

УДК 577.152.2

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП ТИАМИНКИНАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА СВИНЬИ

Черникевич И.П.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Исследована функциональная значимость сульфидрильных групп тиаминокиназы, выделенной из головного мозга свиньи. При использовании реагента Элмана показано, что в реакцию окисления на димер нативного фермента вступают две сульфидрильные группы. Модификация первой быстро реагирующей SH-группы приводит к полному, но частично обратимому торможению активности фермента. Mg^{2+} , $Mg-ATP^{2-}$ в некоторой степени препятствует инактивации. По-видимому, защита функциональных групп при помощи субстратов носит опосредованный через пространственную стабилизацию характер, поскольку число титруемых реагентом SH-групп до и после взаимодействия фермента с лигандами остаётся неизменным. Замена нитроотибензоата на цианид-ион при использовании фермента с небольшой степенью модификации приводит к регенерации лишь 7-10% активности. Предполагается, что блокирование высоко реакционной сульфидрильной группы сопровождается глубокими изменениями в структуре белка. Эта группа не принимает прямого участия в катализе, а выполняет структурную функцию. Показано отсутствие дисульфидных связей в молекуле тиаминокиназы.

Ключевые слова: тиаминокиназа, мозг свиньи, сульфидрильные группы.

Превращение тиамина в тиаминопирофосфат является необходимым условием его участия в катализе в составе ключевых ферментов пентозофосфатного цикла и цикла Кребса (транскетолазы, пируват- и оксоглутарат-дегидрогеназы). Своеобразие тиаминокиназы (АТР: тиаминопирофосфотрансфераза, ЕС 2.7.6.2) заключается в том, что она, в отличие от многочисленной группы киназ, переносящих фосфат, осуществляет одноэтапную транслокацию пирофосфатной группы. Сведения, касающиеся функциональной важности тех или иных аминокислотных групп в молекуле фермента, носят фрагментарный характер. Однако ряд исследователей единодушно указывают на важную роль сульфидрильных групп цистеина для проявления каталитического действия. Так, п-хлормеркурибензоат (п-ХМБ) тормозил активность тиаминокиназы из листьев петрушки на 100% [12], а из мышц сердца свиньи — на 90% [10]. Дитиотреитол, добавленный одновременно с п-ХМБ, полностью предотвращал инактивацию фермента. На этом основании было высказано мнение о ключевой роли сульфидрильных групп тиаминокиназы и принадлежности её к классу SH-ферментов [14]. Несколько менее чувствительны к SH-блокирующим агентам тиаминокиназы дрожжей. Так, часовая инкубация фермента из пекарских дрожжей с п-ХМБ, N-этилмалеимидом и реагентом Элмана сохраняла 50% его начальной активности [13], а при добавлении одного эквивалента п-ХМБ к тиаминокиназе из пивных дрожжей наблюдалось ингибирование тиаминокиназной реакции на 30% [1].

Во всех указанных работах исследовалась лишь степень снижения ферментативной активности под влиянием того или иного реагента. Как известно, интерпретация результатов, полученных на основании только этого приёма, недостаточно обоснована.

Задача настоящей работы — с помощью метода химической модификации, используя различные подходы, выяснить функциональную значимость SH-групп и S-S связей в тиаминокиназе, выделенной из головного мозга свиньи.

Материалы и методы

В опытах использовали электрофоретически гомогенный препарат тиаминокиназы, полученный по разработанному нами методу [6]. Пируватдекарбоксилазу выделяли из пивных дрожжей [5].

В работе применяли следующие реактивы: дитиотреитол — фирмы «Sigma» (США); 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойную кислоту) (реагент Элмана) — фирмы «Boehringer» (ФРГ); тиаминопирофосфат — фирмы «Ferak» (ФРГ); сефадекс G-50 — фирмы «Farmacia» (Швеция); алкогольдегидрогеназу, цистеин, АТР — фирмы «Reanal» (Венгрия). Остальные реактивы — фирмы «Рехим» (Россия).

Активность фермента определяли по скорости образования тиаминопирофосфата [5]. Количество синтезированного кофермента измеряли после рекомбинации 0,03 мл инкубационной смеси с пируватдекарбоксилазой при pH 6,8 в течение 30 мин. [11]. Активность образовавшейся холопируватдекарбоксилазы находили по убыли НАД⁺ в присутствии алкогольдегидрогеназы, регистрируя изменение оптической плотности при 340 нм на двухлучевом спектрофотометре «Perkin-Elmer — 402», (Швеция). Концентрацию белка определяли по методу Лоури и по величине оптической плотности при 280 нм.

Число SH-групп на 1 моль тиаминокиназы оценивали с помощью 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты), при pH 8,0, принимая, что молярный коэффициент поглощения нитроотибензоат-аниона равен при 412 нм $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [9], а молекулярный вес тиаминокиназы — 52800 Да [6].

К 1,5 мл раствора белка (2-6 мкМ) добавляли 40-60-кратный избыток реагента Элмана. Оптическую плотность измеряли при комнатной температуре на спектрофотометре «VSU 2-P» (ФРГ). При определении ферментативной активности окисленного фермента избыток модификатора отделяли на колонке (0,8 × 14 см), заполненной сефадексом G-50. Количество сульфидрильных групп и степень защиты от воздействия на фермент тиолового блокатора оценивали при концентрации лигандов: АТР — 1 мМ; $MgSO_4$ — 10 мМ; тиамин — 0,1 мМ; пиритиамин — 3 и 30 мкМ.

Вытеснение нитроотибензоат-аниона осуществляли в течение 24 ч с помощью избытка KCN при конечной концентрации 50 мМ в 0,05 М трис-HCl буфере, pH 8,0. За освобождением нитроотибензоата наблюдали спектрофотометрически при 412 нм [2].

Для обнаружения S-S групп использовали метод Каваллини [8]. 1,5 мл ферментного раствора инкубировали в течение 1 ч в 8 М мочеvine. После добавления $NaBH_4$ (0,5%)

раствор фермента выдерживали 1 ч при комнатной температуре. Избыток восстановителя разрушали HCl, уменьшая pH смеси до 3,0. Через 5 мин. раствор подщелачивали, доводя pH до 8,0 в течение 1-2 мин. Число SH-групп определяли с помощью реагента Эллмана, как описано выше. Контрольная проба содержала такое же количество реагента в 1,5 мл буфера, pH 8,0.

Результаты и их обсуждение

С момента опубликования Эллманом [9] сообщения о 5,5²-дителибис-(2-нитробензойной кислоте) этот реагент вследствие его абсолютной специфичности широко используется для количественного определения и выяснения функциональной значимости сульфгидрильных групп в белках. Реакция протекает по типу тиол-дисульфидного обмена с образованием окрашенного нитротрибензоат-аниона

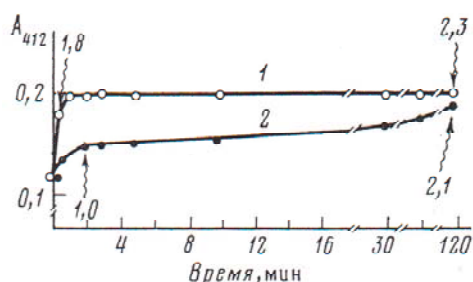


Рисунок 1 – Изменение оптической плотности в зависимости от времени взаимодействия тиаминкиназы с реагентом Эллмана (0,17 мМ) в присутствии (1) и отсутствии (2) 8 М мочевины. Контрольная кювета содержала те же компоненты, исключая белок. Цифры возле стрелок указывают число модифицированных SH-групп

На рисунке 1 представлены результаты 2-часовой инкубации тиаминкиназы с реагентом Эллмана. Этот срок выбран с учётом указания на возможность автоокисления самого модификатора [7]. По приросту поглощения при 412 нм и молярного коэффициента экстинкции окрашенного тиоаниона было показано, что в реакцию окисления вступают две тиоловые группы димера нативного фермента, причём блокирование наиболее реакционноспособной SH-группы происходит в первые 1-1,5 мин. Чтобы оценить роль этой группы в тиаминкиназной реакции 0,5 мл ферментного раствора, после инкубации в течение времени, достаточного для её модификации, пропускали через колонку с сефадексом G-50 для отделения избытка реагента, после чего измеряли ферментативную активность. Окисление белка по одной SH-группе приводило к полной, но частично обратимой потере каталитической активности. Полу-часовая инкубация модифицированного фермента с 1 мМ цистеином или дитиотрептолом реактивировала активность до 7 и 18%, соответственно. Длительное (Н² ч) взаимодействие второй вяло реагирующей SH-группы с реагентом связано, возможно, с медленно идущим процессом разрушения гидрофобного окружения [2] и маскировкой SH-групп в труднодоступных складках молекулы [7].

Общее число определяемых тиоловых остатков не увеличивалось при проведении реакции в 8 М мочеви-не. Однако в присутствии денатурирующего агента титрование полностью завершалось в пределах 1 мин. (рис. 1), что хорошо согласуется с высказанными ранее [5] предположениями о роли пространственных факторов в протекании реакции модификации белка. Чтобы выяснить с

помощью субстратов (в комбинациях Mg²⁺, Mg²⁺ + АТФ, АТФ, тиамин) функциональную значимость SH-групп в тиаминкиназе, исследовали возможность защиты фермента ими от блокирования тиоловым ядом (таблица). АТФ не оказывал влияния на тиол-дисульфидный обмен цистеиновых групп белка и реагента. Реактивация цистеином и дитиотрептолом при этом была незначительной.

Таблица 1 – Влияние субстратов на ферментативную активность тиаминкиназы при взаимодействии её с реагентом Элл-

мана* Субстраты	Ферментативная активность, %	Реактивация цистеином (1 мМ)	Реактивация дитиотрептолом (1 мМ)
-	0	7	18
Mg ²⁺	16	42	79
Mg ²⁺ + АТФ	27	45	82
АТФ	0	9	21

*Реакцию проводили в 50 мМ трис-НСl буфере, pH 8,0.

Объём пробы 0,5 мл. Используемые концентрации: белка – 5 мкМ, реагента Эллмана – 0,17 мМ, Mg²⁺ – 50 мМ, АТФ – 5 мМ

Ионы Mg²⁺ + АТФ частично препятствовали инактивации тиаминкиназы. В их присутствии сохранялось 27% начальной активности фермента, причём восстановленные её цистеином и дитиотрептолом достигало 45 и 82% соответственно. Подобное защитное воздействие, хотя и в меньшей степени, оказывали ионы Mg²⁺. В их присутствии каталитическая активность модифицированной тиаминкиназы была в 2 раза ниже, чем в случае Mg²⁺ + АТФ и составляла 16%, однако реактивация цистеином и дитиотрептолом достигала таких же величин, как в предыдущем случае и равнялась 42 и 79%. Это, вероятно, объясняется тем, что ионы магния взаимодействуют с белком, препятствуя глубоким изменениям пространственной конфигурации фермента.

При исследовании возможности предохранения SH-групп тиаминкиназы тиаминном было обнаружено, что последний взаимодействует с модификатором, о чём свидетельствует появление в растворе «тиамин + реагент» (без белка) в спектре поглощения дополнительной полосы в области 412 нм. Это, вероятно, обусловлено наличием в препарате витамина небольшого количества (0,5%) его тиоловой формы [3], реагирующей с модификатором при pH 8,0. В результате связывания равновесие «тиамин + тиолтиамин» сдвигается вправо, пополняя количество тиола, взаимодействующего с реагентом. Из-за этого данные о значительном уменьшении степени инактивации тиаминкиназы в присутствии тиаминна не могут быть однозначно интерпретированы. В качестве другого лиганда нами был выбран аналог тиаминна — пиритиамин, обладающий избирательным сродством к субстратной площадке. Пиритиамин является конкурентным ингибитором тиаминкиназы [1], имеет близкое к величине K_m тиаминна (0,72 мкМ) значение K_i (0,26 мкМ).

В опытах по защите тиаминкиназы этим лигандом фермент сохранял 27-32% каталитической активности, что свидетельствует о реальной способности субстрата (тиаминна) защитить фермент от воздействия реагента Эллмана и даёт возможность исключить вероятную связь защитного эффекта с дополнительным расходом его на взаимодействие с тиолтиамином.

Таким образом, полная потеря ферментативной активности при блокировании первой легко реагирующей SH-группы, а также факт её защиты перечисленными выше субстратами, конкурентным ингибитором и кофак-

тором позволили выдвинуть гипотезу о непосредственном участии тиоловых групп цистеина в каталитическом акте тиаминкиназы. Для проверки этого мнения было проведено прямое определение числа сульфгидрильных групп в присутствии следующих лигандов: Mg^{2+} , $Mg-ATP^{2-}$ и пиритиамина.

Результаты титрования свидетельствуют о том, что число титруемых SH-групп в присутствии каждого из трёх лигандов не изменяется. Следовательно, предохранение SH-групп тиаминкиназы связано не с конкуренцией за активный центр, а, вероятно, с конформационной стабилизацией образующихся фермент-субстратных комплексов. Таким образом, предположение о локализации сульфгидрильных групп в участке катализа активного центра фермента можно исключить, и указание некоторых авторов [14] о принадлежности тиаминкиназы к группе SH-ферментов является, на наш взгляд, преждевременным.

Имеются данные, свидетельствующие о том, что крупная молекула ингибитора, создавая стерические препятствия для доступа субстрата к активному центру, может тормозить активность фермента [4]. Замена её на менее объёмную, приводила к восстановлению активности. Чтобы выяснить, не связана ли и в нашем случае резкая степень снижения ферментативной активности с близким расположением к активному центру SH-групп, т.е. с пространственным блокированием доступа субстрата к активному центру нитрогибензоатом, последняя группировка была заменена на небольшой по размерам заместитель цианид-анион. Исследовались препараты фермента с разной степенью модификации. Перед их обработкой раствором KCN избыток тиолового реагента отделяли на колонке с сефадексом G-50. Было установлено, что если время взаимодействия тиаминкиназы с реагентом Элмана превышало 8-10 мин., то замена нитрогибензоата на цианид-ион не приводила к появлению ферментативной активности. При уменьшении длительности экспозиции вытеснение нитрогибензоата сопровождалось, как правило, регенерацией лишь 7-10% активности (рис. 2).

Чтобы выяснить наличие меж- и внутрицепочечных дисульфидных связей, мы применили метод Каваллини и др. [8], сущность которого заключается в восстановлении в 8 М мочевины S-S-связей боргидридом натрия, после чего с помощью реагента Элмана определяется сумма имевшихся и вновь образовавшихся тиолов. Как видно из рис. 3, этим методом обнаруживаются две SH-группы, как и без восстановления дисульфидных связей. Иными словами, S-S-связи в тиаминкиназе из мозга свиньи, вероятно, отсутствуют. Неоднократно замечено, что ряд белков, имеющих в своём составе тиоловые группы (как правило внутриклеточных), не содержат S-S-связей.

Литература

1. Воскобоев, А.И. Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиаминкиназы / А.И. Воскобоев, И.П. Черникевич. – Мн.: Наука и техника, 1987. – 200 с.
2. Дарбре, А. Практическая химия белка / А. Дарбре. – М.: GEOTAR-Media, 2009. – 621 с.
3. Островский, Ю.М. Активные центры и группировки в молекуле тиаминкиназы / Ю.М. Островский. – Мн.: Наука и техника, 1975. – 423 с.
4. Торчинский, Ю.М. Сера в белках / Ю.М. Торчинский. – М.: Наука, 1977. – 229 с.
5. 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.

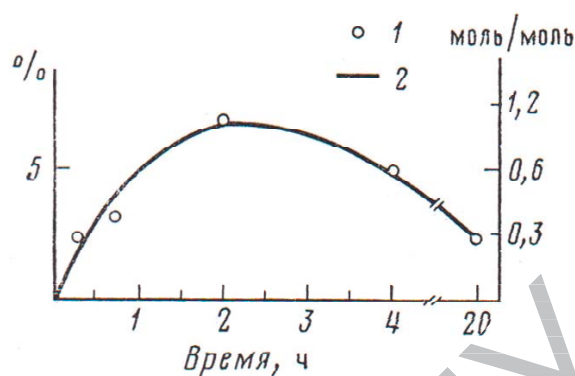


Рисунок 2 – Замена группы нитрогибензоата на цианид-ион в модифицированной тиаминкиназе. 1 – начальная активность, %; 2 – нитрогибензоат, моль/моль
Реакцию проводили при комнатной температуре с 50 мМ KCN в 0,05 М трис-НСl буфере, pH 8,0

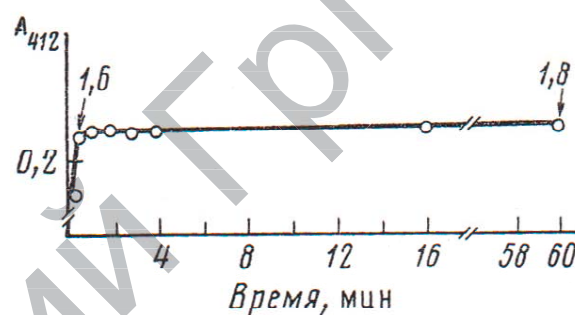


Рисунок 3 – Определение реагентом Элмана общего числа SH-групп после восстановления боргидридом натрия дисульфидных связей. Концентрация белка 2 мкМ. Реакцию проводили в 0,05 М трис-НСl буфере, pH 8,0. Цифры над стрелками указывают число модифицированных групп

Вероятно, тиаминкиназа относится к этому типу ферментов. Стабилизирующая роль сульфгидрильных групп при отсутствии S-S-связей показана и для тиаминкиназы из печени крысы [1].

Вывод

Совокупность имеющихся данных указывает на то, что блокирование первой высоко реакционноспособной сульфгидрильной группы сопровождается глубокими изменениями в структуре белка. Группа не принимает прямого участия в катализе, а выполняет, скорее всего, структурную функцию, т.е. участвует в поддержании каталитически активной конформации фермента.

Literature

1. Voskoboev, A.I. Biosintez, degradacija i transport fosfornih efirov tiamina / A.I. Voskoboev, I.P. Chernikevich. – Mn.: Nauka i tehnika, 1987. – 200 s.
2. Darbre, A. Praktičeskaja himija belka / A. Darbre. – M.: GEOTAR-Media, 2009. – 621 s.
3. Ostrovskii, Yu.M. Aktivnye centry i gruppirovki v molekule tiamina / Yu.M. Ostrovskii. – Mn.: Nauka i tehnika, 1975. – 423 s.
4. Torchinskii, Yu.M. Sera v belkah / Yu.M. Torchinskii. – M.: Nauka, 1977. – 229 s.
5. Chernikevich, I.P. Fermentnye sistemy biotransformacii aktivnyh form vitamina V₁ (struktura, svoistva, reguljacija): avtoref. dis. ... dokt. him. nauk: 03.00.04 / I.P. Chernikevich; Minsk. in-t bioorganicheskoj himii. – Minsk, 1996. – 32 s.

6. Черникевич, И.П. Сравнительный кинетический анализ тиаминкиназы из пивных дрожжей и головного мозга свиньи / И.П. Черникевич // Журнал ГрГМУ. – 2011. - №3. – С. 25-28.

7. Butterworth, P.H. A modification of Ellman procedure for the estimation of protein sulfhydryl groups / P.H. Butterworth, H. Baum, J.W. Poster // Arch. Biochem and Biophys. – 1987. – Vol.118, N 3. – P. 716 -723.

8. Cavallini, D. Determination of disulfide groups in proteins / D. Cavallini, M.T. Graziani, S. Dupre // Nature. – 1966. – Vol.212, N 5059. – P. 294-295.

9. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // Arch. Biochem. and Biophys. – 1959. – Vol.82, N 1. – P.70-77.

10. Hamada, M. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from pig heart / M. Hamada // Seikigaku. – 1970. Vol.41. – P. 310-324.

11. Kaziro, Y. Quantitative determination of thiamine pyrophosphate using apocboxylase and alcohol dehydrogenase / Y. Kaziro // J. Biochem. – 1957. – Vol.44, N 7. – P. 827-838.

12. Mitsuda, H. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf / H. Mitsuda, Y. Takii, K. Iwami // J. Nutr. Sci. Vitaminal. – 1975. – Vol.21, N 2. – P. 103-115.

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

14. Wakabayshi, Y. Some properties of the purified thiamine pyrophosphokinase from pig brain / Y. Wakabayshi // Vitamins. – 1998. – Vol.52, N 5-6. – P. 229-236.

6. Chernikevich, I.P. Sravnitel'nyi kineticheskii analiz tiaminkinaz iz pivnyh drojjei i golovnogo mozga svin'i / I.P. Chernikevich // Jurnal GrGMU. – 2011. - №3. – S. 25-28.

7. Butterworth, P.H. A modification of Ellman procedure for the estimation of protein sulfhydryl groups / P.H. Butterworth, H. Baum, J.W. Poster // Arch. Biochem and Biophys. – 1987. – Vol.118, N 3. – P. 716 -723.

8. Cavallini, D. Determination of disulfide groups in proteins / D. Cavallini, M.T. Graziani, S. Dupre // Nature. – 1966. – Vol.212, N 5059. – P. 294-295.

9. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // Arch. Biochem. and Biophys. – 1959. – Vol.82, N 1. – P.70-77.

10. Hamada, M. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from pig heart / M. Hamada // Seikigaku. – 1970. Vol.41. – P. 310-324.

11. Kaziro, Y. Quantitative determination of thiamine pyrophosphate using apocboxylase and alcohol dehydrogenase / Y. Kaziro // J. Biochem. – 1957. – Vol.44, N 7. – P. 827-838.

12. Mitsuda, H. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf / H. Mitsuda, Y. Takii, K. Iwami // J. Nutr. Sci. Vitaminal. – 1975. – Vol.21, N 2. – P. 103-115.

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

14. Wakabayshi, Y. Some properties of the purified thiamine pyrophosphokinase from pig brain / Y. Wakabayshi // Vitamins. – 1998. – Vol.52, N 5-6. – P. 229-236

THE FUNCTIONAL ROLE OF SULFHYDRYL GROUPS OF THIAMINE KINASE FROM PIG BRAIN

Chernikevich I.P.

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

The functional role of sulfhydryl groups of thiamine kinase from pig brain was studied. Ellman reagent was used to show that two sulfhydryl groups per native enzyme dimer undergo an oxidation reaction. Modification of the first rapidly interacting group results in a complete but partially reversible, inhibition of enzyme. Mg²⁺ and Mg-ATP²⁻, to some extent, prevent the inactivation. Protection of the functional groups with substrates presumably proceed through the spatial stabilization, since the number of the reagent-titrated SH-groups remains unchanged before and after the interaction of enzyme with the ligands. When the enzyme with a low modification degree is used, a substitution of nitrothiobenzoate with cyanide ion results in not more than 7-10 % recovery of enzymatic activity. Inhibition of highly reactive sulfhydryl group is accompanied by the irreversible changes in protein structure. This group is not involved directly in the catalytic act, but performs a structural function. There were no disulfide bonds found in the thiamine kinase molecule.

Key words: thiamine kinase, pig brain, sulfhydryl groups.

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

Поступила 13.09.2013