

УДК 577.152.3

ТИАМИНТРИФОСФАТНАЯ АКТИВНОСТЬ В МЕМБРАНАХ ПОЧЕК БЫКА И ЕЕ ОТНОШЕНИЕ К КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЕ

© 2004 г. И. Э. Гуляй, А. Ф. Макаричов

Лаборатория энзимологии, Институт биохимии НАН Беларуси, БЛК 50, Гродно 230009, Беларусь; тел. (375-152) 33-63-01; факс: (0152) 33-41-21; электронная почта: val@biochem.unibel.by

Поступила в редакцию 16.12. 2003 г.

Исследованы свойства мембранно-ассоциированной тиаминтрифосфатазы (ТТФаза) почек быка. Показано, что в составе мембранного препарата фермент проявляет максимальную активность при pH 5.0, активируется ионами Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} и подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен в диапазоне концентраций субстрата 20–200 мкМ; K_M для ТТР равна 131.9 ± 8.1 мкМ. Функционально активный фермент может быть солюбилизован при помощи различных детергентов, наиболее эффективным из которых является тритон X-100. Обработка 1%-ным тритоном X-100 при соотношении [детергент]/[белок] = 3:1 приводила к экстракции 49% от общей ТТР-азной активности мембранного препарата; солюбилизованный фермент сохранял каталитическую активность в течение нескольких суток ($k_{инакт} = 0.0156 \text{ ч}^{-1}$). Экстракция ТТР-азы из мембран приводила к некоторым изменениям ее кинетических свойств: pH-оптимум наблюдался при pH 5.5, значение K_M для ТТР снижалось до 54.7 ± 3.6 мкМ. Так же как и ТТР-азная, мембранно-связанная *n*-нитрофенилфосфатазная активность была максимальна при pH 5.5 и солюбилизовалась под действием тритона X-100. Фракционирование экстрагированных белков по размеру молекул на колонке с сефарозой CL-2B приводило к разделению этих активностей, причем объем элюции ТТР-азы соответствовал ферменту с более высокой молекулярной массой. Это свидетельствует о различной природе мембранно-связанных ТТР-азы и кислой фосфатазы в почках быка.

Тиаминтрифосфат (ТТР) является компонентом клеток различных типов и обнаружен у всех исследованных организмов, однако его биологическая функция остается неизвестной [1]. У млекопитающих регуляция внутриклеточной концентрации ТТР осуществляется растворимой тиаминтрифосфатазой (ТТР-аза, КФ 3.6.1.28), которая широко экспрессирована в органах и тканях, проявляет абсолютную специфичность и высокое сродство к субстрату [2, 3]. Наряду с этим ферментом в клетках млекопитающих и, вероятно, других классов животных присутствует ТТР-азная активность, ассоциированная с мембранами, специфичность которой и отношение к гидролизу ТТР в клетке недостаточно хорошо изучены. Свойства интегрального фермента исследовались в мембранных препаратах, выделенных из мозга крысы [4], мышц крысы [5] и электрического органа *Electrophorus electricus* [6]. Как оказалось, общим для ТТР-аз мозга и мышц является абсолютная зависимость от ионов двухвалентных металлов и pH-оптимум в нейтральной или слабокислой среде. По некоторым признакам данные ферменты, однако, сильно различались. Так, Matsuda с соавт. [5] установили, что мембранно-связанная ТТР-азная активность мышц заметно стимулируется анионами SCN^- , I^- , NO_3^- , Br^- и Cl^- в отличие от фермента из мембран мозга, для которого наблюдался ингибирующий эффект. Поскольку NO_3^- ингибировал

также и АТР-азную активность, было сделано заключение о специфичности мембранной ТТР-азы в мышцах крысы. В работе [4] дифференцировали ТТР-азную активность мембран мозга крысы от Mg^{2+} -зависимой АТР-азы (НТР-азы), используя β - γ -метиленфосфатный аналог ТТР, который снижал скорость ТТР-азной реакции, но не оказывал влияния на гидролиз нуклеозидтрифосфатов. Кроме того, было показано, что АТР и АДФ ингибируют активность ТТР-азы с K_I 20 и 75 мкМ соответственно [7]. Подобно ферменту из мышц ТТР-аза мембран электрического органа активировалась в присутствии моновалентных анионов и ингибировалась соединениями, тормозящими транспорт анионов (4,4'-диизотиоциано-2,2'-дисульфоновая кислота, 4-ацетамидо-4'-изотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота и др. [8]). Неудивительно, что оба белка проявляли сходные кинетические свойства, поскольку известно, что в онтогенезе электрический орган развивается из мышечной ткани [9].

Представленные выше доказательства специфичности интегральной ТТР-азы не могут рассматриваться в качестве достаточно строгих, так как ни в одном из случаев фермент не выделен из мембран, а в мембранах, как известно, локализован широкий спектр фосфатаз, способных катализировать гидролиз фосфорных эфиров различных соединений. Основная трудность при идентификации мембранно-связанного белка с ТТР-азной ак-

тивностью заключается в его инактивации в процессе выделения и низкой стабильности растворимого препарата [4, 10]. В связи с этим цель настоящей работы состояла в солюбилизации мембранной ТТР-азы поверхностно-активными веществами (ПАВ), исследовании ее стабильности в растворе и влияния процесса солюбилизации на кинетические свойства. В качестве объекта мы использовали почки быка, исходя из высокой ТТР-азной активности во фракции мембран, выделенных из почечной ткани [4]. Кроме того, представлялось интересным сравнить характеристики этого фермента с данными литературы для белков из других источников и его отношение к активности кислой фосфатазы, так как в ранее проводимых исследованиях взаимоотношения мембранно-связанных *p*-нитрофенилфосфатазной и ТТР-азной активностей не изучались.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы тритон X-100, твин-40 ("Ferak", Германия), додецилсульфат Na (SDS) ("Fluka", Швейцария), фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), тиаминдифосфат (TDP), кумасси бриллиантовый голубой G-250 ("Serva", ФРГ), *p*-нитрофенилфосфат ("Sigma", США), альбумин из сыворотки человека (ЧСА), алкогольдегидрогеназа, NADH ("Reanal", Венгрия), сефакрил S-200, сефароза CL-2B ("Pharmacia", Швеция), остальные реактивы производства "Реахим" (Россия). Химический синтез и очистку ТТР осуществляли по методу [11].

Стандартная реакционная смесь для определения ТТР-азной активности содержала 20 мМ ацетатный буфер, pH 5.5, 0.05 мМ ТТФ, 0.1 мг / мл ЧСА, 50 мМ MgSO₄ и 10–20 мкг белка в объеме 0.5 мл. Реакцию осуществляли 30 мин при 37°C и останавливали добавлением 2 мл 0.5 М фосфатного буфера, pH 6.8. Количество образующегося TDP определяли ферментативным методом [12].

Активность кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2) измеряли в аналогичных условиях по скорости гидролиза 1 мМ *p*-нитрофенилфосфата. Реакцию останавливали добавлением 5 мл 0.2 н NaOH, измеряли оптическую плотность при 405 нм и рассчитывали концентрацию образовавшегося *p*-нитрофенола, исходя из коэффициента молярного поглощения $\epsilon = 18500$.

За единицу активности (Ед) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 ммоль продукта за 1 мин в условиях испытания.

Для получения мембранного препарата образцы почек измельчали, добавляли 3 объема охлажденного до 4 °C 50 мМ трис-HCl-буфера, pH 7.3, содержащего 0.15 М KCl, 0.2 мМ EDTA, гомогенизировали в гомогенизатор с тефлоновым пестиком (2000 об мин⁻¹, 10 циклов) и центрифугировали 60

мин при 30000 g. Осадки мембран хранили при –20 °C до использования.

Все операции по солюбилизации ТТР-азы выполнялись при 4°C. Мембраны размораживали и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 50 мМ трис-HCl-буфере, pH 7.5, содержащем 0.1 мМ ФМСФ, 1 мг/мл иодацетамид и 1% детергент. После инкубации в течение 30 мин гомогенат центрифугировали 60 мин при 105000g. Степень солюбилизации определяли как отношение количества ТТР-азной активности в супернатанте к общей активности гомогената.

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [13], используя в качестве стандарта ЧСА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

pH-зависимость начальной скорости ТТР-азной реакции, катализируемой мембранным препаратом, свидетельствует о присутствии в почках мембранно-связанного фермента, обладающего максимальной активностью в кислой области pH. В отличие от ТТР-аз мозга, скелетной мышцы крысы и электрического органа *Electrophorus electricus*, pH-оптимумы которых составляли соответственно 6.5 [4], 7.0 [5] и 6.8 [6], мембранный фермент почек быка характеризовался более низким значением pH-оптимума, проявляя максимальную активность при pH 5.0 (рис. 1а). Подобно ТТР-азам из других тканей животных, ТТР-аза почек активировалась ионами Mg²⁺, Ca²⁺ и Mn²⁺, однако данный фермент обладал активностью и в отсутствие двухвалентных катионов (рис. 1б). Реакция гидролиза ТТР подчинялась кинетике Михаэлиса–Ментен в диапазоне концентраций субстрата 20–200 мкМ; K_м для ТТР, рассчитанная по графику в координатах Хейнса, составляла 131.9 ± 8.1 мкМ (n = 5, рис. 1в), что на порядок ниже значений K_м ТТР-аз, ассоциированных с мембранами мозга крысы и электрического органа угря (1.5 и 1.8 мМ соответственно [4, 6]).

В таблице представлены результаты по дезинтеграции ТТР-азы из мембран почек быка с помощью широко применяемых для солюбилизации биологических мембран анионных детергентов – дезоксихолата натрия (ДОХ) и SDS, а также неионного детергента – тритона X-100. Кроме того, исследовано экстрагирующее действие двух других представителей полиоксиэтиленового ряда – тритона X-305 и твина 40. Наиболее эффективными для данной цели оказались тритон X-100 и ДОХ, в случае которых соответственно 48.7 и 41.3% активности переходило в растворимую фракцию. Остальные соединения проявляли слабую способность к экстракции фермента. Довольно часто переход в коллоидно-дисперсную фазу сопряжен с заметными изменениями каталитической активности мемб-

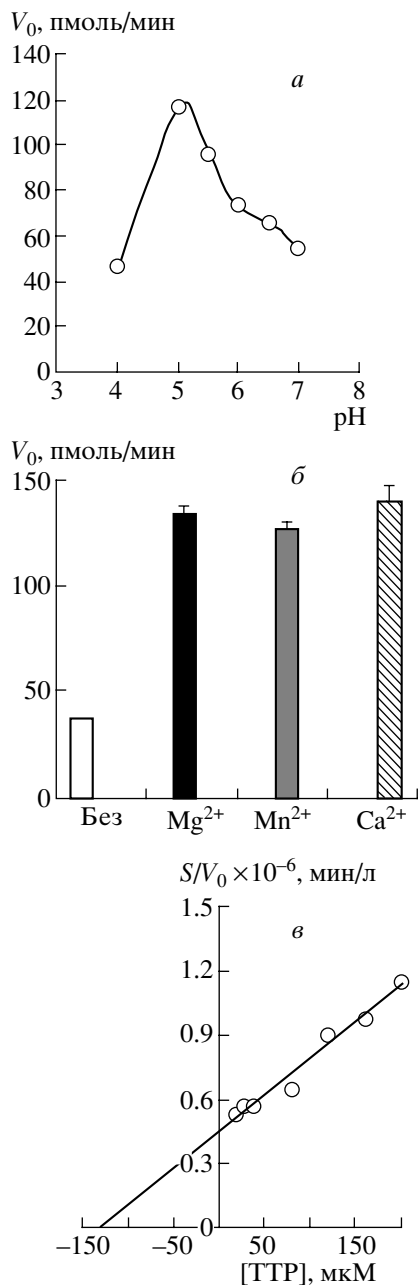


Рис. 1. Кинетические свойства интегрированной в мембраны тиаминтрифосфатазы почек быка. *а* – зависимость ТТР-азной активности от pH; *б* – влияние двухвалентных катионов на начальную скорость реакции гидролиза ТТР; *в* – зависимость начальной скорости ТТР-азной реакции от концентрации субстрата в координатах Хейнса.

ранно-ассоциированных ферментов. Для учета этого обстоятельства и адекватной оценки эффективности солюбилизации ТТР-азы общая активность мембранного препарата определялась в присутствии соответствующих детергентов. Как видно из таблицы, детергенты оказывали различное действие на активность фермента. Так, в присутст-

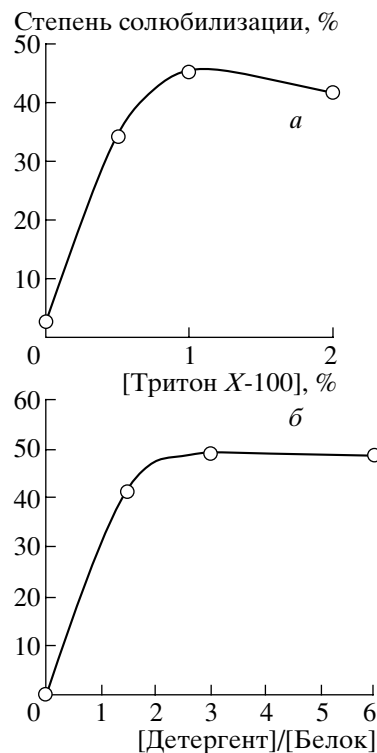


Рис. 2. *а* – влияние концентрации тритона X-100 на степень солюбилизации ТТР-азной активности из мембран почек быка. Соотношение [детергент]/[белок]=3; $n = 3$. *б* – зависимость степени солюбилизации ТТР-азной активности 1%-ным тритоном X-100 от соотношения [детергент]/[белок]; $n = 3$.

вии тритона X-100 общая активность гомогената мембран почек в среднем возрастала на 18%, ДОХ активировал фермент на 25%, тритон X-305 – на 8%. Обычно подобный активирующий эффект объясняется сильным влиянием липидного микроокружения [14]. Противоположная картина, выражающаяся в ингибировании ТТР-азной активности на 57%, имела место при обработке мембран SDS, что, вероятно, обусловлено инактивацией фермента вследствие глубоких конформационных изменений, поскольку SDS обладает высокой способностью связываться с белковыми молекулами, вызывая их денатурацию. Твин 40 не изменял скорости гидролиза ТТР мембранным препаратом и, как можно было ожидать, подобно тритону X-305, практически не обладал солюбилизирующим действием. В системном исследовании свойств различных представителей полиоксиэтиленового ряда ПАВ было показано, что главным параметром детергента, определяющим его эффективность экстрагировать белки митохондриальных мембран, является гидрофильно-липофильный баланс, значение которого должно в идеале находиться в пределах 12.5–13.5, причем используемая концентрация детергента должна значительно превышать критическую концентрацию мицеллообразования

Солюбилизация ТТР-фазы из мембран почек быка 1% растворами детергентов (количество независимых экспериментов $n = 3$)

Детергент	Фракция	Объем, мл	Активность, мЕд · мл ⁻¹	Общая активность, мЕд	Степень солюбилизации, %
Без детергента	Гомогенат	8	43.50 ± 2.30	348.02	–
	Супернатант	7	1.48 ± 0.39	10.39	2.98
Тритон X-100	Гомогенат	8	51.33 ± 3.89	410.62	–
	Супернатант	7	28.59 ± 4.12	200.13	48.74
ДОХ	Гомогенат	8	54.15 ± 2.97	433.23	–
	Супернатант	7	25.61 ± 0.87	179.30	41.39
SDS	Гомогенат	8	18.62 ± 5.49	148.96	–
	Супернатант	7	3.59 ± 1.02	25.13	16.87
Тритон X-305	Гомогенат	8	46.91 ± 4.05	375.28	–
	Супернатант	7	4.41 ± 1.07	30.87	8.21
Твин 40	Гомогенат	8	42.62 ± 5.03	340.97	–
	Супернатант	7	2.33 ± 0.81	16.34	4.79

[15]. Значения гидрофильно-липофильного баланса твина 40 и тритона X-305 заметно отличаются от этой оптимальной величины (соответственно 15.6 и 17.3 [16]). Это, по-видимому, и является причиной их крайне низкой эффективности при солюбилизации ТТР-азы. Исходя из полученных результатов, можно полагать, что тритон X-100 представляет собой наиболее приемлемый детергент для выделения ТТР-азы из мембран почек быка с целью ее дальнейшей очистки и идентификации. Следует отметить, что в настоящее время производится широкий ассортимент самых разнообразных детергентов. Многие из этих соединений, вероятно, могли бы быть не менее эффективными, однако наряду со всеми прочими обстоятельствами всегда приходится учитывать и коммерческий аспект [17].

Известно, что эффективность солюбилизации мембранных белков и стабильность растворимых препаратов зависят от сочетания нескольких факторов, среди которых наиболее важными являются концентрация детергента и соотношение [детергент]/[белок] [17]. Мы исследовали действие названных факторов, подбирая оптимальные условия экстракции ТТР-азы. Как показано на рис. 2а, при соотношении [детергент]/[белок] = 3 степень солюбилизации достигала максимальной величины в 1% растворе тритона X-100. Увеличение концентрации детергента до 2% приводило к некоторому ингибированию ТТР-азы. При обработке мембран 1%-ным тритоном X-100 варьирование соотношения [детергент]/[белок] в диапазоне 1.5–6 к 1 существенно не сказывалось на степени солюбилизации ферментативной активности. Исследуемая зависимость достигала максимума, выходя на плато, при соотношении 3:1 (рис. 2б). Дезинтегрированный из мембран фермент сохранял каталити-

ческую активность в 1% растворе тритона X-100 при 4°C в течение нескольких суток ($k_{\text{инакт}} = 0.0156 \text{ ч}^{-1}$. Диализ продолжительностью 50 ч против 20 мМ трис-НСI-буфера, рН 7.5 не вызывал каких-либо изменений активности ТТР-азы по сравнению с солюбилизатом, хранившимся при 4°C в течение аналогичного срока.

Экстракция фермента из мембран приводила к некоторым изменениям его кинетических свойств. Так, максимальная активность солюбилизированной ТТР-азы наблюдалась при рН 5.5 (рис. 3а), а значение K_m для ТТР снижалось до $54.7 \pm 3.6 \text{ мкМ}$ ($n = 3$, рис. 3б). На наш взгляд, данный эффект может объясняться несколькими причинами. В первую очередь, необходимо сказать, что в общей мембранной фракции присутствует большое количество фосфатаз с широкой субстратной специфичностью, которые имеют определенные места локализации в мембранных структурах клетки [18–20]. Многие из этих ферментов наверняка потенциально способны катализировать гидролиз ТТР *in vitro*, как, например, нуклеозидтрифосфатаза (КФ 3.6.1.15) плазматической мембраны *in vitro* [21]. При этом скорости индивидуальных реакций, а также и сродство к субстрату могут заметно различаться. Исследования локализации мембранно-связанной ТТР-азной активности выявили ее практически равномерное распределение в субклеточных фракциях, выделенных из мозга крысы методом дифференциального центрифугирования [4]. Этот факт уже сам по себе может рассматриваться как свидетельство существования нескольких интегрированных в мембраны фосфатаз, способных катализировать гидролиз ТТР в тканях млекопитающих, поскольку теперь уже не вызывает сомнений справедливость гипотезы о единственном месте локализации фермента в клетке [22].

Выше было показано (таблица), что обработка мембранного препарата тритоном X-100 приводит к высвобождению приблизительно лишь 49% активности, поэтому нельзя исключить ситуацию, при которой детергент селективно экстрагирует определенные фосфатазы, тогда как другие остаются интегрированными и удаляются вместе с не-солюбилированным материалом в процессе центрифугирования. Кроме того, возможны существенные конформационные изменения, часто сопровождающие дезинтеграцию белковых молекул из липидного бислоя, а также эффекты, обусловленные собственно активирующим или ингибирующим действием детергента [17].

В предыдущих исследованиях, касавшихся специфичности мембранно-ассоциированной ТТР-азы тканей млекопитающих, рассматривались ее взаимоотношения с активностью нуклеозидтрифосфатаз (КФ 3.6.1.15) [4, 5], которые, как уже отмечалось, потенциально способны к дефосфорилированию ТТР [21]. Наряду с NTP-азами в мембранных структурах клетки присутствует кислая фосфатаза (КФ 3.2.3.1), причем распределение данного фермента, как и в случае ТТР-азы, не ограничено каким-либо определенным местом локализации [23]. Поэтому нельзя было исключить, что ТТР-азная активность мембранного препарата определяется кислой фосфатазой. Действительно, выполненные нами эксперименты показали, что для реакции гидролиза п-нитрофенилфосфата мембранами из почек быка наблюдается рН-профиль, аналогичный изображенному на рис. 1 (данные не представлены). Обработка мембран тритоном X-100 приводила к одновременному появлению в растворе п-нитрофенилфосфатазной и ТТР-азной активностей, при этом обе активности элюировались в свободном объеме, соответствующем белкам с $M > 300$ кДа, в процессе гель-фильтрации солюбилизата на колонке с сефакрилом S-200 (данные не показаны). Однако использование другого носителя – сефарозы CL-2B (предел эксклюзии 40000 кДа), – позволило разделить изучаемые активности. Для подготовки образца к хроматографии экстракт высаливали сульфатом аммония при степени насыщения 35–60%, осадок собирали центрифугированием и растворяли в 20 мМ трис-HCl-буфере, рН 7.5, содержащем 50 мМ NaCl, 0.2 мМ EDTA и 20% сахарозу. Образец хроматографировали на колонке (диаметр 2.8 × 52 см) в том же буфере без сахарозы со скоростью потока 3 см/ч, собирая фракции по 8 мл. На рис. 4 представлена хроматограмма, на которой видно, что фермент с ТТР-азной активностью имеет более высокую молекулярную массу по сравнению с п-нитрофенилфосфатазой. Следует отметить, что такая картина может быть также обусловлена наложением профилей элюции нескольких ферментов, каждый из которых способен катализировать гидролиз обоих субстратов. Но в любом случае хотя бы частично

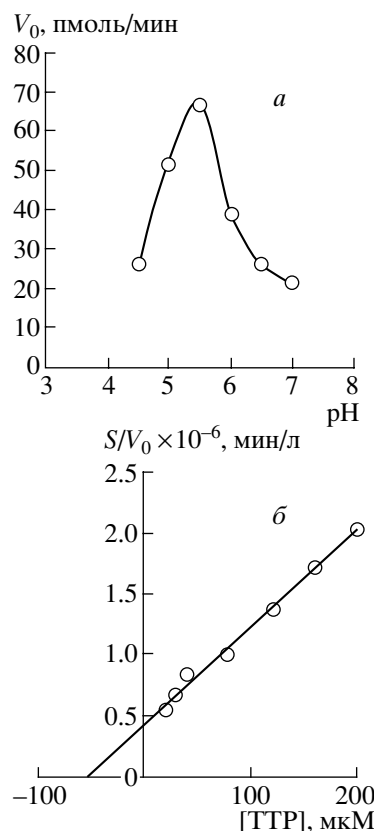


Рис. 3. Кинетические свойства солюбилизированной ТТР-азы. а – рН-зависимость ТТР-азной реакции; б – зависимость начальной скорости ТТР-азной реакции от концентрации субстрата в координатах Хейнса.

активность определяется присутствием в мембранном препарате различных фосфатаз.

Подводя итог нашим исследованиям, можно констатировать, что фермент из почек быка проявляет несколько иные свойства по сравнению с описанными ранее в литературе мембранно-ассо-

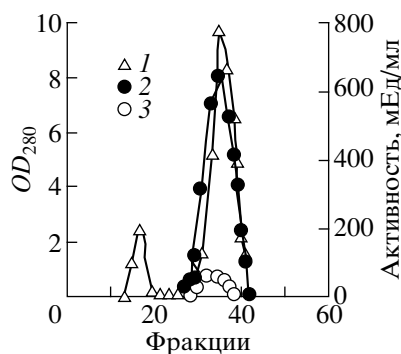


Рис. 4. Хроматография экстракта из мембран почек быка, фракционированного сульфатом аммония в диапазоне 35–60% степени насыщения, на колонке с сефарозой CL-2B: 1 – оптическая плотность при 280 нм; 2 – п-нитрофенилфосфатазная активность; 3 – ТТР-азная активность.

цированными белками с ТТР-азной активностью из мозга и мышц крысы, а также электрического органа *E. electricus* [4–6]. Складывается впечатление, что в противоположность широкому распространению специфичной растворимой ТТР-азы в органах млекопитающих [1], гидролиз ТТР *in vitro* в мембранных препаратах из различных типов тканей катализируется разными ферментами. Представленные в настоящей работе результаты позволяют дифференцировать ТТР-азную и п-нитрофенилфосфатазную активности, локализованные в мембранной фракции из почек быка. Однако вопрос о том, является ли мембранная ТТР-аза почек специфическим белком или фосфатазой широкого спектра действия, остается открытым и требует дальнейшего изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Makarchikov A.F., Lakaye B., Goulyai I. E., Czerniecki J., Coumans B., Wins P., Grisar T., Bettendorff L. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2003. V. 60. P. 1477–1488.
2. Makarchikov A.F., Chernikevich I.P. // *Biochim. et biophys. acta.* 1992. V. 1117. P. 325–332.
3. Lakaye B., Makarchikov A. F., Antunes A. F., Zorzi W., Coumans B., De Pauw E., Wins P., Grisar T., Bettendorff L. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 13771–13777.
4. Barchi R.L., Braun P.E. // *J. Biol. Chem.* 1972. V. 247. P. 7668–7673.
5. Matsuda T., Tonomura H., Baba A., Iwata H. // *Int. J. Biochem.* 1991. V. 23. P. 1111–1114.
6. Bettendorff L., Michel-Cahay C., Grandfils C., De Ryck-er C., Schoffeniels E. // *J. Neurochem.* 1987. V. 49. P. 495–502.
7. Barchi R.L. // *J. Neurochem.* 1976. Vol. 26. P. 715–720.
8. Bettendorff L., Wins P., Schoffeniels E. // *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 154. P. 942–947.
9. Хадорн Э., Венер Р. Общая зоология. М.: Мир, 1989. С. 223–224.
10. Bettendorff L., Longree I., Wins P., Schoffeniels E. // *Biochim. et biophys. acta.* 1991. V. 1073. P. 69–76.
11. Черникевич И. П., Гриценко Э. А., Лучко Т. А., Забродская С. В. // Докл. АН БССР. 1990. Т. 34. С. 274–278.
12. Черникевич И. П., Гриценко Э. А., Макарович А. Ф., Воскобоев А. И. // Прикл. биохимия микробиология. 1991. Т. 27. № 5. С. 762–771.
13. Bradford M. M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
14. Baba A., Matsuda T., Iwata H. // *Biochim. et biophys. acta.* 1977. V. 482. P. 71–78.
15. Egan R. W. // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 51. P. 4442–4447.
16. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. С. 237–238.
17. Джонс О. Т., Эрнест Ю. П., Мак-Нэми М. Дж. Биологические мембраны. Методы / Ред. Финдлей Дж.Б., Эванз У.Г.. М.: Мир, 1990. С. 196–250.
18. Zimmermann H. // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2000. V. 362. P. 299–309.
19. Sabbatini, G.P., Smith, P.J., Von Holt, C. // *Biochim. et biophys. acta.* 1993. V. 1153. P. 132–134.
20. Kalf, G.F., Grece, M.A. // *Biochemistry.* 1970. V. 9. P. 4049–4056.
21. Nishimune T., Ito S., Abe M., Kimoto M., Hayashi R. // *Biochim. et biophys. acta.* 1987. V. 923. P. 74–82.
22. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 3. С. 893–899.
23. Rudiger J., Kalicharan D., Halbhuber K. J., van der Want J. J. // *Histochem. Cell. Biol.* 1998. V. 109. P. 375–382.

Thiamine Triphosphatase Act *in vitro* in Membranes From Bovine Kidney and its Relation to Acid Phosphatase

I. E. Gulyai, A. F. Makarchikov

Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus

It was found that bovine kidney membrane-associated thiamine triphosphatase (ThTPase) has a pH-optimum of 5.5, is activated with divalent cations, such as Mg^{2+} , Ca^{2+} or Mn^{2+} , and obeys Michaelis–Menten kinetics in the range of substrate concentration of 20–200 μM . The apparent K_m for ThTP was estimated to be $131.9 \pm 8.1 \mu M$. The enzyme can be solubilized with different detergents, Triton X-100 being the most effective among tested. The treatment of membranes with Triton X22-100 at 1% concentration and [detergent]/[protein] ratio of 3 : 1 resulted in approximately 49% extraction of total ThTPase activity. The soluble enzyme retained its activity for several days with inactivation constant of $0.0156 h^{-1}$. After solubilization, some changes in kinetic properties were observed: the pH-optimum was shifted to 5.5 and the K_m value became as low as $54.7 \pm 3.6 \mu M$. Like ThTPase, membrane bound p-nitrophenyl phosphatase activity was maximal at pH 5.0 and was extracted with Triton X-100. The two activities were separated by gel filtration on a Sepharose CL-2B column, the ThTPase peak being eluted in the volume corresponding to higher molecular weight. This indicates the different nature of membrane-bound ThTPase and acid phosphatase in bovine kidney.