


**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

Куперман Марина Володимирівна



УДК 577.343 + 577.112.7 + 577.112.824

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

03.00.03 – молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ.

Науковий
керівник

доктор біологічних наук, старший науковий
співробітник
Ковальська Владислава Борисівна,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН
України, провідний науковий співробітник
відділу біомедичної хімії.

Офіційні
опоненти:

доктор біологічних наук, професор
Сиволоб Андрій Володимирович,
ННЦ «Інститут біології та медицини»,
Київський національний університет імені
Тараса Шевченка, професор кафедри загальної
та медичної генетики;

доктор хімічних наук, старший науковий
співробітник
Черній Віктор Ярославович,
Інститут загальної та неорганічної хімії ім.
В.І. Вернадського НАН України, завідувач
лабораторії макроциклічних сполук і
гібридних структур.

Захист дисертації відбудеться “28” січня 2020 року о 10³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 150.

Автореферат розіслано “__” грудня 2019.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук,
старший науковий
співробітник



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

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

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

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

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

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

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

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

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

Методи дослідження: флуоресцентна спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія з розділенням у часі, спектроскопія кругового дихроїзму,

ізотермічна калориметрія титрування, абсорбційна спектроскопія, трансмісійна електрона мікроскопія, гель-електрофорез, МТТ-тест.

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

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

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

Запропоновано амліодчутливий триметиновий бензотіазоловий ціаніновий барвник для детекції амліодних агрегатів і моніторингу реакції фібрилоутворення.

Особистий внесок здобувача. Основний обсяг експериментальної частини, обробка й аналіз отриманих результатів, пошук та обробку літературних даних виконано здобувачем особисто. Автор самостійно проведено спектральні дослідження взаємодій макроциклічних сполук з глобулярними білками методами флуоресцентної і абсорбційної спектроскопії, зв'язування клатрохелатів з альбумінами методом спектроскопії кругового дихроїзму, вплив *клозо*-боратів на фібрилоутворення інсуліну методом флуоресцентної і КД спектроскопії. Дослідження впливу *клозо*-боратів на процес фібрилоутворення за допомогою КД-спектроскопії були проведені у лабораторії д.б.н. З.Ю. Ткачука. Експерименти з дослідження взаємодії клатрохелатів заліза (II) з білками методом КД, а також комплексоутворення каркасних сполук з сироватковими альбумінами методом ізотермічної калориметрії титрування виконано у співпраці з проф. Е. Гумієнною-Контецькою (Вроцлавський

Університет, Польща). Експерименти з цитотоксичності клатрохелатів до культури клітин виконано у співпраці з проф. А. Мохіром (Університет Ерлангена-Нюрнберга, Німеччина). Аналіз спектрів гасіння флуоресценції, КД-спектрів, ІТК даних, обчислення констант зв'язування макроциклів з білками та часу життя збудженого стану білків було здійснено спільно з к.ф.-м.н. М.Ю. Лосицьким. Клатрохелати заліза (II) були синтезовані в Інституті загальної і неорганічної хімії ім. В.І. Вернадського НАН України д.х.н. О.А. Варзацьким і асп. С.В. Вакаровим. *Клозо-борати* були синтезовані в лабораторії Інституту загальної і неорганічної хімії ім. Н.С. Курнакова РАН д.х.н., проф. К.Ю. Жижин.

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

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

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

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

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Дослідження взаємодій глобулярних білків з макроциклами проводили методом гасіння власної флуоресценції білка. Отримані дані коригували, враховуючи ефект внутрішнього фільтру і реабсорбцію флуоресцентного випромінювання білка лігандом. Дослідження впливу кластерів бору на вторинну структури білків (БСА, інсуліну) проводили методом спектроскопії кругового дихроїзму в УФ-області. Термодинамічні параметри комплексоутворення білок-ліганд визначали за допомогою ізотермічної калориметрії титрування (ІТК). Спектри КД, які при зв'язуванні з

білками генерують клатрохелати заліза (II), знімали у видимій області (300-600 нм). Спектри поглинання клатрохелатів отримано за допомогою абсорбційної спектроскопії. Цитотоксичність клатрохелатів визначали за МТТ-тестом на лінії клітин людської промієлоцитарної лейкемії (HL-60). Амілоїдні фібрили білків отримано шляхом інкубації розчинів інсуліну та лізоциму у HCl (pH 2) на водяній бані при 65 °C протягом 5 та 24 годин, відповідно. Моніторинг кінетики фібрилоутворення інсуліну та лізоциму проведено методом флуоресцентної спектроскопії з використанням амілоїдчутливого ціанінового барвника 7519 [Volkova K., 2011]. Інкубацію білків проводили за відсутності та у присутності кластеру бору $[B_{12}H_{12}]^{2-}$. Морфологію продуктів реакції після інкубації білків за відсутності та у присутності кластеру бору $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ досліджували методом TEM. Обробку та графічну ілюстрацію отриманих експериментальних даних здійснювали у програмному пакеті OriginPro 8.1.

Дослідження взаємодій глобулярних білків з клозо-боратами. Клозо-борати – об’ємні кулеподібні кластери з делокалізованим зарядом, які можна модифікувати замісниками різної природи, міняючи сумарний заряд кластера і геометрію сполуки [Grimes R. N., 2004]. Зв’язування білок-ліганд вивчалось за впливу кластерів на власну флуоресценцію білків, за впливу на вторинну структуру білка (методом кругового дихроїзму); термодинамічні характеристики комплексоутворення отримані ізотермічною калориметрією титрування. Ряд білків включав сироваткові альбуміни (бичачий, БСА, і людський, ЛСА), β -лактоглобулін (БЛГ), лізоцим, імуноглобулін G (IgG). Серед досліджених кластерів були незаміщені клозо-борати $[B_{10}H_{10}]^{2-}$, $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ та їх функціональні похідні: аліфатичне – В-4; ароматичні – В-8, В-9; галоген - $[B_{10}Hal_{10}]^{2-}$ (Hal= Cl, Br, I), $[B_{12}Hal_{12}]^{2-}$ (Hal= Cl, I). Структури гідроген клозо-боратів наведені на рис. 1.

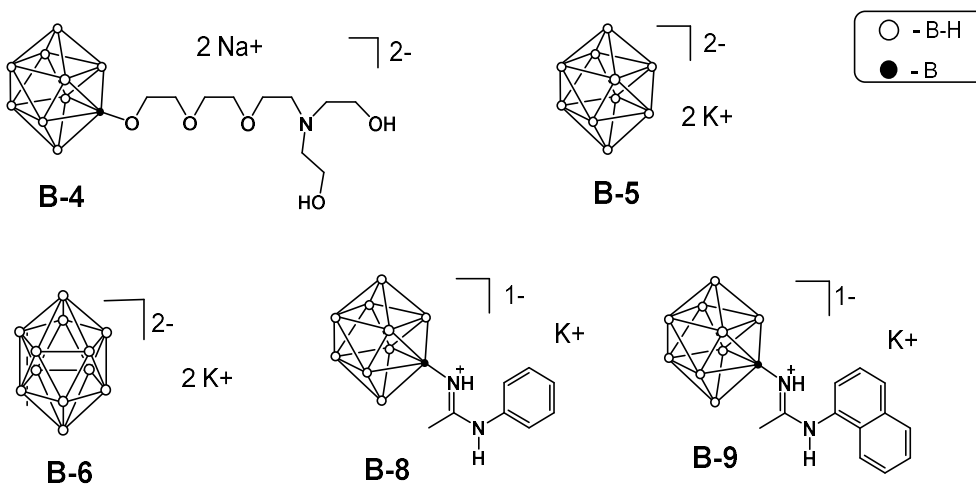


Рис. 1.
Структури
гідроген клозо-
боратів

Значне гасіння власної флуоресценції сироваткових альбумінів (БСА та ЛСА) клозо-боратами (до 11 і 3 разів відповідно, рис. 2а, 2б) свідчить про зв’язування між ними. Гасіння флуоресценції БЛГ, лізоциму, Ig G було менш значним (до 2 разів, рис. 2в – 2д). Клозо-борати з ароматичними замісниками (В-

8, В-9) гасили флуоресценцію всіх білків інтенсивніше, причому, В-9 значно сильніше ніж В-8 (гасіння емісії БСА до 11 і 3,4 разів відповідно, рис. 2а). Клозо-борат В-4 з алкіламіно-замісником впливав лише на емісію БСА, ЛСА і лізоциму (рис. 2а - 2в). Додавання незаміщених клозо-боратів (В-5, В-6) до білків призводить до незначного ефекту (рис. 2).

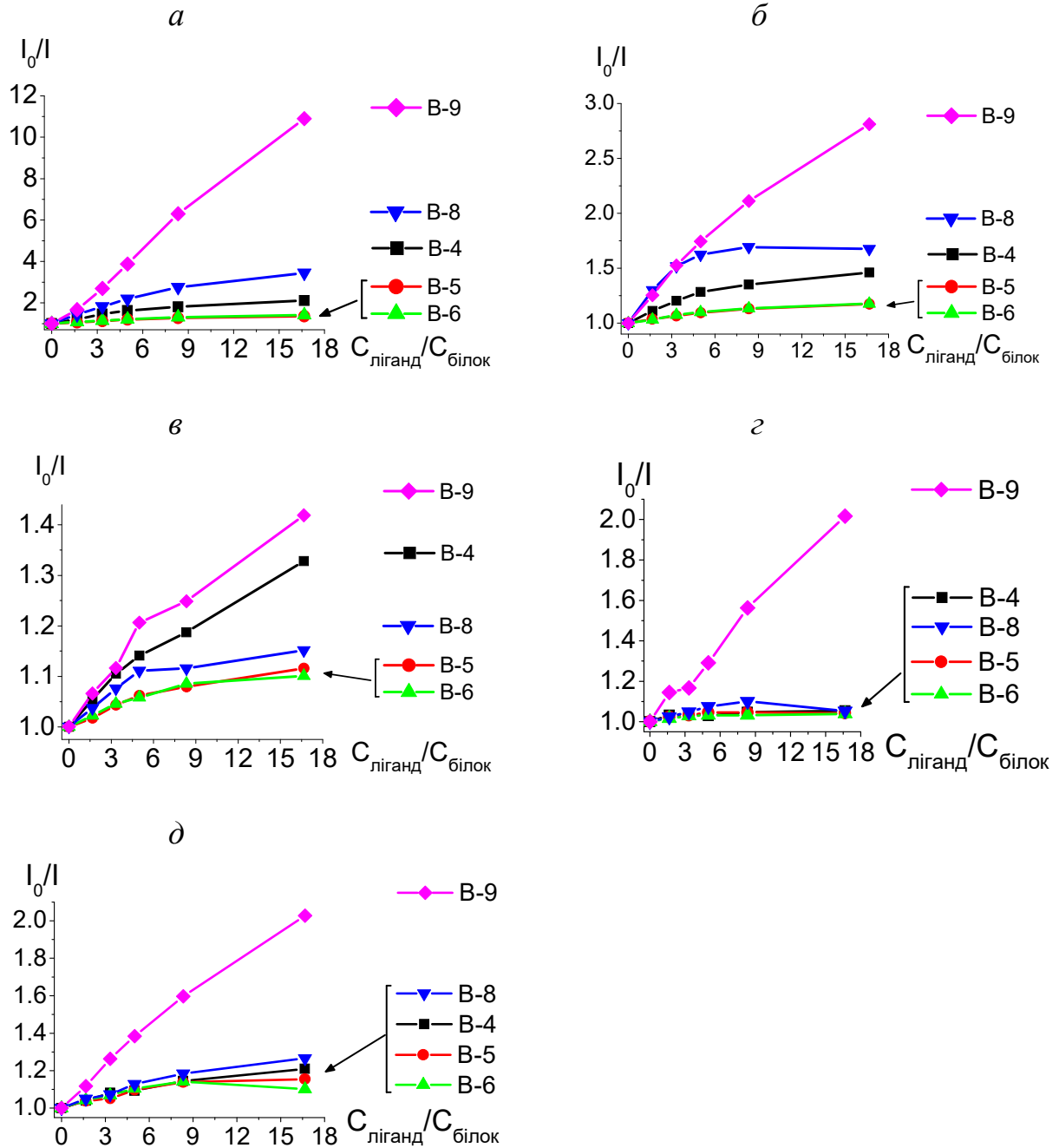


Рис. 2. Графіки гасіння люмінесценції білків (а – БСА, б – ЛСА, в- лізоциму, г – БЛГ, д – Іg G) клозо-боратами в залежності від співвідношення концентрацій клозо-борату до білка. I_0 та I – інтенсивність флуоресценції білку за відсутності та в присутності клозо-борату

Було показано, що додавання до альбумінів розчинів клозо-боратів ($C = 10 \mu\text{M}$) призводить до зменшення середнього часу загасання флуоресценції (з

6,10 до 4,65 нс у випадку БСА і з 5.33 до 4.50 нс у випадку ЛСА). Найбільш виражене зменшення часу життя збудженого стану флуоресценції альбумінів також спостерігалось у присутності ариламіно-заміщених *клозо*-боратів (до 1,3 рази у БСА і до 1,2 рази у ЛСА). Оскільки головні сайти зв'язування альбуміну (Sudlow 1 і 2, рис 4) переважно гідрофобні [Fanali G., 2012], цілком імовірно, що ароматичні замісники сприяють зв'язуванню *клозо*-боратів з білком.

Наявність галоген *клозо*-боратів значно впливає на інтенсивність власної флуоресценції БСА (гасіння до 19 разів, рис. 3а) та менше у випадку ЛСА (приблизно до 2 разів, рис. 3б). У випадку галоген *клозо*-боратів гасіння флуоресценції альбумінів (БСА і ЛСА) залежить від типу кластеру та галоген-атомів у структурі кластеру; воно зростає від $[B_{10}Hal_{10}]^{2-}$ до $[B_{12}Hal_{12}]^{2-}$ і у рядах $[B_{10}Cl_{10}]^{2-} \rightarrow [B_{10}Br_{10}]^{2-} \rightarrow [B_{10}I_{10}]^{2-}$ і $[B_{12}Cl_{12}]^{2-} \rightarrow [B_{12}I_{12}]^{2-}$ (рис. 3). В усіх випадках, гасіння люмінесценції галоген-кластерами є більшим у порівнянні з гасінням відповідними незаміщеними кластерами, що значною мірою можна пояснити зовнішнім ефектом важкого атома.

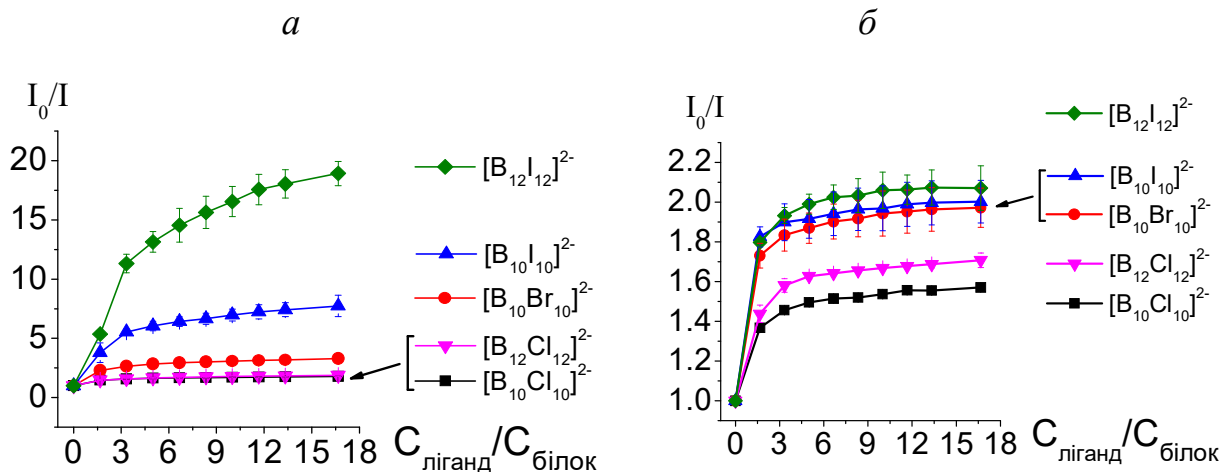


Рис. 3. Графіки гасіння люмінесценції білків (а – БСА, б - ЛСА) *клозо*-боратами у залежності від співвідношення концентрацій *клозо*-борату до білка

Різний вплив *клозо*-боратів на БСА і ЛСА можна пояснити різною кількістю флуоресцентних амінокислотних залишків у молекулах (два триптофани у БСА і лише один у ЛСА) [Ghuman J., 2005]. Більш інтенсивне гасіння флуоресценції БСА порівняно з ЛСА пояснюється тим, що додатковий Трп-134 у складі БСА на поверхні субдомену ІВ є більш доступним, тоді як Трп-213 (БСА) або Трп-214 (ЛСА) сховані всередині глобули у гідрофобному (неполярному) оточенні субдомену ІА (рис. 4).

Апроксимацією даних флуоресцентного титрування було показано, що незважаючи на слабкий вплив на люмінесценцію ЛСА, значення констант зв'язування знаходяться в одному діапазоні ($10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$). Це свідчить про сильне зв'язування з обома білками.

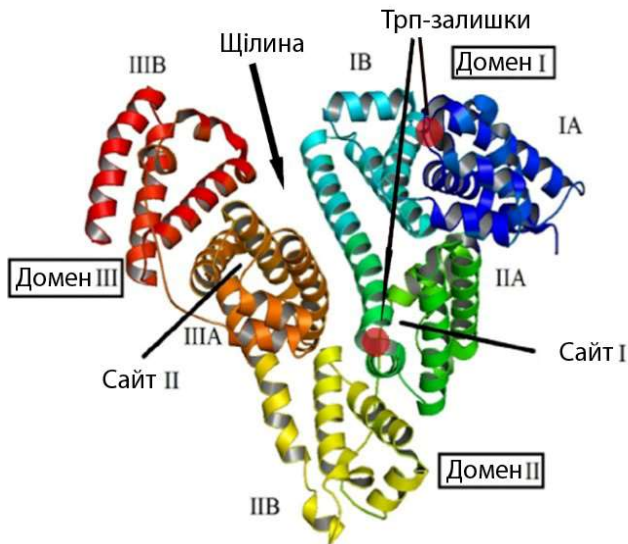


Рис. 4. Структура бичачого сироваткового альбуміну. Адаптовано з [Moradi N., 2015]

Методом спектроскопії КД показано, що зв'язування *клозо*-боратів з альбумінами не викликає змін у вторинній структурі білка (зменшення вмісту α -спіральних ділянок у БСА не перевищує 1%). Можливо, кластери асоціюються у порожнинах на поверхні білка переважно через слабкі міжмолекулярні взаємодії (ймовірно, гідрофобні й електростатичні).

Комплексоутворення альбумін-*клозо*-борат підтверджено методом ІТК на прикладах зв'язування з ЛСА гідроген *клозо*-боратів В-5 і В-8 та з БСА галоген *клозо*-боратів $[B_{10}Hal_{10}]^{2-}$, Hal = Cl, Br, I. За даними ІТК, комплексоутворення ЛСА з гідроген *клозо*-боратами відбувається в сайтах зв'язування з близькими енергетичними параметрам, а зв'язування з БСА галоген *клозо*-боратів - у двох типах сайтів. Показана вища афінність до альбумінів галоген *клозо*-декаборатів (константи зв'язування K_1 і K_2 порядку $10^4 - 10^6 M^{-1}$) у порівнянні з гідроген кластерами (K порядку $10^3 M^{-1}$); комплекси альбумінів з галоген- або ариламинопхідними характеризуються більшою кількістю аніонів (4-5) на молекулу білка у порівнянні з такими для незаміщених гідроген кластерів (2).

Таким чином, найбільш інтенсивне зв'язування з білком спостерігалось у випадку ариламино- і галоген-заміщених кластерів бору з сироватковими альбумінами. Вища афінність до альбумінів галоген *клозо*-боратів і більша кількість кластерів у комплексі з альбуміном у порівнянні з гідроген кластерами бору робить галоген кластери більш привабливими для досліджень як потенційні агенти для бор нейтрон захоплюючої терапії онкологічних захворювань.

Зміни реакції амілоїдної агрегації інсуліну у присутності *клозо*-борату та розробка амілоїдчутливих флуоресцентних барвників. Амілоїдна агрегація білків відбувається шляхом зміни нативної конформації білка та білок-білкових взаємодій внаслідок різних екзогенних або ендогенних факторів, що призводить до певних захворювань (хвороби Альцгеймера і Паркінсона) [Dovidchenko N. V., 2014]. Вплив кластерів бору на білок-білкові взаємодії було досліджено на прикладі вивчення амілоїдної фібрилізації інсуліну під дією

дианіонного *клозо*-борату $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ (В-6) *in vitro*. Дослідження реакції агрегації проводили у відсутності та при різних концентраціях *клозо*-борату.

Для оцінки впливу *клозо*-борату на конформаційні зміни інсуліну під час фібрилоутворення вивчалися КД-спектри інсуліну. Інсулін має КД-спектр, характерний для білка з переважно α -спіральною структурою (негативні смуги на 208 і 222, нм рис. 5) [Mishra N. K., 2013]. Виявлено, що інтенсивність цих КД-смуг у спектрах інсуліну після 60 хв. термоінкубації з *клозо*-боратом зменшується, що не спостерігалось для вільного білка, рис. 5. Це свідчить про втрату α -спіральних ділянок на ранніх стадіях фібрилізації (ранню денатурацію). Поява негативних смуг на 218-220 нм у КД-спектрах інсуліну у вільному стані та з *клозо*-боратом після 150 хвилин процесу термоінкубації (рис. 5) свідчать про утворення префібрилярних агрегатів або амілоїдних фібрил з переважно β -складчастою структурою [Mishra N. K., 2013]. Проте, асоційовані з β -складчастою структурою КД-смуги білка значно менш інтенсивні, якщо фібрилізацію проводили з *клозо*-боратом (до 3.8 разів при 100 μ М В-6), що, можливо, пов'язане з утворенням меншої кількості β -складчастих інсулінових агрегатів або їх злипанням у згустки і латеральні агрегати. Ми припускаємо, що зв'язування частково розгорнутих інтермедіатів інсуліну з *клозо*-боратом також змінює рівновагу між електростатичними та гідрофобними взаємодіями, які є критичними для процесу фібрилізації.

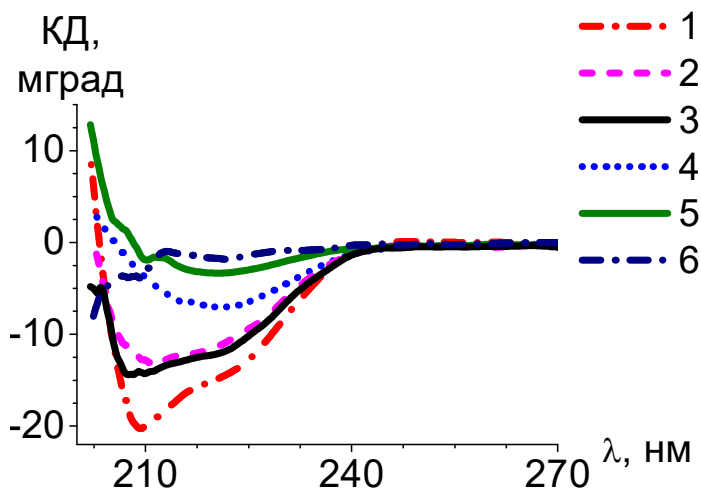


Рис. 5. КД-спектри інсуліну при 65 °С (рН 2) у вільному стані та у присутності 10 і 100 μ М В-6:

- 1 - інсулін у вільному стані через 70 хв. з початку інкубації;
- 2 - інсулін з В-6 (10 μ М) через 60 хв. з початку інкубації;
- 3 - інсулін з В-6 (100 μ М) через 60 хв. з початку інкубації;
- 4 - інсулін у вільному стані через 150 хв. з початку інкубації;
- 5 - інсулін з В-6 (10 μ М) через 150 хв. з початку інкубації;
- 6 - інсулін з В-6 (100 μ М) через 150 хв. з початку інкубації

Зміни кінетики фібрилоутворення вивчали за допомогою амілоїдчутливого ціанінового барвника 7519. Барвник 7519 значно підвищує власний

флуоресцентний сигнал при зв'язуванні з β -складчастими структурами, тому даний метод показує їх відносну кількість протягом реакції фібрилізації. Встановлено, що вплив на кінетику фібрилоутворення В-6 залежить від концентрації (рис. 6): за низької концентрації кластеру (10 μM) спостерігалось більш інтенсивне зростання флуоресцентного відгуку амілоїдчутливого барвника у порівнянні з таким при фібрилоутворенні вільного інсуліну; за високої концентрації *клозо*-борату (100 μM) – незначна інтенсивність флуоресцентного відгуку 7519 протягом усього процесу.

Припускаємо, що низька концентрація кластеру В-6 сприяє утворенню префібрилярних інтермедіатів [Chatani E., 2014], а його висока концентрація - значно підвищує схильність фібрилярних інтермедіатів і зрілих фібрил до злипання у згустки і латеральні агрегати, що зумовлює слабкий відгук флуоресцентного барвника.

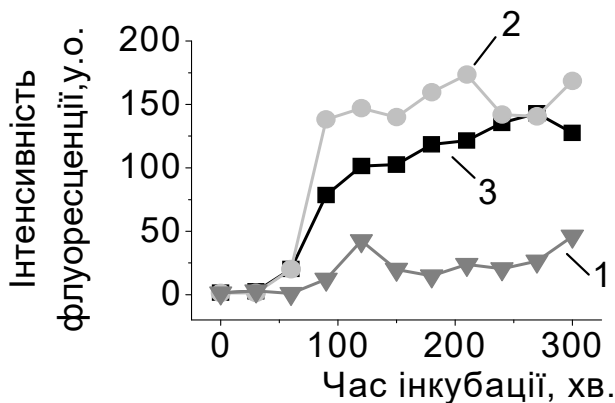


Рис. 6. Оцінка кінетики фібрилоутворення інсуліну у відсутності та присутності різних концентрацій *клозо*-борату за допомогою флуоресцентного барвника 7519.

1 – інсулін інкубований з 100 μM В-6;
2 – інсулін інкубований з 10 μM В-6;
3 – інсулін у вільному стані

Дані візуалізації продуктів процесу фібрилізації ТЕМ-методом показали, що фібрили – основний продукт агрегації інсуліну як у присутності, так і за відсутності В-6 (рис. 7).

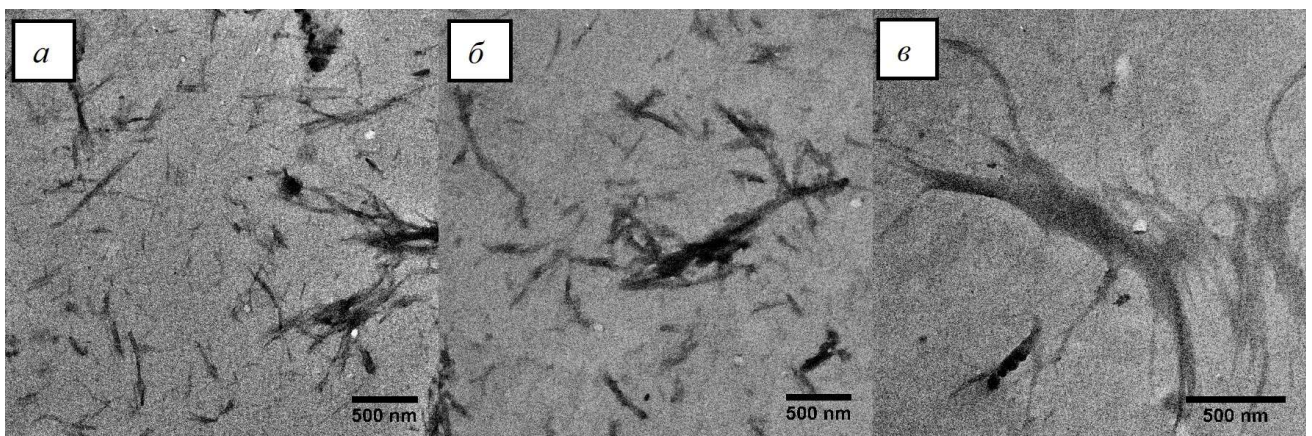


Рис. 7. ТЕМ зображення продуктів фібрилоутворення інсуліну: *а* – у вільному стані; *б* – у присутності 10 μM В-6; *в* – у присутності 100 μM В-6. Шкала 500 нм

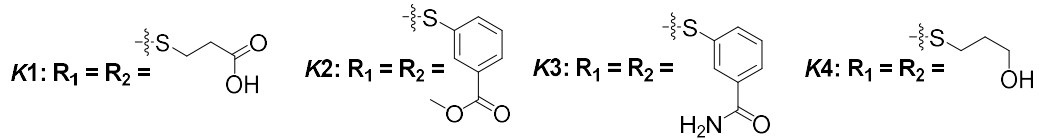
При термоінкубації інсуліну у вільному стані переважно утворюються пучки фібрил, які містять розгалужені фібрилярні агрегати і незначну кількість

поодиноких зрілих фібрил (рис. 7а). Присутність В-6 сприяє формуванню нерозгалужених фібрил інсуліну з більшим діаметром і їх високій схильності до злипання в агрегати (рис. 7б), а при високих концентраціях кластеру (100 μM) – латеральній агрегації фібрил (рис. 7в).

Таким чином, було вперше досліджено амілоїдну агрегацію білка під дією дианіонного кластеру бору $[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]^{2-}$. Ефект кластеру $[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]^{2-}$ залежить від його концентрації. В-6 здатний інтенсифікувати денатурацію інсуліну, а при низьких концентраціях (10 μM) – прискорювати утворення амілоїдних фібрил. *Клозо-борат* індукуює зміни у морфології фібрил, що призводить до формування нерозгалужених структур з більшим діаметром, ніж у випадку фібрилізації вільного інсуліну; у високих концентраціях (100 μM) кластер сильно збільшує здатність до латеральної агрегації. Завдяки цим властивостям *клозо-борат* В-6 представляє інтерес для дослідження як агент для спрямовування реакції фібрилізації та подальшого аналізу ефектів аніонів на конформаційні зміни білка та агрегації.

Зручним методом для виявлення білків та інших біомолекул є флуоресцентна спектроскопія з використанням молекул-зондів, чутливих до певних структурних ділянок. З метою пошуку нових флуоресцентних барвників для детекції білкових агрегатів та моніторингу кінетики реакції фібрилоутворення в реальному часі було досліджено ряд бензотіазол триметинових ціанінових барвників з різними N,N' -замісниками як зондів для визначення амілоїдних фібрил. Барвники показали значне підвищення інтенсивності флуоресценції (до 70 разів) і високі значення квантового виходу (до 0,42) у присутності амілоїдних фібрил. Флуоресцентний відгук дослідженого барвника D-51 з сульфоалкільною групою є вищим у порівнянні з ціаніновим барвником 7519, що використовується в роботі (підвищення до 40 разів) [Volkova K., 2011]. Крім того показано придатність барвників з N -сульфоалкільною (D-51) і N, N' -аміноалкільними (D-151) групами для моніторингу кінетики реакції фібрилоутворення в реальному часі.

Вивчення взаємодій білків з клатрохелатами заліза (II). Клатрохелати є тривимірними макрополіциклічними металокомплексами, які можна легко модифікувати хімічно і таким чином надати молекулі необхідні властивості: просторову геометрію, заряд (негативний, позитивний), електронні й спектральні властивості [Voloshin Y. Z., 2000]. Взаємодію білків з клатрохелатами, її залежність від типу замісників в макроциклі та їх ізомерії досліджували за впливу клатрохелатів на флуоресценцію бичачого і людського сироваткових альбумінів. Структури досліджених клатрохелатів представлено на рис. 8.



клатрохелати з карбоксибенільними замісниками:

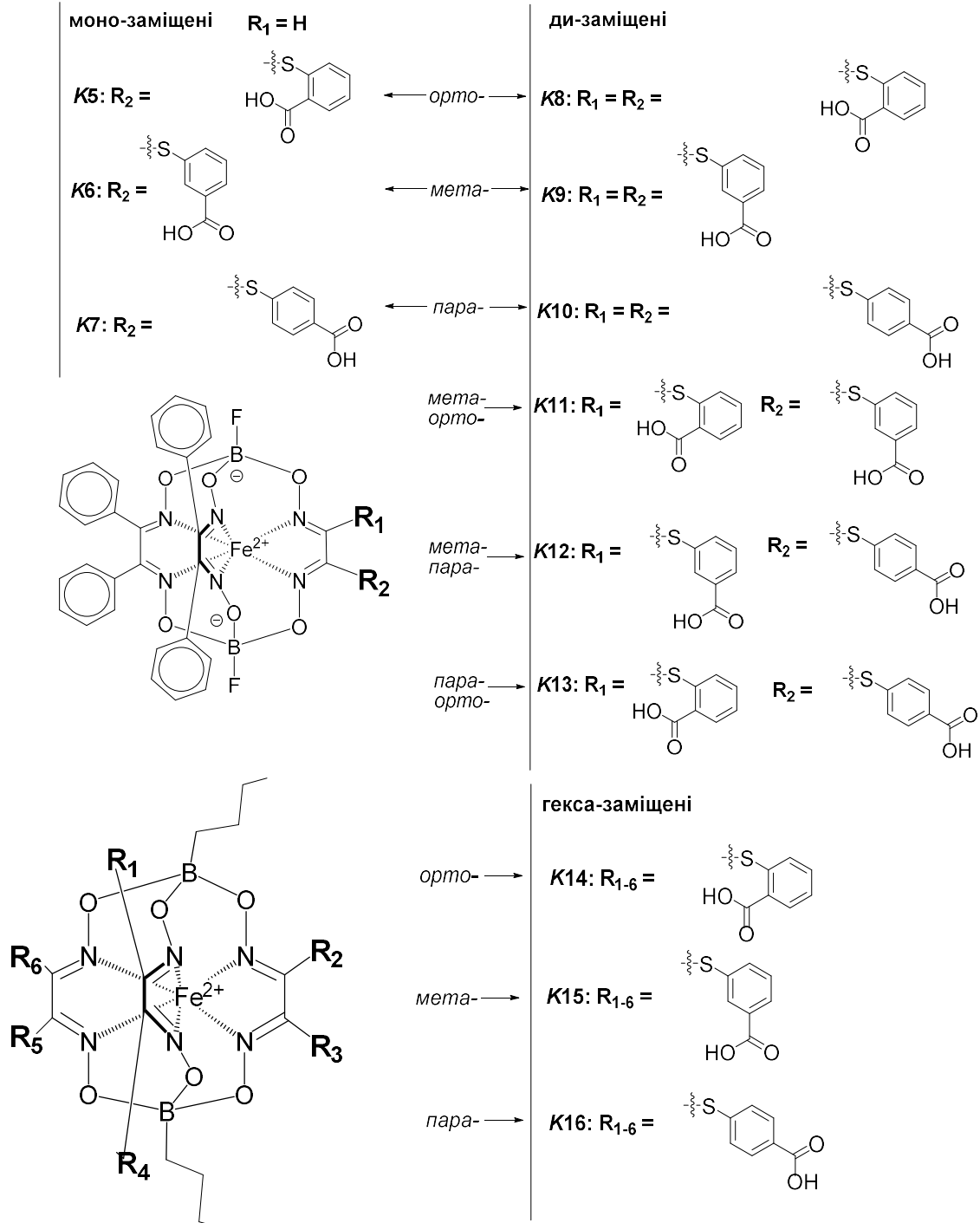


Рис. 8. Структури клатрохелатів заліза (II)

Значне гасіння флуоресценції альбумінів (рис. 9) і короткохвильовий зсув максимуму емісії при додаванні клатрохелатів свідчить про їх взаємодію та

утворення комплексів. Вплив на флуоресценцію білка і, відповідно, на зв'язування з ним залежить від структури та ізомерії замісників у клатрохелаті.

Інтенсивне гасіння флуоресценції бичачого альбуміну у 7 – 17 разів спостерігалось у випадку клатрохелатів **K8** – **K16**, з двома і шістьма карбоксифенільними, і **K1**, з двома карбоксиалкільними групами (рис. 9). Найбільш виражений ефект був у випадку ди-*мета*-карбоксифенільного ізомеру, **K9** (гасіння емісії до 17 разів, рис. 9). Тоді як зменшення флуоресцентного сигналу білка було менш значним при взаємодії з клатрохелатами з однією карбоксифенільною групою (**K5** – **K7**, гасіння у 4,1 – 6,6 разів, рис. 9) або не вираженим для комплексів **K2** – **K4**, з естерними, амідними, гідроксиалкільними групами (гасіння до 1,2 разів, рис. 9). На рис. 9 представлено гасіння флуоресцентного сигналу альбуміну клатрохелатами з різними замісниками для деяких з досліджених макроциклів.

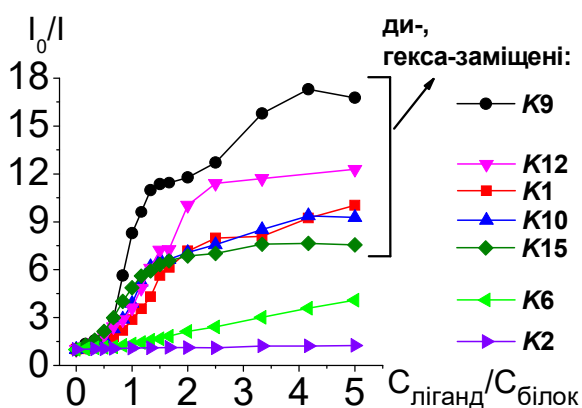


Рис. 9. Графіки гасіння люмінесценції БСА клатрохелатами в залежності від співвідношення концентрацій клатрохелату до білка

Вплив на емісію ЛСА був менш значним (гасіння до 2,3 разів), що швидше за все пов'язано з менш доступним лише одним Трп амінокислотним залишком.

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

Було показано, що взаємодія бичачого сироваткового альбуміну з оптично неактивними (рис. 10б) у вільному стані клатрохелатами заліза (II) спричинює індукцію сигналу кругового дихроїзму цих сполук у видимій області спектру (350 – 600 нм, рис. 10).

При зв'язуванні з БСА клатрохелатів **K5** – **K13**, з однією або двома карбоксифенільними групами, індуковані спектри кругового дихроїзму (КД) мають схожу форму з максимумами близько 350, 450, 515 нм. Інтенсивності КД-смуг залежать від кількості та ізомерії замісників (найбільш інтенсивний КД-спектр, з амплітудою 80,2 мград, показав клатрохелат **K9** з двома *мета*-карбоксифенільними групами, рис. 10а). В присутності БСА КД-спектри,

клатрохелатів **K1** – **K4**, з естерними, амідними, карбокси- і гідрокси-алкільними групами слабоінтенсивні (рис. 10б).

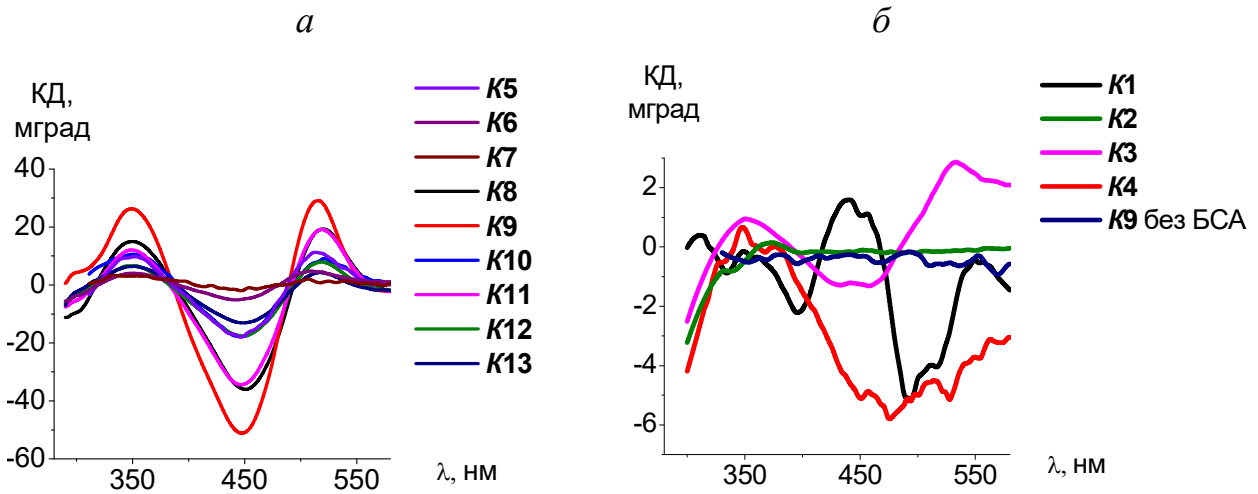


Рис. 10. Спектри індукованого КД комплексів БСА з клатрохелатами

Для визначення чутливості клатрохелатів до особливостей структури білків було порівняно ІКД-відгуки при зв'язуванні з різними та родинно-близькими білками – БЛГ, БСА і ЛСА [Huang В.Х., 2004] – гекса-карбоксифеніл заміщених (*орто*-/*мета*-/*пара*-) клатрохелатів, **K14** – **K16**.

Було показано, що при зв'язуванні БЛГ, БСА і ЛСА з гекса-карбоксифенільними клатрохелатами **K14** – **K16** демонструють ІКД-сигнали різної інтенсивності (у випадку *мета*-ізомеру, **K15**, рис. 11б) або також різної форми смуг (для *орто*- і *пара*-ізомерів, **K14** і **K16**, рис. 11а, 11в). Таким чином, клатрохелати можуть відрізняти різні, зокрема родинно-близькі білки. Можна припустити, що ізомерія кінцевих карбоксифенільних груп впливає на організацію комплексу з білком і його стабільність.

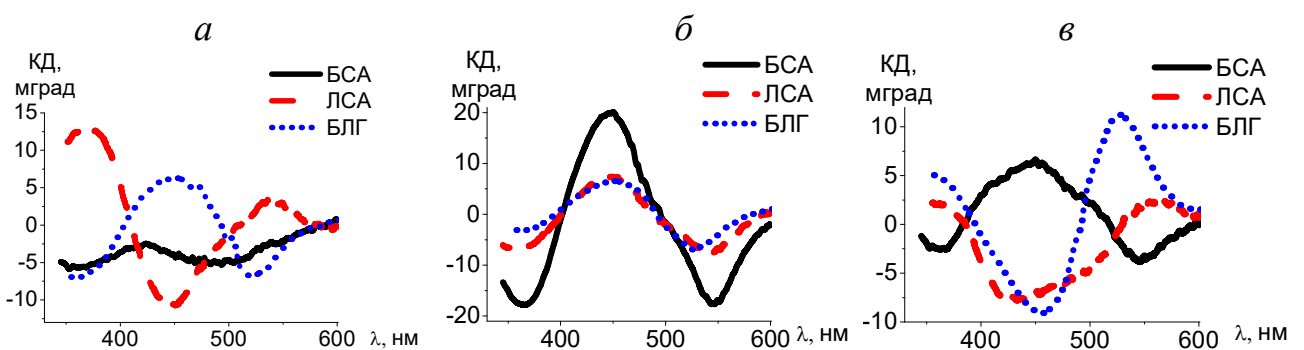


Рис. 11. ІКД спектри *орто*- (а), *мета*- (б), *пара*- (в) ізомерів гекса-карбокси клатрохелатів у присутності БСА, ЛСА і БЛГ

Проте, КД-спектри, які індуковані зв'язуванням з БСА гекса-карбоксифенільних клатрохелатів **K14** – **K16**, менш інтенсивні ніж для дикарбоксифенільних аналогів **K8** – **K13**.

Різні ІКД-сигнали є наслідком різної організації комплексів білок-клатрохелат. Таким чином, клатрохелати заліза (II) можуть бути запропоновані як КД-репортери, чутливі до конформаційних відмінностей білків.

Також було досліджено чутливість клатрохелатів до конформаційних змін білка (на прикладі альбуміну) методами гасіння власної люмінесценції білку і спектроскопії КД. Конформаційні зміни альбуміну були спричинені змінами рН середовища (табл. 1) [Amigó M., 2010].

Таблиця 1

Конформації альбуміну при різних значеннях рН середовища

Конфомер	F (швидка)	↔	N (нормальна)	↔	B (основна)
Інтервал рН	2,7- 4,3		4,3 – 8		8-10
рН перехід		4,3		8	

Виявлено, що інтенсивність гасіння флуоресценції БСА гекса-карбоксі ізомерами клатрохелатів **K14** – **K16** при різних рН відрізняється (рис. 12а): слабке гасіння при рН 3,7 (до 1,8 разів, F-конформація альбуміну), значне – при рН 6 (гасіння у 15-37 разів, N-конформація альбуміну), середній ефект при рН 7,9 (гасіння близько 7 разів, N–B перехід альбуміну).

Інтенсивність гасіння власної флуоресценції білка також залежить від будови ізомерів (*орто*- / *мета*- / *пара*-) клатрохелатів.

Також було показано, що у складі комплексів з БСА або ЛСА ІКД-смуги виникали у випадку всіх трьох ізомерів гекса-карбоксі клатрохелатів **K14** – **K16** в області рН 4-9. Конформаційні зміни білкової глобули, спричинені зміною рН, ведуть до змін в спектрах ІКД клатрохелату (рис. 12б). В залежності від типу сироваткового альбуміну (БСА або ЛСА) і ізомерії макроциклу змінювались форма й інтенсивність або лише інтенсивність ІКД-смуг при варіюванні рН.

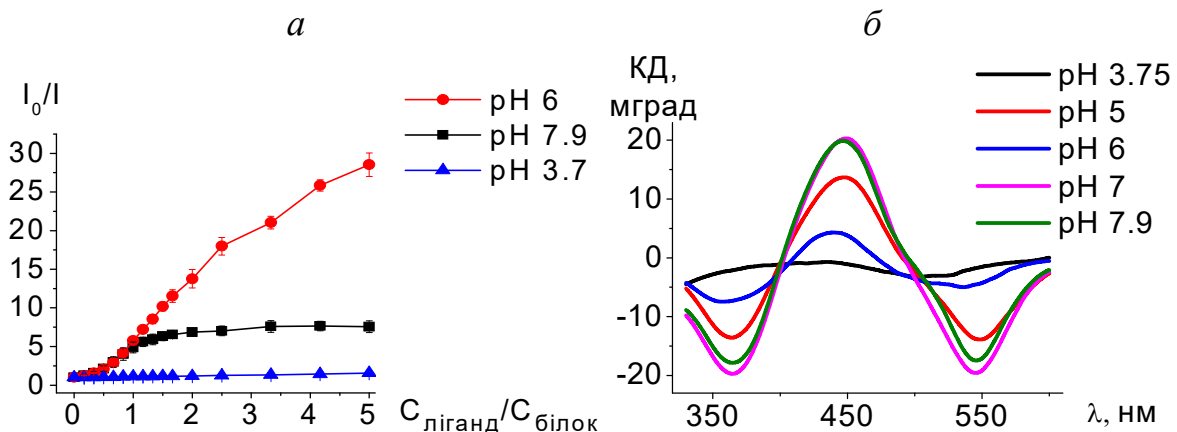


Рис. 12. Графіки гасіння флуоресценції БСА *мета*-ізомером, **K15** (а) і ІКД спектри клатрохелату **K15**, зв'язаного з БСА (б) при різних рН

У кислому середовищі (рН 3.7) всі досліджувані клатрохелати заліза (II) генерують ІКД-сигнали низької інтенсивності (амплітудою до 2,2 мград для

орто-ізомеру, **K14**, у комплексі з БСА). Це, а також низька ступінь гасіння флуоресценції може свідчити про часткову дисоціацію комплексу альбумін-клатрохелат у кислому середовищі при конформаційному переході білка (часткове відмежування домену III і домену I БСА).

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

Для того, щоб визначити, у якому сайті альбуміну знаходиться клатрохелат при зв'язуванні, було проведено експеримент з витіснення клатрохелату з його комплексу з альбуміном специфічними до головних сайтів 1 і 2 лігандами (варфарин та ібупрофен відповідно) [Venturini D., 2017].

Афінність сайт-специфічних речовин до альбуміну на порядки вище ніж така для клатрохелату ($2,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ для варфарину, $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ для ібупрофену і $5,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ для *пара*-клатрохелату **K16**, Табл. 2). Було показано, що навіть більш ніж 30-кратний надлишок сайт-специфічних лігандів призводить до незначних змін у інтенсивності ІКД-смуг клатрохелату. При додаванні 50-кратного надлишку ібупрофену до комплексу ЛСА-**K16** інтенсивність ІКД смуг зменшується до 2,5 разів, рис. 13. Це свідчить про незначний вплив ібупрофену і варфарину на комплекс білок-клатрохелат.

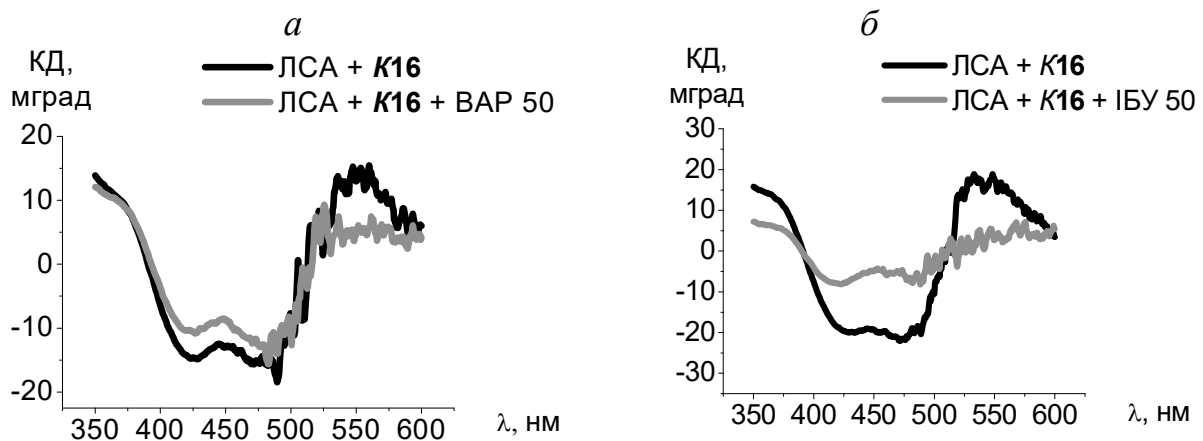


Рис. 13. ІКД-спектри комплексу клатрохелат-альбумін, а також ІКД-спектри при додаванні до комплексу надлишків а) варфарину, VAR, або б) ібупрофену, ІБУ. $S_{\text{БСА}} = 8 \times 10^{-5} \text{ M}$, $S_{\text{клт}} = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$; $S_{\text{ібу}} = S_{\text{вар}} = S_{\text{клт}} \times 50 = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$

Для ди-карбоксіфенільних клатрохелатів, які інтенсивно зв'язуються з білками і мають найбільш виражені ІКД-відгуки, досліджено цитотоксичність на лінії клітин людської промієлоцитарної лейкемії (HL-60) за допомогою МТТ-тесту. Для дослідження впливу ізомерії кінцевих груп на цитотоксичність до клітин був проаналізований ряд ди-заміщених клатрохелатів з однаковими (ди-*орто*-, **K8**/ди-*мета*-, **K9**/ди-*пара*-, **K10**) або різними (*орто*-*мета*-, **K11**/*мета*-*пара*-, **K12**/*орто*-*пара*-, **K13**) ізомерними карбоксіфенільними групами. Згідно клітинного експерименту, всі клатрохелати з однаковими ізомерними замісниками і *мета*-*пара*- клатрохелат (**K12**) мають близьку токсичність ($IC_{50} \approx 41 \mu\text{M}$). *Орто*-*мета*- заміщений клатрохелат (**K11**) дещо менш токсичний,

$IC_{50} \approx 80 \mu M$. Ізомер з *орто-пара-* (**K13**) групами значно відрізняється від інших і має $IC_{50} > 150 \mu M$. Таким чином, клатрохелати продемонстрували низьку цитотоксичність; просторова будова клатрохелату, яка визначається його замісниками, впливає на цитотоксичні властивості сполук.

Термодинамічні параметри комплексоутворення БСА з гексакарбоксіфеніл заміщеними клатрохелатами, **K14** – **K16**, отримані методом ізотермічної калориметрії титрування, показують різницю між механізмами комплексоутворення *орто-* і *мета-* ізомерів, **K14** і **K15**, та *пара-* ізомеру, **K16**, з білком (Табл. 2).

Таблиця 2

Термодинамічні характеристики зв'язування клатрохелатів з БСА, отримані методом ізотермічної калориметрії титрування, $t = 25^\circ C$

Клатрохелат	K_a , 10^3	n^*	ΔH	ΔS	$T\Delta S$	ΔG
K14	24,0	1,95	-9,1	53,2	15,8	-24,9
K15	28,0	1,9	-17,2	27,2	8,1	-25,3
K16	5,3	0,9	-23,2	-6,5	-1,9	-19,3

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

Видно, що значення ΔG (і, відповідно, констант зв'язування) для комплексоутворення БСА з *мета-* і *орто-* ізомерними клатрохелатами, **K14** і **K15**, схожі (K порядку $10^4 M^{-1}$), тоді як з *пара-* заміщеною сполукою, **K16** – менше (K порядку $10^3 M^{-1}$). Показано, що асоціація з БСА *пара-* ізомеру, **K16**, переважно відбувається за рахунок сил міжмолекулярного притягання ($\Delta H < 0$), а *мета-* і *орто-* ізомерів, **K14** і **K15** – гідрофобних ($\Delta S > 0$) і сил міжмолекулярного притягання ($\Delta H < 0$). Зв'язування БСА з *орто-* і *мета-* заміщеними клатрохелатами заліза (II) більш сприятливе у порівнянні з *пара-* заміщеним аналогом. Різниця у механізмах зв'язування може бути пояснена через просторове розташування кінцевих функціональних замісників у клатрохелаті.

Кількість молекул ліганду (клатрохелату) на макромолекулу БСА (n) теж залежить від ізомерії клатрохелатів заліза (II). У комплексах з БСА кількість молекул *орто-* і *мета-* заміщених клатрохелатів було оцінено як $n = 2$, тоді як для *пара-* ізомеру $n = 1$. Тобто, можна припустити, що один додатковий сайт зв'язування на молекулі БСА доступний лише для «стабільного зв'язування» з *орто-* і *мета-* ізомерами.

Механізм появи оптичної активності клатрохелатів було досліджено спільно з нашими колегами д.х.н О.А. Варзацьким, асп. С.В. Вакаровим (Інститут загальної і неорганічної хімії) [Kovalska V.V., 2018]. Виникнення оптичної активності, ймовірно, спричинено фіксацією одної з хіральных конформацій клатрохелату у складі комплексу з альбуміном. Тобто альбумін

стереоселективно зв'язує хіральні молекули з рацемату [Varshney A., 2010, Ascoli G., 2006], і, як наслідок, селективно фіксує обраний конформер клатрохелату завдяки асиметричному оточенню сайту зв'язування.

Оскільки для зв'язування з білком молекулі клатрохелату необхідна присутність карбоксильного замісника, ми вважаємо, що електростатичні взаємодії між їх карбоксильними групами і бічними групами амінокислотних залишків лізину і аргініну грають важливу роль у комплексоутворенні білок-клатрохелат. Також свій вклад у зв'язування вносять і слабкі взаємодії: ароматичні або π -стекінг фенільних груп клатрохелату і бічних груп ароматичних амінокислотних залишків Phe, Tyr або Trp, водневі зв'язки.

Комп'ютерне моделювання комплексу було проведено співробітником ІЗНХ НАН України асп. С.В. Вакаровим. Для цього були обрані ЛСА і ди-мета-карбоксифеніл заміщений клатрохелат, **K9** (рис. 14).

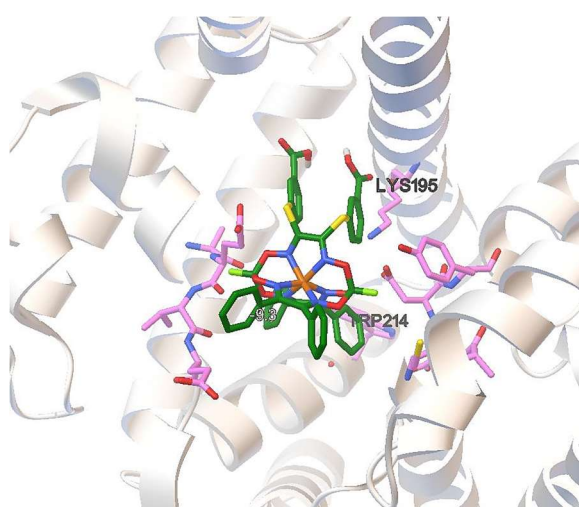


Рис. 14. Локалізація у сайті зв'язування 1 ЛСА клатрохелату, **K9**, згідно молекулярного докінгу

Згідно розрахунків молекулярного докінгу, зв'язування альбумін-клатрохелат відбувається у сайті 1 альбуміну, що узгоджується з даними експерименту з гасіння власної флуоресценції білка. З рис. 14 видно, що у сайті 1 альбуміну клатрохелат знаходиться близько до Ліз-195 і Трп-214.

ВИСНОВКИ

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

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

стехіометрія зв'язування – 2 кластери на молекулу білку).

2. Вперше досліджено процес фібрилоутворення інсуліну *in vitro* під впливом дианіонного кластеру бору. Показано, що присутність при агрегації білка *клозоборату* $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ прискорює денатурацію інсуліну і сприяє латеральній агрегації зрілих фібрил.

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

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

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

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

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Induced CD of iron (ii) clathrochelates: sensing of the structural and conformational alterations of serum albumins / V. Kovalska, **M. Kuperman**, M. Losytskyu, S. Vakarov, S. Potocki, S. Yarmoluk, Y. Voloshin, O. Varzatskii, E. Gumienna-Kontecka // *Metallomics*. – 2019. – Vol. 11(2). – P. 338-48. *Особистий внесок здобувача – дослідження клатрохелатів як потенційних конформаційно чутливих ІКД-репортерів.*

2. N-alkylaryl styrylcyanine dyes as fluorescent probes for nucleic acids detection / **M.V. Kuperman**, Y.V. Snihirova, D.V. Kryvorotenko, M.Y. Losytskyu, V.B. Kovalska, S.M. Yarmoluk // *Biopolymers and Cell*. – 2018. – Vol. 34(5). – P.

374-386. *Особистий внесок здобувача – дослідження можливості застосування серії ціанінових барвників, як зондів для нуклеїнових кислот і білків in vitro спектральними методами.*

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

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

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

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

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

8. ICD-sensitivity of iron(II) clathrochelates to globular proteins / M. Kuperman, S. Vakarov, N. Chornenka, S. Yarmoluk, E. Gumienna-Kontecka, Ya. Voloshin, V. Kovalska // FEBS 3+ Meeting - XI Parnas Conference – Young Scientists Forum Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine September 3-5 2018, Kyiv, Ukraine. – P. 152.

9. Study of CD sensitivity of iron(II) clathrochelates on various globular proteins / M. Kuperman, S. Vakarov, E. Gumienna-Kontecka, Y. Voloshin, O. Varzatskii,

V. Kovalska // Abstract of the 43rd FEBS congress “Biochemistry forever”, July 7 - 12 2018, Prague, Czech Republic. – P. 215-216.

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

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

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

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

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

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

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

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

АНОТАЦІЯ

Куперман М.В. Вивчення взаємодій між глобулярними білками і борвмісними каркасними макроциклічними комплексами. – Рукопис.

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

Пошук макроциклічних сполук середнього розміру і об'ємної геометрії, які здатні до специфічної супрамолекулярної взаємодії з елементами поверхні білка, є актуальним питанням для завдань від регулювання білок-білкових взаємодій до розробки матеріалів на основі білків. Метою роботи є дослідження взаємодій між глобулярними білками і біоактивними борвмісними каркасними об'ємними макроциклами (клозо-боратами, клатрохелатами заліза (II)).

На утворення комплексів альбумінів з клозо-боратами впливає структура кластеру і природа його замісників. Афінієть до альбумінів галоген клозо-боратів і кількість кластерів у комплексі вище ніж для гідроген-аналогу. При амілоїдній агрегації інсуліну з діаніонним кластером $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ відбувається рання денатурація білка; збільшується латеральна агрегація зрілих фібрил.

При взаємодії білок-ліганд оптично неактивні клатрохелати заліза (II) здатні генерувати інтенсивні КД-відгуки у видимій області спектру. Силу зв'язування з білками і характеристики відповідного ІКД-відгуку визначають структура і кількість замісників клатрохелату. Клатрохелати здатні «спектрально відрізнити» родинно-близькі білки (сироваткові альбуміни) за різницею форми та інтенсивності ІКД-смуг.

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

АННОТАЦИЯ

Куперман М.В. Изучение взаимодействий между глобулярными белками и борсодержащими каркасными макроциклическими комплексами. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.03 – молекулярная биология. Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2020.

Поиск макроциклов среднего размера и объемной геометрии, которые способны специфично супрамолекулярно взаимодействовать с элементами поверхности белка – актуальная проблема для задач от регулирования белок-белковых взаимодействий до разработки материалов на основе белков. В работе исследованы взаимодействия между глобулярными белками и биоактивными

борсодержащими каркасными объемными макроциклами (*клозо*-боратами, клатрохелатами железа (II)).

На образование комплексов альбумин-*клозо*-борат влияет структура кластера и природа его заместителей. Аффинность к альбуминам галоген *клозо*-боратов и количество кластеров в комплексе выше, чем для водород-аналога. При амилоидной агрегации инсулина с *клозо*-боратом $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ происходит ранняя денатурация белка; усиливается латеральная агрегация.

При взаимодействии белок-лиганд оптически неактивные клатрохелаты железа (II) могут генерировать характерные КД-сигналы в видимой области спектра. Силу связывания с белками и характеристики соответствующего КД-сигнала определяют структура и количество заместителей клатрохелата. Клатрохелаты способны «спектрально отличать» родственные белки (сывороточные альбумины) по разнице в форме и интенсивности ИКД-полос.

Ключевые слова: глобулярные белки, сывороточные альбумины, амилоидные фибриллы, *клозо*-бораты, клатрохелаты железа (II), флуоресцентная спектроскопия, флуоресцентные зонды, спектроскопия кругового дихроизма, изотермическая калориметрия титрования.

ABSTRACT

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

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

Nowadays, search of the macrocyclic middle-sized molecules of three-dimension structure capable of targeting large protein surface elements by multiple supramolecular interactions is of interest. Application of such compounds spreads from protein-protein interactions modulation to protein-based materials development. The goal of this work is to investigate the interactions between series of globular proteins and bioactive boron containing three-dimensional macrocycles (*closo*-borates, iron (II) clathrochelates).

The interactions of serum albumins and series of globular proteins (lysozyme, β -lactoglobulin, immunoglobulin G) with non-substituted and functionalized *closo*-borates were investigated. The complexes formation between serum albumins and *closo*-borate clusters $[B_{10}H_{10}]^{2-}$, $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ and their functionalized derivatives was confirmed by fluorescent spectroscopy and isothermal titration calorimetry (ITC). The intensity of their binding to albumins is affected by the clusters structure and their substituents nature.

The complexes of albumins with halogen *closo*-decaborates are characterized by higher binding affinity (K about $10^4 - 10^6 M^{-1}$) as compared to the functionalized or non-functionalized hydrogen clusters (K about $10^3 M^{-1}$); albumin complexes with halogen/arylamine derivatives are characterized by larger number of boron clusters (4-

5) bound per one protein molecule in comparison with hydrogen analogues (2). Due to this, halogen *closo*-borates are proposed for further studies as agents for using in BNCT method with higher “target delivery” potency comparing with hydrogen *closo*-borates.

The amyloid protein aggregation with dianionic boron cluster – *closo*-borate $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ – leads to early insulin denaturation; low (10 μ M) cluster concentration speeds up the amyloid fibril formation. In addition, the cluster changes the morphology of the amyloid fibrils: fibrillar structures formed in the cluster presence, are unbranched with larger diameter than that upon fibrillization of free insulin; cluster concentration increase (to 100 μ M) intensifies the fibrils ability to lateral aggregation. Due to these features, the *closo*-borates are of the interest for studies as agents allowing to modify (i.e. to direct) the fibrillization reaction and for further exploring of the effect of anions on protein conformation changes and aggregation.

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

The interactions between serum albumin and iron (II) clathrochelates were investigated and characterized by fluorescent and circular dichroism spectroscopy, ITC. Upon the protein-ligand interaction, optically inactive iron (II) clathrochelates are able to acquire CD-signal in visible range of spectra (350-600 nm).

The nature, number and isomery of clathrochelate terminal groups affect both binding intensity and properties of the corresponding induced CD-signal (shape, peaks values). According to protein fluorescence quenching studies, the protein binding with the clathrochelates containing two or six carboxyl terminal groups, is the most intensive. However, upon serum albumin binding, more intensive ICD-responses acquire clathrochelates with two carboxyphenyl groups; ICD-responses of different shape – hexa carboxyphenyl substituted macrocycles. For the di-carboxyphenyl clathrochelates, which intensively interact with albumins and acquire the most intensive ICD-signals, low cytotoxicity, $IC_{50} = 40 - 150 \mu$ M, on human promyelocytic leukemia cell line was shown.

The complex formation between bovine serum albumin and hexa-carboxyphenyl substituted iron(II) clathrochelates was studied by isothermal titration calorimetry. Binding constants of complex formation BSA with hexa carboxyphenyl isomers are about $10^3 - 10^4 M^{-1}$, binding ratio is 1-2 clathrochelates molecules per protein molecule.

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

According to supposed binding mode of protein-clathrochelate interaction, the electrostatic (polar) interactions between its carboxyl groups and complementary

binding groups of a protein play a key role for clathrochelate-to-protein assembling. The protein binding site geometry defines the clathrochelates optically active conformation.

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