### НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ «ИНСТИТУТ БИОХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

# СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

(г. Гродно, 17-18 мая 2018 г.)

Сборник научных статей

(статьи в сборнике опубликованы в авторской редакции)

Под общей редакцией доктора медицинских наук, профессора И.Н.Семенени доктора биологических наук, профессора, члена-корреспондента НАН Беларуси А.Г.Мойсеёнка

Минск 2018

- 9. Биофортификация куриного яйца. Витамины и каротиноиды. / А. Ш. Кавтарашвили [и др.] // Сельскохозяйственная биология, 2017, Т. 52, № 6.- С. 1094-1104. doi: 10.15389/agrobiology.2017.6.1094rus
- 10. Коденцова, В. М. Анализ отечественного и международного опыта использования обогащенных витаминами пищевых продуктов / В. М. Коденцова, О. А. Вржесинская // Вопр. питания. 2016. Т. 85, № 2. С. 31-50.
- 11. Коденцова, В. М. Витамины и минералы как фактор предупреждения дефектов развития плода и осложнений беременности / В. М. Коденцова // Медицинский совет. В поликлинике. 2016. № 9. С. 42-50.
- 12. Коденцова, В. М. Градации уровней потребления витаминов: возможные риски при чрезмерном потреблении / В. М. Коденцова //Вопр. питания. 2014. Т. 83, № 3. С. 41-51.
- 13. К рабочей дискуссии о проекте ГОСТ Р "Комплексы витаминноминеральные. Общие технические условия" / В.М Коденцова [и др.] //Пищевая промышленность.- 2018.- №2. С.29-34.
- 14. Витаминно-минеральные комплексы в лечебном питании. / В.М Коденцова [и др.] // Consilium Medicum. -2017.-Т. 19, № 12.-С. 76–83.
- 15. Влияние приема витаминно-минерального комплекса с профилактическими дозами микронутриентов на обеспеченность витаминами пациентов противотуберкулезного диспансера. / О.А. Вржесинская [и др.] // Инфекционные болезни- 2018.- Т. 16, №1. С.79-86. DOI: 10.20953/1729-9225-2018-1-79-86

#### УДК 577.164.11:577.152.3

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТИАМИНМОНОФОСФАТАЗЫ

# $\it U.К. Koлoc^{1,2}$ , $\it A.В. Янцевич^3$ , $\it A.В. Иванчик^3$ , $\it T.В. Шкель^3$ , $\it C.A. Усанов^3$ , $\it A.Ф. Макарчиков^{1,2}$

<sup>1</sup>Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», Гродно, Беларусь

<sup>2</sup>Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет», Гродно, Беларусь

<sup>3</sup>Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»,

Минск, Беларусь

**Резюме.** Методом тандемной масс-спектрометрии установлена аминокислотная последовательность тиаминмонофосфатазы, очищенной из печени курицы. Показано, что фермент идентичен низкомолекулярной кислой фосфатазе, которая также известна как низкомолекулярная фосфотирозинпротеин-фосфатаза. Таким образом, гидролиз тиаминмонофосфата в клетках животных осуществляется белком, предположительно участвующим в

#### MOLECULAR IDENTIFICATION OF THIAMINE PHOSPHATASE

I.K.Kolos<sup>1,2</sup>,A.V.Yantsevich<sup>3</sup>,A.V.Ivanchik<sup>3</sup>,T.V.Shkel<sup>3</sup>,S.A.Usanov<sup>3</sup>, A.F.Makarchikov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry of Biologically Active Compound NAS of Belarus Grodno, Belarus

<sup>2</sup>Grodno State Agrarian University, Grodno, Belarus <sup>3</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, NAS of Belarus, Grodno, Belarus

**Summary.** Amino acid sequence of thiamine monophosphatase from chicken liver has been resolved using ESI tandem mass spectrometry. The enzyme was shown to be identical with low-molecular-weight acid phosphatase, also known as low-molecular-weight protein phosphotyrosine phosphatase. Thus, the hydrolysis of thiamine monophosphate in animal tissues is catalyzed by a protein presumably involved in cellular signaling mechanisms.

Введение. Метаболизм витамина В<sub>1</sub> в клетках животных включает в себя ряд взаимосвязанных процессов синтеза, протеидизации деградации фосфорилированных производных тиамина, основными которых количественном отношении являются тиаминдифосфат (ТДФ) тиаминмонофосфат (ТМФ). По имеющимся на сегодня сведениям ТДФ служит коферментом 32-х белков, в т. ч. 5-ти ферментов, кодируемых геномами пируватдегидрогеназы (КФ высших животных: 1.2.4.1), оксоглутаратдегидрогеназы (КФ 1.2.4.2), 3-метил-2-оксобутаноатдегидрогеназы (КФ 1.2.4.4), транскетолазы (КФ 2.2.1.1) и 2-гидроксиацил-КоА-лиазы (КФ 4.1.2.n2) [6]. Активностью ТДФ-зависимых ферментов определяется ход важнейших реакций энергетического, углеводного и аминокислотного обменов. Биохимическая роль ТМФ неизвестна. Наряду с ТДФ и ТМФ в клетках организмов различных филогенетических линий в малых количествах присутствуют тиаминтрифосфат (ТТФ) и аденозин-тиаминтрифосфат (АТТФ) [5, 12], функции которых также не установлены. Результаты экспериментов с бактериальными культурами указывают на возможное участие ТТФ и АТТФ в регуляторных/сигнальных механизмах [2, 5, 14]. В настоящее время из ферментов системы метаболизма витамина  $B_1$  у животных на молекулярном уровне охарактеризованы только тиаминпирофосфокиназа (КФ 2.7.6.2) и растворимая ТТФаза млекопитающих (КФ 3.6.1.28) [10, 15]. Получены также данные, предполагающие, что в биосинтез ТТФ у бактерий и в головном мозге крысы может быть вовлечена АТФ-синтаза (КФ 3.6.3.14), а в скелетных мышцах – цитозольная изоформа аденилаткиназы (АК1, КФ 2.7.4.3) [3, 7, 13]. мембранно-ассоциированной ТТФазы, Вопрос природе катализирующих образование АТТФ и гидролиз ТМФ, ТДФ и АТТФ, остается открытым. В предыдущих работах нами было показано [1, 8], что гидролиз

печени курицы катализируется растворимым ферментом молекулярной массой 18 кДа, который, судя по кинетическим свойствам, субстратной специфичности и субклеточной локализации, может представлять собой низкомолекулярную кислую фосфатазу (LMW-AP, КФ также как фосфотирозин-протеин-фосфатаза (LMW-PTP, КФ известную исследования 3.1.3.48). Цель заключалась молекулярной данного идентификации ТМФазы курицы.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовались ТМФ «Fluka»; трипсин, ацетонитрил, муравьиная кислота, ТРИС, трихлоруксусная кислота (ТХУ), бычий сывороточный альбумин (БСА), дитиотреитол (ДТТ) «Sigma»; фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), сервацел P-23 «Serva»; SP сефадекс C-50, сефадекс G-75, сефадекс G-50 «Pharmacia»; остальные реагенты аналитической степени чистоты.

Свежую печень цыплят-бройлеров получали на птицекомплексе СПК «Прогресс-Вертелишки».

Активность ТМФазы регистрировали по скорости высвобождения неорганического фосфата ( $P_i$ ), количество которого определяли методом Lanzetta с соавт. [9]. Стандартная реакционная смесь объемом 0,2 мл включала 25 мМ трис-25 мМ малеатный буфер, рН 6,0, 1 мМ ТМФ и анализируемый образец белка. Реакцию проводили при 37°C в течение 10–30 мин, останавливали, добавляя 0,1 мл 10 %-ной ТХУ; смесь центрифугировали и отбирали на анализ аликвоты по 0,1 мл. Концентрацию  $P_i$  находили по калибровочному графику.

Концентрацию белка определяли по методу Bradford [4], используя в качестве стандарта БСА, по поглощению при 280 нм.

Молекулярная масса ТМФазы определялась на времяпролетном массспектрометре Microflex LRF (Bruker Daltonics GmbH) с источником ионизации MALDI. Нанесение на мишень растворов образца и матрицы осуществляли методом сухой капли. В качестве стандарта использовали Protein Calibration Standard II (Bruker Daltonics GmbH).

Частичную аминокислотную последовательность ТМФазы устанавливали методом тандемной масс-спектрометрии. Смесь пептидов, полученную в результате трипсинового гидролиза фермента, разделяли на хроматографе «Agilent 1290» с использованием колонки ZORBAX Extend C18 (1,8 мкм, 2,1 × 50 мм) в режиме градиентной элюции ацетонитрилом, содержащим 0,2 %-ную муравьиную кислоту, при температуре 40°С и скорости потока подвижной фазы 0,2 мл/мин. Для детекции использовался квадрупольно-времяпролетный масс-анализатор Q-TOF 6550 (Agilent Technologies) с источником ионизации электроспреем (ESI). Извлечение спектров и поиск по базам данных белков проводили с использованием программного обеспечения Spectrum Mill (Agilent).

**Результаты исследования и их обсуждение**. Очистку ТМФазы из печени цыплят-бройлеров проводили по разработанному нами методу. Процедура включала 7 этапов.

Экстракция. 100 г печени, хранившейся при -20 °C, разрезали на мелкие

куски и гомогенизировали 2 мин в 2,5 объемах 50 мМ трис-HCl буфера, рН 7,5, содержащего 0,15 М КСl, 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ФМСФ и 5 мМ ДТТ, в гомогенизаторе MPW-1 в режиме максимальной скорости. Осадок удаляли центрифугированием в течение 60 мин при 10000 g.

Кислотная обработка. К надосадочной жидкости добавляли 1 М уксусную кислоту до рН 5,0, перемешивали 30 мин, центрифугировали раствор для удаления белковых агрегатов (60 мин, 10000 g) и доводили рН надосадочной жидкости до 7,5 с помощью 1 М трис-HCl буфера, рН 8,9.

Фракционирование сульфатом аммония. К супернатанту при постоянном перемешивании добавляли сульфат аммония до 35 %-ного насыщения. Через 30 мин раствор центрифугировали для удаления осадка (30 мин, 10000 g), полученный супернатант высаливали при степени насыщения 35–60 % и отделяли осадок центрифугированием (30 мин, 10000 g).

 $\Gamma$ ель-фильтрация на сефадексе G-75. Осадок растворяли в 20 мМ МЭС буфере, рН 6,0, содержащем 1 мМ ЭДТА, 50 мМ NaCl, 5 мМ ДТТ, и хроматографировали на колонке (Ø 5,0  $\times$  75 см) с сефадексом G-75 со скоростью 5 см/ч. ТМФазная активность элюировалась одним пиком. Активные фракции объединяли и подвергали дальнейшей очистке.

Ионообменная хроматография. Объединённые фракции наносили на колонку (Ø 1,6  $\times$  25 см) с SP сефадексом C-50, уравновешенную тем же буферным раствором. После промывки колонки адсорбированный на носителе белок элюировали линейным повышающимся градиентом  $KH_2PO_4$  от 0 до 100 мМ (по 150 мл в каждой камере). ТМФазная активность вымывалась одним пиком. Фракции с высокой удельной активностью объединяли и высаливали сульфатом аммония при 80 %-ном насыщении. Осадок отделяли, центрифугируя взвесь на протяжении 30 мин при 10000 g.

*Гель-фильтрация на сефадексе G-50*. Белковый осадок растворяли в 5 мл МЭС буфера и хроматографировали образец на колонке (Ø 2,5  $\times$  100 см) с сефадексом G-50 в том же буфере при скорости потока 5 см/ч.

Хроматография на сервацеле P-23. На заключительном этапе очистки объединенные фракции с предыдущей стадии наносили на колонку с сервацелом P-23 (Ø 0,7  $\times$  3 см), уравновешенную МЭС буфером. После промывки колонки 10 объемами буфера ферментативная активность обнаруживалась в эффлюенте, который концентрировали с помощью центрифужных фильтров Corning Spin-X UF Concentrators и использовали для анализа.

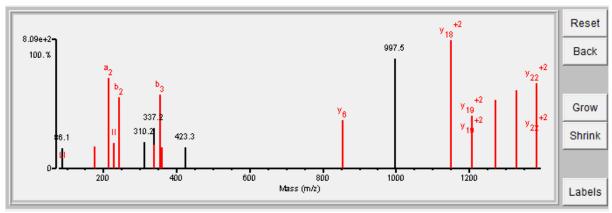
В процессе очистки удельная активность ТМФазы возросла по сравнению с экстрактом в 714 раз – с 3,5 нмоль/мин/мг белка до 2,5 мкмоль/мин/мг белка.

Для определения аминокислотной последовательности образец очищенного фермента подвергали протеолизу в присутствии трипсина, разделяли смесь пептидов на фракции ВЭЖХ и анализировали методом ESI MS/MS с поиском в базе данных Swiss-Prot. Всего идентифицировано 9 пептидов, соответствующих участкам первичной структуры LMW-AP (LMW-PTP) курицы. На аминокислотной последовательности LMW-AP (accession

number Q5ZKG5), приведенной ниже, эти участки выделены жирным шрифтом и подчеркнуты:

- 1 maagevksvl fvclgnicrs **piaeavfrkl vtdekvenk**w ridsaatsty 50
- 51 eignppdyrg qtcmkkhgit mnhiarqvtk ddfqtfdyil cmdesnlrdl 100 101 krksnqvkdc kakiellgay dpqkqliied pyygnekdfe tvyeqcvrcc 150
- 151 kaflekph 158

Тандемный масс-спектр с соотнесением m/z к образующимся фрагментным ионам самого протяженного из идентифицированных пептидов TMФазы QLIIEDPYYGNEKDFETVYEQCVR представлен на рисунке 1.



Puc. 1 — Macc-спектр продуктов коллизионной фрагментации (CID) пептида QLIIEDPYYGNEKDFETVYEQCVR, полученного при трипсинолизе препарата ТМФазы из печени пыпленка

Следует сказать, что молекулярная масса LMW-AP курицы, рассчитанная аминокислотной последовательности, кодируемой открытой рамкой считывания, равна 18195,88 Да. В то же время по данным MALDI TOF массспектрометрии  $M_r$  ТМФазы из печени цыпленка составляет 18058,337 Да. Наряду с инструментальной погрешностью, это расхождение, очевидно, может объясняться посттрансляционными модификациями фермента. Известно, например, что хотя биосинтез полипептидов в клетке начинается с кодона AUG, соответствующего формил-Met у бактерий и Met у эукариот, у большинства белков эти остатки (а иногда и последующие) элиминируются при процессинге. С другой стороны, по некоторым оценкам до 80% от общего количества растворимых белков клетки ацетилированы по N-концевой аминокислотной последовательности аминокислоте. Анализ ТМФазы ExPASy помошью программ сервера (www.expasy.org/tools) также свидетельствует о наличии в структуре белка потенциальных сайтов фосфорилирования, гликирования и сульфатирования.

Первоначально считалось, что LMW-AP, широко распространенная в различных филогенетических линиях — от бактерий до млекопитающих, может участвовать в метаболизме рибофлавина, поскольку наряду с арилфосфатами ее субстратом является флавинмононуклеотид (FMN). После того, как было установлено, что LMW-AP осуществляет гидролиз фосфотирозина, ее стали рассматривать как фосфотирозин-протеин-фосфатазу (LMW-PTP). В системе *in vitro* этот фермент способен к дефосфорилированию таких белковых

субстратов, как рецептор инсулина, Srk-киназа и др. [11]. В любом случае, каковы бы ни были функции LMW-AP *in vivo*, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что данный белок катализирует гидролиз ТМФ в клетках животных.

Заключение. Проведенные нами исследования позволили установить, что белком, отвечающим за ТМФазную активность в печени цыпленка, является низкомолекулярная фосфотирозин-протеин-фосфатаза (LMW-PTP, Uniprot ID Q5ZKG5). Takum образом, ТΜФ служит физиологическим субстратом фермента, биохимические функции которого, предположительно, состоят в дефосфорилировании FMN и нескольких белков, участвующих в процессах дифференцировки адгезии клеток (рецепторы И тромбоцитарного фактора роста, Srk-киназа, факторы транскрипции семейства STAT и др.). Это указывает на возможную связь системы метаболизма тиамина с обменом витамина В2 и регуляцией внутриклеточных сигнальных путей.

#### Список литературы.

- 1. Колос, И.К. Идентификация энзимов гидролиза тиаминмонофосфата в печени кур / И.К. Колос, А.Ф. Макарчиков // Укр. биохим. журн. -2014. Т. 86, № 6. С. 39-49.
- 2. Adenosine thiamine triphosphate accumulates in *Escherichia coli* cells in response to specific conditions of metabolic stress / T. Gigliobianco [et al.] // BMC Microbiology. 2010. Vol. 10:148.
- 3. An alternative role of FoF1-ATP synthase in Escherichia coli: synthesis of thiamine triphosphate / T. Gigliobianco [et al.] // Sci. Rep. 2013. Vol.: 1071.
- 4. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
- 5. Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide / L. Bettendorff [et al.] // Nat. Chem. Biol. 2007. Vol. 3. P. 211–212.
- 6. Enzyme. Enzyme nomenclature database [Electronic resource] / Mode of access: http://www.expasy.org. Date of access: 10.04.2018.
- 7. Evidence for *in vivo* synthesis of thiamin triphosphate by cytosolic adenylate kinase in chicken skeletal muscle / K. Miyoshi [et al.] // J. Biochem. 1990. Vol. 108. P. 267–270.
- 8. Kolas, I.K. Copurification of chicken liver soluble thiamine monophosphatase and low molecular weight acid phosphatase / I.K. Kolas, A.F. Makarchikov // Ukr. Biochem. J. 2017. Vol. 89, N 6. P. 13–21.
- 9. Lanzetta, P.A. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate / P.A. Lanzetta [et al.] // Anal. Biochem. 1979. Vol. 100. P. 95–97.
- 10. Molecular characterization of a specific thiamine triphosphatase widely expressed in mammalian tissues / B. Lakaye [et al.] // J. Biol. Chem. -2002. Vol. 277. P. 13771-13777.
- 11. Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets / R.J. He [et al.] // Acta Pharmacol. Sin. 2014. Vol. 35. P. 1227–1246.