

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

РАХМЕТОВ АНАР ДЖАМАЛОВИЧ

УДК: 577.15.612.438:577.352

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ СПЕЦИФІЧНОЇ ВЗАЄМОДІЇ БІЛКІВ
ПЕРОКСИРЕДОКСИНІВ З КРЕАТИНФОСФОКІНАЗОЮ ГОЛОВНОГО
МОЗКУ ЛЮДИНИ ЗА ДІЇ СТРЕСОРИВ**

03.00.04 – біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ А. Д. Рахметов

Науковий керівник Остапченко Л.І., докт. біол. наук, проф.

Київ – 2017

АНОТАЦІЯ

Рахметов А.Д. Біохімічні механізми специфічної взаємодії білків пероксиредоксинів з креатинфосфокіназою головного мозку людини за дії стресорів. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 - біохімія (091 - Біологія). - Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини», Київ, 2017

Метою даної роботи було дослідити внутрішньоклітинну взаємодію між білками пероксиредоксинами P_{rx} I/P_{rx} II та креатинфосфокіназою головного мозку людини (КФК-ГМ). Оцінити шаперонні властивості білків P_{rx} I/P_{rx} II спрямовані на відновлення активності КФК-ГМ за дії температури та пероксиду гідрогена.

На першому етапі роботи було продемонстровано взаємодію P_{rx} I з КФК-ГМ за інкубування гомогенату головного мозку щура при температурі 50°C.

Для оцінки властивостей КФК-ГМ було отримано та очищено рекомбінантний білок з бактеріальних клітин *E.coli* за допомогою афінної та хроматографії, що поділяє за розміром.

Щоб оцінити функціональну активність рекомбінантного білка КФК-ГМ була використана специфічна ферментативна реакція фосфорилування креатину за участі молекули АТФ. Додатково, було оцінено питому ферментативну активність КФК-ГМ за умов температурного та окисного стресу. Показано інгібування питомої активності КФК-ГМ на 74% за присутності пероксиду гідрогена та на 86% за дії температури. Також, досліджували експресії КФК-ГМ *in vitro* за інкубування клітин з трансфектованим Flag-СКВВ з різними концентраціями пероксиду гідрогена та температури. Відповідно внаслідок дії стресорів на клітини HeLa та A549 було відмічено інгібування сигналу КФК-ГМ на імуноблотаграмі.

На другому етапі роботи за рахунок реакції ко-імуноприципітації продемонстровано взаємодію білків PrxI, Prx II та КФК-ГМ за фізіологічних умов та за умов дії стресорів температури та пероксиду гідрогена. Підвищена температура сприяла вищій афінності взаємодії *in vitro* між КФК-ГМ та Prx II, але не у випадку підвищеної концентрації пероксиду гідрогена. У зв'язку із слабким сигналом взаємодії між Prx I та КФК-ГМ дослідження *in vitro* не проводили.

Щоб оцінити важливість С-термінальної ділянки Prx II для формування взаємодії між білками Prx II та КФК-ГМ були створені укорочені мутантні білки Prx II- Δ C2, Prx II- Δ C5, Prx II- Δ C6, Prx II- Δ C22, що були трансфековані в клітини ліній HeLa та A549. В результаті були відмічені незначні зміни в інтенсивності сигналу після електрофорезу та вестернблот аналізу, що відповідно може служити доказом існування додаткових ділянок взаємодії Prx II з КФК-ГМ окрім С термінальної ділянки Prx II.

Для дослідження шаперонних властивостей рекомбінантних Prx I та Prx II була використана реакція фосфорилування креатину за участі ферменту КФК-ГМ. Ми виявили, що шаперонна властивість Prx I за умов температурного стресу залежала від концентрації білку, досягаючи максимуму при 3 мкМ, де питома активність КФК ГМ досягала 95% від контрольних значень. Це демонструє кращі результати шаперонного захисту, а ніж у випадку Prx II. Шаперонні властивості Prx II відзначались вищою ефективністю за стресору пероксиду гідрогена у порівнянні з Prx I. Шаперонний білок Prx II демонстрував відновлення питомої активності КФК-ГМ до 174% від контрольних значень при концентрації 6 мкМ, що відповідало співвідношенню 1:20.

На заключному етапі роботи були створені моделі взаємодії Prx II та КФК-ГМ за допомогою онлайн докінг-серверу ClusPro 2.0, що вивчались з використання програмного забезпечення "PyMol". Було показано на прикладі перших десяти конформацій, що в утворенні комплексу брала участь низка

амінокислотних залишків, включаючи Lys 11, Arg 13, Ala 204, Arg 209 для КФК-ГМ та Asp 181, Glu 192, Lys 196, Glu 162, Gln 163 для P_{rx} II.

Враховуючи отриманні результати дослідження можна глибше усвідомити функціональну різноманітність та важливість білків пероксиредоксинів для підтримання клітинного гомеостазу. Підтвердження взаємодії між білками P_{rx} I, P_{rx} II та КФК ГМ розширює уявлення про мережу білків-партнерів, які знаходяться під захистом сімейства P_{rx}s. Оскільки КФК ГМ вважається одним із головних маркерів патологічних станів, таких як нейродегенеративні хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Хантінгтона, ангіогенезу ракових пухлин, та ін. постає питання дослідження та попередження інгібування/активації її функції за допомогою внутрішньоклітинних механізмів взаємодії з білками P_{rx}s. Ще одним важливим внеском цієї роботи є розширення знань про шаперонну функцію P_{rx} I та P_{rx} II, та її активацію внаслідок дії стресорів температури та пероксиду гідрогена. Ідентифікація P_{rx} I P_{rx} II як білків-партнерів КФК ГМ може слугувати попередником для створення терапевтичних стратегій лікування нейродегенеративних захворювань та раку.

Ключові слова: пероксиредоксин, креатинфосфокіназа головного мозку, взаємодія, стрес, ко-імунопреципітація.

Annotation

The purpose of this work is to investigate a possible interactions between proteins Prx I, Prx II and CKBB in the cell culture *in vitro* and evaluate chaperoning activity of Prx I, Prx II against thermal and hydrogen peroxide inactivation of CKBB.

It is found that under heat treatment conditions, Prx I interacts with CKBB from rat brain extracts. Prior to study functional activity of CKBB the recombinant protein was constructed and purified from *E. coli* cells. The results of ion-exchange and affinity chromatography demonstrated high yield of the recombinant protein.

To investigate functional specific activity of recombinant CKBB heat and hydrogen peroxide inactivations were used. Result of specific enzymatic assay have indicated on high susceptibility of the recombinant CKBB to applied stressors. Reduction of its specific activity under hydrogen peroxide by 74% and temperature by 86% was observed. To support the assay data the same stresses we used *in vitro* on transiently transfected cells with Flag-CKBB. However due to the absence of considerable change of the blot signal were used slightly elevated temperature. Reduced signals on the blots are registered while applying hydrogen peroxide and temperature stressor what suggested on low resistibility to outer factors of heat and hydrogen peroxide inactivation.

Transfection of A549 and HeLa cells showed firm interaction of Prx II and CKBB proteins. Whereas, Prx I had weaker binding. Exposure to heat stress but not to hydrogen peroxide led to increased interaction capacity between Prx II and CKBB protein partner. Due to the low signal level of Prx I, interaction studies *in vitro* under heat and hydrogen peroxide treatment were conducted with Prx II and CKBB.

To understand whether truncation of C-terminus of Prx II region would affect the interaction of Prx II protein with CKBB, the specific mutants of PRx II were introduced into the cells HeLa and A549. The results of co-

immunoprecipitation assay with Prx II- Δ C2, Prx II- Δ C5, Prx II- Δ C6, Prx II- Δ C22 mutants and CKBB have indicated on relatively high binding affinity between with Flag-CKBB against affinity of Prx II-K Φ K Γ M protein complex. Therefore, suggesting that not only the C-terminal region of Prx II could be important for the interaction with CKBB in A549 and HeLa cell lines.

To investigate chaperoning properties of recombinant Prx I and Prx II the CKBB phosphorylating assay of creatine was used. We found that the chaperoning capacity of Prx I under elevated temperature increased in a concentration-dependent manner, peaking at 3 μ M and rescuing the CKBB specific activity up to 95% of the control numbers, generally showing better protection results than Prx II. In contrast, the Prx II behavior was considerably more effective than that of Prx I in reducing the hydrogen peroxide inhibition of CKBB specific enzyme activity. Prx II was very well maintained at the enzyme concentration peaking at 6 μ M, where CKBB could recover its specific activity up to 174% of control values.

At the final stage of the work specific binding models were generated by ClusPro 2.0 protein docking server and studied using PyMol software. It was shown that a number of amino acid residues including Lys 11, Arg 13, Ala 204, Arg 209 for CKBB, and Asp 181, Glu 192, Lys 196, Glu 162, Gln 163 for Prx II have participated in the complex formation throughout the first ten conformations.

Taking into account the result during the course of the study it can be speculated that Prx I and Prx II due to the ubiquitous distribution in the human body are involved in the protection of specific binding proteins. One of these binding protein has been identified as CKBB the major enzyme found specifically oxidized during neurodegenerative diseases. Hence, the identification of a direct interaction between Prxs and CKBB may provide important insight not only into the physiological roles of Prx family proteins but also indicate the pathological roles of Prx in the neurodegenerations associated diseases. Additionally the work expands our knowledge on the functional versatility of peroxiredoxins functionality with its chaperone protection under stressed conditions. As

identification of CKBB binding protein could serve as a possible precursor for new drug creation.

Key words: peroxiredoxin, creatine kinase brain type, stress induced interaction, co-immunoprecipitation

Перелік статей за темою дисертаційної роботи:

1. Rakhmetov A.D. Molecular Cloning of Human Brain-Type Creatine Kinase Gene into Bacteria Expression Vectors pET-17b, pET-14b and Flag Tagged Mammalian Expression Vector pCMV / Rakhmetov A.D., Lee S.P., Ostapchenko L.I., Chae H.Z.// Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія біологія. – 2013. – Т. 64, №2, – С. 58-61.
2. Rakhmetov A.D. Purification and polyclonal antibody production of recombinant brain-type creatine kinase / Rakhmetov A.D., Lee S.P., Ostapchenko L.I., Chae H.Z.// Russian Journal of Biopharmaceuticals – 2014. – 6, N 2, – P. 7-11.
3. Rakhmetov A.D. Analysis of creatine kinase enzyme activity with observation of protein expression under heat and hydrogen peroxide stimuli / Rakhmetov A.D., Lee S.P., Ostapchenko L.I., Chae H.Z.// Ukr. Biochem. J. – 2015. – 87, N 1, – P. 75-82. (
4. Rakhmetov A. Simulation of Peroxiredoxin II and Brain-type Creatine Kinase protein-protein interaction using the on-line docking server ClusPro 2.0 / Rakhmetov A., Sang Pil Lee, Dmytro Grebinyk, Ludmila Ostapchenko, Ho Zoon Chae // Journal of Applied Pharmaceutical Science – 2015. – 5, N 08, – P. 11-16.
5. Rakhmetov A.D. Prx II and CKBB protein interaction under physiological and thermal stress conditions in A549 and HeLa cells / Rakhmetov A.D., Lee S.P., Ostapchenko L.I., Chae H.Z.// Ukr. Biochem. J. – 2016. – 88, N 1, – P. 61-68.

ЗМІСТ

| | |
|--|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ..... | 11 |
| ВСТУП | 12 |
| РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ..... | 19 |
| 1.1. Мультифункціональні білки як важливий захисний бар'єр клітини..... | 19 |
| 1.1.1. Характеристика родини пероксиредоксинів..... | 20 |
| 1.1.2. Участь сульфїредоксину у процесі гіперокиснення пероксиредоксинів | 25 |
| 1.1.3. Роль білків P _{rx} I та P _{rx} II у захисті клітин під час стресового впливу..... | 27 |
| 1.1.4. Регуляція функціональної активності 2-Цис пероксиредоксинів..... | 32 |
| 1.2. Шаперони – білки теплового шоку | 35 |
| 1.2.1. Механїзм та функції білків-шаперонів у клітині..... | 35 |
| 1.2.2. Пероксиредоксини – олігомерні білки з вираженою шаперонною активністю..... | 38 |
| 1.3. Характеристика креатинфосфокінази головного мозку людини..... | 43 |
| 1.3.1. Функціональна активність ферменту креатинфосфокінази головного мозку та її роль у клітині..... | 43 |
| 1.3.2. Зв'язок креатинфосфокінази головного мозку з розвитком нейродегенеративних захворювань людини..... | 48 |
| РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ..... | 52 |
| 2.1. Використанні матеріали та реактиви..... | 52 |
| 2.2. Клонування та експресія гена КФК ГМ..... | 52 |
| 2.3. Очищення рекомбінантного білка КФК ГМ..... | 53 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4. Диск електрофорез в ДСН-поліакриламідному гелі..... | 54 |
| 2.5. Двовимірний гель електрофорез..... | 55 |
| 2.6. Вестерн-блот аналіз..... | 55 |
| 2.7. Культивування культур клітин A549 та HeLa | 56 |
| 2.8. Очищення білків зв'язаних з Prx I | 57 |
| 2.9. MALDI-TOF-MS аналіз білків зв'язаних з Prx I..... | 57 |
| 2.10. Ко-іммунопреципітація (Co-IP) зв'язаних білків з КФК ГМ | 58 |
| 2.11. Отримання поліклональних антитіл КФК-ГМ | 59 |
| 2.12. Визначення креатинфосфокіназної активності рекомбінантного білка КФК ГМ..... | 59 |
| 2.13. Інактивація рекомбінантного білка КФК ГМ за впливу температури та пероксиду гідрогена..... | 60 |
| 2.14. Шапероний захист Prx I та II Prx інактивованого білка КФК ГМ..... | 61 |
| 2.15. Моделювання міжмолекулярної взаємодії білків КФК ГМ та Prx II..... | 62 |
| 2.16. Статистична обробка даних..... | 62 |
| РОЗДІЛ 3 ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБІНАНТНОГО БІЛКА КРЕАТИН - ФОСФОКІНАЗИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ..... | 63 |
| 3.1. Клонування та експресія гена <i>СКВ</i> людини | 63 |
| 3.2. Очищення рекомбінантного білка КФК ГМ з клітин <i>E.</i> <i>coli</i> | 70 |
| 3.3. Оцінка селективності поліклональних антитіл КФК ГМ за допомогою вестерн-блот аналізу..... | 75 |
| 3.4. Виявлення питомої активності рекомбінантного білка КФК ГМ за допомогою специфічної ферментативної реакції | 76 |
| РОЗДІЛ 4 ІДЕНТИФІКАЦІЯ КФК ГМ ЯК БІЛКА-ПАРТНЕРА ПЕРОКСИ- РЕДОКСИНІВ PRX I ТА PRX II..... | 82 |
| 4.1. Використання підходів протеоміки для пошуку білків- партнерів Prx I | 82 |

| | |
|---|------------|
| 4.2. <i>In vitro</i> взаємодія КФК ГМ з білками Prx I та Prx II у клітинах A549 та HeLa..... | 86 |
| 4.3. Зміна спорідненості взаємодії між КФК ГМ і білками-партнерами Prx I та Prx II шляхом індукованого теплового шоку та пероксиду гідрогена..... | 90 |
| 4.4 Вплив С-термінального вкорочення Prx II на зміну спорідненості до білка КФК ГМ | 96 |
| 4.5 Захист питомої активності КФК ГМ від інактивації температурою та пероксидом гідрогена завдяки шаперонним властивостям білків Prx I та Prx II..... | 99 |
| РОЗДІЛ 5 МОДЕЛЮВАННЯ БЛОК-БІЛКОВОЇ ВЗАЄМОДІЇ МІЖ КФК ГМ ТА PRX II | 105 |
| УЗАГАЛЬНЕННЯ | 109 |
| ВИСНОВКИ..... | 121 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ..... | 123 |
| ДОДАТОК 1..... | 153 |

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

| | |
|------------------|---|
| АТФ | Аденозинтрифосфат |
| AhpC | Алкілгідропероксид редуктаза |
| КФК ГМ | Креатинфосфокіназа головного мозку |
| ДТТ | Дитіотреїтол |
| ДЕАЕ | Диетиламіноетил |
| ЕДТА | Етилендіамінтетраоцтова кислота |
| GSH | Глутатіон відновлений |
| HMW | Високомолекулярні комплекси |
| MALDI | Матрично-активована лазерна десорбція/іонізація |
| IPG | Імобілізований рН градієнт |
| ІПТГ | Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид |
| IAA | Йодоацетамід |
| LMW | Низькомолекулярні комплекси |
| КФК М | Креатинфосфокіназа м'язів |
| НАД ⁺ | Нікотинамідаденіндинуклеотид окиснений |
| НАДН | Нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений |
| NTA | Ni ²⁺ -нітрилотриацетатна кислота |
| P _{rx} | Перексиредоксин |
| PBS | Натрій-фосфатний буфер |
| АФК | Активні форми кисню |
| ДСН-ПААГ | Додецилсульфат натрію-електрофорез в поліакриламідному гелі |
| S _{rx} | Сульфідредоксин |
| TSA | Тіол-специфічний антиоксидант |
| T _{rx} | Тіоредоксин |
| TR | Тіоредоксин редуктаза |
| ДСН | Додецилсульфат натрію |

В С Т У П

Актуальність теми.

На сьогодні типові пероксиредоксини класу 2-Цис (2-Цис Prxs) представляють групу тіол-специфічних антиоксидантних ферментів, що демонструють високу каталітичну активність ($k=10^6-10^8\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) для нейтралізації АФК та органічних пероксидів порівняно з каталазою чи глутатіонпероксидазою [1, 2]. На прикладі людського Prx II показано, що каталітичний цикл ензиму починається з окиснення пероксидазного цистеїну Цис-50 (C_P) до сульфенової кислоти. Де Цис-50 однієї субодиниці димеру реагує з відновлюючим цистеїном Цис-171 (C_R), що знаходиться на другій субодиниці димеру Prx II. В результаті такої взаємодії утворюється гомодимер, з'єднаний дисульфідними зв'язками. Переведення Prx II у фізіологічно активний стан відбувається завдяки відновлюючим властивостям білка тіоредоксину (Trx) та джерела протонів НАДФН. Варто зазначити, що відновлення функціональної активності Prx II за втручання Trx та окиснення НАДФН відбувається повільніше, а ніж окиснення H_2O_2 [2].

Вважається, що активність 2-Цис Prxs є унікальною, оскільки крім пероксидазної функції вони є модуляторами сигнальних процесів завдяки інактивації високими концентраціями пероксиду гідрогена та переходу в гіперокиснений стан. Цей ефект лежить в основі «floodgate» механізму та характеризує сигнальну функцію Prx [3, 4, 5]. Білки 2-Цис Prxs мають високу каталітичну специфічність до пероксиду гідрогена, що дозволяє регулювати трансдукцію сигналу в клітині за рахунок регулювання концентрації H_2O_2 . Функція клітинних модуляторів H_2O_2 вказує на причетність 2-Цис Prxs до розвитку/супресії ракових клітин, нейродегенеративних, серцево-судинних захворювань та метаболічних порушень [6, 7, 8, 9].

Регуляція сигнальних процесів за рахунок 2-Цис Prxs відбувається у відповідності до трьох механізмів, що не виключають один одного. Перший

механізм передбачає пряму взаємодію пероксиду гідрогена з цільовим сигнальним білком, де Ptxs контролюють цей процес регулюючи концентрацію пероксиду гідрогена. Відповідно до другого механізму відбувається окиснення Ptxs молекулою H₂O₂, що далі активує сигнальний білок, наприклад певні транскрипційні фактори або фосфатази. В основі третього механізму лежить взаємодія окисненого Ptx ще з однією молекулою H₂O₂ та відновлення активного стану Ptxs білком-партнером Ttx, що далі передає окиснювальний сигнал на сигнальний білок [10].

2-Цис Ptxs піддаються зміні олігомерного стану від низькомолекулярних форм до високомолекулярних комплексів під впливом гіперокиснення. Як результат, декамерні структурні одиниці білка збираються в «стопки», що ініціює функціональну трансформацію пероксидазних білків до білків шаперонів. Такий перехід може регулюватись температурою чи окисним станом клітини [11]. Додатково відмічено, що олігомеризація бактеріального пероксиредоксину може бути спровокована високою іонною силою, чи зміною рН, де падіння значення рН під час окиснення призводить до зміщення олігомеризації в бік формування декамерів та втратою шапероної активності. Дослідження *Wood et al* [12] демонструють залежність олігомеризації бактеріального пероксиредоксину AhpC (*S.typhimurium*) від редокс-статусу з переважним формуванням (α₂)₅ декамерів у розчині [12]. Збирання HMW комплексів білків 2-Цис Ptxs може також бути спровоковане температурним стресом. Показано, що ці комплекси захищають клітину від теплового шоку [13]. Відповідно, їх можна порівняти з активністю білків теплового шоку sHSPs, які мають гарно організовану олігомерну структуру та постійну кількість субодиниць [14, 15]. Комплекси HWM 2-Цис Ptxs можуть мати молекулярну масу від 40-1000 кДа та демонструють шаперонну активність з дисоціацією на низькомолекулярні форми LMW, що мають пероксидазну активність.

Креатинкіназа головного мозку людини, КФК ГМ – це цитозольний гомодимерний білок з молекулярною масою мономеру 42 кДа. Фермент

переважно експресується в головному мозку та ретині ока, де каталізує обернену реакцію преносу γ -фосфорильної групи молекули АТФ на креатин, в результаті чого утворюється фосфокреатин та АДФ. КФК ГМ вважається ферментом, що забезпечує тимчасовий енергетичний буфер у разі посиленої потреби в АТФ [16, 17].

Якщо порівняти рівні експресії креатинфосфокінази у різних видах ракових пухлин, наприклад ліній ракових клітин легеневої карциноми, карциномі грудей та простати, а також нейробластом будуть спостерігатись різні механізми ініціації надекспресії білка КФК ГМ. Один з механізмів, що сприяє надекспресії КФК ГМ – це онкогенетична активація аденовірусу E1a, яка спричинена тим, що промотор гена *СКВ* вміщає специфічну сигнальну послідовність до продукту E2E гена аденовірусу [18]. Слід зазначити, що негативно регуляція експресії КФК ГМ здійснюється завдяки пухлино-супресуючій активності фактору p53 [19]. Така підвищена активність ензиму у пухлинних новоутвореннях необхідна для забезпечення енергетичних витрат на належному рівні. Ракові клітини зазвичай характеризуються високим рівнем фосфокреатину (PCr), але їхній ріст інгібований циклічним креатином (cCr), фосфорильована форма якого є поганим субстратом для КФК ГМ і може виступати його інгібітором. Тому було описано декілька аналогів креатинфосфокінази, що проявляють цитотоксичну активність і можуть бути багатообіцяючими у розробці антиракових препаратів [20]. Експресія гена *СКВ* включає: альтернативний сплайсинг, множинну ініціацію рибосом, та різноманітні посттрансляційні модифікації [21, 22, 23].

Для оцінки стабільності ферменту КФК ГМ було досліджено вплив різноманітних стресорів таких як сечовина, гуанідин гідрохлорид, температура [24, 25, 26]. Молекулярний шаперон GroEL здатен зв'язувати вторинну структуру КФК ГМ, інактивовану сечовиною, що призводить до ефективної супресії агрегації білка на стадії розплавленної глобули [27, 28]. Було показано, що температурна агрегація КФК ГМ задовільняє валідаційні критерії необерненої двух-стадійної моделі за Кургановим [29]. Під час

впливу температури креатинфосфокіназа піддається послідовним структурним змінами. Ідентифіковано стабільний мономер, відновлення якого після температури не вище 55°C корелює з можливістю об'єднання мономерів у функціональний димерний білок [30]. КФК ГМ виступає одною із головних мішеней окисного стресу під час нейродегенеративних хвороб [31, 32, 33]. Відмічено участь пострансляційних модифікацій у зниженні КФК ГМ активності під час хвороби Альцгеймера. Знижена активність КФК ГМ може слугувати біомаркером для покращеної ідентифікації розвитку нейродегенеративних хвороб на ранніх стадіях [34].

Беручи до уваги важливості родини 2-Цис Ргxs як пероксидазних так і шаперонних білків та буферну енергетичну функцію ферменту КФК ГМ постає потреба детального дослідження зв'язків цих ензимів та їх поведінки *in vitro* за умов стресу, викликаного температурою чи гіперокисненням. Вищевказане стало основою для формування мети та постановки задач дослідження даної дисертаційної роботи.

З'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідної теми: № 11БФ036-01 «Механізми реалізації адаптаційно - компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (2011-2015 рр., № д/р 0111U004648).

Мета та задачі дослідження. Мета роботи - оцінка взаємодії між білками Ргх I/Ргх II та КФК ГМ за фізіологічних умов *in vitro* та впливу стресорів температури та пероксиду гідрогена. Дослідження шаперонних властивостей білків Ргх I/Ргх II на прикладі специфічної реакції фосфорилювання креатину за участі КФК ГМ.

Для досягнення мети досліджень були поставлені такі задачі:

1. Отримати рекомбінантний білок КФК ГМ та провести його очищення.
2. Визначити ферментативну активність рекомбінантного білка КФК ГМ за дії температури та пероксиду гідрогена.

3. Проаналізувати ендogenous взаємодію між експресовани білком КФК ГМ та білками Prx I і Prx II у клітинних ліній A549 та HeLa.
4. Оцінити, як укорочення С-термінальної ділянки Prx II впливає на зміну афінності з білком КФК ГМ на клітинах ліній A549 та HeLa.
5. Оцінити шаперонні властивості білків Prx I та Prx II при визначенні ферментативної активності КФК ГМ за дії температури та пероксиду гідрогена .
6. Створити моделі взаємодії між Prx II та КФК ГМ.

Об'єкт дослідження – внутрішньоклітинна взаємодія між білками пероксиредоксинами, а саме Prx I та Prx II з креатинфосфокіназою головного мозку людини в умовах *in vitro* у контролі та після впливу стресорів температури та пероксиду гідрогена. Шаперонні властивості Prx I та Prx II по відношенню до білка-партнеру КФК ГМ.

Предмет дослідження – отриманий рекомбінантний білок КФК ГМ, активність КФК ГМ, рівень експресії *in vitro* білків КФК ГМ, Prx I та Prx II, афінність взаємодії *in vitro* білків КФК ГМ, Prx I, Prx II, та транкованих С-термінальних мутантів Prx II, шаперона активність PrxI та Prx II.

Методи дослідження: ПЛР, трансфекція та експресія рекомбінантного білка, аніонно-обмінна та афінна хроматографія, MALDI-TOF аналіз, культура клітин, 1-D, 2-D ДСН-ПААГ електрофорез, вестер-блотинг, ко-імунопреципітація, спектрофотометрія, статистичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. Клоновано та очищено ферментативно активний рекомбінантний білок. Оцінена фосфорилуюча активність КФК ГМ в умовах специфічної ферментативної реакції при дії стресорів температури та пероксиду гідрогена . Вперше продемонстровано, що КФК ГМ взаємодіє з Prx I в гомогенаті головного мозку щурів. Також, показана взаємодія КФК ГМ з Prx I та Prx II в лізатах клітинних ліній HeLa та A549 за використання реакції ко-імунопреципітації. Вперше досліджено, що афінність взаємодії Prx II з КФК ГМ сильніша, а ніж між Prx I з КФК ГМ в умовах *in vitro*. Показано, що вкорочення С-термінальної ділянки Prx II

немало впливу на силу взаємодії між Prx II та КФК ГМ. Вперше продемонстровано залежність інтенсивності взаємодії білків Prx II та КФК ГМ під впливом температури та пероксиду гідрогена прикладі клітинних ліній HeLa та A549. Підтверджено ефективність білків шаперонів Prx I та Prx II в попередженні агрегації та відновленні ферментативної активності білка-партнеру КФК ГМ за умов стресових факторів температури та пероксиду гідрогена .

Практичне значення отриманих результатів Результати роботи надають можливість глибше усвідомити функціональну різноманітність та важливість білків пероксиредоксинів для підтримання клітинного гомеостазу. Підтвердження взаємодії між білками Prx I, Prx II та КФК ГМ розширює уявлення на мережу білків-партнерів, які знаходяться під захистом Prxs. Оскільки КФК ГМ вважається одним із головних маркерів патологічних станів, таких як нейродегенеративні хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Хантінгтона, ангіогенезу ракових пухлин, та ін. постає питання дослідження та попередження інгібування/активації її функції за допомогою внутрішньоклітинних механізмів взаємодії з білками пероксиредоксинами. Ще одним важливим внеском цієї роботи є розширення знань про шаперонну функцію Prx I та Prx II, та її активацію внаслідок дії стресорів температури та пероксиду гідрогена . Ідентифікація Prx I PrxII як білків-партнерів КФК ГМ може слугувати попередником для створення терапевтичних стратегій лікування нейродегенеративних захворювань чи раку.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто здійснено підбір літературних джерел та аналіз даних літератури, інтерпретацію та статистичну обробку одержаних результатів, оформлення рисунків та таблиць. Усі експериментальні результати отримані дисертантом особисто або за його безпосередньої участі. Головна ідея та задачі досліджень були сформовані науковим керівником – д.б.н., проф. Остапченко Л.І. та к.б.н., Хо Зун Че (Ho Zoon Chae), Чоннамський Національний Університет (Chonnam National University).

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи були представлені на науковій конференції «Experimental Biology 2012» (San Diego, USA, 2012), 9-й Міжнародній науково-практичній конференції «Шевченківська Весна» (Київ, 2013), 11-й Міжнародній науковій конференції «Молодь і поступ біології» (Львів, 2013), 9-му Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 9 наукових праць: 5 статей у фахових виданнях та 4 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та конгресів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 157 сторінках друкованого тексту, містить 41 рисунок, 1 таблицю. Робота складається зі анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження та їх обговорення, заключення, висновків, списку використаних джерел (253 посилання)

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Мультифункціональні білки як важливий захисний бар'єр клітини

Пероксиредоксини (Peroxiredoxins, Prxs) – це клас специфічних пероксидазних білків із широким спектром біологічних функцій. По-перше, пероксиредоксини нейтралізують пероксид гідрогена, органічні пероксиди і пероксинітри, беруть участь в захисті клітинних компонентів від окисного стресу, як екзогенно, так і ендогенно [35]. По-друге, вони залучені до процесів внутрішньоклітинної сигналізації з опосередкованим використанням пероксиду гідрогена [4, 35]. По-третє, поки найменш досліджена функція цих білків – шаперонна, що, на думку дослідників, сприяє правильному укладанню поліпептидного ланцюга денатурованих білків [36].

Білки пероксиредоксини були вперше ідентифіковані в дріжджових клітинах, але різноманітність їх ізотипів продемонстровано тільки на прикладі людських клітин. У 1968 році Робін Харіс описав дану родину білків, як таких, що мають форму кільця, з на той час ще з неідентифікованими функціями, та назвав їх білками торинами (torin) [37]. У 1985 році, вивчаючи регуляцію активності глутамінсинтетази в дріжджах виду *Saccharomyces cerevisiae*, було знайдено та очищено білок, який запобігав окисненню та інактивації цього ферменту [38]. Відокремлений білок мав молекулярну масу 25 кДа та проявляв свою активність тільки за присутності тіол-вмісного компоненту (ДТТ, меркаптоетанолу, глутатіону, тіогліцеролу, чи дигідроліпоєвої кислоти), доданого до метал-каталізуючої окиснювальної системи в якості донора електронів. У 1994 році група дослідників на чолі з Pi Co Gy (Sue Goo Rhee) ідентифікували Prx, як тіол-

специфічний антиоксидантний білок (thiol-specific antioxidant protein) [39, 40, 41]. Він був описаний як білок, притаманний клітинам дріжджів, із молекулярною масою у 25 кДа, що специфічно захищає клітинні компоненти від впливу руйнуючої дії окисних агентів.

У той же час, із бактерій *Salmonella typhimurium* та *E. coli* виділено алкілгідропероксид редуктазу (Ahp), що каталізує відновлення органічних пероксидів до спирту за рахунок НАДФН [42]. Фермент Ahp складається з двох компонентів, 21 кДа AhpC і 57 кДа AhpF НАДФН дегідрогеназу. Каталітичний механізм відновлення субстрату здійснюється білком AhpC, наступне відновлення AhpC відбувається за рахунок AhpF з використанням НАДФН. Завдяки дослідженням [41] продемонстровано, що між TSA та AhpC існує гомологія. Білки родини TSA/AhpC знайдені у всіх прокариотичних та еукаріотичних організмах [43]. Шляхом порівняння нуклеотидних послідовностей TSA/Ahp показана присутність двох високо-консервативних цистеїнових залишків, що відповідають цистеїнам Цис47 та Цис170 білка TSA. На відмінно від С-кінцевого цистеїну, N-кінцевий цистеїн є спільним для всіх представників родини [43]. За новою номенклатурою тіол-специфічні антиоксиданти TSA/AhpC називаються пероксиредоксинами. На сьогодні в ссавців розрізняють шість ізоформ пероксиредоксинів (Ptx I – Ptx VI), що належать до трьох груп родини Ptx [54].

1.1.1. Характеристика родини пероксиредоксинів

Пероксиредоксини це універсальні компоненти клітини, що експресуються майже всіма живими організмами та проявляють високоспецифічну дію. У середині 90-х років шляхом порівняння ДНК послідовностей вчені ідентифікували ряд білків ссавців (NKEF A, PAG, MSP23, OSF3, HBP23, NKEF B, Calpromotin, Torin, MER5, SP22, AOE372, TtxRANK) з нуклеотидною схожістю до пероксиредоксинів бактерій, дріжджів, щурів, а також людини [35]. Як наслідок, виявилось, що вони є

різними ізоформами білка пероксиредоксину. У відповідності до їх функцій, локалізації та послідовності вони були позначені як: Prx I, Prx II, Prx III, та Prx IV. Нуклеотидні послідовності Prx I (NKEF A, PAG, MSP23, OSF3, HBP23) та Prx II (NKEF B, Calpromotin, Torin) складаються з 199 амінокислотних залишків та розміщені у цитозольному компартменті клітини [44, 45, 46]. Напротимасу, послідовність білка Prx III (MER5, SP22) складається з 253 амінокислотних залишків, 62 з яких знаходиться на NH₂ термінальному кінці, що є специфічною цільовою послідовністю мітохондрій [47, 48]. Антиоксидант Prx IV (AOE372, TrxRANK) вміщає 271 амінокислотний залишок та експресується, головним чином, у ендоплазматичному ретикулумі [49]. Пероксиредоксини Prx I, Prx II, Prx III, Prx IV мають спільні цистеїни на NH₂- та COOH- термінальних кінцях, що з'єднані 121 амінокислотними залишками. Prx I - IV мають понад 70% ідентичної амінокислотної послідовності [50].

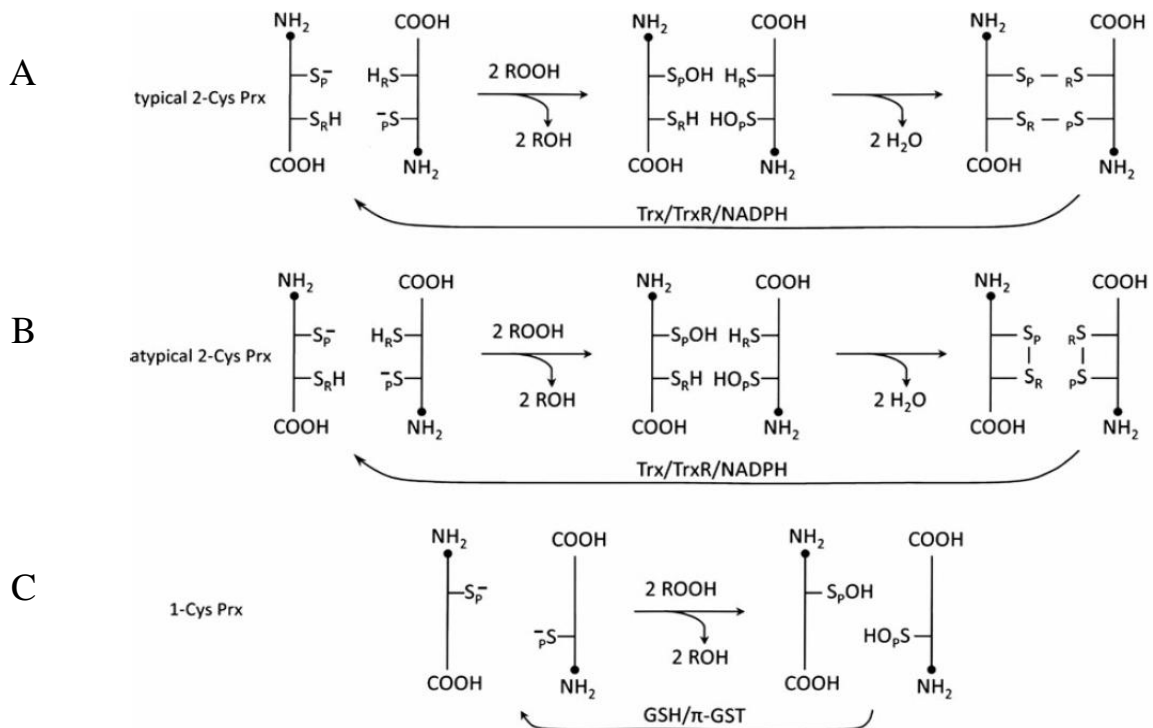


Рис. 1.1.1. Загальна схема функціонування білків пероксиредоксинів. Типові 2-Цис пероксиредоксини (А), атипові 2-Цис Prx (В) та 1-Цис Prx (С) [51]

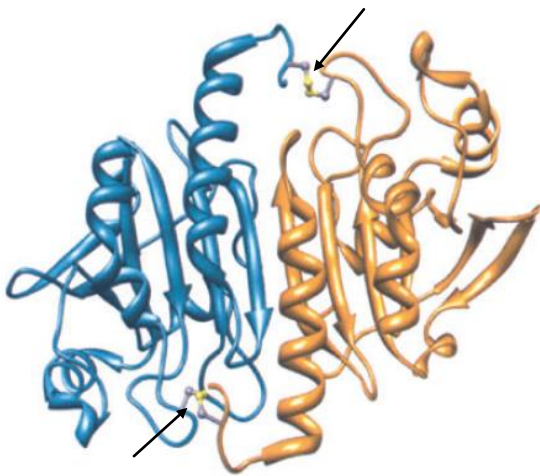
Механізм, за яким пероксиредоксини нейтралізують пероксиди водню, зображений на Рис.1.1 TSA, Prx I – IV функціонують як білки димери, що складаються з двох ідентичних субодиниць. Пероксидазний цистеїн на NH₂-кінці молекули селективно окиснюється пероксидом гідрогена до Цис-SOH та реагує з відновлювальним цистеїном на іншому COOH-термінальному кінці другої молекули димеру, при цьому формуючи спільний дисульфідний зв'язок. Відновлення дисульфідного зв'язку відбувається завдяки функціональній активності ферменту тіоредоксину (Thioredoxin), що виступає донором електронів для інактивованого пероксиредоксину [41].

На відміну від каталази та глутатіонпероксидази, молекула Prx не містить простетичних груп чи іонів металів, її пероксидазна активність спричинена специфічною тіоловою групою залишку цистеїну, що знаходиться на N-термінальному кінці поліпептидного ланцюга. Каталітичний цикл 2-Цис Prx (Prx I-Prx IV) включає обернене окиснення специфічної SH-групи до сульфенату (SOH), який має здатність до відновлення, але тільки за присутності надлишкового рівня клітинних тіолів [52]. Звідси, цистеїн з SH-групою, яка окиснюється активними формами кисню, позначається в літературі як пероксидазний (peroxidatic Cysteine) S_p, де цистеїн з C-термінального кінця позначається як відновлювальний (resolving Cysteine) S_r [51]. На основі особливостей будови та каталітичного механізму пероксиредоксини поділяються на три групи: типові 2-Цис Prx, нетипові 2-Цис Prx та 1-Цис Prx (Рис 1.1.1.) [53].

Переважає більшість Prxs, що мають у своєму складі S_p та S_r цистеїни є гомодимерами, в яких поліпептидні ланцюги орієнтовані в протилежних напрямках так, що S_p цистеїн одного ланцюга просторово наближений до S_r іншого ланцюга гомодимера (Рис. 1.1.2). Під час каталітичного циклу

пероксидазна група одного ланцюга окиснюється пероксидом до сульфенату (Цис- S_pOH), який, у свою чергу, взаємодіє з Цис- S_rH іншого ланцюга Prx [50, 53]. Реакція протікає шляхом тіолдисульфідного обміну з утворенням на проміжному етапі міжланцюгового дисульфідного зв'язку (Цис- S_p-S_r -Цис), який відновлюється за присутності донорів тіолових груп, таких як тіоредоксин та сульфїредоксин [54, 55]. Таким чином, каталітичний цикл пероксиредоксинів завершується відновленням пероксидазного цистеїну тіолової групи до Цис- S_pH , тим самим повертаючи фермент в активний стан.

А



В



Рис. 1.1.2. Димерна (А) та декамерна (В) структури білка Prx I із сформованими дисульфідними зв'язками між C_p та C_r [56]

Представником нетипової групи 2-Цис Prx виступає Prx V, який має консервативний цистеїновий залишок Цис47 на NH_2 -термінальному кінці [57]. Полідовність Prx V є схожою до послідовностей типових 2-Цис Prx, але при порівнянні всього амінокислотного ланцюга молекули Prx V, що включає 162 залишки, було знайдено лише ~10% ідентичності з представниками групи типових Prxs. Також було показано, що $COOH$ термінальна послідовність Prx V є меншою ніж у представників 2-Цис Prx з відсутнім консервативним залишком Цис47 [57]. Молекула Prx V включає мітохондріальний (NH_2 -кінець) та пероксисомальний ($COOH$ -кінець) розпізнавальні сигнали, а також знайдена у цитозолі клітини [58].

Характерною особливістю для цієї групи пероксиредоксинів є присутність додаткових неконсервативних С-кінцевих залишків цистеїну. За своїми властивостями вони прирівнюються до N-кінцевого цистеїну типових 2-Цис P_{rx} [59]. Амінокислотні послідовності P_{rx} V людини та щура розміщують залишок цистеїну на позиціях 72 та 151, як додаток до консервативного цистеїну Цис47. Під час каталітичного циклу, зображеного на (Рис. 1.1.1), P_{rx} V є антипаралельним димером із пероксидазним цистеїном Цис47, який окиснюється ROOH до Цис47-SOH. Останній взаємодіє із Цис¹⁵¹-SH цього ж самого мономеру, тим самим формуючи внутрішньо-молекулярний дисульфід. Таким чином, сформований дисульфідний зв'язок може бути відновлений за рахунок тіоредоксину, але не глутаредоксину чи глутатіону [59].

У випадку 1-Цис P_{rx} (P_{rx} VI) дисульфідний зв'язок між субодиницями димеру не утворюється, що пов'язано з відсутністю додаткового консервативного Цис-S_rH цистеїну [4, 50]. У процесі каталітичного циклу Цис-S_pH обернено окиснюється за рахунок H₂O₂ або ROOH до сульфенату (Цис-S_pOH) (Рис. 1. 1.1). Також, було показано, що P_{rx} VI людини має у своєму складі Цис91. Але, оскільки амінокислота послідовність, що оточує Цис91 залишок не є консервативною, дисульфідний зв'язок не формується [60]. Донорами електронів для відновлення активності 1-Цис P_{rx} виступають ДТТ [60] та глутатіону у присутності π-ізоформи глутатіон S-трансферази [61].

Після відкриття пероксиредоксинів з'явилися численні дані щодо здатності цих білків захищати внутрішні компоненти клітин від перекисного окиснення [62, 63]. Показано, що рівень експресії генів різних ізоформ P_{rx}s суттєво підвищений під час багатьох паталогічних станів, які супроводжуються окисним стресом, при нейродегенеративних захворюваннях (атеросклерозі, хворобі Альцгеймера та Паркінсона) ракових пухлинах, та пошкодженні тканин викликаним іонізуючою радіацією [64, 65]. Така залежність вказує на те, що клітини збільшують рівень експресії генів

Prx для нейтралізації підвищеного вмісту активних форм кисню під час окисного стресу. Піддослідні щура з нокаутованим геном , який кодує Prx I, мають ознаки раннього старіння, що супроводжуються гемолітичною анемією та утворенням різноманітних пухлин [66]. У випадку нокаутування Prx 6, щура розвивались нормально, але були чутливі до окисного стресу [67]. Під час надлишкової експресії гена *prx 6* розвивалась висока резистентність до окисного стресу, викликаного гіпоксією [68]. Також, була показана важлива роль Prx 5 у захисті геному людини від окиснення та його участь у контролі некодуючих ділянок ДНК [69].

1.1.2. Участь сульфiredоксину у процесі гіперокиснення пероксiredоксинів

Інгібування активності пероксiredоксину бактерій AhpC та Prx I людини продемонстровано шляхом реєстрації кількості окисненого НАДФ (A_{340}) у системі Trx, TrxR, H_2O_2 [70]. Це зумовлено селективним окисненням пероксидазного цистеїну S_p-SH до сульфiнового похідного S_p-SO_2H . Представники еукаріотичних 2-Цис Prx мають специфічну амінокислотну послідовність, що представлена GGLG мотивом, та YF мотивом на $COOH$ -термінальному кінці [56, 71, 4]. Взаємодія цих послідовностей попереджає формування дисульфiдного зв'язку між S_r-SH групи одного мономеру та S_p-SOH іншого. Ця каталітична пауза дозволяє надлишковому пероксиду окиснити S_p-SOH до S_p-SO_2H [55, 72, 73].

Гіперокиснення Prxs може відбутися тільки під час каталітичного циклу за присутності всіх необхідних компонентів (H_2O_2 , Trx, TrxR, НАДФ) [70, 72]. У випадку типових 2-Цис Prxs продукт гіперокиснення – сульфiнове похідне цистеїну, відновлюється завдяки активності ферменту сульфiredоксину (Sulfiredoxin, Srx). Забезпечення функцій Srx можливе за присутності іонів Mg^{2+} та молекули АТФ [55, 74]. Сульфiнова група S_p-SO_2H

надалі може бути незворотно окиснена до сульфонового похідного $S_p\text{-SO}_3\text{H}$ з втратою пероксидазної активності Prx .

Коли концентрація внутрішньоклітинного пероксиду гідрогена досягає ($>10\mu\text{M}$) пероксидазний цистеїн Prx у стані $\text{Цис}_p\text{-SOH}$ реагує з надлишковим H_2O_2 , окиснюючись до сульфінного похідного $\text{Цис}_p\text{-SO}_2^-$, тим самим втрачає свою пероксидазну активність. Відновлення активного стану Prx за рахунок ферменту сульфідредоксини та участі молекули АТФ розпочинається з формування проміжного похідного фосфорильного етеру сульфінного залишку ($\text{Цис}-(S_p=O)\text{-OPO}_3^{2-}$). Prx у комплексі з Srx формують тіосульфінат ($\text{Prx}\text{-Цис}-(S_p=O)\text{-S-Цис-Srx}$) з вивільненням неорганічного сульфату. Відновлення пероксиредоксини до $\text{Цис}_p\text{-SOH}$ відбувається за рахунок глутатіонпероксидази або тіоредоксини. Запропоновано декілька шляхів формування сульфгідрильного цистеїну Prx за участі Srx . На Рис. 1.1.3. штриховими лініями зазначений шлях каталізу в основі якого лежить атака сульфінілфосфатного похідного Prx молекулою глутатіону, що призводить до формування $\text{Prx}-(S_p=O)\text{-SG}$ та SrxS^- похідних [75, 55].

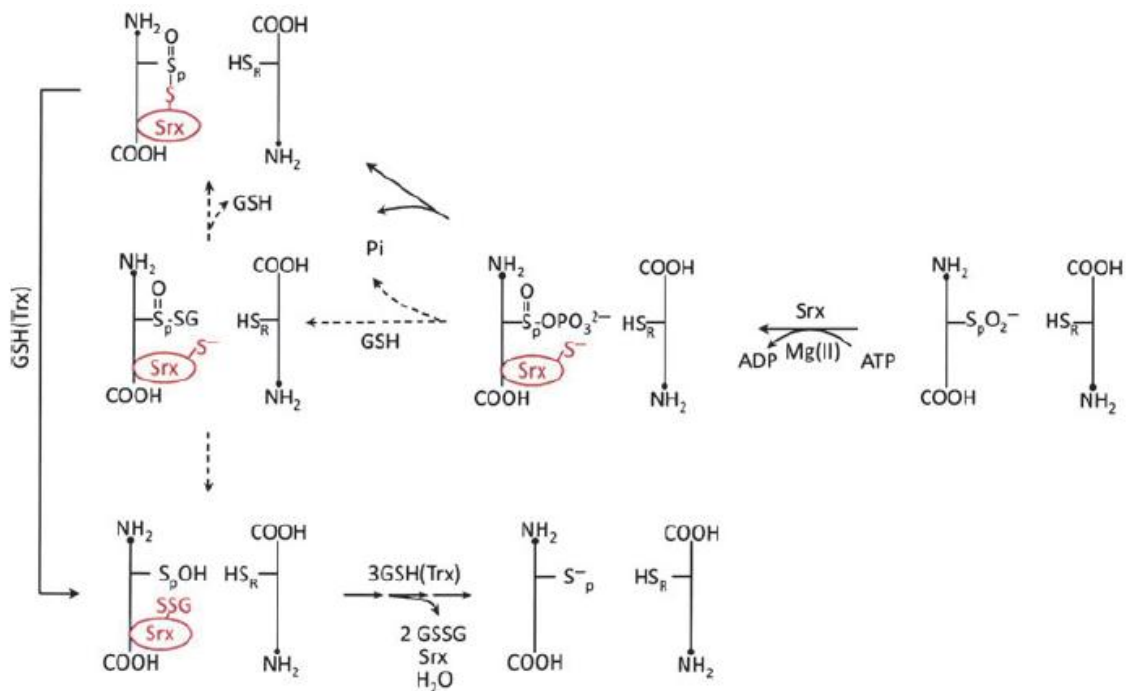


Рис. 1.1.3 Механізм відновлення сульфїнової групи пероксиредоксину до його активної сульфгїдрильної форми завдяки ферменту сульфїредоксину [51].

Окиснення залишку цистеїну характерне не тільки для Prxs, а також для багатьох інших білків; гліцеральдегїд-3-фосфат дегїдрогенази, III карбонільна ангїдрази, 1В тирозинової фосфатази, а також білка DJ-1 асоційованим з хворобою Паркінсона [76-79]. Для розпізнавання окисненої форми пероксиредоксину Srx необхідно специфічно стикуватися з ферментом. Що цікаво, така специфічність проявляється тільки відносно до групи типових 2-Цис Prx. Зниження редукуючої властивості сульфїредоксину людини асоційоване із заміною амінокислотного залишку цистеїну (Цис99) на серин (Сер99) [80, 55]. Базуючись на дослідженнях [75], було показано, що Цис⁹⁹ не бере участі у зв'язуванні молекули АТР для відновлення сульфїнової групи цистеїну.

Згідно останніх літературних даних [13, 81], окиснення S_p-SO₂H до S_p-SO₃H у бактеріальних клітинах за присутності надлишкової кількості H₂O₂ супроводжується формуванням олігомерів – мультидоменних комплексів Prx. Ці унікальні структурні елементи здатні функціонувати у ролі шаперонів, тим самим попереджуючи інактивацію білкових молекул [13].

1.1.3. Роль білків Prx I та Prx II у захисті клітин під час стресового впливу.

На сьогодні продемонстровано участь Prxs у захисті клітин від шкідливої дії активних форм кисню завдяки пероксидазній активності активних димерів та декамерів Prx [35, 50]. Залежно від типу клітини та різновиду стресового фактору дія Prx I, яка попереджує клітинну загибель, спричинену оксидативним стресом, є результатом прямої та непрямої взаємодії з різноманітними типами кіназ та ферментів, що відіграють

ключову роль у регуляції клітинної смерті чи апоптозі [82, 83]. Prx II у свою чергу, також має здатність пригнічувати сигнал-регульовану апоптотичну кіназу ASK 1 (apoptosis signal regulating kinase 1) [84].

Представники родини пероксиредоксинів мають значний відсоток однорідності амінокислотних залишків, що виражається у наявності конформаційно спільних α - та β -структур. Така однорідність спричинена специфічним тіоредоксиновим фолдом (доменом), який виступає попередником усіх пероксиредоксинів [4]. Основна різниця полягає в структурі агрегатного стану молекули під час гіперокиснення пероксидазного цистеїну Prx. Досліджено, що атипові Prx це мономерні білки, водночас типові представники родини 2-Цис та 1-Цис Prxs є димерними структурами в яких С-термінальний кінець простягається вздовж димерного інтерфейсу та досягає іншої субодиниці молекули пероксиредоксину. Представники 2-Цис Prxs здатні утворювати тороїдні структури – конгломерати, які налічують десять та більше $(\alpha_2)_5$ декамерів та з'єднанні гідрофобними зв'язками [85].

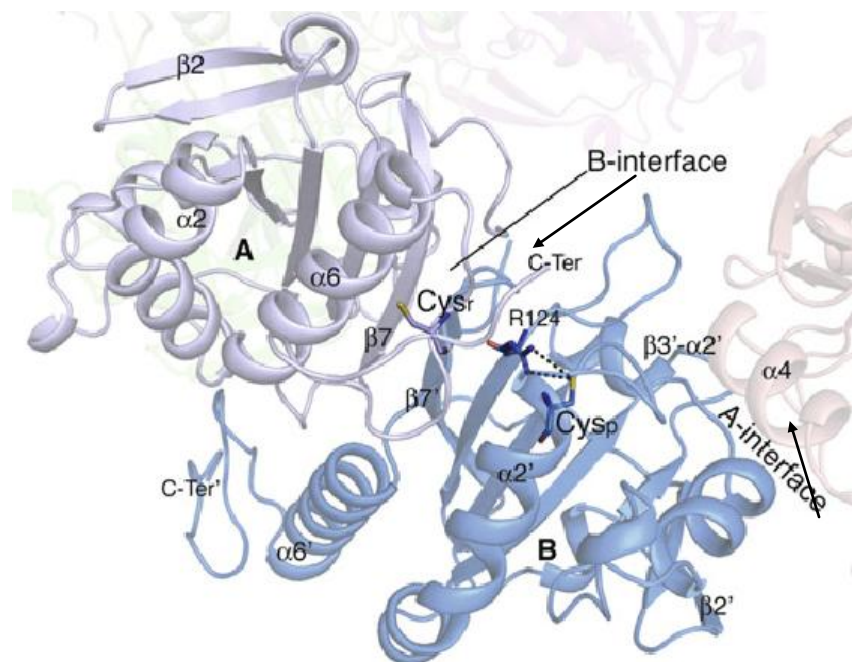


Рис. 1.1.4. А та В інтерфейси димерів Prxs [86]

На відміну від BCP/PtxQ білків, які являються виключно мономерами, пероксиредоксин утворює чітко вираженні олігомерні інтерфейси, що розміщуються поблизу активного центру молекули. Формування димерних структур у представників AhpC/Ptx I, Ptx IV здійснюється по типу «В інтерфейсу», який представлений бета фолдом ($\beta 7$ strands) – структурою з 10 до 14 складок (Рис. 1.1.4) [87]. Водночас білки Ptx та Ptx V родин, що є облігатними димерами, асоціюються між мономерами завдяки альтернативному «А інтерфейсу». Цей тип інтерфейсу включає укладання $\alpha 4$ спіраль, $\beta 3$ - $\alpha 2$ петлю та $\alpha 3$ спіраль напроти другого мономеру молекули пероксиредоксину [86].

Білки Ptx I та Ptx II людини мають близько 76 % ідентичності в амінокислотній послідовності та локалізовані в цитозолі та ядрі клітини. За результатами, представленими у дослідженнях [88] пероксиредоксини I та II мають різну четвертинну структуру, яка відображається в розміщенні пероксидазного та відновлювального функціональних цистеїнів. Пероксидазний цистеїн локалізований на позиціях Цис52 для Ptx I та Цис51 для Ptx II, де відновний знаходиться позиції цистеїнів Цис172 та Цис171 відповідно [71]. У випадку Ptx I цистеїновий залишок Цис83 є унікальним та формує Цис83-Цис83 дисульфідний місток, що сприяє формуванню декамерної структури білка (Рис. 1.1.5). Напротимасу, Ptx II є димерним білком із заміщеним залишком цистеїну (Цис) на треонін (Тре) [88].

```

Prx1  MSSGNAKIGH PAPNFKATAVMPDGQFKDISLSYKGGKYVFFFYPLDFTF
Prx2  MASGNARIGKPAPDFKATAVVDG-AFKEVKLSYKGGKYVVLFFFYPLDFTF
      *:****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      52          71          83
Prx1  VCPTEIIAFSDRAEEFKKLNCCQVIGASVDSHFCHLAWVNTPKKQGGGLGPM
Prx2  VCPTEIIAFSNRAEDFRKLGCEVLGVSVD SQFTHLAWINTPRKEGGLGPL
      *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:
Prx1  NIPLVSDPKRTIAQDYGV LKADEGISFRGLFIIDDKGILRQITVNDLPVG
Prx2  NIPLLADVTRRLSE DYGV LKTDEGIA YRGLFIIDGKG VLRQITVNDLPVG
      *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:
Prx1  RSVDETLRLVQAFQFTDKHGEVCPAGWKPGSDTIKPDVQKSKEYFSKQK
      173          199
Prx2  RSVDEALRLVQAFQYTD EHG EVCPAGWKPGSDTIKPNVDDSKEYFSKHN
      172          198
      *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

```

Рис 1.1.5. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей Prx I та Prx II [88].

Пероксиредоксин II (Prx II) це антиоксидантний білок, що належить до родини типових 2-Цис Prxs. Він має здатність метаболічно нейтралізувати пероксид гідрогена та гідроперокси. У випадку окиснення функціональних груп пероксидазного цистеїну Prx II до –SOH відбувається негайне їх відновлення до активного стану за рахунок тіоредуктазної активності ферменту Trx, який виступає донором електронів та не потребує енергії АТФ [89]. Молекулярна маса індивідуальною мономеру складає 25 кДа, відповідно маса димеру дорівнює ~48 кДа. Показано, що Prx II має високу спорідненість до H_2O_2 ($K_m H_2O_2 \leq 10 \mu M$), схожою до глутатіонпероксидази (GHPx) ($K_m H_2O_2 \leq 1 \mu M$). Такі властивості надаються йому важливості у регулюванні сигнальної системи клітин на основі різних концентрацій пероксиду гідрогена [90]. Піддослідні щура з нокаутованим геном прероксиредоксину II розвивають гемолітичну анемію, тим самим вказуючи на невід’ємну роль Prx II у захисті еритроцитів від окисного стресу [90]. Дефіцит Prx II також призводить до генерування надлишкового пероксиду гідрогена, підвищено активністю PDGF (platelet derived growth factor) рецептору та фосфоліпази $Cy1$, що відповідно створює умови для

підвищеного рівня клітинної проліферації та міграції [91]. Високий рівень надекспресії гена пероксиредоксина забезпечує захист вражених лейкоцитних клітин [92], у випадку недостатнього синтезу Ptx II збільшується швидкість та ефективність загибелі ракових клітин під впливом радіації.

Встановлено, що білок пероксиредоксин I втрачає свою функціональну активність за умов дії відносно низьких концентрацій пероксиду гідрогена, що робить його більш чутливим до стресу, а ніж пероксиредоксин II [88]. На сьогодні ідентифіковано в деяких клітинних ліній, що вміст Ptx I та II складає близько 0,5-1% від загального вмісту всіх білків клітини. Концентрація Ptx I займає найбільший відсоток поміж усіх представників родини пероксиредоксинів [93]. Звідси, в першу чергу білки Ptx I, II відповідають за функцію підсилення резистентності клітин до дії пероксиду гідрогена. Під час перебігу каталітичного циклу, коли концентрація пероксиду гідрогена складає $<1\mu\text{M}$ пероксидативний цистеїн гіперокиснюється, та його частка складає $\sim 0,072\%$ від Ptx I активного цистеїну (S_p) [70]. Дія Ptx I спрямована на елімінацію залишкового пероксиду гідрогена за рахунок транзитного міжмолекулярного дисульфідного зв'язку, що формується між пероксидативним цистеїном Цис⁵² однієї молекули та Цис¹⁷² іншої молекули Ptx I. Схильність Ptx I до інактивації зумовлена присутністю димер-димерних взаємодій завдяки Цис⁸³, які сприяють олігомеризації молекули Ptx I. Вона може бути причиною підвищеної чутливості Ptx I до окиснення низькими концентраціями пероксиду гідрогена, що підтверджується результатами [88, 83]. На противагу цим результатам було також продемонстровано, що пероксиредоксин II клітин лінії HeLa може піддаватись інактивуєчідій дії пероксиду гідрогена з подальшої регенерацією пероксидазної активності [94, 81]. У той самий час Ptx II є ефективнішим пероксидазним ферментом завдяки захищеному каталітичному цистеїну залишком амінокислоти Phe⁸¹, який запобігає гіперокисненню активного цистеїну [71].

Хоча дослідження антиоксидантних ферментів Ptx I, Ptx II відбувались на багатьох типах клітинних ліній та тваринних моделях незалежно, важливість їх функцій й досі не повністю розкрито. Щура з «нокаутованим» геном Ptx I мають неконтрольований клітинний ріст, що може сприяти розвитку ракових пухлин [66]. Відповідно, це свідчить про причетність Ptx I до участі у пригніченні прогресування ракових захворювань. Також, білок Ptx I робить внесок у підвищення резистентності клітини до старіння та прогресії різних типів раку [95, 96]. Фосфорилування фермента Ptx I призводить до тимчасової втрати його пероксидазної функції. Таке інативування Ptx I сприяє накопиченню пероксиду гідрогена, який відіграє роль месенджерної молекули, тим самим активуючи сигнальні рецептори [50]. Активування сигнальних каскадів здійснюється за опосередкованої участі Ptx I через взаємодію з наступними білковими комплексами: комплексу глутатіон-S-трансферази p1/c-Jun N термінальної кінази, апоптотичної сигнальної кінази 1 (ASK1), андрогеного рецептору, фактору міграції та інгібування макрофагів (macrophage migration inhibitory factor, MIF), презеніліну-1 (presenilin-1), гомологу фосфатази (phosphatase homolog), Toll-like рецептору [50, 97, 98].

1.1.4. Регуляція функціональної активності 2-Цис пероксиредоксинів

Використовуючи методи протеоміки, ідентифіковано декілька шляхів регуляції каталітичної активності ферментів Ptx I та II, а саме: глутатіонування, фосфорилування, нітрозилування та ацетилювання [5]. Дослідження активності Ptx I під час знешкодження мілімолярних концентрацій пероксиду гідрогена продемонстрували приєднання молекули глутатіону до активного цистеїну молекули пероксиредоксину [99, 100]. Глутатіонування Ptx I простежується під час дії на клітини A549 (human lung carcinoma) та HeLa мікромольних концентрацій пероксиду гідрогена [101].

Для ідентифікації сайтів глутатіонування були використані мутантні рекомбінантні білки Prx I із заміщеними амінокислотними залишками цистеїну на серин C83S/C173S, C52S/C173S, та C173S/C83S. Як було продемонстровано [50], мутантні білки за рН 7,4 та присутності у розчині відновленого глутатіону GSSG мали глутатіоновані цистеїни, пероксидазний (Цис⁵²), відновлювальний (Цис¹⁷³) а також (Цис⁸³). Глутатіонування перксіредоксинів може спостерігатися під час формування короткочасних інтермедіатів у представників 1-Цис Prx IV, 2-Цис Prxs *Schistosoma mansoni* та Prx V [102, 103]. Оскільки глутатіонування білків це чутлива відповідь організму на підвищений вміст пероксиду гідрогена, тому не дивно, що зворотне глутатіонування Prx може бути залучене до Prx регульованої внутрішньоклітинної передачі сигналу, що асоційоване зі специфічною локалізацією активних форм кисню [51].

За нормальних фізіологічних умов представники родини перксіредоксинів функціонують у вигляді head-to-tail димерів та декамерів [71, 53]. Під час утворення АФК ця динамічна рівновага зміщується у бік формування переважної більшості декамених структур чи так званих комплексів з великою молекулярною масою [13]. Ці структурні зміни сприяють перебудові функціональних властивостей перксіредоксинів, що проявляється втратою пероксидазної активності, та супроводжується набуттям властивостей білків шаперонів [13]. Для розкриття такої аномалії була досліджена поведінка мутантних форм Prx I де активний цистеїн був заміщений серином C52S/C173S, C83S [104]. Концентрація Prx I у цитозолі клітини становила 15-60 μM [54, 104]. За таких умов 97 % білків Prx I знаходиться у вигляді декамерів. Константа дисоціації Prx I за фізіологічного стану має суб-мікромольний діапазон. Напротимасу, глутатіонування Prx I призводить до зміни швидкості седиментації та седементациного коефіцієнту. Таке глутатіонування порушує олігомерну організацію зі зміщенням рівноваги концентрації декамерних форм Prx I у бік низькомолекулярних

димерних структур, тобто повної елімінації висомолекулярних олігомерів (Рис. 1.1.6).

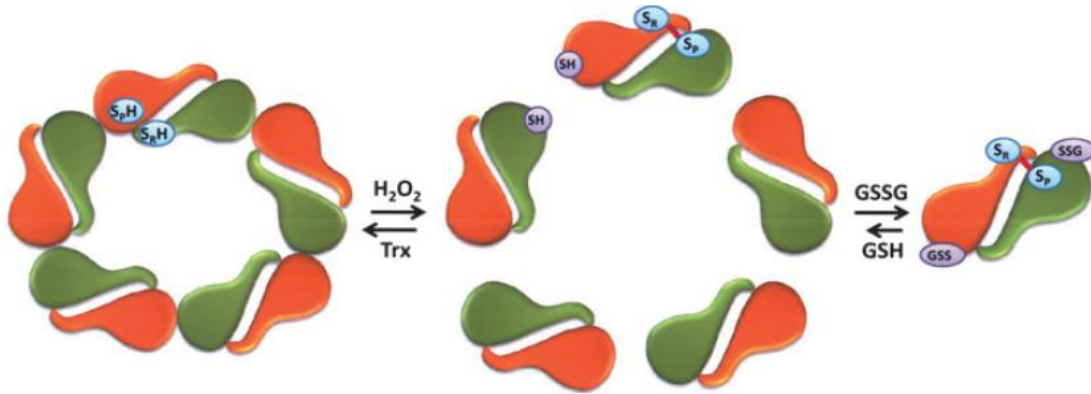


Рис 1.1.6. Схематичне зображення димеризації Prx I за участі молекули глутатіону [51].

Завдяки дослідженням бактеріального перосиредксину стало відомо, що пероксидазна активність не пов'язана та не є необхідною умовою для активування шапероних функцій білків Prxs [13]. Ці дані підкріплені результатами, що вказують на здатність відновленого Prx I, а також його мутантних форм Prx I (C52S/C173S) до прояву шапероної активності. Важливо зазначити причетність активного цистеїну (Цис⁸³) Prx I, до формування димерів та втратою його шапероних властивостей. Відповідно було показано, що розпад олігомерів проявляється завдяки моноглутатіонуванню залишку амінокислоти Цис⁸³ [13].

Як відомо, Цис⁸³ відіграє певну роль у стабілізації гідофобної взаємодії димерів Prx I, що є необхідним для формування декамерних структур [105, 71, 53]. Щоб оцінити всю важливість Цис⁸³ для функціонування Prx I, був проведений порівняльний аналіз глутатіонування цистеїнових залишків активних центрів Prx I та Prx II на прикладі ракових клітин лінії HeLa. Для моніторингу процесу глутатіонування використовувався біотинильований GSH етиловий естер (BioGEE), який здатен проникати клітинні мембрани на відмінну від GSH. У результаті специфічної реакції було показано, що глутатіонування, більшим чином спостерігалось у Prx I, ніж у Prx II. Це може

бути пов'язано саме присутністю активного залишку амінокислоти цистеїну, що знаходиться на позиції 83. Відповідно, Цис⁸³ відіграє регуляторну роль у зміні агрегатного стану молекули з багатокомпонентного декамеру (10 субодиниць) на димер, що супроводжується втратою шаперонної функції Prx I [104].

Показано, що Prx I та Prx II асоційовані з ліпідними рафтами, де розміщуються сигнальні молекули НАДФН оксидази, рецептори тирозинових кіназ, кінази родини Src та тирозинові фосфатази [51]. Пероксиредоксини розміщуючись на ліпідній мембрані, попереджають накопичення надлишкового пероксиду гідрогена, який здатен активувати каскад сигнальних молекул. Під дією стимулюючих факторів росту Prx I інактивується кіназами родини Src, які фосфорилують Tug¹⁹⁴ [83]. Такі дані свідчать про існування альтернативного механізму залученого до активування «шлюзової» («floodgate») функції пероксиредоксинів.

Відповідно до гіпотези «шлюза», за високої концентрації пероксиду гідрогена відбувається перекисне окиснення цистеїну в активному центрі Prx з утворенням сульфінової кислоти, і як наслідок, його інактивація. Завдяки цьому пероксид гідрогена отримує можливість далі взаємодіяти з білками-мішенями [106]. Також, дифузна відстань, тобто відстань, яку окиснювач долає до взаємодії з мішенню, повинна бути відносно невеликою порівняно з діаметром клітини (в середньому 10-20 мкм). Відновлений глутатіон за концентрації, що відповідає внутрішньоклітинній, не здатний обмежити дифузію пероксиду гідрогена в межах внутрішнього простору клітини. Де, в свою чергу присутність великої кількості сильно реакційноздатних пероксиредоксинів є достатньою умовою для обмеження дифузії пероксиду гідрогена. Звідси для ефективного окиснення білка-мішені необхідна його пряма взаємодія з комплексом, що генерує пероксид гідрогена. Можливість підвищити здатність проходження реакції між пероксидом гідрогена та його мішенню є локалізація білка-мішені та джерела пероксиду гідрогена (Nox) в межах одного клітинного компартменту [106].

1.2. Шаперони – білки теплового шоку

1.2.1. Механізм функціонування білків шаперонів у клітині

Відомо, що довготривалий вплив теплового шоку призводить до збою функціональних внутрішньоклітинних систем, та в кінцевому випадку до апоптозу клітини. Відповідно, щоб уникнути такої помилки, всі клітинні організми розвинули специфічний механізм захисту, пов'язаний з експресією білків теплового шоку. У еукаріотичних організмів функціонує декілька класів високомолекулярних білків (high molecular weight heat shock proteins - HSPs), та білків sHSPs з малою молекулярною масою, де, білки HSPs грають роль шаперонів [107, 108].

Головні біологічні функції молекулярних шаперонів полягають у корекції структури та конформації білків клітини, попередженні агрегації неправильно згорнутих чи частково розгорнутих білків, руйнуванні та солюбілізації стабільних білкових агрегатів, розгортанні нативних білків субстратів для їх транслокації через мембрану, дезінтаграції активних олігомерних структур та підтримання їх у стані неактивних мономерів, а також розгортанні активних мономерів для їх наступної деградації [109-112]. Білки теплового шоку класифікуються відповідно до їх молекулярної маси. Малі sHSP (16-30 кДа), HSP40, а також переважно мітохондріальні форми HSP60, HSP70, HSP90, HSP110, що мають АТФазну активність [113, 114]. Під впливом факторів клітинного стресу гіпертермії, надлишкової генерації активних форм кисню, фізичних чи хімічних стресів відбувається активація експресії HSP. Такий механізм отримав назву «відповідь на тепловий шок» (heat shock response HSR). Він виступає як універсальний механізм адаптації до умов довкілля [115].

Показано, що надлишковий синтез АФК під час прогресування ішемічної хвороби, викликає зниження активності антиоксидантних

ферментів [116]. Таке інгібування призводить до окиснення та агрегації ключових білків та ДНК, що спричиняє порушення функціонального стану клітини [117]. Представники HSP70 та їх ко-шаперони грають важливу роль у сортуванні та «контролі якості» пошкоджених білків. Цитозольна зміна рН, редокс статусу та іонного співвідношення впливають на агрегатний стан білкових компонентів клітини. Первинною лінією захисту виступають шаперони HSP70 та HSP90. Вони діють за участі ко-шаперонних білків-партнерів, які забезпечують високий рівень специфічності для зв'язування аргетних молекул [108, 118]. Під час тимчасового стресового впливу HSP70 розпізнає гідрофобні кінці білка-клієнта, відіграючи роль направляючого елемента, який визначає подальшу долю білкової молекули на шляху до формування правильної глобули або до її деградації (Рис. 1.1.7) [119].

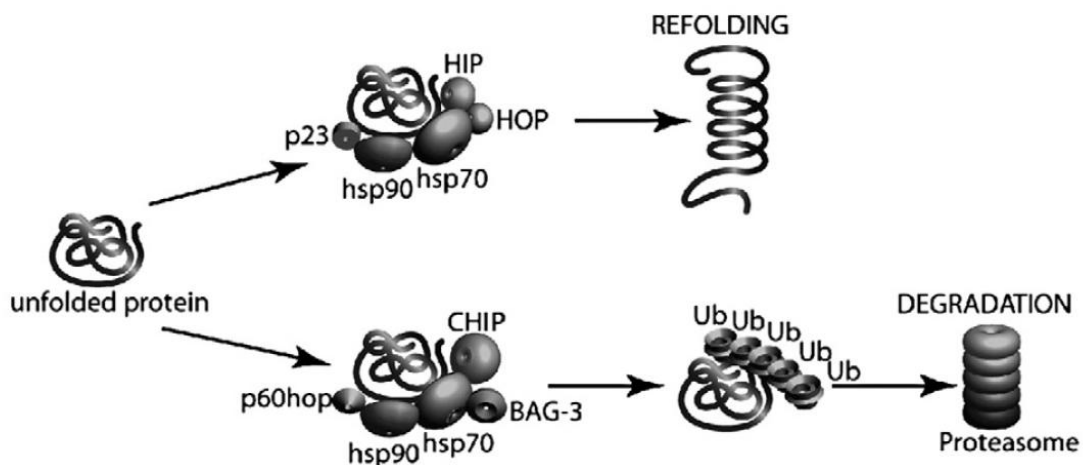


Рис. 1.1.7 Участь шаперонів HSP70 та HSP90 у формуванні правильної глобули та деградації за рахунок ко-шаперонних білків [119].

Ко-шаперонні білки HOP (HSP70-HSP90 organizing protein), HIP (HSP70-interacting protein) ініціюють клієнт-специфічне зв'язування та залучені до відновлення функціонального стану глобулярних білків. У свою чергу, BAG-1 (Bcl-2 associated athanogen-1) та CHIP (Carboxy terminus of HSP70 interacting protein) асоціюючись з HSP70, призводить до інгібування АТФазної активності ко-шаперонних білків HOP [120, 121]. Взаємодія CHIP з

білком-клієнтом здійснюється за рахунок TPR мотиву (3-tetratricoreptide), який знаходиться на N-термінальному кінці ко-шаперону. CHIP, також володіє E3 убіквітин лігазною активністю завдяки U-box домену розміщеному на C-термінальному кінці молекули [122, 123]. Важливість цього ко-шаперону полягає у визначенні специфічності HSP70 до білків-клієнтів. Інгибування здійснюється шляхом пригнічення АТФазної активності HSP70 та убіквітинуванням окисненого білка-мішені. Такий процес забезпечує деградацію убіквітинільованих білків у протеасомах [124, 125]. Підсумовуючи, вирішення проблеми формування правильної глобули чи деградації агрегованого білка здійснюється на етапі білок-білкових взаємодій між білком-клієнтом, шапероном та його ко-шапероном (Рис 7).

По-друге, представники HPS27, HPS70 та HPS90 здатні зв'язувати білки-учасники апоптотичних каскадів, попереджуючи апоптоз клітин та знижуючи дію факторів запалення [119]. Активація апоптозу в клітині здійснюється шляхом надлишкової генерації молекул АФК. Останні активують експресію апоптотичних факторів Araf-1, TRADD, FADD [126, 127]. Відповідно, малі білки теплового шоку (sHSP) зв'язуючись з апоптотичними білками каскадів мітохондрій, пригнічують їх дію так за стресового впливу, білки HPS70 та HPS90 взаємодіють з Araf-1 (apoptosis protease activating factor-1), тим самим пригнічуючи поширення апоптотичного сигналу [128-130]. Araf-1 активується шляхом вивільненням мітохондріального цитохрому *c*. Вихід цитохрому *c* провокує збирання апоптосом та подальшої активації капази 9 [131]. Щоб уникнути клітинної смерті HSP27 інгібує вихід мітохондріального цитохрому *c* або зв'язує цей білок за рахунок білок-білкової взаємодії [132, 133, 134].

1.2.2. Пероксиредоксини – олігомерні білки з вираженою шаперонною активністю

Під час вивчення родина типових 2-Цис пероксиредоксинів виявлено, що його представники утворюють олігомерні структури, залежно від редокс статусу активного центру [142]. У 2004 вперше було показано, що в умовах окисного стресу 2-Цис Ptx дріжджів втрачають пероксидазну активність та набувають шаперонної активності. Гіперокиснення пероксиредоксину АФК спричиняє транзитну перебудову димеру з утворенням тороїдного комплексу декамерів [13, 11]. Такі декамерні комплекси здатні до подальшої агрегації, яка спричинює зміну функціональної активності Ptxs з пероксидазної на шаперонну. Високомолекулярна олігомерна структура (тороїд) представлена у вигляді декамеру, який формують білки димери, сполучені гідрофобними зв'язками [4, 71, 105]. Matsumura та колеги [105] використовуючи метод гель фільтрації показали, що структурний перехід димер-олігомер для білків НВР/Ptx I має місце при заміні амінокислотних залишків активних центрів Ptx цистеїну на серин (C52S та C173S). Водночас білки дикого типу представленні суміщу димерних та декамерних форм. При збільшенні концентрації та присутності дитіотриетолу (ДТТ) їх рівновага зміщується у бік олігомерних комплексів [105]. При заміні цистеїну на серин (C83S) Ptx I набуває вигляду димеру, що підтверджується результатами кристалографічних досліджень [56]. З використанням методів рентгенівського дифракційного аналізу, продемонстровано декамерну тороїдальну структуру мутованого пероксиредоксину (C52S) з діаметром комплексу у $\sim 120\text{Å}$, внутрішнього діаметру $\sim 60\text{Å}$ та товщиною у $\sim 45\text{Å}$ (Рис 1.1.8).

Тіоредоксин пероксидаза В (thioredoxin peroxidase В), що за останньою номенклатурою є пероксиредоксином II, характеризується високим рівнем експресії під час ранніх стадій розвитку еритроцитів до початку формування гемоглобіну [135]. Завдяки роботам Шродера була розв'язана декамерна структура Ptx II, яка дуже нагадує тороїдну структуру Ptx I з майже аналогічними просторовими характеристиками [71]. Результати седиментаційного аналізу демонструють, що за фізіологічних концентрацій

($\mu\text{g}/\text{мл}$) декамерні форми Ptx II не дисоціюють на димерні молекули. Таким чином, запропоновано, що високомолекулярні комплекси пероксиредоксинів формуються за умов окисного стресу. Дія АФК також підсилюється завдяки високій спорідненості гемоглобіну до кисню та вивільненню іону заліза під дією пероксидаз. За мікромольних концентрацій іонів кальцію в цитозолі відбувається збирання високомолекулярних комплексів Ptx II та їх асоціація з внутрішньою поверхнею еритроцитів. Це ініціює витік іонів калію у міжклітинний простір через Ca^{2+} активовані калієві канали (Gardos channels) [136, 137].

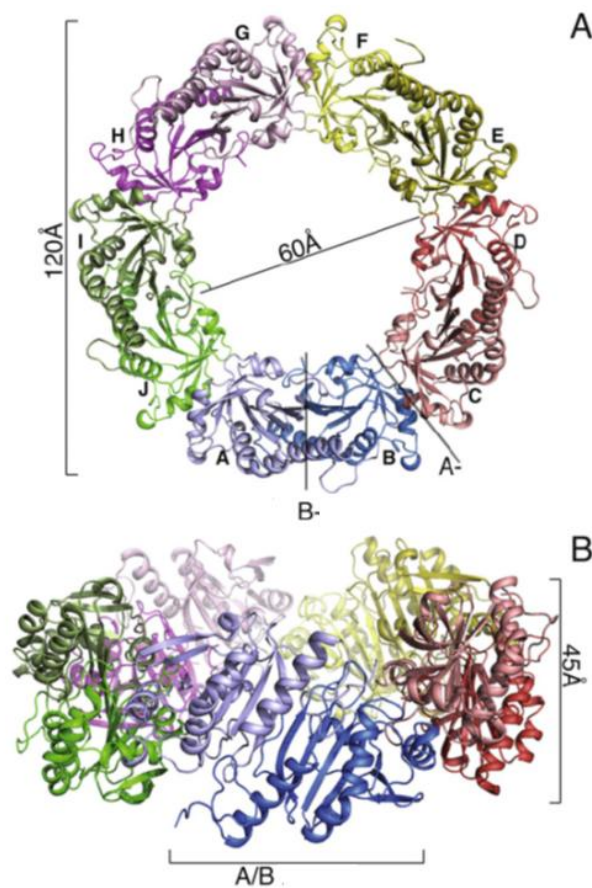


Рис. 1.1.8. Кристалографічний аналіз молекули пероксиредоксину I [Saccossia 2012 429-439]

З літературних даних відомо, що хворі на серповидну клітинну анемію з підвищеним рівнем Ca^{2+} та Na^+ , а також низькою концентрацією калію та хлорид іонів мають низький цитозольний рівень рН (рН 7,14 замість рН 7,29), що спричиняє виникнення окисного стресу [138]. Більше того, іони кальцію

залучені у процес приєднання олігомерних комплексів пероксиредоксинів до внутрішньої мембрани еритроцитів [137]. Механізм цього явища ще має бути дослідженим. Відомо, що декамерний P_{rx} II не має на своїй поверхні позитивно заряджених груп, що, відповідно, унеможлиблює його зв'язування напряду з мембранними фосфоліпідами. Але високомолекулярні комплекси пероксиредоксинів володіють гідрофобними ділянками, які можуть сприяти виникненню гідрофобних зав'язків з мембранно-з'язаними білками [139]. Звідси, збирання олігомерних комплексів P_{rx} та їх інтеграція з білками клітинної мембрани може бути зумовлена відповіддю клітини на окисний стрес.

Завдяки методу трансмісійної електронної мікроскопії було показано, що торини - це кільцеподібні комплекси, які складаються з десяти та більше субодиниць [140]. Молекулярна маса мономеру P_{rx} II складає 21,8 кДа, де димер P_{rx} представлений двома мономерами (~44 кДа), що з'єднані дисульфідними зв'язками [53]. Кожна субодиниця димеру має по два активних цистеїнових центри, які розміщуються один навпроти одного. За присутності надлишкових концентрацій пероксиду гідрогена, пероксидазний цистеїн (Цис_p-SOH), що не встиг прореагувати з відновлювальним цистеїном (Цис_r) сусіднього мономеру, окиснюється до Цис_p-SO₂H та в подальшому до Цис_p-SO₃H. Таке гіперокиснення асоційоване з втратою первинної пероксидазної активності та появою альтернативного, шаперонного механізму функціонування пероксиредоксинів. Біохімічна трансформація обумовлена структурною перебудовою агрегатного стану молекули, яка ініціює олігомеризацію з наступним формуванням високомолекулярних конгломератів [141, 142]. Це підтверджують результати електронної мікроскопії P_{rx} I дріжджів. Було показано, що шаперонна активність P_{rx} I обумовлена різноманітними високомолекулярними формами (HMW), ідентифікованими як кільцеподібні структури або сферичні глобули, що складаються з ідентичних димерів P_{rx} I [13]. Гіперокиснений пероксиредоксин може досягати молекулярної маси у 530 кДа та більше, що

обумовлено об'єднанням декамерів (~220 кДа) у довгі фібрили [81, 143]. На прикладі досліджень [143] культури епітеліальних клітин було зазначено, що за умов окисного стресу довгі філаменти об'єднаних кілець декамерів пероксиредоксину слугували попереджувальним сигналом у порушенні клітинного гомеостазу, тим самим спричиняли арешт клітинного циклу [144].

Окрім цього, здатність до олігомеризації була досліджена у представників типових 2-Цис пероксиредоксинів за допомогою методів гель-фільтрації, аналітичного центрифугування, електрофоретичного розділення білків та мас-спектрометрії [12, 14, 71, 85, 145, 146]. Серед факторів, що сприяють збиранню високомолекулярних комплексів, можна назвати коливання іонної сили, низькі значення рН, високі концентрації металів магнію та кальцію, відновлення редокс-активного центру, та гіперокиснення цистеїну до цистеїн-сульфінової кислоти [71, 85, 146].

У роботі [103] ідентифіковано дві форми 2-Цис Prxs з трематоди *Schistosoma mansoni* Prx I та Prx II. За даними постульованими Вудом [4] амінокислотна послідовність з GGLG мотивом розташована поряд з YF мотивом С-термінальної петлі, має активним центр пероксиредоксину глибоко зануреним поміж ними. Таке розташування активного центру ускладнює відновлення пероксидазного цистеїну до його функціонального стану. Відповідно, Prx II зазнає гіперокиснення з втратою пероксидазної активності [4]. Це, на думку автора, пов'язано з наявністю YF мотиву на С-термінальному кінці молекули Prx. На відмінну від Prx II Prx I не має у своєму складі YF мотиву, що унеможлиблює процес гіперокиснення [103]. За умов мутагенезу послідовності Prx I шляхом додавання YF ділянки, спостерігається гіперокиснення та інактивація антиоксидантних властивостей білка. Де Prx II, набуває резистентності завдяки укороченню С-термінальної послідовності. Щоб дослідити всю важливість цього явища, Мун та колеги за допомогою методів електрофорезу та вестерн-блот аналізу встановили, що Prx II людини формувала високомолекулярні комплекси під дією пероксиду гідрогена після 20 хв експозиції. На противагу, гібридні

форми Prx II з укороченою С-термінальною ділянкою (Δ C-ter) та заміненим активним цистеїном на серин (C51S) були не здатні до агрегації низькомолекулярних субодиниць [11]. Це свідчить про невід'ємну роль С-термінального домену та YF мотиву для структурної та функціональної перебудови пероксиредоксину під дією пероксиду гідрогена.

Яка роль олігомерних комплексів пероксиредоксинів у клітині? За результатами досліджень Prx I з високою ефективністю пригнічує агрегацію цитратсинтази ферменту циклу Кребса, де мутантні форми Prx I були нездатні захистити активність цитратсинтази [13]. Зміна співвідношення концентрацій у бік Prx по відношенню до субстрату сприяла інгібування, а при співвідношенні Prx I до CS 2:1 агрегації не спостерігалось. Також була відмічена роль Prx I у збереженні активного стану β -ланцюга інсуліну за умов стресового впливу. У порівнянні з шаперонними білками HSP16.5 *Methanococcus jannaschi* та α -кристаліну, Prx I показав вищу шаперонну активність у 15 та 3 рази відповідно [14]. Необхідність присутності високих концентрацій для збереження активності CS була також продемонстрована для тубуліну та HSP16 *Caenorhabditis elegant*. Підсумовуючи, Prx I є високоефективним молекулярним шапероном, що за низьких концентрацій попереджує інактивацію білка партнера.

Результати досліджень *in vivo* демонструють значне інгібування агрегації альфа-синуклеїну (α -synuclein) ключового компоненту Тілець Леві, що знайдені у пацієнтів з хворобою Альцгеймера та Паркінсона за присутності цитозольного Prx I [147]. Окрім випадків стрес-індукованої резистентності, високий рівень експресії 2-Цис Prxs спостерігається під час нейродегенеративних порушень, хвороби Альцгеймера, Синдрому Дауна, а також раку щитовидної залози та легенів [4]. Високомолекулярні агрегати пероксиредоксинів зв'язують розкручені глобули цільових білків (субстрат) за рахунок доступних гідрофобних ділянок, що нагадує класичну модель функціонування шаперонів [141]. Важливість шаперонів також підкріплена результатами досліджень трансгенних мишей з інгібованим Prx I, вони мали

коротший життєвий цикл у порівнянні з дикими формами, морфологічні аномалії, гемолітичну анемію, розвиток ракових пухлин та накопичення окиснених білків [66].

1.3. Характеристика креатинфосфокінази головного мозку людини

1.3.1. Функціональна активність ферменту креатинфосфокінази головного мозку людини та її роль у клітині

Креатинфосфокіназа (КФК) (аденозин-5'-трифосфат: креатин фосфотрансфераза, ЕС 2.7.3.2) каталізує обернену реакцію фосфорилування креатину з утворенням фосфокреатину за участі АТФ та Mg^{2+} [148]. Фосфокреатин забезпечує постачання АТФ та вважається невід'ємним джерелом високоенергетичного фосфату у м'язових тканинах, серці та головному мозку [149]. Нейрони головному мозку споживають 50 % енергії генерованої креатинкіназою/фосфокреатиною системою. Пул спожитої енергії забезпечує транспорт іонів через АТФ залежну Na^+-K^+ АТФазу [150, 151]. Звідси, функціонування КФК є ключовим для забезпечення енергетичного гомеостазу головного мозку людини.

Родина КФК представлена трьома тканино-специфічними ізоформами, а саме: КФК головного мозку (КФК ГМ), КФК саркомерів м'язів та мітохондріальною креатинкіназою [16, 152]. Четвертинна структура КФК ГМ складаються з двох ідентичних субодиниць, що утворюють гомодимер із сукупною молекулярною масою у 84 кДа. Відповідно, маса кожного мономеру дорівнює 42 кДа. Завдяки кристалографічним дослідженням Бонга та колег [153] була виявлено структурну організацію ферменту КФК. Загалом, будова мономеру КФК включає N-термінальний домен з 1-100 амінокислотними залишками, С-термінальний α/β домен з 125 по 381 та лінкерну ділянку на відрізьку 101-124, що з'єднує С та N кінці (Рис. 1.1.9). Субстрат-специфічна кишень креатинкінази оточена залишками аргініну

(Arg130, Arg132, Arg236, Arg292 та Arg320), які створюють позитивний заряд для зв'язування фосфатної групи. Роль кофактору грає іон Mg^{2+} , що стабілізує фосфорилування креатину [154]. Одним із ключових функціональних залишків вважається Цис283. Оптимальне зв'язування креатину відбувається за переходу Цис283 в стан тіольного аніону. Доведено, що залишок цистеїну C283 є головною мішенню хімічної інактивації дансил хлоридом та алканами йоду [155, 156]. Заміна цистеїну на серин інгібує специфічну активність КФК на 4 % у напрямку синтезу АТФ, та на 2,5% в напрямку формування фосфокреатину [157].

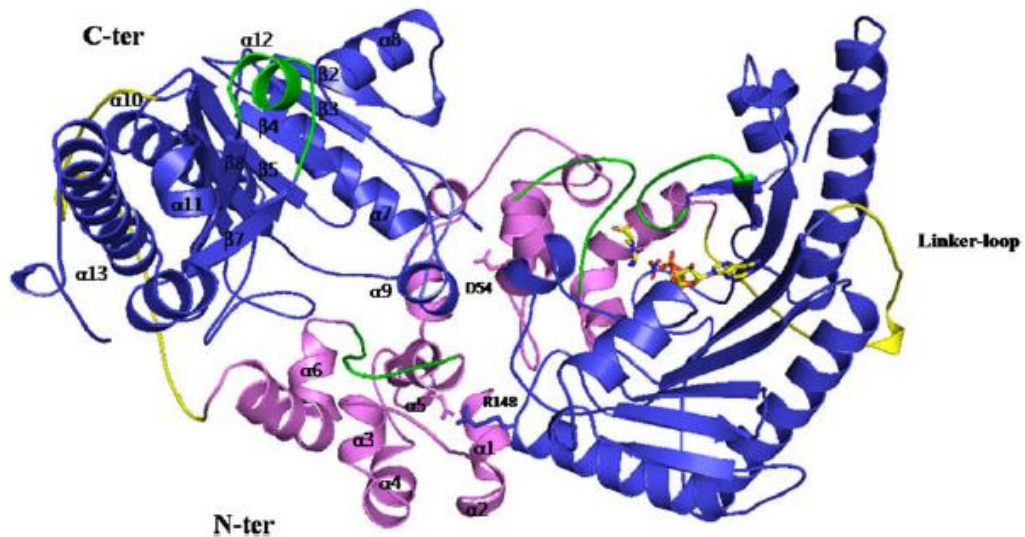


Рис 1.1.9. Схематичне зображення димерної молекули КФК ГМ [153].

Ідентичність послідовностей креатинкінази м'язів та головного мозку складає 80%. Базуючись на дослідженні кінетичних характеристик КФК м'язів, було показано, що не дивлячись на димерну структуру кооперативність між двома активними центрами мономерів відсутня [158, 159]. Заміна амінокислотного залишку КФК м'язів аргініну на аланін призводить до утворення незалежних мономерів, це демонструє важливість аргініну (R147) для димеризації КФК м'язів [160]. Аргінін (R147) утворює гідрофобний зв'язок з негативно зарядженою аспаргіновою кислотою (D209), така взаємодія стабілізує димерну структуру білка. Третя амінокислота, що

приймає участь у димеризації - аргінін (R151). Інактивація тепловим шоком або гуанідин хлоридом продемонстрували, що мутантні форми R151 дисоціюють на мономери за менш жорстких умов, ніж дика форма білка КФК м'язів [160].

Креатин (Cr) фосфорилується до фосфокреатину (PCr) з використанням АТФ (Рис. 1.1.10). Молекула АТФ отримана з гліколізу застосовується ферментом КФК ГМ. Пул PCr/Cr переміщає енергію в клітині таким чином, що використання PCr для регенерації АТФ здійснюється поблизу АТФазних комплексів [161]. Креатинкіназний/фосфокреатиновий (СК/PCr) пул поєднує внутрішньоклітинні компартменти та мобілізує енергетичний потенціал клітини [162]. КФК регулює кількісне співвідношення АДФ/АТФ завдяки пригніченню внутрішньоклітинного рівня АДФ, тим самим попереджаючи інактивацію АТФаз [16, 163]. Синтез креатину, головним чином, здійснюється у нирках та печінці. Клітини адсорбують креатин з кров'яного русла завдяки транспортеру креатину CRT. Система CRT розміщується у гематоенцифалічному бар'єрі головного мозку, а також на плазматичній мембрані клітин нейронів [164, 165].

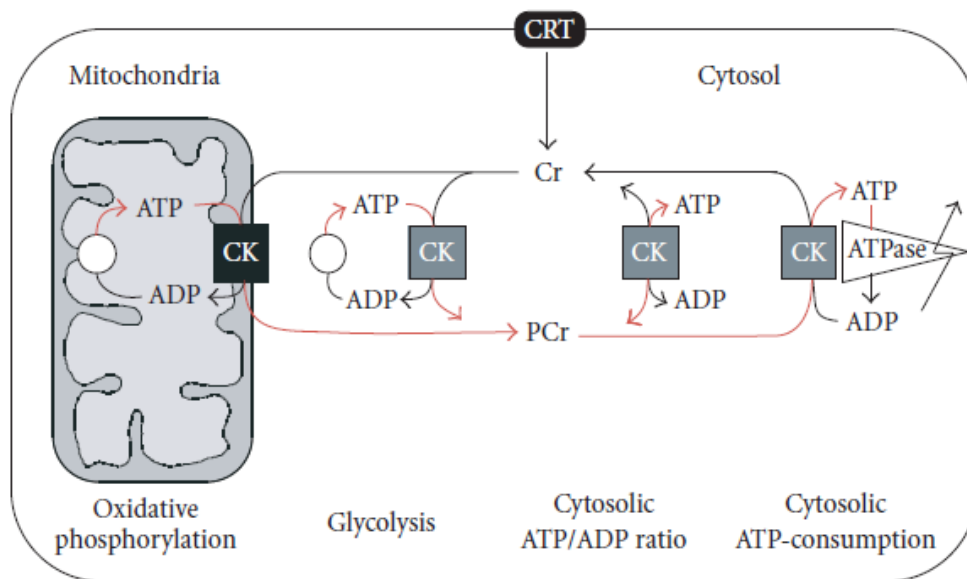


Рис 1.1.10. Креатин/фосфокреатинова система [211]

Денатурація глобули КФК під дією гуанідин хлориду характеризується чотирма структурними переходами, які представлені частково активним димером, інактивним димером, компактним мономером, та частково згорнутим мономером [166, 167]. Кожна субодиниця КФК ГМ вміщує по чотири вільних цистеїни. Рефолдинг креатинкінази відбувається без участі окиснення жодного з активних цистеїнів. Допомога рефолдингу здійснюється за рахунок шаперонних білків. У системі запропонованій (Zhao 2005) денатурація КФК ГМ була спричинена гуанідин хлоридом розчиненому у 30 мМ Трис-НСІ буфері [167]. Шапероний білок PDI (protein disulfide isomerase) це мультидоменний та мультифункціональний гомодимер, що функціонує в плазматичному ретикулумі. Головна його роль полягає у створенні сприятливих умов для правильного фолдингу білків-партнерів [167]. Ефективне відновлення ферментної активності КФК спостерігається при додаванні в інактивовану суміш шапероного білка PDI у концентраціях, які перевищують 1 мкМ.

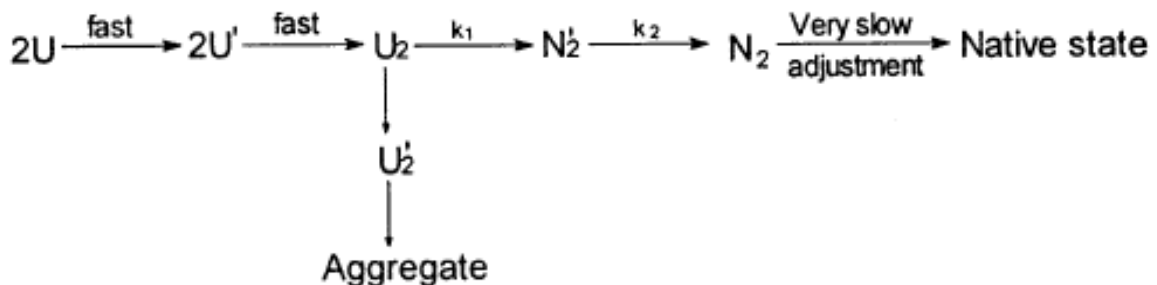


Рис. 1.1.11 Модель інактивації ферменту креатинкінази [24].

Примітки: U – повністю розкручена глобула креатин кінази; U' – інактивований мономер КФК ГМ; U₂ – інактивний димер КФК ГМ; U'₂ – не правильно згорнутий димер; N'₂ – частково активний димер; N₂ – повністю активний димер КФК.

Процеси відновлення активності та рефолдингу четвертинної структури білка КФК є незалежними за концентрацій, що не перевищують

2,6 мкМ [24]. Як показали дослідження [24], за експериментальних умов підвищення концентрації до 4 мкМ процес агрегації стає майже не оберненим. Участь білків шаперонів у процесі рефолдингу є ключовою для відновлення нативної структури. Молекулярний шаперон GroEL за рахунок енергії АТФ коригує правильне укладання поліпептидного ланцюга молекули КФК ГМ на стадії «розплавленої глобули», тим самим запобігає її інактивації [24, 168, 169]. Після усунення інгібітора креатинкінази, 6 М сечовини, активність ферменту відновлюється. При збільшенні концентрації GroEL рекативаційна здатність КФК ГМ значно зменшується. Звідси, можна зробити висновок, що відновлення активного стану білка залежить від його концентрації.

Базуючись на результатах попередніх досліджень, Zhou та колеги запропонували модель рефолдингу кретанкінази [24]. У відповідності з цією моделлю розгорнутий поліпептид знаходиться перед дилемою – згорнутись у правильну тривимірну структуру з активними димерами, або піти по шляху взаємодії з іншими білками КФК формуючи не функціональні агрегати. Іншими словами, при низьких концентраціях ($\leq 2,5$ мкМ) переважає U_2 конформація, з незначною ймовірністю формування не правильно згорнутих димерів U'_2 . Мінімальна кількість U'_2 знижує можливість агрегації, тому КФК переходить у стан активного димеру (N_2). При концентрації, яка дорівнюють ($> 2,5$ мкМ) для КФК характерне збільшення U'_2 форм, що активує процес неправильного укладання поліпептидного ланцюга та зміщає рівномасу в бік інактивації креатинкінази. З результатів відомо, що шапероний білок GroEL зв'язується з КФК на стадії інактивованого димеру U_2 . Тим самим попереджаючи конформаційні зміни структури КФК (Рис 1.1.11).

1.3.2. Зв'язок КФК ГМ з розвитком нейродегенеративних захворювань людини

Енергія АТФ є необхідною для забезпечення функціональної активності нейронів головного мозку. Поляризація мембрани, потік іонів Ca^{2+} в клітину, процесинг нейротрансмітерів, внутрішньоклітинна сигналізація, аксонний та дендритний транспорт здійснюється за присутності АТФ [170]. Концентрація креатину у головному мозку складає 50 mM. За нормальних умов 2/3 від загального внутрішньоклітинного креатину знаходиться у формі високоенергетичного креатинфосфату та 1/3 у формі креатину [171].

За допомогою методів імуногістохімії був продемонстрований високий рівень експресії КФК у клітинах астроцитів головного мозку людини, а також селективною дистрибуцією у нейронах [161]. Високий рівень експресії КФК ГМ спостерігається на ранніх етапах розвитку головного мозку щурів [172]. Креатинкіназа асоційована з синаптичною мембраною, приймає участь в накопиченні глутамату у присинаптичних везикулах, тим самим забезпечуючи енергією процес зберігання нейротрансмітера [173, 174]. Креатинкіназа асоційована з мембранним ацетилхоліновим рецептором, що регулює вивільнення ацетилхоліну в синаптосому [175, 176]. Разом з ферментом енолазою КФК ГМ бере участь у аксоплазматичному транспорті мітохондрій, ліпідних везикул, білків та інших внутрішньоклітинних компонентів [177]. Пацієнти хворі на рак простати мають підвищений рівень синтезу КФК ГМ. Також, висока концентрація цього ферменту знайдена у сироватці крові хворих на аденокарциному [178, 179]. Але, оскільки КФК ідентифікована і в доброякісних пухлинах, не можна однозначно стверджувати, що КФК є унікальним маркером патологічних станів [180].

Біосинтез креатину включає два головні шляхи, що каталізуються L-аргініном: гліцинамінотрансфераза (AGAT) та гуанідиноацетат N-метилтрансфераза (GAMT). Як показано [181-183] значна частина креатину продукується на ранніх стадіях розвитку головного мозку, про що свідчить локалізація AGAT та GAMT, а також транспортеру CRT в клітинних популяціях мозкових клітин. Основний пул Cr надходить з гематоенцифалічного бар'єру завдяки функціонування креатинових

транспортів [164]. Спільною рисою нейродегенеративних порушень, таких як: хвороба Хантінгтона, боковий аміотрофічний склероз, хвороба Паркінсона та Альцгеймера є мутації мітохондріальної та ядерної ДНК. Це неодмінно призводить до колапсу мітохондрій та порушенням енергетичного обміну клітин мозку людини [184]. Дефект церебрального метаболізму глюкози спостерігається у ділянках, асоційованими з новою корою хворих на Альцгеймера [185]. Активність кортикальної ацетилхолінестерази значно нижче у пацієнтів хворих на Альцгеймера, ніж у здорових тієї ж самої вікової групи. Прогресування нейродегенеративних захворювань супроводжується перекисним окисненням білків та ліпідів. Підвищена концентрація карбонільних груп (CO) є маркером перекисного окиснення білків під час хвороби Альцгеймера [45]. За допомогою методів протеоміки були ідентифіковані три специфічні білки КФК ГМ, глютамін синтетаза, убіквітин карбокси-термінальна гідролаза (UCH L-1), що піддаються окисненню в головному мозку хворих на Альцгеймера [186]. Окисна модифікація КФК швидко інактивувала фермент, що призводило до аномального розділення креатинкінази між розчинною та нерозчинною фракціями [33]. У результаті, активність КФК у гомогенатах головного мозку зменшувалась на 86 %, де рівень експресії гена КФК знижувався тільки на 14 % [33]. Це пов'язано з цистеїновим залишком активного центру молекули, що специфічно модифікується АФК [187]. Звідси, низька активність КФК ГМ супроводжується порушенням енергетичного обміну клітин нейроглії, нейронів та синапсних елементів головного мозку хворих з нейродегенеративними порушеннями [31, 33, 188,]. Це підтверджується результатами клінічних досліджень, де у пацієнтів з хворобою Альцгеймера було виявлено знижену концентрацію креатинфосфату на ранніх стадіях розвитку та інгібування процесу окисного фосфорилування порівнянно із здоровими пацієнтами, що вказує на енергетичний стрес головного мозку у хворих на Альцгеймера.

Підсумовуючи вище сказане необхідно зазначити, що пероксиредоксинів – це мультфункціональні білки, які вирізняються наявністю комбінованої пероксидазної та шаперонової активності. Ініціація кожної з цих активностей залежить ексклюзивно від окисного статусу реактивних цистеїнів димерної молекули 2-Цис пероксиредоксинів. В дослідженнях було продемонстровано існування білкової специфічності між Prxs та білками партнерами. Ця специфічність проявляється у захисті білків партнерів та відновленні їх функціонального стану. Відповідно, в данній дисертаційній роботі нами буде розглянуто ідентифікацію КФК ГМ як нового білка партнеру пероксиредоксинів Prx I та Prx II, їх взаємодію *in vitro*, та вплив температурного та окисного стресу на активність рекомбінантного КФК ГМ за умови інкубування з Prx I та Prx II.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Використанні матеріали та реактиви

У роботі були використані такі реагенти та матеріали: креатин (“Sigma-Aldrich Co. LLC”, США), тимол синій (“Sigma-Aldrich Co. LLC”, США), ліпофетамін (“Invitrogen”, США), Coomassie Brilliant Blue G250 (“AppliChem”, Німеччина), Таq ДНК-полімераза (“Invitrogen”, США), ізопропілтіогалактозид (“Sigma-Aldrich Co. LLC”, США), АТФ (“Sigma-Aldrich Co. LLC”, США), триптон (“Sigma-Aldrich Co. LLC”, США), лігаза T4 (“Invitrogen”, США), Трис-НСІ, ЕДТА,

Інші реактиви етиловий спирт, хлороформ, ізопропіловий спирт, β-меркаптоетанол, гідрокарбонат натрію, гідроксид натрію, пероксид гідрогена, сульфат амонію, хлорид натрію, хлорид калію, хлорид кальцію, етилацетат, гліцерол, бромфеноловий синій, сечовина, гуанідин хлорид, сульфат магнію, хлорид магнію, вітчизняного виробництва кваліфікації х.ч. та о.х.ч.

2.2. Клонування та експресія гена КФК ГМ

Ген *СКВ* був ампліфікований у відповідності до нуклеотидної послідовності взятої з «GenBank» під ідентифікатором CR542268.1. Послідовність прямого праймеру: КФК ГМ-F 5'-CATATGCCCTTCTCCAACAG-3' з сайтом рестрикції Nde I; реверсного праймеру: КФК ГМ-R, 5'-GGATCCTCATTTCTGGGCAG-3' з сайтом рестрикції Bam HI [47]. Очищений продукт ПЛР-реакції був клонований у плазміді рЕТ14b з His-tag послідовністю та рЕТ17b для експресії рекомбінантного білка КФК ГМ в бактеріальних клітинах *E.coli*. Для експресії в ракових клітинах *in vitro* ми використали вектор рFlag-CMV, що містив послідовність FLAG. Пара

праймерів мали наступні олігонуклеотидні послідовності: КФК ГМ-F, 5'-AAGCTTATGCCCTTCTCCAAC-3' з сайтом рестрикції Hind III та КФК ГМ-R, 5'-GGATCCTCATTTCTGGGCAG-3' з сайтом рестрикції Bam HI. Умови ПЛР: 30-35 циклів, температура плавлення 94 °С протягом 30 секунд; температура віджигу 55°С протягом 30 секунд; температура синтезу 72 °С протягом 30 секунд з фінальною елонгацією при 72 °С протягом 7 хвилин (BioRad, MJ Mini Thermal Cycler). Для очищення продуктів ПЛР об'єм 50 мкл був взятий у співвідношенні 1 до 5 з буферним розчином очищення (РВ буфер – 5,0 М гуанідин хлорид, 30 % ізопропанол; РЕ буфер – 10 мМ Тріс-НСІ рН 7,5). Всі наступні операції були виконані у відповідності до інструкції виробника ("QIAquick", Qiagen, США). Очищені продукти були представлені в рGEMT-T easy векторну систему (Promega, США) з використанням лігази Т4 та інкубувались при температурі 16 °С протягом ночі. Щоб гарантувати відсутність ПЛР-індукованих мутацій було проведено нуклеотидне секвенування клонованої послідовності КФК ГМ. Порівняння нуклеотидної послідовності проводили за використання програмного забезпечення «BioEdit».

2.3. Очищення рекомбінантного білка КФК ГМ

Рекомбінантний білок був очищений з клітин *E.coli* BL21 з використанням процедури, описаної в дослідженнях, з деякими змінами [30, 189]. Клітини *E.coli* культивували при 37 °С протягом 3 год., щоб досягти значення оптичної густини OD600 близько 0,4. Масову експресію рекомбінантного білка індукували додаванням 0,4 мМ IPTG. Клітини концентрували центрифугуванням після інкубації при 30 °С протягом 6 годин. 5 г клітин було ресуспендовано в 50 мл буферного розчину, що містив 1 мМ ЕДТА, 50 мМ Тріс-НСІ, рН 7,5, після центрифугували (8000 об/хв, 30 хв, 4 °С). Білок преципітували 80 % сульфатом амонію і центрифугували

протягом 30 хв при 14000g. Наступним кроком був діаліз зразку в буферному розчині 50 мМ Na_3PO_4 і 100 мМ NaCl протягом ночі [204].

Для хроматографії, що поділяє за розміром було використано хроматографічну колонку ($V=750$ мл) з сефакрилом (Sephacryl) S-100 HR (GE Lifescience, Sweden). Колонка була попередньо промита β -меркаптоетанолом для усунення дисульфідних зв'язків. Білок об'ємом 5 мл завантажили в колонку та після 3 годин елюювали 100 мМ NaCl . Швидкістю елюції 0,75 мл/хв була встановлена за допомогою перистальтичного насосу ES-1, Econo System (Bio Rad, USA). Елюйовані зразки піддавали діалізу проти буферу 20 мМ Tris-HCl , рН 8,0 протягом ніч.

DEAE-сефароза Fast Flow аніонообмінна колонка (5 PW, 15 см) була урівноважена за допомогою 20 мМ буферу Tris-HCl з послідуєчим введенням рекомбінантного білка об'ємом 5 мл. Фракції зразків збирали при швидкості потоку 5 мл/хв. Елюювання проводили з використанням сольового градієнту 0-50% розчину 1 М NaCl .

His_6 -мічений білок очищали за допомогою афінної смоли на основі Ni^{2+} -нітрилоацетатної кислоти (Ni-NTA) з використанням NTA хелатуючої агарози CL-6B (Pertron Inc, Південна Корея). Зразки білка готували в буферному розчині 20 мМ Tris-HCl , рН 7,5, при кінцевій концентрації білка 1 мг/мл і зберігали при температурі -80°C .

2.4. Диск електрофорез в ДСН-поліакриламідному гелі

Зразки білка для електрофорезу були підготовлені з використанням 2х буферного розчину (0,5 М Tris-HCl , рН 6,8, 4% ДСН, 10% β -меркаптоетанол, 20% гліцерину, 0,1% бромфенол синій) або 5 х (0,5 М Tris-HCl , рН 6,8, 10% ДСН, 10% β -меркаптоетанол, 15 % Ficoll , 0,1 % бромфенол синій) та денатурували при 95°C в протягом 5 хв. Для диск електрофорезу використовували 12 % акриламідний гель для розділення та і 5% для концентрування. Електрофорез проводили при напрузі 70-150 В («Power Pack

1000», Віо-Rad) з використанням 1х буфера (0,5 М Тріс-НСІ, рН 6,8, 2% ДСН, 5 % β -меркаптоетанол, 10 % гліцерину, 0,1 % бромфеноловий синій). Після електрофорезу гель пластинку фарбували в розчині Кумассі діамантового синього або проводили імуноблотинг зі специфічними антитілами.

2.5. Двовимірний (2D) гель електрофорез

Ізоелектрофокусування (ІЕФ) було проведено у відповідності до методики Amersham Biosciences з використанням IPGphor установки для ізоелектричного фокусування (“IPGphor”, “GE Healthcare”, USA). Ресуспендовані зразки клітин у буфері для лізису (8 М сечовина, 50 мМ ТрісНСІ, рН 7,5), змішували з регідратуючим буферним розчином (8 М сечовина, 25 CHAPS, 0,5 % буфер іммобілізованого градієнта рН, 20 мМ ДТТ, і слідові кількості бромфенолового синього) та були обережно завантажені в ємність для смужки без формування бульбашок повітря. Смужка IPG (рН 3-10, 7 см, “GE Healthcare”), покрита мінеральним маслом, була негайно розміщена в ємність із суміщу. Розділення здійснювали при 25 °С з використанням наступних умов: 50 В - 12 годин, 500 В - 30 хвилин, 1000 В - 30 хвилин, 8000 В – 3 години. Після чого ІЕФ смужки були еквілібровані (відновлення, алкілування) протягом 15 хв у регідратаційному буфері (50 мМ Тріс-НСІ, рН 8,8, 6 М сечовина, 30 % гліцерину, 2 % ДСН, 0,1 % бромфеноловий синій) з 100 мг ДТТ на 10 мл регідратаційного буферу, а потім з іншим урівноважуючим буферним розчином, що містив 250 мг йодацетаміда (ІАА) протягом 15 хв. Врівноважені смужки були розділені за допомогою 12 % ДСН електрофорезу в поліакриламідному гелі.

2.6. Вестерн-блот аналіз

Для імуноблот-аналізу, гель з фракціонованими білками після ДСН гель електофорезу був поміщений у трансферний буфер (25 мМ Тріс, 192 мМ

гліцину, 20% MeOH). Нітроцелюлозна мембрана для блотингу (3 M) разом з гель-пластинкою була зібрана в сандвіч за допомогою резервуара касети та розміщена в ємність для блотингу з гелем на катодній стороні і мембрані на стороні анода. Трансфер білків здійснювали при напрузі 100В протягом 50 хв. Потім, блот промивали 10 хв в TBS-T буфері (25 mM Тріс, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, рН 8,3) з додаванням 5% знежиреного молока для блокування сайтів неспецифічного зв'язування. Нітроцелюлозні мембрани після блотингу інкубували з первинними антитілами (анти-КФК ГМ, анти-Ptx I, анти-Ptx II) протягом ночі при температурі 4 °С. Потім промивали чотири рази в буфері TBS-T 5 хв/одне промивання. Далі мембрану інкубували з вторинним антитілами (Goat Anti-Rabbit IgG H&L HRP, "Abcam", США) протягом 1 год при кімнатній температурі і знову промивали чотири рази в буфері TBS-T 5 хв/одне промивання. Для візуалізації блот був занурений в 10 мл AP буфера (100 mM NaCl, 100 mM Тріс, 5mM MgCl₂, рН 9,5). Проявлення проводили за допомогою реагентів NBT (0,5 г/мл в 70% розчині диметилформаміду) і BCIP (0,25 г/мл в 100% розчині диметилформаміду) та за допомогою кон'югованих з пероксидазою хрому вторинних антитіл у відповідності до інструкції виробника ("GE Healthcare", США).

2.7. Культивування культур клітин A549 та HeLa

Клітинні лінії для трансфекції, A549 (клітини аденокарциноми легенів людини) і HeLa (клітин шийки матки людини) були взяті з Американської колекції культур клітин ("ATCC"). Клітини A549 культивували в середовищі RPMI 1640 ("WelGENE", Південна Корея), HeLa клітини в середовищі Dulbecco's modified Eagles medium ("WelGENE", Південна Корея), із додаванням 10 % бичачої сироватки (FBS, "WelGENE", Південна Корея) та 1 % антибіотику ("Invitrogen", США). Температуру культивування середовища доводили до 37 °С в зволоженій атмосфері, що містила 5 % CO₂.

Клітини культивували кожні два-три дні при щільності 70-80%. Плазмідні, що включали послідовність Flag-КФК ГМ були трансфекзовані в 60 мм чашки з культивованими клітинами A549 та HeLa з використанням реагентів Lipofectamine/Plus Reagents (“Invitrogen”, США) у відповідності до протоколу виробника. Для трансфекованих клітин середовище з додаванням 10% FBS було змінено на середовище без FBS через 4-6 годин після інкубації.

2.8. Очищення білків зв’язаних з Prx I

Мозок щурів (40 гр) був гомогенізований за допомогою ультразвукової установки Ultra-Turrax T25 (Janke&Kunkel IKA, Staufen, Germany) в розчині 300 мл зв’язуючого буферу (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 NaCl, 5 mM імідазол), що містив 1mM фенілметилсульфонілу флюориду (PMSF). Гомогенат центрифугували 30 хв за 8000 об/хв. Супернатант інкубували за температури 4 °C з рекомбінантним білком [His]₆-Prx I на ніч. Після чого зразки інкубували за кімнатної температури (RT) та 50°C протягом 30 хв. Для очищення зв’язаних білків з [His]₆-Prx I було використано Ni-NAT афінну колонку (“Econo-Column”, 2,5x10 см, 49 мл, “Bio-Rad”) з об’ємом хелатуючої агарози (CL-6B) 10 мл з наступним центрифугуванням преципітованих білків. На другому етапі очищення було використано Ni-NAT афінну колонку (“Econo-Column”, 1,5x10 см, 18 мл, “Bio-Rad”) з об’ємом афінної смоли 4 мл. Колонка була промита три рази буферним розчином (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 NaCl, 50 mM імідазол). На кінцевій стадії температурно-індуковані зв’язані білки з Prx I були елюйовані 8 мл буферним розчином для елюції (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 NaCl, 600 mM імідазол).

2.9. MALDI-TOF-MS аналіз білків зв’язаних з Prx I

Вирізані шматочки гелю з розігнаної поліакриламідної пластини після 2-D електрофорезу знебарвлювали розчином 1:1, що містив 30 mM калій

фероціаніду та 100 мМ натрій тіосульфату та відновлювали розчином 10 мМ ДТТ з 100 мМ бікарбонату амонію протягом 45 хвилин при 56 °С. Алкілювання проводили за використання 55 мМ йодоацетаміду, розчиненому в 100 мМ бікарбонату амонію протягом 30°С в темному місці. Гель висушували за допомогою “SpeedVac”. Трипсиноліз проводили за використання 20 мкл 12,5 нг/мкл трипсину (“Promega”, США) в розчині 50 мМ бікарбонату амонію з 5 мМ CaCl₂. Елюювали розщеплені білки за допомогою 50 % ацетонітрилу та 5 % мурашиної кислоти. До кожного зразку було додано 10 мг/мл α -ціано-4-гідроксикоричної кислоти у ролі матричного розчину розведеного в 0,1% трифлюороацетатній кислоті та 50% ацетонітрилу. Висолювання здійснювали за рахунок носиків “ZipTipC₁₈” (“Millipore”, США) та елюювали розчином 3 мкл 50% ацетонітрилу з 0,1% трифлюороацетатної кислоти. Масс аналіз проводили на мас-спектрометрі Voyager-DE STR MALDI-TOF (“Perspective Biosystems”, США). Досліджувані зразки були нанесені на металічну плашку, мас-спектри білків були отримані в режимі відбивання позитивної іонізації з запізненою екстракцією спектру. Калібрували прилад за допомогою стандартів ангіотензину I (1296,79 Да), андренокортикоїдного гормону (АСТН сlір 1-17, 2093,01 Да та АСТН сlір 18-39, 2465,20 Да) (“Sigma”, США). Білки були ідентифіковані завдяки отриманим мас-спетрам, що були підтвердженні даними з бібліотеки “Swiss-Prot” за допомогою пошукової програми “MS-Fit”.

2.10. Ко-іммунопреципітація (Co-IP) зв’язаних білків з КФК ГМ

Клітини A549 та HeLa були трансфектовані плазмідами pCMV-Flag та pCMV-NA, що містили фрагменти Flag-КФК ГМ та NA-Prx II та конструкції транкованого Prx II (NA-Prx II: Δ C2, Δ C5, Δ C6, Δ C22). Конструкції NA-Prx II та Prx II (NA-Prx II: Δ C2, Δ C5, Δ C6, Δ C22) були люб’язно надані лабораторією проф. Че Хо Зуна. Через 24 год з моменту трансфекції, культивовані клітини інкубували в умовах підвищеної температури протягом

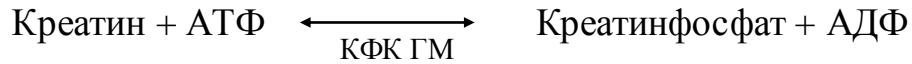
30 хв або обробляли різними концентраціями пероксиду гідрогена. Клітини двічі промивали фосфатним буферним розчином PBS (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ KH₂PO₄) та ресуспендували в буфері для лізису (20 мМ HEPES-NaOH, рН 7,4, 50 мМ NaCl, 10 % гліцерин, 0,5 % Тритон Х-100) з додаванням інгібітору протеаз (Cat. №P8340 “Sigma”, США). Клітинний лізат центрифугували зі швидкістю 8000 обертів/хвилину протягом 30 хв за температури 4 °С. Очищений клітинний лізат інкубували з антитілами “EZview Red Anti-Flag M2 Affinity Gel” (Cat. №F2426, “Sigma”, США) у відповідності до протоколу виробника. Імобілізовані білки осаджували центрифугуванням та промивали TBS буферним розчином (50 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl). Отриманий преципітат денатурували за присутності 2х ДСН електрофорезному буфері. Далі зразки аналізували за рахунок 12% ДСН гель електрофорезу та вестер-блотингу.

2.11. Отримання поліклональних антитіл КФК-ГМ

Для отримання поліклональних антитіл були взяті два білі кролика самиці породи Нова Новозеландська. Кролики були імунізовані очищеним рекомбінантним білком КФК ГМ об’ємом 500 мкл з концентрацією 1 мг/мл. Перед ін’єкцією білок був змішаний з аджювантом (Freund’s complete adjuvant). Другу ін’єкцію робили підшкірно через один місяць. Перед тим як отримати сироватку було взято декілька тестових проб крові. За допомогою ДСН-електрофорезу та вестерн-блот аналізу було підтверджено афінність поліклональних антитіл до внутрішньоклітинної КФК ГМ. Центрифуговану сироватку, що містила антитіла рекомбінантного КФК ГМ зберігали за температури -80°С.

2.12. Визначення креатинфосфокіназної активності рекомбінантного білка КФК ГМ

Активність КФК ГМ визначали в напрямку фосфорилування креатину та формування креатинфосфату у відповідності до рН колориметричного методу [25] з деякими модифікаціями. Ензиматична реакція мала наступний вигляд



Питому ферментативну активність вимірювали по величині абсорбції при довжині хвилі збудження 597 нм на УФ-спектрофотометрі “Jasco V-530” (“Jasco”, Японія). Реакційна суміш об’ємом 600 мкл, містила 24 мМ креатин, 4 мМ АТФ, 5мМ Mg²⁺ і 0,01% тимолу синього була підготовлена в 5 мМ гліцин-NaOH буфері з рН 9,0. Рівняння для розрахунку активності ферменту КФК ГМ виглядало наступним чином (відповідно до Yao, 1982).

$$U = \frac{1.3 \times \Delta A_{597} \times \Delta V_A \times \text{Dilution ratio}}{C \times V_B} \text{ (мкМ} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}\text{)}$$

Де: U – питома активність; 1,3 – коефіцієнт перерахунку; ΔA_{597} – величина абсорбції при довжині хвилі 597 нм; V_A – об’єм субстрату; V_B – об’єм проби; C – концентрація ферменту [25].

2.13. Інактивація рекомбінантного білка КФК ГМ за впливу температури та пероксиду гідрогена

Температурну інактивацію здійснювали шляхом інкубування розведеного в гліцин-NaOH (рН 9,0) буферному розчині очищеного рекомбінантного білка КФК ГМ при температурі 25 °С, 38 °С, 40 °С, 42 °С протягом 30 хв. Після термообробки зразки негайно охолоджували на льодові, а потім залишкову активність вимірювали при 25°С в умовах специфічної ферментативної реакції [25].

За дослідження впливу пероксиду гідрогена додавали наступні концентрації пероксиду гідрогена 0,25, 0,5 і 1 мМ до реакційної суміші рекомбінантної КФК ГМ підготовленої в гліцин-NaOH (рН 9,0) буфері. Аліквоти (60 мкл) відбирали через 20 хв, для визначення залишкової

активності КФК ГМ Залишкову активність розраховували шляхом вимірювання величини абсорбції та обрахунку рівняння ферментативної активності КФК ГМ. Результати залишкової ферментативної активності виражали в $\text{мкм} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$.

2.14. Шаперонна захист P_{гх} I та II P_{гх} інактивованого білка КФК ГМ

Рекомбінантний білок СКВВ з концентрацією 30 нМ інактивували нагріванням при 42 С протягом 20 хв за присутності зростаючих співвідношень P_{гх} I та P_{гх} II (1:1, 1:5, 1:10, 1:20). Білки інкубували в буферному розчині 5 мМ гліцину-NaOH (рН 9,0) буфера. Аліквоти 60 мкл були відібрані для визначення залишкової активності КФК ГМ в напрямку фосфорилювання креатину. Оцінку шаперонної ролі білків P_{гх} I та P_{гх} II визначали як захисну здатність величину залишкової активності КФК ГМ після інактивації стресорним чинником. Вимірювання активності інактивованої КФК ГМ здійснювали після короткої попередньої інкубації на льодові.

Під час інактивації пероксидом гідрогена рекомбінантний білок КФК ГМ був інкубований в 5мМ гліцин-NaOH (рН 9,0) буфері з 1 мМ пероксидом гідрогена протягом 20 хв за різних молярних концентрацій P_{гх} I та P_{гх} II (1:1, 1:5, 1:10, 1:20). Залишкову активність вимірювали за величиною абсорбції при довжині хвилі 597 нм. Оцінка шаперонної ефективності P_{гх} I та P_{гх} II розраховувалась як залишкова активність КФК ГМ та виражали в $\text{мкм} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$.

2.15. Моделювання міжмолекулярної взаємодії білків КФК ГМ та Prx II

Для вивчення міжмолекулярної взаємодії між КФК ГМ та Prx II було використано білковий он-лайн сервер “ClusPro 2.0”. Алгоритм серверу включає три обчислювальні кроки: жорстка взаємодія з використанням FFT (Fast Fourier Transform) кореляційного підходу, кластеризація на основі RMSD (Root Mean Square Deviation) для знаходження найбільших кластерів взаємодії та функція відточення вибраних комплексів [190]. За замовчуванням, налаштування сервера “ClusPro 2.0” дозволяють одночасно генерувати чотири типи моделей, що відзначаються як збалансована, переважно електростатична, переважно гідрофобна та сформована за рахунок електростатичних та взаємодій Ван-дер-Ваальса. Після моделювання взаємодії між КФК ГМ та Prx II, ми вибрали перші десять докінг структур з відносно низькою енергією, які були згенеровані сервером. Програмне забезпечення “PyMOL 1.1” було використано для візуального представлення та оцінки взаємодії, вимірювання відстаней між взаємодіючими амінокислотними залишками. При використанні багатогранного молекулярного програмного забезпечення були отримані зображення поверхонь стикування декамеру Prx II та димеру КФК ГМ.

2.16. Статистична обробка даних

Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [253]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за t-критерієм Ст’юдента. Вірогідною вважали різницю між порівнювальними показниками при $P \leq 0,05$. Розрахунки та побудову графіків виконували з використанням прикладної програми “Microsoft Exel 2010”.

Р О З Д І Л 3

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБІНАНТНОГО БІЛКА КРЕАТИНФОСФОКІНАЗИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ

3.1. Клонування та експресія гена КФК ГМ

Цитозольна ізоформа білка креатинфосфокінази людини експресується переважним чином у головному мозку та ретині, а також асоційована з транспортом іонів через K^+ - Na^+ АТФази і АТФ залежні K^+ -канали [150, 151, 191, 192]. Показано, що гомологічність амінокислотних послідовностей КФК ГМ людини та тварини може досягати 91 % [193]. Ген білка *СКВ* людини кодує поліпептид КФК ГМ, що складається з 381-го амінокислотного залишку, який призводить до утворення зрілого мономеру протеїну з молекулярною масою 42 кДа, де маса активного димеру складає 84 кДа.

Щоб дослідити можливість взаємодії між білками КФК ГМ та P_{rx} I/ P_{rx} II першочерговим завданням було накопичення цільового білка у препаративній кількості та його очищення від інших білків. Вперше функціонально активний ген креатинфосфокінази ізотипу ВВ був ізольований завдяки роботі [194]. В роботі спекулювалось, що ген ізотипу ВВ регулюється під час клітинної диференціації шляхом гормонального впливу, який активується у маленьких клітинах легеневої карциноми. У дослідженнях було показано, що фрагмент людської ДНК довжиною у 8 т.п.н. повністю включав в себе кодуючу ділянку гена, а також 850 пар основ 5'-фланкуючої послідовності. Більш того, 5'-кінець гена був розділений інтроном довжиною у 230 пар нуклеотидів, та розташований на 12 н.п. вище за ініціюючий кодон АТG. Була відмічена дивовижна схожість між 5'-кінцем гена *СКВ* та промотору гена аденовірусу ЕПaЕ.

Як було показано у дослідженнях *Bong та Daouk* [193, 194], ген який кодує КФК ГМ може бути клонованим з людської cDNA за допомогою

реакції ПЛР. Для отримання послідовності ДНК, що кодує білок КФК ГМ було сконструйовано пару олігонуклеотидних праймерів, з ензиматичними сайтами рестрикції NdeI та Bam HI.

Для дизайну праймерів була використана нуклеотидна послідовність гену *СКВ* з GeneBank CR542268.1 довжиною 1146 п.н.. Під час проведення ПЛР реакції матрицею для ампліфікації послужила геномна ДНК, виділена з ліофілізованих клітин лінії HeLa. Послідовність олігонуклеотидних праймерів у напрямку зчитування 5'→3' та 3'→5', а також температурні характеристики ПЛР зазначені у розділі Матеріали та методи. Для верифікації ПЛР-продукту було проведено розділення очищеного продукту за допомогою методу гель-електрофорезу. Результати аналізу представлені на Рис. 3.1.1.

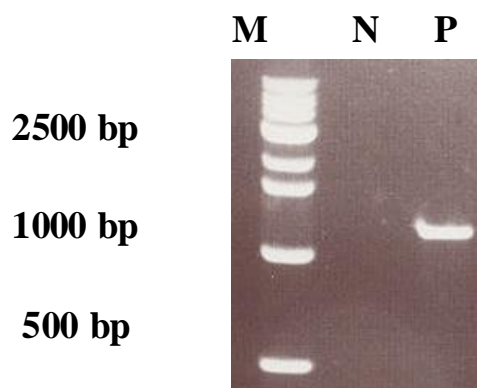


Рис. 3.1.1. Електрофореграма ПЛР продукт ампліфікованого гена *СКВ*. Де, М – маркер, N – негативний контроль, P – продукт.

Судячи з електрофореграми ампліфікований фрагмент гена *СКВ* відповідає очікуваній довжині у ~1200 п.н. Під час ПЛР була використана специфічна Taq полімераза, яка при синтезі послідовності додає залишок аденіну до 3'-кінця олігонуклеотиду. Така маніпуляція значно спрощує процес вбудовування фрагменту гена у вектор pGEM-T, що має на 3'-кінці залишок тимідину (T). Звідси, завдяки комплементарній взаємодії між липкими кінцями (A-T) фрагмента й вектора утворився циркулярний нековалентний комплекс двох молекул ДНК.

Наявність гена *СКВ* у складі гібридної рGEM-T/СКВ плазміди була продемонстрована шляхом ПЛР окремих колоній з трансформованими клітинами бактерій *Escherichia coli* штаму DH-5 α . Рестрикційний аналіз очищеного продукту був проведений за участі ендонуклеазних ферментів *Hind* 3 та *Bam* H1. Результати рестрикції наведено на Рис. 3.1.2. Внаслідок реакції продемонстровано, що довжина виділеного фрагменту ДНК відповідає такій, що дорівнює оригінальній довжині гена *СКВ*.

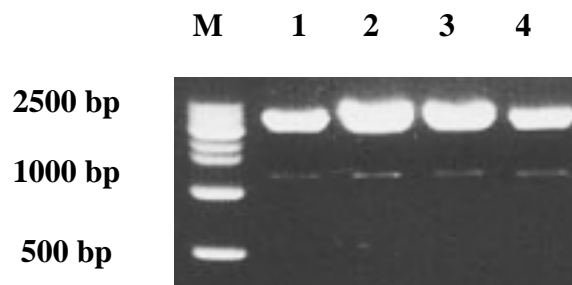


Рис. 3.1.2. Електрофореграма рестрикції ендонуклеазами *Nde*I та *Bam* H1 гена *СКВ* у складі рGEM-T плазміди. Де, 1, 2, 3, 4 – довільно вибрані колонії *E.coli*

Отриманий фрагмент ДНК був субклонований у вектори рЕТ-14b (4,6 т.п.н.) та рЕТ-17b (3,3 т.п.н.) для отримання гібридних плазмід рЕТ-14b/СКВ і рЕТ-17b/СКВ. Вектори рЕТ це потужні системи для експресії рекомбінантних білків у клітинах бактерій *E.coli*, що функціонують під контролем промотору Т7 РНК полімерази [195, 29]. Вектори рЕТ-14b та рЕТ-17b були спеціально підібрані для множинного клонування плазмід з високоефективною системою експресії цільового білка. рЕТ-17b – це трансляційний вектор, що вміщає сайт зв'язування рибосоми з фагу Т7 та спеціально створений для експресії цільових генів, що не мають рибосомального сайту зв'язування. Експресовані білки за допомогою цього вектору можуть бути легко очищені шляхом афінної хроматографії та використовуватись у випадках ідентифікації білків партнерів за участі реакції імунопреципітації. На відмінну від рЕТ-17b, експресія гена у векторі рЕТ-14b проходить з пришиванням міченої ділянки 5-10 молекул гістидину, так

званого тагу «tag» до амінокислотної послідовності рекомбінантного білка. Така ділянка дозволяє ефективно очистити цільовий білок на колонці за присутності хелатного двовалентного нікелю шляхом металоафінної хроматографії.

Після субклонування гібридних плазмід був проведений рестрикційний аналіз вибраних колоній бактерій за допомогою специфічних рестрикційних ензимів. Для вектору рЕТ-14b/СКВ ми використали рестриктази SalI та BamHI, де вектор рЕТ-17b/СКВ був перевірений у присутності ензимів EcoRI і NdeI. Результати аналізу показали, що в цих плазмідах знаходиться вставка очікуваного розміру, яка відповідає довжині олігонуклеотидної послідовності КФК ГМ людини (Рис 3.1.3.).

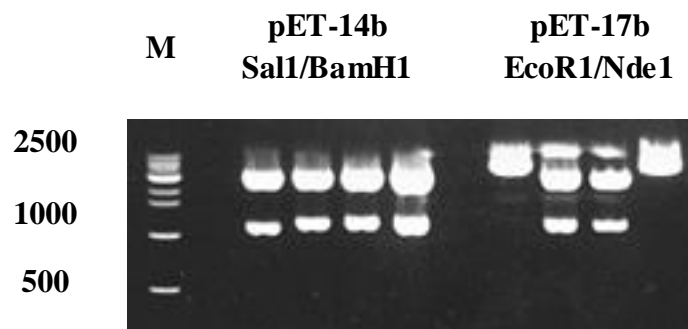


Рис 3.1.3. Електрофореграма рестрикції плазмід рЕТ-14b/СКВ, рЕТ-17b/СКВ.

З метою дослідження *in vitro* взаємодії білка КФК ГМ нами додатково було створено гібридну плазмиду на основі вектору рСМV для експресії КФК ГМ у ракових клітинних ліній HeLa та A549. У системі рСМV контроль синтезу вставки гена здійснюється завдяки промотору цитомегаловірусу людини CMV, що забезпечує стабільну експресію клонованої ділянки у тваринних лініях клітин [196]. Також, цей вектор містить ділянку MCS (Multiple Cloning Sites), олігонуклеотидна послідовність якої дозволяє використовувати найпоширеніші сайти рестрикції для проведення перевірки наявності експресуючої ділянки ДНК та різностороннього дизайну специфічних праймерів. Завдяки олігонуклеотидній послідовності, що кодує

N-термінальну FLAG ділянку, було створено химерний білок КФК ГМ з гідрофільним AspTyrLysAspAspAspAspLys кінцем, що в подальшому може бути ідентифікований за допомогою анти-FLAG моноклональних антитіл.

Послідовність олігонуклеотидних праймерів з рестрикційними сайтами Hind3 та BamH1 зазначена у розділі Матеріали та методи. Фрагмент гена *СКВ* був клонований у рGEMT-easy, а потім у вектор рCMV-FLAG з утворенням гібридної плазміди рCMV-FLAG/*СКВ*. Щоб переконатись, що фрагмент *СКВ* був інтегрований у систему рCMV було проведено подвійний рестрикційний аналіз плазміди за участі ензимів Hind3/BamH1. Результати рестрикційного аналізу наведені на Рис 3.1.4.

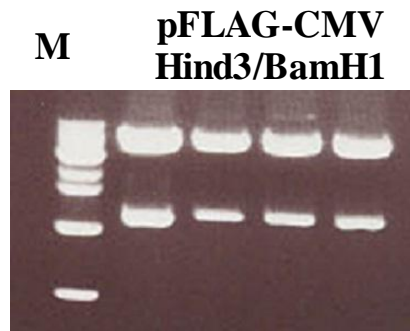


Рис 3.1.4. Електрофореграма рестрикції гібридної плазміди рCMV-FLAG/*СКВ* за участі ензимів Hind3/BamH1

Для підтвердження відповідності клонованої ділянки *СКВ* олігонуклеотидній послідовності гена *СКВ* було проведено секвенування химерних плазмід рЕТ-14b/*СКВ*, рЕТ-17b/*СКВ*, та рCMV-FLAG/*СКВ*. Для порівняння використовували FASTA послідовність гена *СКВ* з бази даних «GenBank». Рамки зчитування усіх послідовностей були проаналізовані у програмі «BioEdit». На Рис 1.5. зображено накладені послідовності чотирьох фрагментів гена *СКВ*.

Експресія клонованих генів може відбуватись у кількох штаммах-реципієнтах *E.coli*, які за своїм призначенням можна розділити на три групи: 1) для загальної експресії – *E.coli* BL21 (DE3); 2) для експресії

рекомбінантних генів, що містять рідкісні кодони, – *E.coli* BL21 (DE3) CodonPlus-RIL; 3) для більш жорсткої регуляції експресії токсичних білків – *E.coli* BL21 AI.

Table with 4 columns: Accession ID, Gene Name, Nucleotide Sequence, and Position. It lists various SKB gene constructs (e.g., CR542268.1, SKBB-pET-14b-F) and compares them to the human SKB gene sequence.

Рис 3.1.5. Порівняння послідовностей клонованого гена SKB з оригінальною послідовністю SKB людини.

Для експресії рекомбінантного білка КФК ГМ ми використали штам-реципієнта бактерії E.coli BL21 (DE3) (“Novagen”, США), в який було трансформовано химерні плазмиди рЕТ-14б/СКВ і рЕТ-17б/СКВ. Штам E.coli BL21 (DE3) має у складі рідної ДНК спеціальне вбудований ген Т7 полімерази, експресія якого регулюється lac опероном. В свою чергу, химерні плазмиди рЕТ з фрагментом СКВ вміщують Т7 промотор, до якого приєднується новосинтезована полімераза Т7. Транскрипція вставки контролювалась промотором лактозного оперону, та індукувалась аналогом лактози – ізопропілтіюгалактозидом (IPTG); завдяки цьому здійснювалась стабільна та контрольована експресія білка КФК ГМ.

Перед індукцією експресії, клітини вирощували до середини фази логарифмічного росту на рідкому середовищі “LB/Ampicillin” при температурі 37°C за умов сильної аерації. Після того як оптимальна концентрація клітин досягла 0.45 при OD 600 нм, культивування рекомбінантного білка КФК ГМ було індуковане шляхом додавання 1 мМ IPTG. Після 6 год експресії весь рекомбінантний білок було центрифуговано та збережено за температури -80°C.

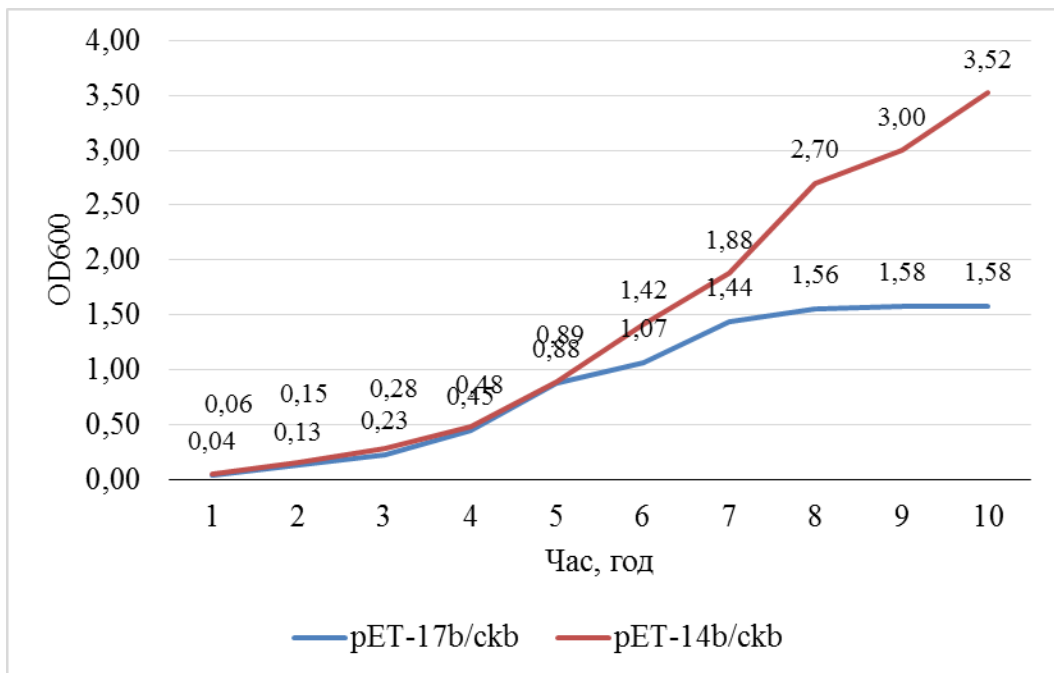


Рис 3.1.6. Криві росту біомаси рекомбінантного білка КФК ГМ

Під час експресії КФК ГМ було встановлено, що максимальні значення абсорбції при OD 600 нм для трансформованих клітин з pET-14b/СКВ та pET-17b/СКВ становили 3,52 та 1,58 відповідно. На Рис 3.1.6. представленні данні щодо експоненційного росту культивованої біомаси клітин *E.coli* BL21. Ці результати засвідчують високу ефективність сконструйованих pET векторів для експресії гена СКВ людини. Необхідно також зауважити, що кількість рекомбінантного білка КФК ГМ, експресованого у векторі pET-14b, значно переважала pET-17b. Це можна пояснити наявністю різного типу N-термінальної ‘tag’ послідовності; His для pET-14b та T7 pET-17b, які у свою

чергу впливають на розчинність (солюбильність) та експресивну здатність цільового. Важливо зауважити, що спостерігались випадки, коли експресія креатинфосфокінази м'язів характеризувалася низьким виходом рекомбінантного білка КФК ГМ за рахунок утворення нерозчинних агрегатів. Солюбілізований активний білок можна було отримати тільки шляхом зниження температури інкубації до 25°C, але це значно інгібувало ріст загальної біомаси [197].

3.2. Очищення рекомбінантного білка КФК ГМ з клітин *E.coli*

Оскільки для синтезу рекомбінантного білка КФК ГМ використовували два типи химерних плазмід, що включали специфічні ділянки на N-термінальному кінці T7 та 6xHis Tag, відповідні моделі очищення дещо різнились.

У випадку 6xHis Tag «таговоної» послідовності ми застосували стратегію металохелатної афінної хроматографії. Її принцип полягає у тому, що деякі амінокислоти, особливо гістидин, здатні формувати комплекси з іонами металів. Після іммобілізації рекомбінантного білка на хелатуючій фазі гістидинові залишки, що знаходяться на N- чи C-термінальному кінці зв'язуються з нерухомою фазою.

Для очищення рекомбінантного КФК ГМ ми використали у якості іммобілізуючої фази сефарозу "CL-6B" із нікель нітрилотриоцтовою кислотою Ni-NTA. Нітрилотриоцтова (ацетатна) група з'єднана з сефарозою 9-атомною лінкерною ділянкою та виступає в ролі хелатора, де сефароза – у ролі фази носія. На кількісний і якісний вихід рекомбінантного білка впливає два чинника: взаємодія іонів нікелю з хелатуючим агентом і взаємодія гістидинового блоку з іонами нікелю [198]. Саме молекула гістидину демонструє найсильнішу взаємодію з іммобілізованим іоном металу матриці, оскільки донорні електрон групи на його імідазольному кільці завзято

формують координаційні зв'язки з іоном металу, у нашому випадку нікелю [199, 200].

Дослідження з експресії та очищення КФК ГМ були проведенні *Vong* та колегами, які експресували рекомбінантний білок за використання вектору рЕТ-28а. КФК ГМ був очищений методом іммобілізованої метало-афінної хроматографії з використанням буферу елюції А, що містив 50-500 мМ градієнт імідазолу [193].

Опираючись на протокол виробника ("Peptron"), підбір сприятливих умов очистки білка полягає у по-стадійному використанні робочих буферів з різною мМ концентрацією імідазолу. Було підготовлено чотири типи буферів: зв'язуючий (20 мМ Tris-HCl, рН 8.0, 0.5 М NaCl, 5 мМ імідазол), промиваючий (50 мМ імідазол), елюючий (200 мМ імідазол) та регенераційний буфер з 100 мМ NiSO₄.

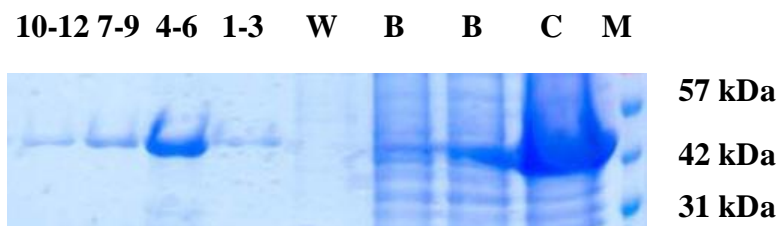


Рис 3.2.1. Електрофореграма рекомбінантного білка КФК ГМ з 6xHis ділянкою очищеного шляхом афінної хроматографії. Фракціям, що зображені на електрофореграмі відповідають наступні літери: М – білковий маркер, С – неочищена фракція КФК ГМ, В – фракція до зв'язування, В – фракція зв'язуючого буферу, W – промиваючий буфер, 1-12 – елюйовані фракції рекомбінантного білка КФК ГМ.

У результаті іммобілізованої метал-афінної хроматографії (ІМАС) на нікельхелатуючій фазі ми отримали високоочищений КФК ГМ з найбільшою концентрацією у фракціях 4-6, як зображено на Рис 3.2.1. Завдяки даному методу лише за один етап можливо отримати очищений цільовий білок з

ефективністю очищення, що досягає >95%. Фракції 4-6 були додатково піддані діалізу проти буферного розчину (20 мМ TrisHCl, рН 7.5).

Коефіцієнт екстинкції для розрахунку концентрації елюйованого білка був розрахований за допомогою веб-серверу “ExPASy Proteomic Server”. Його величина дорівнює значенню абсорбції у 0,796 при довжині хвилі 280 нм – це відповідає концентрації 1 мг/мл (1г/л). Відповідно, за результатами спектрофотометричного аналізу ми отримали значення абсорбції у 0,217, що дорівнювало концентрації КФК ГМ у 0,27 мг/мл. Звідси, ми можемо констатувати, що підібрані умови очищення рекомбінантного білка КФК ГМ, отриманого з химерної плазмиди рЕТ-14b/СКВ є вдалими.

Для очищення рекомбінантного КФК ГМ з бактеріальних клітин з експресованим вектором рЕТ-17b/СКВ було обрано дещо іншу стратегію у зв'язку з відсутністю гістидинового лінкеру 6xHis tag. Детальна двостадійна схема очистки рекомбінантних білків креатинфосфокінази м'язів та головного мозку людини була запропонована *Chen* та колегами [201]. Згідно отриманих результатів хроматографічного очищення з використанням сефарози Blue-Sepharose та смоли MonoQ авторам вдалось відновити 15-20 мг рекомбінантного білка з 1 л біомаси бактеріальних клітин [201].

На першій стадії очищення ми використали хроматографічну колонку з сефакрилом S-100 з додаванням β-меркаптоетанолу для руйнування дисульфідних зв'язків. Результати електрофоретичного розділення фракцій до та після першого етапу очищення зображені на Рис 3.2.2. Ми спостерігали найбільше концентрування рекомбінантного білка КФК ГМ у фракціях 21-24 з молекулярною масою 42 кДа. Завдяки високій концентрації білка вдалося уникнути етапу преципітації етанолом, як зазначено у дослідженнях *White* та колег [202].

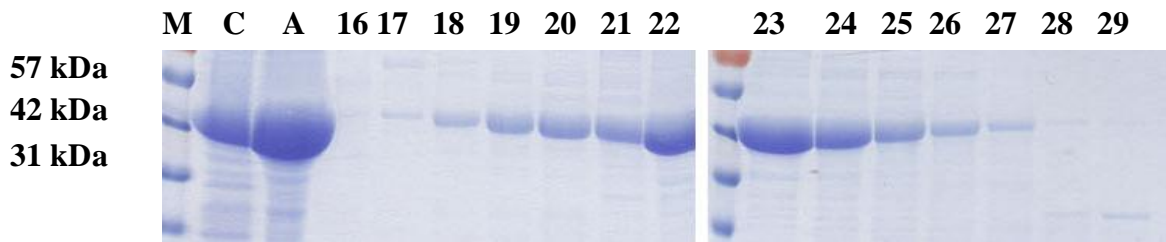
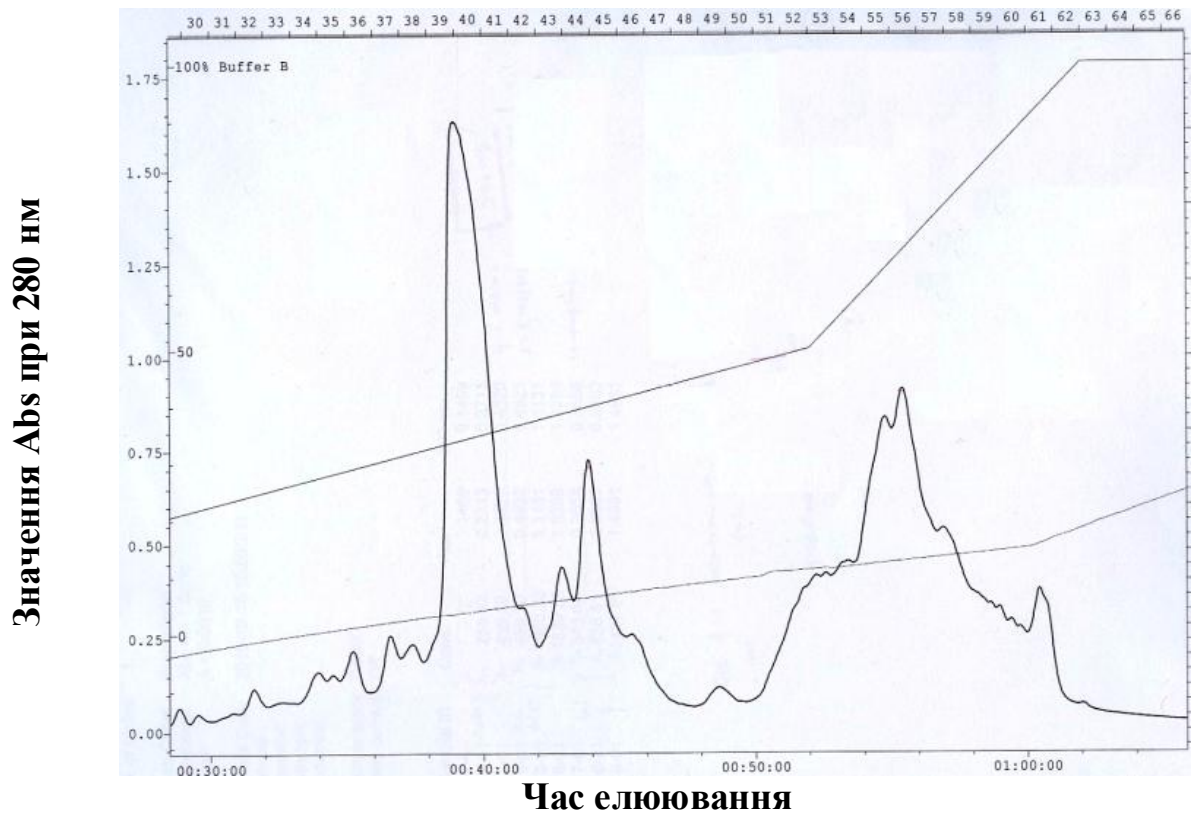


Рис 3.2.2. Електрофореграма фракцій рекомбінантного білка КФК ГМ, отриманих внаслідок хроматографії, що поділяє за розміром та елююванню градієнтом NaCl. М – маркер; С – первина неочищена фракція; А – преципітат із сульфатом амонію; 16-29 – очищені фракції рекомбінантного білка.

Для підвищення чистоти рекомбінантної КФК ГМ на другому етапі було використано DEAE-сефарозу - тип аніон-обмінної смоли, що складається із з'єднаних лінкерних ділянок до яких прикріплені групи діетиламіноетилену ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$). Така смола має слабку іон-обміну здатність, яка залежить від ступеня іонізації відповідно до значень рН. Таким чином, за використання аніон-обмінної хроматографії нам вдалось значно сконцентрувати цільовий білок до значень 11-22 мг на 1 л культури. На отриманій електрофореграмі (Рис 3.2.3.) сигнал мономеру КФК ГМ, молекулярна вага 42kD відповідає вазі димеру КФК ГМ [203, 157].

А

Номер фракції



В М G 37 38 39 40 41 42 43 44

57 kDa

42 kDa

31 kDa

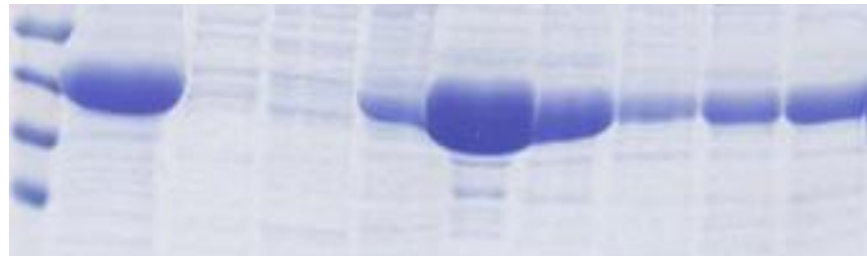


Рис 3.2.3. Хроматограма КФК ГМ. **А** – фракції елюованого рекомбінантного білка КФК ГМ людини отримані за допомогою хроматографічного розділення на DEAE колонці. **В** – електрофореграма очищеного білка; **G** – фракція хроматографії, що поділяє за розміром, 37-44 – фракції концентрованого білка, **M** - маркер.

Як наслідок, за використання хроматографії, що поділяє за розміром та аніонообмінної хроматографії ми отримали очищений рекомбінантний білок КФК ГМ. Ступінь очищення білка перевіряли шляхом електрофоретичного

розділення трьох концентрацій, що дорівнювали 0,5, 0,25 та 0,1 мг (Рис 2.4.). Зазначені результати очищення представленні у роботі [204].

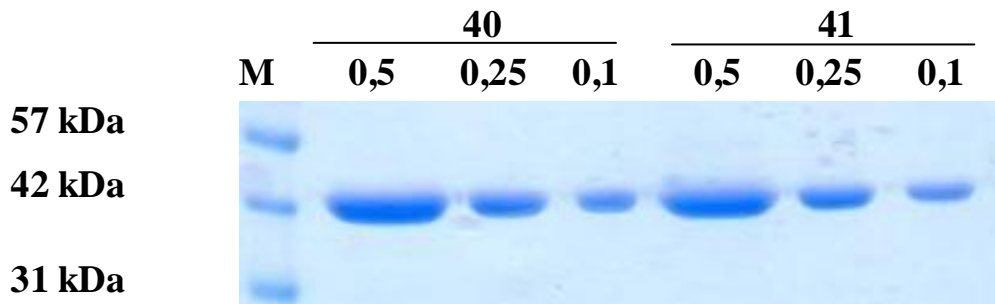


Рис 3.2.4. Електрофореграма в 12,5% ДСН-ПААГ очищеного рекомбінантного білка КФК ГМ. М – маркер, 40, 41 – номер елюйованої фракції; 0,5, 0,25, 0,1 мкг/мл КФК ГМ.

Молекулярна вага очищеного рекомбінантного білка електрофореграмі свідчить про ідентичність молекули з нативним мономером КФК ГМ, молекулярна вага якого дорівнює 42 кДа. Таким чином, у результаті проведених досліджень нами було розроблено ефективну методику очищення рекомбінантної КФК ГМ людини, який у подальшому буде використовуватись для дослідження взаємодії з білками Prx I та Prx II.

3.3. Оцінка селективності поліклональних антитіл КФК ГМ за допомогою вестерн-блот аналізу

Для вивчення взаємодії КФК ГМ з білками партнерами було створено специфічні поліклональні антитіла.

Для імунізації Новозеландського кролика було взято 500 мкл очищеного рекомбінантного білка КФК ГМ з концентрацією 1 мг/мл. Перед введенням білок було змішано з імунобустером (Freund's adjuvant), що містив інактивовану та висушену мікобактерію (*M. tuberculosis*). Антитіла було виділено шляхом центрифугування та розділення сироватки від плазми крові. Щоб ідентифікувати ступінь афінності антитіл проти КФК ГМ ми провели

електрофорез лізатів клітин HeLa та імуноблотинг. Результати вестернблотингу демонструють успішну преципітацію поліклональних антитіл КФК ГМ на нітроцелюлозній мембрані.



Рис 3.3.1. Блотограма аналізу лізату клітин HeLa та очищеного рекомбінантного білка КФК ГМ з використанням поліклональних КФК ГМ антитіл. М – маркер; 5, 10 нг – рекомбінантного білку КФК ГМ; 5, 10, 20 – мкл лізату клітин HeLa.

Відповідно до результатів аналізу зображених на Рис 2.5 можна стверджувати, що поліклональні антитіла є ефективними для білка КФК ГМ та здатні успішно ідентифікувати цільовий білок у зазначених типах клітинних ліній, а також очищений КФК ГМ концентрацією 5 та 10 нг.

3.4. Виявлення активності рекомбінантного білка КФК ГМ за допомогою специфічної ферментативної реакції

Оскільки КФК синтезується майже у всіх типах тканин та є ключовим ферментом метаболізму АТФ, важливим є дослідити ензиматичну активність цього білка на прикладі характерної реакції за впливу стресорів.

Щоб оцінити усю критичність зміни питомої ферментативної активності КФК ГМ, ми проаналізували поведінку очищеного рекомбінантного білка КФК ГМ за впливу стресорів – пероксиду гідрогена та температури. Умови рН-контрольованої ферментативної реакції були специфічно підібрані відповідно до літературних даних [205-207]. Реакція

проходила у напрямку фосфорилування креатину з утворенням фосфокреатину за присутності молекули АТФ та Mg^{2+} . Концентрація КФК ГМ у розчині складала 30 нМ. Ми продемонстрували зниження активності КФК ГМ при попередній інкубації рекомбінантного білка протягом 10 хв з концентраціями пероксиду гідрогена 0,25 мМ, 0,5 мМ та 1,0 мМ.

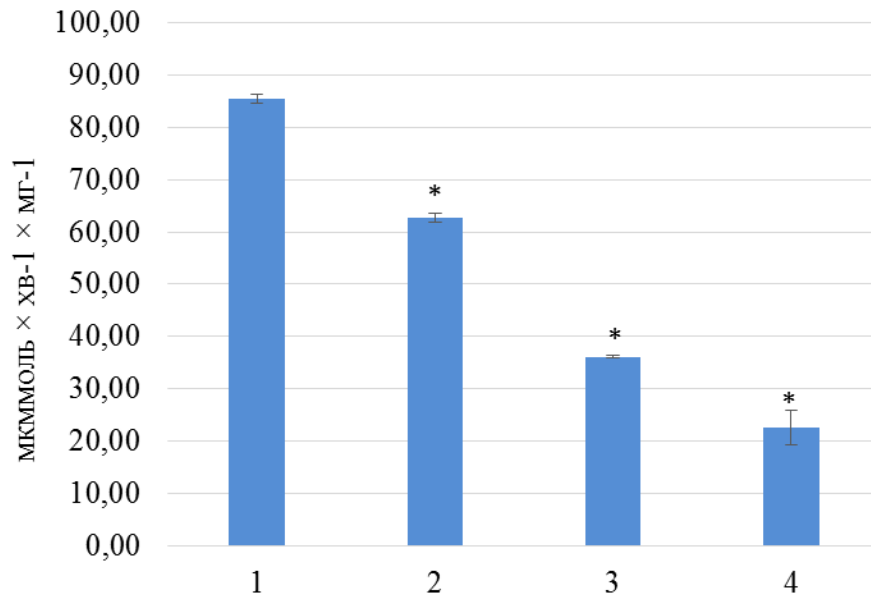


Рис 3.4.1. Питома ферментативна активність рекомбінантного білка КФК ГМ за дії пероксиду гідрогену (n=3). Примітки: 1 – Контроль; 2 – КФК ГМ 25°C; 3 – 0,25 мМ H₂O₂; 4 – 0,5 мМ H₂O₂; 5 – 1 мМ H₂O₂; * – p<0,05

Так, інгібування питомої активності рекомбінантного білка спостерігалось вже за концентрації пероксиду гідрогена, що дорівнювала 0.25 мМ і складало 17%. Як зображено на Рис 3.4.1. всі послідуочі концентрації пероксиду гідрогена у 0,5 мМ та 1 мМ призвели до суттєвого зниження питомої активності на 58 % та 74 % відповідно. З результатів можна стверджувати, що присутність пероксиду гідрогена мала пропорційно-інгібуючий вплив на питому активність КФК ГМ. Отримані результати аналізу підкріплені літературними даними, де вказується на причетність

вільних радикалів до пригнічення тканино-специфічної креатинфосфокінази [208].

Термостабільність КФК ГМ визначали шляхом обрахунку залишкової активності після короткочасного теплового шоку [209]. Нами було встановлено негативну залежність питомої активності КФК ГМ від підвищення температури. Як наслідок, ми спостерігали інгібування питомої активності КФК ГМ на 36 %, 57 % та 86 % після 10 хв інкубування ензиму при температурі у 38 °С, 40 °С та 42 °С, відповідно. Значення залишкової активності КФК ГМ зображені на Рис 3.4.2.

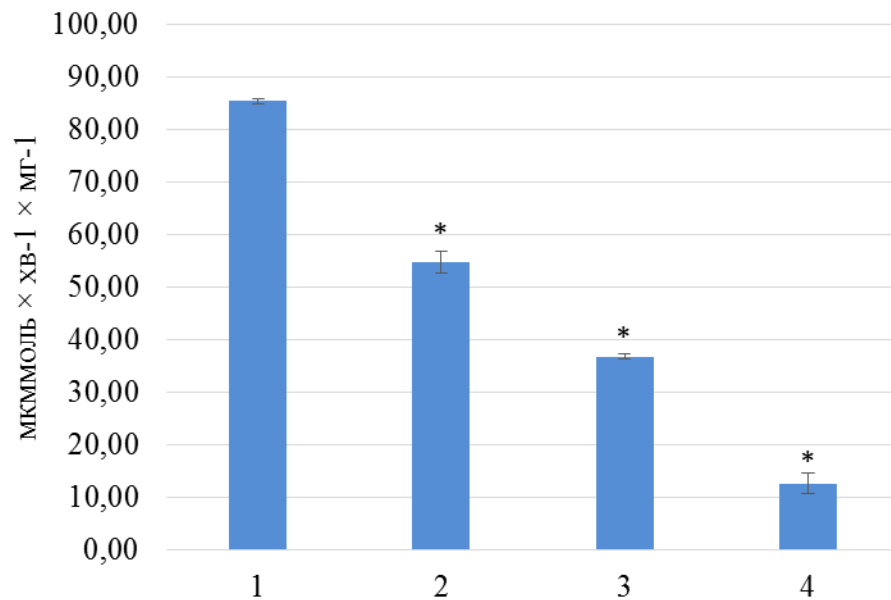


Рис. 3.4.2. Питома ферментативна активність рекомбінантного білка КФК ГМ за дії температури (n=3). Примітки: 1 – Контроль; 2 – КФК ГМ 25°C ; 3 – 38 °С; 4 – 40°C ; 5 – 42°C ; * – p<0,05

| Значення | Питома активність СК ($\mu\text{M}/\text{min} \cdot \text{mg}$) | Відносна активність, % |
|-----------------|--|------------------------|
| Контроль (25°C) | 85,36 \pm 0,52 | 100 |
| 38°C | 54,71 \pm 2,12 | 64,11 |
| 40°C | 36,74 \pm 0,46 | 43,21 |
| 42°C | 12,48 \pm 1,95 | 14,63 |
| Контроль (25°C) | 85,56 \pm 0,86 | 100 |
| 0,25 мМ | 62,70 \pm 0,92 | 73,28 |
| 0,5 мМ | 36,14 \pm 0,35 | 42,24 |
| 1 мМ | 22,56 \pm 3,20 | 26,37 |

Таблиця 1. Питома та відносна активність КФК ГМ за умов дії стресів - пероксиду гідрогена та температури. Mean \pm S.D. (n=3).

При порівнянні результатів впливу стресорів в обох випадках можна стверджувати, що питома ферментативна активність КФК ГМ є більш вразливішою до короткочасного температурного шоку, а ніж до дії пероксиду гідрогена. Загальні результати специфічної активності наведені у Табл 1. Ця різниця може бути пов'язана з незалежними інактиваційними механізмами двох стресових факторів та характерною тільки для креатинфосфокінази головного мозку людини.

Як показано у дослідженнях [30, 207] окисні форми КФК ГМ генеруються у випадку окиснення перекисом водню та цистеїном та можуть бути ідентифіковані шляхом нативного електрофорезу

Результати ДСН-ПФФГ електрофорезу та імуноблотингу лізатів клітин A549 та HeLa зображено на Рис 3.4.3 та Рис 3.4.4. У результаті інкубування клітин, що експресують КФК ГМ із зазначеними концентраціями пероксиду гідрогена не було помічено суттєвих змін у інтенсивності сигналу на імуноблоті. На відмінно від окисного стресу, ми виявили втрату сигналу

КФК ГМ на блоті за дії температур 46 та 50 °С, де у випадку клітин лінії HeLa інгібування сигналу спостерігалось тільки за температури 50°С.

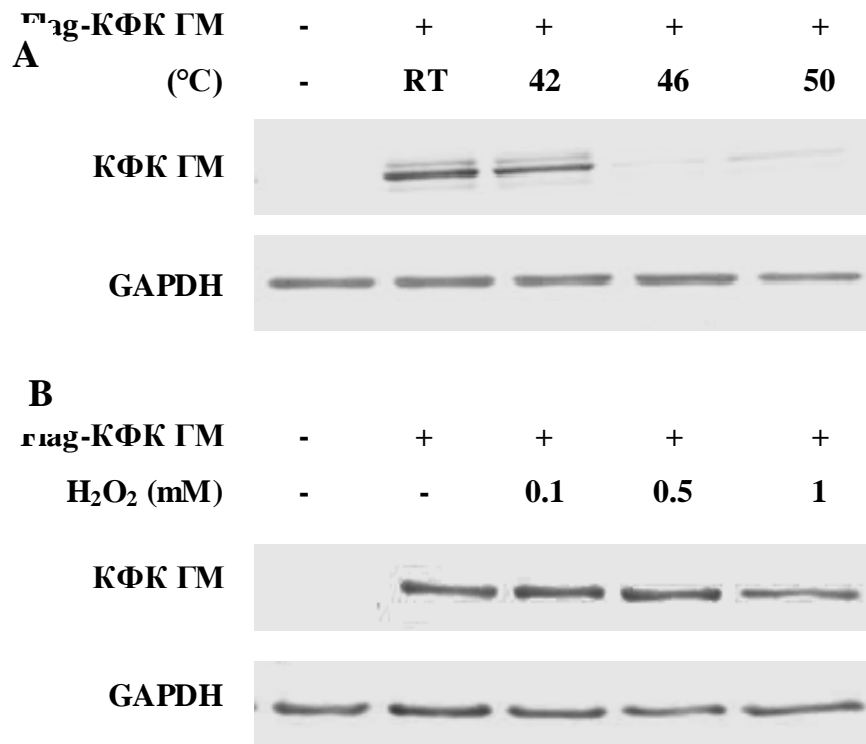


Рис 3.4.3. Імуноблотограма білка КФК ГМ клітинних лізатів A549. А – клітини інкубовані протягом 30 хв за температур 25, 42, 46, та 50 °С та проявлені з анти-КФК ГМ антитілами. В – клітини інкубовані з 0,1 0,5 1,0 мМ пероксидом гідрогену в буферному розчині PBS

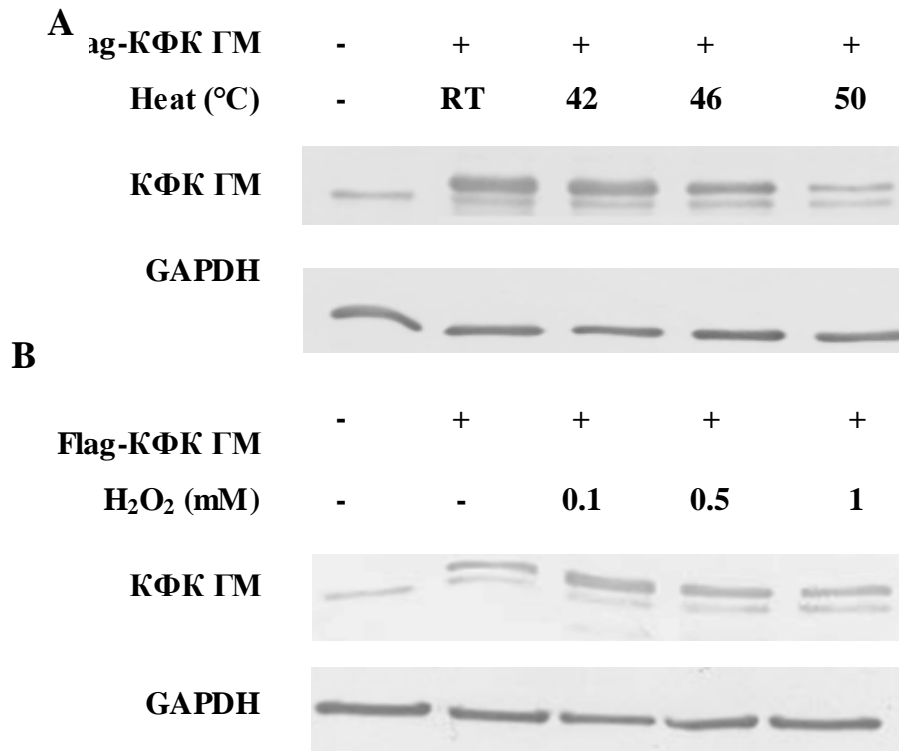


Рис 3.4.4. Імуноблотограма білка КФК ГМ клітинних лізатів HeLa. А – клітини інкубовані протягом 30 хв за температур 25, 42, 46, та 50 °С та проявлені з анти-КФК ГМ антитілами. В – клітини інкубовані з 0,1 0,5 1,0 мМ пероксидом гідрогену в буферному розчині PBS

На прикладі КФК м'язів було продемонстровано, що окиснена форма О- КФК утворює додаткові міжланцюгові дисульфідні зв'язки у кожному мономері. Також вона виступає регулятором механізму деградації КФК м'язів, де саме до молекули О-КФК м'язів відбувається ковалентне приєднання ланцюжка убіквітину завдяки MUFR-1 та його подальше розщеплення протеосоною. Інгібуючі ефекти окисних агентів таких як ксантинооксидази, метилмеркурію та цистеїну на фосфокіназну активність КФК ГМ були досліджені *Genet et al., Li et al.* [208, 210].

Р О З Д І Л 4

ІДЕНТИФІКАЦІЯ КФК ГМ ЯК БІЛКА-ПАРТНЕРА ПЕРОКСИРЕДОКСИНІВ PRX I ТА PRX II

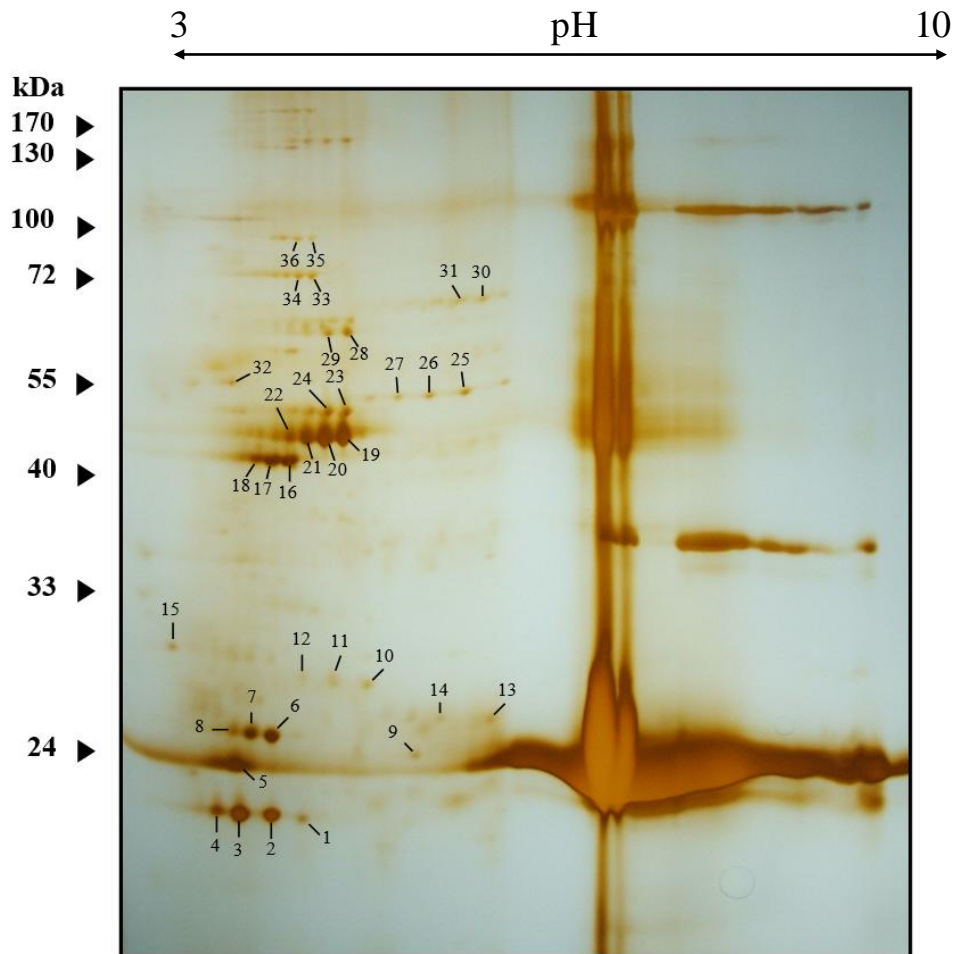
4.1. Використання підходів протеоміки для пошуку білків-партнерів Prx I

У лабораторії професора Chaе H.Z. для пошуку цільових білків-партнерів, що взаємодіють з Prx I, було створено підхід, заснований на методах протеоміки. Цей підхід включає: 1) синтез та очистку міченого рекомбінантного білка Prx I-[His]₆; 2) інкубація гомогенату головного мозку щура разом з Prx I-[His]₆ за температур: 25 °С, 42 °С, 50 °С; 3) елюювання преципітату білків за допомогою Ni-NTA афінної хроматографії та розділення шляхом 2D-ПААГ електрофорезу. 4) ідентифікація проявлених на 2D-ПААГ електрофорезі білкових плям шляхом трипсин-залежного розчеплення та мас-спектрометричного аналізу.

Завдяки цій методиці було розроблено новий підхід для повноцінного дослідження білків-партнерів Prx I в гомогенаті головного мозку щурів. Відповідно, була ідентифікована специфічність взаємодії між Prx I та білками: Prx II, UCH-L1, КФК ГМ та α -енолаза. Така взаємодія була спровокована температурним шоком, під час якого Prx I-[His]₆ інкубували протягом 30 хв при 50 °С з супернатантом гомогенату головного мозку щура. Для порівняння зразки супернатанту інкубувались без Prx I-[His]₆, щоб уникнути неспецифічної білкової взаємодії. Загалом на електрофореграмі двовимірного гель-електрофорезу було фракціоновано 24 білкові плями (Рис 4.1.), що елюювали імідазольним буферним розчином з рН 8.0 (20 мМ Tris-HCl, 0,5 М NaCl, 600 мМ імідазол).

Щоб провести верифікацію ділянок білків, було досліджено відповідність молекулярної маси до первинної амінокислотної послідовності

кожного відбитку завдяки методу мас-спектрометрії. Метод MALDI-TOF разом з високо-специфічним трипсино-залежним гідролізом дозволив отримати характерний для кожного пептиду «MS-peptide fingerprint».



| № | Білок-партнер | № | Білок-партнер |
|-------|---|--------|---|
| 1 | Пероксиредоксин 2 (Prx II) | 25-27 | Креатинфософокіназа (СКВВ) |
| 2-4 | Пероксиредоксин 2 (Prx II) | 28, 29 | Креатинфософокіназа (СКВВ) |
| 5 | Пероксиредоксин 1 (Prx I) | 30, 31 | Білок DPYAL2 |
| 6-8 | Убіквілін карбокси-термінальна гідролаза (UCH-L1) | 32 | АТФаза β-ланцюг |
| 16-18 | Актин (Beta-actin) | 33-36 | Білок теплового шоку з молекулярною вагою 71 кДа (HSP 70 kDa) |
| 19-24 | Креатинфософокіназа (СКВВ) | | |

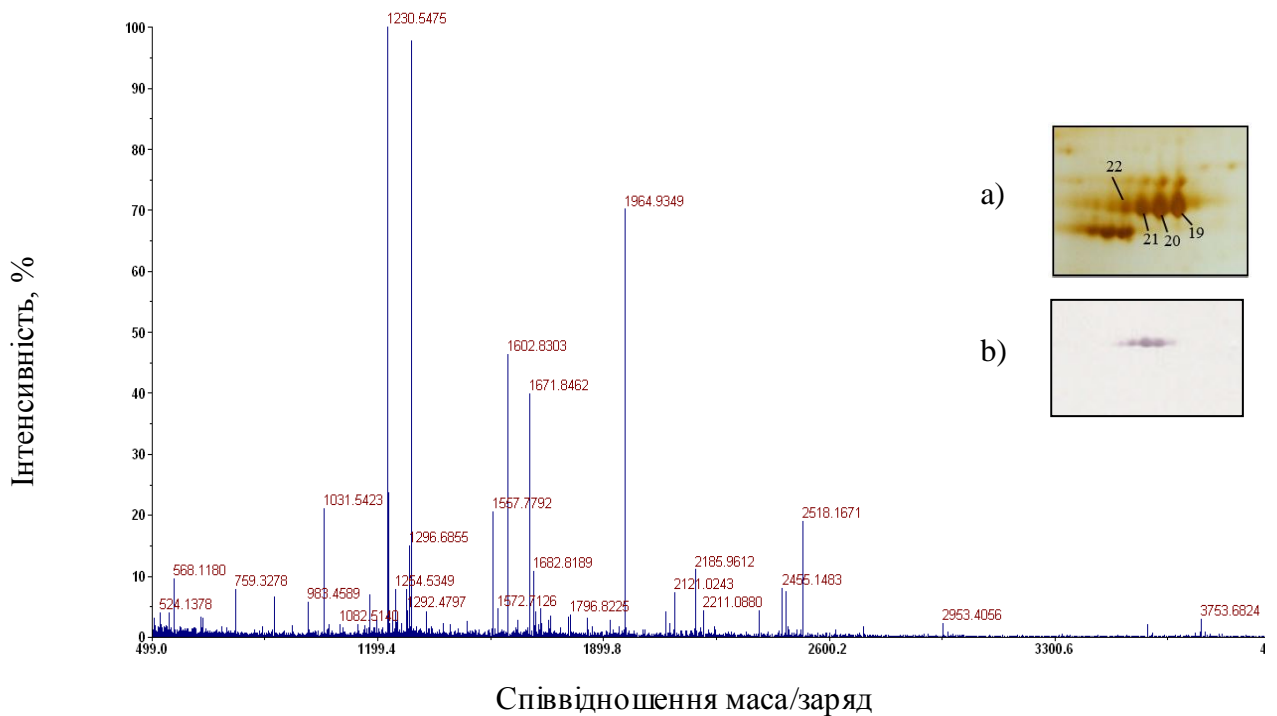
Рис 4.1.1. Двовимірна електрофореграма білків-партнерів Prx I-[His]₆ (фарбовані нітратом срібла)

Порівняння експериментально отриманого мас-спектру індивідуального пептиду відбувалось шляхом співставлення його з теоретичним, що знаходиться в базі даних і відповідає мас-спектру відомих білків. Цей мас-спектрометричний відбиток продуктів протеолітичного гідролізу, як правило, є унікальним для кожного білка, і при використанні пошукових алгоритмів може надати точну інформацію для ідентифікації відповідного патерну.

Для пошуку білків-партнерів P_{rx} I було використано програму “MS-Fit”, що співставляє протеолітичний фінгерпринт з базами даних амінокислотних послідовностей (“Swiss-Prot”, “NCBItr”). Із вище вказаного переліку ідентифікованих білків-партнерів нами було досліджено властивості та взаємодію білка КФК ГМ з представниками родини пероксиредоксинів 2-Цис P_{rx} I та P_{rx} II, оскільки специфічність та інтенсивність сигналу на 2D-електрофореграмі була однією з найвищих. В дослідженнях хворих на Альцгеймера, Хантінгтона було неодноразово відмічено вразливість енергетичної складової клітин, яка представлена КФК ГМ [31, 208, 211, 212]. Оскільки цей фермент відіграє важливу роль у забезпеченні молекули АТФ, яка формується завдяки фосфорилуючій /дефосфорилуючій активності КФК ГМ у напрямку АДФ+креатинфосфат↔АТФ+креатин.

Різна електрофоретична мобільність ізоформ КФК ГМ (43 kDa), що мають близькі значення рІ 5,3-6,0, сприяла розділенню під час ізоелектрофокусуванню та формування характерного фінгерпринту (Рис 4.1.2.) на 2D-електрофореграмі, що, також підтверджено експериментально іншими авторами [31, 213]. Для того, щоб підвередити ідентичність відбитку на гелі двовимірного електрфорезу КФК ГМ отриманого з гомогенату мозку щура з рекомбінантним білком, ми провели «стріп» ізоелектрофокусування (рН 3-10) та електрофорез з використанням ДДС-Na і градієнту концентрацій ПААГ очищеного рекомбінантного білка КФК ГМ. Результат імуноблотингу з візуалізацією поліклональними антитілами анти-КФК ГМ зображений на Рис 6.2 А.

A



B

MPFSNSHNTQKLRFPAEDEFPDLSHNNHMAKVLTPELYAELRAKCTPSGFTLDDAIQT
 GVDNPGHPYIMTVGAVAGDEESYDVFKDLFDPIEDRHGGYQPSDEHKTDLNPDNLQG
 GDDLDPNYVLSSRVRTGRSIRGFCLPPHCSRGERRAIEKLAVEALSSLDGDLSGRYYALK
 SMTEAEQQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMARDWPDARGIWHNDNKTFVLWINEEDHL
 RVISMQKGGNMKEVFTRFCTGLTQIETLFKSKNYEFMWNPHLG YILTCPSNLGTGLRAG
 VHIKLPHLGKHEKFSEVLKRLRLQKRGTGGVDTAAVGGVFDVSNADRLGFSEVELVQM
 VVDGVKLLIEMEQRLEQGQPIDDLMPAQK

Рис 4.1.2. А - Мас-спектрограма КФК ГМ, яка ідентифікована як цільовий білок, що взаємодіє з Prx I за умов теплового шоку. а) двовимірний ДСН-ПААГ КФК ГМ; б) імуноблотограма рекомбінантного білку КФК ГМ. В – пептидні фрагменти КФК ГМ ідентифіковані завдяки MALDI-TOF.

Завдяки методу мас-спектрометрії було отримано 24 фрагменти, маси яких відповідають фрагментам амінокислотних послідовностей КФК ГМ отриманих в результаті протеолітичного розщеплення: 651.3371, 759.3278, 878.5030, 983.4589, 1031.5423, 1138.5540, 1230.5475, 1254.5349, 1272.6757, 1303.7218, 1557.7792, 1572.7126, 1602.8303, 1671.8462, 1728.8780, 1848.9543,

1964.9349, 2121.0243, 2185.9612, 2455.1483, 2518.1671, 2953.4056, 3587.7614, 3753.6824. Завдяки алгоритму MOWSE, який забезпечує високу вибірковість та чутливість, а також підраховує не тільки кількість співпавших пептидів, але і їх масу, було продемонстровано високий рівень ідентичності амінокислотної послідовності КФК ГМ щура, який склав 69 % (Рис 6.2. В).

4.2. *In vitro* взаємодія КФК ГМ з білками Prx I та Prx II у клітинах A549 та HeLa

Багаточисленність та функціональна значимість білок-білкових взаємодій між представниками під-родини 2-Цис Prx, а саме білків Prx I, Prx II з іншими білками-партнерами підтверджена низкою досліджень [50, 214]. Так, наприклад, Prx I приймає участь у прямій кооперації з андрогенним рецептором для проміжної активації цільового гена у відповідь на гіпоксію ракових клітин простати [215]. Молекула H_2O_2 стимулює взаємодію між NH_2 -термінальним кінцем Prx I та ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), яка передбачає участь обох цистеїнів Цис⁵² та Цис¹⁷³ білка Prx I [84]. На відміну від Prx I, Prx II може бути асоційований з β -рецептором PDGF (platelet-derived growth factor receptor), що стимулює PDGF та інгібує інактивацію тирозинової фосфатази, тим самим сприяє проліферації та міграції ендотеліальних клітин [91]. Також, відмічена взаємодія Prx II з Cdk-5 (cyclin-dependent kinase) в гомогенаті головного мозку щура шляхом реакції GST pull-down. Така асоціація призводить до фосфорилування тирозину (Thr⁸⁹) та інгібуванню Prx II [216].

Для підтвердження взаємодії білків партнерів Prx I-[His]₆ *in vitro* були сконструйовано плазмідні гібриди на основі експресійного вектору pFlag-CMV, що містив ген СКВ.

Внутрішньоклітинну взаємодію досліджували в клітинах HeLa та A549. Щоб дослідити взаємодію КФК ГМ та білків Prx I/Prx II ми використали реакцію ко-імунопреципітації (Co-IP) для адгезії білкового антигена (Flag-

КФК ГМ) з розчину шляхом асоціації з іммобілізованим на гелі антитілом (Anti-Flag M2). Лізати клітин A549 та HeLa, з індукованою експресією рекомбінантних плазмід Flag-КФК ГМ та HA-Ptx II, Flag-КФК ГМ та порожньої контрольної плазмиди HA-Mock інкубували із специфічними anti-Flag іммобілізованими антитілами. Як вже зазначалось, в клітинах A549 відмічений низький рівень експресії Ptx II <1,0 мкг та високий >4,0 мкг для Ptx I. Рівень експресії Ptx II у клітинах HeLa складає >3,3 мкг [217, 218]. Це було підтверджено результатами вестерн-блот аналізу лізатів клітин A549 та HeLa, що також продемонстрували успішну експресію Flag-КФК ГМ та HA-Ptx II (Рис 4.2.1 *A-WCL*, *B-WCL* 4.2.2 *A-WCL*, *B-WCL*). Після ко-імунопреципітації з анти-Flag M2 афінними антитілами ми можемо стверджувати, що за фізіологічних умов Ptx II успішно взаємодіє з КФК ГМ на прикладі двох клітинних ліній A549 та HeLa (Рис 4.2.1, *B-IP* 4.2.2, *B-IP*). Але такої інтенсивності ми не спостерігаємо у випадку ендогенного Ptx I, що має внутрішньоклітинну концентрацію вищу, а ніж Ptx II в обох типах клітин. Слабка спорідненість між Ptx I КФК ГМ спостерігається як в A549 так і в HeLa (Рис 4.2.1, *A-IP* 4.2.2, *A-IP*).

З отриманих результатів ко-імунопреципітації можна стверджувати, що обидва пероксиредоксини Ptx I та Ptx II здатні за фізіологічних умов взаємодіяти з КФК ГМ. Але необхідно відзначити, що навіть попри домінуючу кількість білків-партнерів у Ptx I афінність взаємодії Ptx II до КФК ГМ вища ніж Ptx I до КФК ГМ. Наприклад, домінуюча афінність Ptx I по відношенню до ключового фактору стрес індукованого мітохондріального апоптозу p66Shc проявляється навіть за присутності у цитозолі та мітохондріях інших Ptxs, чого не можна сказати про взаємодію з КФК ГМ [219].

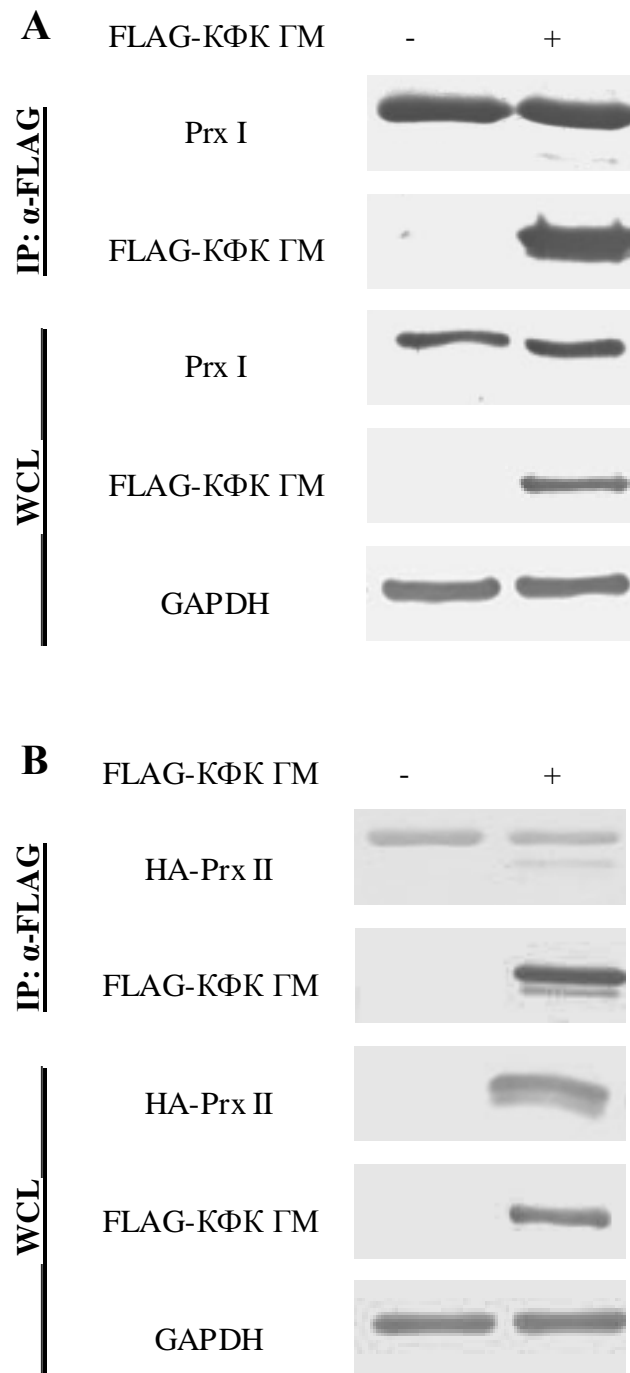


Рис 4.2.1. Блотограма ко-імунопреципітації пероксиредоксинів Prx I/Prx II з КФК ГМ в клітинах A549. А – взаємодія Prx I з КФК ГМ, В – взаємодія Prx II з КФК ГМ. Примітка: IP – імунопреципітація з антитілами Anti-Flag, WCL – рівень внутрішньоклітинної експресії білків. + клітини з трансфектованим КФК ГМ; - відсутність трансфекції КФК ГМ

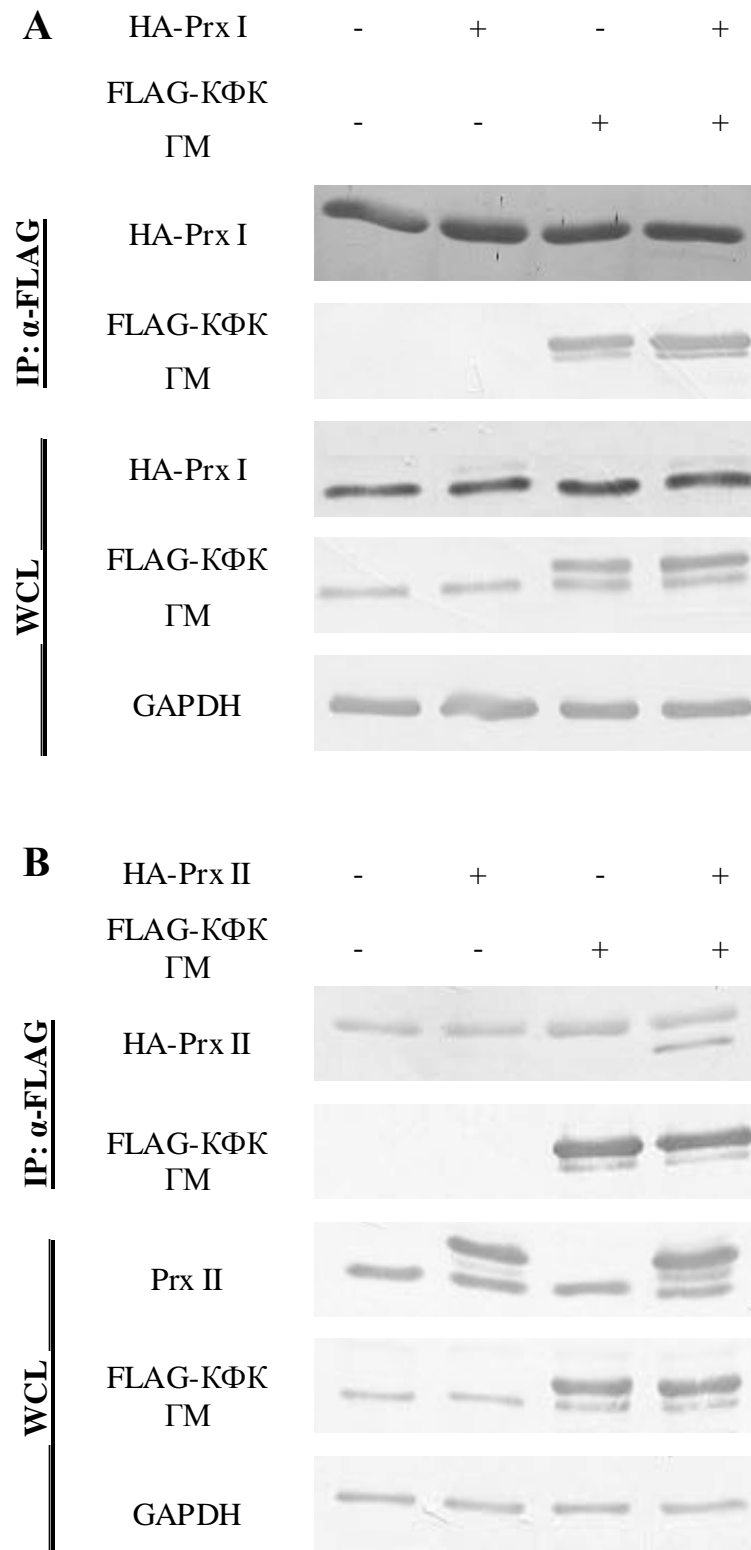


Рис 4.2.2. Блотограма ко-імунопреципітації пероксиредоксинів Prx I/Prx II з КФК ГМ в клітинах HeLa. А – взаємодія Prx I з КФК ГМ, В – взаємодія Prx II з КФК ГМ. Примітка: IP – імунопреципітація з антитілами Anti-Flag, WCL –

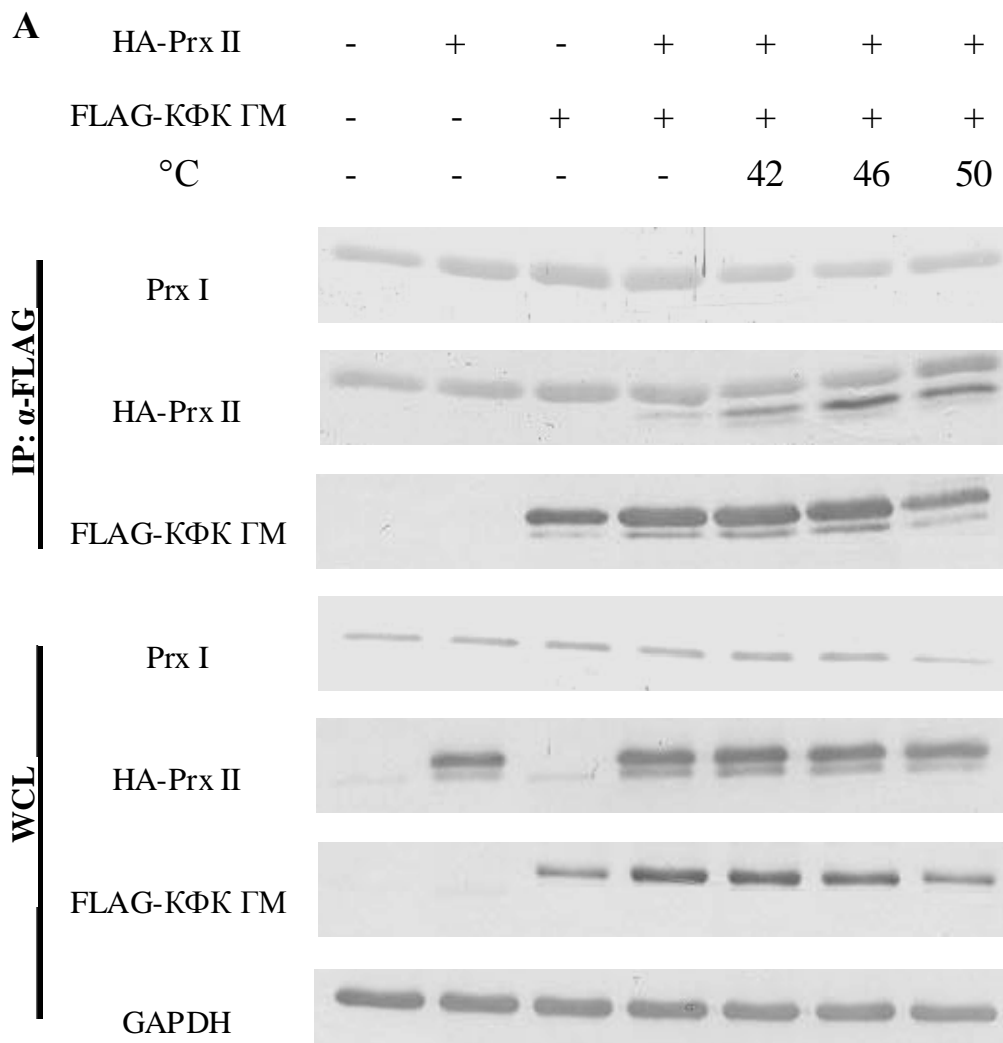
рівень внутрішньоклітинної експресії білків. + клітини з трансфектованим КФК ГМ; - відсутність трансфекції КФК ГМ

4.3. Зміна спорідненості взаємодії між КФК ГМ і білками-партнерами Prx I та Prx II під впливом індукованого теплового шоку та пероксиду гідрогена

Пероксиредоксини характеризуються зміною функціональної активності та структурною реорганізацією за дії стресового агенту пероксиду гідрогена, а також, утворенням специфічних взаємодій та структурною олігомеризацією Prxs бактерій за умов впливу теплового шоку [11, 13]. Тому для подальшої оцінки встановленої взаємодії між Prx I, Prx II та КФК ГМ за стресових умов ми використали два чинника: температуру та пероксид гідрогена. Ми дослідили залежність формування взаємодії за різної інтенсивності стресового чинника. Як відмічено у дослідженнях [30] очищений рекомбінантний білок КФК ГМ мав відносно низьку термостабільність у порівнянні з м'язовою чи мітохондріальною креатинфосфокіназою. Вивчення температурного впливу на КФК ГМ показало характерну послідовність структурних змін білка з першочерговою інактивацією активного центру молекули [189].

Клітини A549, що містили химерні плазмиди pCMV-Flag/КФК ГМ, pCMV-НА/Prx II, pCMV-НА/Mock (контрольна) для синтезу білків Flag-КФК ГМ, НА-Prx II та НА-Mock були інкубовані за температури 42 °C, 46 °C, 50 °C протягом 30 хв. Ми не проводили екзогенну експресію Prx I у зв'язку з високим рівнем експресії ендогенного білка у клітинах A549 (Рис. 4.3.1, А). Для оцінки інтенсивності взаємодії між КФК ГМ-Prx I та КФК ГМ-Prx II ми використали метод ко-імунопреципітації з іммобілізованими антитілами anti-Flag на афінному гелі M2 ("Sigma"). Після ко-імунопреципітації впродовж ночі, білковий преципітат аналізували шляхом ДСН-ПААГ та імуноблотингу.

З отриманих результатів можна стверджувати, що НА-Prx II взаємодіє з Flag-КФК ГМ за фізіологічних умов росту клітин *in vitro* (37 °С) з подальшим посиленням сигналу із збільшенням температури до 50 °С (Рис 4.3.1. А, ІР). Пік інтенсивності взаємодії спостерігався за температури 46°С з наступним зменшенням спорідненості при 50 °С. Це може бути пов'язано з високою чутливістю КФК ГМ до температури та частковою денатурацією білка . На відміну від Prx II, Prx I не мав характерного сигналу на імуноблоті навіть за дії підвищеної температури (Рис 4.3.1, А), що може бути пов'язано з недостатньою чутливістю пероксидази хрину при проявленні блоту.



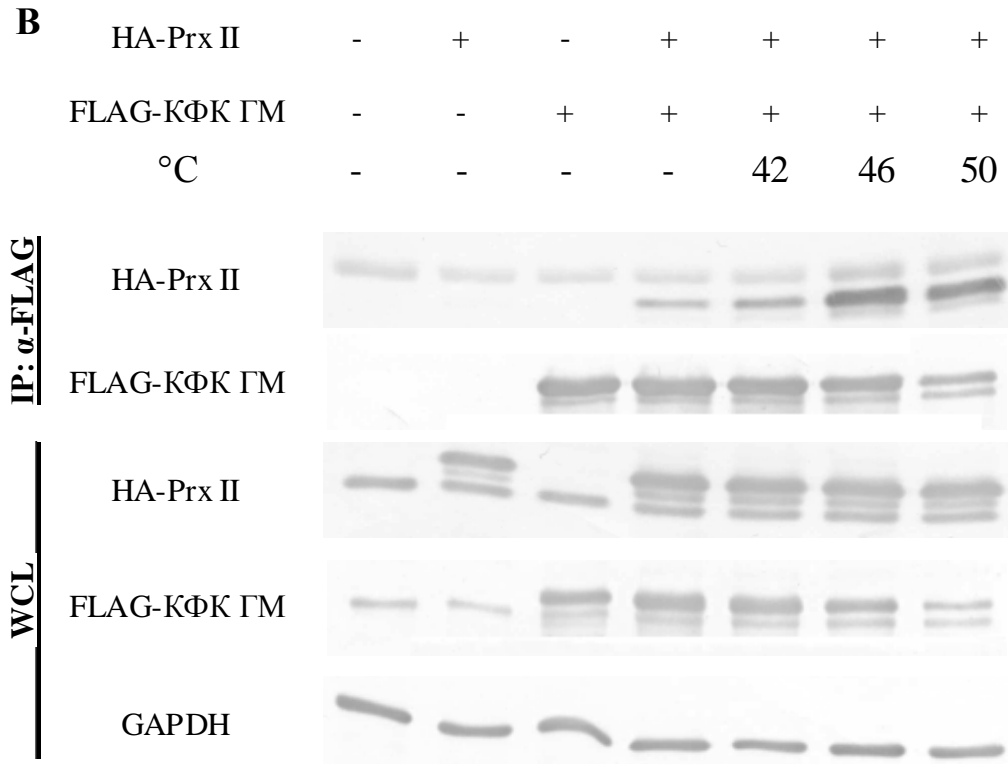
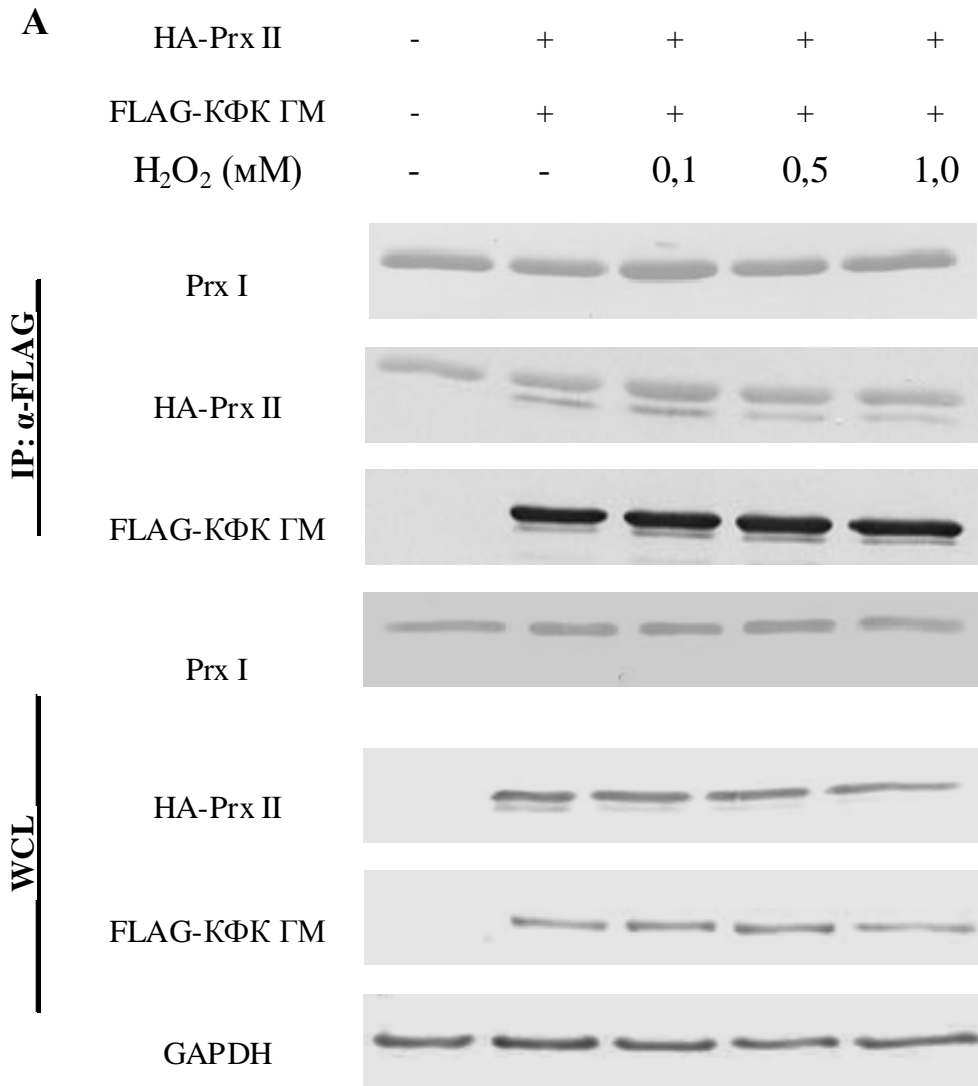


Рис 4.3.1. Блотограма ко-імунопреципітації пероксиредоксинів Prx I/Prx II з КФК ГМ в клітинах A549 (A) та HeLa (B) за дії температури. Примітка: IP – імунопреципітація з антитілами Anti-Flag, WCL – рівень внутрішньоклітинної експресії білків. + клітини з трансфектованим КФК ГМ; - відсутність трансфекції КФК ГМ. GAPDH використовували для контролю кількості введеного білка .

Для порівняння взаємодії під дією температури було обрано клітини лінії HeLa, що на відмінно від A549 містили ендогенний Prx II. На імуноблоті з фракції WCL (whole cell lysate) клітин HeLa видно (Рис 4.3.1, 4.3.2; B), що полоса білка Prx II є подвійною лише у випадку експресії гена Prx II химерної плазмиди рCMV-НА/Prx II. Це спричинено тим, що рекомбінантний білок НА-Prx II містить додатковий кластер амінокислотних залишків представлений НА-тагом, який збільшує загальну молекулярну масу Prx II, що відповідно, відображається на меншій рухливості у гелі та утворені додаткового сигналу. Характер взаємодії між білками Prx II та КФК ГМ у

клітинах HeLa зберігається. За допомогою методу ко-імунопреципітації було показана залежність зміни сили сигналу на блоті від зростання температури (Рис 4.3.1, А, В; IP). Пік інтенсивності сигналу припадає на 46°C з наступним зменшенням сили взаємодії за температури 50°C.



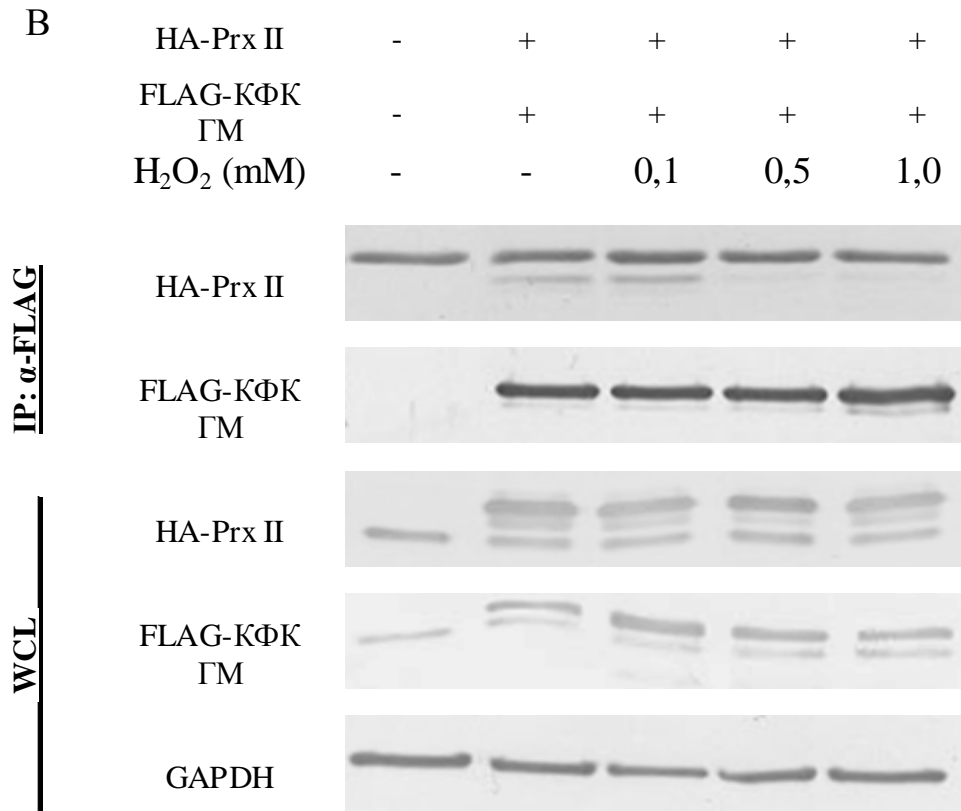


Рис. 4.3.2. Блютограма ко-імунопреципітації пероксиредоксинів Prx I/Prx II з КФК ГМ в клітинах A549 (A) та HeLa (B) за дії пероксиду гідрогену. Примітка: IP – імунопреципітація з антитілами Anti-Flag, WCL – рівень внутрішньоклітинної експресії білків. + клітини з трансфектованим КФК ГМ; - відсутність трансфекції КФК ГМ. GAPDH використовували для контролю кількості введеного білка.

Зміна функціональної активності Prxs за впливу окисних агентів була відзначена багатьма дослідниками [11, 13, 87,]. Так, за їх впливу відбувається зміна окисного стану каталітичного тіолу цистеїну в активному центрі молекули на сульфінану/сульфану кислоту (-SO₂H/-SO₃H). Дана хімічна модифікація призводить до так званої «хамелеонової поведінки» (moonlighting behavior), яка викликає утворення олігомерних структур Prxs з великою молекулярною масою, що проявляють властивості білків-шаперонів та регуляторів клітинних сигналів. Відповідно, було проаналізовано

взаємодію між білками Prx I, HA-Prx II та FLAG-КФК ГМ за дії пероксиду гідрогену на прикладі клітин A549 та HeLa.

Для дослідження взаємодії між Prx II та КФК ГМ було обрано три концентрації пероксиду гідрогену: 0,1, 0,5, 1,0 мМ. Клітини ліній HeLa та A549 були ко-трансфектовані плазмідами pCMV-HA/Prx II, pCMV-Flag/КФК ГМ, та порожньою плазмідною без вставки pCMV-HA/Mock з наступним додаванням перекису водню інтервалом 30 хв [106]. Оцінка дії перекису водню на взаємодію між Prx II та КФК ГМ здійснювалась завдяки реакції ко-імунопреципітації з використанням anti-Flag M2 афінного гелю. За порівняння інтенсивності спорідненості між двома білками з контрольною групою без додавання пероксиду гідрогену шляхом вестерн-блот аналізу ми не спостерігали суттєвих змін в інтенсивності сигналу на блоті між зразком з додаванням 0,1 мМ перекису гідрогену та контрольною групою клітин HeLa та A549 (Рис 4.3.2). Як показано у дослідження [94] Prx II у HeLa клітинах проявляє більшу чутливість до пероксиду гідрогену, а ніж Prx I, про що свідчить формування 80% гіперокисненого Prx II у порівнянні з 40% Prx I за умов дії на клітини 50мМ пероксиду гідрогену. Також, показано, що гіперокиснення Prx II має обернений характер за концентрації пероксиду гідрогену, яка не перевищує концентрацію у 0,5 мМ. Як видно з наших результатів аналізу при додаванні 0,5 чи 1,0 мМ пероксиду гідрогену до клітин з над-експресованими HA-Prx II та Flag-КФК ГМ ми спостерігаємо спад спорідненості взаємодії між двома білками на прикладі клітин A549 та майже повне зникнення лінії Prx II на імуноблоті лізатів клітин HeLa (Рис 4.3.2, А, В; ІР). Зменшення інтенсивності сигналу за умов збільшення концентрації стресового фактору пероксиду гідрогену, що було продемонстровано завдяки реакції ко-імуноприципітації, вказує на модифікацію нативного стану Prx II, що можливо відіграє ключову роль під час взаємодії з КФК ГМ. Як і у випадку температурного стресу, ендогенний Prx I не мав характерного сигналу взаємодії з екзогенною креатинфосфокіназою головного мозку за умов пероксидативного стресу

(Рис. 4.3.2., А), що теж можливо пов'язано з низькою чутливістю методу вестерн-блотингу.

4.4. Вплив С-термінального укорочення Ptx II на зміну спорідненості до білка КФК ГМ

Як відомо, до складу С-термінальної ділянки 2-Цис Ptxs входить специфічний YF мотив, який приймає участь у стабілізації активного центру молекули, але водночас робить Ptx чутливим до гіперокиснення пероксиду гідрогену [11]. Показано, що укорочення С-термінального YF мотиву зменшує чутливість ензиму до окиснення [220]. Важливо зазначити, що присутність YF мотиву характерна майже для всіх еукаріот та деяких прокаріот, що здебільшого відіграє захисну роль антиоксиданта та регуляції сигнальних каскадів ініційованих пероксидом гідрогена [221].

Беручи до уваги функціональну важливість С-термінального кінця у регуляції Ptxs активності ми проаналізували можливу участь цієї ділянки у формуванні взаємодії між білками Ptx II та КФК ГМ. Як продемонстровано у дослідженнях [222] мутантна форма Ptx II із заміненними цистеїнами в активному центрі C54DC176K мала низьку спорідненість до білка-партнеру – НАДФН -залежної тіоредоксин редуктази, де у випадку укорочення С-термінальної ділянки така взаємодія була майже відсутня. Тому, щоб перевірити причетність С-кінця Ptx II до взаємодії з КФК ГМ було сконструйовано декілька мутантних білків, що містили YF-мотив ($\Delta C2$), його частину ($\Delta C5$), чи мутантні форми ($\Delta C6$, $\Delta C22$). Білки Ptx II з укороченим С-кінцями були синтезовані шляхом делітаційного мутагенезу та надекспресії у тваринних чи бактеріальних векторних системах.

Химерні плазміди, що містили транковані форми Ptx II ($\Delta C2$, $\Delta C5$, $\Delta C6$, $\Delta C22$), WT-Ptx II, та КФК ГМ були успішно трансфектовані в клітини A549 та HeLa.

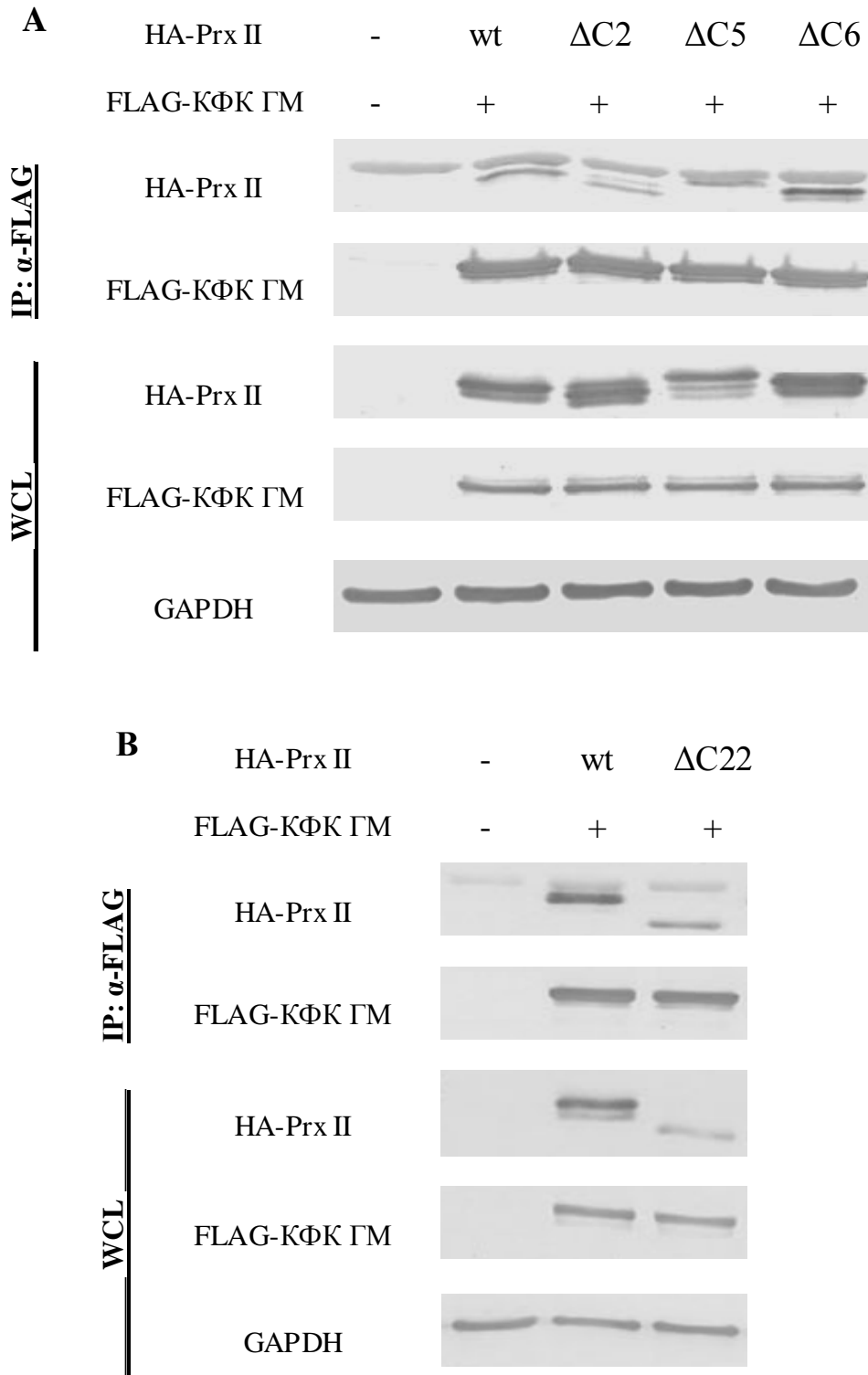


Рис. 4.4.1. Блотограма ко-імунопреципітації Prx II укорочених мутантів з КФК ГМ в клітинах A549. Примітка: IP – імунопреципітація з антитілами Anti-Flag, WCL – рівень внутрішньоклітинної експресії білків. + клітини з трансфектованим КФК ГМ; - відсутність трансфекції КФК ГМ. GAPDH використовували для контролю кількості введеного білка.

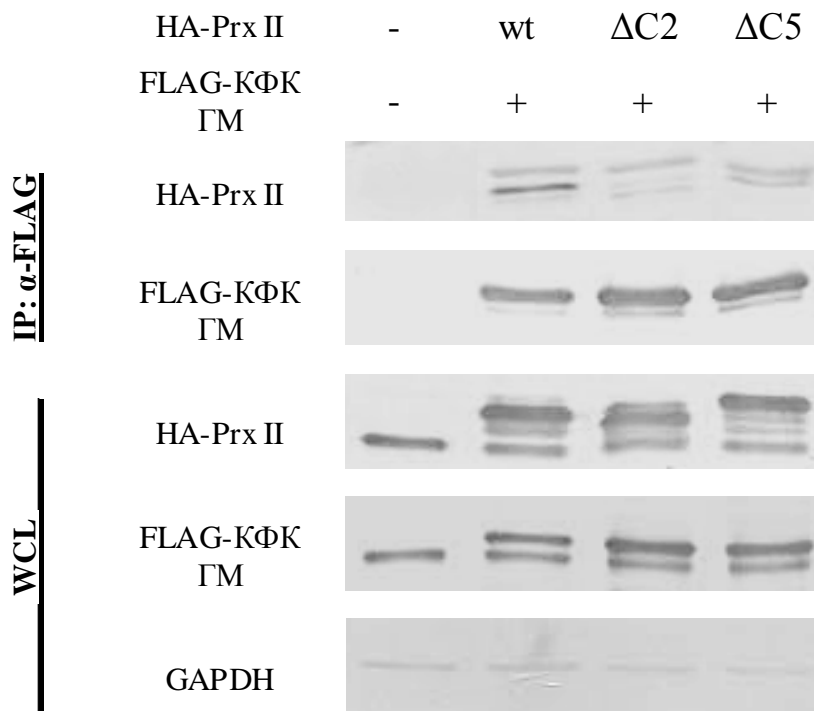


Рис. 4.4.2. Блотограма ко-імунопреципітації Prx II укорочених мутантів з КФК ГМ в клітинах HeLa. Примітка: IP – імунопреципітація з антитілами Anti-Flag, WCL – рівень внутрішньоклітинної експресії білків. + клітини з трансфектованим КФК ГМ; - відсутність трансфекції КФК ГМ. GAPDH використовували для контролю кількості введеного білка.

Рівень трансфектованих білків у клітинних лізатах A549 та HeLa був ідентифікований шляхом імуноблотингу поліклональними антитілами anti-Prx II та anti-КФК ГМ (Рис 4.4.1 B, C; 4.4.2 A, WLC). За використання реакції ко-імунопреципітації із специфічними антитілами anti-Flag до Flag-мітки іммобілізованої на афінному гелі M2, нам вдалось показати, що надекспресовані мутантні форми HA-Prx II $\Delta C2$, $\Delta C5$, $\Delta C22$ проявляють специфічність по відношенню до Flag-КФК ГМ. Але на відмінно від нативної форми (FL) Prx II, мутантні форми демонструють дещо слабкішу взаємодію з КФК ГМ, що може бути пов'язано з відсутністю амінокислотних залишків, які приймають участь у утворенні міжмолекулярних водневих чи іонних

зв'язків. Цей ефект характерний як для клітин A549 з мутантними формами НА-Prx II $\Delta C2$, $\Delta C5$, $\Delta C22$ (Рис 4.4.1 В, С, ІР) так і для клітин HeLa $\Delta C2$, $\Delta C5$ (Рис 4.4.1 В, С, ІР).

Важливо відмітити, що за відсутності YF-мотиву, який представлений мутантом НА-Prx II $\Delta C6$, інтенсивність взаємодії з КФК ГМ зростає. Такий ефект є аномальними, оскільки $\Delta C5$ НА-Prx II на відмінну від НА-Prx II $\Delta C6$ має нижчий рівень сигналу на блоті за відсутності тирозину – однієї з двох амінокислот, що формують YF-мотив. Підсумовуючи, необхідно відзначити, що вкорочення С-термінальної ділянки надає Prx II резистентності до гіперокиснення пероксидом гідрогена, але при цьому втрачається його шаперонна функція та здатність до формування конгломератів [11]. Беручи до уваги невід'ємну роль С-термінальної ділянки Prx II у зв'язуванні із сульфiredоксином чи НАДФН -залежною Тгх-редуктазою, можна стверджувати, опираючись на наші результати, що у випадку взаємодії з КФК ГМ укорочення С-кінця Prx II призводить до послаблення сигналу на блоті, а отже це свідчить про важливість С-термінальної ділянки при взаємодії.

4.5 Захист питомої активності КФК ГМ від інактивації температурою та пероксидом гідрогена завдяки шаперонним властивостям білків Prx I та Prx II

Однією із ключових функцій 2-Цис Prxs є функція шаперонних білків. Prxs приймають участь у відновленні ферментативної активності білків-партнерів шляхом утворення високомолекулярних конгломератів [222]. Гіперокиснення Prx I та Prx II надлишковими концентраціями пероксидів призводить до молекулярної перебудови білків з димерної до олігомерної форм. Як показано у дослідженнях [12, 53, 87] цей механізм перебудови представляє собою об'єднання 2-Цис пероксиредоксинів у декамерні

структури, кожна з яких утворена п'ятьма димерами. Декамери в свою чергу, формують філаменти, що наділені шаперонною активністю [12, 53, 87].

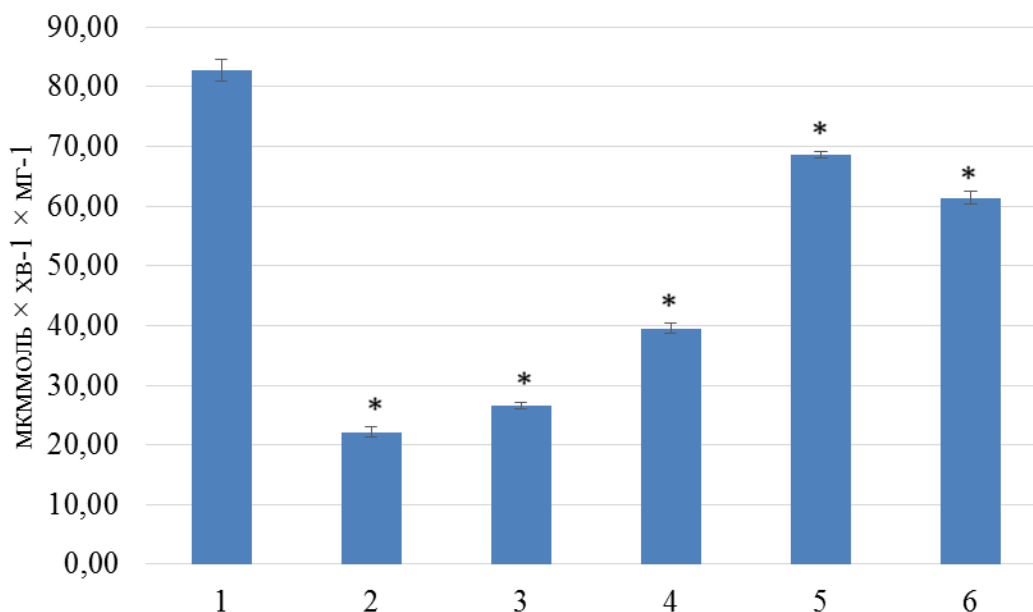


Рис 4.5.1 Питома ферментативна активність рекомбінантного білка КФК ГМ за дії пероксиду гідрогену та присутності Prx I (n=3) Примітки: 1 – Контроль (КФК ГМ 25°C); 2 – 1 mM H₂O₂; 3 – Prx I 1:1; 4 – Prx I 1:5; 5 – Prx I 1:10; 6 – Prx I 1:20, * – p<0,05

Показано, що Prx I у порівнянні з Prx II демонструє виразнішу шаперонну активність у захисті від температурної агрегації малат дегідрогенази. Одним із факторів такої поведінки може виступати присутність додаткового цистеїну Цис⁸³, що сприяє утворенню декамерної структури за рахунок додаткових дисульфідних зв'язків між димерними інтерфейсами [88].

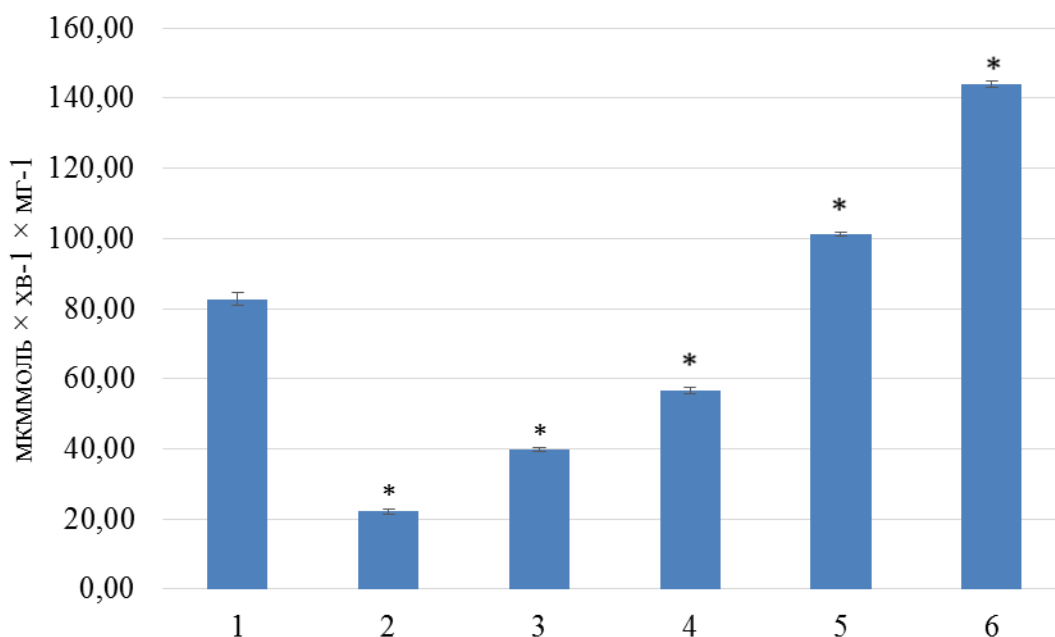


Рис 4.5.2. Питома ферментативна активність рекомбінантного білка КФК ГМ за дії пероксиду гідрогену та присутності Prx II (n=3). Примітки: 1 – Контроль (КФК ГМ 25°C); 2 – 1 мМ Н₂О₂; 3 – Prx II 1:1; 4 – Prx II 1:5; 5 – Prx II 1:10; 6 – Prx II 1:20; * – p<0,05

Для дослідження впливу стресорів пероксиду гідрогена та температури на питому активність КФК ГМ ми використали специфічну реакцію фосфорилування креатину. Питому активність КФК ГМ визначали шляхом спектрофотометричного вимірювання абсорбції при довжині хвилі 597 нм у відповідності до рН-колориметричного методу [25]. Білки Prx I та Prx II додавали до реакційної суміші перед дією стресового чинника. Відповідно, оцінку шаперонної активності Prx I та Prx II проводили на основі відновлення відсотку питомої активності КФК ГМ, що є різницею між дією стресора без участі пероксиредоксинів та за їх присутності у реакції.

Під час реакції фосфорилування креатину за участі КФК ГМ та АТФ ми використали очищений рекомбінантний білок концентрацією 30 нМ. За 100% було прийнято активність КФК ГМ при температурі 25 °С за відсутності дії стресового чинника.

За дії стресового чинника, пероксиду гідрогена, у концентрації 1 мМ залишкова активність КФК ГМ склала 26,78 %. Молярні співвідношення між білком Ргх I КФК ГМ склали 1:1, 1:5, 1:10, 1:20. (Рис. 4.5.1). Ми дослідили, що під час додавання Ргх I відбувається пропорційне відновлення питомої активності КФК ГМ зі збільшенням концентрації Ргх I. Як видно з Рис. 4.5.1 активності КФК ГМ за присутності Ргх I дорівнюють 32,09 %, 47,77%, 82,87 %, 74,19 %. Де у аналогічних концентраціях Ргх II (Рис 4.5.2.) було зареєстровано захист фосфорилуючої активності на рівні для 1:1 - 48,13 %, 1:5 - 68,52 %, 1:10 - 122,32 %, 1:20 - 174,07 %. Беручи до уваги отримані результати, ми можемо стверджувати, що у разі інгібуючої дії 1 мМ розчину перекису гідрогену, Ргх I та Ргх II демонструють виразну шаперонну активність по відношенню до специфічного білка-партнера КФК ГМ.

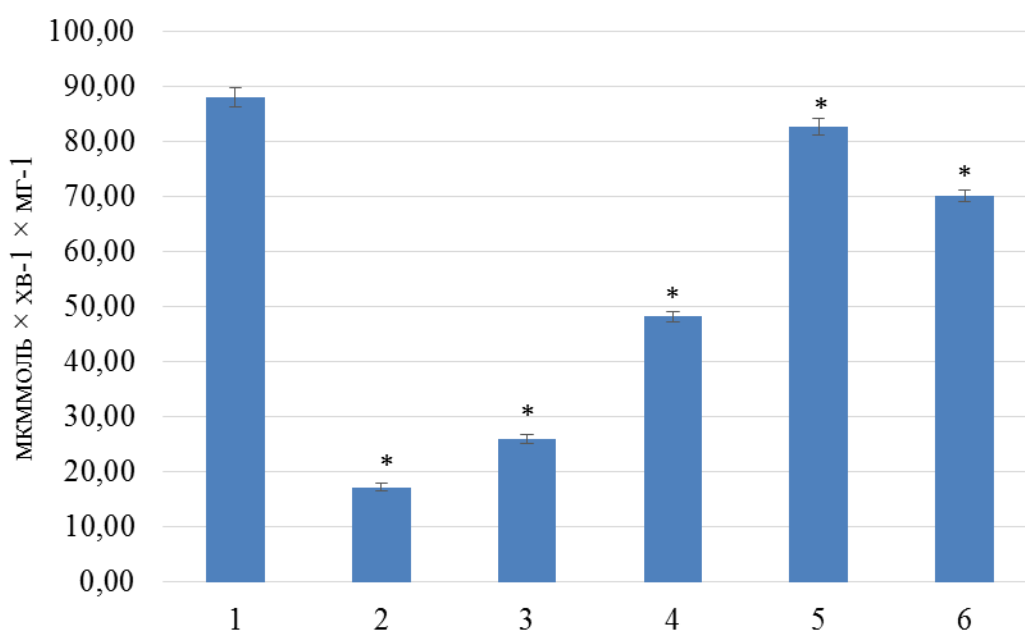


Рис 4.5.3. Питома ферментативна активність рекомбінантного білка КФК ГМ за дії температури та присутності Ргх I (n=3). Примітки: 1 – Контроль (КФК ГМ 25°C); 2 – 42°C; 3 – Ргх I 1:1; 4 – Ргх I 1:5; 5 – Ргх I 1:10; 6 – Ргх I 1:20, * – p<0,05

Якщо порівняти отримані результати активності пероксиредоксинів P_{rx}I/P_{rx}II, то у випадку P_{rx} II за концентрацій 1:10 та 1:20 шаперонний білок демонструє не тільки відновлення початкової активності КФК ГМ, але й її підсилення до 174,07 % за співвідношення 1:20. Такий характер захисту питомої активності КФК ГМ може бути пов'язаний із вищим ступенем спорідненості P_{rx} II до КФК ГМ, а ніж P_{rx} I до КФК ГМ.

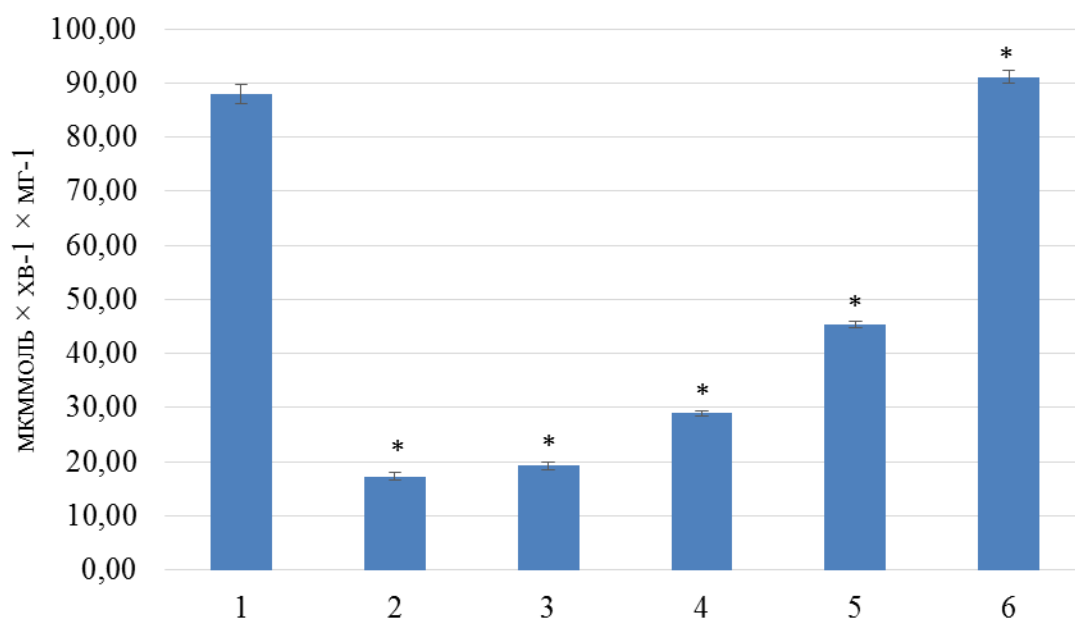


Рис 4.5.4. Питома ферментативна активність рекомбінантного білка КФК ГМ за дії температури та присутності P_{rx} II (n=3). Примітки: 1 – Контроль (КФК ГМ 25°C); 2 – 42°C; 3 – P_{rx} II 1:1; 4 – P_{rx} II 1:5; 5 – P_{rx} II 1:10; 6 – P_{rx} II 1:20, * – p<0,05

З досліджень 2-Цис пероксиредоксинів дріжджів видно, що цитозольні WT/P_{rx} I та P_{rx} II приймають участь у захисті дріжджових клітин під час теплового шоку, для порівняння, мутація P_{rx} I^{-/-} та P_{rx} II^{-/-} призводить до загибелі аналогічних клітин [13]. Заміна амінокислотних залишків S47S/S170S в активному центрі P_{rx} I, призводить до часткового інгібування його пероксидазної функції. За цих умов клітини дріжджів мають часткову

резистентність до теплового шоку, що демонструє додаткову шаперону функцію Prx I [13, 81].

Результати наших досліджень доводять причетність шаперонної функції пероксиредоксинів до захисту фосфорилуючої активності КФК ГМ під впливом теплового шоку. На Рис. 4.5.3. показано, що залишкова активність КФК ГМ після дії температурного стресу 42⁰С протягом 20 хв становила 18,84 %. Внаслідок додавання Prx I у співвідношенні 1:1 до рекомбінантного білка КФК ГМ ми спостерігали відновлення фосфорилуючої активності креатинфосфокінази до 30,48 %. Наступні підвищення концентрації Prx I у співвідношеннях 1:5, та 1:10 характеризувались поверненням значень активності КФК ГМ до 55,14 % та 94,86 %. У випадку 20-ти кратного збільшення концентрації Prx I ми реєстрували інгібування КФК ГМ до 80,14 %.

Одночасно, були досліджені захисні властивості Prx II за умов теплового шоку. Як показано на Рис. 4.5.4, при додаванні Prx II у співвідношенні 1:1, КФК ГМ демонструє незначне відновлення активності, що складає 21,23 %. Послідуючі підвищення концентрації Prx II до співвідношень 1:5; 1:10; та 1:20 мали позитивний характер відновлення активності КФК ГМ та склали 33,22 %, 51,71 %, та 102,74 % відповідно. Варто відмітити схожу тенденцію відновлення активності КФК ГМ за присутності Prx I та Prx II у випадках пероксидазної та теплової інактивації. Ми реєстрували інгібування питомої активності рекомбінантної КФК ГМ при співвідношенні 1:20 білка Prx I як за умов 1мМ пероксиду гідрогена(Рис. 4.5.1.) так і за температури 42⁰ С (Рис. 4.5.3.). У той самий час, Prx II за концентрації 1:20 демонструє незмінну тенденцію посилення каталітичної активності СКВВ за стресових умов (Рис. 4.5.2. та Рис. 4.5.4.).

Р О З Д І Л 5

МОДЕЛЮВАННЯ БЛОК-БІЛКОВОЇ ВЗАЄМОДІЇ МІЖ КФК ГМ ТА PRX II

Кристалографічна будова КФК була вперше досліджена у комплексі з молекулою АДФ- Mg^{2+} - NO^{3-} в лабораторії *Bong* та колег [153]. В роботі було показано, що за зв'язування із субстратом відповідають позитивно зарядженні амінокислотні залишки Asp, Arg, Glu, які знаходяться в активному центрі КФК ГМ. Основу внутрішньомолекулярних зв'язків КФК ГМ складають гідрофобні взаємодії. Субстрат-зв'язуючий карман КФК ГМ утворений п'ятьма позитивно зарядженими залишками аргініну [153].

Відкриття кристалографічної структури Prx II людини з клітин еритроцитів було здійснено в лабораторії Шродера [71]. З досліджень видно, що Prx II може мати тороїдну структуру сформовану п'ятьма димерними молекулами, які об'єднанні гідрофобними зв'язками. Ця структура активна за ініціювання пероксидазної функції Prx II, утворення високомолекулярних структур викликане гіперокисненням молекули Prx II [11]. Також, Prx II може існувати у вигляді димеру за умов низької концентрації пероксиду гідрогена. Молекула димеру утворена двома мономерами, що мають C-термінальний кінець, який переплетений з доменом I іншого мономеру [71].

Дослідження за використання підходів протеоміки показали існування білків партнерів *in vitro* для родини 2-Цис Prx I та Prx II [50]. Наприклад, Prx I взаємодіє з апоптоз сигнал-регулюючою кіназою 1 (ASK1), доменом Mus box II протионкогенного фактору (c-Myc), фактором інгібування міграції макрофагів (MIF); де Prx II ідентифікований як партнер фактору росту тромбоцитів, а також циклін залежної кінази 5 (Cdk5) [84, 216, 223, 225]. Комп'ютерна симуляція взаємодії між Prx I та білком Srx показала, що комплекс існує тільки тоді, коли Prx I знаходиться в олігомерній формі високомолекулярного шаперону [226].

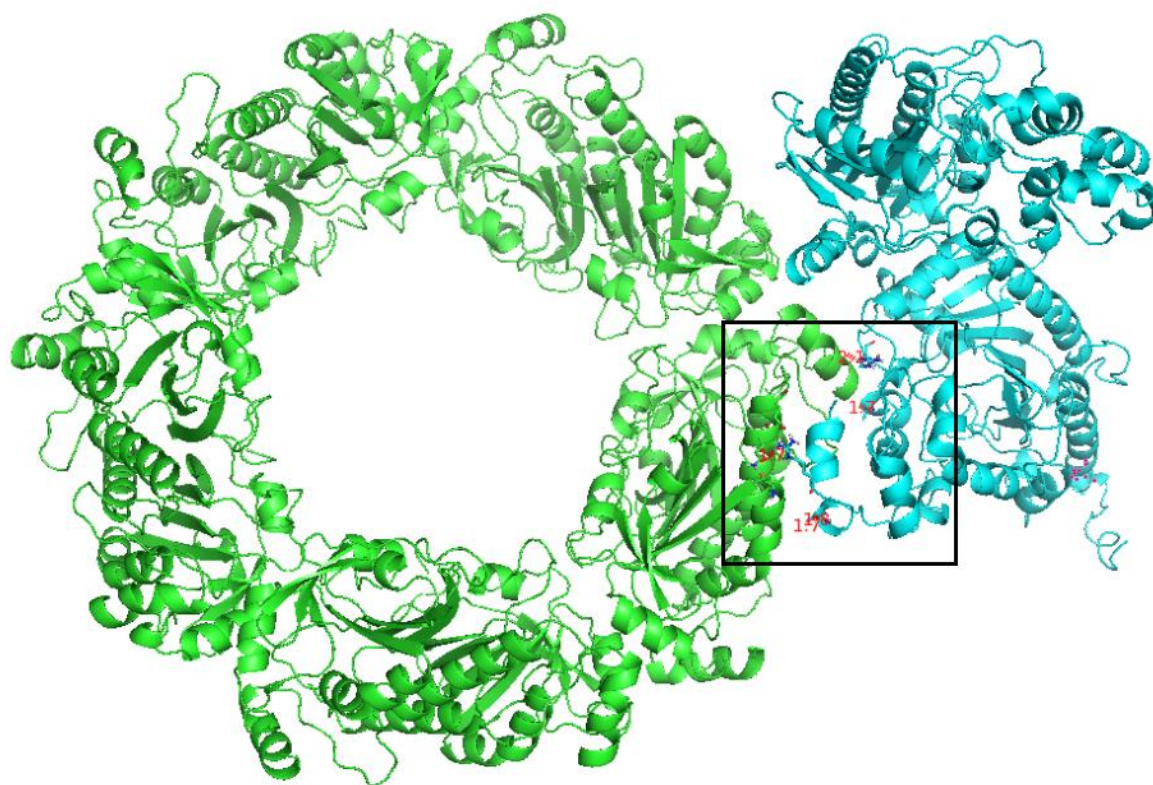


Рис.5.1.1. Взаємодії декамеру Prx II та димеру КФК ГМ. Чорним квадратом позначено можливу зону стикування двох білків.

Ми показали, що рекомбінантний білок КФК ГМ здатен формувати комплекси з Prx II за фізіологічних та стресових умов *in vitro*. Опираючись на отримані результати було досліджено амінокислотні залишки, які приймають участь у процесі взаємодії та активні форми Prx II, які здатні зв'язуватись з КФК ГМ за стресових умов [224]. Амінокислотні послідовності білків КФК ГМ та Prx II були взяті з бази даних “RCSB Protein Databank” під ідентифікаційними номерами Prx II – 1QMV КФК ГМ – 3B6R. Для комп'ютерної симуляції ми використали он-лайн докінг сервер “ClusPro 2.0”. Моделі згенеровані “ClusPro 2.0” згадуються в більш ніж 200 наукових працях [190]. За допомогою “ClusPro 2.0” ми відібрали 20 конфігурацій з енергетично вигідним розміщенням молекул КФК ГМ та Prx II. Перша згенерована модель взаємодії двох білків зображена на Рис 5.1.1. Дослідження отриманих моделей за допомогою програмного забезпечення “PyMol” дозволило нам виділити ключові амінокислотні залишки, що приймають участь у взаємодії.

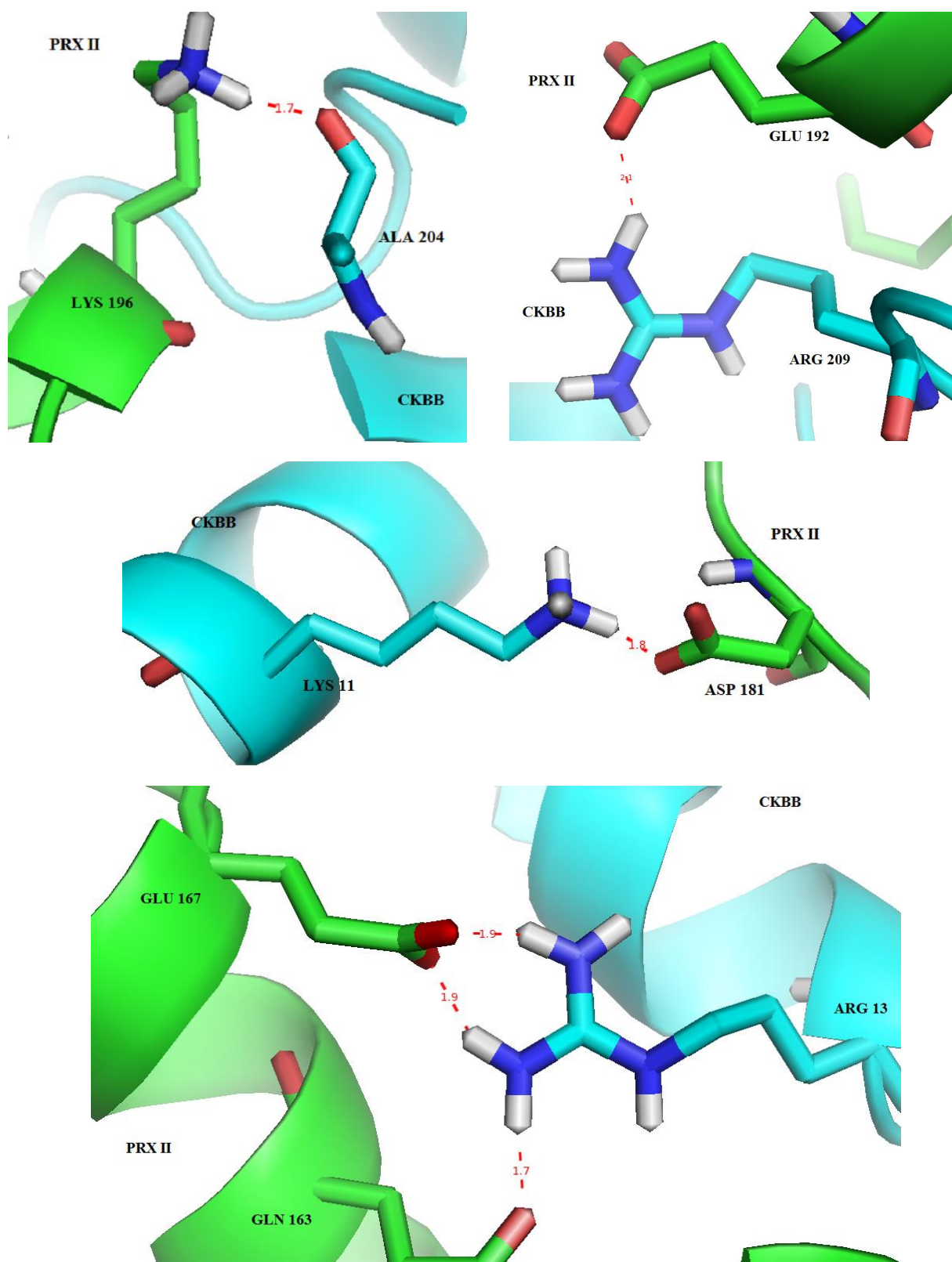


Рис 5.1.2 Набір міжмолекулярних взаємодій між амінокислотними залишками білків КФК ГМ та Prx II. Де, сірим позначено атом гідрогена; синім – атом азоту; червоним – атом кисню. Зображення створенні за допомогою програмного забезпечення “PyMol v 1.8.4.0”.

В результаті аналізу С-термінального кінця Ptx II, залишок Lys¹⁹⁶ окрім стабілізації COOH домену здатен формувати водневий зв'язок із залишком Ala²⁰⁴ білка КФК ГМ. У відповідності до отриманих даних, другий водневий зв'язок може існувати між залишком Asp¹⁸¹, що запобігає разом із His¹⁹⁷ фосфорилуванню молекули Ptx II, та залишком Lys¹¹ КФК ГМ. Комп'ютерна симуляція моделі із найменшим значенням RMSD (Root Mean Square Deviation) виявила участь амінокислотних залишків молекули КФК ГМ Arg¹³ та Asp¹⁸, які розташовані на початку N-термінального кінця, а також Arg²⁰⁹ та Ala²⁰⁴ на С-термінальному кінці. Судячи з даних взаємодії білків КФК ГМ та Ptx II було виявлено моделі, де важливу участь відіграють водневі та електростатичні зв'язки утворені відповідно Ala204 та Lys196, а також Arg209 та Glu192 Рис 5.1.2.

Необхідно відзначити залишок Arg13 з С-термінального кінця молекули КФК ГМ, він був причетний до взаємодії під час всіх 20 комп'ютерних симуляцій. Його важливість була показана на прикладі креатинфосфокінази м'язів кролика, де ензим повністю інактивувався внаслідок модифікації залишку аргініну [227]. Під час комп'ютерного докінгу Arg13 мав сталу міжмолекулярну відстань з амінокислотними залишками Ptx II, яка дорівнювала 1,7Å та 1,9Å. Ми ідентифікували Glu167, Gln163, Lys67, Asp64, Asn60 з білка Ptx II, що взаємодіяли з Arg13 КФК ГМ людини. Підсумовуючи, хочеться зауважити, що залучені амінокислотні залишки є припущенням внаслідок генерування програмним забезпеченням. Гідрофобні чи електростатичні взаємодії *in vivo* двох білків КФК ГМ та Ptx II можуть існувати між іншими залишками, ніж тими, що отримані за допомогою "ClusPro 2.0".

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Пероксиредоксини - це антиоксидатні білки, що каталізують відновлення пероксидів для підтримання клітинного балансу пероксиду гідрогената та утилізації його шкідливого впливу на клітинну. Окрім антиоксидантної функції, ці білки проявляють шаперонну активність та виступають модуляторами сигнальних каскадів клітини за рахунок контролю концентрації пероксиду гідрогену [35, 51, 62, 214].

За використання методу афінної хроматографії та двовимірного гелю електрофорезу нам вдалося ідентифікувати ряд білків партнерів Prx I, зв'язування яких було спровоковане температурним стресом 50°C. В якості білка мішені ми обрали Prx I, шаперонні властивості якого переважають такі Prx II у відповідності з Lee *et all* 2007 [88]. Було ідентифіковано >10 білок зв'язуючих партнерів Prx I. Така значна кількість білків партнерів може бути зумовлена захисною функцією 2-Цис, яка активується внаслідок дії стресу [228]. Другим важливим фактором може слугувати розповсюдженість ізоформ Prxs, які експресуються в цитозолі, мітохондріях, хлоропластах, пероксисомах та асоційовані з ядром та мембранами [229]. Важливість шаперонної функції відзначається у фотосинтезуючих еукаріот з 2-Цис Prxs розташованими у пластидах та взаємодією з циклофеліном Сур20-3. Показано, що Сур20-3 має більшу афінність до димерної ніж декамерної молекули 2-Цис Prxs [230].

Шляхом мас-спектрометрії ми ідентифікували, що одним із партнерів Prx I є КФК ГМ. Було продемонстровано утворення взаємодії між КФК ГМ та Prx I в гомогенатах головного мозку щурів.

Нашим першим етапом в дисертаційній роботі було клонування нуклеотидної послідовності гена КФК ГМ. Клонована послідовність була секвенована і отримане підтвердження, що послідовність в 1146 нуклетидів відповідає зазначеній у "GenaBank" CR542268.1. Для експресії ми

використали два типи плазмід: pET-14b/pET-17b для трансфекції у бактеріальні клітини *E.coli* та накопичення рекомбінантного білка. Білок експресований у плазміді pET-14b містив His ділянку для метал-хелатного очищення. Успішність трансфекції було оцінено шляхом експоненційного росту бактерій та накопичення плазмід з експресованим фрагментом КФК ГМ. В результаті хроматографії, що поділяє за розміром та використання аніонно-обмінної DEAD сефазори ми отримали елюат з концентрованого рекомбінантного КФК ГМ. Нам вдалось отримати до 11-22 мг чистого ферменту на 1 л культурального розчину. У результаті вестрен-блот аналізу було продемонстровано, що молекулярна вага мономеру складає 42-43 кДа. Ці результати підтверджують ідентичність розміру оригінального білка з рекомбінантним, та підкріплені дослідженнями [153, 193, 231].

Біологічна активна молекула КФК ГМ - це димер з молекулярною масою 2x43 кДа. Відомо, що всі ізоформи креатинкінази формують дуже стабільні димери, що можуть бути дисоційованими тільки у випадку високих концентрацій денатуруючих агентів (6М сечовини чи 3М GdHCl) з частковою денатурацією мономеру та вивільненням SH груп [205, 231-233,]. Для оцінки функціональної активності рекомбінантного білка КФК ГМ ми дослідили питому за впливу температури та зростаючої концентрації пероксиду гідрогена. У результаті дії пероксиду гідрогену ми зареєстрували лінійне інгібування активності в напрямку фосфорилування креатину. Зниження активності зареєстроване на 17 %, 58 % та 74 % за інкубування з пероксиду гідрогену в концентраціях 0,25, 0,5 та 1мМ відповідно. З літературних джерел видно, що у хворих на Альцгеймера синтез вільних радикалів, індукований амілоїдним бета-пептидом, провокує зниження ферментативної активності чутливої до окиснення СК, що, відповідно, служить розвитку нейродегенеративних порушень [234]. Головну роль у забезпеченні енергією головного мозку та м'язів відведено саме КФК, оскільки пул фосфокреатин/креатин здатен генерувати молекулу АТФ до 10 разів швидше а ніж мітохондріальне окисне фосфорилування, чи до 40 разів

швидше за гліколіз [16]. Також, важливість креатину відмічено у якості харчової добавки, яка покращує захисні властивості організму людини проти таких хвороб як Хантінгтона (HD), аміотрофічний латеральний склероз, хвороба Паркінсона та ішемія головного мозку [211, 235].

Варто також зауважити опосередковану дію цистеїну на інактивацію молекули КФК. Вивільнення цистеїну з лізосом спричинює оксидативний стрес, який призводить до окиснення КФК ГМ і формування окисної форми О-КФК ГМ. Авторами Li et al [210] продемонстровано утворення дисульфідного зв'язку між мутантними залишками С74S та С254S, який призводив до часткового інгібування активності КФК ГМ. У відповідності до отриманих результатів авторами було зроблено висновок, що головною причиною інактивування КФК ГМ стала модифікація унікального Цис-283, а не генерування О-КФК ГМ. Відновлений КФК ГМ, що все ще містив значну частку О-КФК ГМ після дії глутатіону (GSH), демонстрував 80 % залишкової активності [236, 207]. Активний центр КФК ГМ містить ключові цистеїнові залишки, які виступають можливими мішенями для окисної модифікації вільними радикалами. Внаслідок цих змін відбувається втрата ферментативної активності КФК ГМ, що підкріплено нашими дослідженнями за дії пероксиду гідрогена рекомбінантний білок КФК ГМ.

Під час температурної інактивації зміни були ще більш значимими, а ніж за окиснення. Так ми продемонстрували інгібування активності КФК ГМ на 36 %, 57 % та 86 % за відповідної дії температури 38 °С, 40 °С, та 42°С. У відповідності до літературних даних, білок КФК ГМ має у своєму складі чотири залишки цистеїну [237]. Один з них є ключовим для каталізу реакції фосфорилювання/дефосфорилювання креатину, а інші три приймають участь у конформаційній перебудові четвертинної структури з метою підвищення спорідненості з субстратом [237, 238, 239]. Автором [30] досліджено, що КФК м'язів на відмінно від СК головного мозку, демонструє залишкову активність навіть при температурі 50 °С та повністю інактивується при 62 °С [206, 240]. Не дивлячись на те, що КФК м'язів демонструє високий відсоток

ідентичності амінокислотної послідовності з КФК ГМ, остання має гіршу термостабільність, яка зумовлює різницю температури інактивації у ~ 15 °С. Нами була відзначена часткова інактивація ферменту КФК ГМ вже при 38 °С, та повне інгібування за температури вище 48 °С.

Інактивована КФК ГМ у порівнянні з КФК м'язів має кращу здатність до регенерації ферментативної активності. У відповідності до даних [30] було встановлено, що >60 % активності КФК ГМ може бути реактивовано у льодові протягом 12 годин. На відміну від головного мозку, тканини м'язів характеризуються більшим тепловим навантаженням, тому КФК м'язів має вищий поріг термостійкості, але гіршу здатність до реактивації, що забезпечує безперебійне постачання АТФ під час м'язового скорочення [30]. Відмічено підсилюючий вплив іонів Mg^{2+} на агрегацію КФК м'язів за дії температури, водночас присутність іону Mg^{2+} після зняття чинника не впливала на фосфокіназну активність КФК м'язів [241]. За цими даними можна стверджувати, що відносно низька стабільність і хороша здатність до відновлення КФК ГМ є можливим механізмом контролю метаболічного обміну, а також розвитку патологічних процесів.

Для підкріплення даних ферментативної реакції ми здійснили надекспресію білка КФК ГМ в клітинних лініях HeLa та A549. Клітини були піддані аналогічним стресам теплового та окисного шоку. Виявилось, що 1 мМ та 48°С мали найуражуючий ефект на експресію дослідженого білка за допомоги вестерн-блот аналізу, що підкріплює наші результати отримані під час специфічної ферментативної реакції. Цікаво зауважити, що концентрація білка КФК ГМ в клітинних лізатах A549 та HeLa за дії стресорів різнились. Що може бути викликане присутністю вищої концентрації КФК ГМ у цитозолі клітин HeLa. Відповідно, ми продемонстрували слабку стійкість рекомбінантної КФК ГМ людини за впливу зовнішніх стресорів. Ми припускаємо, що така ензиматична відповідь пов'язана із тканинною специфічністю поширення ензиму. У випадку головного мозку, структурно вразливої ділянки, функціональні білки мають забезпечувати резистентність

та бути схильні до швидкої реактивації. Як вже було продемонстровано у дослідження [30, 242] здатність КФК ГМ до відновлення робить її сумісним до виконання функції енергетичного буферу в тканині головного мозку.

Одну з головних ролей у розвитку нейродегенеративних хвороб займає модифікація білків та ліпідів під впливом АФК, що генеруються завдяки тривалій дії стресових факторів, таких як: мікроклімат, радіація, нервова напруженість тощо [243]. Одним з білків, особливо під час порушень енергетичного балансу, що підпадає під руйнівну дію АФК є КФК ГМ [31]. Генерація молекули АТФ та відповідно активність креатинфосфокінази є критичної для правильного функціонування ЦНС. В період після народження дитини рівень експресії креатинфосфокінази підвищується, що пов'язується з розвитком синаптичних мембран та всмоктування глутамату у везикули [173, 174]. Внаслідок окисної модифікації ферменту відбувається його швидка інактивація, що викликає аномальне розподілення КФК ГМ між розчинною та агрегованою фракціями [33]. Шляхом вестернблотингу та мас-спектрометрії підтверджено, що молекулярна маса мономеру КФК ГМ складає 43 кДа [244]. У гомогенатах клітин головного мозку хворих на Альцгеймера було зареєстровано зниження активності КФК ГМ на 86%, а також пригнічення синтезу ензиму на 14% [208, 211]

Протягом останніх двох десятирічь доведено існування взаємозв'язків між сімейством пероксиредоксинів, цитозольних, мітохондріальних та мембранних білків. Вчені *Rhee, Woo* вказують на те, що кожен представник сімейства Prxs взаємодіє із певними клітинними білками. Так наприклад, Prx I демонструє пряму взаємодію з андрогенним рецептором, апоптоз регулюючої кіназою 1 (ASK1), тирозиною кіназою c-Abl, трансляційним фактором eEF1A-2. У свою чергу PrxII виступає партнером циклін залежної кінази Cdk-p35, рецептору PDGF, фосфоліпази D1 та нещодавньою відкритого хеміхрому (окисненого гемоглобіну) [245]. Така взаємодія може бути індукована температурним чи окисним стресом [87, 11].

Тому на наступному етапі дисертаційної роботи ми проаналізували взаємодію білків PrxI/Prx II з КФК ГМ *in vitro* в клітинних лініях A549 та HeLa. Було показано, що трансфєкована Flag-КФК ГМ здатна взаємодіяти з ендogenous Prx I в клітинах за фізіологічних умов. Також необхідно відзначити посиленням інтеракції за інкубування клітин при підвищені температури. Не дивлячись на те, що Prx I має більшу кількість відомих білків партнерів [50], ко-трансфєкований HA-Prx II продемонстрував більш виразнішу асоціацію з Flag-КФК ГМ в лізатах клітин A549 та HeLa. Також, HA-PrxII мав температуро залежну взаємодію з Flag-КФК ГМ, де пік приходить на 46 °C. Щоб виключити можливість клітинної специфічності було підтверджено характер температурної преципітації HA-Prx II, з КФК ГМ на прикладі двох клітинних ліній A549 та HeLa. Отримані результати можуть свідчити про можливу температурну агрегацію білка КФК ГМ та олігомеризації Prx II викликану структурними перебудовами як відповідь на зміну фізіологічних умов [13, 87].

Вченим *Wood* та колегами [4] було продемонстровано виключну чутливість Prxs до інактивації молекулою пероксиду. Завдяки співставленню нуклеотидних послідовностей 2-Цис Prxs прокариот та еукаріот вдалось встановити, що спільні амінокислотні залишки з'єднані унікальною послідовністю Gly-Gly-Leu-Gly, або GGLG мотивом. Другою спільною характеристикою був С-термінальний кінець, асоційований з унікальною послідовністю Tyr-Phe, яка має назву YF мотив. У роботі вчені також продемонстрували існування двох стабільних конформацій спільних для 2-Цис Prxs. Одна з них представлена окисненим цистеїном активного центру C_POH та відповідає конформації “fully folded” (FF), інша - “locally unfolded” характеризується утворенням дисульфідного зв'язку між C_P та C_R чи іншим відновним агентом з тільною групою. Існування Prx I у відновленій формі за відсутності окисників показано на прикладі клітин Raw 264.7 [72]. В дослідженні було показано, що частина відновленого Prx I зменшилась на 25 % від загального Prx I в клітинах під дією 0,1 мМ пероксиду гідрогену та в

подальшому регенерувало до ~80 % окисненого білка. У випадку повного окиснення Prx I за інкубування з 0,5 мМ пероксиду гідрогену було регенеровано ~65% протягом 4 годин за відсутності окисника. В дослідженнях Woo 2010, Seo 2009 на прикладі клітин HeLa показано гіперокиснення Prx II за дії 0,05-0,5 мМ пероксиду гідрогену чи мМ концентрацій генераторів пероксиду гідрогена [83, 94]. Результати 2-Д електрофорезу вказували на мігрування гіперокисненого Prx II в бік низьких значень рН. Під час інкубування клітин HeLa та A549 0,1-1,0 мМ концентраціями пероксиду гідрогену ми спостерігали втрату спорідненості між ко-транскерованими білками HA-Prx II та Flag-КФК ГМ. Така поведінка може бути спровокована внутрішньоклітинним гіперокисненням білка Prx II надлишковою концентрацією пероксиду гідрогена. Важливість С-термінальної ділянки Prxs продемонстровано на прикладі Prx II, де внаслідок укорочення YF-домену Prx II втрачав здатність до гіперокиснення, і як наслідок до олігомеризації та формування високомолекулярних конгломератів [11]. Враховуючи всю важливість С-термінальної ділянки PrxII ми протестували її причетність до утворення білок-білкових зв'язків з КФК ГМ. Лізати клітин HeLa A549 з транкованими мутантними формами HA-Prx II ($\Delta C2$, $\Delta C5$, $\Delta C6$ та $\Delta C22$) в результаті ко-імунопреципітації мали еквівалентно виразний сигнал на імуноблоті. Це свідчить про високу афінність взаємодії між КФК ГМ та транкованими мутантами Prx II. З отриманих результатів ми можемо стверджувати, що С-термінальна ділянка білка Prx II може приймати участь у взаємодії з КФК ГМ, але не є критичною на прикладі клітинних ліній HeLa та A549. На відмінну від КФК ГМ в лабораторії професора Chae на прикладі UCH-L1 – білка-партнера Prx I/Prx II відкрито вплив довжини С-термінальної ділянки на ступінь афінності між двома білками. Використовуючи методи ко-імунопреципітації та вестерн-блотингу було показано зменшення сигналу на блоті у випадку транкованого YF- домену мутанту $\Delta C5$ /Prx II з надекспресованим UCH-L1 при порівнянні з WT-Prx II. В подальшому мутант $\Delta C22$ /Prx II демонструє

найменшу специфічність по відношенню до UCH-L1. Відповідно, можна підсумувати, що С-термінальний домен Prx II у випадку взаємодії з UCH-L1 є критичним на відмінну для КФК ГМ

Білки Prxs окрім пероксидазної та сигнальної функції виконують функцію білків-шаперонів, що на сьогодні є однією з найменш досліджених. Відомо, що Prx це димерний білок представлений $\alpha 2$ гомодимерами [63]. Пять $\alpha 2$ гомодимерів формують декамерний білок з високою пероксидазною активністю. Внаслідок утворення дисульфідних зв'язків між мономерами, відбувається дезінтеграція декамеру та втрата пероксидазної активності Prxs. Внаслідок гіперокиснення Prxs пероксидом гідрогена з концентрацією >50 мкММ відбувається збирання декамерів в олігомерні філаменти. Виведення Prx з гіперокисненого стану вимагає присутності ферменту Srx та молекули АТФ [105, 221]. Тригером до зміни структурної організації Prxs може служити температура, окисний стрес, чи сайт специфічне фосфорилування [13]. Під дією цих чинників відбувається олігомеризація декамерних структур до високомолекулярних конгломератів (High Molecular Weight). Таким чином, білки Prxs демонструють шаперонну активність шляхом олігомеризації, що спрямована на відновлення функціональної активності білків-партнерів з якими взаємодіють з Prxs [13, 246]. Прикладом прояву шаперонної активності PrxI є попередження денатурації та агрегації білка α -synuclein - головного компоненту тілець Леві, за розвитку хвороб Паркінсона та Альцгеймера [147, 13]. Завдяки шаперонним властивостям Prx II було інгібовано агрегацію ферменту цитрат синтази (CS) за температурного стресу. За співвідношення 3:1/PrxII:CS питома ферментативна активність цитрат синтази була повністю відновлена [11].

Ми продемонстрували, що рекомбінантна фосфокіназна КФК ГМ мала високу питому ферментативну активність за концентрації 30 нМ. За стресових температур ми спостерігали інгібування питомої ферментативної активності КФК ГМ. Така вразливість КФК ГМ була підтримана дослідженнями [30]. Чутливість КФК до окисного стресу підкріплено

результатами інкубування питомої активності ферменту за мілімолярними концентраціями пероксиду гідрогена [247, 248]. Важливість пероксиредоксинів як білків шаперонів продемонстрована багатьма дослідниками [11, 13, 81, 249, 250]. Людські Ptx I/Ptx II мають 78 % ідентичності в амінокислотній послідовності [88]. Як відмічено *Lee 2007* олігомерний стан Ptx I різниться від такого в Ptx II. Це зумовлено наявністю унікального цистеїнового залишку Цис⁸³, який приймає участь у формуванні високомолекулярних конгломератів. Було продемонстровано більшу ефективність цих комплексів проти супресії ферментативної активності під впливом теплового шоку у порівнянні з НМВ Ptx II. Важливість Цис⁸³ підтверджена заміною цистеїнового залишку на залишок серину 83, де мутант Ptx I/Ser⁸³ не зміг перешкодити температурній агрегації білка МДН. Для дослідження шаперонних властивостей пероксиредоксинів Ptx I/PtxII ми використали реакцію фосфорилування креатину за участі рекомбінантного білка КФК ГМ. Було продемонстровано захисні властивості Ptx I/PtxII за дії температури 42°C на реакційну суміш 10x, що містила КФК ГМ з концентрацією 300 нМ. Ми використали декілька співвідношень Ptx I, Ptx II до КФК ГМ з молярними концентраціями 1:1 (300 нМ), 1:5 (1,5 мкМ), 1:10 (3 мкМ) та 1:20 (6 мкМ). Нами було продемонстровано, що у випадку шаперону Ptx I залишкова питома активність КФК ГМ мала концентраційно-залежний характер. Пікова питома активність була зареєстрованою при концентрації Ptx I 3 мкМ та склала 87 % у порівнянні з контролем. Цікаво відмітити, на противагу Ptx I, Ptx II продемонстрував навіть кращі результати захисту питомої активності КФК ГМ за додавання пероксиду гідрогена. Ptx II проявляв виразну захисну властивість з експоненційним зростанням при максимальній концентрації 6 мкМ захист питомої активності склав 92 % по відношенню до контрольних значень.

Посилаючись на дослідження пероксиредоксину бактеріальних клітин AhpC було показано, що білок в окисному стані за концентрації 5 μ М має значно нижчу константу асоціації, що призводить до розпаду олігомерів на

димерні субодиниці [12]. Структурна різниця між олігомерними формами LMW та HMW сімейства Ptxs відображена на рівні активного центру при модифікації α -2 хеліксу та конформаційними змінами С-термінального кінця. Низьке рН, гіперокиснення та висока концентрація Ptxs сприяють формуванню HMW структур, водночас відновні умови (за присутності Ttx, Stx) та низька концентрація білка мають обернений ефект, що проявляється формуванням LMW [246]. Утворення філаментних структур шляхом стакингу декамерів стабілізує локальне розгорнення димерних/тетрамерних ділянок активного центру Ptxs, які стають енергетично доступними лише у випадку гіперокиснення чи протонування пероксидативного цистеїну C_p. Наші результати специфічної взаємодії білка-клієнта з димерними чи декамерними формами Ptx I/II підкріплені дослідженнями *Saccoccia et al.* [246]; частково розгорнуті поліпептиди, у відповідності до їх молекулярної маси взаємодіють з поверхнею білка Ptx у співвідношенні один білок партнер з одним декамером чи подвійним декамером. Окиснення C_p ініціює розгортання С-термінальної ділянки, що сприяє утворенню доступних гідрофобних ділянок для взаємодії з білком партнером. Під час оцінки шаперонних властивостей Ptx I ми спостерігаємо зниження фосфорилуючої активності КФК ГМ при максимальному співвідношенні 1:20. У відповідності до *Saccoccia et al* це може бути пов'язано зі зниженням кількості доступних гідрофобних поверхонь – наслідок накладання декамерних кілець та формування філаментних структур. Також можна спекулювати, оскільки КФК ГМ це досить великий димерний білок, його рефолдинг є значно складнішим, а ніж білкових молекул таких як UCL-N1 утворених маленькими димерами з декількома проміжними формами. Конкуренція між агрегацією білків та правильним укладанням амінокислотних послідовностей була досліджена на прикладі СК [251]. Вченими було продемонстровано, що присутність низьких концентрацій ізомеразі PPIase сприяло правильному рефолдингу КФК ГМ, водночас висока концентрація PPIase інгібувала реактивацію КФК ГМ. Ізомераза PPIase повністю пригнітила процес реактивації агрегованої

КФК ГМ за співвідношень 1:32 та 1:80. Відповідно, якщо ми спробуємо пояснити чому Prx I був не спроможний попередити агрегацію КФК ГМ за концентрацій 1:20 можна припустити наступне: негативна ефективність захисту КФК ГМ може бути пов'язана із зв'язуванням ранніх проміжних форм агрегованої КФК ГМ з Prx I, що як наслідок заважає успішному інгібуванню білкової агрегації.

Форми Prxs WT, C176S, та C54D мають різний характер дисоціації та шаперонну активність у відповідності до результатів *Konig et al.* [222]. Це підтверджено іншим дослідником *Barranco-Medina et al.* Який вказує на існування різновидів декамерних форм з різними структурними та функціональними властивостями [252]. Де відновлений декамер сприяє пероксидазній активності, а гіперокиснений – проявляє шаперонну функцію. Також, відмічено, що шаперонна активність Prxs не лімітована виключно декамерністю чи утворенням високомолекулярних конгломератів [222]. Відповідно, Prxs мають два принципіальні конфірмаційні стани, - декамерий та димерний, які відзначаються шаперонними властивостями. Як показано у дослідженнях *Chae* глутатіонування Prx I трансформує білок з декамерної форми у відновлену димерну з послідуною втратою шаперонової активності [51]

Укорочення С-термінального кінця надає пероксиредоксинам толерантності по відношенню до гіперокиснення та спричинює втрату шаперонової активності ензимів. Звідси, елімінування С-кінця Prxs робить їх більш ефективними пероксидазами [222]. Стає зрозумілим, що С-кінець може бути пререквізитом до функціональної різноманітності Prxs. Нещодавні дослідження також відзначають важливу участь димерних форм Prxs у кооперації з цільовими білками партнерами [222, 246]. Відповідно, ми можемо спекулювати про існування специфічного триггеру, який ініціює функціональну направленість білків під час стресу. Наша робота підкреслює нові можливості поведінки Prxs за умов взаємодії з цільовими білками-партнерами. Ми припускаємо, що не беручи до уваги загально прийняту

стратегію, у відповідності до якої, шаперонні комплекси H₂MW Prxs запобігають агрегації та втраті ферментативної активності білків-партнерів, існує інша своєрідна шаперонна активність, яка проявляється білками Prxs. Тобто досліджені Prx I/II, що взаємодіють з КФК ГМ/UCL-N1 та характеризуються сайт-специфічністю, ініціюють так звану «клієнт специфічну шаперонну активність», а у випадку прийнятої стратегії олігомеризації - демонструють «загальну шаперонну активність» до не специфічних білків-партнерів.

ВИСНОВКИ

Отримані результати досліджень розкривають біохімічні механізми специфічної взаємодії пероксиредоксинів з креатинофосфокіназою головного мозку людини за фізіологічних умов та за умов дії стресорів. Вперше встановлено взаємодію білків P_{rx} I/ P_{rx} II та КФК ГМ на прикладі клітинних ліній HeLa та A549 та оцінено зміну афінності взаємодії при підвищеній температурі та концентрації пероксиду гідрогену. Вперше продемонстровано шаперонні властивості білків P_{rx} I/ P_{rx} II по відношенню до КФК ГМ на прикладі специфічної реакції фосфорилування креатину. Проведено моделювання взаємодії декамерного білку P_{rx} II та димерної КФК ГМ за допомогою он-лайн докінг серверу для оцінки ділянок взаємодії двох білків. Перераховані вище дослідження розкривають нові аспекти функціонування пероксиредоксинів P_{rx} I, P_{rx} II у ролі білків шаперонів, що здатні проявляти захисні властивості по відношенню до білків партнерів. Це у свою чергу, може послужити підґрунтям для створення медичних препаратів для лікування нейродегенеративних хвороб.

1) Використовуючи підходи молекулярної біології було успішно клоновано послідовність гену *СКВ* білка КФК ГМ. Отримано рекомбінантний білок КФК ГМ шляхом експресії в бактеріальних клітинах *E.coli*, та проведено його очищення за допомогою хроматографічних методів розділення;

2) Оцінено питому ферментативну активність рекомбінантного білка КФК ГМ на прикладі специфічної реакції фосфорилування креатину. Показано, що питома активність КФК ГМ була інгібована на 36%, 57%, та 86% при температурі 38°C, 40°C та 42°C, а також на 17%, 58% та 74% за концентрації пероксиду гідрогену 0,25 мМ, 0,5 мМ та 1 мМ відповідно. Встановлено, що питома активність КФК ГМ є більш вразливою до температурного стресу, а ніж до пероксиду гідрогену;

3) Завдяки методу ко-імунопреципітації продемонстровано ендogenous взаємодію між експресованим білком КФК ГМ з P_{rx} I та ко-трансфектованим P_{rx} II на прикладі клітин HeLa та A549. Встановлено, що КФК ГМ є білком-партнером білків P_{rx} I та P_{rx} II. Показано, що P_{rx} II має вищу афінність до КФК ГМ у порівнянні з P_{rx} I в обох клітинних лініях A549 та HeLa. Продемонстровано послаблення взаємодії між P_{rx} II та КФК ГМ в клітинних лініях HeLa та A549 під час гіперокиснення, що вказує на не причетність олігомеризації до взаємодії між білками P_{rx} II та КФК ГМ;

4) Оцінено, що укорочення С-термінальної ділянки P_{rx} II суттєво не впливало на зміну афінності з білком КФК ГМ на клітинах ліній A549 та HeLa.

5) Показано, що за умов дії стресу білки P_{rx} I та P_{rx} II проявляють захисні властивості до інгібування КФК ГМ. У випадку P_{rx} I максимальні значення питомої активності КФК ГМ спостерігались за співвідношення 1:10, як за температури 42°C так і при 1 мМ пероксиду гідрогену. В той самий час, P_{rx} II демонстрував позитивний характер відновлення питомої активності КФК ГМ навіть за співвідношення 1:20.

6) За моделювання взаємодії між КФК ГМ та P_{rx} II за допомогою серверу ClusPro2.0 відмічено важливість амінокислотних залишків Arg 209, Ala 204 С-термінальної ділянки, та Lys 11, Arg 13 N-термінальної ділянки КФК ГМ, в також залишків Glu 167, Gln163, Asp181, Glu 192, Lys 196 С-термінальної ділянки P_{rx} II.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ogusucu R. Reaction of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxyxynitrite: rate constants by competitive kinetics / Ogusucu R., Rettori D., Munhoz D.C., Netto L.E. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 42, №3. – P. 326-334.
2. Peskin A.V. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents / Peskin A.V., Low F.W., Paton L.N., Maghzal G.J., Hampton M.B., and Winterbourn C.C. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, №16. – P. 11885-11892.
3. Winterbourn C.C. Reactivity of biological important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide / Winterbourn C.C., Metodiewa D // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 27, №3-4. – P. 322-328.
4. Wood Z.A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling / Wood Z.A., Poole L.B., and Karplus P.A. // *Science.* – 2003. – Vol. 300, №5619. – P. 650-653.
5. Rhee S.G. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides / Rhee S.G., Woo H.A., Kil I.S., Bae S.H. // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, №7. – P. 4403-4410.
6. Irwin M.E. Redox control of leukemia: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities / Irwin M.E., Rivera-Del Valle D., Chandra J. // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2013. – Vol. 18, №11. – P. 1349-1383.
7. Krapfenbauer K. Abberant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders / Krapfenbauer K., Engidawork E., Cairns N., et al. // *Brain Res.* – 2003. – Vol. 967, №1-2. – P. 152-160.
8. Ahsan M.K. Redox regulation of cell survival by the thioredoxin superfamily: an implication of redox gene therapy in the heart / Ahsan M.K., Leki I., Ray D., et al. // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2009. – Vol. 11, №11. – P. 2741-2758.

9. Abbasi A. Circulating peroxiredoxin 4 and type 2 diabetes risk: the prevention of renal and vascular endstage disease study / Abbasi A., Corpeleijn E., Gansevoort R.T. [et al.] // *Diabetologia*. – 2014. – Vol. 57, №9. – P. 1842-1849.
10. Netto L.E. The roles of peroxiredoxin and thioredoxin in hydrogen peroxide sensing and in signal transduction / Netto L.E., Antunes F. // *Mol. Cell*. – 2016. Vol. 39, №1. – P. 65-71.
11. Moon J.C. Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death / Moon J.C., Hah Y.S., Kim W.Y., et al. // *J. Biol. Chem*. – 2005. – Vol. 280, №31. – P. 28775-28784.
12. Wood Z.A. Dimer to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-Cysteine peroxiredoxins. / Wood Z.A., Poole L.B., Hantgan R.R., et al. // *Biochemistry*. – 2002. – Vol. 30, №17. – P. 5493-5504.
13. Jang H.H. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function / Jang H.H., Lee K.O., Chi Y.H., et al. // *Cell*. – 2004. – Vol. 117, №5. – P. 625-635.
14. Kim K.K. Crystal structure of a small heat-shock protein / Kim K.K., Kim R., Kim S.H. // *Nature*. – 1998. – Vol. 394, №6693. – P. 595-599.
15. Haley D.A. The small heat-shock protein, alphaB-crystallin, has a variable quaternary structure / Haley D.A., Horwitz J., and Stewart P.L. // *J. Mol. Biol*. – 1998. – Vol. 277, №1. – P. 27-35.
16. Wallimann T. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis / Wallimann T., Wyss M., Brdiczka D., et al. // *Biochem J*. – 1992. – Vol. 281, №1. – P. 21-40.

17. McLeish M.J. Relating structures to mechanism in creatine kinase / McLeish M.J., and Kenyon G.L. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 40, №1. – P. 1-20.
18. Kaddurah-Daouk R. Induction of a cellular enzyme for energy metabolism by transforming domains of adenovirus E1a / Kaddurah-Daouk R., Lillie J.W., Daouk G.H. // *Mol. Cell Biol.* – 1990. – Vol. 10, №4. – P. 1476-1483.
19. Zhao J. Mouse p53 represses the rat brain creatine kinase gene but activates the rat muscle creatine kinase gene / Zhao J., Schmiege F.I., Simmons D.T., et al. // *Mol. Cell Biol.* – 1994. – Vol. 14, №12. – P. 8483-8492.
20. Bergnes G. Creatine and phosphocreatine analogs: anticancer activity and enzymatic analysis / Bergnes G., Yuan W., Khandekar V.S., et al. // *Oncol. Res.* – 1996. – Vol. 8, №3. – P. 121-130.
21. Wirz T. A unique chicken B-creatine kinase gene gives rise to two B-creatine kinase isoproteins with distinct N termini by alternative splicing / Wirz T., Brandle U., Soldati T., et al. // *J. Mol. Biol.* – 1990. – Vol. 265, №20. – P. 11656-11666.
22. Soldati T. Alternative ribosomal initiation gives rise to chicken brain-type creatine kinase isoproteins with heterogeneous amino termini / Soldati T., Schafer B.W., Perriard J.C. // *J. Mol. Biol.* – 1990. – Vol. 265, №8. – P. 4498-4506.
23. Quest A.F. Phosphorylation of chicken brain-type creatine kinase affects a physiologically important kinetic parameters and gives rise to protein microheterogeneity in vivo / Quest A.F., Soldati T., Hemmer W., et al. // *FEBS Lett.* – 1990. – Vol. 269, №2. – P. 457-564.
24. Zhou H.M. Comparison of activity and conformation changes during refolding of urea-denatured creatine kinase / Zhou H.M., and Tsou C.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1986. – Vol. 869, №1. – P. 69-74.
25. Yao Q.Z. Conformational changes of creatine kinase during guanidine denaturation / Yao Q.Z., Hou L.X., Zhou H.M., et al. // *Sci. Sin. B.* – 1982. – Vol. 25, №11. – P. 1186-1193.

26. Lyubarev A.E. Two-state irreversible thermal denaturation of muscle creatine kinase / Lyubarev A.E., Kurganov B.I., Orlov V.N., et al. // *Biophys. Chem.* – 1999. – Vol. 79, №3. – P. 199-204.
27. Li S. Aggregation of creatine kinase during refolding and chaperonin-mediated folding of creatine kinase / Li S., Bai J.H., Park Y.D., et al. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 33, №3. – P. 279-286.
28. Hahn H.S. Aggregation and folding of recombinant human creatine kinase / Hahn H.S., Park Y.D., Lee J.R., et al. // *J. Protein. Chem.* – 2003. – Vol. 22, №6. – P. 563-570.
29. Kurganov B.I. Analysis of differential scanning calorimetry data for proteins. Criteria of validity of one-step mechanism of irreversible protein denaturation / Kurganov B.I., Lyubarev A.E., Sanchez-Ruiz J.M., et al. // *Biophys. Chem.* – 1997. – Vol. 69, №2-3. – P. 125-135.
30. Gao Y.S. Isoenzyme-specific thermostability of human cytosolic creatine kinase / Gao Y.S., Zhao T.J., Chen Z., et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2010. – Vol. 47, №1. – P. 27-32.
31. Aksenov M. Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain / Aksenov M., Aksenova M., Butterfield D.A., et al. // *J. Neurochem.* – 2000. – Vol. 74, №6. – P. 2520-2527.
32. Aksenov M.Y. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease / Aksenov M.Y., Aksenova M.V., Butterfield D.A., et al. // *Neuroscience.* – 2001. – Vol. 103, №2. – P. 373-383.
33. David S. Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: correlation of reduced enzyme activity and active site photolabeling with aberrant cytosol-membrane partitioning / David S., Shoemaker M., and Haley B.E. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 1998. – Vol. 54, №2. – P. 276-287.
34. Kim J. Reduced creatine kinase as a central and peripheral biomarker in Huntington's disease / Kim J., Amante D.J., Moody J.P., et al. // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2010. – Vol. 1802, №2. – P. 276-287.

35. Rhee S.G. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling / Rhee S.G., Chae H.Z., and Kim K. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 38, №12. – P. 1543-1552.
36. Jaya N. Substrate binding site flexibility of the small heat shock protein molecular chaperones / Jaya N., Garcia V., Vierling E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106, №37. – P. 15604-15604.
37. Harris J. The protein released from intact erythrocyte ghosts at low ionic strength / Harris J. // *Biochem. J.* – 1971. – Vol. 122, №5. – P. 38-40.
38. Kim K.H. Sequence of peptide from *Saccharomyces cerevisiae* glutamine synthetase. N-terminal peptide and ATP-binding domain / Kim K.H., Rhee S.G. // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263, №2. – P. 833-838.
39. Chae H.Z. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes / Chae H.Z., Robison K., Poole L.B., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1994. – Vol. 91, N15. – P. 7017-7021.
40. Rhee S. G. Antioxidant defence mechanisms: a new thiol-specific antioxidant enzyme / Rhee S. G., Kim K.H., Chae H.Z., et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1994. – Vol. 738. – P. 86-92.
41. Chae H.Z. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast / Chae H.Z., Chung S.J., and Rhee S.G. // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269, №44. – P. 27670-27678.
42. Storz G. An alkyl hydroperoxide reductase induced by oxidative stress in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: genetic characterization and cloning of ahp / Storz G., Jacobson F.S., Tartaglia L.A., et al. // *J. Bacteriol.* – 1989. – Vol. 171, №4. – P. 2049-2055.
43. Chae H.Z. A thiol-specific antioxidant and sequence homology to various proteins of unknown function / Chae H.Z., Rhee S.G., // *Biofactors.* – 1994. – Vol. 4, №3-4. – P. 177-180.

44. Iuchi Y. Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress / Iuchi Y., Okada F., Tsunoda S., et al. // *Biochem. J.* – 2009. – Vol. 419, №1. – P. 149-158.
45. Shau H. Identification of natural killer enhancing factor as a major antioxidant in human red blood cells / Shau H., Kim A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – Vol. 199, №1. – P. 83-88.
46. Immenschun S. Expression of the mRNA of heme-binding protein 23 is coordinated with that of heme oxygenase-1 by heme and heavy metals in primary rat hepatocytes and hepatoma cells / Immenschun S., Iwahara S., Satoh H. // *Biochemistry.* – 1995. – Vol. 34, №41. – P. 13407-13411.
47. Rakhmetov A.D. Molecular Cloning of Human Brain-Type Creatine Kinase Gene into Bacteria Expression Vectors PET-17B, PET-14B and Flag Tagged Mammalian Expression Vector PCMV / Rakhmetov A.D., Lee S.P., Ostapchenko L.I., Chae H.Z. // *Vistnyk KNU* – 2013. – 64, N2, – P. 58-61.
48. Yamamoto T. Cloning of a housekeeping-type gene MER5 preferentially expressed in murine erythroleukemia cells / Yamamoto T., Matsui Y., Natori S., et al. // *Gene.* – 1989. – Vol. 80, N2. – P. 337-343.
49. Tavender T.J. Peroxiredoxin IV protects cells from oxidative stress by removing H₂O₂ produced during disulphide formation / Tavender T.J., Bulleid N.J. // *J. Cell Sci.* – 2010. – Vol. 123, №15. – P. 2672-2679.
50. Rhee S.G. Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones / Rhee S.G., and Woo H.A. // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2011. – Vol. 15, №3. – P. 781-794.
51. Chae H.Z. Protein glutathionylation in the regulation of peroxiredoxins: a family of thiol-specific peroxidases that function as antioxidant, molecular chaperones, and signal molecules / Chae H.Z., Oubrahim H., Park J.W., et al. // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2012. – Vol. 16, №6. – P. 506-523.

52. Kristensen P. Properties of thiol-specific anti-oxidant protein or calpromotion in solution / Kristensen P., Rasmussen D.E., Kristensen B.I. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – Vol. 262, №1. – P. 127-131.
53. Wood Z.A. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins / Wood Z.A., Schroder E., Robin Harris J., et al. // *Trends Biochem. Sci.* – 2003. – Vol. 28, №1. – P. 32-40.
54. Chae H.Z. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin / Chae H.Z., Kim H.J., Kang S.W., et al. // *Diabetes Research and Clinical Practice.* – 1999. – Vol. 45, №2-3. – P. 101-112.
55. Biteau B. ATP-dependent reduction of Cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin / Biteau B., Labarre J., Toledano M.B. // *Nature.* – 2003. – Vol. 425, №6961. – P. 980-984.
56. Hirotsu S. Crystal structure of multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product / Hirotsu S., Abe Y, Okada K., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1999. – Vol. 96, №22. – P. 12333-12338.
57. Declercq J.P. Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1,5Å resolution / Declercq J.P., Evrard C., Clippe A., et al. // *J. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 311, №4. – P. 751-759.
58. Knoops B. Cloning and characterization of AOEB166, a novel mammalian antioxidant enzyme of the peroxiredoxin family / Knoops B., Clippe A., Bogard C., et al. // *J. Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 274, №43. – P. 30451-30458.
59. Knoops B. Peroxiredoxin 5: structure, mechanism, and function of the mammalian atypical 2-Cys peroxiredoxin / Knoops B., Goemaere J., Van der Eecken V., et al. // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2011. – Vol. 15, №3. – P. 817-829.
60. Kang S.W. Characterization of mammalian peroxiredoxin that contains one conserved Cysteine / Kang S.W., Baines I.C., Rhee S.G. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, №11. – P. 6303-6311.

61. Fisher A. Peroxiredoxin 6: A bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities / Fisher A. // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2011. – Vol. 15, №3. – P. 831-844.
62. Hall A. Typical 2-Cys peroxiredoxins – structures, mechanisms and functions / Hall A., Karplus P.A., Poole L.B. // *FEBS J.* – 2009. – Vol. 276, №9. – P. 2469-2477.
63. Hall A. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins / Hall A., Nelson K., Poole L.B., et al. // *Antioxid. Redox Signal.* – 2011. – Vol. 15, №3. – P. 795-815.
64. Butterfield L.H. From cytoprotection to tumor suppression: the multifactorial role of peroxiredoxins / Butterfield L.H., Merino A., Golub S.H., et al. // *Antioxid. Redox Signal.* – 1999. – Vol. 1, №4. – P. 385-402.
65. Karihtala P. Peroxiredoxins in breast cancer / Karihtala P., Mantyniemi A., Kang S.W., et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9, №9. – P. 3418-3424.
66. Neumann C.A. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumor suppression / Neumann C.A., Krause D.S., Carman C.V., et al. // *Nature.* – 2003. – Vol. 424, №6948. – P. 561-565.
67. Wang X. Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidation stress / Wang X., Phelan S.A., Forsman-Semb K., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, №27. – P. 25179-25190.
68. Wang Y. Transgenic mice overexpressing peroxiredoxin 6 show increased resistance to lung injury in hypoxia / Wang Y., Phelan S.A., Manevich Y., et al. // *Am. J. Respir. Cell Mol Biol.* – 2006. – Vol. 34, №4. – P. 481-486.
69. Krotopov A. Constitutive expression of the human peroxiredoxin V gene contributes to protection of the genome from oxidative DNA lesions and to suppression of transcription of noncoding DNA / Krotopov A., Serikov V., Suh J., et al. // *FEBS J.* – 2006. – Vol. 273, №12. – P. 2607-2617.
70. Yang K.S. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation on the catalysis site Cysteine to Cysteine-sulfinic acid

- / Yang K.S., Kang S.W., Woo H.A., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, №41. – P. 38029-38036.
71. Schroder E. Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution / Schroder E., Littlechild J.A., Lebedev A.A., et al. // *Structure* – 2000. – Vol. 8, №6. – P. 605-615.
72. Woo H.A. Reversible oxidation of the active site Cysteine of peroxiredoxins to Cysteine sulfinic acid. Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized Cysteine-containing sequence / Woo H.A., Kang S.W., Kim H.K., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, №48. – P. 47361-47364.
73. Woo H.A. Reduction of Cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-Cys peroxiredoxins / Woo H.A., Jeong W., Chang T.S., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, №5. – P. 3125-3128.
74. Chang T.S. Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation / Chang T.S., Jeong W., Choi S.Y., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, №28. – P. 25370-25376.
75. Jeong W. Molecular mechanism of the reduction of Cysteine sulfinic acid of peroxiredoxin to Cysteine by mammalian sulfiredoxin / Jeong W., Park S.J., Chang T.S., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281, №20. – P. 14400-14407.
76. Souza J.M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite / Souza J.M., Radi R. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998. – Vol. 360, №2. – P. 187-194.
77. Mallis R.J. Irreversible thiol oxidation in carbonic anhydrase III: protection by S-glutathiolation and detection in aging rats / Mallis R.J., Hamann M.J., Zhao W., et al. // *Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 383, №3-4. – P. 649-662.
78. Fu X. Hydrochlorous acid oxygenates the Cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase / Fu X., Kassim S.Y.,

- Parks W.C., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, №44. – P. 41279-41287.
79. Canet-Aviles R.M. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to Cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization / Canet-Aviles R.M., Wilson M.A., Miller D.W., et al. // *Prot. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101, №24. – P. 9103-9108.
80. Chang T.S. Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to Cysteine / Chang T.S., Jeong E., Woo H.A., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, №49. – P. 50994-51001.
81. Lim J.C. Irreversible oxidation of the active-site Cysteine of peroxiredoxin to Cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity / Lim J.C., Choi H.I., Park Y.S., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, №43. – P. 28873-28880.
82. Ishii T. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity / Ishii T., Warabi E., Yanagawa T. // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2012. – Vol. 50, №2. – P. 91-105.
83. Woo H.A. Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H₂O₂ accumulation for cell signaling / Woo H.A., Yim S.H., Shin D.H., et al. // *Cell.* – 2010. – Vol. 140, №4. – P. 517-528.
84. Kim S.Y. A novel function of peroxiredoxin 1 (Prx-1) in apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-mediated signaling pathway / Kim S.Y., Kim T.J., Lee K.Y. // *FEBS Lett.* – 2008. – Vol. 582, №13. – P. 1913-1918.
85. Kitano K. Stimulation of peroxidase activity by decamerization related to ionic strength: AhpC protein from *Amphibacillus xylanus* / Kitano K., Niimura Y., Nishiyama Y., et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, №2. – P. 313-319.
86. Nelson K.J. Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis /

- Nelson K.J., Knutson S.T., Soito L., et al. // *Proteins*. – 2011. – Vol. 79, №3. – P. 947-964.
87. Saccoccia F. Moonlighting by different stressors: crystal structure of the chaperone species of a 2-Cys peroxiredoxin / Saccoccia F., Di Micco P., Boumis G., et al. // *Structure*. – 2012. – Vol. 20, №3. – P. 429-439.
88. Lee W. Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: the unique presence of Cys83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 and Prx 2 / Lee W., Choi K.S., Riddell J., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, №30. – P. 22011-22022.
89. Koo K.H. Regulation of thioredoxin peroxidase activity by C-terminal truncation / Koo K.H., Lee S., Jeong S.K., et al. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – Vol. 397, №2. – P. 312-318.
90. Zhao W. Protection of peroxiredoxin II on oxidative stress-induced cardiomyocyte death and apoptosis / Zhao W., Fan G.C., Zhang Z.G., et al. // *Basic. Res. Cardiol.* – 2009. – Vol. 104, №4. – P. 377-389.
91. Choi M.H. Regulation of PDGF signaling and vascular remodeling by peroxiredoxin II / Choi M.H., Lee I.K., Kim G.W., et al. // *Nature*. – 2005. – Vol. 435, №7040. – P. 347-353.
92. Zhang P. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2 / Zhang P., Liu B., Kang S.W., et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, №49. – P. 30615-30618.
93. Neumann C.A. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling / Neumann C.A., Cao J., Manevich Y. // *Cell Cycle*. – 2009. – Vol. 8, №24. – P. 4072-7078.
94. Seo J.H. Novel protective mechanism against irreversible hyperoxidation of peroxiredoxin: N α -terminal acetylation of human peroxiredoxin II / Seo J.H., Lim J.C., Lee D.Y., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, №20. – P. 13544-13465.
95. Yanagawa T. Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors / Yanagawa T., Ishikawa T., Ishii T., et al. // *Cancer. Lett.* – 1999. – Vol. 145, №1-2. – P. 127-132.

96. Shen J. Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry / Shen J., Person M.D., Zhu J., et al. // *Cancer. Lett.* – 1999. – Vol. 145, №1-2. – P. 127-132.
97. Morinaka A. Oligomeric peroxiredoxin-I is an essential intermediate for p53 to activate MST1 kinase and apoptosis / Morinaka A., Funato Y., Uesugi K., et al. // *Oncogene.* – 2011. – Vol. 30, №40. – P. 4208-4218.
98. Cao J. Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulation PTEN/AKT activity / Cao J., Schulte J., Knight A. // *EMBO J.* – 2009. – Vol. 28, №10. – P. 1505-1517.
99. Fratelli M. Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes / Fratelli M., Demol H., Puype M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, №6. – P. 3505-3510.
100. Fratelli M. Identification of proteins undergoing glutathionylation in oxidatively stressed hepatocytes and hepatoma cells / Fratelli M., Demol H., Puype M., et al. // *Proteomics.* – 2003. – Vol. 3, №7. – P. 1154-1161.
101. Park J.W. Deglutathionylation of 2-Cys peroxiredoxin is specifically catalyzed by sulfiredoxin / Park J.W., Mieyal J.J., Rhee S.G., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, №35. – P. 23364-23374.
102. Manevich Y. Activation of the antioxidant enzyme 1-Cys peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST / Manevich Y., Feinstein S.I., Fisher A.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101, №11. – P. 3780-3785.
103. Sayed A.A. Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni* / Sayed A.A., Williams D.L. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, №25. – P. 26159-26166.
104. Park J.W. Glutathionylation of peroxiredoxin I induces decamer to dimer dissociation with concomitant loss of chaperone activity / Park J.W., Piszczek G., Rhee S.G., et al. // *Biochemistry.* – 2011. – Vol. 50, №15. – P. 3204-3410.

105. Matsumura T. Dimer-oligomer interconversion of wild-type and mutant rat 2-Cys peroxiredoxin: disulfide formation at dimer-dimer interfaces is not essential for decamerization / Matsumura T., Okamoto K., Iwahara S., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, №1. – P. 284-293.
106. Rakhmetov A.D. Prx II and CKBB protein interaction under physiological and thermal stress conditions in A549 and HeLa cells / Rakhmetov A.D., Lee S.P., Ostapchenko L.I., Chae H.Z. // *Ukr. Biochem. J.* – 2016. – 88, N 1, – P. 61-68.
107. Lindquist S. The heat-shock proteins / Lindquist S., Craig E.A. // *Annu. Rev. Genet.* – 1988. – Vol. 22. – P. 631-677.
108. Freeman B.C. The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native proteins and protein refolding / Freeman B.C., Morimoto R.I. // *EMBO J.* – 1996. – Vol. 15, №12. – P. 2969-2979.
109. Kong X.L. High-affinity capture of proteins by diamond nanoparticles for mass spectrometric analysis / Kong X.L., Huang L.C., Hsu C.M., et al. // *Anal. Chem.* – 2005. – Vol. 77, №1. – P. 259-265.
110. Bukau B. Molecular chaperones and protein quality control / Bukau B., Weissman J., Horwich A. // *Cell.* – 2006. – Vol. 125, №3. – P. 443-451.
111. Moqk A. Common and specific mechanism of AAA+ proteins involved in protein quality control / Moqk A., Haslberger T., Tessarz P., et al. // *Biochem. Soc. Trans.* – 2008. – Vol. 36, №1. – P. 120-125.
112. Anelli T. Protein quality control in the early secretory pathway / Anelli T., Satia R. // *EMBO J.* – 2008. – Vol. 27, №2. – P. 315-327.
113. Goloubinoff P. The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together / Goloubinoff P., De Los Rios P // *Trends. Biochem. Sci.* – 2007. – Vol. 32, №8. – P. 372-380.
114. Saibil H.R. Chaperones machines in action / Saibil H.R. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2008. – Vol. 18, №1. – P. 35-42.

115. Lindquist S. The heat-shock response / Lindquist S. // *Annu. Rev. Biochem.* – 1986. – Vol. 55. – P. 1151-1191.
116. Iadecola C. Cerebral ischemia and inflammation / Iadecola C., Alexander M. // *Curr. Opin. Neurol.* – 2001. – Vol. 14, №1. – P. 89-94.
117. Mattson M.P. Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders / Mattson M.P. // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2006. – Vol. 11-12, №1. – P. 1997-2006.
118. Mayer M.P. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism / Mayer M.P., Bukau B. // *Cell. Mol. Life. Sci.* – 2005. – Vol. 62, №6. – P. 670-684.
119. Kalmar B. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress / Kalmar B., Greensmith L. // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2009. – Vol. 61, №4. – P. 310-318.
120. McClellan A.J. Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause / McClellan A.J., Frydman J. // *Nat. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 3, №2. – P. 51-53.
121. Alberti S. BAG-1 a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions / Alberti S., Esser C., Hohfeld J. // *Cell. Stress. Chaperones.* – 2003. – Vol. 8, №3. – P. 225-231.
122. Ballinger C.A. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions / Ballinger C.A., Connell P., Wu Y., et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 1999. – Vol. 19, №6. – P. 4535-4545.
123. Rosser M.F. Chaperone functions of the E3 ubiquitin ligase CHIP / Rosser M.F., Washburn E., Muchowski P.J., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 283, №31. – P. 4535-4545.
124. Hosler M.R. Targeted disruption of specific steps of the ubiquitin-proteasome pathway by oxidation in lens epithelial cells / Hosler M.R., Wang-Su S.T., Wagner B.J. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2003. – Vol. 35, №5. – P. 685-697.

125. Marques C. The triage of damaged proteins: degradation by the ubiquitin-proteasome pathway or repair by molecular chaperones / Marques C., Guo W., Pereira P., et al. // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20, №6. – P. 741-743.
126. Annuziato L. Apoptosis induced in neuronal cell by oxidative stress: role played caspases and intracellular calcium ions / Annuziato L., Amoroso S., Pannaccione A., et al. // *Toxicol. Lett.* – 2003. – Vol. 139, №2-3. – P. 125-133.
127. Yuan J. Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblasts / Yuan J., Murrell G.A., Trickett A., et al. // *Biochim. Biophys Acta.* – 2003. – Vol. 1641, №1. – P. 35-41.
128. Beere H.M. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome / Beere H.M., Wolf B.B., Cain K., et al. // *Nat. Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 2, №8. – P. 469-475.
129. Saleh A. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70 / Saleh A., Srinivasula S.M., Balkir L., et al. // *Nat. Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 2, №8. – P. 476-483.
130. Matsumori Y. Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxia/ischemic brain injury / Matsumori Y., Hong S.M., Aoyama K., et al. // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* – 2005. – Vol. 25, №7. – P. 899-910.
131. Beere H.M. Stress management – heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis / Beere H.M., Green D.R. // *Trends. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 11, №1. – P. 6-10.
132. Gorman A.M. Hsp27 inhibits 6-hydroxydopamine-induced cytochrome c release and apoptosis in PC12 cells / Gorman A.M., Szegezdi E., Quigney D.J., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 327, №3. – P. 801-810.

133. Schepers H. HSP27 protects AML cells against VP-16-induced apoptosis through modulation of p38 and c-Jun / Schepers H., Geugien M., Van Der Toorm M. // *Exp. Hematol.* – 2005. – Vol. 33, №6. – P. 660-670.
134. Garrido C. HSP27 protects cytochrome c-dependent activation of procaspase-9 / Garrido C., Bruey J.M., Fromentin A. // *FASEB. J.* – 1999. – Vol. 13, №14. – P. 660-670.
135. Rabilloud T. Early events in erythroid differentiation: accumulation of the acidic peroxidoxin (PRP/TSA/NKEF-B) / Rabilloud T., Barthier R., Vincon M., et al // *Biochem. J.* – 1995. – Vol. 312, №3. – P. 699-705.
136. Moore R.B. Reconstitution of Ca(2+)-dependent K⁺ transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein / Moore R.B., Mankad M.V., Shriver S.K., et al. // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266, №28. – P. 18964-18968.
137. Plishker G.A. Calcium-activated potassium transport and high molecular weight forms of calpromotin / Plishker G.A., Chevalier D., Seinsoth L., et al. // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267, №30. – P. 21839-21843.
138. Joiner C.H. Cation transport and volume regulation in sickle red blood cells / Joiner C.H. // *Am. J. Physiol.* – 1993. – Vol. 264, №1. – P 251-270.
139. Moore R.B. Protein 7.2b of human erythrocyte membranes binds to calpromotin / Moore R.B., Shriver S.K. // *Biochem Biophys. Res Commun.* – 1993. – Vol. 264, №1. – P. 251-270.
140. Harris J.R. Comparison of the decameric structure of peroxiredoxin-II by transmission electron microscopy and X-ray crystallography / Harris J.R., Schroder M.N., Isupov M.N., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – Vol. 1547, №2. – P. 221-134.
141. Kumsta C. Redox regulated chaperones. / Kumsta C., Jakob U. // *Biochemistry.* – 2009. – Vol. 48, №22. – P. 4666-4676.

142. Barranco-Medina S. The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. / Barranco-Medina S., Lazaro J.J., Dietz K.J. // FEBS Lett. – 2009. – Vol. 583, №12. – P. 1809-1816.
143. Gourlay L.J. Structure-function analysis of recombinant substrate protein 22 kDa (SP-22). A mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin organized as a decameric toroid. / Gourlay L.J., Bhella D., Kelly S.M., et al. // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, №35. – P. 32631-32637.
144. Phalen T.J. Oxidation state governs structural transitions in peroxiredoxin II that correlate with cell cycle arrest and recovery / Phalen T.J., Weirather K., Deming P.B., et al. // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 175, №5. – P. 779-789.
145. Logan C. Cloning, overexpression, and characterization of peroxiredoxin and NADH peroxiredoxin reductase from *Thermus aquaticus*. / Logan C., Mayhew S.G. // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275, №39. – P. 30019-30028.
146. Chauhan R. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv alkyl hydroperoxidase AhpC points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity. / Chauhan R., Mande S.C. // Biochem. J. – 2001. – Vol. 354, №1. – P. 209-215.
147. Kim K.S. Aggregation of alpha-synuclein induced by the Cu, Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system / Kim K.S., Choi S.Y., Kwon H.Y., et al. // Free. Radic. Biol. Med. – 2002. – Vol. 32, №6. – P. 544-550.
148. Seraydarian M.W. The role of the creatine-phosphorylcreatine system in muscle / Seraydarian M.W., Abbott B.C. // J. Mol. Cell. Cardiol. – 1976. – Vol. 8, №10. – P. 741-746.
149. Sahlin K. The creatine kinase reaction: a simple reaction with functional complexity / Sahlin K., Harris R.C. // Amino. Acids. – 2011. – Vol. 40, №5. – P. 1363-1367.

150. Grosse R. Coordinate interplay between (Na⁺+K⁺)-ATPase and creatine phosphokinase optimizes (Na⁺/K⁺)-transport across the membrane of vesicles formed the plasma membrane of cardiac muscle cell / Grosse R., Spitzer E., Kupriyanov V.V., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – Vol. 603, №1. – P. 142-156.
151. Guerrero M. L. Metabolic support of Na⁺ pump in apically permeabilized A6 kidney cell epithelia: role of creatine kinase / Guerrero M. L., Beron J., Spindler B., et al. // *Am. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 272, №2 Pt 1. – P. 697-706.
152. Eppenberger H.M. The comparative enzymology of creatine kinases. Isolation and characterization from chicken and rabbit tissues / Eppenberger H.M., Dawson D.M., Kaplan N.O. // *J. Biol. Chem.* – 1967. – Vol. 242, №2. – P. 204-209.
153. Bong S.M. Structural studies of human brain-type creatine kinase complexed with the ADP-Mg²⁺-NO₃ creatine transition-state analogue complex / Bong S.M., Moon J.H., Nam K.H., et al. // *FEBS. Lett.* – 2008. – Vol. 582, №28. – P. 3959-3965.
154. Jourden M.J. Transition state stabilization by six arginines clustered in the active site of creatine kinase / Jourden M.J., Geiss P.R., Thomenius M.J., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – Vol. 1751, №2. – P. 178-183.
155. Brown C.S. Reaction of reactive sulfhydryl groups of creatine kinase with dansyl chloride / Brown C.S., Cunningham L.W. // *Biochemistry.* – 1987. – Vol. 9, №20. – P. 3878-3885.
156. Reddy S.R. Inhibition of creatine kinase by iodoalkanes. Further appraisal of the essential nature of the reactive thiol group / Reddy S.R., Watts D.C. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1979. – Vol. 569, №1. – P. 109-113.
157. Hornemann T. Why is creatine kinase a dimer? Evidence for cooperativity between the two subunits / Hornemann T., Rutishauser D., Wallimann T. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1480, №1-2. – P. 365-373.

158. Bickerstaff G.F. Creatine kinase: a review of some recent work on the mechanism and subunit behavior of the enzyme / Bickerstaff G.F., Price N.C. // *Int. J. Biochem.* – 2000. – Vol. 1480, №1-2. – P. 365-373.
159. Morrison J.F. The mechanism of the reaction catalyzed by adenosine triphosphate-creatine phosphotransferase / Morrison J.F., James E. // *Biochem. J.* – 1965. – Vol. 97, №1-2. – P. 37-52.
160. Cox J.M. Generation of an active monomer of rabbit muscle creatine kinase by site-directed mutagenesis: the effect of quaternary structure on catalysis and stability / Cox J.M., Davis C.A., Chan C., et al. // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42, №7. – P. 1863-1871.
161. Lowe M.T. Dissociated expression of mitochondrial and cytosolic creatine kinase in the human brain: a new perspective on the role of creatine in brain energy metabolism / Lowe M.T., Kim E.H., Faull R.H. // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* – 2013. – Vol. 33, №8. – P. 1298-1306.
162. Friedman D.L. Compartmentation of multiple forms of creatine kinase in the distal nephron of the rat kidney / Friedman D.L., Perryman M.B. // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266, №33. – P. 22404-22410.
163. Iyengar M.R. Expression of creatine kinase isoenzyme during oogenesis and embryogenesis in the mouse / Iyengar M.R., Iyengar C.W., Chen H.Y., et al. // *Dev. Biol.* – 1983. – Vol. 96, №1. – P. 263-268.
164. Ohtsuki S. The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain / Ohtsuki S., Tachikawa M., Takanaga H., et al. // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* – 2002. – Vol. 22, №11. – P. 1327-1335.
165. Tachikawa M. Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest a novel neuron-glia relationship for brain energy homeostasis / Tachikawa M., Fukaya M., Terasaki T., et al. // *Eur. J. Neurosci.* – 2004. – Vol. 20, №1. – P. 144-160.

166. Webb T.I. Structure of an intermediate in the unfolding of creatine kinase / Webb T.I., Morris G.E. // (2001). *Protein* – 2001. – Vol. 42, №2. – P. 269-278.
167. Zhao T.J. Catalysis of creatine kinase refolding by protein disulfide isomerase involves disulfide cross-link and dimer to tetramer switch / Zhao T.J., Ou W.B., Xie Q., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, №14. – P. 13470-13476.
168. Zhi W. Renaturation of citrate synthase: influence of denaturant and folding assistants / Zhi W., Landry S.J. Gierasch L.M., et al. // *Protein. Sci.* – 1992. – Vol. 1, №4. – P. 522-529.
169. Guise A.D. Protein folding in vivo and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies / Guise A.D., West S.M., Chaudhuri J.B. // *Protein. Sci.* – 1992. – Vol. 1, №4. – P. 522-529.
170. Ames A. CNS energy metabolism as related to function / Ames A. 3rd // *Brain. Res. Brain. Res. Rev.* – 2000. – Vol. 34, №1-2. – P. 42-68.
171. Enjolras N. Inhibition of ubiquitous mitochondrial creatine kinase exoression in Hela cells by an antisense oligodeoxynucleotide / Enjolras N., Godinot C. // *Mol. Cell. Biochem.* – 1997. – Vol. 167, №1-2. – P. 113-125.
172. Holtzman D. Functional maturation of ceratine kinase in rat brain / Holtzman D., Tsuji M., Wallimann T., et al. // *Dev. Neurosci.* – 1993. – Vol. 15, №3-5. – P. 261-270.
173. Friedhoff A.J. Creatine kinase isoenzyme associated with synaptosomal membrane and synaptic vesicles / Friedhoff A.J., Lerner M.H. // *Life. Sci.* – 1977. – Vol. 20, №5. – P. 867-873.
174. Xu C.J. Phosphocreatine-dependent glutamate uptake by synaptic vesicles. A comparison with atp-dependent glutamate uptake / Xu C.J., Klunk W.E., Kanfer J.N., et al. // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271, №23. – P. 13435-13440.
175. Barrantes F.J. Isolation and characterization of acetylcholine receptor membrane-associated (nonreceptor v2-protein) and soluble electrocyte

- creatine kinase / Barrantes F.J., Braceras A., Caldironi H.A. // *J. Biol. Chem.* – 1985. – Vol. 260, №5. – P. 3024-3034.
176. Dunant Y. Energy metabolism and quantal acetylcholine release: effects of botulinum toxin, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, and diamide in the Torpedo electric organ / Dunant Y., Loctin F., Marsal J., et al. // *J. Neurochem.* – 1988. – Vol. 50, №2. – P. 431-439.
177. Brady S.T. Nerve-specific enolase and creatine phosphokinase in axonal transport: soluble proteins and the axoplasmic matrix / Brady S.T., Laser R.J. // *Cell.* – 1981. – Vol. 23, №2. – P. 515-523.
178. Dermer G.B. Autoradiographic localization of glycoprotein in human breast cancer cells maintained in organ culture after incubation with (3H)fucose or (3H)glucosamine / Dermer G.B., Sherwin R.P. // *Cancer. Res.* – 1975. – Vol. 35, №1. – P. 63-67.
179. Silverman L.M. Electrophoretic patterns for serum glycoproteins reflect the presence of human breast cancer / Silverman L.M., Dermer G.B., Tokes Z.A. // *Clin. Chem.* – 1977. – Vol. 23, №11. – P. 2055-2058.
180. Kincaid H.L. More on the detection of serum CK-BB activity and nonspecific fluorescence / Kincaid H.L. // *Clin. Chem.* – 1979. – Vol. 25, №2. – P. 337-338.
181. Braissant O. Creatine synthesis and transport during rat embryogenesis: spatiotemporal expression of AGAT, GAMT and CT1 / Braissant O., Henry H., Villard A.M., et al. // *BMC Dev. Biol.* – 2005. – Vol. 26. – P. 5-9.
182. Braissant O. Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study / Braissant O., Henry H., Loup M., et al. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 2001. – Vol. 86, №1-2. – P. 193-201.
183. Dringen R. Metabolism of glycine in primary astroglial cells: synthesis of creatine, serine, and glutathione / Dringen R., Verleysdonk S., Hamprecht B. // *J. Neurochem.* – 1998. – Vol. 70, №2. – P. 835-840.

184. Beal M.F. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases / Beal M.F. // Trends Neurosci. – 2000. – Vol. 23, №7. – P. 298-304
185. Herholz K. PET studies in dementia / Herholz K. // Ann. Nucl. Med. – 2003. – Vol. 17, №2. – P. 79-89.
186. Castenga A. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71 / Castenga A., Aksenov M., Thongboonkerd V., et al. // J. Neurochem. – 2002. – Vol. 82, №6. – P. 1524-1532.
187. Stachowiak O. Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation / Stachowiak O., Dolder M., Eallimann T., et al. // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273, №27. – P. 16694-16699.
188. Hensley K. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation / Hensley K., Hall N., Subramaniam R. Stachowiak O., et al. // J. Neurochem. – 1995. – Vol. 65, №5. – P. 2146-2156.
189. Gao Y.S. Sequential events in the irreversible thermal denaturation of human brain-type creatine kinase by spectroscopic methods / Gao Y.S., Su J.T., Yan Y.B. // Int. J. Mol. Sci. – 2010. – Vol. 11, №7. – P. 2584-2596.
190. Kozakov D. How good is automated protein docking? / Kozakov D., Beglov D., Bohnuud T., et al. // Protein. – 2013. – Vol. 81, №12. – P. 2159-2166.
191. Kaldis P. Hot spots of creatine kinase localization in brain: cerebellum, hippocampus and choroid plexus / Kaldis P., Hemmer W., Zanolla E., et al. // Protein. – 1996. – Vol. 18, №5-6. – P. 542-554.
192. Lahiri S.D. The 2.1A structure of *Torpedo californica* creatine kinase complexes with the ADP-Mg(2+)-NO³⁻-creatine transition-state analogue

- complex / Lahiri S.D., Wang P.F., Babbitt P.C., et al. // *Biochemistry*. – 2002. – Vol. 41, №47. – P. 13861-13867.
193. Bong S.M. Overexpression, purification, and preliminary X-ray crystallographic analysis of human brain-type creatine kinase / Bong S.M., Moon J.H., Jang E.H., et al. // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 18, №2. – P. 295-298.
194. Daouk G.H. Isolation of a functional human gene for brain creatine kinase / Daouk G.H., Kaddaurah-Daouk R., Putney S., et al. // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 15, №5. – P. 2442-2446.
195. Studier F.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes / Studier F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, et al. // *Methods Enzymol.* – 1988. – Vol. 185. – P. 60-89.
196. Chubet R.G. Vectors for expression and secretion of FLAG epitope-tagged proteins in mammalian cells / Chubet R.G., Brizzard B.L. // *Biotechniques*. – 1996. – Vol. 20, №1. – P. 136-141.
197. Chen L.H. Cloning and expression of functional rabbit muscle creatine kinase in *Escherichia coli*. Addressing the problem of microheterogeneity / Chen L.H., Babbitt P.C., Vasquez J.R., et al. // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266, №18. – P. 12053-12057.
198. Uhlen M. Affinity as a tool in life science / Uhlen M. // *Biotechniques* – 2008. – Vol. 44, N5. – P. 649-654.
199. Porath J. Immobilized metal ion affinity chromatography / Porath J. // *Protein Expr. Purif.* – 1992. – Vol. 3, N4. – P. 263-281.
200. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags / Bornhorst J.A., Falke J.J. // *Methods Enzymol.* – 2000. – Vol. 326. – P. 245-254.
201. Chen L.H. A comparative study of human muscle and brain creatine kinases expressed in *Escherichia coli* / Chen L.H., White C.B., Babbitt P.C., et al. // *J. Protein. Chem.* – 2000. – Vol. 19, №1. – P. 59-66.
202. White K.C. The principal islet of the Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) contains the BB isoenzyme of creatine kinase / White K.C., Babbitt

- P.C., Buechter D.D., et al. // *J. Proteom. Chem.* – 1992. – Vol. 11, №5. – P. 489-494.
203. Wood T.D. Creatine kinase: essential arginine residues at the nucleotide binding site identified by chemical modification and high-resolution tandem mass spectrometry / Wood T.D., Guan Z., Borders C.L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95, №7. – P. 3362-3365.
204. Rakhmetov A.D. Purification and polyclonal antibody production of recombinant brain-type creatine kinase / Rakhmetov A.D., Lee S.P., Ostapchenko L.I., et al. // *Russian Journal of Biopharmaceuticals* – 2014. – Vol. 6, № 2, – P. 7-11.
205. Yao Q.Z. A comparison of denaturation and inactivation rates of creatine kinase in guanidine solution / Yao Q.Z., Zhou H.M., Hou L.X., et al. // *Sci. Sin. B.* – 1982. – Vol. 25, №12. – P. 1296-1302.
206. Zhao T.J. Impact of intra-subunit domain-domain interactions on creatine kinase activity and stability / Zhao T.J., Feng S., Wang Y.L., et al. // *FEBS Lett.* – 2006. – Vol. 580, №16. – P. 3835-3840.
207. Zhao T.J. The generation of the oxidized form of creatine kinase is a negative regulation on muscle kinase / Zhao T.J., Yan Y.B., Liu Y., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, №16. – P. 12022-12029.
208. Genet S. Impaired brain creatine kinase activity in Huntington's disease / Genet S., Kale R.K., Baguer N.Z. // *Neurodegener. Dis.* – 2011. – Vol. 8, №4. – P. 194-201.
209. Rakhmetov A.D. Analysis of creatine kinase enzyme activity with observation of protein expression under heat and hydrogen peroxide stimuli / Rakhmetov A.D., Lee S.P., Ostapchenko L.I., Chae H.Z. // *Ukr. Biochem. J.* – 2015. – 87, N 1, – P. 75-82.
210. Li X.H. Generation of the oxidized form protects human brain type creatine kinase against Cystine-induced inactivation / Li X.H., Chen Z., Gao Y.S., et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2011. – Vol. 48, №2. – P. 239-242.

211. Burklen T.S. The creatine kinase/creatine connection to Alzheimer's disease: CK inactivation, APP-CK complexes, and focal creatine deposits / Burklen T.S., Schlattner U., Homayouni R., et al. // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 2006, №3. – P. 1-11.
212. Lin Y.S. Besides Huntington's disease, does brain-type creatine kinase play a role in other forms of hearing impairment resulting from a common pathological cause? / Lin Y.S., Wang C.H., Chern Y. // *Aging (Albany N.Y.)* – 2011. – Vol. 3, №6. – P. 657-662.
213. Kanemitsu F. Characterization of human creatine kinase BB and MB isoforms by means of isoelectric focusing / Kanemitsu F., Okigaki T. // *Clin. Chim. Acta.* – 1994. – Vol. 231, №1. – P. 1-9.
214. Forquet S. The dual functions of thiol-based peroxidases in H₂O₂ scavenging and signaling / Forquet S., Huang M.E., Dautreaux B., et al. // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2008. – Vol. 10, №9. – P. 1565-1576.
215. Park S.Y. Peroxiredoxin 1 interacts with androgen receptor and enhances its transactivation / Park S.Y., Yu X., Ip C., et al. // *Cancer. Res* – 2007. – Vol. 67, №19. – P. 9294-9303.
216. Qu D. Role of Cdk5-mediated phosphorylation of Prx2 in MPTP toxicity and Parkinson's disease / Qu D., Rashidian J., Mount M.P., et al. // *Neuron.* – 2007. – Vol. 5, №55. – P. 37-52.
217. Kinnula V.L. Cell specific expression of peroxiredoxins in human lung and pulmonary sarcoidosis / Kinnula V.L., Lehtonen S., Kaarteenaho-Wilk R., et al // *Thorax.* – 2002. – Vol. 57, №2. – P. 157-164.
218. Kang S.W. Cytosolic peroxiredoxin attenuates the activation of Jnk and p38 but potentiates that of Erk in Hela cells stimulated with tumor necrosis factor-alpha / Kang S.W., Chang T.S., Lee T.H., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, №4. – P. 2535-2543.

219. Gertz M. Identification of Peroxiredoxin I as a novel interaction partner for the lifespan regulator protein p66Shc / Gertz M., Fischer F., Leipelt M., et al. // *Aging (Albany NY)* – 2009. – Vol. 1, №2. – P. 254-265.
220. Wang X. Structural insights into the peroxidase activity and inactivation of human peroxiredoxin 4 / Wang X., Wang L., Wang X., et al. // *Biochem J.* – 2012. – Vol. 441, №1. – P. 113-118.
221. Perkins A. Tuning of peroxiredoxin catalysis for various physiological roles / Perkins A., Poole L.B., Karplus P.A. // *Biochemistry.* – 2014. – Vol. 53, №49. – P. 7693-7705.
222. König J. The conformational bases for the two functionalities of 2-Cysteine peroxiredoxins as peroxidase and chaperone / König J., Galliardt H., Jutte P., et al. // *J. Exp. Bot.* – 2013. – Vol. 64, №11. – P. 3483-3497.
223. Jung H. Regulation of macrophage migration inhibitory factor and thiol-specific antioxidant protein PAG by direct interaction / Jung H., Kim T., Chae H.Z., et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, №18. – P. 15504-15510.
224. Rakhmetov A. Simulation of Peroxiredoxin II and Brain-type Creatine Kinase protein-protein interaction using the on-line docking server ClusPro 2.0 / Rakhmetov A., Sang Pil Lee, Dmytro Grebinyk, Ludmila Ostapchenko, Ho Zoon Chae // *Journal of Applied Pharmaceutical Science* – 2015. – 5, N 08, – P. 11-16.
225. Choi M.H. Regulation of PDGF signaling and vascular remodeling by peroxiredoxin II / Choi M.H., Lee I.K., Kim G.W., et al. // *Nature.* – 2005. – Vol. 435, №7040. – P. 347-353.
226. Lowther W.T. Reduction of Cysteine sulfinic acid in eukaryotic, typical 2-Cys peroxiredoxins by sulfiredoxin / Lowther W.T., Haynes A.C. // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2011. – Vol. 15, №1. – P. 99-109.
227. Belousova L.V. Kinetics of chemical modification of arginine residues in mitochondrial creatine kinase from bovine heart: evidence for

- negative cooperativity / Belousova L.V., Muizhnek E.L. // *Biochemistry (Mosc.)*. – 2004. – Vol. 69, №4. – P. 455-461.
228. Muthuramalingam M. Multiple redox and non-redox interactions define 2-Cys peroxiredoxin as a regulatory hub in the chloroplast / Muthuramalingam M., Seidel T., Laxa M., et al. // *Mol. Plant*. – 2009. – Vol. 2, №6. – P. 1273-1288.
229. Hofmann B. Peroxiredoxins / Hofmann B., Hecht H.J., Flohe L. // *Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 383, №3-4. – P. 347-364.
230. Liebthal M. Redox-dependent conformational dynamics of decameric 2-Cysteine peroxiredoxin and its interaction with cyclophilin 20-3 / Liebthal M., Struve M., Li X., et al. // *Plant. Cell Physiol.* – 2016. – Vol. 57, №7. – P. 1415-1425.
231. Eder M. Crystal structure of brain-type creatine kinase at 1.41Å resolution / Eder M., Schlattner U., Becker A., et al. // *Protein Sci.* – 1999. – Vol. 8, №11. – P. 2258-2269.
232. Park Y.D. Reactivation kinetics of guanidine hydrochloride-denatured creatine kinase measured using the substrate reaction / Park Y.D., Cao Z.F., Zhou H.M. // *J. Protein. Chem.* – 2001. – Vol. 20, №1. – P. 67-72.
233. Yang H.P. Conformational changes of creatine kinase in trifluoroethanol solutions / Yang H.P., Zhou H.M. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1997. – Vol. 43, №6. – P. 1297-1304.
234. Yatin S.M. The antioxidant vitamin E modulates amyloid beta-peptide-induced creatine kinase activity inhibition and increased protein oxidation: implications for the free radical hypothesis of Alzheimer's disease / Yatin S.M., Aksenov M., Butterfield D.A. // *Neurochem. Res.* – 1999. – Vol. 24, №3. – P. 427-435.
235. Schlattner U. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease / Schlattner U., Tokarska-Schlattner M., Wallimann T. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1762, №2. – P. 164-180.

236. Nuss J.E. Oxidative modification and aggregation of creatine kinase from aged mouse skeletal muscle / Nuss J.E., Amaning J.K., Baily C.E., et al. // *Aging* (Albany N.Y.). – 2009. – Vol. 1, №6. – P. 557-572.
237. Mu H. Towards creatine kinase aggregation due to the Cysteine modification at the flexible active site and refolding pathway / Mu H., Zhou S.M., Yang J.M., et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2007. – Vol. 41, № 2. – P. 439-446.
238. Wang H.R. Ascertaining the number of essential thiol groups for the folding of creatine kinase / Wang H.R., Bai J.H., Zheng S.Y., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – Vol. 221, № 1. – P. 174-180.
239. Zhou H.M. The presence of reactive SH groups in the enzymatically active dicyano derivative of creatine kinase / Zhou H.M., Tsou C.L. // *Biochim. Biophys. Acta* – 1987. – Vol. 911, № 2. – P. 136-143.
240. Feng S. Effects of the single point genetic mutation D54G on muscle creatine kinase activity, structure and stability / Feng S., Zhao T.J., Zhou H.M., et al. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 39, № 2. – P. 392-401.
241. Cao Z.F. Effect of Mg²⁺ on the thermal inactivation and unfolding of creatine kinase / Cao Z.F., Luo W., Zhou H.M. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 31, № 11. – P. 1307-1313.
242. Park Y.D. Reactivation kinetics of guanidine hydrochloride-denatured creatine kinase measured using the substrate reaction / Park Y.D., Cao Z.F., Zhou H.M. // *J. Protein. Chem.* – 2001. – Vol. 20, № 1. – P. 67-72.
243. Dalle-Donne I. Protein carbonylation in human diseases / Dalle-Donne I., Giustarni D., Colombo R., et al. // *Trends Mol. Med.* – 2003. – Vol. 9, № 4. – P. 169-176.
244. Wood T. D. Sequence verification of human creatine kinase (43 kDa) isoenzyme by high-resolution tandem mass spectrometry / Wood T. D., Chen L.H., White C.B., et al. // *Prot. Natl. Acad. Sci USA* – 1996. – Vol. 93, № 21. – P. 12051.

245. Bayer S.B. Interactions between peroxiredoxin 2, hemicrome and the erythrocyte membrane / Bayer S.B., Low F.M., Hampton M.B., et al. // *Free Radic. Res.* – 2016. – Vol. 50, № 12. – P. 1329-1339.
246. Angeluccia F. Switching between the alternative structures and functions of a 2-Cys peroxiredoxin by site-directed mutagenesis / Angeluccia F., Saccoccia F., Ardini M., et al. // *J. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 425, № 22. – P. 4556-4568.
247. Li C. Hydrogen peroxide targets the Cysteine at the active site and irreversibly inactivates creatine kinase / Li C., Sun S., Park D., et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2011. – Vol. 49, № 5. – P. 910-916.
248. Konorev E. A. Kalyanaraman B. Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite / Konorev E. A., Hogg N. // *FEBS Lett.* – 1998. – Vol. 427, № 2, – P. 171-174.
249. Jang H.H. Phosphorylation and concomitant structural changes in human 2-Cys peroxiredoxin isotype I differentially regulate its peroxidase and molecular chaperone functions / Jang H.H., Kim S.Y., Park S.K., et al. // *FEBS Lett.* – 2006. – Vol. 580, № 1, – P. 351-355.
250. Phalen T.J. Oxidation state governs structural transitions in peroxiredoxin II that correlates with cycle arrest and recovery / Phalen T.J., Weirather K., Deming P.B., et al. // *J. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 175, № 5, – P. 779-789.
251. Ou W.B. Chaperone-like activity of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase during creatine kinase refolding / Ou W.B., Luo W., Park Y.D., et al. // *Protein Sci.* – 2001. – Vol. 10, № 11, – P. 2346-2353.
252. Barranco-Medina S. Thermodynamics of the dimer-decamer transition of reduced human and plant 2-Cys peroxiredoxin / Barranco-Medina S., Kakorin S., Lazaro J.J. // *Biochemistry.* – 2008. – Vol. 47, № 27, – P. 7196-7204.
253. Warne R. Statistical methods used in gifted educational journals, 2006-2010 / Warne R., Ramos T., Ritter N., et al. // *Gifted Child Quarterly.*

– 2012. – Vol. 56, № 3, – P. 134-149.

ДОДАТОК 1

Статті у фахових виданнях

6. Rakhmetov A.D. Molecular Cloning of Human Brain-Type Creatine Kinase Gene into Bacteria Expression Vectors pET-17b, pET-14b and Flag Tagged Mammalian Expression Vector pCMV / Rakhmetov A.D., Lee S.P., Ostapchenko L.I., Chae H.Z.// Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія біологія. – 2013. – Т. 64, №2, – С. 58-61. *(Особистий внесок здобувача – клонування гену *ckb* за допомогою методу ПЛР та інтегрування гену в плазмідні носії pET-17b, pET-14b).*

7. Rakhmetov A.D. Purification and polyclonal antibody production of recombinant brain-type creatine kinase / Rakhmetov A.D., Lee S.P., Ostapchenko L.I., Chae H.Z.// Russian Journal of Biopharmaceuticals – 2014. – 6, N 2, – P. 7-11. *(Особистий внесок здобувача – очищення рекомбінантного білку КФК ГМ за допомогою методів хроматографії, що поділяє за розміром та іонообмінної хроматографії).*

8. Rakhmetov A.D. Analysis of creatine kinase enzyme activity with observation of protein expression under heat and hydrogen peroxide stimuli / Rakhmetov A.D., Lee S.P., Ostapchenko L.I., Chae H.Z.// Ukr. Biochem. J. – 2015. – 87, N 1, – P. 75-82. *(Особистий внесок здобувача – оцінка ферментативної активності рекомбінантного білка КФК ГМ на прикладі специфічної біохімічної реакції).*

9. Rakhmetov A. Simulation of Peroxiredoxin II and Brain-type Creatine Kinase protein-protein interaction using the on-line docking server ClusPro 2.0 / Rakhmetov A., Sang Pil Lee, Dmytro Grebinyk, Ludmila Ostapchenko, Ho Zoon Chae // Journal of Applied Pharmaceutical Science – 2015. – 5, N 08, – P. 11-16. *(Особистий внесок здобувача – моделювання міжмолекулярної взаємодії між білками КФК ГМ та Prx II).*

10. Rakhmetov A.D. Prx II and CKBB protein interaction under physiological and thermal stress conditions in A549 and HeLa cells / Rakhmetov A.D., Lee S.P.,

Ostapchenko L.I., Chae H.Z.// Ukr. Biochem. J. – 2016. – 88, N 1, – P. 61-68. (Особистий внесок здобувача – дослідження взаємодії КФК ГМ за допомогою методів ко-імунопреципітації та електрофорезу в поліакриламідному гелі).

Тези наукових доповідей

11.Rakhmetov A.D. Chaperoning activity of peroxiredoxins protects brain-type creatine kinase under various stresses through specific interaction/ Rakhmetov A.D., Lee S.P., Kim K., Chae H.Z. // 2012 Experimental Biology, 21 – 25 April 2012: матер. конфер. – San Diego, CA, USA, 2012. – P. 136.

12.Рахметов А.Д. Вивчення механізмів специфічної взаємодії пероксиредоксинів з креатинфосфокіназою головного мозку / Рахмето А., Лі Сан Піль, Остапченко Л., Че Хо Зун // VIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 3-6 квітня 2012 р.: матер. конфер. – Львів, 2012. – С. 85.

13.Rakhmetov A.D. Identification of the specific interaction between peroxiredoxins and brain type creatine kinase / Rakhmetov A.D., Lee S.P., Ostapchenko L. Chae H.Z. // XI Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська Весна 2013», 18-22 березня 2013 р.: матер. конфер. – Київ, 2013. – С. 10.

14.Rakhmetov A.D. Analysis of kinase activity of recombinant protein CKBB under various stresses / Rakhmetov A.D., Lee S.P., Ostapchenko L. Chae H.Z. // XI Український біохімічний конгрес, 6-10 жовтня 2014 р.: матер. конфер. – Київ, 2014. – С. 132.