

УДК 577.152.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ С ТИАМИНТРИФОСФАТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ МЕМБРАН ПОЧЕК БЫКА

*И.Э. Гуляй¹, А.Ф. Макарович¹, И.П. Черникевич²*¹ Институт биохимии НАНБ, г. Гродно² Гродненский государственный медицинский университет

Из мембран почек быка выделено 6 ферментов с ТТФазной активностью. Показано, что все 6 белков проявляют рН-оптимум в слабокислой среде (5,0-5,5), активируются ионами Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} и катализируют гидролиз различных фосфатсодержащих соединений, причем наиболее высокая скорость реакции наблюдается с АТФ или ИТФ в качестве субстратов. Полученные результаты указывают на то, что гидролиз ТТФ в мембранах почек быка осуществляется неспецифическими фосфатазами.

Ключевые слова: тиаминтрифосфатаза, нуклеозидтрифосфатаза, мембраны, почки быка.

Six enzymes with ThTP-ase activity were isolated from membranes of bovine kidney. All the enzymes had a pH optimum in the mild acid medium pH (5,0-5,5) were activated by metal cations (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}) for maximal activity and hydrolyzed a variety of phosphate compounds, the highest activity being with ATP or ITP as substrates. These results imply the hydrolysis of ThTP in bovine kidney is catalyzed with non-specific phosphatases.

Key words: thiamine triphosphatase, nucleoside triphosphatase, membranes, bovine kidney.

Нарушения системы тиамин-зависимых реакций являются патогенетическим фактором синдрома Вернике-Корсакова, приводят к расстройствам нервной и сердечно-сосудистой систем у человека и экспериментальных животных [5]. Во всех исследованных биологических объектах тиамин обнаружен в виде свободной формы и трех фосфорных эфиров: тиаминмонофосфата (ТМФ), тиаминдифосфата (ТДФ) и тиаминтрифосфата (ТТФ). Биохимическая активность ТДФ обусловлена его участием как кофактора в реакциях окислительного декарбоксилирования α -кетокислот, пентозофосфатного пути, обмена аминокислот с разветвленной цепью и фотосинтеза [7]. Роль ТТФ и ТМФ в жизнедеятельности клетки неизвестна. В настоящее время ТМФ рассматривается как промежуточный продукт обмена ТДФ. Ранее предполагалось, что ТТФ выполняет специфическую функцию в нервной ткани, связанную с генерацией и распространением нервного импульса [5]. Однако полученные недавно экспериментальные данные позволяют предполагать, что ТТФ участвует в молекулярных механизмах адаптации клетки к изменениям физиологических условий [9]. У млекопитающих внутриклеточная концентрация ТТФ регулируется специфичной растворимой тиаминтрифосфатазой (ТТФаза, КФ 3.6.1.28) [10]. Этот фермент широко экспрессирован в органах и тканях человека [8]. Кроме того, в тканях животных обнаружена ТТФазная активность, ассоциированная с мембранами [2, 4, 11]. В настоящее время вопрос

о специфичности мембранно-связанной ТТФазы и ее участия в метаболизме ТТФ в тканях млекопитающих остается открытым. В связи с этим цель настоящей работы заключалась в выделении, частичной очистке и исследовании свойств ферментов с ТТФазной активностью из мембран почек быка.

Материалы и методы. В работе использованы тиаминдифосфат (ТДФ), "Sigma"; фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), *n*-нитрофенилфосфат (НФФ) "Chemapol"; сервацел КМ-32, АТФ, ИТФ, ТМФ "Reanal"; тритон X-100, "Ferak"; тойоперл НВ-60, тойоперл НВ-55 "Toyo Soda Co", сефакрил S-200 "Pharmacia"; остальные реагенты производства "Реахим".

Начальные скорости гидролиза ТТФ, АТФ, ИТФ, ТДФ, ТМФ и РР измеряли по образованию неорганического фосфата (P_i), количество которого определяли по методу Sapru et al. [12]

Нитрофенилфосфатазную активность (НФФаза) регистрировали по количеству *n*-нитрофенола, концентрацию которого рассчитывали исходя из значения коэффициента молярного поглощения $\epsilon_{405} = 18500$ [1].

Молекулярную массу определяли методом гель-фильтрации на калиброванной белками-стандартами колонке ($\varnothing 1,5 \times 40$ см) с тойоперлом НВ-60 в 25 мМ трис-НСl буфере, рН 7,5, содержащем 0,3 М NaCl.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [6] и поглощению при 280 нм.

ГУЛЯЙ И.Э. науч. сотр. лаб. энзимологии, Институт биохимии НАНБ, г.Гродно, val@biochem.unibel.by, т. 33 63 01

МАКАРЧИКОВ А.Ф. к.б.н., зав. лаб. энзимологии, Институт биохимии НАНБ, г. Гродно, val@biochem.unibel.by, т. 33 63 01

ЧЕРНИКЕВИЧ И.П. д.х.н., кафедра общей и биоорганической химии ГрГМУ, т. 78 34 32

Результаты исследования. Все операции по выделению, очистке и солюбилизации ТТФазы проводились при 4°C. Для получения мембран свежие почки освобождали от почечного жира, промывали дистиллированной водой, разрезали на небольшие куски, замораживали и хранили при -20°C. Размороженные образцы гомогенизировали в трехкратном объеме 50 мМ трис-НСl буфера, рН 7,3, содержащего 0,15 М КСl, 0,2 мМ ЭДТА, в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (2000 об · мин⁻¹, 10 циклов) и центрифугировали 60 мин при 105000×g. Препарат мембран хранили при -20°C до использования.

Солюбилизацию мембран осуществляли в 50 мМ трис-НСl буфере, содержащем 1% тритон Х-100 и 0,1 мМ ФМСФ. После инкубации в течение 30 мин. гомогенат центрифугировали 60 мин. при 105000×g. Солюбилизат разбавляли в 1,6 раза и высаливали сульфатом аммония в диапазоне насыщения 35-60%. Осадок растворяли в трис-буфере (20 мМ трис-НСl, рН 7,2, 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ цистеин) и хроматографировали на колонке (Ø 4,5 × 44 см) с сефакрилом S-200 в том же буфере со скоростью 5 см · ч⁻¹. Фракции с ТТФазной активностью объединяли, доводили рН до 5,2, добавляли глицерин до концентрации 10% и наносили на колонку (Ø 2,6 × 56,5 см) с сервацелом КМ-32, уравновешенную 20 мМ ацетатным буфером, рН 5,2, содержащим 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ цистеин и 10% глицерин. Элюцию белка осуществляли возрастающим градиентом NaCl от 50 мМ до 1 М (по 250 мл в каждой камере) со скоростью потока 8 см · ч⁻¹. ТТФазная активность вымывалась двумя пиками, которые мы условно обозначили цифрами I и II в порядке их появления в элюате. При этом важно отметить, что для ТТФазы, АТФазы и НФФазы наблюдались идентичные профили элюции. Часть активности не связывалась с носителем (фракция Н). Для дальнейшей очистки фракции I-го пика объединяли, высаливали сульфатом аммония в диапазоне 0-70%S и пропускали через колонку (Ø 2 × 18 см) с тойоперлом HW-55, уравновешенную трис-буфером, содержащим 35%S (NH₄)₂SO₄. Десорбцию фермента проводили понижающимся градиентом сульфата аммония от 35 до 0%S (по 100 мл в каждой камере) со скоростью 7 см · ч⁻¹. Активные фракции объединяли, концентрировали с помощью мембранных фильтров и хроматографировали на колонке (Ø 1,5 × 40 см) с тойоперлом HW-60, уравновешенной 25 мМ трис-НСl буфером, рН 7,5, содержащим 0,3 М NaCl. В результате гель-фильтрации ТТФазная активность разделялась на 2 пика, один из которых элюировался в свободном объеме колонки (пик I₁, *m* > 1000 кДа), а другой значительно запаздывал (пик I₂, *m* = 66,7 кДа). Аналогичные профили элюции наблюдались для АТФазы и НФФазы. Полученные препараты использовались для дальнейших исследований.

Очистку II-го пика, выявленного при ионообменной хроматографии, осуществляли по такой же схеме: высаливание (0-35%S) → гидрофобная хроматография на тойоперле HW-55 → гель-фильтрация на тойоперле HW-60. В связи с тем, что ТТФаза II-го пика более прочно связывалась с носителем при гидрофобной хроматографии и не вымывалась градиентом (NH₄)₂SO₄, для элюции белка применяли возрастающий градиент (0-2%) тритона Х-100 (по 100 мл в каждой камере). Скорость потока составляла 2 см·ч⁻¹. Фракции с высокой активностью объединяли, концентрировали и хроматографировали на колонке с тойоперлом HW-60 со скоростью 6 см · ч⁻¹. ТТФазная активность разделялась на два пика, один из которых выходил в свободном объеме колонки (пик II₁, *m* > 1000 кДа), а другой следовал непосредственно за ним (пик II₂, *m* > 1000 кДа). На всех стадиях очистки пика II элюционные профили ТТФазной, АТФазной и НФФазной активностей полностью совпадали.

Несвязавшийся при ионообменной хроматографии белок (фракция Н) высаливали (NH₄)₂SO₄ при 70%S и наносили на колонку с тойоперлом HW-55, уравновешенную 70%S (NH₄)₂SO₄ в трис-буфере. Элюцию осуществляли понижающимся градиентом (NH₄)₂SO₄ от 70 до 0%S (по 100 мл в каждой камере) со скоростью 5 см · ч⁻¹. На данном этапе обнаруживалось два пика активности (Н₁ и Н₂), каждый из которых концентрировали и последовательно хроматографировали на колонке с тойоперлом HW-60 со скоростью 6 см·ч⁻¹. Молекулярная масса ферментов Н₁ и Н₂ составляла соответственно 550 кДа и > 1000 кДа.

Таким образом, в результате частичной очистки из мембран почек быка выделено 6 белков с ТТФазной активностью. При использовании ТТФ в качестве субстрата степень очистки составила: для I₁ – 8,9, I₂ – 6,5, II₁ – 47, II₂ – 48, Н₁ – 14 и Н₂ – 20 раз.

Все шесть белков с ТТФазной активностью проявляли рН-оптимум в слабокислой среде при рН 5,0-5,5 (данные не показаны) и активировались катионами двухвалентных металлов. Как видно из таблицы 1, наиболее выраженный активирующий эффект наблюдался при использовании Mg²⁺ и Ca²⁺. Во всех случаях Mn²⁺ является не столь эффективным активатором, а по отношению к ферменту I₂ обладает свойствами ингибитора.

Частично очищенные ферменты подчинялись кинетике Михаэлиса-Ментен в исследованном диапазоне концентраций ТТФ и АТФ и характеризовались разным кажущимся сродством к субстратам. *K_M* для ТТФ и АТФ, рассчитанные по уравнениям регрессии в координатах Хейнса, представлены в таблице 2. Во всех случаях более высокое кажущееся сродство наблюдалось к АТФ.

В таблице 3 представлены данные о субстратной специфичности исследуемых ферментов. Как видно из таблицы, для ферментов I₁ и II₂ самая вы-

сокая активность наблюдалась с АТФ, ферменты I_2 , Π_1 и H_2 с более высокой скоростью катализировали гидролиз ИТФ, а для H_1 лучшим субстратом оказался НФФ.

В настоящей работе впервые описаны кинетические свойства и специфичность частично очищенных ферментов с ТТФазной активностью из мембран почек быка. Свойства мембранно-связанной ТТФазы исследовались ранее в препаратах из электрического органа *Electrophorus electricus* [4], мозга [2] и мышцы крысы [11]. Как оказалось, общим для этих фосфатаз является абсолютная зависимость от ионов двухвалентных металлов, рН-оптимум в нейтральной или слабокислой среде и высокие значения K_m для ТТФ (1,5-1,8 мМ). Для исследования специфичности фермента из мозга крысы Barchi & Braun [2] использовали негидролизующий β - γ -метиленфосфатный аналог ТТФ, который, как оказалось, снижает скорость ТТФазной реакции, но не влияет на гидролиз нуклеозидтрифосфатов. Кроме того, было показано, что АТФ и АДФ ингибировали активность ТТФазы с K_i 20 мкМ и 75 мкМ, соответственно [3]. Это позволило дифференцировать ТТФазную активность мембран мозга крысы от Mg^{2+} -зависимой АТФазы. Matsuda et al. [11] пришли к заключению о специфичности мембранной ТТФазы мышцы крысы на основании того, что анионы NO_3^- ингибировали АТФазную активность, в то же время проявляя эффект активации на скорость гидролиза ТТФ. Однако представленные выше доказательства специфичности интегральной ТТФазы не могут рассматриваться в качестве достаточных, так как ни в одном из случаев фермент не был выделен из мембран и в какой-либо степени очищен, что объясняется крайне низкой стабильностью солюбилизованных препаратов.

Исследованные нами ферменты заметно отличаются по свойствам от описанных в литературе мембранных белков с ТТФазной активностью как в отношении рН-оптимума, значений K_m , так и стабильности. Выделенные из мембран почек быка ферменты сохраняли активность в растворе после удаления детергента в течение нескольких недель и проявляли достаточно высокую устойчивость к замораживанию-оттаиванию. Все это указывает на присутствие в органах млекопитающих нескольких различных ферментов, способных катализировать гидролиз ТТФ.

Исходя из полученных в настоящей работе данных, нам представляется вполне обоснованным заключение о том, что реакция гидролиза ТТФ, катализируемая мембранами почек быка, осуществляется благодаря активности неспецифических фосфатаз.

Литература

- Холод В.М., Ермолаев Г.Ф. Справочник по ветеринарной биохимии. - Мн.: Ураджай, 1988. - 167с.
- Barchi R.L., Braun P.E. A membrane-associated thiamine triphosphatase from rat brain. Properties of the enzyme // J. Biol.

Таблица 1. Влияние катионов двухвалентных металлов на ферменты с ТТФазной активностью из мембран почек быка (% от максимальной активности)

Катион	Фермент					
	I_1	I_2	Π_1	Π_2	H_1	H_2
Без	29	43,2	30,1	3,5	42,6	51,8
Mg^{2+}	100	62,7	100	100	100	100
Mn^{2+}	85,5	30,2	61,5	34,6	33,8	54,2
Ca^{2+}	96,8	100	66,4	68,1	76,8	98,9

Таблица 2. Константы Михаэлиса ферментов гидролиза ТТФ из мембран почек быка (мкМ)

Субстрат	Фермент					
	I_1	I_2	Π_1	Π_2	H_1	H_2
АТФ	10,2±4,0	43,2±3,1	13,0±0,4	18,3±3,6	76,5±19,1	11,3±1,5
ТТФ	97,2±17,6	224,2±12,9	66,4±5,2	146,2±7,3	155,6±12,1	1235,5±4,3

Таблица 3. Субстратная специфичность ферментов с ТТФазной активностью из мембран почек быка (удельная активность нмоль/мин/ мг белка)

Субстрат	Фермент					
	I_1	I_2	Π_1	Π_2	H_1	H_2
ИТФ	79,38	137,10	391,96	553,65	176,04	310,25
АТФ	115,45	77,73	301,70	600,73	185,54	270,05
ТМФ	1,425	2,00	32,87	39,93	3,32	0,028
ТДФ	36,75	51,96	165,12	149,3	60,92	2,41
ТТФ	68,50	50,00	362,96	371,56	109,02	156,25
НФФ	23,50	3,40	117,30	126,74	240,54	159,10
РРi	15,50	31,97	54,48	102,27	33,44	45,74

Chem. - 1972. - Vol. 247. - P.7668- 7673.

- Barchi R.L. Membrane thiamine triphosphatase from rat brain: inhibition by ATP and ADP // J. Neurochem. - 1976. - Vol. 26. - P. 715-720.
- Bettendorff L., Longree I., Wins P. Solubilization of thiamine triphosphatase from the electric organ of *Electrophorus electricus* // Biochim. Biophys. Acta. - 1991. - Vol. 1073. - P. 69-76.
- Bettendorff L., Wins P. Thiamine derivatives in excitable tissues: metabolism, deficiency and neurodegenerative diseases // Recent Res. Devel. Neurochem. - 1999. - Vol. 2. - P. 37-62.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. - 1976. - Vol. 72 - P.248.
- Haas H. Thiamin and the brain // Annu. Rev. of Nutr. - 1988. - Vol. 8. - P. 483 - 515.
- Lakaye B., Makarchikov A., Fernandes Antunes A.F. Molecular characterization of a specific thiamine triphosphatase widely expressed in mammalian tissues // J. Biol. Chem. - 2002. - V.277. - P. 13771 - 13777.
- Makarchikov A.F., Lakaye B., Gulyai I.E. Thiamine triphosphate and thiamine triphosphatase activities: from bacteria to mammals // Cell. Mol. Life Sci. - 2003. - Vol. 60. - P. 1477 - 1488.
- Makarchikov A. F., Chernikevich I. P. Purification and characterization of thiamine triphosphatase from bovine brain // Biochim. Biophys. Acta. - 1992. - Vol.1117. - P. 326 - 332.
- Matsuda T., Tonomura H., Baba A. Membrane-associated thiamine triphosphatase in rat skeletal muscle // Int. J. Biochem. - 1991. - Vol.23. - P. 1111-1114.
- Sapry M.K., Geetha H., Shetty T.K. A single reagent method of phosphate estimation in phosphatase(s) assay. // Ind. J. Biochem. Biophys. - 1987. - Vol. 24. - P. 340 - 343.

Summary

STUDIES ON ENZYMES WITH THIAMINE TRIPHOSPHATASE ACTIVITY IN THE MEMBRANES OF BOVINE KIDNEY

I.E. Gulyai, A.F. Makarchikov, I.P. Chernikevich

Six enzymes with ThTPase activity were isolated from the membranes of bovine kidney. All the enzymes had a pH optimum in the mild acid medium pH (5,0-5,5) were activated by metal cations (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}) for maximal activity and hydrolyzed a variety of phosphate compounds, the highest activity being with ATP or ITP as substrates. These results imply the hydrolysis of ThTP in bovine kidney is catalyzed with non-specific phosphatases.