

УДК 577.152.31 : 577.164.111

СРАВНИТЕЛЬНАЯ КИНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТИАМИНКИНАЗ ИЗ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ И ГОЛОВНОГО МОЗГА СВИНЬИ

И.П. Черникевич, д.х.н., профессор

Кафедра общей и биоорганической химии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

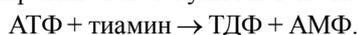
Методами ацетонового и аммонийного фракционирования, ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-тойо-перле 650М, гель-фильтрации на сефадексе G-100 и аффинной хроматографии на голубой сефарозе из мозга свиньи выделена электрофоретически гомогенная тиаминкиназа с суммарным выходом 15% и степенью очистки 2240 раз. По физико-химическим и кинетическим параметрам мембранно-ассоциированная тиаминкиназа из мозга существенно не отличается от одноименного цитозольного белка из пивных дрожжей: имеет оптимум pH 8,6, молекулярную массу $52,8 \pm 1,2$ кДа, металл-зависима и состоит из двух идентичных субъединиц, K_s для свободных ионов магния и K_m для тиаминкиназы и комплекса $Mg \cdot ATP^{2-}$ соответствует внутриклеточному содержанию их в мозге. Исходя из свойств тиаминкиназы ферментов, высказано предположение, что тиаминкиназа животных и микроорганизмов выполняет роль буферной системы, препятствующей немедленным изменениям концентраций активных форм витамина и обеспечивающей постоянство скорости сопряженных реакций, использующих исходный общий кофактор – тиаминдифосфат.

Ключевые слова: тиаминкиназа, мозг, пивные дрожжи, параметры.

Employing the methods of acetone and ammonium sulfate fractionation ion exchange chromatography on a DEAE Toyoperl 650M, gel-filtration of Sephadex G-100 and affinity chromatography on blue sepharose, the electrophoretically homogenous 15% thiamine kinase having 2240 times as high the degree of purity has been extracted from the swine brain. By physicochemical and kinetic parameters the membrane-associated thiamine kinase from the brain does not differ greatly from similar cytosol proteins from beer yeast: it has optimum 8.6 pH, molecular mass 52.8 ± 1.2 kDa, it is metal-dependent and consists of two subunits. K_s for free ions of magnesium and K_m for thiamine and $Mg \cdot ATP^{2-}$ complex correspond to their intracellular content in the brain. On the basis of thiamine kinase enzymes properties it has been assumed that thiamine kinase of animals and microorganisms serve as a buffer system which hinders immediate changes in concentrations of vitamin active form and provides the permanent rate of conjugated reactions using the initial common cofactor – thiamine diphosphate.

Key words: thiamine kinase, brain, beer yeast, parameters.

Биосинтез коферментной формы витамина B_1 – тиаминдифосфата (ТДФ) – осуществляется тиаминкиназой (АТФ: тиаминдифосфотрансфераза; КФ 2.7.6.2), катализирующей двухсубстратную реакцию переноса дифосфатной группировки от молекулы АТФ на тиамин:



Гомогенные препараты фермента выделены с низким выходом из печени крыс [10], листьев петрушки [11], пивных дрожжей [1]. Белковые системы синтеза фосфатов тиаминкиназы нервных клеток практически не исследованы, хотя дифосфорному эфиру, вместе с тиаминтрифосфатом, отводится важная роль в свете решения проблемы биоэлектротрогенеза и физиологии нервного импульса [2, 8]. При дефиците этих соединений в мозге развиваются дегенеративные изменения нервов с сопутствующими нарушениями сердечно-сосудистой регуляции, функции желудочно-кишечного тракта, водно-солевого обмена и др. [3].

Задача настоящей работы – очистка тиаминкиназы из мозга свиньи до электрофоретически гомогенного состояния и сравнительная характеристика физико-химических и кинетических параметров молекул белка из пивных дрожжей и ткани мозга.

Материалы и методы

Для получения препарата тиаминкиназы свежий, отмытый от крови мозг свиньи освобождали от сосудов, измельчали, продавливали через пресс с диаметром пор 1 мм, заливали охлажденным до -20°C ацетоном (мозг/ацетон – 1/10) и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе 30 с при 5000 об/мин. Ацетон немедленно удаляли, а белок просушивали при 4°C на бумажных фильтрах до порошкообразного состояния.

4 г высушенной биомассы мозга повторно гомогенизировали с 60 мл 0,05М трис-НСl буфера pH 7,4, содержащего 0,01% тритон X-100 и 0,2 мМ ЭДТА, после чего центрифугировали в течение 30 мин. при 20000 q и 1 ч при 105000. Тиаминкиназу надосадочной жидкости осаждали сульфатом аммония, собирая белок в интервале 50-80% насыщения. Полученный осадок растворяли в минимальном объеме 0,02М трис-НСl буфера pH 7,4, содержащего 0,05М NaCl, 0,2мМ ЭДТА, и диализовали (12 ч) против этого же буферного раствора. Диализованный препарат в дальнейшем очищали методом колоночной хроматографии (1,3 x 70 см) на носителе ДЕАЕ-тойо-перл 650М, уравновешенном 0,02М трис-НСl буфером pH 7,4, с 0,05М NaCl, 0,2мМ ЭДТА и 20%-м глицерином. Связавшийся белок элюировали линейным возрастающим градиентом NaCl от 50 до 400 мМ (по 150 мл в каждой камере) в этом же буфере со скоростью потока 18 мл/ч. Фракции, элюируемые при концентрации соли 69-77 мМ, объединяли, концентрировали против полиэтиленгликоля и хроматографировали на колонке (2 x 65 см) с сефадексом G-100 в вышеописанном буфере при скорости потока жидкости 24 мл/ч. Элюаты с наиболее высокой активностью фермента объединяли, после чего добавляли глицерин до его конечной концентрации 40%. В результате удельная активность тиаминкиназы, по сравнению с исходным экстрактом, возросла в 946 раз.

На заключительной стадии очистки нами использованы гидрофобные и слабые катионообменные свойства триазинового красителя цибокрона голубого F3GA. Объединенный после гель-фильтрации элюат белка наносили на колонку (0,8 x 3,4 см) с голубой сефарозой, уравновешенной 0,02М трис-НСl буфером pH 8,2, содержащим 0,05М NaCl, 0,2мМ ЭДТА и 40% глицерин. Объем резер-

вуара и смесителя по 15 мл, скорость элюции – 12 мл/ч. В подобранных нами условиях тиаминкиназа не связывалась с носителем, в отличие от сопутствующих примесных белков. Полученный препарат фермента являлся хроматографически (рис. 1) и электрофоретически (рис. 2) гомогенным. Результаты разработанного способа выделения и очистки белка обобщены в таблице 1, откуда следует, что наряду с цитозольными макромолекулами киназ из листьев петрушки [11] и пивных дрожжей [1], с хорошим выходом может быть получена и мембранно-ассоциированная тиаминкиназа из мозга свиньи. На мембранную локализацию фермента указывает значительное повышение выхода белка (3,2 раза) после внесения в среду выделения неионного детергента тритона X-100, сохраняющего нативность структур органелл клетки, но подавляющего гидрофобную сорбцию макромолекул, и невозможность экстракции тиаминкиназы без предварительной стадии ацетонового фракционирования. Подтверждением мембранной ассоциации может служить и низкая устойчивость белка в отсутствие вязкой среды – 40% глицерина.

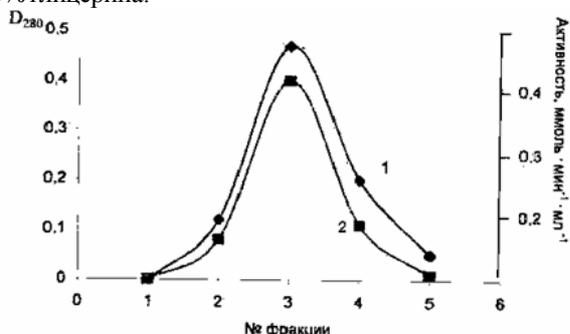


Рисунок 1 – Хроматография препарата на голубой сефарозе: 1 – выход белка, 2 – выход активных фракций тиаминкиназы

Активность тиаминкиназы определяли по скорости образования тиаминдифосфата [5]. Реакционная смесь содержала $2 \cdot 10^{-3}$ М АТФ, $2 \cdot 10^{-5}$ М тиамина, $2 \cdot 10^{-3}$ М трис-НСl буфера рН 8,6, $1 \cdot 10^{-2}$ М $MgSO_4$ и 20-30 мкг препарата белка в общем объеме 1 мл. В качестве контроля использовали те же ингредиенты, к которым добавляли 20-30 мкг предварительно денатурированного фермента. Удельную активность выражали в наномолях тиаминдифосфата, образовавшегося за 1 ч при 37°C в расчёте на 1 мг белка. Концентрацию белка находили по методу Лоури и по поглощению в УФ-области при 280 нм.

При расчёте скорости ферментативной реакции использовали стационарные участки кинетических кривых. Концентрацию свободных ионов металла рассчитывали путём решения квадратного уравнения:

$$C^2 - (M_t + S_t + 1/K_s) \cdot C + M_t \cdot S_t = 0,$$

где C – концентрация комплекса металл · АТФ²⁻, M_t – общая концентрация металла, S_t – общая концентрация АТФ, K_s – константа диссоциации комплекса, с подстановкой полученного значения в выражение: $M_f = M_t - C$, где M_f – концентрация свободного металла.

Электрофорез белка (10-30 мкг) в 7% и 10%-м полиакриламидных гелях выполняли по Орнштейну и Дэвису [4] при рН 8,9 в течение 5 ч при силе тока 20 мА в первые 60 мин., а затем 40 мА на пластинку. Белковые полосы проявляли 0,1%-м кумасси R-250 на 30% ТХУ в течение 20-30 мин. Окрашенные гели отмывали 7% уксусной кислотой и хранили в смеси: метанол-вода-глицерин-ледяная уксусная кислота в соотношении 50 : 50 : 20 : 1. Молекулярную массу тиаминкиназы рассчитывали по калибровоч-

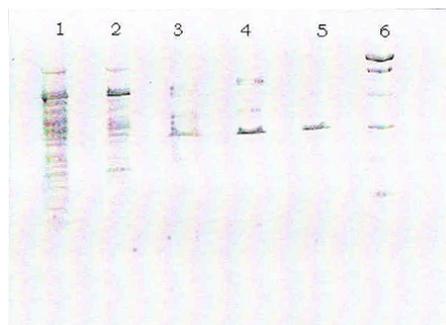


Рисунок 2 – Гель электрофорез препаратов тиаминкиназы из мозга свиньи в 7%-м полиакриламидном геле: 1 – исходный экстракт, 2 – фракционирование сульфатом аммония, 3 – ионообменная хроматография, 4 – гель-хроматография, 5 – аффинная хроматография, 6 – молекулярные массы (M_r) белков-маркёров (135, 94, 69, 57, 43 кДа)

ному графику, выражающему зависимость логарифма молекулярной массы от относительной подвижности стандартных белков-маркёров.

Результаты и их обсуждение

Очищенная в 2240 раз тиаминкиназа (таблица 1) не-стабильна при хранении. Её активность оставалась без изменений в пределах 2-3-х суток при температуре 4-6°C в 40% глицерине. Согласно удельной активности высокоочищенного фермента, максимальное количество синтезированного в среде ТДФ не превышало 10^{-7} М, тогда как концентрации взятых в реакцию АТФ и тиамина составили 10^{-3} и 10^{-5} М, соответственно. Поскольку состояние равновесия системы не достигалось, тиаминкиназная реакция протекает пропорционально времени инкубации. В наших опытах скорость биосинтеза ТДФ оставалась пропорциональной времени в течение 2 ч (таблица 2). Линейный характер зависимости скорости реакции от концентрации фермента в пробе соблюдался до 160 мкг. В указанных интервалах поддерживается стационарность состояния системы, что важно для сравнительной характеристики ферментов.

Почти все тиаминовые киназы активируются ионами двухвалентных металлов. Лучшими эффекторами являются Mg^{2+} , Mn^{2+} и Co^{2+} , причём для фермента из печени крыс наиболее предпочтительны ионы Mg^{2+} [10], а из пекарских дрожжей – Mn^{2+} [9]. Активация Mn^{2+} характеризуется выраженным максимумом при концентрации $3,3 \cdot 10^{-3}$ М. Увеличение содержания металла приводит к резкому ингибированию тиаминкиназы [9]. Ионы Mg^{2+} даже в концентрации $5 \cdot 10^{-2}$ М не давали такого эффекта. Биосинтез ТДФ в мозге свиньи также нуждается в присутствии двухвалентных катионов (таблица 2). По способности к активации катионы металлов располагаются в следующем порядке: $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} > Ni^{2+}$. Mn^{2+} в малых концентрациях ($5 \cdot 10^{-4}$ М) активирует тиаминкиназу мозга даже намного больше, чем Mg^{2+} . Дальнейшее увеличение содержания Mn^{2+} приводит к угнетению ферментативной активности, а Mg^{2+} – к резкой её активации. Оптимальная концентрация Mg^{2+} , по отношению к АТФ, в среде инкубации составляет 4 : 1, $Mn^{2+} - 1 : 1$.

С увеличением величины этого отношения скорость биосинтеза кофермента падает.

Как видно из рис.3, кривая зависимости начальной скорости тиаминкиназной реакции от концентрации общего Mg^{2+} носит S-образный характер (кривая 1) и не спрямляется в системе двойных величин (кривая 3). Ко-

Таблица 1 – Схема выделения и очистки тиаминкиназы из мозга свиньи

Стадия очистки	Общее содержание белка, мг	Общая активность, нмоль · ч ⁻¹	Удельная активность, нмоль · ч ⁻¹ · мг ⁻¹	Степень очистки	Выход, %
Исходный экстракт	42476±147	8920±24	0,21±0,02	1,0	100
Ацетоновое фракционирование*	12000±61	9200±16	0,77±0,01	3,7	103
Аммонийное фракционирование	4306±39	5600±21	1,3±0,01	6,4	63
Ионообменная хроматография на ДЕАЕ-тойоперле 650М	93±12	2976±17	32±1,3	152	34
Гель-хроматография на сефадексе G-100	10±0,7	1970±11	198±9	946	23
Хроматография на голубой сефарозе	2,9±0,1	1369±8	472±13	2240	15

* Увеличение выхода после ацетонового фракционирования связано с удалением фосфатаз.

Таблица 2 – Сравнение характеристик и кинетических параметров мембранно-ассоциированной тиаминкиназы из мозга свиньи и цитоплазматической тиаминкиназы из пивных дрожжей: 37°C, 10 mM трис-HCl буфер pH 8,6

Параметры	Тиаминкиназа мозга	Тиаминкиназа дрожжей
Молекулярная масса нативного фермента, кДа	52,8 ± 1,2	96 ± 5
Молекулярная масса (кДа) и число субъединиц	26 (2)	23 и 26 (4)
V макс., М · с ⁻¹	2,76	1,97
k кат., 10 ⁻¹ , с ⁻¹	0,84	0,6
Активность, нмоль · ч ⁻¹ · мг ⁻¹	472	400
Km для тиамина · 10 ⁻⁶ , М	0,72	6
Km для комплекса Mg · АТФ ⁻² · 10 ⁻⁴ , М	8,3	10
Ks для Mg ²⁺ · 10 ⁻⁴ , М	4	9,8 – 10
Оптимальный pH	8,6	8,6 – 8,8
Ионы – активаторы	Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Co ²⁺ , Fe ²⁺ , Ni ²⁺	Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , Co ²⁺
Устойчивость при 4°C, сут.	2 – 3	4 – 5
Линейность от времени, ч	2	4
Линейность от концентрации белка, мкг	160	410

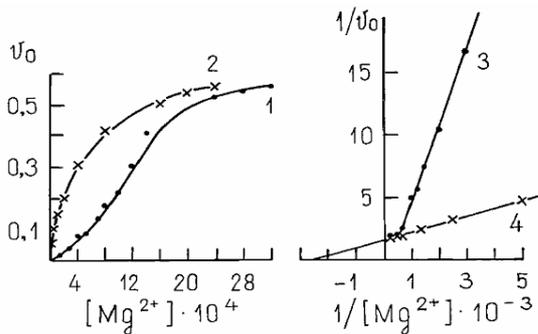


Рисунок 3 – Зависимость начальной скорости тиаминкиназной реакции от концентрации общего (1,3) и свободного (2,4) Mg²⁺ в прямых (1,2) и двойных обратных координатах (3,4). Концентрация АТФ 8 · 10⁻⁴ М

эффицент Хилла n_H , характеризующий степень S-образности, составляет при этом 1,9. Аналогичная зависимость для свободных ионов Mg²⁺, вне комплекса Mg · АТФ⁻², представляет собой гиперболу (кривая 2) хорошо линеаризующуюся в координатах $1/v_0 : 1/[Mg^{2+}]$ (кривая 4) с коэффициентом кооперативности 1,0. Это позволяет рассчитать константу диссоциации для свободных катионов, которая была в пределах истинного содержания Mg²⁺ в мозге и равнялась $4 \cdot 10^{-4}$ М (таблица 2). Полная линеаризация кинетической кривой и снижение величины n_H от 1,9 до 1,0 свидетельствует, что молекула тиаминкиназы содержит участок сорбции свободного Mg²⁺, присоединение к которому не оказывает заметного воздействия на связывание субстратного комплекса Mg · АТФ⁻² в активном центре.

Определение оптимальных значений pH тиаминкиназной реакции при насыщающих концентрациях ионов

металлов показало, что для Mg²⁺ и Mn²⁺ наибольшая активация наблюдается при pH 8,6 (таблица 2). Это предполагает, что «истинным» субстратом фермента является комплекс металл · АТФ, причём Mg²⁺ обладает более слабой способностью к хелатированию. Содержание хелатного комплекса зависит от pH и природы иона активатора. Очевидно, при высоких концентрациях ионов металла образуется неактивный комплекс металл₂ · АТФ, как это происходит в случае тиаминкиназы из пекарских дрожжей [9], что будет вести к уменьшению содержания «истинного» субстрата металл · АТФ, либо к нарушению взаимодействия субстрата с ферментом.

Для зависимости начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата – Mg · АТФ⁻², при соотношении $[Mg^{2+}] / [ATP^{4-}] = 1$, также характерна S-образность. В данном случае характер кривой определяется содержанием активатора (Mg²⁺) в среде инкубации. Увеличение содержания активатора приводит к

уменьшению величины $[S]_{0,5}$ для субстрата, с одновременным снижением степени S-образности. В присутствии избытка ионов магния, при $[Mg^{2+}] / [ATP^{4-}] \geq 4$, сигмоидная кривая трансформируется в гиперболическую с кажущейся K_m для комплекса Mg · АТФ⁻², равной $8,3 \cdot 10^{-4}$ М (таблица 2). Насыщение тиаминкиназы вторым субстратом – тиамином, – наблюдается при более низких концентрациях – кажущаяся K_m $7,2 \cdot 10^{-7}$. Обе величины близки к аналогичным характеристикам для фермента из других источников [1, 7, 9] и приблизительно соответствуют физиологическому содержанию субстратов в тканях мозга.

В плане регуляции метаболизма витамина B₁ важно проследить за состоянием молекулы фермента при воздействии на неё лигандов, поскольку известно, что тиаминкиназа из пивных дрожжей представлена ассоциирующе-диссоциирующей системой олигомеров, состояния равновесия между которыми определяется концентрациями тиамина, связанного с обменом тиамина пирувата и ионов двухвалентных металлов [6]. Анализ скорости биосинтеза ТДФ тиаминкиназой из мозга свиньи показывает (рис. 4, кривая 1), что преинкубация белковой молекулы с 3,6 мкМ тиамином приводит к активации ферментативного процесса, при этом время полуперехода ($t_{1/2} = 9,7$ мин) существенно превосходит величину, которую можно ожидать, исходя из кинетики образования фермент-субстратного комплекса. Ни АТФ, ни Mg · АТФ⁻², в условиях эксперимента (кривая 2), не оказывали воздействия на интенсивность биотрансформации витамина.

Для выяснения вопроса, влияет тиамин на степень олигомеризации или конформационное состояние белка нами определена молекулярная масса тиаминкиназы гель-фильтрацией через сефадекс G-100. Как видно из

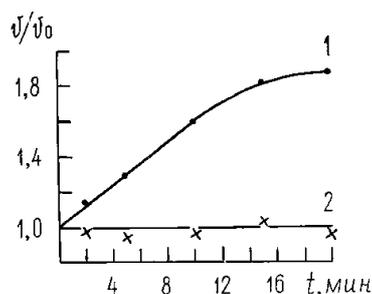


Рисунок 4 – Зависимость относительной скорости тиаминокиназной реакции (v/v_0) от времени преинкубации фермента с тиамином (1), АТФ или комплексом $Mg \cdot АТФ^2$ (2). 30°C; 0,02 М трис-НСl буфер рН 8,6

рис. 5, она составляет 52800 ± 1200 . Аналогичная характеристика для частично очищенного фермента из печени крысы равна 57000 ± 2000 [1], а из *Paracoccus denitrificans* – 44000 [12]. Для фермента из листьев петрушки (гомогенный препарат) эта величина составила 30000 [11]. Принципиальным для данной ситуации, вероятно, является то, что в первых двух источниках тиаминокиназа представлена каталитически активными димерными формами, диссоциирующими на мономеры с массами 28000 и 23000, соответственно, а в последнем – одной функциональной цепью. Сопоставление молекулярных масс уже известных киназ позволяет полагать, что фермент из мозга также будет характеризоваться четвертичной структурой.

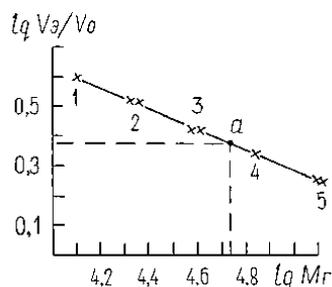


Рисунок 5 – Определение молекулярной массы нативной тиаминокиназы из мозга свиньи методом гелефильтрации (а). Белки-маркеры: 1 – цитохром С (M_r 12400); 2 – трипсин (M_r 23800); 3 – пероксидаза (M_r 44000); 4 – гемоглобин (M_r 67000); 5 – лактатдегидрогеназа (M_r 135000)



Рисунок 6 – Электрофорез денатурированного додецилсульфатом натрия белка в 10% полиакриламидном геле: 1 – белки-маркеры; 2 – тиаминокиназа после хроматографии на голубой сефарозе

Электрофорез в 10% полиакриламидном геле предварительно денатурированного 2% додецилсульфатом натрия (20 мин. при 100°C) белка в присутствии следующих стандартов: цитохрома С (M_r 12400), гемоглобина (M_r 15500), α -химотрипсингена (M_r 25700), овалбумина (M_r 45000), пируваткиназы (M_r 57000) и человеческого сывороточного альбумина (M_r 67000) показал, что масса его мономера равна 26000 Да. Полученные данные свидетельствуют, что в мозге свиньи тиаминокиназа находится в виде двух идентичных субъединиц.

Таким образом, по своим физико-химическим и кинетическим параметрам фермент из мозга свиньи существенно не отличается от аналогичных белков из других источников, однако мембранная ассоциация молекулы требует осторожного подхода в интерпретации результатов эксперимента в ситуации *in vivo*. Кроме того, имеющиеся данные о структуре тиаминокиназы [1,5], относительно медленные внутримолекулярные переходы её под действием субстратов, кофакторов и эффекторов [6], а также катализ начального этапа биотрансформации тиамина до его коферментной формы позволяют говорить про фермент как про буферную систему, которая препятствует мгновенным изменениям других фосфорилированных производных витамина и обеспечивает постоянство скорости сопряжённых реакций, которые используют общий исходный метаболит – ТДФ. Существование такой буферной системы, вероятно, служит одним из механизмов регуляции зависимых от обмена тиамина метаболитов в клетке.

Литература

1. Воскобоев, А.И. Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиамина / А.И. Воскобоев, И.П. Черникович. – Минск.: Наука и техника, 1987. – 200 с.
2. Макаричков, А.Ф. Тиаминтрифосфат и ферменты его гидролиза в биохимических объектах.: автореф. дис...докт. биол. наук: 03.00.04 / А.Ф. Макаричков. – Минск – 2008. – 43 с.
3. Макаричков, А.Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина B_1 /А.Ф. Макаричков. – Минск: Белорусская наука, 2008. – 433 с.
4. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. – М.: Высшая школа, 1981. – 286 с.
5. Черникович, И.П. Ферментные системы биотрансформации активных форм витамина B_1 (структура, свойства, регуляция). : автореф. дис. ... докт. хим. наук: 03.00.04 / И.П. Черникович. – Минск. – 1996. – 35 с.
6. Черникович, И.П. Влияние субстратов, кофакторов и эффекторов на структуру и динамику тиаминокиназы из пивных дрожжей./ И.П. Черникович, А.А. Маскевич, Г.А. Гачко // Биоорганическая химия. – 1992. – Т.18, N 4. – С.509-530.
7. Deus, B. Subcellular distribution of thiamine pyrophosphokinase activity in rat liver and erythrocytes. / B. Deus, H. Blum // Biachim. Biophys. Acta. – 1970. – V. 219. – P. 489 – 497.
8. Haas, R.H. Thiamin and the brain. / R.H. Haas // Ann. Rev. Nutr. – 1988. – V.8. – P.483-515.
9. Kaziro, Y. Studies on thiaminokinase from baker's yeast. I. purification and properties. / Y. Kaziro // J. Biochem. – 1959. – V. 46, № 11. – P. 1523-1539.
10. Mano, Y. Studies on enzymatic synthesis of cocarboxylase in animal tissue. III. Purification and properties of thiaminekinase from rat liver. / Y.Mano // J.Biochem. – 1960. – V. 47, № 2. – P. 283 – 290.
11. Mitsuda, H. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf. / H. Mitsuda, Y.Takii, K. Ivami // J.Biochem. – 1980. – V.88, № 1. – P.223-230.
12. Sanemori, H. Reversed-Phase High – Performance Liquid chromatography Analysis of Thiamine Phosphate Esters in *Paracoccus denitrificans*. / H. Sanemori, H. Ueki, T. Kawasaki // Anal. Biochem. – 1980. – V. 107. – P. 451-455.

Поступила 15.06.2011