УДК 577.3

**К МЕХАНИЗМУ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКЕТОЛАЗЫ ТИАМИНПИРОФОСФАТОМ,**

**ОКСИТИАМИНПИРОФОСФАТОМ И ТИАМИНАЗОЙ**

**В.Л. Кубышин, З.В. Горбач, Ю.А. Лукашенко, Е.В. Мальевская**

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,

г. Гродно, Республика Бедарусь

*(Поступила в редакцию 31.05.2010 г.)*

***Аннотация.*** *В предлагаемой работе обсуждаются экспериментальные данные, характеризующие природу связи тиаминпирофосфата и апофермента, механизмы регуляции активности транскетолазы на уровне кофермента.*

*Из экспериментальных данных установлена неидентичность активных центров по связыванию тиаминпирофосфата апотранскетолазой, которые различаются сродством к коферменту с величинами для первого и второго активных центров (Км=4,5мкМ и Км=19,7мкМ). Показано, что реактивация апофермента тиаминпирофосфатом до величины, соответствующей стационарной скорости ферментативной реакции, развивается после определенного лаг-периода, длительность которого зависит от концентрации ТПФ и характеризует формирование активных центров фермента. Исследованная кинетика реактивации апо-ТК при низкой концентрации ТПФ указывает, что данный процесс может быть одним из механизмов регуляции фермента в условиях тиаминовой недостаточности in vivo. Обсуждаются возможные механизмы воздействия антикофермента – окситиаминпирофосфата и тиаминазы-I на активность ТК. Снижение активности и значительная лабильность ТК, в составе которой вместо ТПФ присутствует ОТПФ, обуславливается проявлением его антикоферментных свойств и усилением деградации замещенной формы модифицированного ОТПФ фермента.*

*В экспериментах in vitro ТПФ в составе холофермента не доступен действию тиаминазы-I при pH близком к физиологическим значениям. При снижении рН, в результате чего изменяется конформация фермента, ТПФ становится доступен для действия**тиаминазы. Показано, что инъекции животным тиаминазы-1 приводят к снижению внутриклеточного уровня свободного тиамина и, как следствие, наблюдается снижение активности ТК.*

***Summary.*** *Experimental data concerning the nature of chemical bond between thiamin pyrophosphate (ThDP) and apoenzyme, as well as mechanisms of transketolase (TK) activity regulation at the level of coenzyme are discussed.*

*It was revealed thet active sites (centers) are not identical with respect to ThDP binding. The first and the second ones being distinguishable in terms of coenzyme affinity (Km 4,5 microM and Km 19,7 microM, respectively). The reactivation of apoenzyme witheThDP was shown to take place after a lag period, which was dependent on ThDP concentration. Kinetics of apo TK reactivation at low ThDP concentrations indicates the process under investigation may be considered as a regulatory mechanism in thiamine deficiency in vivo. Possible mechanisms of oxythiamine pyrophosphate (oxy ThDP) as well as thiaminase-1effects on transketolase activity are also discussed.*

*It was shown that the displacement of ThDP with oxy ThDP resulted in lowering of TK activity and high lability of the enzyme. These effects seem to be due to anticoenzyme properties of oxy ThDP as well as increased rate of degradation of the modified enzyme.*

*Under physiological condition, ThDP as a part of holoenzyme is not available to thiaminase-1action, whereas at low pH the degradation of ThDP by thiaminase-1is possible because of changing of TK conformation.*

*It also shown that thiaminase-1 injections lead to decreasing of intracellular levels of free ThDP and as a consequence to lowering of TK actinity.*

**Введение.** Вопрос обеспеченности организма витамином В1 и явления, вызванные нарушением обмена тиамина, остаются актуальны по сегодняшний день. Потребность организма в тиамине может варьировать в зависимости от физиологических состояний (возраст, гипоксия, нервно-эмоциональные нагрузки), климатических, физических факторов(шум, вибрация, изменение температуры), микрофлоры желудочно-кишечного тракта (при носительстве Bac. thiaminolyticum и других микроорганизмов), а также патологических состояний. У кур, собак, крыс обнаружено ряд штаммов тиаминолитических клостридий, вызывающих снижение уровня тиамина в органах и тканях [1]. Распад тиамина в кишечнике может увеличиваться при повышении тиамининдуцирующего синтеза тиаминазы у E.Colli. Существуют и другие антитиаминовые факторы, широко распространенные в мире растений и гидробионтов.

Эндогенный дефицит тиамина обуславливает возникновение нарушений, связанных с обменом углеводов. В1 недостаточность вызывает прежде всего снижение активности ТПФ-зависимых ферментов.Наиболее ранние признаки В1 – гиповитаминозного состояния у животных распознают по снижению активности ТК в эритроцитах, которая, по мнению некоторых авторов, определяет тиаминовый статус тканей животных [2], что широко используется в клинической диагностике. Количество связанного с белком ТПФ в ткани печени крыс довольно постоянно, составляет 4,5-4,7 мкг/г ткани и не изменяется после инъекций тиамина. Уровень же свободной формы ТПФ подвержен значительным колебаниям. Так, снижение обеспеченности организма тиамином приводит в первую очередь к падению внутриклеточной концентрации свободной формы ТПФ. Установлено, что апо-форма ТК печени крыс, содержавшихся на витамин В1-дефицитном рационе, не обнаруживается (in vitro), но предполагается влияние тиамина на биосинтез апо-ТК [3]. Предполагается, что скорость новообразования апо-фермента зависит от концентрации свободной формы ТПФ. В экспериментах in vivo показано увеличение активности транскетолазы в печени гиповитаминозных животных в ранние сроки в течение 2-х часов после введения больших доз тиамина. Однако ТПФ-эффект у экспериментальных животных, содержавшихся на диете, лишенной тиамина, не выявляется в условиях in vitro в присутствии экзогенного ТПФ. Авторы делают заключение об отсутствии апоформы ТК в печени крысы [3], а для ТК из эритроцитов существование апофермента отмечается [5]. Апо-ТК обнаруживается в организмах, занимающих более низкую ступень в эволюционной лестнице, в частности дрожжах выращенных на среде с недостатком тиамина. Тогда как в дрожжах, выращенных в условиях избытка тиамина, ТК представлена только в виде холофермента [4]. Существование апоформы ТК и ТПФ-эффект в различных тканях животных является предметом исследований и вызывает много спорных вопросов [5, 8, 9, 10].

Транскетолаза (ТК; Д–седогептулозо-7–фосфат, Д–глицеральдегид–3–фосфат гликольальдегидтрансфераза, К.Ф. 2.2.1.1) ключевой тиаминзависимый фермент неокислительной ветви пентозофосфатного пути (ПФП) обмена углеводов. Метаболическая роль обратимых реакций, катализируемых транскетолазой (ТК), заключается в осуществлении связи ПФП и гликолиза, а также обеспечении клетки рибозой и другими фосфосахарами [2]. ТК представляет собой сложный фермент, структура которого состоит из двух идентичных субъединиц, связанных двумя молекулами тиаминпирофосфата (ТПФ), выполняющего роль кофермента. В этой связи внутриклеточный уровень тиамина является одним из факторов, определяющим ферментативную активность ТК.

Активность фермента варьирует в зависимости от ткани животного, его физиологического, патологического состояния, а также от обеспеченности организма тиамином, который регулирует уровень (ТПФ). Недостаточность тиамина в организме вызывает нервно-психическое расстройство – синдром Верника-Корсакова. В развитии заболевания важную роль играют и генетические факторы. Известно, что при дефиците тиамина в пищевом рационе заболевание чаще встречается у европейцев. В исследованиях, проведенных на фибробластах, показано, что способность связывать ТПФ транскетолазой с синдромом Верника-Корсакова в 10 раз ниже, чем у фермента здоровых людей. Клинически снижение активности ТК проявляется в условиях, при которых концентрация ТПФ оказывается недостаточной для насыщения фермента.

Формирование холофермента во многом зависит от природы связи кофермента и апофермента широкоисследуемых из различных источников животного, растительного происхождения и микроорганизмов. На микроорганизмах показано, что связь ТПФ с апо-ТК совершенно не прочная, и для достижения максимальной активности фермента необходимо добавление в реакционную среду ТПФ [6]. В ТК из печени крыс связь ТПФ с апо-ТК прочная, разобщение холофермента на апо- и кофермент происходит в сильно кислой или щелочной среде. А для ТК из печени свиньи и эритроцитов человека [7,8,9,10] предполагается ковалентная связь между апо-ТК и коферментом. Кинетика взаимодействия кофермента и апофермента с формированием активных центров, и их функциональной эквивалентности исследовалось в ряде экспериментов [10, 11, 12, 14, 15] и в представленной литературе нет единого мнения. Следует отметить, что кинетика разобщения холо-ТК на кофермент и апофермент в указанных работах не рассматривалась.

Вопросы, касающиеся обеспеченности организма тиамином, регуляции активности ТК в зависимости от насыщения апофермента коферментом, возможности использования аналогов ТПФ, а также антитиаминовых факторов, проявляющих антикоферментные свойства, предполагает изучение условий взаимодействия (ассоциация-диссоциация) апо-ТК и ТПФ, формирования активного центра молекулы фермента. Опубликованные экспериментальные данные на сегодняшний день остаются предметом обсуждения.

**Цель работы.** Изучитьприроду связи ТПФ и апо-ТК, механизмы регуляции активности ТК на коферментном уровне. Определить условия ингибирования фермента окситиаминпирофосфатом (ОТПФ), активации ТПФ в зависимости от рН среды, концентрации кофермента.

Изучить воздействие тиаминазы-1 на активность ТК в условиях in vitro и in vivo.

**Материалы и методика исследований.** ТК выделяли из печени белых беспородных крыс-самцов, используя метод ионообменной хроматографии на фосфоцеллюлозе [16]. Активность фермента определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм по скорости окисления НАДН в сопряженных реакциях с использованием *α*-глицерофосфатдегидрогеназы, триозофосфатизомеразы («Реанал», Венгрия), пентозофосфатметаболизирующих ферментов или восстановления НАД+ в реакции с глицеральдегидфосфатдегидрогеназой и выражали в микромолях НАД+, концентрация которого изменялась в реакционной среде за 1 минуту при 30оС [6]. Препараты ТПФ использовали фирмы «Serva». Тиаминазу-1, выделенную по методу [Пузач С.С., Горбач З.В. Лаб.дело 1982. №9. С. 540-542.], инкубировали с высокоочищенным препаратом ТК при рН: 5,5; 6,0; 7,4. Инъекции тиаминазы осуществляли белым беспородным крысам внутрибрюшинно дважды с 72 часовым интервалом в общей дозе 1,5 МЕ.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Апоформу фермента получали следующим образом. Холофермент, выделенный с помощью хроматографирования на фосфоцеллюлозе (удельная активность 0,6-0,8 ед. на 1 мг белка), переводили посредством гельфильтрации через сефадекс G-25 (10-40 микрон, «Superfinе», Швеция) в 1мМ раствор трис-НСL-буферный раствор (рН 7,6), содержащем 1мМ ЭДТА, 2мМ МgCI**2**, 0,1мМ меркаптоэтанола. Водный раствор транскетолазы печени крысы в присутствии 30% глицерина при рН 7,6 сохраняет свою ферментативную активность без изменения более 3 часов при 0оС. Полученный фермент использовали в экспериментах по разобщению холо-ТК на ТПФ и апофермент и изучению кинетики реактивации. Разобщение холотранскетолазы на апо-ТК и кофермент осуществляли в 12 мМ цитратном буфере рН 4,0, 30% глицерина, 18оС(рисунок 1).

Отщепившийся ТПФ связывали активированным углем, который удаляли центрифугированием. Полученный апо-фермент стабилизировали добавлением глицерина в конечной концентрации 30% и рН раствора повышали до величины 7,6 внесением 0,5М триэтаноламинового буфера рН 7,6. Ферментативную активность в экспериментах регистрировали на двухлучевом спектрофотометре (Specord UV VIS) при 340 нм. Кинетику связывания или разобщения ТПФ с апо-ТК регистрировали по изменению активности фермента.



Рисунок 1 – Кинетика разобщения холо-ТК на апо-фермент и ТПФ в 12 мМ цитратнатно-фосфатном буферном растворе рН 4,0.

Разобщение холо-ТК на кофакторы (рисунок 1) характеризуется выраженным двухфазным характером. При этом наблюдается быстрый и медленный процесс. Большая часть снижения ферментативной активности наблюдается в быструю фазу, а в медленную – оставшиеся 20-30% активности. Наблюдаемые кинетические сдвиги, вероятно, отражают изменение конформационной структуры димерной молекулы фермента с потерей ферментативной активности. При этом в медленную фазу происходит отщепление ТПФ от апо-ТК. График логарифмов величин снижения активности ТК в зависимости от времени инкубации представляет собой прямую линию с изломом, характеризующую, вероятно, различие каталитических центров фермента по активности и сродству к ТПФ (рисунок 2).



Рисунок 2 – Изменение активности ТК в зависимости от времени инкубации в 12 мМ цитратнатно-фосфатном буферном растворе рН 4,0 в полулогарифмических координатах

На основании анализа кинетики отщепления ТПФ от холо-ТК можно предположить о различном сродстве ТПФ к активным центрам апомономеров, а также возможной неидентичности активных центров фермента.

Обратный процесс реактивации апо-ТК в присутствии субстрата-донора ксилулозо-5-фосфата и низких концентраций ТПФ и Mg2+ соответствующих концентрациям отщепившихся кофакторов от холо-ТК (соотношение белок-димер : ТПФ : Mg2+ -1:2:2) характеризуется восстановлением ферментативной активности до 20% от исходной с достаточно длительным лаг-периодом (рисунок 3).



Рисунок 3 – Реактивация апо-ТК после разобщения фермента на кофакторы. Реактивация апофермента ТПФосфатом:

**а)** в концентрации соответствующей эндогенной в соотношении моль:моль (белок-димер : ТПФ : Mg=1:2:2);

**б)** в насыщающей концентрации

Вероятно, при низких концентрациях тиаминпирофосфата кофермент присоединяется к активному центру с высоким сродством. Для насыщения второго активного центра необходима более высокая концентрация ТПФ. Установленный факт дает основание предположить о возможной неэквивалентности активных центров по связыванию ТПФ апо-ТК. Исследованная кинетика активации апо-ТК при низкой концентрации ТПФ, возможно, представляет собой один из механизмов регуляции фермента в условиях тиаминовой недостаточности in vivo.

В экспериментах по разобщению холо-ТК установлено, что около 20% активности фермента необратимо инактивируется и 80% активности способны реактивироваться в течение более 3-х часов (рисунок 4). Добавление ТПФ в насыщающей концентрации в эту же реакционную среду приводит к реактивации фермента с насыщением и активного центра с низким сродством к ТПФ.

Рисунок1

Рисунок 4 – Кинетика разобщения холо-ТК на ТПФ и апо-ТК в 12 мМ цитратно-фосфатном буфере рН 4,0 ( ―○― ), и реактивации насыщающими концентрациями кофермента ( ―●― ).

Активность холо-ТК ( ―×― ) в 0,05 М трис-НСI буферном растворе рН 7,4. Стрелкой указан уровень реактивации апофермента насыщающими концентрциями ТПФ.

Из кинетики инактивации холо-ТК в испытанной буферной системе (рис.1,2) следует, что наиболее быстро снижается активность одного из каталитических центров с низким сродством апофермента к ТПФ и, вероятно, характеризующегося большей активностью.

В экспериментах показано, что после однократного цикла разобщение холофермента на апофермент и кофермент с последующей реактивацией ТК, насыщающими концентрациями ТПФ, фермент связывается с ТПФ необратимо с формированием активных центров, сохранивших 50%-80% активности. Для полученных препаратов апо-ТК в экспериментах по реактивации апо-ТК установлена зависимость скорости каталитической активности от концентрации ТПФ и представленные величины в обратных координатах Лайнуивера-Берка характеризуются изломом графической кривой (рисунок 5), что, вероятно, обуславливает неэквивалентность активных центров ТК. Это находит подтверждение в экспериментах по реактивации ТК в зависимости от концентрации ТПФ [12, 17, 18, 19, 20].



Рисунок 5 – Зависимость скорости транскетолазной реакции от концентрации ТПФ в координатах Лайнуивера-Берка

Устойчивость апо-ТК, полученной из высокоочищенного препарата фермента, где максимально отщеплен ТПФ, была ограничена во времени. Апо-ТК сохраняла способность к реактивации насыщающими концентрациями ТПФ около 3-х часов.

Неэквивалентность активных центров на холо-ТК печени крысы in vitro выявлена также и для антикофермента (ОТПФ) [16].

В экспериментах in vivo [22] показана высокая лабильность ТК, модифицированной ОТПФ. Возможно, ОТПФ как антикофермент способен стабилизировать структуру ТК in vitro, однако причиной быстрой деградации ТК in vivo, в составе которой присутствует ОТПФ, является повышенная доступность для воздействия протеиназ. Не исключено предположение о повышенной лабильности ТК, модифицированной окситиамином in vivo, связанное с формированием замещенной формы фермента. Это находит подтверждение в экспериментах in vitro, где после замены ТПФ на ОТПФ в ТК терялась возможность полного катализа ферментативной реакции при использовании таких субстратов как рибозо-5-фосфат и ксилулозо-5-фосфат. При замене субстрата-донора гликолевого альдегида ксилулозо-5-фосфата на фруктозо-5-фосфат происходит формирование замещенной формы фермента, т.к. наблюдали окисление α-карбанионного интермедиата, протекающего с высокой эффективностью в присутствии феррицианида. Отсюда следует, что модифицированный окситиамином фермент способен образовывать замещенную форму фермента, при этом дальнейший перенос гликолевого альдегида на субстрат-акцептор не возможен и образовавшийся комплекс (замещенная форма фермента) подвержен ускоренной деградации. Для комплекса окситиаминпирофосфат-апоТК in vivo вероятна повышенная лабильность. Установлено время полуобновления меченого антикофермента в составе апо-ТК 24-30 часов [20], что значительно ниже времени полуобновления кофермента в ТК интактных животных – 153 часа [12].

В пользу этих рассуждений также свидетельствуют эксперименты in vitro, в которых установлено, что ТПФ в составе холо-ТК в физиологических условиях не доступен воздействию тиаминазы-I. В экспериментах, где высокоочищенную ТК инкубировали с тиаминазой – I, в физиологических условиях снижения ферментативной активности не наблюдалось, а при изменении рН до величин 5,5-6,0 наблюдали снижение активности ТК. Есть основание предположить, что при снижении рН происходит изменение конформационной структуры фермента, при которой ТПФ, связанный с активным центром с низким аффинитетом, становится доступным действию тиаминазы. Внутрибрюшинные инъекции тиаминазы-1 в общей дозе 1,5 ед. с двухразовым введением с интервалом 72 часа приводили к снижению активности фермента (К- 1,40 ±0,11; О- 0,68 ±0,04 мкмоль/мин), что соответствует 144 часам, в течение которых активность фермента снизилась на 50%.

**Заключение.** На основании полученных экспериментальных данных можно предположить о возможной неэквивалентности активных центров по связыванию ТПФ апо-ТК, что является одним из механизмов регуляции фермента при низких концентрациях ТПФ. Снижение активности ТК при воздействии окситиаминпирофосфа проявляется в условиях конкурентных взаимоотношений кофермента и антикофермента за центры связывания на апо-ТК и, как следствие, усиление деградации модифицированного окситиаминпирофосфатом фермента. Механизм инактивации ТК в результате воздействия тиаминазы-1 обусловлен снижением уровня внутриклеточной концентрации тиамина и его коферментной формы. 50% снижение ферментативной активности наблюдается в течение 144 часов в результате инъекций тиаминазы, что сравнимо со временем полуобновления апофермента и кофермента интактных крыс [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Титаев А.А. Тиамин. Обмен, механизм действия. // Издательство «Наука».-1978.-С.143.
2. Wood, T. The pentose phosphate pathway.// Academic Press - 1985.- Orlando
3. Виноградов, В.В. О механизмах активации транскетолазы печени В1-гиповитаминозных крыс введением тиамина / В.В. Виноградов, К.К. Мандрик, С.А. Струмилло, С.К. Мацюк // Биохимия. -1979- Т.44, №5.- C.868-875.
4. Катаева, И.А. Активности пируватдегидрогеназы, *σ*-кетоглутаратдегидрогеназы и транскетолазы у дрожжей Candida Lipolitika, выращенных на глюкозе в условиях избытка и недостатка тиамина. / И.А. Катаева, Т.В. Финогенова //Пробл. совр. биохимии и биотехнологии. Тез.докл. 8 Объед.симп.биохим.обществ СССР, ГДР. –. 1985.- C.232.
5. Brin M. Red cell transketolase as an indicator of nutritional deficiency // J.Amer.J. Clin.Nutr 33.-1980. -№2.-P.169-171.
6. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. // Высш.шк.-M.: -1980.-C.90-92.
7. Кочетов, Г.А. Выделение транскетолазы из печени крысы и некоторые ее свойства / Г.А. Кочетов, А.А. Минин // Биохимия. 43. вып.3.-1978-C.1631-1635.
8. Филиппов, П.П. Транскетолаза из печени свиньи: ковалентная связь между коферментом и апобелком. / П.П. Филиппов, Н.К. Тихомирова, А.Н. Котеров // Биохимия. 1980.-Т.45, № 2.- С.305-310.
9. Филиппов, П.П. Транскетолаза печени свиньи: возможность ковалентной связи между коферментом и белком. / П.П. Филиппов, Н.К.Тихомирова // Проблемы современной биохимии и биотехнологии: Тез. докл. 8 объед. симп. биохим.обществ СССР-ГДР. Рига. -1985. -С.144-145.
10. Пустынников, М.Г. Выделение транскетолазы из эритроцитов человека и некоторые ее свойства / М.Г. Пустынников, Г.А. Кочетов //Вестник моск. Ун-та. Сер.16.Биология.-1983 -№3.- С.56-60.
11. Heinrich, C. Studies on the reconstitution of apotransketolase with thiamin pyrophosphate and analogs of the coenzyme./ H. Steffen, P. Janser, O. Wiss. // Eur.J. biochim. 30. -1972. -P. 533-541.
12. 12. Tgan, R. M. Transketolase kinetics. The slow reconstitution of the holoenzyme is due to rate-limiting dimerization of the subunits / R.M. Tgan, H. Z. Sable // J. Biol. Chem 256.-1981.-P. 4877-4883.
13. Горбач, З.В. Обмен кофермента в составе транскетолазы печени крысы / З.В. Горбач, В.Л. Кубышин, С.С. Маглыш, С.В. Забродская // Биохимия.- 1986.- Т.51, вып.7.- С.1093-1099.
14. Сидорова, Н.Н. Обмен кофермента холотранскетолазы со средой / Н.Н. Сидорова, Р.А. Усманов, А.Н. Куимов, Г.А. Кочетов // Биохимия. 62. -1996.–C. 880-886.
15. Ковина, М.В. Исследование кооперативного связывания кофермента активными центрами транскетолазы методом кинетического моделирования / М.В. Ковина, В.А. Селиванов, Н.В. Кочетова, Г.А. Кочетов // Биохимия 63.-1997.-C. 1155-1163.
16. Кубышин, В.Л. Некоторые характеристики транскетолазы печени крысы./ В.Л. Кубышин, З.В. Горбач // Украинский биохимический журнал.-1985.-T.57, №2.- C.37-41.
17. Kochetov, G.A. Kinetics of reconstruction of holotransketolasee / G.A. Kochetov, P. P. Philippov, A.P. Razjivin, N.K. Tikhomirova // FEBS Lett. 53.-1975.-P 211-212.
18. Booth, C. Reconstitution of holotransketolase is by thiamin – diphosphate magnesium complex / C. Booth, P. Nixon // Eur. J. Biochem. 218.-1993.-P. 261-265.
19. Пузач С.С. Выделение и некоторые свойства тиаминазы-1 . /Пузач С.С., Горбач З.В. //Лаб.дело 1982. №9. С. 540-542.
20. Островский Ю.М. Молекулярно-кинетические параметры тиаминовых ферментов и механизм антивитаминного действия окситиамина в организме / Островский Ю.М., Воскобоев А.И., Горенштейн Б.И. // Биохимия. – 1979. – Т. 44. - №9. – С. 1551-1557.