

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Скоробогатов Олександр Юрійович**

УДК 577.32:577.112

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ВИВЧЕННЯ СТРУКТУРНИХ МЕХАНІЗМІВ ВЗАЄМОДІЇ  
ДЕФОСФОРИЛЬОВАНИХ 2'-5'-ТРИАДЕНІЛАТІВ З БІЛКОМ S100A1**

03.00.03 – молекулярна 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

\_\_\_\_\_ О. Ю. Скоробогатов

Науковий керівник: **Ткачук Зеновій Юрійович**, кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник

Київ – 2020

## АНОТАЦІЯ

**Скоробогатов О.Ю. Вивчення структурних механізмів взаємодії дефосфорильованих 2'-5'-триаденілатів з білком S100A1.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

*Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 «Молекулярна біологія». – Інститут молекулярної біології та генетики Національної Академії Наук України, Київ, 2020.*

2'-5'-триаденілати представляють собою групу сполук, що відіграють ряд важливих функцій в організмі вищих еукаріот. На сьогодні відомо, що їх головною та найкраще вивченою функцією є участь в процесі активації інтерферону, який, в свою чергу, активує фермент 2'-5'-олігоаденілатсинтетазу. Надалі, фермент використовує запас АТФ клітини в якості сировини для синтезу олігоаденілатів із загальною хімічною формулою 2'-5'-A<sub>n</sub>, де n=2-6. Серед синтезованих таким чином олігоаденілатів кількісно переважають сполуки, в склад яких входять 3 залишки аденозину – 2'-5'-A<sub>3</sub>. Надалі вони взаємодіють з ферментом РНКазою L, в результаті чого відбувається активація останньої. Головними функціями фермента є гідроліз вірусних та матричних РНК, що представляє собою одну із ланок вродженого імунітету. Цікаво, що внутрішньоклітинний пул олігоаденілатів не є гомогенним: серед них присутні і дефосфорильовані олігоаденілати, утворення яких є результатом ферментативного розщеплення їх фосфорильованих попередників. Біологічні функції дефосфорильованих олігоаденілатів не є до кінця вивченими.

Деякі функції, тим не менш, на сьогодні відомі. Зокрема, відомо, що 2'-5'-A<sub>3</sub> мають антивірусну активність, в тому числі здатність інгібувати рестриктази деяких вірусів, наприклад EcoRI.

Крім того, було виявлено, що 2'-5'-A<sub>3</sub> проявляє і імуностимулюючу активність, а його епоксі-модифікований аналог – 2'-5'-A<sub>3</sub>-epo – проявляє протилежну – імуносупресуючу активність.

Іншим важливим результатом було виявлення здатності дефосфорильованих триаденілатів інгібувати активність натрієвої, магнієвої та кальцієвої АТФаз, на основі чого можна припустити, що дефосфорильовані триаденілати мають антипроліферативну активність.

Окрім того, вченими було виявлено, що 2'-5'-A<sub>3</sub> та 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро здатні впливати на процес скорочення гладеньких м'язів *in vivo*. Таку їх активність можливо пояснити тим, що дефосфорильовані триаденілати можуть взаємодіяти з деякими білками, що приймають участь у процесі м'язового скорочення, зокрема з кальмодуліном, впливаючи таким на його активність. Процес комплексоутворення між кальмодуліном та 2'-5'-A<sub>3</sub> було продемонстровано раніше. В результаті утворення такого комплексу відбуваються зміни константи дисоціації кальмодуліну до іонів Ca<sup>2+</sup>. На основі цих даних, нами було зроблено припущення щодо можливості зв'язування 2'-5'-A<sub>3</sub> з S100A1, який є антогоністом кальмодуліну.

Саме тому дана робота була присвячена вивченню структурних механізмів взаємодії 2'-5'-A<sub>3</sub> з S100A1.

На першому етапі було встановлено можливість утворення комплексу між 2'-5'-A<sub>3</sub>/2'-5'-A<sub>3</sub>-еро і S100A1, що підтверджується характерними змінами КД спектрів білка у порівнянні з комплексом білок-олігоаденілат. Важливо, що утворення комплексу було продемонстровано як за умов присутності так і відсутності у реактивній суміші іонів Ca<sup>2+</sup>.

Було показано, що зв'язування 2'-5'-A<sub>3</sub> або 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро впливає на відсотковий склад вторинних елементів апо-форми білка S100A1. При їх зв'язуванні відбувається зменшення альфа спіральних елементів на 6% та 5% відповідно. У випадку ж голо-форми S100A1 зменшення альфа-спіральних елементів було менш значним – 3% та 4%. Крім того, вдалося зафіксувати підвищення відсотку неупорядкованих елементів вторинної структури як для апо- так і для голо-форм S100A1, що, скоріш за все, свідчить про те, що одним з наслідків зв'язування 2'-5'-A<sub>3</sub> або 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро є розплітання частини альфа-спіральних елементів та їх перетворення в неупорядковані елементи.

Методом ІЧПФ було показано, що зв'язування 2'-5'-A<sub>3</sub> викликало зміщення амідних смуг Amide I, II інфрачервоного спектру білка S100A1 у високохвильову область на 1 та 3 см<sup>-1</sup>, що свідчить про зростання кількості неупорядкованих елементів білка S100A1.

Методом ЯМР вдалося виявити, що амінокислотні залишки з найбільш суттєвими значеннями хімічних зсувів знаходяться в межах Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючих петель – центральних частин EF-hand доменів. Більшість сигналів надходила від N-кінцевого регіону Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючого мотиву, який в своєму складі містить наступні амінокислотні залишки: Гіс18, Ліз21, Асп24, Ліз25 та Ліз30, що характеризуються сильною залежністю від умов проведення експерименту, а саме температури, рН та/або іонної сили розчину.

Амінокислотні залишки, Вал69 та Глн72, в межах C-кінцевого домену білка S100A1, в результаті зв'язування з 2'-5'-A<sub>3</sub>, продемонстрували значно нижчі значення хімічних зсувів.

В зв'язку з невисоким значенням доступності перерахованих вище амінокислотних залишків до взаємодії з розчинником, скоріш за все, молекула 2'-5'-A<sub>3</sub> не має змоги напряду зв'язатися з цими залишками. Набагато більш вірогідним є сценарій, за якого молекула олігоаденілату приєднується до S100A1 в іншому місці (скоріш за все в районі Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючого домену та/або лінкерного регіону) а конфірмаційні зміни, викликані його приєднанням, передаються на чутливий до подібних змін міжмономерний інтерфейс

Методом комп'ютерного моделювання вдалося зафіксувати утворення 3 зв'язків з трьома різними амінокислотними залишками в радіусі 5Å. Один з них – водневий – утворюється між NH<sub>2</sub> групою залишку аденіну I-го залишку АМФ та СО групою Ала80. Другий та третій зв'язки – електростатичні. Вони утворюються між PO<sub>2</sub> групою II залишку АМФ та СО групою Вал69 та між PO<sub>2</sub> групою III залишку АМФ та СО групою Асн64. Моделювання зв'язування 2'-5'-A<sub>3</sub> з S100A1 частково підтверджує раніше отримані результати ЯМР – PO<sub>2</sub> група II залишку АМФ та СО група Вал69 взаємодіють електростатично, що

може пояснювати суттєвий хімічний зсув аміноксилотного залишку. Вал69 є частиною С-кінцевого домену  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючого домену білка S100A1.

Методом флуоресцентної спектроскопії було показано, що 2'-5'- $\text{A}_3$  мають несуттєвий вплив на спорідненість йонів кальцію до гомодимеру S100A1, причому вплив немодифікованого 2'-5'- $\text{A}_3$  характеризується зниженням спорідненості йонів  $\text{Ca}^{2+}$  до білка S100A1 на  $0,2 \cdot 10^{-4}$ . Епоксі модифікований аналог 2'-5'- $\text{A}_3$  спричинив підвищення константи асоціації на  $0,8 \cdot 10^{-3}$  у порівнянні з білком без додавання титрантів.

Отримані дані свідчать про те, що 2'-5'-олігоаденілати істотно впливають на активність ПК, причому можуть виступати як інгібіторами, так і активаторами останніх, залежно від ферменту та природи препарату. При цьому їх дія на активність ПК залежить від концентрації препаратів та АТФ. Досліджено вплив 2'-5'- $\text{A}_3$  і 2'-5'- $\text{A}_3$ -еро на активність ряду модельних протеїнкіназ, в тому числі протеїнкінази Аврора, активність якої інгібувалася олігоаденілатами на 35 та 40% відсотків відповідно.

**Ключові слова:** 2'-5'-триаденілати, S100A1, структурні зміни.

#### Список публікацій здобувача:

1. **Скоробогатов О. Ю.**, Жуков О. Ю., Ткачук З. Ю. Структурні механізми взаємодії дефосфорильованих 2'- 5'- триаденілатів з білком S100A1 // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2020. – № 1. – С. 89-94.

2. **Skorobogatov OY**, Kukharenko AP, Kozlov OV, Dubey IY and Tkachuk ZY. 2'-5'-Linked Triadenylates Act as Protein Kinase Activity Modulators // Journal of Proteomics & Bioinformatics. – 2017. – Vol. 10, №12. – P. 320-323.

3. **О. Ю. Скоробогатов**, І.Ю. Жуков, З.Ю. Ткачук. 2',5'-олігоаденілати змінюють вторинну структуру та функціональну активність білка S100A1 людини // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2015. – № 3. – С. 157-160.

4. **Skorobogatov O. Yu.**, Lozhko D. N., Zhukov I. Yu., Kozlov O. V., Tkachuk Z. Yu. Study of dephosphorylated 2'-5'-linked oligoadenylates impact on apo-S100A1 protein conformation by heteronuclear NMR and circular dichroism. // *Biopolym. Cell.* – 2014. – Vol. 30, № 4. – P. 279-285.

5. Z. Yu. Tkachuk, A. V. Kozlov, **O. Yu. Skorobogatov**. Structural Changes in Therapeutic RNAs / *Macromolecular Symposia.* – 2014. – Vol 335, № 1. – P. 17-19.

6. **О. Ю.Скоробагатов**, І.Ю.Жуков, З.Ю.Ткачук. Вивчення взаємодії дефосфорильованого 2'-5'-триаденілату з протеїном S100A1 людини. Матеріали XII українського біохімічного конгресу, Медична та клінічна хімія. – Тернопіль, Україна. – 2019. – Т. 21, №3. – С. 45.

7. **Skorobogatov Oleksandr Yu.**, Gajda M., Zhukov Igor Yu., Tkachuk Zenoviy Yu. Study on 2'-5'A3 binding to human protein S100A1 // Abstracts of IX Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, *Biopolymers and Cell.* – 2015. – Vol. 31 (Special Issue). – P. 11.

8. **O. Skorobogatov**, I. Zhukov, O. Kozlov, P. Gajda, Z. Tkachuk. 2'-5'-linked oligoadenylates alter the conformation of human S100A1 protein and its functional profile // Abstracts of Conference for Young Scientists. - Kiev, Ukraine. – 2015. – P.35.

9. **O. Yu. Skorobogatov**, I. Yu. Zhukov, Z. Yu. Tkachuk. Expression of recombinant human Calmodulin in insect cells and its purification // Abstracts of VIII Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, *Biopolymers and Cell.* – 2014. – Vol. 30 (Special Issue). – P. 19.

10. **Oleksandr Yu. Skorobogatov**, Igor Yu. Zhukov, Zenoviy Yu. Tkachuk. 2'-5'-linked oligoadenylates alter the conformation of S100A1 and S100B proteins // Abstracts of VII Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, *Biopolymers and Cell.* – 2013. – Vol. 29(Special Issue). – P. 25.

11. **Oleksandr Skorobogatov**, Igor Zhukov and Zenoviy Tkachuk. 2'-5'a3 and its analogue alter s100a1 conformationand Ca<sup>2+</sup> binding profile // Book of abstarcts of Young Scientists Forum. FEBS. – Saint Petersburg, Russia. – 2013. – P.114.



## SUMMARY

**Skorobogatov O. Yu. The study of structural mechanisms of 2'-5'-tradenylates interaction with the S100A1 protein.** – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

*Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.03 – Molecular Biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.*

2'-5'-tradenylates constitute a group of compounds which plays a number of key roles in higher eukariotes. It is known that their most important and well-studied function is activation of interferon, which, in turn, activates 2'-5'-tradenylates-oligoadenylatesynthase. This enzyme uses the intracellular pull of ATP as a source for in order to synthesise oligoadenylates 2'-5'-A<sub>n</sub>, where n=2-6. The most common part of the population of these compounds is the one with 3 adenosine residues – 2'-5'-A<sub>3</sub>. These molecules further interact with another enzyme, RNase L, which leads to the activation of the latter. The main function of RNase L is to hydrolyse viral and matrix RNAs, which is one the main stages of the innate immunity. Interestingly, the intracellular pull of oligoadenylates is not homogenous: there also are dephosphorylated oligoadenylates, the functions of which have not been properly studied yet.

Some functions are nonetheless known up to date. Dephosphrylated 2'-5'-A<sub>3</sub> has an antiviral activity, i.e. a capability of inhibiting some restrictases, including viral ones such as EcoRi.

Moreover, dephosphrylated 2'-5'-A<sub>3</sub> has an immunostimulating activity, while its epoxy-modified analogue 2'-5'-A<sub>3</sub>-epo acts oppositely – it generally acts as an immunosuppressor.

Another important 2'-5'-A<sub>3</sub>'s function is its capability to inhibit the activity of Na-, Mg- and Ca-ATPases, which allows us to assume that dephosphrylated triadenylates posses an antiproliferative function.



It is also known, that dephosphorylated 2'-5'-A<sub>3</sub> can influence the processes of smooth muscular contraction *in vivo*. This phenomenon can be explained by the interaction with various proteins, which are involved in the process of the muscular contraction, i.e. Calmodulin, therefore influencing its activity. Indeed, the 2'-5'-A<sub>3</sub> interaction with this key Ca<sup>2+</sup>-binding protein has already been demonstrated earlier. As a result of such interaction, the Ca<sup>2+</sup>-binding constant of Calmodulin alters. Based on the aforementioned data we assumed that 2'-5'-A<sub>3</sub> could also interact with another key Ca<sup>2+</sup>-binding protein S100A1, which acts as Calmodulin's antagonist.

This is why the current work is dedicated to studying the structural mechanisms of 2'-5'-A<sub>3</sub> interaction with S100A1.

Firstly, the possibility of complex formation between 2'-5'-A<sub>3</sub>/2'-5'-A<sub>3</sub>-epo and S100A1 has been studied. Using the circular dichroism spectroscopy we showed that the CD spectra of S100A1 is altered upon interaction with 2'-5'-A<sub>3</sub>/2'-5'-A<sub>3</sub>-epo. Interestingly, complex formation was shown both in the presence and absence of Ca<sup>2+</sup> ions.

It was shown that 2'-5'-A<sub>3</sub>/2'-5'-A<sub>3</sub>-epo binding causes the protein's secondary structure content change. The complex formation initiates a 6% and 5% decrease of alpha-helical content of the apo-S100A1 respectively. Contrary to the apo-form, the protein's holo-form's alpha-helical content decreased less significantly – 3% and 4% respectively. We also managed to identify the increase of disordered secondary structure elements both for apo- and holo-S100A1, which led us to a suggestion that a part of alpha-helices transform into disordered elements upon 2'-5'-A<sub>3</sub> or 2'-5'-A<sub>3</sub>-epo binding.

We further used Fourier infrared spectroscopy, which allowed to identify the Amide I and II bands shifts. The values of the shifts equaled 1cm<sup>-1</sup> and 3 cm<sup>-1</sup>, which allows us to assume that the percentage of disordered secondary structure elements increased.

We also managed to identify the amino acid residues within the S100A1 protein which demonstrate the highest CSP values upon binding to 2'-5'-A<sub>3</sub>. They turned out to be located with the Ca<sup>2+</sup>-binding loops, which constitute the central

parts of EF-hands. The bulk of the signals originated from the N-terminal region of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domain, where His18, Lys21, Asp24, Lis25 and Lis30 are located. These aminoacid residues are known to strongly depend on the experimental conditions such as temperature and pH.

Other aminoacid residues, Val69 and Gln72, which are located within the C-terminal domain of S100A1, showed significantly lower CSP values upon binding to 2'-5'-A<sub>3</sub>.

Considering the low solvent accesability of the aforementioned aminoacid residues, we assume that 2'-5'-A<sub>3</sub> does not have a possibility to bind those directly. It is more likely that 2'-5'-A<sub>3</sub> binds S100A1 elsewhere, probably  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domain and/or linker region and the conformational changes, caused by the binding, are transmitted to the sensitive monomer interface.

We managed to identify 3 bonds within the 5Å radius using computer modelling. One of the, the hydrogen bond, is formed between the NH<sub>2</sub> group and the adenine I and AMP and CO group of Ala80. The second and third bonds are electrostatic. They are formed between the PO<sub>2</sub> group of the II AMP residue and the CO group of Val69 and between the PO<sub>2</sub> group of the III AMP residue and CO group of Asn64. Computer modelling of the 2'-5'-A<sub>3</sub> 3 S100A1 partly proves the earlier obtained NMR data – the PO<sub>2</sub> group of the second AMP residue and the CO group of Val69 interact electrostatically, which might explain the significant CSP value of Val69. The latter is a part of C-terminal domain of S100A1.

We demonstrated the insignificant impact of 2'-5'-A<sub>3</sub> on the  $\text{Ca}^{2+}$ -affinity of S100A1. Interestingly 2'-5'-A<sub>3</sub> caused the decrease of  $\text{Ca}^{2+}$ -affinity to S100A1 by  $0,2 \cdot 10^{-4}$ , while the epoxy modified analogue caused the increase of the binding constant by  $0,8 \cdot 10^{-3}$  compared to the control experiment.

We also found out that 2'-5'-oligoadenylates significantly impact the protein kinase activity. Interestingly, they were shown to act as either activators or inhibitors according to the nature of a 2'-5'-oligoadenylate. The effect also depended on the concentration of both the 2'-5'-oligoadenylate and ATP. One of the proteinkinases,

Aurora, was shown to be inhibited by 2'-5'-A<sub>3</sub> i 2'-5'-A<sub>3</sub>-epo by 35% and 40% respectively.

**Key Words:** 2'-5'-tradenylates, S100A1, structural changes.

**List of scientific publications published on the topic of the dissertation:**

1. **Skorobogatov O. Yu.**, Zhukov O. Yu., Tkachuk Z. Yu. Structural mechanisms of 2'- 5'-tradenylates interaction with S100A1 protein // Dopov. Nac. akad. nauk. Ukr. – 2020. – №1. – С. 89-94.

2. **Skorobogatov OY**, Kukharenko AP, Kozlov OV, Dubey IY and Tkachuk ZY. 2'-5'-Linked Triadenylates Act as Protein Kinase Activity Modulators // Journal of Proteomics & Bioinformatics. – 2017. – Vol. 10, №12. – P. 320-323.

3. **O. Y. Skorobogatov**, I.Y. Zhukov, Z.Y. Tkachuk. 2',5'-oligoadenylates alter the secondary structure and functional activity of the human S100A1 protein // Dopov. Nac. akad. nauk. Ukr. – 2015. – №3. – P. 157-160.

4. **Skorobogatov O. Yu.**, Lozhko D. N., Zhukov I. Yu., Kozlov O. V., Tkachuk Z. Yu. Study of dephosphorylated 2'-5'-linked oligoadenylates impact on apo-S100A1 protein conformation by heteronuclear NMR and circular dichroism. // Biopolym. Cell. – 2014. – Vol. 30, № 4. – P. 279-285.

5. Z. Yu. Tkachuk, A. V. Kozlov, **O. Yu. Skorobogatov**. Structural Changes in Therapeutic RNAs / Macromolecular Symposia. – 2014. – Vol 335, № 1. – P. 17-19.

6. **O.Y. Skorobogatov**, I.Y. Zhukov, Z.Y. Tkachuk. Study of the interaction of dephosphorlated 2'-5'-tradenylate with the human S100A1 protein. Materials of the XII Ukrainian biochemical congress, Medical and Clinical Chemistry. – Ternopil, Ukraine. – 2019. V.21, №3. – P. 45.

7. **Skorobogatov Oleksandr Yu.**, Gajda M., Zhukov Igor Yu., Tkachuk Zenoviy Yu. Study on 2'-5'A<sub>3</sub> binding to human protein S100A1 // Abstracts of IX Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. – 2015. – Vol. 31 (Special Issue). – P. 11.

8. **O. Skorobogatov**, I. Zhukov, O. Kozlov, P. Gajda, Z. Tkachuk. 2'-5'-linked oligoadenylates alter the conformation of human S100A1 protein and its functional profile // Abstracts of Conference for Young Scientists. - Kiev, Ukraine. – 2015. – P.35.

9. **O. Yu. Skorobogatov**, I. Yu. Zhukov, Z. Yu. Tkachuk. Expression of recombinant human Calmodulin in insect cells and its purification // Abstracts of VIII Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. – 2014. – Vol. 30 (Special Issue). – P. 19.

10. **Oleksandr Yu. Skorobogatov**, Igor Yu. Zhukov, Zenoviy Yu. Tkachuk. 2'-5'-linked oligoadenylates alter the conformation of S100A1 and S100B proteins // Abstracts of VII Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29(Special Issue). – P. 25.

11. **Oleksandr Skorobogatov**, Igor Zhukov and Zenoviy Tkachuk. 2'-5'-a3 and its analogue alter s100a1 conformation and Ca<sup>2+</sup> binding profile // Book of abstracts of Young Scientists Forum. FEBS. – Saint Petersburg, Russia. – 2013. – P.114.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....	16
ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	21
1.1. Біологічні функції 2'-5' олігоаденілатів .....	21
1.1.1. Циклоспорин як класичний інгібітор реакції відтогрнення тканин ....	23
1.1.2. Кальційнейрин як мішень циклоспорину .....	23
1.1.3. Модулюючі властивості «корових» 2'-5' олігоаденілатів .....	24
1.1.4. РНКаза L: структура та функції .....	25
1.1.5. Fe-S інгібітор РНКаз L .....	27
1.1.6. Система RIG-I-подібних рецепторів .....	28
1.1.7. Регуляція судинного тонуусу препаратами 2'-5'-A <sub>3</sub> .....	29
1.2. Ca <sup>2+</sup> -зв'язуючі білки .....	35
1.2.1. Загальні відомості про Ca <sup>2+</sup> -зв'язуючі білки.....	35
1.2.2. EF-мотив .....	35
1.2.3. Білки родини S100 .....	37
1.2.4. Внутрішньоклітинні функції деяких S100 білків .....	38
1.2.5. Функції деяких S100 білків в клітині.....	40
1.2.6. Функції деяких S100 білків поза клітиною .....	42
1.2.7. Перспективи застосування білків сімейства S100 в якості терапевтичних мішеней в клінічній практиці .....	44
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	47
2.1. Об'єкт дослідження .....	47
2.2. Реактиви і обладнання, використані в роботі .....	47
2.3. Методи дослідження.....	49
2.3.1. Хімічний синтез олігоаденілатів .....	49
2.3.2. Флуоресцентна спектроскопія.....	49
2.3.3. Спектроскопія кругового дихроїзму .....	51

2.3.4. Обчислення відсоткового складу елементів вторинної структури в білкових зразках.....	52
2.3.5. Визначення змін у вторинній структурі кальцій-зв'язуючих білків при взаємодії з коровим 2'-5'-A <sub>3</sub> методом фур'є трансформованої інфрачервоної спектроскопії .....	53
2.3.6. Метод ядерно магнітного резонансу.....	53
2.3.7. Метод малокутового розсіювання рентгенівських променів.....	54
2.3.8. Визначення впливу олігоаденілатів на активність протеїнкіназ .....	55
2.3.9. Комп'ютерне моделювання (докінг) взаємодії білків S100A1, S100B та протеїнкінази Аврора з олігоаденілатами .....	56
2.3.10. Дослідження структурних змін в терапевтичних препаратах РНК, створених на основі олігоаденілатів, при нагіванні .....	57
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....</b>	<b>58</b>
3.1. Надекспресія, виділення та очистка рекомбінантного білка S100A1 .....	58
3.2. Вивчення впливу 2'-5'-A <sub>3</sub> та 2'-5'-A <sub>3</sub> -еро на значення константи асоціації білка S100A1 з Ca <sup>2+</sup> методом флуоресцентної спектроскопії .....	63
3.3. Дослідження змін відсоткового складу елементів вторинної структури білка S100A1 внаслідок зв'язування 2'-5'-A <sub>3</sub> та 2'-5'-A <sub>3</sub> -еро.....	70
3.4. Дослідження впливу 2'-5'-A <sub>3</sub> на вторинну структуру білків S100A1 та кальмодуліну методом Фур'є трансформованої інфрачервоної спектроскопії .....	77
3.5. Вивчення впливу 2'-5'-A <sub>3</sub> на структуру білка S100A1 методом ядерно-магнітного резонансу.....	82
3.6. Комп'ютерне моделювання взаємодії S100A1 з 2'-5'-A <sub>3</sub> .....	89
3.7. Вплив 2'-5'-A <sub>3</sub> на активність протеїнкіназ .....	91
3.8. Вивчення впливу 2'-5'-A <sub>3</sub> -еро на флуоресценцію білка EGFP .....	97
3.9. Структурні зміни в терапевтичних РНК, створених на основі 2'-5'-A <sub>3</sub> , під впливом температури .....	99
<b>РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ...</b>	<b>102</b>
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>106</b>

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖРЕЛ.....	107
ДОДАТОК А.....	127

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АТФ	– аденозин трифосфорна кислота
ВК <sub>Ca</sub>	– кальційзалежні калієві канали високої провідності
ГМК	– клітини гладеньких м'язів
КД	– круговий дихроїзм
ОАС	– олігоаденілатсинтетаза
ПКС	– протеїн кіназа С
ІЧПФ	– інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є
ЯМР	– ядерний магнітний резонанс
Ca <sup>2+</sup>	– двовалентний йон кальцію
Csa	– циклоспорин
IFN	– інтерферон
R <sub>YR1</sub>	– ріанодиновий рецептор, ізоформа 1
SAXS	– малокутове розсіювання рентгенівських променів
STOCs	– спонтанні транзйентні вихідні струми
S100A1	– S100 кальцій зв'язуючий білок А1
S100B	– S100 кальцій зв'язуючий білок В
TEA	– тетраетиламоній



## ВСТУП

**Актуальність теми.** На сьогодні відомо, що олігоаденілати відіграють ключову роль в так званому «олігоаденілатному шляху» активації інтерферону, механізм якого полягає в активації останнім ферменту 2'-5'-олігоаденілатсинтетази. Фермент, в свою чергу, використовує внутрішньоклітинний пул АТФ для синтезу особливого класу сполук – 2'-5'-оліго $A_n$  ( $n=2-6$ ), серед яких кількісно переважають тричленні сполуки. В подальшому, оліго $A_n$  активують латентну РНКазу L, що здатна гідролізувати вірусні та матричні РНК [1]. Важливо, що здатність активувати фермент характерна лише для фосфорильованих олігоаденілатів, при чому їх афінність до РНКазы L зростає зі збільшенням кількості фосфатних груп оліго $A$  [2]. В той самий час, клітинний пул 2'-5'-оліго $A_n$  також містить і дефосфорильовані олігоаденілати, які утворюються в результаті ензиматичного відщеплення фосфатних груп. Біологічна роль дефосфорильованих оліго $A_n$  на сьогодні залишається незрозумілою.

Тим не менш, було встановлено деякі закономірності функціонування дефосфорильованого триденілату (2'-5'- $A_3$ ). Зокрема, цілком закономірно було виявлено, що 2'-5'- $A_3$  мають виражені антивірусні властивості: природній 2'-5'- $A_3$  та його хімічно модифіковані аналоги виявили здатність інгібувати цілий ряд вірусних рестриктаз, в тому числі EcoRI [3].

Крім того, було показано, що 2'-5'- $A_3$  здатен проявляти також і імуностимулюючу активність, в той час як його епоксі-модифікований аналог (2'-5'- $A_3$ -ероху) проявляє протилежну імуносупресуючу активність [4].

Дефосфорильовані триаденілати також виявили здатність пригнічувати активність натрієвої, кальцієвої, калієвої та магнієвої АТФаз, що дозволяє припустити існування активності, схожої на анти-проліферативну [5].

Крім того, – і це є найважливішим в об'єктиві задач і цілей даної роботи, – раніше було виявлено, що природній 2'-5'- $A_3$  та його епоксімодифікований

аналог – 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро, здатні впливати на процес скорочення судин гладеньких м'язів *in vivo* [6]. Таку активність можна пояснити декількома шляхами, одним з яких є можлива взаємодія олігоаденілатів з деякими білками, що беруть участь у м'язовому скороченні, зокрема кальмодуліну (CaM) та S100A1, та, як наслідок, модуляція їх активності певним чином.

І справді, можливість утворення комплексу олігоаденілат-CaM вже було раніше продемонстровано [7]. Виявилось, що зв'язування олігоаденілату з кальмодуліном спричиняє зміни в афінності білка до йонів Ca<sup>2+</sup>. Ці дані дозволяють припустити, що олігоаденілати здатні взаємодіяти і з іншим ключовим Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючим білком – S100A1, який, між іншим, є антагоністом кальмодуліну [8]. З цієї причини, вивчення особливостей взаємодії S100A1 із 2'-5'-A<sub>3</sub> було одним з головних завдань даної роботи.

Об'єктом дослідження в даній роботі був природній 2'-5'-A<sub>3</sub>.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Зміст дисертації відповідає основному плану науково-дослідних робіт групи молекулярної фармакології відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Робота виконувалася в рамках тем №2.2.4.15 – "Вивчення механізму взаємодії 2',5' - олігоаденілатів з кальцій-зв'язуючими білками" (номер державної реєстрації – 0108U008528, 2009- 2013 рр.); «Розробка та впровадження методів діагностики та експресії генів» (номер державної реєстрації 0114U001100, 2013); №2.2.4.15 – "Вивчення впливу олігонуклеотидів на сигнальні білки та експресію генів вродженого імунітету» (номер державної реєстрації – 0113U002779, 2014- 2018 рр.).

**Мета та завдання дослідження.** Метою роботи було дослідження структурних та функціональних зміни білка S100A1 при взаємодії з 2'-5'-A<sub>3</sub>.

Для досягнення поставленої мети у роботі вирішували наступні завдання:

1. Отримати препарат рекомбінантного білка S100A1 людини високої чистоти.

2. Дослідити зміни відсоткового складу елементів вторинної структури білка S100A1 в апо- і голо-формах при зв'язуванні з препаратами 2'-5'-A<sub>3</sub> та 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро методом кругового дихроїзму.
3. Дослідити зміни Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючої активності білка S100A1 у комплексі з еквімолярними концентраціями 2'-5'-A<sub>3</sub> та 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро.
4. Вивчити особливості впливу 2'-5'-A<sub>3</sub> та 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро на активність протеїнкінази Auroga *in vitro*.

*Об'єкт дослідження:* елементи вторинної структури та функціональний профіль білка S100A1 внаслідок взаємодії із 2'-5'-A<sub>3</sub>.

*Предмет дослідження:* препарати рекомбінантних білків S100A1, S100B, кальмодуліну, інсуліну, інтерферону, природного та епосі-модифікованого корових 2'-5'-A<sub>3</sub>.

*Методи дослідження:* мікробіологічні (культивування бактеріальних клітин), молекулярно-біологічні (створення конструктів), біохімічні (білковий гель-електрофорез), спектральні (КД спектроскопія, флуоресцентна спектроскопія, ФТІР спектроскопія, ЯМР спектроскопія, SAXS спектроскопія). Також було застосовано метод комп'ютерного моделювання.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше було показано взаємодію 2'-5'-A<sub>3</sub> з цілим рядом білків, а саме Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючі білки родини S100, кальмодулін, інтерферон, інсулін та деякі протеїнкінази. Показано, що така взаємодія призводить не тільки до змін вторинної структури досліджених білків, але й до модифікації їх активності.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати проведених досліджень із вивчення механізмів біологічної дії 2'-5'-олігоА поглиблюють існуючі уявлення про функції корових аденілатів. Отримані в роботі дані можна використати для створення нових противірусних препаратів.

**Особистий внесок здобувача.** Результати, викладені у дисертації, одержано автором особисто або за безпосередньої участі у виконанні експериментів. Зокрема, автором самостійно експресовано рекомбінантні білки

S100A1, отримано КД спектри, спектри флюоресценції, FTIR спектри, проведено комп'ютерне моделювання.

Планування та аналіз результатів експериментів та написання статей проведено спільно з науковим керівником, к.б.н. З.Ю. Ткачуком. Досліди, метою яких було отримання ЯМР спектрів, було проведено в межах співпраці с к.б.н. Жуковим Ігорем Юрійовичем (Інститут Біохімії та Біофізики ПАН, Варшава, Польща).

**Апробація результатів дисертації.** Загальні положення роботи доповідались на поточних наукових семінарах Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та 6 наукових конференціях: XII український біохімічний конгрес (Тернопіль, Україна, 2019), IX Conference of Young Scientists (Kyiv, Ukraine, 2015), Conference of Young Scientists (Kyiv, Ukraine, 2015), VII Conference of Young Scientists (Kyiv, Ukraine, 2014), VII Conference of Young Scientist (Kyiv, Ukraine, 2013), Young Scientists Forum FEBS (Saint Petersburg, Russia, 2013).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 5 статей у наукових фахових журналах та тези 6 доповідей у збірниках матеріалів з'їздів та конференцій.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, висновків та списку використаних джерел. Дисертацію викладено на 128 сторінках машинописного тексту. Вона містить 28 рисунків та 4 таблиці. Список використаної літератури налічує 195 найменувань.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Біологічні функції 2'-5' олігоаденілатів

Роботу по вивченню системи олігоаденілатів, зв'єднаних неканонічним 2'-5' зв'язком (2'-5'-А), було розпочато Аяном Кером (Ian Kerr) ніприкінці 70-х років [1]. Пізніше було продемонстровано їх суттєву роль в інтерферон-активованому каскаді реакцій, які відповідають за функціонування вродженого імунітету людини [2]. Для пояснення цього ефекту, різними групами вчених паралельно було проведено серію досліджень, в результаті яких вдалося виявити здатність трифосфатів 2'-5'-триаденілатів (ppp2'-5'-А<sub>3</sub>, або 2'-5'-А<sub>3</sub>) інгібувати синтез ДНК в різних типах тканин (3), анти-мутагенні властивості [4] та вплив на активність цитотоксичних Т-лімфоцитів [5].

Відомо, що трифосфати 2'-5'-А<sub>3</sub> є активаторами РНКазы L. Вони утворюють комплекс з РНКазою L і таким чином запускають механізм противірусного захисту клітини, індукований інтерфероном. Зв'язування ppp2'-5'-А<sub>3</sub> з цим ферментом є обов'язковою умовою для індукції його рибонуклеазної активності [1]. Для зв'язування з РНКазою L на 5'-кінці 2'-5'-олігонуклеотиду необхідна наявність принаймні однієї фосфатної групи, а для активації ферменту – як мінімум двох фосфатних груп [2]. На сьогодні відомо три активних домени РНКазы L. Перший домен відповідає за безпосереднє зв'язування з 2'-5'-А<sub>3</sub>, другий має нуклеазну активність, а третій за своєю структурою схожий на протеїназу [3].

Як свідчать дані наукових джерел, крім ppp2'-5'-А<sub>3</sub> індукцію РНКазы L здатні викликати й інші хімічні сполуки, які, таким чином, можуть бути активаторами противірусного захисту. Природа таких сполук відрізняється від ppp2'-5'-А<sub>3</sub>, і разом з тим вони є стимуляторами імунної системи [4]. Методом комп'ютерного моделювання були побудовані моделі зв'язування ряду низькомолекулярних синтетичних олігонуклеотидів з РНКазою L, а також

моделі розщеплення нею вірусної РНК. Було встановлено, що дефосфорильовані, так звані корові 2'-5'-триаденілати (2'-5'-A<sub>3</sub>) не можуть зв'язуватися з РНКазою L та індукувати розщеплення вірусної РНК. Однак їх роль у метаболізмі клітини до цього часу повністю не з'ясована. У ряді робіт було показано, що поза РНКазою L існують й інші білки, з якими можуть утворювати комплекси 5'-фосфорильовані 2'-5'-олігоаденілати. Авторами роботи [5] було встановлено, що ppp2'-5'-олігоаденілати впливають на активність топоізомерази I, причому інгібуючий ефект залежить від довжини олігомеру та від наявності фосфатних груп. Найбільш значну інгібуючу активність виявляють фосфорильовані 2'-5'-олігоаденілати, молекули яких містять близько 10 залишків аденозину. Також показано, що вірусна зворотна транскриптаза інгібується фосфорильованими 2'-5'-олігоаденілатами, причому можливе утворення комплексу останніх з ферментом [6].

Також було показано, що фосфорильовані 2'-5'-олігоаденілати не є стабільними утворенням і в клітині зазнають розщеплення ферментом фосфатазою, в результаті чого утворюються дефосфорильовані, або «корові» 2'-5'-олігоаденілати, функції яких наразі не до кінця з'ясовані [4]. Однак відомо, що «корові» 2'-5'-A<sub>3</sub> та їхні аналоги є інгібіторами відторгнення тканин після трансплантації [9], мають кардіопротекторні властивості [10], стимулюють проліферацію стовбурових клітин кісткового мозку та впливають на їхній апоптоз [11], демонструють гальмуючий вплив на скорочення гладеньких м'язів аорти та стегнової артерії шура [12] тощо. Механізм дії «корових» 2'-5'-A<sub>3</sub> вивчено недостатньо. Невідомі всі протеїни-мішені цих сполук. Раніше нами було показано, що однією з мішеней біологічної дії цих олігонуклеотидів та їхніх аналогів є фосфодіестерази циклічних нуклеозидів. Запропоновано гіпотезу широкої участі 2'-5'-A<sub>3</sub> у регуляції цих ключових ферментів, які контролюють велику кількість клітинних процесів [13]. Інші автори вважають, що й антипроліферативна дія 2'-5'-A<sub>3</sub> та їхніх аналогів може бути пов'язана з активацією системи цАМФ [14]. Ми припускаємо, що у клітині знаходяться й інші протеїни-мішені «корових» 2'-5'-A<sub>3</sub>. Пошук цих протеїнів та вивчення їх

взаємодії з 2'-5'А дозволили би встановити деякі фундаментальні механізми регуляції клітинних процесів, а також знайти нові терапевтичні препарати.

**1.1.1. Циклоспорин як класичний інгібітор реакції відторгнення тканин.** Циклоспорин (CsA) представляє собою ліпофільний, циклічний ендекапептид з молекулярною вагою 1202 Дальтони та широко застосовується в якості інгібітора реакції відторгнення трансплантантів [15]. В плазмі крові 90% CsA знаходиться в зв'язаній формі, переважно з ліпопротеїнами, але можливі і інші мішені, зокрема альбуміни та глобуліни в еритроцитах.

Біодоступність CsA суттєво відрізняється серед популяції *Homo sapiens*, що пояснюється різницею в інтенсивності процесу всмоктування речовин в кишечнику, на що, в свою чергу, впливаються процеси травлення, та ряд патологій – дабет, діарея та ін 16. Метаболізм CsA відбувається переважно в печінці, період його існування в організмі в середньому складає 6,4-8,7 годин, причому з сечею та фекаліями виводиться менше 1% від загальної його кількості.

**1.1.2. Кальційнейрин як мішень циклоспорину.** Кальційнейрин (calcineurin) представляє собою кальцій / кальмодулін-залежну серин-треонінову протеїнфосфатазу. Активованій кальційнейрин дефосфорилує регуляторні сайти кількох транскрипційних факторів, особливо ядерних факторів активованих Т-лімфоцитів (NFAT). Інгібування кальційнейрину циклоспорином відбувається завдяки зв'язуванню з циклофіліном. Саме цей крок запобігає дефосфорилуванню NFAT та їх подальшої інтерлейкін-2-(IL-2)-опосередкованої транслокації з цитоплазми в ядро. Саме тому, інгібування на данному етапі запобігає активації промоторів Т-клітинної активації та загальної імунної відповіді.

Крім впливу на імунну функцію, циклоспорин володіє кількома іншими токсичними ефектами. Найбільш помітними є гостра та хронічна нефротоксичність, але також проявляються гіпертонія, гіперліпідемія, гіперплазія ясен, гіперкаліємія, нейротоксичність, гіпомагніємія, гіперурикемія та тромбо мікроангіопатія [15]. Вважається, що дані патологічні прояви

виникають в результаті інгібування кальційнейрину в неліпфатичних тканинах [17]. Порушення електролітичного гомеостазу, як вважають, є наслідком змін функціонування тубулярного апарату і йонного гомеостазу. [16, 18]. Нефротоксичний ефект отримав найбільшу увагу протягом останніх років.

Зважаючи на досить суттєвий токсичний ефект, котрий проявляється при застосуванні циклоспорину, на велику кількість біологічних процесів, що відбуваються в організмі людини, набагато більш доцільним та менш шкідливим варто вважати застосування «корових» 2'-5'-триаденілатів, що володіють схожими властивостями та застосування яких здатно викликати подібні наслідки. Так, було показано, що дані сполуки виступають в якості супресорів імунної відповіді (відторгнення) при трансплантації нирки мавпам, не завдаючи при цьому шкоди імунній системі в цілому та діяльності внутрішніх органів [19]. В іншій серії експериментів було показано, що 2'-5'-A<sub>3</sub> здатні виступати в якості інгібіторів протеїнкіназ [20], що може мати суттєві перспективи для їх застосування замість класичних інгібіторів. Ці інгібітори використовуються при лікуванні цілого спектру патологій, в т.ч. різних типів раку, проявляючи при цьому найрізноманітніші токсичні ефекти в різних органах – серце, печінка, нирки, легені тощо [21].

Ми вважаємо, що такого незначного токсичного ефекту вдається досягти завдяки невисокому значенню константи зв'язування 2'-5'-A<sub>3</sub> з цільовими білками, при цьому не впливаючи суттєво на їх функціонування в цілому, але локально змінюючи профіль їх активності.

**1.1.3. Модуючі властивості «корових» 2'-5' олігоаденілатів.** В роботі [22] показано, що 2'-5' олігоаденілати впливають на активність топоізомерази 1, причому інгібуючий ефект на активність топоізомерази залежить від довжини олігомера і від наявності фосфатних груп. Найбільш значною інгібуючою активністю володіли фосфорильовані молекули олігоаденілатів, які містили приблизно 10 аденінових залишків. Також показано, що вірусна зворотна транскриптаза інгібується 2'-5'-лігоаденілатом завдяки утворенню комплексу олігоаденілату з цим ферментом [23].



Раніше було показано, що "корові" тримери впливають на потенціал залежні кальцієві канали, активність яких пов'язана з протеїнкіназами [24]. Активність переносників кальцію пов'язана з їх фосфорилуванням, яке, в свою чергу, здійснюється протеїнкіназами А і С. Йони  $\text{Ca}^{2+}$  і DAG активують протеїнкіназу С (ПКС), тому синергізм в їх дії реалізується вже, і перш за все, на рівні цього ферменту. Також показано, що ПКС фосфорилує деякі рецептори, змінюючи їх спорідненість до лігандів і взаємодію з G-білком [25].

**1.1.4. РНКаза L: структура та функції.** Ендорибонуклеаза L (РНКаза L) латентний фермент, що експресується майже у всіх типах клітин ссавців і є одним з основних компонентів та важливим медіатором системи 2'-5'-А. Система 2'-5'-А є однією з 3 антивірусних шляхів, індукованих інтерфероном та активованих дволанцюговою РНК (dsRNA); інші дві представлені dsRNA-залежною протеїнкіназою (PKR) [26] та так званим білком Mx [27]. Активація РНКаз L потребує приєднання невеликого олігонуклетиду – 2'-5'-А. 2'-5'-А – набір унікальних 5'-трифосфорильованих олігоаденілатів з нехарактерними для ДНК та РНК 2'-5' фосфодієфірними зв'язками. У 1974 році групі Айана Керра (Ian Kerr) вперше вдалося зафіксувати індуковане інтерфероном підвищення чутливості процесу білкового синтезу до інгібування dsRNA [28]. Через деякий час група Пітера Ленгіла (Peter Lengyel) отримала експериментальні дані, що свідчать про збільшену нуклеазну активність в екстракті клітин оброблених інтерферованих та інкубованих з dsRNA [29, 30]. Ідентифікація групи активаторів цієї нуклеази, 2'-5'-А [31], та ферменту, відповідального за їх синтез, 2'-5'-А-синтетази [32, 33, 34], в кінці цінців призвела до відкриття так званого шляху 2'-5'-А. Згодом, групою вчених було виявлено нуклезу, відому нині як РНКаза L, що активується 2-5-А [35].

Вперше РНКазу L було описано як 185 кДа комплекс [36], пізніше – 78-80 кДа білок в денатураційних умовах [37, 38]. Ці дві форми співіснують в клітинах; співвідношення їх концентрацій варіює в межах клітин різних типів та експериментальних процедур, використаних для виявлення РНКаз L [39-41]. Обидві форми зв'язують 2'-5'-А та мають 2'-5'-А-залежну нуклеазну

активність. Інший невеликий білок (40-60 кДа) що зв'язується з 2'-5'-А та розщеплює poly(U) виявлено в клітинах легенів та селезінки мишей [37, 39, 42]. Появу останнього пов'язують з протеолітичним розщепленням РНКазі L [43, 44].

РНКазі L людини представляє собою білок, що складається з 741 амінокислотного залишку та має молекулярну вагу 83,539 кДа [26]. Цей фермент має 3 домени: N-кінцевий анкерин-повторюваний домен, протеїн-кіназний домен та C-кінцевий рибонуклеазний домен. N-кінцевий домен вважається регуляторним доменом РНКазі L. Він складається з 8 повних та одного неповного анкеринового мотиву (R1-R9). 2 Р-петлевих мотива, що відповідають за зв'язування АТФ/ГТФ розташовані в межах R7 та R8 [45].

Анкеринові мотиви функціонують в якості медіаторів багатьох білок-білкових взаємодій [46]. Кожен такий мотив утворений 33 амінокислотними залишками, що формують попарно з'єднані  $\alpha$ -спіралі, сполучені між собою  $\beta$ -шпильками. Цікаво, що анкеринові мотиви в складі РНКазі L взаємодіють з олігонуклеотидом 2'-5'-А. Експериментальні дані свідчать про те, що наявність мотивів R1, 7, 8 та 9 є визначальною для зв'язування 2'-5'-А [26, 47, 48]. Кристалічна структура N-кінцевого домену РНКазі L у комплексі з 2'-5'-А показує, натомість, що 2'-5'-А безпосередньо взаємодіє з R2-R4 [49]. Крім того було показано, що R2-R4 представляють собою сайт зв'язування 2'-5'-А, а R7-R9 скоріше можуть бути необхідними для структурної цілісності РНКазі L ніж для зв'язування 2'-5'-А.

Фрагмент C-кінцевого домену РНКазі L є гомологічним кіназі/ендорибонуклеазі, IRE1p, що задіяна в процесі так званої «відповіді розгорнутих білків» (UPR) деяких мікроорганізмів та *Homo sapiens* [50, 51, 52]. RNase L та IRE1 крім гомології по нуклеазним доменам, також гомологічні по кіназним/кіназо-подібним елементам послідовності. Тим не менш, в той час як кіназна активність IRE1 є однозначно встановленою, дослідів, що вказують на кіназну активність РНКазі L на сьогодні нема. Вважають, що ця ділянка деяким чином пов'язана з можливістю димеризації РНКазі L [53]. Декілька

амінокислот в С-кінцевому домені РНКазі L є необхідними для каталізу, в т. ч. R667 та H672 [50]. Крім того, Tyr712 та Phe716 є важливими як для зв'язування так і для розщеплення РНК [54].

Зв'язування 2'-5'-А призводить до конформаційних змін в анкіріновому домені РНКазі L та «демаскує» С-кінцевий рибонуклеазний домен, що робить можливим гомодимеризацію РНКазі L та активацію нуклеазної активності ферменту [47, 55-57]. Димеризація та активація РНКазі L можлива лише за умов молярного співвідношення РНКазі L : 2-5А 1:1 [55, 58, 59].

Крім вірусних мРНК та рРНК [56, 60-62] в останніх дослідках було показано, що деякі клітинні мРНК також регулюються РНКазою L. Такі результати вказують на те, що РНКазі L, та 2'-5'-А шлях в цілому, можуть мати широкий спектр біологічних властивостей в межах клітинної фізіології.

**1.1.5. Fe-S інгібітор РНКазі L.** Недавні дослідження показали, що специфічний інгібітор РНКазі L – залізо-сірчаний (Fe-S) білок (Rli1), який належить до сімейства так званих ABC (ATP-binding cassette) білків, є потенціальним фактором термінації трансляції [63]. В структурі білка виявлено два Fe-S –кластери та 2 ABC домена. Для його коректної збірки, вкрай необхідним є активність мітохондріальної та цитозольної Fe-S білкового апарату [64]. Rli1 асоційований з полірибосомами [65] та з білком, водночас задіяним в ініціації трансляції в якості компонента eIF3j фактора ініціації трансляції 3 (eIF3) та в процесингу 20S пре-рРНК – Hcr1 [64]. Крім того, існують експериментальні докази того, що Rli1 є необхідним елементом ефективного формування та стабілізації 43S та 48S пре-ініціаторного комплексу. [65]. Rli1 асоційований з компонентами еукаріотичного апарату трансляції: eIF2, eIF5 та eIF3 [66].

В клітинах людини, Rli1 вперше було виявлено як інгібітор РНКазі L [67]. Дані недавніх експериментів чітко вказують на те, що РНКазі L взаємодіє з еукаріотичним фактором вивільнення поліпептидного ланцюга (eRF3), наслідком чого є підвищення ефективності термінації трансляції [68].

Авторами статті [63] було показано, що Rli1 на пряму взаємодіє не тільки з факторами ініціації трансляції, а й з факторами термінації трансляції eRF1 eRF3. Крім того, отримані прямі докази необхідності цього білка для коректного впізнання стоп кодону.

Таким чином, білок Rli1, що інгібує активність РНКазы L, водночас є компонентом системи трансляції, що пов'язує в кінці кінців активність РНКазы L та системи РНКазыL/олігоаденілатсинтетази (ОАС)/2'-5'-А в цілому з клітинним метаболізмом. Крім того, сам фермент безпосередньо здатен взаємодіяти з фактором термінації трансляції eRF3, що пов'язує його з функціонуванням генетичного апарату як одного з компонентів клітинного метаболізму.

**1.1.6. Система RIG-I-подібних рецепторів.** Невід'ємним компонентом та першою ланкою в механізмі антивірусного захисту клітини без сумніву є внутрішньоклітинні рецептори вірусних РНК, або RIG-I-подібні рецептори (RLRs), яких відомо на сьогодні 3 – RIG-I, MDA-5, LGP-2 [69, 70]. Консервативне хеліказне ядро RIG-I та MDA-5 зв'язане з двома CARD доменами на N-кінці та з  $Zn^{2+}$ -вмісним доменом на C-кінці. LGP-2 має подібну доменну будову, але не містить CARD. RIG-I та MDA-5 мають сигнальні шляхи та адапторні молекули, тим не менш активують їх РНК різних вірусів [69]. Функція LGP-2 вивчена не так детально в зв'язку з тим, що цей білок можуть активувати різні віруси [71, 72]. При зв'язуванні RIG-I з дволанцюговою вірусною РНК або трифосфорильованою РНК, RIG-I зв'язується з адапторною молекулою IPS-1 на зовнішній мембрані мітохондрії через CARD [73, 74]. Це, в свою чергу, призводить до активації деяких транскрипційних факторів, в тому числі IRF3, IRF7 та NF- $\kappa$ B, та викликає синтез інтерферону 1-го типу і деяких запальних цитокінів [73]. Посттрансляційні модифікації RIG-I, в тому числі убіквітинізація та фосфорилування, є необхідними для функціонування останнього [75]. Більше того, RIG-I проявляє апоптоз-стимулюючі властивості в пухлинних тканинах [76, 77].

Авторами роботи [78] було отримано структуру RIG-I, а саме CARD-доменів в його складі, в комплексі з РНК. Виявляється, що у взаємодії приймають участь відразу декілька доменів. Крім того, показана механічна взаємодія між різними компонентами білка.

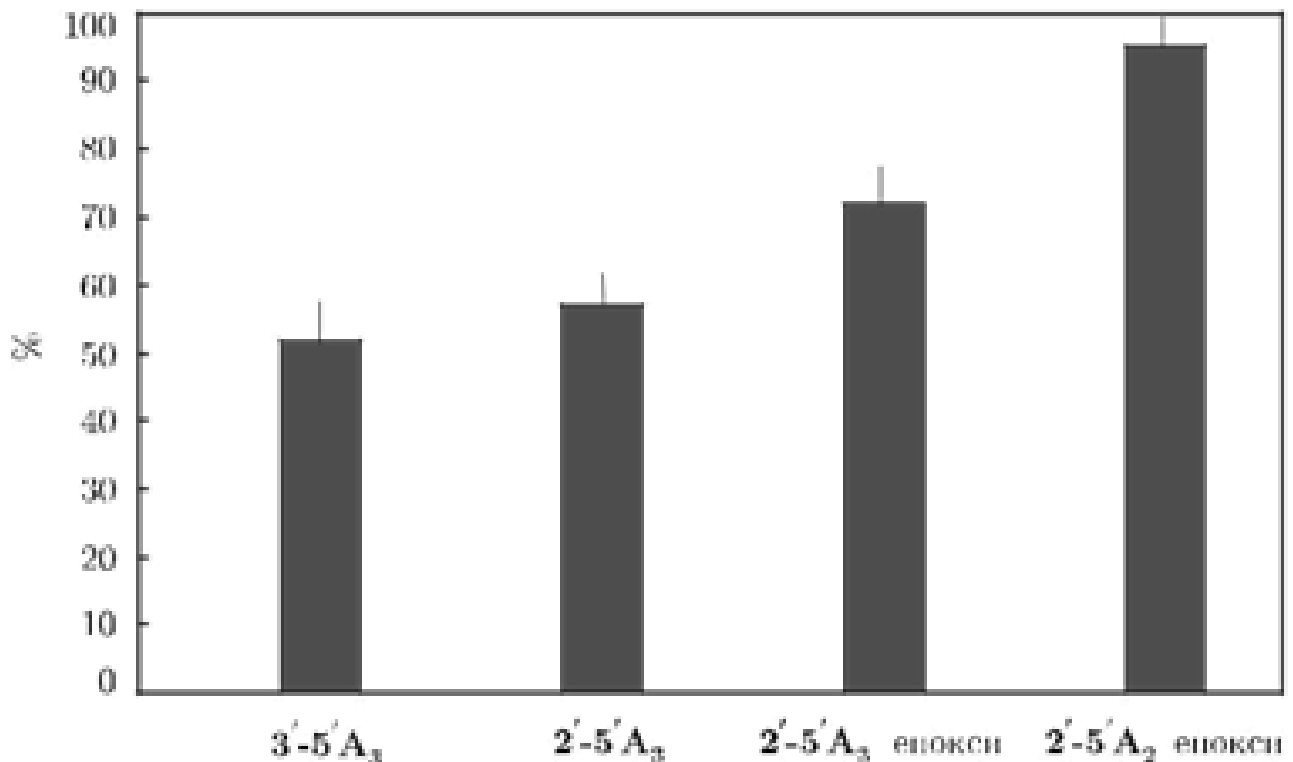
Крім того, автори вважають RIG-I потенціальною мішенню для антивірусних та антипухлинних препаратів, а на основі кристалічної структури отриманого комплексу можлива розробка стратегій для терапевтичного дизайну.

**1.1.7. Регуляція судинного тонузу препаратами 2'-5'-A<sub>3</sub>.** В контексті даної дисертаційної роботи, на наш погляд, доцільно було б навести результати, отримані нами раніше [6].

У вихідному стані гладеньком'язовим препаратам стегнової артерії щура, на відміну від препаратів аорти, властивий незначний базальний тонуз. 2'-5'-A<sub>3</sub> у концентрації 10 мкМ не впливав на вихідний рівень базального тонузу як стегнової артерії, так і аорти.

Скорочення, викликане гіперкалієвим розчином Кребса ( $[K^+]_0 = 60$  мМ), за умов блокади вивільнення нейромедіатора з адренергічних нервових терміналей або в присутності блокатора  $\alpha$ -адренорецепторів фентоламіну ( $10^{-5}$  М) (деполяризація мембрани нервових терміналей іонами  $K^+$  призводитиме до вивільнення норадреналіну), мало фазнотонічну природу. Фазний компонент гіперкалієвого скорочення досліджуваних судин за цих умов майже ніколи не перевищував тонічний. Аплікація гіперкалієвого розчину Кребса на 10-й хв дії 2'-5'-A<sub>3</sub> викликала збільшення амплітуди скорочення щодо контролю для препаратів аорти на  $(45,0 \pm 9,0)\%$  ( $n = 9$ ), стегнової артерії на  $(38,0 \pm 12,0)\%$  ( $n=9$ ). Аплікація 2'-5'-A<sub>3</sub> на тонічному компоненті гіперкалієвого скорочення спричиняла до його збільшення в препаратах стегнової артерії на  $(40,0 \pm 11,0)\%$  ( $n = 9$ ), а в препаратах аорти на  $(35,0 \pm 8,0)\%$  ( $n = 9$ ). Проведені експерименти виявили здатність 2'-5'-A<sub>3</sub> потенціювати скорочення, викликане деполяризацією мембрани судинних клітин гладкої мускулатури (рис. 1.1).

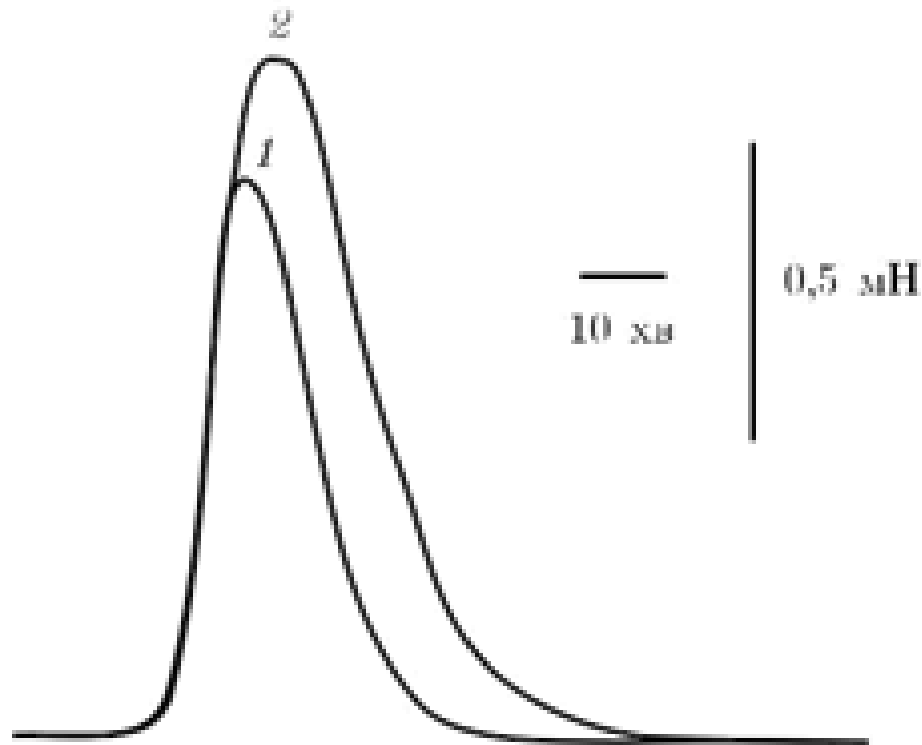
При дослідженні дії 2'-5'-A<sub>3</sub> незалежно від умов експерименту (активація агоністіндукованого скорочення на фоні дії олігоаденілату або аплікація його на тонічному компоненті цього скорочення) завжди спостерігали пригнічення агоністактивованого скорочення препаратів аорти та стегнової артерії щура, викликаного активацією  $\alpha_1$ -адреноре-цепторів (фенілефрин, 10 мкМ) або дією ангіотензину (0,1 мкМ). 2'-5'-A<sub>3</sub> зменшував ангіотензиніндуковане скорочення препаратів стегнової артерії на  $(73,0 \pm 7,8)\%$  (n = 9), препаратів аорти на  $(57,0 \pm 7,0)\%$  (n = 90). Препарати судин відновлювали свою здатність відповідати скороченням на аплікацію досліджуваних агоністів протягом 60–90 хв. Треба зазначити, що дія 2'-5'-A<sub>3</sub> не залежала від наявності або відсутності ендотелію.



**Рис. 1.1.** Здатність різних олігоаденілатів у концентрації 10 мкМ пригнічувати тонічний компонент індукованого фенілефрином (10 мкМ) скорочення гладеньких м'язів аорти щура (%). Кількість експериментів для кожної групи n = 5

Здатність пригнічувати агоністіндуковане скорочення судинних гладеньких м'язів мають також і інші форми олігоаденілатів. На рис. 2

порівнюється гальмівна дія деяких 2'-5'-A<sub>3</sub> та їх аналогів з різною кількістю аденілової кислоти та різними фосфодіефірними зв'язками на фенілефринвикликане скорочення препаратів аорти щурів. Епоксианалоги 2'-5'-A<sub>3</sub> істотно пригнічують тонічний компонент скорочення судинних гладеньких м'язів (рис. 1.2). Особливо високу гальмівну здатність виявляє 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро.



**Рис. 1.2.** Дія 2'-5'-A<sub>3</sub> на кофеїніндуковане скорочення гладеньких м'язів аорти щура в номінально безкальцієвому розчині Кребса. **1** скорочення, викликане аплікацією 10 мМ кофеїну в контролі; **2** скорочення, викликане аплікацією 10 мМ кофеїну на 10-й хв дії 10 мкМ 2'-5'-триаденілату

Надалі робота була сконцентрована на дослідженні механізму 2'-5'-A<sub>3</sub> пригнічувати агоністіндуковане скорочення гладеньких м'язів судинних препаратів. Так, було виявлено, що блокатор ріанодинових рецепторів/каналів саркоплазматичного ретикулула ріанодин (10 мкМ) усуває гальмівну дію 2'-5'-A<sub>3</sub>. Це дало змогу припустити, що активація останнім вивільнення кальцію із саркоплазматичного ретикулула ГМК може активувати Ca<sup>2+</sup>-залежні калієві канали мембрани судинних міоцитів. Той факт, що 2'-5'-A<sub>3</sub> здатен вивільнювати

кальцій з ріанодинчутливого кальцієвого депо саркоплазма тичного ретикулула ГМК, підтвердили результати експериментів з кофеїном. Кофеїн використовується для вивільнення кальцію з ріанодинчутливого кальцієвого депо ендосаркоплазматичного ретикулула клітин різних типів тканин. Так, на 10-й хв преаплікації 10 мкМ 2'-5'-A<sub>3</sub> в нормальному розчині Кребса скорочення препаратів аорти щура, індуковане 10 мМ кофеїну, збільшувалося на (12,0 ± 7,8)% (n = 5), а препаратів стегнової артерії на (14,0 ± 5,0)% (n = 5). При використанні блокаторів Са-залежних калієвих каналів малої (апамін, 0,1 мМ) та великої (тетраетиламоній, 1–3 мМ) провідності показано, що 2'-5'-A<sub>3</sub> пригнічує агоністіндуковане скорочення судинних препаратів за рахунок активації кальційзалежних калієвих каналів великої провідності (BK<sub>Ca</sub>). Відомо [79], що цАМФ-залежна протеїнкіназа здатна підвищувати активність BK<sub>Ca</sub> каналів ГМК за рахунок їх фосфорилування. Блокування цАМФ-чутливої протеїнкінази високоселективним блокатором Rp-8-bromo-cAMPS (0,01 мМ) сприяло усуненню гальмівної дії досліджуваного олігоаденілату.

Автори роботи [80] вважають, що BK<sub>Ca</sub> канали виконують роль негативного зворотного механізму в контролі міогенного тонуру в артеріальних гладеньких м'язах шляхом їх активації іонами кальцію за механізмом Са-опосередкованого вивільнення кальцію з внутрішньоклітинного кальцієвого депо ГМК. Останнє призводить до гіперполяризації мембрани ГМК і розслаблення судин. Можливість того, що BK<sub>Ca</sub> канали послаблюють дію вазоконстрикторної стимуляції, підтверджують результати дослідження внутрішньоклітинної концентрації кальцію та потенціалзалежності активації BK<sub>Ca</sub> каналів. Відкривання каналів відбувається в області мембранного потенціалу -50 . . . -60 мВ при внутрішньоклітинній концентрації кальцію 10<sup>-8</sup>–10<sup>-7</sup> М, а вірогідність збільшується разом з величиною мембранного потенціалу. Таким чином, збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, викликане їх надходженням до клітини через потенціалзалежні кальцієві канали під час деполяризації, призводитиме до активації BK<sub>Ca</sub> каналів.



Існує й інший шлях активації цих каналів. Спонтанне вивільнення іонів кальцію із сарко-плазматичного ретикулула призводить до виникнення спонтанних транзйентних вихідних струмів (STOCs), які викликаються одночасною активацією до 100  $V_{Ca}$  каналів [81, 82]. STOCs можна спостерігати в області мембранного потенціалу  $-50 \dots -60$  мВ, збільшення їх частоти може відбуватися за умов активації вивільнення іонів кальцію з ріанодин(кофеїн)чутливого депо саркоплазматичного ретикулула ГМК прикладанням 1 мМ кофеїну. Підвищення калієвого струму блокується харибдотоксином або 1–3 мМ тетраетиламонієм (TEA) (вищі концентрації TEA блокують поряд з  $V_{Ca}$  каналами і потенціалзалежні калієві канали). Таким чином, вивільнення  $Ca^{2+}$  з ріанодин(кофеїн)чутливого кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулула спричинятиме розслаблення гладеньких м'язів зав-дяки активації  $K^+$  каналів плазматичної мембрани ГМК [83, 84]. На противагу цьому в серцевому м'язі вивільнення  $Ca^{2+}$  з ріанодин(кофеїн)чутливого кальцієвого депо кардіоміцитів забезпечує  $> 90\%$   $Ca^{2+}$ , необхідного для скорочення.

Експерименти, коли скорочення викликалося гіперкалієвим розчином Кребса, показали, що 2'-5'- $A_3$  здатен підвищувати тонічний компонент цього скорочення, мабуть, за рахунок додаткового вивільнення кальцію з ріанодинчутливого кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулула ГМК. Підтвердженням останнього є той факт, що за умов дії гіперкалієвого розчину Кребса ( $[K^+]_0 = 60$  мМ) потенціалзалежні кальцієві канали мембрани ГМК максимально активовані і тому збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію в цитозолі може відбуватися за рахунок мобілізації останнього з внутрішньоклітинного депо. Досліди з кофеїном (кофеїн використовується для ідентифікації ріанодин(кофеїн)чутливого внутрішньоклітинного кальцієвого депо) у номінально безкальцієвому розчині Кребса показали, що на фоні дії 2'-5'- $A_3$  кофеїніндуковане скорочення збільшується. Здатність 2'-5'- $A_3$  вивільнювати кальцій із цього кальцієвого депо ГМК підтверджують експерименти з використанням блокатора ріанодинових рецепторів/каналів

саркоплазматичного ретикулула ріанодину. З іншого боку, блокування цАМФ-залежною протеїнкіназою розслаблюючої дії 2'-5'-A<sub>3</sub> на фенілефриніндуковане скорочення судинних препаратів може свідчити про те, що цей нуклеотид, очевидно, здатен пригнічувати скорочувальні відповіді за рахунок декількох механізмів, а саме: шляхом активації 2'-5'-A<sub>3</sub> цАМФ-залежної протеїнкінази стимулювати вивільнення кальцію з ріанодин(кофеїн)чутливого внутрішньоклітинного кальцієвого депо ГМК і активувати ВК<sub>Ca</sub> канали. Додатково цАМФ-залежна протеїнкіназа може прямо фосфорилувати ВК<sub>Ca</sub> канали, приводячи їх в активний стан, або інші клітинні білки, що регулюють скорочення-розслаблення ГМК.

Таким чином, проведені дослідження показали, що 2'-5'-A<sub>3</sub> за рахунок вивільнення кальцію з ріанодин(кофеїн)чутливого кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулула судинних ГМК і наступної активації ВК<sub>Ca</sub> каналів мембрани ГМК здатен пригнічувати агоністіндуковане скорочення судинних гладеньких м'язів. Активоване 2'-5'-A<sub>3</sub> вивільнення кальцію з ріанодин(кофеїн)чутливого кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулула може спричиняти і потенціювання скорочення, викликаного гіперкалієвим розчином Кребса. В останньому випадку калієва провідність не активується, і тому мобілізація кальцію з ріанодин(кофеїн)чутливого кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулула ГМК буде істотно впливати на приріст амплітуди скорочення.

Отже, з огляду на викладені вище дані, ми вважаємо доцільним дослідження особливостей взаємодії білка S100A1 з коровими 2'-5'-олігоаденілатами, найважливішими з яких для нас є сайт зв'язування, вплив на вторинну структуру білка та зміни його активності.

## 1.2. Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючі білки

**1.2.1. Загальні відомості про Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючі білки.** Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючі білки походять від спільного попередника. Їх основними функціями є регуляція внутрішньоклітинної концентрації йонів Ca<sup>2+</sup> участь у Ca<sup>2+</sup>-сигнальних шляхах [85, 8]. Група Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючих білків, що регулюють рівень Ca<sup>2+</sup>, здебільшого представлена мембранними білками, яким вдалося еволюціонувати задля підтримання низької внутрішньоклітинної концентрації Ca<sup>2+</sup> (~100 нМ) за умов спокою або шляхом його «викачки» із цитозоля в позаклітинне середовище, або ж «закачки» до внутрішньоклітинних кальцієвих депо. Така умова є необхідною для уникнення утворення нерозчинних Ca<sup>2+</sup> сполук і/або надмірної активності Ca<sup>2+</sup>-опосередкованих сигналів. Ca<sup>2+</sup>-АТФаза, наприклад, здатна активувати Ca<sup>2+</sup> депо для швидкого підвищення концентрації йонів кальцію, необхідних для специфічних потреб клітини. Деякі інші Ca<sup>2+</sup> зв'язуючі білки (наприклад кальсеквестрін та кальретінін) характеризуються низькою специфічністю зв'язування Ca<sup>2+</sup> але високою «ємкістю» по відношенню до йонів Ca<sup>2+</sup>, що забезпечується їх високою концентрацією та специфічною локалізацією в кальцієвих депо. Тут вони зв'язують йони кальцію, роблячи його доступним в разі потреби. Інші Ca<sup>2+</sup> зв'язуючі білки, в основному цитоплазматичні, або функціонують в якості «Ca<sup>2+</sup>-буферів» під час виникнення кальцієвих струмів завдяки їх високій спорідненості до Ca<sup>2+</sup> (наприклад парвальбумін та S100G) або як «декодери» Ca<sup>2+</sup> сигналу [86]. Ця остання група представлена значною кількістю різних Ca<sup>2+</sup> зв'язуючих білків, які при зв'язуванні Ca<sup>2+</sup> здатні взаємодіяти з білками-мішенями, регулюючи таким чином велику кількість різноманітних клітинних процесів. Кальмодулін, тропонін-С і більшість білків S100 є по своїй суті Ca<sup>2+</sup>-сигнальними білками і мають в своєму складі кальцій-зв'язуючий домен, що має назву EF-мотив (EF-hand) [3, 85, 86].

**1.2.2. EF-мотив.** Термін «EF-hand» було введено в 1973 році в якості графічного опису кальцій зв'язуючого домену, вперше ідентифікованого в

молекулі парвальбуміну [86]. Даний термін описує не тільки різновид укладання поліпептидного ланцюга, але й зміни конформації білкової молекули, викликані зв'язуванням кальцію.

Класичний EF-мотив представляє собоює послідовно з'єднані елементи вторинної структури білкової молекули – спіраль-петля-спіраль – які, як правило, побудовані з 12 амінокислотних залишків, «фланкованих» двома альфа спіралями, розташованих перпендикулярно одна до другої, що, в свою чергу, схоже на вказівний та великий пальці людської руки. Така петля здатна зв'язувати йони кальцію з різною специфічністю, що є визначним фактором активності білків [87].

Зазвичай, EF-мотиви групуються попарно. Найменший з можливих EF-мотивів, представлений двома альфа спіралями, розділених гнучким лінкером, представлений в складі молекули парвальбуміну та білків, що належать до сімейства S100. Білок кальпаїн (calpain), в той же час, порушує правило попарного групування EF-мотивів, маючи в своєму складі 5 EF-мотивів в С-кінцевій частині великої субодиниці. Тим не менш, ці мотиви групуються попарно з малою субодиницею, що побудована з інших 5 EF-хендів, формуючи таким чином гетеродимер [87].

До складу канонічного EF-мотивів входить приблизно 30 амінокислотних залишків. Такий мотив зустрічається не тільки в складі невеликих білків (в тому числі кальмодуліні та білках S100), але й набагато більших білкових комплексах (в тому числі міозині або кальпаїні). EF-мотив також було ідентифіковано і в інших білках, таких як холінестераза або нейролігіні [88], онкогенному білку MDM2 [89] та трансглікогеназі *Escherichia coli* Slt35 [90].

Даний структурний мотив було знайдено в складі багатьох сімейств білків (більше ніж 66), що виконують найрізноманітніші функції, в тому числі підтримання необхідної концентрації йонів кальцію в цитозолі, передача сигналу від одних компартментів клітини до інших [91] та м'язеве скорочення [92].

**1.2.3. Білки родини S100.** Родина білків S100 представлена 24 невеликими, негативно зарядженими білками з молекулярною масою від 10 до 12 кДа, функціонально розподіленими на три основні підгрупи: ті, що здатні проявляти тільки внутрішньоклітинну регуляторну активність; такі, які крім внутрішньоклітинних ефектів здатні виклати і позаклітинні ефекти та білки, здатні лише до позаклітинної активності. Таку назву родина отримала завдяки здатності білків, що входять до її складу, розчинятися в 100% насиченому розчині сульфату амонію при нейтральному значенні рН. Вперше їх було описано вченим на ім'я Мур (Moore) в 1965 році [85]. S100 білки експресуються виключно в організмах хребетних тварин і є клітинно специфічними. У деяких випадках, в тому числі патологічних, певний представник родини S100 може з'являтися в клітинах, в яких за нормальних фізіологічних умов його виявити неможливо [86].

На відміну від кальмодуліну і тропоніну-С, активність яких обмежується внутрішньоклітинним середовищем, деякі білки S100 здатні виступати як в якості внутрішньоклітинних регуляторів так і позаклітинних сигнальних білків. При цьому, вони можуть виділятися за межі клітини з метою регулювання активності цільових клітин пара- або аутокринним чином. З 24 генів білків S100 людини, 19 розташовані в хромосомі 1q21 [87]. В той же час ген білка S100A11P знаходиться в хромосомі 7q22-Q3, ген S100B – в хромосомі 21q22, ген S100G – в хромосомі Xp22, ген S100P – в хромосомі 4p16, а ген S100Z – в хромосомі 5q13 [87].

В клітини білки родини S100 залучені до регуляції проліферації, диференціації, апоптозу, кальцієвого гомеостазу, енергетичного обміну, запалення і міграції/інвазії завдяки взаємодії з різними білками-мишенями, включаючи ферменти, субдиниці цитоскелету, рецептори, фактори транскрипції і нуклеїнові кислоти [87]. Поза клітинною S100 білки діють аутокринним і паракринним чином через активацію поверхневих рецепторів, G-спряжених рецепторів, або гепарансульфат протеогліканів та N-гліканів [8]. В якості позаклітинних сигналізаторів, S100 білки, як було показано, здатні

регулювати клітинну проліферацію, диференціювання, виживання і міграцію за нормальних і патологічних умов, запальних та відновлювальних процесах. Певні S100 білки також виявлено в сироватці крові та інших біологічних рідинах під час патологічних процесів.

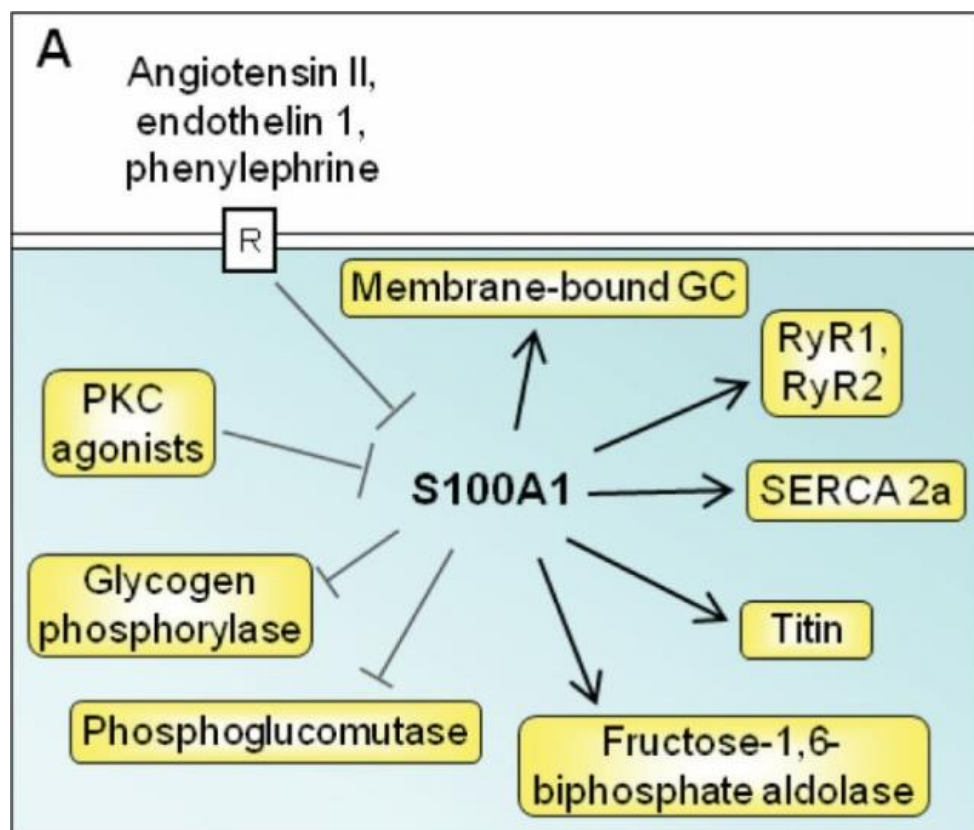
Гени білків S100 індукуються лише в певних типах клітин за допомогою відповідних активаторів – факторів росту, цитокінів і білків, що зв'язуються з TLR. За цих умов білки S100A1, як правило, виділяються в позаклітинне середовище, де можуть виступати в якості зовнішньоклітинних алармінів або факторів, пов'язаних з пошкодженнями тканин, або брати участь в процесах відновлення тканин [85-95]. Підвищена експресія певних генів білків S100 також може посилювати внутрішньоклітинну регуляторну активність. Нарешті, в окремих випадках, індукція експресії одного з неактивних за нормальних умов генів S100 може бути функціонально пов'язана з відповіддю клітини на певний подразник, зокрема стрес. Так, білок S100B не експресується в кардіоміоцитах за нормальних фізіологічних умов. Тим не менш, в постінфарктних кардіоміоцитах спостерігається активація експресії цього гену, що призводить до інгібування експресії генів альфа-актину та бета-міозину, що, в свою чергу, обмежує амплітуду гіпертрофічної відповіді [96]. Незалежно від тканинної приналежності клітини, синтез білків S100A8 і S100A9 підвищується у відповідь на дію оксидативного стресу, кортикостероїдів, певних цитокінів і факторів росту [91].

**1.2.4. Внутрішньоклітинні функції деяких S100 білків.** S100A1 експресується у великих кількостях в скелетних м'язових волокнах, кардіоміоцитах та нейронах певних типів [86]. Було виявлено, що у цих клітинах він розсіяний в цитоплазмі та асоціює з компонентами цитоскелету і мітохондріями. Промотор гена S100A1 містить кілька негативних регуляторних мотивів, контрольованих гальмівними транскрипційними факторами [97]. Відповідно до цього, хронічна стимуляція кардіоміоцитів ангіотензином II, ендотеліном 1, фенілефріном або антагоністами протеїнкінази C знижує як

кількість мРНК так і білка S100A1, що пояснюється гіпертрофічною реакцією клітин серцевого м'язу [98].

S100A1 взаємодіє з  $\text{Ca}^{2+}$ -залежною АТФазою та і RyR2 рецептором саркоплазматичного ретикулула в кардіоміоцитах, що призводить до підвищення  $\text{Ca}^{2+}$  буферизації та збільшення скорочувальної активності.

Узагальнена схема відомих на сьогодні білкових лігандів білка S100A1 представлена на рисунку 1.3.



**Рис.1.3.** Схематичне зображення внутрішньоклітинних взаємодій та субстратів S100A1, адаптовано до [86]

Крім того, в серцевих саркомерах та мітохондріях, S100A1 здатен підвищувати генерацію енергії [99]. Дефіцит S100A1 в саркоплазматичному ретикулумі призводить до зниження кількості  $\text{Ca}^{2+}$  та зниження величини  $\text{Ca}^{2+}$ -опосередкованих струмів, в результаті чого спостерігається прискорене погіршення серцевої діяльності та переходу до серцевої недостатності [99, 100]. При цьому варто зазначити, що цільова доставка S100A1 безпосередньо в

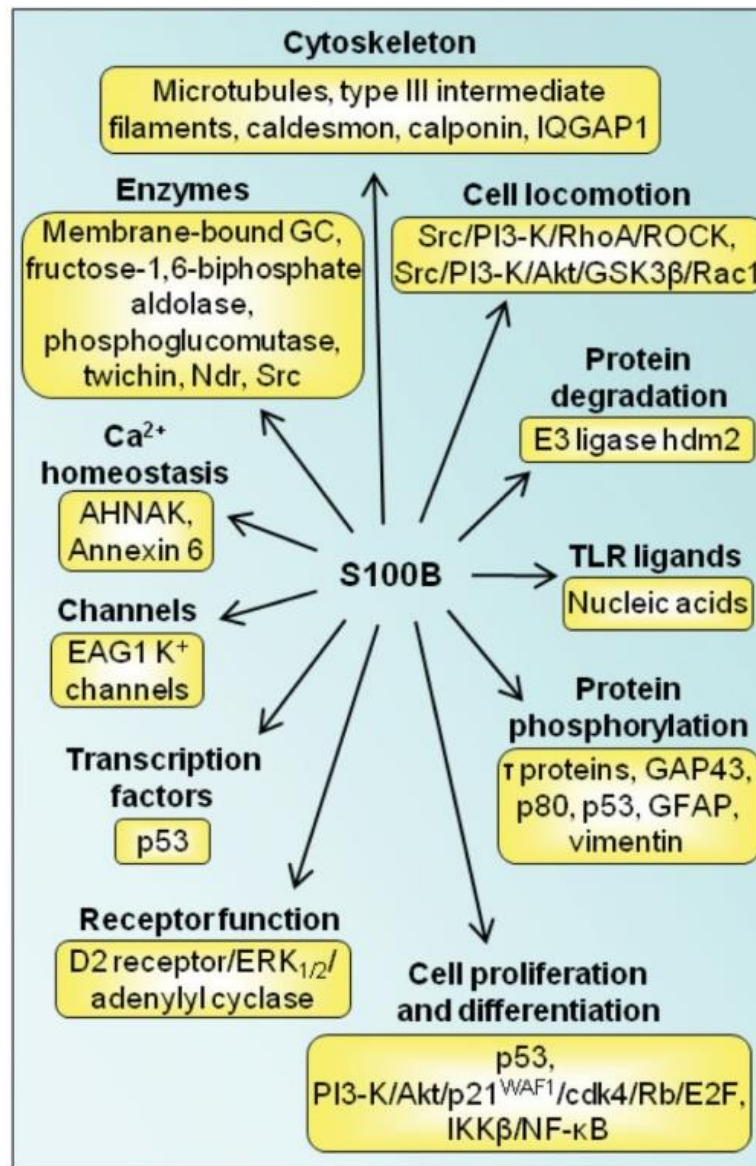
таканину сприяє відновленню нормального функціонування пошкодженого в такий спосіб серцевого м'язу. [101]. У скелетних м'язових волокнах S100A1 зв'язується з RYR1 рецептором, збільшуючи вірогідність його відкриття [102, 103]. S100A1 також взаємодіє з гіганською кіназою саркомеру – тініном – підвищуючи її гнучкість [100]. Крім того, в фоторецепторних клітинах, S100A1 здатен стимулювати зв'язану з мембраною гуанілатциклазу при цьому, ймовірно, беручи участь в адаптації рослин до темряви, а також регулює енергетичний обмін завдяки стимулюванню фруктозо-1,6-біфосфату (одного з ключових інтермедіатів в процесі гліколізу) та інгібуванню фосфоглюкомутази і глікогенфосфорилази [86].

**1.2.5. Функції деяких S100 білків в клітині.** Білок S100B експресується в астроцитах, деяких типах нейронів, клітинах Шванна, меланоцитах, хондроцитах, адипоцитах, скелетних м'язових волокнах і пов'язаних з ними клітинах-сателітах, деяких дендритних клітинах, деяких типах лімфоцитів та кількох інших типах клітин [81]. Він діє в якості стимулятора клітинних проліферації та міграції, також інгібітора апоптозу та диференціації [104-114], що може мати досить суттєвий вплив у процесах розвитку та регенерації/відновлення тканин мозку та клітин скелетних м'язів, активації астроцитів під час пошкодження мозку та нейродегенеративних явищ, інфаркту, розвитку меланом та гліом. Зокрема, пригнічення експресії S100B в стовбурових клітинах має безпосередній вплив на клітинну диференціацію [104-109, 111-113]. Цікаво, що клітини, в яких пригнічується експресія S100B на початку процесу їх диференціації, здатні відновлювати нормальний рівень його експресії пізніше: в зрілій диференційованій клітині білок регулює велику кількість ключових процесів, в тому числі підтримання сталої форми клітини, транскрипцію, процеси, пов'язані з деградацією білка, кальцієвий гомеостаз, енергетичний обмін і функції деяких ферментів, взаємодіючи з широким спектром білків-мішеней [109]. В якості останніх виступають: тубулін і асоційований з микротрубочками  $\tau$  білок, актин-зв'язуючий білок кальдесмон,



кальпонін, субодиниці проміжного філаменту III типу, аннексін 6 [115-122], зв'язана з клітинною мембраною гуанілатциклаза, та інші [123, 124].

Узагальнена схема білків мішеней білка S100B представлена на рисунку 1.4.



**Рис.1.4.** Процеси, які відбуваються за участі S100B в межах клітини та його субстрати, адаптовано до [86]

Таким чином, активність S100B може підтримувати проліферацію клітин. В ході онкогенезу, натомість, ефект буде протилежним. S100B також регулює кальцієвий гомеостаз [125-128], хоча в астроцитах та VSMCs було отримані протилежні за типом дії результати [125, 127]. Крім того, S100B зв'язується з та інгібує калієві канали в Ca<sup>2+</sup>-залежний спосіб, підвищуючи можливість того,

що його негативний вплив на клітинну диференціацію може відбуватися також завдяки і цьому механізму [128]. Хронічно високий рівень S100B, якого було досягнуто в генетично модифікований організмах мишей, пов'язують з розвитком хвороби Паркінсона, що відбувається завдяки зниженню активності D2 допамінового рецептора та G-опосередкованого рецептора кінази 2, підвищення рівня синтезу і метаболізму дофаміну і зниження рівня серотоніну [129]. Підвищений рівень експресії S100B також спостерігається в астроцитах [130] і в значно меншій мірі в деяких типах нейронів [131, 132]. Те ж саме явище в сироватці крові пов'язують з порушеннями настрою [130] і шизофренією [131]. Рівень S100B в сироватці має прогностичне значення у пацієнтів з діагностованою меланомою [105] і раком молочної залози [132]. Питання про те, чи може високий вміст S100B в сироватці крові бути свідченням важких ушкоджень головного мозку і надалі залишається дискусивним [133,134].

Отже, білок S100B, не дивлячись на те, що його послідовність є майже ідентичною до такої білка S100A1, виконує ряд досить важливих функцій в іншій тканині – нервовій, в зв'язку з чим, вивчення впливу різноманітних препаратів на його структуру та функції є досить перспективним.

**1.2.6. Функції деяких S100 білків поза клітиною.** На сьогодні відомо, що S100A1 з'являється в позаклітинному середовищі внаслідок ішемічної хвороби серця. Це, в свою чергу, збільшує амплітуду кальцієвих струмів в кардіоміоцитах шлуночків серця [135] та струмів, опосередкованих кіназою A, потенціалу пролонгованої дії та кальцієвих струмів в нейронах [136].

S100B. Секреція S100B астроцитами має різний (трофічний або токсичний) вплив на нейрони, астроцити та мікроглію в залежності від концентрації [137, 138]. Так, концентрація в кілька наномоль призводить до того, що S100B веде себе подібно до нейротрофіну, захищаючи нервові клітини від нейротоксичної дії завдяки активації ERK1/2 і NF-κB-опосередкованої позитивної регуляції анти-апоптичного білка Bcl-2, в той час як його мікромольні дози здатні вбити нервові клітини, що пояснюється надмірною

амплітудою ERK1/2 сигналу і синтезом надмірної кількості ROS та/або активацією нейротоксичних ефектів  $\beta$ -амілоїду, шляхом залучення RAGE в обох випадках [137-140]. Вченими іншої групи було показано, що високі дози S100B тим не менш не являються смертельними для нейронів [141]. S100B стимулює проліферацію астроцитів в малих концентраціях [137-140]. В той час як при низьких дозах S100B послаблює активацію мікроглії через STAT3 шлях [142, 143], у високих дозах він здатен активувати мікроглію, про що свідчить NF- $\kappa$ B та AP-1-залежна стимуляція експресії цитокінів і їх вивільнення, а також активація експресії циклогенази 2 [137, 138, 144-148]. Крім того було показано, що високі концентрації S100B стимулюють міграцію клітин мікроглії завдяки NF- $\kappa$ B- та AP-1-залежним підвищенням експресії хемокінів і їх вивільнення та стимулювання експресії хемокінових рецепторів [149] через RAGE-опосередкований шлях. В результаті довготривалої оклюзії мозкової артерії в трансгенних S100B мишах амплітуда патологічних наслідків інфаркту значно збільшилася протягом перших днів після інфаркту, а астрогліоз посилюється в порівнянні з контрольною групою [150]. Крім того, такі миші виявляють підвищену сприйнятливості до перинатальної ішемії [151], а надлишкова експресія S100B прискорює розвиток захворювань, подібних до хвороби Альцгеймера, при чому спостерігається підвищений астрогліоз та мікрогліоз [152]. Внутрішньошлуночкове підвищення концентрації S100B викликає нейрогенез в гіпокампі, що пов'язують з підвищенням амплітуди пізнавальної функції після експериментальних черепно-мозкових пошкоджень [153, 154]. В результаті протікання цих процесів, S100B затримує пролонговані патологічні процеси, пов'язані з травмою [155, 156]. Встановлено, що активність S100B підвищується в експериментальних моделях аутоімунного енцефаломієліту, розсіяного склерозу, в той самий час активуючи RAGE білки в CD4+T-клітинах, що вказує на патогенетичну роль взаємодії у випадках склерозу [157]. Крім того, взаємодія S100B-RAGE відіграє важливу роль у процесах проліферації м'язових клітин при діабеті [158] та неоваскулярних розладах [159].

**1.2.7. Перспективи застосування білків сімейства S100 в якості терапевтичних мішеней в клінічній практиці.** Крім того, що S100 білки застосовують в якості діагностичних маркерів, є докази того, що їх негативна регуляція може сприяти розвитку численних патологічних станів, включаючи рак. Зважаючи на це, модуляцію їх активності можна вважати перспективним напрямком терапевтичної практики. Найбільш очевидним засобом для досягнення цієї мети в клінічній практиці можна вважати низькомолекулярні інгібітори, здатні знижувати/блокувати їх активність. Процедура розробки та створення таких сполук як правило включає в себе комбінацію автоматизованого проектування терапевтичних молекул (Drug design), скринінгу створених в такий спосіб речовин, структурної біології, медичної хімії та *in vivo* експериментів. Комп'ютерне моделювання вважається особливо ефективним, так як його застосування дає можливість вирішити проблему афінності зв'язування субстрат-ліганд. В той самий час, додаткової перспективності такому підходу надає велика кількість доступних на інтернет ресурсах 3D структур та даних молекулярної динаміки для комплексів білків S100 з найрізноманітнішими лігандами [160, 161-168]. Маючи в розпорядженні структурні та динамічні дані на рівні атомів, набагато легше вирішити питання білок-білкових взаємодій між білками S100 та білками мієшіями, що, остнім часом, викликає масу запитань [164-167, 169, 170]. Перспективним підходом для вирішення цього питання є застосування ЯМР, рентгенівської кристалографії та медичної хімії з метою визначення одночасного блокування декількох сайтів зв'язування невеликою молекулою, створеною за допомогою комп'ютерного моделювання [171, 172]. Варто звернути увагу на необхідність отримання даних стосовно впливу створених в такий спосіб сполук на живий організм в зв'язку з можливістю виникнення побічних ефектів, в тому числі токсичних. У випадку білків S100 це є особливо важливою процедурою, так як на сьогодні відомо близько 20 структурно подібних білків, залучених до ключових процесів в клітині і здатних зазнавати впливу створених за вищенаведеною методикою інгібіторів [160, 173].

На сьогоднішній день створено цілий ряд інгібіторів білків S100 – невеликих, штучно синтезованих молекул, деякі з яких наразі проходять клінічні випробовування на людях. Наприклад, антиалергічний лікарський засіб кромолин (cromolyn) здатний перешкоджати взаємодії S100P-RAGE та знижувати інтенсивність розвитку пухлин підшлункової залози на моделях тварин [174]. Було показано також здатність даного препарату зв'язуватись з іншими представниками родини S100 – S100A1, S100A12 і S100A13, але його вплив на взаємодію цих білків з їх мішенями наразі детально не вивчений. Сполуки, здатні перешкоджати взаємодії білка S100A10 та аннексину також знаходяться на етапі клінічних експериментів – їх планується використовувати в якості інгібіторів ангиогенезу та метастазування [175]. Інгібіторам S100A1, а саме пентамідину та пропранололу, наразі приділяють значну увагу у випадках терапії деяких когнитивних розладів [168]. Було показано, що декілька фенотіазинів здатні порушувати взаємодію S100A4 та міозину-IIA шляхом опосередкованої цими молекулами олігомеризації молекул білка S100A4, що, в кінцевому рахунку, призводить до його його інактивації [53, 176]. Очевидно, що ці та/або інші ще не розроблені інгібітори S100A4 можуть бути застосовані в медицині з метою лікування декількох типів раку [53, 177]. Іншим вченим вдалося показати, що S100A4 здатен зв'язуватись з анти-алергічними препаратами, в зв'язку з чим, модифікована версія азаксантону (azaxanthone) знаходиться на стадії клінічних випробовувань з метою лікування деяких типів раку в майбутньому [177, 178]. S100A4 відіграє суттєву роль в регулюванні матричної металопротеїнази (MMP) і її тканинних інгібіторів, тому вважається, що крім раку, іншим наслідком підвищеного рівня S100A4 може бути також і артрит [179]. Для S100B, було виявлено ряд інгібіторів, що використовуються для лікування злоякісної меланоми [110, 180]. В даних експериментах використовували такі препарати як пентамідин [180] і хлорпромазин [181, 182], а також модифіковані версії інгібіторів S100B для лікування меланоми. Метою робіт в даному напрямку наразі є створення більш специфічних інгібіторів S100B, які б відрзнялися вищою ефективністю та

меньшою кількістю побічних ефектів. Таким чином створення інгібіторів S100B, здатних відновлювати функції білка p53, специфічно зв'язуючи та інгібуючи активність S100B, є головною метою описаних вище робіт [110, 180].

Іншим терапевтичним підходом є контроль експресії білків родини S100. Добре відомо, що гени декількох з них (S100B, S100A6, та інші) пов'язані з процесами клітинної диференціації, злоякісних перетворень та росту. Крім того, рівень їх експресії може змінюватися в залежності від конкретних умов росту даних клітин. Таким чином, використання інгібіторів клітинного росту, таких як інгібітор топоізомерази II VP-16 або форбол 12-міристат-13-ацетату (phorbol 12-myristate 13-acetate) часто мають різний вплив на рівні специфічних білків S100 [183]. Тому, для того щоб регулювати конкретний білок S100 у випадках певних патологічних процесів, варто використовувати інгібітори, здатні деактивувати відповідний ген. Наприклад, скринінг бібліотек сполук, здатних інгібувати експресію S100A4, показав, що сполука кальциміцин (calcimycin) здатна інгібувати також і промотор гена цього білка [184, 185].

Таким чином, очевидним є той факт, що білки родини S100 є досить перспективними мішенями для створення нових ліків, в зв'язку з чим робота в цьому напрямі ведеться вже досить довгий час, в тому числі в нашій лабораторії.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Об'єкт дослідження

Головними об'єктами дослідження в даній роботі виступали рекомбінантний білок S100A1 людини та штучні синтезовані дефосфорильовані триаденілати – природний 2'-5'-A<sub>3</sub> та його епоксидно-модифікований аналог – 2'-5'-A<sub>3</sub>-epo. Серед інших об'єктів були комерційно доступні ліофілізовані препарати протеїн кінази Аврора (Aurora) та білків інсуліну і інтерферону.

Для отримання рекомбінантного білка S100A1 використовували стандартну процедуру індукції синтезу протеїна в бактеріальних клітинах *E.coli* штаму *BL21DE3*, після чого їх руйнували, а лізати очищували від залишків бактеріальних клітин. Надалі застосовували багатоступеневий процес очистки, який включав “висолювання” за допомогою сульфату амонію, афінну хроматографію із застосуванням сефарози та рідинну хроматографію під високим тиском. Очищений таким чином рекомбінантний білок ліофілізували для довгострокового зберігання.

Природній дефосфорильований триаденілат та його епоксидно-модифікований аналог було отримано в процесі складного багатостадійного хімічного синтезу.

### 2.2. Реактиви і обладнання, використані в роботі

Для синтезу олігоаденілатів використовували наступні реактиви: аденозин, 4,4'-диметокситритилхлорид, триізопропілбензолсульфохлорид (Sigma-Aldrich, Німеччина), пластинки Silicagel 60F<sub>254</sub> (Merck, Німеччина), Molselect DEAE25 («Reanal», Угорщина) та інші реактиви і розчинники вітчизняного виробництва.

Для електрофорезу були використані: агароза, вільна від РНКаз (Gibco BRL, США), агароза з високою роздільною здатністю “TopVision™ Agarose” (MBI Fermentas, Литва), етідію бромід, буфер для внесення зразків ДНК “5x Loading Dye”, буфер для внесення зразків РНК “2x RNA Loading Dye” маркер молекулярних мас ДНК “Gene ruler™ 50 bp DNA Ladder”, маркер молекулярних мас ДНК “Gene ruler™ 100 bp DNA Ladder”, маркер молекулярних мас ДНК “Gene ruler™ 1 kb DNA Ladder” (MBI Fermentas, Литва); буфер для електрофорезу ДНК (ТБЕ рН 8,0); 50-кратний буфер для електрофорезу РНК (1М MOPS, 50 мМ Na<sub>2</sub>-ЕДТА).

Для досліджень також використовували таке обладнання:

вимірювальні прилади: спектрофотометр Specord UV-Vis (KarlZeiss Jena, Німеччина), спектрофлюориметр Cary Eclipse (Varian, USA), спектрополяриметр J-810 (Jasco, Japan), ЯМР спектрометр Unity 500 (Varian, США), SAXS спектрометр SAXSpace system (Ashland, США)

-центрифуги: настільна центрифуга «MiniSpin®» (Eppendorf, Німеччина), центрифуга з охолодженням «5804R» (Eppendorf, Німеччина), мікроцентрифуга-вортекс «FV-2400» (Biosan, Латвія);

-термостати: електричний термостат сухоповітряний «ТС-80М-2» (Медлабортехніка, Україна), твердотільний термостат «Bio TDB-100» (Biosan, Латвія), твердотільний термостат-струшувач «Bio TS-100» (Biosan, Латвія), термостат-орбітальний струшувач S150 (Stuart, США), термоміксер EppendorfThermomixerComfort (Німеччина);

-обладнання для електрофорезу нуклеїнових кислот та електроперенесення: джерело живлення для електрофорезу «PowerPac Basic Power Supply», камеру для горизонтального електрофорезу «Wide Mini-Sub GT Cell» Bioanalyzer 2100 (Agilent, США);

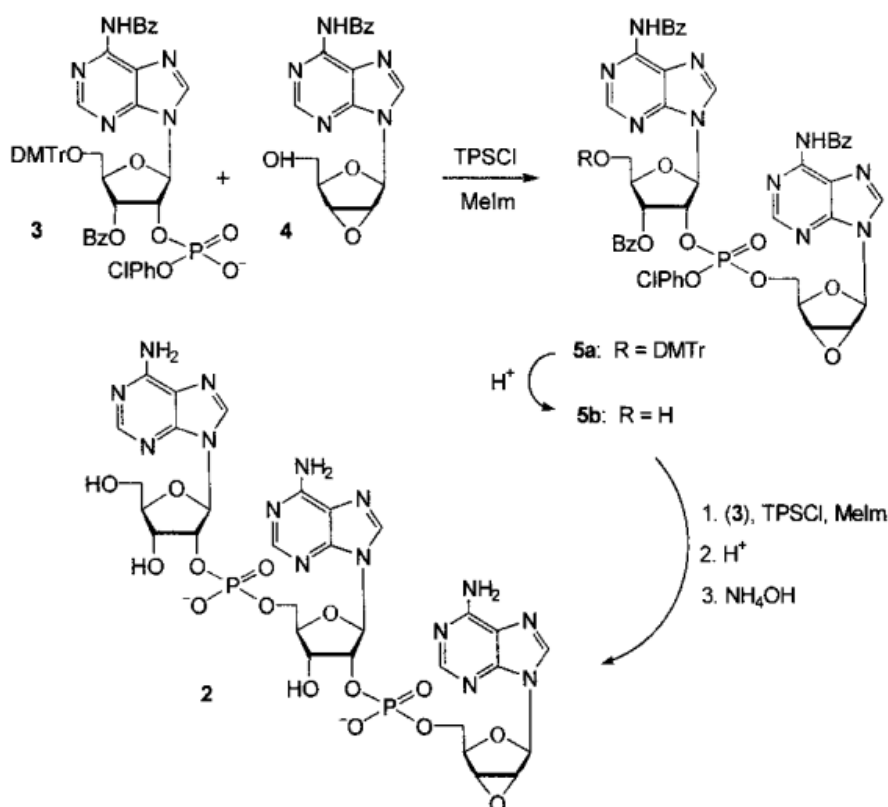
-обладнання для білкового електрофорезу та електроперенесення: джерело живлення для електрофорезу «PowerPac Basic Power Supply» (Biorad, США), камеру для вертикального електрофорезу Mini-PROTEAN Tetra Cell (Biorad, США);



-інше обладнання: магнітні мішалки з підігрівом «ММ6» (Polmed, Польща), рН-метр SevenExcellence pH Meter (Mettler Toledo, США).

## 2.3. Методи дослідження

**2.3.1. Хімічний синтез олігоаденілатів.** Синтез тримерів було проведено за описаною раніше схемою [186].



**Рис. 2.1.** Схема синтезу 3'-епоксимодифікованого 2'-5'-триаденілату. Bz – бензоїл, DMTr – диметокситритил, MeIm – N-метилімідазол, TPSCI – 2,4,6-триізопропілберзолсульфохлорид

Тример 2'-5'-A<sub>3</sub> отримано з сумарним виходом 26 % в розрахунку на вихідний ОН-компонент.

**2.3.2. Флуоресцентна спектроскопія.** Вимірювання спектрів флуоресценції проводили з допомогою приладу Cary Eclipse (Varian, USA).

Прилад було оснащено термостатованим кюветним відділенням, що дозволяло підтримувати сталу температуру протягом проведення дослідів, а саме 25°C за допомогою елементу Peltier, що використовувався для температурного контролю. Крім того, кюветне відділення дозволяло проводити вимірювання послідовно в 4 кюветах.

Для досліджень використовували кварцеві кювети (Sigma-Aldrich, США) з довжиною оптичного шляху 10 мм та максимальним об'ємом зразку 2500 мкл. Об'єм зразку – 8 мкМ розчину білка – становив 2000 мкл.

Флуоресценцію зразків збуджували на довжині хвилі 280 нм з допомогою ксенонової лампи L2482 (Hamamatsu Photonics Deutschland, Germany) та двопризмового монохроматору (M3, Poland). Інтенсивність сигналу емісії фіксували з допомогою скляного фільтру UG1 (Schott, Germany) з пропускною здатністю <1% та фотопомножувача (Hamamatsu Photonics Deutschland, Germany). Спектр емісії записували в діапазоні довжин хвиль 295-450 нм з кроком 0.5 нм. Час відповіді становив 2 секунди; прилад використовували у режимі високої чутливості.

Кожен спектр емісії флуоресценції записували 3 рази, після чого отримували усереднений кінцевий спектр для даного зразка.

Експеримент повторювали 3 рази, після чого визначали статистичну достовірність проведених дослідів.

Для досліджень, зразок ліофілізованого препарату білка S100A1 людини було розчинено в буфері, що містив Tris-HCl (20 мМ), NaCl (100 мМ), та ретельно перемішано. рН використаного в експериментах буферу складало 7.5. Отриманий розчин пропускали через стерильний мікрофільтр з діаметром пори 0.22 мкм та дегазували на спеціальному устаткуванні.

Для експериментів було використано 4 зразки з однаковою концентрацією, яка контролювалась спектрофотометрично, білку – 8 мкМ·л<sup>-1</sup>; 2 мл кожного з них поміщали в окремі кварцеві кювети (умовно назвемо їх a, b, c, d.). До розчинів, що містилися в кюветах a та b додавали по 20 мкл концентрованих розчинів олігоаденілатів – 2'-5'-A<sub>3</sub> та 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро відповідно –

до кінцевої концентрації приблизно  $8 \text{ мкМ} \cdot \text{л}^{-1}$ , розчини в кюветах с та d було використано в якості контрольних, тому замість олігоаденілатів до них додавали такі самі об'єми розчину буферу-розчинника, після чого всі 4 кювети інкубували при температурі  $25^\circ\text{C}$  протягом 30 хвилин, для досягнення рівноваги між зв'язаними та вільними молекулами білка та олігоаденілату.

Надалі розчини, що знаходилися в кюветах а, b та с титрувалися розчином  $\text{CaCl}_2$  (Sigma, Germany), вихідна концентрація якого складала 5 мМ. Розчин в кюветі с виступав в якості позитивного контролю та слугував для визначення величини константи зв'язування нативного S100A1 з йонами  $\text{Ca}^{2+}$ . Для цього, до зразків додавали по 1 мкл цього розчину до моменту насичення молекул S100A1 йонами  $\text{Ca}^{2+}$ . Розчин, що знаходився в кюветі d слугував в якості негативного контролю, з метою чого його титрували буфером, що використовувався в якості розчинника.

**2.3.3. Спектроскопія кругового дихроїзму.** Спектри кругового дихроїзму отримували з допомогою спектрополяриметра J-810 (Jasco, Japan). Перед ввімкненням та ініціалізацією приладу, через всі внутрішні компоненти останнього пропускали газ  $\text{N}_2$  під тиском 40 фунтів на квадратний дюйм (psi, rounds per square inch) протягом 10 хвилин. Таким чином створювалися умови, за яких інтенсивність потоку газу складала 450 л/год. Ця процедура проводилася для того, щоби видалити газ  $\text{O}_2$ , який поглинає світло у важливій для вимірювань ділянці спектру і, тому, перешкоджає отриманню повного спектру результатів, з внутрішніх компартментів приладу.

Кюветне відділення приладу було укомплектоване температурним елементом типу Peltier, що дозволяло підтримувати протягом проведення дослідів сталу температуру  $+25^\circ\text{C}$ . Для отримання спектрів КД використовували кварцові кювети (Hellma-Axiom, США) з довжиною оптичного шляху 2 мм та об'ємом 600 мкл максимум.

Зразки, використані для вимірювань, було приготовано наступним чином: ліофілізовані препарати білків S100A1 або S100B, масою приблизно 1 мг, розчиняли в 10 мл буферу наступного складу: Tris-HCl (5 мМ), NaCl (100 мМ),

ретельно перемішували, після чого рН буферу доводили до значення 7.5 з допомогою HCl. Об'єм досліджуваного препарату білку становив 200 мкл, а концентрація, значення якої контролювали спектрофотометрично, становила 8 мкМ.

Спектри КД було записано у діапазоні довжин хвиль від 205 нм до 300 нм з кроком у 0.5 нм зі швидкістю 20 нм/хв.; швидкість відгуку становила 8с, а ширина щілини становила 1 нм. Контрольний КД спектр буфера-розчинника було записано окремо, після його віднімали від спектру відповідного білкового препарату для отримання достовірних даних. Останнім кроком був перерахунок одиниць вимірювання величини із тих, якими оперує прилад, в одиниці молярної еліптичності  $\Theta$  - градус·см<sup>2</sup>·дециМоль (deg·см<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>) використовуючи наступну формулу:

$$[\theta]_{molar,\lambda} = \frac{1000 \lambda}{md}, \quad (1)$$

де  $[\Theta]_{molar,\lambda}$  – значення еліптичності (в градусах) при довжині хвилі  $\lambda$ ,  $m$  – значення молярної концентрації білка в розчині, а  $d$  – оптичний шлях кювети в сантиметрах.

**2.3.4. Обчислення відсоткового складу елементів вторинної структури в білкових зразках.** Для отримання числових показників елементів вторинної структури в білкових зразках, використовували числові дані, отримані методом КД спектроскопії – їх завантажували в програму CDNN (circular dichroism analysis using Neural Networks), доступну за наступним посиланням в мережі інтернет – <http://gerald-boehm.de/download/cdnn>.

Принцип роботи програми полягає на порівнянні КД спектру, завантаженого користувачем, з реферними білками, наявними в самій програмі. Важливо зауважити, що серед останніх присутні як альфа-спіральні, так і бета-складчасті білки. Після проведення процедури порівняння, програма видає числові значення елементів вторинної структури досліджуваного препарату білка –  $\alpha$ -спіралі,  $\beta$ -складки та невпорядковані елементи – у відсотках.

### **2.3.5. Визначення змін у вторинній структурі кальцій-зв'язуючих білків при взаємодії з коровим 2'-5'-А<sub>3</sub> методом інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є.**

ІЧ-Фур'є спектроскопія представляє собою один із варіантів методу ІЧ-спектроскопії. Завдяки здатності зворотнього перетворення Фур'є дана різновидність ІЧ-спектроскопії, має переваги, які відсутні при звичайній ІЧ-спектроскопії, серед яких в тому числі варто відзначити можливість фіксувати одночасно весь спектр, зменшити час реєстрації та співвідношення сигнал-шум, підвищити роздільну здатність, можливість вивчати конформаційні зміни біополімерів. Чутливість аналітичних визначень на фур'є-спектрометрі в 100-1000 разів вища, продуктивність в сотні разів більша, похибки вимірювань на порядок менші, ніж у випадку використання звичайних дисперсійних ІЧ-спектрометрів.

В роботі використовували розчини білків в концентраціях 10-4 М. Зразки знаходилися у 0,1 молярному NaCl. Для отримання спектрів 40 мкл зразку, який містив 80 мкг білку наносили на підложку, що представляла собою іртранове скло. Досліджуваному розчину давали висохнути, після чого записували спектри на приладі Bruker Tensor 37 (Німеччина). Комплекс білок та 2'-5'-А<sub>3</sub> вивчали в еквімолярних концентраціях.

**2.3.6. Метод ядерного магнітного резонансу.** Для запису ЯМР спектрів використовували спектрометр Unity 500 (Varian, США), який характеризується значенням <sup>1</sup>H резонансної частоти 500-606 мГц. Прилад було обладнано 3 каналами, z-градієнтною приставкою та потрійною вимірювальною головкою, здатною фіксувати значення резонансів ізотопів <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N з можливістю зворотної детекції.

Зразки для ЯМР готували шляхом розчинення 0.3 мМ <sup>15</sup>N-міченого білка S100A1 людини у буфері, що складався з H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90%/10%), 20мМ Tris-d11 та 150мМ NaCl. Всі спектри було записано при 25°C, а в якості зовнішнього непрямого контролю було використано розчин натрій-2,2,-диметил-2-сілапентан-5-сульфонат (DSS) з коефіцієнтами  $\xi = 0.251449530$  та  $\xi =$

0.101329118 для резонансних частот  $^{13}\text{C}$  та  $^{15}\text{N}$  відповідно [187]. Для того, щоб отримати дані про взаємодію апо-S100A1 та 2'-5'-A<sub>3</sub>, розчин білка титрувався концентрованим 130 мкМ розчином 2'-5'-A<sub>3</sub>, приготованим в тому самому буфері. Титрування білкового зразку проводили шляхом послідовного додавання невеликих об'ємів (10 мкл) олігоаденілату. Після кожного наступного додавання титранту записували двовимірний  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC спектр.

Для обробки даних ЯМР спектроскопії користувалися програмою NMR Pipe [188], а для їх аналізу – Sparky [189].

**2.3.7. Метод малокутового розсіювання рентгенівських променів.** Для вимірювань було використано прилад SAXSpace system (Ashland, США). Ліофілізований препарат S100A1 розчиняли в деіонізованій воді, при чому концентрація його складала 1 мг/мл. Під час вимірювань, зразки знаходилися в кварцових капілярах (Hampton Research, США) з діаметром 1 мм та товщиною зовнішньої стінки 0.01 мм.

Непопулярність даного методу викликана, скоріш за все, його відносною новизною та вартістю обладнання, необхідного для проведення відповідних вимірювань, змушує зупинитись на методологічних аспектах більш детально.

Не дивлячись на маловідомість даного методу, його часто застосовують для отримання деяких важливих параметрів, що характеризують слабкі взаємодії, найчастіше білок-білкові та білок-лігандні, при чому в останньому випадку в якості лігандів можуть виступати речовини різноманітної хімічної природи – нуклеїнові кислоти, невеликі хімічно синтезовані сполуки тощо [190].

Одразу після отримання даних SAXS з'являється можливість отримати значення так званих model-free (незалежних від моделі) параметрів, а саме радіусу гірації  $R_g$ , молекулярної маси системи ММ та так званого «виключеного об'єму»,  $V_p$ .

Найбільш відомим параметром є  $R_g$ , що характеризує середній розмір частинок в досліджуваному розчині. Для його розрахунку використовують так зване наближення Гуїнієра (Guinier):

$$I(s) = I(0)e^{-\frac{1}{3}R_g^2 s^2}, \quad (2)$$

де  $I(s)$  – інтенсивність розсіювання променів зразком,  $I(0)$  – інтенсивність розсіювання променів зразком за умови нульового значення кута розсіювання,  $R_g$  – радіус гірації,  $s^2$  – значення вектора розсіювання. Метод SAXS дозволяє визначити значення  $R_g$  з досить високою точністю – до декількох процентів.

Метод SAXS дозволяє визначити інший параметр – молекулярну масу систему (**ММ**), який, в тому числі, дозволяє дослідити олігомерний статус досліджуваної системи. Для його обчислення, значення прямого розсіювання досліджуваного білкового розчину порівнюють зі стандартним (еталонним) – найчастіше БСА. Даний параметр можливо визначити з допомогою наступної формули:

$$MM = I_p(0)/c_p \frac{MM_{stand}}{I_{stand(0)}/c_{stand}}, \quad (3)$$

де  $MM$  – молекулярна маса системи,  $I(0)$  – значення прямого розсіювання цільового білка,  $I_{stand(0)}$  – значення прямого розсіювання стандартного (еталонного) білка,  $c_p$  – вагова концентрація цільового білка в  $mg \cdot ml^{-1}$ ,  $c_{stand}$  – вагова концентрація стандартного білка в  $mg \cdot ml^{-1}$ , а  $MM_{stand}$  – молекулярна вага стандартного білка.

### **2.3.8. Визначення впливу олігоаденілатів на активність протеїнкіназ.**

Здатність олігоаденілатів впливати на активність кіназ було досліджено з використанням методу *in vitro*, описанного раніше [191]. Кожен тест було повторено тричі в реакційному об'ємі 30 мкл, що містив 6 мкг пептидного субстрату СК-tide RRREEETEEE (New England Biolabs, США), 10 одиниць рекомбінантної протеїнкінази Аврора (Aurora) (New England Biolabs, США), 50 мкМ аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ) та 0.05-0.1 мкКі  $\gamma$ -міченого  $^{32}P$  АТФ. Кінцева специфічна активність міченого АТФ 3000 мкКі/мМ. Буфер, що слугував в якості розчинника для протеїнкінази Аврора та олігоаденілатів, мав наступний склад: 20 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 50 мкМ KCl та 10 мкМ MgCl<sub>2</sub>. Час інкубації складав 20 хв при 30°C. Протікання реакції зупиняли шляхом додавання відповідного об'єму 10% о-фосфорної кислоти, після чого реактивний розчин було нанесено на 20 мм диск фосфоцеллюлозного паперу

(Whatman). Диски промивали тричі 1 відсотковим розчином о-фосфорної кислоти, висушували при кімнатній температурі та проаналізовано за методом Черенкова в сцинтиляційному детекторі (LKB). В якості негативного до реактивної суміші додавали рівний об'єм DMSO. Відсоток інгібування обчислювали як співвідношення радіоактивності в присутності інгібітору до радіоактивності в контрольному досліді, тобто за відсутності інгібітору. Для визначення величини концентрації  $IC_{50}$  використовували серію розведень стокового розчину інгібітору. Величина  $IC_{50}$ , визначена нами, представляє собою середнє значення 3 незалежно визначених значень цього параметру.

Визначення специфічності проводилися на згідно рекомендації виробника ліофілізованого препарату протеїнкінази Аврора (Millipore). Залишкова активність кіназ, визначена в присутності 10 мкМ олігоаденілату, виражено у вигляді відсотку від контролю без інгібітору. Кінцева концентрація АТФ в досліді складала 100 мкМ.

**2.3.9. Комп'ютерне моделювання (докінг) взаємодії білків S100A1, S100B та протеїнкінази Аврора з олігоаденілатами.** Для підготовки молекули ліганду (в нашому випадку в якості такої слугувала молекула олігоаденілату) використовували програму AutoDockTools (ADT), доступну на сайті розробників <http://mgltools.scripps.edu/downloads>. Молекулу дефосфорильованого 2'-5'A<sub>3</sub> було згенеровано в програмі ChemDoodle3D, доступну за наступним посиланням <https://www.chemdoodle.com/features/3d/>. Молекулу ліганду завантажували в ADT, де її програмно редагували шляхом додавання атомів водню та деяких інших операцій, після чого молекулу ліганду зберігали в форматі PDBQT.

Подібну процедуру було проведено для молекул рецепторів, 3D структури яких було завантажено з веб-сайту [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) (pdb-код апо-S100A1 – 2LP3, S100B – 2K70, Protein Kinase Aurora-A – 1MQ4) та відкривали в ADT. До молекули рецептора додавали атоми водню, заряди, визначали заряди в одиницях, що використовуються програмою, типи атомів.



Для докінгу використовували метод «Single docking experiment with AutoDock Vina», який слугує в якості базового методу для докінгу одичної молекули ліганду в структуру рецептора. Для візуалізації результатів докінгу використовували програму PyMol, доступну за посиланням: <https://pymol.org/2/>.

**2.3.10. Дослідження структурних змін в терапевтичних препаратах РНК, створених на основі олігоаденілатів, при нагіванні.** Для дослідів було використано декілька препаратів РНК, а саме: 1 (RNA) – гетерогенна фракція дріжджової РНК, довжиною, в середньому,  $25 \pm 2$  основ, 2 (3% препарат тотальної дріжджової РНЕ) – внутрішньовенна форма препарату 1 та 3 (Nuclex) – високо очищена, гомогенна форма препарату 1 у комплексі з манітолом в капсулах.

Водні розчини вищеописаних препаратів, з кінцевою концентрацією РНК 1 мг/мл, було піддано поступовому нагіванню від 25 до 60-70°C зі швидкістю 1°C/хв. Зміни деяких параметрів, що відбувались протягом нагівання детектували двома методами – спектрофотометрично та з допомогою приладу, здатного фіксувати зміни середнього розміру частинок, представлених в досліджуваному розчині.

Спектрофотометричне плавлення проводили на приладі Specord UV-Vis (KarlZeiss Jena, Німеччина). Водний розчин досліджуваної РНК концентрацією 1 мг/мл знаходився в термостійкій кварцовій кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм. Температуру розчину в кюветі фіксували з допомогою саморобної термопари, яку попередньо калібрували.

Визначення розміру частинок у розчині проводили на приладі Nano system (Zetasizer, Об'єднане Королівство). Досліджуваний розчин знаходився в термостійкій кварцовій кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм. Прилад було оснащено термостатованим кюветним відділенням з можливістю програмного контролю та фіксації температури.

### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження особливостей взаємодії дефосфорильованих 2'-5'-триаденілатів з білком S100A1 людини проводилося за наступною схемою: вивчення змін вторинної структури білків S100A1 та S100B внаслідок зв'язування з природним та епоксі-модифікованим 2'-5'-A<sub>3</sub>, методами КД та FTIR спектроскопії; із застосуванням методу двовимірного ЯМР, виявлення амінокислотних залишків білка S100A1, хімічні зсуви яких, при взаємодії з 2'-5'-A<sub>3</sub>, змінюються найсильніше; оцінка зміни міжатомних відстаней в межах білка S100A1 внаслідок зв'язування з 2'-5'-A<sub>3</sub> методом SAXS; виявлення змін Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючої активності білка S100A1 при зв'язуванні з 2'-5'-A<sub>3</sub>.

#### 3.1. Експресія, виділення та очистка рекомбінантного білка S100A1

Штучно створений ген, що кодує амінокислотну послідовність S100A1, було отримано від колег з відділу біохімії і біофізики інституту біохімії і біофізики польської академії наук та клоновано в вектор pET-30a(+), що дозволило відібрати трансформовані клітини, що показували стійкість до антибіотику канаміцину.

Експресію та очистку рекомбінантного білка S100A1 проводили за розробленою раніше методикою [192]. Для надекспресії рекомбінантний білків використовували клітини *E. coli* штаму BL21(DE3). Суспензію бактеріальних клітин (100 мкл, OD<sub>600</sub>=0.3) трансформували 1 мікролітром очищеної плазмідної концентрацією 21 нг/мкл. Клітини інкубували на льодяній бані протягом 10 хв. Далі застосовували метод теплового шоку – клітини інкубували 2 хв при температурі +42°C, після чого клітини інкубували ще 5 хв. на льодяній бані. Після цього, до суспензії клітин додавали 900 мкл рідкого поживного середовища Лурія-Бертані (Luria-Bertani) LB, 1 л якого містив 950 мл H<sub>2</sub>O, 10 г триптон, 10 г хлориду натрію та 5 г дріжджового екстракту, pH=7.4, після чого

клітини інкубували при 37°C протягом 60 хв на термостатованій качалці Thermomixer R (Thomas Scientific, США). Попередньо вирощені таким чином клітини було висіяно методом виснажуючого штриха на чашки Петрі з твердим поживним середовищем LB, 1 л якого містив 950 мл H<sub>2</sub>O, 10 г триптон, 10 г хлориду натрію, 15 г агару, 5 г дріжджового екстракту та 50 мкг/мл антибіотику канаміцину, рН=7.4. Висіяні таким методом клітини нарощували протягом 14 годин в електричному сухоповітряному термостаті «ТС-80М-2» (Медлабортехніка, Україна) при 37°C.

В подальшому, одиничну трансформовану колонію інокулювали в 100 мл рідкого LB з додаванням 50 мкг/мл канаміцину та інкубували при 37°C протягом 16 годин в орбітальному термостаті S150 (Stuart, США), після чого 5 мл клітинної культури інокулювали в 1 л рідкого LB з додаванням 50 мкг/мл канаміцину. Клітини нарощували протягом 2 годин до моменту досягнення культурою світлорозсіювання OD<sub>600</sub> значення 0.5. Експресію рекомбінантних білків індукували за допомогою водного розчину ізопропіл β-D-1-тіогалактопіранозиду, який додавали до культури до кінцевої концентрації 1мМ. Після початку індукції культуру нарощували протягом 3 години.

Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням при 5 000 g при +4°C 10 хв, після чого позбувалися від надосадової рідини, а осадки заморожували при -20°C.

До осадів бактеріальних клітин, отриманих з 2 л культури, додавали 30 мл лізис буферу, яких мав наступний склад – 30 мМ Tris-HCl, рН 8.0, 150 мМ NaCl, 1мМ EGTA, 5 мМ DTT та 0.5 мг/мл лізоциму, після чого використовували ультразвуковий сонікатор Ultrasonic Homogenizer 150V/60Hz (BioLogics, США) протягом 2 хвилин з циклами сонікування/пауза – 2 с/0.5 с. Бактеріальні лізати було висвітлено центрифугуванням протягом 30 хв. при 15 000 g. на центрифусі з охолодженням «5804R» (Eppendorf, Німеччина) при +4°C.

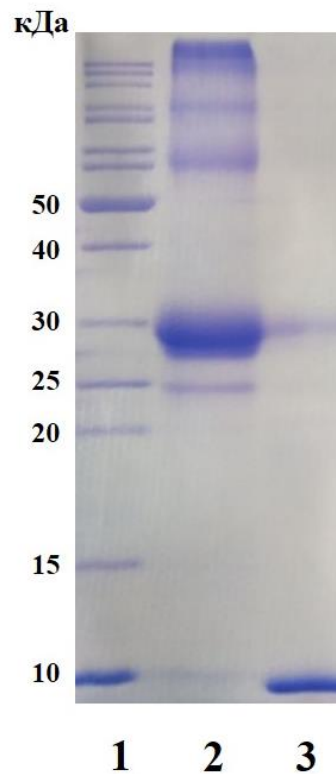
До надосадової рідини додавали 16.8 г сульфату амонію (80% насичення) та ставили на магнітну мішалку на 40 хвилин на льодяній бані. Далі розчин

центрифугували при 15 000 g. протягом 30 хв при +4°C. рН надосадової рідини доводили до 4.0 з допомогою 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. В умовах такого значення рН, білки S100A1 та S100B випадають в осад. Розчин перемішували ще 40 хв на магнітній мішалці на льодяній бані, після чого його центрифугували при 15 000 g протягом 30 хв. при +4°C, надосадової рідини позбувалися. Осад ресуспендували в буфері для промивки наступного складу 25 мМ імідазолу, рН 7.7, 200 мМ NaCl, 5мМ DTT та 10 мМ CaCl<sub>2</sub>.

Наступним етапом була первинна очистка рекомбінантного білка з допомогою феніл-сефарози CL-4В (Sigma, Німеччина) принцип якої полягає в здатності гідрофобних білків зав'язуватися з останньою в присутності йонів Ca<sup>2+</sup>, після чого проводять їх елюцію буфером з EGTA. 5 мл останньої завантажували в колонку та промивали 25 мл H<sub>2</sub>O, а потім 25 мл буфера для промивки. Білковий екстракт пропускали через колонку та промивали колонку 20 об'ємами буферу для промивки, після чого проводили другу промивку тим самим буфером з концентрацією CaCl<sub>2</sub> 1 мМ. Білок елюювали буфером для промивки + 2 мМ EGTA. Елюйовані фракції аналізували шляхом вимірювання OD<sub>280</sub> з урахуванням коефіцієнту екстинції  $\epsilon_{280} = 10026 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Наступним етапом очистки білка була оберненофазова рідинна хроматографія (HPLC). Для цього використовували 2 буферних розчина – буфер А – 0.1% TFA (Merck) в H<sub>2</sub>O та буфер В – 0.1% TFA, 10% H<sub>2</sub>O, 90% CH<sub>3</sub>CN (Lab-Scan), які було використано як для аналітичного так і для препаративного розділення на 3.9×150-мм колонці Vydac C-18 з використанням приладу HPLC System (Waters, Milford, MA).

Після хроматографічного розділення, фракції, що містили цільові білки, було змішано, розведено водою та ліофілізовано за допомогою приладу LyoQuest (Telstar, Іспанія) для подальшого зберігання при кімнатній температурі.

Наявність цільового білка S100A1 у фракціях після хроматографії та чистоту отриманих препаратів підтверджували за допомогою SDS-поліакриламідного гелю електрофорезу (рис. 3.1).



**Рис. 3.1.** Електрофоретичний контроль чистоти отриманого білкового препарату. 1 – білковий маркер, 2 – препарат рекомбінантного білка EGFP, 3 – препарат рекомбінантного білка S100A1

**Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

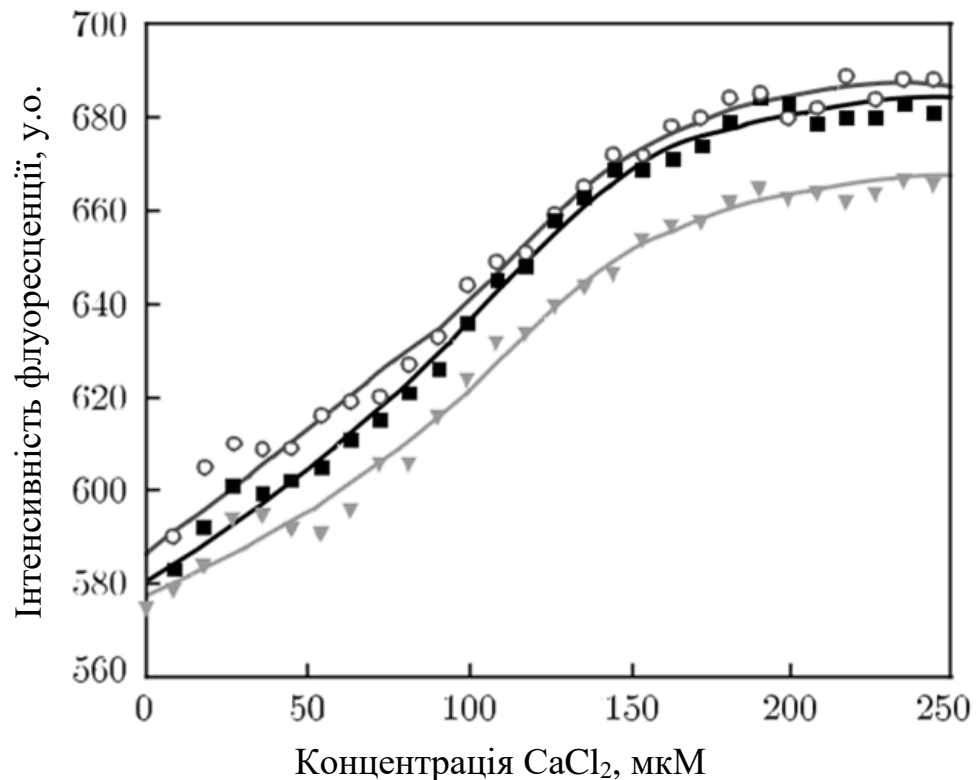
1. **Скоробогатов О. Ю.**, Жуков О. Ю., Ткачук З. Ю. Структурні механізми взаємодії дефосфорильованих 2'- 5'- триаденілатів з білком S100A1 // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2020. – № 1. – С. 89-94.
2. **Skorobogatov OY**, Kukharenko AP, Kozlov OV, Dubey IY and Tkachuk ZY. 2'-5'-Linked Triadenylates Act as Protein Kinase Activity Modulators // Journal of Proteomics & Bioinformatics. – 2017. – Vol. 10, №12. – P. 320-323.
3. **О. Ю. Скоробогатов**, І.Ю. Жуков, З.Ю. Ткачук. 2',5'-олігоаденілати змінюють вторинну структуру та функціональну активність білка S100A1 людини // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2015. – № 3. – С. 157-160.

4. **Skorobogatov O. Yu.**, Lozhko D. N., Zhukov I. Yu., Kozlov O. V., Tkachuk Z. Yu. Study of dephosphorylated 2'-5'-linked oligoadenylates impact on apo-S100A1 protein conformation by heteronuclear NMR and circular dichroism. // *Biopolym. Cell.* – 2014. – Vol. 30, № 4. – P. 279-285.

### **3.2. Вивчення впливу 2'-5'-A<sub>3</sub> та 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро на значення константи асоціації білка S100A1 із іонами Ca<sup>2+</sup> методом флюоресцентної спектроскопії**

Метод флюоресцентної спектроскопії дозволяє встановити закономірності змін інтенсивності флуоресценції хромофору (в нашому випадку залишку триптофану 90) при взаємодії білка з лігандом. В цій роботі дану методику було застосовано з метою визначення впливу 2'-5'-A<sub>3</sub> та 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро на величину константи асоціації S100A1-Ca<sup>2+</sup>.

В результаті проведених дослідів виявилось, що при додаванні іонів Ca<sup>2+</sup> до розчину білка S100A1 відбувається підвищення інтенсивності флуоресценції ароматичних амінокислотних залишків (головним чином Trp 90), що пояснюється суттєвими конформаційними перебудовами, в результаті яких білкова глобула, представлена гомодимером субодиниць S100A1, частково розплітається, вивільнюючи при цьому гідрофобну ділянку, яка містить залишки ароматичних амінокислот. Інтенсивність флуоресценції білка підвищується в результаті збільшення площі поверхні ароматичних залишків, що контактує з розчинником. Відомо, що білок S100A1 не має високої спорідненості до йонів двовалентного кальцію у порівнянні, наприклад, з кальмодуліном. Титрування протеїна S100A1 розчином CaCl<sub>2</sub> призводить до поступового росту інтенсивності флуоресценції, причому крива насичення не має яскраво вираженої сигмоїдальної форми (рис. 3.2).

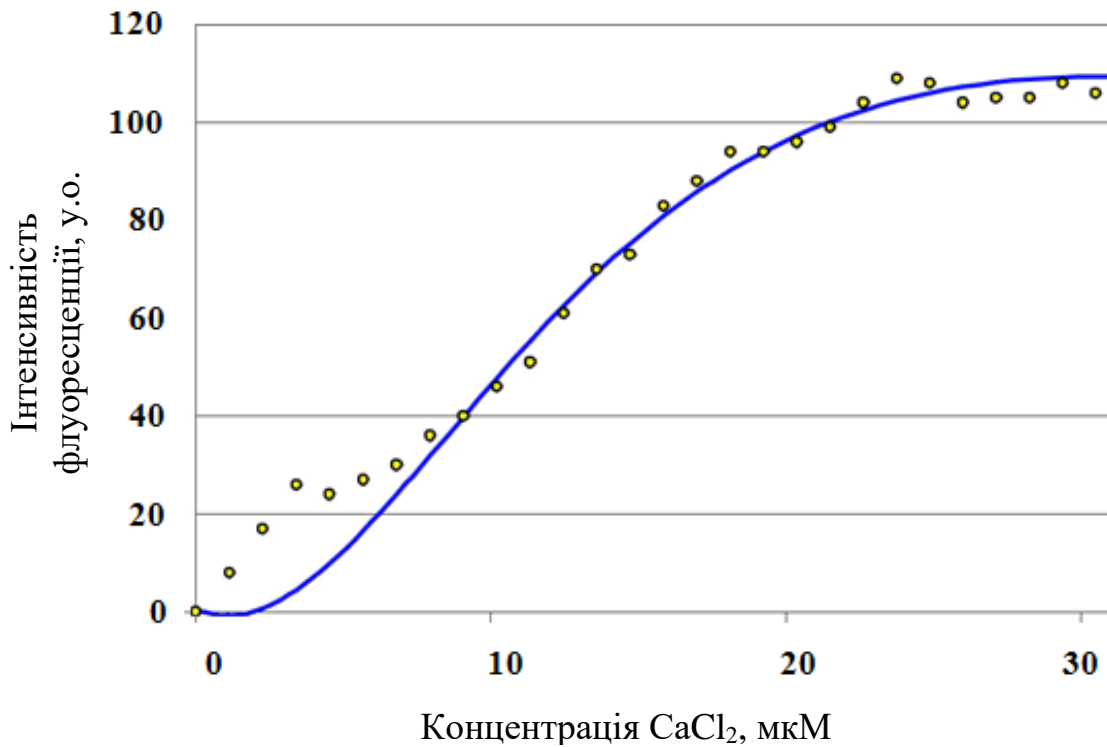


**Рис. 3.2.** Криві титрування білка S100A1 (■) розчином CaCl<sub>2</sub> в присутності 2'-5'-A<sub>3</sub> (▼) та 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро (○). Концентрації білка S100A1 та відповідного олігоаденілату в розчині становили 8 мкМ

На рисунках 3.3, 3.4 та 3.5 приведені криві титрування білка S100A1 та сумішей S100A1 з 2'-5'-A<sub>3</sub> та 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро відповідно. Механічні суміші білка з олігоаденілатами було інкубовано протягом 15 хвилин безпосередньо перед проведенням вимірів, завдяки чому вдалося досягти рівноваги між популяціями вільних та зв'язаних з олігоаденілатом молекул білка S100A1.

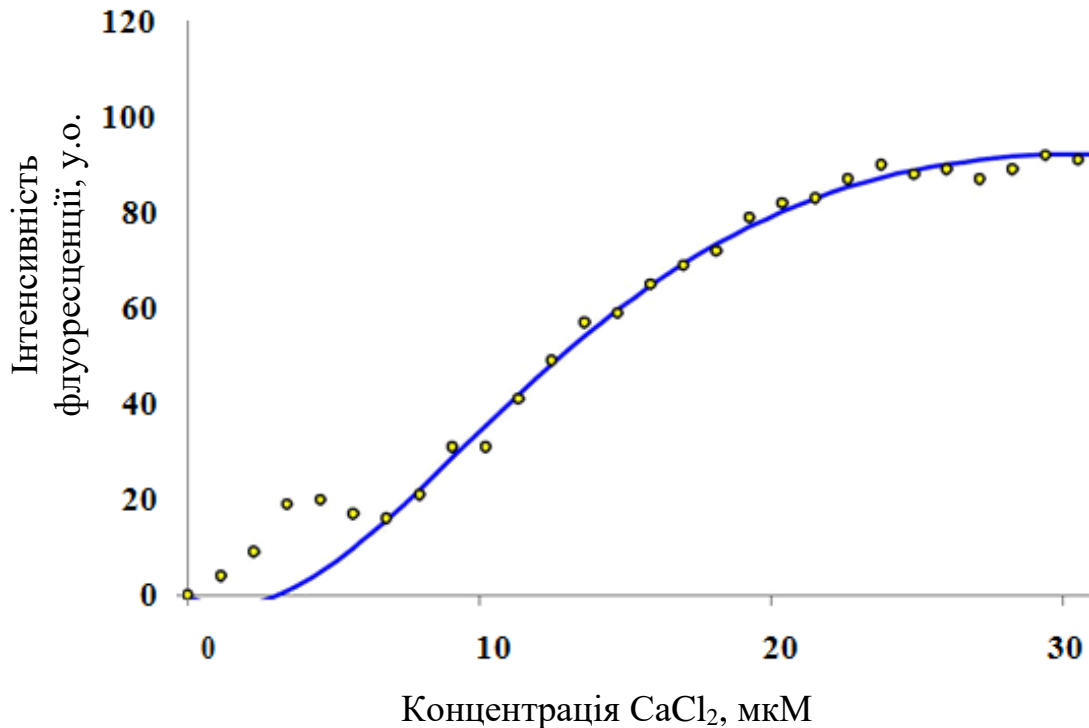
Як видно з рисунку, досліджувані олігоаденілати не змінювали суттєво форму кривої насичення білка S100A1 йонами двовалентного кальцію. Зважаючи на це, ми висунули припущення, що значення констант дисоціації S100A1-2'-5'-A<sub>3</sub> та S100A1-2'-5'-A<sub>3</sub>-еро також не зазнали суттєвих змін.





**Рис. 3.3.** Середина крива титрування білка S100A1 розчином CaCl<sub>2</sub>

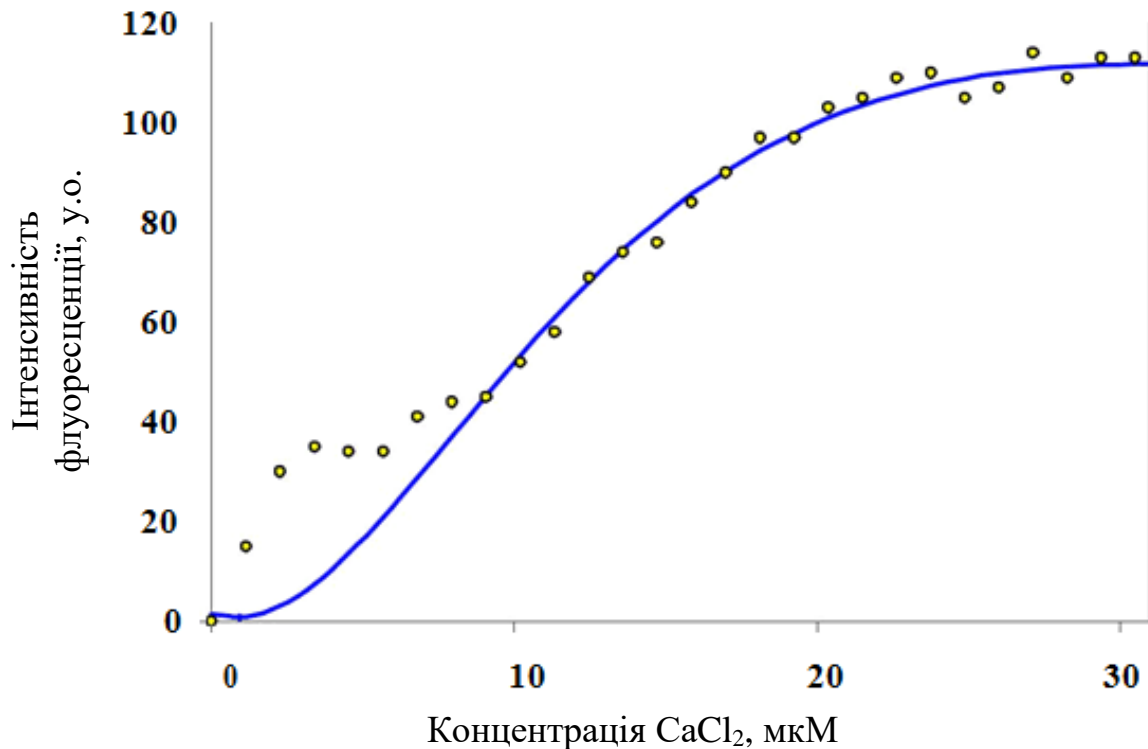
Більш детальний погляд на криві титрування окремих досліджуваних зразків дає змогу виявити наявність невеликого плеча при досягненні концентрації йонами Ca<sup>2+</sup> позначки приблизно 25 мкМ. Скоріш за все, його появу можливо пояснити конформаційними змінами, внаслідок яких здійснюється значний вплив досліджуваного аденілату на певний ароматичний амінокислотній залишок, безперешкодному світінню якого в подальшому заважають наступні зміни структури глобули така картина спостерігається аж до насичення молекул S100A1 йонами кальцію, що призводить до поступового зникнення плеча на кривій титрування.



**Рис. 3.4.** Серединна крива титрування білка S100A1 розчином CaCl<sub>2</sub> в присутності 2'-5'-A<sub>3</sub>

Вихід кривої насичення на «плато» відображає момент насичення обох Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючих EF-мотивів в складі гомодимеру S100A1 йонами Ca<sup>2+</sup>, та припинення виникнення конформаційних змін, які виникли при переході молекули білка в «розгорнутий» стан (holo-S100A1).

Отже, для переходу з апо-форми в holo-форму, білок S100A1 має зв'язати певну кількість йонів Ca<sup>2+</sup>, що опосередковано характеризується значенням константи асоціації. В результаті проведення розрахунків, вдалося встановити величини констант асоціації для 3 досліджених нами зразків S100A1, S100A1+2'-5'-A<sub>3</sub> та S100A1+2'-5'-A<sub>3</sub>-еро.



**Рис. 3.5.** Серединна крива титрування білка S100A1 розчином CaCl<sub>2</sub> в присутності 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро

В результаті проведених вимірювань та розрахунків вдалося встановити, що процес зв'язування йонів двовалентного кальцію білком S100A1 характеризується константою асоціації  $K_{a[1]} = 9 \cdot 10^3 \pm 0,52 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ , що свідчить про низько афінне (низькоспецифічне) зв'язування білка з йонами кальцію. Зразок S100A1, котрий було преінкубовано з еквімолярною кількістю 2'-5'-A<sub>3</sub>, зв'язував йони кальцію з меншою афінністю, що характеризувалася меншим значенням константи асоціації  $K_{a[2]} = 88 \cdot 10^3 \pm 0,36 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ , іншими словами, для насичення усіх EF-мотивів мотивів в розчині має бути присутня більша кількість вільних йонів Ca<sup>2+</sup>. Третій зразок S100A1, преінкубований з 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро, зв'язував йони кальцію з більшою афінністю,  $K_{a[3]} = 9,8 \cdot 10^3 \pm 0,78 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ , тобто у цьому випадку для насичення усіх центрів зв'язування необхідна більша кількість вільних йонів Ca<sup>2+</sup>. Отримані значення констант афінності наведено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

**Значення констант асоціації S100A1 та йонів Ca<sup>2+</sup> в апо-формі в присутності та за умов відсутності 2'-5'-A<sub>3</sub>**

Зразок	Значення константи асоціації S100A1 та Ca <sup>2+</sup> , M <sup>-1</sup>
S100A1	$9 \cdot 10^3 \pm 0.52 \cdot 10^3$
S100A1+2'-5'-A <sub>3</sub>	$8.8 \cdot 10^3 \pm 0.36 \cdot 10^3$
S100A1+2'-5'-A <sub>3</sub> -epo	$9.8 \cdot 10^3 \pm 0.78 \cdot 10^3$

Дані експерименти показали, що 2'-5'-A<sub>3</sub> суттєво не впливає на спорідненість іонів кальцію до гомодимеру S100A1, причому вплив немодифікованого 2'-5'-A<sub>3</sub> характеризується зниженням спорідненості іонів Ca<sup>2+</sup> до білка S100A1 на  $0.2 \cdot 10^3$ , що є статистично недостовірним, враховуючи похибку  $\pm 0.36 \cdot 10^3$ . Епоксі модифікований аналог 2'-5'-A<sub>3</sub> підвищує константу асоціації на  $0.8 \cdot 10^3$  у порівнянні з білком без додавання титрантів, що є статистично достовірним, враховуючи похибку  $\pm 0.78 \cdot 10^3$ .

**Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. **Скоробогатов О. Ю., Жуков О. Ю., Ткачук З. Ю.** Структурні механізми взаємодії дефосфорильованих 2'- 5'- триаденілатів з білком S100A1 // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2020. – № 1. – С. 89-94.
2. **О. Ю. Скоробогатов, І.Ю. Жуков, З.Ю. Ткачук.** 2',5'-олігоаденілати змінюють вторинну структуру та функціональну активність білка S100A1 людини // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2015. – № 3. – С. 157-160.
3. **Skorobogatov O. Yu., Lozhko D. N., Zhukov I. Yu., Kozlov O. V., Tkachuk Z. Yu.** Study of dephosphorylated 2'-5'-linked oligoadenylates impact on apo-S100A1 protein conformation by heteronuclear NMR and circular dichroism. // Biopolym. Cell. – 2014. – Vol. 30, № 4. – P. 279-285.

4. **О. Ю.Скоробагатов**, І.Ю.Жуков, З.Ю.Ткачук. Вивчення взаємодії дефосфорильованого 2'-5'-триаденілату з протеїном S100A1 людини. Матеріали XII українського біохімічного конгресу, Медична та клінічна хімія. – Тернопіль, Україна. – 2019. – Т. 21, №3. – С. 45.
5. **Skorobogatov Oleksandr Yu.**, Gajda M., Zhukov Igor Yu., Tkachuk Zenoviy Yu. Study on 2'-5'A3 binding to human protein S100A1 // Abstracts of IX Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. – 2015. – Vol. 31 (Special Issue). – P. 11.
6. **O. Skorobogatov**, I. Zhukov, O. Kozlov, P. Gajda, Z. Tkachuk. 2'-5'-linked oligoadenylates alter the conformation of human S100A1 protein and its functional profile // Abstracts of Conference for Young Scientists. - Kiev, Ukraine. – 2015. – P.35.
7. **Oleksandr Skorobogatov**, Igor Zhukov and Zenoviy Tkachuk. 2'-5'a3 and its analogue alter s100a1 conformation and Ca<sup>2+</sup> binding profile // Book of abstarcts of Young Scientists Forum. FEBS. – Saint Petersburg, Russia. – 2013. – P.114.

### 3.3. Дослідження змін відсоткового складу елементів вторинної структури білка S100A1 внаслідок взаємодії 2'-5'-A3 та 2'-5'-A3-еро

Метод кругового дихроїзму дозволяє отримати дані щодо змін вторинної структури біомакромолекул при їх взаємодії між собою та з різноманітними лігандами. В якості лігандів в проведених експериментах слугували 2'-5'-A<sub>3</sub> та 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро. Важливо, що для проведення експерименту з *holo*-формою (насиченою йонами Ca<sup>2+</sup>) білка S100A1, в розчин білка було додано розчин CaCl<sub>2</sub> до кінцевої концентрації 8 мкМ.

КД спектри апо-форм білків S100A1 та S100B, записані в області довжин хвиль 260-200 нм, характеризувалися двома мінімумами - при 222 нм та 208 нм, що є типовим для білків, серед елементів вторинної структури яких присутні, головним чином, альфа-спіральні домени [87]. Як було показано раніше, тривимірна структура білків S100A1 та S100B представлена 4 довгими альфа-спіралями та двома антипаралельними бета-складками в С-кінцевій частині обох Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючих петель [8].

З прешого ж погляду на отримані спектри стає очевидним той факт, що вторинна структура білка S100A1 як в формі *apo* так і в *holo* характеризується переважно альфа спіральними елементами, про що свідчить наявність 2 характерних мінімумів на довжинах хвиль 222 нм та 208 нм (рис. 3.6, 3.7). Відомо, що приблизно 55% білкової глобули складається з альфа-спіральних елементів, в той час як бета-складчасті та неупорядковані складають лиш приблизно 45% [24].

Порівняння спектрів білка за умов відсутності олігоаденілату в умовах присутності та відсутності йонів Ca<sup>2+</sup> (*holo*- та *apo*-форми відповідно) дає загальну уяву про структурні перебудови, що відбуваються при насиченні активних центрів білку йонами Ca<sup>2+</sup>. Виявляється, що значення різниці поглинання поляризованого світла на довжинах хвиль 222 нм та 208 радикальним чином змінюється: в *apo* формі, значення поглинання на 208

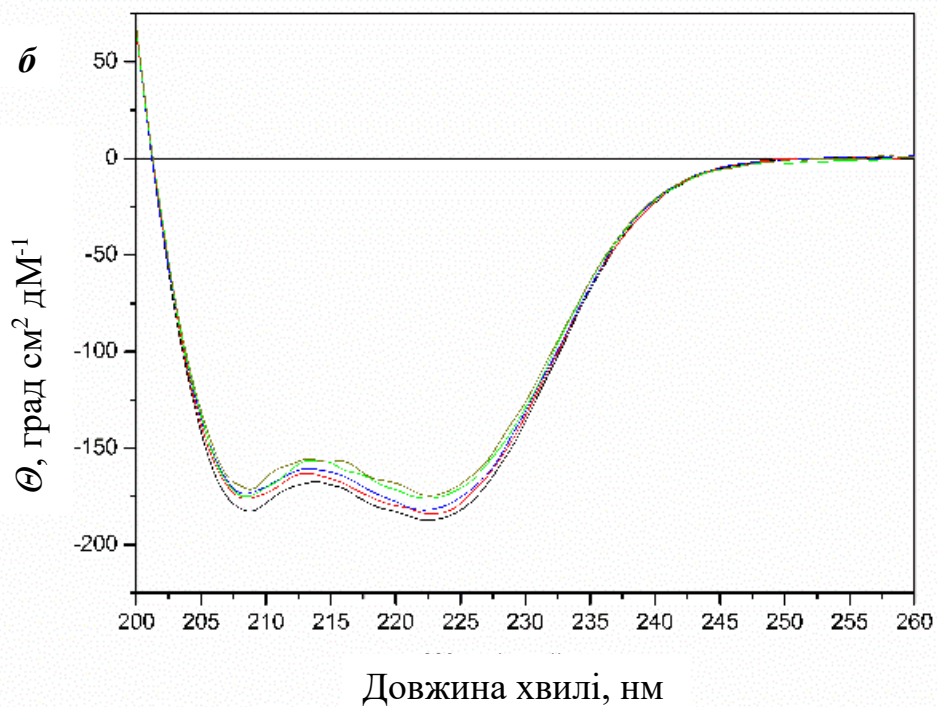
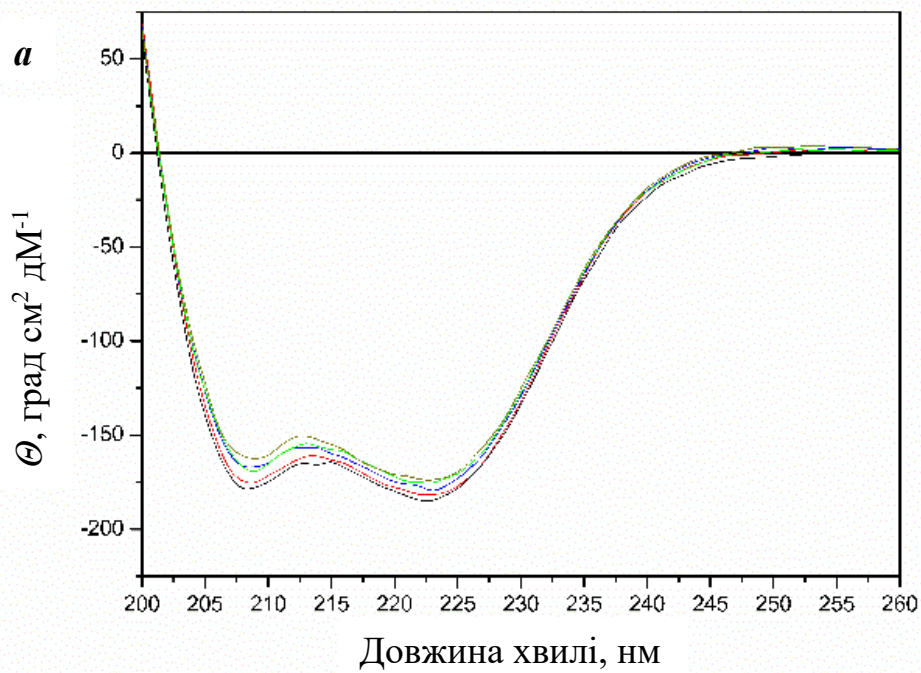
менше за таке на 222, в той час як в *holo* формі значення поглинання на 208 більше за таке на 222.

Візуальний аналіз отриманих спектрів свідчить про те, що зі збільшенням концентрації 2'-5'-A<sub>3</sub> в досліджуваному розчині білка S100A1, як в *apo* так і в *holo* формах, поглинання препаратом поляризованого світла поступово зменшується. Найбільш очевидним поясненням такого ефекту може слугувати банальне розчинення, яке так або інакше виникає при додаванні до вихідного розчину будь-якого титранту (рис. 3.6, 3.7).

Власне з цією метою було проведено дослід, який би підтвердив або ж дозволив відкинути таке припущення. Розчин білка титрувався буфером, в якому було розчинено титрант. Виявилось, що при звичайному розчиненні білкового препарату спостерігаються зміни КД спектрів зовсім іншого характеру: величина поглинання на довжинах хвиль обидвох характерних мінімумів – 208 нм та 222 нм – знижується одночасно та на одну і ту саму величину.

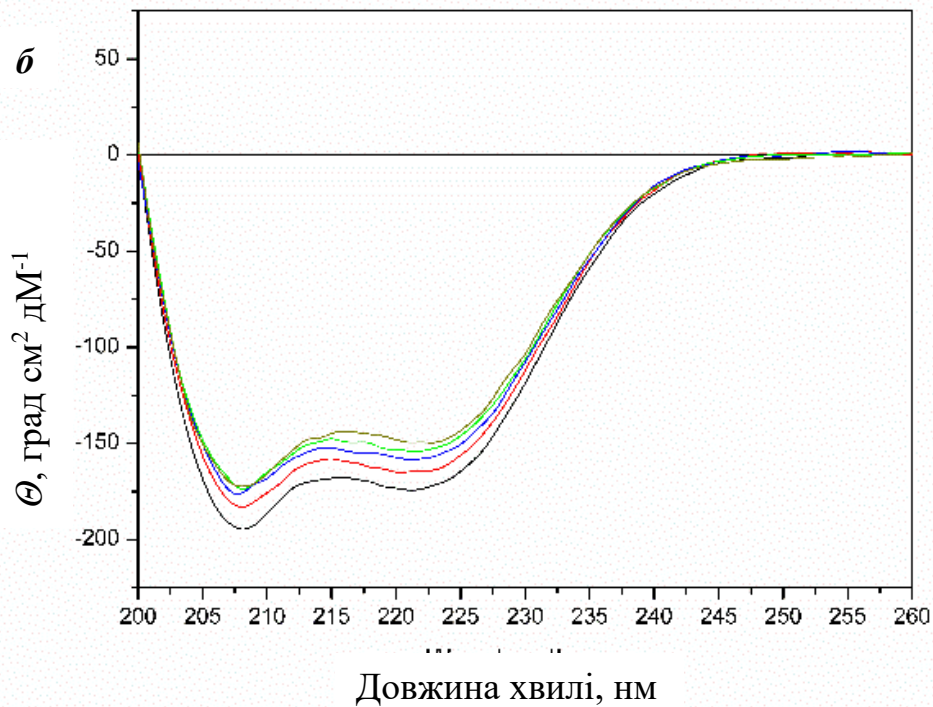
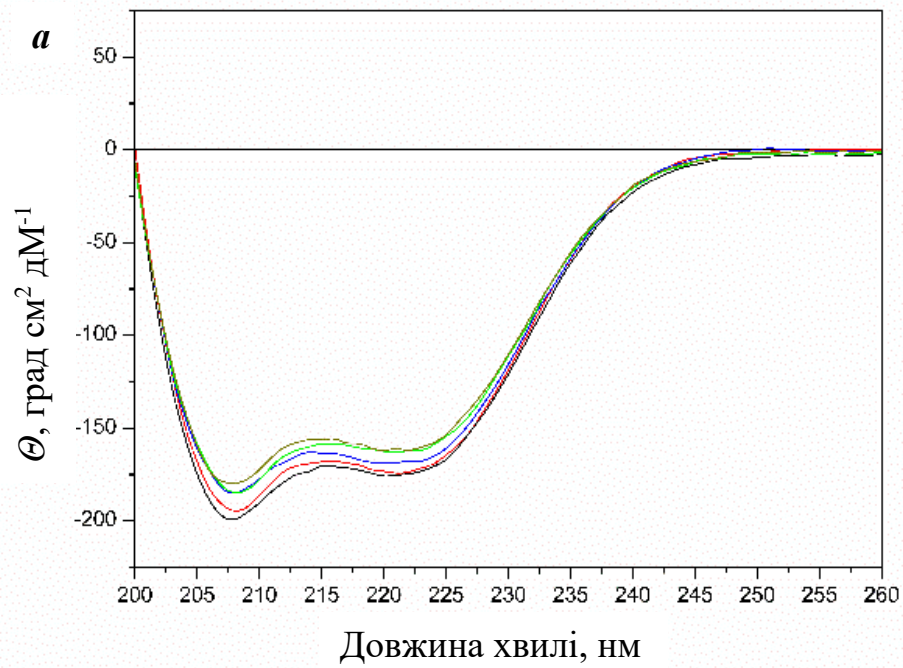
Отримані спектри було проаналізовано з використанням програми CDNN, в результаті чого вдалося визначити, яким саме чином змінюється кількісний склад елементів вторинної структури білка S100A1 при взаємодії з 2'-5'-A<sub>3</sub> та 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро за умов присутності та відсутності в реакційній суміші йонів Ca<sup>2+</sup> (таблиця 3.2).

Перше, на що варто звернути увагу – різниця в процентному співвідношенні між елементами вторинної структури при переході від форми, вільної від йонів Ca<sup>2+</sup> до Ca<sup>2+</sup>-зв'язаної форми білка S100A1. Як видно, процент альфа спіральних елементів в *apo*-формі білка складає приблизно 55%, в той час як вільна від йонів Ca<sup>2+</sup> форма білка містить лише 31,4% альфа спіральних елементів. Очевидно, що це спричинено суттєвими конформаційними змінами, що відбуваються при переході у відкриту, Ca<sup>2+</sup>-зв'язану форму.



**Рис. 3.6.** КД спектри білка S100A1-аро (чорна крива) в концентрації 8 мкМ та його комплексів з 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро (а) та 2'-5'-A<sub>3</sub> (б). Кольорові криві відповідають комплексам білку з відповідним олігоаденілатом у концентрації 8 мкМ (червона крива), 24 мкМ (синя крива), 40 мкМ (зелена крива) та 56 мкМ (темно-жовта крива)





**Рис. 3.7.** КД спектри білка S100A1-holo (чорна крива) в концентрації 8 мкМ та його комплексів з 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро (а) та 2'-5'-A<sub>3</sub> (б). Кольорові криві відповідають комплексам білка з відповідним олігоаденілатом у концентрації 8 мкМ (червона крива), 24 мкМ (синя крива), 40 мкМ (зелена крива) та 56 мкМ (темно-жовта крива)

Як видно з цифрових значень, наведених вище, збільшення концентрації досліджуваних олігоаденілатів до 56 мкМ в реакційній суміші призводило до зменшення відсоткового складу альфа-спіральных елементів приблизно на 5%. Цікаво, що дана величина змінювалася в межах 1% в різних випадках, що можна вважати похибкою, якою можна знехтувати.

Таблиця 3.2.

**Зміни відсоткового складу елементів вторинної структури білка S100A1 при взаємодії з 2'-5'-A<sub>3</sub> та 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро**

Концентрація 2'-5'-A <sub>3</sub> , мкМ	Склад елементів вторинної структури білка S100A1, %					
	Apo-S100A1			Holo-S100A1		
	Альфа спіралі	Бета складки	Невпоряд- ковані елементи	Альфа спіралі	Бета складки	Невпоряд- ковані елементи
0	54,5	13,7	21,1	31,4	17	34,6
8	53,2	13,9	21,7	31	17,1	35
24	50,2	14,2	23,1	29,9	17,3	35,8
40	49,8	14,3	23,4	29,3	17,4	36,4
56	48,8	14,4	23,9	28,8	17,5	36,7
Концентрація 2'-5'-A <sub>3</sub> -еро, мкМ	Склад елементів вторинної структури білка S100A1, %					
	Apo-S100A1			Apo-S100A1		
	Альфа спіралі	Бета складки	Невпоряд- ковані елементи	Альфа спіралі	Бета складки	Невпоряд- ковані елементи
0	54,5	13,7	21,1	31,4	17	34,6
8	52,9	13,9	21,8	29,5	17,3	36,2
24	51,9	14,0	22,4	28,4	17,5	37,1
40	50,6	14,2	23,0	27,7	17,7	37,6
56	49,6	14,3	23,5	27,3	17,8	38,0

Зменшення кількості альфа спіральных елементів в структурі білка супроводжувалося збільшенням неупорядкованих елементів вторинної

структури в середньому на 2,5% та бета структурних елементів приблизно на 1%. Скоріш за все це свідчить про те, що в результаті взаємодії з олігоаденілатами частина альфа спіральних елементів розкручується, втрачаючи в такий спосіб впорядкованість і перетворюються в неупорядковані елементи. Важливо зауважити, що лише частина альфа спіральних елементів утворює неупорядковані елементи вторинної структури (приблизно 2,5%) та бета спіральні елементи (приблизно 1%).

Як вже було зазначено, *holo*-форма білка S100A1 характеризується меншим відсотком альфа спіральних елементів – 31,4%. Було показано, що найвища досліджена концентрація олігоаденілатів (56 мкМ) спричинила перетворення лише 3% альфа спіральних елементів в неупорядковані елементи, відсотковий склад яких поступово зростає і досягнув свого максимуму при фінальній концентрації титрантів – трохи менше 3%.

Обидва досліджені олігоаденілата впливали на відсотковий склад вторинних елементів білка *aro*-S100A1 подібним чином, причому різницею можна і треба знехтувати. Зміни, що виникали в *holo*-S100A1, помітно (в межах досліджу) відрізнялися від таких *aro*-S100A1. Пояснити цей ефект на даному етапі досліджень досить важко – скоріш за все, сайти зв'язування олігоаденілатів на поверхні *aro*- і *holo*-форм білка S100A1 відрізняються, що і є найважливішим фактором, пояснюючим такі зміни.

**Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. **Скоробогатов О. Ю., Жуков О. Ю., Ткачук З. Ю.** Структурні механізми взаємодії дефосфорильованих 2'- 5'- триаденілатів з білком S100A1 // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2020. – № 1. – С. 89-94.
2. **О. Ю. Скоробогатов, І.Ю. Жуков, З.Ю. Ткачук.** 2',5'-олігоаденілати змінюють вторинну структуру та функціональну активність білка S100A1 людини // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2015. – № 3. – С. 157-160.

3. **Skorobogatov O. Yu.**, Lozhko D. N., Zhukov I. Yu., Kozlov O. V., Tkachuk Z. Yu. Study of dephosphorylated 2'-5'-linked oligoadenylates impact on apo-S100A1 protein conformation by heteronuclear NMR and circular dichroism. // *Biopolym. Cell.* – 2014. – Vol. 30, № 4. – P. 279-285.
4. **О. Ю.Скоробагатов**, І.Ю.Жуков, З.Ю.Ткачук. Вивчення взаємодії дефосфорильованого 2'-5'-триаденілату з протеїном S100A1 людини. Матеріали XII українського біохімічного конгресу, Медична та клінічна хімія. – Тернопіль, Україна. – 2019. – Т. 21, №3. – С. 45.
5. **Skorobogatov Oleksandr Yu.**, Gajda M., Zhukov Igor Yu., Tkachuk Zenoviy Yu. Study on 2'-5'A3 binding to human protein S100A1 // Abstracts of IX Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, *Biopolymers and Cell.* – 2015. – Vol. 31 (Special Issue). – P. 11.
6. **O. Skorobogatov**, I. Zhukov, O. Kozlov, P. Gajda, Z. Tkachuk. 2'-5'-linked oligoadenylates alter the conformation of human S100A1 protein and its functional profile // Abstracts of Conference for Young Scientists. - Kiev, Ukraine. – 2015. – P.35.
7. **Oleksandr Yu. Skorobogatov**, Igor Yu. Zhukov, Zenoviy Yu. Tkachuk. 2'-5'-linked oligoadenylates alter the conformation of S100A1 and S100B proteins // Abstracts of VII Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, *Biopolymers and Cell.* – 2013. – Vol. 29(Special Issue). – P. 25.
8. **Oleksandr Skorobogatov**, Igor Zhukov and Zenoviy Tkachuk. 2'-5'a3 and its analogue alter s100a1 conformation and Ca<sup>2+</sup> binding profile // Book of abstarcts of Young Scientists Forum. FEBS. – Saint Petersburg, Russia. – 2013. – P.114.

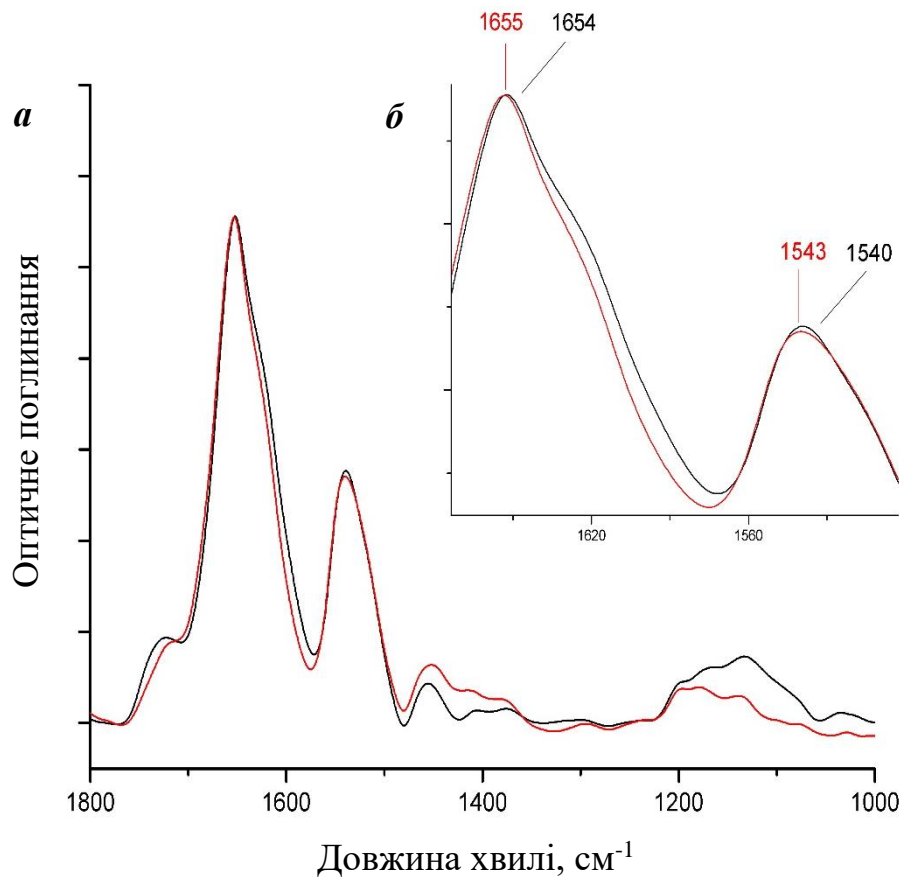
### 3.4. Дослідження впливу 2'-5'-A<sub>3</sub> на вторинну структуру білків S100A1 та кальмодуліну методом інфрачервоної спектроскопії з петеворенням Фур'є

Окрім пріоритетного для даної роботи білку S100A1 людини (рис. 3.8), метод FTIR було застосовано для дослідження ефекту зв'язування 2'-5'-A<sub>3</sub> з іншим ключовим кальцій-зв'язуючим білком – кальмодуліном, який в тому числі задіяний в механізмі вивільнення йонів Ca<sup>2+</sup> з ріанідин-чутливого рецептора, в зв'язку з чим представляє суттєвий інтерес в межах даної роботи (рис. 3.9). Препарат ліофілізованого рекомбінантного білка кальмодуліну було отримано від колег з відділу біохімії і біофізики інституту біохімії та біофізики Польської академії наук Ігоря та Лілії Жукових.

Виявилось, що взаємодія 2'-5'-A<sub>3</sub> з обома кальцій-зв'язуючими білками (S100A1 та CaM) призводить до перебудов FTIR спектру, особливо тієї його частини, яка відповідає за коливання атомів, які задіяні в утворенні пептидного зв'язку. Як відомо, такими ділянками спектру є так звані Amide I та Amide II.

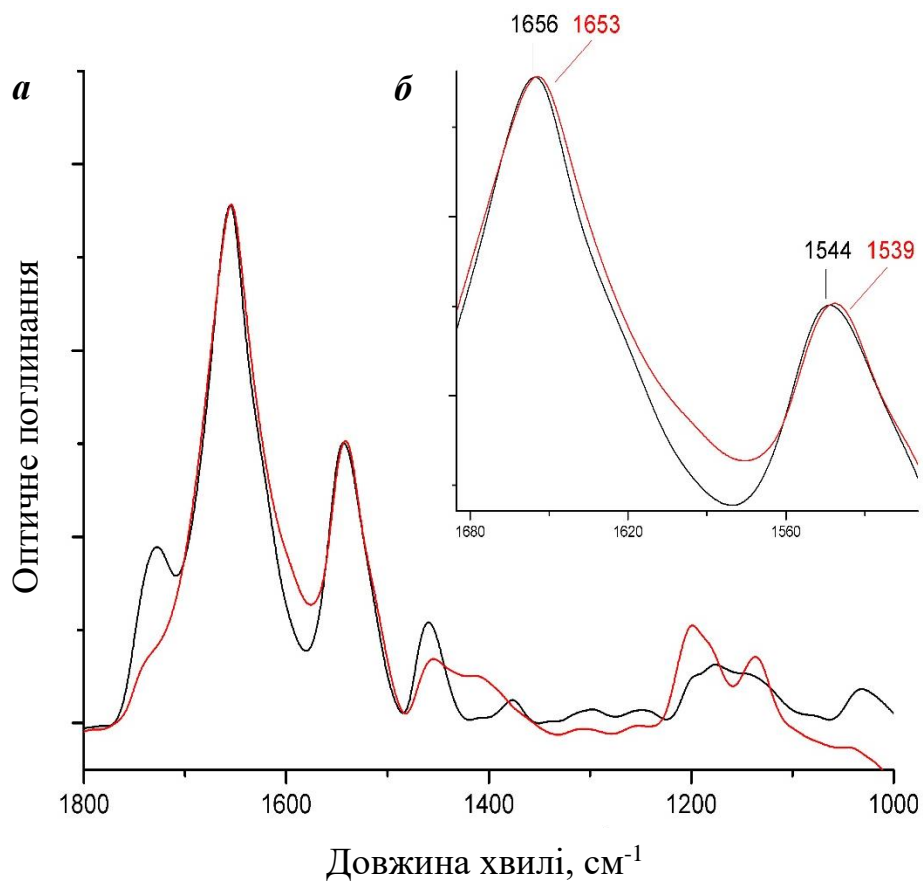
Отримані результати свідчать про те, що зв'язування 2'-5'-A<sub>3</sub> призводить до зміщення максимуму поглинання піку Amide I комплексу S100A1 з 2'-5'-A<sub>3</sub> (1655 см<sup>-1</sup>) порівняно з чистим білком (1654 см<sup>-1</sup>) на 1 см<sup>-1</sup> в низько-частотну область. Крім того, вдалося зафіксувати зміщення максимуму поглинання піку Amide II комплексу S100A1 з 2'-5'-A<sub>3</sub> (1543 см<sup>-1</sup>) порівняно з чистим білком (1540 см<sup>-1</sup>) на 3 см<sup>-1</sup> в низько-частотну область. Також вдалося зафіксувати перебудови спектру в області так званого Amide III 1200-1100 см<sup>-1</sup> (рис. 3.8).

Отримані FTIR спектри було надалі розшифровано з використанням літературних джерел, в результаті чого конформаційно значущі коливання було відповідним чином віднесено до конкретних міжатомних та міжмолекулярних зв'язків (таблиця 3.3).



**Рис. 3.8.** *a* – FTIR спектри білка S100A1 людини (чорна крива) та його комплексу з 2'-5'-A<sub>3</sub> (червона крива). *б* – збільшене зображення спектрів на довжинах хвиль 1680 – 1500 см<sup>-1</sup>

На відміну від S100A1, взаємодія 2'-5'-A<sub>3</sub> з кальмодуліном викликала зміщення максимуму поглинання піку Amide I в іншому напрямі – 1653 см<sup>-1</sup> у випадку комплексу порівняно з чистим білком (1656 см<sup>-1</sup>) на 3 см<sup>-1</sup> у високочастотну область (більший вклад неупорядкованої структури). Було також зафіксовано зміщення максимуму поглинання піку Amide II комплексу CaM з 2'-5'-A<sub>3</sub> (1539 см<sup>-1</sup>) порівняно з чистим білком (1544 см<sup>-1</sup>) на 5 см<sup>-1</sup> у високочастотну область. Подібно до S100A1, було також зафіксовано певні перебудови спектру в області 1200-1100 см<sup>-1</sup> (рис. 3.9).



**Рис. 3.9.** *a* – FTIR спектри кальмодуліну (чорна крива) та його комплексу з 2'-5'-A<sub>3</sub> (червона крива). *б* – збільшене зображення спектрів на довжинах хвиль 1680 – 1500  $\text{cm}^{-1}$ .

Таблиця 3.3.

**Віднесення FTIR спектрів Ca<sup>+2</sup>-зв'язуючих білків та їх комплексів з 2'-5'-A<sub>3</sub>**

Досліджуваний зразок				Віднесення коливань
CaM	CaM+ 2'-5'- A <sub>3</sub>	S100A <sub>1</sub>	S100A <sub>1</sub> + 2'-5'-A <sub>3</sub>	
Amide I, 1700-1600 cm <sup>-1</sup>				
1656	1653	1654	1655	Ввалентні (вал.) C=O (70-85%), вал. C–N (10-20%)
		1627	1629	1615-1637 β-структура головний компонент
1544	1539	1540	1543	1445-1480 Phe, δ (CH <sub>3</sub> ); 1400-1465 Pro, ú (CN); 1425-1475 Pro, δ (CH <sub>2</sub> )
Amide II, 580-1510 cm <sup>-1</sup> :				
1458	1455	1455	1460	1445-1480 Phe, δ (CH <sub>3</sub> ); 1400-1465 Pro, ú (CN); 1425-1475 Pro, δ (CH <sub>2</sub> )
1203	1203	1203	1203	CH <sub>2</sub> , Amide III, CO; C-C (цукор)
1181	1179	1181	1181	1137 вал. C–OH

Таким чином, із застосуванням надчутливого методу FTIR спектроскопії було показано, що коровий 2'-5'-A<sub>3</sub> здатен впливати на структурно важливі амідні (Amide I, II, III) смуги спектру при взаємодії з білками S100A1 та CaM. Було показано, що у випадках обох білків 2'-5'-A<sub>3</sub> впливав на коливання в частині спектру від 1615-1637 см<sup>-1</sup>, що свідчить про перебудови в межах бета-структурних елементів, хоча і незначні. Вплив подібної природи було зафіксовано раніше іншим методом – КД спектроскопією. Скоріш за все, поява зафіксованих змін може свідчити про більшу рухомість атомів пептидного



зв'язку, яка імітує початок переходу  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих білків із  $\text{Ca}^{2+}$ -вільної в  $\text{Ca}^{2+}$ -насичену форму.

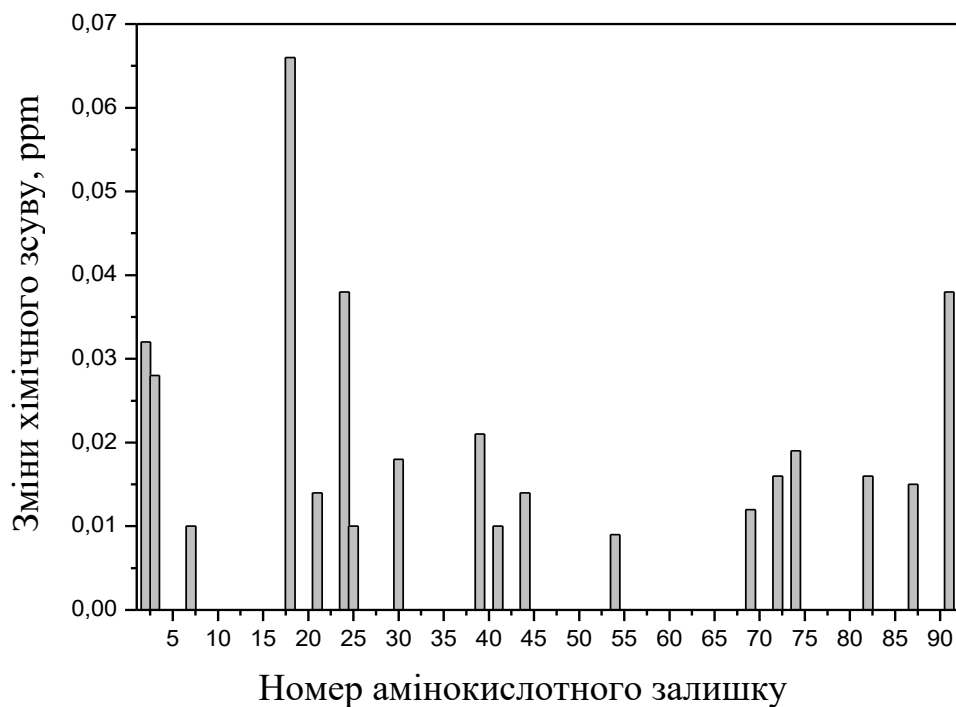
**Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. **Скоробогатов О. Ю., Жуков О. Ю., Ткачук З. Ю.** Структурні механізми взаємодії дефосфорильованих 2'-5'-триаденілатів з білком S100A1 // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2020. – № 1. – С. 89-94.
2. **О. Ю. Скоробогатов, І.Ю. Жуков, З.Ю. Ткачук.** 2',5'-олігоаденілати змінюють вторинну структуру та функціональну активність білка S100A1 людини // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2015. – № 3. – С. 157-160.
3. **Skorobogatov O. Yu., Lozhko D. N., Zhukov I. Yu., Kozlov O. V., Tkachuk Z. Yu.** Study of dephosphorylated 2'-5'-linked oligoadenylates impact on apo-S100A1 protein conformation by heteronuclear NMR and circular dichroism. // Biopolym. Cell. – 2014. – Vol. 30, № 4. – P. 279-285.

### 3.5. Вивчення впливу 2'-5'-A<sub>3</sub> на структуру білка S100A1 методом ядерного магнітного резонансу

Метод ЯМР спектроскопії було застосовано з метою ідентифікації амінокислотних залишків, які безпосередньо «реагують» на утворення комплексу S100A1-2'-5'-A<sub>3</sub> зміною резонансної частоти магнітного поля бічних фрагментів відповідних амінокислотних залишків.

Аналіз отриманих <sup>1</sup>H та <sup>15</sup>N HSQC ЯМР груп даних виявив ряд амінокислотних залишків, що продемонстрували більші, відносно інших, значення хімічних зсувів амідних груп (рис. 3.10).



**Рис. 3.10.** Стовпчикова діаграма залежності значення хімічного зсуву від номеру амінокислотного залишку при титруванні S100A1 розчином 2'-5'-A<sub>3</sub>. Наведено лише амінокислотні залишки з високими значеннями величин хімічних зсувів

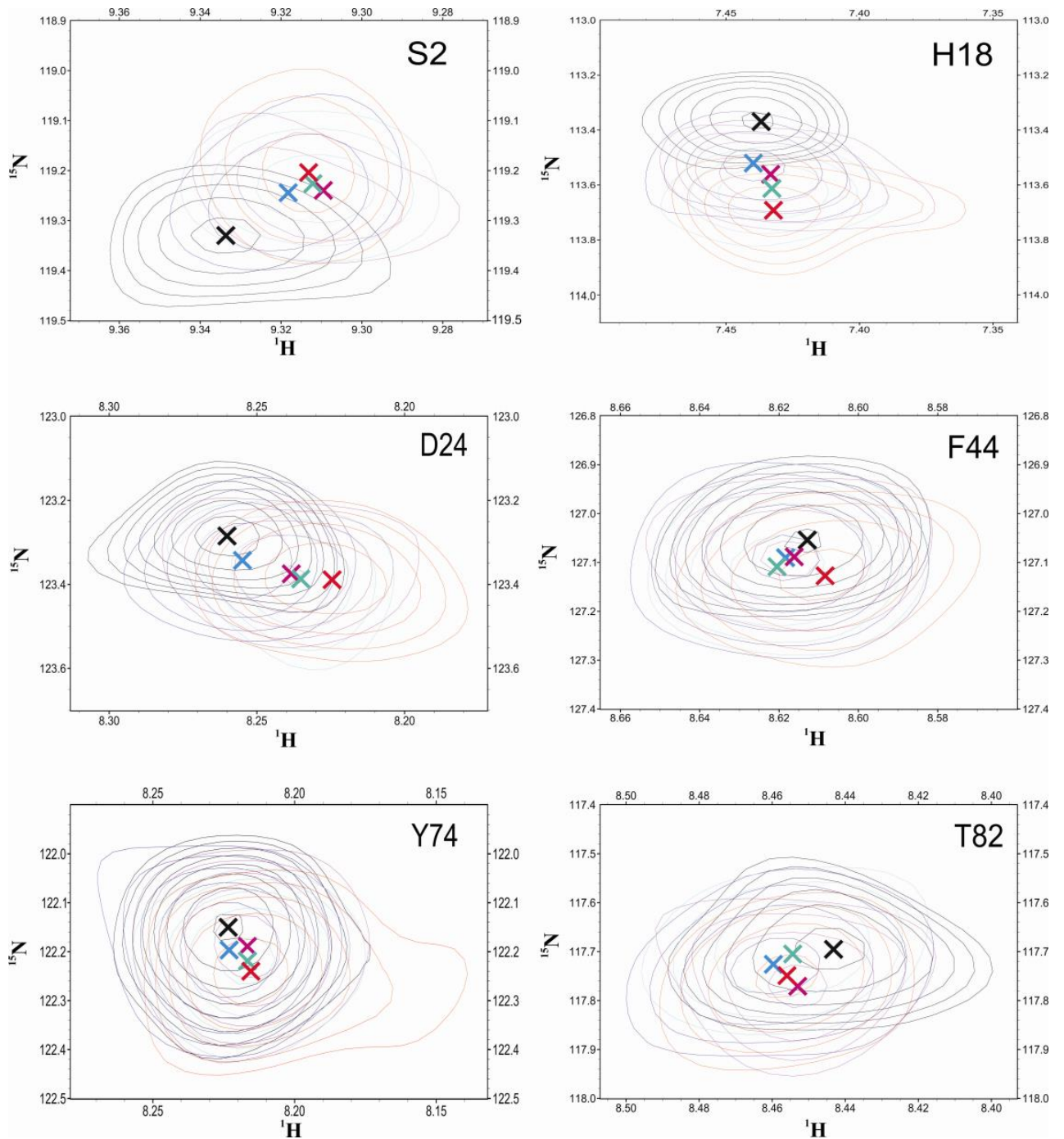
Виявилося, що амінокислотні залишки із найбільш суттєвими значеннями хімічних зсувів знаходяться в межах Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючих петель – центральних частин EF-hand доменів. Більшість сигналів надходила від N-кінцевого регіону

Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючого мотиву, який в своєму складі містить наступні амінокислотні залишки: Гіс18, Ліз21, Асп24, Ліз25 та Ліз30, що характеризуються сильною залежністю від умов проведення експерименту, а саме температури, рН та/або іонної сили розчину.

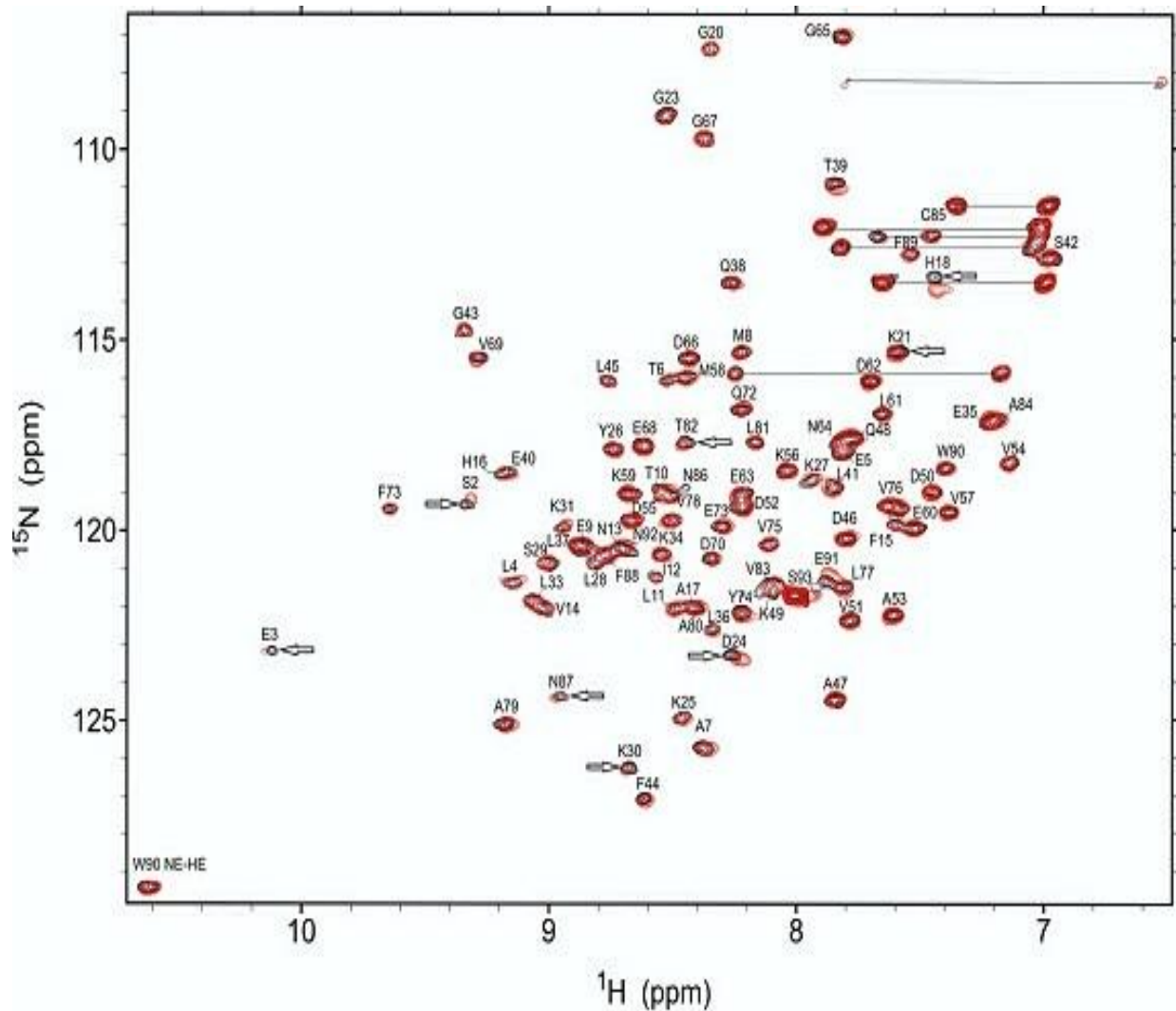
Амінокислотні залишки Вал69 та Глн72, в межах С-кінцевого домену білка S100A1 продемонстрували значно нижчі значення хімічних зсувів в результаті взаємодії з 2'-5'-A<sub>3</sub> (рис. 3.11, 3.12).

Лінкерний домен білка, представлений амінокислотними залишками Глу40-Вал51, в доповнення до С-кінцевої ділянки альфа-спіралі IV, являє собою інший важливий регіон глобули білка S100A1, який відіграє ключову роль у білок-пептидних взаємодіях S100A1 з його мішенями. 2 амінокислотних залишки, що входять до складу лінкерного домену, – Лей41 та Фен44 – характеризувалися високими значеннями хімічних зсувів при взаємодії з 2'-5'-A<sub>3</sub> (рис. 3.11, 3.13).

Відомо, що Фен44 являє собою центральний для лінкерного домену амінокислотний залишок, що формує так званий «тіо-ароматичний перемикач», що контролює гідрофобні взаємодії між лінкером та альфа-спіральним доменом IV в межах цієї частини білкової глобули. Декілька амінокислотних залишків, включаючи Фен44, поруч з яким вони знаходяться, також відзначилися високими значеннями хімічних зсувів при зв'язуванні S100A1 з 2'-5'-A<sub>3</sub> – Тре39 та Глу40 (рис 3.11, 3.13).

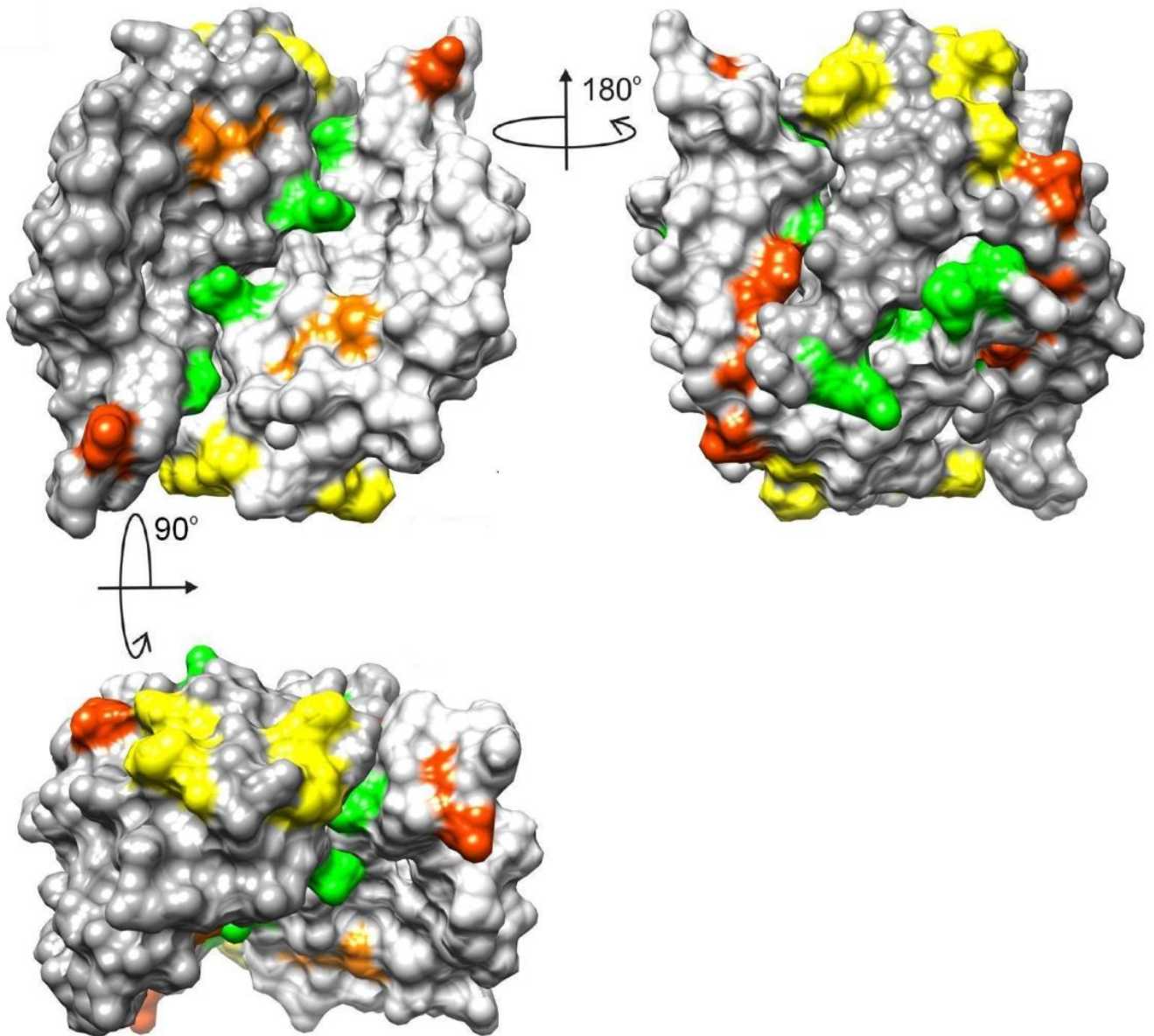


**Рис. 3.11.** Значення хімічних зсувів, отримані в ході двовимірного 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC експерименту для двоміченого  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -апо-S100A1 людини для деяких амінокислотних залишків при додавання 10 мкл 130 мМ розчину 2'-5'- $\text{A}_3$ -нат



**Рис. 3.12.** Двовимірний  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC ЯМР спектр білка S100A1 в апо-формі. Назви амінокислотних залишків наведено з допомогою однолітерного шифру

Важливо зазначити, що Фен44 разом із Лей45 та Ліз49, формують петлевий домен глобули S100A1, котрий, як і лінкерний домен, відіграє важливу у білок-пептидних взаємодіях S100A1 з цільовими білками.



**Рис. 3.13.** Тривимірна структура білка апо-S100A1 людини (2LLU), сконструйована в результаті проведених ЯМР дослідів. Амінокислотні залишки, значення хімічних зсувів яких мали найвищі значення, відображено відповідними кольорами: жовтим – Гіс18, Ліз21, Асп24, Ліз25 (N-кінцевий домен  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючого домену), помаранчевим – Вал69, Глн72 (C-кінцевий домен  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючого домену), червоним – Глу39, Лей41, Фен44, Глу91 (C-кінцевий фрагмент альфа-спіралі IV), зеленим – Сер2, Глу3, Ала7, Вал54, Тир74, Тре82, Асн87 (міжмономерний інтерфейс)

В результаті проведених експериментів також вдалося зафіксувати значні хімічні зсуви амінокислотних залишків в межах міжмономерного інтерфейсу

глобули S100A1 при взаємодії з 2'-5'-A<sub>3</sub> – Сер2, Глу3, Ала7, Еир74, Тре82, Асн87 та Глу91. Ці амінокислотні залишки залучені у формування гідрофобних міжмономерних контактів між спіралями I/I' та IV/IV' в межах гомодимеру S100A1 (рис. 3.13). Важливо зауважити, що, в зв'язку з невисоким значенням доступності перерахованих вище амінокислотних залишків до взаємодії з розчинником, скоріш за все, молекула 2'-5'-A<sub>3</sub> не має змоги напряду зв'язатися з цими залишками. Набагато більш вірогідним є сценарій, за якого молекула олігоаденілату приєднується до S100A1 в іншому місці (скоріш за все в районі Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючого домену та/або лінкерного регіону) а конфірмаційні зміни, викликані його приєднанням, передаються на чутливий до подібних змін міжмономерний інтерфейс.

**Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

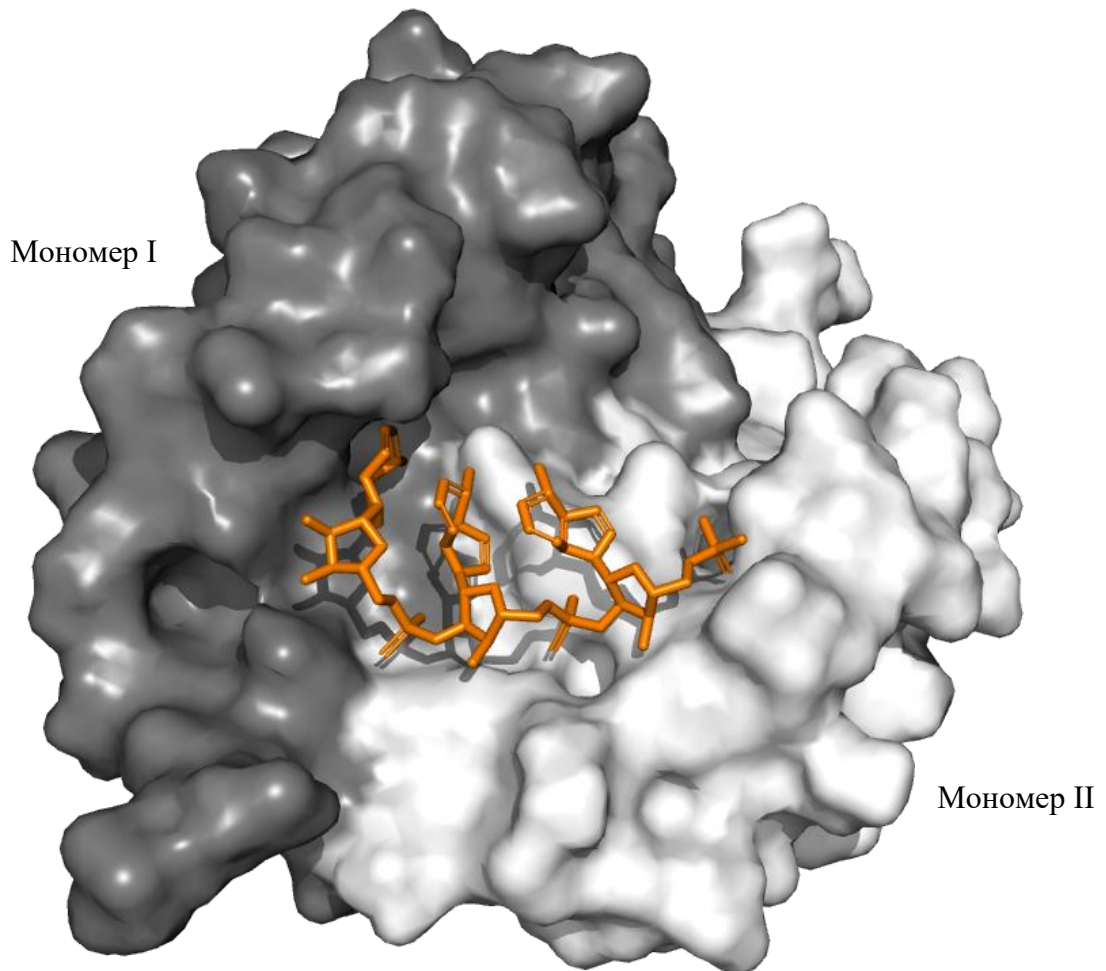
1. **Скоробогатов О. Ю., Жуков О. Ю., Ткачук З. Ю.** Структурні механізми взаємодії дефосфорильованих 2'- 5'- триаденілатів з білком S100A1 // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2020. – № 1. – С. 89-94.
2. **О. Ю. Скоробогатов, І.Ю. Жуков, З.Ю. Ткачук.** 2',5'-олігоаденілати змінюють вторинну структуру та функціональну активність білка S100A1 людини // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2015. – № 3. – С. 157-160.
3. **Skorobogatov O. Yu., Lozhko D. N., Zhukov I. Yu., Kozlov O. V., Tkachuk Z. Yu.** Study of dephosphorylated 2'-5'-linked oligoadenylates impact on apo-S100A1 protein conformation by heteronuclear NMR and circular dichroism. // Biopolym. Cell. – 2014. – Vol. 30, № 4. – P. 279-285.
4. **О. Ю.Скоробогатов, І.Ю.Жуков, З.Ю.Ткачук.** Вивчення взаємодії дефосфорильованого 2'-5'-триаденілату з протеїном S100A1 людини. Матеріали XII українського біохімічного конгресу, Медична та клінічна хімія. – Тернопіль, Україна. – 2019. – Т. 21, №3. – С. 45.

5. **Skorobogatov Oleksandr Yu.**, Gajda M., Zhukov Igor Yu., Tkachuk Zenoviy Yu. Study on 2'-5'A3 binding to human protein S100A1 // Abstracts of IX Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. – 2015. – Vol. 31 (Special Issue). – P. 11.
6. **O. Skorobogatov**, I. Zhukov, O. Kozlov, P. Gajda, Z. Tkachuk. 2'-5'-linked oligoadenylates alter the conformation of human S100A1 protein and its functional profile // Abstracts of Conference for Young Scientists. - Kiev, Ukraine. – 2015. – P.35.



### 3.6. Комп'ютерне моделювання взаємодії S100A1 із 2'-5'-A<sub>3</sub>

Моделювання зв'язування S100A1 із 2'-5'-A<sub>3</sub> було проведено з метою отримання даних щодо амінокислотних залишків білка S100A1, які взаємодіють з 2'-5'-A<sub>3</sub> шляхом утворенням водневих або електростатичних зв'язків (рис 3.14).



**Рис. 3.14.** Комплекс S100A1 з 2'-5'-A<sub>3</sub>. Поверхневе представлення білкової глобули з паличковою моделлю 2'-5'-A<sub>3</sub>. 2'-5'-A<sub>3</sub> взаємодіє з міжмономерним інтерфейсом S100A1

Проведений експеримент свідчить про те, що 2'-5'-A<sub>3</sub> утворює 3 зв'язки з трьома різними амінокислотними залишками в радіусі 5Å. Один з них –

водневий – утворюється між NH<sub>2</sub>- групою залишку аденіну 1-ого залишку АМФ та СО групою Ала80. Другий та третій зв'язки – електростатичні. Вони утворюються між PO<sub>2</sub>- групою 2-ого залишку АМФ та СО групою Вал69 та між PO<sub>2</sub>- групою 3-ого залишку АМФ та СО групою Асн64.

Не можна стверджувати, що утворення трьох вищеописаних міжмолекулярних зв'язків свідчить про наявність специфічного до 2'-5'-A<sub>3</sub> сайту зв'язування на поверхні S100A1, не варто. Більш вірогідно, що взаємодія S100A1-2'-5'-A<sub>3</sub> неспецифічна, доказом чого слугує високе значення константи зв'язування – 2·10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>.

В результаті комп'ютерного моделювання зв'язування 2'-5'-A<sub>3</sub> з S100A1, вдалося частково пояснити раніше отримані результати ЯМР: PO<sub>2</sub>- група 2-ого залишку АМФ та СО група Вал69 взаємодіють електростатично, що пояснює суттєвий хімічний зсув аміноксилотного залишку. Вал69 є частиною С-кінцевого домену Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючого домену білка S100A1, при взаємодії з лігандом може змінюватися профіль зв'язування іонів Ca<sup>2+</sup>, що і було нами показано.

### 3.7. Вплив 2'-5'-A<sub>3</sub> на активність протеїнкіназ

Раніше нами було наголошено на можливості пояснення одного з механізмів біологічної дії 2'-5'-A<sub>3</sub> на скорочення судинних препаратів *in vivo* шляхом взаємодії з цАМФ-залежною протеїнкіназою. З метою вивчення можливого ефекту зв'язування 2'-5'-A<sub>3</sub> з кіназами, було проведено серію експериментів, описаних нижче.

В дослідах використовували 2'-5'-A<sub>3</sub> та його аналоги, в яких 3'-кінцевим нуклеозидом виступав епоксиаденозин та 8-аміноаденозин, тобто аденозин, модифікований відповідно по вуглеводному фрагменту чи по гетероциклічній основі. Вивчали вплив цих препаратів на активність протеїнкіназ (ПК) FGFR, TIE2, ROCK1, Aurora, JNK1, CK2 та ASK в модельній тест-системі [193], причому визначали кількість продукту ферментативної реакції. Пряме визначення ґрунтувалося на фосфорилюванні ферментами короткого пептидного субстрату RRREEETEEE у присутності радіоактивно міченого АТФ.

На початку дослідження вивчали вплив олігоаденілатів на всі ПК при концентрації препаратів 66 мкМ. Як видно з отриманих результатів (таблиця 3.4), різні ПК по-різному реагують на досліджувані сполуки. У більшості випадків препарати стимулюють активність ПК, проте спостерігається й пригнічення. Як видно з таблиці 3.4, природний 2'-5'-A<sub>3</sub> в основному активує кінази, при цьому особливо сильно (на 84%) зростає активність ПК CK2. Помірно активуються ферменти JNK1 і ROCK1 (відповідно на 31 і 40%). У межах 18–25% активуються TIE2, ASK і FGFR. Навпаки, щодо Aurora природний 2'-5'-A<sub>3</sub> виявляє протилежний ефект (35% інгібування).

Аналогічну, однак більш виражену дію має аналог 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро. Його стимулююча активність вища, ніж у немодифікованого 2'-5'-A<sub>3</sub>. Епоксианалог у порівнянні з природним триаденілатом більше стимулює активність ПК: рівень активації ним CK2 і FGFR на 9–12%, ROCK1 і ASK на 20–23%, а JNK1 на 41% вищий. На відміну від 2'-5'-A<sub>3</sub>, який дещо стимулює активність TIE2,

епоксианалог інгібує цю ПК (на 24%) і на 5% сильніше порівняно з природним тримером пригнічує кіназу Auroга (40% інгібування проти 35%).

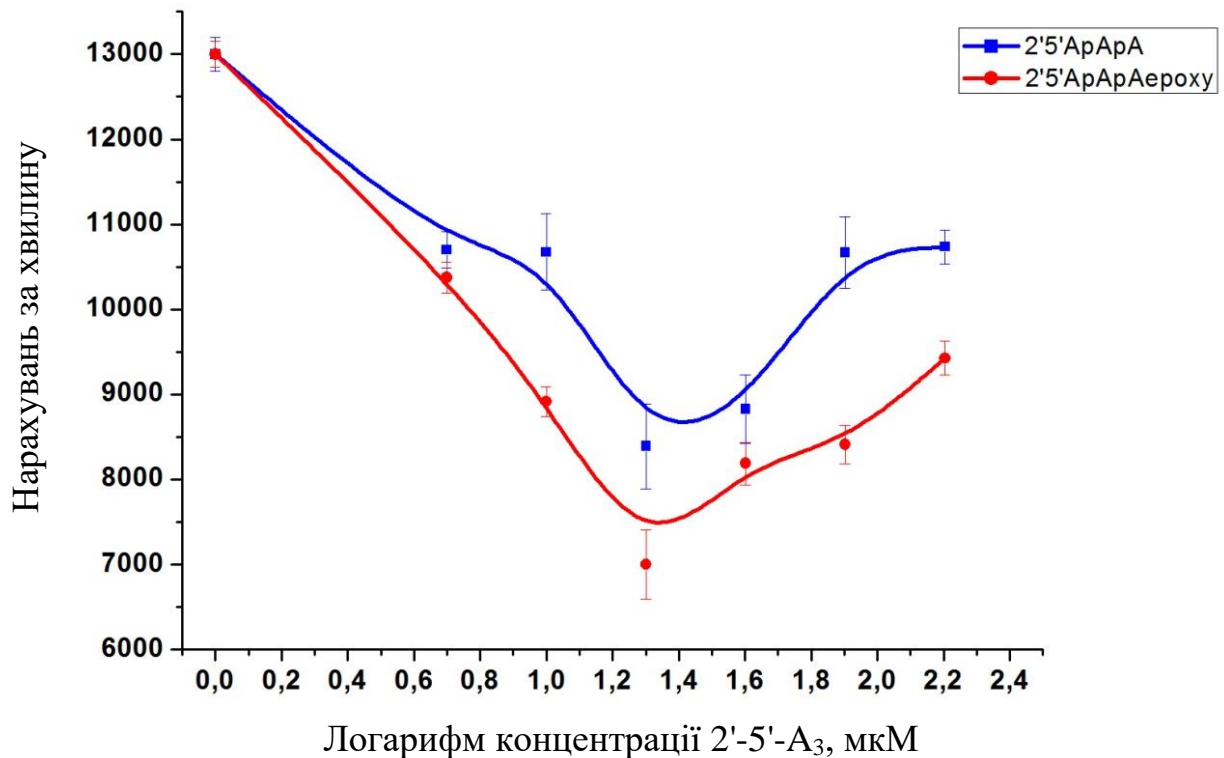
Яскраво виражену інгібуючу дію щодо ПК Auroга (трикратне зниження активності останньої) виявляє аміноаналог 2'-5'-A<sub>3</sub>-amino. Він також помітно інгібує кінрази ASK (на 21%) і СК2 (на 12%). Необхідно підкреслити, що природний “коровий” тример і особливо його епоксианалог мають виражений стимулюючий ефект на ферменти ASK і особливо СК2, аміноаналог же інгібує їх. Однак 2'-5'-A<sub>3</sub> має незначний стимулюючий ефект щодо ПЕ2, подібно до 2'-5'-A<sub>3</sub>-amino, на відміну від інгібуючої дії 2'-5'-A<sub>3</sub>-epo.

Таким чином, 2'-5'-A<sub>3</sub> і його аналоги в описаних умовах проявляють як інгібуючу, так і стимулюючу активність на дію ПК. Особливо варто відзначити майже потрійне зростання активності СК2 під впливом 2'-5'-A<sub>3</sub> та 2'-5'-A<sub>3</sub>-epo та трикратне пригнічення ПК Auroга аміноаналогом. У більшості випадків 2'-5'-A<sub>3</sub>-epo дає сильніший стимулюючий ефект порівняно з немодифікованим 2'-5'-A<sub>3</sub>.

На наступному етапі досліджень ми вивчали залежність активності цієї ПК від концентрації препаратів. Для цього ферментативні реакції проводили в присутності 2'-5'-A<sub>3</sub> і його епоксианалога в різних концентраціях (від 5 до 160 мкМ) при двох концентраціях АТФ 25 і 100 мкМ, при чому, як відомо з описання комерційно доступного препарату Auroга, оптимум функціонування знаходиться саме в межах від 25 мкМ до 100 мкМ АТФ. Було побудовано графіки залежності активності ПК від логарифма концентрації препаратів (взятої в мкМ). Виявилось, що при обох концентраціях АТФ отримані криві не мають лінійної залежності активності від lg C.

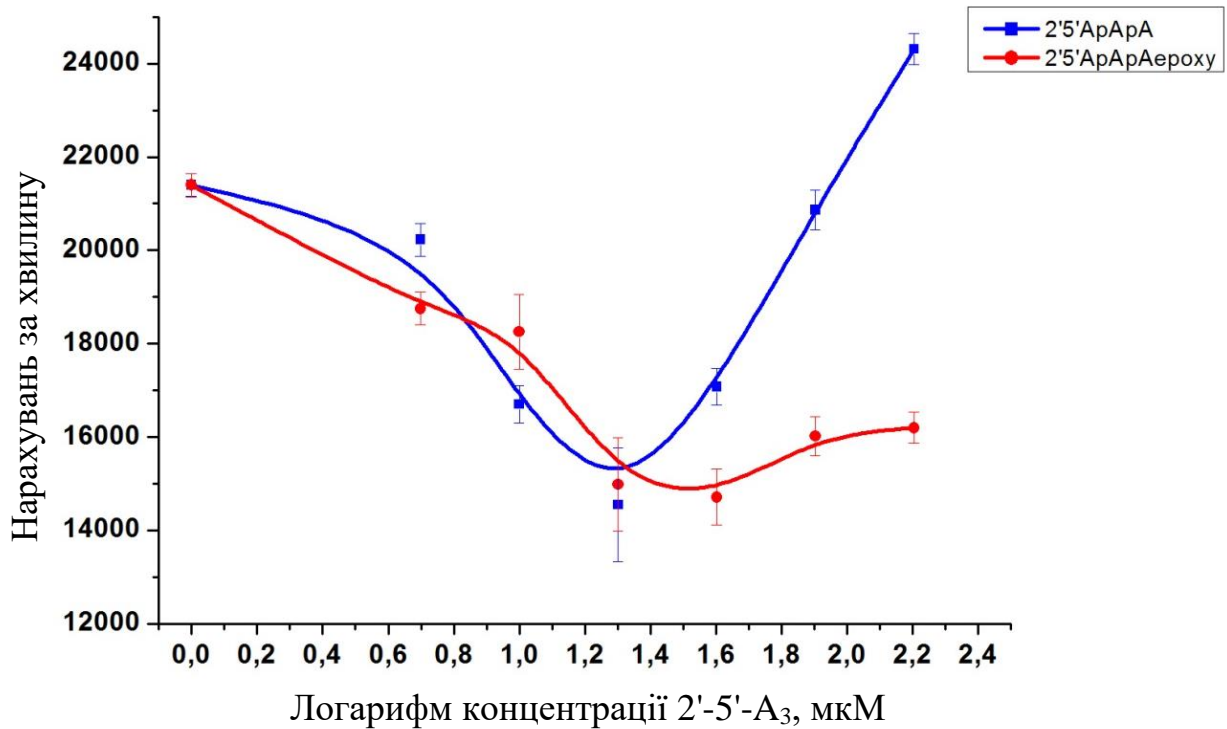
При концентрації АТФ 100 мкМ криві для обох препаратів мають V-подібний характер (рис. 3.14). При титруванні Auroга “коровим” 2'-5'-A<sub>3</sub> в межах концентрацій lgC 0,7–1,0 її активність дещо зростає, а потім різко знижується при збільшенні концентрації до lgC 1,3 і далі підвищується із зростанням концентрації до lgC 1,9. Аналогічну, проте більш виражену картину інгібуючої дії в цих умовах демонструє аналог 2'-5'-A<sub>3</sub>-epo. При зростанні його

концентрації від  $\lg C$  0,7 до  $\lg C$  1,3 інгібуючий ефект зростає, а потім, при подальшому збільшенні концентрації, поступово зменшується.



**Рис. 3.15.** Залежність активності кінрази Аврора від концентрації 2'-5'-A<sub>3</sub>. Концентрація АТФ становила 100 мкМ.

При зменшенні концентрації АТФ до 25 мкМ активність ПК Aurora в контрольних експериментах зростає приблизно вдвічі, інгібуюча ж активність препаратів у цих умовах знижується (рис. 3.15). Крива титрування ферменту “коровим” 2'-5'-A<sub>3</sub> носить V-подібний характер зі зниженням активності в зоні від  $\lg C$  0,7 до  $\lg C$  1,3, далі спостерігається нелінійне зростання з локальним максимумом при  $\lg C$  1,6, а починаючи з  $\lg C$  1,9 підвищення концентрації препарату закінчується різким падінням інгібуючого ефекту й майже повним відновленням базової активності ферменту при  $\lg C$  2,2.



**Рис. 3.16.** Залежність активності кінази Аврора від концентрації 2'-5'-A<sub>3</sub>. Концентрація АТФ становила 25 мкМ.

У випадку 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро крива має інший характер, подібний до того, що спостерігався при концентрації АТФ 100 мкМ. Діапазон інгібування значно ширший, ніж у немодифікованого тримеру, а максимальний ефект спостерігається при ІgС 1,6 (для немодифікованого триаденілату при ІgС 1,3).

Таблиця 3.4.

**Вплив 2'-5'-A<sub>3</sub> та його аналогів на активність протеїнкіназ\***

Препарат	Активність протеїнкіназ, % відносно контролю**						
	CK2	FGFR	TIE2	ROCK1	JNK1	Aurora	ASK
2'-5'A <sub>3</sub>	184	125	118	140	131	65	122
2'-5'ероA <sub>3</sub>	196	134	76	160	172	60	145
2'-5' aminoA <sub>3</sub>	88		110			35	79

Примітки: 1. \*Концентрація олігоаденілатів 66 мкМ, АТФ – 50 мкМ;

2. \*\*Контроль 100% (реакція за відсутності препаратів 2'-5'-олігоаденілатів)

З побудованих кривих титрування (рис. 3.14, 3.15) було визначено величини  $IC_{50}$  олігоаденілатів, тобто концентрацію сполуки, при якій активність ферменту інгібується на 50%. Активніші препарати мають менше значення  $IC_{50}$ . Вища активність препарату дозволяє використовувати меншу діючу концентрацію і знизити ризик розвитку побічних ефектів. Було встановлено, що величина  $IC_{50}$  у зоні низьких концентрацій для 2'-5'- $A_3$  становить 19, мкМ, а для 2'-5'- $A_3$ -еро 11.6 мкМ у присутності 100 мкМ АТФ. Таким чином, епоксиданалог 2'-5'- $A_3$ -еро має значно більшу інгібуючу дію при низьких концентраціях, ніж природний 2'-5'- $A_3$ . Оскільки криві титрування носять V-подібний характер, то можна визначити й інше значення  $IC_{50}$ , що досягається при вищих концентраціях: для 2'-5'- $A_3$  та 2'-5'- $A_3$ -еро цей показник становить відповідно 23.8 та ~85 мкМ. При концентрації АТФ 25 мкМ жоден з препаратів не зміг досягнути 50%-го інгібування ПК Aurora у дослідженому діапазоні концентрацій (рис. 3.15).

Таким чином, наведені дані свідчать про те, що 2'-5'-олігоаденілати істотно впливають на активність ПК, причому можуть виступати як інгібіторами, так і активаторами останніх, залежно від ферменту та природи препарату. При цьому їх дія на активність ПК залежить від концентрації препаратів та АТФ. Отже, досліджені олігоаденілати 2'-5'- $A_3$  та 2'-5'- $A_3$ -еро здатні змінювати активність протеїнкінази Аврора і, таким чином, впливати на перебіг клітинних процесів, включаючись у систему сигнальних шляхів клітини.

Розглянемо деякі можливі механізми описаних вище ефектів. Існує велика кількість ПК, але спільним для всіх є наявність сайту зв'язування з АТФ, сайту зв'язування з білком, який фосфорилується тією чи іншою ПК, та сайту перенесення фосфату від ПК на білок, що фосфорилується. Якщо ліганд ефективно зв'язується з яким-небудь із цих сайтів, відбувається інгібування фосфорилування. Відомо, що аналоги аденіну й аденозину взаємодіють із сайтом зв'язування АТФ і можуть бути потенційними інгібіторами ПК. Можна припустити, що олігоаденілати теж діють за подібним механізмом.

Низькомолекулярні сполуки, що конкурують з АТФ за АТФ-зв'язуючий сайт, запобігають фосфорилуванню клітинних білків і тим самим блокують передачу клітинного сигналу. Відомі інгібітори ПК найчастіше взаємодіють саме із сайтом зв'язування АТФ.

Крім безпосереднього зв'язування лігандів з основними активними сайтами, можливий і інший механізм, за допомогою якого ліганди, в даному випадку похідні 2'-5'-A<sub>3</sub>, впливають на ПК. За цим механізмом, дещо подібним до алостеричного регулювання активності, взаємодія може відбуватися поза функціонально активними сайтами ПК зміни конформації білка, що, у свою чергу, призводить до зміни активності ферменту. На користь цього припущення свідчать отримані нами результати щодо впливу препаратів на активність ПК: під дією олігоаденілатів відбувається не тільки інгібування, а й підвищення активності ферментів. У випадку ж зв'язування препаратів з активним сайтом ПК (наприклад, АТФ-зв'язуючим) активність ферменту повинна пригнічуватись. Тому ймовірно, що 2'-5'-A<sub>3</sub> та його аналоги модулюють активність ПК саме за рахунок впливу на їх конформацію.

**Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

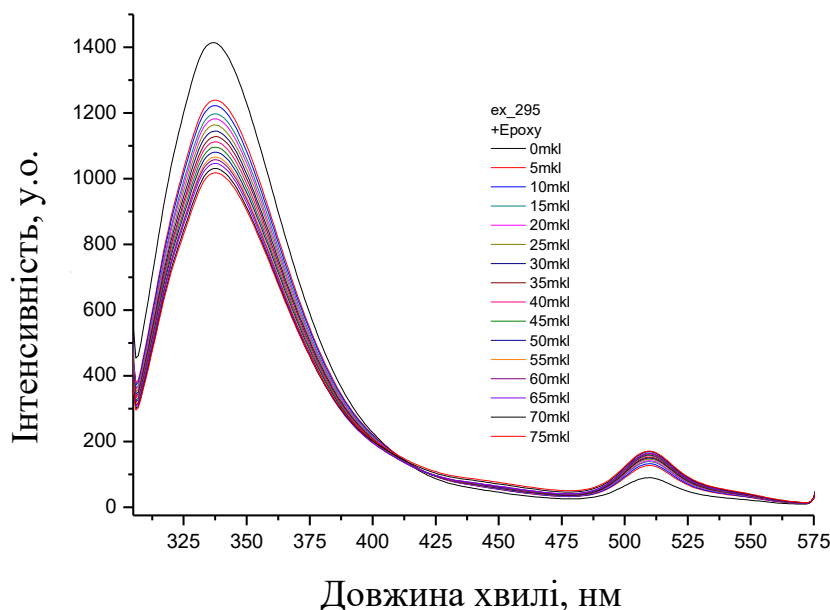
1. Skorobogatov OY, Kukharenko AP, Kozlov OV, Dubey IY and Tkachuk ZY. 2'-5'-Linked Triadenylates Act as Protein Kinase Activity Modulators // Journal of Proteomics & Bioinformatics. – 2017. – Vol. 10, №12. – P. 320-323.



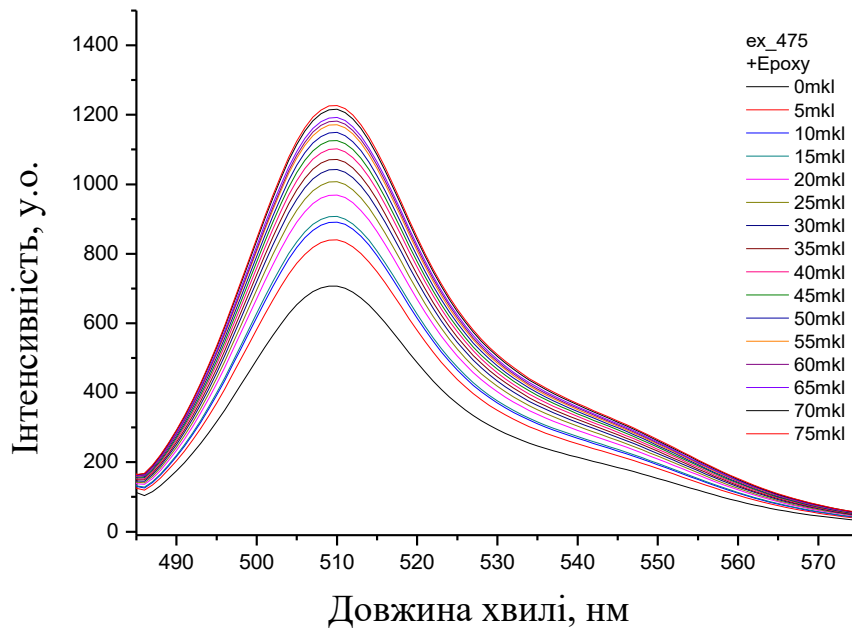
### 3.8. Вивчення впливу 2'-5'-А<sub>3</sub>-еро на флуоресценцію білка EGFP

Окрім центрального для даної роботи білка S100A1 та його антагоніста CaM, в складі яких домінують альфа-спіральні елементи вторинної структури, нас також цікавили інші білки, які б містили в своєму складі головним чином бета-складчасті елементи. Саме для цього нами було використано прерат рекомбінантного білка EGFP (enhanced green fluorescent protein), який нами було отримано від колег із відділу структури і функції білка інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

Концентрація EGFP становила 4 мкМ. Концентрацію 2'-5'-А<sub>3</sub>-еро в реакційній суміші збільшували від 0 до 40мкМ з кроком в 2,5мкМ. Зростання концентрації титранту у випадку збудження триптофанової флуоресценції при 295 нм (рис. 3.16) призводило до її поступового гасіння. При довжині хвилі збудження 475 нм спостерігався подібний ефект, але зменшення інтенсивності флуоресценції відбувалось нерівномірно, тобто з додаванням наступної порції титранту не завжди спостерігалось тільки падіння інтенсивності, інколи спостерігався також і ріст (рис. 3.17).



**Рис. 3.17.** Спектри флуоресценції EGFP. Довжина хвилі збудження становила 295 нм



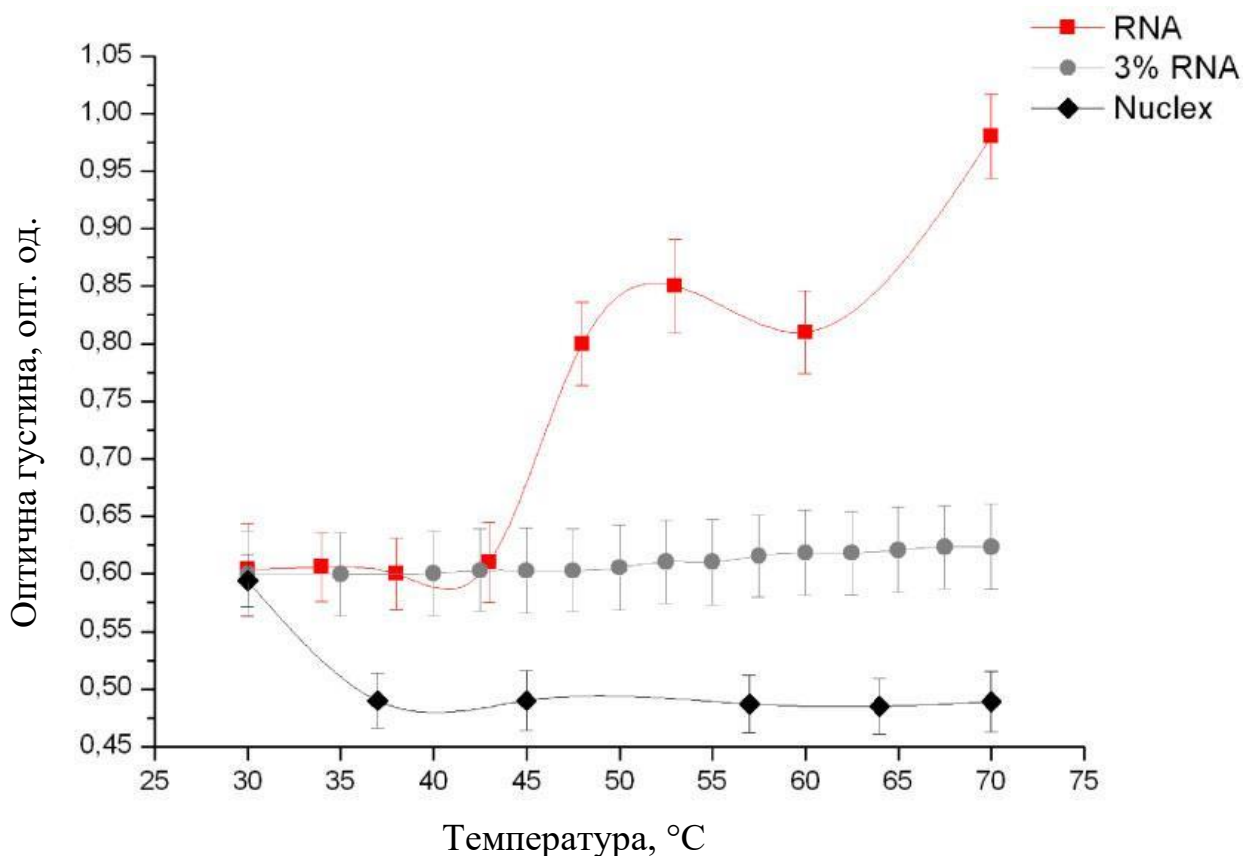
**Рис. 3.18.** Спектри флуоресценції EGFP. Довжина хвилі збудження становила 475 нм

На даному етапі досліджень важко однозначно трактувати отримані дані по взаємодії 2'-5'-A<sub>3</sub> з EGFP, однак важливим висновком є те, що 2'-5'-A<sub>3</sub> здатен взаємодіяти з білками, вторинна структура яких головним чином містить бета структурні елементи.

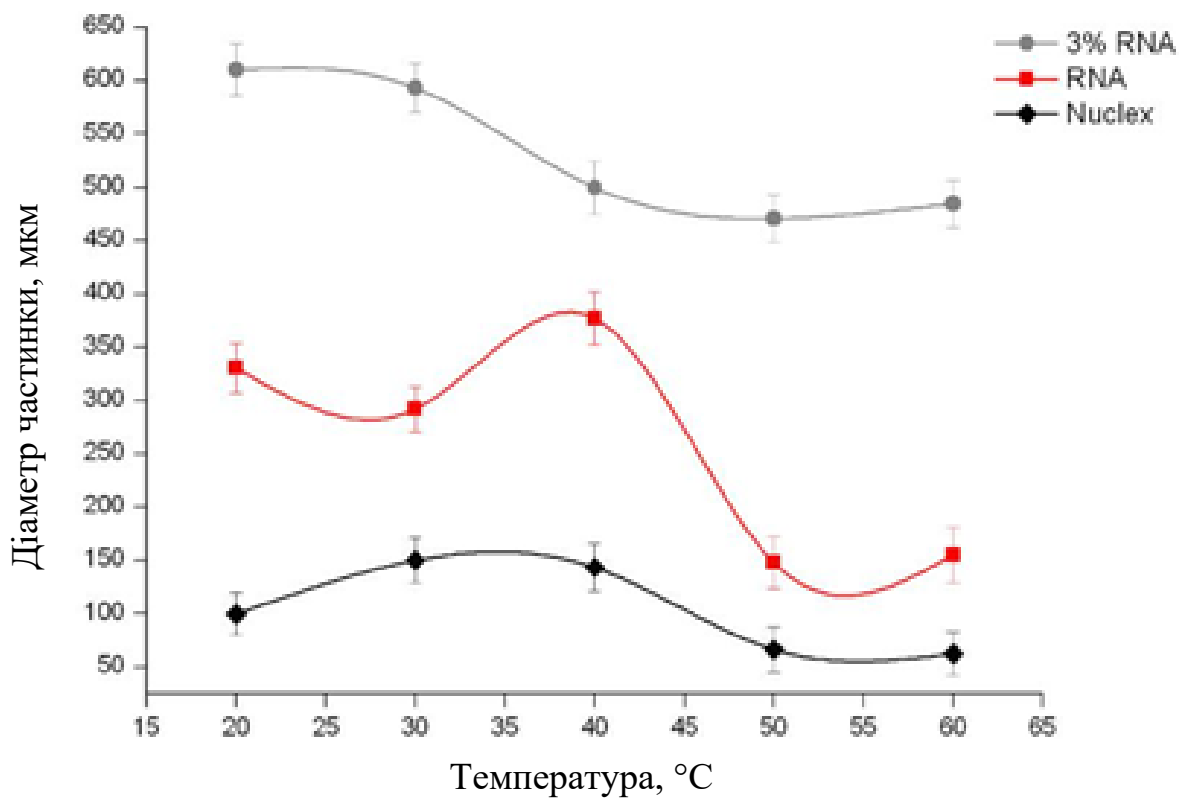
### **3.9. Структурні зміни в терапевтичних РНК, створених на основі 2'-5'-Аз, під впливом температури**

Отримані експериментальні результати свідчать про те, що температура плавлення препарату «RNA» становила 45.5 °С. Ми вважаємо, що спостерігати такий ефект було можливо за рахунок наявності серед молекул РНК великої кількості двоспіральних ділянок. Зразок «Nuclex», представлений гетерогонною сумішю олігоаденілатів різної довжини (від 3 до 25 основ), серед яких, згідно наших припущень, присутні і 2'-5'-триаденілати, поведив себе інакше (рис. 3.18) – його оптична густина зменшувалася при підвищенні температури, що може бути свідченням складної організації молекул даного зразка. Зважаючи на те, що в складі зразку «Nuclex» міститься спирт манітол, молекула якого включає велику кількість гідроксильних груп, відбувалася зміна полярності розчинника, в результаті чого відбувалася дегідратація полімеру та зміна поверхневого заряду. Ми вважаємо, що молекули цього зразку формували більш компактні у порівнянні з іншими досліджуваними зразками структури – молекулярні асоціати, структура яких утримувалася, головним чином, завдяки електростатичним взаємодіям.

Дослідження залежності розміру частинок в розчинах досліджуваних зразків частково підтвердили висунуті раніше припущення (рис. 3.19). З підвищенням температури, досліджувані зразки проявили схильність до дестабілізації, в результаті чого середній розмір частинок в розчині зменшувався. Серед зразків вдалося зафіксувати часточки різних розмірів – неочікуваний результат в світі очікуваної гомогенності зразків. Поступове підвищення температури призводило руйнування макромолекулярних асоціатів, представлених часточками різних розмірів.



**Рис. 3.19.** Залежність оптичної густини досліджуваних зразків від температури



**Рис. 3.20.** Залежність середнього розміру частинок в розчині від температури

Ми вважаємо, що мікрооточення молекул РНК, які слугували в якості головного компонента досліджуваних препаратів, не тільки впливало на структуру біополімеру, але і суттєво змінювало їх біологічні та терапевтичні характеристики. Так, зменшення величини поверхневого заряду терапевтично значущої молекули може підвищувати здатність до проникнення всередину клітини та/або стійкість до нуклеаз.

**Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. Z. Yu. Tkachuk, A. V. Kozlov, **O. Yu. Skorobogatov**. Structural Changes in Therapeutic RNAs / Macromolecular Symposia. – 2014. – Vol 335, № 1. – P. 17-19.

## РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Кальцій-опосередкована сигналізація – один з центральних процесів, що відіграє ключову роль в багатьох біологічних процесах, які відбуваються в клітинах вищих еукаріот. Однією з найважливіших його ланок вважують кальцій зв'язуючі білки – переносники  $\text{Ca}^{2+}$ -опосередкованого сигналу, що, в тому числі, забезпечують злагоджене функціонування всіх його компонентів.

Результати проведеної роботи вказують на те, що природний дефосфорильований триаденілат здатен впливати на спорідненість білка S100A1 до йонів  $\text{Ca}^{2+}$  та його конформацію при зв'язуванні з ним. Інша частина результатів, проведених на біологічній моделі *in vivo*, дозволила висунути припущення щодо можливих наслідків такої взаємодії, а саме можливості вивільнення йонів  $\text{Ca}^{2+}$  з RyR рецептора.

Обговоренню підлягають декілька питань. По-перше, чи є зміни спорідненості до йонів  $\text{Ca}^{2+}$  та зміни вторинної структури білка S100A1 при зв'язуванні з 2'-5'- $\text{A}_3$  досить суттєвими для того, щоб спричинити помітний ефект *in vivo*? По-друге, чи той ефект, що нам вдалося спостерігати *in vivo*, є наслідком взаємодії комплексу S100A1-2'-5'- $\text{A}_3$ , або ж цей феномен був спричинений іншими факторами.

Результати нещодавніх досліджень 194 виявили, що низькоафінні взаємодії, що у великій кількості відбуваються між біологічно значущими молекулами, в тому числі макромолекулами, здатні мати суттєві наслідки для певних сигнальних шляхів в межах описаних біологічних процесів. Виявляється, що так звані неупорядковані по своїй природі білки (Intrinsically Disordered Proteins, IDPs), по суті не здатні взаємодіяти з високим ступенем спорідненості, найбільш вірогідно через відсутність можливості існування конформаційно сталих елементів четвертинної структури, або доменів – певних

фрагментів білкової глобули, що могли б відповідати за сталість взаємодії між двома білковими молекулами.

Тим не менш, виявляється, такі неупорядковані білкові структури все ж здатні взаємодіяти. Очевидно, що афінність такої взаємодії не буде характеризуватися таким же низьким значенням константи дисоціації, як у випадку інших високоспецифічних взаємодій,  $K_D = 10^{-10} - 10^{-12}$  М. Напроти, цей показник буде збільшуватись, що буде слугувати вказівкою на меншу ступінь спорідненості двох білкових молекул.

Аторами статті [195] було висунуте припущення, що менш структуровані, у порівнянні з іншими фрагментами послідовності S100A1, ділянки білкової глобули можуть мати властивості вищезгаданих IDPs. Ще більш важливим є той факт, що посттрансляційна модифікація, вплив якої на властивості S100A1 було досліджено у вищезгаданій роботі, здатна невідомим чином, не напряду, у певному розумінні структурувати даний регіон білкової глобули, найбільш вірогідно, завдяки взаємодії з Phe44. Цікаво, що одним з амінокислотних залишків в межах S100A1, значення хімічного зсуву якого досить суттєво змінюється при взаємодії з 2'-5'-A<sub>3</sub>, є саме Phe44. Тобто можливо припустити, що 2'-5'-A<sub>3</sub> здатен, зв'язуючись з білком S100A1, надавати відносно неупорядкованим фрагментам білкової глобули певної конформаційної сталості шляхом непрямого, просторово-опосередкованого впливу на функціонально важливі ділянки білкової молекули.

З огляду на вищенаведенні дані, низькоафінна, а тому, на перший погляд, біологічно несуттєва взаємодія білка S100A1 з 2'-5'-A<sub>3</sub>, все ж таки може мати певні ефекти *in vivo*. Нам вдалося показати, що аплікація досить невеликих (8 мкМ) концентрації 2'-5'-A<sub>3</sub> на препарати судин миші здатна спричинити суттєвий викид йонів кальцію з ріанодинового Ca<sup>2+</sup> депо саркоплазматичного ретикулуми. Категорично стверджувати, що цей ефект забезпечується безпосередньою взаємодією комплексу RyR-S100A1-2'-5'-A<sub>3</sub>, на жаль неможливо, адже можливим залишається інший механізм, в межах якого впливу на RyR вдається досягти шляхом активації 2'-5'-A<sub>3</sub> цАМФ-залежної

протеїнкінази, яка, в свою чергу, стимулює вивільнення кальцію з RyR внутрішньоклітинного кальцієвого депо ГМК і активує  $ВК_{Ca}$  канали. Крім того, цАМФ-залежна протеїнкіназа, після активації аденілатом, може прямо фосфорилувати  $ВК_{Ca}$  канали, приводячи їх в активний стан, або інші клітинні білки, що регулюють скорочення-розслаблення ГМК.

Дані, отримані в результаті проведених експериментів, не дають змоги виокремити єдиний універсальний механізм, який би забезпечував таку активність  $2'-5'-A_3$  *in vivo*, в зв'язку з чим ми вважаємо необхідним проведення подальших експериментів в живих системах *in vivo*.

Наступним важливим питанням є можливість зв'язування  $2'-5'-A_3$  з  $Ca^{2+}$ -насиченою формою білка S100A1, та отримання даних щодо результатів такої взаємодії *in vitro* та *in vivo*. Відомо, що існують декілька форматів взаємодії S100A1-білок/пептид мішень -  $Ca^{2+}$ -опосередкований та незалежний від йонів  $Ca^{2+}$ . Найбільш цікава в нашому випадку  $Ca^{2+}$ -незалежна взаємодія лежить в основі взаємодії S100A1-RyR, яка була одним з об'єктів нашої уваги. Власне з цієї причини, проблема взаємодії насиченої форми S100A1 з  $2'-5'-A_3$  була розглянута в цій роботі лише фрагментарно. Виявилось, що суттєвої різниці в між амплітудою впливу  $2'-5'-A_3$  на апо та голо-форму S100A1 зафіксувати не вдалося. Важливо зазначити, що цей процес було досліджено лише з використанням методу КД, в той час інші вищеописані методи застосовано не було в зв'язку з нестачою, головним чином, необхідного ресурсного забезпечення, в зв'язку з чим, розгляд цього питання залишається відкритим і, сподіваємося, все ж таки стане предметом подальших досліджень.

Важливим також є питання довготривалості змін афінності до  $Ca^{2+}$  та вторинної структури білка S100A1 на атомарно-молекулярному рівні. Дане питання вимагає наявності окремого проекту, в межах якого його б реалізували і є питанням подальших досліджень. Тим не менш, на основі отриманих нами результатів, існує можливість припустити, що ефект, який викликається зв'язуванням  $2'-5'-A_3$  з S100A1, є досить довготривалим, про що свідчать дані його дії  $2'-5'-A_3$  на кофеїніндуковане скорочення гладеньких м'язів аорти щура.



Серед інших класичних агоністів, довготривалість дії 2'-5'-A<sub>3</sub> виявилася найтривалішою. Відповідно, якщо припустити, що головним механізмом даного феномену є S100A1-опосередкований вплив на функціонування RyR, то досить вірогідним є те, що конформаційні та Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючі зміни, викликані зв'язуванням 2'-5'-A<sub>3</sub>, є досить довготривалими.

Подальше дослідження складної трьохкомпонентної системи, яка очевидно є головною ланкою, що забезпечувала б функціонування такого механізму, є предметом майбутніх експериментів та їх детального аналізу.

## ВИСНОВКИ

Досліджено вплив 2'-5'-A<sub>3</sub> на вторинну структуру і Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючу активність протеїна S100A1, а також на активність ряду протеїнкіназ.

1. Показано утворення комплексу між 2'-5'-A<sub>3</sub>/2'-5'-A<sub>3</sub>-еро і протеїном S100A1, що підтверджено характерними змінами спектрів КД комплексів 2'-5'-A<sub>3</sub>-S100A1 та 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро-S100A1. Показано, що комплекс утворюється як за умов присутності так і у відсутності іонів Ca<sup>2+</sup> в реактивній суміші.

2. Виявлено, що як 2'-5'-A<sub>3</sub> так і 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро здатні впливати на відсотковий склад вторинних елементів білка apo-S100A1, причому зменшується кількість альфа-спіральних елементів на 6% і 5%, відповідно. У випадку холю-форми S100A1 також спостерігали зменшення відсотку альфа-спіральних елементів на 3% та 4%, відповідно. Таким чином, 2'-5'-A<sub>3</sub> і 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро впливали на кількість альфа-спіральних елементів майже однаково, причому наявність в реакційній суміші іонів Ca<sup>2+</sup> не впливала на ефективність утворення комплексів 2'-5'-A<sub>3</sub>/2'-5'-A<sub>3</sub>-еро-S100A1.

3. Методом ІЧПФ було показано, що зв'язування 2'-5'-A<sub>3</sub> викликало зміщення амідних смуг Amide I, II інфрачервоного спектру білка S100A1 у високохвильову область на 1 та 3 см<sup>-1</sup>, що свідчить про зростання кількості невпорядкованих елементів білка S100A1.

4. Методом ЯМР було виявлено значні хімічні зсуви амінокислотних залишків в структурно та функціонально важливих ділянках білка S100A1, серед яких N-кінцевий Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючий домен, C-кінцевий Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючий домен, альфа-спіраль IV та міжмономерний інтерфейс, на основі чого було зроблено припущення щодо амінокислотних залишків, з якими безпосередньо взаємодіє 2'-5'-A<sub>3</sub>. Показано, що 2'-5'-A<sub>3</sub> взаємодіє із протеїном S100A1 в межах N-кінцевого Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючого домену та лінкерного регіону.

5. Методом комп'ютерного моделювання взаємодії 2'-5'-A<sub>3</sub> із S100A1, підтверджено результати, отримані раніше за допомогою ЯМР – PO<sub>2</sub>- група 2-ого залишку АМФ та СО група Вал69 взаємодіють електростатично, що може пояснювати суттєвий хімічний зсув амінокислотного залишку. Вал69 є частиною C-кінцевого домену Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючого домену білка S100A1.

6. Методом флуоресцентної спектроскопії було показано, що 2'-5'-A<sub>3</sub> суттєво не впливають на спорідненість іонів кальцію до гомодимеру S100A1, причому вплив немодифікованого 2'-5'-A<sub>3</sub> характеризується зниженням спорідненості іонів Ca<sup>2+</sup> до білка S100A1 на 0.2·10<sup>-4</sup>. Епоксі модифікований аналог 2'-5'-A<sub>3</sub> підвищує константу асоціації на 0.8·10<sup>-3</sup> у порівнянні з білком без додавання титрантів.

7. Досліджено вплив 2'-5'-A<sub>3</sub> і 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро на активність ряду модельних протеїнкіназ, в тому числі протеїнкінази Аврора, активність якої інгібувалася олігоаденілатами на 35 та 40 % відсотків, відповідно.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖРЕЛ

1. Pauwels R., De Clercq E., Balzarini F. Biological activity of new 2-5A analogues. *Chemica Scripta* — 1986. — 26, № 2. — P. 141-145.
2. Torrence P. F., Brozda D. Alster D. et al. Only one 3'-hydroxyl group of ppp5'A2'p5'A2'p5'A (2-5A) is required for activation of the 2-5A dependent endonuclease // *J. Biol. Chem.*—1988.—263, № 3.— P. 1131-1139.
3. Tkachuk Z. Yu., Tkachuk L. V., Kvasyuk E. L. Changes in functional properties of restriction enzymes under the influence of (2'-5'-) oligoadenylates in vitro // *Biopolym. Cell.* – 1989. – 5, № 2. – P. 69-73.
4. A. V. Kozlov, Z. Yu. Tkachuk, I. I. Slukvin, V. P. Tchernyshev, I. A. Mikhailopulo. 2/5/-oligoadenylates effect on certain indexes of immune response // *Biopolymers and Cell.* – 1994. - 10. № 3-4. – P. 52-57.
5. Rozhmayova O. M., Dolhaya E. V., Pohorelaya N. Ch. et al. Influence epoxy derivative 2'5'-tryoligoadenilat on cell neuroblastom human cells // *Neurophysiology.*—2006.—38, N 2.—P. 97–102.
6. Filippov I. B., Tkachuk Z. Yu., Dubey I. Ya. Mechanisms of vessel tone regulation by 2/-5/-oligoadenylates // *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.*—2010.—N 6.—P. 152–157.
7. Tkachuk Z. Yu., Dubey I. Ya., Tkachuk L. V., Dubey L. V., Shlykov S. G., Babich L. G. The effect of 2'-5'-Oligoadenylates on Calcium Binding to Calmodulin // *Òhe 17th Int. Symp. on Calcium-Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease (July 16–21, 2011 Beijing, China 2011).*—Beijing, 2011.— P. 41.
8. Wright NT, Prosser BL, Varney KM, Zimmer DB, Schneider MF, Weber DJ. S100A1 and calmodulin compete for the same binding site on ryanodine receptor // *J. Biol. Chem.* – 2008. – 9, № 26;283(39). – P. 26676-83.
9. Tkachuk Z., Kvasyuk E., Matsuka G., Mikhailopulo I. // *United States Patent 5571799*, 1996.
10. Сидорик Л. Л., Дубей и. Я., бобык В. и. та ін. // *Доп. НАН України.* – 2001. – № 9. – С. 161–165.

11. Ткачук З. Ю., Дубей І. Я., Яковенко Т. Г. та ін. // *Biopolymers and Cell.* – 2007. – 23, N 1. – С. 14–20.
12. Філіппов І. б., Ткачук З. Ю., Дубей І. Я. // *Доп. НАН України.* – 2010. – № 6. – С. 152–157.
13. Ткачук З. Ю., Ткачук В. В., Ткачук Л. В. та ін. // *Biopolymers and Cell.* – 2001. – 17, N 5. – С. 411–416.
14. Itkes A. V. // *Progr. Mol. Subcell. Biol.* – 1994. – 14. – P. 209–221
15. B. D. Kahan. Drug therapy: cyclosporine // *The New England Journal of Medicine*, vol. 321, no. 25, pp. 1725–1738, 1989.
16. M. Naesens, D. R. J. Kuypers, and M. Sarwal. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity // *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 4, no. 2, pp. 481–508, 2009.
17. D. Williams and L. Haragsim. Calcineurin nephrotoxicity // *Advances in Chronic Kidney Disease*, vol. 13, no. 1, pp. 47–55, 2006.
18. P. Heering and B. Grabensee. Influence of ciclosporin A on renal tubular function after kidney transplantation // *Nephron*, vol. 59, no. 1, pp. 66–70, 1991.
19. Mikhailopulo I. A., Baran E. A., Koslov A. V. et al. Synthesis and use of 2'-5'-oligoadenylate trimers modified at the 2'-terminus in kidney transplantation in rabbits and monkeys // *Nucleosides Nucleotides.*–1995.–14, N 3–5.–P. 1105–1108
20. З.Ю. Ткачук, О.В. Козлов, І.Я. Дубей, А.П. Кухаренко 2'-5'-Олігоаденілати та їх аналоги як модулятори активності протеїнкіназ // *Доповіді НАНУ.* 2011.7.с.186
21. Shah DR1, Shah RR. Tyrosine kinase inhibitors: their on-target toxicities as potential indicators of efficacy // 2013 Jun;36(6):420.
22. Schroder H.C., Kelve M., Schacke H. et al. Inhibition DNA topoisomerase I activity by 2–5 oligoadenylates and mismatched double-stranded RNA in uninfected and HIV1-infected H9 cells // *Chem. Biol. Interact.* – 1994. – 90, No 2. – P. 169–183.

23. Liu D.K., Owens G. F. Inhibition of viral reverse transcriptase by 2-5 oligoadenylates // *Biochem. And Biophys. Res. Communs.* – 1987. – 145, No 1. – P. 291–297.
24. Kostuyk P.G., Kozlov A.V., Tkachuk Z.Yu. et al. Effect of “core” 2',5'-oligoadenylates on the phosphorylation-dependent calcium channels in GH3 cells // *Укр. біохім. журн.* – 1995. – 67, No 1. – P. 26–32.
25. Swartz K. J. Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: Disruption of G protein-mediated inhibition // *Neuron.* – 1993. – 11, No 2. – P. 305–320.
26. Meuers E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, William BR, Hovanessian AG. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA – activated protein kinase induced by interferon // *Cell* 1990;62: 379-390.
27. Pavlovich J, Staeheli P. The antiviral potentials of Mx proteins // *J Interferon Res* 1991;11:215-219.
28. Kerr IM, Brown RE, Ball LA. Increased sensitivity of cell-free protein synthesis to double-stranded RNA after interferon treatment // *Nature* 1974;250:57-59.
29. Brown GE, Lebleu B, Kawakita M, Shaila S, Sen GC, Lengyel P. Increased endonuclease activity in an extract from mouse Ehrlich ascites tumor cells which had been treated with a partially purified interferon preparation: dependence of double-stranded RNA // *Biochem Biophys Res Commun* 1976;69:114-122.
30. Sen GC, Lebleu B, Brown GE, Kawakita M, Slattery E, Lengyel P. Interferon, double-stranded RNA and mRNA degradation // *Nature* 1976;264:370-373.
31. Kerr IM, Brown RE. pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:256-260.

32. Roberts WK, Hovanessian A, Brown RE, Clementus MJ, Kerr IM. Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis. *Nature* 1976;264:477-480.
33. Hovanessian AG, Brown RE, Kerr IM. Synthesis of low molecular weight inhibitor of protein synthesis with enzyme form interferon-treated cells. *Nature* 1977;268:357-540.
34. Kerr IM, Brown RE, Hovanessian AG. Nature of inhibitor of cell-free protein synthesis formed in response to interferon and double-stranded RNA. *Nature* 1977;268:540-542.
35. Clemens MJ, Vaquero CM. Inhibitor of protein synthesis by double-stranded RNA in reticulocyte lysates: evidence for activation of an endoribonuclease. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;83:59-68.
36. Slattery E, Ghosh N, Samanta H, Lengyel P. Interferon, double-stranded RNA, and RNA degradation: activation of an endonuclease by (2'-5')An. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4778-4782.
37. Floyd SG, Yoshie O, Lengyel P. Interferon action. Covalent linkage of (2'-5')pppApApA(32P)pCp to (2'-5')(A)n-dependent ribonucleases in cell extracts by ultraviolet irradiation. *J. Biol Chem* 1982;257:8584-8587.
38. Silverman RH, Jung DD, Nolan SN, Dieffenbach CW, Kedar VP, SenGupta DN. Purification and analysis of murine 2-5A-dependent RNase. *J Biol Chem* 1988;263:7336-7341.
39. Bisbal C, Salehzada T, Lebleu B, Bayard B. Characterization of two murine (2'-5')(A)n-dependent endonucleases of different molecular mass. *Eur J Biochem* 1989;179:595-602.
40. Bayard B, Bette BP, Aliau S. Affinity purification and characterization of (2'-5')oligo(adenylate)-dependent RNase from mouse spleen. *Eur J Biochem* 1994;223:403-410.
41. Le Roy F, Laskowska A, Silhol M, Salehzada T, Bisbal C. Characterization of RNABP, an RNA binding protein that associates with RNase L. *J Interferon Cytokine Res* 2000;20:635-644.

42. Salehzada T, Silhol M, Lebleu B, Bisbal C. Polyclonal antibodies against RNase L. Subcellular localization of this enzyme in mouse cells. *J Biol Chem* 1991;266:5808-5813.
43. Krause D, Silverman RH, Jacobsen H, Leisy SA, Dieffenbach CW, Friedman RM. Regulation of ppp(A2'p)nA-dependent RNase levels during interferon treatment and cell differentiation. *Eur J Biochem* 1985;146:611-618.
44. Bayard B, Zhou A. Affinity blotting assay for 2-5A-dependent RNase. *Anal Biochem* 1992;200:108-114.
45. Hassel BA, Zhou A, Sotomayor C, Maran A, Silverman RH. A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon. *Embo J* 1993;12:3297-3304.
46. Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* 2004;13:1435-1448.
47. Dong B, Silverman RH. A bipartite model of 2-5A-dependent RNase L. *Biol Chem* 1997;272:22236-22242.
48. Diaz-Guerra M, Rivas C, Esteban M. Full activation of RNaseL in animal cells requires binding of 2-5A within ankyrin repeats 6 to 9 of this interferon-inducible enzyme. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:113-119.
49. Tanaka N, Nakanishi M, Kusakabe Y, Goto Y, Kitade Y, Nakamura KT. Structural basis for recognition of 2',5'-linked oligoadenylates by human ribonuclease L. *EMBO J* 2004;23:3929-3938.
50. Dong B, Niwa M, Walter P, Silverman RH. Basis for regulated RNA cleavage by functional analysis of RNase L and IreIp. *RNA* 2001;7:361-373.
51. Sidrauski C, Walter P. The transmembrane kinase IreIp is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 1997;90:1031-1039.
52. Urano F, Bertolotti A, Ron D. IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 2000;113(Pt 21):3697-3702.

53. Dong B, Silverman RH. Alternative function of a protein kinase homology domain in 2',5'-oligoadenylate dependent RNase L. *Nucleic Acids Res* 1999;27:439-445.
54. Nakanishi M, Yoshimura A, Ishida N, Ueno Y, Kitade Y. Contribution of Tyr712 and Phe716 to the activity of human RNase L. *Eur J Biochem* 2004;271:2737-2744.
55. Dong B, Silverman RH. 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A. *J Biol Chem* 1995;270:4133-4137.
56. Wreschner DH, James TC, Silverman RH, Kerr IM. Ribosomal RNA cleavage, nuclease activation and 2-5A(ppp(A2'p)nA) in interferon-treated cells. *Nucleic Acids Res* 1981;9:1571-1581.
57. Nakanishi M, Goto Y, Kitade Y. 2-5A induces a conformational change in ankyrin-repeat domain of RNase L. *Proteins* 2005;60:131-138.
58. Cole JL, Carroll SS, Kuo LC. Stoichiometry of 2',5'-oligoadenylate-induced dimerization of ribonuclease L. A sedimentation equilibrium study. *J Biol Chem* 1996;271:3979-3981.
59. Cole JL, Carroll SS, Blue ES, Viscount T, Kuo LC. Activation of RNase L by 2',5'-oligoadenylates. Biophysical characterization. *J Biol Chem* 1997;272:19187-19192.
60. Silverman RH, Skehel JJ, James TC, Wreschner DH, Kerr IM. rRNA cleavage as an index of ppp (A2'p)nA activity in interferon-treated encephalomyocarditis virus-infected cells. *J Virol* 1983;46:1051-1055.
61. Li XL, Blackford JA, Hassel BA. RNase L mediates the antiviral effect of interferon through a selective reduction in viral RNA during encephalomyocarditis virus infection. *J Virol* 1998;72:2752-2759.
62. Martinand C, Montavon C, Salehzada T, Silhol M, Lebleu B, Bisbal C. RNase L inhibitor is induced during human immunodeficiency virus type 1 infection and down regulates the 2-5/RNase L pathway in human T cells. *J Virol* 1999;73:290-296.



63. Sohail Khoshnevis, Thomas Gross, Carmen Rotte, Claudia Baierlein, Ralf Ficner, Heike Krebber. The iron-sulfur protein RNase L inhibitor functions in translation termination. *EMBP reports* 2010;11:214-217.

64. Kispal G, Sipos K, Lange H, Fekete Z, Bedekovics T, Janaky T, Bassler J, Aguilar Netz Dj, Balk J, Rotte C, Lill R. Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulfur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO J* 2005; 24:589-598.

65. Dong J, Lai R, Nielsen K, Fekete CA, Qui H, Hinnebusch AG. The essential ATP-binding cassette protein Rli1 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. *J Biol Chem* 2004;279:42157-42168.

66. Yarumin A, Panse VG, Petfalski E, Dez C, Tollervey D, Hurt EC. Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *EMBO J* 2005;24:580-588.

67. Bisbal C, Martinand C, Silhol M, Lebleu B, Salehzada T. Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. *J Biol Chem* 1995;270:13308-13317.

68. Jacobson A. The end justifies the means. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12:474-475.

69. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M Jr, Akira S, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5 and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol.* 2005; 175:2851-2858.

70. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobi N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol.* 2004; 5:730-737.

71. Reference: Saito K, et al. (2007) The lipid-binding SEC14 domain. *Biochim Biophys Acta* 1771(6):719-26.

72. Satoh, A.K., Xia, H., Yan, L., Liu, C.H., Hardie, R.C., Ready, D.F. (2010). Arrestin translocation is stoichiometric to rhodopsin isomerization and

accelerated by phototransduction in *Drosophila* photoreceptors // *Neuron* 67(6): 997--1008.

73. Yasutaro Fujita, Hiroshi Matsuoka, Kazutake Hirooka. Regulation of fatty acid metabolism in bacteria // *Molecular Microbiology* // 2007 Volume66, Issue4 November 2007 Pages 829-839.

74. Etienne Meylan, Jürg Tschopp. Toll-Like Receptors and RNA Helicases: Two Parallel Ways to Trigger Antiviral Responses // *Molecular Cell* // Volume 22, Issue 5, 9 June 2006, Pages 561-569.

75. Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity // *Nature* // 2007;446:916–920.

76. Kubler K, Gehrke N, Riemann S, Bohnert V, Zillinger T, Hartmann E, Polcher M, Rudlowski C, Kuhn W, Hartmann G, Barchet W. Targeted activation of RNA helicase retinoic acid-inducible gene-I induces proimmunogenic apoptosis of human ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2010;70:5293–5304.

77. Poeck H, Besch R, Maihoefer C, Renn M, Tormo D, Morskaya SS, Kirschnek S, Gaffal E, Landsberg J, Hellmuth J, et al. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med.* 2008;14:1256–1263.

78. Dahai Luo, Steve C. Ding, Adriana Vela, Andrew Kohlway, Brett D. Lindenbach, Anna Marie Pyle. Structural insights into RNA recognition by RIG-I // *Cell* // 2011;147(2):409-422.

79. Ko E. A., Han J., Jung I. D., Park W. S. Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells // *J. Smooth Muscle Res.* – 2008. – 44, No 2. – P. 65–81.

80. Knot H. J., Nelson M. T. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels // *Science.* – 1992. – 256. – P. 532–535.

81. Benham C. D., Bolton T. B. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular muscle cells of the rabbit // *J. Physiol.* – 1986. – 371. – P. 385–406.

82. Li P., Zeng X., Yang Y. et al. Role of calcium mobilization in the regulation of spontaneous transient outward currents in porcine coronary artery myocytes // *Sci. China C. Life Sci.* – 2007. – 50, No 5. – P. 660–668.
83. Jaggar J. H., Wellman G. C., Heppner T. J. et al.  $\text{Ca}^{2+}$  channels, ryanodine receptors and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels: a functional unit for regulating arterial tone // *Acta Physiol. Scand.* – 1998. – 164, No 4. – P.577–587.
84. Kotlikoff M. L., Wang Y. X., Xin H. B., Ji G. Calcium release by ryanodine receptors in smooth muscle // *Novartis Found. Symp.* – 2002. – 246. – P. 108–119; discussion P. 119–124, P. 221–227.
85. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1965; 19: 739-74
86. Hiroshi Kawasaki Robert H. Kretsinger. Structural and functional diversity of EF-hand proteins: Evolutionary perspectives // *Protein Science* // Volume26, Issue10 October 2017 Pages 1898-1920.
87. Clapham DE. Calcium signaling // *Cell* // 2007 14;131(6):1047-58
88. Donato R. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr Mol Med.* 2007; 7:711–24.
89. Chen M, Sinha M, Luxon BA, Bresnick AR, O'Connor KL. Integrin  $\alpha 6\beta 4$  controls the expression of genes associated with cell motility, invasion, and metastasis, including S100A4/metastasin. *J Biol Chem.* 2009; 284:1484–94.
90. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1793:1008–22.
91. Hsu K, Champaiboon C, Guenther BD, et al. Anti-infective protective properties of S100 calgranulins. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2009; 8:290–305.
92. Kim TH, Kim HI, Soung YH, Shaw LA, Chung J. Integrin ( $\alpha 6\beta 4$ ) signals through Src to increase expression of S100A4, a metastasis-promoting factor: implications for cancer cell invasion. *Mol Cancer Res.* 2009; 7:1605–12.

93. Riuzzi F, Sorci G, Donato R. S100B protein regulates myoblast proliferation and differentiation by activating FGFR1 in a bFGF-dependent manner. *J Cell Sci.* 2011; 124:2389–400.
94. Sorci G, Giovannini G, Riuzzi F, et al. The danger signal S100B integrates pathogen- and dangersensing pathways to restrain inflammation. *PLoS Pathog.* 2011; 7:e1001315.
95. Eggers K, Sikora K, Lorenz M, et al. RAGE-dependent regulation of calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 in human THP-1. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2011; 119:353–7.
96. Tsoporis JN, Marks A, Haddad A, Dawood F, Liu PP, Parker TG. S100B expression modulates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2005; 111:598–606.
97. Kiewitz R, Lyons GE, Schafer BW, Heizmann CW. Transcriptional regulation of S100A1 and expression during mouse heart development. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1498:207–19.
98. Most P, Seifert H, Gao E, et al. Cardiac S100A1 protein levels determine contractile performance and propensity toward heart failure after myocardial infarction. *Circulation.* 2006; 114:1258–68.
99. Rohde D, Ritterhoff J, Voelkers M, Katus HA, Parker TG, Most P. S100A1: a multifaceted therapeutic target in cardiovascular disease. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010; 3:525–37.
100. Volkers M, Rohde D, Goodman C, Most P. S100A1: a regulator of striated muscle sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling, sarcomeric, and mitochondrial function. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010:178614.
101. Most P, Pleger ST, Volkers M, et al. Cardiac adenoviral S100A1 gene delivery rescues failing myocardium. *J Clin Invest.* 2004; 114:1550–63.
102. Prosser BL, Wright NT, Hernandez-Ochoa EO, et al. S100A1 binds to the calmodulin-binding site of ryanodine receptor and modulates skeletal muscle excitation-contraction coupling. *J Biol Chem.* 2008; 283:5046–57.

103. Prosser BL, Hernandez-Ochoa EO, Zimmer DB, Schneider MF. The Qy component of intramembrane charge movement is present in mammalian muscle fibres, but suppressed in the absence of S100A1. *J Physiol*. 2009; 587:4523–41.
104. Hachem S, Laurenson AS, Hugnot JP, Legraverend C. Expression of S100B during embryonic development of the mouse cerebellum. *BMC Dev Biol*. 2007; 7:17.
105. Raponi E, Agenes F, Delphin C, et al. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia*. 2007; 55:165–77.
106. Saito T, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. S100A1 and S100B, transcriptional targets of SOX trio, inhibit terminal differentiation of chondrocytes. *EMBO Rep*. 2007; 8:504–9.
107. Zhang X, Hamada J, Nishimoto A, et al. HOXC6 and HOXC11 increase transcription of S100 $\beta$  gene in BrdU-induced in vitro differentiation of GOTO neuroblastoma cells into Schwannian cells. *J Cell Mol Med*. 2007; 11:299–306.
108. Mocellin S, Zavagno G, Nitti D. The prognostic value of serum S100B in patients with cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2008; 123:2370–6.
109. Brozzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. S100B protein regulates astrocyte shape and migration via interaction with Src kinase: implications for astrocyte development, activation and tumor growth. *J Biol Chem*. 2009; 284:8797–811.
110. Lin J, Yang Q, Wilder PT, Carrier F, Weber DJ. The calcium-binding protein S100B downregulates p53 and apoptosis in malignant melanoma. *J Biol Chem*. 2010; 285:27487–98.
111. Tubaro C, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. S100B protein in myoblasts modulates myogenic differentiation via NF- $\kappa$ B-dependent inhibition of MyoD expression. *J Cell Physiol*. 2010; 223:270–82.

112. Beccafico S, Riuzzi F, Puglielli C, et al. Human muscle satellite cells show age-related differential expression of S100B protein and RAGE. *Age*. 2011; 33:523–41.

113. Tubaro C, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. S100B in myoblasts regulates the transition from activation to quiescence and from quiescence to activation, and reduces apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813:1092–104.

114. Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Donato R. S100B increases proliferation in PC12 neuronal cells and reduces their responsiveness to NGF via Akt activation. *J Biol Chem*. 2005; 280:4402–14.

115. Donato R. Mechanism of action of S-100 protein(s) on the assembly of brain microtubule proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 124:850–6.

116. Garbuglia M, Verzini M, Donato R. Annexin VI binds S100A1 and S100B and blocks the ability of S100A1 and S100B to inhibit desmin and GFAP assemblies into intermediate filaments. *Cell Calcium*. 1998; 24:177–91.

117. Garbuglia M, Verzini M, Rustandi RR, et al. Role of the C-terminal extension in the interaction of S100A1 with GFAP, tubulin, the S100A1- and S100B-inhibitory peptide, TRTK-12, and a peptide derived from p53, and the S100A1 inhibitory effect on GFAP polymerization. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 254:36–41.

118. Garbuglia M, Verzini M, Hofmann A, Huber R, Donato R. S100A1 and S100B interactions with annexins. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1498:192–206.

119. Donato R. Calcium-independent, pH-regulated effects of S-100 proteins on assembly-disassembly of brain microtubule protein in vitro. *J Biol Chem*. 1998; 263:106–10.

120. Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S-100 protein, but not calmodulin, binds to and inhibits the polymerization of the glial fibrillary acidic protein in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *J Biol Chem*. 1993; 268:12669–74.

121. Garbuglia M, Verzini M, Giambanco I, Spreca A, Donato R. Effects of calcium-binding proteins (S100a0, S100a, S100b) on desmin assembly in vitro. *FASEB J*. 1996; 10:317–24.

122. Sorci G, Agneletti AL, Donato R. Effects of S100A1 and S100B on microtubule stability. An in vitro study using tritoncytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines. *Neuroscience*. 2000; 99:773–83.

123. Van Dieck J, Teufel DP, Jaulent AM, et al. Posttranslational modifications affect the interaction of S100 proteins with tumor suppressor p53. *J Mol Biol*. 2009; 394:922–30.

124. Gilquin B, Cannon BR, Hubstenberger A, et al. The calcium-dependent interaction between S100B and the mitochondrial AAA ATPase ATAD3A and the role of this complex in the cytoplasmic processing of ATAD3A. *Mol Cell Biol*. 2010; 30:2724–36.

125. Xiong Z, O'Hanlon D, Becker LE, Roder J, MacDonald JF, Marks A. Enhanced calcium transients in glial cells in neonatal cerebellar cultures derived from S100B null mice. *Exp Cell Res*. 2000; 257:281–9.

126. Gentil BJ, Delphin C, Mbele GO, et al. The giant protein AHNAK is a specific target for the calcium- and zinc-binding S100B protein: potential implications for Ca<sup>2+</sup> homeostasis regulation by S100B. *J Biol Chem*. 2001; 276:23253–61.

127. Tsoporis JN, Overgaard CB, Izhar S, Parker TG. S100B modulates the hemodynamic response to norepinephrine stimulation. *Am J Hypertens*. 2009; 22:1048–53.

128. Sahoo N, Troger J, Heinemann SH, Schonherr R. Current inhibition of human EAG1 potassium channels by the Ca<sup>2+</sup> binding protein S100B. *FEBS Lett*. 2010; 584:3896–900.

129. Liu J, Wang H, Zhang L, et al. S100B transgenic mice develop features of Parkinson's disease. *Arch Med Res*. 2011; 42:1–7.

130. Liu Y, Buck DC, Neve KA. Novel interaction of the dopamine D2 receptor and the Ca<sup>2+</sup>-binding protein S100B: role in D2 receptor function. *Mol Pharmacol*. 2008; 74:371–8.

131. Rambotti MG, Giambanco I, Spreca A, Donato R. S100B and S100A1 proteins in bovine retina: their calcium-dependent stimulation of a membrane-bound

guanylate cyclase activity as investigated by ultracytochemistry. *Neuroscience*. 1999; 92:1089–101.

132. Vives V, Alonso G, Solal AC, Joubert D, Legraverend C. Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. *J Comp Neurol*. 2003; 457:404–19.

133. Schroeter ML, Abdul-Khaliq H, Sacke J, Steiner J, Blasig IE, Mueller K. Mood disorders are glial disorders: evidence from in vivo studies. *Cardiovasc Psychiatr Neurol*. 2010; 2010:780645.

134. Rothermundt M, Ahn JN, Jorgens S. S100B in schizophrenia: an update. *Gen Physiol Biophys*. 2009; 28:P.76–81.

135. Reppel M, Sasse P, Piekorz R, et al. S100A1 enhances the L-type Ca<sup>2+</sup> current in embryonic mouse and neonatal rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2005; 280:36019–28.

136. Hernandez-Ochoa EO, Prosser BL, Wright NT, Contreras M, Weber DJ, Schneider MF. Augmentation of Cav1 channel current and action potential duration after uptake of S100A1 in sympathetic ganglion neurons. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009; 297:C955–70.

137. Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*. 2003; 21:97–108.

138. Sorci G, Bianchi R, Riuzzi F, et al. S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart, and beyond. *Cardiovas Psychiatry Neurol*. 2010.

139. Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through RAGE activation. *J Biol Chem*. 2000; 275:40096–105.

140. Businaro R, Leone S, Fabrizi C, et al. S100B protects neurons against A $\beta$  amyloid-induced neurotoxicity via RAGE engagement at low doses and increases A $\beta$  amyloid neurotoxicity at high doses. *J Neurosci Res*. 2006; 83:897–906.



141. Leclerc E, Fritz G, Weibel M, Heizmann CW, Galichet A. S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains. *J Biol Chem.* 2007; 282:31317–31.

142. Reali C, Scintu F, Pillai R, Donato R, Michetti F, Sogos V. S100B counteracts effects of the neurotoxicant trimethyltin on astrocytes and microglia. *J Neurosci Res.* 2005; 81:677–86.

143. Zhang L, Liu W, Alizadeh D, et al. S100B attenuates microglia activation in gliomas: possible role of STAT3 pathway. *Glia.* 2011; 59:486–98.

144. Petrova V, Hu J, Van Eldik LJ. Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures. *Brain Res.* 2000; 853:74–80.

145. Adami C, Sorci G, Blasi E, Agneletti AL, Bistoni F, Donato R. S100B expression in and effects on microglia. *Glia.* 2001; 33:131–42.

146. Adami C, Bianchi R, Pula G, Donato R. S100B-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1742:169–77.

147. Bianchi R, Adami C, Giambanco I, Donato R. The S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *J Leukoc Biol.* 2007; 81:108–18.

148. Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF- $\kappa$ B and AP-1. Co-regulation of COX-2 expression by S100B and IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . *Neurobiol Aging.* 2010; 31:665–77.

149. Bianchi R, Kastrisianaki E, Giambanco I, Donato R. S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent upregulation of chemokine expression and release. *J Biol Chem.* 2011; 286:7214–26.

150. Mori T, Tan J, Arendash GW, Koyama N, Nojima Y, Town T. Overexpression of human S100B exacerbates brain damage and periinfarct gliosis after permanent focal ischemia. *Stroke.* 2008; 39:2114–21.

151. Wainwright MS, Craft JM, Griffin WS, et al. Increased susceptibility of S100B transgenic mice to perinatal hypoxiaischemia. *Ann Neurol.* 2004; 56:61–7.
152. Mori T, Koyama N, Arendash GW, Horikoshi-Sakuraba Y, Tan J, Town T. Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Glia.* 2010; 58:300–14.
153. Kleindienst A, McGinn MJ, Harvey HB, Colello RJ, Hamm RJ, Bullock MR. Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2005; 22:645–55.
154. Kleindienst A, Bullock MR. A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. *J Neurotrauma.* 2006; 23:1185–200.
155. Willoughby KA, Kleindienst A, Muller C, Chen T, Muir JK, Ellis EF. S100B protein is released by in vitro trauma and reduces delayed neuronal injury. *J Neurochem.* 2004; 91:1284–91.
156. Ellis EF, Willoughby KA, Sparks SA, Chen T. S100B protein is released from rat neonatal neurons, astrocytes, and microglia by in vitro trauma and anti-S100 increases trauma-induced delayed neuronal injury and negates the protective effect of exogenous S100B on neurons. *J Neurochem.* 2007; 101:1463–70.
157. Yan SS, Wu ZY, Zhang HP, et al. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system. *Nat Med.* 2003; 9:287–93.
158. Shaw SS, Schmidt AM, Banes AK, Wang X, Stern DM, Marrero MB. S100B-RAGE-mediated augmentation of angiotensin II-induced activation of JAK2 in vascular smooth muscle cells is dependent on PLD2. *Diabetes.* 2003; 52:2381–8.
159. Ma W, Lee SE, Guo J, et al. RAGE ligand upregulation of VEGF secretion in ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48:1355–61.
160. Zimmer DB, Weber DJ. The calcium-dependent interaction of S100B with its protein targets. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010.

161. Bhattacharya S, Bunick CG, Chazin WJ. Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1742:69–79.
162. Ostendorp T, Diez J, Heizmann CW, Fritz G. The crystal structures of human S100B in the zinc and calcium-loaded state at three pH values reveal zinc ligand swapping. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813:1083–91.
163. Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J*. 2006; 396:201–14.
164. Weber, DJ. Rustandi, R.; Carrier, F.; Zimmer, DB. CALCIUM: The Molecular Basis of Calcium Action in Biology and Medicine. Pochet, R., editor. Kluwer Academic Publishers; Dordrecht: 2000. p. 521-39.
165. Markowitz J, Chen I, Gitti R, et al. Identification and characterization of small molecule inhibitors of the calcium-dependent S100B-p53 tumor suppressor interaction. *J Med Chem*. 2004; 47:5085–93.
166. Markowitz J, Mackerell AD Jr, Carrier F, Charpentier TH, Weber DJ. Design of inhibitors for S100B. *Curr Top Med Chem*. 2005; 5:1093–108.
167. Charpentier TH, Wilder PT, Liriano MA, et al. Small molecules bound to unique sites in the target protein binding cleft of calcium-bound S100B as characterized by nuclear magnetic resonance and X-ray crystallography. *Biochemistry*. 2009; 48:6202–12.
168. Wright NT, Cannon BR, Zimmer DB, Weber DJ. S100A1: Structure, Function, and Therapeutic Potential. *Curr Chem Biol*. 2009; 3:138–45.
169. Wilder PT, Lin J, Bair CL, et al. Recognition of the tumor suppressor protein p53 and other protein targets by the calcium-binding protein S100B. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1763:1284–97.
170. Wilder PT, Charpentier TH, Liriano M, et al. In vitro screening and structural characterization of inhibitors of the S100B-p53 interaction. *Int J High-Throughput Screening*. 2010; (1):109–126.
171. Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows RP, Fesik SW. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science*. 1996; 274:1531–4.

172. Huang Q, Petros AM, Virgin HW, Fesik SW, Olejniczak ET. Solution structure of a Bcl-2 homolog from Kaposi sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:3428–33.

173. Leclerc E, Heizmann CW. The importance of Ca<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> signaling S100 proteins and RAGE in translational medicine. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011; 3:1232–62.

174. Arumugam T, Ramachandran V, Logsdon CD. Effect of cromolyn on S100P interactions with RAGE and pancreatic cancer growth and invasion in mouse models. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98:1806–18.

175. Reddy TR, Li C, Guo X, Myrvang HK, Fischer PM, Dekker LV. Design, synthesis, and structureactivity relationship exploration of 1-substituted 4-aryloxy-3-hydroxy-5-phenyl-1H-pyrrol-2(5H)-one analogues as inhibitors of the annexin A2-S100A10 protein interaction. *J Med Chem*. 2011; 54:2080–94.

176. Garrett SC, Hodgson L, Rybin A, et al. A biosensor of S100A4 metastasis factor activation: inhibitor screening and cellular activation dynamics. *Biochemistry*. 2008; 47:986–96.

177. House RP, Pozzuto M, Patel P, et al. Two functional S100A4 monomers are necessary for regulating nonmuscle myosin-IIA and HCT116 cell invasion. *Biochemistry*. 2011; 50:6920–32.

178. Mack GS, Marshall A. Lost in migration. *Nat Biotechnol*. 2010; 28:214–29.

179. Elenjord R, Ljones H, Sundkvist E, Loennechen T, Winberg JO. Dysregulation of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors by S100A4. *Connect Tissue Res*. 2008; 49:185–8.

180. Markowitz J, MacKerell AD Jr, Weber DJ. A search for inhibitors of S100B, a member of the S100 family of calcium-binding proteins. *Mini Rev Med Chem*. 2007; 7:609–16.

181. Donato R. Chlorpromazine binding to S-100 protein. *J Neurochem*. 1984; 42:1468–71.

182. Donato R. Chlorpromazine inhibits the calcium-mediated effects of S-100 protein(s) on assembled brain microtubule proteins, but not those on microtubule protein assembly. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 122:983–90.

183. Matsumoto T, Murao S, Kito K, Kihana T, Matsuura S, Ueda N. Modulation of S-100 genes response to growth conditions in human epithelial tumor cells. *Pathol Int.* 1997; 47:339–46.

184. Sack U, Walther W, Scudiero D, et al. S100A4-induced cell motility and metastasis is restricted by the Wnt/  $\beta$ -catenin pathway inhibitor calcimycin in colon cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2011; 22:3344–54.

185. Sack U, Walther W, Scudiero D, et al. Novel effect of antihelminthic Niclosamide on S100A4-mediated metastatic progression in colon cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011; 103:1018–36.

186. Дубей І. Я., Дубей Л. В. Синтез (2'-5')-триаденілатів та їх аналогів з використанням О-нуклеофільного каталізу реакції міжнуклеотидної конденсації // *Biopolymers and Cell.* – 2007. – 23, № 6. – С. 538–544.

187. Wishart DS, Bigam CG, Yao J, Abildgaard F, Dyson HJ, Oldfield E, Markley JL, Sykes BD.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J Biomol NMR.* 1995;6(2):135–40.

188. Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A. NMR Pipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR.* 1995;6(3):277–93.

189. Goddard TD, Kneller DG. SPARKY 3. San Francisco, University of California, 2004.

190. Anne T Tuukkanen, Dmitri I Svergun. Weak protein-ligand interactions studied by small-angle X-ray scattering // *FEBS J.* – 2014. – 281(8). –1974-87.

191. C.J. Hastie, H.J. McLauchlan, P. Cohen, Assay of protein kinases using radio-labeled ATP: a protocol // *Nat. Protocol.* – 2006 – P. 968-971.

192. Deloulme, Jean Christophe & Mbele, Gaëlh & Baudier, Jacques. S100 Proteins: From Purification to Functions // *Methods in molecular biology* – 2002. – 172. – С. 185-98.

193. Грищенко А. А., Бджола В. Г., Кухаренко О. П., Ярмолюк С. М. Пошук інгібіторів протеїнкінази FGFR1 серед похідних хромону // *Ukr. Bioorg. Acta.* – 2009. – № 1. – С. 50–56.

194. Jakob Dogan, Stefano Gianni and Per Jemth. The binding mechanisms of intrinsically disordered proteins // *Phys. Chem. Chem. Physics* – 2014 – 16. – P.6323-6331

195. Uversky, V. N., Oldfield, C. J., Midic, U., Xie, H., Xue, B., Vucetic, S., Iakoucheva, L. M., Obradovic, Z., and Dunker, A. K. Unfoldomics of human diseases. Linking protein intrinsic disorder with diseases // *BMC Genomics* – 2009 – 10. – Suppl. 1, S7.

## ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ  
ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Скоробогатов О. Ю.**, Жуков О. Ю., Ткачук З. Ю. Структурні механізми взаємодії дефосфорильованих 2'-5'-триаденілатів з білком S100A1 // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2020. – № 1. – С. 89-94.
2. **Skorobogatov OY**, Kukhareno AP, Kozlov OV, Dubey IY and Tkachuk ZY. 2'-5'-Linked Triadenylates Act as Protein Kinase Activity Modulators // Journal of Proteomics & Bioinformatics. – 2017. – Vol. 10, №12. – P. 320-323.
3. **О. Ю. Скоробогатов**, І.Ю. Жуков, З.Ю. Ткачук. 2',5'-олігоаденілати змінюють вторинну структуру та функціональну активність білка S100A1 людини // Допов. Нац. акад. наук Укр. – 2015. – № 3. – С. 157-160.
4. **Skorobogatov O. Yu.**, Lozhko D. N., Zhukov I. Yu., Kozlov O. V., Tkachuk Z. Yu. Study of dephosphorylated 2'-5'-linked oligoadenylates impact on apo-S100A1 protein conformation by heteronuclear NMR and circular dichroism. // Biopolym. Cell. – 2014. – Vol. 30, № 4. – P. 279-285.
5. Z. Yu. Tkachuk, A. V. Kozlov, **O. Yu. Skorobogatov**. Structural Changes in Therapeutic RNAs / Macromolecular Symposia. – 2014. – Vol 335, № 1. – P. 17-19.
6. **О. Ю.Скоробагатов**, І.Ю.Жуков, З.Ю.Ткачук. Вивчення взаємодії дефосфорильованого 2'-5'-триаденілату з протеїном S100A1 людини. Матеріали XII українського біохімічного конгресу, Медична та клінічна хімія. – Тернопіль, Україна. – 2019. – Т. 21, №3. – С. 45.
7. **Skorobogatov Oleksandr Yu.**, Gajda M., Zhukov Igor Yu., Tkachuk Zenoviy Yu. Study on 2'-5'A3 binding to human protein S100A1 // Abstracts of IX Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. – 2015. – Vol. 31 (Special Issue). – P. 11.
8. **O. Skorobogatov**, I. Zhukov, O. Kozlov, P. Gajda, Z. Tkachuk. 2'-5'-linked oligoadenylates alter the conformation of human S100A1 protein and its functional profile // Abstracts of Conference for Young Scientists. - Kiev, Ukraine. – 2015. – P.35.
9. **O. Yu. Skorobogatov**, I. Yu. Zhukov, Z. Yu. Tkachuk. Expression of recombinant human Calmodulin in insect cells and its purification // Abstracts of VIII Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. – 2014. – Vol. 30 (Special Issue). – P. 19.
10. **Oleksandr Yu. Skorobogatov**, Igor Yu. Zhukov, Zenoviy Yu. Tkachuk. 2'-5'-linked oligoadenylates alter the conformation of S100A1 and S100B proteins // Abstracts of VII Conference of Young Scientists Institute of

Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29(Special Issue). – P. 25.

11. **Oleksandr Skorobogatov**, Igor Zhukov and Zenoviy Tkachuk. 2'-5'a3 and its analogue alter s100a1 conformation and Ca<sup>2+</sup> binding profile // Book of abstracts of Young Scientists Forum. FEBS. – Saint Petersburg, Russia. – 2013. – P.114.

### ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. XII український біохімічний конгрес, Тернопіль, Україна, 2019;
2. Конференція молодих вчених «IX Conference of Young Scientists», Київ, Україна, 2015;
3. Конференція молодих вчених «Conference for Young Scientists», Київ, Україна, 2015;
4. Конференція молодих вчених «Conference of Young Scientists», Київ, Україна, 2014;
5. Конференція молодих вчених «Conference of Young Scientists», Київ, Україна, 2013;
6. Форум молодих вчених Федерації Європейських біохімічних товариств «Young Scientists Forum. FEBS», Санкт-Петербург, Росія, 2013.