

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

**Рахметов Анар Джамалович**

УДК: 577.15.612.438:577.352

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

03.00.04-біохімія

Автореферат  
дисертації на здобуття  
наукового ступеня кандидата біологічних наук

Київ - 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

**Науковий керівник:**

доктор біологічних наук, професор  
**Остапченко Людмила Іванівна**,  
Київський національний університет імені  
Тараса Шевченка,  
директор ННЦ «Інститут біології та  
медицини».

**Офіційні опоненти:**

доктор біологічних наук, професор,  
академік НАН України,  
**Костерін Сергій Олексійович**,  
Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН  
України заступник директора з наукової  
роботи, завідувач відділу біохімії м'язів;

доктор біологічних наук, професор  
**Філоненко Валерій Вікторович**,  
Інститут молекулярної біології та  
генетики НАН України завідувач відділу  
сигнальних систем клітини.

Захист дисертації відбудеться «29» грудня 2017 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12

Автореферат розісланий «29» листопада 2017 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Н.Г. Ракша

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** На сьогодні типові 2-Цис пероксиредоксини (2-Цис Prxs) представляють родину тіол-специфічних антиоксидантних ферментів, що демонструють високу каталітичну активність ( $k=10^6-10^8\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) нейтралізації АФК та органічних пероксидів порівняно з каталазою чи глутатіонпероксидазою [Ogusucu R., 2007, Peskin A.V., 2007]. Вважається, що активність 2-Цис Prxs є унікальною, оскільки окрім 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 2-Цис Prxs [Winterbourn C.C., 1999., Wood Z.A., 2003, Rhee S.G., 2012]. Білки 2-Цис Prxs мають високу каталітичну специфічність до пероксиду гідрогена, що дозволяє регулювати трансдукцію сигналу в клітині за рахунок регулювання концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Функція клітинних модуляторів  $\text{H}_2\text{O}_2$  вказує на причетність 2-Цис Prxs до розвитку/супресії ракових клітин, нейродегенеративних, серцево-судинних захворювань та метаболічних порушень [Irwin M.E., 2013, Abbasi A., 2014].

2-Цис Prxs піддаються зміні олігомерного стану від низькомолекулярних (LWM) до високомолекулярних (HWM) комплексів під впливом гіперокиснення [Wood Z.A., 2002]. 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 [Moon J.C., 2005]. 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 шаперонної активності [Saccoccia F., 2012]. Дослідження *Wood et al* демонструють залежність олігомеризації бактеріального пероксиредоксину AhpC (*S.typhimurium*) від редокс-статусу з переважним формуванням  $(\alpha_2)_5$  декамерів у розчині [Wood Z.A., 2002.]. Збирання HWM комплексів білків 2-Цис Prxs може також бути спровоковане температурним стресом. Показано, що ці комплекси захищають клітину від теплового шоку [Jang H.H., 2004]. Відповідно, їх можна порівняти з активністю білків теплового шоку sHSPs, які вирізняються гарно організованою олігомерною структурою [Kim K.K., 1998, Haley D.A., 1998]. Комплекси HWM 2-Цис Prxs можуть мати молекулярну масу від 40 кДа до 1000 кДа та демонструють шаперонну активність з дисоціацією на LMW форми, що наділені пероксидазною активністю [Jang H.H., 2004].

Креатинфосфокіназа головного мозку людини, КФК ГМ – це цитозольний гомодимерний білок з молекулярною масою мономеру 42 кДа [Wallimann T., 1992]. Фермент переважно експресується в головному мозку та ретині ока, де каталізує обернену реакцію преносу  $\gamma$ -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 [McLeish M.J., 2005].

Відмічено, що у ракових клітинах легеневої карциноми та нейробластоми спостерігається ініціація надекспресії білка КФК ГМ [Bergnes G., 1996]. Новоутворені пухлини мають підвищену активність КФК ГМ, що необхідна для забезпечення енергетичних витрат ракових клітин. Ракові клітини зазвичай характеризуються високим рівнем фосфокреатину (PCr), але їхній ріст інгібований циклічним креатином (cCr), фосфорильована форма є інгібітором КФК ГМ. Тому було описано декілька аналогів КФК, що проявляють цитотоксичну активність і можуть бути багатообіцяючими у розробці антиракових препаратів [Bergnes G., 1996].

Для оцінки стабільності ферменту КФК ГМ було досліджено вплив стресорів сечовини, гуанідин гідрохлориду, температури [Zhou H.M., 1986, Lyubarev A.E., 1999]. Молекулярний шаперон GroEL здатен зв'язувати вторинну структуру КФК ГМ інактивовану сечовиною, що призводить до ефективної супресії агрегації білка на стадії розплавленої глобули [Li S., 2001, Hahn H.S., 2003]. Під час впливу температури КФК піддається послідовним структурним змінами [Kurganov B.I., 1997]. Ідентифіковано, що структура мономеру здатна до відновлення за температури не вище 55°C, що корелює з можливістю об'єднання мономерів у функціональний димерний білок [Gao Y.S., 2010]. КФК ГМ виступає одною із головних мішеней окисного стресу під час нейродегенеративних хвороб [Aksenov M., 2000, Aksenov M.Y., 2001]. Відмічено участь пострасляційних 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 [Kim J., 2010].

Беручи до уваги важливість пероксидазної та шаперонної функції 2-Цис Prxs білків та буферно-енергетичну функцію ферменту КФК ГМ постає потреба детального дослідження зв'язків цих білків та їх поведінки за умов стресу викликаного чинниками температурою та гіперокисненням. У зв'язку з цим пошук нових білків-партнерів, які підпадають під захисний вплив пероксиредоксинів є актуальним, оскільки саме такі взаємодії можуть послужити прекурсором до розуміння шляхів попередження розвитку нейродегенеративних хвороб, раку та запальних процесів в організмі людини. Вищевказане стало основою для формування мети та постановки задач дослідження даної дисертаційної роботи.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідної теми «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.) та «Механізми регуляції метаболічних

процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.)

**Мета і задачі дослідження.** Дослідити взаємодію між білками Prx I/Prx II та білком-партнером КФК ГМ за фізіологічних умов та стресу. Оцінити шаперонні властивостей білків Prx I/Prx II на прикладі специфічної реакції фосфорилування КФК ГМ.

Для досягнення мети досліджень були поставлені такі задачі:

1. Отримати очищений рекомбінантний білок КФК ГМ.
2. Визначити ферментативну активність рекомбінантного білка КФК ГМ за дії стресорів.
3. Проаналізувати ендогенну взаємодію між білком КФК ГМ та Prx I/Prx II на прикладі клітинних ліній A549 та HeLa.
4. Оцінити, як укорочення С-термінальної ділянки Prx II впливає на зміну кооперативності з білком КФК ГМ на прикладі клітинних ліній A549 та HeLa.
5. Оцінити шаперонні властивості білків Prx I та Prx II на прикладі специфічної реакції фосфорилування КФК ГМ за дії стресорів.
6. Створити моделі взаємодії між Prx II та КФК ГМ.

*Об'єкт дослідження* – внутрішньоклітинна взаємодія між білками пероксиредоксинами Prx I/Prx II та білком-партнером КФК ГМ людини в умовах *in vitro* у контролі та після впливу стресорів температури та пероксиду гідрогена. Захист білка-партнеру КФК ГМ завдяки шаперонним властивостям Prx I та Prx II.

*Предмет дослідження* – клонування, очищення, ферментативна активність рекомбінантного білка КФК ГМ та його взаємодія з білками Prx I/Prx II.

*Методи дослідження:* у роботі були використані методи ПЛР для клонування гену КФК ГМ, методи трансфекції для експресії рекомбінантного білка в клітинні лінії HeLa та A549, хроматографія, що поділяє за розміром та афінна хроматографія для очищення рекомбінантного білка КФК ГМ, метод мас-спектрометрії MALDI-TOF для ідентифікації КФК ГМ після трипсинолізу, культура клітин для експресії білка КФК ГМ, Prx I та Prx II, ДСН-ПААГ для розділення білків КФК ГМ, Prx I та Prx II, метод вестер-блотингу для детекції білків КФК ГМ, Prx I та Prx II з використанням антитіл, метод ко-імунопреципітації для оцінки взаємодії між білками КФК ГМ, Prx I та Prx II в клітинних лізіатах, спектрофотометрію для вимірювання величини абсорбції, статистичний аналіз.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Клоновано та очищено ферментативно активний рекомбінантний білок КФК ГМ. Оцінена питома активність рекомбінантного білка КФК ГМ в умовах специфічної ферментативної реакції при дії стресорів температури та пероксиду гідрогена.

Вперше підтверджено за допомогою методу мас-спектрометрії, що Prx I взаємодіє з КФК ГМ в гомогенаті головного мозку щура. Вперше показана

взаємодія КФК ГМ з білками Prx I та Prx II в клітинах HeLa та A549 за використання реакції ко-імунопреципітації. Вперше показано сильнішу кооперативність Prx II з КФК ГМ, а ніж між Prx I та КФК ГМ.

Вперше встановлено, що вкорочення С-термінальної ділянки Prx II не впливає на спорідненість між Prx II та КФК ГМ. Вперше продемонстровано залежність кооперативності білків Prx II та КФК ГМ від температури та пероксиду гідрогену на 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 стресових умов. Вперше проведено моделювання взаємодії між Prx II та КФК-ГМ за допомогою он-лайн докінг серверу «ClusPro2.0».

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати роботи надають можливості 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 родини 2-Цис Prxs.

Оскільки КФК ГМ вважається одним із головних маркерів патологічних станів, таких як нейродегенеративні хвороби Альцгеймера, Паркісона, Хантінгтона, ангіогенезу ракових пухлин, тощо постає питання дослідження та попередження інгібування/активації її функції за допомогою внутрішньоклітинних механізмів взаємодії з білками пероксиредоксинами. 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 Prx II як білків-партнерів КФК ГМ може слугувати попередником для створення терапевтичних стратегій лікування нейродегенеративних захворювань та раку.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем особисто проаналізовано наукову літературу за темою роботи. Усі експериментальні результати отримані дисертантом особисто або за його безпосередньої участі. Здобувачем самостійно здійснено підготовку матеріалів до публікації. За участі співавторів публікацій проведено інтерпретацію отриманих результатів.

Планування експериментальних робіт, аналіз та обговорення отриманих результатів проведено спільно з науковим керівником д.б.н., проф. Остапченко Л.І.

**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, у тому числі 5 статей у фахових вітчизняних та міжнародних періодичних виданнях, з

яких 3 публікації у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз та 4 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень та їх обговорення, заключення, висновків та списку літературних джерел (253 найменування). Робота викладена на 155 сторінках, проілюстрована 41 рисунком та 1 таблицею.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали та методи досліджень

Клонування та експресію гена КФК ГМ проводили за допомогою методу ПЛР [Rakhmetov A.D., 2013]. Для експресії рекомбінантного білка КФК ГМ в бактеріальних клітинах *E.coli*. використовували плазмідні системи рЕТ14b та рЕТ17b. Для експресії КФК ГМ *in vitro* використовували векторну систему рFlag-CMV (Novagen, США). Лігування продукту КФК ГМ здійснювали за допомогою лігази Т4 у відповідності до стандартного протоколу виробника (Promega, США).

Очищення рекомбінантного білка КФК ГМ проводили у відповідності до методики [Gao Y.S., 2010]. Для хроматографії, що поділяє за розміром використовували хроматографічну колонку (V=750 мл) з носієм Sepharyl S-100 HR (GE Lifescience, Sweden), для іонообмінної хроматографії використовували носій DEAE-sepharose. Для очищення білків зв'язаних з [His]<sub>6</sub>-Prx I було використано Ni-NAT афінну колонку ("Econo-Column", 2,5x10 см, 49 мл та "Econo-Column", 1,5x10 см, 18 мл, "Bio-Rad"). Характеристику одержаних фракцій проводили електрофоретично в 12 % ДСН-ПААГ. Ізоелектрофокусування (IEF) було проведено у відповідності до методики Amersham Biosciences з використанням IPGphor установки для ізоелектричного фокусування ("IPGphor", "GE Healthcare", USA). Первинні поліклональні антитіла для імуноблотингу отримували у відповідності до методики [Rakhmetov A.D., 2014]. У якості вторинних антитіл використовували Goat Anti-Rabbit IgG H&L HRP, виробництва ("Abcam", США). Детекцію білків на блотограмі проводили за допомогою реагентів NBT і BCIP у відповідності до протоколу виробника ("GE Healthcare", США).

Трансфекцію плазмід рCMV-Flag/КФК ГМ проводили з використанням клітинних ліній аденокарциноми легенів людини A549 та клітин шийки матки людини HeLa. Клітини A549 культивували в середовищі RPMI 1640 ("WelGENE", Південна Корея), клітини HeLa в середовищі Dulbecco's modified Eagles medium ("WelGENE", Південна Корея), із додаванням 10 % бичачої сироватки (FBS, "WelGENE", Південна Корея) та 1 % антибіотику ("Invitrogen", США). Трансфекцію проводили з використанням реагенту Lipofectamine/Plus Reagents ("Invitrogen", США). Трипсиноліз білків для мас-спектрометричного аналізу здійснювали за використанням трипсину ("Promega", США) у

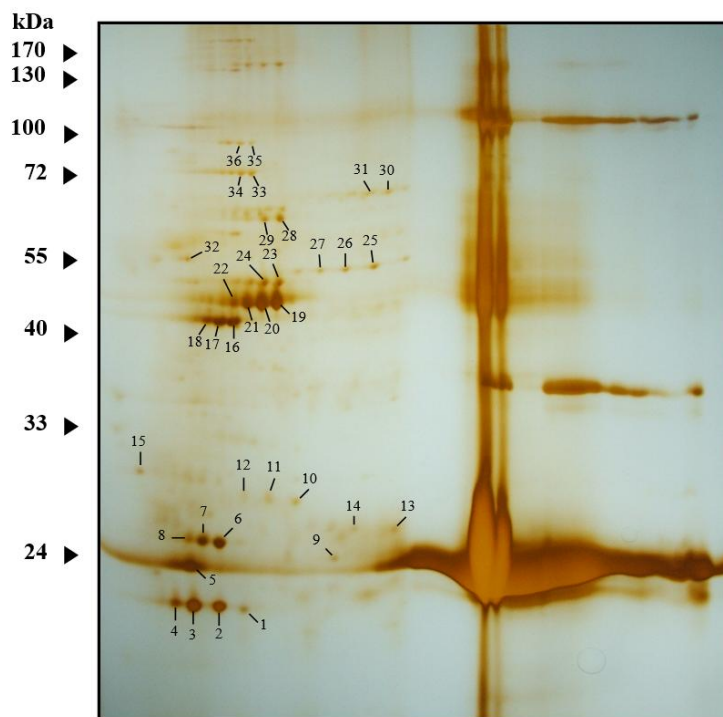
відповідності до методики [Jimenez C.R., 1998]. Мас-аналіз проводили на мас-спектрометрі Voyager-DE STR MALDI-TOF (“Perspective Biosystems”, США). Реакцію ко-іммунопреципітації здійснювали з антитілами “EZview Red Anti-Flag M2 Affinity Gel” (Cat. №F2426, “Sigma”, США) у відповідності до протоколу виробника. Питому активність КФК ГМ визначали у відповідності до рН колориметричного методу [Yao Q.Z., 1982]. Величину абсорбції при довжині хвилі збудження 597 нм вимірювали на УФ-спектрофотометрі “Jasco V-530” (“Jasco”, Японія).

Аналіз нуклеотидних послідовностей проводили за використання програмного забезпечення «BioEdit». Ідентифікацію білків по мас-спектрам здійснювали з використання бібліотеки “Swiss-Prot” за допомогою пошукової програми “MS-Fit”. Для вивчення міжмолекулярної взаємодії між білками КФК ГМ та Prx II використовували он-лайн сервер “ClusPro 2.0”. Вірогідність результатів визначали за t-критерієм Стьюдента.

### Результати досліджень та їх обговорення

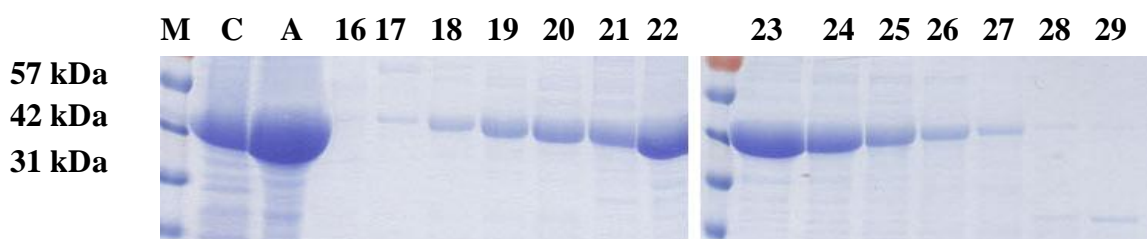
За використання методу афінної хроматографії та двовимірного гелю електрофорезу нам вдалося ідентифікувати ряд білків партнерів Prx I, зв’язування яких було спровоковане температурним стресом 50°C. В якості білка мішені ми обрали Prx I, шаперонні властивості якого переважають такі Prx II у відповідності з роботою [Lee W., 2007]. Як показано на рис. 1 було ідентифіковано >10 білок зв’язуючих партнерів Prx I. Така значна кількість білків партнерів може бути зумовлена захисною функцією родини 2-Цис Prxs, яка активується внаслідок дії стресу [Muthuramalingam M., 2009].

Щоб дослідити можливість взаємодії між білками КФК ГМ та Prx I/Prx II першочерговим завданням було накопичення КФК ГМ білка у препаративній кількості та його очищення. Вперше функціонально активний ген кратинфосфокінази ізотипу ВВ був ізольований завдяки роботі [Daouk G.H., 1988]. Для очищення рекомбінантного КФК ГМ з бактеріальних клітин з експресованим вектором рЕТ-17b/СКВ було обрано двостадійну схему очистки. На першій стадії очищення ми використали метод хроматографії, що поділяє за розміром. У якості фази носія використовували Sephacryl S-100 HR з додаванням β-меркаптоетанолу. Результати електрофоретичного розділення фракцій до та після першого етапу очищення зображені на рис. 2. Ми спостерігали найбільше концентрування рекомбінантного білка КФК ГМ у фракціях 21-24 з молекулярною масою мономеру 42 кДа.



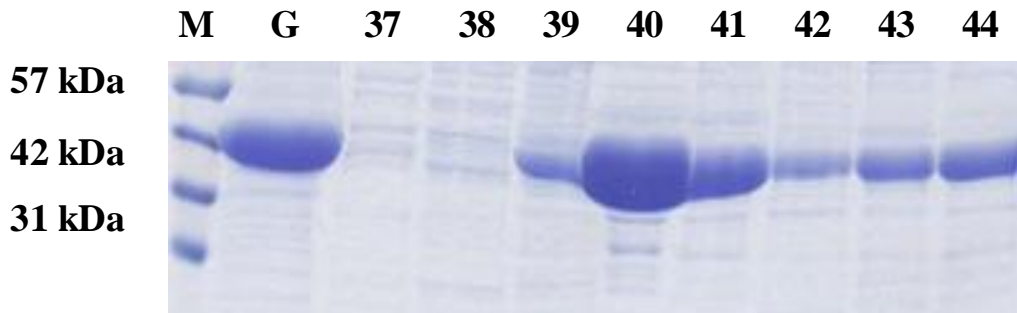
№	Білок-партнер	№	Білок-партнер
1	Пероксиредоксин 2 (Prx II)	25-27	Креатинфософокіназа (СКВВ)
2-4	Пероксиредоксин 2 (Prx II)	28, 29	Креатинфософокіназа (СКВВ)
5	Пероксиредоксин 1 (Prx I)	30, 31	Білок DPYAL2
6-8	Убіквілін карбокси-термінальна гідролаза (UCH-L1)	32	АТФаза $\beta$ -ланцюг
16-18	Актин (Beta-actin)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

**Рис. 1.** Двовимірна електрофореграма білків-партнерів Prx I-[His].



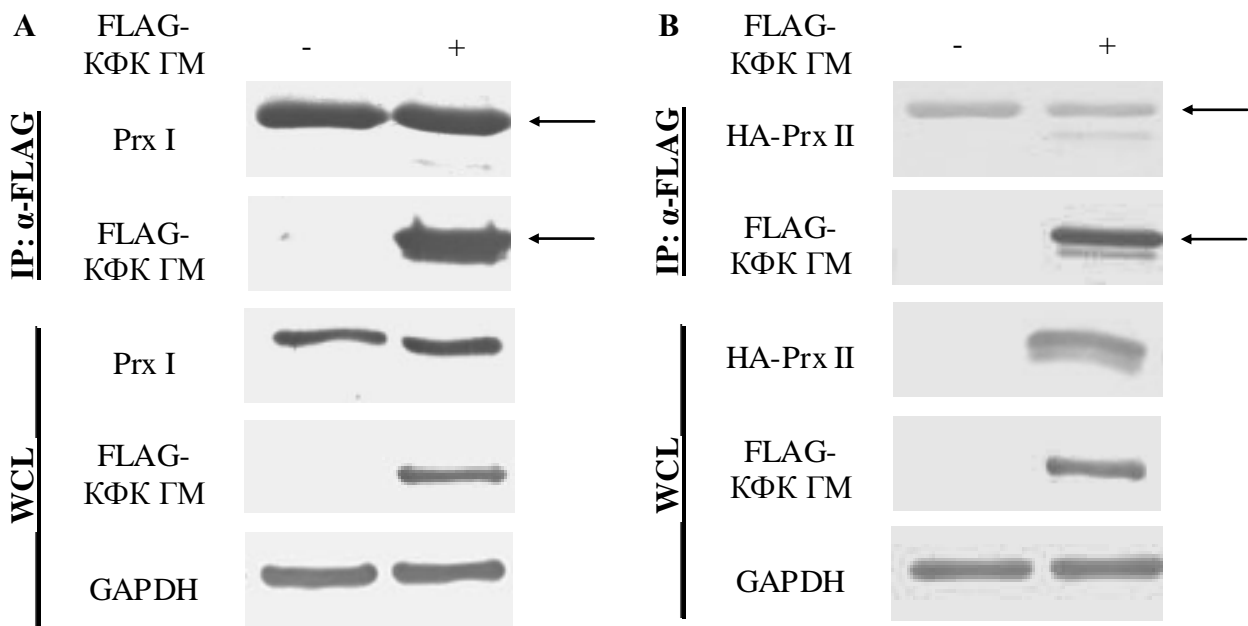
**Рис. 2.** Електрофореграма фракцій рекомбінантного білка КФК ГМ отримана після хроматографії, що поділяє за розміром; С – первина неочищена фракція; А – преципітат із сульфатом амонію; 16-29 – очищені фракції рекомбінантного білка; М – маркер молекулярної маси.

На другому етапі очищення було використано DEAE-сефарозу. Результати ДСН-ПААГ елюювання фракції білка КФК ГМ зображенні на рис. 3.



**Рис. 3.** Електрофореграма рекомбінантного білка КФК ГМ; G – фракція КФК ГМ після хроматографії, що поділяє за розміром; 37-44 – фракції концентрованого білка; М – маркер молекулярної маси.

Молекулярна маса очищеного рекомбінантного білка на електрофореграмах (рис. 2., 3) відповідає масі мономеру КФК ГМ, що дорівнює 42 кДа.

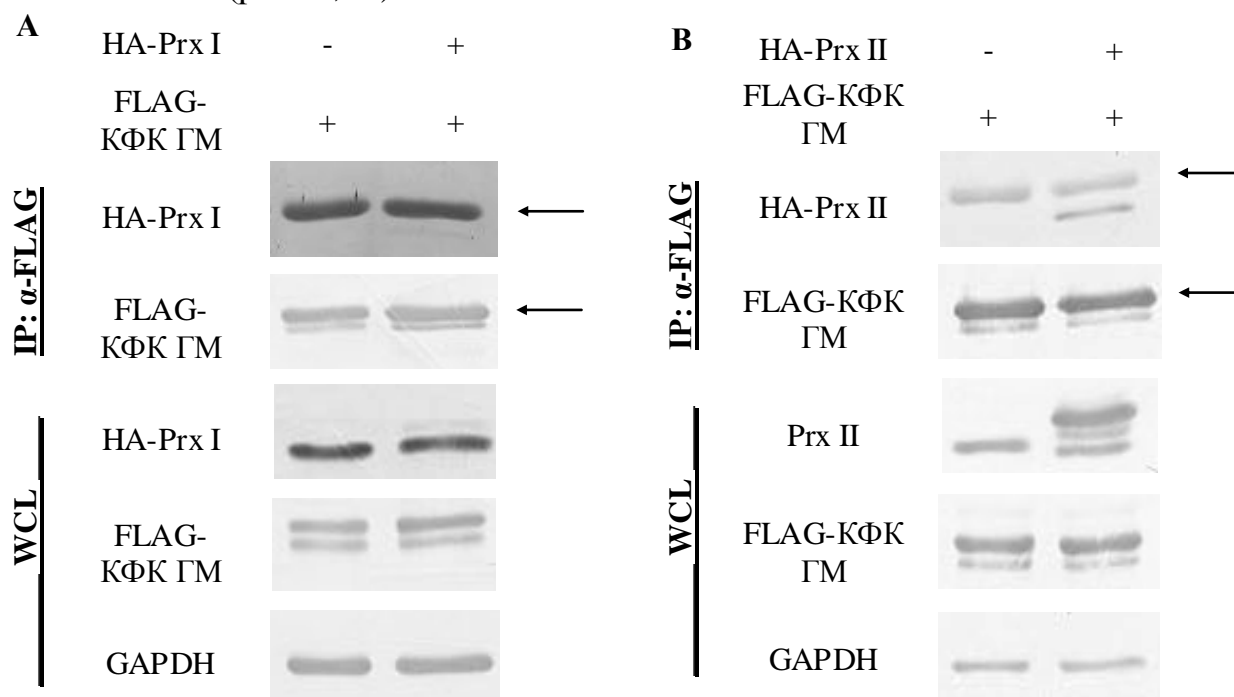


**Рис. 4.** Блотограма ко-імунопреципітації пероксиредоксинів Prx I/Prx II з КФК ГМ в клітинах A549. А – взаємодія Prx I з КФК ГМ, В – взаємодія Prx II з КФК ГМ. Примітка: IP – імунопреципітація з антитілами Anti-Flag, WCL – рівень внутрішньоклітинної експресії білків. + – клітини з трансфектованим КФК ГМ; - – відсутність трансфекції КФК ГМ; стрілочками позначені важкий ланцюг імуноглобулінів (IgG heavy chain) та легкий ланцюг імуноглобулінів (IgG light chain).

Для дослідження взаємодії КФК ГМ та білків Prx I/Prx II ми використали реакцію ко-імунопреципітації (Co-IP). Лізати клітин A549 та HeLa з індукованою експресією рекомбінантних плазмід Flag-КФК ГМ та HA-Prx II, Flag-КФК ГМ та порожньої контрольної плазмиди HA-Mock інкубували із специфічними anti-Flag іммобілізованими антитілами. В клітинах A549

відмічений низький рівень експресії Prx II <1,0 мкг та високий >4,0 мкг для Prx I. Рівень експресії Prx II у клітинах HeLa складає >3,3 мкг [Kinnula V.L., 2002, Kang S.W., 2004]. Це було підтверджено результатами вестерн-блот аналізу лізатів клітин A549 та HeLa, що також продемонстрували успішну експресію Flag-КФК ГМ та HA-Prx II (рис 4., 5.).

Після ко-імунопреципітації з афінними антитілами анти-Flag M2 ми можемо стверджувати, що за фізіологічних умов Prx II успішно взаємодіє з КФК ГМ на прикладі двох клітинних ліній A549 та HeLa (рис 4., 5.). Але такої інтенсивності ми не спостерігаємо у випадку ендогенного Prx I, що має внутрішньоклітинну концентрацію вищу, а ніж Prx II в обох типах клітин. Слабка кооперативність між Prx I та КФК ГМ спостерігається як в A549 так і в HeLa клітинах (рис 4., 5.).



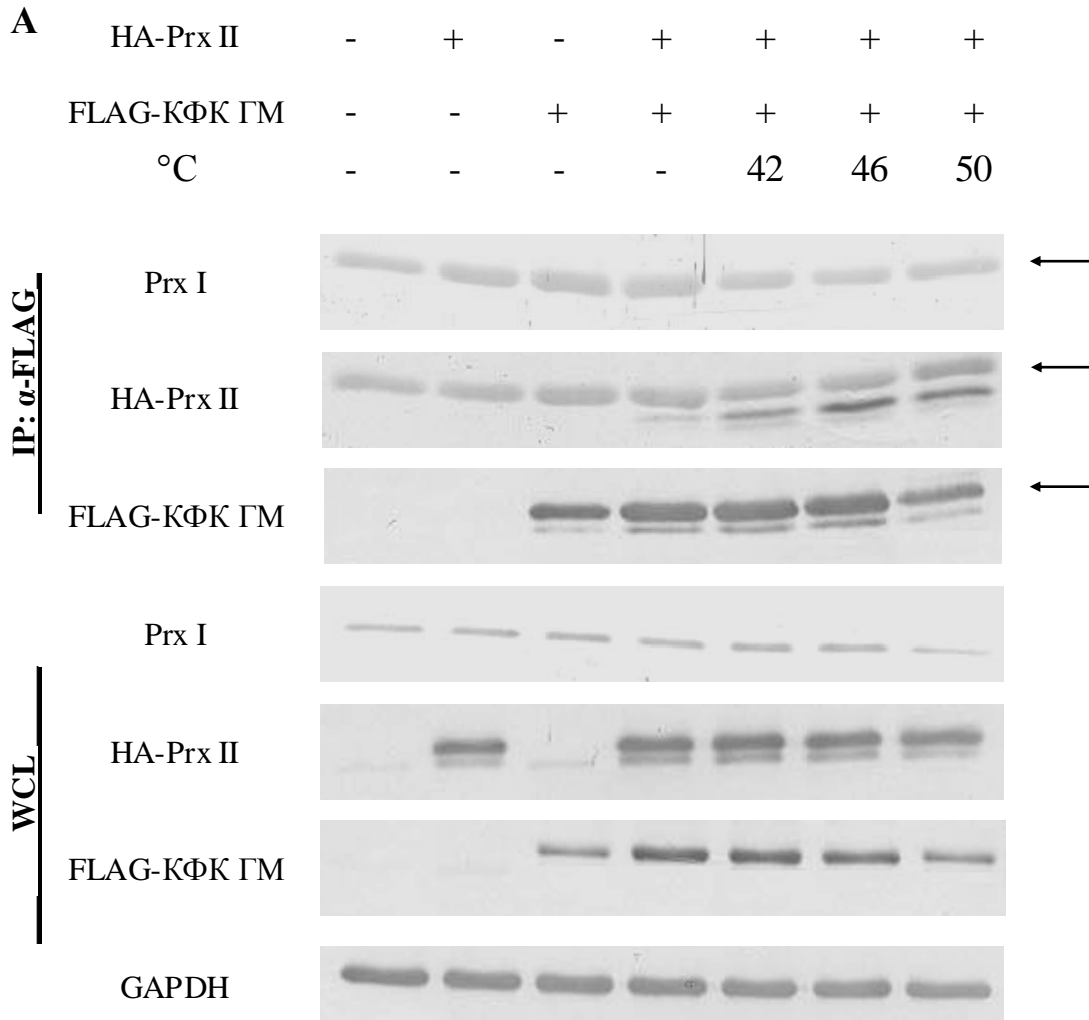
**Рис. 5.** Блотограма ко-імунопреципітації пероксиредоксинів Prx I/Prx II з КФК ГМ в клітинах HeLa. А – взаємодія Prx I з КФК ГМ, В – взаємодія Prx II з КФК ГМ. Примітка: IP – імунопреципітація з антитілами Anti-Flag, WCL – рівень внутрішньоклітинної експресії білків. + – клітини з трансфектованим КФК ГМ; - – відсутність трансфекції КФК ГМ; стрілочками позначені важкий ланцюг імуноглобулінів (IgG heavy chain) та легкий ланцюг імуноглобулінів (IgG light chain).

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 [Moon J.C., 2005, Jang H.H., 2004]. Тому для подальшої оцінки встановленої взаємодії між Prx I, Prx II та білком-партнером КФК ГМ за стресових умов ми використали два чинники: температуру та пероксид гідрогена. Ми дослідили залежність формування взаємодії за різної інтенсивності стресового чинника. Як відмічено у дослідженнях [Gao Y.S., 2010] очищений рекомбінантний білок КФК ГМ мав

відносно низьку термостабільність у порівнянні з м'язовою чи мітохондріальною КФК. Вивчення температурного впливу на КФК ГМ показало характерну послідовність структурних змін білка з першочерговою інактивацією активного центру молекули [Gao Y.S., 2010].

Клітини A549, що містили химерні плазмиди рСМV-Flag/КФК ГМ, рСМV-НА/Prx II, рСМV-НА/Mock (контрольна) були інкубовані за температур 42 °С, 46 °С, 50 °С протягом 30 хв. Після ко-імунопреципітації, білковий преципітат аналізували шляхом ДСН-ПААГ та імуноблотингу.

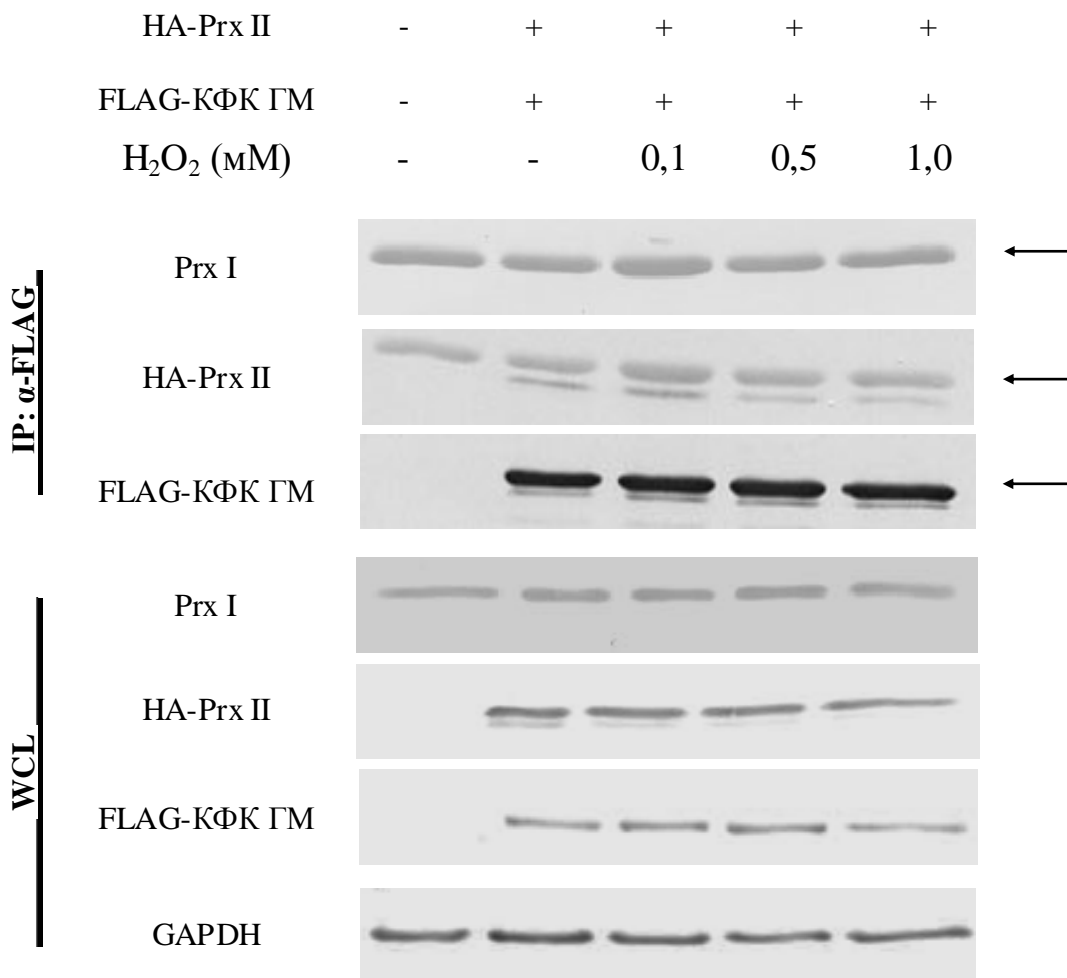
З отриманих результатів можна стверджувати, що взаємодіє між Prx II та білком-партнером КФК ГМ характеризується посиленням кооперації із підвищенням температури (рис. 6.). Пік інтенсивності взаємодії спостерігався за температури 46°C з наступним послабленням сигналу при 50 °С. Це може бути пов'язано з високою чутливістю КФК ГМ до температури та частковою денатурацією білка. На відмінну від Prx II, Prx I не мав характерного сигналу на імуноблоті навіть за дії температури (рис. 6.).



**Рис. 6.** Блотограма ко-імунопреципітації Prx I/Prx II 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 – контроль; стрілочками позначені важкий ланцюг імуноглобулінів (IgG heavy chain) та легкий ланцюг імуноглобулінів (IgG light chain).

Зміна функціональної активності пероксиредоксинів за впливу окисних агентів була відзначена багатьма дослідниками [Moon J.C., 2005, Jang H.H., 2004]. Так, за їх впливу відбувається зміна окисного стану каталітичного цистеїну в активному центрі молекули на сульфїнову/сульфонову кислоту (-SO<sub>2</sub>H/-SO<sub>3</sub>H). 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, нами було проаналізовано взаємодію між білками Prx I, Prx II та білком-партнером 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. Під час оцінки спорідненості між Prx II та білком-партнером КФК ГМ з контролем без додавання пероксиду гідрогену ми не спостерігали суттєвих змін сигналу на блоті між групою клітин з додаванням 0,1 мМ перекису гідрогена та контролем A549 (рис. 7.).



**Рис. 7.** Блотограма ко-імунопреципітації Prx I/Prx II з КФК ГМ в клітинах A549 за дії пероксиду гідрогена. Примітка: IP – імунопреципітація з антитілами Anti-Flag, WCL – рівень внутрішньоклітинної експресії білків. + – клітини з трансфектованим КФК ГМ; - – відсутність

трансфекції КФК ГМ; GAPDH – контроль; стрілочками позначені важкий ланцюг імуноглобулінів (IgG heavy chain) та легкий ланцюг імуноглобулінів (IgG light chain).

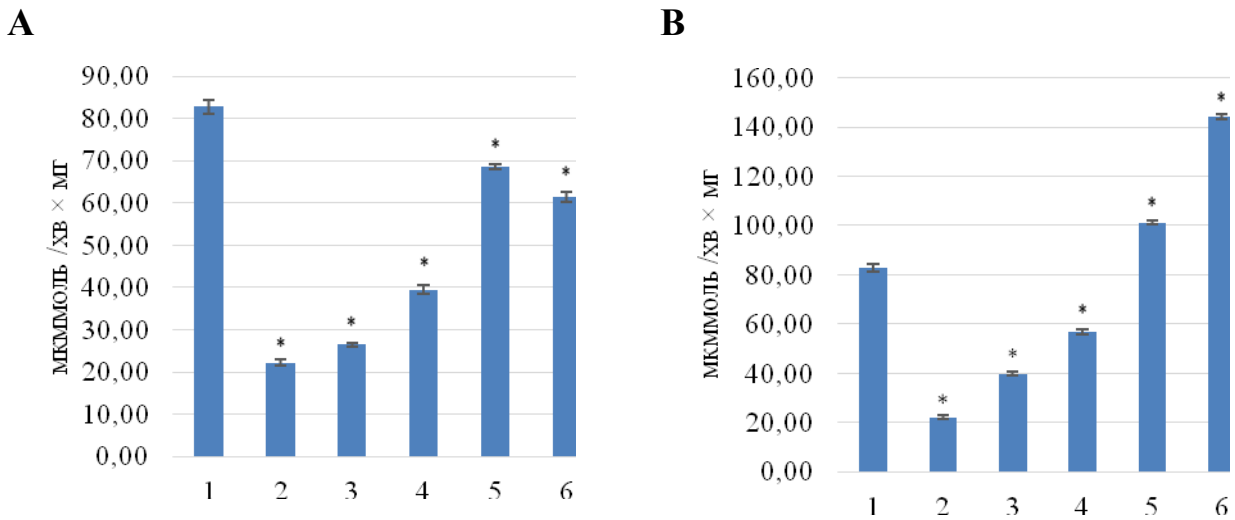
Як показано у дослідження [Seo J.H., 2009] Prx II у HeLa клітинах проявляє більшу чутливість до пероксиду гідрогена, а ніж Prx I, про що свідчить формування 80% гіперокисненого Prx II у порівнянні з 40% Prx I за умов дії на клітини 50мМ пероксиду гідрогена. Також показано, що гіперокиснення Prx II має обернений характер за концентрації пероксиду гідрогена, яка не перевищує 0,5 мМ. Як видно з наших результатів при додаванні 0,5 чи 1,0 мМ пероксиду гідрогену до клітин з над-експресованими НА-Prx II та Flag-КФК ГМ ми спостерігаємо спад спорідненості взаємодії між двома білками на прикладі клітин A549 (рис. 7.).

Зменшення інтенсивності сигналу за умов збільшення концентрації стресового фактору пероксиду гідрогена, 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 КФК ГМ за умов стресу (рис. 7.).

Показано, що Prx I у порівнянні з Prx II демонструє виразнішу шаперонну активність під час 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 [Lee W., 2007]. Для дослідження впливу стресорів пероксиду гідрогена та температури на питому активність КФК ГМ ми використали специфічну реакцію фосфорилування креатину за присутності КФК ГМ. Питому активність КФК ГМ визначали шляхом спектрофотометричного вимірювання абсорбції при довжині хвилі 597 нм у відповідності до рН-колориметричного методу [Yao Q.Z., 1982]. 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 збереженого відсотку питомої активності КФК ГМ, що є різницею між дією стресора без участі пероксиредоксинів та за їх присутності у реакції.

За дії стресового чинника пероксиду гідрогена у концентрації 1 мМ залишкова активність КФК ГМ склала 26,78 %. Молярні співвідношення між білком Prx I та КФК ГМ склали 1:1, 1:5, 1:10, 1:20. (рис. 8., А). Ми дослідили, що під час додавання Prx I відбувається пропорційне збереження питомої активності КФК ГМ зі збільшенням концентрації Prx I. Як видно з рис. 8 активності КФК ГМ за присутності Prx I дорівнюють 32,09 %, 47,77%, 82,87 %, 74,19 %. Де у аналогічних концентраціях Prx II було зареєстровано захист фосфорилуючої активності на рівні для 1:1 - 48,13 %, 1:5 - 68,52 %, 1:10 - 122,32 %, 1:20 - 174,07 % (рис. 8., В). Беручи до уваги отримані результати, ми можемо стверджувати, що у разі інгібуючої дії 1 мМ розчину пероксиду гідрогена, Prx I та Prx II демонструють виразну шаперонну активність по відношенню до білка-партнера КФК ГМ. Якщо порівняти отримані результати активності Prx I та Prx II, то у випадку Prx II за концентрацій 1:10 та 1:20

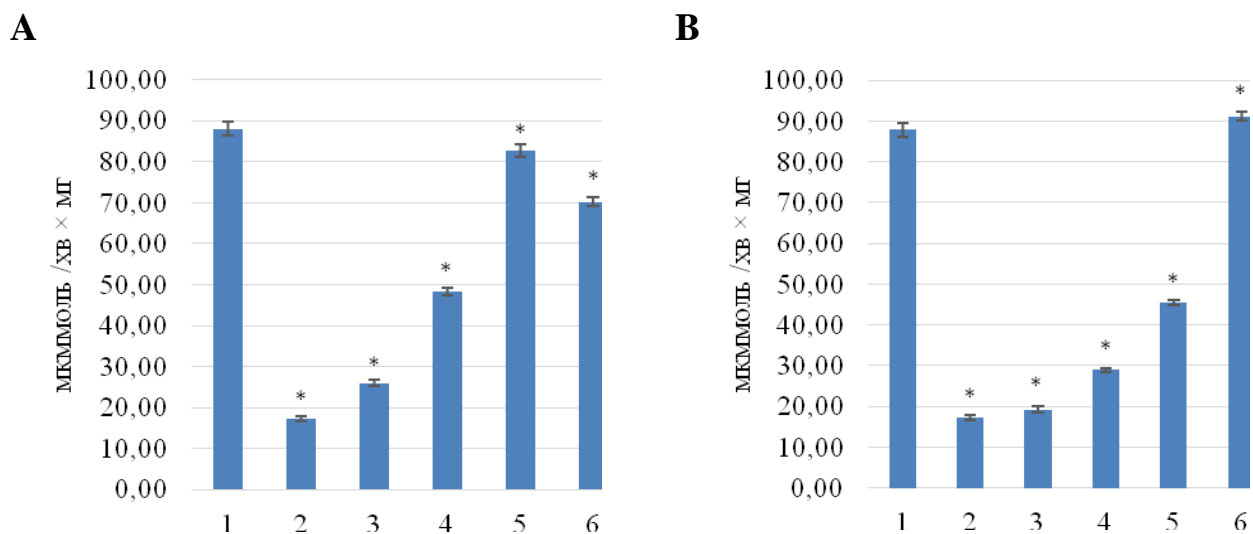
шаперонний білок демонструє не тільки відновлення початкової активності КФК ГМ, але й її підсилення до 174,07 % за співвідношення 1:20. Такий характер захисту активності КФК ГМ може бути пов'язаний із вищим ступенем спорідненості Prx II до КФК ГМ, а ніж Prx I до КФК ГМ.



**Рис. 8.** Питома ферментативна активність рекомбінантного білка КФК ГМ за дії пероксиду гідрогена та присутності Prx I (А) та Prx II (В) (n=3) Примітки: 1 – Контроль (КФК ГМ 25°C); 2 – 1 мМ Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>; 3 – Prx I/Prx II 1:1; 4 – Prx I/Prx II 1:5; 5 – Prx I/Prx II 1:10; 6 – Prx I/Prx II 1:20, \* – p<0,05.

З досліджень 2-Цис Prxs дріжджів видно, що цитозольні Prx I та Prx II приймають участь у захисті дріжджових клітин під час теплового шоку [Jang Н.Н., 2004.]. Для порівняння, мутація Prx I<sup>-/-</sup> та Prx II<sup>-/-</sup> призводить до загибелі аналогічних клітин [Jang Н.Н., 2004.]. Заміна амінокислотних залишків С47S/С170S в активному центрі Prx 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 [Jang Н.Н., 2004., Lim J.С., 2008].

Результати наших досліджень доводять причетність шаперонної функції пероксиредоксинів до захисту фосфорилуючої активності КФК ГМ під час теплового шоку. На (рис. 9., А) показано, що залишкова активність КФК ГМ після дії температури 42<sup>0</sup>С хв становила 18,84 %. Внаслідок додавання Prx I у співвідношенні 1:1 до КФК ГМ ми спостерігали збереження фосфорилуючої активності на рівні 30,48 %. Наступні підвищення концентрації Prx I у співвідношеннях 1:5, та 1:10 характеризувались збереженням 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 %.



**Рис. 9.** Питома ферментативна активність рекомбінантного білка КФК ГМ за дії температури та присутності Prx I (А) та Prx II (В) (n=3). Примітки: 1 – Контроль (КФК ГМ 25°C); 2 – 42°C; 3 – Prx I / Prx II 1:1; 4 – Prx I / Prx II 1:5; 5 – Prx I / Prx II 1:10; 6 – Prx I / Prx II 1:20, \* – p<0,05.

Одночасно, були дослідженні захисні властивості Prx II за умов теплового шоку. Як показано на (рис. 9. В), при додаванні Prx II у співвідношенні 1:1, КФК ГМ демонструє незначне збереження активності, що складає 21,23 %. Послідуючі підвищення концентрації Prx II до співвідношень 1:5; 1:10; та 1:20 мали позитивний характер на збереження активності КФК ГМ та склали 33,22 %, 51,71 %, та 102,74 % відповідно. Варто відмітити схожу тенденцію збереження 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 так і за температури 42 ° С. У той самий час, Prx II за концентрації 1:20 демонструє підсилення активності КФК ГМ за стресових умов.

## ВИСНОВКИ

Отримані результати досліджень розкривають біохімічні механізми специфічної взаємодії пероксиредоксинів Prx I та Prx II з КФК ГМ за фізіологічних умов та за дії стресорів. Вперше встановлено взаємодію білків Prx I/Prx II та КФК ГМ на прикладі клітинних ліній HeLa та A549 та оцінено зміну кооперативності за впливу температури та пероксиду гідрогена. Вперше продемонстровано шаперонний захист білку КФК ГМ за присутності Prx I/Prx II. Проведено моделювання взаємодії Prx II з білком-партнеру КФК ГМ. Перераховані вище дослідження розкривають нові аспекти щодо функціонування 2-Цис Prxs Prx I, Prx II у ролі білків шаперонів, що проявляють специфічні захисні властивості по відношенню до білків-партнерів. Це у свою

чергу може послужити підґрунтям для створення медичних препаратів для попередження розвитку нейродегенеративних хвороб чи раку.

- 1) Успішно клоновано та експресовано рекомбінантний білок КФК ГМ з бактеріальних клітинах *E.coli*, проведено його очищення за допомогою методів хроматографії;
- 2) Оцінено питому активність рекомбінантного білка КФК ГМ на прикладі специфічної реакції фосфорилування креатину. Показано, що питома активність КФК ГМ була інгібована на 36%, 57%, та 86% за температур 38°C, 40°C та 42°C відповідно. Де за пероксиду гідрогена інгібування спостерігали на рівні 17%, 58% та 74% за концентрацій 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 взаємодію між білком-партнером КФК ГМ з Prx I та Prx II на прикладі клітинних ліній HeLa та A549. Встановлено, що КФК ГМ є білком-партнером білків Prx I та Prx II. Показано, що Prx II має вищу кооперативність до КФК ГМ у порівнянні з Prx I в обох клітинних лініях A549 та HeLa. Продемонстровано послаблення взаємодії між Prx II та КФК ГМ в клітинних лініях HeLa та A549 під час гіперокиснення, що вказує на не причетність олігомеризації до взаємодії між білками Prx II та КФК ГМ;
- 4) Оцінено, що укорочення С-термінальної ділянки Prx II суттєво не впливає на зміну кооперативності з білком КФК ГМ.
- 5) Показано, що за умов дії стресу білки Prx I та Prx II проявляють захисні властивості по відношенню до білка-партнера КФК ГМ. У випадку Prx I максимальні значення питомої активності КФК ГМ спостерігались за співвідношень 1:1, 1:5, та 1:10. Де, Prx II демонструє збереження питомої активності КФК ГМ за співвідношень 1:1, 1:5, 1:10 та 1:20.
- 6) Під час моделювання взаємодії між КФК ГМ та Prx 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 Prx II.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Статті у фахових виданнях*

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. (Особистий внесок здобувача – клонування гену *ckb* за допомогою методу ПЛР та інтегрування гену в плазмідні носії pET-17b, pET-14b).

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. *(Особистий внесок здобувача – очищення рекомбінантного білку КФК ГМ за допомогою методів хроматографії, що поділяє за розміром та іонообмінної хроматографії).*

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. *(Особистий внесок здобувача – оцінка ферментативної активності рекомбінантного білка КФК ГМ на прикладі специфічної біохімічної реакції).*

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. *(Особистий внесок здобувача – моделювання міжмолекулярної взаємодії між білками КФК ГМ та Prx II).*

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. *(Особистий внесок здобувача – дослідження взаємодії КФК ГМ за допомогою методів ко-імунопреципітації та електрофорезу в поліакриламідному гелі).*

*Тези наукових доповідей*

6. 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.

7. Рахметов А.Д. Вивчення механізмів специфічної взаємодії пероксиредоксинів з креатинфосфокіназою головного мозку / Рахметов 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.

8. 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.

9. 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.

## 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 за спеціальністю 03.00.04-біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, МОН України, Київ, 2017.

В даній дисертаційній роботі було досліджено питому ферментативну активність рекомбінантного білку КФК-ГМ за умов температурного та окисного стресу. Показано інгібування активності КФК-ГМ на 74% за інкубування з 1 мМ пероксидом гідрогена та на 86% за температури 42°C.

На другому етапі роботи на прикладі реакції ко-імунопреципітації було продемонстровано взаємодію білків PrxI, Prx II та КФК-ГМ в клітинних лініях HeLa та A549 за дії стресорів. Підвищення температури сприяло кооперативності між КФК-ГМ та Prx II. При дослідженні шаперонних властивостей Prx I та Prx II ми виявили, що шаперонна активність Prx I за умов температурного стресу мала концентраційно залежний характер. Шаперонні властивості Prx II відзначались вищою ефективністю за впливу стресору пероксиду гідрогена у порівнянні з Prx I. На заключному етапі роботи були створені моделі взаємодії Prx II та КФК-ГМ за допомогою онлайн докінг-серверу ClusPro 2.0.

Враховуючи отриманні результати дослідження можна глибше усвідомити функціональну різноманітність та важливість білків пероксиредоксинів для підтримання клітинного гомеостазу. Ідентифікація КФК-ГМ як білка-партнеру Prx I/Prx II може слугувати попередником для створення терапевтичних стратегій лікування нейродегенеративних захворювань та раку.

**Ключові слова:** пероксиредоксини, КФК головного мозку, взаємодія, стрес, ко-імунопреципітація, шаперонна активність, білок-партнер, рекомбінантний білок.

## АННОТАЦИЯ

**Рахметов А.Д. Биохимические механизмы специфического взаимодействия белков пероксиредоксинов с креатинфосфокиназой головного мозга человека при воздействии стрессоров – Квалификационный научный труд на правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04-биохимия. - Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, МОН Украины, Киев, 2017.

В данной диссертационной работе была исследована удельная ферментативная активность рекомбинантного белка КФК-ГМ в условиях температурного и окислительного стресса. Показано ингибирование активности

КФК-ГМ на 74% за инкубирования с 1 мМ пероксидом водорода и на 86% при температуре 42 ° С.

На втором этапе работы на примере реакции ко-иммунопреципитации было продемонстрировано взаимодействие белков Prx I, Prx II и КФК-ГМ в клеточных линиях HeLa и A549 за действия стрессоров. Повышение температуры способствовало кооперативности между КФК-ГМ и Prx II. При исследовании шаперонных свойств Prx I и Prx II мы обнаружили, что шаперонная активность Prx I в условиях температурного стресса имела концентрационно зависимый характер. Шаперонные свойства Prx II отличались высокой эффективностью при воздействии стрессора пероксида водорода по сравнению с Prx I. На заключительном этапе работы были созданы модели взаимодействия Prx II и КФК-ГМ с помощью онлайн докинг-сервера ClusPro 2.0.

Учитывая полученные результаты исследования можно глубже изучить функциональное разнообразие и важность белков пероксиредоксинив для поддержания клеточного гомеостаза. Идентификация КФК ГМ как белка-партнера Prx I / Prx II может служить предшественником для создания терапевтических стратегий лечения нейродегенеративных заболеваний и рака.

**Ключевые слова:** пероксиредоксины, КФК главного мозга, взаимодействие, стресс, ко-иммунопреципитация, шаперонная активность, белок-партнер, рекомбинантный белок.

## SUMMARY

**Rakhmetov A.D. Identification of the specific interaction between peroxiredoxins and СКВВ proteins under stress conditions. - Manuscript.**

Dissertation for a candidate of biological sciences degree in specialty 03.00.04-biochemistry. - Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

To investigate functional reactivity of the recombinant СКВВ protein heat and hydrogen peroxide stresses were applied. The results of specific enzymatic assay have indicated on high susceptibility of the recombinant СКВВ to stressors. Reduction of specific activity of СКВВ under 1 mM hydrogen peroxide was registered by 74% and heat 42°C by 86%. To support our assay data heat and hydrogen peroxide stresses we applied to A549 and HeLa cells expressing СКВВ. Under the stresses reduced СКВВ immunoblot signals were registered. This results suggest low resistibility of СКВВ to heat and hydrogen peroxide stresses.

The results of co-immunoprecipitation assay (IP) have shown that Prx I has weak binding with of СКВВ whereas Prx II demonstrated strong interaction with СКВВ in A549 and HeLa cells. Exposure to heat stress but not to hydrogen peroxide resulted in increased interaction signal between Prx II and СКВВ protein. To understand whether truncation of C-terminal region of Prx II would affect the interaction of Prx II and СКВВ specific mutants of Prx II were introduced into the

HeLa and A549 cells. IP results have indicated on relatively high binding affinity between Prx II truncated mutants and CKBB.

To investigate chaperoning properties of Prx I and Prx II we used CKBB phosphorylation assay. We found that chaperoning capacity of Prx I under elevated temperature was concentration-dependent. At 3  $\mu$ M Prx I preserved 95% of CKBB specific activity what showed better protection results than Prx II. In contrast, Prx II was considerably more effective than Prx I in protection of CKBB specific activity under hydrogen peroxide stress. Prx II chaperoning capacity was very well maintained at 6  $\mu$ M, where CKBB specific activity was registered at 174% of control values. At the final stage of the work we investigated binding models that were generated by ClusPro 2.0 protein docking server. It was shown that 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 interaction.

Taking into account results of the study we could speculated that Prx I and Prx II involved in the protection of specific binding protein CKBB. This work expands our understanding of functional versatility of 2-Cys Prxs. Prx I/Prx II demonstrate strong chaperone activity toward newly identified binding protein CKBB. Therefore, this finding could serve as a potential precursor for new drug development for treatment of neurodegenerative diseases and cancer.

Key words: peroxiredoxin, creatine kianse brain type, steress induced interaction, co-immunoprecipitaiton, chaperonning activity, binding-protein, recombinant protein.