

**КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
МЕМБРАННО-АССОЦИИРОВАННОЙ  
ТИАМИНТРИФОСАТАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КУРИЦЫ**

**Колос И. К., Макарович А. Ф.**

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси  
г. Гродно, Республика Беларусь

Наряду с тиаминдифосфатом (ТДФ) – коферментной формой витамина В<sub>1</sub> – в большинстве исследованных биологических объектов обнаружены другие производные тиамин: тиаминмонофосфат, тиаминтрифосфат (ТТФ) и аденозин-тиаминтрифосфат (АТТФ), значение которых для жизнедеятельности клетки не установлено [1, 2]. Результаты исследований, проведенных за последнее десятилетие, указывают на возможное участие ТТФ и АТТФ в процессах краткосрочной биохимической адаптации [2, 3]. В настоящее время ферменты обмена АТТФ у представителей различных систематических групп организмов практически не изучены; известно лишь, что его биосинтез у *E. coli* осуществляется Mg<sup>2+</sup>-зависимым растворимым белком, а в печени крысы присутствует мембранно-ассоциированная АТТФ-гидролаза. Противоречивы также сведения о механизмах биосинтеза ТТФ. Гидролиз ТТФ в клетках млекопитающих катализируется специфичной ТТФазой – растворимым Mg<sup>2+</sup>-зависимым ферментом с молекулярной массой ~ 25 кДа, который экспериментально не обнаружен у других классов организмов. У бактерий, грибов, растений, птиц и рыб гидролиз ТТФ, судя по всему, протекает под действием менее специфичных фосфатаз, филогенетически не родственных ТТФазе млекопитающих; ни один из этих белков не охарактеризован на молекулярном уровне [4]. Цель данной работы заключалась в изучении кинетических свойств фермента, катализирующего гидролиз ТТФ в печени курицы (*Gallus gallus*).

Для приготовления гомогенатов образцы печени растирали в стеклянном гомогенизаторе в 5-кратном объеме охлажденного до 4 °С 50 мМ трис–НСl буфера, рН 7,3, содержащего 0,15 М КСl и 0,2 мМ ЭДТА. Экстракт получали центрифугированием гомогената в течение 60 мин (20000 g, 4 °С). ТТФазную активность измеряли по скорости высвобождения неорганического фосфата, количество которого определялось методом Lanzetta с соавт. [5].

В результате проведенных исследований установлено, что ТТФаза гомогената печени проявляет максимальную активность в слабокислой

среде при pH 5,5-6,0. Катионы двухвалентных металлов –  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  – увеличивают скорость ТТФазной реакции в 17–20 раз. В исследованном диапазоне концентраций субстрата в присутствии 5 мМ  $Mg^{2+}$  фермент подчинялся кинетике Михаэлиса-Ментен; кажущаяся  $K_m$  для ТТР, рассчитанная методом нелинейной регрессии и в координатах Хейнса, составила 1,7-2,2 мМ. Моновалентные анионы ( $\Gamma$ ,  $SCN^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $Br^-$ ,  $Cl^-$ ) в концентрации 150 мМ ингибировали ферментативную активность, снижая скорость гидролиза ТТФ на 20-60%. После центрифугирования гомогената печени более 85% ТТФазной активности обнаруживалось в осадке, что указывает на мембранную локализацию фермента. Обработка осадка 1%-м дезоксихолатом натрия приводила к солюбилизации 53% ТТФазной активности. При хроматографии на колонке с тойоперлом HW-55 ТТФазная активность элюировалась совместно с аденозин- и инозинтрифосфатазной активностями в объеме, соответствующем белкам с молекулярной массой  $\geq 700$  кДа. Фракции ТТФазного пика также проявляли заметную инозиндифосфатазную активность (32% от активности с ТТФ) и менее выраженную способность дефосфорилировать ТДФ и *n*-нитрофенилфосфат (соответственно 16% и 9% от активности с ТТФ). Полученные данные свидетельствуют о том, что гидролиз ТТФ в печени курицы осуществляется мембранно-ассоциированным белковым комплексом, обладающим широкой субстратной специфичностью.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Makarchikov A. F., Lakaye B., Gulyai I. E., Czerniecki J., Coumans B., Wins P., Grisar T., Bettendorff L. Thiamine triphosphate and thiamine triphosphatase activities: from bacteria to mammals // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2003. – Vol. 60. – P. 1477–1488.
2. Bettendorff L., Wirtzfeld B., Makarchikov A.F., Mazzucchelli G., Frédéric M., Gigliobianco T., Gandolf M., De Pauw E., Angelot L., Wins P. Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide // *Nat. Chem. Biol.* – 2007. – Vol. 3. – P. 211–212.
3. Lakaye B., Wirtzfeld B., Wins P., Grisar T., Bettendorff L. Thiamine triphosphate, a new signal required for optimal growth of *Escherichia coli* during amino acid starvation // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 17142–17147.
4. Makarchikov A.F. Vitamin B<sub>1</sub>: metabolism and functions // *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B: Biomedical Chemistry.* – 2009. – Vol. 3. – P. 116–128.
5. Lanzetta P. A., Alvarez L. J., Reinach P. S., Candia O. A. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 100. – P. 95–97.