

УДК 577.152.28 : 591.481.1

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТИАМИНКИНАЗЫ ИЗ МОЗГА СВИНЬИ

И.П. Черникевич<sup>1</sup>, А.А. Маскевич<sup>2</sup><sup>1</sup> – УО «Гродненский государственный медицинский университет»<sup>2</sup> – УО «Гродненский государственный университет им. Я.Купаль»

Исследован аминокислотный состав и собственная флуоресценция тиаминкиназы (КФ 2.7.6.2) из мозга свиньи. Показано, что молекула фермента характеризуется повышенной концентрацией аминокислот, способствующих  $\alpha$ -спирализации белковой глобулы, при одновременно высоком содержании остатков, связывающих полипептидные цепи (цистеин), или осуществляющих их резкий поворот (пролин). Значение изоэлектрической точки белка равно 6,21. Максимум спектра флуоресценции — 328 нм, полуширина — 53 нм, квантовый выход — 0,14. Триптофановые остатки локализованы в гидрофобном окружении, недоступны анионным и мало доступны катионным тушителям. При pH 5–9 структура белка не изменяется. С возрастанием температуры свыше 40°C нарушается нативность глобулы. Увеличение содержания фермента от 0,05 до 1 мг/мл влечёт за собой повышение степени поляризации с 0,115 до 0,194, причём квантовый выход и положение спектра флуоресценции остаются неизменными. Полученные результаты развивают представление о равновесной системе множественных олигомерных форм тиаминкиназы с различными каталитическими свойствами.

**Ключевые слова:** тиаминкиназа, аминокислотный состав, флуоресценция.

The aminoacid composition and intrinsic fluorescence of thiaminekinase (ES 2.7.6.2) from the pig brain have been studied. It has been shown that the enzyme molecule is characterized by the increased aminoacids concentration promoting protein globule  $\alpha$ -helix formation, in the amount of residues (cysteine, proline) either binding or folding polypeptide chains is considerably high. The protein isoelectric point value is 6.21. The fluorescence spectrum has a maximum at 328 nm, halfwidth at 53 nm and a quantum yield at 0.14 nm. The tryptophane residues are located in hydrophobic surroundings and are inaccessible to anion quenchers and are almost inaccessible to cation ones. The protein conformation remains unchanged at pH of 5–9. The temperature rise above 40°C results in the nativity of the globule. The elevation of the enzyme concentration from 0.05 to 1 mg/ml increases the polarization degree from 0.115 to 0.194, the quantum yield and the spectrum position remaining unchanged. The obtained results develop the knowlence of the equilibrium system of oligomeric forms of thiamin kinase with different catalytic properties.

**Key words:** thiaminekinase, aminoacid composition, fluorescence.

Роль тиаминдифосфата–коферментной формы тиамина в обменных процессах весьма существенна. Тиаминдифосфат–содержащие ферменты катализируют целый ряд ключевых реакций, которые можно свести к нескольким основным вариантам: окислительному и неокислительному декарбоксилированию  $\alpha$ -кетокислот, ацилоинового конденсации, фосфорокластическому расщеплению кетосахаров [7]. Известно участие тиаминдифосфата в оперативной регуляции активности пируватдегидрогеназного комплекса по механизму фосфорилирования — дефосфорилирования его пируватдегидрогеназного компонента [15]. Биосинтез коферментной формы осуществляется тиаминкиназой (АТР: тиаминпирофосфотрансфераза), выделенной в высокоочищенном индивидуальном состоянии из мозга свиньи [18], листьев петрушки [14], пивных дрожжей [8]. Исследованы кинетические характеристики фермента, его субстратная специфичность, аллостерическая регуляция ионами металлов и природа аминокислотных остатков активного центра. Показана прямая корреляция скорости биосинтеза тиаминдифосфата от концентрации кофактора киназы мио-инозитол-1-пирофосфата [13]. Однако какие-либо сведения, касающиеся пространственной организации молекулы фермента, взаимосвязи между структурой и возможностью

регуляторного контроля активности глобулы при её пространственной перестройке, в литературе отсутствуют. Лишь в отношении тиаминкиназы из пивных дрожжей, по данным гель-фильтрации и диск-электрофореза, предполагается наличие находящихся в динамическом равновесии множественных олигомерных форм белка с различными каталитическими свойствами [6].

Задача настоящей работы — дальнейшее изучение структуры и некоторых физико-химических характеристик фермента из мозга свиньи.

### Материалы и методы

Гомогенный препарат тиаминкиназы выделяли по разработанной ранее методике [18]. Активность фермента определяли по скорости образования тиаминдифосфата [17]. Реакционная смесь содержала  $2 \cdot 10^{-3}$  М АТР,  $2 \cdot 10^{-5}$  М тиамина,  $2 \cdot 10^{-3}$  М трис-НСI буфера, pH 8,6,  $1 \cdot 10^{-2}$  М MgSO<sub>4</sub> и 20–30 мкг фермента в общем объёме 1 мл. Удельную активность выражали в наномолях тиаминдифосфата, образовавшегося за 1 ч при 37°C в расчёте на 1 мг белка. Концентрацию белка находили по методу Лоури и спектрофотометрически.

Аминокислотный состав гидролизатов тиаминкиназы определяли на аминокислотном анализаторе ААА-Т 339 «Mikrotechna Praha» (Чехия) [11].

При расчёте содержания треонина, пролина, тирозина, метионина и серина учитывали процент распада аминокислот в процессе гидролиза. Концентрацию триптофана оценивали отдельно [16]. Гидролиз белка осуществляли в запаянных вакуумированных ампулах с 6 М HCl при 110°C в течение 18, 22, 48 и 72 ч.

Изоэлектрическую точку (pI) рассчитывали по аминокислотному составу и с помощью метода изоэлектрофокусирования [10]. Собственную величину pH, изоионную точку определяли посредством диализа тиаминкиназы (0,32 мг/мл) против бидистиллированной воды с последующим измерением pH в диализате.

Электрофорез белка (15–60 мкг) в 7,5 %-м полиакриламидном геле выполняли по Орнштейну и Дэвису [12] при pH 8,9 в течение 5 ч при силе тока 20 мА в первые 60 мин, а затем 40 мА на пластинку. Обнаружение белковых фракций осуществляли 0,1 %-м раствором кумасси R-250 на 12,5 %-м растворе ТХУ в течение 20–30 мин. Изоэлектрофокусирование проводили на пластинках 4,5 %-го полиакриламидного геля с использованием 1 % амфолина фирмы «ЛКВ», pH 3–10. Белковые полосы окрашивали серебром [10].

Спектры поглощения контролировали на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (Карл Цейс). Спектры и длительность флуоресценции регистрировали на автоматизированном импульсном спектрофлуориметре [1]. Среднюю длительность флуоресценции  $\tau$  рассчитывали по формуле:

$$\bar{\tau} = \frac{\sum A_i \cdot \tau_i}{\sum A_i},$$

где  $A_i$  — амплитуда;  $\tau_i$  — длительность затухания  $i$ -й компоненты флуоресценции. Квантовый выход флуоресценции (В) определяли относительно триптофана, для которого В = 0,20 [2]. Спектральная ширина щели монохроматора возбуждения составляла не более 4 нм, а монохроматора регистрации — 2,5 нм. Оптическая плотность растворов на длине волны возбуждения не превышала 0,05. Центр тяжести спектра флуоресценции ( $\mu_{\text{фл}}$ ) определяли из соотношения:

$$\mu_{\text{фл}} = \frac{\sum I_{\lambda} \cdot \lambda_{\text{фл}}}{\sum I_{\lambda}},$$

где  $I_{\lambda}$  — интенсивность;  $\lambda_{\text{фл}}$  — длина волны флуоресценции.

### Результаты и их обсуждение

Общий анализ аминокислотного состава не позволяет судить о пространственной организации молекулы фермента. Более важные сведения получают из первичной последовательности. Тем не менее, выяснение количественного соотношения аминокислотных остатков несет полезную информацию для интерпретации результатов субклеточной локализации белков, установления и фиксации участков связывания субстратов и лигандов, пони-

мания полифункциональных свойств.

В отношении тиаминкиназы нас в первую очередь интересовало наличие и концентрация аминокислот с ионизируемыми основными и кислотными группами, поскольку в соответствии со структурой тиаминкиназы и АТФ, субстратов тиаминкиназной реакции, и свойств самого фермента связывание с глобулой могло происходить по четвертичному азоту молекулы витамина и отрицательно заряженной пирофосфатной группировке АТФ. Кроме того, учитывая биологическое действие нуклеотида в комплексе с ионами металлов, в частности, с  $Mg^{2+}$ , присоединяющимся исключительно по  $\beta$ - и  $\gamma$ - фосфатам АТФ и нивелирующим общий заряд субстрата, приравнивая его к заряду тиаминкиназы, можно было ожидать, что общее количество кислотных остатков молекулы тиаминкиназы будет соответствовать числу основных.

Полученные данные (табл. 1) аминокислотного состава тиаминкиназы мозга подтверждают наше предположение (соответственно, 18,62 и 17,15% кислотных и основных остатков), отличая данный фермент от рассчитанного «среднего белка» [9], где общая концентрация кислотных заместителей (25,4%) выше, чем основных (16,3%). Обращает внимание и наличие в молекуле фермента повышенной концентрации аминокислот (аланин, глутаминовая кислота, лейцин), способствующих  $\alpha$ -спирализации белковой глобулы, при одновременно высоком содержании аминокислот, связывающих полипептидные цепи (цистеин) или осуществляющих их резкий поворот на 130° (пролин), несовместимый с ходом  $\alpha$ -спирали. Отмеченная особенность тиаминкиназы в определенной мере объясняет стабилизирующий эффект ионов металлов, при концентрациях последних, в 5–10 раз превышающих применяемые концентрации АТФ, и необходимость защиты SH-групп от окисления, приводящего к быстрой, необратимой инактивации фермента [6].

Таблица 1 — Аминокислотный состав тиаминкиназы из мозга свиньи

Аминокислота	Содержание аминокислот	
	Число остатков на молекулу (М 48 кДа)	Содержание к общему количеству остатков, %
Аспарагиновая	25	9,13
Лизин	14	5,40
Гистидин	2	0,95
Аргинин	29	10,80
Цистеин	1	0,39
Треонин	17	6,33
Серин	22	8,19
Глутаминовая	21	7,63
Пролин	24	9,00
Глицин	19	7,26
Цистеин	9	3,35
Валин	14	5,21
Метионин	5	1,67
Изолейцин	10	3,72
Лейцин	19	7,08
Тирозин	5	1,86
Фенилаланин	12	4,65
Аланин	20	7,46
Триптофан	16	5,45
Всего	284	100

Интересен и тот факт, что аминокислотный состав тиаминкиназы напоминает таковой тиаминсвязывающего белка [4], участвующего в транспорте тиаминина через клеточные мембраны: такое же высокое содержание аспартата, глутамата, треонина, серина, пролина и низкое — цистеина и метионина. Вероятно, это указывает на сходство механизмов связывания витамина обеими молекулами.

Сопоставляя количество аминокислотных остатков, содержащих незаряженные полярные и неполярные R-группы, можно отметить некоторое, свойственное растворимым белкам, преобладание гидрофильных остатков над гидрофобными (соответственно, 55,62 и 44,38%). Причём, из аминокислот с неполярными R-группами наиболее распространены аминокислоты средней и низкой гидрофобности (лейцин, аланин, валин), небольшие углеводородные радикалы которых вряд ли смогут препятствовать контакту белка с полярной водной фазой, содержащей металл, АТР и тиамин.

Обнаруженная незначительная концентрация кислых аминокислотных остатков тирозина и основных гистидина, располагающихся для известных ферментных систем внутри белковой глобулы и в силу того не вносящих заметного вклада в величину суммарного заряда [9], позволяет с достаточной достоверностью рассчитать по аминокислотному составу величину изоэлектрической точки, равную для тиаминкиназы из мозга свиньи 6,21. Сходная усреднённая величина pI (6,22) найдена методом изоэлектрического фокусирования. Значение изоионной точки, измеренное в процессе диализа низких концентраций ферментного раствора и равное 6,28, подтверждает достоверность полученных результатов.

Молекулярная масса высокоочищенной тиаминкиназы из пивных дрожжей, определённая методом гель-фильтрации [4], равна 104000. Для фермента из листьев петрушки (гомогенный препарат) эта величина составила 28000 [14]. Что касается фермента из мозга свиньи, то активной формой тиаминкиназы, по данным гель-фильтрации, является димер с молекулярной массой 52000, распадающийся в присутствии додецилсульфата натрия на две субъединицы с молекулярными массами 26000. Сопоставление величин молекулярных масс очищенных киназ из разных источников могло свидетельствовать о существовании ассоциирующе-диссоциирующей системы олигомерных форм фермента с различными каталитическими свойствами.

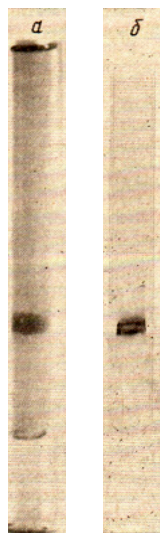


Рисунок 1 — Электрофорез высокоочищенного препарата тиаминкиназы в 7%-м полиакриламидном геле: а — 64 мкг белка на трубку, б — 22 мкг

Косвенным тому подтверждением является выявленное методом электрофореза (рис. 1) раздвоение нативного белка по мере его хранения или разведения в 3–5 раз.

Для проверки предположения о структурной гетерогенности киназы исследована зависимость степени поляризации собственной флуоресценции фермента от концентрации раствора. Согласно рис. 2, в результате увеличения концентрации белка повышается степень поляризации. Поскольку положение спектра и квантовый выход флуоресценции при этом не изменяются, то причиной указанных выше изменений степени поляризации фермента может быть увеличение степени ассоциации белковых молекул.

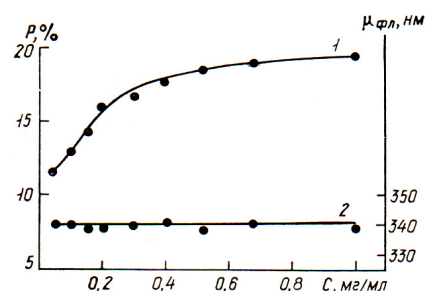


Рисунок 2 — Зависимость степени поляризации P (1) флуоресценции ( $\lambda_{\text{фл}}=340$  нм) и положения центра тяжести  $\mu_{\text{фл}}$  (2) от концентрации тиаминкиназы в 0,01 М трис-HCL буфере, pH 7,3, при  $\lambda_{\text{возб}}=296$  нм и  $T=293$  К.

Устойчивость олигомеров в значительной мере зависит от температуры. Кратковременное нагревание раствора фермента ( $C=0,9$  мг/мл) до температуры 50°C в течение 30 с, а затем быстрое охлаждение до комнатной температуры приводит к значительному падению степени поляризации флуоресценции. Так, при  $\lambda_{\text{возб}}=296$  и  $\lambda_{\text{фл}}=340$  нм степень поляризации уменьшается с 19 до 11%. Согласно данным измерений, проведенных через 30 мин после охлаждения, диссоциация была обратной — значения степени поляризации увеличились до исходной величины.

Из приведённых в таблице 1 результатов следует, что тиаминкиназа содержит в расчёте на одну субъединицу 2–3 тирозиновых и 8 триптофановых остатков, которые могут вносить вклад в образование спектра излучения. На рис. 3 приведены спектры поглощения и стационарной люминесценции фермента. Параметры излучения сведены в таблице 2. Коротковолновое положение максимума спектра флуоресценции и относительно малое значение полуширины спектра при  $\lambda_{\text{возб}}=296$  нм позволяют сделать вывод, что излучение образовано триптофанами класса 1 [3], для которых характерно гидрофобное окружение и локализация в интерьере белковой молекулы. При возбуждении 280 нм, когда в поглощение вносят вклад и остатки тирозина, максимум флуоресценции испытывает незначительный коротковолновый сдвиг (~1 нм), а квантовый выход уменьшается на 0,01. Эти изменения лежат в пределах точности измерений, поэтому можно заключить, что тирозин вносит

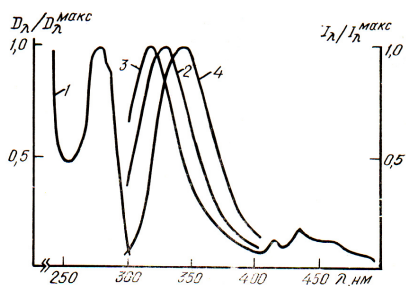


Рисунок 3 — Спектры поглощения (1) и люминесценции ( $\lambda_{\text{возб}}=296$  нм) (2–4) нативной тиаминкиназы в 0,01 М трис–HCl буфере, pH 7,3, до (1–3) и после денатурации белка 6 М мочевиной (4) при температурах 293 (1,2,4) и 77 К (3).

Таблица 2 — Спектрально-кинетические характеристики тиаминкиназы ( $\lambda_{\text{возб}}=296$  нм) в 0,01 М трис–HCl буфере

pH	293 К				77 К		
	$\lambda_{\text{фл}}$ , нм	$\Delta\lambda_{\text{фл}}$ , нм	B	$\bar{\tau}$ , нс	$\lambda_{\text{фл}}$ , нм	$\Delta\lambda_{\text{фл}}$ , нм	$\bar{\tau}$ , нс
7,3 <sup>1</sup>	327±0,5	52±1	0,13±0,01	2,45±0,05	317±0,05	45±1	5,3±0,1
7,3	328±0,5	53±1	0,14±0,01	2,55±0,05	317±0,05	45±1	-
7,3 <sup>2</sup>	335±0,5	56±1	0,08±0,01	1,54±0,03	-	-	-
7,3 <sup>3</sup>	344±0,5	59±1	0,17±0,01	2,92±0,05	320±0,5	48±1	-
3,5	332±0,5	57±1	0,12±0,01	2,20±0,05	-	-	-
11,0	334±0,5	58±1	0,11±0,01	1,90±0,05	-	-	-

$\lambda_{\text{возб}}=280$  нм;  $T=77$  К; <sup>3</sup> в 6 М мочевины.

крайне малый вклад в флуоресценцию белка даже при  $\lambda_{\text{возб}}$  равной 280 нм. Расчёт по методике, предложенной в [2], даёт близкое к нулю значение эффективности тирозин–триптофанового переноса энергии электронного возбуждения тиаминкиназы.

Квантовый выход и средняя длительность свечения фермента имеют более низкие значения, чем таковые для триптофана в нейтральных водных растворах [2]. Поскольку, как указывалось выше, триптофановые остатки не имеют контакта с водой, то необходимо признать решающую роль в тушении флуоресценции пептидной связи и соседних тушащих групп. Определённый вклад в уменьшении квантового выхода могут вносить и процессы гомопереноса энергии (триптофан–триптофан), приводящие к концентрационному тушению флуоресценции.

Замораживание растворов до 77 К приводит к значительному коротковолновому сдвигу максимума спектра флуоресценции (~10 нм), а также к появлению характерной триптофановой фосфоресценции с максимумами на 410, 435 и 460 нм (рис. 3). Обращает на себя внимание и малое значение относительной интенсивности фосфоресценции ( $I_{\text{фл}}^{317}/I_{\text{фосф}}^{435}=7,1$ ), в то время как для свободного триптофана в аналогичных условиях отношение интенсивности флуоресценции в максимуме к максимальной интенсивности фосфоресценции приблизительно равно 1,7. В результате добавления мочевины в концентрации 2,5 М уменьшается отношение  $I_{\text{фл}}/I_{\text{фосф}}$  в 5,6 раз и происходит незначительный длинноволновый сдвиг всего спектра (~2 нм). Аналогичный эффект наблюдается и после денатурации белка. Увеличение интенсивности фосфоресценции после денатурации можно объяснить следующим образом. В нативной молекуле тиаминкиназы излучающие триптофановые хромо-

форы расположены в недоступных воде и ионам солей гидрофобных участках. При денатурации значительно изменяется нативность структуры, вследствие чего хромофорные группы становятся доступными ионам солей. Как известно [2], агрегация индольных хромофоров с ионами солей приводит к значительному увеличению интенсивности фосфоресценции. Высокая чувствительность фосфоресценции к конформационным изменениям молекулы позволяет надеяться, что её параметры, наряду с флуоресцентными, могут быть с успехом использованы для исследования взаимодействия фермента с субстратом.

Для уточнения места локализации хромофоров тиаминкиназы и заряда окружения был использован метод избирательного тушения флуоресценции. Исследования показали, что присутствие в растворе белка отрицательно заряженных ионов Г в концентрации, менее 0,1 М при нейтральных pH не отражается на интенсивности флуоресценции. Это может быть следствием «экранирования» триптофанов отрицательно заряженными группировками. Малая эффективность тушения флуоресценции тиаминкиназы характерна и для положительно заряженных ионов  $C_s^+$ . Из приведённой на рис. 4 зависимости тушения флуоресценции белка от концентрации  $C_s^+$ , построенной в координатах Штерна–Фольмера, следует, что она не является линейной. Отметим также, что тушение флуоресценции тиаминкиназы ионами  $C_s^+$  носит динамический характер, то есть, процессы тушения полностью лимитируются диффузией. Такое заключение вытекает из совпадения кривых тушения, построенных на основании данных по квантовому выходу и длительности флуоресценции.

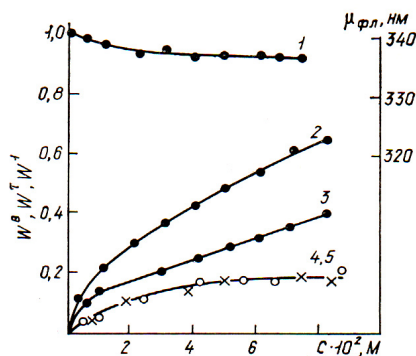


Рис. 4. Зависимость положения центра тяжести  $\mu_{\text{фл}}$  спектра флуоресценции (1) тиаминкиназы и эффективностей тушения  $W^B$  (2,5),  $W^I$  (3),  $W^Ф$  (4) от концентрации акриламида (2–4) и  $C_s^+$  (5)

В отличие от ионов Г и  $C_s^+$ , нейтральные молекулы акриламида являются эффективными тушителями триптофановой флуоресценции тиаминкиназы. Причём, как следует из приведённых на рис. 4 графиков, имеет место как динамическое, так и статическое (первого рода) тушение. В этом случае зависимость эффективности тушения от концентрации тушителя описывается следующим уравнением [5]:

$$W^B = \frac{B_0}{B} - 1 = (1 - \kappa^\tau \cdot C)(1 + \kappa^1 \cdot C) - 1, \quad (1)$$

где  $B_0$  и  $B$  — квантовые выходы флуоресценции, соответственно, в отсутствие и в присутствии тушителя;  $\kappa^\tau$  — константа динамического и  $\kappa^1$  — статического тушения. Если обозначить

$$W^\tau = \frac{\tau_0}{\tau} - 1 = \kappa^\tau \cdot C; \quad W^1 = \kappa^1 \cdot C$$

то уравнение (1) можно переписать в виде

$$W^B + 1 = (1 + W^\tau) \cdot (1 + W^1) \quad (2)$$

Согласно рассчитанному с помощью формулы (2) графику зависимости  $W^B$  от концентрации акриламида (рис. 4), триптофановые остатки тиаминкиназы имеют различные константы статического тушения. Вследствие отличий констант тушения флуоресценции различных триптофановых остатков белка акриламидом параллельно с уменьшением квантового выхода наблюдается коротковолновое смещение спектра излучения (рис. 4). Вероятно, хромофоры, имеющие относительно других длинноволновое положение спектра флуоресценции, расположены ближе к поверхности глобулы и более доступны нейтральным молекулам тушителя.

На рис. 5 приведены результаты исследования влияния температуры и pH на флуоресцентные характеристики тиаминкиназы. При увеличении температуры раствора нами отмечены длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции, а также значительное падение квантового выхода. Смещение спектра начинается при 40°C и достигает при 55°C ~7 нм. Квантовый выход уменьшается монотонно во всем исследованном интервале температур и, по видимому, отражает увеличение динамики триптофанилов и соседних тушащих групп. Дальнейшее увеличение внутримолекулярной подвижности при  $t > 40^\circ\text{C}$  приводит к разрыву водородных связей, в результате чего изменяется структура макромолекулы и полярность окружения хромофоров.

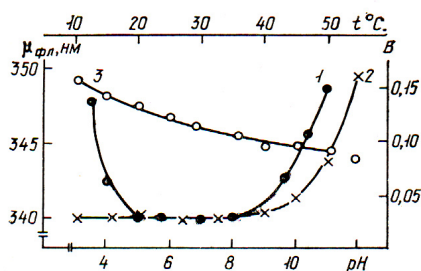


Рис. 5. Зависимость положения центра тяжести спектра  $\lambda_{\phi n}$  (1, 2) и квантового выхода  $B$  (3) флуоресценции ( $\lambda_{\text{всп}} = 296 \text{ нм}$ ) тиаминкиназы в 0,01 трис-НСL буфере от pH (1;  $T = 293 \text{ K}$ ) и температуры (2, 3; pH 7,3)

Структура тиаминкиназы стабильна в области pH 5–9. Это подтверждается неизменностью спектра флуоресценции (рис. 5). При изменении pH ниже 5 и выше 9 происходят значительные конформационные перестройки третичной структуры, приводящие к увеличению полярности микроокружения и, как следствие этого, длинноволновому сдвигу спектра триптофановой флуоресценции.

Таким образом, анализ полученных результатов позволяет сделать следующие **выводы**:

– Фермент существует во множественных олигомерных формах, находящихся в динамическом равновесии.

– Триптофановые остатки молекулы тиаминкиназы локализованы внутри глобулы в гидрофобном окружении. Они недоступны отрицательно заряженным ионам  $\Gamma$ , малодоступны положительно заряженным ионам  $C_s^+$  и доступны нейтральным молекулам акриламида. Физико-химические свойства окружения различных триптофанилов, влияющих на их излучательные характеристики, характеризуются заметной гетерогенностью.

– Спектральные исследования свидетельствуют о конформационной стабильности фермента при pH 5–9 и температурах менее 40°C.

#### Литература

1. Автоматизированный импульсный спектрофлуориметр / Г.А. Гачко [и др.] // Журн. приклад. спектроскопии. — 1987. — Т.47, №2. — С.335–339.
2. Бурштейн, Э.А. Люминесценция белковых хромофоров (модельные исследования) / Э.А. Бурштейн // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. — М.: ВИНТИ, 1976. — Т.6. — С. 171.
3. Бурштейн, Э.А. Собственная люминесценция белка / Э.А. Бурштейн // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. — М.: ВИНТИ, 1977. — Т. 7. — С. 187.
4. Воскобоев, А.И. Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиамина / А.И. Воскобоев, И.П. Черникович. — Минск.: Наука и техника, 1987. — 200с.
5. Лакович, Д. Основы флуоресцентной спектроскопии / Д.Лакович. — М.: Мир, 1986. — 469с.
6. Множественные формы АТФ: тиаминпирофосфотрансферазы из пивных дрожжей / И.П. Черникович [и др.] // Биохимия. — 1988. — Т.53, №10. — С.1728–1737.
7. Островский Ю.М. Тиамин / Ю.М. Островский. — Минск: Беларусь, 1971. — 153с.
8. Очистка и характеристика тиаминпирофосфокиназы из пивных дрожжей / А.И. Воскобоев [и др.] // Биоорган. химия. — 1975. — Т.1, №10. — С. 1728–1497.
9. Полтораки, О.М. Физико-химические основы ферментативного катализа / О.М. Полтораки, Е.С. Чухрай. — М.: Высшая школа, 1971. — 311 с.
10. Ригетти, П. Изозлектрическое фокусирование. Теория, методы и применение / П.Регетти. — М.: Мир, 1986. — 398 с.
11. Chromatography of amino acids on sulfonated polisterene resins. An improved system / S. Moore [et al.] // Anal. Chem. 1958. — V.30. — P. 1185–1206.
12. Disc electroforesis. Method and application to human serum protein / L. Ornstein [et al.] // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1964. — V.121. — P. 305–320.
13. Okazaki, K. Evidence for existence and a tentative identification of coenzyme in the yeast thiamine pyrophosphokinase / K. Okazaki // Biochem. and Biophys. Res. Comuns. — 1975. — V.64, №1. — P. 20–27.
14. Purification of and properties of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf / H. Mitsuda [et al.] // J. Nutr. Sci. Vitaminol. — 1975. — V.21, №2. — P. 103–115
15. Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase / R.M. Denton [et al.] // Mol. and Cell. Biochem. — 1975. — V.9, №1. — P.27–53.
16. The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophane in proteins / T.W. Goodwin [et al.] // Biochem. J. — 1946. — V.40, №4. — P. 628–632.
17. Ullrich, J. Yeast pyruvate decarboxylase (2-oxoacid carboxylase, EC 4.1.1.1). Assay of thiamine pyrophosphate / J. Ullrich // Method. Enzymol. — 1970. — V.18A. — P. 109–228.
18. Wakabayashi, Y. Thiamine Pyrophosphokinase from pig brain / Y. Wakabayashi // Vitamins. — 1978. — V.52, №5/6. — P.223–228.

Поступила 18.02.08