

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭНЗИМОВ ГИДРОЛИЗА ТИАМИНМОНОФОСФАТА В ПЕЧЕНИ КУР

И. К. КОЛОС, А. Ф. МАКАРЧИКОВ

Гродненский государственный аграрный университет;
Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси;
e-mail: a_makarchikov@yahoo.com

У животных тиаминмонофосфат (ТМР) является интермедиатом на пути деградации коэнзимной формы витамина B_1 – тиаминдифосфата. В настоящее время энзимы, участвующие в метаболизме ТМР в тканях животных, не идентифицированы. Цель данной работы состоит в исследовании гидролиза ТМР в печени кур. В гомогенате печени обнаружены два энзима с активностью ТМРазы – растворимый с рН-оптимумом в кислой среде (рН 6,0), и мембраносвязанный, активность которого максимальна при рН 9,0. Мембраносвязанная фосфатаза в присутствии 5 мМ Mg^{2+} активировалась в 1,7 раза. Кажущаяся K_m этого энзима для ТМР, рассчитанная в координатах Хейнса, составляет 0,6 мМ. Левамизол ингибировал мембранную ТМРазу по бесконкурентному типу с $K_i = 53$ мкМ. Активность растворимого энзима не зависит от ионов Mg^{2+} и не ингибируется левамизолом, кажущаяся K_m для ТМР равна 0,7 мМ. По данным гель-фильтрации на колонке с тойоперлом HW-55 молекулярная масса растворимой ТМРазы составляет 17,8 кДа, при этом пик активности ТМРазы совпадает с пиками флавиномононуклеотид- и *n*-нитрофенилфосфатазной активности. Полученные результаты указывают на то, что ТМР является физиологическим субстратом низкомолекулярной кислой фосфатазы, известной также как низкомолекулярная протеин-фосфотирозин-фосфатаза. Гидролиз ТМР, наблюдаемый в гомогенате печени кур при щелочных рН, обусловлен действием щелочной фосфатазы.

К л ю ч е в ы е с л о в а: тиаминмонофосфатаза, кислая фосфатаза, щелочная фосфатаза, кинетические свойства, левамизол, печень кур.

В итамин B_1 необходим для жизнедеятельности всех видов организмов. Основными его формами, присутствующими в клетках разной специализации, являются свободный (нефосфорилированный) тиамин, тиаминмонофосфат (ТМР) и тиаминдифосфат (ТДР); в небольших количествах в биологических объектах также обнаружены тиаминтрифосфат (ТТР) и аденозин-тиаминтрифосфат (АТТР) [1]. Принято считать, что исключительная значимость витамина B_1 для метаболизма клеток эукариотов обусловлена, главным образом, участием ТДР в качестве коэнзима в реакциях энергетического и углеводного обмена, катализируемых дегидрогеназными комплексами 2-кетокислот и транскетотазой (2.2.1.1); биохимическая роль других природных производных тиамина в настоящее время остается неизвестной. Эксперименты, выполненные на относительно простых модельных организмах – *E. coli* и *Arabidopsis thaliana*, ука-

зывают на наличие у ТТР и АТТР фундаментальных сигнальных или регуляторных функций (возможно, столь же жизненно важных, как и коэнзимная функция ТДР); формально же эти соединения можно отнести к алармонам – индикаторам тревожного состояния клетки [2]. По современным представлениям ТМР является одним из метаболитов системы обмена тиамина. У бактерий, растений и дрожжей ТМР может непосредственно синтезироваться из 2-метил-4-амино-5-гидроксиэтилпиримидиндифосфата и 4-метил-5-β-гидроксиэтилтиазолмонофосфата на пути биосинтеза коэнзимной формы тиамина [3]. В клетках животных образование ТМР связано исключительно с гидролизом ТДР; никаких специализированных путей или энзимов, участвующих в биосинтезе монофосфата, у животных не обнаружено. Занимая центральное место в системе метаболизма витамина B_1 , ТДР также служит субстратом для биосинтеза ТТР и АТТР.

Несмотря на огромное значение, которое имеет витамин В₁ для нормального хода жизненных процессов, фундаментальные аспекты его метаболизма изучены лишь фрагментарно: из энзимов, образующих систему обмена тиамин, в настоящее время на молекулярном уровне охарактеризованы только тиамин-пирофосфокиназа (2.7.6.2) и растворимая ТТРаза (3.6.1.28). До сих пор остаются открытыми вопросы о механизме биосинтеза ТТР у животных, специфичности мембраноассоциированной ТТРаза и существовании специфичной ТДРаза [1, 2]. Специфический энзим, осуществляющий гидролиз ТМР в животных клетках, также не идентифицирован. Известно лишь, что ТМР может служить субстратом щелочной фосфатазы (ЩФ, 3.1.3.1) [4] и фторидрезистентной, простатической кислой фосфатазы (ПКФ, 3.1.3.2) – гистохимического маркера некоторых типов нейронов млекопитающих [5–9]. О метаболизме АТТР в клетках эукариот в научной литературе какие-либо сведения отсутствуют.

Одна из основных задач в области исследований витамина В₁ состоит в молекулярной идентификации всех энзимов, участвующих в биосинтезе и деградации его природных производных. Можно надеяться, что полученные при этом сведения позволят создать целостное представление о системе метаболизма тиамин, проследить ее эволюцию в различных филогенетических линиях и в конечном итоге ускорить прогресс в понимании всего многообразия биологических функций витамина. Цель данной работы заключалась в характеристике свойств энзимов, катализирующих гидролиз ТМР в гомогенате печени кур (*Gallus gallus*) – одного из модельных организмов, используемых в медико-биологических исследованиях.

Материалы и методы

В работе использованы тойоперл HW-55 (Тоуо Soda Со., Япония), бычий сывороточный альбумин (БСА), *n*-нитрофенилфосфат, флавиномононуклеотид (FMN) (Sigma, США), голубой декстран, инозин-5'-монофосфат (ИМР), пируваткиназа, лактатдегидрогеназа (Reanal, Венгрия), ферритин, цитохром *c* (Serva, Германия). Все остальные реагенты производства Реахим (Россия) квалификации чда и хч.

Объектом исследования служила печень кур породы белый леггорн. 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 (19 000 g, 4 °С).

Фосфатазную активность измеряли по скорости образования неорганического фосфата P_i, количество которого определялось методами Lanzetta с соавт. [10] и Sapru с соавт. [11]. Стандартная реакционная смесь включала 25 мМ трис – 25 мМ малеатный буфер, рН 6,0 или 50 мМ трис-НСl буфер, рН 9,0, 5 мМ MgCl₂, анализируемый образец (50–100 мкг протеина), 1 мМ субстрат (0,5 мМ – в случае ИМР). При кинетических исследованиях состав реакционной среды изменялся в зависимости от цели эксперимента. Реакцию проводили при 37 °С в течение 15–60 мин. В случае использования метода [11] реакция осуществлялась в объеме 0,1 мл, останавливалась добавлением 1 мл реагента на P_i, после чего смесь инкубировали 25 мин при 37 °С, центрифугировали (10 мин, 2500 об./мин) и измеряли абсорбцию раствора при 325 нм. При определении P_i по методу [10] объем реакционной системы составлял 0,2 мл, реакцию останавливали, добавляя равный объем 10%-й трихлоруксусной кислоты, смесь центрифугировали (10 мин, 2500 об./мин) и отбирали на анализ аликвоты по 0,1 мл. Концентрацию P_i находили по калибровочным графикам. За единицу активности (Е) принимали количество, катализирующее образование 1 мкмоль P_i за 1 мин.

Хроматография экстракта осуществлялась на калиброванной протеинами-стандартами колонке с тойоперлом HW-55 (Ø 1,6 40 см) в 20 мМ трис-НСl буфере, рН 7,5, содержащем 0,2 М NaCl, 0,2 мМ ЭДТА при скорости потока 5 см·ч⁻¹. Молекулярные массы рассчитывали по графику в координатах lgV_c/V₀–lg Мм.

Содержание протеина определяли по методу Bradford [12], используя в качестве стандарта БСА, и по величине абсорбции при 280 нм.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы GraphPad Prism 5.0. Графические данные представлены в виде средних значений ± ошибка репрезентативности (M ± SEM).

Результаты и обсуждение

Гидролиз ТМР в гомогенате печени кур протекает в широком диапазоне значений рН, при этом на графике рН-зависимости активности тиаминмонофосфатазы (ТМРаза) наблюдаются два выраженных максимума – в слабнокислой (рН 6,0) и щелочной (рН 9,0) среде (рис. 1). В пересчете на 1 г ткани активность ТМРаза составляет 0,36–0,63 Е при рН 6,0 и 0,89–1,27 Е при рН 9,0.

Аналогичная рН-зависимость установлена ранее для гидролиза ТМР в экстрактах ацетонного порошка из мозга и почек крысы, однако в печени крысы наблюдался единственный рН-оптимум при 6,0 [13].

После центрифугирования гомогената печени (60 мин, 19 000 г) ~ 90% от общей ТМР-активности, наблюдаемой при рН 9,0, обнаруживается в осадке; в то же время, ТМР-активность, регистрируемая при рН 6,0, сосредоточена преимущественно в надосадочной жидкости (рис. 2). Эти данные свидетельствуют о наличии в печени кур, по крайней мере, двух фосфатаз, способных катализировать гидролиз ТМР. Один из этих энзимов, проявляющий активность при щелочных рН, локализован в клеточных мембранах, тогда как фосфатаза с рН-оптимумом в кислой области значений водородного показателя представляет собой растворимый протеин. То, что в супернатанте остается ~ 10% щелочной ТМРаза можно объяснить недостаточно эффективным режимом центрифугирования (60 мин, 19 000 г), не позволяющим осадить самые мелкие фрагменты мембран. С другой стороны, наличие в осадке кислой ТМРаза должно быть, в первую очередь, следствием его загрязнения компонентами растворимой фракции; обычно в протеиновых преципитатах половина массы приходится на удерживаемую жидкость [14]. Не исключено также, что в мембранах локализована фосфатаза, способная с низкой скоростью дефосфорилировать ТМР в кислых условиях среды.

Из данных, представленных на рис. 3, видно, что гидролиз ТМР в гомогенате печени кур при рН 9,0 может протекать в отсутствие экзогенных катионов металлов. Добавление в систему ионов Mg^{2+} в концентрации 5 мМ ускорило реакцию в 1,7 раза. Катионы Ca^{2+} , вносимые в реакцию среду в такой же концентрации, не оказывали существенного влияния на скорость

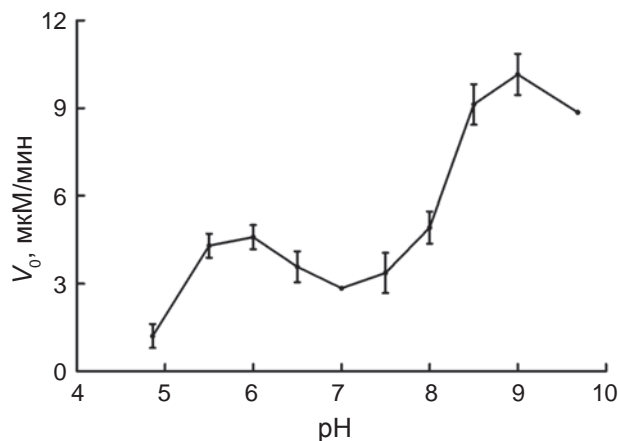


Рис. 1. Влияние рН на скорость гидролиза ТМР в гомогенате печени кур. Использованы буферные растворы: 20 мМ ацетатный (рН 4,86); 25 мМ трис–25 мМ малеатный (рН 5,5–8,5); 50 мМ трис-НСl (рН 9,0); 50 мМ глициновый (рН 9,5)

гидролиза ТМР при рН 9,0. Как и мембраносвязанный энзим, кислая ТМРаза экстракта из печени кур для проявления каталитической активности не требует катионов металлов. Однако в отличие от мембранного протеина растворимая фосфатаза индифферентна к ионам Mg^{2+} и заметно ингибируется (на 25%) ионами Ca^{2+} .

Известно, что в различных биологических объектах присутствует ЩФ – мембраноассоциированный энзим, катализирующий гидролиз широкого круга субстратов с фосфомоноэфирными связями [15]. У млекопитающих обнаружено несколько изоформ ЩФ, кодируемых различными генными локусами [16, 17]. Характерным свойством ЩФ является высокая чув-

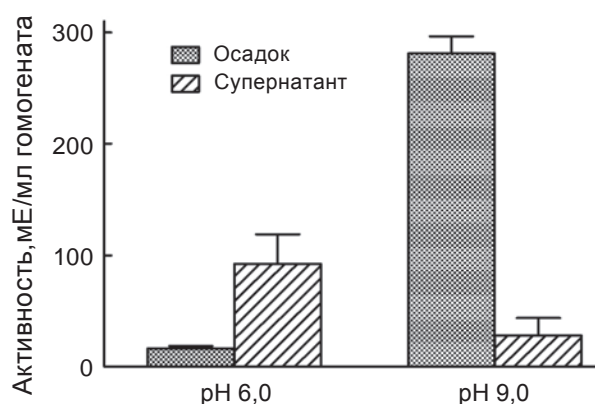


Рис. 2. Распределение активности ТМРаза между осадком и растворимой фракцией гомогената печени кур

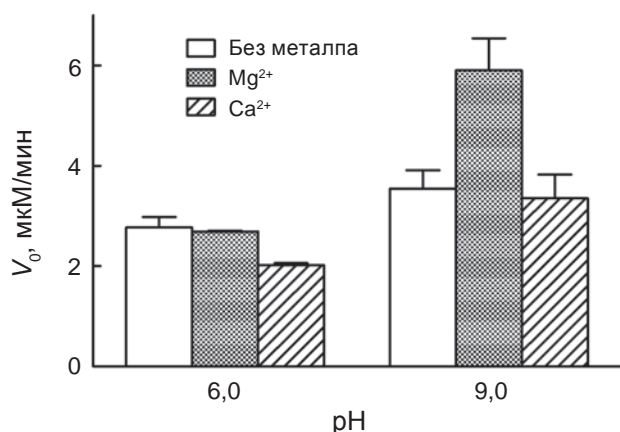


Рис. 3. Влияние ионов Mg²⁺ и Ca²⁺ на скорость гидролиза ТМР в гомогенате печени кур

ствительность к левамизолу (декарису) – противоглистному препарату, который стимулирует н-холинорецепторы нервно-мышечных синапсов гельминтов, вызывая тем самым спастический паралич их мускулатуры [18]. Для нескольких видов млекопитающих было показано, что активность тканеспецифичных изоформ ЩФ (ТНЩФ) практически полностью подавляется при концентрациях левамизола < 1 мМ [19–22]; тканеспецифичные ЩФ менее чувствительны к действию ингибитора (I₅₀ для разных изоэнзимов колеблется в диапазоне 1,1–23,7 мМ [20–22]). В экспериментах на мышцах установлено [6], что при pH 8,5 левамизол (в концентрации 2,5 мМ) ингибирует ТМРазную активность гомогенатов почек на 94, печени – на 86, спинного мозга – на 83, сердца – на 69%. Эти результаты указывают на способность ЩФ млекопитающих осуществлять гидролиз ТМР *in vitro*. Выше уже отмечалось, что ТМР также является субстратом ЩФ из тонкой кишки телят [4].

Чтобы составить представление о природе щелочной ТМРазы печени курицы мы исследовали влияние левамизола на ТМРазную и *n*-нитрофенилфосфатазную активность гомогената при pH 9,0. Как видно на рис. 4, левамизол, добавляемый в реакционную смесь в концентрации 1 мМ, вызывает практически одинаковое снижение скорости гидролиза обоих субстратов (~ на 69%). Для сравнения, *n*-нитрофенилфосфатазная активность ТНЩФ из 17-дневного куриного эмбриона ингибировалась 1 мМ левамизолом при pH 10,4 на 63% [23]. При увеличении концентрации ингибитора до 2,5 мМ наблюдалось еще более выра-

женное торможение *n*-нитрофенилфосфатазной и ТМРазной активности (рис. 4). Следует отметить, что левамизол, исходя из полученных нами данных, обладает практически одинаковой эффективностью действия на ТМРазную активность печени кур (83% ингибирования) и мыши (86% ингибирования [6]).

Кинетические исследования показали, что при pH 9,0 гидролиз ТМР в гомогенате печени кур описывается уравнением Михаэлиса–Ментен, при этом величины кажущейся K_m и V_{max} , рассчитанные в координатах Хейнса, составили соответственно 627 ± 91 мкМ и $11,1 \pm 0,2$ мкМ/мин (рис. 5, кривая 1). На рис. 5 также представлена зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата в присутствии 1 мМ левамизола (кривая 2). Действие ингибитора проявлялось в уменьшении обеих кинетических констант ($K'_m = 140 \pm 28$ мкМ, $V'_{max} = 2,5 \pm 0,3$ мкМ/мин); пересечение прямых на оси ординат свидетельствует о бесконкурентном типе ингибирования. В связи с этим следует отметить, что левамизол ингибирует ЩФ также по бесконкурентному типу [16, 20]. По данным рис. 5 можно оценить K_i энзима печени кур для левамизола, применяя уравнение

$$K_i = [I] / (K_m V_{max} / (K'_m V'_{max}) - 1),$$

где $[I]$ – концентрация ингибитора [24]. Использование этой формулы дает значение $K_i = 53$ мкМ – величину одного порядка с приводимыми в литературе K_i ТНЩФ ($K_i = 6,6–320$ мкМ) [20, 25–27].

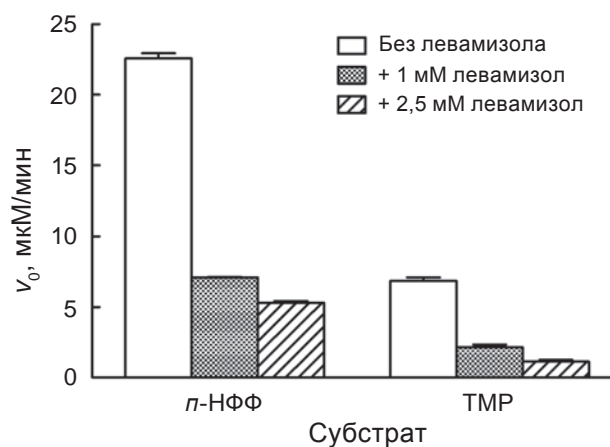


Рис. 4. Действие левамизола на гидролиз *n*-нитрофенилфосфата (*n*-НФФ) и ТМР в гомогенате печени кур при pH 9,0

Еще одним аргументом в пользу того, что ЩФ катализирует гидролиз ТМР в гомогенате печени кур, может служить отношение щелочной ТМРаза к катионам двухвалентных металлов. Хотя, как известно, ЩФ – это цинксодержащий фермент, для полного проявления его активности необходимо присутствие ионов Mg^{2+} [17]. Стимулирующий эффект Mg^{2+} был установлен для препаратов ЩФ из различных источников [28–31]. В каталитическом механизме ЩФ *E. coli* роль катионов Mg^{2+} состоит в координации молекулы воды, обеспечивающей протонирование/депротонирование остатка Ser-102 [32]. В то же время ионы Ca^{2+} не влияют на активность ЩФ [28, 33]. Аналогичные закономерности наблюдаются при гидролизе ТМР при pH 9,0 (рис. 3).

Таким образом, полученные нами результаты и имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что ТМР-разная активность, регистрируемая в гомогенатах тканей животных при щелочных pH, принадлежит мембраноассоциированной ЩФ. Однако в настоящее время нет никаких оснований рассматривать этот белок в роли компонента системы метаболизма витамина B₁₂, т. е. в качестве фермента, катализирующего гидролиз ТМР *in vivo*. Поскольку ЩФ является эктонуклеотидазой экспонированной наружу плазматической мембраны [17], ее уча-

стие во внутриклеточном метаболизме ТМР представляется маловероятным. Вместе с тем, необходимо отметить, что ранее высказывалось предположение о существовании в кишечнике крысы механизма биосинтеза ТМР, в котором задействована ЩФ [34].

Как уже упоминалось выше, ТМР является субстратом еще одной эктонуклеотидазы – фторидрезистентной кислой фосфатазы (КФ), высокий уровень экспрессии которой характерен для некоторых структур нервной ткани млекопитающих. С помощью гистохимических методов этот фермент, использовавшийся несколько десятилетий в качестве специфического маркера, визуализируется в плазматических мембранах синаптических клубочков *substantia gelatinosa*, аппарате Гольджи и аксолемах малых и средних сенсорных нейронов дорсальных корешков спинного мозга [6, 7, 9]. Сравнительно недавно фторидрезистентная ТМРаза была идентифицирована как трансмембранный изофермент ПКФ (ТИ-ПКФ) [5], секреторная форма которой экспрессируется в эпителиальных клетках предстательной железы, где ее содержание в норме может достигать 0,5 мг на 1 г ткани [35]. Высокая концентрация секреторной формы ПКФ также характерна для спермы – 1 мг/мл [36], тогда как в плазме крови концентрация этого фермента

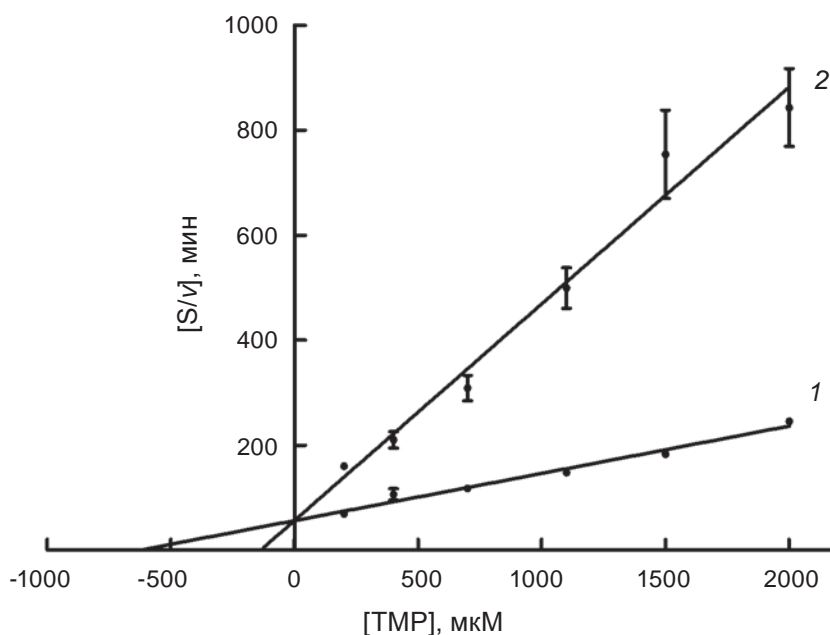


Рис. 5. Ингибирование активности ТМРаза гомогената печени кур левамизолом при pH 9,0. 1 – Зависимость начальной скорости реакции от концентрации ТМР. 2 – То же в присутствии 1 мМ левамизола

составляет всего лишь 1–3 нг/мл [37]. Обе изоформы ПКФ кодируются одним и тем же геном, представляя собой продукты альтернативного сплайсинга [38]. Хотя принято считать, что синтез ПКФ – это почти полная прерогатива предстательной железы, для которой данный фермент рассматривается как один из тканеспецифичных антигенов [37], в небольших количествах мРНК трансмембранной изоформы выявлена в различных органах и тканях млекопитающих [38, 39]. При этом у человека самый низкий уровень экспрессии мРНК ТИ-ПКФ наблюдается в печени (0,02% от экспрессии в простате); в других органах содержание мРНК ПКФ по сравнению с простатой ниже в 50–1000 раз [39]. По данным иммуногистохимического анализа в клетках предстательной железы фермент локализован во внутренних мембранах базальных и апикальных везикул, мультивезикулярных телец (эндосом) и лизосомах [38]. Среди других тканей человека слабое или умеренное окрашивание наблюдалось только в некоторых типах клеток поджелудочной и молочной желез, толстого кишечника, кожи и скелетных мышц [38, 39]. В то же время, биохимическими методами высокая ТМРазная активность при «кислых» рН регистрируется в различных тканях млекопитающих [6, 13, 40], включая печень, где экспрессия мРНК ПКФ крайне незначительна. Имея в виду, что метабо-

лизм тиаминфосфатов осуществляется во всех клетках организма, едва ли оправданным было бы рассматривать ТМР в качестве возможного физиологического субстрата ПКФ.

Металлнезависимая кислая ТМРаза экстракта из печени кур подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен в исследованном диапазоне концентраций субстрата от 0,1 до 6 мМ. На рис. 6, А представлен график, отражающий гиперболическую зависимость начальной скорости реакции от концентрации ТМР. Значение кажущейся K_m растворимой ТМРазы, рассчитанное по уравнениям линейной регрессии в координатах Хейнса, составляет 726 ± 17 мкМ (рис. 6, Б). Фермент экстракта печени проявлял максимальную активность при рН 6,0 (график не представлен). Левамизол не оказывал ингибирующего действия на активность растворимой ТМРазы.

В клетках животных синтезируется несколько растворимых изоэнзимов (типов) КФ, различающихся структурой, субклеточной локализацией, иммунологическими и другими свойствами [41]. У человека помимо гена ПКФ идентифицированы еще 3 локуса, кодирующих КФ лизосомального типа (ЛКФ): КФ эритроцитарного типа (ЭКФ) и КФ остеокластов и макрофагов [42–46]. Экспрессия КФ остеокластов и макрофагов – гликопротеинов с M_r 35 кДа –

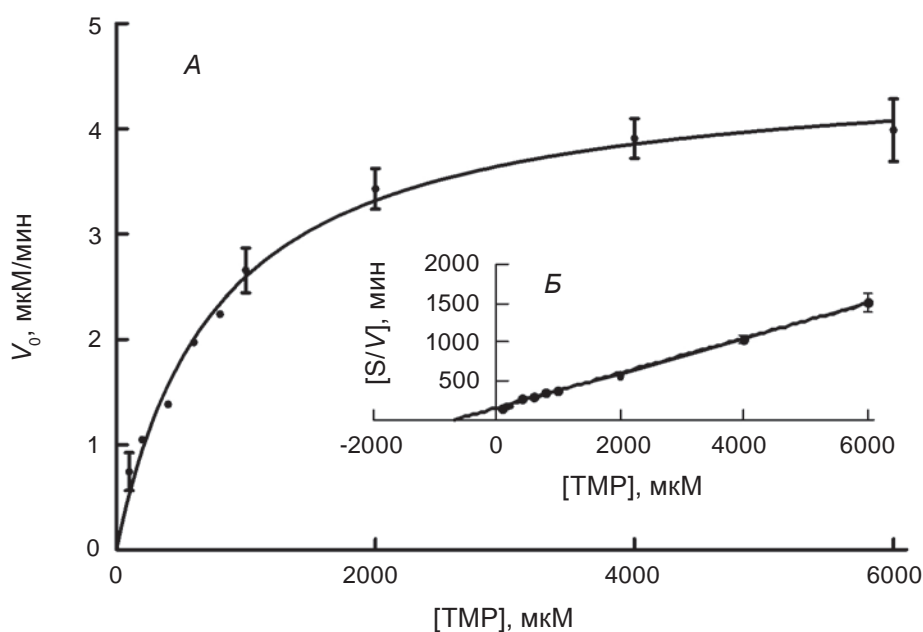


Рис. 6. А – Зависимость начальной скорости гидролиза ТМР в экстракте из печени кур от концентрации субстрата при рН 6,0. Б – то же в координатах Хейнса

ограничена преимущественно клетками фагоцитарной системы [47–49]. В то же время ЛКФ и ЭКФ экспрессируются в клетках различных органов и тканей животных, в том числе в печени кур [50]. Первоначально эти изоэнзимы КФ обозначались соответственно как высокомолекулярная (high-molecular-weight, HMW, Мм ~ 100 кДа) и низкомолекулярная (low-molecular-weight, LMW, Мм ~ 14–18 кДа) формы КФ; ЭКФ является цитозольным энзимом, тогда как ЛКФ локализована в лизосомах [51, 52]. Лизосомальный энзим характеризуется широкой специфичностью; его субстратами, наряду с *n*-нитрофенилфосфатом, фенил- и нафтилфосфатом, могут служить FMN, β -глицерофосфат, фосфоэнолпируват, пиридоксаль-5-фосфат, нуклеозидмонофосфаты и ряд других веществ [50, 53–55]. Напротив, среди природных соединений ЭКФ проявляет высокую избирательность к FMN [50, 54–56]. В середине 1980-ых было установлено, что ЭКФ также способна осуществлять гидролиз фосфотирозиновых остатков в протеинах [57, 58]. Это послужило причиной для ее переименования в протеин-фосфотирозинфосфатазу (low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase, LMPTR), однако неясно, выполняет ли этот энзим такую функцию *in vivo* [59]. Мы исследовали отношение растворимой кислоты

ТМРаза печени кур к названным изоэнзимам КФ, используя метод гель-фильтрации.

На рис. 7 показаны результаты хроматографии экстракта из печени кур на колонке с тойоперлом HW-55. Как следует из приведенных данных, в процессе хроматографии *n*-нитрофенилфосфатазная активность разделялась на два пика, соответствующих высокомолекулярной (Мм = 96 кДа) и низкомолекулярной (Мм = 17,8 кДа) КФ. Аналогичный профиль элюции был получен для FMNРаза, тогда как IMРазная активность регистрировалась только во фракциях, содержащих высокомолекулярную КФ, что согласуется с представлениями о широкой субстратной специфичности этого энзима [50]. На хроматограмме видно, что кислая ТМРаза выходила из колонки одним пиком, совпадающим со вторыми пиками *n*-нитрофенилфосфатазы и FMNРазы (Мм = 17,8 кДа), при этом площадь ТМРазного пика составляет ~ 17% от пика *n*-нитрофенилфосфатазной активности. Таким образом, данные гель-хроматографии указывают на то, что ТМР является физиологическим субстратом низкомолекулярной КФ (ЭКФ).

В заключение следует еще раз отметить, что полученные нами результаты дают основания сделать вывод о том, что ТМРазная актив-

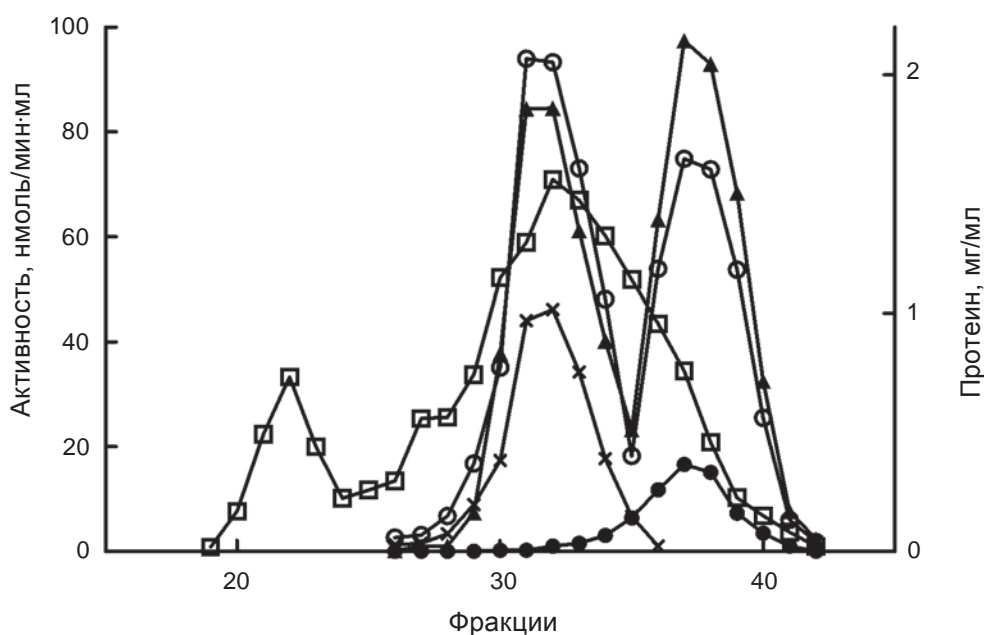


Рис. 7. Хроматограмма экстракта из печени кур на колонке с тойоперлом HW-55: \circ – *n*-нитрофенилфосфатаза, \blacktriangle – FMNРаза, \bullet – ТМРаза, \times – IMРаза, \square – концентрация протеина. Объем фракций – 1,5–1,6 мл

ность гомогената печени кур, наблюдаемая при щелочных значениях pH, обусловлена действием ЩФ. Локализация этого энзима на внешней стороне плазматической мембраны исключает его участие во внутриклеточном гидролизе TMP. Подходящим кандидатом на эту роль, судя по всему, является ЭКФ, однако с полной уверенностью об этом можно будет говорить лишь после молекулярной идентификации растворимой кислой TMPазы.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЕНЗИМІВ ГІДРОЛІЗУ ТІАМІНМОНОФОСФАТУ В ПЕЧІНЦІ КУРЕЙ

I. K. Kolas, O. F. Makarchikov

Гродненський державний аграрний університет;
Інститут біохімії біологічно активних
сполук НАН Білорусі, Гродно;
e-mail: a_makarchikov@yahoo.com

У тварин тіамінмонофосфат (TMP) є інтермедіатом на шляху деградації коenzимної форми вітаміну B₁ – тіаміндифосфату. Натепер ензими, що беруть участь у метаболізмі TMP в тканинах тварин, не ідентифіковані. Мета роботи полягала в дослідженні гідролізу TMP в печінці курей. В гомогенаті печінки виявлені два ензими з активністю TMPази – розчинний, що виявляє pH-оптимум в кислому середовищі (pH 6,0), і мембранозв'язаний, активність якого максимальна при pH 9,0. Мембранозв'язана фосфатаза активується в 1,7 раза в присутності 5 мМ Mg²⁺. Уявна K_m цього ензиму для TMP, розрахована в координатах Хейнса, становить 0,6 мМ. Левамізол інгібує мембранну TMPазу за безконкурентним шляхом з K_i = 53 мкМ. Активність розчинного ензиму не залежить від іонів Mg²⁺ і не інгібується левамізолом, уявна K_m для TMP дорівнює 0,7 мМ. За даними гель-фільтрації на колонці з тойоперлом HW-55 молекулярна маса розчинної TMPази становить 17,8 кДа, при цьому пік активності TMPази збігається з піками флавінмононуклеотид- і *n*-нітрофенілфосфатазної активності. Одержані результати вказують на те, що TMP є фізіологічним субстратом низькомолекулярної кислої фосфатази, відомої також як низькомолекулярна протеїн-фосфотирозин-фосфатаза. Гідроліз TMP, який спостерігається в гомогенаті

печінки курей за лужних pH, обумовлено дією лужної фосфатази.

Ключові слова: тіамінмонофосфатаза, кисла фосфатаза, лужна фосфатаза, кінетичні властивості, левамізол, печінка курей.

IDENTIFICATION OF THIAMINE MONOPHOSPHATE HYDROLYZING ENZYMES IN CHICKEN LIVER

I. K. Kolas, A. F. Makarchikov

Grodno State Agrarian University;
Institute of Biochemistry of Biologically
Active Compounds, National Academy
of Sciences of Belarus, Grodno;
e-mail: a_makarchikov@yahoo.com

In animals, thiamine monophosphate (TMP) is an intermediate on the path of thiamine diphosphate, the coenzyme form of vitamin B₁, degradation. The enzymes involved in TMP metabolism in animal tissues are not identified hitherto. The aim of this work was to study TMP hydrolysis in chicken liver. Two phosphatases have been found to contribute to TMP hydrolysis in liver homogenate. The first one, possessing a maximal activity at pH 6.0, is soluble, whereas the second one represents a membrane-bound enzyme with a pH optimum of 9.0. Membrane-bound TMPase activity was enhanced 1.7-fold by 5 mM Mg²⁺ ions and strongly inhibited by levamisole in uncompetitive manner with K_i of 53 μM, indicating the involvement of alkaline phosphatase. An apparent K_m of alkaline phosphatase for TMP was calculated from the Hanes plot to be 0.6 mM. The soluble TMPase has an apparent K_m of 0.7 mM; this enzyme is Mg²⁺ independent and insensitive to levamisole. As estimated by gel filtration on a Toyopearl HW-55 column, the soluble enzyme has a molecular mass of 17.8 kDa, TMPase activity being eluted simultaneously with peaks of flavinmononucleotide and *p*-nitrophenyl phosphatase activity. Thus, TMP appears to be a physiological substrate for a low-molecular weight acid phosphatase, also known as low-molecular-weight protein phosphotyrosine phosphatase.

Key words: thiamine monophosphatase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, kinetic properties, levamisole, chicken liver.

References

1. Makarchikov A. F. Thiamine triphosphate: a new view on non-coenzyme function of vitamin B₁. Mn: Belorusskaya nauka, 2008. 433 p. (in Russian).
2. Bettendorff L., Wins P. Thiamin diphosphate in biological chemistry: new aspects of thiamin metabolism, especially triphosphate derivatives acting other than as cofactors. *FEBS J.* 2009;276:2917-2925.
3. Spenser I. D., White R. L. Biosynthesis of vitamin B₁ (thiamin): an instance of biochemical diversity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997;36:1032-1046.
4. Vovk A. I., Babiy L. V., Muravyova I. V. Relative reactivities of thiamin monophosphate and thiamin diphosphate upon interaction with alkaline phosphatase. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2002;74(1):93-96. (in Russian).
5. Zylka M. J., Sowa N. A., Taylor-Blake B., Twomey M. A., Herrala A., Voikar V., Vihko P. Prostatic acid phosphatase is an ectonucleotidase and suppresses pain by generating adenosine. *Neuron.* 2008;60:111-122.
6. Ogawa K., Sakai M., Inomata K. Recent findings on ultracytochemistry of thiamin phosphatases. *Ann. NY Acad. Sci.* 1982;378:188-214.
7. Knyihar-Csillik E., Bezzegh A., Boti S., Csillik B. Thiamine monophosphatase: a genuine marker for transganglionic regulation of primary sensory neurons. *J. Histochem. Cytochem.* 1986;34:363-371.
8. Taylor-Blake B., Zylka M. J. Prostatic acid phosphatase is expressed in peptidergic and nonpeptidergic nociceptive neurons of mice and rats. *PLoS ONE.* 2010;5(1):e8674.
9. Silverman J. D., Kruger L. Acid phosphatase as a selective marker for a class of small sensory ganglion cells in several mammals: spinal cord distribution, histochemical properties, and relation to fluoride-resistant acid phosphatase (FRAP) of rodents. *Somatosens Res.* 1988;5:219-246.
10. Lanzetta P. A., Alvarez L. J., Reinach P. S., Candia O. A. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* 1979;100:95-97.
11. Sapru M. K., Geetha H., Taranath S. K. A single reagent method of phosphate estimation in phosphatase(s) assay. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 1987;24:340-343.
12. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254.
13. Kiessling K.-H. Thiamine phosphatases in liver, kidney, and brain of the rat. *Acta Chem. Scand.* 1960;14:1669-1670.
14. Scopes R. Protein Purification: Principles and Practice. Springer, 1994. 380 p.
15. McComb R. B., Bowers G. N. Jr., Posen S. Alkaline phosphatase. New York: Plenum, 1979. 986 p.
16. Millan J. L. Phosphatases. Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signalling.* 2006;2:335-341.
17. Zimmermann H., Zebisch M., Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signalling.* 2012;8:437-502.
18. Neal M J. Medical Pharmacology at a Glance. Wiley-Blackwell, 2012. 115 p.
19. McDougall K., Plumb C., King W. A., Hahnel A. Inhibitor profiles of alkaline phosphatases in bovine preattachment embryos and adult tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 2002;50:415-422.
20. Van Belle H. Kinetics and inhibition of alkaline phosphatase from canine tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* 1972;289:158-168.
21. Goldstein D. J., Rogers C. E., Harris H. Expression of alkaline phosphatase loci in mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980;77:2850-2867.
22. Goldstein D. J., Rogers C., Harris H. Evolution of alkaline phosphatases in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982;79:879-883.
23. Delomenède M., Buchet R., Mebarek S. Lansoprazole is an uncompetitive inhibitor of tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *Acta Biochim. Pol.* 2009;56:301-305.
24. Krupyanko V. I. A vector method for representation of enzyme reactions. M.: Nauka, 1990. 144 p. (in Russian).
25. Cyboron G. W., Wuthie R. E. Purification and initial characterization of intrinsic membrane-bound alkaline phosphatase from chicken epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.* 1981;256:7262-7268.
26. Khodaparast-Sharifi S. H., Snow L. D. Levamisole inhibition of alkaline phosphatase and

- 5'-nucleotidase of bovine milk fat globule membranes. *Int. J. Biochem.* 1989;21:401-405.
27. Kozlenkov A., Le Du M. H., Cuniasse P., Ny T., Hoylaerts M. F., Millán J. L. Residues determining the binding specificity of uncompetitive inhibitors to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J. Bone Miner. Res.* 2004;19:1862-1872.
 28. Wang H., Gilles-Baillien M. Alkaline phosphatase and ATPases in brush-border membranes of rat jejunum: distinct effects of divalent cations and of some inhibitors. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* 1992;100:289-294.
 29. Dean R. L. Kinetic studies with alkaline phosphatase in the presence and absence of inhibitors and divalent cations. *BAMBED.* 2002;30:401-407.
 30. Hiwada K., Wachsmuth E. D. Catalytic properties of alkaline phosphatase from pig kidney. *Biochem. J.* 1974;141:283-291.
 31. Cathala G., Brunel C., Chappelet-Tordo D., Lazdunski M. Bovine kidney alkaline phosphatase. Purification, subunit structure, and metalloenzyme properties. *J. Biol. Chem.* 1975;250:6040-6045.
 32. Stec B., Holtz K. M., Kantrowitz E. R. A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. *J. Mol. Biol.* 2000;299:1303-1311.
 33. Leone F. A., Ciancaglini P., Pizauro J. M. Effect of calcium ions on rat osseous plate alkaline phosphatase activity. *J. Inorg. Biochem.* 1997;68:123-127.
 34. Rindi G., Ricci V., Gastaldi G., Patrini C. Intestinal alkaline phosphatase can transphosphorylate thiamin to thiamin monophosphate during intestinal transport in the rat. *Arch. Physiol. Biochem.* 1995;103:33-38.
 35. Goldfarb D. A., Stein B. S., Shamszadeh M., Petersen R. O. Age-related changes in tissue levels of prostatic acid phosphatase and prostate specific antigen. *J. Urol.* 1986;136:1266-1269.
 36. Ronnberg L., Vihko P., Sajanti E., Vihko R. Clomiphene citrate administration to normogonadotropic subfertile men: blood hormone changes and activation of acid phosphatase in seminal fluid. *Int. J. Androl.* 1981;4:372-378.
 37. Muniyan S., Chaturvedi N. K., Dwyer J. G., LaGrange C. A., Chaney W. G., Lin M.-F. Human prostatic acid phosphatase: structure, function regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:10438-10464.
 38. Quintero I. B., Araujo C. L., Pulkka A. E., Wirkkala R. S., Herrala A. M., Eskelinen E. L., Jokitalo E., Hellstrom P. A., Tuominen H. J., Hirvikoski P. P., Vihko P. T. Prostatic acid phosphatase is not a prostate specific target. *Cancer Res.* 2007;67:6549-6564.
 39. Graddis T. J., McMahan C. J., Tamman J., Page K. J., Trager J. B. Prostatic acid phosphatase expression in human tissues. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2011;4:295-306.
 40. Laforenza U., Patrini C., Rindi G. Distribution of thiamine, thiamine phosphates, and thiamine metabolizing enzymes in neuronal and glial cell enriched fractions of rat brain. *J. Neurochem.* 1988;51:730-735.
 41. Bull H., Murray P. G., Thomas D., Fraser A. M., Nelson P. N. Demystified...Acid phosphatases. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 2002;55:65-72.
 42. Sharief F. S., Lee H., Lauderman M. M., Lundwall A., Deaven L. L., Lee C. L., Li S. S. Human prostatic acid phosphatase: cDNA cloning gene mapping and protein sequence homology with lysosomal acid phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989;160:79-86.
 43. Pohlmann R., Krentler C., Schmidt B. Human lysosomal acid phosphatase: cloning, expression and chromosomal assignment. *EMBO J.* 1998;7:2343-2350.
 44. Wo Y. Y., McCormack A. L., Shabanowitz J., Hunt D. F., Davis J. P., Mitchell G. L., Van Etten R. L. Sequencing, cloning and expression of human red cell-type acid phosphatase, a cytoplasmic phosphotyrosyl protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 1992;267:10856-10865.
 45. Bryson G. L., Massa H., Trask B. J., Van Etten R. L. Gene structure, sequence, and chromosomal localization of the human red cell-type low-molecular-weight acid phosphotyrosyl phosphatase gene, ACPI. *Genomics.* 1995;30:133-140.
 46. Lord D. K., Cross N. C. P., Bevilacqua M. A. Sequence, expression and chromosomal localization of a differentiation-associated protein of the human macrophage. *Eur. J. Biochem.* 1990;189:287-293.
 47. Hayman A. R., Bune A. J., Bradley J. R., Rashbass J., Cox T. M. Osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5): its localization

- to dendritic cells and diverse murine tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 2000;48:219-228.
48. Schindelmeiser J., Münstermann D. Immunohistochemical characterization of purple acid phosphatase-containing leucocytes in the human placenta. *Histochem. J.* 1991;23:38-42.
49. Drexler H. G., Gignac S. M. Characterization and expression of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in hematopoietic cells. *Leukemia.* 1994;8:359-368.
50. Haider S., Naz R., Khan A. R., Saeed A. Acid phosphatases in chicken's liver. *J. Chem. Soc. Pak.* 1993;15:64-71.
51. de Araujo P. S., Mies V., Miranda O. Subcellular distribution of low- and high-molecular-weight acid phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1976;452:121-130.
52. Panara F., Miletì A. Subcellular localization of high- and low-molecular weight acid phosphatases from chicken liver. *Int. J. Biochem.* 1986;18:1057-1059.
53. Helwig J. J., Farooqui A. A., Bollack C., Mandel P. Purification and some properties of tartrate-sensitive acid phosphatase from rabbit kidney cortex. *Biochem. J.* 1978;175:321-329.
54. Fujimoto S., Urata Y., Nakagawa T., Ohara A. Characterization of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from bovine kidney cortex. *J. Biochem.* 1984;96:1079-1088.
55. Siddiqua A., Rehmat M., Saeed A., Amin S., Naz R., Sherazi M., Khan G. M., Saeed A. Acid phosphatases from the liver of *Labeo rohita*: purification and characterization. *Biol. Pharm. Bull.* 2008;31:802-808.
56. Taga E. M., Van Etten R. L. Human liver acid phosphatases: purification and properties of a low-molecular-weight isoenzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 1982;214:505-515.
57. Chernoff J., Li H. C. A major phosphotyrosyl-protein phosphatase from bovine heart is associated with a low-molecular-weight acid phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985;240:135-145.
58. Boivin P., Galand C. The human red cell acid phosphatase is a phosphotyrosine protein phosphatase which dephosphorylates the membrane protein band 3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986;29:557-564.
59. Bottini N., Bottini E., Gloria-Bottini F., Mustelin T. Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase and human disease: in search of biochemical mechanisms. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 2002;50:95-104.

Получено 22.01.2014