

УДК: 577.152.276 \*2.042.535.370

## ОСОБЕННОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТИАМИНКИНАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА СВИНЬИ, КОВАЛЕНТНО МЕЧЕНОЙ ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТОМ

Черникевич И. П. (*chemistry@grsmu.by*), Болтromeюк К. В. (*kirich.2.0.pro@mail.ru*),  
Вавренюк М. Ю. (*vavrenyuk-1997@mail.ru*)

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

*С использованием флуоресцентной метки (пиридоксаль-5'-фосфата) исследованы свойства и параметры тиаминокиназы (КФ 2.7.6.2) головного мозга свиньи при её взаимодействии с субстратами (тиамин, АТР), кофактором (ионами магния) и эффектором (пируватом). Показано, что молекула фермента содержит два быстрореагирующих центра связывания метки по  $\epsilon$ - или N-концевым  $\alpha$ -аминогруппам лизиновых остатков с  $K_S$  0,9 · 10<sup>3</sup> М-1. Модификация аминогрупп сопровождается выраженным увеличением скорости ферментативной реакции, причём характер изменения скорости свидетельствует о неоднозначности обоих участков. Активация тиаминокиназы меткой объясняется наличием в ней карбонильной группы и схожа по механизму с активацией пируватом. Пируват и субстрат фермента – тиамин, независимо от последовательности своего внесения, эффективно тушат флуоресценцию обоих типов хромофоров метки, указывая на функциональную взаимосвязь их центров сорбции, реализуемую посредством конформационных изменений белковой молекулы. Центры сорбции АТР и ионов металла пространственно удалены от метки.*

**Ключевые слова:** тиаминокиназа, головной мозг свиньи, флуоресцентный анализ.

Тиаминокиназа (КФ 2.7.6.2) катализирует начальный этап биотрансформации витамина В1 до его коферментной формы – тиаминдифосфата [8]. Методами стационарной и разрешенной во времени флуориметрии нами ранее показано [9], что активный центр фермента представляет собой гидрофобную полость, в которой субстраты – тиамин и АТР – сорбируются пиримидиновым и адениновым циклами. Кофакторы – ионы двухвалентных металлов – увеличивают сродство тиамина и АТР к белку, способствуя одновременно повышению гидрофобности его активного центра. Эффектор ферментативного процесса – пируват – имеет два центра связывания: ингибирующий (относительно гидрофобный) и активизирующий (гидрофильный). Последний находится в непосредственной близости с центром связывания тиамина и обеспечивает взаимодействие карбонильной группы пирувата с субстратом. Однако при этом остаётся не ясной причина ингибирования реакции другим важным интермедиатом клетки – фосфоенопируватом, у которого отсутствует гидрофобная метильная группа. Недостаточная интенсивность аналитического сигнала тушения флуоресценции тиаминокиназы, вызванная гетерогенностью излучающих хромофоров, не позволила нам одновременно рассмотреть и вопросы регуляторных возможностей молекулы белка [9], касающиеся конформационной подвижности отдельных её частей, предсказать расположение взаимодействующих компонентов в процессе катализа. Получить такого рода информацию часто удаётся с применением флуоресцентных меток или зондов, многократно усиливающих аналитический сигнал, связываясь непосредственно в области или в самих активных центрах ферментов.

В настоящей работе продолжено исследование структурной организации и динамики тиаминокиназы, в присутствии пиридоксаль-5'-фосфата, широко используемого красителя, особенности флуоресценции которого наиболее адекватно интерпретируются.

### Материалы и методы

Тиаминокиназу из головного мозга свиньи выделяли по описанной ранее методике [10]. Чистоту ферментного препарата контролировали методом диск-электрофореза в 7% полиакриламидном геле с использованием трис-глицинового электродного бу-

фера, рН 8.3, на приборе фирмы Reanal (Венгрия), модель 69. На заключительном этапе получали гомогенный белок, который хранили при 4°C без снижения ферментативной активности в течение 3-х дней. Активность фермента определяли по методу [18] с модификациями, указанными в работе [11]. Количество образовавшегося в тиаминокиназной реакции тиаминдифосфата находили при помощи апопируватдекарбоксилазы [14]. Активность рекомбинированной за 30 мин. при 20°C и рН 6.8 холопируватдекарбоксилазы, пропорциональную содержанию тиаминдифосфата в пробах, оценивали по убыли НАДН в присутствии алкогольдегидрогеназы [11]. Калибровочный график строили с хроматографически чистым препаратом тиаминдифосфата. Белок определяли по методу Лоури [15] и спектрофотометрически по поглощению при 280 нм. Удельную активность тиаминокиназы выражали в нмоль тиаминдифосфата, образовавшегося за 1 ч при 40°C в расчете на 1 мг белка ферментного препарата.

При оценке скорости биосинтеза тиаминдифосфата в присутствии аллостерического эффектора – пирувата в качестве акцептора пирофосфатных группировок вместо тиамина использовался меченый субстрат – [тиазол-2-14С] тиамин. В остальном состав инкубационной смеси идентичен описанному в работе [11]. После остановки реакции смесь разбавляли 0,02 М трис-НСl-буфером (рН 8.0) до 10 мл и разделяли на колонке (1,2x10 см) с ДЭАЭ-сефадексом А-25. Несвязавшийся [14С] тиаминдифосфат элюировали 25 мл 0.5 М НСl. Концентрацию [14С] тиаминдифосфата находили по известной удельной радиоактивности меченого тиамина. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике Mark- II (Nuclear Chicago, США). Активность фермента в этом случае выражали в условных единицах (имп/мин), учитывая, что биосинтез 1 нмоль тиаминдифосфата соответствует его радиоактивности 0,9 имп/мин.

Изменения структурной организации тиаминокиназы при взаимодействии с субстратами, ионами магния или пируватом регистрировали после 20 мин. преинкубации компонентов в среде определения. Количество пирувата или метки, связывающихся с белком, определяли методом гель-фильтрации на ко-

лонке (1,2x40 см) с сефадексом G-50 [5]. Число мест связывания и значения кажущихся констант связывания рассчитывали из зависимости  $\gamma/c$  от  $\gamma$ , где  $c$  – концентрация лиганда,  $\gamma$  – соотношение связанных лиганд/белок, моль/моль [17]. Присоединение пиридоксаль-5'-фосфата к молекуле тиаминкиназы проводили согласно методике [13]. Восстановление двойной связи осуществляли боргидридом натрия с последующим удалением избытка пиридоксаль-5'-фосфата гельфильтрацией через сефадекс G-50.

Спектры флуоресценции фиксировали на люминесцентной установке СДЛ-2 (ЛОМО, Россия), при этом спектральная ширина щелей не превышала 1нм. В ходе флуоресцентных исследований количество образца подбиралось таким образом, чтобы его поглощение при длине волны возбуждения не превышало 0,05 ОЕ. Спектры флуоресценции корректировали с учетом спектральной чувствительности флуориметра. Квантовый выход флуоресценции (В) определяли относительно водного раствора триптофана, для которого  $V=0,20$  [2]. Положение спектров собственной флуоресценции растворов белка и его комплексов с меткой определяли по величине отношения интенсивностей флуоресценции I315/I350 или I315/I370 и, соответственно, I370/I430, которые относятся к коротко- и длинноволновым краям спектров. Эффективность переноса энергии с остатков триптофана на пиридоксаль-5'-фосфат оценивали из отношения интенсивностей I400/I330, измеренных вблизи максимумов спектров флуоресценции акцептора и донора.

Измерение длительности флуоресценции производили на импульсном флуориметре [3]. Анализ регистрируемых кривых затухания с учетом длительности возбуждающего импульса и функции отклика системы регистрации (обращение сверток) производили с помощью специальной программы, реализующей метод Пауэлла [1]. Функцию затухания флуоресценции  $f(t)$  представляли в виде суммы  $i$  экспонент:

$$f(t) = \sum_{i=1}^3 a_i e^{-t/\tau_i},$$

где  $a_i$  и  $\tau_i$  – амплитуда и длительность затухания  $i$ -й компоненты свечения. Представление функции  $f(t)$  в виде одной экспоненты ( $i=1$ ) или суммы двух или трех экспонент ( $i=2,3$ ) осуществляли, исходя из минимума значений статистического критерия  $\chi^2$  временной зависимости функции распределения взвешенных остатков и их автокорреляционной функции [16]. Вклад  $i$ -й компоненты  $S_i$  в общее затухание флуоресценции определяли из соотношения:

$$S_i = a_i \tau_i / \sum_{i=1}^N a_i \tau_i,$$

где  $N=1,2,3$ . Для учета спектральной зависимости системы регистрации флуориметра использовали метод «эталонного» соединения [20]. В качестве таких соединений использовали  $p$ -терфенил (спектральная область 300-400 нм), и РОРОР ( $p$ -бис[2-(5-фенилосазолил)] бензол) (спектральная область 380-500 нм), имеющих экспоненциальное затухание флуоресценции [6]. Экспериментальные данные обрабатывали с помощью вычислительного комплекса ДВК-3.

### Результаты и обсуждение

Известно, что пиридоксаль-5'-фосфат ковалентно связывается с белками через азотиную связь по  $\epsilon$ -аминогруппам лизиновых остатков или по N-кон-

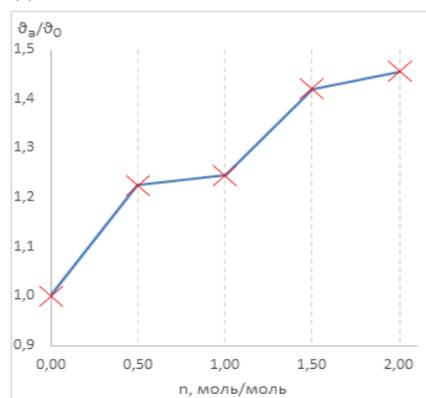
цевым  $\alpha$ -аминогруппам, образуя при этом Шиффово основание [12]. Для стабилизации комплекса фермент – пиридоксаль-5'-фосфат двойную связь восстанавливают боргидридом натрия. В зависимости от условий преинкубации пиридоксаль-5'-фосфата с тиаминкиназой (избыток пиридоксаль-5'-фосфата) нами получены разные концентрационные соотношения молекул белка и метки. В таблице 1 приведены флуоресцентные характеристики меченого фермента при соотношениях белок-метка, равных 2:1, 1:1, 1:1,5 и 1:2.

**Таблица 1.** – Флуоресцентные характеристики пиридоксаль-5'-фосфата в комплексах пиридоксаль-5'-фосфат – тиаминкиназа ( $\lambda$  возб 330 нм)

Белок: метка, моль/ моль	$I_{370}/I_{330}$	$I_{400}/I_{330}$	$P_{400/330}$	$P_{440/330}$	$P_{440/365}$	$P_{440/295}$	$\tau_i^{***}$		$S_2^{***}$
							$\tau_1^{***}$	$\tau_2^{***}$	
2:1	0,81	0,27	0,20	0,19	0,22	0,18	4,56	2,22	0,67
1:1	0,81	0,46	0,17	0,17	0,23	0,12	4,47	2,45	0,74
1:1,5	0,80	0,75	0,13	0,13	0,22	0,10	4,40	2,20	0,77
1:2	0,79	1,03	0,11	0,11	0,21	0,08	4,35	2,43	0,80
1:2	0,71**	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание: Условия определения : 0,01M трис-HCl-буфер (pH 7.3), T 293 K, [E] 0,24 M; \* $\lambda$  возб 295 нм, \*\*  $\lambda$  возб 365 нм, \*\*\* См. Материалы и методы

Определение количества участков связывания для пиридоксаль-5'-фосфата методом Скэтчарда показало, что молекула тиаминкиназы содержит быстро реагирующих центра связывания метки с  $K_S 0,9 \cdot 10^3 M^{-1}$ . Модификация аминокрупп белка приводит к выраженному увеличению скорости ферментативной реакции (рис.1), причем характер изменения скорости от концентрации метки свидетельствует о неоднозначности обоих участков связывания. Активация пиридоксаль-5'-фосфатом белковых молекул показана для ряда ферментных систем [19], но в отношении тиаминкиназы из пивных дрожжей [10] и мозга свиньи [11] известен лишь ингибирующий эффект органическими фосфатами, продуктами реакции (АМР, тиамидифосфатом) в концентрациях, значительно превышающих их физиологическое содержание. В этой связи увеличение скорости ферментной реакции при ковалентном связывании белка с пиридоксаль-5'-фосфатом, в эквимольных или близких к эквимольным концентрациях, ниже физиологических, очевидно, можно объяснить наличием в молекуле пиридоксаль-5'-фосфата карбонильной группы, причем механизмы активации реакции фосфорилирования тиамина меткой и пируватом могут быть сходными.



**Рисунок 1.** – Зависимость относительной скорости ферментативной реакции от мольного соотношения метка/белок в комплексе пиридоксаль-5'-фосфат – тиаминкиназа

Кривые затухания флуоресценции пиридоксаль-5'-фосфата, ковалентно связанного с тиаминкиназой, хорошо аппроксимируются суммой двух экспоненциальных членов с  $\tau_1=4,40$  и  $\tau_2=2,40$  нс (табл. 1). Исходя из этого можно предположить, что два компонента затухания свечения образованы хромофорами, локализованными в двух местах связывания с тиаминкиназой. Наличие сдвига спектра флуоресценции при переходе от длины волны возбуждения 330 к 365 нм указывает на различие спектров поглощения и излучения, связанных с белком молекул пиридоксаль-5'-фосфата. Кроме того, на длинноволновом краю спектра флуоресценции вклад короткоживущего компонента увеличивается, что означает, что хромофоры, имеющие меньшую длительность свечения, характеризуются более длинноволновым положением спектров флуоресценции и поглощения, чем хромофоры с большим временем жизни возбужденного состояния. Различие спектрально-кинетических свойств флуоресцентных меток отражает значительную гетерогенность центров связывания. Хромофоры, имеющие более длинноволновое поглощение и флуоресценцию, очевидно, расположены в более полярных областях белка. Они испытывают значительное динамическое тушение полярными белковыми группами, приводящее к уменьшению длительности их свечения. Второй центр связывания более гидрофобен и молекулы пиридоксаль-5'-фосфата, локализованные в нем, имеют коротковолновые спектры поглощения и флуоресценции (в дальнейшем будем называть их, соответственно, «гидрофобным» и «гидрофильным» центрами).

Оба центра имеют достаточно высокую нано- и субнаносекундную вращательную подвижность относительно белковой молекулы, о чем свидетельствуют невысокие, не превышающие 0,23, значения степени поляризации флуоресценции,  $P$  (табл. 1). Как видно из таблицы 1, увеличение относительной концентрации метки приводит к существенному уменьшению степени поляризации и длинноволновому смещению спектра излучения, если возбуждение осуществлялось в области максимума спектра поглощения. Кроме того, в этом случае заметно увеличивается (с 0,67 до 0,80) вклад гидрофильных центров, излучение которых характеризуется меньшей длительностью. Однако изменения степени поляризации при возбуждении флуоресценции в области 365 нм не наблюдается. Более того, при длинноволновом возбуждении прослеживается некоторое коротковолновое смещение спектра излучения.

Эти результаты показывают, что между метками осуществляется обмен энергией электронного возбуждения, имеющий преимущественно направленный характер от хромофоров с более коротковолновым спектром флуоресценции и большим  $t_{фл}$  к более длинноволновым с меньшим  $t_{фл}$ . Увеличение относительной концентрации пиридоксаль-5'-фосфата ведет к увеличению числа донорно-акцепторных пар. Данный вывод подтверждается уменьшением  $\tau_1$  и увеличением  $\tau_2$  при повышении соотношения фермент-пиридоксаль-5'-фосфат (табл. 1), а также зависимостью  $P = f(\lambda_{фл})$  (рис. 2).

При длине волны возбуждения 365 нм, когда перенос энергии между метками маловероятен, степень поляризации не зависит от соотношения фермент – пиридоксаль-5'-фосфат (табл. 1). Поскольку в этом случае было обнаружено коротковолновое смещение спектра излучения по мере увеличения концентрации

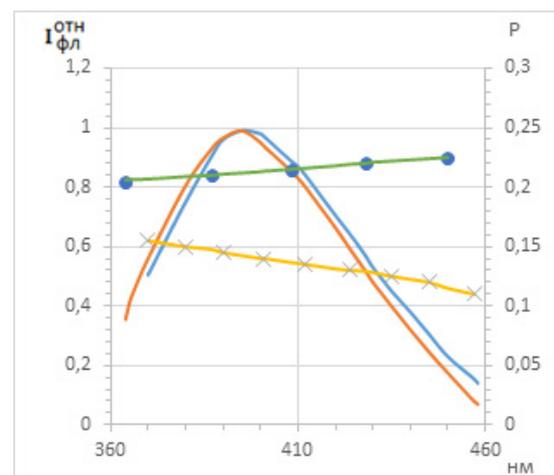


Рисунок 2. – Спектры флуоресценции (1, 2) и спектральная зависимость степени поляризации (3, 4) комплекса пиридоксаль-5'-фосфат – тиаминкиназа в 0,01 М трис-НСI-буфере (рН 7.3) при  $\lambda_{возб}$  340 (1,3) и 360 нм (2,4)

пиридоксаль-5'-фосфата, можно заключить, что гидрофобный зонд имеет несколько меньшую константу связывания.

Расстояние между центрами связывания меток,  $R$ , можно оценить, воспользовавшись формулой Ферстера для диполь-дипольного переноса энергии:

$$R^6 = R_0^6 / (\tau_0 / \tau - 1),$$

где  $R_0$  – критический радиус переноса, рассчитываемый из перекрытия спектров поглощения и излучения [4],  $\tau$  и  $\tau_0$  – длительность флуоресценции доноров (в нашем случае меток в «гидрофобном» центре) в присутствии и в отсутствие акцепторов. Предполагая, что  $\tau_0=4,6$ , а  $\tau=4,3$  нс, т. е., что при соотношении фермент – пиридоксаль-5'-фосфат, равном 1:2, имеет место насыщение молекул тиаминкиназы донорно-акцепторными парами, получим  $R=17,9$  Å.

Помимо описанного выше обмена энергией между центрами связывания пиридоксаль-5'-фосфата в модифицированной тиаминкиназе наблюдается также перенос энергии электронного возбуждения от триптофановых остатков на метку. Это проявляется в сильном уменьшении степени поляризации флуоресценции метки при длине волны возбуждения 295 нм в области поглощения остатков триптофана белка (табл. 1). Перенос энергии приводит к значительному уменьшению длительности флуоресценции триптофановых остатков.

Наиболее значительный перенос энергии наблюдается для триптофанилов третьего типа [7], локализованных в наиболее гидрофобном окружении (табл. 2). При соотношении фермент – пиридоксаль-5'-фосфат, равном 1:2, вклад в излучение триптофанилов этого типа при  $\lambda_{фл} = 330$  нм уменьшается с 0,26 до 0,08, причём изменение интенсивности соответствует изменению длительности свечения. К сожалению, количественно оценить расстояния между остатками триптофана и метками белка практически невозможно из-за мультидонорности, т. е. значительной гетерогенности самой системы. В то же время необходимо отметить, что рассчитанный по формуле Ферстера критический радиус  $R_0$  диполь-дипольного переноса энергии с остатков триптофана тиаминкиназы на пи-

**Таблица 2.** – Параметры кинетики собственной флуоресценции тиаминкиназы ( $\lambda_{\text{возб}} 296$ ,  $\lambda_{\text{фл}} 330$  нм) при её ковалентном связывании с пиридоксаль-5'-фосфатом

Комплекс	$\tau_1^*$	$\tau_2$	$\tau_3$	$S_1$	$S_2$	$S_3$
	нс					
Фермент	6,39	3,21	1,03	0,332	0,413	0,260
Фермент - пиридоксаль-5'-фосфат (1:2)	4,02	1,47	0,31	0,282	0,630	0,080

Примечание: Условия определения см. в подписи к табл.1; \* См. Материалы и методы

ридоксаль-5'-фосфат равен 20,8 Å. Это расстояние сравнимо с размерами молекулы белка и в этой связи можно было ожидать полного тушения триптофановой флуоресценции фермента пиридоксаль-5'-фосфатом. Поскольку этого не происходит, следует полагать, что некоторые триптофаны имеют по отношению к молекулам метки неблагоприятное для переноса энергии пространственное расположение.

Результаты по воздействию субстратов и эффекторов на флуоресценцию меченой пиридоксаль-5'-фосфатом тиаминкиназы приведены в таблице 3. В качестве параметров, характеризующих флуоресцентные свойства метки, выбраны интенсивность свечения на коротковолновом ( $I_{380}$ ) и длинноволновом ( $I_{450}$ ) краях спектра и степень поляризации ( $P_{330}^{440}$ ). Представленные данные показывают, что субстраты (главным образом АТР) тушат флуоресценцию «гидрофильной» метки, указывая на её локализацию вблизи активного центра. При этом каких-либо изменений конформации белка в областях связывания меток не обнаруживается, о чём свидетельствуют неизменность  $P_{330}^{440}$  и одинаковые значения параметра  $I_{450}$  при длинах волн возбуждения 330 и 360 нм. Внесение в раствор тиаминкиназы ионов магния, оказывающих стабилизирующее воздействие на структуру макромолекулы, приводит к тушению флуоресценции меток, находящихся в обоих центрах связывания.

Как отмечалось ранее [9], пируват имеет два центра связывания на молекуле фермента, которые, очевидно, являются регуляторными. Из таблицы 3 видно, что взаимодействие пирувата с тиаминкиназой, меченой пиридоксаль-5'-фосфатом, приводит к эффективному тушению флуоресценции обоих типов хромофоров метки, которое может быть следствием близости их центров связывания и обусловлено переносом энергии на тушитель. Последующее после пирувата присоединение к белку субстрата, тиаминна, способствует дальнейшему тушению свечения гидрофобных меток и ослаблению тушения гидрофильных, что проявляется в снижении параметра  $I_{380}^{380}$  с 0,92 до 0,89 и увеличением параметра  $I_{450}^{360}$

### Литература

1. Башарин, С. К. Разложение свёртки кривых затухания флуоресценции / С. К. Башарин, Г. А. Гачко, Л. Н. Кивач // Журн. прикладной спектроскопии. – 1990. – Т.52, №1. – С.48-52.
2. Бурштейн, Э. А. Люминесценция белковых хромофоров (модельные исследования) // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – М.: ВИНТИ, 1976. – Т.6. – 171с.
3. Гачко, Г. А. Автоматизированный импульсный спектрофлуориметр / Г. А. Гачко, В. К. Зыбельт, Л. Н. Кивач // Журн. прикладной спектроскопии. – Т.47, №2. – С.335-339.

**Таблица 3.** – Влияние субстратов и эффекторов на параметры флуоресценции комплекса тиаминкиназа - пиридоксаль-5'-фосфат (1:1)

Добавленный к комплексу реагент	* $I_{380}$	** $I_{450}$	* $I_{450}$	
-	1,00	1,00	1,00	0,17
АТР	1,00	0,93	0,93	0,17
Тиамин	1,02	0,98	0,98	0,17
$Mg^{2+}$	0,96	0,90	0,92	0,16
$Mg^{2+}$ + АТР	0,96	0,94	0,97	0,17
Пируват	0,92	0,86	0,85	0,17
Пируват + тиамин	0,89	0,95	0,92	0,17

Примечание: [Тиамин] = 10-5М, [АТР] = [Mg2+] = [Пируват] = 10-3М. Условия определения см. в подписи к табл.1; \*  $\lambda_{\text{возб}} 330$  нм. \*\*  $\lambda_{\text{возб}} 360$  нм

с 0,86 до 0,95. Изменения флуоресцентных характеристик связанной с тиаминкиназой метки (пиридоксаль-5'-фосфата) при внесении в среду инкубации тиаминна и пирувата не зависят от последовательности добавления субстрата или эффектора. Одновременно следует отметить, что эти изменения не аддитивны тем, которые наблюдаются при взаимодействии фермента отдельно с тиаминном и пируватом. Это указывает на то, что центры их адсорбции находятся в функциональной взаимосвязи, которая реализуется посредством конформационных изменений белковой молекулы.

### Выводы

1. Флуоресцентная метка, пиридоксаль-5'-фосфат, связывается по двум быстрореагирующим центрам молекулы тиаминкиназы с  $K_S 0,9 \cdot 10^3$  М-1. Модификация белковой глобулы сопровождается увеличением скорости ферментативной реакции, причём характер изменения скорости от концентрации метки свидетельствует о неоднозначности обоих участков связывания.
2. Активация тиаминкиназы меткой объясняется наличием в ней карбонильной группы и, вероятно, схожа по механизму с активацией пируватом.
3. Центры сорбции аллостерического эффектора, пирувата, и субстрата, тиаминна находятся в функциональной взаимосвязи, которая реализуется посредством конформационных изменений белковой молекулы.
4. Центры сорбции второго субстрата, АТР и ионов кофактора, магния, активного центра не реагируют на локальные изменения в области связывания метки.

### Литература

1. Basharin, S. K. Decomposition fold fluorescence decay curves / S. K. Basharin, G. A. Gachko, L. N. Kivach // Journal. Applied Spectroscopy. - 1990 - Т.52, №1. - С.48-52.
2. Burstein, EA. Luminescence of protein chromophores (modeling studies) // Results of science and technology. Ser. Biophysics. - М.: ВИНТИ, 1976. - V.6. - 171s.
3. Gachko, G. A. Automated switching Spectrofluorometer / G. A. Gachko, V. K. Zybelt, L. N. Kivach // Journal. Applied Spectroscopy. - Т.47, №2. - С.335-339.
4. Ermolaev VL. Nonradiative energy transfer of electronic excitation / V. L. Ermolaev, E. I. Bodunov,

4. Ермолаев, В. Л. Безизлучательный перенос энергии электронного возбуждения / В. Л. Ермолаев, Е. И. Бодунов, Е. Б. Свешникова. – Л.: Наука, 1977. – 328с.
5. Керридж, Д. Биохимическая логика / Д. Керридж, К. Типтон. – М.: Мир, 1974. – 328с.
6. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович. – М.: Мир, 1986. – 496с.
7. Маскевич, А. А. Флуоресцентные исследования внутримолекулярной подвижности тиаминкиназы из пивных дрожжей / А. А. Маскевич, И. П. Черникевич, С. А. Маскевич // Журн. физ. химии. – 1990. Т. 64, №8. – С. 2162-2168.
8. Островский, Ю. М. Тиамин / Ю. М. Островский. – Мн.: Беларусь, 1971. – 144с.
9. Черникевич, И. П. Спектрально-кинетические исследования структуры и динамики тиаминкиназы головного мозга свиньи / И. П. Черникевич // Журн. ГрГМУ. – 2015 - №2. – С.63-60.
10. Черникевич, И. П. Сравнительный кинетический анализ тиаминкиназ из пивных дрожжей и головного мозга свиньи / И. П. Черникевич // Журн. ГрГМУ. – 2011.- № 3. – С.25-28.
11. Черникевич, И. П. Ферментные системы биотрансформации активных форм витамина В1 (структура, свойства, регуляция): автореф. дис. ... докт. хим. наук: 03.00.04 / И. П. Черникевич; Минск. ин-т биоорганической химии. – Минск, 1996. – 32с.
12. Черницкий, Е. А. Спектральный люминесцентный анализ в медицине / Е. А. Черницкий, Е. И. Слабожанина. – Мн. : Наука и техника, 1989. – 141с.
13. Chang, S.I. Amino acid sequences of pyridoxal-5'-phosphate binding sites and fluorescence resonance energy transfer in chicken liver fatty acid synthase / S. I. Chang, G. G. Hammes // Biochemistry. – 1989. – V.28, №9. – P.3787-3788.
14. Kaziro, Y. Quantitative determination of thiamine pyrophosphate using apocarbaxylase and alcohol dehydrogenase / Y. Kaziro // J. Biochem. – 1957. – V.44, № 7. – P.827-838.
15. Lowry, O. N. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. N. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr // J. Biol. Chem. – 1951. – V.193. – P.265-275.
16. O'Connor, D. V. Time-correlated Single Photon Counting // D. V. O'Connor, D. Phillips // Acad. Press. – 1984. – P.283.
17. Scatchard, C. The attractions of proteins for small molecules and ions / C. Scatchard // Ann. Molec. Inter.– 1949. – V.51, № 4. – P.573-582.
18. Ullrich, J. Assay of thiamine pyrophosphate / J. Ullrich // Methods Enzymol. – 1970. – V.18 A. – P.109-115.
19. Viljoen, C. C. Histidine and lysine residues and the activity of phospholipase A2 from the venom of Bitis Gabonica / C. C. Viljoen, L. Visser, P. P. Boten // Biochim. Biophys. Acta. – 1977. – V.483, № 1. – P.107-120.
20. Voss, K. Application of a reference convolution method to tryptophane fluorescence in proteins / K. Voss, A. Hock, A. J. W. G. Visser // Eur. J. Biochem. – 1987. – V.165, № 1. – P.55-63.
- E.B.Sveshnikova. - L. : Nauka, 1977. - 328s.
5. Kerrizhd, D. Biochemical logic / D. Kerrizhd, K. Tipton. - M?.: Mir, 1974. - 328s.
6. Lakovich, George. Fundamentals of fluorescence spectroscopy / J. Lakovich. - M: Mir, 1986. - 496s.
7. Maskevich, A. A. Fluorescent study of intramolecular mobility of brewer's yeast tiaminkinazy / A. A. Maskevich, I. P. Chernikevich, S. A. Maskevich // Journal. nat. chemistry. - T.64 1990, №8. - С. 2162-2168.
8. Ostrovsky, Y. M. Thiamine / Yu. M. Ostrovsky. - Mn. : Belarus, 1971. - 144с.
9. Czernikiewicz, I. P. Spectral and kinetic studies of the structure and dynamics of the brain tiaminkinazy pig / I.P.Chernikevich // Journal. GSMU. - 2015 - №2. - С.63-60.
10. Chernikevich, I. P. Comparative kinetic analysis tiaminkinaz of brewer's yeast and porcine brain/I.P.Chernikevich // Journal. GSMU. - 2011.- №3. - S.25-28.
11. Czernikiewicz, I.P. Enzymatic biotransformation of the active form of vitamin B1 (structure, properties, regulation): Abstract. Dis. ... Doctor. chemical. Sciences: 03.00.04 / I. P. Chernikevich; Minsk. Institute of Bioorganic Chemistry. - Minsk, 1996. - 32с.
12. Chernitskii, E. A. Spectral luminescent analysis in medicine / E. A. Chernitsky, E.I.Slabozhanina. - Mn. Science and Technology, 1989. - 141с.
13. Chang, S. I. Amino acid sequences of pyridoxal-5'-phosphate binding sites and fluorescence resonance energy transfer in chicken liver fatty acid synthase / S. I. Chang, G. G. Hammes // Biochemistry. – 1989. – V.28, №9. – P.3787-3788.
14. Kaziro, Y. Quantitative determination of thiamine pyrophosphate using apocarbaxylase and alcohol dehydrogenase / Y. Kaziro // J.Biochem. – 1957. – V.44, № 7. – P.827-838.
15. Lowry, O. N. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. N. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr // J. Biol. Chem. – 1951. – V.193. – P.265-275.
16. O'Connor, D. V. Time-correlated Single Photon Counting // D. V. O'Connor, D. Phillips // Acad. Press. – 1984. – P.283.
17. Scatchard, C. The attractions of proteins for small molecules and ions / C. Scatchard // Ann. Molec. Inter.– 1949. – V.51, № 4. – P.573-582.
18. Ullrich, J. Assay of thiamine pyrophosphate / J. Ullrich // Methods Enzymol. – 1970. – V.18 A. – P.109-115.
19. Viljoen, C. C. Histidine and lysine residues and the activity of phospholipase A2 from the venom of Bitis Gabonica / C. C. Viljoen, L. Visser, P. P. Boten // Biochim. Biophys. Acta. – 1977. – V.483, № 1. – P.107-120.
20. Voss, K. Application of a reference convolution method to tryptophane fluorescence in proteins / K. Voss, A. Hock, A. J. W. G. Visser // Eur. J. Biochem. – 1987. – V.165, № 1. – P.55-63.

## PECULIARITIES OF FLUORESCENCE OF THIAMINE KINASE COVALENTLY LABELED WITH PYRIDOXAL-5-PHOSPHATE IN PIG BRAIN

*Chernikievich I. P., Baltrameyuk K. V., Vavraniuk M. Y.*

Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

---

*The properties and parameters of pig brain thiamine kinase (EC 2.7.6.2) during its interaction with substrates (thiamine, ATP), cofactor (magnesium ions) and effector (pyruvate) have been studied with the use of a fluorescent label, (pyridoxal-*

5'-phosphate). It has been shown that enzyme molecule contains two rapidly reacting centers binding the mark by  $\epsilon$ - or N-terminals of lysine  $\alpha$ -amino residues with  $K_s$  of  $0,9 \cdot 10^3$  M-I. Modification of amino groups is accompanied by marked increase in enzymatic reaction rate, the rate variation indicating ambiguity of both sites for modification. Thiamine kinase activation with labeling may be explained by the presence of carbonyl group in it and is similar to pyruvate labeling activation by the mechanism. Pyruvate and enzyme substrate —thiamine effectively inhibit the fluorescence of both reacting centers of chromophore labels regardless of their entry sequence which indicates functional relationship between sorption sites, realized through protein molecule conformation changes. Sorption sites for ATP and magnesium ions are spatially distant from the label.

**Keywords:** thiamine kinase, pig brain, fluorescence analysis.

---

Поступила: 05.02.2016

Отрецензирована: 08.02.2016