

**КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
МЕМБРАННО-АССОЦИИРОВАННОЙ
ТИАМИНТРИФОСАТАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КУРИЦЫ**

Колос И. К., Макавичков А. Ф.

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси
г. Гродно, Республика Беларусь

Наряду с тиаминдифосфатом (ТДФ) – коферментной формой витамина B_1 – в большинстве исследованных биологических объектов обнаружены другие производные тиаминна: тиаминмонофосфат, тиаминтрифосфат (ТТФ) и аденозин-тиаминтрифосфат (АТТФ), значение которых для жизнедеятельности клетки не установлено [1, 2]. Результаты исследований, проведенных за последнее десятилетие, указывают на возможное участие ТТФ и АТТФ в процессах краткосрочной биохимической адаптации [2, 3]. В настоящее время ферменты обмена АТТФ у представителей различных систематических групп организмов практически не изучены; известно лишь, что его биосинтез у *E. coli* осуществляется Mg^{2+} -зависимым растворимым белком, а в печени крысы присутствует мембранно-ассоциированная АТТФ-гидролаза. Противоречивы также сведения о механизмах биосинтеза ТТФ. Гидролиз ТТФ в клетках млекопитающих катализируется специфичной ТТФазой – растворимым Mg^{2+} -зависимым ферментом с молекулярной массой ~ 25 кДа, который экспериментально не обнаружен у других классов организмов. У бактерий, грибов, растений, птиц и рыб гидролиз ТТФ, судя по всему, протекает под действием менее специфичных фосфатаз, филогенетически не родственных ТТФазе млекопитающих; ни один из этих белков не охарактеризован на молекулярном уровне [4]. Цель данной работы заключалась в изучении кинетических свойств фермента, катализирующего гидролиз ТТФ в печени курицы (*Gallus gallus*).

Для приготовления гомогенатов образцы печени растирали в стеклянном гомогенизаторе в 5-кратном объеме охлажденного до 4 °С 50 мМ трис-НСl буфера, рН 7,3, содержащего 0,15 М КСl и 0,2 мМ ЭДТА. Экстракт получали центрифугированием гомогената в течение 60 мин (20000 г, 4 °С). ТТФазную активность измеряли по скорости высвобождения неорганического фосфата, количество которого определялось методом Lanzetta с соавт. [5].

В результате проведенных исследований установлено, что ТТФаза гомогената печени проявляет максимальную активность в слабокислой

среде при pH 5.5-6.0. Катионы двухвалентных металлов – Mg^{2+} и Ca^{2+} – увеличивают скорость ТТФазной реакции в 17–20 раз. В исследованном диапазоне концентраций субстрата в присутствии 5 мМ Mg^{2+} фермент подчинялся кинетике Михаэлиса-Ментен; кажущаяся K_m для ТТР, рассчитанная методом нелинейной регрессии и в координатах Хейнса, составила 1.7-2.2 мМ. Моновалентные анионы (Γ , SCN^- , NO_3^- , Br^- , Cl^-) в концентрации 150 мМ ингибировали ферментативную активность, снижая скорость гидролиза ТТФ на 20-60%. После центрифугирования гомогената печени более 85% ТТФазной активности обнаруживалось в осадке, что указывает на мембранную локализацию фермента. Обработка осадка 1%-м дезоксихолатом натрия приводила к соллобализации 53% ТТФазной активности. При хроматографии на колонке с тойоперлом HW-55 ТТФазная активность элюировалась совместно с аденозин- и инозинтрифосфатазной активностями в объеме, соответствующем белкам с молекулярной массой ≥ 700 кДа. Фракции ТТФазного пика также проявляли заметную инозиндифосфатазную активность (32% от активности с ТТФ) и менее выраженную способность дефосфорилировать ТДФ и *n*-нитрофенилфосфат (соответственно 16% и 9% от активности с ТТФ). Полученные данные свидетельствуют о том, что гидролиз ТТФ в печени курицы осуществляется мембранно-ассоциированным белковым комплексом, обладающим широкой субстратной специфичностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Makarchikov A. F., Lakaye B., Gulyai I. E., Czerniecki J., Coumans B., Wins P., Grisar T., Bettendorff L. Thiamine triphosphate and thiamine triphosphatase activities: from bacteria to mammals // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2003. – Vol. 60. – P. 1477–1488.
2. Bettendorff L., Wirtzfeld B., Makarchikov A.F., Mazzucchelli G., Frédéric M., Gigliobianco T., Gandolf M., De Pauw E., Angelot L., Wins P. Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide // *Nat. Chem. Biol.* – 2007. – Vol. 3. – P. 211–212.
3. Lakaye B., Wirtzfeld B., Wins P., Grisar T., Bettendorff L. Thiamine triphosphate, a new signal required for optimal growth of *Escherichia coli* during amino acid starvation // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 17142–17147.
4. Makarchikov A.F. Vitamin B₁: metabolism and functions // *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B: Biomedical Chemistry.* – 2009. – Vol. 3. – P. 116–128.
5. Lanzetta P. A., Alvarez L. J., Reinach P. S., Candia O. A. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 100. – P. 95–97.