

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н.КАРАЗІНА

ГОВОР ІРИНА ВІКТОРІВНА

УДК 577.336+543.426+543.428

**ФЛУОРЕСЦЕНТНІ СИСТЕМИ НА ОСНОВІ КОМБІНАЦІЙ ЧУТЛИВИХ ДО
МІКРООТОЧЕННЯ БАРВНИКІВ ДЛЯ РАЦІОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ
КОНФОРМАЦІЙНИХ ЗМІН ПРОТЕЇНІВ**

02.00.04 – фізична хімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата хімічних наук

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Державній науковій установі «НТК «Інститут монокристалів» Національної академії наук України.

Науковий керівник:

кандидат хімічних наук, старший дослідник,
Татарець Анатолій Леонідович,
Державна наукова установа «НТК «Інститут монокристалів» НАН України,
завідувач відділу люмінесцентних матеріалів та барвників ім. Б.М. Красовицького.

Офіційні опоненти:

доктор хімічних наук, професор,
Рошаль Олександр Давидович,
Науково-дослідний інститут хімії Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна МОН України,
виконуючий обов'язки директора;

доктор хімічних наук,
Посохов Євген Олександрович,
Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут» МОН України, старший викладач кафедри органічної хімії, біохімії, лакофарбових матеріалів та покриттів.

Захист відбудеться 16 вересня 2021 року о 16⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.051.14 Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (Україна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-79)

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна (Україна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4)

Автореферат розісланий «04» серпня 2021 року

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради

Олександр КИРИЧЕНКО

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Раціометричні методи визначення, зокрема методи на основі ферстерівського резонансного переносу енергії (FRET) є популярними інструментами для вивчення конформацій протеїнів. Для виявлення FRET застосовують нечутливі до оточення флуоресцентні барвники, які ковалентно зв'язують з аналітом. Маркування протеїнів донорними та акцепторними барвниками відбувається на специфічних ділянках протеїнів і часто є складним та вимагає розробки певної стратегії маркування для кожного типу протеїнів. Такий підхід обмежує використання методу FRET у гетерогенних біологічних системах та може призводити до заниження фактичної ефективності FRET, якщо більшість молекул буде промарковано лише донором. Явище, на якому основана дія флуоресцентних зондів (барвників, які взаємодіють з протеїном нековалентно), а саме залежність спектральних характеристик та інтенсивності флуоресценції від оточення, повинно приводити до додаткових змін в ефективності FRET. Таким чином, чутливість барвника-донора та/або барвника-акцептора до мікрооточення може покращити чутливість флуоресцентних біоаналітичних методів, які основані на раціометричних вимірюваннях та FRET. У той же час, раціометричні системи та донорно-акцепторні FRET пари, в яких обидва барвники були б чутливими до мікрооточення та не зв'язані ковалентно між собою раніше не використовувались для визначення змін конформацій протеїнів.

Актуальність теми визначається необхідністю розробки та покращення флуоресцентних методів аналізу в медичній діагностиці та медико-біологічних дослідженнях, зокрема для визначення конформаційних змін у протеїнах, а також одержання нових діагностичних матеріалів з поліпшеними експлуатаційними характеристиками для цих застосувань, а саме раціометричних систем флуоресцентних барвників, дія яких основана на визначенні FRET.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є складовою частиною планових наукових досліджень відділу люмінесцентних матеріалів та барвників ім. Б.М. Красовицького ДНУ «НТК «Інститут монокристалів» НАН України» і виконувалась у межах тем відомчого замовлення НАН України "Флуоресцентний резонансний перенос енергії між скварайновими барвниками в модельних біологічних системах" (2013 р., № держреєстрації 0113U003293) та "Перенос енергії, гасіння та посилення флуоресценції в мультифлуорофорних системах" (2016-2018 рр., № держреєстрації 0116U001210) та міжнародного проекту УНТЦ "Флуоресцентні зонди і мітчики для медико-біологічних застосувань" (№ P548).

Мета і задачі дослідження. Мета роботи полягає у встановленні закономірностей щодо зв'язку між структурою та спектрально-люмінесцентними і фотофізичними властивостями барвників для створення

систем з раціометричним детектуванням для розробки нового, чутливого способу визначення конформаційних змін у протеїнах.

Для досягнення поставленої мети необхідно виконати наступні завдання:

- запропонувати новий флуоресцентний спосіб визначення конформаційних змін протеїнів;
- визначити алгоритм відбору барвників та дослідити вплив оточення на спектральні та фотофізичні властивості барвників;
- відібрати найбільш ефективні пари барвників для раціометричного детектування та визначення FRET на прикладі модельного протеїну БСА (бичачий сироватковий альбумін);
- на прикладі протеїнів, різних за фізико-хімічними властивостями, визначити придатність та обмеження застосування нового підходу;
- вивчити вплив способу з'єднання барвників з протеїном на чутливість раціометричного детектування та уявну ефективність переносу енергії між барвниками при визначенні конформаційних змін у протеїнах;
- дослідити можливість практичного застосування розробленого підходу у системі гетерогенного протеїнового складу.

Об'єкти дослідження — вплив середовища та мікрооточення на спектральні властивості барвників; ферстерівський резонансний перенос енергії між барвниками у протеїнах, раціометричне визначення конформаційних змін у протеїнах.

Предмет дослідження — розчини флуоресцентних барвників у водних та органічних розчинниках, а також при ковалентному зв'язуванні та нековалентній взаємодії барвників з протеїнами.

Методи дослідження — електронна абсорбційна і флуоресцентна спектроскопія, рефрактометрія, гель-хроматографія.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше:

- з'ясовано вплив полярності середовища та наявності протеїнів на спектрально-люмінесцентні властивості ряду норскварайнових і скварайнових барвників;
- розроблено новий флуоресцентний підхід для визначення змін конформації протеїнів із застосуванням раціометричного детектування та визначення ферстерівського резонансного переносу енергії між барвниками, чутливими до мікрооточення та незв'язаних з аналітом ковалентним зв'язком;
- оцінено чутливість розробленого підходу виявлення конформаційних змін у протеїні, ініційованих розчинами сечовини різної концентрації (0–7 M);
- визначено залежність уявної ефективності переносу енергії в комплексах донорно-акцепторних пар барвників з протеїнами від структури та молекулярної маси протеїнів;

- продемонстровано можливість використання нового підходу у системі гетерогенного протеїнового складу (плазма крові людини) для визначення змін, що викликані заморожуванням та довгостроковим низькотемпературним зберіганням.

Практичне значення одержаних результатів полягає у дослідженні комплексів [барвник–донор]–[протеїн]–[барвник–акцептор] та змін уявної ефективності переносу енергії між барвниками при зміні конформації протеїну, що дозволило розробити новий підхід, заснований на флуоресцентному визначенні конформаційних змін в протеїнах. Показано можливість використання нових флуоресцентних матеріалів (раціометричних систем та донорно-акцепторних пар барвників) для визначення змін плазми крові людини, викликаних дією низьких температур. Новий підхід є перспективним флуоресцентним засобом для медицини та біології.

Особистий внесок автора полягає у систематизації даних літератури за темою дисертації, виконанні всіх спектральних досліджень, а саме: вимірюванні електронних спектрів поглинання і флуоресценції, визначенні квантових виходів та коефіцієнтів екстинкції, проведенні математичного аналізу та обробки одержаних результатів. Постановка завдань, обговорення результатів досліджень та формулювання висновків проведені спільно з науковим керівником – к.х.н., ст. досл. Татарцем А. Л. Автор виражає подяку співробітникам ДНУ "НТК "Інститут монокристалів" НАН України к.х.н., с.н.с. Колосовій О. С., м.н.с. Обуховій О. М. та к.х.н., с.н.с. Федюняєвій І. А. за синтез барвників, співробітниці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України к.б.н., н.с. Фалько О. В. за надані зразки плазми крові людини.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації було представлено на XIV Kharkiv young scientists conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics (Харків, 2014), на 39-й щорічній конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині. Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» (Харків, 2015), 14-й, 15-й Міжнародних конференціях "Methods and Applications of Fluorescence" (Вюрцбург, Німеччина, 2015; Брюгге, Бельгія, 2017), 5-й Міжнародній конференції "Актуальні проблеми молекулярної спектроскопії конденсованих середовищ" (Самарканд, Узбекистан, 2016), X Всеукраїнській науковій конференції студентів та аспірантів "Хімічні Каразінські читання – 2018" (Харків, 2018), XIII Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії (Харків, 2018), 8th International Conference "Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles" in memoriam of Prof. Valeriy Orlov (CNCH-2018) (Kharkiv, 2018).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 14 публікацій, з яких 6 статей (3 – у фахових виданнях України, 3 – у зарубіжних періодичних виданнях інших держав, що входять до міжнародної наукометричної бази Scopus) та 8 тез доповідей у збірках матеріалів міжнародних, українських та регіональних конференцій.

Структура і обсяг роботи. Дисертація викладена на 184 сторінці та складається зі вступу, п'яти розділів, висновків, переліку використаних джерел (209 найменувань); містить 3 схеми, 81 рисунки та 6 таблиць. Обсяг основного тексту дисертації складає 130 сторінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність роботи, сформульовано мету та завдання дослідження, відображено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів.

Перший розділ присвячено аналізу наукової літератури за темою дисертації. Проведено оцінку відомих на момент виконання досліджень флуоресцентних методів і барвників, що використовуються для визначення конформації протеїнів, а саме за зміною власної флуоресценції протеїнів, за методом одного флуоресцентного зонду, флуоресценція якого є чутливою до зміни конформації протеїну, та метод FRET між двома нечутливими до оточення барвниками, такими як ціаніни Cy5 і Cy5.5, що зв'язані з протеїном ковалентно. На підставі аналізу літературних даних було запропоновано новий підхід, який полягає у поєднанні двох відомих флуоресцентних методів, а саме комбінації методу визначення FRET, але з використанням двох чутливих до мікрооточення флуоресцентних барвників-зондів.

У **другому розділі** розроблено схему відбору барвників для використання у запропонованому підході (рис. 1), яка включає оцінку розчинності та схильності до агрегації, спектральних та фотофізичних властивостей барвника у водному фосфатному буфері з рН 7.4 (PB) (полярному розчиннику) та хлороформі (неполярному розчиннику).

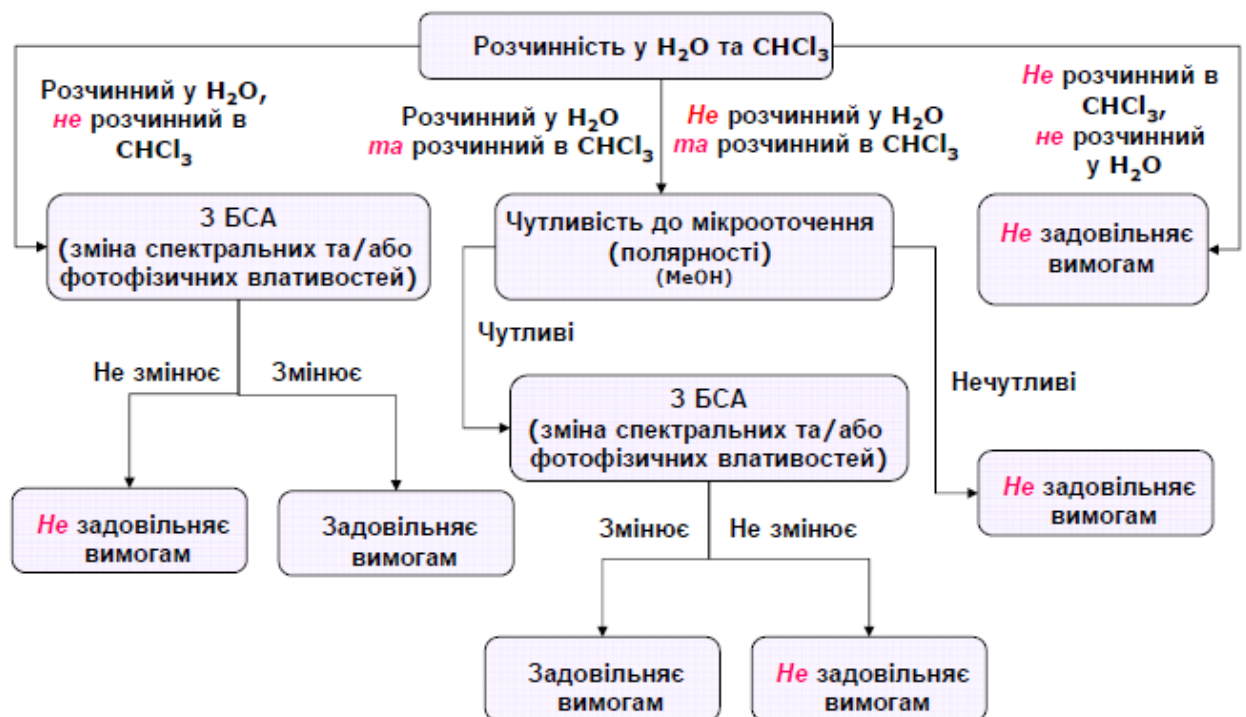


Рис. 1 Схема відбору барвників

У випадку, коли барвник розчинний лише в одному з розчинників, додатково визначали чутливість спектральних властивостей барвника до мікрооточення. Далі досліджували розчини барвників у присутності бичачого сироваткового альбуміну (БСА) як модельного протеїну. Тільки барвники, які утворюють комплекси, тобто демонструють зміни спектральних характеристик при взаємодії з протеїном, придатні для подальшого дослідження.

Пошук барвників здійснювався серед класів сквараїнових, норсквараїнових та стирилових барвників (рис. 2). Ці барвники були обрані з огляду на те, що деякі з них вже були запропоновані у літературі для визначення концентрації або наявності протеїнів у розчинах, але інформації про їх взаємодію з протеїнами було недостатньо для використання у запропонованому підході.

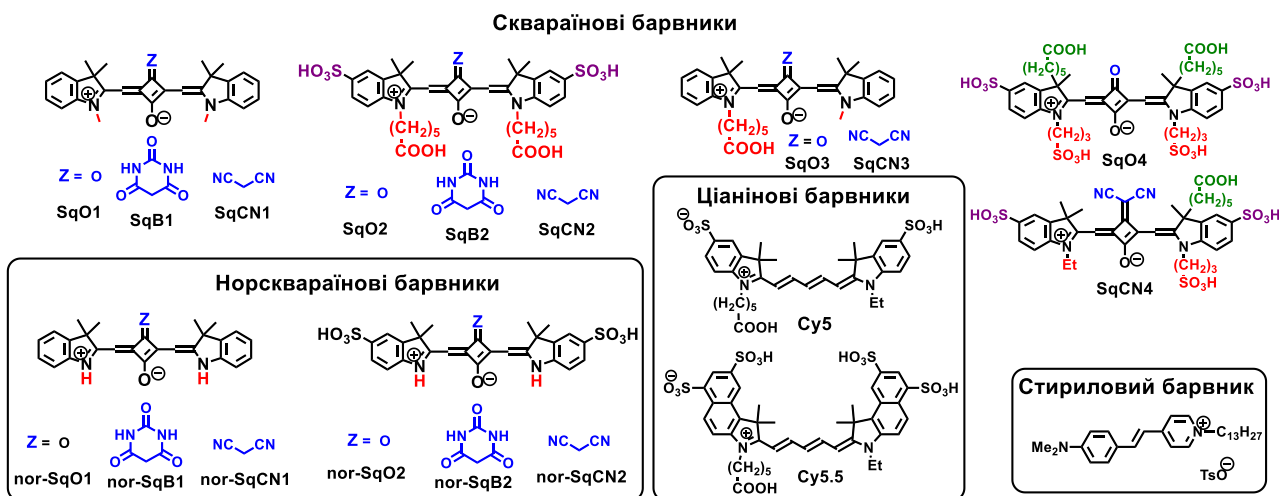


Рис. 2 Структури барвників, що досліджувалися

Сквараїнові барвники відрізнялись замісниками біля атома азоту, у бензольному циклі та положенні 3 індоленінового фрагмента, а також у сквараїновому фрагменті. Норсквараїнові барвники, що містять атом водню біля атома азоту індоленіна, мали аналогічні замісники в інших положеннях. Також був використаний стириловий барвник (**Styryl**), який має довгий аліфатичний ланцюг. Чутливість барвників порівнювали з відомими комерційно доступними барвниками ціанінового ряду **Cy5** та **Cy5.5**.

Спектральні характеристики досліджених барвників наведено у таблиці 1. Спектральні дані для гідрофільних сквараїнів **SqO2**, **SqO4**, **nor-SqO2**, **SqB2**, **nor-SqB2**, **SqCN2**, **SqCN4**, **nor-SqCN2** та ціанінів **Cy5** і **Cy5.5**, що містять сульфогрупи в ароматичному кільці та/або алкільному ланцюзі у положенні 1 індоленінового фрагмента, було отримано тільки у РВ. Для визначення властивостей **SqO1**, **nor-SqO1**, **SqB1**, **SqCN1**, **nor-SqCN1** у полярному середовищі, використовували суміш розчинників РВ-ДМСО (5:1), де ДМСО застосовували для підвищення розчинності барвників.

Спектральні та фотофізичні характеристики досліджених барвників у фосфатному буфері з рН 7.4 (PB), органічних розчинниках та у 1 мкМ розчинах бичачого сироваткового альбуміну (БСА) ($c_{\text{барвника}}=1$ мкМ)

Барвник	Середовище	Поглинання			Флуоресценція			$\Delta\nu_{\text{st}}$, см ⁻¹
		$\lambda_{\text{макс.}}$, нм	$\Delta\nu_{1/2}$, см ⁻¹	ε , М ⁻¹ см ⁻¹	$\lambda_{\text{макс.}}$, нм	$\Delta\nu_{1/2}$, см ⁻¹	Φ_{F} , %	
SqO1	PB – ДМСО (5:1)	624	750	92000	635	740	3	280
	CHCl ₃	633	690	219000	642	690	25	220
	MeOH	625	640	н/в*	635	690	4	250
	БСА	639	790	203000	648	760	22	220
SqO2	PB	632	680	265000	642	700	7	250
	MeOH	637	620	н/в	646	640	18	220
SqO3	PB	622	760	285000	632	760	1.9	250
	CHCl ₃	634	600	312000	644	650	25	250
	MeOH	627	640	н/в	636	660	6	230
	БСА	642	860	215000	655	770	26	310
SqO4	PB	635	650	300000	645	670	12	250
	MeOH	640	590	н/в	649	640	40	220
nor-SqO1	PB – ДМСО (5:1)	639	960	92000	659	850	13	470
	CHCl ₃	654	780	218000	669	780	45	340
	MeOH	647	830	200000	662	800	44	350
	БСА	655	1020	200000	669	890	27	320
nor-SqO2	PB	636	870	149000	653	820	32	410
	MeOH	650	840	н/в	667	760	41	390
SqB1	PB – ДМСО (5:1)	618	1410	86000	646	1620	<1	700
	CHCl ₃	641	1110	103000	669	1380	4	650
SqB2	PB	627	1080	150000	650	1100	5	560
nor-SqB2	PB	638	1230	88000	666	1120	20	660
SqCN1	PB – ДМСО (5:1)	660	2030	70000	678	1510	<1	400
	MeOH	666	890	н/в	687	930	8	460
	CHCl ₃	683	800	196000	701	830	37	380
SqCN2	PB	667	860	188000	685	860	7	390
	БСА	677	1100	134400	698	920	24	450
SqCN3	PB	654	1250	138000	670	850	1.0	370
	MeOH	668	880	н/в	690	730	10	480
	CHCl ₃	683	800	202000	701	830	32	380
	БСА	684	900	162000	706	860	47	460
SqCN4	PB	667	840	179000	686	860	7	420
nor-SqCN1	CHCl ₃	694	750	120000	712	730	28	360
nor-SqCN2	PB	670	1090	123000	693	910	19	500
	БСА	682	1480	46300	713	1040	13	640
Styryl	PB	456	5800	15700	615	2460	<1	5670
	EtOH	484	4045	50500	612	2680	3.1	4320
	CHCl ₃	488	3450	56000	585	2720	7	3400
	БСА	474	5340	42400	598	2540	13	4370

* не вимірювали

Сквараїнові та норсквараїнові барвники виявляють негативний сольватохромізм та сольватофлуорохромізм, при цьому спектральні смуги норсквараїнів є більш довгохвильовими у порівнянні зі смугами сквараїнів аналогічної будови.

Стоксові зсуви зростають в ряду замісників у сквартному фрагменті **кисень < диціанометиленова група < барбітурова кислота**. Для барвників з барбітуровою групою це пов'язано зі змінами, які відбуваються у збудженому стані з внутрішньомолекулярними водневими зв'язками між атомами кисню барбітурової кислоти та метиновими протонами, що і призводить до втрати енергії.

Заміщені за сквартним циклом гідрофобні барвники, які не містять сульфогруп, значно агрегують у водному середовищі, що спектрально підтверджується уширенням смуги поглинання та/або появою додаткової смуги, розташованої на 40-50 нм у більш короткохвильовій області.

Через агрегацію квантові виходи флуоресценції сквараїнів (**SqB1** і **SqCN1**) у водному буферному розчині не перевищують 1%, а у аналогічних за структурою норсквараїнів флуоресценція взагалі відсутня. Барвник **nor-SqB1** має дуже низьку розчинність, через що неможливо дослідити його спектральні властивості в жодному з досліджених розчинників, а **nor-SqCN2** розчинявся без значних ознак агрегації лише у хлороформі. Встановлено, що сквараїни більш чутливі до полярності оточення, що виявляється у зниженні їх квантового виходу у 3.2-6.3 разів при переході від розчину у неполярному розчиннику (хлороформі) до полярного середовища (метанолу), в той час як квантовий вихід норсквараїнів майже не залежить від полярності середовища.

Для стирилового барвника **Styryl** максимуми поглинання та флуоресценції істотно залежать від полярності розчинника та при переході від РВ до хлороформу максимум поглинання зсувається у довгохвильову область на 32 нм, а максимум флуоресценції — у короткохвильову на 30 нм. Квантовий вихід барвника у хлороформі дорівнює 6.7%, а у водних середовищах спостерігається значна агрегація, через що **Styryl** майже не флуоресціює.

У **третьому розділі** досліджено спектральні властивості барвників в комплексах з протеїнами та вплив денатурації протеїну на властивості барвників у таких комплексах. Спочатку вивчено комплекси з модельним протеїном, бичачим сироватковим альбуміном (БСА). Встановлено, що для отримання стабільних комплексів необхідний час, протягом якого відбувається поступове зміщення максимуму спектра флуоресценції (**рис. 3**). При цьому спектральні властивості комплексів залежать від концентрації БСА, та при його певній концентрації відбувається насичення, тобто відсутність подальших спектральних змін. Найбільш придатними є барвники, для яких насичення відбувається при співвідношенні, близькому до еквімолярного. Тому усі наступні дослідження комплексоутворення з протеїнами проводились при концентрації барвників та протеїнів 1 мкМ. Встановлено, що норсквараїни є менш чутливими до присутності протеїну (БСА), ніж сквараїнові барвники,

оскільки їх квантові виходи у присутності БСА змінюються в меншій мірі (таблиця 1).

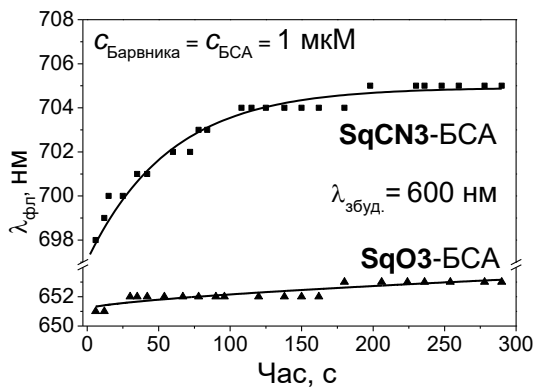


Рис. 3 Залежність максимуму флуоресценції комплексів SqO3-БСА та SqCN3-БСА від часу витримки

На відміну від барвників з сульфогрупами, що не змінюють своїх спектральних властивостей у присутності БСА, при утворенні комплексів з БСА спектральні смуги барвників зсуваються у довгохвильову частину спектра на 10–36 нм відносно максимумів у водних розчинах, при цьому квантові виходи зростають до 47 разів. Найбільші спектральні зміни при утворенні комплексів з БСА спостерігаються для оксо- (SqO1, nor-SqO1, SqO3) і

диціанометиленових (SqCN3) сквараїнів та стирилового (Styryl) барвників, що не містять сульфогруп, тому ці барвники є найбільш перспективними зондами.

Виявилося, що гідрофобні барвники SqB1, SqCN1 і nor-SqCN1 значно агрегують у комплексі з БСА, а з гідрофільними — SqO2, SqB2, nor-SqO2, nor-SqB2, SqO4, SqCN4 за спектрами поглинання та флуоресценції утворення комплексів не відбувається, тому ці барвники для подальших досліджень не використовувалися. Для гідрофільних диціанометиленових барвників SqCN2 та nor-SqCN2 спостерігалось зниження коефіцієнтів екстинкції в комплексах з протеїнами, тому ці барвники були також виключені з подальших досліджень.

Для з'ясування впливу будови, молекулярної маси протеїну та наявності зв'язаних з протеїном низькомолекулярних сполук на взаємодію з барвниками ми дослідили комплексоутворення SqO3, SqCN3 та Styryl з шістьма модельними протеїнами: бичачим сироватковим альбуміном (БСА) і сироватковим альбуміном людини (САЛ), що не містять жирних кислот, а також бичачим сироватковим альбуміном і сироватковим альбуміном людини з жирними кислотами (відповідно БСАж і САЛж), пероксидазою хрону (ПХ) та лізоцимом, які різняться за структурою та фізико-хімічними властивостями (таблиця 2).

Спектральні властивості та квантові виходи барвників залежать від типу протеїну, з яким утворюють комплекс. Відносно водного розчину, у присутності альбумінів (молекулярна маса ~66 кДа) барвники мають більші спектральні зміни, ніж з лізоцимом (найменший з досліджених протеїнів, з молекулярною масою 15 кДа).

Незважаючи на те, що альбуміни бика та людини мають подібну будову та молекулярну масу, квантовий вихід сквараїнових барвників у 1.3–1.8 рази вищий в комплексах з альбуміном людини (САЛ). Треба відзначити, що наявність жирних кислот не впливає на квантовий вихід комплексів сквараїнів SqO3 та SqCN3 з бичачими альбумінами, проте він знижується у 1.1–1.3 рази в комплексах з альбумінами людини, тобто квантові виходи в комплексах з САЛж менші, ніж в комплексах з САЛ.

Спектральні та фотофізичні характеристики комплексів барвників з протеїнами у РВ (сбарвника = 1 мкМ, спротеїну = 1 мкМ)

Барвник	Середовище	Поглинання			Флуоресценція			Δv_{st} , см ⁻¹
		λ_{\max} , нм	$\Delta v_{1/2}$, см ⁻¹	ϵ , М ⁻¹ см ⁻¹	λ_{\max} , нм	$\Delta v_{1/2}$, см ⁻¹	Φ_F , %	
SqO3	РВ	622	760	285000	632	760	1.9	250
	Сечовина 7М	627	720	276100	638	730	4.6	280
	БСА	642	860	215000	655	770	26	310
	БСАж	642	860	215000	655	770	25	310
	САЛ	637	850	241000	649	730	48	290
	САЛж	635	980	213000	649	730	37	340
	ПХ	624	1150	144000	652	800	14	610
	Лізоцим	622	730	285000	634	770	2	310
SqCN3	РВ	654	1250	138000	670	850	1	370
	Сечовина 7М	660	880	184700	675	890	3.2	340
	БСА	684	900	162000	706	860	47	460
	БСАж	687	860	162000	708	860	49	430
	САЛ	686	860	180000	707	870	61	430
	САЛж	686	900	180000	706	900	54	420
	ПХ	679	1170	85000	705	890	30	540
	Лізоцим	654	2300	114000	670	880	<1	390
Styryl	РВ	456	5800	15700	615	2460	<1	5670
	Сечовина 7М	465	5700	17700	615	3080	1.7	5250
	БСА	474	5340	32700	598	2540	13	4370
	БСАж	468	5680	30000	593	2540	8	4500
	САЛ	486	5300	30200	601	2300	13	3930
	САЛж	486	5300	33500	601	2300	15	3930
	ПХ	467	7550	26300	596	2540	5	4640
	Лізоцим	456	6040	12300	618	2340	<1	5770

Барвник **Styryl** має однакові квантові виходи з БСА і САЛ, але, на відміну від скварайнів, наявність жирних кислот саме в бичачому альбуміні (БСАж) призводить до зменшення квантового виходу та короткохвильових зсувів спектрів поглинання і флуоресценції комплексу **Styryl**-БСАж.

В комплексах з ПХ барвники агрегують, через що їх напівширини поглинання збільшуються, а квантові виходи знижуються. Спектральні властивості барвників у присутності лізоциму майже не відрізняються від властивостей у фосфатному буфері, що свідчить про відсутність утворення комплексів з лізоцимом, тому у подальшому цей протеїн не використовували.

Для контрольованої денатурації третинної структури протеїнів ми використовували розчини сечовини у концентрації до 7 М, які широко використовують у біологічних дослідженнях для поступового розгортання протеїнів. Використовуючи розчини сечовини, ми можемо отримати набір конформаційних станів протеїну, які умовно можна поділити на малі (<3 М), середні (≥3–5 М) та значні (≥5–7 М) зміни.

Для виявлення ефектів безпосередньої дії сечовини на барвники, **SqO3**, **SqCN3** та **Styryl** досліджено у розчинах сечовини (0–7 М). Відносно властивостей барвників у РВ, у 7М сечовині максимуми поглинання/флуоресценції барвників зсуваються у довгохвильову область, а квантові виходи незначним чином зростають (таблиця 2). Але зміни, що спостерігаються, є набагато меншими, ніж при утворенні комплексів з протеїнами, тому у подальшому вони не враховувалися.

Кожен з барвників ми перевірили на чутливість до конформаційних змін протеїнів, як одиночних зондів. Вимірювання спектрів поглинання та флуоресценції проводили у розчинах сечовини з концентраціями до 7 М, в яких знаходились протеїн та барвник в концентрації 1 мкМ кожен.

Денатурація приводить до зменшення упорядкованої компактної структури протеїнів та зростання сольватації їх неполярних областей, через що барвник стає доступним до впливу водного розчину. Це приводить до зсувів положення смуг флуоресценції та значного зменшення їхньої інтенсивності (рис. 4). Чутливість барвників до конформаційних змін протеїнів оцінювали за динамічним діапазоном (ДД) кривої залежності інтенсивності флуоресценції

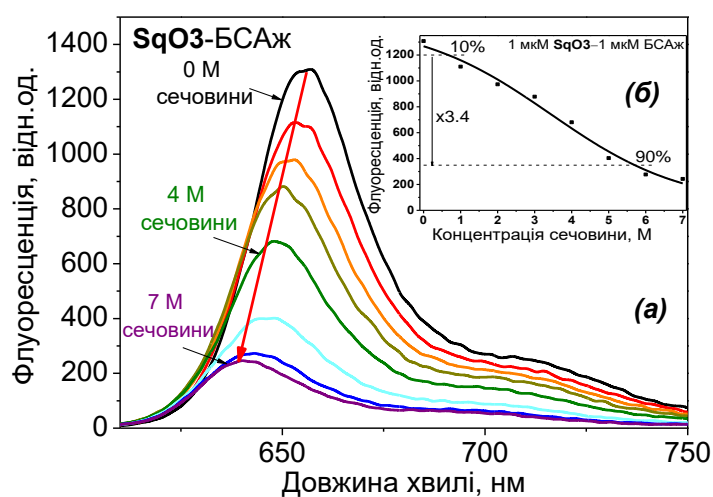


Рис. 4 Спектри флуоресценції у розчинах сечовини різної концентрації (а) та залежність інтенсивності флуоресценції **SqO3-BSA** (б) від концентрації сечовини ($c_{\text{барвника}} = c_{\text{BSA}} = 1 \mu\text{M}$)

комплексу барвник-протеїн від концентрації сечовини у розчині, який розраховували як відношення значень на рівні 10% та 90% залежності (рис. 4 (б)). Найбільшу чутливість до конформаційних змін **SqO3** виявляє у комплексі з САЛ, а **Styryl** з БСА, у той час як **SqCN3** не проявляє явної селективності до певного протеїну (таблиця 3). Найменшу чутливість до конформаційних змін барвники мають у комплексі з ПХ.

Четвертий розділ присвячено використанню раціометричних систем барвників для визначення конформаційних змін модельних протеїнів, з'ясуванню впливу способу з'єднання барвників з протеїном (ковалентно або нековалентно) на ефективність переносу енергії між барвниками, а також встановленню можливості практичного застосування розробленого підходу у системі гетерогенного протеїнового складу (плазма крові людини).

Перенос енергії в раціометричних системах барвників ми оцінювали за двома показниками: уявна ефективність переносу енергії (Уявна E_{FRET}) та співвідношення FRET (так зване FRET ratio). Для цього проводили

вимірювання спектрів флуоресценції при збудженні раціометричної системи та її компонентів на одній довжині хвилі у кожному розчині (РВ та розчинах сечовини різної концентрації) та одержували: інтенсивність флуоресценції комплексу [барвник-донор]-[протеїн] (F_D), інтенсивність флуоресценції донора у присутності барвника-акцептора (F_{DA}), інтенсивність флуоресценції акцептора у присутності донора (F_{AD}) та інтенсивність флуоресценції донора без акцептора на довжині хвилі максимуму випромінювання акцептора ($F_{D\lambda_{maxA}}$).

Таблиця 3

Динамічний діапазон інтенсивності флуоресценції барвників ($I_{фл.}$) та E_{FRET} і FRET ratio для FRET пар при денатурації протеїнів під дією сечовини, ($C_{барвників}=1мкМ$, $C_{протеїнів}=1мкМ$)

Система	Параметр	Динамічний діапазон параметра, разів				
		БСА	БСАЖ	САЛ	САЛЖ	ПХ
[SqO3]-[протеїн]	$I_{фл.}$	3.6	3.4	5.0	4.2	2.7
[SqCN3]-[протеїн]	$I_{фл.}$	2.7	2.4	2.8	2.4	2.4
[Styryl]-[протеїн]	$I_{фл.}$	4.8	3.4	4.4	4.5	2.8
[SqO3]-[протеїн]-SqCN3	Уявна E_{FRET}	9.0	9.0	9.0	4.9	3.2
	FRET ratio	4.7	4.5	2.7	2.7	3.8
[Styryl]-[протеїн]-SqO3	Уявна E_{FRET}	1.9	3.2	5.1	4.9	4.1
	FRET ratio	5.2	6.2	6.9	4.9	5.4
[кон'югат SqO4–БСА] -[SqCN3]	Уявна E_{FRET}	4.8	Не вимірювали			
	FRET ratio	4.0				
[SqO4–БСА–SqCN4] (кон'югат)	Уявна E_{FRET}	1.1				
[Cy5–БСА–Cy5.5] (кон'югат)	Уявна E_{FRET}	1.1				

Уявну E_{FRET} визначали як $E_{FRET}=1-(F_{DA}/F_D)$. Однак в цей спосіб зміни флуоресценції акцептора не приймаються до уваги. Тому, для врахування змін флуоресценції обох флуорофорів застосовують інший параметр, FRET ratio, що бере до уваги як зміни інтенсивності флуоресценції донора, так і акцептора: $FRET\ ratio=(F_{AD} -\alpha \times F_D)/F_D$, де коефіцієнт $\alpha = F_{D\lambda_{maxA}}/F_D$ враховує внесок донора в інтенсивність флуоресценції акцептора за присутності обох барвників у розчині.

FRET ratio безпосередньо не залежить від уявної E_{FRET} , тому цим способом неможливо визначити відстань між флуорофорами, однак FRET ratio дозволяє спостерігати за відносними змінами FRET в межах однієї системи.

Для подвійних комплексів [донор]-[БСА]-[акцептор] (SqO1-БСА-SqCN3, nor-SqO1-БСА-SqCN3, SqO3-БСА-SqCN3 та Styryl-БСА-SqO3), в яких барвники не були зв'язані з протеїном ковалентно, було розраховано уявну E_{FRET} та FRET ratio. Барвники в цих парах мають добре перекриття спектрів, тому можуть утворювати донорно-акцепторні пари з ефективним FRET, що відображається великими значеннями їх інтегралів перекриття та ферстерівських радіусів (таблиця 4).

У відсутності сечовини при еквімолярному співвідношенні компонентів найкращі результати за обома способами розрахунку відносяться до пари несиметричних сквараїнів з карбоксильними групами **SqO3-BCA-SqCN3** (Уявна $E_{\text{FRET}} = 81\%$, FRET ratio=4.82) та пари **Styryl-BCA-SqO3** (Уявна $E_{\text{FRET}} = 71\%$, FRET ratio=4.75), в якій донор з попередньої пари використовували як акцептор. Таким чином, ми обрали дві системи барвників для раціометричного детектування: **SqO3** з **SqCN3** та **Styryl** з **SqO3**, які у подальшому використовували для дослідження конформації протеїнів.

Таблиця 4

Інтеграл перекриття (J), ферстерівські радіуси переносу енергії (R_0), ефективність переносу енергії (E_{FRET}) та FRET ratio донорно-акцепторних пар в комплексах з БСА

Комплекс донор-БСА-акцептор (мольне співвідношення)	J , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$	R_0 , \AA	Уявна E_{FRET} , %	FRET ratio
SqO1-BCA-SqCN3 (1 : 1 : 1)	1.32×10^{-12}	61.4	74	3.03
nor-SqO1-BCA-SqCN3 (1 : 1 : 1)	1.73×10^{-12}	66.5	47	1.05
SqO3-BCA-SqCN3 (1 : 1 : 1)	1.44×10^{-12}	64.1	81	4.82
SqO3-BCA-SqCN3 (1 : 0.8 : 1)	–	–	83	3.32
SqO3-BCA-SqCN3 (0.87 : 1 : 1)	–	–	88	7.25
SqO3-BCA-SqCN3 (1.5 : 1 : 1)	–	–	69	2.90
Styryl-BCA-SqO3 (1 : 1 : 1)	0.90×10^{-12}	52.8	71	4.75

На прикладі системи сквараїнових барвників було проварійовано співвідношення компонентів у системі. У порівнянні з еквімолярним співвідношенням, зменшення кількості БСА, або збільшення концентрації донора (**SqO3**) в системі приводить до зниження FRET ratio в 1.5–1.7 разів та змін уявної E_{FRET} . Зменшення концентрації донора підвищує обидва параметри. Тому далі ми дослідили вплив конформації БСА на перенос енергії в парі сквараїнів з двома різними мольними співвідношеннями компонентів **SqO3-BCA-SqCN3** (1 : 1 : 1 та 0.87 : 1 : 1).

В спектрах поглинання та флуоресценції подвійного комплексу **SqO3-BCA-SqCN3** (1 : 1 : 1) присутні дві смуги, що належать **SqO3** (донору) та **SqCN3** (акцептору). У відсутності сечовини (0 М) смуга акцептора відповідає знаходженню барвника у комплексі з протеїном (684 нм). У той же час смуга поглинання донора знаходиться при 627 нм, що не відповідає абсорбції барвника у комплексі з БСА (642 нм) (рис. 5a). Таким чином, можна припустити, що обидва сквараїни мають однакові центри зв'язування з протеїнами, через що акцептор (**SqCN3**) витісняє донор (**SqO3**) з гідрофобних кишень протеїну, і донор приєднується у місці, що більш доступне для водного оточення. Коли збільшується концентрація сечовини у розчині, **SqO3** відокремлюється від БСА та частково переходить у розчин сечовини, в результаті чого його абсорбція збільшується, акцептор також стає доступнішим для водної фази, через що інтенсивність його смуги при

684 нм (комплекс з протеїном) зменшується та з'являється нова смуга при 660 нм (**SqCN3** у розчині сечовини).

В спектрах флуоресценції денатурація приводить до зміщення обох смуг у короткохвильову область та зменшення інтенсивності флуоресценції донора і/або акцептора (рис. 5б).

Зменшення концентрації донора для системи сквараїнових барвників зменшує чутливість при визначенні уявної E_{FRET} у 1.5 рази (рис. 5в). За способом розрахунку FRET ratio концентрація донора майже не впливає на чутливість системи (рис. 5г), яка дорівнює 4.3–4.7 разів. Треба відзначити, що за обома способами розрахунку при зменшенні кількості донора система стає більш чутливою до малих конформаційних змін БСА, які відбуваються при <3 М сечовини. Для досягнення більшої чутливості системи з усіма іншими дослідженими протеїнами вивчено комплекси з еквімолярним співвідношенням компонентів.

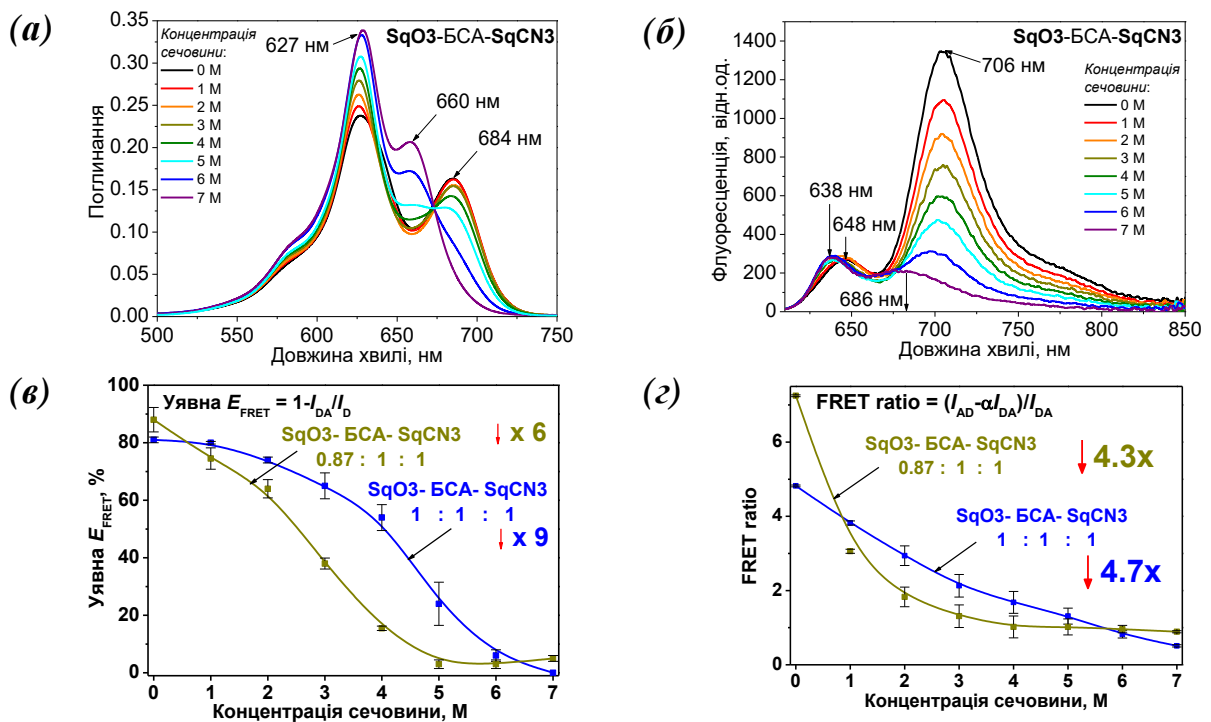


Рис. 5 Спектри поглинання (а) та флуоресценції (б) системи **SqO3-БСА-SqCN3** (1 : 1 : 1), а також зміни уявної E_{FRET} (в) і FRET ratio (г) для системи **SqO3-БСА-SqCN3** з мольними співвідношеннями (1 : 1 : 1 та 0.87 : 1 : 1) у 0–7 М розчинах сечовини

За допомогою пари **SqO3-SqCN3** та пари **Styryl-SqO3**, було досліджено чутливість до конформаційних змін низки протеїнів. А на прикладі БСА та сквараїнової пари були також досліджені системи з різним способом зв'язування барвників з протеїном (ковалентно або утворення комплексів) (таблиця 3).

Встановлено, що перенос енергії між барвниками залежить від типу протеїну, з яким FRET пара барвників утворює комплекс. Крім того, за різними способами розрахунку досягається різна чутливість пар до

конформаційних змін протеїнів. Так, для сквараїнової пари більша чутливість спостерігається при обчислюванні за уявною E_{FRET} , а для пари стирил-сквараїн більша чутливість за FRET ratio. Водночас, для обох пар за допомогою параметра FRET ratio стає можливою реєстрація менших конформаційних змін протеїнів.

На прикладі БСА також були перевірені і можливі способи зв'язку барвників з протеїном. Для запобігання витіснення **SqO3** акцептором з гідрофобних кишень, ми ковалентно з'єднали барвник-донор з БСА. Через сильну агрегацію **SqO3** у кон'югаті з протеїном був використаний його гідрофільний аналог – **SqO4**. Чутливість такої системи до визначення конформаційних змін БСА за ефективністю переносу енергії знижується приблизно у два рази (таблиця 3).

Загальноприйнятим підходом реалізації методу FRET є ковалентне зв'язування донора та акцептора з аналітом, тому ми також дослідили систему з гідрофільними аналогами **SqO3** та **SqCN3** — **SqO4**–БСА–**SqCN4**, де барвники ковалентно зв'язані з БСА. Це дозволило перевірити ймовірність використання обраних нами сквараїнів у класичних дослідженнях за допомогою FRET та запобігти витісненню донора або акцептора у водне середовище. Встановлено, що при дії сечовини на таку систему зміна уявної ефективності FRET складає лише 10%.

Ті ж самі результати отримано і з "класичною" парою ціанінових барвників **Cy5**-**Cy5.5**, які не чутливі до оточення та зв'язані з БСА ковалентно (таблиця 3).

Таким чином, запропонований у роботі новий підхід визначення конформаційних змін у протеїнах, в якому використовуються раціометричні системи двох чутливих до білка та незв'язаних з ним ковалентно флуоресцентних зондів і визначення змін уявної ефективності ферстерівського резонансного переносу енергії або FRET ratio, є найбільш чутливим методом у порівнянні з традиційними методами, які використовують або вимірювання інтенсивності флуоресценції одиночного зонда, або FRET між ковалентно прив'язаними флуоресцентними барвниками (таблиця 3).

Розроблений підхід ми випробували для визначення стану зразків плазми крові. Досліджено три типи зразків: нативна плазма, тобто зразки, що не були заморожені, зразки, що заморожували до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ та зразки з вичерпаним терміном придатності (негативний контроль). При використанні одиночних барвників як зондів, їх інтенсивність флуоресценції для всіх типів зразків змінюється незначним чином.

Порівняння зразків нативної плазми та зразків, що заморожувалися, при використанні раціометричних систем барвників **SqO3**-**SqCN3** та **Styryl-SqO3**, показало, що зі зниженням температури заморожування уявна ефективність переносу енергії поступово зростає до 1.3 разів для системи **SqO3**-**SqCN3** та зменшується до 1.2 разів для системи **Styryl-SqO3**, у той час як FRET ratio для обох систем залишається майже незмінним (таблиця 5).

Відносно зразків нативної плазми до зразків з вичерпаним терміном придатності уявна ефективність переносу енергії та FRET ratio змінюються однаково: у 1.6 разів для пари сквараїнів та 1.3 рази для пари стирил-сквараїн. Це дозволяє однозначно визначати придатність плазми крові для використання (таблиця 5).

Таблиця 5

 E_{FRET} та FRET ratio в зразках плазми крові людини

Пара	Параметр	Нативна плазма	-20°C	-80°C	-196°C	Негативний контроль
SqO3-SqCN3	E_{FRET}	35	39	43	45	56
	FRET ratio	0.47	0.45	0.49	0.47	0.73
Styryl-SqO3	E_{FRET}	50	45	45	42	38
	FRET ratio	4.13	4.32	4.33	3.88	3.24

П'ятий розділ є експериментальною частиною, що містить основні методики спектральних, фотофізичних і біофізичних експериментів. Достовірність одержаних результатів досягалася багаторазовим повторенням експериментів в однакових умовах та комплексним використанням сучасних експериментальних і теоретичних методів дослідження.

ВИСНОВКИ

Визначено закономірності зв'язку між структурою та спектрально-люмінесцентними і фотофізичними властивостями барвників у розчинах та при комплексоутворенні з протеїнами, створено раціометричні системи з резонансним переносом енергії на основі пар чутливих до мікрооточення флуоресцентних барвників і вирішено наукову проблему розробки нового, чутливого підходу для визначення конформаційних змін у протеїнах. Доведено можливість практичного застосування нового підходу для визначення придатності плазми крові людини для медичного використання.

1. Сквараїнові та норсквараїнові барвники виявляють негативний сольватохромізм та сольватофлуорохромізм, при цьому спектральні смуги норсквараїнів є більш довгохвильовими у порівнянні зі смугами сквараїнів аналогічної будови. Квантовий вихід флуоресценції норсквараїнів, на відміну від сквараїнів, майже не чутливий до полярності середовища.

2. Норсквараїнові барвники є менш чутливими до присутності протеїну (БСА), ніж сквараїнові барвники. При утворенні комплексів з БСА спектральні смуги сквараїнів зсуваються у довгохвильову частину спектру на 10–36 нм відносно максимумів у водних розчинах, при цьому квантові виходи зростають до 47 разів. Найбільші спектральні зміни при утворенні комплексів спостерігаються для оксо, диціанометиленових сквараїнів та стирилового барвників, що не містять сульфогруп, тому ці барвники є найбільш перспективними зондами. Збільшення водорозчинності барвників

шляхом введення сульфогруп знижує їх здатність до утворення комплексів з протеїнами у водних розчинах при еквімолярному співвідношенні між ними.

3. Спектральні властивості та квантові виходи флуоресценції барвників залежать від типу протеїну з яким утворюють комплекс. Відносно водного розчину, у присутності альбумінів (молекулярна маса ~66 кДа) барвники мають більші спектральні зміни, ніж з лізоцимом (молекулярна маса 15 кДа). На відміну від стирилового барвника, квантовий вихід сквараїнових барвників істотно залежить не тільки від типу альбуміну, але і від присутності зв'язаних з ним жирних кислот.

4. Чутливість визначення конформаційних змін протеїнів, оцінена за динамічним діапазоном (відношення вимірюваного параметру на рівні 90 та 10% кривої), залежить як від вибору барвників для раціометричної системи, так і від способу математичної обробки отриманих результатів. Для пари сквараїнових барвників більша чутливість досягається при обчисленні уявної ефективності переносу енергії. Для системи стирил-сквараїн більші зміни спостерігаються при визначенні раціометричного параметру (FRET ratio). Водночас, для обох систем барвників, раціометричний спосіб FRET ratio дозволяє реєстрацію менших конформаційних змін протеїнів.

5. Серед можливих комбінацій зв'язування сквараїнових барвників з бичачим альбуміном, а саме: нековалентне зв'язування (комплексоутворення) обох барвників з протеїном, ковалентне зв'язування (кон'югація) барвника-донора і комплексоутворення з барвником-акцептором, та кон'югація обох барвників — найвища чутливість (зміна параметру у 9 разів) досягається при використанні барвників, що незв'язані з протеїном ковалентним зв'язком, а найменша (у 1,1 разів) — при кон'югації обох барвників з протеїном.

6. Варіювання мольного співвідношення компонентів у системі БСА з некон'югованими сквараїновими донором та акцептором дозволяє адаптувати підхід до визначення необхідного ступеня змін конформації протеїну. Так, зменшення відносної кількості донора у порівнянні з системою з еквімолярним складом компонентів звужує діапазон реєстрованих конформаційних змін та зменшує динамічний діапазон ефективності переносу енергії у 1.5 рази, але, водночас, забезпечує чутливість до малих змін конформації протеїну.

7. В системах з гетерогенним складом протеїнів, а саме у плазмі крові людини, у зразках, що не були заморожені та заморожувалася до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, зі зменшенням температури заморожування для обох пар барвників параметр FRET ratio майже не змінюється, а ефективність переносу енергії зростає у 1.3 рази для пари сквараїнових барвників та зменшується у 1.2 рази для пари стирил-сквараїн. Щодо порівняння зразків свіжої (нативної) плазми із зразками з вичерпаним терміном придатності: обидва параметри (уявна ефективність переносу енергії та FRET ratio) змінюються у 1.6 разів для сквараїнової пари та у 1.3 рази для пари стирил-сквараїн, що дозволяє визначати придатність плазми крові для медичного використання.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Публікації у періодичних наукових виданнях інших держав, які входять до міжнародних наукометричних баз:

1. Tracing the conformational changes in BSA using FRET with environmentally-sensitive squaraine probes / **Iryna V. Govor**, Anatoliy L. Tatarets, Olena M. Obukhova, Ewald A. Terpetschnig, Gary Gellerman, Leonid D. Patsenker // Methods Appl. Fluoresc. – 2016. – Vol. 4, Is. 2. – Art. num. 024007. (Scopus, Web of Science) *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, прийнято участь у написанні тексту статті та обговоренні результатів.*

2. Molecular structure and spectral properties of indolenine based norsquaraines versus squaraines / Olga S. Kolosova, Svitlana V. Shishkina, Vered Marks, Gary Gellerman, **Iryna V. Govor**, Anatoliy L. Tatarets, Ewald A. Terpetschnig, Leonid D. Patsenker // Dyes and Pigments. – 2019. – Vol. 163. – P. 318-329. (Scopus, Web of Science) *Здобувачкою виконано спектральні та фотофізичні дослідження барвників, прийнято участь у підготовці статті до друку.*

3. Water-soluble norsquaraine dyes for protein labeling and pH-sensing applications / **Iryna V. Govor**, Olga S. Kolosova, Edward V. Sanin, Olena M. Obukhova, Anatoliy L. Tatarets, Ewald A. Terpetschnig, Leonid D. Patsenker // Dyes and Pigments. – 2019. – Vol. 170. – Art. num. 107567. (Scopus, Web of Science) *Здобувачкою виконано спектральні та фотофізичні дослідження барвників, прийнято участь у підготовці статті до друку.*

Публікації у фахових виданнях України:

4. Вплив конформаційних змін у молекулі альбуміну (BSA) на спектральні властивості сквараїнового и диціанометилен-сквараїнового барвників / **І. В. Говор**, О. М. Обухова, А. Л. Татарец, О. С. Колосова, Л. Д. Паценкер // Вісник Одеського національного університету, Серія: Хімія. – 2018. – Т. 23, Вип. 3(67). – С. 67-79. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, підготовлено статтю до друку.*

5. Застосування стирилового та сквараїнового барвників для визначення конформаційних змін у молекулах протеїнів / **І. В. Говор**, І. А. Федюняєва, О. М. Обухова, А. Л. Татарец, О. С. Колосова // Вісник Одеського національного університету, Серія: Хімія. – 2020. – Т. 25, Вип. 3(75). – С. 94-103. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, підготовлено статтю до друку.*

6. Comparison of squaraine and norsquaraine dyes for biomedical applications / **I. V. Govor**, O. S. Kolosova, O. M. Obukhova, A. L. Tatarets, L. D. Patsenker // Functional Materials. – 2020. – Vol. 27, Is. 4. – P. 836-845. (Scopus, Web of Science) *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, підготовлено статтю до друку.*

Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:

7. Govor I. V. New method for assessing the conformational changes of proteins: Förster resonance energy transfer between the microenvironment sensitive squaraine dyes / **I. V. Govor** // XIV Kharkiv young scientists conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics, 14–17 October 2014 : abstracts – Kharkiv (Ukraine), 2014. – P. ВІО-9. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, написано текст тез, підготовлено усну доповідь.*

8. Говор И. В. Исследование конформационных изменений белков с применением донорно-акцепторной пары флуоресцентных зондов / **И. В. Говор** // «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии»: 39-я Ежегодная конференция молодых ученых, 20-21 мая 2015 г. : тезисы доп. – Харьков, 2015. – С. 191. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, написано текст тез, підготовлено усну доповідь.*

9. Application of FRET between Environment-Sensitive Squaraine Dyes for Assessment of the Conformational Changes of Proteins / A. L. Tatarets, **I. V. Govor**, O. M. Obukhova, E. A. Terpetschnig, L. D. Patsenker // The 14th International Conference on Methods and Applications in Fluorescence, 13-16 September 2015 : abstracts – Würzburg (Germany), 2015. – P. 233. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, підготовлено стендову доповідь.*

10. Говор И. В. Применение ферстеровского резонансного переноса энергии между сквараиновыми красителями для оценки конформационных изменений белков / **И. В. Говор**, А. Л. Татарец, Л. Д. Паценкер // "Актуальные проблемы молекулярной спектроскопии конденсированных сред" : V Международная конференция, 22-24 сентября 2016 г. : тезисы докл. – Самарканд (Узбекистан), 2016. – С. 51-52. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, написано текст тез.*

11. Environment-sensitive fluorescent probes for the intensity and FRET based tracing of the conformational changes in proteins / A. Tatarets, **I. Govor**, I. Fedyunyayeva, E. Terpetschnig, L. Patsenker // The 15th Conference on Methods and Applications in Fluorescence, 10-13 September 2017 : abstracts – Bruges (Belgium), 2017. – P. 277. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, підготовлено стендову доповідь.*

12. Говор И. В. Влияние микроокружения на спектральные свойства красителей S485, Sq634 и Sq685 / **И. В. Говор** // "Хімічні Каразінські читання – 2018" : X Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів, 23-25 квітня 2018 р. : тези доп. – Харків, 2018. – С. 158-159. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, написано текст тез, підготовлено усну доповідь.*

13. Говор И. Фотофизические свойства красителей S485, Sq634 и Sq685 и их применение для мониторинга конформационных изменений в протеинах

/ **И. Говор** // XIII Всеукраїнська конференція молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії, 2-4 травня 2018 р. : тези доп. – Харків, 2018. – С. 49. *Здобувачкою виконано експеримент, математичну обробку даних, написано текст тез, підготовлено усну доповідь.*

14. Synthesis, molecular structure and spectral properties of indolenine based norsquaraines versus squaraines / O. S. Kolosova, A. L. Tatarts, **I. V. Hovor**, S. V. Shishkina, L. D. Patsenker // "Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles" : 8th International Conference in memoriam of Prof. Valeriy Orlov (CNCH-2018), 12-16 November 2018 : abstracts – Kharkiv, 2018. – P. 102. *Здобувачкою виконано спектральні та фотофізичні дослідження барвників.*

АНОТАЦІЯ

Говор І. В. Флуоресцентні системи на основі комбінацій чутливих до мікрооточення барвників для раціометричного визначення конформаційних змін протеїнів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.04 – фізична хімія. Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, – Харків, 2021.

В дисертаційній роботі досліджені спектрально-люмінесцентні і фотофізичні властивості ряду сквараїнових, норсквараїнових і стирилового барвників у розчинах та при взаємодії з протеїнами. Встановлені закономірності зв'язку між структурою та властивостями барвників для створення раціометричних систем з ферстерівським резонансним переносом енергії (FRET) з метою розробки нового підходу для визначення конформаційних змін в протеїнах.

Дослідження спектральних властивостей в різних середовищах показало, що норсквараїнові барвники менш чутливі до полярності середовища та до присутності протеїну, ніж сквараїни. Найбільші спектральні зміни при утворенні комплексів з протеїнами спостерігаються для барвників, що не містять сульфогруп. Збільшення водорозчинності барвників шляхом введення сульфогруп знижує їх здатність утворювати комплекси з протеїнами.

Варіювання мольного співвідношення компонентів в системі БСА з некон'югованими барвниками дозволяє адаптувати підхід до визначення різного ступеня змін досліджуваних конформацій протеїну. На основі отриманих закономірностей розроблено новий флуоресцентний підхід визначення зміни конформації протеїнів із застосуванням FRET між барвниками незв'язаними з протеїном ковалентним зв'язком. Продемонстровано можливість практичного використання нового підходу.

Ключові слова: раціометричне детектування, Ферстерівський резонансний перенос енергії (FRET), сквараїнові барвники, норсквараїнові барвники, стириловий барвник, протеїни, зміни конформації протеїнів, ефективність переносу енергії, FRET ratio.

ABSTRACT

Hovor I. V. Fluorescent systems based on combinations of microenvironment-sensitive dyes for ratiometric determination of conformational changes of proteins. - Manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Chemistry, speciality 02.00.04 – Physical chemistry. – V. N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, – Kharkiv, 2021.

In this work the spectral-luminescent and photophysical properties of a number of squaraine, norsquaraine and styryl dyes in free state in solutions and when bound to various proteins were investigated. Regularities regarding the relationship between the structure and the spectral-luminescent and photophysical properties of dyes were established with the aim to create the ratiometric systems with Förster's resonance energy transfer (FRET) to develop a new approach for the determination of conformational changes in proteins.

Squaraines are more sensitive to the polarity of the environment, what is manifested in a decrease in their quantum yield by 3.2-6.3 times during the transition from a solution in a nonpolar solvent (chloroform) to a polar medium (methanol), while the quantum yield of norsquaraines is almost independent from the polarity. The introduction of sulfo-groups increases the solubility of dyes in aqueous solution, but also it reduces the sensitivity of dyes to the polarity of environment. The presence of one carboxyl group also contributes to the solubility of the dyes in aqueous solution, but retains the sensitivity of the dyes to the polarity of the medium. Stable complexes of dyes with BSA are formed within some period of time, during which a gradual shift of fluorescence maximum of the spectrum is observed. The spectral properties of the complexes depend on the concentration of BSA. Norsquaraines are less sensitive to the presence of protein (BSA) than squaraine dyes. In contrast to dyes with sulfo-groups, which do not change their spectral properties in the presence of BSA, the spectral bands of squaraines are red-shifted by 10–36 nm relatively to the maxima in aqueous solutions upon formation of complexes with BSA.

The asymmetric squaraines with an oxygen atom and a dicyanomethylene group in the squarate moiety and one carboxypentyl group in indolenine cycle as well as styryl dye proved to be the best for use in the proposed method. These dyes were tested in complexes with six model proteins: bovine serum albumin (BSA) and human serum albumin (HSA), which do not contain fatty acids, as well as bovine serum albumin and human serum albumin with fatty acids (BSAf and HSAf, respectively), horseradish peroxidase (HRP) and lysozyme.

Squaraines have the higher quantum yields in complexes with human albumins, which depend on the presence of fatty acids. Styryl dye, on the other hand, has the higher quantum yields in complexes with bovine albumins, which is reduced in the presence of fatty acids in albumin. The lowest quantum yields of dyes were observed in complexes with HRP, while with lysozyme the complexes weren't formed at all. Protein denaturation was initiated by urea at concentrations of up to 7 M, which directly almost does not have effect on the properties of the

dyes. As a single probe, upon the denaturation of proteins, oxosquaraine shows the greatest sensitivity to changes in HSA, styryl dye — to BSA, while dicyanomethylene squaraine does not show clear selectivity towards a particular protein. The lowest sensitivity of the dyes to conformational changes are shown in complexes with HRP. Two FRET pairs were studied: first one based on two squaraines and styryl-oxosquaraine pair. Two main parameters were calculated : the efficiency of FRET and FRET ratio.

The use of dyes in pairs is a more sensitive method for determining the conformational changes in proteins as compared to the use of dyes as single probes. The greater sensitivity when calculated by the EFRET method is observed for the squaraine pair, while the styryl-squaraine pair reveals the higher sensitivity when using the FRET ratio method. At the same time, the FRET ratio parameter makes it possible to register the small conformational changes in proteins for both of the pairs.

The developed method has been tested to determine the status of blood plasma samples. Three types of samples were studied: native plasma (samples that weren't frozen), samples that were frozen to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ or $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, and samples after an expiry date (negative control). The fluorescence intensity in each of the sample types is slightly changed if dyes were used as single probes. As for FRET pairs, in samples that have not been frozen and frozen to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ or $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, with decreasing of freezing temperature the FRET ratio parameter is almost unchanged for both pairs, while the energy transfer efficiency increases by 1.3 times for squaraine pair and decreases by 1.2 times for the styryl-squaraine pair.

Compared to the native plasma samples, the efficiency of energy transfer and FRET ratio in expired samples change equally: 1.6 times for squaraine pair and 1.3 times for styryl-squaraine pair, which allows to determine the suitability of blood plasma for the use.

Keywords: ratiometric detection, Förster resonance energy transfer (FRET), squaraine dyes, norsquaraine dyes, styryl dye, proteins, protein conformation changes, energy transfer efficiency, FRET ratio.