

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ імені О.В. ПАЛЛАДИНА**

*Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису*

Меженська Ольга Олександрівна

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

Спеціальність 03.00.04 – Біохімія

Галузь знань 091 - Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

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

_____ Меженська О.О.

Науковий керівник: **Пархоменко Юлія Михайлівна,**
доктор біологічних наук, провідний
науковий співробітник

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Меженська О.О. Нові протеїнові мішені дії тіаміну і його похідних в нервовій тканині. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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.

Вітамін В₁ (тіамін), відкритий ще на початку ХХ ст., з того часу поглиблено вивчався. Зараз добре відома роль дифосфатного похідного тіаміну у якості коензиму. Відомо декілька десятків ензимів, до складу яких як коензим входить тіамін дифосфат (ТДФ). Найважливішими з них вважаються поліензимні комплекси, які здійснюють декарбоксілювання кетокислот. Регуляція активності цих багатоконпонентних ензимних комплексів виконується саме на рівні першої реакції – ТДФ-залежного декарбоксілювання α -кетоглутарата чи пірувата і, таким чином, реакція за участю ТДФ є пусковою, лімітуючою ланкою усього каскаду реакцій каталізованого цими комплексами. Поряд з участю у декарбоксілюванні кетокислот не менш важливою є коензимна роль ТДФ у пентозофосфатному циклі, продукти якого в подальшому йдуть на синтез нуклеїнових кислот.

Але багаторічні дослідження показали, що надзвичайно високу чутливість клітин нервової системи до дефіциту тіаміну виявилось неможливим пояснити лише тільки його коензимними функціями. Існують відомості, які свідчать, що багато які нейродегенеративні захворювання, такі як енцефалопатія Верніке-Корсакова, хвороби Альцгеймера і Паркінсона, лобово-скронева деменція та ін. супроводжуються або навіть ініціюються порушенням обміну тіаміну. Існує гіпотеза щодо існування специфічної некоензимної нейротропної дії вітаміну В₁. Молекулярні механізми такої дії наразі остаточно не з'ясовані. Некоензимні функції вітаміну В₁ пов'язують з функціонуванням окремого мобільного пулу біологічно активних похідних тіаміна, зокрема його фосфатів, за участю системи певних протеїнів. Ця система протеїнів включає як вже відомі ензими метаболізму тіаміна і його фосфатів, так і ще не ідентифіковані на молекулярному рівні протеїни, які мають тіамінзв'язувальні ділянки і за рахунок чого здатні взаємодіяти з тіаміном і його похідними. Не виключено, що ці протеїни поєднані не тільки функціонально, а й структурно. Виявлення таких протеїнів та дослідження механізмів їх взаємодії з тіаміном і його похідними є одним з шляхів з'ясування ролі тіаміну у розвитку

нейродегенеративних процесів та пошуку засобів попередження і лікування вказаних патологій.

Внаслідок виконання цієї роботи ми сподівалися встановити нові тіамінзв'язувальні протеїни - мішені дії тіаміну в клітинах, що в подальшому допоможе розширити уявлення про молекулярні механізми дії вітаміну В₁. Зокрема ідентифікувати тіамінзв'язувальний білок (ТЗБ).

Для з'ясування питання чи є зв'язування протеїнів з тіаміном специфічним було синтезовано два види сорбентів: афінний сорбент, що містив тіамін як ліганд (т-АС), і такий, що не містив тіаміну (АС без Т). Як показали результати експериментів, в елюатах з сорбенту, що не містив тіаміну (АС без Т), з усіх досліджених активностей було виявлено тільки аденозинфосфат гідролази. Це свідчило, що протеїни з МДГ, ГДГ і тіамінфосфатазними активностями зв'язуються з тіаміном специфічно. Також в ході роботи було визначено ефект тіаміну на малатдегідрогеназу та тіаміну і його дифосфату на глутаматдегідрогеназу активності *in vitro* та вплив забезпеченості організму тіаміном на вказані активності *in vivo*. Зі свого боку ці дані також свідчили про специфічність зв'язування цих протеїнів з тіаміном і про те, що виявлений феномен є фізіологічним і має місце на рівні організму.

Далі було проведено афінну хроматографію комерційного препарату МДГ на т-АС та ідентифікація протеїнів з МДГ активністю у фракціях елюатів з т-АС. Використання комерційного препарату МДГ з серця свині 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. Тому наступні серії експериментів були спрямовані на з'ясування питання про те чи є спорідненість до тіаміну притаманною усім видам МДГ, чи тільки певному з них. Аналіз профілю елюції протеїнів з колонки показував, що з т-АС елююється кілька піків з МДГ-активністю, що підтверджувало здатність кількох ізоформ МДГ зв'язуватися з тіаміном. Відомо, що різні ізозими МДГ відрізняються за ізоелектричною точкою, тому для підвищення точності ідентифікації було вирішено

застосувати двовимірний електрофорез, що давав змогу розділити протеїни елюйовані тіаміном за двома параметрами: ізоелектричною точкою та молекулярною масою. Результати мас-спектрометричного 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 цитозольної МДГ -МДГ1В. Крім того, в елюатах з т-АС при афінній хроматографії комерційного препарату МДГ, мас-спектрометричний аналіз показав присутність лактатдегідрогенази, оскільки МДГ і ЛДГ це протеїни одного сімейства (МДГ еволюційно походить від ЛДГ), а також низку інших дегідрогеназ. Також в тіамінових елюатах з т-АС ідентифіковано 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. 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.

Наступним після афінної хроматографії етапом виділення ТЗБ з нервової тканини була гель-фільтрація. Цей етап також дозволяв визначити молекулярну масу виділених тіамінзв'язувальних протеїнів. 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 афінної хроматографії. В отриманих після гель-фільтрації різних за молекулярною масою протеїнових фракціях визначали ензиматичні активності характерні для ТЗБ. При чому виявилось, що після гель-фільтрації МДГ активність супроводжує тіаміндіфосфатазну і розділити їх не вдається. Після чого проводився аналіз протеїнів у смугах, які відповідали за молекулярною масою описаному раніше ТЗБ та його субодиницям. Крім того, орієнтувалися на доріжки, у яких для електрофорезу розміщували протеїнові фракції, що проявили найвищі рівні тіаміндіфосфатазної активності. Далі було отримано мас-спектри відповідних смуг і проводилася ідентифікація протеїнів з екстрактів нервової тканини, що специфічно зв'язуються з т-АС і потрапляють в препарат ТЗБ після гель-фільтрації. Таким чином було визначено, що сам ТЗБ може представляти собою комплекс з двох протеїнів, а саме

Агрін та LRP4, які є компонентами кластеру АХР нікотинного типу. Комплекс складається з двох молекул Агріну і двох молекул LRP4. Визначені експериментально молекулярні маси є характерними для обох протеїнів комплексу. Молекулярна маса комплексу складає близько 900 кДа. Цим можна пояснити високу молекулярну масу протеїнової фракції у піку № 1 після гель-фільтрації. Крім того в препараті ТЗБ була виявлена присутність інших протеїнів кластеру нікотинного АХР та функціонально пов'язані протеїни, які совиділяються разом з ТЗБ. Звертає увагу те, що при виділенні протеїнів з мозку, як і при роботі з препаратом з серця (комерційний препарат МДГ), було ідентифіковано лінгвальну ліпазу та протеїн UEV-3. Як вже згадувалося, тіамінфосфатазні та МДГ активності не вдалося відділити одна від одної в процесі гель-фільтрації. Цікаво те, що лінгвальна ліпаза крім того, що потенційно може виявляти МДГ-активність, одночасно є поліфосфатазою, що доведено експериментально. З іншого боку, UEV-3, який містить МДГ/ЛДГ-домен у своєму складі, є другою компонентою системи убіквітинування. При цьому receptor-associated protein of the synapse (Rapsin) (акцептор третьої макроергічної фосфатної групи від ТТФ (*Nghiêm et al., 2001*) і каркасний протеїн кластеру nAChR) є протеїном, без якого не відбудеться транспортування субодиниць nAChR та їх вбудовування у мембрану, виявився ще й третьою компонентою системи убіквітинування тобто E3 убіквітинлігазою. Це означає, що Рапсин є функціональним партнером UEV-3 і вони можуть совиділятися разом в умовах наших експериментів. Наразі відомо, що поза деградацією протеїнів, така посттрансляційна модифікація як убіквітинування, зокрема субодиниць nAChR, необхідна для низки сигнальних шляхів, проліферації та росту клітин, росту аксонів тощо. З іншого боку, в результатах мас-спектрометричного аналізу виявилася велика кількість NAD(P)/NAD(P)H-залежних протеїнів поряд з дегідрогеназами. Зокрема, присутні протеїни щільного контакту – коннексини і паннексини. Один з протеїнів цього сімейства, ідентифікований в елюатах з т-АС після гель-фільтрації, а саме Gap junction alpha-1 protein (connexin 43) за сучасними даними вважається каналом відповідальним за транспортування нікотинамідаденіндинуклеотидів через плазматичну мембрану клітини, яка раніше вважалася непроникною для цих сполук. Додатково це підтверджується експериментально впливом на стан протеїнів щільних контактів *in vivo* в умовах дефіциту тіаміну (літературні дані). Відомо, що коннексин 43 багатьма метаболічними шляхами пов'язаний з рецепторами ацетилхоліну і може

регулюватися шляхом холінергического сигналігу, зокрема через такі протеїни, як Src-кіназа, ZO-1 та убіквітинлігаза Nedd4 (*Sorgen et al., 2004, Spagnol et al., 2016*). Особливо це стосується АХР нікотинного типу тому, що МДГ/ЛДГ-домени містять протеїни пов'язані функціонально з кластером nAChR і ідентифіковані в елюатах з т-АС. Для експериментальної перевірки результатів МС-дослідження ми застосували вестерн-блот аналіз, яким 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 Агріну частково відновлюється при одноразовому введенні тваринам високої дози тіаміну. На наступному етапі за допомогою молекулярного докінгу визначено амінокислотні залишки протеїнів Агрін та LRP4, які відповідають за взаємодію з тіаміном. Мас-спектрометричний аналіз показав присутність в мас-спектрах пептидів зі складу поліпептидних ланцюгів як агріну, так і LRP4. При цьому виявлені пептиди присутні як у вільному, так і у зв'язаному з тіаміном стані у відповідних смугах. 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.

Ретельний аналіз даних привів до висновку про високий ступінь ідентичності досліджених протеїнів. Так само, як і ідентифікація ТЗБ за амінокислотним складом елюатів з першого базового т-АС, який раніше застосовувався в дослідженнях нашою групою, яку ми також проводили, підтвердила поточні результати. Все разом дозволяє говорити про високу ймовірність того, що вперше виділений, раніше частково охарактеризований нашою групою ТЗБ і ТЗБ виділений в рамках цієї роботи з застосуванням специфічної елюції тіаміном є протеїновим комплексом Agrin-LRP4, який є складовою частиною кластера ацетилхолінового рецептора нікотинного типу.

Використання методів комп'ютерної біології дозволило передбачити біологічну роль тіаміну і його біологічно активних похідних при зв'язуванні з комплексом протеїнів, який ми вважаємо ТЗБ: 1) стабілізація комплексу LRP4-Agrin в процесі складання кластеру nAChR; 2) тіамінтрифосфатазна активність у LRP4; 3) функціонування рухомого пулу тіаміна (РПТ) і пов'язані з цим процеси через кластер nAChR оскільки згідно з нашими уявленнями ТЗБ є однією з ключових ланок в обміні РПТ в нервових клітинах і критичні порушення в його функціонуванні можуть бути причиною ініціації нейродегенеративних процесів.

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.

SUMMARY

Mezhenska O.O. "Novel protein targets of thiamine and its derivatives in nervous tissue". - Qualification scientific work, the 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.

Vitamin B₁ (thiamine) was discovered in the early twentieth century and has since been thoroughly studied. The role of the diphosphate derivative of vitamin B₁ as a coenzyme is now well designated. Several dozen enzymes are known to have thiamine diphosphate (ThDP) as a coenzyme. The most important ones are multienzyme complexes that carry out decarboxylation of keto acids. Regulation of the activity of such supramolecular enzyme complexes is performed at the level of the first reaction - ThDP-dependent decarboxylation of α -ketoglutarate or pyruvate. The reaction involving ThDP is the limiting stage of the entire cascade of reactions catalyzed by these complexes. Along with participation in the decarboxylation of keto acids, the coenzyme plays a crucial role in the pentose phosphate cycle, the products of which are subsequently fed to nucleic acids biosynthesis pathways.

As many years of research show, the extremely high sensitivity of nerve cells to thiamine deficiency cannot be explained only by its coenzyme functions. Meanwhile, considerable evidence suggests that various neurodegenerative diseases, such as Wernicke-Korsakov encephalopathy, Alzheimer's and Parkinson's disease, fronto-temporal dementia, and others are accompanied or even initiated by the impairments of thiamine metabolism. A hypothesis was postulated regarding the existence of a specific non-coenzyme neurotropic effects of vitamin B₁, however, the molecular mechanisms are not yet fully understood. Non-coenzyme action of vitamin B₁ is associated with the functioning of a separate mobile pool of biologically active thiamine derivatives (MThP), in particular its phosphates, and requires the participation of certain proteins.

The protein system includes both already known enzymes of thiamine metabolism and its phosphorylated forms as well as not yet identified proteins that have thiamine-

binding sites and, therefore, are capable of interacting with thiamine and its derivatives. It is possible that these proteins have certain features in common not only functionally but also structurally. Identification of such proteins and study of the mechanisms of their interaction with thiamine and its derivatives could be one of the approaches to clarify the role of thiamine in the development of neurodegenerative processes and to find out the ways to prevent and treat these pathologies. As a result of this study, we hoped to establish new thiamine-binding proteins - thiamine targets in cells, that will further help to expand the understanding of the molecular mechanisms of vitamin B₁ action. In particular, thiamine binding protein (ThBP) will be identified.

To determine whether protein binding to thiamine was specific, two types of sorbents were synthesized: an affinity sorbent that contained thiamine as a ligand (T-AS) and a sorbent that did not contain thiamine (AS without T). As the data obtained showed, in the eluates from the sorbent containing no thiamine (AS without T), of all the studied activities only the activity of adenosine phosphate hydrolase was detected. This showed that proteins with MDH, GDH and thiamine phosphatase activities bind specifically to thiamine. The effect of thiamine on malate dehydrogenase and thiamine and its diphosphate on glutamate dehydrogenase activity *in vitro* and the effect of thiamine supplementation on these activities *in vivo* were also determined. On the other hand, these data also indicated the specificity of the binding of these proteins to thiamine and the fact that the observed phenomenon is physiological and occurs at the level of the organism.

Next, we performed affinity chromatography of the commercial MDH on T-AS and identified proteins with MDH activity in the fractions of eluates from T-AS. The use of the commercial MDH from porcine heart in our studies was based on two considerations. First, the direct binding of the purified enzyme preparation to thiamine by affinity chromatography was additional confirmation of the thiamine binding specificity. In these experiments, the protocol for thiamine-binding proteins isolation from the brain was completely reproduced. Second, previous electrophoretic studies have shown that the commercial MDH we used was heterogeneous. We assumed that the reason for this was the presence in the preparation of several MDH isozymes characteristic of animal cells. Therefore, the following series of experiments was aimed at elucidating whether the affinity for thiamine is inherent in all types of MDH, or only in some of them. Analysis of the elution profile of proteins from the column showed that several peaks with MDH activity were washed out from T-AS, which confirmed the ability of several MDH isoforms to bind to

thiamine. It is known that different MDH isozymes differ in their isoelectric point; therefore, to improve the identification accuracy, it was decided to use two-dimensional electrophoresis, which made it possible to separate the proteins eluted with thiamine by two parameters: isoelectric point and molecular weight.

The results of mass spectrometric analysis with a reliable probability showed that thiamine was able to bind two different molecular weight mitochondrial isoforms of MDH: two different MDH2 and a partially characterized isoform of cytosolic MDH - MDH1B. In addition, in the eluates of a commercial MDH after affinity chromatography with T-AS, mass spectrometric analysis showed the presence of lactate dehydrogenase, (MDH and LDH are proteins of the same family), as well as a number of other dehydrogenases. Additionally, in thiamine eluates from T-AS, proteins were identified that could potentially have inherent MDH activity. These are proteins that contain the MDH/LDH domain, lingual lipase namely and an enzyme that is the second component of the UEV-3 protein ubiquitination system. For lingual lipase, malate dehydrogenase activity is shown bioinformatively by homology. The fact that half of the UEV-3 protein (alternative name EV and lactate/malate dehydrogenase domain containing protein) is an MDH/LDH domain has been shown experimentally, including by obtaining a recombinant protein.

The next step after affinity chromatography was the isolation of ThBP from nerve tissue by gel filtration. This step also allowed determining the molecular weight of the isolated thiamine-binding proteins. Proteins were isolated both by the basic method (using sodium chloride at stage I) and by a modified protocol, where a specific elution with thiamine was introduced at stage I of the affinity chromatography. In the protein fractions of different molecular weight obtained after gel filtration the enzymatic activities characteristic of ThBP were determined. Moreover, it turned out that, after gel filtration, along with the thiamine diphosphatase activity, MDH activity was also present, which could not be separated.

Then, the analysis of proteins in the bands corresponding to the molecular weight of the previously described ThBP and its subunits was performed. In addition, we focused on the tracks into which the protein fractions that showed the highest levels of thiamine diphosphatase activity were placed for electrophoresis. Subsequently, the mass spectra of the respective bands were obtained and proteins were identified from extracts of nervous tissue that specifically bind to T-AS and appears as the ThBPs after gel filtration. Thus, it was determined that ThBP itself may be a complex of two proteins, Agrin and LRP4, which

are components of the cluster of the nicotine-type AChR. The complex consists of two Agrin molecules and two LRP4 molecules. The experimentally determined molecular weights correspond to the weights of both complex proteins. The molecular weight of the complex is about 900 kDa. This may explain the high molecular weight of the protein fraction at peak № 1 after gel filtration.

In addition, the presence of other nicotine AChR cluster proteins and functionally related proteins co-isolated with ThBP was detected in ThBPs. It is noteworthy that when isolating proteins from the brain, as well as when working with commercial MDH from the heart, lingual lipase and UEV-3 protein were identified. As already mentioned, thiamine diphosphatase and MDH activities could not be separated from each other in the process of gel filtration. Interestingly, lingual lipase, in addition to potentially exhibiting MDH activity, is also an experimentally proven polyphosphatase. On the other hand, UEV-3 containing the MDH/LDH domain in its composition is the second component of the ubiquitination system. A receptor-associated protein of the synapse (Rapsin) (the acceptor of the third macroergic phosphate group of ThTP (*Nghiêm et al., 2001*) and a framework protein of the nAChR cluster, as well as a protein without which nAChR subunits will not be transported and incorporated into membrane), was also the third component of the ubiquitination system, ie E3 ubiquitinprotein ligase. This means that Rapsin is a functional partner of UEV-3 and they can be isolated together in our experiments. It is now known that additionally to protein degradation, posttranslational modification such as ubiquitination, in particular nAChR subunits, is required for a number of signaling pathways, cell proliferation and growth, axon growth etc. On the other hand, the results of mass spectrometric analysis revealed a large number of NAD(P)/NAD(P)H-dependent proteins along with dehydrogenases. In particular, among them there are gap junction proteins - connexins and pannexins. Gap junction alpha-1 protein (connexin 43) is one of the proteins of this family identified in the eluates from T-AS after gel filtration. It is currently considered to be the channel responsible for transporting nicotinamide adenine dinucleotides across the plasma membrane of the cell, which was previously considered impermeable for these compounds. Moreover, this is confirmed experimentally by the effect of thiamine deficiency on the functional state of the proteins of gap contacts *in vivo* (literature data). It is known that connexin 43 is metabolically linked to acetylcholine receptors and can be regulated by cholinergic signaling, in particular through proteins such as Src kinase, ZO-1 and ubiquitin ligase Nedd4 (*Sorgen et al., 2004, Spagnol et al., 2016*).

This is especially true for nicotine-type AChRs, since the MDH/LDH domains contain proteins operably linked to the nAChR cluster and identified in T-AS eluates. Since MS analysis only shows the probability of the presence of proteins in the samples, it was imperative to verify the accuracy of the identification. For experimental testing, we used Western blot analysis, which confirmed that the proteins LRP4 and Agrin are components of the ThBP. The content of these proteins in brain tissue was critically reduced under conditions of alimentary thiamine deficiency. The content of LRP4 was completely restored, while Agrin only partially, by a single thiamine administration to animals in a high dose. In the next step, the amino acid residues of Agrin and LRP4 proteins, which are responsible for the interaction with thiamine, were determined by molecular docking. Mass spectrometric analysis showed the presence in the mass spectra of peptides from the polypeptide chains of agrin and LRP4. The detected peptides are present in both the free and thiamine-bound states (weighing 301 Da more) in the respective bands. A comparative analysis of the binding sites of thiamine and its phosphorus esters with these proteins and with known thiamine-dependent proteins showed their high similarity and low probability of replacing thiamine with adenosine compounds or acetylcholine.

Next, we compared the information obtained in this research and described earlier concerning the properties of ThBP. Careful analysis of the data led to the conclusion of a high degree of identity of the studied proteins. As well as the identification of ThBP by the amino acid composition of the eluates from the first basic T-AS, which was previously used in studies by our group, which we also conducted, confirmed the current results. We can summarize that there is a high probability that the previously isolated and partially characterized by our group ThBP and ThBP isolated in this study using specific elution with thiamine could be a protein complex Agrin-LRP4, which is a part of the nicotinic acetylcholine receptor cluster.

The use of computer biology methods allowed us to predict the biological role of thiamine and its biologically active derivatives in binding to the protein complex, which we consider the ThBP: 1) stabilization of the LRP4-Agrin complex in the process of assembling of the nAChR cluster; 2) ThTPase activity of LRP4; 3) the functioning of MThP and related processes through the nAChR cluster because according to our ideas ThBP is one of the key links in the metabolism of MThP in nerve cells. Crucial disturbances in its functioning may be the cause of the initiation of neurodegenerative processes.

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

Список публікацій здобувача 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.
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.
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.
4. *Pavlova OS, Tykhomyrov 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
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
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
7. Меженська ОО, Музичка 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

8. *Parkhomenko YuM, Pavlova AS, Mejenskaya OA* (2016) Mechanisms Responsible for the High Sensitivity of Neural Cells to Vitamin B1 Deficiency *Neurophysiology*. - 48(6):451-465
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

Апробація матеріалів дисертації:

1. *Протасова ЗС, Меженська ОО, Степаненко СП, Чехівська ЛІ, Пархоменко ЮМ* (2014) Зв'язування міченого тіаміну синаптосомами як показник обміну тіаміну в нервових клітинах при певних патологіях (Мат Укр біохім конгресу). *Ukr Biochem J* 86(5, Supplement 2):25-26 Київ, 6-10 жовтня
2. *Меженская ОА, Буник ВИ, Пархоменко ЮМ* (2015) Выявление новых протеинов мозга, проявляющих аффинность к тиамину. Актуальные проблемы современной биохимии и клеточной биологии: мат III Межд научн конф (под ред Ушаковой ГА) Днепропетровск, издательство Арбуз 192с сс 74-76 Днепропетровск, 24-25 сентября
3. *Меженская ОА, Музычка ОВ, Вовк АИ, Буник ВИ, Пархоменко ЮМ* (2016) Биоспецифичность связывания протеинов с тиаминном как лигандом аффинного сорбента. Сб мат Межд научн конф молодых учёных по мед биологии ФГБУ ФНКЦ физ-хим медицины ФМБА (под ред Ильиной ЕН, Кострюковой ЕС) 172 с сс 91-92 Москва, ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, 19-20 апреля
4. *Алешин В, Меженская О, Кэне Т, Пархоменко Ю, Буник В* (2016) Аффинная хроматография и масс-спектрометрия для идентификации тиамин (витамин В₁)-зависимых фосфатаз мозга. Сб мат Межд научн конф молодых учёных по мед биологии ФГБУ ФНКЦ физ-хим медицины ФМБА (под ред Ильиной ЕН, Кострюковой ЕС) 172 с сс15-16 Москва, ФНКЦ ФХМ ФМБА России Москва, 19-20 апреля
5. *Меженська ОО, Музичка ОВ* (2016) Відмінності в спектрах протеїнів взаємодіючих з сорбентами, що містять тіамін як ліганд і без нього. Актуальні проблеми біохімії та біотехнології. Тези доповідей конференції-конкурсу молодих учених присвяченої 110-річчю з дня народження ВО Беліцера (за ред Мазанової АО та інш) Киев, Санченко с 34 Київ, 15-16 травня

6. **Mezhenskaya O, Parkhomenko Yu** (2016) 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 Acta Biochimica Polonica 63(suppl 1):26 Wrocław, 10th-12th July
7. **Mezhenska OO, Rebryev AV, Parkhomenko YuM** (2018) 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 Ukr Biochem J 90(Special Issue):157 Kyiv, 3id -5th September
8. **Aleshin VA, Kaehne T, Bunik VI, Parkhomenko YM, Mezhenskaya OA** (2018) Phosphatases of the thiamin-binding proteomes Міжн конференція: EMBO at Basellife-2918 <https://www.basellife.org/2018/> Базель, Швейцарія, 11-14 вересня
9. **Mezhenska OO, Rebriev AV, Parkhomenko YuM** (2019) Detection of new protein targets of thiamine. Матеріали XII Укр біохім конгресу. Медична та клінічна хімія 3(80)(том 21, Додаток):35-36 Тернопіль, 30 вересня-4 жовтня
10. **Parkhomenko YuM, Pavlova OS, Mezhenska OO, Stepanenko SP, Chehivska LI** (2019) Do oxidized derivatives of thiamine participate in regulation of its metabolism? Матеріали XII Укр біохім конгресу Медична та клінічна хімія 3(80) (том 21, Додаток):232 Тернопіль, 30 вересня- 4 жовтня
11. **Меженська О, Ребриєв А, Пархоменко Ю** (2020) Нові протеїнові мішені дії тіаміну 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. – с.23 Дніпро, 1-2 жовтня

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень	19
ВСТУП	20
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	27
<i>Глава I. РОЛЬ ТІАМІНУ ТА ЙОГО ПОХІДНИХ У ЖИВОМУ ОРГАНІЗМІ</i>	27
1.1 Відомості про вітамін В ₁ (тіамін).....	27
1.1.1 Загальні уявлення про будову і фізико-хімічні властивості тіаміну.....	27
1.1.2 Вибрані відомості щодо біологічної ролі тіаміну.....	28
1.2 Біологічно активні похідні тіаміну.....	31
1.2.1 Похідні тіаміну з провітамінною активністю.....	32
1.2.1.1 Фосфорні ефіри тіаміну.....	32
1.2.1.2 Окислені похідні тіаміну.....	46
1.2.1.3 Біологічна активність окремих складових молекули тіаміну та сполук, отриманих штучно на їх основі.....	52
1.2.2 Антагоністи вітаміну В ₁	54
1.3 Захворювання, пов'язані з недостатністю та порушенням обміну тіаміну.....	56
<i>Глава II. СУЧАСНІ ВІДОМОСТІ ЩОДО ПРОТЕЇНІВ, ЗДАТНИХ ЗВ'ЯЗУВАТИСЯ З ТІАМІНОМ</i>	63
2.1 Транспортування тіаміну та його похідних.....	63
2.1.1 Механізми транспорту тіаміну в тваринному організмі.....	63
2.1.2 Сімейство транспортерів тіаміну: властивості, особливості будови.....	65
2.2 Тіамінзв'язувальні протеїни, що не пов'язані з транспортуванням вітаміну в живому організмі, їх розповсюдження в природі, загальна інформація.....	66
2.2.1 Відомі специфічні тіамінзв'язувальні протеїни.....	66

	16
2.2.2 Протеїни, що мають тіамінзв'язувальні ділянки.....	68
2.2.3 Вплив тіаміну на функціонування інших протеїнів.....	70
Розділ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	74
<i>Глава III. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....</i>	<i>74</i>
3.1 Матеріали та реактиви.....	74
3.2 Синтез афінних сорбентів.....	74
3.2.1 Активація носія та іммобілізація спейсера.....	75
3.2.2 Отримання базового афінного сорбенту з тіаміном в якості ліганда.....	75
3.3 Визначення концентрації ліганду у складі афінного сорбенту.....	76
3.4 Виділення ТЗП.....	76
3.4.1 Отримання ацетонового порошку.....	77
3.4.2 Афінна хроматографія ТЗП.....	77
3.4.3 Гель-фільтрація та визначення молекулярної маси ТЗП.....	78
3.5 Афінна хроматографія комерційної МДГ.....	78
3.6 Визначення ензиматичних активностей.....	79
3.6.1 Вимірювання фосфатгідролазних активностей.....	79
3.6.2 Вимірювання малатдегідрогеназної активності.....	80
3.6.3 Вимірювання глутаматдегідрогеназної активності.....	80
3.7 Вивчення ефекторних впливів тіаміну і ТДФ на малатдегідрогеназну і глутаматдегідрогеназну активність.....	81
3.8 Кількісне визначення протеїну.....	81
3.9 Електрофорез та вестерн-блотинг.....	81
3.10 Мас-спектрометричні дослідження.....	83

3.11 Електронна мікроскопія.....	84
3.12 Створення тваринних моделей недостатності тіаміну.....	84
3.12.1 Аліментарний дефіцит тіаміну.....	84.
3.13 Біоінформативні методи.....	85
3.13.1 Попарні і множинні вирівнювання протеїнів.....	85
3.13.2 Просторове вирівнювання протеїнів.....	85
3.13.3 Докінг тіаміну до молекул протеїнів.....	85
3.13.4 Інші використані ресурси.....	85
3.14 Статистичні методи обробки результатів.....	86
<i>Глава IV. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....</i>	<i>87</i>
4.1 Аналіз т-АС на вміст ліганду.....	87
4.2 Аналіз протеїнів мозку, що здатні зв'язуватися з тіаміном, отриманих елюцією з т-АС.....	88
4.2.1 Ензиматичні активності в елюатах з афінного сорбенту, що містить тіамін як ліганд: неспецифічна і специфічна елюція.....	88
4.2.1.1 Рівні дегідрогензаних активностей.....	88
4.2.1.2 Рівні фосфатазних активностей.....	91
4.2.2 Визначення оптимальних умов специфічної елюції.....	93
4.3 Афінна хроматографія протеїнових екстрактів мозку на сорбенті, що не містить тіамін як ліганд.....	98
4.4 Гель-фільтрація протеїнових фракцій-елюатів з т-АС та визначення молекулярної маси ТЗП.....	102
4.5 Вплив тіамінових сполук на активність малат- і глутаматдегідрогенази <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i>	106

4.5.1 Вивчення дії тіаміну і ТДФ на МДГ і ГДГ мозку, що були виділені шляхом афінної хроматографії на т-АС	106
4.5.2 Активності МДГ і ГДГ в умовах експериментальної недостатності тіаміну.....	111
4.6 МС-ідентифікація ізозимів/ізоформ малат дегідрогенази, що проявляють спорідненість до тіаміну, з використанням комерційного препарату МДГ.....	113
4.7 Аналіз даних отриманих за допомогою мас-спектрометричних досліджень протеїнів мозку, що були елюйовані з т-АС.....	127
4.8 Дослідження ТЗП методом Вестерн-блот аналізу.....	144
4.9 Біоінформативний аналіз результатів.....	147
4.9.1 Ідентифікація протеїнів, елюйованих з т-АС, за амінокислотним складом....	147
4.9.2 Докінг тіаміну з протеїнами.....	150
4.9.3 Вирівнювання протеїнів.....	157
Розділ 3. ЗАКЛЮЧЕННЯ.....	163
ВИСНОВКИ (положення, що виносяться на захист)	171
Список джерел.....	173
Додатки.....	196
Додаток 1. Узагальнення результатів МС-ідентифікації ТЗП.....	196
Додаток 2. Порівняння сайтів зв'язування досліджуваних лігандів за докінгу у високоафінний сайт зв'язування тіаміну.....	221
Додаток 3. Список опублікованих праць за темою дисертації.....	228

Перелік умовних скорочень

Ach	ацетилхолін	ОТ	окситіамін
АДФ	аденозин дифосфат	м- холінорецеп тор, mAHP	мускариновий ацетилхоліновий рецептор
АК	амінокислоти, амінокислотні залишки	nAHP	нікотиновий ацетилхоліновий рецептор
АЛТ	аланінамінотрансфераза	ПТ	піритіамін
АМФ	аденозин монофосфат	ПДК	піруватдегідрогеназний комплекс
АСТ	аспартатамінотрансфераза	ПДГ	піруватдегідрогеназа
АТДФ,	аденозин тіамін дифосфат,	ОГДК	оксоглутарат дегідрогеназний
АТТФ	аденозин тіамін трифосфат	(α -КГДК)	комплекс
АТФ	адензин трифосфат	т-АС	тіаміновий афінний сорбент, афінний сорбент, що містить тіамін як ліганд
АХ	афінна хроматографія	ТДФ	тіамін дифосфат
б.а. похідні	біологічно активні похідні тіаміну	РПТ	рухомий пул тіаміну та його б.а. похідних (фосфатів)
ГДГ	глутаматдегідрогеназа	ТЗБ	тіамінзв'язувальний білок
ГДК	глутаматдекарбоксилаза	ТЗП	тіамінзв'язувальні протеїни
ГДФ	гуанозин дифосфат	ТК	транскетолаза
ГТФ	гуанозин трифосфат	ТПК	тіамін пірофосфокіназа
ГЕБ	гемато-енцефалічний бар'єр	ТТФ-аза	тіамінтрифосфат гідролаза, тіамінтрифосфатаза
ГФ	гель-фільтрація	ТМФ	тіамін монофосат
ДТ	дефіцит тіаміну	ТТФ	тіамін трифосфат
ЕФ	електрофорез	ХА	хвороба Альцгеймера
ІМФ	інозин монофосфат	ХП	хвороба Паркінсона
МДГ	малатдегідрогеназа		
МС	мас-спектрометрія		

ВСТУП

Актуальність теми дослідження

Вітамін В₁ (тіамін) - один з найважливіших незамінних мікронутрієнтів, що бере участь у багатьох фізіологічних процесах в організмі живої істоти. З точки зору функціональної біохімії роль тіаміну та його дифосфорного ефіру (ТДФ) в метаболізмі тварин вивчена досить добре. Відомо декілька десятків ензимів, до складу яких як коензим входить ТДФ. Найважливішими з них вважаються мультіензимні комплекси дегідрогеназ α -кетокислот. Важливим етапом, оскільки лімітує ЦТК, є окислювальне декарбоксилювання пірувату за участю піруватдегідрогеназного комплексу (ПДК). В результаті реакцій каталізованих цим комплексом утворюється ацетил-СоА - важливий інтермедіат обміну вуглеводів, протеїнів, ліпідів, попередник синтезу нейромедіатора ацетилхоліна. Аналогічну будову має α -кетоглутаратдегідрогеназний комплекс (ОГДК), одна з ланок циклу Кребса. Не менш важливою є коензимна роль ТДФ у пентозофосфатному циклі, де окислюється значна частина вуглеводів з утворенням пентозофосфатів, що далі йдуть на синтез нуклеїнових кислот.

Адекватна реалізація згаданих реакцій є дуже важливою для нормального функціонування всіх типів клітин. Проте, як показали багаторічні експериментальні і клінічні спостереження, надзвичайно високу чутливість саме нервових клітин до дефіциту вітаміну В₁, яка значно перевищує подібну у клітин інших тканин, виявилось неможливим пояснити лише коензимною роллю ТДФ у функціонуванні низки ключових ензимів. Поступово сформувалися уявлення про некоензимні механізми залучення тіаміну і його б.а. похідних до регуляції клітинних процесів [1-3]. Накопичені на цей час дані переконливо свідчать про існування некоензимних функцій у вітаміні В₁ [4,5].

На підставі спостережень кількох дослідницьких груп було зроблено припущення про існування у клітинах, стан яких є дуже динамічним (особливо нервових), рухомого пулу тіаміну і його фосфатів (РПТ). Циркуляція РПТ між внутрішньоклітинним простором і пресинаптичною щільною спряжена зі змінами мембранного потенціалу нервової клітини [5,6]. 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 НАНУ [7]. Згідно попередніх досліджень, ізольований ТЗБ є біфункціональним [8,9]: поряд зі здатністю специфічно зв'язувати тіамін, він вибірково гідролізує його фосфорні ефіри, найбільш активно – тіамін трифосфат (ТТФ). Здатність ТЗБ, локалізованого в плазматичній мембрані нервових клітин [9,10], вибірково гідролізувати фосфорні ефіри тіаміну співпадає з результатами ранніх спостережень в дослідах *in situ*, які свідчать, що з нервових препаратів при збудженні в середовище вивільнюється вільний тіамін, в той час як у внутрішньоклітинному пулі похідних тіаміну превалюють його фосфорні ефіри [11], тобто при проходженні через мембрану останні мають бути дефосфорильовані. На жаль, до цих пір ТЗБ залишався не ідентифікованим. Досліджені на цей час властивості ТЗБ наводять на думку, що це може бути сукупність протеїнів, які здатні утримуватися разом на всіх етапах виділення препарату. Це цілком можливо через наявність в молекулі тіаміну цілого ряду хімічно активних угруповань - гідроксиетильної, аміногрупи піримідинового компонента, четвертинного азоту, лабільної сірки тiazолієвого циклу, що зумовлює високу реакційну здатність молекули вітаміну В₁. Тіамін легко вступає в різні взаємодії з протеїнами і клітинними структурами. На підставі отриманих відомостей щодо властивостей ТЗБ (або сукупності протеїнів, що входять до цього препарату) ми припускаємо, що ці протеїни є однією з ключових ланок в функціонуванні рухомого пулу тіаміну (РПТ), яка опосередковує перенесення тіаміну через збудливу мембрану в обох напрямках.

Згідно наших припущень, система протеїнів РПТ включає як вже відомі ензими метаболізму тіаміну і його фосфатів, так і ще не ідентифіковані на молекулярному рівні протеїни, які мають тіамінзв'язуючі ділянки, за рахунок чого здатні взаємодіяти з тіаміном та його похідними. Дійсно, мас-спектрометричні дослідження протеїнів, що потрапляють у препарат ТЗБ [12], отриманий за розробленим авторами методом [7], виявили наявність у препараті низки протеїнів з іншими властивостями. Зокрема було показано високу вірогідність присутності малатдегідрогенази та деяких інших дегідрогеназ. Крім того, є підстави вважати, що протеїни РПТ поєднані не тільки функціонально, а й структурно. Виявлення таких протеїнів та дослідження механізмів їх взаємодії з тіаміном і його похідними є дуже необхідним в аспекті з'ясування ролі тіаміну у розвитку нейродегенеративних процесів. Актуальність таких досліджень зумовлена тим, що різного походження функціональні порушення тіамін-залежних

процесів в нервових клітинах є одним з важливих ініціюючих або обтяжуючих чинників в патогенезі таких захворювань, як зверхнекротизуюча енцефаломієлопатія (хвороба Лея), синдром Верніке-Корсакова, хвороби Альцгеймера і Паркінсона та багатьох інших [4]. З'ясування вкладу тіамін-залежних процесів у функціонування нервових клітин є підґрунтям для пошуку шляхів попередження та лікування вказаних патологій.

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. За розробленою раніше методикою 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 вимиваються 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 (М = 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 зв'язування з тіаміном протеїнів ідентифікованих як складові ТЗБ і визначити тіамінзв'язувальні сайти в цих протеїнах. Спрогнозувати можливу біологічну роль зв'язування тіаміну та його похідних з протеїнами, що входять до складу ТЗБ.

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; методи білкової хімії; біохімічні методи, зокрема, методи визначення активності ензимів; спектрофотометрія, флюориметрія; електронна мікроскопія. Ідентифікація протеїнів проводилася з використанням методів одно- і двовимірного гель-електрофорезу з SDS, мас-спектрометрії (МС), Вестерн-блотингу, біоінформативних підходів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, проблема «Біохімія тварин та людини» (шифр 2.28.4) за бюджетними темами: 1) тема № 4: «Роль вітамінів А, Е, В₁, РР, D₃, убіхінону та їх коензимів у забезпеченні функціонування спеціалізованих клітин за норми та за умов ініціалізації 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) тема № 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 E, B₁, PP, коензимами та їх біологічно активними похідними внутрішньоклітинного метаболізму в нормі та за патології». Роботу також було підтримано грантом РФФИ № 15-34-50124_мол_нр (2015 р.).

Наукова новизна одержаних результатів

В ході роботи з застосуванням специфічної елюції та двох видів сорбентів, визначено, що зв'язування з тіаміном в процесі афінної хроматографії протеїнів, що проявляють дегідрогеназні, зокрема малатдегідрогеназну та глутаматдегідрогеназну, та тіамінфосфатазні активності є специфічним. В експериментах *in vitro* показано вплив тіаміну на МДГ активність та тіаміну і ТДФ на ГДГ активність елюйованих з афінного сорбенту, що містить тіамін як ліганд. В досліджах *in vivo* виявлено, що цей феномен є фізіологічним і має місце на рівні організму. Після проведення афінної хроматографії комерційного препарату МДГ ідентифіковано ізозими МДГ та деякі мінорні протеїни зі складу комерційного препарату МДГ, здатні зв'язуватися з тіаміном і що раніше не були відомі як тіамінзалежні. 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 НАХР. Вперше з використанням методу молекулярного докінга визначено АК 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 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, що складається з протеїнів Agrin та LRP4.

Практичне значення одержаних результатів

Приймаючи до уваги той факт, що з V_1 -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

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), тільки після афінної хроматографії 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 експериментальних 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 конференціях: 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 (2013-2020 рр.).

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 9 статей та 11 тез доповідей у матеріалах міжнародних та українських 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.

РОЗДІЛ 1.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Глава I. РОЛЬ ТІАМІНУ ТА ЙОГО ПОХІДНИХ У ЖИВОМУ ОРГАНІЗМІ

1.1 ВІДОМОСТІ ПРО ВІТАМІН В₁ (ТІАМІН)

1.1.1. Загальні уявлення про будову і фізико-хімічні властивості тіаміну

Тіамін (вітамін В₁, аневрин) - вітамін групи В. ІУРАС назва: 2-[3-[(4-аміно-2-метил-піримідин-5-іл)метил]-4-метил-тіазол-5-іл]етанол [13]. Молярна маса: 300,81 г/моль. Вітамін В₁ (тіамін) віднесено до групи водорозчинних вітамінів, оскільки він не розчиняється в жирах і багатьох органічних розчинниках (у гліцерині та метанолі розчинний), але добре розчиняється у воді, термолабільний (нестабільний при впливі тепла, але стабільний при зберіганні в замороженому стані), нестійкий до змін рН (у бік лужного діапазону), при дії радіації і УФ-опромінення та не може депонуватися в тканинах, а тому потребує постійного надходження з їжею. Тим більше, що швидкість обміну тіаміну, як і аскорбінової кислоти, є найвищою у порівнянні з усіма іншими вітамінами.

Молекула тіаміну представляє собою гетероциклічну систему з піримідинового (2-метил-5-оксиметил-6-амінопіримідин) та тіазолового (4-метил-5-оксиетилтіазол) кілець, з'єднаних містком через метиленову групу (Рис.1.1.1). Рентгеноструктурні кристалографічні дослідження довели існування п'яти можливих резонансних форм тіазолового та шести форм піримідинового циклів молекули вітаміну [13].

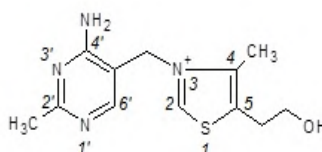


Рис. 1.1.1 – тіамін

Тіамін є безбарвною сульфурорганічною сполукою з формулою C₁₂H₁₇N₄OS, яку синтетично отримують зазвичай у вигляді хлоридної чи бромідної солі. Отримані сульфат і мононітрат вітаміну, деякі інші солі. Особливе значення мають ефіри тіаміну з фосфорною кислотою, зокрема тіамін дифосфат, що є коензимною формою вітаміну. Комерційно доступна форма тіаміну – це гідрохлорид

(молекулярна маса 337,3), а тіаміндифосфату (кокарбоксілази) – монохлорид (молекулярна маса 460,8). Відомі α - і β -форми кристалів тіамінгідрохлориду. β -форма має більш міцні водневі зв'язки, через що спостерігається виділення 4-5ккал (16,7-20,9 кДж) тепла при перетворенні β - у α -форму. У комерційних препаратах вітаміну превалює α -форма, що характеризується підвищеною гідрофільністю.

Давно відомим фактом є те, що в лужних розчинах молекула тіаміну здатна піддаватися двохстадійній реакції розкриття тiazолієвого кільця з утворенням аніону тіольної форми. Фахівці вважають, що така властивість, зумовлена присутністю тiazолієвого кільця в тіаміні, є незвичайною для невеликої молекули, і в свій час вона допомогла вченим встановити будову молекули тіаміну [14,15]. До ряду окисно-відновних перетворень тіаміну відносяться також реакції його взаємодії з поліфенолами, такими як кавова і дубильна кислоти, деякі флавоноли, катехоламіни, гідрохінон, пірогаллол, гемін та інші [16]. Ці реакції призводять до розкладання тіаміну при рН 7.0 *in vitro* і відповідальні за інактивацію тіаміну в організмі людей, що споживають продукти харчування, збагачені біологічними поліфенолами.

Уся вищенаведена інформація свідчить про значну хімічну активність і здатність до комплексоутворення молекули тіаміну, яка зумовлена наявністю у молекулі великої кількості функціонально активних груп (зокрема метиленова група через яку зв'язані гетероцикли, аміногрупа у складі піримідинового кільця, С₂-атом та атом сульфору у тiazоловій складовій і оксиетильний радикал). Функціональні групи діють у реакціях як окремо, так і кооперативно, причому кооперативна взаємодія не є простою сумою властивостей окремих груп і надає досліджуваній сполуці строго індивідуального характеру. Завдяки цьому тіамін здатен виконувати свої чисельні функції у біологічних системах, зокрема і через велику кількість біологічно активних похідних.

1.1.2 Вибрані відомості щодо біологічної ролі тіаміну

Вітамін В₁ було відкрито на початку ХХ ст. як речовину, що лікувала захворювання «бері-бері». Це захворювання характеризувалось важкими ураженнями нервової системи [17, 18], що спровокувало назву речовини «аневрин».

Ще на перших порах вивчення вітаміну В₁, практично одночасно з його синтезом у лабораторії і підтвердженням структури у 1937 р., було виявлено вивільнення тіаміну у вільній формі зі збуджених нервових волокон (разом з ацетилхоліном), що свідчить про зв'язок вітаміну В₁ з функціональною активністю збудливих мембран [19,20]. З того часу дослідження, направлені на вивчення ролі тіаміну у клітинних процесах, фокусувалися на проблемі з'ясування механізмів його високої нейроактивності.

Важливим етапом у вивченні біохімії тіаміну було виявлення його основної біологічно активної форми - тіаміндіфосфату (ТДФ), який, як з'ясувалося далі, є коензимом низки ензимів, що каталізують утворення і розрив карбон-карбонових зв'язків і беруть участь у ключових метаболічних шляхах [21,22]. Таким чином, Peters запропонував одну з ранніх гіпотез щодо нейротропної дії тіаміну. Ця гіпотеза припускає, що патологічні зміни у нервовій тканині при дефіциті тіаміну можуть бути віднесені до порушення синтезу ацетил-КоА, який є попередником біосинтезу нейромедіатора ацетилхоліну (АCh). Зниження синтезу ацетил-КоА при дефіциті тіаміну пояснювалося зниженням активності ПДК через дефіцит коензиму. Ця гіпотеза довгий час не отримувала визнання на тій підставі, що вченим не вдавалося отримати доказів кореляції між активністю ПДК, синтезом ацетилхоліну і забезпеченням тканин тіаміном. Цей зв'язок виявився складнішим, ніж передбачалося раніше [23].

Відкриття існування в живих клітинах тіамінтрифосфату (ТТФ) і з'ясування його ролі у етіології хвороби Лея стало ще одним етапом в дослідженні нейротропної дії вітаміну В₁ і на деякий час загальмувало розвиток "ацетилхолінової" гіпотези [24]. Ці дані спонукали авторів висунути припущення про особливу роль ТТФ у передачі нервового імпульсу, з метою перевірки якого проводиться багато досліджень, але до теперішнього часу в цьому питанні немає однозначності [22-27].

Накопичені до кінця ХХ ст. експериментальні дані в галузі фізіології і біохімії вітаміну В₁ сприяли формуванню уявлень, що надзвичайно високу чутливість нервових клітин до його дефіциту неможливо пояснити лише роллю ТДФ у функціонуванні ряду залежних від нього ензимів, зокрема, ПДГ. В той же час

сформулювалися уявлення щодо існування у цього вітаміну некоензимних функцій, які можуть виявитися набагато ширшими, ніж коензимні [5,12,23, 28-32].

На сучасному етапі не виключається, що висока спорідненість тіаміну до ацильного радикалу може зумовлювати модулюючу дію його біологічно активних похідних на обмін ацетилхоліну і, відповідно, на спряження обміну цих двох сполук на кількох ділянках. Такими ділянками можуть бути: регуляція синтезу ацильного компонента ацетилхоліну (регуляція активності ПДК), перенесення ацетильної компоненти через мітохондрійні мембрани (а можливо і мембрани інших клітинних компартментів), захоплення та вивільнення ацетилхоліну або продуктів його гідролізу нервовими закінченнями. Тож роль тіаміну не обмежується його участю в регуляції синтезу ацетил-КоА, лімітуючого субстрату в синтезі ацетилхоліну. Передбачається взаємозв'язок цих двох сполук протягом всього шляху обміну ацетилхоліну в нервовому закінченні, а, можливо, і в пресинаптичній щілині. Таким чином, можна розглядати вітамін В₁ як супутник ацетилхоліну [5]. Водночас існують дані, що безсумнівно свідчать про вплив тіаміну на функціонування ацетилхоліну як нейромедіатора. Так, у 1976 р. в *Nature* запропоновано гіпотезу про участь тіаміну у передачі збудження в холинергічних синапсах через вплив на реліз АСh [33]. В подальшому ці дослідження було продовжено та показано зміни у рівнях тіаміну та його фосфорних ефірів [34-35]. Важливо відмітити, що дія тіаміну залежала від концентрації. Аналогічні різноспрямовані ефекти спостерігалися при дослідженні передачі імпульсу в нервово-м'язових з'єднаннях. Так, Романенко [36] виявив потенціювання дії АСh тіаміном. За даними ж Enomoto і Edwards [37], тіамін блокує нервово-м'язову передачу. У зв'язку з цим цікаво, що в свій час препарати тіаміну (у високих дозах) навіть пропонувалося використовувати для анестезії [38]. Більше того, існують результати, що продемонстрували безпосереднє зв'язування тіаміну з НАХР виділених з *T.Marmorata* ($K_d = 30-50$ мкМ) [39]. Але головною проблемою була специфічність такої взаємодії. В наш час існує також ще цілий ряд не з'ясованих запитань і протиріч, що не дозволило теорії про участь тіаміну або його б.а. похідних чи антагоністів у проведенні нервового імпульсу бути остаточно доведеною і сприйнятою широкими колами вчених.

З іншого боку, серією робіт було доведено, що тіамін є конкурентним інгібітором нікотину, причому антагонізм тіаміну по відношенню до нікотину виражений сильніше у порівнянні з ацетилхоліном та гістаміном [40]. А за дією на блукаючий нерв (депрессорні ефекти-вазоділатація), тіамін виявляє дію протилежну ефекту атропіна – відомого блокатора м-холінорецепторів [41]. Був також відмічений блокуючий ефект атропіну на синтез ТТФ у гангліозних клітинах [24]. Крім того, тіамін нормалізував гіперглікемію, що була викликана введенням нікотину через стимулювання викиду адреналіну. Також тіамін значно нівелював антидиурез у людини, викликаний курінням цигарок. При цьому тіамін не мав ніякого ефекту на антидиурез, що викликається гіпоталамо-гіпофізарною системою викидом у кров вазопресину [40].

Але поки що немає цільної картини всіх клітинних процесів, протікання яких прямо або опосередковано залежить від вітаміну В₁. Аналізуючи чисельні дані, відомі на цей час, ми приходимо до висновку, що ефективним шляхом для виявлення таких процесів є дослідження протеїнів, функціонування яких залежить від тіаміну. Вивчення цього питання є важливим, оскільки експериментальні дані, отримані до цього часу, наполегливо свідчать про те, що функціональне порушення тіамін-залежних процесів в організмі людини може бути одним з важливих патогенетичних факторів розвитку більшості метаболічних та нейродегенеративних захворювань [5,42].

1.2 БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ ПОХІДНІ ТІАМІНУ

Відомо, що, крім вільного тіаміну, в клітинах присутні три його фосфорних ефіри: ТМФ (тіамін монофосфат), ТДФ (тіамін дифосфат) і ТТФ (тіамін трифосфат), слідові кількості аденильованих похідних тіаміну (АТДФ і АТТФ – аденозінтіаміндифосфат і аденозінтіамінтрифосфат, відповідно) (Рис.1.2.1).

В тканинах визначають також окислені похідні тіаміну: тіаміндисульфід (ТДС), тіохром та ін. (виявлено утворення понад 25 різних сполук) [25,43]. Вміст вітаміну В₁ у вигляді всіх форм, так званий тіаміновий пул, в тваринних клітинах становить від 4 до 35 нмоль на г сирової тканини. Потреба у тіаміні дорослої людини складає 2-3 мг/добу [43].

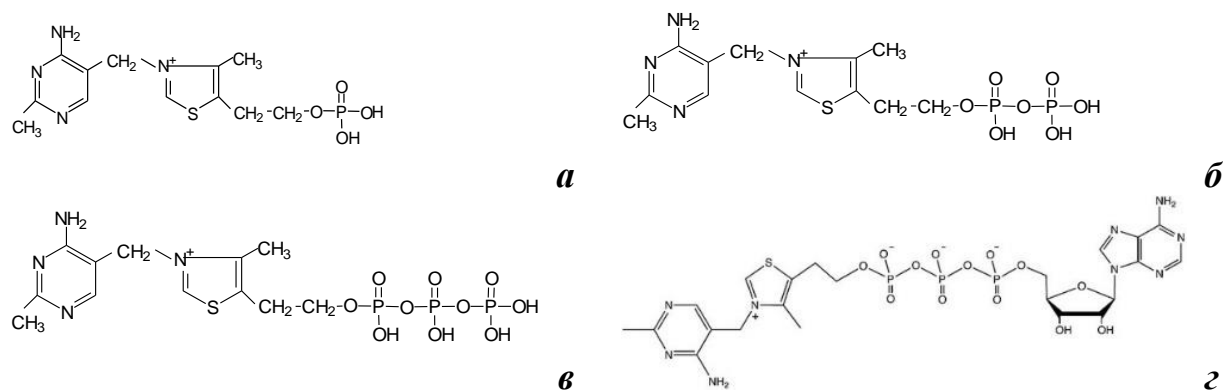


Рис.1.2.1 – фосфорні ефіри тіаміну: а) тіамінмонофосфат, б) тіаміндифосфат, в) тіамінтрифосфат, г) аденільований тіамінтрифосфат

За даними, отриманими на щурах, близько половини всього вітаміну, що знаходиться в організмі, припадає на скелетні м'язи, 40% - на внутрішні органи, причому 15-20% з них (з 40%) містить печінка [13]. Концентрація вітаміну найбільш висока в серці, печінці, мозку, нирках, статевих залозах, наднирниках, підшлунковій залозі. Відносний вміст нефосфорильованого тіаміну в різних тканинах варіює від 1 до 9% [45-47]. Винятком є насіння рослин, де відсоток нефосфорильованої форми може доходити до 50. Це може бути пов'язано з великою кількістю тіамінзв'язувальних протеїнів, роль яких полягає у збереженні вітаміну В₁ для процесів проростання [48]. Щодо вмісту в організмі ссавців було встановлено [49], що тіамін, ТМФ і ТДФ присутні як у розчинних, так і в мембранних фракціях мозку, нирок, печінки і скелетних м'язів, а ТТФ локалізована в мембранах серця, мозку, а в печінці розподіляється приблизно у рівній мірі у мембранних і розчинних фракціях. В експериментах з поділом гомогенату мозку щура методом диференційного центрифугування, тіамін і ТМФ розподіляються в основному в цитозольній фракції, ТДФ в мітохондріях, а ТТФ в рівній мірі як в цитозолі, так і в мітохондріях. Також виявлено, що велика кількість ТМФ присутня у ядрах клітин.

1.2.1 Похідні тіаміну з провітамінною активністю

1.2.1.1 Фосфорні ефіри тіаміну

Тіамін дифосфат (ТДФ)

Розповсюдження та біосинтез у клітинах

У більшості випадків близько 60-90% тіаміну присутні у вигляді дифосфатного ефіру, ТДФ (ТПФ) (рис. 1.2.1, б). Значна кількість ТДФ транспортується в мітохондрії, де він включається в ПДК, ОГДК і дегідрогеназний комплекс 2-оксокислот з розгалуженим ланцюгом, а в цитозолі – в транскетолазу (ТК) [25]. При цьому не весь ТДФ зв'язується з відповідними апоферментними протеїнами. Показано, що по мірі розвитку авітамінозу В₁ запаси ТДФ в тканинах можуть зменшуватися більш ніж удвічі без пропорційного падіння активності ТК або ПДГ [5,23,50]. За деякими оцінками до складу ТДФ-залежних ензимів нервової тканини інкорпоровано 90-95% від загального внутрішньоклітинного вмісту ТДФ, швидкість оборту якого складає 6-20 годин. Проте у гепатоцитах на долю вільного ТДФ може припадати до 60%. Невелика кількість вільного ТДФ разом з іншими фосфорильованими похідними тіаміну утворює не зв'язаний з протеїнами пул, який дуже швидко обмінюється. Щодо субклітинного розподілу тіамінфосфатів, то при дослідженні в мозку щурів виявили найбільш високий вміст ТДФ в мітохондрійній та синаптосомній фракціях, найменший - в мікросомній, мієліновій та цитозольній [49].

Біосинтез ТДФ у еукаріотичних організмів і, принаймі, у деяких прокариот, наприклад *P. Denitrificans*, відбувається у ході реакції: тіамін + АТФ ↔ ТДФ + АМФ, яка каталізується тіамінпірофосфокіназою (ТПК), альтернативні назви: тіаміндифосфокіназа або АТФ: тіамін пірофосфотрансфераза (ЕС 2.7.6.2). У кишечних бактерій *E.coli* та *S.Tiphimurium* - синтез ТДФ *de novo* відбувається за альтернативним шляхом, який включає фосфорилування ТМФ тіамінмонофосфаткіназою (ЕС 2.7.4.16) [51,52] без попереднього гідроліза останнього до вільного тіаміну.

Характер реакцій, що каталізуються ТДФ, та сучасні уявлення щодо механізму тіамінового каталіза

Ензими, що містять ТДФ як коензим, присутні в більшості рослинних і тваринних тканин, а також у мікроорганізмах, де беруть участь в ряді біохімічних перетворень, пов'язаних з декарбоксілюванням кетокислот і переносом альдегідних залишків. Найбільш розповсюдженим поясненням механізму каталізу за участю ТДФ є утворення ключового інтермедіату – біполярного йону (іліду) тіазолію, який

утворюється внаслідок відщеплення протону від карбону у положенні 2 тіазолового циклу, який слугує своєрідним стоком для електронів [53].

Але загальноприйняті уявлення про молекулярні механізми каталітичної дії ТДФ не пояснюють цілого ряду накопичених експериментальних даних та й самі по собі містять масу внутрішніх протиріч [13]. Наприклад, дріжжова ПДК крім пірувата активно декарбоксілює фенілгліоксилову та циклогексил-гліоксилову кислоти. Спроби уявити собі взаємодію цих сполук з 2-С-Тз на молекулярних моделях виявляються абсолютно безуспішними. Припущення про вирішальне значення іонізації 2-С-Тз для взаємодії каталізатора з субстратом також натрапляють на серйозні заперечення. Тож взаємодія ТДФ з кетоальдегідами, а також деякі давно відомі факти, не вкладаються у механізм, постульований Бресловим. В першу чергу це стосується пояснення механізму дії декарбоксілаз деяких дикарбонових органічних кислот, які не мають кетогрупи, наприклад, оксаліл-КоА. Своєрідно відбувається за участі ТДФ та йонів магнію декарбоксілювання гліоксилової кислоти в одного з видів *Pseudomonas*. Також існують дані, які свідчать, що тіамін здатен каталізувати не тільки декарбоксілювання, але й утворення α -кетокислот. Вочевидь, що таким чином намічаються шляхи для пояснення обміну карбоксильної групи піровиноградної кислоти на однокарбонові радикали (вуглекислота, форміат) і можливої ролі ТДФ в обміні метилгліоксаля [13].

Усі наведені протиріччя і сумніви повністю пояснюють чому і в наш час не перериваються спроби «удосконалити», «уточнити», «модернізувати» уявлення про молекулярні механізми каталітичної дії ТДФ [54,55]. Деякі з цих спроб будуються на новій методичній основі, зокрема на застосуванні полярографічних та рентгеноструктурних досліджень або на виявленні у вітаміна нових фізико-хімічних властивостей. Серед них не останнє місце займає те, що деякі проміжні продукти перетворень ТДФ викликають появу колового дихроїзму сигналів, коли тіамін дифосфат знаходиться у складі ензиму. Цього не спостерігається за відсутності ензиму. Це дасть змогу додатково дослідити ці інтермедіати на шляху остаточного з'ясування механізму коензимної дії вітаміну В₁ [55].

Також у дослідників викликає подив той факт, що саме дифосфорильована форма тіаміну є коензимом, тоді як монофосфат міг би виконувати ту ж функцію так

само добре, як, наприклад, і у випадку з пірідоксальфосфатом. Відомо те, що дифосфат робить внесок в енергію зв'язування з апоензимом, але, як це загальноприйнято, каталітичні властивості тіаміну залежать тільки від тіазолієвого фрагменту молекули тіаміну, здатного втратити протон і утворити реактивний ілід. Ілід формується не під впливом присутності фосфатної групи на гідроксиетильному хвості і тоді не існує ніяких очевидних переваг у використанні ТДФ (а не ТМФ чи ТТФ) у якості коензиму. Але ж саме ТДФ еволюцією обрано на роль кофактору, тож вище сказане тільки доводить те, що точний механізм тіамінового каталізу ще не визначено остаточно і дуже вірогідним є те, що взаємодія всіх активних центрів у молекулі ТДФ під час каталізу має кооперативний характер [56].

ТДФ-залежні ензими, їх роль в клітинному метаболізмі

Коензимна функція тіаміну відкрита у 1937 р. коли Lohmann і Schuster [22] виявили, що ТДФ є кофактором окислювального декарбоксілювання пірувату дріжжовою піруватдекарбоксілазою (ЕС 4.1.1.1). Наразі відомо декілька десятків ТДФ-залежних ензимів (за останніми даними понад 50 [57]), 28-ом з цих ензимів присвоєно індивідуальні шифри (www.exPASy.ch); 4 з них займають провідні позиції в проміжному обміні. Це піруватдегідрогеназа (ЕС 1.2.4.1), α -кетоглутаратдегідрогеназа (ЕС 1.2.4.2) і дегідрогеназа α -кетокислот з розгалуженим ланцюгом (ЕС 1.2.4.4), які входять до складу локалізованих в мітохондріях еукаріотичних клітин та цитозолі прокаріот дегідрогеназних мультиензимних комплексів, а також цитозольна транскетолаза (ЕС 2.2.1.1).

Піруватдегідрогеназний комплекс (ПДК) крім ПДГ (піруватдегідрогенази, E1) містить ще 2 каталітичних компонента – дигідроліпоїл-ацетилтрансферазу (E2) (ЕС 2.3.1.12) та дигідроліпоїлдегідрогеназу (E3) (ЕС 1.8.1.4). Комплекс каталізує окисне декарбоксілювання пірувату з утворенням ацетил-КоА і, таким чином, забезпечує входження до ЦТК багатьох специфічних шляхів катаболізму вуглеводів, жирів і амінокислот. До складу цього поліензимного комплексу, крім функціональних одиниць, входять ще регуляторні ензими, а саме, специфічні кіназа та фосфатаза, що приймають участь у регуляції ПДГ за механізмом фосфорилування - дефосфорилування. На додаток до його коензимної функції, ТДФ виявився

інгібітором кінази піруватдегідрогенази (ПДГ-кінази), в той час як ТДФ – інгібітором фосфатази ПДГ [23,58]. Реакція утворення ацетил-КоА є ключовою для всього метаболізму, і тому активність ПДК знаходиться під суворим контролем. Особливе значення це має для нервової тканини, оскільки експериментально було доведено, що піруват є єдиним джерелом ацетил-КоА для синтезу ацетилхоліну в нервовій клітині [34,59]. Мутація ПДК, що виражається в заміні Arg-263 на Gly в E1 α -субодиниці (знаходиться у складі ТДФ-зв'язувального сайту), є однією з причин підгострої некротизуючої енцефалопатії (хвороба Лея). Оскільки ген E1 α -субодиниці локалізований у X-хромосомі, синдром Лея, пов'язаний з дефектом ПДК, представляє собою зціплене зі статтю захворювання [25].

Оксоглутаратдегідрогеназний комплекс (ОГДК, α -КГДК) (ЕС 1.2.4.2) – один з ключових ензимів циклу Кребса та **дегідрогеназний комплекс розгалужених оксокетокислот**, що бере участь в катаболізмі валіну, лейцину та ізолейцину, побудовані схожим з ПДК чином [13]. Крім того, E1-компонент ОГДК представляє з себе α 2-гомодимер. Дегідрогеназа α -кетоглутарової кислоти 2-оксоглутаратдегідрогеназа (ОГДГ або α -КГДГ) побудована з більших за розміром субодиниць протеїну ніж ПДГ, а ТДФ в ензимі зв'язаний з декарбоксилюючим фрагментом міцніше у порівнянні з аналогічною протеїновою ділянкою у ПДГ. Цей комплекс не містить регуляторних ензимів. Та обставина, що ТДФ у складі E1-субодиниці ОГДГ міцно зв'язаний вже сама по собі в значній мірі пояснює більшу стійкість ензиму до нестачі тіаміну в організмі і особливим чином підкреслює важливість для процесів життєдіяльності реакції каталізованої α -КГДК. Цікаво відмітити, що при тіамін-залежній формі MSUD («Хвороба сечі з запахом кленового сиропу» або, коротко, «хвороба кленового сиропу» чи лейциноз) мутаціями зачеплено не E1 α чи E1 β , а E2-субодиниці комплексу.

До групи дегідрогеназ оксокетокислот можна віднести також гомологічний ОГДК комплекс – **оксоадіпатдегідрогеназний комплекс** (ОАДК), що був відкритий нещодавно і який бере участь в перетворенні 2-оксоадіпату – загального інтермедіату шляхів деградації лізину і триптофану [60] за подібним до ОГДК механізмом на глутаріл-КоА.

Ще один ТДФ-залежний ензим - *дегідрогеназа γ -окси- α -кетоглутарової кислоти*. Ця сполука утворюється у тканинах в помітних кількостях з оксипроліна або з пірувату чи гліюксилату. Після окислювального декарбоксілювання γ -окси- α -КГК перетворюється на яблучну кислоту (малат), що є одним з проміжних субстратів ЦТК. При дефіциті тіаміну ензим швидко втрачає свою активність, а спостережуваний у цих умовах уповільнений обмін пірувату сприяє накопиченню γ -окси- α -КГК. Остання сполука, як з'ясувалося, є потужним конкурентним інгібітором аконітази, ізоцитратдегідрогенази та дегідрогенази 2-оксоглутарової кислоти, тобто одразу трьох ензимів ЦТК. Вказана обставина достатньо добре пояснює те, що раніше здавався суперечливим: кількість ОГДГ за вітамінозу В₁ залишається майже нормальною, а функціонування циклу Кребса явно загальмоване [13].

Транскетолаза (ТК) (ЕС 2.2.1.1) – ключовий ензим неокиснювальної гілки пентозофосфатного шляху і фотосинтезу – переносить двокарбонові фрагменти з кето- на альдо-вуглеводи, можливий також односубстратний каталіз. Механізм останнього нещодавно було розшифровано у лабораторії Г.А. Кочетова [61,62]. Метаболічна роль ТК полягає в тому, що вона зворотно пов'язує гліколіз з пентозофосфатним шляхом. У фотосинтезуючих організмів ТК забезпечує взаємодію циклу Кальвіна-Бенсона з метаболізмом вуглеводів з одного боку і анаболічними шляхами, що ведуть до утворення нуклеїнових кислот, амінокислот та їх багаточисельних похідних – з іншого. У геномі людини крім гена ТК (*TKT*) виявлено ще 2 транскетолазоподібних гени (*TKTL1* і *TKTL2*). Припускають, що збільшена експресія *TKTL1* має пряме відношення до канцерогенезу [63]. Та чи насправді *TKTL1* і *TKTL2* експресують справжню ТК і понині жваво обговорюється у наукових колах, що займаються цією проблемою [64,65].

У 1999 р. в печінці щура відкрито новий ТДФ-залежний ензим – *2-гідроксифітаноїл-СоА-ліаза* (ЕС 4.1.2.2). Цей ензим локалізований в пероксисомах і каталізує розщеплення С-С зв'язку в процесі α -окислення 3-метил-жирних кислот [66].

Деякі інші ТДФ-залежні ензими знайдено лише в клітинах мікроорганізмів. Зокрема, такі ензими, як сульфоацетальдегідсульфоліаза (ЕС 2.3.3.15) [67], фосфокетолаза (ЕС 4.1.2.9) [68], бензоїлформ(і)атдекарбоксілаза (ЕС 4.1.1.7) [69],

ацетолактатсинтаза (ЕС 2.2.1.6) [70] і піруватоксидаза (ЕС 1.2.2.2) [71] виконують спеціалізовані функції у метаболічних шляхах певних груп організмів, в основному бактерій.

На сьогодні клоновані кДНК більшості відомих ТДФ-залежних ензимів. Для деяких з них методами рентгеноструктурного аналізу і колового дихроїзму сигналів розрахована тривимірна структура.

Некоензимні механізми участі ТДФ у клітинних процесах

Одержано результати стосовно некоензимної дії ТДФ. Показано, що для ПДГК з *E.coli* ТДФ є також алостеричним ефектором, що активує повну реакцію комплексу. Згодом встановлено, що ТДФ є інгібітором кінази піруватдегідрогенази (ЕС 2.7.11.2), тобто гальмує інактивацію ПДГК за механізмом фосфорилування ПДГ специфічною кіназою. Підтверджено, що ТДФ гальмує фосфорилування залишків серину компоненту E1 ПДГК, інгібуючи при цьому всі чотири ізоформи кінази ПДГ людини [23,58].

На початку ХХІ ст. було відкрито механізм регуляції генів, за яким висококонсервативні некодуєчі елементи на 5'-кінці мРНК, так звані рибосвітчі, зв'язуючи невеликі молекули метаболітів (наприклад, деякі вітаміни, АК, нуклеотидні основи) та зазнаючи при цьому конформаційних змін, контролюють експресію кодуєчих ділянок генів. Рибосвітч ТНІ-бох, який зв'язує ТДФ, один з перших відкритих рибосвітчів, представлений у всіх доменів життя, і є єдиним на сьогодні, який було ідентифіковано у еукаріот: знайдено в інтроні грибів та на 3'-кінці мРНК рослин. На сьогодні показано, що ТНІ-бох-рибосвітч регулює експресію генів, що відповідають за біосинтез, фосфорилування та транспорт тіаміну, у відповідь на внутрішньоклітинну концентрацію ТДФ [72,73].

Відомості щодо ролі тіамінтрифосфату в організмі

Розповсюдження та біологічна роль

Згідно даних літератури, рівень ТДФ (рис.1.2.1, в) в більшості біологічних об'єктів визначається в межах 1-10% від загальної концентрації тіаміну [44,74,75], а в мозку ссавців – 0,3 – 5,0 % [74,76-78]. Але слід зазначити, що ТДФ є досить

лабільною сполукою і визначена величина його вмісту може залежати як від способу відбору біологічного матеріалу, так і від методу визначення. Проте було показано, що як абсолютний, так і відносний вміст ТТФ дуже високий (більш ніж 50%) в скелетних м'язах курчат і свиней, а також в скелетних м'язах *Electrophorus electricus* [79-80] і це досі не знайшло свого пояснення. Припускають, що в даному випадку ТТФ може брати участь у регуляції процесів анаеробного виробництва енергії (гліколізу).

З того часу, як ТТФ вперше було знайдено в живих організмах на початку 1950 р.р., висувались різноманітні припущення про можливу його роль в процесах клітинної активності, які при детальному дослідженні не знаходили експериментального підтвердження, тож біологічна роль ТТФ і досі залишається остаточно не з'ясованою. У 1969 р. Cooper et al. [81] висловили думку про те, що ТТФ є нейроактивною формою вітаміну В₁. Передумовою такого припущення були дані, одержані при з'ясуванні причин некротизуючої енцефаломієлопатії – в мозку хворих ТТФ повністю відсутній, а протікання хвороби корелює з його рівнем. Розвиваючи цю ідею, Schoffeniels [82] запропонував модель, в якій ТТФ відводилась роль регулятора Na⁺-каналу аксональної мембрани. Тіамінфосфат дійсно було знайдено в частково очищеному препараті Na⁺-каналу з електричного органу *E. electricus* [83], але в подальшому виявилось, що фосфорильовані похідні тіаміну мають інше місце локалізації [49], а саме, вони виявляються в мітохондріях, цитозолі, ядерній фракції.

В 1975 р. Fox та Duprel [84] на підставі своїх експериментів висунули припущення, що ТТФ та ТДФ стабілізують електричне поле мембрани в стані спокою. Вони показали, що ТТФ та ТДФ в концентрації 2 мМ запобігають експоненціальному затуханню Na⁺ та K⁺ струмів в перехваті волокон Ранв'є з сідлищного нерва жаби *Rana esculenta*. Але слід зазначити, що за фізіологічних умов така концентрація тіамінфосфатів в клітині неможлива. Є також повідомлення про вивільнення дофаміну під впливом ТТФ в присутності йонів Ca²⁺ в стріатумі мозку щура [85]. Але помітний ефект спостерігався лише при концентрації ТТФ вище 0,1 мМ.

В експериментах з везикулами плазматичних мембран мозку щурів виявлено взаємозв'язок між ТТФ та транспортом йонів Cl⁻ [86,87]. За допомогою методу patch-clamp для реєстрації хлоридних токів в збудливих "петчах" з експонованою назовні

поверхнею з клітин нейробластоми було встановлено, що ТТФ є активатором Ca^{2+} -каналів, які присутні в плазматичних мембранах клітин різної спеціалізації, а активація відбувається шляхом фосфорилування [88].

З цієї причини, становлять інтерес результати стосовно фосфорилування 43K рапсину – протеїну постсинаптичної мембрани нервово-м'язового сполучення ската *Torpedo marmorata*, необхідного для групування (кластеризації) ацетилхолінових рецепторів. Показано, що фосфорилування цього протеїну здійснюється ендогенною протеїнкіназою, здатною в якості субстрату використовувати [^{32}P]-ТТФ [28]. Таким чином, автори вказують на новий шлях фосфорилування для синаптичних протеїнів, де донором фосфату виступають не класичні пуринові трифосфати, а ТТФ.

Також існує гіпотеза про участь ТТФ в адаптації до дії стресорних факторів. Було показано, що в клітинах *E.coli* спостерігається різкий підйом концентрації ТТФ в умовах енергодефіциту при анаеробному культивуванні, тоді як його практично неможливо детектувати при вирощуванні культури в присутності кисню [89].

Сучасні відомості щодо синтезу ТТФ в клітинах

Ситуація, яка склалася на сьогодні стосовно вивчення механізму синтезу ТТФ, є доволі складною. Вперше механізм синтезу ТТФ було запропоновано в 1964 р. Eskert & Moebus [90]. В експериментах на гомогенатах спинного мозку свині було виявлено ензим, що здійснює фосфорилування ТДФ за схемою $TDF + ATP \leftrightarrow TTF + ADP$, який одержав назву ТДФ-кіназа (АТР:тіаміндифосфаттрансфераза, ЕС 2.7.4.15).

У 1968 р. за результатами експериментів з субклітинними фракціями мозку щура було зроблено висновок, що ТДФ-кіназа має мітохондрійну локалізацію [91]. А пізніше було також виявлено ТДФ-кіназну активність у цитозольній фракції печінки щура [92,93] та мітохондрійній фракції мозку бика [94,95], при цьому автори стверджували, що субстратом реакції є не вільний, а протеїнзв'язаний ТДФ, який як субстрат для визначення активності було одержано також з цитозоллю печінки щура. Препарати ТДФ-кінази, субстратом для якої є вільний ТДФ, було одержано з цитозоллю печінки щура [96] та пивних дріжджів *S. Carlsbergensis* [97], але в усіх випадках реакція відбувалась з низькою швидкістю.

Існує думка, що ізоzim 1 аденілатциклази (ЕС 2.7.4.3), яка предромінує в цитозолі скелетних м'язів, здатен синтезувати ТТФ [80,98]. Але дослідження на химерних мишах, дефіцитних по аденілатциклазі, ставлять під сумнів цей факт, тому що вміст ТТФ у таких тварин залишався на рівні контролю [99]. Експерименти на клітинах *E.coli*, термочутливих по аденілатциклазі, також демонструють підвищення рівня ТТФ, незважаючи на повну інактивацію аденілатциклази при 37 °С [100]. І все ж не слід виключати можливість, що аденілатциклаза може бути альтернативним шляхом синтезу ТТФ, який вмикається за певних умов.

Нещодавно одержані дані, які ставлять під сумнів той факт, що ТТФ синтезується саме в цитоплазматичній фракції. На основі експериментів з гомогенатами мозку щура зроблено припущення, що синтез ТТФ може відбуватися й усередині ізольованих структур [101,102]. Нещодавно показано, що у *E.coli* ТТФ може синтезуватися в мітохондріях з ТДФ і неорганічного фосфату за допомогою хеміосмотичного механізму, подібно до синтезу АТФ [103]. Більш того, knock-out F_0F_1 -АТФ-синтази у бактерій призводив до зникнення синтезу ТТФ, у зв'язку з чим дослідники припустили, що АТФ-синтаза здатна до синтезу ТТФ замість АТФ *in vivo*. Однак автори не змогли показати такий синтез *in vitro* з використанням очищеної F_0F_1 -АТФ-синтази, функціонально активної у реакції синтезу АТФ.

Також було виділено аденильоване похідне ТТФ з еукаріотичних клітин [104]. Припускають, що синтез аденильованої форми ТТФ (рис.1.2.1 з) здійснюється ферментом тіаміндифосфат-аденілтрансферазою, що каталізує реакцію $\text{ТДФ} + \text{АТФ}/(\text{АДФ}) \leftrightarrow \text{АТТФ} + \text{PP}_i (\text{P}_i)$ у відповідь на стресові умови. Однак механізм реакції залишається нез'ясованим навіть в частині того, чи є субстратом-донором фосфатного залишку, який переноситься на ТДФ, АДФ чи це все-таки АТФ.

Гідроліз ТТФ в живих клітинах

В більшості клітин ссавців постійна концентрація ТТФ залишається низькою (10^{-7} - 10^{-6} М), можливо через наявність декількох специфічних ТТФ-гідролізуючих ензимів (ТТФ-аз). Попередні дослідження показали наявність розчинної та мембранозв'язаної ТТФ-аз в тканинах щура [105].

Розчинна цитозольна ТТФ-аза (ЕС 3.6.1.28) була вперше очищена з головного мозку бика в 1992 р. [106]. Протеїн виявляє абсолютну специфічність до субстрату. Гідроліз ТТФ відбувається з утворенням потрійного протеїн-субстратного комплексу за неупорядкованого приєднання Mg^{2+} та Mg^{2+} -ТТФ [107]. На теперішній час клоновано цитозольну ТТФ-азу декількох видів тварин та експресовано ензим людини в *E.coli* [108-109]. Протеїни різних видів відрізняються за амінокислотним складом (від 218 АК у бика до 230 АК у людини) та каталітичними властивостями, також дещо варіює рН-оптимум ензиму (8,7-9,5) [110]. Розчинна ТТФ-аза досить широко представлена в тканинах ссавців, однак у представників інших класів живих організмів цей ензим не виявлено [108,110]. Цікавим фактом є те, що в тканинах свині виявлена дуже низька ТТФ-азна активність. За допомогою сайт-спрямованого мутагенезу було показано, що заміна *Glu85* на *Lys* є відповідальною за знижену розчинність та каталітичну активність завдяки змінам у просторовій структурі протеїну свині. За даними імуногістохімічного аналізу розподілення протеїну в мозку свині подібне до його розподілення в мозку гризунів. Таким чином, ці результати свідчать, що 25 кДа протеїн, який експресується в тканинах свині, є гомологічним ТТФ-азі людини (77 % ідентичності), але практично позбавлений ензиматичної активності [111]. Це не виключає можливості фізіологічної ролі цього протеїну, відмінної від гідролізу ТТФ.

Разом із СуаВ-подібною аденілатциклазою цитозольна ТТФ-аза ссавців входить до суперсімейства протеїнів, які містять СУТН-домен (СуаВ, *thiamine triphosphatase*), спільний еволюційний попередник яких, ймовірно, брав участь в метаболізмі нуклеотидів та органічних поліфосфатів. СуаВ протеїн з *Aeromonas hydrophila* виявляє аденілатциклазну активність за високої температури (65°C) та лужного рН (9,5). Також продукт гену з *E.coli* є подібним до СУТН домену і має назву *ugiF* (AP002564), показано 33 % гомології з ТТФ-азою людини (понад 95 амінокислотних залишків), але ТТФ-азної активності не було виявлено [112].

Нещодавно встановлено просторову будову рекомбінантної цитозольної ТТФ-ази миші. Методом ЯМР було визначено залишки, відповідальні за зв'язування Mg^{2+} та ТТФ. Зв'язування Mg^{2+} викликає лише незначні локальні конформаційні зміни, тоді як зв'язування ТТФ призводить до більш значних змін у конформації ензиму.

Авторами обґрунтовано модель просторової структури потрійного комплексу (мишача ТТФ-аза–ТТФ– Mg^{2+}), на основі якої дійшли висновку, що вільна ТТФ-аза має відкриту конформацію, а ензим, зв'язаний з субстратом – закриту. З аналізу структури ензиму очевидно, що за високу субстратну специфічність можуть відповідати залишки на С-кінцевій спіралі $\alpha 8$, яка розпізнає амінопіридиновий та тiazолієвий компоненти ТТФ [113].

Також було ідентифіковано мітохондрійну ізоформу цитозольної ТТФ-ази в мозку та нирках бика, в печінці і мозку щура [114,115]. Методом гель-фільтрації встановлено молекулярну масу протеїну з мітохондрій. Виявилось, що він має таку ж саму масу, що і цитозольний ензим. Судячи по розподіленню ТТФ у внутрішньоклітинних структурах, цей факт свідчить не тільки про компартменталізацію метаболізму ТТФ, а й про наявність множинних форм ТТФ-ази в клітинах ссавців [116].

Важливим питанням є регуляція активності цитозольної ТТФ-ази, роль якої, ймовірно, полягає в контролі рівня ТТФ в цитоплазмі. Аналіз амінокислотної послідовності розчинної ТТФ-ази вказує на наявність в структурі ензиму потенційних сайтів для посттрансляційних модифікацій, а точніше ділянок фосфорилування. Встановлено, що рекомбінантна ТТФ-аза людини *in vitro* фосфорилується кіназою С та казеїнкіназою-2 [108,109]. Зворотнє фосфорилування, ймовірно, є основним механізмом регуляції активності цього ензиму та однією з причин існування його множинних форм в нирках бика [117]. Нещодавно показано, що супресор метастазів *Ndgr-1*, який регулюється йонами Fe, підвищує експресію 25 кДа ТТФ-ази в декількох моделях ракових клітин [118]. Також експресія ТТФ-ази оборотно корелює з антигеном меланоми p97 (MТf), який є Fe-зв'язувальним протеїном і експресується у великій кількості в клітинах меланоми [119]. Значення цих фактів залишається незрозумілим, але, цілком ймовірно, що експресія цитозольної форми ТТФ-ази якимось чином зв'язана зі ступенем диференційованості клітин. Дійсно, у мозку зрілих гризунів розчинна ТТФ-аза знаходиться переважно у високо диференційованих пірамідальних нейронах та нейронах Пуркінє [120].

На відміну від цитозольного ензиму, який є досить добре дослідженим, дані стосовно ТТФ-ази, локалізованої в мембранах клітин, є обмеженими. Вперше

мембранозв'язану ТТФ-азну активність було виявлено в мозку щура в 1972 р. Varchi з соавторами [105], але сам протеїн не було ізольовано та ідентифіковано. Дослідження рН-оптимуму асоційованої з мембраною ТТФ-ази виявило досить пологий пік активності, а оптимальне значення рН для мембранозв'язаного ензиму знаходилось в діапазоні від 6,5 до 7,2. Ензим активувався йонами двохвалентних металів, таких як Mg^{2+} , Ca^{2+} та Mn^{2+} , та виявляв низьку спорідненість до ТТФ. Мембранозв'язана ТТФ-аза інгібувалася неконкурентно АТФ та АДФ [121,122]. Питання стосовно специфічності цього протеїну лишається не з'ясованим.

Висока мембранозв'язана ТТФ-азна активність спостерігалась в електричному органі електричного вугра *Electrophorus electricus*, який характеризувався значним вмістом ТТФ (до 87 % від загальної концентрації тіаміну) [123]. Ідентифікація продуктів реакції гідролізу ТТФ мембранами з електричного органу свідчить про протікання каскадного дефосфорилування ТТФ до тіаміну. Мембранозв'язану ТТФ-азу було також виявлено в скелетному м'язі щура і нирках бика, міозині кроля та інших біологічних об'єктах [124-127], але їх властивості мало досліджені.

Як мембранозв'язану ТТФ-азу можна розглядати також протеїн, що був ізольований як тіамінзв'язувальний з синапсом мозку щурів. Цей протеїн було ізольовано та частково досліджено його властивості у відділі біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна [7-10,128-133]. Як і мембранозв'язана ТТФ-аза електричного органу, він здійснював каскадне дефосфорилування ТТФ до тіаміну і мав вибрану специфічність до тіамінфосфатів.

Тіамін монофосфат: метаболізм, біологічна роль

Як правило, вміст ТМФ (рис. 1.2.1 а) варіює від 2 до 12% від загального тіаміну [13,44,76,77].

Перетворення ТМФ у клітині досі залишаються майже не дослідженими. Вважається, що в тканинах ссавців ТМФ утворюється виключно при гідролізі ТДФ. Ніяких альтернативних шляхів або ензимів біосинтезу ТМФ в клітинах тварин на даний момент не виявлено. Тим не менш, показано, що при транспорті з клітин кишечника в еритроцити тіамін може безпосередньо фосфорилуватися до ТМФ під дією лужної фосфатази мембран щіткової облямівки. Ензим фосфорилує тіамін до

ТМФ за рахунок перенесення фосфату з макроергів, таких як β -гліцерофосфат або креатинфосфат [134]. В даному випадку кількість ТМФ невелика і не перевищує 0.01% від загальної кількості неорганічного фосфату, що одночасно вивільняється при гідролізі відповідного донора (β -гліцерофосфат або креатинфосфат). При насичуючих концентраціях креатинфосфату (близько 50 мМ) лужна фосфатаза виявляє досить високу спорідненість до тіаміну. Можливо, ця реакція може сприяти адсорбції вітаміну клітинами кишечника за рахунок створення градієнта концентрації тіаміну шляхом його внутрішньоклітинного фосфорилування.

Крім того, показано, що в матриксі мітохондрій коензим може гідролізуватися ТДФ-азою, і утворений при цьому ТМФ транспортується назад у цитозоль, де піддається подальшому розщепленню до тіаміну [135]. ТМФ гідролізується до тіаміну під дією мембранозв'язаних фосфогідролаз, активність яких виявлена в мозку та інших органах ссавців [136-137]. На даний момент не відомо, чи існують ензими, яким властива висока специфічність до ТМФ порівняно з нуклеотидами. Відсутні дані про амінокислотні послідовності цих ензимів. Невирішеним залишається і питання чи є ТМФ просто проміжною сполукою у метаболізмі тіаміну, чи несе додаткову функцію в клітині.

У мікроорганізмів і рослин синтез ТМФ каталізується ензимом тіамінфосфатдифосфорилазою [138]. У дріжджів цей протеїн представляє собою біфункціональний комплекс, який каталізує не тільки реакцію синтезу ТМФ з 2-метил-4-аміно-5-гідрокси-метилпіримідинфосфата і 4-метил-5- β -гідроксиетилтіазолмонофосфата, але і його попередника 4-метил-5- β -гідроксиетилтіазолмонофосфата (Thz-P), який так само бере участь в утворенні ТМФ разом з 4-аміно-5-гідроксиметил-2-метилпіримідин пірофосфатом (HMP-PP). HMP-P фосфорилується піридоксалькіназою, що свідчить про перетин шляхів метаболізму тіаміну і піридоксаля у тіамін-синтезуючих організмів. Однак у тварин, що не синтезують тіамін, даних про такий перетин метаболізму вітамінів не було до появи роботи [12]. У цій роботі представлено результати, що свідчать про різні механізми інгібування піридоксалькінази тіаміном і ТДФ.

За даними ультрацитохімічного зафарбовування зрізів головного мозку щурів при рН 9,2 ТМФ-азна активність локалізована у плазмалемі нейронів, синаптичних

мембранах і везикулах, апікальній і базальній мембранах ендотелію капілярів, піноцитозних везикулах. За рН 5,5 ТМФ-аза візуалізується в плазматичній мембрані центральних закінчень сенсорних нейронів ганглій дорсальних корінців окреслюючи обриси *substantia gelatinosa* по всій довжині спинного мозку. Ця специфічна локалізація ТМФ-ази ідентична локалізації флуорстійкої нелізосомної кислоти фосфатази. Крім цього позитивна реакція має місце в цистернах ендоплазматичної мережі і ретикулярної частини апарату Гольджі перікаріону, звідки перенесення ензиму здійснюється в аксональні закінчення. Флуорстійка «кисла ТМФ-аза» не виявляється цитохімічно в структурах головного мозку. Відповідно, «кисла» ТМФ-азна активність, що виявляється у фракції гліальних клітин, але не нейронів, виділених з головного мозку щура, повинна бути зумовлена дією іншої фосфатази. Тобто питання щодо ензимів, для яких характерна ТМФ-азна активність, залишається відкритим [25].

У теперішній час на молекулярному рівні ідентифіковані лише два ензими метаболізму тіаміну – це тіаміндіфосфокіназа і розчинна ТТФ-аза. У зв'язку з цим, ідентифікація інших протеїнів, пов'язаних з тіаміном, як з його метаболізмом, так і задіяних у виконанні ним усіх його біологічних функцій, є нагальним завданням.

1.2.1.2 Окислені похідні тіаміну

В біологічних об'єктах в незначній кількості визначаються парні та змішані дисульфіди тіаміну і тіохром (рис.1.2.2) [16]. Відомості про умови утворення окислених похідних тіаміну в фізіологічних умовах, їх вміст у тканинах і роль у біохімічних процесах досить обмежені. Біологічне значення здатності тіаміну до окисно-відновних перетворень досі залишається остаточно не з'ясованим.

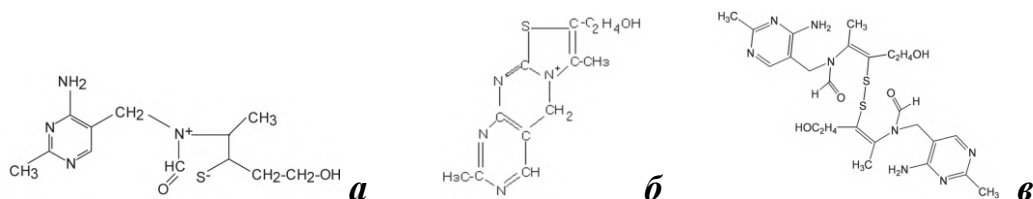


Рис. 1.2.2 – окиснені похідні тіаміну:

а) аніон тіольної форми вітаміну, б) тіохром, в) тіаміндисульфід (TSST) парний

Більшість публікацій щодо утворення, обміну і ролі окислених похідних тіаміну в тканинах живих організмів відносяться до вивчення окислювально-відновних властивостей тіаміну і його похідних в умовах *in vitro*. Вперше зверхнакопичення дисульфідів ТДФ в крові людей при критичному зниженні його циклічної форми було зафіксовано у людей, що постраждали від аварії на ЧАЕС. Ці зміни в статусі тіаміну супроводжувалися суттєвими порушеннями функцій нервової системи [139]. Численні дослідження переконливо свідчать про те, що ультрафіолетове, рентгенівське, радіоактивне опромінення прискорюють руйнування тіаміну в організмі шляхом окисної трансформації його молекули. Цей процес пов'язаний із захистом інших біологічно важливих структур від негативної дії перерахованих видів опромінення [140,141]. Показано, що високі дози тіаміну можуть попереджати негативний вплив рентгенівського опромінення на генетичний апарат клітини [142].

Швидке каталітичне окислення тіаміну хінонами призводить до утворення тіаміндисульфиду з тіольної форми, зрушуючи рівновагу реакції в сторону, протилежну від циклічної форми тіаміну [16]. Скоріше за все такий же характер мають початкові стадії взаємодії тіаміну з ароматичними амінокислотами протеїнів. В цьому випадку реакція не доходить до окиснення тіаміну, а обмежується переведенням його тіазолієвого компонента в каталітично активну форму, яка утворюється і при реалізації функцій ТДФ як коензиму [14,15]. Про це свідчать результати дослідників, які в модельних експериментах показали наявність вираженої взаємодії тіазолієвого кільця з індолем (моделюючи триптофановий залишок протеїну) [143].

Дані Степура зі співавт. [144] також свідчать, що вільні радикали тирозину або вільні радикали інших монофенольних сполук окислюють тіольну і трициклічну форми тіаміну до тіаміндисульфиду і тіохрому відповідно. Автори вважають, що важливим джерелом феноксильних радикалів в організмі можуть бути реакції взаємодії фенольних сполук з пероксидазами, каталазами і оксоферрильними формами гемопроїнів. У гемову кишеню проникає тіольна форма тіаміну, яка окислюється в дисульфід тіаміну, і відновлює оксоферрильний комплекс. Вільні радикали, що утворюються на АК-залишках протеїнової глобули, більш доступні для молекул тіаміну і окислюють як тіольну, так і трициклічну форми тіаміну. Тіохром

утворюється внаслідок взаємодії трицикличної форми тіаміну з тирозиновими радикалами, локалізованими на протейновій глобулі. Подібні реакції характерні і для оксоферрильних форм інших гемопротейнів. Це свідчить про те, що при окисному стресі, коли різко зростає рівень активних форм кисню і збільшується вміст оксоферрильних форм гемопротейнів, фенол, тирозин, парацетамол, саліцилова кислота активують катаболізм тіаміну, окислюючи його в тіохром і тіаміндисульфід [144,145].

З теоретичного аналізу здатності молекули тіаміну і його фосфатів до окисно-відновлювальних перетворень впливає, що з ряду азолієвих сполук тільки йон тіазолію задовольняє умовам, необхідним для участі в каталітичній реакції окислювального декарбоксилування α -кетокислот тому, що, за фізіологічних значень рН, швидкість розкриття його кільця і швидкість каталітичної реакції співрозмірні. Разом з цим, теоретично обґрунтовано припущення про те, що саме здатність до швидкого взаємопереходу із закритої форми тіазолію у відкриту забезпечує ефективність транспортування та обміну тіаміну в клітинах, і що утворення тіольної форми тіаміну є однією з обов'язкових ланок на шляху реалізації його біохімічних функцій. Дійсно, показано, що зв'язування тіаміну через S-S зв'язок з протейнами крові є важливим чинником для його транспортування в організмі [16,146].

Є дані, що в присутності окисленого адреналіну відбувається окислення тіаміну в тіохром. Відповісти на питання, чи має яке-небудь специфічне значення в організмі реакція взаємодії тіаміну з адреналіном, поки що не вдалося [147]. Таке ж питання виникає при аналізі результатів, отриманих Разумович і Доста [16,148], які вивчали можливий взаємозв'язок між утворенням тіаміндисульфіду і функціонуванням дихального ланцюга мітохондрій. Автори висунули припущення, що в тканинах тварин відновлення тіаміндисульфіду до вільного тіаміну може відбуватися за участі дихального ланцюга мітохондрій на рівні системи цитохромів. Отримані результати дозволили авторам припустити, що пероксидазне окислення тіаміну, поєднане з окисленням монофенольних сполук, може бути чинником, який перешкоджає накопиченню токсичної оксоферрильної форми $\text{Cyt c} + \bullet\text{Fe} (\text{IV}=\text{O})$ і сприяє елімінації H_2O_2 з міжмембранного простору мітохондрій. Ці дані підтверджуються експериментальними результатами, що свідчать про вплив забезпеченості організму

тіаміном на функціонування цитохрому P-450, який бере участь у детоксикації ксенобіотиків [149].

Отримані результати та аналіз даних літератури дають підстави припустити, що тіамін і його гідрофобний метаболіт – тіохром, при певних умовах, можуть виконувати важливу антиоксидантну функцію захисту клітинних структур від ушкоджуючої дії пероксинітриду, нітроген діоксиду, пероксидів [150]. Однак, говорячи про те, що тіольна або трициклічна форма тіаміну окислюється при взаємодії з такими-то молекулами, природно, мається на увазі, що молекула-партнер при цьому відновлюється і, отже, в цих реакціях тіамін виступає як досить сильний антиоксидант. Ця властивість тіаміну може бути важливою для живого організму, тому, що окислювально-відновний потенціал молекули тіаміну співрозмірний з таким для багатьох природних сполук [151]. Більш того, тіамін здатний вивільняти NO з його ендогенних депо, таких як S-нітрозоглутатіон, або відновлювати до NO нітрити. Цими властивостями тіаміну також можуть пояснюватися його вазопротекторні ефекти при діабеті та атеротромбозі [152].

Можна зробити висновок, що здатність молекули тіаміну до тіолізації (розкриття тіазолієвого кільця) становить одну з необхідних умов його обміну в клітинах, а для ТДФ – одним з етапів в реалізації його функції як каталізатора. Хоча цей процес зворотний, при наявності окисників, якими в живих клітинах можуть бути, наприклад, фенокисильні радикали, тіольна форма тіаміну легко окислюється до дисульфіду або тіохрому, і в результаті частина тіаміну виключається з обміну. Щоправда, ензимів, що каталізують окислення тіаміну цим шляхом, в тканинах тварин не виявлено. Однак присутність окислених метаболітів тіаміну і його фосфатів в клітинах тварин, хай навіть і в мінорних кількостях, є встановленим фактом. Отже, не можна виключати можливість регуляторного впливу окислених похідних тіаміну, опосередкованого специфічною взаємодією цих сполук з клітинними структурами або протеїнами. У цьому аспекті заслуговують на увагу роботи С.А. Петрова [31,32], що свідчать про здатність тіохрому брати участь в регуляції активності певних ензимів.

Згідно даних літератури, дисульфідні похідні тіаміну (рис.1.2.3) легше долають ГЕБ, що зумовило їх використання у фармацевтичній практиці поряд з тіамінхлори-

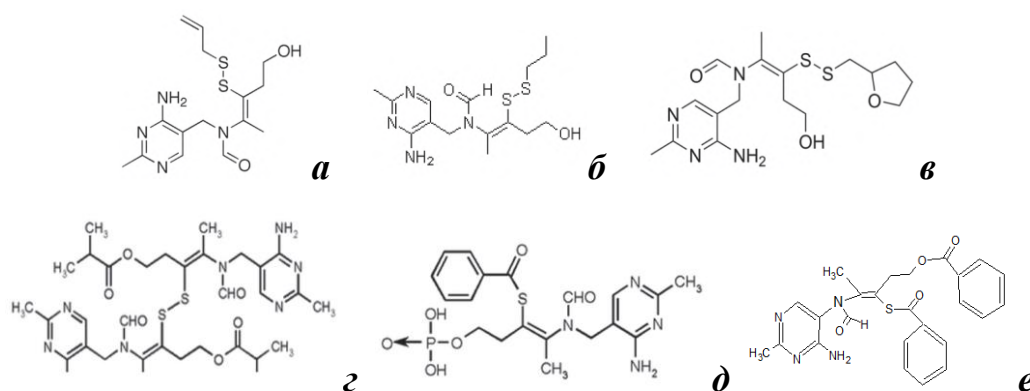


Рис.1.2.3 – дисульфідні похідні тіаміну – перспективні як лікарські засоби: а) аллітіамін, б) тіамін пропіл дисульфід (ТПД), просултіамін, в) тіамін тетрагідрофурфуріл дисульфід, фурсултіамін, г) ізобутирил тіаміндисульфід, сулбутіамін, д) S-бензоїл-тіамін-О-монофосфат, бенфотіамін, е) дібензоїлтіамін (ДБТ)

дом і тіамінбромідом [16,148]. При лікуванні ряду патологій вони виявилися навіть більш ефективними, ніж сам тіамін. Запропоновано використання глікозильованого дисульфиду тіаміну в якості активного переносника для доставки в мозок лікарських препаратів, зокрема, напроксену.

Пригнічувальну дію дисульфідної форми тіаміну на патогенні віруси було показано *in vitro* на людський лімфоцитарний вірус типу HTLV-1 і на ВІЛ [153]. Досліджено кілька тіольних і дитіольних сполук (TSST-тіаміндисульфід, ліпоєву кислоту і N-ацетилцистеїн) як анти-ВІЛ-препарати проти опосередкованої трансактиватором (Tat) трансактивації ВІЛ-1 (HIV-1). Ці сполуки значно знижували ВІЛ-1-Tat активність, але з них тільки TSST виявляв помітну анти-ВІЛ-Tat дію, інгібуючи продукцію прогена HIV-1 при гострому і хронічному HIV-інфікуванні СЕМ-клітин у нетоксичних концентраціях. Показано, що TSST може бути ефективним в хіміотерапії СНІДу. Продовжуючи дослідження, ті ж автори провели детальне вивчення дії о,о'-бісміристил тіамін дисульфиду (БМТД) на декілька клітинних ліній, інфікованих вірусом HIV-1 *in vitro* [154]. Вони показали, що БМТД інгібує ядерну транслокацію HIV-1 трансактиватора (Tat) і клітинного ядерного транскрипційного фактора- κ B (NF- κ B), що призводить до пригнічення реплікації HIV-1. Детальний механізм взаємодії БМТД з молекулами HIV-1-tat і NF- κ B та ефективність цієї сполуки в лікуванні ВІЛ-інфекції в організмі людини, належить ще з'ясувати.

Показано дуже цікаві результати застосування бенфотіаміну (рис.1.2.3 д). Ця сполука є аналогом ТМФ, хоча у дослідженнях найчастіше бенфотіамін порівнюють з тіаміном [155,156]. Зокрема, мембранна кисла фосфатаза простати, яка експресується в нейронах спінальних гангліїв, дефосфорилує і бенфотіамін, і ТМФ [157]. Саме дефосфорилування бенфотіаміну аналогічне дефосфорилуванню ТМФ, може бути пов'язане з позитивним ефектом бенфотіаміну при запальному і нейропатичному болях, які залежать від дії кислої фосфатази. Ще один приклад: бенфотіамін виявився інгібітором PP2A – протеїнфосфатази, що, серед іншого, викликає загибель ендотеліальних клітин при гіперглікемії [158]. Далі, бенфотіамін, подібно до тіаміну, виявив антидепресивну та антистресорну дію через вплив на експресію та активність GSK-3 β (метаболізм глікогену, Wnt-сигналінг) [159]. При цьому тіамін структурно схожий з інгібіторами цієї кінази, які використовуються для лікування ХА [160]. Тобто бенфотіамін може виявитися перспективним в лікуванні цієї хвороби [161]. В цьому плані цікавими є дані Sun et al. [162], які свідчать, що бенфотіамін інгібує збільшення продукції β -амілоїду та покращує когнітивні функції без збільшення рівня ТДФ у мозку. Також показано, що бенфотіамін здатен протидіяти агресії, викликаній ультразвуком, нормалізувати експресію АМРА-рецепторів і маркерів пластичності і знижувати окислювальний стрес у мишей [163]. Всі ці дані, хоча і опосередковано, підтверджують нейротропність тіаміну.

Показана багатьма авторами висока реакційна здатність молекули тіаміну в присутності окислювачів взаємодіяти з природними сполуками, що мають фенольні структури в молекулі (такі як адреналін, цитохром *c*, амінокислоти та інш.), свідчить про те, що такі реакції можуть мати місце і в живому організмі. В цілому питання про можливу специфічну роль окисно-відновних перетворень молекули тіаміну у реалізації його біологічних функцій в організмі все ще лишається відкритим.

1.2.1.3 Біологічна активність окремих складових молекули тіаміну та сполук, отриманих штучно на їх основі

Активність фрагментів молекули тіаміну

Введений ентерально і перентерально тіамін в процесі метаболізму розпадається на два компоненти: піримідиновий та тіазоловий, які частково видаляються з сечею, частково зазнають подальшого розпаду [164,165,170]. Питання про те, у якому компартменті клітини і за участі яких ензимів відбуваються ці перетворення на разі досі не знайшли відповідей. Але є деякі зрушення в дослідженнях. Останнім часом протеїни, що виявляють тіаміназну активність, виділені з комах (*Anophe spp.*) [165] і риб [166]. За допомогою біоінформативного пошуку в базах даних виявлено, що в геномах коропа і *Danio rerio* існує до трьох дуплікованих генів, які можуть кодувати тіаміназу I [167]. Наразі ці гени анотовані як ізоформи серпінів – протеїнів, подібних до кортикостероїдзв'язувального глобуліну – транскортину, який входить до сімейства серпінів. Таким чином, тіаміназу I [166] можна вважати одним з серпінів. З огляду на можливість деградації тіаміну в організмі ссавців [168,169], можна припустити, що тіаміназна активність властива одному або декільком протеїнам, що кодуються генами серпінів ссавців. Автори статті [167] порівняли опубліковані послідовності генів тіамінази I коропових риб [166] з гомологами з сімейства серпінів ссавців. Проведений аналіз показав, що N-кінцева ділянка, що відповідає за тіаміназну активність ензиму коропа, розташовується всередині послідовностей добре охарактеризованих серпінів. Тому цілком можливо, що тіаміназна активність з'являється в результаті посттрансляційного протеолізу, характерного для серпінів [170].

Однак беззаперечним є той факт, що для вітамінонеактивних метаболітів анейрину – тіазолу і піримідину – характерною є біологічна активність і фармакокінетична дія [171]. Так, відомо, що обидва компоненти впливають на нервову систему: піримідиновий цикл викликає збудження та судоми [172], а тіазоловий має заспокійливу та снотворну дію [173]. Останнє стало приводом для створення седативних препаратів на його основі. Найбільш близькими до тіазолу за будовою є препарати гемінейрин та гемітіамін (хлортіазол) (рис.1.2.4).

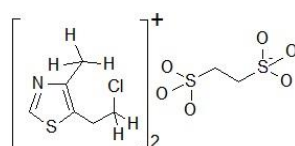


Рис.1.2.4 – гемітіамін (етандісульфонат 4-метил-5β-гідроксіетилхлориду тіазола)

Крім них широко використовуються похідні тіазолу – стимулятори дихання, антагоністи морфіну, никотинатів, барбітуратів [174]. Як седативний засіб гемінейрин видається цінним, оскільки є природним продуктом катаболізму тіаміну, а не речовиною, яка непритаманна для організму. Фармакокінетика, фармакодинаміка та показання до застосування цієї сполуки досить широко вивчалися, зокрема під керівництвом Розанова А.Я. [175], але все ще досконало не досліджені. З наведеного можна заключити, що нейротропна дія тіаміну та окремих його складових не викликає сумнівів, хоча механізми подібної дії потребують подальшого систематичного вивчення.

Активність штучно синтезованих солей тіазолію

Таке штучно синтезоване похідне тіазолу, як децил-оксикарбоніл - 4-метил-5-β-гідроксиетил-тіазолій хлорид, виявилось здатним мімікрувати ефекти тіаміну на синтез АСh з пірувату в синапсосомах [176]. Деякі з препаратів, які зменшують гіперфосфорилування тау-білка в моделях ХА-мишей, також мають структурну подібність з тіазоловим компонентом молекули тіаміну [177]. Іншою групою авторів [178] показано здатність похідних тіазолу сімейства 4-заміщених метоксибензоїл-арил-тіазолів (SMART) інгібувати полімеризацію тубуліну, затримувати ракові клітини у фазі клітинного циклу G2/M і індукувати їх апоптоз.

Спостереження про негативний вплив на певні клітинні процеси сполук, до складу яких входить кільце тіазолію, аналогічне структурному компоненту молекули тіаміну, і які можуть бути антагоністами тіаміну, наводять на думку про те, що тіамін або його б.а. похідні є необхідними учасниками цих процесів, зокрема процесу формування і функціонування протеїнів цитоскелета. Включення похідних вітаміну В₁ в такі некоензимні процеси, на додачу до його коензимної ролі, могло б пояснити відсутність надійної кореляції між позитивним ефектом тіаміну та активністю ТДФ-залежних ензимів і рівнем ТДФ у мозку деяких пацієнтів, які страждають на нейродегенеративні захворювання.

1.2.2 АНТАГОНІСТИ ВІТАМІНУ В₁

До антагоністів тіаміну відноситься група речовин різного походження, в числі яких такі його структурні аналоги: ампролій, окситіамін, піритіамін, неопіритіамін, 2'-бутилтіамін та інші. Існують також природні антагоністи. Це ензими, що руйнують тіамін (тіамінази I і II) і про які вже згадували у попередньому розділі. Але в експериментальній роботі зазвичай використовують перші три з перерахованих вище речовин. В залежності від особливостей структури, вказані сполуки проявляють антагонізм з тіаміном як на етапі його всмоктування та розподілу в організмі, проникнення в тканини через гістогематичні бар'єри, так і в клітинах, перешкоджаючи включенню тіаміна у метаболічні процеси.

Ампроліум (ампролій, 1-[(4-аміно-2-пропіл-5-піримідиніл) метил]-2-піколініум хлорид) (рис.1.2.5а) – структурний аналог тіаміну, похідне піримідину. В основі дії – конкурентний антагонізм з тіаміном за транспортні системи клітини. Ампролій займає активні центри зв'язування тіаміну на переносниках, внаслідок чого порушується надходження тіаміну в клітину і в результаті клітина гине. Ампроліум широко використовується для лікування та профілактики кокцидозу у тварин [179].

Окситіамін (ОТ) (рис. 1.2.5б) – структурний аналог тіаміну, в якому аміногрупа у піримідиновому циклі заміщена на гідроксогрупу. Проникаючи через мембрану в клітину, ОТ взаємодіє з тіамінкіназою, слабо інгібуючи її. При цьому утворюється антикоензим – окситіаміндифосфат і далі – окситіамінтрифосфат. Це значно уповільнює ТДФ-залежні реакції. Зниження активності ПДК призводить до накопичення надмірних кількостей пірувату [180]. Окситіамін спричиняє такі фізіологічні відхилення, як летаргія та анорексія, тоді як інший антагоніст піритіамін в основному – неврологічні відхилення. Окситіамін і його похідні є природними антагоністами тіаміну зокрема у ТДФ-залежних реакціях. З іншого боку, існують відомості про можливість участі окситіаміну у метаболізмі при реалізації некоензимних функцій тіаміну [23,181-184]. Низька концентрація даного похідного в організмі тварин може підтримуватися за рахунок секреції з жовчу і сечею за участю транспортерів МАТЕ, для яких нещодавно показаний транспорт тіаміну [185,186].

Піритіамін (ПТ) (мал.1.2.5в) вперше синтезований в 1941 році [13,187]. ПТ є найбільш ефективним антагоністом тіаміну по дії *in vivo*. Ця сполука замість тiazолового циклу містить піридиновий. На відміну від інших, ПТ істотно інгібує

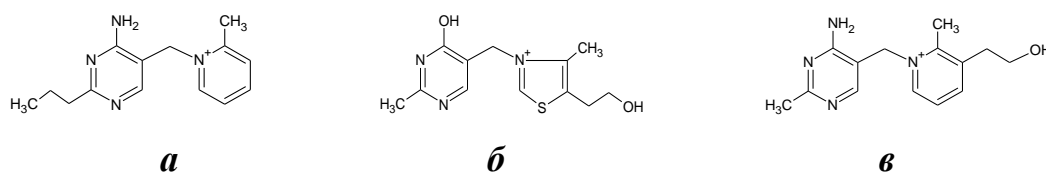


Рис.1.2.5 – антагоністи тіаміну: а – ампроліум, б – окситіамін, в - піритіамін

тіамінкіназу. Піритіамін повністю відтворює неврологічні порушення, які спостерігаються при паралітичній формі захворювання бері-бері та синдромі Верніке-Корсакова [188,189]. ПТ та інші структурні аналоги здатні змінювати напрямок транспорту тіаміну в місці його всмоктування (у тонкій кишці) – зі стінки у просвіт. В результаті тіамін не тільки не всмоктується з кишечника в кров, але й виводиться з організму в підвищеній кількості. Це наслідок конкуренції за мембранний переносник вітаміну В₁. ПТ, на відміну від ОТ, здатний долати ГЕБ. Він зменшує надходження тіаміну з крові в цереброспінальну рідину і нейрони, а також витісняє тіамін з нейронів, що пояснюється конкуренцією за механізми активного транспорту. Крім того, було показано, що ПТ, взаємодіючи з α -субодиницею Na⁺,K⁺-АТР-ази, блокує її роботу, що супроводжується окисненням на протеїні двох сульфгідрильних груп [190].

Показано також здатність ампроліуму, окситіаміну та піритіаміну викликати апоптоз нервових клітин [191].

1.3 ЗАХВОРЮВАННЯ, ПОВ'ЯЗАНІ З НЕДОСТАТНІСТЮ ТА ПОРУШЕННЯМ ОБМІНУ ТІАМІНУ

Свого часу вітаміни, зокрема тіамін, було відкрито завдяки пошуку причин виникнення хвороби *бері-бері*. Ця хвороба розвивається у людей з сильно обмеженим харчуванням, недостатнім на вітамін В₁, і успішно піддається тіаміновій терапії [23]. Вона супроводжується порушенням функції периферичної нервової системи, а також характерними ураженнями серцево-судинної системи. Розвиток патології бері-бері пов'язаний з дегенерацією периферичних аксонів [192]. Механізм, який пов'язує дефіцит тіаміну (ДТ) та розвиток патології, все ще не з'ясовано. З одного боку, існує припущення, що важливою є роль тіаміну в метаболізмі вуглеводів, оскільки у хворих на бері-бері накопичуються недоокислені продукти обміну пірувату, які здійснюють токсичний вплив на центральну нервову систему і обумовлюють розвиток

метаболічного ацидозу [176]. З іншого боку, не можна виключати також і роль тіаміну при передачі нервового сигналу [193,194]. До того ж сухий авітаміноз (суха форма бері-бері) може імітувати найбільш поширену форму синдрому Гійєна-Барре, гостру запальну демієлінізацію та полірадикулоневропатію.

Говорячи про тіамін-залежні патології, слід зазначити, що їхніми причинами можуть бути як дефіцит вітаміну В₁, що включає порушення коензимних та некоензимних функцій, так і вроджені вади протеїнових компонентів ТДФ-залежних ензимів та порушення синтезу протеїнів, у взаємодії з якими тіамін або його активні форми виконують свої специфічні функції.

Медичні спостереження та експериментальні дослідження показали, що природний чи експериментальний дефіцит тіаміну в організмі може викликати порушення як в центральній, так і в периферичній нервовій системі. Відмінності в прояві патології обумовлені тим, що відділи нервової системи зазнають ураження нерівномірно. Однак, причини регіональної селективності у виникаючих патологіях дотепер не зрозумілі. Достеменно відомо, що практично усі нейродегенеративні захворювання супроводжуються ДТ. Тому було зроблено висновок, що недостатня кількість тіаміну або порушення функціонування тіамін-залежних процесів є обтяжуючим або навіть ініціюючим чинником багатьох хвороб, за яких має місце нейродегенерація, зокрема таких, як лобово-скронева деменція, хвороби Альцгеймера і Паркінсона, синдром Верніке-Корсакова та інших.

Дефіцит вітаміну В₁ при довготривалому вживанні алкоголю є добре встановленим фактом та вважається однією з причин розвитку нейродегенеративного захворювання у людей, які страждають на хронічний алкоголізм – *синдрому Верніке-Корсакова*. Синдром Верніке-Корсакова характеризується пошкодженнями в перивентрикулярних відділах проміжного мозку, стовбуру мозку, верхній частині черв'я мозочку, таламусі, сосцевидному тілі, вестибулярному ядрі та оливі довгастого мозку [195-198]. На базі спостережень, зроблених при постмортальному дослідженні тканини мозку трьох груп хворих з нейродегенеративними змінами у мозку (хронічних алкоголиків, алкоголиків з синдромом Верніке-Корсакова та контроль відповідного віку), Cullen і Halliday [199] зробили висновок про тіамін-залежний механізм накопичення тау-протеїнів і клітинної загибелі в холінергічних ділянках

переднього мозку хворих з синдромом Верніке-Корсакова. Дані відносно впливу етанолу на біохімічні процеси, які беруть участь в обміні та функціонуванні тіаміну в нервових клітинах, доволі обмежені. Експериментально встановлено, що під впливом хронічного споживання алкоголю знижується активність тіамініпірофосфокінази [200-201]. Зниження утворення ТДФ за хронічного алкоголізму підтверджується помітним зниженням активності ПДК, ОГДК та ТК в мозку хворих з діагнозом синдрому Верніке-Корсакова. Це, в свою чергу, призводить до роз'єднання функції мітохондрій в нервових клітинах та окислювального стресу [202]. Та ця хвороба може розвинути також у людей, які не зловживають алкоголем (*енцефалопатія Верніке*) [203-205]. Цей нейропсихіатричний синдром характеризується атаксією, тіамін-чутливою офтальмоплегією, ністагмом, сплутаністю ходи, запамороченням свідомості, комою. Симптоми синдрому останнім часом спостерігались також і в результаті медичних втручань, у тому числі при баріатричній хірургії і хіміопроменевої терапії, що індукують дефіцит тіаміну [206,207]. Групу ризику складають алкоголіки, які страждають також на захворювання, що призводять до погіршення засвоєння їжі: хвороби шлунково-кишкового тракту [208], нестримне блювання вагітних [209], злоякісні новоутворення, СНІД [210-212]. Відомо, що у більшості людей з цукровим діабетом спостерігається дефіцит тіаміну, що може приводити до виникнення подальших ускладнень [213].

Зверхнекротизуюча енцефаломієлопатія (*хвороба Лея, subacute necrotizing encephalopathy - SNE*) – спадкова хвороба, пов'язана з порушенням функції мітохондрій нервових клітин, яка характеризується недостатнім постачанням нейронів енергією. Захворювання проявляється у вигляді некротичних уражень базального ядра, проміжного мозку та стовбуру головного мозку [244]. Хвороба зазвичай розвивається в перші роки життя та є летальною. Симптоми проявляються втратою апетиту, нудотою, ускладненням ковтання та смоктання, пізніше спостерігається затримка та регресія психомоторного розвитку, погіршення зору, слуху, голосу, конвульсії [198]. Етіологія хвороби Лея є і досі суперечливою. Показано, що в мозку пацієнтів, які загинули від цього захворювання, взагалі не виявлено ТДФ. Це порушення мало локальний характер, оскільки вміст ТДФ в печінці та нирках був у нормі [215-217]. При вивченні причин локальної відсутності ТДФ в

мозковій тканині було з'ясовано, що в крові, сечі та спинномозковій рідині хворих присутній протеїновий інгібітор ензиму ТДФ-АТР-фосфотрансферази, який каталізує процес синтезу ТТФ з ТДФ [218-220]. Синдром також може спостерігатися і в тому випадку, якщо транспортер тіаміну не мутував, оскільки мутації переносника можуть викликати інші, відмінні від синдрому Лея, фенотипи. Так існують інші експериментальні дані, які свідчать, що причиною цього захворювання може бути порушення функції одного чи декількох комплексів дихального ланцюга I, II, IV чи V [221,222], недостатність коензиму Q [223] або генетичні дефекти, які призводять до порушення функціонування ПДК [23]. В останньому випадку однією з мутацій зачеплено ТДФ-зв'язувальний сайт.

Синдром раптової смерті зовні здорової дитини (SIDS) вважався пов'язаним з годуванням немовляти тіамін-дефіцитним грудним молоком. Більш пізні дослідження показали надзвичайно високі концентрації сироваткового тіаміну у жертв цього синдрому, що передбачає порушення надходження тіаміну в тканини [224]. Але виникає питання чи не був ДТ у матері під час вагітності причиною дефекту транспортерів тіаміну у дитини? Цікаво відзначити, що екскреція з сечею інгібітора синтезу ТТФ і його не зв'язаність з вмістом ТДФ в головному мозку виявлені у пацієнтів з синдромом Лея та у пацієнтів з SIDS, чії симптоми були полегшені при щоденних добавках 150 мг тіаміну.

Хвороба сечі з запахом кленового сиропу (хвороба кленового сиропу, лейциноз, валінолейцинурія, MSUD) – спадкове аутосомальне рецесивне захворювання, викликане недостатньою функцією дегідрогенази α -кетокислот з розгалуженим карбоновим скелетом похідних таких амінокислот, як лейцин, ізолейцин та валін. Хвороба характеризується порушеннями функції центральної нервової системи та в більшості випадків закінчується летально. Може бути викликана мутаціями в будь-якій з каталітичних (E1, E2, E3) субодиниць комплексу дегідрогенази α -кетокислот з розгалуженим ланцюгом. Цікаво, що при тіамін-залежній формі MSUD, за якої терапія підвищеними дозами тіаміну має лікувальний ефект, мутаціями зачеплено не E1 α чи E1 β , а E2-субодиниці комплексу [225,226].

Залежною від тіаміну хворобою є також **тіамінзалежна мегалобластична анемія** (TRMA або синдром Роджерса) – це аутосомальний рецесивний синдром, який

включає мегалобластичну анемію, м'яку тромбоцитопенію та лейкопенію, сенсорнейрову глухоту та діабет [227,228]. Для з'ясування причин захворювання використовували включення [³H]тіаміну в TRMA- і нормальні фібробласти. Для нормальних фібробластів спостерігалось насичуюче високоефективне включення [³H]тіаміну, у той час, як для мутантних клітин подібного ефекту не виявлено. Коли виявилось, що трансфекція TRMA-фібробластів з дріжжовим тіамінтранспортним геном TH10 запобігала загибелі клітин, вчені зробили висновок, що первинною аномалією за TRMA є відсутність або дефект високоспецифічного тіамінового транспортера. Так було встановлено первинну причину TRMA і, що дуже важливо, тоді вперше ідентифіковано ген, який кодує тіамінтранспортний протеїн у ссавців. При утриманні на ДТ-дієті у мишей з ціленаправлено пошкодженим геном тіамінового транспортеру розвиваються усі симптоми TRMA [229].

Активация фосфорилування протеїну-прекурсорю β -амілоїду (APP) і тау-білка вважається ініціюючим чинником амілоїдозу нейронів та *хвороби Альцгеймера* (ХА, AD). Загибель нейронів за ХА пов'язують з гіперфосфорилуванням тау-білків (одна з гіпотез), які утворюють нейрофібрилярні клубки у середині нервових клітин та викликають їх смерть [230-232]. При цьому рівень тіаміну в плазмі крові пацієнтів, що страждають на ХА, є зниженим, а вимірювання рівню тіаміну і його похідних в крові має діагностичне значення [233]. При цьому спостерігається істотне збільшення активностей ТМФ-ази і ТДФ-ази без зміни тіаміндіфосфокіназної активності [233]. Ключова роль фосфатаз тіамінових фосфорних ефірів в порушенні метаболізму тіаміну за ХА підтверджується порушенням кореляції рівнів ТМФ і ТДФ в плазмі крові хворих [234]. Раніше за ці дані було показано, що у щурів за індукованої ДТ дегенерації нервових клітин спостерігалось накопичення попередника β -амілоїду – APP/попередника амілоїдоподібного протеїну 2 (APLP2) у клітинах пошкоджених при ДТ ділянок мозку [235]. Пізніше підтверджено, що зміни у нервових клітинах за ДТ різної етіології подібні тим, що мають місце при ХА [236-237]. Тобто зміни у клітинах нервової системи, що спостерігаються за ДТ і ХА, мають багато спільного. Але, не зважаючи, на те, що на сьогодні накопичилося достатньо інформації про залучення тіаміну в патогенез ХА, конкретні молекулярні мішені і метаболічні/сигнальні шляхи досі не ідентифіковано.

Хвороба Паркінсона (ХП, PD) є другою найбільш поширеною формою нейродегенерації серед осіб похилого віку. ХП клінічно характеризують тремор, ригідність, сповільненість рухів і порушення балансу. Інформації про стан гомеостазу тіаміну при ХП значно менше ніж для ХА, але існуючі публікації на цю тему відзначають виражені негативні зміни в обміні тіаміну і при цій патології. Так Jiménez-Jiménez et al. [238] повідомили про знижені, порівняно з контролем, рівні вільного тіаміну в цереброспінальній рідині пацієнтів з ХП. Laforenza et al. [239] відзначили значне зниження активності ТТФ-ази (оптимум рН 9,0) в лобовій корі пацієнтів з ALS (amyotrophic lateral sclerosis) та ХП порівняно з контрольною групою. За наявними даними, що проаналізовані в огляді Luong та Nguyễn [240], мутації в гені DJ-1 (PARK7) асоційовані з ХП. Відзначено, що цей протеїн зв'язується з афінним сорбентом, який у якості ліганду містить тіазолієвий компонент молекули тіаміну [12]. З функціонуванням цього гена пов'язують безліч функцій клітини, включаючи клітинну трансформацію, транскрипційні ефекти, контроль стабільності мРНК, відповіді на окислювальний стрес тощо. Далі автори [240] вбачають певну схожість у зміні функції транспортера глутамату при ХП і ДТ. А саме, дисфункція цього транспортера, який забезпечує видалення надлишків глутамату з міжсинаптичної щілини, і, як наслідок - виснаження пулу глутатіону в астроцитах - одна з істотних ознак ХП, спостерігається як при ХП, так і при ДТ [241]. Обговорюються також схожі зміни в експресії протеїну p53 при ХП і ДТ: вона значно підвищена як при ХП, так і при ДТ. У той же час показана здатність тіаміну пригнічувати експресію цього гена і інгібувати внутрішньоклітинну активність p53 [242,243]. І ще одна ознака описана для ХП: надекспресія полі(АДФ-рибозо)полімерази-1 (PARP-1). Цей процес не вивчався при ДТ, але припускають участь тіаміну у його регулюванні на тій підставі, що нещодавно виявлене в біологічних об'єктах нове похідне тіаміну АТТФ здатне специфічно інгібувати активність PARP-1 [244]. Раніше була описана роль активації PKR у розвитку дегенеративних процесів при ХА і ДТ. За ХП також описано участь PKR в дегенерації екстрастріатума [245]. З іншого боку, широко відомо, що ця патологія викликана прогресуючим руйнуванням і загибеллю дофамінергічних нейронів, перш за все в чорній субстанції, а також в інших відділах ЦНС. Недостатнє вироблення дофаміну веде до постійного активуючого впливу базальних гангліїв на

кору головного мозку. Вивільнення дофаміну - процес, що опосередкований струмом йонів Ca^{2+} в клітину. При цьому, Yamashita et al. [246] методом мікродіаліза *in vivo* виявили вивільнення дофаміну під впливом ТТФ в присутності йонів Ca^{2+} в стріатумі мозку щура, хоча помітний ефект спостерігався лише при концентрації ТТФ $>0,1$ мМ. Всі аргументи про можливу причетність ДТ до розвитку ХП заслуговують подальшого вивчення і спрямовані на з'ясування питання: чи може бути тіамін ефективним в лікуванні цієї патології. Наразі існують повідомлення про позитивні результати використання високих доз тіаміну в лікуванні пацієнтів з хворобою Паркінсона [247].

Мутації у мітохондрійному ТДФ-транспортері SLC25A19 (у базах даних відомий як DNC) викликають *летальну Аміш-мікроцефалію* (MCPHA) і *двосторонній некроз стріатуму* [248-249]. Серцево-судинні порушення, такі як підвищений ризик серцевого інсульту, зниження судинної резистентності, а також підвищені напружені реакції на навколишній стрес, спостерігалися в алелі ризику нового людського тіамінового переносника SLC35F3 [250].

Ще одним захворюванням, для етіології якого може бути дуже важливим вміст тіаміну в організмі, може виявитися *Синдром Рефсума* (поліневритоподібна гемератопічна гередоатаксія), яка є рідкісним спадковим захворюванням. Вважають, що воно зумовлене тим, що внаслідок дефекту екресії спеціального ензиму α -окислення жирних кислот, в організмі людини накопичується фітанова кислота. Ця кислота починає заміщати інші незамінні жирні кислоти. Концентрація фітанової кислоти підвищується в клітинах центральної і периферичної нервових систем, а також в тканинах внутрішніх органів. Через певний час вміст цієї кислоти в мієліні зростає до половини від загальної кількості жирних кислот у ньому, що призводить до перекисного окислення ліпідів і деструкції мієлінової оболонки. Першим ензимом α -окислення фітанової кислоти є гідроксифітаноїл-КоА-ліаза, яка є ТДФ-залежним ензимом (розд.1.2.1). Показано, що надмірне накопичення фітанової кислоти ніяк не впливає на активність ензимів ЦТК, але при цьому знижує швидкість окисного фосфорилування в дихальному ланцюзі і активність Na^+, K^+ -АТФ-ази. Na^+, K^+ -АТФ-аза блокується антагоністом тіаміну – піритіаміном [251].

Інформація, що з'явилася останнім часом в літературі, наводить на думку про те, що пріонні хвороби також можуть бути пов'язані з тіаміновим статусом організму. Спочатку стало відомо про те, що нормальний розчинний пріоновий протеїн зв'язує тіамін [252]. Останні дані говорять про те, що ендоцитоз молекул пріонів зі зв'язаним тіаміном може представляти собою специфічний клітинний механізм захоплення тіаміну всередину клітини. Це необхідно для активації ТДФ-залежного синтезу сукциніл-КоА, а, як відомо, біосинтез гемму починається з сукциніл-КоА. Цей випереджаючий тип регуляції вмісту сукциніл-КоА разом з пріон-порфірин ІХ-комплексом надчутливим до йонів заліза, може синергетичним чином служити для арегуляції біосинтезу гемоглобіну. Дійсно, червоні кров'яні клітини і тканини мозку PrP^{-/-}-мишей демонструють значно менше α -глобінової субодиниці гемоглобіну по відношенню до PrP^{+/+}-контролів. Тобто це можна розуміти як те, що виявлено ще один специфічний механізм транспорту тіаміну? І те, що ДТ подібним чином може викликати гальмування синтезу гемоглобіну, а значить анемії? Поки що на користь цього говорить те, що гемоглобін з допомогою МС-аналізу виявлено в елюатах з модифікованих тіамінвмісних афінних сорбентів, причому і α -, і β -субодиниці гемоглобіну зв'язувалися як з тіаміном, так і з тіазолієвим компонентом, які були лігандами сорбентів [12]. Можливо недостатня кількість тіаміну в якийсь момент може викликати перетворення нормальних клітинних α -спіральних протеїнів (PrP^c) в ненормальноскладену ізоформу (PrP^{S^c}), багату на β -складчасті структури, яка не піддається протеолізу і викликає невиліковне захворювання? Адже на прикладі інших протеїнів є відомим вплив тіаміну на фолдинг протеїнів [253]. Чи не має тут аналогії з ХА, ХП, хворобою Хантінгтона? При цьому захворюванні також утворюються нерозчинні агрегати (β -амілоїдні бляшки), що веде до загибелі і, як вже сказано вище, між наслідками, що викликаються в організмі нестачею тіаміну і нейродегенеративними патологіями багато спільного. Все це вимагає подальших досліджень і, в тому випадку, якщо вчені в своїй роботі підуть в цьому напрямку, їх чекає чимало цікавого в процесі остаточного з'ясування етіології як ХА та інших нейродегенеративних захворювань, так і пріонних хвороб, таких, як губчаста енцефалопатія у тварин і людська *хвороба Крейцфельда-Якоба*. Показано, що найточніше діагностування спорадичних випадків хвороби Крейцфельда-Якоба

можливе при вимірюванні рівня експресії цитозольної МДГ, протеїнів тау та 14-3-3 в одних і тих же зразках [254].

Глава II. СУЧАСНІ ВІДОМОСТІ ЩОДО ПРОТЕЇНІВ, ЗДАТНИХ ЗВ'ЯЗУВАТИСЯ З ТІАМІНОМ

2.1 ТРАНСПОРТУВАННЯ ТІАМІНУ ТА ЙОГО ПОХІДНИХ

2.1.1 Механізми транспорту тіаміну в тваринному організмі.

У водних розчинах тіамін заряджений позитивно, а його фосфорні похідні - негативно. Тому транспорт всіх форм тіаміну через біологічні мембрани вимагає відповідних транспортерів і може бути використаний для регуляції метаболізму на рівні експресії цих транспортерів [255,256]. Детальна характеристика транспорту тіаміну і ТМФ має специфічне значення для мозку, оскільки лише ці сполуки проникають до органу [57,257].

Місцем найбільш ефективного всмоктування тіаміну є тонкий кишківник, особливо його проксимальна частина. За фізіологічних концентрацій, які в просвіті (люменальному просторі) кишечника людини та щура є нижче 2 мкМ, тіамін адсорбується клітинами епітелію за допомогою процесу, який здійснюється протеїном-переносником [257-258]. Цей процес є електронейтральним, Na^+ - та K^+ -незалежним і відбувається за механізмом тіамін/ H^+ -антипорту [259]. За більш високих концентрацій (вище 2 мкМ) тіамін потрапляє в ентероцити головним чином в результаті пасивної дифузії [257]. Після проходження тіаміну через мембрани клітин епітелію слизової оболонки кишечника (щіткова облямівка) і капілярів він поступає в кров. Основна маса вітаміну B_1 в крові міститься у формених елементах і представлена фосфорними ефірами тіаміну. Загальна концентрація вітаміну в крові складає 70-300 нМ, з них 86-94 % представлено ТДФ, 2-7 % - тіамін, 1-9 % ТМФ (2 – 8 нМ), до 4 % ТТФ [257].

Наведений механізм активного транспорту є характерним і для систем трансферу тіаміну в клітинах інших органів ссавців [260-262]. Вважають, що після перенесення через клітинну мембрану тіамін негайно фосфорилується до ТДФ, що створює

позитивний градієнт концентрацій для транспорту в клітину вільного тіаміну і є рушійною силою усього процесу [263,264].

Через ГЕБ тіамін та ТМФ проникають за допомогою активного транспорту, механізм якого включає насичуваний та ненасичуваний компоненти [265]. Тобто спостерігається швидке насичення систем транспорту тіаміну в тканину мозку та цереброспинальну рідину, які знаходяться в напівнасиченому стані навіть при нормальному вмісті тіаміну в крові. Коли система активного транспорту вітаміну В₁ повністю насичується, лише порівняно невеликі кількості тіаміну можуть проникати в цереброспинальну рідину та мозок за допомогою механізму простої дифузії [266].

Є підстави припускати, що в збудливих мембранах транспортна система для тіаміну регулюється мембранним потенціалом [267]. В плазматичній мембрані ізольованих нервових клітин виявлені ТТФ-, ТДФ- та ТМФ-азна активності [128], які можуть активуватись при деполяризації, внаслідок чого в пресинаптичну щілину з нервових закінчень надходить, в основному, вільний (нефосфорильований) тіамін. Захват тіаміну у клітину відбувається при реполяризації. На підставі цих даних запропоновано гіпотезу щодо наявності в нервових закінченнях рухомого пулу тіаміну (РПТ), циркуляція якого між пресинаптичною щілиною і внутрішньоклітинним простором спряжена зі змінами мембранного потенціалу. При цьому вдалося ізольовати з фракції грубих синапсом мозку протеїн, здатний одночасно зв'язувати тіамін і вибірково гідролізувати його фосфорні ефіри (ТЗБ) [7-8,128], але який не було ідентифіковано.

Перенос ТДФ до мітохондрій опосередкований протеїном-транспортером, тобто він є активним. Існує думка, що транспорт ТМФ з мітохондрій до цитозолу здійснюється в обмін на ТДФ. В залежності від фізіологічних умов, Trc1p (мітохондрійний транспортер у клітинах дріжджів *S.cerevisiae*) працює за механізмом антипорту або уніпорту обмінюючи мітохондрійний ТМФ на цитозольний ТДФ. У людини протеїном, що переносить ТДФ до мітохондрій, є добре вивчений SLC25A19 [268].

2.1.2 Сімейство транспортерів тіаміну, властивості, особливості будови

У ссавців добре відомі два плазматичних мембранних транспортера тіаміну (SLC19A2, $K_m = 2,5 \cdot 10^{-6} M$ і SLC19A3, $K_m = 2,7 \cdot 10^{-9} M$), ТДФ-транспортер мітохондрійних мембран (SLC25A19), а також кілька інших транспортерів тіаміну і його похідних, які були охарактеризовані. Вони включають трансмембранні переносники органічних катіонів 1 і 2 (OCT1 і OCT2), (SLC22A1 та SLC22A2, відповідно) [269,270], а також новий людський тіаміновий переносник SLC35F3 [250], який був виявлений для транспортування тіаміну шляхом встановлення гомології послідовності між локусом гена людини відповідальним за сприйнятливість до гіпертензії і передбачуваним тіаміновим транспортером у дріжджів. Специфічні високоафінні тіамінові транспортери SLC19A2 та SLC19A3 відносяться до сімейства фолатних транспортерів. Відкриття захвату ТДФ через SLC44A4 [271], який є ТДФ-транспортером плазматичної мембрани і віднесений до суперсімейства транспортерів холіну, було несподіванкою, оскільки ТДФ, як раніше вважали, може знаходитися тільки всередині клітини.

В перенесенні тіаміну через плазматичну мембрану можуть брати участь і протеїни, що транспортують різні токсини і ліки з клітин, зокрема метформін. До них відносяться протеїни сімейства MATE: MATE1 (SLC47A1) і MATE2K (SLC47A2). Величини K_m цих транспортерів для тіаміну становлять 3,5 і 3,9 мкМ відповідно, що підтверджує фізіологічну значимість здійснюваного ними транспорту тіаміну [185,272].

Постгеномні технології дозволили ідентифікувати ряд нових транспортерів тіаміну і його похідних на додачу до раніше відомих з біохімічних досліджень. Порушення роботи цих транспортерів може призводити до ДТ не тільки в цілому організмі, але і в окремих його тканинах і клітинах. Завдяки наявності альтернативних транспортерів тіаміну і/або неповної втрати функції при мутації негативний ефект таких мутацій часто лишається не ідентифікованим в нормальних умовах, але може проявитися при патологічних і/або терапевтичних впливах. Наприклад, показано, що конкуренція між метформіном і тіаміном за транспортери призводить до дефіциту тіаміну [273,274]. Крім того, метформін інгібує транспорт тіаміну до клітини через високоспецифічний THTR2 (SLC19A3). Це може пояснити побічний ефект метформіну (препарат, що є найбільш розповсюдженим при лікуванні цукрового

діабету II типу) - виникнення лактоацидозу. Наразі виявлено 146 лікарських препаратів, що є потенційними інгібіторами THTR2 [275]. Для 28 з них (включно з метформіном та хіналоприлом) отримано експериментальні підтвердження і визначено IC_{50} . Більшість з цих лікарських засобів - препарати, що найчастіше призначаються пацієнтам. У таких випадках може знадобитися прийом високих доз тіаміну. Так, прийом хворими на цукровий діабет II типу, які довгий час приймали метформін, фурсултіаміну (рис.1.2.4.в) сприяв швидкому зникненню лактатного ацидозу і підвищенню рівня тіаміну в плазмі крові. Тому ідентифікація генів транспорту тіаміну є актуальним завданням персоніфікованої медицини.

Загалом, найсучаснішу інформацію щодо протеїнів-транспортерів тіаміну та його б.а. похідних представлено у роботі [276].

2.2 ТІАМІНЗВ'ЯЗУВАЛЬНІ ПРОТЕЇНИ, ЩО НЕ ПОВ'ЯЗАНІ З ТРАНСПОРТУВАННЯМ ВІТАМІНУ В ЖИВОМУ ОРГАНІЗМІ, ЇХ РОЗПОВСЮДЖЕННЯ В ПРИРОДІ, ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

2.2.1 Відомі специфічні тіамінзв'язувальні протеїни

Зараз експериментально доведено існування специфічних протеїнів, які беруть активну участь у метаболізмі вітамінів – від процесів всмоктування і транспортування до клітин до функціонування в самих клітинах у представників всіх царств живої природи.

Протеїни, що специфічно зв'язують тіамін, у мікроорганізмів вивчалися переважно на клітинах *Escherichia coli* та дріжджах *Saccharomyces cerevisiae*, частково на *Lactobacillus fermenti*, *L.casei*, *Bacillus cereus* і *Salmonella typhimurium*. Вони характеризуються спільними властивостями: кінетикою насичення, субстратною специфічністю, залежністю від енергії, рН і температури середовища, здатністю конкурентно інгібуватися структурними аналогами тіаміна [9].

В клітинах *S.cerevisiae* виявлено два види ТЗП – розчинний та мембранозв'язаний [321]. Спочатку було виділено розчинний ТЗП. Пізніше було показано, що розчинний ТЗП є ідентичним з тіамін-репресуючою кислотою фосфатазою, яка бере участь в гідролізі екзогенних фосфорних ефірів тіаміну у періплазматичному просторі. Встановлено, що мутанти *Sac.cerevisiae* з порушеним

транспортом тіаміна і вихідний батьківський штам містять близькі кількості розчинного ТЗП. Це вказує на те, що білок не є транспортним, а для транспорту тіаміна через мембрану необхідний інший протеїновий компонент. З фракції мембран виділено мембранозв'язаний ТЗП. Локалізація мембранного ТЗП, подібність кінетичних констант, паралелізм в регуляції транспорту і тіамінзв'язуючої здатності, дефіцит ТЗП у мутанта PT-R2, дозволяє стверджувати, що мембранний ТЗП *Sac.cerevisiae* безпосередньо бере участь у транспорті тіаміна.

Стосовно рослин, то на сьогодні специфічні ТЗП виявлені в насінні рису, гречки, сезаму, соняшника та хвойних [53]. Отримані результати вказують на те, що ТЗП гречки відрізняється від протеїнів риса і сезама за субодиничною структурою та імунологічно, проте схожий за механізмом взаємодії з тіаміном. ТЗП ізольований з насіння соняшника має властивості подібні до ТЗП насіння гречки, проте вони відрізняються від властивостей аналогічних протеїнів насіння риса і сезама. Отже, всі відомі на сьогодні ТЗП рослин відрізняються між собою за фізико-хімічними та ліганд-протеїновими характеристиками. Стосовно ролі цих протеїнів в насінні рослин припускається, що вони забезпечують накопичення та запасання тіаміна в рослинах. Коли зародок починає рости, протеїни розщеплюються протеолітичними ензимами, АК використовуються для синтезу нових протеїнів, а звільнений тіамін фосфорилується і, як коензим, бере участь в реакціях, які відбуваються з утворенням енергії.

Відомостей про ТЗП тварин і на сучасному етапі дуже мало. Ці дослідження почалися в кінці 70-х років, коли з'явилися повідомлення про їхню присутність у курячому яйці. Протеїни, здатні специфічно взаємодіяти з тіаміном, було одержано з білка і жовтка курячих яєць. В одній з статей про свою серію експериментів, Muniyappa та Adiga [322-324] відмічають те, що ТЗП та РЗП (рибофлавінзв'язувальний протеїн) з білка курячих яєць дуже специфічно зв'язуються один з одним у співвідношенні 1:1. Ця властивість зв'язувальних протеїнів була успішно використана дослідниками як альтернативний та більш м'який підхід для очистки ТЗП. Виявилось, що ТЗП яєчного білка та жовтка гомогенні, не є глікопротеїнами, взаємодіють з радіоактивно міченим тіаміном у молярному співвідношенні 1:1. У протеїн-лігандній взаємодії активну участь брали

залишки ароматичних амінокислот. Імунологічний аналіз показав, що ТЗП з обох компартментів яєць є продуктами одного структурного гену.

Через нейротропний ефект тіаміна особливу увагу дослідників привертають ТЗП збудливих клітин, зокрема ссавців, відомості про які є обмеженими. Судячи з доступних матеріалів, існує достатня кількість даних стосовно транспортних ТЗП, але залишаються не дослідженими протеїни-акцептори тіаміна і його фосфорних ефірів, за допомогою яких реалізується весь спектр біологічної дії тіаміна. І в цьому плані особливу цікавість мають подальші дослідження властивостей ТЗП, а також виявлення протеїнів, що мають тіамінзв'язуючі ділянки у нервовій тканині, їх функціональних зв'язків і вирішення питання про виконувани ними ролі. На сьогодні це є актуальними проблемами, що потребують свого розв'язання.

2.2.2 Протеїни, що мають тіамінзв'язувальні ділянки

Розглядаючи механізми взаємодії тіаміна з протеїнами, потрібно зазначити, що тіамін може неспецифічно взаємодіяти з протеїнами, наприклад з альбуміном сироватки крові чи казеїном [9].

У попередній роботі нашої групи показано, що серед протеїнів виділених на тіазоловому сорбенті, знайдено протеїни, пов'язані з нейродегенерацією, а саме: DJ-1(або PARK7) і β -амілоїд, а також мембранний глікопротеїн Thy-1 та інші протеїни, серед яких є вже відомі протеїни, але про них раніше не було інформації, що вони здатні зв'язувати тіамін, а саме: МДГ (ЕС 1.1.1.37), ГДГ (ЕС 1.4.1.2), гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (ЕС 1.2.1.12), фруктозобісфосфатальдолаза (ЕС 4.1.2.13), аспартатамінотрансфераза (ЕС 2.6.1.1), альдозоредуктаза (ЕС 1.1.1.21), глутатіон-залежна гліоксилаза II (Protein/nucleic acid deglycase DJ-1, ЕС 3.5.1.124) та інші [12].

За допомогою методів *in silico* показано опосередковане водою зв'язування пріонового протеїну PRNP (PrP^c) з тіаміном, коли останній знаходиться у V-конформації і визначено «кишені», в яких знаходяться тіамінзв'язувальні сайти [29,30]. Оскільки інші вже відомі ТЗП, задіяні у цьому дослідженні, серед яких мишача пірофосфокіназа (мТПК), онко-асоційований протеїн *Mycoplasma hyorhinitis* (МНР37), піруватдегідрогеназа *E.coli* (ПДГ) і людська транскетолаза (ЛТК), зв'язуються з тіаміном коли той приймає саме V-конформацію, дослідники зробили

висновок про те, що зв'язувальні властивості тіаміна та його похідних є аналогічними для тіамін-залежних ензимів і пріону і можуть насправді мати місце *in vivo*. Зате з іншими протеїнами тіамін може зв'язуватися у F-конформації. Наприклад, протеїни, що беруть участь в метаболізмі тіамінових сполук, зокрема цитозольна ТТФ-аза. На відміну від зв'язування ТДФ з p53 [256] або АТТФ с PARP [244], зв'язування з пріоном PrP^c не залежить від фосфорилування тіаміну.

А у своїй роботі Mendoza, Anderson та Overbaugh доповідають про ідентифікацію клітинного рецептора для кошачого амфотропного вірусу лейкемії підгрупи А (FeLV-A), що є найрозповсюдженішою формою цієї хвороби [325]. Виявилось, що амінокислотна послідовність, що кодується котячою кДНК на 93% ідентична з людським тіаміновим транспортером I типу (ThTR1, SLC19A2). Як відомо, ретровірусна інфекція ініціюється зв'язуванням глікопротеїнової ділянки вірусної оболонки з певним клітинним рецептором. Показно, що ThTR1 функціонував як рецептор для FeLV-A (тобто зв'язувався з вірусом), хоча і з меншою ефективністю ніж котячий протеїн. Ці дані свідчать, що котячий протеїн є ортологом людського тіамінтранспортного протеїну I типу. Тому котячий рецептор назвали feThTR1. Ідентифікація цього рецептора дозволить більш детально вивчити ранні події у передачі вірусу і дасть змогу проникнути у суть патогенеза FeLV.

Існують дані про ще декілька ТЗП. З використанням методу ВЕРХ показано присутність ТЗП у гомогенатах деяких тканин щурів, зокрема мозку та серця [280]. Виявлено два основних протеїнових піки: перший з молекулярною масою 250 кДа визнали як ТЗП, а другий, з молекулярною масою 150 кДа, виявився транскетолазою. Також виявлено високомолекулярний ТЗП з молекулярною масою 250 кДа на електрофореграмах гомогенатів мембран гігантського аксона кальмара [281]. Отримано попередні дані про наявність на синаптичних мембранах мозку щурів рецепторних ділянок протеїнової природи з високою афінністю до тіаміну ($K_d \approx 3$ мкМ). Встановлено, що електростимуляція викликає 50%-кове підвищення зв'язування з [³⁵S]-міченим тіаміном протеїнового піку в зоні 250 кДа і ще більше підвищення в зоні 70 кДа. Оскільки молекулярна маса натрієвого каналу дорівнює 250 кДа, було висунуте припущення, що радіоактивно мічений тіамін певним чином зв'язаний з протеїном натрієвого каналу і бере участь в процесах збудження. В

жодному з вказаних випадків ТЗП з нервових клітин не було виділено та охарактеризовано.

2.2.3 Вплив тіаміна на функціонування інших протеїнів

Останнім часом також з'являються відомості щодо взаємодії тіаміна або його б.а. похідних з протеїнами цитоскелета та впливу забезпеченості організма тіаміном на стан цитоскелета і роботу інших протеїнів. Щоправда, ці дані є дуже обмеженими. Встановлено, що введення піритіаміна та раціон-індукований ДТ патологічно підсилюють накопичення β -амілоїда у мозку [282]. Крім того, при цьому спостерігалось гіперфосфорилування білка тау (Microtubule-associated protein tau, МАРТ), який стабілізує мікротрубочки цитоскелета, і зниження активності кінази глікогенсинтази-3 β (GSK-3 β , EC 2.7.11.26). Це дало змогу припустити, що за додаткового введення достатньої кількості тіаміна, піритіамін може стати причиною Альцгеймер-подібних патологічних змін аналогічно до аліментарного В₁-авітамінозу. При цьому тіамін структурно подібний до інгібіторів кінази GSK-3 β , які використовуються для боротьби з ХА [283]. Більш того, в умовах, коли спостерігається збільшення рівня кінази, що кодується геном *GSK3B*, наприклад, в тваринній моделі фізіологічного стресу з використанням хижака (predator stress), введення тваринам тіаміну або бенфотіаміну знижує експресію даного ензиму. Це запобігає індукованому стресом зниженню нейрогенезу гіпокампу і покращує когнітивні здібності тварин [159,163,284]. Неодноразово відмічено, що поліпшення функцій мозку в таких дослідженнях супроводжується зростанням вмісту в мозку тіаміну, але не ТДФ [284]. Таким чином, відсутність кореляції між рівнем коензиму ТДФ в мозку і позитивними ефектами бенфотіаміна свідчить на користь некоензимного характеру дії бенфотіаміна і/або продуктів його метаболізму.

Інші автори спостерігали зміни в стані такого протеїна як синапсин I в мозку щурів при ДТ, що викликали введенням щурам піритіаміна [285]. Цей протеїн бере участь у зв'язуванні малих синаптичних везикул з актином цитоскелета. За цих умов спостерігалось зниження фосфорилування синапсина I в гіпокампі щурів.

Нейропатологічні особливості енцефалопатії Верніке-Корсакова включають геморагічні висипання, у зв'язку з чим припущено, що пробій ГЕБ грає важливу роль

в патогенезі ДТ. В цьому плані є цікавими результати досліджень, що представлені в роботі [286]. Метою було вивчити експресію Tj-білків асоційованих з матриксними протеїнами оклюзійної зони міжклітинних контактів і виміряти рівні матричних металопротеїназ (ММР) як функцію зміни місцевої проникності ГЕБ у ДТ-мишей. Показано, що збільшення проникності ГЕБ супроводжується змінами в експресії Tj-протеїнів і пов'язаних з ними матриксних протеїнів ZO-1 та ZO-2 і передбачає залучення матриксної металопротеїнази ММР-9 (ЕС 3.4.24.35) у патогенез локально-вибіркових порушень ГЕБ, що є характерним для ДТ.

Тіамін-залежними можна вважати також окремі протеїни, що беруть участь у детоксикації метилгліоксалу і гліоксалу. Два основних шляхи окиснення метилгліоксала вивчені достатньо детально. Один з них, каталізований ензимом гліоксилазою (ЕС 3.5.1.124), пов'язаним з коензимними функціями глутатіону, інший – відбувається за участі нікотинамідних коензимів (ензим α -кетальдегіддегідрогеназа (ЕС 1.2.1.23) [13]. Але є певні відомості про залежність цих реакцій від забезпеченості організму вітаміном В₁. Так, недостатність тіаміну в організмі викликає порушення в обміні гліоксала. Оскільки ці порушення з вказаними відомими шляхами перетворення α -кетальдегідів навпрямую не можуть бути пов'язані, то можлива роль ТДФ при цьому була досліджена додатково. Результати дослідів, що були поставлені з класичними акцепторами електронів і гідрогену, показали, що при цьому можлива регенерація тіаміну як каталізатора з утворенням відповідно α -кетокислоти і відновленого переносника. Встановлено, що сироватковий альбумін, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, фруктозобісфосфатальдолаза і аспартатамінотрансфераза деглікуються за участі протеїнів YajL і DJ-1 [287]. Всі ці протеїни зв'язуються з модифікованими тіамін/тіазолієвим афінними сорбентами поряд з DJ-1 та двома іншими ензимами, що беруть участь у детоксикації метилгліоксалу і гліоксалу, а саме, альдозоредуктазою (ALDR_RAT) і глутатіон-залежною гліоксалазою II (GLO2_RAT) [12]. Також показано, що кількість гліоксалу і метилгліоксалу збільшуються у гепатоцитах при додаванні антагоніста тіаміну окситіаміна або у тварин з ДТ [287]. З використанням гомогенатів тканин таких тварин *in vitro* показано, що активність гліоксалази знижувалася за ДТ і підвищувалася при його додаванні [287], аналогічно змінам

активності ТДФ-залежних ензимів. В цілому, різні лінії доказів вказують на тіамінову залежність шляхів детоксикації метилглюксалу і глюксалу, які важливі для захисту від окисного стресу в головному мозку. Хоча ензими цих шляхів не використовують ТДФ в якості коензиму, існуючі дані свідчать на користь алостеричної регуляції глюксалази та/або деглікази DJ-1 тіаміном та/або його похідними.

Взагалі в літературі наявна інформація щодо більш ніж двохсот протеїнів, на параметри яких впливає тіаміновий статус організму. На додаток до зазначеної вище інформації, можна привести дані Петрова та ін. про взаємодію тіаміну або його похідних з лактатдегідрогеназою (ЕС 1.1.1.27), алкогольдегідрогеназою (АДГ, ЕС 1.1.1.1), ацетілхолінестеразою (ЕС 3.1.1.7) [288-290]. Також під керівництвом Петрова С.А. отримано цікаві результати щодо аспартат- (АСТ, ЕС 2.6.1.1) і аланін-амінотрансфераз (АЛТ, ЕС 2.6.1.2) [291] оскільки вже при концентрації 3 мкмоль/л тіамін чи його похідні або інгібували, або активували зазначені ензими. Взаємодію тіаміну з АДГ також підтверджено іншою дослідницькою групою [292]. При чому спорідненість тіаміну до протеїну була найвищою у порівнянні з іншими використаними в експерименті сполуками (тіазол, етанол, NAD). Також показано взаємодію похідних тіаміну з лужною фосфатазою (ЕС 3.1.3.1) [293].

Отже, і вітамін В₁, і/або його б.а. похідні можуть взаємодіяти з великою кількістю різноманітних протеїнів. І хоча на сьогодні є лише уривчасті спостереження, що свідчать про пряму або опосередковану взаємодію тіаміну з протеїнами, які не є ТДФ-залежними ензимами, або протеїнами, які беруть участь у метаболізмі вітаміну В₁, тим не менш, не виключено, що з плином часу буде ідентифіковано мережу протеїнів, які разом з уже відомими ТДФ-залежними ензимними протеїнами і протеїнами метаболізму тіаміну можна розглядати як "тіаміновий протеом". Такий термін для подібної сукупності протеїнів пропонує використовувати група авторів [371].

Таким чином, у розділі «Огляд літератури» проаналізовано дані щодо властивостей тіаміну та його б.а. похідних. Розглянуто відомості щодо протеїнів, що здатні зв'язувати тіамін, зокрема про вперше виділений у нашому відділі та частково досліджений протеїн, що отримав назву тіамінзв'язувальний білок (ТЗБ, ThBP), а також про протеїни, на які впливає тіаміновий статус організму.

В розділі 2 будуть наведені власні експериментальні результати щодо ідентифікації протеїнів здатних зв'язувати тіамін.

Роботи за участю дисертанта, в яких опубліковані результати згадані в розділі

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

Пархоменко ЮМ, Павлова АС, **Меженская ОА** (2016) Современные представления о механизмах, обуславливающих высокую чувствительность нервных клеток к дефициту витамина В₁. *Neurophysiology/Нейрофизиология* 48(6):451-465

Протасова З, **Межинська О**, Степаненко С, Чехівська Л, Пархоменко Ю (2014) Зв'язування міченого тіаміну синаптосомами як показник обміну тіаміну в нервових клітинах при певних патологіях. *Мат Укр біохім конгресу The Ukr Biochem J* 86(5, Supplement 2):25-26

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Глава III. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Матеріали та реактиви

Гідразид-N-4-амінобензоїл-ε-амінкапронової кислоти був люб'язно наданий чл.-кор., д.х.н. Вовком А.І. (Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України). Використані в роботі солі були кваліфікації осч і хч. При необхідності реактиви перекристалізували. Для приготування усіх без винятку розчинів використовували бідистильовану воду. Тіамін, ТМФ, ТДФ, АМФ, АТФ, АДФ, ГДФ, ГТФ, ІМФ, оксалоацетат, 2-оксоглутарат (динатрієва сіль), акриламід та бісметиленакриламід фірм Sigma та Reanal; NADH фірми Boehringer (Німеччина); Трис(оксиметил)амінометан – «Serva» (Німеччина). ЛСА, соєвий інгібітор трипсину, набір протеїнів для калібрування колонки для гель-фільтрації – Reanal (Угорщина).

Бікарбонатний фізіологічний буфер Кребса-Рінгера для ссавців мав такий склад: 125 мМ NaCl, 1,3 мМ KH_2PO_4 , 4,5 мМ KCl, 1,3 мМ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5 мМ CaCl_2 , 17,6 мМ NaHCO_3 , 11 мМ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.

За основні об'єкти дослідження використовували протеїнові фракції мозку щурів і бика отримані елюцією з т-АС і гомогенати мозку щурів (інші об'єкти вказані у відповідних розділах). В роботі використовували білих щурів, самців, вагою 120-200 г. Тварин утримували на звичайному раціоні віварію. Всі роботи з тваринами проводили згідно міжнародним правилам проведення робіт з експериментальними тваринами. Для виділення протеїнів з мозку бика використовували мізки биків віком 1,5-3 роки чорно-рябої породи від ФГ «Журавушка» Броварського району Київської обл.

3.2. Синтез афінних сорбентів

Афінний сорбент синтезували за методом Клящицького та ін. [295] з деякою модифікацією, яка полягала в тому, що для синтезу тіамін-N-4-азобензоїл-ε-

амінокапроїлгідразидосефарози-4В ми використовували гідразид-N-4-амінобензоїл-ε-амінкапронової кислоти.

3.2.1 Активація носія та іммобілізація спейсера

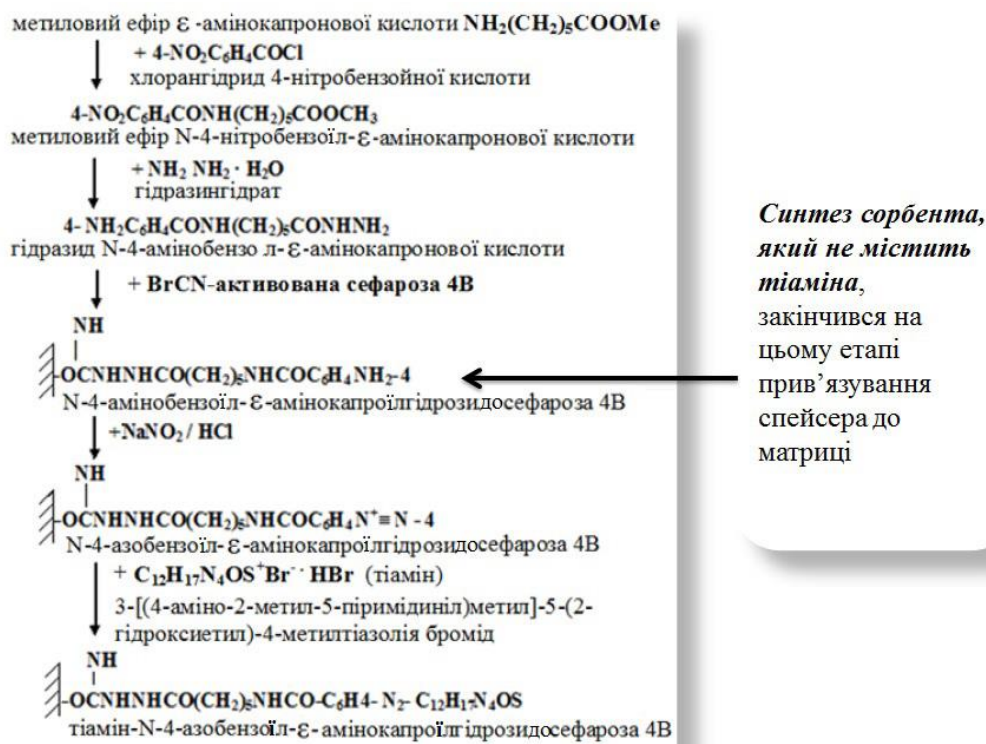
У якості носія для сорбенту використали сефарозу 4В (Pharmacia, Швеція). До одного об'єму суспензії сефарози 4В у воді (1:1) додавали 1 об'єм 2М Na_2CO_3 , охолоджували до $t=4^\circ\text{C}$, збільшували швидкість перемішування і вносили 0,05 об'єму розчину BrCN в ацетонітрилі (2 г/л). Після інтенсивного перемішування, переносили на скляний пористий фільтр і послідовно промивали охолодженими розчинами 0,1М NaHCO_3 (рН 9.5) – 10 об'ємів, дистильованою водою - 10 об'ємів і 0,2М NaHCO_3 (рН 9.5) – 10 об'ємів. Відсмоктували насосом розчин, суспендували в 1 об'ємі 0,2М натрій бікарбонату (рН 9.5), внесли в цю суспензію спейсер (гідразид N-4-амінобензоїл-ε-амінокапронової кислоти), який розчиняли в 50 мл NaHCO_3 і інкубували при 4°C перемішуватися протягом ночі. Далі відфільтрували сефарозу і послідовно промивали 0,1М натрій ацетатом (рН 4.0), такою ж кількістю 2М сечовини і таким же об'ємом натрію бікарбонату. Отриману сефарозу 4В з пришитим спейсером поміщали і зберігали в 0,05М натрій-фосфатному буфері (рН 7.4) до моменту іммобілізації ліганду. Синтез афінного сорбенту, що не містить тіаміну у якості ліганду, був припинений на цьому етапі. Сорбент без ліганду зберігався у 0,02% NaN_3 .

3.2.2 Отримання базового афінного сорбенту з тіаміном в якості ліганда

Отриманий гель послідовно промивали охолодженими 5 об'ємами 0,5М NaHCO_3 , 5 об'ємами дистильованої води і 5 об'ємами 0,5н HCl . Гель суспендували в 17,8 мл 0,1М NaNO_2 і перемішували 7 хв при 4°C (на льоду), промивали холодною дистильованою водою і переносили в розчин 1,78М тіамін броміду в 12,6 мл холодного насиченого натрій-боратного буферу (рН 9.0). З допомогою 5н NaOH рН доводили до 8.6, добре перемішуючи, при цьому колір суспензії почав змінюватися. У момент рН 8.6 колір був блідо-оранжевий. Далі стаканчик з суспензією помістили в пластикову ємність з льодом і перемішували періодично (з інтервалом ≈ 20 хв) контролюючи температуру, яку необхідно підтримувати в інтервалі $0-4^\circ\text{C}$. Через 4

години процес закінчили. Яскраво-помаранчевий з червоним відтінком сорбент промили 100 мл холодного бідистиляту і суспендували в 100 мл 0,02% NaN_3 .

Схему синтезу сорбентів представлено на рис.3.2.1. Структурні формули сорбентів подано на рис. 3.2.2.



Мал. 3.2.1 - Схема синтезу сорбентів: афінного - з ковалентно приєднаним тіаміном як лігандом і сорбента без тіаміну

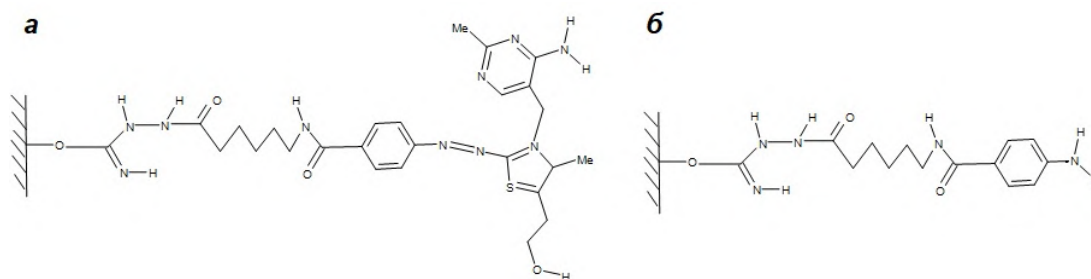


Рис. 3.2.2 - Структурні формули афінних сорбентів: **а** – з тіаміном у якості ліганду (*m*-АС); **б** – без тіамінового залишку (АС без Т)

3.3 Визначення концентрації ліганду у складі афінного сорбенту

Вміст тіаміну в складі сорбенту визначали тіохромним методом [43] з використанням йонобмінної хроматографії після кислотного гідролізу т-АС.

3.4 Виділення ТЗП

3.4.1 Отримання ацетонового порошку

Для виділення протеїнів, що проявляють спорідненість до тіаміну, з тканини головного мозку на першому етапі отримували так званий ацетоновий порошок, що містить протеїни грубої фракції мітохондрій шляхом застосування диференціального центрифугування. Гомогенат тканини мозку отримували на льоду за допомогою скляного гомогенізатора Поттера з тефлоновим товкачем в 0,32М сахарозі в 5 мМ трис-НСІ буфері (рН 7.4), що містила ЕДТА, PMSF, апротонін, лейпептин чи коктейль інгібіторів протеаз (Sigma Aldrich або Thermo Fisher Scientific). Для видалення ядер і залишків клітин проводили центрифугування при 1500g протягом 10 хв, на наступному етапі центрифугування здійснювалося протягом 25 хв при швидкості 12500 об/хв. Отриманий осад суспендували в мінімальній кількості буфера для гомогенізації. Суспензію струшували на льоду протягом 10 хв, поступово додаючи 9 обсягів холодного ацетону (попередньо охолодженого до $t = -20^{\circ}\text{C}$). Після чого суміш негайно переносили на воронку Бюхнера, швидко видаляли рідину та промивали осад від ацетону невеликою кількістю діетилового ефіру (Reaxim). Осад просушували при кімнатній температурі і зберігали при $t = -70^{\circ}\text{C}$.

3.4.2 Афінна хроматографія ТЗП

Протеїни з ацетонового порошку екстрагували Кребс-Рінгер бікарбонатним буфером (рН 7,4) у співвідношенні 20 мл буфера на 1,5 г ацетонового порошку. Для цього розтирали у фарфоровій ступці, потім в скляному гомогенізаторі і на останній стадії перемішували в льоду протягом 30 хв. Отриманий екстракт ацетонового порошку мозку наносили на колонку ($d=16$ мм; $h=7$ см) з афінним сорбентом т-АС попередньо врівноважену Кребс-Рінгер бікарбонатним буфером (рН 7,4) при швидкості потоку 0,2 мл/хв. Видалення незв'язаних або слабкозв'язаних протеїнів проводили Кребс-Рінгер бікарбонатним буфером (рН 7,4) до фонового рівня при 280 нм. Протеїни, що зв'язалися, елюювали за двома протоколами в кілька етапів. *Перший протокол* передбачав повне відтворення умов виділення ТЗБ, що використовувався нашою групою раніше. У цьому випадку застосовувалася неспецифічна елюція.

Протеїни, що зв'язувались з сорбентом, елюювали в три етапи ступінчастим сольовим градієнтом на 10 мМ трис-НСl буфері, рН 7,4: 1М NaCl, 2М та 4М сечовиною.

Згідно *другого протоколу* застосували специфічну елюцію [296]. Протеїни, що зв'язувались з сорбентом, елюювали в три етапи: 1 – 10 мМ тіамін хлоридом (рН 7,4) або 10 мМ тіамін хлоридом (рН 5,6) чи 5 мМ тіамін хлоридом (рН 7,4) у Кребс-Рінгер бікарбонатному буфері (рН 7,4); 2 - 1М NaCl в 10 мМ трис - НСl буфері (рН 7,4); 3 - 2М сечовиною в 10 мМ трис - НСl буфері (рН 7,4) при швидкості потоку 0,4 мл/хв. Збирали фракції по 2,0 мл. Перед початком елюції розчином натрій хлориду буфер у колонці замінювали на 10 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4). Об'єднані фракції піддавали концентруванню на ультрафільтрах Амікон типу «Центрифужні ультрафільтри Амікон Ультра-15, 3 кДа» (Merck Millipore, США) з заміною буфера двічі на 10 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4). Регенерацію сорбенту в колонці проводили 8М сечовиною з подальшою промивкою 4-ма о'ємами дистильованої води. Сорбент зберігали в 0,02%-ному розчині натрій азиду.

3.4.3. Гель-фільтрація та визначення молекулярної маси ТЗП

Концентровані протеїнові фракції наносили на колонку з сефадексом G-150 (Pharmacia, Швеція) (2,2см*50,0см), попередньо врівноважену 10 мМ трис-НСl буфером (рН 7,4) з додаванням 0,15М NaCl і елюювали цим же буфером зі швидкістю потоку 0,3 мл/хв. Збирали фракції по 2,0 мл, тестували спектрофотометрично при 280 нм. Фракції піків об'єднували на ультрафільтрах Амікон типу «Центрифужні ультрафільтри Амікон Ультра-15, 3 кДа» з заміною буфера двічі на 10 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4). В отримані протеїнові піки обов'язково додавали PMSF та коктейль інгібіторів протеаз, сушили під вакуумом на приладі Eppendorf Concentrator plus AG 22331 та зберігали при -70⁰С до подальших експериментів. Сорбент зберігали в 0,02%-ному розчині натрій азиду.

3.5 Афінна хроматографія комерційної МДГ

Приготування зразка - комерційний препарат МДГ з серця свині (Reanal, Угорщина) з питомою активністю 92,5 мкмоль/хв*мг протеїну в кількості 40,8 мг

протеїну розчинявся в 24 мл Кребс-Рінгер бікарбонатного буфера (рН 7,4) і наносився на колонку з т-АС.

Афінна хроматографія - розчин комерційного препарату МДГ наносили на колонку з афінним сорбентом т-АС, попередньо врівноважену Кребс-Рінгер бікарбонатним буфером (рН 7,4), при швидкості потоку 0,2 мл/хв. Видалення протеїнів, що не зв'язалися або слабо зв'язалися, проводили Кребс-Рінгер бікарбонатним фізіологічним розчином у 10 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,4) до фонового рівня екстинкції при 280 нм. Протеїни, що специфічно зв'язалися з т-АС, елюювали в кілька етапів. На першому етапі елюцію здійснювали 10 мМ розчином тіамін хлориду (рН 7,4). Далі продовжували ступеневу елюцію як описано раніше для ТЗБ [7,296]: 1М NaCl в 10 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,4); 2М сечовиною в 10 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,4). Швидкість елюції - 0,4 мл/хв, збирали фракції об'ємом 2 мл. У кожній фракції аналізували МДГ активність і концентрацію протеїну. Фракції, отримані елюцією кожним видом елюента, об'єднували і піддавали концентруванню на ультрафільтрах типу «Центрифужні ультрафільтри Амікон Ультра-15, 3 кДа» з заміною буфера двічі на 10 мМ трис-НСІ буфер (рН 7,4). Регенерацію сорбенту проводили 8М розчином сечовини з наступною промивкою 4-ма об'ємами дистильованої води. Сорбент зберігали в 0,02%-ному розчині азиду натрію.

3.6. Визначення ензиматичних активностей

3.6.1 Вимірювання фосфатгідролазних активностей

Вимірювання фосфатазних активностей ензимів проводили за продукцією неорганічного фосфату за методом Chan et al. [297]. Для зупинки ензиматичної реакції використовували змішаний реагент, основними компонентами якого є малахітовий зелений і розчин амоній молібдату в 6М хлоридній кислоті. Неорганічний фосфор утворює з молібденовою кислотою фосфорномолібденову гетерополікислоту, під час реакції якої з основним барвником — малахітовим зеленим утворюється комплекс, що дає зеленувато-синє забарвлення. Якщо фосфату не має, то малахітовий зелений в кислому середовищі забарвлений в жовтий колір. У присутності фосфату реакційна суміш стає смарагдового кольору. Для забезпечення колоїдної стійкості утвореного

комплексу в розчин додаємо полівініловий спирт (Японія, 1,16 г у 50 мл окропу). Реакції проводили в 0,1 М трис-НСІ буфері (рН 7,4) в присутності йонів магнію. Об'єм інкубаційної суміші, в якій проводили ензиматичну реакцію (до додавання реагенту з малахітовим зеленим), становив 50 мкл. Після реакції протягом 15 хв ($t=37^{\circ}\text{C}$) додавали 200 мкл змішаного реагенту і після перемішування вимірювали оптичну густину при 630 нм на рідерах Plate Reader TECAN Sunrise, BioTek μ Quant Microplate Spectrophotometer або Multiscan EX (Thermo) з використанням 96-лункової плашки с максимальним об'ємом 300 мкл. У наших експериментах метод застосовували для вимірювання гідролазної активності в елюатах щодо таких субстратів: ТМФ, ТДФ, АМФ, АДФ, АТФ, ГДФ, ГТФ та ІМФ.

3.6.2 Вимірювання малатдегідрогеназної активності

Малатдегідрогеназну активність визначали по [298] спектрофотометрично за зниженням поглинання світла при 340 нм за рахунок окислення NADH у 96-лункових плашках з прозорим дном і чорними стінками з об'ємом лунки 300 мкл на Plate Reader TECAN Sunrise, BioTek μ Quant Microplate Spectrophotometer або Multiscan EX (Thermo) в середовищі наступного складу: 20 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,2), 0,3 мМ оксалоацетат, 0.14 мМ NADH. Швидкість реакції визначали по лінійній ділянці кривої ходу реакції (від 0.4 до 1 хв).

3.6.3 Вимірювання глутаматдегідрогеназної активності

Активність ГДГ визначали спектрофотометрично по [298] в бік утворення глутамату з 2-оксоглутарата щодо зменшення поглинання субстрату реакції NADH при 340 нм на Plate Reader TECAN Sunrise, BioTek μ Quant Microplate Spectrophotometer або Multiscan EX (Thermo) з використанням 96 - лункової плашки з прозорим дном і чорними стінками в обсязі 300 мкл. Швидкість реакції визначали по лінійній ділянці кривої ходу реакції (від 0.4 до 1 хв). Активність вимірювали у середовищі наступного складу: 100 мМ Tris-НСІ (рН 7,5), 2.5 мМ 2-оксоглутарат, 0.2 мМ NADH, 50 мМ NH_4Cl .

3.7 Вивчення ефекторних впливів тіаміну і ТДФ на малатдегідрогеназу і глутаматдегідрогеназу

Дослідження ефектів тіаміну або ТДФ на ензими проводили в специфічних для кожного ензиму умовах максимізації ефектів [12]. Деталі використаних умов наведено в подальшому у підписах до рисунків і таблиць.

3.8 Кількісне визначення протеїну

Концентрацію протеїнів в розчинах розраховували за показаннями спектрофотометра при 280 нм. Однак при цій же довжині хвилі спостерігається інтенсивне поглинання молекулою тіаміну, тому в кожній протеїновій фракції, що елюювалася розчином тіаміну, дублювали визначення вмісту протеїну, використовуючи метод Бредфорд [299], для якого присутність тіаміну не є перешкодою. Ці експерименти дозволили визначити метод для вимірювання концентрації протеїнів у присутності тіаміну. Також використовували метод Лоурі [300].

3.9 Електрофорез та вестерн-блотинг

ДСН ПААГ-електрофорез

Одновимірний електрофорез в денатуруючих умовах проводили в 10% ПААГ з 0,1 % SDS за методом Laemmli [301] при фіксованих значеннях сили струму – 20 мА, напруги – 80 В на етапі концентруючого гелю і на етапі розділяючого гелю сила струму становила 20 мА, напруга – 140 В. Розчин розділяючого гелю, що готували з 30% розчину акриламід (відношення акриламід: N,N'-метилен біс-акриламід складало 37,5:1), містив: 10 % акриламід, 375 мМ трис-НСl буфер (рН 8.8) та 0,1 % SDS. Розчин концентруючого гелю містив: 4 % акриламід, 0,125М трис-НСl буфер (рН 6.8) та 0,1% SDS. Полімеризацію акриламід ініціювали додаванням амоній персульфату до кінцевої концентрації 0,05 % та TEMED 0,005%. Пластини с гелем фіксували в камері для електрофорезу та заповнювали камеру буфером для електрофорезу наступного складу: 25 мМ трис-НСl (рН 8.3), 195 мМ гліцин, 0,1% SDS. В якості протеїнів-маркерів використовували набір: Multicolor Broad Range

Protein Ladder Spectra™ від Thermo Fisher Scientific™ – з молекулярною масою в діапазоні 10-250 кДа.

2D-SDS PAGE

Процедуру 2D-електрофорезу 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. Поділ в першому напрямку проводили шляхом ізоелектрофокусування на стрипах IPG pH 3-10 («Bio_Rad»). Стрипи пасивно регідратували протягом 16 годин в розчині, що містив протеїнову фракцію отриману специфічною елюцією тіаміном з т-АС (170 мкг протеїна в пробі) та регідратуючий буфер (8М сечовина, 2% CHAPS (M/V), 50 мМ дитіотрейтол, 0,2% амфоліни pH 3-10 (M/V) Bio-Lyte® («Bio_Rad»). Процедуру ізоелектрофокусування проводили при напрузі 250 В протягом 20 хв, далі протягом 2 год при лінійному підйомі напруги до 10000 В і протягом 5 год при 10000 В до досягнення загальних 14000 в×г. Після ізоелектрофокусування стрипи інкубували протягом 10 хв у врівноважуючому буфері I (0,375 М Трис-НСІ буфер (pH 8.8), що містив 6М сечовину, 20% гліцерол, 2% SDS і 2% (w/v) дитіотрейтол), а потім у врівноважуючому буфері II (0,375 М Трис-НСІ буфер (pH 8.8), що містив 6М сечовину, 20% гліцерол, 2% SDS і 2.5% йодацетамід (Fluka®)). Для поділу протеїнів у другому напрямку використовували 8-16% вертикальні градієнтні гелі, приготовані за стандартним протоколом з використанням камери для електрофорезу Scie-Plas TV100Y standard twin-plate minigel unit (Cambridge, Великобританія) та джерела току Tachware PS 251-2 (Sigma Aldrich, США). Гелі фарбували сріблом з використанням кіта ProteoSilver™ Silver Stain Kit (Sigma®) відповідно до методик, описаних в інструкції до набору або за допомогою барвника Coomassie Blue відповідно до стандартного протоколу. Розмір гелів становив 0,15×7,2×8,6 см.

Електроперенесення протеїнів та Вестерн-блот аналіз

Для електроперенесення протеїнів використовували нітроцелюлозну або PVDF мембрани. Електроперенесення протеїнів на мембрану здійснювали в трансфер-

буфері, що містив 25мМ трис-НСІ (рН 8.3), 192мМ гліцин, 0,01% SDS та 20% метанол, протягом 1,5 год при напрузі 25В і силі струму 150-175мА, використовуючи прилад для напіврідкого електроперенесення UNIBLOT BLOTTING SYSTEMS MAX (Cambridge, Великобританія).

Після електроперенесення протеїнів мембрану, використовуючи шейкер, відмивали 5 разів протягом 5 хв у PBSt при кімнатній температурі. Сайти неспецифічної сорбції на мембрані блокували протягом 2 годин в PBS, що містив 1,5% ЛСА та 1,5% БСА. Імуноблот-аналіз проводили за допомогою поліклональних антитіл кроля, специфічних до Агріну або LRP4 у розведенні 1:750 на 1,5% ЛСА + 1,5% БСА розчині у PBS, інкубуючи мембрану з антитілами при 2-4°C впродовж ночі. Відмивали мембрану 7 разів по 5 хв PBS з 0,1 % Tween-20 та інкубували протягом 1,5 години у буфері PBS, що містив 1,5 % ЛСА та 1,5% БСА, з вторинними антитілами проти IgG кроля, кон'югованими з пероксидазою хрому (розведення 1:5000). Після цього відмивали мембрану, як описано вище, та візуалізували за допомогою набору ECL. Сигнал фіксували за допомогою рентгенівської плівки або використовували систему візуалізації з застосуванням субстрату пероксидазної реакції – барвника 3,3'-діамінобензидину (DAB) (Sigma Aldrich, США). Для денситометричного аналізу застосовано програму CLIQS від TotalLab Ltd (v.1.5.167).

3.10 Мас-спектрометричні дослідження

Пофарбовані плями протеїнів вирізали з гелю, відмивали забарвлення кумассі блю або сріблом і обробляли бичачим трипсином (Applied Biosystems, США). 0,5 мкл суміші пептидів змішували на мішені з 1,1 мкл 10 мг/мл розчину α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) ("Sigma", США) в 50% ацетонітрилі с 0,1% трифтороцтовою кислотою і висушували на повітрі. Мас-спектри отримували на MALDI-TOF-масспектрометрі Voyager DE PRO серійний № 6393 («Applied Biosystems», США) в режимі позитивних іонів у діапазоні мас від 500 до 5000 Да, напруга 20 кВ, рефлекторний режим. Отримані мас-спектри калібрували, використовуючи зовнішні пептиди (Sequazyme kit standarts, Applied Biosystems) і внутрішні піки (матричний MH^+ 666.0293 і піки автолізу трипсина, MH^+ 2163.0566 і 2273.1599). Список пептидних піків формували з використанням сервісної програми Data Explorer 4.1.

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>). Були задані наступні параметри пошуку: точність визначення маси 0,5 Да, одне пропущене розщеплення, можливість різних модифікацій цистеїну акриламідом і окислення метіоніну. Для ідентифікації використано бази даних первинних протеїнових послідовностей NCBI і SwissProt, таксони *Mammalian*, *Rattus norvegicus* (Rat), *Bos taurus* (Bovine) та *Sus scrofa* (Pig), у зв'язку з низьким рівнем розшифровки геному тварин у порівнянні з геномом людини.

3.11 Електронна мікроскопія

Дослідження проведено за методом Reynolds E.S. [302]. Краплю суспензії протеїнів, що зв'язалися з тіаміном (з головного мозку щурів), наносили на мідну сіточку 200 меш (AGAR) покриту плівкою формвара (AGAR) і укріплену вугіллям (AGAR) за допомогою напилювальної установки (IB-3, Японія). Для додання вугільній поверхні гідрофільності (для кращої адсорбції молекул зразка), сітки додатково обробляли на установці (HUS-5GB, Японія). Інкубацію біосуспензії на поверхні сіток вели протягом 1 хвилини, потім за допомогою фільтрувального паперу видаляли рідину і заміняли її краплею 1% розчину ураніацетату (AGAR) у дистильованій воді. Забарвлення вели протягом 10 хвилин, потім барвник видаляли фільтром. Тонкий шар ураніацетату на плівці висушували на повітрі. Сітки зі зразками переглядали і фотографували в просвічувальному електронному мікроскопі H-600 (Hitachi, Японія) за прискорювальної напруги 75 kV і збільшенні до 30.000.

3.12 Створення тваринних моделей недостатності тіаміну

3.12.1 Аліментарний дефіцит тіаміну

Модель недостатності тіаміну створювали за допомогою дієти Габлера по [303]. Було створено дві моделі аліментарного В₁-авітамінозу. В роботі використовували білих щурів-самців масою 100-120 г. Щурам з парногодованого контролю тіамін вводився перорально (200 мкг/день*100 г маси тіла тварини) – модель № 1, або

додаванням в корм – модель № 2. За добу до декапітації частині щурів в моделі № 2 вводили тіамін відповідно добовій нормі. Крім того, модель № 1 (4 тижні) відрізнялася від моделі № 2 різними термінами безтіаミノвої дієти (4,5 і 6 тижнів). Кількість тварин у групах: 18 щурів (модель №1+ модель №2), з них контрольних - n= 7 тварин, Т - n= 8 і ТД+В₁ - n= 3.

3.13 Біоінформативні методи

3.13.1 Попарні та множинні вирівнювання протеїнів

Для вирівнювання протеїнів за первинною амінокислотою послідовністю використано онлайн доступні біоінформативні ресурси Align (ClustalO) від The Universal Protein Resource (UniProt), ClustalW від ExPASy Bioinformatics Resource Portal (Swiss Institute of Bioinformatics) і спеціалізовані програми PyMOL (версія 1.1) від платформи Schrodinger та Jalview (версія 2.11.0) від BBSRC (Великобританія).

3.13.2. Просторове вирівнювання протеїнів

Для 3D-вирівнювання протеїнів використано біоінформативний ресурс Sequence & Structure Alignment від PDB (The Protein Data Bank).

3.13.3 Докінг молекул

Докінг тіаміну до протеїнів, виявлених з використанням результатів мас-спектрометрії в елюатах з т-АС, виконувався з допомогою спеціалізованої програми AutoDock Vina (версія 4.2) відповідно до протоколу, представленого в роботі S. Forli et al. [304]. Для підготовки протеїнів та лігандів і візуалізації результатів використовували пакети програм MGLTools та Discovery Studio.

3.13.4 Інші використані ресурси

Для вирішення інших задач в ході роботи були також використані наступні біоінформатичні ресурси: Phobius (the transmembrane topology and signal peptide predictor), Protein isoelectric point calculator та AACompIdent (є засобом, що дозволяє ідентифікувати протеїн за його амінокислотним складом) від ExPASy Bioinformatics

Resource Portal (Swiss Institute of Bioinformatics) і бази даних UniProt/SwissProt (the European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), the SIB Swiss Institute of Bioinformatics and the Protein Information Resource (PIR)) та Genecards (The Weizmann Institute of Science).

3.14 Статистична обробка результатів

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 Стюдента. 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 використанням надбудови BioStat від AnalystSoft та GraphPad Prism, версія 8.0 (США).

Роботи, в яких опубліковані деякі наукові результати розділу

Меженська ОО, Музичка ОВ, Вовк АІ, Пархоменко ЮМ (2016) Використання афінної хроматографії для виявлення протеїнів, які проявляють спорідненість до тіаміну. Вісник Львівського університету. Серія біологічна 74(спец):160-165

Глава IV. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

4.1 Аналіз т-АС на вміст ліганду

У відділі біохімії вітамінів і коензимів протягом багатьох років досліджується ТЗБ, який шляхом афінної хроматографії виділяється з синапсом мозку. Станом на початок 2014 року у розпорядженні нашої групи були два афінні сорбенти, що містили наступні ліганди:

- 1) тiazоловий компонент молекули тіаміну;
- 2) дві молекули тіаміну іммобілізованих на одному спейсері (цей сорбент отримав назву модифікований).

Структурні формули вказаних сорбентів представлено в роботі 2015 року [12]. Тобто дані, представлені у вказаній статті, було отримано з використанням тiazолового та модифікованого афінних сорбентів. Тоді як протеїн, що отримав назву ТЗБ, раніше виділяли та досліджували за допомогою афінного сорбента, що містив одну молекулу тіаміну в якості ліганду. Тому першочерговим завданням в рамках цього дослідження став синтез того ж самого сорбенту, на якому ТЗБ було виділено вперше, з метою його ідентифікації з використанням сучасних методів. Саме цей сорбент, з однією молекулою тіаміну в якості ліганду, отримав назву базовий тіаміновий афінний сорбент (т-АС) і був синтезований за протоколом представленим в главі III «Матеріали і методи».

Надалі повстало завдання перевірити якість отриманого сорбента і отримати дані щодо кількісних параметрів ліганду в складі т-АС. За разом цій процедурі піддали також модифікований та тiazоловий афінні сорбенти (вони у цій роботі в подальшому не застосовувалися). Після кислотного гідролізу сорбентів і застосування тіохромного методу [43] ми отримали показники, що представлені у таблиці 4.1.1. Сорбційна здатність колонки склала 1,16 мг протеїнів/г сорбенту.

У результаті проведеного експерименту ми визначили концентрацію ліганду в складі т-АС. Згідно з [305] це означало змогу виділити з суміші компоненти (протеїни), що містяться в мінорних кількостях і специфічно зв'язуються з лігандом. При чому при цій концентрації ліганду на процес АХ не впливатиме геометрія колонки.

Таблиця 4.1.1 – концентрація ліганду в складі сорбентів

Афінний сорбент	Кількість тіаміну в складі сорбенту,	
	мкг В ₁ /г АС	моль В ₁ /л АС
базовий АС (т-АС)	27,67 ±2,23	9,19*10 ⁻⁵
модифікований АС	50,19 ±4,54	1,67*10 ⁻⁴

Також цей експеримент підтвердив, що модифікований сорбент містить вдвічі більшу кількість тіаміну у порівнянні з базовим.

Роботи, в яких опубліковані основні наукові результати розділу

Меженська ОО, Музичка ОВ, Вовк АІ, Пархоменко ЮМ (2016) Використання афінної хроматографії для виявлення протеїнів, які проявляють спорідненість до тіаміну Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 74(спец):160-165

4.2 Аналіз протеїнів мозку, що здатні зв'язуватися з тіаміном, отриманих елюцією з т-АС

4.2.1 Ензиматичні активності в елюатах з афінного сорбенту, що містить тіамін як ліганд: неспецифічна і специфічна елюція

4.2.1.1 Рівні дегідрогензаних активностей

У зв'язку з тим, що результати трьох попередніх МС-досліджень протеїнових фракцій, елюйованих з модифікованого сорбенту (розділ 4.1), показали наявність в них МДГ2 та/або МДГ1 і ГДГ, було вирішено перевірити присутність цих протеїнів за їх ензиматичною активністю в елюатах з новосинтезованого базового т-АС при виділенні протеїнів з мозку щурів і бика. В результаті неспецифічної елюції ми отримали дані, що подані в таблиці 4.2.1.

В подальшому для елюції протеїнів з т-АС ми застосували специфічну елюцію тіамін хлоридом. В процесі цих експериментів ми отримали результати, що їх подано у таблиці 4.2.2.

Таблиця 4.2.1 – Малатдегідрогеназна активність у протеїнових фракціях з мозку щура і бика до та після афінної хроматографії з застосуванням базового т-АС і неспецифічної елюції

Протеїнова фракція		Загальна концентрація протеїнів, мг/мл	Питома активність, нмоль/хв*мг протеїну
<i>Протеїни з мозку щура</i>			
Нанесений препарат (екстракт АП)		0,746	243,1±19,5
Елюент	1М NaCl	0,207	252,8±22,7
	2М сечовина	0,189	118,1±10,6
<i>Протеїни з мозку бика</i>			
Нанесений препарат (екстракт АП)		1,379	165,3±13,2
Елюент	1М NaCl	0,414	323,0±29,1
	2М сечовина	0,324	167,2±20,0

Таблиця 4.2.2 – Малатдегідрогеназна активність у протеїнових фракціях з мозку щура і бика до та після афінної хроматографії з застосуванням базового т-АС і специфічної елюції

Протеїнова фракція		Загальна концентрація протеїнів, мг/мл	Питома активність, нмоль/хв*мг протеїну
<i>1</i>		<i>2</i>	<i>3</i>
<i>Протеїни з мозку щура</i>			
Нанесений препарат (екстракт АП)		1,19	128,5±10,3
Елюент	10 мМ тіамін хлорид, рН 7.4	0,339	255,1±23,0
	1М NaCl	0,237	151,6±13,6
	2М сечовина	0,227	51,2±4,1
<i>Протеїни з мозку бика</i>			

<i>1</i>		<i>2</i>	<i>3</i>
Нанесений препарат (екстракт АП)		1,393	191,2±13,4
Елюент	10 мМ тіамін хлорид, рН 7.4	0,443	460,5±55,3
	1М NaCl	0,263	351,7±31,7
	2М сечовина	0,2	58,5±6,0

Тобто всі отримані нами результати свідчили про здатність протеїнів з МДГ-активністю з мозку двох видів ссавців зв'язуватися з тіаміном [306].

Щодо ГДГ, то отримані результати подано у наступних двох таблицях (табл.4.2.3, табл. 4.2.4). Результати вимірювання глутаматдегідрогеназної активності також вагомо свідчать, що протеїни з ГДГ-активністю з мозку двох видів ссавців виявляють спорідненість до тіаміну [306].

Таблиця 4.2.3 – Глутаматдегідрогеназна активність у протеїнових фракціях з мозку щура і бика до та після афінної хроматографії з застосуванням базового т-АС і неспецифічної елюції

Протеїнова фракція		Загальна концентрація протеїнів, мг/мл	Питома активність, нмоль/хв*мг протеїну
<i>Протеїни з мозку щура</i>			
Нанесений препарат (екстракт АП)		0,746	3,2±0,3
Елюент	1М NaCl	0,207	1,8±0,1
	2М сечовина	0,189	5,9±0,5
<i>Протеїни з мозку бика</i>			
Нанесений препарат (екстракт АП)		1,379	14,3±1,0
Елюент	1М NaCl	0,414	9,2±0,9
	2М сечовина	0,324	16,1±1,2

Таблиця 4.2.4 – Глутаматдегідрогеназна активність у протеїнових фракціях з мозку щура і бика до та після афінної хроматографії з застосуванням базового т-АС і специфічної елюції

Протеїнова фракція		Загальна концентрація протеїнів, мг/мл	Питома активність, нмоль/хв*мг протеїну
<i>Протеїни з мозку щура</i>			
Нанесений препарат (екстракт АП)		1,19	6,8±0,6
Елюент	10 мМ тіамін хлорид, рН 7,4	0,339	9,3±0,7
	1М NaCl	0,237	6,3±0,4
	2М сечовина	0,227	3,7±0,3
<i>Протеїни з мозку бика</i>			
Нанесений препарат (екстракт АП)		1,393	18,7±1,1
Елюент	10 мМ тіамін хлорид, рН 7,4	0,443	11,8±0,9
	1М NaCl	0,263	14,1±1,5
	2М сечовина	0,2	2,1±0,2

4.2.1.2 Рівні фосфатазних активностей

Свого часу результати отримані нашою групою достеменно свідчили про те, що ізольований ТЗБ здатний каталізувати гідроліз фосфорних ефірів тіаміну (найбільш активно гідролізував ТТФ) [9]. Тому для ідентифікації ТЗБ особливо важливо було визначити рівень саме фосфат гідролазних (фосфатазних) активностей в елюатах з т-АС. Рівень цих активностей ми також визначали в протеїнових фракціях після ГФ (розділ 4.3).

Через велику ступінь структурної схожості тіамін і нуклеозид фосфатів, у своїх дослідженнях ми також використали доступні нам нуклеотиди. Інформацію про

сучасний рівень досліджень у цьому напрямку маємо з літератури [200]: протеїни відрізняють фосфати тіаміну, але більш докладно обговорюватимемо це в розділі 4.7. Наразі на рис. 4.2.1 приводимо наші дані про рівень фосфатазних активностей в протеїнових фракціях елюйованих з т-АС [307].

Як бачимо з рис. 4.2.1 безперечним є вплив на фосфат гідролазні активності умов елюції, а саме таких параметрів, як рН елюючого розчину на I етапі і концентрація специфічного агента, в нашому випадку – тіаміну. Звертає увагу те, що

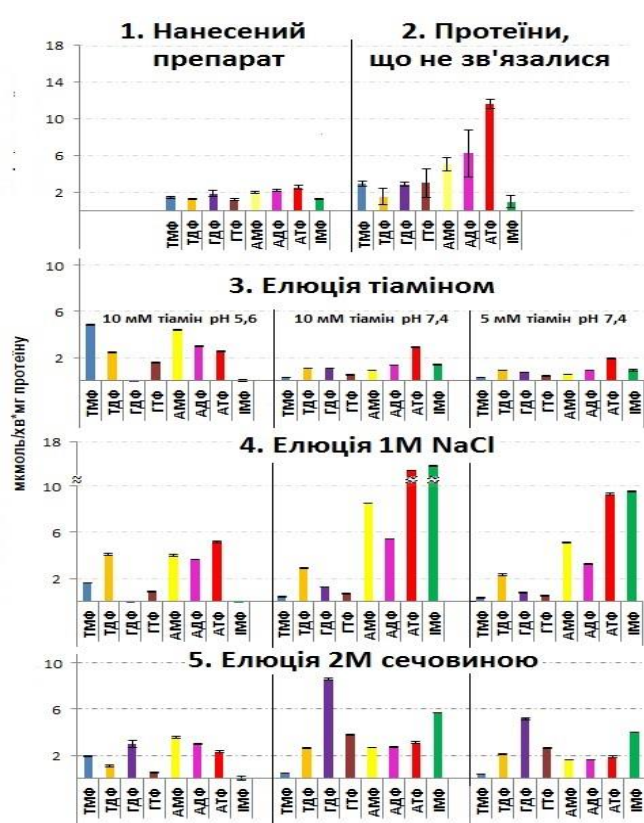


Рис. 4.2.1 – Рівень фосфатазних активностей в протеїнових фракціях після АХ з застосуванням специфічної елюції. По осі абсцис приведені використані субстрати

(згадувалася в огляді літератури (розділ 1.2.1.1), яка до сих пір не ідентифікована на молекулярному рівні. Нажаль, МС-аналіз даної фракції проведено не було, що є мотивом зробити це у майбутньому.

Навпаки, за рН 7,4 бачимо, що рівень ТДФ-азної активності був більшим у порівнянні з ТМФ-азною. Це стосується усіх етапів елюції. Тобто з т-АС елюювався

рівень вимірюваних ензиматичних активностей істотно нижчий у всіх зразках при використанні на I етапі елюції 5 мМ концентрації тіаміну.

Щодо рН, то тут висновки неоднозначні. Так, деякі фосфатази у більшій мірі елюювалися саме розчином тіаміну з рН 5,6. Особливо це стосується фосфатази, яка здатна гідролізувати ТМФ. Причому рівень цієї активності продовжував залишатися досить високим (але меншим у порівнянні з етапом I) навіть на наступних етапах елюції (1M NaCl, 2M сечовина), що свідчило про специфічність елюції на першому етапі та про продовження відмивки даного протеїну на наступних етапах. Тому ми припустили, що цією фосфатазою може бути кисла ТМФ-аза

протеїн, що був більш активним по відношенню до ТДФ. Це відповідає інформації, яка була нам відома щодо ТЗБ з попередніх досліджень (зростання гідролазної активності по відношенню до фосфатів тіаміну у порядку ТМФ <ТДФ <ТТФ).

Також на рис. 4.2.1 бачимо, що в тіаміновому елюаті (рН 7,4) були присутні і нуклеотид фосфатазні активності. Проте на відміну від ТДФ-азної активності, у фракції «протеїни, що не зв'язалися» рівень нуклеотид фосфатазних активностей (особливо аденозинфосфат гідролазних) був значно вищим порівняно з такими у препараті нанесеному на т-АС, що означає, що більша частина протеїнів, яким властиві ці активності, з т-АС не зв'язалися. Більше того, вони навіть зазнали очищення після того, як протеїни, що здатні зв'язуватися з тіаміном, залишилися зв'язаними з т-АС. Щодо тих протеїнів, що зв'язалися з афінним сорбентом, то рівень нуклеотид фосфатазних активностей був значно вище у фракціях елюйованих неспецифічними елюентами. Особливо зросли на стадії елюції натрій хлоридом рівні аденозин фосфат гідролазних активностей, а рівні гуанозин фосфат фосфатазних активностей були найвищими у протеїнових фракціях елюйованих сечовиною. Це свідчило, що названі активності належали різним протеїнам та їх зв'язування з тіаміном у складі сорбенту було різної природи.

Визначені у тіаміновому елюаті поряд з тіамінфосфатазними нуклеотид фосфатазні активності були різного рівня. Та чи належало одразу декілька фосфатазних активностей одночасно певному протеїну/протеїнам, здатним зв'язувати тіамін, чи це були зовсім різні протеїни, належало з'ясувати з допомогою наступних етапів досліджень, у т.ч. з використанням ГФ з метою також розділити протеїни з тіамін фосфат фосфатазними і нуклеотид фосфатазними активностями (розділ 4.4). В будь-якому разі, ці результати також підтвердили наявність в тіаміновому елюаті суміші протеїнів і разом з ЕФ обґрунтували доцільність застосування ГФ.

4.2.2 Визначення оптимальних умов специфічної елюції

Послідовна елюція розчинами 1М NaCl і далі розчинами сечовини (2М і 4М) не забезпечувала суворої специфічності елюції протеїнів, афінних до тіаміну.

Враховуючи це, в даній роботі ми вирішили підвищити специфічність елюції, ввівши в процес хроматографії додатковий етап елюції розчином тіамін хлориду.

Оскільки специфічна елюція в рамках цієї дослідницької роботи застосовувалася вперше, необхідно було підібрати оптимальні умови елюції тіаміном. Ми почали з використання різних концентрацій тіаміну для більш ефективної елюції. Результати цих дослідів будуть представлені на прикладі МДГ-активності. Щодо фосфатазних активностей, вплив умов на їх рівень був приведений на рис. 4.2.1.

На рис. 4.2.2 представлені дані щодо дії тіаміну на МДГ-активність з мозку бика. Як бачимо з цього рисунка, повнота елюції протеїнів з МДГ активністю з т-АС залежить від концентрації тіаміну в розчині елюенту. Очевидно, що концентрація тіаміну 5 мМ і навіть 10 мМ не є достатньою для повного витіснення з сорбенту протеїну (або протеїнів) з МДГ-азною активністю, проте більший вихід цієї активності при підвищенні концентрації тіаміну в елюенті ще раз підтверджує специфічність взаємодії МДГ з тіаміном. Ми припускаємо, що неповна елюція з т-АС протеїнів з МДГ-азною активністю може бути пов'язана з різним афінитетом протеїнів з МДГ-активністю до вільного тіаміну і зв'язаного через спейсер в складі т-АС через перерозподіл електронної густини в молекулі тіаміну або різної конформації вільної і зв'язаної у сорбенті молекули тіаміну, що в результаті позначається на зв'язуванні з протеїном. Як свідчать наведені дані, більш повне зняття з т-АС досягається лише при використанні на наступних етапах в якості елююючих агентів натрій хлориду (1М розчин) і сечовини (2М розчин). При цьому кількість елюйованого протеїну (протеїнів) на другому і третьому етапах елюції в значній мірі залежить від концентрації тіаміну в елюенті на першому етапі. Так само як і від рН елюючого розчину на I етапі про що піде мова далі в поточному розділі. З останньої частини рисунка (сумарна активність) видно, що в обох варіантах досягається повне зняття МДГ-активності, тобто протеїнів-носіїв цієї активності що зв'язалися з афінним сорбентом.

Наступним кроком цієї серії експериментів було дослідження залежності ефективності елюції протеїнів з МДГ активністю від рН розчину елюенту на 1-ому

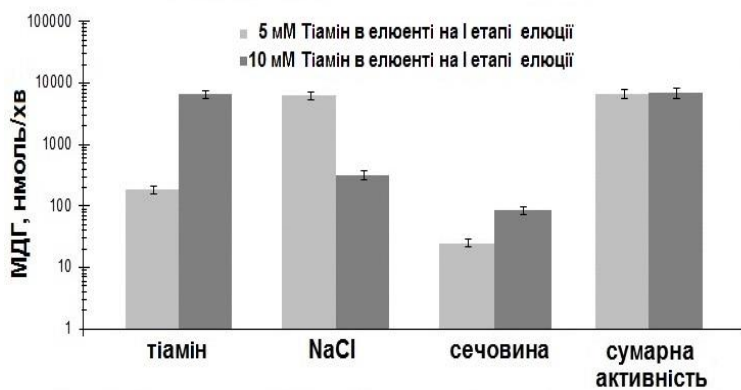


Рис. 4.2.2 – Залежність елюції МДГ-активності мозку бика в процесі афінної хроматографії на т-АС від концентрації тіаміну в елююючому розчині на I етапі елюції (2 варіанти – 5 і 10 мМ тіаміну); II етап і III етап - однакові в обох варіантах - 1М розчин NaCl (2-ий етап) та 2М розчин сечовини (3-й етап); далі – сумарна

активність МДГ у всіх елюатах (у розрахунку на загальний обсяг всіх елюентів). Усереднені результати від 2 до 6 незалежних хроматографій.

етапі. Спочатку, у зв'язку з тим, що в даній роботі для виділення ТЗП був використаний мозок не тільки щура, але і бика - нового для наших досліджень організму, щоб мати можливість порівнювати одержувані результати з раніше отриманими, ми використовували елюцію розчином тіаміну з рН 7,4 згідно з застосовуваним протоколом. Далі, оскільки молекула тіаміну більш стабільна в слабо-кислому середовищі, а також виходячи з даних літератури [308,309] про різну чутливість ізозимів МДГ і ГДГ до рН розчину, ми перевірили ефект рН 5,6 на елюцію тіаміном протеїнів, що зв'язалися з т-АС.

Отже, результати представлені на рис. 4.2.3 дозволили нам зробити висновок, що елюція, як і у випадку концентрації тіаміну в елюенті, залежить від рН розчину елюенту на I етапі [310]. При цьому МС-дослідження продемонстрували що при рН 5,6 тіамін знімав переважно мітохондрійну ізоформу (МДГ2), а за рН 7,4 - цитоплазматичну (МДГ1) [310]. Реакція середовища елюента 7,4 за концентрації тіаміну в елююючому розчині 10 мМ виявилася найефективнішою, тому було вирішено у подальших дослідженнях використовувати саме ці параметри елюенту на першому етапі елюції протеїнів, що зв'язалися, з афінного сорбенту.

Крім того, згідно даних літератури відомо, що мМДГ (МДГ2) дисоціює на мономери при рН 5.0 [308], тоді як цМДГ (МДГ1) залишається олігомеризованою навіть за більш низьких значень рН [309,311]. Проте відомо [312], що цитозольна МДГ є активною тільки в мономерному стані. На відміну від цього, активна форма мітохондрійної МДГ – димер. Це є механізмом редокс-регуляції активності двох ізо-

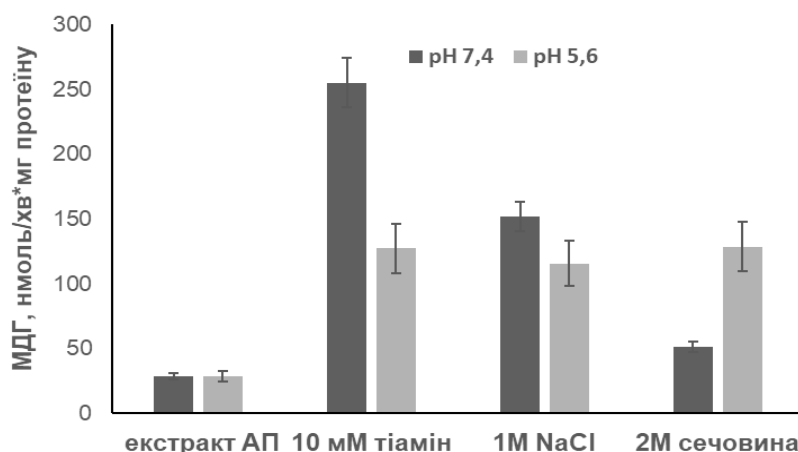


Рис. 4.2.3 – Залежність елюції МДГ-активності мозку бика в процесі афінної хроматографії на *t-AC* від рН розчину тіаміну на I етапі елюції (2 варіанти рН– 7,4 і 5,6): I етап елюції, розчин тіаміну рН 7,4; II етап і III етап - однакові в обох варіантах - 1М розчин NaCl (2-ий етап) та 2М розчин сечовини (3-й етап); далі – сумарна активність МДГ у всіх елюатах (у розрахунку на загальний обсяг всіх елюентів). Усереднені результати від 2 до 6 незалежних хроматографій.



Рис. 4.2.4 - Схема експериментів з виділення протеїнів, що проявляють спорідненість до тіаміну.

зимів МДГ (як і багатьох інших протеїнів). Редокс-чутливі залишки цистеїну в складі протеїну та дисульфідні містки, що формуються з цих залишків, слугують в якості редокс-чутливого молекулярного перемикача. Ці перемикачі сприймають клітинні окислювальні чинники, зокрема кисень, активні форми кисню (АФК), азот і його активні форми (АФА), гідроген пероксид; клітинні відновлювальні чинники, зокрема тіоредоксин (Trx), Глутатіон (GSH), і молекули, що належать до їх сімейств. Оскільки

здатність тіаміну до окисно-відновних перетворень давно відома, цілком ймовірним є участь тіаміну та/або його б.а. похідних в процесах редокс-регуляції функціонування низки протеїнів.

Таким чином, в наслідок проведених експериментів (рис. 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3) обгрунтовано параметри специфічного елюенту: концентрація тіаміну – 10 мМ, рН елююючого розчину – 7,4. Що також обгрунтовувалося попередніми результатами визначення оптимуму ТТФ-азної реакції [313].

Отже, на рис. 4.2.4 ми можемо привести узагальнюючу схему наших експериментів у рамках цієї роботи після визначення оптимальних умов специфічної елюції.

Роботи, в яких опубліковані основні наукові результати розділу

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 Семенени ИН, Мойсеенка АГ) Минск, ИВЦ Минфина 795 с сс 369-376 Гродно, 17-18 мая

Pavlova OS, Tykhomyrov AA, **Mejenskaya OA**, Stepanenko SP, Chehivska LI, Parkhomenko YuM (2019) Protective effects of high single dose of thiamine against chronic ethanol consumption impact to rat brain astroglia. Ukr Biochem J 91(4):41-49

Меженская ОА, Алёшин ВА, Кэне Т, Артюхов АВ, Буник ВИ (2020) Регуляция малатдегидрогеназ и глутаматдегидрогеназы мозга животных тиаминном *in vitro* и *in vivo*. Биохимия/Biochemistry (Moscow) 85(1):34–48

Алёшин ВА, **Меженская ОА**, Пархоменко ЮМ, Кэне Т, Буник ВИ (2020) Фосфатазы моно- и дифосфата тиаминна в синапсосамах мозга быка. Биохимия/Biochemistry (Moscow) 85(3):438-448

Меженская ОА, Буник ВИ, Пархоменко ЮМ (2015) Выявление новых протеинов мозга, проявляющих аффинность к тиамину. Актуальные проблемы современной биохимии и клеточной биологии: материалы III Международной

научной конференции (под ред Ушаковой ГА) Днепропетровск, издательство Арбуз 192 с 74-76 Днепропетровск, 24-25 сентября

Алёшин В, **Меженская О**, Кэне Т, Пархоменко Ю, Буник В (2016) Аффинная хроматография и масс-спектрометрия для идентификации тиамин (витамин В₁)-зависимых фосфатаз мозга. Сб мат Межд науч конф молодых учёных по мед биологии ФГБУ ФНКЦ физ-хим медицины ФМБА (под ред Ильиной ЕН, Кострюковой ЕС) Москва, ФНКЦ ФХМ ФМБА России 172 с сс 15-16 Москва, 19-20 апреля

Mezhenskaya O, Parkhomenko Yu (2016) 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 Acta Biochimica Polonica 63(suppl 1):26 Wrocław, 10th -12th July

Aleshin VA, Kaehne T, Bunik VI, Parkhomenko YM, **Mezhenskaya OA** Phosphatases of the thiamin-binding proteomes. Міжнародна конференція: EMBO at Basellife-2018 <https://www.basellife.org/2018/> Базель, Швейцарія, 11-14 вересня

Parkhomenko YuM, Pavlova OS, **Mezhenska OO**, Stepanenko SP, Chehivska LI (2019) Do oxidized derivatives of thiamine participate in regulation of its metabolism? Матеріали XII Українського біохімічного конгресу Медична та клінічна хімія 3(80) (том 21, Додаток) с 232 Тернопіль, 30 вересня- 4 жовтня

4.3 Аффинная хроматография протеиновых экстрактов мозга на сорбенте, что не содержит тиамин как лиганд

В процесі досліджень виникло логічне запитання: чи є зв'язування протеїнів з т-АС специфічним щодо ліганда (тіаміну)?

Основою для синтезу сорбенту є сефароза, тому не можна було виключати ймовірності, що ідентифіковані в елюатах з т-АС протеїни зв'язуються не з лігандом, а з іншою частиною сорбенту. Завданням цієї частини роботи було перевірити це припущення. Для його виконання слід було, зберігаючи всі етапи синтезу сорбента до приєднання тіаміну, синтезувати «безтіаміновий» сорбент (АС без Т) і провести

порівняльне дослідження здатності обох сорбентів зв'язувати з екстрактів мозку окремі з ідентифікованих раніше протеїнів, які елюювалися з т-АС. У зв'язку з високою вартістю МС-аналізу для ідентифікації протеїнів у цьому разі ми зупинилися на кількох протеїнах, наявність яких в елюатах з сорбентів можна було перевірити, вимірюючи їхню специфічну ензиматичну активність у фракціях елюатів. Схему синтезу сорбентів і їх структурні формули подано в главі III (рис.3.2.1, 3.2.2).

У результаті проведених експериментів ми виявили відмінності у спектрі протеїнів, які зв'язуються з т-АС і сорбентом без тіаміну. Профілі елюції протеїнів з обох сорбентів представлені на рис. 4.3.1. Потрібно відзначити, що рівень оптичної густини в процесі елюції тіаміном не відображає елюцію протеїнів оскільки при 280 нм спостерігається високий рівень поглинання світла молекулою тіаміна [13]. Тому подальші висновки щодо різниці між цими елюйованими фракціями робили за рівнем виявлених ензиматичних активностей.

Аналіз МДГ- і ГДГ-активності свідчить про наявність цих ензимів в елюатах з т-АС і їх відсутність в аналогічних фракціях, що елюювалися з АС без Т (рис. 4.3.2.) [296].

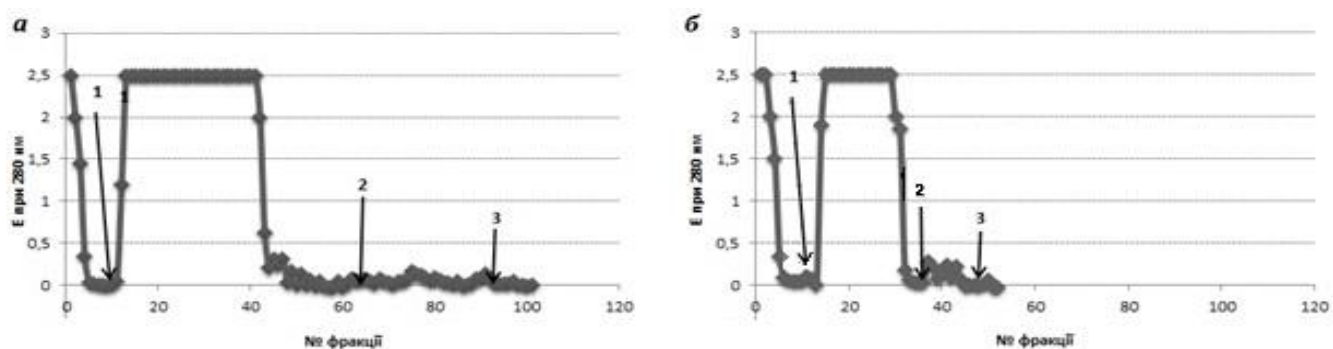


Рис. 4.3.1 - Профілі елюції з сорбентів: **а** – т-АС; **б** – «безтіамінового» (АС без Т); стрілками позначено зміну елюентів: 1 – тіамін; 2 - натрій хлорид; 3 - сечовина

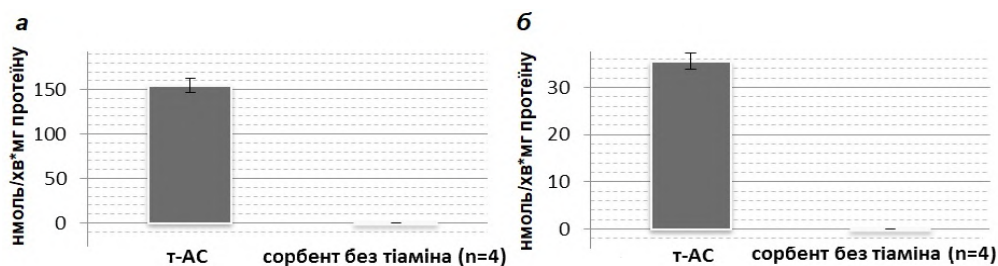


Рис. 4.3.2 - Дегідрогеназні активності в елюатах з сорбентів: **а** – МДГ-активність; **б** – ГДГ-активність

Що стосується фосфатазних активностей, то у фракціях протеїнів, елюйованих з сорбенту без тіаміну, виявляються тільки аденозинфосфатазні активності, причому вони мають різні рівні. Більш детально дані представлені в таблиці 4.3.1.

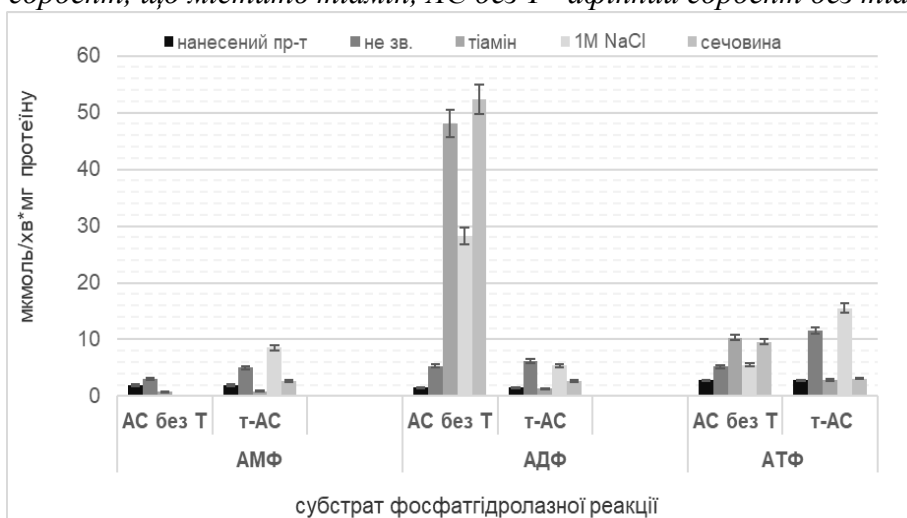
Таблиця 4.3.1 - Фосфатазні активності в елюатах з сорбенту без тіамінового залишку

Субстрат	Рівень активності, мколь/хв на мг протеїну
ТМФ	Не виявлено
ТДФ	Не виявлено
ГДФ	Не виявлено
ГТФ	Не виявлено
ІМФ	Не виявлено
АМФ	тільки в тіаміновому елюаті (0,8 -проти 3,1 у незв.)
АДФ	48,1 - елюція тіамін хлоридом; 28,3 – елюція NaCl; 52,4 – елюція сечовиною - проти 5,3 у незв.*
АТФ	10,3- елюція тіамін хлоридом; 5,5 - елюція NaCl; 9,6 - елюція сечовиною - проти 5,2 у незв.

*/незв. – об'єднана фракція протеїнів, які не зв'язалися з сорбентом

На відміну від сорбенту без тіаміну, у всіх елюатах з т-АС виявлені всі види вимірних фосфатазних активностей. Оскільки малатдегідрогеназної, глутаматдегідрогеназної, тіамінмоно-, тіамінди-, гуанозинди-, гуанозинтри- й інозинмонофосфатазної активностей не виявлено в елюатах з сорбенту, що не містить тіамін, ми зробили висновок про те, що ці ензими зв'язуються з тіаміновим залишком у складі афінного сорбенту специфічно.

Рис.4.3.3 – аденозинфосфат гідролазні активності в елюатах з афінних сорбентів: т-АС – афінний сорбент, що містить тіамін, АС без Т – афінний сорбент без тіаміну



Те ж можна сказати про деякі протеїни, що виявляли аденозинфосфат гідролазні активності (табл.4.3.1, рис.4.3.4). Тому потрібною буде експериментальна перевірка щодо кожного

протеїну з вказаними активностями. Слід зауважити, що у кожній протеїновій фракції кожна активність може належати одразу декільком ензимам, що виявляють дану активність. З рис. 4.3.4 бачимо, що АМФ-азна активність фактично є більш специфічною для елюатів з т-АС, проте протеїни, що виявляють дану активність, у більшій мірі знімаються з т-АС натрій хлоридом і сечовиною, а не специфічним елюентом – тіаміном. Щодо АТФ-аз, ситуація складніша, але і АТФ-ази краще елюються з т-АС саме NaCl. Особливу увагу звертає АДФ-азна активність: як чітко видно з рис. 4.3.4 протеїни, які виявляють цю активність виявили більшу спорідненість до сорбенту без тіаміну. Проте певний ензим з АДФ-азною активністю зв'язується з тіаміном у складі т-АС. Що йдеться про один протеїн, видно з рівня активності особливо у порівнянні з АДФ-активністю в елюатах з сорбенту без тіаміну. Що це за протеїн, ще належить встановити. Але можемо зробити висновок, що рівень цієї АДФ-ази не зростає в тіаміновому елюаті з т-АС (вони фактично однакові: $\approx 1,4$ мкмоль/хв*мг протеїну). Цей рівень різко зростає в сольовому елюаті (у 3,9 рази), що свідчить про очищення, а значить специфічність, протеїну на цьому етапі, а також про складний характер зв'язування протеїном і тіаміну, і АДФ. Через це більш ефективним елюентом в даному випадку виявляється натрій хлорид. Однозначний висновок з цих результатів поки що зробити нема можливості.

Роботи, в яких опубліковані основні наукові результати розділу

Меженська ОО, Музичка ОВ, Вовк АІ, Пархоменко ЮМ (2016) Використання афінної хроматографії для виявлення протеїнів, які проявляють спорідненість до тіаміну. Вісник Львівського університету. Серія біологічна 74(спец):160-165 Львів, 16-18 листопада

Меженская ОА, Музычка ОВ, Вовк АИ, Буник ВИ, Пархоменко ЮМ (2016) Биоспецифичность связывания протеинов с тиаминном как лигандом аффинного сорбента. Сб мат Межд научн конф молодых учёных по мед биологии ФГБУ ФНКЦ физ-хим медицины ФМБА (под ред Ильиной ЕН, Кострюковой ЕС) Москва, ФНКЦ ФХМ ФМБА России 172 с сс 91-92 Москва, 19-20 апреля

Меженська ОО, Музичка ОВ (2016) Відмінності в спектрах протеїнів взаємодіючих з сорбентами, що містять тіамін як ліганд і без нього. Актуальні

проблеми біохімії та біотехнології. Тези доповідей конференції-конкурсу молодих учених присвяченої 110-річчю з дня народження Беліцера ВО (за ред Мазанової АО та інш) Киев, Санченко с 34 Київ, 15-16 травня

4.4 Гель-фільтрація протеїнових фракцій-елюатів з т-АС та визначення молекулярної маси ТЗП

З метою очистки і визначення молекулярної маси на другому етапі виділення ТЗП ми застосовували «молекулярні сита» (альтернативні назви молекулярно-ситова хроматографія, ексклюзійна хроматографія або гель-фільтрація).

Загальний принцип цього методу доволі простий. Ступінь доступності захопленої гелем рухомої фази для розчинених речовин визначається пористістю частинок гелю і розміром молекул цих речовин. Таким чином, розподілення речовин на колонці з гелем залежить тільки від доступного для них загального об'єму рухомої фази (як у середині частинок гелю, так і поза ними). Для певного типу гелю конкретної сполуки між внутрішньою та зовнішньою рухомою фазою є функцією розміру його молекул. Завдячуючи різниці розмірів пор в окремих частинках гелю, для молекул проміжних розмірів якась доля рухомої фази доступна, якась – ні; відповідно, значення K_d (коефіцієнта розподілення (точніше коефіцієнта доступності K_{av} [314]) коливаються в діапазоні від 0 до 1. Саме ці варіації K_d дозволяють розділити в гелі сполуки за розмірами молекул.

Експериментально визначити коефіцієнт розподілення (коефіцієнт доступності) можна за формулою:

$$K_{av} = (V_R - V_0) / (V_t - V_0), \quad (4.4.1)$$

де V_R – об'єм елюенту, що вийшов з колонки до моменту появи піку, мл;

V_0 – вільний об'єм колонки, мл;

V_t – об'єм пустої колонки, що визначається її геометричними параметрами, мл.

В своїх експериментах ми використали гель Сефадекс G-150 оскільки в його пропускний діапазон вкладалися молекулярні маси відомих ТЗП (глава II). Пропускна здатність G-150 по протеїнах складає 5-300 кДа.

Далі, оскільки K_{av} є функцією молекулярної маси, можна визначити цей параметр побудувавши графік у координатах K_{av} -lgM. Для побудови калібрувального графіку використовуються протеїни з відомою молекулярною масою. Ми використали наступні протеїни: ферритин (495 кДа), каталаза (238 кДа або 246 кДа в залежності від джерела) (та її субодиниці (димер 140кДа або мономер 60 кДа)), альдолаза (158 кДа) (та її субодиниці (40 кДа)), людський сироватковий альбумін (70 кДа), бичий сироватковий альбумін (68-69 кДа), овальбумін (43 кДа) та інгібітор трипсину (22,5 кДа). Результати розділення отриманих після афінної хроматографії і специфічною, і неспецифічною елюцією на першому етапі АХ протеїнових фракцій представлено у таблиці 4.4.1.

Таблиця 4.4.1 - Молекулярні маси протеїнів, що знімаються з т-АС в процесі афінної хроматографії на I етапі елюції 1М NaCl або 10 мМ тіаміном

1М NaCl		10 мМ Тіамін	
<i>№ піку</i>	<i>кДа</i>	<i>№ піку</i>	<i>кДа</i>
1	2	3	4
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

Як бачимо з отриманих результатів, сольовий та тіаміновий елюати після ГФ також виявилися гетерогенними. Причому вони включали протеїнові піки, що

відповідають за масою результатам попередніх робіт нашої групи, у яких визначалась молекулярна маса ТЗБ (97-110 кДа, 60-75 кДа, 35-40 кДа) [7,9,313]. Крім того, такі ж маси ТЗП з різних джерел визначали й інші дослідники у своїх роботах [277-281]. Деяка різниця в отриманих результатах (\pm кДа) може пояснюватися тим, що на практиці відбуваються відхилення від ідеальної поведінки сполук через недостатньо рівномірне наповнення колонок для ГФ. З іншого боку, є ще декілька загальних рис, що об'єднують попередні результати (отримані з застосуванням неспецифічної елюції натрій хлоридом) з отриманими у рамках цієї роботи (як неспецифічною, так і специфічною елюцією на етапі АХ). Зокрема, особливу увагу звертає присутність в протеїнових елюатах з т-АС протеїну (можливо субдиниці) з молекулярною вагою 36,6-39,9 кДа. Це важливо, оскільки методом вестерн-блотингу у роботі Строкіної А.О. [313] було визначено, що антитіла до цитозольної (розчинної) ТТФ-ази зреагували на протеїн, що під час ЕФ зафіксувався саме в районі 35 кДа. Тому було припущено, що саме ця субдиниця ТЗБ є відповідальною за мембранозв'язану ТТФ-азну активність нервових клітин.

Окремо також слід обговорити пік, що виходив першим з ГФ-колони при будь-якому варіанті АХ. Під час всіх експериментів, пов'язаних з ГФ, ми постійно спостерігали, що цей пік виходить дуже швидко: на рівні з вільним об'ємом та навіть раніше за ферритин, що його було застосовано при калібровці. Феритин (495 кДа) виходив дуже швидко, практично відразу за вільним об'ємом, оскільки його маса перевищує пропускну здатність сефадекса G-150 (діапазон ефективного розділення). А пік №1 виходив швидше за феритин (саме з метою перевірки цього факту феритин застосовано при калібровці колонки). Це означає, що молекулярна маса протеїну/-нів цього піку дуже висока. Тому ми припустили, що це може бути цілий кластер пов'язаних між собою протеїнів. Те, що ми фіксували його в умовах виділення навіть після ГФ говорить про те, що кластер стабільний в умовах наших експериментів.

Припущення про кластер викликало потребу провести дослідження методом електронної мікроскопії (ЕМ). ЕМ показала результати представлені на рис. 4.4.1. Подібні комплекси за участі протеїну, який пізніше було ідентифіковано МС-аналізом в цьому зразку, отримано з інших біологічних об'єктів, зокрема з клітинних ліній [315,316].

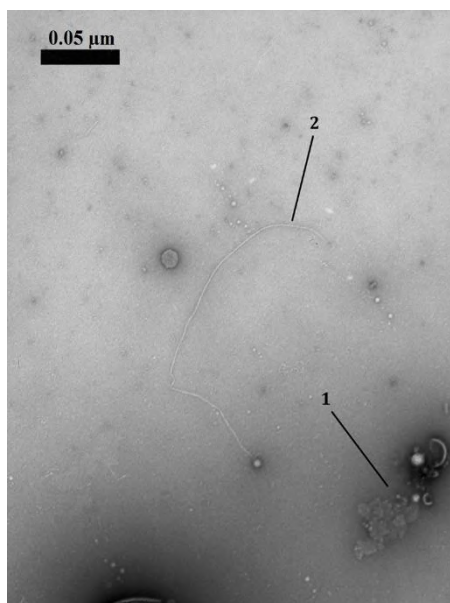
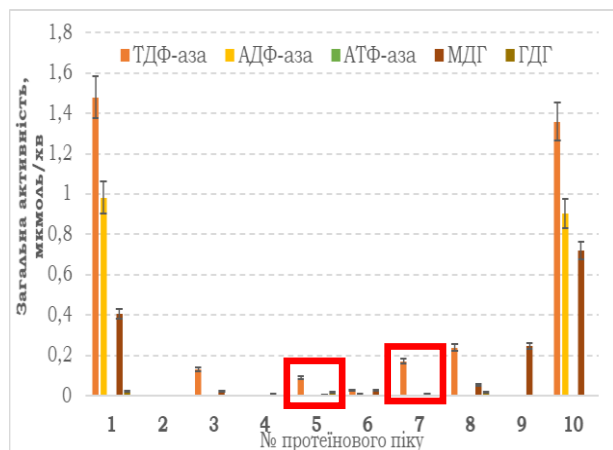
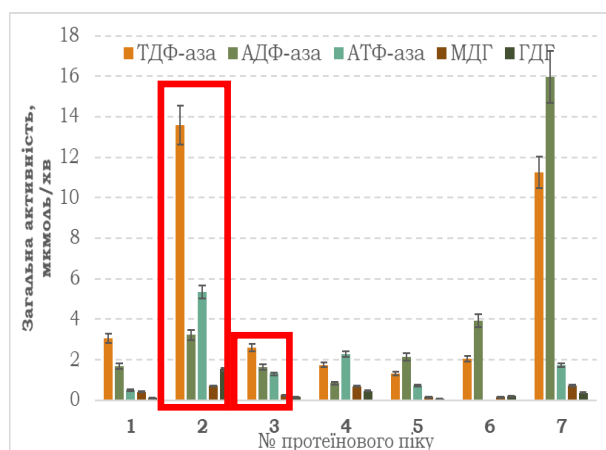


Рис. 4.4.1 – Електронна мікрофотографія протеїнової фракції >497 кДа (пік №1) після ГФ (табл. 4.4.1, рис. 4.7.1, Сольовий елюат): 1 – можливий кластер; 2 – один з розгорнутих протеїнів.

Проводячи аналіз отриманих після ГФ протеїнових фракцій (табл.4.4.1) ми визначали рівень ензиматичних активностей. При вимірюванні ензиматичних активностей вставновлено, що в піках №№ 1-3 (рис. 4.4.2б, табл.4.4.1) ТДФ-азна активність достовірно перевищує гідролазну активність по відношенню до нуклеотидів, а МДГ-активність супроводжує тіамінфосфат гідролазну і не відділяється від неї навіть після ГФ. Те ж саме стосується сольового елюату. Але наврядчи обидві активності притаманні одному і тому ж протеїну, оскільки їх співвідношення у фракціях було різним крім фракцій №№ 6-7, де воно склало $\approx 13,5$. Слід також відмітити, що рівень загальної МДГ-активності після ГФ виявився однаковим у піці №1 при використанні і специфічної, і неспецифічної елюції на першому етапі АХ (0,4 мкмоль/хв).



а



б

Рис. 4.4.2 - ензиматичні активності в протеїнових фракціях після ГФ: а - I етап афінної хроматографії NaCl, б – I етап афінної хроматографії - тіамін.

Рівень ТДФ-азної активності в піці № 1 після ГФ тіамінового елюату у порівнянні з піком № 1 сольового елюату виявився більшим у 2 рази (3,1 мкмоль/хв vs 1,5 мкмоль/хв). Також рівень цієї активності (13,6 мкмоль/хв) був беззаперечно найвищим у піці №2 (Mr ≈ 97 кДа), який і вважався ТЗБ. До речі, нинішні результати частково

можуть пояснити деякий різнобій в результатах попередніх досліджень: мономер-димер, 97-110 кДа чи 35+70-75 кДа оскільки зараз ми можемо припустити, що всі ці субодиниці можуть входити до складу кластеру, який виходить в піці № 1.

Роботи, в яких опубліковані основні наукові результати розділу

Mezhenska OO, Rebriev AV, Parkhomenko YuM (2019) Detection of new protein targets of thiamine. Матеріали XII Укр біохім конгресу Медична та клінічна хімія 3(80) (том 21, Додаток):35-36 Тернопіль, 30 вересня-4 жовтня

4.5 Вплив тіамінових сполук на активність малат- і глутаматдегідрогенази *in vitro* та *in vivo*

4.5.1 Вивчення дії тіаміну і ТДФ на МДГ і ГДГ мозку, що були виділені шляхом афінної хроматографії на т-АС

Ефекти тіамінових сполук на ізольовані з застосуванням т-АС ГДГ і МДГ досліджували з урахуванням отриманих раніше на комерційних препаратах ензимів чи частково очищених мітохондрійних екстрактах даних про діючі концентрації і умови максимізації ефектів даних сполук на досліджувані ензими [12]. У порівняльних експериментах використовували фіксовані концентрації тіаміну (0,05 мМ) і ТДФ (1 мМ), співвідношення яких імітує ситуацію *in vivo*. На рис. 4.5.1 наведені результати впливу тіаміну і/або ТДФ на активність ГДГ мозку в початкових препаратах і в елюатах з т-АС. Видно, що у вихідних препаратах тіамін і ТДФ інгібують активність ГДГ, тоді як після АХ спостерігається активація ензиму даними сполуками. Аналогічну різницю в ефекті ТДФ на ГДГ спостерігали раніше в умовах насичення субстратами очищеного комерційного ензиму (1,2-кратна активація ТДФ) і ензиму в складі мітохондрійного екстракту (1,3-кратне інгібування ТДФ) [12]. На порядок вищі ефекти ТДФ на ГДГ, виявлені в цій роботі, при АХ препаратів ГДГ мозку (рис. 4.5.1) свідчать про роль концентрації протеїну і/або ендогенних чинників, що містяться у вихідних препаратах ГДГ мозку і дисоціюють в ході АХ, в регуляції ензиму під дією ТДФ. Наприклад, можна очікувати, що вміст АДФ - активатора ГДГ - істотно вище в гомогенаті мозку, ніж в ацетонових екстрактах синаптосомної

фракції мозку. Як бачимо, ТДФ перешкоджає активації ГДГ під дією АДФ [310]. Тобто інгібуюча дія ТДФ в препаратах, що піддаються АХ може бути пов'язана з виразністю активуючого ефекту АДФ на ГДГ. Менше інгібівання ензиму ТДФ в складі синаптосомної фракції мозку (Рис. 4.5.1.a) відповідає очікуваному зменшенню вмісту АДФ в даному препараті в порівнянні з повним гомогенатом мозку, де ефект ТДФ на ГДГ істотно більш виражений (Рис. 4.5.1б). З іншого боку, активація ТДФ після АХ може бути пов'язана з полегшеною дисоціацією ГТФ - високоефективного інгібітора ГДГ. Крім впливу ендогенних регуляторів, при інтерпретації різних ефектів ТДФ на ГДГ синаптосом і гомогенату мозку (Рис.4.5.1) не можна виключити і різницю тіамінової регуляції синаптосомної і загальної ГДГ мозку - наприклад, за рахунок специфічних для синаптосом пост-трансляційних модифікацій або альтернативного сплайсингу ензиму.

Слід зазначити, що при меншому інгібуючому ефекті ТДФ на ГДГ в вихідному препараті меншою є і його активуючий вплив на ГДГ, що елююється тіаміном (рН 7,4) (Рис.4.5.1). Так, в частково очищеному препараті з мозку бика спостерігається 2-кратне інгібівання ГДГ під дією ТДФ, яке змінюється 1,5-кратною активацією в тіаміновому елюаті (рН 7,4) (Рис. 4.5.1.a). У той же час в гомогенаті мозку додавання ТДФ призводить до 20-кратного інгібівання ГДГ, а в тіаміновому елюаті (рН 7,4) даного препарату ГДГ показує 8-кратну активацію під дією ТДФ (Рис. 4.5.1б). Отримані результати свідчать про те, що аллостеричні ефекти ТДФ, як інгібуючий, так і активуючий, сильніше виражені по відношенню до ГДГ гомогенату мозку, ніж до ГДГ після ацетонової екстракції його синаптосомної фракції (Рис.4.5.1).

З рис. 4.5.1 також видно, що при хроматографії ацетонового екстракту активування ТДФ ГДГ значно вище після елюції NaCl і сечовиною (5-7-кратна активація) в порівнянні з ефектом, що спостерігається на стадії специфічної елюції тіаміном (1,5-1,7-кратна активація). При цьому в умовах відсутності ТДФ рівень активності специфічно елюйованої тіаміном ГДГ не відповідає рівню активованої ТДФ ГДГ (рис.4.5.1), виключаючи можливість того, що низька активація зумовлена вже активованим станом елюйованої тіаміном ГДГ за рахунок міцного зв'язування ензимом тіаміну. Аналогічний (1,2-кратний) рівень активації ензиму ТДФ в умовах насичення ГДГ 2-оксоглутаратом і амонієм при низькій концентрації NADH

спостерігали і раніше [12] при дослідженні очищеного комерційного ензиму або ГДГ в складі мітохондрійного екстракту. Проте, при хроматографії гомогенату мозку максимальна (8-кратна) активація ТДФ ГДГ спостерігається саме у фракції, яка елююється тіаміном (Рис. 4.5.1.в). Оскільки в цьому випадку тіамін елюює

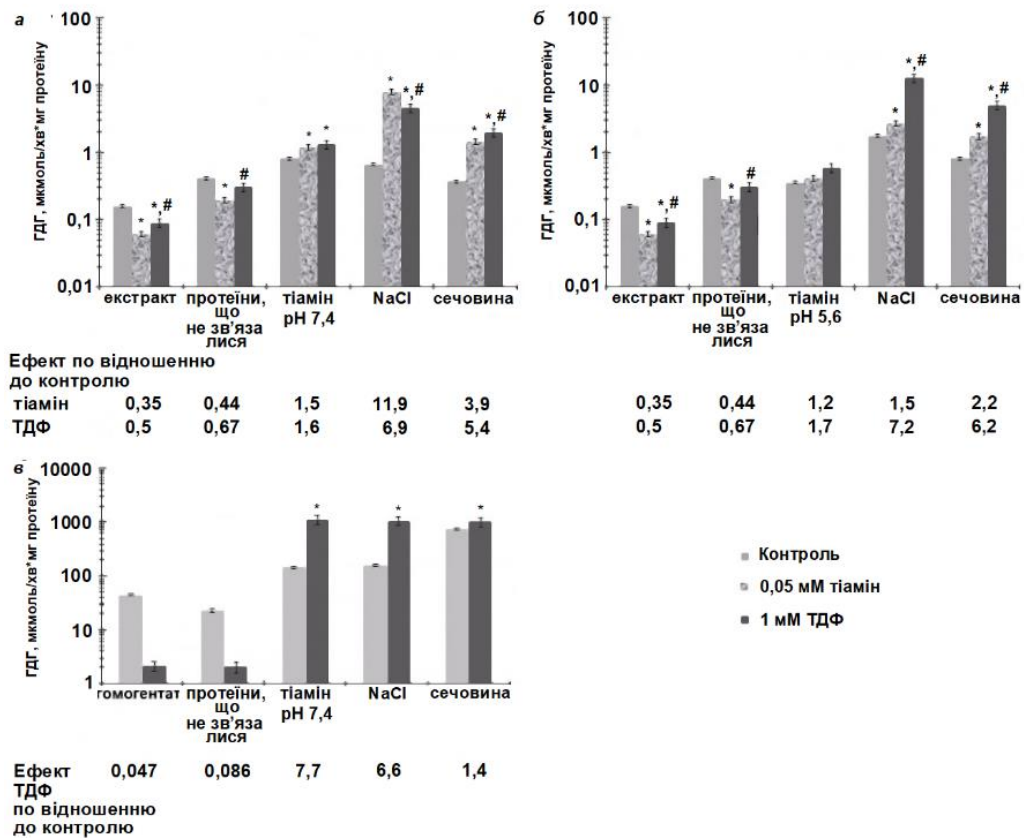


Рис. 4.5.1 - Вплив тіаміну і/або тіаміндифосфату (ТДФ) на активність глутаматдегідрогенази (ГДГ) з мозку бика або щурів, що елюються з *t*-АС в різних умовах: **а** - ефекти тіаміну і ТДФ на активність ГДГ після АХ ацетонового екстракту синапсом мозку бика при застосуванні на I етапі елюції 10 мМ розчину тіаміну, рН 7,4; **б** - ефекти тіаміну і ТДФ на активність ГДГ після АХ 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.

переважну частину ГДГ (64% від загальної активності в вихідному препараті, табл.1), можна зробити висновок, що високий активуючий ефект ТДФ визначається концентрацією ГДГ і/або її гетерологічних комплексів з іншими протеїнами. Дослідження дії тіаміну на ГДГ синапсомної фракції, яка елююється NaCl і

сечовиною (Рис. 4.5.1.а, б), підтверджує це припущення. На відміну від дії ТДФ, яке не залежить від значення рН за попередньої елюції тіаміном, активація ГДГ тіаміном в сольовому і сечовинному елюатах значна (до 12-кратної) лише після проведення тіамінової елюції при рН 7,4 (Рис. 4.5.1.а). У цих же умовах ГДГ, що елююється NaCl і сечовиною, становить значно меншу частину загальної активності ГДГ, ніж після проведення специфічної елюції тіаміном за рН 5,6. В останньому випадку, в елюатах, як показано за допомогою МС-аналізу, міститься більше МДГ2, тобто спостерігаються кращі умови для утворення гетерологічного комплексу ГДГ і МДГ2, однак питома і загальна активності МДГ, а також активація МДГ тіаміном, істотно нижче в порівнянні з тими, що спостерігаються в сольових і сечовинних елюатах після елюції тіаміном за рН 7,4 (табл.4.5.2). Таким чином, отримані результати свідчать про те, що після хроматографії на т-АС активація ГДГ тіаміном не виражена в умовах, що сприяють утворенню гетерологічного комплексу ГДГ з МДГ2 (за спеціальної елюції при рН 5,6). Навпаки, активація ГДГ тіаміном є максимальною в умовах низької загальної активності ГДГ і зниженого вмісту МДГ2 в елюатах NaCl і сечовиною (за спеціальної елюції при рН 7,4) (табл.4.5.1) У зв'язку з цим можна припустити, що тіамін, аналогічно МДГ2, стабілізує ГДГ в NaCl і сечовинних елюатах, здатних викликати часткову дисоціацію і/або денатурацію ГДГ.

Таблиця 4.5.1. - Активність глутаматдегідрогенази (ГДГ) і унікальні для ГДГ пептиди в елюатах з т-АС за АХ ацетонового екстракту синапсом мозку бика

Протеїнова фракція	Питома активність ГДГ		Загальна активність ГДГ		Кількість пептидів ГДГ
	нмоль/хв на мг протеїну	%	нмоль/хв	%	
І етап елюції: 10 мМ тіамін, рН 7.4					
Ацетоновий екстракт	19±1,5	100	782±63	100	8
10 мМ тіамін	12±2	64	304±51	39	1
1М NaCl	14±4	75	36±2	5	1
2М сечовина	2±0,5	11	5±1	2	4
І етап елюції: 10 мМ тіамін, рН 5.6					
Ацетоновий екстракт	14±1	100	596±48	100	8
10 мМ тіамін	6±2	43	148±49	25	6
1М NaCl	16±5	114	84±27	14	4
2М сечовина	21±6	150	230±67	39	6

Стимулюючий ефект тіаміну на активність МДГ різних протеїнових препаратів характеризується менш складними закономірностями, ніж дія тіаміну на активність ГДГ. Відсутність ефекту тіаміну на активність МДГ вихідних препаратів, що включають як МДГ1, так і МДГ2, узгоджується з раніше охарактеризованою різнонаправленістю дії тіаміну (пригнічення МДГ1 і активація МДГ2) на дані ізозими [12]. Це підтверджує і максимальне (9-кратне) підвищення МДГ активності тіаміном (Рис. 4.5.2,*б*) за спеціальної елюції на цій стадії МДГ2 при рН 5,6 (табл. 4.5.2). Коелюція МДГ1 і МДГ2 при елюції розчином тіаміну (рН 7,4) знижує спостережувану в присутності тіаміну активацію (до 7-кратної, Рис. 4.5.2.*а*), що добре відповідає накладенню інгібування МДГ1 тіаміном на сумарний ефект тіаміну у фракції, що містить обидві ізоформи ензиму (табл. 4.5.2). У всіх випадках, тобто при хроматографії як синаптосомної фракції мозку, так і гомогенату мозку, максимальний

Таблиця 4.5.2. - Активність малатдегідрогенази (МДГ) і унікальні для цитоплазматичної (МДГ1) і мітохондрійної (МДГ2) ізозимів пептиди в елюатах з т-АС за АХ ацетонового екстракту синаптосом мозку бика.

Протеїнова фракція	Питома активність МДГ		Загальна активність МДГ		Кількість пептидів МДГ	
	нмоль/хв на мг протеїну	%	нмоль/хв	%	МДГ1	МДГ2
І етап елюції: 10 мМ тіамін, рН 7.4						
Ацетоновий екстракт	191±9	100	7994±399	100	2	3
10 мМ тіамін	461±0,5	279	11872,1±12	148,5	2	1
1М NaCl	352±134	213	886,2±337	11,1	0	2
2М сечовина	59±21	36	145,1±50	1,8	0	2
І етап елюції: 10 мМ тіамін, рН 5.6						
Ацетоновий екстракт	160±3	100	6599±329	100	2	3
10 мМ тіамін	16±1	10	385±23	6	0	4
1М NaCl	32± 6	20	167±32	2,5	3	5
2М сечовина	29±5	18	32±5	0,5	1	5

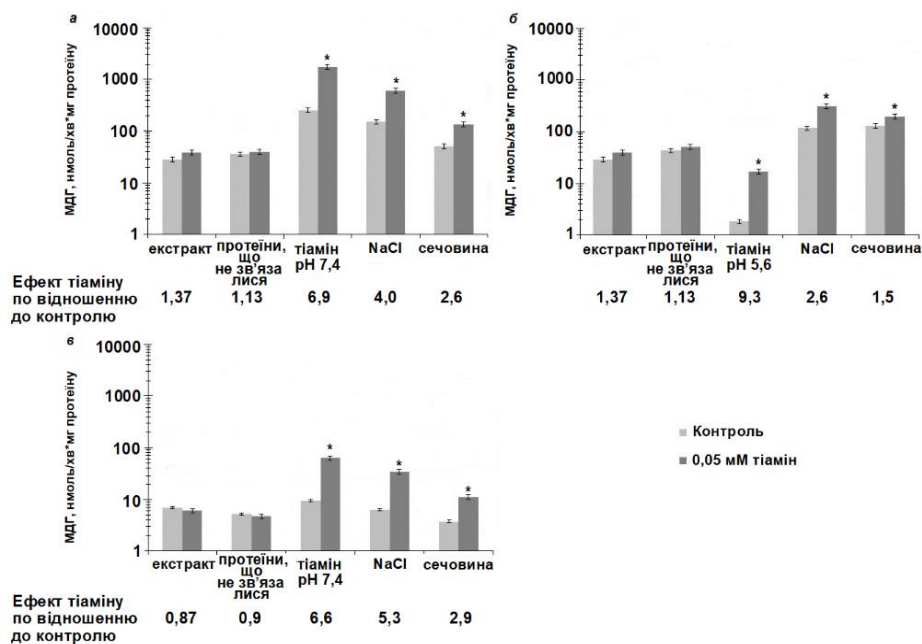


Рис. 4.5.2 - Вплив тіаміну (0,05 мМ) на активність малатдегідрогенази (МДГ) з мозку бика і щурів, що елюються з т-АС в різних умовах: **а** - ефект тіаміну на активність МДГ після АХ ацетонового екстракту синапсом мозку бика при застосуванні на I етапі елюції 10 мМ розчину тіаміну, рН 7.4; **б** - ефект тіаміну на активність МДГ після АХ 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.

ефект тіаміну на активність МДГ спостерігається у фракції, елюованій з т-АС високою концентрацією тіаміну, а елюція NaCl і, особливо, сечовиною призводить до значного зниження цієї дії тіаміну (рис. 4.5.2), що свідчить про часткову десенситизацію МДГ2 до дії тіаміну після елюції NaCl або сечовиною.

4.5.2 Дослідження змін активності МДГ і ГДГ в умовах експериментальної недостатності тіаміну

Крім експериментів з застосуванням виділених протеїнів, дуже важливим напрямком наших досліджень були експерименти *in vivo*. Для вирішення поставленого в цьому дослідженні завдання, а саме оцінити ймовірність впливу

забезпеченості тканини мозку щурів тіаміном на активність МДГ і ГДГ *in vivo*, ми навмисно використовували моделі дефіциту тіаміну в організмі тварин, зокрема модель класичного В₁-авітамінозу. Однак розуміючи, що за 4 тижні утримання тварин на безтіаміновій дієті знижується не тільки забезпеченість тканин тіаміном, але і порушуються багато енергетичних процесів, а, можливо, відбуваються і якісь зміни в клітинних структурах, ми половині з групи В₁-дефіцитних тварин за добу до декапітації одноразово вводили 200 мкг тіаміну/кг маси тварин. При цьому ми припускали, що якщо зниження активності досліджуваних ензимів зумовлене тільки збідненням тканини мозку на тіамін, то введення високої дози вітаміну призведе до нормалізації цих активностей. Дані, отримані на моделі В₁-авітамінозу наведені в табл.4.5.3.

Таблиця 4.5.3 - 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 щурам 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 $p < 0,05$.

Як видно з наведених у таблиці даних, при класичному В₁-авітамінозі спостерігається істотне зниження всіх досліджених показників. Після одноразового введення високої дози тіаміну всі показники підвищуються, проте достовірно відрізняються від таких в групі В₁-авітамінозних тварин тільки показники «Вільні SH-групи» і «Активність МДГ». Одноразове введення тваринам тіаміну не призвело до повної нормалізації рівня ТДФ, активності ТПК і ГДГ. Це може свідчити про те, що при жорсткому тривалому В₁-авітамінозі відбуваються стабільні зміни в системі обміну тіаміну, для нормалізації яких буде потрібен більш тривалий час.

Таким чином, дослідження, проведені на моделі дефіциту тіаміну на щурах, підтверджують отримані *in vitro* дані про можливість впливу тіаміну і його біологічно активних похідних на активність МДГ і ГДГ. Причому в умовах суворого дефіциту тіаміну зміни у функціональній активності окремих протеїнів можуть бути важко зворотними (ГДГ, табл.4.5.3).

Роботи, в яких опубліковані основні наукові результати розділу

Меженская ОА, Алёшин ВА, Кэне Т, Артюхов АВ, Буник ВИ (2020) Регуляция малатдегидрогеназ и глутаматдегидрогеназы мозга животных тиамином *in vitro* и *in vivo*. Биохимия 85(1):34–48

Меженская ОА, Буник ВИ, Пархоменко ЮМ (2015) Выявление новых протеинов мозга, проявляющих аффинность к тиамину. Актуальные проблемы современной биохимии и клеточной биологии: материалы III Межд научн конф (под ред Ушаковой ГА) Днепропетровск, издательство Арбуз 192 с сс 74-76 Днепропетровск, 24-25 сентября

4.6 МС-ідентифікація ізозимів/ізоформ малат дегідрогенази, що проявляють спорідненість до тіаміну, з використанням комерційного препарату МДГ

Визначення МДГ активності в елюатах з т-АС

У процесі досліджень, що проводяться нашою групою, у свій час несподіваним виявилось те, що попередній МС-аналіз показував дуже високу ймовірність присутності у піку елюйованому з т-АС і що містив протеїни, які виявляють тіамінфосфатазні активності, - малатдегідрогенази (МДГ). Присутність в елюатах з т-АС МДГ, як і деяких інших протеїнів, в тому числі з класу дегідрогеназ, було також показано MALDI-TOF мас-спектрометричним аналізом, проведеним фахівцями у Німеччині і Бельгії [12]. Нарешті, дослідження, проведені з використанням двох сорбентів: т-АС і сорбенту без тіаміну як ліганду (розділ 4.3) підтвердили специфічність зв'язування протеїнів з МДГ активністю на т-АС саме з тіаміном. Оскільки, в клітинах тварин існує кілька ізоформ МДГ і вони совиділяються при грубому очищенні цього ензиму, ми вирішили перевірити, чи властива висока

афінність до тіаміну будь-якій з ізоформ МДГ, чи вона властива тільки певним з ізозимів. З цією метою ми піддали АХ комерційний препарат МДГ з серця свині і провели ідентифікацію протеїнів в елюатах з т-АС. У цьому розділі містяться результати цих досліджень. На рис. 4.6.1 приведено дані щодо виходу фракцій протеїнів з т-АС в процесі АХ комерційного препарату МДГ.

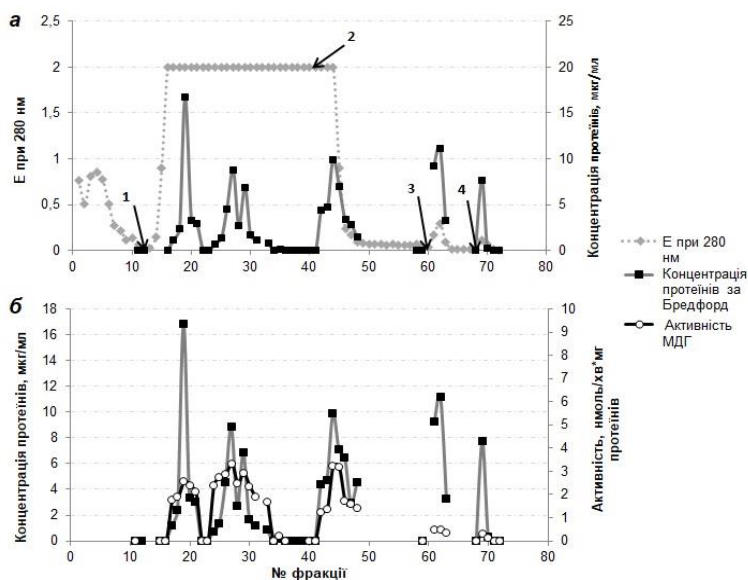


Рис. 4.6.1. – АХ на т-АС препарату МДГ з серця свині: **а** - вихід протеїну, контрольований двома різними методами - вимірювання при 280 нм, аналіз вмісту протеїнів у фракціях по Бредфорд (реєстрація при довжині хвилі 595 нм); стрілки вказують на зміну елююючого розчину: 1 - 10 мМ тіамін, 2 - 10 мМ трис-НCl буфер (рН 7,4), 3 - 1М NaCl, 4 - 2М сечовина; **б** - активність МДГ у фракціях

Аналіз вмісту протеїну у фракціях показав, що розчином тіаміну знімається з т-АС кілька окремих протеїнових піки з малатдегідрогеназною активністю (Рис.4.6.1). У табл. 4.6.1 наведено баланс хроматографічного розділення протеїнів комерційного препарату МДГ. Як бачимо з даних, наведених на рис. 4.6.1 і в табл. 4.6.1, більше половини протеїнів з МДГ активністю нанесеного препарату не зв'язалися з сорбентом. Однак практично всі протеїни з МДГ активністю, що зв'язалися з т-АС, елюються з колонки розчином тіаміну. Судячи з даних табл. 4.6.1, близько 45% малатдегідрогеназної активності нанесеного на т-АС препарату виявляється в елюатах з т-АС. Причому, після проходження через колонку з т-АС питома активність протеїнів знижується. В процесі двох наступних етапів елюції розчинами NaCl і сечовини з т-АС знімаються лише слідові кількості протеїнів. Ці результати підтверджують високу афінність до тіаміну протеїнів з малатдегідрогеназною активністю. Всі протеїнові фракції з МДГ активністю, що були елюйовані розчином тіаміну, ми об'єднували і позбавлялися від тіаміну на ультрафільтрах типу Амікон. Цим також досягалося концентрування протеїнів. Отримані фракції протеїнів підда-

Таблиця 4.6.1. - Вихід протеїнів з т-АС при нанесенні на колонку комерційного препарату МДГ

Препарат/фракція	МДГ активність (А), нмоль/хв*мг протеїну	Концентрація протеїну, мг/мл	V, мл	A заг., мкмоль/хв	Вихід МДГ активності, %
Нанесено на т-АС	92,50	1,70	24	3774,0	100
Протеїни, що не зв'язалися	54,85	1,46	25,4	2034,1	53,9
10 мМ тіамін рН7.4	62,1	0,28	98,5	1712,7	45,4
1М NaCl	2,49	0,15	13	4,9	0,13
2М сечовина	0,75	0,13	21,5	2,1	0,06

вали дослідженню з застосуванням методів одновимірного і двовимірного електрофорезу і мас-спектрометричного аналізу.

МС-ідентифікація ізозимів/ізоформ малатдегідрогенази, здатних зв'язуватися з тіаміном

При розділенні протеїнів методом одновимірного денатуруючого електрофорезу по Леммлі прояв протеїнових смуг проводили з використанням двох прийомів: традиційний прояв розчином Кумассі і більш чутливе фарбування сріблом. На рис.4.6.2 представлені результати одновимірного електрофорезу за Леммлі. Як видно з цих даних, препарат, що наноситься на колонку гетерогенний. Найбільш інтенсивні протеїнові смуги спостерігаються в районі 52 і 26 кДа, менш інтенсивні смуги, що відповідають молекулярній масі 70-72 кДа і відповідної субодиниці (35-36 кДа). Цікавим є наявність смуги 140 кДа як на треку, в який наносився вихідний, комерційно доступний препарат малатдегідрогенази (3), так і на треках, в які наносили тіамінові елюати з т-АС (4 і 5). Це може говорити, що з т-АС зв'язується тетрамірна форма МДГ, але не можна виключати можливість агрегування протеїну МДГ в процесі концентрування на фільтрах Амікон. МС-аналіз виявив також інший цікавий результат. Смуги, що відповідають 140, 72 і 36 кДа в треках 4 і 5 проявилися чіткіше, ніж у треку з вихідним препаратом. Ймовірно це пов'язано з їх частковим очищенням на афінному сорбенті. Результати одновимірного електрофорезу вихідного препарату МДГ і сумарної фракції протеїнів, які знімаються з афінного

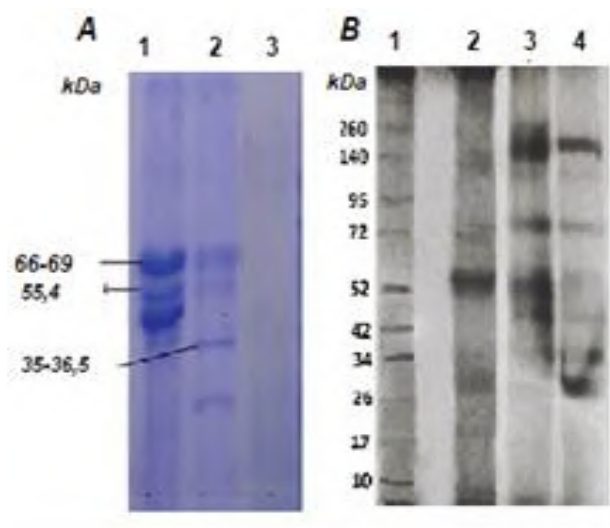


Рис. 4.6.2 – Одновимірний ДСН ПААГ електрофорез вихідного комерційного препарату МДГ та МДГ, елюйованих з т-АС:

A - Фарбування протеїнів розчином Кумасі. 1 - суміш маркерних протеїнів: бичачий сироватковий альбумін ($M_n = 68-69$ кДа), ГДГ (55,4 кДа), ліпоамідегідрогеназа (35-36,5 кДа); 2 - комерційна МДГ з серця свині; 3 - протеїни, елюйовані з т-АС за допомогою тіаміну (рН 7,4); *B* - Фарбування протеїнів срібним реагентом

(ProteoSilver™ Silver Stain Kit (Sigma®)). 1 - маркери молекулярної маси Multicolor Broad Range Protein Ladder Spectra™ від Thermo Fisher Scientific™; 2 – комерційна МДГ з серця свині; 3 і 4 - протеїни, елюйовані з т-АС за допомогою тіаміну (рН 7,4) (різні експерименти).

сорбенту розчином тіаміну, продемонстрували, що практично всі протеїнові фракції, виявлені в комерційному препараті МДГ, присутні і в елюатах з т-АС. Однак можна відзначити деякі відмінності. По-перше, після АХ змінюється співвідношення інтенсивності протеїнових смуг, по-друге, явно проглядається нова смуга з молекулярною масою 42 кДа. Спостережувані зміни можна пояснити різною спорідненістю до тіаміну окремих ізомерів, що призводить до концентрування деяких з них на т-АС.

Відомі ізоформи МДГ різної клітинної локалізації і з різних джерел відрізняються між собою не тільки за молекулярною масою, але і за ізоелектричною точкою. Розділити елюйовані з т-АС протеїни за цими двома показниками (молекулярна маса, ізоелектрична точка) можна було за допомогою 2D-електрофорезу, тому об'єднані і сконцентровані фракції протеїнів, елюйовані розчином тіаміну, далі піддали двовимірному електрофорезу, щоб підвищити точність ідентифікації. Протеїни, сфокусовані в плямах 1-8, які були виявлені на 2D-електрофореграммі (рис. 4.6.3), були піддані мас-спектрометричному дослідженню.

Основні результати аналізу протеїнів методом MALDI TOF MS, які дуже строго відповідали усім параметрам, представлені в табл. 4.6.2. Як видно з даних табл. 4.6.2, з афінним сорбентом зв'язалося 4 ізоформи МДГ. Слід зазначити, що на даний момент відомо 3 ізоформи (продукти різних генів) МДГ: Malate dehydrogenase, cytoplasmic (Mdh1 або просто Mdh); Malate dehydrogenase, mitochondrial (Mdh2 або

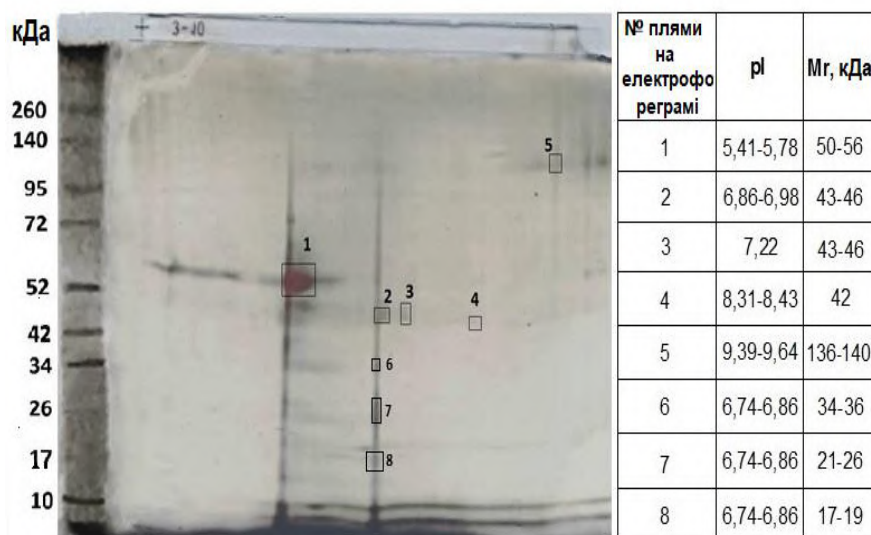


Рис. 4.6.3 - Скановане зображення 2D-електрофореграми протеїнів комерційного МДГ з серця свині, елюйованих з *m*-АС 10 мМ тіаміном (рН 7,4) та параметри плям. Прямокутники вказують на протеїнові плями, які були вирізані з гелю для аналізу методом MALDI TOF MS

Mor1); Malate dehydrogenase 1B (Mdh1b або rCG_22254). У кожного ізоферменту (ізозиму) існує велика кількість ізоформ, сплайс-варіантів і варіантів з різними пост-трансляційними модифікаціями.

Пляма №1 на рис. 4.6.3 має найбільшу площу. Це дає підставу зробити висновок, що саме цей протеїн, який згідно з даними МС-аналізу відповідає протеїну МДГ1В (табл.4.6.2), становить основу протеїнів-компонентів досліджуваного комерційного препарату МДГ з МДГ-активністю, здатних зв'язувати тіамін.

Сучасні відомості про МДГ1В з свині, як і про цей ізозим з інших організмів, вельми обмежені. Ці ізоформи мають молекулярні маси в діапазоні 52-58 кДа, а їх субодиниці - 26-29 кДа. Із застосуванням інструменту BLAST від бази даних UniProt вдалося з'ясувати, що Putative malate dehydrogenase 1B from *Sus scrofa* на 83,5% є гомологічною людській ізоформі с(3) Putative malate dehydrogenase (МДГ1В) from *Homo sapiens* (Human). Найвищі рівні експресії згідно UniProt та Genecards характерні для наступних тканин: гіпофіз, кора, сім'яники, епітеліальні клітини бронхів і легенів. Цей протеїн може бути як цитоплазматичним, так і мембранозв'язаним, а також таким, що секретується як показує ресурс Phobius.

Всі інші протеїнові плями, що проявилися на 2D-електрофореграмі, виражені набагато слабкіше, і відповідають слідам протеїнів, які виділяються разом з МДГ1В при отриманні препарату МДГ з серця свині. Крім МДГ1В ще 3 різні ізоформи МДГ ідентифіковано в плямах 2D-електрофореграми на рис. 4.6.3, а саме

Таблиця 4.6.2 - Ензими з МДГ-активністю, визначені шляхом МС-аналізу після 2D-електрофорезу в тіаміновому елюаті, отриманому з Т-АС

№ протеїну	Назва протеїну	Організм	Молекулярна маса, Да	Score	Matches (Кількість пептидів)	Середнє значення рІ (діапазон за різними системами) (розрахований Mascot рІ)	% покриття АК-послідовності	Посилання
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Пляма № 1</i>								
1	Putative malate dehydrogenase 1B	<i>Sus scrofa</i>	55984	82	16	5,59 (4,03-6,16) (6,3)	24%	https://www.uniprot.org/uniprot/A0A287AW19 , https://www.uniprot.org/uniprot/F1SHD
<i>Пляма № 2</i>								
2	Gastric triacylglycerol lipase precursor Alternative name(s): Lingual lipase, lipase F, gastric type, RNLIP; Rnlp	<i>Rattus norvegicus</i>	44559	54	11	5,83 (3,598 -6,616) (6,12)	27%	https://www.uniprot.org/uniprot/P04634 ,
		<i>Homo sapiens</i>	45238	42	10	6,55 (3,757 -7,374) (6,84)	26%	https://rgd.mcw.edu/rgdw/eb/report/gene/main.html?id=708441
3	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 3 isoform X1 ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 3 isoform X3 ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 3 isoform X2	<i>Sus scrofa</i> , <i>Capra hircus</i> - isoform X5;	52128	73	11	6.11 (4.285-6.882) (6.80)	31%	https://www.uniprot.org/uniprot/A0A481B758
		<i>Pantholops hodgsonii</i> - isoform X4	37054	55	9	5.68 (4.297-6.291) (5.91)	32%	https://www.uniprot.org/uniprot/A0A480K0S2
			41068	52	9	6.18 (4.338-6.971) (6.46)	29%	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_020938920.1?report=genbank&log\$=protalign&blast_rank=1&RID=JWCCSSC K014
<i>Пляма № 4</i>								
4	PREDICTED: malate dehydrogenase, mitochondrial isoform X1	<i>Ovis aries</i>	42173	80	6	7,12 (4,484 -8,603) (8,23)	22%	https://www.uniprot.org/uniprot/W5PWO5

1	2	3	4	5	6	7	8	9
5	Gastric triacylglycerol lipase (precursor) Alternative name(s): Lingual lipase, lipase F, gastric type, RNLIP; Rnlp	<i>Rattus norvegicus</i> , <i>Homo sapiens</i>	44559 45238	54 42	11 10	5,83 (3,598-6,616) (6,12) 6,55 (3,757-7,374) (6,84)	27% 26%	https://www.uniprot.org/uniprot/P04634 , https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=708441
6	Lysosomal acid lipase/cholesterol ester hydrolase precursor	<i>Sus scrofa</i>	40362	42	6	6,55 (3,757-7,374) (6,84)	28%	https://www.uniprot.org/uniprot/A0A286ZVK3 , https://www.uniprot.org/uniprot/A0A287ABD8 , https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0016788 , https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/annotations?geneProductId=A0A286ZVK3
<i>Пляма № 6</i>								
8	Malate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Sus scrofa</i> , <i>Felis catus</i> +14 organisms	35557	97	6	7,88 (4,803-9,244) (8,93)	39%	https://www.uniprot.org/uniprot/P00346
9	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 3 isoform X3	<i>Sus scrofa</i>	37054	45	7	5.68 (4.297-6.291) (5.91)	26%	https://www.uniprot.org/uniprot/A0A480K0S2
10	L-lactate dehydrogenase A chain	<i>Sus scrofa</i>	36595	20	2	7,31 (4,616-8,458) (8,18)	11%	https://www.uniprot.org/uniprot/P00339
<i>Пляма № 7</i>								
11	Mitochondrial malate dehydrogenase 2, NAD, partial	<i>Equus caballus</i>	28416	57	4	<u>6,53</u> (4,262-7,492) (7,12)	31%	https://www.uniprot.org/uniprot/F6TYW4

в плямах № 4, № 6 та №7. Та обставина, що ці протеїни зв'язалися з т-АС і були елюйовані тіаміном, може свідчити про наявність у них сайтів афінних до тіаміну. У цьому плані становить інтерес присутність у тіаміновому елюаті з т-АС такого протеїну як лінгвальна ліпаза – плями 2 та 4 на рис. 4.6.3, у якого також передбачається наявність МДГ-активності (згідно UniProt, визначено за допомогою

біоінформативних підходів). Відомо, що цей ензим і його гомологи мають також естеразну активність. Ізозими/ізоформи Lipf і ортологи цього ензиму у інших видів мають молекулярні маси 40-50 кДа, є мономерами, 4 залишки N-глікозильовані. У глікозильованому стані протеїн може мати молекулярну масу 52 кДа.

Крім ліпази в елюатах з т-АС виявлено ще один протеїн, в якому за аналогією з його людським ортологом (73,7% ідентичності BLAST, CLUSTALO) комп'ютерний аналіз та отримання рекомбінантиних протеїнів людини виявили наявність лактат/малат дегідрогеназного домену. МС-аналіз передбачає наявність в елюатах декількох ізоформ протеїну Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 3 (UEV-3) в плямах №№ 2 і 6 (рис. 4.6.3, табл.4.6.2), який також має альтернативну назву EV and lactate/malate dehydrogenase domain-containing protein бо весь С-кінець цього протеїну представляє собою ЛДГ/МДГ-домен. Причому UEV-3 може бути екстрацелюлярним/секретуємим протеїном, як і лінгвальна ліпаза. При цьому присутність МДГ поза клітиною показано експериментально [317,318]. Звертає увагу, що в плямі № 1 МС-аналіз також виявив наявність третьої складової системи убіквітинілювання протеїнів, а саме таких ензимів, як E3 убіквітинлігази. Виявлені E3 протеїнубіквітинлігази можуть бути пов'язані з E2-компонентом UEV-3 функціонально. Причому всі ці протеїни містять RING-домен відповідальний за механізм каталізу властивий саме цьому типу E2 і E3-компонентів убіквітин-лігазної системи.

Крім малатдегідрогеназ в елюатах з т-АС при використанні для АХ комерційного препарату МДГ були визначені інші представники класу дегідрогеназ в основному NAD/NADP-залежні за рідким виключенням (пролін/гідроксипролін і сукцинат дегідрогенази, табл. 4.6.2). Так, зовсім не викликало подиву присутність в результатах ЛДГ. Оскільки МДГ еволюційно походить від ЛДГ і є членом саме ЛДГ-сімейства протеїнів, а Mascot при ідентифікації бачить саме гомологічні ділянки в протеїнах, був отриманий цей результат. Тому, при інтерпретації результатів мас-спектрометрії, так важливо було враховувати в комплексі абсолютно всі нюанси експерименту, а не тільки параметри електрофорезу і Score. Отже, як показують результати МС-аналізу (табл. 4.6.3) смузі 140 кДа (рис. 4.6.2)

Таблиця 4.6.3 – Інші ензими класу дегідрогеназ виявлені МС-аналізом в тіаміновому елюаті з т-АС в експериментах з АХ комерційного препарату МДГ

№ протеїну	Назва протеїну	Організм	Молекулярна маса, Да	Score	Matches (Кількість пептидів)	Середнє значення рІ (діапазон за різними системами) (розрахований Mascot)	% покриття АК-послідовності протеїну	№ плями, у якій протеїн було ідентифіковано	Посилання
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Sus scrofa</i> , <i>Bos Taurus</i> +5	35813 (35845,...)	49	5	7,62 (4,581 - 8,707) (8,51)	23%	6	https://www.uniprot.org/uniprot/P00355
2	11-cis retinol dehydrogenase (retinol dehydrogenase 5) PREDICTED: retinol dehydrogenase 16-like	<i>Bos taurus</i>	35015 39642	34 42	4 7	8,3 (4,723-9,398) (9,2) 7,92 (4,317-9,205) (8,98)	19% 29%	4 4	https://www.uniprot.org/uniprot/Q27979 https://www.uniprot.org/uniparc/UPI0004D0AB69
3	3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (NADPH-dependent 3-ketosteroid reductase HSD3B3)	<i>Mesocricetus auratus</i>	41780	32	4	7,79 (4,319-8,863) (8,73)	17%	4	https://www.uniprot.org/uniprot/O352966za
4	Alcohol dehydrogenase E chain	<i>Equus caballus</i>	39910	20	2	7,14 (4,452-8,72) (8,31)	10%	4	https://www.uniprot.org/uniprot/P00327
5	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial	<i>Sus scrofa</i>	18506	23	3	9,34 (9,343-10,39) (9,87)	45%	5	https://www.uniprot.org/uniprot/D0VWV4
6	L-lactate dehydrogenase A chain	<i>Sus scrofa</i>	36595	20	2	7,31 (4,62-8,46) (8,18)	11%	6	https://www.uniprot.org/uniprot/Q3T056

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
7	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron- sulfur subunit, mitochondrial	<i>Acinonyx jubatus</i>	33448	48	8	8,15 (4,387- 9,4) (9,17)	42%	5	https://www.uniprot.org/uniparc/UPI00072E1DCA
8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	<i>Bos taurus</i>	21775	24	2	7,99 (4,46- 8,95) (8,82)	21%	8	https://www.uniprot.org/uniprot/Q02369
9	PREDICTED: glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial-like isoform X2	<i>Macaca nemestrina</i>	23403	44	3	5,83 (3,6 - 6,62) (7,0)	18%	8	https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2K6DLD1
10	PREDICTED: glycine dehydrogenase (decarboxylating), mitochondrial isoform X2	<i>Rattus norvegicus</i>	96440	28	6	6,83 (4,29 -7,93) (7,62)	7%	2,4	https://www.uniprot.org/uniparc/UPI00005062D0
11	PREDICTED: proline dehydrogenase 1, mitochondrial isoform X2	<i>Rattus norvegicus</i>	61410	32	10	6,15 (4,18- 6,91) (6,46)	20%	4	https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0G2K2S1
12	Hydroxyproline dehydrogenase	<i>Rattus norvegicus</i>	50970	20	3	7,47 (4,4- 8,83) (8,6)	12%	1	https://www.uniprot.org/uniprot/Q2V057

крім МДГ2 (<https://www.rcsb.org/structure/4wlu>) відповідають, ЛДГ та СДГ, що присутні в складі комерційного препарату МДГ і молекулярна маса яких складає 140 кДа (рис. 4.6.3, пляма 5). При цьому МДГ2, що може складатися з чотирьох субодиниць, в плямі 5 пошуковиком виявлена не була. Причин може бути кілька: 1) належність протеїну протеомові іншого виду; 2) PubMed ID is not available (<http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?tabtoshow=Current&grid=BFF18144>); 3) великий ступінь подрібненості можливої чотирьохсубодиничної мітохондрійної МДГ в умовах нашого експерименту, через що вона у вигляді окремих субодиниць була ідентифікована в інших плямах; 4) гомологічність МДГ з ЛДГ.

В результатах присутні деякі інші протеїни, які можуть слугувати як непрямі підтвердження отриманих результатів. Мається на увазі присутність функціонально-

Таблиця 4.6.4 – Інші протеїни, ідентифіковані МС-аналізом в тіаміновому елюаті з т-АС в експериментах з АХ комерційного препарату МДГ

№з/п	Назва протеїну	Організм	Молекулярна маса, Да	Score	Matches (Кількість пептидів)	Середнє значення рІ (діапазон за різними системами) (розрахований Mascot рІ)	% покриття АК-последовності протеїну	Посилання
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein (Solute carrier family 25 member 11)	<i>Bos taurus</i>	34150	21	2	9,49 (9,491 - 10,372)(9,89)	13 %	https://www.uniprot.org/uniprot/P22292
2	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	<i>Elephantulus edwardii</i>	48789	46	8	7,92 (4,998 - 9,141) (8,89)	22 %	https://www.uniprot.org/uniprot/arc/UPI0003F0ACCA
3	Pyridoxal kinase	<i>Rattus norvegicus</i>	34886	20	3	6,04 (4,29-6,82) (6,32)	12 %	https://www.uniprot.org/uniprot/O35331
4	Solute carrier family 25 member 36	<i>Manis javanica</i> + 2 organisms	43793	42	7	8,92 (4,64-9,67) (9,56)	34 %	https://www.uniprot.org/uniprot/arc/UPI000813ABAA
5	Solute carrier family 25 member 39	<i>Homo sapiens</i>	39223	30	4	9,12 () (9,68)	18 %	https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BZJ4
6	Inorganic pyrophosphatase	<i>Pongo abelii</i>	32722	32	5	5,44 (4,12-6,1) (5,66)	32 %	https://www.uniprot.org/uniprot/Q5R8T6

1	2	3	4	5	6	7	8	9	
7	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) kinase isozyme 1, mitochondrial Pyruvate dehydrogenase [lipoamide] kinase isozyme 2, mitochondrial	<i>Mus musculus</i> + 2 organisms	48964	28 52	5 8	7,45 (4,16-8,45) (8.36) 6,09 (3,89-6,91) (6,4)	23 26	% %	https://www.uniprot.org/uniprot/Q8BFP9 https://www.uniprot.org/uniprot/arc/UPI0002A91578
8	Phosphotriesterase-related protein	<i>Bos taurus</i>	39073	20	2	5,78(4,143-6,545) (6,06)	11	%	https://www.uniprot.org/uniprot/rot/A6QLJ8
9	Vitamin D binding protein	<i>Bos taurus</i>	53626	8	5	5,54 (3,58-5,89) (5.75)	16	%	https://www.uniprot.org/uniprot/arc/UPI0000616878
10	NF-kappa-B essential modulator	<i>Mus musculus</i> , <i>Rattus norvegicus</i>	47942	26	3	5,43 (4,42-5,84) (5,61)	10	%	https://www.uniprot.org/uniprot/rot/O88522
11	Tumor protein p53-inducible protein 13	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	20880	46	8	10,46 (10,456 - 11,234) (10,65)	54	%	https://www.uniprot.org/uniprot/arc/UPI0001554D16
12	CCAAT/enhancer-binding protein zeta	<i>Cavia porcellus</i> (Guinea)	120644	52	15	5,64 (4,54-6,18) (5.84)	21	%	https://www.uniprot.org/uniprot/rot/H0WC93
13	Growth/differentiation factor 2	<i>Homo sapiens</i>	47291	27	6	5,75 (4,2-6,49) (6.03)	20	%	https://www.uniprot.org/uniprot/rot/Q9UK05
14	Brain-derived neurotrophic factor precursor	<i>Sus scrofa</i> + 2 organisms	28269	42	8	8,06 (4,57-9,21) (9.01)	41	%	https://www.uniprot.org/uniprot/arc/UPI000012687F

1	2	3	4	5	6	7	8	9
15	Plasminogen-like protein A	<i>Homo sapiens</i>	10908	25	2	5,9 (4,31-6,53) (6,11)	36%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q15195
16	Alpha-2-antiplasmin precursor	<i>Bos taurus</i>	54676	6	4	5,27 (4,42-5,71) (5,45)	7%	https://www.uniprot.org/uniprot/arc/UPI000012500E
17	DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial	<i>Mus musculus</i>	52410	27	4	8,48 (4,78-9,61) (9,34)	12%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q99M87
18	<u>Matrix metalloproteinases</u> - 9, -19, -27	<i>Bos taurus</i> + 2 organismes	79038	21, 42, 30	2,10,3	5,37 (3,74-5,91) (5,59)	5%, 26%, 8%	https://www.uniprot.org/uniprot/P52176
19	Metalloproteinase inhibitor 1	<i>Sus scrofa</i>	23083	27	3	7,27 (3,39-8,84) (8,47)	22%	https://www.uniprot.org/uniprot/O62683
20	Spermatogenesis-associated serine-rich protein 1 isoform X2	<i>Equus asinus</i> + 2 organismes	26647	48	7	5,83 (4,26-6,55) (6,09)	39%	https://www.uniprot.org/uniprot/arc/UPI00071A54BE
	<u>E3 ubiquitin-protein ligases</u> parkin, Praja-1, E3C, RING finger protein unkempt homolog	<i>Homo sapiens</i> + 7 organismes		30, 44	6,9	6,23 (3,23-7,09) (6,2)	27%	https://www.uniprot.org/uniprot/O60260
22	SRC kinase signaling inhibitor 1	<i>Homo sapiens</i>	127027	24	5	8,63 (5,54-10,05) (9,39)	5%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q9C0H9
23	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases 37	<i>Sus scrofa</i>	110414	30	5	5,57 (4,46-6,04) (5,76)	8%	https://www.uniprot.org/uniprot/F1SRY5

1	2	3	4	5	6	7	8	9
24	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases 14	<i>Homo sapiens, Oryctolag</i>	110101	30	5	5,66 (4,47-6,21) (5,87)	7%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q86T82
25	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4	<i>Mus musculus, Rattus norvegicus</i>	211818	35	4	5 (3,56-5,38) (5,15) 4,98 (3,54-5,37) (5,14)	4%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q8VI56 https://www.uniprot.org/uniprot/Q9QYP1
26	Metallothioneines -2 and -3	<i>Rattus norvegicus, Oryctolagus cuniculus</i>	6140	24 27	2 2	6,94 (0,001-8,72) (8,23) 4,22 (0,001-4,409) (4,96)	49% 60%	https://www.uniprot.org/uniprot/P04355 https://www.uniprot.org/uniprot/2PS21
27	Delta-sarcoglycan	<i>Dipodomys ordii</i>	31980	40	7	8,27 (4,92-9,4)(9.16)	40%	https://www.uniprot.org/uniprot/arc/UPI000652382C

пов'язаних протеїнів. Наприклад, таким підтвердженням може слугувати присутність в результатах, крім E2 і E3 складових убіквітин-лігазної системи, про які згадано вище, протеїну-транспортера Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein (Solute carrier family 25 member 11). До речі, до цього ж сімейства протеїнів відноситься мітохондрійний транспортер ТДФ (Solute carrier family 25 member 19), а також роз'єднувальний протеїн UCP-1 (Solute carrier family 25 member 7), рівень якого змінюється в умовах ДТ. Ці факти говорять про структурну схожість цих протеїнів. Ідентифікація протеїну, який специфічно експресується у серцевій тканині (дельта-саркоглікан, табл.4.6.4), також вказує на коректність інтерпретації отриманих результатів, оскільки комерційний препарат досліджуваного ензиму було отримано саме з серця.

Додатково слід зауважити, що результати МС-аналізу елюатів з т-АС при використанні для АХ протеїнів грубої фракції синаптосом і протеїнів з комерційного препарату МДГ корелюють між собою оскільки показали тіамін-зв'язувальну здатність для багатьох однакових протеїнів.

Роботи, в яких опубліковані основні наукові результати розділу

Mezhenska OO, Rebryev AV, Parkhomenko YuM (2018) 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, Ukr Biochem J 90(Special Issue):157 Kyiv, 3id -5th September

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

4.7 Аналіз даних отриманих за допомогою мас-спектрометричних досліджень протеїнів мозку, що були елюйовані з т-АС

В наш час мас-спектрометрія стала одним з найуніверсальніших інструментів при аналізі складних біологічних проб: за допомогою цього підходу можна успішно вирішувати ряд біологічних задач, зокрема ідентифікація протеїнів, розшифровка АК-послідовностей, виявлення посттрансляційних модифікацій та сайтів зв'язування з низькомолекулярними лігандами.

В нашій роботі ми проводили МС-аналіз протеїнів, що проявляють спорідненість до тіаміну, на двох етапах: після АХ на т-АС та після ГФ на сефадексі G-150. Також проводився МС-аналіз елюатів при виділенні ТЗП з використанням неспецифічної (1М NaCl) та специфічної елюції (10 мМ тіамін) на першому етапі виділення після ЕФ (рис.4.7.1, 4.7.2). Аналіз всіх отриманих результатів узагальнено у додатку 1. Як і раніше, наші дослідження виявили в елюатах цілий спектр протеїнів, який для краткості назвали тіамін-зв'язувальним протеомом. Слід, однак, мати на увазі, що не всі протеїни в таких протеомах зв'язуються з афінними сорбентами безпосередньо. Отримані протеоми включають також протеїни стабільних в умовах відмивання сорбенту від протеїнів, що не зв'язуються з тіаміном, гетерологічних протеїн-протеїнових комплексів, де принаймні один (можливо декілька) з протеїнів

взаємодіє з тіаміном у складі сорбента безпосередньо. Також слід зважити, що у додатку 1 наведено не всі варіанти видані в результатах пошуковою системою MASCOT.

Вказаний пошуковик може давати результати, що містять протеїни-гомологи тих протеїнів, що знаходяться у зразку насправді, що пов'язано з низьким рівнем розшифровки геномів тварин у порівнянні з геномом людини. Оскільки біоінформативні методи аналізу тільки розвиваються, вони можуть мати деякі недоліки, зокрема при наявності багатьох варіантів протеїнів, що містять знайдені за масою пептиди, пошуковик з більшим значенням параметру Score (вірогідність присутності протеїну у зразку) видасть той протеїн, який є більше відомим, тобто чим більше протеїн досліджено, чим більший термін протеїн міститься в базах даних, тим більшою є вірогідність того, що саме він буде виданий як результат з більш високим пріоритетом. Іншим недоліком є те, що більш високий рівень Score отримують ті протеїни, яких у зразку більше кількісно. Тому особливо важливим при інтерпретації результатів було врахувати абсолютно всі параметри, а не тільки Score. Зокрема, оцінювати кількість повторів запуску MASCOT та розкид мас пептидів визначених протеїнів, що їх пошуковик видає в результатах у вигляді діаграм (рис. 4.7.4).

Аналізуючи гелі ми звернули увагу, що багато смуг мали однакові координати. Менша кількість смуг на рис. 4.7.2 свідчила про підвищення специфічності протеїнів. Крім того, ми звернули увагу на відтворюваність пептидів (співпадіння мас) отриманих трипсинолізом в процесі МС-аналізу при порівнянні списків пептидів з гелів на рис. 4.7.1 і 4.7.2. Тобто, незалежно від специфічності елюції на I етапі АХ, трипсиноліз давав однакові пептиди у певних плямах. Більше того, деякі однакові пептиди ми знайшли також в списках при ідентифікації протеїнів з тіамінового елюату після АХ комерційного препарату МДГ (розділ 4.6). Зокрема, пептид 1639 Да (рис. 4.7.3). Ці факти можуть свідчити про те, що було ідентифіковано одні й ті ж самі протеїни не дивлячись на тканини, з якої протеїни виділялися і незалежно від різниці у методах виділення, оскільки трипсин розрізав протеїни в одних і тих же місцях і дав однакові пептиди, на чому взагалі базується Peptide Mass Fingerprint – основний принцип МС-аналізу. На рис. 4.7.4 представлено

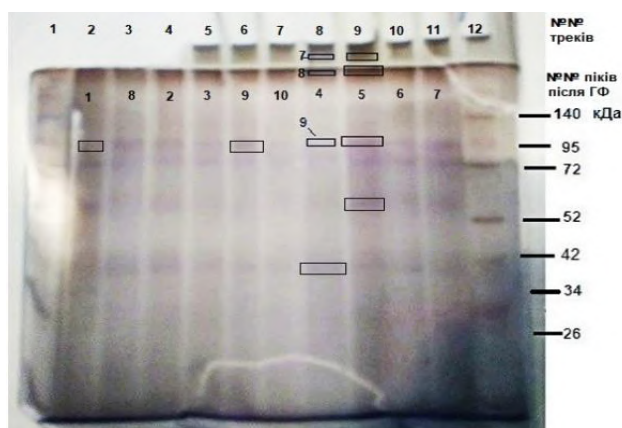


Рис.4.7.1 - Аналіз протеїнових піків після ГФ отриманих елюцією 1М NaCl з *t*-АС методом електрофорезу в 10 % ПААГ в денатуруючих умовах. Прямокутниками виділені протеїнові зразки, що їх в подальшому аналізували з застосуванням мас-спектрометрії. Номера піків відповідають тим, що їх було отримано і пронумеровано в процесі ГФ (рис. 4.3.1).

Треки 1 і 12 – маркери молекулярної маси Multicolor Broad Range Protein Ladder Spectra™ від Thermo Fisher Scientific™.

Треки 2-11 – протеїнові піки 1-10 після ГФ сольового елюату з *t*-АС (табл. 4.4.1).

Після ЕФ протеїнові треки на гелі спочатку проявляли за допомогою Кумассі Блю, а потім сріблом.

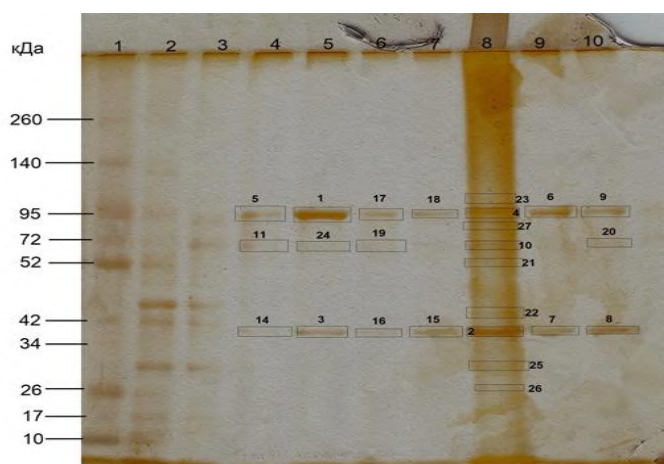


Рис. 4.7.2 - Аналіз протеїнових піків після ГФ отриманих елюцією 10 мМ тіаміном з *t*-АС методом електрофорезу в 10 % ПААГ в денатуруючих умовах. Прямокутниками виділені протеїнові зразки, що їх в подальшому аналізували з застосуванням мас-спектрометрії. Номера піків відповідають тим, що їх було отримано і пронумеровано в процесі ГФ (рис. 4.3.2).

Трек 1 – маркери молекулярної маси Multicolor Broad Range Protein Ladder Spectra™ від Thermo Fisher Scientific™.

Трек 2 – екстракт АП нанесений на *t*-АС.

Трек 3 – протеїни, що не зв'язалися з *t*-АС під час АХ.

Треки 4-10 – протеїнові піки 1-7 після ГФ тіамінового елюату з *t*-АС (рис. 4.3.2).

Після ЕФ протеїнові треки на гелі проявляли за допомогою обробки сріблом.

одну з відповідей пошуковика, де показано увесь список знайдених пептидів при тому запуску MASCOT, включаючи підкреслений на рисунку. Як видно з цього рисунку розкид мас більшості пептидів зі складу ідентифікованого протеїна не перевищував одиниці, що є однією з ознак точності ідентифікації.

У зв'язку з отриманими результатами МС-аналізу, ми зробили висновок, що ТЗБ – це не окремий протеїн, це – протеїни кластеру ацетилхолінового рецептору нікотинного типу Agrin (Agrn) та Low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4) (додаток 1, позиції 1-7). Точніше сказати, протеїновий комплекс у складі кластеру nAHP, який містить дві молекули агрину та дві молекули LRP4. Далі ми перевірили результати МС-аналізу отриманих препаратів ТЗБ (розділи 4.8, 4.9).

Присутність усіх протеїнів представлених у додатку 1 є обгрунтовано пояснюваною. Зокрема не має питань щодо того, що МС-аналіз показав присутність деяких протеїнів не тільки з кластеру, але і субодиниць самого nAHP (додаток 1, позиції 28-29).

З моменту публікації роботи [28] було відомо, що донором фосфату для одного з протеїнів кластеру nAHP виявився не класичний аденозин трифосфат, а саме тіамін трифосфат. Тому не є дивною присутність в елюатах протеїну рапсину - 43 kDa receptor-associated protein of the synapse (Rapsn) (додаток 1, позиція 9). Крім того, показано, що агрін підвищує експресію та орієнтацію рапсину до постсинаптичної мембрани, тим самим запаковуючи більше субодиниць АХР в стабільні, функціонально повноцінні кластери АХР [319].

Інші протеїни, що входять до складу кластеру або функціонально-пов'язані з кластером, також мають молекулярну масу в районі 40 кДа (FNPA, Hsp40 (додаток 1, позиція 13), Skap1 (SKAP55 adaptor protein) (додаток 1, позиція 10), а також Lirf (додаток 1, позиція 106) і UEV-3 (додаток 1, позиція 18). Це стало причиною нашого припущення: ці протеїни також можуть виявитися акцепторами фосфату від ГТФ. Та це потребує додаткових досліджень: наразі впевнено стверджувати, що так воно і є *in vivo*, ми не маємо права. Справа в тому, що на момент проведення досліджень, про які йде мова у роботі [28], існування кластеру nAHP нічого відомо не було: незадовго до того було відкрито сам Rapsn. Тому на тому етапі дослідники могли скористатися антитілами тільки до рапсину.

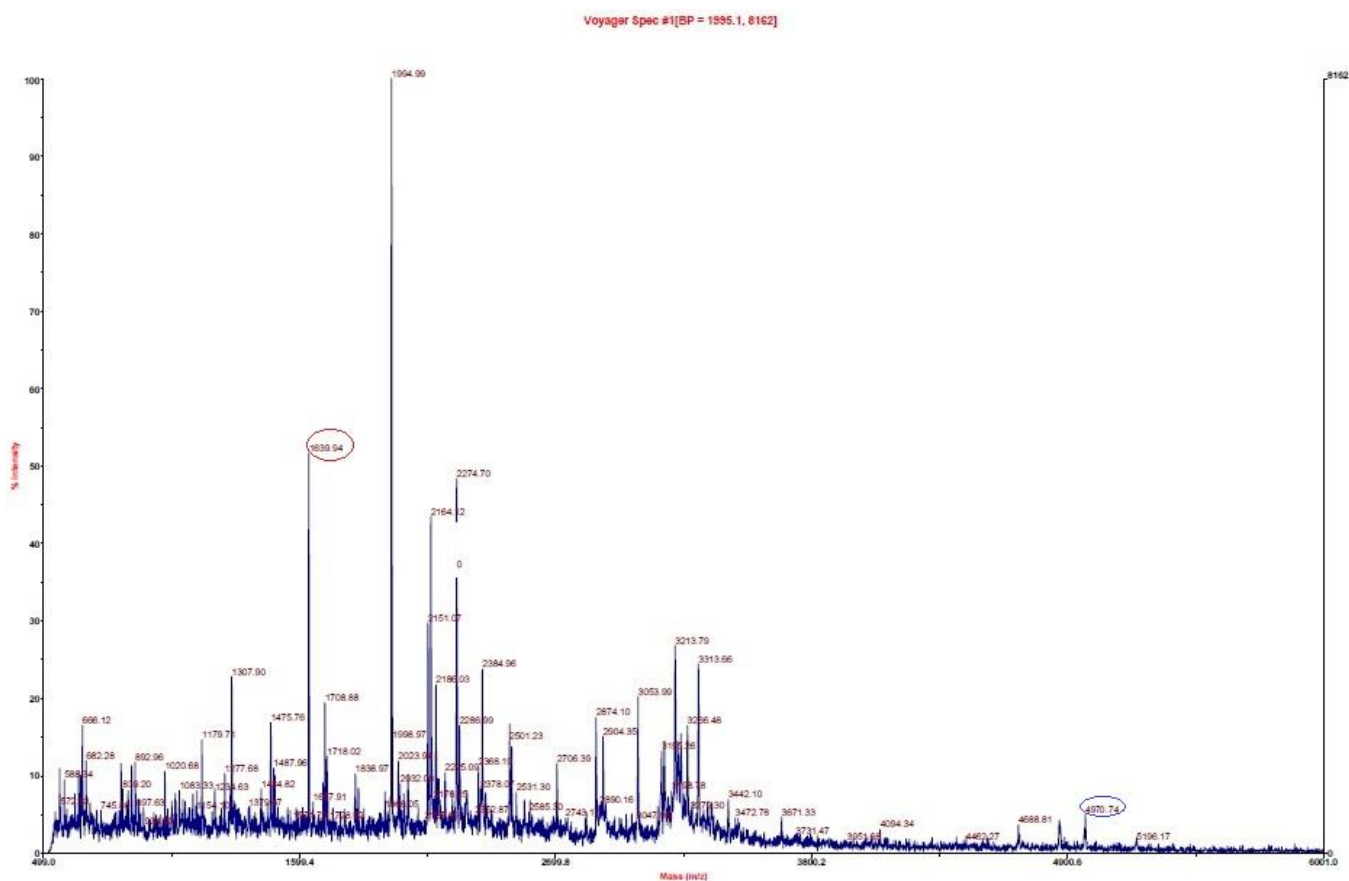


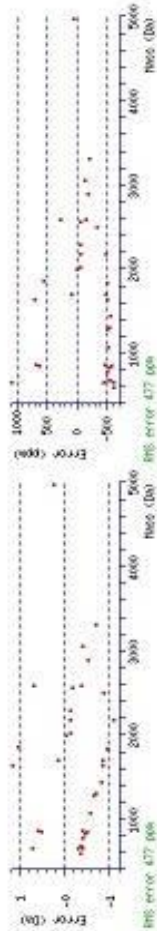
Рис. 4.7.3 – Мас-спектр протеїнової смуги №9 на електрофореграмі (рис. 4.7.1). Червоним обведено унікальний пептид характерний для ідентифікованого протеїну LRP4 (додаток 2, позиції 1-4), синім обведено унікальний пептид характерний для ідентифікованого протеїну Агріну (додаток 2, позиції 5-7). Велика кількість пептидів знайдених в пептидній карті смуги, що ідентифікувалася, означає те, що зразок містив складну суміш протеїнів.

Набагато пізніше стало відомо те, що рапсин є Е3 убіквітинпротеїнлігазою [321]. Та ця його активність може бути потрібною не тільки для направлення відпрацьваних/неправильно сторнутих протеїнів на шлях деградації. Саме для недилування субодиниць самого НАХР необхідне приєднання другої молекули рапсину в процесі збирання кластеру НАХР [320,321]. Цей факт пояснив присутність інших ензимів убіквітин-лігазної системи в елюатах з т-АС (додаток 1, позиції 18-20). Як і великої кількості інших Е3 убіквітинпротеїнлігаз (додаток 1, позиція 16). Загальною рисою притаманною усім наведеним в позиціях 9 і 16 (додаток 1) Е3 убіквітинпротеїнлігаз є присутність в їх структурі спеціального RING finger-домену. Тому у позиції 17 (додаток 1) наведено протеїни видані MASCOT, що містять цей домен. Їх присутність в результатах ідентифікації може пояснюватися як їх гомологічністю з рапсином і функціональними зв'язками усередині Е3 убіквітинлі-

Sort by residue number increasing mass decreasing mass
Show matched peptides only predicted peptides also

Start - End	Observed	Mr (exp.)	Mr (calc.)	Delta M	Peptide
83 - 104	2459.0000	2497.9927	2498.8033	-0.8606	R. SVAWCKDQKEDSDQCFER.E
275 - 280	677.0000	675.9927	676.3439	-0.3511	R. SQRVSR.L
475 - 497	1637.0000	1635.9927	1634.8417	1.1511	R. BELVNSGDTLDR.I
586 - 607	2585.0000	2583.9927	2584.3663	-0.3735	R. RLIAAGTELEENPOLDTDYGAORR.H
607 - 620	1839.0000	1837.9927	1838.9362	-0.9435	R. RMYWADRHVIER.A
607 - 620	1839.0000	1837.9927	1838.9362	-0.9435	R. RMYWADRHVIER.A
615 - 628	1650.0000	1638.9927	1639.9231	-0.9384	R. RHVIESAKLDQSER.K
739 - 749	1437.0000	1435.9927	1436.8074	-0.8147	R. FLPAEEMSLR.K
745 - 750	847.0000	845.9927	845.4654	0.5274	R. RNDIIS.I
963 - 968	776.0000	774.9927	775.9824	-0.9897	R. STQSDG.L
970 - 975	674.0000	672.9927	673.3759	-0.3832	R. LTQDSR.E
1036 - 1052	1659.0000	1657.9927	1658.8334	-0.8407	R. TSPQWMSFLPAR.I
1036 - 1052	1700.0000	1698.9927	1698.8334	0.1593	R. TSPQWMSFLPAR.I
1038 - 1056	2183.0000	2181.9927	2182.1139	-0.1212	R. TSPQWMSFLPARIDQNR.K
1101 - 1132	3310.0000	3308.9927	3309.8901	-0.8874	R. ITRHAKDSDIHEIIVTQVTTDGLAVALDR.K
1167 - 1187	2561.0000	2559.9927	2560.1555	-0.1628	R. AIVLREKMNWYVAKENAR.L
1270 - 1276	826.0000	824.9927	825.4487	-0.4530	R. STHRAQK.W
1270 - 1276	826.0000	824.9927	825.4487	-0.4530	R. STHRAQK.W
1301 - 1312	1277.0000	1275.9927	1276.8346	-0.8419	R. AQLPDRKQSR.N
1309 - 1339	3049.0000	3047.9927	3048.3973	-0.4046	R. CQSRQKCKSHLCLEFRSDFSGCFQVQLK.Q
1343 - 1362	2285.0000	2283.9927	2284.1270	-0.1343	R. TQDSRETVLLFSRQSLRR.I
1368 - 1368	588.0000	586.9927	587.3503	-0.3576	R. QSTES.I
1403 - 1458	650.0000	648.9927	649.2854	-0.2926	R. LDQSKR.K
1403 - 1458	650.0000	648.9927	649.2854	-0.2926	R. LDQSKR.K
1403 - 1458	650.0000	648.9927	649.2854	-0.2926	R. LDQSKR.K
1430 - 1459	651.0000	649.9927	649.5854	0.7074	R. LDQSKR.K
1460 - 1477	2024.0000	2022.9927	2023.1214	-0.1287	R. VLDDSDLEFRFAVALER.K
1479 - 1494	1992.0000	1990.9927	1991.0034	-0.0126	R. QYLELMDVHTAKIES.A
1495 - 1502	861.0000	859.9927	860.3988	-0.4061	R. AHDQSKR.K
1495 - 1502	862.0000	860.9927	860.3988	0.5939	R. AHDQSKR.K
1574 - 1590	845.0000	843.9927	844.4787	-0.4839	R. STQPRQK.Y
1574 - 1590	1308.0000	1306.9927	1307.4946	-0.7019	R. STQPRQKSOR.N
1578 - 1586	1056.0000	1064.9927	1065.5587	-0.5640	R. VDPVYSQSKR.E
1581 - 1586	2888.0000	2886.9927	2887.3228	-0.3238	R. YSRQKQETVLANVDLMDIIVWSPQR.Q
1581 - 1586	2888.0000	2886.9927	2887.3228	-0.3238	R. YSRQKQETVLANVDLMDIIVWSPQR.Q
1697 - 1744	4959.0000	4967.9927	4967.1984	0.2543	R. DAQLQVCHSRVAVFAAFAQQLBISSAIVQGLLSLLVIVAVLVMLVLR.H
1745 - 1749	655.0000	653.9927	654.3925	-0.3998	R. HRSKQ.P
1774 - 1789	1853.0000	1851.9927	1850.9600	1.0327	R. IEAVYEPANQQLSKR.K
1801 - 1823	2590.0000	2588.9927	2588.3043	0.6884	R. EKIKYVDTQGLLSDQKMDLQK.Q
1882 - 1901	2181.0000	2179.9927	2181.0702	-1.0775	R. QSLDQVAKHPEPLSSQSLV.-

No match for: 549.0000, 550.0000, 551.0000, 552.0000, 553.0000, 554.0000, 555.0000, 556.0000, 557.0000, 558.0000, 559.0000, 560.0000, 561.0000, 562.0000, 563.0000, 564.0000, 565.0000, 566.0000, 567.0000, 568.0000, 569.0000, 570.0000, 571.0000, 572.0000, 573.0000, 574.0000, 575.0000, 576.0000, 577.0000, 578.0000, 579.0000, 580.0000, 581.0000, 582.0000, 583.0000, 584.0000, 585.0000, 586.0000, 587.0000, 588.0000, 589.0000, 590.0000, 591.0000, 592.0000, 593.0000, 594.0000, 595.0000, 596.0000, 597.0000, 598.0000, 599.0000, 600.0000, 601.0000, 602.0000, 603.0000, 604.0000, 605.0000, 606.0000, 607.0000, 608.0000, 609.0000, 610.0000, 611.0000, 612.0000, 613.0000, 614.0000, 615.0000, 616.0000, 617.0000, 618.0000, 619.0000, 620.0000, 621.0000, 622.0000, 623.0000, 624.0000, 625.0000, 626.0000, 627.0000, 628.0000, 629.0000, 630.0000, 631.0000, 632.0000, 633.0000, 634.0000, 635.0000, 636.0000, 637.0000, 638.0000, 639.0000, 640.0000, 641.0000, 642.0000, 643.0000, 644.0000, 645.0000, 646.0000, 647.0000, 648.0000, 649.0000, 650.0000, 651.0000, 652.0000, 653.0000, 654.0000, 655.0000, 656.0000, 657.0000, 658.0000, 659.0000, 660.0000, 661.0000, 662.0000, 663.0000, 664.0000, 665.0000, 666.0000, 667.0000, 668.0000, 669.0000, 670.0000, 671.0000, 672.0000, 673.0000, 674.0000, 675.0000, 676.0000, 677.0000, 678.0000, 679.0000, 680.0000, 681.0000, 682.0000, 683.0000, 684.0000, 685.0000, 686.0000, 687.0000, 688.0000, 689.0000, 690.0000, 691.0000, 692.0000, 693.0000, 694.0000, 695.0000, 696.0000, 697.0000, 698.0000, 699.0000, 700.0000, 701.0000, 702.0000, 703.0000, 704.0000, 705.0000, 706.0000, 707.0000, 708.0000, 709.0000, 710.0000, 711.0000, 712.0000, 713.0000, 714.0000, 715.0000, 716.0000, 717.0000, 718.0000, 719.0000, 720.0000, 721.0000, 722.0000, 723.0000, 724.0000, 725.0000, 726.0000, 727.0000, 728.0000, 729.0000, 730.0000, 731.0000, 732.0000, 733.0000, 734.0000, 735.0000, 736.0000, 737.0000, 738.0000, 739.0000, 740.0000, 741.0000, 742.0000, 743.0000, 744.0000, 745.0000, 746.0000, 747.0000, 748.0000, 749.0000, 750.0000, 751.0000, 752.0000, 753.0000, 754.0000, 755.0000, 756.0000, 757.0000, 758.0000, 759.0000, 760.0000, 761.0000, 762.0000, 763.0000, 764.0000, 765.0000, 766.0000, 767.0000, 768.0000, 769.0000, 770.0000, 771.0000, 772.0000, 773.0000, 774.0000, 775.0000, 776.0000, 777.0000, 778.0000, 779.0000, 780.0000, 781.0000, 782.0000, 783.0000, 784.0000, 785.0000, 786.0000, 787.0000, 788.0000, 789.0000, 790.0000, 791.0000, 792.0000, 793.0000, 794.0000, 795.0000, 796.0000, 797.0000, 798.0000, 799.0000, 800.0000, 801.0000, 802.0000, 803.0000, 804.0000, 805.0000, 806.0000, 807.0000, 808.0000, 809.0000, 810.0000, 811.0000, 812.0000, 813.0000, 814.0000, 815.0000, 816.0000, 817.0000, 818.0000, 819.0000, 820.0000, 821.0000, 822.0000, 823.0000, 824.0000, 825.0000, 826.0000, 827.0000, 828.0000, 829.0000, 830.0000, 831.0000, 832.0000, 833.0000, 834.0000, 835.0000, 836.0000, 837.0000, 838.0000, 839.0000, 840.0000, 841.0000, 842.0000, 843.0000, 844.0000, 845.0000, 846.0000, 847.0000, 848.0000, 849.0000, 850.0000, 851.0000, 852.0000, 853.0000, 854.0000, 855.0000, 856.0000, 857.0000, 858.0000, 859.0000, 860.0000, 861.0000, 862.0000, 863.0000, 864.0000, 865.0000, 866.0000, 867.0000, 868.0000, 869.0000, 870.0000, 871.0000, 872.0000, 873.0000, 874.0000, 875.0000, 876.0000, 877.0000, 878.0000, 879.0000, 880.0000, 881.0000, 882.0000, 883.0000, 884.0000, 885.0000, 886.0000, 887.0000, 888.0000, 889.0000, 890.0000, 891.0000, 892.0000, 893.0000, 894.0000, 895.0000, 896.0000, 897.0000, 898.0000, 899.0000, 900.0000, 901.0000, 902.0000, 903.0000, 904.0000, 905.0000, 906.0000, 907.0000, 908.0000, 909.0000, 910.0000, 911.0000, 912.0000, 913.0000, 914.0000, 915.0000, 916.0000, 917.0000, 918.0000, 919.0000, 920.0000, 921.0000, 922.0000, 923.0000, 924.0000, 925.0000, 926.0000, 927.0000, 928.0000, 929.0000, 930.0000, 931.0000, 932.0000, 933.0000, 934.0000, 935.0000, 936.0000, 937.0000, 938.0000, 939.0000, 940.0000, 941.0000, 942.0000, 943.0000, 944.0000, 945.0000, 946.0000, 947.0000, 948.0000, 949.0000, 950.0000, 951.0000, 952.0000, 953.0000, 954.0000, 955.0000, 956.0000, 957.0000, 958.0000, 959.0000, 960.0000, 961.0000, 962.0000, 963.0000, 964.0000, 965.0000, 966.0000, 967.0000, 968.0000, 969.0000, 970.0000, 971.0000, 972.0000, 973.0000, 974.0000, 975.0000, 976.0000, 977.0000, 978.0000, 979.0000, 980.0000, 981.0000, 982.0000, 983.0000, 984.0000, 985.0000, 986.0000, 987.0000, 988.0000, 989.0000, 990.0000, 991.0000, 992.0000, 993.0000, 994.0000, 995.0000, 996.0000, 997.0000, 998.0000, 999.0000, 1000.0000



LOCUS ERF0260 1901 aa Linear F02-045-2016
 DEFINITION low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (Crinia gularis)
 GI:5548182

Рис.4.7.4 – Результат MASCOT, що відповідає позиції 3 (Додаток № 2) і смугі 17 на рис. 4.7.2

газної системи, так і, можливо, здатністю безпосередньо зв'язувати тіамін.

До складу кластеру nAXP входять також кінази, зокрема MuSK, Abl1, Src та PAK. Src та Abl1, як і MuSK (додаток 1, позиція 8), належать до тирозинових кіназ. Abl1 здатна активізувати оксидоредуктази (до яких належать і дегідрогенази). Ген кінази Src – один з перших онкогенів, що став відомий вченим. Через цю кіназу, як і через hsp90, кластер nAXP пов'язаний з тау-протеїнами. Також показано утворення комплексу Src-кіназа- Na^+/K^+ -АТР-аза необхідного для інгібування Src-кінази [322]. В результатах MASCOT можна побачити ще й інші різноманітні тирозинові кінази, які ми навіть не включили до додатку 1. Проте, як ми можемо бачити з цього додатку, відповідний розділ містить достатньо велику кількість серин-треонінових кіназ (також не всі варіанти). До цього типу кіназ відноситься кіназа PAK. Відомості про зміну рівня цього протеїну в умовах ДТ маємо з літератури [323]. Оскільки пошуковик жодного разу не видав кіназу PAK, ми маємо припущення, що він міг видати її гомологи. Серед серин-треонінових кіназ зафіксованих у результатах, звертає увагу екстрацелюлярна кіназа FAM20C, через що в додатку 1 (позиція 119) розміщено низку протеїнів, що мали ту ж аббревіатуру в назві.

Присутність в результатах ідентифікації після ГФ пірідоксалькінази (додаток 1, позиція 61) обґрунтована експериментально у роботі [12], де використовувалася рекомбінантна пірідоксаль кіназа. Це свідчить про взаємозв'язки вітамінів B_1 і B_6 . Тому цікавою є постійна присутність в результатах ГДК (додаток 1, позиція 141) – для якої пірідоксаль фосфат є коензимом, як і для багатьох інших ензимів зокрема амінотрансфераз. Амінотрансферази також завжди ідентифікуються в елюатах з т-АС як після АХ, так і після ГФ. Крім того, вплив тіаміну та його метаболітів на АЛТ та АСТ зафіксовано експериментально групою Петрова С.А. [291]. В одному підрозділі з кіназами також розміщено різноманітні фосфатази (додаток 1, позиції 71-78), до яких ми особливо придивлялися під час аналізу з тієї причини, що з перших етапів досліджень для ТЗБ була визначена тіамінфосфат гідролазна активність. До того ж про здатність лужної фосфатази взаємодіяти з тіамін фосфатами також було відомо раніше [293].

Дуже довго вчені шукали протеїн-посередник між кіназою MuSK і агріном в процесі інервації м'язів. Ним виявився LRP4 - на той час вже відомий з іншого

напрямку досліджень на щурах глікопротеїн, що мав назву MEGF7 (Multiple epidermal growth factor-like domains 7). Тому цей протеїн, як і багато інших, має дві альтернативні назви. MASCOT ідентифікував цей протеїн в наших елюатах під обома його назвами (додаток 1, позиції 1-4). Причому пошуковик міг видати результат, який включав два варіанти, але з різним Score. Присутність в елюатах різноманітних ростових чинників (додаток 1, позиції 79-82) і аполіпопротеїнів (додаток 1, позиції 23-26) є закономірною. Особливо ApoB та ApoE (додаток 1, позиції 23 і 27) оскільки ці ліпопротеїни є лігандами LRP4.

Логічним є також присутність в елюатах з т-АС Amyloid-beta A4 protein (додаток 1, позиція 52), тому що саме розчинна форма LRP4 (молекулярна маса ≈ 70 кДа) [324,325] зв'язує амілоїд бета пептиди для виведення їх через позаклітинні рідини (кровоток, спинно-мозкова рідина) в здоровому організмі. Це відбувається за участі аквапорину 4. Зниження експресії цього транспортеру виявлено за умов ДТ [326]. В тих же умовах неодноразово фіксували зростання патологічних амілоїд бета пептидів. Згідно з дослідженнями, проведеними на тваринах, бета-амілоїди можуть виступати в ролі противірусного [327] і антибактеріального [328] механізму захисту мозку (потенційно пов'язаного з прозапальною активністю A β). При зараженні вірусом герпесу мишей нервові клітини починають активно виробляти бета-амілоїд пептиди, що зв'язують вірус і перешкоджають розвитку енцефаліту [328]. Було виявлено ще кілька потенційних активностей щодо A β , включаючи активацію кіназ [329], захист проти окислювального стресу [330], регулювання транспорту холестерину [331] та функціонування у якості фактору транскрипції генів, які пов'язують з етіологією ХА [332]. Зв'язок тіаміну з A β непрямим шляхом підтверджується на тваринних моделях ДТ [333]. Можливо наші результати будуть додатковим доказом.

Коли в складі наших протеїнових фракцій елюйованих з т-АС MASCOT показав вірогідність присутності Gastric triacylglycerol lipase (precursor) (Alternative name(s): Lingual lipase, lipase F, gastric type, RNLIP; Rnlp) (додаток 1, позиція 109, розділ 4.6, табл.4.6.1, позиції 5-6), ми вирішили, що це через функціональний зв'язок з LRP4 оскільки цей протеїн є ліпазою, а серед результатів було ще декілька інших ліпаз. До того існує робота [334], де йдеться про використання інгібітору mAHP атропіну та нейропептиду субстанція P на секрецію lipase F, що свідчить про функціональні

зв'язки з холіновим рецептором (хоча і іншого типу) та механізмами чутливості до болю. Проте в подальшому виявилось, що лінгвальна ліпаза може мати МДГ-активність (визначено біоінформативно, дані UniProt) та водночас здатна гідролізувати різні фосфорні та тіоефіри [335] тобто є поліфосфатазою та тіоестеразою, яка відноситься до сімейства лужної фосфатази. Здатність до МДГ-активності визначена за подобою лінгвальної ліпази з протеїном нардлізином (NRD-C). Наш власний біоінформативний аналіз (розділ 4.9) при вирівнюванні lipF з щура проти людського нардлізину показав, що ці протеїни містять 83 повністю ідентичні і 138 подібні АК-позиції. Тобто ці протеїни достатньо подібні, щоб існувала можливість виконання ними однакових функцій. При цьому NRD-C – це внутрішньоклітинний протеїн, який для реалізації певних функцій об'єднується у комплекс з МДГ2 (згадували про подібні комплекси в розділі 4.5), в той час, коли лінгвальна ліпаза – позаклітинний протеїн, що здатний виконувати ті ж функції, що і NRD-C, але в інших умовах поза клітиною. При цьому потрібний МДГ-домен lipF містить у складі своєї молекули. Присутність МДГ поза клітиною була визначена експериментально [317-318]. Чому ні? Та поки що це лише припущення. Подібне в цих протеїнах ще й те, що обидва є цинкзалежними, як, до речі, і більшість дегідрогеназ (додаток 1, позиції 125-140). Можливо це також може пояснити наявність в результатах великої кількості zinc finger протеїнів (додаток 1, позиція 115) та металотіонеїнів (додаток 1, позиція 114), здатних обмінюватися з протеїнами йонами Zn^{2+} . Цинк- та залізо-залежними є також і пріонні протеїни, наприклад, Prion-like protein doppel (Prion protein 2) (позиція 54, додаток 1).

Наявність в результатах МС інших рецепторів пояснюється функціональними зв'язками між рецепторами, але не тільки. Справа в тому, що в елюатах знайдені інші гетеромерні лігандкеровані йонні канали сімейства Cys-петельних рецепторів (до яких належить nAHR). Іншими представниками цього сімейства є рецептори таких нейромедіаторів, як γ -аміномасляна кислота, гліцин і серотонін (один з типів). Хоча, слід зазначити, що в додатку 1 (позиція 149) представлено лише протеїн метаболізму серотоніну, що функціонально може бути пов'язаний з серотоніновими рецепторами. Отже, причиною зв'язування з тіаміном може бути загальний для названих протеїнів структурний домен. Зв'язування самих

АХР з тіаміном є доведеним експериментально [39]. Той факт, що рецептори ГАМК, гліцину, серотоніну та дофаміну (останній в результатах не представлено, хоча такий був) траплялися зрідка і лише по кілька разів, свідчив, що не вони є досліджуваним ТЗБ. Про зв'язок з ГАМК додатково свідчить присутність в результатах ГДК (додаток 1, позиція 144). Відомо, що кластеризація ГАМК(А)-рецепторів опосередковується також через рапсин [336].

Потрапляння в результати практично кожного разу різних рецепторів глутамату також свідчить про функціональні зв'язки рецепторів ацетилхоліну з рецепторами інших нейромедіаторів. Так, відомо про зв'язок α ХР з глутаматними NMDA рецепторами через зв'язок NMDA - α 3 субодиниця Na^+/K^+ -АТР-ази - агрін [337]. Саме α 3 Na^+/K^+ -АТР-азу здатний блокувати піритіамін [190]. В елюатах після ГФ були зафіксовані також інші глутаматзв'язувальні та багаті на глутамат протеїни (додаток 1, позиції 115, 126, 144).

З іншого боку, в результатах виявилася велика кількість NAD(P)/NAD(P)H-залежних протеїнів (додаток 1, позиції 69, 125, 128, 130, 133-139, 141-143, 145-146). Зокрема, ми можемо бачити протеїни щільового контакту – коннексини. Один з протеїнів цього сімейства, а саме Gap junction alpha-1 protein (connexin 43) (додаток 1, позиція 83) за сучасними даними вважається каналом відповідальним за транспортування нікотинамідаденіндинуклеотидів через плазматичну мембрану клітини, яка раніше вважалася непроникною для цих сполук [338]. Функціональними зв'язками можна пояснити ідентифікацію інших протеїнів цієї групи (додаток 1, позиції 84-96), що підтверджується експериментально впливом на стан цих протеїнів *in vivo* в умовах ДТ [286]. Те ж можна сказати про Glial fibrillary acidic protein (GFAP) (додаток 1, позиція 110) [339].

В результатах бачимо також NAD-dependent protein deacylase sirtuin-5 (додаток 1, позиція 125). А також протеїн ADP-ribose glycohydrolase MACROD1 (таблиця 4.6.3, розділ 4.6.2), який до речі серед інших виявляє ADP-рибозилглутамат гідролазну активність. Альтернативними назвами останнього протеїну є O-acetyl-ADP-ribose deacetylase MACROD1 та Protein LRP16. І хоча сам MACROD1 не є NAD-залежною деацетилазою, проте цікаво те, що були ідентифіковані інші гомологічні йому ADP-залежні глікогідролази і пов'язані протеїни. Зокрема визначений експериментально у

роботі [244] вплив АТФ на PARP може тепер бути пояснений функціональним зв'язком (рис.4.7.5) PARP з PARG (додаток 1, позиція 126). З іншого боку, зростання аденозиндифосфат гідролазних активностей у протеїнових піках 5-7 (рис.4.4.2б) та перевищення рівня цієї активності у порівнянні з тіаміндифосфат гідролазною свідчив про вихід у цих піках специфічного протеїну. Подібний пік спостерігався в процесі ГФ сольових елюатів з т-АС (пік 7, рис.4.7.2а, рівень АДФ-азної активності – 1,35 мкмоль/мг протеїну*хв, водночас ТДФ-азної та АТФ-азної активності в цьому піці не зафіксовано). Ідентифікація в смузі 9 (рис.4.7.1) та смузі 6 (рис.4.7.2) протеїну PARG (EC 3.2.1.143) частково пояснила результати вимірювання фосфатазних активностей в протеїнових піках після ГФ, а також рівні АДФ-азної активності в протеїнових фракціях, що елюювалися тіаміном до ГФ (рис.4.2.1, 4.3.4). Ми припускаємо, що протеїном, який виходить у піках 6-7 (рис.4.7.2) з колонки разом з PARG є протеїн-партнер PARG здатний гідролізувати АДФ. Через можливу локалізацію PARG у ядрі, ми звертали увагу на ядерні протеїни, які також були присутні в результатах (не показані в додатку 1). Хоча ядро – не єдиний компартмент, де функціонує PARG. При чому, потрібно враховувати, що після дії PARG АДФ залишається з'єднаним з рибозою. Таким чином, маємо поки що неідентифікований протеїн-АДФ-азу. Не виключено, що обидва протеїни: і PARG, і ще неідентифікований партнер PARG з АДФ-азною активністю здатні безпосередньо зв'язувати тіамін чи його похідні.

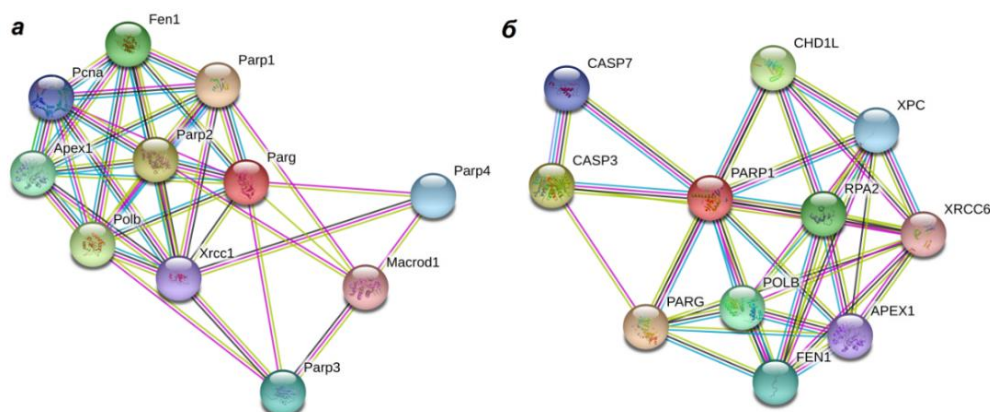


Рис. 4.7.5 – Відповідь ресурсу *STRING* (<https://string-db.org/network/10116.ENSRNOP00000027071>) на запит щодо функціональних зв'язків: **а** – PARG; **б** – PARP1.

Можемо відмітити присутність у результатах великої кількості дегідрогеназ причому саме NAD(P)/NAD(P)H-залежних. Деякі з них, що представлені в таблицях 4.6.1-4.6.2 (розділ 4.6), для уникнення повторення не були показані в додатку 1.

Наявність деяких представників класу дегідрогеназ можна було б пояснити їх зв'язками з добре відомими ТДФ-залежними протеїнами зі складу ПДК чи ЦТК. Та існує вже велика кількість доказів, в т.ч. представлених у цій роботі, здатності деяких з них безпосередньо зв'язуватися з тіаміном. Щодо ГДГ, як ми маємо змогу пересвідчитися, важливе значення при цьому мають два сайти – глутамат-зв'язувальний та коензим-зв'язувальний.

МДГ потребує окремого обговорення. Маємо наступні результати, які: 1) підтверджують безпосереднє зв'язування різних ізоформ МДГ з тіаміном (розділ 4.6), 2) показують вплив тіаміну на МДГ-активність (розділ 4.5), 3) показують результати МС-аналізів, проведених не тільки в нашому інституті, що виявляли присутність МДГ в елюатах з т-АС, в т.ч. отриманих специфічною елюцією, 4) демонструють наявність МДГ-активності в протеїнових піках після ГФ (рис.4.4.2). При цьому, як ми бачили з результатів представлених в розділі 4.5 (таблиця 4.5.2) більша кількість пептидів, ідентифікованих в елюатах, належить саме МДГ2. Тоді як пляма, що займала найбільшу площу на 2D-електрофореграмі (рис.4.6.3, досліди з використанням комерційного препарату МДГ), містила ізоформ МДГ1В, що є мембранозв'язаним чи таким, що секретується у позаклітинний простір (ресурс Phobius). В той же час ці експерименти підтвердили зв'язування МДГ2 з тіаміном (табл.4.6.1). Крім того, слід звернути увагу на той важливий момент, що саме МДГ МС-аналіз показував тільки після етапу АХ. Після ГФ MASCOT не видавав у результатах саме МДГ, а тільки протеїни, що потенційно чи підтверджено містять лактат/малат дегідрогеназний домен: LipF (додаток 1, позиція 109), про яку вже йшлося вище, та Ubiquitin-conjugating enzyme E2 (UEV-3) (додаток 1, позиція 18), що може бути функціональним партнером рапсину (додаток 1, позиція 9), які також вже згадували в поточному розділі. Цей факт можна пояснити тим, що пошуковик видав гомологічний протеїн у результатах (ЛДГ, додаток 1, позиція 134). Перевірка унікальності пептидів потребує часу. Та виникає питання: чому MASCOT показував МДГ в елюатах після АХ, де поряд з МДГ видавав також і ЛДГ (як в препаратах з мозку, так і в препаратах з серця), а в препаратах після ГФ МДГ не ідентифікувалося хоча це були протеїнові фракції більш високого ступеня очищення та одночасно мали МДГ-активність? Всі ці факти призводять до висновку, що, можливо, зв'язування

тіаміну фізіологічно має два напрямки. Перше – зв’язувати тіамін здатна саме МДГ і це має значення у середині клітини, особливо у мітохондріях. А другий напрямок функцій – зв’язування тіаміну протеїнами, що містять ЛДГ/МДГ-домен і функціонують в районі плазмалемми чи поза клітиною. І знову-таки: значення має структура домену. Таким чином маємо висновок, що МДГ-активність, яку показали протеїнові піки після ГФ, може належати як LipF, так і UEV-3, або обом відразу та ще й обидва протеїни мають функціональні зв’язки з кластером НАХР і молекулярні маси в однаковому діапазоні (≈ 40 кДа \pm). Тому ці протеїни могли виходити в одних і тих же піках після ГФ і рухатися в одній смузі в процесі одномірного ЕФ.

Щодо присутності NADH дегідрогенази, яка одночасно є комплексом I дихального ланцюга, в елюатах з т-АС (додаток 1, позиція 135; таблиця 4.6.2, розділ 4.6, позиція 8), то це можна пояснити прямим функціональним зв’язком з МДГ2, що є класичним, так само як і наявність NADH оксидоредуктази – корової субодиноці комплексу I, яка була декілька разів у результатах (наприклад, http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180502%2FFTmmfGaaR.dat&hit=15&db_idx=1). Бачимо також в результатах і комплекс II (СДГ, до речі ФАД-залежна дегідрогеназа) (таблиця 4.6.2, розділ 4.6, позиція 5). Примітно, що з літератури відомо про безпосередню взаємодію МДГ2 з комплексом III (цитохром-*bc*₁-комплекс), які утворюють міцний комплекс [340]. Даний факт було перевірено за допомогою сучасних методів: мас-спектрометрії, вестерн-блотингу та перехресного зшивання. Крім поданих в таблиці 4.6.2 та у додатку 1, в результатах виявилися наступні протеїни: CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 3, mitochondrial (http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180502%2mfGuES.dat&hit=16&db_idx=1), cytochrome P450 2B3 precursor (http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180730%2FFTmpliseS.dat&hit=46&db_idx=1), PREDICTED: NADH-cytochrome *b*₅ reductase 1 (http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190716%2FFTecliYaR.dat&hit=18&db_idx=1). А також, як можемо побачити з табл. 4.6.2, в елюатах був присутній Cytochrome *b*₅ type B (позиція 40). Крім того існує ізозим ЛДГ (EC 1.1.2.3) який є L-lactate dehydrogenase (cytochrome), одночасно він же L-lactate ferricytochrome *c* oxidoreductase і Cytochrome *b*₂ (<https://enzyme.expasy.org/EC/1.1.2.3>).

Всі ці зв'язки є особливо цікавими в світлі результатів школи акад. Ю.М. Островського (глава I, розділ 1.2.1.2) [148]. Тоді експериментально показано, що завдяки реакціям пероксидазного окислення ряду монофенольних сполук (таких як парацетомол, саліцилова кислота, тирозин), пов'язаних з окисненням тіаміну до тіохрому, забезпечується відновлення неактивної оксоферрильної форми цитохрому *c* до активного ферріцитохрому, який знову може брати участь у транспорті електронів. Їх дані підтверджувалися даними Yoo Jeong-Sook H. та ін. [149], що свідчили про вплив забезпеченості організму тіаміном на функціонування цитохрому P-450, який бере участь у детоксикації ксенобіотиків. Можливо, припущення А.Н. Разумович і Г.А. Доста є вірними і наші результати - додаткові докази. Тобто здатність тіаміну до окислення і передбачувані захисні властивості по відношенню до протеїнів можуть мати місце в реальності. В наш час залишається все менше сумнівів у зв'язках тіаміну з електрон-транспортним ланцюгом і не тільки на рівні цитохрому *c*.

Як відомо, кластер nAHP містить також у своєму складі такий протеїн, як farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha (FNTA) [341,342]. Бачимо, що в результатах маємо велику кількість різноманітних трансфераз (додаток 1, позиції 145-148), хоча самої FNTA не було. Ця трансфераза має значення на шляху синтезу холестерину/вітаміну D₃. Звідси можна пояснити те, чому в елюатах з т-АС міг бути ідентифікований функціонально-пов'язаний Vitamin D binding protein (розділ 4.6, таблиця 4.6.3). Звідси, через кластер nAHP, можна припустити вплив амілоїду β на шляхи метаболізму холестерину. Функціональним зв'язком FNTA (в цілому всього кластеру nAHP) пояснюється присутність в елюатах таких протеїнів, як Squalene synthase, Lanosterol 14-alpha demethylase (вона ж Sterol 14-alpha demethylase або Cytochrome P450 51A1) та Fatty acid-binding protein (додаток 1, позиції 119-121). Останній може бути пов'язаний безпосередньо з LRP4. Нам здається, що цим також можна пояснити зафіксовані в літературі [343,344] факти втрати транспортерів глутамату в умовах дефіциту вітамінів B₁ та D₃, оскільки це взаємопов'язані процеси. Останні факти також можна пояснити іншими, що не були згадані вище, взаємозв'язками обох вітамінів з кластером nAHP. Показано, що NF-κB є транскрипційним фактором, що регулює експресію рапсину [345]. Вплив 25OHD на NF-κB-асоційовані сигнальні шляхи, зокрема цитокінову систему

RANKL/RANK/OPG є відомим [346]. З іншого боку експресія рапсину регулюється агріном [319], можливо саме через NF- κ B-асоційовані сигнальні шляхи. Також відомо, що NF- κ B може інгібувати активність JNK (Mapk8) – кінази, що бере участь у неканонічному Wnt-сигнальному шляху. Але показано, що у всіх видах Wnt-сигналіngu (канонічний, неканонічний, кальцій-залежний) на початку шляху задіяно адаптерний протеїн - компонент кластеру nAXP – DVL1 (додаток 1, позиція 12). Зв'язування DVL1 з комплексом агрін-LRP4 через Musk показано експериментально [342]. Відомою є участь GSK-3 β у канонічному Wnt-сигнальному шляху, де вона руйнує комплекс Gsk3b – Arc – axin - катенін β шляхом фосфорилування β -катеніну і, таким чином, перериває проходження сигналу. При цьому за ДТ спостерігається ріст активності GSK-3 β [282], Це може свідчити, що кластеризація nAXP знижується. І, оскільки зв'язку DVL1 – Musk – агрін - LRP4, не утворюється, то не утворюються і стабільні комплекси Gsk3b – Arc – axin - катенін β . Це означає, що відбувається надмірне фосфорилування β -катеніну і переривання сигналу. При цьому показано, що введення тіаміну і бенфотіаміну запобігає пригніченню нейрогенезу у гіпокампі мишей, спричиненому стресом, не впливаючи на рівень ТДФ в мозку та покращують пізнання і зменшують розлади поведінки мишей викликані стресом через GSK-3 β [159,284]. Нещодавно також показано вплив тіаміну, ТДФ та ТТФ на систему RANKL/RANK/OPG [347]. Крім того, про ще один зв'язок свідчить ідентифікація протеїну Iy6/PLAUR domain-containing protein 4 (додаток 1, позиція 95), який належить до того ж сімейства протеїнів, що і протеїни-регулятори AXP – SLURP1 та SLURP2 [348]. Все це свідчить про перетин шляхів, у яких виконують свої функції тіамін і холекальциферол та про їх зв'язок з холінергічною системою.

У зв'язку з інформацією про те, що серпіни можуть виявитися тіаміназами ссавців [167], важливим підтвердженням цього факту може бути присутність в результатах ідентифікації протеїнів елюйованих з т-АС серпіну A3-7 (додаток 1, позиція 116).

Важливе значення має взаємодія тіаміну чи/та його б.а. похідних з протеїнами теплового шоку. Вивчаючи молекулярні механізми болю і знеболення, Лі зі співавт. [349] використовуючи фосфопротеомний аналіз, знеболюючи запальний біль у щурів за допомогою акупунктури серед протеїнів, фосфорилування яких зменшується при

знеболюванні, виявили тіамінтрифосфатазу, а також сигнальний протеїн γ 14-3-3, який поряд з деякими іншими протеїнами, зв'язувався з т-АС [12]. Цікавим є, що серед протеїнів, фосфорилування яких збільшувалася, згадується також один з протеїнів теплового шоку - Hsp90, який також зв'язувався з т-АС [12]. Показано, що hsp90 регулює оборот рапсину, формування та подальше функціонування кластеру nAHP [350]. Шин та інш. [351] виявили, що цитостатичний ефект тіаміну відносно культивованих кардіоміоцитів новонароджених щурів при ішемії зумовлений здатністю вітаміну B₁ індукувати експресію білка теплового шоку - Hsp70 - heat shock protein 70. Цей протеїн вважається важливим фактором у захисті клітин від викликаного стресом апоптозу [352]. Важливо, що результати МС-аналізу, які тут згадані, були отримані щодо протеїнових фракцій отриманих безпосередньо після АХ, МС-аналіз протеїнових фракцій після ГФ на той момент ще не проводився. Як можемо впевнитися з додатку 1, після ГФ у результатах маємо три типи hsp (диференціюються за молекулярною масою) елюйованих з т-АС у протеїнових піках: hsp40, hsp70 та hsp90 (додаток 1, позиції 13-15). Та найцікавішим, з нашої точки зору, виявилось те, що один з протеїнів кластеру nAHP, а саме DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A3, є шапероном. Можливо цим і можна було б пояснити перераховані у цьому абзаці ефекти тіаміну, включаючи анестезуючий.

У літературі є інформація, що тіамін є відомим регулятором калієвих токів, що, серед величезної кількості фізіологічних ефектів, має відношення також і до сприйняття болю. Інгібування калієвих каналів потребує внутрішньоклітинної трансформації тіамінових сполук. При цьому йонний канал nAHP представляє собою калій-провідний канал поряд зі здатністю до проведення йонів Na⁺ і Ca²⁺. Крім того, відомим блокатором калієвих каналів, що призначається людям з розсіяним склерозом та хворобою Паркінсона для поліпшення рухової активності, є 4-амінопіридин (фампрідин, дальфампрідин) [353]. Показано було, що 4-амінопіридин також регулює потенціалзалежні потоки йонів Ca²⁺[354]. Клінічні дослідження показали, що 4-амінопіридин здатний обертати ефекти отруєння тетродотоксином у тварин [355]. Ця сполука є близьким структурним аналогом 4-амінопіримідину, який є продуктом розкладання тіаміну тіаміназою, що особливо важливо в зв'язку з можливою ідентифікацією тіаміназ у ссавців, (додаток 1, позиція 116), про що вже

сказано в одному з попередніх абзаців. Але незалежно від того, чи є справжній регулятор продуктом розпаду тіаміну або іншим похідним тіаміну, тіамін-залежне внутрішньоклітинне інгібування калієвих каналів [356] підсилює позаклітинну дію тіамінфосфатів в якості субстратів ектоензимів, один з яких було ідентифіковано у наших елюатах з т-АС (додаток 1, позиція 153). Це може підтверджувати ідею про некоензимну дію тіаміну також у пуринергічній передачі сигналів і зв'язок між холіновими і пуринергічними рецепторами. При цьому показано [255], що протеїни в сайтах зв'язування відрізняють тіамін від аденозину і така подвійна специфічність має біологічне значення і добре пояснює наявність в елюатах з т-АС також АДФ-залежних ензимів (наприклад, PARG, див. вище), які вдалося розділити за допомогою ГФ. Також давно відоме спільне вивільнення тіаміну з ацетилхоліном в нервово-м'язових з'єднаннях може бути пов'язане з тіамін-залежною регуляцією й інших калієвих каналів через те, що G-протеїн-залежні калієві канали активуються і при стимуляції мускаринових рецепторів (додаток 1, позиція 30) ацетилхоліном. При цьому кластер nAChR має безпосередні зв'язки з G-протеїнами, що поруч з даними [342] підтверджується цілим спектром протеїнів в додатку 1 (позиції 57-60) і результатами вимірів фосфатазних активностей в елюатах з т-АС (розділ 4.2). Беручи до уваги велику кількість доступних літературних джерел щодо взаємодій між холінергічною та іншими нейротрансмітерними системами, можна припустити, що спільне вивільнення тіаміну з ацетилхоліном [19,20] може бути пов'язане з позаклітинною дією тіаміну як на холінові рецептори, так і на рецептори подібні або ідентичні пуринергічним рецепторам P1 для аденозину, що підтверджується отриманими в нашій роботі результатами. Пріоритет щодо nAChR також підтверджується результатами цього дослідження. При цьому конкуренція тіамінових сполук за зв'язування з пуринергічними рецепторами (або вплив на них через функціональні зв'язки з nAChR) можуть бути необхідними для регуляції сигналів, що викликаються пуриновими сполуками [167,255].

Також потрібно додати про ще одну велику групу протеїнів представлених у додатку 1 (позиції 97-99) і таблиці 4.9.2 (позиції 8 і 42). З тієї причини, що ці або подібні протеїни завжди були присутніми в результатах, можемо припускати участь

тіаміну та/чи його б.а. похідних в процесах синтезу протеїнів через вплив на ці протеїни.

Таким чином, ми проаналізували результати МС-аналізу, що показали здатність зв'язувати тіамін та/або його б.а. похідні та функціонально-пов'язані з ними протеїни, зокрема визначили які з протеїнів з найбільшою вірогідністю можуть бути досліджуваним ТЗБ. Усі ці результати потребують подальшої експериментальної перевірки. Та, враховуючи їх і важливий внесок холінергічної сигналізації в імунітет, рак, не кажучи вже про різні типи нейротрансмісії, включаючи глутаматергічну, пурінергічну та, можливо, інші системи, участь тіаміну в ацетилхоліновій сигналізації може лежати в основі системної некоензимної дії тіаміну та його похідних, що спостерігалось у великій кількості досліджень.

Роботи, в яких опубліковані основні наукові результати розділу Mezhenska OO, Rebriev AV, Parkhomenko YuM (2019) Detection of new protein targets of thiamine. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу Медична та клінічна хімія 3(80)(том 21, Додаток):5-36 Тернопіль, 30 вересня-4 жовтня

Меженська О, Ребриєв А, Пархоменко Ю (2020) Нові протеїнові мішені дії тіаміну 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. – с.23 Дніпро, 1-2 жовтня

4.8 Дослідження ТЗП методом Вестерн-блот аналізу

Як показано у попередніх розділах, за допомогою мас-спектрометрії ми отримали дуже цікаві результати. Та, оскільки МС, яка нам доступна, показує тільки ймовірність присутності протеїну в елюаті, потрібно було за допомогою доступних нам підходів перевірити результати МС-аналізу. Для цього ми використали як експериментальні, так і біоінформативні методи (розділ 4.9).

Для експериментальної перевірки в цій роботі ми застосували вестерн-блот аналіз. Реагування з антитілами до протеїнів кластеру nAHP агріну і LRP4 проводили з елюатами з т-АС отриманих як неспецифічною, так і специфічною елюцією після ГФ. Причому протеїнові піки після ГФ сольових елюатів з т-АС на момент

проведення вестер-блотингу зберігалися при температурі -70°C більше року. Усі протеїнові зразки на момент аналізу знаходилися в RIPA-буфері з додаванням коктейлю інгібіторів протеаз для усунення процесів протеолізу. Для проявки блотів використовували як більш чутливий метод з фіксуванням люмінесценції, так і менш чутливий спосіб проявки з застосуванням діамінобензидину (ДАБ) в якості субстрату для кон'югованої з вторинними антитілами пероксидази з хрому (глава III) і отримували відповіді при застосуванні обох методів.

Один з результатів цих експериментів представлено на рис. 4.8.1. Наявність декількох смуг в одному трекові може пояснюватися тим, що антитіла поліклональні, тому можуть давати реакцію на декілька епітопів. Якщо порівнювати частини *a* і *б* (рис. 4.8.1), ми бачимо, що реакція була більш виразною у протеїна LRP4. Ми вважаємо, що це може свідчити про те, що кількість молекул цього протеїну превалює в елюаті. При чому у лунки гелю вносилися однакова кількість протеїну та, при використанні для візуалізації люмінесцентного методу, проявка проводилася протягом однакового терміну. Крім того звертає на себе увагу, що кількісно протеїнів більше в елюатах, ніж в нанесеному на т-АС препараті, що свідчить про їх очистку після АХ та ГФ.

В якості позитивного контролю реакційної здатності антитіл ми використали біологічний зразок, що обов'язково містив досліджувані протеїни – гомогенат мозку інтактних здорових щурів (контрольних). При цьому ми перевірили зміну рівня протеїнів за умов ДТ та відповідь на введення тіаміну за добу до декапітації. Через те, що рівень обох протеїнів реагував на недостатність тіаміну достовірним зниженням та відповідав на короткотермінове введення тіаміну ззовні, представлені

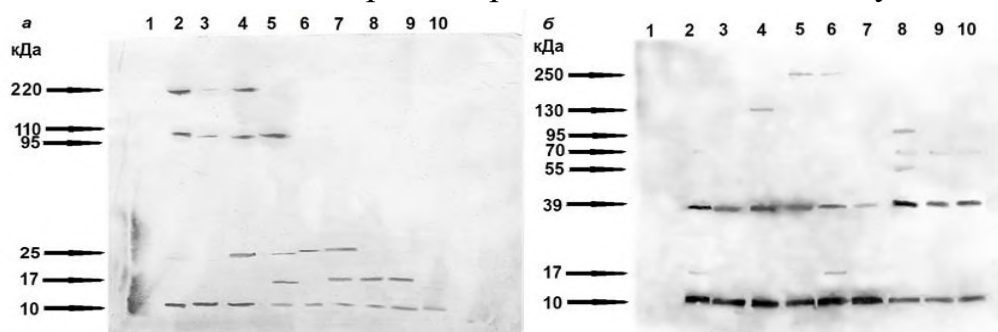


Рис. 4.8.1 - Вестерн-блот аналіз протеїнів після гель-фільтрації тіамінових елюатів з т-АС з застосуванням поліклональних антитіл (Sigma-Aldrich, США): *a* - anti-Agrn, *б* - anti-LRP4; трек 1 – препарат протеїнів з мозку щурів нанесений на колонку з т-АС (екстракт ацетонового порошку), трек 2 – протеїни, що не зв'язалися з т-АС, треки 3-10 – протеїнові піки 1-7 після гель-фільтрації (рис.4.4.2)

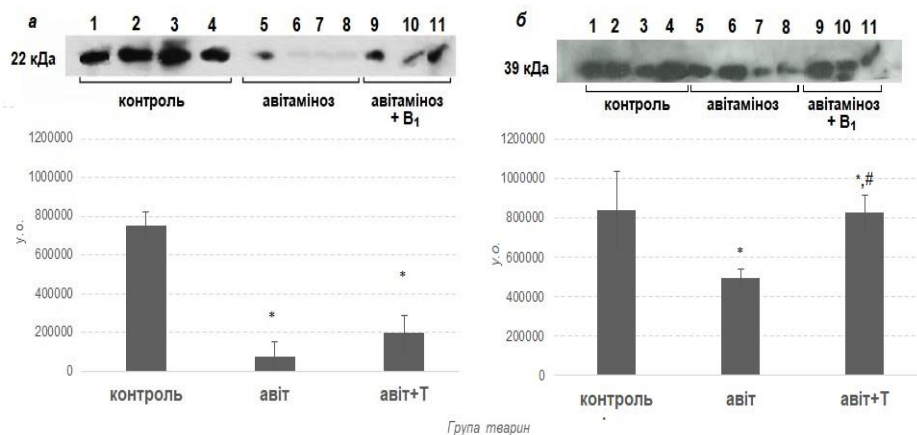


Рис. 4.8.2 – Зміни рівнів досліджуваних протеїнів у гомогенатах мозку щурів з моделлю B_1 -авітамінозу і після введення авітамінозним щурам 200 мкг тіаміну:

a – агрін;

б – LRP4.

на рис.4.8.2 результати можна розглядати як доказ залежності стану протеїнів агрін і LRP4 від забезпеченості клітин тіаміном. При чому щодо агріну відповідь була достовірною хоча одноразового введення в умовах досліду виявилось недостатнім для його 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.4.8.1, 4.8.2) 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 [357]. Різну реакцію цих протеїнів на ДТ-умови ми намагалися пояснити. LRP4 також виконує в клітині функції незалежні від його зв'язування з агріном. Ймовірно, ці функції на додачу до тих, що реалізуються через участь LRP4 у комплексі Agrin-LRP4, є залежними від тіаміну. Можливо має місце вплив вмісту тіаміну на процеси транскрипції генів, що кодують Agrin і LRP4 та трансляції при синтезі їх молекул. Та все-таки наші результати наразі не дають змогу розшифрувати механізми завдячуючи яким ми отримали такі відповіді *in vivo*.

Отже, на цьому етапі досліджень ми мали можливість зробити висновок, що експериментальні результати підтверджують результати мас-спектрометрії.

Роботи, в яких опубліковані основні наукові результати розділу

Mezhenska OO, Rebriev AV, Parkhomenko YuM (2019) Detection of new protein targets of thiamine. Матеріали XII Укр біохімі конгресу Медична та клінічна хімія 3(80) (том 21, Додаток):35-36 Тернопіль, 30 вересня-4 жовтня

Меженська О, Ребриєв А, Пархоменко Ю (2020) Нові протеїнові мішені дії тіаміну 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. – с.23 Дніпро, 1-2 жовтня

4.9 Біоінформативний аналіз результатів

4.9.1 Ідентифікація протеїнів, елюйованих з т-АС, за амінокислотним складом

Ще один підхід може застосовуватися для ідентифікації не описаних раніше протеїнів: за вмістом АК (мол.%) у протеїні. Застосовувані алгоритми засновані на різних математичних методах. Перші алгоритми визначення протеїнів за АК-послідовностями представляли собою перебір всіх можливих комбінацій амінокислот. Вони нині є удосконаленими і доступними онлайн для користування.

Визначення АК-складу виділених на т-АС протеїнів було виконано у попередніх роботах Постоєнко В.А. та Янчій О.Р. [7,9]. Наразі ми вирішили застосувати ці результати як дані для ідентифікації ТЗП за допомогою ресурсу <https://web.expasy.org/aacompident/> (*Constellation 5*), так і для порівняння з результатами, отриманими у рамках цієї роботи іншими методами.

Як вихідні дані використали АК-склад ТЗБ, що представлений у табл. 4.9.1. Для ідентифікації задавались необхідні параметри: молекулярна маса та ізоелектрична точка. Отримані результати щодо ТЗП мозку представлені у таблиці 4.9.2.

Таблиця 4.9.1 - Порівняльний аналіз ТЗБ з різних органів за %-вим вмістом амінокислот

АК	Mol%		
	<i>ТЗБ мозку</i>	<i>ТЗБ нирок</i>	<i>ТЗБ печінки</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Asp, Asx (Asp+Asn)	12,12	12,35	12,2
Glu, Glx (Glu+Gln)	13,75	14,06	14,15
Ser	7,75	9,54	9,76
His	1,18	1,23	1,22
Gly	10,12	10,51	10,49
Thr	4,82	5,5	5,49
Ala	9,41	9,66	9,51
Pro	5,29	5,38	5,49
Tyr	2,47	2,32	2,32

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Arg	3,88	3,79	3,78
Val	4,0	4,4	4,27
Met	2,94	0,49	0,61
Cys	0,82	0,86	0,85
Pe	2,47	2,81	2,93
Leu	7,65	7,7	7,68
Trp	1,41	не визн.	не визн.
Phe	4,0	3,3	3,17
Lys	5,88	6,15	6,1

Таким чином бачимо, що результати у табл. 4.9.2 корелюють з даними отриманими шляхом МС-аналізу (розд. 4.6 та додаток 1) та при створенні моделей ДТ. Ці результати, серед іншого, підтверджують, що в рамках цієї роботи, ідентифіковано ТЗБ, що попередньо досліджувався нашою групою і виділявся на першому базовому т-АС, повним аналогом якого є т-АС, що його синтезовано і використано у цій роботі. Причому LRP4 представлений у табл. 4.9.2 двічі (позиції 1 і 32) під власною назвою та третій раз - з високим значенням балів Score – під назвою рецептор аполіпопротеїну В (апоВ) (позиція 52). У всіх трьох позиціях один і той же протеїн показаний з різними молекулярними масами та цьому можна знайти пояснення у літературі [324,357,358]. Це також може пояснити різницю в молекулярних масах, які раніше визначалися для ТЗБ. Крім того, відомо, що мала ізоформа апоВ – апоВ48 (молекулярна маса повнорозмірного апоВ–100 кДа)-не має ділянки для зв'язування з рецептором, через що АпоВ48 зв'язується з рецептором тільки у комплексі з іншим протеїном – аполіпопротеїном Е (апоЕ), який також є лігандом для LRP4 [359]. В табл. 4.9.2 разом з LRP4 в результатах бачимо також інші протеїни кластеру НАХР та убіквітинлігазної системи. Можливо і четверта позиція (позиція 21) свідчить саме про LRP4 оскільки цей рецептор (як вже звертали увагу в розділі 4.7) містить EGF-домени і з початку був ідентифікований як MEGF7 і молекулярні маси позицій 1, 21 і 52 є доволі близькими.

Присутність в результатах протеїну HIV TAT specific factor 1 (табл.4.9.2, позиція 49) могла б пояснити факт впливу TSST та БМТД на HIV саме через TAT-транскрипційний фактор [153,154] (розділ 1.2.1), як і інгібування транслокації ядерного фактору NF-карра-В (табл. 4.9.2, позиція 9, табл. 4.6.4, позиція 10, додаток 1, позиція 108, регулюючий протеїн) цими сполуками. Також у результатах, крім

Таблиця 4.9.2 – Результати ідентифікації ТЗБ за амінокислотним складом з рецептором, через що АпоВ 48 зв'язується

Rank	Score	Protein	(pI	Mw)	Description
1	15	LDLR_RAT	4.80	94452	Low-density lipoprotein receptor 4
2	16	A0A146LFW7_LYGHE	4.35	46561	Subname:Synapse-associated protein
3	16	A0A1D1Y3J5_9ARAE	5.00	50926	Subname:E3 SUMO-protein ligase RanBP2
4	16	A0A1E3NMC8_9ASCO	5.32	37871	Subname:Uncharacterized protein
5	34	TKT_STAAC	4.97	72251	Transketolase
6	38	PA23_HELISU	4.67	16048	Phospholipase A2 isozymes PA3A/PA3B/PA5
7	47	TE2IP_MOUSE	4.70	43222	Telomeric repeat-binding factor 2
8	48	EF2K_RAT	5.09	81358	Eukaryotic elongation factor 2 kinase
9	50	NFKB1_HUMAN	5.20	105356	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit
10	50	UB2Q1_HUMAN	4.96	46127	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q1
11	50	PPB11_RAT	5.56	53143	Intestinal-type alkaline phosphatase 1
12	51	A0A0G2JTM9_RAT	8.83	42142	Subname:DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B14
13	51	PHAG1_RAT	4.69	45915	Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains 1
14	58	UN13A_RAT	5.10	196356	Protein unc-13 homolog A
15	60	OGRL1_RAT	5.90	52821	Opioid growth factor receptor-like
16	61	INADL_RAT	4.87	199468	InaD-like protein. /FTId=PRO_0000447579.
17	64	APBB1_RAT	4.91	77656	Amyloid-beta A4 precursor protein
18	65	MPDZ_RAT	4.94	218592	Multiple PDZ domain protein.
19	66	GASP1_RAT	4.93	151349	G-protein coupled receptor-associated
20	69	VIP1_RAT	5.09	159619	Inositol hexakisphosphate and and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 1
21	70	A7BFV9_RAT	4.48	98613	Subname: Epidermal growth factor receptor
22	73	TEX14_RAT	5.15	162407	Inactive serine/threonine-protein kinase
23	78	GON4L_RAT	4.82	247903	GON-4-like protein. /FTId=PRO_0000197111
24	80	SOR_RAT	5.14	238552	Sortilin-related receptor. {ECO:0000255}
25	81	MTAP2_RAT	4.77	202411	Microtubule-associated protein 2.
26	83	NISCH_RAT	5.22	166503	Nischarin. /FTId=PRO_0000348267.
27	89	SPKAP_RAT	4.98	184451	A-kinase anchor protein SPHKAP
28	91	AKAP6_RAT	4.95	254352	A-kinase anchor protein 6.
29	92	NID2_RAT	5.21	149863	Nidogen-2. /FTId=PRO_0000392064
30	95	CLIC6_RAT	4.29	64687	Chloride intracellular channel protein 6
31	96	MAP1A_RAT	4.79	274269	MAP1A heavy chain. /FTId=PRO_0000418378.
32	99	LRP4_RAT	5.10	209701	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4
33	100	SKAP1_RAT	4.35	40903	Src kinase-associated phosphoprotein 1
34	100	B0B1T8_RAT	4.99	40265	Subname:Putative alpha7-nAChR chaperone
35	101	SCN4A_RAT	4.93	208867	Sodium channel protein type 4 subunit alpha
36	101	D3ZTF1_RAT	5.01	79024	Subname:Solute carrier family 4 member 1 (Brain-specific organic anion transporter) adaptor protein
37	104	PTPRZ_RAT	4.74	252558	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta
38	105	RIMB1_RAT	5.17	200204	Peripheral-type benzodiazepine receptor
39	107	MAP1B_RAT	4.74	269512	Microtubule-associated protein 1B
40	112	CYB5B_RAT	4.89	15220	Cytochrome b5 type B
41	120	OXR1_RAT	5.00	92810	Oxidation resistance protein 1
42	121	EF1D_RAT	4.94	31199	Elongation factor 1-delta
43	121	IP3KC_RAT	5.07	74463	Inositol-trisphosphate 3-kinase C
44	126	PJA2_RAT	4.34	77790	E3 ubiquitin-protein ligase Praja-2
45	129	NOTC2_RAT	4.99	262731	Neurogenic locus notch homolog protein 2
46	130	NOTC1_RAT	4.89	268920	Neurogenic locus notch homolog protein 1
47	136	LTBP2_RAT	5.09	185961	Latent-transforming growth factor beta
48	136	OBSL1_RAT	5.22	197865	Obscurin-like protein 1.
49	141	D4A997_RAT	4.27	88624	Subname:HIV TAT specific factor 1 (Predicted)
50	154	NFAT5_RAT	5.09	167207	Nuclear factor of activated T-cells 5.
51	158	DMBT1_RAT	4.95	153602	Deleted in malignant brain tumors 1
52	164	A0A0G2K7M4_RAT	4.40	111080	Subname: Apolipoprotein B receptor
53	176	NOTC3_RAT	5.05	240038	Neurogenic locus notch homolog protein 3

54	183	TPR_RAT	4.95	267174	Nucleoprotein TPR. /FTId=PRO_0000422101.
55	301	GCC2_RAT	5.05	195083	GRIP and coiled-coil domain-containing protein
56	425	CO5A1_RAT	4.81	180626	Collagen alpha-1(V) chain

коллагену, спостерігається велика кількість протеїнів цитоскелету (в таблиці не показано), Zinc finger proteins, Coiled-coil domain-containing proteins, Ras-related proteins, протеїнофосфатаз і кіназ, шаперонів та інших протеїнів. Всі вони потребують подальших досліджень щодо специфічності зв'язування з тіаміном.

4.9.2 Докінг тіаміну з протеїнами

Знання просторової структури комплексів клітинних протеїнів і мембранних рецепторів з лігандами є важливим кроком на шляху до розуміння механізмів їх функціонування. Але експериментальне визначення просторової структури комплексу «протеїн-ліганд» пов'язане з певними труднощами. Як наслідок, широкого розповсюдження набули методи комп'ютерного моделювання, які поступово стають невід'ємною частиною фундаментальних досліджень.

Метод молекулярного моделювання, метою якого є пошук сайтів зв'язування та найбільш достовірної орієнтації і конформації ліганду в центрі зв'язування протеїна-мішені, називається молекулярним докінгом. Молекулярний докінг дозволяє передбачати просторову структуру комплексу рецептор-ліганд і вільну енергію його утворення (з якої судять про афінність), виходячи з даних про просторову структуру рецептора, яка відома з роздільною здатністю в кілька ангстрем (наприклад, отриманої за допомогою рентгеноструктурного аналізу), і хімічну структуру ліганда. Одна з переваг цього методу є очевидною: встановлення ключових АК-залишків в активному центрі протеїну, що дозволяє вивчати природу зв'язування та структурно-динамічні основи ензиматичних реакцій на атомному рівні якщо протеїн є ще й ензимом.

Для докінгу ми використовували просторові структури протеїнів та лігандів отриманих з відкритих баз даних в інтернеті або генерували структурні формули лігандів в графічному редакторі хімічних формул ChemScetch12 і конвертували отримані структури у потрібний формат (PDB) з використанням програми OpenBabel (version 2.4.1). Далі структури були енергетично мінімізовані і підготовлені для стикування у пакеті MGLTools. Використовували сліпий та сайт-спрямований протоколи.

Докінгу піддавали протеїни, що їх було ідентифіковано МС-аналізом в елюатах з т-АС. На рис.4.9.1 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). Серед дев'яти розрахованих програмою AutoDock Vina варіантів присутній можливий середньоафінний сайт (між ланцюгами А і В). Також визначені АК-залишки відповідних поліпептидних ланцюгів (як агріну, так і LRP4) відповідальні за зв'язування тіаміну. 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. Потрібно враховувати, що обговорюваний комплекс містить по дві молекули агріну (ланцюги А і В) та LRP4 (ланцюги С і D). Тому існує вірогідність того, що загалом сайтів зв'язування тіаміну п'ять: два високоафінних, один середньоафінний та два низькоафінних. Це було причиною нашого припущення, що біологічним змістом зв'язування тіаміну є стабілізація комплексу Agrin-LRP4 по всіх можливих місцях при збиранні кластеру наХР.

Порівняльний аналіз сайтів зв'язування тіаміну з протеїнами комплексу Agrin-LRP4 визначив їх високу подібність до сайтів зв'язування у добре охарактеризованих тіамін-залежних протеїнах зокрема сайтом зв'язування ТДФ у ПДГ, ТК та інших. Було виявлено співпадіння конформації молекули ліганду при зв'язуванні з проаналізованими протеїнами, у яких ТДФ виконує функціональну роль: з комплексом Agrin-LRP4 у всіх сайтах тіамін/фосфорні похідні тіаміну зв'язуються у V-конформації (рис.4.9.2а, 4.9.2д). При цьому конформація ТДФ у сайті зв'язування метаболічного ензиму відрізняється (4.9.2з).

Докінг комплексу Agrin-LRP4 з фосфорними ефірами тіаміну дозволив визначити різницю у зв'язуванні та пояснити причини більш низької афінності фосфатів у порівнянні з тіаміном. Обов'язковими елементами тіамін/ТДФ-зв'язувального сайту є, з одного боку, β -структури, з іншого, α -структура (α -спіраль чи повороти). У випадку комплексу Agrin-LRP4 (високоафінний сайт), з β -структур та поворотів складається кишеня у складі LRP4, де зв'язуються гетероцикли молеку-

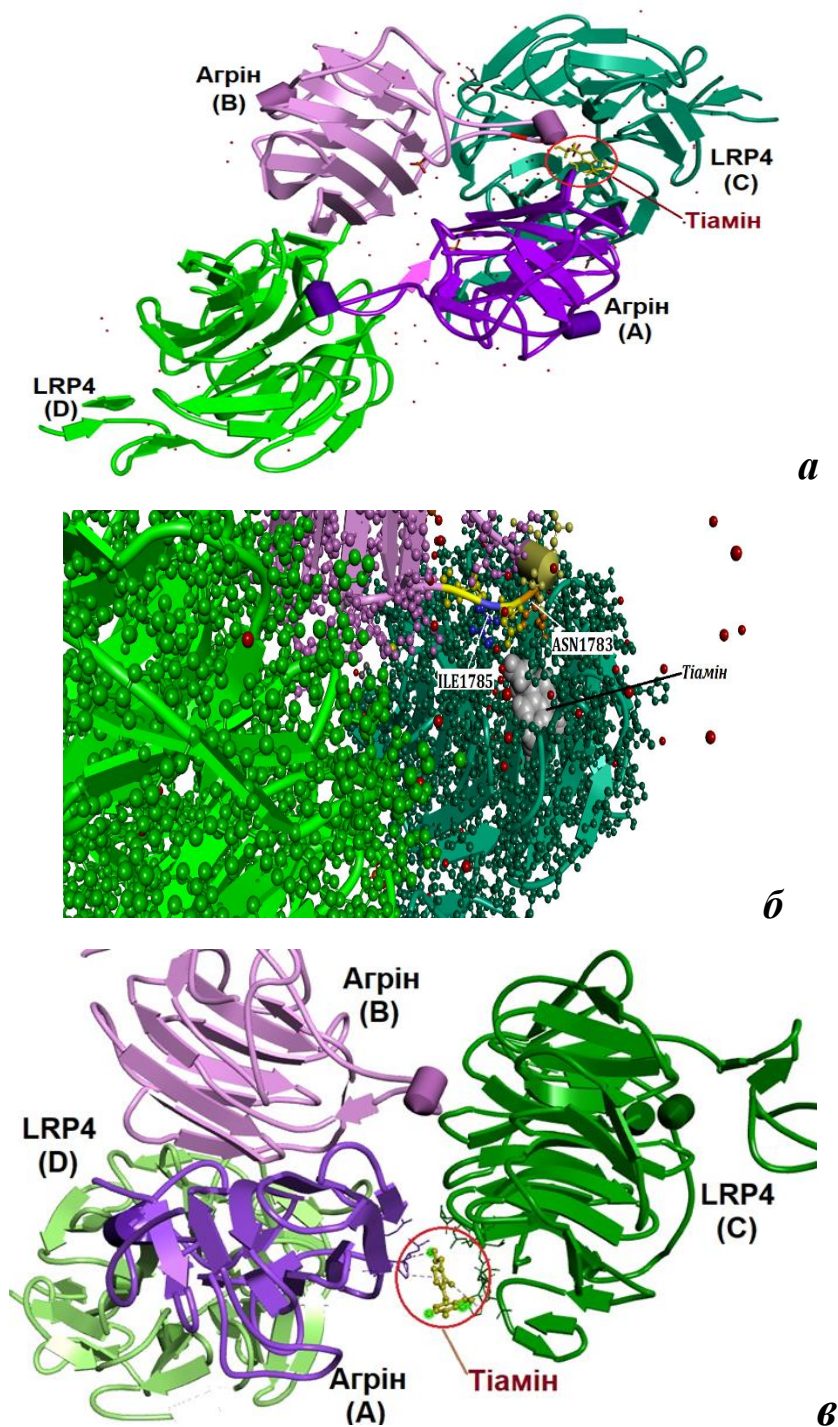


Рис.4.9.1 - Докінг тіаміну з ТЗБ (комплекс *Agrn-LRP4* (PDB код 3v64)) у програмі *AutoDock Vina* та візуалізованого за допомогою програмного пакету *Discovery Studio* від *BIOVIA*: **а** – високоафінний сайт, **б** - високоафінний сайт у збільшеному масштабі (прибрано субодиночку А). Жовтим кольором на субодиночці В (рожева) позначено з8-пептид характерний для нейрональної ізоформи Агріну, який входить до складу пептиду масою 4970 Да (рис.4.7.3), а також меншого за розміром пептиду, до складу якого входять ці 8 АК: 3988 (вільний) та 4292 Да (зв'язаний з тіаміном); синім та жовтим кольором виділено АК Агріну, що беруть участь у зв'язуванні тіаміну. Примітно, що мутація будь-якого з залишків (ASN1783, ILE1785) усуває взаємодію Агрін-LRP4 і подальшу кластеризацію *nAHP*; **в** - низькоафінний сайт.

ли тіаміну, а α -циліндр (α -спіраль) знаходиться у складі петлі агріну, яка простягається до кишені LRP4 і містить специфічний z8-пептид. При чому, на відміну від його фосфорних похідних, тіамін зв'язується у сайті повернутим оксиетильним радикалом до z8-пептиду (рис.4.9.2a). Тоді як наявність фосфатних груп змінює заряд молекули ліганду, що змінює його орієнтацію у сайті зв'язування (рис.4.9.2б,в). Таким чином похідні тіаміну зв'язуються поверненими піримідиновим кільцем до α -циліндру. При цьому природа зв'язку з z8-пептидом змінюється. Зв'язок стає більш напруженим, афінність знижується. ТТФ у сайті зв'язування також знаходиться у V-конформації, але, на відміну від тіаміну та ТДФ, вигнутий метиленовим містком до гори, що ще більше напружує зв'язки і знижує афінність (рис.4.9.2в). ТТФ своєю третьою макроергічною фосфатною групою зв'язується з залишком Ser582 у складі LRP4. Тому існує вірогідність того, що Ser582 виявиться новим сайтом для посттрансляційної модифікації LRP4 шляхом фосфорилування.

Щодо аденозину та його фосфатів, то їх зв'язування відбувається інакше (рис.4.9.2г). Подібно до тіаміну та його б.а. похідних, у відповідній кишені LRP4 зв'язуються гетероцикли сполук, але, на відміну від тіаміну/б.а.похідних тіаміну, зв'язування з z8-пептидом агріну не відбувається. Орієнтація молекул нуклеотидів у сайті зв'язування інакша, при цьому α -циліндр у складі агріну, що містить z8-пептид, знаходиться на дуже далекій відстані. Тому утворення зв'язку з агріном не можливе і аденозинові сполуки зв'язуються тільки з LRP4. Крім того, ми звернули увагу, що при зв'язуванні аденозину та, особливо, його фосфатів змінюється форма кишені через зсув у просторі відповідних β -структур, тобто відбувається налагодження кишені під форму ліганду, що, взагалі, не дивно. Але подібної перебудови кишені при зв'язуванні тіамінових сполук не відбувається: вона не потрібна, оскільки ці ліганди «вписуються» у кишеню ідеально у зв'язку з гнучкістю молекули тіаміну в області метиленового містка. Зокрема у випадку стикування з комплексом, що має просторову будову закристалізовану і розміщену у базах даних під кодом 3v64. При використанні для докінгу просторової структури з кодом 3v65 ми отримали подібні результати, повне співпадіння виявлене для низькоафінного сайту. Пептиди, що входять до складу цього сайту, які належать як агріну, так і LRP4, а також середньоафінного сайту (пептиди у цьому випадку належать двом різним субодини-

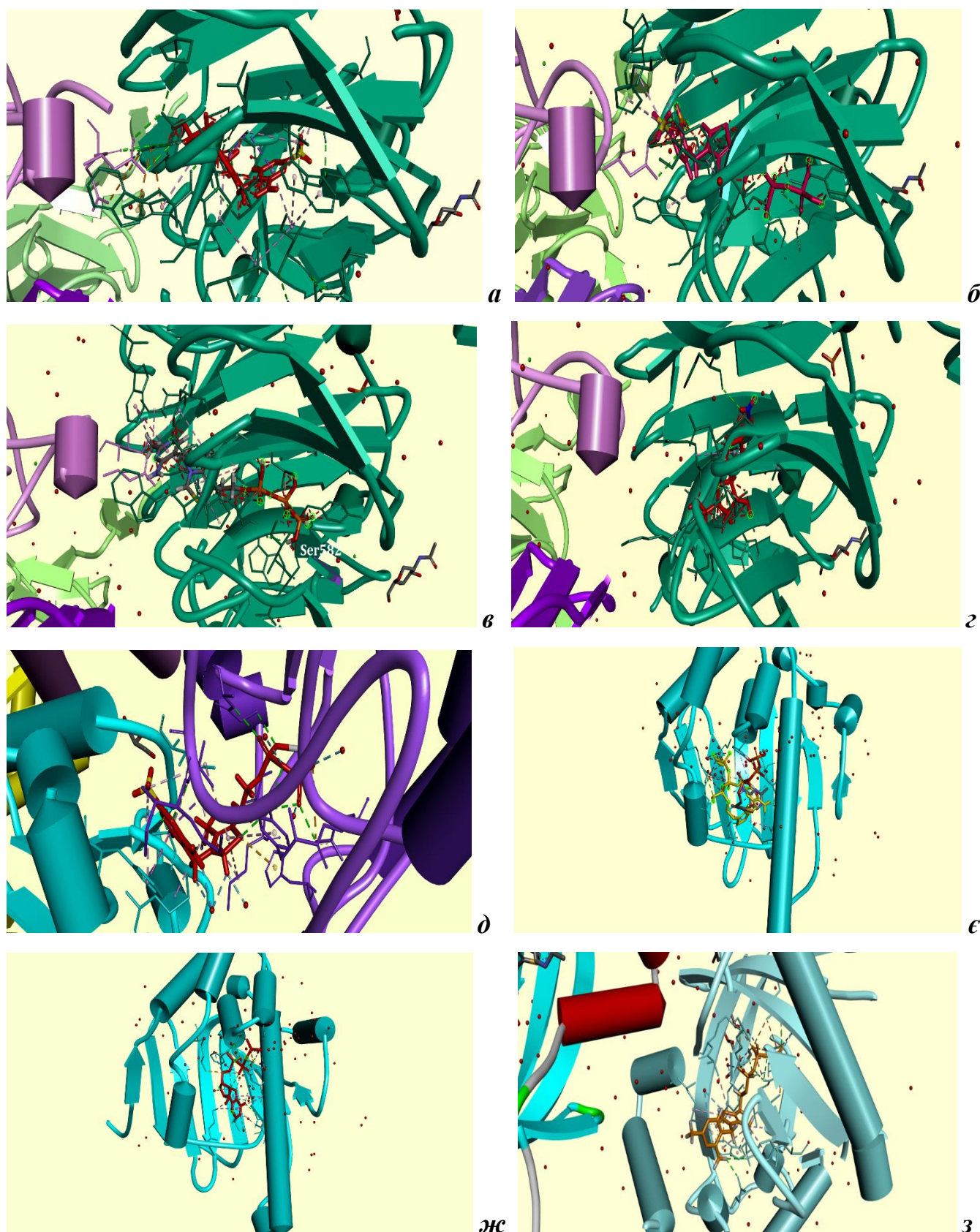


Рис. 4.9.2 – Аналіз сайтів зв'язування тіаміну/б.а.похідних тіаміну з протеїнами: *а* - Agrn-LRP4 (3v64)-тіамін (високоафінний сайт), *б* - Agrn-LRP4 (3v64)-ТДФ, *в* - Agrn-LRP4 (3v64)-ТТФ, *г* - Agrn-LRP4 (3v64)-аденозин, *д* - ПДГ (3ехе)-ТДФ, *е* - hsp90 (3t0z) -ТТФ у двох різних можливих конформаціях у сайті зв'язування, *ж* - hsp90 (3t0z) -АТФ, *з* - цТТФ-аза (5a64) - ТТФ

цям агріну та LRP4) також були виявлені МС-аналізом у складі препарату ТЗБ елюйованому з т-АС з застосуванням і специфічної, і неспецифічної елюції, як у вільному, так і у зв'язаному з тіаміном стані.

Про зв'язування тіаміну з АХР було відомо з експериментів, проведених в рамках роботи [39]. Зв'язування ацетилхоліну з ТЗБ досліджено у роботі Янчій О.Р. [132]. Нарешті, також з попередніх досліджень нашої групи [7], було відомо, що фосфорні ефіри тіаміну за здатністю конкурувати з ^{14}C -тіаміном за зв'язування з ТЗБ розташовуються в наступному порядку: тіамін > ТМФ > ТТФ > ТДФ. Ці факти послужили частковим поясненням результатів наведених на рис. 4.2.1., а також поштовхом для перевірки результатів попередників і отриманих власне в рамках цієї роботи (шляхом МС і Вестерн-блот аналізу) за допомогою біоінформативних підходів. Результати розрахунків у програмі AutoDock Vina дозволили нам отримати значення енергії зв'язування з комплексом Agrn-LRP4, який ми вважаємо ТЗБ, крім тіаміну (рис. 4.9.2) також й інших сполук. А заразом, з метою порівняння, ми провели докінг ацетилхоліну з комплексом Agrn-LRP4 оскільки ці протеїни є компонентами кластеру рецептора саме цього нейромедіатора. Таким чином отримані дані ми узагальнили у вигляді діаграми (рис. 4.9.3) та представили у додатку 2.

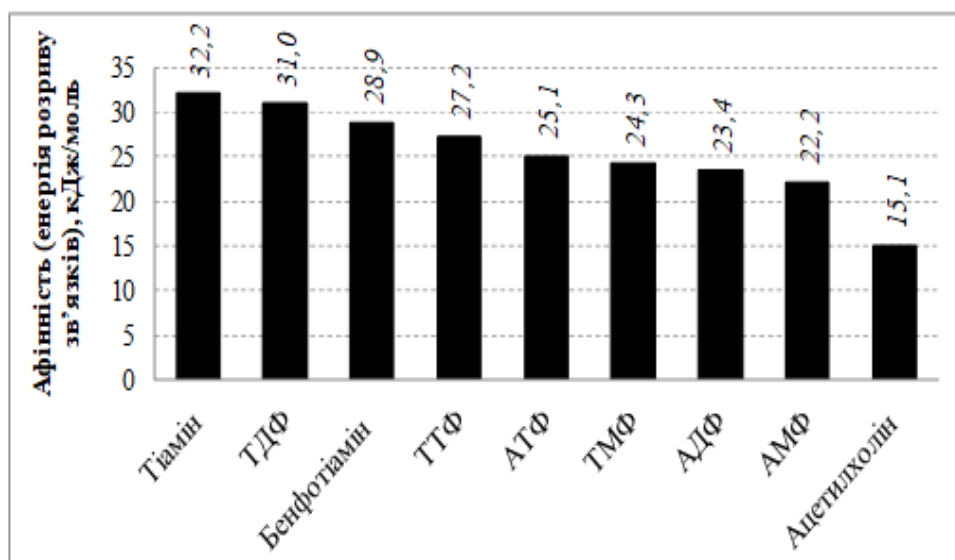


Рис.4.9.3 – Порівняння енергії зв'язування певних сполук, які представляли інтерес в рамках даного дослідження, з комплексом Agrn-LRP4 (PDB код 3v64) (показані значення виключно для найоптимальніших (найвищий рівень енергії зв'язування-найменша відстань до вузлів зв'язування) варіантів №1 розрахованих в програмі AutoDock Vina

Отже, дані рис. 4.9.3 і в додатку 2 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 АСh до ТЗБ у порівнянні з тіаміном [132] у даному випадку

підтвердився по відношенню до комплексу Agrn-LRP4 за допомогою одного з методів комп'ютерної біології. Таким чином, ми зробили висновок, що результати молекулярного докінгу також підтверджують, що комплекс Agrn-LRP4 може бути ТЗБ.

Разом результати наведені на рис. 4.9.2*a-g*, 4.9.3 та в додатку 2 свідчать про низьку вірогідність заміни тіаміну/б.а.похідних тіаміну нуклеотидами при функціонуванні комплексу Agrn-LRP4. Навпаки, у інших випадках ТТФ може бути сильним конкурентом класичного АТФ. Один з прикладів наводився вище (фосфорилування рапсину за рахунок ТТФ, а не АТФ). У нашій роботі докінг ТТФ з протеїном теплового шоку hsp90, (який серед інших функцій є ще АТФ-азою) показав майже близьку за значенням спорідненість лігандів до протеїну (за енергією розриву зв'язків): 33,49 кДж/моль (АТФ) vs 32,66 кДж/моль (ТТФ). Як видно з рис.4.9.2,*ε,ж*, трифосфостильний радикал ТТФ дуже гнучкий і може вигинатися ближче до бета-структури, яка на передньому плані, повністю відтворюючи конформацію АТФ. Можливо при цьому спорідненість ТТФ до hsp90 зростає. Це може пояснити причину чому hsp90 було виявлено у фосфопроотеомах [349]. При цьому, як можна впевнитися за допомогою рис.4.9.2, hsp90 має просторову будову подібну до сайту зв'язування тіаміну у комплексі Агрін-LRP4 або у ТДФ-залежних протеїнах: присутні обов'язкові β- та α-структури у сайті зв'язування. Подібна просторова будова також притаманна протеїнові Iyб/PLAUR domain-containing protein 4 isoform X1 (додаток 1, позиція 95), що належить до сімейства ендогенних протеїнових регуляторів НАХР.

Щодо НАХР, зважаючи на експериментальні дані про зв'язування НАХР з тіаміном [39] та/або, можливо, продуктом дії тіамінази I і на те, що в наших зразках, елюйованих тіаміном з т-АС, шляхом МС-дослідження було ідентифіковано α3 та δ субодиноці НАХР (додаток 1, позиції 28-29), тобто саме ті, в місці стикування яких знаходиться ортостеричний сайт зв'язування ацетилхоліну, логічним було також виконати докінг НАХР з тіаміном та його похідними. Але через те, що просторову структуру гетеропентамерного НАХР у складі якого присутні і α3, і δ субодиноці наразі не отримано, для докінгу ми використали доступні у базах даних цілісні структури НАХР іншого складу або трансмембранних доменів, з яких складається

йонний канал nAHP. В процесі цих експериментів *in silico* було отримано низку цікавих та вагомих результатів, але це вже буде темою іншої дослідницької роботи.

4.9.3 Вирівнювання протеїнів

Вирівнювання послідовностей — це один з основних інструментів біоінформатики, який реалізується через взаємне розміщення послідовностей ДНК, РНК і протеїнів для того, щоб побачити місця схожості, які можуть бути наслідком функціональних, структурних або еволюційних взаємозв'язків між цими послідовностями. Загалом справедливим буде висловлювання, що якщо біомакромолекули мають загальні послідовності мономерів, то вони, як правило, виявляють подобу в структурах і в біологічних функціях. Найчастіше для таких біомакромолекул виявляється і загальний предок. У цьому випадку, говорять, що якщо два протеїни або дві нуклеотидні послідовності мають велику схожість, то вони є гомологами, і, як правило, мають спільного попередника, схожу функцію і схожі структури. Однак не слід забувати, що в біології з гомології найчастіше слідує подібність функцій, тоді як подібність функцій може бути наслідком як гомології, так і аналогії. Гомологічними протеїнами називають протеїни, чиє походження від загального предка доведено. Якщо ж згортки протеїнів подібні, але первинні послідовності відмінні, то такі згортки вважають аналогічними. Вони можуть мати подібну 3D-структуру і в тій чи іншій мірі схожу АК-послідовність зокрема у структурних доменах або активних сайтах ензимів.

Тому при доказі гомологічності/аналогічності декількох послідовностей виникає завдання встановлення відповідності один одному окремих протяжних ділянок послідовностей. В цьому випадку прийнято говорити про вирівнювання послідовностей. У найпростішому випадку вирівнюються дві послідовності (парне вирівнювання (*pair sequence alignment*)), у більш складних випадках вирівнюється цілий набір послідовностей (множинне вирівнювання (*multiple sequence alignment*)). Як правило, множинне вирівнювання здійснюється на основі результатів парного.

У наших дослідженнях ми використали можливості, які надають біоінформативні інструменти та виконали вирівнювання визначених в елюатах з т-АС МС-аналізом

протеїнів проти відомих ТДФ-залежних протеїнів чи протеїнів, що приймають участь у метаболізмі тіаміну та його фосфорних ефірів.

Як бачимо, на рис. 4.9.4 представлено результат 2D і 3D pair sequence alignment, що виявили певну схожість у первинній послідовності (однакові чи замінені на подібні за властивостями амінокислоти (АК)) або просторовій будові порівнюваних протеїнів у сайтах зв'язування субстратів, коензимів чи ефекторів. Так, на частинах *a* і *b* видно, що частина АК ділянки, що зв'язує ТДФ, знаходиться між АК ділянки, що зв'язує NAD(H), а сайт зв'язування АМФ (на рис.4.9.4 показана частина) знаходиться поруч та навіть пересікається з ділянкою, що зв'язує ТДФ. Можливо зробити висновок які саме АК-залишки входять до ділянок, що здатні зв'язувати тіамін/ТДФ у складі ізозимів МДГ. Результати вирівнювання МДГ2 щура проти ТПК щура в UniProt виявили, що ці протеїни мають 53 повністю ідентичні позиції та 66 подібних

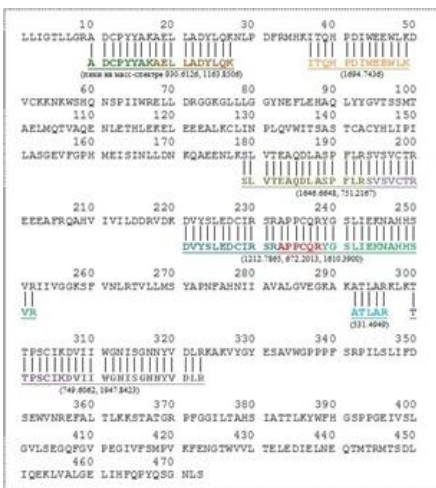


Рис. 4.9.5 - Вирівнювання пептидів, виявлених МС і ідентифікованих в плямі № 1 (Рис. 4.6.3) проти MDH1B свині (UniProtKB - F1SHD0). Основна послідовність протеїну MDH1B позначена чорним кольором, амінокислотна послідовність пептидів, є кольоровою

(15% ідентичності). Це означає, що ці протеїни не є гомологами (ідентичність повинна перевищувати 30%), але мають аналогічні сайти для зв'язування одних і тих же сполук. Наші експериментальні результати, що приведені у попередніх розділах, продемонстрували факт зв'язування тіаміну/його б.а. похідних з деякими протеїнами, що були виявлені в елюатах з т-АС. Біоінформативний аналіз дав можливість спрогнозувати місцезнаходження сайтів зв'язування.

В процесі ідентифікації ізозимів МДГ, що виявляють афінитет до тіаміну, з використанням препарату комерційної МДГ (розділ 4.6), Mascot видав як результат перелік пептидів, за якими був ідентифікований ізозим МДГ1В (табл. 4.6.2) у плямі № 1. Для того щоб з'ясувати локалізацію пептидів у АК-послідовності ідентифікованого протеїну, ми виконали вирівнювання і отримали результат, що його представлено на рис. 4.9.5. Нашим наступним завданням було виявити наявність ідентичного протеїну у людини. Виявилося, що МДГ1В свині та людини є гомологами оскільки вони ідентичні на

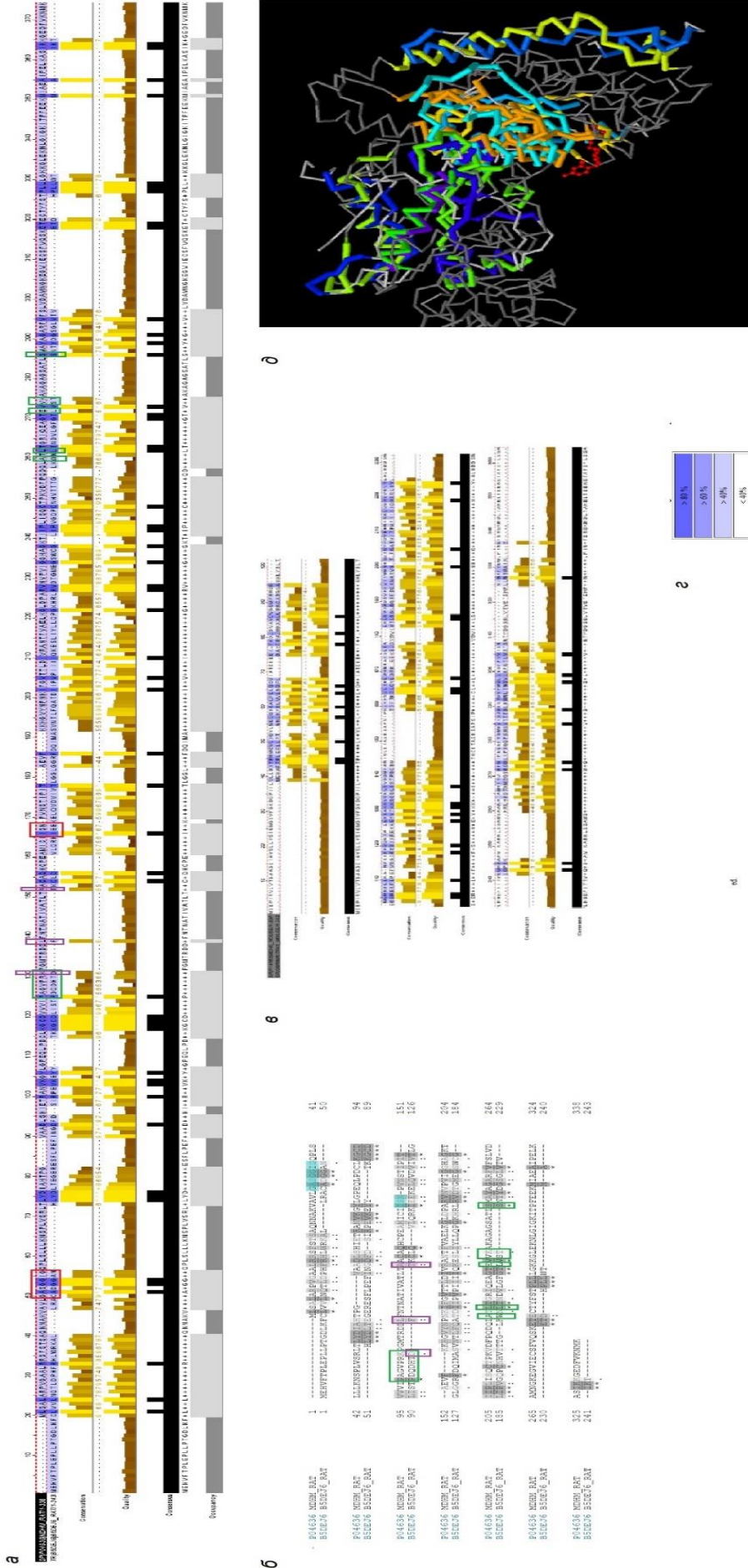


Рис. 4.9.4 - Попарне і просторове вирівнювання МДГ проти відомих тіамінзалежних протейнів: *a* – мітохондрійної МДГ шкура проти ТПК шкура з використанням програми Jalview (версія 2.11.0); *б* – попарне вирівнювання мітохондрійної МДГ шкура проти ТПК шкура з застосуванням онлайн-ресурсу Align від UniProt, що використовує програму Clustal Omega (<https://www.uniprot.org/align>); *в* - цитозольної МДГ в порівнянні з мишачю ТПК; *г* - значення інтенсивності кольору щодо ідентичності АК-залишків на частинах *a* і *б*, *те ж* стосується рівня сірого кольору на частині *б*; кольоровими прямокутниками позначені сайти зв'язування і подібні частини у порівнюваному протейні: червоним (блакитним у частині *б*) – NAD(H), зеленим – TДФ, фіолетовим – АМФ; *д* - просторове вирівнювання цитозольної МДГ свині проти ТК свині; кольорові стрижні позначають АК, подібні в обох протейнах: зелені, жовті і помаранчеві - амінокислоти ТК, світло - блакитні, сині, темно - сині - амінокислоти МДГ, червоним позначено ТДФ.

78,5% (BLAST, UniProt).

У зв'язку з тим, що існує інформація щодо наявності E3 убіквітинлігазної активності у протеїну кластеру nAXP рапсину та ідентифікацією його можливого функціонального партнера - Ubiquitin-conjugating enzyme E2 (EV and lactate/malate dehydrogenase domain-containing protein (UEV-3)) в елюатах з т-АС та у складі комерційного препарату МДГ було вирішено виконати множинне глобальне вирівнювання за допомогою BLAST від UniProt з метою виявлення подібних протеїнів у інших видів. Виявилось, що організм людини виробляє протеїн, що на 73,7% ідентичний Ubiquitin-conjugating enzyme E2 щура, тобто ці протеїни є гомологами і подібні біологічні функції мають місце в організмі людини. Попарне вирівнювання людських UEV-3 проти МДГ2 показало 136 подібні АК-позиції і 59 повністю ідентичних, куди входив також і сайт зв'язування NAD в обох протеїнах. При цьому докінг тіаміну до UEV-3 (код PDB 3DL2) показав 9 варіантів зв'язування тіаміну з молекулою UEV-3. Два з дев'ятох приходяться на ділянку зв'язування з NAD. Та ці результати лише попередні і потребують ретельної перевірки усіх варіантів.

Після того, як були отримані результати вимірювання ТДФ-азної активності у фракціях після ГФ, визнання того факту, що МДГ-азна активність постійно супроводжує тіамінфосфат гідролазну активність (у т.ч. і після ГФ), докінгу тіаміну з комплексом LRP4-Agrn, що входить до складу кластера АХР нікотинового типу і зроблено аналіз складу вказаного кластера і результатів попередніх досліджень нашої групи, було зроблено припущення, що саме LRP4 може бути мембранною ТДФ-азою, яку вже багато років шукають дослідники. Для перевірки цієї гіпотези ми вирішили почати з 3D-вирівнювання цього протеїну проти добре охарактеризованого протеїну, що гідролізує ТДФ, а саме розчинної цитозольної тіамінтрифосфатази (ЕС 3.6.1.28) хоча до сьогодні ніяких ензиматичних активностей у LRP4 виявлено не було. Результат цього аналізу продемонстрував наявність у LRP4 кишені, яка подібна до кишені, де зв'язується та гідролізується ТДФ у складі цитозольної ТДФ-ази. Виявлена кишеня LRP4 знаходиться у безпосередній близькості до мембрани з боку цитозолу (рис.4.9.7), що співпадає з даними, отриманими щодо локалізації ензиму з ТДФ-азною активністю, яку досліджували з використанням препаратів синаптосом та плазматич-

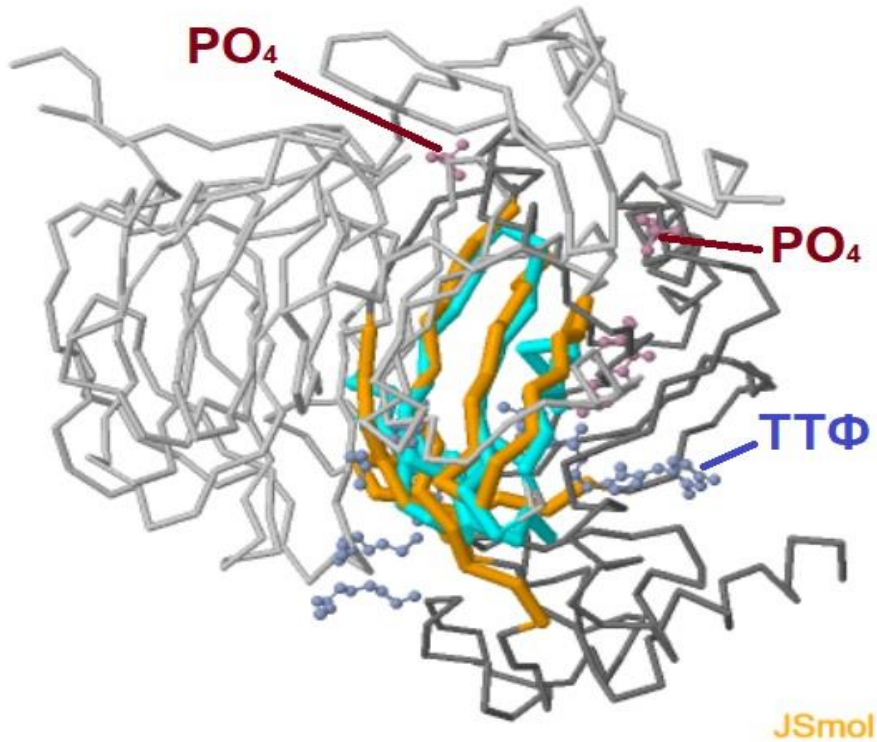


Рис. 4.9.6 – 3D-вирівнювання *LRP4* vs *цитозольна ТТФ-аза* (онлайн-доступний біоінформатичний ресурс від Protein Data Bank), блакитні та світло-сірі стрижні - *LRP4*, помаранчеві та темно-сірі стрижні – *цитозольна тіамін трифосфатаза*. Також на рисунку присутні інші ліганди *LRP4*.

Highlight

Annotation

- Helix
- Binding site
- Modified residue
- Turn
- Signal peptide
- Glycosylation
- Transmembrane
- Metal binding

LAST

Entry	Entry name	Protein names	Organism	Gene name
Q9QYP1	LRP4_RAT	Low-density lipoprotein receptor-re...	Rattus norvegicus (Rat)	Lrp4 Megf7
Q8CGV7	THTPA_RAT	Thiamine-triphosphatase	Rattus norvegicus (Rat)	Thtpa

```

Q9QYP1 LRP4_RAT      1501 LDGSERKVLINADLGNPNGLTLDYDTRRIYVVD AHLDRIESADLNKGRQVLVSHVSHPF 1560
Q8CGV7 THTPA_RAT    148  .....SDFGFAVE.....IIV..... 159

Q9QYP1 LRP4_RAT      1561 ALTQQDRWIYWDWQTKSIQRVDKYSGRNKETVLANVEGLMDIIVVSPORQTGTNACGVN 1620
Q8CGV7 THTPA_RAT    160  ..... 159

Q9QYP1 LRP4_RAT      1621 NNGCSHLCFARASDFVCACPEFDSHPCSLVPLGMPAPRATSLNEKSPVLPNTLPTLH 1680
Q8CGV7 THTPA_RAT    160  ..... 159

Q9QYP1 LRP4_RAT      1681 SSTTRTRTSPEGAEGRCSEDAQLGLCGNEAVEKSPGCGHHAVGSLKLLLLLV 1740
Q8CGV7 THTPA_RAT    160  .....AVVHEKALVPALEKLEISVS...SMVVPACEKA 190

Q9QYP1 LRP4_RAT      1741 YKALD...YRHEKSKFTDPGMGNLTVSNPSYRTSTQEVKIEAAPKAMKCYKKEGSPDH 1800
Q8CGV7 THTPA_RAT    191  PAKLLVLLRF.....RQDYQRLLEADSSSEAT 219

Q9QYP1 LRP4_RAT      1801 SYTKERIKIVEGIHLLAGHDAEWGDLKQLRSSRGLLRDHVCMKTDTVSIQASSGSLDDT 1860
Q8CGV7 THTPA_RAT    220  ..... 219
                
```

Рис.4.9.7 - Попарне вирівнювання амінокислотних послідовностей *LRP4* проти *цитозольної ТТФ-ази* (показано частину в районі трансмембранного домену *LRP4*)

```

160          170          180          490          500
P50137 (TKT_RAT) CMLGDGEVS.....E GSVWEAMAFA .....RTSRPENAI IYSNNEFDQVG

1340        1350        1360        1370        1380        1390        1400
Q9QYP1 (LRP4_RAT) LKGDGKTCDP SPETYLLFSS RGSIRRIISLD TDDHTDVHVP VPGL....NNVISL DYDSDVGKVV
                
```

Рис.4.9.8 – Класичний ТДФ-зв'язувальний мотив у складі протеїнів (АК, задіяні у зв'язуванні, виділено жирним шрифтом)

них мембран синапсом у нашій групі [328]. Ймовірно ТТФ у цьому сайті зв'язується подібно до способу зв'язування ТТФ в сайті розчинної ТТФ-ази (рис.4.9.6., 4.9.2з). Отже, на цьому етапі ми отримали дані (рис. 4.9.6), які підтверджують нашу гіпотезу щодо природи мембранної ТТФ-ази. МС-аналіз показав присутність в препаратах ТЗБ пептидів, що належать внутрішньоклітинному С-кінцю LRP4. Та потрібно також зважити на те, що деяку кількість ділянок зв'язування з тіаміном знайдено в позаклітинній частині LRP4, в т.ч. високо-, середньо- та низькоафінні сайти, про які йшлося вище. Обидві 3D-структури LRP4 (3v64, 3v65) містять лише позаклітинні N-кінці LRP4, які вдалося закристалізувати. Вирівнювання LRP4 проти добре відомих ТДФ-залежних ензимів, зокрема ТК, також виявило у первинній послідовності LRP4 класичний ТДФ-зв'язувальний мотив (рис.4.9.8) [360]. Цей мотив розташований у позаклітинній частині LRP4. При аналізі рис. 4.9.7 у внутрішньоклітинній частині можна знайти подібний сайт за участі тих же та схожих за властивостями амінокислот.

Щодо агріну програми докінгу також показали ще кілька сайтів зв'язування з тіаміном крім визначеного у кишнях між агріном та LRP4. Кожен з сайтів потребує окремого дослідження бо це також може мати біологічний зміст: декілька сайтів зв'язування з лігандом у одного протеїну. Крім комплексу Agrip-LRP4 ззовні клітини, який потрібен для інервації м'язів або утворення міжнейронних зв'язків, у середині клітини без агріну субодиниці самого nAHP не будуть транспортовані та вбудовані до мембрани [319]. Це є обов'язковим для утворення повноцінно функціонуючого nAHP.

Роботи, в яких опубліковані основні наукові результати розділу

Mezhenska OO, Rebriev AV, Parkhomenko YuM (2019) Detection of new protein targets of thiamine. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу Медична та клінічна хімія. – 3(80)(том 21, Додаток):35-36 Тернопіль, 30 вересня-4 жовтня

Меженська О, Ребрів А, Пархоменко Ю (2020) Нові протеїнові мішені дії тіаміну 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. – с.23 Дніпро, 1-2 жовтня

РОЗДІЛ 3. ЗАКЛЮЧЕННЯ

Надзвичайно високу чутливість нервових клітин до дефіциту вітаміну В₁, яка значно перевищує таку для клітин інших тканин, виявилось неможливим пояснити лише з позиції участі ТДФ як коензиму у функціонуванні ряду ключових ензимів метаболізму. Пошуки можливих молекулярних механізмів, які можуть бути відповідальні за високу нейротропність тіаміну, розвивалися в кількох напрямках, відповідно до тієї чи іншої гіпотези, якої дотримувалися вчені.

Головна ідея мембранної гіпотези передбачає участь тіаміну або його біологічно активних похідних в процесі провідності нервового імпульсу на рівні збудливої мембрани. Метаболічна гіпотеза розглядає внесок тіамін-залежних біохімічних процесів у функціональну активність нервових клітин, включаючи і функціонування збудливої мембрани. Ця гіпотеза припускає існування в нервових клітинах крім пулу ТДФ, що зв'язується з ензимними протеїнами, швидкообмінюваного пулу похідних тіаміну (РПТ), сполученого з функціями збудливої мембрани і обміном АСh. Уявлення про наявність в клітині РПТ, обмін якого пов'язаний зі змінами мембранного потенціалу нервової клітини, перегукується з сучасними уявленнями про високу динамічність клітинних структур як невід'ємну властивість живої клітини.

Вся сукупність отриманих на сьогодні даних щодо ролі тіаміну в клітинах дає підстави зробити висновок, що некоензимні механізми дії тіаміну набагато ширші, ніж це уявляли раніше і що і коензимні, і некоензимні механізми дії тіаміну на клітинний метаболізм тісно взаємопов'язані і це підтверджується при вивченні гомеостазу тіаміну на моделях його дефіциту і при нейродегенеративних патологіях. Тому не дивно, що дослідники все частіше використовують експериментальні моделі ДТ для вивчення механізмів розвитку нейродегенеративних процесів.

Порівняльний аналіз результатів, отриманих при вивченні дії антагоністів тіаміну на тваринних моделях дає можливість експериментально розрізнити ефекти різних за структурою речовин, які перешкоджають реалізації функцій тіаміну в живому організмі. Так, тільки при введенні тваринам ПТ у них спостерігаються

симптоми розладу нервової системи, хоча більш виражені зміни в активності ТДФ-залежних ензимів відбуваються при введенні ОТ. Зазначені спостереження досить легко пояснити з позиції гіпотези про існування РПТ, що забезпечує сполучення метаболізму нервової клітини з функціонуванням збудливої мембрани. Так, ПТ більш специфічно, ніж ОТ, блокує фосфорилування тіаміну в клітині, перериваючи функціонування РПТ на рівні ТПК, до такого ж результату призводить блокування синтезу ТТФ при хворобі Лея. У той же час, ОТ, подібно самому тіаміну (але при набагато більш високих значеннях K_m), здатний фосфорилуватися до ди- і трифосфатів, мімікуючи таким чином регуляторну дію фосфатів тіаміну і впливаючи на синтез ацетилхоліну, через що його дія на нервову систему є більш «м'якою».

Ключовими протеїнами обміну РПТ, в першу чергу, є транспортери тіаміну, локалізовані в плазматичній мембрані, та ТПК. Безумовно, ці протеїни не єдині, що включені у функціонування РПТ. Ось чому пошуки механізмів нейротропної дії тіаміну не обмежуються лише колом відомих на сьогодні тіамін-залежних протеїнів або протеїнів, що беруть участь в обміні вітаміну B_1 . Як свідчать результати порівняльного аналізу змін в стані протеїнів при нейродегенеративних процесах, певних патологіях і при дефіциті тіаміну, коло протеїнів в клітинах, що специфічно взаємодіють з б.а. похідними тіаміну або реагують на зміну гомеостазу тіаміну, виявляється значно ширшим, ніж вважалося раніше. Аналіз всієї сукупності даних літератури з проблеми некоензимних механізмів участі тіаміну в функціонуванні нервової системи, накопичених до цього часу, дає підстави припускати, що одним з ефективних підходів в пошуку таких механізмів є ідентифікація нових функціонально-активних протеїнів нервової тканини, які проявляють високу афінність до тіаміну або його похідних, а також реагують на його дефіцит. Чому і була присвячена ця дисертаційна робота.

У процесі ідентифікації не-ТДФ-залежних протеїнових мішеней дії тіаміну у мозку був виділений і частково вивчений протеїн, який отримав найменування тіамінзв'язувальний білок або ТЗБ. Виявилося, що крім тіамінзв'язувальної активності (ТЗА), цей, виділений з синапсом, протеїн володіє тіамінтри- (ТТФ), тіамінди- (ТДФ) і тіамінмонофосфатазними активностями. ТЗБ виділяли у м'яких умовах за допомогою афінного сорбенту, який містив в якості ліганда одну молекулу

тіаміну іммобілізовану до матриці через спейсер. Цей афінний сорбент отримав назву базовий оскільки в подальших дослідженнях також були використані модифіковані сорбенти, що відрізняються від базового, в яких до одного спейсеру були прив'язані або дві молекули тіаміну, або структурний компонент молекули тіаміну у вигляді ДМГТ - 3-децил-оксікарбоніл-метил-4-метил-5-(2-гідроксіетил) тiazолу. В ході проведення афінної хроматографії з модифікованих сорбентів також збирали фракції збагачені тіаміндіфосфатазною (ТДФ-азною) активністю. Отримані фракції піддавали ДСН-ПААГ електрофорезу і провели МС аналіз. Таким чином у 2008 році в нашому інституті в елюатах з афінного сорбенту за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії вперше були ідентифіковані малат- і глутаматдегідрогеназа. Практично в цей же час також членами нашої групи за допомогою Вестерн-блот аналізу було виявлено, що менша субодиниця ТЗБ реагує з антитілами до цитозольної ТДФ-ази, внаслідок чого тіамінфосфатазна активність ТЗБ була співвіднесена саме з поліпептидним ланцюгом, який має молекулярну масу в районі 35 кДа.

Розчинна ТДФ-аза наразі досліджена достатньо добре. Що стосується мембранозв'язаної ТДФ-ази, описаної в літературі, то інформація про цей протеїн дуже обмежена. Встановлення мембранної локалізації ізолюваного раніше ТЗБ, який виявляє ТДФ-азну активність, дало підставу замислитися про ідентичність ТЗБ з протеїном, описаним Varchi et al. [105]. Визначене значення оптимуму рН для ТДФ-азної активності, асоційованої з препаратами ПМС, співпадає з визначеним для ізолюваного ТЗБ мозку щура та ближче за значенням до величини рН-оптимуму, визначеному Varchi et al. для мембранозв'язаного ензиму (6,5-7,2), і, навпаки, досить істотно відрізняється від рН-оптимуму цитозольного ензиму (8,7-9,5). Отже, аналіз даних, одержаних у проведених нашою групою дослідженнях на тому етапі, дозволив зробити висновок, що ТЗБ є найбільш вірогідним і єдиним носієм тіамінтрифосфатазної активності в плазматичних мембранах нервових клітин.

Результати цієї роботи дозволили ідентифікувати протеїнову складову плазматичних мембран, компоненти якої одночасно здатні зв'язуватися з тіаміном, ймовірно можуть володіти тіамінфосфатазними активностями, а також містять протеїн, що секретується у позаклітинний простір і якому притаманна МДГ-активність. При чому для підвищення точності ідентифікації було застосовано

специфічну елюцію ТЗП з т-АС. Спочатку було підтверджено присутність протеїнів з МДГ- і ГДГ-активностями в елюатах після афінної хроматографії. Також наші дослідження виявили зв'язування з тіаміном МДГ2 і МДГ1В-ізоформ малатдегідрогенази, що дозволяє припускати участь тіаміну в регуляції МДГ-активності як у середині клітини, так і у позаклітинному просторі. До того ж у позаклітинному просторі протеїн з МДГ-активністю було ідентифіковано саме у якості регуляторної субодиниці йонного каналу [318].

Оскільки МДГ виконує конвертацію NAD/NADH, то її біологічна роль в районі плазмалемми може бути аналогічною такій у мітохондрійній мембрані, де вона є учасником малат-аспартатного шатлу. Раніше вважалося, що плазматична мембрана клітини є непроникною для NAD/NADH. Проте було виявлено що транспортером NAD/NADH через плазматичну мембрану є протеїн щільового контакту коннексин 43 [342]. Можливо, що позаклітинна МДГ є регуляторною субодиницею саме каналів транспортування NAD/NADH через плазматичні мембрани нервових клітин. У рамках цієї роботи разом з коннексином 43 ідентифіковано цілий спектр NAD/NADH-конвертуючих ензимів, в т.ч. МДГ і ті, які мають МДГ-активність, а також ГДГ та інші дегідрогенази, PARG - протеїн партнер PARP, ріанодиновий та інші рецептори і протеїни, представлені у відповідних таблицях і додатках. Таким чином коннексин 43 багатьма метаболічними шляхами пов'язаний з рецепторами ацетилхоліну і може регулюватися шляхом холінергического сигналігу, зокрема через такі протеїни, як Src-кіназа, ZO-1 та убіквітинлігаза Nedd4 [361,362]. Особливо це стосується АХР нікотинного типу, тому що МДГ/ЛДГ-домени містять протеїни пов'язані функціонально з кластером nAChR і ідентифіковані в елюатах з т-АС.

Ідентифікація $\alpha 3$ і δ субодиниць самого nAChR та результати експериментів з докінгу дозволили висловити припущення про можливість зв'язування тіаміну та/або його похідних з ацетилхоліновими рецепторами. При цьому низьку афінність тіаміну до nAChR, що була визначена групою під керівництвом Waldenlind [39] можна пояснити тим, що для експерименту тоді було використано весь спектр виділених nAChR, а не, можливо, суто специфічний до тіаміну nAChR, у склад якого входять ідентифіковані в елюатах з т-АС субодиниці.

В рамках цієї роботи нам вдалося наблизитися до ідентифікації протеїну, який

було ізольовано раніше як тіамінзв'язувальний і який був названий ТЗБ. ТЗБ виявився компонентом кластеру nAXP - комплексом протеїнів Agrn-LRP4. Крім МС-аналізу, це було підтверджено кількома методами. Так, Вестерн-блот аналіз показав присутність і Агріну, і LRP4 в тіамінових елюатах з т-АС, а також реакцію цих протеїнів на умови жорсткого дефіциту тіаміну і короткострокове введення тіаміну в організм піддослідних тварин ззовні. Відповісти на питання чи є ТЗБ весь комплекс чи це будь-який з протеїнів окремо, а присутність другого зумовлена лише потужними структурно-функціональними зв'язками цих протеїнів, які посилюються при зв'язуванні тіаміну, на даному етапі не представляється можливим: необхідні подальші дослідження. Кількісно більш представленим в елюатах згідно з відповіддю антитіл був LRP4. У той же час відповідь Агріну на введення тіаміну ззовні за добу до декапітації була більш однозначною. Хоча це може пояснюватися функціями LRP4 незалежними від утворення комплексу з Агріном. При цьому, за результатами просторового вирівнювання LRP4 проти цитозольної ТТФ-ази, нами висловлено припущення, що мембранозв'язаною ТТФ-азою є саме LRP4. Хоча це не виключає того, що ТЗБ може бути весь комплекс.

Нами виключається можливість того, що шуканою мембранозв'язаною ТТФ-азою може бути тісно пов'язаний з кластером nAXP hsp90 тому, що в препараті ТЗБ ідентифіковано β -ізоформу, яка не є мембранозв'язаною. Також тому, що спорідненість АТФ до протеїну у цьому разі є дещо вищою у порівнянні з ТТФ. Це не виключає успішну конкуренцію ТТФ з АТФ при функціонуванні hsp90 як показали результати докінгу.

Для перевірки правильності ідентифікації протеїнів мозку, виділених з використанням т-АС, ми провели порівняння результатів отриманих в рамках цієї роботи (як експериментальних, так і біоінформативних), а також відомостей про протеїни комплексу Agrn-LRP4 з літератури і онлайн-доступних баз даних з раніше отриманими нашою групою результатами досліджень ТЗБ і препаратів ПМС. Отримані результати звели в таблицю 3.1.

Ретельний аналіз даних привів до висновку про високий ступінь ідентичності досліджених протеїнів. Так само, як і ідентифікація ТЗБ за амінокислотним складом

Таблиця 3.1 - Порівняння попередніх експериментальних результатів з даними, що були отримані в рамках цієї роботи

<i>№ з/п</i>	<i>Параметр</i>	<i>Кількісне значення параметру для ТЗП (попередні експериментальні результати)</i>	<i>Кількісне значення параметру для ТЗП-комплексу Агрін-LRP4 у складі кластеру nAXP (результати цієї роботи: експериментальні, бази даних, біоінформатичні)</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
1	Молекулярна маса цілого протеїну (комплексу), кДа	≈95-110	≈940 (окремо 220-250), цілого кластеру ще вище
2	Молекулярна маса субодиниць та/або компонентів кластеру, кДа	≈30-35 і ≈60-75	220-250, 96-130, 70-75, 35-45, 16-25
3	Молекулярна маса субодиниці, що виявляла ТТФ-азну активність	≈30-35	37-39
4	pH-оптимум зв'язування	7,4	7,4
5	Природа протеїну	Кисла (pI≈4,8-5,5)	Кисла (pI≈4,98 і 5,45-5,52)
6	Пост-трансляційна модифікація	глікопротеїн	глікопротеїн, протеоглікан, гепарансульфат, фосфопротеїн, дисульфідний зв'язок
7	Активність зв'язування тіаміну	Ділянка з високою спорідненістю $K_d = 3,1 \cdot 10^{-6}$ мкМ (3,1*10 ⁻⁶ М) (4,8 нмоль/мг протеїну) Ділянка з низькою спорідненістю $K_d = 30 \cdot 10^{-5}$ мкМ (3*10 ⁻⁵ М)(7,1 нмоль/мг протеїну)	Афінність визначена за допомогою програми AutoDock Vina: 32,2 кДж/моль
8	Ензиматичні активності (експериментальні дані)	Гідролазна активність по відношенню до фосфорних ефірів тіаміну ТМФ (тіамін монофосфат) <ТДФ (тіамін дифосфат) <ТТФ (тіамін трифосфат)	Гідролазна активність по відношенню до фосфорних ефірів тіаміну (ТМФ<ТДФ), малатдегідрогеназна активність

1	2	3	4
9	Присутність фосфоліпідів	Викликає зростання тіамін-зв'язувальної та тіамінфосфатазної активностей (у співвідношенні 2 моль фосфоліпідів/моль ТЗП ↑ більше ніж у 2 рази)	Присутність фосфоліпідів та холестерину є обов'язковою умовою оптимального функціонування
10	Присутність ацетилхоліну	Інгібує зв'язування ТЗП з тіаміном, $K_i = 4,7 \text{ мкМ}$ ($4,7 \cdot 10^{-6} \text{ М}$)	Викликає відкриття йонного каналу nAHP та подальші події
11	Активність зв'язування ацетилхоліну	$K_d = 13 \text{ мкМ}$ ($1,3 \cdot 10^{-5} \text{ М}$)	Афінність визначена за допомогою програми AutoDock Vina: 15,1 кДж/моль
12	Вплив йонів металів	Видалення йонів Na^+ та Ca^{2+} значно знижує тіамінзв'язуючу здатність протеїну	Йони Ca^{2+} є лігандами комплексу Agrn-LRP4, йони Na^+ проходять через йонний канал nAHP, через Agrn кластер nAHP пов'язаний з рецепторами глутамату (NMDA і AMPA)

елюатів з першого базового т-АС, який раніше застосовувався в дослідженнях нашою групою, підтвердила поточні результати. Все разом дозволяє говорити про високу ймовірність того, що вперше виділений і раніше частково охарактеризований нашою групою ТЗБ є протеїновим комплексом Agrn-LRP4, який є складовою частиною кластера ацетилхолінового рецептора нікотинного типу.

Передбачувана біологічна роль тіаміну і його біологічно активних похідних при зв'язуванні з комплексом Agrn-LRP4: 1) стабілізація комплексу в процесі складання кластеру; 2) тіамінтрифосфатазна активність у LRP4; 3) функціонування РПТ і пов'язані з цим процеси через кластер nAHP, оскільки згідно з нашими уявленнями ТЗБ є однією з ключових ланок в обміні РПТ в нервових клітинах, критичні порушення в його функціонуванні можуть бути причиною ініціації нейродегенеративних процесів. Тим більше це може виявитися таким у зв'язку з припущенням ТТФ-азної активності у LRP4.

А з іншого боку аналіз інформації з доступних протеїнових баз даних і літературних джерел привів нас до розуміння того, що саме на НАХР, його кластері і функціонально-пов'язаних з ними протеїнах, сходяться всі можливі гіпотези етіології хвороби Альцгеймера. Що робить зрозумілими симптоми, які спостерігаються як при ДТ, так і при ХА, і підтверджує значну роль тіаміну для здорового стану нервової, а також інших систем живого організму. Можливо ці результати також допоможуть прояснити деякі досі незрозумілі нюанси механізмів виникнення бері-бері, захворювання, пошуки етіології якого свого часу призвели до відкриття вітамінів, і які залишаються остаточно не з'ясованими. Більш того, в разі подальшого підтвердження результатів отриманих у цій роботі, можливим стане об'єднання гіпотез причин високої нейротропності тіаміну в одну і остаточно з'ясування механізмів системної дії тіаміну.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, відповідно до мети та поставлених завдань, представлено експериментальні дані та біоінформатичний 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 малатдегідрогеназою, глутаматдегідрогеназою та тіамін фосфатгідролазними 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. Визначено варіанти протеїнів, що можуть бути складовими препарату ТЗБ, зокрема, протеїни LRP4 і Agrin

5. Підтверджено, що протеїни LRP4 та Agrin є складовими 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 Агрін 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 Agrn-LRP4 є необхідною подією для підтримання функціонального стану nAHP, зокрема, для стабілізації комплексу в процесі збирання кластеру nAHP.

Список використаних джерел

- [1] Ostrovsky YuM (1968) On the mechanism of coenzymic and noncoenzymic action of thiamine. *J Vitaminol.*, 14(Suppl.):98-102
- [2] Berman K, Fishman RA (1975) Thiamine phosphate metabolism and possible coenzyme independent functions of thiamine in brain. *J.Neurochem.* 24(3):457-465
- [3] Пархоменко ЮМ, Донченко ГВ, Протасова ЗС (1996) Нейроактивность тиамин: факты и гипотезы. *Укр Биохим Журн.* 68(2):3-14
- [4] Bettendorff L (1994) Thiamine in excitable tissues: reflections on a non-cofactor role *Metabolic Brain Disease* 9(3):183-209
- [5] Parkhomenko YuM, Pavlova AS, Mezhenskaya OA (2016) Mechanisms Responsible for the High Sensitivity of Neural Cells to Vitamin B₁ Deficiency. *Neurophysiology* 48(6):429-448
- [6] Itokawa Y (1996) Thiamine and nervous system function: an historical sketch. *Metab Brain Dis.* 11(1):1-7
- [7] Постоенко ВА, Пархоменко ЮМ, Вовк АИ, Халмурадов АГ, Донченко ГВ (1987) Выделение и некоторые свойства тиаминсвязывающего белка синапсом головного мозга крыс. *Биохимия* 52(11):1792-1797
- [8] Постоенко ВА, Пархоменко ЮМ, Донченко ГВ (1987) Характеристика тиаминсвязывающего белка синапсом мозга крыс. *Укр биохим журн.* 59:9–14
- [9] Янчий ОР, Пархоменко ЮМ, Донченко ГВ (2001) Свойства тиаминсвязывающих белков из мозга, печени и почек. *Укр биохим журн.* 73:107–111
- [10] Пархоменко ЮМ, Протасова ЗС, Янчий ОР, Хосла К, Донченко ГВ (2001) Локализация тиаминсвязывающего белка в синапсоммах из головного мозга крыс. *Нейрофизиология* 33(3):161-165
- [11] Muralt A (1958) The role of thiamine (vitamin B₁) in nerve excitation. *Exp Cell Res.* 5:72–79
- [12] Mkrtychyan G, Aleshin V, Parkhomenko Yu, di Salvo ML, Parroni A, Contestabile R, Vovk A, Bettendorff L, Bunik V (2015) Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamine in brain: biochemical, structural and pathway analysis. *Sci Rep.* 5:12583
- [13] Островский ЮМ (1975) Активные центры и группировки в молекуле тиамин. Наука и техника, Минск
- [14] Pullman B, Spanjaard C (1961) Electronic aspects of the mechanism of thiamine-catalyzed reactions. *Biochem Biophys Acta* 46(3): 576–580
- [15] Metzler D (1960) In: *The Enzyme* (eds.), 2nd ed. Academic Press, New York, 295
- [16] Пархоменко ЮМ, Степура ИИ, Донченко ГВ, Степура ВИ (2012) Окисленные производные тиамин: образование, свойства, биологическая роль. *Укр біохімім журн.* 84(6):5-24
- [17] Von Muralt A (1947) Thiamine and Peripheral Neurophysiology. *Vitamins & Hormones* 5:93-118
- [18] Carpenter KJ (2012) The discovery of thiamin. *Ann Nutr Metab* 61(3):219-223
- [19] Binet L, Minz B (1936) Sur les reactions biochimiques des nerf au repos et au cours d'une excitation electrique. *Arch Intern Physiol.* 42:281-300

- [20] Minz B (1938) Sur la liberation de la vitamin B₁ par le trone isole de nerf pneumogastrique soumis a l'excitation electrique. *Compt Rend Soc Biol* 127(6): 1251-1253
- [21] Gavrilesco N, Meiklejohn AP, Passmore R, Peters RA (1932) Carbohydrate metabolism in birds. The site of the biochemical lesion in avian polyneuritis. *Proc R Soc Lond B*, 110:431-447
- [22] Lohmann K, Schuster P (1937) On Cocarboxylase (trans: Schmidt J). *Natur wissenschaften*, 25:26-27
- [23] Parkhomenko YuM, Vovk AI, Protasova ZS (2019) Thiamine and pyruvate dehydrogenase complex. Chapter 10 in: *Molecular nutrition. Vitamins*, Ed, Vinood B Patel, Elsevier, Academic Press, 735 p, 185-206
- [24] Eliasson SG, Scarpellini JD (1976) Stimulation of thiamine triphosphate metabolism in nerve by cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. *Neurochemical Research* 1:192-200
- [25] Макаричиков АФ (2009) Витамин В₁: метаболизм и функции. *Биомедицинская химия* 55(3):278-297
- [26] Haas RH (1988) Thiamin and the brain. *Annu Rev Nutr.* 8:483-515
- [27] Iwata H (1982) Possible role of thiamine in nervous system. *Trends Pharm Sci.* 3:171 –173
- [28] Nghiêm H-O, Bettendorff L, Changeux J-P (2000) Specific phosphorylation of Torpedo 43K rapsyn by endogenous kinase(s) with thiamine triphosphate as the phosphate donor. *The FASEB Journal* 14:543-554
- [29] Perez-Pineiro R, Gibbs E, Wishart DS, et al. (2011) The prion protein binds thiamine. *FEBS Journal* 278:4002–4014
- [30] Pagadala NS, Bjordahl TC, Blinov N, Kovalenko A, Wishart DS (2013) Molecular docking of thiamine reveals similarity in binding properties between the prion protein and other thiamine-binding proteins. *J Mol Model.* 19:5225–5235
- [31] Петров СА, Желязкова ИА (1991) Влияние тиаминa и его метаболитов на активность тканевой и очищенной алкоголь дегидрогеназы. *Физиол Журн.* 37(1):45–49
- [32] Петров СА, Розанов АЯ, Гаврилюк ІВ, Миськова ОБ (1990) Вплив тіаміну та його метаболітів на активність пепсину й трипсину. *Укр біохим журн.* 62(1): 102–106
- [33] Eder L, Hirt L, Dunant Y (1976) Possible involvement of thiamine in acetylcholine release. *Nature* 264:186–188
- [34] Eder L, Dunant Y (1980) Thiamine and cholinergic transmission in the electric organ of Torpedo. I. Cellular localization and functional changes of thiamine and thiamine phosphate esters. *J Neurochem.* 35:1278–1286
- [35] Eder L, Dunant Y, Loctin F (1980) Thiamine and cholinergic transmission in the electric organ of Torpedo. II. Effects of exogenous thiamine and analogues on acetylcholine release. *J Neurochem.* 35:1287–1296
- [36] Romanenko AV (1990) A new way of muscle activity regulation: thiamine participation in neuromuscular transmission. In: *Muscle and Motility*, Hampshire 2: 151-153

- [37] Enomoto K-I, Edwards C (1985) Thiamine Blockade of Neuromuscular Transmission. *Brain Res* 358:316-323
- [38] Galzigna L (1969) The synaptolytic effect of thiamine related to its interaction with neurotransmitters. *Biochemical Pharmacology* 18(10):2485–2493
- [39] Waldenlind L, Elfman L, Rydqvist B (1978) Binding of thiamine to nicotinic acetylcholine receptor in *Torpedo marmorata* and the frog end plate. *Acta Physiol Scand* 103:154-159
- [40] Takenaka T, Yoshioka T, Inoue H (1978) Incorporation of thiamine into membrane proteins in the squid giant axon. *Proc Jap Acad* 54:316–320
- [41] Жмуров ВА (2017) Психиатрия. Энциклопедия. Accent Graphics communications, с 2609
- [42] Nardone Y, Höller M, Storti M et al (2013) Thiamine deficiency induced neurochemical, neuroanatomical, and neuropsychological alterations: a reappraisal. *Sci. World J.* 2013:309143
- [43] Островский ЮМ, Спиричев ВБ, Матусис ИИ и др (1979) Экспериментальная витаминология: Справ. Руководство. Минск, Наука и техника 551 с, сс 176-223
- [44] Ishii K, Sarai K, Sanemori H, Kawasaki T (1979) Concentrations of thiamine and its phosphate esters in rat tissues determined by high-performance liquid chromatography. *J Nutr Sci Vitaminol.* 25(6):517-523
- [45] Tallaksen SM, Bohmer T, Karlsen J (1997) Concomitant determination of thiamin and its phosphate esters in human blood, plasma, and urine. *Methods Enzymol* 279:67-74
- [46] Халмурадов АГ, Тоцкий ВН, Чаговец РВ (1982) Мембранный транспорт коферментных витаминов и коферментов. Киев, Наукова думка
- [47] Тоцкий ВН, Халмурадов АГ (1980) Биохимические аспекты транспорта тиамин. *Укр бмохим журн* 52(1):110-118
- [48] Kozik A (1996) Thiamine-protein interaction. Chemical mechanism of ligand-binding and bioanalytical application of thiamine-binding proteins from seeds. Krakow, Jagiellonian University
- [49] Bettendorff L (1994) The compartmentation of phosphorylated thiamine derivatives in cultured neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1222(1):7-14
- [50] Parkhomenko YM, Kudryavtsev PA, Pylypchuk SY (2011) Chronic alcoholism in rats induces a compensatory response, preserving brain thiamine diphosphate, but the brain 2-oxo acid dehydrogenases are inactivated despite unchanged coenzyme levels. *J Neurochem* 117(6):1055-1065
- [51] Čhagovec RV, Rybina AA (1959) Investigating on the forms & metabolism of thiamine in tissues of the animal organism by means of thiamine S³⁵. *International Symposium B Vitamins, Poznań*, 324-338
- [52] Воскобоев АИ, Черникевич ИП (1987) Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиамин. Минск, Наука и техника, 200 с
- [53] Breslow R, McNelis E (1959) Studies on Model Systems for Thiamine Action. Synthesis of Reactive Intermediates, and Evidence on the Function of the Pyrimidine Ring. *J Am Chem Soc* 81:3080-3082

- [54] Мешалкина ЛЕ, Кочетов ГА, Хюбнер Г, Титтманн К, Голбик Р (2009) Новая функция аминогруппы тиаминдифосфата в тиаминовом катализе. *Биохимия* 74(3):362–371
- [55] Jordan F, Nemeria NS (2014) Progress in the experimental observation of thiamin diphosphate-bound intermediates on enzymes and mechanistic information derived from these observations. *Bioorganic Chemistry* 57:251–262
- [56] Bettendorff L, Wins P (2013) Biological functions of thiamine derivatives: Focus on non-coenzyme roles. *OA Biochemistry*, May 01 1(1):10
- [57] Bunik VI, Tylicki A, Lukashev NV (2013) Thiamin diphosphate-dependent enzymes: from enzymology to metabolic regulation, drug design and disease models. *FEBS J* 280:6412–6442
- [58] Hucho F, Randall DD, Roche TE (1972) Keto acid dehydrogenase complexes. XVII. Kinetic and regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and pyruvate dehydrogenase phosphatase from bovine kidney and heart. *Arch Biochem Biophys* 151(1):328-340
- [59] Bielarczyk H, Szutowicz A (1989) Evidence for the regulatory function of synaptoplasmic acetyl-CoA in acetylcholine synthesis in nerve endings. *Biochem J* 262:377–380
- [60] Bunik VI, Degtyarev D (2008) Structure function relationships in the 2-oxo acid dehydrogenase family: substrate-specific signatures and functional predictions for the 2-oxoglutarate dehydrogenase-like proteins. *Proteins* 71:874–890
- [61] Мешалкина ЛЕ, Соловьева ОН, Ходак ЮА, Друца ВЛ, Кочетов ГА (2010) Выделение и некоторые свойства транскетолазы человека. *Биохимия* 75(7):992-1000
- [62] Solovjeva ON, Kovina M, Zavialova MG, Zgoda V, Shcherbinin DS, Kochetov GA (2018) New in the mechanism of one-substrate transketolase reaction. *Bioscience Reports* March
- [63] Coy JF, Dressler D, Wilde J, Schubert P (2005) Mutations in the Transketolase-like Gene TKTL1: Clinical Implications for Neurodegenerative Diseases, Diabetes and Cancer. *Clin Lab* 51:257-273
- [64] Meshalkina L, Drutsa VL, Koroleva O, Solovjeva ON, Kochetov GA (2012) Is transketolase-like protein, TKTL1, transketolase? *Biochimica et Biophysica Acta* 1832(3):387–390
- [65] Deshpande G, Patterton H-G, Essop MF (2019) The human transketolase-like proteins TKTL1 and TKTL2 are bona fide transketolases, *BMC Structural Biology*, 19(1):19-22
- [66] Foulon V, Antonenkov VD, Croes K, et al (1999) Purification, molecular cloning, and expression of 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase, a peroxisomal thiamine pyrophosphate-dependent enzyme that catalyzes the carbon–carbon bond cleavage during α -oxidation of 3-methyl-branched fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10039-10044
- [67] Denger K, Ruff J, Rein U, Cook AM (2001) Sulphoacetaldehyde sulpho-lyase (EC 4.4.1.12) from *Desulfonispora thiosulfatigenes*: purification, properties and primary sequence. *Biochem J* 357:581-586
- [68] Miele L., Rohr LM, Geissmann T, et al (2001) Characterization of the d-Xylulose 5-Phosphate/d-Fructose 6-Phosphate Phosphoketolase Gene (xfp) from *Bifidobacterium lactis*. *J Bacteriol* 183:2929-2936

- [69] Wilcocks R, Ward OP, Collins S, et al (1992) Acyloin Formation by Benzoylformate Decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 58:1699-1704
- [70] Pang SS, Duggleby RG (1999) Regulation of yeast acetohydroxyacid synthase by valine and ATP. *Biochemistry* 38:5222-5231
- [71] Grabau C, Cronan JrJE (1986) Sulphoacetaldehyde sulpho-lyase (EC 4.4.1.12) from *Desulfonispora thiosulfatigenes*: purification, properties and primary sequence. *Nucleic Acids Res* 14:5449-5460
- [72] Miranda-Rios J (2007) The THI-box riboswitch, or how RNA binds thiamin pyrophosphate. *Structure* 15:259–265
- [73] Soukup JK, Soukup GA (2004) Riboswitches exert genetic control through metabolite-induced conformational change. *Curr Opin Struct Biol* 14:344–349
- [74] Koike H, Wada T, Minakami H (1967) Quantitative separation of triphosphothiamine in biological materials and its formation from S³⁵-thiamine in rat liver. *J Biochem* 62(4):492-494
- [75] Parkhomenko JM, Rybina AA, Khalmuradov AG (1979) Separation of thiamine phosphoric esters on sephadex cation exchanger. *Methods Enzymol* 62:59-62
- [76] Comincioli V, Reggiani C, Patrini C, Rindi G (1980) A preliminary approach to the study of thiamine phosphorylation and dephosphorylation in some rat nervous regions and the liver. *Brain Res* 199(2):482-487
- [77] Matsuda T, Cooper JR (1981) The separation and determination of thiamine and its phosphate esters in brain. *Anal Biochem* 117(1):203-207
- [78] Bettendorff L, Grandfils C, De Rycker C, Schoffeniels E (1986) Determination of thiamine and its phosphate esters in human blood serum at femtomole levels. *J Chromatogr* 382:297-302
- [79] Egi Y, Koyama S, Shikata H, Yamada K, Kawasaki T (1986) Content of thiamin phosphate esters in mammalian tissues--an extremely high concentration of thiamin triphosphate in pig skeletal muscle. *Biochem Int* 12(3):385-90
- [80] Miyoshi K, Egi Y, Shioda T, Kawasaki T (1990) Evidence for *in vivo* synthesis of thiamin triphosphate by cytosolic adenylate kinase in chicken skeletal muscle. *J Biochem* 108(2):267-70
- [81] Cooper JR, Pincus JH, Itokawa Y (1969) Enzyme inhibiting factor in subacute necrotizing encephalomyelopathy. *Neurology* 19(6):841-845
- [82] Schoffeniels E (1983) Thiamine phosphorylated derivatives and bioelectrogenesis. *Arch Int Physiol Biochim* 91:233–242
- [83] Schoffeniels E, Dandrifosse G, Bettendorff L (1984) Phosphate derivatives of thiamine and Na⁺ channel in conducting membranes. *J Neurochem* 43:269–271
- [84] Fox JM, Duppel W (1975) The action of thiamine and its di- and triphosphates on the slow exponential decline of the ionic currents in the node of Ranvier. *Brain Res* 89:287–302
- [85] Yamashita H, Zhang YX, Nakamura S (1993) The effects of thiamin and its phosphate esters on dopamine release in the rat striatum *Neurosci Lett* 158:229-231

- [86] Bettendorff L, Henuy B, De Clerck A (1994) Chloride permeability of rat brain membrane vesicles correlates with thiamine triphosphate content. *Brain Res* 652:157–160
- [87] Bettendorff L, Kolb HA, Schoffeniels E (1993) Thiamine triphosphate activates an anion channel of large unit conductance in neuroblastoma cells. *J Membr Biol* 136:281–288
- [88] Franciolini F, Petris A (1990) Chloride channels of biological membranes, *Biochim. Biophys Acta* 1031:247–259
- [89] Lakaye B, Wirtzfeld B, Wins P, Grisar T, Bettendorff L (2004) Thiamine triphosphate, a new signal required for optimal growth of *Escherichia coli* during amino acid starvation. *J Biol Chem* 279:17142–17147
- [90] Eckert T, Moebus W (1964) On the ATP thiaminediphosphate phosphotransferase activity in nerve tissue. A contribution on the mechanism of nerve impulse conduction. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 338:286–288
- [91] Itokawa Y, Cooper JR (1968) The enzymatic synthesis of triphosphothiamin. *Biochim Biophys Acta* 158:180–182
- [92] Ruenwongsa P, Cooper JR (1977) The role of bound thiamine pyrophosphate in the synthesis of thiamine triphosphate in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 482:64–70
- [93] Iwata H, Matsuda T, Tonomura H (1988) Improved high-performance liquid chromatographic determination of thiamine and its phosphate esters in animal tissues. *J Chromatogr* 450(3):317–323
- [94] Cooper JR, Nishino K, Nishino N, Piros K (1982) The enzymatic synthesis of thiamin triphosphate. *Ann NY Acad Sci* 37(8):177–187
- [95] Nishino K, Itokawa Y, Nishino N, Piros K, Cooper JR (1983) Enzyme System Involved in the Synthesis of Thiamin Triphosphate. *J Biol Chem* 258:11871–11878
- [96] Воскобоев АИ, Лучко ВС (1980) Выделение и радиометрическое определение АТФ: тиаминдифосфаттрансферазы в печени крысы. *Вопр мед хим* 26:564–568
- [97] Voskoboyev AI, Chernikevich IP, Luchko VS (1987) Studies on thiamine diphosphate kinase (EC 2.7.4.15) from brewer's yeast: purification and some properties. *Biomed Biochim Acta* 46:3–13
- [98] Shikata H, Koyama S, Egi Y (1989) Cytosolic adenylate kinase catalyzes the synthesis of thiamin triphosphate from thiamin diphosphate. *Biochem Int* 18:933–941
- [99] Makarchikov AF, Wins P, Janssen E (2002) Adenylate kinase 1 knockout mice have normal thiamine triphosphate levels. *Biochim Biophys Acta* 1592:117–121
- [100] Gigliobianco T, Lakaye B, Makarchikov AF (2008) Adenylate kinase-independent thiamine triphosphate accumulation under severe energy stress in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* 8:16–22
- [101] Bettendorff L, Peeters M, Wins P (1993) Metabolism of thiamine triphosphate in rat brain: correlation with chloride permeability. *J Neurochem* 60:423–434
- [102] Gangolf M, Wins P, Thiry M (2010) Thiamine triphosphate synthesis in rat brain occurs in mitochondria and is coupled to the respiratory chain. *J Biol Chem* 285:583–594

- [103] Gigliobianco T, Gangolf M, Lakaye B, et al. (2013) An alternative role of F₀F₁-ATP synthase in *Escherichia coli*: synthesis of thiamine triphosphate. *Sci Rep* 3:1071
- [104] Bettendorff L, Wirtzfeld B, Makarchikov AF (2007) Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide. *Nat Chem Biol* 3:211–212
- [105] Barchi RL, Braun PE (1972) A membrane-associated thiamine triphosphatase from rat brain: Properties of the enzyme. *J Biol Chem* 23(247):7668-7673
- [106] Makarchikov AF, Chernikevich IP (1992) Purification and characterization of thiamine triphosphatase from bovine brain. *Biochim Biophys Acta* 1117:326 – 332
- [107] Черникевич ИП, Макаричиков АФ (1998) Цитозольная тиаминтрифосфатаза из мозга быка. 2. Взаимодействие трифосфорного эфира тиаминтрифосфата с ферментом. *Укр биохим журн* 70:22–30
- [108] Lakaye B, Makarchikov AF, Antunes AF (2002) Molecular characterization of a specific thiamine triphosphatase widely expressed in mammalian tissues. *J Biol Chem* 277:13771–13777
- [109] Lakaye B, Verlaet M, Dubail J (2004) Expression of 25 kDa thiamine triphosphatase in rodent tissues using quantitative PCR and characterization of its mRNA. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2032–2041
- [110] Makarchikov AF, Lakaye B, Gulyai IE (2003) Thiamine triphosphate and thiamine triphosphatase activities: from bacteria to mammals. *Cell Mol Life Sci* 60:1477-1488
- [111] Szyniarowski P, Lakaye B, Czerniecki J (2005) Pig tissues express a catalytically inefficient 25-kDa thiamine triphosphatase: insight in the catalytic mechanisms of this enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1725:93–102
- [112] Iyer LM, Aravind L (2002) The catalytic domains of thiamine triphosphatase and CyaB-like adenylyl cyclase define a novel superfamily of domains that bind organic phosphates. *BMC Genomics* 3:33-44
- [113] Song J, Bettendorff L, Tonelli M (2008) Structural basis for the catalytic mechanism of mammalian 25-kDa thiamine triphosphatase. *J Biol Chem* 283:10939–10948
- [114] Русина ИМ, Макаричиков АФ (2003) Тиаминтрифосфатазная активность в митохондриях млекопитающих. *Укр биохим журн*. 5:63–68
- [115] Русина ИМ, Макаричиков АФ (2004) Физико-химические и кинетические характеристики митохондриальной тиаминтрифосфатазы из почек быка. *Новости мед-биол наук* 1:103–107
- [116] Bettendorff L, Wins P, Lesourd M (1994) Subcellular localization and compartmentation of thiamine derivatives in rat brain *Biochim Biophys Acta* 1222:1-6
- [117] Макаричиков АФ, Русина ИМ (2003) Выделение, очистка, физико-химические и кинетические свойства минорной формы тиаминтрифосфатазы в почках быка. *Весті НАН Беларусі. Сер мед-біял навук* 4:76–79
- [118] Kovacevic Z, Fu D, Richardson DR (2008) The iron-regulated metastasis suppressor, NdrG-1: identification of novel molecular targets. *Biochim Biophys Acta* 1783:1981–1992

- [119] Suryo Rahmanto Y, Dunn LL, D.R. Richardson (2007) Identification of distinct changes in gene expression after modulation of melanoma tumor antigen p97 (melanotransferrin) in multiple models *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis* 28:2172–2183
- [120] Czerniecki J, Chanas G, Verlaet M (2004) Neuronal localization of the 25-kDa specific thiamine triphosphatase in rodent brain. *Neuroscience* 125:833–840
- [121] Barchi RL, Viale RO (1976) Membrane-associated thiamin triphosphatase. II. Activation by divalent cations. *J Biol Chem* 251:93–197
- [122] Barchi RL (1976) Membrane thiamine triphosphatase from rat brain: inhibition by ATP and ADP. *J Neurochem* 26:715–720
- [123] Bettendorff L, Longree I, Wins P (1991) Solubilization of thiamine triphosphatase from the electric organ of *Electrophorus electricus*. *Biochim Biophys Acta* 1073:69–76
- [124] Matsuda T, Tonomura H, Baba A (1991) Membrane-associated thiamine triphosphatase in rat skeletal muscle. *Int J Biochem* 23:1111–1114
- [125] Гуляй ИЭ, Макарович АФ (2000) Исследование свойств тиаминтрифосфатазы из мембран почек быка. Биологически активные соединения в регуляции метаболического гомеостаза. Междунар. науч. конф., тезисы докл., Гродно 120–123
- [126] Murai A, Katsura E (1975) Thiamine triphosphatase activity of myosin and accelerating effect of thiamine di- and triphosphates on superprecipitation of actomyosin. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 21:169–181
- [127] Penttinen HK, Uotila L (1981) The relation of the soluble thiamine triphosphatase activity of various rat tissues to nonspecific phosphatases. *Med Biol* 59:177–184
- [128] Пархоменко ЮМ, Протасова ЗС, Постоенко ВО (1988) Локалізація ферментів синтезу і деградації тиаминтрифосфату в синапсах мозку щурів. Доп АН УРСР 8:73–76
- [129] Постоенко ВА, Пархоменко ЮМ, Донченко ГВ (1990) Изучение аминокислотного состава и небелковых компонентов тиаминсвязывающего белка синапсом головного мозга крыс. *Нейрохимия* 9:33–37
- [130] Янчий ОР, Пархоменко ЮМ, Донченко ГВ (2003) Внутриклеточная локализация тиаминсвязывающих белков печени и почек крыс. *Укр биохим журн* 75:99–105
- [131] Пархоменко ЮМ, Еремеева МГ, Протасова ЗС, Донченко ГВ (1995) Модифицирующее действие фосфолипидов на биологическую активность тиаминсвязывающего белка синапсом мозга крыс. 4-й Симпозиум по биохимии липидов, Тез. докл., Санкт-Петербург 181
- [132] Parkhomenko YuM, Yanchiy OR, Donchenko GV (1999) Acetylcholine interaction with rat brain thiamine binding protein. Fifth IBRO World Congress of Neuroscience, Abstracts, Jerusalem, Israel, 170
- [133] Пархоменко ЮМ, Строкина АА, Пилипчук СЮ (2010) Наличие двух различных активных центров на тиаминсвязывающем протеине плазматических мембран синапсом. *Укр Биохим Журн* 82(1):34–41

- [134] Rindi G, Ricci V, Gastaldi G, Patrini C (1995) Intestinal alkaline phosphatase can transphosphorylate thiamin to thiamin monophosphate during intestinal transport in the rat. *Arch Physiol Biochem* 103(1):33-38
- [135] Barile M, Valenti D, Brizio C, et al (1998) Rat liver mitochondria can hydrolyse thiamine pyrophosphate to thiamine monophosphate which can cross the mitochondrial membrane in a carrier-mediated process. *FEBS Lett* 435(1):6-10
- [136] Ogawa K, Sakai M (1982) Recent findings on ultracytochemistry of thiamin phosphatases. *Ann NY Acad Sci* 378:188-214
- [137] Kiessling K-H (1960) Thiamine Phosphatases in Liver, Kidney, and Brain of the Rat. *Acta Chem Scand* 14:1669-1670
- [138] Kawasaki Y (1993) Copurification of hydroxyethylthiazole kinase and thiamine-phosphate pyrophosphorylase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 175:5153-5158
- [139] Пархоменко ЮМ, Черныш ИЮ, Протасова ЗС, Донченко ГВ (1995) Нарушение обмена тиамин в крови больных с лучевой патологией и возможная связь этого нарушения с поражением нервной системы, *ДАН Украины* 2:112–114
- [140] Parkhomenko YuM, Donchenko GV, Mejenskaya OA, et al (2015) Metovitan prevents the accumulation of thiamine diphosphate oxidized forms in rat tissues under irradiation. *Biotechnologia acta* 8(4):63-70
- [141] Протасова ЗС, Меженська ОО, Пархоменко ЮМ та інші (2014) Зв'язування міченого тиаміну синапсоматоми як показник обміну тиаміну в нервових клітинах при певних патологіях. *Мат Укр біохім конгресу, The Ukr Biochem J*, 86(5, Supplement 2):25-26
- [142] Konopačka M, Rogolinski J (2004) Thiamine prevents X-ray induction of genetic changes in human lymphocytes *in vitro*. *Acta Biochem Polonica*, 51(3):839–843
- [143] Ishide T, Matsui M, Inoe M (1983) Stacking interaction of indole ring with thiazolium ring and effect for H-D exchange reaction of thiamin. *Biochem Biophys Res Com* 116(2):486–491
- [144] Степура АИ, Адамчук РИ, Опарин АЮ, Степура ИИ (2008) Тиамин ингибирует образование дитиозина, специфического маркера окислительного стресса, в реакциях, катализируемых оксоферрильными формами гемоглобина. *Биохимия* 73(9):1281–1293
- [145] Бурлакова ЕБ, Храпова НГ (1985) Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты. *Усп химии, LIV*(9):1540–1558
- [146] Рыбина АА, Халмурадов АГ, Пархоменко ЮМ (1980) Белки, специфически связывающие тиамин, и их биохимическая роль. *Укр биохим журн* 52:652–667
- [147] Титаев АА (1978) Тиамин и нервная система. В кн.: *Тиамин, Москва, Наука* 85-107
- [148] Разумович АН, Доста ГА (1963) Отношение тиамин дисульфида к дыхательной цепи митохондрий. *Биохимия* 28(3):439–444
- [149] Yoo Jeong-Sook H, Park H-S, Ning Shu M (1990) Effects of thiamine deficiency on hepatic cytochromes P450 and drug-metabolizing enzyme activities. *Biochem Pharmacol* 39(3):519–525

- [150] Степуро АИ, Пилецкая ТП, Степуро ИИ (2005) Роль тиольной формы тиамин в обмене оксида азота. *Биохимия* 70(3):416–429
- [151] Степуро ИИ, Опарин АЮ, Степуро ВИ (2012) Окисление тиамин под действием диоксида азота, генерируемого ферриформами миоглобина и гемоглобина в присутствии нитрита и пероксида водорода. *Биохимия* 77(1):53–70
- [152] Stepuro II (2005) Thiamine and vasculopathies. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids* 72:115–127
- [153] Shoji S, Furuishi K, Misumi S, et al (1994) Thiamine disulfide as a potent inhibitor of human immunodeficiency virus (type 1) production. *Biochem Biophys Res Commun* 205:967-975
- [154] Shoji S, Furuishi K, Ogata A (1998) An Allosteric Drug, *o,o'*-Bismyristoyl Thiamine Disulfide, Suppresses HIV-1 Replication through Prevention of Nuclear Translocation of both HIV-1 Tat and NF- κ B. *Biochem Biophys Res Commun* 249(3):745–753
- [155] Sambon M, Napp A, Wins P, Bettendorff L, et al (2019) Thiamine and benfotiamine protect neuroblastoma cells against paraquat and β -amyloid toxicity by a coenzyme-independent mechanism. *14;5(5)*
- [156] Tapias V, Starkova N, Bettendorff L, Calingasan NY, Gibson GE, et al (2018) Benfotiamine treatment activates the Nrf2/ARE pathway and is neuroprotective in a transgenic mouse model of tauopathy. *Hum Mol Genet* 27:2874–2892
- [157] Hurt JK, Coleman JL, Fitzpatrick BJ, et al (2012) Prostatic acid phosphatase is required for the antinociceptive effects of thiamine and benfotiamine. *PLoS One* 7: e48562
- [158] Du Y, Kowluru A, Kern TS (2010) PP2A contributes to endothelial death in high glucose: inhibition by benfotiamine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299:1610–1617
- [159] Markova N, Bettendorff L, Strelakova T, et al (2016) Thiamine and benfotiamine improve cognition and ameliorate GSK-3 β -associated stress-induced behaviours in mice. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*. 75:148–156
- [160] Zhang X, Hernandez I, Rei D, et al (2013) Diaminotiazoles modify Tau phosphorylation and improve the tauopathy in mouse models. *J Biol Chem* 288:22042–22056
- [161] Pan X, Chen Zh, Fei G, et al (2016) Long-term cognitive improvement after benfotiamine administration in patients with Alzheimer's Diseases. *Neurosci Bull* 32(6):591–596
- [162] Sun X-J, Zhao L, Zhao N, et al (2012) Benfotiamine prevents increased β -amyloid production in HEK cells induced by high glucose. *Neurosci Bull* 28(5):561–566
- [163] Gorlova A, Bettendorff L, Strelakova T, et al (2019) Thiamine and benfotiamine counteract ultrasound-induced aggression, normalize AMPA receptor expression and plasticity markers and reduce oxidative stress in mice. *Neuropharmacology* 156
- [164] Розанов АЯ (1963) Метаболизм тиамин, его фосфорных эфиров и дисульфидов в животном организме. Автореф. дисс. на соискание уч. степени доктора мед. наук, Одесса 30 с

- [165] Nishimune T, Watanabe Y, Okazaki H, Akai H (2000) Thiamin is decomposed due to Anaphe spp. entomophagy in seasonal ataxia patients in Nigeria. *J Nutr* 130:1625–1628
- [166] Bos M, Kozik A (2000) Some molecular and enzymatic properties of a homogeneous preparation of thiaminase I purified from carp liver. *J Protein Chem* 19:75–84
- [167] Алёшин ВА, Мкртчян ГВ, Буник ВИ (2019) Механизмы некоферментного действия тиамин: белковые мишени и медицинское значение. *Биохимия* 84(8):1051–1075
- [168] Петров СА (1992) Метаболизм тиамин в органах и тканях мыши *in vivo* и *in vitro*. *Физиологический журнал* 38:79–75
- [169] Matsuo T, Suzuoki Z (1969) The occurrence of 4-methylthiazole-5-acetic acid as a thiamine metabolite in rabbit, dog, man and rat. *J Biochem* 65:953–960
- [170] Law RH, Zhang Q, McGowan S, et al (2006) An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol* 7:216
- [171] Розанов АЯ (1978) Динамика метаболизма тиамин, его биологическое значение и зависимость от функций пищеварительной системы. В кн.: Тиамин. Москва, Наука 27-84
- [172] Доста ГА, Горенштейн БИ, Москвичёва МВ, Ковальчук ВГ, Бушма МИ (1975) Взаимоотношения тиамин с аминопиримидиновым и оксипиримидиновым компонентами, дополнительно вводимыми животным. В кн.: Межвитаминные взаимоотношения, Матер.3-го Гродненского симпозиума 53
- [173] Веневский ВЛ, Панащенко АД, Ершова ТГ, Фельдман ИХ, Хейфиц ГМ (1962) Химическое и фармакологическое изучение нового снотворного препарата гемитиамин. *Фармакол и токсикол* 25(6):657-661
- [174] Мирян НИ, Тринус ФП, Изотова ПВ, и др (1973) Биологическая активность некоторых производных тиазола. *Хим-фарм журн* 7(8):17-20
- [175] Филипова ЛБ (1979) Распределение в нейроструктурах головного мозга и обмен в организме $[^{35}\text{S}]$ тиамин и $[^{35}\text{S}]$ геминейрин при острой алкогольной интоксикации. Дисс на соискание научн степени кан биол наук, спец 03.00.04 Биохимия, Одесса 139 с
- [176] Parkhomenko Yu, Vovk A, Protasova Z (2014) Thiamine derivatives use to investigate the modulator role of thiamine in the biosynthesis of acetylcholine from pyruvate. In: The 8th International Conference on thiamine: From catalise to pathology, Liege, 30, May 23-26
- [177] Zhang X, Hernandez I, Rei D (2013) Diaminotiazoles modify Tau phosphorylation and improve the tauopathy in mouse models. *J Biol Chem* 288(3):22042-22056
- [178] Chien-Ming L, Wang Z, Lu Y (2011) Biological activity of 4-substituted methoxybenzoyl-aryl-thiazole: an active microtubule inhibitor. *Cancer Res* 71(1):216–224
- [179] Rogers EF (1982) General discussion of antithiamin compounds and thiamin antagonists *Ann NY Acad Sci* 378:157-160
- [180] Величко МГ, Требухина РВ, Островский ЮМ (1979) Эффект окситиамин на метаболизм пирувата и лактата в тканях крыс. *Вопр Мед Хим* 25(2):166-170

- [181] Fukui S, Ohishi N, Kishimoto Takamizawa A, Hamazima Y (1965) Formation of «thiaminosuccinic acid» as an intermediate in the transformation of oxythiamine to thiamine by a thiamineless mutant of *Escherichia Coli*. *J Biol Chem* 240:1315–1321
- [182] Goyer A, Hasnain G, Frelin O, et al (2013) A cross-kingdom Nudix enzyme that preempts damage in thiamin metabolism. *Biochem J* 454:533–542
- [183] Zhang F, Masania J, Anwar A, et al (2016) The uremic toxin oxythiamine causes functional thiamine deficiency in end stage renal disease by inhibiting transketolase activity. *Kidney Int* 90:396–403
- [184] Singh V, Peng CS, Li D, et al (2014) Direct observation of multiple tautomers of oxythiamine and their recognition by the thiamine pyrophosphate riboswitch. *ACS Chem Biol* 9:227–236
- [185] Kato K, Mori H, Kito T, et al (2014) Investigation of endogenous compounds for assessing the drug interactions in the urinary excretion involving multidrug and toxin extrusion proteins. *Pharm Res* 31:136–147
- [186] Tanihara Y, Masuda S, Sato T, et al. (2007) Substrate specificity of MATE1 and MATE2K, human multidrug and toxin extrusions/H⁺-organic cation antiporters. *Biochem Pharmacol* 74:359–371
- [187] Tylicki A, Łotowski Z, Siemieniuk M, Ratkiewicz A (2017) Thiamine and selected thiamine antivitamin – biological activity and methods of synthesis, *Bioscience Reports*. DOI 10.1042/BSR20171148
- [188] Butterworth RF, Heroux M (1989) Effect of pyriethiamine treatment and subsequent thiamine rehabilitation on regional cerebral amino acids and thiamine-dependent enzymes. *J Neurochem* 52:1079–1084
- [189] Wooley D (1950) Pyriethiamine and neopyriethiamine. *J Am Chem Soc* 72:5763–5765
- [190] Matsuda T, Iwata H, Cooper JR (1985) Involvement of sulfhydryl groups in the inhibition of brain Na⁺,K⁺-ATPase by pyriethiamine. *Biochim Biophys Acta* 817(1): 17–24
- [191] Chorny S, Parkhomenko J, Chorna N (2007) Thiamine deficiency caused by thiamine antagonists triggers upregulation of apoptosis inducing factor gene expression and leads to caspase 3-mediated apoptosis in neuronally differentiated rat PC-12 cells. *Acta Biochim Pol* 54(2):315–322
- [192] Ohnishi A, Tsuji S, Igisu H (1980) Beriberi neuropathy. Morphometric study of sural nerve. *J Neurol Sci* 45:177–190
- [193] Sasa M, Takemoto I, Nishino K (1976) The role of thiamine on excitable membrane of crayfish giant axon. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 22:21–24
- [194] Cooper JR, Pincus JH (1979) The role of thiamine in nervous tissue. *Neurochem Res* 4:223–239
- [195] Harper C (2007) The neurotoxicity of alcohol. *Hum Exp Toxicol* 26:251–257
- [196] Thomson AD, Cook CC, Guerrini I (2008) Wernicke's encephalopathy: 'Plus ça change, plus c'est la même chose'. *Alcohol Alcohol* 43:180–186
- [197] Harper C (2009) The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol Alcohol* 44:136–140
- [198] Kril JJ (1996) Neuropathology of thiamine deficiency disorders. *Metab Brain Dis* 11:9–17

- [199] Cullen KM, Halliday GM (1995) Mechanisms of cell death in cholinergic basal forebrain neurons in chronic alcoholics. *Metab Brain Dis* 10(1):81-91
- [200] Rindi G, Reggiani C, Patrini C (1992) Effect of ethanol on the in vivo kinetics of thiamine phosphorylation and dephosphorylation in different organs of rat II. Acute effects. *Alcohol Alcohol* 27:505–522
- [201] Ceccanti M, Mancinelli R, Sasso GF (2005) Erythrocyte thiamine (Th) esters: a major factor of the alcohol withdrawal syndrome or a candidate marker for alcoholism itself? *Alcohol Alcohol* 40:283–290
- [202] Hazell AS, Butterworth RF (2009) Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation. *Alcohol Alcohol* 44:141–147
- [203] Guisado J, Carbonell C, Donaire L (2001) Wernicke-Korsakoff syndrome: malignant tumor as triggering factor. *Actas Esp Psiquiatr* 29(4):279-281
- [204] Thomson AD (2000) Mechanisms of vitamin deficiency in chronic alcohol misusers and the development of the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Alcohol Suppl* 35(1):2-7
- [205] Ishibashi S, Yokota T, Shiojiri T (2003) Reversible acute axonal polyneuropathy associated with Wernicke-Korsakoff syndrome: impaired physiological nerve conduction due to thiamine-deficiency? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74(5):674-676
- [206] Zeng KL, Kuruvilla S, Sanatani M, Louie AV (2015) Bilateral Blindness Following Chemoradiation for Locally Advanced Oropharyngeal Carcinoma. *Cureus* 7(10): e352
- [207] Huertas-Gonzalez N, Hernando-Requejo V, Luciano-García Z, Cervera-Rodilla JL (2015) Wernicke's Encephalopathy, Wet Beriberi, and Polyneuropathy in a Patient with Folate and Thiamine Deficiency Related to Gastric Phytobezoar, *Case Rep Neurol Med.*, 2015 624807-624812
- [208] Lindboe CF, Loberg EM (1989) Wernicke's encephalopathy in non-alcoholics. An autopsy study. *J Neurol Sci* 90:125–129
- [209] Ohkoshi N, Ishii A, Shoji S (1994) Wernicke's encephalopathy induced by hyperemesis gravidarum, associated with bilateral caudate lesions on computed tomography and magnetic resonance imaging. *Eur Neurol* 34:177–180
- [210] Soffer D, Zirkin H, Alkan M (1989) Wernicke's encephalopathy in acquired immune deficiency syndrome (AIDS): a case report. *Clin Neuropathol* 8:192–194
- [211] Butterworth RF, Gaudreau C, Vincelette J (1991) Thiamine deficiency and Wernicke's encephalopathy in AIDS, *Metab. Brain Dis.*, 6 207–212
- [212] Butterworth RF, Gaudreau C, Vincelette J, et al (1991) Thiamine deficiency in AIDS. *The Lancet* 338:1086
- [213] Page GL, Laight D, Cummings MH (2011) Thiamine deficiency in diabetes mellitus and the impact of thiamine replacement on glucose metabolism and vascular disease. *Int J Clin Pract* 65:684–690
- [214] Harper CG, Butterworth RF (1997) Nutritional and metabolic disorders. *Greenfield's Neuropathology*, Graham DI, Lantos P (eds), Cambridge 601-655

- [215] Cooper JR, Pincus JH (1972) Role of thiamine triphosphate in subacute necrotizing encephalomyelopathy. *J Agric Food Chem* 20:490–493
- [216] Cooper JR, Itokawa Y, Pincus JH (1969) Thiamine triphosphate deficiency in subacute necrotizing encephalomyelopathy. *Science* 164:74–75
- [217] Pincus JH, Solitare GB, Cooper JR (1976) Thiamine triphosphate levels and histopathology. Correlation in Leigh disease. *Arch Neurol* 33:759–76
- [218] Plaitakis A, Whetsell WO, Jr., Yahr MD (1977) Subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh's disease): clinical and genetic considerations of its adult form. *Trans Am Neurol Assoc* 102:32–36
- [219] Pincus JH, Itokawa Y, Cooper JR (1969) Enzyme-inhibiting factor in subacute necrotizing encephalomyelopathy. *Neurology* 19:841–845
- [220] Plaitakis A, Whetsell WO, Jr., Cooper JR (1980) Chronic Leigh Disease: a genetic and biochemical study. *Ann Neurol* 7:304–310
- [221] Benit P, Chretien D, Kadhom N (2001) Large-scale deletion and point mutations of the nuclear *NDUFV1* and *NDUFS1* genes in mitochondrial complex I deficiency *Am J Hum Genet* 68:1344–1352
- [222] Martin MA, Blazquez A, Gutierrez-Solana LG (2005) Leigh syndrome associated with mitochondrial complex I deficiency due to a novel mutation in the *NDUFS1* gene *Arch Neurol* 62:659–661
- [223] Lopez LC, Schuelke M, Quinzii CM (2006) Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (*PDSS2*) mutations. *Am J Hum Genet* 79:1125–1129
- [224] Lonsdale D (2015) Sudden infant death syndrome and abnormal metabolism of thiamin. *Medical Hypotheses* 85(6):922–926
- [225] Chuang DT, Ku LS, Cox RP (1982) Thiamin-responsive maple-syrup-urine disease: decreased affinity of the mutant branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase for alpha-ketoisovalerate and thiamin pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:3300–3304
- [226] Chuang DT, Ku LS, Cox RP (1982) Biochemical basis of thiamin-responsive maple syrup urine disease. *Trans Assoc Am Physicians* 95:196–204]
- [227] Diaz GA, Banikazemi M, Oishi K, Desnick RJ, Gelb BD (1999) Mutations in a new gene encoding a thiamine transporter cause thiamine-responsive megaloblastic anaemia syndrome. *Nat Genet* 22:309-312
- [228] Akin L, Kurtoglu S, Kendirci M, Akin MA, Karakukcu M (2011) Does early treatment prevent deafness in thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome? *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 3:36–39
- [229] Oishi K, Hofmann S, Diaz GA, et al (2002) Targeted disruption of *Slc19a2*, the gene encoding the high-affinity thiamin transporter *Thtr-1*, causes diabetes mellitus, sensorineural deafness and megaloblastosis in mice. *Hum Mol Genet* 11:2951-2960

- [230] Bose A, Mouton-Liger F, Paquet C (2011) Modulation of tau phosphorylation by the kinase PKR implication in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 21(2):189-200
- [231] Lu'o'ng KV, Nguyen LT (2011) Role of thiamine in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 26(8):588-598
- [232] Blass JP, Gleason P, Brush D. et al (1988) Thiamin and Alzheimer's disease. A pilot study. *Arch Neurol* 45(8):833-835
- [233] Pan X, Fei G, Lu J, et al (2016) Measurement of blood thiamine metabolites for Alzheimer's disease diagnosis. *E BioMedicine* 3:155–162
- [234] Pan X, Sang S, Fei G, et al (2017) Enhanced activities of blood thiamine diphosphatase and monophosphatase in Alzheimer's disease. *PLoS One* 12: e0167273
- [235] Calingasan NY, Gandy SE, Baker H, et al (1996) Novel Neuritic Clusters with accumulations of amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 immunoreactivity in brain regions damaged by thiamine deficiency. *American Journal of Pathology* 149(3):1063-1071
- [236] Karuppagounder SS, Hui X, Pechman D, et al (2008) Translocation of Amyloid precursor protein C-terminal fragment (s) to the nucleus precedes neuronal death due to thiamine deficiency induced mild impairment of oxidative metabolism. *Neurochem Res* 33(7):1365-1372
- [237] Gibson GE, Hirsch JA, Cirio RT, et al (2013) Abnormal thiamine-dependent processes in Alzheimer's disease. Lessons from diabetes, *Mol Cell Neurosci* 55(1):17-25
- [238] Jiménez-Jiménez FJ, Molina JA, Hernánz A, et al (1999) Cerebrospinal fluid levels of thiamine in patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 271(1):33-36
- [239] Laforenza U, Patrini C, Poloni M, et al (1992) Thiamin mono- and pyrophosphatase activities from brain homogenate of Guamanian amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia patients. *J Neurol Sci* 109(2):156-161
- [240] Luong KV, Nguyễn LT (2011) The beneficial role of thiamine in Parkinson disease. *CNS Neurosci Ther* 19(7):461-468
- [241] Favier M, Carcenac C, Druil G, et al (2013) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus modifies the expression of vesicular glutamate transporters in basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* 14(152):1-13
- [242] McLure KG, Nakagi M, Kastan MB (2004) NAD⁺ Modulates p53 DNA Binding specificity and function. *Molecular and cellular biology* 24(22):9958-9967
- [243] Yang Z, Ge J, Yin W, Shen H, Liu H, Guo Y (2004) The expression of p53, MDM2 and Ref1 gene in cultured retina neurons of SD rats treated with vitamin B₁ and/or elevated pressure. *Yan Ke Xue Bao* 20:259–263
- [244] Tanaka T, Yamamoto D, Sato T, et al (2011) Adenosine thiamine triphosphate (AThTP) inhibits Poly(ADP-Ribose) polymerase-1 (PARP-1) activity. *J Nutr Sci Vitaminol* 57(2):192-196

- [245] Bando Y, Onuki R, Katayama T, et al (2005) Author information Double-strand RNA dependent protein kinase (PKR) is involved in the extrastriatal degeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease. *Neurochem Int* 46(1):11-18
- [246] Yamashita H, Zhang Y-X, Nakamura S (1993) The effects of thiamin and its phosphate esters on dopamine release in the rat striatum. *Neurosci Lett* 158:229-231
- [247] Costantini A, Fancellu R (2016) An open-label pilot study with high-dose thiamine in Parkinson's disease. *Neural Regen Res* 11(3):406-407
- [248] Dolce V, Fiermonte G, Runswick MJ, Palmieri F, Walker JE (2001) The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in the toxicity of nucleoside antivirals. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2284-2288
- [249] Spiegel R, Shaag A, Edvardson S, et al (2009) *SLC25A19* mutation as a cause of neuropathy and bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol* 66(3):419-424
- [250] Zhang K, Huentelman MJ, Rao F, et al (2014) Genetic implication of a novel thiamine transporter in human hypertension. *J Am Coll Cardiol* 63:1542–1555
- [251] Busanello ENB, Maso Viegasa C, Pimentel Mouraa A, et al (2010) *In vitro* evidence that phytanic acid compromises Na⁺,K⁺-ATPase activity and the electron flow through the respiratory chain in brain cortex from young rats. *Brain Research* 1352:231–238
- [252] Pagadala NS, Bjorndahl TC, Blinov N, et al (2013) Molecular docking of thiamine reveals similarity in binding properties between the prion protein and other thiamine-binding proteins. *J Mol Model* 19:5225–5235
- [253] Lonsdale D (2019) Thiamin and protein folding. *Medical Hypotheses* 129:109252
- [254] Schmitz M, Llorens F, Pracht A, et al (2016) Regulation of human cerebrospinal fluid malate dehydrogenase 1 in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Aging* 8(11)2927-2935
- [255] Aleshin VA, Bunik VI (2017) Analysis of the protein binding sites for thiamin and its derivatives to elucidate the molecular mechanisms of the noncoenzyme action of thiamin (vitamin B₁). *Studies in Natural Products/Chemistry* 53:375–429
- [256] Lo PK, Chen JY, Tang PP, et al (2001) Identification of a mouse thiamine transporter gene as a direct transcriptional target for p53. *J Biol Chem* 276:37186–37193
- [257] Rindi G, Laforenza U (2000) Thiamine intestinal transport and related issues: recent aspects. *Proc Soc Exp Biol Med* 224:246-255
- [258] Said HM, Ortiz A, Subramanian VS, et al (2001) Mechanism of thiamine uptake by human colonocytes: studies with cultured colonic epithelial cell line NCM460. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:144-150
- [259] Laforenza U, Orsenigo MN, Rindi G (1998) A thiamine/H⁺ antiport mechanism for thiamine entry into brush border membrane vesicles from rat small intestine. *J Membrane Biol* 161:151-161
- [260] Casirola D, Patrini C, Ferrari G, Rindi G (1990) Thiamin transport by human erythrocytes and ghosts. *J Membrane Biol* 118:11-18

- [261] Said HM, Reidling JC, Ortiz A (2002) Cellular and molecular aspects of thiamin uptake by human liver cells: studies with cultured HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* 1567:106-112
- [262] Gastaldi G, Cova E, Verri A, Laforenza U, Faelli A, Rindi G (2000) Transport of thiamin in rat renal brush border membrane vesicles. *Kidney Int* 57:2043-2054
- [263] Gusaro G, Rindi G, Sciorelli G (1977) Subcellular distribution of thiamine-pyrophosphokinase and thiamine-pyrophosphatase activities in rat isolated enterocytes. *Int J Vit Nutr Res* 47:99-106
- [264] Yoshioka K (1984) Some properties of the thiamine uptake system in isolated rat hepatocytes *Biochim Biophys Acta* 778:201-209
- [265] Patrini C, Reggiani C, Laforenza U, Rindi G (1988) Blood-brain transport of thiamine monophosphate in the rat: a kinetic study *in vivo*. *J Neurochem* 50:90-93
- [266] Spector R (1976) Thiamine transport in the central nervous system. *R Spector. Am J Physiol* 230:1101-1107
- [267] Пархоменко ЮМ (1993) Исследование механизмов реализации некоферментных функций тиамин в тканях животных. Автореф дисс на соискание научн степени доктора биол наук, спец 03.00.04 Биохимия, Киев 38 с
- [268] Kang J, Samuels DC (2008) The evidence that the DNC (SLC25A19) is not the mitochondrial deoxyribonucleotide carrier. *Mitochondrion* 8:103-108
- [269] Lemos C, Faria A, Meireles M, et al (2012) Thiamine is a substrate of organic cation transporters in Caco-2 cells. *Eur J Pharmacol* 682:37-42
- [270] Chen L, Shu Y, Liang X, et al (2014) OCT1 is a highcapacity thiamine transporter that regulates hepatic steatosis and is a target of metformin. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:9983-9988
- [271] Nabokina SM, Subramanian VS, Said HM, et al (2014) Molecular identification and functional characterization of the human colonic thiamine pyrophosphate transporter. *J Biol Chem* 289:4405-4416
- [272] Tanihara Y, Masuda S, Sato T, et al (2007) Substrate specificity of MATE1 and MATE2K, human multidrug and toxin extrusions/H⁺organic cation antiporters. *Biochem Pharmacol* 74:359-371
- [273] Godo S, Yoshida Y, Fujita M, et al (2017) The dramatic recovery of a patient with biguanide-associated severe lactic acidosis following thiamine supplementation. *Intern Med* 56:455-459
- [274] McGarvey C, Francon C, Prentice D, Bynevelt M (2018) Metformin-induced encephalopathy: the role of thiamine. *Intern Med J* 48:194-197
- [275] Vora B, Green EAE., Khuri N, et al (2019) Drug-nutrient interactions: discovering prescription drug inhibitors of the thiamine transporter ThTR-2 (SLC19A3). *Am J Clin Nutr* 00:1-12. doi:10.1093/ajcn/nqz255/5637679
- [276] Алёшин ВА, Мкртчян ГВ, Буник ВИ (2019) Механизмы некоферментного действия тиамин: белковые мишени и медицинское значение. *Биохимия* 84(8):1051-1075
- [277] Muniyappa K, Adiga PR (1979) Isolation and characterization of thiamin-binding protein from chicken egg white. *Biochem J* 177:887-894

- [278] Muniyappa K, Adiga PR (1981) Nature of the thiamin-binding protein from chicken egg yolk. *Biochem J* 193:679-685
- [279] Mendoza R, Anderson MM, Overbaugh J (2006) A Putative Thiamine Transport Protein Is a Receptor for Feline Leukemia Virus Subgroup A. *J Virol* 80(7):3378-3385
- [280] Kimura M, Itokawa Y (1981) Separation and determination of thiamine-binding proteins in rats by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 211(2):290-294
- [281] Takenaka T, Yoshioka T, Inoue H, Inomata K, Horie H (1978) Incorporation of thiamine into membrane proteins in the Squid Giant Axon. *Proc Japan Acad* 54(B):316-320
- [282] Zhao J, Sun X, Zhong Ch, et al (2011) Exposure to Pyriithiamine Increases β -Amyloid Accumulation, Tau Hyperphosphorylation, and Glycogen Synthase Kinase-3 Activity in the Brain. *Neurotox Res* 19:575–583
- [283] Markova N, Bettendorff L, Strekalova T, et al (2017) Thiamine and benfotiamine improve cognition and ameliorate GSK-3 β -associated stress-induced behaviours in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 75:148–156
- [284] Vignisse J, Strekalova T, Bettendorff L (2017) Thiamine and benfotiamine prevent stress-induced suppression of hippocampal neurogenesis in mice exposed to predation without affecting brain thiamine diphosphate levels. *Mol Cell Neurosci* 82:126–136
- [285] Resende LS, Ribeiro AM, Werner D, et al (2012) Thiamine deficiency degrades the link between spatial behavior and hippocampal synapsin I and phosphorylated synapsin I protein levels *Behavioural Brain Research* 232(2):421– 425
- [286] Beauchesne E, Desjardins P, Hazell AS, Butterworth RF (2009) Altered expression of tight junction proteins and matrix metalloproteinases in thiamine-deficient mouse brain. *J Neurochemistry International* 55:275–281
- [287] Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ (2007) Hepatocyte susceptibility to glyoxal is dependent on cell thiamin content. *Chem Biol Interact* 165(2):146-54
- [288] Петров СА, Желязкова ИА (1991) Влияние тиаминa и его метаболитов на активностъ тканевой и очищенной алкогольдегидрогеназы. *Физиол.ж-л* 37(1):45-49
- [289] Петров СА, Котенко ОА, Эль-Абси М (1991) Вплив тiамiну та його метаболiтiв на активнiсть тканинної та очищеної лактатдегiдрогенази. *Укр бiох ж-л* 63(2):105-108
- [290] Петров СА, Розанов ЛЯ, Тищенко ДВ (1987) Влияние тиаминa и его производных на активностъ ацетилхолинэстеразы мозга и крови белых мышей. *Укр биохим журн* 59(3):76-79
- [291] Петров СА, Донеско ЕВ (1989) Влияние тиаминa и его метаболитов на аспартат и аланин аминотрансферазную активностъ в организме белых крыс и донорской крови. *Физиол ж-л* 35(4):94-96
- [292] Dalvi RR (1987) Purification of rat liver alcohol dehydrogenase and studies on kinetic characteristics of thiamine, thiazole and NAD⁺ by the purified enzyme/ *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 24:248-251

- [293] Вовк АИ, Бабий ЛВ, Муравьева ИВ (2002) Относительная реактивность тиамин монофосфата и тиамин дифосфата при взаимодействии со щелочной фосфатазой. Укр Биохим Журн 74(1):93-96
- [294] Bettendorff L, Lakaye B, Kohn G, Wins P (2014) In search of physiological role for thiamine triphosphate and the 25 kDa thiamine triphosphatase; Mkrtchyan G., Kulakovskaya E, Bunik V Thiamine-binding proteins of rat synaptosomes: bioinformatics and functional studies. Abstracts of thiamine biochemistry. The 8th International Conference on Thiamine: from Catalysis to Pathology (Liege, Belgium, 23-26 May) 31-32, 39
- [295] Клящицкий БА, Позднев ВФ, Митина ВХ и др (1980) Хроматография пируватдекарбоксилазы из пивных дрожжей. Биоорг химия 6(4):1572–1579
- [296] Меженська ОО, Музичка 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
- [297] Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. Anal Biochem 157(2):375-380
- [298] Кочетов ГА (1980) Практическое руководство по энзимологии. Москва, Высшая школа, 272 с
- [299] Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem 72:248-254
- [300] Lowry OH, Rosebrough NJ (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275
- [301] Laemmli UK, Bequin F, Gujer-Kelenberger GA (1970) Factor Preventing the Major Head Protein of Bacteriophage T4 from Random Aggregation J Mol Biol 47:69-85
- [302] Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J of Cell Biology 17:208-212
- [303] Zapadnyuk IP, Zapadnyuk VI, Zakhariya EA et al (1983) Laboratory Animals. Breeding, Management, Use in Experiment [in Russian], Vyshcha Shkola, Kyiv
- [304] Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner M, Goodsell DS Olson AJ (2016) Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. Nat Protoc 11(5):905–919
- [305] Туркова Я (1980) Аффинная хроматография (пер с англ). Москва, Мир 472 с
- [306] 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 Семенени ИН, Мойсеенка АГ) Минск, ИВЦ Минфина Гродно, 17-18 мая сс 369-376
- [307] Aleshin VA, Mezhenka OO, Parkhomenko YM, Kaehne T, Bunik VI (2020) Thiamine mono- and diphosphate phosphatases in bovine brain synaptosomes Biochemistry (Moscow) 85(3):378–386

- [308] Bleile DM, Schulz RA, Harrison JH, Gregory EM (1977) Investigation of the subunit interactions in malate dehydrogenase. *J Biol Chem* 252:755–758
- [309] Birktoft JJ, Fu Z, Banaszak LJ, Banaszak LJ, et al (1989) Comparison of the molecular structures of cytoplasmic and mitochondrial malate dehydrogenase. *Biochem Soc Trans* 17:301–304
- [310] 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)* 85(1):27–39
- [311] Rudolph R, Fuchs I, Jaenicke R (1986) Reassociation of dimeric cytoplasmic malate dehydrogenase is determined by slow and very slow folding reactions. *Biochemistry* 25:1662-1669
- [312] Nagahara N (2011) Intermolecular disulfide bond to modulate protein function as a redox-sensing switch. *Amino Acids* 41:59–72
- [313] Строкіна АО (2011) Тіамінфосфатгідролазна активність плазматичних мембран нервових клітин. Дисс на здобуття наук ст канд біол наук, спец 03.00.04 Біохімія Київ 139 с
- [314] Остерман ЛА (1985) Хроматография белков и нуклеиновых кислот. Москва, Наука 536 с
- [315] Stetzkowski-Marden F, Gaus K, Recouvreur M, Cartaud A, Cartaud J (2006) Agrin elicits membrane lipid condensation at sites of acetylcholine receptor clusters in C2C12 myotubes. *J Lipid res* 47(10):2121-2133
- [316] Denzer AJ, Schulthess T, Fauser Ch, Schumacher B, Kammerer RA, Engel Ju, Ruegg MA (1998) Electron microscopic structure of agrin and mapping of its binding site in laminin-1. *The EMBO J* 17(2):335–343
- [317] Böhm D, Keller K, Pieter Ju, et al (2012) Comparison of tear protein levels in breast cancer patients and healthy controls using a de novo proteomic approach *Oncology Reports* 28:429-438
- [318] Hanss B, Leal-Pinto E, Teixeira A, et al (2002) Cytosolic malate dehydrogenase confers selectivity of the nucleic acid-conducting channel. *PNAS* 99(3):1707–1712
- [319] Brockhausen J, Cole RN, Gerva'sio OL, et al (2008) Neural Agrin increases postsynaptic ACh receptor packing by elevating Rapsyn protein at the mouse neuromuscular synapse. *Developmental Neurobiology* 68(9):1153-1169
- [320] Riley BE et al (2013) Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases. *Nat. Commun.* 4:1 doi:10.1038/ncomms2982.
- [321] Li L, Cao Yu, Wu H, et al (2016) Enzymatic Activity of the Scaffold Protein Rapsyn for Synapse Formation. *Neuron* 92(5):1007–1019
- [322] Tian J., Cai T, Yuan Z, et al (2006) Binding of Src to Na⁺/K⁺-ATPase forms a functional signaling complex. *Mol Biol Cell* 17(1): 317-326
- [323] Nunes PT, Gómez-Mendoza DP, Rezende CP, et al (2018) Thalamic proteome changes and behavioral impairments in thiamine-deficient rats *4 Neuroscience* 385:181-197
- [324] Quinn KA, Pye VJ, Dai Ya-P, et al (1999) Characterization of the Soluble Form of the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP). *Experimental Cell Research* 251:433–441

- [325] Sagare A, Deane R, Bell RD, et al (2007) Clearance of amyloid- β by circulating lipoprotein receptors. *Nature Medicine (Brief communications)* 13(9):1029-1031
- [326] Chan H, Butterworth RF, Hazell AS (2004) Primary cultures of rat astrocytes respond to thiamine deficiency-induced swelling by downregulating aquaporin-4 levels. *Neuroscience Letters* 366:231–234
- [327] Kagan BL, Jang H, Capone R, (2012) Antimicrobial properties of amyloid peptides. *Molecular Pharmaceutics* 9(4): 708–717
- [328] Schluesener HJ, Su Y, Ebrahimi A, Pouladsaz D (2012) Antimicrobial peptides in the brain: neuropeptides and amyloid. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* 4:1375–1380
- [329] Tabaton M., Zhu X., Perry G., et al (2010) Signaling effect of amyloid-beta(42) on the processing of A β PP *Experimental Neurology* 221(1):18–25
- [330] Baruch-Suchodolsky R, Fischer B (2009) A β 40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems. *Biochemistry* 48(20): 4354–70
- [331] Yao ZX, Papadopoulos V (2002) Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *FASEB J* 16(12):1677–1679
- [332] Maloney B, Lahiri DK (2011) The Alzheimer's amyloid β -peptide (A β) binds a specific DNA A β -interacting domain (A β ID) in the APP, BACE1, and APOE promoters in a sequence-specific manner: characterizing a new regulatory motif. *Gene* 488(1–2):1–12
- [333] Zhang Q, Yang G, Li W, et al (2011) Thiamine deficiency increases β -secretase activity and accumulation of β -amyloid peptides *Neurobiology of Aging* 32:42–53
- [334] Field RB, Chirtel SJ, Redman RS (1997) Effect of Substance P and Receptor Antagonists on Secretion of Lingual Lipase and Amylase from Rat von Ebner's Gland. *Peptides* 18(2):277–285
- [335] van Loo B, Jonasa S, Babbie AC, et al (2010) An efficient, multiply promiscuous hydrolase in the alkaline phosphatase superfamily. *PNAS* 107(7):2740–2745
- [336] Ebert V, Scholze P, Fuchs K, Sieghart W (1999) Identification of subunits mediating clustering of GABA(A) receptors by rapsyn. *Neurochem Int* 34(5):453-63
- [337] Hilgenberg Lutz GW, Su H, Gu H, et al (2006) α 3Na⁺/K⁺-ATPase is a Neuronal Receptor for Agrin. *Cell* 125:359–369
- [338] Bruzzone S, Guida L, Zocchi E, et al (2001) Connexin 43 hemichannels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *FASEB J* 15:10-12
- [339] de Andrade JAA, Gayer CRM, Pereira de Almeida Nogueira N, et al (2014) The effect of thiamine deficiency on inflammation, oxidative stress and cellular migration in an experimental model of sepsis. *Journal of Inflammation* 11(1):11-21
- [340] Qiyu W, Yu L, Yu Ch-A (2010) Cross-talk between Mitochondrial Malate Dehydrogenase and the Cytochrome bc1 Complex. *J Biol Chem* 285:10408-10414
- [341] Luo ZG, Je HS, Wang Q, et al (2003) Implication of geranylgeranyltransferase I in synapse formation. *Neuron* 40(4):703-717

- [342] Wu H, Xiong WC, Mei L (2010) To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* 137:1017-1033
- [343] Hazell AS, Sheedy D, Oanea R, et al (2010) Loss of astrocytic glutamate transporters in Wernicke encephalopathy. *Glia* 58:148–156
- [344] Beaudin S, Welsh J (2016) 1,25-Dihydroxyvitamin D induces the glutamate transporter SLC1A1 and alters glutamate handling in non-transformed mammary cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 424:34-41
- [345] Wang J, Fu X-Q, Lei W-L, et al (2010) Nuclear Factor κ B controls Acetylcholine Receptor clustering at the Neuromuscular Junction. *The Journal of Neuroscience* 30(33):11104 –11113
- [346] Лісаковська ОО (2019) Роль вітаміну D3 у регулюванні NF- κ B-асоційованих сигнальних шляхів за преднізолон-індукованого остеопорозу. Дисс на здобуття ст канд біол наук спец 03.00.04 Біохімія Київ 173 с
- [347] Ma Q, Liang M, Wang Y et al (2020) Non-coenzyme role of vitamin B₁ in RANKL-induced osteoclastogenesis and ovariectomy induced osteoporosis. *J Cell Biochem.* doi:10.1002/jcb.29632
- [348] Arvaniti M, Jensen MM, Soni N, et al (2016) Functional interaction between Lypd6 and nicotinic acetylcholine receptors *Journal of Neurochemistry* 138(6):806–820
- [349] Lee SH, Kim SY, Kim JH et al (2012) Phosphoproteomic analysis of electroacupuncture analgesia in an inflammatory pain rat model. *Mol Med Rep* 6(1):157-162
- [350] Luo Sh, Zhang B, Dong X-P, et al (2008) HSP90 β regulates Rapsyn turnover and subsequent AChR Cluster formation and maintenance. *Neuron* 60(1): 97–110
- [351] Shin BH, Choi SH, Cho EY, et al (2004) Thiamine attenuates hypoxia-induced cell death in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Mol Cells* 18(2):133-140
- [352] Beere HM, Green DR (2001) Stress management – heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol* 11(1):6-10
- [353] Li G et al (2016) Blockade of presynaptic 4-aminopyridine-sensitive potassium channels increases initial neurotransmitter release probability, reinstates synaptic transmission altered by GABAB receptor activation in rat midbrain periaqueductal gray. *Neuroreport* 27(1):50-55
- [354] Wu Z-Zh, Li D-P, Chen S-R, Pan H-L (2009) Aminopyridines Potentiate Synaptic and Neuromuscular Transmission by Targeting the Voltage-activated Calcium Channel Subunit β *JBC* 284(52):36453–36461
- [355] van der Voort PH, Wilffert B, van Roon EN, Uges DR (2016) 4-Aminopyridine as a life-saving treatment in calcium channel antagonist intoxication *Neth J Med* 74(6):276
- [356] Houzen H, Kanno M (1998) Thiamine and its derivatives inhibit delayed rectifier potassium channels of rat cultured cortical neurons *Neuropharmacology* 37(3):313-322
- [357] Zong Y, Zhang B, Gu Sh, et al (2012) Structural basis of agrin–LRP4–MuSK signaling. *Genes & Development* 26:247–258

- [358] Tian Q-B, Suzuki T, Yamauchi T, et al (2006) Interaction of LDL receptor-related protein 4 (LRP4) with postsynaptic scaffold proteins via its C-terminal PDZ domain-binding motif, and its regulation by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *European Journal of Neuroscience* 23:2864–2876
- [359] Lu Yo, Tian Q-B, Endo Sh, Suzuki T (2007) A role for LRP4 in neuronal cell viability is related to apoE-binding. *Brain research* 1177:19–28
- [360] Hawkins CF, Borges A, Perham RN (1989) A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. *FEBS Lett* 255(1):77-82
- [361] Sorgen PL, Duffy HS, Sahoo P, et al (2004) Structural changes in the carboxyl terminus of the gap junction protein connexin43 indicates signaling between binding domains for c-Src and zonula occludens-1 *J Biol Chem* 279: 54695-54701
- [362] Spagnol G, Kieken F, Kopanic JL, et al (2016) Structural Studies of the Nedd4 WW Domains and Their Selectivity for the Connexin43 (Cx43) Carboxyl Terminus. *J Biol Chem* 291: 7637-7650

Узагальнення результатів MS-ідентифікації ТЗП

№з/п	Назва протеїну	Організм	Молекулярна маса, Да	Score	Matches (Кількість знайдених пептидів)	Обчислене Середнє значення pI (діапазон за різними системами) (розраховани й Mascot)	% покриття АК- послідовності протеїну	Посилання
1	2	3	4	5	6	7	8	9
КЛАСТЕР nAXP								
1	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (Alternative name(s): Multiple epidermal growth factor-like domains 7, MEGF7) (бенди 7-9, рис.4.4.1)	Mus musculus, <i>Rattus norvegicus</i>	211818 211744	35	4	5,0 (3,56-5,38) (5,15) 4,98 (3,54-5,37) (5,14)	4%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q8VI56 https://www.uniprot.org/uniprot/Q9QYP1
2	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (бенд 8, рис.4.4.1)	Cricetulus griseus	210423 211528	40	40	4,86 (3,51-5,21) (5,0) 4,91 (3,54-5,27) (5,06)	23%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180412%2FFTmoizHwh.dat&hit=32&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180412%2FFTmoizHwh.dat&hit=38&db_idx=1 https://www.uniprot.org/uniparc/UPI0004549C42

1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (бенд 1,17, рис.4.4.2)	<i>Rattus norvegicus</i>	211744	21, 60	18,10	4,98 (3,54-5,37) (5,14)	10% 8%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191003%2FFTeoIGeem.dat&hit=17&db_idx=1
4	MEGF7, partial (бенд 2, рис.4.4.2) MEGF7, partial (бенд 8, рис.4.4.1)	<i>Rattus norvegicus</i>	144233	58 39	24 37	5,86 (4,13-6,66) (6,17)	22% 24%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190726%2FFTecCGemm.dat&hit=1&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180412%2FFTmoizHwh.dat&hit=49&db_idx=1
5	Agrin (бенд 5, рис.4.4.2)	<i>Rattus norvegicus</i>	208509	65	35	5,5 (1,42-6,15) (5,77)	17%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191003%2FFTeoInHwe.dat&hit=1&db_idx=1
6	Agrin	<i>Rattus norvegicus</i>	208509	25	8	5,5 (1,42-6,15) (5,77)	3%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190730%2FFTecCfYTL.dat&hit=4&db_idx=1
7	Agrin (11 варіантів) (бенд 8, рис..4.4.1)	<i>Rattus norvegicus</i>	205953 - 220314	70-68	23	5,5 (1,25-6,15) (5,76)	12%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180412%2FFTmoizTtT.dat&hit=1&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180412%2FFTmoizTtT.dat&hit=4&db_idx=1
8	Muscle, skeletal receptor tyrosine protein kinase (бенд 1, рис.4.4.2)	<i>Rattus norvegicus</i>	96759	85	40	6,64 (3,83-7,91) (7,61)	51%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191003%2FFTeoIGeem.dat&hit=1&db_idx=1
9	PREDICTED: 43 kDa receptor-associated protein of the synapse isoform X1 43 kDa receptor-associated protein of the synapse	<i>Rattus norvegicus</i>	46253 40208	46 32	7 6	7,05 (3,98-8,61) (8,26) 7,12 (4,16-8,72) (8,34)	12% 11%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191109%2FFTemSasTt.dat&hit=1&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	PREDICTED: src kinase-associated phosphoprotein 1 isoform X1 (Proto-oncogene c-Src), src kinase-associated phosphoprotein 1 SKAP55 adaptor protein	<i>Rattus norvegicus</i>	39010 40877 40863	51 50	4	4,24 (3,62-4,49) (4,35)	15% 14%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmplncOO.dat&hit=1&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmplncOO.dat&hit=3&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmplncOO.dat&hit=4&db_idx=1
11	SRC kinase signaling inhibitor 1 SRC kinase signaling inhibitor 1 Isoform 3	Homo sapiens	127027 28590	24	5	8,63 (5,54-10,05) (9,39)	5%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180502%2FFTmmfGuES.dat&hit=33&db_idx=1
12	Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-1 (бенд 9 рис. 4.4.1)	Pan troglodytes	72806	27	7	6,66 (4,6-7,48) (7,01)	14%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20170802%2FFTiemaswO.dat&hit=46&db_idx=1
ШАПЕРОНИ								
13	DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial (hsp40) (бенд , рис.), DnaJ homolog subfamily B member 5 (бенд 9, рис.4.4.1), DnaJ homolog subfamily B member 6 (HSC40) (бенд 9, рис.4.4.1), DnaJ homolog subfamily B member 7 (Heat shock protein Hsp40-3) (бенд 9, рис.4.4.1), PREDICTED: dnaJ homolog subfamily C member 13 isoform X1, PREDICTED: dnaJ homolog subfamily C member 13 isoform X2, DnaJ (Hsp40) homolog,	<i>Rattus norvegicus</i> + 4 organismes	39109	29-44	4-24	8,31 (4,98-9,56) (9,12)	12-17%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20170802%2FFTiemaswO.dat&hit=17&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20170802%2FFTiemaswO.dat&hit=18&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
13	subfamily C, member 13 (predicted), PREDICTED: dnaJ homolog subfamily C member 13 isoform X2, DnaJ homolog subfamily C member 25, dnaJ homolog subfamily C member 25 precursor							http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20170802%2FFTiemaswO.dat&hit=16&db_idx=1 https://www.uniprot.org/uniprot/Q99M87
14	Heat shock 70 kDa protein 1A and 1B, heat shock 70 kDa protein 13 precursor	<i>Rattus norvegicus</i>	70142	21	2	5,45 (4,54-5,82) (5,61)	8%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSacOE.dat&hit=23&db_idx=1
15	Endoplasmin <i>AltName</i> : 94 kDa glucose-regulated protein, Heat shock protein 90 kDa beta member 1 (Hsp90b1)	<i>Rattus norvegicus</i>	92713	21	16	4,64 (4,19-4,8) (4,72)	23%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGenS.dat&hit=30&db_idx=1
Е3 УБІКВІТИНЛІГАЗИ та ПОВ'ЯЗАНІ ПРОТЕЇНИ								
16	E3 ubiquitin-protein ligases parkin, RAD18, Rnf157, 181, 187, 213 and 220, MIB2, TRIM39, Praja-1, E3C, Itchy, TOM1, TRIM50, PDZRN3, UBR4, MAEA, potential ubiquitin ligase, isoform CRA_b, NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP2 isoform X2	Homo sapiens + 9 organismes	51607	30, 44	6, 9	6,23 (3,23-7,09) (6,2)	27%	https://www.uniprot.org/uniprot/O60260 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSacOE.dat&hit=3&db_idx=1
17	RING finger protein unkempt homolog, RING finger protein 207, PREDICTED: RING finger protein 166, RING finger protein 10, PREDICTED: RING finger protein 37 isoform X4, similar to ring finger	Bos taurus	61629	26, 31	4, 3	6,01 (3,77-6,83) (6,34)	4-14%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180414%2FFTmolGaOL.dat&hit=9&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
17	protein 127 (predicted), PHD and RING finger domain-containing protein 1 isoform X4	+ 5 organismes						
18	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D1, variant 3 isoform X1, variant 3 isoform X3, variant 3 isoform X2, variant 3 isoform X5, variant 3 isoform X4 <i>Alternative name(s):</i> EV and lactate/malate dehydrogenase domain-containing protein	<i>Rattus norvegicus</i> + 4 organismes	16591, 52128, 37054, 41068, 37122, 37148	73-27	3-11	6,65 (3,98-7,54) (6,95)	21-38%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190730%2FFTecCfYTL.dat&hit=3&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190716%2FFTecliYaR.dat&hit=31&db_idx=1
19	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases 7, 14, 28, 37, 42, BAP1, 13, 13-like, partial	Sus scrofa + 3 organismes	110414 110101	30	5	5,57 (4,46-6,04) (5,76) 5,66 (4,47-6,21) (5,87)	8% 7%	https://www.uniprot.org/uniprot/F1SRY5 https://www.uniprot.org/uniprot/Q86T82 https://www.uniprot.org/uniprot/P40826
20	PREDICTED: ubiquitin conjugation factor E4 B isoform X2	<i>Rattus norvegicus</i>	150341	27	22	6,03 (4,31-6,8) (6,14)	14%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmpieSmE.dat&hit=34&db_idx=1
АПОЛІПОПРОТЕЇНИ та ІНШІ ЛІПОПРОТЕЇНОВІ РЕЦЕПТОРИ								
21	PREDICTED: oxidized low-density lipoprotein receptor 1 isoforms X1 and X2 PREDICTED: oxidized low-density lipoprotein receptor 1	Felis catus, Acinonyx jubatus	27436 31210 31234	39-42	5	6,89 (4,33-8,0) (7,62), 6,7 (4,46-7,63) (7,11) 7,1 (4,3-8,41) (8,07)	22-25%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180501%2FFTmoObSeL.dat&hit=15&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180501%2FFTmoObSeL.dat&hit=4&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180501%2FFTmoObSeL.dat&hit=16&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
22	lipolysis stimulated lipoprotein receptor, isoform CRA_d	<i>Rattus norvegicus</i>	28879	31	7	8,63 (4,9-9,28) (8,82)	28%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180731%2FFTmplbHSO.dat&hit=34&db_idx=1
23	Apolipoprotein E (смуга 1, рис.4.7.2) Apolipoprotein E precursor (смуга 3, рис.4.7.2)	<i>Rattus norvegicus</i> <i>Bos taurus</i>	35731 35958	23 11	6 3	5,16 (4,72-5,27) (5,23)	25%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190807%2FFTecOrEOt.dat&hit=8&db_idx=1 https://www.uniprot.org/uniprot/P02650
24	Apolipoprotein M	<i>Sus scrofa</i>	21228	20	2	6,14 (3,83-6,91) (6,42)	20%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q2LE37
25	Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein A-II	<i>Odobenus rosmarus divergens</i> +6 organismes	29923	19	3	5,47 (4,69-5,8) (5,61)	16%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190716%2FFTecliYOe.dat&hit=43&db_idx=1
26	apolipoprotein L3	<i>Rattus norvegicus</i>	39654	27	3	4,97 (4,49-5,17) (5,07)	16%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180724%2FFTmribaEL.dat&hit=35&db_idx=1
27	apolipoprotein B editing enzyme catalytic polypeptide-like 3C, apolipoprotein B editing complex 3, isoform CRA_a similar to apolipoprotein B, partial	<i>Puma concolor</i> , <i>Rattus norvegicus</i> <i>Bos taurus</i>	17233	32	13	8,8 (4,27-9,58) (9,43)	66%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmpieSmE.dat&hit=8&db_idx=1
РЕЦЕПТОРИ								
28	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-3	<i>Mus musculus</i> , <i>Rattus norvegicus</i>	57072 56960	34 19	4 10	5,46 (3,51-5,92) (5,64) 5,66 (3,53-6,26) (5,9)	14% 28%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q8R4G9 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191003%2FFTeoIGeem.dat&hit=44&db_idx=1
29	acetylcholine receptor subunit delta precursor	<i>Rattus norvegicus</i>	58846	28	18	5,36 (4,16-5,76) (5,53)	41%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180727%2FFTmplrYaS.dat&hit=32&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
30	PREDICTED: muscarinic acetylcholine receptor M2	Rousettus aegyptiacus	53799	56	9	8,3 (4,15-9,34) (9,14)	29%	https://www.uniprot.org/uniparc/UPI00078813DC
31	Glutamate receptor 1 (AMPA)	Homo sapiens+ 25 organismes	85758-101514	67	8-10	4,133-8,874	14-18%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20170802%2FFTiemaswO.dat&hit=1&db_idx=1
32	NMDA receptor synaptonuclear signaling and neuronal migration factor	Mus musculus, <i>Rattus norvegicus</i>	60255-60244	27	4	8,23 (4,92-9,34) (9,12) 8,3 (4,98-9,47) (9,17)	12%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q99NF2 https://www.uniprot.org/uniprot/Q9EPI6 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180502%2FFTmmfGaaR.dat&hit=42&db_idx=1
33	Glutamate receptor ionotropic, delta-2	<i>Rattus norvegicus</i>	113290	33	5	5,65 (4,14-6,29) (5,89)	7%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmplncTR.dat&hit=10&db_idx=1
34	Metabotropic glutamate receptor 5	<i>Rattus norvegicus</i>	131800	20	4	6,9 (3,97-8,35) (8,07)	4%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmpieTaE.dat&hit=37&db_idx=1
35	PREDICTED: glutamate receptor ionotropic, kainate 3 isoform X2	<i>Rattus norvegicus</i>	101113	29	34	6,82 (4,31-7,88) (7,56)	33%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGTSO.dat&hit=43&db_idx=1
36	gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-1 precursor	<i>Rattus norvegicus</i>	54038	35	18	8,13 (4,2-9,03) (8,89)	46%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180727%2FFTmplrYaS.dat&hit=4&db_idx=1
37	Ryanodine receptor 1	<i>Rattus norvegicus</i>	565122	24	4	5,06 (4,01-5,3) (5,18)	1%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmpieTaE.dat&hit=24&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
38	Folate receptor gamma	Homo sapiens	27620	25	3	6,81(3,48-8,25)	17%	https://www.uniprot.org/uniprot/P41439
39	Oxytocin receptor	Ovis aries	43243	22	2	8,6 (4,76-9,72) (9,48)	6%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q28756
40	Interleukin-17 receptor E	<i>Rattus norvegicus</i>	70806	27	4	7,39 (4,18-9,04) (8,68)	9%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmpieTaE.dat&hit=13&db_idx=1
41	Ephrin type-B receptor 6, Ephrin type-A receptor 5	Mus musculus, <i>Rattus norvegicus</i>	104714	27	17	6,37 (4,07-7,22) (6,83)	18%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmpieSmE.dat&hit=30&db_idx=1
42	Nuclear receptor subfamily 1 group I member 3, nuclear receptor binding SET domain protein 1 (predicted), isoform CRA_b	Pusa sibirica, <i>Rattus norvegicus</i>	283251	28	21	6,84 (4,48-8,42) (8,03)	9%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmpieSmE.dat&hit=19&db_idx=1
43	PREDICTED: GDNF family receptor alpha-4 isoform X1, PREDICTED: GDNF family receptor alpha-4 isoform X6	<i>Rattus norvegicus</i>	40490,33660	28, 26	6-7	7,76 (4,28-9,49) (9,08) 7,86 (4,2-9,53) (9,16)	36-37%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190726%2FTecCGcTE.dat&hit=10&db_idx=1
44	Lutropin-choriogonadotropic hormone receptor	Sus scrofa	78041	20	2	7,49 (3,74-8,95) (8,71)	5%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180414%2FTmolGaOL.dat&hit=43&db_idx=1
45	PREDICTED: paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta isoform X8	<i>Rattus norvegicus</i>	24937	24	6	8,71 (4,64-9,68) (9,3)	39%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190726%2FTecCGcTE.dat&hit=46&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
46	Endothelin receptor type B, endothelin receptor type B precursor, ET-B endothelin receptor	<i>Rattus norvegicus</i>	49422	32	8	8,6 (4,74-9,9) (9,5)	35%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190726%2FFTecCGcTE.dat&hit=3&db_idx=2
47	Putative gustatory receptor clone РТЕ03 (Fragment) (лингвлипаза)	<i>Rattus norvegicus</i>	18654	20	3	8,1 (0,95-9,27) (9,08)	11%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190730%2FFTecCfYTL.dat&hit=32&db_idx=1
48	Plasminogen receptor (КТ)	<i>Rattus norvegicus</i>	17301	20	10	8,79 (8,79-10,34) (9,48)	44%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191003%2FFTeoIGeem.dat&hit=35&db_idx=1
50	Probable G-protein coupled receptor 176	<i>Rattus norvegicus</i>	56749	20	2	8,22 (4,38-9,31) (9,15)	9%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSacOE.dat&hit=32&db_idx=1
СИНАПТОСОМНІ ПРОТЕЇНИ та ПРОТЕЇНИ пов'язані з різними НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНИМИ ХВОРОБАМИ								
51	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 2	<i>Rattus norvegicus</i> + 2 organismes	172757	30	4	8,48 (5,16-9,8) (9,31)	4%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q9EQZ7 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180502%2FFTmmfGaaR.dat&hit=35&db_idx=1
52	Amyloid-beta A4 protein (бeнд 1, рис.4.4.2)	<i>Rattus norvegicus</i>	86649	22	5	4,64 (3,8-4,81) (4,73)	8%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190807%2FFTecOrEOt.dat&hit=20&db_idx=1 https://www.uniprot.org/uniprot/P08592
53	Presenilin-2	<i>Bos taurus</i>	50238	25	6	4,43 (1,22-4,6) (4,51)	20%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q9XT96 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180414%2FFTmolGuth.dat&hit=16&db_idx=1
54	Prion-like protein doppel	<i>Ovis aries</i>	20635	24	2	8,3 (4,71-9,48) (9,23)	19%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q9GJY2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
55	Protein S100-A4	<i>Rattus norvegicus</i>	11769	21	5	4,96 (4,2-5,12) (5,04)	71%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGetE.dat&hit=32&db_idx=1
56	Protein piccolo	<i>Rattus norvegicus</i>	552376	19	15	5,88 (4,58-6,1) (6,13)	3%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191003%2FFTeoInHwe.dat&hit=38&db_idx=1
ПРОТЕЇНИ ПОВ'ЯЗАНІ З МАЛИМИ ГТФ-азами								
57	synaptic Ras GTPase activating protein, partial, Ras/Rap GTPase-activating protein SynGAP, rab GTPase-activating protein 1-like, rho GTPase-activating protein 25 isoform X2, rho GTPase-activating protein 24 isoform 1, PREDICTED: rho GTPase-activating protein 24 isoform X1, PREDICTED: rho GTPase-activating protein 24 isoform X2, rho GTPase-activating protein 24 isoform 5, rho GTPase-activating protein 24 isoform 3, GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1, RAS protein activator like-3, Rho GTPase-activating protein 29, rho GTPase-activating protein 24	<i>Rattus norvegicus</i> + 4 <i>organismes</i>	43952	34	7	9,37 (9,37-10,62) (9,95)	10%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191109%2FFTemSaswm.dat&hit=36&db_idx=1
58	Regulator of G-protein signaling 4, Regulator of G-protein signaling 1	<i>Rattus norvegicus</i>	23234	24	14	7,52 (4,48-9,04) (8,69)	48%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGenS.dat&hit=12&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
59	Ras-related protein Rab-13, Ras-related protein M-Ras, Ras-related protein Ral-A, Ras-related protein Rab-5C, Ras-related protein Rab-12, ras-related protein Rab-5C	<i>Rattus norvegicus</i>	22887	19	2	8,67 (8,67-10,28) (9,47)	16%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSacOE.dat&hit=47&db_idx=1
60	Rho guanine nucleotide exchange factor 25, similar to SH3-containing guanine nucleotide exchange factor (predicted), isoform CRA_a, Rho guanine nucleotide exchange factor 2	<i>Rattus norvegicus</i>	64119	19	9	5,12 (4,17-5,31) (5,22)	16%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191003%2FFTeoInHwe.dat&hit=34&db_idx=1
ΦΟСΦΑΤАЗИ i КИНАЗИ								
61	Pyridoxal kinase	<i>Rattus norvegicus</i>	34886	20	3	6,04 (4,29-6,82) (6,32)	12%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180731%2FFTmplbTwR.dat&hit=41&db_idx=1
62	Extracellular serine/threonine protein kinase FAM20C (смуга 9, рис.4.7.1)	Homo sapiens	66193	34	6	6,92 (4,44-7,98) (7,66)	15%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20170802%2FFTiemaswO.dat&hit=10&db_idx=1
63	microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2 isoform X16, isoform X12, isoform X14, isoform X13, isoform X6, isoform X5, isoform X11, isoform X3, isoform X1, isoform X15, isoform X7, isoform X10	Microcebus murinus	164195	51	37	6,48 (4,61-7,32) (6,87)	28%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180412%2FFTmoizHwh.dat&hit=2&db_idx=1
64	Serine/threonine-protein kinase Nek7	<i>Rattus norvegicus</i>	34506	20	3	7,46 (4,15-8,68) (8,49)	14%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180731%2FFTmplbTwR.dat&hit=39&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
65	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog	<i>Rattus norvegicus</i>	116935	25	18	9,49 (9,49-11) (10,23)	20%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191107%2FFTemSGamE.dat&hit=18&db_idx=1
66	serine-threonine kinase, partial	<i>Rattus norvegicus</i>	6064	30	7	6,63 (4,68-7,36) (6,78)?	98%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180727%2FFTmplrYaS.dat&hit=9&db_idx=1
67	Serine/threonine-protein kinase Chk1	<i>Rattus norvegicus</i>	54394	19	8	7,35 (4,66-8,68) (8,4)	17%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191107%2FFTemSGcEh.dat&hit=43&db_idx=1
68	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: serine/threonine-protein kinase BRSK2 isoform X7 brain serine/threonine kinase 2, isoform CRA_a RecName: Full=Serine/threonine-protein kinase BRSK2; AltName: Full=Brain-specific serine/threonine-protein kinase 2; Short=BR serine/threonine-protein kinase 2; <i>AltName</i> : Full=Serine/threonine-protein kinase SAD-A PREDICTED: serine/threonine-protein kinase BRSK2 isoform X5 PREDICTED: serine/threonine-protein kinase BRSK2 isoform X6	<i>Rattus norvegicus</i>	58134	34	9	7,2 (4,8-8,37) (8,08)	25%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180731%2FFTmplbTOm.dat&hit=13&db_idx=1
			63159	31	9	7,69 (4,8-9,01) (8,75)	23%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180731%2FFTmplbTOm.dat&hit=27&db_idx=1
69	NAD kinase 2, mitochondrial	<i>Rattus norvegicus</i>	48087	20	6	6,23 (4,5-6,97) (6,5)	15%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190807%2FFTecOrEOt.dat&hit=25&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
70	PREDICTED: diacylglycerol kinase epsilon isoform X3	<i>Rattus norvegicus</i>	56126	30	7	7,69 (4,8-9,01) (8,33)	17%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180731%2FFTmplbHSO.dat&hit=43&db_idx=1
71	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 beta	<i>Rattus norvegicus</i>	47234	27	12	6,73 (4,46-7,66) (7,18)	38%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGenS.dat&hit=6&db_idx=1
72	Inorganic pyrophosphatase	Pongo abelii	32722	32	5	5,44 (4,12-6,1) (5,66)	32%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q5R8T6
73	Phosphotriesterase-related protein	Bos taurus	39073	20	2	5,78(4,143 - 6,545) (6,06)	11%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180414%2FFTmolGaOL.dat&hit=38&db_idx=1
74	PREDICTED: intestinal-type alkaline phosphatase-like, partial	Leptonyctes weddellii	47559	43	10	6,37 (4,18-7,2) (6,67)	25%	https://www.uniprot.org/uniparc/UPI0003EDFF9E https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2U3XS89
75	Phospholipid phosphatase-related protein type 3	<i>Rattus norvegicus</i>	76738	18	6	5,48 (4,13-5,99) (5,69)	13%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191003%2FFTeoInHwe.dat&hit=47&db_idx=1
76	Inositol polyphosphate 5-phosphatase OCRL-1	<i>Rattus norvegicus</i>	104340	20	6	5,85 (4,26-6,55) (6,12)	4%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190730%2FFTecCfYTL.dat&hit=28&db_idx=1
77	Phosphatidylglycerophosphatase and protein-tyrosine phosphatase 1	<i>Rattus norvegicus</i>	21872	20	7	9,14 (5,03-10,06) (9,65)	38%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGenS.dat&hit=35&db_idx=1
78	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2	<i>Rattus norvegicus</i>	139056	23	21	5,81(4,47-6,48) (9,06)	15%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGenS.dat&hit=17&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
РОСТОВІ ЧИННИКИ								
79	Growth/differentiation factor 2	Homo sapiens	47291	27	6	5,75 (4,2-6,49) (6,03)	20%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UK05
80	Brain-derived neurotrophic factor precursor	Sus scrofa+3 organismes	28269	42	8	8,06 (4,57-9,21) (9,01)	41%	https://www.uniprot.org/uniparc/UPI000012687F
81	platelet-derived growth factor D precursor	<i>Rattus norvegicus</i>	42782	29	24	7,02 (4,17-8,41) (8,11)	41%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGTso.dat&hit=39&db_idx=1
82	Endothelial differentiation-related factor 1	<i>Rattus norvegicus</i>	16359	20	12	9,13 (9,13-11,18) (9,99)	60%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGTme.dat&hit=30&db_idx=1
ПОЗАКЛІТИННИЙ ПРОСТІР, ПРОТЕЇНИ ЩІЛЬОВОГО КОНТАКТУ, ПРОТЕЇНИ, ЩО СЕКРЕТУЮТЬСЯ								
83	gap junction alpha-1 protein (connexin 43) (смуга 7, рис. 4.7.1)	Bos taurus + 48 organismes	43160	84	11	7,89 (4,29-9,05) (8,88)	28%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180413%2FFTmoieHtS.dat&hit=6&db_idx=1
84	Gap junction alpha-5 protein (смуги 1 і 17, рис.4.7.2)	<i>Rattus norvegicus</i>	40207	23	3	6,88 (4,15-7,97) (7,62)	12%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSacOE.dat&hit=15&db_idx=1
85	Gap junction beta-1 protein	Equus caballus	31943	20	3	8,24 (4,28-9,37) (9,19)	19%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190716%2FFTecliYOe.dat&hit=26&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
86	Plasminogen-like protein A Plasminogen precursor	Homo sapiens Bos taurus	10908 91157	25	2	5,9 (4,31-6,53) (6,11)	36%	https://www.uniprot.org/uniprot/Q15195 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191003%2FFTeoIGeem.dat&hit=14&db_idx=1
87	Alpha-2-antiplasmin precursor	Bos taurus	54676	6	4	5,27 (4,42-5,71) (5,45)	7%	https://www.uniprot.org/uniparc/UPI000012500E
88	Plasminogen activator inhibitor 1	<i>Rattus norvegicus</i>	44981	21	12	5,91 (4,72-6,65) (6,17)	38%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191003%2FFTeoIGeem.dat&hit=14&db_idx=1
89	Tight junction protein ZO-3	Canis lupus familiaris	98355	29	3	6,55 (4,77-7,35) (6,87)	5%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180414%2FFTmolGaOL.dat&hit=13&db_idx=1
90	MAGUK p55 subfamily member 4 (Amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosomal region candidate gene 5 protein)	Homo sapiens	72732	38	6	5,4 (3,95-5,62)	8%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180730%2FFTmpliseR.dat&hit=24&db_idx=1
91	Matrix metalloproteinases -2, partial; -3, -9, -16, -19, -20, -27	<i>Bos taurus</i> + 2 organismes	79038	21,42, 30	2,10,3	5,37 (3,74-5,91) (5,59)	5%, 26%, 8%	https://www.uniprot.org/uniprot/P52176 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190726%2FFTecCGemm.dat&hit=30&db_idx=1
92	Metalloproteinase inhibitor 1	<i>Sus scrofa</i> , <i>Ovis aries</i>	23083	27	3	7,27 (3,39-8,84) (8,47)	22%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180502%2FFTmmfGaaR.dat&hit=38&db_idx=1
93	Pannexin-2	Homo sapiens, <i>Rattus norvegicus</i>	74400	30	4	7,2 (4,53-8,42) (7,27)	10%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180502%2FFTmmfGaaT.dat&hit=9&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
94	extracellular matrix protein 2 isoform X1	Physeter catodon	78991	44	7	4,97 (3,94-5,15) (5,06)	14%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190716%2FFTeclxeTR.dat&hit=38&db_idx=1
95	PREDICTED: ly6/PLAUR domain-containing protein 4 isoform X1	Odobenus rosmarus divergens	26887	44	7	7,53 (3,33-8,99) (7,47)		http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20190716%2FFTecliYaR.dat;sessionID=guest_guestsession
96	PREDICTED: laminin subunit alpha-3	Myotis brandtii	187898 91480 10869	43	9	5,78 (4,38-7,94) (6,72)	12%	http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20190716%2FFTecliYaR.dat;sessionID=guest_guestsession
ПРОТЕЇНИ, що беруть участь у СИНТЕЗІ ПРОТЕЇНІВ								
97	60S ribosomal protein L29, 60S ribosomal protein L5, Ubiquitin-60S ribosomal protein L40, Putative 60S ribosomal protein L37, L37a, 60S ribosomal protein L12, 60S ribosomal protein L8, 60S ribosomal protein L30	<i>Rattus norvegicus</i>	17315	23	8	11,6 (11,6-12,34) (11,79)	53%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSG.TbO32bB56enS.dat&hit=18&db_idx=1
98	39S ribosomal protein L14, mitochondrial, 40S ribosomal protein S16, 30S ribosomal protein S9	<i>Rattus norvegicus</i> , <i>Pseudomonas syringae</i>	16435	19	6	9,93 (9,92-11,04) (10,21)	32%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191003%2FFTeoInHwe.dat&hit=29&db_idx=1
99	PREDICTED: translation initiation factor IF-2-like Eukaryotic translation initiation factor 4E type 1B	<i>Rattus norvegicus</i> , Homo sapiens	45723 27579	34 32	7 4	11,47 (10,98-12,11) (11,61)	19%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180731%2FFTmplbHSO.dat&hit=19&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
ТРАНСПОРТЕРИ та МЕМБРАННІ ПРОТЕЇНИ і КАНАЛИ								
100	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein (Solute carrier family 25 member 11)	Bos taurus + 2 organismes	34150	20-22	2	9,49 (9,491 - 10,372) (9,89)	13%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180414%2FFTmolGaOL.dat&hit=26&db_idx=1
101	uncoupling protein 2 (Solute carrier family 25 member 8)	<i>Rattus norvegicus</i>	33369	29	5	9,21 (5,0-10,15) (9,7)	15%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmplncTR.dat&hit=50&db_idx=1
102	Excitatory amino acid transporter 3	<i>Rattus norvegicus</i>	56735	19	4	5,75 (4,38-6,29) (5,95)	16%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191107%2FFTemSGcEh.dat&hit=36&db_idx=1
103	Sodium channel and clathrin linker 1	<i>Rattus norvegicus</i>	80279	23	17	5,77 (4,78-6,34) (5,98)	25%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGenS.dat&hit=16&db_idx=1
104	Electroneutral sodium bicarbonate exchanger 1	Homo sapiens	122858	26	4	5,92 (4,19-6,71) (6,22)	6%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180502%2FFTmmfGaaR.dat&hit=49&db_idx=1
105	Sodium/potassium/calcium exchanger 2	<i>Rattus norvegicus</i>	74609	18	5	5,68 (4,26-6,34) (5,93)	7%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190807%2FFTecOrEOt.dat&hit=50&db_idx=1
106	Chloride channel protein 2	Oryctolagus cuniculus	98484	28	5	7,64 (4,58-9,06) (8,8)	10%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180414%2FFTmolGeat.dat&hit=8&db_idx=1
107	ATP-binding cassette sub-family F member 3, ATP-binding cassette sub-family G member 8; molybdate ABC transporter substrate-binding protein	Homo sapiens + 2 organismes	78186 28669	22 60	5 7	6,46 (3,83-7,33) (6,91) 8,93 (7,6-10,35) (9,62)	7% 43%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190807%2FFTecOrEOt.dat&hit=18&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180729%2FFTmplfTnT.dat&hit=18&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
108	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	<i>Rattus norvegicus</i>	30778	20	10	7,96 (4,3-9,09) (8,91)	31%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGetE.dat&hit=49&db_idx=1
ІНШІ ПРОТЕЇНИ РІЗНИХ КЛАСІВ								
109	gastric triacylglycerol lipase precursor	<i>Rattus norvegicus</i>	44559	31	5	5,83 (3,598 - 6,616) (6,12)	13%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180729%2FFTmplfTnh.dat&hit=20&db_idx=1
110	Glial fibrillary acidic protein	<i>Rattus norvegicus</i>	49927	25	19	5,25 (4,53-5,45) (5,35)	51%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191107%2FFTemSGamE.dat&hit=15&db_idx=1
111	NF-kappa-B essential modulator	Mus musculus, <i>Rattus norvegicus</i>	47942	26	3	5,43 (4,42-5,84) (5,61)	10%	https://www.uniprot.org/uniprot/O88522
112	Tumor protein p53-inducible protein 13	Ornithorhynchus anatinus	20880	46	8	10,46 (10,456 -11,234) (10,65)	54%	https://www.uniprot.org/uniparc/UPI0001554D16
113	Spermatogenesis-associated serine-rich protein 1 isoform X2	Equus asinus + 2 organismes	26647	48	7	5,83 (4,26-6,55) (6,09)	39%	https://www.uniprot.org/uniparc/UPI00071A54BE
114	Cellular retinoic acid-binding protein 1	<i>Rattus norvegicus</i>	15582	24	7	5,16 (4,31-5,37) (5,3)	52%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGenS.dat&hit=15&db_idx=1
115	Vitamin K-dependent protein S	<i>Rattus norvegicus</i>	74579	20	11	5,21 (3,5-5,5) (5,33)	10%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191107%2FFTemSGcEh.dat&hit=24&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
116	Serpin A3-7	Bos Taurus	46912	20	2	5,84 (4,27-6,35) (5,9)	9%	https://www.uniprot.org/uniprot/A2I7N3
117	Metallothioneines-2, -2A and -3	<i>Rattus norvegicus</i> , Oryctolagus cuniculus	6140 6778	24 27	2 2	6,94 (0,001-8,72) (8,23) 4,22 (0,001-4,409) (4,96)	49% 60%	https://www.uniprot.org/uniprot/P04355 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190726%2FFTecCGemm.dat&hit=27&db_idx=1 https://www.uniprot.org/uniprot/Q2PS21
118	Zinc finger protein 622, PREDICTED: zinc finger protein 431-like, partial, Zinc finger protein 354C, Zinc finger FYVE domain-containing protein 21, Zinc finger protein 382, Zinc finger protein 57, zinc finger protein 585A isoform X1, PREDICTED: zinc finger protein 709-like, PREDICTED: PR domain zinc finger protein 15, PREDICTED: zinc finger protein 81, Zinc finger protein 830, PREDICTED: zinc finger protein OZF-like, Zinc finger CCCH domain-containing protein 7A, Zinc finger CCHC domain-containing protein 2, zinc finger protein 114 isoform X2, MORC family CW-type zinc finger protein 2B, Zinc finger protein 37, PREDICTED: zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 2 isoform X2, Zinc finger protein 652, Zinc finger protein 18, zinc finger protein 830, PREDICTED: zinc finger HIT domain-containing protein 3, zinc	<i>Rattus norvegicus</i>	43862	28	11	4,73 (3,92-4,91) (4,82)	36%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGenS.dat&hit=3&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmpieTne.dat&hit=33&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
118	finger protein 512B, PREDICTED: zinc finger E-box-binding homeobox 2 isoform X2, zinc finger homeobox 1b, isoform CRA_a, PREDICTED: zinc finger E-box-binding homeobox 2 isoform X1, zinc finger E-box-binding homeobox 2, PREDICTED: zinc finger protein OZF-like, PREDICTED: zinc finger protein 81							
119	Squalene synthase	<i>Rattus norvegicus</i>	48075	23	9	6,26 (3,95-7,08) (6,61)	24%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191003%2FFTeoInHwe.dat&hit=8&db_idx=1
120	Lanosterol 14-alpha demethylase	<i>Rattus norvegicus</i>	56670	20	7	7,79 (4,27-8,84) (8,71)	16%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191107%2FFTemSGcEh.dat&hit=32&db_idx=1
121	Fatty acid-binding protein, heart	<i>Rattus norvegicus</i>	14766	22	5	5,68 (4,8-6,33) (5,9)	30%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191003%2FFTeoInHwe.dat&hit=9&db_idx=1
122	Protein FAM162A PREDICTED: protein FAM65B isoform X3 PREDICTED: protein FAM65B isoform X4 PREDICTED: protein FAM65B isoform X5 PREDICTED: protein FAM65B isoform X1 PREDICTED: protein FAM65B isoform X8 Protein FAM229B, PREDICTED: protein FAM133A	<i>Rattus norvegicus</i>	17816 119775	19 31	7	9,25 (9,26-10,97) (10,02)	30% 5%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191003%2FFTeoInHwe.dat&hit=33&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmplncTR.dat&hit=34&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
123	Insulin-like 3, preproinsulin 1	<i>Rattus norvegicus</i> <i>Rattus losea</i>	14101 12428	19 29	3 4	7,01 (4,4-8,18) (7,72) 5,45 (3,13- 5,84) (5,62)	43% 44%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191003%2FFTeoInHwe.dat&hit=37&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190726%2FFTecCGcTE.dat&hit=8&db_idx=1
124	Alpha-S2-casein-like B		19833	20	13	8,97 (5,28- 10,34) (9,62)	54%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGTee.dat&hit=46&db_idx=1
ДЕАЦЕТИЛАЗИ і ПОВ'ЯЗАНІ З НИМИ ПРОТЕЇНИ								
125	NAD-dependent protein deacylase sirtuin-5, mitochondrial	<i>Bos taurus</i>	33966	19	3	7,26 (4,26- 8,78) (8,43)	18%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190716%2FFTecliYOe.dat&hit=38&db_idx=1
126	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase PARG (смуга 9 рис.4.7.1, смуга 6 рис.4.7.2)	<i>Rattus norvegicus</i>	108935	36 20	8 16	6,17 (4,35- 6,95) (6,51)	14% 19%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20170802%2FFTiemaswO.dat&hit=7&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGenS.dat&hit=43&db_idx=1
127	ADP-ribosylation factor-related protein 1	<i>Rattus norvegicus</i>	22644	22	8	5,93 (4,01- 6,55) (6,17)	40%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGenS.dat&hit=26&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
ДЕГІДРОГЕНАЗИ і ДЕКАРБОКСИЛАЗИ								
128	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase muscle Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Rattus norvegicus</i>	80921	21	4	5,9 (4,19-6,64) (6,18)	7%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSacOE.dat&hit=25&db_idx=1
129	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	<i>Acinonyx jubatus</i>	33448	48	8	8,15 (4,39-9,4) (9,17)	42%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180412%2FFTmoizTtT.dat&hit=27&db_idx=1
130	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	<i>Rattus norvegicus</i>	58276	28	11	6,87 (4,35-7,94) (7,57)	31%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmpieSmE.dat&hit=20&db_idx=1
131	PREDICTED: dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial-like	<i>Pantholops hodgsonii</i>	51268	44	7	7,03 (4,67-8,07) (7,66)	22%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190716%2FFTeclxeTR.dat&hit=37&db_idx=1
132	Choline dehydrogenase, mitochondrial	<i>Rattus norvegicus</i>	66346	21	4	7,65 (4,34-8,94) (8,75)	7%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190730%2FFTecCfYTL.dat&hit=16&db_idx=1
133	Alcohol dehydrogenase E chain Alcohol dehydrogenase 1	<i>Equus caballus</i>	39910	20	2	7,14 (4,45-8,72) (8,31)	10%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180414%2FFTmolGaOL.dat&hit=47&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191107%2FFTemSGcEh.dat&hit=16&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
134	L-lactate dehydrogenase A-like 6B L-lactate dehydrogenase A chain L-lactate dehydrogenase C chain	<i>Bos taurus</i> <i>Rattus norvegicus</i>	41566 35664	20 21	2 10	7,88 (4,76-9,19) (8,91) 7,49 (4,68-8,72) (8,45) 6,86 (4,44-7,98) (7,56)	10% 29% 27%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180414%2FFTmolGaOL.dat&hit=39&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGenS.dat&hit=28&db_idx=1 http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGenS.dat&hit=29&db_idx=1
135	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12-like isoform X1	<i>Rattus norvegicus</i>	8951	34	3	7,84 (4,12-8,59) (7,85)	23%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191109%2FFTemSaswh.dat&hit=1&db_idx=1
136	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	<i>Rattus norvegicus</i>	56453	20	6	6,3 (4,2-7,07) (6,63)	14%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191107%2FFTemSGcEh.dat&hit=30&db_idx=1
137	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	<i>Rattus norvegicus</i>	50935	23	6	7,91 (4,65-9,07) (8,88)	15%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190807%2FFTecOrEOt.dat&hit=9&db_idx=1
138	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4	<i>Rattus norvegicus</i>	29803	23	9	8,74 (8,74-10,58) (9,6)	19%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191107%2FFTemSGcEh.dat&hit=8&db_idx=1
139	PREDICTED: glycine dehydrogenase (decarboxylating), mitochondrial isoform X1	<i>Rattus norvegicus</i>	113532	28	6	6,5 (4,24-7,37) (6,95)	7%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180730%2FFTmpliseS.dat&hit=34&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
140	PREDICTED: proline dehydrogenase 1, mitochondrial isoform X2	<i>Rattus norvegicus</i>	61410	32	10	6,15 (4,18-6,91) (6,46)	20%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180731%2FFTmplbTOM.dat&hit=18&db_idx=1
141	PREDICTED: dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial-like	<i>Panholops hodgsonii</i>	51268	44	7	7,03 (4,67-8,07) (7,66)	22%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20190716%2FFTeclxeTR.dat&hit=37&db_idx=1
142	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	<i>Rattus norvegicus</i>	40386	20	3	8,5 (4,15-9,18) (8,99)	14%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180725%2FFTmpieTaE.dat&hit=42&db_idx=1
143	PREDICTED: retinol dehydrogenase 16-like	<i>Galeopterus variegatus</i>	39642	42	7	7,92 (4,32-9,21) (8,98)	29%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180414%2FFTmolGaOO.dat&hit=43&db_idx=1
144	Glutamate decarboxylase 1	<i>Rattus norvegicus</i>	66598	26	15	6,51 (4,27-7,37) (6,95)	31%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGenS.dat&hit=11&db_idx=1
ТРАНСФЕРАЗИ								
145	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	<i>Rattus norvegicus</i>	55403	20	3	6,39 (4,16-7,19) (6,69)	9%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSacOE.dat&hit=39&db_idx=1
146	PREDICTED: nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase 3 isoform X1	<i>Rattus norvegicus</i>	27560	28	3	8,1 (4,72-9,08) (8,9)	24%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180729%2FFTmplfTnh.dat&hit=40&db_idx=1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
147	Choline O-acetyltransferase	<i>Rattus norvegicus</i>	71817	22	15	7,1 (4,21-8,56) (8,27)	24%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20191108%2FFTemSGenS.dat&hit=21&db_idx=1
148	glutathione S-transferase alpha-3, glutathione S-transferase alpha-5 isoform 2, Glutathione S-transferase Mu 2, Glutathione S-transferase P	<i>Rattus norvegicus</i> + 2 <i>organismes</i>	25303 19620	26 36	5 5	7,09 (4,13-8,1) (8,07)	9%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180414%2FFTmolGaOL.dat&hit=49&db_idx=1
149	Palmitoyltransferase ZDHHC5	<i>Bos taurus</i>	76928	20	2	8,23 (4,57-9,29) (9,15)	6%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180414%2FFTmolGaOL.dat&hit=40&db_idx=1
150	histone acetyltransferase KAT5 isoform 1 histone acetyltransferase KAT5 isoform 6	<i>Mus musculus</i>	58561	30	5	7,68 (4,37-8,92) (8,74)	9%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180729%2FFTmplfTnh.dat&hit=27&db_idx=1
151	PREDICTED: dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	<i>Elephantulus edwardii</i>	48789	46	8	7,92 (5,0-9,14) (8,89)	22%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180414%2FFTmolGaOO.dat&hit=13&db_idx=1
152	PREDICTED: acetylserotonin O-methyltransferase-like, partial	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	31515	38	5	7,48 (4,48-9,04) (8,7)	17%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180501%2FFTmoObSeL.dat&hit=21&db_idx=1
153	Ecto-ADP-ribosyltransferase 3	<i>Mus musculus</i>	41988	31	4	5,59 (4,09-6,03) (5,76)	15%	http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20180502%2FFTmmfGaaR.dat&hit=16&db_idx=1

ДОДАТОК 2

Порівняння сайтів зв'язування досліджуваних лігандів за докінгу у високоафінний сайт зв'язування тіаміну, пояснення скорочень після таблиці

№ з/п	АК залишок/поліпептидний ланцюг	Тіамін	ТМФ	Бенфотіамін	ТДФ	ТТФ	Аденозин	АМФ	АДФ	АТФ	Ацетилхолін	Метилнікотин
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
LRP4												
1	ILE C471					CH ₃ ПЦ, усі Н NH ₂ і ПЦ (А, СтВЗ)						
2	GLY C514				ТЦ (вдВ)	CH ₃ ПЦ (вдВ)						
3	ILE C535									β, γ PO ₄ (вдВ)		
4	LEU C553									γPO ₄ (вдВ)		
5	GLU C554									γPO ₄ (вдВ)		
6	LYS C555					О γPO ₄ (УВ)	Н в ОН біля С5' у рибозі (СтВЗ)			О βPO ₄ (УВ)		
7	PRO C556	CH ₃ ТЦ (вдВ)					О в ОН біля 5'С у рибозі (УВ)			О βPO ₄ (КВЗ)	Холін (УВ)	
8	ARG C557	ГЕР (УВ)	ТЦ; CH ₃ ТЦ, αPO ₄ (А, π-А, УВ)	С і Н в CH ₃ ТЦ, С і Н в CH ₃ , N1, N3, C2, C4, C5, C6, Н біля С6 ПЦ, С і Н ММ (УВ)	ПЦ; NH ₂ , C4', C2', C5', N3' ПЦ, С і Н ММ, N3, C2 і Н біля С2 ТЦ (π-К; УВ)		О в ОН біля С5' у рибозі; ПЦ аденіну (УВ; π-А)	О, Р αPO ₄ , Н біля С5', С3' та ОН біля нього у рибозі (УВ)	О біля С3' у рибозі; О в ОН αPO ₄ (УВ, СтВЗ)	О αPO ₄ , О βPO ₄ (УВ, СтВЗ)	4а CH ₃ у холіні (УВ)	ПрЦ; Н біля С3, С4 ПрЦ (π-А; УВ)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
9	ALA C558	ПЦ, ТЦ, CH ₃ ТЦ	ПЦ, ТЦ, CH ₃ ТЦ (UB, π-A)	CH ₃ , S, C2 і Н залишку ТЦ, ММ, C5' і C6'	S, C2, C5 ТЦ, C1, C2 і всі Н біля них	CH ₃ ТЦ; ТЦ (π-A; A)	N3, N9, C4 в аденіні, Н біля	Усі атоми рибози (UB)	O αPO ₄ ; C8 і Н біля нього	O αPO ₄ і Н, Щ аденіну (UB, СтВЗ, π-A)	Усі атоми	C2, C3 і Н біля C3
10		(π-σ, UB)		ПЦ, O і P PO ₄ (UB)	залишку ГЕР (UB)		C4' у рибозі (UB, KB3)		в Щ аденіну; ПЦ		4bCH ₃ (UB)	ПрЦ, C3' ПірЦ (UB)
11	ILE C559	ПЦ (вдВ)		CH ₃ залишку ТЦ або PO ₄ (UB)	βPO ₄ (вдВ)		ПЦ аденіна (вдВ)	O біля C2' і 3' у рибозі (UB)		αPO ₄ (вдВ)	АГ (вдВ)	
12	ALA C560	N1' ПЦ (A)	C в CH ₃ ПЦ; ПЦ (A, π-A)		α і β PO ₄ (вдВ)	γPO ₄ (вдВ)	ПЦ аденіну (вдВ)				АГ (вдВ)	
13	THR C567					γPO ₄ (вдВ)						
14	ILE C568					γPO ₄ (вдВ)						
15	TYR C569	ПЦ (вдВ)	Н і С в CH ₃ ПЦ (UB)		O βPO ₄ (UB)	O і P γ PO ₄ (UB)					АГ (вдВ)	
16	TRP C570	ПЦ (вдВ)	ПЦ; C5' і C6', Н біля C6' ПЦ (π-Lone Pair; UB)	P і O PO ₄ , C1, C2 залишку ГЕР або атом O в АлГ після розкриття ТЦ, C2 та Н біля C2 БЦ (UB)	P і O αPO ₄ ; O βPO ₄ (UB; стВЗ)	Н в ОН γPO ₄ ; O і P γ PO ₄ (стВЗ; UB)	O в ОН біля C2' у рибозі (UB)	Щ аденіну (π-Амідний стекінговий)	O βPO ₄ (UB)	O γPO ₄ , O βPO ₄ (UB, π-Dг вз)	АГ (вдВ)	C5' і Н біля нього ПрЦ (UB)
17	THR C571	NH ₂ , C4', C5', C6' ПЦ, C2 і C4, N3, C	S, C2 і 4, Н біля C2 ТЦ; Н біля C2 залишку ГЕР, C і	O АлГ, S, C4, C5 ТЦ після розкриття; C6 і Н біля нього БЦ (UB)	C і Н CH ₃ ТЦ, C4, C5 ТЦ, C1, C1 і Н залишку ГЕР, O і Н αPO ₄ (UB)	P, O, Н в α та β PO ₄ ; C1, C2, Н біля них у залишку ГЕР (UB)	N9 в аденіні, атоми C1', 4' і 5' та Н біля C2', C3',	C2', O1' в рибозі, N7, N9, C4, C5 в аденіні; Н біля C3' і C4' в рибозі (UB;	C5' в рибозі, P і O αPO ₄ (UB)	C2 α, β PO ₄ (UB)	C5, O6 АГ, O1, C2 і Н біля C2	N1, C5 ПрЦ, N1' і всі атоми C ПірЦ (UB)

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
17	THR C571	CH ₃ ТЦ (УВ)	Н CH ₃ ТЦ, С5 ПЦ (УВ; Квз)				С5' в рибозі (УВ)	Квз)			(УВ)	
18	ASP C572	ММ, ТЦ (вдВ)			αPO ₄ (вдВ)	Р, О, Н в α та γ PO ₄ ; ТЦ, С1, С2 залишку	О і Н біля атому С3' у рибозі (УВ)		О і Р β PO ₄ (УВ)	β і γ PO ₄ (УВ)	Холін (вдВ)	
19	TRP C573	ПЦ (вдВ)		CH ₃ ПЦ або О в АлГ після розкриття ТЦ (π-А або УВ)	CH ₃ ТЦ (π-А)	ТЦ, Р, О, Н в α та γ PO ₄ (вдВ, УВ)	Рибоза (вдВ)		Н в ОН αPO ₄ (УВ)	О αPO ₄ (π-Dr)	Холін (вдВ)	
20	ARG C578	ММ (вдВ)			αPO ₄ (вдВ)	Н βPO ₄ (СтВ3)	Рибоза (вдВ)			γPO ₄ (вдВ)		
21	ILE C579	N4' ПЦ (вдВ)	ПЦ, ТЦ, NH ₂ ПЦ (π-А, УВ)	БЦ (π-А або π-σ)	α, β PO ₄ (вдВ)	О βPO ₄ (УВ)	Рибоза (вдВ)	NH ₂ і С6 ПЦ аденіну; ПЦ аденіну (УВ, π-А)			АГ (вдВ)	ПірЦ (π-А)
22	GLU C580			Н в ОН PO ₄ (СтВ3)	О β PO ₄ (УВ)	О і Н в ОН γ PO ₄ (УВ)	Рибоза (вдВ)					
23	ALA C581					γPO ₄ (вдВ)						
24	SER C582					γPO ₄ (вдВ)						
25	ILE C592				βPO ₄ (вдВ)	γPO ₄ (вдВ)						
26	LEU C597			БЦ (π-А)								

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
27	TRP C599				ПЦ (вдВ)	ТЦ (π-π Т-подібний, π-Амідний стекінг)						
28	PRO C600	ТЦ, N і S ТЦ (π-А, UB)	ТЦ, S ТЦ, Н біля С2 задишку ГЕР (UB KB3)	Всі С БЦ, О АлГ після розкриття ТЦ (UB)	С і Н CH ₃ ТЦ (UB)	Атоми О α і β PO ₄ (UB)	ТЦ; С5 та S ТЦ, С2 та Н біля нього в залишку ГЕР (π-А, UB)	С8 і Н біля нього в аденіні (Щ), Н біля С2' в рибозі (UB, KB3)	С4' і Н біля нього в рибозі (UB)	О αPO ₄ (UB)	4с CH ₃ , атом Н біля С3, 4а CH ₃ (холін) (UB, KB3)	CH ₃ та N1 ПрЦ (UB)
29	ASN C601	S і C5 ТЦ, ГЕР (UB)	С і Н залишку ГЕР, PO ₄ , S ТЦ (UB, S-X)	NH ₂ та С4' ПЦ, С6 (29) БЦ (UB)	С і Н CH ₃ , С2' і С4' ПЦ; С5 ТЦ (UB, U Ac-Ac)	С1 і 2, Н у залишку ГЕР, О в αPO ₄ (UB)	ММ, С2, С4, N3, CH ₃ ТЦ; NH ₂ ПЦ (UB, СтВ3)	N7, С5 і С8 в аденіні (Щ) (UB)	С2' і Н біля нього, С3' і О біля нього, С4' і О біля нього, С5' у рибозі (UB, U Dr-Dr)	Рибоза О6', С1', 2', 3', 4' О біля С2' і С3' (UB)	4С CH ₃ , атом Н біля С3, 4а CH ₃ (UB)	С4', С5' і Н біля нього в ПрЦ (UB)
30	GLY C602	ТЦ, ГЕР (вдВ)		ММ і Н біля С4' в ПЦ (UB)	Залишок ГЕР (вдВ)	С1 і Н у залишку ГЕР, О αPO ₄ (UB)	NH ₂ , С6, С2, N1, С5, N7 ПЦ аденіну (UB)	Щ аденіну (π-амідний стекінговий)	С2' і Н біля нього, О біля С3' в рибозі, N9, С8 і С5 ПЦ в аденіні (UB, U Dr-Dr)	Аденін (Щ), С4, 8, N9, рибоза, О6, атом Н біля С2', атоми С2' і С4' (UB)	Н біля С2 в холіні (KB3)	
31	LEU C603	Н CH ₃ , N1' і N3' ПЦ (UB)	С в CH ₃ , С2, С4, С6, N3 ПЦ (UB)	Р і О αPO ₄ ; О в АлГ після розкриття ТЦ (UB)	Р і О αPO ₄ (UB)	α і β PO ₄ (UB)	С6, N3 ПЦ аденіну (UB)	N1, N3, С2, С4 ПЦ в аденіні (UB)	NH ₂ , С6, С5, С4, N7 в аденіні (UB)	ПЦ аденіну, аденін, С4, С5 і С8, N7 і N9 (π-А, UB)	7CH ₃ в АГ (UB)	С6 і Н біля нього в ПірЦ (UB)
32	THR C604	ПЦ (вдВ)				βPO ₄ (вдВ)	ПЦ аденіну (вдВ)		Всі атоми NH ₂ аденіну (UB)	Всі атоми NH ₂ аденіну (UB)		
33	ILE C605				βPO ₄ (вдВ)					ПЦ (вдВ)		
34	MET C612	ПЦ (вдВ)		БЦ (π-S)	ОН βPO ₄ (UB)	βPO ₄ (вдВ)						

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
35	TYR C613									ПЦ аденіну (вдВ)		
36	TRP C614	ПЦ (вдВ)		БЦ (π - π стекінг)	α PO ₄ (вдВ)	γ PO ₄ (вдВ)	ПЦ (вдВ)		ПЦ (π - σ)	ПЦ (π - σ)	C2 холіну (вдВ)	
37	VAL C615	ТЦ (вдВ)		БЦ або Н біля C8 ПЦ аденіну (вдВ, СтВ3)		α PO ₄ (вдВ)	NH ₂ аденіну (вдВ)		ПЦ аденіну (π -A)	ПЦ аденіну (π -A)	Холін (вдВ)	
38	ALA C617				CH ₃ ПЦ (π -A)							
39	ILE C622									ПЦ (вдВ)		
40	HIS C642				CH ₃ ПЦ (π -A)							
41	PRO C643				CH ₃ ПЦ (вдВ)							
42	PHE C644	ТЦ (вдВ)	Н і О α PO ₄ (UB)	ПЦ, Н в NH ₂ , CH ₃ ПЦ (π - π стекінг, СтВ3, π -A)	CH ₃ ПЦ (π -A)	N3 ТЦ; MM; C4 і C5 ТЦ, C2', 4', 5', N1', 3` ПЦ, ТЦ, CH ₃ ПЦ (π -K; KB3; UB; π -A, A)	Н в NH ₂ ПЦ аденіну (СтВ3)		О біля C2' в рибозі (UB)	рибоза, Н біля C1', Н в OH біля атому C3' (UB, СтВ3)		
43	ALA C645					CH ₃ ТЦ, ТЦ (UB; π -A)	NH ₂ ПЦ аденіну (вдВ)			Рибоза (вдВ)		
44	ILE C646						NH ₂ ПЦ аденіну (вдВ)		N1, C6, C2 ПЦ аденіну (UB)	ПЦ, C2, C4, C5, C6, N1 і N3 (π -Am стекінг, UB)		
45	THR C647									ПЦ (вдВ)		

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
46	VAL C648									ПЦ (вдВ)		
47	TRP C658				CH ₃ ПЦ (π-A)	CH ₃ ПЦ (π-A, π-Ам стекінг)						
48	MET C683					ПЦ, CH ₃ ПЦ (π-S, UB)						
49	MET C685					ПЦ (вдВ)						
50	ASP C686					Четвертинний азот (N3) ТЦ, N та H в NH ₂ ПЦ (π-K, UB)						
51	HOH C907	ГЕР (вдВ)	H PO ₄ (BB3)		ПЦ, MM, ТЦ (вдВ)	ПЦ (вдВ)	ОН біля C5' у рибозі (ГМР) (вдВ)					
52	HOH C918	ГЕР (вдВ)		H у MM або C і H CH ₃ ПЦ (BB3, UB)	ТЦ, залишок ГЕР (вдВ)	ПЦ, MM, H біля C2 ТЦ (вдВ, BB3)					Аденін (вдВ)	
53	HOH C2117					ПЦ (вдВ)						
Агрін												
54	ASN B1783	ГЕР (вдВ)			C і H CH ₃ ПЦ (UB)	NH ₂ ПЦ (СтВ3, UB)						
55	GLU B1784					ПЦ (вдВ)						

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
56	ILE B1785	ГЕР (вдВ)			ММ, ПЦ (вдВ)	CH ₃ ПЦ, C2' (π- A, UB)						
57	PRO B1786					ПЦ (вдВ)						

* - ПЦ- піримідиновий цикл, ТЦ- тiazоловий цикл, ПрЦ- піролідоновий цикл, ПірЦ- піридиновий цикл, ІЦ- імідазоловий цикл, ГЕР- гідроксиетильний радикал, ГМР- гідроксиметильний радикал, ММ- метиленовий місток; вдВ – сили Ван дер Ваальса, СтВЗ- стандартний водневий зв'язок, ВВЗ- водний водневий зв'язок, КВЗ- карбоновий водневий зв'язок, π-А -пі-алкільний зв'язок, А- алкільний зв'язок, π-Ам – пі-амідний стекинговий зв'язок, π-S- пі-сірковий зв'язок, π-К- пі-катионний зв'язок, π-σ- пі-сігма зв'язок (ковалентний), π-π Т-подібний- пі-пі Т-подібний зв'язок (ковалентний), π-Lone Pair- пі-неподілена пара електронів, UB- нестабільний зв'язок, U Dr-Dr- нестабільний донор-донорний зв'язок, U Ac-Ac- нестабільний акцептор-акцепторний зв'язок

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. *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
2. *Пархоменко ЮМ, Павлова АС, Меженская ОА* (2016) Современные представления о механизмах, обуславливающих высокую чувствительность нервных клеток к дефициту витамина В₁. *Neurophysiology/Нейрофизиология* 48(6):451-465
3. *Меженська ОО, Музичка ОВ, Вовк АІ, Пархоменко ЮМ* (2016) Використання афінної хроматографії для виявлення протеїнів, які проявляють спорідненість до тіаміну. Вісник Львівського університету. Серія біологічна 74(спец):160-165
4. *YuM Parkhomenko, AS Pavlova, OA Mejenskaya, SP Stepanenko, LI Chehovskaya* (2017) Thiamine diphosphate synthesis ana redox state indices in the rat brain during development of В₁ hypovitaminosis *Ukr Biochem J* 89(5):84-95
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 Семенени ИН, Мойсеенка АГ) Минск, ИВЦ Минфина 795 с сс 369-376 Гродно, 17-18 мая
6. *Pavlova OS, Tykhomyrov AA, Mejenskaya OA, Stepanenko SP, Chehivska LI, Parkhomenko YuM* (2019) Protective effects of high single dose of thiamine against chronic ethanol consumption impact to rat brain astroglia. *Ukr Biochem J* 91(4):41-49
7. *Меженская ОА, Алёшин ВА, Кэне Т, Артюхов АВ, Буник ВИ* (2020) Регуляция малатдегидрогеназ и глутаматдегидрогеназы мозга животных тиаминном *in vitro* и *in vivo*. *Биохимия/Biochemistry (Moscow)* 85(1):34-48

8. Алёшин ВА., Меженская ОА, Пархоменко ЮМ, Кэне Т, Буник ВИ (2020) Фосфатазы моно- и дифосфата тиамин в синапсоммах мозга быка. Биохимия/Biochemistry (Moscow) 85(3):438-448
9. *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.

Відомості про апробації матеріалів дисертації

1. Протасова ЗС, Меженська ОО, Степаненко СП, Чехівська ЛІ, Пархоменко ЮМ (2014) Зв'язування міченого тіаміну синапсоммами як показник обміну тіаміну в нервових клітинах при певних патологіях (Мат Укр біохім конгресу) *Ukr Biochem J* 86(5,Supplement 2):25-26 Київ, 6-10 жовтня
2. *Меженская ОА, Буник ВИ, Пархоменко ЮМ* (2015) Выявление новых протеинов мозга, проявляющих аффинность к тиамину. Актуальные проблемы современной биохимии и клеточной биологии: материалы III Междунар научн конф (под ред Ушаковой ГА) Днепропетровск: издательство Арбуз 192 с сс 74-76 г Днепропетровск, 24-25 сентября
3. *Меженская ОА, Музыка ОВ, Вовк АИ, Буник ВИ, Пархоменко ЮМ* (2016) Биоспецифичность связывания протеинов с тиаминном как лигандом аффинного сорбента. Сб мат Междунар научн конф молодых учёных по мед биологии ФГБУ ФНКЦ физ-хим медицины ФМБА (под ред Ильиной ЕН, Кострюковой ЕС) Москва, ФНКЦ ФХМ ФМБА России 172 с сс 91-92 Москва, 19-20 апреля
4. *Алешин В, Меженская О, Кэне Т, Пархоменко Ю, Буник В* (2016) Аффинная хроматография и масс-спектрометрия для идентификации тиамин (витамин В₁)-зависимых фосфатаз мозга. Сб мат Междунар научн конф молодых учёных по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ физ-хим медицины ФМБА (под ред Ильиной ЕН, Кострюковой ЕС) Москва, ФНКЦ ФХМ ФМБА России 172 с сс 15-16 Москва, 19-20 апреля
5. *Меженська ОО, Музыка ОВ* (2016) Відмінності в спектрах протеїнів взаємодіючих з сорбентами, що містять тіамін як ліганд і без нього. Актуальні проблеми біохімії та біотехнології Тези доповідей конференції

конкурсу молодих учених присвяченої 110-річчю з дня народження ВО Беліцера (за ред Мазанової АО та інш) Київ, Санченко с 34 Київ, 15-16 травня

6. *Mezhenskaya O, Parkhomenko Yu* (2016) 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 Acta Biochimica Polonica 63(suppl 1):26 Wrocław, 10th-12th July
7. *Mezhenska OO, Rebryev AV, Parkhomenko YuM* (2018) 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 Ukr Biochem J 90 (Special Issue):157 Kyiv, 3id -5th September
8. *Aleshin VA, Kaehne T, Bunik VI, Parkhomenko YM, Mezhenskaya OA* (2018) Phosphatases of the thiamin-binding proteomes. Міжнародна конференція: EMBO at Basellife-2018 <https://www.basellife.org/2018/> Базель, Швейцарія, 11-14 вересня
9. *Mezhenska OO, Rebrjev AV, Parkhomenko YuM* (2019) Detection of new protein targets of thiamine. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу Медична та клінічна хімія 3(80)(том 21, Додаток):35-36 Тернопіль, 30 вересня-4 жовтня
10. *Parkhomenko YuM, Pavlova OS, Mezhenska OO, Stepanenko SP, Chehivska LI* (2019) Do oxidized derivatives of thiamine participate in regulation of its metabolism? Матеріали XII Українського біохімічного конгресу Медична та клінічна хімія 3(80), том 21(Додаток):232 Тернопіль, 30 вересня - 4 жовтня
11. *Меженська О, Ребрієв А, Пархоменко Ю* (2020) Нові протеїнові мішені дії тіаміну 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. – с.23 Дніпро, 1-2 жовтня