ISSN 0206-5657. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016. Випуск 73. С. 160–165
Visnyk of the Lviv University. Series Biology. 2016. Issue 73. P. 160–165

УДК 577.151.6:577.164.1

ВИКОРИСТАННЯ АФІННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ПРОТЕЇНІВ, ЯКІ ПРОЯВЛЯЮТЬ СПОРІДНЕНІСТЬ ДО ТІАМІНУ

О. Меженська[1], О. Музичка[2], А. Вовк[2], Ю. Пархоменко[1]

[1]Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
вул. Леонтовича, 9, Київ 01601, Україна
[2]Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України
вул. Мурманська, 1, Київ 02660, Україна
e-mail: o.mejen2012@gmail.com

Афінна хроматографія з подальшою ідентифікацією селективно зв'язаних протеїнів є ефективним засобом виявлення нових біологічно значущих молекулярних взаємодій. Використовуючи цей метод раніше (*Mkrtchyan et al., 2015*) були ідентифіковані нові протеїни - мішені для тіаміну, серед яких, зокрема, наявні ензими малатдегідрогеназа та глутаматдегідрогеназа і кілька інших протеїнів. З метою з'ясувати специфічність взаємодії цих протеїнів з тіаміном було синтезовано два афінних сорбенти – з тіаміном як лігандом (т-АС) і без тіаміну. Порівняльне дослідження здатності деяких протеїнів з екстрактів мозку ссавців зв'язуватися у процесі афінної хроматографії на цих сорбентах показало відмінності у спектрах елюйованих протеїнів. Результати свідчать, що малатдегідрогеназа і глутаматдегідрогеназа, а також протеїни, що демонструють тіамінмонофосфатазну, тіаміндифосфатазну, гуанозиндифосфатазну, гуанозинтрифосфатазну й іноозинмонофосфатазну активності, зв'язуються тільки з т-АС, що свідчить про специфічність їх взаємодії з тіаміном. Ці дані будуть корисними у з'ясуванні некоензимних функцій вітаміну B_1.

Ключові слова: тіамін, афінна хроматографія, тіамінзв'язуючі протеїни, молекулярні взаємодії.

У міру поглиблення наших знань про вітамін B_1 (тіамін) зміцнюється уявлення про те, що його роль у життєдіяльності клітин не обмежується участю тіаміндифосфату (ТДФ) як коферменту у функціонуванні низки ключових ферментів клітинного метаболізму [8]. Відкриття нових сигнальних похідних тіаміну, таких як тіамінтрифосфат і аденозилтіамінтрифосфат [6], поширило ці уявлення і прискорило пошуки некоферментних механізмів реалізації біологічної дії тіаміну та його похідних. Аналіз літературних даних і результатів власних досліджень дав нам змогу припустити, що некоензимна роль тіаміну і його похідних може реалізовуватися за участю скоординованої системи протеїнів. Згідно з нашим припущенням, ця система протеїнів включає як уже відомі ензими метаболізму тіаміну і його фосфатів, так і ще не ідентифіковані на молекулярному рівні протеїни, котрі можуть мати тіамінзв'язуючі ділянки, завдяки чому здатні взаємодіяти з тіаміном і його похідними. Не виключено, що ці протеїни об'єднані не тільки функціонально, але й структурно з утворенням своєрідного метаболона.

Як методичний підхід для виявлення протеїнів, котрі можуть мати відношення до так званого «тіамінового протеому», ми у своїй попередній роботі використовували афінний сорбент із молекулою тіаміну як ліганда (т-АС). Об'єктом дослідження були екстракти тканини мозку. За ступінчастої елюції білків з т-АС у протеїнових піках після їх розділення методом гель-електрофорезу з SDS та ідентифікації за допомогою мас-спектрометрії (МС) було виявлено низку протеїнів [8], про здатність яких зв'язуватися з тіаміном раніше нічого

© Меженська О., Музичка О., Вовк А., Пархоменко Ю., 2016

відомо не було. Так, серед них виявилися протеїни, які асоціюються з нейродегенеративними захворюваннями, а саме DJ-1 і β-амілоїд, а також окремі протеїни енергетичного обміну. Але чи є зв'язування зазначених протеїнів з т-АС селективним щодо ліганда (тіаміну)? Основою для синтезу сорбенту є сефароза [1,4], тому не можна виключати ймовірності, що ідентифіковані в елюатах з т-АС протеїни зв'язуються не з лігандом, а з іншою частиною сорбенту. Метою даної роботи було перевірити це припущення. Для виконання мети слід було, зберігаючи всі етапи синтезу сорбента до приєднання тіаміну, синтезувати «безтіаміновий» сорбент і провести порівняльне дослідження здатності обох сорбентів зв'язувати з екстрактів мозку окремі з ідентифікованих раніше протеїнів [8], які елюювалися з т-АС. У зв'язку з високою вартістю масспектрометричного аналізу для ідентифікації протеїнів ми зупинилися на кількох протеїнах, наявність яких в елюатах зі сорбентів можна було перевірити, вимірюючи їхню специфічну активність у фракціях елюатів.

Матеріали та методи

Синтез сорбентів. Афінний сорбент синтезували за методом Клящицького та ін. [1,4] з деякою модифікацією, яка полягала в тому, що для синтезу тіамін-N-4-азобензоїл-ε-амінокапроїлгідразидосефарози-4В ми використовували гідразид-N-4-амінобензоїл-ε-амінкапронової кислоти. Прив'язування спейсера до активованої бромціаном матриці проводили в 0,1М $NaHCO_3$ (pH=8,0). Схему синтезу подано на рис. 1. Структурні формули обох сорбентів представлені на рис. 2.

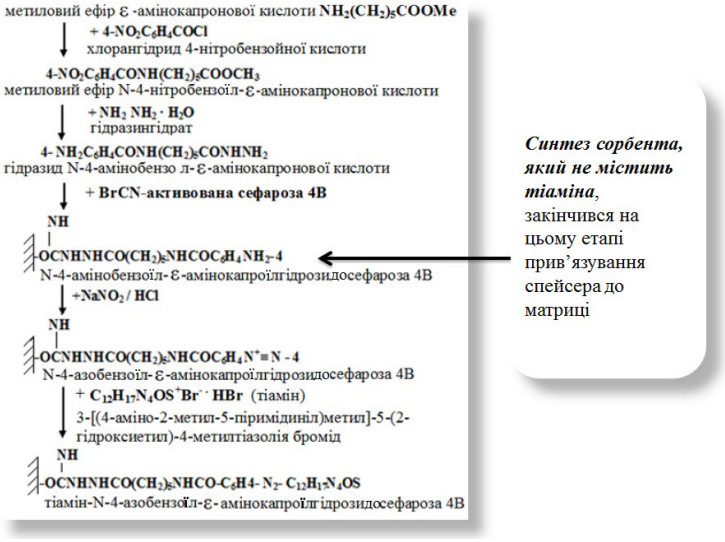

Рис. 1. Схема синтезу сорбентів: афінного - з ковалентно приєднаним тіаміном як лігандом і сорбента без тіаміну

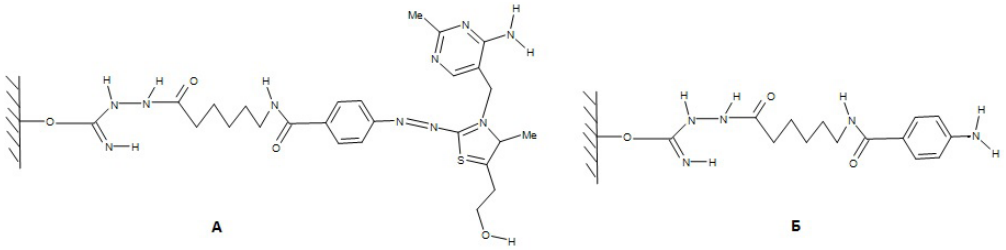

Рис. 2. А - структурна формула т-АС; Б – структурна формула сорбента без тіамінового залишку

Для виділення протеїнів брали такий біологічний матеріал: 1) тканина мозку щура; 2) ацетоновий порошок мозку щура; 3) ацетоновий порошок мозку бика.

Отримання грубої фракції синаптосом з тканини мозку й ацетонового порошку (АП) з них проводили згідно з методами, описаними Постоєнко та ін. [4].

Хроматографія тіамінзв'язуючих протеїнів мозку. Протеїни з АП екстрагували 10 мМ трис-HCl буфером (pH=7,4) у співвідношенні 20 мл буферу на 1,5 г АП розтиранням у фарфоровій ступці, потім у скляному гомогенізаторі та на останній стадії, перемішували на льоду протягом 30 хв. Нерозчинені часточки видаляли центрифугуванням протягом 1,5 год при 11,5 тис. об/хв. Додавали рівний об'єм Кребс-Рінгер бікарбонатного буфера і отриманий екстракт АП мозку наносили на колонку (d=16 мм; h=7 см) з афінним сорбентом т-АС (тіамін-N-4-азобензоїл-ε-гідразидосефарозою 4В) або зі сорбентом, який містить тільки матрицю і спейсер, попередньо врівноважену сумішшю у співвідношенні 1:1 Кребс-Рінгер бікарбонатного буферу (pH=7,4) і 10 мМ трис-HCl буферу (pH=7,4). Видалення білків, що не зв'язалися, проводили 10 мМ трис-HCl буфером (pH=7,4) до фонового рівня при 280 нм. Зв'язані білки елюювали в кілька етапів (1 – 10 мМ тіамін хлоридом (pH=7,4); 2 - 1М NaCl в 10 мМ трис-HCl буфері (pH=7,4); 3 - 2М сечовиною в 10 мМ трис-HCl буфері (pH=7,4). Перед початком елюції розчином NaCl буфер у колонці замінювали на 10 мМ трис-HCl буфер (pH=7,4). У міру об'єднання фракції піддавали концентруванню на фільтрах типу «Центрифужні ультрафільтри Амікон Ультра-15, 30 кДа» з заміною буферу двічі на 10 мМ трис-HCl буфер (pH=7,4). Сорбенти зберігали у 0,02%-ному розчині азиду натрію.

Вимірювання ферментативних активностей. Активність малат дегідрогенази (МДГ) і глутамат дегідрогенази (ГДГ) детектували спектрофотометрично при 340 нм на Bio-Tek μQuant Microplate Spectrophotometer по швидкості окислення НАДН при відновленні оксалоацетату до малату (в бік утворення глутамату з 2-оксоглутарату щодо ГДГ). Швидкість реакції визначали по лінійній ділянці кривої ходу реакції (від 0,4 до 1 хв) [2]. Вимірювання фосфатазних активностей ферментів проводили за продукцією неорганічного фосфату за методом Chan et al. [7] із малахітовим зеленим. У наших експериментах метод застосовували для вимірювання гідролазної активності в елюатах щодо таких субстратів: ТМФ, ТДФ, АМФ, АДФ, АТФ, ГДФ, ГТФ та ІМФ. Оптичну щільність вимірювали при 630 нм.

Визначення концентрації ліганду у складі афінного сорбенту. Вміст тіаміну в складі сорбенту визначали тіохромним методом [3] після кислотного гідролізу т-АС.

У роботі використовували такі реактиви і матеріали: тіамін, тіамінмонофосфат (ТМФ), тіаміндифосфат (ТДФ), АМФ, АТФ, АДФ, ГДФ, ГТФ, ІМФ, оксалоацетат, 2-оксоглутарат (динатрієва сіль) і сефароза 4В фірм Sigma та Reanal; NADH фірми Boehringer, Німеччина; Трис-HCl – «Serva», Німеччина; BrCN було попередньо синтезовано і надано нам д.б.н. С. В. Верьовкою. Бікарбонатний фізіологічний буфер Кребса-Рінгера для ссавців мав такий склад: NaCl -125 мМ, KH_2PO_4 -1,3 мМ, KCl -4,5 мМ, $MgSO_4*7H_2O$ -1,3 мМ, $CaCl_2$ -2,5 мМ, $NaHCO_3$ -17,6 мМ, $C_6H_{12}O_6$ -11 мМ.

Результати і їхнє обговорення

У результаті проведеного експерименту ми визначили, що концентрація ліганду в т-АС становила 28 мкг тіаміну/1г афінного сорбенту. Це висока концентрація ліганду, яка дає змогу виділити зі суміші компоненти (протеїни), що містяться в мінорних кількостях і на це не впливає геометрія колонки згідно з [5]. Були виявлені відмінності у спектрі протеїнів, які зв'язуються з афінним сорбентом і сорбентом без тіаміну. Профілі елюції протеїнів з обох сорбентів представлені на рис. 3.

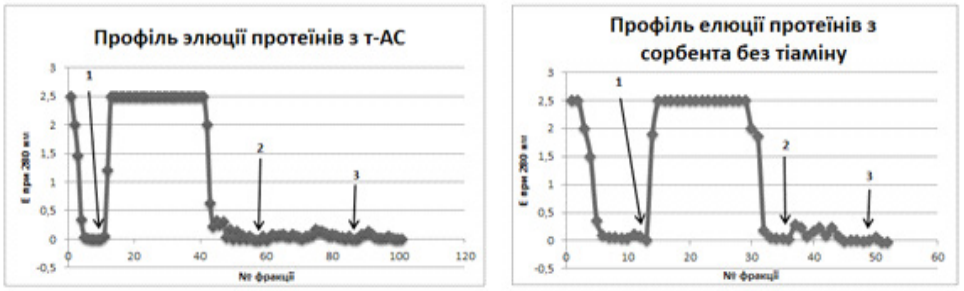

Рис. 3. Картина елюції білків зі сорбентів; стрілками позначена зміна елюентів: 1 – 5мМ тіамін хлорид; 2 - 1М натрій хлорид; 3 - 2М сечовина

Аналіз МДГ- і ГДГ-активності підтвердив наявність цих ензимів в елюатах з т-АС і їх відсутність в аналогічних фракціях, що елюювалися з безтіамінового сорбенту (рис. 4).

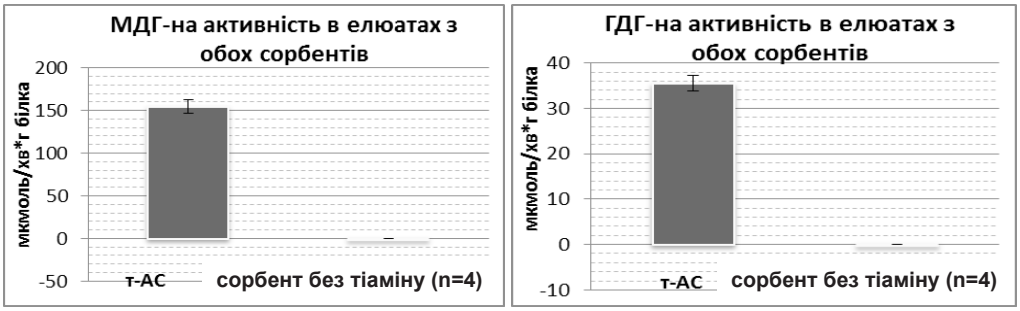

Рис. 4. Дегідрогеназні активності в елюатах зі сорбентів

Що стосується фосфатазних активностей, то у фракціях протеїнів, елюйованих зі сорбенту без тіаміну, виявляються тільки аденозинфосфатазні активності, причому вони мають різні рівні. Більш детально дані представлені в таблиці.

Фосфатазні активності в елюатах зі сорбенту без тіамінового залишку

Субстрат	Рівень активності, моль/хв на мг білка
ТМФ	Не виявлено
ТДФ	Не виявлено
ГДФ	Не виявлено
ГТФ	Не виявлено
ІМФ	Не виявлено
АМФ	тільки в тіаміновому елюаті (0,8 – проти 3,1 у незв.)
АДФ	48,1 - елюція тіамін хлоридом; 28,3 – елюція NaCl; 52,4 – елюція сечовиною - проти 5,3 у незв.*
АТФ	10,3 – елюція тіамін хлоридом; 5,5 - елюція NaCl; 9,6 - елюція сечовиною - проти 5,2 у незв.

Примітка: */незв. – об'єднана фракція протеїнів, які не зв'язалися зі сорбентом.

На відміну від сорбенту без тіаміну, у всіх елюатах з т-АС виявлені всі види виміряних фосфатазних активностей. Оскільки малатдегідрогеназної, глутаматдегідрогеназної, тіамінмоно-, тіамінди-, гуанозинди-, гуанозинтри- й інозинмонофосфатазної активностей не виявлено в елюатах зі сорбенту, що не містить тіамін, ми зробили висновок про те, що ці ензими зв'язуються з тіаміновим залишком у складі афінного сорбенту специфічно.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Кляцицкий Б. А., Позднев В. Ф., Митина В. Х. и др.* Хроматография пируватдекарбоксилазы из пивных дрожжей // Биоорг. химия. 1980. № 6. С. 1572–1579.(4)
2. *Кочетов Г.А.* Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. 272 с.
3. *Островский Ю.М., Спиричев В.Б., Матусис И.И.* и др. Экспериментальная витаминология: Справ. Руководство. Минск : Наука и техника, 1979. 551 с.
4. *Постоенко В.А., Пархоменко Ю.М., Вовк А.И.* и др. Выделение и некоторые свойства тиаминсвязывающего белка синаптосом головного мозга крыс // Биохимия. 1987. Т.52, вып.11. С.1792-1797.
5. *Туркова Я.* Аффинная хроматография. М.: Мир, 1980. 472 с.
6. *Bettendorff L., Wins P.* Biological functions of thiamine derivatives: Focus on non-coenzyme roles // O. A. Biochemistry. 2013. 01.1. P.1:10.
7. *Chan K. M., Delfert D., Junger K. D.* A direct colorimetric assay for Ca^{2+}- stimulated ATPase activity // Anal. Biochem. 1986. Vol. 157, № 2. P. 375-380.
8. *Mkrtchyan G., Aleshin V., Parkhomenko Yu.,* et al. Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamine in brain: biochemical, structural and pathway analysis // Sci. Rep, 5, 2015. 12583. P.1-26.

Стаття: надійшла до редакції 15.06.16
доопрацьована 31.08.16
прийнята до друку 2.09.16

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОТЕИНОВ, КОТОРЫЕ ПРОЯВЛЯЮТ СРОДСТВО К ТИАМИНУ

О. Меженская[1], О. Музычка[2], А. Вовк[2], Ю. Пархоменко[1]

[1]Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины
ул. Леонтовича, 9, Киев 01601, Украина
[2]Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины
ул. Мурманская,1, Киев 02660, Украина
e-mail: o.mejen2012@gmail.com

Аффинная хроматография с последующей идентификацией селективно связанных протеинов является эффективным средством выявления новых биологически значимых взаимодействий. Используя этот метод ранее (*Mkrtchyan et al., 2015*), были идентифицированы новые протеины - мишени для тиамина, среди которых, в частности, присутствуют энзимы малатдегидрогеназа и глутаматдегидрогеназа и несколько других протеинов. С целью выяснить специфичность взаимодействия этих протеинов с тиамином было синтезировано два аффинных сорбента - с тиамином в качестве лиганда (т-АС) и без тиамина. Сравнительное исследование способности некоторых протеинов из экстрактов мозга млекопитающих связываться в процессе аффинной хроматографии на этих сорбентах показало различия в спектрах элюированных протеинов. Результаты свидетельствуют, что малатдегидрогеназа и глутаматдегидрогеназа, а также протеины, демонстрирующие тиаминмонофосфатазную, тиаминдифосфатазную, гуанозиндифосфатазную, гуанозинтрифосфатазную и инозинмонофосфатазную

активности, связываются только с т-АС, что свидетельствует о специфичности их взаимодействия с тиамином. Эти данные будут полезны в выяснении некоэнзимных функций витамина B_1.

Ключевые слова: тиамин, аффинная хроматография, тиаминсвязывающие протеины, молекулярные взаимодействия.

APPLYING AFFINITY CHROMATOGRAPHY FOR DETECTION OF PROTEINS THAT EXHIBIT AN AFFINITY FOR THIAMINE

O. Mezhenska[1], O. Muzychka[2], A. Vovk[2], Yu. Parkhomenko[1]

[1]Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine
9, Leontovych St., Kyiv 01601, Ukraine
[2]Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine
1, Murmanska St., Kyiv 02660, Ukraine
e-mail: o.mejen2012@gmail.com

Affinity chromatography followed by identification of selectively bound proteins is an effective means to identify new biologically relevant molecular interactions. Using this method before (*Mkrtchyan et al., 2015*) identified new proteins - target for thiamine, including, in particular, there are enzymes malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase and several other proteins. In order to ascertain the specificity of the interaction of these proteins with thiamine was synthesized two affine sorbenst - with thiamine as a ligand (th-AS) and without thiamine. Comparative study of the ability of certain proteins from extracts of mammalian brain to communicate during these affinity chromatography sorbents showed differences in the spectra of eluted proteins. The results exhibit that the malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase, as well as proteins that exhibit thiamin monophosphatase, thiamine diphosphatase, guanosine diphosphatase, guanosine threephosphatase and inosine monophosphatase activities are associated only with th-AS, indicating that the specificity their interaction with thiamine. These data will be useful in clarifying nonkoenzim functions of vitamin B_1.

Keywords: thiamine, affinity chromatography, thiamine binding proteins, molecular interactions.