

УДК 577.37

QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE BENZANTHRONE AMINODERIVATIVE BINDING TO AMYLOID FIBRILS OF LYSOZYME**K. O. Vus¹, V. M. Trusova¹, G. P. Gorbenko¹,
E. Kirilova², G. Kirilov², I. Kalnina²**¹*V.N. Karazin Kharkov National University, 4 Svobody Sq., Kharkov, 61077*²*Department of Chemistry and Geography, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Daugavpils University, 13 Vienibas, Daugavpils LV5401, Latvia*

Submitted October 19, 2010

Accepted November 11, 2010

The accumulation of amyloid fibrils in different tissues is associated with a number of neurodegenerative diseases. Despite a huge variety of amyloid-specific probes, all of them suffer from many drawbacks, highlighting the necessity of searching for more preferable dyes. In the present work, the potential of new fluorescent probe AM3 for selective detection of fibrillar protein aggregates, formed from lysozyme, has been evaluated. To quantify the affinity of this dye for amyloid fibrils, the isotherms of dye binding to the fibrillar lysozyme have been derived from fluorimetric titration. Parameters of the dye-protein complexation: association constant, molar fluorescence and binding stoichiometry, calculated from the Langmuir adsorption model, revealed that AM3 interacts strongly with protein insoluble aggregates. High values of the binding parameters make AM3 an alternative to a widely-used amyloid-specific probe Thioflavin T. We also investigated the effects of polarity and viscosity on AM3 fluorescence properties. The binding of AM3 to the protein hydrophobic cavities has been followed by red shift of the dye emission spectra, which can be explained by H-bonding between proton-donating groups of the protein and carbonyl moiety of the probe. Long-wavelength shift of emission maximum was observed also upon increasing the excitation wavelength. This finding suggests that reorientation time of solvent molecules is higher, than the dye fluorescence lifetime. Fluorescence anisotropy studies revealed slow rotation diffusion of the probe, bound to amyloid fibrils being indicative of high viscosity of AM3 microenvironment. The observed photophysical properties of the new aminobenzanthrone derivative make AM3 a perspective probe for basic research and medical diagnostics.

KEY WORDS: amyloid fibrils, benzanthrone fluorescent dye, dye-protein binding, lysozyme.**КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ СВЯЗЫВАНИЯ АМИНОПРОИЗВОДНОЙ БЕНЗАНТРОНА С АМИЛОИДНЫМИ ФИБРИЛЛАМИ ЛИЗОЦИМА****Е. А. Вус¹, В. М. Трусова¹, Г. П. Горбенко¹, Е. Кирилова²,
Г. Кирилов², И. Калнина²**¹*Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61077*²*Кафедра химии и географии, факультет естественных наук и математики, Даугавпилский университет, 13 Виенибас, Даугавпилс LV5401, Латвия*

Отложение амилоидных фибрилл в различных тканях связано с развитием ряда нейродегенеративных болезней. Несмотря на большое количество специфичных к амилоидам зондов, им присуще множество недостатков, следовательно, актуален поиск более эффективных маркеров. В данной работе оценивалась способность нового флуоресцентного красителя АМЗ к селективному определению фибриллярных белковых агрегатов, приготовленных из лизоцима. Высокие значения параметров связывания флуорофора с белком (константы ассоциации, молярной флуоресценции и стехиометрии), определенных в рамках модели Ленгмюра, свидетельствуют о прочном связывании зонда с нерастворимыми агрегатами лизоцима, что делает АМЗ альтернативой часто используемому специфическому амилоидному маркеру Тиофлавину Т. В работе были также исследованы эффекты полярности и вязкости на флуоресцентные свойства АМЗ. Связывание АМЗ с белком (предположительно, с его гидрофобными полостями) сопровождается красным сдвигом максимума спектра флуоресценции зонда, что можно объяснить образованием водородной связи протон-донорными группами белка и карбонилем АМЗ. Длинноволновый сдвиг максимума эмиссии наблюдался и при увеличении длины волны возбуждения. Это означает, что время переориентации растворителя больше времени жизни