

И. М. РУСИНА, А. Ф. МАКАРЧИКОВ

ТИАМИНТРИФОСФАТНАЯ АКТИВНОСТЬ В МИТОХОНДРИЯХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

У препаратах митохондрий, выделенных из нирок и головного мозга бика, а также из печени та мозку пацюка, виявлено активність тіамінтрифосфатази (ТТФ-аза). За умов заморожування—відтавання препаратів така активність визначається у розчині, що свідчить про розчинну природу ферменту. ТТФ-азна активність в цих розчинах та активність маркерних ферментів із митохондрий за дії осмотичного шоку або зростаючих концентрацій тритону X-100 свідчить про присутність ТТФ-ази в матриксі та в міжмембранному просторі митохондрий. Величина молекулярної маси митохондріального ферменту за методом гель-фільтрації відповідає масі специфічної цитозольної ТТФ-ази (3.6.1.28). Ферменти, однак, розрізняються за значенням K_m : митохондріальна ТТФ-аза виявляє вищу уявну спорідненість до відповідного субстрату. Одержані результати дозволяють дійти висновку про існування у клітинах ссавців множинних форм ТТФ-ази.

К л ю ч о в і с л о в а: тіамінтрифосфатаза, множинні форми, митохондрії, локалізація.

Тіамінтрифосфат (ТТФ) обнаружен в биологических объектах более 50 лет назад [1], однако роль этого соединения в жизнедеятельности клетки все еще остается неизвестной. Долгое время предполагалось, что ТТФ выполняет специфическую некоферментную функцию в возбудимых тканях. Так, с позиций одной из наиболее распространенных гипотез, обсуждавшихся в литературе вплоть до начала 1990-х годов, ТТФ рассматривался в качестве регулятора Na^+ -канала плазматической мембраны [2]. Эта гипотеза, однако, в итоге не получила экспериментального подтверждения [3]. В то же время за последние двадцать лет появилось немало фактов, которые позволяют более широко взглянуть на возможную функцию ТТФ, не ограничиваясь рассмотрением его специфической роли в явлениях биоэлектrogenеза. Современные методы количественного анализа на основе использования высокоэффективной жидкостной хроматографии подтвердили результаты более ранних исследований, предполагавших присутствие ТТФ в различных организмах — от бактерий до млекопитающих [4,5], причем в эукариотической клетке ТТФ обнаруживается не только в плазматической мембране и цитозольной фракции, но и в митохондриях и ядрах [6]. Характерно, что в этих же субклеточных фракциях локализованы ферменты, способные к его синтезу и дефосфорилированию [7–11]. Кроме того, в экспериментах с мембранными везикулами и культурой клеток нейробластомы было показано, что ТТФ активизирует макси- Cl^- -каналы [3], которые присутствуют в клетках различной специализации и могут быть вовлечены в процессы меж-

клеточной коммуникации, регуляции объема или внутриклеточного pH [12,13]. Имеются указания на то, что макси- Cl^- -канал и митохондриальный порин представляют одно белковое семейство [14]. Канал с аналогичными характеристиками локализован также в ядерной оболочке [15]. Все эти данные могут свидетельствовать об общей фундаментальной роли ТТФ в биологии клетки. С другой стороны, не исключено, что в клетке существует несколько функционально обособленных пулов ТТФ. Иными словами активность ТТФ, возможно, реализуется не только на уровне плазматической мембраны, но и в процессе жизнедеятельности внутриклеточных органелл.

В тканях млекопитающих обнаружены два типа тиаминтрифосфатазной (ТТФ-азной) активности — мембранная, которая связана с субклеточными частицами, и растворимая, выявляемая в цитозольной фракции клетки [7,8]. Растворимая ТТФ-аза — это Mg^{2+} -зависимый низкомолекулярный белок с pH-оптимумом 8,0–8,9, характеризующийся абсолютной специфичностью и высоким сродством к субстрату [16,17]. Предполагается, что именно этот фермент регулирует концентрацию ТТФ в ответ на изменения физиологических условий в клетке. Мембранная ТТФ-аза проявляет pH-оптимум в слабнокислой среде, активируется ионами двухвалентных металлов, чувствительна к анионам и обладает низким сродством к ТТФ. Вопрос о специфичности фермента и, как следствие, его участия в метаболизме ТТФ остается открытым.

Исследования субклеточного распределения ТТФ-азной активности показали, что ядерная, митохондриальная и микросомальная фракции из

головного мозга крысы содержат 92,5% мембранно-связанной ТТФ-азы (рН 6,5), тогда как в цитозоле обнаруживается лишь 37–51% от общей активности гомогената при рН 9,0–9,5 [7,8]. Следовательно, с внутриклеточными частицами ассоциирована значительная часть ТТФ-азной активности, наблюдаемой в оптимальных для действия цитозольной ТТФ-азы условиях.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании природы и свойств фермента, катализирующего реакцию гидролиза ТТФ при щелочных значениях рН в препаратах митохондрий из клеток млекопитающих.

Материалы и методы

В работе использованы сефакрил S-200 («Pharmacia», Швеция), фикоилл 400, папаин («Loba», Австрия), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), пируваткиназа, альбумин из сыворотки человека (ЧСА), α -химотрипсिन, NAD⁺, NADH («Reanal», Венгрия), овальбумин, цитохром *c*, миоглобин («Serwa», Германия), остальные реактивы производства «Реахим» (Россия).

Эксперименты проводились с митохондриальными препаратами, полученными методом дифференциального центрифугирования [9,18]. Дополнительную очистку митохондрий из мозга быка и крысы осуществляли по методу J. V. Clark и W. J. Nicklas [19].

Стандартная инкубационная смесь для измерения ТТФ-азной активности состояла из 50 мМ трис-НСl-буфера (рН 8,9), 5 мМ MgCl₂, 50 мкг ЧСА, 0,05 мМ ТТФ и образца белка в общем объеме 0,5 мл. Реакцию проводили 30 мин при 37 °С, количество образующегося ТДФ определяли ферментативным методом [20].

Активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ, 1.4.1.3), лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27) и сульфитоксидазы (СО, 1.8.3.1) определяли в соответствии с методиками, описанными в литературе [18,21,22].

Активность кислой фосфатазы (3.1.3.2) регистрировали по скорости гидролиза *n*-нитрофенилфосфата. Реакционная смесь содержала 40 мМ Na-ацетатный буфер (рН 4,5); 1 мМ субстрат; 0,25 М сахарозу и исследуемый образец в объеме 0,5 мл. Реакцию осуществляли 30 мин при 37 °С, останавливали добавлением 5 мл 0,2 н. NaOH, измеряли оптическую плотность при 405 нм и рассчитывали концентрацию образовавшегося *n*-нитрофенола, исходя из коэффициента молярного поглощения $\epsilon=18500$.

Молекулярную массу ТТФ-азы определяли методом гель-фильтрации на колонке с сефакрилом S-200 (\varnothing 2,2 × 46 см) в 20 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,5), содержащем 0,1 М NaCl, при

скорости потока 5 см · ч⁻¹. Значение M_r рассчитывали по калибровочному графику, построенному с использованием белков-маркеров.

Концентрацию белка определяли по методу M. M. Bradford [23].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены результаты определения активности ТТФ-азы, ГДГ и ЛДГ в митохондриальной фракции из почек быка. В данном эксперименте осадки митохондрий суспендировали в изотонической среде выделения и одну подфракцию подвергали замораживанию–оттаиванию. Затем обе подфракции центрифугировали при 105 000 g 60 мин. Как видно на диаграмме, нарушение целостности частиц приводит к резкому возрастанию ТТФ-азной активности в надосадочной жидкости, что свидетельствует о присутствии в препарате митохондрий растворимого фермента с ТТФ-азной активностью. Одновременно с ТТФ-азной активностью в супернатанте разрушенных митохондрий значительно повышается по сравнению с контролем активность фермента матрикса – ГДГ. Как правило, субклеточные фракции, выделяемые методом дифференциального центрифугирования, не бывают свободными от перекрестных загрязнений. В полученном нами препарате обнаруживалось высокое содержание ЛДГ, которая широко используется в качестве специфического цитозольного маркера. В связи с этим очевидно, что ТТФ-азная активность в растворе могла бы быть обусловлена наличием в митохондриальном препарате цитозольных примесей (окруженных плазматической мембраной везикул, которые образуются при разрушении клетки). С другой стороны, в ряде исследований выявлена двойственная локализация ЛДГ в тканях животных: наряду с цитозольными небольшие количества изоформ фермента систематически обнаруживаются также в митохондриях [24]. По данным на рис. 1 можно рассчитать соотношение активности ЛДГ и ТТФ-азы, которое равно 53 : 1, тогда как в цитозоле того же образца почек эта величина составляет 74 : 1. Более низкое соотношение ЛДГ/ТТФ-аза в растворимом содержимом митохондриальной фракции указывает на присутствие в митохондриях эндогенного белка с ТТФ-азной активностью. Действительно, если допустить, что в митохондриях локализована изоформа ЛДГ, но нет ТТФ-азы, соотношение ЛДГ/ТТФ-аза в митохондриальном препарате должно возрастать, тогда как на самом деле наблюдается обратная картина.

Для исследования локализации растворимой ТТФ-азы в митохондриях нами использовались два подхода: выделение фракций межмембран-

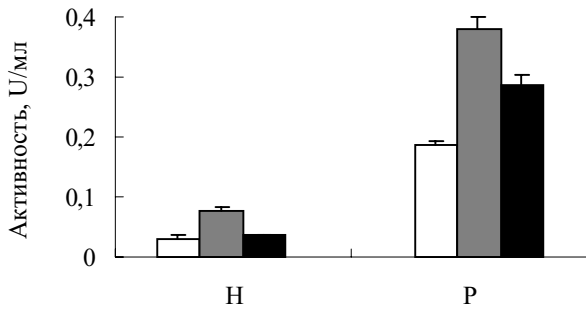


Рис. 1. Активность ГДГ (□), ЛДГ (▨) и ТТФ-азы (■, $\times 40$ раз) в супернатантах, полученных высокоскоростным центрифугированием суспензии нативных (H) и разрушенных замораживанием-оттаиванием митохондрий из почек быка (P). Каждое значение - среднее для трех экспериментов.

ного пространства и матрикса и обработка интактных митохондрий возрастающими концентрациями тритона X-100 [18,25]. На рис. 2 показано распределение ТТФ-азной активности, а также маркерных ферментов – ГДГ и СО в субмитохондриальных компартментах печени крысы. Количество СО и ГДГ во фракции межмембранного пространства составляет соответственно 73% и < 1%, тогда как в матриксе сосредоточено > 99% общей активности ГДГ и 27% СО. Высокая активность СО в матриксе вероятно свидетельствует о загрязнении фракции компонентами межмембранного пространства из-за недостаточной продолжительности гипосмотического шока для разрыва наружной мембраны во всей популяции митохондрий. ТТФ-азная активность практически в равной мере обнаруживается в обоих компартментах. При гель-фильтрации субмитохондриальных фракций и цитозоля на колонке с сефакрилом S-200 во всех трех случаях наблюдается пик ТТФ-азной активности, соответствующий белку с M_m 28,2–29,7 кДа (данные не приведены). K_m ферментов межмембранного пространства, матрикса и цитозоля составляет соответственно (мкМ): $20,2 \pm 2,0$, $20,4 \pm 0,6$ и $27,8 \pm 0,7$ ($n = 3$) (рис. 3, А). Следовательно, ферменты фракций межмембранного пространства и матрикса неразличимы по изучаемым признакам, тогда как ТТФ-аза цитозоля проявляет более низкое кажущееся сродство к субстрату.

При хроматографии митохондриального экстракта из почек быка ТТФ-азная активность элюировалась в виде одного пика с $M_m = 27,7$ кДа, что соответствует M_m цитозольной ТТФ-азы [16,17]. Однако фермент из митохондрий достоверно отличается от цитозольного по величине K_m ($p < 0,05$). В обоих случаях реакция подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен в диапазоне

концентраций ТТФ 10–100 мкМ. Кажущиеся значения K_m , рассчитанные по уравнениям линейной регрессии для графиков в координатах Хейнса, составляют $33,8 \pm 3,1$ и $45,1 \pm 1,6$ мкМ ($n = 3$) соответственно для митохондриальной и цитозольной фракций (рис. 3, Б). Последняя величина практически полностью совпадает с K_m гомогенной ТТФ-азы [16]. Известно, что для системы из двух ферментов, действующих на один субстрат (что, вероятно, имеет место в рассматриваемом нами случае из-за неизбежных цитозольных загрязнений митохондриальных препаратов, выделяемых методом дифференциального центрифугирования [26]), форма кривой, описываемой линеаризованным уравнением Михаэлиса-Ментен, зависит от соотношений величин K_{m1} и K_{m2} [27]. При условии $K_{m1} \approx K_{m2}$ кривая превращается в прямую, при этом K_m принимает промежуточное значение. Поэтому можно ожидать, что истинное значение K_m митохондриальной ТТФ-азы ниже экспериментально полученной нами величины и должно приближаться к 20–22 мкМ. Сказанное в равной степени относится и к значению K_m фермента митохондрий печени крысы. Таким образом, исследование свойств ТТФ-азной активности почек быка показало, что, как и в печени крысы, в митохондриях почек присутствует фермент, неотличимый от цитозольной ТТФ-азы по молекулярной массе, но характеризующийся более высоким кажущимся сродством к субстрату.

Другой путь изучения локализации ферментов, не требующий выделения отдельных подфракций, заключается в титровании митохондрий детергентами, такими как дигитонин или тритон X-100 [25,28]. Так, J. C. K. Lai и

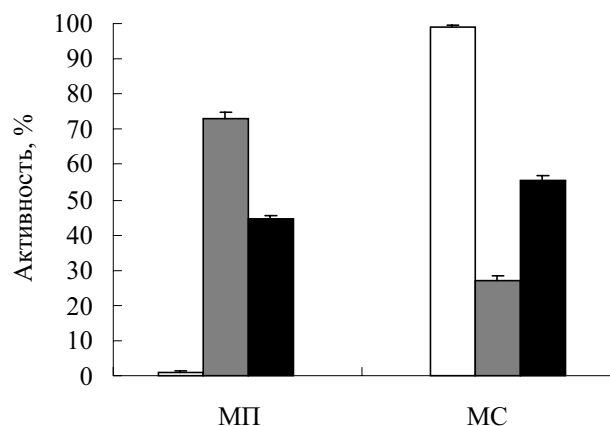


Рис. 2. Распределение активности ферментов-маркеров и ТТФ-азы в межмембранном пространстве (МП) и матриксе (МС) митохондрий печени крысы: □ – ГДГ, ▨ – СО, ■ – ТТФ-аза. Каждое значение – среднее трех экспериментов.

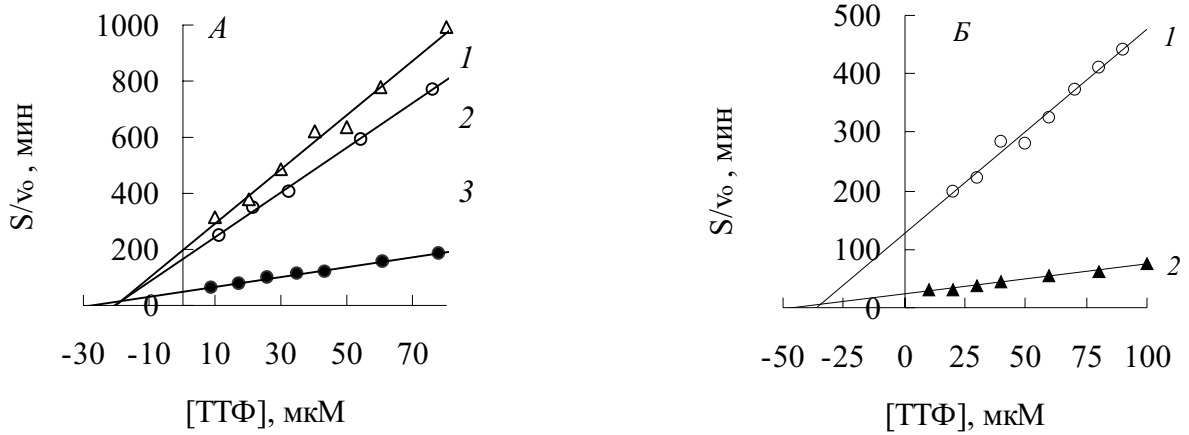


Рис. 3. А – зависимость начальной скорости ГТФ-азной реакции, катализируемой фракциями межмембранного пространства митохондрий (1), матрикса митохондрий (2) и цитозоля (3) печени крысы, от концентрации ГТФ в координатах Хейнса; Б – то же для экстракта митохондрий (1) и цитозольной фракции (2) почек быка.

А. J. L. Соорег [25] установили, что активность α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса митохондрий мозга крысы в изотоническом растворе зависит от концентрации тритона X-100. При концентрации 0,001–0,01% латентная активность комплекса (< 5% от максимальной) возрастает в незначительной степени, однако увеличение концентрации детергента до 0,03% приводит к резкому всплеску активности и выходу ее на плато. Поскольку кетоглутаратдегидрогеназный комплекс расположен в матриксе, подобная зависимость объясняется разрывом субстратного барьера, воздвигаемого внутренней митохондриальной мембраной. Фактически свободная диффузия субстратов (и продуктов реакции) имеет место при концентрации тритона X-100 в пределах 0,02–0,05%.

Используя описанный подход, мы провели серию экспериментов с митохондриями мозга крысы, а также мозга и почек быка. В данной серии митохондриальная суспензия инкубировалась 1 ч при 4 °С в изотонической среде в присутствии различных концентраций детергента с последующим определением активности в стандартной реакционной смеси, содержащей 0,25 М сахарозу. Результаты изучения влияния тритона X-100 на ГТФ-азную активность суспензии митохондрий отражены на рис. 4. Во всех трех случаях наблюдается всплеск активности при ожидаемой концентрации детергента 0,03–0,05%. Кроме того, в суспензии митохондрий из почек быка определяется еще один резкий скачок активности в области очень низких концентраций детергента

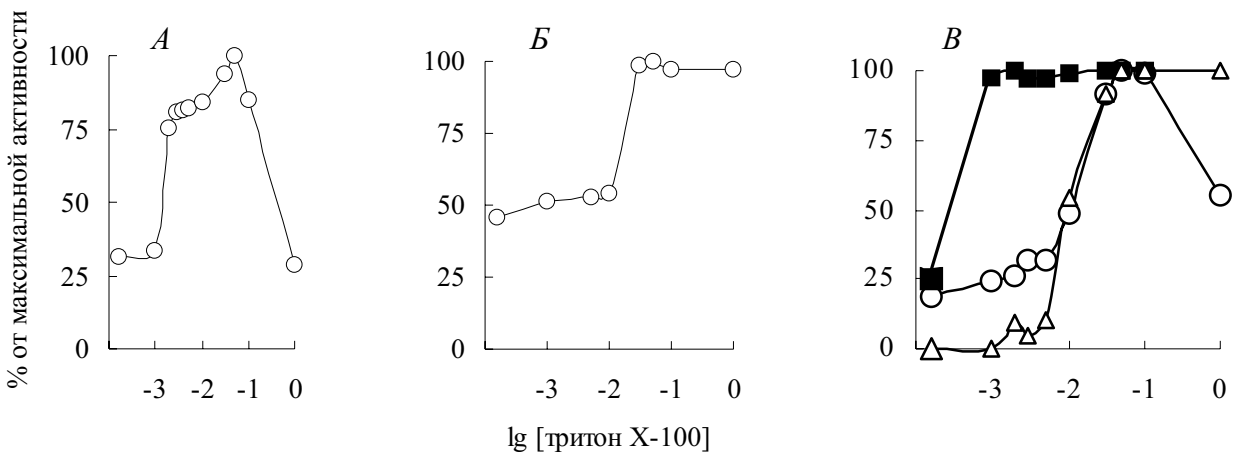


Рис. 4. ГТФ-азная активность в суспензиях митохондрий, обработанных различными концентрациями тритона X-100: А – почки быка; Б – головной мозг быка; В – головной мозг крысы: Δ – ГДГ, \circ – ГТФ-аза, \blacksquare – кислая фосфатаза. На всех рисунках первая точка соответствует активности необработанных детергентом митохондрий. Каждое значение – среднее двух экспериментов.

(рис. 4, А). Это различие в форме кривых, на наш взгляд, может объясняться степенью чистоты митохондриальных препаратов. Как уже упоминалось, мы использовали грубую митохондриальную фракцию из почек, а митохондрии из мозга подвергали дальнейшей очистке в ступенчатом градиенте плотности фиколл-маннитол [19]. Первый всплеск активности на рис. 4, А может быть связан с разрушением примесных мембранных везикул, содержащих цитозольную ТТФ-азу. В то же время электронные микрофотографии, на которых в поле зрения встречаются лишь отдельные загрязняющие микросомальные пузырьки и лизосомы, свидетельствуют о высокой степени чистоты препаратов из мозга (не показаны). На рис. 4, В также представлены результаты исследования активности кислой фосфатазы и ГДГ в митохондриальном препарате из мозга крысы. Как видно, активность латентной лизосомальной кислой фосфатазы возрастает до максимального значения уже при концентрации 0,001% тритона X-100, тогда как для ГДГ и ТТФ-азы формы кривых полностью совпадали, что подтверждает сделанное выше заключение о локализации фермента с ТТФ-азной активностью в матриксе митохондрий. Можно полагать, что высокий базовый фон ТТФ-азной активности в интактных митохондриях (не обработанных детергентом) обусловлен сочетанием нескольких факторов. К их числу, вероятно, относится активность фосфатаз наружной мембраны, частичное разрушение митохондрий в процессе инкубации, а также активность ТТФ-азы межмембранного пространства, поскольку внешняя мембрана проницаема для молекул с M_m менее 10 кДа, что создает условия для свободной диффузии субстратов и в отсутствие детергента [29]. Следует также отметить, что высокие концентрации тритона X-100 ингибировали активность ТТФ-азы в препаратах из мозга крысы и почек быка, но не оказывали заметного влияния на ТТФ-азу мозга быка.

Ранее было показано, что в митохондриях млекопитающих присутствуют ферменты обмена ТДФ и биосинтеза ТТФ, что, вероятно, означает наличие собственной системы метаболизма фосфорилированных производных тиамин в данных органеллах [10,28,30]. Результаты настоящей работы, по нашему мнению, свидетельствуют о существовании в клетках млекопитающих множественных форм специфичной растворимой ТТФ-азы, одна из которых находится в митохондриях. Это позволяет предположить, что в митохондриях локализован функционально активный пул ТТФ, который, возможно, играет важную роль в процессе их жизнедеятельности.

I. M. Rusina, A. F. Makarchikov

THIAMINE TRIPHOSPHATASE ACTIVITY IN MAMMALIAN MITOCHONDRIA

S u m m a r y

Mitochondrial preparations isolated from bovine kidney and brain as well as the liver and the brain of rat show thiamine triphosphatase (ThTPase) activity. The activity was determined from the particles by freezing-thawing suggesting that a soluble enzyme is involved. The liberation patterns of ThTPase and marker enzyme activities from mitochondria under osmotic shock or treatment with increasing Triton X-100 concentrations indicate the presence of ThTPase both in the matrix and intermembrane space. It was found, basing on gel filtration behavior, that the mitochondrial ThTPase has the same molecular mass as specific cytosolic ThTPase (EC 3.6.1.28). The enzymes, however, were clearly distinguishable in K_m values, the mitochondrial one showing a higher apparent affinity for substrate. These results imply the existence of ThTPase multiple forms in mammalian cells.

Key words: thiamine triphosphatase, multiple forms, mitochondria, localization.

Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Grodno;
e-mail: val@biochem.unibel.by

1. Rossi-Fanelli A., Siliprandi N., Fasella P. // *Science*. 1952. **116**. P. 711–713.
2. Haas R. H. // *Ann. Rev. Nutr.* 1988. **8**. 483–515.
3. Bettendorff L. // *Metab. Brain Dis.* 1994. **9**. P. 183–209.
4. Nishimune T., Hayashi R. // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1987. **33**. P. 113–127.
5. Bettendorff L., Michel-Cahay C., Grandfils C. et al. // *J. Neurochem.* 1987. **49**. P. 495–502.
6. Bettendorff L., Wins P., Lesourd M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1994. **1222**. P. 1–6.
7. Barchi R. L., Braun P. E. // *J. Biol. Chem.* 1972. **247**. P. 7668–7673.
8. Hashitani Y., Cooper J. R. // *Ibid.* P. 2117–2119.
9. Русина И. М., Макаровичев А. Ф. // *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* 2002, № 1. С. 115–117.
10. Nishino K., Itokawa Y., Nishino N. et al. // *J. Biol. Chem.* 1983. **258**. P. 11871–11878.
11. Shikata H., Koyama S., Egi Y. et al. // *Biochem. Int.* 1989. **18**. 933–941.
12. Schwarze W., Kolb H.-A. // *Phlugers Arch.* 1984. **402**. P. 281–291.

13. Zhang J. J., Jacob T. J. // J. Physiol. 1997. **499**. P. 379–389.
14. Dermietzel R., Hwang T.-K., Buettner R. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. **91**. P. 499–503.
15. Hanover J. A. // 1992. FASEB J. 1992. **6**. P. 2288–2295.
16. Makarchikov A. F. // J. Biochem. Mol. Biol. Biophys. 2001. **5**. P. 75–82.
17. Lakaye B., Makarchikov A. F., Antunes A. F. et al. // J. Biol. Chem. 2002. **277**. P.13771–13777.
18. Практикум по биохимии / Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. М., 1989. 509 с.
19. Clark J. B., Nicklas W. J. // J. Biol. Chem. 1970. **245**. P. 4724–4731.
20. Черникевич И. П., Гриценко Э. А., Макариков А. Ф., Воскобоев А. И. // Прикл. биохим. микробиол. 1991. **27**, вып. 5. С. 762–771.
21. Fahien L. A., Wiggert B. O., Cohen P. P. // J. Biol. Chem. 1965. **240**. P. 1083–1090.
22. MacLeod R. M., Farkas W., Fridovich I., Handler P. // Ibid. 1961. **236**. P. 1841–1846.
23. Bradford M. M. // Analyt. Biochem. 1976. **72**. P. 248–254.
24. Brandt R. B., Laux J. E., Spainhour S. E., Kline E. S. // Arch. Biochem. Biophys. 1987. **259**. P. 412–422.
25. Lai J. C. K., Cooper A. J. L. // J. Neurochem. 1986. **47**. P. 1376–1386.
26. Биохимическое исследование мембран / Под ред. Э. Мэдди. М.: Мир, 1979. 460 с.
27. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. **1**. 392 с.
28. Barile M., Valenti D., Brizio C. et al. // FEBS Lett. 1998. **435**. P. 6–10.
29. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир. 1994. **1**. 517 с.
30. Черникевич И. П. // Весці АН Беларусі. Сер. біял. навук. 1995, № 2. С. 75–81.

Институт биохимии НАН Беларуси, Гродно;
e-mail: val@biochem.unibel.by

Получено 11.12.2002