



УДК 577.164.11:577.112

## ИЗУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА И НЕБЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ ТИАМИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА СИНАПТОСОМ МОЗГА КРЫС

ПОСТОЕНКО В. А., ПАРХОМЕНКО Ю. М., ДОНЧЕНКО Г. В.

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

Исследован аминокислотный состав и содержание небелковых компонентов тиаминасвязывающего белка (ТСБ) синапсом мозга крыс. Показано, что белок является гликопротеином, его тиаминасвязывающая активность зависит от фосфолипидного окружения. Проведено исследование аминокислотного состава ТСБ. Отмечено высокое содержание остатков метионина и моноаминодикарбоновых аминокислот, характерных для структуры подобных белков, выделенных из других источников.

На основании полученных данных высказывается предположение о мембранной локализации ТСБ.

В настоящее время доказано, что процессы мембранного переноса большинства витаминов и коферментов, равно как и реализация их функций в специализированных клетках и клеточных структурах опосредованы специфическими белками [1].

Имеющаяся в литературе информация о тиаминасвязывающих белках касается главным образом клеток микроорганизмов [1]. Хорошо изучены и описаны ТСБ, выделенные из белка куриного яйца [2] и рисовых отрубей [3]. Сведения же о таких белках из тканей млекопитающих весьма ограничены и носят предварительный характер [1]. Не составляют исключения и ТСБ возбудимых клеток, которые в настоящее время привлекают особое внимание исследователей в связи с расшифровкой молекулярного механизма нейротропного эффекта тиамина [1, 4—6].

Ранее методом аффинной хроматографии нами впервые был выделен гомогенный препарат ТСБ из синапсом головного мозга крыс и изучен характер его специфического взаимодействия с тиамином и его фосфатами [7—9]. Показано, что белок имеет два участка связывания тиамина с  $K_{d1}$  3,1 мкМ и  $K_{d2}$  30 мкМ [8]. На основании полученных экспериментальных данных было высказано предположение о том, что ТСБ является интегральным белком синаптических мембран и играет определенную роль в реализации нейротропной функции тиамина.

Целью настоящей работы являются исследования некоторых фи-

зико-химических особенностей структурной организации ТСБ и их возможного значения для функционирования выделенного нами белка.

### Материалы и методы

В работе использовали электрофоретически гомогенный препарат ТСБ, выделенный из синапсом мозга крыс методами аффинной хроматографии и гель-фильтрации на сефадексе G-200 [7]. Специфическое связывание [<sup>14</sup>C] тиамина с белком определяли по методу, описанному нами ранее [7]. Препарацию ТСБ в присутствии нейраминидазы (100 мкг/мг белка), фосфолиаз А<sub>2</sub> (270 мкг/мг белка), С (360 мкг/мг белка), Д (540 мкг/мг белка) проводили в течение 30 мин при 37°. По истечении этого времени в среду инкубации добавляли меченый лиганд для измерения тиаминсвязывающей активности обработанного ферментами белка.

Аминокислотный состав гидролизата ТСБ определяли на анализаторе ААА-881 «Microtechna» (ЧССР). ТСБ гидролизовали в 6 н. НСl 24 ч. После гидролиза ионы хлора удаляли в эвекаторе над щелочью. Триптофан определяли спектрофотометрически [10].

Суммарную фракцию фосфолипидов мозга крыс получали экстракцией метанол-хлороформной смесью [11] с последующей кристаллизацией в ацетоне на холоде [12].

Белки синаптических мембран мозга крыс, связывающие тиамин, идентифицировали методом электрофореза с DDS-Na. Данная методическая часть работы экспериментально подобрана нами. Испытывались различные концентрации DDS-Na, β-меркаптоэтанола, pH среды. Связывание белков синаптических мембран с [<sup>14</sup>C] тиамином проводили до и после их обработки DDS-Na и β-меркаптоэтанолом. Для выявления специфического связывания ставились контрольные пробы: с 100-кратным избытком немеченого лиганда; с кипяченым белком; с БСА, обработанным DDS-Na.

Белки синаптических мембран мозга крыс солюбилизировали в 0,05 М трис-НСl буфере, pH 8,3, содержащем 1% β-Сl-Na и 1% β-меркаптоэтанол. Затем в инкубационную смесь добавляли [<sup>14</sup>C] тиамин (50 мкМ) и инкубировали 30 мин при 37°. Несвязывающую метку отделяли центрифугированием на микроколонках с сефадексом G-50 [13]. Полученный образец белков синаптических мембран, связанных с [<sup>14</sup>C] тиамином, наносили на ПААГ (градиент от 5 до 20%, 40 мкл, 100 мкг белка). Параллельно с этими пробами наносили на гель и белки-маркеры. Электрофорез проводили в трис-боратной буферной системе [14]. По окончании электрофореза несколько полос геля с белками мембран и белками-маркерами окрашивали. Оставшиеся полоски геля с белками синаптических мембран разрезали по 0,5 см. Каждый полусантиметровый фрагмент геля растворяли в 30% растворе перекиси водорода с 1% NH<sub>4</sub>OH при 65° в течение 5—6 ч и далее просчитывали радиоактивность в ЖС-103 на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-20 «Intertechnique» (Франция). Затем строили график профиля тиаминсвязывающей активности белков синаптических мембран мозга крыс. Величину M определяли по электрофоретической подвижности.

Нейтральные углеводы и фосфолипиды, входящие в состав ТСБ, определяли методами Seifter [16] и Васьковского [17].

Белок определяли по Bradford [13].

В работе использовали реактивы: [тиазол-2-<sup>14</sup>C]тиамин фирмы "Amersham" (Англия) с удельной радиоактивностью 24 мКи/ммоль; нейраминидаза фирмы "P-L Biochemicals" (Швеция); фосфолипаза А<sub>2</sub>, выделенная из яда пчелы, (N.A. 200 ед/мг белка), С—из *Vacillus cereus* (У.А. 100 ед/мг белка), Д—из *Stereptomyces cinnamonensis*: миоэлаза, β-галактозидаза, фосфорилаза В, БСА, овальбумин, карбоангидраза ("Sigma", США).

### Результаты и обсуждение

В настоящее время в литературе накоплено достаточно сведений о том, что многие синапсомные белки, рецепторы гормонов, нейромедиаторов и нейропептидов являются сложными макромолекулами, содержащими в своем составе углеводные и липидные компоненты [19, 20].

Для выявления небелковых компонентов в функциональной единице ТСБ использовали методы специфического ферментативного гидролиза.

Согласно представленным данным (табл. 1), предварительная

Таблица 1

Влияние фосфолипаз и нейраминидазы на связывание [<sup>14</sup>C] тиаминна тиаминсвязывающего белка (n=4)

Воздействие	Специфическое связывание	
	имп/мин 5 мкг белка	%
Нативный белок	2448,3±152,7	100
Фосфолипаза А <sub>2</sub>	1885,3±104,5*	77,0
Фосфолипаза С	2036,0±39,9	85,2
Фосфолипаза Д	1918,3±49,6*	79,6
Нейраминидаза	4526,0±242,3*	188,0

Примечание. \*p < 0,05.

обработка ТСБ фосфолипазами А<sub>2</sub>, С и Д вызывает определенное снижение (в среднем на 20%) тиаминсвязывающей активности белка. Количественное определение фосфолипидов в липидном экстракте ТСБ позволяет обнаружить в его составе лишь следы фосфатидилхолина (≤0,002 моль на 1 моль белка). На основании этих данных делается вывод, что фосфолипиды не входят в заметном количестве в состав структуры изолированного нами гомогенного ТСБ.

Однако, предполагая мембранную локализацию ТСБ, мы исследовали возможность влияния экзогенных фосфолипидов на тиаминсвязывающую активность белка. Как следует из табл. 2, преникубация препарата ТСБ с фосфолипидами мозга крыс (в течение 30 мин) при 37° в соотношении 1, 2 и 4 моль фосфолипидов на 1 моль ТСБ приводит к значительному повышению тиаминсвязывающей активности белка (особенно в соотношении 2 моль фосфолипидов на 1 моль белка).

По-видимому, фосфолипидное окружение участвует в формировании активного белкового центра акцепции тиаминна. Предварительная обработка ТСБ нейраминидазой (табл. 1) приводит к увеличению его тиаминсвязывающей активности на 88,9%. Этот факт позво-

воляет предположить наличие углеводного компонента в составе ТСБ, что подтвердилось результатами количественного анализа. В изолированном нами ТСБ обнаружено  $5,90 \pm 0,36\%$  остатков нейтральных углеводов. Приведенные экспериментальные данные гово-

Таблица 2

Влияние фосфолипидов мозга крысы на связывание [ $^{14}$ C]тиамина тиаминсвязывающего белка ( $n=3$ )

Концентрация фосфолипидов, в моль на 1 моль ТСБ	Специфическое связывание [ $^{14}$ C] тиамина	
	нм/мин 4мкг белка	%
Контроль	2161,0 $\pm$ 193	100
1:1	2672,5 $\pm$ 153*	123,7
2:1	4855,0 $\pm$ 315*	224,7
4:1	3376,4 $\pm$ 221*	156,3

Примечание. \*  $p < 0,05$ .

рят о том, что выделенный ТСБ из синапсом мозга крысы является гликопротеином. Однако не исключена возможность, что функционально активной формой ТСБ *in vivo* является гликолипопротеин. Роль углеводных остатков для проявления функции гликопротеинов окончательно не установлена. Исходя из факта о повышении тиаминсвязывающей активности белка после его обработки нейрамини-

Таблица 3

Аминокислотный состав тиаминсвязывающего белка

Аминокислота	Количество остатков	Аминокислота	Количество остатков
Лизин	50	Аланин	60
Гистидин	10	1,2-Пикетин*	7
Аргинин	33	Валин	34
Аспарагиновая кислота		Изолейцин	21
аспаратин	103	Лейцин	65
Треонин	41	Метионин*	25
Серин	66	Тирозин	21
Глутаминовая кислота*		Фенилаланин	31
глутамин	117	Триптофан*	12
Пролин	45		
Глицин	16	Всего	850

Примечание. \* Определено полуколичественным методом.

\*\* данные получены спектрофотометрическим определением.

дазой, можно предположить, что углеводы не входят в состав тиаминсвязывающих участков белка. Обработка нейраминидазой препарата ТСБ приводит, возможно, к высвобождению дополнительных тиаминсвязывающих группировок белка. По-видимому, углеводы маскируют эти участки, осуществляя таким образом регулицию связывания тиамина белком. Эти результаты дают основание предполагать роль карбоксильных и амидных групп моноаминодикарбоновых кислот и их амидов во взаимодействии тиамина с белком [21], так как эти группы преобладают в структуре изучаемого ТСБ (табл. 3), и именно они играют решающую роль в связывании сигналовых кислот белками [22].

С целью выяснения особенностей структуры ТСБ изучали его аминокислотный состав (табл. 3). Прежде всего, обращает на себя внимание большое количество в составе белка моноаминодикарбоновых аминокислот и метионина. Преобладание моноаминодикарбоновых аминокислот подтверждается и ИЭТ, определенной нами ранее при pH 4,8—5,0 [8]. Из изолированных на сегодняшний день ТСБ аминокислотный состав описан для белков из трех объектов: молочнокислых бактерий [23], дрожжей [21], эритроцитов крови [24].

Наряду с различием в величине  $M_r$  и количественном соотношении отдельных аминокислот можно отметить и некоторое сходство в структуре описанных ранее и изолированного нами впервые из синапсомозга крысы ТСБ, а именно, содержание большого количества моноаминодикарбоновых и серусодержащих аминокислот. По данным японских исследователей, изучавших ТСБ, выделенный из дрожжей, остатки кислых аминокислот играют существенную роль в связывании тиамина белком [22]. Они предполагают, что четвертичный атом тиазолового цикла тиамина (положительно заряженный) взаимодействует с отрицательно заряженными группировками на белке (COOH-группы глутаминовой и аспарагиновой кислот).

Кроме установленных фактов активации экзогенными фосфолипидами тиаминсвязывающей активности белка, наличия в его составе углеводных остатков и значительного количества гидрофобных аминокислот ранее нами получен еще ряд косвенных доказательств мембранного прохождения белка: значения  $K_d$  и сродство тиаминфосфатов идентичны как для препаратов изолированного из синапсомозга ТСБ, так и для тиаминсвязывающих участков белой природы синаптических мембран [7, 8, 24].

Однако изучение мембранной локализации выделенного ТСБ является предметом отдельных исследований и представляется важным для оценки функциональной роли белка.

Полученные данные свидетельствуют о сложности структуры изолированного белка и о несомненной регуляторной роли фосфолипидов и сигналов кислот во взаимодействии тиамина с ТСБ синапсомозга крысы.

## STUDY OF AMINOACID COMPOSITION AND NON-PROTEIN COMPONENTS OF THIAMINE-BINDING PROTEIN IN RAT BRAIN SYNAPTOSOMES

POSTOENKO V. A., PARKHOMENKO YU. M., DONCHENKO O. V.

Palladin Institute of Biochemistry, Ukrainian SSR Academy of Sciences, Kiev

The aminoacid composition of thiamine binding protein (TBR) has been studied in synaptosomes of rat brain alongside with its non-protein components. This protein belongs to glycoproteins and its thiamine-binding capacity depends on the phospholipid environment. The aminoacid composition of TBR was examined. High content of residues of methionine and monoaminodicarboxylic aminoacids, characteristic of such proteins isolated from other sources was detected. On the basis of the data obtained we propose that TBR is located in the membrane.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Халмурадов А. Г., Тоцкий В. П., Чаговец Р. В. — В кн.: Мембранный транспорт коферментных витаминов и коферментов, с. 16—60, Киев, Наукова думка, 1982.
2. Maniyappa K., Aiga P. R. *Biochim. J.*, v. 193, p. 679—685, 1981.
3. Nishimura H., Uechara Y., Saitaka K., Iwashima A. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v. 30, p. 1—10, 1984.
4. Kimuro M., Itokawa Y. *J. Chromatogr.*, v. 211, № 2, p. 290—291, 1981.
5. Takenaka T., Yoshioka T., Inoue H. *Proc. Jap. Acad. B*, v. 54, p. 316—320, 1978.
6. Iwata H. *Vitamin (Zaen)*, v. 50, № 1, p. 1—12, 1976.
7. Постоенко В. А., Пархоменко Ю. М., Вовк А. П., Халмурадов А. Г., Донченко Г. В. *Биохимия*, т. 52, с. 1792—1797, 1987.
8. Постоенко В. А., Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В. *Укр. биохим. журн.*, т. 59, № 6, с. 9—14, 1987.
9. Постоенко В. А. — В сб.: Укр. биохим. съезд, т. 2, с. 167—168, Киев, Наукова думка, 1987.
10. Демченко А. П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. Киев, Наукова думка, 1981.
11. Folch J., Lees M., Sloan Stanley G. H. *J. Biol. Chem.*, v. 226, p. 497—511, 1957.
12. Small D. M., Bourges M. C., Derwichian D. G. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 125, p. 563—580, 1966.
13. Nishimura H., Yoshioka K., Iwashima A. *Anal. Biochem.*, v. 139, p. 373—376, 1984.
14. Кавецкий Р. Е., Казьмин С. Д. *Докл. АН СССР*, т. 230, № 1, с. 223—226, 1976.
15. Abita J., Chicheportiene E., Schweitz H., Lazdunski M. *Biochemistry*, v. 16, p. 1838—1844, 1977.
16. Seifter S., Dayton S., Novic B., Muntwyler E. *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 25, p. 191—200, 1950.
17. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasantin I. M. *J. chromatogr.*, v. 114, № 1, p. 129—141, 1975.
18. Bradford M. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248—254, 1976.
19. Глебов Р. П., Крыжановский Г. П. *Функциональная биохимия синапсов*, М., Медицина, 1978.
20. Henryk M. *Handbook Neurochem. N. Y. London*, Plenum Press, v. 7, p. 111—134, 1984.
21. Henderson G. B., Zevety E. M., Kander R. J., Huennkens F. M. *J. Supramol. Struct.*, v. 6, № 2, p. 231—247, 1977.
22. Iwashima A., Nishimura H., Nishino H. *Vitamin*, v. 58, № 12, p. 577—588, 1974.
23. Аверин В. А. Транспорт тиамина через биохимические мембраны, Автореф. канд. дис., Вильнюс, Ин-т биохимии АН Литовской ССР, 1983.
24. Пархоменко Ю. М., Черныш Ю. П., Протасова З. С., Постоенко В. А. *Укр. биохим. съезд*. Киев, Наук. Думка, т. 1, с. 120—121, 1987.

Поступила 25.XII.1989