УДК: 577.15.03 : 615.014.67

ПРИРОДА АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ТИАМИНКИНАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА СВИНЬИ

Черникевич И.П., Тырсина А.А., Воскобоев А.И.
УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Цель работы – выяснение природы аминокислотных остатков активного центра тиаминкиназы (КФ 2.7.6.2) головного мозга свиньи методами химической модификации. Показано, что окислительное галогенирование индольного ядра остатка триптофана N-бромсукцинимидом возможно лишь при избыточных по отношению к тиаминкиназе концентрациях, что указывает на малую вероятность непосредственного участия этой α-аминокислоты в связывании субстрата ферментом. На основании высокой скорости фотоинактивации глобулы, сенсибилизированной бенгальским розовым и метиленовой синью, S-образной зависимости потери активности от pH при облучении в присутствии фотосенсибилизаторов, характерного изменения спектра поглощения модифицированного белка высказывается предположение о важной роли имидазольного остатка гистидина как одной из функциональных групп тиаминкиназы.

Ключевые слова: *тиаминкиназа, мозг свиньи, идентификация функциональных групп.*

Ферменты, коферментом которых является тиаминпирофосфат, участвуют в обмене углеводов, нуклеиновых кислот и белков. Биосинтез тиаминпирофосфата осуществляется тиаминкиназой (АТР: тиаминпирофосфотрансфераза, КФ 2.7.6.2), выделенной к настоящему времени в высокоочищенном индивидуальном состоянии из печени крысы [1], сердца и мозга свиньи [9,6], листьев петрушки [10], пивных дрожжей [7]. Исследованы кинетические характеристики фермента [2, 12], его субстратная специфичность [2,7], четвертичная структура [1, 2], механизм действия [11, 12, 14]. Однако сведения о природе функциональных групп активного центра тиаминкиназы в литературе единичны [11, 14].

В данной работе предпринята попытка исследовать роль определённых аминокислотных остатков в активном центре тиаминкиназы методом химической модификации.

Материалы и методы. Гомогенный препарат тиаминкиназы выделяли разработанным нами методом [6]. Активность фермента определяли по скорости образования тиаминпирофосфата [7]. Реакционная смесь содержала 2 · 10–3 М АТР, 2 · 10–5 М тиамин, 2 · 10–3М трис-HCl буфер pH 8,6, 1 · 10–2 М MgSO4 и 20-30 мкг фермента в общем объёме 1 мл. Удельную активность выражали в нмоль тиаминпирофосфата, образовавшегося за 1 ч при 40˚С в расчёте на 1 мг белка. Белок определяли по методу Лоури и по величине оптической плотности при 280 нм.

Ингибирующее действие N-бромсукцинимида: к 0,1 мл фермента (6 · 10–6 – 1 · 10–5М) в 0,05 М ацетатном буфере pH 4,0 добавляли по 0,01 мл перекристаллизованного свежеприготовленного раствора N-бромсукцинимида (1 · 10–4 – 1 · 10–3М) в этом же буфере. Смесь инкубировали в течение 15 мин. при 35˚С и определяли тиаминкиназную активность [7].

Фотоокисление тиаминкиназы: метиленовую синь использовали без предварительной очистки, растворяя 22,5 мг реагента в 50 мл H_2O. Для приготовления раствора бенгальского розового навеску (50 мг) растворяли в небольшом объёме H_2O и пропускали через колонку (2х35 см) с КМ-целлюлозой (СМ-50) в Na+-форме. Сенсибилизатор элюировали водой и доводили концентрацию до 0,2 мг/мл.

Фотоокисление фермента метиленовой синью выполняли в 0,05 М ацетатном, трис-малеатном и трис-HCl буферах, pH 4,0-10,0 В тонкостенную пробирку помещали 1 мл раствора фермента требуемого pH и добавляли 0,05 мл 3% раствора метиленовой сини. Облучение образцов осуществляли в течение 20 мин. лампой накаливания мощностью 200 Вт при 18˚С на расстоянии 20 см. Охлаждение проб проводилось при обдуве вентилятором. В качестве контроля использовали пробы без сенсибилизатора (с освещением и с метиленовой синью в темноте). Фотоокисленные образцы доводили до pH 8,6, уравнивали объемы и отбирали аликвоты для определения активности.

Фотоокисление, сенсибилизированное бенгальским розовым, проводили аналогичным образом, используя 0,1% раствор сенсибилизатора. Облучение осуществляли лампой дневного света (ЛДС-15) в течение 45 мин.

При изучении защитного действия субстратов перед облучением к ферменту добавляли раздельно Mg2+, тиамин и АТР в концентрациях, необходимых для протекания тиаминкиназной реакции, или сочетания – Mg +АТР и Mg + тиамин.

УФ-спектрофотометрический анализ фотоокисления тиаминкиназы с метиленовой синью приводили в 1-см кварцевых кюветах. 2 · 10–6 М фермент pH 7,5, содержащий метиленовую синь (конечная концентрация 4 · 10–5М), облучали и записывали дифференциальные спектры, используя систему из четырёх кювет: 1 – облучаемый раствор фермента с фотосенсибилизатором, 2 – необлучаемый буферный раствор с метиленовой синью, 3 – фермент с метиленовой синью без облучения и 4 – облучаемый буферный раствор с фотосенсибилизатором. Параллельно осуществлялось измерение ферментативной активности.

Результаты и их обсуждение. В кислотно-основном катализе, характерном для большинства ферментов, в том числе и для ферментов класса трансфераз, важное место отводится остаткам триптофана и гистидина из-за наличия у них сопряжённых индольного и имидазольного циклов с кислотными пиррольными и основными пиридиновыми атомами азота [8]. Для модификации триптофана широко используется N-бромсукцинимид [3]. Считается, что этот реагент наиболее реакционноспособен при pH 4,0. Кроме того, при чётком контроле расхода количества реагента в реакции с белком можно добиться его избирательного действия на остаток триптофана [3]. Как видно из рис. 1, N-бромсукцинимид в избыточных количествах вызывал полную инактивацию фермента. Однако для модификации одного триптофанильного остатка требуется обычно добавление 2-4 эквивалентов N-бромсукцинимида [4]. Реакция с другими аминокислотами осуществляется медленнее и нуждается в повышенном расходе реагента. Так, для модификации остатков тирозина и гистидина, которая также при этом может иметь место, необходим 10-20-кратный избыток N-бромсукцинимида. Из данных рис. 1 следует, что 4-кратный избыток модификатора не проводил к снижению ферментативной активности. Характерно, что в этом случае наблюдалась даже некоторая активация (17-18%). Поскольку высокоочищенный препарат тиаминкиназы обладает сравнительно невысокой термостабильностью [6], то преинкубация контрольной пробы в течение 15 мин. при 35˚С могла вести к некоторой инактивации, а присоединение N-бромсукцинимида, с другой стороны, увеличивало, вероятно, термоустойчивость фермента. Ингибирование модификатором начиналось при 6-кратном избытке реагента и достигало максимума при 14–15-кратном соотношении N-бромсукцинимид/фермент. Ввиду того, что при модификации фермента для полной потери активности потребовалось 14-15 моль N-бромсукцинимида на 1 моль белка, маловероятно, что инактивация тиаминкиназы связана только с блокированием триптофана. Не исключено, однако, что главная роль триптофанильных остатков заключается либо в поддержании нативного конформационного состояния молекулы фермента, либо они находятся в относительной близости с аминокислотными остатками, которые осуществляют непосредственное связывание субстрата в активном центре.

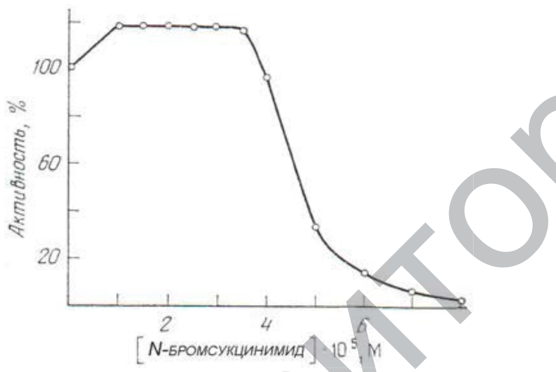

Рисунок 1 – Инактивация тиаминкиназы N-бромсукцинимидом. Концентрация фермента в пробе 6 · 10–6М

Одним из широко применяемых методов для выяснения природы аминокислотных остатков, существенных для ферментативного катализа, является фотоокисление в присутствии сенсибилизаторов. Его механизм сводится к возбуждению с помощью световой энергии молекулы фотосенсибилизатора и превращению этой энергии в энергию окислительно-восстановительного процесса разрушения того или иного остатка – главным образом триптофана, гистидина, тирозина, метионина, цистина и цистеина [5]. Изучая зависимость скорости фотоокисления от рН, сравнивая её с такой же зависимостью для перечисленных выше аминокислот в модельной системе, можно сделать заключение о роли отдельных аминокислот в проявлении ферментативной активности. Причём скорость фотоокисления гистидина наиболее характерна – она выражается S–образной кривой. В качестве сенсибилизаторов используют чаще всего метиленовую синь и бенгальский розовый.

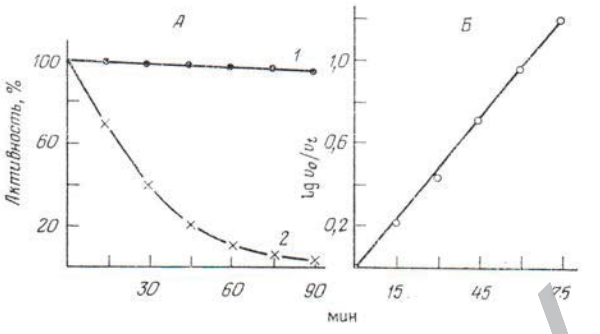

Рисунок 2 – Фотоинактивация тиаминкиназы во времени. А – фотоинактивация, сенсибилизированная метиленовой синью (2), контроль в отсутствие метиленовой сини (1); Б – кривая 2 в логарифмических координатах (vo – скорость фотоокисления в отсутствие и vt – в присутствии метиленовой сини)

Согласно рис. 2, облучение тиаминкиназы в присутствии метиленовой сини приводило к резкому снижению активности в первые 15 мин. экспозиции. В логарифмических координатах временная зависимость фотоинактивации описывается прямой, что указывает на разрушение одних и тех же однотипных аминокислотных остатков без образования промежуточных инактивированных форм фермента. Рассчитанная согласно экспериментальной прямой (рис. 2.Б) константа скорости реакции была равна 1,13 мин. –1, период полураспада – 24,6 мин.

Результаты по фотосенсибилизированному окислению фермента в присутствии метиленовой сини в зависимости от рН представлены на рис. 3 (растворы ацетатного, трис-малеатного и трис-HCl буферов готовили с перекрывающимися значениями рН, чтобы исключить эффект природы буферных компонентов). Видно, что в кислой среде ферментативная активность подавлялась незначительно – на 20-22%. В интервале рН 5,0–6,5 наблюдается резкое ускорение процесса инактивации с выходом на плато при рН 7,0. Аналогичная зависимость наблюдается при изучении скорости фотоокисления гистидина [13] как в отношении формы кривой, так и точки её перегиба (рН 6,0–6,5). В большинстве опытов вывод о важности остатков гистидина в каталитическом центре, сделанном на основании однотипности фотоинактивации фермента и фотоокисления гистидина при рН 6,6–8,0, как правило, подтверждался применением других специфических методов, включая аминокислотный анализ [13]. Исследованный нами процесс окисления триптофанильных остатков показал, что он одинаков (30%) при всех значениях рН, хотя скорость фотоинактивации, как следует из рис. 3, характеризуется S-образной кривой. Это дополнительно свидетельствует в пользу высказанного выше предположения о малой функциональной значимости остатков триптофана.

На рис. 3 одновременно представлены данные по фотоокислению тиаминкиназы, сенсибилизированной бенгальским розовым, в интервале рН 4,5–10,0. В этом случае характер кривой фотоинактивации фермента был идентичен таковому при фотоокислении сенсибилизированном метиленовой синью, т.е. был типичен для окисления гистидина. Следует, однако, указать и на некоторые различия. Во-первых, кривая фотоинактивации в присутствии бенгальского розового сдвинута в кислую область с перегибом

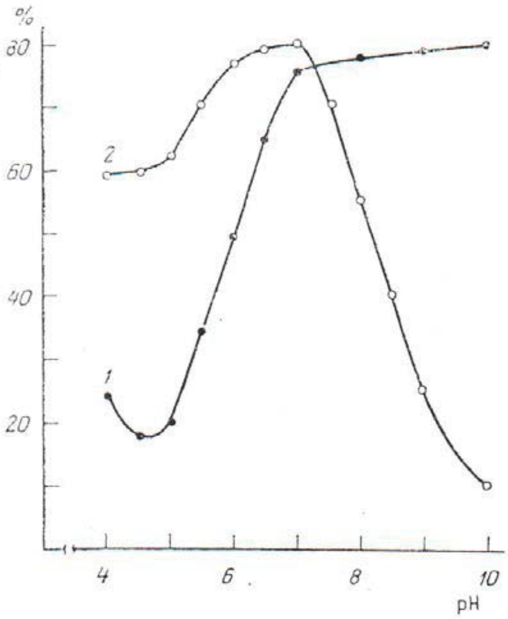

Рисунок 3 – Зависимость фотоинактивации тиаминкиназы (%) от pH при фотоинактивации, сенсибилизированной метиленовой синью (1) и бенгальским розовым (2)

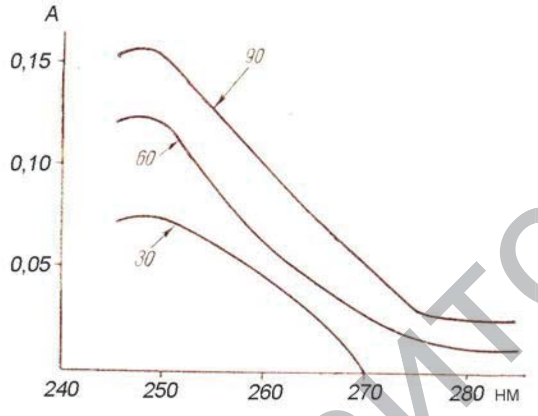

Рисунок 4 – Дифференциальные спектры тиаминкиназы в присутствии метиленовой сини. Реакция проводилась в 50 мМ трис-HCl буфере pH 8,5. Концентрация белка 6 мкМ

при pH 5,0. Такой сдвиг, по-видимому, можно объяснить общей более повышенной интенсивностью процесса [5], в связи с чем инактивация в кислой среде выражена значительно сильнее по сравнению с нейтральной средой. Во-вторых, в отличие от модельных систем [15] при pH 7,0 начиналось ослабление процесса фотоинактивации. При pH 8,6 (оптимум тиаминкиназной реакции) ингибирование фермента незначительно, а при pH 10,0 фермент совершенно не подвержен фотоинактивации в присутствии бенгальского розового. Резкое уменьшение скорости фотоинактивации тиаминкиназы при значениях pH, оптимальных для протекания ферментативной реакции, является, вероятно, следствием её конформационной перестройки или возможного изменения ионизационной формы аминокислотных остатков, ответственных за активность фермента. Подтверждением последнего предположения может служить тот факт, что химическая природа метиленовой сини и бенгальского розового различна. Если метиленовая синь является анионным красителем, то бенгальский розовый – катионным [15]. По-видимому, при щелочных значениях pH создаётся такое ионизационное состояние аминокислотных остатков активного центра или всей молекулы фермента, которое препятствует взаимодействию её с бенгальским розовым.

На рис. 4 представлены дифференциальные спектры фермента после фотоинактивации в присутствии метиленовой сини на 30, 60 и 90%, соответственно. Увеличение оптической плотности в области 244-265 нм с максимумом при 246-248 нм свидетельствует о разрушении остатков гистидина. Данный спектрофотометрический анализ может применяться и для количественного расчёта «убыли» остатков гистидина в случае изучения фотоокисления различных ферментов [5]. Таким образом, высокая скорость фотоинактивации тиаминкиназы в присутствии бенгальского розового и метиленовой сини, S-образная кинетика фотоинактивации в зависимости от pH и характерные при этом изменения спектра поглощения указывают на важную роль имидазольного остатка гистидина в качестве одной из функциональных групп для проявления тиаминкиназной активности. Обращает внимание и такой факт, что поглощение фотоокисленной глобулы белка при 280 нм практически оставалось неизменным, подтверждая тем самым отсутствие процесса разрушения ароматических аминокислот – тирозина и триптофана.

Исследование фотоинактивации тиаминкиназы, сенсибилизированной бенгальским розовым и метиленовой синью, в присутствии субстратов показало, что и тиамин, и ATP сами по себе никакого эффекта не оказывали, в то время как Mg2+(кофактор фермента) и сочетания Mg2+ + ATP и Mg2+ + тиамин проявляли защитное действие. Это, по-видимому, обусловлено индуцированием конформационных изменений в молекуле фермента, ведущих к маскировке остатков гистидина. Отсюда можно заключить, что связывание субстратов с гистидином, вероятно, осуществляется через ионы Mg2+ .

Методом аминокислотного анализа установлено [7], что на одну молекулу тиаминкиназы приходится два аминокислотных остатка гистидина. Для выяснения роли каждого из этих остатков в проявлении каталитической активности фермента была применена его химическая модификация диэтилпирокарбонатом. При взаимодействии с имидазолом гистидина диэтилпирокарбонат образует карбэтоксигистидин с максимумом поглощения при 242 нм. Наблюдаемое нами в процессе эксперимента трехфазное изменение оптической плотности раствора тиаминкиназы при 242 нм в зависимости от времени её взаимодействия с химическим реагентом свидетельствует о различной реакционной способности гистидиновых остатков фермента (рис.5). Корреляция между числом модифицированных групп гистидина и остаточной активностью тиаминкиназы показывает, что при модификации одного остатка гистидина активность фермента снижается более чем на 87%. Взаимодействие второго остатка практически не влияет на скорость реакции. Таким образом, по-видимому, лишь один остаток гистидина является функционально активным.

Вывод. Формируя исходную структуру тиаминкиназы, аминокислотные остатки тирозина и метионина не принимают непосредственного участия в переносе пирофосфатной группировки от молекулы ATP на тиамин. Роль триптофанильных остатков

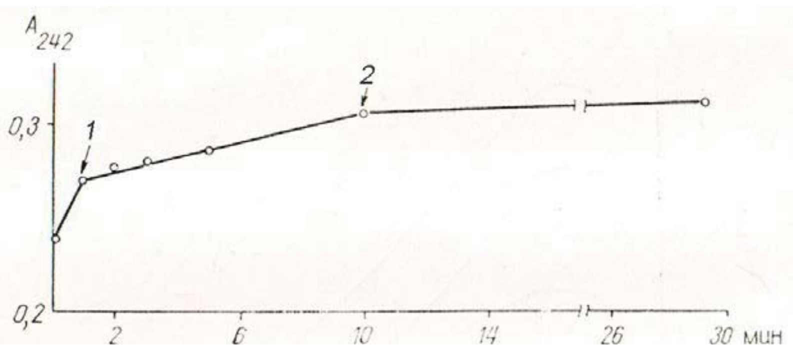

Рисунок 5 – Изменение адсорбции тиаминкиназы (3,8 мкМ) в присутствии диэтилпирокарбоната (7,6) мМ). Реакция проводилась в 5 мМ ацетатном буфере рН 6,0. Объёмы образцов 2,0 мл. Цифры над стрелками указывают число модифицированных гистидиновых остатков

заключается либо в поддержании каталитически активного трехмерного состояния белковой глобулы, либо они располагаются в участках сорбции активного центра, способствуя связыванию субстратов через ионы магния. Биотрансформация витамина В1 в его физиологически активную коферментную форму осуществляется с помощью имидазольного кольца гистидина, причем только один аминокислотный остаток ответственен за акт катализа.

Литература

1. Арцукевич, И.М. Очистка и некоторые свойства тиаминпирофосфокиназы из печени крысы / И.М. Арцукевич, А.И. Воскобоев, Ю.М. Островский // Вопр. мед. химии. – 1977. – Т.23, № 2. – С. 203-210.
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. Дарбре, А. Практическая химия белка / А. Дарбре. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 621 с.
4. Елякова, Л.А. О возможной роли триптофана в ферментативной активности β-1,3-глюканазы из Spisula sachalinensis / Л.А. Елякова, В.В. Сова, Т.Г. Светашева // Биоорганическая химия. – 1995. – Т. 2, № 1. – С. 90-97.
5. Кочетов, Г.А. Природа и функция аминокислотных остатков транскетолазы, существенных для проявления её активности / Г.А. Кочетов, К.П. Кобылянская // Биохимия. – 1970. – Т. 35, № 1. – С. 3-11.
6. Черникевич, И.П. Сравнительный кинетический анализ тиаминкиназ из пивных дрожжей и головного мозга свиньи / И.П. Черникевич // Журнал ГрГМУ. – 2011. – № 3. – С. 25-28.
7. 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.
8. Шульц, Г. Принципы структурной организации белков / Г. Шульц, Р. Ширмер. – М.: Мир, 1992. – 354 с.
9. Hamada, M. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from pig heart / M. Hamada // Seikigaku. – 1970. – Vol.41. – P. 310-324.
10. Mitsuda, H. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf / H. Mitsuda, Y. Takii, K. Iwami // J. Nutr. Sci. Vitaminol. – 1975. – Vol.21, N 2. – P. 103-115.
11. Mitsuda, H. Mechanism and regulation of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf / H.Mitsuda, Y. Takii, K. Yasumoto // J. Nurt. Sci.Vitaminol, - 1975 – Vol.21, N3. – P.189-198.
12. Peterson, J.W. Partial purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from pig brain / J.W. Peterson, C.J. Gubler, S.A. Kuby // Biochim. biophys. acta. – 1975. – Vol. 397, N 2. – P. 377-394.
13. Sluyterman, L.A. Photooxidation, sensitized by proflavine of furfuryl alcohol, I T – allyl thiourea and histidine / L.A. Sluyterman // Recueil. trav. chim. – 1961. – Vol. 80, IT 10. – P.989 -998.

Literatura

1. Arcukevich, I.M. Ochistka i nekotorye svojstva tiaminpirofosfokinazy iz pecheni krysy / I.M. Arcukevich, A.I. Voskoboev, Ju.M. Ostrovskij // Vopr. med. himii. – 1977. – T.23, № 2. – S. 203-210.
2. Voskoboev, A.I. Biosintez, degradacija i transport fosfornyh jefirov tiamina // A.I. Voskoboev, I.P. Chernikevich. – Minsk.: Nauka i tehnika, 1987. – 200 s.
3. Darbre, A. Prakticheskaja himija belka / A. Darbre. – M. : GJeOTAR-Media, 2009. – 621 s.
4. Eljakova, L.A. O vozmozhnoj roli triptofana v fermentativnoj aktivnosti β-1,3-gljukanazy iz Spisula sachalinensis / L.A. Eljakova, V.V. Sova, T.G. Svetasheva // Bioorganicheskaja himija. – 1995. – T. 2, № 1. – S. 90-97.
5. Kochetov, G.A. Priroda i funkcija aminokislotnyh ostatkov transketolazy, sushhestvennyh dlja projavlenija ejo aktivnosti / G.A. Kochetov, K.P. Kobyljanskaja // Biohimija. – 1970. – T. 35, № 1. – S. 3-11.
6. Chernikevich, I.P. Sravnitel'nyj kineticheskij analiz tiaminkinaz iz pivnyh drozhzhej i golovnogo mozga svin'i / I.P. Chernikevich // Zhurnal GrGMU. – 2011. – № 3. – S. 25-28.
7. Chernikevich, I.P. Fermentnye sistemy biotransformacii aktivnyh form vitamina V1 (struktura, svojstva, reguljacija): avtoref. dis. … dokt. him. nauk: 03.00.04 / I.P. Chernikevich; Minsk. in-t bioorganicheskoj himii. – Minsk, 1996. – 32 s.
8. Shul'c, G. Principy strukturnoj organizacii belkov / G. Shul'c, R. Shirmer. – M.: Mir, 1992. – 354 s.
9. Hamada, M. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from pig heart / M. Hamada // Seikigaku. – 1970. – Vol.41. – P. 310-324.
10. Mitsuda, H. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf / H. Mitsuda, Y. Takii, K. Iwami // J. Nutr. Sci. Vitaminol. – 1975. – Vol.21, N 2. – P. 103-115.
11. Mitsuda, H. Mechanism and regulation of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf / H.Mitsuda, Y. Takii, K. Yasumoto // J. Nurt. Sci.Vitaminol, - 1975 – Vol.21, N3. – P.189-198.
12. Peterson, J.W. Partial purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from pig brain / J.W. Peterson, C.J. Gubler, S.A. Kuby // Biochim. biophys. acta. – 1975. – Vol. 397, N 2. – P. 377-394.
13. Sluyterman, L.A. Photooxidation, sensitized by proflavine of furfuryl alcohol, I T – allyl thiourea and histidine / L.A. Sluyterman // Recueil. trav. chim. – 1961. – Vol. 80, IT 10. – P.989 -998
14. Thame-Beau, F. ATP: Thiamine pyrophosphotransferase. Purification et etude du mechanisme du reaction / F. Thome-

14. Thame-Beau, F. ATP : Thiamine pyrophosphotransferase. Purification et etude du mechanisme du reaction / F. Thome-Beau, T. Lan, A. Olomuski // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – Vol.182, N 1. – P. 111-121.

15. Westhead, E.W. Photoinactivation and Carbethoxylation of Leucine Aminopeptidase / E.W. Westhead // Biochemistry. – 1965. – Vol. 4. – P. 2139 2144.

Beau, T. Lan, A. Olomuski // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – Vol.182, N 1. – P. 111-121.

15. Westhead, E.W. Photoinactivation and Carbethoxylation of Leucine Aminopeptidase / E.W. Westhead // Biochemistry. – 1965. – Vol. 4. – P. 2139 2144.

NATURE OF AMINO ACIDS RESIDUES IN ACTIVE CENTER OF THIAMINE KINASE IN PIG BRAIN TISSUE

Chernikevich I.P., Tyrsina A.A., Voskoboyev A.I.

Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

The aim of the research was to estimate the nature of amino acids residues in the active center of thiamine kinase (EC 2.7.6.2) extracted from the pig brain by means of chemical modification. It has been shown that oxidative halogenation of indole nucleus in the tryptophane residue by the N-Bromosuccinimide is possible only in quantities, excessive against thiamine kinase concentration which proofs low possibility of the direct interaction of this α-amino acid with the binding of substrate by enzyme. Based on the relatively high speed of photoinactivation of the protein globule, sensibilized with Rose Bengale and Methylene Blue dyes; S-shaped dependency of the loss of activity on the change of pH during visible light irradiation in the presence of photosensibilizers and specific changes in the absorption spectrum of the modified protein there is a suggestion about the crucial role of hystidine imidazole residue as one of thiamine kinase functional groups.

***Key words**: thiamine kinase, pig brain, identification of functional groups.*

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

Поступила 11.04.2013