскопія, термофлуоресцентний аналіз і оцінювання агрегації характеризують різні структурні та фізико-хімічні властивості білкової системи. Тому результати цих методів розглядали як комплементарні, але не як такі, що повинні механічно підтверджувати один одного.

1.5.2. Моделі зв’язування та межі механістичних висновків. Для рівноважних титрувань спочатку слід перевіряти найпростішу фізично обґрунтовану модель. У діапазоні концентрацій, де виснаження ліганда є істотним, модель 1:1 коректніше за лінійні перетворення. Моделі Ленгмюра, Хілла, Адаїра, двох незалежних сайтів, Кошланда (KNF) та MWC можуть бути корисними для складніших профілів, але збільшення кількості параметрів потребує достатньої кількості точок і повторів. Вибір має спиратися на скоригований R^2, структуру залишків, AICc, довірчі інтервали та ідентифікованість параметрів.

Розрахункові підходи корисні лише за чіткого розуміння їхньої ієрархії. Підготовка структур і візуалізація за допомогою Chimera/Discovery Studio, генерація структур лігандів в Avogadro, використання AlphaFold-моделей і AutoDock Vina/PyRx формують робочий ланцюг гіпотезоутворення [132–138]. Однак багаторічні бенчмарки docking-програм показують, що правильне відтворення конформації не гарантує точного ранжування афінності, а скорингова функція особливо чутливі до протонування, води, гнучкості рецептора та складу набірних даних [139–144].

Математичні моделі кооперативності також описують різні рівні абстракції. MWC-модель формалізує рівновагу між конформаційними станами взаємопов’язаних субодиниць [145], тоді як KNF-модель допускає послідовні ліганд-індуковані конформаційні переходи [146]. Рівняння Хілла є емпіричним описом крутизни й не дозволяє ототожнювати nH з кількістю фізичних сайтів [147]. Сучасний формалізм кооперативного зв’язування підкреслює необхідність розрізняти макро- та мікроскопічні параметри [148].

Вибір між альтернативними моделями має спиратися не лише на R^2, а й на інформаційні критерії, складність, залишки та ідентифікованість параметрів. Підхід Burnham і Anderson передбачає порівняння альтернативних моделей за AIC/AICc та вагами моделей, що дає змогу оцінити відносну підтримку кожної з них даними [149]. Для спектральних сумішей аналогічний принцип діє в MCR: математичний розклад не є єдиним, а рішення залежить від обмежень і ротаційної неоднозначності [150]. Це обґрунтовує обережну інтерпретацію Adair-, KNF-, MWC- та MCR-ALS-параметрів у

дисертації як моделей даних, а не як прямих доказів унікального мікроскопічного механізму.

1.5.3. Функціональна інтерпретація та необхідні обмеження. Конформаційна зміна in vitro не є прямим доказом зміни противірусної активності ІНФ α-2b. Для функціонального висновку потрібні дослідження повного рецепторного комплексу ІНФАР 2–ІНФ α-2b–ІНФАР 1, фосфорилювання JAK–STAT, експресії інтерферон-стимульованих генів і клітинної відповіді. Важливо також оцінити, чи зберігається комплекс у фізіологічній іонній силі, у присутності плазмових білків і конкуруючих метаболітів.

Таким чином, доказовість доцільно будувати як ієрархію. Перший рівень — відтворюваний, концентраційно залежний контакт після виключення оптичних і колоїдних артефактів. Другий — незалежна ознака зміни конформаційного або динамічного ансамблю. Третій — зміна стабільності або взаємодії з рецепторним компонентом та функціональна відповідь у клітинній системі.

1.6. Узагальнення літературних даних та обґрунтування робочої гіпотези

ІНФ α-2b є придатною моделлю для перевірки цієї концепції, оскільки має стабільний α-спіральний каркас, рухливі заряджені поверхневі ділянки та складне стан-залежне рецепторне розпізнавання. Нуклеотиди, своєю чергою, поєднують фосфатний електростатичний мотив із різними донорно-акцепторними та ароматичними властивостями основ. D-манітол дає змогу експериментально змінювати гідратаційне оточення, а порівняння форм препаратів — досліджувати роль протиіонів і протонного стану.

Систематично не з’ясовано, чи утворюють АМФ, ГМФ, ЦМФ, УМФ та олігорибонуклеотиди відтворювані комплекси з ІНФ α-2b; чи залежить контакт від препаративної форми та D-манітолу; чи супроводжується він зміною конформаційного ансамблю; і чи відрізняється розпізнавання ізольованого ІНФ α-2b, ІНФАР 1 та їх

попередньо сформованого комплексу. Саме ця сукупність прогалин визначає логіку дисертаційного дослідження.

Поставлена проблема вимагає не пошуку єдиного «найкращого» нуклеотиду, а встановлення закономірностей. Порівняння АМФ, ГМФ, ЦМФ і УМФ дає змогу відокремити внесок азотистої основи за спільного фосфатно-рибозного каркаса; зіставлення моно- й олігорибонуклеотидів — оцінити роль багатовалентності; кислотних і динатрієвих форм — перевірити залежність від іонно-гідратаційного стану; систем із D-манітолом — визначити внесок осмолітного мікрооточення. Аналіз вільного ІНФ α-2b, рецепторного компонента та їх поєднання, своєю чергою, перевіряє, чи залежить мікромодуляція від початкового конформаційного стану мішені.

Робоча гіпотеза. 5′-Рибонуклеозидмонофосфати та олігорибонуклеотиди є молекулярними мікромодуляторами конформаційної пластичності ІНФ α-2b, а напрям їхньої дії визначається структурою ліганда, станом молекулярного середовища та конформаційним станом білкової системи.

На контактному рівні фосфатна група забезпечує електростатичний і воднево-зв’язувальний потенціал, азотиста основа додає структурно селективні полярні, дисперсійні й ароматичні контакти, а рибоза визначає їхню геометрію. На середовищному рівні протонування, протиіони, іонна сила, вода та D-манітол регулюють доступність цих контактів і вартість десольватації. На ансамблевому рівні сукупний ефект зміщує ІНФ α-2b між близькими конформаційними станами, що може проявлятися у зміні спектральних, термодинамічних, агрегаційних і рецепторно-залежних характеристик.

Гіпотеза передбачає контекстну, а не універсально стабілізувальну дію. Кислотні та натрієві форми не повинні автоматично спричиняти протилежні ефекти; D-манітол не має однаково посилювати всі взаємодії; а найсильніше гасіння флуоресценції не обов’язково відповідає найменшому K_d. Натомість очікується узгоджувана сукупність закономірностей, яка пояснюється трирівневою моделлю та перевіряється за допомогою ортогональних методів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Загальний дизайн дослідження

Досліджували три варіанти білкової системи: ізольований ІНФ α-2b, ізольований ІНФАР 1 та попередньо інкубовану еквімолярну суміш ІНФ α-2b і ІНФАР 1. Для одержання останньої компоненти змішували в еквімолярному співвідношенні та інкубували при температурі 37 °C протягом 15 хв перед проведенням титрування. Оскільки в межах цього етапу дослідження частку асоційованого ІНФ α-2b/ІНФАР 1 незалежним методом не визначали, сам факт попередньої інкубації не розглядали як кількісне підтвердження утворення стехіометрично визначеного білкового комплексу. Тому надалі цей зразок коректно розглядали як попередньо асоційовану модельну систему, або, у строгому термінологічному сенсі, як попередньо інкубовану суміш ІНФ α-2b та ІНФАР 1.

Крім того, оскільки ІНФАР 2 у досліджуваній системі був відсутній, цей зразок не ототожнювали з повним сигнальним рецепторним комплексом інтерферону I типу. Його використовували лише для порівняння властивостей ізольованих білків із системою, у якій ІНФ α-2b та ІНФАР 1 попередньо перебували в спільному розчині за однакових умов інкубації.

Лігандна панель включала кислотні та динатрієві форми АМФ, ГМФ, ЦМФ і УМФ, кислотні та натрієві форми ОРН, а також відповідні композиції з D-манітолом (D-M). Порівняння проводили за принципом парних умов: кислотна форма проти натрієвої; ліганд без D-M проти того самого ліганда з D-M; ізольований білок проти рецептора та попередньо сформованої білкової системи. Така матриця давала змогу порівняти сукупний вплив структури азотистої основи, стану фосфатної групи, протиіонної атмосфери, молекулярного розміру та поліольного компонента.

2.2. Використані реактиви, біологічні препарати та обладнання

Для досліджень також використовували вимірювальні прилади: спектрофотометр Specord 210+ UV-Vis (Analytik Jena AG, Німеччина), спектрополяриметр J-810 та спектрофлуориметр FP 8200 (Jasco, Японія), ITC Nano (TA Instruments, США), HORIBA FluoroMax-4P (HORIBA, США), Nicolet™ iS50 FTIR Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, США).

Рекомбінантний ІНФ α-2b надано НВК «Інтерфармбіотек» (Київ, Україна). Препарат ІНФАР 1 отримано від Cloud-Clone Corp. у вигляді надмембраного фрагменту (Велика Британія). Кислотний препарат тотальних дріжджових олігорибонуклеотидів (ОРН) надано SC «BioCell» (Київ, Україна). D-манітол, 5′-рибонуклеозид-монофосфати та їх динатрієві солі отримано від Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США): аденозин 5`-монофосфат моногідрат (CAS: 18422-05-4), аденозин 5`-монофосфат динатрієва сіль (CAS: 4578-31-8), цитидин 5`-монофосфат (CAS: 63-37-6) та цитидин 5`-монофосфат динатрієва сіль, гуанозин 5`-монофосфат (CAS: 85-32-5), гуанозину 5`-монофосфату динатрієвої солі гідрат (CAS: 5550-12-9), уридин 5`-монофосфат (CAS: 58-97-9) та уридин 5`-монофосфат динатрієва сіль (CAS: 3387-38-8), чистоту і відповідність перевіряли хроматографічно і завдяки ^{1}H ЯМР (в D_2O та DMSO-d_6 1 мг/мл— за частоти приблизно 400,462 МГц і 21 °C на Varian, використовуваною імпульсною послідовністю була s2pul, референс – тетраметилсилан, перетворювали за допомогою перетворення Фур'є та розміщували на осі хімічного зсуву на основі параметрів спектрального діапазону, частоти спектрометра та референсних значень із файлів VNMR у iNMR), відповідні дані наведено в Додатку Б (рис. Б.1-2, табл. Б.1).

2.3. Приготування розчинів і формування експериментальних систем

Стокові розчини нуклеотидмонофосфатів (НМФ) готували у концентрації 3 мМ. У флуоресцентних, анізотропних і частині конформаційних дослідів робоча концентрація НМФ або $НМФNa_2$ змінювалася в межах 0–10 мкМ. Кінцева

концентрація ІНФ α-2b або ІНФАР 1 у кюветі становила 1 мкМ; загальний об’єм — 2,0 мл. Для ІНФ α-2b використовували молярний коефіцієнт екстинкції ε = 19 200 $М^{-1}·см^{-1}$, для ІНФАР 1 — ε = 45 170 $М^{-1}·см^{-1}$. Базовим середовищем був 50 мМ Tris–HCl, pH 7,4, якщо для конкретного методу не було зазначено інше. Ліганди майже не змінювали pH буферу (табл. Б.2).

Концентрація ОРН подана в умовних пентануклеотидних еквівалентах, установлених за попередніми мас-спектрометричними даними. Середню молекулярну масу розраховували за формулою:

$$\mathrm{Mr}_{\mathrm{OPH}} = 5 \times 321{,}47 + 18{,}02 = 1625{,}37.$$

Відповідно, масова концентрація 1 мг/мл відповідала приблизно 615,2 мкМ умовних п’ятинуклеотидних молекул. Цю концентрацію слід розглядати як усереднену для гетерогенного препарату ОРН.

Композиції НМФ–D-M готували у ваговому співвідношенні 2,5:1. Цю пропорцію обрано за попередніми ІЧ/MCR-ALS-даними як умову максимального прояву відокремленого комплексоподібного спектрального компонента [89]; відповідне зображення наведено в Додатку Б (рис. Б. 3).

Для мінімізації внеску розчиненого газу у водні вимірювання використовували бідистильовану воду, отриману на системі Arium Pro (Sartorius), і дегазовану на DEGASSING STATION (TA Instruments). У кожній серії реєстрували відповідний контроль буфера, ліганда або композиції ліганд–D-M без білка. Для кислих препаратів додатково контролювали pH реакційної суміші за тією самою схемою титрування, що й у білковому дослідженні.

Молекулярну масу та чистоту ІНФ α-2b контролювали електрофорезом у 10 % поліакриламідному гелі в денатурувальних умовах у присутності лаурилульфату натрію за методом Леммлі та хроматографічно [103]. До окремих доріжок наносили суміш маркерних білків PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США) та 10 мкл препарату ІНФ α-2b. За електрофоретичною рухливістю основної смуги та гель-фільтраційним HPLS визначено молекулярну масу приблизно 18,2 кДа; відповідне зображення наведено в Додатку Б (рис. Б.4).

2.4. Спектроскопічні методи дослідження

2.4.1. Флуорометрія. Взаємодію ІНФ α-2b з кислотними та динатрієвими формами НМФ, препаратами ОРН і відповідними композиціями з D-манітолом досліджували за зміною власної флуоресценції білка [87, 89, 130].

Спектри емісії реєстрували на JASCO FP-8200 у діапазоні 300–450 нм за λex = 295 нм у кварцовій кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см. Швидкість сканування становила 200 нм·хв$^{-1}$, ширина щілин збудження та емісії — 2,5 нм. Основні титрування проводили у 50 мМ Tris–HCl, pH 7,5, за 37 °C; для окремих ненагрітих спектральних серій використовували кімнатну температуру, що зазначали під час інтерпретації відповідних наборів.

Після кожного додавання титранту суміш перемішували, витримували до стабілізації сигналу та реєстрували спектр. Інтенсивність оцінювали переважно за максимумом емісії ІНФ α-2b близько 336–337 нм. Із сигналу білок–ліганд віднімали фон відповідного буфера та внесок ліганда або композиції ліганд–D-M за тієї самої концентрації. Дані нормалізували відносно сигналу білка без ліганда.

За наявності оптичного поглинання у ділянках збудження або емісії застосовували корекцію внутрішнього фільтра:

$$F_{кор} = F_{спост} \times 10^{(A_{ex}+A_{em})/2},$$

де $F_{спост}$ — виміряна інтенсивність, A_{ex} — оптична густина за довжини хвилі збудження, A_{em} — оптична густина за довжини хвилі емісії. У робочих серіях A_{295} була меншою за 0,05; тому очікуваний внесок первинного внутрішнього фільтра був малим, але корекцію та спектральні контроли використовували, щоб уникнути систематичного зміщення.

Ступінь гасіння визначали як

$$Q = 100 \times (F_0 - F)/F_0,$$

де F_0 і F — інтенсивності білка відповідно без ліганда та за його наявності. Амплітуду гасіння не ототожнювали з афінністю, оскільки на неї одночасно впливають статичне комплексоутворення, динамічне гасіння, доступність флуорофора,

перенесення енергії та конформаційна перебудова мікрооточення. Отже, визначалась спостережна K_d.

Побудову спектрів гасіння флуоресценції ІФН за дії ОРН та ОРН-D-M і НМФ та розрахунок константи дисоціації проводили за допомогою програми Origin 8.0(OriginLab, США). Для оцінки константи дисоціації була використана наступна формула

$$m = 1 + \left(\frac{P}{Do}\right) + \left(\frac{K_d}{D_0}\right), A = A_f - (A_f - A_b) * \left(0.5m - \sqrt{0.25m^2 - \frac{P}{D_0}}\right),$$

де D_0 – концентрація титранту, P — концентрація білка. A_f — максимальна флуоресценція, A_b — мінімальна флуоресценція. Спектри ІФН α-2b і ОРН та ОРН:D-M були нормалізовані.

У випадку, коли всі флуорофори є повністю доступними для гасника, процес гасіння флуоресценції описували лінійним рівнянням Штерна–Фольмера:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \times [L],$$

де F_0 і F — інтенсивність стаціонарної флуоресценції білка за відсутності та наявності гасника відповідно; [L] — загальна концентрація гасника.

Для оцінки частки флуоресценції, доступної для гасіння, та визначення параметрів зв'язування використовували модифіковане рівняння Штерна–Фольмера:

$$\frac{F_0}{F} = \left(1 + \frac{[Q]}{K_{dSV}}\right) \times e^{V[Q]},$$

де V – константа статичного гасіння, пов'язана з утворенням неемісійного комплексу білок–ліганд, Q — концентрація гасника, $K_{dSV}=1/K_{SV}$.

У разі відхилення від лінійності (вигнута залежність у координатах Штерна–Фольмера), яке може бути зумовлена змішаним механізмом гасіння, використовували модифіковану модель Лерера:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{K_d}{f_a \times [L]} + \frac{1}{f_a},$$

де fa – частка початкової флуоресценції, доступна для взаємодії.

Константи дисоціації (K_d, M) визначали на основі лінійного регресійного аналізу в межах моделей Скетчарда, Клотца та Хілла.

Для систем із одним домінуючим сайтом зв’язування застосовували модифіковане рівняння Скетчарда в модифікації Хірацуки:

$$\frac{r}{[Lf]} = \frac{(n - r)}{K_d},$$

де r – кількість зв’язаного ліганду на молекулу білка; [Lf] – концентрація вільного (незв’язаного) ліганду; n – кількість сайтів зв’язування; K_d – константа дисоціації.

Константу дисоціації додатково оцінювали за рівнянням Клотца:

$$r = \frac{n \times [L_f]}{K_d + [L_f]},$$

де параметри мають той самий фізичний зміст.

Кооперативність зв’язування та константу асоціації визначали також за рівнянням Хілла:

$$\log\left(\frac{Q}{1-Q}\right) = nH \times \log[L] - \log(K_d),$$

де Q — ступінь насичення зв’язування (fractional saturation); nH — коефіцієнт Хілла, що характеризує кооперативність процесу[130].

Моделі порівнювали за скоригованим R^2, структурою залишків, AICc і стабільністю оцінок за повторностями. Розрахунки виконували в Origin/OriginPro 8.0.

Константу асоціації та стандартну вільну енергію обчислювали як $K_a = 1/K_d$ і $\Delta G° = -R \times T \times \ln K_a$ за умови приведення K_d до молярних одиниць та використання стандартного стану 1 М.

2.4.2. Часороздільна флуоресценція та Фьорстерівський перенос енергії. Час життя власної триптофанової флуоресценції ІНФ α-2b визначали методом час-корельованого підрахунку одиничних фотонів (TCSPC) на спектрофлуориметрі FluoroMax-4 Plus (HORIBA Scientific), обладнаному імпульсним модулем DeltaDiode та джерелом збудження DeltaDiode DD-295.

Довжина хвилі збудження становила 295 нм, реєстрацію емісії проводили при 337 нм; ширина емісійної щілини становила 2,5 нм, довжина оптичного шляху кювети — 1 см. Часове вікно становило 100 нс і було розподілене на 4000 каналів, що

відповідало часовому кроку 25 пс на канал. Частота повторення імпульсів становила 4 MHz.

Функцію відгуку приладу (instrument response function, IRF) реєстрували за розсіяним світлом відповідного стандарту/розсіювача за тих самих параметрів часової розгортки та максимально наближених оптичних умов. Експериментальні криві спаду аналізували методом ітеративної реконволюції модельної функції з експериментально визначеною IRF у програмному забезпеченні DAS6, версія 6.0.

λ_{ex} = 295 нм, λ_{em} = 337 нм, ширина емісійної щілини — 2,5 нм, довжина оптичного шляху — 1 см. Спад інтенсивності апроксимували одноекспоненційною функцією $I(t) = I_0 \times \exp^{(-t/\tau)}$ або, якщо цього вимагала структура залишків, сумою експонент. Значення середнього часу життя порівнювали для білка без ліганда та у присутності відповідних кислотних, динатрієвих і D-M-вмісних форм [130].

Ефективність безвипромінювального перенесення енергії оцінювали за зміною часу життя донора [111]:

$$E = 1 - \tau DA/\tau D,$$

де τD і τDA — час життя донора без акцептора та у присутності акцептора. Інтеграл спектрального перекривання визначали за співвідношенням:

$$J = \int_0^\infty (F_D(\lambda) \times \varepsilon_A(\lambda)\lambda^4)d\lambda / \int_0^\infty F_D(\lambda)d\lambda,$$

де J – інтеграл перекривання спектра випромінювання донора F_D (λ) зі спектром поглинання акцептора $\varepsilon_A(\lambda)$; J задано в $M^{-1} \cdot cm^3$; Q_D – квантовий вихід донора. Радіус Фьорстера обчислювали за стандартним співвідношенням:

$$R_0 = 979(\kappa^2 \times Q_D \times n^{-4} \times J)^{1/6},$$

де числовий коефіцієнт 979 є результатом об’єднання фундаментальних констант у рівнянні Фьорстера та перерахунку одиниць за умови, що λ задано в нм. За припущення швидкої випадкової реорієнтації використовували $\kappa^2 = 2/3$ і показник заломлення водного середовища n ≈ 1,4. Відстань донор–акцептор оцінювали як:

$$r = R_0 \times [(1/E) - 1]^{1/6}.$$

2.4.3. Анізотропія флуоресценції. Картування концентраційної відповіді НМФ у системах ІНФ α-2b, ІНФАР 1 та ІНФ α-2b–ІНФАР 1 проводили на FluoroMax 4 Plus.

Кінцева концентрація білкового компонента становила 1 мкМ у 50 мМ Tris–HCl, pH 7,5; температура — 36 °C; кювета — 1 см. Титрантами були АМФ, ГМФ, ЦМФ і УМФ у кислотній або натрієвій формі, з D-M або без нього, до максимальної концентрації приблизно 10 мкМ. Загальні принципи флуоресцентної анізотропії та аналізу білок–нуклеїнова кислота відповідали методичним рекомендаціям [131]. Для вимірювань анізотропії використовували довжину хвилі збудження λex=295 нм та довжину хвилі реєстрації λem=337 нм. Час накопичення сигналу для кожної поляризаційної компоненти становив 1 с; кожне значення отримували як середнє з 5 послідовних вимірювань.

Для вертикально поляризованого збудження стаціонарну анізотропію визначають за чотирма каналами та G-фактором:

$$r = (I_{VV} - G \times I_{VH})/(I_{VV} + 2G \times I_{VH}).$$

Поправочний G-фактор, що враховує різну спектральну чутливість каналу реєстрації для вертикально та горизонтально поляризованого випромінювання, визначали за співвідношенням $G = I_{HV}/I_{HH}$.

Перед розрахунком анізотропії з кожної з чотирьох поляризаційних компонентів віднімали відповідний фоновий сигнал буферу та, за необхідності, сигнал розчину відповідного НМФ тієї самої концентрації за відсутності білка:

$$I_{corr}=I_{sample}-I_{blank}.$$

Після кожного додавання титранту розчин перемішували та витримували протягом 3 хв до реєстрації сигналу. Фактичні концентрації компонентів після кожного додавання перераховували з урахуванням зміни загального об’єму кювети.

Як титранти використовували АМФ, ГМФ, ЦМФ та УМФ у кислотній і натрієвій формах, а також відповідні системи в присутності D-манітолу (D-M). Для прямих концентраційних титрувань концентрацію НМФ підвищували від 0 до приблизно 10 мкМ. Концентрація білкового компонента в дослідах прямого зв’язування становила 1,0 мкМ.

Для розмежування прямого зв’язування НМФ з окремими білками, впливу попереднього утворення комплексу та ефекту порядку додавання компонентів використовували п’ять експериментальних схем.

Схема 1 — пряме титрування ІНФ α-2b нуклеотидом. Початкова концентрація ІНФ α-2b становила 1,0 мкМ. До білкового розчину послідовно додавали АМФ, ГМФ, ЦМФ або УМФ відповідної фармакофорної форми, збільшуючи кінцеву концентрацію НМФ від 0 до приблизно 10 мкМ. ІНФАР 1 у цій схемі не додавали. У дослідах із D-M:НМФ=1:2,5.

Схема 2 — пряме титрування ІНФАР 1 нуклеотидом. Концентрація ІНФАР 1 становила 1,0 мкМ. НМФ додавали послідовно до концентрації приблизно 10 мкМ за тією самою концентраційною серією. ІНФ α-2b у цій серії був відсутній. Для систем із D-M використовували ту саму схему його введення, що й у серіях з ІНФ α-2b.

Схема 3 — титрування ІНФАР 1 у попередньо сформований комплекс НМФ–ІНФ α-2b. ІНФ α-2b у концентрації 1,0 мкМ попередньо інкубували з обраним НМФ у фіксованій концентрації 10 мкМ протягом 15 хв за температури 37 °C. Після формування стану ІНФ α-2b–НМФ до системи послідовно додавали ІНФАР 1 у діапазоні кінцевих концентрацій 1 мкМ. При цьому концентрацію ІНФ α-2b та НМФ підтримували сталою з урахуванням розведення.

Оскільки при λ_{ex} = 295 нм власну флуоресценцію реєстрували як від ІНФ α-2b, так і від ІНФАР 1, експериментальний сигнал двобілкової системи розглядали як сумарний внесок обох білкових компонентів. Тому концентраційно залежне збільшення внеску ІНФАР 1 саме по собі не трактували як ознаку асоціації білків.

Для визначення фонового внеску титрованого рецептора проводили контрольне титрування ІНФАР 1 за тих самих концентрацій і об’ємів у буфері з 10 мкМ НМФ без ІНФ α-2b. Отриману залежність власного сигналу ІНФАР 1 від його концентрації використовували для корекції експериментальних кривих.

Схема 4 — титрування ІНФ α-2b у попередньо сформований комплекс НМФ–ІНФАР 1. ІНФАР 1 у концентрації 1,0 мкМ попередньо інкубували з НМФ у концентрації 10 мкМ.

Після цього послідовно додавали ІНФ α-2b. Такий експеримент використовували для оцінювання залежності концентраційної відповіді від порядку формування потрійної системи НМФ–ІНФ α-2b–ІНФАР 1.

Схема 5 — титрування попередньо сформованого комплексу ІНФ α-2b/ІНФАР 1 нуклеотидом. ІНФ α-2b та ІНФАР 1 попередньо змішували у співвідношенні 1:1; концентрації компонентів становили відповідно 1 мкМ. Після попередньої інкубації протягом 15 хв до білкового комплексу додавали НМФ, підвищуючи його концентрацію від 0 до приблизно 10 мкМ.

Оскільки ступінь асоціації ІНФ α-2b та ІНФАР 1 після попередньої інкубації незалежно не визначали, термін «попередньо сформований комплекс» у цьому протоколі не використовували як доказ кількісного утворення стехіометричного комплексу 1:1. Надалі цю систему позначали як попередньо інкубовану суміш ІНФ α-2b/ІНФАР 1.

Для кожної з п’яти схем реєстрували концентраційну залежність анізотропії (r = f(C)). Для коректного порівняння систем із різним порядком додавання реагентів концентрації, наведені для кожної експериментальної точки, відповідали фактичним кінцевим концентраціям компонентів у кюветі після внесення чергової аліквоти титранту, а не номінальним концентраціям доданого розчину.

Основною описовою кінцевою точкою було відносне зменшення сигналу від першої до останньої точки:

$$\Delta r_{кінц} = 100 \times (r_0 - r_{10})/|r_0|.$$

Найпростіша механістична модель передбачала один ліганд-еквівалентний перехід, який спостерігається на макромолекулі за загальної концентрації [P]T = 1 мкМ.

Для опису концентраційної залежності флуоресцентної анізотропії враховували можливу відмінність молярної флуоресцентної яскравості вільного та зв’язаного станів білка. Спрощене рівняння:

$$r_{obs} = r_f + (r_b - r_f) \times f_b,$$

є коректним лише за умови, що флуоресцентна яскравість вільної та зв’язаної форм однакова або її зміною при зв’язуванні можна знехтувати.

Оскільки взаємодія досліджуваних нуклеотидів із білком супроводжувалася зміною інтенсивності власної флуоресценції, спостережувану анізотропію доцільно описувати як величину, зважену за внеском кожної форми у сумарну інтенсивність:

$$r_{obs}= (r_f \times I_f + r_b \times I_b)/(I_f + I_b),$$

де r_f і r_b — анізотропія відповідно вільної та зв'язаної форм білка, а I_f та I_b — їх внески у сумарну інтенсивність флуоресценції.

Якщо f_b — молярна частка зв'язаного білка, а відносну молярну флуоресцентну яскравість зв'язаної форми порівняно з вільною позначити як $\alpha=B_b/B_f$, де B_f та B_b — молярні флуоресцентні яскравості вільної та зв'язаної форм, тоді

$$I_f \propto (1-f_b)\times B_f,\ I_b \propto f_b \times B_b.$$

У такому разі рівняння для спостережуваної анізотропії набуває вигляду:

$$r_{obs} = (r_f \times (1-f_b) + \alpha \times r_b \times f_b) / ((1-f_b) + \alpha \times f_b).$$

Еквівалентна форма:

$$r_{obs} = r_f + (r_b - r_f) \times (\alpha \times f_b / (1-f_b+\alpha \times f_b)).$$

Таким чином, експериментально спостережувана зміна анізотропії визначається не безпосередньо молярною часткою зв'язаного білка, а часткою сумарної флуоресценції, що походить від зв'язаного стану:

$$f_b^{(F)} = \alpha \times f_b / (1-f_b+\alpha \times f_b).$$

При $\alpha=1$, тобто за однакової флуоресцентної яскравості вільного та зв'язаного станів, рівняння переходить у спрощену форму:

$$r_{obs} = r_f + (r_b - r_f)\ f_b.$$

Параметр α можна визначати як відношення інтенсивності флуоресценції зв'язаної та вільної форм. Якщо за максимальної концентрації ліганду досягається або наближено досягається насичення зв'язування, використовують оцінку $\alpha \approx F_{sat}/F_0$, де F_0 — інтенсивність флуоресценції білка за відсутності ліганду, а F_{sat} — інтенсивність за насичувальної концентрації ліганду.

Перед визначенням α інтенсивності необхідно скоригувати її на фоновий сигнал та, за потреби, на ефект внутрішнього фільтра.

Для моделі зв’язування 1:1 частку зв’язаного білка розраховували з урахуванням матеріального балансу:

$$f_b = \frac{[P]_T + [L]_T + K_d - \sqrt{([P]_T + [L]_T + K_d)^2 - 4 \times [P]_T \times [L]_T}}{2[P]_T},$$

де $[P]_T$ та $[L]_T$ — загальні концентрації білка і ліганду відповідно, а K_d — константа дисоціації.

Отримане значення fb використовували в інтенсивно-зваженому рівнянні анізотропії. Такий підхід дозволяє врахувати гасіння або посилення флуоресценції під час комплексоутворення та зменшити систематичне зміщення оцінених параметрів зв’язування, зокрема K_d.

Параметри підбору були r_f, r_b та K_d. Термін «спостережна» підкреслює умовний характер оцінки: виміряний сигнал може містити внески кількох флуоресцентних станів, концентрації відновлено з вихідних даних, а багатокомпонентні системи можуть не відповідати моделі єдиної мікроскопічної рівноваги. Нелінійний метод найменших квадратів було застосовано до K_d, обмеженого від 10^{-5} до 10^3 мкМ.

Для емпіричного опису концентраційної залежності сигналу використовували рівняння Хілла:

$$Y = Y_0 + {(Y_{max} - Y_0 \times [L]^{nM})}\Big/{(C_{50}^{nM} + [L]^{nM})},$$

де Y — експериментально виміряний сигнал, Y_0 — сигнал за відсутності титранту, Y_{max} — асимптотичне значення сигналу, nH — параметр форми кривої Хілла, а C_{50} — концентрація титранту, за якої підібрана моделлю амплітуда зміни сигналу досягає 50 %:

$$Y_{C50} = Y_0 + (Y_{max} - Y_0)/2.$$

Таким чином, C_{50} розглядали як спостережуваний параметр концентраційної відповіді, а не як безпосередню термодинамічну константу дисоціації K_d. Таке позначення є особливо важливим для багатокомпонентних систем і схем із послідовним додаванням реагентів, у яких концентраційна відповідь може залежати від попереднього стану системи.

У рівнянні Хілла [L] означала фактичну кінцеву концентрацію компонента, який змінювали в межах відповідної серії титрування, після врахування розведення в кюветі. Відповідно: у схемі титрування ІНФ α-2b нуклеотидом [L] відповідала кінцевій концентрації НМФ; у схемі титрування ІНФАР 1 нуклеотидом [L] відповідала кінцевій концентрації НМФ; у схемі, де до попередньо сформованої системи ІНФ α-2b–НМФ додавали ІНФАР 1, [L] відповідала кінцевій концентрації ІНФАР 1; у схемі, де до попередньо сформованої системи ІНФАР 1–НМФ додавали ІНФ α-2b, [L] відповідала кінцевій концентрації ІНФ α-2b; у схемі титрування попередньо сформованого комплексу ІНФ α-2b–ІНФАР 1 нуклеотидом [L] відповідала кінцевій концентрації НМФ.

Параметр nH використовували виключно як емпіричний показник форми та крутизни концентраційної залежності. Під час апроксимації його обмежували інтервалом 0,1–8,0. Значення nH не інтерпретували як число сайтів зв’язування або безпосередній доказ кооперативності, оскільки для систем із власною флуоресценцією білка на форму концентраційної залежності можуть впливати гетерогенність флуоресцентної відповіді, конформаційні переходи, зміна квантового виходу, багатокомпонентне комплексоутворення та порядок додавання реагентів.

Для порівняння якості апроксимації експериментальних кривих моделлю зв’язування 1:1 та рівнянням Хілла використовували скоригований інформаційний критерій Акаїке (AICc). Обидві моделі апроксимували до одного й того самого набору (N) незалежних експериментальних точок із застосуванням однакового способу зважування.

За припущення незалежних нормально розподілених залишків з однаковою дисперсією AICc розраховували з величини суми квадратів залишків (RSS):

$$AICc=-2\ln L+2k+(2k\times(k+1))/(N-k-1),$$

де (N) — кількість незалежних експериментальних точок, використаних для апроксимації; L — максимізована функція правдоподібності за тією самою моделлю дисперсії для обох варіантів; (k) — загальна кількість параметрів, оцінених із цього самого набору даних. Для моделі 1:1 кількість вільних параметрів становила (k=3): F_0,

ΔF_{max}, K_d. Для моделі Хілла (k=4): F_0, ΔFmax, C_{50}, n_H. Різницю інформаційних критеріїв визначали як $\Delta AICc = AIC_{cHill} - AIC_{c1:1}$.

За ΔAICc < -2 кращу підтримку даними вважали такою, що має модель Хілла, тоді як за ΔAICc > +2 перевагу надавали моделі 1:1. Значення -2 ≤ ΔAICc ≤ +2 розглядали як недостатні для однозначного вибору між моделями.

Значення K_d і C_{50} трактували як спостережні характеристики складеної відповіді, оскільки власна флуоресценція може об'єднувати внески кількох емісійних станів, а порядок складання компонентів змінює спостережуваний сигнал. Адекватність моделі оцінювали за допомогою RSS, R^2, скоригованого R^2, скоригованого для малої вибірки інформаційного критерію Акаїке (AICc), ΔAICc та ваг Акаїке.

Однокрокова модель Адаїра була записана як

$$\theta = K_1[L]/(1 + K_1[L]) = [L]/(K_d + [L]),$$

а спостережувана анізотропна реакція як

$$r([L]) = r_0 + \Delta r \cdot \theta.$$

Адаїр-1 математично еквівалентний одновузловій ізотермі Ленгмюра і тому слугує економною опорною моделлю.

Для опису двох послідовних стадій зв'язування ліганду використовували двостадійну модель Адаїра. Поліном зв'язування задавали як

$$Q = 1 + K_1 \times [L] + K_1 \times K_2 \times [L]^2,$$

де [L] — концентрація вільного ліганду, а K_1 і K_2 — послідовні макроскопічні константи асоціації для першої та другої стадій зв'язування відповідно. Фракційні популяції становили:

$$f_0 = 1/Q,\ f_1 = (K_1 \times [L])/Q \text{ та } f_2 = (K_1 \times K_2 \times [L]^2)/Q,$$

причому $f_0+f_1+f_2=1$, а відгук становив $r([L]) = r_0 + \Delta r_1 f_1 + \Delta r_2 f_2$. Відповідні ступінчасті макроскопічні константи дисоціації визначали як $K_{d,1}^{macro} = 1/K_1$ та $K_{d,2}^{macro} = 1/K_2$.

Два нееквівалентні, але незалежні класи сайтів були представлені як

$$r([L]) = r_0 + \Delta rA \times [L]/(K_{d,A} + [L]) + \Delta rB \times [L]/(K_{d,B} + [L]).$$

Оскільки мітки сайтів є взаємозамінними, підібрані рішення були впорядковані за Kd після оптимізації. Розділення $K_{d,A}$ та $K_{d,B}$ було прийнято лише тоді, коли обидві

амплітуди та обидві константи можна було оцінити в межах експериментального вікна концентрацій.

Для перевірки гіпотези про послідовно індуковану конформаційну перебудову використовували ефективну модель, засновану на принципах Koshland–Némethy–Filmer (KNF). На відміну від двостадійної моделі Адаїра, ця модель передбачала, що перше зв'язування ліганду може переводити однолігандний комплекс у спектроскопічно відмінний конформаційний стан, який характеризується зміненою спорідненістю до наступної молекули ліганду.

Схему моделі задавали як

$$P+L \rightleftharpoons PL,\ PL \rightleftharpoons P\times L,\ P\times L+L \rightleftharpoons P\times L_2,$$

де P — вихідний стан білка, PL — первинний однолігандний комплекс, P×L— конформаційно перебудований однолігандний стан, а P×L2 — стан після зв'язування другої молекули ліганду.

Для першої стадії зв'язування використовували ефективну константу $K_{d,1}=K_{d,intr}$, а для другої — $K_{d,2}=K_{d,intr}/\alpha$, де α характеризує зміну ефективної спорідненості після конформаційної перебудови.

Конформаційну рівновагу між станами PL і P*L описували безрозмірною константою Kc=[P*L]/[PL]. Якщо x=[L]/$K_{d,intr}$, поліном станів для цієї моделі набував вигляду

$$Q= 1+x+K\times cx+\alpha\times K\times cx^2.$$

Фракційні популяції окремих станів становили $f_P=1/Q$, $f_{PL}=x/Q$, $f_{P*L}=K_c\times x/Q$, $f_P\times L_2= \alpha\times Kc\times x^2/Q$. Спостережувану анізотропію описували як сумарний внесок усіх станів:

$$r([L])= r_P\times f_P+ r_{PL}\times f_{PL}+ r_{P\times L}\times f_{P\times L}+ r_{P\times L2}\times f_{P\times L2}.$$

Для використаної KNF-inspired рівноважної схеми конформаційна рівновага між однолігандними станами задавалася співвідношенням [P×L]/[PL]=Kc. За цієї умови популяції PL і \P×L не є незалежно ідентифікованими з однієї рівноважної кривої. Відповідний поліном станів

$Q=1+(1+K_c\times[L])/K_{d,intr}+(\alpha\times Kc\times[L]^2)/K_{d,intr}^2$ може бути перепараметризований у двоступеневу форму Адаїра.

Отже, окремі параметри K_c, $K_{d,intr}$ та α не можуть бути однозначно визначені лише з форми однієї рівноважної залежності; експериментально ідентифікованими є лише їх комбінації, еквівалентні макроскопічним параметрам моделі Адаїра.

Таким чином, одна рівноважна флуоресцентна або анізотропна крива не дозволяє окремо розділити внески PL та P×L і сама по собі не може слугувати доказом KNF-подібного конформаційного механізму. У подальшому KNF параметризацію розглядали лише як альтернативне математичне представлення двоступеневого зв’язування. Механістичні висновки щодо послідовного конформаційного переходу на підставі переваги цієї параметризації за AICc не робили.

Модель MWC передбачала рівновагу між конформаціями T та R із низькою та високою спорідненістю, що характеризується $L_0 = [T_0]/[R_0]$, а також конформаційно-специфічними константами дисоціації KT і KR. Для двох еквівалентних сайтів поліном зв'язування становив $Q = (1 + [L]/K_R)^2 + L_0(1 + [L]/K_T)^2$;

середню зайнятість і реакцію анізотропії розраховували з відповідних ліганд-зв'язаних термінів. Коефіцієнт зв'язування $c = K_R/K_T$ описує переважне зв'язування ліганду зі станом R або T.

2.4.4. Термостійкість і агрегаційний відгук ІНФ α-2b. Термофлуоресцентні вимірювання проводили для ІНФ α-2b у концентрації 1 мкМ без ліганда та за наявності 10 мкМ кислотних або динатрієвих форм НМФ або ОРН. Спектри емісії реєстрували на JASCO FP-8200 у діапазоні 310–450 нм із кроком 1 нм за температури 20–80 °C із кроком 1 °C. Для кожної температури визначали максимальну інтенсивність і положення максимуму; траєкторію інтенсивності нормалізували до значення при 20 °C. Загальні принципи флуоресцентного моніторингу стабільності білків було викладено в огляді [118].

Послідовні перші різниці розраховували за температурної сітки 1 °C. Щоб виключити низькотемпературні коливання, пошук характерної точки основного переходу обмежили температурою від 56 °C. До цієї точки та двох сусідніх точок підбирали квадратичний поліном; координату вершини позначали Тплав. – спостережна температура.

Агрегаційну відповідь білкових систем додатково оцінювали за зміною флуоресценції тіофлавіну Т (ThT). Кінцева концентрація ThT у вимірювальній суміші становила 1 мкМ. Флуоресценцію збуджували при λex = 420 нм, а емісію реєстрували при λem = 450 нм. Ширина щілин збудження та емісії становила відповідно по 5 нм.

Білкові зразки інкубували за температури 80 °C протягом 3 год у присутності відповідного НМФ або його натрієвої форми, з D-манітолом чи без нього. Концентрації білка, НМФ і D-манітолу становили відповідно 1 мкМ, 10 мкМ та 10 мкМ. D-манітол досліджували також як окрему експериментальну умову для відокремлення його власного впливу на термічно індуковані зміни білка від ефекту комплексних композицій.

Порядок додавання компонентів був однаковим для всіх серій: спочатку до білкового розчину додавали попередньо приготовлену композицію НМФ–D-манітол, після чого зразки інкубували. ThT додавали після завершення інкубації до кінцевої концентрації 1 мкМ. Після внесення ThT зразки додатково витримували протягом 30 хв перед реєстрацією флуоресценції.

Для кожної експериментальної умови паралельно реєстрували оптичний бланк, що містив усі відповідні компоненти, включаючи ThT, НМФ і D-манітол, але не містив білка. Це дозволяло врахувати власну флуоресценцію компонентів, можливі зміни поглинання, внутрішньофільтрові ефекти, а також прямий вплив досліджуваних сполук на квантовий вихід або зв’язування ThT.

Фоново скоригований сигнал визначали як

$$F_{скор}=F_{зразка}-F_{фон},$$

де $F_{зразка}$— інтенсивність флуоресценції повної досліджуваної системи, а $F_{фон}$— сигнал відповідного оптичного бланка без білка.

Для порівняння між експериментальними серіями сигнал нормалізували до відповідного білкового контролю:

$$F_{норм}=(F_{зразка}-F_{фон,зразка})/(F_{контроль}-F_{фон,контроль}),$$

де $F_{контроль}$— сигнал контрольного білкового зразка, проведеного за тих самих температурних і часових умов, але без досліджуваного ліганду або композиції. Для

графічного подання значення контрольного зразка приймали за 1,0 або 100 %, а результати експериментальних систем виражали як відносну флуоресценцію ThT.

Кожну експериментальну умову досліджували у 5 незалежних експериментах, кожен з яких включав 3 повтори. Результати подавали як середнє значення ± SD.

Збільшення флуоресценції ThT інтерпретували як ознаку формування структур із підвищеною здатністю зв'язувати ThT, а не як самодостатній доказ утворення амілоїдних фібрил. З огляду на можливу неспецифічну взаємодію ThT з агрегованими та частково впорядкованими білковими структурами, амілоїдну природу агрегатів не встановлювали категорично за відсутності незалежної морфологічної або структурної валідації [102,119].

2.4.5. Спектроскопія кругового дихроїзму. Спектри КД реєстрували на спектрополяриметрах JASCO J-810/J-815 у далекій УФ-ділянці. Перед вимірюванням оптичну систему продували азотом протягом 10 хв за тиску 40 psi; витрата газу становила приблизно 450 л·год$^{-1}$. Температуру кюветного відділення підтримували на рівні 37 °C за допомогою елемента Пельтьє. Використовували кварцові кювети Hellma-Axiom з довжиною оптичного шляху 10 мм та об'ємом 2 мл. Діапазон сканування становив 260–195 нм, кількість проходів — 2, час накопичення — 2 с; у відповідній серії швидкість сканування становила 100 нм·хв$^{-1}$. Якість КД-вимірювань і необхідність контролю високої напруги фотопомножувача оцінювали відповідно до загальних рекомендацій [100, 101]. Для кожного складу розчину реєстрували відповідний буферний контроль за тих самих параметрів приладу та в тій самій кюветі; його спектр віднімали від спектра білкового зразка. Якість вихідних спектрів оцінювали до проведення деконволюції за НТ-профілем, спектральним шумом, відтворюваністю повторних сканів і поведінкою буферного контролю.

Концентрацію зразків перевіряли спектрофотометрично. Від спектра білок–ліганд віднімали спектр відповідного буфера з тією самою концентрацією ліганда або композиції ліганд–D-M. КД-сигнал нормалізували до середньої залишкової еліптичності:

$$[\Theta]_{\mathrm{MRE}} = \Theta_{\mathrm{obs}} /(10\times c\times l\times Nr),$$

де Θ_{obs} — еліптичність у m(deg), c — молярна концентрація білка, l — довжина оптичного шляху в сантиметрах, Nr — кількість амінокислотних залишків. Для титрацій еліптичність у вибраній ділянці, зокрема близько 223 нм, використовували як змінну відгуку та аналізували за квадратною або гіперболічною моделлю зв'язування.

Вміст компонентів вторинної структури оцінювали незалежно кількома алгоритмами: BeStSel [104], K2D3 [105], CAPITO [106] та CDNN [107]. Порівнювали не лише абсолютні частки α-спіралей, β-структур, поворотів і невпорядкованих ділянок, а й напрям їхніх змін порівняно з контрольним ІНФ α-2b. Розбіжності між алгоритмами враховували як компонент методичної невизначеності; категоричних висновків про відсутність певного типу β-структури за одним алгоритмом не робили.

Кожну КД-умову реєстрували щонайменше 3 рази. Для контролю можливого впливу pH окремо титрували 2 мл 50 мМ Tris–HCl тими самими об'ємами препаратів, що й у білковій серії, та реєстрували зміну pH. Це давало змогу відокремити спрямовану конформаційну відповідь від простого зсуву кислотності середовища.

Фіксовану концентрацію білка титрували зі збільшенням загальної концентрації ліганду, а еліптичність при 223 нм використовували як змінну відгуку. Оскільки концентрація білка була співмірною з очікуваними значеннями K_d або перевищувала їх, концентрацію вільного ліганду не прирівнювали до його загальної концентрації. Аналіз виконували з урахуванням матеріального балансу для комплексу зі стехіометрією 1:1: P+L⇌ PL. Для цієї рівноваги K_d=[P]×[L]/[PL]. За відомих загальних концентрацій білка P_T і ліганду L_T концентрацію комплексу розраховували за квадратичним рівнянням:.

$$[PL]=((P_T+L_T+K_d)[PL] = ((P_T + L_T + K_d) - \frac{\sqrt{(P_T+L_T+K_d)^2-4P_T\times L_T}}{2},$$

Частку білка у зв'язаному стані визначали як fb=[PL]/P_T. Відповідно, концентраційну залежність КД-сигналу при 223 нм апроксимували рівнянням:

$$\theta_{obs} = \theta_0 + \Delta\theta_{max} \times \left(P_T + L_T + K_d - \frac{\sqrt{(P_T + L_T + K_d)^2 - 4P_T \times L_T}}{2 \times P_T} \right),$$

де θ_{obs} — спостережувана еліптичність при 223 нм, θ_0 — еліптичність білка за відсутності ліганду, $\Delta\theta_{max}$— максимальна зміна КД-сигналу, що відповідає переходу

білка у зв’язаний стан, P_T — загальна концентрація білка, L_T— загальна концентрація ліганду після врахування розведення, а K_d — константа дисоціації комплексу 1:1.

Нелінійну регресію виконували з використанням фактичних кінцевих концентрацій білка та ліганду в кожній точці титрування з урахуванням зміни об’єму після додавання титранту. Параметри K_d і $\Delta\theta_{max}$ визначали безпосередньо під час апроксимації; θ_0 фіксували за експериментальним значенням контрольного білка. Константи асоціації були розраховані як Ka = $1/K_d$ після перетворення K_d на молярні одиниці. Стандартні вільні енергії Гіббса були перераховані за температури 310 K з використанням $\Delta G° = -R \times T \times \ln(K_a)$, де R = 8,314462618 Дж·моль$^{-1}$·K^{-1}.

2.4.6. Інфрачервона спектроскопія та MCR-ALS. Інфрачервоні спектри реєстрували на Thermo Scientific Nicolet iS50 у режимі пропускання. Краплю розчину вимірювали на вікні ZnSe товщиною зразка приблизно 0,025 мм. Для кожного зразка накопичували 32 скани в діапазоні 4000–720 см$^{-1}$; робоча спектральна роздільна здатність становила 4 см$^{-1}$, а крок цифрового подання — 1 см$^{-1}$. Температуру рідких зразків перед нанесенням підтримували на рівні 37 ± 0,2 °C. Призначення смуг бічних груп і амідної ділянки виконували з урахуванням оглядових даних [112, 115].

Для аналізу білкової конформації порівнювали спектри ІНФ α-2b, ліганда та системи ІНФ α-2b–ліганд–D-M у діапазоні 1500–1750 см$^{-1}$. Незалежні спектри лігандів використовували для контролю прямого перекриття зі смугами аміду I та II. Відносні внески α-спіралей, β-структур, поворотів і невпорядкованих компонентів оцінювали за деконволюцією амідної ділянки; результати інтерпретували разом із КД, оскільки обидва методи мають різну чутливість до води, бічних груп і до вибору математичної моделі.

Вихідні сполуки та D-манітол готували у вигляді розчинів і об'єднували у вигляді сумішей для контролю кінцевих точок. У MCR використовувалися номінальні внески нуклеотидів/РНК 0, 15, 35, 50, 65, 75, 85 та 100%.

Матрицю серії композицій D було представлено як $D = CS^T + E$, де C містить розділені профілі композицій, S^T — спектральні навантаження, а E — матриця залишків. Використовували графічний інтерфейс MCR-ALS 2.0 у MATLAB із трьома

компонентами, обмеженнями ненегативності та унімодальності, обмеженими 800–1800 $см^{-1}$. Два компоненти пов’язували зі спектрами вихідних нуклеотидів/РНК та D-манітолу, а третій — зі змінами, зумовленими їхньою взаємодією.

2.5. Термодинамічні методи дослідження

2.5.1. Ізотермічна титраційна калориметрія. Термодинамічні параметри взаємодії ІНФ α-2b з лігандами визначали на ITC Nano.

Білок попередньо діалізували проти 50 мМ Tris–HCl, pH 7,5; той самий буфер використовували у комірці порівняння та для приготування титранту. Ліганд 120 мкМ додавали до розчину білка 1 мкМ серією з 25 ін’єкцій по 2 мкл з інтервалом 300 с у комірку 600 мкл за температури 37 °C, зі швидкістю перемішування 200 об/хв. Для кожної серії проводили контрольне титрування ліганда в буфері та віднімали теплоту розведення. Враховували поправку на зміну об’єму, кількість повторів і оцінку $c=n[P]/K_d$. Загальний підхід відповідав принципам кількісного ITC-аналізу [16-21, 116]. Схему досліду наведено у Додатку Б (рис. Б.5).

Після інтегрування піків тепловий ефект нормалізували за кількістю молів введеного ліганда. Вимірюючи зміни у виділенні або поглинанні тепла під час процесу зв'язування, вираховували термодинамічні параметри реакції взаємодії (зміни ентальпії, вільної енергії Гіббса та ентропії). Для визначення цих параметрів реакції використовують наступне рівняння:

$$\frac{dQ}{dn_L}(Z) = \frac{1}{2}\Delta H_b \left[1 + \left(1 - \frac{[L]}{n[M]} - \frac{1}{nK_b[M]}\right)\left(\left(1 + \frac{[L]}{n[M]} + \frac{1}{nK_b[M]}\right)^2 - \frac{4[L]}{n[M]}\right)^{-\frac{1}{2}}\right]$$

де графік зміни тепла (dQ/dnL) виступає як функція концентрації (Z = [L]/[M], де [L] і [M] – молярні концентрації ліганду та макромолекули відповідно). У цьому рівнянні невідомими параметрами є ΔH [кДж·$моль^{-1}$], Kb [$М^{-1}$] і n, які являють собою зв'язувальну ентальпію (енергію, що бере участь у процесах асоціації), константу зв'язування (афінність, спорідненість між двома сполуками) і реакційну стехіометрію відповідно. Ізотерму як функцію молярного співвідношення Z = [L]/[M]

апроксимували моделлю з одним набором ідентичних сайтів (MNIS) у NanoAnalyze. Параметрами фітування були стехіометрія n, константа зв'язування Kb та молярна ентальпія ΔH. Вільну енергію й ентропійний внесок обчислювали:

$$\Delta G^\circ = -R \times T \times \ln(K_b)\,;\ \Delta S^\circ = (\Delta H - \Delta G^\circ)/T.$$

Ентальпію, вільну енергію та ентропію подавали відповідно у кДж·моль, кДж·моль та Дж·моль·К. Знак ΔH інтерпретували як сумарний тепловий баланс зв'язування, десольватації, іонізації буфера, перерозподілу протиіонів і конформаційних змін; його не використовували як прямий доказ одного типу нековалентного контакту.

2.5.2. Одноразова інжекційна калориметрія та спостережна теплова релаксація. Для порівняння теплової відповіді нуклеотидів у середовищах різної складності використовували одноразову інжекційну калориметрію. Лігандна панель включала кислотні й динатрієві форми АМФ, ГМФ, ЦМФ та УМФ; кислотні й натрієві форми ОРН аналізували як дослідницьку серію. Середовищами були 50 мМ Tris–HCl, pH 7,5; альбумін 60 мг·мл$^{-1}$ у PBS; зразок плазми «група III». Експериментальну матрицю наведено у додатку (рис. Б.6).

У кожному вимірюванні 50 мкл 50 мкМ ліганда вводили до 600 мкл середовища в ITC Nano за 37 °C і зі швидкістю перемішування 200 об·хв$^{-1}$. Крок збору даних становив 1 с, загальна тривалість запису — 4000 с. Для кожної траєкторії визначали початковий рівень $P_{initial}$, екстремальну амплітуду $|P_{max}|$, час максимуму tmax, часи відновлення $t_{1/2}$, t_{90} і t_{95}, початковий нахил dP/dt та інтегровану площу Q. Робочий процес подано у додатку (рис. Б.7).

Видиму константу релаксації обчислювали як $k = \ln(2/t_{1/2})$. Ділянку після ін'єкції за наявності моноекспоненційної релаксації описували:

$$P(t) = P\infty + A \times \exp[-k \times (t - t_0)].$$

Якщо залишки та AICc свідчили про дві розділені фази, використовували обмежену двоекспоненційну модель

$$P(t) = P\infty + A_1 \times \exp[-k_1 \times (t - t_0)] + A_2 \times \exp[-k_2 \times (t - t_0)].$$

Двоекспоненційну модель приймали лише за фізично правдоподібних амплітуд, достатнього розділення k_1/k_2 та відтворюваності. Профілі, які не піддавалися стійкому фітуванню, класифікували як неекспоненційні або багатофазні. Методологічну відмінність між терморелаксацією та кінетичним ITC враховували за підходами kinITC [117].

Дескриптори стандартизували як z-оцінки; асиметричні позитивні часові показники та логарифмували перед стандартизацією. Схожість умов візуалізували за допомогою ієрархічної кластеризації Варда, а взаємозв'язки — за допомогою коефіцієнтів Пірсона. Математично залежні параметри, наприклад, $t_{1/2}$ і k, не вважали доказами незалежності. Спостережуваний тепловий сигнал розглядали як суму змішування, розведення, іонізації, сольватації, макромолекулярних контактів і перебудови матриці (рис. Б.8), а не як пряму ентальпію зв'язування [15-21, 117].

2.6. Обрахункові методи дослідження

2.6.1. Молекулярний докінг. Тривимірні структури низькомолекулярних лігандів будували та попередньо оптимізували в Avogadro [138]. Після оптимізації геометрії структури імпортували її до UCSF Chimera 1.18 [132], перевіряли валентність і протонування та готували для подальшого використання в PyRx [133].

Для молекулярного докінгу ІНФ α-2b використовували повноатомну модель, що відповідала канонічній послідовності ІНФ A2, UniProt P01563. Модель AlphaFold Protein Structure Database мала accession AF-P01563-F1, version 6.

Експериментальну кристалографічну структуру ІНФ α-2b PDB 1RH2 [52] використовували як структурну референцію для перевірки загальної укладки білка, але не як безпосередню повноатомну структуру для аналізу ліганд-білкових контактів. Запис 1RH2 містить п'ять копій ІНФ α-2b (ланцюги A–E) і характеризується неповним атомним представленням бічних груп. Тому використання вихідних координат 1RH2 без реконструкції атомів для молекулярного докінгу було виключено.

Для ІНФАР 1 використовували модель AlphaFold Protein Structure Database AF-P17181-F1, version 6, що відповідає канонічній послідовності людського ІНФАР 1,

UniProt P17181. Повна послідовність ІНФАР 1 містить 557 амінокислотних залишків. Для докінгу використовували лише позаклітинну частину рецептора, залишки 1–436; трансмембранний сегмент 437–457 та цитоплазматичну ділянку 458–557 вилучали. Позаклітинна ділянка включала чотири фібронектиноподібні домени типу III: SD1 (32–126), SD2 (127–227), SD3 (231–329) та SD4 (331–432).

Модель комплексу ІНФ α-2b/ІНФАР 1 формували на основі експериментально визначеної просторової орієнтації компонентів у структурі комплексу типу I інтерферону з рецептором PDB 3SE3. У цій структурі ланцюг A відповідає ІНФАР 1, ланцюг B — ІНФ α-2b, а ланцюг C — ІНФАР 2. Оскільки ІНФ α-2b у 3SE3 містить три інженерні амінокислотні заміни, його координати безпосередньо як структуру досліджуваного ІНФ α-2b не використовували.

Для побудови комплексу повноатомну модель зрілого ІНФ α-2b (AF-P01563-F1) просторово суміщали з ланцюгом B структури 3SE3, а модель позаклітинного домену ІНФАР 1 (AF-P17181-F1, залишки 1–436) — з ланцюгом A. Після суміщення шаблонні ланцюги 3SE3, ІНФАР 2 та гетероатоми видаляли. Таким чином, 3SE3 використовували лише як експериментальний шаблон взаємної орієнтації ІНФ α-2b та ІНФАР 1, тоді як безпосередні докінгові розрахунки виконували для повноатомних моделей канонічних білкових послідовностей (Рис. Б.10).

Підготовка білків включала видалення сторонніх молекул води, іонів і кофакторів, додавання полярних атомів гідрогену, призначення атомних типів AutoDock і часткових зарядів Гастайгера. Для енергетичної підготовки білкових моделей використовували параметризацію ff14SB в AMBER14. Зону пошуку задавали прямокутною сіткою 60 × 60 × 60 Å.

Докінг виконували через PyRx/AutoDock Vina [137]. Для кожного комплексу аналізували ранжування орієнтацій, повторюваність локалізації та типи контактів. Візуалізацію здійснювали у BIOVIA Discovery Studio Visualizer [134]. Фіксували водневі зв’язки, сольові містки, електростатичні контакти, π–π- та катіон–π-взаємодії, а також гідрофобні контакти. Розраховану оцінку ΔGdock використовували порівняльно; абсолютні значення не прирівнювали до експериментальної ΔG°,

зважаючи на обмежену гнучкість рецептора, спрощений розчинник і похибки скорингових функцій [139].

2.6.2. Квантово-хімічний аналіз електронної структури. Об’єктами розрахунку були АМФ, ГМФ, ЦМФ і УМФ, їхні динатрієві форми, D-манітол та модельні комплекси НМФ–D-M.

Для оптимізованих структур визначали енергії ВЗМО і НВМО, енергетичну щілину $\Delta E_{gap} = E_{НВМО} - E_{ВЗМО}$, постійний дипольний момент μ, розподіл електронної густини та донорно-акцепторний параметр φ_0. Підхід до електронних дескрипторів узгоджували з попередніми роботами щодо π-електронної афінності нуклеотидних гетероциклів [81].

Квантово-хімічні розрахунки виконували методом теорії функціонала густини (DFT) у програмному пакеті Gaussian 09 Revision D.01 [135]. Оптимізацію геометрії проводили із застосуванням далекодіючого гібридного функціонала з дисперсійною поправкою ωB97X-D у базисному наборі 6-311G(d,p). Для кожної молекулярної форми задавали її фактичний сумарний заряд і спінову мультиплетність. Розрахунки проводили у газовій фазі. Оптимізовані геометрії перевіряли за допомогою розрахунку гармонічних коливальних частот. Структуру вважали локальним мінімумом на поверхні потенціальної енергії за умови завершеної оптимізації та відсутності у спектрі уявних частот. Електронні переходи розраховували методом часозалежної теорії функціонала густини (TD-DFT) на оптимізованих геометріях. Для кожного збудженого стану аналізували енергію переходу E, розраховану довжину хвилі λ, силу осцилятора f та основні внески молекулярних орбіталей у конфігурацію збудженого стану. Характер переходів визначали на основі складу відповідних молекулярних орбіталей і класифікували, зокрема, як переважно π–π* або n–π*.

Абсолютні значення розрахованих максимумів поглинання інтерпретували з урахуванням обмежень використаного рівня теорії та моделі середовища; основний акцент робили на порівнянні тенденцій між досліджуваними молекулярними формами. Для комплексів НМФ–D-M аналізували дві початкові конфігурації: K_1 — орієнтація поліолу до донорно-акцепторних центрів гетероциклічної основи; K_2 — переважний

контакт з гідроксильними групами рибозного фрагмента. Порівняльну енергію взаємодії визначали як $E_{bind} = E_{complex} - (E_{NMPs} + E_{mannitol})$. E_{bind} трактували як характеристику відносної стабільності модельних геометрій.

2.7. Статистичний аналіз і контроль якості моделей

Основні кількісні серії виконували у 10 незалежних повторностях, якщо інше не зазначено для конкретного методу. Для кожної групи розраховували середнє значення M, стандартне відхилення SD [129].

Нормальність перевіряли тестом Шапіро–Вілка, однорідність дисперсій — тестом Левена. Для перевірки параметричних припущень використовували однофакторний ANOVA з пост-хок тестом Тьюкі. За порушення нормальності або гомоскедастичності застосовували критерій Краскела–Уолліса з множинними порівняннями Данна та поправкою Бонферроні. Відмінності вважали статистично значущими за $p < 0,05$; для КД-серій із наперед визначеним суворішим порогом використовували $p < 0,01$. Узагальнену схему наведено у Додатку Б (рис. Б.9).

Узагальнення методологічного підходу

Методичну частину побудовано відповідно до центральної концепції дисертації — дослідження конформаційної мікромодуляції білків малими природними лігандами. Експериментальна логіка передбачала послідовну перевірку п’яти взаємопов’язаних рівнів: формування контакту білок–ліганд; зміни мікрооточення ароматичних флуорофорів і збудженого стану; перебудову конформаційного ансамблю білка; термодинамічний режим процесу; залежність відповіді від препаративної форми ліганда, наявності D-манітолу, білкового стану та складу середовища. Жодного окремого спектрального або розрахункового показника не розглядали як самодостатній доказ механізму; висновки формували на основі сукупності взаємодоповнювальних методів.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Спектроскопічна характеристика взаємодії ІНФ α-2b з нуклеотидними лігандами та їх впливу на структурно-функціональний стан білка

3.1.1. Визначення параметрів зв'язування ІНФ α-2b з оліго- та мононуклеотидами і їх комплексами з D-манітолом методом флуоресцентної спектроскопії прямою нелінійною апроксимацією.

Раніше нами було показано, що взаємодія ОРН із білками супроводжується зміною їхнього конформаційного стану [87]. Власна триптофанова флуоресценція є чутливим, але неспецифічним індикатором змін мікрооточення ароматичних залишків ІНФ α-2b [130]. Тому на першому етапі визначали вплив концентрації, форми препарату ОРН і D-манітолу на емісію ІНФ α-2b. За λex = 295 нм максимум емісії вільного білка спостерігали поблизу 336 нм; додавання досліджуваних лігандів спричиняло концентраційно-залежне гасіння сигналу.

Внутрішню флуоресценцію триптофану ІНФ α-2b контролювали під час титрування нативними та натрієвими формами нуклеотидів і олігорибонуклеотидів у присутності та відсутності D-манітолу. Ступінь гасіння флуоресценції розраховували як відносне зменшення інтенсивності випромінювання (%) порівняно з інтенсивністю випромінювання незв'язаного білка.

Значні відмінності в ефективності гасіння флуоресценції спостерігалися залежно від типу нуклеотидного ліганду та складу досліджуваної композиції. Для олігорибонуклеотидних систем ОРН та у композиції з D-манітолом ступінь гасіння становив відповідно 25 % і 28 %. Таким чином, присутність D-манітолу супроводжувалася помірним збільшенням амплітуди гасіння флуоресценції.

Цю різницю розглядали як зміну спектральної відповіді системи, а не як прямий доказ підвищення афінності зв'язування. Інтенсивність гасіння може залежати не лише від частки зв'язаного ліганду, але й від геометрії комплексу, локального оточення флуорофорів, доступності гасників, конформаційних змін білка та механізму

статичного або динамічного гасіння. Тому висновки щодо зміни афінності робили окремо на підставі параметрів зв'язування, отриманих із відповідних моделей. Для ГМФ та ГМФ у присутності D-манітолу гасіння становило 32% і 45% відповідно; ці значення також наведено в нашій попередній публікації [89]. Зареєстроване гасіння флуоресценції свідчить про зміну флуоресцентного відгуку білка під дією ліганду. ЦМФ та ЦМФ-D-M також призвели до суттєвого гасіння (38% та 42% відповідно), що свідчить про сильну взаємодію з ІНФ α-2b. На противагу цьому, АМФ та АМФ-D-M індукували помірне гасіння (15% та 21%), тоді як УМФ та УМФ-D-M показали найслабший ефект (13% та 14%) (рис. 3.1).

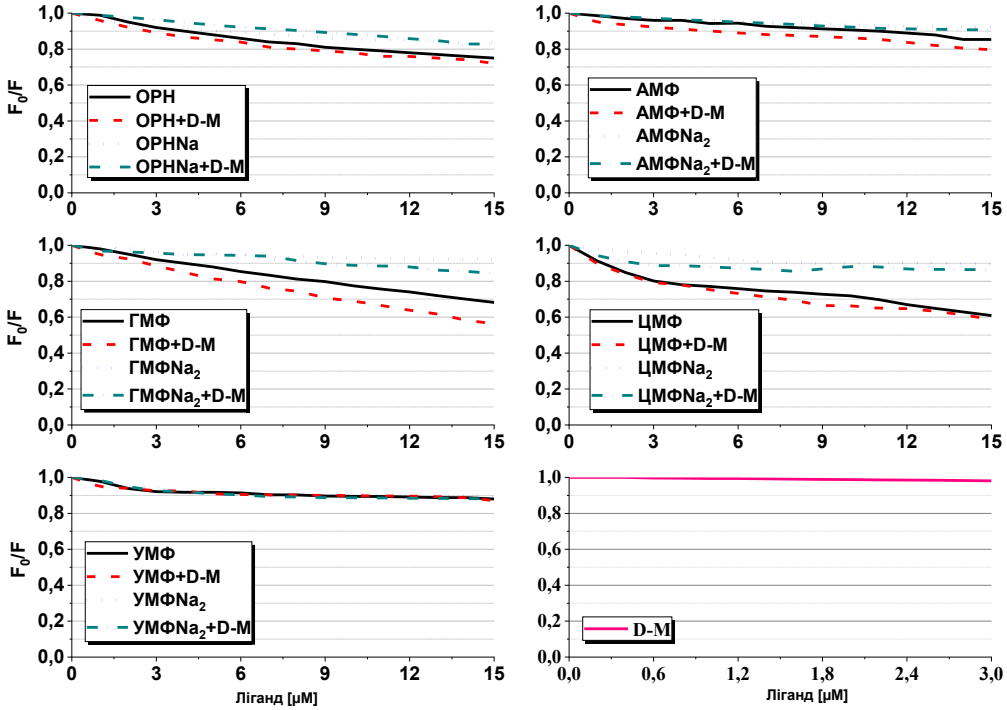


Рис. 3.1. Залежність інтенсивності власної флуоресценції ІНФ α-2b від концентрації різних форм НМФ.

Примітка. T = 37 °C; λ_{ex} = 295 нм; діапазон реєстрації 300–450 нм; концентрація ІНФ α-2b — 1 мкМ; 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5

Загалом, порядок ефективності гасіння для нативних лігандів був таким:

ЦМФ ≈ ГМФ > ОРН > АМФ > УМФ

Після додавання D-M тенденція дещо змістилася, причому похідні гуаніну демонстрували домінуючий ефект:

ГМФ-D-M > ЦМФ-D-M > ОРН-D-M > АМФ-D-M > УМФ-D-M

Ці результати узгоджуються з вищою спорідненістю зв'язування, визначеною раніше для пуринових нуклеотидів, зокрема лігандів, що містять гуанін.

Титрування натрієвими формами нуклеотидів загалом супроводжувалося меншим гасінням флуоресценції порівняно з відповідними кислотними формами. Для ОРН-Na та композиції ОРН-Na з D-манітолом гасіння становило 16 % і 17 % відповідно. Найменші ефекти серед наведених динатрієвих форм спостерігали для $АМФNa_2$ та $ГМФNa_2$ — по 8 %. У присутності D-манітолу гасіння для $АМФNa_2$ зростало до 10 %, тоді як для ГМФNa — до 16 %.

Для $ЦМФNa_2$ та композиції $ЦМФNa_2$ з D-манітолом ступінь гасіння становив відповідно 11 % і 18 %, а для $УМФNa_2$ та $УМФNa_2$ з D-манітолом — 11 % і 12 %. Таким чином, вплив D-манітолу на амплітуду флуоресцентної відповіді залежав від типу нуклеотиду і був найбільш вираженим для $ГМФNa_2$ та $ЦМФNa_2$.

Менша амплітуда гасіння для динатрієвих форм може бути сумісною зі зміною електростатичного внеску у взаємодію білок–ліганд, однак сама по собі не доводить механізм електростатичного екранування. Така інтерпретація потребує контролю іонної сили та порівняння з відповідними сольовими контролями. Аналогічно, збільшення гасіння у присутності D-манітолу слід розглядати як зміну спектральної відповіді системи, а не як прямий доказ компенсації електростатичного екранування або підвищення афінності зв’язування.

Додавання D-M послідовно збільшує гасіння флуоресценції, що вказує на посилене комплексоутворення та/або сильніше збурення мікрооточення триптофану. Відмінності гасіння сумісні з впливом іонного оточення, проте внесок електростатичного екранування окремо не визначено. Серед наведених умов найбільше гасіння флуоресценції спостерігали для ГМФ у поєднанні з D-манітолом.

Виражене гасіння, що спостерігається для ГМФ-D-M (45%), передбачає або просторову близькість між лігандом та залишками триптофану або конформаційні перебудови, що призводять до часткового екранування ароматичних залишків від розчинника.

Величина гасіння флуоресценції у поєднанні з визначеними константами зв’язування свідчить про взаємодію досліджуваних лігандів із білком, однак сама по

собі не дозволяє однозначно встановити статичний або динамічний механізм гасіння. З урахуванням змін часу життя флуоресценції, описаних у розділі 3.1.3, отримані результати доцільніше інтерпретувати як такі, що відповідають складному або змішаному механізму, в якому внесок комплексоутворення може поєднуватися з динамічними процесами деактивації збудженого стану.

Відмінності між нуклеотидами та їх натрієвими формами вказують на залежність флуоресцентної відповіді від хімічної природи ліганду та його іонного стану. Потенційний внесок електростатичних, водневих, гідрофобних або ароматичних взаємодій може розглядатися як механістична гіпотеза, але не встановлюється безпосередньо лише за даними гасіння флуоресценції.

Аналогічно, зміни амплітуди гасіння у композиціях із D-манітолом свідчать про зміну мікрооточення флуорофорів або характеру взаємодії компонентів системи, але не є самостійним доказом підвищення структурної комплементарності чи стабілізації комплексу білок–ліганд. Такі висновки потребують підтвердження незалежними структурними, термодинамічними або молекулярно-моделювальними методами. Підсумовуючи, аналіз гасіння флуоресценції підтверджує, що ІНФ α-2b проявляє селективну чутливість до нуклеотидної структури, природи основи та іонного стану, причому похідні гуаніну демонструють найсильніший конформаційний і спектроскопічний вплив на білок.

Під час цього дослідження ми розрахували константу зв’язування білків-лігандів за допомогою нелінійної регресійної залежності триптофанової флюоресценції білка від концентрації ліганду. Показано, що зміни в кривих гасіння інтенсивності флуоресценції ІНФ α-2b залежно від концентрації препаратів ОРН та їхніх комплексів з D-манітолом більш виражено проявляються у значеннях їхніх констант зв’язування.

Для комплексу ІНФ α-2b–ОРН-D-M (рис. 3.2) встановлено $K_d = 1{,}11 \pm 0{,}09$ мкМ, що свідчить про відносно високу афінність зв’язування. Нативна форма ОРН характеризується нижчою спорідненістю ($K_d = 2{,}36 \pm 0{,}47$ мкМ), тоді як натрієва форма (OPHNa) демонструє істотне зниження афінності ($K_d = 9{,}15 \pm 0{,}16$ мкМ). Аналогічна тенденція зберігається для OPHNa-D-M ($K_d = 8{,}13 \pm 0{,}46$ мкМ). Додавання D-M підвищує афінність, ймовірно, завдяки оптимізації гідрофобних або з ароматичними

залишками триптофану. Водночас присутність іонів Na^+ екранує електростатичні взаємодії, що призводить до зростання значень K_d (тобто до зниження спорідненості).

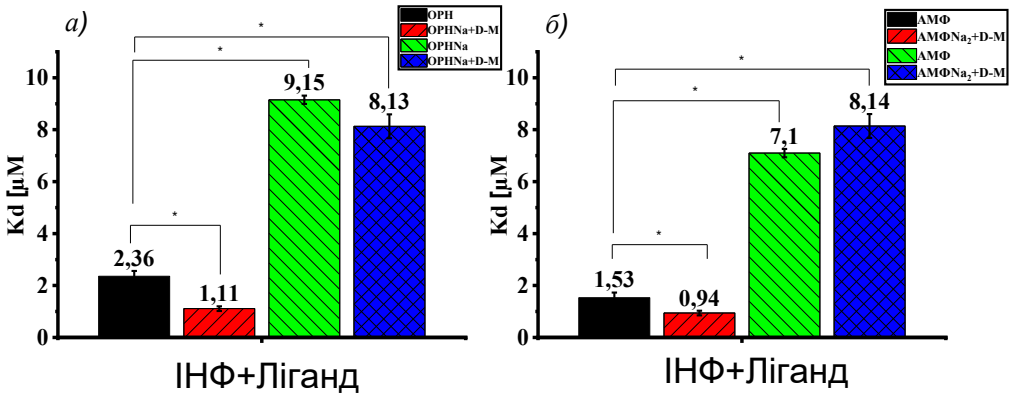


Рис. 3.2. Константи дисоціації (у мкМ) ІНФ α-2b з а) – олігорибонуклеотидами та б) АМФ

Примітка. * — статистично значуща відмінність порівняно з відповідним контролем, $p \leq 0,05$

Для комплексу ІНФ α-2b–АМФ у композиції з D-манітолом визначено $K_d = 0,94 \pm 0,19$ мкМ, тоді як для АМФ без D-манітолу цей показник становив $1,53 \pm 0,41$ мкМ. Отже, для кислотної форми АМФ присутність D-манітолу супроводжувалася суттєвим зменшенням K_d, що відповідає тенденції до підвищення афінності.

Перехід до натрієвої форми супроводжувався значно більшими значеннями K_d 7,10±0,19 мкМ для $АМФNa_2$ та 8,14±0,73 мкМ для композиції $АМФNa_2$ з D-манітолом. Таким чином, у випадку натрієвої форми додавання D-манітолу не призводило до підвищення афінності; навпаки, спостерігалося невелике чисельне збільшення K_d.

Найбільш вираженою закономірністю була різниця між кислотною та натрієвою формами АМФ. Значення K_d для $АМФNa_2$ було приблизно у 4,6 раза вищим, ніж для АМФ, а для композиції $АМФNa_2$ з D-манітолом — приблизно у 8,7 раза вищим, ніж для відповідної композиції кислотної форми. Це свідчить про істотну залежність параметрів зв'язування від та іонної форми препарату нуклеотиду.

Водночас ефект D-манітолу залежав від форми ліганду і не був односпрямованим: для АМФ K_d зменшувався приблизно на 39 %, тоді як для $АМФNa_2$ він збільшувався приблизно на 15 %. Тому D-манітол не слід характеризувати як

універсальний стабілізатор комплексу ІНФ α-2b–АМФ; коректніше говорити про залежний вплив композиції на параметри зв'язування.

Отримані результати вказують на найкращу взаємодію комплексу кислотної форми ОРН і D-манітолу з ІНФ α-2b. Ми бачимо, що за цими показниками взаємодія лігандів ОРН з ОРН-D-M ІНФ α-2b показує ту саму закономірність, яку ми виявили раніше в лінійці під час вивчення інфрачервоного поглинання сполук: ОРН+D-M>ОРН>ОРН-Na+D-M>ОРН-Na [155].

Отримані криві підтверджують наявність відтворюваного ліганд-залежного спектрального відгуку ІНФ α-2b. Водночас саме стаціонарне гасіння не є самодостатнім доказом одного механізму зв'язування, оскільки може містити внески внутрішнього фільтра, а також внески статичного й динамічного гасіння. Тому його зіставляли з часом життя флуоресценції, модельними значеннями K_d, калориметрією та структурними методами [130].

Можливе також перехоплення енергії електронного збудження триптофанових груп молекулами ОРН. Можна припустити утворення комплексів між ОРН та ІНФ α-2b і, нарешті, можливий варіант — зміна конформації макромолекул протеїну під час контакту з ОРН. Можна було припустити, що за такої взаємодії ОРН з ІНФ α-2b відбувається обмін протонами. При цьому найбільший обмін протонами відбувається у D-манітоловому комплексі кислої форми ОРН, а найменший — у сольовому комплексі ОРН; комплекс D-манітолу з ОРН сприяє цьому обміну.

У цьому дослідженні ми розрахували константу взаємодії білків-лігандів за допомогою параметричної нелінійної регресії залежності флуоресценції триптофану білка від концентрації ліганду. Для ЦМФ+D-M (рис.3.3) встановлено $K_d = 1{,}71 \pm 0{,}09$ мкМ, тоді як для ЦМФ — $2{,}5 \pm 0{,}2$ мкМ. Динатрієва форма (ЦМФNa_2) демонструє різке зниження афінності ($10{,}16 \pm 0{,}13$ мкМ), подібно до ЦМФNa_2+D-M ($9{,}13 \pm 0{,}44$ мкМ).

Цитидинові похідні мають помірну спорідненість до ІНФ α-2b. D-M-модифікація підвищує стабільність комплексу приблизно у 1,5 раза, що підтверджує універсальність позитивного ефекту цієї модифікації для піримідинових нуклеотидів.

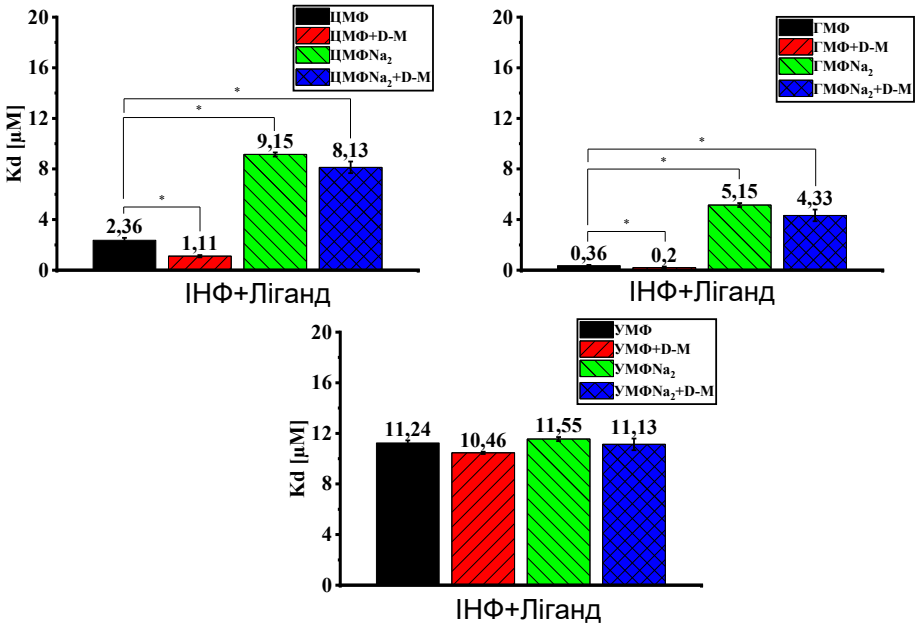


Рис. 3.3. Видимі константи взаємодії ІНФ α-2b з мононуклеотидами

Примітка. * — статистично значуща відмінність порівняно з відповідним контролем, $p \leq 0,05$

Найнижче значення K_d (найвища афінність) спостерігається для комплексу ІНФ α-2b–ГМФ+D-M (0,2 ± 0,03 мкМ). Для ГМФ без модифікації K_d становить 0,36 ± 0,06 мкМ. Натрієві форми (ГМФNa_2 та ГМФNa_2+D-M) демонструють істотне зниження афінності (5,15 ± 0,11 та 4,33 ± 0,35 мкМ відповідно). Гуанінові похідні проявляють найвищу спорідненість до ІНФ α-2b серед досліджених лігандів. Це може бути пов’язано з більшою площею ароматичної системи гуаніну та потенціалом для утворення додаткових водневих зв’язків. D-M-модифікація додатково стабілізує комплекс, тоді як екранування заряду натрієм суттєво послаблює електростатичний внесок.

З отриманих кривих гасіння ми вивели константи дисоціації як міру сили взаємодії між різними 5'-рибонуклеозидмонофосфатами та ІНФ α-2b (рис. 3.3). 5'-ЦМФ має приблизно в 4 рази вищу спорідненість до ІНФ α-2b, ніж 5'-ЦМФNa_2. Спорідненість 5'-ЦМФ дещо зростає за наявності D-манітолу. Співвідношення K_d 5'-ЦМФNa_2+D-M та 5'-ЦМФ+D-M дорівнює 5,3. 5'-ГМФ взаємодіє з ІНФ α-2b приблизно в 7 разів сильніше, ніж 5'-ЦМФ. Порівняння 5'-ГМФ з його динатрієвою сіллю показує, що гуанілова кислота має приблизно в 15 разів вищу спорідненість порівняно з 5'-

ГМФNa_2. У присутності D-манітолу спорідненість гуанілової кислоти до ІНФ α-2b зростає до 20 разів порівняно з її динатрієвою сіллю.

Для взаємодії ІНФ α-2b з УМФ визначено K_d = 5,36 ± 0,17 мкМ, тоді як у композиції УМФ з D-манітолом значення знижувалося до 4,11 ± 0,25 мкМ. Для динатрієвих форм отримано вищі значення K_d, 14,55 ± 0,18 мкМ для УМФNa_2 та 13,13 ± 0,52 мкМ для УМФNa_2 з D-манітолом. Таким чином, кислотні форми УМФ характеризувалися вищою афінністю до ІНФ α-2b порівняно з відповідними натрієвими формами. Присутність D-манітолу супроводжувалася помірним зниженням K_d, як для УМФ, так і для УМФNa_2.

Спостережуване гасіння флуоресценції білка є сумісним із його взаємодією з олігорибонуклеотидами, але саме по собі не доводить утворення специфічного комплексу чи зміни біологічної активності. Внесок внутрішнього фільтра мінімізували шляхом контролю A_{295} < 0,05 і відповідної корекції сигналу. Після цього зміни флуоресценції могли бути пов'язані зі зміною мікрооточення триптофанових залишків, конформаційними перебудовами білка або перенесенням енергії збудження.

Отримані результати щодо гасіння інтенсивності флуоресценції ІНФ α-2b при додаванні ОРН показують, що нуклеотидні ліганди в кислій формі, а особливо в комплексі з D-манітолом, сильніше зв'язуються з ІНФ α-2b порівняно з сольовими аналогами, що стало поштовхом для подальших досліджень.

3.1.2. Визначення параметрів зв'язування ІНФ α-2b з оліго- та мононуклеотидами і їх комплексами з D-манітолом методом флуоресцентної спектроскопії за лінеаризованими моделями. Значення K_d, наведені на рис. 3.2, отримані окремою прямою нелінійною апроксимацією концентраційної залежності гасіння флуоресценції та не використовувалися для міжсистемного порівняння з параметрами, визначеними за лінеаризованими моделями. Для порівняльного аналізу між білковими мішенями надалі використовували виключно $K_{d,SV}$.

Для зіставлення спорідненості АМФ до ІНФ α-2b, ІНФАР 1 та попередньо сформованого комплексу ІНФ α-2b–ІНФАР 1 використовували значення $K_{d,SV}$, отримані за однаковою моделлю апроксимації. Перехід до динатрієвої форми АМФ

супроводжувався істотним збільшенням K_d, тобто зменшенням спорідненості (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Константи дисоціації ІНФ α-2b, рецептора та комплексу з АМФ та D-M у мкМ

Ліганд	Білок	Kd_{sv}	K_d Lehrer	K_d Scatchard	K_d Klotz	K_d Hill	ΔG°зв'яз., ккал/моль
D-M	ІНФ	5,12±0,1*	7,40±0,1*	10,76±0,1*	8,60±0,1*	6,36±0,1*	-7,5±0,2*
АМФ		0,26±0,05	0,37±0,01	0,54±0,01	0,43±0,02	0,32±0,03	-9,3±0,3
АМФ+D-M		0,17±0,01*	0,2±0,05*	0,35±0,01*	0,28±0,01*	0,21±0,02*	-9,6±0,2*
$АМФNa_2$		2,12±0,1*	3,07±0,2*	4,47±0,1*	3,57±0,2*	2,64±0,1*	-8,0±0,2
$АМФNa_2$+D-M		2,06±0,2*	2,98±0,3*	4,33±0,2*	3,46±0,3*	2,56±0,1*	-8,0±0,2
D-M	ІНФАР 1	5,98±0,1*	8,64±0,2*	12,56±0,1*	10,04±0,2*	7,43±0,1*	-7,4±0,3*
АМФ		0,38±0,01	0,56±0,05	0,81±0,01	0,65±0,04	0,48±0,01	-9,0±0,2
АМФ+D-M		0,2±0,01*	0,3±0,04*	0,46±0,05*	0,37±0,04*	0,27±0,01*	-9,4±0,2*
$АМФNa_2$		2,52±0,1*	3,64±0,1*	5,30±0,1*	4,24±0,3*	3,13±0,2*	-7,8±0,2
$АМФNa_2$+D-M		2,25±0,1*	3,26±0,2*	4,73±0,2*	3,78±0,1*	2,80±0,3*	-7,9±0,1
D-M	ІНФ/ ІНФАР 1	6,07±0,1*	8,77±0,1*	12,75±0,2*	10,19±0,2*	7,54±0,2*	-7,4±0,1*
АМФ		0,18±0,01	0,26±0,02	0,38±0,05	0,30±0,01	0,22±0,01	-9,5±0,1
АМФ+D-M		0,14±0,01*	0,20±0,03	0,30±0,03*	0,24±0,01*	0,17±0,04*	-9,7±0,2*
$АМФNa_2$		1,87±0,2*	2,70±0,2*	3,93±0,2*	3,14±0,2*	2,32±0,1*	-8,1±0,4
$АМФNa_2$+D-M		1,98±0,1*	2,87±0,2*	4,17±0,1*	3,33±0,1*	2,46±0,3*	-8,1±0,1

Примітка. * Показано статистично значущу різницю порівняно з вільним 5′-рНМФ ($p \leq 0,05$, $n = 10$). Стандартну вільну енергію зв'язування (ΔG° зв'язування) розраховували за формулою ΔG° зв'язування = $RT \ln(K_dSV)$, де R – газова стала (1,987 кал·моль$^{-1}$·K^{-1}), T – 310 K, а K_d – у молярних одиницях.

Для вільного АМФ вони становили 0,32, 0,48 та 0,22 мкМ відповідно, що вказує на найнижче значення K_d для комплексу ІНФ α-2b/ІНФАР 1. У присутності D-манітолу значення знижувалися до 0,21, 0,27 та 0,17 мкМ відповідно.

Додавання D-манітолу мало виражений позитивний вплив на зв'язування АМФ із гетеродимером. У комплексі ІНФ α-2b/ІНФАР 1 у присутності D-манітолу K_d АМФ знизився до 0,14–0,20 мкМ (зниження на ≈30%). На окремих білках ефект був менш вираженим, але зберігав ту саму тенденцію. Таким чином, D-манітол діє як селективний підсилювач афінності до пуринових нуклеотидів, що може свідчити про стабілізацію конформації сайту зв'язування, сприятливої для аденінового кільця.

Термодинамічний аналіз показав, що АМФ має найсприятливіші параметри зв'язування серед усіх досліджених лігандів. Для вільного АМФ значення зв'язування ΔG° становило приблизно від -9,0 до -9,5 ккал/моль, тоді як для комплексу АМФ+D-M у системі ІНФ α-2b/ІНФАР 1 воно становило -9,7 ккал/моль. Ці значення вказують на високу термодинамічну стабільність комплексів і узгоджуються з низькими значеннями K_d, отриманими за допомогою флуоресцентного титрування.

Найбільш негативні значення ΔG° спостерігали для попередньо сформованої двокомпонентної системи ІНФ α-2b–ІНФАР 1, що може свідчити про більш сприятливе середовище для зв’язування АМФ порівняно з ізольованими білками. Це потенційно може бути пов’язано з появою додаткових контактів або зміною геометрії доступної поверхні зв’язування.

Для динатрієвої форми АМФ значення ΔG° становили приблизно −8,0…−8,1 ккал/моль, що відповідає менш сприятливому зв’язуванню порівняно з кислотною формою. Можливий внесок змін у гідратацію та електростатичне оточення фосфатної групи розглядався як механістична гіпотеза, а не як безпосередньо встановлений механізм.

На відміну від АМФ, вільний ГМФ має помірну спорідненість (K_d 0,35–1,48 мкМ), яка дещо послаблюється D-манітолом, як показано флуоресцентною спектроскопією (табл. 3.2). Він зв'язується з усіма мішенями з K_d 0,35–1,48 мкМ, з найвищою спорідненістю до комплексу ІНФ α-2b/ІНФАР 1 ($K_d \approx$ 0,35–0,50 мкМ). D-манітол не знижує K_d для цього комплексу й може навіть збільшувати його (до 0,46–0,67 мкМ), дещо послаблюючи зв'язування. Для ізольованих ІНФ та ІНФАР 1 ефект D-манітолу був незначним або змінним. Динатрій ГМФ зв'язується слабше (K_d 1,29–4,95 мкМ), і D-манітол не посилює цього ефекту. Значення зв'язування ΔG° ГМФ залишалися негативними для всіх білків-мішеней, що підтверджує сприятливу взаємодію. Вільний ГМФ мав значення зв'язування ΔG° приблизно від -8,6 до -9,1 ккал/моль, утворюючи найстабільніші комплекси з гетеродимером ІНФ α-2b/ІНФАР 1.

Таблиця 3.2

Константи дисоціації ІНФ α-2b, рецептора та комплексу з ГМФ у мкМ

Ліганд	Білок	Kd_{sv}	K_d Lehrer	K_d Scatchard	K_d Klotz	K_d Hill	ΔG°зв'яз., ккал/моль
ГМФ	ІНФ	0,47±0,01	0,68±0,03	1,00±0,01	0,80±0,05	0,59±0,02	-8,9±0,1
ГМФ+D-M		0,51±0,01*	0,74±0,01*	1,08±0,04*	0,86±0,01*	0,64±0,01*	-8,8±0,2*
$ГМФNa_2$		2,34±0,1*	3,39±0,2*	4,92±0,2*	3,93±0,2*	2,91±0,1*	-7,9±0,3
$ГМФNa_2$+D-M		2,36±0,2*	3,40±0,1*	4,95±0,1*	3,96±0,1*	2,93±0,1*	-7,9±0,2
ГМФ	ІНФАР 1	0,70±0,01	1,02±0,01	1,48±0,01	1,18±0,02	0,87±0,01	-8,6±0,2
ГМФ+D-M		0,60±0,02*	0,87±0,02*	1,26±0,1*	1,01±0,01*	0,75±0,02*	-8,7±0,2*
$ГМФNa_2$		1,29±0,01*	1,87±0,02*	2,72±0,1*	2,17±0,2*	1,61±0,1*	-8,3±0,1
$ГМФNa_2$+D-M		1,60±0,01*	2,31±0,01*	3,36±0,1*	2,69±0,2*	1,99±0,2*	-8,2±0,2
ГМФ	ІНФ/ ІНФАР 1	0,35±0,03	0,50±0,04	0,73±0,05	0,58±0,05	0,43±0,03	-9,1±0,1
ГМФ+D-M		0,46±0,02*	0,67±0,03*	0,97±0,03*	0,77±0,03*	0,57±0,04*	-8,9±0,5*
$ГМФNa_2$		2,23±0,2*	3,22±0,1*	4,68±0,4*	3,74±0,1*	2,77±0,3*	-8,0±0,1
$ГМФNa_2$+D-M		2,05±0,1*	2,96±0,3*	4,30±0,1*	3,44±0,2*	2,54±0,1*	-8,0±0,2

Примітка. * — статистично значуща різниця порівняно з відповідним вільним 5′-рНМП ($p \leq 0,05$, $n = 10$).

На відміну від АМФ, D-манітол суттєво не покращував термодинаміку зв'язування ГМФ, іноді роблячи ΔG° зв'язування менш негативним та збільшуючи K_d, але не демонструючи додаткової стабілізації гуанозинових комплексів. Результати докінгу показали дуже негативні енергії для ГМФ+D-M, особливо в ІНФ α-2b/ІНФАР 1, що свідчить про розбіжність від експериментальних значень ΔG° зв'язування. Такі фактори, як гнучкість білка, конкуренція за воду та множинні стани зв'язування, ймовірно, впливають на зв'язування, але докінг не враховує всіх цих чинників. Перетворення на динатрієвий ГМФ знижувало спорідненість зв'язування, з ΔG° зв'язування близько -8,0 ккал/моль, що вказує на слабше зв'язування після іонізації фосфату.

ЦМФ характеризувався відносно помірними змінами параметрів зв'язування залежно від складу системи (табл. 3.3). Для коректного порівняння використовували значення $K_{d,SV}$, отримані за однаковим способом аналізу. Для ІНФ α-2b додавання D-манітолу супроводжувалося незначним зменшенням K_d від 0,78 до 0,72 мкМ. Натомість для ІНФАР 1 значення K_d збільшувалося від 0,96 до 1,05 мкМ, а для

двокомпонентної системи ІНФ α-2b/ІНФАР 1 — від 0,56 до 0,67 мкМ. Таким чином, вплив D-манітолу на зв'язування ЦМФ був невеликим і залежав від білкової мішені: слабка тенденція до підвищення афінності спостерігалася лише для ІНФ α-2b, тоді як для ІНФАР 1 і системи ІНФ α-2b–ІНФАР 1 спостерігалася протилежна тенденція.

Таблиця 3.3

Константи дисоціації ІНФ α-2b, рецептора та комплексу з ЦМФ у мкМ

Ліганд	**Білок**	**Kd_{sv}**	**K_d Lehrer**	**K_d Scatchard**	**K_d Klotz**	**K_d Hill**	**ΔG°зв'яз., ккал/моль**
ЦМФ	ІНФ	0,78±0,02	1,13±0,01	1,64±0,01	1,31±0,03	0,97±0,04	-8,5±0,1
ЦМФ+D-M		0,72±0,01*	1,04±0,03*	1,51±0,01*	1,20±0,06*	0,89±0,07*	-8,6±0,2*
ЦМФNa_2		2,41±0,2*	3,48±0,1*	5,06±0,2*	4,04±0,1*	2,99±0,2*	-7,9±0,3
ЦМФNa_2+D-M		2,16±0,1*	3,13±0,08*	4,55±0,1*	3,63±0,2*	2,69±0,1*	-8,0±0,2
ЦМФ	ІНФАР 1	0,96±0,02	1,39±0,01	2,02±0,01	1,61±0,03	1,19±0,02	-8,4±0,1
ЦМФ+D-M		1,05±0,01*	1,52±0,01*	2,21±0,05*	1,76±0,01*	1,30±0,02*	-8,3±0,1*
ЦМФNa_2		1,34±0,1*	1,94±0,2*	2,82±0,1*	2,26±0,3*	1,67±0,1*	-8,3±0,3
ЦМФNa_2+D-M		2,38±0,2*	3,44±0,1*	5,00±0,2*	4,00±0,1*	2,96±0,1*	-7,9±0,2
ЦМФ	ІНФ/ ІНФАР 1	0,56±0,01	0,81±0,01*	1,18±0,02	0,95±0,02	0,70±0,02	-8,7±0,1
ЦМФ+D-M		0,67±0,01*	0,96±0,03*	1,40±0,01*	1,12±0,02*	0,83±0,01*	-8,6±0,5*
ЦМФNa_2		2,09±0,2*	3,02±0,2*	4,38±0,2*	3,50±0,1*	2,59±0,1*	-8,0±0,3
ЦМФNa_2+D-M		2,04±0,1*	2,94±0,1*	4,28±0,1*	3,42±0,3*	2,53±0,1*	-8,0±0,3

** — статистично значуща різниця порівняно з відповідним вільним 5'-рНМП ($p \leq 0,05$, $n = 10$).*

Для окремих білкових систем відмінності у значеннях K_d залишалися в межах експериментальної похибки. Динатрієва форма ЦМФ загалом характеризувалася нижчою видимою спорідненістю, ніж кислотна форма, однак вплив D-манітолу залежав від білкової мішені та способу оцінювання K_d. Зокрема, для системи ЦМФNa_2–ІНФАР 1 за моделлю Lehrer додавання D-манітолу супроводжувалося збільшенням K_d з 1,94 до 3,44 мкМ, тобто послабленням взаємодії.

Значення ΔG° для ЦМФ переважно становили близько −8,4…−8,7 ккал/моль. Додавання D-манітолу спричиняло лише невеликі та залежні від системи зміни ΔG° , тому отримані дані не дають підстав стверджувати про універсальний стабілізувальний або кооперативний ефект D-манітолу для ЦМФ та його натрієвої форми.

Піримідинова основа цитозин, ймовірно, не забезпечує достатньої структурної комплементарності для утворення стабільних водневих зв'язків або гідрофобних

контактів з D-манітолом. Це узгоджується з даними докінгу, які показують, що ЦМФ має нижчі енергії зв'язування, ніж АМФ або ГМФ. Для динатрієвих солей ЦМФ ΔG°зв'язування збільшується приблизно до -7,9 – -8,0 ккал/моль, що вказує на те, що зв'язування послаблюється при іонізації.

УМП подібний до АМФ, але має дещо нижчу спорідненість. Вільний УМП зв'язується з K_d 0,20–0,89 мкМ, залежно від мішені та моделі (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Константи дисоціації ІНФ α-2b, рецептора та комплексу з УМФ у мкМ

Ліганд	Білок	Kd_{sv}	K_d Lehrer	K_d Scatchard	K_d Klotz	K_d Hill	ΔG°зв'яз., ккал/моль
УМФ	ІНФ	0,31±0,03	0,44±0,01	0,65±0,03	0,52±0,02	0,38±0,02	-9,2±0,1
УМФ+D-М		0,28±0,01*	0,41±0,01*	0,59±0,01*	0,47±0,01*	0,35±0,01*	-9,2±0,2*
$УМФNa_2$		3,64±0,2*	5,25±0,3*	7,64±0,2*	6,11±0,2*	4,52±0,1*	-7,5±0,2
$УМФNa_2$+D-М		2,56±0,1*	3,70±0,1*	5,38±0,1*	4,30±0,1*	3,18±0,1*	-7,8±0,2
УМФ	ІНФАР 1	0,36±0,04	0,52±0,03	0,75±0,01	0,60±0,03	0,45±0,01	-9,1±0,1
УМФ+D-М		0,42±0,01*	0,61±0,02*	0,89±0,01*	0,71±0,02*	0,52±0,01*	-9,0±0,1*
$УМФNa_2$		1,31±0,2*	1,89±0,1*	2,74±0,3*	2,19±0,1*	1,62±0,1*	-8,3±0,1
$УМФNa_2$+D-М		1,51±0,1*	2,18±0,2*	3,17±0,1*	2,54±0,2*	1,88±0,1*	-8,2±0,1
УМФ	ІНФ/ ІНФАР 1	0,27±0,02	0,39±0,01	0,56±0,01	0,45±0,01	0,33±0,01	-9,3±0,1
УМФ+D-М		0,20±0,02*	0,30±0,01*	0,43±0,03*	0,34±0,01*	0,25±0,01*	-9,5±0,2*
$УМФNa_2$		2,21±0,1*	3,20±0,1*	4,65±0,2*	3,72±0,1*	2,75±0,2*	-8,0±0,3
$УМФNa_2$+D-М		2,16±0,2*	3,13±0,1*	4,55±0,1*	3,63±0,2*	2,69±0,1*	-8,0±0,4

Примітка. * — статистично значуща різниця порівняно з відповідним вільним 5′-рНМП ($p \leq 0,05$, $n = 10$).

За моделлю Hill найвищу спорідненість УМФ спостерігали для двокомпонентної системи ІНФ α-2b/ІНФАР 1: K_d=0,33±0,01 мкМ, а в присутності D-манітолу — 0,25±0,01 мкМ, тобто приблизно на 24 % нижче. Для ізольованого ІНФ α-2b вплив D-манітолу був невеликим — від 0,38 до 0,35 мкМ, тоді як для ІНФАР 1 значення K_d збільшувалося від 0,45 до 0,52 мкМ. Отже, вплив D-манітолу на параметри зв'язування УМФ був залежним від білкової системи й найбільш вираженим у попередньо сформованій системі ІНФ α-2b/ІНФАР 1.

УМФ характеризувався сприятливими термодинамічними параметрами серед досліджених піримідинових нуклеотидів: для вільного УМФ значення ΔG° становили від −9,1 до −9,3 ккал/моль залежно від білкової системи. Для двокомпонентної системи

ІНФ α-2b/ІНФАР 1 значення змінювалося від −9,3 ккал/моль для УМФ до −9,5 ккал/моль для композиції УМФ з D-манітолом, що узгоджувалося з тенденцією до більш сприятливого зв’язування. Для УМФNa_2 значення ΔG° залежали від мішені та становили від −7,5 до −8,3 ккал/моль. Вплив D-манітолу на натрієву форму був неоднаковим: для ІНФ α-2b ΔG° змінювалося з −7,5 до −7,8 ккал/моль, для ІНФАР 1 — з −8,3 до −8,2 ккал/моль, а для системи ІНФ α-2b/ІНФАР 1 залишалося близько −8,0 ккал/моль. Отже, універсального стабілізувального ефекту D-манітолу для УМФNa_2 не спостерігалося.

Динатрієва форма УМФ характеризувалася нижчою спорідненістю порівняно з кислотною формою. Для двокомпонентної системи ІНФ α-2b/ІНФАР 1 значення K_d, отримане за аналізом Stern–Volmer, становило 2,21±0,1 мкМ для УМФNa_2 та 2,16±0,2 мкМ для композиції УМФNa_2 з D-манітолом (nабл/ 3.4). Ця різниця є меншою за експериментальну похибку і тому не свідчить про достовірне посилення зв’язування. За результатами молекулярного докінгу для композиції УМФNa_2+D-М було отримано ΔG = −8,4 ккал/моль, однак цей розрахунковий показник слід розглядати окремо від експериментальних констант зв’язування.

Враховуючи гіпотезу про те, що олігонуклеотиди гідролізуються до мономерів in vivo, у цьому дослідженні вивчали взаємодію обох форм із рекомбінантними білками (табл.3.5). Додатково досліджено взаємодію ІНФ α-2b з 2′–5′-тріаденілатом (2′–5′ А3). Для дослідженого препарату 2′–5′ А3 отримано значення K_d у межах 0,31–0,53 мкМ, зіставні зі значеннями, визначеними для АМФ та ОРН. Це свідчить про виражену взаємодію саме дослідженого 2′–5′ А3 з ІНФ α-2b. Функціональний зв’язок 2′–5′-олігоаденілатів з активацією Rnase L описаний у літературі [86].

У комплексі ІНФ α-2b/ІНФАР 1 у присутності D-манітолу K_d для ОРН знизився до 0,24–0,35 мкМ. Тенденція, подібна до тієї, що спостерігається з АМФ, спостерігалася і для ОРН, що свідчить про подібний механізм стабілізації пуринвмісних рибонуклеотидів у присутності поліолу. Тим не менш, спектроскопічні константи дисоціації показують дуже схожу картину змін.

Таблиця 3.5

Константи дисоціації ІНФ α-2b, рецептора та комплексу з ОРН у мкМ

Ліганд	Білок / стан	Kd_{sv}	K_d Lehrer	K_d Scatchard	K_d Klotz	K_d Hill	ΔG°зв'яз., ккал/моль
ОРН	ІНФ	0,35±0,01	0,50±0,04	0,73±0,03	0,58±0,01	0,43±0,01	-9,1±0,3
ОРН + D-M		0,32±0,01	0,46±0,3	0,67±0,01*	0,54±0,04*	0,40±0,05*	-9,2±0,2
ОРН-Na		2,37±0,1*	3,42±0,1*	4,98±0,1*	3,98±0,1*	2,94±0,1*	-8,0±0,2*
ОРН-Na+D-M		2,34±0,1*	3,39±0,1*	4,92±0,1*	3,93±0,2*	2,91±0,4*	-8,0±0,2*
ОРН	ІНФАР 1	0,52±0,01	0,76±0,1	1,10±0,05	0,88±0,04	0,65±0,02	-9,0±0,2
ОРН+D-M		0,4±0,01*	0,57±0,1*	0,83±0,02*	0,67±0,01*	0,49±0,03*	-9,1±0,2
ОРН-Na		1,57±0,1*	2,28±0,1*	3,31±0,2*	2,64±0,4*	1,96±0,1*	-7,7±0,2*
ОРН-Na+D-M		1,37±0,1*	1,98±0,1*	2,88±0,1*	2,30±0,2*	1,70±0,1*	-8,3±0,1*
ОРН	ІНФ/ ІНФАР 1	0,31±0,01	0,44±0,05	0,65±0,01	0,52±0,01	0,38±0,01	-9,3±0,1
ОРН+D-M		0,2±0,02*	0,35±0,05	0,51±0,02*	0,41±0,05*	0,30±0,01*	-9,6±0,2*
ОРН-Na		2,06±0,1*	2,98±0,1*	4,33±0,1*	3,46±0,2*	2,56±0,1*	-8,2±0,4*
ОРН-Na+D-M		2,25±0,1*	3,26±0,2*	4,73±0,1*	3,78±0,1*	2,80±0,1*	-8,0±0,1*
2′-5′ A_3	ІНФ	0,31±0,2	0,44±0,2	0,53±0,2	0,52±0,2	0,39±0,2	-9,2±0,1

Примітка. * Показано статистично значущу різницю порівняно з вільними ОРН ($p \leq 0,05$, $n = 10$).

Експериментально оцінювали інтенсивність флуоресценції, ступінь її гасіння, анізотропію флуоресценції та константи дисоціації K_d. Отримані зміни цих параметрів залежали від хімічної та іонної форми рибонуклеотидів, наявності D-манітолу та порядку збирання системи ІНФ α-2b/ІНФАР 1. Водночас ці дані самі по собі не доводять конкретних конформаційних переходів, змін біологічної активності або впливу на сигнальний шлях інтерферону.

3.1.3. Дослідження часу життя збудженого стану флуоресценції ІНФ α-2b у присутності оліго- та мононуклеотидів і їх комплексів з D-манітолом. Додатковим методом дослідження білок–лігандних взаємодій була імпульсна флуориметрія з реєстрацією часу життя флуоресценції. Після імпульсного збудження залишків триптофану при 295 нм реєстрували часовий спад інтенсивності емісії.

Час життя флуоресценції характеризує швидкість зменшення популяції молекул у збудженому стані та може змінюватися внаслідок динамічного гасіння або безвипромінювального перенесення енергії на ліганд (рис. 3.4).

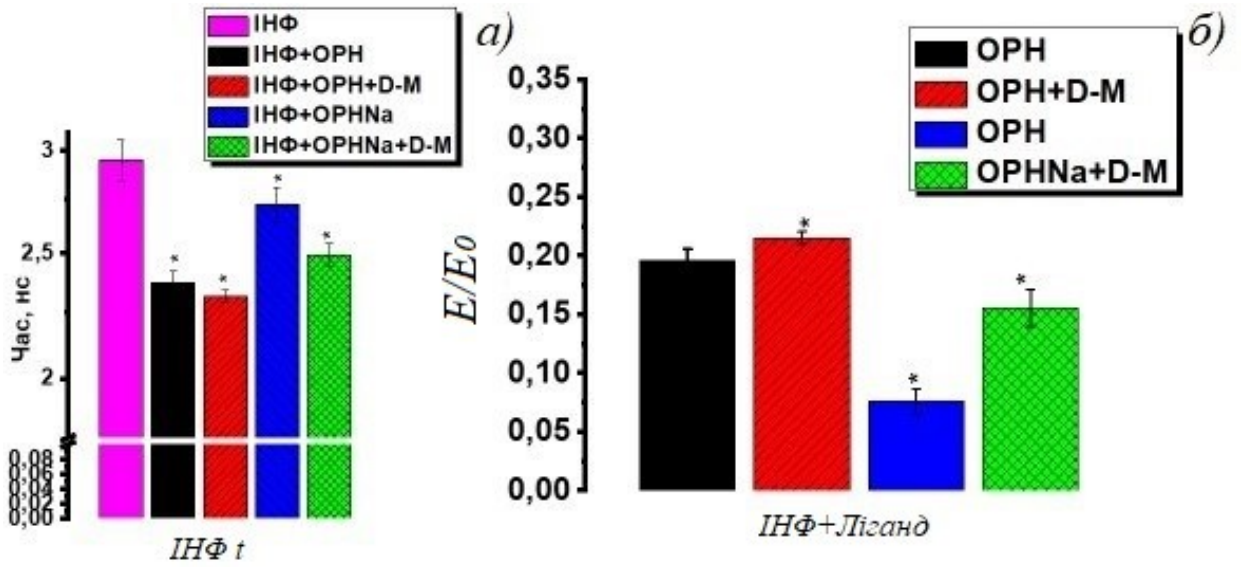


Рис. 3.4. Часороздільна флуоресценція ІНФ α-2b за взаємодії з препаратами ОРН: а) — час життя флуоресценції; б) — спостережна ефективність переносу енергії

ІНФ α-2b в чистому вигляді має тривалість життя люмінесценції 2,95 нс (рис. 3.4 а). При взаємодії цього білка з кислою формою ОРН та її комплексом з D-манітолом час життя його флуоресценції дорівнює 2,37 та 2,32 нс відповідно. А при взаємодії ІНФ α-2b із сольовою формою ОРН та її комплексом із D-манітолом час життя його флуоресценції дорівнює 2,73 та 2,49 нс відповідно (рис. 3.4 а).

Ефективність Фьостерівського переносу енергії між ІНФ α-2b і кислою формою ОРН та її комплексом з D-манітолом дорівнювала 19,5% та 21,5%, а при додаванні сольової форми ОРН та її комплексу з D-манітолом — 7,6% та 15,6% відповідно (рис. 3.4 б).

Відстань Фьостерівського переносу енергії ІНФ α-2b при додаванні кислої форми ОРН та її комплексу з D-манітолом дорівнює 23 Å і 18 Å відповідно, а з сольовою формою ОРН та її комплексом з D-манітолом 31 Å та 55 Å відповідно. Зміна часу життя флуоресценції ІНФ α-2b у присутності НМФ наведені на рис. 3.5.

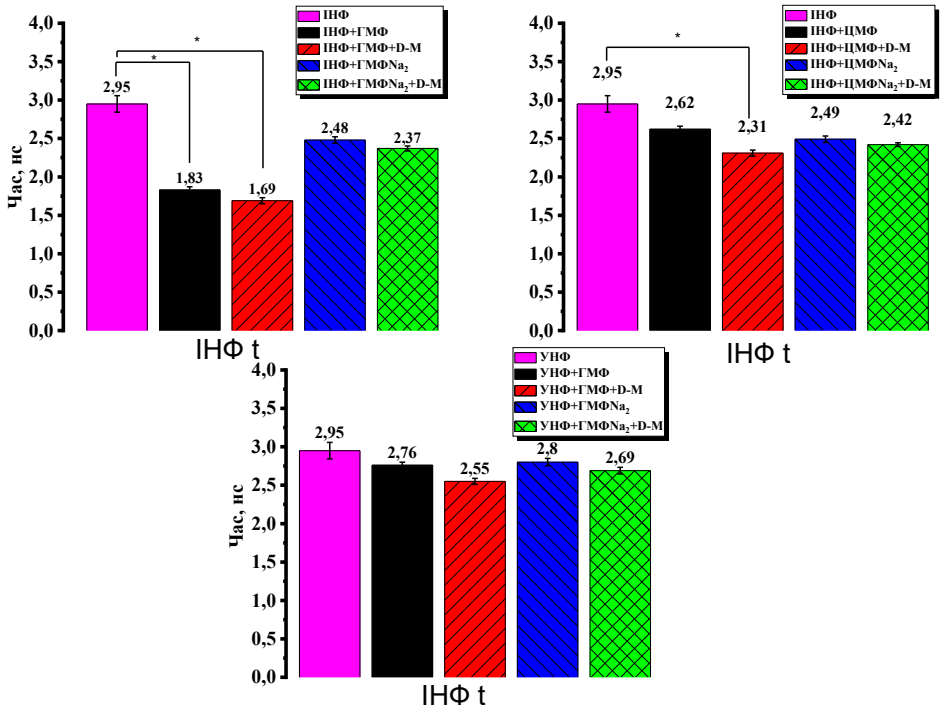


Рис. 3.5. – Зміна часу життя флуоресценції ІНФ α-2b у присутності НМФ, їх динатрієвих солей і комплексів із D-манітолом

Примітка. * — статистично значуща відмінність порівняно з контролем ІНФ α-2b, $p \leq 0,05$

Коли ІНФ α-2b взаємодіяв з ГМФ та ГМФ+D-M, ефективність передачі енергії становила 0,43 та 0,49 відповідно, ЦМФ та ЦМФ+D-M – 0,17 та 0,23, УМФ та УМФ+D-M – 0,15 та 0,18 (рис. 3.6). При взаємодії з $ГМФNa_2$ та $ГМФNa_2$+D-M – 0,23 та 0,27, $ЦМФNa_2$ та $ЦМФNa_2$+D-M – 0,09 та 0,13, $УМФNa_2$ та $УМФNa_2$+D-M – 0,08 та 0,11.

Ефективність безвипромінювального перенесення енергії за механізмом Фьорстера залежить від відстані між донором і акцептором відповідно до співвідношення $E=1/(1+(r/R_0)^6)$, де R_0 є радіусом Фьорстера і може відрізнятися для різних лігандів. У досліджених системах кислотні форми НМФ характеризувалися більш вираженими змінами часових параметрів флуоресценції порівняно з натрієвими формами. Однак скорочення часу життя флуоресценції не можна однозначно приписувати лише фьорстерівський резонансний перенос енергії , оскільки можливий внесок інших механізмів динамічного гасіння. Тому отримані результати розглядали як такі, що узгоджуються з можливим перенесенням енергії та відмінностями у взаємному розташуванні білка і ліганду.

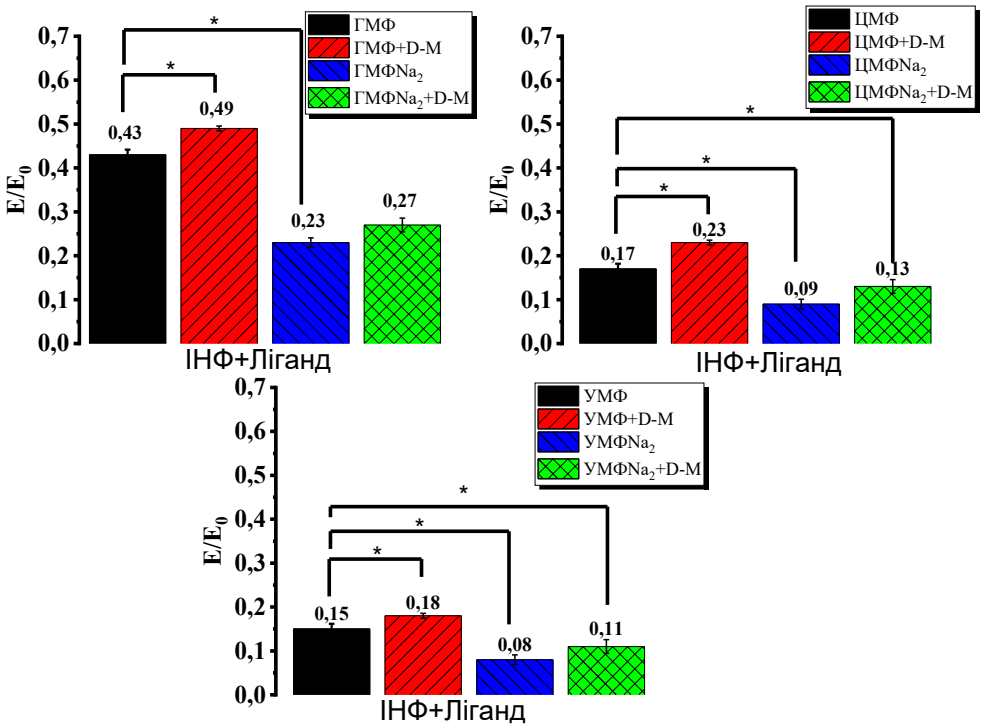


Рис. 3.6. Ефективність Фьорстерівського переносу енергії між ІНФ α-2b і НМФ, їх динатрієвими солями та комплексами з D-манітолом

Примітка. * — статистично значуща відмінність порівняно з відповідною кислотною формою, $p \leq 0,05$

Скорочення часу життя флуоресценції ІНФ α-2b у присутності ОРН узгоджується з появою додаткових безвипромінювальних шляхів деактивації збудженого стану, одним із яких може бути фьорстерівський резонансний перенос енергії. Для кислотної форми ОРН спостерігали більш виражені зміни часових параметрів флуоресценції, однак їх не слід однозначно трактувати як доказ меншої міжмолекулярної відстані без урахування можливого внеску інших механізмів гасіння та відмінностей R_0.

3.1.4. Дослідження взаємодії мононуклеотидів з ІНФ α-2b, ІНФАР 1 та попередньо сформованим комплексом ІНФ α-2b/ІНФАР 1 методом стаціонарної флуоресцентної анізотропії. Усі 100 кривих апроксимовано моделлю 1:1 та емпіричною моделлю Хілла.

Медіана R^2 для умовної моделі 1:1 становила 0,951. П'ятдесят три криві досягли $R^2>=0,95$, а всі 100 — $R^2>=0,80$, що вказує на те, що плавна насичувана реакція добре описувала спостереження. Однак сама якість підгонки не встановлює унікального

механізму зв'язування. За критерієм ΔAICc модель Хілла мала перевагу для 51 кривої (ΔAICc < −2), а модель 1:1 — для 30 кривих (ΔAICc > 2). Для решти 19 кривих жодна моделі не мала однозначної переваги**.** У всіх п'яти блоках ввідповідої форми препарату медіана зростання прямої кінцевої точки становила 30,7% для ІНФ α-2b, 36,5% для ІНФАР 1 та 46,6% для попередньо зібраного комплексу ІНФ α-2b/ІНФАР 1 (рис. 3.7).

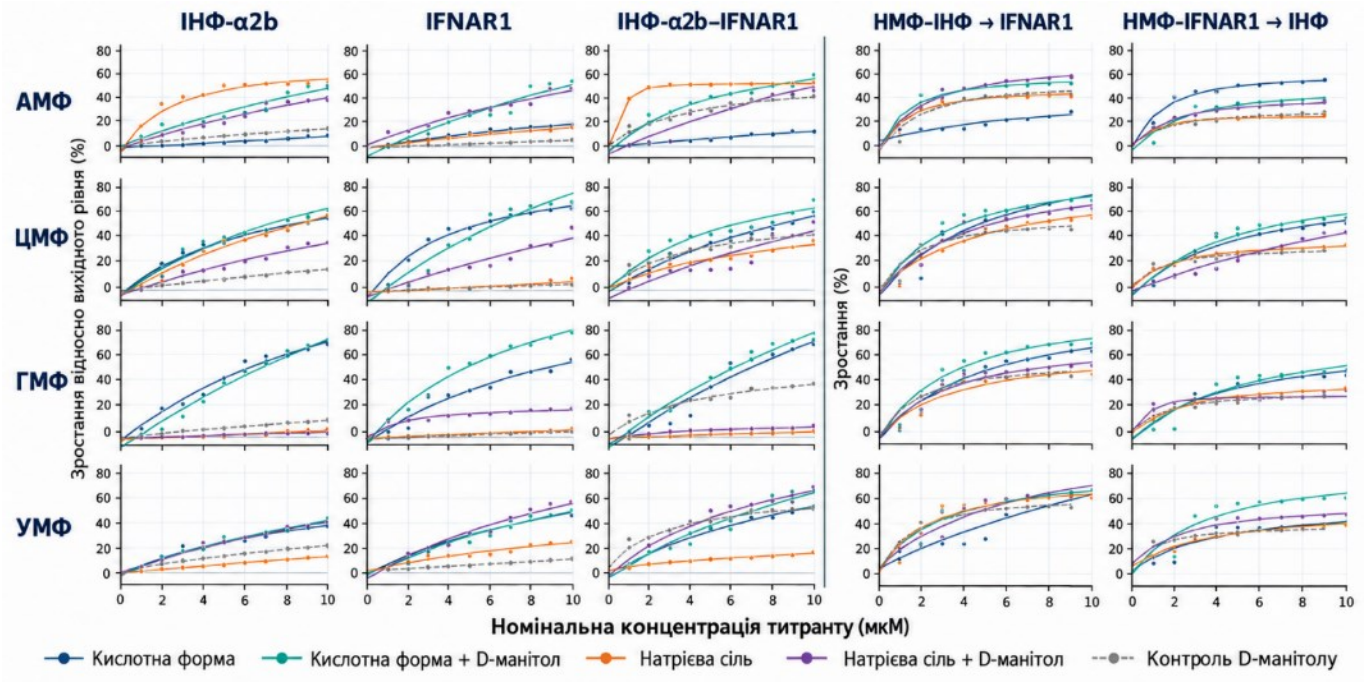


Рис. 3.7. Відносна зміна видимої анізотропії флуоресценції досліджуваних систем.

Примітка. Точки відображають відсоток зростання анізотропії відносно початкового значення для кожної кривої; вісь (x) відповідає номінальній концентрації титрованого компонента в діапазоні 0–10 мкМ.

Більша зміна анізотропії флуоресценції комплексу сама по собі не означає сильнішої мікроскопічної спорідненості; це вказує на те, що сигнал флуоресценції є більш чутливим до титрування за цих умов. Під час прямого титрування втрата інтенсивності поляризованого світла залежала від типу азотистої основи нуклеотиду. Для кислотної форми НМФ зростання кінцевої точки для ІНФ α-2b становило 8,1% (АМФ), 45,5% (ЦМФ), 65,7% (ГМФ) та 23,4% (УМФ). В присутності ІНФАР 1 втрати становили 14,7%, 56,2%, 54,8% та 31,4%; для попередньо зібраного комплексу — 11,7%, 54,1%, 66,0% та 37,9%. Таким чином, ГМФ та ЦМФ демонстрували найбільші зміни, УМФ був проміжним, а АМФ — найнижчим.

Додавання D-манітолу змінило як амплітуду, так і ранжування. Відповіді на кислотну форму плюс D-манітол для ІНФ α-2b становили 41,9% (АМФ), 54,1% (ЦМФ), 66,3% (ГМФ) та 27,4% (УМФ). Для ІНФАР 1 вони становили 46,3%, 61,4%, 74,4% та 34,0%; для попередньо зібраного комплексу — 52,0%, 65,1%, 68,9% та 48,3%. Найбільше відносне посилення спостерігалося для АМФ, який перейшов від найслабшої відповіді лише на кислоту до помірної відповіді в усіх трьох цільових станах (рис. 3.8).

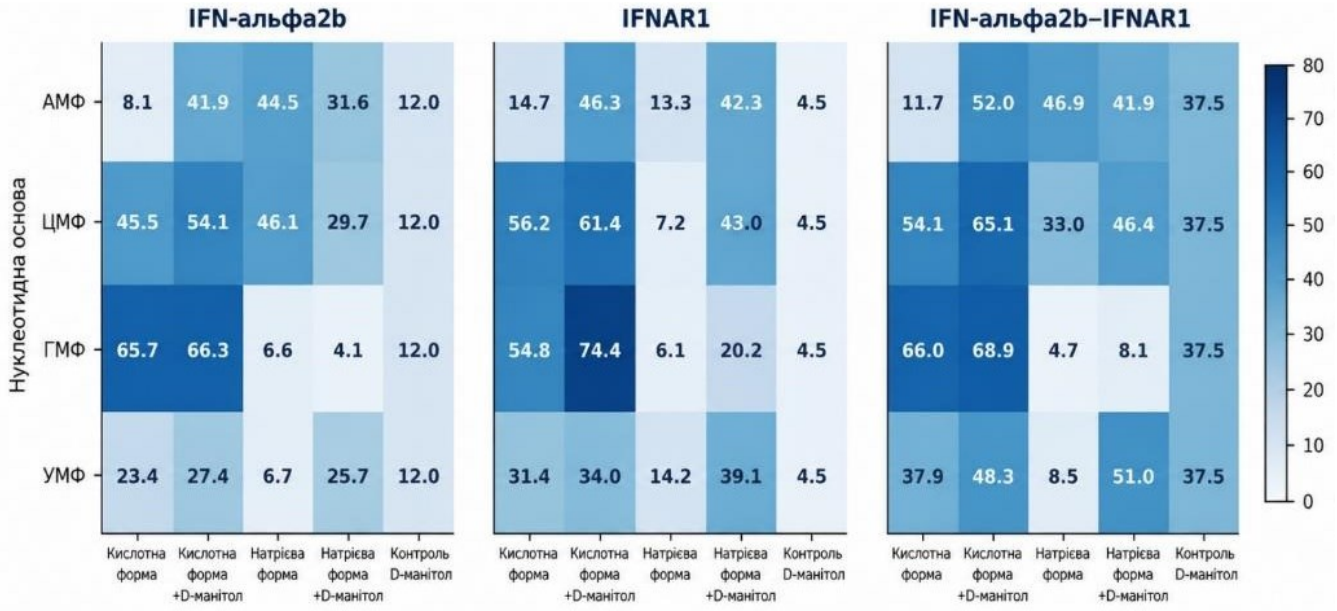


Рис. 3.8. Карта кінцевих точок реакції для прямого титрування.

Примітка. Значення — це відсоткове зростання від початкової до кінцевої впорядкованої точки. Вплив кислоти, натрієвої солі та D-манітолу змінюється залежно від нуклеотидної основи та стану мішені

Медіана прямих реакцій для кислотної форми становила 34,5%, 43,1% та 46,0% для ІНФ α-2b, ІНФАР 1 і комплексу відповідно. Для динатрієвих солей відповідні медіани становили 25,6%, 10,3% та 20,8%. Додавання D-манітолу збільшило медіану реакції кислотної форми до 48,0%, 53,8% та 58,6%; реакції натрієвої солі плюс D-манітол становили 27,7%, 40,7% та 44,1% (табл. 3.6).

D-манітол сам по собі не був нейтральним відносно анізотропії. Його медіанне зростання кінцевої точки становило 12,1% для ІНФ α-2b, 4,5% для ІНФАР 1 та 37,5% для попередньо зібраного комплексу.

Таблиця 3.6

Медіанні дескриптори прямої відповіді для чотирьох нуклеотидних основ

Цільовий стан	Препаративна форма	Зростання медіани кінцевої точки (%)	Медіана K_d	Медіана R^2
ІНФ	Кислота	34,48	12,60	0,960
	Кислота + D-M	48,01	26,06	0,969
	Динатрієва сіль	25,63	23,35	0,946
	Динатрієва сіль + D-M	27,68	26,83	0,967
	Контроль D-M	12,05	-	0,995
ІНФАР 1	Кислота	43,07	13,28	0,969
	Кислота + D-M	53,84	25,07	0,954
	Динатрієва сіль	10,28	32,24	0,948
	Динатрієва сіль + D-M	40,69	29,73	0,954
	Контроль DM	4,51	-	0,951
ІНФ/ ІНФАР 1	Кислота	45,99	22,00	0,966
	Кислота + D-M	58,55	15,88	0,951
	Динатрієва сіль	20,78	16,48	0,969
	Динатрієва сіль + D-M	44,14	17,61	0,937
	Контроль DM	37,46	-	0,964

У схемах із попередньою асоціацією зростання інтенсивності у контрольних серіях лише з D-манітолом становило 42,3% за послідовності «спочатку ІНФ » і 27,1% за послідовності «спочатку рецептор». Отже, різницю між умовами «+D-M» та «без D-M» не можна віднести виключно до сильнішого зв'язування нуклеотидів; D-манітол може змінювати контрольований стан білка або його фотофізичну реакцію (рис В.4).

Умовна модель 1:1 дала медіанні значення K_d, 12,60, 26,06, 23,35 та 26,83 мкМ для кислоти, кислоти плюс D-манітол, натрієвої солі та натрієвої солі плюс D-манітол відповідно проти ІНФ α-2b. Відповідні медіани становили 13,28, 25,07, 32,24 та 29,73 мкМ проти ІНФАР 1 і 22,00, 15,88, 16,48 та 17,61 мкМ проти попередньо зібраного комплексу.

На рисунку додатка В.1 підсумовано титрування анізотропії контролю, проведене з D-манітолом за відсутності мононуклеотидів. D-манітол викликав вимірну, але порівняно скромну реакцію при безпосередньому додаванні до ІНФ α-2b,

ІНФАР 1 або їх попередньо сформованого комплексу. Більш складна реакція спостерігалася, коли D-манітол був попередньо пов’язаний з ІНФАР 1 перед додаванням ІНФ; цю криву формально краще відтворювала модель двох незалежних сайтів. Оскільки той самий контроль був повторений у наборах даних АМФ, ЦМФ, ГМФ та УМФ, ці записи є реплікованими контрольними вимірюваннями, а не чотирма нуклеотидно-специфічними ефектами. Загалом, контролі вказують на те, що D-манітол має вплив на анізотропію, але сам по собі не може пояснити нуклеотидно-залежні патерни реакції (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Зростання анізотропії між початковою та кінцевою точками прямого титрування для різних НМФ, %

НМФ	ІФН +НМФ	ІФН+НМФ + D-M	ІНФАР 1 +НМФ	ІНФАР 1+ НМФ + D-M	Комплекс +НМФ	Комплекс+ +НМФ+ D-M
АМФ	8,1	41,9	14,7	46,3	11,7	52,0
ЦМФ	45,5	54,1	56,2	61,4	54,1	65,1
ГМФ	65,7	66,3	54,8	74,4	66,0	68,9
УМП	23,4	27,4	31,4	34,0	37,9	48,3

Для 57 зі 100 кривих найнижче значення AICc мали моделі, відмінні від Adair-1, тобто такі, що враховують дві події зв’язування, гетерогенність центрів або конформаційне спряження. Модель KNF була найкращою для 48 кривих, Adair-2 — для 4, а модель двох незалежних центрів — для 5 кривих. Модель MWC не була найкращою для жодної експериментальної умови. Ці результати свідчать про відхилення частини кривих від простої одноцентрової залежності, однак не дозволяють однозначно встановити стехіометрію або мікроскопічні параметри зв’язування. Тому вибір моделі розглядали насамперед як характеристику форми експериментальної залежності (рисунки В.2-5).

Модель Adair-2 виявилася найкращою лише в чотирьох випадках: зв’язування АМФNa_2 з ІНФ; зв’язування АМФ–D-манітолу з попередньо утвореним комплексом ІНФАР 1 з подальшим додаванням ІНФ; зв’язування ГМФ–D-манітолу з ІНФ;

попереднє утворення комплексу ГМФ–D-манітолу з ІНФ з подальшим додаванням ІНФАР 1.

Ці результати апроксимації продемонстрували високі коефіцієнти детермінації: R^2 = 0,9873–0,9984, скоригований R^2 = 0,9789–0,9973 та ваги Акаіке в діапазоні 0,704–0,866. Найбільш переконливе підтвердження моделі Adair-2 отримано для системи АМФ–D-манітол–ІНФАР 1, яку згодом титрували ІНФ wi = 0,866. Перевага моделі Adair-2 полягає в тому, що ці криві містять дві розрізнювані фази зміни сигналу, які узгоджуються з послідовними переходами, пов'язаними зі зв'язуванням ліганду.

Три з чотирьох випадків, у яких модель Adair-2 мала найнижчий AICc, стосувалися систем із нуклеотидом та D-манітолом, причому у двох випадках використовувався ГМФ. Це може вказувати на те, що для таких систем форма експериментальної кривої краще описується двокомпонентною функцією. Водночас параметри K_{d1} і K_{d2} залишалися сильно корельованими та неідентифікованими незалежно один від одного. Тому вибір моделі Adair-2 не слід трактувати як доказ двох фізично розрізнених стадій або послідовного механізму зв'язування; він лише відображає кращий опис форми кривої порівняно з одноцентровою моделлю.

Модель двох незалежних сайтів виявилася кращою для п'яти кривих: контрольний зразок (D-манітол), попередньо зв'язаний з ІНФАР 1, з подальшим додаванням ІНФ; відповідні контрольні криві з D-манітолом, отримані в експериментальних серіях з АМФ, ЦМФ, ГМФ та УМФ; зв'язування $ГМФNa_2$–D-манітолу з ІНФАР 1.

Чотири випадки з D-манітолом відображають одну й ту саму контрольну реакцію (без нуклеотидів), відтворену в чотирьох експериментальних наборах даних, тому їх не слід розглядати як чотири незалежні результати, специфічні для певного нуклеотиду. Отже, єдиним варіантом із вмістом нуклеотиду, для якого модель двох незалежних сайтів виявилася кращою, була взаємодія $ГМФNa_2$–D-манітолу з ІНФАР 1. Ця апроксимація дала значення R^2=0,9927 та скориговане R^2=0,9878, однак підтримка за критерієм Акаїке була лише помірною (wi=0,449).

Модель припускає, що спостережувана реакція може складатися з внесків двох анізотропно відмінних компонентів взаємодії. Вони можуть відповідати двом

нееквівалентним ділянкам білка, гетерогенним конформаційним станам або одночасним внескам, що залежать як від нуклеотиду, так і від манітолу. Проте визначити значення $K_{d,A}$ чи $K_{d,B}$ не вдалося. Таким чином, отримані дані не підтверджують наявності двох структурно незалежних сайтів зв'язування; вони лише свідчать про те, що криву можна описати двокомпонентною реакцією.

Модель KNF виявилася найкращим рішенням для систем із кількома лігандами, забезпечивши найнижче значення AICc для 48 кривих. Її перевага значною мірою залежала від порядку утворення комплексу: 17 випадків нуклеотид попередньо зв'язувався з ІНФ перед додаванням ІНФАР 1; 12 випадків нуклеотид попередньо зв'язувався з ІНФАР 1 перед додаванням ІНФ; 8 випадків — пряме зв'язування нуклеотиду з ІНФАР 1; 7 випадків — зв'язування нуклеотиду з уже сформованим комплексом ІНФ –ІНФАР 1; 4 випадки — пряме зв'язування нуклеотиду з ІНФ.

Розподіл за типами нуклеотидів був відносно широким: АМФ — 12 випадків, ЦМФ — 14, ГМФ — 11, УМФ — 11. Отже, перевага моделі KNF не обмежувалася лише однією азотистою основою. Це стосувалося кислот, динатрієвих солей та їхніх композицій із D-манітолом: 11 кривих для кислот, 12 — для солей, 10 — для комбінацій кислот із D-манітолом та 11 — для комбінацій солей із D-манітолом. Чотири додаткові варіанти включали спільні контрольні зразки з D-манітолом.

До найсильніших варіантів, підтверджених методом KNF, належали: безпосереднє зв'язування АМФ з ІНФ: R^2=0,9787, wi=0,943; попереднє утворення комплексу $АМФNa_2$–D-манітолу з ІНФ з подальшим додаванням ІНФАР 1: R^2=0,9949, wi=0,942; зв'язування $АМФNa_2$ з попередньо сформованим комплексом ІНФ –ІНФАР 1: R^2=0,9992, wi=0,875; попереднє утворення комплексу $ЦМФNa_2$–D-манітолу з ІНФ з подальшим додаванням ІНФАР 1: R^2=0,9810, wi=0,868; попереднє утворення комплексу $УМФNa_2$ з ІНФАР 1 з подальшим додаванням ІНФ: R^2=0,9847, wi=0,848.

Концентраційна залежність, відображена цими кривими, краще узгоджувалася з моделлю послідовного переходу між станами, ніж із моделлю двох незалежних гіперболічних компонентів. У межах такої інтерпретації перша подія за участю ліганда може змінювати анізотропну відповідь на наступному етапі утворення білок–білкового або білок–лігандного комплексу. Це узгоджується з можливим конформаційним

спряженням, механізмом індукованої відповідності (induced fit) або перерозподілом між уже наявними конформаційними станами білка, однак не дозволяє однозначно встановити конкретний механізм.

Однак жодна з апроксимацій за моделлю KNF не дала змоги визначити конкретні значення внутрішньої константи дисоціації або коефіцієнта кооперативності α.

Модель MWC не виявилася найкращою для жодної зі 100 кривих титрування. Її медіанне значення ΔAICc становило 9,33, що вказує на значно слабшу підтримку порівняно з найкращою моделлю для більшості умов. Одночасне оцінювання параметрів KR, KT та константи конформаційної рівноваги L0 призвело до отримання значень, що сильно корелюють і є чисельно нестабільними.

Відсутність кривих, для яких модель MWC виявилася б оптимальною, свідчить про те, що наявні дані не підтверджують гіпотезу про узгоджений перехід між двома глобально рівноважними конформаціями білка. Тим не менш, цей результат остаточно не виключає можливості конформаційного відбору. Обмежений діапазон концентрацій і схема експерименту з 11 точками є недостатніми для визначення трьох взаємозалежних параметрів моделі MWC без додаткової незалежної інформації про L0, одну з констант спорідненості для конкретного стану або олігомерну стехіометрію.

Аналіз взаємодії з кількома лігандами виявив три рівні складності відповіді. Модель Adair-2 ідентифікувала чотири двофазні криві, що узгоджуються з двома послідовними переходами, пов’язаними зі зв’язуванням. Модель двох незалежних центрів зв’язування виявила одну умову (система ГМФNa_2–D-манітол з ІНФАР 1), за якої спостерігаються два окремі компоненти відгуку. Модель KNF описала значно ширшу групу з 48 кривих, характер яких залежав від шляху утворення комплексу, зокрема, коли комплекс нуклеотид–білок формувався до додавання другого білка. Модель MWC не отримала прямого підтвердження під час процедури вибору моделей.

Отже, отримані дані свідчать про частина кривих відхиляється від простої однокомпонентної моделі, особливо під час впорядкованого збирання комплексів нуклеотид–ІНФ –ІНФАР 1. Водночас ці дані поки що не дозволяють достовірно визначити точну кількість центрів зв’язування чи значення K_d по кожному з них. Тому параметри складних моделей слід розглядати як попередні оцінки, тоді як основний

висновок має зосереджуватися на залежності складності відгуку від шляху збирання комплексу та на можливій конформаційній спряженості.

3.1.5. Аналіз термічної стабільності та агрегації ІНФ α-2b у присутності мононуклеотидів. Максимальна інтенсивність флуоресценції ІНФ α-2b знижувалася з нагріванням у кожному стані та демонструвала більш виражену зміну у верхній температурній області (рис. 3.9). Довжина хвилі максимального випромінювання зміщувалася між 20 та 80 °C на 3–11 нм, причому лише для ІНФ α-2b зміщувалася з 338 до 347 нм. Дріжджова РНК показала найбільше зміщення кінцевої точки (з 339 до 350 нм).

Температури $T_{плавлення}$ 68,54 °C для ІНФ α-2b, 66,70 °C для ІНФ α-2b із дріжджовою РНК та 66,80 °C для системи з дріжджовою РНК і D-манітолом.

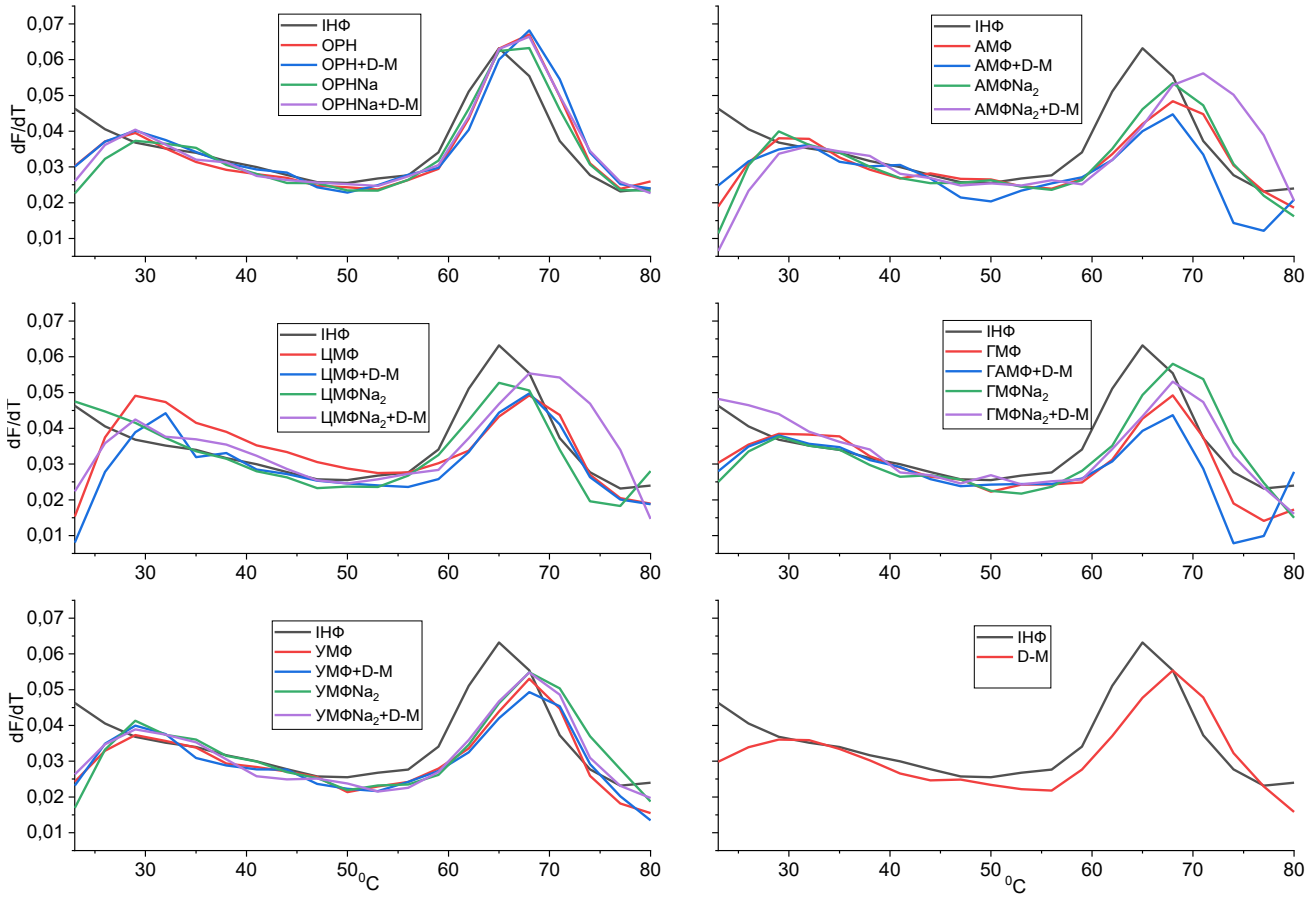


Рис. 3.9.Температурна залежність власної флуоресценції ІНФ α-2b

Для ІНФ α-2b без ліганду значення $T_{плавлення}$, визначене інтерполяційним методом, становило 68,54 °C. У присутності лігандів $T_{плавлення}$ змінювалося від 65,32 °C для ІНФ α-2b з $ГМФNa_2$ до 71,10 °C для ІНФ α-2b з АМФ. Найбільше підвищення відносно контролю становило +2,56 °C для АМФ, а найбільше зниження — −3,22 °C для $ГМФNa_2$. Для 17 із 20 нуклеотид-вмісних умов зміна $T_{плавлення}$ не перевищувала 2 °C, причому більшість значень знаходилася в межах ±1,5 °C. Для ІНФ α-2b у присутності D-манітолу $T_{плавлення}$ становило 69,03 °C, тобто на 0,49 °C вище, ніж у контрольній групі. Для систем ІНФ α-2b з дріжджовою РНК значення $T_{плавлення}$ становили 66,70–67,68 °C, що відповідало змінам від −1,84 до −0,86 °C.

Зміна інтенсивності флуоресценції тіофлавіна Т (ThT) (рис. 3.10) для кислотних форм нуклеотидів та їх композицій із D-манітолом становила 0,46–1,07.

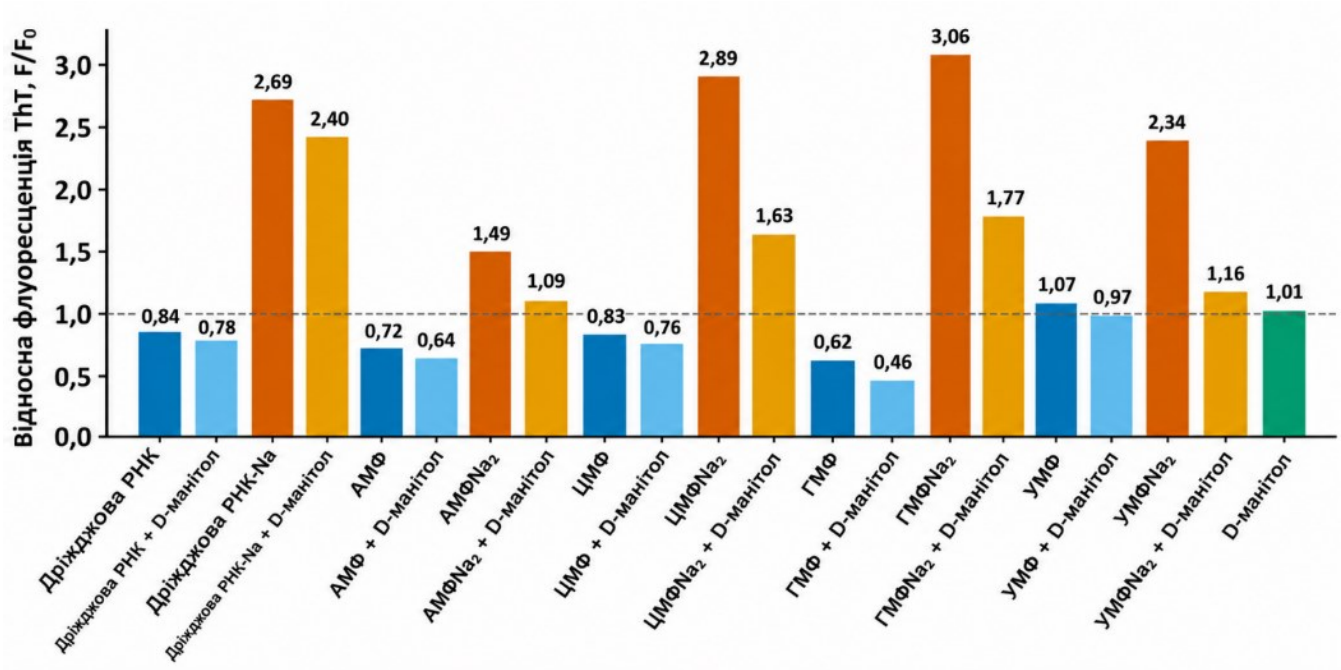


Рис. 3.10. Відносна ThT-флуоресценція ІНФ α-2b у присутності кислотних і динатрієвих форм нуклеотидів та D-манітолу.

Примітка. Пунктирна лінія відповідає рівню контролю ІНФ α-2b

Для динатрієвих форм без D-манітолу вона складала 1,49 для $AMPNa_2$, 2,89 для $CMPNa_2$, 3,06 для $GMPNa_2$, 2,34 для $UMPNa_2$ та 2,69 для ORNsNa. У композиціях із D-манітолом інтенсивність сигналу ThT для динатрієвих форм змінювалась у 1,09–2,40 рази. Для системи IFNα-2b з D-манітолом співвідношення дорівнювало приблизно

1,01. Карта зіставлення показників засвідчила, що виражена зміна сигналу ThT для кількох динатрієвих форм нуклеотидів не завжди супроводжувався підвищенням $T_{плав.}$.

Наприклад, $GMPNa_2$ мав найбільший негативний тепловий зсув (−3,22 °C) та найбільший приріст інтенсивності ThT (3,06), тоді як $CMPNa_2$ мав тепловий зсув, близький до референсного (−0,19 °C), та приріст світіння ThT − 2,89. У 20 умовах коефіцієнт Пірсона становив −0,19, а ρ Спірмена – 0,04.

3.1.6. Дослідження вторинної структури ІНФ α-2b та її змін при взаємодії з лігандами методом спектроскопії кругового дихроїзму. Для підтвердження припущення про зміну конформації ІНФ α-2b під час взаємодії з ОРН нами проведено КД-дослідження вторинної структури білка. ОРН у кислій формі, а особливо в комплексі з D-манітолом, призводять до зміни конформаційної рухливості за рахунок збільшення вмісту неупорядкованих ділянок. Водночас сольові аналоги збільшують кількість структурованих вторинних елементів і, ймовірно, підвищують конформаційну жорсткість ІНФ α-2b.

Різні конформації, особливо вторинної структури, білків вивчаються за допомогою спектроскопії кругового дихроїзму. Відомо, що вторинна структура білків проявляє чіткий КД-спектр унаслідок змін їхньої конформації, особливо під час взаємодії з різними лігандами.

Раніше круговий дихроїзм ми використовували для оцінювання впливу різних форм 5′-АМФ та олігорибонуклеотидів на вторинну структуру ІНФ α-2b [88]. У цій роботі метод застосовано для кількісного порівняння помірних змін у конформаційному ансамблі. Результати деконволюції трактували як алгоритм-залежні оцінки часток структурних елементів, а не як самостійний доказ денатурації або функціональної активації білка.

За даними спектроскопії кругового дихроїзму, взаємодія ІНФ α-2b з різними формами 5′-рибонуклеозидмонофосфатів супроводжувалася помірними, залежними від ліганду змінами часток елементів вторинної структури. Напрямок і величина цих змін залежали від хімічної та іонної форми нуклеотиду, тому їх не слід інтерпретувати як універсальне розгортання α-спіралей або дестабілізацію білка. Результати КД

свідчать радше про перерозподіл компонентів вторинної структури в межах конформаційного ансамблю ІНФ α-2b.

Таким чином, ОРН, особливо ОРН: D-M та АМФ:D-M, призводять до зміни конформаційної рухливості ІНФ α-2b шляхом збільшення вмісту невпорядкованих ділянок за BeStSel (табл. 3.8). Інші деконволюції наведені в табл. В.1–В.3.

Таблиця 3.8

Вплив різних форм 5′-НМФ на вміст елементів вторинної структури ІНФ α-2b %

Система	α-спіралі	антипаралельні β-шари	паралельні β-шари	β-повороти	невпорядкована структура
ІНФ	37,6	20,3	0	6,8	35,3
ІНФ +ГМФ	25,5	8,6	0	7,1	58,8
ІНФ +ГМФ+D-M	26,1	8	0	6,7	59,2
ІНФ +ГМФNa_2	41,5	20,8	2,4	11	24,3
ІНФ +ГМФNa_2+D-M	36,5	20,7	0,7	10,5	31,6
ІНФ +ЦМФ	26,5	8,4	0	7,8	57,3
ІНФ +ЦМФ+D-M	27,7	7	0	7,1	58,2
ІНФ +ЦМФNa_2	45,5	25,6	1,5	11,1	16,3
ІНФ +ЦМФNa_2+D-M	47,6	24,4	1,1	10,7	16,2
ІНФ +УМФ	33,5	8,2	0,1	8	50,2
ІНФ +УМФ+D-M	29,2	8,5	0	7,5	54,8
ІНФ +УМФNa_2	45,6	23,6	2,6	10,2	18
ІНФ +УМФNa_2+D-M	46,6	23,6	1,4	10,3	17,1
ІНФ +АМФ	25,4	8,1	0	7,3	59,2
ІНФ +АМФ+D-M	29,1	7,7	0	7,6	55.6
ІНФ +АМФNa_2	41,9	25,1	1,5	12,3	19,2
ІНФ +АМФNa_2+D-M	49,5	24	1	11,7	13,8
ІНФ +ОРН	27,8	8,8	0	7,6	55,8
ІНФ + ОРН +D-M	26,2	7,6	0	7,2	59
ІНФ + ОРН-Na_2	43,8	25,7	2	11,9	16,6
ІНФ +ОРН-Na_2+D-M	47,5	24,5	1	10,8	16,2
ІНФ +D-M	32,3	12,3	3,5	7,2	44,7

Водночас сольові аналоги збільшують кількість структурованих вторинних елементів, таких як α-спіралі, β-повороти та β-антипаралельні шари, і, ймовірно, підвищують конформаційну жорсткість ІНФ α-2b.

ІНФ α-2b без лігандів має 37,6% альфа-спіралей, 20,3% антипаралельних бета-шарів, 0% паралельних бета-шарів, 6,8% бета-згинів і 35,3% неорганізованої структури. Це базовий стан білка.

За даними КД-аналізу, додавання кислотних форм ГМФ, ЦМФ, УМФ і АМФ супроводжувалося зменшенням оціненої частки α-спіральної структури ІНФ α-2b приблизно з 37% до 25–33%, зменшенням частки антипаралельних β-структур і збільшенням неупорядкованої компоненти до приблизно 50–59%. Для відповідних динатрієвих форм характер змін був іншим і загалом відповідав менш вираженому зростанню неупорядкованої компоненти.

Ці відмінності свідчать про залежність спектральної відповіді ІНФ α-2b від іонної форми нуклеотиду. Водночас динатрієва сіль у водному розчині не означає утворення електронейтрального нуклеотиду, оскільки Na^+ і аніонна форма нуклеотиду перебувають у розчині як іонні компоненти. Можливий вплив Na^+ на гідратацію, екранування електростатичних взаємодій і характер білок–лігандного контакту слід розглядати лише як гіпотезу, що потребує спеціальних контролів іонної сили та складу середовища.

Додавання D-манітолу не спричиняло однаково спрямованих значних змін оцінених часток вторинної структури в усіх системах, тому його вплив слід описувати як залежний від конкретного нуклеотиду та його іонної форми.

Зовсім інша картина спостерігається для динатрієвих солей нуклеотидів. У всіх випадках ($ГМФNa_2$, $ЦМФNa_2$, $УМФNa_2$, $АМФNa_2$) вміст альфа-спіралей зростає вище контрольного рівня (до ~41–49%), антипаралельні бета-шари також збільшуються або залишаються на рівні контролю (~20–25%), а частка неорганізованої структури різко знижується (до ~16–24%). Це вказує на значну стабілізацію вторинної структури. Додавання D-манітолу до цих комплексів у деяких випадках трохи зменшує альфа-спіральність (наприклад, для $ГМФNa_2$ — з 41,5% до 36,5%), але загальна структура залишається дуже стабілізованою порівняно з контролем.

Ключовим спостереженням є залежність КД-оцінених параметрів вторинної структури ІНФ α-2b від іонної форми нуклеотидів. Кислотні та натрієві форми спричиняли різні за напрямком і величиною зміни часток α-спіралей, β-структур і

неупорядкованих ділянок. Однак ці зміни не можна безпосередньо трактувати як термодинамічну стабілізацію або дестабілізацію білка. Вплив нуклеїнових основ, нуклеозидів і D-манітолу також був залежним від конкретної системи та загалом відповідав помірній модуляції конформаційного ансамблю ІНФ α-2b, а не універсальному стабілізувальному чи дестабілізувальному ефекту.

Відмінності між кислотною та натрієвою формами нуклеотидів узгоджуються з впливом їхньої іонної форми на взаємодію з ІНФ α-2b. Водночас безпосередню роль Na^+ та зв'язок цих відмінностей зі стабільністю білка необхідно перевіряти окремо. Можливими чинниками можуть бути екранування електростатичних взаємодій, іонне парування та зміни сольватації нуклеотидного аніона і білкової поверхні. Такі ефекти здатні модифікувати характер білок–лігандної взаємодії без зміни формального заряду нуклеотидного аніона. Тому спостережувані відмінності між кислотною та натрієвою формами не слід безпосередньо інтерпретувати як наслідок нейтралізації фосфатної групи або як доказ стабілізації чи дестабілізації ІНФ α-2b.

Додавання D-манітолу (D-M) разом із нуклеотидами має різний ефект. У випадку вільних кислот нуклеотидів (без Na) D-M не вносить суттєвих змін. Для динатрієвих солей D-M іноді трохи зменшує α-спіральність (наприклад, для $ГМФNa_2$ — з 41,5% до 36,5%), але для інших (наприклад, $АМФNa_2$) навіть збільшує її (з 41,9% до 49,5%). В цілому, D-M, схоже, не радикально змінює картину, але може модулювати ефект.

За наведеними даними, сумарна гідролізована дріжджова РНК (ОРН) поводиться аналогічно нуклеотидам: без натрію дестабілізує, а у формі натрієвої солі (ОРН-Na) — сильно стабілізує її структуру.

Значення константи дисоціації K_d та стандартної вільної енергії Гіббса $\Delta G°$ характеризують афінність ліганду до білка та термодинамічну вигідність утворення комплексу. Менші значення K_d і більші значення Ka відповідають вищій афінності, тоді як більш негативне значення $\Delta G°$ свідчить про термодинамічно більш сприятливий процес зв'язування.

Стандартну вільну енергію Гіббса розраховували при 310 K за рівнянням:

$$\Delta G° = RT \times \ln(K_d/1M).$$

Кислотні форми нуклеотидів характеризувалися одними з найнижчих значень спостережної константи дисоціації K_d серед досліджених форм, причому найбільш виражена тенденція до зв'язування спостерігалася для ГМФ і АМФ. Композиції нуклеотидів із D-манітолом у деяких випадках характеризувалися ще нижчими значеннями K_d, зокрема, максимальне значення належало композиції ГМФ+D-манітол, а не вільному ГМФ. З огляду на модельну залежність оцінювання та обмежену ідентифікованість наномолярних K_d у КД-титруваннях, ці результати слід трактувати як відносні відмінності спостережної спорідненості, а не як доказ високоафінного зв'язування (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Видимі параметри зв'язування та розраховані термодинамічні показники за даними КД-титрування

P+L	**Kd, 10^{-6} M**	**ΔG°, kJ/M^{-1}**	**P+L**	**Kd, 10^{-6} M**	**ΔG° ,kJ/M^{-1}**
ІНФ +ГМФ	0,20	-4,395	ІНФ +УМФNa_2	0,88	-4,027
ІНФ +ГМФ+D-M	0,13	-4,501	ІНФ +УМФNa_2+D-M	0,69	-4,088
ІНФ +ГМФNa_2	0,66	-4,099	ІНФ +АМФ	0,24	-4,349
ІНФ +ГМФNa_2+D-M	0,61	-4,118	ІНФ +АМФ+D-M	0,22	-4,371
ІНФ +ЦМФ	0,37	-4,242	ІНФ +АМФNa_2	0,84	-4,039
ІНФ +ЦМФ+D-M	0,40	-4,223	ІНФ +АМФNa_2+D-M	0,80	-4,051
ІНФ +ЦМФNa_2	0,83	-4,042	ІНФ +ОРН	0,27	-4,320
ІНФ +ЦМФNa_2+D-M	0,84	-4,039	ІНФ + ОРН +D-M	0,25	-4,339
ІНФ +УМФ	0,61	-4,118	ІНФ + ОРН-Na	0,85	-4,036
ІНФ +УМФ+D-M	0,56	-4,139	ІНФ + ОРН-Na+D-M	0,85	-4,037

Для вільних мононуклеотидів, що не містили Na^+ та D-манітолу, значення K_d знаходилися в межах 0,20–0,61 × 10^{-6} М. Відповідні значення ΔG° становили від −4,116 до −4,392 кДж·$моль^{-1}$. Найвищу афінність серед досліджених вільних мононуклеотидів виявлено для ГМФ K_d=0,20*10^{-6}M; ΔG° =-4,392 кДж·$моль^{-1}$ та АМФ K_d=0,24*10^{-6} М; ΔG° =-4,347 кДж·$моль^{-1}$. ОРН також характеризувалися високою видимою афінністю K_d=0,27*10^{-6} М; ΔG°=-4,318 кДж·$моль^{-1}$.

Натрієві форми нуклеотидів характеризувалися нижчою афінністю до ІНФ α-2b. Для ГМФNa_2, ЦМФNa_2, УМФNa_2 та АМФNa_2 значення K_d становили 0,66–0,88 × 10^{-6} М, тоді як ΔG° знаходилися у відносно вузькому діапазоні −4,025...−4,097 кДж·$моль^{-1}$.

Аналогічна тенденція спостерігалась для ОРН-Na K_d=0,85*10^{-6} М; ΔG° =-4,034) кДж·моль$^{-1}$. Таким чином, перехід від кислотної до натрієвої форми супроводжувався зростанням K_d та зменшенням абсолютної величини негативної ΔG°, що свідчить про послаблення афінності до ІНФ α-2b.

Вплив D-манітолу залежав від природи ліганду. Найбільш виражений ефект спостерігався для ГМФ: додавання D-манітолу знижувало K_d з 0,20 до 0,13 × 10^{-6} М і змінювало ΔG° з −4,392 до −4,499 кДж·моль$^{-1}$. Комплекс ІНФ α-2b+ГМФ+D-М характеризувався найнижчим K_d та найнегативнішою ΔG° серед досліджених систем. Для АМФ ефект D-манітолу був меншим: K_d знижувався з 0,24 до 0,22 × 10^{-6} М, а ΔG° змінювалася з −4,347 до −4,369 кДж·моль$^{-1}$. Для УМФ та ОРН також спостерігалося невелике посилення видимої афінності.

Водночас ефект D-манітолу не був універсальним. Для ЦМФ значення (K_d) дещо збільшувалося з 0,37 до 0,40 × 10^{-6} М, а ΔG° ставала менш негативною від −4,240 до −4,221 кДж·моль$^{-1}$. Для динатрієвих форм зміни були переважно невеликими; найбільш помітне покращення спостерігалося для УМФNa_2, тоді як для ЦМФNa_2 та ОРН-Na ефект D-манітолу був практично відсутнім.

Отже, результати КД-титрування вказують на систематично вищу афінність кислотних форм нуклеотидів та ОРН до ІНФ α-2b порівняно з відповідними натрієвими формами. D-манітол може додатково модулювати зв’язування, однак величина та напрямок цього ефекту залежать від структури нуклеотиду.

Для динатрієвих солей ефект D-М неоднозначний і слабо виражений. У деяких випадках зв'язування трохи посилюється (ГМФNa_2, УМФNa_2), в інших — майже не змінюється або навіть трохи ослаблюється (ЦМФNa_2, АМФNa_2). D-М виступає як фактор, стабілізуючий комплексний білок ІНФ із вільними нуклеотидами, але практично не впливає на зв'язок з їх натрієвими солями.

Кислотні форми нуклеотидів загалом характеризувалися нижчими значеннями видимого K_d, ніж відповідні натрієві форми, що вказує на відмінності їхньої видимої спорідненості до ІНФ α-2b. Водночас зміни оцінених часток вторинної структури залежали від хімічної та іонної форми ліганду і не могли безпосередньо трактуватися як стабілізація або дестабілізація білка. D-манітол модулював параметри окремих

систем, однак його вплив був не універсальним і залежав від конкретного нуклеотиду та його форми. У межах дослідженої серії одні з найбільш виражених тенденцій до зв’язування спостерігали для пуринових нуклеотидів ГМФ і АМФ, у деяких випадках — у композиціях із D-манітолом. Отримані результати характеризують фізико-хімічні особливості взаємодії, але самі по собі не доводять впливу на біологічну функцію ІНФ α-2b.

Можливо, білок ІНФ α-2b має два типи зв'язування сайтів або різні режими взаємодії: один — високоафінний, але викликає конформаційні зміни (для вільних нуклеотидів), і інший — нековалентний мікромодулятор, що стабілізує структуру (для динатрієвих солей). D-M, ймовірно, діє на перший тип взаємодій.

Спостережні значення K_d розділяли ті самі хімічні класи, ідентифіковані за допомогою КД (рис.3.11; табл. 3.9).

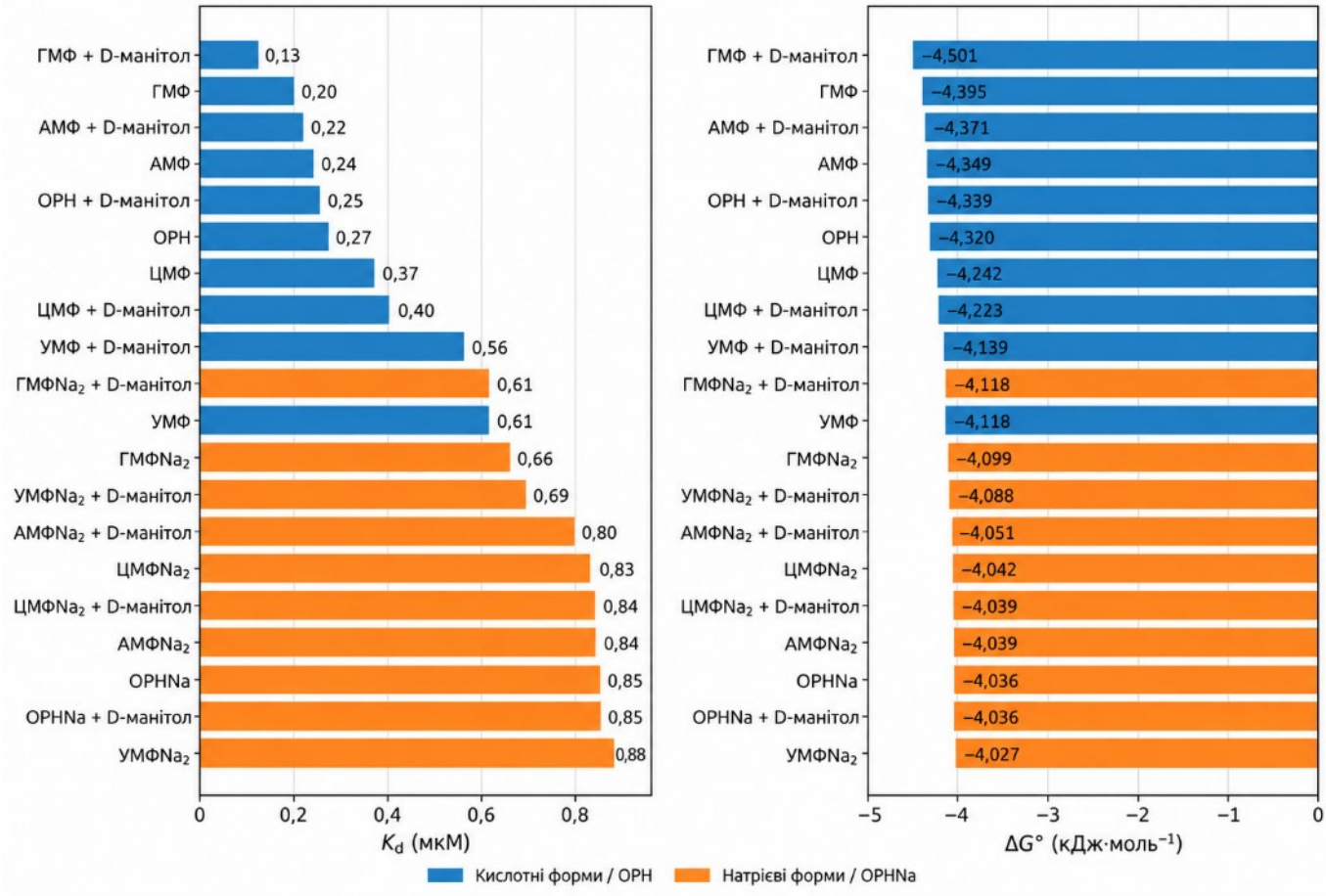


Рис. 3.11. Параметри зв’язування, отримані за допомогою КД-титрування.

За відсутності D-манітолу, кислотні/ОРН форми мали середнє видиме K_d 0,338 мкМ, порівняно з 0,812 мкМ для динатрієвих солей, що відповідає приблизно у 2,4 раза

сильнішій видимій спорідненості до кислотної/ОРН групи. Для D-манітолу відповідні середні значення груп становили 0,312 та 0,758 мкМ.

Ліворуч – значення K_d. Праворуч — стандартні вільні енергії, перераховані як $\Delta G° = -RT \ln(1/K_d)$ за температури 310 K. Більш негативне значення $\Delta G°$ вказує на більшу вільну енергію асоціації ГМФ плюс D-манітол показали найменший K_d (0,13 мкМ), далі йдуть ГМФ (0,20 мкМ), АМФ плюс D-манітол (0,22 мкМ) та АМФ (0,24 мкМ). Серед солей натрію значення згрупувалися в інтервалі 0,61–0,88 нМ. Такий рейтинг підтверджує сильний вплив хімічної форми та вторинний вплив ідентичності основи. Оскільки всі значення знаходяться нижче зазначеної концентрації білка, їхня головна доказова цінність — порівняльна, а не твердження про точні константи рівноваги.

Вплив D-манітолу на спостережувані параметри зв’язування був неоднаковим для різних лігандів. Для ГМФ значення K_d зменшилося з 0,20 до 0,13 мкМ, тобто приблизно на 35%. Для АМФ та ОРН зменшення становило близько 8% і 7% відповідно. Для УМФ K_d змінювалося з 0,61 до 0,56 мкМ, тоді як для ЦМФ — з 0,37 до 0,40 мкМ. Серед динатрієвих форм найбільша числова зміна спостерігалася для $УМФNa_2$: з 0,88 до 0,69 мкМ, що відповідає зменшенню приблизно на 21,6%. Для $ГМФNa_2$ та $АМФNa_2$ зміни були невеликими, для $ЦМФNa_2$ значення залишалися близькими, а для ОРН-Na — практично незмінними на рівні близько 0,85 мкМ. За відсутності оцінок похибки або статистичного порівняння ці відмінності слід розглядати як числові тенденції, а не як статистично підтверджений ефект D-манітолу.

Структурна реакція також була умовною. У присутності D-манітолу для $АМФNa_2$, $ЦМФNa_2$, $УМФNa_2$ та ОРН-Na спостерігали вищу оцінену частку α-спіральної структури; $ГМФNa_2$ був винятком за результатами всіх трьох алгоритмів. Ця гетерогенність свідчить проти опису D-манітолу як універсального стабілізатора в цій системі розчинів. Натомість він поводиться як залежний від рецептури модифікатор, ефект якого випливає з комбінованого контексту ліганду, протиіона, гідратації та білка.

У 20 препаратах K_d позитивно корелювала із середньою зміною α-спіралі (r Пірсона = 0,93): препарати сильно зв'язуючої кислоти/ОРН мали тенденцію до

негативних зсувів α-спіралі, тоді як слабше зв'язуючі солі натрію призводили до позитивних зсувів. У межах кожного класу залишалися очевидні відхилення, специфічні для основ і D-манітолу.

Таким чином, об'єднані дані відрізняють спорідненість зв'язування від структурного напрямку. Меншому значенню видимої константи дисоціації не обов’язково відповідала більша частка α-спіральної структури. У наведеному порівнянні ліганди з найменшими K_d були пов’язані з вищими оцінками частки невпорядкованої структури. І навпаки, солі натрію забезпечували більш спіральну КД-сигнатуру, незважаючи на нижчу видиму спорідненість.

3.1.7. Дослідження конформаційного стану ІНФ α-2b та спектральна ідентифікація мононуклеотидів методом інфрачервоної спектроскопії. ІЧ-спектри сумішей ОРН із D-манітолом реєстрували в діапазоні 700–4000 $см^{-1}$, що дозволяло одночасно аналізувати смуги азотистих основ, фосфатного остова та функціональних груп D-манітолу.

У ділянці 1500–1800 $см^{-1}$ окремі смуги ОРН, зокрема близько 1608, 1654 та 1698 $см^{-1}$, можуть бути пов’язані переважно з коливаннями азотистих основ і використовуватися для оцінювання спектральних змін за присутності D-манітолу. Зміни положення, інтенсивності та форми цих смуг розглядали як ознаки зміни локального молекулярного оточення та можливих міжмолекулярних взаємодій, але не як прямий метод визначення концентрації комплексу без відповідного калібрування.

У фосфатній ділянці смуга приблизно 1068–1087 $см^{-1}$ відповідає переважно симетричному валентному коливанню PO_2, тоді як смуга близько 1244 $см^{-1}$ — антисиметричному валентному коливанню PO_2. Смуга близько 1488 $см^{-1}$ переважно пов’язана з площинними коливаннями цитозину. Частина цих смуг перекривається зі смугами D-манітолу, що ускладнює їх однозначне кількісне трактування.

У ділянці 2800–3000 $см^{-1}$ нормована інтенсивність становила 0,65 для ОРН, 0,41 для ОРН-Na, 0,74 для ОРН + D-манітол та 0,56 для ОРН-Na + D-манітол (рис. 3.12). Цю спектральну область не слід відносити виключно до фосфатних груп, оскільки в ній істотний внесок мають валентні C–H-коливання, а в ширшій області близько 2800–

3200 см$^{-1}$ можливе також перекриття з O–H-коливаннями та воднево-зв’язаними групами. Тому відмінності інтенсивності розглядали як зміни сумарного спектрального оточення та воднево-зв’язаної мережі, а не як специфічний показник протонування фосфатної групи.

У спектральній області 3200–2800 см$^{-1}$ спостерігали відмінності в нормованій інтенсивності смуги між досліджуваними системами. Найвище значення було характерне для ОРН + D-манітол (0,74), далі — для ОРН (0,65), ОРН-Na + D-манітол (0,56) та ОРН-Na (0,41). Таким чином, за амплітудою сигналу системи розташовувалися в ряді: ОРН + D-М > ОРН > ОРН-Na + D-М > ОРН-Na. Оскільки в цій області перекриваються внески O–H- і C–H-валентних коливань, відмінності нормованої інтенсивності можуть відображати зміни молекулярного оточення та воднево-зв’язаної мережі, однак не дають змоги безпосередньо визначати кількість водневих зв’язків.

Спектри переважно відрізняються в області фінгерпринту 700–1700 см$^{-1}$. Збільшення ІЧ-поглинання в області 3200–2800 см$^{-1}$ свідчить про більший внесок коливань O–H/C–H у лігандах нуклеотидної природи.

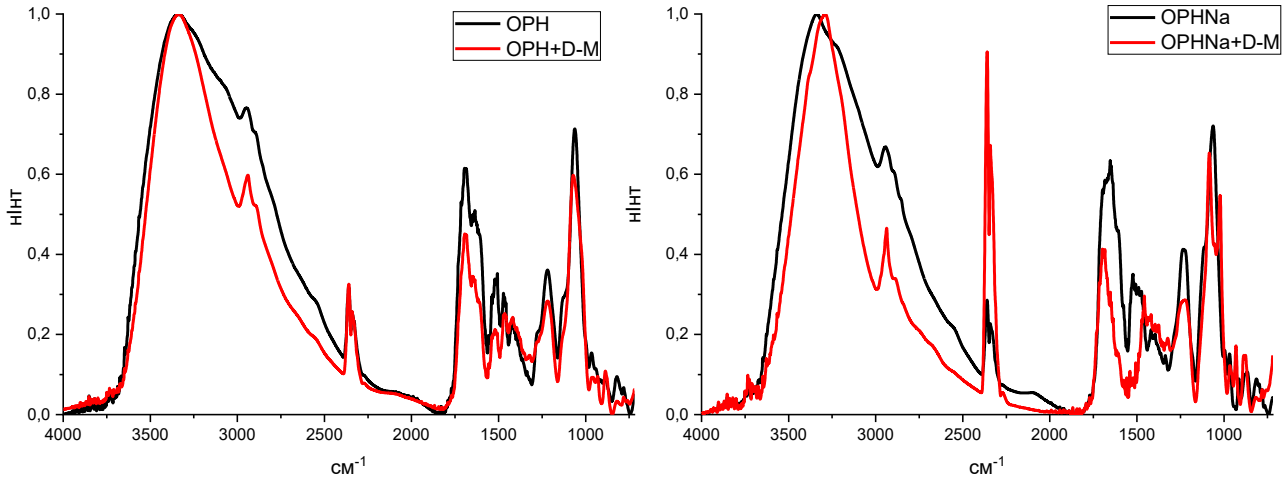


Рис. 3.12. Нормовані інфрачервоні спектри ОРН у діапазоні 4000–720 см$^{-1}$

У ділянці 3000–2800 см$^{-1}$ нормована інтенсивність сигналу відрізнялася між досліджуваними формами ОРН. Для комплексу ОРН + D-манітол вона становила 0,74, для вільної кислої форми ОРН — 0,65, для ОРН-Na + D-манітол — 0,56, а для ОРН-Na

— 0,41 (рис. 3.12). Таким чином, за використаного способу нормування спостерігалася послідовність ОРН + D-манітол > ОРН > ОРН-Na + D-манітол > ОРН-Na.

ІЧ-спектроскопію використовували для порівняння коливальних характеристик досліджуваних нуклеотидних форм за положенням та відносною інтенсивністю спектральних смуг. У цій серії аналізували відповідні нуклеозидмонофосфати (НМФ) у кислотній та динатрієвій препаративних формах. Спектри НМФ отримані в спектральному діапазоні 720–4000 $см^{-1}$ за 32 цикли в тонкошаровій каплі на ZnSe-склі. Спектри в основному відрізняються в області фінгерпринту 700–1700 $см^{-1}$. Протони на фосфатній групі представлені піками АМФ 938 та 816 $см^{-1}$, ЦМФ 947 та 819 $см^{-1}$, ГМФ 957 та 807 $см^{-1}$, УМФ 822 та 806 $см^{-1}$ (рис. 3.13).

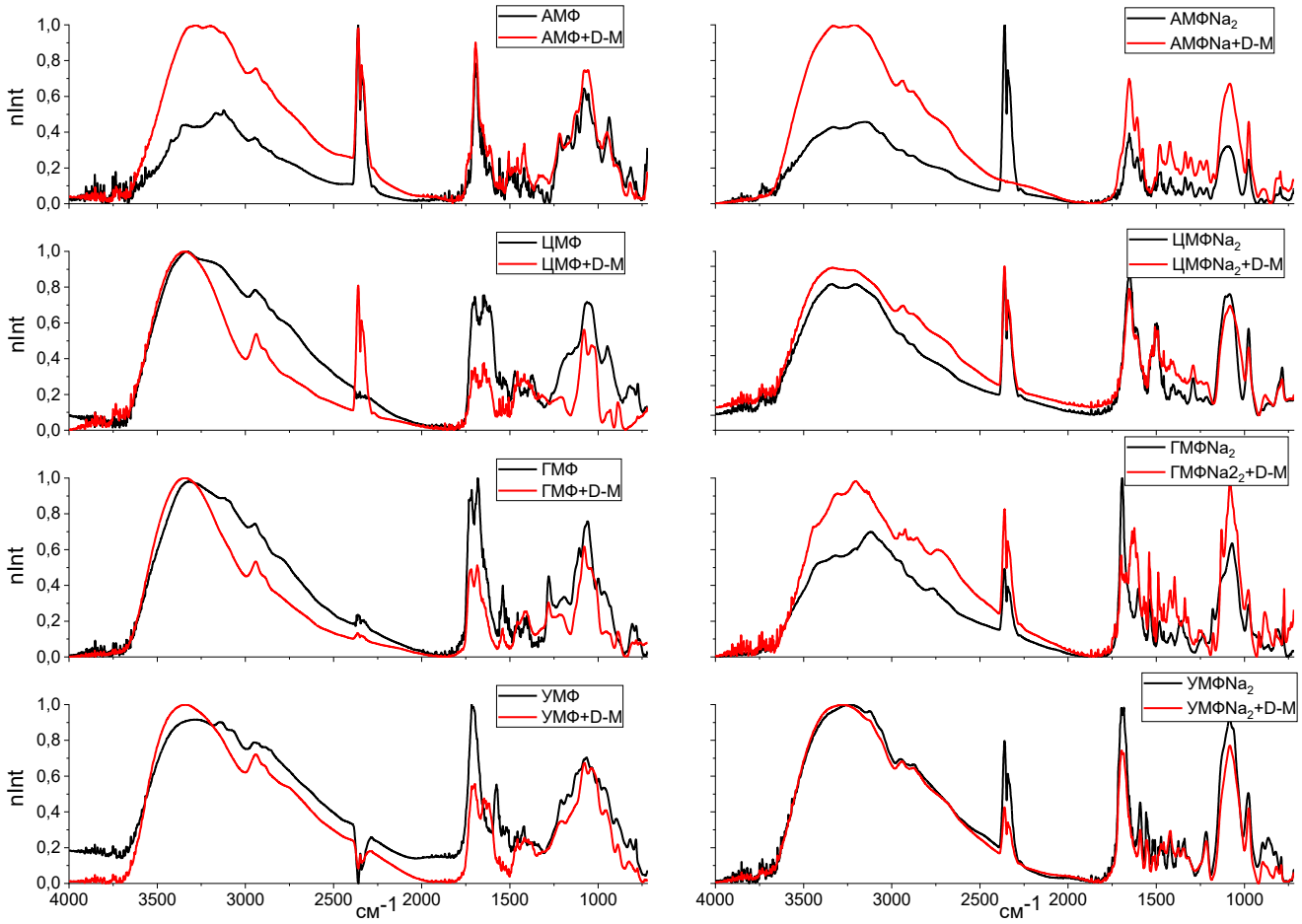


Рис. 3.13. Нормовані інфрачервоні спектри НМФ у діапазоні 4000–720 $см^{-1}$.

Відмінності ІЧ-спектрів кислотних і динатрієвих форм НМФ відображали зміни коливальних мод фосфатної групи, рибози та азотистої основи. Наявність або зміна

інтенсивності окремих смуг не дозволяє безпосередньо визначати кількість протонів у фосфатній групі. Зокрема, смуги в області приблизно 970–980 $см^{-1}$ можуть містити внесок фосфат-естерних і рибозофосфатних скелетних коливань, тоді як область близько 1080–1095 $см^{-1}$ характерна переважно для симетричних валентних коливань фосфатної групи.

Вільні кислоти (АМФ, ГМФ, ЦМФ, УМФ, ОРН) суттєво знижують вміст α-спіралей (до 28–32% проти 41,2% у контролі) та збільшують частку невпорядкованої структури (до 51–62% проти 34,8% у контролі) (рис. 3.14, табл. 3.10).

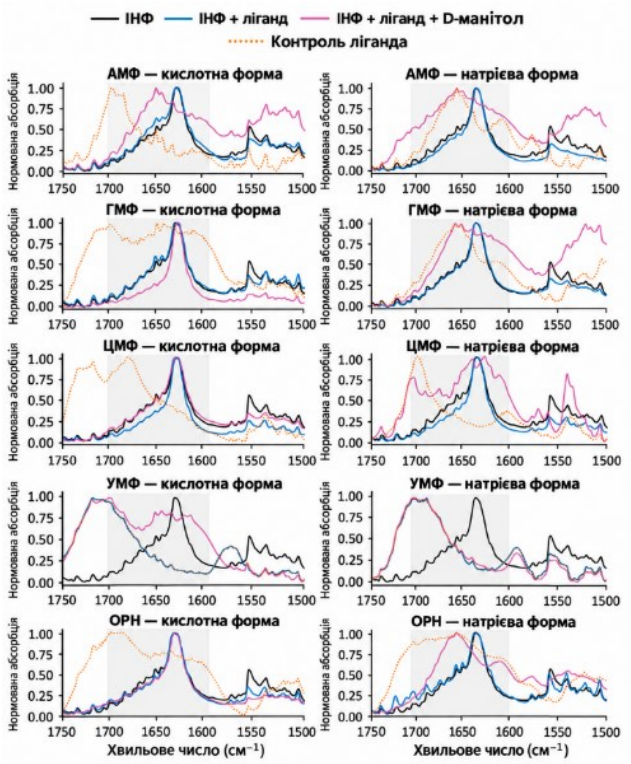


Рис. 3.14. Спектри ІНФ α-2b, суміші та ліганд-контролю перекриваються в області аміду I

Примітка. Незалежні ліганд-контролі поглинають в одному вікні, що запобігає однозначному віднесенню відмінностей у суміші до вторинної структури білка

Смуги в діапазоні приблизно 1200–1500 $см^{-1}$ можуть містити перекривні внески коливань азотистих основ, рибози та фосфатного остова, тому їх однозначне віднесення до окремих атомів Гідрогену без розрахунку нормальних коливань або додаткових спектроскопічних даних є некоректним. Виявлені відмінності між спектрами АМФ, ЦМФ, УМФ і ГМФ та їх динатрієвими формами надалі розглядалися

як прояв зміни іонного стану й локального молекулярного оточення відповідних функціональних груп.

Натрієві солі нуклеотидів (АМФNa_2, ГМФNa_2, ЦМФNa_2, УМФNa_2, ОРН-Na) зберігають або навіть збільшують вміст α-спіралей (38–44%) та значно знижують невпорядковану структуру (22–28%) (табл. 3.10). Отже, вони стабілізують структуру білка.

Таблиця 3.10

Вміст елементів вторинної структури ІНФ α-2b під впливом нуклеотидів, їхніх динатрієвих солей та D-манітолу за даними інфрачервоної спектроскопії (M ± SD, %)

Ліганд / структура	1660–1649 cm^{-1} α-спіралі	1640–1615 cm^{-1} β-листи	1680–1660 cm^{-1} β повороти	1648–1641 cm^{-1} неструктуровані ділянки
ІНФ	41,2±0.5	17,9±0,9	6,1±0,6	34,8±1,1
ІНФ +АМФ	28,7±0,6*	9,5±0,8*	6,9±0,5	54,9±1,3*
ІНФ +АМФ+D-M	32,4±0,7*	6,8±0,9*	7±0,6	53,8±1,2*
ІНФ +АМФNa_2	38,5±0,6*	24,1±1,0*	11,7±0,8*	25,7±1,0*
ІНФ +АМФNa_2+D-M	46,1±0,5*	22,3±1,1*	10,5±0,7*	21,1±0,9*
ІНФ +ГМФ	29,8±0,6*	10,2±0,8*	6,4±0,5	53,6±1,3*
ІНФ +ГМФ+D-M	30,5±0,7*	7,3±0,9*	5,9±0,6	56,3±1,2*
ІНФ +ГМФNa_2	39,2±0,6*	21,7±1,0*	10,8±0,8*	28,3±1,1*
ІНФ +ГМФNa_2+D-M	43,1±0,5*	19,8±1,0*	9,2±0,7*	27,9±1,0*
ІНФ +ЦМФ	31,6±0,7*	9,8±0,9*	7,2±0,6	51,4±1,3*
ІНФ +ЦМФ+D-M	25,9±0,5*	6,1±0,8*	6,4±0,5	61,6±0,9*
ІНФ +ЦМФNa_2	42,3±0,6	25,4±1,1*	10,1±0,8*	22,2±0,9*
ІНФ +ЦМФNa_2+D-M	44,7±0,5*	23,9±1,0*	9,5±0,7*	21,9±0,9*
ІНФ +УМФ	29,8±0,6*	9,7±0,8*	7,5±0,5	53±1,2*
ІНФ +УМФ+D-M	34,1±0,7*	7,9±0,9*	6,8±0,6	51,2±1,2*
ІНФ +УМФNa_2	43,9±0,6*	24,6±1,1*	9,3±0,8*	22,2±0,9*
ІНФ +УМФNa2+D-M	44,2±0,5*	24,1±1,0*	9,6±0,7*	22,1±0,9*
ІНФ +ОРН	32,5±0,6*	7,9±0,8*	6,8±0,5	52,8±1,3*
ІНФ +ОРН+D-M	28,4±0,5*	6,3±0,8*	6,1±0,5	59,2±1,4*
ІНФ +ОРН-Na	40,1±0,6	25,3±1,1*	11,2±0,8*	23,4±1,0*
ІНФ +ОРН-Na+D-M	44,8±0,5*	23,1±1,0*	9,7±0,7*	22,4±0,9*

У поєднанні з вільними кислотами ефект манітолу неоднозначний: для деяких умов (наприклад, ІНФ α-2b+АМФ+D-M) спостерігається незначне збільшення α-

спіралей, для інших (наприклад, ІНФ α-2b+ЦМФ+D-М) — подальше зниження. Вміст невпорядкованої структура залишається високим.

У композиціях динатрієвих форм нуклеотидів із D-манітолом у деяких випадках спостерігали збільшення оціненої частки α-спіральної структури; зокрема, для ІНФ α-2b + АМФNa_2 + D-манітол вона становила до 46,1%. Це свідчить про спільний вплив іонної форми нуклеотиду та D-манітолу на оцінені параметри вторинної структури ІНФ α-2b.

Серед динатрієвих солей найвищий вміст α-спіралей спостерігається для ЦМФNa_2 (42,3%) та УМФNa_2 (43,9%), найнижчий — для АМФNa_2 (38,5%). Для вільних кислот найменшу дестабілізацію викликає ЦМФ (α-спіраль 31,6%), найбільшу — АМФ (α-спіраль 28,7%).

Наявність катіонів натрію, ймовірно, сприяє формуванню іонних взаємодій з білком, що підтримує його вторинну структуру. Вільні кислоти, позбавлені таких катіонів, можуть порушувати електростатичний баланс, що призводить до часткової денатурації. Манітол, відомий як стабілізуючий агент, посилює позитивний ефект динатрієвих солей, можливо, за рахунок зменшення стресу, пов'язаного з осмотичними ефектами, або безпосередньої взаємодії.

Натрієві солі нуклеотидів стабілізують вторинну структуру білка ІНФ, зберігаючи α-спіралі та зменшуючи його невпорядкованість. Додавання манітолу посилює цю стабілізацію. Навпаки, вільні кислоти нуклеотидів дестабілізують структуру, збільшуючи частку невпорядкованих ділянок. Ці результати можуть бути важливими для розуміння умов зберігання або застосування білкових препаратів у присутності нуклеотидів.

В Додатку В (табл. В.6) містить відносні зміни інтенсивності ІЧ-смуг, попередньо віднесених за літературними даними до характерних коливальних мод певних типів бічних груп амінокислот ІНФ α-2b. Таке віднесення не дозволяє однозначно ідентифікувати внесок конкретного амінокислотного залишку, оскільки ІЧ-смуги різних функціональних груп можуть перекриватися.

Відносну зміну інтенсивності розраховували за формулою

$\Delta I(\%)=100*(I_{corr}-I_{ІНФ})/I_{ІНФ}$, де I_{corr} — інтенсивність відповідної смуги спектра системи ІНФ α-2b–ліганд після віднімання спектра ліганду за тієї самої концентрації; для композицій із D-манітолом віднімали контрольний спектр відповідної композиції ліганд–D-манітол; $I_{ІНФ}$ — інтенсивність тієї самої смуги контрольного ІНФ α-2b після корекції на фон буфера. Таким чином, $I_{ІНФ}$ використовували як знаменник і референтне значення $\Delta I = 0$ для контролю. Великі значення ΔI слід трактувати обережно, оскільки вони можуть виникати за низької початкової інтенсивності відповідної контрольної смуги та не є безпосередньою мірою кількості залучених амінокислотних залишків або сили їх взаємодії.

ІЧ-спектральні дані свідчать про зміни локального оточення функціональних груп ІНФ α-2b під час взаємодії з нуклеотидами та олігорибонуклеотидами (ОРН). Напрям і величина змін залежать від природи ліганду, його кислотної чи натрієвої форми та присутності D-манітолу.

Найбільші відносні зміни інтенсивності окремих смуг спостерігали для УМФ: приблизно +203,2% для Asp, +262% для Cys, +730,4% для Glu та +1364% для Thr. ГМФ також спричиняв виражені зміни, тоді як вплив АМФ і ЦМФ загалом був помірнішим. Для ЦМФ інтенсивність смуг, попередньо віднесених до Ala, Leu та Ile, знижувалася приблизно на 53–54%, що може відображати зміни в оточенні гідрофобних груп. Таке ранжування характеризує амплітуду ІЧ-відгуку, а не спорідненість лігандів до білка.

Перехід до динатрієвих форм істотно змінював спектральну відповідь, проте універсальної тенденції не виявлено. Наприклад, для смуги Thr зміна становила близько −63,6% у присутності ЦМФ і +333% — ЦМФNa_2. Відмінності між кислотами та солями можуть бути пов’язані зі станом протонування, електростатичним оточенням і гідратацією, однак самі ІЧ-дані не встановлюють конкретного механізму взаємодії.

Вплив D-манітолу також залежав від системи. Для АМФ він змінював ΔI смуги Asp із −3,6% до +84,6%. Для ГМФ амплітуда змін зменшувалася: для Glu — приблизно з +364% до +15,8%, Asp — із +164,9% до −22,5%, Thr — із +657% до +64,9%. Для УМФ відповідні значення знижувалися до +544,8%, +146,8% і +1005%, залишаючись

значними. У системі АМФNa_2 додавання D-манітолу посилювало негативні зміни смуг Ala, Cys та Ile приблизно до −84–−85%, тоді як для УМФNa_2 зменшувало амплітуду окремих позитивних змін.

Участь залишків Asp, Cys та Gln у взаємодії з лігандами додатково підтверджується змінами інтегральної інтенсивності смуг в ІЧ-спектрах поглинання ІНФ після зв'язування з лігандом (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

Зміна інтегральної інтенсивності характеристичної смуги амінокислотного залишку ІНФ порівняно з контролем (без ліганду)

АК	**Лігандний комплекс**	**ІЧ, %**	**АК**	**Лігандний комплекс**	**ІЧ, %**	**АК**	**Лігандний комплекс**	**ІЧ, %**
Asp	АМФ	−3.60	Leu	ГМФ+D-M	−45.75	Ala	ГМФ+D-M	−47.41
	ГМФNa_2	119.47		УМФNa_2	69.13		УМФNa_2	81.31
Ser	ЦМФ	−58.06	**Asp**	ГМФ+D-M	−22.51	Gln	ЦМФ	−63.60
	ЦМФ+D-M	103.64		УМФNa_2	53.40		ЦМФ+D-M	80.56
	ГМФNa_2	113.51	Glu	ЦМФNa_2	60.56	Glu	АМФ	50.20
Gly	АМФ+D-M	55.43		ЦМФNa_2+D-M	65.59		АМФNa_2	10.20
	ГМФNa_2	25.57	Asn	ГМФ	**363.95**		ЦМФ	−60.09
	ГМФNa_2+ D-M	10.78		АМФNa_2+D-M	−83.95		ГМФNa_2	**222.22**
Ser	АМФ	−6.19	**Arg**	УМФ+ D-M	73.62		ГМФNa_2+ D-M	91.88
	АМФNa_2	−11.45		ЦМФNa_2+ D-M	95.46			
	ГМФNa_2	113.51		ГМФ	29.92			
	ГМФNa_2+ D-M	21.72						
	УМФ	**165.35**						

Примітка. Значення > 100% або <−50% виділені жирним шрифтом для наочності. Усі значення наведені відносно контрольної смуги з корекцією базової лінії та нормалізацією до загальної інтенсивності аміду I.

Препарат ОРН спричиняв переважно невеликі зміни, зокрема близько −13,9% для Ala та −12,9% для Lys. Для ОРН-Na спостерігали позитивні зміни смуг Cys, Glu, Tyr і Gln — приблизно +34,9%, +70,4%, +47,4% і +34,9% відповідно. D-манітол

посилював негативний відгук системи ОРН і позитивний відгук ОРН-Na: для Cys — до +173,2%, для Gln — до +182,1%. Через гетерогенність препарату ці результати характеризують інтегральну відповідь суміші.

Найчутливішими були смуги, попередньо віднесені до Thr, Glu, Asp, Cys і Lys. Сукупність змін узгоджується з можливим внеском електростатичних взаємодій, водневих зв'язків і перебудови локального оточення білка. Водночас вона не доводить масштабних конформаційних перебудов, зміни редокс-стану, функціональної активації або синергічного чи стабілізувального механізму дії D-манітолу без додаткових експериментальних підтверджень.

За результатами молекулярного докінгу окремі амінокислотні залишки, зокрема Glu, Asp та Ser, були передбачені як потенційні контактні ділянки для нуклеотидів. Незалежно від цього, інфрачервоний аналіз виявив значні відносні зміни інтенсивності смуг, попередньо віднесених до відповідних типів функціональних груп. Наприклад, у системі з ГМФ для смуг, асоційованих із Glu, спостерігали зміну близько +364%, а для груп, віднесених до Asp і Ser, також реєстрували значні зміни інтенсивності.

Однак інфрачервоні дані не дозволяють приписати ці зміни конкретно Glu, Asp або Ser, оскільки спектральні смуги відображають сумарний внесок відповідних типів функціональних груп у білку. Тому збіг між докінговими контактами та інфрачервоною відповіддю слід розглядати лише як узгодженість незалежних спостережень, а не як пряме експериментальне підтвердження контакту конкретного залишку.

Для ЦМФ без D-манітолу низка смуг демонструвала негативні зміни інтенсивності, тоді як у композиції ЦМФ + D-манітол для частини з них напрямок зміни ставав позитивним. Це свідчить про модифікацію спектрального оточення відповідних функціональних груп, але не дозволяє однозначно встановити конкретний атомний механізм взаємодії.

$ГМФNa_2$ викликає значні позитивні зрушення в залишках Asp, Ser та Glu, тоді як УМФ та його похідні дають позитивні піки, особливо в Ser, Leu, Ala. π–алкільні контакти (Leu, Ala) демонструють спектральні ефекти; ГМФ+D-М дає негативну відповідь (−46%); $УМФNa_2$ — позитивну (+69…+81%), що свідчить про те, що

неполярні взаємодії впливають на коливання аліфатичних груп через конформаційні та гідратаційні зміни.

D-M (манітол) різко модулює реакцію зв'язаних залишків. У випадках Asn (АМФNa_2 + D-M: −84%) та Ser (ЦМФ + D-M +104%) додавання D-M змінює не лише величину, а й знак ефекту, що узгоджується з можливістю перебудови мережі водневих зв'язків.

Майже всі комплекси, в яких певний залишок ідентифікований як контактний, демонструють або дуже сильне збільшення, або різке зменшення інтенсивності смуги (модуль > 40%). Є кілька винятків: Asp з АМФ (−3,6%) та Gly з ГМФNa_2 + D-M (10,8%). Зміни близькі до фонових, що можна пояснити слабким внеском цього залишку в загальний сигнал цього типу.

Знак і величина %ΔI відображають зміни спектрального оточення функціональних груп білка у присутності ліганду, однак не дозволяють однозначно встановити утворення або втрату конкретного міжмолекулярного контакту. Інфрачервоні дані в окремих випадках узгоджувалися з контактами, передбаченими молекулярним докінгом, оскільки для відповідних типів функціональних груп спостерігали помітні зміни інтенсивності смуг. Водночас через перекривання ІЧ-смуг і неможливість однозначно віднести сигнал до конкретного амінокислотного залишку таку узгодженість слід розглядати як непряму підтримку модельних контактів, а не як незалежне картування сайтів зв’язування.

Висновки до підрозділу 3.1.

Стаціонарна флуоресцентна спектроскопія виявила концентраційно- та ліганд-залежні зміни флуоресценції ІНФ α-2b. Кислотні форми нуклеотидів переважно характеризувалися меншими спостережуваними Kd, ніж натрієві аналоги. Максимальне гасіння спостерігали для ГМФ із D-манітолом (≈45 %). Часороздільні вимірювання показали скорочення часу життя флуоресценції з 2,95 до 2,32–2,37 нс у присутності ОРН та ОРН–D-манітолу, що свідчить про зміни мікрооточення триптофанових залишків. Кислотні форми загалом характеризувалися вищою

видимою ефективністю Фьорстерівського переносу енергії та меншими модельними донорно-акцепторними відстанями.

Флуоресцентна анізотропія залежала від природи й іонної форми нуклеотидів, складу системи ІНФ α-2b/ІНФАР 1, D-манітолу та порядку додавання компонентів. Форма й амплітуда кривих були інформативнішими за абсолютні Kd, значна частина яких перевищувала діапазон титрування (10 мкМ). Термофлуоресцентний і ThT-аналізи не виявили універсальної стабілізації: у 17 із 20 умов зміни температури плавлення не перевищували 2 °C; найбільше підвищення спричиняв АМФ (+2,56 °C), зниження — ГМФNa_2 (−3,22 °C). Слабка кореляція з ThT-відповіддю ($r = −0,19$; $\rho = 0,04$) свідчила про відмінність теплової стійкості й агрегаційної поведінки.

КД-спектроскопія показала, що кислотні форми переважно зменшували оцінену частку α-спіралей і збільшували невпорядковану складову, тоді як натрієві сприяли більш упорядкованій спектральній сигнатурі. Ці зміни не мали прямої відповідності зі спорідненістю та не доводили денатурації білка. ІЧ-спектроскопія виявила вплив протонування, Na^+ і D-манітолу на водневі зв’язки, гідратацію та локальне оточення функціональних груп. Узгодження з докінгом підтримує можливу участь електростатичних, водневих і гідрофобних взаємодій без однозначного встановлення окремих амінокислотних контактів.Результати, представлені в підрозділі 3.1, опубліковані в наукових працях:

1. Вплив олігорибонуклеотидів на конформацію та стабільність інтерферону / **Ніколаєв Р. О.,** Вівчарик М. М., Черних С. І., Ткачук З. Ю. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2019. Т. 17, № 2. С. 165–171. DOI: 10.7124/visnyk.utgis.17.2.1217.
2. **Nikolaiev R. O.,** Tkachuk Z. Yu. Interaction of 5′-ribonucleoside monophosphates with Interferon α-2b. *Biopolymers and Cell*. 2024. Vol. 40, No. 4. P. 264–277. DOI: 10.7124/bc.000B03.

3. **Nikolaiev R. O.,** Tkachuk Z. Yu. Comparative analysis of the interaction of INF-, INFAR1 and the INF-INFAR1 complex with ribonucleotides by spectroscopic methods and docking. *ScienceRise: Biological Science*. 2026. No. 3 (47). P. 11–24. DOI: 10.15587/2519-8025.2026.368056.
4. Conformational changes of secondary and tertiary structures of interferon under the influence of oligoribonucleotides-based drugs / **Nikolaiev R. O.,** Vivcharyk M. M., Levchenko S. M., Chernykh S. I., Obernikhina N. V., Tkachuk Z. Yu. *Proceedings of the 4th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry*. MDPI, 2018. Art. 5629. DOI: 10.3390/ecmc-4-05629.
5. **Nikolaiev R. O.,** Stepanenko Ye. Yu., Tkachuk Z. Yu. Conformational, fluorescence and energy parameters of Interferon α2b under the influence of mono and oligoribonucleotides-based drug. *Proceedings of the 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry*. MDPI, 2019. Art. 6328. DOI: 10.3390/ecmc2019-06328.
6. **Nikolaiev R. O.,** Chernykh S. I., Tkachuk Z. Yu. Analysis of amyloidogenic potential, stability and fluorescence properties of insulins and interferons of different purity. VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement "Science and modern pharmaceutical manufacturing" (Kyiv, Ukraine, November 21, 2019). *Український медичний часопис*. 2019. № 6 (134), XI/XII. С. 41.
7. Fluorescence and circular dichroism spectroscopy studies of interactions between Interferon α2b and yeast oligoribonucleotides / **Nikolaiev R. O.,** Chernykh S. I., Obernikhina N. V., Tkachuk Z. Yu. The 44th FEBS Congress "From molecules to living systems" (Krakow, Poland, 6–11 July 2019). Posters. *FEBS Open Bio*. 2019. Vol. 9, Suppl. 1. P. 215. DOI: 10.1002/2211-5463.12675.
8. **Nikolaiev R. O.,** Chernykh S. I., Tkachuk Z. Yu. Fluorescence and circular dichroism spectroscopy studies of an interaction between interferon α2β, oligoribonucleotides and amp. XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists. *Biopolymers and Cell*. 2019. Vol. 35, No. 5. P. 406. DOI: 10.7124/bc.000A14.

9. **Nikolaiev R. O.,** Chernykh S. I., Tkachuk Z. Yu. Spectroscopy and thermodynamic studies of an interaction between interferon a2b, oligoribonucleotides and ribonucleotides. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу (м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р.). *Медична та клінічна хімія*. 2019. Т. 21, № 3. С. 227–228.
10. Interaction of Interferon α-2b with different forms of oligonucleotides / **Nikolaiev R. O.,** Chernykh S. I., Stepanenko Ye. Yu., Tkachuk Z. Yu. *XIV Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України* : electronic abstract book. 2020. P. 19.
11. Fluorescence properties interaction Interferon a2b with oligo- and monoribonucleotides / **Nikolaiev R. O.,** Chernykh S. I., Stepanenko Ye. Yu., Tkachuk Z. Yu. *12th International Conference "Electronic Processes in Organic and Inorganic Materials" ICEPOM-12* (Kamianets-Podilskyi, June 1–5, 2020). 2020. P. 251.
12. Conformational, Fluorescence and Energy Parameters of Interferon α2b with Different Forms of Adenosine Monophosphate / **Nikolaiev R. O.,** Stepanenko Ye. Yu., Chernykh S. I., Melnichuk N. S., Tkachuk Z. Yu. *Proceedings*. 2021. Vol. 78, No. 1. Art. 16. DOI: 10.3390/IECP2020-08697.
13. **Nikolaiev R. O.,** Spivak M. Ya., Tkachuk Z. Yu. Spectral studies of ligand-protein interactions of oligoribonucleotides. XVIII International Conference "Factors in Experimental Evolution of Organisms", dedicated to the 50th anniversary of the foundation of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the NASU. *Biopolymers and Cell*. 2023. Vol. 39, No. 4. P. 315. DOI: 10.7124/bc.000AA8.
14. **Nikolaiev R. O.,** Tkachuk Z. Yu. Interaction of 5′-monoribonucleotides with Interferon α-2b. BioGENext Conference "Shaping the future of medicine through biomedical R&D" (Kyiv, September 17–20, 2024). *Biopolymers and Cell*. 2024. Vol. 40, No. 3. P. 175. DOI: 10.7124/bc.000AB9.

15. The effect of oligonucleotides, mononucleotides and their complexes with mannitol on the conformational stability of Interferon α2b / **Nikolaiev R. O.,** Tkachuk Z. Yu., Obernikhina N. V., Dotsenko M. A., Stepanenko Ye. Yu. *Proceedings of the 1st International Electronic Conference on Medicinal Chemistry and Pharmaceutics* (1–30 November 2025). ECMC-P Book of Abstracts 2025. Basel, Switzerland : MDPI, 2025. P. 28. URL: https://sciforum.net/paper/25661 (дата звернення: 01.10.2026). URL збірника: https://sciforum.net/event/ECMC-P2025/abstract-book (дата звернення: 01.10.2026).
16. Біологічна афінність мононуклеотидів в різних значеннях pH середовища / **Ніколаєв Р. О.,** Оберніхіна Н. В., Качковський О. Д., Ткачук З. Ю. *Чаргаффські читання* : матеріали XX Міжнародної наукової конференції, присвяченої 150-річчю Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича та 120-річчю від дня народження Ервіна Чаргаффа (м. Чернівці, Україна, 27–30 жовтня 2025 р.). Чернівці : Чернівец. нац. ун-т ім. Ю. Федьковича, 2025. С. 57–58.
17. **Nikolaiev R. O.,** Tkachuk Z. Yu. Interaction of the INF-INFAR1 complex with ribonucleotides and D-mannitol : prospects for the development of next-generation interferon-based therapeutics. *Biopolymers and Cell*. 2026. Vol. 42, Special Issue. P. 10. DOI: 10.7124/bc.000b43.

3.2. Термодинамічна та термокінетична характеристика взаємодії ІНФ α-2b з нуклеотидними лігандами

3.2.1. Термодинамічна характеристика комплексоутворення ІНФ α-2b з нуклеотидними лігандами методом ізотермічної калориметрії титрування. Для визначення видимих енергетичних параметрів взаємодії ОРН і НМФ з ІНФ α-2b використовували ізотермічну титраційну калориметрію [116, 117].

За тепловим ефектом титрування оцінювали ΔH і пов’язані з ним модельні параметри. Значення порівнювали лише між серіями, отриманими за однакового складу буфера, температури та моделі обробки.

У подальших експериментах ми дослідили енергетичні параметри цих взаємодій за допомогою ізотермічної титраційної нанокалориметрії.

Вимірюючи зміни у виділенні або поглинанні тепла (рис. 3.15, В.6–В.9) під час процесу зв'язування, можна визначити термодинамічні параметри реакції (зміни ентальпії, вільної енергії Гіббса та ентропії).

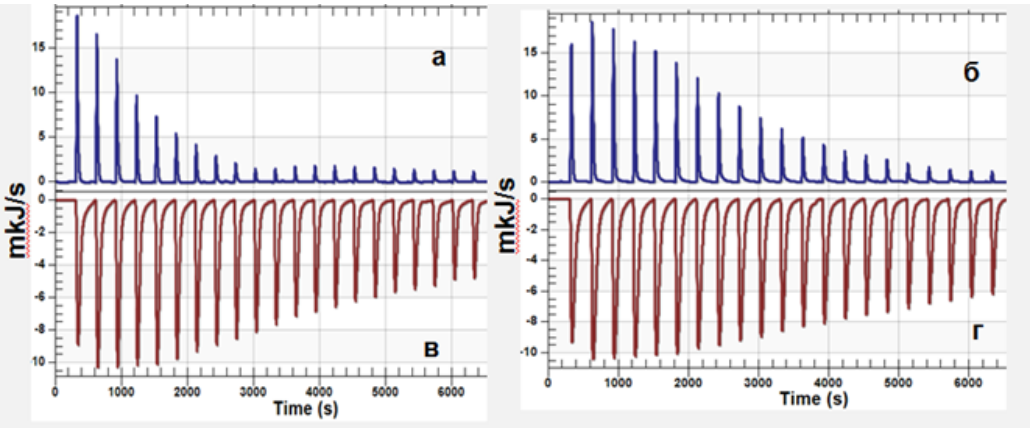


Рис. 3.15. Калориметричні криві титрування ІНФ α-2b різними формами ОРН та їх комплексами з D-манітолом: а) – ОРН, б) – ОРН+D-M; в) ОРНNa; г) – ОРНNa+D-M.

Отримані криві титрування ІНФ α-2b з різними формами ОРН свідчать про те, що реакція взаємодії між білком і кислими формами ОРН є екзотермічною, а з сольовими — ендотермічною. Такі результати вивчення ефектів термодинаміки різних форм ОРН та їхніх комплексів з D-манітолом під час титрування ІНФ α-2b можуть свідчити про різні режими зв’язування та різні типи конформаційних змін білка, до яких призводить це зв’язування. Переваги взаємодії з даним білком мають кислі форми ОРН, особливо їхні комплекси з D-манітолом, на відміну від сольових форм ОРН, оскільки вони мають сильніше зв'язування завдяки наявності негативної ентальпії. Також, можливо, це може свідчити про зміну положення гідрофобних амінокислот, занурених у глобулу білка, і відповідну зміну сольватації білка.

Калориметричні криві виявили відмінності в знаку та амплітуді спостережуваного теплового ефекту між кислотною та натрієвою формами. Ці дані характеризують сумарний баланс контактів, протонного обміну та реорганізації розчинника, але самі по собі не дають змоги зробити висновок про зміну біологічної активності ІНФ α-2b.

Різні сайти зв'язування можуть пояснювати термодинамічні ефекти різних форм ОРН. Переваги взаємодії з білками мають кислі ОРН та рибонуклеотиди, на відміну від солей ОРН і нуклеотидних монофосфатів, оскільки вони забезпечують сильніше зв'язування.

За калориметричними даними можна порівняти теплові ефекти взаємодії, але функціональні наслідки для ІНФ α-2b потрібно встановлювати окремими біологічними тестами. Таким чином, одна й та сама сполука в різних формах може виступати як інгібітор, так і як активатор білка. Проте для доведення цього потрібне пряме визначення біологічної активності/JAK–STAT-відповіді.

Результати ITC для цієї серії, представлені також у попередній публікації [89], показали екзотермічну взаємодію кислотних форм НМФ з ІНФ α-2b та ендотермічну взаємодію відповідних динатрієвих форм (рис. 3.16).

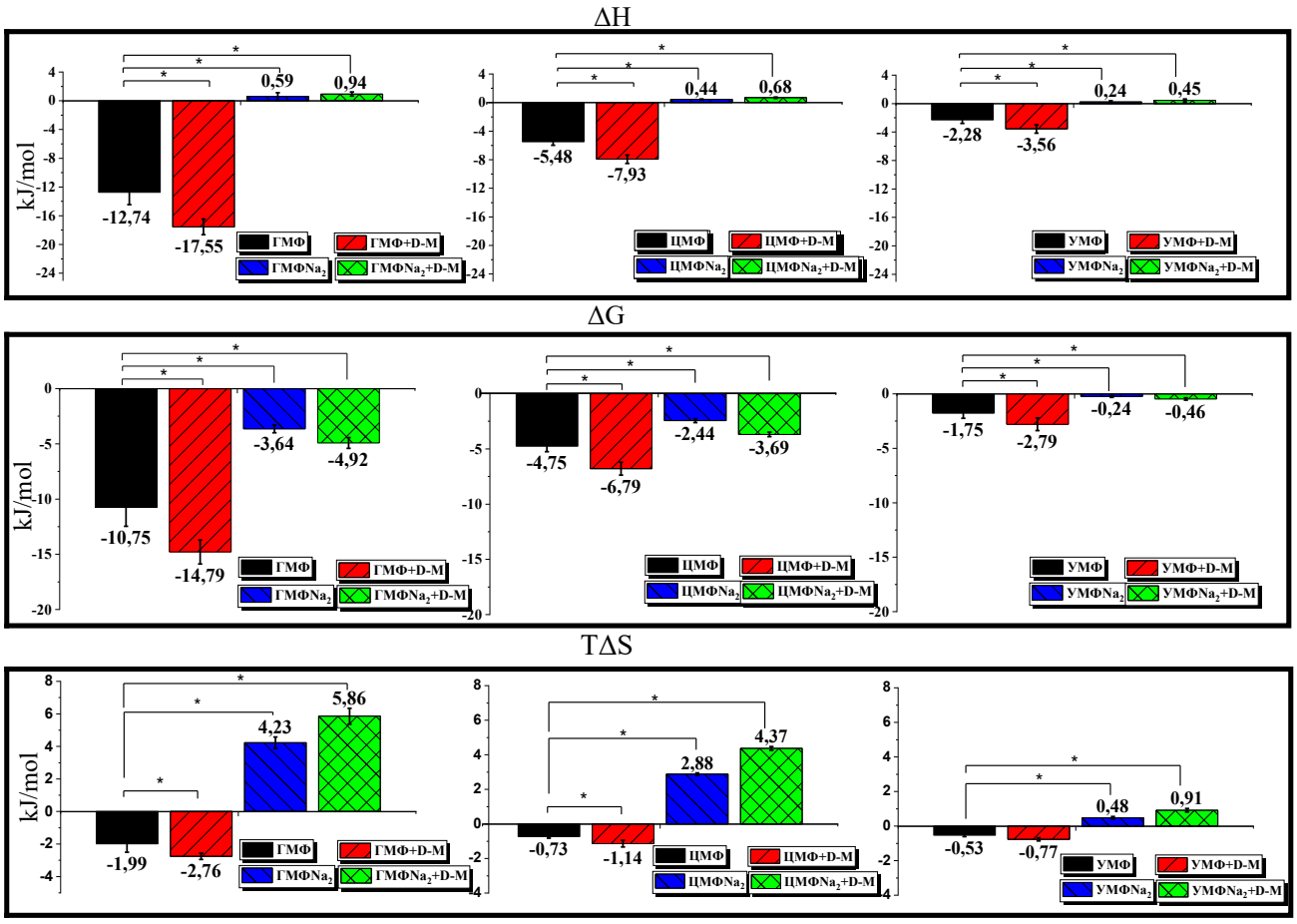


Рис. 3.16. Термодинамічні параметри взаємодії ІНФ α-2b з кислотними й динатрієвими формами 5′-рНМФ за відсутності та за присутності D-манітолу

Примітка. * — статистично значуща відмінність, $p \leq 0,05$

Зміни ентальпії під час титрування ІНФ α-2b кислими формами ГМФ, ЦМФ та УМФ становили −12,74, −5,47 та −2,28 кДж/моль відповідно. Для $ГМФNa_2$, $ЦМФNa_2$ та $УМФNa_2$ зміни ентальпії становили 0,59, 0,44 та 0,24 кДж/моль відповідно. Зміни ентальпії під час титрування кислої форми ІНФ α-2b ГМФ+D-M, ЦМФ+D-M та УМФ+D-M становили −17,55, −7,93 та −3,56 кДж/моль відповідно.

Для $ГМФNa_2$+D-M, $ЦМФNa_2$+D-M та $УМФNa_2$+D-M зміни ентальпії становили 0,94, 0,68 та 0,45 кДж/моль відповідно. Зміна ентропійного компонента після додавання ГМФ, ЦМФ та УМФ до ІНФ α-2b становила -1,99, -0,73 та -0,53 кДж/моль, а для ГМФ+D-M, ЦМФ+D-M та УМФ+D-M — -2,76, -1,14 та -0,77 кДж/моль відповідно. Зміна ентропійного компонента після додавання $ГМФNa_2$, $ЦМФNa_2$ та $УМФNa_2$ становила 4,23, 2,68 та 0,28 кДж/моль, а для $ГМФNa_2$+D-M, $ЦМФ_{Na2}$+D-M та $УМФNa_2$+D-M – 5,86, 4,37 та 0,91 кДж/моль відповідно. Подібна закономірність спостерігалася під час вивчення зміни енергії Гіббса під час титрування ІНФ α-2b з ГМФ, ЦМФ та УМФ, яка становила -10,75, -4,75 та -1,75 кДж/моль, а ГМФ+D-M, ЦМФ+D-M та УМФ+D-M — -14,79, -6,79 та -2,79 кДж/моль відповідно. При титруванні з $ГМФNa_2$, $ЦМФNa_2$ та $УМФNa_2$ значення становили -3,64, -2,44 та -0,24 кДж/моль, а для $ГМФNa_2$+D-M, $ЦМФNa_2$+D-M та $УМФNa_2$+D-M — -4,92, -3,69 та -0,46 кДж/моль відповідно. Для порівняння наведено раніше опубліковані значення ΔH для АМФ та АМФ з D-манітолом: −10,7 і −12,8 кДж/моль відповідно [88, 89]. Натомість зміна ентальпії, спричинена 5’-$АМФNa_2$ та 5’-$АМФNa_2$+D-M, становила 0,65 та 0,92 кДж/моль відповідно. Подібні спостереження були зроблені для 5’-АМФ та 5’-AMP+D-M, для яких зміна ентропійного компонента оцінювалася як –1,59 та –1,93 кДж/моль відповідно, тоді як для 5’-$АМФNa_2$ та 5’-$АМФNa_2$+D-M — 1,59 та 3,07 кДж/моль відповідно. 5’-АМФ кислота (ΔG = –9,11 кДж/моль для 5’-АМФ окремо та –10,87 кДж/моль для 5’-АМФ+D-M. 5’-$АМФNa_2$ — окремо та −2,16 кДж/моль для 5’-$АМФNa_2$+D-M.

3.2.2. Дослідження терморелаксаційних процесів нуклеотидних лігандів методом одноразової інжекційної калориметрії. Для кислотних форм усіх чотирьох мононуклеотидів наведено від'ємні значення ΔH у кожній із трьох досліджуваних матриць (табл. 3.12). В альбуміні значення коливалися від -0,9 до -1,5 кДж/моль, у плазмі — від -1,3 до -1,7 кДж/моль, а в Tris — від -0,6 до -2,0 кДж/моль. Натрієві форми мали негативні ΔH в альбуміні та плазмі, тоді як ЦМФNa_2, ГМФNa_2 та УМФNa_2 ΔH позитивні в Tris (+2,2, +1,4 та +1,3 кДж/моль відповідно).

Таблиця 3.12

Спостерігаємі молярні теплові ефекти одноразової ін'єкції (ΔH, кДж/моль)

Ліганд	Альбумін	Плазма	Тріс
АМФ	-1.1	-1.3	-1.7
АМФNa_2	-1.1	-1.1	-1.1
ЦМФ	-1.4	-1.7	-2.0
ЦМФNa_2	-1,5	-1,5	+2.2
ГМФ	-1,5	-1,5	-0,6
ГМФNa_2	-1,5	-1.6	+1.4
УМФ	-0,9	-1,5	-1.4
УМФNa_2	-1.4	-1.3	+1.3

Примітка. Для кожної ін'єкції тепловий сигнал інтегрували після корекції базової лінії, віднімали відповідний контрольний тепловий ефект розведення ліганда та нормували на кількість молів введеного ліганда. Отриману величину позначали як ΔH, оскільки вона відображає сумарний видимий тепловий ефект процесів змішування, розведення, іонізації, сольватації та взаємодії компонентів середовища і не є безпосередньою молярною ентальпією зв'язування.

АМФNa_2 залишався негативним у Tris (−1,1 кДж/моль). Таким чином, найбільша кислотно-сольова дивергенція спостерігалася в простій матриці Tris, а не в середовищі, що містить білок.

Криві показали значні відмінності в часі релаксації, незважаючи на відносно схожі екстремуми на графічній шкалі сигналу (рис. 3.17). Натрієві форми загалом наближалися до свого кінцевого плато значно швидше, ніж відповідні кислотні форми. Ця різниця була найвираженішою в Tris. Медіана $t_{1/2}$ для 5 кислотних/ОРН систем становила 1632 с у Tris порівняно зі 125 с для 5 динатрієвих систем. В альбуміні відповідні медіани становили 965 та 233 с, а в плазмі — 1482 та 369 с. Ці відмінності

описують часову організацію складної теплової реакції і не повинні бути ототожнені зі швидкостями молекулярної асоціації.

Найшвидшими окремими профілями були $АМФNa_2$ у Tris ($t_{1/2}$ = 75,0 с; k = 0,00924 $с^{-1}$), $ГМФNa_2$ у Tris ($t_{1/2}$ = 95,2 с; k = 0,00728 $с^{-1}$) та $ЦМФNa_2$ у Tris ($t_{1/2}$ = 124,5 с; k = 0,00557 $с^{-1}$). Найповільнішими профілями були ГМФ у Tris (2509 с; 0,000276 $с^{-1}$), ОРН в альбуміні (2443 с; 0,000284 $с^{-1}$) та ЦМФ у Tris (2112 с; 0,000328 $с^{-1}$).

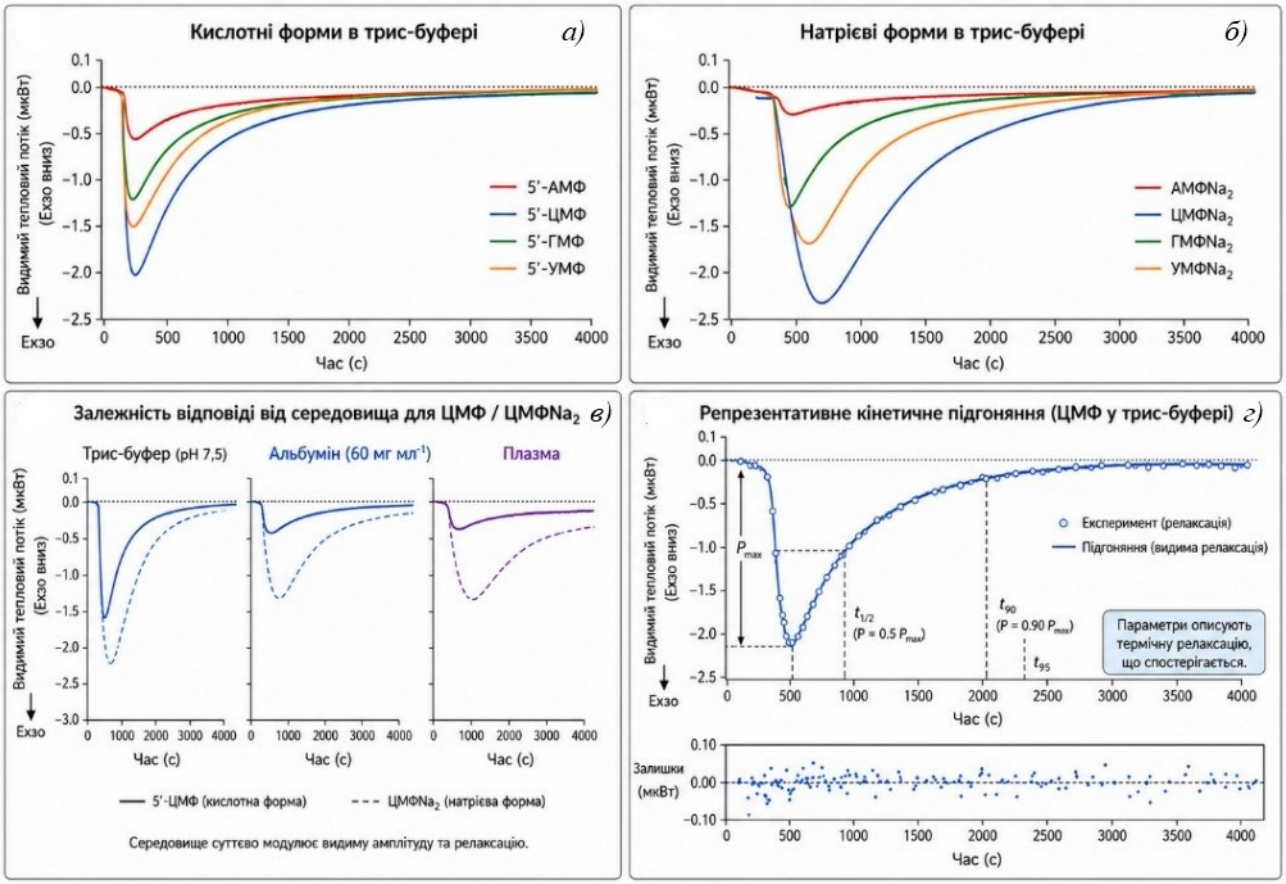


Рис. 3.17. Типові калориметричні профілі з часовою роздільною здатністю. а) Кислі форми в Tris; б) Натрієві форми в Tris; в) Порівняння ЦМФ/$ЦМФNa_2$ між Tris, альбуміном і плазмою; г) Оперативне визначення $t_{1/2}$, t_{90} та t_{95} для $АМФNa_2$ в Tris після нормалізації між початковою відповіддю та кінцевим плато

За всіх 30 умов значення $|P_{max}|$ займали значно вужчий діапазон, ніж $t_{1/2}$ та k, тоді як інтегровані області, пов'язані з переходом, суттєво відрізнялися залежно як від середовища, так і від іонної форми (рис. 3.18, табл. 3.13). Такий розрив між амплітудою та часом релаксації вказує на те, що величина початкового теплового коливання та час, необхідний для досягнення системою стабільного плато, є частково незалежними дескрипторами. Зокрема, кілька форм натрію демонстрували значні видимі коливання,

але швидко релаксували, тоді як кілька кислотних профілів демонстрували тривалу теплову еволюцію.

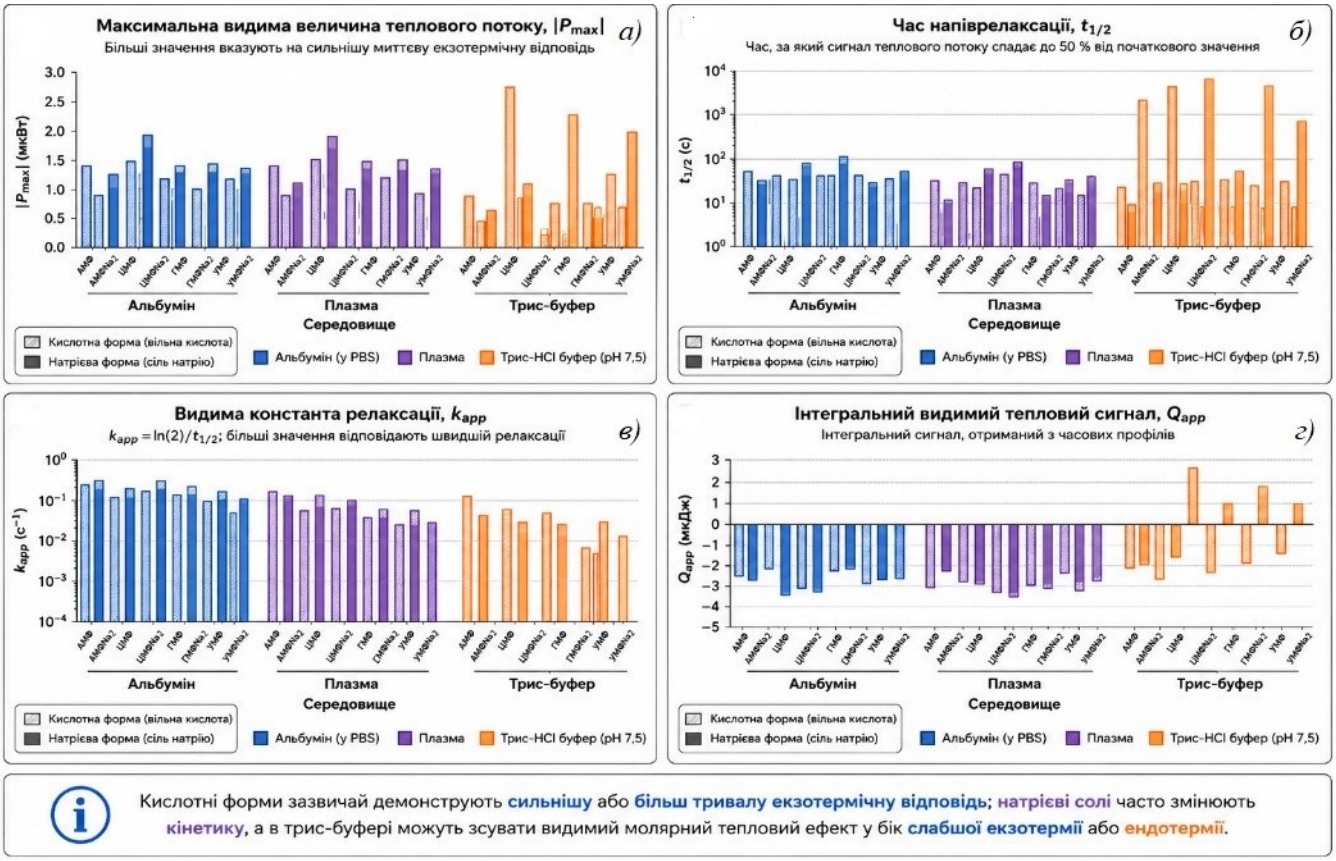


Рис. 3.18. Порівняльний кількісний аналіз 30 термограм нуклеотид-середовища. а) Максимальна величина видимого теплового потоку; б) Час напіврелаксації; в) Спостережна константа релаксації, $k = \ln(2)/t_{1/2}$; г) Абсолютна величина інтегрованої площі, пов'язаної з переходом, відносно кінцевого плато

Стандартизований багатовимірний аналіз показав, що експериментальні системи сильніше розрізнялися за дескрипторами часової шкали та площі ніж лише за |Pmax|. Ієрархічна кластеризація не підтримувала єдиного універсального групування за ідентичністю нуклеотидних основ; натомість умови розділялися відповідно до комбінацій іонної форми, середовища та релаксаційної поведінки. Кореляційна матриця підтвердила сильну коваріацію між t_{max}, $t_{1/2}$, t_{90} та t_{95}, як і очікувалося, оскільки ці дескриптори відображають пов’язані аспекти однієї й тієї самої часової прогресії. Зворотний математичний зв'язок між $t_{1/2}$ та k розглядався як дефініційний, а не механістично незалежний.

Таблиця 3.13

Медіанні дескриптори видимої теплової релаксації залежно від іонної форми та середовища

Середовище	Форма	n	Медіана t1/2 (с)	Діапазон t1/2 (с)	Медіана k, $с^{-1}$	Інтерпретація
Тріс	Кислотний/ОРН	5	1632.1	767,7–2509,4	0,000425	Повільніше
Тріс	Натрій	5	124,5	75,0–410,8	0,005567	Швидше
Альбумін	Кислотний/ОРН	5	965,5	293,1–2442,9	0,000718	Повільніше
Альбумін	Натрій	5	233.2	170,9–321,3	0,002972	Швидше
Плазма	Кислотний/ОРН	5	1482.1	596,9–2038,1	0,000468	Повільніше
Плазма	Натрій	5	369.0	357,5–525,0	0,001878	Швидше

У додатку (рис. В.10) наведено АМФ/$АМФNa_2$. На панелях A–B порівнюються часові профілі теплового потоку для кислотної та динатрієвої форм у Tris, альбуміні та плазмі; панель C переводить сигнали на нормований масштаб, що дозволяє безпосередньо порівнювати швидкості переходу; панель D узагальнює стандартизовані амплітудні та кінетичні дескриптори. Найбільш виразна особливість — $АМФNa_2$ релаксує суттєво швидше за АМФ, особливо в Tris: $t_{1/2}$ становить приблизно 75 с проти 768 с, а k — 0.00924 проти 0.000903 $с^{-1}$. В альбуміні різниця зберігається, хоча й менша; у плазмі обидва профілі ускладнюються та класифікуються як неекспоненціальні/багатофазні.

На (рис. В.11) наведено часові профілі для ЦМФ і $ЦМФNa_2$. У середовищі Tris для ЦМФ спостерігався повільний багатофазний перехід із $t_{1/2} \approx 2112$ с і $Q \approx 69583$ умовних одиниць, тоді як для $ЦМФNa_2$ $t_{1/2}$ становив приблизно 125 с, а Q — близько 4379 умовних одиниць. Q визначали, як площу оцифрованого часового профілю відносно кінцевого плато шляхом інтегрування сигналу за часом. Оскільки вихідні криві були отримані з графічної шкали, цей показник наведено в умовних інтегральних одиницях «одиниця сигналу × с» і його не слід трактувати як абсолютну теплоту або енергію.

Подібне скорочення часової шкали переходу для натрієвої форми спостерігали також в альбуміні. У плазмі профілі обох форм були складнішими та багатофазними, що узгоджується з додатковим внеском компонентів середовища у спостережувану теплову релаксацію.

На (рис. В.12) наведено ГМФ/ГМФNa2. Це один із найконтрастніших прикладів. У Tris кислотна форма ГМФ має дуже повільний перехід: $t_{1/2} \approx 2509$ с, t95 ≈ 3425 с та Q ≈ 92431, тоді як ГМФNa2 характеризується $t_{1/2} \approx 95$ с, t95 ≈ 284 с і Q ≈ 3326. Тобто, перехід для натрієвої форми відбувається приблизно на порядок швидше й супроводжується значно меншою інтегральною тепловою відповіддю. В альбуміні ГМФ стає набагато швидшим, тоді як у плазмі кислотна форма знову переходить у повільний багатофазний режим.

На (рис. В.13) наведено УМФ/УМФNa2. Для УМФ також спостерігається прискорення після переходу до натрієвої форми. У Tris $t_{1/2}$ зменшується приблизно з 1632 до 400 с, а k збільшується з $4.25\times10{-}4$ до $1.74\times10{-}3$ $с^{-1}$. В альбуміні різниця зберігається. Цікаво, що у плазмі УМФ демонструє значно швидшу початкову перебудову, ніж ЦМФ або ГМФ, хоча профіль залишається неекспоненціальним.

На (рис. В.14) наведено ОРН/ОРН-Na. Для олігорибонуклеотидів масштаб теплового сигналу в Tris різко відрізняється від мононуклеотидів: $|P_{max}|$ для ОРН і ОРН-Na становить близько 163 умовних одиниць. Водночас зберігається загальна закономірність: динатрієва форма релаксує швидше — $t_{1/2}$ зменшується з ≈1068 до ≈411 с у Tris. Особливо сильна різниця спостерігається в альбуміні: приблизно 2443 с для ОРН проти 229 с для ОРН-Na; причому ОРН-Na в альбуміні є одним із небагатьох профілів, які добре описуються моноекспоненційною моделлю.

У всіх чотирьох мононуклеотидних парах видно одну спільну тенденцію: перехід від протонованої/кислотної форми до натрієвої різко прискорює часову релаксацію калориметричного сигналу. Це проявляється у зменшенні $t_{1/2}$, t_{90} і t_{95} та відповідному збільшенні k. Ефект особливо виражений для ГМФ і ЦМФ у Tris. Одночасно кислотні форми часто характеризуються більшою інтегральною площею Q, тобто не лише повільнішим, а й тривалішим у часі тепловим переходом.

Дані дуже добре демонструють, що Tris, альбумін і плазма не є взаємозамінними середовищами. У простому буфері контраст між кислотною та натрієвою формами здебільшого максимальний. Альбумін суттєво модифікує як часову шкалу, так і форму сигналу, причому для окремих систем навіть переводить складний профіль у приблизно моноекспоненціальний режим. Плазма найчастіше дає неекспоненціальні

або багатофазні профілі, що узгоджується з високою композиційною складністю цього середовища. Наприклад, АМФ і АМФNa_2 у плазмі обидва класифіковані як багатофазні, тоді як у Tris їх можна описати простіше. Повний набір кінетичних дескрипторів для 30 умов наведено в таблиці В.4. Значення P_{max} та Q відображаються на осі шкали графіків. Q-перехід позначає інтегровану площу відносно кінцевого плато. Контрольні проміри та повторюваність на графіках В.15 та В.16, відповідно.

У Tris цей ефект найвиразніший. Для АМФ період напівпереходу зменшується з 767.7 до 75.0 с, тобто приблизно у 10.2 раза, а k зростає практично у стільки ж — з $9.03\times10{-}4$ до $9.24\times10{-}3$ $с^{-1}$. Одночасно $Q_{transition}$ зменшується з 26 819 до 706 умовних одиниць, майже у 38 разів. Аналогічна, але ще сильніша різниця спостерігається для ЦМФ: $t_{1/2}$ зменшується з 2111.9 до 124.5 с, тобто приблизно у 17 разів, а для ГМФ — з 2509.4 до 95.2 с, тобто приблизно у 26 разів. Саме ГМФ/ГМФNa_2 демонструє найбільший контраст між кислотною та натрієвою формами у простому буфері.

Для УМФ ефект менш екстремальний, але все одно чіткий: $t_{1/2}$ у Tris зменшується з 1632.1 до 399.6 с, а k зростає приблизно у 4.1 раза. Для ОРН/ОРН-Na відповідна різниця становить приблизно 2,6 раза за $t_{1/2}$. За кратністю зменшення $t_{1/2}$ при переході від кислотної до натрієвої форми в середовищі Tris досліджені системи можна розташувати в ряд: ГМФ 26,4 > ЦМФ 17,0 > АМФ 10,2 > УМФ 4,1 > ОРН 2,6.

В альбуміні різниця між формами загалом зменшується, але залишається систематичною. Для АМФ $t_{1/2}$ зменшується приблизно у 2,1 раза, для ЦМФ — у 3,7 раза, для УМФ — у 4,0 раза. Найбільш виражений ефект спостерігається для ОРН: 2442,9 с для кислотної форми проти 228,5 с для ОРН-Na, тобто прискорення приблизно у 10,7 разів. Водночас ГМФ є винятком: в альбуміні різниця між ГМФ і ГМФNa_2 значно слабша — лише приблизно 1,26 раза за $t_{1/2}$. Це може свідчити про те, що альбумін по-різному модулює релаксацію окремих нуклеотидів.

У плазмі відмінності між кислотними та натрієвими формами ще більше згладжуються, а профілі переважно стають неекспоненціальними. Для АМФ прискорення становить близько 2 разів, для ЦМФ — 3,4 раза, для ГМФ — 4,1 раза, для УМФ — лише 1,6 раза, а для ОРН — приблизно 3,9 раза. Це добре узгоджується з тим, що складне біологічне середовище додає кілька паралельних внесків у теплову

відповідь — взаємодію з білками плазми, сольватацію, іонний обмін та, потенційно, кілька послідовних релаксаційних процесів.

Параметр $Q_{transition}$ характеризує інтегральний тепловий відгук і доповнює порівняння кінетичних параметрів переходу. У Tris кислотні форми мають значно більшу площу переходу: для АМФ — приблизно у 38 разів, ГМФ — у 27,8 раза, ЦМФ — у 15,9 раза, УМФ — у 3,9 раза, ОРН — у 2,4 раза. Для кислотних форм часто спостерігали більший інтегральний тепловий відгук.

За типом моделі переважають неекспоненціальні/багатофазні профілі: 21 із 30 умов, тоді як лише 9 профілів класифіковано як приблизно моноекспоненціальні. Моноекспоненціальна поведінка характерна насамперед для деяких динатрієвих форм у Tris — АМФNa_2, ЦМФNa_2 і ГМФNa_2, що додатково підтримує ідею про швидшу й кінетично простішу релаксацію цих систем. Натомість плазма переважно переводить систему у багатофазний режим.

Висновки до підрозділу 3.2.

Ізотермічна титраційна калориметрія виявила два видимі термодинамічні режими: взаємодія ІНФ α-2b з кислотними формами НМФ була екзотермічною, тоді як для динатрієвих форм реєстрували незначні додатні ΔH. Найвиразніший екзотермічний ефект спостерігали для ГМФ (−12,74 кДж/моль) і ГМФ + D-манітол (−17,55 кДж/моль).

Одноразова інжекційна калориметрія продемонструвала іонно- та матричнозалежну теплову релаксацію. У Tris натрієві форми переважно релаксували швидше й мали меншу інтегральну площу переходу, ніж відповідні кислотні форми; найбільший контраст за $t_{1/2}$ спостерігали для пари ГМФ/ГМФNa_2 — приблизно у 26 разів. В альбуміні та плазмі відмінності частково згладжувалися, а багатофазні профілі переважали у 21 із 30 умов. Параметри $t_{1/2}$ і k описують одну часову шкалу та не повинні трактуватися як незалежні константи швидкості молекулярного зв’язування.

Результати, представлені у підрозділі 3.2, опубліковані у наукових працях:

1. Спосіб отримання біологічно активних сполук з використанням пуринових і піримідинових нуклеотидів та їх композицій : пат. 164333 Україна, U : МПК A61K 31/00, C07H 19/00, A61K 31/7072 / Мельнічук Н. С., **Ніколаєв Р. О.,** Ткачук З. Ю. № a 202402297 ; заявл. 06.06.2024 ; опубл. 23.09.2026, Бюл. № 31. Т. 1.
2. **Nikolaiev R. O.,** Stepanenko Ye. Yu., Tkachuk Z. Yu. Conformational, fluorescence and energy parameters of Interferon α2b under the influence of mono and oligoribonucleotides-based drug. *Proceedings of the 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry*. MDPI, 2019. Art. 6328. DOI: 10.3390/ecmc2019-06328.
3. **Nikolaiev R. O.,** Chernykh S. I., Tkachuk Z. Yu. Spectroscopy and thermodynamic studies of an interaction between interferon a2b, oligoribonucleotides and ribonucleotides. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу (м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р.). *Медична та клінічна хімія*. 2019. Т. 21, № 3. С. 227–228.
4. **Nikolaiev R. O.,** Chernykh S., Tkachuk Z. Thermodynamics of interaction of interferon alpha-2b with different forms of oligonucleotides. The 45th FEBS Congress “Molecules of life: Towards new horizons” (online event, 3–8 July 2021). *FEBS Open Bio*. 2021. Vol. 11, Suppl. 1. P. 126. DOI: 10.1002/2211-5463.13205.
5. Conformational, Fluorescence and Energy Parameters of Interferon α2b with Different Forms of Adenosine Monophosphate / **Nikolaiev R. O.,** Stepanenko Ye. Yu., Chernykh S. I., Melnichuk N. S., Tkachuk Z. Yu. *Proceedings*. 2021. Vol. 78, No. 1. Art. 16. DOI: 10.3390/IECP2020-08697.
6. **Ніколаєв Р. О.,** Оберніхіна Н. В., Ткачук З. Ю. Теплові ефекти при взаємодії 5′-мононуклеотидів з біологічними середовищами. *Чаргаффські читання* : матеріали XX Міжнародної наукової конференції. 2025. С. 53–54.

3.3. Теоретичне моделювання молекулярних властивостей нуклеотидних лігандів та їх взаємодії з ІНФ α-2b і ІНФАР 1

3.3.1. Квантово-хімічна характеристика НМФ і комплексів із D-манітолом.

Властивості нуклеотидмонофосфатів (НМФ) пуринового та піримідинового ряду, особливо їхня здатність до міжмолекулярної взаємодії як перший етап виконання біологічних функцій, обумовлені природою молекулярних орбіталей (МО) та розподілом електронної густини в молекулі, що зображені на рис. 3.19.

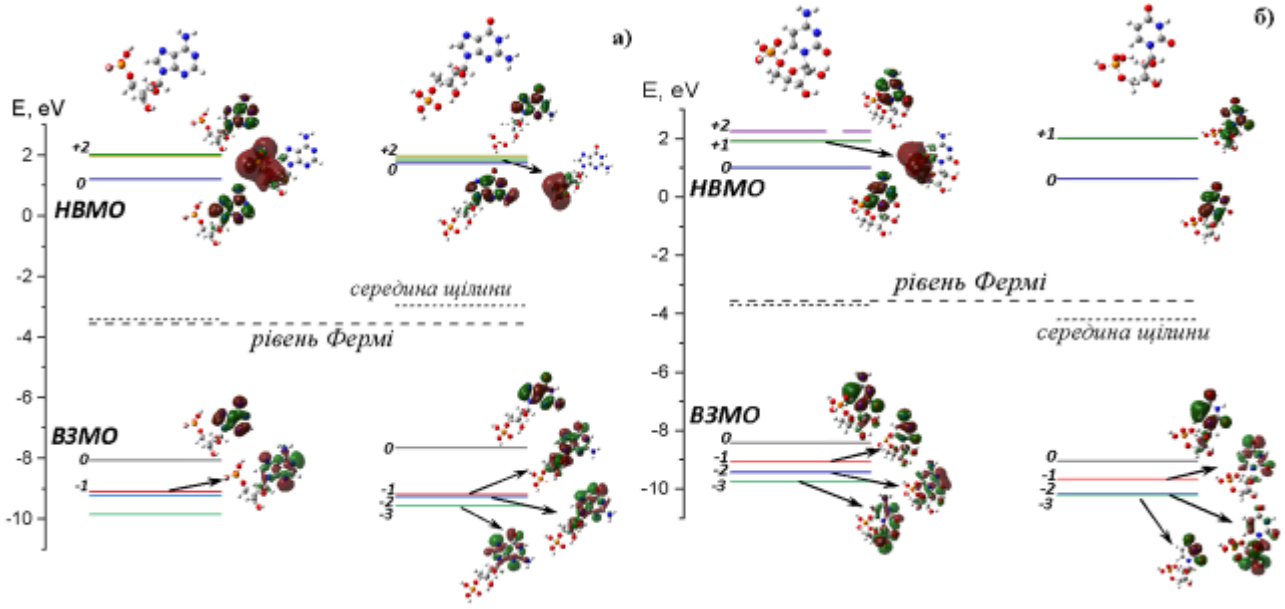


Рис. 3.19. Взаємне розташування МО та розподіл електронної густини в молекулах НМФ а) пуринового та б) піримідинового рядів

Як показано на рисунку 3.19, енергетичне положення наведених молекулярних орбіталей відрізнялося залежно від типу нуклеотиду. Для ГМФ відповідні молекулярні орбіталі (МО) були зміщені приблизно на 0,5 еВ відносно АМФ, тоді як для УМФ спостерігалося їх зміщення приблизно на 0,5 еВ у бік нижчих енергій порівняно з ЦМФ. Водночас зміна ширини енергетичної щілини була неоднаковою: для ГМФ ΔE_{gap} становила 9,39 еВ порівняно з 9,27 еВ для АМФ, тобто різниця дорівнювала 0,12 еВ, тоді як для НМФ піримідинового ряду вона становила приблизно 0,25 еВ. Такі відмінності в положенні фронтальних орбіталей та величині ΔE_{gap} характеризують різницю електронної структури НМФ і можуть бути пов’язані з відмінностями їхніх донорно-акцепторних властивостей.

Найбільший внесок у донорно-акцепторні властивості молекул роблять фронтальні молекулярні орбіталі. Вища зайнята молекулярна орбіталь (ВЗМО) та нижча вакантна молекулярна орбіталь (НВМО) визначають межі енергетичної щілини. Для порівняння електронодонорних і електроноакцепторних властивостей НМФ використовували параметр φ_0, розрахований за енергіями фронтальних орбіталей [81-82]; числові значення наведено в таблиці 3.14.

Таблиця 3.14

Теоретично обраховані показники НМФ

	АМФ	**ГМФ**	**УМФ**	**ЦМФ**
НВМО $E_{НВМО}$ еВ	1,20	1,73	0,62	1,00
ВЗМО(0) $E_{ВЗМО}$ еВ	-8,07	-7,66	-9,04	-8,41
ВЗМО $E_{n\text{-}MO}$ еВ	-9,11	-9,57	-9,66	-9,43
ΔE_{gap} еВ	9,27	9,39	9,66	9,41
E_{tot} Hartree	-1531,22	-1606,46	-1458,86	-1478,75
ϕ_0	0,51	0,56	0,43	0,49
μ D	5,57	7,86	4,78	8,34

Примітка. Енергетичну щілину визначали як $\Delta E_{gap}=E_{НВМО}-E_{ВЗМО}$. Для порівняння донорно-акцепторних властивостей використовували безрозмірний індекс ϕ_0[81-82]: $\phi_0=(E_{НВМО}-\alpha)/(E_{НВМО}-E_{ВЗМО})$, де α— енергія референтного незв'язуючого рівня (рівня Фермі). За використаною шкалою $\phi_0=0,5$ відповідає збалансованому положенню фронтальних рівнів; $\phi_0>0,5$ характеризує переважно донорний, а $\phi_0<0,5$ — переважно акцепторний характер електронної системи. Показник E_{tot} характеризує повну розраховану електронну енергію окремої молекули.

Як показує таблиця 3.14, НМФ пуринового ряду проявляють донорні властивості, а НМФ піримідинового ряду — акцепторні, причому електронодонорність ГМФ на 0,05 у.о. вища порівняно з АМФ. Та ж тенденція спостерігається і в піримідинових нуклеотидах: електроноакцепторність ЦМФ на 0,06 у.о. більша, ніж в УМФ. Такі квантово-хімічні обрахунки узгоджуються з правилом комплементарності (див. табл. 3.14).

Молекулярно-орбітальний аналіз показав, що для досліджених НМФ ВЗМО(0) має переважно π-характер і локалізується на кон'югованій системі пуринової або

піримідинової основи (рис. 3.19). Така електронна будова свідчить про потенційну здатність нуклеотидних основ брати участь у π-залежних нековалентних взаємодіях.

(n)-орбіталі, пов'язані з неподіленими електронними парами гетероатомів, для АМФ і УМФ розташовувалися ближче до ВЗМО, тоді як для ГМФ і ЦМФ — на нижчих енергетичних рівнях (рис. 3.19; табл. 3.14). Ці відмінності характеризують електронну доступність потенційних донорних центрів і можуть впливати на здатність молекул до водневих та інших донорно-акцепторних взаємодій.

Для того, щоб зрозуміти природу міжмолекулярних взаємодій НМФ пуринового та піримідинового ряду, розглянемо їхні електронні переходи, значення яких наведено в Додатку В (табл. В.7).

Квантово-хімічні розрахунки показали, що перший електронний перехід для ГМФ і ЦМФ має переважно π–π*-характер, тоді як для АМФ і УМФ — n–π*-характер. Особливості розподілу електронної густини в заленжності від природи молекули відображають МО, а електронні переходи показують ймовірності реалізації енергії відповідної електронної густини, такми чином, опираючись на природу електронних переходів, підтверджену спектроскопічно, можна стверджувапти ,що та чи інша молекула реалізовуватиме міжмолекулярну взаємодію за тим чи іншим механізмом.

Сила осцилятора (f) характеризує інтенсивність відповідного електронного переходу. Так, для першого переходу АМФ значення (f) приблизно у 160 разів перевищує відповідне значення для УМФ, однак ця різниця не може бути інтерпретована як 160-разове посилення водневого зв'язування. Для оцінки здатності НМФ до водневих, π-стекінгових та інших нековалентних взаємодій необхідно додатково враховувати геометрію комплексу, розподіл електронної густини, протонний стан, сольватацію та результати молекулярного моделювання (величина f табл. В.7).

Водночас під час міжмолекулярної взаємодії електронна структура партнера, геометрія контакту, сольватація та взаємна орієнтація функціональних груп можуть додатково впливати на реалізацію донорно-акцепторних взаємодій.

Перехід від кислотних НМФ до їх динатрієвих форм супроводжувався істотною перебудовою енергій фронтальних молекулярних орбіталей (табл. 3.15; рис. 3.20). Для

досліджених сполук енергетична щілина ΔE_{gap} зменшувалася, причому найбільша зміна спостерігалася для ГМФ — приблизно на 2,4 еВ. Основний внесок у звуження щілини був пов'язаний зі зміною енергії НВМО, тоді як положення ВЗМО змінювалося меншою мірою. У розрахункових моделях динатрієвих форм електронна густина НВМО частково локалізувалася в області фосфатного фрагмента та центрів, пов'язаних із Na^+.

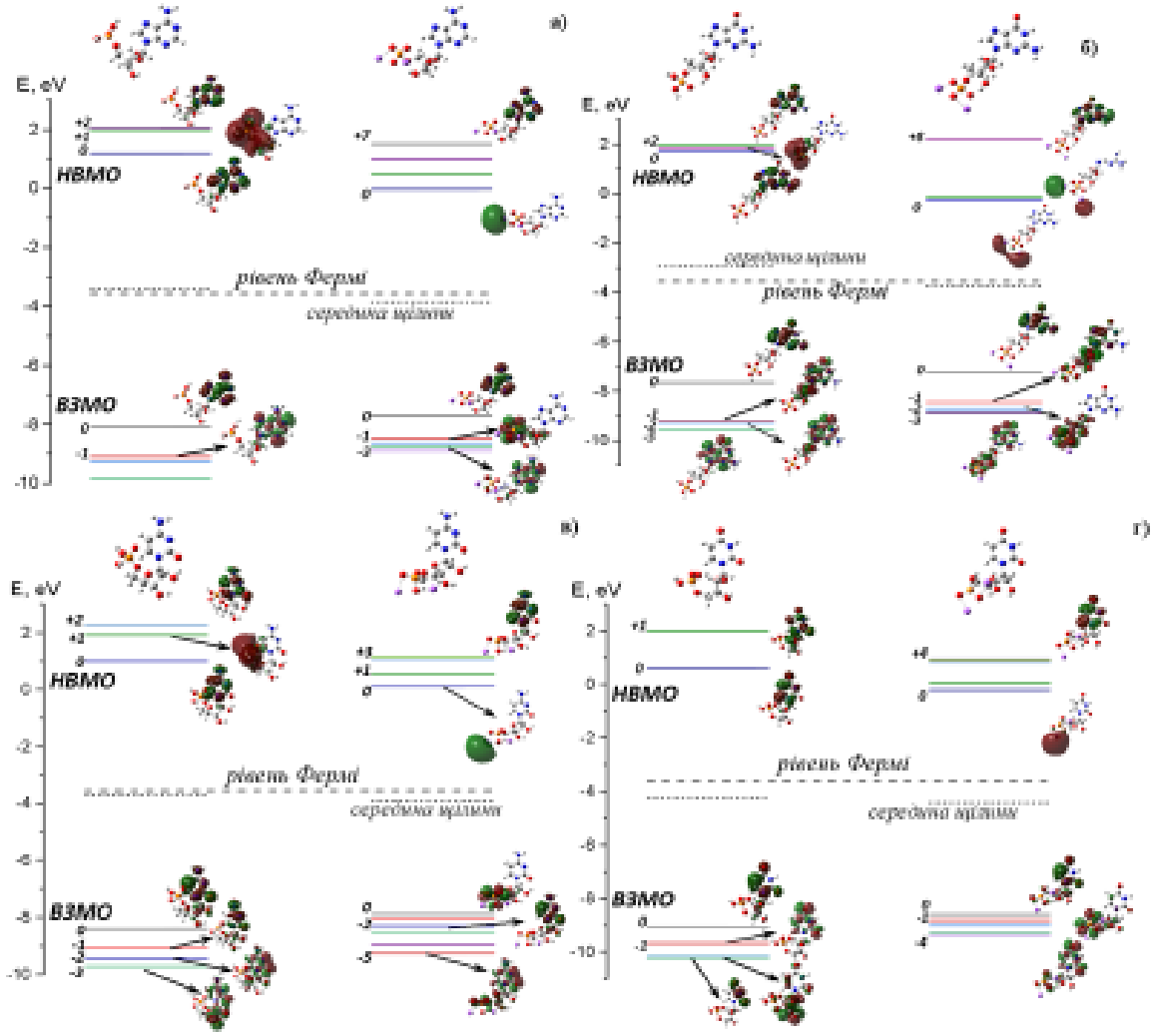


Рис. 3.20. Порівняння МО та розподілу електронної густини в молекулах динатрієвих солей НМФ пуринового та піримідинового ряду: а) аденілові нуклеотиди; б) гуанілові нуклеотиди; в) цитидилові нуклеотиди; г) уридилові нуклеотиди

Звуження ВЗМО–НВМО-щілини свідчить про зміну електронної структури та енергетичної доступності фронтальних орбіталей, однак саме по собі не означає посилення або обмеження міжмолекулярних взаємодій. Значення донорно-акцепторного параметра ϕ_0 для динатрієвих форм зменшувалися порівняно з

відповідними кислотними формами: приблизно на 0,05 для АМФ, 0,09 для ГМФ і 0,03 для УМФ та ЦМФ (табл. 3.15). Це характеризує зміну розрахованого донорно-акцепторного балансу електронної системи.

Дипольний момент також істотно залежав від іонної форми нуклеотиду: для АМФ, ГМФ та УМФ у розрахункових моделях динатрієвих форм він збільшувався, тоді як для ЦМФ він зменшувався приблизно на 1,32 D. Ці зміни відображають перерозподіл заряду та полярності молекулию

Таблиця 3.15

Теоретично обраховані показники НМФ та їх динатрієвих солей

	АМФ		**ГМФ**		**УМФ**		**ЦМФ**	
	2 Na	Δ	2 Na	Δ	2 Na	Δ	2 Na	Δ
НВМО	-0,027	1,23	-0,27	2,00	-0,21	0,83	0,11	0,89
ВЗМО(0)	-7,69	-0,38	-7,23	-0,43	-8,59	-0,45	-7,90	-0,51
Δ(ширина енергетичної щілини)	7,66	1,61	6,96	2,43	8,40	1,26	8,00	1,41
Енергія стабілізації	-1854,74	11,17	-1929,97	3,82	-1802,25	4,06	-1782,37	4,29
ϕ_0	0,46	0,05	0,47	0,09	0,40	0,03	0,46	0,03
μ	10,31	-4,74	18,50	-10,64	12,38	-7,60	7,02	1,32

Перш за все, потрібно відзначити, що введення атомів натрію в молекули НМФ призвело до зменшення енергії їх стабілізації приблизно на 4 ккал/моль; винятком є молекула АМФ, стабільність якої зменшено приблизно на 11 ккал/моль. Розрахунки вказують на відмінності в електронній структурі натрієвих і кислотних форм нуклеотидів. У молекулі ЦМФ саме введення атомів натрію змінило природу ВЗМО(0) з π-МО на n-МО, локалізовану на динатрійфосфатному залишку молекули. Такі зміни в електронній будові молекул призведуть до зміни їхньої біологічної афінності. Вірогідність міжмолекулярних взаємодій розглянемо через природу електронних переходів динатрієвих солей НМФ, чисельні величини яких наведено в таблиці В.7.

Перехід від кислотних до динатрієвих форм НМФ супроводжувався змінами енергій, сил осцилятора та орбітальної природи розрахованих електронних переходів.

Для УМФ характер першого переходу зберігався, водночас розрахована сила осцилятора збільшувалася приблизно у 7 разів. Для АМФ перший перехід мав n–π*-характер і включав орбіталі з істотним внеском фосфатного фрагмента та Na^+-асоційованої області; для наступних переходів внесок орбіталей, локалізованих на пуриновій основі, відрізнявся.

Для динатрієвих форм ГМФ і ЦМФ серед низькоенергетичних переходів також спостерігали n–π* та π–π*-компоненти, причому відповідні орбіталі були локалізовані як у ділянці фосфатного фрагмента, так і на кон'югованих системах азотистих основ (рис. 3.20; табл. В.7). Отже, присутність Na^+ істотно змінює електронну структуру та характер доступних електронних переходів НМФ.

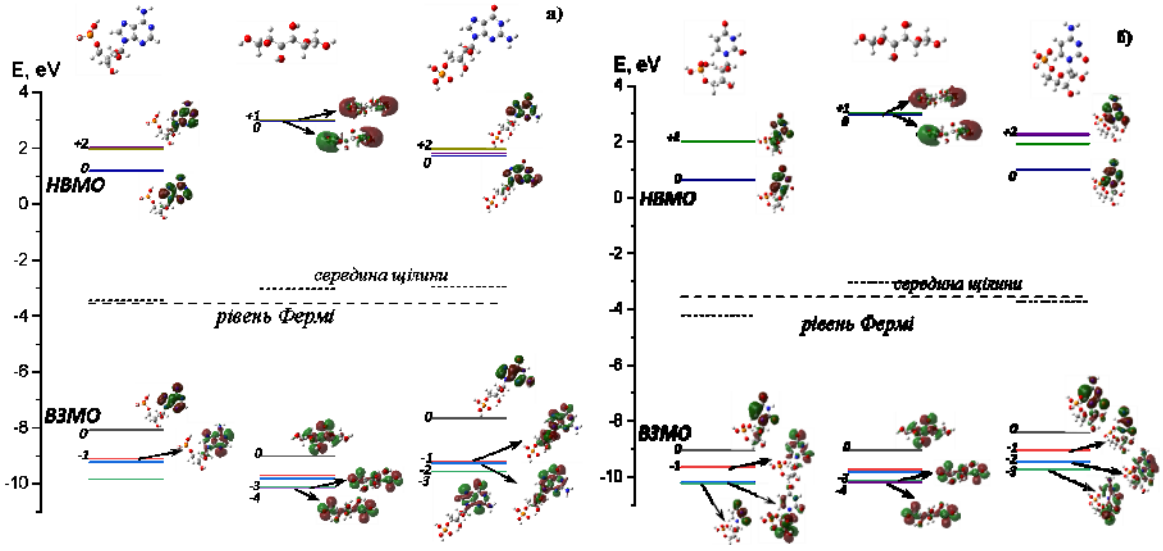


Рис. 3.21. Порівняння МО та розподілу електронної густини в молекулах НМФ і манітолу: а) НМФ пуринового ряду; б) НМФ піримідинового ряду

Як показано на рисунку 3.21, для розрахованої структури D-манітолу граничні зайняті орбіталі мають переважно n-характер і локалізуються на атомах Оксигену гідроксильних груп. Така електронна будова узгоджується з потенційною здатністю D-манітолу брати участь у водневих та інших донорно-акцепторних взаємодіях. Для оптимізованого конформера D-манітолу розрахована енергетична щілина становила близько 12,0 еВ, а дипольний момент був близьким до нуля (табл. 3.16).

Розрахований параметр $\phi_0 = 0{,}55$ характеризує донорно-акцепторні властивості D-манітолу в межах використаної моделі. Відмінності електронної структури пуринових і піримідинових НМФ можуть впливати на характер їх взаємодії з D-манітолом, однак самі значення ϕ_0 та енергії молекулярних орбіталей не дозволяють ранжувати ефективність комплексоутворення. Для такого висновку необхідно зіставляти розраховані енергії зв'язування E_{bind}, геометрії комплексів, водневі контакти та, за можливості, враховувати сольватаційні й термохімічні поправки (табл. 3.16).

Таблиця 3.16

Теоретично обраховані показники НМФ та манітолу

	Манітол	**АМФ**	**ГМФ**	**УМФ**	**ЦМФ**
НВМО	2,98	1,20	1,73	0,62	1,00
ВЗМО(0)	-9,02	-8,07	-7,66	-9,04	-8,41
ВЗМО (n-МО)	-10,13	-9,11	-9,57	-9,66	-9,43
Δ(ширина енергетичної щілини)	12,0	9,27	9,39	9,66	9,41
ϕ_0	0,55	0,51	0,56	0,43	0,49
μ	0,0016	5,57	7,86	4,78	8,34

Аналіз електронних переходів молекули манітолу показав (див. табл. В.8), що першим електронним переходом є n – π*. Перехід з ВЗМО(-3) або ВЗМО(-4), які розташовані значно глибше, відбувається за стилем «молекулярного пінцету». Тому з такими краще утворюватиметься комплекс.

За результатами TD-DFT-розрахунку для D-манітолу перший розрахований електронний перехід S_0 - S_1 мав енергію 7,77 еВ, Δ≈160 нм (табл. В.8). Основний внесок у цей збуджений стан забезпечували конфігурації ВЗМО−4→НВМО та ВЗМО−3→НВМО+1. У початковому аналізі цей перехід було віднесено до n – π*-типу, однак таке віднесення потребує перевірки просторової локалізації та характеру відповідних зайнятих і вільних орбіталей, оскільки D-манітол є насиченим поліолом і не містить очевидної кон'югованої π-системи.

Потенційну здатність D-манітолу до взаємодії з НМФ можна оцінювати за геометріями оптимізованих комплексів, міжмолекулярними O–H···O/N-контактами та розрахованими енергіями взаємодії.

НМФ пуринового та піримідинового ряду мають кілька контактів для міжмолекулярної взаємодії з манітолом за механізмом водневого зв'язку, вони можуть утворювати міжмолекулярні комплекси по гетероциклічній системі та по пентозі (див. рис. 3.22, табл. 3.17)

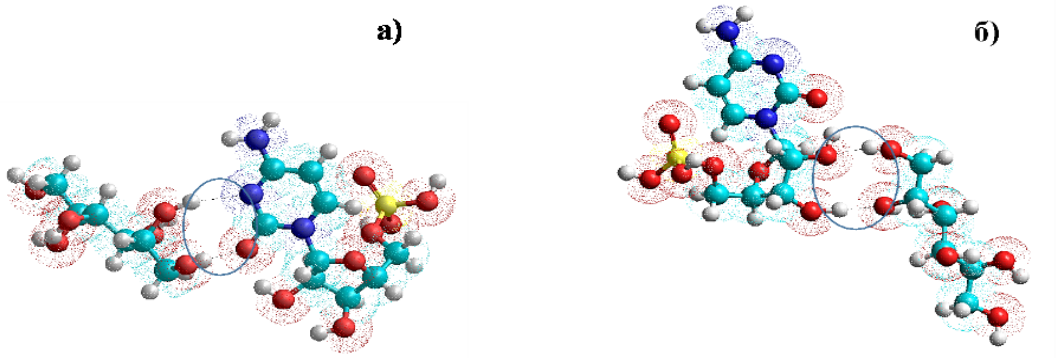


Рис. 3.22. Варіанти утворення комплексів НМФ з манітолом: а) утворення водневих зв'язків манітолу по ядру (тип К1); б) утворення водневих зв'язків манітолу по спиртових групах рибози (тип К2)

Таблиця 3.17

Теоретично обраховані енергії стабілізації комплексів НМФ з манітолом

Ліганд	$E_{molecule}$, a.u.	**[Манітол:НМФ]комплекс (К1)**		**[Манітол:НМФ]комплекс (К2)**	
		E_{compl}, a.u.	E_{bind}, kcal/mol	E_{compl}, a.u.	E_{bind}, kcal/mol
АМФ	-1531,217363	-2219,533003	-39,43	-2219,633987	-23,94
ГМФ	-1606,460697	-2294,877545	-24,08	-2294,877361	-23,97
УМФ	-1478,745835	-2167,153031	-18,03	-2167,161176	-16,35
ЦМФ	-1458,860542	-2147,274169	-22,06	-2147,26507	-23,14
Манітол	-688,378471	-	-	-	-

Квантово-хімічні розрахунки показали, що для комплексів типу К2, у яких D-манітол переважно взаємодіє з гідроксильними групами рибозного фрагмента, значення E_{bind} для АМФ, ГМФ і ЦМФ були близькими та становили відповідно −23,94, −23,97 і −23,14 ккал·моль$^{-1}$. Для УМФ розраховане значення було менш негативним (−16,35 ккал·моль$^{-1}$), що в межах використаної моделі відповідає менш сприятливій взаємодії.

Для комплексів типу K_1, орієнтованих на взаємодію D-манітолу з донорно-акцепторними центрами гетероциклічної основи, відмінності були вираженішими: E_{bind} становила −39,43 ккал·моль⁻¹ для АМФ, −24,08 ккал·моль⁻¹ для ГМФ, −22,06 ккал·моль⁻¹ для ЦМФ і −18,03 ккал·моль⁻¹ для УМФ (табл. 3.17). Таким чином, серед досліджених модельних геометрій найбільш сприятливе значення E_{bind} одержано для комплексу АМФ–D-манітол типу K_1, тоді як УМФ характеризувався найменш негативними значеннями для обох конфігурацій.

Виявлені відмінності можуть бути пов'язані з геометрією комплексу, розташуванням донорних і акцепторних центрів, а також особливостями електронної структури НМФ. Оскільки розрахунки не включали поправки BSSE, нульову коливальну енергію, ентропійний внесок, явну сольватацію та конформаційний ансамбль, отримані E_{bind} характеризують відносну стабільність конкретних модельних геометрій, а не експериментальну вільну енергію комплексоутворення.

3.3.2. Молекулярний докінг НМФ до ІНФ α-2b, ІНФАР 1 та комплексу ІНФ α-2b/ІНФАР 1. Для АМФ у присутності D-манітолу одержано більш негативні докінгові оцінки в моделі комплексу ІНФ α-2b/ІНФАР 1. Такі скорингові значення використовували лише для локалізації можливих контактів і порівняння лігандів у межах одного протоколу; їх не ототожнювали з експериментальною вільною енергією або константою дисоціації [137, 139] (табл. 3.18).

Таблиця 3.18

Скоринг-функція зв'язування ІНФ α-2b, рецептора та комплексу з АМФ

Ліганд	**Білок**	**ΔGдок.**	**Ліганд**	**Білок**	**ΔGдок.**	**Ліганд**	**Білок**	**ΔGдок.**
D-M	ІНФ	-4,3±0,2*	D-M	ІНФАР 1	-3,8±0,3*	D-M	Компл.	-4,9±0,1*
АМФ	ІНФ	-7,2±0,3	АМФ	ІНФАР 1	-6,2±0,2	АМФ	Компл.	-6,3±0,1
АМФ+D-M	ІНФ	-7±0,1	АМФ+D-M	ІНФАР 1	-6,5±0,2	АМФ+D-M	Компл.	-8,7±0,2*
$АМФNa_2$	ІНФ	-6,9±0,2	$АМФNa_2$	ІНФАР 1	-6,1±0,2	$АМФNa_2$	Компл.	-6,7±0,4
$АМФNa_2$+D-M	ІНФ	-6±0,1*	$АМФNa_2$+D-M	ІНФАР 1	-6,1±0,1	$АМФNa_2$+D-M	Компл.	-7,4±0,1*

Примітка. * *Показано статистично значущу різницю порівняно з вільним 5'-рНМФ ($p \leq 0,05$, $n = 10$).*

Молекулярний докінг (рис. 3.23) підтверджує ці висновки. Вільний АМФ створює широку мережу водневих зв'язків із залишками в обох білках: на ІНФ — Asp2, Ser11, Glu159; на ІНФАР 1 — Ile114, Cys200, Gly116. У комплексі ІНФ α-2b/ІНФАР 1 також задіяні такі залишки, як Gln5, Asp2, Leu3, Asp94 та Cys98, що вказують на точки контакту всередині гетеродимера.

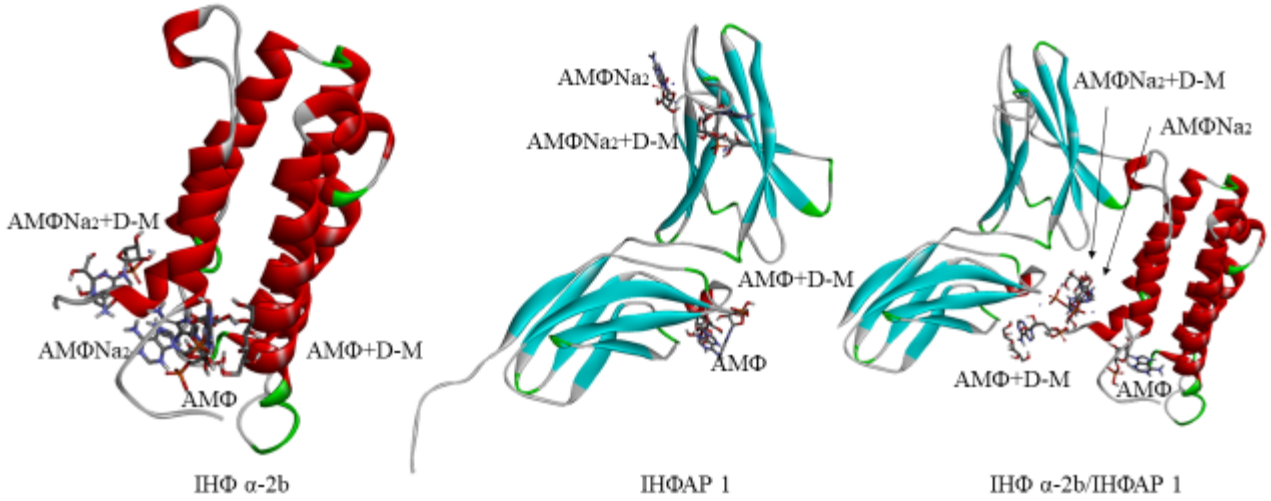


Рис. 3.23. Докінг-візуалізація інтерферону, рецептора інтерферону (ІНФАР 1) та їх комплексу у взаємодії з АМФ

Додавання D-манітолу (АМФ+D-M) призводить до утворення нових водневих зв'язків за участю Gln90 (зв'язується з манітолом), Arg13 та Leu9, а також у комплексі Arg162(зв'язується з ІНФ) , Glu186 та Glu157. Енергія зв'язування АМФ з D-манітолом у мішені ІНФ α-2b/ІНФАР 1 становить –8,7 ккал/моль, що є одним із найвигідніших значень серед усіх досліджених сполук.

Водночас молекулярний докінг (рис. 3.24, табл. 3.19) показав, що для комплексу ГМФ + D-манітол із модельною системою ІНФ α-2b–ІНФАР 1 було отримано одну з найсприятливіших скорингових оцінок $\Delta G_{dock} = -9{,}4$ ккал·моль$^{-1}$.

Це значення характеризує відносну перевагу конкретної розрахованої позиції ліганда в межах використаної докінгової моделі та не є експериментально визначеною термодинамічною вільною енергією зв’язування.

Таблиця 3.19

Скоринг-функція зв'язування ІНФ α-2b, рецептора та комплексу з ГМФ

Ліганд	Білок	ΔGдок.	Ліганд	Білок	ΔGдок.	Ліганд	Білок	ΔGдок.
ГМФ	ІНФ	-6,3±0,1	ГМФ	ІНФАР 1	-6,3±0,2	ГМФ	Компл.	-7,5±0,1
ГМФ+D-M	ІНФ	-7,3±0,2*	ГМФ+D-M	ІНФАР 1	-7,7±0,2*	ГМФ+D-M	Компл.	-9,4±0,5*
$ГМФNa_2$	ІНФ	-7,6±0,3*	$ГМФNa_2$	ІНФАР 1	-6,1±0,1	$ГМФNa_2$	Компл.	-6,4±0,1*
$ГМФNa_2$+D-M	ІНФ	-6,6±0,2*	$ГМФNa_2$+D-M	ІНФАР 1	-5,6±0,2*	$ГМФNa_2$+D-M	Компл.	-7,1±0,2*

Примітка. * — *статистично значуща різниця порівняно з відповідним вільним 5'-рНМП ($p \leq 0,05$, $n = 10$).*

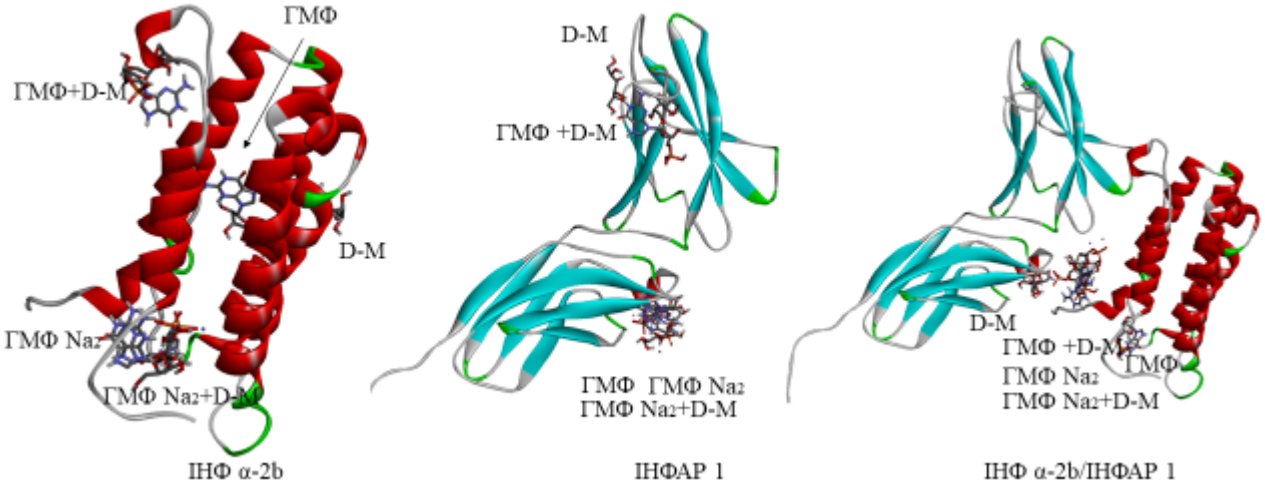


Рис. 3.24. Докінг-візуалізація інтерферону, рецептора інтерферону (ІНФАР 1) та їх комплексу у взаємодії з ГМФ

Розбіжність між цією скоринговою оцінкою та результатами флуоресцентної спектроскопії, де присутність D-манітолу не супроводжувалася відповідним посиленням зв’язування ГМФ, може бути пов’язана з відмінностями між модельним і експериментальним описом системи. У AutoDock ViNa конформаційна гнучкість переважно враховується для ліганда, тоді як білкова мішень моделюється переважно як жорстка структура; крім того, спрощено враховуються сольватація, ентропійні внески, протонні стани та конкурентні взаємодії з розчинником. Тому результати докінгу доцільно використовувати для порівняння можливих геометрій і контактів, а не як кількісний замінник експериментальної афінності.

Розбіжності між результатами докінгу та вимірюваннями для системи ГМФ–D-манітол у розчині можуть бути пов’язані з кінетичними обмеженнями, конформаційними переходами та впливом сольватації. Внесок кожного із цих чинників у роботі не встановлено. Конформаційна динаміка білків також впливає на зв'язування; при цьому структури AlphaFold та докінг не можуть повністю врахувати гнучкість петель і алостеричні переходи в гетеродимері ІНФ α-2b/ІНФАР 1 за 37 °C. Докінг оцінює енергетичну вигідність окремих розрахованих поз зв’язування, тоді як спектроскопічні вимірювання характеризують сумарний відгук досліджуваної системи в розчині.

Аналіз міжмолекулярних контактів показує, що ГМФ у вільному стані взаємодіє з ІНФ через Glu42, Ala118, Glu41, Gly37, Arg125 та π-алкільний зв'язок з Pro39. У комплексі ІНФ α-2b/ІНФАР 1 з D-манітом (ГМФ+D-M) з'являються взаємодії (Glu141 на ІНФ) та додаткові водневі зв'язки з Asn156, Ser160 та Ser163 (зв'язується з ІНФ), а також з HIS76 та ASP138 (зв'язується з ІНФАР 1). Це свідчить про те, що маніт може сприяти локальній перебудові сайту зв'язування, тим самим значно стабілізуючи гуаніновий нуклеотид. Однак за рівноважних умов у розчині ця стабілізація не відображається у зменшенні K_d, можливо, через кінетичні обмеження або конкуренцію з молекулами води.

За результатами молекулярного докінгу скорингові оцінки для ЦМФ залежали від білкової мішені (табл. 3.20).

Таблиця 3.20

Скоринг-функція зв'язування ІНФ α-2b, рецептора та комплексу з ЦМФ

Ліганд	**Білок**	**ΔGдок.**	**Ліганд**	**Білок**	**ΔGдок.**	**Ліганд**	**Білок**	**ΔGдок.**
ЦМФ	ІНФ	-6,2±0,1	ЦМФ	ІНФАР 1	-5,9±0,1	ЦМФ	Компл.	-5,8±0,1
ЦМФ+D-M	ІНФ	-6,9±0,2*	ЦМФ+D-M	ІНФАР 1	-5,7±0,1*	ЦМФ+D-M	Компл.	-6,7±0,5*
ЦМФNa_2	ІНФ	-5,4±0,3*	ЦМФNa_2	ІНФАР 1	-5,2±0,3*	ЦМФNa_2	Компл.	-6,4±0,3*
ЦМФNa_2+D-M	ІНФ	-4,7±0,2*	ЦМФNa_2+D-M	ІНФАР 1	-6,5±0,2*	ЦМФNa_2+D-M	Компл.	-6,3±0,3*

Примітка. * — *статистично значуща різниця порівняно з відповідним вільним 5'-рНМП ($p \leq 0,05$, $n = 10$).*

Для вільного ЦМФ значення ΔG_{dock} становили −6,2 ккал·моль$^{-1}$ для ІНФ α-2b, −5,9 ккал·моль$^{-1}$ для ІНФАР 1 та −5,8 ккал·моль$^{-1}$ для модельної системи ІНФ α-2b–ІНФАР 1. У присутності D-манітолу відповідні значення становили −6,9, −5,7 та −6,7 ккал·моль$^{-1}$. Для тієї самої модельної системи ІНФ α-2b–ІНФАР 1 скоринг ЦМФ + D-манітол (−6,7 ккал·моль$^{-1}$) був менш сприятливим, тобто менш негативним, ніж для АМФ + D-манітол (−8,7 ккал·моль$^{-1}$) та ГМФ + D-манітол (−9,4 ккал·моль$^{-1}$).

Для ЦМФNa_2 значення ΔG_{dock} становили −5,4, −5,2 та −6,4 ккал·моль$^{-1}$ для ІНФ α-2b, ІНФАР 1 та системи ІНФ α-2b–ІНФАР 1 відповідно, а для ЦМФNa_2 + D-манітол — −4,7, −6,5 та −6,3 ккал·моль$^{-1}$. Отже, вплив динатрієвої форми та D-манітолу на скорингову оцінку був мішень-залежним і не демонстрував універсального послаблення або посилення зв’язування.

Докінг (рис. 3.25) показує, що вільний ЦМФ утворює водневі зв'язки переважно з Ser8, Gln158 та Glu159 на ІНФ, а також з Ile158 та Asp138 на ІНФАР 1. Комплекс ІНФ α-2b/ІНФАР 1 характеризується контактами з Arg162 (зв'язується з ІНФ), Glu157, Lys155 та Glu186.

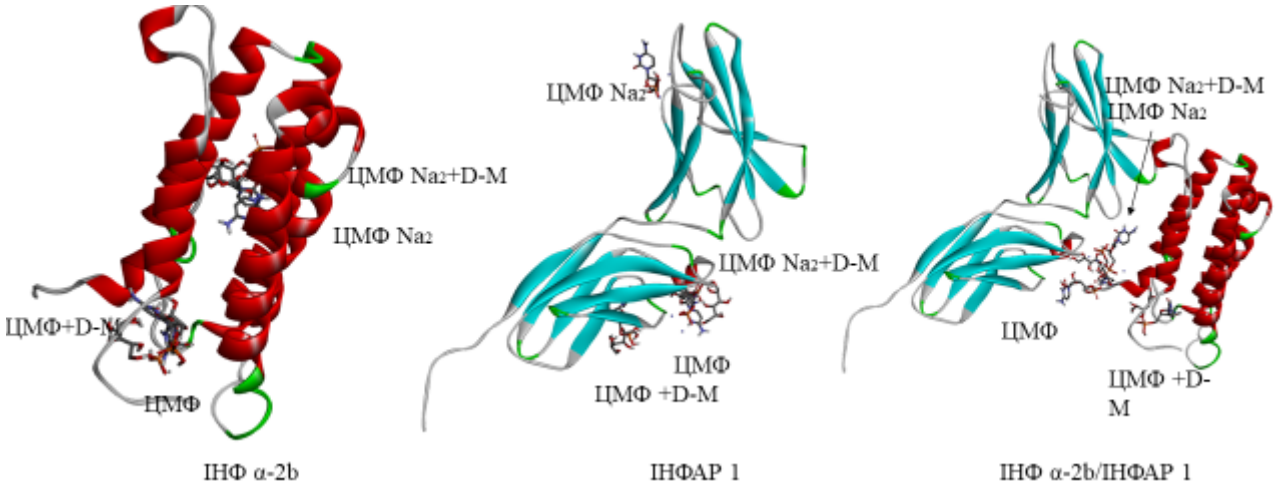


Рис. 3.25. Докінгова візуалізація інтерферону, рецептора інтерферону (ІНФАР 1) та їх комплексу у взаємодії з ЦМФ

У присутності D-манітолу (ЦМФ+D-M) виникають додаткові взаємодії, зокрема за участю Ser8, Gln158 та Glu159 з манітолом, Asp94 та Asp2 з ЦМФ, але ці контакти суттєво не підвищують спорідненість. Водночас для попередньо сформованої системи ІНФ α-2b–ІНФАР 1 скорингова оцінка комплексу ЦМФ + D-манітол становила ΔG dock = −6,7 ккал·моль$^{-1}$. За тієї самої мішені відповідні значення для АМФ + D-манітолу та

ГМФ + D-манітолу були більш негативними і становили −8,7 та −9,4 ккал·моль$^{-1}$ відповідно. Отже, у межах використаної докінгової моделі ЦМФ + D-манітол характеризувався менш сприятливою скоринговою оцінкою, ніж відповідні системи з АМФ і ГМФ. Це може відображати відмінності в геометрії та наборі контактів у розрахованих позах, однак не є прямим доказом нижчої структурної комплементарності цитозину або меншої експериментальної афінності.

УМП подібний до АМФ, але має дещо нижчу спорідненість, залежно від мішені та моделі (таблиця 3.21).

Таблиця 3.21

Скоринг-функція зв'язування ІНФ α-2b, рецептора та комплексу з УМФ

Ліганд	**Білок**	**ΔGдок.**	**Ліганд**	**Білок**	**ΔGдок.**	**Ліганд**	**Білок**	**ΔGдок.**
УМФ	ІНФ	-6,6±0,1	УМФ	ІНФАР 1	-6,1±0,1	УМФ	Компл.	-5,9±0,1
УМФ+D-M	ІНФ	-5,7±0,2*	УМФ+D-M	ІНФАР 1	-5,9±0,1*	УМФ+D-M	Компл.	-7,6±0,2*
$УМФNa_2$	ІНФ	-5±0,2*	$УМФNa_2$	ІНФАР 1	-6,2±0,1	$УМФNa_2$	Компл.	-7±0,3*
$УМФNa_2$+D-M	ІНФ	-6,7±0,2*	$УМФNa_2$+D-M	ІНФАР 1	-6,8±0,1*	$УМФNa_2$+D-M	Компл.	-8,4±0,4*

Примітка. * — *статистично значуща різниця порівняно з відповідним вільним 5'-рНМП ($p \leq 0,05$, $n = 10$).*

Докінг виявив розширені водневі зв'язки в УМП+D-M. Вплив D-манітолу був менш вираженим в ізольованих білках, що свідчить про те, що максимальна стабілізація відбувається після утворення повного гетеродимера. Динатрій УМП мав менше негативне зв'язування ΔG° (-8,0…-8,3 ккал/моль), але комплекс $УМПNa_2$ + D-M продемонстрував покращені термодинамічні параметри порівняно з самим $УМПNa_2$, що вказує на часткову компенсацію ефектів іонізації завдяки додатковим взаємодіям з Д-манітолом.

Докінг (рис. 3.26) виявляє водневі зв'язки між вільним УМФ та Thr155, Ser11, Ser8 та Ala50 на ІНФ, а також з Lys159, Ile158 та Leu139 на ІНФАР 1. Також спостерігаються контакти з Glu159 та Asn156 на частині ІНФ, а також з His187 на частині ІНФАР 1. Присутність D-манітолу (УМФ+D-M) значно розширює мережу

взаємодії: Gly44 (з манітолом), Asn45, Ser160, Ser163 на ІНФ; Lys53 (з манітолом), ARG73, Glu71 на ІНФАР 1; а в гетеродимері — Asn45, Ser163, Arg162, Ser160 на частині ІНФ та маніт-опосередковані зв'язки з His76, Asp138 на частині ІНФАР 1 комплексу ІНФ α-2b/ІНФАР 1. Хоча значення ΔG dock для УМФ+D-M (-7,6 ккал/моль) не є рекордним, воно помітно краще, ніж для ЦМФ. Це вказує на значний внесок урацильної основи в утворення стабільного потрійного комплексу.

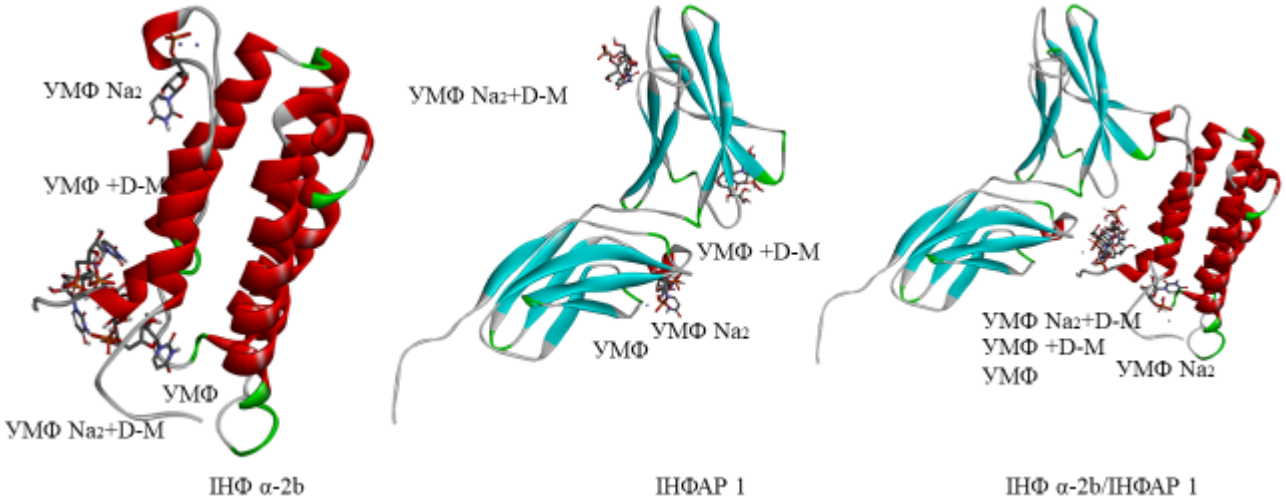


Рис. 3.26. Докінг-візуалізація інтерферону, рецептора інтерферону (ІНФАР 1) та їх комплексу у взаємодії з УМФ

Аналіз повторюваних міжмолекулярних взаємодій (табл. 3.22) виявив характерні амінокислотні залишки, що беруть участь у зв'язуванні різних лігандів із рецептором ІНФАР 1 та в комплексі ІНФ α-2b/ІНФАР 1. Для ІНФ найпоширенішими були звичайні водневі зв'язки між залишками Glu159 та Ser11, що спостерігалися у більшості мононуклеотидів та їх комплексів з манітом.

У рецепторі ІНФАР 1 домінували взаємодії за участю Asp138, Glu132, Ile158 та Leu139, що вказує на формування стабільного сайту зв'язування для нуклеотидів та їхніх похідних. Для комплексу ІНФ α-2b/ІНФАР 1 найчастіше спостерігалися водневі зв'язки із залишками Arg162 та Ser160 інтерферону, а також із залишком Asp138 рецептора. Манітол у комплексах мононуклеотид–манітол також сприяв стабілізації взаємодій ліганд–білок, зокрема через контакти з Leu29 рецептора та Asp138 у комплексі ІНФ α-2b/ІНФАР 1. Окрім звичайних водневих зв'язків, спостерігалися π-аніонні, π-катіонні, π-алкільні та ван-дер-ваальсові взаємодії, що додатково стабілізували комплекси. Варто зазначити, що ліганди зв'язуються переважно з ІНФ у

N-кінцевому (сигнальному) домені (Asp2, Ser8, Gly10 та Ser11) і з D- та E-спіралями (Arg125, Ala145, Gln158 та Glu159). З рецептором ІНФАР 1 ліганди взаємодіють переважно в межах субдоменів SD1 та SD2.

Таблиця 3.22

Зв'язки білок-ліганд під час докінгу

1) ІНФ		**2) ІНФАР 1**		**3) ІНФ α-2b/ІНФАР 1**	
Звичайний Н-зв’язок		Звичайний Н-зв’язок		Звичайний Н-зв’язок	
Asp2	АМФ, $ГМФNa_2$	Tyr7	$АМФNa_2$+D-M, ГМФ+D-M	Asp2 ІНФ	АМФ, ЦМФ+D-M, ГМФ, $УМФNa_2$
Ser8	ЦМФ, ЦМФ+D-M, $ГМФNa_2$	Leu29	D-mannitol, $ЦМФNa_2$, $УМФNa_2$+D-M	Ala50 ІНФ	ГМФ, $УМФNa_2$
Gly10	АМФ+D-M, $ГМФNa_2$, $ГМФNa_2$+D-M	Glu132	$ЦМФNa_2$+D-M, ГМФ, $ГМФNa_2$, $УМФNa_2$	Ser160 ІНФ	$АМФNa_2$, ГМФ+D-M, $ГМФNa_2$+D-M, УМФ+D-M, $УМФNa_2$+D-M
Ser11	АМФ, $АМФNa_2$, ГМФNa2, $ГМФNa_2$+D-M, УМФ	Leu135	АМФ+D-M, $ЦМФNa_2$+D-M, ГМФ	Arg162 ІНФ	$АМФNa_2$, АМФ+D-M, ЦМФ, $ЦМФNa_2$, $ЦМФNa_2$+D-M, УМФ+D-M
Asp32	ГМФ+D-M, $УМФNa_2$	Phe137	АМФ+D-M, $ЦМФNa_2$+D-M, $УМФNa_2$	Asp94 ІНФ	АМФ, ЦМФ+D-M
Glu41	$ЦМФNa_2$, $ЦМФNa_2$+D-M, ГМФ	Asp138	ЦМФ, $ЦМФNa_2$+D-M, ГМФ, $ГМФNa_2$+D-M, $УМФNa_2$	Asn156 ІНФАР 1	$ЦМФNa_2$, $ГМФNa_2$, ГМФ+D-M, УМФ
Asn45	$АМФNa_2$+D-M, УМФ+D-M	Leu139	$ГМФNa_2$, ГМФNa2+D-M, УМФ, $УМФNa_2$	His76 ІНФАР1	$ЦМФNa_2$, ГМФ+D-M, УМФ+D-M
Arg125	$ЦМФNa_2$+D-M, ГМФ	Ile158	ЦМФ, $ЦМФNa_2$+D-M, ГМФ, УМФ	Asp138 ІНФАР 1	ГМФ+D-M, $ГМФNa_2$+D-M, УМФ+D-M
Gln158	ЦМФ, ЦМФ+D-M			His187 ІНФАР 1	ЦМФ, $ЦМФNa_2$, УМФ
Glu159	АМФ, $АМФNa_2$, ЦМФ, $ГМФNa_2$, $ГМФNa_2$+D-M				
π–алкільний зв.		π–аніон/–катіон/електростатич.		Ван дер Ваальс/ π–аніон	
Leu26	ГМФ+D-M, $УМФNa_2$	Lys59 π–аніон	$ГМФNa_2$, УМФ	His76 ВандерВаальс	$ЦМФNa_2$, $ГМФNa_2$, УМФ
Ala145	ГМФ+D-M, $УМФNa_2$	Lys159 електростатич.	$ЦМФNa_2$+D-M, $ГМФNa_2$+D-M	Asp138 ВандерВаальс	$АМФNa_2$+D-M, $УМФNa_2$+D-M
		Asp138 π–катіон	$ГМФNa_2$, УМФ	Arg149 π–аніон	$ГМФNa_2$, УМФ

Результати для ОРН були досліджені окремо попередньо [151].

Висновки до підрозділу 3.3.

Квантово-хімічні розрахунки виявили вплив природи азотистої основи та іонної форми фосфату на електронну структуру й донорно-акцепторні властивості НМФ. Моделювання комплексів НМФ–D-манітолу показало можливість утворення міжмолекулярних водневих зв'язків, а розраховані енергії зв'язування залежали від геометрії комплексу: для конфігурації K1 найсприятливішою була взаємодія з АМФ, тоді як для K2 значення АМФ, ГМФ і ЦМФ були близькими. Молекулярний докінг виявив потенційні ділянки зв'язування поблизу N-кінцевої області та D-, E-спіралей ІНФ α-2b і субдоменів SD1–SD2 ІНФАР 1, зокрема за участю Arg162, Ser160 та Asp138. D-манітол міг розширювати мережу нековалентних контактів. Розрахункові результати формують структурні гіпотези, але не доводять механізму зв'язування.

Сукупність результатів дозволяє розглядати моно- та олігорибонуклеотиди як мікромодулятори конформаційного стану ІНФ α-2b, дія яких залежить від природи основи, протонного й сольового стану, D-манітолу, гідратації та взаємодії з ІНФАР 1. Вплив на біологічну активність потребує функціонального підтвердження.

Результати, представлені у підрозділі 3.3, опубліковані у наукових працях:

1. The Natural Oligoribonucleotides Functionalized by D-Mannitol Affected Interactions of Hemagglutinin with Glycan Receptor Indicating Anti-Influenza Activity / Tkachuk Z. Yu., Melnichuk N. S., **Nikolaiev R. O.,** Szutkowski K., Zhukov I. *Membranes*. 2021. Vol. 11, No. 10. Art. 757. DOI: 10.3390/membranes11100757.
2. π-Електронна афінність азотистих основ нуклеїнових кислот / Оберніхіна Н. В., **Ніколаєв Р. О.,** Качковський О. Д., Ткачук З. Ю. *Доповіді НАН України*. 2019. № 6. С. 75–81. DOI: 10.15407/dopovidi2019.06.075.
3. **Nikolaiev R. O.,** Tkachuk Z. Yu. Comparative analysis of the interaction of INF-, INFAR1 and the INF-INFAR1 complex with ribonucleotides by spectroscopic methods and docking. *ScienceRise: Biological Science*. 2026. No. 3 (47). P. 11–24. DOI: 10.15587/2519-8025.2026.368056.

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Сукупність результатів дисертації показує, що взаємодія 5′-рибонуклеозидмонофосфатів, олігорибонуклеотидів та їхніх композицій з D-манітолом з ІНФ α-2b залежить від природи азотистої основи, препаративної кислотної або натрієвої форми, іонно-гідратаційного оточення та стану білкової системи. Її неможливо описати одним універсальним механізмом. Експериментальні й розрахункові дані підтримують уявлення про нуклеотиди як мікромодулятори конформаційної пластичності ІНФ α-2b, дія яких поєднує безпосередні нековалентні контакти, перебудову гідратації та зміни доступності поверхневих ділянок.

Ця інтерпретація відповідає концепції енергетичного ландшафту й конформаційних ансамблів білків, сформульованій Frauenfelder та розвиненій у дослідженнях молекулярного розпізнавання [1–3]. Зв’язування ліганда може зміщувати популяції близьких за енергією станів через конформаційний відбір і подальшу локальну адаптацію. Тому невеликі спектральні або термодинамічні зміни можуть відображати реальну перебудову білка без глобального розгортання. Однак сама ансамблева концепція не доводить мікромодуляції: найвагомішим аргументом є повторювана залежність флуоресценції, КД, ІЧ-спектрів, теплових ефектів та анізотропії від тих самих експериментальних чинників.

Необхідно розрізняти безпосередню білок-лігандну взаємодію, супровідні конформаційно-гідратаційні зміни та можливі функціональні наслідки. Перші два рівні підтримані взаємодоповнювальними методами. Вплив на рецепторну сигналізацію залишається гіпотезою, оскільки досліджено систему з ІНФАР 1 без ІНФАР 2 та прямих клітинних тестів. Для ІНФ α2 природне утворення комплексу зазвичай починається зі зв’язування з більш високоафінною ІНФАР 2, після чого рекрутується ІНФАР 1 [53–56, 92–95]. Отже, двокомпонентна система відтворює лише частину рецепторного розпізнавання.

Попередні власні роботи характеризували вплив ОРН на конформаційний стан ІНФ α-2b [87], взаємодію з різними формами АМФ [88] та ряд НМФ із D-манітолом [89]. Поточне дослідження систематизує ці спостереження й розширює їх на ІНФАР 1, попередньо сформований комплекс, а також на різний порядок додавання компонентів. Новизна полягає в інтегрованому розгляді форми ліганда, середовища та стану білкової мішені. ЯМР-дані про α-спіральний каркас і локальну гнучкість ІНФ α-2a [51] підтримують можливість локальних перебудов спорідненого ІНФ α-2b, але не визначають їхньої конкретної геометрії.

Стаціонарна флуоресценція виявила концентраційно-залежний і ліганд-специфічний відгук ІНФ α-2b. Найвиразніше гасіння серед НМФ спостерігали для ГМФ із D-манітолом — близько 45 %; для цієї системи отримано й найменше модельне Kd прямої взаємодії, 0,20 ± 0,03 мкМ. Проте амплітуда гасіння не є еквівалентом афінності: вона залежить від електронних властивостей основи, оточення флуорофорів і механізмів релаксації [130, 131]. Геометрично сприятлива близькість ліганда до ароматичного залишку може давати сильний сигнал без пропорційного збільшення спорідненості, що пояснює розбіжності в ранжуванні за гасінням і Kd.

Скорочення часу життя флуоресценції за наявності НМФ та ОРН свідчить про наявність додаткових шляхів безвипромінювальної релаксації та узгоджується зі зміною мікрооточення триптофанових залишків. Оцінки фьорстерівського переносу енергії допускають нанометрову близькість донора й акцептора, але залежать також від спектрального перекриття, квантового виходу, показника заломлення та орієнтаційного фактора κ^2 [130]. Тому вони не встановлюють точного сайту чи атомної геометрії контакту. Відмінності між кислотними й натрієвими формами [89] характеризують просторове та спектральне мікрооточення донорно-акцепторної пари, а не безпосередньо картирують зв’язування.

Balasubramanian та співавт. показали, що олігодезоксинуклеотид змінює вторинну й третинну структуру ІНФ γ, а також флуоресценцію та розпізнавання антитілами, без ознак денатурації чи агрегації [97]. Це є прецедентом конформаційного впливу коротких нуклеїнових кислот на інтерферон, однак інший клас білка та рецепторної системи не дозволяє безпосередньо перенести цей механізм на ІНФ α-2b.

У нашій роботі мультиспектральна відповідь підтримує фізико-хімічну взаємодію; її біологічні наслідки потребують незалежної перевірки.

Вища спостережна афінність більшості кислотних форм порівняно з натрієвими є однією з найстійкіших закономірностей. Вона не зводиться до протиставлення повністю протонованої та депротонованої молекул: за експериментального pH фосфатні групи значною мірою іонізовані. Препаративна форма визначає вихідне протиіонне оточення, іонне парування, гідратацію та витрати на десольватацію. Це узгоджується з роботами Record та оглядами іонних взаємодій білків із нуклеїновими кислотами [24–26]. Yu, Pettitt та Iwahara наголошують на динамічності таких контактів [26], що є важливим і для малих нуклеотидних лігандів.

Na^+ може асоціюватися з фосфатом, екранувати електростатичний потенціал, змінювати гідратацію та перерозподілятися під час утворення комплексу [24, 26]. Це впливає не лише на наближення до заряджених ділянок білка, а й на орієнтацію рибози та основи. Моделювання Goh, Knight і Brooks підтверджує залежність протонних рівноваг від розчинника та сусідніх заряджених центрів [27, 28]. Отже, кислотна форма препарату є варіантом вихідного іонно-гідратаційного стану, а не доказом незмінного протонування фосфату під час титрування.

Калориметрія незалежно виявила різні термодинамічні режими: кислотні форми переважно давали від'ємні ΔH, динатрієві — значно менші або невеликі додатні. Найвиразніша екзотермічна відповідь була характерною для ГМФ і ГМФ із D-манітолом. Це сумісне з вагомішим внеском сприятливих безпосередніх контактів у кислотних системах та десольватації й вивільнення води або іонів у натрієвих. Водночас вимірювана теплота включає зв'язування, перебудову розчинника, протонні реакції та буферні внески; знак ΔH сам по собі не визначає природи чи кількості контактів.

Baker і Murphy показали залежність спостережуваної ентальпії протонно-спряженого зв'язування від pH та ентальпії іонізації буфера [15]. Оскільки відповідної серії буферних ITC-вимірювань у дисертації не виконували, отримані параметри є характеристиками конкретного середовища. Одноразова інжекційна калориметрія виявила найбільший контраст між кислотною та натрієвою формами Tris і його

часткове згладжування в альбуміні та плазмі, де сигнал є суперпозицією взаємодій із кількома компонентами. Параметри $t_{1/2}$, t_{90}, t_{95} і k характеризують релаксацію теплового сигналу, а не окрему мікроскопічну стадію; кінетична інтерпретація потребує моделі вимірювання та урахування інструментальної функції [117].

D-манітол доцільно розглядати як контекстно-залежний модифікатор молекулярного середовища. Праці Gekko, Morikawa й Timasheff пов'язують ефекти поліолів із сольватаційною термодинамікою, переважною гідратацією та виключенням або зв'язуванням косолвенту [37, 47]; сучасні дослідження також виявляють залежність дії осмолітів від властивостей білка та складу розчину [48]. У наших системах D-манітол для частини кислотних форм посилював гасіння, зменшував модельне K_d і збільшував модуль екзотермічного ефекту, але не діяв однаково в усіх умовах і не завжди підвищував температуру переходу.

Дослідження Вівчарик та співавт. [85], Shchodryi і Tkachuk [86] описали взаємодію манітолу з РНК та полінуклеотидами. Наші ІЧ- і MCR-ALS-дані розширюють ці спостереження: спектрально відмінні стани виникають уже у вільних НМФ/ОРН до контакту з білком. Це допускає зміну вихідної сольватації ліганда. Однак амплітуда MCR-компонента є дескриптором спектрального стану, а не безпосередньою молярною часткою комплексу чи доказом стехіометрії; розклад залежить від накладених обмежень і може бути неоднозначним [115, 150].

Контрольні анізотропні досліди показали, що D-манітол без НМФ також спричиняє відповідь, залежну від стану ІНФ α-2b, ІНФАР 1 або їхнього комплексу. Отже, різниця між НМФ і НМФ із D-манітолом включає зміну стану ліганда та прямий або середовищний вплив поліолу на білкову систему. Це пояснює осново- й стан-залежність ефекту та виключає його трактування як універсального підсилення зв'язування. Для білкових композицій необхідно оцінювати не лише стабільність під час зберігання, а й гідратацію, спектральний стан, видиму афінність і рецепторно-залежний відгук [123].

КД-спектроскопія виявила помірні зміни вторинної структури. Кислотні форми за частиною умов частіше зменшували оцінену частку α-спіралей і збільшували невпорядкований компонент, натомість натрієві — зберігали або збільшували

структуровані компоненти; для низки лігандів, зокрема ОРН, спостерігали зростання α-спірального внеску. Напрям ефекту залежав від природи, довжини та іонної форми ліганда. Абсолютні оцінки відрізнялися між алгоритмами, що свідчить про залежність деконволюції від еталонного набору, спектрального діапазону та базової лінії [100, 101, 104–110]. Зміни на кілька відсоткових пунктів не означають тотальної денатурації; надійнішою є їхня узгодженість з іншими методами.

ІЧ-спектри доповнюють КД, оскільки амідні смуги чутливі до вторинної структури, водневого зв’язування й оточення карбонільних груп [112–114]. Відмінності між кислотними та натрієвими формами й зміни в лігандних системах із D-манітолом підтримують гідратаційну інтерпретацію частини спектрального відгуку. Водночас зміщення окремої смуги не визначає конкретного водневого зв’язку. Тому висновок стосується перебудови воднево-зв’язаного й конформаційного ансамблю, а не встановлення атомного механізму за одним спектральним маркером.

Температура переходу нативного ІНФ α-2b становила 68,54 °C; у присутності лігандів — приблизно 65,32–71,10 °C, причому в 17 із 20 нуклеотидвмісних умовах зміна не перевищувала ±2 °C. Це не підтримує універсальної різкої стабілізації чи дестабілізації. Тплав. є операційним показником, залежним від способу детекції, доступності флуорофорів, агрегації та середовища [118]. Відсутність узгодженої кореляції з ThT-відповіддю також закономірна: сторонні сполуки можуть змінювати сигнал ThT через оптичні ефекти, взаємодію з барвником або конкуренцію за зв’язування [119]. Тому його інтенсивність не є прямою мірою кількості агрегатів.

Конформаційну, термічну й колоїдну стабільність слід розглядати окремо: збільшення структурної впорядкованості не обов’язково знижує агрегаційну схильність, яка залежить від заряду поверхні, гідрофобної доступності та ступеня гідратації. Відповідно до методології аналізу агрегатів [102], спектроскопічні результати потребують доповнення вимірюваннями розміру, морфології та світлорозсіювання. Дані роботи засвідчують зміну структурно-агрегаційного відгуку, але не обґрунтовують правил, за якими кислотні форми завжди дестабілізують білок, а натрієві — стабілізують.

Основа нуклеотиду може визначати локальну комплементарність незалежно від загального заряду ліганда. Більша ароматична площа пуринів створює можливості для дисперсійних контактів, проте розташування донорів і акцепторів водневого зв'язку в піримідинах також може бути сприятливим для певної білкової ділянки. Тому спостережуваний профіль є основоспецифічним і залежить від сольватації. Для розділення цих внесків — перспективне зіставлення експериментальних K_d та ΔH з розрахунками конформерів у явній воді, де окремо враховано основу, фосфат, Na^+ та водні містки.

Фосфат є важливим, але не єдиним детермінантом взаємодії. Відмінності флуоресценції, K_d, ΔH та конформаційного відгуку між АМФ, ГМФ, ЦМФ і УМФ свідчать про роль донорно-акцепторних центрів, електронної структури та ароматичної поверхні основи [81–83]. Проте електронний дескриптор не є самостійним предиктором афінності, оскільки вільна енергія включає десольватацію, адаптацію та ентропію. ГМФ давав особливо виразні відповіді; описана Panda і Walmsley чутливість його самоорганізації до середовища [84] є контекстом, але не доказом гуанозинових супраструктур у наших умовах. Виражений відгук ЦМФ також виключає універсальну ієрархію «пурини сильніші за піримідини».

Анізотропія показала залежність форми й амплітуди відповіді від білкової мішені та порядку складання системи. Це узгоджується з роботами Piehler, Thomas та співавт. про динамічну збірку рецепторного комплексу та роль його афінності, кінетики й часу життя [53, 55, 56, 61, 62, 92, 94, 95]. Після утворення комплексу частина поверхні стає недоступною, можуть змінюватися локальна гідратація й електростатичний потенціал, а також можуть виникати композитні ділянки. Тому одна лігандна система здатна давати різні відгуки для ізольованих компонентів і попередньо сформованого комплексу.

Jaitin та співавт. одержали мутант ІНФ α2 з підвищеною спорідненістю до ІНФАР 1 та властивостями, наближеними до ІНФ β [68]; Kalie та співавт. пов'язали активність зі стійкістю тернарного комплексу [69]. Strunk та співавт. виявили ліганд-індуковані зміни ІНФАР 1, що поширюються на мембранно-проксимальний домен [70]. Ці роботи обґрунтовують можливі функціональні наслідки невеликих змін

рецепторної збірки, але не доводять такого ефекту НМФ. Досліджена двокомпонентна система без ІНФАР 2 не відтворює просторового зближення рецепторних ланцюгів, необхідного для повноцінної JAK–STAT-відповіді.

Докінг виявив повторювані потенційні контакти в N-кінцевій ділянці й поблизу D/E-спірального регіону ІНФ α-2b, а для ІНФАР 1 — переважно в SD1–SD2. Вони узгоджуються з можливістю зв'язування поблизу рецепторно значущих поверхонь [53–56, 92–95], але не встановлюють єдиного універсального центру. AutoDock Vina [137] та інші оцінювальні функції придатні для формування гіпотез про орієнтацію й залишки контакту, проте їхні оцінки не є експериментальними ΔG або K_d [139–142]. Неповна кореляція з афінністю очікувана; локалізація контактів потребує ЯМР, HDX-MS або мутагенезу.

Стан-залежність відповіді не обов'язково означає пряме перекриття нуклеотидом рецепторної поверхні. Зв'язування на сусідній ділянці також може змінювати орієнтацію бічних ланцюгів, рухливість петель або ступінь гідратації. Залежність від порядку додавання компонентів сумісна з такими можливостями, але сама по собі їх не розрізняє. Аналіз ізольованого білка, рецептора й комплексу, таким чином, розширює фізико-хімічний контекст дослідження, залишаючи причинний зв'язок між локальною структурною зміною та клітинною відповіддю предметом подальших експериментів.

Окремого обмеження потребує модельний аналіз титрувань. AICc часто підтримував KNF або Адейр-1, тоді як складніші моделі переважали лише в окремих випадках. Статистична перевага означає кращий баланс між якістю апроксимації та кількістю параметрів, але не доводить механізму. За відсутності плато K_d корелює з амплітудою та має широкий довірчий інтервал. Багато анізотропних оцінок були близькими до верхньої межі титрування 10 мкМ або перевищували її. Тому порівняння форм кривих і кінцевих амплітуд надійніше, ніж жорстке ранжування абсолютної афінності.

Коефіцієнт Хілла не слід прирівнювати до кількості фізичних сайтів [147, 148]; макроскопічні стадії Адейра не дають однозначного визначення мікроконстант. KNF-подібна апроксимація тут є феноменологічним описом, а не доказом класичного

олігомерного механізму Koshland–Némethy–Filmer. Негіперболічність може відображати множинні поверхневі ділянки, конформаційний відбір, гетерогенність препарату, послідовне складання системи або сумарний вплив манітолу. Різні методи також реєструють різні фотофізичні й рівноважні процеси, тому їхні K_d не є автоматично взаємозамінними. Узгодженість насамперед оцінювали за напрямом дії ліганда, формою препарату, середовищем і станом білка.

Обмеження різних методів не скасовують цінності їхнього поєднання. Флуоресценція характеризує мікрооточення хромофорів, анізотропія — зміну відповідного оптичного відгуку, калориметрія — сумарну теплоту, КД та ІЧ-спектри — інтегральні структурні й середовищні ознаки. Їхня узгодженість має оцінюватися на рівні перевірюваних тенденцій, а не вимоги однакових абсолютних констант. Водночас міжметодні розбіжності визначають конкретні питання для перевірки: досягнення насичення, внесок середовища, гетерогенність поверхневих ділянок, а також надійність ідентифікації параметрів.

Інтегрована модель охоплює три взаємопов’язані рівні. Контактний рівень включає електростатичні й водневі взаємодії фосфату, водневі, дисперсійні та ароматичні контакти основи, а також геометричну роль рибози [24–26, 72–78]. Іонно-гідратаційний рівень визначається протонним станом, Na^+, активністю води й D-манітолом та впливає на десольватацію й можливі водні містки [13–21, 85, 86]. Конформаційно-рецепторний рівень поєднує локальні зміни ансамблю ІНФ α-2b з доступністю поверхневих ділянок у системі з ІНФАР 1 [53–56, 68–70]. Конкретний вплив на повний сигнальний комплекс залишається неперевіреним.

Окремо в літературі описано конформаційні ансамблі [1–3], іонні ефекти нуклеїнових кислот [24–36], переважну гідратацію в осмолітних розчинах [37–50] та рецепторну збірку інтерферонів [53–70, 92–95]. Внесок роботи полягає в їх поєднанні в межах однієї експериментальної системи: природний нуклеотид, його препаративна форма, протиіон, поліол і рецепторне оточення спільно визначають зв’язування та структурний відгук ІНФ α-2b. Така інтеграція пояснює, чому зміна одного компонента композиції може одночасно впливати на кілька незалежних показників.

Сильною стороною роботи є поєднання незалежних методів, порівняння кислотних і натрієвих форм в одній експериментальній матриці та включення рецепторного контексту. Основні обмеження — неповна ідентифікованість частини K_d, невідокремлений внесок протонного спряження в ΔH, відсутність прямого картування контактів, ІНФАР 2 та клітинної перевірки сигналізації. Пріоритетними продовженнями є розширені титрування й глобальні апроксимації кількох каналів, ITC за різних pH і в буферах із різною ентальпією іонізації, білок-орієнтований $^{1}H–^{15}N$ ЯМР або HDX-MS, молекулярна динаміка в явній воді з Na^+ та D-манітолом.

Функціональну гіпотезу доцільно перевірити порівнянням вільного ІНФ α-2b, комплексу з ІНФАР 2 та повного ІНФАР 2–ІНФ α-2b–ІНФАР 1, а також визначенням кінетики взаємодії, фосфорилювання STAT1/STAT2, експресії інтерферон-стимульованих генів і антивірусної активності. Практично результати вказують на необхідність контролювати форму нуклеотидного препарату, протиіон, буфер, поліол і стан білка, а не лише pH та концентрацію [123]. Внесок дисертації полягає в установленні їхнього спільного впливу на профіль «афінність — ентальпія — гідратація — конформація — рецепторно-залежна відповідь» та обґрунтуванні моделі контекстно-залежної конформаційної мікромодуляції ІНФ α-2b.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено пряме нековалентне зв’язування моно- та олігорибонуклеотидів з ІНФ α-2b, яке залежить від природи азотистої основи, форми препарату і присутності D-манітолу. Кислотні форми характеризувалися переважно вищою спорідненістю до білка порівняно з натрієвими: різниця у константах дисоціації становила від 2,7 до 14,3 раза, а за присутності D-манітолу — до 21,7 раза.

2. Виявлено відмінності в термодинамічних механізмах взаємодії кислотних і натрієвих форм нуклеотидів з ІНФ α-2b. Кислотні форми характеризувалися переважно екзотермічними ефектами (ΔH від –2,28 до –12,74 кДж·моль$^{-1}$), тоді як натрієві — слабкими ендотермічними (від +0,24 до +0,59 кДж·моль$^{-1}$). D-манітол модифікував флуоресцентну відповідь і теплові ефекти взаємодії.

3. Показано, що моно- і олігорибонуклеотиди спричиняють конформаційні зміни ІНФ α-2b. За даними спектроскопії кругового дихроїзму, кислотні форми моно- і олігорибонуклеотидів переважно знижували оцінену частку α-спіральної структури з 37,6% до 25,4–33,5%, тоді як натрієві підвищували її до 41,5–45,6%, а в окремих композиціях із D-манітолом — до 49,5%.

4. Встановлено залежність взаємодії нуклеотидів від стану рецепторної системи ІНФ α-2b/ІНФАР 1 та порядку формування комплексів. Молекулярний докінг виявив декілька ймовірних поверхневих ділянок зв’язування, частина яких розташована поблизу рецепторно значущих областей. Флуоресцентна анізотропія підтвердила складний характер відповіді: серед 100 кривих найкращий опис забезпечували моделі Кошланда (48 випадків) та Адаїр-1 (43 випадки).

5. Запропоновано трирівневу модель молекулярної мікромодуляції ІНФ α-2b нуклеотидними лігандами, яка об’єднує контактний, середовищний та конформаційно-ансамблевий рівні взаємодії. Модель узагальнює результати флуоресцентної спектроскопії, кругового дихроїзму, анізотропії, калориметрії та молекулярного докінгу. Показано, що характер впливу нуклеотидів визначається сукупністю їхньої хімічної структури, кислотно-основного стану, іонного та гідратаційного оточення, що створює фізико-хімічне підґрунтя для спрямованої модуляції властивостей ІНФ α-2b.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Frauenfelder H., Sligar S. G., Wolynes P. G. The energy landscapes and motions of proteins. *Science*. 1991. Vol. 254, No. 5038. P. 1598–1603. DOI: 10.1126/science.1749933.
2. The ensemble Nature of allostery / Motlagh H. N., Wrabl J. O., Li J., Hilser V. J. *Nature*. 2014. Vol. 508. P. 331–339. DOI: 10.1038/Nature13001.
3. Boehr D. D., Nussinov R., Wright P. E. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nature Chemical Biology*. 2009. Vol. 5. P. 789–796. DOI: 10.1038/nchembio.232.
4. Henzler-Wildman K., Kern D. Dynamic personalities of proteins. *Nature*. 2007. Vol. 450, No. 7172. P. 964–972. DOI: 10.1038/nature06522.
5. Hammes G. G., Chang Y.-C., Oas T. G. Conformational selection or induced fit : a flux description of reaction mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2009. Vol. 106, No. 33. P. 13737–13741. DOI: 10.1073/pnas.0907195106.
6. Csermely P., Palotai R., Nussinov R. Induced fit, conformational selection and independent dynamic segments : an extended view of binding events. *Trends in Biochemical Sciences*. 2010. Vol. 35, No. 10. P. 539–546. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.04.009.
7. Hilser V. J., Wrabl J. O., Motlagh H. N. Structural and energetic basis of allostery. *Annual Review of Biophysics*. 2012. Vol. 41. P. 585–609. DOI: 10.1146/annurev-biophys-050511-102319.
8. Allostery in its many disguises : from theory to applications / Wodak S. J. et al. *Structure*. 2019. Vol. 27, No. 4. P. 566–578. DOI: 10.1016/j.str.2019.01.003.
9. Gunasekaran K., Ma B., Nussinov R. Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins? *Proteins*. 2004. Vol. 57, No. 3. P. 433–443. DOI: 10.1002/prot.20232.
10. Tsai C.-J., Nussinov R. A unified view of “how allostery works”. *PLoS Computational Biology*. 2014. Vol. 10, No. 2. Art. e1003394. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003394.
11. Nussinov R., Tsai C.-J. Allostery in disease and in drug discovery. *Cell*. 2013. Vol. 153, No. 2. P. 293–305. DOI: 10.1016/j.cell.2013.03.034.

12. Changeux J.-P. Allostery and the Monod–Wyman–Changeux model after 50 years. *Annual Review of Biophysics*. 2012. Vol. 41. P. 103–133.
13. Folding funnels, binding funnels, and protein function / Tsai C. J., Kumar S., Ma B., Nussinov R. *Protein Science*. 1999. Vol. 8, No. 6. P. 1181–1190.
14. Changeux J.-P., Edelstein S. J. Allosteric mechanisms of signal transduction. *Science*. 2005. Vol. 308, No. 5727. P. 1424–1428. DOI: 10.1126/science.1108595.
15. Baker B. M., Murphy K. P. Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry. *Biophysical Journal*. 1996. Vol. 71, No. 4. P. 2049–2055. DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79403-1.
16. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter / Wiseman T., Williston S., Brandts J. F., Lin L.-N. *Analytical Biochemistry*. 1989. Vol. 179, No. 1. P. 131–137.
17. Leavitt S., Freire E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Current Opinion in Structural Biology*. 2001. Vol. 11, No. 5. P. 560–566.
18. Velazquez-Campoy A., Freire E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. *nature Protocols*. 2006. Vol. 1, No. 1. P. 186–191. DOI: 10.1038/nprot.2006.28.
19. Turnbull W. B., Daranas A. H. On the value of c : can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *Journal of the American Chemical Society*. 2003. Vol. 125, No. 48. P. 14859–14866. DOI: 10.1021/ja036166s.
20. Freyer M. W., Lewis E. A. Isothermal titration calorimetry : experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods in Cell Biology*. 2008. Vol. 84. P. 79–113. DOI: 10.1016/S0091-679X(07)84004-0.
21. Pierce M. M., Raman C. S., Nall B. T. Isothermal titration calorimetry of protein–protein interactions. *Methods*. 1999. Vol. 19, No. 2. P. 213–221.
22. Entropy–enthalpy compensations fold proteins in precise ways / Li J. et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, No. 17. Art. 9653. DOI: 10.3390/ijms22179653.

23. Hayashi T., Kinoshita M. Statistical thermodynamics of aromatic–aromatic interactions in aqueous solution. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2016. Vol. 18. P. 32406–32417. DOI: 10.1039/C6CP05523A.

24. Record M. T. Jr., Lohman T. M., De Haseth P. Ion effects on ligand–nucleic acid interactions. *Journal of Molecular Biology*. 1976. Vol. 107, No. 2. P. 145–158. DOI: 10.1016/S0022-2836(76)80023-X.

25. Understanding nucleic acid–ion interactions / Lipfert J., Doniach S., Das R., Herschlag D. *Annual Review of Biochemistry*. 2014. Vol. 83. P. 813–841. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060409-092720.

26. Yu B., Pettitt B. M., Iwahara J. Dynamics of ionic interactions at protein–nucleic acid interfaces. *Accounts of Chemical Research*. 2020. Vol. 53, No. 9. P. 1802–1810. DOI: 10.1021/acs.accounts.0c00212.

27. Goh G. B., Knight J. L., Brooks C. L. Constant pH molecular dynamics simulations of nucleic acids in explicit solvent. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2012. Vol. 8, No. 1. P. 36–46. DOI: 10.1021/ct2007894.

28. Goh G. B., Knight J. L., Brooks C. L. Towards accurate prediction of protonation equilibrium of nucleic acids. *Journal of Physical Chemistry Letters*. 2013. Vol. 4, No. 5. P. 760–766.

29. Draper D. E. A guide to ions and RNA structure. *RNA*. 2004. Vol. 10, No. 3. P. 335–343. DOI: 10.1261/rna.5205404.

30. Draper D. E., Grilley D., Soto A. M. Ions and RNA folding. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2005. Vol. 34. P. 221–243. DOI: 10.1146/annurev.biophys.34.040204.144511.

31. Manning G. S. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1978. Vol. 11, No. 2. P. 179–246. DOI: 10.1017/S0033583500002031.

32. Quantitative and comprehensive decomposition of the ion atmosphere around nucleic acids / Bai Y., Greenfeld M., Travers K. J., Chu V. B., Lipfert J., Doniach S., Herschlag D. *Journal of the American Chemical Society*. 2007. Vol. 129, No. 48. P. 14981–14988.

33. Woodson S. A. Metal ions and RNA folding : a highly charged topic with a dynamic future. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2005. Vol. 9, No. 2. P. 104–109.

34. Pyle A. M. Metal ions in the structure and function of RNA. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2002. Vol. 7, No. 7–8. P. 679–690. DOI: 10.1007/s00775-002-0387-6.

35. Misra V. K., Draper D. E. On the role of magnesium ions in RNA stability. *Biopolymers*. 1998. Vol. 48, No. 2–3. P. 113–135.

36. Anderson C. F., Record M. T. Jr. Salt–nucleic acid interactions. *Annual Review of Physical Chemistry*. 1995. Vol. 46. P. 657–700.

37. Timasheff S. N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proceedings of the national Academy of Sciences USA*. 2002. Vol. 99, No. 15. P. 9721–9726. DOI: 10.1073/pnas.122225399.

38. Timasheff S. N. Water as ligand : preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding. *Biochemistry*. 1992. Vol. 31, No. 41. P. 9857–9864. DOI: 10.1021/bi00156a001.

39. Bolen D. W., Baskakov I. V. The osmophobic effect : natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *Journal of Molecular Biology*. 2001. Vol. 310, No. 5. P. 955–963. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4819.

40. Street T. O., Bolen D. W., Rose G. D. A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2006. Vol. 103, No. 38. P. 13997–14002.

41. Auton M., Bolen D. W. Predicting the energetics of osmolyte-induced protein folding/unfolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2005. Vol. 102, No. 42. P. 15065–15068.

42. Canchi D. R., García A. E. Cosolvent effects on protein stability. *Annual Review of Physical Chemistry*. 2013. Vol. 64. P. 273–293.

43. Living with water stress : evolution of osmolyte systems / Yancey P. H., Clark M. E., Hand S. C., Bowlus R. D., Somero G. N. *Science*. 1982. Vol. 217, No. 4566. P. 1214–1222. DOI: 10.1126/science.7112124.

44. Kaushik J. K., Bhat R. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278, No. 29. P. 26458–26465.

45. Xie G., Timasheff S. N. The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophysical Chemistry*. 1997. Vol. 64, No. 1–3. P. 25–43.

46. Lee J. C., Timasheff S. N. The stabilization of proteins by sucrose. *Journal of Biological Chemistry*. 1981. Vol. 256, No. 14. P. 7193–7201.

47. Gekko K., Morikawa T. Thermodynamics of polyol-induced thermal stabilization of chymotrypsinogen. *Journal of Biochemistry*. 1981. Vol. 90, No. 1. P. 51–60. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133469.

48. Meena P., Kishore N. Synergistic effects of osmolytes on solvent exclusion and resulting protein stabilisation. *Journal of Molecular Liquids*. 2023. Vol. 372. Art. 121175.

49. Izutsu K., Yoshioka S., Terao T. Effect of mannitol crystallinity on the stabilization of enzymes during freeze-drying. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1994. Vol. 42, No. 1. P. 5–8. DOI: 10.1248/cpb.42.5.

50. Sharma V. K., Kalonia D. S. Effect of vacuum drying on protein–mannitol interactions : the physical state of mannitol and protein structure in the dried state. *AAPS PharmSciTech*. 2004. Vol. 5, No. 1. Art. 10. DOI: 10.1208/pt050110.

51. The three-dimensional high-resolution structure of human interferon α-2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution / Klaus W. et al. *Journal of Molecular Biology*. 1997. Vol. 274, No. 4. P. 661–675.

52. RCSB Protein Data Bank. Recombinant human interferon-alpha 2B (PDB ID: 1RH2). URL: https://www.rcsb.org/structure/1RH2 (дата звернення: 25.08.2026).

53. Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation / Piehler J., Thomas C., Garcia K. C., Schreiber G. *Immunological Reviews*. 2012. Vol. 250, No. 1. P. 317–334. DOI: 10.1111/imr.12001.

54. A structural basis for interferon-α-receptor interactions / Kumaran J., Wei L., Kotra L. P., Fish E. N. *FASEB Journal*. 2007. Vol. 21, No. 12. P. 3288–3296. DOI: 10.1096/fj.07-8585com.

55. Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons / Thomas C. et al. *Cell*. 2011. Vol. 146, No. 4. P. 621–632. DOI: 10.1016/j.cell.2011.06.048.

56. Piehler J., Roisman L. C., Schreiber G. New structural and functional aspects of the type I interferon–receptor interaction revealed by comprehensive mutational analysis of the binding interface. *Journal of Biological Chemistry*. 2000. Vol. 275, No. 51. P. 40425–40433. DOI: 10.1074/jbc.M006854200.

57. de Weerd N. A., Nguyen T. The interferons and their receptors—distribution and regulation. *Immunology and Cell Biology*. 2012. Vol. 90, No. 5. P. 483–491. DOI: 10.1038/icb.2012.9.

58. Ivashkiv L. B., Donlin L. T. Regulation of type I interferon responses. *nature Reviews Immunology*. 2014. Vol. 14, No. 1. P. 36–49. DOI: 10.1038/nri3581.

59. Type I interferons in infectious disease / Mcnab F., Mayer-Barber K., Sher A., Wack A., O'Garra A. *Nature Reviews Immunology*. 2015. Vol. 15, No. 2. P. 87–103. DOI: 10.1038/nri3787.

60. Lazear H. M., Schoggins J. W., Diamond M. S. Shared and distinct functions of type I and type III interferons. *Immunity*. 2019. Vol. 50, No. 4. P. 907–923. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.025.

61. Schreiber G., Piehler J. The molecular basis of type I interferon signal transduction. *Trends in Immunology*. 2015. Vol. 36, No. 3. P. 139–149.

62. The receptor of the type I interferon family / Uzé G., Schreiber G., Piehler J., Pellegrini S. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2007. Vol. 316. P. 71–95. DOI: 10.1007/978-3-540-71329-6_5.

63. Instructive roles for cytokine-receptor binding parameters in determining signaling and functional potency / Moraga I. et al. *Science Signaling*. 2015. Vol. 8, No. 402. Art. ra114.

64. How cells respond to interferons / Stark G. R., Kerr I. M., Williams B. R. G., Silverman R. H., Schreiber R. D. *Annual Review of Biochemistry*. 1998. Vol. 67. P. 227–264.

65. Pestka S., Krause C. D., Walter M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*. 2004. Vol. 202. P. 8–32.

66. de Weerd N. A., Samarajiwa S. A., Hertzog P. J. Type I interferon receptors : biochemistry and biological functions. *Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282, No. 28. P. 20053–20057.

67. Aaronson D. S., Horvath C. M. A road map for those who don't know JAK–STAT. *Science*. 2002. Vol. 296, No. 5573. P. 1653–1655. DOI: 10.1126/science.1071545.

68. An IHΦ -α2 mutant with enhanced affinity to IHΦAP 1 is functionally similar to IHΦ -β / Jaitin D. A. et al. *Molecular and Cellular Biology*. 2006. Vol. 26, No. 5. P. 1888–1897. DOI: 10.1128/MCB.26.5.1888-1897.2006.

69. The stability of the ternary interferon–receptor complex, rather than the affinity for the individual subunits, dictates differential biological activities / Kalie E. et al. *Journal of Biological Chemistry*. 2008. Vol. 283, No. 47. P. 32925–32936. DOI: 10.1074/jbc.M806019200.

70. Ligand binding induces a conformational change in IHΦAP 1 that is propagated to its membrane-proximal domain / Strunk J. J. et al. *Journal of Molecular Biology*. 2008. Vol. 377, No. 3. P. 725–739. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.01.017.

71. Interferon-based biopharmaceuticals : overview on the production, purification and formulation / Vale P. J. et al. *Vaccines*. 2021. Vol. 9, No. 4. Art. 328. DOI: 10.3390/vaccines9040328.

72. Protein–RNA interactions : a structural analysis / Jones S., Daley D. T. A., Luscombe N. M., Berman H. M., Thornton J. M. *Nucleic Acids Research*. 2001. Vol. 29, No. 4. P. 943–954. DOI: 10.1093/nar/29.4.943.

73. Bahadur R. P., Zacharias M., Janin J. Dissecting protein–RNA recognition sites. *Nucleic Acids Research*. 2008. Vol. 36, No. 8. P. 2705–2716. DOI: 10.1093/nar/gkn102.

74. Draper D. E. Themes in RNA–protein recognition. *Journal of Molecular Biology*. 1999. Vol. 293, No. 2. P. 255–270. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2991.

75. Williamson J. R. Induced fit in RNA–protein recognition. *Nature Structural Biology*. 2000. Vol. 7, No. 10. P. 834–837. DOI: 10.1038/79575.

76. Lunde B. M., Moore C., Varani G. RNA-binding proteins : modular design for efficient function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007. Vol. 8, No. 6. P. 479–490.

77. Auweter S. D., Oberstrass F. C., Allain F. H.-T. Sequence-specific binding of single-stranded RNA : is there a code for recognition? *Nucleic Acids Research*. 2006. Vol. 34, No. 17. P. 4943–4959.

78. Treger M., Westhof E. Statistical aNalysis of atomic contacts at RNA–protein interfaces. *Journal of Molecular Recognition*. 2001. Vol. 14, No. 4. P. 199–214.

79. Gerstberger S., Hafner M., Tuschl T. A census of human RNA-binding proteins. *Nature Reviews Genetics*. 2014. Vol. 15, No. 12. P. 829–845. DOI: 10.1038/nrg3813.

80. A brave new world of RNA-binding proteins / Hentze M. W., Castello A., Schwarzl T., Preiss T. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018. Vol. 19, No. 5. P. 327–341.

81. In silico binding affinity studies of phenyl-substituted 1,3-oxazoles with protein molecules / Zhuravlova M. et al. *Ukrainica Bioorganica Acta*. 2020. Vol. 15, No. (1). P. 12–19. DOI: 10.15407/bioorganica2020.01.012.

82. Topological index of conjugated heterocyclic compounds as their donor/acceptor parameter / Obernikhina N. et al. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 2020. Vol. 40, No. 4. P. 1196–1209.

83. Quantum-chemical and experimental estimation of non-bonding level (Fermi level) and π-electron affinity of conjugated systems / Obernikhina N. et al. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 2021. Vol. 41, No. 10. P. 2110–2119.

84. Panda M., Walmsley J. A. Circular dichroism study of supramolecular assemblies of guanosine 5′-monophosphate. *Journal of Physical Chemistry B*. 2011. Vol. 115, No. 19. P. 6377–6383. DOI: 10.1021/jp201630g.

85. Комплексоутворення РНК з манітолом, його спектральні характеристики та біологічна активність / Вівчарик М. М., Ільченко О. О., Левченко С. М., Ткачук З. Ю. *Доповіді НАН України*. 2016. № 10. С. 78–83. DOI: 10.15407/dopovidi2016.10.078.

86. Shchodryi V., Tkachuk Z. Study of interactions between D-mannitol and polynucleotides. *Proceedings of the 3rd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry*. 2017. Art. 4701. DOI: 10.3390/ecmc-3-04701.

87. Вплив олігорибонуклеотидів на конформацію та стабільність інтерферону / Ніколаєв Р. О., Вівчарик М. М., Черних С. І., Ткачук З. Ю. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2019. Т. 17, № 2. С. 165–171. DOI: 10.7124/visnyk.utgis.17.2.1217.

88. Conformational, fluorescence and energy parameters of interferon α2b with different forms of adenosine monophosphate / Nikolaiev R., Stepanenko Y., Chernykh S., Melnichuk N., Tkachuk Z. *Proceedings*. 2021. Vol. 78, No. 1. Art. 16. DOI: 10.3390/IECP2020-08697.

89. Nikolaiev R. O., Tkachuk Z. Yu. Interaction of 5′-ribonucleoside monophosphates with interferon α-2b. *Biopolymers and Cell*. 2024. Vol. 40, No. 4. P. 264–277. DOI: 10.7124/bc.000B03.

90. BeStSel : a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra / Micsonai A., Wien F., Bulyáki É. et al. *Nucleic Acids Research*. 2018. Vol. 46, No. W1. P. W315–W322. DOI: 10.1093/nar/gky497.

91. Lambert D., Draper D. E. Effects of osmolytes on RNA secondary and tertiary structure stabilities and RNA–Mg^{2+} interactions. *Journal of Molecular Biology*. 2007. Vol. 370, No. 5. P. 993–1005. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.03.080.

92. Ligand-induced assembling of the type I interferon receptor on supported lipid bilayers / Lamken P., Lata S., Gavutis M., Piehler J. *Journal of Molecular Biology*. 2004. Vol. 341, No. 1. P. 303–318. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.05.059.

93. Functional cartography of the ectodomain of the type I interferon receptor subunit ІНФАР 1 / Lamken P., Gavutis M., Peters I. et al. *Journal of Molecular Biology*. 2005. Vol. 350, No. 3. P. 476–488. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.05.008.

94. Receptor dimerization dynamics as a regulatory valve for plasticity of type I interferon signaling / Wilmes S., Beutel O., Li Z. et al. *Journal of Cell Biology*. 2015. Vol. 209, No. 4. P. 579–593. DOI: 10.1083/jcb.201412049.

95. The EM structure of a type I interferon-receptor complex reveals a novel mechanism for cytokine signaling / Li Z., Strunk J. J., Lamken P., Piehler J., Walz T. *Journal of Molecular Biology*. 2008. Vol. 377, No. 3. P. 715–724. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.12.005.

96. Dynamics of Cations around DNA and Protein as Revealed by ^{23}Na Diffusion NMR Spectroscopy / Yu B., Bien K. G., Pletka C. C., Iwahara J. *Analytical Chemistry*. 2022. Vol. 94, No. 5. P. 2444–2452. DOI: 10.1021/acs.analchem.1c04197.

97. Interferon-γ-inhibitory oligodeoxynucleotides alter the conformation of interferon-γ / Balasubramanian V., Nguyen L. T., Balasubramanian S. V., Ramanathan M. *Molecular Pharmacology*. 1998. Vol. 53. P. 926–932.

98. Platanias L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2005. Vol. 5. P. 375–386. DOI: 10.1038/nri1604.

99. Meng Z., Lu M. RNA interference-induced innate immunity, off-target effect, or immune adjuvant? *Frontiers in Immunology*. 2017. Vol. 8. Art. 331. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00331.

100. Miles A. J., Janes R. W., Wallace B. A. Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins : a tutorial review. *Chemical Society Reviews*. 2021. Vol. 50. P. 8400–8413. DOI: 10.1039/D0CS00558D.

101. Greenfield N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*. 2006. Vol. 1, No. 6. P. 2876–2890. DOI: 10.1038/nprot.2006.202.

102. Guide to the structural characterization of protein aggregates and amyloid fibrils by CD spectroscopy / Kardos J. et al. *Protein Science*. 2025. Vol. 34, No. 3. Art. e70066. DOI: 10.1002/pro.70066.

103. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. Vol. 227, No. 5259. P. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.

104. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy / MicsoNai A., Wien F., Kernya L. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2015. Vol. 112, No. 24. P. E3095–E3103. DOI: 10.1073/pnas.1500851112.

105. Louis-Jeune C., Andrade-Navarro M. A., Perez-Iratxeta C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins*. 2012. Vol. 80, No. 2. P. 374–381. DOI: 10.1002/prot.23188.

106. Wiedemann C., Bellstedt P., Görlach M. CAPITO—A web server-based analysis and plotting tool for circular dichroism data. *Bioinformatics*. 2013. Vol. 29, No. 14. P. 1750–1757. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt278.

107. Böhm G., Muhr R., Jaenicke R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Engineering*. 1992. Vol. 5, No. 3. P. 191–195. DOI: 10.1093/protein/5.3.191.

108. Kelly S. M., Jess T. J., Price N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005. Vol. 1751, No. 2. P. 119–139. DOI: 10.1016/j.bbapap.2005.06.005.

109. Whitmore L., Wallace B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy : methods and reference databases. *Biopolymers*. 2008. Vol. 89, No. 5. P. 392–400. DOI: 10.1002/bip.20853.

110. Sreerama N., Woody R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra : comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry*. 2000. Vol. 287, No. 2. P. 252–260. DOI: 10.1006/abio.2000.4880.

111. Probing Förster and Dexter energy-transfer mechanisms in fluorescent conjugated polymer chemosensors / Murphy C. B., Zhang Y., Troxler T. et al. *Journal of Physical Chemistry B*. 2004. Vol. 108, No. 5. P. 1537–1543.

112. Barth A. The infrared absorption of amino acid side chains. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2000. Vol. 74, No. 3–5. P. 141–173. DOI: 10.1016/S0079-6107(00)00021-3.

113. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007. Vol. 1767, No. 9. P. 1073–1101. DOI: 10.1016/j.bbabio.2007.06.004.

114. Kong J., Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2007. Vol. 39, No. 8. P. 549–559.

115. Jaumot J., de Juan A., Tauler R. MCR-ALS GUI 2.0 : new features and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2015. Vol. 140. P. 1–12. DOI: 10.1016/j.chemolab.2014.10.003.

116. Isothermal titration calorimetry as a powerful tool to quantify and better understand agglomeration mechanisms during interaction processes between TiO_2 nanoparticles and humic acids / Loosli F., Vitorazi L., Berret J.-F., Stoll S. Environmental Science : Nano. 2015. Vol. 2, No. 5. P. 541–550. DOI: 10.1039/C5EN00139K.

117. Extending ITC to kinetics with kinITC / Dumas P., Ennifar E., Da Veiga C. et al. *Methods in Enzymology*. 2016. Vol. 567. P. 157–180. DOI: 10.1016/bs.mie.2015.08.026.

118. Gooran N., Kopra K. Fluorescence-based protein stability monitoring—a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. Vol. 25, No. 3. Art. 1764. DOI: 10.3390/ijms25031764.

119. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds / Hudson S. A., Ecroyd H., Kee T. W., Carver J. A. *FEBS Journal*. 2009. Vol. 276, No. 20. P. 5960–5972. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07307.x.

120. Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005. Vol. 289, No. 1–2. P. 1–30. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.11.014.

121. Protein aggregation : pathways, induction factors and analysis / Mahler H.-C., Friess W., Grauschopf U., Kiese S. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009. Vol. 98, No. 9. P. 2909–2934. DOI: 10.1002/jps.21566.

122. Roberts C. J. Therapeutic protein aggregation : mechanisms, design, and control. *Trends in Biotechnology*. 2014. Vol. 32, No. 7. P. 372–380. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.05.005.

123. Protein–excipient interactions : mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development / Kamerzell T. J., Esfandiary R., Joshi S. B., Middaugh C. R., Volkin D. B. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011. Vol. 63, No. 13. P. 1118–1159.

124. Physical stability of proteins in aqueous solution : mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation / Chi E. Y., Krishnan S., Randolph T. W., Carpenter J. F. *Pharmaceutical Research*. 2003. Vol. 20, No. 9. P. 1325–1336.

125. Lanez T., Henni M. Spectrophotometrical study of antioxidant standards interacting with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Chemistry & Chemical Technology*. 2016. Vol. 10, No. 3. P. 255–258.

126. Foti M. C. Use and abuse of the DPPH• radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015. Vol. 63, No. 40. P. 8765–8776. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b03839.

127. La J., Kim M.-J., Lee J. Evaluation of solvent effects on the DPPH reactivity for determining the antioxidant activity in oil matrix. *Food Science and Biotechnology*. 2021. Vol. 30, No. 3. P. 367–375. DOI: 10.1007/s10068-020-00874-9.

128. Olszowy M., Dawidowicz A. L. Is it possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compounds? *Chemical Papers*. 2018. Vol. 72, No. 2. P. 393–400. DOI: 10.1007/s11696-017-0288-3.

129. Vandever C. Introduction to research statistical analysis : an overview of the basics. *HCA Healthcare Journal of Medicine*. 2020. Vol. 1, No. 2. P. 71–75. DOI: 10.36518/2689-0216.1062.

130. Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. New York : Springer, 2006. 954 p.

131. Fluorescence spectroscopy and anisotropy in the analysis of DNA–protein interactions / Favicchio R., Dragan A. I., Kneale G. G., Read C. M. *Methods in Molecular Biology*. 2009. Vol. 543. P. 589–611. DOI: 10.1007/978-1-60327-015-1_35.

132. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis / Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C. et al. *Journal of Computational Chemistry*. 2004. Vol. 25, No. 13. P. 1605–1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.

133. PyRx Virtual Screening Tool. URL: https://pyrx.sourceforge.io (дата звернення: 15.05.2024).

134. Dassault Systèmes BIOVIA. Discovery Studio Modeling Environment. Release 2017. San Diego : Dassault Systèmes, 2016.

135. Gaussian 09. Revision D.01 / Frisch M. J. et al. Wallingford, CT : Gaussian, Inc., 2013.

136. AlphaFold Protein Structure Database : massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models / Varadi M., Anyango S., Deshpande M. et al. *Nucleic Acids Research*. 2022. Vol. 50, No. D1. P. D439–D444. DOI: 10.1093/nar/gkab1061.

137. Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina : improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 2010. Vol. 31, No. 2. P. 455–461. DOI: 10.1002/jcc.21334.

138. Avogadro : an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform / Hanwell M. D., Curtis D. E., Lonie D. C. et al. *Journal of Cheminformatics*. 2012. Vol. 4. Art. 17. DOI: 10.1186/1758-2946-4-17.

139. Assessing scoring functions for protein–ligand interactions / Ferrara P., Gohlke H., Price D. J., Klebe G., Brooks C. L. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004. Vol. 47, No. 12. P. 3032–3047. DOI: 10.1021/jm030489h.

140. A critical assessment of docking programs and scoring functions / Warren G. L. et al. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006. Vol. 49, No. 20. P. 5912–5931.

141. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery : methods and applications / Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004. Vol. 3, No. 11. P. 935–949. DOI: 10.1038/nrd1549.

142. Pantsar T., Poso A. Binding affinity via docking : fact and fiction. *Molecules*. 2018. Vol. 23, No. 8. Art. 1899. DOI: 10.3390/molecules23081899.

143. Pinzi L., Rastelli G. Molecular docking : shifting paradigms in drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, No. 18. Art. 4331. DOI: 10.3390/ijms20184331.

144. Mobley D. L., Dill K. A. Binding of small-molecule ligands to proteins : “what you see” is not always “what you get”. *Structure*. 2009. Vol. 17, No. 4. P. 489–498. DOI: 10.1016/j.str.2009.02.010.

145. Monod J., Wyman J., Changeux J.-P. On the nature of allosteric transitions : a plausible model. *Journal of Molecular Biology*. 1965. Vol. 12. P. 88–118.

146. Koshland D. E. Jr., Némethy G., Filmer D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*. 1966. Vol. 5, No. 1. P. 365–385.

147. Weiss J. N. The Hill equation revisited : uses and misuses. *FASEB Journal*. 1997. Vol. 11, No. 11. P. 835–841.

148. Stefan M. I., Le Novère N. Cooperative binding. *PLoS Computational Biology*. 2013. Vol. 9, No. 6. Art. e1003106. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003106.

149. Burnham K. P., Anderson D. R. Multimodel inference : understanding AIC and BIC in model selection. *Sociological Methods & Research*. 2004. Vol. 33, No. 2. P. 261–304. DOI: 10.1177/0049124104268644.

150. Tauler R. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 1995. Vol. 30, No. 1. P. 133–146.

151. The Natural Oligoribonucleotides Functionalized by D-Mannitol Affected Interactions of Hemagglutinin with Glycan Receptor Indicating Anti-Influenza Activity / Tkachuk Z. Yu., Melnichuk N. S., Nikolaiev R. O., Szutkowski K., Zhukov I. *Membranes*. 2021. Vol. 11, No. 10. Art. 757. DOI: 10.3390/membranes11100757.

ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Публікації здобувача за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях

1. The Natural Oligoribonucleotides Functionalized by D-Mannitol Affected Interactions of Hemagglutinin with Glycan Receptor Indicating Anti-Influenza Activity / Tkachuk Z. Yu., Melnichuk N. S., **Nikolaiev R. O.**, Szutkowski K., Zhukov I. *Membranes*. 2021. Vol. 11, No. 10. Art. 757. DOI: 10.3390/membranes11100757. (Q2, Impact Factor 4,2). *Особистий внесок здобувача – докінг ОРН та ОРН-D-M, підготовка статті до друку.*

2. Вплив олігорибонуклеотидів на конформацію та стабільність інтерферону / **Ніколаєв Р. О.**, Вівчарик М. М., Черних С. І., Ткачук З. Ю. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2019. Т. 17, № 2. С. 165–171. DOI: 10.7124/visnyk.utgis.17.2.1217. *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, обробка результатів, написання статті та підготовка її до друку.*

3. π-Електронна афінність азотистих основ нуклеїнових кислот / Оберніхіна Н. В., **Ніколаєв Р. О.**, Качковський О. Д., Ткачук З. Ю. *Доповіді НАН України.* 2019. № 6. С. 75–81. DOI: 10.15407/dopovidi2019.06.075. (Impact Factor 0,345). *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, обробка результатів, написання статті та підготовка її до друку.*

4. **Nikolaiev R. O.,** Tkachuk Z. Yu. Interaction of 5′-ribonucleoside monophosphates with Interferon α-2b. *Biopolymers and Cell.* 2024. Vol. 40, No. 4. P. 264–277. DOI: 10.7124/bc.000B03. (Q4, Impact Factor 0,34). *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, обробка результатів, написання статті та підготовка її до друку.*

5. **Nikolaiev R. O.**, Tkachuk Z. Yu. Comparative analysis of the interaction of INF, INF-INFAR1 and the INF-INFAR1 complex with ribonucleotides by spectroscopic methods

and docking. *ScienceRise: Biological Science.* 2026. No. 3 (47). P. 11–24. DOI: 10.15587/2519-8025.2026.368056. (Q4). *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, обробка результатів, написання статті та підготовка її до друку.*

Патент

Спосіб отримання біологічно активних сполук з використанням пуринових і піримідинових нуклеотидів та їх композицій : пат. 164333 Україна, U : МПК A61K 31/00, C07H 19/00, A61K 31/7072 / Мельнічук Н. С., Ніколаєв Р. О., Ткачук З. Ю. № a 202402297 ; заявл. 06.06.2024 ; опубл. 23.09.2026, *Бюл*. № 31. Т. 1.

Тези наукових доповідей

1. Conformational changes of secondary and tertiary structures of interferon under the influence of oligoribonucleotides-based drugs / **Nikolaiev R. O.**, Vivcharyk M. M., Levchenko S. M., Chernykh S. I., Obernikhina N. V., Tkachuk Z. Yu. *Proceedings of the 4th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry.* MDPI, 2018. Art. 5629. DOI: 10.3390/ecmc-4-05629.

2. **Nikolaiev R. O.**, Stepanenko Ye. Yu., Tkachuk Z. Yu. Conformational, fluorescence and energy parameters of Interferon α2b under the influence of mono and oligoribonucleotides-based drug. *Proceedings of the 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry.* MDPI, 2019. Art. 6328. DOI: 10.3390/ecmc2019-06328.

3. **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Tkachuk Z. Yu. Analysis of amyloidogenic potential, stability and fluorescence properties of insulins and interferons of different purity. VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement "Science and modern pharmaceutical manufacturing" (Kyiv, Ukraine, November 21, 2019). *Український медичний часопис.* 2019. № 6 (134), XI/XII. С. 41.

4. Fluorescence and circular dichroism spectroscopy studies of interactions between Interferon α2b and yeast oligoribonucleotides / **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Obernikhina N. V., Tkachuk Z. Yu. The 44th FEBS Congress "From molecules to living systems"

(Krakow, Poland, 6–11 July 2019). Posters. *FEBS Open Bio*. 2019. Vol. 9, Suppl. 1. P. 215. DOI: 10.1002/2211-5463.12675.

5. **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Tkachuk Z. Yu. Fluorescence and circular dichroism spectroscopy studies of an interaction between interferon α2β, oligoribonucleotides and amp. XIII IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists. *Biopolymers and Cell.* 2019. Vol. 35, No. 5. P. 406. DOI: 10.7124/bc.000A14.

6. **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Tkachuk Z. Yu. Spectroscopy and thermodynamic studies of an interaction between interferon a2b, oligoribonucleotides and ribonucleotides. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу (м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р.). *Медична та клінічна хімія.* 2019. Т. 21, № 3. С. 227–228.

7. Interaction of Interferon α-2b with different forms of oligonucleotides / **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Stepanenko Ye. Yu., Tkachuk Z. Yu. *XIV Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України* : electronic abstract book. 2020. P. 19.

8. Fluorescence properties interaction Interferon a2b with oligo- and monoribonucleotides / **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S. I., Stepanenko Ye. Yu., Tkachuk Z. Yu. *12th International Conference "Electronic Processes in Organic and Inorganic Materials" ICEPOM-12* (Kamianets-Podilskyi, June 1–5, 2020). 2020. P. 251.

9. **Nikolaiev R. O.**, Chernykh S., Tkachuk Z. Thermodynamics of interaction of interferon alpha-2b with different forms of oligonucleotides. The 45th FEBS Congress "Molecules of life: Towards new horizons" (online event, 3–8 July 2021). *FEBS Open Bio.* 2021. Vol. 11, Suppl. 1. P. 126. DOI: 10.1002/2211-5463.13205.

10. Conformational, Fluorescence and Energy Parameters of Interferon α2b with Different Forms of Adenosine Monophosphate / **Nikolaiev R. O.**, Stepanenko Ye. Yu., Chernykh S. I., Melnichuk N. S., Tkachuk Z. Yu. *Proceedings*. 2021. Vol. 78, No. 1. Art. 16. DOI: 10.3390/IECP2020-08697.

11. **Nikolaiev R. O.**, Spivak M. Ya., Tkachuk Z. Yu. Spectral studies of ligand-protein interactions of oligoribonucleotides. The Conference of Young Scientists within the framework of the XVIII International Conference "Factors in Experimental Evolution of Organisms", dedicated to the 50th anniversary of the foundation of the Institute of Molecular

Biology and Genetics of the NASU. *Biopolymers and Cell.* 2023. Vol. 39, No. 4. P. 315. DOI: 10.7124/bc.000AA8.

12. **Nikolaiev R. O.**, Tkachuk Z. Yu. Interaction of 5′-monoribonucleotides with Interferon α-2b. BioGENext Conference “Shaping the future of medicine through biomedical R&D” (Kyiv, September 17–20, 2024). *Biopolymers and Cell*. 2024. Vol. 40, No. 3. P. 175. DOI: 10.7124/bc.000AB9.

13. The effect of oligonucleotides, mononucleotides and their complexes with mannitol on the conformational stability of Interferon α2b / **Nikolaiev R. O.**, Tkachuk Z. Yu., Obernikhina N. V., Dotsenko M. A., Stepanenko Ye. Yu. *Proceedings of the 1st International Electronic Conference on Medicinal Chemistry and Pharmaceutics* (1–30 November 2025). ECMC-P Book of Abstracts 2025. Basel, Switzerland : MDPI, 2025. P. 28. URL: https://sciforum.net/paper/25661 (дата звернення: 01.10.2026). URL збірника: https://sciforum.net/event/ECMC-P2025/abstract-book (дата звернення: 01.10.2026).

14. Біологічна афінність мононуклеотидів в різних значеннях pH середовища / **Ніколаєв Р. О.**, Оберніхіна Н. В., Качковський О. Д., Ткачук З. Ю. *Чаргаффські читання* : матеріали XX Міжнародної наукової конференції, присвяченої 150-річчю Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича та 120-річчю від дня народження Ервіна Чаргаффа (м. Чернівці, Україна, 27–30 жовтня 2025 р.). Чернівці : Чернівец. нац. ун-т ім. Ю. Федьковича, 2025. С. 57–58.

15. **Ніколаєв Р. О.**, Оберніхіна Н. В., Ткачук З. Ю. Теплові ефекти при взаємодії 5′-мононуклеотидів з біологічними середовищами. *Чаргаффські читання* : матеріали XX Міжнародної наукової конференції. 2025. С. 53–54.

16. **Nikolaiev R. O.**, Tkachuk Z. Yu. Interaction of the INF-INFAR1 complex with ribonucleotides and D-mannitol : prospects for the development of next-generation interferon-based therapeutics. *Biopolymers and Cell.* 2026. Vol. 42, Special Issue. P. 10. DOI: 10.7124/bc.000b43.

ДОДАТОК Б

МЕТОДИЧНІ РИСУНКИ ТА СХЕМИ

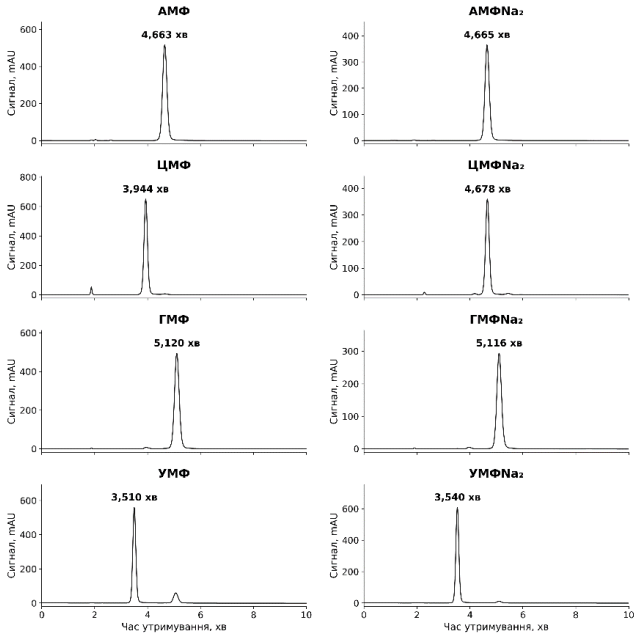


Рис. Б.1. Хроматограми кислотних і динатрієвих форм 5′-рибомононуклеотидів

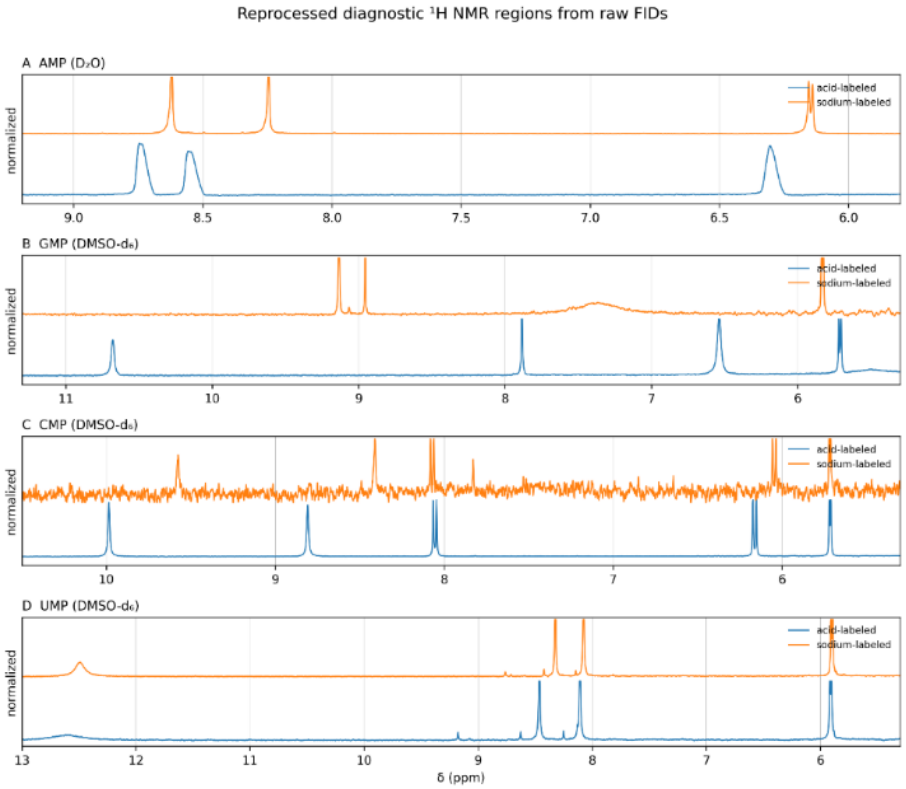


Рис. Б.2. ¹H ЯМР кислотних і динатрієвих форм 5′-рибонуклеотидів, отриманих із вихідних FID: А — АМФ/АМФNa₂ у D₂O; Б — ГМФ/ГМФNa₂ у DMSO-d₆; В — ЦМФ/ЦМФNa₂ у DMSO-d₆; Г — УМФ/УМФNa₂ у DMSO-d₆. Спектри нормалізовано в межах показаних діапазонів

Таблиця Б.1

Описи сигналів ^{1}H ЯМР

Ліганд	Спостер. δ (ppm)	Визначення	Комент
АМФ (D_2O)	8.74 (s); 8.55 (m); 6.30 (s); 4.88–4.27 (m)	аденін H; аденін H; H-1′; рибозна ділянка	HDO ~4,80 без урахування
АМФNa_2 (D_2O)	8.62 (s); 8.25 (s); 6.15 (d); 4.53–4.03 (m)	аденін H; аденін H; H-1′; рибозна ділянка	HDO ~4,80 без урахування
ГМФ (DMSO-d_6)	10.68 (s); 7.88 (s); 6.54; 5.71 (d); 4.45–3.92	NH; H-8; область NH_2; H-1′; область рибози	ДМСО-d_5 ~2,50 без урахування
ГМФNa_2 (DMSO-d_6)	9.13 (s); 8.95 (s); 5.83 (d); 4.49; 4.21; 3.48	основа/замінний; пов'язаний з основою; кандидат H-1′; рибозна ділянка	попередні призначення на нижній лінії
ЦМФ (DMSO-d_6)	9.99; 8.81 (s); 8.06 (d); 6.16 (d); 5.72 (d); 4.02–3.76	обмінний; основа/обмінний; H-6; H-5; H-1′; рибоза	Добре виражений H-5/H-6
ЦМФNa_2 (DMSO-d_6)	8.07 (d); 3.60 (dd); 3.54 (d); 3.45 (m); 3.37 (dd)	сигнали рибозної області	H-5/H-1′ не впевнено призначено
УМФ (DMSO-d_6)	8.46 (s); 8.11 (s); 5.91 (d); 4.51; 4.11; 4.03; 3.93	основа/мінор; кандидат H-6; ділянка H-5/H-1′; рибоза	5,91 ppm перекриття призначення
УМФNa_2 (DMSO-d_6)	12.49 (s); 8.32 (s); 8.08 (s); 5.90 (d); 4.50; 4.06; 3.78	обмінний NH; пов'язаний з основою; кандидат H-6; H-5/H-1′; рибоза	—
D-mannitol (D_2O)	3.89 (dt); 3.81 (m); 3.74–3.72 (m)	CH/CH_2 поліольна область	HDO ~4,78 без урахування
АМФ (DMSO-d_6)	8.39 (s); 8.20 (d); 7.72 (s); 5.93 (d); 5.86 (s); 4.58–3.95	аденін/основна область; аномерні /рибозні кандидати	—
АМФNa_2 (DMSO-d_6)	8.47 (s); 8.13 (s); 5.88 (s); 4.60; 4.21; 3.99; 3.77	аденіно-асоційований; H-1′-кандидат; рибозна ділянка	лише якісні;
D-mannitol (DMSO-d_6)	4.45; 4.38; 4.20; 3.56–3.36	OH/поліольні та CH/CH_2 області	вода ~3,43; ДМСО ~2,50

Таблиця Б.2

Зміни pH 50 мМ TRIS буфера при додаванні лігандів 2 мл буфера + 10 мкл ліганда в концентрації в буфері 10 μM (Точність приладу ±0,02 pH)

Ліганд	pH	Δ	Ліганд	pH	Δ
Контроль	7,43	0	ІНФ +D-M	7,43	0
ІНФ	7,42	0,01	ІНФ +АМФ	7,40	0,03
ІНФ +ГМФ	7,39	0,04	ІНФ +АМФ+D-M	7,40	0,03
ІНФ +ГМФ+D-M	7,39	0,04	ІНФ +АМФNa_2	7,44	-0,01
ІНФ +ГМФNa_2	7,45	-0,02	ІНФ +АМФNa_2+D-M	7,44	-0,01
ІНФ +ГМФNa_2+D-M	7,45	-0,02	ІНФ +ОРН	7,39	0,04
ІНФ +ЦМФ	7,41	0,02	ІНФ + ОРН +D-M	7,39	0,04
ІНФ +ЦМФ+D-M	7,41	0,02	ІНФ + ОРН-Na	7,44	-0,01
ІНФ +ЦМФNa_2	7,43	0	ІНФ + ОРН-Na+D-M	7,44	-0,01
ІНФ +ЦМФNa_2+D-M	7,43	0			
ІНФ +УМФ	7,41	0,02			
ІНФ +УМФ+D-M	7,41	0,02			
ІНФ +УМФNa_2	7,43	0			
ІНФ +УМФNa_2+D-M	7,43	0			

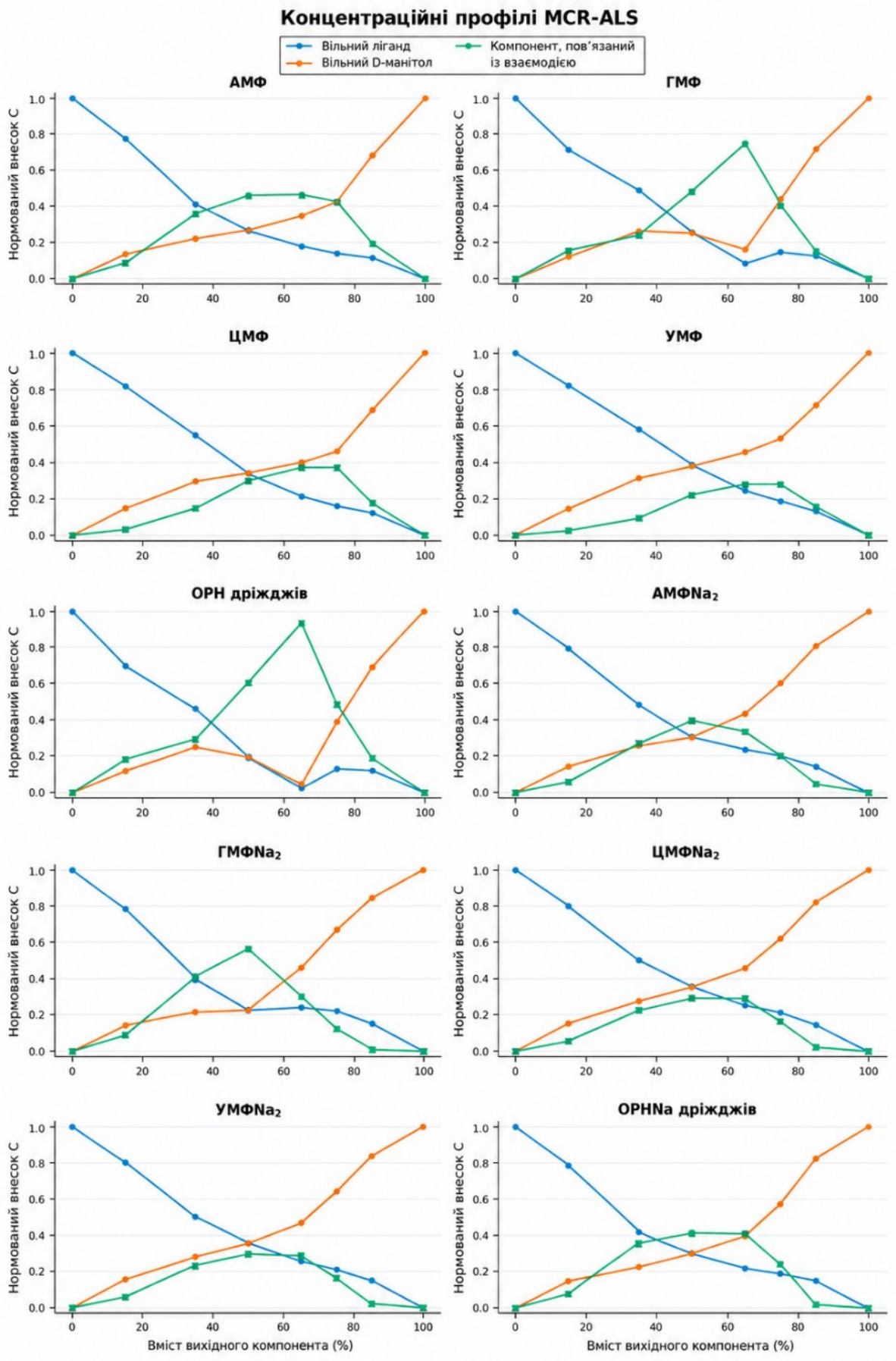


Рис. Б.3. MCR-ALS-дані кислотних і динатрієвих форм 5′-рибонуклеотидів

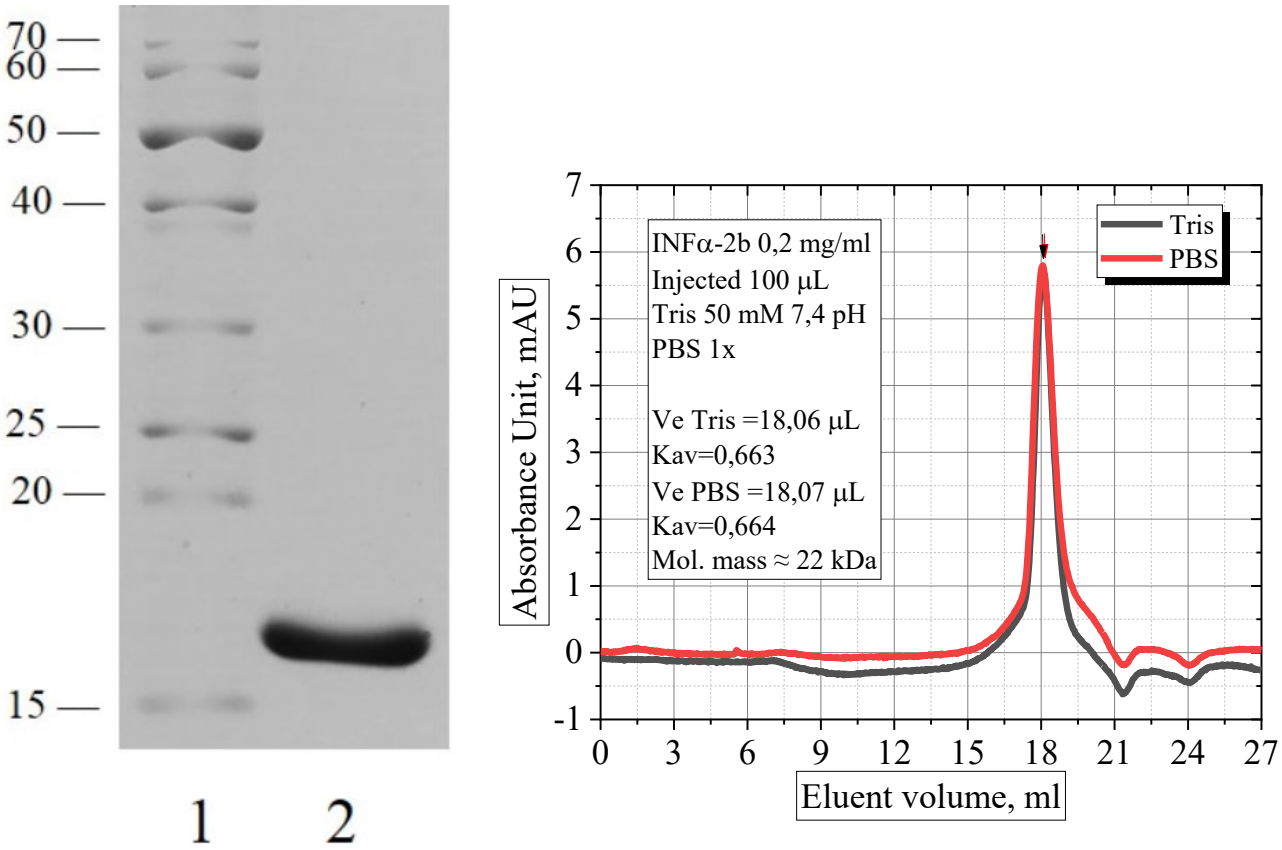


Рис. Б.4. SDS-PAGE рекомбінантного ІНФ α-2b та гель-фільтраційний HPLS ІНФ α-2b: 1 — суміш маркерних білків PageRuler Unstained Protein Ladder (шкала кДа); 2 — основна смуга ІНФ α-2b з молекулярною масою приблизно 18,2 кДа.

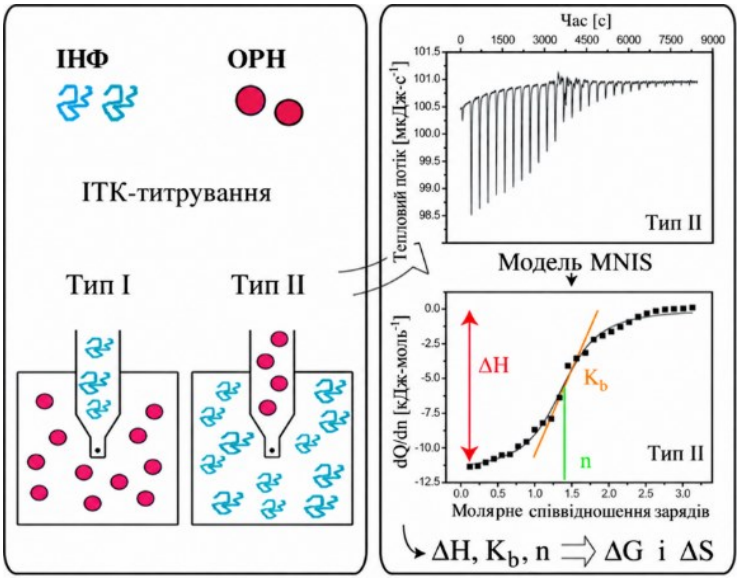


Рис. Б.5. Схема експерименту з нанокалориметричного титрування ІНФ-РНК-вими препаратами [модифіковано з [103]]. Нами використовувався тип II, коли ліганд додається до білка. Вимірювання ITC реєструють зміну температури протягом 3 хв. для кожної з 25 ін'єкцій. Отримані дані обчислювали за допомогою функції підгонки

відповідно до експериментальних кривих у програмі Nanoanalise. Це дало змогу отримати значення ΔH та K_b і обчислити ентропію ΔS і загальну вільну енергію ΔG під час взаємодії ІНФ–РНК.

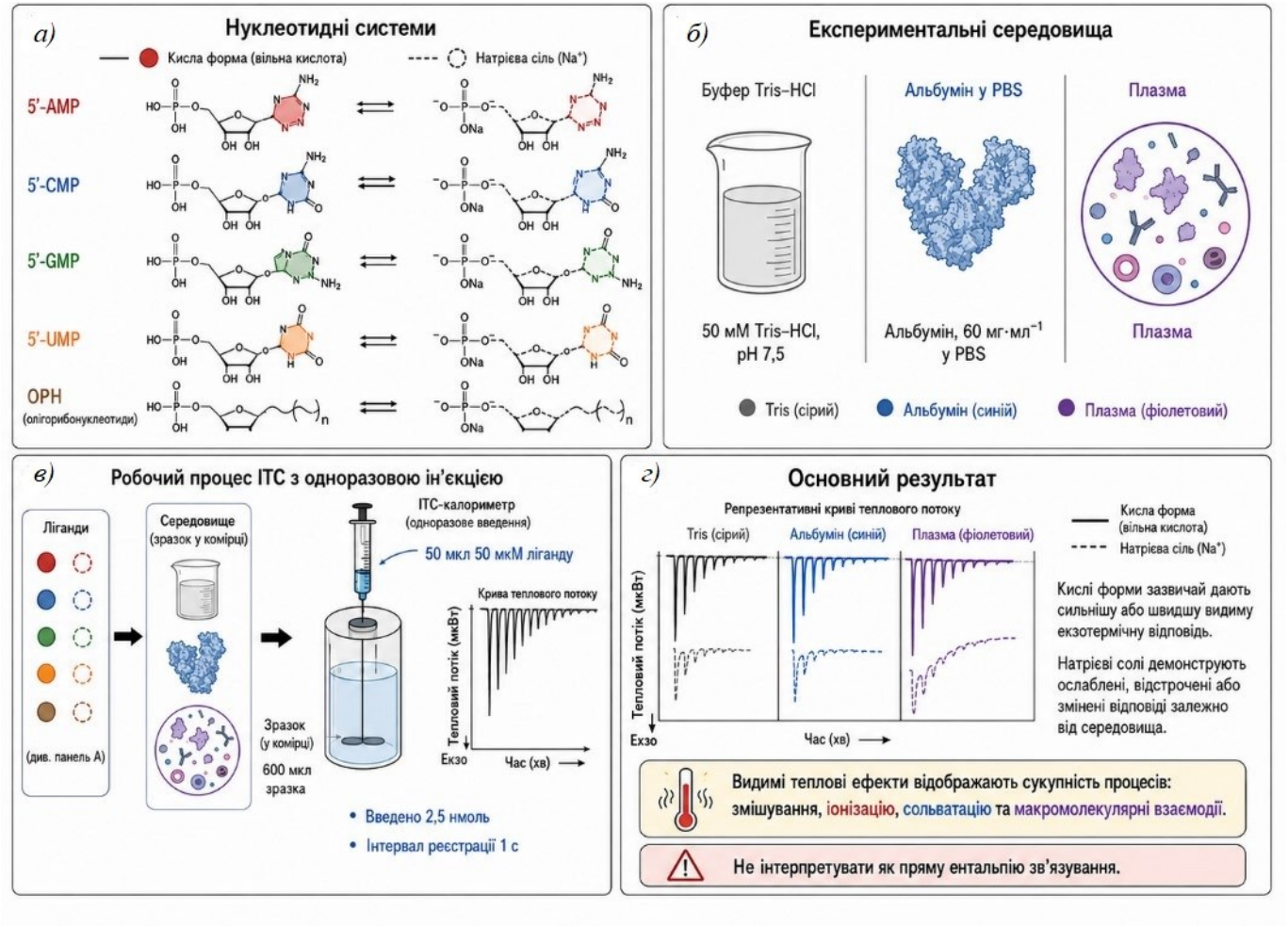


Рис. Б.6. Графічний огляд калориметричного дослідження з одноразовою ін'єкцією. Схематично підсумовано панель нуклеотидів, три експериментальні середовища, робочий процес з одноразовою ін'єкцією та інтерпретацію спостережуваного сигналу теплового потоку як складеної видимої реакції. Хімічні структури та молекулярні зображення є схематичними.

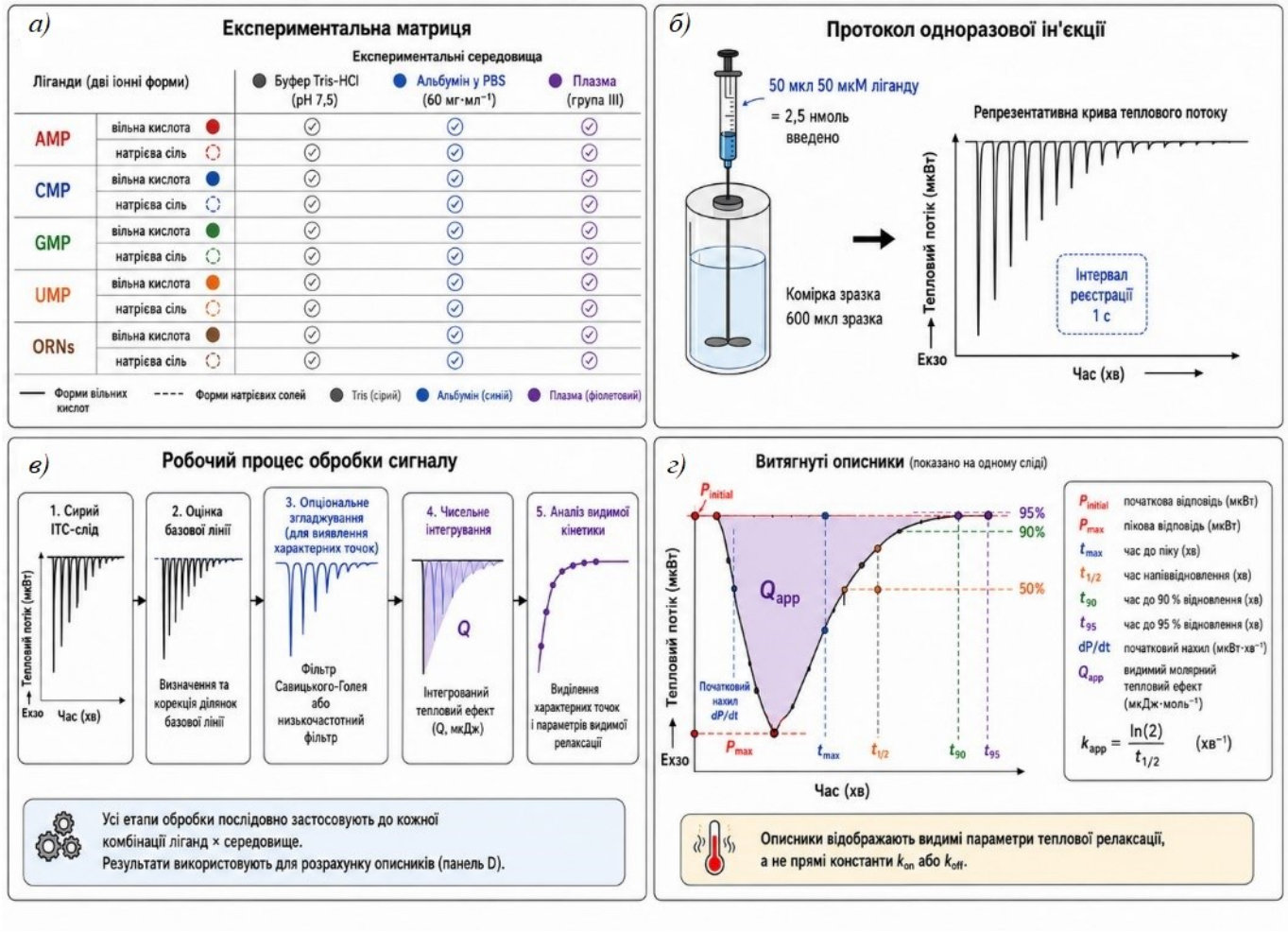


Рис. Б.7. Експериментальний план і робочий процес обробки калориметричних даних. Матриця аналізу поєднує кислі та натрієві нуклеотидні форми з Tris, альбуміном і плазмою. Криві часової області були оброблені для отримання дескрипторів на основі амплітуди, часу, площі, нахилу та релаксації.

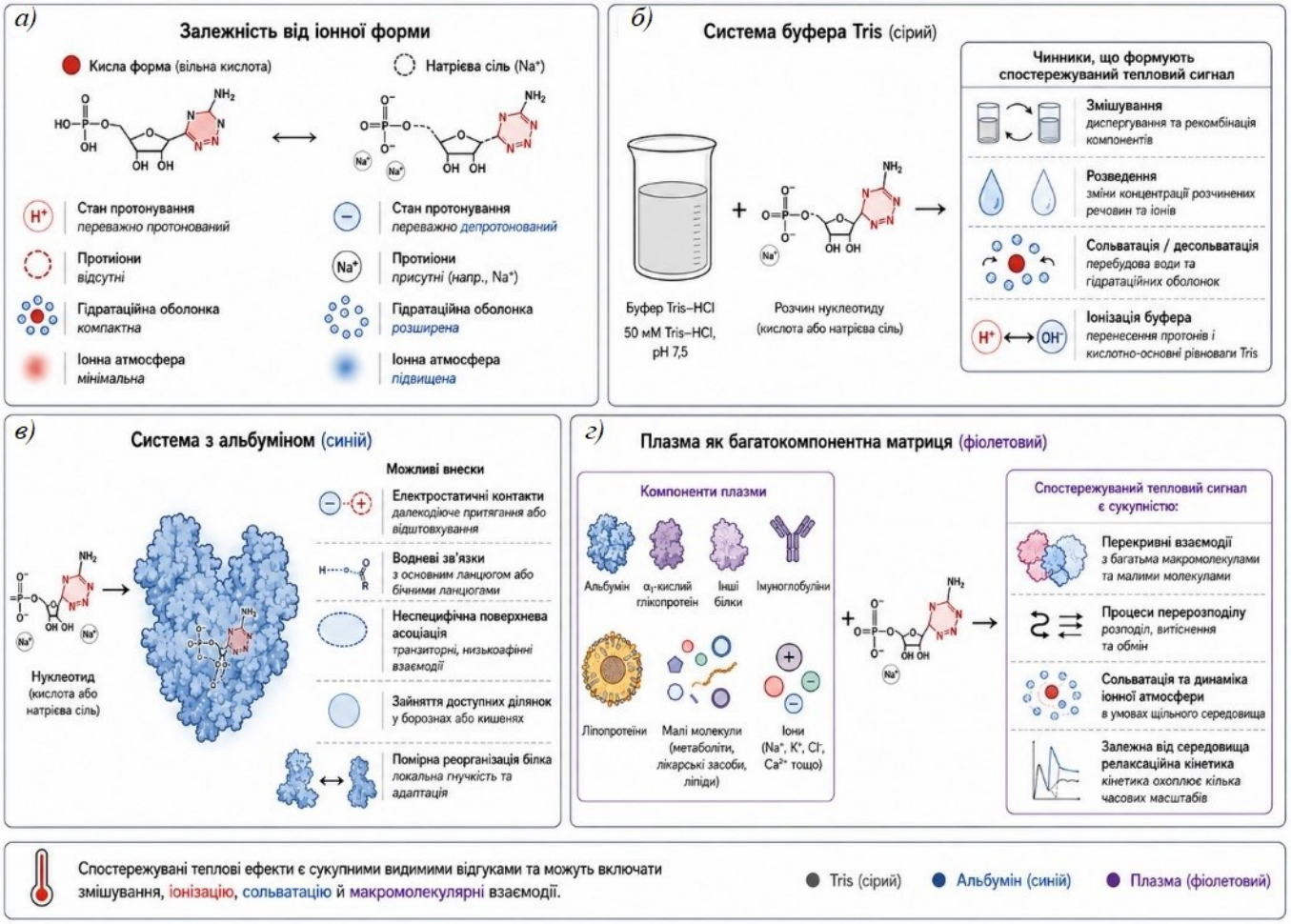


Рис. Б.8. Концептуальна організація можливих фізико-хімічних внесків у калориметричну реакцію. Іонізація, перерозподіл протиіонів, сольватація/десольватація, розведення, іонізація буфера, макромолекулярні контакти та реорганізація матриці можуть перетинатися в часі



Рис. Б.9. Інтегрована схема дослідження конформаційної мікромодуляції ІНФ α-2b малими природними лігандами. Схема пов’язує лігандну панель, білкові стани, середовище, контролі та рівень експериментального доказу.

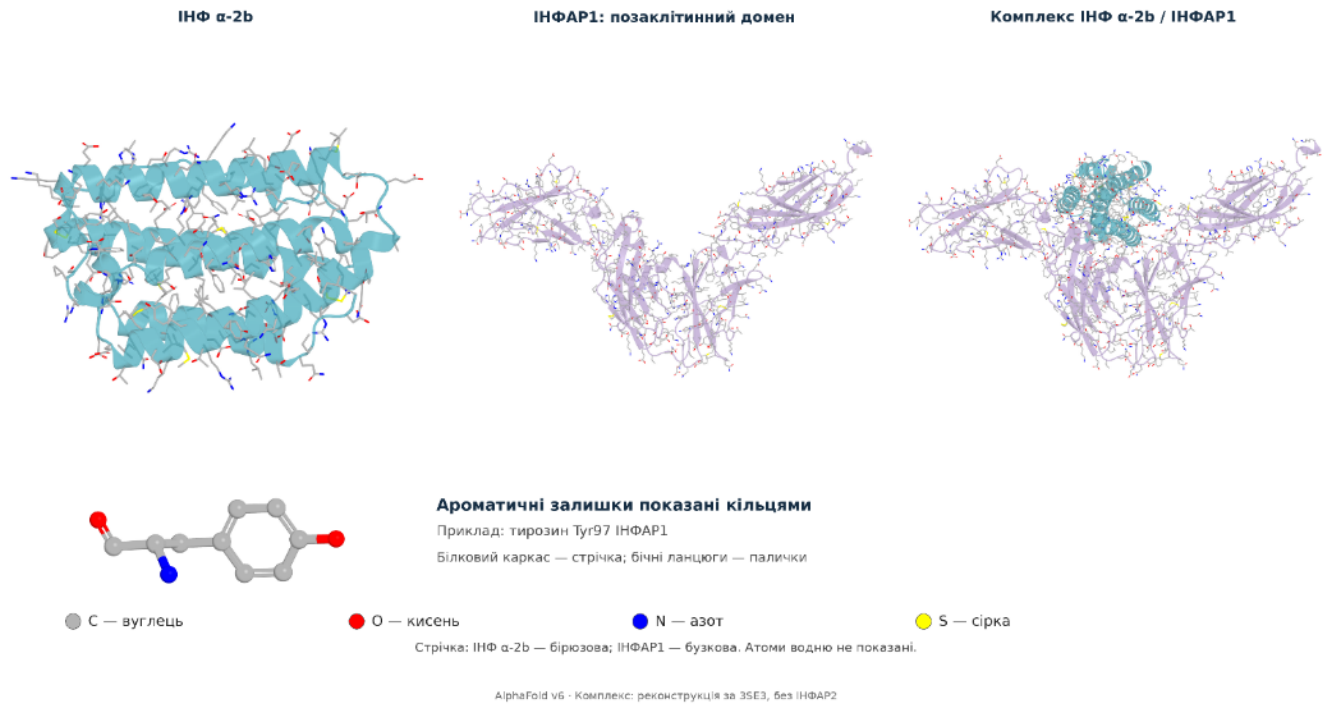


Рис. Б.10. Атомна будова бічних ланцюгів білків в докінгу

ДОДАТОК В
Додаткові матеріали до розділу 3

Таблиця В.1

Дані для алгоритму K2D3

Зразок	α-спіралі	Неупорядковані	β-листи (загалом)
ІНФ	32.5	42.8	24.7
ІНФ +ГМФ	22.8	60.5	16.7
ІНФ +ГМФ+D-M	23.5	60.1	16.4
ІНФ +ГМФNa_2	39.8	28.5	31.7
ІНФ +ГМФNa_2+D-M	35.2	28.0	36.8
ІНФ +ЦМФ	23.2	60.0	16.8
ІНФ +ЦМФ+D-M	24.8	59.8	15.4
ІНФ +ЦМФNa_2	43.0	21.0	36.0
ІНФ +ЦМФNa_2+D-M	44.5	20.0	35.5
ІНФ +УМФ	28.0	55.0	17.0
ІНФ +УМФ+D-M	25.5	58.5	16.0
ІНФ +УМФNa_2	43.2	22.5	34.3
ІНФ +УМФNa_2+D-M	44.1	21.8	34.1
ІНФ +АМФ	22.5	62.0	15.5
ІНФ +АМФ+D-M	25.0	61.2	13.8
ІНФ +АМФNa_2	40.5	23.8	35.7
ІНФ +АМФNa_2+D-M	46.0	20.0	34.0
ІНФ +ОРН	24.0	59.5	16.5
ІНФ +ОРН+D-M	23.0	61.0	16.0
ІНФ +ОРН-Na	41.5	22.0	36.5
ІНФ +ОРН-Na+D-M	44.5	21.0	34.5

Таблиця В.2

Дані для алгоритму CAPITO

Зразок	α-спіралі	Неупорядковані	β-листи (загалом)
ІНФ	34.0	40.5	25.5
ІНФ +ГМФ	25.0	55.0	20.0
ІНФ +ГМФ+D-M	25.5	55.5	19.0
ІНФ +ГМФNa_2	41.0	25.0	34.0
ІНФ +ГМФNa_2+D-M	36.0	26.5	37.5
ІНФ +ЦМФ	26.0	54.5	19.5
ІНФ +ЦМФ+D-M	27.5	53.5	19.0
ІНФ +ЦМФNa_2	45.0	18.0	37.0
ІНФ +ЦМФNa_2+D-M	47.0	17.5	35.5
ІНФ +УМФ	32.5	46.0	21.5
ІНФ +УМФ+D-M	28.0	52.0	20.0
ІНФ +УМФNa_2	45.0	19.0	36.0
ІНФ +УМФNa_2+D-M	46.0	18.5	35.5
ІНФ +АМФ	25.0	55.0	20.0
ІНФ +АМФ+D-M	28.5	54.0	17.5
ІНФ +АМФNa_2	41.5	21.5	37.0
ІНФ +АМФNa_2+D-M	48.5	17.0	34.5
ІНФ +ОРН	27.0	52.0	21.0
ІНФ +ОРН+D-M	25.5	55.5	19.0
ІНФ +ОРН-Na	43.5	19.0	37.5
ІНФ +ОРН-Na+D-M	46.5	18.5	35.0

Таблиця В.3

Дані для алгоритму CDNN

Зразок	α-спіралі	β-повороти	Неупорядковані	β-листи (антипаралельні)	β-листи (паралельні)
ІНФ	38.5	18.0	34.0	19.5	2.0
ІНФ +ГМФ	26.0	22.0	48.0	8.0	1.0
ІНФ +ГМФ+D-M	27.0	21.0	47.0	8.0	0.5
ІНФ +ГМФNa_2	42.0	19.5	22.0	21.5	2.5
ІНФ +ГМФNa_2+D-M	37.0	20.0	24.5	21.0	1.5
ІНФ +ЦМФ	27.0	22.5	46.0	8.0	0.5
ІНФ +ЦМФ+D-M	28.5	21.5	46.0	7.0	0.5
ІНФ +ЦМФNa_2	46.0	18.5	17.5	25.5	1.5
ІНФ +ЦМФNa_2+D-M	48.0	18.0	17.0	24.0	1.0
ІНФ +УМФ	34.0	20.5	38.5	8.0	0.5
ІНФ +УМФ+D-M	29.5	21.5	43.0	8.5	0.5
ІНФ +УМФNa_2	46.0	18.0	20.0	23.5	2.5
ІНФ +УМФNa_2+D-M	47.0	18.5	19.0	23.5	1.5
ІНФ +АМФ	26.0	22.0	48.5	8.0	0.5
ІНФ +АМФ+D-M	29.5	21.0	48.0	7.5	0.5
ІНФ +АМФNa_2	42.5	19.0	21.0	25.5	2.0
ІНФ +АМФNa_2+D-M	49.0	19.0	16.0	24.0	1.0
ІНФ +ОРН	28.5	22.0	46.0	8.5	0.5
ІНФ +ОРН+D-M	27.0	22.0	47.5	8.0	0.5
ІНФ +ОРН-Na	44.5	18.5	19.0	25.5	2.0
ІНФ +ОРН-Na+D-M	48.0	18.5	18.0	24.5	1.0

Таблиця В.4

Кінетичні дескриптори для всіх 30 умов одноразової ін'єкції

Ліганд	Середовище	|Pmax|	tmax	t1/2	т90	т95	капп	Q-перехід	Модель
АМФ	Тріс	38,44	3553	767,7	1885.0	2334.1	0,000903	26819	моноексп
$АМФNa_2$	Тріс	38,63	387	75,0	238,5	292.1	0,009237	706	моноексп
АМФ	Альбумін	38,98	1819	359,9	875.2	1091.7	0,001926	11537	моноексп
$АМФNa_2$	Альбумін	39.11	528	170,9	296.3	345.2	0,004055	5329	моноексп
АМФ	Плазма	40,41	1522	712.6	1039.7	1116,5	0,000973	17090	Багатоф.
$АМФNa_2$	Плазма	38,46	916	357,5	495,5	559.2	0,001939	13788	Багатоф.
ЦМФ	Тріс	37.33	3917	2111.9	3102.2	3400.3	0,000328	69583	Багатоф.
$ЦМФNa_2$	Тріс	38,47	1696	124,5	254,7	317.1	0,005567	4379	моноексп
ЦМФ	Альбумін	39.01	2519	965,5	1495.2	1718,5	0,000718	32435	Багатоф.
$ЦМФNa_2$	Альбумін	38,90	625	261.8	390,7	439.2	0,002648	8360	Багатоф.
ЦМФ	Плазма	37.25	2985	1541.8	2066,6	2282.3	0,000450	56538	Багатоф.
$ЦМФNa_2$	Плазма	38.19	3542	451.3	597.3	671.6	0,001536	19753	Багатоф.
ГМФ	Тріс	37.04	3896	2509.4	3198.5	3425.3	0,000276	92431	Багатоф.
$ГМФNa_2$	Тріс	38,83	503	95.2	225,4	283,9	0,007283	3326	моноексп
ГМФ	Альбумін	38,88	1687	293.1	797.3	1006.2	0,002365	9210	моноексп
$ГМФNa_2$	Альбумін	38,68	593	233.2	358,7	408.4	0,002972	7083	Багатоф.
ГМФ	Плазма	39,96	3249	1482.1	2044.1	2284.4	0,000468	54788	Багатоф.
$ГМФNa_2$	Плазма	38.35	1656	365.4	614.1	1117.0	0,001897	15880	моноексп
УМФ	Тріс	35.18	3356	1632.1	2160.6	2484.5	0,000425	60851	Багатоф.
$УМФNa_2$	Тріс	38,78	790	399,6	532.4	587,9	0,001735	15551	Багатоф.
УМФ	Альбумін	37.06	2899	1294.8	1827.9	2046.0	0,000535	44431	Багатоф.
$УМФNa_2$	Альбумін	38.22	680	321.3	448,7	495.3	0,002157	10510	Багатоф.
УМФ	Плазма	36,46	3136	596,9	1145.2	1418.9	0,001161	16283	Багатоф.
$УМФNa_2$	Плазма	38.12	3527	369.0	513.0	582,9	0,001878	15588	Багатоф.
ОРН	Тріс	162,79	2429	1068.2	1589.1	1796.4	0,000649	144598	Багатоф.
ОРН-Na	Тріс	163.01	776	410.8	543,9	596,6	0,001687	60944	Багатоф.
ОРН	Альбумін	37,69	3775	2442.9	2968.6	3169.6	0,000284	87629	Багатоф.
ОРН-Na	Альбумін	39.03	1150	228,5	369,7	436.2	0,003033	7799	моноексп
ОРН	Плазма	35,87	3428	2038.1	2571.8	2784.7	0,000340	70105	Багатоф.
ОРН-Na	Плазма	38,74	1504	525,0	739.8	787.3	0,001320	20861	Багатоф.

Таблиця В.5

Основні смуги ІЧ-поглинання бічних груп амінокислот ІНФ α-2b [112]

Віднесення	Положення смуги, $см^{-1}$ (H_2O)
Ala, ν(C–H)	2850–2960
Arg, $\nu_{as}(CNH^+)$	1614–1695
Asn, δ(NH2), ν(CO)	1612–1622, 1677–1678
Asp, δ(COH), ν(CO), δ(COH), νas(COO−), νs(COO−)	1160–1253, 1264–1450, 1574–1579, 1716
Cys, ν(SH)	2551
Gln, δ(NH2), ν(CO), ν(CN)	1410, 1586–1610, 1668–1687
Glu, ν(CO), δ(COH)	1160–1253, 1404, 1712
Gly, $\nu(CH_2)$	2920, 3084
His, δ(CH), ν(CN), δ(NH), ν(CC)	1090, 1094, 1104,1106, 1199, 1217, 1229, 1439, 1575,1594, 1631
Ile,$\delta(CH_3)$, $\delta(CH_2)$, ν(C–H)	1370-1450, 2870-2960
Leu,$\delta(CH_3)$, ν(C–H)	1365-1395, 2870-2860
Lys, $\delta_{as}(NH^+)$, δs(NH+)	1526–1527, 1626–1629
Met, ν(C–S)	700-750, 2850-2960
Phe, ν(CCring)	1494
Pro, ν(CN)	1400–1465
Ser, δ(COH) or $\delta(CO^2H)$, ν(CO), ν(C\O)	983, 1030, 1181–1420
Thr, δ(CO2H,) ν(C\O)	865–942, 983, 1075–1150
Trp, δ(CH), ν(CC), ν(CN), δ(NH), ν(NC)	1012–1016, 1064, 1092, 1203, 1245, 1276, 1334–1342, 1352–1361, 1412–1435, 1462, 1496, 1509, 1622
Tyr, ν(CC), δ(COH), δ(CH)	1169–1273, 1498–1500, 1516–1518, 1594–1602, 1614–1621
Val, $\delta(CH_3)$, ν(C–H), (CH_3, CH)	1370–1390, 2870–2960

Таблиця В.6

Відносні зміни інтенсивності ІЧ-смуг, попередньо віднесених до типів бічних груп ІНФ α-2b за взаємодії з лігандами

Ліганди	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile
АМФ	8,32	-4,64	-3,6	-3,6	-3,8	0,5	50,2	6,65	14,55	2,61
АМФ+D-M	81,46	64,9	76,2	84,62	117	154	127,9	55,43	147,86	80,74
$АМФNa_2$	-15,2	-22,3	-22	-12,4	-12	-30	10,2	-13,3	-2,62	-16,6
$АМФNa_2$+D-M	-84,1	-84,7	-84	-82,3	-85	-76	-66,8	-86,1	-77,67	-84,3
ГМФ	3,78	29,9	38,2	164,9	118	105	364	-5,41	137,61	27,36
ГМФ+D-M	-47,4	-47,1	-45	-22,5	-30	-43	15,82	-44,3	-23,65	-44,2
$ГМФNa_2$	31,68	39,4	49	119,5	106	81	222,2	25,57	97,75	43,71
$ГМФNa_2$+D-M	26,69	4,89	26,5	31,83	14,7	71	91,88	10,78	46,84	26,27
ЦМФ	-54	-53,6	-56	-58,8	-60	-64	-60	-48,6	-52,1	-54,8
ЦМФ+D-M	31,53	37	47,1	109,9	106	81	202,8	24,83	91,92	41,91
$ЦМФNa_2$	-23,2	-19,7	-18	14,12	4,62	-8,2	60,56	-21,8	8,68	-18
$ЦМФNa_2$ +D-M	82,56	95,5	139	75,04	212	203	65,59	65,36	236,25	87,32
УМФ	108,3	82,1	39	203,2	262	247	730,4	76,59	282,04	99,41
УМФ+D-M	81,28	56,8	73,6	146,8	177	143	544,8	52,22	209,95	77,05
$УМФNa_2$	81,31	96,1	20,4	53,4	157	309	218,4	68,26	242,74	63,27
$УМФNa_2$+D-M	76,87	51,7	-8,7	48,3	142	191	135,1	61,19	180,32	68,13
ОРН	-13,9	-12,8	-12	-7,61	-4,1	-13	7,59	-11,5	-4,31	-13,9
ОРН+D-M	-19,4	-25	-25	-23	-21	-26	-0,53	-16,7	-9,05	-21,5
ОРН-Na	12,54	18	19,7	35,47	34,9	35	70,38	9,76	38,52	15,87
ОРН-Na+D-M	93,21	85,8	84,4	100	173	182	173,8	70,87	229,62	87,97
Ліганди	**Leu**	**Lys**	**Met**	**Phe**	**Pro**	**Ser**	**Thr**	**Trp**	**Tyr**	**Val**
АМФ	5,11	-12,4	8	8,14	-11	-6,2	109,4	-1,39	19,37	5,85
АМФ+D-M	74,88	18,8	84,9	216,3	130	71	444,2	152,8	119,18	74,49
$АМФNa_2$	-15,9	-19	-16	-34,7	-23	-11	55,84	-18,1	-8,05	-15,7
$АМФNa_2$+D-M	-84,5	-89,8	-84	-70,8	-82	-83	-55,3	-79,4	-73,94	-84,6
ГМФ	12,26	5,98	19,1	206,5	132	151	657	160,9	211,28	8,7
ГМФ+D-M	-45,8	-41,4	-45	-36,2	-34	-24	64,9	-28,6	-15,08	-46,1
$ГМФNa_2$	35,78	26,1	38,4	110,1	95,5	114	358	109,2	139,95	33,9
$ГМФNa_2$+D-M	23,95	-16,2	32	169,2	52,8	22	229,6	69,3	70,08	23,62
ЦМФ	-53,9	-46,9	-54	-68,9	-61	-58	-57,3	-61,7	-60,33	-53,7
ЦМФ+D-M	34,42	22,1	37,9	104,4	91,9	104	333	104,1	128,73	32,7
$ЦМФNa_2$	-21,2	-19,9	-20	7,66	3,37	11	124,1	8,87	22,23	-21,9
$ЦМФNa_2$ +D-M	76,21	38,4	91,1	122,8	136	59	1072	200	83,06	73,98
УМФ	96,45	-24,4	107	92,39	124	165	1364	196,7	347,13	96,38
УМФ+D-M	74,91	-22,2	77,7	-35,6	91,8	129	1005	150,6	271,23	74,46

Продовження таблиці В.6

Ліганди	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
УМФNa_2	69,13	-50,5	78,5	13,43	36,1	40	1295	128,8	93,44	70,45
УМФNa_2+D-M	65,64	-58,9	74,3	7,03	85	36	870,5	131,6	49,63	66,37
ОРН	-14,1	-12,9	-15	-19,1	-14	-6,6	8,47	-14,2	-3,4	-14
ОРН+D-M	-20,6	-24,9	-20	-29,1	-29	-22	22,63	-24,4	-14,03	-20,3
ОРН-Na	12,67	7,4	12	31,82	37,1	34	87,78	38,29	47,35	12,19
ОРН-Na+D-M	82,7	9,92	96,7	177,8	130	88	798,9	174,1	140,61	82,87

Таблиця В.7

Розраховані довжини хвиль (λ) та сили осцилятора (f) різних форм НМФ за методом TD-DFT

Сполука	Перехід	λ, nm	f	E, eV	Тип	Основні конфігурації	Конфігурація орбіталей
АМФ	$S_0 – S_1$	231	0.0160	5.38	n –π*	+0.637 В3МО-1–НВМО>	Н-В
ГМФ	$S_0 – S_1$	236	0.1691	5.26	π–π*	+0.660 В3МО–НВМО>	stacking
ЦМФ	$S_0 – S_1$	242	0.1298	5.13	π–π*	+0.680 В3МО–НВМО>	stacking
УМФ	$S_0 – S_1$	243	0.0001	5.10	n –π*	+0.646 В3МО-1–НВМО>	Н-В
АМФNa_2	$S_0 – S_1$	237	0.0003	5.24	n –π*	+0.553 В3МО-1–НВМО+1>	Na фосф гр
ГМФNa_2	$S_0 – S_1$	237	0.0004	5.22	n –π*	+0.503 В3МО-2–НВМО>	Na фосф гр
ЦМФNa_2	$S_0 – S_1$	256	0.0001	4.84	n –π*	+0.548 В3МО–НВМО>	Na фосф гр
УМФNa_2	$S_0 – S_1$	239	0.0007	5.18	n –π*	-0.562 В3МО-4–НВМО+4>	Н-В

Таблиця В.8

Розраховані довжини хвиль (λ) та сили осцилятора (f) D-манітолу за методом TD-DFT

Сполука	Перехід	λ, nm	f	E, eV	Тип	Основні конфігурації	Конфігурація орбіталей
D-manitol	$S_0 – S_1$	160	0.0018	7.77	n – π*	+0.470 В3МО-4–НВМО> +0.444 В3МО-3–НВМО+1>	Н-В



Рис. В.1. Контролі лише з D-манітолом у різних експериментальних архітектурах. Відмінності відгуку в контрольних системах показують, що D-манітол сам впливає на вимірювану анізотропію флуоресценції.

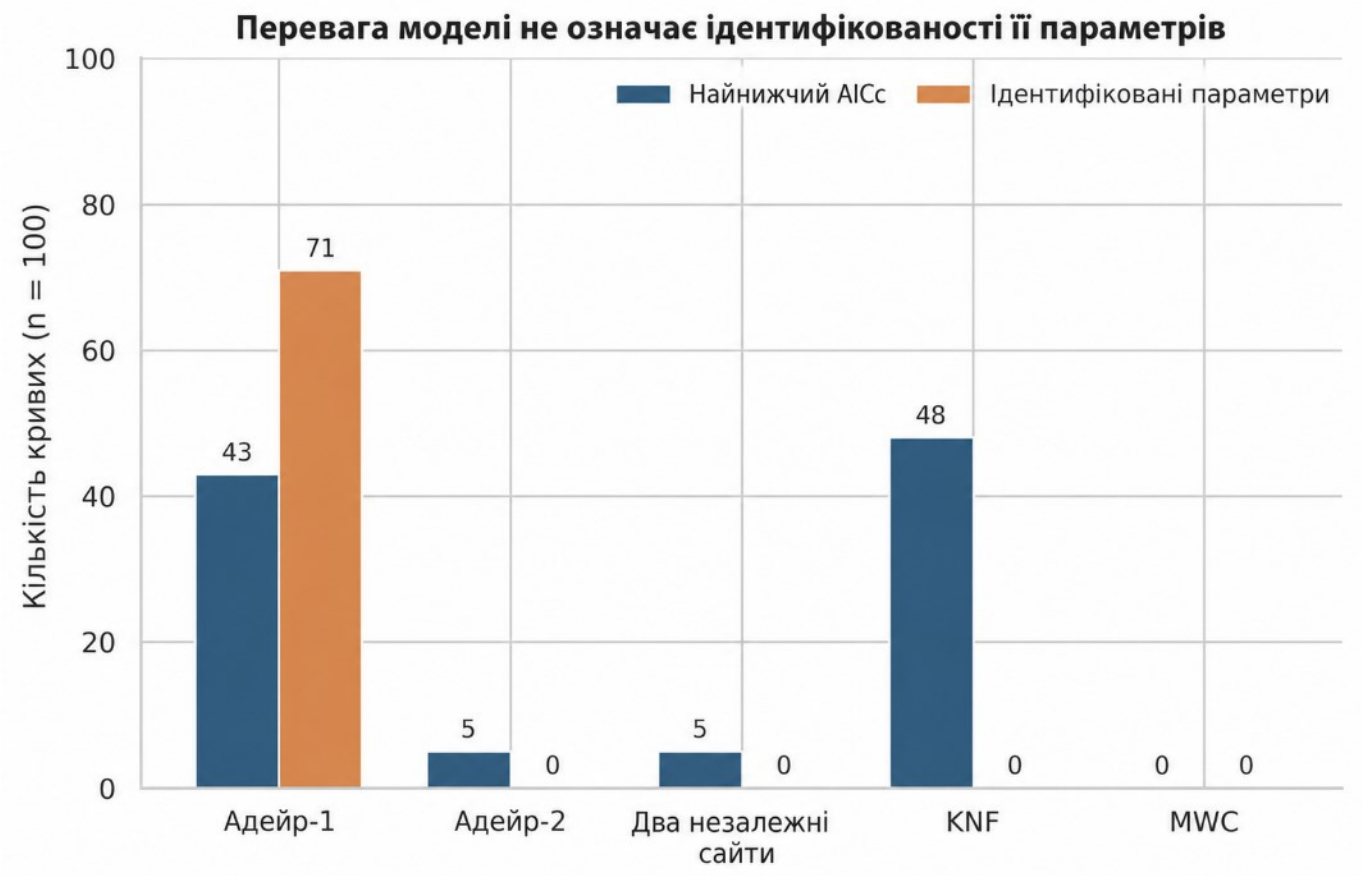


Рис. В.2. Вибір моделі та ідентифікація параметрів. Кількість кривих титрування, для яких кожна модель дала мінімальне значення AICc, порівнюється з кількістю кривих, які задовольняли заздалегідь визначені критерії ідентифікації параметрів



Рис. В.3. Залежність підтримки альтернативної моделі від способу складання. Теплова карта медіанних значень ΔAICc для 5 експериментальних схем складання. Нижчі значення вказують на сильнішу відносну підтримку

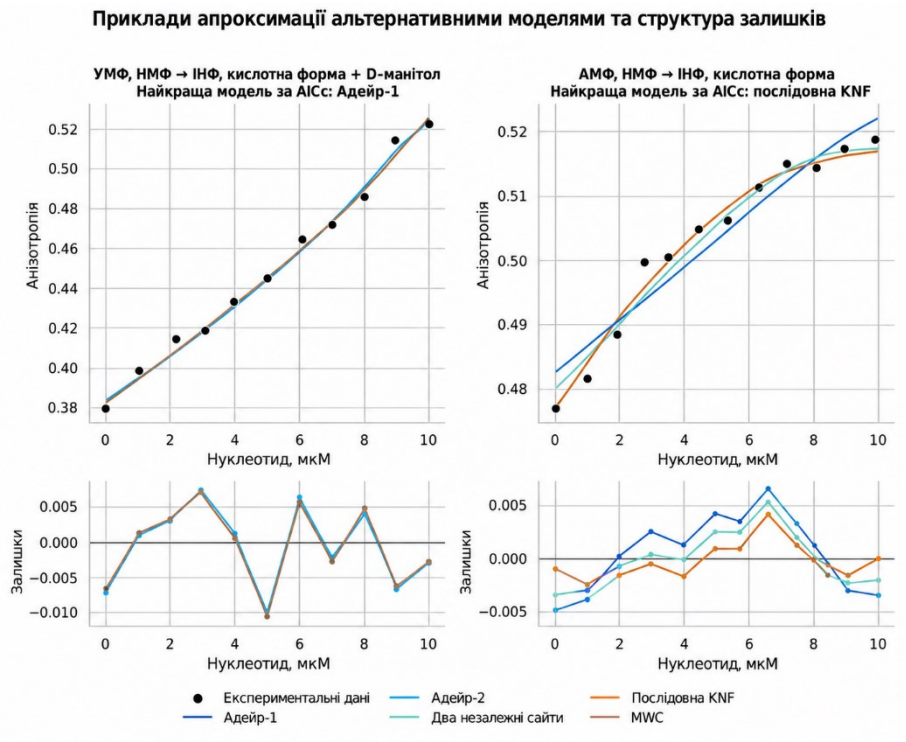


Рис. В.4. Типові підгонки та залишки для альтернативних моделей зв'язування. Показані експериментальні анізотропні реакції з прогнозами моделей Adair-1, Adair-2, двох незалежних сайтів, KNF та MWC. Подібні підібрані траєкторії, незважаючи на різні механістичні припущення, ілюструють практичну неунікальність мікроскопічних параметрів

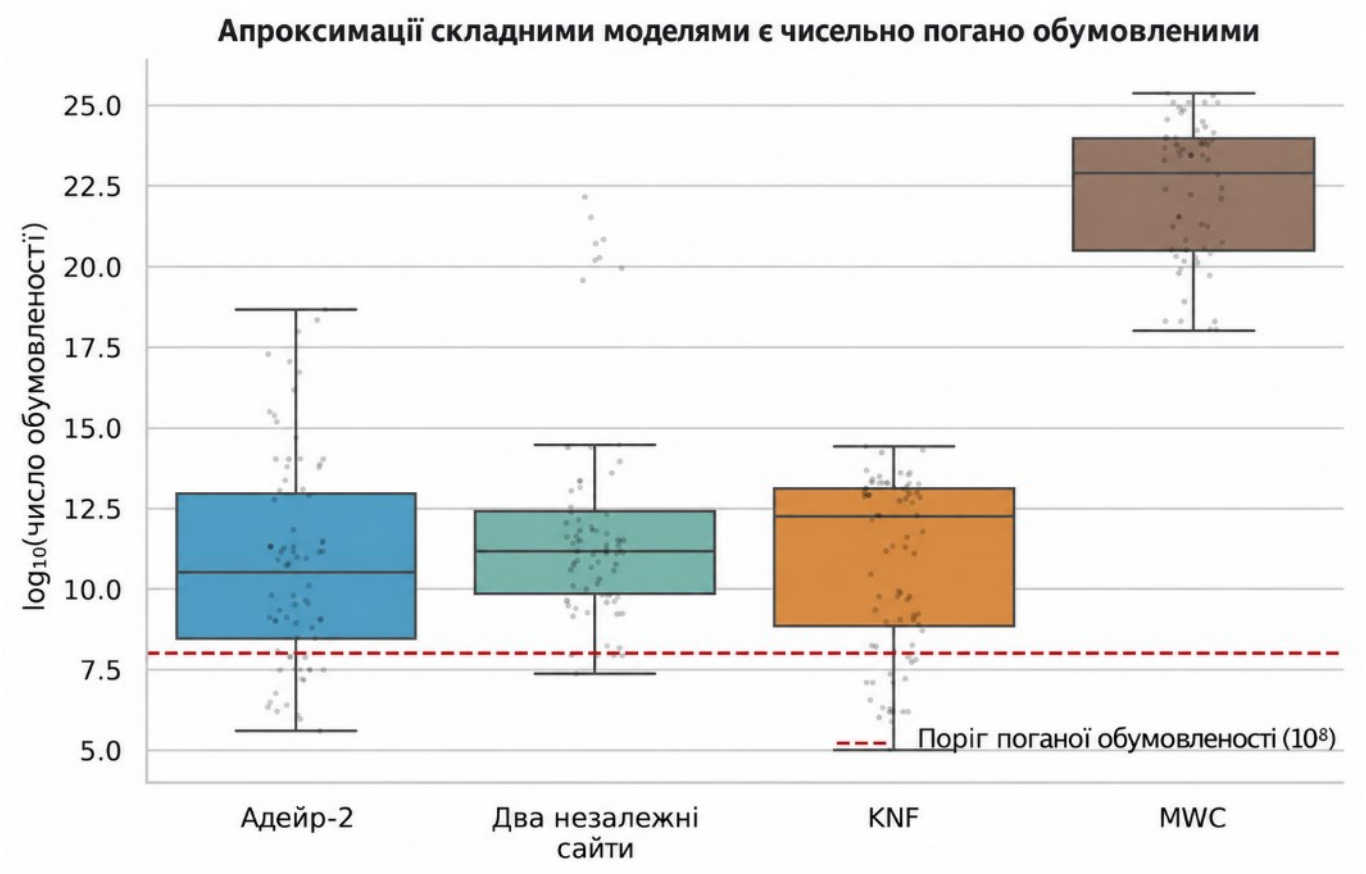


Рис. В.5. Чисельна стабільність підгонки комплексних моделей. Розподіл логарифмічних чисел обумовленості для моделей Adair-2, двох незалежних сайтів, KNF та MWC

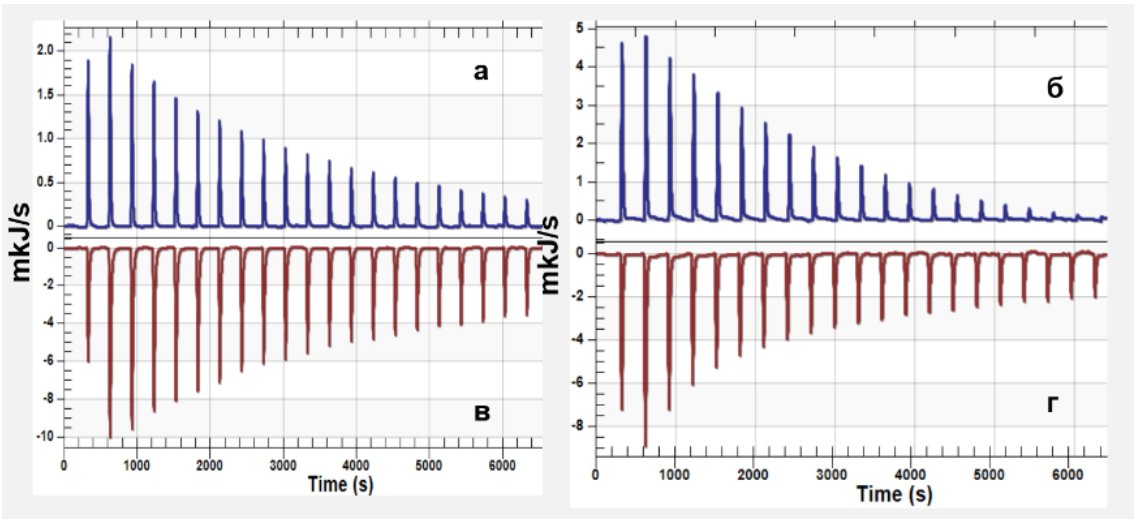


Рис. В.6. Калориметричні криві взаємодії ІНФ α-2b з АМФ: а — АМФ; б — АМФ + D-манітол; в — $АМФNa_2$; г — $АМФNa_2$ + D-манітол

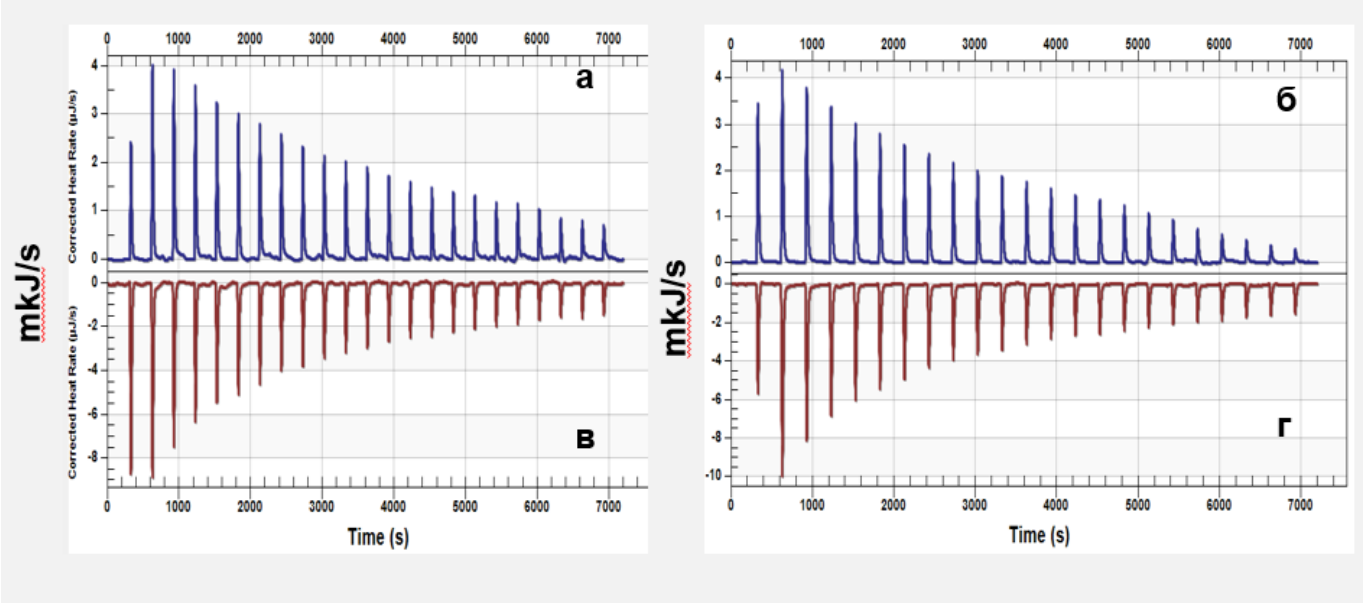


Рис. В.7. Калориметричні криві взаємодії ІНФ α-2b з ЦМФ: а — ЦМФ; б — ЦМФ + D-манітол; в — $ЦМФNa_2$; г — $ЦМФNa_2$ + D-манітол

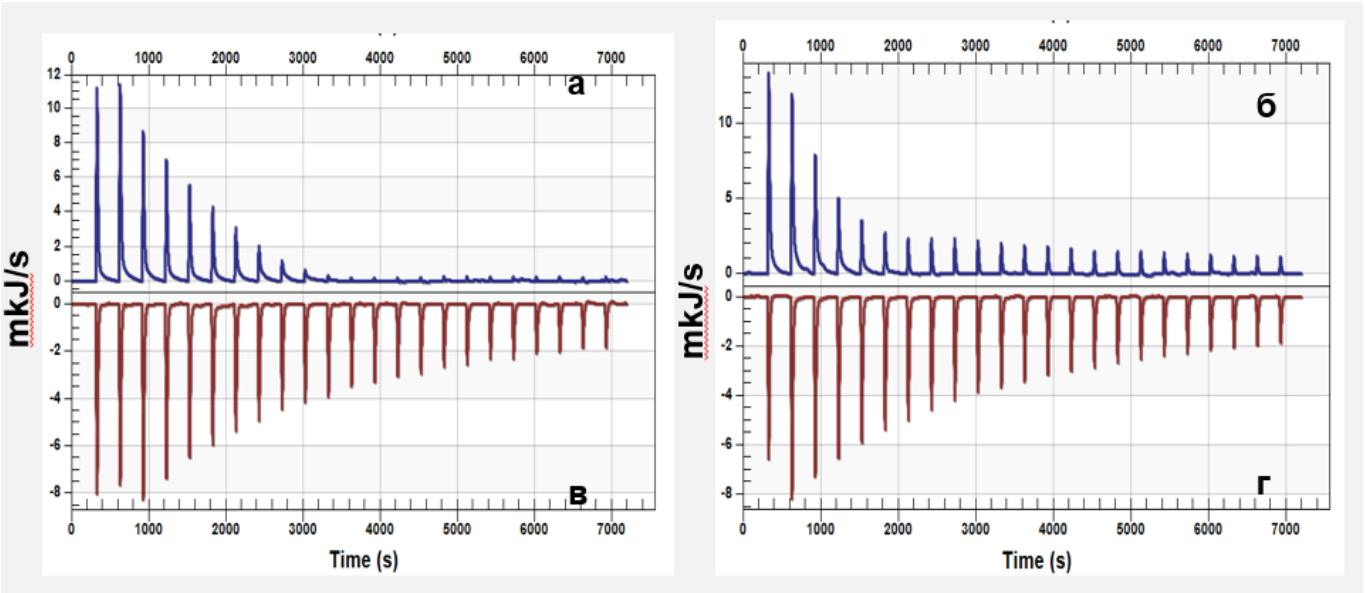


Рис. В.8. Калориметричні криві взаємодії ІНФ α-2b з ГМФ: а — ГМФ; б — ГМФ + D-манітол; в — $ГМФNa_2$; г — $ГМФNa_2$ + D-манітол

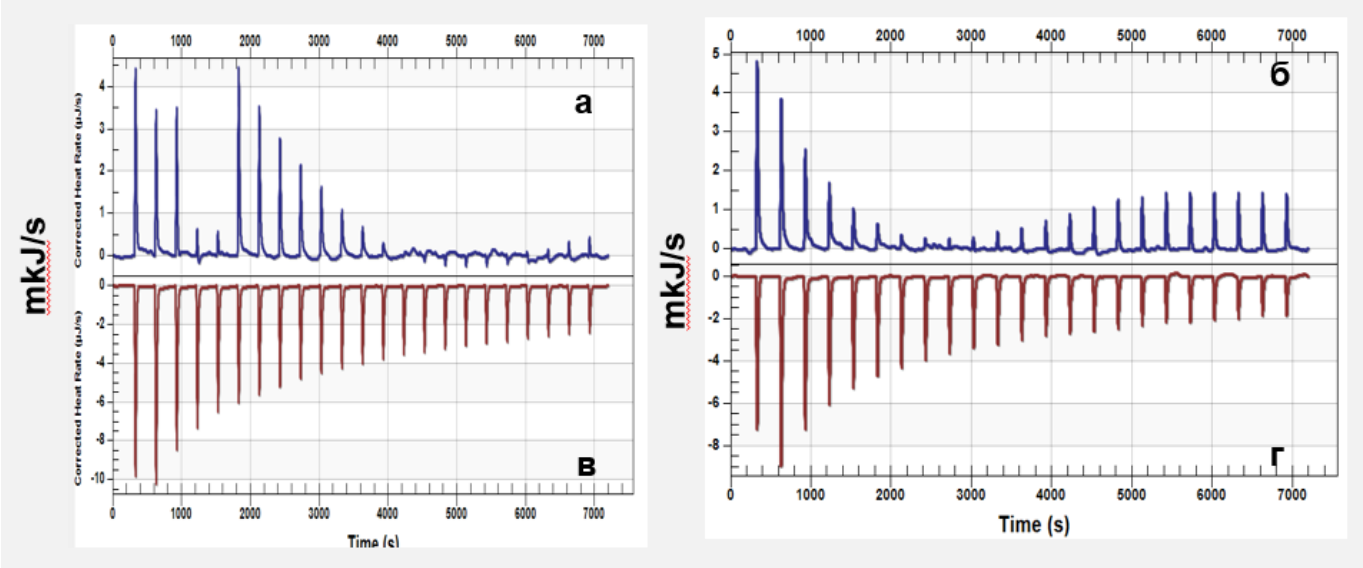


Рис. В.9. Калориметричні криві взаємодії ІНФ α-2b з УМФ: а — УМФ; б — УМФ + D-манітол; в — УМФNa_2; г — УМФNa_2 + D-манітол

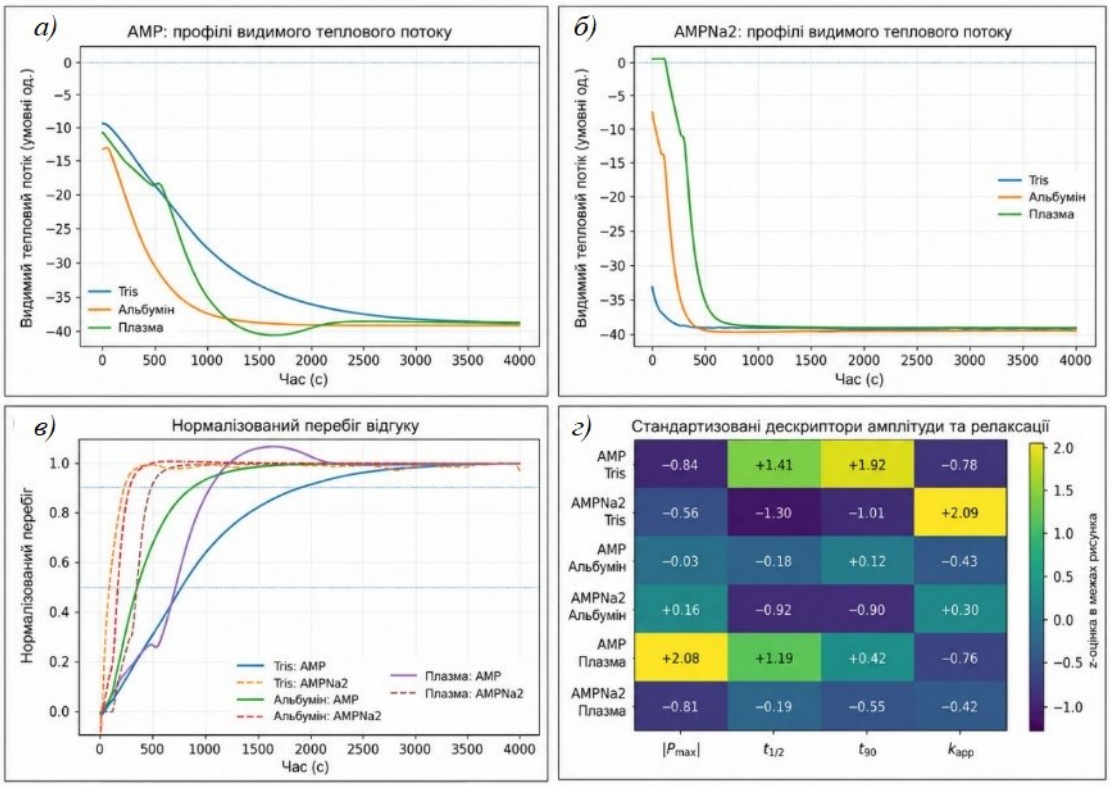


Рис. В.10. Повний аналіз АМФ та АМФNa_2 з роздільною здатністю за часом у Tris, альбуміні та плазмі, включаючи нормалізовані накладання та стандартизовані дескриптори

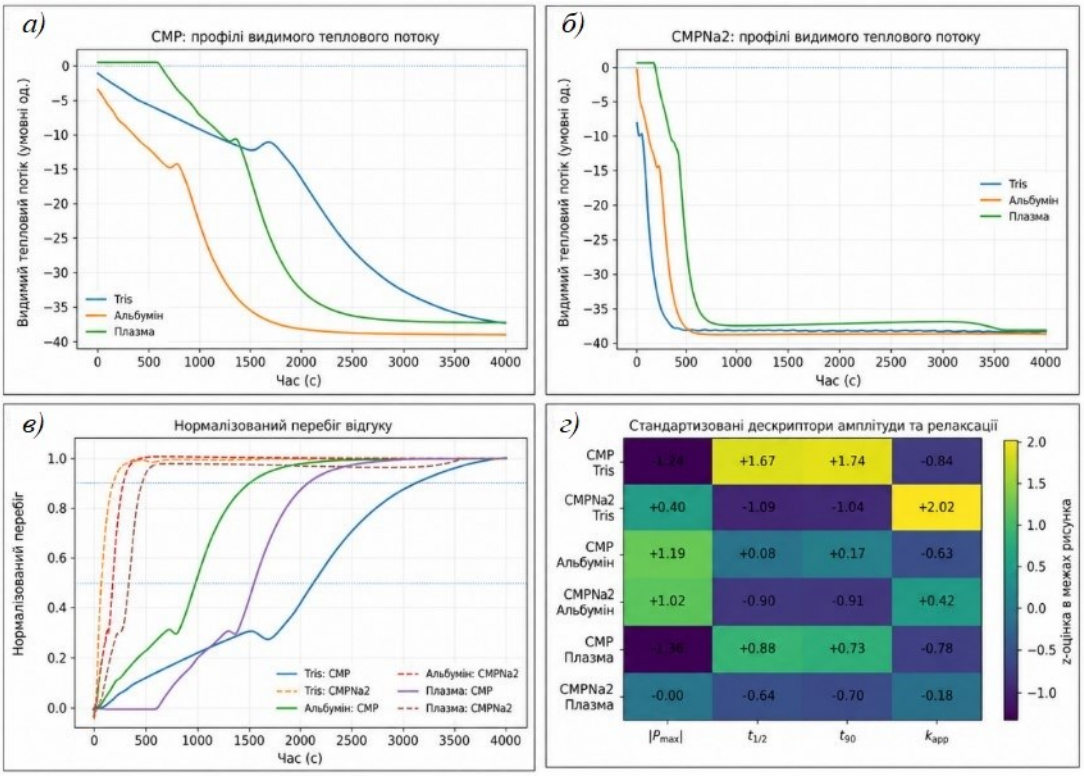


Рис. В.11. Повний аналіз ЦМФ та ЦМФNa_2 із роздільною здатністю в часі через Tris, альбумін і плазму

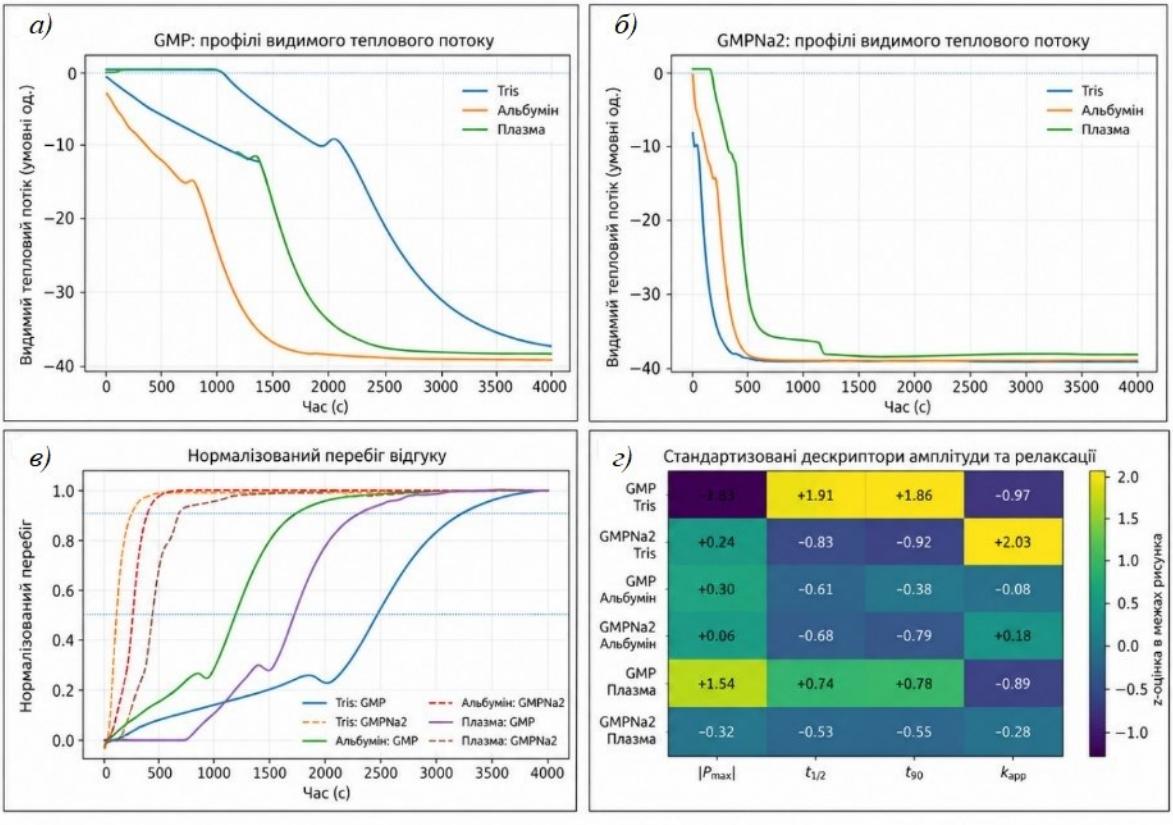


Рис. В.12. Повний аналіз ГМФ та ГМФNa_2 із роздільною здатністю в часі за допомогою Tris, альбуміну та плазми

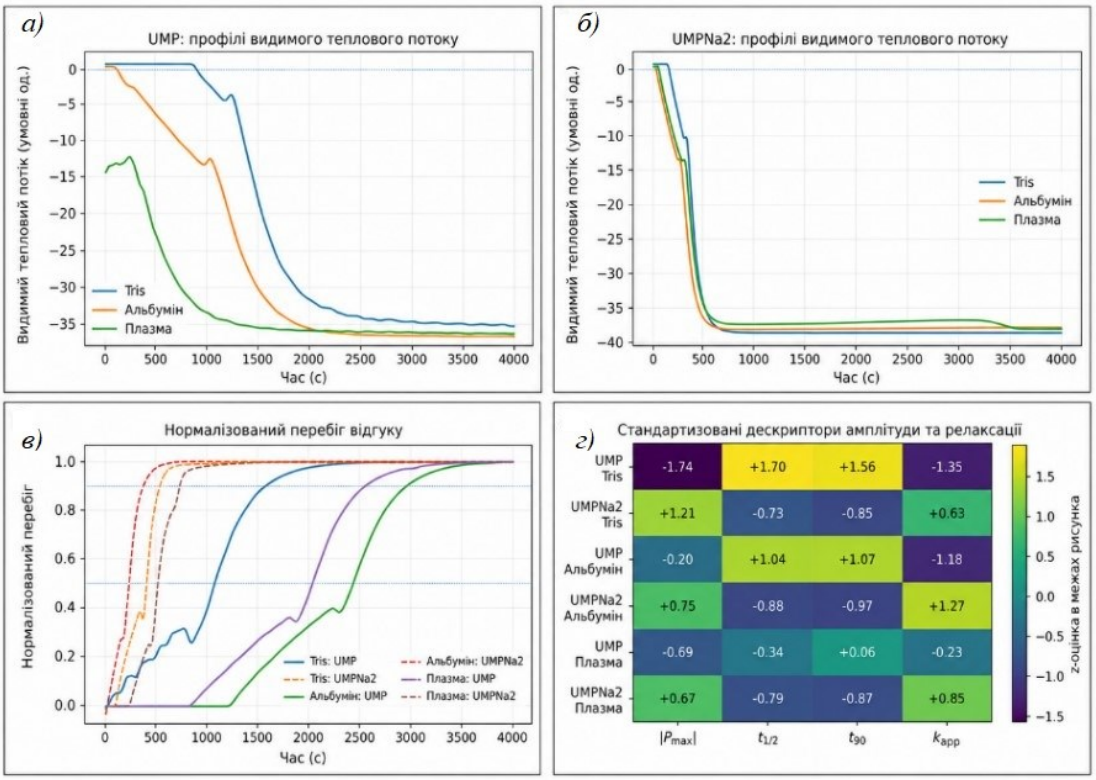


Рис. В.13. Повний аналіз УМФ та УМФNa_2 із роздільною здатністю в часі через Tris, альбумін і плазму

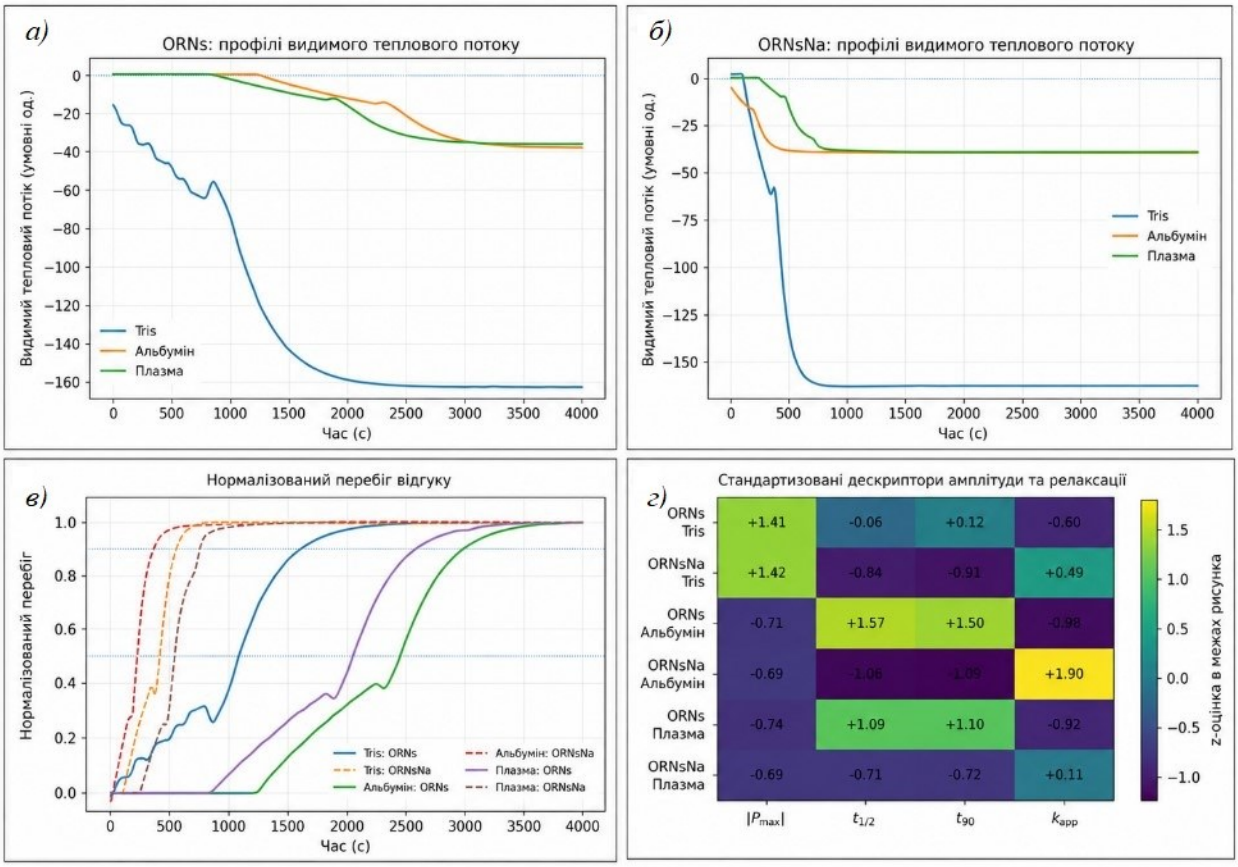


Рис. В.14.Повний аналіз з роздільною здатністю в часі для кислих і динатрієвих п репаратів ОРН у Tris, альбуміні та плазмі

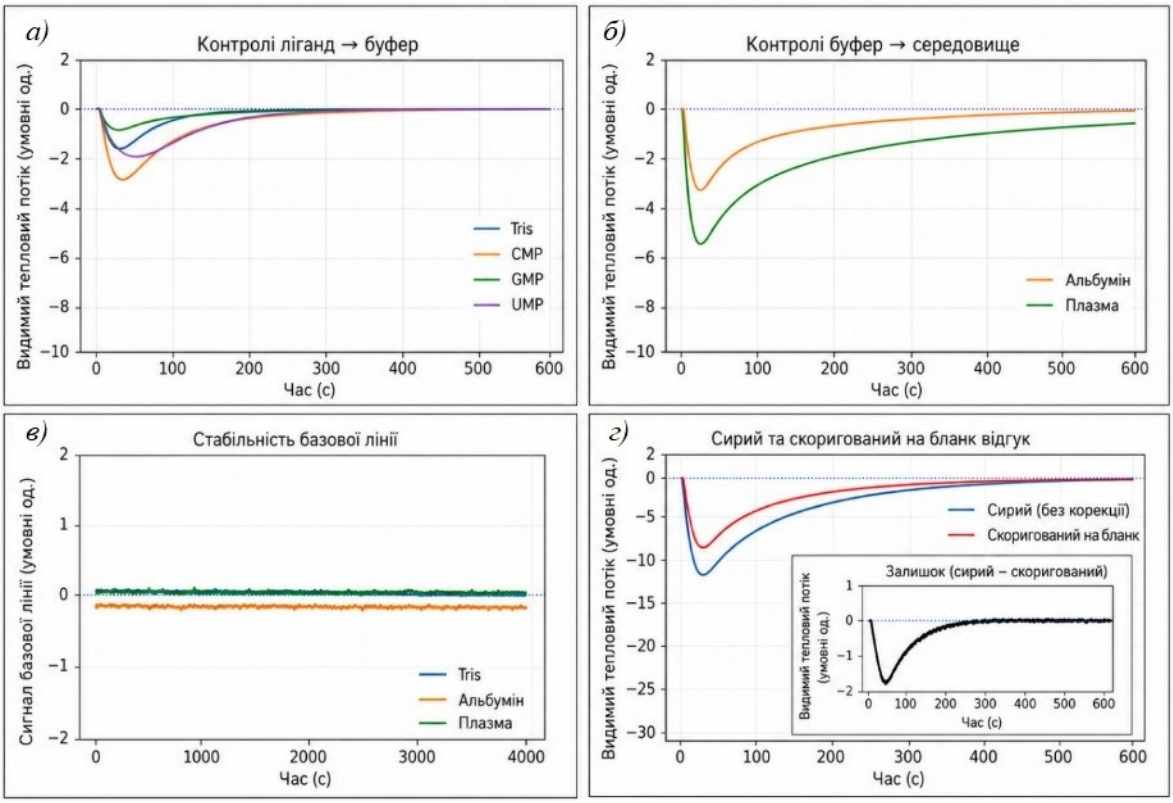


Рис. В.15. Контрольні вимірювання для одноразової інжекційної калориметрії. Контрольні профілі реєстрували на ITC Nano за 37 °C зі швидкістю перемішування 200 об/хв. а — контроль теплового ефекту розведення/змішування ліганда при введенні 50 мкл 50 мкМ розчину відповідного нуклеотиду в 600 мкл 50 мМ Tris–HCl, pH 7,5; наведено криві для контрольних розчинів і НМФ, зазначені на рисунку. б — контроль внеску самого середовища при у буфер об’ємом 600 мкл розчину альбуміну (60 мг/мл у PBS) або плазми («група III»). в — стабільність базової лінії для Tris–HCl, альбуміну та плазми протягом 4000 с. г — приклад вихідного часового профілю до корекції та після віднімання відповідного бланкового сигналу; на вставці показано різницю між сирими та скоригованими кривими. Вісь абсцис — час, с; вісь ординат — відносний тепловий сигнал в одиницях вихідної графічної шкали (умовні од.). Кожний контроль виконано у n = 5 незалежних повторів; лінії на панелях відображають окремі вимірювання.

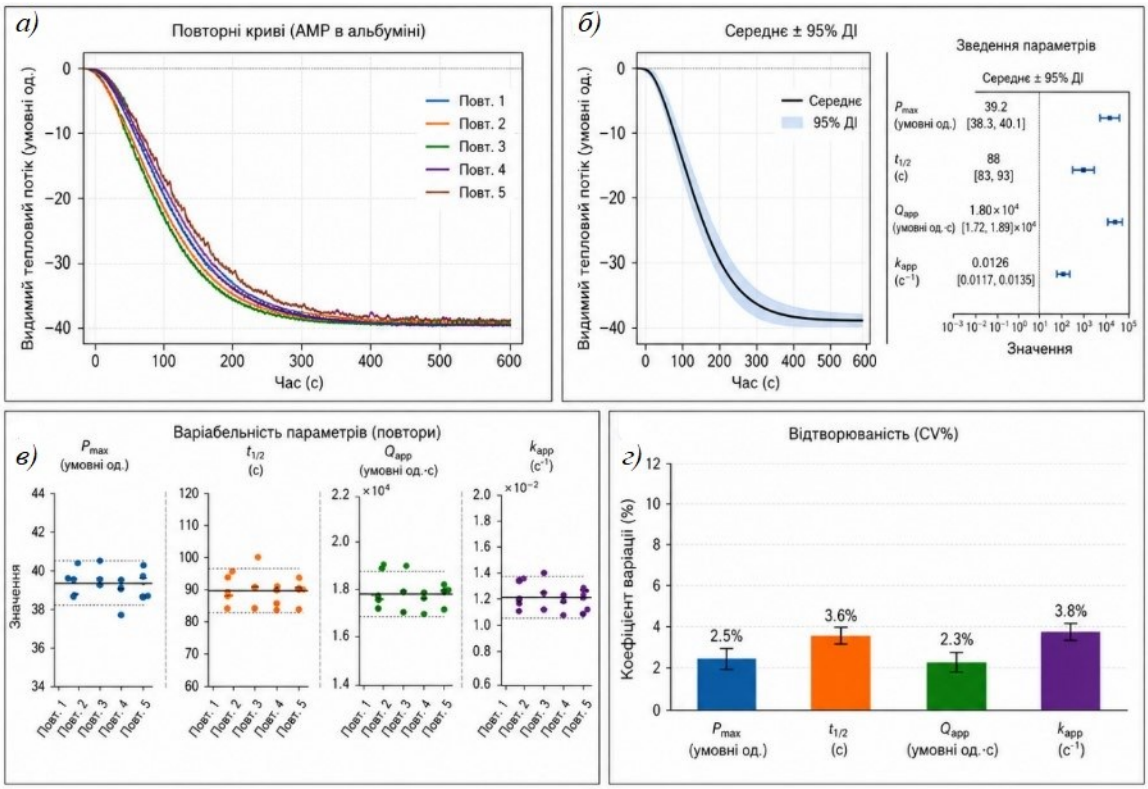


Рис. В.16. Оцінка повторюваності параметрів видимої теплової релаксації для АМФ в альбуміновому середовищі. У кожному вимірюванні 50 мкл 50 мкМ АМФ вводили в 600 мкл розчину альбуміну (60 мг/мл у PBS) при 37 °C і швидкості перемішування 200 об/хв; кінцева концентрація АМФ після змішування становила приблизно 3,85 мкМ. Наведено 5 окремих інжекційних повторів (n = 5); на графіках показано перші 600 с релаксаційного профілю. а — індивідуальні часові криві п’яти повторів; вісь ординат — видимий тепловий сигнал в умовних одиницях; вісь абсцис — час, с. б — середня часова крива; чорна лінія відповідає середньому значенню, заштрихована область — 95% довірчому інтервалу; праворуч наведено середні значення та 95% ДІ для P_{max}, $t_{1/2}$, Q і k; в — міжповторна варіабельність цих параметрів: точки відповідають окремим вимірюванням, суцільні горизонтальні лінії — середнім значенням, пунктирні — межам 95% ДІ. г — коефіцієнти варіації (CV) для Pmax, $t_{1/2}$, Q і k, які становили відповідно 2,5%, 3,6%, 2,3% і 3,8%.