

УДК 577.164.11:577.112

Янчій О. Р., Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В.

ВИДІЛЕННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ТІАМІНЗВ'ЯЗУЮЧИХ БІЛКІВ З РІЗНИХ ТКАНИН ЩУРІВ, НАСИЧЕНИХ ТІАМІНОМ

За допомогою афінної хроматографії на тіамін-*N*-4-азобензойл- ϵ -амінокапроїлгідрозидоцефарази 4В і гель-фільтрації на сефадексі G-100 були виділені тіамінзв'язуючі білки (ТЗБ) із мозку, печінки та нирок щурів. Ізольовані ТЗБ із печінки та нирок так само, як описаний раніше ТЗБ із мозку щурів, були біфункціональними: поряд із здатністю специфічно зв'язувати тіамін вони проявляли здатність вибірково гідролізувати фосфорні ефіри вітаміну B_1 . ТЗБ, виділені з трьох тканин, відрізнялись один від одного як за молекулярною масою, так і за здатністю гідролізувати фосфорні ефіри тіаміну. Питома тіамінзв'язуюча активність зростала в ряду: ТЗБ мозку < ТЗБ печінки < ТЗБ нирок. Молекулярна маса ТЗБ, згідно з даними гель-фільтрації, для білка з мозку становила близько 100 кДа, печінки — 93 кДа, нирок — 90 кДа.

На сьогодні вдалося виділити й охарактеризувати цілий ряд білків, котрі специфічно зв'язують тіамін. Так, добре вивчені тіамінзв'язуючі білки мікроорганізмів [1, 2, 3]. Вважають, що їхня роль пов'язана з перенесенням вітаміну B_1 через біологічні мембрани. В достатній мірі досліджені та описані ТЗБ, виділені з білка курячого яйця [4, 5], насіння гречки [6], насіння сояшника [7], рисових висівок [8]. Відомості про ТЗБ з тканин ссавців нечисленні й обмежені. Так, був виділений і охарактеризований ТЗБ з синапсом мозку щурів [9, 10]. Наявність таких білків у гомогенатах кількох тканин щурів була показана Кімурою та Ітокавою [11], але білки не були ізольовані і досліджені. Є також відомості про ТЗБ з еритроцитів крові щурів [12].

Мета даної експериментальної роботи полягала у виділенні тіамінзв'язуючих білків з мозку, печінки і нирок щурів та проведенні їх порівняльного дослідження. Вивчення білків, котрі специфічно зв'язують тіамін, ми розглядаємо як один з можливих підходів до розуміння механізмів реалізації біохімічних функцій тіаміну в тканинах живих організмів.

Матеріали і методи

У роботі використовували білих щурів обох статей лінії Вістер, вагою 150—180 г. Тварин утримували на звичайному раціоні з додатковим введенням у корм тіаміну у розрахунку 40 мкг на одного щура за добу протягом двох тижнів.

Тіамінзв'язуючі білки з мозку, печінки і нирок виділяли за розробленим та описаним раніше методом [9], який включає декілька стадій: 1) одержання ацетонового порошку (грубу фракцію мітохондрій ресуспендували в 0,32 М сахарозі на 5 мМ трис-НСІ буфері, рН 7,4, обробляли 9 об'ємами ацетону при -20°C , після чого фільтрували на воронці Бюхнера і промивали мінімальним об'ємом холодного ефіру); 2) афінна хроматографія з використанням сорбенту тіамін-*N*-4-азобензойл- ϵ -амінокапроїлгідрозидоцефараза 4В, синтезованого за методом Кляшицького та інших [13] (екстракт з ацетонового порошку наносили на афінну колонку, після чого білки елюювали 10 мМ трис-НСІ буфером, рН 7,4, з додаванням 1 М NaCl, 2М та 4М сечовини); 3) гель-фільтрація на сефадексі G-100.

Від солей білки очищали за допомогою сефадексу G-25 та діалізу, після чого їх ліофілізували. Всі операції по виділенню ТЗБ проводили з додаванням у буфер інгібітора протеаз — фенілметилсульфонілфториду (0,5—1 мМ).

Тіамінзв'язуючу активність білків досліджували за допомогою радіолігандного методу [14]. Специфічне зв'язування [^{14}C] тіаміну з білком визначали по різниці між загальним зв'язуванням (інкубація лише з міченим тіаміном) і неспецифічним зв'язуванням (інкубація з міченим тіаміном у присутності 100-кратного надлишку неміченого). В досліджах використовували насичуючі концентрації [^{14}C] тіаміну (20—30 мкМ) при концентрації білка 5—10 мкг, рН 7,4. Радіоактивність вимірювали на рідинному сцинтиляційному лічильнику SL-20 "Intertechnique" (Франція). Питому активність виражали за кількістю нмоль тіаміну, зв'язаного 1 мкг білка.

Молекулярну масу білків визначали гель-фільтрацією на колонці (2,3 \times 45 см) з сефадексом G-100. Для побудови калібрувальної кривої

залежності логарифма молекулярної маси від об'єму виходу стандартних білків використовували такі білки: лактатдегідрогеназа м'язів кролика (140 кДа), гексокіназа дріжджів (96 кДа), альбумін сироватки людини (68 кДа), гемоглобін крові коня (64 кДа).

Активності тіамінтрифосфатази, тіаміндіфосфатази та тіамінмонофосфатази визначали по накопиченню неорганічного фосфору за допомогою методу з використанням барвника малахітового зеленого [15]. Відповідні активності виражали в мкмольх неорганічного фосфору, який відщеплюється за 30 хвилин у перерахунку на 1 мг білка. Тіамінтрифосфат був синтезований нами за методом Н. К. Penttinen [16].

Білок визначали за методом Бредфорда [17] та спектрофотометрично при 280 нм.

Статистичну обробку даних було проведено за допомогою стандартних комп'ютерних програм.

Результати й обговорення

За допомогою афінного сорбенту з мозку, печінки та нирок шурів одержані три білкові фракції (піки 1, 2, 3 на рис. 1). Здатність специфічно зв'язувати тіамін виявляли тільки білки першого піку, тому подальші дослідження проводили з цією білковою фракцією. Білки другого і третього піків зв'язували тіамін неспецифічно.

При дослідженні тіамінзв'язуючої активності (ТЗА) білків мозку, печінки та нирок, було встановлено, що для всіх цих білків вона суттєво відрізняється. Як видно з результатів, поданих на рис. 2, найбільша ТЗА характерна для білка, виділеного з нирок — 3,3 нмоль/мг, менша — у виділеного з печінки — 1,9 нмоль/мг, наймен-

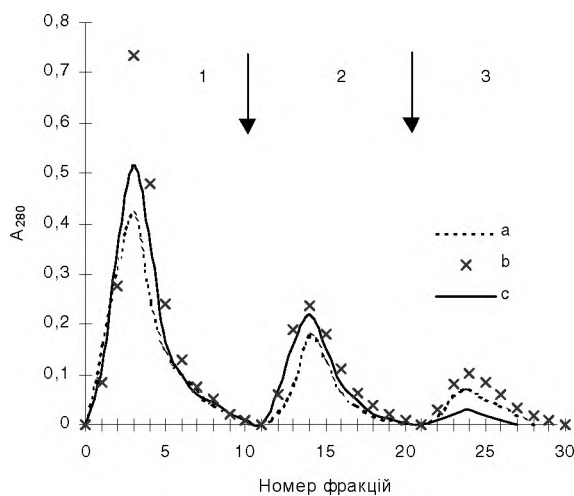


Рис. 1. Результати хроматографії на афінному сорбенті білкових екстрактів з мозку (а), печінки (б) та нирок (в) шурів. Умови: елюція ступеневим сольовим градієнтом на 10 мМ трис-НСІ буфері, рН 7,4, з додаванням: 1 — 1М NaCl; 2 — 2М сечовини; 3 — 4М сечовини

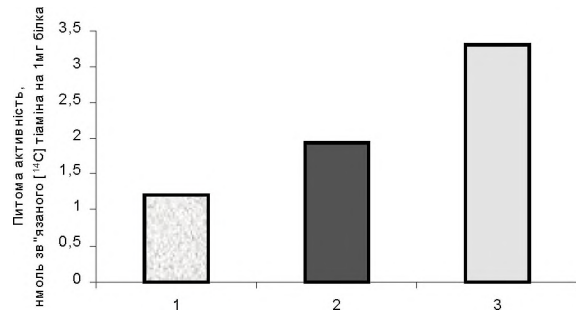


Рис. 2. Тіамінзв'язуюча активність ТЗА мозку (1), печінки (2) та нирок (3) шурів

ша — у білка з мозку — 1,2 нмоль/мг. Слід зазначити, що раніше для ТЗА, ізольованого в аналогічних умовах із мозку шурів, які утримувались на раціоні віварію, питома тіамінзв'язуюча активність складала близько 8,2 нмоль/мг білка. В даній серії досліджень шурам додатково до основного раціону вводили з кормом 40 мкг тіаміну на одного шура за добу з метою досягнути насичення організму вітаміном В₁. Приблизні розрахунки свідчать, що в цих умовах підвищується майже втричі вихід ТЗА, але питома активність у цих умовах значно знижується. Цей факт поки що пояснити важко.

Дослідження молекулярної маси виділених білків за методом гель-фільтрації показали, що білки з різних органів шурів дещо відрізняються за молекулярною масою (рис. 3). Так, білок з мозку має молекулярну масу близько 100 кДа, білок з печінки — 93 кДа, нирок — 90 кДа. Отримані результати є новими і досить цікавими, проте потребують детальнішого дослідження та пояснення.

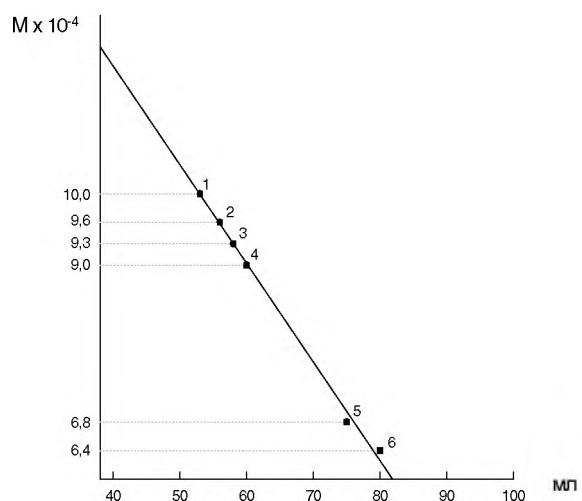


Рис. 3. Графічне зображення калібрувальної кривої залежності логарифма молекулярної маси від об'єму виходу стандартних білків: 1 — ТЗА мозку, 2 — гексокіназа дріжджів (96 кДа), 3 — ТЗА печінки, 4 — ТЗА нирок, 5 — альбумін сироватки людини (68 кДа), 6 — гемоглобін крові коня (64 кДа)

Здатність ТЗБ, вилучених із мозку, печінки та нирок щурів, гідролізувати тіамінфосфати та деякі нуклеотидтрифосфати ($M \pm m; n = 3-5$)

Субстрат для гідролізу	Утворений неорганічний фосфор (P _i), нмоль/мг білка за 30 хв		
	мозок	печінка	нирки
Тіамінтрифосфат *, Mg ²⁺	372,5 ± 32,4	729,3 ± 79,1	320,5 ± 14,8
Тіаміндифосфат **, Mg ²⁺	224,5 ± 66,2	475 ± 88	346 ± 40
Тіамінмонофосфат *, Mg ²⁺	77 ± 14	72,4 ± 14,6	164,5 ± 29
АТФ **, Mg ²⁺	0	0	0
ГТФ **, Mg ²⁺	0	0	0
ЦТФ **, Mg ²⁺	0	0	0

* рН 7,5;

** рН 9,0.

Наступним етапом досліджень було вивчення ферментативних властивостей виділених білків: тіамінтри-, ди-, монофосфатазної, АТФ-, ГТФ-, ЦТФ-азної активності. Виходячи з того, що раніше ТЗБ мозку щурів виявляв здатність гідролізувати фосфорні ефіри тіаміну [18], ми перевірили, чи характерні ці активності для білків з інших органів. Отримані результати представлені в таблиці. Слід відзначити, що для всіх білків характерна здатність гідролізувати фосфорні ефіри тіаміну, але співвідношення ТТФ-, ТДФ-, ТМФ-азної активності неоднакові. Жоден з білків не мав нуклеотидтрифосфатазної активності.

Отже, проведені нами дослідження показали наявність тіамінзв'язуючих білків у тканинах мозку, печінки та нирок щурів. Виділені білки не є цілком однаковими, вони відрізняються за молекулярною масою, тіамінзв'язуючою активністю та здатністю гідролізувати фосфорні ефіри тіаміну. Проведена експериментальна робота є першим кроком у вивченні ТЗБ різних тканин щурів. Подальші дослідження в цьому напрямку сприятимуть глибшому розумінню і поясненню фізико-хімічних властивостей та функціонального значення цих білків.

1. Nishimura H., Hayashi R. Purification and some properties of thiamine-binding protein of *Escherichia coli* // *Biochem. et biophys. acta.*— 1973.— 328, N 1.— P. 124—132.

2. Iwashima A., Nishimura H., Nose Y. Soluble and membrane-bound thiamine-binding proteins from *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochem. et biophys. acta.*— 1979.— 577, N 2.— P. 460—468.

3. Халдмурадов А. Г., Тоцкний В. Н., Чаговец Р. В. Мембранний транспорт коферментних вітамінів і коферментів.— Киев: Наук. думка, 1982.— С. 7—59.

4. Muniyappa K., Adiga P. R. Nature of the thiamine-binding protein from chicken egg yolk // *Biochem. J.*— 1981.— 193, N 3.— P. 679—685.

5. Subramain S., Rao J., Adita P. R. Active immunization of rats with chicken egg thiamin carrier protein results in early embryonic loss at periimplantation stages // *Indian J. Exp. Biol.*— 1996.— 34.— P. 302—306.

6. Watanabe K., Shimizu M., Adachi T., Yoshida T., Mitsunada T. Characterization of thiamine-binding protein from buckwheat seeds // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*— 1998.— 44, N 2.— P. 323—328.

7. Watanabe K., Chikushi K., Adachi T., Shimizu M., Yoshida T., Mitsunada T. Thiamin-binding protein from sunflower seeds // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*— 1998.— 44, N 5.— P. 665—672.

8. Nishimura H., Uechara Y., Sempuku K., Iwashima A. Purification and some properties of thiamine-binding protein from rice bran // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*— 1984.— 30.— P. 1—10.

9. Постоенко В. А., Пархоменко Ю. М., Вовк А. И., Халдмурадов А. Г., Донченко Г. В. Выделение и некоторые свойства тиаминсвязывающего белка мозга крыс // *Биохимия.*— 1987.— Т. 52, № 11.— С. 1792—1797.

10. Постоенко В. А., Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В. Характеристика тиаминсвязывающего белка синапсомозга крыс // *Укр. биохим. журн.*— 1987.— Т. 59, № 6.— С. 9—14.

11. Kimura M., Itokava Y. Separation and determination of thiamine-binding proteins in rats by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatog.*— 1981.— 211, N 2.— P. 290—294.

12. Воскобоев А. И., Аверин А. Очистка ТЗБ эритроцитов крыс аффинной хроматографией // *Бюлл. эксперим. биологии и медицины.*— 1982.— 93, № 1.— С. 110—111.

13. Кляшицкий Б. А., Поздnev В. Ф., Митина В. Х. и др. Аффинная хроматография пивратдекарбоксылазы из пивных дрожжей // *Биоорг. химия.*— 1980.— 6, № 10.— С. 1572—1579.

14. Cuatrecasas P. Isolation of the insulin receptor of liver and fat-cell membranes (detergent-solubilized-(125 I)insulin-

polyethylene glycol precipitation-sephadex) // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1972.— 69, N 2.— P. 318—322.

15. Kwok-Mind Chan, Dennis Delfart, Kurt D. Anger. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} — stimulated ATPase activity. // Analytical Biochemistry.— 1986.— 157, N 2.— P. 375—380.

16. Penttinen H. K. Preparation of thiamine triphosphate // Methods in enzymology.— 1979.— 62.— P. 112.

17. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-binding // Anal. Biochem.— 1976.— 72, N 2.— P. 248—254.

18. Пархоменко Ю. М., Протасова З. С., Постоєнко В. О., Донченко Г. В. Локалізація ферментів синтезу і деградації тіамінтрифосфату в синапсомозку щурів // Доп. АН УРСР.— 1988.— № 8.— С. 73—76.

Janchij O. P., Parchomenko Ju. M., Donchenko G. W.

SEPARATION AND STUDY OF THIAMINE-BINDING PROTEINS FROM DIFFERENT TISSUES OF THIAMINE SATURATED RATS

Thiamine-binding proteins (ThBP) from the brain, liver and kidneys of rats were isolated by means of affinity chromatography on thiamine-N-4-azobenzoyl- ϵ -aminocaproylhydrazidosepharose 4A and gel-filtration on Sephadex G-100. The ThBP from livers and kidneys as well as isolated early from rat brain ThBP were bifunctional: together with the ability to bind thiamine, they showed an ability to hydrolyse phosphoric esters of thiamine selectively. ThBP of all tissues were investigated both on molecular mass and on the specific enzymatic activity. Specific thiamine-binding activity increased abreast: ThBP brain < ThBP livers < ThBP kidney. Molecular mass ThBP was estimated for ThBP from brain near 100 kDa, livers — 93 kDa, kidney — 90 kDa by gel-filtration.