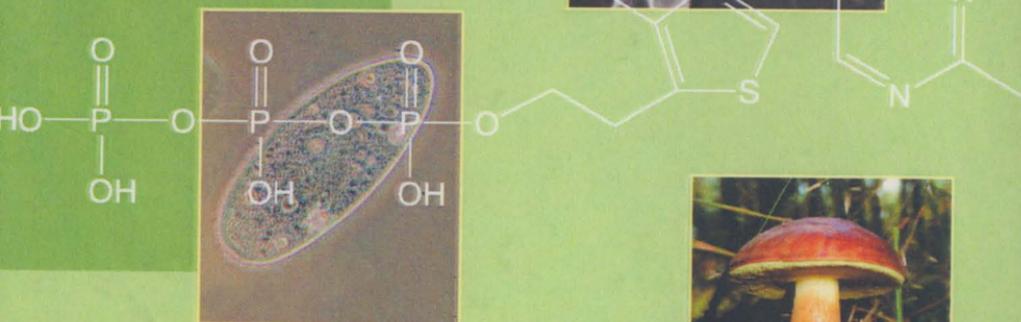
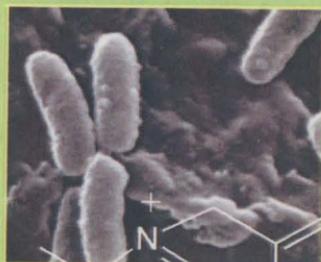




А. Ф. Макарович

ТИАМИНТРИФОСФАТ:

НОВЫЙ ВЗГЛЯД
на некоферментную
функцию витамина В₁



УДК 615.35:577.164.11

Макарчиков, А. Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина В₁ / А. Ф. Макарчиков. — Минск: Белорус. наука, 2008. — 433 с. — ISBN 978-985-08-0932-2.

В монографии рассмотрены современные представления о метаболизме и функциях витамина В₁ (тиамина). Приводятся сведения о системах транспорта тиамин в клетки различных видов организмов, ферментах синтеза и деградации его фосфорных эфиров, а также молекулярных основах наследственных тиаминзависимых патологий. Исходя из результатов собственных исследований, сформулирована концепция о фундаментальной биологической роли тиаминтрифосфата, связанной с адаптацией клетки к стрессу. Описано открытие нового производного тиамин — аденилированного тиаминтрифосфата — и фермента его биосинтеза.

Адресована научным работникам, преподавателям и студентам вузов, а также всем, интересующимся современной методологией молекулярно-биологических исследований.

Табл. 25. Ил. 138. Библиогр.: 734 назв.

Р е ц е н з е н т ы:

доктор биологических наук, профессор В. В. Виноградов,
доктор биологических наук, профессор З. В. Горбач

ISBN 978-985-08-0932-2

© Макарчиков А. Ф., 2008
© Оформление. РУП «Издательский дом «Белорусская наука», 2008

ВВЕДЕНИЕ

Если завести речь о механизмах, посредством которых реализуется биологическая активность витамина В₁, у людей, изучавших биохимию в рамках курса университетской программы, всплывает в памяти прочная ассоциация с каталитической коферментной функцией ТДФ. В этом нет ничего удивительного, ведь именно с данным ампула связана фундаментальная роль тиамин в жизнедеятельности клетки, когда, оперируя категориями общего, особенного и частного, ее рассматривают в качестве элементарной структурно-функциональной единицы живой материи. Этот атрибутивный механизм распространяется на клетки всех известных типов вне зависимости от особенностей их строения, условий обитания или специализации — будь то мельчайшая анаэробная бактерия в рубце жвачного животного или напичканный кислородом эритроцит, совершающий свое путешествие в кровяном русле человека. ТДФ-зависимые ферменты обнаружены у представителей всех классов организмов, живущих ныне на Земле, и в настоящее время число белков, для которых ТДФ служит каталитическим инструментом, перешагнуло отметку в 25 (Enzyme Nomenclature, www.exPASy.ch). Пальму первенства в этом списке прочно удерживают ПДГК, ОГДГК и ТК: без упоминания о них в разделах, описывающих важнейшие метаболические пути и процессы, такие, как гликолиз, ЦТК, пентозофосфатный путь и фотосинтез, не может обойтись ни один учебник общей биохимии [6, 30, 33, 40, 83].

В более обстоятельных руководствах [477] можно найти упоминание об особой некоферментной роли витамина В₁ в нервной (возбудимых) ткани. Эта тема, иногда

облаченная в «доспехи» нейротропности, звучит одним из лейтмотивов почти всех обзоров, сборников статей и монографий, в которых рассматриваются механизмы биологической активности тиамин [32, 58, 64, 76, 133, 135, 150, 212, 301, 337, 413, 434, 662, 663]. Взаимоотношениям тиамин и нервной системы всегда уделялось пристальное внимание, ведь витамин В₁ был открыт как пищевой фактор, предотвращающий и излечивающий полиневриты у экспериментальных животных и болезнь бери-бери у людей. Именно этим обстоятельством объясняется широкое использование в прошлом таких его названий, как анейрин и аневрин.

Неврологические последствия алиментарного дефицита тиамин легко наблюдать у птиц в виде характерного запрокидывания головы, называемого опистотонус. У человека основные симптомы тиаминовой недостаточности включают полиневрит, атаксию и нарушения умственной деятельности [301]. Столь очевидной взаимосвязью между нормальной работой нервных клеток и обеспеченностью организма тиамином обусловлен тот факт, что большинство исследований, направленных на выяснение биохимических функций этого витамина, было проведено на объектах, представляющих собой элементы нервной системы. Значительный вклад в понимание молекулярных механизмов реализации биологической активности витамина В₁ сыграли эксперименты, проведенные Peters et al. [470], в которых было показано, что нагрузка тиамином авитаминозных голубей приводит к их быстрому выздоровлению в течение 30 мин, причем в мозге птиц отсутствовали какие-либо признаки морфологических изменений как до, так и после лечения. При использовании глюкозы в качестве окисляемого субстрата потребление кислорода гомогенатами мозга авитаминозных особей заметно снижалось, но нормальный уровень дыхания можно было восстановить, добавляя тиамин. Эти эксперименты способствовали формулировке концепции «биохимического нарушения». После того, как Lohmann & Schuster [431] установили, что ТДФ является кофактором окислительно-го декарбоксилирования пирувата у дрожжей, появились

все основания полагать, что неврологические симптомы, вызываемые недостаточностью тиамина, обусловлены нарушением окисления пирувата. Вскоре было обнаружено [447] снижение синтеза АХ в мозге V_1 -авитаминозных голубей, и таким образом оказалось возможным связать нейротропность тиамина с обменом этого нейромедиатора через образование КоА, являющегося источником ацетильного компонента. Очевидно, что в данном случае речь не идет о какой-либо особой функции тиамина в нервной ткани, и вся специфика его действия определяется лишь особенностями метаболизма нервных клеток, а именно способностью холинергических нейронов вырабатывать АХ. Тем не менее эти исследования сыграли важную роль в формировании так называемой транзиттерной гипотезы [64] специфической функции тиамина в нервной ткани.

Практически в то же самое время, в 40-е годы XX в., в электрофизиологических экспериментах было продемонстрировано, что электростимуляция нервно-мышечных препаратов вызывает высвобождение тиамина в инкубационную среду [480]. Этот феномен, тщательно исследованный Von Muralt [680], в наиболее яркой форме проявлялся в периферических холинергических нервных окончаниях, так что тиамин даже рассматривали как «Vagusstoff II» в дополнение к АХ, получившему название «Vagusstoff I». Таким образом, благодаря усилиям физиологов зародились представления о специфической некоферментной функции витамина V_1 , которая может проявляться на уровне возбудимых мембран.

«Трансмиттерная» гипотеза, предполагающая участие тиамина в передаче нервного импульса, получила дальнейшее развитие и была конкретизирована в работах других исследователей, которые изучали различные аспекты действия тиамина на холинергическую систему. Так, Eder et al. [243, 244] обнаружили влияние тиамина и окситиамина на амплитуду и продолжительность потенциала в электрических пластинках электрического органа *Torpedo marmorata*. Ю. М. Пархоменко с соавт. [64], используя в качестве модели синаптосомы из мозга крысы, полу-

чили данные, указывающие на существование в нервной клетке подвижного пула тиамин, связанного с обменом ацетилхолина. Циркуляция этого пула между пресинаптической щелью и внутриклеточным пространством, по мнению авторов, сопряжена с изменениями мембранного потенциала, при этом витамин B_1 может рассматриваться как спутник АХ. В данном случае рассматривается пресинаптический механизм действия тиамин. Было также установлено, что тиамин взаимодействует с изолированным из *T. marmorata* АХ рецептором ($K_d = 30-50 \mu M$), при этом его миллимолярные концентрации вызывают изменения кинетики рецептора [254, 686]. Здесь следует отметить, что полученные различными авторами данные об эффектах тиамин на холинергические синапсы порой достаточно противоречивы. Например, Romanenko [577] обнаружил, что тиамин потенцирует действие АХ, в то же время результаты Enomoto & Edwards [254] свидетельствуют об обратном, т. е. блокировании нервно-мышечной передачи. Такая неоднозначность наряду с множественностью предполагаемых мест действия тиамин (т. е. пре- и постсинаптические эффекты), на наш взгляд, порождает определенные сомнения в наличии и специфичности его взаимоотношений с холинергической системой, если, конечно же, не учитывать участие ТДФ в качестве кофермента ПДГК при биосинтезе ацетил-КоА — источника ацетильного компонента АХ.

Альтернативная гипотеза, которая также была сформулирована главным образом на основании электрофизиологических исследований, предполагала участие тиамин в процессах переноса ионов через возбудимые мембраны при распространении нервного импульса. Доказательная база этой гипотезы, долгое время являвшейся одной из наиболее популярных, была построена на нескольких положениях, которые приводятся ниже. Так, по данным флуоресцентной микроскопии [658], тиамин преимущественно локализован в плазматических мембранах нервных волокон. Было выявлено, что пиритиамин вызывает частичную инактивацию системы транспорта Na^+ в перехватах Ранвье [266] и, кроме того, уменьшает

скорость подъема потенциала действия без изменения порогового потенциала и потенциала покоя [287, 401]; аналогичный эффект наблюдался при обработке нерва тиаминазой [287]. Высвобождение тиамина имело место не только при электрической стимуляции изолированных нервов [214], но и при действии на них некоторых нейроактивных соединений, причем данный феномен можно было продемонстрировать и на субклеточных фракциях из нервной ткани [338, 339, 342]. Поскольку процесс сопровождался дефосфорилированием ТДФ и ТТФ, эти эксперименты положили начало представлениям о том, что основную роль в реализации мембранной функции витамина В₁ играют его фосфорные эфиры.

Itokawa & Соопер [341], наблюдая действие ТТХ на высвобождение тиамина из синапсом, выдвинули гипотезу об участии последнего в работе Na⁺-канала, высказав при этом мысль, что в качестве нейроактивной формы может выступать ТТФ [208]. По сведениям Matsuda & Соопер [460], по мере очистки мембранной фракции синапсом количество ТТФ в ней возрастает, и это, по мнению авторов, также является косвенным указанием на связь данного вещества с функционированием возбудимых мембран.

Здесь, по-видимому, стоит сделать небольшое отступление для того, чтобы дать краткую характеристику раннего периода исследований ТТФ. Это фосфопроизводное было синтезировано в 1948 г. Velluz et al. [678]. Первые попытки установить биологическую функцию ТТФ были направлены на выяснение возможности его участия в общем метаболизме в роли кофактора ГДФ-зависимых ферментов. В отличие от данных, полученных на отмытых дрожжах, когда ТТФ проявлял заметную каталитическую активность в декарбоксилировании пировиноградной кислоты [677], испытание очищенных бумажной хроматографией препаратов, добавляемых к лишенным фосфатазной активности образцам апоПДК из дрожжей и апоТК, дало отрицательные результаты [225, 371, 372, 582]. Не нашли дальнейшего подтверждения и данные, демонстрировавшие причастность ТТФ (совместно с АДФ) в активации

ОГДГК из дрожжей и печени крыс, как полагали, за счет ферментативного образования связанного с комплексом ТДФ [727, 729]. Как оказалось, эффект активации создается ТДФ, образующимся при гидролизе ТТФ [302]. Некоторое время также рассматривалась возможность вовлечения ТТФ в реакции трансфосфорилирования гексоз [296], однако и в данном случае более тщательные исследования показали несостоятельность подобных взглядов [726]. Таким образом, к концу 1960-х годов не было получено определенных результатов, которые могли бы указывать на выполнение ТТФ каких-либо функций в общем метаболизме клетки.

Возможно, во многом именно благодаря этому идея об особой роли ТТФ в явлениях биоэлектrogenеза получила широкую поддержку, так что за последние 30 лет практически все исследования, касавшиеся метаболизма и функций ТТФ, были проведены на препаратах из возбуждаемых тканей. Причем в качестве молекулярной точки приложения действия ТТФ помимо Na^+ -канала [146, 605, 606, 607] рассматривался также макси- Cl^- -канал [137, 138, 139, 145, 152]. На наш взгляд, однако, неадекватность гипотезы о прямом участии ТТФ, тиамин или других его производных в проведении нервного импульса (мембранная функция) достаточно очевидна. Эти вопросы рассматриваются в главе 1.

Сделанный выше небольшой экскурс в историю исследований некоферментной функции тиамин лишь подчеркивает ту неоднозначность, с которой приходится иметь дело при решении данной проблемы. Главный вопрос, возникающий при анализе уже имеющихся гипотез о роли тиамин и его фосфопроизводных (прежде всего ТТФ) в функционировании мембран, — это вопрос о специфичности наблюдаемых эффектов и в конечном итоге о том, действительно ли существует особая роль тиамин в возбуждаемых тканях. На наш взгляд, ответ на данный вопрос должен быть отрицательным: никаких исключительных тканевых особенностей метаболизма и функций тиамин не существует, а высокая чувствительность нервной системы к нарушениям баланса витамина B_1 определяется

спецификой ее структурно-функциональной организации. Иными словами, представления о нейротропности тиамин и его некоферментной функции никак не соотносятся. Напротив, можно думать, что молекулярные механизмы, посредством которых реализуется биологическая активность тиамин, в том числе и некоферментная, в различных тканях и типах клеток в принципе едины. Есть лишь определенные особенности их регуляции, характерные для тех или иных тканей или видов организмов. В этом тезисе, конкретизированном по отношению к ТТФ, по сути дела и заключается тот новый взгляд, о котором говорит название настоящей монографии.

Действительно, ситуация с ТТФ довольно показательна. Долгое время ТТФ рассматривали в качестве носителя некоферментной функции тиамин в нервной ткани. Между тем до середины 1980-х годов само присутствие этого вещества в клетках нервной системы, равно как и в других биологических объектах, вызывало некоторые сомнения. Лишь с развитием методов ВЭЖХ в сочетании с флуоресцентной детекцией, анализом спектров эмиссии и обработкой экстрактов специфичной ТТФазой наличие ТТФ в возбудимых тканях было окончательно доказано [348]. В главе 2 приводятся результаты исследований по содержанию ТТФ в объектах живой природы. Исходя из этих результатов, свидетельствующих о том, что данное соединение является универсальным компонентом клеток организмов различных типов — от бактерий до млекопитающих, мы уже вправе говорить о древней филогении молекулы ТТФ. Сейчас уже становится очевидным, что, как и ТДФ, ТТФ выполняет одну и ту же функцию у различных организмов, т. е. его роль в жизнедеятельности клетки фундаментальна. Отсюда следует, что при дальнейшем изучении функции ТТФ необходимо руководствоваться категорией общего, а не ограничивать себя использованием лишь возбудимых тканей в качестве объектов исследования, переводя тем самым проблему в разряд частного научного значения. Пока эта функция не совсем ясна, однако эксперименты на бактериях и растениях

дают все основания сформулировать концепцию об участии ТТФ в биохимических механизмах краткосрочной адаптации клетки к стрессу, возможно, путем активации энергетического обмена.

В главе 3 описана очистка, физико-химические, кинетические и регуляторные свойства растворимой ТТФазы из почек быка. Как и ТТФаза из головного мозга [441], этот фермент абсолютно специфичен к субстрату и является единственным белком почечного экстракта, способным катализировать гидролиз ТТФ в условиях его физиологических концентраций. Уже сам по себе факт экспрессии специфичной ТТФазы не только в мозге, но и в невозбудимых тканях может служить указанием на общность функций ТТФ в клетках различной специализации. Надо полагать, что этот фермент выступает в роли чувствительного прецизионного механизма, регулирующего концентрацию ТТФ в клетках млекопитающих в ответ на изменения физиологических условий. Регуляция активности ТТФазы, по-видимому, может осуществляться как на кинетическом уровне, так и путем обратимых ковалентных модификаций.

Глава 4 посвящена расшифровке первичной структуры растворимой ТТФазы. В ней показано, как с помощью масс-спектрометрии и клонирования кДНК была установлена полная аминокислотная последовательность фермента быка и человека. Анализ последовательности ТТФазы свидетельствует о наличии в ее молекуле консенсусных сайтов гликозилирования и фосфорилирования. Установлено, что синтезируемый на рибосомах белок подвергается дальнейшему процессингу, в результате чего удаляется N-концевой *Met* и ацетируется следующий за ним *Ala*. ТТФаза человека, экспрессированная в *E. coli* в виде GST-слитого белка, проявляет специфичность к субстрату и кинетические свойства, характерные для фермента дикого типа.

В главе 5 рассматривается вторичная структура рекомбинантной ТТФазы человека, установленная методом ИК-спектроскопии. Здесь же представлены результаты исследований каталитического механизма фермента. При-

менение химической модификации и сайт-направленного мутагенеза в сочетании с кинетическими методами позволило выявить важную роль для активности ТТФазы остатков *Cys*, *Lys*, *Arg*, *Tyr*, *His*, а также карбоксильных групп.

В главе 6 обсуждается проблема распространения растворимой ТТФазы в биологических объектах, а также отдельные аспекты ее молекулярной эволюции. Принципиальный вывод, который можно сделать, опираясь на эти исследования, — это заключение о том, что механизм регуляции метаболизма ТТФ проделал эволюционный путь от контроля за скоростью его синтеза к контролю за скоростью гидролиза.

И, наконец, в главе 7 описано открытие нового производного тиамин — АТТФ. Данное вещество обнаружено во всех исследованных объектах — бактериях, растительных и животных тканях. У бактерий АТТФ синтезируется в ответ на углеродный голод под действием растворимого фермента в присутствии термостабильного активатора.

Экспериментальная часть настоящей монографии была выполнена в лаборатории энзимологии Института биохимии НАН Беларуси (ныне ГУ НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси»), руководителем которой автор являлся на протяжении семи лет, и в Центре молекулярной и клеточной нейробиологии университета г. Льежа во время двухлетней рабочей стажировки. Хотелось бы высказать слова самой искренней благодарности всем тем сотрудникам названных учреждений, с которыми мне посчастливилось разделить радость научного творчества. С глубокой теплотой вспоминаю научного руководителя — д.х.н. И. П. Черникевича, открывшего передо мной дверь в загадочный мир ферментов, многому научившего, а самое главное, личным примером преданности науке показавшего истинную цену знаниям. С не меньшей признательностью хотелось бы перечислить имена сотрудников лаборатории энзимологии, на протяжении многих лет создававших непринужденную, доброжелательную и доверительную обстановку в коллективе, без непосредственной помощи, поддержки или просто

дружеских чувств которых реализация данной работы вряд ли бы оказалась возможной. Это И. М. Русина, И. Э. Гуляй, Т. А. Лучко, Е. А. Макар, В. Л. Кубышин, А. В. Помозова, Э. А. Гриценко, И. М. Арцукевич, С. А. Островцова, В. А. Аверин. В равной мере автор благодарен за помощь, содействие и теплое отношение сотрудникам Центра молекулярной и клеточной нейробиологии — Л. Беттендорффу, Б. Лакае, И. Маргинеану, П. Винсу. И, наконец, автор хотел бы отдать должное всем своим родным и близким, проявлявшим постоянный живой интерес к его научным изысканиям, окружавшим заботой и пониманием.

Глава 1

ВИТАМИН В₁: МЕТАБОЛИЗМ И ФУНКЦИИ

1.1. Система метаболизма тиамина

В большинстве объектов живой природы витамин В₁ присутствует в свободной (нефосфорилированной) форме и в виде трех фосфорных эфиров — ТМФ, ТДФ и ТТФ [43, 443], которые вместе с соответствующими ферментами составляют систему его метаболизма. Совсем недавно был идентифицирован еще один компонент — аденилированный ТТФ ([154], гл. 7). Тиамин и тиаминфосфаты обнаружены во всех исследованных тканях животных, бактериях, простейших, растениях и грибах, и прежде чем приступить к обсуждению метаболизма данных соединений, кратко остановимся на вопросах, связанных с их количественным определением в биологических образцах.

1.1.1. Содержание тиамина и тиаминфосфатов в биологических объектах

До начала 80-х годов XX в. для оценки содержания фосфатных производных витамина В₁ в биологическом материале использовались методы бумажной хроматографии, электрофореза и ионообменной хроматографии низкого давления с последующей флуориметрической детекцией разделяемых компонентов [297, 375, 392, 535, 540, 570, 580]. В настоящее время для этой цели в качестве референтного общепризнан метод ВЭЖХ [142, 144, 335, 348, 598].

Сопоставляя данные разных авторов, можно обнаружить заметные разночтения в оценке как абсолютного, так и относительного содержания производных тиамина даже в одном и том же органе одного и того же вида животных. В некоторых случаях эти различия весьма

существенны. Так, в упомянутых выше работах процент тиамина в мозге крыс колебался в пределах 2,5—5,8%, в сердце — 0,9—2,3, в почках — 6,2—13,2, в печени — 1,9—7,5% от общего количества витамина. Относительное содержание ТМФ в перечисленных тканях составляло соответственно 3,6—17,2; 5,9—9,8; 6,0—14,7 и 7,7—12,2%, а количество дифосфорного эфира — 78,9—92,0; 86,0—89,4; 75,3—85,7 и 73,9—86,1%. Уровень ТТФ варьировал еще в более широком диапазоне: 0,24—5,0; 0,3—5,6; 0,2—5,2 и 0,5—10,9% соответственно в мозге, сердце, почках и печени.

Теперь, исходя из результатов, полученных методом ВЭЖХ, становится очевидным, что столь существенные расхождения прежде всего могут объясняться низкой разрешающей способностью и воспроизводимостью использовавшихся ранее методов анализа. Однако это, вероятно, не является единственной причиной; нельзя также исключать влияние таких факторов, как способ подготовки образца к анализу, физиологическое состояние организма животных и их пищевой статус на момент забоя.

По данным ВЭЖХ уровень ТТФ в большинстве биологических объектов не превосходит 1—2% от общей концентрации витамина, а в мозге млекопитающих — 0,3—0,75% [246, 348, 443]. Все еще остается загадочным тот факт, что как абсолютное, так и относительное содержание этого компонента гораздо выше в белых скелетных мышцах цыпленка и свиньи, а также в скелетной мышце и электрическом органе *Electrophorus electricus*. В указанных тканях количество ТТФ достигает соответственно 81,3 (1,9 нмоль · г⁻¹ сырой ткани), 69,2 (18,2 нмоль · г⁻¹), 12,5 (0,084 нмоль · г⁻¹ сырой ткани) и 86,5% (3,9 нмоль · г⁻¹) от общего тиамина [142, 246, 485]. Правдоподобное объяснение этому феномену, на наш взгляд, можно найти, привлекая концепцию о возможном участии ТТФ в регуляции процессов анаэробного производства энергии (гликолиза) (см. гл. 3).

Относительное содержание нефосфорилированного витамина В₁ в различных видах клеток колеблется в пределах 1—29% [443]. Исключением, вероятно, являются се-

мена растений. Так, для проростков фасоли характерен необычайно высокий процент нефосфорилированной формы (58,3% [443]), что может быть связано с их насыщенностью тиаминсвязывающими белками, роль которых, как полагают, состоит в сохранении витамина В₁ для процесса прорастания [626, 688]. Из всех исследованных тканей млекопитающих самый высокий уровень нефосфорилированного тиамин (13,2%) наблюдался в почках крыс [348].

Как правило, содержание ТМФ в объектах живой природы варьирует в диапазоне 2—15% от общего тиамин, а количество коферментной формы — ТДФ — от 80 до 90%. Интересно отметить, что в быстрорастущих клетках *E. coli* обнаружена самая высокая абсолютная концентрация ТДФ в пересчете на 1 г биомассы — 152,0 нмоль [443]. Это в 8—10 раз выше концентрации кофермента в тканях млекопитающих. ТМФ — единственный фосфорный эфир тиамин, циркулирующий в плазме крови, и у человека его концентрация равна 2—8 нМ, тогда как ТДФ является основной формой, локализованной в эритроцитах [136, 179, 247, 314, 379, 656].

Содержание витамина В₁ (в виде всех форм) в клетках животных составляет от 4 до 35 нмоль · г⁻¹ сырой ткани [43, 246, 348, 443, 485]. В растительном материале и грибах (за исключением дрожжей) обнаруживаются меньшие количества тиамин по сравнению с тканями животных (0,1—4,8 нмоль · г⁻¹ сырого веса [43, 443]). Общая концентрация тиамин в крови таких видов млекопитающих, как кролик, морская свинка, крыса и мышь, заметно выше, чем в крови человека (0,65—1,8 мкМ против 0,074—0,18 мкМ) [179, 247, 379, 656].

В исследованиях распределения тиамин и его фосфорных эфиров между растворимой и мембранной фракциями клетки было установлено, что нефосфорилированный витамин, ТМФ и ТДФ присутствуют в обеих фракциях, выделенных из головного мозга, сердца, почек, печени и скелетных мышц крысы. Что же касается ТТФ, то в мозге, сердце и почках он локализован в мембранах, а в печени практически в равной степени распределяет-

ся между мембранами и растворимым содержимым клеток. В мышечной ткани ТТФ находится исключительно в растворимой форме [466].

При разделении гомогената головного мозга крысы на субклеточные фракции методом дифференциально-центрифугирования свободный тиамин и ТМФ выявляются главным образом в цитозоле (соответственно 12 и 40 пмоль · мг⁻¹ белка), тогда как более 80% ТДФ (150 пмоль · мг⁻¹ белка) сосредоточено в митохондриях; ТТФ присутствует как в цитозольной фракции, так и в ядрах, митохондриях и плазматической мембране [151]. В клетках *Euglena gracilis* 60,4% от общего содержания ТДФ приходится на цитозоль, 35,2% — на митохондрии и 4,3% — на хлоропласты [623].

1.1.2. Метаболизм фосфорных эфиров тиамина

На рис. 1.1 схематично представлен метаболизм фосфорилированных производных тиамина в нервной клетке. По исторической традиции подавляющее большинство экспериментальных данных, касающихся обмена вита-

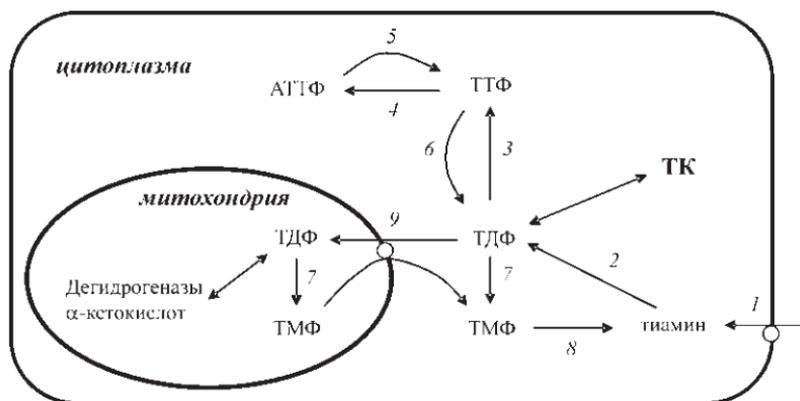


Рис. 1.1. Схема метаболизма фосфорилированных производных тиамина в клетке нервной системы: 1 — белок-переносчик, 2 — ТПК, 3 — ТДФ-киназа (АК), 4 — ТДФ-аденилилтрансфераза, 5 — АТТФаза, 6 — ТТФаза, 7 — ТДФаза (НДФаза), 8 — ТМФаза, 9 — митохондриальный транспортер

мина V_1 , получено именно при изучении препаратов из нервной ткани. Тем не менее можно полагать, что эта схема в своих основных чертах справедлива и для других клеток животных, так как ее элементы обнаруживаются во всех исследованных органах и тканях, т. е. система обмена тиамин, по-видимому, универсальна.

1.1.3. Транспорт тиамин в клетку

Витамин V_1 синтезируется бактериями, другими микроорганизмами и растениями [125, 357, 413, 515, 576, 642, 709]. Животные клетки не способны к биосинтезу тиамин, и поэтому он является незаменимым алиментарным фактором, который должен постоянно поступать в организм. Суточная потребность человека составляет 0,5 мг/1000 ккал диеты, крупных сельскохозяйственных животных (лошади, свиньи) — 2—5 мг/100 кг массы в зависимости от возраста и физиологического состояния, птиц — 60—80 мг на 100 г кормовой смеси [11, 82]. Исключением являются жвачные, потребность которых в витамине V_1 может быть практически полностью обеспечена за счет микрофлоры преджелудков (рубца). Дефицит тиамин в организме вызывает полиневриты у животных, приводит к развитию сердечнососудистых и неврологических расстройств, болезни бери-бери и синдрома Вернике—Корсакова у людей [301].

При физиологических концентрациях, которые в люминальном пространстве кишечника человека и крысы ниже 2 мкМ, тиамин адсорбируется клетками эпителия с помощью насыщаемого опосредованного белком-переносчиком процесса [571, 589, 590]. Этот процесс электро-нейтрален, не зависит от ионов Na^+ и K^+ и протекает по механизму тиамин/ H^+ -антипорта [187, 406]. В препаратах мембранных везикул щеточной каемки из тонкого кишечника крысы K_m транспорта составляла 0,8—6,2 мкМ, максимальная скорость — 0,09—2,5 пмоль · мг белка⁻¹ · с⁻¹ в зависимости от градиента рН [187, 406]. В везикулах щеточной каемки тощей кишки человека значения K_m и V_{max} равны соответственно 0,61 мкМ и 0,1 пмоль · мг

белка⁻¹ · с⁻¹ [589]. Структурные аналоги и производные витамина ингибируют транспорт по конкурентному типу с $K_i = 33$ мкМ, 1,7 мкМ, 27 мкМ, 55 мкМ и 510 мкМ соответственно для ТМФ, пиритиамина, этилтиамина, ампролиума и окситиамина [187]. При более высоких концентрациях (> 2 мкМ) тиамин проникает в энтероциты главным образом в результате пассивной диффузии [571].

Описанные свойства характерны также для систем транспорта тиамин в эритроцитах [188] и мембранных препаратах из других органов млекопитающих — печени [490, 591], эпителия плаценты [295] и коркового слоя почек [274]. После переноса в клетку молекула тиамин быстро фосфорилируется до ТДФ ТПК, и это, как полагают, является движущей силой всего процесса [149, 261, 300, 468, 724].

В клетках нейробластомы мыши обнаружены переносчики с высоким ($K_M = 35$ нМ) и низким ($K_M = 0,8$ мМ) сродством к тиамину [149]. Высокоаффинный транспорт блокировался активаторами Na⁺-канала — вератридином и батрахотоксином, которые, однако, не оказывали никакого влияния на низкоаффинный компонент. При любых концентрациях тиамин процесс его аккумуляции не зависел от ионов Na⁺, частично ингибировался в результате деполяризации клетки и проявлял чувствительность к метаболическим ядам.

Тиамин и ТМФ проникают в нервную ткань через гематоэнцефалический барьер посредством активного транспорта, механизм которого включает насыщаемый и ненасыщаемый компоненты [566]. В четырех исследованных отделах головного мозга крысы K_M белка-транспортера для тиамин варьировала в пределах 1,9—2,6 мкМ, а $V_{\text{макс}}$ — 106—155 пмоль · г⁻¹ · мин⁻¹. Транспорт ТМФ характеризуется меньшей максимальной скоростью (27—39 пмоль · г⁻¹ · мин⁻¹) и более высоким значением K_M (2,6—4,9 мкМ) [539]. При физиологических концентрациях ТМФ транспортируется в головной мозг со скоростью 2,0—4,9 пмоль · г⁻¹ · мин⁻¹ и таким образом вносит определенный вклад в обеспечение метаболизма тиамин

в нервной ткани. ТМФ может также поглощаться клетками других тканей при участии переносчика восстановленного фолата [114].

Сравнительно недавно клонированы кДНК белков-переносчиков, осуществляющих транспорт тиамин в клетки человека и мыши [240, 525, 559]. Тиаминовые транспортеры человека — SLC19A2 (ThTr1), SLC19A3 (ThTr2) — и их мышинный гомолог Slc19a2 принадлежат к семейству фолатного транспортера [106, 240, 262, 270, 559, 567]. Экспрессированные в клетках HeLa, ThTr1 и ThTr2 проявляют все характеристики, свойственные системам транспорта тиамин в тканях млекопитающих, — независимость от ионов Na^+ , высокую специфичность, оптимум активности при pH 7,4—8,0 [240, 559]. Кинетика ThTr1-опосредованного транспорта тиамин в HeLa описывается кривой с насыщением, при этом K_m составляет 2,5 мкМ [240]. Ген SLC19A2 расположен в регионе q23.3 первой хромосомы, состоит из 6 экзонов и 5 интронов и кодирует белок из 497 аа, предположительно содержащий 12 трансмембранных доменов [233, 240]. Мутации SLC19A2 служат причиной редкого аутосомального рецессивного заболевания — тиаминчувствительной мегалобластической анемии (TRMA, синдром Роджерса), сопровождающейся сахарным диабетом и глухотой [233, 263, 404]. При содержании на тиаминдефицитной диете у мышей с целенаправленно поврежденным геном Slc19a2 развиваются все симптомы TRMA [525].

Методом химической модификации было показано, что для транспорта в везикулы щеточной каемки тонкого кишечника и почек крысы существенны остатки *Ser*, *Arg*, *His*, $-\text{COOH}$ и $-\text{SH}$ группы молекул белков-переносчиков; в механизме тиамин/ H^+ -антипорта важное значение принадлежит остатку *Ser* [679]. Сайт-направленный мутагенез свидетельствует о критической роли *Glu-138*, *Ser-143* и *Gly-172* для функциональной активности ThTr1[114].

ThTr1 и ThTr2, по-видимому, не задействованы в поглощении тиамин клетками плаценты. В линии BeWo трофобластов человека процесс транспорта имеет не-

сколько отличительных особенностей: 1) зависим от ионов Na^+ ; 2) индифферентен по отношению к ампролиуму, окситиамину и ТДФ; 3) ингибируется органическими катионами — гуанидином, N-метилникотинамидом, тетраэтиламмонием и др. Тот факт, что транспорт тиамин тробластами тормозится под влиянием серотонина, флуоксетина и дезипрамина, может указывать на участие в процессе серотонинового транспортера (SERT) [365].

Многие организмы, способные синтезировать тиамин *de novo*, также располагают периферическими системами его транспорта. Так, дрожжи, культивируемые на минимальной среде, активно продуцируют тиамин, поддерживая его внутриклеточную концентрацию на уровне 10 пмоль в расчете на 10^7 клеток. Внесение витамина в культуру ведет к быстрому росту его интрацеллюлярной концентрации, которая может транзитивно увеличиваться почти в 1000 раз [668]. Дрожжевые клетки поглощают тиамин посредством системы активного транспорта с рН-оптимумом 4,5 и K_m 0,18 мкМ [344]. В настоящее время тиаминовый транспортер *S. cerevisiae* охарактеризован на молекулярном уровне. Его ген — *THI10* — находится в XII хромосоме и содержит ОРС из 1794 пн, кодирующую белок с m 66,903 кДа. Экспрессия этого белка-переносчика регулируется на уровне мРНК в зависимости от внутриклеточной концентрации ТДФ [253].

У бактерий (*E. coli*, *S. typhimurium*) активная транслокация тиамин и его фосфорных эфиров через внутреннюю мембрану осуществляется АТФ-связывающим кассетным транспортером (ABC-транспортер) [690]. Этот комплекс, состоящий из тех компонентов — периплазматического тиаминсвязывающего белка, мембранного канала и АТФазы, кодируется *thiBPQ*-опероном, транскрипция которого регулируется экзогенным тиамином. Было показано, что процесс транспорта тиамин *in vivo* подчиняется кинетике Михаэлиса—Ментен со значениями K_m и $V_{\text{макс}}$ соответственно 15 нМ и 46 Ед · мг⁻¹ [322]. Тиаминсвязывающий белок комплекса представляет собой мономер с m 34,205 кДа [321].

1.1.4. Ферменты биосинтеза фосфорных эфиров тиамина

1.1.4.1. Биосинтез ТМФ

Образование ТМФ из 2-метил-4-амино-5-гидрокси-метилпиримидиндифосфата и 4-метил-5-β-гидрокси-этилтиазолмонофосфата, катализируемое ТМФ-ФФазой, является предпоследним этапом на пути биосинтеза тиамина у различных микроорганизмов и растений [413, 576]. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ген ТМФ-ФФазы — *THI6* — локализован в XVI хромосоме и содержит ОРС, кодирующую полипептид из 540 аа с *m* 58,058 кДа [517]. По данным гель-фильтрации и электрофореза в присутствии ДСН *m* равна соответственно 470 кДа и 60 кДа, т. е. белок построен из 8 идентичных субъединиц [363]. Было установлено, что ТМФ-ФФаза *S. cerevisiae* представляет собой бифункциональный фермент, который катализирует не только реакцию синтеза ТМФ, но и его предшественника 4-метил-5-β-гидроксиэтилтиазолмонофосфата [363, 517]. Однако у *E. coli* и других бактерий эти реакции осуществляются отдельными ферментами, поскольку *thiM* и *thiE* гены, кодирующие гидроксиэтилтиазолкиназу (КФ 2.7.1.50) и ТМФ-ФФазу, расположены в разных локусах [111, 486].

Помимо рассмотренной выше ТМФ-ФФазной реакции, которая характерна для всех организмов, способных к синтезу витамина В₁ *de novo*, в клетках *E. coli* и *S. typhimurium* ТМФ может образоваться путем непосредственного фосфорилирования тиаминина [345, 691]. Реакция является промежуточной на пути биосинтеза ТДФ при выращивании культур данных видов бактерий на экзогенных источниках тиаминина. Этот путь не обнаружен у *P. denitrificans* [595] и *B. subtilis* [476]. Тиаминкиназа (КФ 2.7.1.89) *E. coli* кодируется локусом *thiK* [333].

Считается устоявшимся представлением о том, что в тканях млекопитающих ТМФ образуется исключительно при гидролизе ТДФ; никаких специализированных путей или ферментов биосинтеза монофосфата в клетках животных не обнаружено. Тем не менее при транспорте в энтероциты тиамин может непосредственно фосфори-

лироваться до ТМФ под действием щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) мембран щеточной каемки [572].

Количество ТМФ, синтезируемого в результате осуществления данной реакции, невелико и не превышает 0,01% от общего количества P_i , одновременно высвобождающегося при гидролизе подходящего донора (β -глицерофосфата или креатинфосфата). Однако расчеты показывают, что при концентрации тиамин $0,5 \text{ мкМ}$ скорость синтеза его монофосфата в препарате мембранных везикул из щеточной каемки кишечника крысы должна находиться в пределах $0,5\text{—}0,88 \text{ пмоль} \cdot \text{мг белка}^{-1} \cdot 15 \text{ мин}^{-1}$. Это хорошо согласуется со скоростью образования ТМФ изолированными энтероцитами [572]. При насыщающей концентрации креатинфосфата (50 мМ) щелочная фосфатаза кишечника проявляет достаточно высокое сродство к тиамину ($K_M = 86 \text{ нМ}$). Вполне вероятно, что данная реакция может благоприятствовать процессу адсорбции витамина B_1 клетками кишечника.

В настоящее время вопрос о том, является ли ТМФ просто промежуточным соединением в биосинтезе и метаболизме фосфорных эфиров тиамин либо несет какую-то специфическую биохимическую функцию, не решен и требует дальнейшего тщательного изучения.

1.1.4.2. Биосинтез ТДФ

Биосинтез ТДФ в эукариотных организмах и, по крайней мере, у некоторых прокариот осуществляется в ходе реакции: тиамин + АТФ \leftrightarrow ТДФ + АМФ, катализируемой ТПК [18, 413, 483, 595]. Электрофоретически гомогенные препараты фермента были получены из *P. denitrificans*, пивных дрожжей (*S. carlsbergensis*), листьев петрушки эритроцитов человека, печени крысы, головного мозга и сердца свиньи [18, 247, 303, 484, 596, 685]. По данным физико-химических методов анализа ТПК млекопитающих — гомодимер с m 50—64 кДа, построенный из двух идентичных субъединиц [18, 61, 247, 303, 685], тогда как фермент из листьев петрушки, представляет собой мономерный белок с m 30 кДа [484]. Однако при хромато-

графии частично очищенного препарата ТПК из другого растительного объекта — проростков сои (*Glycine max*) — на колонке с сефадексом G-100 активность элюировалась в объеме, соответствующем m 49 кДа, что, вероятно, свидетельствует о димерной структуре молекулы фермента [488].

Сравнительно недавно клонированы и экспрессированы в *E. coli* кДНК ТПК мыши и человека [518, 519, 731]. ОРС обеих кДНК кодируют белки из 243 аа с m 27 кДа, степень идентичности которых составляет 89%. Ген ТПК человека занимает позицию q34 в 7-й хромосоме [518, 731]. Методом рентгенокристаллографии установлена пространственная структура мышинной ТПК, состоящей из двух одинаковых субъединиц [667].

В дрожжах *S. cerevisiae* ТПК кодируется геном *THI80*, который содержит ОРС из 957 пн с информацией о полипептиде массой 36,616 кДа [516]. Методом гель-фильтрации было показано, что m экспрессированной в *E. coli* ТПК, слитой N-концевым остатком с тремя аминокислотными остатками вектора рTс99А, равна 72 кДа, т. е. фермент дрожжей также существует в форме гомодимера. Пространственная структура ТПК *S. cerevisiae* установлена рентгеноструктурным анализом при разрешении 1,8 Е [113]. Субъединица ТПК построена из двух доменов, один из которых представляет собой складку Россмана с 4 α -спиралями на каждой стороне 6-цепочечного антипараллельного β -слоя. Во втором домене расположены 4-цепочечный и 6-цепочечный антипараллельные β -слои, формирующие уплощенную сэндвичеподобную структуру. Активный центр находится в расщелине между соприкасающимися поверхностями субъединиц.

Выше уже отмечалось, что ТПК катализирует биосинтез ТДФ в клетках *P. denitrificans* [595]. Как и в случае с дрожжами и млекопитающими, активной является димерная форма фермента с m 44 кДа [596]. Эта форма способна агрегировать, образуя низкоактивный тетрамер. Аналогичная склонность к ассоциации характерна также для ТПК из дрожжей *S. carlsbergensis*, которая в зависимости от рН среды может быть представлена различными

олигомерными формами, находящимися в динамическом равновесии [88].

У кишечных бактерий — *E. coli* и *S. typhimurium* — синтез ТДФ *de novo* протекает по альтернативному пути, включающему фосфорилирование ТМФ, без его предварительного гидролиза до свободного тиамин [497, 691]. Тиаминмонофосфаткиназа (КФ 2.7.4.16) является продуктом *thiL* локуса, который кодирует белок с *m* 35 кДа [333, 691].

ТПК характеризуется широкой специфичностью в отношении обоих субстратов. Так, в качестве донора пирофосфата фермент может использовать не только АТФ, но и другие нуклеозид-5'-трифосфаты, причем в ряде случаев АТФ даже не является предпочтительным субстратом [18, 364, 488]. Аналогичным образом наряду с тиамин ТПК способна фосфорилировать широкий спектр его структурных аналогов, включая такие хорошо известные антагонисты, как пиритиамин и окситиамин [18, 429]. Как правило, K_M фермента для тиамин находится в микромолярной (0,1—10 мкМ), а для АТФ — в миллимолярной области концентраций (0,38—5,9 мМ) [18, 247, 303, 355, 484, 488, 544, 596, 685], что соответствует внутриклеточным физиологическим концентрациям этих соединений. Реакция, катализируемая ТПК, не идет в отсутствие катионов двухвалентных металлов. Среди исследованных катионов наиболее сильный активирующий эффект наблюдался при добавлении Mg^{2+} , Mn^{2+} и Co^{2+} [18, 247, 446]. Установлено, что истинным субстратом ТПК выступает комплекс $Me-NTP$. Методом сайт-направленного мутагенеза было показано, что в каталитическом механизме рекомбинантной ТПК человека важная роль принадлежит остаткам *Asp-71*, *Asp-73*, *Gln-96*, *Thr-99*, *Asp-100*, *Arg-131* и *Asp-133* [527].

В печени, энтероцитах и эритроцитах крысы ТПК находится исключительно в цитозольной фракции клетки [232, 300]. При исследовании активности фермента в субклеточных фракциях из *Euglena gracilis* 9,2% активности обнаружено в хлоропластах, 15,7% — в митохондриях и 65,7% — в цитозоле. K_M митохондриального фермента для

тиамина составляла 0,63 мкМ, цитозольного — 0,91 мкМ, при этом оба фермента различались по чувствительности к температуре и рН-оптимумам. ТПК хлоропластов проявляла крайне высокую степень лабильности. Вполне вероятно, что в субклеточных фракциях эвглены присутствуют три изоформы ТПК [623].

ТДФ, синтезированный *de novo*, занимает центральное положение в метаболизме фосфорных эфиров тиамина в эукариотной клетке (рис. 1.1). Основная его масса транспортируется в митохондрии, где включается в ПДГК, ОГДГК и дегидрогеназный комплекс α -кетокислот с разветвленной цепью. Другая часть связывается с цитозольной ТК. По некоторым оценкам в состав ТДФ-зависимых ферментов нервной ткани инкорпорировано 90—95% от общего внутриклеточного содержания ТДФ; этот белковосвязанный кофермент формирует пул, скорость оборота которого колеблется в пределах 6—20 ч [134, 151, 569]. Однако в гепатоцитах на долю свободного ТДФ может приходиться до 60 % [13].

Транспорт ТДФ в митохондрии печени крыс опосредован белком-переносчиком с K_m 20 мкМ [121]. В матриксе митохондрий свободный кофермент может гидролизиться ТДФазой, а образующийся при этом ТМФ транспортируется обратно в цитозоль, где подвергается дальнейшему расщеплению до тиамина — субстрата ТПК. Возможно, транспорт ТМФ из митохондрий осуществляется в обмен на ТДФ [122]. Исследования кинетики поглощения ТДФ митохондриями из различных типов клеток человека, выполненные в широком диапазоне концентраций, выявили, что процесс описывается двухфазной кривой насыщения с $K_m = 0,2—0,6$ мкМ для высокоаффинного компонента и $K_m = 115$ мкМ для компонента с низким сродством (лимфобласты). Интересно отметить, что транспорт ТДФ митохондриями из культур лимфобластов здоровых людей и больных TRMA имеет практически идентичные характеристики, тогда как в системе переноса тиамина у последних отсутствует высокоаффинный компонент. Данное обстоятельство может служить указанием на общую природу перенос-

чиков тиамина в плазматической и митохондриальной мембранах [639].

Недавно Lindhurst et al. [425] идентифицировали митохондриальный переносчик ТДФ в модели на нокаутных мышах. Им оказался белок *Slc25a19* — ортолог SLC25A19-транспортера человека, известного также под названием DNC и, как считалось ранее, ответственного за транспорт дезоксинуклеотидов в митохондрии [237]. Нуль-мутантные мыши проявляли признаки врожденной летальной Амиш-микроцефалии (МСРНА) — рецессивного аутосомального заболевания, характеризующегося пороками развития ЦНС и 10—100-кратным возрастанием уровня α -кетоглутарата (АКГ-урия) [366].

Аминокислотная последовательность SLC25A19 на 28% идентична последовательности Trc1p — митохондриального переносчика в клетках дрожжей *S. cerevisiae* [452]. Trc1p представляет собой мономерный белок внутренней мембраны с *m* 35,5 кДа, способный, хотя и с меньшей эффективностью, наряду с ТДФ и ТМФ осуществлять транспорт нуклеотидов. В зависимости от физиологических условий Trc1p работает по механизму унипорта либо антипорта, обменивая митохондриальный ТМФ на цитозольный ТДФ.

В клетках нервной системы свободный ТДФ, служащий предшественником ТТФ и ТМФ и насчитывающий 9—10% от общего содержания кофермента, формирует быстрооборачиваемый пул со скоростью возобновления в пределах 1—3 ч [134]. Концентрация свободного ТДФ в мозге крысы — величина порядка 2 мкМ [151]. Пока не ясно, состоит ли быстрооборачиваемый пул только из цитозольного ТДФ, или же его часть локализована в митохондриальном матриксе [122].

У бактерий генетический контроль регуляции биосинтеза ТДФ во многом реализуется благодаря механизму «рибосвитчей» (riboswitch). Было показано, что мРНК генов, кодирующих ферменты тиаминового пути, содержат консервативную нуклеотидную последовательность в 5'-UTR регионе (*thi* box-домен), способную специфическим образом связывать производные тиамина [481].

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	3
Введение	7
ГЛАВА 1. Витамин В₁: метаболизм и функции	17
1.1. Система метаболизма тиаминна	17
1.1.1. Содержание тиаминна и тиаминфосфатов в биологических объектах	17
1.1.2. Метаболизм фосфорных эфиров тиаминна	20
1.1.3. Транспорт тиаминна в клетку	21
1.1.4. Ферменты биосинтеза фосфорных эфиров тиаминна	25
1.1.4.1. Биосинтез ТМФ	25
1.1.4.2. Биосинтез ТДФ	26
1.1.4.3. Биосинтез ТТФ	31
1.1.5. Ферменты гидролиза фосфорных эфиров тиаминна	36
1.1.5.1. Гидролиз ТТФ	36
1.1.5.2. Гидролиз ТДФ	41
1.1.5.3. Гидролиз ТМФ	43
1.2. Биологическая роль витамина В ₁	44
1.2.1. Коферментная функция ТДФ	44
1.2.2. Некоферментная функция тиаминна	47
1.2.2.1. Специфическая функция тиаминна в нервной ткани	47
1.2.2.2. Биологическая роль ТТФ	50
ГЛАВА 2. Распространение тиаминтрифосфата в биологических объектах	55
2.1. Содержание тиаминна и тиаминфосфатов в биологических объектах	56
2.2. Зависимость концентрации ТТФ в органах млекопитающих от массы тела	67
2.3. Синтез ТТФ у бактерий и растений в ответ на изменения физиологических условий	83
2.4. Биосинтез ТТФ в органах и тканях мышечных	115

ГЛАВА 3. Гидролиз тиаминтрифосфата в невозбудимых тканях: очистка, физико-химические, кинетические и регуляторные свойства растворимой тиаминтрифосфатазы из почек быка	122
3.1. Отношение растворимой ТТФазной активности экстрактов из почек быка к щелочной фосфатазе, аденозин- и нуклеозидтрифосфатазам	124
3.2. Получение гомогенного препарата ТТФазы из почек быка..	139
3.3. Субстратная специфичность и кинетические свойства ТТФазы из почек быка	144
3.4. Регуляция активности ТТФазы почек	151
3.4.1. ТТФазная активность в почках крыс при экспериментальном аллоксановом диабете	152
3.4.2. Ингибирование ТТФазы из почек быка нуклеозид-5'-трифосфатами	162
3.5. Фосфорилирование рекомбинантной ТТФазы человека <i>in vitro</i> под действием протеинкиназы СК2 (казеинкиназы II)..	168
3.6. Выделение, очистка, физико-химические и кинетические свойства минорной формы цитозольной ТТФазы из почек быка	172
3.6.1. Очистка ТТФазы из почек быка	172
3.6.2. Идентификация фермента минорного пика.....	176
3.6.3. Сравнительная характеристика модифицированной и основной форм ТТФазы из почек быка.....	178
ГЛАВА 4. Первичная структура растворимой тиаминтрифосфатазы..	184
4.1. Очистка ТТФазы из головного мозга теленка	186
4.2. Секвенирование ТТФазы из головного мозга теленка ...	193
4.3. Клонирование кДНК гипотетического белка MGC2652....	197
4.4. Экспрессия кДНК гипотетического белка MGC2652 в <i>E. coli</i>	203
4.5. Субстратная специфичность и кинетические свойства рекомбинантной GST-слитой ТТФазы человека	208
4.6. Клонирование кДНК ТТФазы быка.....	212
4.7. Первичная структура ТТФазы быка	214
4.8. Структура и локализация гена ТТФазы человека.....	220
4.9. О чем говорит аминокислотная последовательность ТТФазы	221
ГЛАВА 5. Исследование вторичной структуры и каталитического механизма растворимой тиаминтрифосфатазы.....	226
5.1. Экспрессия в <i>E. coli</i> , очистка и исследование кинетических свойств рекомбинантной ТТФазы человека.....	228
5.2. Вторичная структура ТТФазы человека	233

5.3. Исследование каталитического механизма ТТФазы.....	237
5.3.1. Влияние pH на кинетические параметры ТТФазы из почек быка	238
5.3.2. Химическая модификация ТТФазы из почек быка .	243
5.3.2.1. Модификация реагентами на SH-группы	244
5.3.2.2. Модификация остатков лизина	248
5.3.2.3. Модификация остатков тирозина	250
5.3.2.4. Модификация остатков гистидина	252
5.3.2.5. Модификация реагентами на остатки аргинина	254
5.3.2.6. Модификация COOH-групп	256
5.3.3. Кинетические свойства химически модифицированной ТТФазы.....	257
5.3.4. Сайт-специфический мутагенез ТТФазы человека ..	260
5.3.4.1. Влияние мутаций S66A и S66S на кинетические свойства рекомбинантной ТТФазы человека	263
5.3.4.2. Модификация рекомбинантной ТТФазы человека реагентами на SH-группы	265
5.3.4.3. Влияние мутаций E63Q, E78K и E85K на GST-слитую ТТФазу человека	271
5.3.5. Термодинамические характеристики рекомбинантной ТТФазы человека	273
5.3.6. Некоторые элементы каталитического механизма ТТФазы	276
ГЛАВА 6. Гидролиз тиаминтрифосфата в биологических объектах..	285
6.1. Гидролиз ТТФ в тканях млекопитающих	287
6.1.1. Субклеточная локализация растворимой ТТФазы в почках быка.....	287
6.1.2. Распределение растворимой ТТФазы в органах и тканях быка	293
6.1.3. Кинетические свойства и распределение растворимой ТТФазы в органах и тканях крысы	295
6.1.4. Исследование кинетических свойств и экспрессии растворимой ТТФазы в органах и тканях мыши.....	298
6.1.5. Экспрессия мРНК растворимой ТТФазы в органах и тканях человека	303
6.1.6. Первичная структура ТТФазы свиньи отличается множественными заменами консервативных аминокислотных остатков	307
6.2. Гидролиз ТТФ в бактериях, растениях, тканях птиц и рыб.....	312
6.2.1. Растворимые ферменты с ТТФазной активностью в клетках <i>E. coli</i>	312

6.2.2. Идентификация растворимого белка с ТТФазной активностью в листьях петрушки.....	316
6.2.2.1. Исследование свойств фермента с ТТФазной активностью в экстрактах из листьев петрушки	317
6.2.2.2. Частичная очистка, субстратная специфичность и кинетические свойства белка с ТТФазной активностью из листьев петрушки	319
6.2.2.3. Выделение гомогенного препарата кислой фосфатазы из листьев петрушки	322
6.2.3. Гидролиз ТТФ в тканях перепелки, цыпленка и радужной форели.....	325
6.3. Молекулярная эволюция растворимой ТТФазы	329
ГЛАВА 7. Идентификация нового фосфатного производного тиамин-аденилированный тиаминтрифосфат	344
7.1. Выявление неизвестного фосфатного производного тиамин у <i>E. coli</i>	346
7.2. Очистка неизвестного фосфатного производного тиамин из клеток <i>E. coli</i>	347
7.3. Идентификация нового фосфатного производного тиамин	349
7.4. Распространение АТТФ в биологических объектах	358
7.5. Взаимосвязь метаболизма АТТФ и ТТФ у <i>E. coli</i>	359
7.6. Частичная очистка АТТФ-синтезирующего фермента из клеток <i>E. coli</i>	363
7.7. Кинетические свойства фермента синтеза АТТФ	367
7.8. Субстратная специфичность фермента синтеза АТТФ	374
Заключение	376
Литература	384