

УДК 577.1

ФОСФАТАЗЫ МОНО- И ДИФОСФАТА ТИАМИНА В СИНАПТОСОМАХ МОЗГА БЫКА

© 2020 В.А. Алешин^{1,2*}, О.А. Меженская³, Ю.М. Пархоменко³,
Т. Кэне⁴, В.И. Буник^{1,2,5*}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия;
электронная почта: aleshinvasily@gmail.com; bunik@belozersky.msu.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия

³ Институт биохимии им. А.В. Палладина НАНУ, 01601 Киев, Украина

⁴ Институт экспериментальной медицины университета имени Отто фон Гюрнике, 39120 Магдебург, Германия

⁵ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119992 Москва, Россия

Поступила в редакцию 31.12.2019

После доработки 08.01.2020

Принята к публикации 09.01.2020

Активности фосфатаз моно- и дифосфатов тиаминина меняются при нейродегенеративных заболеваниях, однако молекулярная природа этих ферментов у млекопитающих не определена в полной мере. В данной работе фракция синапсом мозга быка, обогащенная фосфатазными активностями в отношении производных тиаминина, была подвергнута аффинной хроматографии на модифицированной тиаминном сефарозе (тиамин-сефарозе). В последовательных элюатах белков, связавшихся с носителем, растворами тиаминина (рН 7,4 или 5,6), хлорида натрия и мочевины характеризовали фосфатазные активности в отношении тиаминмонофосфата (ТМФ), тиаминдифосфата (ТДФ) и структурно сходных с тиаминном пуриновых нуклеотидов. Элюируемые на каждой стадии белки идентифицировали методом масс-спектрометрии, используя базу данных SwissProt по всем организмам, ввиду недостаточной аннотации генома быка. В элюате кислым раствором тиаминина идентифицировали пептиды, найденные в двух бактериальных фосфатазах: щелочной фосфатазе L из семейства DING-белков и экзополифосфатазе. Представленность пептидов фосфатазы L во фракциях элюируемых белков коррелировала с элюцией ТМФ-азной активности, а экзополифосфатазы — с элюцией ТДФ-азной активности. Профили элюции данных белков и активностей в отношении фосфатов тиаминина отличались от профилей элюции фосфатаз нуклеотидов, свидетельствуя о специфичности ферментов к производным тиаминина. Направленный поиск DING-фосфатаз млекопитающих в элюатах с тиамин-сефарозы выявил преимущественную элюцию X-DING-CD4 тиаминном (рН 5,6). Для экзополифосфатазы выявлено структурное сходство с обладающими ТДФ-азной активностью апиразами. Полученные результаты свидетельствуют в пользу фосфатазных активностей DING-белков и апираз млекопитающих в отношении ТМФ и ТДФ соответственно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апираза, тиамин, тиаминмонофосфатаза, тиаминдифосфатаза, DING-фосфатаза, HPBP, X-DING-CD4.

DOI: 10.31857/S0320972520030136

Тиамин (витамин В1) является незаменимым водорастворимым витамином. Его функция как предшественника тиаминдифосфата (ТДФ) — кофермента энергетического метабо-

лизма — давно известна. Однако помимо этого накоплено большое количество данных о роли тиаминина и его производных в качестве регуляторов синаптической нейротрансдукции и транскрипции [1, 2]. В клетках млекопитающих, помимо тиаминина и ТДФ, который является основным представителем тиаминного пула, содержится также достаточно много тиаминмонофосфата (ТМФ) [2]. При этом из ферментов, осуществляющих превращения между тиаминном, ТМФ и ТДФ, на молекулярном уровне охарактеризованы лишь тиаминдифосфокиназа (ЕС 2.7.6.2) и кислая фосфатаза простаты

Принятые сокращения: ТМФ — тиаминмонофосфат; ТДФ — тиаминдифосфат; тиамин-сефароза — модифицированная тиаминном сефароза (тиамин-N-4-азобензоил-ε-гидразидсефароза 4В); DING-белки — семейство белков DING (названо по началу N-концевой последовательности); HPBP — фосфат-связывающий DING-белок человека; X-DING-CD4 — секретрируемый белок DING из CD4(+) T-клеток.

* Адресат для корреспонденции.

(ЕС 3.1.3.5) [3]. Гены многих тканеспецифичных фосфатаз, обладающих активностями в отношении фосфатов тиамин, до сих пор не идентифицированы [2]. В частности, это относится к синапсосомальным тиамин-связывающим белкам мозга млекопитающих, обладающим высокой фосфатазной активностью по отношению к фосфорилированным производным тиамин [4, 5]. В этой связи целью данной работы было провести масс-спектрометрическую идентификацию фосфатаз в белковых фракциях, получаемых очисткой фосфатазных активностей синапсом мозга быка путем аффинной хроматографии, используя модифицированную тиамин-сефарозу (тиамин-сефарозу). Актуальность данного исследования для медицины определяется корреляцией между развитием болезни Альцгеймера и изменением активностей ТДФ-аз и ТМФ-аз в крови пациентов, сопровождающихся снижением уровней ТДФ и ТМФ [6]. Поскольку уровень ТДФ, в отличие от уровня амилоидных агрегатов, коррелирует со скоростью метаболизма глюкозы в мозге [7] данные ферменты метаболизма фосфатов тиамин могут быть потенциальными мишенями для разработки эффективных комбинированных терапий нейродегенеративных заболеваний. Отсутствие же молекулярной идентификации таких фосфатаз не позволяет использовать эти ферменты для таких подходов к лечению заболеваний.

Проведенное нами исследование показало, что плохая молекулярная идентификация фосфатаз, участвующих в метаболизме тиамин, может отчасти быть связана с проблемой аннотации генов эукариот, имеющих, в отличие от бактериальных генов, сложную интрон-экзонную структуру. Например, представители семейства белков DING хорошо идентифицированы у бактерий, но у млекопитающих (в основном у человека) обнаружены лишь на уровне мРНК и белка [8–10]. В представленной работе получены данные в пользу участия плохо идентифицируемых в геномах млекопитающих фосфатаз семейства DING в дефосфорилировании ТМФ, а апираз — в дефосфорилировании ТДФ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. В исследованиях использованы следующие реактивы: ТДФ, AMP, ADP, ATP, GDP, GTP, UMP, Tris-HCl, ингибиторы протеаз AEBSF, апротинин, бестатин, E-64, лейпептин, пепстатин А («Sigma», США); тиамин, глюкоза («Serva», Германия); ТМФ («Fluca», Швейца-

рия); малахитовый зеленый («PanReac AppliChem», Испания); глицерин («Biomedicals, LLC», США). Растворы готовили на деионизированной воде стандарта Milli-Q, использованные в работе соли были наивысшей степени чистоты.

Тиамин-N-4-азобензоил-ε-гидразидсефарозу 4В (тиамин-сефароза) синтезировали аналогично ранее опубликованному протоколу [11].

Приготовление образцов для аффинной хроматографии. Мозг быков возрастом 1,5–3 года был получен на бойне (г. Киев). Ацетоновый порошок из частично очищенной фракции синапсом мозга, обогащенной фосфатазными активностями по отношению к производным тиамин [4, 5], получали согласно ранее описанной методике [5] и хранили сухим при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Экстракцию белков ацетонового порошка проводили согласно ранее описанному протоколу [12].

Аффинная хроматография. Хроматографию с использованием тиамин-сефарозы проводили аналогично опубликованному протоколу [13]. Вкратце, экстракт ацетонового порошка мозга наносили на колонку с тиамин-сефарозой, предварительно уравновешенную буфером элюции (буфер Кребса–Рингера: 24,9 мМ NaHCO₃; 118 мМ NaCl; 2,34 мМ KH₂PO₄; 4,6 мМ KCl; 1,19 мМ MgSO₄; 2,42 мМ CaCl₂ и 10 мМ глюкозы, pH 7,4). Удаление не связавшихся белков контролировали по оптической плотности элюата при 280 нм до базовой линии. Связавшиеся с тиамин-сефарозой белки элюировали буфером Кребса–Рингера, содержащим 5 мМ раствор тиамин, pH 7,4 или 10 мМ раствор тиамин, pH 5,6. Для дальнейшей ступенчатой элюции использовали 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4, содержащий 1 М NaCl или 2 М мочевины, как описано ранее [12, 13].

Измерение активности фосфатаз. Активность фосфатаз измеряли по продукции неорганического фосфата с использованием одного из следующих субстратов: ТМФ, ТДФ, AMP, ADP, ATP, IMP, GDP и GTP. Уровень фосфата определяли, как описано ранее [12, 14].

Измерение концентрации белка в образцах. Концентрацию белка определяли по методу Lowry et al. [15].

Характеристика тиамин-зависимых протеомов исследуемых образцов. Элюированные с тиамин-сефарозы белки разделяли с помощью электрофореза в денатурирующих условиях с последующей идентификацией методом масс-спектрометрии (LC-MS/MS) после трипсинолиза, как описано ранее [12]. Ввиду плохой аннотации белков быка в базе UniProtKB/TrEMBL идентификацию пептидов проводили

по курируемой базе данных UniProtKB/SwissProt, используя для поиска программное обеспечение «Biotools Software for Protein Analysis» («Bruker», Германия). В связи с отсутствием многих белков быка в этой базе поиск пептидов и белков проводили по всем организмам. Результаты такого скрининга проверяли и уточняли вручную, осуществляя направленный поиск гомологичных идентифицированных фосфатазам белков быка или млекопитающих по другим базам данных.

Определение относительного содержания белков в образцах. Содержание исследуемых белков в частично очищенных препаратах оценивали с помощью полуколичественного метода, основывающегося на пропорциональности между количеством белка в препарате и долей покрытия последовательности белка пептидами, идентифицированными при масс-спектрометрии [13, 16]. При сравнении разных образцов контролировали параметры общего потока ионов в ходе масс-спектрометрической детекции, пропорционального количеству белка в анализируемой пробе. Данный параметр мало отличался между образцами, варьируя в диапазоне $1,4 \cdot 10^{10}$ – $1,7 \cdot 10^{10}$ условных единиц.

Биоинформатический анализ. Для поиска последовательностей DING-белков млекопитающих в базе данных UniProtKB/TrEMBL использовали сервис blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) – в варианте tblastn с параметрами по умолчанию. Поскольку TrEMBL является не курируемой базой данных, информацию о находках проверяли, используя сервис Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) и данные литературы.

Множественные выравнивания последовательностей белков получали, используя алгоритм Clustal Omega в сервисе Uniprot, и обрабатывали в программе Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

Поиск гомологов фосфат-связывающего DING-белка человека (HPBP) по его структуре (PDB ID: 2v3q) осуществляли с помощью сервиса PDBeFold (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>) с порогом сходства 40%. Аналогично осуществляли поиск гомологов экзополифосфатазы Q9ZN70, используя структуру 1ubz с наибольшей (40%) идентичностью последовательности. Выравнивания структур получали с помощью PyMOL 1.7.4 (<https://pymol.org>) и проверяли с помощью алгоритма гибкого структурного выравнивания POSA (<http://posa.sanfordburnham.org/>). Согласно этому алгоритму, для выравнивания структур 2v3q и 2qru, а также 1ubz и 4brh не требуется введения дополнительных изгибов белковых цепей, которые могут быть необходимы для выравнивания бел-

ков, обладающих высокой подвижностью структуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аффинная хроматография синапсомальной фракции мозга быка на тиамин-сефарозе. На рис. 1 представлены активности фосфатаз из синапсомальной фракции мозга быка на разных стадиях аффинной хроматографии в зависимости от значения pH раствора тиамина (5,6 или 7,4) на первой, аффинной, стадии элюции. Поскольку проведенный ранее анализ показал структурное сходство белковых комплексов с производными тиамина и пуриновыми нуклеотидами [1], активности ТМФ-аз и ТДФ-аз во фракциях (рис. 1, а, б) исследовали в сравнении с активностями в отношении фосфорилированных производных пуриновых нуклеотидов – AMP, ADP, ATP, IMP, GDP и GTP (рис. 1, в–з). На рис. 1 видно, что активности фосфатаз по отношению к двум наиболее представленным фосфорилированным производным тиаминового пула млекопитающих – ТМФ и ТДФ (рис. 1, а, б) – более специфично элюируются при проведении аффинной элюции тиамином в кислой среде (pH 5,6). Так, ТМФ-аза синапсомом мозга быка элюируется в основном лишь при кислом значении pH аффинной элюции (рис. 1, а). Пик ТДФ-азной активности наблюдали при элюции NaCl (рис. 1, б), однако наиболее высокая и специфичная в отношении ТДФ активность на этой стадии требовала проведения аффинной элюции при pH 5,6. Если же аффинную элюцию проводили при pH 7,4, то при последующей элюции NaCl и мочевиной во фракциях обнаруживали также значительную активность в отношении пуриновых нуклеотидов (рис. 1, в–з). Таким образом, оптимальная процедура очистки ТМФ-азы и ТДФ-азы состоит в проведении аффинной элюции при pH 5,6. Удельная активность ТМФ-азы в данном элюате увеличивается в 5 раз по сравнению с ТМФ-азной активностью исходного препарата (рис. 1, а). Увеличение активности ТДФ-аз по сравнению с исходным препаратом на стадии кислой (pH 5,6) аффинной элюции – в 2 раза, а в максимуме, т.е. на стадии элюции NaCl после кислой аффинной элюции – в 3 раза (рис. 1, б).

Идентификация тиамин-зависимых фосфатаз, элюируемых при аффинной хроматографии на тиамин-сефарозе. Для идентификации синапсомальных фосфатаз ТМФ и ТДФ использовали масс-спектрометрический анализ белковых элюатов, полученных при аффинной хроматографии на тиамин-сефарозе (см. «Материалы и

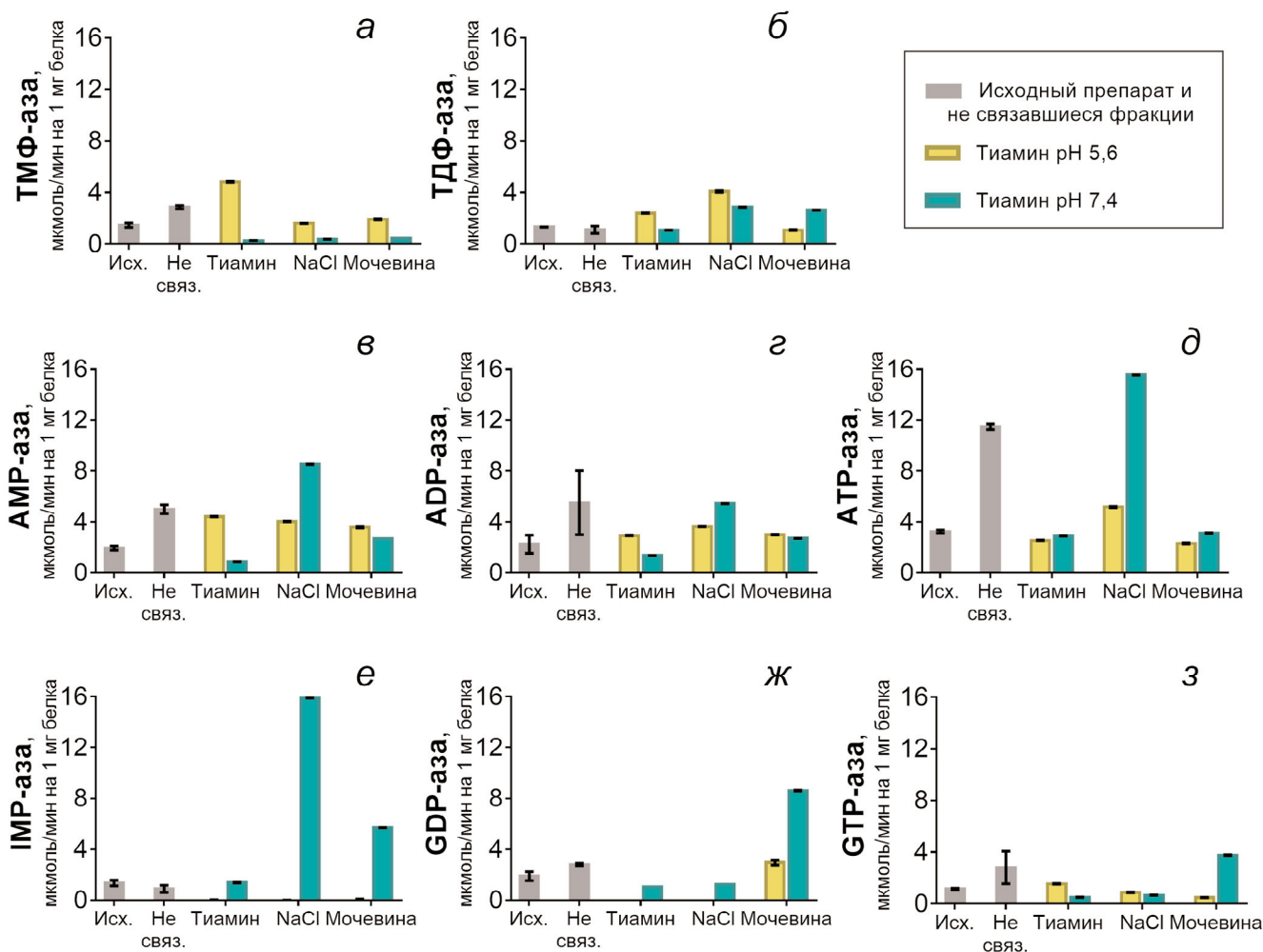


Рис. 1. Активности фосфатаз при хроматографии белков синаптосомальной фракции мозга быка на тиамин-сефарозе. Показаны активности ТМФ-азы (а), ТДФ-азы (б), АМР-азы (в), АДР-азы (г), АТР-азы (д), ИМР-азы (е), GDP-азы (ж) и GTP-азы (з) в исходных препаратах (Исх.) и не связавшихся с тиамин-сефарозой (Не связ.) фракциях белков, а также в элюатах растворами тиамин (рН 5,6 или 7,4), NaCl и мочевиной. Хотя вариации рН элюента были лишь при аффинной элюции раствором тиамин, результаты последующей элюции NaCl и мочевиной зависели от первой стадии. Поэтому два цвета для активностей фосфатаз в элюатах даны для всех стадий элюции. Цветовой код указан в представленной на рисунке легенде. Данные получены по трем независимым хроматографическим экспериментам и представлены в виде средних значений ± SEM.

С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

методы»). Определяемые в результате такого анализа наборы белков составляют так называемые тиаминные протеомы [12, 13]. В элюируемой тиаминной фракции масс-спектрометрически определили ~100 белков, наиболее представленными из которых были высоко экспрессируемые глутаматдегидрогеназа и малатдегидрогеназа, взаимодействующие с тиамин и его производными [13]. Поэтому аффинную очистку тиамин-зависимых фосфатаз, экспрессируемых в значительно меньшей степени, чем ферменты центрального метаболизма, нельзя охарактеризовать с помощью электрофоретического анализа исходного препарата и фракций элю-

ата. Вместо этого для характеристики степени очистки мы использовали увеличение удельной активности целевых ферментов (рис. 1) и количественную оценку представленности белка по покрытию его аминокислотной последовательности идентифицированными масс-спектрометрически пептидами аннотированных фосфатаз (таблица).

Поиск тиамин-зависимых фосфатаз в элюируемых протеомах проводили с использованием следующих критериев: идентифицированные пептиды должны принадлежать белкам, аннотированным как фосфатазы, их содержание в не связавшихся с тиамин-сефарозой фракциях

Представленность фосфатаз, их гомологов и белковых партнеров в элюатах белков синаптосомальной фракции мозга быка с тиамин-сефарозы, по данным масс-спектрометрии

Белок (ID)	Покрытие пептидами, %, в элюатах с тиамин-сефарозы			
	Не св.	Тиамин (pH 5,6)	NaCl	Мочевина
Фосфатазы				
Фосфатаза L (P35482)	–	11	–	6
Экзополифосфатаза (Q9ZN70)	–	2	7	–
Белки семейства DING человека				
X-DING-CD4 (R4H484)	4	9	–	4
HPBP (P85173)	12	2	6	7
Партнер фосфат-связывающего белка человека HPBP				
Параоксоназа-1 (P27169)	–	–	–	6

Примечание. Суммированы результаты определения фосфатаз во фракции не связавшихся с тиамин-сефарозой белков (Не св.), при кислой (pH 5,6) элюции тиаминном и последующих элюциях NaCl и мочевиной. При слабощелочной (pH 7,4) элюции тиаминном и последующих элюциях NaCl и мочевиной данные белки не определялись. Покрытие идентифицированными масс-спектрометрически пептидами указанных в таблице белков представлено в % общей длины пептидов от длины последовательности данного белка.

должно быть мало по сравнению с содержанием в элюатах с тиамин-сефарозы, а элюция должна определяться аффинной стадией. Из определенных в элюатах с аффинной колонки пептидов аннотированных фосфатаз данным критериям удовлетворяли лишь пептиды двух фосфатаз *Pseudomonas aeruginosa*: щелочной фосфатазы L (P35482) и экзополифосфатазы (Q9ZN70). Профили элюции пептидов этих двух фосфатаз отличались (таблица) аналогично профилям элюции ТМФ-азы и ТДФ-азы соответственно (рис. 1). При этом элюция обеих фосфатаз была чувствительна к аффинной стадии, т.к. ферменты были идентифицированы лишь после аффинной элюции при pH 5,6, но не 7,4 (таблица).

Относительная представленность пептидов данных фосфатаз во фракциях, элюируемых тиаминном с тиамин-сефарозы (таблица), коррелировала с уровнями фосфатазных активностей в элюатах после аффинной хроматографии (рис. 1, а, б). Для пептидов фосфатазы L наблюдали корреляцию с уровнем активности ТМФ-аз, а для пептидов экзополифосфатазы – с уровнем активности ТДФ-аз (рис. 1, таблица). Так, наибольшую активность ТМФ-аз ($4,8 \pm 0,1$ мкмоль/мин на мг белка) детектировали при кислой (pH 5,6) элюции раствором тиаминна. В элюате были определены пептиды фосфатазы L, покрывающие 11% ее последовательности. В элюате мочевиной, где активность ТМФ-азы составляла $1,9 \pm 0,1$ мкмоль/мин на

мг белка (рис. 1, а), было определено меньше пептидов фосфатазы L, покрытие последовательности 6% (таблица). Активности ТМФ-аз в других образцах были ниже и могли соответствовать фосфатазам, не имеющим высокой специфичности к ТМФ (рис. 1).

Активность ТДФ-аз была наибольшей ($4,1 \pm 0,1$ мкмоль/мин на мг белка) при элюции NaCl после кислой (pH 5,6) элюции раствором тиаминна. В этих же условиях наблюдали наибольший уровень определения пептидов экзополифосфатазы (7% покрытия последовательности). На предшествующей стадии элюции тиаминном (pH 5,6) и активность ТДФ-аз ($2,4 \pm 0,1$ мкмоль/мин на мг белка), и количество пептидов экзополифосфатазы (2% покрытия) были меньше по сравнению с их максимальным значением в элюате NaCl (рис. 1, таблица).

Поиск гомологов фосфатазы L из семейства DING, аннотированных у млекопитающих. Идентификация пептидов рассмотренных выше бактериальных ферментов при аффинной хроматографии белков быка указывала на присутствие в элюатах ортологичных бактериальным фосфатазам ферментов быка, последовательности которых отсутствуют в курируемой базе данных SwissProt. Поэтому для идентификации фосфатаз быка мы проводили направленный поиск идентифицированных пептидов аннотированных фосфатаз бактерий в последовательностях млекопитающих, используя базу UniProtKB/TrEMBL (см. «Материалы и методы»). В резуль-

тате поиска мы столкнулись с проблемой идентификации DING-белков, представителем которых была бактериальная фосфатаза L, в геномах млекопитающих [17–20]. Из семейства данных белков лишь последовательности белков человека HPBP [8, 21] и X-DING-CD4 [22, 23] (таблица) определены достоверно. Гомология данных белков человека с бактериальной фосфатазой L (таблица) следует из принадлежности к общему семейству белков DING и 54–66% сходства между последовательностями (рис. 2). Проведенный нами направленный поиск пептидов X-DING-CD4 показал, что данная фосфатаза была представлена в не связавшихся с тиамин-сефарозой белках меньше (4% покрытия), чем при специфической элюции тиамином (11% покрытия, таблица). При этом профиль элюции пептидов фосфатазы X-DING-CD4

совпадал с таковым для пептидов щелочной фосфатазы L (таблица), что указывает на принадлежность пептидов одному и тому же ортологичному белку DING из генома быка. Корреляция же представленности пептидов данных белков (таблица) с уровнями ТМФ-азной активности в элюатах (рис. 1, а) указывает на то, что ортолог бактериальной фосфатазы L у животных, такой как белок X-DING-CD4 или его гомолог, является ТМФ-азой. При выравнивании последовательностей один из идентифицированных пептидов, соответствующий консервативному для этих последовательностей участку, определен как общий для бактериальной фосфатазы L и X-DING-CD4 человека (рис. 2). Отсутствие совпадения других выявленных пептидов бактериальной фосфатазы L и X-DING-CD4 белка человека, очевидно, определено

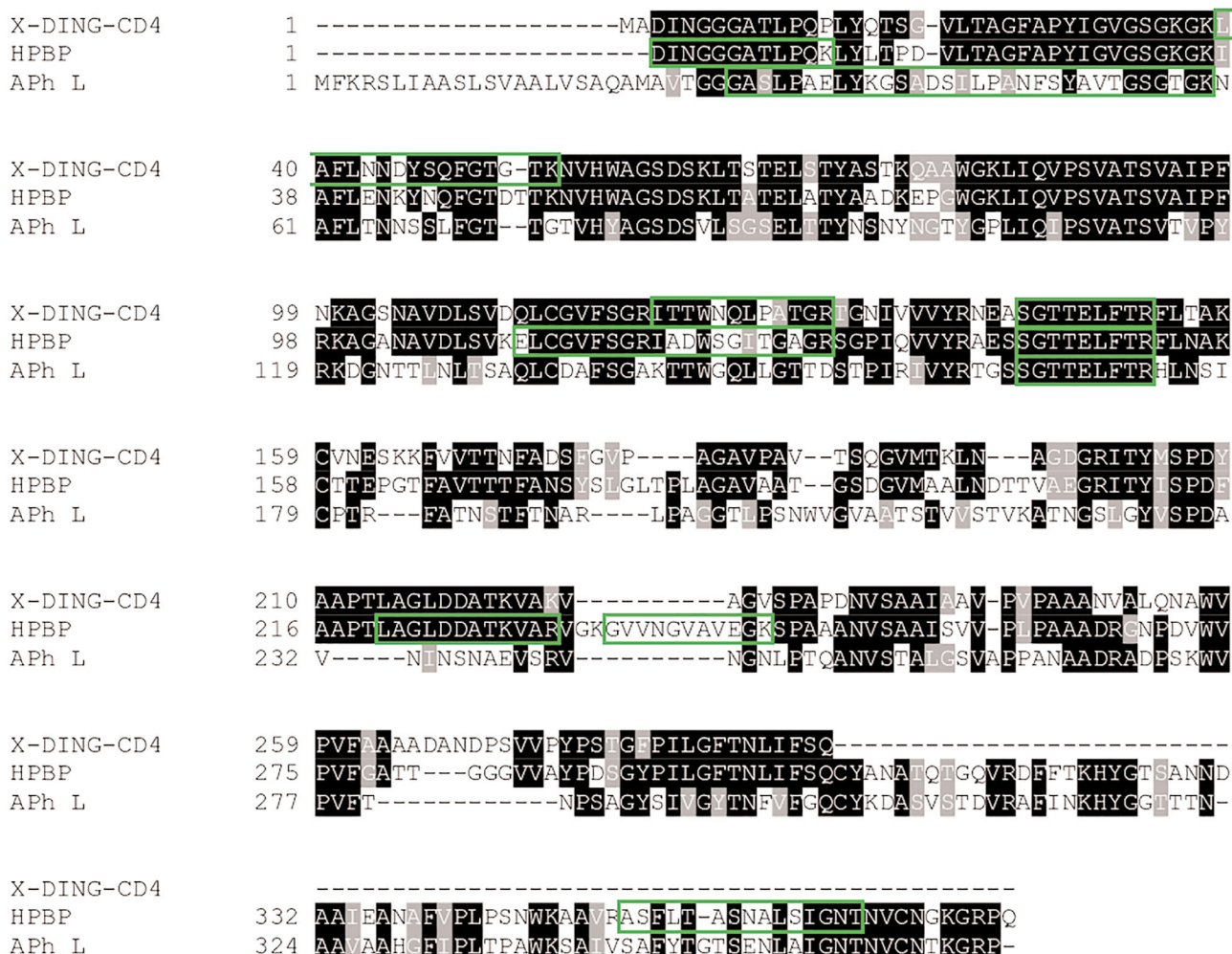


Рис. 2. Множественное выравнивание (Clustal Omega) последовательностей белков семейства DING, пептиды которых идентифицированы при аффинной хроматографии на тиамин-сефарозе. X-DING-CD4 – R4H484, HPBP – P85173, щелочная фосфатаза L (APh L) – P35482. Найденные уникальные пептиды отмечены зелеными рамками. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohksm/>

структурными отличиями данных фосфатаз у человека и быка.

Определенные в элюатах пептиды другого представителя семейства DING белков млекопитающих – фосфат-связывающего белка HPBP – не совпадают с пептидами X-DING-CD4 и фосфатазы L при выравнивании их последовательностей (рис. 2). Наблюдаются и существенные отличия профилей элюции пептидов HPBP и фосфатазы L или X-DING-CD4 (таблица). Эти результаты свидетельствовали о присутствии как минимум двух DING-белков в элюатах с тиамин-сефарозы.

При элюции тиамин (рН 5,6) фосфат-связывающий белок HPBP практически не детектировался (2% покрытия), но был наиболее высоко представлен (12% покрытия) во фракции белков, не связавшихся с тиамин-сефарозой (таблица). При элюции белков с тиамин-сефарозы неспецифическими агентами (NaCl и мочевиной) HPBP детектировали на промежуточном уровне (6–7% покрытия). Такой профиль элюции не соответствует ни одной из детектированных нами фосфатазных активностей (рис. 1), хотя для HPBP показано наличие активности щелочной фосфатазы в стандартном анализе с пара-нитрофенилфосфатом [24]. Различия профилей элюции пептидов, соответствующих последовательностям щелочной фосфатазы L и белка HPBP, отсутствие корреляции уровня HPBP и активности ТМФ-аз или ТДФ-аз (рис. 1, а, б) и наличие значительной части этого белка во фракции белков, не связавшихся с тиамин-сефарозой (таблица), дает основания считать, что определенные в элюатах синапсом мозга быка пептиды соответствуют таковым бычьего ортолога HPBP, а не другому представителю DING белков – X-DING-CD4.

Следует отметить, что представленность пептидов HPBP во фракциях элюата с аффинной колонки была наиболее высока (7% покрытия) в элюате мочевиной, где также детектировали параоксоназу-1 (таблица). Гидролизующая лактоны, эфиры и фосфорорганические соединения параоксоназа-1 (ген *PONI*) прочно связывает HPBP и соочищается с ним при выделении из плазмы крови человека [9]. Взаимодействие этих белков функционально значимо для поддержания стабильности параоксоназы-1 [25]. В связи с этим возможно, что с тиамин-сефарозой связывается не сам HPBP, а прочно взаимодействующая с ним параоксоназа-1. В этом случае детекция значительной части HPBP во фракции не связавшихся с тиамин-сефарозой белков (таблица) может объясняться его свободным от параоксоназы состоянием. Наблюдаемый же профиль элюции HPBP может свидетельство-

вать о прочном связывании с тиамин-сефарозой комплекса HPBP с параоксоназой. Частичное разрушение данного комплекса идет под действием NaCl, приводя к элюции HPBP. Связь же параоксоназы с тиамин-сефарозой разрушается лишь при элюции мочевиной, приводя к идентификации обоих белков комплекса в данном элюате (таблица).

Таким образом, поиск бычьих ортологов известных DING-белков человека показал наличие двух представителей семейства DING во фракции синапсом мозга быка. Бычий ортолог фосфатазы X-DING-CD4 человека эффективно элюируется кислым раствором тиамина одновременно с ТМФ-азной активностью. Бычий ортолог фосфат-связывающего белка HPBP, по-видимому, связывается с тиамин-сефарозой через параоксоназу-1, а в изолированном виде находится среди не связавшихся с аффинным носителем белков. Хотя наши результаты не показали высокого уровня ТМФ-азной или ТДФ-азной активностей в элюируемой мочевиной фракции белков (рис. 1), это могло быть связано с инактивацией фермента в условиях элюции. Не исключено, что активность HPBP в отношении фосфатов тиамина требует комплекса с параоксоназой. В связи с известными данными об активности щелочной фосфатазы в отношении ТДФ [26] и наличием активности щелочной фосфатазы у HPBP [24] представляется перспективным дальнейшее исследование участия HPBP в метаболизме фосфатов тиамина.

Гомология DING-белка человека и бактериального тиамин-связывающего белка. Наличие структурного и/или функционального сходства может указывать на гомологию белков с низкой консервативностью аминокислотных последовательностей. Используя сервис PDBeFold и структуру DING-белка человека HPBP (PDB ID: 2v3q) – единственного DING-белка млекопитающих с известной пространственной структурой, – был проведен поиск его структурных гомологов (см. «Методы исследования»). Помимо бактериальных представителей семейства DING-белков данный поиск определил структурное сходство DING-белка человека HPBP с бактериальными субъединицами ABC-транспортеров. Хотя наибольшим структурным сходством с фосфат-связывающим DING-белком человека HPBP обладали фосфат-связывающие белки PstS, в качестве гомолога был идентифицирован также белок ThiB *Escherichia coli* (PDB ID: 2qru), связывающий тиамин, ТМФ и ТДФ. Гомологичные белки DING и PstS показывают до 30% идентичности по аминокислотной последовательности [17]. Сходство последовательностей HPBP и ThiB *E. coli* незначи-

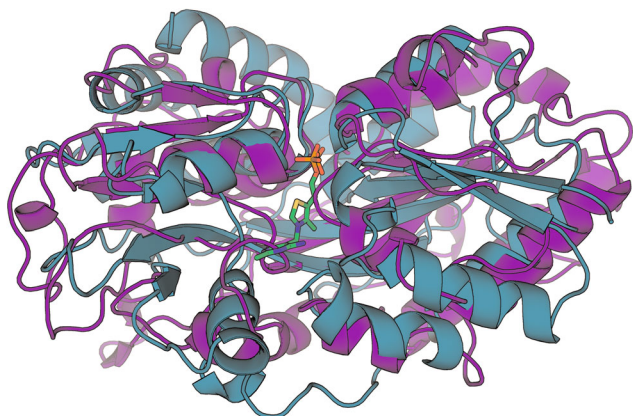


Рис. 3. Структурное выравнивание фосфат-связывающего белка человека HPBP из семейства DING (PDB ID: 2v3d, белок показан фиолетовым) и бактериального тиамин-связывающего белка ThiB (PDB ID: 2qgu, белок показан бирюзовым) с фосфатом (оранжевые связи с красными атомами кислорода) и ТМФ (зеленые атомы углерода) соответственно.

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

тельное – всего 15% идентичных остатков. Однако выравнивание структур белков HPBP и ThiB (рис. 3) показывает не только общее строение, проявляющееся в соответствии элементов вторичной структуры, но и совпадение центров белков, связывающих фосфат и фосфатную группу ТМФ (рис. 3). Таким образом, обнаружено функциональное и структурное сходство белков HPBP и ThiB.

Идентификация экзополифосфатазы как потенциальной ТДФ-азы. Профиль элюции пептидов экзополифосфатазы *P. aeruginosa*, идентифицированных при аффинной хроматографии на тиамин-сефарозе при кислой элюции тиаминном (пептид YAQAYTAAR) и NaCl (пептиды VQLAAGLDEER, YAQAYTAAR и HGAYLIEHSDLAGFSR), соответствует профилю элюции ТДФ-азной активности (таблица, рис. 1). Экзополифосфатаза относится к семейству экзополифосфатаз/гуанозинпентафосфатфосфогидролаз и является многофункциональным ферментом, гидролизующим полифосфаты до ортофосфатов при возможном сопряжении данной реакции с ADP-киназной [27]. Таким образом, сведения о данном ферменте не исключают связывания и гидролиза ТДФ, обладающего структурным сходством с АДФ, в его активном центре.

Аминокислотная последовательность экзополифосфатазы *P. aeruginosa* не гомологична таковой экзополифосфатазы млекопитающих (ген *PRUNE1*). Определить гомологи бактериальной экзополифосфатазы у млекопитающих не удалось и с использованием поиска blast. При на-

правленном поиске идентифицированных пептидов экзополифосфатазы в базе данных UniProtKB/TrEMBL не были обнаружены значимые совпадения с имеющимися на данный момент последовательностями млекопитающих. Анализ доменной структуры экзополифосфатазы *P. aeruginosa* показал, что на N-конце ее последовательности аннотирован экзополифосфатазный/гуанозинпентафосфатфосфогидролазный домен Ppx-GppA (PF02541). Из недавно полученной трехмерной структуры гомолога этого фермента из *E. coli* следует, что оставшаяся часть последовательности экзополифосфатазы формирует второй не охарактеризованный С-концевой домен [28]. Используя разрешенную структуру ближайшего гомолога определенной нами экзополифосфатазы (PDB ID: 1ubz, идентичность 40%), мы провели поиск гомологичных белков млекопитающих с помощью PDBeFold. Помимо бактериальных белков такой поиск обнаружил гомологию с эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролазами (апиразами) крысы (на примере одного из паралога, кодируемого геном *ENTPD2*) [29]. Анализ найденного сходства показал, что апиразный домен (GDA1_CD39, PF01150) относится к тому же структурному семейству SCOP (Ppx/GppA phosphatase), что и N-концевой домен экзополифосфатаз/гуанозинпентафосфатфосфогидролаз (Ppx-GppA, PF02541).

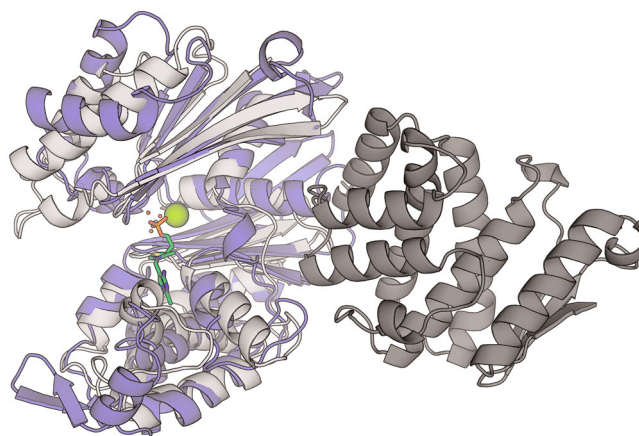


Рис. 4. Структурное выравнивание экзополифосфатазы и апиразы. В структуре экзополифосфатазы из *E. coli* (PDB ID: 1ubz) N-концевой домен показан светло-серым, а С-концевой домен – темно-серым. В структуре апиразы из *Legionella pneumophila* (PDB ID: 4brh) апиразный домен показан голубым. Апираза включает ион магния (показан в виде зеленой сферы) и ванадийсодержащий аналог ТДФ. Атомы ванадата показаны маленькими шариками, атомы углерода аналога ТДФ показаны зеленым, цвета других атомов даны в соответствии со стандартной цветовой схемой. С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Хотя в базе Pfam эти домены имеют разные идентификаторы, ввиду отсутствия достаточно-го сходства их аминокислотных последовательностей, пространственная структура *N*-концевого домена экзополифосфатазы хорошо выравнивается со структурой апиразы (рис. 4). Более того, известно связывание и гидролиз ТДФ апиразами [29]. Таким образом, экзополифосфатаза, идентифицированная по элюируемым с тиамин-сефарозы пептидам, не гомологична экзополифосфатазе млекопитающих, но имеет структурное сходство с апиразами.

Каталитической особенностью апираз является их способность гидролизовать как три-, так и дифосфатные производные при отсутствии способности расщеплять монофосфаты [29]. В этой связи следует отметить, что фосфатазная активность синаптосомальных фракций по отношению к тиаминтрифосфату соотносится с фосфатазной активностью к ТДФ [4]. Такая особенность может указывать на принадлежность синаптосомальной фосфатазы ТДФ и/или тиаминтрифосфата к группе апираз. Кроме того, свойства ранее выделенной, но не охарактеризованной на молекулярном уровне мембранной ТДФ-азы мозга крысы [30], во многом совпадают с известными свойствами апираз млекопитающих.

Аффинная хроматография экстракта синаптосом мозга быка на тиамин-сефарозе при кислот (рН 5,6) элюции тиаминном приводит к 4-кратной очистке ТМФ-азы и ТДФ-азы по максимальной удельной активности, определяемой

в элюатах тиаминном и NaCl соответственно. Профили элюции данных активностей коррелируют с масс-спектрометрической идентификацией пептидов фосфатаз, элюируемых с тиамин-сефарозы в зависимости от рН аффинной элюции. Структурный анализ аннотированных фосфатаз, включающих идентифицированные в элюатах с тиамин-сефарозы пептиды, показал, что ТМФ-аза мозга быка может быть ортологом белка человека X-DING-CD4, тогда как ТДФ-аза мозга быка может быть апиразой. Обнаружено опосредованное параоксоназой-1 связывание на тиамин-сефарозе DING-белка, ортологичного белку человека НРВР, обладающему активностью щелочной фосфатазы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-34-00235.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. В частности, все эксперименты с животными проводили с соблюдением этических норм согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденным директивой Евросоюза 2010/63/EU. Эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bunik, V.I., and Aleshin, V.A. (2017) Analysis of the protein binding sites for thiamin and its derivatives to elucidate the molecular mechanisms of the noncoenzyme action of thiamin (vitamin B1), in *Studies in natural products chemistry*, Vol. 53, pp. 375–429, Elsevier, Amsterdam, doi: 10.1016/b978-0-444-63930-1.00011-9.
2. Aleshin, V.A., Mkrtchyan, G.V., and Bunik, V.I. (2019) Mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin: protein targets and medical significance, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 829–850, doi: 10.1134/S0006297919080017.
3. Hurt, J.K., Coleman, J.L., Fitzpatrick, B.J., Taylor-Blake, B., Bridges, A.S., Vihko, P., and Zylka, M.J. (2012) Prostatic acid phosphatase is required for the antinociceptive effects of thiamine and benfotiamine, *PLoS one*, **7**, e48562, doi: 10.1371/journal.pone.0048562.
4. Parkhomenko, Y.M., Protasova, Z.S., Yanchiy, O.R., Khosla, K., and Donchenko, G.V. (2001) Localization of thiamine-binding protein in synaptosomes from the rat brain, *Neurophysiology*, **33**, 135–139, doi: 10.1023/a:1012840417285.
5. Постоевко В.А., Пархоменко Ю.М., Вовк А.И., Халмуратов А.Г., Донченко Г.В. (1987) Выделение и некоторые свойства тиаминсвязывающего белка синаптосом головного мозга крыс, *Биохимия*, **52**, 1792–1797.
6. Pan, X., Sang, S., Fei, G., Jin, L., Liu, H., Wang, Z., Wang, H., and Zhong, C. (2017) Enhanced activities of blood thiamine diphosphatase and monophosphatase in Alzheimer's disease, *PLoS one*, **12**, e0167273, doi: 10.1371/journal.pone.0167273.
7. Sang, S., Pan, X., Chen, Z., Zeng, F., Pan, S., Liu, H., Jin, L., Fei, G., Wang, C., Ren, S., Jiao, F., Bao, W., Zhou, W., Guan, Y., Zhang, Y., Shi, H., Wang, Y., Yu, X., Wang, Y., and Zhong, C. (2018) Thiamine diphosphate reduction strongly correlates with brain glucose hypometabolism in Alzheimer's disease, whereas amyloid deposition does not, *Alzheimers Res. Ther.*, **10**, 26, doi: 10.1186/s13195-018-0354-2.
8. Diemer, H., Elias, M., Renault, F., Rochu, D., Contreras-Martel, C., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., and Chabriere, E. (2008) Tandem use of X-ray crystallography

- and mass spectrometry to obtain ab initio the complete and exact amino acids sequence of HPBP, a human 38-kDa apolipoprotein, *Proteins*, **71**, 1708–1720, doi: 10.1002/prot.21866.
9. Renault, F., Chabriere, E., Andrieu, J.P., Dublet, B., Masson, P., and Rochu, D. (2006) Tandem purification of two HDL-associated partner proteins in human plasma, paraoxonase (PON1) and phosphate binding protein (HPBP) using hydroxyapatite chromatography, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **836**, 15–21, doi: 10.1016/j.jchromb.2006.03.029.
 10. Gonzalez, D., Elias, M., and Chabriere, E. (2014) The DING family of phosphate binding proteins in inflammatory diseases, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **824**, 27–32, doi: 10.1007/978-3-319-07320-0_4.
 11. Клящицкий Б.А., Позднев В.Ф., Митина В.Х., Воскобоев А.И., Черникевич И.П. (1980) Выделение и очистка биополимеров методом аффинной хроматографии. Аффинная хроматография пируватдекарбоксилазы из пивных дрожжей, *Биоорганическая химия*, **6**, 1572–1579.
 12. Mkrtchyan, G., Aleshin, V., Parkhomenko, Y., Kaehne, T., Di Salvo, M.L., Parroni, A., Contestabile, R., Vovk, A., Bettendorff, L., and Bunik, V. (2015) Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin in brain: biochemical, structural and pathway analysis, *Sci. Rep.*, **5**, 12583, doi: 10.1038/srep12583.
 13. Mezhsenska, O.A., Aleshin, V.A., Kaehne, T., Artiukhov, A.V., and Bunik, V.I. (2020) Regulation of malate dehydrogenases and glutamate dehydrogenase in animal brain with thiamine *in vitro* and *in vivo*, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 27–39, doi: 10.1134/S0006297920010034.
 14. Chan, K.M., Delfert, D., and Junger, K.D. (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity, *Anal. Biochem.*, **157**, 375–380, doi: 10.1016/0003-2697(86)90640-8.
 15. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
 16. Bunik, V., Kaehne, T., Degtyarev, D., Shcherbakova, T., and Reiser, G. (2008) Novel isoenzyme of 2-oxoglutarate dehydrogenase is identified in brain, but not in heart, *FEBS J.*, **275**, 4990–5006, doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06632.x.
 17. Berna, A., Bernier, F., Chabriere, E., Perera, T., and Scott, K. (2008) DING proteins; novel members of a prokaryotic phosphate-binding protein superfamily which extends into the eukaryotic kingdom, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **40**, 170–175, doi: 10.1016/j.biocel.2007.02.004.
 18. Collombet, J.M., Elias, M., Gotthard, G., Four, E., Renault, F., Joffre, A., Baubichon, D., Rochu, D., and Chabriere, E. (2010) Eukaryotic DING proteins are endogenous: an immunohistological study in mouse tissues, *PLoS One*, **5**, e9099, doi: 10.1371/journal.pone.0009099.
 19. Cherrier, T., Elias, M., Jeudy, A., Gotthard, G., Le Douce, V., Hallay, H., Masson, P., Janossy, A., Candolfi, E., Rohr, O., Chabriere, E., and Schwartz, C. (2011) Human-Phosphate-Binding-Protein inhibits HIV-1 gene transcription and replication, *Virology*, **8**, 352, doi: 10.1186/1743-422X-8-352.
 20. Sachdeva, R., Li, Y., Shilpi, R.Y., and Simm, M. (2015) Human X-DING-CD4 mediates resistance to HIV-1 infection through novel paracrine-like signaling, *FEBS J.*, **282**, 937–950, doi: 10.1111/febs.13192.
 21. Morales, R., Berna, A., Carpentier, P., Contreras-Martel, C., Renault, F., Nicodeme, M., Chesne-Seck, M. L., Bernier, F., Dupuy, J., Schaeffer, C., Diemer, H., Van-Dorselaer, A., Fontecilla-Camps, J. C., Masson, P., Rochu, D., and Chabriere, E. (2006) Serendipitous discovery and X-ray structure of a human phosphate binding apolipoprotein, *Structure*, **14**, 601–609, doi: 10.1016/j.str.2005.12.012.
 22. Lesner, A., Shilpi, R., Ivanova, A., Gawinowicz, M.A., Lesniak, J., Nikolov, D., and Simm, M. (2009) Identification of X-DING-CD4, a new member of human DING protein family that is secreted by HIV-1 resistant CD4(+) T cells and has anti-viral activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **389**, 284–289, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.08.140.
 23. Ivanova, A., Shilpi, R.Y., Sachdeva, R., Li, G., and Simm, M. (2012) Native X-DING-CD4 protein secreted by HIV-1 resistant CD4⁺ T cells blocks activity of IL-8 promoter in human endothelial cells infected with enteric bacteria, *Innate Immun.*, **18**, 571–579, doi: 10.1177/1753425911427065.
 24. Porzio, E., De Maio, A., Ricciardi, T., Mistretta, C., Manco, G., and Faraone-Mennella, M.R. (2018) Comparison of the DING protein from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* with human phosphate-binding protein and *Pseudomonas* fluorescence DING counterparts, *Extremophiles*, **22**, 177–188, doi: 10.1007/s00792-017-0985-4.
 25. Rochu, D., Renault, F., Clery-Barraud, C., Chabriere, E., and Masson, P. (2007) Stability of highly purified human paraoxonase (PON1): association with human phosphate binding protein (HPBP) is essential for preserving its active conformation(s), *Biochim. Biophys. Acta*, **1774**, 874–883, doi: 10.1016/j.bbapap.2007.05.001.
 26. Вовк А.И., Бабий Л.В., Муравьева И.В. (2002) Относительная реактивность тиаминмонофосфата и тиаминдифосфата при взаимодействии со щелочной фосфатазой, *Укр. биохим. журн.*, **74**, 93–96.
 27. Beassoni, P.R., Gallarato, L.A., Boetsch, C., Garrido, M.N., and Lisa, A.T. (2015) *Pseudomonas aeruginosa* exopolyphosphatase is also a polyphosphate: ADP phosphotransferase, *Enzyme Res.*, **2015**, 404607, doi: 10.1155/2015/404607.
 28. Song, H., Dharmasena, M. N., Wang, C., Shaw, G. X., Cherry, S., Tropea, J. E., Jin, D. J., and Ji, X. (2019) Structure and activity of PPX/GppA homologs from *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*, *FEBS J.*, doi: 10.1111/febs.15120.
 29. Zebisch, M., Krauss, M., Schafer, P., Lauble, P., and Strater, N. (2013) Crystallographic snapshots along the reaction pathway of nucleoside triphosphate diphosphohydrolases, *Structure*, **21**, 1460–1475, doi: 10.1016/j.str.2013.05.016.
 30. Sano, S., Matsuda, Y., Miyamoto, S., and Nakagawa, H. (1984) Thiamine pyrophosphatase and nucleoside diphosphatase in rat brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**, 292–298, doi: 10.1016/0006-291x(84)91099-4.

PHOSPHATASES OF THIAMINE MONO- AND DIPHOSPHATES IN BOVINE BRAIN SYNAPTOSOMES

V. A. Aleshin^{1,2*}, O. A. Mezhenka³, Y. M. Parkhomenko³, T. Kaehne⁴, and V. I. Bunik^{1,2,5*}

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics,
119991 Moscow, Russia; E-mail: aleshinvasily@gmail.com; bunik@belozersky.msu.ru

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

³ Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, 01601 Kyiv, Ukraine

⁴ Institute of Experimental Internal Medicine, Otto von Guericke University, 39120 Magdeburg, Germany

⁵ Sechenov First Moscow State Medical University Ministry of Health of the Russian Federation, 119992 Moscow, Russia

Received December 31, 2019

Revised January 8, 2020

Accepted January 9, 2020

Activities of the thiamine mono- and diphosphate phosphatases change in neurodegenerative diseases, but molecular identification of these enzymes in mammals is incomplete. In this work, bovine brain synaptosomes fraction, enriched with phosphatase activities toward the thiamine derivatives, was subjected to affinity chromatography using thiamine-Sepharose. Proteins bound to the affinity sorbent were sequentially eluted with solutions of thiamine (pH 7.4 or 5.6), sodium chloride and urea, and the eluates were assayed for phosphatase activities toward thiamine monophosphate (ThMP), thiamine diphosphate (ThDP) and structurally similar purine nucleotides. Protein sets in each eluted fraction were identified by mass-spectrometry; the SwissProt database for all organisms was used due to insufficient annotation of the bovine genome. In the acidic thiamine eluates, we identified peptides of two bacterial phosphatases – alkaline phosphatase L from the family of DING proteins and exopolyphosphatase. The representation of the peptides of phosphatase L and exopolyphosphatase in the eluates correlated with the elution of the ThMPase and ThDPase activities, respectively. The elution profiles of these phosphatase activities differed from those of nucleotide phosphatases, pointing to the phosphatase specificities toward the thiamine derivatives. Targeted search for mammalian DING phosphatases in eluates from thiamine-Sepharose revealed predominant elution of X-DING-CD4 protein with acidic (pH 5.6) thiamine solution. Structural similarity of the exopolyphosphatase (identified by peptides) with apyrases possessing ThDPase activity was revealed. The results obtained support the correspondence of ThMPase and ThDPase activities to mammalian DING proteins and apyrases, respectively.

Keywords: apyrase, thiamine, thiamine monophosphate, thiamine diphosphate, DING-phosphatase, HPBP, X-DING-CD4