

УДК 543.42:543.421/.422+543.423.3:57.088

І. В. Говор¹, О. М. Обухова¹, А. Л. Татарець¹, О. С. Колосова¹, Л. Д. Паценкер²¹Державна наукова установа «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» НАН України», пр. Науки 60, м. Харків, 61072, Україна; e-mail: altatarets@gmail.com²Кафедра хімії, Факультет природничих наук, Аріельський університет, Аріель, 40700, Ізраїль

ВПЛИВ КОНФОРМАЦІЙНИХ ЗМІН У МОЛЕКУЛІ АЛЬБУМІНУ (BSA) НА СПЕКТРАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ СКВАРАЇНОВОГО ТА ДИЦІАНОМЕТИЛЕН-СКВАРАЇНОВОГО БАРВНИКІВ

Досліджено вплив конформаційних змін в молекулі сироваткового альбуміну бика (BSA) на спектральні властивості сквараїнового барвника *Sq1* при ковалентному та нековалентному зв'язуванні з BSA; диціанометиленового сквараїнового барвника *Sq2* при нековалентному зв'язуванні з BSA; а також можливість використання ферстерівського резонансного переносу енергії (FRET) між барвниками *Sq1* (донор) і *Sq2* (акцептор) для флуоресцентного моніторингу конформаційних змін в молекулі BSA. Конформаційні зміни ініціювали сечовиною в концентраціях до 8 М. Барвник *Sq1* поглинає і випромінює у водному середовищі при 635 нм і 645 нм, а барвник *Sq2* – відповідно, 654 нм і 670 нм. Встановлено, що ковалентне зв'язування барвників *Sq1* і *Sq2* з BSA, а також утворення їх комплексів з BSA приводять до довгохвильового зсуву смуг поглинання і флуоресценції, та зростання квантового виходу флуоресценції. Розгортання молекули BSA зменшує інтенсивність флуоресценції у комплексі барвника *Sq2* з BSA в три рази, а зміна інтенсивності флуоресценції барвника *Sq1* у кон'югаті з BSA складає лише 20%. У той же час, ефективність переносу енергії (FRET) з барвника-донора *Sq1*, кон'югованого з BSA, на некон'югований барвник-акцептор *Sq2* зменшується при конформаційних змінах в BSA значно більше, приблизно в 10 разів. Таким чином, метод FRET є найбільш чутливим і може бути запропонований для моніторингу конформаційних змін в молекулах BSA.

Ключові слова: сквараїнові барвники, альбумін, конформація, флуоресценція, FRET

В організмі людини білки виконують багато різноманітних функцій (транспортна, захисна, рухова та інші). Вплив внутрішніх та зовнішніх факторів, таких як захворювання, лікарські препарати, температура або осмос, можуть призводити до зворотних або незворотних змін у конформації білка та втрати його функціональної здатності [1, 2]. Наслідком цього є, так звані, білкові конформаційні захворювання людини [3], до яких відносяться такі захворювання, як хвороба Паркінсона та системний амілоїдоз [4, 5]. Тому дослідження конформаційних змін у білках є надзвичайно важливим аналізом у біологічних та медико-біологічних дослідженнях, а також у клінічній діагностиці та попередженні багатьох захворювань.

Сучасні найчутливіші, прості та надійні методи моніторингу конформаційних змін в білках використовують флуоресценцію барвників, які зв'язуються з молекулою білка. Існують два класичних метода застосування барвників для дослідження конформаційних змін. Один з цих методів – метод флуоресцентного зонду – використовує флуоресцентний барвник-зонд, який здатен нековалентно,

тобто без утворення хімічного зв'язку, зв'язуватися з молекулою білка та змінювати свою флуоресценцію (інтенсивність або положення спектральних смуг) при змінах мікрооточення середовища, ініційованих конформаційними перетвореннями білка. Зв'язування барвника з білком здійснюється завдяки так званим гідрофобним [6], специфічним [7] та електростатичним [8] взаємодіям.

Інший класичний метод використовує два барвника-мітчика, які ковалентно зв'язують з різними місцями молекули білка [2]. Через те, що спектр поглинання одного з цих барвників (акцептора, **A**), перекривається зі спектром випромінювання іншого (донора, **D**), здійснюється так званий ферстерівський резонансний перенос енергії електронного збудження (FRET) [1] від донора до акцептора: при збудженні донору спостерігається флуоресценція як донору, так і акцептору. Ефективність FRET залежить від відстані між молекулами донору та акцептору. Зміни цієї відстані, що відбуваються при зміні конформації білка, впливають на ефективність FRET, і таким чином, зміни FRET можуть використовуватися для моніторингу конформаційних змін білка.

Нещодавно ми запропонували новий підхід до флуоресцентного моніторингу конформаційних змін білків. Цей підхід засновано на вимірюванні змін в ефективності FRET між двома зондами, донором та акцептором, нековалентно зв'язаними з молекулою білка [9]. Такий підхід дозволив суттєво підвищити чутливість визначення конформаційних змін в молекулі сироваткового альбуміну бика (BSA).

В цій роботі ми досліджуємо вплив конформаційних змін в молекулі BSA на спектральні властивості сквараїнового барвника **Sq1** при ковалентному та нековалентному зв'язуванні з BSA; диціанометиленового сквараїнового барвника **Sq2** при нековалентному зв'язуванні з BSA; а також можливість використання FRET між барвниками **Sq1 (D)** і **Sq2 (A)** для моніторингу конформаційних змін в молекулі BSA. Хімічні структури сквараїну **Sq1** та диціанометиленового сквараїну **Sq2** наведено на рис. 1. Конформаційні зміни в молекулі BSA, як і в роботах [10, 11], ініціювали сечовиною в концентраціях до 8 М.

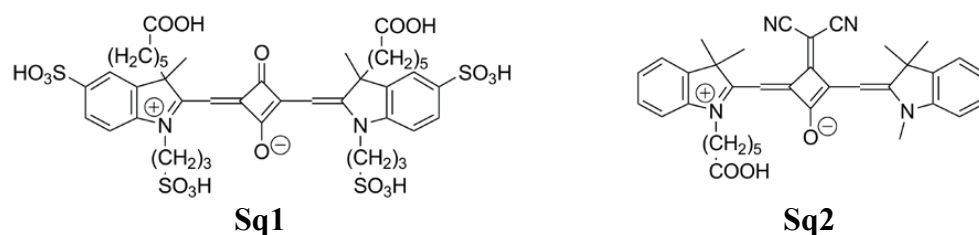


Рис. 1. Молекулярна будова сквараїну **Sq1** та диціанометиленового сквараїну **Sq2**

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Барвники **Sq1** і **Sq2** синтезовано за методиками, описаними в роботі [12, 13], їх структуру підтверджено спектрами ^1H ЯМР, а чистоту перевірено методом високоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Сpektри ^1H ЯМР вимірювали на спектрометрі Varian Mercury VX-200 (200 МГц) у ДМСО- d_6 з використанням ГМДС як внутрішнього стандарту.

Sq1 {4-[3-(5-карбоксіпентил)-3-метил-5-сульфо-1-(3-сульфопропил)-3*H*-індоліл-1-ій-2-іл]метилен}-2-{[3-(5-карбоксіпентил)-3-метил-5-сульфо-1-(3-сульфопропил)індолін-2-іліден]метил}-3-оксоциклобутен-1-олат): ¹H ЯМР (200 Гц, ДМСО-d₆), δ, м.ч.: 7.64 (2H, с, аром.), 7.61 (2H, д, аром., 4.2 Гц), 7.40 (2H, д, аром., 4.2 Гц), 5.91 (2H, с, *CH*), 4.25 (4H, широкий с, *NCH*₂), 2.63 (4H, т, *CH*₂SO₃H, 6 Гц), 2.01 (4H, т, *CH*₂COOH, 6.3 Гц), 2.09–1.92 (8H, м, *CH*₂), 1.66 (6H, с, *CH*₃), 1.38–0.91 (8H, м, *CH*₂), 0.77–0.33 (4H, м, *CH*₂).

Sq2 {4-[(1-(5-карбоксіпентил)-3,3-диметил-3*H*-індол-1-ій-2-іл]метилен}-3-(диціанометил)-2-((1,3,3-триметиліндолін-2-іліден)метил)циклобутен-1-олат): ¹H ЯМР (ДМСО-d₆), δ, м.ч.: 11.95 (1H, широкий с, COOH), 7.55 (2H, д, 7.3 Гц, аром.), 7.48–7.33 (4H, м, аром.), 7.32–7.17 (2H, м, аром.), 6.31 (2H, с, *CH*), 4.03 (2H, т, 6.4 Гц, *NCH*₂), 3.60 (3H, с, *NCH*₃), 2.19 (2H, т, 7.0 Гц, *CH*₂COOH), 1.68 (12H, с, (*CH*₃)₂), 1.80–1.29 (6H, м).

BSA (особливо очищений від насичених кислот, фракція V) отримано з Sigma. Концентрований розчин BSA ($c_{\text{BSA}} = 1.5 \times 10^{-4}$ М) готували в 10 мМ фосфатному буфері з рН 7.4 (PB). Експерименти проводили при концентрації BSA 1 мкМ. Для цього 20 мкл концентрованого розчину BSA додавали до 3 мл PB або розчину сечовини ($c_{\text{urea}} = 1\text{--}8$ М). Розчини сечовини (чда, Україна) з концентраціями від 1 до 8 М готували розчиненням сухої сечовини у PB.

Дослідження комплексів протеїну з барвником проводили при однаковій концентрації BSA ($c_{\text{BSA}} = 1$ мкМ) і барвника ($c_{\text{dye}} = 1$ мкМ). Для утворення комплексів **Sq2**–BSA (нековалентне зв'язування) до 3 мл розчину BSA ($c_{\text{BSA}} = 1$ мкМ) у PB або у розчині сечовини ($c_{\text{urea}} = 1\text{--}8$ М) додавали 20 мкл розчину **Sq2** у ДМФА (концентрація барвника у стоковому розчині становила $1.5 \cdot 10^{-4}$ М).

Для одержання кон'югату сквараїна **Sq1** з BSA (ковалентне зв'язування) карбоксильну групу барвника перетворювали на *N*-гідроксисукцинімідний (NHS) естер за методикою [14]. Для цього до розчину 7 мг карбонової кислоти **Sq1** в 200 мкл сухого ДМФА додавали 6.3 мг тетрафторборату *O*-(*N*-сукцинімідил)-*N,N,N',N'*-тетраметилсечовини (TSTU) та 15 мкл *N,N*-діізопропілетиламіну (DIPEA). Реакцію проводили 1 годину при 24 °С, при постійному перемішуванні. Отриманий NHS-естер без виділення та додаткової очистки використовували для зв'язування з BSA, яке проводили у бікарбонатному буфері (рН 9.0) при кімнатній температурі, як наведено в методиках [15, 16]. Кон'югат відокремлювали від незв'язаного барвника методом гель-проникної хроматографії на Sephadex G50.

Спектральні вимірювання проводили при кімнатній температурі на спектрофотометрі PerkinElmer Lambda 35 UV/Vis и спектрофлуориметрі Varian Cary Eclipse у стандартних 1 см кварцових кюветах.

Для визначення молярного коефіцієнту екстинкції 10 мг барвника розчиняли у 50 мл PB. Отриманий розчин розбавляли до концентрації барвника $c_{\text{dye}} \sim 0.5$ мкМ та вимірювали спектри поглинання у 5 см кварцових кюветах. Молярний коефіцієнт екстинкції розраховували за законом Бугера–Ламберта–Бера. Вимірювання проводили декілька разів та усереднювали отримані данні. Помилка вимірювання не перевищувала $\pm 2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Квантові виходи флуоресценції вимірювали в 1 см кварцових кюветках із застосуванням в якості стандарту **Cy5**TM (GE Healthcare Life Sciences) у РВ ($\Phi_F = 27\%$) [17, 18]. Квантовий вихід визначали за формулою 1 [1]:

$$\Phi_F = \Phi_{FCy5} \cdot (F/F_{Cy5}) \cdot (A_{Cy5} / A) \cdot (n^2/n_{Cy5}^2), \quad (1)$$

де Φ_{FCy5} квантовий вихід **Cy5**, F_{Cy5} та F інтегральні інтенсивності спектрів флуоресценції ($F = \int I(\lambda) d\lambda$) **Cy5** та досліджуваного барвника, A_{Cy5} та A абсорбція на довжині хвилі збудження флуоресценції **Cy5** та барвника, n_{Cy5}^2 та n^2 відповідно, показник заломлення розчинника **Cy5** (РВ) та показники заломлення середовища, у якому знаходився досліджуваний барвник (РВ або розчини сечовини різної концентрації). Показники заломлення визначали на рефрактометрі РФ-22. Значення показника заломлення для $c_{urea} = 1-8$ М наведені в таблиці 1. Отримані значення співпадають з даними для показників заломлення розчинів сечовини наведених у [19].

Таблиця 1

Показники заломлення (n) розчинів сечовини

($c_{urea} = 1-8$ М) при 20 °С

c_{urea} , М	0	1	2	3	4	5	6	7	8
n	1.3333	1.3421	1.3503	1.3588	1.3673	1.3755	1.3839	1.3918	1.4000

Кількість молекул барвника **Sq1**, зв'язаних з однією молекулою протеїну, (Dye-to-Protein ratio, D/P) визначали за формулою 2 [18, 20]:

$$D/P = A_{conj(\lambda 643)} \cdot \epsilon_{BSA} / (A_{conj(\lambda 278)} - x \cdot A_{conj(\lambda 643)}) / \epsilon_{Sq1}, \quad (2)$$

де $A_{conj(\lambda 643)}$ і $A_{conj(\lambda 278)}$ – абсорбція кон'югату **Sq1**–BSA відповідно у максимумі довгохвильової смуги барвника (643 нм) та на довжині хвилі 278 нм (BSA); ϵ_{BSA} – молярний коефіцієнт поглинання BSA на 278 нм ($45000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); ϵ_{Sq1} – молярний коефіцієнт поглинання барвника **Sq1** у максимумі ($192000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); x – коефіцієнт, який враховує вклад поглинання барвника у кон'югаті на 278 нм; $x = A_{Sq1(\lambda 278)} / A_{Sq1(\lambda_{max})}$, де $A_{Sq1(\lambda 278)}$ та $A_{Sq1(\lambda_{max})}$ абсорбція барвника **Sq1** у розчині РВ на довжині хвилі 278 нм та у максимумі довгохвильової смуги (635 нм).

При визначенні FRET усі експериментальні спектри флуоресценції виправляли математично з урахуванням спектральної чутливості спектрофлуориметру та ефекту внутрішнього фільтра за формулою 3 [1]:

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{(A_{ex} + A_{em})/2}, \quad (3)$$

де F_{corr} – виправлений спектр флуоресценції, F_{obs} – експериментальний спектр флуоресценції, A_{ex} – абсорбція на довжині хвилі збудження, A_{em} – абсорбція на відповідній довжині хвилі спектра флуоресценції.

Ефективність переносу енергії (E_{FRET}) розраховували за формулою 4 [1]:

$$E_{FRET} = [1 - (I_{DA} / I_D)] \cdot 100\%, \quad (4)$$

де I_D – інтенсивність флуоресценції донора (**Sq1**) в максимумі у відсутності акцептора (**Sq2**), I_{DA} – інтенсивність флуоресценції донора (**Sq1**) у присутності акцептора (**Sq2**) в максимумі смуги флуоресценції донора.

Кожний спектральний експеримент проводили 3 рази та одержані результати усереднювали.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Спектри поглинання та флуоресценції барвників **Sq1** і **Sq2** у буфері (pH 7.4) та при зв'язуванні з BSA наведено на рис. 2, а основні спектральні характеристики представлено у таблиці 2.

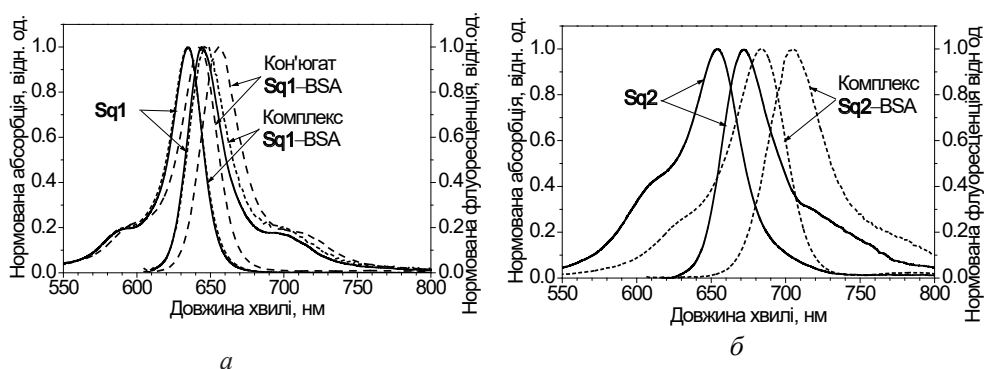


Рис. 2. Спектри поглинання та флуоресценції **Sq1** (а) і **Sq2** (б), виміряні у фосфатному буфері pH 7.4 у вільному стані (—) та при ковалентному (---) і нековалентному (····) зв'язуванні з BSA

Барвник **Sq1** у фосфатному буфері має максимуми смуг поглинання та флуоресценції 635 нм і 645 нм. Диціанометиленовий скварайн **Sq2** є більш довгохвильовим і поглинає/випромінює, відповідно, на 654 нм і 670 нм. Квантові виходи флуоресценції обох барвників у буфері є невисокими, 12% і 1%, але ефективність випромінювання суттєво збільшується при зв'язуванні з білком, що важливо для їх практичного застосування. Гасіння флуоресценції скварайнів у водних середовищах є добре відомим ефектом. Він пов'язаний зі значними безрадіаційними втратами енергії електронного збудження на переорієнтацію полярних молекул барвника у збудженому стані в полярному середовищі [21]. Досліджені барвники характеризуються малими значеннями Стоксових зсувів ($\Delta\nu_{st}$): 240 cm^{-1} для **Sq1**, і дещо більший – 370 cm^{-1} для **Sq2**. Зростання безрадіаційних втрат енергії барвника **Sq2** пов'язане, скоріш за все, з більш полярною будовою його молекули через наявність сильної електроноакцепторної диціанометиленової групи у скваратному фрагменті.

Додавання 7–8 М сечовини до водних розчинів барвників **Sq1** та **Sq2** збільшує інтенсивності їх флуоресценції, відповідно, в 1.5 і 2.3 рази, а квантовий вихід збільшується приблизно однаково, в 1.8 та 1.9 разів (рис. 3). Інтенсивність абсорбції **Sq1** при цьому має незначну тенденцію до зниження, а для **Sq2** вона збільшується в 1.3 рази.

Таблиця 2

Спектральні характеристики барвників **Sq1** і **Sq2**, комплексу і кон'югату **Sq1**–BSA та комплексу **Sq2**–BSA у фосфатному буфері (рН 7.4). Довжини хвиль максимумів поглинання (λ_{\max} (abs)) та флуоресценції (λ_{\max} (em)), Стоксові зсуви ($\Delta\nu_{st}$), молярні коефіцієнти абсорбції (ϵ) та квантові виходи флуоресценції (Φ_f)

Зразок	λ_{\max} (abs)	ϵ , M ⁻¹ cm ⁻¹	λ_{\max} (em)	Φ_f %	$\Delta\nu_{st}$
Барвник Sq1	635	192000	645	12	240
Барвник Sq1 у присутності BSA ($c_{Sq1} = 1$ мкМ, $c_{BSA} = 1$ мкМ)	635	н.в.*	647	14	290
Барвник Sq1 при $c_{urea} = 8$ М	640	н.в.*	648	22	
Кон'югат Sq1 –BSA (D/P=1.5) у РВ	643	н.в.*	656	33	310
Кон'югат Sq1 –BSA (D/P=1.5) при $c_{urea} = 8$ М	643	н.в.*	656	35	310
Барвник Sq2	654	138000	670	1.0	370
Комплекс Sq2 –BSA ($c_{Sq2} = 1$ мкМ, $c_{BSA} = 1$ мкМ)	684	162000	703	47	460

* Не визначали.

Утворення комплексів барвник–білок відбувається за рахунок гідрофобних [6], специфічних [7] і електростатичних взаємодій [8]. Через високу гідрофільність (наявність чотирьох сульфогруп) барвник **Sq1** майже не утворює комплексів з BSA, про що свідчить той факт, що його спектральні характеристики у присутності BSA практично не відрізняються від таких у буфері.

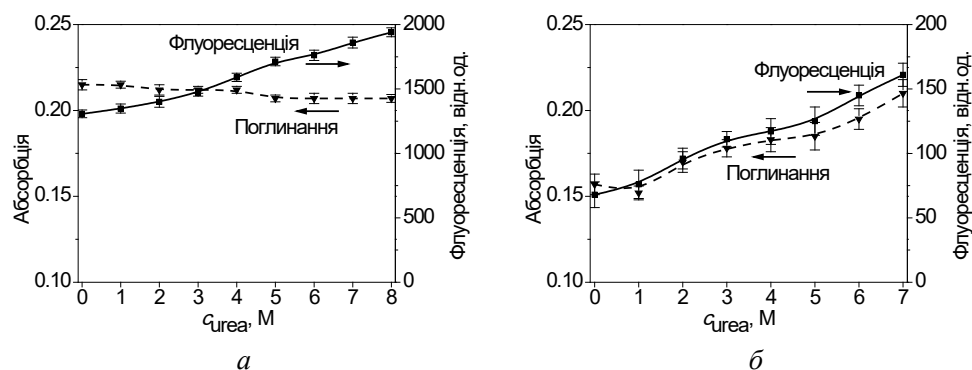


Рис. 3. Залежність інтенсивності абсорбції (-----) та флуоресценції (—) скварайнів **Sq1** (а) і **Sq2** (б) ($c_{Sq1} = c_{Sq2} = 1$ мкМ) від концентрації сечовини

Ковалентне зв'язування **Sq1** з BSA приводить до зсуву спектрів поглинання та флуоресценції у довгохвильову область та збільшенню квантового виходу майже втричі, з 12% до 33%. Скоріш за все, це відбувається завдяки зменшенню кон-

формаційної лабільності молекули барвника при іммобілізації на макромолекулі білка [12].

Барвник **Sq2**, на відміну від **Sq1**, не має жодної сульфогрупи, і тому суттєво агрегує у водному середовищі (рис. 2,б), про що свідчить збільшене плече (615 нм) у смугі поглинання та суттєве порушення дзеркальної симетрії між смугами поглинання та флуоресценції. Інтенсивність смуги агрегації зменшується при переході барвника з водної фази до більш гідрофобного мікрооточення макромолекули BSA.

Утворення комплексу **Sq2** з BSA приводить до значного довгохвильового зсуву спектрів поглинання (з 654 нм до 684 нм) та флуоресценції (з 670 нм до 703 нм). Зменшення полярності мікрооточення **Sq2** при комплексоутворенні з BSA спричиняє зменшення безрадіаційних втрат енергії та суттєво збільшує квантовий вихід, з 1% до 47%.

Чутливість **Sq1** та **Sq2** до конформаційних змін BSA досліджували за зміною інтенсивності флуоресценції кон'югату **Sq1**-BSA та комплексу **Sq2** з BSA при додаванні сечовини.

Додавання сечовини в кількості $c_{\text{urea}} = 0-8$ М до розчину кон'югату **Sq1**-BSA ($c_{\text{conj}} = 0.48$ мкМ) не впливає на положення і форму спектрів поглинання та флуоресценції, а також на інтенсивність абсорбції кон'югату, проте значно впливає на інтенсивність флуоресценції (рис. 4).

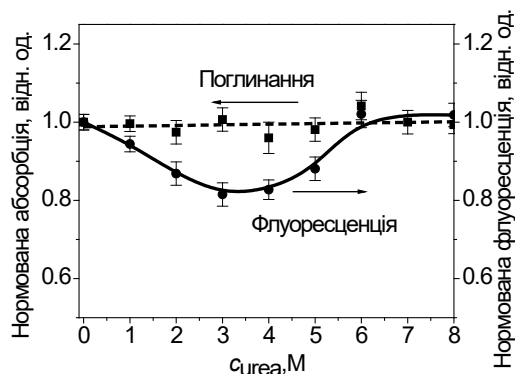


Рис. 4. Залежність інтенсивності абсорбції (----) та флуоресценції (—) кон'югата скварайну **Sq1**-BSA ($D/P = 1.5$) від концентрації сечовини ($c_{\text{urea}} = 0-8$ М) при концентрації кон'югату $c_{\text{conj}} = 0.48$ мкМ

Залежність інтенсивності флуоресценції кон'югату від концентрації сечовини ($c_{\text{urea}} = 0-8$ М) має мінімум при $c_{\text{urea}} \sim 3$ М. Це пов'язано із наявністю двох процесів, що протилежно впливають на флуоресценцію **Sq1** у кон'югата з BSA у різних діапазонах концентрації сечовини. У діапазоні $c_{\text{urea}} = 0-3$ М розгортання молекули білка під дією сечовини призводить до зміни мікрооточення барвника на більш полярне, що веде до зменшення квантового виходу з 33% при $c_{\text{urea}} = 0$ М до 27% при $c_{\text{urea}} = 3$ М. Але, починаючи з $c_{\text{urea}} \sim 4$ М квантовий вихід **Sq1** зростає зі збільшенням концентрації сечовини і при $c_{\text{urea}} = 8$ М сягає 35%, що є наслідком безпосередньої взаємодії барвника із сечовиною (табл. 2, рис. 3).

Спектральні властивості **Sq1** при ковалентному зв'язуванні з BSA виявляють недостатню чутливість до конформаційних змін білку і тому не можуть використовуватись для практичних застосувань.

Дослідження впливу сечовини на комплекси **Sq2** з BSA показало, що збільшення концентрації сечовини від нуля до $c_{\text{urea}} = 7 \text{ M}$ приводить до зміни форми, положення та інтенсивності їх смуг поглинання (рис. 5,а), а також до короткохвильового зсуву та значного зниження інтенсивності смуг флуоресценції (рис. 5,б). Зі збільшенням концентрації сечовини смуги флуоресценції зміщуються у короткохвильову область на 24 нм, а інтенсивність зменшується приблизно в 3 рази. Зміни в спектрах поглинання мають більш складний характер – при підвищенні концентрації сечовини смуга поглинання зсувається у короткохвильову область, але її інтенсивність спочатку зменшується, а напівширина збільшується, після чого інтенсивність знову зростає, а напівширина зменшується. Мінімум поглинання протеїнового комплексу сквараїна **Sq2** спостерігається при $c_{\text{urea}} \sim 2.7 \text{ M}$ (рис. 5,а).

Такий складний характер зміни смуги поглинання при збільшенні концентрації сечовини є наслідком конформаційних змін в молекулах BSA, тобто розгортання їх третинної структури. Конформаційні зміни BSA змушують барвник переходити з більш гідрофобної протеїнової фази (з комплексу) до більш гідрофільного водного розчину (руйнування комплексу). У цих двох фазах спектр поглинання барвнику відрізняється за декількома параметрами – максимумом довжини хвилі поглинання, напівшириною та інтенсивністю. Максимуми смуг поглинання та флуоресценції барвника **Sq2** у білку без сечовини становлять, відповідно, 684 нм і 703 нм (табл. 2), а при додаванні сечовини ($c_{\text{urea}} = 8 \text{ M}$) ці максимуми зміщуються, відповідно, до 660 нм і 679 нм, тобто наближуються до таких у водному розчині (654 нм і 670 нм).

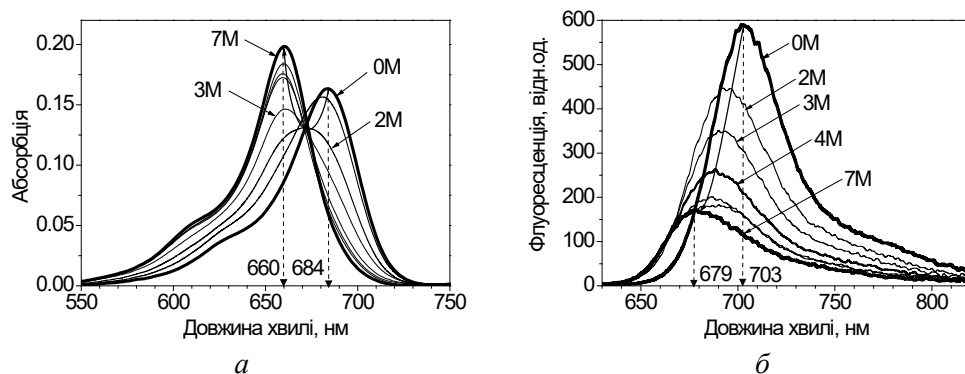


Рис. 5. Залежність смуг поглинання (а) та флуоресценції (б) комплексу сквараїна **Sq2** з BSA ($c_{\text{Sq2}} = 1 \text{ мкМ}$, $c_{\text{BSA}} = 1 \text{ мкМ}$) від концентрації сечовини

Далі ми дослідили перенос енергії з кон'югованого сквараїну **Sq1** (D) на некон'югований сквараїн **Sq2** (A). Дослідження проводили при мольному співвідношенні компонентів $c_{\text{Sq1}} : c_{\text{BSA}} : c_{\text{Sq2}} = 1.5:1:2$. Мольні співвідношення були обрані таким чином, щоб **Sq2** був у невеликому надлишку відносно **Sq1** у кон'югаті з

$D/P = 1.5$, що дозволяє збільшити статистичну можливість утворення комплексу **Sq2** з кон'югованим BSA та збільшити початкове значення ефективності FRET, яке при додаванні сечовини та розгортанні молекули BSA повинно зменшуватися.

В спектрі випромінювання системи «кон'югат **Sq1**–BSA – **Sq2**» спостерігаються дві смуги, які відповідають обом барвникам, **Sq1** (**D**) та **Sq2** (**A**) (рис. 6). У відсутності сечовини положення першої, менш інтенсивної смуги (~656 нм) відповідає випромінюванню **Sq1**, кон'югованого з BSA, а положення іншої смуги (~703 нм) – комплексу **Sq2** з BSA.

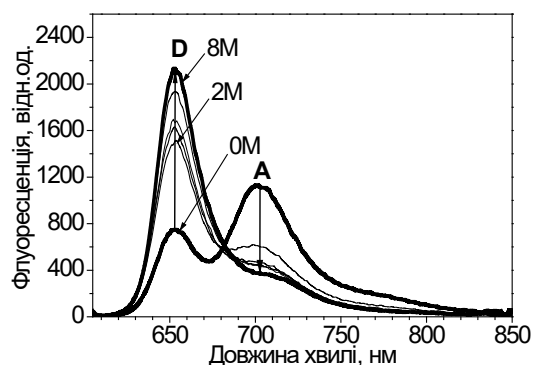


Рис. 6. Спектри флуоресценції системи «кон'югат **Sq1**–BSA – **Sq2**» у розчинах сечовини ($c_{urea} = 0-8$ M)

Додавання сечовини до системи «кон'югат **Sq1**–BSA+некон'югований **Sq2**» приводить до розгортання третинної структури протеїну, внаслідок чого відстань між барвниками **Sq1** та **Sq2** збільшується. Це приводить до зменшення ефективності FRET (рис. 7), що супроводжується зменшенням інтенсивності флуоресценції акцептора **Sq2** (при ~703 нм) та збільшенням флуоресценції кон'югованого з протеїном донору **Sq1** (~656 нм, рис. 6).

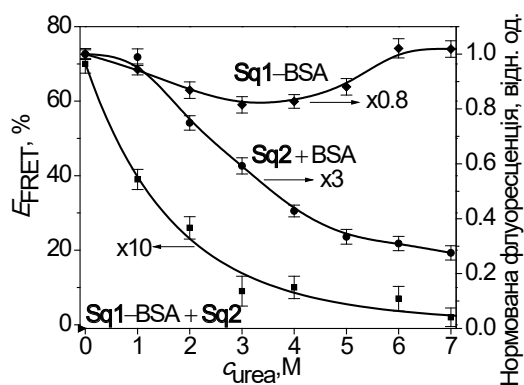


Рис. 7. Залежність ефективності переносу енергії (E_{FRET}) в системі «кон'югат **Sq1**–BSA + **Sq2**» та інтенсивності флуоресценції кон'югату скваріаїна **Sq1**–BSA і комплексу скваріаїна **Sq2** з BSA від концентрації сечовини

При збільшенні концентрації сечовини від нуля до 6 М ефективність FRET у «кон'югат **Sq1**–BSA – некон'югований сквараїн **Sq2**» зменшується майже в 10 разів – з 71% до 7%. Це є найбільш суттєвим відгуком на конформаційні перетворення в BSA, ніж при зміні інтенсивності флуоресценції комплексу сквараїна **Sq2** з BSA, яка зменшується лише у 3 рази (рис. 7). В кон'югаті **Sq1**-BSA найбільша зміна інтенсивності флуоресценції складає лише 20% і відповідна функція має мінімум, який не дозволяє її використовувати для дослідження конформаційних змін.

ВИСНОВКИ

Вивчено вплив ініційованих сечовиною конформаційних змін в молекулі BSA на спектральні властивості сквараїнових барвників **Sq1** та **Sq2**, а також на ефективність FRET між барвником-донором **Sq1**, кон'югованим з BSA, і некон'югованим барвником-акцептором **Sq2**. Встановлено, що ковалентне зв'язування барвників **Sq1** і **Sq2** з BSA, а також утворення їх комплексів з BSA приводять до довгохвильового зсуву смуг поглинання і флуоресценції, та зростання квантового виходу флуоресценції. Розгортання молекули BSA зменшує інтенсивність флуоресценції комплексу барвника **Sq2** з BSA в 3 рази, а зміна інтенсивності флуоресценції кон'югата **Sq1**–BSA складає лише 20%. У той же час, ефективність переносу енергії (FRET) з барвника-донора **Sq1**, кон'югованого з BSA, на некон'югований барвник-акцептор **Sq2** зменшується при конформаційних змінах в BSA значно більше, приблизно в 10 разів. Таким чином, цей метод є найбільш чутливим і може бути запропонований для моніторингу конформаційних змін в молекулах BSA.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Lakowicz J.R.* Principles of Fluorescence Spectroscopy. – 3rd ed., Springer, 2006, 960 p.
2. *Szöllösi J., Damjanovich S., Mátyus L.* Application of Fluorescence Resonance Energy Transfer in the Clinical Laboratory: Routine and Research // *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*. – 1998. – Vol. 34. – P.159–179. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19980815\)34:4<159::AID-CYTO1>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19980815)34:4<159::AID-CYTO1>3.0.CO;2-B)
3. *Carrell R.W., Lomas D.A.* Conformational disease. // *Lancet*. – 1997. – Vol. 350. – P. 134–138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02073-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02073-4)
4. *Ellisdon A.M., Bottomley St.P.* The Role of Protein Misfolding in the Pathogenesis of Human Diseases. // *Life*. – 2004. – Vol. 56, N 3. – P. 119–123. <https://doi.org/10.1080/15216540410001674003>
5. *Carrell R.W.* Cell toxicity and conformational disease. // *Trends in Cell Biology*. – 2005. – Vol. 15, N 11. – P. 574–580. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.09.005>
6. *Dorh N., Zhu1 Sh., Dhungana K.B., Pati R., Luo F.-T., Liu H., Tiwari A.* BODIPY-based fluorescent probes for sensing protein surface-hydrophobicity. // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 18337. <https://doi.org/10.1038/srep18337>
7. *Oushiki D., Kojima H., Takahashi Y., Komatsu T., Terai T., Hanaoka K., Nishikawa M., Takakura Y., Nagano T.* Near-Infrared Fluorescence Probes for Enzymes Based on Binding Affinity Modulation of Squarylium Dye Scaffold. // *Analyt. Chem*. – 2012. – Vol. 84. – P. 4404–4410. <https://doi.org/10.1021/ac300061a>
8. *Maiti J., Biswasa S., Chaudhurib A., Chakraborty S., Chakraborty S., Das R.* Environment Sensitive Fluorescent Analogue of Biologically Active Oxazoles Differentially Recognizes Human Serum Albumin and Bovine Serum Albumin: Photophysical and Molecular Modeling Studies. // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2017. – Vol. 175. – P. 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.12.032>
9. *Govor I.V., Tatarets 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>

10. 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://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.c.4079948>
11. Das A., Mukhopadhyay Ch. Urea-Mediated Protein Denaturation: A Consensus View. // J. Phys. Chem. B – 2009. – Vol. 113. – P. 12816–12824. <https://dx.doi.org/10.1021/jp906350s>
12. Tatars A.L., Fedyunyayeva I.A., Dyubko T.S., Povrozin Ye.A., Doroshenko A.O., Terpetschnig E.A., Patsenker L.D. Synthesis of water-soluble, ring-substituted squaraine dyes and their evaluation as fluorescent probes and labels. // Anal. Chem. Acta. – 2006. – Vol. 570, N 2. – P. 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.019>
13. 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>
14. Bannwarth W., Knorr R. Formation of carboxamides with N,N,N',N'-tetramethyl(succinimido)uronium tetrafluoroborate in aqueous / organic solvent systems. // Tetrahedron Lett. – 1991. – Vol. 32, N 9. – P. 1157–1160. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)92032-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)92032-X)
15. Knorr R., Trzeciak A., Bannwarth W. New coupling reagents in peptide chemistry. // Tetrahedron Lett. – 1989. – Vol. 30, N 15. – P. 1927–1930. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)99616-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)99616-3)
16. Lin Yu., Weissleder R., Tung Ch.-H. Novel near-infrared cyanine fluorochromes: synthesis, properties, and bioconjugation. // Bioconjugate Chem. – 2002. – Vol. 13, N 3. – P. 605–610. <https://doi.org/10.1021/bc0155723>
17. Parker C.A. Photoluminescence of solutions. // Elsevier, Amsterdam. – 1968, 544 p.
18. Mujumdar R.B., Ernst L.A., Mujumdar S.R., Lewis Ch.J., Waggoner A.S. Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. // Bioconjugate Chem. – 1993. – Vol. 4. – P. 105–111. <https://doi.org/10.1021/bc00020a001>
19. Warren J.R., Gordon Ju.A. On the Refractive Indices of Aqueous Solutions of Urea. // Phys. Chem. – 1966. – Vol. 70. – P. 297–300. <https://doi.org/10.1021/j100873a507>
20. Mujumdar S.R., Mujumdar R.B., Grant Ch.M., Waggoner A.S. Cyanine-labeling reagents: Sulfo benzindocyanine succinimidyl esters. // Bioconjugate Chem. – 1996. – Vol. 7. – P. 356–365. <https://doi.org/10.1021/bc960021b>
21. 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>

Стаття надійшла до редакції 13.07.2018

**И. В. Говор¹, Е. Н. Обухова¹, А. Л. Татарец¹, О. С. Колосова¹,
Л. Д. Паценкер²**

¹ ГНУ «НТК «Інститут монокристаллов» НАН України», пр. Науки 60, г. Харків, 61072, Україна; e-mail: altatars@ gmail.com

² Кафедра хімії, Факультет естественных наук, Ариельський університет, Ариель 40700, Ізраїль

ВЛИЯНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В МОЛЕКУЛЕ АЛЬБУМИНА (BSA) НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА СКВАРАИНОВОГО И ДИЦИАНОМЕТИЛЕН- СКВАРАИНОВОГО КРАСИТЕЛЕЙ

Исследовано влияние конформационных изменений в молекуле бычьего сывороточно-го альбумина (BSA) на спектральные свойства сквараинового красителя *Sq1* при ковалентном и нековалентном связывании с BSA; дицианометиленового сквараинового красителя *Sq2* при нековалентном связывании с BSA, а так же возможность использования ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) между двумя красителями *Sq1* (донор) и *Sq2* (акцептор) для флуоресцентного мониторинга конформационных изменений в молекуле BSA. Конформационные изменения инициировали мочевиной в концентрации до 8 М. Краситель *Sq1* поглощает и флуоресцирует в водной среде при 635 нм и 645 нм, а краситель *Sq2* – соответственно, 654 нм и 670 нм. Установлено, что

ковалентное связывание красителей *Sq1* и *Sq2* с BSA, а также образование их комплексов с BSA приводят к длинноволновому сдвигу полос поглощения и флуоресценции, и увеличению квантового выхода флуоресценции. Разворачивание молекулы BSA уменьшает интенсивность флуоресценции комплекса красителя *Sq2* в три раза, а изменение интенсивности флуоресценции конъюгата *Sq1*-BSA составляет всего 20%. Эффективность переноса энергии (FRET) с красителя-донора *Sq1*, конъюгированного с BSA, на неконъюгированный акцептор *Sq2*, уменьшается при конформационных изменениях BSA значительно больше, приблизительно в 10 раз. Таким образом, метод FRET является наиболее чувствительным и может быть предложен для мониторинга конформационных изменений в молекулах BSA.

Ключевые слова: скварайновые красители, альбумин, конформация, флуоресценция, FRET

I. V. Hovor¹, O. M. Obukhova¹, A. L. Tatarsky¹, O. S. Kolosova¹,
L. D. Patsenker²

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

² Department of Chemical Sciences, The Faculty of Natural Sciences, Ariel University, Ariel 40700, Israel

THE IMPACT OF CONFORMATIONAL CHANGES IN ALBUMIN MOLECULE (BSA) ON THE SPECTRAL PROPERTIES OF SQUARAINE AND DICYANOMETHYLENE SQUARAINE DYES

The work was to develop a highly sensitive, fluorescence based method to monitor conformational changes in proteins. With this aim, the influence of unfolding of bovine serum albumin (BSA) molecules on the spectral properties of squaraine dye *Sq1* and dicyanomethylene squaraine dye *Sq2* was investigated. The conformational changes were initiated by urea in the concentration of up to 8 M. The following three intensity-based methods of using these dyes were evaluated: (i) dye *Sq1* was covalently bound to BSA; (ii) dye *Sq1* was noncovalently bound to BSA; and (iii) dye *Sq2* was noncovalently bound to BSA. The change in the fluorescence intensity of these dyes upon the BSA unfolding was measured. An additional, fourth method was based on the measurements of the change in the Förster Resonance Energy Transfer (FRET) between *Sq1* (donor) covalently bound to BSA and *Sq2* (acceptor) able to noncovalent binding with BSA. The change in the FRET was due to the BSA unfolding initiated by urea. The absorption and emission maxima measured in water were 635 / 645 nm for dye *Sq1* and 654 / 670 nm for *Sq2*. Addition of 7–8 M urea to aqueous solutions of dyes *Sq1* and *Sq2* increased their fluorescence intensities by factor of 1.5 and 2.3 while the quantum yield increased by factor of 1.8 and 1.9, respectively. The absorption intensity of *Sq1* in the presence of urea had a tendency to decrease while for *Sq2* it increased by factor of 1.3. The formation of complexes of dyes *Sq1* and *Sq2* with BSA as well as the covalent conjugation of *Sq1* with BSA caused the red-shift in the absorption and emission maxima and an increase in the quantum yields. Unfolding of BSA molecule resulted in a blue-shift of the absorption and emission bands and a 3-fold decrease in the fluorescence intensity of *Sq2*-BSA complex. Unfolding of protein in *Sq1*-BSA conjugate had almost no effect on the position and shape of the absorption and emission bands but decreased the fluorescence intensity by about 20%. At the same time, according to the fourth method the efficiency of FRET from *Sq1* conjugated with BSA, to non-conjugated *Sq2* exhibited much more pronounced decrease (~10 times) upon BSA unfolding. Thus, the FRET based approach was found to be more sensitive compared to the intensity based methods and therefore can

be proposed as the most sensitive technique for fluorescence monitoring of conformational changes in BSA.

Keywords: squaraine dyes, albumin, conformation, fluorescence, FRET

REFERENCES

1. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. – 3rd ed., Springer, 2006, 960 p.
2. Szöllösi J., Damjanovich S., Mátyus L. *Application of Fluorescence Resonance Energy Transfer in the Clinical Laboratory: Routine and Research*. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry), 1998, vol. 34, pp. 159–179. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19980815\)34:4<159::AID-CYTO1>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19980815)34:4<159::AID-CYTO1>3.0.CO;2-B)
3. Carrell R.W., Lomas D.A. *Conformational disease*. *Lancet*, 1997, vol. 350, pp. 134–138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02073-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02073-4)
4. Ellisdon A.M., Bottomley St.P. *The Role of Protein Misfolding in the Pathogenesis of Human Diseases*. *Life*, 2004, vol. 56, no 3, pp. 119–123. <https://doi.org/10.1080/15216540410001674003>
5. Carrell R.W. *Cell toxicity and conformational disease*. *Trends in Cell Biology*, 2005, vol. 15, no 11, pp. 574–580. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.09.005>
6. Dorh N., Zhu Sh., Dhungana K. B., Pati R., Luo F.-T., Liu H., Tiwari A. *BODIPY-based fluorescent probes for sensing protein surface-hydrophobicity*. *Scientific Reports*, 2015, vol. 5, 18337. <https://doi.org/10.1038/srep18337>
7. Oshiki D., Kojima H., Takahashi Y., Komatsu T., Terai T., Hanaoka K., Nishikawa M., Takakura Y., Nagano T. *Near-Infrared Fluorescence Probes for Enzymes Based on Binding Affinity Modulation of Squarylium Dye Scaffold*. *Analyt. Chem.*, 2012, vol. 84, pp. 4404–4410. <https://doi.org/10.1021/ac300061a>
8. Maiti J., Biswasa S., Chaudhurib A., Chakraborty S., Chakraborty S., Das R. *Environment Sensitive Fluorescent Analogue of Biologically Active Oxazoles Differentially Recognizes Human Serum Albumin and Bovine Serum Albumin: Photophysical and Molecular Modeling Studies*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2017, vol. 175, pp. 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.12.032>
9. 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, 024007. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/4/2/024007>
10. 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://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.c.4079948>
11. Das A., Mukhopadhyay Ch. *Urea-Mediated Protein Denaturation: A Consensus View*. *J. Phys. Chem. B*, 2009, vol. 113, pp. 12816–12824. <https://dx.doi.org/10.1021/jp906350s>
12. Tatars A.L., Fedyunyayeva I.A., Dyubko T.S., Povrozin Ye.A., Doroshenko A.O., Terpetschnig E.A., Patsenker L.D. *Synthesis of water-soluble, ring-substituted squaraine dyes and their evaluation as fluorescent probes and labels*. *Anal. Chim. Acta.*, 2006, vol. 570, no 2, pp. 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.019>
13. 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, no 3, pp. 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.09.007>
14. Bannwarth W., Knorr R. *Formation of carboxamides with N,N,N',N'-tetramethyl(succinimido)uronium tetrafluoroborate in aqueous / organic solvent systems*. *Tetrahedron Lett.*, 1991, Vol. 32, N 9, pp. 1157–1160. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)92032-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)92032-X)
15. Knorr R., Trzeciak A., Bannwarth W. *New coupling reagents in peptide chemistry*. *Tetrahedron Lett.*, 1989, vol. 30, no 15, pp. 1927–1930. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)99616-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)99616-3)
16. Lin Yu., Weissleder R., Tung Ch.-H. *Novel near-infrared cyanine fluorochromes: synthesis, properties, and bioconjugation*. *Bioconjugate Chem.*, 2002, vol. 13, no 3, pp. 605–610. <https://doi.org/10.1021/bc0155723>
17. Parker C.A., *Photoluminescence of solutions*. Elsevier, Amsterdam, 1968, 544 p.
18. Mujumdar R.B., Ernst L.A., Mujumdar S.R., Lewis Ch.J., Waggoner A.S. *Cyanine dye labeling reagents: sulfobenzocyanine succinimidyl esters*. *Bioconjugate Chem.*, 1993, vol. 4, pp. 105–111. <https://doi.org/10.1021/bc00020a001>
19. Warren J.R., Gordon Ju.A. *On the Refractive Indices of Aqueous Solutions of Urea*. *Phys. Chem.*, 1966, vol. 70, no 1, pp. 297–300. <https://doi.org/10.1021/j100873a507>
20. Mujumdar S.R., Mujumdar R.B., Grant Ch.M., Waggoner A.S. *Cyanine-labeling reagents: Sulfobenzocyanine succinimidyl esters*. *Bioconjugate Chem.*, 1996, vol. 7, pp. 356–365. <https://doi.org/10.1021/bc960021b>
21. 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>