

ВЫДЕЛЕНИЕ И РАДИОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АТР: ТИАМИНДИФОСФАТФОСФОТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ МИТОХОНДРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА СВИНЬИ

Черникевич И. П. (*chemistry@grsmu.by*), Хильманович Е. Н., Кравец Е. В.
УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Введение. Назначение и биологические пути регуляции уровня трифосфорного эфира тиамин в клетке остаются невыясненными. Связано это с отсутствием надёжной методологической основы оценки активности фермента биосинтеза метаболита – АТР: тиаминдифосфатфосфотрансферазы (КФ 2.7.4.15).

Цель. Разработать адекватный способ разделения ингредиентов трансферазной реакции, выделить частично очищенный препарат фермента.

Материал и методы. В качестве субстрата использовался экзогенный, полученный нами, ^{14}C – тиаминдифосфат. Образовавшийся продукт – трифосфорный эфир тиамин – отделяли ионообменной хроматографией.

Результаты. Из митохондриальной фракции головного мозга свиньи выделен частично очищенный препарат трансферазы с выходом 14,2%. Установлено, что максимальная ферментативная активность проявляется при рН 7,0–8,5, концентрациях тиаминдифосфата $2,5 - 3,0 \cdot 10^{-5}$ М.

Выводы. Предложенный изотопный метод обладает достаточной чувствительностью и позволяет фиксировать АТР: тиаминдифосфатфосфо-трансферазную активность в субклеточных фракциях мозга.

Ключевые слова: АТР: тиаминдифосфатфосфотрансфераза, мозг свиньи, радиометрический метод, свойства фермента.

Введение

Наряду с тиаминдифосфатом – коферментом мультиферментных комплексов окислительного декарбокислирования альфа-кетокислот и транскетолазы – в объектах живой природы присутствует другая фосфорилированная форма витамина B_1 – тиаминтрифосфат, функция которого в жизнедеятельности клетки неизвестна [1]. На протяжении 30 лет возможная биологическая роль трифосфорного эфира рассматривается исключительно в контексте представлений о специфической некоферментной функции B_1 в возбудимых тканях, связанной с распространением и передачей нервного импульса [2–4]. Несмотря на то, что надёжных доказательств этой гипотезы так и не получено, на важную роль трифосфорного эфира тиамин для работы нервной системы указывает хотя бы тот факт, что в митохондриальной фракции головного мозга крыс [5], быка [6], спинном мозге свиней [7], цитозоле печени крыс [8], пивных дрожжах [9] был обнаружен фермент АТР: тиаминдифосфатфосфотрансфераза, катализирующий превращение коферментной формы тиамин до трифосфорного эфира. Несколько позже из головного мозга крыс выделен и белок обратного процесса – расщепления тиаминтрифосфата, с абсолютной специфичностью к субстрату [1, 10, 11]. Вместе с тем к началу 1990-х методами ВЭЖХ было достоверно установлено наличие трифосфорного эфира тиамин не только в мозге и других тканях млекопитающих, но и в бактериях [12, 13]. Это обстоятельство, предполагающее общность роли трифосфорного эфира тиамин в клетках разной специализации, диктует необходимость создания принципиально иной концептуальной основы, которая могла бы послужить прочным базисом для прогресса исследований в области некоферментных функций витамина B_1 , раз-

работки и применения новых лекарственных средств. К числу первоочередных задач, требующих решения в свете идеи о фундаментальной роли трифосфата в биологии клетки, относятся вопросы распространения трифосфорного эфира, связанной и/или растворимой АТР: тиаминдифосфатфосфотрансферазы в объектах разных уровней организации, специфичности, структурно-функциональных и регуляторных свойств фермента синтеза эфира тиамин, механизмов контроля внутриклеточного уровня трифосфата и их совершенствования в ходе эволюционного процесса. Выполнимость подобных изысканий возможна при хорошей методологической базе.

Попытки выделения и очистки АТР: тиаминдифосфатфосфотрансферазы пока безуспешны. Одной из причин этого является отсутствие высокочувствительного метода детекции активности фермента. Предложенный ранее [8] изотопный способ с использованием $[32\text{P}]$ АТР имеет ряд существенных недостатков, поскольку это соединение – короткоживущий изотоп и, кроме того, практически очень трудно отделить $[32\text{P}]$ АТР от $[32\text{P}]$ тиаминтрифосфата методами электрофореза, хроматографией на бумаге и на колонках с катионообменниками. Недостаточно чёткое разделение этих ингредиентов искажает получаемые результаты. Более того, субстратом ферментативной реакции считался только комплекс тиаминдифосфата с каким-либо белком-носителем, из-за чего очистка этого фермента известными в энзимологии методами рассматривалась как процесс невозможный [5, 8].

Целью исследования является разработка радиометрического метода определения активности трансферазы. В настоящей работе представлен адекватный метод определения активности трансферазы и приводятся данные по ее выделению, частичной очистке и некоторым свойствам.

Материал и методы

Для получения фермента использовали митохондрии. Около 10 г свежей ткани головного мозга свиньи промывали охлажденной (около 0°C) средой выделения (0,32 М сахараза; 0,15 мМ КСl; 0,2 мМ ЭДТА; 0,01 М трис-НСl буфер рН 7,4), измельчали, вносили 60 мл исходной среды и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Смесь центрифугировали 3 минуты при 2000 g, а полученную надосадочную жидкость повторно центрифугировали 8 минут при 12500 g. Грубую митохондриальную фракцию ресуспендировали в 10 мл 3% фикола (3% фиколл; 0,12 М манноза; 0,03 М сахараза; 25 мкМ КСl; 0,2 мМ ЭДТА; 0,01 М трис-НСl буфер рН 7,4), после чего осторожно наслаивали на 20 мл раствора 6% фикола (6% фиколл; 0,24 М манноза; 0,06 М сахараза; 50 мкМ КСl; 0,2 мМ ЭДТА; 0,02 М трис-НСl буфер рН 7,4) с последующим центрифугированием 30 минут при 12500 g. Супернатант декантировали, удаляя одновременно мелкий «пух», лежащий на митохондриях. Митохондриальную фракцию повторно ресуспендировали в среде выделения и центрифугировали 10 минут при 12500 g. Перед определением активности АТР: тиаминдифосфатфосфотрансферазы осадок органелл разбавляли 4 мл Н₂О, содержащей тритон X-100 в конечной концентрации 1%, с двухкратным замораживанием-оттаиванием раствора.

Для контроля чистоты и целостности структур митохондрий полученные при центрифугировании осадки фиксировали 1% четырёхокисью осмия на буфере Миллонига и заливали в аралдит. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, анализируя органеллы под электронным микроскопом ЭМВ 100ЛМ (Россия).

Активность фермента определяли по количеству образовавшегося трифосфорного эфира тиамин. На начальных этапах выделения и очистки использовали радиометрический метод детекции скорости с применением [¹⁴C] тиаминдифосфата в качестве одного из субстратов. Меченый [¹⁴C] тиаминдифосфат получали из [¹⁴C] тиамин по схеме: [¹⁴C] тиамин + АТР → [¹⁴C] тиаминдифосфат + АМР в присутствии дрожжевой тиаминкиназы [9]. АТР: тиаминдифосфатфосфотрансферную реакцию проводили в стандартных условиях в течение 1 часа при 37° С. Инкубационная смесь в 1 мл содержала (в М): фосфатный буфер рН 7,5 – 5·10⁻²; АТР – 5·10⁻³; сульфат магния – 2·10⁻²; [¹⁴C] тиаминдифосфат – 5·10⁻⁶ (15 мкКи/мкмоль) и 0,3 мл супернатанта мозга (3-5 мг белка) или 0,5-2,0 мг белка (в зависимости от степени очистки). В качестве контроля использовали те же компоненты и денатурированный кипячением белок. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 10% ТХУ. После центрифугирования кислоту удаляли двойной экстракцией тремя объемами эфира. Остаток эфира упаривали и продукты реакции разделяли на колонке с катионообменным сефадексом SP-C-25 (1×20 см), уравновешенной 0,005 М ацетатным буфером рН 4,0. Элюцию

проводили исходным буфером, собирая фракции на коллекторе по 2 мл. Для определения количества трифосфорного эфира тиамин отбирали аликвоты по 0,2 мл и помещали в 6 мл диоксанового сцинтиллятора. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике «Mark-2» (США) в течение 1 минуты. Концентрацию [¹⁴C] тиаминтрифосфата находили, исходя из известной удельной радиоактивности [¹⁴C] тиамин.

При работе с более очищенным белком применяли тиохромный метод определения активности. Условия проведения реакции, концентрации всех ингредиентов и разделение продуктов были такими, как описано выше, за исключением концентрации тиаминдифосфата, равнявшейся 5·10⁻⁴ М. После хроматографии тиаминтрифосфат переводили в тиохромтрифосфат с помощью феррицианида калия в щелочной среде аналогично тиамину. Величину флуоресценции измеряли в этиловом спирте на флуориметре ЭФ-3-МА. Калибровочную кривую строили с известным количеством хроматографически чистого трифосфорного эфира.

За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое в условиях определения за 1 час синтезирует 1 нмоль тиаминтрифосфата. Удельную активность выражали числом единиц фермента на 1 мг белка. Белок определяли по методу Лоури и спектрофотометрически по Варбургу и Кристиану.

Выделение фермента проводили на холоду. Митохондрии предварительно разрушали двукратным замораживанием-размораживанием в среде с 1% тритоном X-100, разбавляли в 2 раза 0,32 М раствором сахаразы, центрифугировали в течение 1,5 часа при 105000 g на ультрацентрифуге VAC-60I (Германия), осадок отбрасывали, а супернатант использовали в качестве ферментного препарата.

На этапах очистки супернатант сначала подвергали дробному фракционированию сульфатом аммония в пределах 45-55, 55-65 и 65-75% насыщения. Высоленный белок центрифугировали 10 минут при 18000 об/мин; осадки в виде аммонийной пасты хранили при -10°C. Для определения ферментативной активности и последующей очистки пасту в дальнейшем обессоливали на колонке с сефадексом G-50 (1,5×60 см), уравновешенной 0,01 М трис-НСl буфером рН 7,5 содержащим 0,05 М NaCl. Обессоленный белковый препарат наносили на колонку (2×20 см), заполненную анионообменным носителем – сефадексом ДЭАЭ А-50, уравновешенным приведенным выше трис-НСl буфером рН 7,5 с 0,05 М NaCl и 0,002 М дитиотрейтолом. После адсорбции белка колонку промывали тем же раствором до минимального поглощения при D280. Белок снимали линейным градиентом NaCl от 0,05 до 0,5 М со скоростью тока жидкости 15 мл/ч. Активные фракции использовали для изучения свойств фермента.

Результаты и обсуждение

Примененный нами метод радиометрического определения трифосфорного эфира тиамин

позволил показать наличие активности АТР: тиаминдифосфатфотрансферазы в митохондриальной фракции головного мозга свиньи и возможность синтеза тиаминтрифосфата из экзогенного (не связанного с белком) тиаминдифосфата (рис. 1).

Результаты очистки приведены в таблице. Активность фермента в супернатанте низка и не превышает 0,021 нмоль на 1 мг белка за 1 ч. Более высокую активность трансферазы, полученную ранее [8], очевидно, можно объяснить методическими недочетами авторов. Основное количество фермента высаливается в пределах 50-70% насыщения сульфатом аммония, а при 55-65% насыщении удельная активность достигает 0,083 ммоль тиаминтрифосфата, превышая исходную в 4 раза.

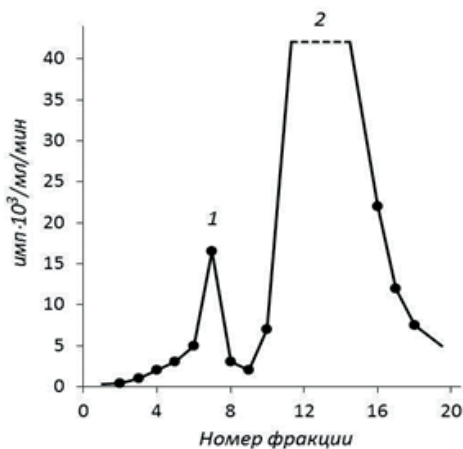


Рисунок 1. – Профиль элюции тиаминтри- и дифосфата на колонке с сефадексом SP-C-25. Источник фермента – супернатант митохондрий головного мозга

- 1 – тиаминтрифосфат;
- 2 – тиаминдифосфат

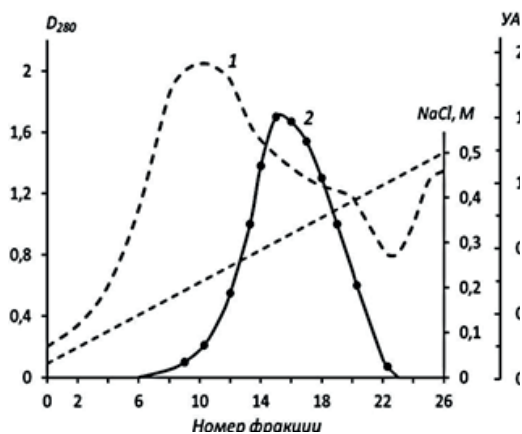


Рисунок 2. – Очистка АТР: тиаминдифосфатфотрансферазы на сефадексе ДЭАЭ А-50

- 1 – кривая выхода белка (D280);
- 2 – удельная активность фермента (УА)

После хроматографии на ДЭАЭ А-50 степень очистки возросла в 80-85 раз, относительно супернатанта, с выходом около 14%. Линейный градиент в пределах 0,05-0,5 М NaCl позволил получить активность АТР: тиаминдифосфатфотрансферазы, равную 1,7 нмоль тиаминтрифосфата (рис. 2), что дало возможность изучить отдельные свойства фермента.

Таблица. – Очистка АТР: тиаминдифосфатфотрансферазы из митохондрий головного мозга свиньи

Этап очистки	Объём, мл	Белок, мг/мл	Удельная активность, ед. на 1мг белка	Общая активность, ед.	Выход, %	Степень очистки
Супернатант	360	7	0,021	52,9	100	-
Фракционирование сульфатом аммония с гель-фильтрацией на G-50	16	12	0,083	15,4	29	4
Хроматография на сефадексе ДЭАЭ А-50	4	1,1	1,7	7,5	14,2	85

Наработка тиаминтрифосфата прямо пропорциональна количеству белка в пробе, вплоть до 2,0 мг, а пропорциональность во времени соблюдается первые 2 ч. Полученные результаты указывают на правомерность проведения реакции в описанных выше условиях и одновременно на недостаточную степень чистоты и устойчивость препарата. АТР: тиаминдифосфатфотрансфераза сохраняет активность при 0-4°C всего несколько дней, при комнатной температуре инактивируется в течение суток.

Изучение зависимости скорости реакции от рН с разными буферными системами показало наличие двух оптимумов: в кислой (рН 5,0-6,5) и щелочной (рН 7,0-8,5) среде (рис. 3), причём щелочной оптимум более выражен. Ранее в этой области проводились лишь единичные определения активности АТР: тиаминдифосфатфотрансферазы [8]. Очевидно, можно считать обоснованным проведение реакции синтеза трифосфорного эфира тиаминина в пределах рН 7,5-8,0, что приближает условия оценки активности к оптимальным. Однако не исключено, что данная картина является следствием дополнительного наложения эффекта тиаминтрифосфатазы, обнаруженной нами в ферментном препарате и проявляющей значительную активность при рН, близкой к 7,0 (от 0,24 мкмоль тиаминтрифосфата на 1 мг белка за 30 мин. при рН 6,0) и не отражает действительного положения.

Зависимость скорости реакции от концентрации тиаминдифосфата описывается S-образной кривой с выходом на плато при концентрации $2,5 \cdot 10^{-5}$ М (рис. 4). Полученные данные указывают на то, что оптимальные значения субстрата-акцептора при оценке активности фермента лежат в пределах $2,5 \cdot 3 \cdot 10^{-5}$ М.

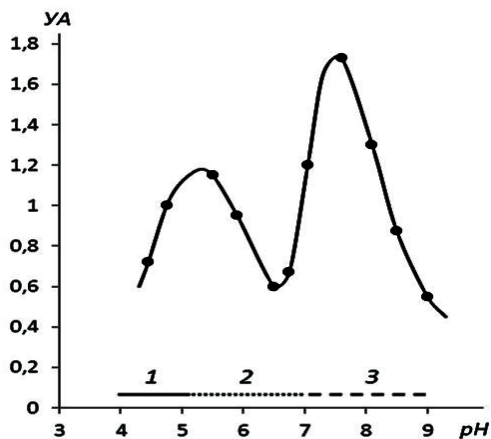


Рисунок 3. – Зависимость активности АТР: тиаминдифосфатфосфотрансферазы от рН

- 1 – ацетатный;
2 – фосфатный;
3 – трис-НСI буферные растворы

Недостаточная степень очистки препарата и быстрая инактивация АТР: тиаминдифосфатфосфотрансферазы при хранении затрудняют проведение тщательного изучения кинетических параметров фермента, исследование механизма его действия и особенно пространственной организации и динамики каталитического и регуляторного центров. Выполнение такого рода изысканий возможно при наличии гомогенного препарата.

Литература

- Макарчиков, А. Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина В₁ / А. Ф. Макарчиков. – Минск : Белорусская наука, 2008. – 443 с.
- Пархоменко, Ю. М. Нейроактивность тиамин: факты и гипотезы / Ю. М. Пархоменко, Г. В. Донченко, З. С. Протасова // Украинский биохимический журнал. – 1996. – Т. 68, № 2. – С. 3-14.
- Bettendorff, L. Thiamine derivatives in excitable tissues: metabolism, deficiency and neurodegenerative diseases / L. Bettendorff, P. Wins // Recent Res. Devel. Neurochem. – 1999. – Vol. 2, part 1. – P. 37-62.
- Itokawa, Y. Thiamine and nervous system function: an historical sketch / Y. Itokawa // Metab. Brain. Dis. – 1996. – Vol. 11, № 1. – P. 1-7.
- Itokawa, Y. The enzymatic synthesis of triphosphothiamin / Y. Itokawa, J. R. Cooper // Biochim. Biophys. Acta. – 1968. – Vol. 158, № 1. – P.180-182.
- Murphy, J. V. Leigh's disease: biochemical characteristics of the inhibitor / J. V. Murphy, L. J. Craig, R. H. Glew // Arch. Neurol. – 1974. – Vol. 31, № 4. – P. 220-227. – doi: 10.1001/archneur.1974.00490400034002.
- Eckert, T. Über eine АТР: Thiamindiphosphat-Phosphotransferasa-Aktivität im Nervengewebe Ein Beitrag zum Mechanismus der nervösen Reizleitung / T. Eckert, W. Möbus // Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. – 1964. – Vol. 338, № 1-2. – P. 286-288. – doi: 10.1515/bchm2.1964.338.1-2.286.

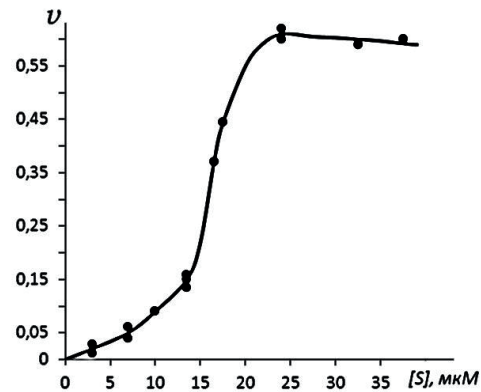


Рисунок 4. – Зависимость скорости АТР: тиаминдифосфатфосфотрансферазной реакции от концентрации тиаминдифосфата

Выводы

- Предложен радиометрический метод определения активности АТР: тиаминдифосфатфосфотрансферазы, ответственной за синтез некоферментной формы витамина В₁.
- На заключительном этапе степень очистки возросла в 85 раз и достигла 1,7 единиц на 1 мг белка.
- Показано, что свободный, не связанный с гипотетическим белком тиаминдифосфат, может использоваться как субстрат данной реакции.
- Выяснено, что максимальная скорость биосинтеза трифосфорного эфира тиамин наблюдается при рН 7,0-8,5 и концентрации субстрата $2,5 \cdot 10^{-5}$ М.

- Ruenwongsa, P. The role of bound thiamine pyrophosphate in the synthesis of thiamine triphosphate in rat liver / P. Ruenwongsa, J. R. Cooper // Biochim. Biophys. Acta. – 1977. – Vol. 482, № 1. – P. 64-74.
- Voskoboyev, A. I. Studies on thiamine diphosphate kinase (EC 2.7.4.15) from brewer's yeast: purification and some properties / A. I. Voskoboyev, I. P. Chernikevich, V. S. Luchko // Biomed. Biochim. Acta. – 1987. – Vol. 46, № 1. – P. 3-13.
- Hashitani, Y. The partial purification of thiamine triphosphatase from rat brain / Y. Hashitani, J. R. Cooper // J. Biol. Chem. – 1972. – Vol. 247, № 7. – P. 2117-2119.
- Makarchikov, A. F. Purification and characterization of thiamine triphosphatase from bovine brain / A. F. Makarchikov, I. P. Chernikevich // Biochim. Biophys. Acta. – 1992. – Vol. 1117, № 3. – P. 326-332. – doi: 10.1016/0304-4165(92)90032-P.
- Content of thiamin phosphate esters in mammalian tissues – an extremely high concentration of thiamin triphosphate in pig skeletal muscle / Y. Egi [et al.] // Biochem. Int. – 1986. – Vol. 12, № 3. – P. 385-390.
- Nishimune, T. Hydrolysis and synthesis of thiamine triphosphate in bacteria / T. Nishimune, R. Hayashi // J. Nutr. Sci. Vitaminol. – 1987. – Vol. 33, № 2. – P. 113-127.

References

- Makarchikov AF. Tiamin trifosfat: novyj vzgljad na некоферментную функцию витамина В₁ [Thiaminetriphosphate:

- a new view on uncoenzyme function of vitamin B1]. Minsk: Belorusskaja nauka; 2008. 443 p. (Russian).
- Parhomenko YuM, Donchenko GV, Protasova ZS. Nejroaktivnost tiamina: fakty i gipotezy [Neuroactivity of Thiaminum: facts and hypothesis]. *Ukrainskij biohimicheskiy zhurnal* [The Ukrainian Biochemical Journal]. 1996;68(2):3-14. (Russian).
 - Bettendorff L, Wins P. Thiamine derivatives in excitable tissues: metabolism, deficiency and neurodegenerative diseases. *Recent Res. Devel. Neurochem.* 1999;2(1):37-62.
 - Itokawa Y. Thiamine and nervous system function: an historical sketch. *Metab. Brain. Dis.* 1996;11(1):1-7.
 - Itokawa Y, Cooper JR. The enzymatic synthesis of triphosphothiamin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1968;158(1):180-182.
 - Murphy JV, Craig LJ, Glew RH. Leigh's disease: biochemical characteristics of the inhibitor. *Arch. Neurol.* 1974;31(4):220-227. doi: 10.1001/archneur.1974.00490400034002.
 - Eckert T, Möbus W. Über eine ATP: Thiamindiphosphat-Phosphotransferasa-Aktivität im Nervengewebe Ein Beitrag zum Mechanismus der nervösen Reizleitung. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 1964;338(1-2):286-288. doi: 10.1515/bchm2.1964.338.1-2.286. (German).
 - Ruenwongsa P, Cooper JR. The role of bound thiamine pyrophosphate in the synthesis of thiamine triphosphate in rat liver. *Biochym. Biophys. Acta.* 1977;482(1):64-74.
 - Voskoboyev AI, Chernikevich IP, Luchko VS. Studies on thiamine diphosphate kinase (EC 2.7.4.15) from brewer's yeast: purification and some properties. *Biomed. Biochim. Acta.* 1987;46(1):3-13.
 - Hashitani Y, Cooper JR. The partial purification of thiamine triphosphatase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 1972;247(7):2117-2119.
 - Makarchikov AF, Chernikevich IP. Purification and characterization of thiamine triphosphatase from bovine brain. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992;1117(3):1326-1332. doi: 10.1016/0304-4165(92)90032-P.
 - Egi Y, Koyama S, Shikata H, Yamada K, Kawasaki T. Content of thiamin phosphate esters in mammalian tissues – an extremely high concentration of thiamin triphosphate in pig skeletal muscle. *Biochem. Int.* 1986;12(3):385-390.
 - Nishimune T, Hayashi R. Hydrolysis and synthesis of thiamine triphosphate in bacteria. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1987;33(2):113-127.

SELECTION AND RADIOMETRIC METHOD OF DETERMINING THE ACTIVITY OF ATP: THIAMINEDIPHOSPHATEPHOSPHOTRANSFERASE FROM MITOCHONDRIA OF THE PIGS BRAIN TISSUE

Chernikevich I. P., Khilmanovich E. N., Kravec E. V.

Educational Establishment «Grodno State Medical University», Grodno, Belarus

Introduction. The purpose and biological pathways of regulation of level of thiamine triphosphate ester in the cell remain unclear. This is due to the absence of reliable methodological basis for the assessment of the activity of the enzyme of the biosynthesis of this metabolite - ATP: thiaminediphosphatephosphotransferase (EC 2.7.4.15).

Objective. To develop an adequate method of separation of ingredients of transferase reaction, to isolate a partially purified drug of the enzyme.

Material and methods. As substrate was used an exogenous ¹⁴C- thiaminediphosphate, that was obtained by us. The having been resulted product – thiamine triphosphate ester was separated by ion-exchange chromatography.

Results. From the mitochondrial fraction of the pig's brain was isolated a partially purified transferase preparation with a yield of 14.2%. It was found that the maximum enzymatic activity is manifested at pH 7.0 - 8.5, the concentrations of thiamine diphosphate is 2.5 - 3.0 · 10⁻⁵ M.

Conclusions. The proposed isotope method has sufficient sensitivity and allows fixing ATP: thiamine diphosphate phosphotransferase activity in subcellular fractions of the brain.

Keywords: ATP: thiaminediphosphatephosphotransferase, pig's brain, radiometric method, properties of enzyme.

Поступила: 29.06.2017

Отрецензирована: 14.07.2017