

РОЛЬ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП В ПРОЯВЛЕНИИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ТИАМИНКИНАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА СВИНЬИ

Черникевич И. П. (chemistry@grsmu.by), Вавренюк М. Ю. (vavrenyuk1997@mail.ru),
Болтromeюк К. В. (kirich.2.0.pro@mail.ru)

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

С использованием меркаптидообразующих реагентов, $HgCl_2$ и *n*-хлормеркурибензоата, определено количество и реакционная способность SH-групп тиаминкиназы головного мозга свиньи. Показано, что молекула фермента содержит два типа сульфидрильных групп: одну легкодоступную, быстро взаимодействующую и вторую – частично скрытую, «вяло» реагирующую. Модификация *n*-хлормеркурибензоатом SH-группы первого типа приводит к 36% снижению скорости ферментативной реакции, второго – к полной инактивации тиаминкиназы. Из-за разной химической природы меркаптидообразующие реагенты различаются эффективностью блокирующего действия. Если *n*-хлормеркурибензоат в эквивалентных с белком соотношениях формирует одну химическую связь: белок-S-HgR, – то $HgCl_2$, вероятно, две. Субстрат – тиамин, но не АТФ, а ионы магния лишь частично защищают тиаминкиназу от инактивирующего действия *n*-хлормеркурибензоата. Можно полагать, что SH-группы не принимают прямого участия в процессе биотрансформации витамина В1, а локализованы в участках сорбции активного центра белка, стабилизируя его структуру.

Ключевые слова: тиаминкиназа, головной мозг свиньи, химическая модификация, SH-группы

Тиаминкиназа (АТФ: тиаминпирофосфотрансфераза, КФ 2.7.6.2) превращает тиамин в его пирофосфорный эфир, который выполняет коферментную функцию в метаболизме α -кетокислот, жирных кислот с разветвленной цепью и транскетолазной реакции пентозофосфатного пути. До настоящего времени большинство исследований по поиску функционально важных аминокислотных остатков тиаминкиназы (сульфидрильных, имидазольных, аминогрупп) было выполнено с использованием их специфических ингибиторов с синхронной регистрацией уровня ферментативной активности. Показано, что фермент, выделенный из разных органов животных, полностью инактивируется тиоловыми реагентами [8, 12], на основании чего высказывалось мнение о принадлежности тиаминкиназы к классу SH-ферментов [12]. Аналогичные результаты получены при изучении тиаминкиназы из листьев петрушки. Незначительная потеря каталитической активности при действии *n*-хлормеркурибензоата и реагента Элмана на фермент из пивных и пекарских дрожжей, наоборот, свидетельствовала о мирной роли в нем остатков цистеина [2, 11].

С использованием реагента Элмана нами ранее анализировалась биологическая функция цистеиновых остатков тиаминкиназы головного мозга свиньи в синтезе тиаминпирофосфата [6]. Блокирование первой из двух обнаруженных SH-групп приводило к полной потере ферментативной активности. Эти и другие полученные данные указывали на важную роль тиоловых взаимодействий в молекуле глобулы. Однако известно немало случаев [3], когда 100% торможение при действии реагентов ошибочно приписывали функциональной значимости модифицируемых остатков. При более тщательном исследовании выяснялось, что эффект обусловлен не каталитической ролью самих SH-групп, а природой молекулы используемого ингибитора (его размерами, зарядом). Для уточнения и конкретизации получаемых результатов с учётом многообразия реакций, в которые вступают высокореакционно-способные сульфидрильные группы, в последнее время всё чаще применяют разные по механизму действия и объёму реагенты.

Данная работа предпринята в целях дальнейшего изучения роли цистеиновых остатков тиаминкиназы с помощью меньших по размеру, чем реагент Элмана,

на, меркаптидообразующих тиоловых ингибиторов.

Материалы и методы

Тиаминкиназу выделяли из головного мозга свиньи и очищали до гомогенного состояния по разработанной ранее методике [5]. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически при 280 нм. Активность измеряли по количеству синтезированного в течение 1 ч при 37°C тиаминпирофосфата. Состав инкубационной смеси: АТФ – 1 мкмоль; тиамин – 0,1 мкмоль; $MgSO_4$ – 10 мкмоль; трис-НСl буфер рН 8,6 – 0,05 ммоль. Объём пробы: 1 мл. Количество кофермента определяли ферментативно с помощью апопируватдекарбоксилазы, выделенной из пивных дрожжей [9], и алкогольдегидрогеназы, полученной из дрожжей фирмы «Reanal» (Венгрия). Скорость реакции регистрировали по убыли НАДН при 340 нм на двухлучевом спектрофотометре "Perkin – Elmer" типа 402 (Швеция). При исследовании способности субстратов защищать фермент, концентрации АТФ, тиамин и Mg^{2+} не отличались от используемых в инкубационной пробе при проведении реакции.

Содержание SH-групп в тиаминкиназе определяли спектрофотометрическим титрованием по методу Бойера [7], а также при помощи $HgCl_2$. Для этого 2 мг *n*-хлормеркурибензоата растворяли в 0,1 мл 0,1 н NaOH, добавляли 9,9 мл 0,2 М фосфатного буфера рН 7,0 с последующим фильтрованием. Концентрацию *n*-хлормеркурибензоата находили путём измерения поглощения при 232 нм, принимая молярную экстинкцию при этой длине волны и рН 7,0 равной $1,69 \cdot 10^4$ [7]. $HgCl_2$ растворяли в 0,2 М фосфатном буфере рН 7,0. В обоих случаях при блокировании SH-групп за ходом реакции следили по приросту поглощения при 250 нм. Молярную экстинкцию образующегося меркаптида принимали равной 7600 [7]. В кювету сравнения, содержащую буферный раствор, добавляли равные количества реагента. Экстинкцию измеряли на однолучевом спектрофотометре VSU-2P (Германия).

Общее количество доступных и замаскированных SH-групп измеряли после 16 ч инкубации белка с денатурирующими агентами – 8 М мочевиной или 0,5% раствором додецилсульфата натрия. Влияние степени модификации на скорость тиаминкиназной реакции исследовали путём тестирования ферментативной активности в процессе титрования. В работе использовали *n*-хлормеркурибензоат – «Chemapol» (Чехия),

дитиотреитол – «Sigma» (США), додецилсульфат натрия – «Merck» (Германия), АТФ – «Reanal» (Венгрия). Остальные реактивы фирмы «Реахим» (Россия).

Результаты и их обсуждение

Данные, полученные в предыдущей работе [6] с использованием абсолютно специфичного сульфгидрильного реагента Элмана – 5,5'-дитиобис – (2-нитробензойной кислоты), – свидетельствовали в пользу важной структурной функции тиоловых групп тиаминкиназы. Однако наличие публикаций [3, 4] о возможном пространственном воздействии объёмных молекул присоединившихся ингибиторов, способных снижать или блокировать доступ субстратам, кофакторам, эффекторам к активным центрам ферментов, требует осторожности в интерпретации конечных результатов. В настоящей работе в качестве другого тиолового реагента был выбран небольшой по размеру $HgCl_2$, избирательно реагирующий, особенно в малых концентрациях, с SH-группами белков с образованием меркаптидов, регистрируемых при 250 нм.

На рис. 1 представлены результаты инкубации тиаминкиназы с $HgCl_2$ в 8 М мочевины. В реакцию меркаптидирования на димер фермента, как и при взаимодействии его с 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислотой), вступают 2 тиоловые группы.

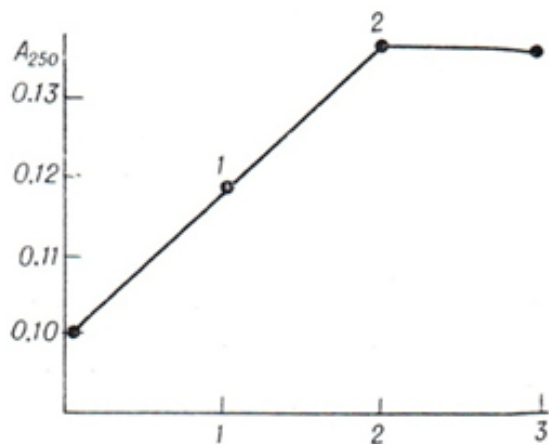


Рисунок 1. – Изменение оптической плотности в зависимости от количества добавленных эквивалентов $HgCl_2$ в присутствии 8 М мочевины. По оси абсцисс эквивалент $HgCl_2$. Концентрация белка 2,3 мкМ. Цифры у стрелок – число модифицированных SH-групп

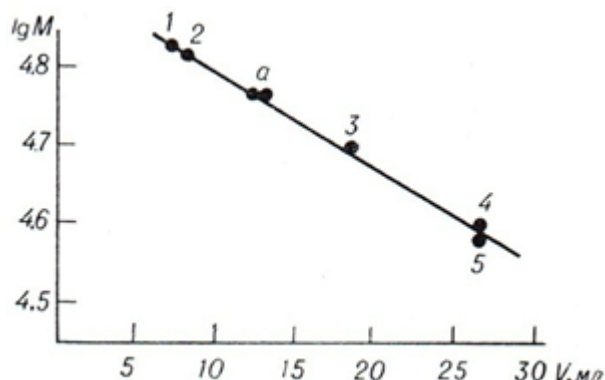


Рисунок 2. – Определение молекулярной массы модифицированной $HgCl_2$ тиаминкиназы. Маркеры: 1 – альбумин (молекулярная масса 65000); 2 – гемоглобин (67000); 3 – щелочная фосфатаза (100000); 4 – пероксидаза (140000); 5 – дрожжевая алкогольдегидрогеназа (150000); а – нативная и обработанная сулемой тиаминкиназа

Следует отметить, что при использовании в качестве сульфгидрильного реагента $HgCl_2$ нельзя быть уверенным в типе возникающей связи, так как это соединение, в зависимости от пространственного расположения SH-групп белка, может образовывать производные двух типов: 1) белок – S – $HgCl$ и 2) (белок – S)₂ – Hg [4]. При титровании нативной тиаминкиназы оказалось, что 0,5 моля $HgCl_2$ полностью инактивировали 1 моль фермента. Эти данные позволили предположить, что молекула сулемы реагирует как бифункциональный ингибитор и взаимодействует с легкодоступными, но локализованными в разных молекулах, меркаптогруппами одного типа. Если это так, то процесс должен сопровождаться удвоением молекулярной массы фермента. Однако, как видно из рис. 2, модифицированная сулемой и нативная тиаминкиназа выходит из колонки, заполненной сефадексом G-200 (30×0,8 см) и откалиброванной белками с известной молекулярной массой, в одном объеме, что свидетельствует об отсутствии образования димерной формы. Ранее было показано [1], что обработка тиаминкиназы $HgCl_2$ (10-7М) приводит к превращению S-образной зависимости скорости реакции от концентрации ионов магния в обычную гиперболу Михаэлиса. Таким образом, не исключено, что в данном случае более высокие концентрации $HgCl_2$ взаимодействуют и внутримолекулярно с SH-группами и с аллостерическими центрами, приводя к полной потере каталитической активности фермента.

Избирательность действия $HgCl_2$ контролировали реактивацией дитиотреитолом (1 мМ, 30 мин.), которая составляла в среднем 75-80% начальной активности. Внесение следующего полумолярного количества сулемы с последующим удалением реагента приводило почти к такому же восстановлению исходной активности. При дальнейшем титровании её величина резко снижалась (до 30%), что свидетельствует о необратимых конформационных изменениях молекулы. При этом возможна и неспецифичность взаимодействия избыточных количеств $HgCl_2$ с другими функциональными группами тиаминкиназы. Субстраты в любых комбинациях не защищали фермент от инактивации.

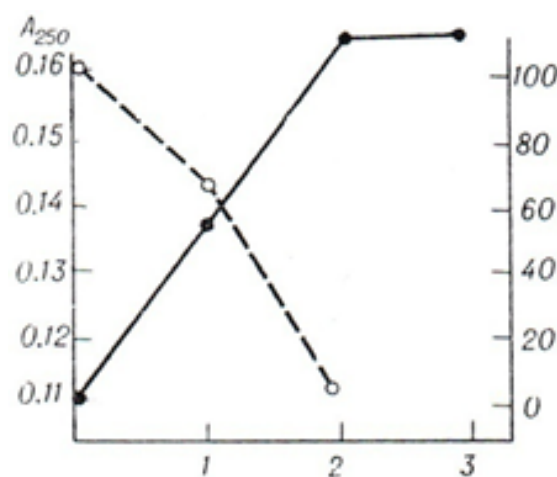


Рисунок 3. – Спектрофотометрическое титрование тиаминкиназы головного мозга свиньи n-хлормеркурибензоатом. По оси абсцисс – эквиваленты n-хлормеркурибензоата; по оси ординат справа – оптическая плотность, слева – активность (в % от исходной). Концентрация белка 3,6 мкМ. Реакция протекала в 20 мМ фосфатном буфере pH 7,0

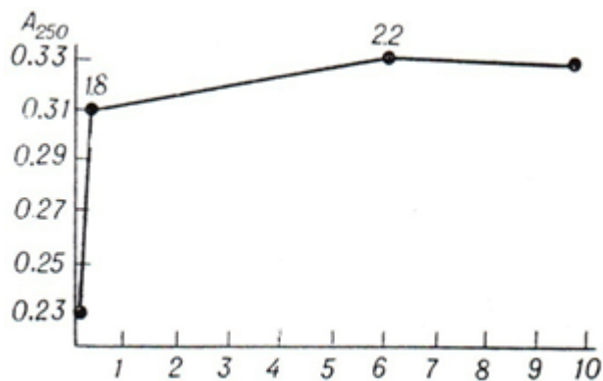


Рисунок 4. – Спектрофотометрическое титрование тиаминкиназы п-хлормеркурибензоатом в присутствии 0,5% раствора додецилсульфата натрия. По оси абсцисс – время (в мин.); по оси ординат – оптическая плотность. Концентрация белка 5 мкМ. Реакция протекала в 20 мМ фосфатном буфере рН 7,0. Цифры у стрелок – число модифицированных SH-групп

В связи с указанной неоднозначностью механизма взаимодействия HgCl₂ с белком и, следовательно, трудностью интерпретации результатов изучения реакционной способности и роли различных SH-групп тиаминкиназы мы применили другой монофункциональный высокоспецифичный реагент – п-хлормеркурибензоат, результаты титрования которым представлены на рис. 3. Видно, что две титруемые SH-группы различаются по реакционной способности. Если первая легкодоступна и взаимодействует с п-хлормеркурибензоатом практически мгновенно (в течение 30 с), вызывая торможение активности на 30-40%, то образование второй меркаптидной связи протекает около 10-15 мин., приводя к полному исчезновению каталитической активности глобулы. Инкубация фермента с дитиотрептолом (200-кратный избыток, 30 мин.), после взаимодействия с одним эквивалентом п-хлормеркурибензоата оканчивается 70-75% реактивацией и остаётся постоянной в течение 20 мин. Восстановление 56-65% исходной активности в тех же условиях наблюдали и после модификации второй, слегка маскированной SH-группы. Вероятно, в результате её блокирования происходит более глубокая трансформация белковой молекулы. Количество определяемых сульфгидрильных групп не изменялось и когда реакция протекала в 8 М мочеvine или 0,5% растворе додецилсульфата натрия. В присутствии детекторов обе группы становились легкодоступными и титрование практически полностью завершалось в течение 20-30 с (рис. 4)

Таблица – Защита субстратами и ионами магния тиаминкиназы от действия п-хлормеркурибензоата и 5,5-дитиобис (2-нитробензойной кислоты)

Субстраты	п-хлормеркурибензоат		5,5 – дитиобис– (2-нитробензойная кислота)	
	активность	реактивация дитиотрептолом	активность	реактивация дитиотрептолом
	% от исходной			
-	0	65	0	12
АТФ	0	64	0	12
АТФ +Mg ²⁺	43	48	24	67
Mg ²⁺	30	65	12	69
Тиамин	49	72	-	-
АТФ + тиамин	50	72	-	-
Mg ²⁺ +тиамин	71	89	-	-
Пиритиамин	-	-	19	-

В таблице представлены результаты 10-минутной инкубации фермента с двукратным молярным количеством п-хлормеркурибензоата в присутствии субстратов. АТФ не оказывал влияния на поведение тиаминкиназы. Степень угнетения и реактивации были такими же, как и без нуклеотида. Mg²⁺ частично защищал фермент. Ещё более выражен этот эффект у комплекса АТФ Mg²⁺. Тиамин + Mg²⁺ и тиамин + АТФ практически давали сумму эффектов отдельных компонентов.

Интересно сравнить (см. таблицу) вышеприведенные результаты с аналогичными данными, полученными с помощью 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислоты) – строго специфичного окислительного реагента, взаимодействующего с SH-группами по тиол-дисульфидному обмену. Отчётливо видна полная аналогия в характере защиты субстратами. Так, оба тиоловых ингибитора индифферентны к АТФ, который не оказывал влияния ни на степень инактивации, ни на величину реактивации фермента. Таким образом, очевидно, что если АТФ и имеет места связывания на тиаминкиназе (АТФ защищает её от инактивации диэтилпирикарбонатом [2]), то пространственные и электронные смещения, индуцируемые актом присоединения, не затрагивают область локализации SH-групп.

В случае с п-хлормеркурибензоатом Mg²⁺ слабее, чем тиамин, а при использовании 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) – слабее, чем конкурентный аналог тиамин – пиритиамин (использовали пиритиамин, так как при рН 8,0 – требуется условие реакции – тиамин частично существует в тиоловой форме, которая взаимодействует с реагентом Элмана), защищает тиаминкиназу от инактивации, однако в его присутствии степень реактивации достаточно велика, что является косвенным доказательством стабилизации её пространственной конфигурации.

Среди причин, которыми может быть обусловлено наблюдаемое отсутствие защитного эффекта субстратами у HgCl₂ и наличие его у п-хлормеркурибензоата и 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислоты), надо отметить возможную локализацию SH-групп вблизи активного центра. Присоединение субстратов может создать стерические препятствия для таких крупных молекул, как п-хлормеркурибензоат и особенно 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислоты). В то же время доступ к SH-группам небольшой по размеру молекулы HgCl₂ остаётся свободным.

Явление защиты фермента субстратами ещё не является доказательством локализации SH-групп в области активного центра. Более конкретным считается определение их количества до и после инкубации фермента с субстратами [4]. Однако из-за того, что и АТФ и тиамин сильно поглощают в области регистрации меркаптидной связи, постановка такого рода экспериментов оказалась невозможной. Следует все же отметить, что в случае с 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислотой) количество обнаруживаемых нами SH-групп до взаимодействия с субстратами и после его оставалось неизменным [6].

Вывод

Полученные данные указывают, что тиаминкиназа относится к числу ферментов, у которых SH-группа не ответственна за акт биотрансформации витамина, а расположена вблизи активного центра, в участках сорбции, и выполняет важную структурную функцию по поддержанию нативной конфигурации глобулы.

Литература

1. Воскобоев, А.И. Четвертичная структура и аллостерические свойства тиаминпирофосфокиназы из печени крыс / А.И. Воскобоев, И.М. Арцукевич, Ю.М. Островский // Биохимия. – 1976. – Т. 41, №12. – С. 2196-2201
2. Воскобоев, А.И. Идентификация функциональных групп дрожжевой тиаминпирофосфокиназы / А.И. Воскобоев, В.П. Гриневиц // Биохимия. – 1978. – Т. 43, №10. – С. 1743-1748.
3. Дарбре, А. Практическая химия белка / А. Дарбре. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 612с.
4. Торчинский, Ю.М. Сера в белках / Ю.М. Торчинский. – М.: Наука, 1977. – 229с.
5. Черникевич, И.П. Сравнительный кинетический анализ тиаминкиназ из пивных дрожжей и головного мозга свиньи / И.П. Черникевич // Журнал ГрГМУ. – 2011. – №3. – С. 25-28.
6. Черникевич, И.П. Функциональная значимость сульфгидрильных групп тиаминкиназы головного мозга свиньи / И.П. Черникевич // Журнал ГрГМУ. – 2013. – №4. – С. 25-28.
7. Boyer, P.D. Enzymes / P.D. Boyer. – New York.: Academic Press, 1971. – Vol. 3.
8. Hamada, M. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from pig hear / M. Hamada // Seikigaku. – 1970. – Vol. 41. – P. 310-324.
9. Kaziro, Y. Quantitative determination of thiamine pyrophosphate using apocarbaxylase and alcohol dehydrogenase / Y. Kaziro // J. Biochem. – 1957. – V. 44, N 7. – P. 827-838.
10. Mitsuda, H. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf / H. Mitsuda, Y. Takii, K. Iwawi // J. Nutr. Sci. Vitaminol. – 1975. – Vol. 21, N 2. – P. 103-115.
11. Thome-Bean, F. ATP: Thiamine pyrophosphotransferase. Purification et etude du mechanismu de reaction / F. Thome-Bean, T. Lan, A. Olomuski // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – Vol. 182, N1. – P. 111-121.
12. Wakabayashi, Y. Some properties of the purified thiamine pyrophosphokinase from pig brain / Y. Wakabayashi // Vitamins. – 1998. – Vol. 52, N 5-6. – P. 229-236.

Literatura

1. Voskoboev, A.I. CHetertichnaja struktura i allostericheskie svoistva tiaminpirofosfokinazy iz pecheni krysa / A.I. Voskoboev, I.M. Arcukevich, YU.M. Ostrovskii // Biohimija. – 1976. – T. 41, №12. – S. 2196-2201
2. Voskoboev, A.I. Identifikacija funkcional'nyh grupp drozhzhevoi tiaminpirofosfokinazy / A.I. Voskoboev, V.P. Grinevich // Biohimija. – 1978. – T. 43, №10. – S. 1743-1748.
3. Darbre, A. Prakticheskaja himija belka / A. Darbre. – M.: GYeOTAR-Media, 2009. – 612s.
4. Torchinskii, YU.M. Sera v belkah / YU.M. Torchinskii. – M.: Nauka, 1977. – 229s.
5. CHernikevich, I.P. Sravnitel'nyi kineticheskii analiz tiaminkinaz iz pivnyh drozhzhei i golovnogo mozga svin'i / I.P. CHernikevich // Zhurnal GrGMU. – 2011. – №3. – S. 25-28.
6. CHernikevich, I.P. Funkcional'naja znachimost' sul'fgidril'nyh grupp tiaminkinazy golovnogo mozga svin'i / I.P. CHernikevich // Zhurnal GrGMU. – 2013. – №4. – S. 25-28.
7. Boyer, P.D. Enzymes / P.D. Boyer. – New York.: Academic Press, 1971. – Vol. 3.
8. Hamada, M. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from pig hear / M. Hamada // Seikigaku. – 1970. – Vol. 41. – P. 310-324.
9. Kaziro, Y. Quantitative determination of thiamine pyrophosphate using apocarbaxylase and alcohol dehydrogenase / Y. Kaziro // J. Biochem. – 1957. – V. 44, N 7. – P. 827-838.
10. Mitsuda, H. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf / H. Mitsuda, Y. Takii, K. Iwawi // J. Nutr. Sci. Vitaminol. – 1975. – Vol. 21, N 2. – P. 103-115.
11. Thome-Bean, F. ATP: Thiamine pyrophosphotransferase. Purification et etude du mechanismu de reaction / F. Thome-Bean, T. Lan, A. Olomuski // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – Vol. 182, N1. – P. 111-121.
12. Wakabayashi, Y. Some properties of the purified thiamine pyrophosphokinase from pig brain / Y. Wakabayashi // Vitamins. – 1998. – Vol. 52, N 5-6. – P. 229-236.

ROLE OF SULFHYDRYL GROUPS IN THIAMINE KINASE
ENZYMATIC ACTIVITY MANIFESTATION IN PIG BRAIN

Chernikevich I. P., Vavreniuk M. Yu., Boltromeyuk K. V.

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

With the help of mercaptide-forming reagents, HgCl₂ and p-chloromercury benzoate the amount and reactivity of SH-groups of pig brain thiamine kinase was determined. The enzyme molecule was demonstrated to contain two types of sulfhydryl groups: the first one is easily accessible and fast interacting; the second one - partially hidden and "sluggish" reactive. Modification of the first type SH group by p-chloromercury benzoate lead to 36 % reduction of enzymatic reaction rates, while modification of the second type SH group resulted in complete thiamine kinase inactivation. Mercaptide-forming reagents have different blocking activity because of their different chemical nature. While p-chloromercury benzoate taken in equivalent proportions with protein forms one chemical bond: protein-S-HgR, HgCl₂ probably forms two. The substrate is thiamine, but not ATP and magnesium ions only partially protect thiamine kinase from p-chloromercury benzoate induced inactivating action. It is possible to assume that SH-groups do not directly participate in the process of vitamin B1 biotransformation, but are localized in sorption areas of the protein active center thus stabilizing its structure.

Keywords: thiamine kinase, pig brain, chemical modification, SH-groups.

Поступила: 19.05.2016

Отрецензирована: 27.05.2016