

РОЛЬ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ В СТАБИЛИЗАЦИИ СТРУКТУРЫ ПЕРОКСИРЕДОКСИНОВ

© 2018 г. М.Г. Шарапов*, Н.В. Пеньков*, С.В. Гудков** *** ****, Р.Г. Гончаров*,
В.И. Новоселов*, Е.Е. Фесенко*

*Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

**Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского,
129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2

***Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 38

****Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

E-mail: sharapov.mg@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.09.2017 г.

После доработки 27.10.17 г.

С помощью физико-химических и биохимических методов проведена сравнительная характеристика термостабильности пероксиредоксинов P_{rx}1–P_{rx}6 человека и показана роль дисульфидных связей в стабилизации их структуры. Среди исследованных пероксиредоксинов P_{rx}1 и P_{rx}2 обладают наибольшей пероксидазной активностью и термостабильностью. В среднем, по сравнению с остальными пероксиредоксинами P_{rx}1 и P_{rx}2 более чем в два раза активнее в отношении H₂O₂ и гидропероксида *трет*-бутила, но при этом сохраняют не менее 50% своей активности после 30-минутного прогрева при температуре 64°C, что более чем на 10°C превышает значения полученные для P_{rx}3–6. Восстановление дисульфидных связей P_{rx}1 и P_{rx}2 приводит к снижению их термостабильности, приближая к значениям термостабильности P_{rx}3–P_{rx}6, что подтверждает важную роль межмолекулярных S–S-связей в стабилизации структуры этих белков.

Ключевые слова: пероксиредоксины, олигомеры, термостабильность, калориметрия, светорассеяние, дисульфидные связи.

Пероксиредоксины (P_{rx}) – древнее семейство пероксидаз, которые широко представлены во всем живом мире и способны восстанавливать гидропероксиды как органической, так и неорганической природы [1]. Кроме пероксидазной активности, P_{rx} при определенных условиях проявляют шаперонную и фосфолипазную активность, а также играют важную сигнально-регуляторную роль в клетке [2].

Молекулярная масса белков семейства P_{rx} находится в диапазоне 20–30 кДа. По аминокислотной последовательности пероксиредоксины не проявляют значительной гомологии с другими антиоксидантными ферментами, несмотря на то, что по пространственной структуре они могут быть очень близки с тиоловыми оксидоредуктазами, так как имеют общую с ними тиоредоксиновую укладку [3]. По количеству остатков цистеина (Cys), непосредственно участвующих в ферментативной реакции,

пероксиредоксины разделены на два основных подсемейства: 1-Cys P_{rx} и 2-Cys P_{rx}. Существенным для катализа и характерным для всех пероксиредоксинов является остаток цистеина в N-концевой области – так называемый пероксидазный цистеин C_P (peroxidatic cysteine). У 2-Cys P_{rx} в C-концевой области белка располагается дополнительный «восстанавливающий» остаток цистеина – C_R (resolving cysteine) (рис. 1). После понимания деталей механизма реакции 2-Cys P_{rx} позже были разделены на типичные 2-Cys- и атипичные 2-Cys-пероксиредоксины. У млекопитающих обнаружено шесть представителей семейства пероксиредоксинов: P_{rx}1–P_{rx}4 (типичные 2-Cys P_{rx}), P_{rx}5 (атипичный 2-Cys P_{rx}) и P_{rx}6 (1-Cys P_{rx}).

Аминокислоты, формирующие пероксидазный каталитический центр пероксиредоксинов, являются высококонсервативными. Каталитический центр суперсемейства тиоловых оксидоредуктаз имеет консервативный мотив CXXC (два цистеина разделены двумя другими ами-

Сокращение: P_{rx} – пероксиредоксины.

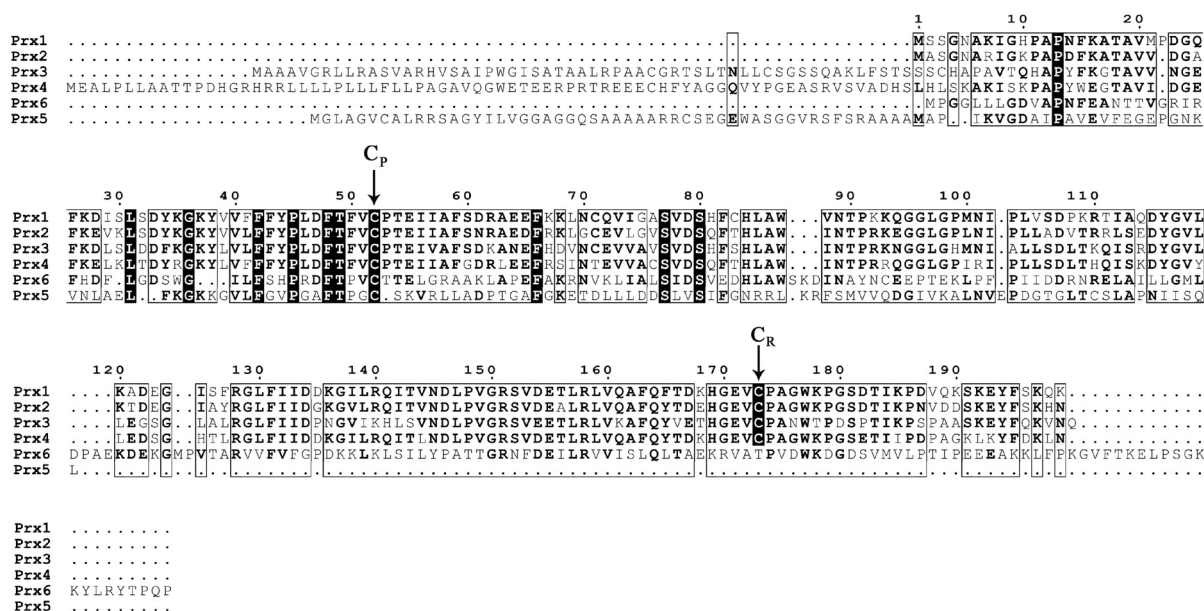


Рис. 1. Аминокислотные последовательности пероксиредоксинов человека Prx1–Prx6. Черным фоном выделены высококонсервативные, а жирным шрифтом – консервативные аминокислоты. C_P – пероксидазный остаток цистеина, C_R – восстанавливающий остаток цистеина.

нокислотами), в случае семейства пероксиредоксинов один из цистеинов замещен на треонин – ТХХС (рис. 1) [4]. Анализ имеющихся на сегодняшний день трехмерных структур пероксиредоксинов показал, что несмотря на различия в аминокислотных последовательностях, все Prx имеют общую тиоредоксиновую укладку, которая включает в себя четыре β-структуры и три α-спирали, с небольшими отличиями в виде вставок дополнительных вторичных элементов структуры [5]. Пероксидазный остаток цистеина (C_P–SH) находится в узком, доступном для растворителя «кармане» и находится на первом витке α2-спирали. После реакции с гидропероксидами C_P–SH окисляется до сульфеновой кислоты (C_P–SOH), которая восстанавливается до C_P–SH в присутствии тиолов, таких как глутатион и т.п. При высоких концентрациях гидропероксидов в клетке пероксидазный остаток цистеина может окисляться до сульфеновой (C_P–SO₂H) и сульфоновой (C_P–SO₃H) кислот, причем последняя – это необратимо окисленная форма. Восстановление окисленного пероксидазного цистеина 1-Cys Prx происходит через образование дисульфидной связи (S–S) с низкомолекулярными тиолами (C_P–S–S–R) и последующим восстановлением до C_P–SH. В случае 2-Cys-пероксиредоксинов восстановление пероксидазного (C_P–SH)-цистеина происходит благодаря восстанавливающему (C_R–SH)-цистеину, который расположен на карбоксильном конце той же полипептидной цепи (рис.1). Ти-

пичные 2-Cys Prx образуют S–S-связь между цистеинами двух мономеров (aC_P–S–S–bC_R), атипичные 2-Cys Prx образуют внутримолекулярную S–S-связь в пределах одной полипептидной цепи (aC_P–S–S–aC_R). Пероксидазный (C_P–SH) и восстанавливающий (C_R–SH) цистеины 2-Cys Prx пространственно разобщены на значительное расстояние, поэтому для образования между ними внутри- или межмолекулярной S–S-связи и последующего восстановления C_P–SOH требуется локальное разворачивание α2-спирали. Подобные конформационные перестройки, сопровождающиеся локальным разворачиванием α2-спирали, и формирование так называемой C_P-петли являются общими как для 1-Cys-, так и для 2-Cys-пероксиредоксинов [6].

Значительные структурные отличия между представителями семейства пероксиредоксинов наблюдаются на уровне четвертичной структуры. Так, 1-Cys Prx (Prx6) – это гомодимеры, а атипичные 2-Cys Prx (Prx5) – мономеры, в то время как типичные 2-Cys Prx могут быть гомодимерами или олигомерами. Олигомерные формы типичных 2-Cys Prx представляют из себя высокомолекулярные структуры в виде тороидов (пять–шесть гомодимеров замыкаются в кольцо) и полых цилиндрических структур (сложенные в стопки тороиды) [7–9]. Олигомеры 2-Cys Prx появляются вследствие переокисления активного пероксидазного цистеина (C_P–SO₂H, C_P–SO₃H), например, в условиях окислительного стресса. При этом если димеры 2-Cys Prx –

это типичные пероксидазы, то олигомеры обладают шаперонной активностью. Таким образом, в зависимости от окислительно-восстановительного статуса клетки происходят структурные перестройки пероксиредоксинов, что ведет к изменению их функций в клетке [7]. Важную роль в восстановлении ферментативной активности пероксиредоксинов и образовании/поддержании олигомерных структур играют межмолекулярные дисульфидные связи [8,9]. В данной работе впервые с помощью физико-химических и биохимических методов проведена оценка вклада дисульфидных связей в стабильность олигомерных структур пероксиредоксинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение, выделение и очистка рекомбинантных пероксиредоксинов. Генно-инженерные конструкции, содержащие гены Prx1–Prx5 человека, были получены с помощью стандартных молекулярно-биологических методов, как было описано ранее при получении Prx6 человека [10]. Полученные генно-инженерные конструкции использовали для трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3). Ночной культурой трансформантов заражали 1 л среды LB с ампициллином (100 мкг/мл) и выращивали на качалке (120 об/мин) при +37°C до оптической плотности $D = 0,6$ ($\lambda = 600$ нм), после чего добавляли изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид до конечной концентрации 1 мМ и культивировали еще в течение 4 ч при +30°C. Бактерии собирали центрифугированием (4000 об/мин, 20 мин). Все генно-инженерные конструкции кодируют последовательность шести остатков гистидина (His-tag) на карбоксильном конце белков Prx1–Prx6, что позволяет провести очистку белков с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Очистку белков Prx1, Prx2, Prx4 и Prx6 проводили в нативных условиях по следующей схеме. Осадок бактерий (5 г) ресуспендировали в 25 мл связывающего буфера «В» (15 мМ трис–HCl, pH 7,8, 150 мМ NaCl, 10 мМ имидазола) и разрушали ультразвуком при 4°C с помощью установки УЗДН-2Т (Россия). Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 14000 g в течение 30 мин, надосадок фильтровали через фильтр с порами 0,45 мкм (Coring, США) и наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой (Invitrogen, США), которая предварительно была уравновешена тем же буфером «В». Лизат пропускали через колонку три–четыре раза (при +4°C), что позволяет полностью связаться целевому белку с носителем. Затем колонку промывали 200 мл буфера «W» (15 мМ

трис–HCl, pH 7,8, 150 мМ NaCl, 20 мМ имидазола). Элюцию белка проводили 10 мл буфера «Е» (15 мМ трис–HCl, pH 7,8, 150 мМ NaCl, 250 мМ имидазола). Белок концентрировали с помощью мембранного концентратора Vivaspin с отсечением 10 кДа (Sartorius, Германия) и в нем же диализовали против фосфатного буфера (1,7 мМ KH_2PO_4 , 5,2 мМ Na_2HPO_4 , 150 мМ NaCl, pH 7,4). В ходе синтеза в клетках *E. coli* белки Prx3 и Prx5 образуют водонерастворимые тельца включений, поэтому эти ферменты выделяли в денатурирующих условиях с помощью 8 М мочевины по следующей схеме. Осадок бактерий (~2 г) растворяли в 10 мл денатурирующего раствора «D» (15 мМ трис–HCl, pH 7,8, 150 мМ NaCl, 8 М мочевины, 10 мМ имидазола), добиваясь полного растворения осадка с помощью ультразвуковой обработки. Полученный раствор центрифугировали (30 мин, 14000 g при +10°C), надосадок фильтровали через фильтр с порами 0,45 мкм и пропускали три–четыре раза (при +10°C) через колонку ($V = 10$ мл) с Ni-NTA-агарозой, предварительно уравновешенную буфером «D». Затем колонку промывали 100 мл буфера «dW» (15 мМ трис–HCl, pH 7,8, 150 мМ NaCl, 8 М мочевины, 20 мМ имидазола), после чего проводили ступенчатое сворачивание белка на колонке путем промывки растворами «R1–5» (по 50 мл каждого) с понижающейся до нуля концентрацией мочевины (15 мМ трис–HCl, pH 7,8, 150 мМ NaCl, 8 М–6 М–4 М–2 М–0 М). Затем проводили элюцию белка 10 мл буфера «Е» (15 мМ трис–HCl, pH 7,8, 150 мМ NaCl, 250 мМ имидазола). Белок концентрировали с помощью мембранного концентратора Vivaspin (отсечение 10 кДа) и диализовали против фосфатного буфера (1,7 мМ KH_2PO_4 , 5,2 мМ Na_2HPO_4 , 150 мМ NaCl, pH 7,4). По данным электрофореза, чистота белков Prx1–Prx6 составляла не менее 95%. Электрофорез белков в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия проводили по стандартной методике Лэммли. Препараты ферментов Prx1–Prx6 (в концентрации 10 мг/мл) хранили при –20°C. За два месяца хранения не отмечено снижения ферментативной активности.

Определение пероксидазной активности. Пероксидазную активность Prx1–Prx6 определяли согласно процедуре, описанной в работе [11], с небольшими модификациями. Реакционная смесь (150 мкл) содержала 7 мМ фосфатного буфера, pH 7,3, 150 мМ NaCl, 2 мМ дитиотреитола, 100 мкМ пероксида водорода или 100 мкМ гидропероксида *трет*-бутила, а также фермент в различных концентрациях. Реакцию проводили в течение 5 мин при 37°C и оста-

Таблица 1. Ферментативная активность Prx1–Prx6 по отношению к перекиси водорода и гидропероксиду трет-бутила (tBOOH)

Фермент	Ферментативная активность, нмоль/мин/мг белка		Оптимум pH	Оптимум T, °C
	H ₂ O ₂	tBOOH		
Prx1	550	228	6,0–7,5	30–45
Prx2	383	160	6,0–7,5	30–45
Prx3*	80	15	6,0–7,0	30–42
Prx4	183	57	6,0–7,0	30–40
Prx5*	204	23,5	6,0–7,0	30–42
Prx6	200	95	6,0–7,0	30–42

Примечание. * – Белки получены путем ренатурации из 8 М мочевины. Приведены средние значения ($n = 3$). Стандартное отклонение составляет $\pm 7\%$ от средних значений.

наливали, добавляя 50 мкл 0,6 М HCl. Затем добавляли 100 мкл 10 мМ Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ и 50 мкл 2,5 М KSCN, что приводило к образованию комплексного соединения железа красного цвета. Концентрация перекисных соединений пропорциональна интенсивности окраски, которую измеряли при длине волны 492 нм. Для каждой концентрации белка проводили по три измерения. Погрешность измерений составляла $\pm 7\%$ от среднего значения.

Определение термостабильности ферментов. Растворы белков Prx1–Prx6 (в концентрации 1 мг/мл) прогревали в термоциклере MJ Mini (BioRad, США), с установкой градиента по температуре 37–90°C (отклонение от заданной температуры $\pm 0,2^\circ\text{C}$). Объем проб составлял 100 мкл. Прогрев проводили в течение 30 мин. Остаточную пероксидазную активность ферментов определяли при 37°C [12].

Дифференциальная сканирующая калориметрия. Тепловую денатурацию белков изучали с помощью дифференциального сканирующего калориметра Nano DSC 602001 фирмы TA Instruments (США). Растворы белка с концентрацией 1 мг/мл нагревали с постоянной скоростью 1 К/мин от 20 до 90°C (отклонение от заданной температуры $\pm 0,1^\circ\text{C}$) при постоянном избыточном давлении воздуха 4 атм для минимизации процесса испарения образца при нагреве [13].

Интенсивность рассеяния света и определение среднего гидродинамического диаметра частиц в растворах перокси-редоксинов проводили с помощью установки Zeta Sizer nano ZS фирмы Malvern (Великобритания). В качестве источника света использовали He-Ne-лазер с длиной

волны 632,8 нм, угол рассеяния – 173°. Методика подробно описана ранее [14].

Статистическая обработка. Статистический анализ выполняли с использованием программы SigmaPlot 8.0 (Systat Software Inc). Результаты выражали как среднее значение \pm стандартное отклонение (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение активности и термостабильности Prx1–Prx6. Была проведена сравнительная характеристика Prx1–Prx6 человека по их ферментативной активности, а также проведена оценка оптимальных условий катализа (табл. 1).

Как видно из табл. 1, наибольшую пероксидазную активность в отношении как пероксида водорода, так и гидропероксида трет-бутила проявляют Prx1 и Prx2. По сравнению с Prx1 ферментативная активность Prx4 и Prx6 более чем в два раза ниже. Важно отметить, что Prx3 и Prx5 получены путем ренатурации из 8 М мочевины, что могло негативно сказаться на их ферментативной активности. Таким образом, по пероксидазной активности наиболее активными являются 2-Сус-перокси-редоксины Prx1 и Prx2. Более того, Prx1 и Prx2, в отличие от других перокси-редоксинов, сохраняют 90% своей ферментативной активности при несколько более широком диапазоне pH и температуры.

Важной характеристикой фермента является его стабильность. Теоретически стабильность белка может отражать «время жизни» молекулы. Проведена оценка термостабильности Prx1–Prx6 человека по остаточной пероксидазной активности. Белки прогревали при различных

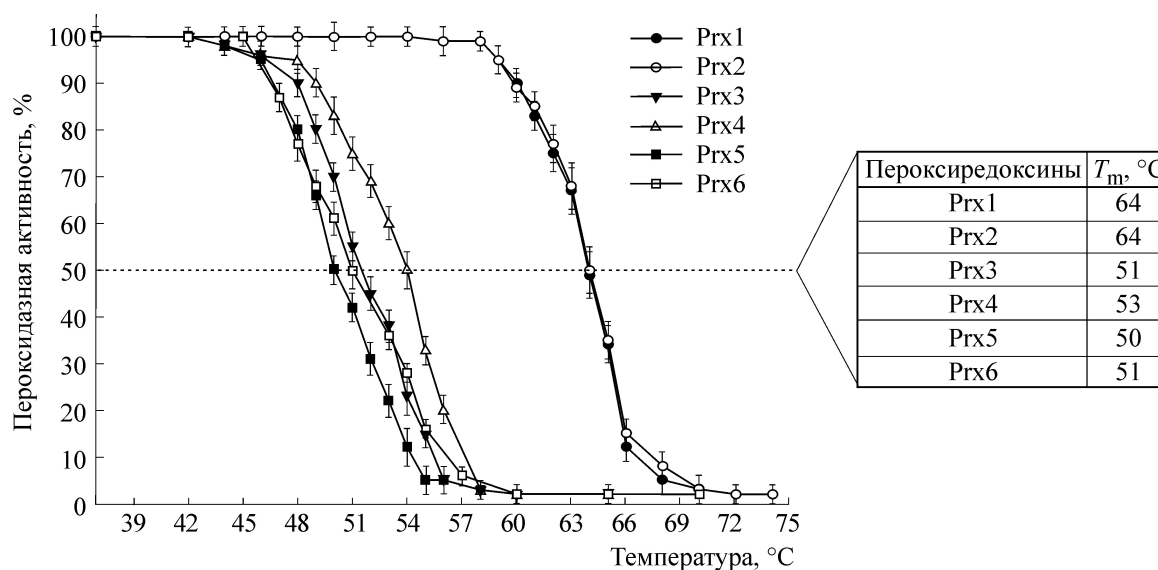


Рис. 2. Определение остаточной активности пероксиредоксинов (1 мг/мл), после прогревания при заданной температуре в течение 30 мин. Представлены средние значения $\pm SD$. На вкладке указаны значения температуры (T_m), при которых сохраняется 50% активности ферментов ($SD \pm 0,5^\circ\text{C}$).

температурах от 37 до 70°C в течение 30 мин, затем определяли остаточную активность.

Как видно из рис. 2, пероксиредоксины в существенной степени отличаются друг от друга по термостабильности, образуя две основные группы. Показано, что Prx3–Prx6 достаточно близки по термостабильности, 50% активности ферменты сохраняют после 30 мин прогревания при температуре $50\text{--}53^\circ\text{C}$, в то время как Prx1 и Prx2 теряют 50% активности только при нагревании до 64°C . Мы предполагаем, что более высокая термостабильность Prx1 и Prx2 связана с их шаперонной активностью, которая, как известно, препятствует термической агрегации [15].

Оценка стабильности пероксиредоксинов с помощью физико-химических методов. С помо-

щью метода дифференциальной сканирующей калориметрии и динамического светорассеяния проведена оценка термодинамических и гидродинамических параметров Prx2 и Prx6, представляющих два крайних случая термостабильности пероксиредоксинов (рис. 3, табл. 2).

Из рис. 3 и табл. 2 следует, что денатурация белков Prx2 и Prx6 в окисленном (ox) состоянии существенно отличается, так для Prx2(ox) максимум пика плавления на 14°C больше, чем в случае Prx6(ox), т.е. окисленная форма Prx2 обладает значительно большей термостабильностью. Ранее отмечалось, что при окислении 2-Cys Prx, к которым относится Prx2, при окислении теряют пероксидазную активность и приобретают шаперонную, которая существенным образом стабилизирует их структуру.

Таблица 2. Основные показатели, характеризующие тепловую денатурацию восстановленной и окисленной форм Prx2 и Prx6

Образец	Начало роста интенсивности светорассеяния, $^\circ\text{C}^*$	Начало роста гидродинамического диаметра, $^\circ\text{C}^*$	Начало эндотермического процесса при нагреве, $^\circ\text{C}^*$	Температура полуперевода $T_m, ^\circ\text{C}^*$	Энтальпия плавления ΔH , кДж/моль**
Prx2(ox)	58	60	64	74	215
Prx2(red)	47	45	48	54, 62	423
Prx6(ox)	49	46	47	60	156
Prx6(red)	47	45	47	60	401

Примечание. * – Приведены средние значения температуры ($n = 3$), стандартное отклонение составляет $\pm 0,5^\circ\text{C}$. ** – Приведены средние значения энтальпии плавления ($n = 3$), стандартное отклонение составляет $\pm 5\%$.

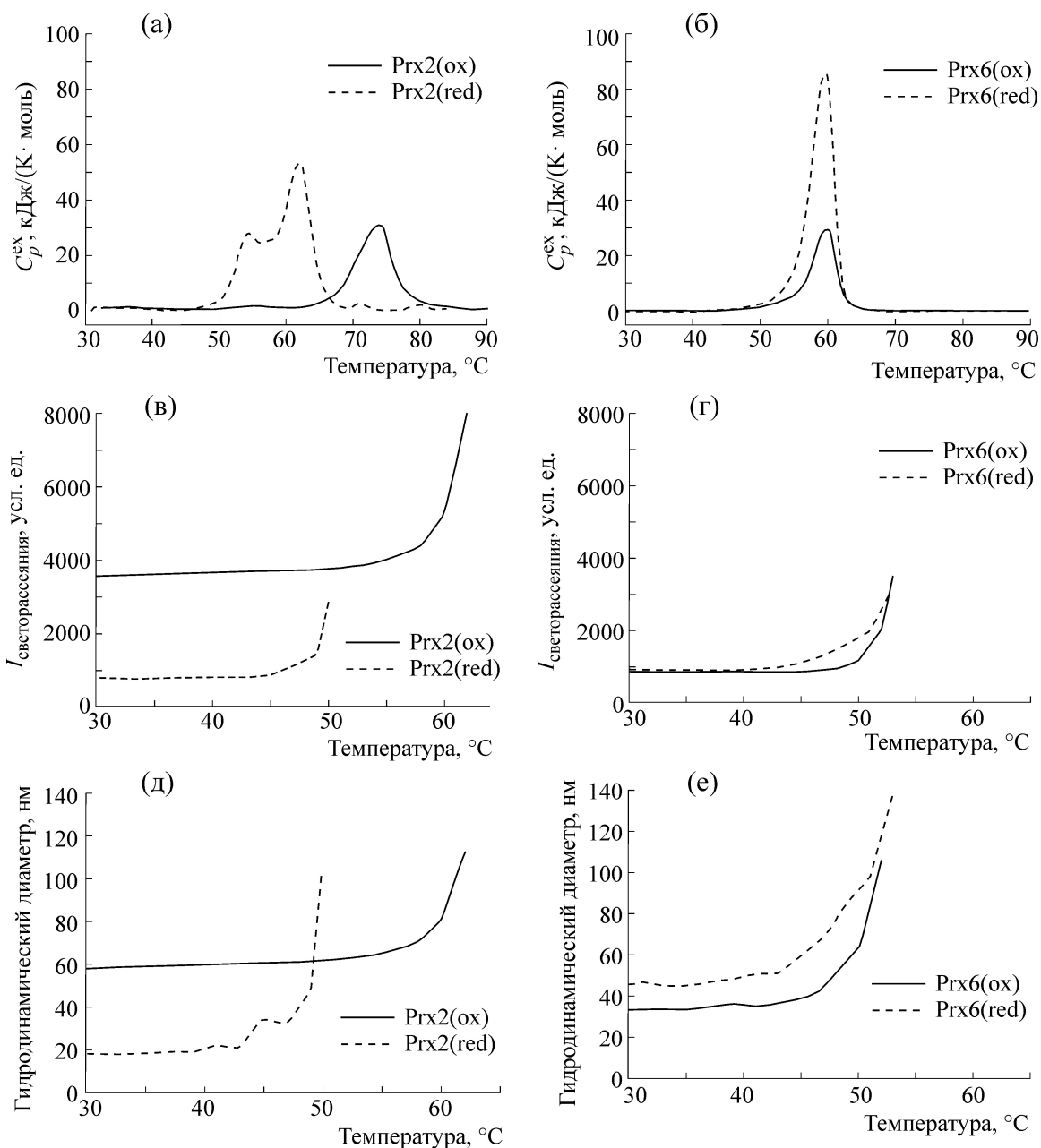


Рис. 3. Проявления тепловой денатурации восстановленной и окисленной форм Prx2 и Prx6. Восстановленные формы белков обозначены как Prx2(red) и Prx6(red), окисленные – Prx2(ox) и Prx6(ox). Концентрация Prx2 и Prx6 составляет 1 мг/мл. (а), (б) – Зависимости изменений избыточной теплоемкости (C_p^{ex}) растворов перокси-редоксинов от температуры. Значения базовой линии вычтены. (в), (г) – Зависимости изменений интенсивности рассеяния света растворами перокси-редоксинов от температуры. (д), (е) – Зависимости изменений среднего гидродинамического диаметра частиц, образованных молекулами перокси-редоксинов, от температуры. Представлены средние значения, стандартное отклонение составляет $\pm 5\%$.

Плавление Prx2 с восстановленными (red) остатками цистеина, в отличие от окисленной формы Prx2(ox), напротив, очень напоминает плавление Prx6. При этом тепловая денатурация Prx6 как в восстановленном, так и окисленном состоянии происходит схожим образом (рис. 3б, табл. 2). Калориметрические данные позволяют

выявить существенное отличие в процессе тепловой денатурации Prx2(red) и Prx6(red). Денатурация восстановленного Prx2(red) происходит, по-видимому, в две стадии, о чем свидетельствует наличие двух пиков плавления (рис. 3а). При этом данный феномен нельзя списать на гетерогенность системы, так как

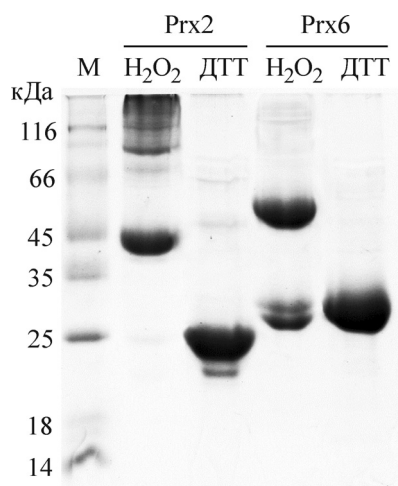


Рис. 4. Электрофорез пероксиредоксинов Prx2 и Prx6 в окисленном (+1 мМ H_2O_2) и восстановленном состоянии (+ 3 мМ дитиотреитола (ДТТ)).

восстановленный Prx2(red) преимущественно является мономером, что подтверждается гелеэлектрофорезом (рис. 4, табл. 3), поэтому наличие двух пиков плавления у Prx2(red) может объясняться плавлением субдоменов данного белка.

Тепловая денатурация Prx2 в окисленном и восстановленном состоянии существенно отличается, разрушение межмолекулярных дисульфидных связей с помощью восстановителя дитиотреитола приводит к падению термостабильности Prx2 примерно на 15°C . Полученные закономерности подтверждают предположение о важной роли межмолекулярных дисульфидных связей в стабилизации структуры олигомеров 2-Cys Prx, в частности Prx2.

При сравнении результатов термостабильности пероксиредоксинов, полученных различными методами, следует, что значение середины перехода (T_m) для Prx2(ox) и Prx6(ox)/Prx6(red), полученное в экспериментах с остаточной активностью, отличается почти на 10°C от значения, полученного методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Данное рас-

хождение, вероятно, объясняется тем, что при нагревании структурные флуктуации белка сильно влияют на его каталитический центр, поэтому последствия нагревания, сказывающиеся на активности фермента, выявляются при более низких температурах.

Как видно из рис. 4 и табл. 3, олигомеризация существенным образом зависит от степени восстановленности цистеинов Prx2 и Prx6. Димеризация и олигомеризация при окислении цистеинов в большей мере характерна для Prx2, чем для Prx6. Показано, что Prx2 в восстановленном состоянии более чем на 90% находится в форме мономеров, тогда как при окислении более 95% молекул Prx2 представлены в виде димеров и олигомеров (рис. 4, табл. 3). У Prx6 в восстановленном состоянии также около 90% молекул являются мономерами. При окислении только 60% молекул Prx6 димеризуется и образует агрегаты, остальные 40% так и остаются мономерами.

Подтверждением «склонности» Prx2 к олигомеризации являются данные по динамическому светорассеянию. Величины гидродинамического диаметра у Prx6 в окисленном и восстановленном состоянии практически не отличаются, в то время как у Prx2 в окисленном и восстановленном отличаются более чем в три раза (рис. 3д,е). Известно, что 2-Cys-пероксиредоксины, в частности Prx2, образуют олигомерные структуры, размеры которых колеблются от 50 нм (тороиды из пяти–шести пар молекул Prx2) до нескольких сотен нм (цилиндрические полые структуры из самих тороидов) [9,16,17], и, как видно из рис. 3в,д, важную роль в стабилизации данных структур играют дисульфидные связи.

Необходимо отметить, что пероксиредоксины благодаря высокой лабильности пероксидазного цистеина (C_p) очень чувствительны к изменению уровня пероксидов в окружающей среде, благодаря чему они участвуют в передаче сигналов, опосредованных гидропероксидами. В качестве партнеров по передаче сигналов выступают белки, содержащие восстановленные

Таблица 3. Степень олигомеризации Prx2 и Prx6 в окисленном и восстановленном состоянии

Фракции	Prx2(ox), %	Prx2(red), %	Prx6(ox), %	Prx6(red), %
Олигомеры	22	3	5	1
Димеры	75	5	56	6
Мономеры	3	92	39	93

Примечание. Результаты получены с помощью денситометрического анализа (рис. 4) с помощью программы ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Приведены средние значения, стандартное отклонение составляет $\pm 8\%$.

остатки цистеинов (–SH-группы), с помощью которых они могут образовывать межмолекулярные дисульфидные связи с пероксиредоксинами. Среди пероксиредоксинов млекопитающих такая функция впервые была показана для Prx4, который преимущественно локализован на эндоплазматическом ретикулуме клетки [18]. Окисленная форма Prx4 (C_p–SOH) непосредственно взаимодействует с окисленной формой протеин-дисульфидизомеразы и на первой стадии образует межмолекулярную дисульфидную связь, которая затем восстанавливается вторым остатком цистеина протеин-дисульфидизомеразы, в результате чего Prx4 становится полностью восстановленным, а протеин-дисульфидизомераза – окисленной. В цитозоле клеток, обработанных H₂O₂, окисленный Prx1 образует межмолекулярную дисульфидную связь с транскрипционным фактором ASK1 [19] и APE1/Ref-1, что подавляет активацию NF-κB и увеличивает экспрессию IL-8 [20]. Для окисленной формы Prx2 была показана сигнально-регуляторная роль через образование межмолекулярной дисульфидной связи с транскрипционным фактором STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription). Взаимодействуя через дисульфидный мостик, Prx2 ингибирует активность STAT3 и транскрипцию генов, контролируемых этим транскрипционным фактором [21]. В кардиомиоцитах для Prx2 было показано образование дисульфидной связи с важным антиоксидантным и регуляторным белком DJ-1 (PARK7) [22].

Таким образом, благодаря высокой лабильности пероксидазного цистеина пероксиредоксины способны образовывать межмолекулярные дисульфидные связи с различными регуляторными белками, тем самым корректируя сценарий развития событий в клетке. Несмотря на прогресс в исследовании роли межмолекулярных дисульфидных связей семейства пероксиредоксинов, сигнально-регуляторные пути, в которых участвуют эти ферменты, требуют дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 15-04-04021а, 17-04-

00356а, 17-44-500476р_а) и гранта Президента Российской Федерации (МК-2261.2017.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Perkins, L. B. Poole, and P. A. Karplus, *Biochemistry* **53**, 7693 (2014).
2. S. G. Rhee, *Mol. Cells* **39**, 1 (2016).
3. E. M. Hanschmann, J. R. Godoy, C. Berndt, et al., *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 1539 (2013).
4. Z. A. Wood, E. Schryder, J. R. Harris, and L. B. Poole, *Trends Biochem. Sci.* **28**, 32 (2003).
5. J. L. Pan and J. C. Bardwell, *Prot. Sci.* **15**, 2217 (2006).
6. A. Perkins, K. J. Nelson, J. R. Williams, et al., *Biochemistry* **52**, 8708 (2013).
7. S. G. Rhee and I. S. Kil, *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 1 (2016).
8. J. König, H. Galliardt, P. Jütte, et al., *J. Exp. Bot.* **64**, 3483 (2013).
9. F. Angelucci, A. Bellelli, M. Ardini, et al., *FEBS J.* **282**, 2827 (2015).
10. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, and V. K. Ravin, *Mol. Biol. (Moscow)* **43** (3), 505 (2009).
11. S. W. Kang, I. C. Baines, and S. G. Rhee, *J. Biol. Chem.* **273**, 6303 (1998).
12. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, E. E. Fesenko, et al., *Free Radic. Res.* **51** (2), 148 (2017).
13. P. L. Privalov, E. I. Tiktopulo, and N. N. Khechinashvili, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **5** (4), 229 (1973).
14. N. F. Bunkin, A. V. Shkirin, N. V. Suyazov, et al., *J. Phys. Chem. B* **120**, 1291 (2016).
15. W. Lee, K. S. Choi, J. Riddell, et al., *J. Biol. Chem.* **282** (30), 22011 (2007).
16. F. Angelucci, F. Saccoccia, M. Ardini, et al., *J. Mol. Biol.* **425**, 4556 (2013).
17. M. G. Sharapov, V. K. Ravin, and V. I. Novoselov, *Mol. Biol. (Moscow)* **48** (4), 600 (2014).
18. T. J. Tavender, J. J. Springate, and N. J. Bulleid, *EMBO J.* **29**, 4185 (2010).
19. R. M. Jarvis, S. M. Hughes, and E. C. Ledgerwood, *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 1522 (2012).
20. H. Nassour, Z. Wang, A. Saad, et al., *Sci. Rep.* **6**, 29389 (2016).
21. M. C. Sobotta, W. Liou, S. Stocker, et al., *Nat. Chem. Biol.* **11**, 64 (2015).
22. M. Fernandez-Caggiano, E. Schroder, H. J. Cho, et al., *J. Biol. Chem.* **291**, 10399 (2016).

The Role of Intermolecular Disulfide Bonds in Stabilizing the Structure of Peroxiredoxins

M.G. Sharapov*, N.V. Penkov*, S.V. Gudkov** *** ****, R.G. Goncharov*,
V.I. Novoselov*, and E.E. Fesenko*

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Vladimirsky Moscow Regional Scientific Research Clinical Institute, ul. Schepkina 61/2, Moscow, 129110 Russia*

****Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 38, Moscow, 119991 Russia*

*****Lobachevsky National Research Nizhny Novgorod State University,
prosp. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603950 Russia*

A comparison of thermal stability characteristics of the peroxiredoxins Prx1 to Prx6 Human was performed using physico-chemical and biochemical methods and the role of disulfide bonds in stabilizing their structure was shown. Among the tested peroxiredoxins, Prx1 and Prx2 exhibit the highest peroxidase activity and thermal stability. Taken together, Prx1 and Prx2 are more than 2 times active against H₂O₂ and hydroperoxide of tert-butyl compared to other peroxiredoxins, thereby retaining at least 50% of its activity after 30 minute warm-up at a temperature of 64°C, that is more than 10°C higher than the values obtained for Prx3 to Prx6. The reduction of the disulfide bonds between Prx1 and Prx2 leads to the decrease of their thermal stability, leading to the values of thermal stability of Prx3–Prx6, which confirms the important role of intermolecular S–S bonds in stabilizing the structure of these proteins.

Keywords: peroxiredoxins, oligomers, thermal stability, calorimetry, light scattering, disulfide bonds