

УДК 577.164.1:577.152.3

## МЕТАБОЛИЗМ ТИАМИНДИФОСФАТА В ПЕЧЕНИ КУРИЦЫ

И.К. Колос, А.Ф. Макаричиков

Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет»  
Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси

Тиаминдифосфат (ТДФ) является коферментной формой витамина  $B_1$ . В настоящее время метаболизм ТДФ у птиц не изучен.

Цель работы – исследование свойств ферментов, катализирующих биосинтез и гидролиз ТДФ в печени курицы.

**Материал и методы.** Использованы информационные ресурсы NCBI, EBI, геномного браузера Ensembl, методы ферментативной кинетики, биоинформатики, гель-хроматография.

**Результаты и их обсуждение.** Активность тиаминпирофосфокиназы в печени курицы не выявлена, хотя анализ аминокислотных последовательностей свидетельствует о наличии в молекуле фермента консервативных остатков, существенных для каталитической активности гомологичных белков млекопитающих. Установлено, что гидролиз ТДФ в гомогенате печени курицы протекает в широком диапазоне pH, при этом наблюдаются два оптимума активности – при pH 6,0–6,5 и pH 9,5. ТДФазная активность, регистрируемая в щелочных условиях, обусловлена действием двух мембранно-ассоциированных белков –  $Mg^{2+}$ -независимой щелочной фосфатазы и  $Mg^{2+}$ -зависимой фосфатазы. При кислых pH гидролиз ТДФ в гомогенате печени курицы катализируется мембранно-ассоциированной  $Mg^{2+}$ -зависимой фосфатазой.

**Заключение.** Отсутствие тиаминпирофосфокиназной активности, определяемой стандартными методами, в печени курицы указывает на то, что ферменту присущи существенные структурно-функциональные особенности по сравнению с гомологичными белками млекопитающих. В клетках печени кур гидролиз ТДФ, вероятно, катализируется неспецифичными нуклеозиддифосфатазами L- и B-типов.

**Ключевые слова:** тиаминдифосфат, тиаминпирофосфокиназа, тиаминдифосфатаза, нуклеозиддифосфатаза, щелочная фосфатаза, печень курицы.

METABOLISM OF THIAMINE DIPHOSPHATE  
IN CHICKEN LIVER

I.K. Kolas, A.F. Makarchikov

Educational Establishment «Grodno State Agrarian University»  
Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, NAS of Belarus

Thiamine diphosphate (ThDP) is the coenzyme form of vitamin  $B_1$ . Metabolism of ThDP in birds has not been studied to date.

The aim of the present paper was to study some properties of enzymes catalyzing ThDP biosynthesis and hydrolysis in chicken liver.

**Material and methods.** The research was performed using NCBI and EBI databases, Ensembl genome browser, methods of enzyme kinetics and bioinformatics, size exclusion chromatography.

**Findings and their discussion.** The activity of thiamine pyrophosphokinase was not revealed in chicken liver, though amino acid sequence analysis indicates the predicted chicken full-length enzyme to contain conservative residues important for catalytic activity of mammalian homologous proteins. In liver homogenate, the hydrolysis of ThDP was shown to occur in a wide range of pH, two optima being observed at pH 6,0–6,5 and pH 9,5. ThDPase activity observed in alkaline conditions is due to the action of two membrane-bound proteins –  $Mg^{2+}$ -independent alkaline phosphatase and a  $Mg^{2+}$ -dependent phosphatase. The hydrolysis of ThDP in liver homogenate at acid pHs was revealed to be catalyzed by a membrane-associated  $Mg^{2+}$ -dependent phosphatase.

**Conclusion.** The absence of thiamine pyrophosphokinase activity in chicken liver under standard assays implies the enzyme to possess significant structure-functional features as compared to homologous mammalian proteins. In chicken liver cells, the hydrolysis of ThDP is apparently catalyzed by non-specific L- and B-type nucleoside diphosphatases.

**Key words:** thiamine diphosphate, thiamine, thiamine diphosphatase, nucleoside diphosphatase, alkaline phosphatase, chicken liver.

**В**итамин В<sub>1</sub> находится в клетках живых организмов в форме нескольких витамеров – свободного тиамин, ТМФ, ТДФ, ТТФ и АТТФ, среди которых количественно преобладает ТДФ, выполняющий коферментные функции в реакциях энергетического, углеводного, липидного и аминокислотного обменов [1]. В настоящее время у животных идентифицировано 5 ТДФ-зависимых белков – пируватдегидрогеназа (КФ 1.2.4.1), оксоглутаратдегидрогеназа (КФ 1.2.4.2), 3-метил-2-оксобутаноатдегидрогеназа (КФ 1.2.4.4), транскетолаза (КФ 2.2.1.1) и 2-гидроксиацил-КоА-лиаза (КФ 4.1.2.n2) ([www.brenda-enzymes.org](http://www.brenda-enzymes.org)). Помимо осуществления коферментных функций ТДФ занимает центральное место в системе внутриклеточного обмена витамина В<sub>1</sub>, являясь предшественником для синтеза ТТФ и АТТФ, а также субстратом фосфатаз, катализирующих гидролиз ТДФ до ТМФ. В клетках млекопитающих ТДФ синтезируется из тиамин и АТФ под действием цитозольной ТПК (КФ 2.7.6.2) [2]. В гидролиз ТДФ у млекопитающих предположительно вовлечены неспецифические НДФазы (КФ 3.6.1.6) [3; 4]. Сведения о метаболизме ТДФ у птиц в литературе отсутствуют.

Цель работы – исследование свойств ферментов, участвующих в обмене ТДФ в печени курицы (*Gallus gallus*).

**Материал и методы.** Использованы тиамин «AcrosOrganics»; ТДФ, трис «AppliChem»; левамизол, *л*-НФФ, ДОХ, ИДФ, ТХУ «SigmaAldrich»; тойоперл HW-55 «ToyoSoda Co.»; БСА, ферритин, овальбумин, цитохром с «Serva»; голубой декстран, АТФ, NADH, ЛДГ, пируваткиназа «Reanal»; остальные реагенты производства «Реахим» квалификаций ч.д.а и х.ч.

Для приготовления гомогенатов образцы печени кур, хранившейся при – 80°C, размораживали и растирали в стеклянном гомогенизаторе в 5-ти объемах охлажденного до 4°C 50 мМ трис-HCl буфера (рН 7,5), содержащего 0,15 М КCl и 0,2 мМ ЭДТА. Экстракты готовили, центрифугируя гомогенат при 20000 g в течение 60 мин.

Активность ТПК определялась в реакционных смесях, описанных в работах Арцукевич с соавт. [5] и Fraccascia et al. [6]. В первом случае реакцию проводили 60 мин в 50 мМ трис-HCl, рН 8,0, и 50 мМ трис-малеатном, рН 5,2, буферах, содержавших 50 мкМ тиамин, 1 мМ АТФ, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 50 мкл аликвоту экстракта, в общем объеме 0,2 мл. При применении метода [6] реакционная смесь включала 40 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7,4, 8 мМ тиамин, 24 мМ АТФ, 8 мМ MgCl<sub>2</sub>, аликвоту экстракта и фосфатазные ингибиторы – 5 мМ NaF и 0,1 мМ ортованадат – в объеме 0,2 мл. После остановки реакции количество ТДФ выявляли ферментативным методом с помощью апопируватдекарбоксилазы из пивных дрожжей [7].

Активность ЩФ регистрировали по накоплению *л*-нитрофенола в результате гидролиза *л*-НФФ в реакционной среде объемом 0,1 мл, состоящей из 50 мМ трис-HCl, рН 10,0, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мМ субстрата и аликвоты исследуемого образца. Реакцию проводили 10–30 мин при 37°C, останавливали, добавляя по 1 мл 0,2 н. NaOH и фотометрировали при 405 нм. Концентрацию *л*-нитрофенола рассчитывали исходя из коэффициента молярного поглощения  $\epsilon_{405}=18500$ .

Стандартная реакционная смесь для измерений скорости гидролиза ТДФ и ИДФ включала 50 мМ трис-HCl, рН 9,0, или трис-малеатный, рН 6,0, буфер, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ субстрат и образец белка в объеме 0,2 мл. Реакцию осуществляли 10–30 мин при 37°C, останавливали внесением 0,1 мл 15%-ной ТХУ, смесь центрифугировали (10 мин, 2500 об/мин) и отбирали на анализ аликвоты по 100 мкл. Количество P<sub>i</sub>, высвобождающегося в результате гидролиза субстрата, находили с помощью метода Lanzetta et al. [8].

За единицу (Е) ферментативной активности принимали количество, катализирующее образование 1 мкмоль продукта за 1 мин в условиях испытания.

Молекулярную массу ТДФазы определяли методом гель-фильтрации на колонке с тойоперлом HW-60 (Ø 1,6 × 40 см) в 20 мМ трис-HCl буфере, рН 7,4, содержащем 0,3 М NaCl при скорости потока 5 см/ч. Для построения калибровочного графика использовались белки-маркеры: цитохром с (12,4 кДа), овальбумин (45 кДа), БСА (67,5 кДа), ЛДГ (135 кДа), пируваткиназа (228 кДа) и ферритин (480 кДа). Объемы элюции (V<sub>e</sub>) белков выявляли по поглощению при 280 нм или ферментативной активности. Свободный объем (V<sub>0</sub>) колонки измеряли по объему элюции голубого декстрана. Значения M<sub>r</sub> рассчитывали в координатах lgM<sub>r</sub> – lgV<sub>e</sub>/V<sub>0</sub>.

В работе применялись информационные ресурсы Национального центра биотехнологической информации (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Швейцарского института биоинформатики ([www.expsy.ch](http://www.expsy.ch)), Европейского института биоинформатики (EBI, [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) и геномного браузера Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Поиск, обработку и анализ аминокислотных последовательностей проводили с помощью алгоритма BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Множественное выравнивание последовательностей осуществлялось программой BioEdit, v. 7.0.9.0.

Статистическую обработку данных и расчеты кинетических параметров проводили с помощью программы GraphPadPrism 5.0.

**Результаты и их обсуждение.** В эукариотных организмах и у многих прокариот ТДФ синтезируется из тиамин и АТФ в реакции, катализируемой ТПК:  $\text{АТФ} + \text{тиамин} \rightleftharpoons \text{ТДФ} + \text{АМФ}$ . Данный фермент был очищен и охарактеризован из различных биологических источников, включая ткани млекопитающих, растения, дрожжи и бактерии [1; 2]. ТПК млекопитающих представляет собой гомодимерный белок с  $M_r$  субъединицы 27 кДа. Эта олигомерная форма фермента способна агрегировать, образуя тетрамеры. В настоящее время установлены кристаллические структуры ТПК дрожжей, человека и мыши [9–11].

Исходя из мультиэкзонной структуры гена ТПК1 ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), можно ожидать существования множественных форм ТПК, являющихся продуктами альтернативного сплайсинга. Действительно, экспрессия нескольких сплайс-вариантов ТПК как на уровне мРНК, так и на уровне белка была продемонстрирована в тканях и клеточных линиях радужной форели [12]. Известно, что ОРС кДНК ТПК человека и мыши кодируют белки из 243 ао, которые были экспрессированы в *E. coli* в виде функционально активных форм фермента. У курицы ТПК1, содержащий 8 экзонов и 7 интронов, расположен в хромосоме 2. Аминокислотная последовательность предсказанного варианта фермента курицы длиной 244 ао (GenBank accession no. XP\_015131384.1) на 73% идентична ТПК человека (NP\_071890.2) и мыши (NP\_038889.1).

Функциональные свойства куриной ТПК в настоящее время неизвестны. Для того чтобы получить информацию об активности этого фермента в экстракте из печени курицы, мы применили метод, предложенный ранее для измерений активности ТПК в печени крысы [5]. Ввиду того, что ТПК крысы проявляет рН-оптимумы в кислой и щелочной средах [5], реакцию проводили при рН 8,0 и рН 5,2. Достаточно неожиданным оказалось полное отсутствие синтеза ТДФ в принятых условиях испытания. Чтобы исключить гидролиз ТДФ под действием фосфатаз, которые, возможно, находятся в экстракте, нами была использована реакционная смесь, содержащая фосфатазные ингибиторы – NaF и ортованадат [6]. Однако и в этом случае зарегистрировать активность ТПК в экстракте из печени курицы не удалось, хотя в параллельных экспериментах синтез ТДФ наблюдался в образцах печени крысы при применении обоих методов, причем измеряемая активность соответствовала значениям, приводимым в литературе (27,8 нмоль/ч/г ткани, или 0,54 нмоль/ч/мг белка). Хорошо известно, что ТПК является растворимым белком, который локализован в цитозоле клеток млекопитающих, растений, простейших, грибов и бактерий [2]. Тем не менее мы также попытались определить активность этого фермента в гомогенате печени курицы, поскольку нельзя исключить возможности мембранной локализации ТПК у птиц. Но и в такой постановке эксперимента ТДФ-синтезирующая активность выявлена не была. Здесь следует сказать, что уровни экспрессии мРНК в печени крысы и курицы сопоставимы. По данным Merkin et al. [13], полученным с помощью RNA-Seq технологии, уровень экспрессии мРНК ТПК в печени цыпленка составляет 2 TPM. В то же время в печени крысы обозначенная величина равна 5 TPM (Expression Atlas, [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)). В связи с этим возникает ряд вопросов по поводу функциональности ТПК курицы.

Кристаллографические данные и результаты исследований по сайт-направленному мутагенезу ТПК человека и мыши позволили установить аминокислотные остатки, существенные для каталитической активности фермента [10; 11; 14]. Показано, что в узнавании, связывании и превращении субстрата важную роль играют остатки *Asn-25*, *Asp-46*, *Gly-47*, *Asp-71*, *Asp-73*, *Gln-96*, *Thr-99*, *Asp-100*, *Phe-101*, *Gly-127*, *Gly-129*, *Arg-131*, *Asp-133*, *Gln-134* и, возможно, *Lys-103* и *Glu-57*. Так как первичная структура куриного фермента предсказана по нуклеотидной последовательности его гена, можно попытаться сделать заключение о функциональной состоятельности ТПК курицы с помощью множественного выравнивания. Для этого мы сравнили аминокислотные последовательности ТПК пяти видов млекопитающих, у которых экспрессия каталитически активного белка установлена экспериментально, с предсказанной последовательностью (XP\_015131384.1) фермента курицы (рис. 1).

<i>M. musculus</i>	MEHAFTPLEPLPTGNLKYCLVVLN <sup><u>Q</u></sup> PLDA-RFRHLWKKALLRACAD <sup><u>D</u></sup> GGA	
<i>H. sapiens</i>	MEHAFTPLEPLPTGNLKYCLVILN <sup><u>Q</u></sup> PLDN-YFRHLWKNKALLRACADGGA	
<i>R. norvegicus</i>	MEHVFTPLEPLPTGDLKFCVLVNL <sup><u>N</u></sup> QLDLP-HFRHLWRKALLRACADGGA	
<i>B. taurus</i>	MEHAITPLDPLPSGSLKYCLVILN <sup><u>Q</u></sup> PLDK-CFRHLWHKALLRACADGGA	
<i>S. scrofa</i>	MEHAITPLDPLPSGSLKYCLVILN <sup><u>Q</u></sup> PLDK-CFRHLWHKALLRACADGGA	
<i>G. gallus</i>	MERVFTPLDCLLPAGNLKFCLLILN <sup><u>Q</u></sup> PQDFRGHFHCLWSKAALRACADGGA	50
	** *	
<i>M. musculus</i>	NHLYDLTEGERESFLPEFVSG <sup><u>DFDS</u></sup> SIRPEVK <sup><u>EY</u></sup> TKKGC <sup><u>DL</u></sup> ISTPD <sup><u>Q</u></sup> DH <sup><u>T</u></sup>	
<i>H. sapiens</i>	NRLYDITEGERESFLPEFING <sup><u>DFDS</u></sup> SIRPEVRE <sup><u>YAT</u></sup> KGC <sup><u>EL</u></sup> ISTPD <sup><u>Q</u></sup> DH <sup><u>T</u></sup>	
<i>R. norvegicus</i>	NHLYDLTEGERESFLPEFING <sup><u>DFDS</u></sup> SIRPEVK <sup><u>EY</u></sup> TKKGC <sup><u>DL</u></sup> ISTPD <sup><u>Q</u></sup> DH <sup><u>T</u></sup>	
<i>B. taurus</i>	NHLYDVTEGERESFLPEFISGDFDSIRPEVREHYA <sup><u>IKGCEI</u></sup> ISTPD <sup><u>Q</u></sup> DH <sup><u>T</u></sup>	
<i>S. scrofa</i>	NHLYDVTEGERESFLPEFISGDFDSIRPEVREHYA <sup><u>IKGCEI</u></sup> ISTPD <sup><u>Q</u></sup> DH <sup><u>T</u></sup>	
<i>G. gallus</i>	NRLYHITEGSQDSFLPDYISGDFDSIQPEVKAY <sup><u>KAKGCELI</u></sup> ETMD <sup><u>Q</u></sup> DFT	100
	* *	
<i>M. musculus</i>	<sup><u>DF</u></sup> TKCLQVLRKIEE <sup><u>KE</u></sup> LQVDVIVTLGGLG <sup><u>RF</u></sup> DQIMASVNTLFQATHIT	
<i>H. sapiens</i>	<sup><u>DF</u></sup> TKCLKMLQK <sup><u>IE</u></sup> EKDLKVDVIVTLGGLAG <sup><u>R</u></sup> DQIMASVNTLFQATHIT	
<i>R. norvegicus</i>	<sup><u>DF</u></sup> TKCLQVLRKIEE <sup><u>KE</u></sup> LQVDVIVTLGGLGGRF <sup><u>DQ</u></sup> IMASVNTLFQATDII	
<i>B. taurus</i>	<sup><u>DF</u></sup> TKCLEVLRKIEE <sup><u>KE</u></sup> LQVDVIVTLGGLAGRF <sup><u>DQ</u></sup> IMASVNTLFQAPQIT	
<i>S. scrofa</i>	<sup><u>DF</u></sup> TKCLEVLRKIEE <sup><u>KE</u></sup> LQVDVIVTLGGLAGRF <sup><u>DQ</u></sup> IMASVNTLFQAPQIT	
<i>G. gallus</i>	<sup><u>DF</u></sup> TKCLQILQKIEE <sup><u>KE</u></sup> LQIDLIVTLGGLGGRF <sup><u>DQ</u></sup> TMASVETL <sup><u>F</u></sup> HATNIT	150
	***** *	
<i>M. musculus</i>	PVPIIIIQKDSLIYLLQPGK <sup><u>HRLHVD</u></sup> TGMEGSWCGLIPV <sup><u>GQ</u></sup> PCNQVTTTG	
<i>H. sapiens</i>	PFPIIIIQEESLIYLLQPGK <sup><u>HRLHVD</u></sup> TGMEGDWCGLIPV <sup><u>GQ</u></sup> PCNQVTTTG	
<i>R. norvegicus</i>	PVPIIIIQKESLIYLLQPGK <sup><u>HRLHVD</u></sup> TGMEGSWCGLIPV <sup><u>GQ</u></sup> PCN <sup><u>H</u></sup> VTTTG	
<i>B. taurus</i>	SLPVIIIQEESLIYLLQPGK <sup><u>HKLHVD</u></sup> TGMEGDWCGLIPV <sup><u>GQ</u></sup> PCNQVTTTG	
<i>S. scrofa</i>	SLPVIIIQEESLIYLLQPGK <sup><u>HKLHVD</u></sup> TGMEGDWCGLIPV <sup><u>GQ</u></sup> PCNQVTTTG	
<i>G. gallus</i>	PFPIVVIQESSLIYLLQPGK <sup><u>HKLQVNT</u></sup> GLEGSWCGLIP <sup><u>IGSSCD</u></sup> SVTTTG	200
	* *	
<i>M. musculus</i>	LKWNLTNDVLA <sup><u>F</u></sup> GT <sup><u>LV</u></sup> STSN <sup><u>TY</u></sup> DGSGV <sup><u>TV</u></sup> ETD <sup><u>HP</u></sup> LLWTMAIKS	
<i>H. sapiens</i>	LKWNLTNDVLG <sup><u>F</u></sup> GT <sup><u>LV</u></sup> STSN <sup><u>TY</u></sup> DGSG <sup><u>LV</u></sup> TVETD <sup><u>HP</u></sup> LLWTMAIKS	
<i>R. norvegicus</i>	LKWNLTNDVLG <sup><u>F</u></sup> GT <sup><u>LV</u></sup> STSN <sup><u>TY</u></sup> DGSG <sup><u>LV</u></sup> TVETD <sup><u>HP</u></sup> LLWTMAIKT	
<i>B. taurus</i>	LKWNLT <sup><u>H</u></sup> QMLG <sup><u>F</u></sup> GT <sup><u>LV</u></sup> STSN <sup><u>TY</u></sup> DGSGV <sup><u>TV</u></sup> ETD <sup><u>HP</u></sup> LLWTMAIKN	
<i>S. scrofa</i>	LKWNLT <sup><u>H</u></sup> QMLG <sup><u>F</u></sup> GT <sup><u>LV</u></sup> STSN <sup><u>TY</u></sup> DGSGV <sup><u>TV</u></sup> ETD <sup><u>HP</u></sup> LLWTMAIKN	
<i>G. gallus</i>	LRWNLANQVLK <sup><u>F</u></sup> GT <sup><u>LV</u></sup> STSN <sup><u>TY</u></sup> DNSG <sup><u>VT</u></sup> IKT <sup><u>DK</u></sup> ELLWTMAIKL	244
	* *	

**Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей пяти видов млекопитающих (мышь, человек, крыса, бык, свинья) и курицы. Аминокислотные остатки в молекулах ТПК человека и мыши, существенность которых для каталитической активности фермента следует из результатов рентгеноструктурного анализа и сайт-специфического мутагенеза [10; 11; 14], выделены полужирным курсивом и подчеркнуты**

Как видно на рис. 1, все остатки, существенные для каталитической активности ТПК человека и мыши, консервативны среди сравниваемых последовательностей. Единственным исключением является остаток 129, который, как полагают, участвует в гидрофобных контактах с адениновым кольцом молекулы АТФ. Эта позиция, очевидно, может быть занята либо *Gly*, либо *Ala*. Таким образом, нет никаких оснований полагать, что ТПК курицы, по крайней мере ее 244 ао вариант, каталитически неэффективна. Причина отсутствия активности ТПК в печени курицы остается неясной. Возможно, это связано с экспрессией другого сплайс-варианта фермента, обладающего специфическими функциональными свойствами.

В процессе внутриклеточного метаболизма витамина В<sub>1</sub> ТДФ подвергается гидролизу под действием фосфатазы. По данным S. Sano et al. [3; 4] в катаболизме ТДФ у крыс могут участвовать две мембранно-ассоциированные НДФазы, обозначаемые НДФаза типа В (мозг) и НДФаза типа L (печень). Хотя оба фермента были получены в гомогенном виде, НДФаза L-типа – из печени быка [15], а НДФаза В-типа – из головного мозга крысы [3], информации об их первичной структуре в базах данных белковых и нуклеотидных последовательностей нет. В связи с этим ответить на вопрос, существуют ли указанные ферменты в организме кур, используя методы биоинформатики, не представляется возможным. С целью общей характеристики катаболизма ТДФ у кур мы провели исследование свойств ТДФазной активности в печени.

Прежде всего, было изучено влияние рН на скорость гидролиза ТДФ в гомогенате печени в присутствии 5 мМ Mg<sup>2+</sup>. Как показано на рис. 2А, ТДФазная активность регистрируется в широком диапазоне концентраций ионов водорода, при этом на графике имеются два максимума, соответствующих

значениям pH 6,0–6,5 и ~ 9,5. Подобный pH-профиль может означать наличие в печени курицы по меньшей мере двух фосфатаз, сильно различающихся по требованиям к кислотности реакционной среды. После центрифугирования гомогената при 20000 g в течение 60 мин основная масса ферментативной активности, как при pH 6,0, так и при pH 9,0, обнаруживалась в осадке (рис. 2Б), что указывает на участие в гидролизе ТДФ мембранно-ассоциированных фосфатаз. Небольшое количество (~ 5% от общего содержания в гомогенате) ТДФазной активности, наблюдаемое во фракции супернатанта при pH 6,0, очевидно, объясняется присутствием в нем неосажденных фрагментов мембран. С другой стороны, относительно высокое (~ 23%) содержание в надосадочной жидкости ТДФазной активности, измеренной при pH 9,0, может свидетельствовать о том, что в печени курицы наряду с мембранно-ассоциированными фосфатазами экспрессируется растворимый фермент, способный с заметной скоростью осуществлять гидролиз ТДФ в щелочных условиях.

Скорость гидролиза ТДФ при pH 6,0 и 9,0 в мембранной фракции гомогената печени курицы так же, как и при pH 9,0 в экстракте, сильно увеличивалась под действием ионов  $Mg^{2+}$  (рис. 2В). Этого и следовало ожидать, поскольку общим свойством всех описанных до настоящего времени ферментов (кроме неспецифичных кислотной и щелочной фосфатаз), субстратом которых может служить ТДФ, является их зависимость от катионов двухвалентных металлов [3; 15–17]. Что же касается достаточно высокой  $Mg^{2+}$ -независимой ТДФазной активности в осадке при pH 9,0, то она, по-видимому, обусловлена действием ЩФ, которой, как было установлено Eaton & Moss [18], для гидролиза ТДФ двухвалентные катионы не нужны. Более того, в присутствии 10 мМ  $Mg^{2+}$  скорость дефосфорилирования ТДФ ЩФ из печени и кишечника человека несколько снижалась [18]. О том, что в щелочной среде ТДФазная активность гомогената печени курицы на самом деле, хотя бы частично, определяется работой ЩФ, свидетельствуют результаты экспериментов с левамизолом – специфичным ингибитором этого фермента. Ранее в экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что ТДФ является субстратом ЩФ из кишечника телят [19], печени и кишечника человека [18].

На рисунке 2Г представлены результаты экспериментов по влиянию 1 мМ левамизола на ТДФазную и *l*-НФФазную активности гомогената печени курицы. Как видно, степень ингибирования левамизолом ТДФазной активности составила 24%, тогда как скорость гидролиза *l*-НФФ снижалась на 65%. Полученные результаты хорошо согласуются с данными Ogawa et al. [20], согласно которым при pH 9,0 левамизол в концентрации 2,5 мМ уменьшал ТДФазную активность гомогената печени мыши на 25%. С другой стороны, Delomenède et al. [21] показали, что 1 мМ левамизол при pH 10,5 ингибирует ЩФ куриных эмбрионов на 63%. Из всего сказанного следует, что вклад ЩФ в гидролиз ТДФ в гомогенатах печени курицы при щелочных pH не является определяющим. По большей части эта «щелочная» ТДФазная активность, вероятно, обусловлена действием микросомальной НДФазы L-типа. Следует также сказать, что ЩФ является экто-нуклеотидазой, поэтому ее участие во внутриклеточном метаболизме ТДФ исключено.

НДФаза В-типа, впервые очищенная из головного мозга крысы S. Sano et al. в 1988 г. [3], еще долго до этого применялась в качестве гистохимического маркера аппарата Гольджи [22]. Фермент из мозга крысы имеет  $M_r$  75 кДа (по данным денатурирующего электрофореза в ПААГ) и с сопоставимыми скоростями катализирует гидролиз ТДФ и различных нуклеозиддифосфатов [3; 4]. В присутствии катионов  $Mg^{2+}$  и с ТДФ в качестве субстрата НДФаза В-типа проявляет активность в широком диапазоне значений водородного показателя с выраженным максимумом при pH 6,0–6,5. Исходя из того, что у млекопитающих НДФаза В-типа экспрессируется не только в головном мозге, но и в печени [23], можно предположить, что эта же фосфатаза катализирует гидролиз ТДФ и в гомогенате печени кур. В данном отношении следует отметить, что, аналогично ТДФазе, ИДФазная активность гомогената куриной печени проявляла pH-оптимум при pH 6,0–6,5 (рис. 2Д).

Кинетические исследования показали, что гидролиз ТДФ в гомогенате печени курицы как при pH 6,0, так и при pH 9,0 подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен. Величины кажущихся  $K_m$  для ТДФ при фиксированной концентрации катионов  $Mg^{2+}$  5 мМ, рассчитанные методом нелинейной регрессии, составили  $2,31 \pm 0,32$  мМ (pH 6,0;  $n = 5$ ) и  $1,80 \pm 0,37$  мМ (pH 9,0;  $n = 5$ ). Трансформация в координатах Хейнса в обоих случаях дает прямые, которые отсекают на оси абсцисс отрезки, соответствующие значениям  $K_m$   $2,28 \pm 0,40$  мМ (pH 6,0) и  $1,58 \pm 0,39$  мМ (pH 9,0) (рис. 2Е). Для сравнения, величины кажущихся  $K_m$  описанных в литературе ферментов с ТДФазной активностью из других биологических

источников составляют: НДФазы В-типа из головного мозга крысы – 0,66–2 мМ [3; 4], НДФазы L-типа из печени крысы – 17 мМ [4], НДФазы из микросом печени быка – 20,7 мМ [15], ТДФазы из головного мозга овцы – 1,33 мМ [17], ТДФазы из головного мозга кролика – 1,2 мМ [16], ЩФ из тонкого кишечника и печени человека – соответственно 1,2 мМ и 6,3 мМ [18], ЩФ из тонкого кишечника телят – 0,3 мМ [19].

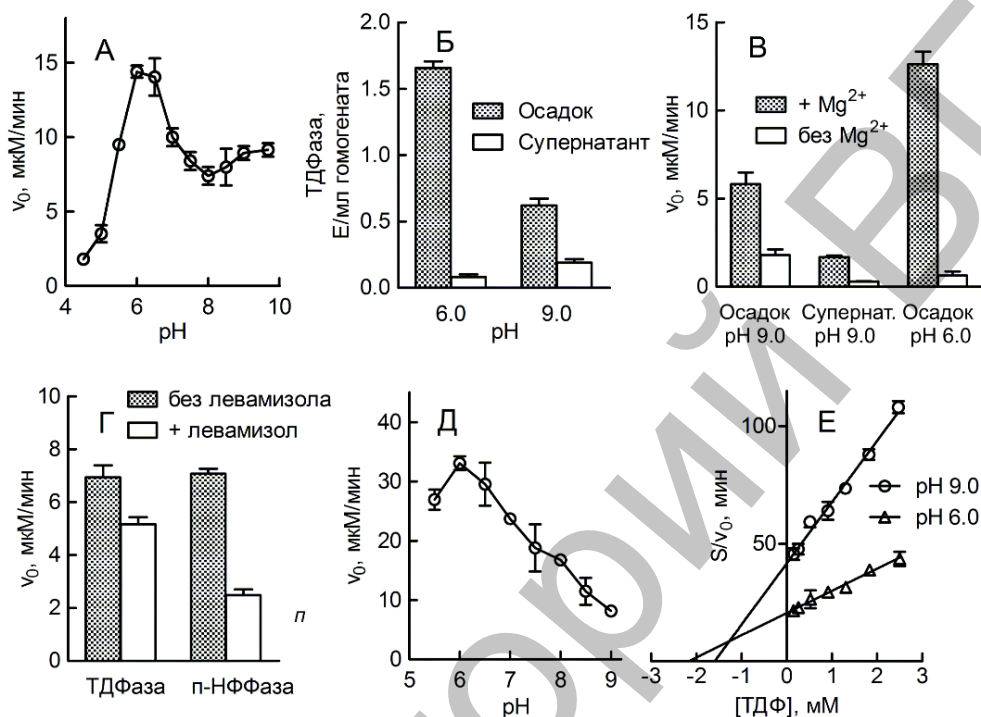


Рис. 2. А. Влияние рН на начальную скорость гидролиза ТДФ в гомогенате печени курицы. Б. Распределение активности ТДФазы между растворимой и мембранной фракциями гомогената печени курицы. В. Влияние ионов  $Mg^{2+}$  на скорость гидролиза ТДФ в мембранной и растворимой фракциях гомогената печени курицы. Г. Влияние 1 мМ левамизола на скорость гидролиза ТДФ и п-НДФ в гомогенате печени курицы при рН 9,0. Д. рН-зависимость гидролиза ИДФ в гомогенате печени курицы. Е. Линеаризованная в координатах Хейнса зависимость начальной скорости реакции гидролиза ТДФ в гомогенате печени курицы

При хроматографии супернатанта на калиброванной белками-стандартами колонке с тойперлом HW-55 элюировался пик «щелочной» ТДФазной активности, соответствующий белку с  $M_r$  135,2 ± 10,3 кДа ( $n = 2$ , рис. 3). Необходимо отметить, что скорость гидролиза ИДФ при рН 9,0 во фракциях этого пика значительно превышала скорость ТДФазной реакции (данные не представлены). В то же время при рН 6,0 ТДФазная активность не наблюдалась по всему профилю элюции, за исключением фракций свободного объема колонки ( $M_r > 700$  кДа), содержащих белковые агрегаты и очень мелкие фрагменты мембран. При рН 6,0 активность ТДФазы в пиковой фракции свободного объема составляла 6,2–7,8 мЕ/мл; в этом же объеме выходил небольшой пик ТДФазной активности, измеряемой при рН 9,0. Таким образом, гидролиз ТДФ, который наблюдается в экстракте из печени курицы в щелочной среде, обусловлен действием растворимой НДФазы неизвестной природы. Скорее всего, эта НДФаза гомологична микросомальному ферменту, очищенному ранее из печени быка, крысы и свиньи [15; 24; 25]. Действительно, Yamazaki & Hayashi [16] было установлено, что фермент микросом слабо связан с мембранами и частично экстрагируется буферными растворами даже при слабощелочных рН. Как показали Ohkubo et al. [25], микросомальная НДФаза из печени крысы представляет собой белок с  $M_r$  130 кДа, построенный из двух субъединиц ( $M_r = 65$  кДа).

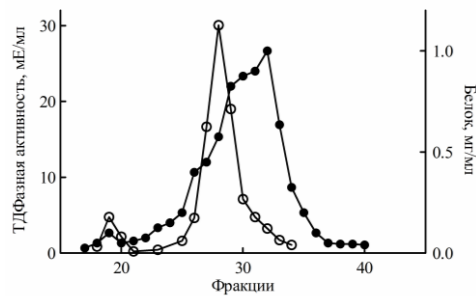


Рис. 3. Хроматография экстракта из печени курицы на колонке с тойоперлом HW-55, ● – концентрация белка, ○ – ферментативная активность при pH 9,0

**Заключение.** По результатам настоящей работы можно сделать следующие выводы:

- с помощью методов, применявшихся в исследованиях ТПК из печени крысы и других биологических объектов, активность фермента в печени курицы не выявляется. Сравнение предсказанной аминокислотной последовательности 244 ао сплайс-варианта куриной ТПК (XP\_015131384.1) с первичными структурами ТПК пяти видов млекопитающих указывает на то, что фермент курицы должен обладать функциональной активностью, так как содержит консервативные аминокислотные остатки, существенные для каталитической активности ТПК млекопитающих. Для выяснения причин отсутствия активности ТПК в печени курицы необходимы дальнейшие исследования;
- гидролиз ТДФ в гомогенате печени курицы протекает в широком диапазоне pH, при этом наблюдаются два оптимума активности – в кислой среде при pH 6,0–6,5 и в щелочной среде при pH ~ 9,5;
- ТДФазная активность гомогената, регистрируемая в щелочных условиях, обусловлена действием, по меньшей мере, двух мембранно-ассоциированных ферментов –  $Mg^{2+}$ -независимой ЩФ и  $Mg^{2+}$ -зависимой фосфатазы, вероятно, представляющей собой НДФазу L-типа;
- при кислых pH гидролиз ТДФ в гомогенате печени курицы катализируется мембранно-ассоциированным  $Mg^{2+}$ -зависимым белком, возможно, НДФазой B-типа.

#### Перечень принятых обозначений и сокращений

АТФ – аденозинтрифосфат, ИДФ – инозиндифосфат, ИДФаза – инозиндифосфатаза, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, НДФаза – нуклеозиддифосфатаза, ТМФ – тиаминмонофосфат, ТДФ – тиаминдифосфат, ТДФаза – тиаминдифосфатаза, ТПК – тиаминпирофосфокиназа, ТТФ – тиаминтрифосфат, ЩФ – щелочная фосфатаза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Makarchikov, A.F. Vitamin B1: metabolism and functions / A.F. Makarchikov // Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomedical Chemistry. – 2009. – Vol. 3(2). – P. 116–128.
2. Воскобоев, А.И. Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиамин / А.И. Воскобоев, И.П. Черникевич. – Минск: Наука и техника, 1987. – 200 с.
3. Sano, S. Type B nucleoside diphosphatase of rat brain. Purification and properties of an enzyme with high thiamin pyrophosphatase activity / S. Sano, Y. Matsuda, H. Nakagawa // Eur. J. Biochem. – 1988. – Vol. 171. – P. 231–236.
4. Thiamine pyrophosphatase and nucleoside diphosphatase in rat brain / S. Sano [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1984. – Vol. 118. – P. 292–298.
5. Арцукевич, И.М. Очистка и некоторые свойства тиаминпирофосфокиназы из печени крыс / И.М. Арцукевич, А.И. Воскобоев, Ю.М. Островский // Вопр. мед. химии. – 1977. – Т. 23. – С. 203–210.
6. Presence of thiamine pyrophosphate in mammalian peroxisomes / P. Fraccascia [et al.] // BMC Biochem. – 2007. – Vol. 8:10.
7. Ферментативный микрометод количественного определения тиаминдифосфата в биологических жидкостях / И.П. Черникевич [с соавт.] // Прикл. биохим. микробиол. – 1991. – Т. 27, вып. 5. – С. 65–68.
8. Lanzetta, P.A. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate / P.A. Lanzetta [et al.] // Anal. Biochem. – 1979. – Vol. 100. – P. 95–97.
9. Crystal structure of human thiamin pyrophosphokinase 1 [Electronic resource] / L. Shen [et al.]. – Mode of access: <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3S4Y>. – Date of access: 13.07.2018.
10. Crystal structure of thiamin pyrophosphokinase / D.E. Timm [et al.] // J. Mol. Biol. – 2001. – Vol. 310. – P. 195–204.
11. Liu, J.-Y. A new crystal form of mouse thiamin pyrophosphokinase 1 / J.-Y. Liu, T.D. Hurley // Int. J. Biochem. Mol. Biol. – 2011. – Vol. 2. – P. 111–118.
12. Identification of the thiamin pyrophosphokinase gene in rainbow trout: characteristic structure and expression of seven splice variants in tissues and cell lines and during embryo development / S. Yuge [et al.] // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. – 2012. – Vol. 163. – P. 193–202.

13. Evolutionary dynamics of gene and isoform regulation in mammalian tissues / J. Merkin [et al.] // *Science*. – 2012. – Vol. 338(6114). – P. 1593–1599.
14. Onozuka, M. Steady-state kinetics and mutational studies of recombinant human thiamin pyrophosphokinase / M. Onozuka, K. Nosaka // *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. – 2003. – Vol. 49. – P. 156–162.
15. Yamazaki, M. Allosteric properties of nucleoside diphosphatase and its identity with thiamine pyrophosphatase / M. Yamazaki, R. Hayashi // *J. Biol. Chem.* – 1968. – Vol. 243. – P. 2934–2942.
16. Cooper, J.R. The partial purification and characterization of thiamine pyrophosphatase from rabbit brain / J.R. Cooper, M.M. Kini // *J. Neurochem.* – 1972. – Vol. 19. – P. 1809–1811.
17. Shetty, K.T. Thiamine pyrophosphatase in brain. Partial purification, regional distribution and ontogeny / K.T. Shetty, Veeranna // *Neurochem. Int.* – 1991. – Vol. 19. – P. 33–37.
18. Eaton, R.H. Organic pyrophosphates as substrates for human alkaline phosphatases / R.H. Eaton, D.W. Moss // *Biochem. J.* – 1967. – Vol. 105. – P. 1307–1312.
19. Вовк, А.И. Относительная реакционная способность тиаминмонофосфата и тиаминдифосфата при взаимодействии со щелочной фосфатазой / А.И. Вовк, Л.В. Бабий, И.В. Муравьева // *Укр. биохим. журн.* – 2002. – Т. 74, № 1. – С. 93–96.
20. Ogawa, K. Recent findings on ultracytochemistry of thiamin phosphatases / K. Ogawa, M. Sakai, K. Inomata // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1982. – Vol. 378. – P. 188–214.
21. Delomenède, M. Lansoprazole is an uncompetitive inhibitor of tissue-nonspecific alkaline phosphatase / M. Delomenède, R. Buchet, S. Mebarek // *Acta Biochim. Pol.* – 2009. – Vol. 56. – P. 301–305.
22. Goldfischer, S. Nucleoside diphosphatase and thiamine pyrophosphatase activities in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus / S. Goldfischer, E. Essner, B. Schiller // *J. Histochem. Cytochem.* – 1971. – Vol. 19. – P. 349–360.
23. Sano, S. Thiamine pyrophosphatase (nucleoside diphosphatase) in the Golgi apparatus is distinct from microsomal nucleoside diphosphatase / S. Sano, Y. Matsuda, H. Nakagawa // *J. Biochem.* – 1988. – Vol. 103. – P. 678–681.
24. Pinsley, C.L. Nucleoside diphosphatase from pig liver: purification and some properties / C.L. Pinsley, M.C. Scrutton // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1973. – Vol. 158. – P. 331–345.
25. Purification and characterization of nucleoside diphosphatase from rat-liver microsomes. Evidence for metalloenzyme and glycoprotein / I. Ohkubo [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1980. – Vol. 112. – P. 111–118.

## REFERENCES

1. Makarchikov, A.F. Vitamin B1: metabolism and functions / A.F. Makarchikov // *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomedical Chemistry*. – 2009. – Vol. 3(2). – P. 116–128.
2. Voskoboyev A.I., Chernikevich I.P. *Biosintez, degradatsiya i transport fosfornykh efirov tiamina* [Biosynthesis, Degradation and Transport of Thiamine Phosphoric Esters], Minsk, Nauka and Tekhnika, 1987, 200 p.
3. Sano, S. Type B nucleoside-diphosphatase of rat brain. Purification and properties of an enzyme with high thiamin pyrophosphatase activity / S. Sano, Y. Matsuda, H. Nakagawa // *Eur. J. Biochem.* – 1988. – Vol. 171. – P. 231–236.
4. Thiamine pyrophosphatase and nucleoside diphosphatase in rat brain / S. Sano [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1984. – Vol. 118. – P. 292–298.
5. Artsukevich I.M., Voskoboyev A.I., Ostrovsky Yu.M. *Vopr. Med. Khim.* [Issues of Medical Chemistry], 1977, 23, pp. 203–210.
6. Presence of thiamine pyrophosphate in mammalian peroxisomes / P. Fraccascia [et al.] // *BMC Biochem.* – 2007. – Vol. 8:10.
7. Chernikevich I.P. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* [Applied Biochemistry Microbiology], 1991, 27(5), pp. 65–68.
8. Lanzetta, P.A. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate / P.A. Lanzetta [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 100. – P. 95–97.
9. Crystal structure of human thiamin pyrophosphokinase 1 [Electronic resource] / L. Shen [et al.] – Mode of access: <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/354Y>. – Date of access: 13.07.2018.
10. Crystal structure of thiamin pyrophosphokinase / D.E. Timm [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 310. – P. 195–204.
11. Liu, J.-Y. A new crystal form of mouse thiamin pyrophosphokinase / J.-Y. Liu, T.D. Hurley // *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 2. – P. 111–118.
12. Identification of the thiamin pyrophosphokinase gene in rainbow trout: characteristic structure and expression of seven splice variants in tissues and cell lines and during embryo development / S. Yuge [et al.] // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 163. – P. 193–202.
13. Evolutionary dynamics of gene and isoform regulation in mammalian tissues / J. Merkin [et al.] // *Science*. – 2012. – Vol. 338(6114). – P. 1593–1599.
14. Onozuka, M. Steady-state kinetics and mutational studies of recombinant human thiamin pyrophosphokinase / M. Onozuka, K. Nosaka // *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. – 2003. – Vol. 49. – P. 156–162.
15. Yamazaki, M. Allosteric properties of nucleoside diphosphatase and its identity with thiamine pyrophosphatase / M. Yamazaki, R. Hayashi // *J. Biol. Chem.* – 1968. – Vol. 243. – P. 2934–2942.
16. Cooper, J.R. The partial purification and characterization of thiamine pyrophosphatase from rabbit brain / J.R. Cooper, M.M. Kini // *J. Neurochem.* – 1972. – Vol. 19. – P. 1809–1811.
17. Shetty, K.T. Thiamine pyrophosphatase in brain. Partial purification, regional distribution and ontogeny / K.T. Shetty, Veeranna // *Neurochem. Int.* – 1991. – Vol. 19. – P. 33–37.
18. Eaton, R.H. Organic pyrophosphates as substrates for human alkaline phosphatases / R.H. Eaton, D.W. Moss // *Biochem. J.* – 1967. – Vol. 105. – P. 1307–1312.
19. Vovk A.I., Babiy L.V., Muravyeva I.V. *Ukr. Biochem. J.* [Ukraine Biochemistry Journal], 2002, 74 (1), pp. 93–96.
20. Ogawa, K. Recent findings on ultracytochemistry of thiamin phosphatases / K. Ogawa, M. Sakai, K. Inomata // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1982. – Vol. 378. – P. 188–214.
21. Delomenède, M. Lansoprazole is an uncompetitive inhibitor of tissue-nonspecific alkaline phosphatase / M. Delomenède, R. Buchet, S. Mebarek // *Acta Biochim. Pol.* – 2009. – Vol. 56. – P. 301–305.
22. Goldfischer, S. Nucleoside diphosphatase and thiamine pyrophosphatase activities in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus / S. Goldfischer, E. Essner, B. Schiller // *J. Histochem. Cytochem.* – 1971. – Vol. 19. – P. 349–360.
23. Sano, S. Thiamine pyrophosphatase (nucleoside diphosphatase) in the Golgi apparatus is distinct from microsomal nucleoside diphosphatase / S. Sano, Y. Matsuda, H. Nakagawa // *J. Biochem.* – 1988. – Vol. 103. – P. 678–681.
24. Pinsley, C.L. Nucleoside diphosphatase from pig liver: purification and some properties / C.L. Pinsley, M.C. Scrutton // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1973. – Vol. 158. – P. 331–345.
25. Purification and characterization of nucleoside diphosphatase from rat-liver microsomes. Evidence for metalloenzyme and glycoprotein / I. Ohkubo [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1980. – Vol. 112. – P. 111–118.

Поступила в редакцию 21.11.2018

Адрес для корреспонденции: e-mail: kolosik\_2210@mail.ru – Колос И.К.