

УДК 571.151.4 : 591.481.1

МЕХАНИЗМ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТИАМИНКИНАЗЫ ИЗ МОЗГА СВИНЬИ

И.П. Черникевич

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

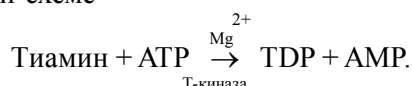
Проведен кинетический анализ бисубстратной ферментативной реакции, катализируемой электрофоретически гомогенной тиаминокиназой из мозга свиньи. Кинетические исследования начальных скоростей в отсутствие продуктов и ингибирования продуктами реакции, а также данные равновесного диализа указывают на то, что реакция протекает через образование тройного фермент-субстратного комплекса. Присоединение субстратов и освобождение продуктов является строго упорядоченным. Обсуждается возможная схема механизма реакции.

Ключевые слова: тиамин, тиаминокиназа мозга, механизм реакции.

The kinetic analysis of bisubstrate enzymatic reaction catalyzed by electrophoretically homogenous thiamine kinase (E.C. 2.7.6.2), isolated from pig brain has been carried out. Kinetic studies of the initial rates in the absence of the products and inhibition by the reaction products as well as the data from the equilibrium dialysis suggest that the reaction proceeds through the formation of a ternary enzyme-substrate complex. The combination with substrates and release of the products appears to be highly ordered. A possible scheme of the reaction mechanism is discussed.

Key words: thiamine, thiamine kinase of the brain, mechanism of the reaction.

Значение тиаминдифосфата* определяется его ролью как кофермента ключевого фермента углеводного обмена – транскетолазы – и таких важнейших мультиферментных комплексов, как пируватдегидрогеназного и α -кетоглутаратдегидрогеназного. TDP синтезируется в микробных клетках [10], исключая мутант *Escherichia coli* K12, животных [7] и растительных [9] тканях, согласно общепринятой схеме



Реакция катализируется тиаминокиназой (АТР: тиаминпирофосфотрансфераза, КФ 2.7.6.2).

К настоящему времени фермент выделен в гомогенном состоянии из пивных дрожжей [1], листьев петрушки [9], сердца [5] и мозга [14] свиньи, изучены его кинетические характеристики, определены молекулярные массы [1, 9], показано наличие четвертичной структуры и аллостерической регуляции ионами Mg^{2+} [1]. Кроме того, относительно недавно стало известно, что для осуществления каталитической функции киназы также необходим кофермент мио-инозитол-1-пирофосфат [8].

Относительно механизма переноса пирофосфатной группировки с АТР на тиамин сведения мало численны и довольно противоречивы [1, 5]. Это можно объяснить различной видовой специфичностью фермента и, кроме того, неодинаковой степенью его очистки. Поскольку нами ранее установлены основные кинетические характеристики и изучены некоторые свойства электрофоретически

гомогенной Т-киназы из мозга свиньи, представлялось интересным выяснить механизм действия катализируемой ферментом бисубстратной реакции. В данной работе излагаются полученные результаты.

Материалы и методы

Т-киназа из мозга свиньи была очищена до гомогенного состояния, как описано ранее [14]. Все опыты проводились в 0,02 М трис-малеатном буфере pH 5,2, что соответствует оптимуму реакции. При этом pH диссоциируют три ОН-группы АТР (рК четвертой ОН группы равна 6,5). Вследствие сильно выраженной способности пирофосфатных групп связываться с двухвалентными катионами, можно считать, что АТФ вступает в реакцию в виде комплекса АТР-Н- Mg^{I} . Соотношение концентраций Mg^{2+} и АТР всегда было постоянным и равным 10. В реакции использовались ненасыщающие концентрации обоих субстратов. Инкубацию проводили при 40°C 1 ч, после чего реакцию останавливали кипячением в течение 1 мин. Смесь разбавляли в 2-3 раза 0,05 М фосфатным буфером pH 6,8 и соответствующие аликвоты отбирали для количественного определения TDP, которое осуществляли ферментативным методом [13] с некоторыми модификациями [1], при помощи апопируватдекарбоксилазы. Активность рекомбинированной в течение 30 мин при комнатной температуре (pH 6,8) холопируватдекарбоксилазы, пропорциональной содержанию TDP в пробах, определяли по убыли НАД•Н в присутствии алкогольдегидрогеназы. Калибровочный график строили с хроматографически чистым препаратом TDP.

Радиометрический метод определения тиаминокиназной активности [3]. Условия проведения реакции и концентрации всех ингредиентов были

*Принятые сокращения: Т – тиамин, TDP – тиаминдифосфат, Т-киназа – тиаминокиназа.

такими, как указано выше. В качестве субстрата фермента использовали [тиазол-2- ^{14}C]-тиамин. После остановки реакции пробы разбавляли 8-10 мл 0,02 М трис-НСI буфера рН 8,9, смесь количественно переносили на колонку (1,5·3см) с ДЭАЭ-сефадексом А-25, уравновешенную 0,02 М трис-НСI буфером рН 8,0. Незафосфорилированный [^{14}C]-тиамин снимали исходным буфером до исчезновения радиоактивности в элюате. TDP вымывали 25 мл 0,5 н. НСI. Для определения количества синтезированного в реакции меченого TDP отбирали аликвоты по 1 мл и помещали во флаконы с 10 мл диоксанового сцинтиллятора. Концентрацию [^{14}C]- TDP находили, исходя из известной удельной радиоактивности [^{14}C]-тиамина.

Равновесный диализ. Ячейку для диализа [11] изготавливали из плексигласа. Между двумя цилиндрическими камерами помещали полупроницаемую мембрану, которую для увеличения пористости перед употреблением кипятили в дистиллированной воде в течение 5 мин. Через имеющиеся в корпусе ячейки капилляры в одну из камер вносили 1 мл $2 \cdot 10^{-5}$ М раствора [^{14}C]-тиамина в 0,01 М трис-НСI буфере рН 7,7 с 0,05 М NaCl, во вторую – такой же объём электрофоретически гомогенного белка с концентрацией $1,1 \cdot 10^{-5}$ М в том же буфере. Камеры плотно прижимали друг к другу металлическим винтом и ячейку закрепляли на встряхивающем аппарате. Через определенные интервалы времени из ячеек отбирали пробы (0,1 мл) и помещали во флаконы с 10 мл диоксанового сцинтиллятора. Количество связанного с Т-киназой субстрата находили по разности радиоактивности между обеими сторонами мембраны после установления равновесной концентрации. Белок определяли по методу Лоури и спектрофотометрически по поглощению при 280 нм. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счётчике Mark-11 («Nuclear Chicago», США).

Результаты и их обсуждение

К наиболее распространённым методам установления формального механизма ферментативной реакции относится изучение начальных скоростей процесса, т.е. того периода реакции, когда концентрацией продукта можно пренебречь. Для реакции типа $A + B \leftrightarrow P + Q$ анализ начальных скоростей заключается в изменении концентрации каждого субстрата (вариабельный субстрат) при нескольких фиксированных уровнях другого. Зависимость начальной скорости от концентрации субстрата (А) выражается линейной функцией, в которой фиксируемая концентрация (В) является экзогенно задаваемым параметром. Возможны два варианта такой зависимости. В одном случае фиксируемая концентрация определяет лишь значение свободного члена в уравнении (1), в другом – она входит в выражение как углового коэффициента, так и свободного члена этой функции – уравнение (2):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a}{V} \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_b}{B}\right) \quad (1)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a}{V} \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_b}{B}\right) \quad (2)$$

где А и В – концентрации субстратов; K_b и K_a – константы Михаэлиса для А и В; \bar{K}_a – константа диссоциации А. Очевидно, что при варьировании параметра В алгебраическая интерпретация первого уравнения представляет собой семейство параллельных прямых – случай механизма, основанного на образовании замещённой формы фермента (синонимы: механизм двухтактного замещения, механизм типа «пинг-понг»).

Уравнение (2) интерпретирует собой пучок прямых, т.е. совокупность прямых, пересекающихся в одной точке. Координаты точки пересечения двух прямых $y = k_1x + v_1$ и $y = k_2x + v_2$, вид которых и является общей записью уравнения (2), равны

$$x = \frac{v_1 - v_2}{k_2 - k_1} \quad (3)$$

и

$$y = \frac{k_2v_1 - k_1v_2}{k_2 - k_1}, \quad (4)$$

где

$$k_1 = \frac{1}{V} \left(K_a + \frac{\bar{K}_a K_b}{B_1} \right); \quad k_2 = \frac{1}{V} \left(K_a + \frac{\bar{K}_a K_b}{B_2} \right);$$

$$v_1 = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_b}{B_1} \right); \quad v_2 = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_b}{B_2} \right).$$

Подставив эти значения в выражения (3) и (4), получим

$$x = -\frac{1}{K_a}; \quad (5)$$

$$y = \frac{\bar{K}_a - K_a}{K_a V}. \quad (6)$$

Поскольку вычисленные координаты не зависят от параметра В, то очевидно, что все прямые, интерпретируемые уравнением (2), пересекаются в точке с этими координатами.

Возможен случай, когда ордината точки пересечения семейства прямых равна нулю (см. результаты эксперимента). Согласно (2), имеем

$$y = \frac{K_a - K_a}{K_a V} = 0.$$

Это справедливо при условии $K_a = \bar{K}_a$. Таким образом, абсцисса совокупности прямых, возникающих при варьировании параметра В в уравнении (2), равна отрицательному значению обратной величины константы диссоциации фермент-субстратного комплекса $E+A \leftrightarrow EA$. Эти же результаты справедливы и в случае, когда В – вариабельный субстрат, а А – фиксированный.

На рисунке 1 графически представлены результаты исследования начальных скоростей тиамин-

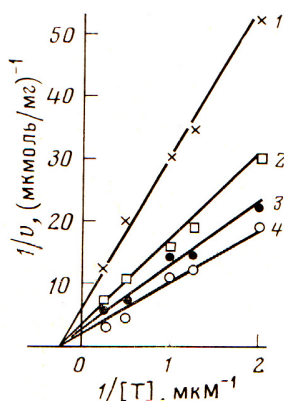


Рисунок 1 – Влияние концентрации АТР на начальную скорость тиаминакиназной реакции. Т – переменный субстрат. Концентрация АТР, мМ: 1 – 0,2; 2 – 0,4; 3 – 0,6; 4 – 0,8

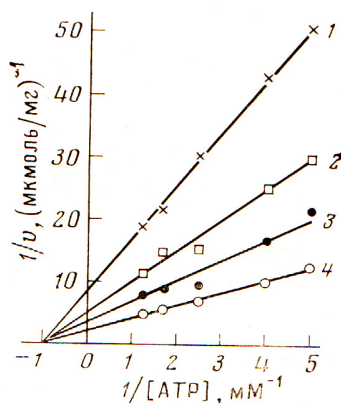


Рисунок 2 – Влияние концентрации Т на начальную скорость тиаминакиназной реакции. АТР – переменный субстрат. Концентрация Т, мМ: 1 – 0,5; 2 – 1,0; 3 – 2,0; 4 – 4,0

киназной реакции. Из двойных обратных величин зависимости скорости реакции от концентрации Т при фиксированных уровнях АТР получена серия прямых, пересекающихся на горизонтальной оси. Такое же семейство прямых наблюдается для случая, когда АТР – переменный субстрат, а Т – фиксированный (рис. 2). Как указывалось выше, такие данные свидетельствуют о том, что реакция протекает с образованием тройного фермент-субстратного комплекса, т.е. оба субстрата должны быть добавлены до освобождения любого из продуктов. Аналогичные данные были получены с гомогенными препаратами Т-киназы, выделенной из пивных дрожжей [1] и листьев петрушки [9]. Что касается результатов начальных скоростей с частично очищенными препаратами фермента из сердца свиньи [5] и пекарских дрожжей [12], то они оказались, по признанию самих авторов, неожиданными и, пожалуй, необъяснимыми. В обоих случаях прямые, выражающие зависимость x^{-1} от обратной концентрации АТР, пересекались в точке, лежащей на оси абсцисс. В случае же зависимости x^{-1} от обратной концентрации Т было получено семейство параллельно прямых. Учитывая, что при перестановке местами в приведенных выше уравнениях (1) и (2) фиксированного и переменного субстратов результаты кинетического анализа не должны изменяться, их можно объяснить лишь ошибкой эксперимента.

Из приведенных на рисунках 1 и 2 данных нельзя сделать окончательного вывода относительно типа ферментативной реакции, так как уравнения начальной скорости, а следовательно, и графическое описание упорядоченного механизма, механизма Теорелла-Чанса, а также неупорядоченного с быстрым установлением равновесия между всеми формами, кроме двух тройных комплексов, имеют одну и ту же форму. Их можно различить, исследуя ингибирование продуктами реакции. На

преимущество этого метода, позволяющего установить порядок присоединения субстратов и освобождения продуктов, указывали ряд авторов [2, 4].

Влияние АМР на АТР изучалось при фиксированных концентрациях Т. Метод двойных обратных величин дает семейство прямых, точка пересечения которых лежит на оси ординат (рис. 3), что свидетельствует о конкурентном виде ингибирования. Такой же результат получен при работе с частично очищенным ферментом из этого же источника [6]. Константа диссоциации комплекса фермент – АМР, рассчитанная по формуле для обратимого конкурентного ингибирования, оказалась равной

$2 \cdot 10^{-2}$ М. Таким образом, можно полагать, что физиологические концентрации этого метаболита вряд ли оказывают какую-либо роль в регуляции активности изучаемого фермента.

В опытах по ингибированию вторым продуктом реакции – ТДР – определить количество синтезированного ТДР ферментативным методом не удалось, поскольку для того, чтобы уложиться в калибровочный график, нужны большие разведения, и доля ТДР, образовавшегося в процессе реакции, становится крайне малой. По этой причине был использован модифицированный изотопный метод определения активности Т-киназы. Для опыта был взят меченый [^{14}C] – тиамин. Реакция протекала по схеме: $\text{АТР} + [^{14}\text{C}]\text{-Т} \rightarrow [^{14}\text{C}]\text{-ТДР} + \text{АМР}$. Поскольку содержание [^{14}C] – ТДР определялось ионообменной хроматографией, по радиоактивности образующегося кофермента, экзогенно внесенный ТДР не влиял на точность анализа.

На рисунке 4 изображена зависимость скорости реакции от концентрации Т при постоянной концентрации АТР и переменного количества ТДР. Прямые, вычерченные по методу двойных обратных величин, имеют общую точку пересечения, лежащую на оси абсцисс. Такая ситуация возникает в случае одновременного воздействия ингибитора как на свободный фермент, так и на фермент-субстратный комплекс, т.е. в случае неконкурентного ингибирования. Оказалось, что этот продукт тиаминакиназной реакции является её мощным ингибитором: константа диссоциации комплекса фермент – ТДР равна $3 \cdot 10^{-5}$ М. Этот факт помогает понять отсутствие значительного прироста кофермента в тканях при введении высоких доз Т in vivo.

С учетом правил Келланда [4], полученные результаты по ингибированию продуктами реакции, удовлетворяют условиям двух механизмов: 1) неупорядоченного механизма с быстрым установлением равновесия между всеми формами, кроме

двух тройных комплексов, содержащего стадию образования тупикового комплекса; 2) упорядоченного механизма с обязательной последовательностью присоединения субстратов и диссоциации продуктов, описываемого схемой: $ATP + T \rightarrow TDP + AMP$.

Для того чтобы исключить один из этих вероятных механизмов, было изучено взаимодействие тиаминкиназы с тиаминном методом равновесного диализа через полупроницаемую мембрану. Отправной точкой был тот факт, что для неупорядоченного механизма необходимым условием является независимость связывания субстратов на двух центрах фермента, т.е. как АТР, так и Т должны связываться с белком. В результате образования фермент-субстратного комплекса концентрация метки в камере, содержащей белок, должна быть выше, чем в камере с радиоактивным Т, на величину, соответствующую концентрации связанного с белком субстрата. В случае же упорядоченного механизма комплекс Т-киназа – Т образовываться не должен. Результаты эксперимента, представленные на рисунке 5, показывают, что состояние равновесия, к которому приходит система, характеризуется нулевым градиентом концентрации $[^{14}C]$ -Т по обе стороны мембраны, что свидетельствует об отсутствии какой-либо протейдизации субстрата.

Таким образом, кинетические исследования начальных скоростей в отсутствие продуктов и ингибирование продуктами реакции, а также данные равновесного диализа указывают на то, что бисубстратная ферментативная реакция, катализируемая электрофоретически гомогенной тиаминкиназой, выделенной из мозга свиньи, протекает через образование тройного фермент-субстратного комплекса, причем, присоединение субстратов и освобождение продуктов являются строго упорядоченными и протекают, согласно представленной схемы (рис. 6).

Литература

1. Воскобоев, А.И. Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиаминна/ А.И. Воскобоев, И.П. Черникович. – Минск : Наука и техника, 1987. – 200с.
2. Келети, Т. Основы ферментативной кинетики/ Т. Келети. – М.: Мир, 1990. – 348с.
3. Радиометрический метод определения активности тиаминпирофосфокиназы / И.П. Черникович [и др.] // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. – 1976. – № 3. – С. 112-114.
4. Cleland, W.W. The kinetics of enzyme catalyzed reactions with two or more substrates or products. 1. Nomenclature and rate equations/ W.W. Cleland // Biochim. Biophys. Acta. – 1963. – V. 67. – P. 104-137.

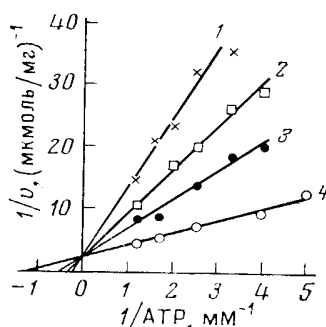


Рисунок 3 – Ингибирование тиаминкиназной реакции АТР. Т – фиксированный субстрат (4 мкМ); АТР – вариабельный субстрат. Концентрация АТР, мМ: 1 – 63; 2 – 49; 3 – 21; 4 – без ингибитора

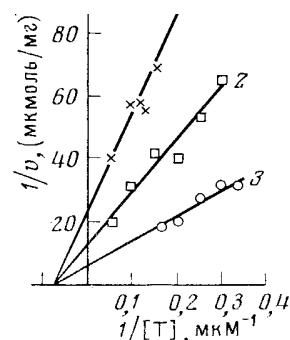


Рисунок 4 – Ингибирование тиаминкиназной реакции ТДР. АТР – фиксированный субстрат (0,5 мМ); Т – вариабельный субстрат. Концентрация ТДР, мкМ: 1 – 55; 2 – 33; 3 – без ингибитора

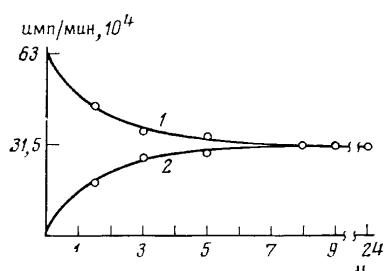


Рисунок 5 – Равновесный диализ $[^{14}C]$ -тиаминна с тиаминкиназой. 1 – радиоактивность $[^{14}C]$ -тиаминна в камере с буфером; 2 – в камере с белком

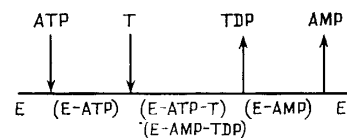


Рисунок 6 – Предполагаемая схема механизма тиаминкиназной реакции

5. Hamada, M. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from pig heart / M. Hamada // Seikiyaku. – 1970. – V.41. – P. 310-324.
6. Mano, Y. Studies on enzymatic synthesis of cocarboxylase in animal tissue. Fundamental properties of the reactions / Y. Mano // I. Biochem. – 1960. – V. 47, N 1. P. 24-36.
7. Mano, Y. Studies on enzymatic synthesis of cocarboxylase in animal tissue. Purification and properties of thiamine kinase from rat liver / Y. Mano // I. Biochem. – 1960. – V. 47, N 3. – P. 283-290.
8. Okazaki, K. Enzyme synthesis of cocarboxylase in animal tissues / K. Okazaki // Biophem. Biophys. Res. Commun. – 1975. – V. 64. – P. 20-27.
9. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf / H. Mitsuda [et. al.] // I. Nutr. Sci. Vitaminol. – 1975. – V.21, N 2. – P.103-115.
10. Soluble and membrane bound thiamine – binding proteins from *S. cerevisiae*. / A. Iwashima [et. al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 1972. – V.258. – P.333-336.
11. The interaction of ribonuclease with purine and pyrimidine phosphates. Binding of adenosine 5- monophosphate to ribonuclease / Y.P. Myer [et. al.] // Biochim. Biophys. Acta. – V. 55. – P.361-373.
12. Thiamine pyrophosphotransferase. Purification et etude du mecanisme de reaction / F. Thome-Beau [et. al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 1969. – V.182, N 1. – P.111-121.
13. Ullrich, I. Assay of thiamine pyrophosphate / I. Ullrich // Methods in Enzymology. – 1970. – V.18. – P. 109-155.
14. Wakabayashi, Y. Thiamin Pyrophosphokinase. Purification of thiamin pyrophosphokinase from pig brain / Y. Wakabayashi // Vitamins. – 1978. – V.52, N 5/6. – P.223-228.

Поступила 01.04.08