

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТОПОГРАФИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ТИАМИНКИНАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА СВИНЬИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

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

*Введение.* Биосинтез коферментной формы витамина  $B_1$  – тиаминдифосфата – осуществляется тиаминкиназой (КФ 2.7.6.2), механизм и пути регуляции которого могут существенно проясниться после выяснения структурной организации активного центра фермента, его конформационной подвижности.

*Цель.* Исследование топографии активного центра тиаминкиназы, локальных конформационных перестроек, ответственных за функционирование белка.

*Материал и методы.* Исследования выполнены на электрофоретически гомогенных препаратах фермента головного мозга свиньи с использованием в качестве зондов 2-толуидинонафталин-6-сульфоната и 1-анилинонафталин-8-сульфоната.

*Результаты.* Установлено, что активный центр тиаминкиназы представляет гидрофобную полость, в которой тиамин и АТФ сорбируются пиримидиновым и адениновым циклами, а дифосфатный радикал субстрата-донора направлен в сторону субстрата-акцептора. Пируват связывается вблизи места локализации тиамина и облегчает отщепление тиаминдифосфата. Ионы металлов определяют оптимальную геометрию сорбции субстратов и, очевидно, способствуют их сближению. Предложена модель организации каталитического центра тиаминкиназы.

*Выводы.* Участки сорбции субстратов, кофакторов и эффекторов в молекуле фермента пространственно разделены. Взаимодействие их осуществляется путем конформационной перестройки глобулы.

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

### Введение

В качестве перспективного биокатализатора для медицинского использования выступает тиаминкиназа (КФ 2.7.6.2), обеспечивающая синтез коферментной формы витамина  $B_1$ . Важность ее исследования связана прежде всего с обнаружившейся инактивацией глобулы белка при ряде патологических состояний, воздействии неблагоприятных факторов внешней среды [1]. Прослеживается связь системы  $B_1$ -зависимых процессов с развитием болезней Альцгеймера и Паркинсона [2, 3]. Молекулярные механизмы патогенеза этих заболеваний пока не ясны, но физиологическая ценность работ по раскрытию механизма функционирования фермента начального этапа биотрансформации тиамина несомненна. С использованием разрешенной во времени флуориметрии, а также флуоресцентной метки (пиридоксаль-5'-фосфата) нами начаты исследования по влиянию субстратов (тиамин,  $Mg \cdot АТФ$ ), кофакторов ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) и эффекторов (пируват, фосфоенолпируват) на структуру и внутримолекулярную подвижность тиаминкиназы [4, 5]. Показано, что активация белка меткой связана с наличием в ней карбонильной группы и схожа по механизму с активацией пируватом. Пируват и субстрат фермента – тиамин – эффективно тушат флуоресценцию хромофоров пиридоксаль-5'-фосфата, указывая на функциональную зависимость центров их связывания, реализуемую посредством конформационных изменений. Второй субстрат – АТФ и ионы двухвалентных металлов – пространственно удалены от метки и не реагируют на локальные перестройки в области ее связывания. В результате расположение АТФ и ионов

кофакторов в молекуле тиаминкиназы осталось невыясненным.

Более значимую информацию о структуре и динамике белка часто удается получить при помощи природных или синтетических красителей – зондов. В отличие от метки зонды сорбируются по иным функционально активным химическим группам (обратимо) и для их связывания достаточно наличия в белковой молекуле подходящих участков, в которые зонд мог бы встроиться [6, 7]. Большинство нативных белков имеет не более 1-3 таких участков. Как правило, ими являются активные и/или аллостерические центры макромолекул и поэтому зонд чувствительно реагирует на изменения, происходящие в области катализа при взаимодействии белка с субстратами, ингибиторами или другими специфическими лигандами.

**Цель настоящей работы** – дальнейшее изучение активного центра тиаминкиназы с использованием зондов для выяснения его топографии, локальных конформационных явлений, ответственных за функциональность белка.

### Материал и методы

Тиаминкиназу получали из головного мозга свиньи [8]. Активность фермента оценивали исходя из скорости наработки тиаминдифосфата – 1 мг белка за 1 ч при 37°C [1]. В качестве зондов использовали 2-толуидинонафталин-6-сульфонат (ТНС) и 1-анилинонафталин-8-сульфонат (АНС). Количество зонда, связавшегося с белком, определяли гель-фильтрацией на колонке (1,2×40 см) с сефадексом G-50. Спектры флуоресценции регистрировали на установке СДЛ-2 (Россия). Спектральная ширина щелей не превышала 1 нм. В ходе исследований количество

образца подбирались таким образом, чтобы его поглощение при длине волны возбуждения составляло 0,05 ОЕ. Квантовый выход (В) определяли относительно водного раствора триптофана, для которого  $V = 0,20$  [9]. Степень поляризации (Р) измеряли статическим способом [10], вводя коррекцию на разную чувствительность установки при регистрации по разному поляризованных составляющих излучения. Измерение длительности затухания свечения производили на наносекундном импульсном спектрофлуориметре [11]. Длительность импульсов возбуждения составляла около 1 нс. Для управления аппаратурой и обработки данных применяли ЭВМ IBM 386ДХ, используя компьютерную программу из комплекса аппаратных средств обеспечения [12]. Анализ кривых затухания с учетом длительности затухающих импульсов и функции отклика системы регистрации (обращение свертка), осуществляли с помощью специально разработанного теста [13], реализующего оптимизационный метод Пауэлла [14]. Для учета зависимости функции отклика системы регистрации от длины волны использовали способ, описанный в работе [15].

**Результаты и обсуждение**

Взятые нами красители – АНС и ТНС – нековалентно связываются в гидрофобных областях белковых молекул – чаще всего вблизи активных центров или мест сорбции аллостерических эффекторов [6, 7]. В водных растворах они обладают крайне слабой флуоресценцией, однако при связывании с макромолекулами или мембранами квантовый выход их флуоресценции увеличивается на 2-3 порядка. Это обстоятельство позволяет практически не учитывать свечения, присутствующего в растворе несвязавшегося зонда.

Общие флуоресцентные свойства зондов приведены в таблице 1. Константы связывания (KS) определяли флуориметрически по методике, подробно изложенной в монографии [6]. Приведенные значения KS являются усредненными, поскольку используемый метод предполагает

**Таблица 1.** – Параметры стационарной флуоресценции ТНС и АНС и константы их связывания KS с тиаминкиназой (Е) ( $\lambda_{\text{возб}} = 350$  нм). Условия определения: 0,01 М трис-НС1 буфер (рН 7,3), Т 293°К, [Е] 0,24 М

Комплекс	$\lambda$	макс	нм	Р	440	Р	480	В	$K_s \cdot 10^4, M^{-1}$
		фл.			350		350		
ТНС (H <sub>2</sub> O)	505 ± 2,0			0,00	0,00		0,001	–	
ТНС (этанол)	435 ± 1,0			0,00	0,00		0,40	–	
Е + АНС	468 ± 1,0			0,25	0,23		0,03	0,5	
Е + ТНС	443 ± 1,0			0,26	0,26		0,09	2,0	
Е + ТНС*	444 ± 1,0			0,27	0,26		–	–	

\*  $\lambda_{\text{возб}} = 390$  нм

идентичность центров связывания. Несмотря на сходство структуры зондов, АНС и ТНС значительно (в 4 раза) различаются по величинам KS. Это свидетельствует о важности гидрофобных взаимодействий при образовании комплекса белок-зонд, т. е. в связывании с белком участвует гидрофобный гетероцикл, содержащий в случае ТНС боковую метильную группу. Поскольку ТНС лучше связывается с молекулой белка, более информативен, наши результаты основаны на его флуоресцентных параметрах.

**Таблица 2.** – Влияние пирувата на флуоресценцию комплекса ТНС - тиаминкиназа ( $\lambda_{\text{возб}} = 337$  нм, концентрация пирувата –  $5 \cdot 10^{-3}$  М). Условия определения см. в подписе к таблице 1

Комплекс	$\tau_1$	$\tau_2$	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	X <sup>2</sup>
	нс				
ТНС (H <sub>2</sub> O)	0,10 ± 0,05	—	1,00	—	1,45
ТНС (этанол)	7,9 ± 0,44	—	1,00	—	1,25
Е + ТНС*	11,2 ± 0,33	2,3 ± 0,13	0,92	0,08	1,05
Е + ТНС**	11,3 ± 0,42	1,9 ± 0,21	0,90	0,10	1,34
Е+ТНС+ пируват**	10,2 ± 0,40	1,9 ± 0,20	0,88	0,12	1,36

\*  $\lambda_{\text{фл}} = 430$  нм, \*\*  $\lambda_{\text{фл}} = 480$  нм

Согласно таблице 1, ТНС в комплексе с тиаминкиназой имеет коротковолновое положение спектра флуоресценции (443 нм), что подтверждает его локализацию в гидрофобном участке макромолекулы. Квантовый выход свечения (В) при этом составляет 9%. Неэкспоненциальность затухания флуоресценции ТНС во многих случаях объясняется наличием наносекундной релаксации, при этом при краевом возбуждении, как правило, наблюдается батохромное смещение спектров, достигающее, например, у сывороточного альбумина человека 14 нм [16]. При связывании ТНС с тиаминкиназой использование длинноволнового возбуждения (390 нм) вызывает лишь незначительный сдвиг спектра излучения, не превышающий 1 нм (табл. 1). Увеличение температуры раствора до 35°С также не изменяет "краевой эффект". Всё это указывает на отсутствие наносекундной релаксации хромофоров. В этой связи главной причиной неэкспоненциальности законов затухания флуоресценции ТНС является гетерогенность центров связывания зонда на молекуле фермента. Математический анализ кривых затухания показал, что они хорошо аппроксимируются суммой двух экспонент с разными значениями длительности:  $\tau_1 = 11,2 \pm 0,33$  и  $\tau_2 = 2,3 \pm 0,13$  нс (табл. 2).

Вода – эффективный тушитель флуоресценции ТНС [3]. Тушение происходит по механизму переноса электрона на кластер, состоящий из четырех молекул воды. Для комплекса ТНС-тиаминкиназа возможности образования кластера ограничены и

поэтому тушение водой несущественно. Предполагается [17], что молекулы зонда в комплексе с белками могут иметь две конформации: плоскую, когда нафтильное и фенильное кольца находятся в одной плоскости (а), и тетраэдрическую с атомом азота в вершине тетраэдра (б). Конформер (а) вследствие смещения электронной плотности при возбуждении от фенильного кольца и атома азота к нафтильному обладает значительным дипольным моментом, поэтому его флуоресцентные свойства в отличие от конформера (б) зависят от полярности растворителя. Исходя из этого, можно допустить, что тип конформера в местах сорбции будет определяться свойствами центра, прежде всего его геометрией. Отсюда следует, что оба компонента затухания флуоресценции обусловлены свечением двух разных центров. Хромофоры, имеющие большую длительность свечения, представляют собой конформеры (б) ТНС, а хромофоры с меньшим  $\tau_{\text{фл}}$  – конформеры (а). Конформер (а), вероятно, более подвижен и испытывает значительное динамическое тушение со стороны аминокислотных остатков белка. Вклад этих хромофоров во флуоресценцию связанного с белком ТНС незначителен и составляет 8% при  $\lambda_{\text{фл}}$  430 нм. С увеличением длины волны свечения вклад компонентов практически не изменяется (табл. 2), что указывает на близость их спектров излучения, следовательно, и дипольных свойств окружения. В пределах спектра флуоресценции значение  $\tau_1$  остается неизменным,  $\tau_2$  уменьшается. Релаксационные процессы, протекающие параллельно с излучением, приводят к противоположной спектральной зависимости длительности свечения и поэтому не могут служить причиной наблюдаемых изменений  $\tau_2$ .

Как известно, непосредственную информацию о динамических свойствах связанных с белком молекул зонда дают поляризационные измерения. При отсутствии движений самого зонда деполяризация его флуоресценции будет происходить исключительно за счёт броуновского вращения всей белковой глобулы. В этом случае расчёт по формуле Левшина-Перрена при значениях  $P_0 = 0,44$  [6] и  $Mg = 52000$  для димерной тиаминкиназы [8] даёт значение  $P = 0,24$ . Это значение близко к экспериментально определяемому (см. табл. 1). Высокие значения степени поляризации, постоянные в пределах всей полосы флуоресценции, свидетельствуют о жёсткости окружения зонда, имеющего большую длительность свечения и вносящего наиболее значимый вклад в излучение, и об отсутствии у него наносекундной динамики.

Отсутствие обмена энергией электронного возбуждения между зондами говорит о значительной (более 10 Å) пространственной разобщённости двух центров связывания ТНС на молекуле тиаминкиназы. Наличие нескольких разных участков связывания для ТНС было обнаружено нами и ранее [4] методом гель-фильтрации, при графическом представлении данных эксперимента в координатах Скэтчарда.

При внесении АТФ в раствор тиаминкиназы,

после преинкубации белка с зондом, наблюдается значительное возрастание интенсивности свечения зонда и смещение максимума спектра флуоресценции в коротковолновую область приблизительно на 8 нм (рис. 1, кривая 2). Это свидетельствует о том, что АТФ и ТНС имеют разные области сорбции на молекуле белка, расположенные в непосредственной близости друг от друга, причём после связывания субстрата с белком заметно повышается гидрофобность микроокружения ТНС. Скорее всего, АТФ ограничивает доступ молекул воды к зонду.

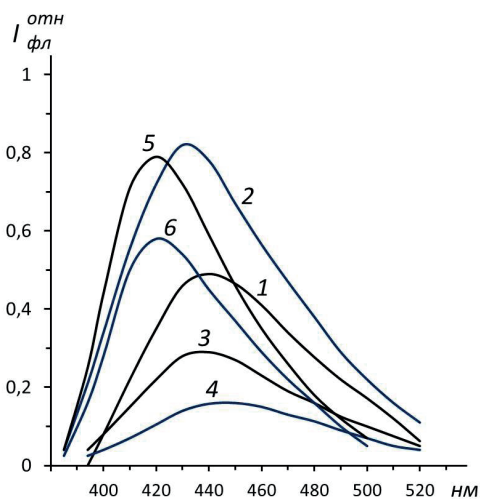


Рисунок 1. – Влияние АТФ (2), тиамин (3,6) и пирувата (4) на спектры флуоресценции ТНС, связанного с тиаминкиназой (1-4) и её комплекса с магнием (5,6). Условия определения:  $[E]$  0,25 мг/мл,  $[$ тиамин $]$   $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $[$ АТФ $]$   $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $[Mg^{2+}]$   $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $[$ пируват $]$   $5 \cdot 10^{-3}$  М; 0,01 М трис-НСI буфер (рН 7,3),  $\lambda_{\text{возб}}$  350 нм

Другой субстрат – тиамин – конкурирует за место связывания с ТНС, что выражается в тушении флуоресценции последнего в присутствии тиамин (рис. 1, кривые 3, 6), т. е. одним из двух участков локализации ТНС на молекуле тиаминкиназы головного мозга является активный центр фермента. Однозначным тому подтверждением могут служить результаты по изучению торможения активности тиаминкиназы по отношению к тиамину под действием ТНС (рис. 2). ТНС – конкурентный ингибитор с константой ингибирования, равной  $1,7 \cdot 10^{-5}$  М, что указывает на высокое сродство данного красителя к ферменту, близкое к сродству самого тиамин (рис. 2). Второй центр связывания зонда, возможно, является центром аллостерической регуляции, так как флуоресценция ТНС тушится пируватом (рис. 1, кривая 4), что наблюдается при связывании эффектора в ингибиторном центре фермента. При концентрации пирувата  $5 \cdot 10^{-3}$  М, когда его активирующее действие на ферментативную активность тиаминкиназы наиболее заметно, явно обнаруживается воздействие эффектора на оба центра связывания ТНС (табл. 2). Модельные исследования тушения флуоресценции пируватом в водно-спиртовых

растворах показали, что эффективное тушение флуоресценции комплекса зонд-белок лигандом не может быть объяснено иначе как связыванием тушителя с ферментом.

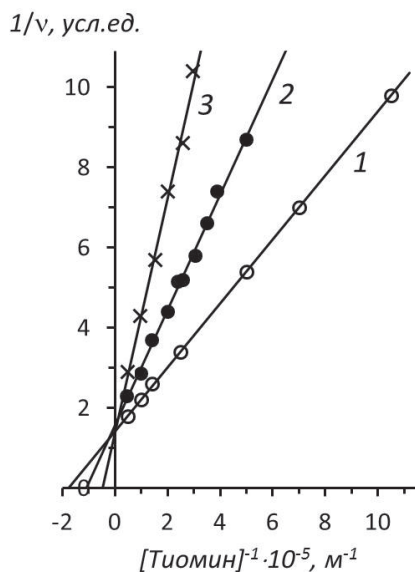


Рисунок 2. – Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации тиамин в координатах Лайнуивера-Берка. [TNC] = 0 (1),  $3 \cdot 10^{-5}$  (2) и  $5 \cdot 10^{-5}$  М (3)

Сопоставление спектров излучения комплекса TNC-тиаминкиназа после внесения в раствор тиамин и после внесения пирувата (рис. 1) показывает, что функциональная взаимосвязь указанных выше метаболитов и тиаминкиназы реализуется, очевидно, следующим образом: конформационные перестройки в белке, происходящие вследствие связывания пирувата, способствуют большему раскрытию области активного центра фермента, обеспечивая тем самым лучший доступ к нему молекул тиамин. Одновременно повышается подвижность микроокружения активного центра. Характерные признаки такого взаимодействия – длинноволновое смещение спектра флуоресценции комплекса TNC-белок (рис. 1) и уменьшение длительности его свечения (табл. 2) под воздействием эффектора.

Структурные аналоги пирувата – этиловый эфир пирувата и фосфоенолпируват – по-разному влияют на флуоресценцию комплекса тиаминкиназа-TNC (рис. 3а, табл. 3). Фосфоенолпируват в концентрации  $5 \cdot 10^{-3}$  М вызывает значительное (приблизительно в 5 раз) тушение флуоресценции связавшегося с ферментом зонда, этиловый эфир пирувата характеризуются более низкой эффективностью тушения.

Результаты модельных исследований показывают (рис. 3б), что последний – наиболее эффективный тушитель флуоресценции водно-этанольных (1:20) растворов TNC. При этом следует отметить, что тушение флуоресценции TNC в основном статическое, обусловленное образованием нефлуоресцирующих комплексов зонда с молекулой тушителя, о чем свидетельствует более значительное уменьшение интенсивности

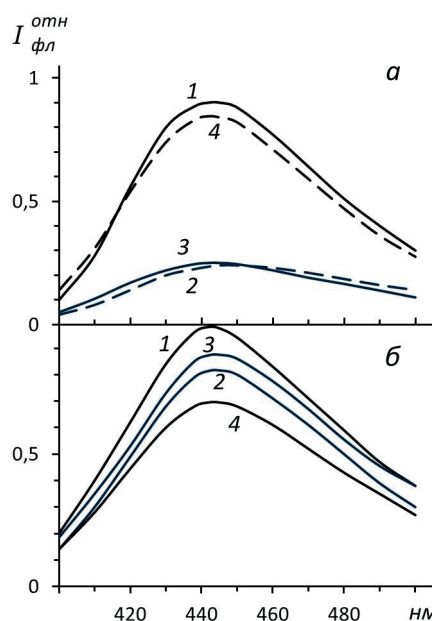


Рисунок 3. – Влияние пирувата (2), фос-фоенолпирувата (3) и этилового эфира пирувата (4) на спектры флуоресценции комплекса TNC-тиаминкиназа в 0,01 М трис-НСl буфере (рН 7,3) (а) и TNC в водно-этанольном (1:20) растворе (б). [Эффектор] 0 (1),  $5 \cdot 10^{-3}$  М (2-4).  $\lambda_{возб}$  350 нм

свечения флуорофора по сравнению с уменьшением длительности (табл. 3).

Таблица 3. – Влияние пирувата, этилового эфира пирувата и фосфоенолпирувата на параметры стационарной и разрешённой во времени флуоресценции TNC ( $\lambda_{возб}$  337 нм,  $\lambda_{фл}$  440 нм) при связывании с тиаминкиназой (5:1) [Эффектор]  $5 \cdot 10^{-3}$  М. Условия определения см. в подписи к таблице 1

Эффектор	$\lambda$	макс	нм	$\tau^*$	$\tau_1$	$\tau_2$	$S_1$	$S_2$
		фл.						
—	443			10,8	11,20	2,4	0,92	0,08
Пируват	450			7,8	10,20	1,9	0,88	0,12
Этиловый эфир пирувата	443			10,9	11,50	2,2	0,94	0,06
Фос-фоенолпируват	443			8,0	9,18	2,5	0,85	0,15

\* Среднюю длительность  $\tau$  определяли по формуле

$$\tau = \frac{\sum_{i=1}^N a_i \tau_i}{\sum_{i=1}^N a_i}$$

Следовательно, главной причиной уменьшения интенсивности флуоресценции связанного с тиаминкиназой TNC может быть диссоциация комплекса зонд-фермент и образование нового комплекса эффектора с зондом. Это возможно только в том случае, если эффекторы и TNC имеют общие или находящиеся в непосредственной близости друг от друга центры сорбции. В та-

кой ситуации относительно невысокая эффективность тушения флуоресценции комплекса фермент-ТНС под действием этилового эфира пирувата подтверждает правомочность сделанного выше вывода о важности карбоксильной группы пирувата в связывании с ферментом.

Более того, карбоксильная группа пирувата существенна для связывания в активирующем центре тиаминкиназы, который находится вблизи центра сорбции тиамин. Эти выводы вытекают из сравнения результатов воздействия фосфоенолпирувата и пирувата на спектральные и кинетические характеристики комплекса фермент-ТНС (рис. 1, табл. 3).

Несмотря на то, что фосфоенолпируват и пируват имеют общий центр связывания с тиаминкиназой, первый является ингибитором, вероятно, из-за отсутствия карбонильной группы. Определённую роль может играть и фосфатная группа фосфоенолпирувата, способная создать стерические препятствия взаимодействию тиамин с фосфатными группами АТФ.

Исследование воздействия ионов  $Mg^{2+}$  на комплекс зонд-ТНС-тиаминкиназа показало, что внесение в раствор фермента ионов металла после предварительной инкубации белка с ТНС и далее – с субстратами или эффекторами – заметного влияния на параметры флуоресценции ТНС не оказывает. Однако в случае, когда краситель первоначально взаимодействует с комплексом металл-белок и лишь затем – с тиамином или пируватом, двухвалентные ионы металла вносят принципиальные изменения в флуоресцентные характеристики зонда (рис. 1). Зондирование тиаминкиназы посредством ТНС после её связывания с  $Mg^{2+}$  свидетельствует, что в результате воздействия кофактора на молекулу белка области локализации зонда приобретают исключительную гидрофобность. Данный вывод вытекает из того, что спектр флуоресценции комплекса  $Mg^{2+}$ -Е-ТНС имеет очень коротковолновое положение ( $\lambda_{\text{макс}} = 419$  нм, рис. 1), которое наблюдается у ТНС, например, в бутаноле или диоксане. В этой связи наиболее обоснованным выглядит предположение о том, что ионы метал-

ла связывают (фиксируют) подвижные полярные боковые группы аминокислот, которые ограничивают доступ субстратам и аллостерическим эффекторам к активному центру. В результате создаются оптимальные условия для протекания ферментативной реакции и её аллостерической регуляции. При этом не исключена вероятность того, что после связывания с ионами металла в молекуле тиаминкиназы "открываются" дополнительные регуляторные участки взаимодействия с аллостерическими эффекторами. Сходная интерпретация результатов прослеживается при анализе зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации активаторов ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) в отсутствие и при наличии избытка ионов металлов [1], результатов собственной флуоресценции белка в присутствии ионов [4], их воздействия на комплекс тиаминкиназа-пиридоксаль-5'-фосфат [5].

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать вывод, что активный центр тиаминкиназы головного мозга представляет собой гидрофобную полость, в которой субстраты – тиамин и АТФ – адсорбируются так, что пирофосфатный радикал субстрата-донора направлен в сторону субстрата-акцептора (рис. 4). Ионы двухвалентных металлов за счёт связывания подвижных отрицательно заряженных групп белка и пирофосфатной группы АТФ обеспечивают оптимальную геометрию сорбции молекул субстратов в активном центре фермента и, очевидно, способствуют их сближению.

Что касается активирующего эффекта пирувата, то, связываясь карбоксильной и, возможно, карбонильной группами в гидрофильной области, в непосредственной близости от центра локализации тиамин, данный метаболит путем взаимодействия карбонильной группы пирувата с четвертичным азотом тиазола витамина  $B_1$  может облегчать процесс отщепления продукта – тиаминдифосфата – от молекулы тиаминкиназы. Кроме того, его связывание повышает сегментальную подвижность белковой молекулы, что может приводить к увеличению скорости реакции.

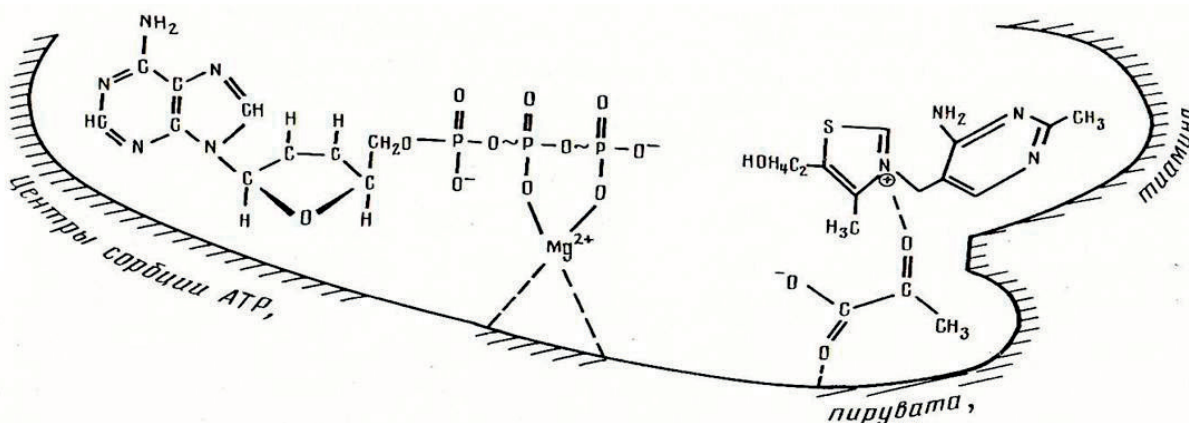


Рисунок 4. – Схема расположения субстратов и пирувата в активном центре тиаминкиназы

### Вывод

Результаты исследований свидетельствуют о том, что участки сорбции субстратов, кофакторов и эффекторов тиаминокиназы головного моз-

### Литература

1. Черникевич, И. П. Ферментные системы биотрансформации активных форм витамина В<sub>1</sub> (структура, свойства, регуляция) : автореф. дис. ... докт. хим. наук : 03.00.04 / Иван Петрович Черникевич ; Минский институт биоорганической химии. – Минск, 1996. – 32 с.
2. Макаричов, А. Ф. Тиамирифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина В<sub>1</sub> / А. Ф. Макаричов. – Минск : Белорусская наука, 2008. – 433 с.
3. Gibson, G. E. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration / G. E. Gibson, H. Zhang // *Neurochem. Int.* – 2002. – Vol. 40. – P. 493-504.
4. Черникевич, И. П. Спектрально-кинетические исследования структуры и динамики тиаминокиназы головного мозга свиньи / И. П. Черникевич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2015. – № 2. – С. 60-63.
5. Черникевич, И. П. Особенности флуоресценции тиаминокиназы головного мозга свиньи, ковалентно меченой пиридоксаль-5'-фосфатом / И. П. Черникевич, К. В. Болтромаеук, М. Ю. Ваврениук // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2016. – № 1. – С. 67-72.
6. Владимиров, Ю. А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю. А. Владимиров, Г. Е. Добрецов. – Москва : Наука, 1980. – 320 с.
7. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович. – Москва : Мир, 1986. – 496 с.
8. Черникевич, И. П. Сравнительный кинетический анализ тиаминокиназ из пивных дрожжей и головного мозга свиньи / И. П. Черникевич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2011. – № 3. – С. 25-28.
9. Бурштейн, Э. А. Люминесценция белковых хромофоров (модельные исследования) / Э. А. Бурштейн // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – Москва, 1976. – С. 171.
10. Левшин, Л. В. Люминесценция и ее измерение: молекулярная люминесценция / Л. В. Левшин, А. М. Салецкий. – Москва : Изд-во МГУ, 1999. – 272 с.
11. Гачко, Г. А. Автоматизированный импульсный спектрофлуориметр / Г. А. Гачко, В. К. Зыбельт, Л. Н. Кивач // Журнал прикладной спектроскопии. – 1987. – Т. 47, № 2. – С. 335-339.
12. Маскевич, А. А. Комплекс аппаратных и программных средств для исследования кинетики затухания флуоресценции / А. А. Маскевич, В. И. Степура, П. Т. Балинский // *Вестник Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сeryя 2.* – 2013. – № 3 (159). – С. 107-119.
13. Башарин, С. К. Разложение свертки кривых затухания флуоресценции / С. К. Башарин, Г. А. Гачко, Л. Н. Кивач // Журнал прикладной спектроскопии. – 1990. – Т. 52, № 1. – С. 48-52.
14. Vos, K. Application of a reference convolution method to tryptophane fluorescence in proteins / K. Vos, A. Hoek, A. J. Visser // *Eur. J. Biochem.* – 1987. – Vol. 165, № 1. – P. 55-63.
15. O'Connor, D. V. Time-correlated Single Photon Counting / D. V. O'Connor, D. Phillips. – London : Academic Press, 1984. – 283 p.

га свиньи, пространственно разделены, их взаимодействие осуществляется путём конформационной перестройки глобулы белка. Предложена схема топографии активного центра фермента.

16. Демченко, А. П. Люминесценция и динамика структуры белков / А. П. Демченко. – Киев : Наукова думка, 1988. – 280 с.

17. Kumbar, M. A. Conformation study of N-phenyl-1-naphthylamine and 1-anilino-8-naphthalene sulphonate by the empirical method / M. Kumbar, V. T. Maddaiach // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1977. – Vol. 497, № 3. – P. 707-718.

### References

1. Chernikevich IP. Fermentnye sistemy biotransformacii aktivnyh form vitamina В<sub>1</sub> (struktura, svojstva, reguljacija) [masters thesis]. Minsk (Belarus); 1996. 32 p. (Russian).
2. Makarchikov AF. Tiaminrifosfat: novyj vzgljad na некоферментную функцию витамина В<sub>1</sub>. Minsk: Belorusskaja nauka; 2008. 433 p. (Russian).
3. Gibson GE, Zhang H. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. *Neurochem. Int.* 2002;40:493-504.
4. Chernikevich IP. Spektralno-kineticheskie issledovaniya struktury i dinamiki tiaminkinazy golovnogogo mozga svini [Spectroscopic investigation of structure and dynamics of thiamine kinase in pig brain tissue]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University]. 2015;2:60-63. (Russian).
5. Chernikevich IP, Boltromeyuk KV, Vavraniuk MY. Osobennosti fluorescencii tiaminkinazy golovnogogo mozga svini, kovalentno mechenoj piridoksal'-5'-fosfatom [Peculiarities of fluorescence of thiamine kinase covalently labeled with pyridoxal-5-phosphate in pig brain]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University]. 2016;1:67-72. (Russian).
6. Vladimirov JuA, Dobrecov GE. Fluorescentnye zondy v issledovanii biologicheskikh membran. Minsk: Nauka; 1980. 320 p. (Russian).
7. Lakovich Dzh. Osnovy fluorescentnoj spektroskopii. Moskva: Mir; 1986. 496 p. (Russian).
8. Chernikevich IP. Sravnitelnyj kineticheskij analiz tiaminkinaz iz pivnyh drozhzhej i golovnogogo mozga svini. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University]. 2011;3:25-28. (Russian).
9. Burshtejn JeA. Ljuminescencija belkovyh hromoforov (modelnye issledovaniya). In: Itogi nauki i tehniki. Ser. Biofizika. Moskva: VINITI; 1976. p. 171. (Russian).
10. Levshin LV, Saleckij AM. Ljuminescencija i ee izmerenie: molekularnaja ljuminescencija. Minsk: Izd-vo MGU; 1999. 272 p. (Russian).
11. Gachko GA, Zybelt VK, Kivach LN. Avtomatizirovannyj impulsnyj spektrofluorimetr. *Zhurnal prikladnoj spektroskopii.* 1987;47(2):335-339. (Russian).
12. Maskevich AA, Stepuro BI, Balinskij PT. Kompleks apparatnyh i programnyh sredstv dlja issledovaniya kinetiki zatuhaniya fluorescencii [The complex of hardware and program instruments for research of kinetics of fluorescence offenuation]. *Vesnik Grodzenskaga dzjarzhaynaga yniversiteta imja Janki Kupaly. Seryja 2.* 2013;3(159):107-119. (Russian).
13. Basharin SK, Gachko GA, Kivach LN. Razlozhenie svertki krivyh zatuhaniya fluorescencii. *Zhurnal prikladnoj spektroskopii.* 1990;52(1):48-52. (Russian).

14. Vos K, Hoek A, Visser AJ. Application of a reference convolution method to tryptophane fluorescence in proteins. *Eur. J. Biochem.* 1987;165(1):55-63.
15. O'Connor DV, Phillips D. *Time-correlated Single Photon Counting*. London: Academic Press; 1984. 283 p.
16. Demchenko AP. *Ljuminescencija i dinamika struktury belkov*. Kiev: Naukova dumka; 1988. 280 p. (Russian).
17. Kumbhar MA, Maddaiach VT. Conformation study of N-phenyl-1-naphthylamine and 1-anilino-8-naphthalene sulphonate by the empirical method. *Biochim. Biophys. Acta.* 1977;497(3):707-718.

## TOPOGRAPHY RESEARCH OF THIAMINE KINASE ACTIVE CENTER IN PIG BRAIN USING FLUORESCENT PROBES

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

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

---

*Background.* Biosynthesis of thiamine-diphosphate – coenzyme form of  $B_1$  – is carried out with thiamine kinase (EC 2.7.6.2). The mechanism and ways of its regulation can be essentially clarified after identification of structural organization of enzyme active center and its conformational mobility.

*Objective.* To study topography of thiamine kinase active center in pig brain and local conformation phenomena, which are responsible for protein functionality.

*Material and methods.* Research has been carried out on electrophoretically homogeneous preparations of pig brain enzyme using 2-toluidinenaphthalene-6-sulfonate and 1-anilidonaphthalene-8-sulfonate as probes.

*Results.* It has been established that active center of thiamine kinase is a hydrophobic cavity, where thiamine and ATP (adenosine triphosphate) are sorbed by pyrimidine and adenine cycles, and diphosphate radical of substrate-donor is directed to substrate-acceptor side. Pyruvate is connected where thiamine is located and facilitates elimination of thiamine diphosphate. Metal ions define optimal sorption geometry of substrates and, obviously, contribute to its convergence. Organization model of thiamine kinase catalytic center has been proposed.

*Conclusions.* The sorption area of substrates, cofactors and effectors in enzyme molecule are spastically divided. Their interaction is implemented with conformational reorganization of globule.

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

---

Поступила: 27.03.2018

Отрецензирована: 03.05.2018