

УДК 543.42:543.421/.422+543.423.3:57.088

**І. В. Говор, І. А. Федюняєва, О. М. Обухова, О. С. Колосова,
А. Л. Татарець**Державна наукова установа «Науково-технологічний комплекс »Інститут монокристалів» НАН України», пр. Науки 60, м. Харків, 61072, Україна;
e-mail: altatarets@gmail.com**ЗАСТОСУВАННЯ СТИРИЛОВОГО ТА СКВАРАЇНОВОГО
БАРВНИКІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНФОРМАЦІЙНИХ
ЗМІН У МОЛЕКУЛАХ ПРОТЕЇНІВ**

Досліджено спектральні властивості та FRET між двома барвниками, що мають поглинання у різних областях спектру, та оцінено можливість використання такої FRET-пари для визначення конформаційних змін у протеїнах. У якості донора використовували стириловий барвник (St), який поглинає в блакитній області спектру, а в якості акцептору — довгохвильовий сквараїн (Sq). Властивості St та Sq досліджено в полярному (фосфатний буфер), неполярному (хлороформ) середовищах та при нековалентному зв'язуванні з альбумінами BSA та HSA, а також вивчено вплив змін конформації цих протеїнів на спектральні властивості барвників та ефективність переносу енергії. Виявлено, що полярність середовища по-різному впливає на флуоресцентні властивості досліджених барвників: стириловий барвник має позитивний сольватофлуорохромізм, а сквараїн – негативний, але обидва барвники проявляють негативний сольватохромізм, а їх квантові виходи флуоресценції різко зростають у менш полярному оточенні. Незважаючи на спектральні відмінності комплексів St з різними альбумінами, їх квантові виходи співпадають, а у випадку сквараїну квантовий вихід для Sq-HSA майже у 2 рази вищий за Sq-BSA. При зміні конформації протеїнів барвники переходять до водної фази, внаслідок чого інтенсивність їх флуоресценції знижується майже до рівня флуоресценції вільного барвника у фосфатному буфері. В спектрах флуоресценції комплексів альбумінів з обома барвниками одночасно присутні дві смуги, що відповідають донору та акцептору. Встановлено, що ефективність переносу енергії між барвниками для HSA змінюється в 11.5 рази, а для BSA лише в 2.1 рази, тобто, за допомогою пари барвників St–Sq можлива реєстрація зміни конформації протеїнів, однак ефективність FRET між барвниками залежить від властивостей протеїну, що досліджується.

Ключові слова: FRET, стириловий барвник, сквараїновий барвник, альбуміни, зміни конформації.

Методи флуоресцентної спектроскопії з використанням лазерів у якості джерела збуджуючого світла [1, 2], широко застосовують у медико-біологічних дослідженнях та клінічній діагностиці. Найбільш розповсюдженими у таких флуоресцентних приладах є блакитні лазери з фіксованою довжиною хвилі збуджуючого світла 476 або 488 нм, що потребує використання барвників з поглинанням на відповідних довжинах хвиль.

Раніше ми вивчили вплив конформаційних змін бичачого сироваткового альбуміну (BSA) на ферстеровській резонансний перенос енергії (FRET) між чутливими до мікрооточення барвниками [3, 4]. Нами були досліджені сквараїни, довгохвильові барвники, флуоресценція яких збуджується червоними лазерами, які є менш розповсюдженими, ніж блакитні [5]. Через це ми дослідили FRET між барвниками, що мають поглинання у різних областях спектру для оцінки можли-

вості використання такої FRET-пари для визначення конформаційних змін у протеїнах. У якості донора використовували стириловий барвник (**St**), який поглинає в блакитній області спектру, а в якості акцептору – довгохвильовий сквараїн (**Sq**) (рис. 1).

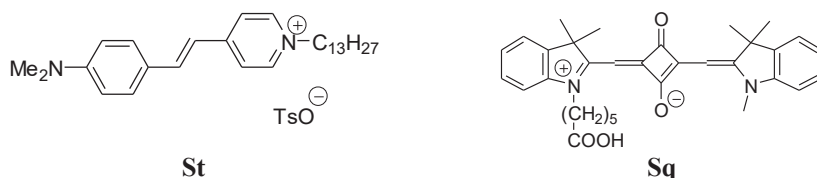


Рис. 1. Молекулярна будова стирилового (**St**) та сквараїнового (**Sq**) барвників

Fig. 1. Molecular structure of styryl (**St**) and squaraine (**Sq**) dyes

В цій роботі ми досліджуємо властивості **St** та **Sq** у фосфатному буфері (PB), хлороформі та при нековалентному зв'язуванні з альбумінами BSA та HSA (сироватковий альбумін людини), а також вплив змін конформації протеїнів на спектральні властивості барвників і ефективність переносу енергії. Конформаційні зміни в протеїнах, як і в роботах [6, 7], ініціювали додаванням сечовини в концентраціях до 7 М.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Барвники **St** і **Sq** синтезовано за методиками [8, 9]. Протеїни BSA та HSA отримано з Sigma. Спочатку готували концентровані розчини барвників з концентрацією 1.5×10^{-4} М у ДМФА та розчини протеїнів з концентрацією 1.5×10^{-4} М у 10 мМ фосфатному буфері з рН 7.4 (PB). Для одержання комплексів до 3 мл розчинника (PB або розчин сечовини у PB) додавали по 20 мкл аліквоти концентрованих розчинів протеїну та барвників. Усі вимірювання проводили при концентрації барвників і протеїнів 1 мкМ.

Спектральні вимірювання проводили за кімнатної температури на спектрофотометрі PerkinElmer Lambda 35 UV/Vis і спектрофлуориметрі Varian Cary Eclipse у стандартних 1 см кварцових кюветах. Усі експериментальні спектри флуоресценції виправляли математично з урахуванням спектральної чутливості спектрофлуориметру, а при визначенні FRET спектри флуоресценції також коригувались на ефект внутрішнього фільтра [10].

Ефективність переносу енергії (E_{FRET}) розраховували за формулою 1 [10]:

$$E_{\text{FRET}} = [1 - (I_{\text{DA}} / I_{\text{D}})] \times 100\%, \quad (1)$$

де I_{D} — інтенсивність флуоресценції донора (**St**) в максимумі у відсутності акцептора (**Sq**), I_{DA} — інтенсивність флуоресценції донора (**St**) у присутності акцептора (**Sq**) у максимумі смуги флуоресценції донора.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Спектральні характеристики барвників наведено у таблиці 1. Внаслідок сильної донорно-акцепторної взаємодії між електронодонорними та електроноакцепторними фрагментами барвників, обидві сполуки є чутливими до полярності оточення та змінюють свої спектральні властивості в залежності від полярності середовища. У водному розчині барвники майже не флуоресціюють (табл. 1), проте в менш полярному оточенні (хлороформ або водний розчин протеїну) їх квантові виходи зростають. Гасіння флуоресценції полярних молекул у полярних розчинниках, до яких відносяться водні розчини, є добре відомим фактом [11].

При переході від водного розчину до хлороформу спектри поглинання **St** та **Sq** зсуваються у довгохвильову частину спектру, відповідно, на 32 нм та 12 нм, тобто барвники проявляють негативний сольватохромізм. При цьому зміни у флуоресценції барвників є протилежно направлені, при зменшенні полярності середовища максимуми **Sq** зсуваються у довгохвильову область спектру, а **St**, навпаки, у короткохвильову (табл. 1). Таким чином, стириловий барвник має позитивний сольватофлуорохромізм, а сквараїн – негативний.

Таблиця 1
Спектральні характеристики барвників **St** і **Sq** у фосфатному буфері (PB),
хлороформі та у комплексах з протеїнами

Table 1

Spectral characteristics of **St** and **Sq** dyes in phosphate buffer (PB),
chloroform and in complexes with proteins

Барвник	Середовище	Максимум поглинання, нм	Максимум флуоресценції, нм	Квантовий вихід, %
St	PB	456	615	0.6
	хлороформ	488	585	6.7
	BSA	474	598	13.0
	HSA	486	601	13.0
Sq	PB	622	632	1.7
	хлороформ	634	644	25.0
	BSA	642	655	26.0
	HSA	637	649	48.0

Негативний сольватохромізм проявляється також при утворенні протеїнових комплексів, оскільки барвник розташовується у неполярних ділянках протеїну, так званих, “гідрофобних кишнях” [12, 13]. Незважаючи на досить близьку амінокислотну послідовність та третинну структуру сироваткових альбумінів [14], BSA та HSA відрізняються за гідрофільно-гідрофобними властивостями [15, 16], через що спектральні характеристики барвників залежать від протеїну, з яким вони утворюють комплекс. Відносно вільного барвника у PB, максимуми поглинання комплексів **St** мають батохромній зсув на 18 нм та 30 нм, відповідно, для

BSA та HSA. Максимуми флуоресценції при цьому зсуваються у короткохвильову частину спектру на 17 нм для BSA та 14 нм для HSA. Незважаючи на спектральні відмінності комплексів **St**-BSA та **St**-HSA, їх квантові виходи співпадають та становлять 13%.

На відміну від стирилового барвника, для скварайну зниження полярності оточення барвника у гідрофобних кишнях протеїнів приводить до довгохвильових зсувів максимумів як поглинання, так і флуоресценції комплексів **Sq**-BSA та **Sq**-HSA. Окрім спектральних максимумів комплекси відрізняються і за квантовим виходом, який для **Sq**-HSA у 1.8 рази вищий за **Sq**-BSA (табл. 1).

У розчинах сечовини з концентрацією від 0 М до 7 М відбувається розгортання третинної структури протеїнів, яке збільшується зі зростанням кількості сечовини [17, 18]. Збільшення ступеня денатурації протеїнів проявляється у поступовому зменшенні упорядкованості їх компактної структури [7, 19] та зростанні рівня гідратації неполярних областей протеїнів [20, 21] з подальшим їх руйнуванням. З цієї причини барвник не має відповідних умов для знаходження у гідрофобних кишнях протеїну та стає доступним до впливу розчинника (води), що відображається у зміні положення та інтенсивності смуг поглинання і випромінювання (рис. 2).

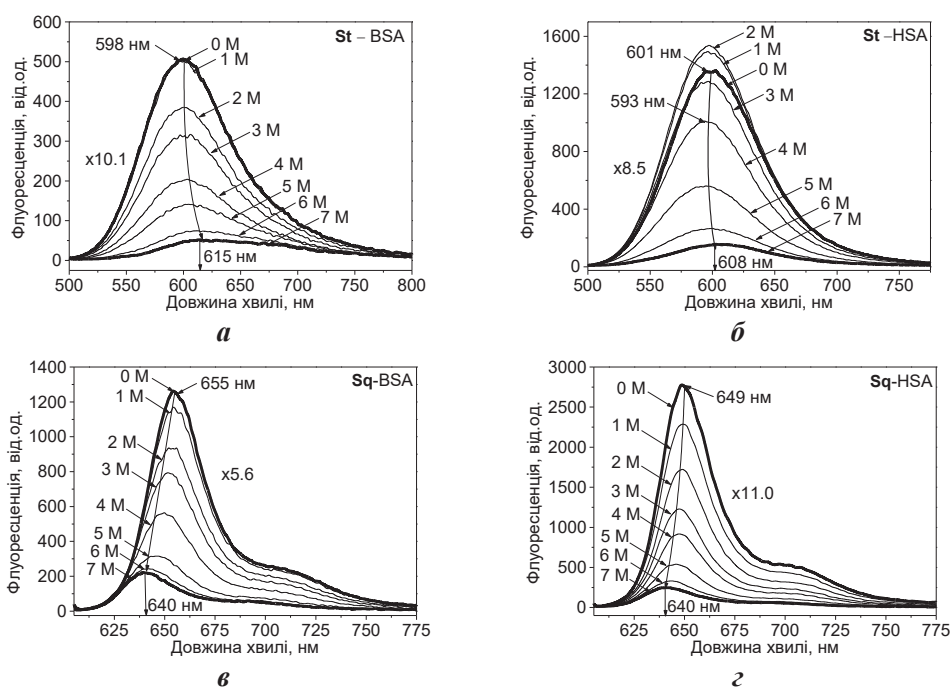


Рис. 2 Спектри флуоресценції комплексів **St**-BSA (а), **St**-HSA (б), **Sq**-BSA (в) та **Sq**-HSA (г) у розчинах сечовини ($c_{\text{сечовини}} = 0-7 \text{ M}$)

Fig. 2. Fluorescence spectra of **St**-BSA (a), **St**-HSA (b), **Sq**-BSA (c) and **Sq**-HSA (d) complexes in urea solutions ($c_{\text{urea}} = 0-7 \text{ M}$)

У відсутності сечовини ($c_{\text{сечовини}}=0$ М) максимум флуоресценції комплексу **St-BSA** становить 598 нм (рис. 2а). При додаванні сечовини максимум флуоресценції комплексу зсувається у довгохвильову область спектру та при $c_{\text{сечовини}}=7$ М сягає значення 615 нм, що дорівнює випромінюванню вільного барвника у РВ. Таким чином, при розгортанні **BSA St** повністю переходить до водної фази, внаслідок чого інтенсивність його флуоресценції знижується в 10.1 рази.

Більш складний характер змін мають спектри випромінювання комплексів **St** з **HSA** (рис. 2б). При $c_{\text{сечовини}}=0$ М максимум комплексу становить 601 нм, а додавання сечовини в кількості 1–2 М приводить до незначного зростання інтенсивності флуоресценції без зміни положення максимуму. Поступове збільшення концентрації сечовини до 5 М знижує інтенсивність випромінювання комплексу та зсуває максимум до 593 нм. В подальшому (при $c_{\text{сечовини}} > 5$ М) відбувається зворотній зсув спектрів у довгохвильову область до 608 нм. Такі складні зміни спектрів флуоресценції комплексів відбуваються внаслідок змін мікрооточення **St** при розгортанні молекул протеїну. При малих концентраціях сечовини розпушення щільної упаковки протеїну дає можливість барвнику глибше проникнути у молекулу **HSA**, що підвищує інтенсивність флуоресценції та зсуває максимуми у короткохвильову область. При значних концентраціях сечовини, коли протеїн денатурує, його гідрофобні області стають доступними для розчинника, що збільшує полярність оточення барвника і, як наслідок, смуги флуоресценції комплексів зсуваються у довгохвильову область, а їх інтенсивність зменшується у 8.5 разів у порівнянні з флуоресценцією **St-HSA** у РВ.

Для скваряїну збільшення полярності оточення, внаслідок розгортання протеїнів при додаванні сечовини, призводить до короткохвильового зсуву спектрів флуоресценції та зменшенню інтенсивності в 5.6 разів для **BSA** та 11.0 разів для **HSA** (рис. 2. в, з).

В спектрах флуоресценції подвійних комплексів **St-BSA-Sq** та **St-HSA-Sq** присутні дві смуги, що відповідають донору та акцептору, співвідношення інтенсивностей цих смуг змінюється зі зміною конформації протеїнів (рис. 3).

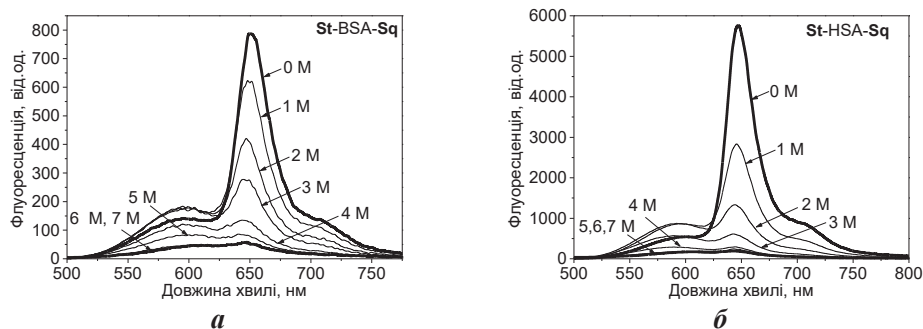


Рис. 3. Спектри флуоресценції подвійних комплексів **St-BSA-Sq** (а) та **St-HSA-Sq** (б) у розчинах сечовини ($c_{\text{сечовини}}=0-7$ М)

Fig. 3. Fluorescence spectra of **St-BSA-Sq** (a) and **St-HSA-Sq** (b) double complexes in urea solutions ($c_{\text{urea}}=0-7$ M)

Зі збільшенням ступеню розгортання молекул протеїнів інтенсивність смуги акцептора поступово зменшується, а протилежний ефект сольватофлуорохромізму барвників, стає причиною складної зміни інтенсивності смуги донора. У присутності 1–3 М сечовини інтенсивність смуги флуоресценції **St** спочатку зростає, відносно спектру у РВ, а потім зменшується при подальшому збільшенні концентрації сечовини.

Використовуючи спектри **St**-BSA, **St**-HSA та подвійних комплексів, ми розрахували значення ефективності переносу енергії між **St** та **Sq** при різних концентраціях сечовини, які відповідають поступовим змінам конформацій протеїнів (рис. 4).

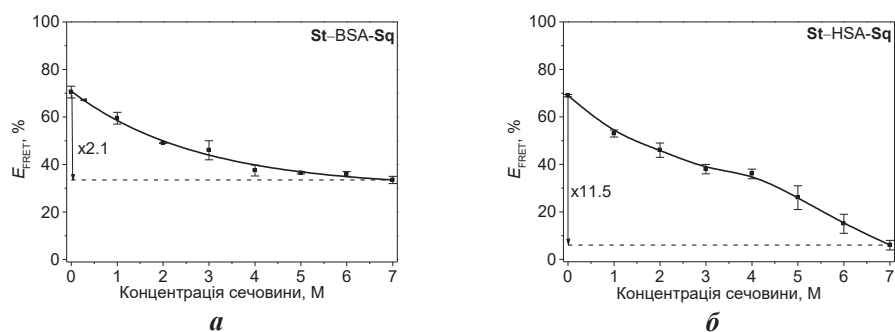


Рис. 4. Залежність ефективності переносу енергії (E_{FRET}) в подвійних комплексах **St-BSA-Sq** (а) та **St-HSA-Sq** (б) від концентрації сечовини

Fig. 4. Energy transfer efficiency (E_{FRET}) vs. urea concentration in **St-BSA-Sq** (a) and **St-HSA-Sq** (b) double complexes

Виявилось, що пара барвників стирил–скварайн у різному ступені чутлива до розгортання структури цих альбумінів. Ефективність переносу для HSA змінюється в 11.5 рази, а для BSA лише в 2.1 рази. Таким чином, за допомогою пари барвників **St-Sq** є можливою реєстрація зміни конформації протеїнів, однак ефективність FRET між барвниками залежить від властивостей протеїну, що досліджується.

ВИСНОВКИ

В результаті проведених досліджень встановлено, що полярність середовища різним чином впливає на флуоресцентні властивості барвників: стириловий барвник (**St**) має позитивний сольватофлуорохромізм, а скварайн (**Sq**) – негативний. В той самий час, обидва барвники проявляють негативний сольватохромізм, а їх квантові виходи різко зростають у менш полярному оточенні (хлороформ або комплекс з протеїном). Незважаючи на спектральні відмінності комплексів **St-BSA** та **St-HSA**, їх квантові виходи співпадають, а у випадку скварайну квантовий вихід для **Sq-HSA** майже у 2 рази вищий за **Sq-BSA**. При зміні конформа-

ції протеїнів (розгортанні) барвники переходять до водної фази, внаслідок чого інтенсивність їх флуоресценції знижується майже до рівня флуоресценції вільного барвника у РВ. В спектрах флуоресценції подвійних комплексів **St-BSA-Sq** та **St-HSA-Sq** присутні дві смуги, що відповідають донору та акцептору, а пара барвників пектр–скварайн у різному ступені чутлива до розгортання структури цих альбумінів: ефективність переносу для HSA змінюється в 11.5 рази, а для BSA лише у 2.1 рази. Тобто за допомогою пари **St-Sq** є можливою реєстрація змін конформації протеїнів, однак ефективність використання цієї пари залежить від властивостей протеїну, що досліджується.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Sanchez-Rico C., Voith von Voithenberg L., Warner L., Lamb C.D. and Sattler M. Effects of fluorophore attachment on protein conformation and dynamics studied by spFRET and NMR // *Chem.* – 2017. – Vol. 23, N 57. – P. 14267–14277. <https://doi.org/10.1002/chem.201702423>
2. Komatsu N., Terai K., Imanishi A., Kamioka Y., Sumiyama K., Jin T., Okada Y., Nagai T., Matsuda M. A platform of BRET-FRET hybrid biosensors for optogenetics, chemical screening, and in vivo imaging // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8. – 8984. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27174-x>
3. Govor I.V., Tatars A.L., Obukhova O.M., Terpetschnig E.A., Gellerman G., Patsenker L.D. Tracing the conformational changes in BSA using FRET with environmentally-sensitive squaraine probes // *Methods Appl. Fluoresc.* – 2016. – Vol. 4, N 2. – 024007. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/4/2/024007>
4. Говор I.B., Обухова O.M., Татарець A.L., Колосова O.C., Паценкер Л.Д. Вплив конформаційних змін у молекулі альбуміну (BSA) на спектральні властивості скварайнового та диціанометилен-скварайнового барвників // *Вісник ОНУ. Хімія.* – 2018. – Т. 23, № 3. – С. 67-79. [https://doi.org/10.18524/2304-0947.2018.3\(67\).140802](https://doi.org/10.18524/2304-0947.2018.3(67).140802)
5. Sanderson M.J., Smith I., Parker I., Bootman M.D. Fluorescence Microscopy // *Cold Spring Harbor Protocols.* – 2014. – Vol. 10. – P. 1042-1065. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>
6. Brennan J.M., Hollingshead S.E., Wilker J.J., Liu J.C. Critical factors for the bulk adhesion of engineered elastomeric proteins // *R. Soc. Open. Sci.* – 2018. – Vol. 5. – 171225. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.4079948>
7. Das A., Mukhopadhyay Ch. Urea-Mediated Protein Denaturation: A Consensus View // *J. Phys. Chem. B* – 2009. – Vol. 113. – P. 12816–12824. <https://doi.org/10.1021/jp906350s>
8. Dubur G.Y., Dobretsov G.E., Deme A.K., Dubure R.R., Lapshin E.N., Spirin M.M. Fluorescent probes based on styrylpyridinium derivatives: optical properties and membrane binding // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 1984. – Vol. 10. – P. 123-134. [https://doi.org/10.1016/0165-022x\(84\)90032-0](https://doi.org/10.1016/0165-022x(84)90032-0)
9. Volkova K.D., Kovalska V.B., Tatars A.L., Patsenker L.D., Kryvorotenko D.V., Yarmoluk S.M. Spectroscopic study of squaraines as protein-sensitive fluorescent dyes // *Dyes and Pigments.* – 2007. – Vol. 72, N 3. – P. 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.09.007>
10. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. – 3rd ed., Springer, 2006. – 960 p.
11. Mishra A., Behera R.K., Behera P.K., Mishra B.K., Behera G.B. Cyanines during the 1990s: A Review // *Chem. Rev.* – 2000. – Vol. 100, N. 6. – P. 1973–2012. <https://doi.org/10.1021/cr990402t>
12. Chang-Ying Y., Yi L., Dan Zh., Jun-Cheng Z., Jie D. Luminescence of aniline blue in hydrophobic cavity of BSA // *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* – 2007. – Vol. 188. – P. 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2006.11.017>
13. Xing P., Niu Y., Mu R., Wang Z., Xie D., Li H., Dong L., Wang C. A pocket-escaping design to prevent the common interference with near-infrared fluorescent probes in vivo // *Nature Commun.* – 2020. – Vol. 10. – 1573. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15323-8>
14. Gelamo E.L., Tabak M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants // *Spectrochim. Acta Part A.* – 2000. – Vol. 56. – P. 2255–2271. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(00\)00313-9](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(00)00313-9)
15. Akdogan Y., Reichenwallner J., Hinderberger D. Evidence for Water-Tuned Structural Differences in Proteins: An Approach Emphasizing Variations in Local Hydrophilicity // *PloS ONE.* – 2012. – Vol. 7, Iss. 9. – e45681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045681>
16. Mukherjee S.K., Gautam S., Biswas S., Kundu J., Chowdhury P.K. Do Macromolecular Crowding Agents Exert Only an Excluded Volume Effect? A Protein Solvation Study // *J. Phys. Chem. B.* – 2015. – Vol. 119. – P. 14145–14156. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b09446>

17. Kumaran R., Ramamurthy P. Denaturation Mechanism of BSA by Urea Derivatives: Evidence for Hydrogen-Bonding Mode from Fluorescence Tools // J. Fluoresc. – 2011. – Vol. 217. – P. 1499–1508. <https://doi.org/10.1007/s10895-011-0836-0>
18. Bennion B.J., Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100, N 9. – 5142–5147. <https://doi.org/10.1073/pnas.0930122100>
19. Boeris V., Farruggia B., Romanini D., Picó G. How flexible polymers interact with proteins and its relationship with the protein separation method by protein–polymer complex formation // Protein J. – 2009. – Vol. 28, N 5. – P. 233–239. <https://doi.org/10.1007/s10930-009-9188-x>
20. Itri R., Caetano W., Barbosa L.R.S., Baptista M.S. Effect of Urea on Bovine Serum Albumin in Aqueous and Reverse Micelle Environments Investigated by Small Angle X-Ray Scattering, Fluorescence and Circular Dichroism // Brazilian J. Phys. – 2004. – Vol. 34, N 1. – P. 58–63. <https://doi.org/10.1590/S0103-97332004000100009>
21. Zhang T., Li D. Influences of urea and pH on the interaction of cinchonidine with bovine serum albumin by steady state fluorescence spectroscopy // Spectrochim. Acta Part A. – 2013. – Vol. 112. – P. 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.04.032>

Стаття надійшла до редакції 03.08.2020

**И. В. Говор, И. А. Федюняева, Е. Н. Обухова, О. С. Колосова,
А. Л. Татарец**

ГНУ «НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины», пр. Науки 60, г. Харьков,
61072, Украина; e-mail: altatarets@gmail.com

ПРИМЕНЕНИЕ СТИРИЛОВОГО И СКВАРАИНОВОГО КРАСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В МОЛЕКУЛАХ ПРОТЕИНОВ

В результате исследований спектральных свойств стирилового (**St**) и сквараинового (**Sq**) красителей в полярном, неполярном растворителях и при нековалентном связывании с альбуминами БСА и ЧСА обнаружено, что полярность среды влияет на флуоресцентные свойства красителей по-разному: стироловый краситель имеет положительный сольватифлуорохромизм, а сквараин – отрицательный. Оба красителя проявляют отрицательный сольватохромизм, а их квантовые выходы флуоресценции существенно увеличиваются с уменьшением полярности среды. Несмотря на спектральные различия комплексов **St**-BSA и **St**-HSA, их квантовые выходы одинаковы, а в случае сквараина квантовый выход для **Sq**-HSA почти в 2 раза выше, чем для **Sq**-BSA. При изменении конформации белка, инициированных мочевиной, красители переходят в водную среду, в результате чего интенсивность их флуоресценции снижается почти до уровня флуоресценции свободного красителя в фосфатном буфере. В спектрах флуоресценции двойных комплексов **St**-BSA-**Sq** и **St**-HSA-**Sq** присутствуют две полосы, соответствующие донору и акцептору, соотношение интенсивностей которых изменяется с увеличением степени разворачивания протеинов. При этом пара **St** и **Sq** по-разному чувствительна к конформационным изменениям. Эффективность переноса энергии между красителями в случае HSA изменяется в 11.5 раз, а для BSA только в 2.1 раза. Таким образом, пара **St**-**Sq** обладает способностью регистрировать изменения конформации белков, но эффективность применения этой пары зависит от свойств исследуемого белка.

Ключевые слова: FRET, стироловый краситель, сквараиновый краситель, альбумины, конформационные изменения.

**I. V. Govor, I. A. Fedyunyayeva, O. M. Obukhova, O. S. Kolosova,
A. L. Tatarsky**

State Scientific Institution "Institute for Single Crystals" of the
National Academy of Sciences of Ukraine, 60 Nauky Ave., Kharkiv, 61072, Ukraine;
e-mail: altatarsky@gmail.com

THE APPLICATION OF STYRYL AND SQUARAINE DYES FOR DETERMINATION OF CONFORMATION CHANGES IN PROTEIN MOLECULES

It is known, that the application of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) between two dyes absorbing in different spectrum regions allows shifting of the excitation wavelength into the blue region. We investigated spectral properties and FRET between styryl (St) and squaraine (Sq) dyes to evaluate the possibility of using such FRET-pair to determine conformational changes in proteins. Spectral properties of St and Sq in polar (phosphate buffer), nonpolar (chloroform) solvents and in non-covalent complexes with BSA (bovine serum albumin) and HSA (human serum albumin) were studied. The effect of changes in protein conformation induced by urea solutions of various concentrations on the spectral properties of dyes and energy transfer efficiency was also studied. It was found that the polarity of the medium affects the fluorescent properties of dyes in different ways: styryl dye has a positive solvatochromism, while the squaraine dye has the negative one. Both dyes show negative solvatochromism, and their quantum yields substantially increase in a less polar environment. Despite the spectral differences of the St-BSA and St-HSA complexes, their quantum yields are the same, and in case of squaraine dye the quantum yield for Sq-HSA is almost twice higher than for Sq-BSA. When the conformation of protein changes, the dyes go into the aqueous phase, as a result the intensity of their fluorescence decreases almost to the level of fluorescence of the free dye in phosphate buffer. There are two bands corresponding to the donor and acceptor in the fluorescence spectra of the double complexes St-BSA-Sq and St-HSA-Sq. The pair of styryl-squaraine dyes is differently sensitive to the conformation changes in these albumins caused by urea: the FRET efficiency for HSA changes by 11.5 times, while for BSA only by 2.1 times. Thus, the St-Sq pair has the ability to detect a change in the conformation of proteins, but the efficiency of the pair depends on the properties of the protein under study.

Keywords: FRET, Styryl dye, Squaraine dye, Albumins, Conformational changes.

REFERENCES

1. Sanchez-Rico C., Voith von Voithenberg L., Warner L., Lamb C.D., Sattler M. *Effects of fluorophore attachment on protein conformation and dynamics studied by spFRET and NMR*. Chem., 2017, vol. 23, no 57, pp. 14267–14277. <https://doi.org/10.1002/chem.201702423>
2. Komatsu N., Terai K., Imanishi A., Kamioka Y., Sumiyama K., Jin T., Okada Y., Nagai T., Matsuda M. *A platform of BRET-FRET hybrid biosensors for optogenetics, chemical screening, and in vivo imaging*. Sci. Rep., 2018, vol. 8, 8984. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27174-x>
3. Govor I.V., Tatarsky A.L., Obukhova O.M., Terpetschnig E.A., Gellerman G., Patsenker L.D. *Tracing the conformational changes in BSA using FRET with environmentally-sensitive squaraine probes*. Methods. Appl. Fluoresc., 2016, vol. 4, no 2, 024007. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/4/2/024007>
4. Govor I.V., Obukhova O.M., Tatarsky A.L., Kolosova O. S., Patsenker L.D. *Vplyv konformacijnih zmin u molekuli al'buminu (BSA) na spektral'ni vlastivosti skvaraïnovogo ta dicianometilen-skvaraïnovogo barvnikiv*. [The impact of conformational changes in albumin molecule (BSA) on the spectral properties of squaraine and dicyanomethylene squaraine dyes]. Visn. Odes. nac. univ. Him., vol. 23, no 3, pp. 67-79. [https://doi.org/10.18524/2304-0947.2018.3\(67\).140802](https://doi.org/10.18524/2304-0947.2018.3(67).140802) (in Ukrainian)
5. Sanderson M. J., Smith I., Parker I., Bootman M. D. *Fluorescence Microscopy*. Cold Spring Harbor Protocols, 2014, vol. 10, pp. 1042-1065. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>
6. Brennan J.M., Hollingshead S.E., Wilker J.J., Liu J.C. *Critical factors for the bulk adhesion of engineered elastomeric proteins*. R. Soc. Open. Sci., 2018, vol. 5, 171225. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.4079948>

7. Das A., Mukhopadhyay Ch. *Urea-Mediated Protein Denaturation: A Consensus View*. J. Phys. Chem. B, 2009, vol. 113, pp. 12816–12824. <https://doi.org/10.1021/jp906350s>
8. Dubur G. Y., Dobretsov G. E., Deme A. K., Dubure R. R., Lapshin E. N., Spirin M. M. *Fluorescent probes based on styrylpyridinium derivatives: optical properties and membrane binding*. J. Biochem. Biophys. Methods., 1984, vol. 10, pp. 123-134. [https://doi.org/10.1016/0165-022x\(84\)90032-0](https://doi.org/10.1016/0165-022x(84)90032-0)
9. Volkova K.D., Kovalska V.B., Tatarets A.L., Patsenker L.D., Kryvorotenko D.V., Yarmoluk S.M. *Spectroscopic study of squaraines as protein-sensitive fluorescent dyes*. Dyes and Pigments, 2007, vol. 72, no 3, pp. 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.09.007>
10. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. – 3rd ed., Springer, 2006, 960 p.
11. Mishra A., Behera R.K., Behera P.K., Mishra B.K., Behera G.B. *Cyanines during the 1990s: A Review*. Chem. Rev, 2000, vol. 100, no 6, pp. 1973–2012. <https://doi.org/10.1021/cr990402t>
12. Chang-Ying Y., Yi L., Dan Zh., Jun-Cheng Z., Jie D. *Luminescence of aniline blue in hydrophobic cavity of BSA*. J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 2007, vol. 188, pp. 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2006.11.017>
13. Xing P., Niu Y., Mu R., Wang Z., Xie D., Li H., Dong L., Wang C. *A pocket-escaping design to prevent the common interference with near-infrared fluorescent probes in vivo*. Nature Commun., 2020, vol. 10, 1573. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15323-8>
14. Gelamo E.L., Tabak M. *Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants*. Spectrochim. Acta Part A, 2000, vol. 56, pp. 2255–2271. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(00\)00313-9](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(00)00313-9)
15. Akdogan Y., Reichenwallner J., Hinderberger D. *Evidence for Water-Tuned Structural Differences in Proteins: An Approach Emphasizing Variations in Local Hydrophilicity*. PLoS ONE, 2012, vol. 7, no 9, e45681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045681>
16. Mukherjee S. K., Gautam S., Biswas S., Kundu J., and Chowdhury P. K. *Do Macromolecular Crowding Agents Exert Only an Excluded Volume Effect? A Protein Solvation Study*. J. Phys. Chem. B, 2015, vol. 119, pp. 14145–14156. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b09446>
17. Kumaran R., Ramamurthy P. *Denaturation Mechanism of BSA by Urea Derivatives: Evidence for Hydrogen-Bonding Mode from Fluorescence Tools*. J. Fluoresc., 2011, vol. 217, pp. 1499–1508. <https://doi.org/10.1007/s10895-011-0836-0>
18. Bennion B.J., Daggett V. *The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, vol. 100, no 9, pp. 5142–5147. <https://doi.org/10.1073/pnas.0930122100>
19. Boeris V., Farruggia B., Romanini D., Picó G. *How flexible polymers interact with proteins and its relationship with the protein separation method by protein–polymer complex formation*. Protein J., 2009, vol. 28, no 5, pp. 233–239. <https://doi.org/10.1007/s10930-009-9188-x>
20. Itri R., Caetano W., Barbosa L.R.S., Baptista M.S. *Effect of Urea on Bovine Serum Albumin in Aqueous and Reverse Micelle Environments Investigated by Small Angle X-Ray Scattering, Fluorescence and Circular Dichroism*. Brazilian J. Phys., 2004, vol. 34, no 1, pp. 58–63. <https://doi.org/10.1590/S0103-97332004000100009>
21. Zhang T., Li D. *Influences of urea and pH on the interaction of cinchonidine with bovine serum albumin by steady state fluorescence spectroscopy*. Spectrochim. Acta Part A., 2013, vol. 112, pp. 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.04.032>