

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП ТИАМИНКИНАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА СВИНЬИ

Вавренюк М.Ю.

Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь

Кафедра общей и биорганической химии

Научный руководитель – д-р хим. наук, профессор Черникович И.П.

Превращение тиамина в тиаминпирофосфат является необходимым условием его участия в катализе в составе ключевых ферментов пентозофосфатного цикла и цикла Кребса (транскетолазы, пируват- и оксоглутаратдегидрогеназных комплексов). Своеобразие тиаминкиназы (АТР: тиаминпирофосфаттрансфераза, 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 вероятную роль сульфгидрильных групп цистеина в проявлении каталитической активности.

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

**Материалы и методы.** В опытах использовали электрофоретически гомогенный препарат тиаминкиназы, полученный по разработанному нами методу [1]. Число SH-групп на 1 моль белка оценивали с помощью 5,5' – дитиобис- (2- нитробензойной кислоты), - реагент Элмана, про pH 8,0, принимая, что молярный коэффициент поглощения нитротиибензоат аниона равен при 412 нм  $13600 \text{ M}^{-1} \text{ xcm}^{-1}$ , а молекулярный вес тиаминкиназы – 52800 Да. Для этого к 1,5 мл раствора фермента (2-6 мкМ) добавляли 40-60 – кратный избыток реагента Элмана. Оптическую плотность измеряли при комнатной температуре на спектрофотометре «VSU 2-P» (Германия). При определении тиаминкиназной активности окисленного белка избыток модификатора отделяли на колонке (0,8 x 14 см), заполненной сефадексом G-50. Количество сульфгидрильных групп и степень защиты от воздействия на фермент тиолового блокатора оценивали при концентрациях лигандов: АТР – 1 мМ;  $\text{MgSO}_4$  – 10 мМ; тиамин – 0,1 мМ; пиритиамин – 3 и 30 мкМ. Для обнаружения S-S групп использовали метод Каваллини.

**Результаты.** С использованием реагента Элмана показано, что в реакцию окисления на димернативного фермента вступают две сульфгидрильные группы. Модификация первой быстро реагирующей SH-группы приводит к полному, но частично обратимому торможению активности тиаминкиназы.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mg} - \text{ATP}^{2-}$  в некоторой степени препятствуют 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 нитротиибензоата на цианид-ион, при использовании фермента с небольшой степенью модификации, приводит к регенерации лишь 7-10% активности. Предполагается, что блокирование высоко реакционной сульфгидрильной группы сопровождается глубокими изменениями в структуре белка. Эта группа не принимает прямого участия в катализе, а выполняет структурную функцию. Установлено отсутствие дисульфидных связей в молекуле киназы.

**Вывод.** Имеющиеся данные указывают, что блокирование первой высоко реакционной сульфгидрильной группы тиаминкиназы сопровождается изменением структуры глобулы. Группа не принимает прямого участия в катализе, а выполняет, скорее всего, структурную функцию, т.е. участвует в поддержании каталитически активной конформации белка.