

## НАЛИЧИЕ ДВУХ РАЗЛИЧНЫХ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ НА ТИАМИНСВЯЗЫВАЮЩЕМ ПРОТЕИНЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН СИНАПТОСОМ

Ю. М. ПАРХОМЕНКО, А. А. СТРОКИНА, С. Ю. ПИЛИПЧУК,  
С. П. СТЕПАНЕНКО, Л. И. ЧЕХОВСКАЯ, Г. В. ДОНЧЕНКО

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;  
e-mail: yurark@biochem.kiev.ua

*Исследовано влияние тиаминтрифосфата на тиаминсвязывающую активность (ТСА) в препаратах плазматических мембран синапсом (ПМС), изолированных из головного мозга крыс. Показано ингибирование тиаминтрифосфатом тиаминсвязывающей активности ПМС, которое носит конкурентный характер ( $K_i = 1,0 \pm 0,3$  мкМ). В то же время тиамин в диапазоне концентраций 0,5–20 мкМ не оказывает ингибирующего действия на тиаминтрифосфатазную (ТнТР-азную) активность, а, напротив, наблюдается ее активация с максимумом при концентрации 2,5 мкМ.*

*Изучено влияние классических антагонистов тиамина (ампролиума, окситиамина и пиритиамина) на биологическую активность плазматических мембран, присущую тиаминсвязывающему протеину (ТСП). Величина  $IC_{50}$  для ингибирования ампролиумом тиаминсвязывающей активности ПМС определена равной  $50 \pm 4,0$  мкМ, в то время как на ТнТР-азную активность этот антагонист не оказывает влияния. Показано ингибирование окситиамином обоих видов активности ТСП. Величина  $IC_{50}$  составляет  $125 \pm 28$  и  $1000 \pm 95$  мкМ соответственно для ТСА и ТнТР-азной активности. А величины  $IC_{50}$  для ингибирования ТСА и ТнТР-азной активности пиритиамином отличаются на порядок, составляя соответственно  $2,2 \pm 0,2$  и  $43 \pm 9$  мкМ.*

*Полученные данные свидетельствуют о том, что активные центры на ПМС, отвечающие за ТСА и ТнТР-азную активность, обладают различной чувствительностью к антагонистам тиамина. Полученные результаты дают основание предположить, что за специфическое связывание и гидролиз тиаминфосфатов в ТСП синаптических мембран отвечают различные активные центры.*

*Ключевые слова: тиамин, тиаминтрифосфат, тиаминтрифосфатаза, плазматические мембраны синапсом, тиаминсвязывающий протеин, антагонисты тиамина.*

**В**ысокую чувствительность нервных клеток к дефициту тиамина (витамина В<sub>1</sub>), отмечаемую уже на ранних этапах изучения этого витамина, оказалось невозможным объяснить только с позиции его энзимной функции, то есть с позиции участия тиаминдифосфата (ThDP) в функционировании нескольких энзимов углеводного обмена [1–3]. Это обстоятельство побудило исследователей искать и другие пути участия тиамина в биохимических процессах, обеспечивающих функциональную активность нервных клеток.

Анализ результатов собственных исследований и данных литературы позволил авторам выдвинуть предположение о существовании в нервных клетках подвижного пула тиамина и его фосфатов (не связанных с протеинами), циркуляция которых между внутриклеточным пространством и пресинаптической щелью обеспечивает сопряжение между обменом тиамина в нервной клетке и ее функцией [1]. На-

рушение такого сопряжения может вносить существенный вклад в развитие дегенеративных изменений в клетках независимо от причины, ее вызвавшей: недостаточность витамина алиментарного происхождения [2, 4], генетические дефекты протеинов, принимающих участие в обмене и функционировании витамина В<sub>1</sub> [2, 5], действие антагонистов этого витамина, блокирующих определенные реакции в его обмене [6].

По нашим представлениям, ТСП, изолированный нами ранее из нервных клеток [7, 8], опосредует перенос тиамина через плазматическую мембрану в обоих направлениях. Сведения о мембранной локализации ТСП [9] и выявленная его способность избирательно гидролизовать фосфорные эфиры тиамина [8] переключаются с ранними наблюдениями в опытах с нервно-мышечными препаратами, свидетельствующими о том, что из этих препаратов при возбуждении высвобождается

в среду свободный тиамин, а не его фосфорные эфиры, превалирующие в общем внутриклеточном пуле производных тиамина [10]. Согласно сформулированной гипотезе, ключевыми звеньями обмена тиамина, обеспечивающими циркуляцию его подвижного пула в клетку и из нее, в частности, являются: 1 — вышеуказанный мембранный тиаминсвязывающий протеин, осуществляющий перенос тиамина через плазматическую мембрану внутрь клетки, 2 — цитозольный фермент тиаминкиназа (КФ 2.7.6.2), фосфорилирующий поступивший в клетку тиамин до ThDP, что способствует созданию позитивного градиента свободного тиамина внутрь клетки, 3 — мембранная тиаминфосфатгидролаза, осуществляющая гидролиз тиаминфосфатов до свободного тиамина при выходе его из клетки. Последняя ферментативная активность, согласно полученным нами данным, также присуща мембранному ТСП. В наших предыдущих исследованиях было показано, что ТСП является единственным носителем тиаминтрифосфатазной активности, ассоциированной с плазматическими мембранами [11]. Вопрос о том, является ли этот протеин тиаминфосфатгидролазой, где один активный центр отвечает за связывание тиамина и его фосфатов и за гидролиз последних, или на протеине имеется два различных активных центра, один из которых проявляет аффинность к тиамину, а другой отвечает за избирательный гидролиз тиаминфосфатов, остается не выясненным. Изолированный нами протеин по изученным сегодня свойствам отличается как от описанного транспортера тиамина [12], так и от хорошо изученной растворимой цитозольной тиаминтрифосфатазы (ThTP-азы) [13] и, как можно заключить из результатов электрофореза в ПААГ, состоит из двух субъединиц [14]. Поскольку нет полной уверенности в том, что ТСП, который мы изучаем в изолированном состоянии, сохраняет свои нативные свойства, наше исследование проведено на препаратах ПМС, где данный протеин локализован [9]. Цель настоящей работы — приблизиться к пониманию структурно функциональной организации тиаминсвязывающего протеина в плазматической мембране.

### Материалы и методы

В работе использовали сахарозу, пируват, тиамин, окситиамин (1-[(4-амино-2-метил-5-пиримидил)метил]-4-(2-гидроксиэтил)-5-метилпиримидиний-1-хлорид), ампролиум (1-[(4-амино-2-пропил-5-пиримидил)метил]-2-метилпиримидин), пиритиамин (1-[(4-ами-

но-2-метил]-5-пиримидилметил)-2-метил-3-(β-гидроксиэтил)пиридиний бромид), алкогольдегидрогеназу, (Sigma, США), трис-гидроксиметиламинометан, тиаминдифосфат, NADH (Fluka, Швейцария). Тиаминтрифосфат гидрохлорид был синтезирован и любезно предоставлен нам проф. В.Н. Сильниковым (Институт химической биологии и фундаментальной медицины РАН, Новосибирск), за что мы выражаем ему глубокую благодарность. Остальные реактивы были отечественного производства квалификации чда и хч.

В экспериментах использованы крысы-самцы с массой тела 180–200 г.

Синапсомы и плазматические мембраны синапсом получали из мозга крыс методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы как описано ранее [15]. До использования препараты ПМС сохранялись в жидком азоте.

Связывание [<sup>14</sup>C]тиамина с препаратами ПМС исследовали с помощью радиолигандного метода описанного ранее [15]. Определение тиаминсвязывающей активности проводили с использованием меченого по углероду [тиазол-2-<sup>14</sup>C]тиамина в 0,05 М Рингер-бикарбонатном буфере, pH 7,4 (в mM): NaCl — 125, KCl — 4,5, CaCl<sub>2</sub> — 2,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1,3, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O — 1,3, NaHCO<sub>3</sub> — 17,6, глюкоза — 11). Объем инкубационной среды составлял 0,5 мл, концентрация [<sup>14</sup>C]тиамина в пробе — 0,8–1,2 мкМ, препараты плазматических мембран добавлялись из расчета 0,5 мг общего протеина в 1 мл. В опытах по изучению влияния холодного тиамина, тиаминдифосфата и тиаминтрифосфата на связывание меченого тиамина препаратами синапсом и ПМС конечная концентрация указанных соединений составляла 10 мкМ. Инкубацию проводили при 37 °С в течение 5 мин. Реакцию останавливали охлаждением на ледяной бане (0 °С). Несвязанный лиганд отделяли фильтрацией на мембранных фильтрах Whatman GF/C с диаметром пор 0,45 мкм после введения в инкубационную среду 0,1%-го раствора γ-глобулина G и 25%-го полиэтиленгликоля (M<sub>r</sub> = 6000) для осаждения протеинов. На фильтрах препарат дважды промывали 5 мл охлажденной до 0 °С инкубационной смесью без тиамина. Вся процедура промывания и фильтрации занимала не более 30 с. Фильтры с препаратами высушивали в потоке воздуха и переносили во флаконы со сцинтилляционной жидкостью (СЖ-1). Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-20 (Intertechneque, Франция). Специфическое связывание определяли по разнице между общим связыванием (инкубация только с

меченым тиамином) и неспецифическим (в присутствии 100-кратного избытка немеченого тиамин). Удельную активность выражали в пмолях тиамин, связавшегося с 1 мг протеина.

ThTP-азную активность ПМС определяли по накоплению ThDP, который образуется в результате реакции гидролиза ThTP. Энзиматическое определение ThDP основывается на рекомбинации его как коэнзима с апопируватдекарбоксилазой (апоПДК) и проведении реакции с избытком пирувата в присутствии алкогольдегидрогеназы (АДГ) [16]. Реакция оценивалась по окислению NADH. Для определения ThDP получали апоПДК из пивных дрожжей (*Saccharomyces carlsbergensis*) в виде сульфатной пасты, которую хранили при -20 °С. Непосредственно перед работой из пасты получали апоэнзим [16].

ThTP-азную активность определяли при 37 °С в стандартной среде инкубации (объем 0,25 мл), которая содержала: 50 мМ трис-НСl буфер, рН 7,4, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 80 мкМ ThTP. Время инкубации – 20 мин. Энзиматическую реакцию инициировали введением в среду инкубации 50 мкл суспензии ПМС (50 мкг протеина) и останавливали добавлением 1 мл 0,05 М Na-фосфатного буфера, рН 6,8. Для количественного определения образовавшегося ThDP 0,1 мл аликвоты инкубировали в течение 30 мин при 25 °С с апоПДК [16]. Активность определяли в сопряженной с АДГ реакции по снижению экстинкции NADH при 340 нм. Количество образовавшегося ThDP рассчитывали по калибровочной кривой, которую строили, используя определенные концентрации хроматографически чистого ThDP.

Содержание протеина в мембранном препарате определяли по методу Лоури.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Кинетический анализ и статистическую обработку данных проводили с помощью программы Excel.

### Результаты и обсуждение

Согласно предыдущим исследованиям [7–9], изолированный нами ранее из мембранных препаратов ТСП, является бифункциональным и состоит из двух субъединиц. Присущи ли оба вида биологической активности ТСП (способность связывать тиамин и способность гидролизовать тиаминфосфаты) одному и тому же активному центру (субъединице) или они являются функцией разных активных центров или субъединиц не установ-

лено. Этот вопрос возник в связи с результатами предыдущих исследований, проведенных на изолированном ТСП. Было показано, что тиаминмонофосфат (ThMP) и тиаминтрифосфат (ThTP), но не ThDP, способны частично конкурировать с тиамином за тиаминсвязывающие участки на ТСП. Так, ThMP снижает связывание меченого тиамин в среднем на 50, а ThTP – на 25% при концентрации этих соединений в среде инкубации в десять раз превышающей концентрацию тиамин [7]. В то же время тиаминфосфатгидролазная активность ТСП не является строго специфичной к ThTP, что отличает данный протеин от растворимой тиаминтрифосфатазы, проявляющей строгую специфичность только к ThTP [13, 17]. Показано, что ТСП избирателен к фосфорным эфирам тиамин, его активность в отношении гидролиза трех природных тиаминфосфатов составляет ряд: ThTP > ThDP > ThMP.

Чтобы найти ответ на поставленный выше вопрос в данной работе проведено исследование влияния некоторых производных тиамин на активность ПМС.

Слабое ингибирование ThTP тиаминсвязывающей активности ТСП в составе плазматических мембран синаптосом было показано ранее [7]. Мы исследовали кинетику этого ингибирования, используя концентрацию тиаминтрифосфата, начиная с физиологической и выше (диапазон 0,1–8 мкМ), и две концентрации меченого тиамин – 0,8 и 1,2 мкМ. Результаты приведены на рис. 1.

Полученные данные свидетельствуют о том, что ингибирование ТСА плазматических мембран ThTP является конкурентным. Среднее значение кажущейся  $K_m$ , рассчитанное по данным трех экспериментов, определено равным  $1,0 \pm 0,3$  мкМ, что не сильно превышает величину возможной концентрации ThTP в нервных клетках, если учитывать, что общая концентрация всех производных тиамин в этих клетках находится в пределах 10–12 мкМ. Однако этот результат еще не является доказательством того, что тиаминсвязывающие участки на мембране (или ТСП) отвечают и за гидролиз тиаминфосфатов. Скорее всего, они свидетельствуют о сродстве этих участков к тиамину и его фосфатам. При сравнительном изучении способности холодного тиамин и тиаминфосфатов конкурировать с меченым тиамин за связывание с изолированными синаптосомами и ПМС оказалось, что ThTP и, в некоторой степени, ThDP, проявляют конкурентную способность только на препаратах мембран и не конкурируют с тиамин за связывание с целыми синаптосомами (табл. 1).

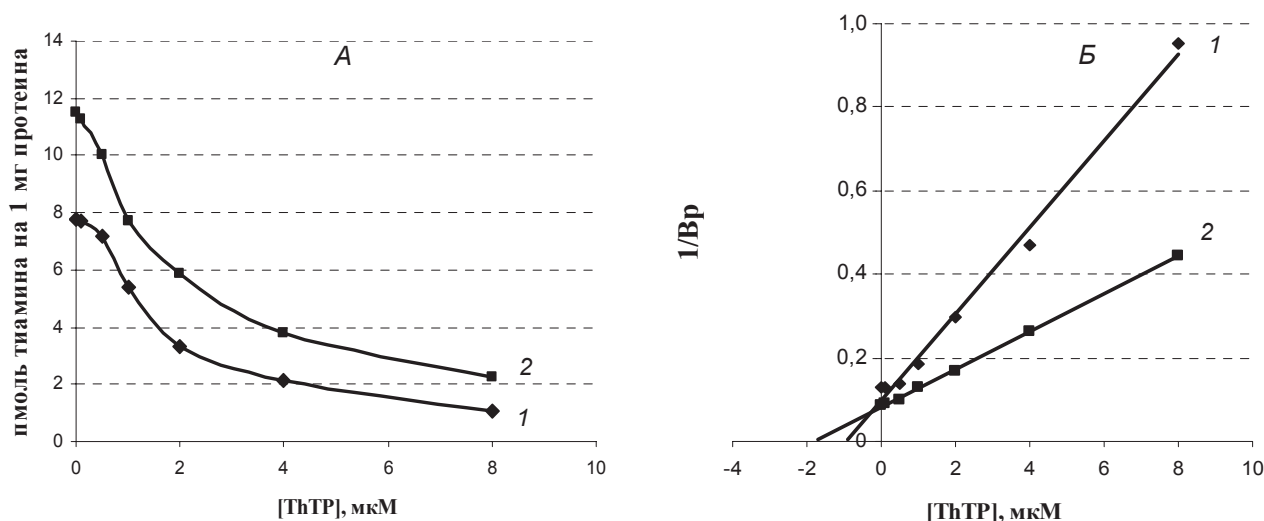


Рис. 1. Связывание  $[^{14}\text{C}]$ тиамина с плазматическими мембранами синапсом в присутствии в инкубационной среде ThTP (А); и выраженное в координатах Диксона (Б); 1 – концентрация тиамина 0,8 мкМ, 2 – концентрация тиамина 1,2 мкМ. Вр – количество меченого тиамина, связавшегося с 1 мг протеина (данные типичного эксперимента)

Более четкий ответ был получен при исследовании влияния связывания тиамина с мембранами на ThTP-азную активность ТСП. В этом исследовании диапазон концентрации тиамина варьирует от 0,5 до 20 мкМ. Приведенные на рис. 2 результаты свидетельствуют, что на изолированных мембранах тиамин не ингибирует ThTP-азную активность. Напротив, наблюдается достоверное повышение этой активности, пик которой приходится на концентрацию тиамина порядка 2,5 мкМ. Эти данные дают основания предположить, что, во-первых, на ТСП за его активность отвечают различные участки, во-вторых, что эти участки конформационно могут взаимодействовать.

Для того, чтобы окончательно убедиться в том, что два типа активности ТСП не являются результатом функционирования одного и того же центра на протеине, далее мы провели исследование влияния производных тиамина – его антагонистов: ампролиума, окситиамина и пиритиамина на обе активности. Поскольку в настоящее время доказано, что ТСП локализован в плазматических мембранах [9, 11], где он проявляет обе свои активности, в данной серии исследования проведены на изолированных препаратах плазматических мембран.

Данные литературы свидетельствуют о том, что диапазон концентраций различных антагонистов тиамина, при которых наблюда-

Таблица 1. Влияние тиамина и его фосфатов на связывание  $[^{14}\text{C}]$ тиамина с препаратами синапсом и плазматических мембран синапсом

Соединение, добавленное в инкубационную среду	Связывание, %	
	Синапсомы	Плазматические мембраны синапсом
Контроль	100,0 ± 12,0	100,0 ± 9,8
Тиамин (холодный)	37,1 ± 14,3*	11,4 ± 2,1*,#
Тиаминдифосфат	94,3 ± 9,0	74,3 ± 15,0
Тиаминтрифосфат	122,2 ± 15,6	22,9 ± 3,7*,#

За 100% принято связывание  $[^{14}\text{C}]$ тиамина при отсутствии производных тиамина ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ). Концентрация меченого тиамина в среде колеблется в пределах 1 мкМ, конечная концентрация холодного тиамина и его фосфатов – 10 мкМ. \*  $P < 0,05$  в сравнении с контролем, #  $P < 0,05$  в сравнении с экспериментами на синапсоме.



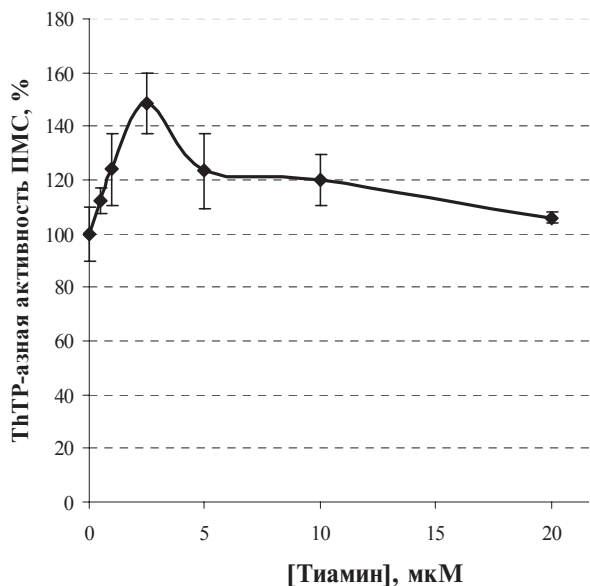


Рис. 2. Влияние тиаминна на тиаминтрифосфатазную активність плазматических мембран синапсом. За 100% принята ThTP-азная активність при отсутствии в инкубационной среде тиаминна ( $M \pm t, n = 6$ )

ется их действие на определенные реакции обмена тиаминна, очень отличается [18]. Поэтому были проведены исследования по оценке эффективных концентраций выбранных соединений для тиаминсвязывающей и тиаминтрифосфатазной активности ПМС, которые в случае ингибирования оценивались по величине  $IC_{50}$  (концентрация антагониста, которая приводит

к 50%-му ингибированию от максимально возможного для этого антагониста) [18, 19].

На рис. 3 приведены данные, полученные в экспериментах с ампролиумом.

Ампролиум описан в литературе как специфический ингибитор транспорта тиаминна в клетку [20]. Действительно, полученные данные подтверждают ингибирование ампролиумом связывания тиаминна с ПМС, в то же время в наших исследованиях он не оказывал достоверного эффекта на тиаминтрифосфатазную активність ПМС.

Данные по влиянию окситиаминна на исследуемую активність приведены на рис. 4. Согласно данным литературы, окситиамин, в отличие от ампролиума, способен проникать в клетки и взаимодействовать с протеинами, принимающими участие в обмене тиаминна, хотя его сродство к этим протеинам значительно ниже, чем для тиаминна [21]. В наших исследованиях окситиамин ингибирует оба вида анализируемой активності, однако определяемая величина  $IC_{50}$  для ThTP-азной активності намного выше, чем для тиаминсвязывающей.

Пиритиамин считается одним из наиболее сильных антагонистов тиаминна [20] по токсичному эффекту на нервную систему *in vivo*. В наших исследованиях он, так же как и окситиамин, ингибирует активність ПМС, однако диапазон эффективных концентраций для ThTP-азной активності, как можно видеть из рис. 5, более чем на порядок выше, чем для тиаминсвязывающей.

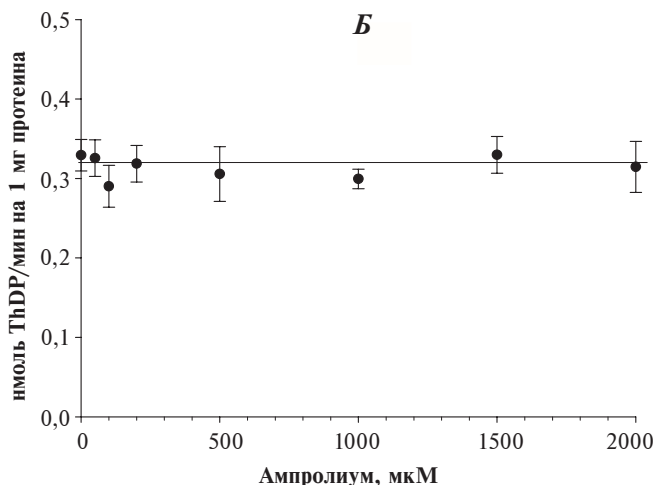
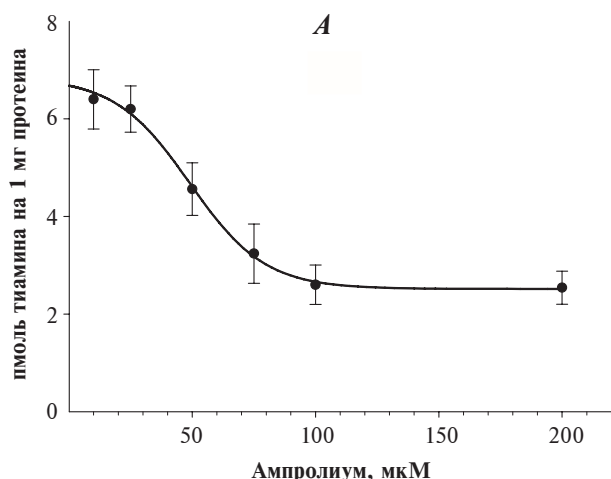


Рис. 3. Концентрационная зависимость влияния ампролиума на тиаминсвязывающую и ThTP-азную активність изолированных плазматических мембран синапсом: А – тиаминсвязывающая активність (пмоль тиаминна, связавшегося с 1 мг протеина), концентрация тиаминна в среде инкубации – 1,4 мкМ; Б – ThTP-азная активність (нмоль ThDP, образовавшегося за 1 мин в 1 мг протеина), концентрация ThTP в среде инкубации – 80 мкМ

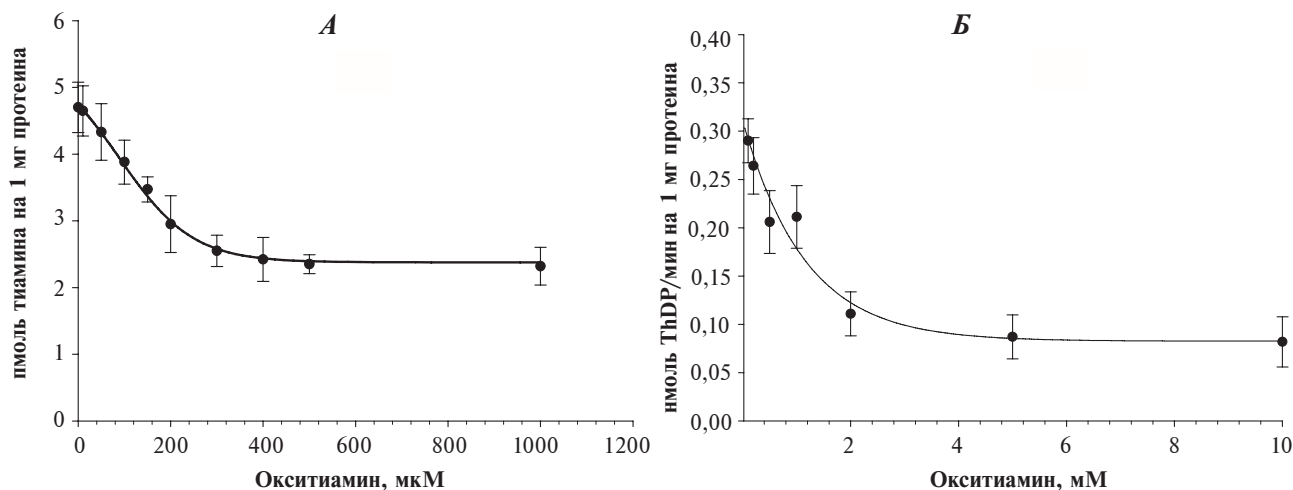


Рис. 4. Концентрационная зависимость влияния окситиамина на тиаминсвязывающую и ThTP-азную активность изолированных плазматических мембран синапсом: А – тиаминсвязывающая активность (пмоль тиамина, связавшегося с 1 мг протеина), концентрация тиамина в среде инкубации – 1,4 мкМ; Б – ThTP-азная активность (нмоль ThDP, образовавшегося за 1 мин в 1 мг протеина), концентрация ThTP в среде инкубации 80 мкМ

Результаты, полученные в данном исследовании, свидетельствуют о различной чувствительности двух типов активности ТСП к антагонистам тиамина и подтверждают сделанное выше предположение о том, что за специфическое связывание тиамина и гидролиз тиаминфосфатов отвечают различные активные центры этого протеина. Для более точной оценки способности производных тиамина ингибировать активность ТСП по приведен-

ным на рис. 1–3 результатам были определены величины  $IC_{50}$  после трансформации данных в полулогарифмические координаты:  $\{V$  (пмоль тиамина/мг протеина или нмоль ThDP/мин на 1 мг протеина);  $\lg[i]\}$ . Полученные результаты приведены в табл. 2.

Анализируя данные относительно влияния производных тиамина на тиаминсвязывающую и тиаминфосфатгидролазную активность ТСП в составе ПМС, можно сделать вывод: актив-

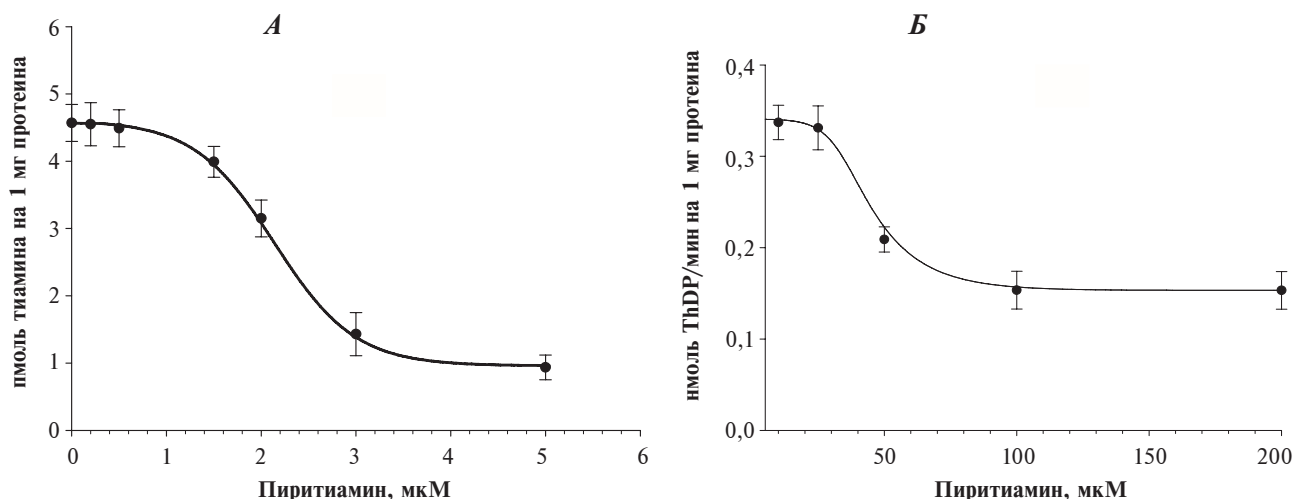


Рис. 5. Концентрационная зависимость влияния пиритиамина на тиаминсвязывающую и ThTP-азную активность изолированных плазматических мембран синапсом: А – тиаминсвязывающая активность (пмоль тиамина, связавшегося с 1 мг протеина), концентрация тиамина в среде инкубации – 1,4 мкМ; Б – ThTP-азная активность (нмоль ThDP, образовавшегося за 1 мин в 1 мг протеина), концентрация ThTP в среде инкубации 80 мкМ

Таблиця 2.  $IC_{50}$  для інгібування антагоністами тиамина тиамінсвязуваючої та ThTP-азної активності плазматических мембран синапсом

Производное тиамина	Значение $IC_{50}$ , мкМ	
	ТСА	ThTP-азная активність
Ампролиум	$50,0 \pm 4,0$	—
Окситиамин	$125,0 \pm 28,0$	$1000,0 \pm 95,0$
Пиритиамин	$2,2 \pm 0,2$	$43,0 \pm 9,0$

ные центры, отвечающие за оба вида активности, локализованы на разных участках ТСП, возможно на разных его субъединицах (из выявленных двух) [14]. Можно предположить, что тиамінсвязуваюча активність ТСП обеспечивает способность плазматических мембран нервных клеток связывать тиамин и транспортировать его в клетку, тиаминфосфатгидролазная активність — способность плазматических мембран гидролизовать тиаминфосфаты, что приводит к выходу из клетки свободного тиамина при деполяризации.

Принимая во внимание, что антагонисты тиамина используются в настоящее время при изучении роли тиамина в сигнальных процессах клеток, полученные результаты позволяют также определить эффективные концентрации производных тиамина в реакциях обмена подвижного пула тиамина в нервных клетках.

#### НАЯВНІСТЬ ДВОХ ВІДМІННИХ АКТИВНИХ ЦЕНТРІВ НА ТІАМІНЗВ'ЯЗУВАЛЬНОМУ ПРОТЕЇНІ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН СИНАПТОСОМ

Ю. М. Пархоменко, А. О. Строкіна,  
С. Ю. Пилипчук, С. П. Степаненко,  
Л. І. Чехівська, Г. В. Донченко

Институт биохимии им. О. В. Палладина  
НАН Украины, Київ;  
e-mail: yupark@biochem.kiev.ua

Досліджено вплив тіамінтрифосфату на тіамінзв'язуючу активність у препаратах плазматических мембран синапсом (ПМС), ізольованих з головного мозку щурів. Показано інгібування тіамінтрифосфатом тіамінзв'язувальної активності ПМС, яке має конкурентний характер ( $K_i = 1,0 \pm 0,3$  мкМ). У той самий час тіамін у діапазоні концентрацій 0,5–20 мкМ не інгібує тіамінтрифосфатазну (ThTP-азну) активність, а навпаки, спостерігається її активація з максимумом концентрації близько 2,5 мкМ.

Досліджено вплив класичних антагоністів тіаміну (ампроліуму, окситіаміну та піритіаміну) на біологічну активність плазматических мембран, яка властива тіамінзв'язувальному протеїну (ТЗП). Величина  $IC_{50}$  для інгібування ампроліумом тіамінзв'язувальної активності ПМС складає  $50 \pm 4,0$  мкМ, в той час як на ThTP-азну активність цей антагоніст не має впливу. Показано інгібування окситіаміном обох видів активності ТЗП. Величина  $IC_{50}$  складає  $125 \pm 28$  та  $1000 \pm 95$  мкМ для тіамінзв'язувальної та ThTP-азної активності відповідно. Визначені величини  $IC_{50}$  для інгібування тіамінзв'язувальної та ThTP-азної активності піритіаміном відрізнялись на порядок, складаючи, відповідно,  $2,2 \pm 0,2$  та  $43 \pm 9$  мкМ.

Одержані дані свідчать про різну чутливість до антагоністів тіаміну активних центрів на ПМС, які відповідають за тіамінзв'язувальну та ThTP-азну активність. Наші результати дозволяють зробити припущення, що за специфічне зв'язування відповідають окремі активні центри.

Ключові слова: тіамін, тіамінтрифосфат, тіамінтрифосфатаза, плазматичні мембрани синапсом, тіамінзв'язувальний протеїн, антагоністи тіаміну.

#### EXISTENCE OF TWO DIFFERENT ACTIVE SITES ON THIAMINE BINDING PROTEIN IN SYNAPTIC PLASMA MEMBRANES

Yu. M. Parkhomenko, A. A. Strokina,  
S. Yu. Pylypchuk, S. P. Stepanenko,  
L. I. Chekhivska, G. V. Donchenko

Palladin Institute of Biochemistry, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: yupark@biochem.kiev.ua

#### Summary

The current work is aimed at understanding the structure and functionality of thiamine binding

protein (TBP) in neural cells plasma membranes. The influence of thiamine triphosphate on thiamine binding by TBP in synaptic plasma membranes (SPM) isolated from the rat brain was investigated. It was shown that thiamine triphosphate inhibits thiamine binding activity of SPM in concurrent manner ( $K_i = 1.0 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ). At the same time thiamine had no effect on thiamine triphosphatase (ThTPase) activity at the concentration range 0.5–20  $\mu\text{M}$ . Otherwise, ThTPase activation with the maximum at the concentration about 2.5  $\mu\text{M}$  was observed.

Further, the influence of classic thiamine antagonists (amprolium, oxythiamine and pyriothiamine) on both biological activities of TBP in SPM was studied. The  $\text{IC}_{50}$  value for inhibition of thiamine binding on SPM by amprolium comprised  $50 \pm 4.0 \mu\text{M}$ . Still, this antagonist had no effect on ThTPase activity. For the oxythiamine inhibition of both TBP activities was detected. The values of  $\text{IC}_{50}$  were  $125 \pm 28$  and  $1000 \pm 95 \mu\text{M}$  for thiamine binding and ThTPase activity, respectively. The values of  $\text{IC}_{50}$  for thiamine binding and ThTPase activity inhibition differed by more than one order of magnitude and comprised  $2.2 \pm 0.2$  and  $43 \pm 9 \mu\text{M}$ , respectively.

The obtained data indicate that the active sites on SPM responsible for thiamine binding and ThTPase activity have different sensitivity to thiamine antagonists. Our results allow us to suppose that different active protein sites are responsible for the specific binding and for thiamine phosphates hydrolysis by TBP of synaptic membranes.

**Key words:** thiamine, thiamine triphosphate, thiamine triphosphatase, synaptic plasma membranes, thiamine-binding protein, thiamine antagonists.

1. Пархоменко Ю. М., Протасова З. С., Донченко Г. В. // Укр. біохім. журн. – 1996. – **68**, № 2. – С. 3–15.
2. Haas R. H. // Ann. Rev. Nutr. – 1988. – **8**. – P. 483–515.
3. Bâ A. // Cell. Mol. Neurobiol. – 2008. – **28**. – P. 923–931.
4. Leevy C. M. // Ann. NY Acad. Sci. – 1982. – **378**. – P. 316–326.
5. Stagg A. R., Fleming J. C., Baker M. A. et al. // J. Clin. Invest. – 1975. – **103**, N 12. – P. 723–729.
6. Chornyyi S., Parkhomenko J., Chorna N. // Acta Biochim. Polonica. – 2007. – **54**, N 2. – P. 315–322.
7. Постоечко В. О., Пархоменко Ю. М., Вовк А. И. и др. // Биохимия. – 1987. – **52**, № 11. – С. 1792–1797.
8. Постоечко В. А., Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В. // Нейрохимия. – 1990. – **9**, № 1. – С. 29–34.
9. Пархоменко Ю. М., Протасова З. С., Янчий О. Р. и др. // Нейрофизиология. – 2001. – **33**, № 3. – С. 161–165.
10. Muralt A. // Exp. Cell. Res. – 1958. – **5**, N 1. – P. 72–79.
11. Сидорова А. А., Степаненко С. П., Пархоменко Ю. М. // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 3. – С. 58–65.
12. Subramanian V. S., Marchant J. S., Parker I., Said H. M. // J. Biol. Chem. – 2003. – **278**, N 6 – P. 3976–3984.
13. Szyniarowski P., Lakaye B., Czerniecki J. et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – **1725**, N 1. – P. 93–102.
14. Янчий О. Р., Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В. // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 3. – С. 107–111.
15. Протасова З. С., Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В., Чурилова Т. Я. // Там само. – 1999. – **71**, № 4. – С. 50–57.
16. Экспериментальная витаминология / под ред. Ю. М. Островского. – Минск: Наука и техника, 1979. – 552 с.
17. Пархоменко Ю. М., Протасова З. С., Постоечко В. А., Донченко Г. В. // ДАН АН Украины. – 1988. – № 8. – С. 73–76.
18. Casirolo D., Ferrari G., Gestaldi G. et al. // J. Physiology. – 1988. – **398**. – P. 329–339.
19. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. – М: Мир, 1990. – 350 с.
20. Rindi G., Patrini C., Nauti A. et al. // Metab. Brain Dis. – 2003. – **18**, N 1. – P. 245–263.
21. Островский Ю. М. Тиамин. – Минск: Беларусь, 1971. – 144 с.

Получено 16.11.2009