УДК: 577.152.276*2.042.535.370

СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ И ДИНАМИКИ ТИАМИНКИНАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА СВИНЬИ

Черникевич И.П.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

С использованием стационарной флуориметрии изучено влияние субстратов (тиамин, Mg·ATP), кофакторов (Mg2+, Mn2+, Ca2+) и эффекторов (фосфорные эфиры тиамина, пируват, фосфоенолпируват, этиловый эфир пирувата) на структуру и динамику тиаминкиназы (КФ 2.7.6.2) головного мозга свиньи. Показано, что связывание лигандов с тиаминкиназой сопровождается заметным тушением её триптофановой флуоресценции. Анализ полученных результатов позволил установить, что тиамин и ATP связываются, соответственно, пиримидиновым и адениновым циклами в гидрофобной области молекулы фермента. Пируват имеет два центра связывания: ингибирующий (относительно гидрофобный) и активирующий (гидрофильный). Последний находится в непосредственной близости с центром связывания тиамина и обеспечивает взаимодействие карбонильной группы пирувата с субстратом. Ионы двухвалентных металлов увеличивают сродство субстратов и эффекторов к белку, способствуя одновременно повышению гидрофобности его активного центра.

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

Дефицит тиамина различной этиологии сопровождается многообразными биохимическими сдвигами, свидетельствующими о серьёзных нарушениях клеточного метаболизма. Временная последовательность развития событий, их причинная обусловленность и взаимосвязь происходящих при этом изменений остаются ещё полностью не расшифрованными [13]. Молекулярной основой обменных нарушений, наблюдаемых при развитии недостаточности витамина B1, считается снижение концентрации тиаминдифосфата – кофермента немногочисленных, но занимающих ключевое положение в метаболизме клетки тиаминдифосфатзависимых ферментов [7]. Биосинтез коферментной формы тиамина осуществляется тиаминкиназой, катализирующей двухсубстратную реакцию переноса дифосфатной группировки от молекулы ATP на тиамин:

ATP + тиамин ↔ тиаминдифосфат + AMP.

К настоящему времени фермент выделен в высокоочищенном состоянии из разных источников [2]. Описаны кинетическая модель функционирования тиаминкиназы, её субстратная специфичность, аллостерическая регуляция ионами металлов, механизм действия. Однако каких-либо сведений, касающихся пространственной организации молекулы фермента, её внутримолекулярной подвижности и взаимосвязи между структурой и возможностью регуляторного контроля активности белка при его пространственной перестройке, в литературе не имеется.

Для тиаминкиназы из пивных дрожжей в работах [8, 10] изучены некоторые спектрально-кинетические и поляризационные характеристики собственной флуоресценции белка. В настоящей работе продолжено изучение структурной организации и динамики тиаминкиназы, но в качестве объекта исследования выбрана тиаминкиназа мозга, где в отличие от дрожжей вместо четырёх две субъединицы и их внутримолекулярная подвижность, очевидно, будет более значительной. Исследования касаются регуляторных аспектов, – влияния субстратов, кофакторов и эффекторов на параметры триптофановой флуоресценции глобулы белка.

Материалы и методы

Тиаминкиназу из головного мозга выделяли по описанной ранее методике [11]. Удельную активность фермента выражали в нмоль тиаминдифосфата (ThDP), образовавшегося за 1 ч при 40°C в расчёте на 1 мг белка гомогенного препарата.

При оценке скорости биосинтеза ThDP в присутствии аллостерических эффекторов (пирувата, фосфоенолпирувата, этилового эфира пирувата) в качестве акцептора дифосфатных группировок вместо тиамина использовался меченый субстрат – [тиазол-2-14C] тиамин. В остальном состав инкубационной смеси идентичен описанному в работе [10]. Активность фермента в данном случае выражали в условных единицах (имп/мин), учитывая, что биосинтез 1 нмоль ThDP соответствует его радиоактивности 0,9 имп/мин.

Изменения структурной организации тиаминкиназы при взаимодействии с субстратами, кофакторами или эффекторами регистрировали после 20 мин. преинкубации компонентов в среде определения. Количество пирувата, фосфоенолпирувата, этилового эфира пирувата, связавшихся с белком, определяли методом гель-фильтрации на колонке (1,2x40 см) с сефадексом G-50 [4]. Число мест связывания и значения кажущихся констант связывания рассчитывали из зависимости γ/c от γ, где c – концентрация лиганда, γ – соотношение связанный лиганд/белок, моль/моль.

Спектры флуоресценции фиксировали на люминесцентной установке СДЛ-2 (ЛОМО, Россия), при этом спектральная ширина щелей не превышала 1 нм. Измерения при комнатной температуре проводили в прямоугольных кюветах со стороной 1 см. 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 (B) определяли относительно водного раствора триптофана, для которого B=0,20. Положение спектров собственной флуоресценции растворов белка и его комплексов с эффекторами определяли по величине отношения интенсивностей флуоресценции I_{315}/I_{350} или I_{320}/I_{370} и, соответственно, I_{370}/I_{430}, которые относятся к коротко- и длинноволновым краям спектров. Данные по тушению флуоресценции белка лигандами представляли графически в координатах Штерна-Фольмера [6] согласно уравнению

$$(I_0 - I)/I = K_{sv}\,[Q],$$

где I_0 и I – интенсивность флуоресценции об-

разца в отсутствие и в присутствии тушителя в концентрации Q; K_{sv} – константа Штерна-Фольмера. Состав буфера, концентрации лигандов и белка указаны в подписях к рисункам и таблице.

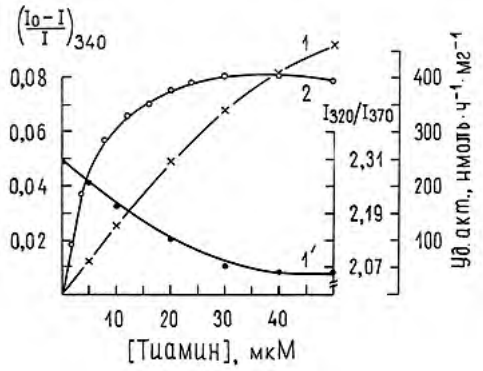


Рисунок 1. – Зависимость эффективности тушения, (I0–I)/I340) (I), положения спектра флуоресценции I_{320}/I_{370} (I ') и удельной ферментативной активности (2) тиаминкиназы от концентрации тиамина. Условия определения: 0,01 М трис-HCl-буфер (pH 7,3), [E] 0,8·10-6М, $\lambda_{возб}$ 296 нм, $\lambda_{фл}$ 340 нм

Таблица 1. – Спектральные и поляризационные характеристики флуоресценции комплексов тиаминкиназы с производными тиамина, АТР и ионами Mg2+ в 0,01 М трис-HCl-буфере, pH 7,3 (λвозб 296 нм, Т 293 К)

Соединение	I^{max}фл	I_{315}/I_{350}	P340*/295
Тиаминкиназа (E)	1,00	1,19	0,17
E+Mg^{2+}	0,93	1,19	0,17
E+Th	0,90	1,17	0,17
E+Th + Mg^{2+}	0,87	1,18	0,17
E+ThMP	0,90	1,17	0,17
E+ThDP	0,90	1,17	0,17
E+ThTP	0,89	1,15	0,17
E+ThTP+ Mg^{2+}	0,85	1,15	0,17
E+ATP	0,99	1,22	0,19
E+ATP + Mg^{2+}	0,97	1,22	0,19

[Th] = [ThMP] = [ThDP] = [ThTP] = 10^{-5} М, [ATP] = [Mg^{2+}] = 10^{-3} М, [E] 0,24 М, Mr 52 кДа.

*Нижний индекс, относящийся к степени поляризации (P), соответствует длине волны возбуждения, верхний – длине волны регистрации флуоресценции

Результаты и обсуждение

Из основных метаболитов клетки, оказывающих непосредственное влияние на скорость биосинтеза ThDP, особый интерес вызывают субстраты тиаминкиназной реакции: АТР и тиамин. Как видно из рис.1, связывание тиамина с тиаминкиназой сопровождается тушением ее триптофановой флуоресценции (кажущееся значение константы Штерна-Фольмера, K_{sv}, оцененное по начальному наклону кривой тушения, для тиамина равно 2,5·103 M^{-1}) и незначительным длинноволновым сдвигом спектра, характеризуемым уменьшением отношения интенсивности флуоресценции при 320 нм к интенсивности при 370 нм (I_{320}/I_{370}, кривая I '). Заметного изменения степени поляризации при этом не происходит. Тиаминмонофосфат (ThMP) и ThDP тушат флуоресценцию фермента с эффективностью, близкой к эффективности тушения тиамином (табл.1). Связывание молекул белка с тиаминтрифосфатом (ThTP) проявляется в еще более значительном длинноволновом сдвиге спектра излучения.

Взаимодействие тиаминкиназы с АТР приводит к принципиально иным спектральным изменениям (рис. 2). В этом случае наблюдается коротковолновое смещение спектра флуоресценции белка, сопровождающееся некоторым уменьшением интенсивности (для АТР K_{sv}=1,14·102 M^{-1}). Эффективность тушения флуоресценции и величина сдвига спектра уменьшается по мере насыщения центров связывания субстратом. Это объясняется тем, что тиамин и АТР связываются с макромолекулой белка в различных, пространственно разобщённых участках, при этом фосфатные группы не играют решающей роли в связывании, т.е. взаимодействие тиамина и его фосфорных эфиров с тиаминкиназой осуществляется через пиримидиновый компонент, а взаимодействие АТР – посредством аденинового цикла. Разнонаправленность изменений спектральных характеристик при связывании АТР и тиамина согласуется с имеющимися данными об упорядоченном присоединении АТР и тиамина к молекуле фермента [2].

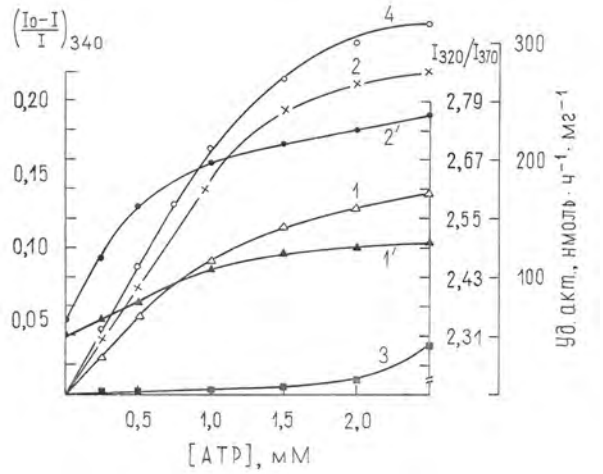


Рисунок 2. – Зависимость эффективности тушения (1, 2), положения спектра флуоресценции (1 ', 2 ') и удельной ферментативной активности (3, 4) тиаминкиназы от концентрации АТР в отсутствие Mg^{2+} (1, 1 ') и при внесении его в концентрации 1 · 10^{-3} (3) и 5·10^{-3} М (2, 2 ', 4). Условия определения см. в подписи к рисунку 1

Наблюдаемые изменения спектра флуоресценции тиаминкиназы при связывании с производными тиамина и АТР могут быть следствием либо селективного тушения свечения триптофановых остатков, имеющих, соответственно, более коротковолновый и длинноволновый спектры излучения, либо конформационных изменений белковой молекулы, ведущих к изменениям полярности микроокружения хромофоров. В первом случае остатки триптофана должны входить в состав активного центра фермента. Такая ситуация имеет место, например, в случае транскетолазы [5]. Для выбора между указанными возможностями нами было исследовано влияние одного из субстратов реакции – тиамина – на спектры поглощения тиаминкиназы. Согласно рис. 3, внесение в раствор фермента тиамина не изменяет форму спектра поглощения в длинноволновой области, т.е. характерная для комплексов тиамин-триптофан в модельных си-

стемах и холотранскетолазы полоса переноса заряда в области 310 нм для тиаминкиназы из головного мозга свиньи не проявляется. Этот комплекс начинает обнаруживаться при частичной денатурации фермента (рис. 3). Исходя из представленных данных, можно сделать вывод, что триптофановые остатки не входят в состав активного центра тиаминкиназы и в этой связи наблюдаемые незначительные изменения параметров триптофановой флуоресценции белковой молекулы при связывании её с тиамином, по-видимому, являются следствием происходящих при этом локальных конформационных изменений. Очевидность такого утверждения вытекает и из сравнения реальных значений кажущихся констант ассоциации витамина со свободным триптофаном (K_a 4,4 M^{-1}) [12], и из константы Михаэлиса, характеризующей сродство фермента к тиамину ($0{,}72 \cdot 10^{-6}$M).

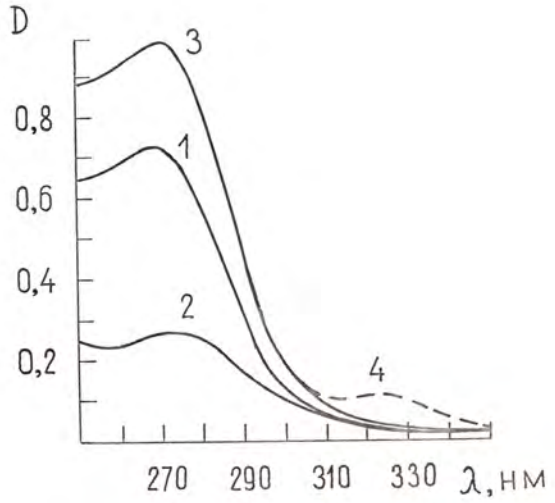


Рисунок 3. – Спектры поглощения растворов тиаминкиназы (1), тиамина (2) и комплекса тиаминкиназа-тиамин (3,4) в нативном состоянии (3) и после 3-недельного хранения (4) в 0,01 М трис-HCl-буфере (pH 7,3). [E] 0,25 мг/мл, [Th] $8 \cdot 10^{-5}$ М

Гораздо более высокая эффективность тушения флуоресценции фермента тиамином и низкое значение константы Михаэлиса для него по сравнению с такими же характеристиками для АТР (K_m $0{,}83 \cdot 10^{-3}$ М) свидетельствуют о более высоком сродстве тиаминкиназы к данному субстрату, что соответствует физиологическим концентрациям витамина и АТР в клетках мозга. Для сравнения на рис. 1 и 2 представлены зависи-мости удельной ферментативной активности от концентрации субстратов. Ход кинетических кривых коррелирует с изменением спектральных параметров собственной флуоресценции фермента.

Для протекания тиаминкиназной реакции необходимы ионы Mg^{2+}, Mn^{2+} или Ca^{2+} [2], взаимодействие которых с ферментом либо формирует каталитически активную конформацию молекулы белка, либо ионы металлов выступают в качестве «якорной» группировки, не принимая непосредственного участия в акте катализа. В отношении близких по свойствам трансфераз достаточно однозначно показано, что истинным субстратом трансферазных реакций является комплекс металл – АТР [2, 3]. Учитывая физиологические концентрации ионов Mg^{2+} и АТР в клетках мозга, а также зная константы ассоциации магния и нуклеозидтрифосфата, можно рассчитать, что в случае протекания реакции дифосфорилирования тиамина в щелочных условиях при оптимуме pH (константа диссоциации комплекса Mg·АТР для тиаминкиназной реакции при pH 8,6 равна 1·10-6 М [1]) концентрация свободных ионов магния и АТР составит в среде определения не более 3% от общей концентрации комплекса Mg·АТР. При увеличении концентрации одного из лигандов в 2 раза концентрация другого свободного лиганда практически снизится до нуля. В этой связи спектральные и поляризационные характеристики собственной флуоресценции тиаминкиназы при её связывании с ионами металлов были исследованы нами не только на фоне насыщения фермента кофактором, когда скорость ферментативной реакции достигает V_{max}, но и при соотношении металл-АТР, равном 1, при котором ионы двухвалентных металлов полностью связаны в составе комплекса (табл. 1).

Внесение в присутствии АТР в раствор тиаминкиназы ионов Mg^{2+} в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М (Mg^{2+}/АТР=1) приводит к дальнейшему уменьшению интенсивности свечения (для Mg·АТР $K_{SV}=1{,}13 \cdot 10^2$ M^{-1}). Положение и форма спектра излучения, как и степень поляризации флуоресценции (P), при этом не изменяются (табл. 1). Не было обнаружено изменений и в длительности затухания флуоресценции.

Согласно проведенным экспериментам, ионы Ca^{2+} и Mn^{2+}, так же как и ионы Mg^{2+}, не оказывают существенного влияния на собственную флуоресценцию комплекса белок-АТР. В то же время в отсутствие нуклеозидтрифосфата как Ca^{2+} и Mn^{2+}, так и Mg^{2+} в используемых нами концентрациях оказались более эффективными тушителями триптофановой флуоресценции тиаминкиназы, чем комплекс Mg·АТР, не влияющими, однако, на положение и форму спектра излучения. Воздействие ионов металла на комплекс белок-тиамин или белок-ThTP сходно по эффективности воздействия на комплекс белок-АТР.

Характер кривых, отражающих параметры триптофановой флуоресценции тиаминкиназы, зависит от соотношения ионов кофактора и АТР в инкубационной среде. Увеличение концентрации кофактора по отношению к АТР приводит к значительному повышению интенсивности флуоресценции фермента и коротковолновому смещению спектра (рис. 2, кривые 2 и 2 '). В присутствии избытка ионов Mg^{2+} при соотношении Mg^{2+} – АТР, равном 10, кривая интенсивности флуоресценции почти полностью совмещается с кривой зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (Mg·АТР) при насыщающей концентрации кофактора. При этом величина K_{SV}, характеризующая сродство фермента к кофактору, была значительно выше ($1{,}64 \cdot 10^2$ M^{-1}), чем в случае, когда Mg^{2+} и АТР использовались в эквимолярных количествах.

Сами ионы Mg^{2+}, Mn^{2+} или Ca^{2+} в концентрациях свыше $1 \cdot 10^{-3}$ М являются эффективными тушителями флуоресценции тиаминкиназы (рис. 4). В отсутствие АТР в среде инкубации связывание избыточных количеств ионов металлов с белком характеризуется усилением свечения возбуждённых хромофоров, которое прекращается после насыщения лигандосвязывающих центров кофактором. Эффективность тушения для излучаемых нами ионов приблизительно одинакова, в то же время характер изменения положения спектра флуоресценции различен. Изменения спектральных параметров собственной флуоресценции тиаминкиназы происходят в том же диапазоне концентраций ионов металлов, в котором прослеживается и их активирующий эффект (рис. 4), однако

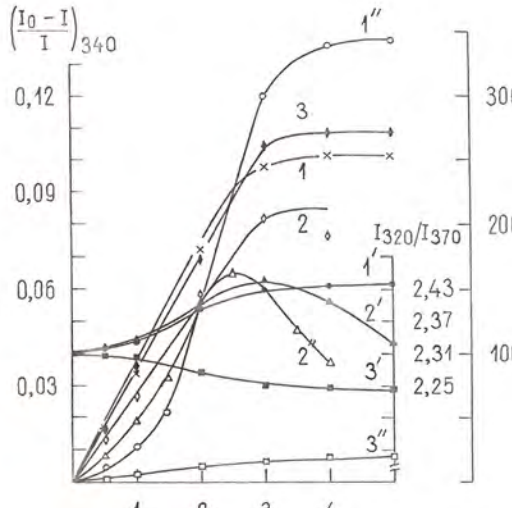


Рисунок 4. – Зависимость эффективности тушения (1-3), положения спектра флуоресценции (1'-3') и удельной ферментативной активности (1''-3'') тиаминкиназы от концентрации ионов Mg^{2+} (1, 1', 1''), Mn^{2+} (2, 2', 2'') или Ca^{2+} (3, 3', 3''). Условия определения см. в подписи к рисунку 1

корреляционные связи между интенсивностью свечения хромофоров и активностью фермента при действии металлов не для всех ионов в достаточной степени выражены. Наблюдаемые особенности влияния отдельных кофакторов на положение спектра флуоресценции и каталитическую активность, вероятно, могут быть обусловлены неоднозначностью мест связывания в самой белковой молекуле для ионов металлов и (или) различием в эффективности их сорбции. Известно, например, что для выполнения функции кофактора в принципе могут подходить многие ионы, но белковая глобула избирательно активируется лишь некоторыми из них с учётом всех свойств ионов [9]. Согласно данным по измерению активности тиаминикназы, почти во всех случаях Mg^{2+} можно заменить на Mn^{2+}, тогда как другие двухзарядные ионы металлов, включая Ca^{2+}, его заменить не могут.

На основании полученных нами результатов по изучению влияния низких концентраций ионов металлов и комплекса металл-АТР (металл/АТР=1) на параметры собственной флуоресценции тиаминкинзы, а также учитывая имеющиеся в литературе данные по активации фермента [8], можно утверждать, что истинным субстратом реакции дифосфорилирования тиамина является комплекс металл-АТР, при этом ионы металла выступают связующим звеном, обеспечивающим дополнительное взаимодействие субстрата с белком, снижая одновременно избыточный отрицательный заряд на фосфате нуклеотида. Предварительная инкубация АТР с ферментом в отсутствие ионов двухвалентных металлов приводит к нарушению стерической комплементарности активного центра по отношению к истинному субстрату. Избыточное внесение кофактора (металл/АТР>1) способствует формированию наиболее активной конформации молекулы тиаминкиназы, подтверждая адекватность постулируемой нами ранее кинетической модели функционирования фермента [2] и её соответствие аллостерической модели Моно [14], которая, предусматривая для ионов металла функцию активатора белка, оставляет за ним роль важного субстратного компонента, лимитирующего процесс связывания в активном центре молекулы Mg·АТР.

Помимо субстратов и кофакторов тиаминкиназной реакции значимую роль в регуляции биосинтеза ThDP играет основной метаболит гликолиза – пируват. Определение количества участков связывания для пирувата в координатах Скэтчарда показывает, что присоединение его осуществляется по двум, очевидно разным центрам белковой молекулы с константами связывания $K_S = 0{,}41 \cdot 10^3$ и $1{,}43 \cdot 10^3$ M^{-1} (рис. 5). Характер связывания с лигандом отражается на спектральных и поляризационных параметрах собственной флуоресценции тиаминкиназы.

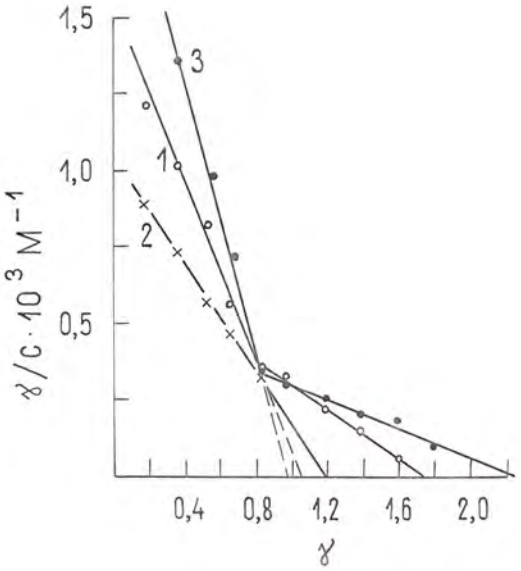


Рисунок 5. – Определение числа участков связывания пирувата (1), фосфоенолпирувата (2) и этилового эфира пирувата (3) с молекулой тиаминкиназы методом Скэтчарда

Как было показано в работе [10], изменение флуоресцентных характеристик белка при связывании с пируватом обусловлено переносом энергии электронного возбуждения с остатков триптофана на пируват и локальными конформационными изменениями структуры белковой молекулы. Из рис. 6 следует, что взаимодействие с пируватом сопровождается тушением триптофановой флуоресценции белка с изменением положения её максимума, причём смещение спектра флуоресценции имеет двухфазный характер, меняющийся в зависимости от концентрации лиганда: при более низких концентрациях пирувата (до 0,6 мМ) прослеживается длинноволновый сдвиг спектра, который при повышении концентрации отчасти сменяется коротковолновым. В этой связи можно предположить, что изменение параметров собственной флуоресценции фермента отражает разнонаправленное изменение конформации молекулы белка, определяемое концентрацией пирувата. Подобные эффекты, как правило, объясняются наличием нескольких типов участков связывания лиганда на молекуле белка, взаимодействие с которыми вызывает вышеописанные структурные изменения. Следует отметить, что при концентрации пирувата $5 \cdot 10^{-3}$ М, когда задействованы оба участка связывания с тиаминкиназой, происходит повышение подвижности ряда триптофановых остатков [8].

Двойное, разнонаправленное действие пирувата отмечено и в случае определения ферментативной активности, когда лиганд в концентрациях, близких к физиологическим, ингибирует (Ki $0{,}42\cdot10^{-3}$M), а в более высоких активирует (Ka $2{,}1\cdot10^{-3}$M) биосинтез ThDP (рис. 6). Таким образом, пируват, являясь субстратом ряда метаболически важных ThDP-зависимых белковых систем, оказывает выраженное регуляторное влияние на активность тиаминкиназы – фермента биосинтеза коферментной формы витамина B1. Отсюда повышение содержания пирувата в клетке до нормы, не превышающей его физиологическую концентрацию, будет вести к ингибированию биосинтеза кофермента и, соответственно, к снижению скорости реакции декарбоксилирования (положительная обратная связь), в то время как дальнейшее повышение содержания эффектора до концентрации, превосходящей его физиологический уровень, напротив, через активацию наработки ThDP будет способствовать усилению утилизации пирувата по принципу отрицательной обратной связи.

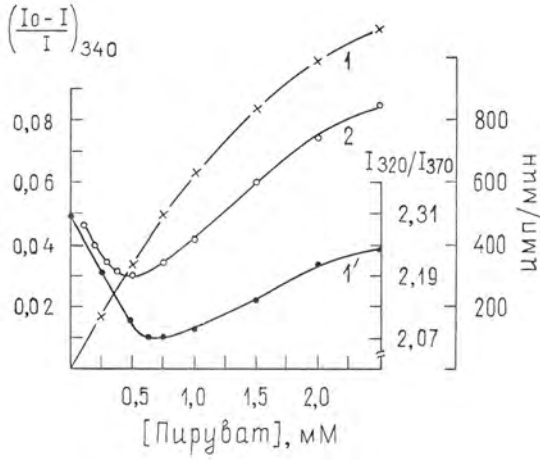
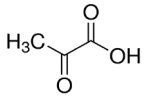
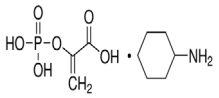


Рисунок 6. – Зависимость эффективности тушения (1), положения спектра флуоресценции (1') и ферментативной активности (2) тиаминкиназы от концентрации пирувата. Условия определения см. в подписи к рисунку 1

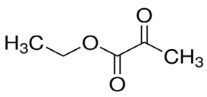
Из химического строения пирувата очевидно, что он может адсорбироваться в гидрофобной области молекулы белка за счёт метильной группы и в гидрофильной с помощью карбоксила и карбонила. Естественно было ожидать, что при связывании в ингибиторном и активаторном центрах используются различные группировки молекулы. С целью получения дополнительной информации об этом нами использованы структурные аналоги пирувата: фосфоенолпируват и этиловый эфир пирувата. В силу своих структурных особенностей фосфоенолпируват практически лишён возможности адсорбироваться в гидрофобных участках молекулы фермента и не имеет карбонильной группы, тогда как этиловый эфир пирувата, наоборот, обладает повышенными гидрофобными свойствами и содержит две карбонильные группы.



Пируват



Фосфоенолпируват



Этиловый эфир пирувата

Замена карбонильной группы в молекуле пирувата на фосфоенольную меняет характер взаимодействия лиганда с белком. Незначительное тушение триптофановой флуоресценции тиаминкиназы под действием фосфоенолпирувата сопровождается однонаправленным длинноволновым сдвигом спектра флуоресценции (рис. 7). Так же как и для пирувата, эффективность воздействия фосфоенолпирувата на белок возрастает при добавлении ионов металлов. Константа Штерна-Фольмера увеличивается с 0,2 до $0{,}4\cdot10^{2}$ M^{-1}, соответственно, в отсутствие и в присутствии $5\cdot10^{-3}$ M Mg^{2+}. Отсюда можно предположить, что истинным эффектором белка является комплекс фосфоенолпируват - Mg^{2+}. Ион металла, который, как известно, присоединяется по фосфатной группе фосфоенолпирувата, в данном случае может выступать связующим звеном, обеспечивающим взаимодействие лиганда с ферментом. Наблюдаемые различия в спектральных характеристиках флуоресценции комплексов E-пируват и E-фосфоенолпируват могут быть следствием того, что фосфоенолпируват имеет только один участок сорбции на поверхности молекулы белка. Подтверждение тому – почти полная потеря для фосфоенолпирувата способности к активации биосинтеза ThDP при сохранении для него возможности к ингибированию (K_i $0{,}9\cdot10^{-3}$M). Об этом же свидетельствует и наличие для последнего единственного участка связывания (рис. 5), причём значение константы связывания ($1{,}05\cdot10^{3}$ M^{-1}) для фосфоенолпирувата близко к значению K_S для пирувата в активирующем центре фермента ($1{,}4\cdot10^{3}$ M^{-1}).

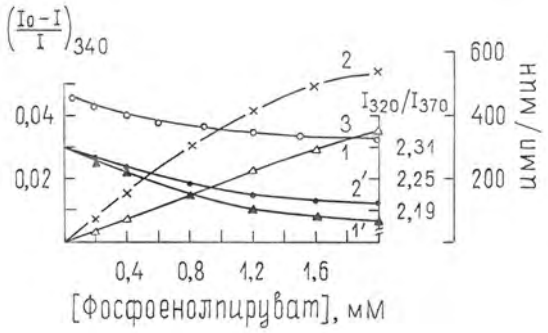


Рисунок 7. – Зависимость эффективности тушения (1, 2), положения спектра флуоресценции (1', 2') и ферментативной активности (3) тиаминкиназы от концентрации фосфоенолпирувата при [Mg^{2+}] 0 (1, 1'), и $5\cdot10^{-3}$ M (2, 2', 3). Условия определения см. в подписи к рисунку 1

Этерификация молекулы пирувата приводит к увеличенному сродству этилового эфира пирувата к первому, более быстро реагирующему участку тиаминкиназы (K_S $2{,}18\cdot10^{3}$ M^{-1}) и некоторому ослаблению сродства ко второму (K_S $0{,}32\cdot10^{3}$ M^{-1}), однако как активирующий, так и ингибирующий эффекты изменения скорости биосинтеза ThDP при этом снижаются (соответственно, на 26 и 47% по сравнению с пируватом). Количество участков связывания остается равным двум. Характер взаимодействия центров, связывающих этиловый эфир пирувата, зависит прежде всего от концентрации субстрата – тиамина (рис. 8). S-образный характер зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации эффектора обнаруживается лишь при достаточно малых концентрациях субстрата и исчезает с ростом последней при одновременном уменьшении величины

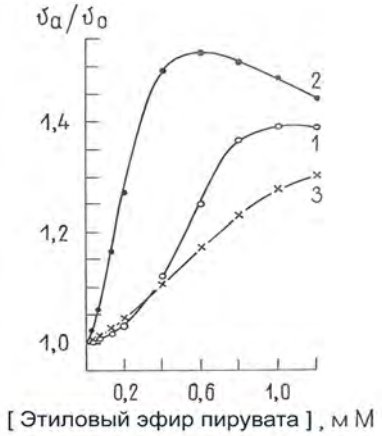


Рисунок 8. – Зависимость относительной скорости ферментативной реакции от концентрации этилового эфира пирувата [Тиамин]: 4,2·10⁻⁶ М (1, 3), 2,1·10⁻⁵ М (2); 1, 2 – при 40°С, 3 – после тепловой обработки при 52°С

полунасыщения для этилового эфира пирувата (кривые 1, 2). 3-минутная обработка раствора тиаминкиназы при 52°С приводит к утрате чувствительности макромолекулы к аллостерическому эффектору при сохранении каталитической активности, указывая тем самым на пространственную разделенность активных центров и центров связывания этилового эфира пирувата.

Эти результаты показывают, что ингибиторный и активаторный центры тиаминкиназы задействованы в том случае, если молекула эффектора содержит группы с выраженными гидрофобными и гидрофильными свойствами (пируват и этиловый эфир пирувата). Для выполнения функции активатора необходимо наличие карбонильной группы. Учитывая более высокое значение KS для этилового эфира пирувата по сравнению с соответствующей величиной для пирувата, можно предположить, что ингибиторный центр фермента гидрофобен.

Выводы

1. Связывание субстратов – тиамина и АТР – в активном центре тиаминкиназы осуществляется через пиримидиновый и адениновый циклы, соответственно;
2. Кофакторы – ионы двухвалентных металлов – снижая отрицательный заряд, увеличивают сродство субстратов и эффекторов к белку;
3. Регулятор ферментативной активности – пируват – имеет два участка связывания: ингибирующий (относительно гидрофобный) и активирующий (гидрофильный).

Литература

1. Виноградов, В. В. Механизм активации тиаминпирофосфокиназы печени крыс ионами магния / В. В. Виноградов, С. А. Струмило // Биохимия. – 1979. – Т.44, № 1. – С.50-56.
2. Воскобоев, А. И. Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиамина //А. И. Воскобоев, И. П. Черникевич. – Минск.: Наука и техника, 1987. – 200 с.
3. Грин, Д. Молекулярные аспекты жизни / Д. Грин, р. Гольдбергенр. – М.: Мир, 1968. – 310 с.
4. Керридж, Д. Биохимическая логика / Д. Керридж, К. Типтон. – М.: Мир, 1974. – 328 с.
5. Кочетов, Г. А. Тиаминовые ферменты / Г. А. Кочетов. – М.: Наука, 1978. – 234 с.
6. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович. – Мир, 1986. – 496 с.
7. Макарчиков, А. Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина В1 / А. Ф. Макарчиков. – Минск : Белорусская наука, 2008. – 433 с.
8. Маскевич, А. А. Флуоресцентные исследования внутримолекулярной подвижности тиаминкиназы из пивных дрожжей /А. А. Маскевич, И. П. Черникевич, С. А. Маскевич, Л. Н. Кивач // Журнал физ. химии. – 1990. – Т.64, 3 8. – С.2162-2168.
9. Полторак, О.М. Физико-кинетические основы ферментативного катализа / О. М. Полторак, Е. С. Чухрай – М.: Высшая школа, 1971. – 311 с.
10. 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. – 32 с.
11. Черникевич, И. П. Сравнительный кинетический анализ тиаминкиназ из пивных дрожжей и головного мозга свиньи / И. П. Черникевич // Журнал ГрГМУ. – 2011. - №3. – С.25-28.

Literatura

1. Vinogradov, V.V. Mehanizm aktivacii tiaminpirofosfokinazy pecheni krys ionami magniya /V.V.Vinogradov, S.A.Strumilo // Biohimiya. – 1979. – T.44, № 1. – S. 50-56
2. Voskoboev, A. I. Biosintez, degradaciya i transport fosfornyh efirov tiamina //A.I.Voskoboev, I.P.Chernikevich. – Minsk.: Nauka i tehnika, 1987. – 200 s.
3. Grin, D. Molekulyarnye aspekty jizni / D. Grin, r.Gol'dbergenr. – M.: Mir, 1968. – 310 s.
4. Kerridj, D. Biohimicheskaya logika /D. Kerridj, K.Tipton. – M.: Mir, 1974. – 328 s.
5. Kochetov, G. A. Tiaminovye fermenty / G. A. Kochetov. – M.: Nauka, 1978. – 234 s.
6. Lakovich, Dj. Osnovy fluorescentnoi spektroskopii / Dj.Lakovich. – Mir, 1986. – 496 s.
7. Makarchikov, A.F. Tiamintrifosfat: novyi vzglyad na nekofermentnuyu funkciyu vitamina V1 /A. F. Makarchikov. – Minsk: Belorusskaya nauka, 2008. – 433 s.
8. Maskevich, A. A. Fluorescentnye issledovaniya vnutrimolekulyarnoi podvijnosti tiaminkinazy iz pivnyh drojjei /A. A. Maskevich, I. P. Chernikevich, S. A. Maskevich, L. N. Kivach //Jurnal fiz. himii. – 1990. – T.64, 3 8. – S.2162-2168.
9. Poltorak, O. M. Fiziko-kineticheskie osnovy fermentativnogo kataliza /O. M. Poltorak, E. S. Chuhrai – M.: Vysshaya shkola, 1971. – 311 s.
10. Chernikevich, I.P Fermentnye sistemy biotransformacii aktivnyh form vitamina V1 (struktura, svoistva, regulyaciya): avtoref. dis. … dokt. him. nauak: 03.00.04 /I. P. Chernikevich: Minsk. in-t bioorganicheskoi himii. – Minsk, 1996. – 32 s.
11. Chernikevich, I. P. Sravnitel'nyi kineticheskii analiz tiaminkinaz iz pivnyh drojjei i golovnogo mozga svin'i /I.P.Chernikevich //Jurnal GrGMU. – 2011. - №3. – S.25-28.
12. Farzami, B. Solvents effects on thiamine-enzyme model interactions/ I. Interactions with tryptophane /B. Farzami, P. H. Mariam, F. Jordon //Biochemistry. – 1977. – V.16, N 6. – P. 1105 – 1110.
13. Haas, R. H. Thiamin and the brain / R.H. Haas //Ann.

12. Farzami, B. Solvents effects on thiamine-enzyme model interactions / I. Interactions with tryptophane / B. Farzami, P. H. Mariam, F. Jordon // Biochemistry. – 1977. – V.16, N 6. – P. 1105 – 1110.

13. Haas, R. H. Thiamin and the brain / R. H. Haas // Ann. Rev. Nutr. – 1988. -V. 8.-P. 483 – 515.

14. Monod, I. on the nature of allosteric transitions: a plausible model / I. Monod, I. Wyman, I. P. Changeux // I. Mol. Biol. – 1965. – V. 12, N1.- P. 88-102.

Rev. Nutr. – 1988.-V. 8. – P. 483 – 515.

14. Monod, I. on the nature of allosteric transitions: a plausible model / I. Monod, I. Wyman, I.P. Changeux // I. Mol. Biol. – 1965. – V. 12, N1.- P. 88-102.

SPECTROSCOPIC INVESTIGATION OF STRUCTURE AND DYNAMICS OF THIAMINE KINASE IN PIG BRAIN TISSUE

Chernikevich I.P.

[1]-Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

Steady-state fluorimetry was used to study the effects of substrates (thiamine, Mg·ATP), cofactors (Mg2+, Mn2+, Ca2+) and effectors (thiamine phosphate esters, pyruvate, phosphoenol pyruvate, ethyl pyruvate) on the structure and dynamics of thiamine kinase (EC 2.7.6.2) in pig brain tissue. Binding of the ligands to thiamine kinase was shown to be accompanied by quenching of its tryptophane fluorescence. The analysis of the results obtained revealed that thiamine and ATP were bound by the pyrimidine and adenide rings at the hydrophobic region of the enzyme's molecule. Pyruvate has two binding sites: an inhibitory (relatively hydrophobic) and an activating hydrophilic site, the latter being in a close proximity to the thiamine's binding centre and providing the interaction between the carbonyl group and the substrate. Divalent metal ions raised affinity of the substrates and effectors for thiamine kinase, favouring simultaneously in increase in hydrophobicity of its active site.

Key words: *thiamine kinase, pig brain tissue, fluorimetry analysis.*

Адрес для корреспонденции: e-mail: chemistry@grsmu.by

Поступила 27.04.2015