

УДК 577.152.3

А. Ф. МАКАРЧИКОВ<sup>1</sup>, Т. А. ЛУЧКО<sup>1</sup>, Л. БЕТТЕНДОРФФ<sup>2</sup>, Б. ЛАКАЕ<sup>2</sup>, П. ВИНС<sup>2</sup>**ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ИОНОГЕННЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ  
В КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТИАМИНТРИФОСФАТАЗЫ ИЗ ПОЧЕК БЫКА  
МЕТОДОМ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ**<sup>1</sup>Институт биохимии НАН Беларуси, Гродно<sup>2</sup>University of Liege, Belgium*(Поступила в редакцию 18.01.2002. Принята после рецензирования 17.04.2002)*

Тиаминтрифосфатаза (ТТФаза, КФ 3.6.1.28) — специфичный  $Mg^{2+}$ -зависимый белок — катализирует гидролиз ТТФ в тканях млекопитающих [1, 2]. Впервые фермент был обнаружен в головном мозге крысы в 1972 г. [3], однако до настоящего времени его физиологическая функция остается неизвестной. В отличие от большинства представителей подкласса фосфогидролаз (КФ 3.6.), способных осуществлять гидролиз широкого ряда фосфатсодержащих соединений, то есть проявляющих групповую специфичность, ТТФаза характеризуется абсолютной специфичностью к субстрату [1]. Организация активного центра, обеспечивающая проявление указанного уникального свойства, и механизм катализируемой ферментом реакции не исследованы.

Наиболее надежные сведения о строении активных центров ферментов могут быть получены из данных рентгеноструктурного анализа. Выполненный с высоким разрешением расчет третичной структуры белка и построение молекулярных моделей позволяют не только наглядно представить архитектуру активного центра, но и имеют важное значение для воссоздания динамики взаимодействия фермента с субстратом и расшифровки механизма каталитического превращения [4]. Осуществить подобные исследования ТТФазы пока не представляется возможным в связи с трудностями получения достаточных для кристаллизации количеств чистого фермента. По оценке, основанной на удельной активности гомогенных препаратов [1, 2], в 1 г головного мозга и почек быка содержится 0.4–0.8 мкг ТТФазы. Практически это означает, что с учетом 3–4%-го выхода в процессе очистки, для выделения 1 мг чистого белка необходимо переработать 30–50 кг животной ткани. Решение указанной проблемы состоит в применении технологии рекомбинантных ДНК для сверхэкспрессии ТТФазы в клетках бактерий. Кроме того, методы молекулярной биологии позволяют осуществлять сайт-направленные точечные мутации и проследить их влияние на функциональную активность изучаемого фермента [5].

Распространенным методом исследования, не потерявшим своего значения и в наши дни, является химическая модификация белковых молекул специфичными к определенным аминокислотам реагентами [6]. Важная информация о строении активного центра может быть также получена методами стационарной кинетики, которые дают возможность определять такие характеристики, как константы ионизации свободного фермента или фермент-субстратного комплекса, и, исходя из рассчитанных  $pK$ , прогнозировать значение тех или иных аминокислотных остатков для каталитической активности [7].

Недавно было установлено, что открытая рамка считывания кДНК ТТФазы быка, человека и обезьяны кодирует полипептиды с молекулярными массами 24–25.6 кДа, состоящие соответственно из 219, 230 и 230 аминокислотных остатков [8]. Сравнение этих последовательностей с реконструированными из базы данных EST Национального центра биотехноло-

гической информации ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST)) аминокислотными последовательностями гомологичных белков мыши и крысы показывает, что первичная структура фермента названных видов животных включает несколько высококонсервативных участков, в состав которых входят инвариантные остатки лизина, аргинина, цистеина и гистидина. Цель настоящей работы заключалась в исследовании, основанном на кинетическом и химическом подходах, возможной роли указанных аминокислот для каталитической активности ТТФазы.

**Материалы и методы исследований.** В работе использованы пиридоксаль 5'-фосфат «Merck»; фенилглиоксаль, диэтилпирокарбонат «Sigma»; альбумин из сыворотки человека, алкогольдегидрогеназа (АДГ), *n*-хлоромеркуриобензоат (*n*ХМБ) «Reanal» (N-этилмалеимид «ICN»; тиаминдифосфат «Serva»; остальные реагенты — производства «Реахим». Синтез ТТФ и очистку ТТФазы осуществляли как описано ранее [2, 9].

Стандартная реакционная смесь для определения ТТФазной активности содержала 50 мМ Трис-НСl, рН 8.9, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мкг сывороточного альбумина, 25 мкМ ТТФ и 0.6 нг фермента в общем объеме 0.5 мл. Реакцию осуществляли 20 мин при 37 °С, останавливали добавлением 2 мл 0.5 М Na-фосфатного буфера, рН 6.8 и анализировали количество образующегося тиаминдифосфата в сопряженной системе АДГ-пируватдекарбоксилаза [10]. При исследовании рН-зависимостей использовали 25 мМ Трис-малеатный, рН 7.0, 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5—9.0, и 50 мМ глициновый, рН 9.5—10.5, буферы. Реакцию проводили при 25 °С в течение 20—60 мин.

Влияние модифицирующих агентов (пиридоксаль 5'-фосфата, фенилглиоксаля, *n*ХМБ и N-этилмалеимида на активность ТТФазы исследовали, инкубируя фермент с указанными соединениями в 25 мМ Трис-НСl буфере, рН 7.5 при 25 °С в течение 30 мин (20 мин для N-этилмалеимида) [14] и определяя затем активность в стандартной реакционной смеси. При модификации диэтилпирокарбонатом использовали 20 мМ Na-фосфатный буфер, рН 6.8, и время инкубации 20 мин [14]. Протекторное действие субстрата изучали, проводя модификацию в присутствии 0.1—0.2 мМ ТТФ и 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Концентрация ТТФазы во всех экспериментах составляла 15 нг · мл<sup>-1</sup>.

**Результаты и обсуждение.** Все ферменты содержат в составе активных центров ионогенные группы, участвующие в специфическом распознавании, связывании и каталитическом превращении субстрата. Анализ рН-зависимостей ферментативных реакций позволяет изучать число и свойства таких групп [7]. Ранее нами было показано, что ТТФаза проявляет максимальную активность в щелочной области рН, причем зависимость начальной скорости реакции от концентрации водородных ионов описывается колоколообразной кривой [1, 2]. В общем случае интерпретация подобного рН-профиля заключается в предположении о присутствии в активном центре двух ионогенных групп — кислой, действующей в процессе катализа как основание при рН > рK<sub>a</sub>, и основной, выполняющей роль общей кислоты при рН < рK<sub>b</sub> [11]. Численные значения констант диссоциации для обеих групп могут быть рассчитаны исходя из влияния рН на  $k_{кат}$  ( $V_{макс}$ ) реакции и на отношение  $k_{кат}/K_M$ ; при этом изменение величины  $k_{кат}$  отражает влияние рН на ионогенные группы фермент-субстратного комплекса, а  $k_{кат}/K_M$  — на свободную форму фермента [7]. Результаты выполненных нами исследований влияния рН на кинетические параметры ТТФазы представлены в таблице; графическое определение констант ионизации в полулогарифмических координатах показано на рис. 1.

Из рис. 1 видно, что для свободного фермента рK<sub>a</sub> = 7.5 и рK<sub>b</sub> = 9.5 (А), а для фермент-субстратного комплекса рK<sub>a</sub> = 7.5, рK<sub>b</sub> = 10.1 (Б). Следовательно, при взаимодействии фермента с субстратом не изменяются свойства кислотной группы, однако константа диссоциации основной группы снижается с 3.16 · 10<sup>-10</sup> М до 7.94 · 10<sup>-11</sup> М.

Влияние рН на кинетические параметры ТТФазы из почек быка

рН	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	10.5
$k_{кат}, c^{-1}$	15.71	29.85	40.54	48.64	49.37	44.23	35.5	20.3
$K_M (каж), мкМ$	14.0	12.1	13.2	14.0	17.0	27.1	37.6	51.9
$k_{кат}/K_M(каж), c^{-1} \cdot мкМ^{-1}$	1.12	2.47	3.07	3.80	2.90	1.63	0.94	0.39

**П р и м е ч а н и е.** Величину  $K_M (каж)$  рассчитывали по уравнениям линейной регрессии для графиков в координатах Хейнса [6]. Значения  $k_{кат}$  и  $k_{кат}/K_M(каж)$  находили после преобразования соответствующих выражений в линейную форму согласно методам, описанным в [7].

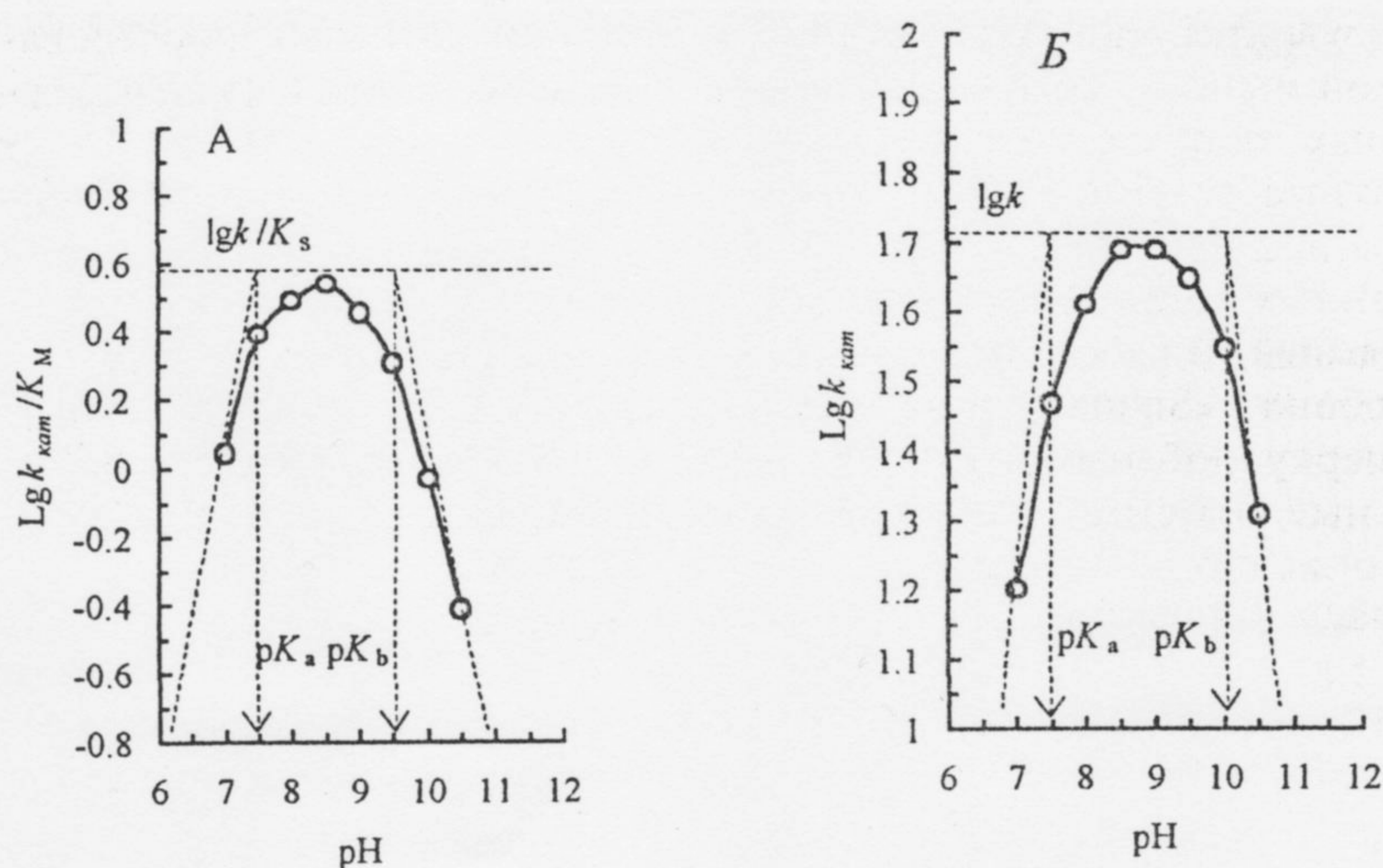


Рис. 1. Определение  $pK$  ионогенных групп ТТФазы: А — свободного фермента; Б — фермент-субстратного комплекса

Полученные значения  $pK$  находятся в области титрования ионогенных групп боковых цепей гистидина, цистеина, тирозина, лизина, аргинина и N-концевой аминогруппы, входящих в состав белковых молекул [6]. В оптимальных для осуществления ТТФазной реакции условиях имидазольная, сульфгидрильная и  $\alpha$ -аминогруппа преимущественно диссоциированы и поэтому могли бы выполнять роль акцептора протонов в общем кислотном катализе, тогда как гидроксильная, гуанидиновая и  $\epsilon$ -аминогруппа протонированы и находятся в форме общей кислоты. Учитывая ионную природу Mg-ТТФ комплекса, который является истинным субстратом ТТФазы и при  $pH > 7.0$  несет два отрицательных заряда на  $\gamma$ -фосфате, можно предположить, что в активном центре фермента присутствуют положительно заряженные аминокислотные остатки (лизин, аргинин), не принимающие непосредственного участия в катализе, но обеспечивающие связывание субстрата. Справедливость данного предположения подтверждается ингибиторным эффектом нуклеозидтрифосфатов, который кинетически проявляется как конкурентное ингибирование и свидетельствует о конкуренции субстрата и ингибитора за субстратсвязывающий участок активного центра [12]. Снижение активности ТТФазы при сильнощелочных  $pH$  (таблица), в таком случае, является результатом потери заряда субстратсвязывающей группой вследствие ее депротонирования, что ведет к ослаблению фермент-субстратного взаимодействия. Действительно, как видно из таблицы, значение  $K_{M(каж)}$ , в известной мере характеризующей сродство фермента к субстрату, практически не изменяется в области  $pH 7.0-9.0$ , но резко возрастает при  $pH > pK_b$ . Следовательно,  $pK_b$  может отражать ионизацию субстратсвязывающей группы активного центра ТТФазы. Тогда смещение  $pK$  этой группы на 0.6 ед. вправо при образовании фермент-субстратного комплекса (рис. 1) объясняется стабилизирующим эффектом отрицательного заряда атома кислорода  $\gamma$ -фосфата молекулы субстрата. Принимая во внимание изложенное, мы далее не рассматривали вероятность участия тирозина в каталитическом механизме ТТФазы. Результаты по клонированию кДНК ТТФазы человека позволяют также исключить из рассмотрения свободную  $\alpha$ -аминогруппу, поскольку экспрессированная в *E. coli* в составе конъюгата с глутатион S-трансферазой (GST fusion protein) рекомбинантная ТТФаза, несмотря на отсутствие свободной  $\alpha$ -аминогруппы, не только сохраняла каталитическую активность, но и проявляла незначительные изменения кинетических свойств [8]. Более того, секвенирование методом масс-спектрометрии N-концевого фрагмента ТТФазы из головного мозга телят выявило, что в условиях клетки фермент подвергается посттрансляционной модификации в результате ацетилирования  $\alpha$ -аминогруппы.

Следует отметить, что однозначная интерпретация  $pH$ -зависимостей ферментативных реакций не представляется возможной, поскольку микроокружение того или иного аминокислотного остатка, как правило, значительно влияет на величину соответствующей  $pK$ . Обычно эти изменения не превышают 2 ед., однако известны примеры, когда  $pK$  аминокислотных остатков в составе белка смещены более, чем на 3 ед. по сравнению со свободным состоянием в растворе. Так,  $pK$  глутамата—35 в активном центре лизоцима возрастает до 6.0, что связано с гидрофобным окружением [6], а  $pK$  остатка лизина ацетоацетатдекарбоксилазы снижается до 6.6 вследствие электростатических эффектов расположенных вблизи положительных зарядов [13].

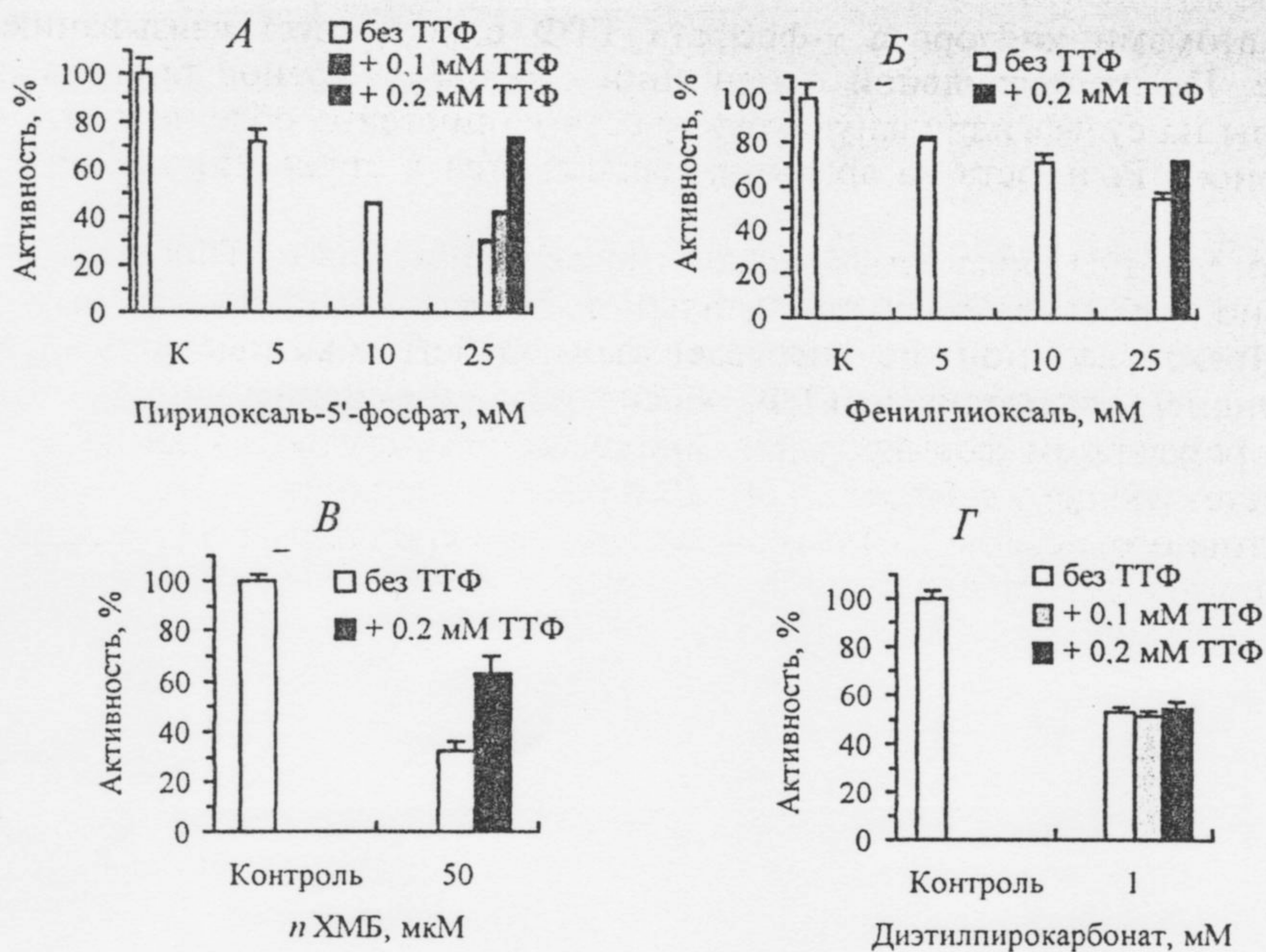


Рис. 2. Влияние химической модификации на активность ТТФазы. Каждое значение представляет собой среднее трех независимых экспериментов

Более надежный метод выявления существенных для активности аминокислотных остатков состоит в химической модификации фермента. Считается, что если активность фермента падает в результате реакции определенного аминокислотного остатка со специфическим реагентом, то с большой вероятностью рассматриваемый остаток является компонентом активного центра. Однако, также возможно, что модифицированный остаток не входит в состав активного центра, но имеет важное значение для стабилизации нативной конформации белка. Для разграничения двух указанных ситуаций обработку проводят в присутствии субстрата, который должен защищать от модификации аминокислотные остатки активного центра [6].

Выше обсуждалось, что анализ рН-зависимостей ТТФазной реакции свидетельствует о возможном участии в формировании структуры активного центра боковых групп лизина, аргинина, гистидина и цистеина. Широко используемыми соединениями для селективной химической модификации данных аминокислотных остатков являются пиридоксаль-5'-фосфат (образует основания Шиффа с остатками лизина), фенилглиоксаль (реагирует с гуанидиновыми группами аргинина), диэтилпирокарбонат и *n*ХМБ (модификаторы соответственно имидазольной и SH-групп) [14]. Мы исследовали влияние на активность ТТФазы названных веществ в отсутствие и в присутствии субстрата.

Как показано на рис 2, преинкубация с пиридоксаль-5'-фосфатом и фенилглиоксалем приводила к концентрационнозависимой инактивации ТТФазы. Аналогичным образом, диэтилпирокарбонат и *n*ХМБ, каждый из которых использовался при одной фиксированной концентрации, вызывали значительную потерю ферментативной активности. Полученные данные свидетельствуют о важной роли всех четырех аминокислотных остатков для каталитической активности ТТФазы. Присутствие Mg-ТТФ комплекса в среде инкубации оказывало протекторное действие при модификации пиридоксаль-5'-фосфатом, фенилглиоксалем и *n*ХМБ, о чем можно судить по достоверному возрастанию остаточной ТТФазной активности (рис. 2, А, Б, В), но не влияло на степень модификации фермента в случае диэтилпирокарбоната (рис. 2, Г). Известно, что *n*ХМБ обладает очень высоким сродством к SH-группам цистеина, но при определенных условиях способен реагировать и с некоторыми другими аминокислотными остатками. Более селективным соединением считается N-этилмалеимид, который обычно взаимодействует лишь с наиболее реакционноспособными SH-группами белков [14]. Преинкубация с 1 мМ N-этилмалеимидом снижала активность ТТФазы на  $26.4 \pm 0.5\%$ ; в присутствии 0.2 мМ субстрата остаточная активность возрастала до  $87.8 \pm 0.6\%$  (данные не показаны).

Таким образом, в соответствии с полученными результатами можно полагать, что гистидин не принимает непосредственного участия во взаимодействии с молекулой ТТФ, но имеет важное значение для стабилизации структуры фермента. Вероятно, что электростатическое притяжение, возникающее между положительно заряженными остатками лизина фермента и

отрицательно заряженными атомами кислорода  $\gamma$ -фосфата ТТФ способствует связыванию субстрата в активном центре. После правильной ориентации субстрата перенос протона с каталитической молекулы воды на сульфгидрильную группу остатка цистеина облегчает атаку атома фосфора гидроксил-ионом. Роль остатка аргинина заключается в стабилизации переходного состояния.

Очевидно, несмотря на то, что предполагаемый каталитический механизм ТТФазы в общих чертах удовлетворительно объясняет экспериментальные данные, описанная картина является далеко не полной. Прежде всего она не учитывает взаимодействие активного центра фермента с тиаминовым компонентом молекулы ТТФ, обеспечивающее специфичность, которая, как известно, является результатом формирования множественных слабых связей между молекулой фермента и соответствующего субстрата [14]. Для более детального исследования структурной организации активного центра ТТФазы и механизма катализируемой реакции необходимо использование других методических подходов, таких как рентгеноструктурный анализ и сайт-направленный мутагенез.

### Литература

1. Makarchikov A. F., Chernikevich I. P. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1992. Vol. 1117. P. 326—332.
2. Makarchikov A. F. // *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 2001. Vol. 5. P. 75—82.
3. Hashitani Y., Cooper J. R. // *J. Biol. Chem.* 1972. Vol. 247. P. 2117—2119.
4. Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. // *Биологическая химия*. М. 2000. С. 199—208.
5. Howe C. // *Gene Cloning and manipulation*. Cambridge University Press, 1995. P. 115—130.
6. Palmer T. // *Understanding enzymes*. Ellis Harwood Ltd., 1981. P. 126—128, 190—205.
7. Варфоломеев С. Д., Гуревич К. Г. // *Биокинетика: Практический курс*. М., 1999. С. 60—68, 191—196.
8. Lakaye B., Makarchikov A. F., Fernandes Antunes A., Zorzi W., Coumans B., De Pauw E., Wins P, Grisar T., Bettendorff L. // *JBC* (в печати).
9. Черникевич И. П., Гриценко Э. А., Лучко Т. А., Забродская С. В. // *Докл. АН БССР*. 1990. Т. 34. С. 274—278.
10. Черникевич И. П., Гриценко Э. А., Макариков А. Ф., Воскобоев А. И. // *Прикл. биохим. микробиол.* 1991. Т. 27. С. 762—771.
11. Garrett R. H., Grisham C. M. // *Biochemistry*. Saunders College Publishing, 1999. P. 525.
12. Макариков А. Ф. // *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* 2000. № 4. С. 91—93.
13. Nelson D. L., Cox M. M. // *Lehninger principles of biochemistry*. Worth Publishers, 2000. P. 253—255, 269.
14. Dawson R. M. C., Elliott D. C., Elliott W. H., Jones K. M. // *Data for biochemical research*. Clarendon Press, 1989. P. 134, 318, 322, 388, 394.

A. F. MAKARCHIKOV<sup>1</sup>, T. A. LUCHKO<sup>1</sup>, L. BETTENDORFF<sup>2</sup>, B. LAKAYE<sup>2</sup>, P. WINS<sup>2</sup>

STUDY OF ROLE OF IONOGENIC AMINO-ACID RESIDUES IN CATALYTIC ACTIVITY OF THIAMINE TRIPHOSPHATASE FROM BOVINE KIDNEY BY MEANS OF CHEMICAL MODIFICATION

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

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

### Summary

pH-analysis of  $k_{\text{cat}}$  and  $k_{\text{cat}}/K_m$  dependence showed the ionizable groups essential for bovine kidney ThTPase activity to possess pK 7.5 and 9.5 for free enzyme and pK 7.5 and 10.1 for enzyme-substrate complex. Chemical modification of ThTPase revealed the presence of essential lysine, arginine, cysteine, and histidine residues. The lysine residues may participate in substrate binding, cysteine is considered to take part in general base catalysis whereas arginine stabilizes the transition state. Histidine is not likely to be a constituent of ThTPase active site but has an important role for native conformation stabilization.