

СВОЙСТВА МЕМБРАНОАССОЦИИРОВАННОЙ ТИАМИНТРИФОСФАТАЗЫ 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*

*Энзимы, участвующие в метаболизме тиаминтрифосфата (ТТР) в тканях птиц, в настоящее время не охарактеризованы. Цель данной работы заключалась в исследовании свойств тиаминтрифосфатазы (ТТРазы) печени кур (*Gallus gallus*). Установлено, что зависимость скорости гидролиза ТТР в гомогенате печени от рН описывается колоколообразной кривой с максимумом при рН 5,5–6,0. Катионы двухвалентных металлов (Mg^{2+} , Ca^{2+}) увеличивали активность ТТРазы в 17–20 раз, в присутствии 5 мМ Mg^{2+} кажущаяся K_M энзима для ТТР, рассчитанная методом нелинейной регрессии и в координатах Хейнса, составляет 1,7–2,2 мМ. Моновалентные анионы (I^- , SCN^- , NO_3^- , Br^- , Cl^-) в концентрации 150 мМ проявляли ингибирующее действие, снижая скорость ТТРазной реакции на 20–60%. После центрифугирования гомогената печени более 85% ТТРазной активности обнаруживалось в осадке, что свидетельствует о мембранной локализации энзима. Обработка осадка 1%-ым дезоксихолатом натрия приводила к солюбилизации 53% ТТРазной активности. При хроматографии на колонке с тойоперлом HW-55 ТТРазы элюировалась совместно с аденозин- и инозинтрифосфатазой в объеме, соответствующем протеинам с молекулярной массой ~ 700 кДа. Полученные данные свидетельствуют о том, что гидролиз ТТР в печени кур осуществляется мембраноассоциированным протеиновым комплексом, обладающим широкой субстратной специфичностью.*

Ключевые слова: тиаминтрифосфатаза, кинетические свойства, локализация, солюбилизация, печень кур.

Тиаминтрифосфат (ТТР) – трифосфорный эфир тиамин (витамина В₁) – впервые синтезирован в 1948 г. L. Velluz с соавт. [1]. В первой половине 1950-х появились сообщения о наличии ТТР в биологических объектах – печени крысы и пекарских дрожжах [2, 3]. После того как было установлено, что ТТР не обладает коэнзимной активностью [4, 5], на протяжении 1970–90-х годов в научной литературе обсуждались различные гипотезы о его специфической функции в клетках нервной системы, связанной с регуляцией ионной проницаемости плазматических мембран [6, 7]. В настоящее время рассматривается другой механизм участия ТТР в процессах нервной деятельности, в основе которого лежит циркуляция подвижного пула производных тиамин между внутриклеточным пространством и пресинаптической щелью [8, 9]. Результаты исследований, проведенных за последнее десятилетие, указывают на существование более фундаментальной биологической роли ТТР, общей для клеток раз-

личных типов и специализации, которая может иметь отношение к сигнальным (регуляторным) механизмам [10]. В тканях млекопитающих при обычных физиологических условиях концентрация ТТР поддерживается на низком уровне (порядка 30–400 пмоль/л) благодаря экспрессии растворимой тиаминтрифосфатазы (ТТРазы, 3.6.1.28) – Mg^{2+} -зависимого энзима с Мм 25 кДа, обладающего абсолютной субстратной специфичностью [11–13]. Хотя растворимая ТТРазы экспериментально найдена только у млекопитающих, методами биоинформатики существование протеинов-гомологов также предсказано у костных рыб, земноводных и рептилий, тогда как у птиц, насекомых, червей, прокариот, простейших, грибов и растений аминокислотные и нуклеотидные последовательности, гомологичные ТТРазе с Мм 25 кДа, не выявлены [14, 15]. За исключением растворимой ТТРазы млекопитающих специфичные энзимы, участвующие в гидролизе ТТР в клетках организмов других систематических групп, на молекулярном уровне

не идентифицированы. Известно лишь, что ТТР может служить субстратом АТФазы миозина (3.6.4.1) [16], нуклеозидтрифосфатазы (НТРаза; 3.6.1.15), очищенной из *E. coli* [17], кислот (3.1.3.2) [18] и щелочной (3.1.3.1) [19] фосфатаз; кроме того, способность к гидролизу ТТР проявлял тиаминсвязывающий протеин, выделенный из головного мозга крысы [20]. ТТРазная активность не установленной природы также обнаружена в мембранных структурах тканей крысы (*Rattus norvegicus*) [21], головного мозга мыши (*Mus musculus*) [22], почек быка (*Bos taurus*) [23], скелетных мышц крысы [24] и электрического органа электрического угря (*Electrophorus electricus*) [25]. Ограниченность имеющихся на сегодня сведений о молекулярной структуре и свойствах энзимов, осуществляющих метаболизм ТТР и других тиаминфосфатов у представителей различных филогенетических линий, не позволяет воссоздать в какой-либо степени целостную картину эволюции системы обмена витамина В₁. Вместе с тем, подобные построения могли бы содействовать скорейшему прогрессу в области исследований некоэнзимных функций производных тиамин. Цель данной работы состояла в изучении основных характеристик энзима, катализирующего гидролиз ТТР в печени кур (*Gallus gallus*); энзимы с ТТРазной активностью из тканей птиц в настоящее время не описаны.

Материалы и методы

В работе использовались бычий сывороточный альбумин (БСА), дезоксихолат натрия (ДОХ), фенилметилсульфонилфторид, инозин-5'-трифосфат (ИТР), АТФ, тиаминдифосфат (ТДФ), п-нитрофенилфосфат (*n*-НФФ) (Sigma, США); пируваткиназа, лактатдегидрогеназа, инозин-5'-дифосфат (ИДФ) (Reanal, Венгрия); сефадекс G-10, DEAE сефадекс A-25, SP сефадекс C-25 (Pharmacia, Швеция); тойоперл HW-55 (Toyo Soda Co., Япония); ферритин, цитохром *c*, кумасси бриллиантовый голубой G-250 (Serva, Германия). Остальные реагенты производства «Реахим» квалификации чда и хч.

Объектом исследования служила печень кур породы белый леггорн. Для приготовления гомогенатов образцы печени, хранившиеся при -20 °С, размораживали и растирали в стеклянном гомогенизаторе в 20-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 (20 000 г, 4 °С).

Энзиматическая активность измерялась по скорости образования неорганического фосфата (P_i), количество которого определяли методом P. Lanzetta с соавт. [26]. Стандартная реакционная смесь объемом 100 мкл включала 25 мМ трис-25 мМ малеатный буфер, рН 5,5; 5 мМ MgCl₂, анализируемый образец (20–50 мкг протеина гомогената, 1–9 мкг протеина постколлоночных фракций) и 1 мМ субстрата. При кинетических исследованиях состав реакционной среды изменялся в зависимости от цели эксперимента. Реакцию проводили при 37 °С в течение 5 мин, останавливали, добавляя 50 мкл 15%-й трихлоруксусной кислоты, смесь центрифугировали (10 мин, 2500 об./мин) и отбирали на анализ аликвоты по 100 мкл. Количество P_i находили по калибровочному графику. За единицу активности (Е) принимали количество, катализирующее образование 1 мкмоль продукта за 1 мин в условиях опыта.

Для солюбилизации ТТРазы образцы ткани гомогенизировали в 5-кратном объеме охлажденного до 4 °С 50 мМ трис-НСl буфера, рН 7,5, содержащего 0,15 М КСl и 0,2 мМ ЭДТА. Осадок отделяли центрифугированием в течение 60 мин (20 000 г, 4 °С), суспендировали в исходном объеме 20 мМ трис-НСl буфера, рН 7,5, содержащего 50 мМ NaCl, 0,2–1%-й ДОХ, 0,2 мМ ЭДТА, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид, и выдерживали 30 мин на льду. Нерастворившийся материал удаляли, центрифугируя суспензию 60 мин (20 000 г, 4 °С). Степень солюбилизации рассчитывали как отношение общей ТТРазной активности супернатанта к общей активности суспензии до центрифугирования.

Хроматографию солюбилизированных протеинов осуществляли на калиброванной маркерами 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. Протеинами-маркерами служили ферритин (480 кДа), пируваткиназа (228 кДа), лактатдегидрогеназа (135 кДа), БСА (67,5 кДа) и цитохром *c* (12,4 кДа).

Концентрацию протеина определяли по методу M. Bradford [27], используя в качестве стандарта БСА.

Синтез и очистку ТТР проводили, как описано в работе [28]. 5,6 г 98%-й Н₃Р₀₄ и 4,4 г

P_2O_5 нагревали при 60 °С до образования однородной массы, после чего добавляли 2,5 г тиаминхлорида. Реакционную смесь выдерживали при данной температуре 70 мин, охлаждали до 20 °С в ледяной бане, растворяли стекловидную массу в 12 мл воды (4 °С) и приливали к 0,5 л абсолютного ацетона (-20 °С). Образовавшийся осадок тиаминфосфатов растворяли в 15 мл 20 мМ трис-НСl буфера, рН 7,4, и пропускали через колонку (Ø 2,5×100 см) с сефадексом G-10. Свободные от фосфорной кислоты фракции хроматографировали на колонке (Ø 2,5×20 см) с DEAE сефадексом А-25 в 20 мМ трис-НСl буфере, рН 7,4, осуществляя элюцию фосфатов тиамина линейным градиентом NaCl от 0,1 до 0,4 М (по 300 мл в каждой камере). Фракции 3-го пика, содержащие ТТР, объединяли, упаривали до ~ 1 мл и осаждали в 10-кратном объеме абсолютного ацетона. Кристаллы растворяли в 5 мл 5 мМ ацетатного буфера, рН 3,8, и наносили на колонку (Ø 2,5×20 см) с SP сефадексом С-25. ТТР не сорбируется на ионообменнике и вымывается буфером основным пиком. Препарат ТТР хранили в аликвотах при -80 °С. По данным ВЭЖХ чистота препарата превышала 99%.

Для статистической обработки результатов использовали программу GraphPad Prism 5.0. Графические данные представлены в виде средних значений ± ошибка репрезентативности ($M \pm SEM, n = 3$).

Результаты и обсуждение

Исследования гидролиза ТТР в биологических объектах берут начало с 1972 г., когда в тканях крысы были обнаружены растворимая [29] и мембраноассоциированная [21] ТТРазная активность. В настоящее время растворимая ТТРаза, первоначально полученная в гомогенном виде из головного мозга [12], а затем из почек [30] быка, охарактеризована на молекулярном уровне [13, 31, 32]. Это Mg^{2+} -зависимый мономерный протеин с Мм ~ 25 кДа, проявляющий максимальную активность при рН 8,5–9,0. Экспериментально 25 кДа ТТРаза обнаружена только в тканях млекопитающих [11]. У человека ген ТТРаза – *ТНТРА* – занимает локус 14q11.2 в большом плече 14-й хромосомы. Учитывая абсолютную специфичность растворимой ТТРаза к субстрату [12, 30], можно полагать, что именно данный протеин является компонентом системы метаболизма витамина B_1 у млекопитающих. В

отличие от растворимого энзима мембраносвязанные ТТРаза из различных биологических источников имеют оптимумы активности в области рН 5,0–7,4 [9, 17, 21, 23–25]. Установлено, что в мембранах *E. coli* гидролиз ТТР осуществляется НТРазой с широкой субстратной специфичностью. Бактериальная НТРаза представляет собой металлнезависимый протеин с Мм 16 кДа, способный в равной степени ускорять гидролиз ТТР и различных нуклеозид- и дезоксинуклеозидтрифосфатов; кроме того, энзим проявлял заметную активность к нуклеозиддифосфатам [17]. Молекулярная природа и специфичность ТТРаза, локализованных в мембранных структурах эукариотных клеток [9, 21, 23–25], все еще остаются неясными. Ни один из этих протеинов не получен в достаточно чистом виде, поэтому судить об их специфичности приходится на основании косвенных признаков. По данным I. Matsuda с соавт. [24] мембраноассоциированная ТТРаза скелетных мышц крысы отличается от АТРаза тем, что активируется ионами NO_3^- , тогда как на АТРазную активность нитрат-ионы оказывали ингибирующее действие. R. Varghi и P. Braun [21] разграничили ТТРазную и Mg^{2+} -зависимую АТРазную (НТРазную) активность мембран мозга крысы, используя β - γ -метиленовый аналог ТТР, который снижал скорость ТТРазной реакции, но не оказывал влияния на гидролиз нуклеозидтрифосфатов. Было также показано, что АТР и АДФ ингибируют активность мембранной ТТРаза с K_i соответственно 20 и 75 мкМ [33]. Недавно были получены свидетельства в пользу того, что ТТРазная активность синаптосомных мембран из мозга крысы, проявляющая рН-оптимум при рН 7,4, принадлежит тиаминсвязывающему протеину [9]. Поскольку в клетках млекопитающих экспрессируется специфичная растворимая ТТРаза, участие мембраноассоциированных энзимов в метаболизме ТТР у млекопитающих, на наш взгляд, представляется маловероятным. Вместе с тем, интегрированные в мембраны фосфатазы могут быть вовлечены в гидролиз ТТР у организмов, наследственный аппарат которых не содержит генов-ортологов *ТНТРА*, в т. ч. у птиц. Примечательно, что в результате хромосомной делеции в геномах птиц утеряно около 30 генов, ортологи которых расположены в 14-й хромосоме человека [32].

На первом этапе исследований энзима, катализирующего гидролиз ТТР в печени курицы,

нами изучалось влияние на начальную скорость реакции кислотности среды. Из данных, представленных на рис. 1, видно, что исследуемая зависимость описывается кривой колоколообразной формы с максимумом при pH 5,5–6,0. Симметричный характер pH-профиля с равномерным падением активности по обе стороны от оптимума pH может указывать на наличие в гомогенате печени единственного энзима, который способен эффективно катализировать ТТРазную реакцию. Как уже отмечалось, pH-оптимумы в слабокислой или нейтральной среде присущи всем известным сегодня мембраноассоциированным энзимам с ТТРазной активностью [9, 17, 21, 23–25]. Максимальную активность при «кислых» pH 4,0–4,5 также проявляла неспецифичная растворимая ТТРаза, очищенная из листьев петрушки (*Petroselinum crispum*) [18].

При центрифугировании (20 000 g, 60 мин) гомогената печени курицы большая часть ТТРазной активности проявлялась в осадженном нерастворимом материале, представляющем в основной своей массе обломки мембранных клеточных структур. Как видно на рис. 2, общая ТТРазная активность осадка почти в 7 раз превышала активность экстракта. Таким образом, исходя из полученных данных, можно говорить о том, что гидролиз ТТР в печени кури-

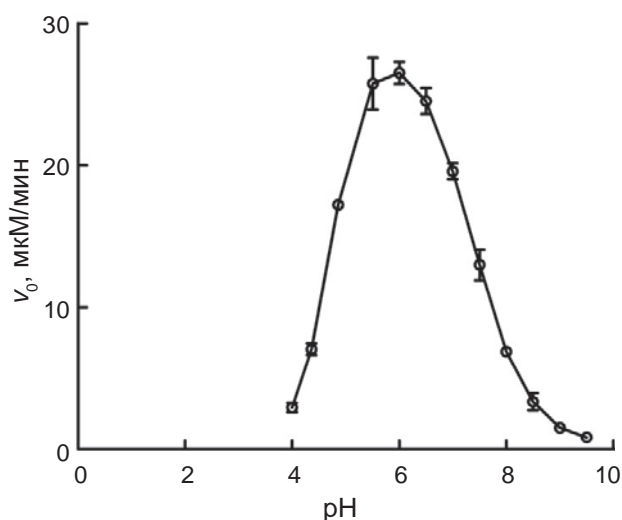


Рис. 1. Влияние pH на скорость гидролиза тиаминтрифосфата в гомогенате печени кур ($M \pm t$, $n = 3$). Использованы буферные растворы: 25 мМ ацетат (pH 4,0–4,86), 25 мМ трис–25 мМ – малеат (pH 5,5–8,5), 50 мМ трис–HCl (pH 9,0), 50 мМ глицин (pH 9,5)

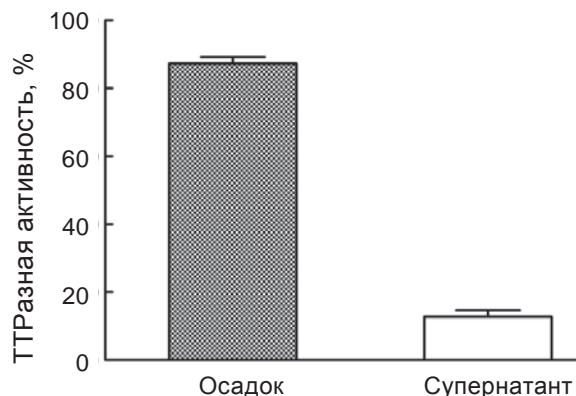


Рис. 2. Распределение активности тиаминтрифосфатазы между осадком и растворимой фракцией гомогената печени кур ($M \pm t$, $n = 3$)

цы осуществляется мембраноассоциированной фосфатазой.

Общим свойством мембраноассоциированных ТТРаз эукариотного происхождения является их абсолютная либо частичная зависимость от ионов Mg^{2+} [9, 21, 23–25]. Проведенные нами эксперименты свидетельствуют о том, что катионы данного металла также существенны для проявления каталитической активности ТТРаза курицы. Как показано на рис. 3, в отсутствие катионов металлов гидролиз ТТР в гомогенате печени протекает с едва заметной скоростью. При добавлении в реакцию среду ионов Mg^{2+} в концентрации 5 мМ скорость ТТРазной реакции возрастала в 20 раз. Ионы Ca^{2+} , вносимые в той же концентрации, обладали несколько менее выраженным эффектом, ускоряя реакцию в 18 раз. Известно, что концентрация ионов Mg^{2+} в ткани печени поддерживается на довольно высоком уровне – порядка 10 мМ [34]. В связи с этим, базальная активность ТТРаза может быть обусловлена активирующим действием содержащегося в гомогенате печени эндогенного Mg^{2+} . В любом случае очевидно, что ТТРаза из печени кур относится к обширной группе Mg^{2+} -активируемых энзимов, насчитывающей более 300 протеинов [35].

На рис. 4 представлены результаты экспериментов, в которых исследовалась зависимость начальной скорости ТТРазной реакции от концентрации субстрата в диапазоне 0,27–2,10 мМ при фиксированной концентрации ионов Mg^{2+} 5 мМ. В этих условиях кинетика реакции описывалась гиперболической кривой, причем значение кажущейся константы Михаэлиса (K_M), рас-

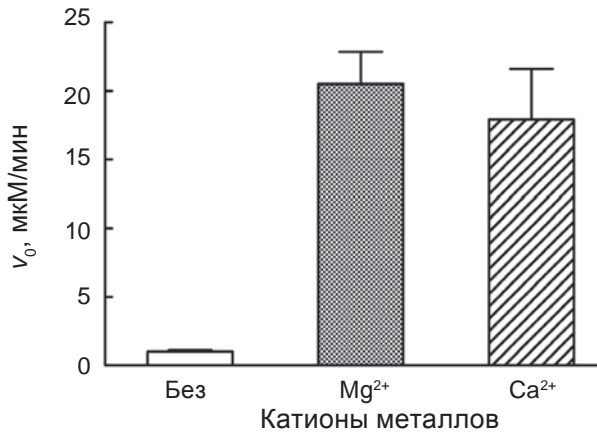


Рис. 3. Влияние катионов двухвалентных металлов на скорость гидролиза тиаминтрифосфата ($M \pm m$, $n = 3$)

считанное методом нелинейного регрессионного анализа, составило $1,7 \pm 0,5$ мМ. Трансформация кривой насыщения в координатах Хейнса дает прямую линию, отсекающую на оси абсцисс отрезок, длина которого соответствует K_M 2,2 мМ (рис. 4, вставка). Сходные значения K_M ранее были получены для мембраноассоциированных ТТРаз головного мозга крысы (1,5 мМ) [21] и электрического органа *E. electricus* (1,76 мМ) [25]. В то же время, ТТРаза, интегрированная в мембраны почек быка, и синаптосомная ТТРаза мозга крысы характеризуются более низкими

величинами кажущихся K_M (130 мкМ [23] и 52 мкМ [9] соответственно).

В работах [24, 36] была продемонстрирована высокая чувствительность мембраносвязанных ТТРаз электрического органа *E. electricus* и скелетной мышцы крысы к анионам. Как выяснилось, моновалентные анионы обладают мощным активирующим эффектом в отношении обеих фосфатаз, располагаясь по способности стимулировать гидролиз ТТР мембранными препаратами в следующий ряд (при концентрации аниона 150 мМ): $SCN^- \approx I^- > NO_3^- > Br^- > Cl^-$. При этом степень активации ионами NO_3^- сильно возрастала при сдвиге кислотности реакционной среды с pH 6,0–6,5 до pH 7,5. После солиubilизации лубролом-РХ свойства ТТРаза существенно изменялись, так что вместо активации можно было наблюдать ингибирование ТТРазной реакции при концентрациях ионов NO_3^- и Cl^- , превосходящих 50 мМ. На ассоциированный с мембранами энзим головного мозга крысы все названные выше анионы, взятые в таких же концентрациях, оказывали ингибирующий эффект [24]. Вполне вероятно, что ТТРаза электрического органа *E. electricus* и скелетной мышцы крысы представляют собой гомологичные протеины, особенно если учитывать тот факт, что в процессе онтогенеза электрический орган развивается из мышечной ткани [37].

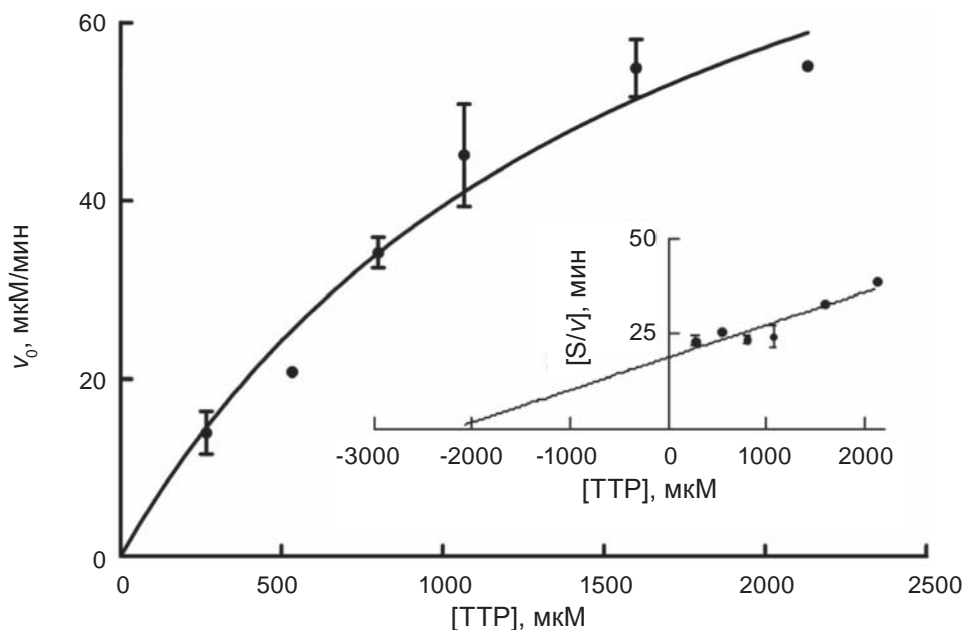


Рис. 4. Зависимость скорости гидролиза ТТРазной реакции от концентрации субстрата в прямых координатах и координатах Хейнса – вставка ($M \pm m$, $n = 3$)

Рис. 5 отражает данные, полученные нами при изучении влияния моновалентных анионов на скорость гидролиза ТТР в гомогенате печени курицы. На диаграмме видно, что вне зависимости от кислотности среды все тестируемые анионы проявляли ингибирующее действие, снижая активность энзима на 20–60%. Контролем служила ТТРазная активность, регистрируемая в присутствии 5 мМ Cl⁻-ионов (белые столбцы), которые вносились в среду инкубации вместе с катионами Mg²⁺ в виде MgCl₂.

Обширное исследование по солюбилизации мембраноассоциированной ТТРазы из электрического органа *E. electricus* поверхностно активными веществами было проведено L. Bettendorff с соавт. [38]. Среди тестируемых соединений (более 10 детергентов) самыми эффективными оказались неионные детергенты – луброл-РХ, генапол Х-080 и тезит; анионные детергенты (додецилсульфат натрия и ДОХ) вызывали полную инактивацию энзима. Экстрагированная из мембран 1%-ым лубролом-РХ ТТРаза не отличалась высокой стабильностью, теряя при 35 °С половину активности в зависимости от рН раствора за 11–83 мин. Безрезультатно также закончились попытки получить растворимый препарат мембраноассоциированной ТТРазы из ядерной и микросомальной фракций головного мозга крысы с помощью ДОХ и тритона Х-100 [21]. Обработка мембран указанными детергентами приводила к быстрой потере энзиматической активности. С

другой стороны, протеин с ТТРазной активностью успешно экстрагирован из мембран почек быка под действием тритона Х-100, при этом в присутствии 1%-го детергента каталитическая активность сохранялась в течение нескольких суток ($k_{\text{инакт}} = 0,0156 \text{ ч}^{-1}$ при 4 °С) [23]. В процессе очистки протеинов мембранного экстракта было выявлено 6 форм ТТРазы, отличающихся субстратной специфичностью, физико-химическими и кинетическими свойствами [39]. В настоящей работе мы изучали возможность выделения растворимого препарата ТТРазы из печени курицы с использованием ДОХ. Как оказалось, при обработке мембранного осадка 1%-ым детергентом степень солюбилизации ТТРазной активности достигает 53%. Существенным представляется то, что экстрагированный энзим обладал высокой стабильностью в растворе при 4 °С, сохраняя 85% каталитической активности в течение двух суток. Это создает хорошие предпосылки для его дальнейшей очистки и идентификации на молекулярном уровне.

При хроматографии солюбилизата на колонке с тойоперлом НВ-55 (Ø 1,6×41 см) ТТРазная активность обнаруживалась в объеме элюата, соответствующем свободному объему колонки (рис. 6). Поскольку предел эксклюзии данного носителя составляет ~ 700 кДа, очевидно, что энзим с ТТРазной активностью экстрагируется из мембран печени курицы в виде крупного протеинового комплекса. Следует от-

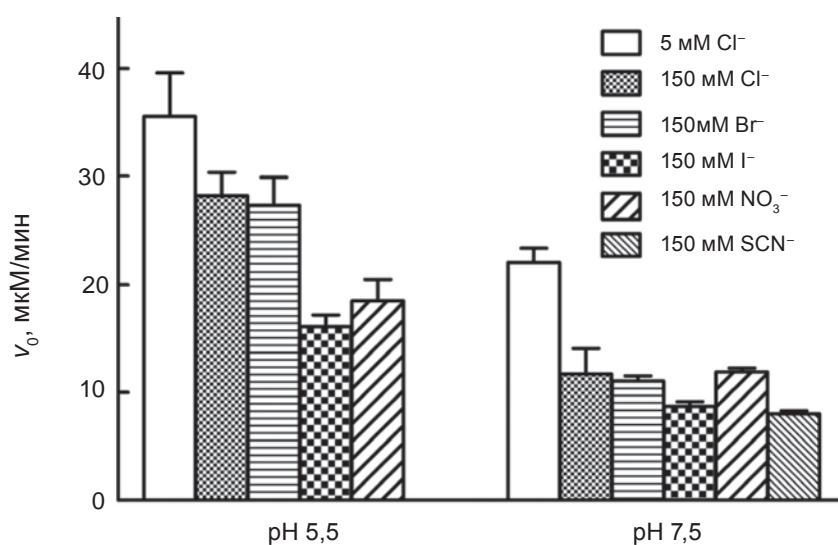


Рис. 5. Влияние моновалентных анионов на скорость гидролиза тиаминтрифосфата в гомогенате печени кур ($M \pm m$, $n = 3$)

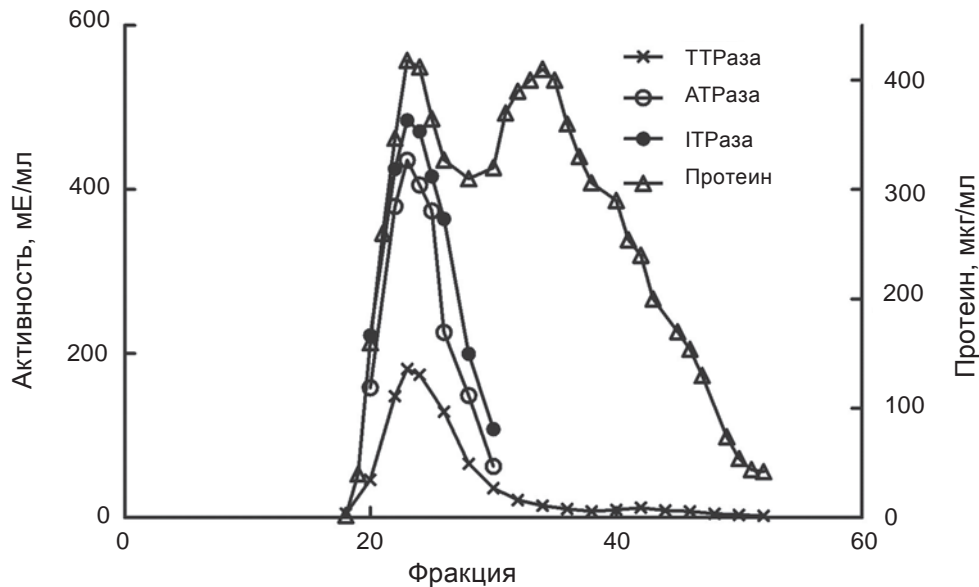


Рис. 6. Хроматограмма экстракта из мембран печени кур на колонке с тойперлом HW-55. Объем фракций ~1,2 мл

метить, что ТТРазный пик совпадал с профилем элюции АТРаза и ИТРаза, причем скорость гидролиза нуклеозид-5'-трифосфатов была значительно выше по сравнению с ТТР. Фракции анализируемого пика также проявляли заметную ИДРазную активность (32% от активности с ТТР) и менее выраженную способность дефосфорилировать GDP и *n*-НФФ (соответственно 16 и 9% от активности с ТТР).

Таким образом, результаты настоящей работы позволяют говорить о том, что гидролиз ТТР в печени курицы катализируется высокомолекулярной мембраноассоциированной фосфатазой. Очевидно, что ТТРаза курицы отличается от всех известных мембранных ТТРАЗ, обнаруженных ранее в биологических объектах [9, 17, 21, 23–25]. В свою очередь, мембраноассоциированные ТТРАЗы из других источников заметно различаются между собой, за исключением энзимов электрического органа *E. electricus* и мышц крысы, близких по свойствам. Все это свидетельствует о высокой степени дивергенции мембранных фосфатаз, способных катализировать гидролиз ТТР, в процессе биологической эволюции.

Вопрос о молекулярной природе ТТРаза печени курицы остается открытым. Не исключено, что этот энзим представляет собой НТРаза с широкой субстратной специфичностью. На то, что ТТРазная, АТРазная и ИТРазная активность

принадлежат одному протеину, в частности, указывают данные гель-хроматографии (рис. 6). С другой стороны, относительно низкая скорость гидролиза IDP и *n*-НФФ анализируемыми фракциями позволяет исключить действие НДРАЗ (3.6.1.6) и кислой фосфатазы. В научной литературе и электронных базах данных мы не нашли каких-либо сведений о присутствии в объектах живой природы НТРАЗ, молекулярная масса которых составляла бы ~ 700 кДа или выше. Единственным известным нам протеином, подходящим под данный критерий, является F_1F_0 -АТРаза (АТР-синтаза; 3.6.3.14) митохондрий. Хотя молекулярная масса этого энзима, в зависимости от биологического источника, равна 540–585 кДа [40], методами электронной микроскопии было показано, что во внутренней митохондриальной мембране АТР-синтаза организована в виде димерных форм, формирующих ряды олигомеров [41, 42]. Кроме того, АТР-синтаза, возможно, ассоциирована с другими протеинами, которые транспортируют P_i и адениновые нуклеотиды, образуя так называемые синтасомы [43]. При солюбилизации митохондрий детергентами ди- и олигомерные формы энзима переходят в раствор наряду с мономерами; их можно разделить с помощью голубого нативного электрофореза [44]. В то же время, в процессе гель-фильтрации на колонке с суперозой 6 солюбилизированная АТР-синтаза

елюировалась одним пиком, соответствующим $M_m > 850$ кДа [45]. Исходя из сказанного, на наш взгляд, может быть правдоподобным предположение о том, что в гидролиз ТТР в печени курицы вовлечена митохондриальная АТР-синтаза. В связи с этим интересно также отметить, что лучшим субстратом F_1 -фрагмента АТРазы из печени курицы служит ИТР, а не АТР [46]. Насколько обоснованной является данная гипотеза должны продемонстрировать дальнейшие исследования.

ВЛАСТИВОСТІ МЕМБРАНОАСОЦІЙОВАНОЇ ТІАМІНТРИФОСФАТАЗИ ПЕЧІНКИ КУРЕЙ

I. K. Kolas, O. F. Makarchikov

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

Ензими, які беруть участь у метаболізмі тіамінтрифосфату (ТТР) у тканинах птахів, дотепер не охарактеризовано. Метою цієї роботи було дослідити властивості тіамінтрифосфатази (ТТРазы) печінки курей (*Gallus gallus*). Встановлено, що залежність швидкості гідролізу ТТР у гомогенаті печінки від рН має вигляд колоколоподібної кривої з максимумом рН 5,5–6,0. Катіони двовалентних металів (Mg^{2+} , Ca^{2+}) збільшують активність ТТРазы в 17–20 разів, у присутності 5 мМ Mg^{2+} уявлена K_m ензиму для ТТР, розрахована методом нелінійної регресії та в координатах Гейнса, становить 1,7–2,2 мМ. Моновалентні аніони (I^- , SCN^- , NO_3^- , Br^- , Cl^-) у концентрації 150 мМ виявляють інгібуючу дію, знижуючи швидкість ТТРазной реакції на 20–60%. Після центрифугування гомогенату печінки більше 85% ТТРазной активності виявлялося в осаді, що свідчить про мембранну локалізацію ензиму. Обробка осаду 1%-им дезоксихолатом натрію спричинює солюбілізацію мембран і виявлення в розчині 53% активності ТТРазы. У разі хроматографії на колонці з тойоперлом HW-55 ТТРазы елюювалася разом з аденозин- та інозинтрифосфатазою в об'ємі, що відповідає протеїнам із M_m 700 кДа. Одержані дані свідчать про те, що гідроліз ТТР у печінці курей відбувається мембраноасоційованим

протеїновим комплексом, який виявляє широку субстратну специфічність.

Ключові слова: тіамінтрифосфатаза, кінетичні властивості, локалізація, солюбілізація, печінка курей.

PROPERTIES OF CHICKEN LIVER MEMBRANE-ASSOCIATED THIAMINE TRIPHOSPHATASE

I. K. Kolas, A. F. Makarchikov

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

The enzymes involved in thiamine triphosphate (ThTP) metabolism in birds are not characterized so far. The aim of the present work was to study some properties of ThTPase in chicken liver. In liver homogenate, ThTPase activity has been found to display a bell-like pH-profile with a maximum of 5.5–6.0. Low activity was observed without divalent metal ions, while the addition of Mg^{2+} or Ca^{2+} , each at 5 mM concentration, enhanced the rate of ThTP hydrolysis by a factor of 17–20. In the presence of 5 mM Mg^{2+} an apparent K_m of the enzyme for ThTP was estimated by the method of non-linear regression as well as from the Hanes plot to be 1.7–2.2 mM. Monovalent anions such as I^- , SCN^- , NO_3^- , Br^- , Cl^- (at 150 mM concentration) showed inhibitory effect decreasing the rate of ThTPase reaction by 20–60%. After the homogenate was centrifuged, more than 85% of ThTPase activity was revealed in the fraction of insoluble particles indicating a membrane localization of the enzyme. The precipitate treatment with 1% sodium deoxycholate caused about 53% solubilization of the activity. During Toyopeal HW-55 chromatography, ThTPase activity was eluted simultaneously with ATPase and ITPase peaks in the void volume of the column. Thus, a non-specific high molecular mass protein complex seems to be involved in ThTP hydrolysis in the chicken liver. The chicken liver phosphatase is clearly distinguishable from all membrane-bound ThTPases reported previously.

Key words: thiamine triphosphatase, kinetic properties, localization, solubilization, chicken liver.

References

1. Velluz L., Amiard G., Bartos J. Un nouveau derive de phosphorylation de la vitamine B₁ l'acide thiamine triphosphorique. *Bull. Soc. Chim. France*. 1948;15:871-878.
2. Rossi-Fanelli A., Siliprandi N., Fasella P. On the presence of triphosphothiamine (TPT) in the liver. *Science*. 1952;116:711-713.
3. Kiessling K.-H. Thiamine triphosphate in baker's yeast. *Nature*. 1953;172:1187-1188.
4. De la Fuente G., Diaz-Cadavieco R. Cocarboxylase activity of thiamine phosphoric esters. *Nature*. 1954;174:1014.
5. Kiessling K.-H. Cocarboxylase activity of thiamine triphosphate in yeast transketolase. *Acta Chem. Scand*. 1958;12:663-667.
6. Haas R. H. Thiamin and the brain. *Ann. Rev. Nutr.* 1988;8:483-515.
7. Bettendorff L., Wins P. Thiamine derivatives in excitable tissues: metabolism, deficiency and neurodegenerative diseases. *Recent Res. Devel. Neurochem*. 1999;2:37-62.
8. Parkhomenko Yu. M., Strokina A. A., Pylypchuk S. Yu., Stepanenko S. P., Chekhivska L. I., Donchenko G. V. Existence of two different active sites on thiamine binding protein in synaptic plasma membranes. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2010;82(1):34-41. (In Russian).
9. Sydorova A., Stepanenko S., Parkhomenko Yu. M. Characterization of thiamine triphosphatase associated with neural cells plasma membranes. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2009;81(3):57-65. (In Russian).
10. Makarchikov A. F. Thiamine triphosphate: a new view on non-coenzyme function of vitamin B₁. Mn: Belorusskaya nauka, 2008; 433 p. (In Russian).
11. 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;60:1477-1488.
12. Makarchikov A. F., Chernikevich I. P. Purification and characterization of thiamine triphosphatase from bovine brain. *Biochim. Biophys. Acta*. 1992;1117:326-332.
13. Lakaye B., Makarchikov A. F., Antunes A. F., Zorzi W., Coumans B., De Pauw E., Wins P., Grisar T., Bettendorff L. Molecular characterization of a specific thiamine triphosphatase widely expressed in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* 2002;277(16):13771-13777.
14. Makarchikov A. F. The rate of molecular evolution of mammalian soluble thiamine triphosphatase. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2009;81(6):26-42. (In Russian).
15. Bettendorff L., Wins P. Thiamine triphosphatase and the CYTH superfamily of proteins. *FEBS J.* 2013;280:6443-6455.
16. Murai A., Katsura E. Thiamine triphosphatase activity of myosin and accelerating effect of thiamine di- and tri-phosphates on superprecipitation of actomyosin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1975;21:169-181.
17. Nishimune T., Ito S., Abe M., Kimoto M., Hayashi R. Nucleoside-triphosphatase and hydrolysis of thiamin triphosphate in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1987;923:74-82.
18. Gulyai I. E., Makarchikov A. F. Purification and properties of a protein with thiamine triphosphatase activity from parsley leaves. *Proc. Nat. Acad. Sci. Belarus. Ser. Biol. Sci.* 2002;(4):78-81. (In Russian).
19. Penttinen H. K., Uotila L. The relation of the soluble thiamine triphosphatase activity of various rat tissues to nonspecific phosphatases. *Med. Biol.* 1981;59:177-184.
20. Yanchiy O. R., Parkhomenko Yu. M., Donchenko G. V. Properties of thiamine-binding proteins isolated from brain, liver and kidneys of rats. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2001;73(3):107-111. (In Ukrainian).
21. Barchi R. L., Braun P. E. A membrane-associated thiamine triphosphatase from rat brain. Properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 1972;247:7668-7673.
22. Ogawa K., Sakai M., Inomata K. Recent findings on ultracytochemistry of thiamine phosphatases. *Ann. NY Acad. Sci.* 1982;378:188-214.
23. Gulyai I. E., Makarchikov A. F. Thiamine triphosphatase activity in membranes from bovine kidney and its relation to acid phosphatase. *Biol. Membr.* 2004;21(5):391-396. (In Russian).
24. Matsuda I., Tonomura H., Baba A., Iwata H. Membrane-associated thiamine triphosphatase in rat skeletal muscle. *Int. J. Biochem.* 1991;23:1111-1114.
25. Bettendorff L., Michel-Cahay C., Grandfils C., De Rycker C., Schoffeniels E. Thiamine triphosphate and membrane-associated

- thiamine phosphatases in the electric organ of *Electrophorus electricus*. *J. Neurochem.* 1987;49:495-502.
26. 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.
 27. 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.
 28. Chernikevich I. P., Gritsenko E. A., Luchko T. A., Zabrodskaya S. V. Synthesis, purification and stabilization of thiamine triphosphate. *Doklady AN BSSR.* 1990;34(3):274-278. (In Russian).
 29. Hashitani Y., Cooper J. R. The partial purification of thiamine triphosphatase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 1972;247:2117-2119.
 30. Makarchikov A. F. Thiamine triphosphate hydrolysis in non-excitabile tissues: purification and properties of thiamine triphosphatase from bovine kidney. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 2001;5:75-82.
 31. Song J., Bettendorff L., Tonelli M., Markley J. L. Structural basis for the catalytic mechanism of mammalian 25-kDa thiamine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 2008;283:10939-10948.
 32. Delvaux D., Kerff F., Murty M. R. V. S., Lakaye B., Czerniecki J., Kohn G., Wins P., Herman R., Gabelica V., Heuze F., Tordoir X., Marée R., Matagne A., Charlier P., De Pauw E., Bettendorff L. Structural determinants of specificity and catalytic mechanism in mammalian 25-kDa thiamine triphosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1830:4513-4523.
 33. Barchi R. L. Membrane thiamine triphosphatase from rat brain: inhibition by ATP and ADP. *J. Neurochem.* 1976;26:715-720.
 34. Ebel H., Gunther T. Magnesium metabolism: a review. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1980;18:257-270.
 35. Pasternak K., Kocot J., Horecka A. Biochemistry of magnesium. *J. Elementol.* 2010;15:601-616.
 36. Bettendorff L., Wins P., Schoffeniels E. Thiamine triphosphatase from *Electrophorus electricus* organ is anion-dependent and irreversibly inhibited by 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988;154(3):942-947.
 37. Hadorn E., Wehner R. General Zoology. M.: Mir, 1989; 528 p. (In Russian).
 38. Bettendorff L., Longree I., Wins P., Schoffeniels E. Solubilization of thiamine triphosphatase from the electric organ of *Electrophorus electricus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991;1073:69-76.
 39. Gulyai I. E., Makarchikov A. F., Chernikevich I. P. Studies on enzymes with thiamine triphosphatase activity from membranes of bovine kidney. *Zhurnal GGMU.* 2004;(2):32-34. (In Russian).
 40. Dabbeni-Sala F., Rai A. K., Lippe G. F₀F₁ ATP synthase: a fascinating challenge for proteomics. in Proteomics – Human Diseases and Protein Function, Tsz-Kwong Man and R. J. Flores (Ed.). InTech, 2012; P. 161-188.
 41. Strauss M., Hofhaus G., Schröder R. R., Kühlbrandt W. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* 2008;27:1154-1160.
 42. Davies K. M., Strauss M., Dauma B., Kief J. H., Osiewacz H. D., Rycovska A., Zickermann V., Kühlbrandt W. Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108:14121-14126.
 43. Chen C., Ko Y., Delannoy M., Ludtke S. J., Chiu W., Pedersen P. L. Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP. *J. Biol. Chem.* 2004;27:31761-31768.
 44. Krause F., Reifschneider N. H., Goto S., Dencher N. A. Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 2005;329:583-590.
 45. Arnold I., Bauer M. F., Brunner M., Neupert W., Stuart R. A. Yeast mitochondrial F₁F₀-ATPase: the novel subunit e is identical to Tim11. *FEBS Lett.* 1997;411:195-200.
 46. Lo Piero A. R., Petrone G. Purification and properties of the F₁-ATPase from liver mitochondria of *Gallus gallus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 1992;103:235-238.

Получено 19.02.2015