

**GAPTOGLOBINNING TUZILMA MODELI VA UNING
ANTIKOAGULYANT EKOTIN VARIANTLARI BILAN KOMPLEKSLARI:
TUZILMA–FAOLIYAT O‘ZARO BOG‘LIQLIGI BO‘YICHA TADQIQOT
HAMDA O‘ZARO TA’SIRLARNI TAHLIL QILISH.**

Baxodirov Behzod Baxodirovich
Toshkent davlat tibbiyot universiteti

Annotatsiya: Yaqinda ilmiy adabiyotlarda haptoglobin (Hp) ning ekotin bilan bog‘lanishi tasvirlangan. Ekotin-bu antikoagulyant xususiyatga ega, serin proteazalarni ingibitsiya qiluvchi, Escherichia coli tomonidan ishlab chiqariladigan katlanish-spetsifik ingibitor hisoblanadi.

Ushbu ishda biz in silico (kompyuter modellashtirish) va in vitro (tajriba sharoitida) usullar yordamida Hp ning uch o‘lchovli (3D) tuzilmasini hamda ularning tabiiy (wild-type) va ikki xil o‘zgartirilgan ekotin variantlari bilan o‘zaro ta’sirini baholadik.

Olingan ma’lumotlar Hp modellari tripsinga o‘xshash katlanish (fold) tuzilmasini saqlab qolganini ko‘rsatdi, bu esa in vitro sharoitida Hp ning tripsinga qarshi antitanalar tomonidan immunologik aniqlanishi bilan mos keladi.

Ekotinning uch xil kompleksi — RR va TSRR/R mutantlari hamda tabiiy shakli tahlil qilinganda Hp va ekotinning ikkinchi darajali bog‘lanish joyi o‘rtasida bir nechta vodorod bog‘lari mavjudligi aniqlandi. Ushbu natijalar PAGE tahlili bilan ham tasdiqlandi, unda Hp-RR kompleksi tabiiy gel sharoitida kuzatildi.

Qizig‘i shundaki, uchlik (ternar) kompleks ichidagi o‘zaro ta’sirlar inhibitör tuzilmasi va yo‘naltirilgan mutatsiya joyi ga qarab farqlandi. HP ning TSRR/R varianti bilan o‘zaro ta’siri yangi aminokislotalar qoldiqlarini jalb qilgan bo‘lib, bu esa mutatsiya natijasida bog‘lanish energiyasining ortishini ko‘rsatadi.

Kalit so‘zlar: Qiyosiy molekulyar modellashtirish, Ekotin variantlari, Gaptoglobin, Serin-proteaza ingibitori, uchlik (ternar) komplekslar.

Kirish: Gaptoglobin (Hp)-bu gemoglobin (Hb) bilan bog‘lanadigan, qon plazmasida mavjud va jigar tomonidan sintez qilinadigan oqsildir [1]. Ushbu α_2 -sialoglikoprotein inson fiziologik jarayonlarining bir nechtasida muhim rol o‘ynaydi, chunki u plazmadagi erkin Hb kabi turli oqsillar bilan o‘zaro ta’sir qiladi. Hp-Hb bilan barqaror kompleks hosil qilib, makrofag CD163 retseptori bilan birgalikda Hb bilan bog‘liq temirni tezda yo‘qotilishini ta’minlaydi [2-4]. Bu mexanizm qon aylanish tizimida temirning uzoq saqlanishi natijasida yuzaga keladigan oksidlovchi ta’sirlarni oldini oladi[5-6].

Aslida, HP faqat toksik HB ni plazmadan olib tashlash bilangina cheklanmay, balki boshqa biologik jarayonlarda ham ishtirok etadi. Hp shuningdek, immunomodulyator xususiyatlarga ega bo'lgan o'tkir faza oqsili hisoblanadi [7-8]. Qonda Hp kontsentratsiyasining oshishi infeksiya jarayonlarini, o'smalar rivojlanishini yoki organizmdagi yallig'lanish holatini kuzatishda marker sifatida xizmat qilishi mumkin [9-10].

Insonlarda Hp ning ikki xil geni-Hp1 va Hp2 allellari mavjud bo'lib, ular Hp1 genidagi ichki duplikatsiya natijasida paydo bo'lgan. Natijada hosil bo'lgan Hp2 oqsilida α -zanjirlarni bog'lovchi sistein qoldig'i ikki marta takrorlanadi. Shu sababli Hp 2-1 va Hp 2-2 fenotiplari turlicha biologik xususiyatlarni modulyatsiya qiluvchi Hp (α - β) multimerlarining keng spektrini namoyon etadi [6].

Hp ikki zanjirdan iborat: yengil zanjir (α_1 -9 kDa va α_2 -18 kDa) hamda og'ir zanjir (β -38 kDa) bo'lib, ular birlashib monomerik Hp (Hp1) hosil qiladi. Hp dimerni Hp1-1- esa har bir β -zanjirdagi Cys15 qoldiqlari o'rtasidagi disulfid bog' orqali kovalent tarzda bog'lanish natijasida shakllanadi [11-12]. Qiziqarli jihati shundaki, Hp ning yengil (α) zanjiri komplement nazorat oqsillariga o'xshash, og'ir (β) zanjiri esa serin-proteazaga o'xshash ketma-ketlikka ega, biroq unda to'liq katalitik markaz yoki fermentativ faollik mavjud emas [13-15].

Hozirga qadar Hp ning fiziologik ahamiyatga ega bo'lgan makromolekulyar maqsadlar bilan o'zaro ta'siri molekulyar modellash tirish usullari yordamida o'rganilgan [11,12,16]. Shuningdek, Andersen va hammualliflar [14] tomonidan cho'chqa Hp-Hb kompleksining kristall tuzilmasi aniqlanib, Hp-Hb o'zaro ta'sirida ishtirok etuvchi asosiy aminokislota qoldiqlari va Hp ning gem tomonidan induksiyalangan reaktiv kislorod turlarining hosil bo'lishiga qarshi himoya rolini ochib bergan.

Yaqinda bizning tadqiqot guruhimiz tomonidan olib borilgan izlanishlarda Hp ning *Escherichia coli* bakteriyasidan olingan periplazmatik oqsil-ekotin (16 kDa) bilan o'zaro ta'sirga kirishishi aniqlangan. Ekotin "tuzilishga xos" ingibitor bo'lib, tripsinga o'xshash proteazalarga nisbatan g'ayrioddiy keng spetsifiklikka ega. Shu sababli u turli xil biologik faolliklarni (masalan, antikoagulyant, antitrombotsitar va antitumor ta'sirlar) namoyon qiladi [17-18]. Ushbu 142 ta aminokislota qoldig'idan tashkil topgan serin-proteaza ingibitori fermentini tanib olish uchun ikki xil bog'lanish markazidan foydalanadigan o'ziga xos bog'lanish mexanizmiga ega [19]. Shunday qilib, bu ingibitor tripsinga o'xshash serin-proteazalar bilan tetramer tuzilma hosil qila oladi [20].

Tripsin tuzilishiga ega serin-proteazalar ko'plab biologik jarayonlarda, jumladan, qon ivishida [21], saraton hujayralarining metastazlanishida [22], fibrinolizda [23], sut bezining involyutsiya jarayonida [24] hamda zaharli hayvonlar chaqishi jarayonida [25] ishtirok etadi. Ushbu fermentlardan ba'zilar ekotin tomonidan inhibitsiya

qilinadi: ularga tripsin, ximotripsin, elastaza, X faoli (faktor Xa), kallikrein va XIIa faoli (faktor XIIa) kiradi [20,26].

Qizig'i shundaki, ekotin tomir ichiga yuborilgandan keyin, o'xshash molekulyar og'irlikka ega boshqa oqsillar (taxminan 30 daqiqa) bilan taqqoslaganda, qon aylanish tizimida 12-14 soatgacha saqlanib qoladi [27]. Ko'rinadiki, bu farmakokinetik xususiyat ekotinning Hp bilan bog'lanishi natijasida yuzaga keladi, bunda Hp ekotin uchun qon plazmasida "rezervuar" yoki "tashuvchi oqsil" vazifasini bajaradi. Natijada ekotinning farmakodinamik profili yanada kuchayadi [20].

Ekotinning serin-proteazalarga oid oqsil bilan bog'lanish mexanizmini nazariy jihatdan aniqlash hamda Hp ning sutemizuvchilar qonida ushbu ingibitor uchun potensial nishon sifatidagi rolini mustahkamlash maqsadida ushbu tadqiqotda *in silico* (kompyuter modellash) yondashuvi qo'llanildi. Shu bilan birga, inson Hp oqsilining serin-proteazalarga va yaqinda aniqlangan cho'chqa Hp ning kristall tuzilmasiga o'xshashligi ham tahlil qilindi.

Shuningdek, ekotin va ikki xil variant-M84R/M85R (RR) hamda D70R, V81T, T83S, M84R, M85R (TSRR/R)-o'rtasidagi o'zaro ta'sir o'rganildi. Mazkur variantlar ikki xil serin-proteaza, ya'ni u-PA (urokinaza-plazminogen aktivatori) va trombin uchun mo'ljallangan bo'lib, ekotin bilan bog'lanish xususiyatlarini tahlil qilish imkonini berdi [27].

Materiallar va usullar:

Native-PAGE va Vestern-blot tahlili

Oqsil namunalar Laemmli (1970) usuliga binoan 10% **SDS-PAGE** yoki **Native-PAGE** da elektroforez qilindi [28]. Immunoblot tahlili uchun oqsil bantlari nitrotsellyuloza membranaga o'tkazilib, tris-bufer eritmasi (pH 7,4) tarkibidagi 0,1% (v/v) Triton X-100 va 5% (w/v) yog'siz quruq sut (TBST, SIGMA, St. Louis, MO) bilan ishlov berildi.

Membrana 1:5000 nisbatda suyultirilgan maxsus antitana bilan shu eritmada 1 soat davomida inkubatsiya qilindi, so'ngra TBST bilan uch marta yuvildi. Keyin echkidan olingan antitanacha – quyon antitanachasi bilan kon'yugatsiyalangan peroksidaza (horseradish peroxidase) (Pierce) 1:5000 nisbatda TBST-1% sut eritmasida qo'llanildi va membrana bilan 1 soat inkubatsiya qilindi. Membrana yuvilgach, antitana bilan bog'langan oqsil bantlari kuchaytirilgan kimiluminessensiya usuli yordamida aniqlangan [29].

Native-gel tahlili uchun ekotin-RR (8 mg) va Hp (8 mg) 20 mM tris-HCl buferida (pH 7,5) inkubatsiya qilindi; buning uchun turli konsentratsiyalar sinovdan o'tkazilib, eng yaxshi natija beradigan sharoit tanlandi. Aralashma 37°C da 1 soat davomida inkubatsiya qilingach, ikki qismga bo'lindi.

Birinchi qism denaturatsiya qilinmagan 20% akrilamid gelda elektroforezdan o'tkazilib, ekotin-Hp kompleksi hosil bo'lishi kuzatildi.

Ikkinchi qismga urokinaza-tipdagi plazminogen aktivatori (u-PA, 1 IU) qo'shildi va 37°C da 2 daqiqa o'tgach, SPECTROZYME UK (urokinazani amidolitik tahlil qilish uchun xromogen substrat, *American Diagnostica Inc.*, Stamford, CT) 0,2 mM yakuniy kontsentratsiyada kiritildi. Absorbsiya 450 nm to'lqin uzunligida kuzatildi.

Molekulyar modellashtirish: Dimerik HP-1-1: tuzilish yaratish va taqqoslamali baholash. Gaptoglobin1 (Hp1) oqsilining ketma-ketligi Milliy biotexnologiya markazi GenBank ma'lumotlar bazasidan olingan (kirish raqami: X00637), inson DNK ketma-ketligidan dekodlash orqali aniqlangan. Og'ir va yengil zanjirlar uchun oqsilning o'xshashligi Clustal W2 dasturida bir nechta ketma-ketliklarni solishtirish orqali aniqlangan [3,12,31].

Dimerik HP tuzilishini yaratish uchun bosqichda amalga oshirildi:

1. HP ning yengil (α) va og'ir (β) zanjirlari,
2. Monomer,
3. Dimer.

Buning uchun Swiss-Model va Deepview/Swiss-PDB Viewer Version 4.04 dasturlaridan foydalanganmiz [33-34], hamda shablon sifatida komplement proteaza C1r ning zymogen va faol katalitik domeni (PDB ID: 1gpz va 1md8) ishlatilgan [14,35,36].

Boshlanishida, Hp1 ketma-ketligidagi N-terminaldagi 18 aminokislota, ya'ni signal peptidi olib tashlangan, chunki polipeptidning proteolitik yetilish jarayonida ular ajralib chiqadi. So'ng, Hp1 monomerlari Abreu va hamkasblari tomonidan tavsiflangan usulda qurilgan [32] va ular dimer proteaza C1r kristall tuzilmasi (PDB ID: 1gpz) bilan antiparallel holatda strukturaviy ravishda tekislangan [16,35].

HP dimerik tuzilishini yaratish uchun Ettrich va hamkasblari [12] tomonidan elektron mikroskopiya ma'lumotlaridan foydalangan holda zanjirlar joylashtirildi va yengil zanjirlardagi Cys15 sisteinlari o'rtasida disulfid bog' hosil qilindi.

HP-1-1 va ekotin variantlarining nazariy komplekslarini yaratish.

Ekotin-Hp komplekslarini yaratish Castro va hamkasblari (2001) tavsiflagan usul bo'yicha amalga oshirilgan [37]. Avvalo, mutant ekotin homodimeri (Y69F, D70P) va mutant anion tripsin II (D102N) ga bog'langan kristall tuzilma (PDB ID: 1ezu) shablon sifatida tanlangan [31,38,39].

Keyin ekotin vild-tur yoki mutant variantlari (RR – M84R, M85R va TSRR/R-D70R, V81T, T83S, M84R/M85R) bilan tekislangan, tripsin esa u-PA kristall tuzilmasi (PDB ID: 1gja) bilan tekislangan [40].

Shundan so'ng, uchlamchi kompleks (ferment-ekotin-Hp) yaratish uchun Hp1 dimer modeli ekotin-u-PA yakuniy kompleksi bilan DeepView/Swiss-PDB Viewer 4.0 dasturi yordamida moslashtirilgan.

Optimallashtirish, tekshirish va o'zaro ta'sirlarni tahlil qilish:

Barcha modellar Deepview/Swiss-PDB Viewer Version 4.0 dasturida mavjud bo'lgan Gromos96 kuch maydoni yordamida ketma-ket geometriya optimallashtirish bosqichlaridan o'tkazilgan, bu orqali energiya minimal holatga keltirilgan [4]. Shu dastur yordamida shuningdek elektrostatik potentsial xaritasi, yuzasi va hajmi kabi boshqa parametrlar ham baholangan.

Modellar Ramachandran diagrammasi tahlili orqali tekshirilgan. Bundan tashqari, PDBsum serveridagi Procheck dasturi yordamida o'zaro ta'sirlar tahlil qilingan [41].

Yaqinda e'lon qilingan cho'chqa Hp ning Hb bilan bog'langan kristall tuzilmasi (PDB ID: 4F4O) [4] bilan biz inson Hp ning nazariy modelini Swiss PDB Viewer dasturi orqali solishtirdik. Bu solishtirish umumiy root mean square deviation (RMSD) ni aniqlash va Hp ning fiziologik himoyaviy roli (Hb bilan bog'lanish) ning ekotin bilan bog'langanda tuzilmasi mumkinligini tasdiqlash uchun amalga oshirilgan.

Natijalar va muhokama:

So'nggi tadqiqotlarimizda biz Hp ning tripsin tuzilishiga ega ferment ingibitori-ekotin bilan o'zaro ta'sirini affinitet kolonkalari yordamida aniqlaganimizni xabar qilgan edik [20].

Ushbu ishda biz ushbu bog'lanishni in silico yondashuvi orqali yanada yoritdik. Tadqiqotning maqsadi Hp1-1 ning uch o'lovli tuzilmasini, Hp-ekotin kompleksining bog'lanish mexanizmini va uchlamchi Hp-ekotin-serin-proteaza kompleksining hosil bo'lish imkoniyatini tahlil qilishdan iborat bo'ldi.

HP-1-1 ni yaratish:

HP1 yengil (α) va og'ir (β) zanjirlari asosiy ketma-ketliklarining bir nechta ketma-ketliklarni solishtirish tahlili shuni ko'rsatdiki:

Hp1 yengil zanjir (α) ning asosiy tuzilishi apolipoprotein H (PDB ID: 1c1za), komplement tizimi proteazalari C1r (PDB ID: 1gpza) va C1s (PDB ID: 1elva) bilan o'xshashlik ko'rsatadi.

Hp1 og'ir zanjir (β) esa Tripsin superoilasiga mansub bir nechta aminokislota qoldiqlarini saqlab qolgan [35,42,43].

Hp1 ning C1r proteazalari, elastaza, ximaz, tripsin, ximotripsin, trombin va qon ivish faktor X bilan solishtirilganda o'xshashlik darajasi 21% dan 33% gacha bo'lib, bir xil qoldiqlar soni nisbatan kam.

Garchi bir xil aminokislotalar soni kam bo'lsa-da, Hp1 ning yengil (α) va og'ir (β) zanjirlari ikkilamchi tuzilmasining nazariy bashorati avvalgi tadqiqotlarda ta'kidlanganidek, har ikkala zanjir uchun asosiy strukturaning saqlanib qolganini ko'rsatdi.

Hp1 β -zanjirida C-terminal mintaq (α -spiral) va tuzilmaning yadrosi (β -qavatlar) Tripsin superoilasiga mansub oqsillarda uchraydigan β - β bochka shaklidagi tuzilishga mos keladi.

Qiziqarli tomoni shundaki, Hp ning gemoglobin (Hb) va makrofag CD163 retseptori bilan bog'lanish joylari boshqa tripsin oila a'zolari uchun xos bo'lgan hududlarda joylashmagan. Shu bilan birga, odatiy serin-proteazalarning katalitik triadasi (His57, Asp102, Ser195) Hp tarkibida to'liq saqlanmagan (Lys57, Asp102, Ala195), bu esa enzimatik faollikning yo'qligiga olib keladi.

C1r komplement proteazasi (PDB ID: 1gpza) asosida qurilgan Hp1 yengil (α) zanjirining nazariy modeli olti ta β -qavatdan iborat ellipsoidsimon tuzilmani ko'rsatdi [35]. Bu model Ettrich va boshqalar tomonidan tasvirlangan modelga va komplement tizimi oqsillarining kristall tuzilmasiga o'xshash bo'ldi [12]. Shu bilan birga, Hp1 og'ir (β) zanjiri modeli komplement proteazasi C1r ning faol katalitik domeni (PDB ID: 1md8a) asosida, Polticelli va hammualliflar ma'lumotlariga tayangan holda qurildi [16,36]. Bu model ikki β -qavat guruhi va ikki α -spiraldan iborat globular shaklni, ya'ni serin-proteazalar uchun xos struktura shaklini namoyish etdi.

G'arbiy blot (Western blot) tahlili natijalari Hp1 ni tripsin va Hp antitanachalari bilan tanilganini ko'rsatdi, bu esa nazariy modelni qo'llab-quvvatladi. Ikkala antitana tomonidan tanilishi tuzilmaviy o'xshashlikni isbotlaydi. Bu natijalar ecotin-RR affinitet kolonnasi orqali Hp ni tozalash haqidagi adabiyotdagi ma'lumotlarga mos keladi, bu esa oqsilning to'liq tanilishini anglatadi [27].

Qiziqarli jihat shundaki, serin-proteazalarga o'xshashligiga qaramay, Hp ning elektrostatik potentsial xaritasi har bir zanjirda va solishtirilgan fermentlarda turlicha zaryad taqsimotini ko'rsatdi. Hp1 og'ir (β) zanjirida salbiy zaryad ustun, yengil (α) zanjirda esa ba'zi musbat maydonlar mavjud, bu esa Hb bilan bog'lanish va CD163 retseptori tomonidan tanib olinishi jarayonlarini nozik muvofiqlashtiradi. Shunday qilib, tuzilma darajasida o'xshashlik bo'lsa-da, elektron, elektrostatik va konformatsion xususiyatlar ushbu oqsillarning spetsifikligini saqlab qoladi, immunogen tuzilmasiga esa ta'sir ko'rsatmaydi.

Hp-1: Monomer (Hp1) va dimer (Hp1-1)

HP1 ning yengil (α) va og'ir (β) zanjirlarini C1r komplement proteazasi (PDB ID: 1gpza) asosida tekislash va Cys72–Cys189 orasida disulfid bog' hosil qilish orqali Hp monomeri (Hp1) qurildi [3,16].

Tayyorlangan HP1 monomer modeli:

- Yuza maydoni: $16 \text{ \AA}^2$
- Hajmi: $42,6 \text{ \AA}^3$

Potentsial xarita parametrlari bir xil tarqalgan manfiy zaryadli profilni ko'rsatdi. Qiziqarli tomoni, makrofag CD163 retseptori bilan bog'lanish sohasi tashqariga yo'naltirilgan, bu esa Hp ning bir vaqtning o'zida HB va CD163 bilan o'zaro ta'sirlashish imkoniyatini ko'rsatadi.

Ramachandran diagrammasi bo'yicha Hp1 monomeri modeli C1r komplement proteazasi zimojen katalitik domenining kristall tuzilmasiga o'xshash ekanligi aniqlangan. Natijalar quyidagicha:

- 208 aminokislota qoldig'i – qulay sohalarda (73,2%),
- 74 qoldiq – ruxsat etilgan sohalarda (25,3%),
- 4 ta qoldiq (Ala60, His131, Gln152, Lys214) – taqiqlangan sohalarda (1,4%) joylashgan.

Dimerik Hp1-1 nazariy modeli ikki monomerni tekislash orqali yig'ildi. Olingan struktura barqaror bo'lib, Wejman va hammualliflar tomonidan tasvirlangan modellarga o'xshash natija berdi [16,44].

HP-1-1–ecotin nazariy komplekslari: maxsus buklama inhibitorini baholash:

Hozirgi kunda ko'plab tadqiqotlar oqsil tuzilmasi, biologik faolligi, bog'lanish o'zaro ta'sirlari, tanishuv va affinitet o'rtasidagi munosabatni tushunishga qaratilgan. Adabiyotlarda qayd etilishicha, oqsillarning selektivligini to'liq anglash uchun birlamchi ketma-ketlik va uch o'lchovli (3D) tuzilma birgalikda tahlil qilinishi zarur. Shunday tadqiqotlarning bir qismi oqsillarni va ularning 3D komplekslarini o'rganish orqali biologik funksiyalarini hamda o'zaro ta'sir mexanizmlarini aniqlashga xizmat qiladi [32,45,46].

Ushbu ishda biz Hp-1-1 dimerni, ecotin (yovvoyi tur yoki variantlari) va urokinaza-tip plazminogen aktivatori (u-PA — tripsin-simon serin-proteaza) o'rtasida hosil bo'luvchi uchlamchi kompleksning bog'lanish usulini molekulyar modellashtirish orqali o'rgandik. Adabiyot ma'lumotlariga ko'ra, Hp ecotinning u-PA ni inhibe qilish qobiliyatiga ta'sir ko'rsatmaydi [20]. Shu sababli, ilgari taklif etilgan ecotin ikkilamchi (secondary) bog'lanish joyi mavjudligini tekshirish maqsad qilingan [39]. Shunga ko'ra, u-PA va Hp oqsillari ecoting birlamchi va ikkilamchi bog'lanish joylariga mos ravishda joylashtirildi, bu Laboissiere va hammualliflar ma'lumotlariga asoslanadi [47].

Bizning nazariy ma'lumotlarimiz shuni ko'rsatdiki, ecotin-RR Hp bilan ikkilamchi bog'lanish joyi orqali o'zaro ta'sirga kirisha oladi (Hp1-1–Ecotin, Asp320–Gly66, His162–Trp67 va Asn110–Pro163 o'rtasida bog'lanish mavjud), bu holat adabiyotda keltirilgan ma'lumotlar bilan mos [20] bo'lib, Hp ning tripsin-simon strukturasini yana bir bor tasdiqlaydi.

Shuningdek, Hp ni ecotin-RR affinitet kolonnasi orqali tozalash, in vitro Trypsin antitanalari bilan tanilishi va ecotinRR-HP o'zaro ta'siri natijalari nazariy natijalarimizni yanada mustahkamladi [27].

Ushbu ishda biz uchlamchi kompleks (HP-1-1–ecotin–u-PA) modelini yaratdik, chunki nazariy jihatdan Hp1-1 ecotin bilan ikkilamchi bog'lanish joyi orqali o'zaro

ta'sirlashishi bilan birga ecotinning proteazalarni (masalan, u-PA) ingibe qilish qobiliyatini saqlab qolishi mumkinligi taxmin qilindi [20].

Qiziqarli tomoni, uchlamchi komplekslar nazariy jihatdan barqaror bo'lsa-da, o'zaro ta'sir namunasi biroz farq qilganligi kuzatildi. Eng muhim jihati, u-PA katalitik markazi va ecotin birlamchi bog'lanish joyi o'rtasidagi interfeysda vodorod bog'lari va gidrofob o'zaro ta'sirlar soni ecotinning ikkilamchi bog'lanish joyi va Hp dimerni o'zaro ta'siridan ancha ko'p ekanligi aniqlandi.

Adabiyotlarga ko'ra, ecotinning birlamchi yoki ikkilamchi bog'lanish joylaridagi mutatsiyalar uning u-PA bilan o'zaro ta'sirlarini o'zgartiradi [39]. Wang va hammualliflar [48] shuni ko'rsatdiki, yovvoyi turdagi ecotinning u-PA bilan affiniteti pastroq, M84R va M85R (RR) mutatsiyalar esa bu affinitetni oshiradi-bu holat bizning molekulyar modellashirish natijalarimiz bilan mos.

Bizning natijalarimiz shuni ko'rsatadiki, har bir mutatsiya ecotinning ferment bilan o'zaro ta'sirini modulyatsiya qiladi, bu esa bog'lanish tarmog'ining kengayishiga olib keladi. Ehtimol, bog'lanish mintaqasidagi musbat zaryadlar ko'paygani tufayli ecotin-RR (M84R va M85R) modeli yovvoyi turdagi ecotin nisbatan u-PA bilan ko'proq o'zaro ta'sir nuqtalarini hosil qiladi (masalan, RR-u-PA vodorod bog'lari: Arg85–Asp228 va Arg84–Asp370, Ser371, Gly399).

Shuningdek, faqat ecotinning ikkilamchi bog'lanish joyidagi mutatsiya (TSRR/R) Hp1-1 bilan o'zaro ta'sirning ortishiga olib keldi, bu esa ushbu mintaqadagi vodorod bog'lanishlarning qayta taqsimlanishi bilan izohlanadi (masalan, ecotin TSRR/R ning Arg70 qoldig'i va Hp1-1 ning His260 qoldig'i o'rtasidagi bog'lanish).

Yovvoyi turdagi ecotin bilan solishtirganda, HP–ecotin mutantlari (asosan TSRR/R) o'zaro ta'siri: Yovvoyi turdagi ecotin bilan solishtirilganda, Hp ning ecotin mutantlari (asosan TSRR/R) bilan o'zaro ta'siri bir nechta yangi qoldiqlar ishtirokini o'z ichiga olgan yaxshilangan bog'lanish naqshini hosil qildi. Bunga, xususan, ecotin TSRR/R ning Arg70 qoldig'i va Hp1-1 ning His260 qoldig'i o'rtasidagi vodorod bog'i, shuningdek, ushbu molekulalar o'rtasidagi o'zaro ta'sirni kuchaytiruvchi yangi bog'lanishlar majmuasi kiradi.

Ushbu ma'lumotlar Hp ni plazmadagi ecotin uchun potentsial “rezervuar” yoki “tashuvchi oqsil” sifatida qarash mumkinligini yana bir bor tasdiqlaydi. Bu holat ecotinning qon zardobida aylanish vaqtining (12–14 soat) uzayishiga sabab bo'lishi ehtimolini ko'rsatadi [27].

Ko'rinishicha, ecotinning birlamchi bog'lanish joyi orqali Hp-ecotin kompleksi hosil bo'lish ehtimoli past, chunki Hp1-1 da serin-proteazalarga xos faol markaz mavjud emas. Bu esa tuzilmaning qayta joylashishiga, sterik to'siqlarga va natijada ecotinning bog'lanishining oldini olishga olib keladi [46].

Umuman olganda, bizning eksperimental va nazariy ma'lumotlarimiz Hp1-1 ning sut emizuvchilar qonidagi ecotin uchun tripsin-simon nishon ekanligi haqidagi

gipotezani mustahkamladi. Sigir zardobi ecotin-RR kolonnasi bilan inkubatsiya qilingan tajribalar plazmadagi asosiy ecotin bilan bog'lovchi oqsil Hp ekanligini tasdiqladi va bu gipotezani yana bir bor qo'llab-quvvatladi [27].

Nihoyat, nazariy natijalarimizga ko'ra, **CD163 retseptori bilan bog'lanishda ishtirok etuvchi Hp mintaqasi (Val241, Glu243, Lys244 va Thr246) hamda Hp og'ir zanjirining 212–221 halqasi (HB37 bilan bog'lanishda ishtirok etuvchi) ecotin bilan o'zaro ta'sir natijasida ta'sirlanmagan. Bu esa Hp ning biologik funksional profiliga hech qanday ta'sir ko'rsatmasligini ko'rsatadi.

Xulosa: Ushbu tadqiqotda biz Hp1-1 dimeri, u-PA va antikoagulyant ecotin variantlaridan tashkil topgan uchlik (ternar) kompleksning bog'lanish mexanizmini baholadik. Tadqiqotning maqsadi-ularning o'zaro ta'sirini aniqlash hamda sut emizuvchilarning qonida Hp oqsilining ecotin uchun tashuvchi (carrier) sifatidagi mumkin bo'lgan rolini aniqlashdan iborat edi.

Olingan natijalar shuni ko'rsatdiki, ecotinning har bir varianti (yovvoyi tur, RR va TSRR/R) o'ziga xos o'zaro ta'sir naqshini namoyon etdi. Bundan tashqari, Hp va ecotinning har biri o'zining biologik faolligini saqlab qolishi mumkinligi ilmiy jihatdan asoslandi. Umuman olganda, bizning eksperimental va nazariy ma'lumotlarimiz quyidagi xulosani yana bir bor tasdiqlaydi: Hp1-1 oqsili sut emizuvchilarning qon plazmasida ecotinning tripsinga o'xshash maqsadli bog'lanish oqsili sifatida xizmat qiladi.

Foydalanilgan adabiyotlar:

1. Levy A.P., Asleh R., Blum S. va boshq. Haptoglobin: asosiy va klinik jihatlar. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010; 12:293–304.
2. Alayash A.I. Haptoglobin: eski oqsilning yangi funksiyalari. *Clinica Chimica Acta*, 2011; 412:493–8.
3. Nielsen M.J., Petersen S.V., Jacobsen C. va boshq. Haptoglobinning serin proteaza domenidagi noyob halqa cho'zilishi CD163 reseptorining haptoglobin-gemoglobin kompleksini tanib olishi uchun zarur. *Journal of Biological Chemistry*, 2007; 28:1072–9.
4. Andersen C.B.F., Torvund-Jensen M., Nielsen M.J. va boshq. Haptoglobin–HB kompleksi tuzilishi. *Nature*, 2012; 489:456–9.
5. Theilgaard-Mönch K., Jacobsen L.C., Nielsen M.J. va boshq. Haptoglobin granulotsitlar differensiasiyasi jarayonida sintez qilinadi, maxsus granulalarda saqlanadi va neyrofillar tomonidan faollanishda ajratiladi. *Blood*, 2006; 108:353–61.
6. Van Vlierberghe H., Langlois M., Delanghe J. Haptoglobin polimorfizmlari va temir homeostazi: sog'lomlik va kasallikdagi ahamiyati. *Clinica Chimica Acta*, 2004; 345:35–42.
7. Wassell J. Haptoglobin: funksiyasi va polimorfizmi. *Clinical Laboratory*, 2000; 46:547–52.
8. Wicher K.B., Fries E. Gemoglobin tutuvchilarining evolyutsion jihatlar. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010; 12:249–59.

9. Ye B., Cramer D.W., Skates S.J. va boshq. Haptoglobin alfa subbirligi tuxumdon saratoni uchun potensial zardob biomarkeri sifatida. *Clinical Cancer Research*, 2003; 9:2904–11.
10. Zhang S., Shu H., Luo K. va boshq. Jigar kasalligi bo'lgan bemorlarda zardobdagi haptoglobin beta zanjiri glikan o'zgarishlari. *Molecular BioSystems*, 2011; 7:1621–8.
11. Boonyapranai K., Tsai H.Y., Chen M.C. va boshq. Haptoglobin multimerlarining glikoproteomik tahlili va molekulyar modellashtirilishi. *Electrophoresis*, 2011; 32:1422–32.
12. Ettrich R., Brandt W., Baumruk V. va boshq. Inson haptoglobin shaperon-sifatidagi faolligi: issiqlik shok sharoitidagi konformatsion o'zgarishlar va o'zaro ta'sir joylari. *Biological Chemistry*, 2002; 383:1667–76.
13. Di Cera E. Serin proteazalar. *IUBMB Life*, 2009; 61:510–15.
14. Guex N., Peitsch M.C. SWISS-MODEL va Swiss-PDB Viewer: oqsil strukturalarini taqqoslamali modellashtirish muhiti. *Electrophoresis*, 1997; 18:2714–23.
15. Varfolomeev S.D., Gariev I.A., Uporov I.V. Gidrolazalarning katalitik joylari: tuzilmalari va katalitik sikllari. *Russian Chemical Reviews*, 2005; 74:61.
16. Polticelli F., Bocedi A., Minervini G., Ascenzi P. Inson haptoglobin tuzilishi va funksiyasi – molekulyar modellashtirish asosidagi tadqiqot. *FEBS Journal*, 2008; 275:5648–56.
17. Yang S.Q., Craik C.S. Tripsin va urokinaza-tip plazminogen aktivatori uchun ikki bog'lanishli makromolekulyar inhibitörlarni ishlab chiqish. *Journal of Molecular Biology*, 1998; 279:1001–11.
18. Zani M.L., Moreau T. Faj-displey texnikasi proteaza inhibitörlarini ishlab chiqishda kuchli vosita sifatida. *Biochimie*, 2010; 92:1689–704.
19. Bachovchin D.A., Cravatt B.F. Serin gidrolazalarning farmakologik manzarasi va terapevtik potentsiali. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2012; 11:52–68.
20. Castro H.C., Monteiro R.Q., Assafim M. va boshq. Ekotinning trombin faolligini eksosit-2 o'zaro ta'siri orqali modulyatsiyasi. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006; 38:1893–900.
21. Krarup A., Wallis R., Presanis JS va boshqalar. MBL bilan bog'liq serin proteaza 2 tomonidan komplement va ivish tizimlarining bir vaqtda faollashuvi. *PLoS One*, 2007; 2:e623.
22. Dass K., Ahmad A., Azmi AS va boshqalar. Inson saraton kasalliklarida uPA/uPAR tizimining o'zgarib borayotgan roli. *Cancer Treatment Reviews*, 2008; 34:122–136.
23. Parmar N., Albisetti M., Berry LR, Chan AKC. Yangi tug'ilganlar va bolalarda fibrinolitik tizim. *Clinical Laboratory*, 2006; 52:115–124.
24. Watson CJ. Laktatsiyadan keyingi sut bezining regressiyasi: molekulyar asoslari va ko'krak bezi saratoni uchun ahamiyati. *Expert Review of Molecular Medicine*, 2006; 8:1–15.
25. De Lima DC, Alvarez Abreu P, De Freitas CC va boshqalar. Ilon zahari: antibiotiklar va saratonga qarshi vositalar uchun manba bo'lishi mumkinmi? *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2005; 2:39–47.

26. McGrath ME, Gillmor SA, Fletterick RJ. Ekotin: proteazalarga to'la muhitda yashab qolish saboqlari. *Protein Science*, 1995; 4:141–148.
27. Sathler PC, Craik CS, Takeuchi T va boshqalar. Trypsin strukturasiga ega oqsillarni aniqlash uchun ekotinni muhandislik yo'li bilan o'zgartirish. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010; 160:2355–2365.
28. Laemmli UK. Bakteriofag T4 yig'ilish jarayonida tuzilmaviy oqsillarning parchalanganligi. *Nature*, 1970; 227:680–685.
29. McGrath ME, Hines WM, Sakanari JA va boshqalar. Ekotinning ketma-ketligi va faol markazi: *Escherichia coli*'dan olingan oshqozon osti bezi serin proteazalarining umumiy inhibitörü. *Journal of Biological Chemistry*, 1991; 266:6620–6625.
30. Maruyama M, Sugiki M, Yoshida E va boshqalar. Ilon zahari fibrinolitik fermentlarining keng substrat spetsifikligi: qon ketishdagi ehtimoliy roli. *Toxicon*, 1992; 30:1387–1397.
31. Altschul SF, Gish W, Miller W va boshqalar. Mahalliy moslikni izlashning asosiy vositasi (BLAST). *Journal of Molecular Biology*, 1990; 215:403–410.
32. Abreu PA, Albuquerque MG, Rodrigues CR, Castro HC. Ilon zahari lektinlarining molekulyar modellashtirish, ketma-ketlik tahlili va biologik ma'lumotlarga asoslangan tuzilish-funksional xulosalari. *Toxicon*, 2006; 48:690–701.
33. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. SWISS-MODEL ish muhiti: oqsil tuzilmasining gomologik modellashtirish uchun veb-asosli tizim. *Bioinformatics*, 2006; 22:195–201.
34. Kiefer F, Arnold K, Künzli M va boshqalar. SWISS-MODEL ma'lumotlar bazasi va unga tegishli resurslar. *Nucleic Acids Research*, 2009; 37:D387–D392.
35. Budayova-Spano M, Lacroix M, Thielens NM va boshqalar. Komplement proteazasining zimogen katalitik domenining kristall tuzilmasi. (*maqola nomi davom etgan bo'lishi mumkin — iltimos, keyingi qismni yuboring*).
36. Budayova-Spano M, Grabarse W, Thielens NM va boshqalar. Komplement proteaza C1r zimogen va faol katalitik domenining monomerik tuzilmalari: C1 faollashuv mexanizmi haqida yangi tushunchalar. *Structure*, 2002; 10:1509–1519.
37. Castro HC, Silva DM, Craik C, Zingali RB. Ilon zaharidagi trombin-ga o'xshash fermentning tuzilma xususiyatlari: yagona katalitik platformada trombin va tripsin? *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2001; 1547:183–195.
38. Bernstein FC, Koetzle TF, Williams GJ va boshqalar. Oqsil ma'lumotlar banki: makromolekulyar tuzilmalar uchun kompyuterga asoslangan arxiv tizimi. *Journal of Molecular Biology*, 1977; 112:535–542.
39. Gillmor SA, Takeuchi T, Yang SQ va boshqalar. Ekotindagi muvozanat va moslashuv: serin proteazalarning dimerik makromolekulyar inhibitörü. *Journal of Molecular Biology*, 2000; 299:993–1003.
40. Katz BA, Sprengeler PA, Luong C va boshqalar. Ser190 tripsin-ga o'xshash serin proteaza dori nishonlarining S1 joylariga yuqori selektivlikka ega inhibitörlarni muhandislik yo'li bilan yaratish. *Chemistry & Biology*, 2001; 8:1107–1121.

- 41.Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: oqsil tuzilmalarining stereokimyoviy sifatini tekshirish dasturi. *Journal of Applied Crystallography*, 1993; 26:283–291.
- 42.Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K va boshqalar. Inson beta2-glikoprotein I ning kristall tuzilmasi: fosfolipid bilan bog‘lanish va antifosfolipid sindromi uchun ahamiyati. *EMBO Journal*, 1999; 18:6228–6239.
- 43.Gaboriaud C, Rossi V, Bally I va boshqalar. Inson komplement C1s katalitik domenining kristall tuzilmasi: “tutqich”ga ega serin proteaza. *EMBO Journal*, 2000; 19:1755–1765.
- 44.Wejman JC, Hovsepian D, Wall JS va boshqalar. Haptoglobin va haptoglobin–gemoglobin kompleksining tuzilmasi: elektron mikroskopiya orqali o‘rganish. *Journal of Molecular Biology*, 1984; 174:319–341.
- 45.Tanramluk D, Schreyer A, Pitt WR, Blundell TL. Ferment inhibitörlerinin selektivligi va universalligining kelib chiqishi: staurosporinga bog‘lanayotgan oqsil kinaza misolida tadqiqot. *Chemistry & Biology Drug Design*, 2009; 74:16–24.
- 46.Varshney A, Sen P, Ahmad E va boshqalar. Inson zardob albuminining ligand bilan bog‘lanish strategiyalari: yuk (cargo) qanday foydalanilishi mumkin? *Chirality*, 2010; 22:77–87.
- 47.Laboissiere MC, Young MM, Pinho RG va boshqalar. Ekotinning ikkilamchi bog‘lanish joyini urokinazani inhibitsiya qilish uchun muhandislik yo‘li bilan o‘zgartirish: kompyuter yordamida mutageniz. *Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277:26623–26631.
- 48.Wang CI, Yang Q, Craik CS. Fag-display usuli yordamida ekotindan urokinaza tipidagi plazminogen faollashtiruvchining yuqori affinitetli inhibitörini ajratib olish. *Journal of Biological Chemistry*, 1995; 270:12250–12256.