

А. Ф. МАКАРЧИКОВ<sup>1</sup>, Л. БЕТТЕНДОРФФ<sup>2</sup>РАСПРОСТРАНЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОЙ ТИАМИНТРИФОСФАТАЗЫ  
В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ<sup>1</sup>Институт биохимии НАН Беларуси, Гродно<sup>2</sup>Центр клеточной и молекулярной нейробиологии Льежского университета, Льеж, Бельгия

Первые свидетельства того, что в биологических объектах наряду с тиаминном, его моно (ТМФ)- и дифосфорным (ТДФ) эфирами присутствует тиаминтрифосфат (ТТФ) относятся к 1952 г., когда Rossi-Fanelli с соавт. [25] с помощью бумажной хроматографии выделили это соединение из экстракта печени крысы. В течение нескольких последующих лет, несмотря на значительные трудности, обусловленные как невысоким уровнем развития инструментальной техники, так и крайне низкими концентрациями в большинстве биологических источников, ТТФ был обнаружен в других организмах [15, 24, 27]. Этому обстоятельству, по сути означавшему, что биосинтез ТТФ осуществляется клетками разных типов, длительное время не уделялось должного внимания, поскольку практически все усилия были направлены на исследование возбудимых тканей, исходя из господствовавшей идеи о нейроспецифичной некоферментной функции тиамина [12] — гипотезы, которая в итоге оказалась малопродуктивной и не получила развития. По прошествии 50 лет роль ТТФ все еще не ясна [9]. Теперь уже не вызывает сомнений факт, подтвержденный современными методами анализа, что ТТФ широко распространен в живой природе и, вероятно, является универсальным компонентом клеток различных организмов — от бактерий до млекопитающих [7, 13, 21]. Это позволяет совершенно по-иному оценить его возможную биологическую функцию — с позиций фундаментальной роли для жизнедеятельности клетки как элементарной единицы живой материи.

Большое значение для понимания функции ТТФ принадлежит исследованию молекулярно-кинетических и регуляторных свойств ферментативных систем, которые участвуют в его метаболизме в различных тканях; немаловажную роль играет также выяснение специфических особенностей и распространения этих ферментов у разных видов организмов. В тканях животных обнаружены два типа тиаминтрифосфатазной активности — мембранно-связанная и растворимая [6, 14]. Мембранная ТТФаза является относительно малоисследованным белком и, вероятнее всего, представляет собой разнородную группу неспецифичных ферментов, которые встречаются в разных типах клеток и обладают способностью катализировать гидролиз ТТФ при слабощелочных или нейтральных значениях pH [6, 7, 19]. Растворимая ТТФаза (КФ 3.6.1.28) — специфичный  $Mg^{2+}$ -зависимый белок с высоким сродством к субстрату и максимальной активностью в щелочной области pH [17]. Данные дот-блот анализа наряду с результатами, полученными биохимическими методами, свидетельствуют о широкой экспрессии фермента в органах и тканях человека и быка [3, 16]. В настоящей работе нами экспериментально исследовалось распространение растворимой ТТФазы у других видов млекопитающих, а также у организмов, относящихся к иным классам царства животных, таким как рыбы и птицы. Здесь же представлен теоретический анализ, проведенный с помощью баз данных Национального центра биотехнологической информации США ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

**Материалы и методы.** В работе использованы сепадекс G-75, белки-стандарты "Pharmacia"; тетрагидрофуран, диэтиловый эфир "Vel"; трихлоруксусная кислота (ТХУ), бис-трис-пропан, бычий сывороточный альбумин (БСА) "Sigma"; остальные реагенты фирмы "Merck".

Объектами исследования служили органы и ткани лабораторной мыши (*Mus musculus*), крысы (*Rattus norvegicus*), свиньи (*Sus scrofa*), цыпленка (*Gallus gallus*), перепелки (*Coturnix coturnix japonica*) и радужной форели (*Salmo iridens*).

Для приготовления экстрактов ткани разрушали 10 циклами в механическом гомогенизаторе с тefлоновым пестиком в 3—10 кратном объеме 50 мМ трис-HCl буфера, pH 7.5, содержащего 0.15 М KCl, 0.2 мМ ЭДТА, и центрифугировали 30 мин при 15 000 g.

Стандартная инкубационная смесь для определения ТТФазной активности состояла из 50 мМ бис-трис-пропанового буфера, pH 8.9, 5 мМ  $MgCl_2$ , 10 мкг БСА, 0.1 мМ ТТФ и образца белка в общем объеме 0.1 мл. Реакцию проводили в течение 10-60 мин при 37° С, останавливали добавлением 0.5 мл 12% ТХУ и центрифугировали 5 мин при 15 000 g. ТХУ удаляли экстракцией диэтиловым эфиром, образец окисляли,

добавляя к 80 мкл 50 мкл 4,3 мМ феррицианида калия в 15%-ном NaOH, и разделяли тиохромные производные методом ион-парной обращенно-фазной ВЭЖХ на хроматографе System 522 (Kontron Instruments) при скорости потока 0.5 мл · мин<sup>-1</sup> на аналитической колонке PRP-1 (Ø4.1 × 150 мм, поли(стирол-дивинилбензол), размер частиц 5 мкм; Hamilton Co, Reno, Nevada) с протекторным колоночным картриджем (Ø2.3 × 25 мм) [8]. Для детекции использовали флуоресцентный спектрометр LS-4 (Perkin-Elmer) с объемом проточной ячейки 3 мкл; длина волны возбуждения — 365 нм, эмиссии — 433 нм. Компьютерную обработку данных осуществляли при помощи программного обеспечения KromaSystem 2000 (Kontron Instruments).

Активности нуклеозидтрифосфатазы (КФ 3.6.1.15) и щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) регистрировали по количеству неорганического фосфата. Стандартная реакционная смесь объемом 0.1 мл содержала 50 мМ Бис-Трис-Пропан, рН 8.9, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мкг БСА, образец белка и 0.5 мМ АТФ или 1 мМ п-НФФ.

Реакцию проводили 30-120 мин при 37°C, добавляли 1 мл реагента [26], смесь инкубировали 25 мин при 37°C, охлаждали и спектрофотометрировали при 318 нм. Калибровочную кривую строили с использованием KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>.

При проведении кинетических исследований состав стандартных инкубационных смесей для определения ферментативных активностей видоизменялся в отношении переменного параметра кинетического эксперимента (начальная концентрация ТТФ, рН).

Молекулярную массу определяли методом гель-хроматографии в 20 мМ Трис-НСl буфере, содержащем 0.1 М NaCl, на колонке с сефадексом G-75 (Ø2.5 × 36 см) при скорости потока 8 см · ч<sup>-1</sup>. Для построения калибровочного графика в координатах  $\lg V_0/V_s$  —  $\lg M_r$  использовались белки-стандарты: РНКаза (13.7 кДа), α-химотрипсिनоген (25.7 кДа), овалбумин (45 кДа) и БСА (67.5 кДа).

Концентрацию белка измеряли по поглощению при 280 нм.

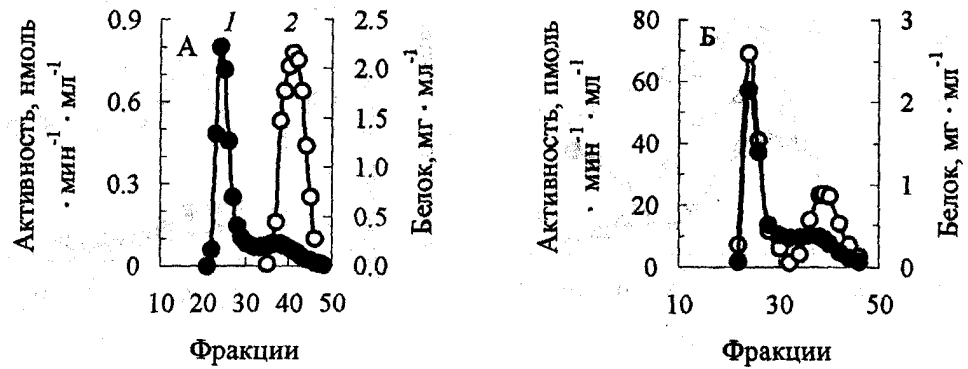
**Результаты и обсуждение.** В таблице приведены результаты определения ТТФазной активности в органах и тканях нескольких видов животных и на двух стадиях эмбрионального развития крысы. Как видно из таблицы, гидролиз ТТФ обнаруживался во всех исследованных образцах, однако скорость реакции значительно варьировала, что, вероятно, может быть обусловлено тканевыми и межвидовыми различиями в содержании фермента. С другой стороны, необходимо отметить, что здесь речь идет об общей ТТФазной активности экстракта, суммарный вклад в которую могут вносить несколько ферментов. Так, растворимая ТТФаза является единственным ферментом гидролиза ТТФ (в заданных условиях эксперимента) в цитозольной фракции почек быка [18]. В то же время известно, что ТТФазной активностью обладает ряд других, менее специфичных белков — щелочная и кислая (КФ 3.1.3.2) фосфатазы, АТФаза миозина (КФ 3.6.1.32), НТФаза, апираза (КФ 3.6.1.5) [1, 20, 22, 23]. Поэтому для выяснения вопроса о распространении ТТФазы у разных видов организмов мы провели системное исследование, включавшее в себя определение характерных свойств белков с ТТФазной активностью в тканях животных и анализ электронных баз данных GeneBank, в которых содержится информация об известных аминокислотных и нуклеотидных последовательностях.

Растворимая ТТФаза была впервые описана в работе Hashitani & Cooper [14], которые частично очистили фермент из мозга крысы. Препарат ТТФазы проявлял максимальную активность при щелочных рН и обладал высокой специфично-

#### ТТФазная активность в тканях животных

| Исследуемый объект              | Активность, нмоль мин <sup>-1</sup> г <sup>-1</sup> ткани |
|---------------------------------|---|
| <b>Мышь</b>                     |   |
| печень                          | 868 ± 55  |
| почки                           | 513 ± 39  |
| матка                           | 406 ± 5   |
| сердце                          | 352 ± 7   |
| мышца (GPS-комплекс)            | 284 ± 41  |
| головной мозг (полушария)       | 282 ± 14  |
| желудок                         | 260 ± 23  |
| кишечник (duodenum)             | 221 ± 60  |
| селезенка                       | 208 ± 3   |
| щитовидная железа               | 186 ± 33  |
| семенники                       | 182 ± 10  |
| мозжечок                        | 179 ± 12  |
| лимфатические узлы              | 178 ± 21  |
| поджелудочная железа            | 142 ± 33  |
| легкие                          | 101 ± 5   |
| <b>Свинья</b>                   |   |
| почки                           | 16 ± 1  |
| мышца (l. dorsum)               | 13 ± 1  |
| <b>Цыпленок</b>                 |   |
| мышца (pectoralis)              | 932 ± 1   |
| головной мозг                   | 11 ± 2  |
| <b>Крыса</b>                    |   |
| головной мозг                   | 437 ± 10  |
| печень                          | 299 ± 4   |
| почки                           | 189 ± 2   |
| селезенка                       | 82 ± 1  |
| семенники                       | 42 ± 2  |
| лимфатические узлы              | 17 ± 1  |
| эмбрион 10 дней                 | 72 ± 3  |
| эмбрион 15 дней (головной мозг) | 253 ± 3   |
| эмбрион 15 дней (печень)        | 128 ± 5   |
| <b>Перепелка</b>                |   |
| печень                          | 2.4   |
| почки                           | 0.8   |
| головной мозг                   | 0.6   |
| сердце                          | 0.6   |
| мышца (pectoralis)              | 0.3   |
| <b>Радужная форель</b>          |   |
| головной мозг                   | 0.52 ± 0.05   |
| осевая мышца                    | 0.29 ± 0.01   |

Рис. 1. Гель-фильтрация экстрактов из печени крысы (А) и почек свиньи (Б) на колонке с сефадексом G-75: 1 — концентрация белка; 2 — ТТФазная активность



стью (среди тиаминфосфатов), но низким кажущимся сродством к субстрату ( $K_m = 1.2$  мМ). Penttinen & Uotila [23] продемонстрировали, что в различных органах крысы, за исключением кишечника, электрофоретическая подвижность белка с ТТФазной активностью находится в пределах 0.79–0.84. При гель-хроматографии экстрактов из мозга и печени выявлялись пики активности, соответствовавшие низкомолекулярному белку с массой 30 кДа;  $K_m$  ТТФазы печени составляла 0.5 мМ, рН-оптимум — 9.0. Таким образом, было сделано заключение о том, что ТТФаза не является белком, специфичным для нервной ткани. Оценивая результаты данных работ, нельзя не отметить один их общий недостаток — определение активности ТТФазы по количеству образующегося в реакции неорганического фосфата. Эти методы не отличались высоким пределом обнаружения и чувствительностью и, как следствие, требовали использования высоких концентраций субстрата. Так, Hashitani & Cooper [14] определяли  $K_m$  фермента мозга крысы при концентрациях ТТФ 0.2—8 мМ, что, видимо, гораздо выше истинного значения  $K_m$  (для сравнения  $K_m$  фермента из мозга быка составляет 43 мкМ [17]), тогда как для наиболее точных измерений необходимо варьировать концентрации субстрата в области 0.5—2  $K_m$  [2]. В связи с этим важно отметить, что при высоких концентрациях ТТФ на скорость реакции могли оказывать влияние примесные неспецифичные фосфатазы. Возможно, именно по этой причине, полученные значения  $K_m$  для ТТФаз из мозга и печени крысы более чем в 10 раз превышают  $K_m$  фермента из тканей быка. Для выяснения того, с чем связаны такие существенные различия, обусловлены ли они видовыми особенностями или иными обстоятельствами, нами исследована кинетика гидролиза ТТФ ферментами из печени и мозга крысы, а также почек свиньи при низких концентрациях субстрата. Эксперименты проводились с использованием частично очищенных на колонке с сефадексом G-75 препаратов и ВЭЖХ для регистрации убыли ТТФ и образования ТДФ в ходе реакции.

Как показано на рис. 1, ТТФаза печени крысы элюировалась симметричным низкомолекулярным пиком, тогда как в случае почек свиньи активность разделялась на два пика, один из которых выходил из колонки в свободном объеме ( $m > 100$  кДа), а другой — в области белка с  $m > 33.8$  кДа. В свободном объеме колонки обнаруживались также АТФазная и п-НФФазная активности, причем скорость гидролиза п-НФФ и АТФ в 150–200 раз превышала скорость ТТФазной реакции. Можно полагать, что ТТФазная активность этой фракции обусловлена действием неспецифичной фосфатазы, поскольку на самом деле имеет место каскадный гидролиз ТТФ до тиаминина, в отличие от реакции, катализируемой низкомолекулярным белком, когда на ВЭЖХ-хроматограммах наблюдалось образование только пиков ТДФ (не показано). Здесь следует также сказать, что для хроматографии нами использовалась не чистая цитозольная фракция, а экстракты, содержащие мелкие фрагменты мембран. Поэтому возможно, что высокомолекулярный фермент с ТТФазной активностью даже не является растворимым белком, а представляет собой мембранно-связанную фосфатазу: общеизвестен факт о высокой активности щелочной фосфатазы в почках млекопитающих. Впрочем, какова бы ни была природа этого высокомолекулярного белка, для нас представляется важным, что в почках свиньи присутствует специфичная растворимая ТТФаза, хотя экспрессия фермента, вероятно, гораздо ниже по сравнению с большинством тканей крысы и мыши, о чем можно судить по данным таблицы.  $K_m$  ТТФазы почек свиньи составляла 49.5 мкМ (данные не показаны), что соответствует значениям, полученным для фермента из органов быка [3]. Константы Михаэлиса ТТФазы мозга и печени крысы, рассчитанные графическим методом по уравнениям линейной регрессии в координатах Хейнса, были несколько ниже:  $16.0 \pm 0.7$  и  $27.0 \pm 0.08$  мкМ соответственно ( $n = 3$ , данные не показаны). Таким образом, белок из тканей крысы характеризуется значительно более высоким кажущимся сродством к

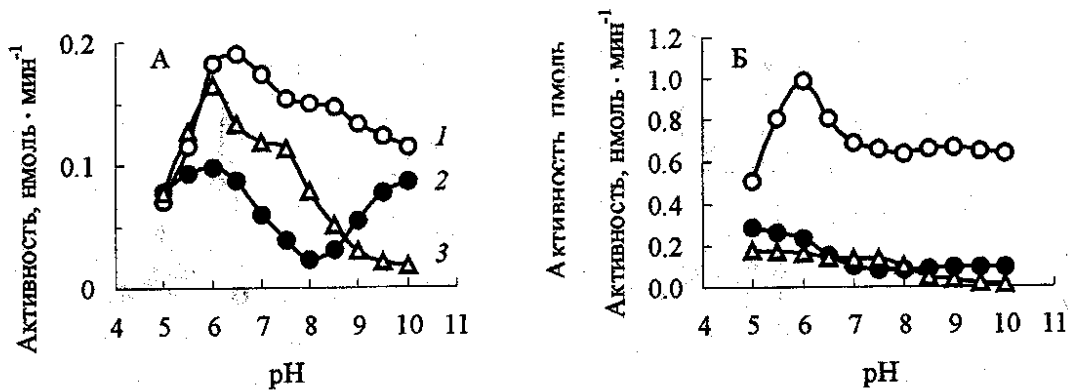


Рис. 2. pH-зависимости фосфатазных активностей во фракциях свободного объема при хроматографии экстрактов из мозга перепелки (А) и радужной форели (Б) на колонке с сефадексом G-75: 1 АТФаза; 2 п-нитрофенилфосфатаза; 3 ТТФаза  $\times 100$

субстрату, чем следует из ранее опубликованных работ [14, 23]. Молекулярная масса фермента по результатам гель-фильтрации равна  $31.0 \pm 1.3$  кДа ( $n = 2$ ).

Исследования свойств ТТФазной активности в зародышах крысы свидетельствуют о том, что экспрессия специфичной ТТФазы осуществляется уже на самых ранних стадиях эмбрионального развития, когда невооруженным глазом еще невозможно обнаружить признаков дифференцировки органов. Как и у взрослых особей, фермент 10-дневного эмбриона имеет молекулярную массу 31.1 кДа, оптимум активности при pH 8.9 и проявляет высокое кажущееся сродство к субстрату ( $K_m = 21.4 \pm 1.3$  мкМ,  $n = 3$ ).  $K_m$  ТТФазы мозга и печени 15-дневного эмбриона были соответственно равны  $20.1 \pm 2.6$  и  $25.3 \pm 1.6$  мкМ ( $n = 3$ , данные не показаны).

Анализ базы данных EST (Expressed sequence tags) [10] позволил воссоздать нуклеотидную последовательность открытой рамки считывания (ОРС) кДНК ТТФазы мыши. EST представляют собой короткие, обычно длиной до 300–500 нуклеотидов, сегменты, секвенированные из библиотек кДНК. Как правило, EST генерируются в больших масштабах [4] и в настоящее время их количество в базе данных насчитывает более 15 млн., в т. ч. более 3 млн. — мыши (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>). С помощью алгоритма BLAST [5] нами выявлено 59 статистически значимых соответствий EST мыши с нуклеотидной последовательностью ОРС кДНК ТТФазы человека [16]. Мы провели трехрамочную трансляцию наиболее длинных фрагментов и по перекрывающимся участкам восстановили полную аминокислотную последовательность ТТФазы мыши, которая представлена на схеме. Для этой цели были использованы 9 EST (B1414782, BF134107, A1425356, AA265178, B1082095, BE380403, BG973809, B1664287, B1658626).  $K_m$  фермента почек и головного мозга мыши составляют соответственно  $20.6 \pm 0.4$  и  $22.7 \pm 0.2$  мкМ (данные не показаны).

Представленные результаты позволяют сделать заключение о том, что специфичная растворимая ТТФаза широко распространена в клетках млекопитающих. Небольшие вариации свойств фермента из разных источников, вероятно, связаны с особенностями, присущими метаболизму тех или иных типов тканей и, как следствие, функциональной адаптацией фермента к соответствующим условиям, а также являются проявлением межвидовых различий.

Очень низкая ТТФазная активность наблюдалась в экстрактах тканей перепелки и форели (таблица). Так, например, скорость гидролиза ТТФ в головном мозге этих видов более чем в 600 раз ниже по сравнению с мозгом крысы. Следует, однако, отметить, что в данных экспериментах мы использовали 10 мкМ концентрацию субстрата, чтобы исключить возможное влияние на скорость реакции неспецифичных ферментов с низким сродством к ТТФ. При гель-фильтрации экстрактов из мозга форели и перепелки в обоих случаях ТТФазная, АТФазная и п-НФФазная активности обнаруживались во фракциях

С х е м а. Аминокислотная последовательность, кодируемая ОРС к ДНК ТТФазы мыши

```

1  MAQGLIEVERKFAPGPDTEERLQELGATLEHRVTFRDYYDTSELSLMLS
51  DHWLRQREGSGWELKCPGVTGVSGPHNEYVEVTSEAAIVAQLFELLGSGE
101 QKPAGVAAVLGSLKLQEVASFITRSSWKLALSGAHGQEPQLTIDLDSAD
151 FGYAVGVEEAMVNEKAIEVPAALEKIITVSSMLGVPAQEBAKLMVYLQR
201 FRPLDYQRLLEAASSGEATGDSAS

```

свободного объема колонки. Исследование рН-зависимостей показало, что эти фракции содержат сложные смеси нескольких фосфатаз. Судя по форме рН-профилей, представленных на рис. 2, можно предположить, что в экстрактах из мозга присутствуют, по крайней мере, по два различных высокомолекулярных ( $m > 100$  кДа) фермента, осуществляющих дефосфорилирование АТФ и п-НФФ. Один из рН-оптимумов ТТФазы в мозге перепелки совпадал с максимумом п-НФФазной активности при рН 6.0, другой фермент гидролиза ТТФ проявлял максимальную активность при рН 7.5. Этот белок, вероятно, присутствует также в мозге форели, как и фосфатаза с более кислым рН-оптимумом. Выше уже отмечалось, что фракции свободного объема содержали фрагменты мембран вследствие недостаточно эффективных условий центрифугирования, которые были использованы для отделения осадков, поскольку цель работы состояла в исследовании низкомолекулярной растворимой ТТФазы. По этой причине мы полагаем, что активность с рН-оптимумом 7.5 может принадлежать мембран-ассоциированной ТТФазе, выявленной Barchi & Braun [6], которые также наблюдали различия в рН-оптимумах между ТТФазной и АТФазной реакциями, катализируемыми микросомальной фракцией из головного мозга крысы.

По крайней мере активность одной из двух ТТФаз мозга перепелки ингибировалась ионами  $Mg^{2+}$ . Замораживание-оттаивание исследуемой фракции приводило к агрегации части материала и значительной потере активности.  $K_m$  фермента, оставшегося в осветленном центрифугированием супернатанте, при рН 6.5 и в отсутствие ионов  $Mg^{2+}$  составляла 11 мкМ (данные не показаны).

При гель-хроматографии экстракта из мышцы цыпленка ТТФазная активность не выявлялась ни в одной из фракций по всему профилю элюции — от свободного до общего объема колонки. В верхнем слое носителя при этом формировался слой белкового осадка, что, на наш взгляд, может объясняться преципитацией миозина, поскольку хорошо известно, что миозин растворим при относительно высоких концентрациях соли, но образует высокомолекулярные нерастворимые агрегаты в результате разбавления раствора [11]. Как уже упоминалось, миозин обладает способностью катализировать гидролиз ТТФ [20]. Исходя из этого, можно полагать, что ТТФазная активность экстракта мышцы цыпленка обусловлена действием АТФазы миозина.

В данной работе нами показано, что специфичная растворимая ТТФаза широко распространена в тканях млекопитающих, но отсутствует у представителей таких классов животных, как рыбы и птицы. В настоящее время полностью секвенированы геномы нескольких одноклеточных и многоклеточных эукариотических организмов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, водоросли *Guillardia theta*, плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, нематоды *Caenorhabditis elegans* и растения *Arabidopsis thaliana*, а также 103 видов бактерий. Поиск нуклеотидных последовательностей, гомологичных к ДНК ТТФазы, в базах данных GeneBank не принес положительных результатов: геномы указанных видов не несут информацию о первичной структуре фермента. Таким образом, на основании проведенных исследований можно говорить об особенностях систем метаболизма ТТФ у разных групп живых организмов. Специфичная ТТФаза, вероятно, является эволюционно молодым ферментом, который появился у первых млекопитающих как более тонкий и чувствительный механизм регуляции внутриклеточных концентраций ТТФ в ответ на изменения физиологических условий, тогда как в клетках других классов организмов гидролиз ТТФ, по-видимому, осуществляется неспецифичными фосфатазами.

### Литература

1. Гуляй И. Э., Макавичков А. Ф. // Вестн НАН Беларуси. Сер. биол. наук. 2002. № 4. С. 78—81.
2. Крупянко В. И. Векторный метод представления ферментативных реакций. М., 1990. С. 9—26.
3. Макавичков А. Ф., Гуляй И. Э., Русина И. М., Лучко Т. А. // Биологически активные соединения в регуляции метаболического гомеостаза: Материалы Междунар. науч. конф. Гродно, 2000. Ч. II. С. 17—21.
4. Adams M. D., Kelley J. M., Gocayne J. D., Dubnick M., Polymeropoulos M. H., Xiao H., Merril C. R., Wu A., Olde B., Moreno R. F., Kerlavage A. R., McComb W. R., Venter J. C. // Science. 1991. Vol. 252. P. 1651—1656.
5. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 215. P. 403—410.
6. Barchi R. L., Braun P. E. // J. Biol. Chem. 1972. Vol. 247. P. 7668—7673.
7. Bettendorff L., Michel-Cahay C., Grandfils C., De Rycker C., Schoffeniels E. // J. Neurochem. 1987. Vol. 49. P. 495—502.
8. Bettendorff L., Peeters M., Jouan C., Wins P., Schoffeniels E. // Anal. Biochem. 1991. Vol. 198. P. 52—59.
9. Bettendorff L., Wins P. // Recent Res. Devel. Neurochem. 1999. Vol. 2. P. 37—62.
10. Boguski M. S., Lowe T. M., Tolstoshev C. M. // Nat. Genet. 1993. Vol. 4. P. 332—333.
11. Citi S., Kendrick-Jones J. // Bioessays. 1987. Vol. 7. P. 155—159.
12. Cooper J. R., Pincus J. H. // Neurochem. Res. 1979. Vol. 4. P. 223—239.

13. Egi Y., Koyama S., Shikata H., Yamada K., Kawasaki T. // *Biochem. Int.* 1986. Vol. 12. P. 385—390.
14. Hashitani Y., Cooper J. R. // *J. Biol. Chem.* 1972. Vol. 247. P. 2117—2119.
15. Kissling K.-H. // *Nature.* 1953. Vol. 172. P. 1187—1188.
16. Lakaye B., Makarchikov A. F., Fernandes Antunes A., Zorzi W., Coumans B., De Pauw E., Wins P., Grisar T., Bettendorff L. // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P.13771—13777.
17. Makarchikov A. F., Chernikevich I. P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. Vol. 1117. P. 326—332.
18. Makarchikov A. F., Chernikevich I. P. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1998. Vol. 46. P. 115—123.
19. Matsuda T., Tonomura H., Baba A., Iwata H. // *Int. J. Biochem.* 1991. Vol. 23. P. 1111—1114.
20. Murai A., Katsura E. // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1975. Vol. 21. P. 169—183.
21. Nishimune T., Hayashi R. // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1987. Vol. 33. P. 113—127.
22. Nishimune T., Ito S., Abe M., Kimoto M., Hayashi R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1987. Vol. 923. P. 74—82.
23. Penttinen H. K., Uotia L. // *Med. Biol.* 1981. Vol. 59. P. 177—184.
24. Rossi-Fanelli A., Ipata P. L., Fasella P. // *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 1961. Vol. 4. P. 23—27.
25. Rossi-Fanelli A., Siliprandi N., Fasella P. // *Science.* 1952. Vol. 116. P. 711—713.
26. Sapry M. K., Geetha H., Shetty T. K. // *Ind. J. Biochem. Biophys.* 1987. Vol. 24. P. 340—343.
27. Yusa T. // *Plant Cell Physiol.* 1961. Vol. 2. P. 471—474.

A. F. MAKARCHIKOV<sup>1</sup>, L. BETTENDORFF<sup>2</sup>

### DISTRIBUTION OF SPECIFIC THIAMINE TRIPHOSPHATASE IN BIOLOGICAL OBJECTS

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences, Grodno, Belarus*

<sup>2</sup>*Liege University, Belgium*

#### Summary

The occurrence of specific soluble thiamine triphosphatase (ThTPase, EC 3.6.1.28) was studied in several species including mouse (*Mus musculus*), rat (*Rattus norvegicus*), pig (*Sus scrofa*), chicken (*Gallus gallus*), quail (*Coturnix coturnix japonica*) and trout (*Salmo irideu*). The enzyme was revealed to be distributed widely in mammalian tissues but not in the fish and birds. In addition, the BLAST search using human ThTPase cDNA open reading frame indicates that ThTPase is not coded by any of fully sequenced non-mammalian eucaryotic genomes (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Guillardia theta*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*) as well as the genomes of 103 bacterial species. The results show the peculiarities in ThTP metabolizing systems within the living cells. The soluble enzyme seems to be an attribute of mammals whereas in different of organisms some non-specific phosphatases apparently fulfil the hydrolysis of ThTP.