

МЕМБРАННО-АССОЦИИРОВАННАЯ ТИАМИНКИНАЗА ИЗ ГОЛОВНОГО МОЗГА СВИНЬИ: РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ И ОТДЕЛАХ, АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ



И. П. Черникевич, Н. Н. Костеневич, А. Д. Иванова

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Введение. Тиаминокиназа – фермент медицинского назначения, генетически детерминированные «поломки» при синтезе которого приводят к ряду нейродегенеративных заболеваний. Знание распределения фермента в компартментах мозга, регуляторных возможностей глобулы в образовании коферментной формы витамина В1 – тиаминдифосфата – позволит вести направленную коррекцию патологических состояний.

Цель. Выяснить локализацию фермента в мозге свиньи, роль гидрофобных и гидрофильных взаимодействий в ассоциации на мембранах, природу аминокислотных остатков, определяющих структуру белка.

Материал и методы. Для получения мембран свежий очищенный от оболочек и сосудов мозг измельчали, заливали четырьмя объемами охлажденного трис-НСl буфера (50 мМ, рН 7,4) с 0,2 мМ ЭДТА и гомогенизировали (2000 об·мин⁻¹) 5 циклами. Гомогенат центрифугировали (60 минут при 30000 g), супернатант отбрасывали, оставшиеся в осадке мембраны подвергали солиubilизации исходным буфером, содержащим в своем составе 0,05-1% детергенты. Активность фермента оценивали по скорости образования тиаминдифосфата.

Гидролиз белка осуществляли в вакуумированных ампулах с 6 М НСl при 110°C в течение 18, 22, 48 и 72 часов. Изoeлектрическую точку (pI) рассчитывали по аминокислотному составу и с помощью метода изоэлектрофокусирования. Изоионную точку находили посредством диализа тиаминокиназы с последующим измерением рН в диализате.

Результаты. Установлено, что гидрофобные детергенты обладают более выраженным солиubilизирующим эффектом по сравнению с гидрофильными. При высоких значениях критической концентрации мицеллообразования (1%) и те и другие изменяют конформационное состояние макромолекулы, влияя на ее сродство к субстратам и эффекторам.

Тиаминокиназа достаточно равномерно распределена во всех отделах мозга, однако субклеточная локализация разная. Наибольшая ферментативная активность прослеживается в митохондриальных фракциях.

Фермент характеризуется повышенной концентрацией аминокислот, способствующих α -спирализации белковой глобулы при одновременно низком содержании остатков, связывающих полипептидные цепи и высокомолекулярных – осуществляющих их резкий поворот на 130°, несовместимый с ходом α -спирали.

Выводы. Тиаминокиназа головного мозга – мембранно-ассоциированный белок. Во взаимодействии с липидным бислоем мембран задействованы в основном гидрофобные силы. В зависимости от концентрации детергента процесс солиubilизации сопровождается изменением конформации глобулы. Основное количество тиаминокиназы сосредоточено в митохондриальных мембранах.

Ключевые слова: тиаминокиназа, локализация, мозг свиньи, аминокислотный состав.

Для цитирования: Черникевич, И. П. Мембранно-ассоциированная тиаминокиназа из головного мозга свиньи: распределение в субклеточных фракциях и отделах, аминокислотный состав / И. П. Черникевич, Н. Н. Костеневич, А. Д. Иванова // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2022. Т. 20, № 2. С. 197-203. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2022-20-2-197-203>.

Введение

Биосинтез коферментной формы витамина В1 – тиаминдифосфата (ТДФ) – осуществляется тиаминокиназой (АТФ: тиаминдифосфотрансфераза, КФ 2.7.6.2), катализирующей двухсубстратную реакцию переноса пирофосфатной группировки от молекулы АТФ на тиамин: АТФ + тиамин → ТДФ + АМФ. К настоящему времени известна наследственная основа ряда заболеваний, связанная с тиаминзависимыми дефектами образования ТДФ [1, 2, 3, 4]. К их числу относятся аутосомальная мегалобластическая анемия (синдром Роджерса), подострая некротизирующая энцефаломиелопатия (болезнь Лея), «моча с запахом кленового сиропа», при которых обнаруживаются мутации в аминокислотных последовательностях макромолекулы киназы. Снижение концентрации кофермента в мито-

хондриях клеток мозга в условиях дефицита В1 служит причиной возникновения и прогрессирующего развития такого рода патологий [5, 6, 7], как болезни Альцгеймера и Паркинсона, энцефалопатия Вернике-Корсакова, часто наблюдаемая у пациентов, страдающих алкоголизмом.

Белковые системы синтеза фосфатов тиамина нервных клеток практически не исследовались, хотя дифосфорному эфиру вместе с тиаминтрифосфатом отводится особая роль в свете решения проблемы биоэлектрогенеза и физиологии нервного импульса. На сегодняшний день нет однозначного ответа о количественном содержании фосфатов В1 в отделах мозга. Остается неясным принципиальный вопрос о субклеточном распределении ферментов биотрансформации витамина. Согласно имеющимся данным, тиаминокиназа печени локализована преимуще-

ственно в растворимой фракции клеток, в то время как тиаминдифосфаткиназа (КФ 2.7.4.15), фермент последующего биопревращения ТДФ, во внутримитохондриальной [8], что не совсем соответствует сведениям о мембранной протейдизации тиаминфосфатов и современным представлениям о метаболонном распределении макромолекул, участвующих в одном и том же метаболическом цикле.

Цель – выяснить локализацию фермента в мозге свиньи, роль гидрофобных и гидрофильных взаимодействий в ассоциации на мембранах, природу аминокислотных остатков, определяющих структуру белка.

Материал и методы

Для получения плазматических мембран свежий очищенный от оболочек и кровеносных сосудов мозг измельчали продавливанием через пресс с диаметром пор 1 мм, заливали четырьмя объемами охлажденного до 4°C трис-НСl буфера (50 мМ, рН 7,4) с 0,2 мМ ЭДТА и гомогенизировали в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком при 2000 об/мин⁻¹ 5 циклами. Гомогенат центрифугировали 60 минут при 30000 g, супернатант отбрасывали, оставшиеся в осадке мембраны хранили при -20°C для последующей солюбилизации.

Операции по солюбилизации тиаминкиназы выполняли при +4°C. Размороженный осадок мембран повторно гомогенизировали (5000 об/мин⁻¹, 10 циклов) со 100 мл исходного буфера; содержимое разделяли на пробы объемом по 10 мл и в каждую вносили один из солюбилизирующих детергентов до достижения конечной концентрации 0,05-1%. После 20-минутной инкубации гомогенат центрифугировали в течение 1 часа при 105000 g. Эффективность экстракции оценивали по появлению ферментативной активности в надосадочной жидкости.

Активность тиаминкиназы определяли по скорости образования ТДФ. Реакционная смесь в своем составе содержала 2 мкМ тиамин, 2 мМ АТФ, 10 мМ MgSO₄, 0,02 М трис-НСl буфера рН 8,6 и 100-200 мкг фермента в общем объеме 1 мл. В качестве контроля использовали те же ингредиенты, к которым добавляли 100-200 мкг изначально денатурированного фермента. Удельную активность выражали в нмоль ТДФ, образовавшегося за 1 ч при 37°C в расчете на 1 мг белка. Белок определяли по методу Бредфорда. Ядра, митохондрии и микросомы выделяли отдельно согласно описанным ниже методикам.

Получение митохондрий. Около 10 г свежей ткани мозга промывали охлажденной (около 0°C) средой выделения (0,32 М сахароза; 0,15 мМ KCl; 0,2 мМ ЭДТА; 0,01 М трис-НСl буфер рН 7,4), измельчали, вносили 60 мл исходной среды и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Смесь центрифугировали 3 минуты при 2000 g, полученную надосадочную жидкость повторно центрифугировали 8 минут при 12500 g. Грубую митохондриальную фракцию ресуспендировали в 10 мл 3% фикола (3% фикола; 0,12 М манноза; 0,03 М сахароза; 25 мкМ

KCl; 0,2 мМ ЭДТА; 0,01 М трис-НСl буфер рН 7,4), после чего осторожно наслаивали на 20 мл раствора 6% фикола (6% фикола; 0,24 М манноза; 0,06 М сахароза; 50 мкМ KCl; 0,2 мМ ЭДТА; 0,02 М трис-НСl буфер рН 7,4) с последующим центрифугированием 30 минут при 12500 g. Супернатант декантировали, удаляя одновременно мелкий «пух», лежащий на митохондриях. Митохондриальную фракцию повторно ресуспендировали в среде выделения и центрифугировали 10 минут при 12500 g. Для выяснения концентрации ТДФ и активности тиаминкиназы осадок органелл разбавляли 4 мл H₂O.

Получение ядер. Мозг гомогенизировали в трехкратном объеме буферного раствора, включающего 0,32 М сахарозу; 0,025 М трис-НСl рН 7,4; 5 мМ MgCl₂; 50 мМ KCl девятью циклами тефлонового пестика при 600 об•мин⁻¹. К 3 мл суспензии добавляли 6 мл 2,3 М сахарозы на этом же буфере (ρ=1,29 г/см³) и после перемешивания наслаивали на 2 мл 2,3 М сахарозы с исходными компонентами. Конечную смесь центрифугировали 1 ч при 45000 g на ультрацентрифуге MOM 3170 (Венгрия). Ядра разрушали ресуспендированием в 0,5 мл H₂O, содержащей тритон X-100 в конечной концентрации 1%, и двухкратным замораживанием-оттаиванием.

Получение микросом. Разрушенную в среде выделения митохондрий биомассу мозга центрифугировали 30 минут при 12500 g, а затем в течение 1 ч при 105000 g. Микросомальный осадок промывали и дважды переосаждали. Микросомы ресуспендировали 0,5 мл H₂O, содержащей 0,05% тритон X-100, с последующим двукратным замораживанием-оттаиванием.

Для контроля чистоты и целостности структур ядер, митохондрий и микросом полученные при центрифугировании осадки фиксировали 1% четырехокисью осмия на буфере Миллонига и заливали в аралдит. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, анализируя органеллы под электронным микроскопом ЭМВ 100ЛМ (Россия).

При определении аминокислотного состава тиаминкиназы использовали гомогенные препараты, полученные нами ранее [9]. Гидролиз белка проводили в запаянных вакуумированных ампулах с 6 М HCl при 110°C в течение 18, 22, 48 и 72 ч. Изоэлектрическую точку (pI) рассчитывали по аминокислотному составу и с помощью метода изоэлектрофокусирования. Собственную величину рН, изоионную точку находили посредством диализа тиаминкиназы (0,32 мг/мл) против бидистиллированной воды с последующим измерением рН в диализате.

Экспериментальные данные обрабатывали статистически с вычислением средних арифметических (M), среднеквадратических отклонений (SD) и квадратических ошибок репрезентативности средних арифметических (SEM). Для оценки достоверности разности средних величин применяли t-критерий Стьюдента. Расчеты осуществлялись с использованием программы GraphPad Prism 5.0.

Результаты и обсуждение

Большинство мембраносвязанных белков можно экстрагировать из мембран в присутствии детергентов, в состав которых входят липофильные цепи, взаимодействующие с гидрофобными поверхностями белка, вытесняя его из комплекса с мембраной. Из детергентов, используемых для этой цели, наиболее широко применяются неионные детергенты, такие как тритон X-100, твины, из анионных – дезоксихолат натрия, додецилсульфат. Первые крайне мягкие по своему действию и большинство белков, как связанных с мембранами, так и свободных, выдерживают концентрации тритона X-100, например, до 1-3% (вес/объем). Напротив, некоторые анионные, как додецилсульфат, помимо хороших солюбилизирующих свойств, характеризуются сильным денатурирующим эффектом.

Из-за возможного влияния процесса солюбилизации или самого детергента на тиаминкиназу для правильной оценки значимости разных по природе детергентов ферментативную активность измеряли в гомогенате мембран, после инкубации с солюбилизирующим агентом, и в супернатанте, после центрифугирования (табл. 1). Степень солюбилизации выражали в процентах активности в супернатанте по отношению к общей активности гомогената до инкубации. Согласно полученным данным, скорость образования ТДФ практически не менялась в присутствии дезоксихолата натрия, KCl, тритона X-100 и несколько снижалась под действием 0,5% твинов. Додецилсульфат натрия вызывал активацию тиаминкиназы на 13%, очевидно, вследствие изменения ее нативной конформации из-за высокой связывающей способности детергента и известного сильного влияния на структуру белков. При этом неионные детергенты обладали более выраженным солюбилизирующим эффектом по сравнению с анионными. Незначительное появление активности в экстракте вызывала и процедура замораживания-оттаивания мембранного препарата.

Подбирая оптимальные условия экстракции, было проанализировано воздействие изменяющихся концентраций тритона X-100 и соотношений детергент/белок на процесс солюбилизации. При увеличении концентрации тритона X-100 до 1% степень солюбилизации возрастала (рис. 1). Более высокие концентрации детергента вызывали ингибирование фермента. В присутствии 1% тритона X-100 солюбилизация была максимальной (79,4%) при соотношении детергент/белок 4,8:1, уменьшение соотношения до 2,4:1 вело к снижению эффективности солюбилизации до 68,3%. При высоких соотношениях, более чем 4,8:1, прослеживалась быстрая инактивация фермента.

Обычно мембранные белки становятся гораздо более лабильными после солюбилизации. Чаще всего инактивация обусловлена делипидизацией глобулы и отрицательным влиянием высоких концентраций детергента на ее конформацию. По этой причине нами исследовалось воздействие условий солюбилизации (концентраций тритона X-100) на сохранение активности тиаминкиназы. Связанная с мембранами тиаминкиназа проявляла высокую стабильность. При 4°C в гомогенате мембран в отсутствие детергента ферментативная активность оставалась без изменений в течение нескольких суток. Однако после солюбилизации 1% тритона X-100 (детергент/белок=2,4:1) через 24 ч потеря активности составляла около 50% ($t_{1/2}=24,75$ ч, $K_{инакт}=0,028$ ч⁻¹). Использование 0,5% тритона при отмеченных соотношениях детергент/белок способствовало заметному снижению скорости инактивации и было более приемлемым для солюбилизации тиаминкиназы. В 0,5% тритоне X-100 время полужизни фермента составляло 196,2 ч ($K_{инакт}=0,0035$ ч⁻¹).

Особенность многих мембранных белков состоит в том, что они могут находиться в нескольких состояниях, которые характеризуются разным сродством к субстратам и (или) эффекторам. Переход между конформационными состояниями

Таблица 1. – Солюбилизация тиаминкиназы из мембран головного мозга свиньи (M±SD; n=3)
Table 1. – Solubilization of thiamine kinase from pig's brain membranes (M±SD; n=3)

Детергент	Фракция	Удельная активность, нмоль·ч ⁻¹ ·мг ⁻¹	Общая активность, нмоль·ч ⁻¹	Степень солюбилизации, %
Замораживание-оттаивание	гомогенат	3,11±0,09	31,1±2,1	100
	супернатант	0,21±0,02	2,0±0,17	6,9
KCl, 0,5M	гомогенат	3,12±0,11	31,1±2,0	100
	супернатант	0,34±0,03	3,3±0,09	10,4
Дезоксихолат натрия	гомогенат	3,12±0,10	31,2±2,4	100
	супернатант	1,12±0,06	9,9±1,13	36,1
Додецилсульфат натрия	гомогенат	3,94±0,17	39,4±2,8	100
	супернатант	1,46±0,08	12,8±1,42	40,7
Тритон X-100	гомогенат	3,12±0,12	31,2±2,23	100
	супернатант	2,13±0,05	19,8±1,05	68,3
Твин 40	гомогенат	2,86±0,10	28,6±2,19	100
	супернатант	1,57±0,06	14,2±0,87	51,2
Твин 80	гомогенат	2,69±0,11	26,9±1,96	100
	супернатант	1,26±0,04	10,5±0,91	43,4

Примечание – конечная концентрация детергентов 0,5%; объем гомогената – 10; супернатанта 8,2 мл

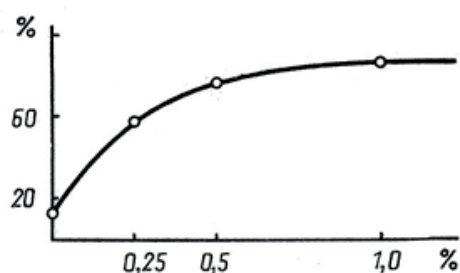


Рисунок 1. – Влияние концентрации тритона X-100 на степень солюбилизации тиаминокиназы (ось ординат). Концентрация белка 3,6 мг/мл; n=3
Figure 1. – Effect of concentration of triton X-100 on the degree of solubilization of thiamine kinase (y-axis). Protein concentration 3.6 mg/ml; n=3

ми часто вызван сменой липидного окружения и солюбилизация может оказаться благоприятной для одного, как правило, более устойчивого из них. Проследить за конформационными переходами можно, используя кинетический анализ. Такое исследование в первую очередь представляло интерес для оценки перспективности применения липофильных детергентов с целью максимальной солюбилизации тиаминокиназы из мембран головного мозга при одновременном сохранении ее нативного состояния. Перед проведением изысканий 1 мл гомогената мембран после инкубации с 1% тритоном X-100 диализовали 20 ч против 200 мл 50 мМ трис-HCl буфера pH 7,4 для удаления детергента.

Как видно на рисунке 2, в двойных обратных координатах зависимость начальной скорости тиаминокиназной реакции от концентрации субстрата – тиамина – не линейна и представляет собой часть равносторонней гиперболы. Наблюдаемая картина, на наш взгляд, обусловлена наличием в мембране и солюбилизированном материале двух конформаций фермента, которые проявляют высокую активность в условиях pH-оптимума реакции и обладают разным сродством к витамину. Экстраполяция линейных участков кривых позволяет рассчитать константу Михаэлиса для фермента с высоким сродством (K_{m1}) и, с меньшей точностью, K_{m2} для фермента с низкой афинностью.

Солюбилизация способствовала инактивации тиаминокиназы (рис. 2), которая сопровождается увеличением K_m с $1,1 \times 10^{-7}$ до 5×10^{-7} М. Если рассчитать степень солюбилизации, исходя из рисунка 2, сравнивая v_0 обеих кривых при концентрации тиамина 0,3 мкМ, обнаруживается, что в солюбилизате присутствует около 80% общей активности гомогената мембран. В реальности при использовании 1% тритона X-100 достигается 77,6% экстракция (рис. 1).

Кинетический анализ скорости тиаминокиназной реакции от концентрации второго субстрата – $Mg \cdot ATP^{2-}$ – позволил аналогично оценить афинность конформеров к свободным катионам магния – эффекторам белка. Константы диссоциации (K_S) для ионов металла были равны $1,4 \times 10^{-4}$ и $5,2 \times 10^{-4}$ М, что соответствует количеству Mg^{2+} в мозге свиньи.

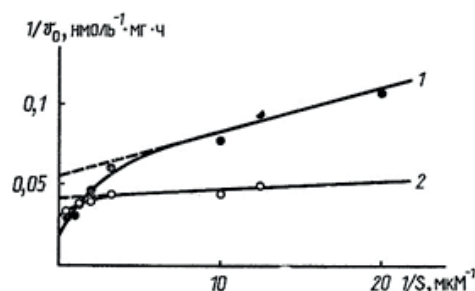


Рисунок 2. – Зависимость начальной скорости тиаминокиназной реакции от концентрации тиамина; 1 – гомогенат мембран после инкубации; 2 – до инкубации с детергентом
Figure 2. – Dependence of the initial rate of the thiamine kinase reaction on the concentration of thiamine; 1 – membrane homogenate after incubation; 2 – before incubation with detergent

Исходя из функциональной неоднородности ткани мозга, можно было ожидать проявления разной активности тиаминокиназы в отдельных ее структурах, что стало бы хорошей предпосылкой последующей очистки белка. Неоднозначное распределение белковых молекул казалось логичным и с точки зрения нейротропности тиамина. Выполненные нами эксперименты, однако, показали (табл. 2), что уровень ТДФ и активность тиаминокиназы практически одинакова в разных структурах и не определяется конкретно выполняемыми функциями отделов мозга.

Изучение содержания ТДФ в субклеточных фракциях мозга свиньи (табл. 3) подтвердило депонирование кофермента в гиалоплазме и митохондриях, т. е. тех участках клетки, в которых сосредоточены основные ТДФ-зависимые системы: пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназные комплексы и транскетолаза. В отношении тиаминокиназы наиболее высокая скорость биосинтеза кофермента обнаруживается в митохондриях. В отличие от печени и сердца, где уста-

Таблица 2. – Содержание ТДФ и активность тиаминокиназы в разных отделах головного мозга свиньи ($M \pm SD$; n=6)

Table 2. – TDP content and thiamine kinase activity in various parts of the pig's brain ($M \pm SD$; n=6)

Исследуемый отдел мозга	Белок, мг/мл	ТДФ, мкг/г ткани	Удельная активность тиаминокиназы, нмоль · ч ⁻¹ · мг ⁻¹
Стриатум	11,60	2,23±0,16	2,99±0,07
Гиппокамп	11,50	2,44±0,11	3,26±0,13
Промежуточный мозг	11,97	2,23±0,13	2,61±0,19
Средний мозг	10,01	2,72±0,10	4,17±0,06
Продолговатый мозг	11,15	2,26±0,24	3,03±0,11
Гипоталамус	6,37	3,00±0,18	2,57±0,16
Мозжечок	11,38	3,36±0,07	3,42±0,09
Мост	9,78	2,92±0,05	4,18±0,10
Серое вещество	12,29	2,52±0,18	3,17±0,14
Белое вещество	10,41	2,01±0,20	3,69±0,08

Примечание – в гомогенатах отделов мозга $p > 0,1$ по отношению к гомогенату исходной ткани

Таблица 3. – Содержание ТДФ и активность тиаминкиназы в субклеточных фракциях мозга свиньи (M±SD; n=3)**Table 3.** – TDP content and thiamine kinase activity in subcellular fractions of the pig's brain (M±SD; n=3)

Исследуемые субклеточные фракции	ТДФ, мкг/мг белка	% от содержания в гомогенате	Удельная активность тиаминкиназы, нмоль·ч ⁻¹ ·мг ⁻¹	% от активности гомогената
Гомогенат	0,115±0,007	-	1,21±0,03	-
Ядра	0,008±0,0001	7,2	0,78±0,017	11,14
Митохондрии	0,064±0,003	54,1	4,65±0,05	66,34
Микросомы	0,006±0,001	5,0	0,46±0,021	6,52
Гиалоплазма	0,038±0,002	33,7	1,12±0,04	16,00

новлена цитозольная локализация энзима [10], в гиалоплазме мозга регистрируется только 16% активности тиаминкиназы от ее общей в исходном гомогенате.

Общий анализ аминокислотного состава не позволяет судить о пространственной организации макромолекул. Более важные сведения получают из первичной последовательности. Тем не менее, выяснение количественного соотношения аминокислотных остатков несет полезную информацию для интерпретации результатов субклеточной локализации белков, установления и фиксации участков связывания субстратов и лигандов, понимания полифункциональных свойств.

В отношении тиаминкиназы нас в первую очередь интересовало наличие и концентрация аминокислот с ионизируемыми основными и кислотными группами, поскольку в соответствии со структурой тиаминкиназы и АТФ, субстратов тиаминкиназной реакции, свойств самого фермента связывание с глобулой могло происходить по четвертичному азоту молекулы витамина и отрицательно заряженной пиррофосфатной группировке АТФ. Кроме того, учитывая биологическое действие нуклеотида в комплексе с ионами металлов, в частности с Mg²⁺, присоединяющимся исключительно по β- и γ-фосфатам АТФ и нивелирующим общий заряд субстрата, приравнивая его к заряду тиами-

на, можно было ожидать, что общее количество кислотных остатков молекулы тиаминкиназы будет соответствовать числу основных.

Полученные данные (табл. 4) аминокислотного состава тиаминкиназы мозга подтверждают наше предположение (соответственно, 14,85 и 14,08%) кислотных и основных остатков), отличая данный фермент от рассчитанного «среднего белка», где общая концентрация кислотных заместителей (25,4%) выше, чем основных (16,3%). Обращает внимание и наличие в молекуле фермента повышенной концентрации аминокислот (аланин, глутаминовая кислота, лейцин), способствующих α-спирализации белковой глобулы при одновременно низком содержании аминокислот, связывающих полипептидные цепи (цистеин), и высоком (пролин) – осуществляющих их резкий поворот на 130°, несовместимый с ходом α-спирали. Отмеченная особенность тиаминкиназы в определенной мере объясняет стабилизирующий эффект ионов металлов при концентрациях последних, в 5-10 раз превышающих применяемые концентрации АТФ и необходимость защиты SH-групп от окисления, приводящего к быстрой, необратимой инактивации фермента.

Интересен и тот факт, что аминокислотный состав тиаминкиназы напоминает таковой тиаминсвязывающего белка, участвующего в транспорте тиаминкиназы через клеточные мембраны: такое

Таблица 4. – Аминокислотный состав тиаминкиназы из головного мозга свиньи (n=3)**Table 4.** – Amino acid composition of thiaminkinase from pig's brain (n=3)

Аминокислота	Содержание аминокислот		Аминокислота	Содержание аминокислот	
	Число остатков на молекулу (Mг 52 кДа) *	Содержание к общему количеству остатков, %		Число остатков на молекулу (Mг 52 кДа) *	Содержание к общему количеству остатков, %
Аспаргиновая	36	8,64	Цистеин	2	0,48
Лизин	30	7,19	Валин	20	4,81
Гистидин	4	0,98	Метионин	6	1,44
Аргинин	29	6,89	Изолейцин	19	4,55
Цистин	0	0,00	Лейцин	29	6,98
Треонин	27	6,47	Тирозин	6	1,44
Серин	29	6,98	Фенилаланин	23	5,92
Глутаминовая	26	6,21	Аланин	41	9,76
Пролин	24	5,76	Триптофан	26	6,23
Глицин	40	9,59	Всего	417	100

Примечание – * – взяты усредненные числа

же высокое содержание аспартата, глутамата, треонина, серина, пролина и низкое – цистеина и метионина. Вероятно, это указывает на сходство механизмов связывания витамина обеими молекулами.

Сопоставляя количество аминокислотных остатков, содержащих незаряженные полярные и неполярные R-группы, можно отметить некоторое, свойственное мембранным белкам, преобладание гидрофобных остатков над гидрофильными (соответственно, 55,62 и 44,38%). Причем из аминокислот с неполярными R-группами наиболее распространены аминокислоты средней (валин, лейцин) и высокой гидрофобности (фенилаланин, триптофан). Большие углеводородные радикалы последних могут препятствовать контакту белка с полярной водной фазой, содержащей металл, АТФ и тиамин.

Обнаруженная незначительная концентрация кислых аминокислотных остатков тирозина и основных – гистидина, располагающихся для известных ферментных систем внутри белковой глобулы и в силу того не вносящих заметного вклада в величину суммарного заряда, позволяет с достаточной достоверностью рассчитать по

аминокислотному составу величину изоэлектрической точки, равную для тиаминкиназы головного мозга 6,23. Сходная усредненная величина pI найдена методом изоэлектрического фокусирования. Значение изоионной точки, измеренное в процессе диализа низких концентраций ферментного раствора и равное 6,27, подтверждает достоверность полученных результатов.

Заключение

Тиаминкиназа головного мозга – мембранно-ассоциированный белок. Во взаимодействии с липидным бислоем мембран участвуют в основном гидрофобные силы. В зависимости от концентрации детергента процесс солубилизации сопровождается изменением конформации глобулы. Основное количество тиаминкиназы сосредоточено в митохондриальных мембранах. Фермент характеризуется повышенной концентрацией аминокислот, способствующих α -спирализации макромолекулы, при одновременно низком содержании остатков, связывающих полипептидные цепи, и высоким – осуществляющих их резкий поворот. Значение изоэлектрической точки равно 6,23.

Литература

1. Biotin-responsive basal ganglia disease in ethnic Europeans with novel SLC19A3 mutations / R. Debs [et al.] // *Arch Neurol.* – 2010. – Vol. 67, iss. 1. – P. 126-130. – doi: 10.1001/archneurol.2009.293.
2. Ruhoy, I. S. The genetics of Leigh syndrome and its implications for clinical practice and risk management / I. S. Ruhoy, R. P. Saneto // *Appl Clin Genet.* – 2014. – Vol. 32. – P. 221-234. – doi: 10.2147/TACG.S46176.
3. Exome sequencing reveals mutated *SLC19A3* in patients with an early-infantile, lethal encephalopathy / S. H. Kevelam [et al.] // *Brain.* – 2013. – Vol. 136, iss. 5. – P. 1534-1543. – doi: 10.1093/brain/awt054.
4. Mutant deoxynucleotide carrier is associated with congenital microcephaly / M. J. Rosenberg [et al.] // *Nat Genet.* – 2002. – Vol. 32, iss. 1. – P. 175-179. – doi: 10.1038/ng948.
5. Abnormal Thiamine-Dependent Processes in Alzheimer's Disease. Lessons from diabetes / G. Gibson [et al.] // *Mol Cell Neurosci.* – 2013. – Vol. 55. – P. 17-25. – doi: 10.1016/j.mcn.2012.09.001.
6. Luong, K. V. The beneficial role of thiamine in Parkinson disease / K. V. Luong, L. T. Nguyen // *CNS Neurosci Ther.* – 2013. – Vol. 19, iss. 7. – P. 461-468. – doi: 10.1111/cns.12078.
7. Wernicke-Korsakoff syndrome not related to alcohol use: a systematic review / S. J. Scalzo [et al.] // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2015. – Vol. 86, iss. 12. – P. 1362-1368. – doi: 10.1136/jnnp-2014-309598.
8. Черникович, И. П. Выделение и радиометрический метод определения активности АТФ: тиаминдифосфатфосфотрансферазы из митохондрий головного мозга свиньи / И. П. Черникович, Е. Н. Хильманович, Е. В. Кравец // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета.* – 2017. – Т. 15, № 4. – С. 442-446. – <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2017-15-4-442-446>.
9. Черникович, И. П. Сравнительная кинетическая характеристика тиаминкиназ из пивных дрожжей и головного мозга свиньи / И. П. Черникович // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета.* – 2011. – № 3. – С. 25-28.

10. Макаричкова, А. Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина B₁ / А. Ф. Макаричкова. – Минск: Белорусская наука, 2008. – 430 с.

References

1. Debs R, Depienne C, Rastetter A, Bellanger A, Degos B, Galanaud D, Keren B, Lyon-Caen O, Brice A, Sedel F. Biotin-responsive basal ganglia disease in ethnic Europeans with novel SLC19A3 mutations. *Arch Neurol.* 2010;67(1):126-130. doi: 10.1001/archneurol.2009.293.
2. Ruhoy IS, Saneto RP. The genetics of Leigh syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *Appl Clin Genet.* 2014;7:221-234. doi: 10.2147/TACG.S46176.
3. Kevelam SH, Bugiani M, Salomons GS, Feigenbaum A, Blaser S, Prasad C, Häberle J, Baric I, Bakker IM, Postma NL, Kanhai WA, Wolf NI, Abbink TE, Waisfisz Q, Heutink P, van der Knaap MS. Exome sequencing reveals mutated SLC19A3 in patients with an early-infantile, lethal encephalopathy. *Brain.* 2013;136(5):1534-1543. doi: 10.1093/brain/awt054.
4. Rosenberg MJ, Agarwala R, Bouffard G, Davis J, Fiermonte G, Hilliard MS, Koch T, Kalikin LM, Makalowska I, Morton DH, Petty EM, Weber JL, Palmieri F, Kelley RI, Schäffer AA, Biesecker LG. Mutant deoxynucleotide carrier is associated with congenital microcephaly. *Nat Genet.* 2002;32(1):175-179. doi: 10.1038/ng948.
5. Gibson GE, Hirsch JA, Cirio RT, Jordan BD, Fonzetti P, Elder J. Abnormal thiamine-dependent processes in Alzheimer's Disease. Lessons from diabetes. *Mol Cell Neurosci.* 2013;55:17-25. doi: 10.1016/j.mcn.2012.09.001.
6. Luong KV, Nguyen LT. The beneficial role of thiamine in Parkinson disease. *CNS Neurosci Ther.* 2013;19(7):461-468. doi: 10.1111/cns.12078.
7. Scalzo SJ, Bowden SC, Ambrose ML, Whelan G, Cook MJ. Wernicke-Korsakoff syndrome not related to alcohol use: a systematic review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;86(12):1362-8. doi: 10.1136/jnnp-2014-309598.
8. Chernikevich IP, Hilmanovich EN, Kravec EV. Vydelenie i radiometricheskij metod opredelenija aktivnosti ATF:

- tiamindifosfatfosfottransferazy iz mitohondrij golovnogogo mozga svini [Selection and radiometric method of determining the activity of ATP: thiaminediphosphate phosphotransferase from mitochondria of the pig's brain tissue]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University]. 2017;15(4):442-446. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2017-15-4-442-446> (Russian).
9. Chernikevich IP. Sravnitel'naja kineticheskaja karakteristika tiaminkinaz iz pivnyh drozhzhej i golovnogogo mozga svini [Comparative kinetic analysis of thiaminkinases from brewer's yeast and pig's brain]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University]. 2011;(3):25-28. (Russian).
10. Makarchikov AF. Tiamintrifosfat: novyj vzgljad na nekofermentnuju funkciju vitamina B₁ [Thiamine triphosphate: a new look at the non-coenzymatic function of vitamin B₁]. Minsk: Belorusskaja nauka; 2008. 430 p. (Russian).

MEMBRANE-ASSOCIATED THIAMINE KINASE FROM PIG'S BRAIN: DISTRIBUTION IN SUBCELLULAR FRACTIONS AND BRAINS, AMINO ACID COMPOSITION

I. P. Chernikevich, N. N. Kostenevich, A. D. Ivanova
Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Background. Thiamine kinase is a medical enzyme, genetically determined "breakdowns" during the synthesis of which lead to a number of neurodegenerative diseases. Knowledge of the distribution of the enzyme in the compartments of the brain, the regulatory capabilities of the globule in the formation of the coenzyme form of vitamin B₁ – thiamine diphosphate, will enable to perform targeted correction of pathological conditions.

Purpose of the study. To determine the localization of the enzyme in the pig's brain, the role of hydrophobic and hydrophilic interactions in association on membranes, the nature of amino acid residues that determine the structure of the protein.

Material and methods. To obtain membranes, fresh brain, cleaned from membranes and vessels, filled with 4 volumes of chilled Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4) with 0.2 mM EDTA and homogenized (2000 rpm⁻¹) for 5 cycles. The homogenate was centrifuged for (60 min at 30,000 g), the supernatant was discarded into the membranes remaining in the pellet and subjected to solubilization with the initial buffer containing 0.05-1 % of detergents. The enzyme activity was assessed by the rate of thiamine diphosphate formation. Protein hydrolysis was carried out in evacuated ampoules with 6 M HCl at 110 °C for 18, 22, 48, and 72 h. The isoelectric point (pI) was calculated from the amino acid composition and using the isoelectric focusing method. The isoionic point, was determined by dialysis of thiamine kinase, followed by measuring the pH in the dialysate.

Results. It was found that hydrophobic detergents have a more pronounced solubilizing effect compared to hydrophilic ones. At high values of the critical concentration of micelle formation (1 %), both of them change the conformational state of the macromolecule, affecting its affinity for substrates and effectors.

Thiamine kinase is fairly evenly dispersed in all parts of the brain. However, the subcellular localization is different. Low enzymatic activity is observed in the mitochondrial fractions.

The enzyme is characterized by an increased concentration of amino acids, contributing to the α -helicalization of the protein globule, while at the same time a low content of residues that bind polypeptide chains and high - carry out its sharp rotation by 130 °, incompatible with the course of the α -helix.

Conclusions. Brain thiamine kinase is a membrane-associated protein. Hydrophobic forces are mainly involved in the interaction with the lipid bilayer of membranes. Depending on the concentration of the detergent, the solubilization process is accompanied by a change in the conformation of the globule. The main amount of thiamine kinase is concentrated in mitochondrial membranes.

Keywords: thiamine kinase, localization, pig's brain, amino acid composition.

For citation: Chernikevich IP, Kostenevich NN, Ivanova AD. Membrane-associated thiamine kinase from pig's brain: distribution in subcellular fractions and brains, amino acid's composition. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2022;20(2):197-203. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2022-20-2-197-203>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.
Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Об авторах / About the authors.

*Черникевич Иван Петрович / Chernikevich Ivan, e-mail: chemistry@grsmu.by, ORCID: 0000-0001-5319-5014
Костеневи́ч Никола́й Николаевич / Kostenevich Nicolai, e-mail: chemistry@grsmu.by, ORCID: 0000-0002-2565-863
Иванова Анастасия Дмитриевна / Ivanova Anastasia, e-mail: chemistry@grsmu.by

* - автор, ответственный за переписку / corresponding author