

КИНЕТИКА ДИССОЦІАЦІЇ І РЕАКТИВАЦІЇ ХОЛОТРАНСКЕТОЛАЗИ ПЕЧЕНИ КРЫС

В. Л. КУБЫШИН, Е. В. ТОМАШЕВА, И. В. КУЛЕШ, З. В. ГОРБАЧ

УО «Гродненский государственный аграрный университет», Беларусь;
e-mail: lena7843041mal@rambler.ru

Предложен метод выделения транскетолазы из печени крыс с использованием ионообменной хроматографии и субстратной элюции энзима. Представлены экспериментальные данные по регуляции активности транскетолазы (ТК) с участием тиаминпирофосфата (ТПФ) и его антикоэнзимных аналогов. Исследована кинетика диссоциации холо-ТК (при рН 5,0 и 4,0) и реактивации апо-ТК при широком варьировании концентрацией ТПФ, а также его производными, обладающими антикоэнзимными свойствами. Диссоциация холо-ТК на апоэнзим и коэнзим (при указанных значениях рН) характеризуется выраженной двухфазностью изменения активности: активность энзима снижается преимущественно в быстрой фазе, а в медленной – оставшиеся 20–30%. Установлена неидентичность активных центров энзима по связыванию ТПФ апотранскетолазой. Величины K_m для ТПФ к первому и второму активному центру равнялись 0,3–4,5 и 1,3–19,7 мкМ соответственно.

Ключевые слова: транскетолаза, тиаминпирофосфат, пентозофосфатный путь.

Транскетолаза (ТК; 2.2.1.1) ключевой тиаминзависимый энзим неокислительной ветви пентозофосфатного пути (ПФП) обмена углеводов. Метаболическая роль обратимых реакций, катализируемых ТК, заключается в осуществлении связи ПФП и гликолиза, а также обеспечении клетки рибозой и другими фосфосахарами [1]. ТК представляет собой сложный энзим, структура которого состоит из двух идентичных субъединиц, связанных двумя молекулами тиаминпирофосфата (ТПФ), выполняющего роль коэнзима. В этой связи внутриклеточный уровень тиамин является одним из факторов, определяющих энзиматическую активность ТК.

Обеспеченность организма витамином В₁ и явления, вызванные нарушением обмена тиамин остаются актуальными по сегодняшний день. Потребность организма в тиамине может варьировать в зависимости от физиологических состояний (возраст, гипоксия, нервно-эмоциональные нагрузки), климатических и физических факторов (шум, вибрация, изменение температуры), микрофлоры желудочно-кишечного тракта (*Bac. thiaminolyticum* и другие микроорганизмы), а также патологических состояний. У кур, собак, крыс обнаружено ряд штаммов тиаминолитических клостридий, вызывающих снижение уровня тиамин [2]. Распад тиамин в кишечнике может увеличиваться при повышении тиамининдуцированного синтеза тиаминазы у *E. coli*. Существуют

и другие антитиаминные факторы, широко распространенные в мире растений и гидробионтов.

Эндогенный дефицит тиамин обуславливает возникновение нарушений, связанных с обменом углеводов. Недостаточность В₁ вызывает прежде всего снижение активности ТПФ-зависимых энзимов. Наиболее ранние признаки В₁-гиповитаминоза у животных распознают по снижению активности ТК в эритроцитах. По мнению некоторых авторов, по ее активности можно определить тиаминный статус тканей животных [1], что широко используется в клинической диагностике. Количество связанного с протеином ТПФ в печени крыс довольно постоянно (4,5–4,7 мкг/г ткани) и не изменяется после инъекций тиамин, тогда как уровень свободной формы ТПФ подвержен значительным колебаниям. Так, снижение обеспеченности организма тиамин в первую очередь ведет к падению внутриклеточной концентрации свободной формы ТПФ. Установлено, что апо-форма ТК печени крыс, содержащихся на В₁-дефицитном рационе, не обнаруживается *in vitro*, но предполагается влияние тиамин на биосинтез апо-ТК [3]. Полагают, что скорость новообразования апоэнзима зависит от концентрации свободной формы ТПФ. В экспериментах *in vivo* показано увеличение активности транскетолазы в печени гиповитаминозных животных в течение двух часов после введения больших доз тиамин. Однако ТПФ-эффект у

экспериментальных животных, содержащихся на безтиаминовой диете, не установлен в присутствии экзогенного ТПФ. Авторы отмечают отсутствие апоформы ТК в печени крысы [3], тогда как в работе [4] описано существование апоэнзима для ТК из эритроцитов. Апо-ТК была обнаружена в организмах, занимающих более низкую ступень эволюционной лестницы, в частности дрожжах, выращенных на среде с недостатком тиамин. В то же время в дрожжах, выращенных при избытке тиамин, ТК представлена только в виде холоэнзима [5]. Существование апоформы ТК и ТПФ-эффект в различных тканях животных является предметом исследований и вызывает много спорных вопросов [4, 6–8].

Активность энзима варьирует в зависимости от ткани животного, его физиологического, патологического состояния, а также от обеспеченности организма тиамином, который регулирует уровень (ТПФ). Недостаточность тиамин в организме вызывает нервно-психическое расстройство – синдром Вернике-Корсакова. В развитии заболевания важную роль играют и генетические факторы. Известно, что при дефиците тиамин в пищевом рационе заболевание чаще встречается у европейцев. В исследованиях, проведенных на фибробластах, показано, что способность связывать ТПФ транскетолазой с синдромом Вернике-Корсакова в 10 раз ниже, чем у энзима здоровых людей. Клинически снижение активности ТК проявляется в условиях, при которых концентрация ТПФ оказывается недостаточной для насыщения энзима.

Формирование холоэнзима во многом зависит от природы связи коэнзима и апоэнзима, полученных из различных источников животного, растительного происхождения и микроорганизмов. На микроорганизмах показано, что связь ТПФ с апо-ТК весьма непрочная и для достижения максимальной активности энзима необходимо добавление в реакционную среду ТПФ [9]. В ТК из печени крыс связь ТПФ с апо-ТК прочная, диссоциация холоэнзима на апо- и коэнзим происходит в кислой или щелочной среде. Для ТК из печени свиньи и эритроцитов человека [10, 7, 6] предполагают наличие ковалентной связи между апо-ТК и коэнзимом. Взаимодействие коэнзима и апоэнзима с формированием активных центров и их функциональной эквивалентности описано в работах [7, 11–17]. Следует отметить, что кинетика диссоциации холо-ТК на коэнзим и апоэнзим в указанных работах не рассматривалась.

Целью настоящей работы является исследование особенностей кинетики диссоциации холо-ТК на ТПФ и апоэнзим, и последующей реактивации ТК с восстановлением энзиматической активности, а также изучение регуляции активности ТК в зависимости от концентрации ТПФ и его производных, обладающих антикоэнзимным свойством.

Материалы и методы

Активность энзима определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм по скорости окисления NADH в сопряженных реакциях с использованием α -глицерофосфатдегидрогеназы, триазофосфатизомеразы, (Реанал, Венгрия), пентозофосфатметаболизирующих энзимов или восстановления NAD⁺ в реакции с глицеральдегидфосфатдегидрогеназой при 30 °C [9]. Препараты ТПФ использовали фирмы (Serva, Германия). Тиаминазу – 1 (2.5.1.2), выделенную по методу [18], инкубировали с высокоочищенным препаратом ТК при pH: 5,5; 6,0; 7,4. В экспериментах *in vivo* тиаминазу инъецировали дважды с 72-х часовым интервалом в дозе 1,5 МЕ. Ингибирование ТК-реакции производными тиамин осуществляли в условиях совместного инкубирования апо-ТК, ТПФ и соответствующего антикоэнзима при насыщающих концентрациях субстратов и сопряженных активностей энзимов. Реакцию инициировали внесением субстрата. Кинетические параметры ингибирования ТК-реакции с участием антикоэнзимов получены с использованием графиков, построенных в координатах Диксона.

Результаты и обсуждение

Высокоочищенный препарат ТК из печени белых беспородных крыс-самцов получали по методу [19] с некоторой модификацией, заключающейся в использовании фруктозо-6-фосфата в качестве элюирующего агента, что позволило выявить минорную фракцию ТК (рис. 1, пик с). Замена фруктозо-6-фосфата на рибозо-5-фосфат в качестве элюирующего агента, в указанных условиях, оказалась неэффективной.

Хроматография осуществлялась на колонке, заполненной фосфоцеллюлозой (слой катионообменника 4×15 см) и уравновешенной 10 мМ трис-буферным раствором pH 7,4, содержащим 1% глицерина. Связавшуюся с ионообменником транскетолазу элюировали 3 мМ раствором фруктозо-6-фосфата (Реанал, Венгрия). Скорость элюции 6–8 мл за 10 мин.

Фракции протеинового профиля (b), показанные с максимальной активностью (рис. 1) объединяли, концентрировали на ультрафильтраторе и хранили в 30%-ом растворе глицерина при pH 7,6. При -7 °С энзим сохраняет свою активность без изменения более 3 месяцев.

Апоформу ТК получали следующим образом. Холоэнзим (фракцию протеина, профиль b), удельной активностью 1,6–1,8 ед. на 1 мг протеина, переводили посредством гель-фильтрации через сефадекс G-25 (10–40 мк, Superfine, Швеция) в 1 мМ трис-НСl буфере (pH 7,6), содержащем 1 мМ ЭДТА, 2 мМ MgCl₂, 0,1 мМ меркаптоэтанол.

Диссоциацию холотранскетолазы на апо-ТК и коэнзим осуществляли в 12 мМ цитратном буфере pH 4,0; 5% глицерина, 18 °С; (рис. 2, Б) и 0,5 М малатном буфере pH 5,0 (рис. 2, А).

В этих условиях энзим способен реактивироваться при насыщающих концентрациях ТПФ до 80%.

Отщепившийся ТПФ связывали активированным углем, который удаляли центрифугированием. Полученный апоэнзим стабилизируют добавлением глицерина (конечная концентрация 30%), pH раствора повышали до величины 7,6 внесением 0,5 М триэтанолами-

нового буфера. Апо-ТК сохраняла способность к реактивации насыщающими концентрациями ТПФ около трех часов 0 °С. Кинетику связывания или диссоциации ТПФ с апо-ТК регистрировали по изменению активности энзима. Как видно, разобщение холо-ТК на апоэнзим и коэнзим (рис. 2, Б) характеризуется быстрой и медленной фазами. Снижение большей части энзиматической активности наблюдается в быструю фазу, а в медленную – оставшиеся 20–30%. График снижения активности ТК в зависимости от времени инкубации представляет собой прямую линию с изломом, характеризующую, вероятно, различие каталитических центров энзима по активности и средству к ТПФ (рис. 3).

На основании анализа кинетики отщепления ТПФ от холо-ТК, можно сделать предположение о различном средстве ТПФ к активным центрам апомономеров, а также возможной неидентичности активных центров энзима. Так, при инкубации холо-ТК в 0,5 М малатном буфере pH 5,0 (рис. 2, А) не было полного отщепления ТПФ от ТК. Энзим сохранял до 30% первоначальной активности. Возможно, в указанных условиях активный центр с высоким средством к ТПФ сохраняет свою активность. Кинетика инактивации

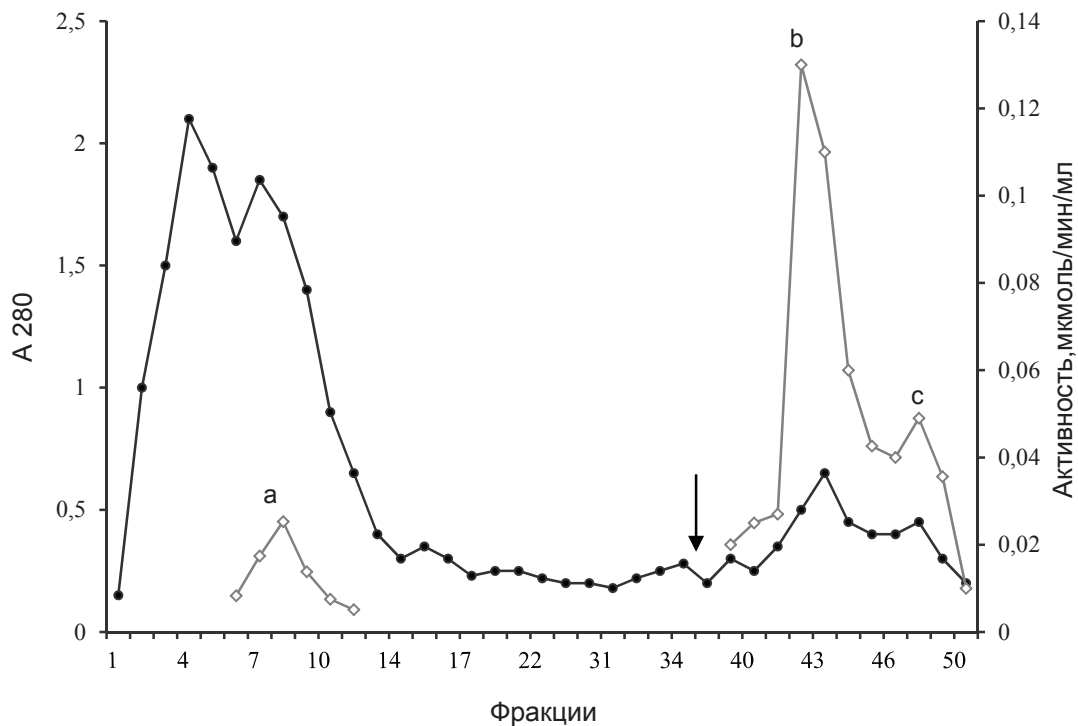


Рис. 1. Хроматография транскетолазы на фосфоцеллюлозе. По вертикали: слева — абсорбция протеина (●) при λ 280 нм, справа — транскетолазная активность (◇) — а; b; c. Стрелкой указано начало элюции 3,0 мМ раствора фруктозо-6-фосфата

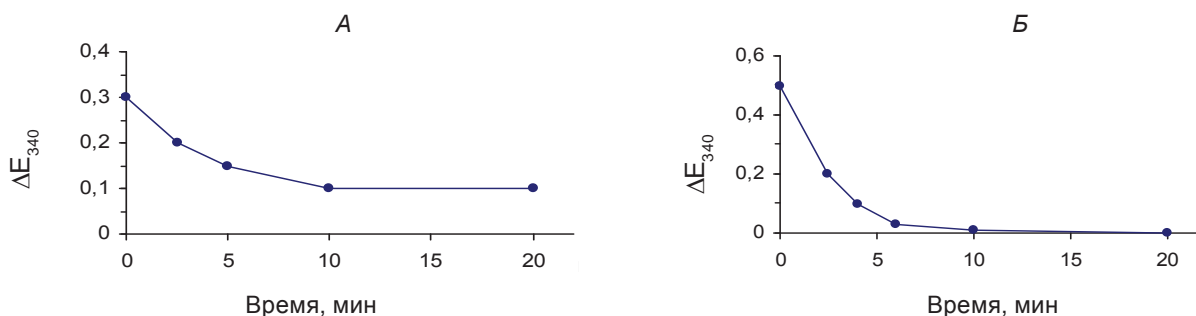


Рис. 2. Кинетика разобщения холо-ТК на апоэнзим и ТПФ: А – 0,5 М малатный буфер рН 5,0; Б – 12 мМ цитратно-фосфатный буфер рН 4,0 при 18 °С

холо-ТК (рис. 2, Б) показала, что быстрее снижается активность одного из каталитических центров с низким сродством апоэнзима к ТПФ и, вероятно, характеризующегося большей активностью.

Обратный процесс реактивации апо-ТК (рН до 7,6) при насыщающих концентрациях субстратов – ксилулозо-5-фосфата и рибозо-5-фосфата, и низких концентраций ТПФ и Mg^{2+} , в соотношении (моль:моль) апопротеин-димер : ТПФ : Mg^{2+} – 1:2:2, характеризуется восстановлением энзиматической активности на 20–30% от исходной величины с достаточно длительным лаг-периодом (рис. 4).

Вероятно, при низких концентрациях тиаминпирофосфата коэнзим присоединяется к активному центру ТК с высоким сродством (рис. 4, а) и низкой активностью. Для насыщения второго активного центра (с меньшим сродством и высокой активностью) необходима

более высокая концентрация ТПФ (рис. 4, б). Этот факт дает основание предположить возможную неэквивалентность активных центров по связыванию ТПФ апо-ТК. Исследованная кинетика активации апо-ТК при низкой концентрации ТПФ, возможно, представляет собой один из механизмов регуляции энзима в условиях тиаминовой недостаточности *in vivo* и существования частично насыщенного ТПФ холо-ТК, что согласуется с имеющимся в некоторых тканях животного ТПФ-эффекта при V_1 -недостаточности.

В экспериментах показано, что после однократного цикла разобщения холоэнзима на апоэнзим и коэнзим с последующей реактивацией ТК насыщающими концентрациями ТПФ, энзим связывается с ТПФ необратимо с формированием активных центров. В опытах

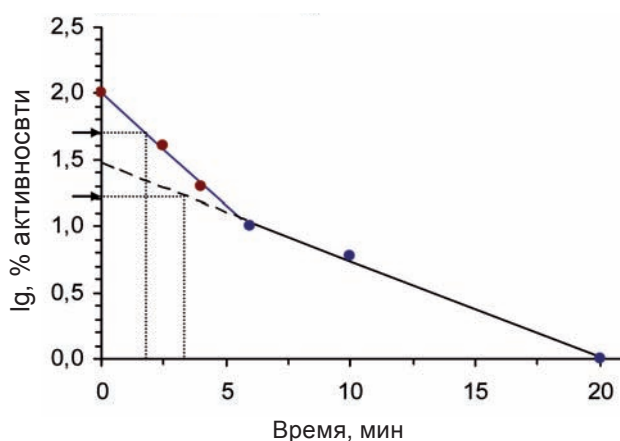


Рис. 3. Изменение активности ТК в зависимости от времени инкубации в 12 мМ цитратно-фосфатном буфере рН 4,0 в полулогарифмических координатах. Стрелками указаны предположительно S времени инактивации энзима для 1 и 2 активных центров

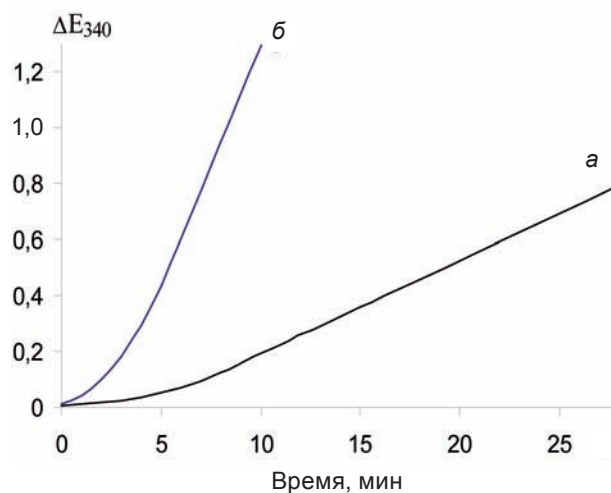


Рис. 4. Реактивация апо-ТК в присутствии ТПФ и Mg^{2+} : а – при концентрации, соответствующей эндогенной и соотношении моль:моль (протеин-димер : ТПФ : Mg^{2+} = 1 : 2 : 2); б – при насыщающей концентрации

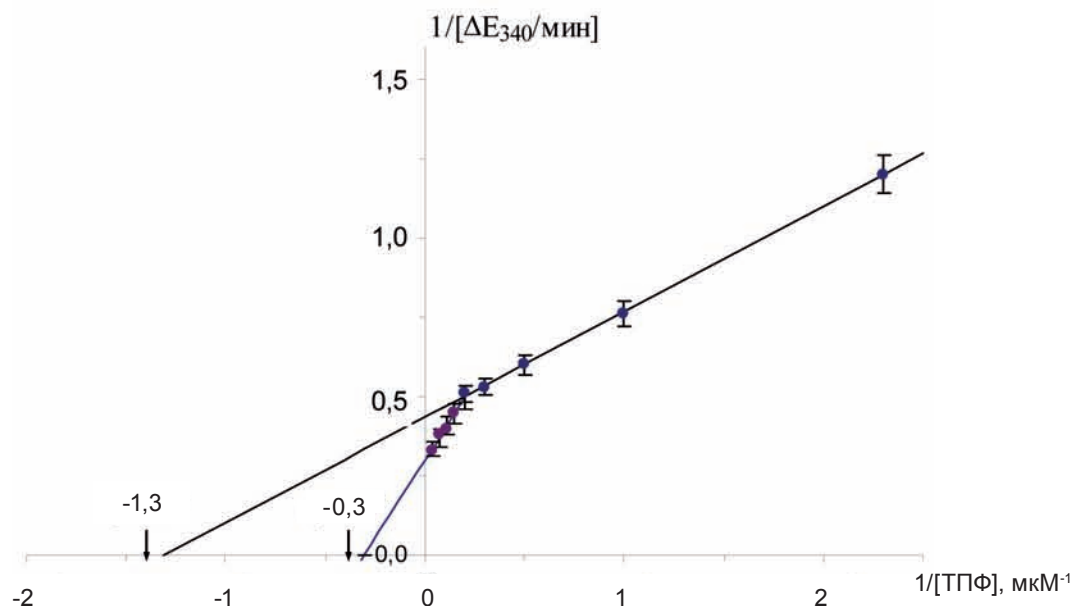


Рис. 5. Залежність зміни швидкості транскетолазної реакції від різних концентрацій ТПФ в координатах Лайнувера–Берка

по реактивації отриманих препаратів апо-ТК встановлено залежність швидкості каталітичної активності від концентрації ТПФ. Графік в координатах Лайнувера-Берка характеризується изломом прямої лінії (рис. 5), що, ймовірно, обумовлено нееквівалентністю активних центрів ТК. Це підтверджується експериментами по реактивації ТК при різних концентраціях ТПФ [11, 18].

Нееквівалентність активних центрів холо-ТК печінки крыси *in vitro* знайдена також і для похідних тiamіна, що мають антикоenzимні властивості (таблиця).

Варіабельність отриманих величин вказує на різне сродство апо-ТК до коenzиму і його аналогам, а також неідентичність активних центрів. В експериментах по інгібуванню ТК реакції ТзПФ, у якого відсутній піримідиновий компонент, виявляється один активний центр зв'язування на апо-ТК. Зниження активності ТК в присутності окситіамінопірофосфата і інших ана-

логів проявляється в умовах конкурентних взаємодій коenzима і антикоenzима за центри зв'язування на апо-ТК.

В експериментах *in vivo* [12] показана висока лабільність ТК, модифікованої ОТПФ. Так, час поновлення меченого антикоenzима в апо-ТК становить 24–30 ч, що значно нижче часу поновлення коenzима в ТК інтактних тварин – 153 ч [11] і 192 ч для апоenzима [20]. По даним Горбача, в дослідах з використанням ¹⁴С-гліцину, час півжиття протеїнової частини еnzима відповідає – 161 ч [21]. В експериментах *in vitro* встановлено, що в фізіологічних умовах при широкому варіюванні часу інкубації ТПФ (в складі холо-ТК) недоступний впливу тiamінази-І. При зміні рН до величин 5,5–6,0 спостерігали зниження активності ТК. Є підстави передположити, що при кислих значеннях рН відбувається зміна конформаційної структури

Значення K_i для антикоenzимів, М

K_m ТПФ, мкМ	ОТПФ	ТГОТПФ	ТхДФ	ТзПФ	ТГТДФ
0,3–4,5	$0,7–2,0 \cdot 10^{-8}$	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-5}$
1,3–19,7	$1,2–1,9 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$1,17 \cdot 10^{-2}$	0	$4,5 \cdot 10^{-4}$

Примечание: ОТПФ – окситіамінопірофосфат, ТГОТПФ – тетрагідрокситіамінопірофосфат, ТхДФ – тиохромдифосфат, ТзПФ – тиозолпірофосфат, ТГТДФ – тетрагідротіамінопірофосфат.

ензима, при которой тиаміназа способна расщепить ТПФ.

В результате внутрибрюшинной инъекции тиаміназы-1 наблюдали изменение активности ТК (контроль – $1,40 \pm 0,11$; опыт – $0,68 \pm 0,04$ мкмоль/мин). Активность энзима в опытной группе снизилась на 50% по сравнению с контрольной группой в течение 144 ч. Представленные данные показывают, что у интактных животных время полужизни ТК выше, чем у ТК после инъекций окситиаміна или тиаміназы-1.

Полученные в независимых экспериментах величины, характеризующие время полужизни апоэнзима и коэнзима, имеют существенные различия, вариабельность которых, вероятно, обусловлена степенью насыщения апо-ТК ТПФ. На основании кинетических исследований по диссоциации холо-ТК при кислых значениях pH и реактивации апо-ТК ТПФ, выявлена неидентичность активных центров энзима, которая подтверждается K_i для производных тиаміна с антикоэнзимными свойствами.

Выражаем благодарность Забродской Светлане Викторовне за предоставленные производные тиаміна.

КІНЕТИКА ДИСОЦІАЦІЇ І РЕАКТИВАЦІЇ ХОЛОТРАНСКЕТОЛАЗИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

В. Л. Кубышин, О. В. Томашева, И. В. Кулеш, З. В. Горбач

УО «Гродненський державний аграрний університет», Білорусь;
e-mail: lena7843041mal@rambler.ru

Запропоновано метод виділення транскетоллази з печінки щурів із використанням іонообмінної хроматографії і субстратної елюції энзима. Представлені експериментальні дані по регуляції активності транскетоллази за участю тиамініпрофосфату (ТПФ) і його антикоензимних аналогів. Досліджено кінетику дисоціації холо-ТК (pH 5,0 і 4,0) і реактивації апо-ТК при широкому варіюванні концентрацією ТПФ і його похідними, що мають антикоензимні властивості. Дисоціація холо-ТК на апоензим і коензим (за зазначених pH) характеризується вираженою двофазністю зміни активності: активність энзима знижується переважно у швидку фазу, а в повільну фазу – решта 20–30% активності. З цих кінетичних досліджень

встановлено неідентичність активних центрів энзима щодо зв'язування ТПФ апотранскетоллазою. Величини K_m для ТПФ до першого і другого активного центру дорівнюють 0,3–4,5 і 1,3–19,7 мкМ відповідно.

Ключові слова: транскетоллаза, тиамініпрофосфат, пентозофосфатний шлях.

KINETICS OF DISSOCIATION AND REACTIVATION OF RAT LIVER HOLOTRANSKETOLASE

V. L. Kubyshin, A. V. Tomashova, I. V. Kulesh, Z. V. Gorbach

Educational Establishment Grodno State Agrarian University, Belarus;
e-mail: lena7843041mal@rambler.ru

Summary

The work deals with isolation of transketolase from the rat liver by means of ion-exchange chromatography and substrate elution of enzyme. Experimental data on the regulation of transketolase activity with thiamin pyrophosphate (TPP) and its anticonzyme analogues are presented. The kinetics of dissociation of holo-TK at pH 4.0 and 5.0 and reactivation of apo-TK at a wide variation of the concentration of TPP and its derivatives with anticonzyme properties has been studied. The dissociation of holo-TK into apoenzymes and coenzymes at the specified values of pH is characterised by most evident diphasic nature, both fast and slow process being observed. The most part of enzymic activity slowdown falls on the fast phase, while the remaining 20–30% take place within the slow phase. The kinetics research findings illustrate the nonidentity of enzyme active sites with respect to TPP binding with transketolase. The K_m values for TPP both per the first and second active sites equalled 0.3–4.5 μM and 1.3–19.7 μM , accordingly.

Key words: thiamin pyrophosphate, transketolase, pentose phosphate pathway.

1. Wood T. The pentose phosphate pathway. – O.: Academic Press, 1985. – 204 p.
2. Tumaev A. A. Тиамин. Обмен, механизм действия. – Издательство «Наука», 1978. – 143 с.
3. Виноградов В. В., Мандрик С. А., Струмилло С. К., Машок С. К. // Биохимия. – 1979. – 44, № 5. – С. 868–875.
4. Brin M. // J. Amer. J. Clin. Nutr. – 1980. – 33, N 2. – P. 169–171.

5. Катаева И. А., Финогенова Т. В. // Пробл. совр. биохимии и биотехнологии / Тез. докл. 8 Объед. симп. биохим. обществ СССР-ГДР. – Рига, 1985. – С. 232.
6. Филиппов П. П., Тихомирова Н. К. // Проблемы современной биохимии и биотехнологии / Тез. докл. 8 Объед. симп. биохим. обществ СССР-ГДР. – Рига, 1985. – С. 144–145.
7. Пустынников М. Г., Кочетов Г. А. // ВМУ. Биология. – 1983. – **16**, № 3. – С. 56–60.
8. Mitschke L., Parthier C., Schroder-Tittmann K. et al. // J. Biol. Chem. – 2010. – **285**, N 41. – P. 31559–31570.
9. Кочетов Г. А., Минин А. А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: ВШ, 1980. – С. 90–92.
10. Кочетов Г. А., Минин А. А. // Биохимия. – 1978. – **43**, вып. 9. – С. 1631–1635.
11. Egan R. M., Sable Y. Z. // J. Biol. Chem. – 1981. – **256**, N 10. – P. 4877–4883.
12. Горбач З. В., Кубышин В. Л., Маглыш С. С., Забродская С. В. // Биохимия. – 1986. – **51**, вып. 7. – С. 1093–1099.
13. Zhao J., Zhong C. J. // Neurosci. Bull. – 2009. – **25**, N 2. – P. 94–99.
14. Kochetov G. A., Sevostyanova I. A. // UBMB Life. – 2010. – **62**, N 11. – P. 797–802.
15. Yurshev V. A., Sevostyanova I. A., Solovjeva O. N. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2007. – **361**, N 4. – P. 1044–1047.
16. Esakova O. A., Meshalkina L. E., Golbik R. et al. // IUBMB Life. – 2007. – **59**, N 2. – P. 104–109.
17. Kovina M. V., Selivanov V. A., Kochevova N. V., Kochetov G. A. // FEBS Lett. – 1997. – **418**, N 1–2. – P. 11–14.
18. Booth C., Nixon P. // Eur. J. Biochem. – 1993. – **218**, N 1. – P. 261–265.
19. Кубышин В. Л., Горбач З. В. // Укр. биохим. журн. – 1985. – **57**, №2. – С. 37–41.
20. Островский Ю. М., Горбач З. В., Маглыш С. С., Кубышин В. Л. // Докл. АН БССР. – 1983. – № 4. – С. 375–377.
21. Горбач З. В., Маглыш С. С., Забродская С. В. // Укр. биохим. журн. – 1981. – **53**, № 6. – С. 69–73.

Получено 01.11.2011