

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДИНА

МЕЖЕНСЬКА ОЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 577.151.6:577.161.11:577.152.3

**НОВІ ПРОТЕЇНОВІ МІШЕНІ ДІЇ ТІАМІНУ І ЙОГО ПОХІДНИХ
В НЕРВОВІЙ ТКАНИНІ**

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук
Пархоменко Юлія Михайлівна,
провідний науковий співробітник
відділу біохімії вітамінів і коензимів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
чл.-кор. НАН України, професор
Корнелюк Олександр Іванович,
завідувач відділу білкової інженерії та
біоінформатики
Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України

доктор біологічних наук, професор
Петров Сергій Анатолійович
завідувач кафедри біохімії
Одеського національного університету
ім. І.І. Мечникова

Захист відбудеться “__” лютого 2021 року о ___ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01054, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (01054, Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розісланий “__” _____ 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

Н.П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Вітамін В₁ (тіамін) - один з найважливіших незамінних мікронутрієнтів, що бере участь у багатьох фізіологічних процесах в організмі. Відомо, що різного походження функціональні порушення тіамін-залежних процесів в нервових клітинах є одним з важливих ініціюючих або обтяжуючих чинників в патогенезі багатьох нейродегенеративних захворювань, зокрема енцефалопатії Верніке-Корсакова, хвороб Альцгеймера і Паркінсона та інших (*Pan et al., 2017, Gibson et al., 2013, Jiménez-Jiménez et al., 1999, Calingasan et al., 1996*). Вже зараз високі дози вітаміну В₁ застосовують у медичній практиці для терапії цих патологій (*Constantini et al., 2013*). Позитивні ефекти, що спостерігаються при цьому, зазвичай пояснюються поліпшенням центрального метаболізму через коензимну роль тіамін дифосфату (ТДФ). Однак, терапевтична значущість доз тіаміну, що істотно перевищують необхідні для реалізації його коензимної функції, може вказувати на існування ще невідомих механізмів дії цього вітаміну. Дійсно, ряд даних свідчить про те, що функції тіаміну не обмежуються його коензимною дією. По-перше, покращення мозкових функцій організму при введенні високих доз тіаміну не завжди корелює зі збільшенням рівня ТДФ і/або ТДФ-залежних ензимів чи їх активності (*Haas, 1988, Parkhomenko et al., 1996, Vignisse et al., 2017*). По-друге, у всіх класах живих організмів, включаючи ссавців і людину, виявлено синтез некоензимних похідних тіаміну, зокрема таких, як тіамін трифосфат (ТТФ) і аденильований тіамін трифосфат (АТТФ) (*Bettendorff et al., 2007, Gangolf et al., 2010*). По-третє, відомі протеїни, що взаємодіють з цими чи іншими похідними тіаміну, відмінні від ТДФ-залежних ензимів і ензимів метаболізму тіаміну (*McLure et al., 2004, Nghiêm et al., 2000, Tanaka et al., 2011, Mkrtchyan et al., 2015*). У клітинах, стан яких є дуже динамічним (особливо нервових) некоензимні функції вітаміну В₁ пов'язують з функціонуванням окремого рухомого пулу біологічно активних похідних тіаміну, зокрема, його фосфатів (РПТ) (*Parkhomenko et al., 2016*), за участю системи певних протеїнів. В цьому аспекті, як одна з ключових ланок, привертає увагу тіамінзв'язувальний білок (ТЗБ), що його було вперше ізольовано і частково охарактеризовано у відділі біохімії коферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна (*Постоечко и др., 1987, Янчий и др., 2001, Сидорова и др., 2009*). Було показано, що ТЗБ є біфункціональним протеїном: поряд зі здатністю специфічно зв'язувати тіамін, він вибірково гідролізує його фосфорні ефіри, найбільш активно – тіамін трифосфат (ТТФ), і є інтегральним протеїном плазматичних мембран нервових клітин (*Пархоменко и др., 2010*). Крім того, шляхом мас-спектрометричного аналізу в препараті ТЗБ було показано велику вірогідність присутності протеїнів-ензимів з підкласу дегідрогеназ, зокрема МДГ та ГДГ (*Mkrtchyan et al., 2015*). Але сам ТЗБ залишився не ідентифікованим. В силу перерахованих причин, виявлення механізмів позакоензимної дії вітаміну В₁, зокрема ідентифікація нових протеїнових мішеней тіаміну і його похідних, є актуальним завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами відділу. Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу

біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України з проблеми «Біохімія тварин та людини» (шифр 2.28.4) за бюджетними темами: 1) № 4: «Роль вітамінів А, Е, В₁, РР, D₃, убіхінону та їх коензимів у забезпеченні функціонування спеціалізованих клітин за норми та за умов ініціації їх загибелі» (№ держреєстрації 0112U002625, 2012-2016 р.р.), розділ 3

«Вивчення механізмів регуляції обміну та функціонування вітаміну В₁ та його похідних в нервових клітинах та за нейродегенеративних патологій»; 2) № 15 «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (№ держреєстрації 0112U002624, 2012-2016 р.р.), підрозділ 2 «Взаємодія систем регуляції вітамінами та коензимами внутрішньоклітинного метаболізму; вивчення фундаментальних основ процесів функціонування біологічних систем і регуляції вітамінами Е, В₁, РР, коензимами та їх біологічно активними похідними внутрішньоклітинного метаболізму в нормі та за патології». Роботу було підтримано грантом РФФИ № 15-34-50124 (2015 р.).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи було ідентифікувати протеїни нервової тканини, що проявляють спорідненість до тіаміну, зокрема тіамінзв'язувальний білок (ТЗБ).

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

1. Синтезувати два варіанти сорбенту: такий що містить в якості ліганду тіамін (т-АС) і без тіаміну (АС без Т), та дослідити властивості цих сорбентів. За допомогою синтезованих сорбентів визначити специфічність зв'язування з тіаміном окремих ензимів, виявлених раніше в елюатах з т-АС.
2. Перевірити вплив тіаміну на активність окремих протеїнів (МДГ і ГДГ), що виявили афінність до тіаміну, з метою оцінити фізіологічність цього феномену.
3. Провести афінну хроматографію комерційного препарату МДГ на т-АС та ідентифікувати протеїни з МДГ активністю у фракціях елюатів з т-АС.
4. Визначити молекулярну масу протеїнів з екстрактів нервової тканини, що після зв'язування з т-АС елюювалися розчином 1М NaCl, рН 7,4 (згідно протоколу, що раніше використовувався для виділення ТЗБ) або 10 мМ розчином тіаміну, рН 7,4 (модифікований метод) і провести ідентифікацію протеїнів, що відповідають за молекулярною масою описаному раніше ТЗБ (Mr= 95-110 кДа) та субодиницям (35-37 і 65-70 кДа).
5. З залученням сучасних методів експериментально перевірити наявність в препараті ТЗБ протеїнів, ідентифікованих на попередньому етапі як такі, що можуть входити до складу ТЗБ, а також дослідити *in vivo* вплив забезпеченості організму тіаміном на їх вміст.
6. Проаналізувати за допомогою біоінформативних підходів можливість і біологічне значення зв'язування з тіаміном протеїнів, ідентифікованих як складові ТЗБ; визначити тіамінзв'язувальні сайти в цих протеїнах.

Об'єкт дослідження: механізми некоензимної дії вітаміну В₁ в нервовій тканині.

Предмет дослідження: протеїни нервової системи, що мають спорідненість до тіаміну чи його біологічно активних похідних.

Методи дослідження: дослідження проведені з використанням наступних методів: афінна хроматографія (АХ); методи білкової хімії; спектрофотометрія, флюориметрія; електронна мікроскопія. Ідентифікація протеїнів проводилася з використанням методів одно- і двовимірного гелі-електрофорезу з SDS, мас-спектрометрії (МС), Вестерн-блотингу, біоінформативних підходів.

Наукова новизна одержаних результатів. В ході роботи з застосуванням афінної хроматографії та специфічної елюції визначено, що зв'язування з тіаміном протеїнів, які проявляють малатдегідрогеназну та глутаматдегідрогеназну активності, так само як і тіамін фосфат гідролазну активність, є специфічним. В експериментах *in vitro* показано вплив тіаміну на МДГ активність та тіаміну і ТДФ на ГДГ активність протеїнів, елюйованих з афінного сорбенту, що містить тіамін як ліганд (т-АС). В дослідях *in vivo* підтверджено залежність активності вищевказаних ензимів від забезпеченості організму тіаміном. Після проведення афінної хроматографії комерційного препарату МДГ у фракціях елюатів з т-АС з використанням МС-аналізу ідентифіковано ізозими МДГ та деякі мінорні протеїни, здатні зв'язуватися з тіаміном, що раніше не були відомі як тіамін-залежні. Аналіз протеїнів з екстрактів тканини мозку, що специфічно зв'язуються з тіаміном у складі афінного сорбенту, проведений з залученням мас-спектрометрії, вестерн-блотингу та біоінформативного аналізу, дозволив вперше визначити варіанти протеїнів, що можуть бути складовими ТЗБ, зокрема, комплекс протеїнів LRP4-Agrin, який є компонентом кластеру nAHP. Вперше з використанням методу молекулярного докінга визначено амінокислотні залишки у складі поліпептидних ланцюгів як Агріну, так і LRP4, що беруть участь у зв'язуванні тіаміну. Порівняльний аналіз сайтів зв'язування тіаміну та його фосфорних ефірів з цими протеїнами і з відомими тіамін-залежними протеїнами показав їх високу подібність і низьку вірогідність заміни тіаміну аденозиновими сполуками або ацетилхоліном, а також дав змогу пояснити причини більш низької спорідненості до ТЗБ фосфорних ефірів тіаміну у порівнянні з тіаміном. Біоінформативні інструменти дозволили передбачити можливе біологічне значення зв'язування тіаміну чи його біологічно активних похідних з комплексом, що складається з протеїнів Agrin та LRP4.

Практичне значення одержаних результатів. Приймаючи до уваги той факт, що з В₁-недостатністю пов'язана значна кількість патологій, в подальшому отримані дані можуть бути основою для визначення терапевтичних мішеней та пошуку шляхів для розробки методів діагностики та лікування захворювань, пов'язаних з недостатністю тіаміну в організмі. Результати використовуються у власній педагогічній діяльності при проведенні занять з курсу «Біохімія» в Національному медичному університеті ім. О.О. Богомольця.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота – завершене дослідження, виконане здобувачем відповідно до поставленої мети та завдань самостійно або за його безпосередньої участі. Головна ідея та задачі досліджень були сформульовані науковим керівником – д.б.н. Пархоменко Ю.М. Підбір, систематизація, аналіз та узагальнення відповідних літературних даних було

проведено дисертанткою. Синтез афінних сорбентів виконаний за безпосередньої участі дисертантки та за допомоги спеціалістів в області афінної хроматографії та органічного синтезу, зокрема, чл.-кор. НАН України, д.х.н. Вовка А.І. та д.б.н. Верьовки С.В. Деякі експерименти були проведені разом із співробітниками Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, які є співавторами опублікованих робіт. Отримання мас-спектрів протеїнових смуг після афінної хроматографії та гель-фільтрації виконано к.б.н. Ребрівим А.В. (Київ, Україна), в окремих випадках після афінної хроматографії МС аналіз проводився д. Кене Т. (Магдебург, Німеччина). Дослідження методом електронної мікроскопії виконані с.н.с. Чернишовим В.І. (ІБХ ім. О.В. Палладіна). Кінетичний і статистичний аналіз експериментальних результатів було здійснено автором дисертації. Біоінформативний аналіз отриманих результатів виконаний дисертанткою самостійно. Аналіз результатів, їх узагальнення, інтерпретацію, формулювання основних положень і висновків роботи було проведено разом з науковим керівником. Всі розділи роботи та автореферат написані дисертанткою самостійно.

Апробація результатів дисертації Результати досліджень, що викладено в дисертації, були заслухані, апробовані та обговорені на таких наукових заходах: XI Український біохімічний з'їзд (2014 р., Київ, Україна); X Парнасівська конференція (2016 р., Вроцлав, Польща); XI Парнасівська конференція - Форум молодих учених «Біохімія та молекулярна біологія для інноваційної медицини» (2018 р., Київ, Україна); II Білоруський біохімічний конгрес «Сучасні проблеми біохімії та молекулярної біології» (2018 р., Гродно, Білорусь); III міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (2015 р., Дніпропетровськ, Україна); міжнародна конференція EMBO at Basellife-2018 (2018, Базель, Швейцарія); міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії» присвячена 100-річчю проф. Б.В. Сухомлинова (2016 р., Львів, Україна); міжнародна наукова конференція молодих вчених з медичної біології ФГБУ ФНКЦ фізико-хімічної медицини ФМБА (2016 р., Москва, РФ); конференція молодих вчених Ін-ту біохімії ім. О.В. Палладіна «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології присвячена В.О. Беліцеру» (2016 р., Київ, Україна); XII Український біохімічний конгрес присвячений 165-й річниці від дня народження І.Я. Горбачевського (2019 р., Тернопіль, Україна), V Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (2020 р., Дніпро, Україна). Результати експериментів неодноразово доповідались та обговорювались на наукових семінарах відділу біохімії вітамінів і коензимів, наукових семінарах та засіданнях Вченої Ради Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (2014-2020 рр.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 9 статей (серед яких 8 відповідають вимогам ДАК, оскільки 6 робіт опубліковано у журналах, що входять до списку ДАК, а 2 статті – у закордонному фаховому журналі, причому 7 робіт реферуються у базі Scopus, а 1 – у Web of Science) та 11 тез доповідей у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1320-6492>

Структура і обсяг дисертації. Дисертація містить такі розділи: анотація, зміст, список використаних скорочень, вступ, огляд літератури (складається з двох глав), матеріали та методи досліджень, результати та їх обговорення, узагальнення, висновки, список використаних джерел (362 найменування) та трьох додатків, включно зі списком публікацій здобувача. Дисертацію викладено на 230 сторінках друкованого тексту, загальна кількість ілюстративних матеріалів у роботі – 15 таблиць та 37 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. Представлено дані щодо властивостей молекули тіаміну і його природних та штучних біологічно активних похідних. Узагальнено сучасні уявлення відносно механізмів участі тіаміну у функціонуванні клітин нервової тканини за норми та за умов розвитку процесів нейродегенерації. Приведено аналіз сучасних відомостей щодо протеїнів, здатних зв'язуватися з тіаміном, їх ролі в транспортуванні тіаміну та реалізації його біохімічних функцій.

Матеріали та методи досліджень.

Афінні сорбенти синтезували за описаним методом (*Клящицький и др., 1980*) за безпосередньої участі здобувача з деякою модифікацією, що полягала в зміні вихідної сполуки для синтезу спейсеру. Спейсер було надано чл.-кор., д.х.н. Вовком А.І. У якості стаціонарної матриці для сорбентів використали сефарозу 4В. Синтез сорбенту, що не містив тіаміну, було закінчено після іммобілізації спейсеру. Для визначення концентрації ліганду у складі афінного сорбенту використовували тіохромний метод. При дослідженні протеїнів, що проявляють спорідненість до тіаміну, афінній хроматографії піддавали екстракт протеїнів, отриманих з ацетонового порошку мозку щурів (білі щури самці лінії Вістар вагою 120-200 г) як описано раніше (*Постоєнко и др., 1987*), або отриманий таким же чином екстракт протеїнів з мозку бика (бики віком 1,5-3 роки чорно-рябої породи). Для ідентифікації ізозимів/ізоформ МДГ використовували комерційний препарат малатдегідрогенази з серця свині (Reanal, Угорщина). Використаний нами комерційний препарат МДГ з серця свині на момент цих експериментів мав питому активність 92,5 нмоль/хв*мг протеїну. При цьому, за даними виробника, питома активність препарату дорівнювала 100,0 нмоль/хв*мг протеїну. Модель недостатності тіаміну відтворювали за допомогою дієти Габлера. В цих експериментах використовували білих щурів-самців масою 100-120 г. Дослідження проведено без порушень загальноприйнятих біоетичних норм гуманного поводження з лабораторними тваринами згідно до відповідних національних та міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт (Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986); Закон України “Про захист тварин від жорстокого поводження” № 3447-IV, 2006). Активність дегідрогеназ визначали спектрофотометрично при 340 нм щодо зменшення поглинання субстрату реакції NADH при його окисненні до NAD. Дослідження ефектів тіаміну або ТДФ на ізольовані шляхом афінної хроматографії ензими проводили в специфічних для кожного ензиму умовах максимізації ефектів, визначених у попередніх дослідженнях на комерційних

препаратах МДГ і ГДГ та мітохондрійних екстрактах. Концентрацію протеїнів в розчинах визначали загальноприйнятими методами (при 280 нм, метод Лоурі). Крім того, у протеїнових фракціях, що були елюйовані розчином тіаміну, дублювали визначення вмісту протеїну, використовуючи метод Бредфорд, для якого присутність тіаміну не є перешкодою. Електрофоретичне розділення протеїнів проводили у буферній системі Леммлі з використанням 10-15% розділяючого поліакриламідного гелю. Після електроперенесення протеїнів мембрану інкубували з відповідними первинними антитілами у попередньо підібраних оптимальних концентраціях (поліклональні антитіла кроля, специфічні до Агріну або LRP4). Імунореактивні сигнали виявляли використовуючи реагенти для посиленої хемілюмінесценції (люмінол, кумарова кислота та гідроген пероксид, Sigma, США). Крім того блотограми проявляли з використанням системи діамінобензидин + H_2O_2 . Для денситометричного аналізу застосовано програму CLIQS від TotalLab Ltd (v.1.5.167). Процедуру 2D-електрофорезу для розділення ізозимів МДГ, афінних до тіаміну, проводили з використанням приладу для ізофокусування протеїнів Protean IEF Cell ("Bio_Rad", США) і установки для ДСН ПААГ-електрофорезу Mini-PROTEAN 3 cell («Bio_Rad», США) згідно інструкції виробника. Мас-спектри отримували на MALDI-TOF- масспектрометрі Voyager DE PRO («Applied Biosystems», США). Ідентифікацію протеїнів за наборами значень мас пептидів після трипсинолізу проводили з використанням опції Peptide Fingerprint онлайн-ресурсу Mascot («Matrix Science», США) (<http://www.matrixscience.com>). Електронномікроскопічне дослідження проведено за методом Reynolds. Для вирівнювання протеїнів за первинною амінокислотою послідовністю використано онлайн доступні біоінформативні ресурси Align (ClustalO) (UniProt), ClustalW від ExPASy (Swiss Institute of Bioinformatics) і спеціалізовані програми PyMOL (версія 1.1) та Jalview (версія 2.11.0). Для 3D-вирівнювання протеїнів використано біоінформативний ресурс Sequence & Structure Alignment (The Protein Data Bank). Докінг тіаміну до протеїнів, виявлених з використанням мас-спетрометрії в елюатах з тіамінвмісного афінного сорбенту (т-АС), виконувався за допомогою спеціалізованої програми AutoDock Vina (версія 4.2), а також пакетів програм MGLTools та Discovery Studio. Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами статистики. У всіх експериментах було мінімум три технічних повтори. Розраховували значення середніх арифметичних (M) та їх середніх квадратичних похибок (m). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій t Стьюдента. Для аналізу достовірних відмінностей між двома групами використовувався непарний односторонній тест Манна-Уїтні. Значення p-value < 0,05 вважали достовірним. Для розрахунків та графічної презентації одержаних результатів були використані комп'ютерні програми Microsoft Excel (пакет Office 365) з застосуванням надбудови BioStat від AnalystSoft та GraphPad Prism, версія 8.0 (США).

Результати досліджень та їх обговорення

Аналіз в елюатах з т-АС протеїнів мозку, що здатні зв'язуватися з тіаміном. Для вирішення поставлених завдань було синтезовано два сорбенти. Один з них,

що містив тіамін як ліганд, був позначений як т-АС. Для з'ясування чи є зв'язування протеїнів з тіаміном у складі т-АС специфічним, було синтезовано сорбент, що не містив тіаміну і його позначили як АС без Т. Результати експериментів підтвердили наявність у протеїнових фракціях, елюйованих з т-АС як з використанням неспецифічної елюції (1М NaCl, рН 7.4), так і з використанням специфічної елюції (10 мМ тіамін, рН 7.4) на I етапі афінної хроматографії, протеїнів з МДГ і ГДГ-активністю. Це мало місце при виділенні протеїнів як з мозку щура, так і з мозку бика (табл.1). Проведений в подальшому в університеті м. Магдебург (Німеччина) МС-аналіз наших зразків з новосинтезованого т-АС також показав вірогідність присутності МДГ і ГДГ.

Таблиця 1 – Малатдегідрогеназна та глутаматдегідрогеназна активності у протеїнових фракціях з мозку щура і бика до та після афінної хроматографії з застосуванням т-АС і специфічної елюції

Протеїнова фракція		Загальна концентрація протеїнів, мг/мл	Питома активність, нмоль/хв*мг протеїну	
			МДГ	ГДГ
<i>1</i>		<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>Протеїни з мозку щура</i>				
Нанесений препарат (екстракт АП)		1,19	128,5±10,3	6,8±0,6
Елюент	10 мМ тіамін хлорид, рН 7.4	0,339	255,1±23,0	9,3±0,7
	1М NaCl	0,237	151,6±13,6	6,3±0,4
	2М сечовина	0,227	51,2±4,1	3,7±0,3
<i>Протеїни з мозку бика</i>				
Нанесений препарат (екстракт АП)		1,393	191,2±13,4	18,7±1,1
Елюент	10 мМ тіамін хлорид, рН 7.4	0,443	460,5±55,3	11,8±0,9
	1М NaCl	0,263	351,7±31,7	14,1±1,5
	2М сечовина	0,2	58,5±6,0	2,1±0,2

Щодо фосфатазних активностей, то експериментальні результати показали, що рівень ТДФ-азної активності був більшим у порівнянні з ТМФ-азною. Це стосується усіх етапів елюції. Тобто з т-АС елюювався протеїн, що був більш активним по відношенню до ТДФ. Це відповідає інформації, яка була нам відома про властивості ТЗБ з попередніх досліджень (зростання гідролазної активності по відношенню до фосфатів тіаміну у порядку ТМФ <ТДФ <ТТФ).

Визначені у тіаміновому елюаті поряд з тіамінфосфатазними нуклеотидфосфатазні активності були різного рівня. Проте на відміну від ТДФ-азної активності, у фракції «протеїни, що не зв'язалися» рівень нуклеотидфосфатазних активностей (особливо аденозинфосфатгідролазних) був значно вищим порівняно з такими у препараті нанесеному на т-АС. Це означає, що більша частина протеїнів, яким властиві ці активності, з т-АС не зв'язалися.

Афінна хроматографія протеїнових екстрактів мозку на сорбенті, що не містить тіамін як ліганд. Надійним, дешевим та найшвидшим способом оцінити різницю в елюатах з т-АС та АС без Т було вимірювання ензиматичних активностей, тому ми орієнтувалися на активності МДГ і ГДГ в елюатах, а також на тіамінфосфатгідролазні активності характерні для ТЗБ. Через структурну схожість крім фосфатів тіаміну як субстрати було використано аденозинфосфати та низка інших нуклеотидів. Як показали результати експериментів в елюатах з сорбенту, що не містив тіаміну, з усіх досліджених активностей було виявлено тільки аденозинфосфатгідролазні. Причому їх рівень в тіамінових елюатах був значно меншим ніж у елюйованих натрій хлоридом чи сечовиною. Тобто, отримані дані свідчили, що протеїни з МДГ, ГДГ і тіамінфосфатазними активностями зв'язуються з тіаміном специфічно.

Вплив тіамінових сполук на активність малат- і глутаматдегідрогенази *in vitro* та *in vivo*. Ефекти тіамінових сполук на ГДГ та МДГ активності протеїнів в зразках, елюйованих з т-АС, досліджували з урахуванням отриманих раніше на комерційних препаратах МДГ і ГДГ або частково очищених мітохондрійних екстрактах даних про діючі концентрації тіаміну і ТДФ на досліджувані ензими. У порівняльних експериментах використовували фіксовані концентрації тіаміну (0,05 мМ) і ТДФ (1 мМ), співвідношення яких імітує ситуацію *in vivo*. Отримані

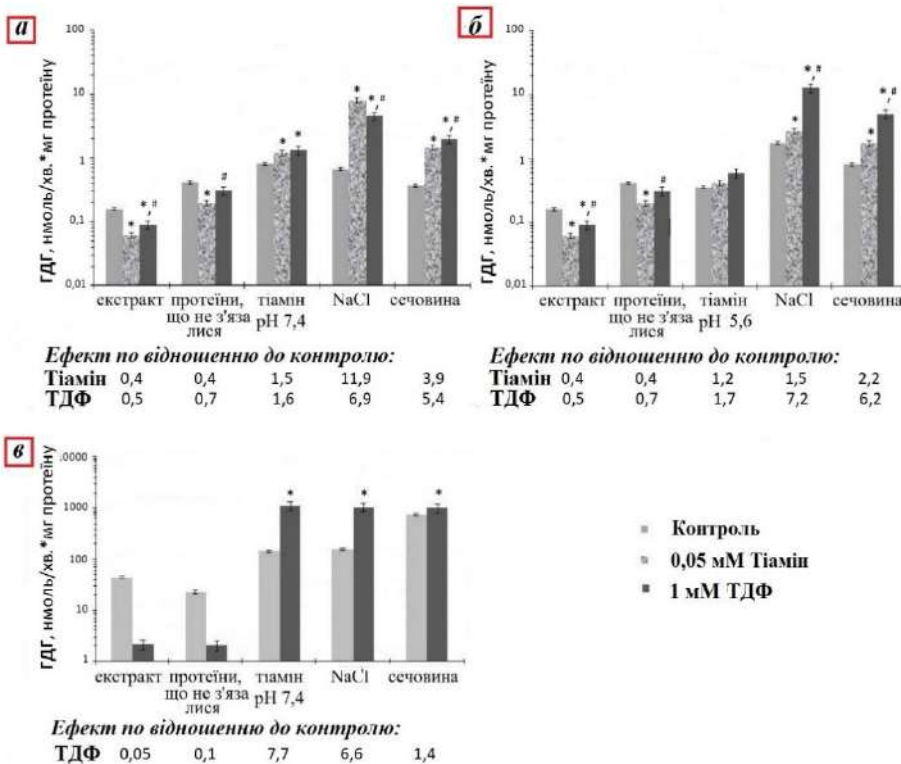


Рис.1 - Вплив тіаміну і/або тіаміндифосфату (ТДФ) на активність глутаматдегідрогенази (ГДГ) з мозку бика або щурів, що елюються з т-АС за різних умов: **а** - ефекти тіаміну і ТДФ на активність ГДГ після афінної хроматографії ацетонового екстракту синапсом мозку бика при застосуванні на I етапі елюції 10 мМ розчину тіаміну, рН 7.4; **б** - ефекти тіаміну і ТДФ на активність ГДГ після афінної хроматографії ацетонового екстракту синапсом мозку бика

при застосуванні на I етапі елюції 10 мМ розчину тіаміну, рН 5.6; **в**- ефект ТДФ на активність ГДГ після АХ гомогената кори мозку щура при застосуванні на I етапі елюції 10 мМ розчину тіаміну, рН 7.4. Наведено усереднені результати по 2-4 незалежних експериментах. *, # - Достовірні ($p < 0,05$) відмінності від контрольної активності і від активності в присутності 0,05 мМ тіаміну, відповідно, згідно t-тесту Стьюдента.

в експериментах *in vitro* дані свідчили, що тіамін мав активуючу дію на ізольовані протеїни з МДГ і ГДГ активністю. Так, в присутності тіаміну МДГ активність у протеїновій фракції, яка була елюйована 10 мМ тіаміном (рН 7.4), зростала у 6,9 рази (рис.2), а ГДГ активність - у 1,5 рази (рис.1). При цьому слід зауважити, що на момент цих дослідів у протеїнових зразках тіамін, натрій хлорид та сечовина були відсутні, що досягалося швидкою заміною буферу на центрифужних ультрафільтрах. Для визначення ефекту тіаміну або ТДФ додавалися у реакційне середовище безпосередньо перед вимірюванням.

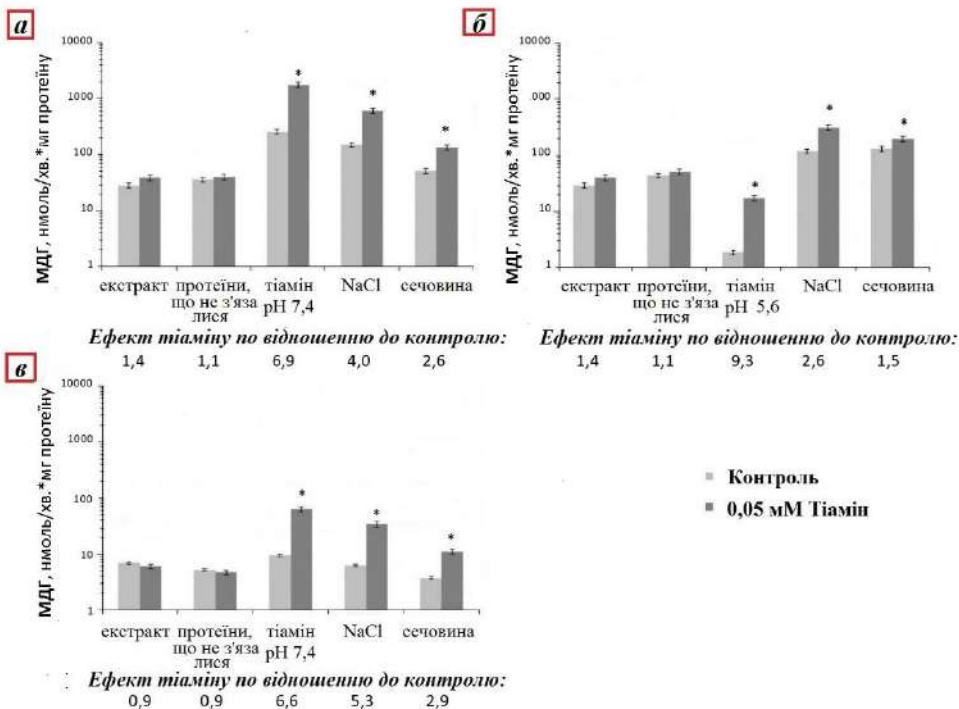


Рис.2 - Вплив тіаміну (0,05 мМ) на активність малат-дегідрогенази (МДГ) з мозку бика і щурів, що елюються з *m*-АС в різних умовах: **а** - ефект тіаміну на активність МДГ після афінної хроматографії ацетонового екстракту синапсом мозку бика при застосуванні на I етапі елюції 10 мМ розчину тіаміну, рН 7.4; **б** - ефект тіаміну на активність МДГ після афінної хроматографії ацетонового екстракту синапсом мозку бика при застосуванні на I

етапі елюції 10 мМ розчину тіаміну, рН 5.6; **в** - ефект тіаміну на активність МДГ після афінної хроматографії гомогената кори мозку щура при застосуванні на I етапі елюції 10 мМ розчину тіаміну, рН 7.4. Наведено усереднені результати по 2-5 незалежних експериментах. * - Достовірні ($p < 0,05$) відмінності активності в присутності тіаміну від контрольної згідно *t*-тесту Стьюдента.

Важливим напрямком наших досліджень були експерименти *in vivo*. Для вирішення поставленого в цих дослідженнях завдання, а саме оцінити ймовірність впливу забезпеченості тканини мозку щурів тіаміном на активність МДГ і ГДГ *in vivo*, ми використовували модель класичного V_1 -авітамінозу. Розуміючи, що за 4 тижні утримання тварин на безтіаміновій дієті знижується не лише забезпеченість тканин тіаміном, а й порушуються багато інших процесів, і, можливо, відбуваються якісь зміни в клітинних структурах, ми частині щурів з групи V_1 -дефіцитних тварин за добу до декапітації одноразово вводили 200 мкг тіаміну на кг маси. При цьому ми припускали, що якщо зниження активності досліджуваних ензимів зумовлене тільки зменшенням вмісту тіаміну у тканині мозку, то введення високої дози вітаміну призведе до підвищення або взагалі

нормалізації цих активностей. Як видно з наведених у табл.2 даних, при класичному В₁-авітамінозі спостерігається істотне зниження всіх досліджених показників. Після одноразового введення високої дози тіаміну всі показники підвищуються. Проте одноразове введення тваринам тіаміну не призвело до повної нормалізації рівня ТДФ, активності тіамініпрофосфокінази (ТПК, ЕС 2.7.6.2) і ГДГ. Це може свідчити про те, що при жорсткому тривалому В₁-авітамінозі відбуваються стабільні зміни як в системі обміну тіаміну, так і в інших клітинних структурах, для нормалізації яких потрібен більш тривалий час.

Таблиця 2 - Вміст ТДФ (мкг в 1 г вол. тканини), SH-груп (мкмоль в 1 г вол. тканини) і активність досліджуваних ензимів: МДГ і ГДГ (мкмоль/хв * г тканини), а також ТПК (мкг ТДФ за 1 годину на 1 мг протеїну) в гомогенаті мозку щурів з моделлю В₁ авітамінозу і після введення авітамінозних щуром 200 мкг тіаміну.

Показник	Контроль	Авітаміноз В ₁	Авітаміноз В ₁ +тіамін
Вміст ТДФ	2,25±0,32	1,12±0,25*	1,55±0,24
Вміст SH-груп	1,70±0,11	1,40±0,10*	1,75±0,08 [#]
Активність МДГ	19,35±1,01	4,53±0,74*	22,34±5,18 [#]
Активність ГДГ	2,29±0,06	1,51±0,09*	1,87±0,24
Активність ТПК	0,14±0,01	0,08±0,01*	0,11±0,01 [#]

*, # - відповідно, показник достовірно відрізняється від такого в контрольній групі тварин і в групі В₁-авітамінозних тварин при $p < 0,05$.

Таким чином, усі дані, отримані в експериментах *in vivo*, свідчать про те, що виявлене явище є фізіологічним і активності досліджуваних ензимів (МДГ, ГДГ) реагують на короткострокове введення тіаміну ззовні.

МС-ідентифікація ізозимів/ізоформ малатдегідрогенази, здатних зв'язуватися з тіаміном, з використанням комерційного препарату МДГ. Використання комерційного препарату МДГ з серця свині у наших дослідженнях було зумовлене двома міркуваннями. По-перше, безпосереднє зв'язування очищеного препарату ензиму з тіаміном в процесі афінної хроматографії було ще одним підтвердженням специфічності зв'язування з тіаміном. У цих експериментах повністю відтворювався протокол, що застосовувався для виділення тіамінзв'язувальних протеїнів мозку. По-друге, попередні електрофоретичні дослідження показували, що препарат МДГ, який був у нашому розпорядженні, є гетерогенним. Ми вважали, що причиною є присутність в препараті декількох ізозимів МДГ, характерних для клітин тварин. Тож наступні серії експериментів були спрямовані на з'ясування питання про те чи є спорідненість до тіаміну притаманною усім видам МДГ чи тільки певним її ізозімам. Аналіз профілю елюції протеїнів з т-АС-колонки показував, що елюється кілька піків з МДГ-активністю, що підтверджувало здатність декількох ізоформ МДГ зв'язуватися з тіаміном (рис.3). Потрібно було з'ясувати які саме.

Відомо, що різні ізозими МДГ відрізняються за ізоелектричною точкою, тому для підвищення точності ідентифікації було вирішено застосувати двовимірний

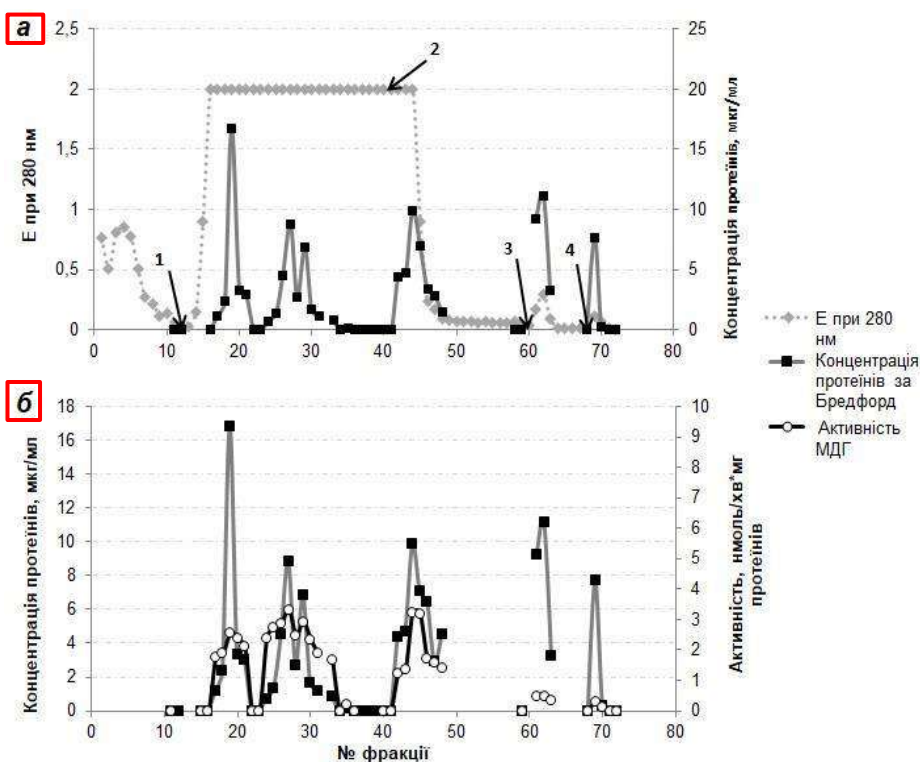


Рис.3 – Афінна хроматографія на т-АС препарату МДГ з серця свині: **а** - вихід протеїну, контрольований двома різними методами - вимірювання при 280 нм, аналіз вмісту протеїнів у фракціях по Бредфорд (реєстрація при довжині хвилі 595 нм); стрілки вказують на зміну елююючого розчину: 1 - 10 мМ тіамін, 2 -10 мМ трис-НСІ буфер (рН 7,4), 3-1М NaCl, 4 - 2М сечовина; **б** - активність МДГ у фракціях

електрофорез, що давав змогу розділити протеїни, елюйовані тіаміном, за двома параметрами: ізоелектричною точкою та молекулярною масою. Результати цього розділення представлено на рис.4. Зафарбовані сріблом зони, у яких сфокусувалися протеїни, було відібрано на МС-аналіз.

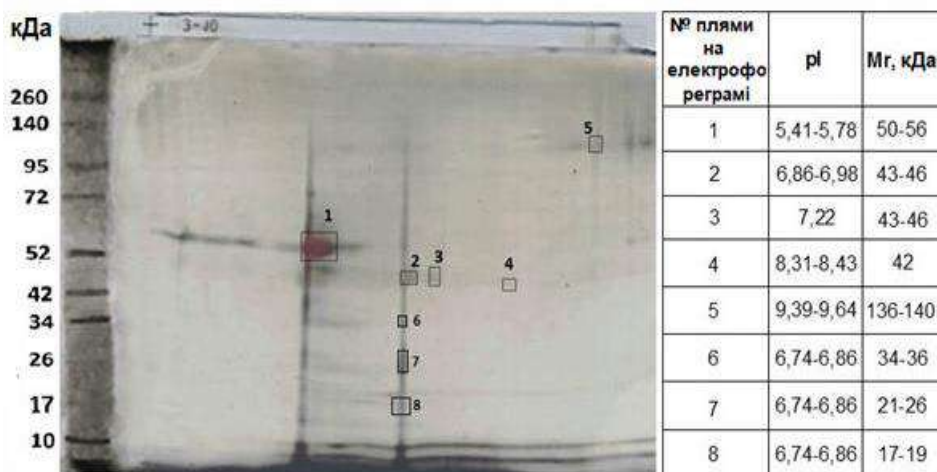


Рис.4 – 2D-електрофорез протеїнів комерційного МДГ з серця свині, елюйованих з т-АС 10 мМ тіаміном (рН 7,4) та параметри плям. Прямокутники вказують на протеїнові плями, які були вирізані з гелю для аналізу методом MALDI TOF MS

Результати МС-аналізу з достовірною вірогідністю показали, що з тіаміном здатні зв'язуватися дві різні за молекулярною масою мітохондрійні ізоформи МДГ, тобто дві різні МДГ2, і частково охарактеризована ізоформа цитозольного ізоциму МДГ, а саме: МДГ1В. Крім того, в елюатах з т-АС при афінній хроматографії комерційного препарату МДГ МС-аналіз показав присутність лактатдегідрогенази (оскільки МДГ і ЛДГ це протеїни одного сімейства), а також протеїни, яким потенційно може бути властива МДГ активність. Це протеїни, що містять МДГ/ЛДГ домен, а саме лінгвальна ліпаза і ензим, що є другим компонентом

системи убіквітинування протеїнів UEV-3. Як відомо з літературних джерел, для лінгвальної ліпази малатдегідрогеназна активність показана біоінформативно за гомологією. Те, що половина протеїну UEV-3 (альтернативна назва EV and lactate/malate dehydrogenase domain-containing protein) представляє собою МДГ/ЛДГ домен, показано експериментально, у т.ч. за допомогою отримання рекомбінантного протеїну (*Walker et al., 2017*).

Гель-фільтрація протеїнових фракцій, елюйованих з т-АС в процесі АХ екстрактів з мозку щурів, визначення молекулярної маси тіамінз'язувальних протеїнів (ТЗП). Після афінної хроматографії наступним етапом виділення ТЗБ з мозку була гель-фільтрація. Цей етап також дозволяє визначити молекулярну масу виділених ТЗП. Протеїни виділяли як за базовим методом (тобто з використанням натрій хлориду на I етапі), так і за модифікованим протоколом, де було введено специфічну елюцію тіаміном на I етапі. В отриманих після гель-фільтрації різних за молекулярною масою протеїнових фракціях (табл.3) визначали ензиматичні активності, характерні для ТЗБ, та деякі інші (рис.5). Протеїни у смугах, які відповідали за молекулярною масою описаному раніше ТЗБ та його субдиницям, піддавали МС-аналізу. Оскільки виявилось, що навіть після гель-фільтрації МДГ-азна активність супроводжує ТДФ-азну і розділити їх не вдається, орієнтувалися на доріжки, у яких для електрофорезу розміщували протеїнові фракції, що проявили найвищі рівні ТДФ-азної активності. Тому в першу чергу МС-аналізу піддавали протеїнові фракції 5 та 7, отримані в процесі ГФ протеїнів, елюйованих з тАС розчином натрій хлориду на I етапі елюції (Табл.3), та 2 і 3, відповідно, після специфічної елюції розчином 10 мМ тіаміну (Табл.3).

Таблиця 3 - Молекулярні маси протеїнів, що знімаються з т-АС в процесі афінної хроматографії на I етапі 1М NaCl або 10 мМ тіаміном, визначені шляхом гель-фільтрації

1М NaCl		10 мМ Тіамін	
№ піку	кДа	№ піку	кДа
1	>497,4	1	>472,8
2	251,4		
3	223,2		
4	127,4		
5	105,6	2	97,0
6	70,7		
7	36,9	3	36,0
		4	22,6
8	17,2	5	17,5
9	10,7	6	9,3
10	5,7	7	5,3

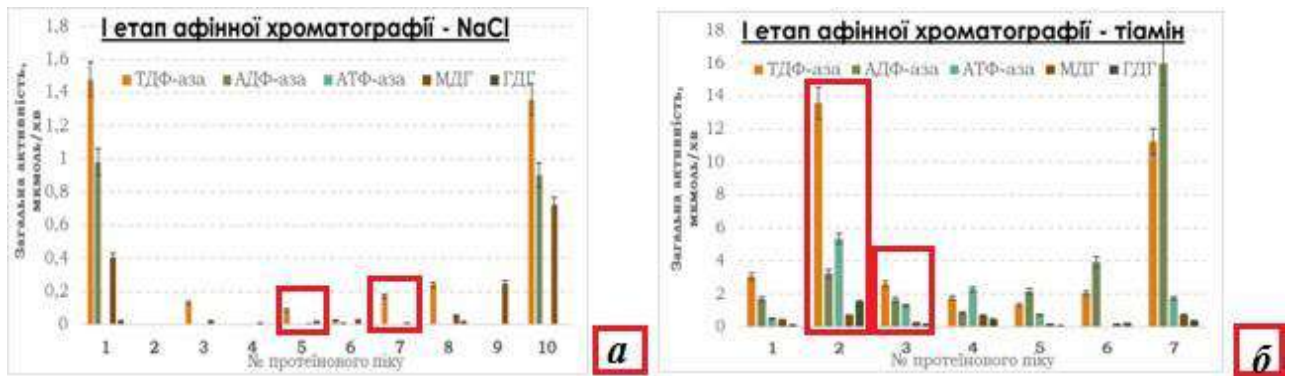


Рис.5 - Ензиматичні активності в протеїнових фракціях після гель-фільтрації

Аналіз результатів мас-спектрометричних досліджень протеїнів мозку, отриманих елюцією з т-АС. МС аналіз протеїнів мозку, що проявляють спорідненість до тіаміну, ми проводили на двох етапах: після афінної хроматографії на т-АС та після гель-фільтрації на сефадексі G-150. Аналізуючи гелі після електрофорезу протеїнів, отриманих з т-АС як специфічною елюцією (10 мМ тіаміном), так і неспецифічною елюцією (1М NaCl), ми звернули увагу, що багато смуг мали однакові координати. Крім того, спостерігалась відтворюваність пептидів (співпадіння мас) отриманих трипсинолізом в процесі мас-спектрометричного аналізу при порівнянні списків пептидів з гелів. Тобто, незалежно від специфічності елюції на I етапі афінної хроматографії, трипсиноліз давав однакові пептиди у певних плямах. Більше того, деякі однакові пептиди ми знайшли також в списках при ідентифікації протеїнів з тіамінового елюату після афінної хроматографії комерційного препарату МДГ, зокрема, пептид 1639 Да. За отриманими списками пептидів проводилася ідентифікація протеїнів у смугах за допомогою ресурсу MASCOT, що видавав варіанти, які у подальшому піддавалися комплексному аналізу. Кожен варіант оцінювався за всіма можливими параметрами, включаючи як експериментальні дані, отримані для протеїну, що ідентифікується, так і дані MASCOT, які інструмент врахував для відповідного варіанту, як то: бали Score (вірогідність присутності у зразку), достовірність, враховані пептиди, відсоток покриття зафіксованими пептидами первинної послідовності ідентифікованого варіанту протеїну, розкид мас пептидів, присутність унікальних пептидів тощо. Крім того, при аналізі обов'язково враховувалися дані, що їх розміщено в базах даних щодо відповідного варіанту, зокрема локалізація у клітині і рівні експресії у тканинах та інформація отримана з літературних джерел. В цілому комплексний аналіз, проведений нами з метою з'ясувати можливу структуру описаного раніше ТЗБ, підтвердив припущення, що цей препарат складається з кількох функціонально-пов'язаних протеїнів. Аналіз результатів МС дослідження препарату ТЗБ після електрофоретичного розділення його складових та подальша перевірка зроблених припущень за допомогою біоінформативних підходів дозволили нам зупинитись на висновку, що ТЗБ може складатися з двох протеїнів: Agrin (Agrn) і LRP4 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 4), хоча, як свідчить МС-аналіз, в препараті можуть бути присутні інші протеїни кластеру нікотинового ацетилхолінового рецептору (nAChR) та протеїни, що взаємодіють з ними.

Зокрема, звертає увагу те, що при виділенні протеїнів з мозку, як і при роботі з комерційним препаратом МДГ з серця, було ідентифіковано лінгвальну ліпазу, яка потенційно (біоінформативні дані) може виявляти МДГ-активність, а також є поліфосфатазою, яка входить до сімейства лужної фосфатази, що доведено експериментально (*van Loo et al., 2010*). Можливо, саме присутність цього протеїну зумовлює деякі описані властивості ТЗБ.

Згідно даних літератури (*Zong et al., 2012*), комплекс з двох молекул Агріну і двох молекул LRP4, є необхідним для кластеризації рецепторів ацетилхоліну нікотинного типу, індукованої нейрональним Агріном. Молекулярна маса кожного з вищевказаних протеїнів, які мають складну доменну будову, у нативному стані складає більш 200 кДа, а в цілому визначена молекулярна маса тетрамерного комплексу складає близько 900 кДа. Цим можна пояснити високу молекулярну масу протеїнової фракції у піку № 1 після гель-фільтрації та молекулярні маси інших протеїнових фракцій (Табл.3).

Дослідження ТЗП методом Вестерн-блот аналізу. Оскільки МС-аналіз показує лише вірогідність присутності протеїнів в зразках, точність ідентифікації потребувала перевірки. Для цього ми продовжили дослідження двома шляхами: експериментальним і за допомогою біоінформативних підходів. Для експериментальної перевірки ми застосували вестерн-блот аналіз. Реагування з антитілами до протеїнів кластеру nAHP агріну і LRP4 проводили з протеїнами отриманими як неспецифічною, так і специфічною елюцією з т-АС у фракціях після гель-фільтрації. Неможна сказати, що на цей час згадані вище протеїни є дуже добре дослідженими. Відомі мембрано-зв'язані (нейрональні) та секретуємі (нервово-м'язові) форми Агріну. Для Агріна відомо, що спеціальний ензим – нейротрипсин, розщеплює молекулу агріну навпіл, утворюючи N-агрін 110 кДа і С-агрін 110 кДа. Той же ензим здатен відщеплювати від С-агріну 110 кДа домен LG3, який називають Агрін 22, бо він має молекулярну масу 22 кДа, або САФ. За участі саме цього домену відбувається зв'язування з LRP4. Крім того, домен Агрін 22 відіграє певну роль в синаптичному гомеостазі (*Peng et al., 2015*), а зміна вмісту відщепленого Агріну 22 в плазмі крові має діагностичне значення, зокрема при таких патологіях як саркопенія, хронічна обструктивна хвороба легенів, гострий інфаркт міокарду, гостра травма нирок після інфаркту міокарду та деяких інших. Специфічні для нейрональних ізоформ z-пептиди знаходяться в складі саме домену Агрін 22. Після відщеплення від С-агріну 110 домену Агрін 22 утворюється С-агрін 90-95 кДа, що має власні функції. Партнер агріну по комплексу протеїн LRP4 було ідентифіковано пізніше. Є інформація щодо наявності у цього протеїна домена (β 1-пропелер) з $M_r \approx 39$ кДа, через який відбувається зв'язування з Агріном (*Zong et al., 2012*) без чого не можлива кластеризація nAHP. Внутрішньоклітинний С-кінець LRP4 разом з трансмембранним доменом має $M_r \approx 17$ кДа. Розчинна форма LRP4 з $M_r \approx 70$ кДа необхідна для кліренсу амілоїду β . Наші дослідження показали наявність в елюатах з афінного сорбенту всіх вищезгаданих протеїнів та їх доменів. Один з результатів цих експериментів, де ТЗБ виділяли з застосуванням специфічної елюції на I етапі, представлено на рис.6. Наявність декількох смуг в одному

трекові можна пояснити тим, що антитіла поліклональні та, ймовірно, можуть давати реакцію на декілька епітопів.

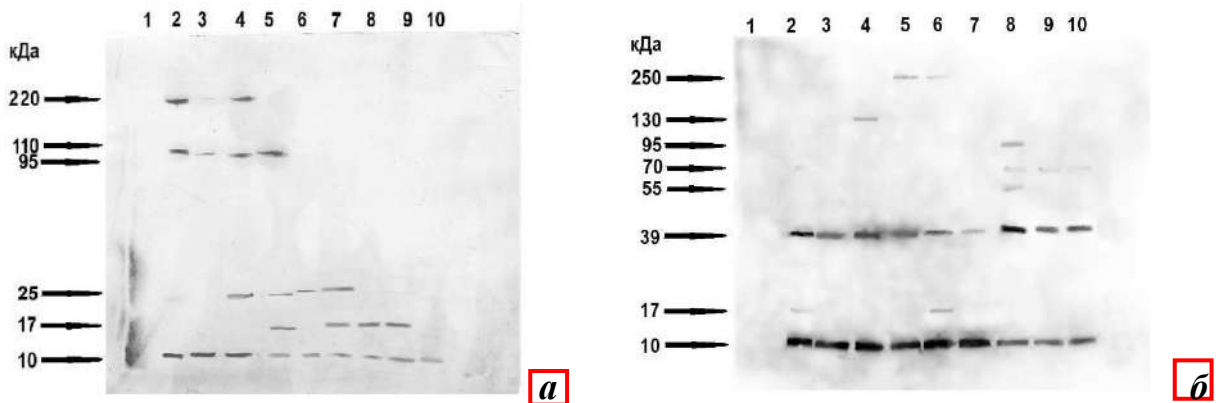


Рис.6 - Вестерн-блот аналіз протеїнів після гель-фільтрації тіамінових елюатів з *m-AC* з застосуванням поліклональних антитіл (*Sigma-Aldrich, США*): **а** - *anti-Agrn*, **б** - *anti-LRP4*; трек 1 – препарат протеїнів з мозку щурів нанесений на колонку з *m-AC* (екстракт ацетонового порошку), трек 2 – протеїни, що не зв'язалися з *m-AC*, треки 3-10 – протеїнові піки 1-7 після гель- фільтрації (табл.3)

В якості позитивного контролю реакційної здатності антитіл нами було використано біологічний зразок, що обов'язково містив досліджувані протеїни – гомогенат мозку інтактних (контрольних) щурів. Крім того, в цих же експериментах ми перевірили зміну рівня протеїнів за умов дефіциту тіаміну та відповідь на введення тіаміну за добу до декапітації (Рис.7). Через те, що рівень обох протеїнів реагував на недостатність тіаміну, у даному випадку на рівні доменів 22 і 39 кДа, достовірним зниженням та відповідав на короткотермінове введення тіаміну ззовні, представлені на рис.7 результати можна розглядати як доказ залежності стану протеїнів агріну і LRP4 від забезпеченості клітин тіаміном.

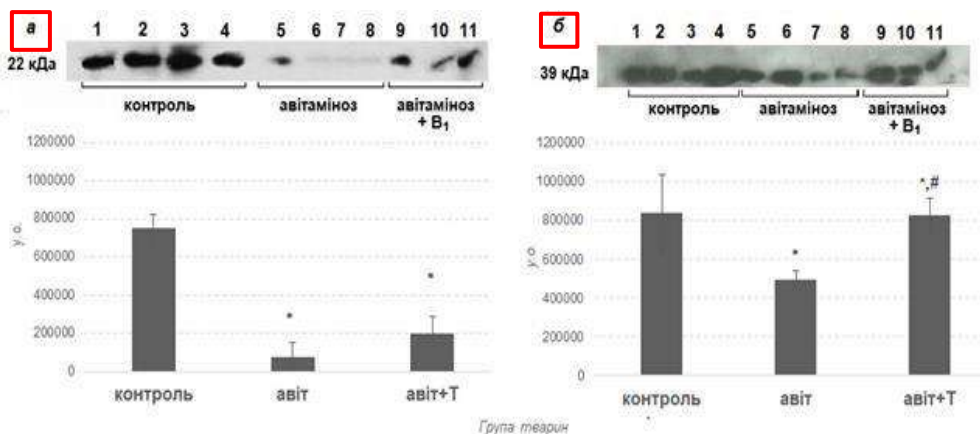


Рис. 7 – Зміни рівнів досліджуваних протеїнів у гомогенатах мозку щурів з моделлю B_1 -авітамінозу і після введення авітамінозним щурам 200 мкг тіаміну: **а** – агрін; **б** – LRP4

Щодо агріну відповідь була достовірною хоча одноразового введення в умовах досліду виявилось недостатнім для його повної нормалізації до рівня у гомогенатах мозку контрольних щурів. Проте навіть одноразового введення тіаміну було достатньо для того, щоб рівень LRP4 повернувся до контрольних значень. Слід зазначити, що молекулярні маси на рівні яких відреагували антитіла(рис.8) відповідають молекулярним масам певних доменів агріну і LRP4,

зокрема тим частинам, що були отримані в процесі кристалізації комплексу при розв'язанні його просторової будови за допомогою рентгеноструктурного аналізу (Zong *et al.*, 2012, 2013), а саме 22 (LG3) і 39 кДа (β 1-пропелер). Як показали результати молекулярного докінгу, саме у місцях стиковки цих доменів, знаходяться тіамін-зв'язувальні сайти.

Таким чином, вестерн-блот аналізом підтверджено, що протеїни LRP4 та Agrin є складовими препарату ТЗБ. Вміст цих протеїнів в тканині мозку критично знижується за умов аліментарного дефіциту тіаміну. При цьому вміст LRP4 повністю, а Агрину частково відновлюється при одноразовому введенні тваринам високої дози тіаміну.

Біоінформативний аналіз результатів. Оцінити можливість зв'язування з тіаміном протеїнів, ідентифікованих як складові ТЗБ, і визначити тіамінзв'язувальні сайти в цих протеїнах дозволяв метод молекулярного докінгу. Для докінгу ми використовували просторові структури протеїнів та лігандів, отриманих шляхом рентгено-структурного аналізу. Використовували сліпий та сайт-спрямований протоколи. Стиковці піддавали практично всі варіанти протеїнів, що їх було ідентифіковано МС-аналізом в елюатах з т-АС після гель-фільтрації, та 3D структури яких були доступними у відкритих базах даних в інтернеті. На рис.8 представлено результати докінгу тіаміну і комплексу Agrin-LRP4 у фізіологічних умовах тобто за присутності води та інших лігандів. Докінг показав кишені для зв'язування тіаміну як між ланцюгами В і С (високоафінний сайт), так і між ланцюгами А і С (низькоафінний сайт). Також визначені амінокислотні залишки відповідних поліпептидних ланцюгів (як агрину, так і LRP4) відповідальні за зв'язування тіаміну.

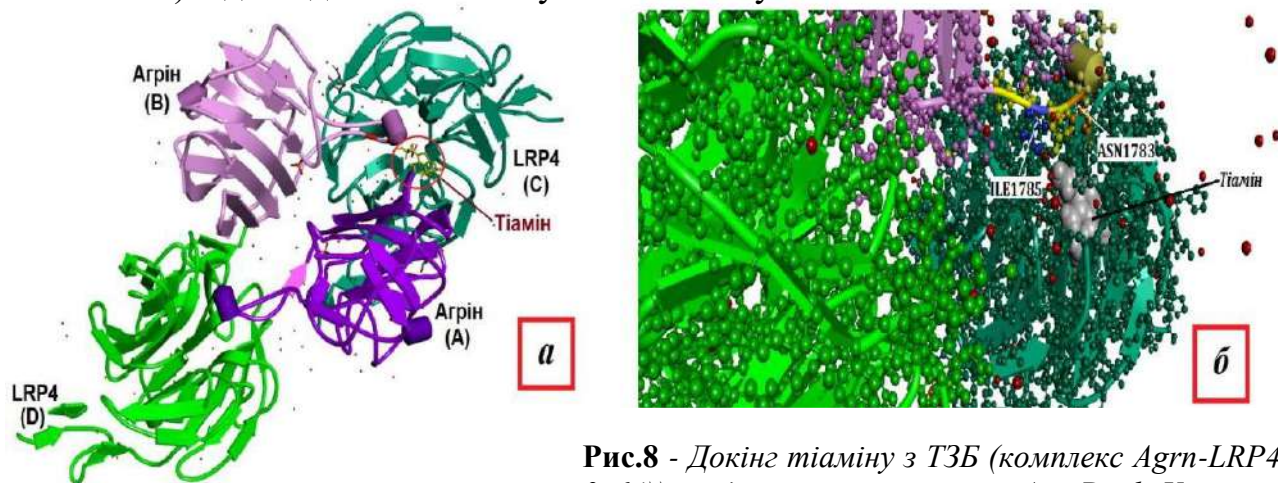


Рис.8 - Докінг тіаміну з ТЗБ (комплекс Agrin-LRP4 (PDB код 3v64)) за допомогою програм AutoDock Vina та Discovery Studio у присутності води та інших лігандів:

а – високоафінний сайт;

б – високоафінний сайт у збільшеному масштабі (прибрано субодиночку А), жовтим кольором на субодиночці В (рожева) позначено з8-пептид характерний для нейрональної ізоформи Агрину (МС-анліз показав у наших зразках наявність пептиду, що може містити ці 8 амінокислот у своєму складі). Примітно, що мутація будь-якого з залишків (ASN1783, ILE1785) усуває взаємодію Агрин-LRP4 і подальшу кластеризацію nAXP;

в – низькоафінний сайт

Результати МС-аналізу показують наявність в елюатах пептидів, що містять визначені амінокислоти. При цьому виявлені пептиди присутні як у вільному, так і у зв'язаному з тіаміном стані (тобто масою на 301 Да більше) у відповідних смугах. Щодо зв'язування тіаміну з АХР, в літературі зустрічається публікація 70-тих років ХХ ст. для АХР з *Torpedo marmorata* (Waldenlind, 1978), згідно якої ця взаємодія оцінювалась Кд порядку 30-50 μM . Приблизно такий же порядок визначено для Кд взаємодії ацетилхоліну і ТЗБ з мозку щурів. Також з попередніх досліджень відомо, що фосфорні ефіри тіаміну за здатністю конкурувати з тіаміном при зв'язуванні з ТЗБ проявляють нижчу афінність, ніж тіамін.

Вищенаведені факти було перевірено в рамках цієї роботи за допомогою одного з біоінформативних підходів. Результати розрахунків у програмі AutoDock Vina дозволили нам отримати значення енергії зв'язків, що також свідчать про афінність, з комплексом Agrn-LRP4, який ми вважаємо ТЗБ, крім тіаміну також й інших сполук. З метою порівняння, ми також провели докінг ацетилхоліну з комплексом Agrn-LRP4. Отримані таким чином дані ми узагальнили у вигляді діаграми (рис.9). Отже, дані приведені на діаграмі (рис.9) переконливо свідчать, що тіамін, його фосфати, а також сульфопохідне ТМФ – бенфотіамін – перевищують аденозин фосфати за спорідненістю до комплексу Agrn-LRP4. Експериментальний результат щодо більш низької спорідненості ацетилхоліну до ТЗБ у порівнянні з тіаміном у даному випадку підтвердився по відношенню до комплексу Agrn-LRP4 за допомогою методів комп'ютерної біології.

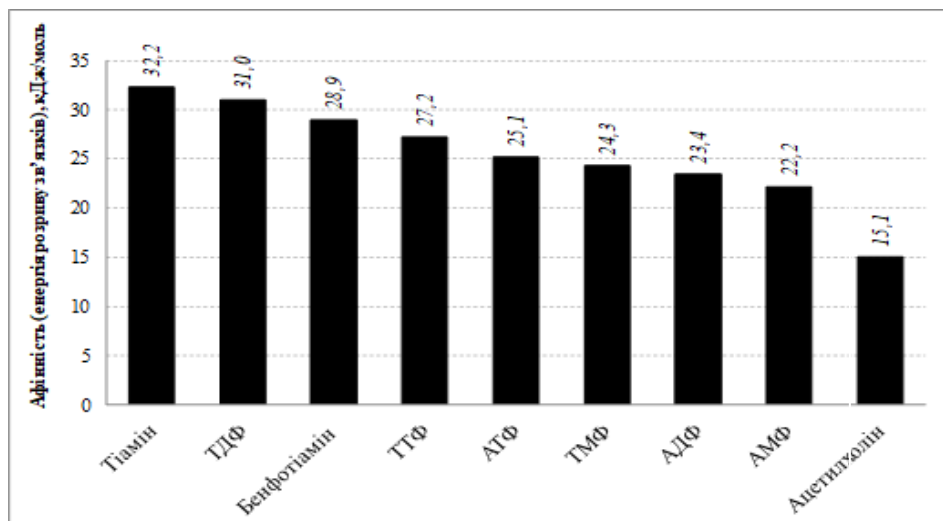


Рис.9 - Порівняння енергії зв'язування певних сполук, які представляли інтерес в рамках даного дослідження, з комплексом Agrn-LRP4 (PDB код 3v64) (показані значення виключно найоптимальніших(найвищий рівень енергії зв'язування-найменша відстань до вузлів зв'язування) варіантів №1 розрахованих в програмі

Порівняльний аналіз сайтів зв'язування тіаміну з протеїнами комплексу Agrn-LRP4 (рис.10) визначив їх високу подібність до сайтів зв'язування у добре охарактеризованих тіамін-залежних протеїнах, зокрема сайтом зв'язування ТДФ у ПДФ (рис.10г). Було виявлено співпадіння конформації молекули ліганду при зв'язуванні з проаналізованими протеїнами. Докінг комплексу Agrn-LRP4 з фосфорними ефірами тіаміну дозволив визначити різницю у зв'язуванні та пояснити причини більш низької афінності фосфатів тіаміну у порівнянні з тіаміном. Після того, як були отримані результати вимірювання ТДФ-азної активності у фракціях після гель-фільтрації, виявлення факту, що МДФ-азна активність постійно супроводжує тіамінфосфатгідролазну активність (у т.ч.

після гель-фільтрації), докінгу тіаміну з комплексом LRP4-Agrn, і виконано аналіз отриманих раніше результатів щодо властивостей ТЗБ, було зроблено припущення, що саме LRP4 може бути мембранною ТТФ-азою, яку вже багато років шукають дослідники.

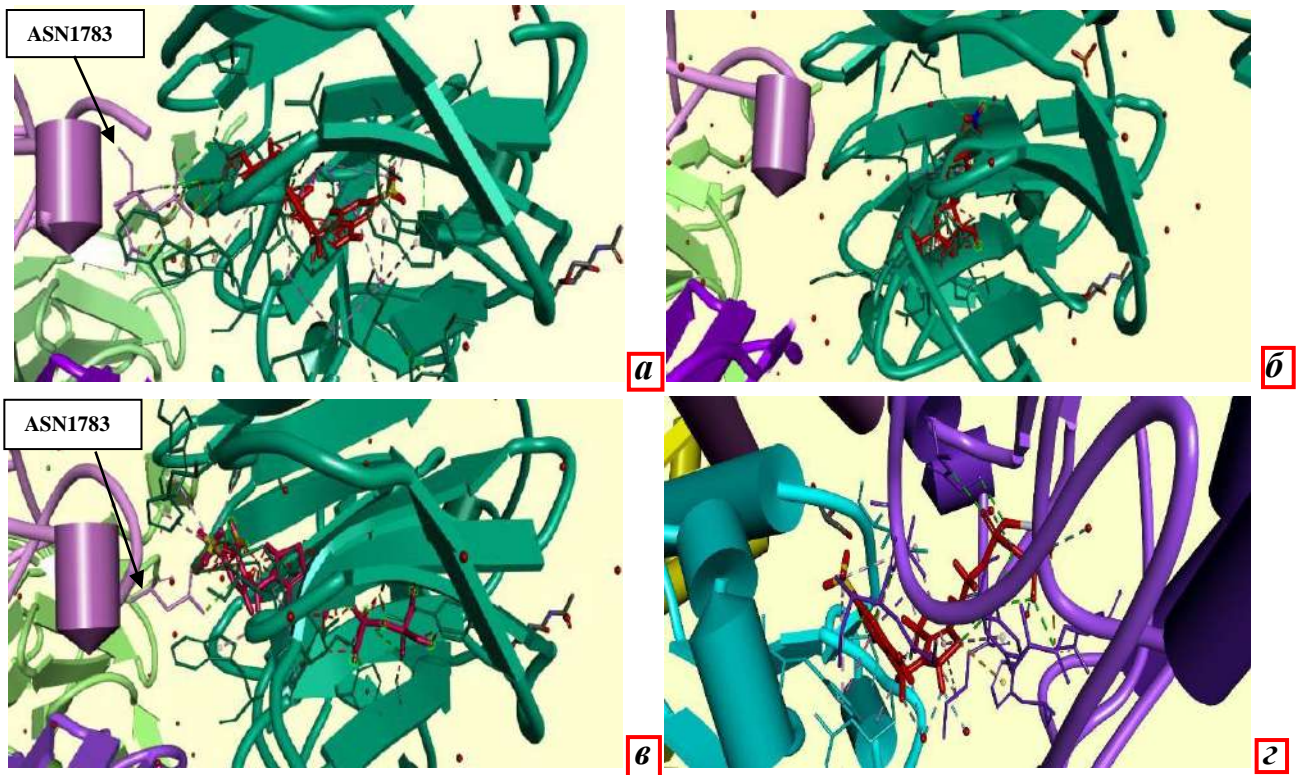


Рис.10 – Аналіз сайтів зв'язування тіаміну/біологічно активних похідних тіаміну з протеїнами: **а** - Agrn-LRP4 (3v64)-тіамін (високоафінний сайт), **б** - Agrn-LRP4 (3v64)-аденозин, **в** - Agrn-LRP4 (3v64)-ТТФ, **г** - ПДГ (3exh)-ТТФ

Для перевірки цієї гіпотези ми вирішили застосувати попарне та просторове вирівнювання цього протеїну проти добре охарактеризованого протеїну, що гідролізує ТТФ (Рис.11), а саме розчинної цитозольної тіамінтрифосфатази, хоча до сьогодні ніяких ензиматичних активностей у LRP4 виявлено не було.

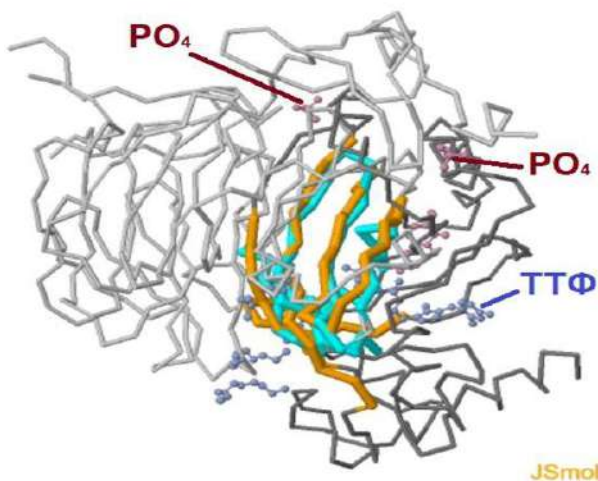


Рис.11 - 3D-вирівнювання LRP4 проти цитозольної ТТФ-ази (онлайн-доступний біоінформативний ресурс від Protein Data Bank), блакитні та світло-сірі стрижні - LRP4, помаранчеві та темно-сірі стрижні - цитозольна тіамін трифосфатаза. Також на рисунку присутні інші ліганди LRP4.

Результат цього аналізу продемонстрував наявність у LRP4 кишені, яка подібна до кишені, де зв'язується та гідролізується ТТФ у складі цитозольної ТТФ-ази. Виявлена кишеня LRP4 знаходиться у безпосередній близькості до мембрани з боку цитозолу, що співпадає з даними, отриманими щодо локалізації ензиму з

ТТФ-азною активністю, яку досліджували раніше з використанням препаратів синапсом та плазматичних мембран синапсом. МС-аналіз також показав присутність в елюатах пептидів, що входять до внутрішньоклітинної частини LRP4. Попарне вирівнювання LRP4 проти добре відомих ТДФ-залежних ензимів також виявило у первинній послідовності LRP4 класичний ТДФ- зв'язувальний мотив.

В цілому на підставі результатів щодо природи і властивостей ТЗБ, отриманих нами в даній дослідницькій роботі, у т.ч. з використанням біоінформативних інструментів, можна припустити, що важлива роль тіаміну і його біологічно активних похідних у функціонуванні АХР полягає в стабілізації комплексу LRP4-Agrin в процесі складання і функціонування кластеру nAHP. Але, можливо, є ще більш важливий аспект специфічної взаємодії вітаміну В₁ і АХР, наявність якої вже не викликає сумніву. Зокрема, якщо LRP4 дійсно є мембранною ТТФ-азою, що має вибірку специфічність до всіх тіамінфосфатів, АХР, крім всього, можна розглядати як канал для вивільнення з нервових клітин тіаміну в нефосфорильованому стані, оскільки ще на зорі вивчення нейротропної дії вітаміну В₁ було показано, що при збудженні нервово-м'язових волокон спостерігалось вивільнення в навколишнє середовище разом з ацетилхоліном речовини, яка пізніше була ідентифікована як тіамін. Отже, ці нові дані щодо механізмів реалізації нейротропної дії тіаміну, за умови їх підтвердження в ході подальших досліджень, відкривають нові перспективи в розумінні біологічного значення некоензимних функцій вітаміну В₁.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, відповідно до мети та поставлених завдань, представлено експериментальні дані та біоінформативний аналіз щодо питання специфічної некоензимної взаємодії молекули вітаміну В₁ (тіаміну) з певними протеїнами. З використанням афінної хроматографії виявлено ряд протеїнів, що здатні специфічно зв'язуватися з тіаміном і реагують на забезпеченість клітин тіаміном. У майбутньому це може допомогти остаточно з'ясувати молекулярні механізми системної нейротропної дії тіаміну.

1. Визначено, що зв'язування ензимів з малатдегідрогеназною, глутаматдегідрогеназною, також як і з тіамін фосфатгідролазами активностями, з афінним сорбентом, що містить тіамін як ліганд, є специфічним.
2. Показано *in vitro* активуючий вплив тіаміну (0,05 мМ) та тіамін дифосфату (1 мМ) на елюйовані з тіамін-вмісного афінного сорбенту протеїни, що проявляють малатдегідрогеназну та глутаматдегідрогеназну активності, та вплив забезпеченості організму тіаміном на вказані активності *in vivo*.
3. Ідентифіковано ізозими МДГ та деякі мінорні протеїни зі складу комерційного препарату МДГ, здатні зв'язуватися з тіаміном, зокрема: МДГ1В та МДГ2, декілька NAD-залежних дегідрогеназ, а також протеїни що містять/ можуть містити у своєму складі МДГ/ЛДГ-домен: Ubiquitin-conjugating enzyme E2 та лінгвальна ліпаза LipF.
4. Шляхом МС-аналізу протеїнів з екстрактів нервової тканини, що специфічно

зв'язуються з т-АС і потрапляють в препарат ТЗБ після гель-фільтрації, визначено варіанти протеїнів, що можуть бути складовими препарату ТЗБ, зокрема, протеїни LRP4 і Agrin.

5. Вестерн-блот аналізом підтверджено, що протеїни LRP4 та Agrin входять до складу препарату ТЗБ. Вміст цих протеїнів в тканині мозку критично знижується за умов аліментарного дефіциту тіаміну і частково відновлюється при одноразовому введенні тваринам високої дози тіаміну.

6. Визначено амінокислотні залишки протеїнів Agrin та LRP4, які відповідають за взаємодію з тіаміном, що підтверджено і МС-аналізом протеїнів в елюатах з т-АС. Порівняльний аналіз сайтів зв'язування тіаміну та ТДФ з цими протеїнами і відомими тіамін-залежними протеїнами показав їх високу подібність і низьку вірогідність заміни тіаміну аденозиновими сполуками або ацетилхоліном. Визначено ідентичність ТЗБ, виділеного і охарактеризованого в даній роботі і описаного раніше. Отримані результати дають підстави вважати, що зв'язування тіаміну з протеїнами комплексу Agrin-LRP4 є необхідною подією для підтримання функціонального стану НАХР, зокрема, для стабілізації комплексу в процесі збирання кластеру НАХР.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. *Mezhenska O, Rebriev A, Kobzar O, Zlatoust N, Vovk A, Parkhomenko Yu* (2020) Non-coenzyme properties of thiamine: evaluation of binding affinity to malate dehydrogenase isoforms. *Biotechnologia acta* 13(4):26-38 (Особистий внесок здобувача - дизайн експерименту, виділення протеїнів афінних до тіаміну, вимірювання загального протеїну, вимірювання рівня малатдегідрогеназної активності, електрофорез виділених протеїнів, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до публікації).
2. *Aleshin VA, Mezhenska OO, Parkhomenko YM, Kaehne T, Bunik VI* (2020) Thiamine mono- and diphosphate phosphatases in bovine brain synaptosomes. *Biochemistry (Moscow)*. — Vol. 85, № 3. — P. 378–386. (Особистий внесок здобувача - виділення протеїнів афінних до тіаміну і яким притаманні фосфатазні активності, вимірювання загального протеїну, вимірювання рівня фосфатазних активностей, електрофорез виділених протеїнів, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до публікації).
3. *Mezhenska OO, Aleshin VA, Kaehne T, Artiukhov AV, Bunik VI* (2020) Regulation of malate dehydrogenases and glutamate dehydrogenase of mammalian brain by thiamine *in vitro* and *in vivo*. *Biochemistry (Moscow)*. — Vol. 85, № 1. — P. 27–39. (Особистий внесок здобувача - виділення протеїнів афінних до тіаміну, вимірювання загального протеїну, рівня тіаміну, рівня ензиматичних активностей (МДГ та ГДГ), відтворення моделей, електрофорез виділених протеїнів, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до публікації).
4. *Pavlova OS, Tykhomurov AA, Mejenskaya OA, Stepanenko SP, Chehivska LI, Parkhomenko YuM* (2019) High thiamine dose restores levels of specific astroglial proteins in rat brain astrocytes affected by chronic ethanol consumption. *Ukr Biochem J* 91(4):41- 49 (Особистий внесок здобувача - відтворення моделей, вимірювання рівня загального протеїну та тіаміну, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до друку).

5. **Меженская ОА, Павлова АС, Степаненко СП, Чеховская ЛИ, Пархоменко ЮМ** (2018) Активности малат- и глутаматдегидрогеназы в тканях зависят от обеспеченности организма витамином В₁? Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии: сборник статей II Белорусского биохимического конгресса (под общ ред ИН Семенени, АГ Мойсеенка) Минск, ИВЦ Минфина Гродно 17-18 мая 795 с сс 369-376 (*Особистий внесок здобувача - відтворення моделей, вимірювання загального протеїну, рівня тіаміну, ензиматичних активностей (МДГ та ГДГ), статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до друку*).
6. **Parkhomenko YuM, Pavlova AS, Mejenskaya OA, Stepanenko SP, Chehovskaya LI** (2017) Thiamine diphosphate synthesis ana redox state indices in the rat brain during development of В₁ hypovitaminosis. Ukr Biochem J 89(5):84- 95 (*Особистий внесок здобувача - вимірювання загального протеїну, рівня тіаміну, рівня ензиматичних активностей, відтворення моделей, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до публікації*).
7. **Меженська ОО, Муzychка ОВ, Вовк АІ, Пархоменко ЮМ** (2016) Використання афінної хроматографії для виявлення протеїнів, які проявляють спорідненість до тіаміну. Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна 74(спец):160-165 (*Особистий внесок здобувача – синтез афінних сорбентів, виділення протеїнів, вимірювання ензиматичних активностей, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до публікації*).
8. **Parkhomenko YuM, Pavlova AS, Mejenskaya OA** (2016) Mechanisms Responsible for the High Sensitivity of Neural Cells to Vitamin В₁ Deficiency. Neurophysiology. - 48(6):451-465 (*Особистий внесок здобувача – підбір та аналіз літературних даних з питання, підготовка матеріалів до публікації*).
9. **Parkhomenko YuM, Donchenko GV, Chehovskaya LI, Stepanenko SP, Mejenskaya OA, Gorban EN** (2015) Metovitan prevents the accumulation of thiamine diphosphate oxidized forms in rat tissues under irradiation. Biotechnologia acta 8(4):63-70 (*Особистий внесок здобувача – участь у виділенні апопіруватдекарбоксілази та вимірюванні рівня ТДФ, підготовці матеріалів до друку*).
10. **З.С. Протасова, О.О. Меженська, С.П. Степаненко, Л.І. Чехівська, Ю.М. Пархоменко** Зв'язування міченого тіаміну синаптосомами як показник обміну тіаміну в нервових клітинах при певних патологіях // (Мат. Укр. біохім. конгресу), 2014. The Ukrainian Biochemical Journal, 2014, vol. 86, №5 (Supplement 2), С. 25-26.
11. **Меженская О.А., Буник В.И., Пархоменко Ю.М.** Выявление новых протеинов мозга, проявляющих аффинность к тиамину/ Актуальные проблемы современной биохимии и клеточной биологии: материалы III Международной научной конференции (24-25 сентября 2015 г., г.Днепропетровск)/ под ред. Ушаковой Г.А. – Днепропетровск: издательство Арбуз, 2015 – 192 с. – с.74-76.
12. **О.А. Меженская, О.В. Муzychка, А.И. Вовк, В.И. Буник, Ю.М. Пархоменко.** Биоспецифичность связывания протеинов с тиаминном как лигандом аффинного сорбента// Сб. мат. Международной научной

конференції молодих учених по медичинській біології ФГБУ ФНКЦ фізико-хімічної медицини ФМБА (19-20 квітня 2016 року)/ під ред. Е.Н. Ільїної, Е.С. Кострюкової - М.: ФНКЦ ФХМ ФМБА Росії, 2016. - — 172 с. — С.91-92.

13. *В. Алешин, О. Меженська, Т. Кэне, Ю. Пархоменко, В. Буник* Аффинная хроматография и масс-спектрометрия для идентификации тиамин (витамин В₁)-зависимых фосфатаз мозга// Сб. мат. Международной научной конференции молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА (19-20 апреля 2016 года)/ под ред. Е.Н. Ильиной, Е.С. Кострюковой - М.: ФНКЦ ФХМ ФМБА России, 2016. — 172 с.—с.с.15-16.

14. *О.О. Меженська, О.В. Музичка*. Відмінності в спектрах протеїнів взаємодіючих з сорбентами, що містять тямін як ліганд і без нього/ Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016. Тези доповідей конференції- конкурсу молодих учених присвяченої 110-річчю з дня народження В.О. Беліцера/ за ред. Мазанової А.О. та інш. – К.: Санченко., 2016. - С.34

15. *О. Mezhenskaya, Yu. Parkhomenko*. Detection of new brain proteins that exhibit affinity for thiamine. Abstracts of the X Parnas Conference Young Scientist Forum “Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine”, 10th - 12th July 2016, Acta Biochimica Polonica. 2016.-Vol.63, suppl. 1. - P.26.

16. *Mezhenska O.O., Rebryev A.V., Parkhomenko Yu.M.* Identification of isozymes of malate dehydrogenase able to bind of thiamine - Abstracts of the FEBS3+meeting -XI Parnas Conference Young Scientist Forum “Biochemistry and molecular biology for Innovative Medicine”, 3rd -5th September 2018, The Ukrainian Biochemical Journal, 2018.-Vol.90, Special Issue. - P.157

17. *Aleshin V.A., Kaehne T., Bunik V.I., Parkhomenko Y.M., Mezhenskaya O.A.* Phosphatases of the thiamin-binding proteomes/ Міжнародна конференція: EMBO at Basellife 2018 (Базель, Швейцарія, 11-14 вересня 2018)/ <https://www.basellife.org/2018/>

18. *Mezhenska O.O., Rebriev A.V., Parkhomenko Yu.M.* Detection of new protein targets of thiamine/ Матеріали XII Українського біохімічного конгресу,

30 вересня-4 жовтня 2019 р., Медична та клінічна хімія. – 3(80), том 21(Додаток). – 2019. – с.с.35-36.

19. *Parkhomenko Yu.M., Pavlova O.S., Mezhenska O.O., Stepanenko S.P., Chehivska L.I.* Do oxidized derivatives of thiamine participate in regulation of its metabolism? / Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, 30 вересня- 4 жовтня 2019 р., Медична та клінічна хімія. – 3(80), том 21(Додаток). – 2019. – с.232.

20. *Меженська О, Ребрів А, Пархоменко Ю* (2020) Нові протеїнові мішені дії тяміну і його похідних в нервовій тканині/ Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології: матеріали V Міжнародної наукової конференції (за заг. ред. Ушакової Г.О.) Дніпро, Ліра - 174 с. – Дніпро, 1-2 жовтня.- с.23.

АНОТАЦІЯ

Меженська О.О. Нові протеїнові мішені дії тіаміну і його похідних в нервовій тканині. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 – «Біохімія». - Інститут біохімії імені О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена ідентифікації протеїнів нервової тканини, що проявляють спорідненість до тіаміну, зокрема тіамінзв'язувального білка (ТЗБ), що його було описано у відділі біохімії вітамінів і коензимів раніше. З застосуванням специфічної елюції та двох видів сорбентів, визначено, що зв'язування з тіаміном протеїнів, що проявляють дегідрогеназні, зокрема МДГ і ГДГ, та тіамінфосфатазні активності є специфічним. Визначено ефекторний вплив тіаміну на малатдегідрогеназу та тіаміну та його дифосфату на глутаматдегідрогеназу активності *in vitro* та вплив забезпеченості організму тіаміном на вказані активності *in vivo* за умов недостатності тіаміну на моделі аліментарного авітамінозу В₁. Після проведення афінної хроматографії комерційного препарату МДГ з використанням мас-спектрометричного аналізу (МС-аналізу) ідентифіковано ізозими МДГ та деякі мінорні протеїни зі складу комерційного препарату МДГ, здатні зв'язуватися з тіаміном і що раніше не були відомі як тіамін-залежні. Шляхом МС-аналізу і вестерн-блот аналізу протеїнів з екстрактів нервової тканини, що специфічно зв'язуються з тіаміном у складі афінного сорбенту в процесі афінної хроматографії і потрапляють в препарат ТЗБ після гель-фільтрації, вперше визначено варіанти протеїнів, що можуть бути складовими ТЗБ, зокрема, комплекс протеїнів LRP4-Agrin, який є компонентом кластеру nAChR. Вперше з використанням методу молекулярного докінга визначено амінокислотні залишки у складі поліпептидних ланцюгів як агрину, так і LRP4, що беруть участь у зв'язуванні тіаміну. Порівняльний аналіз сайтів зв'язування тіаміну та його фосфорних ефірів з цими протеїнами і з відомими тіамін-залежними протеїнами показав їх високу подібність і низьку вірогідність заміни тіаміну аденозиновими сполуками або ацетилхоліном, а також пояснити причини більш низької спорідненості до ТЗБ фосфорних ефірів тіаміну у порівнянні з тіаміном. Біоінформативні інструменти дозволили передбачити можливі біологічні ролі тіаміну і його біологічно активних похідних при зв'язуванні з комплексом Agrin-LRP4. Отримані в дисертаційній роботі результати мають важливе значення, оскільки розширюють сучасні уявлення щодо клітинно-молекулярних механізмів реалізації функцій вітаміну В₁. Це додатково обґрунтовує доцільність застосування тіаміну та його фармакологічних форм для профілактики та/або лікування патологій, які індукуються або супроводжуються дефіцитом тіаміну.

Ключові слова: тіамін, рухомий пул тіаміну, некоензимні функції тіаміну, тіамінзв'язувальні протеїни, тіамінзв'язувальний білок (ТЗБ), кластер нікотинового ацетилхолінового рецептору, агрін, LRP4, протеїни з МДГ активністю, нейродегенеративні захворювання.

ABSTRACT

Mezhenska O.O. “Novel protein targets of thiamine and its derivatives in nervous tissue”. - Manuscript.

The thesis for a degree in Biological Sciences (Doctor of Philosophy), specialty 03.00.04 - "Biochemistry". – Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, 2021.

The thesis is devoted to the identification of nerve tissue proteins that exhibit affinity for thiamine, in particular the thiamin binding protein (ThBP), previously described at the Department of Biochemistry of Vitamins and Coenzymes. Using specific elution and two types of affinity sorbents, binding of thiamine to proteins that exhibit dehydrogenase, such as MDH and GDH, and thiaminphosphatase activity is determined to be specific. The effect of thiamine on malate dehydrogenase and thiamine and its diphosphate on glutamate dehydrogenase activity *in vitro* and the effect of providing thiamine on these activities *in vivo* on model of alimentary thiamine deficiency were determined. After affinity chromatography of a commercial MDH preparation using mass spectrometric analysis (MS analysis), MDH isozymes and some minor proteins from the commercial MDH composition capable of binding to thiamine and not previously known to be thiamine dependent were identified. The proteins from nerve tissue extracts that specifically bind thiamine in the affinity sorbent during affinity chromatography and enter to the ThBP preparation after gel filtration, for the first time variants of proteins that may be ThBP components have been identified by MS analysis and Western blot analysis, in particular, the LRP4-Agrin protein complex, which is a component of the nAChR cluster. For the first time, using the molecular docking method, the amino acid residues of both agrin and LRP4 polypeptide chains involved in thiamine binding were determined. Comparative analysis of the binding sites of thiamine and its phosphorous esters with these proteins and with known thiamine-dependent proteins revealed their high similarity and low likelihood of replacement of thiamine with adenosine compounds or acetylcholine, as well as explaining the causes of lower affinity for thiamine phosphate esters compared to thiamine. Bioinformatics tools suggested the possible biological roles of thiamine and its biologically active derivatives when binding to the Agrin-LRP4 complex. The results obtained in these studies are important as they expand the current understanding of cell-molecular mechanisms of vitamin B₁ functions realization. This further substantiates the advisability of using thiamine and its pharmacological forms for the prevention and/or treatment of pathologies that are induced or accompanied by thiamine deficiency.

Keywords: thiamine, mobile thiamine pool, non-coenzyme functions of thiamine, thiamine binding proteins (ThBPs), thiamin binding protein (ThBP), nicotinic acetylcholine receptor cluster (nAChR cluster), agrin, LRP4, proteins with MDH activity, neurodegenerative diseases.