

Received: 2011.02.07  
Accepted: 2011.05.02  
Published: 2011.07.06

## Tiamina i jej pochodne w regulacji metabolizmu komórek

### Thiamine and its derivatives in the regulation of cell metabolism

Adam Tylicki, Magdalena Siemieniuk

Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

#### Streszczenie

Tiamina (wit. B<sub>1</sub>) od ponad 70 lat cieszy się niesłabnącym zainteresowaniem biologów, biochemików i lekarzy ze względu na swój udział w głównych procesach biochemicznych i fizjologicznych. Cząsteczka tiaminy składa się z pierścienia pirymidynowego i tiazolowego połączonych mostkiem metylenowym. Jest ona syntetyzowana w komórkach mikroorganizmów, grzybów i roślin, natomiast zwierzęta i ludzie muszą pobierać ją z pożywieniem. W komórkach tiamina występuje w postaci wolnej oraz estrów fosforanowych (mono-, piro- i trifosforanu), a także – co niedawno stwierdzono – w postaci adenozyntrifosfotiaminy. Pirofosforan tiaminy jest koenzymem ponad 20 szcharakteryzowanych enzymów związanych z różnymi szlakami metabolicznymi (udział w przemianach katabolicznych prowadzących do syntezy ATP, biosynteza pentoz niezbędnych do budowy nukleotydów, metabolizm aminokwasów i innych związków organicznych). Badania ostatnich lat dowodzą również niekoenzymatycznej funkcji pochodnych tiaminy w regulacji ekspresji genów (ryboprzełączniki u mikroorganizmów i roślin), reakcjach stresowych, transdukcji sygnałów nerwowych, a także w nieznanym dotąd szlaku transdukcji odbierających bodźce związane z niekorzystnymi warunkami środowiska. Niedobory tiaminy są kojarzone z wieloma stanami patologicznymi, takimi jak beri-beri, choroba Parkinsona, Alzheimer, Wernickego-Korsakowa, a także innymi patologiami układu nerwowego i krwionośnego. Dlatego witamina ta jest stosowana jako lek wspomagający w tych przypadkach. Rosnące zainteresowanie wzbudza uzyskiwanie coraz to nowych syntetycznych analogów tiaminy i możliwości ich wykorzystania jako antybiotyków, cytostatyków, herbicydów, czy też farmaceutyków łagodzących stan deficytu tej witaminy. W pracy przedstawiamy aktualny stan wiedzy dotyczący tiaminy i jej naturalnych, a także syntetycznych pochodnych, wskazując na udział tych związków w regulacji metabolizmu komórek przez ich funkcję koenzymatyczną i niekoenzymatyczną.

#### Słowa kluczowe:

**biosynteza i transport tiaminy • monofosforan tiaminy • pirofosforan tiaminy • trifosforan tiaminy • adenozyntrifosfotiamina • antywitaminy • funkcja koenzymatyczna i niekoenzymatyczna**

#### Summary

For over 70 years thiamine (vitamin B<sub>1</sub>) has aroused the interest of biologists, biochemists and medical doctors because of its multilateral participation in key biochemical and physiological processes. The thiamine molecule is composed of pyrimidine and thiazole rings which are linked by a methylene bridge. It is synthesized by microorganisms, fungi and plants, whereas animals and humans have to obtain it from food. There are several known forms of vitamin B<sub>1</sub> inside cells: free thiamine, three phosphate esters (mono-, di-, and triphosphate), and the recently found adenosine thiamine triphosphate. Thiamine has a dual, coenzymatic and non-coenzymatic

role. First of all, it is a precursor of thiamine diphosphate, which is a coenzyme for over 20 characterized enzymes which are involved in cell bioenergetic processes leading to the synthesis of ATP. Moreover, these enzymes take part in the biosynthesis of pentose (required for the synthesis of nucleotides), amino acids and other organic compounds of cell metabolism. On the other hand, recent discoveries show the non-coenzymatic role of thiamine derivatives in the process of regulation of gene expression (riboswitches in microorganisms and plants), the stress response, and perhaps so far unknown signal transduction pathways associated with adverse environmental conditions, or transduction of nerve signals with participation of thiamine triphosphate and adenosine thiamine triphosphate. From the clinical point of view thiamine deficiency is related to beri-beri, Parkinson disease, Alzheimer disease, Wernicke-Korsakoff syndrome and other pathologies of the nervous system, and it is successfully applied in medical practice. On the other hand, identifying new synthetic analogues of thiamine which could be used as cytostatics, herbicides or agents preventing deficiency of vitamin B1 is currently the major goal of the research. In this paper we present the current state of knowledge of thiamine and its derivatives, indicating the participation of these compounds in the regulation of cell metabolism at both the coenzymatic and non-coenzymatic level.

**Key words:** biosynthesis and transport of thiamine • thiamine phosphate • antivitamin • coenzymatic and non-coenzymatic role

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=951633>

**Word count:** 8402

**Tables:** 5

**Figures:** 4

**References:** 193

**Adres autora:** dr Adam Tylicki, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, ul. Świerkowa 20B, 15-950 Białystok; e-mail: atyl@uwb.edu.pl

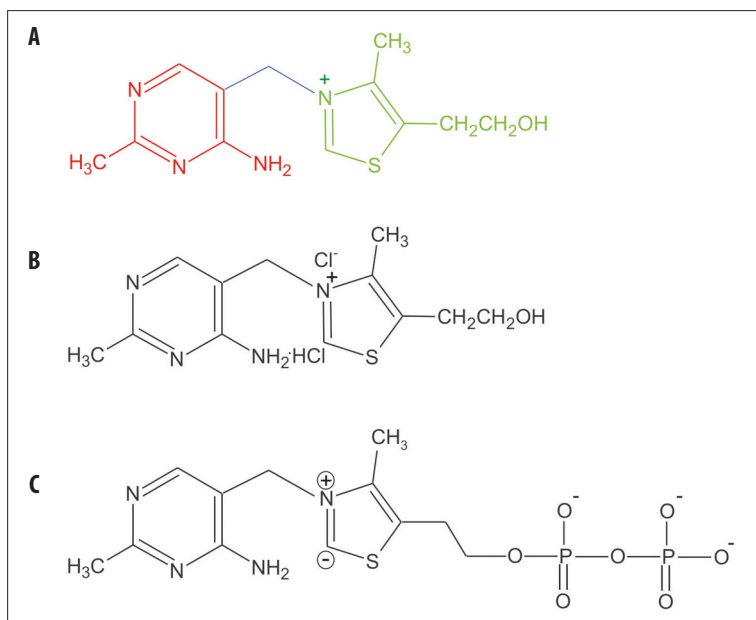
## 1. WPROWADZENIE

Odkrycie witamin, w tym tiaminy (ryc. 1A) stanowiło istotny etap rozwoju medycyny. Wiązało się z poszukiwaniem substancji biologicznie czynnych, zapobiegających różnym stanom chorobowym. Zidentyfikowanie czynnika, którego niedobór prowadził do zapalenia wielonerwowego (*polyneuritis*), przejawiającego się objawami klinicznymi typowymi dla choroby beri-beri, przyczyniło się do wyodrębnienia, ustalenia budowy chemicznej i opracowania metod syntezy *in vitro* witaminy B<sub>1</sub>, czyli tiaminy.

Choroba beri-beri w XIX w. powszechnie występowała w Azji, gdzie podstawą diety ludzi i zwierząt był ryż. Rozpowszechnienie technologii łuskania i mielenia ryżu, która pozbawiała go tiaminy zawartej w osłonkach ziaren, przyczyniło się do wzrostu liczby przypadków beri-beri pod koniec XIX w. Choroba ta dotykała głównie biedne populacje Dalekiego Wschodu, więźniów, marynarzy, niedożywione kobiety w ciąży, niemowlęta i dzieci. Głównymi objawami beri-beri, powodowanymi awitaminozą B<sub>1</sub>, były zaburzenia sercowo-naczyniowe, nadciśnienie tętnicze i obrzęki obwodowe – tzw. mokra postać beri-beri lub symetryczna polineuropatia obwodowa zarówno ruchowa jak i czuciowa – tzw. sucha postać beri-beri. Piorunująca postać beri-beri, zwana także zespołem Shoshina, cechowała się natomiast ostrą niewydolnością układu krążenia połączoną z obrzękiem płuc [105]. Fundamentalnych odkryć związanych z ustaleniem przyczyny beri-beri dokonano na przełomie XIX i XX wieku [81,187]. Holenderski lekarz Christiaan Eijkman w 1897 r.

pracując nad sposobami leczenia beri-beri stwierdził, że w otrębach ryżowych jest zawarty czynnik, którego brak w organizmie powoduje objawy tej choroby. Za swoje odkrycie uhonorowano go Nagrodą Nobla w 1929 r. W badaniach eksperymentalnych wykazał, że objawy beri-beri można wywołać karmiąc kurczęta polerowanym ryżem (ziarnem pozbawionym osłonek ziaren). Natomiast podawanie kurczętom otrębów ryżowych powodowało ustąpienie choroby. Obserwacje Eijkmana wyznaczyły kierunek dalszych badań, których celem było wyodrębnienie substancji zapobiegającej beri-beri. Pierwsze próby jej izolacji z otrębów ryżowych prowadzono na początku XX w. W latach 1911–1912 polski biochemik Kazimierz Funk pracując w Instytucie Listera w Londynie nad czynnikami wywołującymi awitaminozę wyodrębnił z otrębów ryżowych substancję, która przeciwdziałała objawom beri-beri. Otrzymana substancja nie była jednorodna pod względem chemicznym. Funk stwierdził, że substancja ta w swojej strukturze zawierała grupę aminową. Zaproponował więc nazwę witamina, czyli amina życia. Nazwą witaminy określa się obecnie wszystkie drobnocząsteczkowe związki organiczne biorące udział w katalizie enzymatycznej lub niezbędne do zapewnienia innych procesów biochemiczno-fizjologicznych w organizmach, które nie mogą syntetyzować tych związków *de novo*, lecz muszą je pozyskiwać z pożywieniem lub w wyniku symbiozy z mikroorganizmami.

Częściowo oczyszczony preparat, którego dzienna dawka 50 mg zapobiegała objawom beri-beri, a później bardziej oczyszczoną jego postać pozwalającą na sześciokrotne zmniejszenie dawki, uzyskali w 1926 r. niemieccy



Ryc. 1. Budowa chemiczna tiaminy, chlorowodoru chlorku tiaminy i jonu obojnaczego pirofosforanu tiaminy; **A** – tiamina, kolor czerwony – pierścień pirymidynowy, kolor niebieski – mostek metylenowy, kolor zielony – pierścień tiazolowy, **B** – chlorowodorek chlorku tiaminy, **C** – Ylid, aktywna postać pirofosforanu tiaminy, na ryc. przedstawiono rozmieszczenie ładunków elektrycznych w jonie obojnaczym powstałym po deprotonacji atomu C2 pierścienia tiazolowego

biochemicy Barend Coenraad Petrus Jansen i Willem Frederik Donath. Wyodrębnioną i oczyszczoną substancję nazwali oni aneuryną. Nie udało się im jednak ustalić prawidłowego wzoru strukturalnego aneuryny. W latach trzydziestych ub.w., dzięki wynikom badań Adolfa Otty Reinholda Windausa, który opracował skuteczną metodę izolacji aneuryny z drożdży oraz stwierdził obecność siarki w cząsteczce udało się ustalić chemiczną strukturę i metody syntezy tej witaminy. Robert Runnels Williams w latach 1933–1936 ostatecznie sprecyzował wzór strukturalny tiaminy i opracował metodę jej syntezy *in vitro*. Uzyskany preparat miał podobną aktywność biologiczną do związku z otrąb ryżowych. Williams jako pierwszy zaproponował nazwę tiamina, odzwierciedlającą obecność zarówno siarki jak i grupy aminowej w cząsteczce [187].

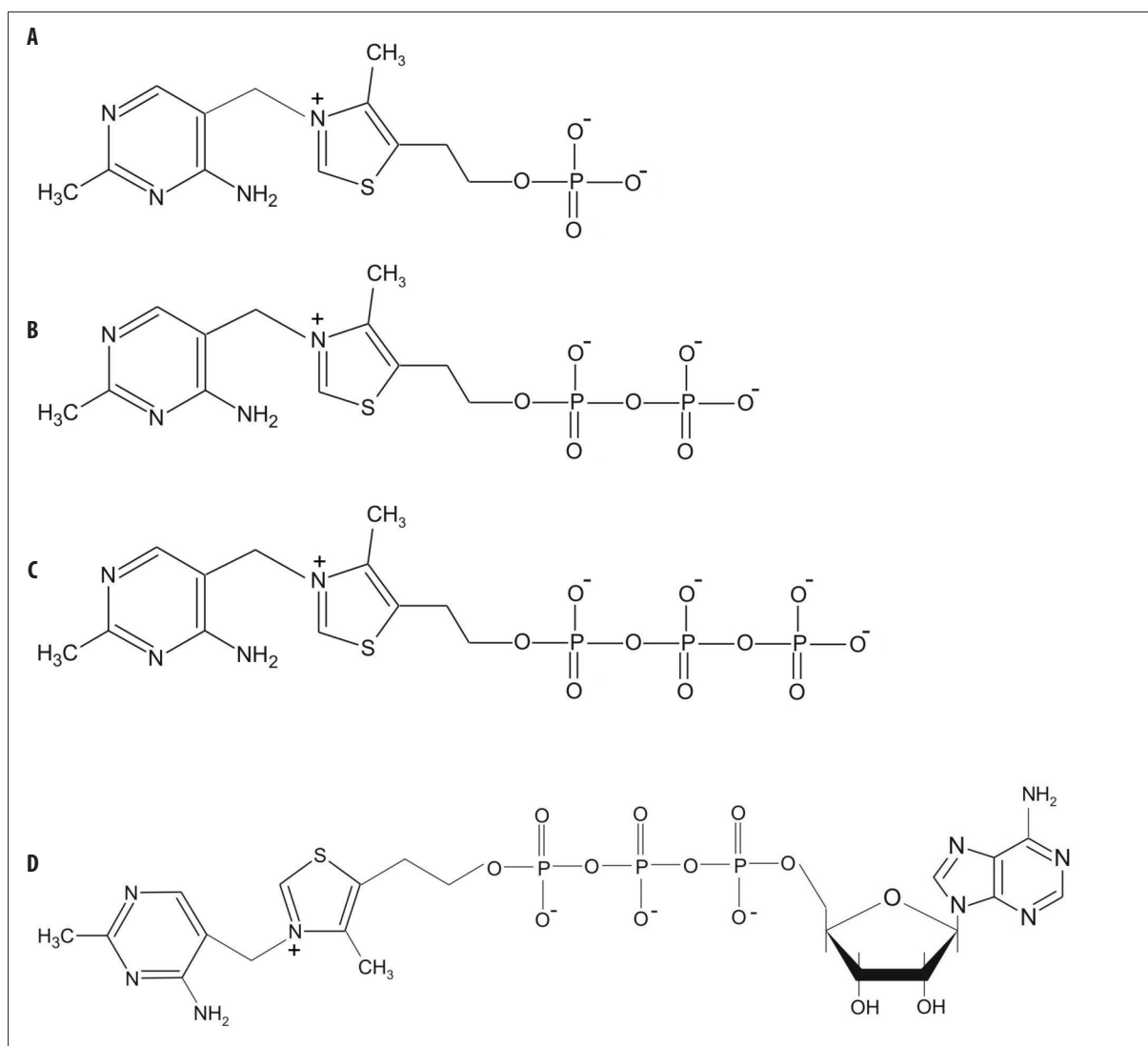
Cząsteczka tiaminy składa się z dwóch podstawionych pierścieni: pirymidynowego i tiazolowego połączonych mostkiem metylenowym (ryc. 1A). Ze względu na atom azotu wbudowany w strukturę pierścienia tiazolowego cała cząsteczka uzyskuje ładunek dodatni i łatwo tworzy stabilne sole tiazolowe [22,86,95].

Obecnie objawy beri-beri związane ze skrajną hipowitaminozą B<sub>1</sub> są dość rzadkie w związku z dużym urozmaiceniem pożywienia i szeroką dostępnością suplementów diety zawierających tiaminę, najczęściej w postaci chlorowodoru chlorku tiaminy (chlorku amoniowego tiaminy, ryc. 1B). Mimo to stany hipowitaminozy B<sub>1</sub> mogą występować w przypadkach diety niedoborowej lub jako skutki towarzyszące niektórym schorzeniom czy nadmiernemu stosowaniu niektórych leków (np. furosemid) oraz nadużywaniu alkoholu [105,149,159]. Fizjologiczne objawy łagodnych deficytów tiaminy to głównie uczucie zmęczenia, drażliwość, pogorszenie nastroju, zaburzenia koncentracji. Obecnie w społeczeństwach wysoko rozwiniętych do grupy ryzyka niedoboru tiaminy należą np. ludzie w podeszłym wieku, cukrzycy, alkoholicy, pacjenci po rozległych operacjach, kobiety w ciąży i w okresie laktacji, palacze tytoniu i młodzież preferująca dietę wysokowęglowodanową [105].

Stany chorobowe wywołane niedoborem tiaminy związane są głównie z obniżeniem aktywności enzymów, których kofaktorem jest pirofosforan tiaminy (ryc. 1C). W konsekwencji prowadzi to do nagromadzenia substratów reakcji katalizowanych przez te enzymy. Objawy deficytu tiaminy najszybciej obserwowane są w obrębie układu nerwowego, prawdopodobnie ze względu na toksyczne działanie mleczanu, akumulowanego w wyniku zmniejszonej aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (EC 1.2.4.1, tab. 4). Wzrost stężenia mleczanu może prowadzić do zwiększonego napływu jonów sodowych do komórek, a w konsekwencji do ich porażenia mięśniowego, objawiają się także w postaci zakłóceń pracy serca czy też ogólnego osłabienia [73]. Opisane wyżej neurofizjologiczne objawy towarzyszą niekiedy dysfunkcjom przewodu pokarmowego. Ich podłożem może być wówczas zaburzenie wchłaniania tiaminy, w następstwie czego dochodzi do stanu deficytu tej witaminy, mimo jej obfitości w spożywanym pokarmie.

Podsumowując, rolę tiaminy i jej pochodnych (ryc. 1 i 2) w metabolizmie komórek możemy rozpatrywać w dwóch aspektach. Po pierwsze, jako kofaktora wielu bardzo istotnych reakcji enzymatycznych (ryc. 3) kontrolujących procesy bioenergetyczne [153,154,155,171]), metabolizm aminokwasów [23,66] oraz przemiany różnych związków organicznych, w tym pentoz niezbędnych do wytwarzania nukleotydów [191].

Po drugie, nie sposób lekceważyć niekoenzymatycznej roli fosforylowanych pochodnych tiaminy w kontroli metabolizmu komórek przez allosteryczną regulację enzymów związanych z bioenergetyką komórki [25,153,152,



Ryc. 2. Budowa chemiczna fosforylowanych pochodnych tiaminy; **A** – monofosforan tiaminy, **B** – pirofosforan tiaminy, koenzymatyczna postać tiaminy, **C** – trifosforan tiaminy, **D** – adenylozotrifosfotiamina

71], udział w przekazywaniu sygnałów nerwowych w synapsach i prawdopodobny udział w szlakach sygnałowych związanych z odbieraniem bodźców ze środowiska [15,22,53,115]. Dodatkowo pirofosforan tiaminy może bezpośrednio regulować proces biosyntezy białek związanych z produkcją tiaminy i jej przemianami poprzez uruchamianie tzw. ryboprzełączników (riboswitches) u mikroorganizmów i roślin [24,136]. Ponadto wyniki najnowszych badań dobitnie wskazują, że tiamina i jej fosforylowane pochodne odgrywają ważną rolę w reakcji mikroorganizmów [77], zwierząt [98,179] i roślin [3,129,170,180] na różnego rodzaju niekorzystne czynniki środowiska, stres oksydacyjny i patogeny.

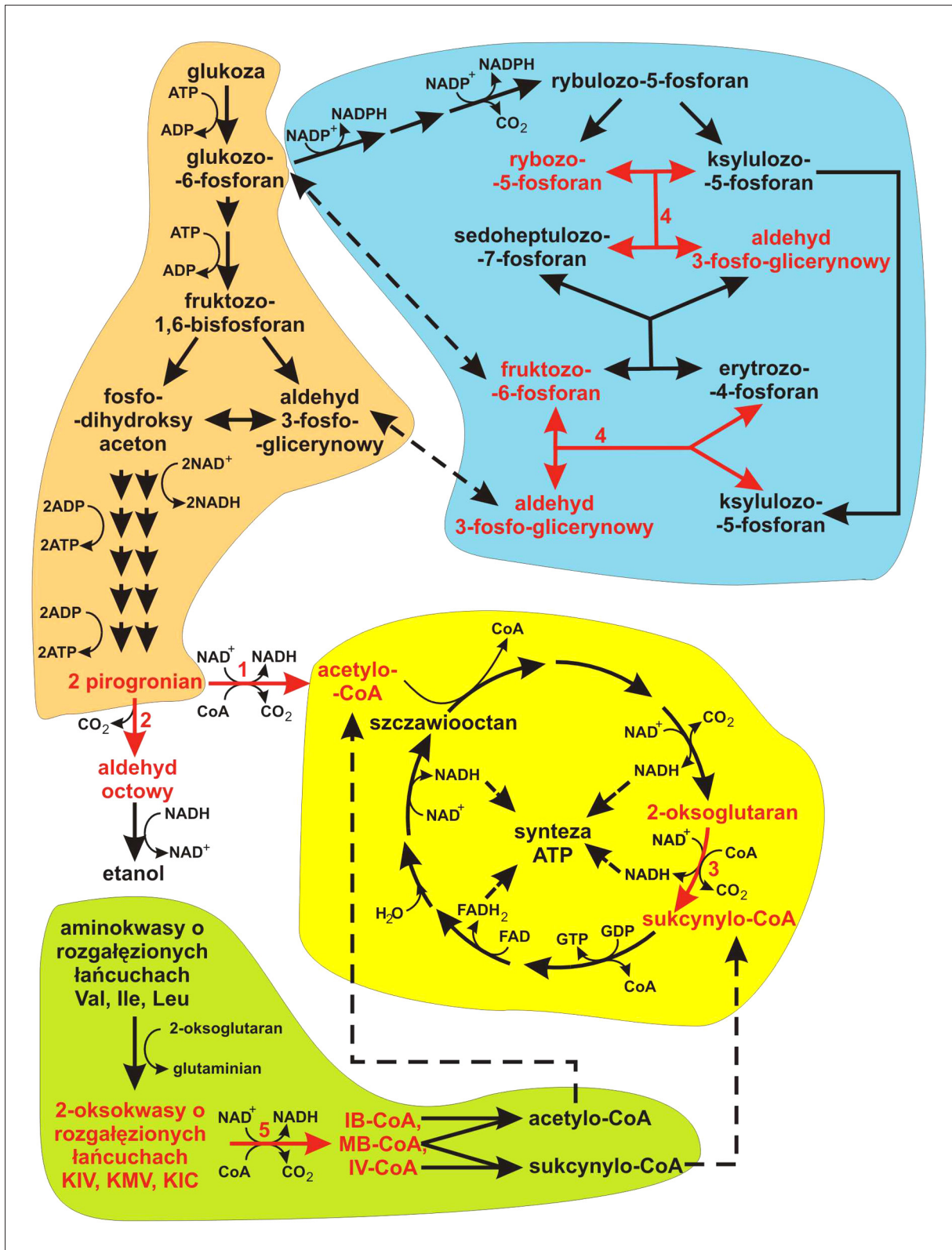
W pracy przedstawiono podstawową wiedzę na temat dostępności tiaminy i jej udziału w kontroli metabolizmu komórek na poziomie koenzymatycznym. Umieszczono również aktualny przegląd informacji dotyczących niekoenzymatycznej funkcji tiaminy oraz jej pochodnych akcentując możliwości związane z wykorzystaniem tiaminy i jej różnorodnych analogów w rozwiązywaniu aktualnych problemów medycznych.

## 2. BIOSYNTeza I ROZKŁAD TIAMINY

Bakterie, niektóre pierwotniaki, grzyby i rośliny syntetyzują tiaminę *de novo* [10,56,87,181]. Fragment pirymidynowy (4-amino-5-hydroksymetylo-2-metylopirymidynopirofosforan – HMP-PP) i tiazolowy (5-(2hydroksyetylo)-4-metylotiazolofosforan – HET-P) syntetyzowane są osobno, a następnie kondensowane do monofosforanu tiaminy.

U bakterii, roślin i drożdży ufosforylowany pierścień pirymidynowy powstaje z histydyny i pirydoksalo-5-fosforanu tworząc 5-aminoimidazol rybitydu, który ulega przekształceniu do HMP-P w reakcji katalizowanej przez kinazę HMP-P (nazwa systematyczna: hydroksymetylpirymidine kinase, EC 2.7.1.49) zwaną THIC. O podobnym szlaku syntezy części pirymidynowej tiaminy u bakterii i roślin świadczy stwierdzenie genu homologicznego z bakteryjnym THIC u *Arabidopsis thaliana*, gdzie aktywność THIC stwierdzono w stromie chloroplastów [85,131]. Powyższa reakcja wymaga dostarczenia S-adenylozylometioniny i zredukowanego nikotynamidu.





Ryc. 3. Podstawowe szlaki metaboliczne, w których uczestniczą enzymy zależne od pirofosforanu tiaminy. Reakcje zależne od pirofosforanu tiaminy wraz z ich najistotniejszymi substratami i produktami zaznaczono na czerwono. Numery w kolorze czerwonym oznaczają następujące enzymy: 1 – kompleks dehydrogenazy pirogronianowej, 2 – dekarboksylaza pirogronianowa, 3 – kompleks dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej, 4 – transketolaza, 5 – kompleks dehydrogenazy 2-oksokwasów o rozgałęzionych łańcuchach. Szlaki metaboliczne oznaczono kolorami: niebieski – szlak pentozofosforanowy, brązowy – glikoliza, żółty – cykl Krebsa, zielony – katabolizm aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach. Przerywane strzałki oznaczają połączenia pomiędzy poszczególnymi szlakami metabolicznymi. IB-CoA – izobutyrylo CoA, IV-CoA – izowalerylo CoA, KIC – kwas 2-oksokaprylowy, KIV – kwas 2-oksoizowalerianowy, KMV – kwas 2-oksometylowalerianowy, MB-CoA – α-metylobutyrylo CoA

Następnie HMP-P ulega fosforylacji do HMP-PP przez kinazę HMP-P (HMPPK, nazwa systematyczna: phosphomethylpyrimidine kinase, EC 2.7.4.7), o podobnej sekwencji aminokwasów u bakterii i roślin. Wykazano, że enzym ten u roślin (w przypadku *Zea mays* białko THI3) wykazuje podwójną swoistość substratową. Może fosforylować HMP i HMP-P, a także uczestniczyć w kolejnym etapie biosyntezy timiny łącząc oba ufosforylowane pierścienie (tiazolowy i pirymidynowy) w monofosforan timiny [130].

Prekursorami ufosforylowanego pierścienia tiazolowego u bakterii są 1-deoksy-D-ksyluloza, siarka pochodząca z cysteiny, fragment C2-N2 z grupy aminowej tyrozyny. Pierścień tiazolu ulega fosforylacji w jednostopniowym procesie, katalizowanym przez kinazę tiazolową, w obecności ATP i jonów magnezu [11,160]. Biosynteza ufosforylowanego fragmentu tiazolowego (HET-P) przebiega podobnie u drożdży i roślin. W procesie bierze udział NAD<sup>+</sup> jako donor pentoz lub D-pentulozo-5-fosforan (który może być zastąpiony przez metabolity szlaku pentozofosforanowego, jak D-rybulozo-5-fosforan lub D-ksylulozo-5-fosforan), glicyna i donor siarki, którym najprawdopodobniej jest cysteina [32,33,87]. Z syntezą tiazolowego prekursora timiny związany jest enzym kinaza HET-P (nazwa systematyczna: hydroxyethylthiazole kinase, EC 2.7.1.50), którego gen *THI4* został scharakteryzowany u drożdży, a jego homologi stwierdzono u kilku gatunków roślin [12,99,134]. Mutanty ryżu o zmniejszonej ekspresji genu kodującego kinazę HET-P charakteryzowały się zredukowaną w stosunku do typu dzikiego zawartością timiny [180]. Badania białka THI1 z *Arabidopsis thaliana* wykazały, że jest to oktamer związany z biosyntezą pierścienia tiazolowego timiny wykorzystujący NAD jako substratu, podobnie jak w przypadku kinazy HET-P u drożdży [32,55]. Enzym ten jest umiejscowiony w chloroplastach i mitochondriach roślin i prócz udziału w biosyntezie timiny ma prawdopodobnie związek z ochroną mitochondrialnego DNA [4,30].

W kolejnym etapie biosyntezy timiny ufosforylowane prekursoru obu pierścieni (HET-P i HMP-PP) są kondensowane do monofosforanu timiny przez pirofosforylaza fosforanu timiny (nazwa systematyczna: thiamine-phosphate diphosphorylase, EC 2.5.1.3) zwaną też syntetazą tiaminofosforanową u bakterii [11,78,86,160]. Roślinne geny *THI3* (*Zea mays*), *BTH1* (*Brassica napus*), *THI* (*Arabidopsis thaliana*) kodują białka o podobnej aktywności, co bakteryjna pirofosforylaza monofosforanu timiny na C-końcu i bakteryjna kinaza HMP-P na N-końcu. Dualizm struktury tych białek umożliwia im zarówno kondensację ufosforylowanych pierścieni tiazolowego i pirymidynowego, jak i fosforylację pirymidynowego prekursora timiny [56,130].

Komórki drożdży mają dodatkowy szlak biosyntezy timiny, w którym przy dostępności nieufosforylowanych prekursorów timiny (HET i HMP) w środowisku mogą je pobierać, a następnie fosforylować do HET-P i HMP-PP i włączać w szlak prowadzący do ich kondensacji do monofosforanu timiny [82,117].

U *Enterobacteriaceae* monofosforan timiny może zostać ufosforylowany do postaci koenzymatycznej, czyli pirofosforanu timiny przez kinazę tiaminofosforanową (nazwa systematyczna: ATP: thiamine-phosphate phosphotransferase, EC 2.7.4.16) wykorzystującą ATP jako dawcę grupy

fosforanowej. U pozostałych bakterii, roślin i innych eukariontów zdolnych do syntezy witaminy B<sub>1</sub> monofosforan timiny w wyniku reakcji katalizowanej przez nieswoiste hydrolazy, ulega defosforylacji do wolnej timiny, by następnie uległa ona jednoetapowej fosforylacji do pirofosforanu timiny. Reakcję tę katalizuje pirofosfokinaza tiaminowa (nazwa systematyczna: ATP: thiamine diphosphotransferase, EC 2.7.6.2) – enzym występuje także u organizmów niezdolnych do syntezy timiny *de novo*. Enzym ten wykorzystuje różne trifosforany nukleotydów jako donory grupy pirofosforanowej z różnym powinowactwem w zależności od gatunku (w przypadku ludzkiego enzymu UTP wykazuje większe powinowactwo niż ATP [119], u *Zea mays* najbardziej efektywnym donorem grup fosforanowych jest GTP [128]). Ostatnio u roślin (*Arabidopsis thaliana*) scharakteryzowano dwa geny *AtTPK1* i *AtTPK2* kodujące białka o podobnej sekwencji aminokwasów do pirofosfokinazy tiaminowej znanej u zwierząt i grzybów. Ogromne znaczenie tych genów w biosyntezie pirofosforanu timiny wykazano u roślin, gdzie mutanty pozbawione obu genów akumulowały wolną tiaminę i były prawie całkowicie pozbawione pirofosforanu timiny w wyniku czego siewki obumierały. Letalny efekt mutacji można było cofnąć podając siewkom egzogeny pirofosforan timiny [4].

Biosynteza timiny u bakterii [136,147] i roślin [24,163] jest regulowana przez tzw. ryboprzełączniki (riboswitches). Są one fragmentami mRNA, kodowanymi w genach odpowiedzialnych za biosyntezę witaminy B<sub>1</sub>, do których może się przyłączać pirofosforan timiny. Po związaniu pirofosforanu timiny ryboprzełącznik działa jak przedwczesny terminator transkrypcji powodując powstanie niewłaściwego mRNA lub jako inhibitor translacji. W warunkach niedoboru timiny ryboprzełączniki pozostają nieaktywne, pozwalając na prawidłowy przebieg syntezy enzymów niezbędnych do jej wytwarzania.

Ryboprzełączniki, których ligandem jest pirofosforan timiny występują, u wszystkich roślin nasiennych, w regionie nieulegającym translacji (3' UTR) mRNA kodowanego w obrębie genu *THIC*. Gen ten koduje enzym związany z powstawaniem ufosforylowanego pierścienia pirymidynowego. U mszaków, widłaków, sagowcowatych za kontrolę syntezy pierścienia tiazolowego odpowiada ryboprzełącznik zlokalizowany w obszarach 3' UTR transkryptów genu *THI1* [19,24,178].

Enzymy rozkładające tiaminę – tiaminazy – wykryto u bakterii, drożdży, niektórych ryb i skorupiaków, a także u roślin [21,71,111,118]. Tiaminaza I jest transferazą pirymidynową mogącą wykorzystywać różne akceptory. W warunkach *in vitro* rozkłada tiaminę wymieniając pierścień tiazolowy na prolinę lub cysteinę. Znaczenie fizjologiczne tego enzymu nie jest dokładnie poznane, ale jego obecność i aktywność może wywoływać zatrucia zwierząt, np. u przeżuwaczy i koni, wypasanych na otwartych pastwiskach, a także ludzi, których głównym pożywieniem są skorupiaki i ryby zawierające ten dość stabilny enzym. Tiaminaza II jest hydrolazą rozkładającą wolną tiaminę na część tiazolową i pirymidynową. Enzym nie wykazuje aktywności w stosunku do fosforylowanych pochodnych timiny. Niektóre dane wskazują, że enzym ten może być zaangażowany w odzyskiwanie produktów degradacji timiny i przekształcanie ich do prekursorów niezbędnych do ponownej biosyntezy

Tabela 1. Zawartość tiaminy w wybranych produktach żywnościowych (wg [105])

Produkt	Zawartość tiaminy mg/100g
Ananasy	0,08
Brukselka	0,1
Cielęcina: serce	0,6
Drożdże piekarskie (suszone)	2,7–6,6
Drożdże piwne (suszone)	15–20
Fasola biała	0,6
Groch zielony	0,32
Jajka	0,12
Kalafior	0,11
Łosoś	0,17
Mąka pszenna z całego ziarna	0,55
Mąka żytnia z całego ziarna	0,3
Mięso kaczki, gęsi	0,1
Pomarańcze	0,1
Ryż brązowy	0,29
Soja	0,85
Wieprzowina: polędwica	1,1
Wołowina: wątroba	0,3

tej witaminy. Wyniki badań przeprowadzonych na drożdżach i *Bacillus subtilis* wskazują, że metaboliczną rolą tiaminazy II, oprócz rozkładu tiaminy, może być także regeneracja pirymidyny [61,71,118]. Wykazano, że tiaminaza II może przekształcać formylaminopirymidynę powstającą w glebie do aminopirymidyny lub hydroksypirymidyny, które mogą zostać wykorzystane do powtórnej syntezy tiaminy [71,118].

### 3. ZAPOTRZEBOWANIE CZŁOWIEKA NA TIAMINĘ, JEJ DOSTĘPNOŚĆ W ŻYWNOCI ORAZ IMPLIKACJE MEDYCZNE

Tiamina dla zwierząt i człowieka jest substancją egzogenną. W celu zaspokojenia potrzeb metabolicznych musimy dostarczać do organizmu odpowiednio jej ilości wraz z pożywieniem, gdzie jest dostępna zarówno w postaci wolnej, jak również w postaci mono-, piro- i trifosforanowych estrów (ryc. 1A, ryc. 2). Zapotrzebowanie na witaminę B<sub>1</sub> jest zróżnicowane i zależy m.in. od masy ciała, wieku, płci, rodzaju wykonywanej pracy oraz stanu fizjologicznego organizmu. Zalecana dawka tiaminy waha się 0,5–2,2 mg/dobę. Najmniejsze zapotrzebowanie na tiaminę mają niemowlęta, największe ilości tiaminy są niezbędne kobietom w stanie laktacji. Zalecana dawka dobową (RDA) dla mężczyzn wynosi 1,2–1,5 mg, a dla kobiet 1,0–1,1 mg [105]. Głównym źródłem tiaminy dla ludzi jest pożywienie, ponadto śladowe jej ilości mogą być dostarczane przez mikroflorę jelitową. Najbardziej obfitymi w tiaminę składnikami diety są pełnoziarniste pieczywo (chleb razowy, żytni, słonecznikowy), mięso, nasiona roślin motylkowych, różnego rodzaju produkty zawierające

otręby zbożowe, a także produkty przygotowane z wykorzystaniem drożdży (tab. 1).

Za transport tiaminy do komórek organizmów zwierzęcych odpowiadają trzy białka z rodziny transporterów błonowych SLC19A [50]. SLC19A1 przenosi monofosforan i pirofosforan tiaminy, przyczyniając się do zachowania homeostazy fosforylowanych pochodnych witaminy B<sub>1</sub> w układzie nerwowym [192]. Dwa pozostałe transportery, THTR-1 i THTR-2, są swoistymi antyporterami tiaminy i jonów wodorowych. Występują one powszechnie w tkankach ssaków, ale THTR-2 ( $K_m = 10^{-7}$ – $10^{-8}$  M) wykazuje znacznie większe powinowactwo do tiaminy w porównaniu z THTR-1 ( $K_m = 10^{-5}$ – $10^{-6}$  M) [42,138]. Przemiany tiaminy wewnątrz komórek, w wyniku działania pirofosfokinazy tiaminowej, prowadzą do jej przekształcenia do pirofosforanu tiaminy (ryc. 1). Spośród organelli komórek zwierzęcych mitochondria odznaczają się dużym zapotrzebowaniem na ten koenzym. Jednak nie stwierdzono aktywności pirofosfokinazy tiaminowej w tym przedziale subkomórkowym. Opisano i scharakteryzowano kilka białek odpowiedzialnych za transport pirofosforanu tiaminy do mitochondriów. W mitochondriach człowieka rolę tę spełnia białko Tpc [91], w komórkach muszki owocowej białko DmTpc1p [68], a u drożdży białko Tpc1p [107].

W praktyce klinicznej zaleca się zapobieganie niedoborom tiaminy przez podawanie nie więcej niż 30 mg chlorowodoru chlorku tiaminy (ryc. 1B) dziennie. Profilaktyka ta dotyczy głównie grup pacjentów zagrożonych hipowitaminozą B<sub>1</sub>. Przedawkowanie i zatrucie tiaminą w praktyce klinicznej jest rzadko spotykane. Wynika to z dobrej rozpuszczalności tiaminy w wodzie i jej stosunkowo niewielkiego powinowactwa do białek surowicy krwi. Wszystko to sprzyja wydajnej filtracji witaminy B<sub>1</sub> w kłębuszkach nerkowych i jej wydalaniu z moczem. Szybkość filtracji tiaminy w nerkach jest proporcjonalna do jej stężenia we krwi. Przy niskich stężeniach tiaminy we krwi wzrasta również tempo jej reabsorpcji w nerkach [184]. W stanach chorobowych, takich jak kwasica cukrzycowa czy mleczanowa lub ostra niewydolność mięśnia sercowego stosuje się tiaminę w postaci pirofosforanu w iniekcjach domięśniowych, podskórnych lub nawet dożylnych w dawkach 100–200 mg/dobę. Bardzo wysokie dawki tiaminy, nawet 3 g/dobę, były korzystne w terapii choroby Alzheimera, nie dając jakichkolwiek objawów przedawkowania [105]. Podczas takiej terapii obserwowano redukcję stresu oksydacyjnego i poprawę metabolizmu glukozy [52].

Niedobory tiaminy i związane z tym zaburzenia leżą również u podstaw innych chorób neurodegeneracyjnych, a odpowiednio dawkowanie tiaminy hamuje rozwój i łagodzi objawy tych chorób [53]. Wyniki badań eksperymentalnych [164] świadczą, że tiamina może znacząco opóźnić wystąpienie komplikacji naczyniowych i metabolicznych wywołanych przewlekłą cukrzycą, gdyż wpływa ona normalizująco na metabolizm lipidów (stężenie cholesterolu i triacylogliceroli) oraz węglowodanów (uaktywnienie transketolazy – EC 2.2.1.1 i łagodzenie stanu nagromadzenia fosforanów triozy). Dlatego też sugeruje się wzbogacanie diety chorych na cukrzycę znaczną ilością tiaminy w celu zapobiegania i łagodzenia groźnych powikłań [164].

Badania kliniczne wykazały, że pacjenci z przewlekłymi chorobami układu krążenia są szczególnie narażeni na



Tabela 2. Zawartość tiaminy i jej pochodnych w wybranych tkankach i organizmach (wg [101])

Gatunek	TMP	TPP	TTP	Tiamina
	nmol·g <sup>-1</sup> świeżej masy			
<b>PROKARYOTA</b>				
<i>Escherichia coli</i>	9,1 (6,0)	142 (93,4)	nd	0,94 (0,6)
<b>GRZYBY</b>				
Drożdże piekarskie	0,55 (2,4)	20 (88,9)	0,24 (1,1)	1,7 (7,6)
<i>Tricholoma gambosa</i>	0,09 (6,5)	1,1 (79,7)	0,025 (1,8)	0,16
<b>ROŚLINY</b>				
Pietruszka (liście)	0,005 (1,1)	0,43 (95,6)	nd	0,015 (3,3)
Rzodkiewnik pospolity (liście)	nd	0,80 (72,7)	nd	0,30 (27,3)
<b>ZWIERZĘTA</b>				
Człowiek (kora mózgowa)	0,26 (6,4)	2,9 (71,1)	0,021 (0,5)	0,9 (22,0)
Pawian (kora mózgowa)	0,28 (3,9)	5,5 (77,2)	0,24 (3,4)	1,1 (15,4)
Szczur (kora mózgowa)	0,27 (4,1)	5,8 (88,4)	0,07 (1,1)	0,42 (6,4)
Świnia domowa (kora mózgowa)	0,30 (7,6)	3,1 (78,5)	0,15 (3,8)	0,4 (10,1)
Kura domowa (mózg)	0,48 (4,4)	9,5 (86,4)	0,92 (8,4)	0,1 (0,9)
Pstrąg (mózg)	0,36 (4,3)	7,8 (93,4)	0,029 (0,3)	0,16 (1,9)

TPP – pirofosforan tiaminy, TMP – monofosforan tiaminy, TTP – trifosforan tiaminy, nd – nie wykryto.

W nawiasach podano procentową zawartość poszczególnych związków chemicznych w stosunku do sumarycznej ilości tiaminy i wszystkich jej pochodnych.

niekorzystne działanie niedoborów tiaminy. W tych przypadkach niedobory tiaminy i innych witamin z grupy B są związane z niepożądanym działaniem niektórych leków. Wtórny niedobór tiaminy obserwowano u pacjentów z przewlekłą niewydolnością serca i zastoinową niewydolnością serca długotrwale przyjmujących furosemid [149]. Późniejsze badania potwierdziły niekorzystne działanie furosemidu i wykazały, że jest ono zależne od dawki leku i sprowadza się do nadmiernego wydalania tiaminy z moczem [189]. Podawanie tiaminy przez 7 tygodni dożylnie lub doustnie znacząco usprawniało pracę serca (o 22% zwiększenie efektywności wyrzutowej lewej komory serca u 90% testowanych pacjentów). Najnowsze badania eksperymentalne [38] i kliniczne [83] wskazują, że podawanie furosemidu nie jest pierwotną przyczyną niedoborów tiaminy, ale może znacząco pogłębiać deficyt witaminy B<sub>1</sub> w przypadkach zbyt małej podaży tej witaminy z pożywieniem. Należy zaznaczyć, że hipowitaminoza u pacjentów z chorobami serca nie dotyczy tylko tiaminy, ale również innych witamin z grupy B (głównie pirydoksyny i ryboflawiny).

Niedobór tiaminy stanowi istotny problem w geriatric. Badania przeprowadzone w dwóch grupach pacjentów, w przedziale wiekowym 76–90 lat, wykazały stan hipowitaminozy B<sub>1</sub> u przeszło 40% osób hospitalizowanych i 20% przypadków ambulatoryjnych [122]. U chorych z niedoborem tiaminy częściej odnotowywano przypadki choroby Alzheimera, depresje, uszkodzenia mięśnia sercowego. Niedobór tiaminy wiązano z zażywaniem diuretyków, niezbilansowaną dietą, a także z pogorszeniem tempa wchłaniania tiaminy w układzie pokarmowym z upływem lat [74]. Z danych tych wynika, że kontrolowane uzupełnianie diety tiaminą może w znaczący sposób poprawić komfort życia osób starszych.

Tiamina stosowana jest też jako środek wspomagający działanie niesteroidowych leków przeciwbólowych w zespołach bólowych kręgosłupa. Witamina B<sub>1</sub> podawana zwierzętom doświadczalnym osobno lub z innymi witaminami z grupy B mogła łagodzić ból poprzez zahamowanie aktywności neuronów rdzeniowych i wzgórzowych, wpływając na efektywność neuroprzekazników: 5-hydroksytryptaminy i noradrenaliny [79]. Rozważa się także możliwość wykorzystania



Tabela 3. Zawartość tiaminy i jej pochodnych w niektórych tkankach i organach człowieka (wg [50])

Tkanka	Tiamina	TMP	TPP	TTP	ATTP
	pmol/mg białka				
Błona śluzowa macicy	0,1 (0,3)	18 (57,9)	13 (41,8)	nd	nd
Grasica	0,23 (2,3)	1,1 (10,6)	7,1 (68,7)	1,1 (10,6)	0,81 (7,8)
Jajnik	0,3 (0,7)	5 (11,2)	39 (87,8)	0,06 (0,1)	0,08 (0,2)
Jajowód	0,8 (2)	1,7 (4,4)	36 (92,9)	0,15 (0,4)	0,10 (0,3)
Łożysko	1,7 (9,1)	0,9 (4,8)	15 (80,6)	0,12 (0,6)	0,9 (4,9)
Mięsień szkieletowy	0,6 (2,9)	0,7 (3,4)	17 (81,7)	1 (4,8)	1,5 (7,2)
Nerki	3,5 (3)	80 (68,5)	33 (28,3)	0,19 (0,2)	nd
Pępowina	3,1 (33,7)	0,8 (8,7)	5 (54,3)	0,13 (1,4)	0,17 (1,9)
Płuca	2,2 (6,3)	2,0 (5,7)	30 (85,4)	0,49 (1,4)	0,43 (1,2)
Pochwa	0,05 (0,5)	2,8 (28,1)	7,1 (71,4)	nd	nd
Skóra	2,1 (4)	3,6 (6,8)	47 (88,2)	0,44 (0,8)	0,13 (0,2)
Tkanka tłuszczowa	3 (8,4)	3 (8,4)	27 (75,4)	2 (5,6)	0,8 (2,2)
Wątroba	0,26 (0,5)	3 (6)	45 (90,1)	1,7 (3,4)	nd

ATTP – adenylozotrifosforan, TPP – pirofosforan tiaminy, TMP – monofosforan tiaminy, TTP – trifosforan tiaminy, nd – nie wykryto.

W nawiasach podano procentową zawartość poszczególnych związków chemicznych w stosunku do sumarycznej ilości tiaminy i wszystkich jej pochodnych.

tiaminy w połączeniu z analgetykami w celu przeciwdziałania przewlekłym bółom powodowanym przez nowotwory [70].

Wyniki najnowszych badań wskazują, że tiamina może wspomagać detoksykację w zatruciu ołowiem wiążąc ten metal z pierścieniem pirymidynowym i obniżając jego stężenie we krwi, nerkach i kościach [133].

Przytoczone przykłady udanych zastosowań klinicznych tiaminy, a także narażenie ludzi na jej niedobory związane z różnymi stanami chorobowymi i fizjologicznymi przekonująco uzasadniają konieczność profilaktycznego stosowania tej witaminy oraz podejmowania dalszych badań prowadzących do poznania nowych możliwości jakie daje umiejętne stosowanie tej stosunkowo prostej w budowie i łatwej do uzyskania cząsteczki.

#### 4. TIAMINA I JEJ ESTRY FOSFORANOWE W METABOLIZMIE KOMÓREK, ICH FUNKCJA KOENZYMATYCZNA I NIEKOENZYMATYCZNA

W komórkach wszystkich organizmów żywych tiamina powszechnie występuje w postaci wolnej (ryc. 1A), trzech estrów fosforanowych: monofosforanu tiaminy (ryc. 2A),

pirofosforanu tiaminy (ryc. 2B) i trifosforanu tiaminy (ryc. 2C), jak i adenylozotrifosfotiaminy (ryc. 2D).

Całkowite stężenie tiaminy i jej pochodnych we krwi zwierząt (mysz, szczur, świnka morska, królik, pies, kurczę, gołąb) wynosi około 1  $\mu\text{M}$ , natomiast u ludzi zaledwie 0,1  $\mu\text{M}$ . Spośród estrów fosforanowych tiaminy w osoczu krwi człowieka stwierdza się niewielkie stężenie monofosforanu tiaminy (10–15 nM). W tkance nerwowej szczura tiamina i jej pochodne występują w stężeniach 6–13 nmoli/g świeżej masy, podczas gdy u ludzi stężenie tych związków w mózgu wynosi zaledwie 3–4 nmole/g [13]. Szczegółowe dane dotyczące zawartości tiaminy i jej fosforylowanych pochodnych w różnych narządach ludzkich przedstawia tabela 3. Dane te jednoznacznie wskazują człowieka jako gatunek szczególnie narażony na negatywne skutki niedoborów tiaminy.

W materiale biologicznym, spośród wszystkich fosforylowanych pochodnych, w największych stężeniach występuje pirofosforan tiaminy (70–90%, tab. 2). Właśnie on pełni funkcję koenzymu wielu enzymów. Wolną tiaminę i jej pozostałe estry fosforanowe stwierdza się w znacznie

niższych stężeniach (tab. 2, 3). Coraz częściej estrom tiaminy przypisuje się rolę regulatorów metabolizmu w sposób niekoenzymatyczny, zarówno u roślin jak i u zwierząt.

W ostatnich latach ukazało się wiele prac dotyczących roli tiaminy w kształtowaniu oporności roślin na choroby i różnorodne czynniki stresowe. Wyniki badań wskazują, że tiamina i jej pochodne aktywują ekspresję genów białek związanych z odpowiedzią roślin na patogeny (np. *PR-1* u *Nicotiana tabacum*) powodując uruchomienie lokalnej odpowiedzi obronnej zależnej od kwasu salicylowego [103]. Późniejsze badania wykazały, że tiamina może również indukować systemiczną odpowiedź nabytą (SAR – systemic acquired resistance) u różnych gatunków roślin. Wykazano, że rośliny wcześniej poddawane działaniu egzogennej tiaminy, po infekcji patogena akumulują znacznie większe ilości mRNA białek z rodziny PR (pathogenesis-related proteins) w porównaniu z roślinami kontrolnymi [2,3]. Dane zgromadzone w ostatnich latach jednoznacznie wskazują, że tiamina i jej fosforylowane pochodne pełnią rolę cząsteczki sygnałowej w odpowiedzi roślin na atak patogenów [56,180,183]. Wykazano jednak, że zawartość tiaminy i jej estrów fosforanowych u *Zea mays* i *Arabidopsis thaliana* znacznie wzrasta w warunkach stresowych wywołanych czynnikami abiotycznymi, takimi jak stres oksydacyjny, zasolenie, podwyższona i obniżona temperatura zbyt intensywne oświetlenie [129,170]. Obserwowany efekt był skorelowany ze wzrostem tempa ekspresji genów kodujących enzymy związane z biosyntezą tiaminy (kinazy HET-P, kinazy HMP-P, pirofosfokinazy tiaminowej, pirofosforylasy fosforanu tiaminy). Dane przytoczone wyżej wskazują, że tiamina może również pełnić rolę cząsteczki sygnałowej podczas uruchamiania roślinnych mechanizmów adaptacyjnych, wywołanych czynnikami abiotycznymi [56].

W poniższych podrozdziałach scharakteryzowano udział poszczególnych fosforylowanych pochodnych tiaminy w regulacji metabolizmu komórek.

#### 4.1. Monofosforan tiaminy

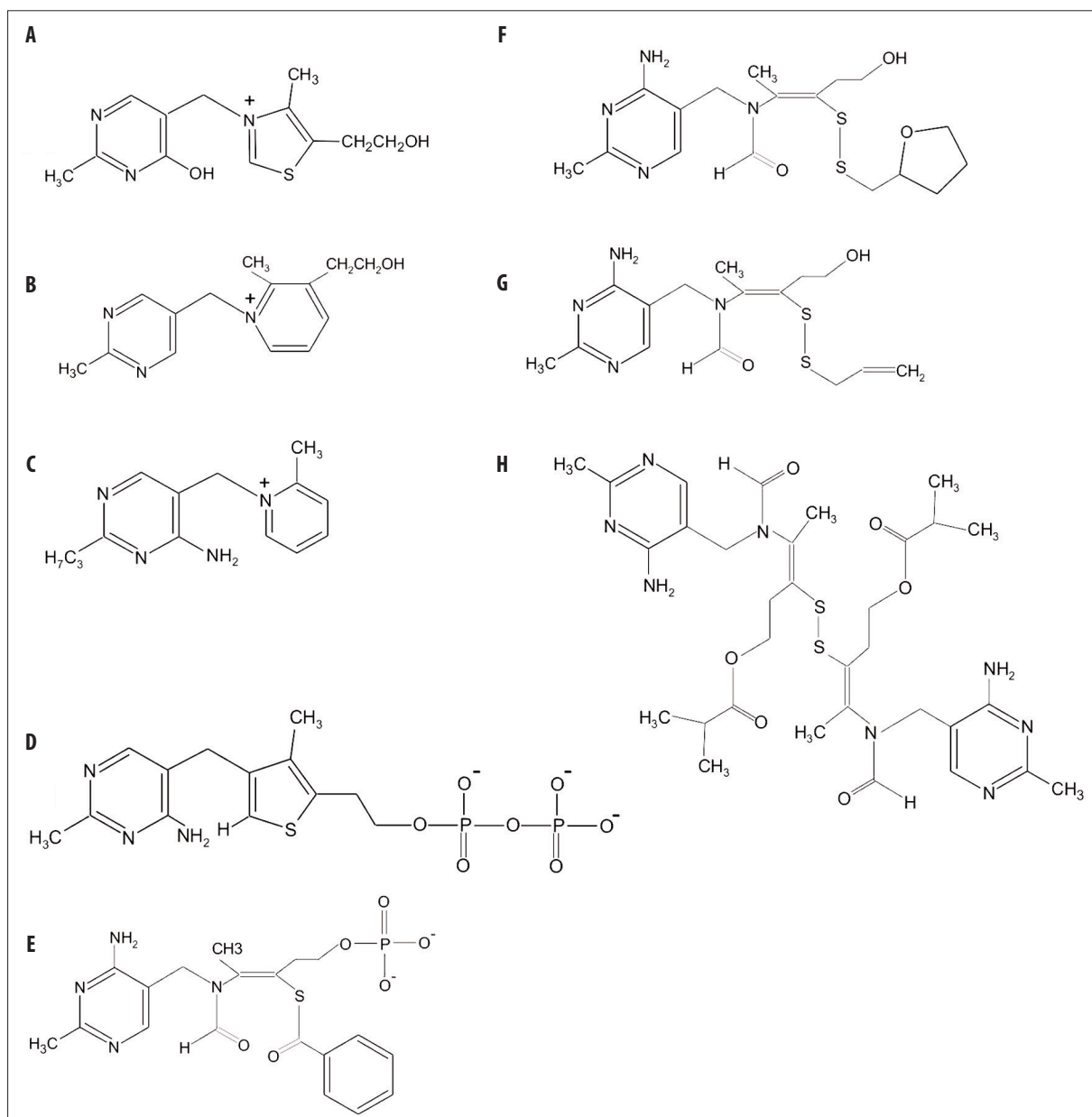
Monofosforan tiaminy (ryc. 2A) jest obecny w różnych tkankach ludzkich, zwierzęcych i roślinnych oraz u grzybów i wśród organizmów prokariotycznych (tab. 2 i 3). Największe jego stężenia stwierdzono w tkance nerwowej zwierząt i ludzi (6–7% w odniesieniu do sumarycznej zawartości tiaminy i jej fosforylowanych pochodnych). Wśród przebadanych organizmów (kilkanaście gatunków) najmniej zasobnymi w monofosforan tiaminy okazały się rośliny [101]. Źródłem monofosforanu tiaminy może być rozpad pirofosforanu tiaminy katalizowany przez różne fosfatazy o różnej swoistości substratowej. Mimo że hydroliza pirofosforanu tiaminy do jego monofosforanu i fosforanu nieorganicznego jest uznawana za reakcję markerową aparatu Golgiego, jak dotąd nie udało się wyizolować i scharakteryzować absolutnie swoistej fosfatazy katalizującej ten proces. Fizjologiczna rola monofosforanu tiaminy jest jeszcze nieznaną. Jest on uważany za intermediat w szlakach transformacji fosforylowanych pochodnych tiaminy. W komórkach jest on zapewne szybko przekształcany do wolnej tiaminy pod wpływem różnych fosfataz, chociaż również w tym przypadku, nie licząc bakterii, nie udało się wyizolować absolutnie swoistej monofosfatazy tiaminowej [15].

#### 4.2. Pirofosforan tiaminy i enzymy od niego zależne

Pirofosforan tiaminy (ryc. 2B) powstaje przeważnie w wyniku fosforylacji wolnej tiaminy przez pirofosfokinazę tiaminową wykorzystującą nukleotydy trifosforanowe jako donory grup fosforanowych [119]. Innymi źródłami pirofosforanu tiaminy mogą być: defosforylacja trifosforanu tiaminy, rozpad adenozyntrifosfotiaminy połączony z defosforylacją lub uwalnianie koenzymu z zawierających go enzymów ulegających proteolizie [15]. Wolny pirofosforan tiaminy w cytosolu jest szybko wiązany przez transketolazę [92] i inne enzymy zależne od tiaminy. Większa część puli pirofosforanu tiaminy jest transportowana do mitochondriów z udziałem przENOŚNIKA SLC25A19 [91], gdzie jest on wbudowywany w centra aktywne enzymów od niego zależnych. Badania ostatnich lat wskazują, że pewna część cytosolowej puli pirofosforanu tiaminy jest przenoszona do peroksysomów [46]. Obecnie znanych jest ponad 20 różnych enzymów zależnych od pirofosforanu tiaminy (tabela 4), z których najwięcej występuje u organizmów prokariotycznych. Enzymy te biorą przeważnie udział w podstawowych procesach metabolizmu komórek wszystkich organizmów żywych (ryc. 3), takich jak: cykl Krebsa, oksydacyjna dekarboksylacja pirogronianu, reakcje fermentacyjne i inne związane z syntezą ATP, szlak pentozofosforanowy, biosynteza i degradacja aminokwasów [47,75,124,166]. Pirofosforan tiaminy bierze udział w katalizie kilku typów reakcji. Oprócz dobrze poznanych właściwości rozrywania i tworzenia wiązania węgiel-węgiel (dekarboksylacja 2-oksokwasów), formowania chiralnych 2-hydroksyketonów (synteza (R)-fenylacetylokarbinolu, intermediatu w syntezie efedryny) i reakcji transferazowych (przenoszenie grup glikoaldehydowych pomiędzy ufosforylowanymi cukrami), pirofosforan tiaminy może uczestniczyć również w tworzeniu wiązań węgiel-azot, węgiel-siarka, węgiel-tlen [123,124]. Mechanizm działania pirofosforanu tiaminy bez względu na typ katalizowanej reakcji polega na deprotonacji węgla w pozycji C-2 pierścienia tiazolowego i wytworzeniu 2-karboanionu o charakterze ylidu (ryc. 1C), tzn. jonu obojaczowego z ładunkami elektrycznymi rozmieszczonymi na sąsiadujących ze sobą atomach [47,104]. Na przykład podczas reakcji dekarboksylacji karboanion reaguje ze spolaryzowaną grupą karbonylową z wytworzeniem wiązania kowalencyjnego. Następnie dochodzi do rozerwania określonego wiązania C-C (między grupą karbonylową a karboksylową), czemu towarzyszy uwalnianie się CO<sub>2</sub>. Jeśli substratem jest pirogronian, to w wyniku dekarboksylacji powstaje 2-hydroksyetylotiamina, która następnie rozpada się na pirofosforan tiaminy i aldehyd octowy [1].

##### 4.2.1. Wieloenzymatyczne kompleksy dehydrogenaz 2-oksokwasów

Do dobrze poznanych enzymów zależnych od pirofosforanu tiaminy należą wieloenzymatyczne kompleksy dehydrogenaz 2-oksokwasów. Do tej grupy należą kompleksy dehydrogenazy pirogronianowej [155], dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej [154,171] oraz nieco rzadziej opisywany kompleks dehydrogenazy 2-oksokwasów o rozgałęzionych łańcuchach [23,60]. Wszystkie wyżej wymienione kompleksy zawierają trzy enzymy składowe występujące w wielu kopiach:



Ryc. 4. Struktura chemiczna wybranych pochodnych tiaminy; **A** – oksytiamina, **B** – piritiamina, **C** – amprolium, **D** – pirofosforan 3-deazotiaminy, **E** – benfotiamina, **F** – fursultiamina, **G** – allitiamina, **H** – sulbutiamina

- swoistą względem substratu, zależną od pirofosforanu tiaminy dehydrogenazę (pirogronianową – EC 1.2.4.1, 2-oksoglutaranową – EC 1.2.4.2, lub dehydrogenazę 2-oksokwasów o rozgałęzionych łańcuchach – EC 1.2.4.4) zwaną składnikiem E1 (tab. 4);
- swoistą względem pośredniego produktu reakcji, podobną w funkcjonowaniu transferazę acylodihydroliponianową zwaną składnikiem E2;
- zależną od FAD dehydrogenazę dihydroliponianową zwaną składnikiem E3.

Rdzeniem we wszystkich trzech kompleksach jest składnik E2 występujący w kompleksie dehydrogenazy pirogronianowej ssaków w 60 powtórzeniach, natomiast w kompleksie dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej i w kompleksie dehydrogenazy 2-oksokwasów o rozgałęzionych łańcuchach w 24 powtórzeniach. Wokół rdzenia rozmieszczone są

satelitarne oligomeryczne lub dimeryczne cząsteczki E1 (odpowiednio w trzydziestu, sześciu i dwunastu kopiach) i E3 we wszystkich kompleksach po 6 dimerycznych cząsteczek. Mechanizm reakcji wszystkich tych kompleksów wieloenzymatycznych jest podobny. W pierwszym etapie następuje reakcja oksydacyjnej dekarboksylacji odpowiedniego substratu (2-oksokwasu) z udziałem pirofosforanu tiaminy, związanego ze składnikiem E1, z uwolnieniem dwutlenku węgla. Pozostały fragment substratu przenoszony jest na lipoamid związany ze składnikiem E2 kompleksu, gdzie dochodzi do powstania odpowiedniego acylo-CoA i redukcji lipoamidu. Ostatnim etapem reakcji katalizowanym przez składnik E3 kompleksu jest odtworzenie utlenionej postaci lipoamidu z udziałem FAD jako akceptora elektronów, a następnie redukcja NAD<sup>+</sup> z udziałem elektronów z FAD z wytworzeniem NADH i odtworzenie utlenionej postaci FAD. Kompleks dehydrogenazy

pirogrońianowej pełni ważną rolę w procesach bioenergetycznych komórek eukariotycznych regulując dopływ acetylo-CoA do cyklu Krebsa i innych reakcji (oksydacyjna dekarboksylacja pirogrońianu, ryc. 3). Kompleks dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej stanowi jedno z głównych ogniw regulatorowych cyklu Krebsa (ryc. 3). Dostarcza on sukcyńnylo-CoA do fosforylacji substratowej GDP lub do syntez wielu aminokwasów i hemu. Kompleks dehydrogenazy 2-oksokwasów o rozgałęzionych łańcuchach jest z kolei ograniczającym ogniwem katabolizmu waliny, leucyny i izoleucyny. Aminokwasy te po transaminacji z udziałem 2-oksoglutaranu są przekształcane do glutamianu i odpowiednich 2-oksokwasów: 2-oksoizowalerianowego, 2-okso-metylowalerianowego i 2-oksoizokapronowego. Następnym ograniczającym etapem katabolizmu wyżej wspomnianych aminokwasów jest zależna od pirofosforanu tiaminy oksydacyjna dekarboksylacja 2-oksokwasów przeprowadzana przez kompleks dehydrogenazy 2-oksokwasów o rozgałęzionych łańcuchach. W wyniku tej reakcji powstają: izobutyrylo-CoA,  $\alpha$ -metylobutyrylo-CoA, izowalerylo-CoA i NADH (ryc. 3). Powstające w wyniku reakcji pochodne acylowe CoA mogą być następnie przekształcane do sukcyńnylo-CoA lub acetylo CoA i włączone do cyklu Krebsa lub do biosyntezy różnych związków organicznych. Ze względu na główną rolę wyżej opisanych kompleksów wieloenzymatycznych w metabolizmie komórek ich prawidłowe funkcjonowanie jest kontrolowane na wielu płaszczyznach [59,153,154,155,171]. Wszystkie kompleksy są regulowane izosterycznie i allosterycznie. Produkty reakcji hamują ich aktywność, podczas gdy allosteryczne efekторы dodatnie, do których można zaliczyć pirofosforan tiaminy w przypadku kompleksu pirogrońianowego lub ADP i fosforan nieorganiczny w przypadku kompleksu 2-oksoglutaranowego, znacząco podwyższają powinowactwo tych kompleksów do swoich substratów [152]. Ponadto kompleks dehydrogenazy pirogrońianowej i kompleks dehydrogenazy 2-oksokwasów o rozgałęzionych łańcuchach są efektywnie regulowane przez fosforylację (kinazy) i defosforylację (fosfatazy) składników E1 [8,50]. Proces fosforylacji powoduje inaktywację kompleksów, podczas gdy defosforylacja składnika E1 przyczynia się do przywrócenia aktywności całego kompleksu. W odróżnieniu od kompleksu dehydrogenazy pirogrońianowej i dehydrogenazy 2-oksokwasów o rozgałęzionych łańcuchach, aktywność kompleksu dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej nie zależy od bezpośredniej fosforylacji składnika E1. Jednak wyniki badań wskazują na możliwość regulacji tego kompleksu przez fosforylację w inny sposób [116,142]. U sinic, serynowo/treoninowa kinaza białkowa G poprzez fosforylację inhibitorowego białka (OdhI) powoduje jego dysocjację od kompleksu i wzrost aktywności. Natomiast jeśli białko inhibitorowe pozostaje niefosforylowane łączy się z kompleksem powodując silne wyhamowanie jego aktywności ( $K_i=2,4$  nM).

#### 4.2.2. Dekarboksylaza pirogrońianowa

Innym enzymem zależnym od pirofosforanu tiaminy jest dekarboksylaza pirogrońianowa (nazwa systematyczna: karboksylaza 2-oksokwasów, EC 4.1.1.1, tab. 4) – enzym charakterystyczny dla organizmów pozyskujących energię w wyniku procesów beztlenowych (np. drożdże). Jest to jeden z lepiej poznanych enzymów zależnych od pirofosforanu tiaminy. Katalitycznie aktywny enzym z drożdży

piwowarskich i bakterii jest tetramerem złożonym z identycznych lub prawie identycznych podjednostek, u roślin występują natomiast większe, oligomeryczne kompleksy [48,97]. Każdy dimer wchodzący w skład tetramery zawiera dwa miejsca przyłączenia pirofosforanu tiaminy w dwóch centrach aktywnych. Haploidalny genom drożdży koduje trzy wysoce homologiczne izoformy dekarboksylazy pirogrońianowej przez geny: *Pdc1*, *Pdc5* i *Pdc6*. Każda z izoform może niezależnie utworzyć aktywny enzym i w związku z tym ekspresja tylko jednego z genów wystarcza, by komórki drożdży wykazywały aktywność dekarboksylazy pirogrońianowej. W regulacji ekspresji wyżej wymienionych genów bierze udział wolna tiamina, która silnie hamuje ekspresję *Pdc5*, ale nie wpływa na ekspresję *Pdc1* [66]. Dekarboksylaza pirogrońianowa jako enzym zależny od pirofosforanu tiaminy zasługuje na szczególną uwagę z dwóch powodów. Po pierwsze, jest ważnym ogniwem podczas fermentacji alkoholowej zabezpieczającej potrzeby energetyczne organizmów czerpiących ATP z glikolizy w warunkach beztlenowych. Katalizuje ona bowiem nieodwracalną reakcję dekarboksylacji pirogrońianu – końcowego produktu glikolizy – do aldehydu octowego (ryc. 3). Jest to pierwszy krok do wytwarzania etanolu podczas fermentacji alkoholowej, który powstaje w wyniku redukcji aldehydu octowego z udziałem dehydrogenazy alkoholowej. Reakcja katalizowana przez dehydrogenazę alkoholową, do której substratu dostarcza dekarboksylaza pirogrońianowa jest jednym z wydajniejszych sposobów odtwarzania utlenionej postaci  $NAD^+$  niezbędnej do prawidłowego przebiegu glikolizy w warunkach beztlenowych. Po drugie, reakcje katalizowane przez dekarboksylazę pirogrońianową są powszechnie wykorzystywane w przemyśle spożywczym i mogą dostarczać ważnych substratów dla przemysłu farmaceutycznego. Jedną z reakcji, katalizowanych przez dekarboksylazę pirogrońianową, jest kondensacja aldolowa zachodząca między dwiema cząsteczkami aldehydu octowego, w wyniku czego powstaje acetoina [9,151]. Innym procesem biotransformacji z użyciem tego enzymu może być wytwarzanie fenyloacetylkarbinolu, prekursora L – efedryny, w wyniku kondensacji aldehydu benzoowego i pirogrońianu z wykorzystaniem całych komórek drożdży lub izolowanego preparatu enzymatycznego [141].

#### 4.2.3. Enzymy zależne od pirofosforanu tiaminy związane z alternatywnymi drogami syntezy ATP

Swoiste enzymy zależne od pirofosforanu tiaminy utleniające pirogrońian u bakterii uczestniczą w powstawaniu ATP w alternatywnych w stosunku do organizmów eukariotycznych szlakach metabolizmu [166]. Do enzymów takich należy oksydoreduktaza pirogrońianowo-ferrodoksynowa (nazwa systematyczna: pyruvate: ferredoxin 2-oxidoreductase (CoA-acetylating), EC 1.2.7.1, tab. 4), która odwracalnie przekształca pirogrońian i CoA w acetylo-CoA i  $CO_2$  wykorzystując ferrodoksynę lub flawodoksynę jako ostateczny akceptor elektronów. Ponieważ reakcja ta może przebiegać w odwrotnym kierunku (synteza pirogrońianu), jest ona wykorzystywana przez bakterie acetogenne i zielone do asymilacji ditlenku węgla [6,44,126]. Innym enzymem zależnym od pirofosforanu tiaminy utleniającym pirogrońian jest oksydaza pirogrońianowa (nazwa systematyczna: pyruvate: oxygen 2-oxidoreductase (phosphorylating), EC 1.2.3.3, tab. 4). Enzym ten występuje u bakterii i może funkcjonować w dwa odmienne



Tabela 4. Niektóre enzymy zależne od pirofosforanu tiaminy (wg [47,124])

L.p.	Nazwa enzymu	Skrót	Nr EC	Szlak metaboliczny	Piśmiennictwo
1	<b>Dehydrogenaza 2-oksoglutaranowa</b> , składnik E1 kompleksu dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej (2-oxoglutarate dehydrogenase)	OGDH	1.2.4.2	przekształcanie 2-oksoglutaranu do bursztynylo-CoA w cyklu Krebsa	[171]
2	<b>Dehydrogenaza 2-oksokwasów o rozgałęzionych łańcuchach</b> składnik E1 kompleksu dehydrogenazy 2-oksokwasów o rozgałęzionych łańcuchach (branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase)	BCKDH	1.2.4.4	udział w katabolizmie waliny, leucyny i izoleucyny	[23]
3	<b>Dehydrogenaza pirogronianowa</b> , składnik E1 kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (pyruvate dehydrogenase)	PDH	1.2.4.1	oksydacyjna dekarboksylacja pirogronianu z wytworzeniem acetyloCoA	[154]
4	<b>Dekarboksylaza 3-fosfopirogronianowa</b> (3-phosphonopyruvate decarboxylase)	PPDC	4.1.1.82	biosynteza antybiotyków u <i>Bacteroides fragilis</i> i bakterii z rodzaju <i>Streptomyces</i>	[190]
5	<b>Dekarboksylaza benzoilomrówczanowa</b> (benzoylformate decarboxylase)	BFD	4.1.1.7	katabolizm kwasu migdałowego	[125]
6	<b>Dekarboksylaza fenylopirogronianowa</b> (phenylpyruvate decarboxylase)	PhePDC	4.1.1.43	szlak Ehrlicha u drożdży i niektórych bakterii	[177]
7	<b>Dekarboksylaza indolo-3-pirogronianowa</b> (indole-3-pyruvate decarboxylase)	InPDC	4.1.1.74	katabolizm tryptofanu u <i>Enterobacter cloacae</i> , synteza auksyny – kwasu indolilo-3-octowego u roślin	[144,145]
8	<b>Dekarboksylaza pirogronianowa</b> (pyruvate decarboxylase)	PDC	4.1.1.1	fermentacja alkoholowa, przekształcanie pirogronianu do aldehydu octowego	[94]
9	<b>Dekarboksylaza sulfopirogronianowa</b> (sulfopyruvate decarboxylase)	SPDC	4.1.1.79	biosynteza koenzymu M u <i>Archaea</i>	[57]
10	<b>Fosfoketolaza</b> (phosphoketolase)	PK	4.1.2.9	katabolizm węglowodanów u bakterii kwasu octowego	[72]
11	<b>Karboligaza glioksalanowa</b> (glyoxylate carboligase)	GXC	4.1.1.47	katabolizm glioksalanu u <i>Escherichia coli</i>	[80]
12	<b>Liaza 2-hidroksyfityanoilo CoA</b> (2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase)	2-HPCL	4.1.2.n2	Szlak $\alpha$ -oksydacji 3-metylo kwasów tłuszczowych u <i>Arabidopsis thaliana</i> i peroksysomach ssaków	[45]
13	<b>Liaza aldehydu benzoesowego</b> (benzaldehyde lyase)	BAL	4.1.2.38	synteza hydroksyketonów u <i>Pseudomonas fluorescens</i>	[39]
14	<b>Oksydaza pirogronianowa</b> (pyruvate oxidase)	POX	1.2.3.3	alternatywny metabolizm energetyczny u bakterii – synteza acetylofosforanu lub octanu	[114,165]
15	<b>Oksydoreduktaza pirogronianowo-ferrodoksynowa</b> (pyruvate ferredoxinoxidoreductase)	PFOR	1.2.7.1	przekształcanie pirogronianu do aktywnego octanu, asymilacja CO <sub>2</sub> z wykorzystaniem acetyloCoA u bakterii zielonych i acetogennych	[126]
16	<b>Syntaza 1-deoksy-d-ksylulozo 5-fosforanowa</b> (1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase)	DXS	2.2.1.7	biosynteza izoprenoidów u bakterii i roślin	[188]
17	<b>Syntaza 5-fosforanu deoksyksylulozy</b> (deoxyxylulose 5-phosphate synthase)	DXPS	2.2.1.7	niemewalonianowy szlak syntezy izoprenoidów u bakterii i w chloroplastach roślin	[43]
18	<b>Syntaza dihydroksyacetona, transketolaza formaldehydu</b> (dihydroxyacetone synthase, formaldehyde transketolase)	DHAS	2.2.1.3	asymilacja formaldehydu (cykl dihydroksyacetonu), asymilacja metanolu	[146]
19	<b>Syntaza kwasu hydroksyoctowego i acetomlekowego</b> (acetoxyacid synthase and acetylactate synthase)	AHAS	2.2.1.6	biosynteza aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach, udział w szlaku przemian 2,3-butanodiolu u bakterii i roślin	[120,121]
20	<b>Syntaza N<sup>2</sup>-(2-karboksyetylo)argininy</b> (N <sup>2</sup> -(2-carboxyethyl) arginine synthase)	CEAS	2.5.1.66	biosynteza kwasu klawulanowego u <i>Streptomyces clavuligerus</i>	[28]
21	<b>Transketolaza</b> (transketolase)	TK	2.2.1.1	nieoksydacyjne odgałęzienie szlaku pentozofosforanowego	[191]

sposoby. Enzym z *Lactobacillus plantarum* jest zdolny do przekształcenia pirogronianu w obecności tlenu, jonów fosforanowych i jonów wodorowych do wysokoenergetycznego acetylofosforanu z wytworzeniem CO<sub>2</sub> i nadtlenu wodoru. Acetylofosforan może zostać zużyty do fosforylacji ADP do ATP z udziałem kinazy octanowej [161,165]. Odmienne mechanizmy działania reprezentuje oksydaza pirogronianowa z *Escherichia coli*. Enzym ten jest białkiem błonowym ulokowanym po stronie cytoplazmatycznej. Interakcja białka z błoną jest związana z redukcją kofaktora flawinowego. Enzym nie jest zależny od jonów fosforanowych i w odróżnieniu od oksydazy pirogronianowej z *Lactobacillus plantarum* przekształca pirogronian w octan i CO<sub>2</sub>, wykorzystując jony OH<sup>-</sup> i poprzez flawinę redukując błonowy przenośnik elektronów ubiquinon 8 (Q<sub>8</sub>) będący ogniwem łańcucha oddechowego. W ten sposób oksydaza pirogronianowa z *E. coli* może się przyczynić do poprawy wydajności syntezy ATP w łańcuchu oddechowym [114]. Przytoczone wyżej przykłady wskazują, że zależne od pirofosforanu tiaminy enzymy utleniające pirogronian u bakterii przyczyniają się do poprawy wydajności procesów bioenergetycznych wytwarzając wysokoenergetyczne metabolity (acetylo-CoA, acetylofosforan czy zredukowaną flawinę), które mogą zostać zużyte do syntezy ATP lub wykorzystane jako aktywowane intermedyaty w procesach anabolicznych.

#### 4.2.4. Transketolaza

Enzymem zależnym od pirofosforanu tiaminy, związanym z metabolizmem węglowodanów jest również transketolaza (nazwa systematyczna: sedoheptuloze-7-phosphate: D-glyceraldehyde-3-phosphate glycolaldehydetransferase, EC 2.2.1.1, tab. 4). W badaniach nad strukturą tego enzymu stwierdzono, że jest on homodimerem zawierającym dwa centra katalityczne wiążące z dużym powinowactwem pirofosforan tiaminy [34,84]. Enzym izolowany z różnych źródeł charakteryzuje się podobną budową i właściwościami kinetycznymi, jednak transketolaza ssaków jest bardziej selektywna pod względem wykorzystywanych substratów w porównaniu z enzymem z innych źródeł [140]. Transketolaza jest głównym enzymem nieutleniającej gałęzi szlaku pentozofosforanowego katalizującym odwracalny transfer fragmentu dwuwęglowego z ksylulozo-5-fosforanu na rybozo-5-fosforan lub erytrozo-4-fosforan, w wyniku czego powstają sedoheptulozo-7-fosforan lub fruktozo-6-fosforan i aldehyd-3-fosfoglicerynowy (ryc. 3). Przez swój udział w szlaku pentozofosforanowym transketolaza spełnia trzy ważne funkcje w metabolizmie komórek. Po pierwsze dostarcza pentoz (rybozo-5-fosforan) do syntezy nukleotydów niezbędnych do budowy kwasów nukleinowych, a także w przetwarzaniu i magazynowaniu metabolicznie użytecznej energii (nukleotydy adenylowe). Po drugie, dostarcza metabolitów o dużej energii swobodnej do szlaku glikolizy (aldehyd 3-fosfoglicerynowy). Po trzecie, pośrednio może wpływać na wydajność syntezy NADPH niezbędnego do różnego rodzaju syntez (np. biosynteza kwasów tłuszczowych) i redukcji naturalnych antyoksydantów (glutation, kwas askorbinowy). NADPH jest szczególnie potrzebny do utrzymania odpowiedniego stopnia zredukowania glutationu w układzie nerwowym. Z tego względu utrzymywanie aktywności transketolazy na odpowiednim poziomie jest istotne dla prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego, gospodarki tłuszczowej

i cukrowej organizmu. Liczne badania wskazują na udział transketolazy w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, cukrzycy i nowotworów, a także na jej ważną rolę w leczeniu i profilaktyce tych chorób [5,95,191].

Pomiary aktywności transketolazy w erytrocytach są wykorzystywane w diagnostyce medycznej do stwierdzenia niedoborów tiaminy. Porównując pomiar bazowy (bez egzogenego pirofosforanu tiaminy) z wynikiem pomiaru przeprowadzonego po wzbogaceniu mieszaniny reakcyjnej w egzogeny pirofosforan tiaminy można określić stan deficytu tiaminy w organizmie. Kiedy różnica obu pomiarów mieści się w zakresie 0–15%, stężenie tiaminy jest w normie. Jeśli różnica jest większa niż 15%, lecz nie przekracza 25% wskazuje to na stan umiarkowanego deficytu tiaminy. Natomiast kiedy różnica przekracza 25% świadczy to o głębokim niedoborze tiaminy w organizmie [40].

#### 4.3. Trifosforan tiaminy i adenozyntrifosfotiamina

Jak wskazują najnowsze badania, fosforylowane pochodne tiaminy, oprócz udziału w wyżej opisanych przemianach enzymatycznych (pirofosforan tiaminy), mogą regulować metabolizm komórek na poziomie niekoenzymatycznym. Dotyczy to trifosforanu tiaminy (ryc. 2C) i adenozyntrifosfotiaminy (ryc. 2D).

Trifosforan tiaminy powszechnie występuje w komórkach organizmów żywych. Związek ten najczęściej jest stwierdzany w ilościach śladowych i jego zawartość nie przekracza kilku procent całkowitej puli tiaminy i jej pochodnych obecnych w komórkach. Stosunkowo bogata w ten związek jest tkanka nerwowa zwierząt (tab. 2 [101]). W tkankach ludzkich trifosforan tiaminy występuje w śladowych ilościach (tab. 3 [50]). Mimo szerokiego rozpowszechnienia trifosforanu tiaminy u organizmów żywych, proces jego syntezy dotąd nie został całkowicie wyjaśniony. We wcześniejszych badaniach stwierdzono, że kinaza pirofosforanu tiaminy wykorzystując ATP może z bardzo powoli syntetyzować trifosforan tiaminy [176]. Jednak wyniki badań ostatnich lat podważają słuszność wcześniejszych obserwacji. Okazało się, że we wspomnianej reakcji powstaje inna fosforylowana pochodna tiaminy jaką jest adenozyntrifosfotiamina [100]. Udowodniono, że syntetyzować trifosforan tiaminy w cytoplazmie komórek mięśniowych może kinaza adenylanowa I, wykorzystując ADP [109]. Późniejsze badania wykazały jednak, że transgeniczne myszy pozbawione aktywności kinazy adenylanowej I miały prawidłowe stężenie trifosforanu tiaminy [102]. Wyniki wyżej cytowanych prac wskazują, że może istnieć inny, nieznan mechanizm syntezy trifosforanu tiaminy. Przymuszczalnym miejscem syntezy trifosforanu tiaminy mogą być mitochondria lub inne organella komórkowe, a nie, jak dotąd sądzono, cytosol komórki [15]. Hydrolizę trifosforanu tiaminy do pirofosforanu tiaminy katalizuje enzym fosfataza trifosforanu tiaminy (nazwa systematyczna: thiamine-triphosphate phosphohydrolase, EC 3.6.1.28). Enzym ten występuje w dwóch postaciach: związanej z błonami i cytosolowej. Postać związana z błonami występuje w mięśniach, jest aktywowana przez aniony (Γ<sup>-</sup> i NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), co wyróżnia ją od enzymu występującego w mózgu, który jest hamowany przez te aniony i aktywowany przez jony metali dwuwartościowych (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>). Optimum pH dla tej reakcji wynosi 6,5. Postać cytosolowa enzymu jest

białkiem o niewielkiej masie molekularnej (około 25 kDa), monomerycznym, zależnym od jonów metali dwuwartościowych, hydrofilnym, z optimum reakcji w pH=9,0. Białko to wykazuje bardzo dużą swoistość substratową w stosunku do trifosforanu tiaminy i dużą efektywność katalityczną. Aktywność tego białka jest powszechna w tkankach ssaków i chociaż powstają stosunkowo niewielkie jego ilości, to dzięki dużej sprawności katalitycznej utrzymuje ono stężenie trifosforanu tiaminy w komórkach na bardzo niskim poziomie [89,101]. Uważa się, że trifosforan tiaminy odgrywa szczególną rolę w mechanizmach przenoszenia sygnałów nerwowych, aktywując kanały anionowe Cl<sup>-</sup> o małej swoistości bramkowane napięciem [14,22,53]. Sugeruje się także, że trifosforan tiaminy pełni swoistą funkcję w mechanizmie neurotransmisji. Ponadto na podstawie badań nad białkiem rapsyną 43K, które jest zasocjowane z receptorami acetylocholinowymi (nAChR) w błonie postsynaptycznej wykazano, że swoista kinaza białkowa fosforyluje rapsynę 43K wykorzystując trifosforan tiaminy jako donor grupy fosforanowej. W związku z tym trifosforan tiaminy może brać udział w fosforylacji białek związanych z przekazywaniem sygnału przez synapsy [115]. Najnowsze badania wskazują jednak, że być może trifosforan tiaminy pełni bardziej ogólną metaboliczną rolę niż tylko donor grup fosforanowych w przebiegu fosforylacji białek synaptycznych. Hipotezę tę potwierdza obecność trifosforanu tiaminy w różnych tkankach, u różnych organizmów, począwszy od bakterii poprzez jednokomórkowce i rośliny, kończąc na zwierzętach i człowieku (tab. 2). Trifosforan tiaminy potencjalnie może być wykorzystywany do fosforylacji różnych białek podobnie jak ATP. Wskazuje to, że proces fosforylacji białek przez trifosforan tiaminy może być częścią nowej, nieznaną dotąd kaskady przekazywania sygnałów w komórkach [15,101]. U *Escherichia coli* stwierdzono, że trifosforan tiaminy jest syntetyzowany (lub jego rozpad z udziałem swoistej fosfatazy jest hamowany) w odpowiedzi na brak aminokwasów w pożywce, co może świadczyć, że jest on cząsteczką sygnałową wytwarzaną w odpowiedzi na zmiany w środowisku życia bakterii. Ponadto wyniki tych badań wskazują, że utrzymywanie odpowiedniego stężenia trifosforanu tiaminy w komórkach bakterii jest warunkiem koniecznym do podtrzymywania wzrostu kultury *E. coli* przy braku aminokwasów w pożywce [90]. Wyżej przytoczone obserwacje są jak dotąd jedynym eksperymentalnym przykładem na to, że trifosforan tiaminy jest konieczny w procesie adaptacji organizmów żywych w skrajnie niekorzystnych warunkach środowiska. Obserwacja ta w powiązaniu z istnieniem bardzo swoistego i wydajnego mechanizmu regulacji stężenia trifosforanu tiaminy poprzez fosfatazę trifosforanu tiaminy sugeruje istnienie szlaku sygnałowego związanego prawdopodobnie z fosforylacją białek z udziałem trifosforanu tiaminy, gdzie głównym elementem może być regulacja aktywności swoistej fosfatazy w odpowiedzi na bodźce ze środowiska.

Dodatkowych argumentów na korzyść niekoenzymatycznej roli fosforanowych pochodnych tiaminy w regulacji metabolizmu komórek dostarczyło odkrycie nieznaną do niedawna pochodnej tiaminy – adenozynotrifosfotiaminy ([16], ryc. 2D). Związek ten stwierdzono w śladowych ilościach w niektórych tkankach ludzkich, szczurzych, komórkach *E. coli*, kulturach *in vitro* komórek ludzkich, mysich i szczurzych [16,50,54]. W przypadku bakterii

adenozynotrifosfotiamina jest prawdopodobnie syntetyzowana przez swoisty enzym transferazę adenylo-tiaminopirofosforanową. Enzym ten wykorzystuje ATP lub ADP jako dawcę grupy adenylowej, którą przyłącza do pirofosforanu tiaminy. Jest on prawdopodobnie kompleksem białek o dużej masie molekularnej, który do osiągnięcia pełnej aktywności wymaga drobnocząsteczkowego białkowego aktywatora [100]. Adenozynotrifosfotiamina jest akumulowana u *E. coli* w odpowiedzi na brak węgla organicznego w pożywce lub upośledzony metabolizm oksydacyjny pirogronianu. Może więc ona być, podobnie jak trifosforan tiaminy, cząsteczką sygnałową biorącą udział w odpowiedzi stresowej i w adaptacji do niekorzystnych warunków środowiska. Argumentem przemawiającym za taką hipotezą jest to, że po uzupełnieniu pożywki w glukozę następuje gwałtowny spadek stężenia adenozynotrifosfotiaminy w komórkach. Ponadto w preparatach zwierzęcych zawierających znaczne stężenia trifosforanu tiaminy nie stwierdza się adenylowanej pochodnej i odwrotnie. Sugeruje to istnienie układu enzymatycznego zdolnego do szybkiej i precyzyjnej regulacji stężenia obu wyżej wspomnianych pochodnych tiaminy w komórce. Dalsze badania wskazały, że trifosforan tiaminy hamuje syntezę adenozynotrifosfotiaminy [54]. Biorąc pod uwagę, że *E. coli* jest zasobna w znaczną pulę pirofosforanu tiaminy (nawet do 60%), który może być łatwo przekształcony w obie wspomniane pochodne tiaminy, można sądzić, że zanizona synteza ATP w wyniku braku zasilania w węgiel organiczny nie jest jedynym warunkiem stymulującym syntezę adenozynotrifosfotiaminy. Aby doszło do nagromadzenia tego metabolitu w komórkach bakterii, musi dodatkowo zostać zablokowana synteza lub przyspieszona degradacja trifosforanu tiaminy. Sugeruje to silną współzależność syntezy i degradacji wszystkich fosforylowanych pochodnych tiaminy w procesach odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiska i istnienie zintegrowanego systemu enzymatycznego regulującego stężenie fosforylowanych pochodnych tiaminy w zależności od bodźców napływających ze środowiska zewnętrznego. Być może wyhamowanie tempa wzrostu bakterii w warunkach głodzenia jest mechanizmem, regulowanej przez fosforylowane pochodne tiaminy, adaptacji pozwalającej „przeżyć trudny okres” w warunkach ograniczonego tempa metabolizmu. W przypadku organizmów eukariotycznych nie ma danych eksperymentalnych potwierdzających udział trifosforanu tiaminy i adenozynotrifosfotiaminy w procesach przystosowawczych. Do tej pory nie udało się ustalić warunków, w których wyżej wymienione pochodne tiaminy byłyby gromadzone lub hydrolizowane. Ostatnio stwierdzono jednak w badaniach tkanek ludzkich, że w przypadkach niektórych stanów patologicznych (niedokrwienie wątroby) następuje wzrost stężenia wolnej tiaminy i spadek stężenia trifosforanu tiaminy [50].

## 5. INNE POCHODNE TIAMINY

W ostatnich latach pojawiło się wiele informacji na temat różnych analogów tiaminy [1,95,162]. W zależności od rodzaju modyfikacji w budowie cząsteczki pochodne tiaminy mogą być rozpuszczalne w wodzie bądź w tłuszczach i rozpuszczalnikach organicznych. Różnice w budowie w stosunku do tiaminy decydują także o tym, czy dany analog jest aktywny biologicznie (tab. 5). Wiele modyfikacji związanych z różnymi podstawnikami w pierścieniu

Tabela 5. Charakterystyka niektórych pochodnych tiaminy

Nazwa pochodnej	Cechy	Piśmiennictwo
Allitiamina	nierozpuszczalna w wodzie przenika przez błonę komórkową szybko podwyższa koncentrację tiaminy w komórkach nie działa antagonistycznie w stosunku do tiaminy	[174]
Amprolium	rozpuszczalna w wodzie wzmaga tempo rozpadu pirofosforanu tiaminy nie ulega fosforylacji hamuje dokomórkowy transport tiaminy wykorzystywana w leczeniu kokcydiozy	[36,51,132,135]
Benfotiamina	nierozpuszczalna w wodzie podawana doustnie przenika do organizmu po defosforylacji do 5-benzoilotiaminy w erytrocytach i wątrobie jest przekształcana w wolną tiaminę nie działa antagonistycznie wobec tiaminy działa na układ nerwowy	[7,58,95,174]
3-dezazotiamina	rozpuszczalna w wodzie w postaci difosforanu hamuje aktywność enzymów zależnych od tiaminy, włącza się w strukturę enzymów z lepszym powinowactwem od pirofosforanu tiaminy	[62,106]
Fursultiamina	nierozpuszczalna w wodzie przenika przez błony do komórek, gdzie jest przekształcana w tiaminę podwyższa stężenie tiaminy w organizmie działa przeciwzapalnie	[67,95,96,167,174,182]
Oksytiamina	rozpuszczalna w wodzie ulega fosforylacji do pirofosforanu oksytiaminy nie powoduje spadku poziomu tiaminy w organizmie nie przenika bariery krew-mózg hamuje aktywność enzymów zależnych od tiaminy powoduje ograniczenie przyrostu komórek <i>in vitro</i>	[20,127,156,172,193]
Pirytiamina	rozpuszczalna w wodzie ulega fosforylacji do pirofosforanu pirytiaminy hamuje enzymy zależne od tiaminy powoduje objawy deficytu witaminy B <sub>1</sub> toksyczna dla zwierząt (myszy) oddziałuje z ryboprzełącznikami tiaminowymi u bakterii	[36,94,135,158]
Sulbutiamina	nierozpuszczalna w wodzie przenika barierę krew-mózg oddziałuje swoiście na neurony	[17,174]

pirymidynowym bądź tiazolowym sprawia, że pochodna, w odróżnieniu od tiaminy, może być nieaktywna biologicznie, mimo podobnej budowy chemicznej (ryc. 1A i 4). W przypadku takich analogów możemy mówić o antymetabolitach lub antywitaminach. Brak aktywności biologicznej niektórych pochodnych tiaminy może wynikać z niemożności tworzenia fosforanowych estrów lub niezdolności do formowania jonu obojnaczego. Takie antywitaminowe pochodne mogą się wiązać z centrami aktywnymi zależnych od tiaminy enzymów powodując ich zablokowanie, a w konsekwencji hamowanie całych szlaków metabolicznych, w których enzymy te uczestniczą (ryc. 3). Niektóre analogi tiaminy nie są zdolne do interakcji z centrami aktywnymi enzymów np. w związku z brakiem możliwości osiągnięcia konformacji „V” lub niemożliwością tworzenia estrów pirofosforanowych. Takie pochodne mogą jednak wpływać na dystrybucję tiaminy w komórkach lub intensywność pobierania witaminy B<sub>1</sub> do komórek, w wyniku blokowania transporterów tiaminy.

Wśród licznych pochodnych tiaminy są takie, które cechują się chociażby lepszą przyswajalnością niż tiamina, a fizjologicznym skutkiem ich działania może być podwyższenie wewnątrzkomórkowego stężenia tiaminy. Tego typu analogów nie należy kwalifikować do grupy antywitamin. Obie wymienione grupy pochodnych tiaminy mimo skrajnie różnego działania znajdują coraz większe zastosowanie w praktyce medycznej i weterynaryjnej.

Niżej przedstawiono krótki przegląd niektórych pochodnych tiaminy wskazując na mechanizm ich działania i potencjalne lub faktyczne zastosowanie w praktyce.

Do grupy antywitaminowych pochodnych tiaminy należy oksytiamina (ryc. 4A). W cząsteczce oksytiaminy grupa aminowa w pozycji 4 pierścienia pirymidynowego, która jest niezbędna do zachowania właściwości katalitycznych, została zastąpiona grupą hydroksylową.



Antywitaminowe działanie oksytiaminy wynika z tego, że pod wpływem pirofosfokinazy tiaminowej tworzy ona pirofosforan oksytiaminy, który może się łączyć z enzymami zależnymi od pirofosforanu tiaminy blokując w ten sposób możliwość przyłączenia aktywnego koenzymu. Brak grupy  $\text{NH}_2$  przy czwartym węglu pierścienia pirymidynowego, w przypadku oksytiaminy, uniemożliwia deprotonację węgla C2 pierścienia tiazolowego, nie dopuszczając w konsekwencji do formowania jonu obojnego, którego powstanie jest warunkiem koniecznym do zajścia aktu katalizycznego. Na tej podstawie można sądzić, że oksytiamina jest inhibitorem wszystkich reakcji zależnych od pirofosforanu tiaminy. Obserwowano to w przypadku dekarboksylazy pirogronianowej u mikroorganizmów, a także kompleksów dehydrogenaz 2-oksokwasów i transketolazy, zarówno w badaniach enzymologicznych *in vitro*, jak i w eksperymentach *in vivo* u drożdży i zwierząt [156,157,162,172].

Oksytiamina, w związku ze swoimi właściwościami, może być przydatna w leczeniu nowotworów oraz grzybic. Związek ten wpływając na aktywność enzymów zależnych od pirofosforanu tiaminy może hamować szlaki bioenergetyczne, wytwarzanie fosforanów pentoz niezbędnych do syntezy nukleotydów i tempo syntezy oraz rozkładu aminokwasów. Na zakłócenia wyżej wymienionych procesów szczególnie wrażliwe są szybko dzielące się komórki nowotworowe i komórki grzybów odpowiedzialnych za powierzchniowe i wewnątrzustrojowe infekcje. Wyhamowanie proliferacji komórek nowotworowych w warunkach *in vitro*, a także regresję guza Ehrlicha u myszy pod wpływem oksytiaminy wykazano w warunkach laboratoryjnych [20,127]. Zastosowanie oksytiaminy w kulturach *in vitro* grzybów (*Saccharomyces cerevisiae*, *Malassezia pachydermatis*) powodowało ograniczenie tempa przyrostu liczby komórek, a w wyższych stężeniach było nawet cytotoksyczne [173,193]. Podawanie oksytiaminy zwierzętom doświadczalnym wywołuje wiele działań o charakterze toksycznym. Powoduje u nich m.in. ospałość, utratę masy ciała oraz bradykardię. Oksytiamina nie wywołuje natomiast objawów charakterystycznych dla beri-beri. Jest to spowodowane prawdopodobnie tym, że nie może ona przenikać bariery krew-mózg i gromadzić się w komórkach układu nerwowego [20,94].

Kolejną pochodną tiaminy, która może być alternatywnym substratem dla pirofosfokinazy tiaminowej jest pirytyamina (ryc. 4B). Antywitamina ta zamiast pierścienia tiazolowego ma pierścień pirydynowy. Antykoenzymatyczne działanie pirytyaminy jest podobne jak w przypadku oksytiaminy, gdyż udowodniono eksperymentalnie, że mimo różnicy w strukturze chemicznej związek ten może podobnie jak tiamina ulegać fosforylacji [94] i jako analog koenzymu konkurować o wiązanie w centrach aktywnych enzymów zależnych od pirofosforanu tiaminy powodując ich inaktywację [185]. Pirytyamina jest jedną z najsilniejszych antyvitamin tiaminy. Niewielkie dawki rzędu 0,5 mg są letalne dla młodych myszy, a kilkakrotnie niższe powodują zaburzenia w rozwoju noworodków myszy [186]. Toksyczne działanie pirytyaminy stwierdzono w przypadku niektórych grzybów, glonów i bakterii [37,88,158]. Ciekawy proces zaobserwowano w przypadku działania antyvitamin tiaminy na komórki *Saccharomyces cerevisiae*. Otóż podawanie drożdżom oksytiaminy lub pirytyaminy osobno powodowało wyhamowanie tempa przyrostu liczby

komórek, a dodanie oksytiaminy do kultury wcześniej potraktowanej pirytyaminą spowodowało powrót kultury do kontrolnego tempa wzrostu [69]. Prawdopodobnie drożdże mogą rozszczepiać antywitaminę, a następnie wykorzystując pierścień tiazolowy oksytiaminy i pirymidynowy pirytyaminy, syntetyzować prawidłową witaminę  $\text{B}_1$ . Pirytyamina powoduje objawy neurologiczne podobne do zespołu Wernickego-Korsakowa i inne zaburzenia metaboliczne [36,94,135]. Może ona także zaburzać proces syntezy tiaminy u mikroorganizmów poprzez interakcje z ryboprzełącznikami regulującymi proces biosyntezy białek związanych z wytwarzaniem tiaminy [18,158]. Efekt ten może mieć znaczenie w badaniach nad nowymi generacjami leków. W badaniach eksperymentalnych antyvitamina ta, a także oksytiamina są stosowane do wywoływania objawów podobnych do niedoboru tiaminy w organizmie [27,113]. Jednak w odróżnieniu od rzeczywistego niedoboru tiaminy w diecie, efekt uzyskiwany eksperymentalnie przez podawanie *in vivo* jej analogów może sprzyjać występowaniu zjawiska preferencyjnego hamowania aktywności enzymów zależnych od pirofosforanu tiaminy. Nie jest to zazwyczaj uwzględniane podczas interpretacji wyników badań nad zespołem Wernickego-Korsakowa [27], a także przy modelowaniu hipowitaminozy  $\text{B}_1$  u szczurów [113] i myszy [168], przez podawanie pirytyaminy i innych antymetabolitów tiaminy [26,63,135].

Do antagonistów tiaminy należy również amprolium (ryc. 4C). Zastąpienie grupy metylowej  $-\text{CH}_3$  w pozycji 2 pierścienia pirymidynowego podstawnikiem o dłuższym łańcuchu węglowodorowym  $-\text{C}_3\text{H}_7$  skutkuje obniżeniem aktywności biologicznej związku. Brak grupy hydroksyetylowej  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  w pozycji 5, która jest konieczna do utworzenia postaci pirofosforanowej powoduje, że analog ten jest nieczynny jako antykoenzym.

Amprolium wzmacnia defosforylację pirofosforanu tiaminy do monofosforanu tiaminy, hamuje również dokomórkowy transport tiaminy oraz wchłanianie tiaminy w przewodzie pokarmowym. Amprolium, występujące pod nazwami handlowymi Amprovine, Amprolium, Amprol, Anticoccid, Corid jest dodawane do pasz i wykorzystywane jako środek przeciwko kokcydiozie (chorobie pasożytniczej zwierząt gospodarskich, psów i kotów wywoływanej przez pierwotniaki z rodzaju *Eimeria*) [51,76,132,137,150].

Jednym z najsilniejszych inhibitorów enzymów zależnych od pirofosforanu tiaminy jest 3-deazotiamina. Związek ten został zsyntetyzowany dopiero w 2001 roku [62]. Budową różni się od tiaminy tym, że w drugim pierścieniu atom azotu N-3 został zastąpiony atomem węgla. W badaniach enzymologicznych wykazano, że pirofosforan 3-deazotiaminy (ryc. 4D) jest bardzo silnym, nieodwracalnym inhibitorem dekarboksylazy pirogronianowej i kompleksu dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej [106]. Wiąże się z centrami aktywnymi wyżej wymienionych enzymów ze znacznie większym powinowactwem niż pirofosforan tiaminy, a ponieważ nie jest zdolny do formowania jonu obojnego powoduje ich inaktywację. Proponuje się, że analog ten będzie inaktywował równie skutecznie inne enzymy zależne od tiaminy, takie jak transketolaza i kompleks dehydrogenazy pirogronianowej [1]. Mimo że synteza 3-deazotiaminy jest skomplikowana i wymaga przeprowadzenia reakcji w 12 etapach, związek ten ze względu na

swoje właściwości względem enzymów zależnych od pirofosforanu tiaminy może mieć potencjalne zastosowania praktyczne. Jeżeli wyniki uzyskane w badaniach z użyciem izolowanych enzymów potwierdzą się w warunkach *in vivo*, 3-deazotiamina może się okazać skutecznym antybiotykiem i cytostatykiem.

Niektóre związki zbliżone do tiaminy pod względem budowy chemicznej są stosowane jako herbicydy i antybiotyki. Przykładem herbicydu może być metsulfuron metylu hamujący aktywność zależnej od tiaminy syntazy kwasu hydroksyoctowego. Enzym ten jest niezbędny do syntezy aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach. Metsulfuron metylu uniemożliwia wiązanie pirofosforanu tiaminy w centrum aktywnym syntazy kwasu hydroksyoctowego [108]. Innym herbicydem będącym analogiem tiaminy jest kłomazon. Związek ten jest w komórkach przekształcany w 5-ke-toklomazon, który hamuje aktywność syntazy 5-fosforanu deoksyksylulozy – enzymu zaangażowanego w biosyntezę terpenów w szlaku niemewalonianowym u roślin [110]. Interesującym analogiem pierścienia tiazolowego tiaminy jest metronidazol – antybiotyk stosowany w zwalczaniu infekcji bakteryjnych i powodowanych przez niektóre pierwotniaki. Związek ten zastępuje pierścień tiazolowy w tiaminie powodując powstanie analogu tiaminy, który bardzo wydajnie hamuje aktywność pirofosfokinazy tiaminy wpływając tym samym negatywnie na aktywność wszystkich enzymów zależnych od tiaminy [1].

Dużą grupę wśród analogów tiaminy stanowią jej tiolowe pochodne. Związki te, w odróżnieniu od omówionych wyżej, nie działają antagonistycznie w stosunku do witaminy B<sub>1</sub>, ale mogą się przyczyniać do podwyższenia wewnątrzkomórkowego stężenia tiaminy. Do tej grupy pochodnych należą: benfotiamina (ryc. 4E), fursultiamina (ryc. 4F), allitiamina (ryc. 4G), sulbutiamina (ryc. 4H). Budzą one szerokie zainteresowanie naukowców ze względu na obecność bardzo reaktywnej grupy tiolowej –SH, co stwarza niemal nieograniczone możliwości syntezy innych pochodnych (tab. 5).

Benfotiamina (S-benzoilo, O-monofosforan tiaminy) jest S-acylową pochodną tiaminy. W odróżnieniu od disiarcz-kowych pochodnych tiaminy, benfotiamina nie jest związkiem lipofilowym. Podawana doustnie może przenikać przez błonę komórkową dopiero po defosforylacji do S-benzoilotiaminy w wyniku działania fosfatazy zasadowej, która jest wydzielana przez rąbki szczoteczkowe śluzówki jelita cienkiego. S-benzoilotiamina dyfunduje do komórek śród błonka jelita, a następnie do krwi skąd znaczna jej część trafia do erytrocytów, gdzie jest przekształcana w wolną tiaminę w wyniku przeniesienia grupy S-benzoilowej na glutation. W wątrobie S-benzoilotiamina może być przetwarzana do tiaminy przez tioesterazę obecną w hepatocytach.

Prawdopodobnie w wyniku zwiększenia stężenia tkankowego pirofosforanu tiaminy oraz przez zwiększenie aktywności transketolazy, która katalizuje przemianę aldehydu 3-fosfoglicerynowego i fruktozo-6-fosforanu do pentoz i innych cukrów, benfotiamina zapobiega rozwojowi i pogłębieniu przewlekłych powikłań w cukrzycy, takich jak retinopatia cukrzycowa, czy nefropatia cukrzycowa. Dzięki tej reakcji zostają również zahamowane niekorzystne dla

śródbłonka naczyń krwionośnych szlaki przemiany glukozy. Benfotiamina podawana doustnie powoduje znaczący wzrost stężenia tiaminy, a także jej mono- i pirofosforanu we krwi oraz w wątrobie. Nie ma żadnych dowodów na niekorzystne działania benfotiaminy na ośrodkowy układ nerwowy. Wyniki niektórych badań wskazują, że benfotiamina poprawia pamięć u gryzoni, a także u ludzi. Jest to prawdopodobnie wynik aktywacji układu cholinergicznego i dopaminergicznego [7,58,95,174].

Kolejną tiolową postacią tiaminy jest fursultiamina (tetrahydrofurfurylodisiarczek tiaminy). Jest to disiarcz-kowa pochodna tiaminy. Ze względu na swój lipofilny charakter cząsteczka fursultiaminy łatwo przenika do wnętrza komórki, gdzie jest przekształcana w tiaminę, a następnie w wyniku działania pirofosfokinazy tiaminowej w pirofosforan tiaminy. Fursultiamina ma korzystne działanie izotropowe na mięsień sercowy. Działa również jako czynnik przeciwpalny, prawdopodobnie poprzez zahamowanie kaskady biosyntezy kwasu arachidonowego [67,95,96,167,174,182].

Allitiamina (disiarczek allilotiaminy) jest allilodisiarcz-kową pochodną tiaminy. Podobnie jak pozostałe disiarcz-kowe pochodne tiaminy nie rozpuszcza się w wodzie, jest jednak dobrze rozpuszczalna w tłuszczach i rozpuszczalnikach organicznych. Allitiamina z łatwością przenika przez błonę komórkową, co prowadzi do zwiększonej koncentracji witaminy B<sub>1</sub> wewnątrz komórki. Dyfuzja do komórki nie wymaga żadnego systemu przENOŚNIKÓW. W związku z tym pochodna ta może powodować szybkie nagromadzenie dużej ilości tiaminy wewnątrz komórek nawet w wypadkach zakłócenia funkcjonowania błonowych transporterów witaminy B<sub>1</sub> [174].

Sulbutiamina (O-izobutyrylo disiarczek tiaminy, ryc. 4H) podobnie jak fursultiamina i allitiamina jest również disiarcz-kową pochodną tiaminy. Ze względu na lipofilowy charakter związek ten może przenikać do mózgu i swoiście oddziaływać na neurony. Sulbutiamina powoduje wzrost stężenia tiaminy i jej estrów fosforanowych w mózgu i tkankach obwodowych u szczurów. Jest podawana w przypadkach ogólnego osłabienia i przemęczenia – astenii [17,174].

## 6. PODSUMOWANIE

Mimo że minęło już ponad 70 lat od ustalenia struktury chemicznej tiaminy związek ten nadal odkrywa przed nami swoje tajemnice. W świetle wyników najnowszych badań wyjaśnienie udziału fosforanowych pochodnych tiaminy (trifosforan tiaminy i adenozyntrifosfotiamina) w regulacji metabolizmu komórek na poziomie niekoenzymatycznym może rzucić zupełnie nowe światło na zagadnienie udziału witamin z grupy B w regulacji metabolizmu komórek. Aktualnie stawiane hipotezy o udziale fosforylowanych pochodnych tiaminy w procesach transdukcji sygnału są dyskusyjne i wymagają potwierdzenia.

Wyniki badań świadczą o ciągłym zagrożeniu łagodnymi stanami niedoborów witaminy B<sub>1</sub>. Stany te dotyczą zwłaszcza dzieci i osób starszych, mogą się przyczyniać do pogłębienia powikłań w chorobach przewlekłych, takich jak np. cukrzyca. Szczegółowe poznanie udziału pirofosforanu tiaminy w procesie katalizy enzymatycznej przyczyniło się do wyjaśnienia podłoża różnego rodzaju chorób

i opracowania nowych sposobów leczenia z wykorzystaniem witaminy B<sub>1</sub> i rozwoju perspektyw zastosowania analogów tiaminy w medycynie. Dalsze odkrycia w tej dziedzinie z pewnością przyczynią się do powstania nowych leków i metod leczenia z wykorzystaniem tiaminy i jej analogów w przypadku tak niebezpiecznych z punktu widzenia ludzi schorzeń jak grzybnice czy nowotwory. Bardzo przydatne wydają się badania dotyczące wykorzystania najnowszych odkryć w dziedzinie regulacji biosyntezy

tiaminy (ryboprzełączniki) do produkcji nowej generacji antybiotyków, cytostatyków i herbicydów.

Zagadnienie regulacji metabolizmu komórek z udziałem tiaminy i jej różnorodnych pochodnych, mimo nagromadzenia znacznej wiedzy nadal pozostaje fascynującym zadaniem badawczym, a wszelkie odkrycia w tej dziedzinie mogą być niezwykle istotne z punktu widzenia zarówno medycyny, biologii jak i gospodarki.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Agyei-Owusu K., Leeper F.J.: Thiamin diphosphate in biological chemistry: analogues of thiamin diphosphate in studies of enzymes and riboswitches. *FEBS J.*, 2009; 276: 2905–2916
- [2] Ahn I.P., Kim S., Lee Y.H.: Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiol.*, 2005; 138: 1505–1515
- [3] Ahn I.P., Kim S., Lee Y.H., Suh S.C.: Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the NPR1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 2007; 143: 838–848
- [4] Ajjawi I., Tsegaye Y., Shintani D.: Determination of the genetic, molecular, and biochemical basis of the Arabidopsis thaliana thiamin auxotrophy th1. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007; 459: 107–114
- [5] Aleksander-Kaufman K., Harper C.: Transketolase: observations in alcohol-related brain damage research. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2009; 41: 717–720
- [6] Astashkin A.V., Seravalli J., Mansoorabadi S.O., Reed G.H., Ragsdale S.W.: Pulsed electron paramagnetic resonance experiments identify the paramagnetic intermediates in the pyruvate ferredoxin oxidoreductase catalytic cycle. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006; 128: 3888–3889
- [7] Babaei-Jadidi R., Karachalias N., Achmed N., Battah S., Thornalley P.J.: Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. *Diabetes*, 2003; 52: 2110–2120
- [8] Bao H., Kasten S.A., Yan X., Hiromasa Y., Roche T.E.: Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2 activity stimulated by speeding up the rate of dissociation of ADP. *Biochemistry*, 2004; 43: 13442–13451
- [9] Baykal A., Chakraborty S., Dodoo A., Jordan F.: Synthesis with good enantiomeric excess of both enantiomers of alpha-ketols and acetolactates by two thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. *Bioorg. Chem.*, 2006; 34: 380–393
- [10] Begley T.P., Chatterjee A., Hanes J.W., Hazra A., Ealick S.E.: Cofactors biosynthesis – still yielding fascinating new biological chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2008; 12: 118–125
- [11] Begley T.P., Downs D.M., Ealick S.E., McLafferty F.W., Van Loon A., Taylor S., Campobasso N., Chiu N., Kinsland C., Reddick J., Xi J.: Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch. Microbiol.*, 1999; 171: 293–300
- [12] Belanger F., Leustek T., Chu B., Kirz A.: Evidence for the thiamine biosynthetic pathway in higher plants plastids and its developmental regulation. *Plant Mol. Biol.*, 1995; 29: 809–821
- [13] Bettendorff L.: Thiamine in excitable tissues: reflections on a non-cofactor role. *Metab. Brain Dis.*, 1994; 9: 183–209
- [14] Bettendorff L., Peeters M., Wins P., Schoffeniels E.: Metabolism of thiamin triphosphate in rat brain: correlation with chloride permeability. *J. Neurochem.*, 1993; 60: 423–434
- [15] Bettendorff L., Wins P.: Thiamin diphosphate in biological chemistry: new aspects of thiamin metabolism, especially triphosphate derivatives action other than as cofactors. *FEBS J.*, 2009; 276: 2917–2925
- [16] Bettendorff L., Wirtzfeld B., Makarchikov A.F., Mazzucchelli G., Frederich M., Gigliobianco T., Gangolf M., De Pauw E., Angenot L., Wins P.: Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide. *Nat. Chem. Biol.*, 2007; 3: 211–212
- [17] Bizot J.C., Herpin A., Pothion S., Pirot S., Trovero F., Ollat H.: Chronic treatment with sulbutiamine improves memory in an object recognition task and reduces some amnesic effects of dizocilpine in a spatial delayed-non-match-to-sample task. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2005; 29: 928–935
- [18] Blound K.F., Breaker R.R.: Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nat. Biotechnol.*, 2006; 24: 1558–1564
- [19] Bocobza S., Adato A., Mandel T., Shapira M., Nudler E., Aharoni A.: Riboswitch-dependent gene regulation and its evolution in the plant kingdom. *Genes Dev.*, 2007; 21: 2874–2879
- [20] Boros L.G., Puigjaner J., Cascante M., Lee W.N., Brandes J.L., Bassilian S., Yusuf F.I., Williams R.D., Muscarella P., Melvin W.S., Schirmer W.J.: Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation. *Cancer Res.*, 1997; 57: 4242–4248
- [21] Boś M.: Hipotetyczna funkcja tiaminy w układzie nerwowym. *Postępy Biol. Kom.*, 2001; 16: 213–220
- [22] Boś M., Kozik A.: Some molecular and enzymatic properties of a homogeneous preparation thiaminase I purified from carp liver. *J. Protein Chem.*, 2000; 19: 75–84
- [23] Brosnan J.T., Brosnan M.E.: Branched-chain amino acid: enzyme and substrate regulation. *J. Nutr.*, 2006; 136: 207S–211S
- [24] Bugala K., Żywicki M., Wyszko E., Barciszewska M.Z., Barciszewski J.: Przełączniki RNA. *Postępy Bioch.*, 2005; 51: 111–119
- [25] Bunik V.I., Strumilo S.: Regulation of catalysis within cellular network: metabolic and signaling implications of N2-(2-oxoglutarate oxidative decarboxylation. *Curr. Chem. Biol.*, 2009; 3: 279–290
- [26] Butterworth R.F.: Thiamine deficiency-related brain dysfunction in chronic liver failure. *Metab. Brain Dis.*, 2009; 24: 189–196
- [27] Butterworth R.F., Kril J.J., Harper C.G.: Thiamine-dependent enzyme changes in the brains of alcoholics: relationship to the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 1993; 17: 1084–1088
- [28] Caines M.E., Elkins J.M., Hewitson K.S., Schofield C.J.: Crystal structure and mechanistic implications of N2-(2-carboxyethyl)arginine synthase, the first enzyme in the clavulanic acid biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 5685–5692
- [29] Casteels M., Foulon V., Mannaerts G.P., Van Veldhoven P.P.: Alpha-oxidation of 3-methyl-substituted fatty acids and its thiamine dependence. *Eur. J. Biochem.*, 2003; 270: 1619–1627
- [30] Chabregas S.M., Luche D.D., Farias L.P., Ribeiro A.F., van Sluys M.A., Menck C.F., Silva-Filho M.C.: Dual targeting properties of the N-terminal signal sequence of *Arabidopsis thaliana* TH11 protein to mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol. Biol.*, 2001; 46: 639–650
- [31] Chabriere E., Vernede C., Guigliarelli B., Charon M.H., Hatchikian E.C., Fontecilla-Camps J.C.: Crystal structure of the free radical intermediate of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase. *Science*, 2001; 294: 2559–2663
- [32] Chatterjee A., Jurgenson C.T., Shroeder F.C., Ealick S.E., Begley T.P.: Biosynthesis of thiamin thiazole in eukaryotes: conversion of NAD to an advanced intermediate. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007; 129: 2914–2922
- [33] Chatterjee A., Shroeder F.C., Jurgenson C.T., Ealick S.E., Begley T.P.: Biosynthesis of the thiamin thiazole in eukaryotes: identification of a thiazole tautomer intermediate. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008; 130: 11394–11398
- [34] Chen J., Anderson J.B., De Weese-Scott C., Fedorova N.D., Geer L.Y., He S., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Jacobs A.R., Lanczycki C.J., Liebert C.A., Liu C., Madej T., Marchler-Bauer A., Marchler G.H., Mazumder R., Nikolskaya A.N., Rao B.S., Panchenko A.R., Shoemaker B.A., Simonyan V., Song J.S., Thiessen P.A., Vasudevan S., Wang Y., Yamashita R.A., Yin J.J., Bryant S.H.: MMDb: Entrez's D-structure database. *Nucleic Acid Res.*, 2003; 31: 474–477
- [35] Chipman D.M., Duggleby R.G., Tittmann K.: Mechanisms of aceto-hydroxyacid synthasas. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2005; 9: 475–481
- [36] Chornyy S.A., Parkhomenko M.: Comparative characteristic of thiamine antagonists on apoptosis induction in different types of nerve cell lines. *Ukr. Biochem. Zhurn.*, 2008; 80: 76–84
- [37] Croft M.T., Moulin M., Webb M.E., Smith A.G.: Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 20770–20775



- [38] da Cunha S., Cunha Bastos J., Salles J.B., Silva M.C., Cunha Bastos V.L., Mandarim-de-Lacerda C.A.: Cardiac alterations in furosemide-treated thiamine-deprived rats. *J. Card. Fail.*, 2007; 13: 774–784
- [39] Demir A.S., Sesenoglu O., Dunkelmann P., Muller M.: Benzaldehyde lyase-catalysed enantioselective carbonylation of aromatic aldehydes with mono- and dimethoxy acetaldehyde. *Org. Lett.*, 2003; 5: 2047–2050
- [40] Doolman R., Dinbar A., Sela B.A.: Improved measurement of transketolase activity in the assessment of “TPP effect”. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1995; 33: 445–446
- [41] Duggleby R.G., Pang S.S., Yu H., Guddat L.W.: Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase. Interpretation of herbicide-resistance data. *Eur. J. Biochem.*, 2003; 270: 2895–2904
- [42] Dutta B., Huang W., Molero M., Kekuda R., Leibach F.R., Devoe L.D., Ganapathy V., Prasad P.D.: Cloning of the human thiamin transporter, a member of the folate transporter family. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 31925–31929
- [43] Estevez J.M., Cantero A., Romero C., Kawaide H., Jimenez L.F., Kuzuyama T., Seto H., Kamiya Y., Leon P.: Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 2000; 124: 95–104
- [44] Evans M.C.W., Buchanan B.B., Arnon D.I.: A new ferredoxin dependent carbon reduction cycle in photosynthetic bacterium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966; 55: 928–934
- [45] Foulon V., Sniekers M., Huysmans E., Asselberghs S., Mahieu V., Mannaerts G.P., Van Veldhoven P.P., Casteels M.: Breakdown of 2-hydroxylated straight chain fatty acids via peroxisomal 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase: a revised pathway for the  $\alpha$ -oxidation of straight chain fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 9802–9812
- [46] Fraccascia P., Sniekers M., Casteels M., Van Veldhoven P.P.: Presence of thiamine pyrophosphate in mammalian peroxisomes. *BMC Biochem.*, 2007; 8: 10
- [47] Frank R.A.W., Leeper F.J., Luisi B.F.: Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007; 64: 892–905
- [48] Furey W., Arjunan P., Chen L., Sax M., Guo F., Jordan F.: Structure – function relationships and flexible tetramer assembly in pyruvate decarboxylase revealed by analysis of crystal structures. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1385: 253–270
- [49] Ganapathy V., Smith S.B., Prasad P.D.: SLC19: the folate/thiamin transporter family. *Pflugers Arch.*, 2004; 447: 641–646
- [50] Gangolf M., Czerniecki J., Radermecker M., Detry O., Nisolle M., Jouan C., Martin D., Chantraine F., Lakaye B., Wins P., Grisar T., Bettendorff L.: Thiamine status in human and control of phosphorylated thiamine derivatives in biopsies and cultured cells. *PLoS ONE*, 2010; 5: e13616
- [51] Ghanem M.M., Radwan M.E., Moustafa A.M.M., Ebeid M.H.: Comparative therapeutic effect of toltrazuril, sulphadimidine and amprolium on *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* given at different times following infection in buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Prev. Vet. Med.*, 2008; 84: 161–170
- [52] Gibson G.E., Blass J.P.: Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration. *Antioxid. Redox Signal.*, 2007; 9: 1605–1619
- [53] Gibson G.E., Zhang H.: Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. *Neurochem. Int.*, 2002; 40: 493–504
- [54] Gigliobianco T., Lakaye B., Wins P., El Moulaj B., Zorzi W., Bettendorff L.: Adenosine thiamine triphosphate accumulates in *Escherichia coli* cells in response to specific conditions of metabolic stress. *BMC Microbiol.*, 2010; 10: 148
- [55] Godoi P.H., Galhardo R.S., Luche D.D., Van Sluys M.A., Menck C.F., Oliva G.: Structure of thiazole biosynthetic enzyme THI1 from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 30957–30966
- [56] Goyer A.: Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry*, 2010; 71: 1615–1624
- [57] Graupner M., Xu H., White R.H.: Identification of the gene encoding sulfoxypyruvate decarboxylase, an enzyme involved in biosynthesis of coenzyme M. *J. Bacteriol.*, 2000; 182: 4862–4867
- [58] Hammes H.P., Du X., Edelstein D., Taguchi T., Matsumura T, Ju Q., Lin J., Bierhaus A., Nawroth P., Hannak D., Neumaier M., Bergfeld R., Giardino I., Brownlee M.: Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat. Med.*, 2003; 9: 294–299
- [59] Harris R.A., Joshi M., Jeoung N.H.: Mechanisms responsible for regulation of branched-chain amino acid catabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 313: 391–396
- [60] Harris R.A., Kobayashi R., Murakami T., Shimomura Y.: Regulation of branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase kinase expression in rat liver. *J. Nutr.*, 2001; 131: 841S–845S
- [61] Hass A.L., Laun N.P., Begley T.P.: Thi20, a remarkable enzyme for *Saccharomyces cerevisiae* with dual thiamin biosynthetic and degradation activities. *Bioorg. Chem.*, 2005; 33: 338–344
- [62] Hawksley D., Griffin D.A., Leeper F.J.: Synthesis of 3-deazathiamin. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, 2001; 1: 144–148
- [63] Hazell A.S., Butterworth R.F.: Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation. *Alcohol*, 2009; 44: 141–147
- [64] Heinrich C.P., Stadler H., Weiser H.: The effect of thiamine deficiency on the acetyl coenzyme A and acetylcholine levels in the rat brain. *J. Neurochem.*, 1973; 21: 1273–1281
- [65] Hghiem H.O., Bettendorff L., Changeux J.P.: Specific phosphorylation of Torpedo 43K rapsin by endogenous kinase(s) with thiamine triphosphate as the phosphate donor. *FASEB J.*, 2000; 14: 543–554
- [66] Hohmann S., Meacock P.A.: Thiamin metabolism and thiamin diphosphate – dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1358: 201–219
- [67] Houzen H., Kanno M.: Thiamine and its derivatives inhibit delayed rectifier potassium channels of rat cultured cortical neurons. *Neuropharmacol.*, 1998; 37: 313–322
- [68] Iacopetta D., Carrisi C., De Filippis G., Calcagnile V.M., Cappello A.R., Chimento A., Curcio R., Santoro A., Voza A., Dolce V., Palmieri F., Capobianco L.: The biochemical properties of the mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier from *Drosophila melanogaster*. *FEBS J.*, 2010; 277: 1172–1181
- [69] Iwashima A., Yoshioka K., Nishimura H., Nosaka K.: Reversal of pyridoxamine-induced growth inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by oxythiamine. *Experientia*, 1984; 40: 582–583
- [70] Jakubowski P.: Patofizjologia bólu i jej znaczenie dla działania leków przeciwbólowych. *Terapia i Leki*, 2000; 1: 5–8
- [71] Jenkins A.H., Shyns G., Potot S., Sun G., Begley T.P.: A new thiamin salvage pathway. *Nat. Chem. Biol.*, 2007; 3: 492–497
- [72] Jeong D.W., Lee J.M., Lee H.J.: Cloning and characterization of a gene encoding phosphoketolase in a *Lactobacillus paraplantarum* isolated from Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007; 17: 822–829
- [73] Jhala S.S., Hazell A.S.: Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: consequences of impaired oxidative metabolism. *Neurochem. Int.*, 2011; 58: 248–260
- [74] Johnson K. A., Bernard M.A., Funderburg K.: Vitamin nutrition in older adults. *Clin. Geriatr. Med.*, 2002; 18: 773–799
- [75] Jordan F.: Current mechanistic understanding of thiamine diphosphate-dependent enzymatic reactions. *Nat. Prod. Rep.*, 2003; 20: 184–201
- [76] Joyner L.P., Norton C.C.: The anticoccidial effects of amprolium, dinitolide and monensin against *Eimeria maxima*, *E. brunetti* and *E. acervulina* with particular reference to oocyst sporulation. *Parasitology*, 1977; 75: 155–164
- [77] Jung I.L., Kim I.G.: Thiamin protects against paraquat-induced damage: scavenging activity of reactive oxygen species. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2003; 15: 19–26
- [78] Jurgenson C.T., Begley T.P., Ealick S.E.: The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 2009; 78: 569–603
- [79] Jurna I.: Analgesic and analgesiapotentiating action of B vitamins. *Schmerz*, 1998; 12: 136–141
- [80] Kaplun A., Binshtein E., Vyazmensky M., Steinmetz A., Barak Z., Chipman D.M., Tittmann K., Shaanan B.: Glyoxylate carbonylase lacks the canonical active site glutamate of thiamine-dependent enzymes. *Nat. Chem. Biol.*, 2008; 4: 113–118
- [81] Karlson P.: The structure of vitamin B1. *Trends Biochem. Sci.*, 1984; 9: 536–537
- [82] Kawasaki Y., Onozuka M., Mizote T., Nosaka K.: Biosynthesis of hydroxymethylpyrimidine pyrophosphate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 2005; 47: 156–162
- [83] Keith M.E., Walsh N.A., Darling P.B., Hanninen S.A., Thirugnanam S., Leong-Poi H., Barr A., Sole M.J.: B-vitamin deficiency in hospitalized patients with heart failure. *J. Am. Diet. Assoc.*, 2009; 109: 1406–1410



- [84] Kochetov G.A., Sevostyanova I.A.: Binding of the coenzyme and formation of the transketolase active center. *IUBMB Life*, 2005; 57: 491–497
- [85] Kong D., Zhu Y., Wu H., Cheng X., Liang H., Ling H.Q.: AtTHIC, a gene involved in thiamine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Biochem.*, 2008; 38: 213–240
- [86] Kotas I.: Biosynteza i bioaktywacja tiaminy. *Postepy Biol. Kom.*, 2001; 28(Suppl.16): 199–212
- [87] Kowalska E., Kozik A.: The genes and enzymes involved in the biosynthesis of thiamin and thiamin diphosphate in yeasts. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2008; 13: 271–282
- [88] Kubodera T., Yamashita N., Nishimura A.: Pyriothiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*: cloning, characterisation and application as a dominant selectable marker for transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2000; 64: 1416–1421
- [89] Lakaye B., Makarchikov A.F., Antunes A.F., Zorzi W., Coumans B., De Pauw E., Wins P., Grisar T., Bettendorff L.: Molecular characterization of a specific thiamin triphosphatase widely expressed in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 13771–13777
- [90] Lakaye B., Verlaet M., Dubail J., Czerniecki J., Bontems S., Makarchikov A.F., Wins P., Piette J., Grisar T., Bettendorff L.: Expression of 25 kDa thiamin triphosphatase in rodent tissues using quantitative PCR and characterization of its mRNA. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2004; 36: 2032–2041
- [91] Lindhurst M.J., Fiermonte G., Song S., Struys E., De Leonardi F., Schwartzberg P.L., Chen A., Castegna A., Verhoeven N., Mathews C.K.: Knockout of *Slc25a19* causes mitochondrial thiamine pyrophosphate depletion, embryonic lethality, CNS malformations and anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 15927–15932
- [92] Lindqvist Y., Schneider G., Ermler U., Sundstrom M.: Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *EMBO J.*, 1992; 11: 2373–2379
- [93] Lingen B., Kolter-Jung D., Dünkelpmann P., Feldmann R., Grötzinger J., Pohl M., Müller M.: Alteration of the substrate specificity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* by directed evolution. *ChemBioChem.*, 2003; 4: 721–726
- [94] Liu J.Y., Timm D.E., Hurley T.D.: Pyriothiamine as a substrate for thiamine pyrophosphokinase. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 6601–6607
- [95] Lonsdale D.: A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. *eCAM*, 2006; 3: 49–59
- [96] Lonsdale D.: Thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide: a little known therapeutic agent. *Med. Sci. Monit.*, 2004; 10: RA199–RA203
- [97] Lu G., Dobritzsch D., Baumann S., Schneider G., König S.: The structural basis of substrate activation in yeast pyruvate decarboxylase. A crystallographic and kinetic study. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 861–868
- [98] Lukienko P.I., Melnichenko N.G., Zverinskii I.V., Zabrodskaya S.V.: Antioxidant properties of thiamine. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2000; 130: 874–876
- [99] Machado C.R., de Oliveira R.L., Boiteux S., Praekelt U.M., Meacock P.A., Menck C.F.: *Thi1*, a thiamin biosynthetic gene in *Arabidopsis thaliana*, complements bacterial defects in DNA repair. *Plant Mol. Biol.*, 1996; 31: 585–593
- [100] Makarchikov A.F., Brans A., Bettendorff L.: Thiamin diphosphate adenylyl transferase form *E. coli*: functional characterization of the enzyme synthesizing adenosine thiamin triphosphate. *BMC Biochem.*, 2007; 8: 17
- [101] Makarchikov A.F., Lakaye B., Gulyai I.E., Czerniecki J., Coumans B., Wins P., Grisar T., Bettendorff L.: Thiamine triphosphate and thiamine triphosphatase activities: from bacteria to mammals. *CMLS Cell. Mol. Life Sci.*, 2003; 60: 1477–1488
- [102] Makarchikov A.F., Wins P., Janssen E., Wieringa B., Grisar T., Bettendorff L.: Adenyl kinase 1 knockout mice have normal thiamin triphosphate levels. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1592: 117–121
- [103] Malamy J., Sanchez Casas P., Hennig J., Guo A.L., Klessig D.F.: Dissection of the salicylic acid signaling pathway in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1996; 9: 474–482
- [104] Malandrinos G., Louloudi M., Hadjilias N.: Thiamine models and perspectives on the mechanism of action of thiamine-dependent enzymes. *Chem. Soc. Rev.*, 2006; 35: 684–692
- [105] Małecka S.A., Popławski K., Bilski B.: Profilaktyczne i terapeutyczne zastosowanie tiaminy (witaminy B<sub>1</sub>) – nowe spojrzenie na stary lek. *Wiad. Lek.*, 2006; 59: 383–387
- [106] Mann S., Perez Melero C., Hawsley D., Lepper F.J.: Inhibition of thiamin diphosphate dependent enzymes by 3-deazathiamin diphosphate. *Org. Biomol. Chem.*, 2004; 2: 1732–1741
- [107] Marobbio C.M., Vozza A., Harding M., Bissaccia F., Palmieri F., Walker J.E.: Identification and reconstruction of the yeasts mitochondrial transporter for thiamine pyrophosphate. *EMBO J.*, 2002; 21: 5653–5661
- [108] McCourt J.A., Pang S.S., King-Scott J., Guddat L.W., Duggleby R.G.: Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetoxyhydroxyacid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 569–573
- [109] Miyoshi K., Egi Y., Shioda T., Kawasaki T.: Evidence for *in vivo* synthesis of thiamin triphosphate by cytosolic adenylyl kinase in chicken skeletal muscle. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1990; 108: 267–270
- [110] Mueller C., Schwender J., Zeidler J., Lichtenthaler H.K.: Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.*, 2000; 28: 792–793
- [111] Murata K.: Actions of two types of thiaminase on thiamin and its analogues. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1982; 378: 146–156
- [112] Nakai T., Nakagawa N., Maoka N., Masui R., Kuramitsu S., Kamiya N.: Ligand-induced conformational changes and a reaction intermediate in branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase (E1) from *Thermus thermophilus* HB8, as revealed by X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.*, 2004; 337: 1011–1033
- [113] Navarro D., Zwingmann C., Butterworth R.F.: Region-selective alterations of glucose oxidation and amino acid synthesis in the thiamine-deficient rat brain: a re-evaluation using <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Neurochem.*, 2008; 106: 603–612
- [114] Neumann P., Weidner A., Pech A., Stubbs M.T., Tittmann K.: Structure basis of membrane binding and catalytic activation of the peripheral membrane enzyme pyruvate oxidase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 17390–17395
- [115] Nghiem H.O., Bettendorff L., Changeux J.P.: Specific phosphorylation of Torpedo 43K rapsyn by endogenous kinase(s) with thiamine triphosphate as the phosphate donor. *FASEB J.*, 2000; 14: 543–554
- [116] Niebisch A., Kabus A., Schultz C., Weil B., Bott M.: Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 12300–12307
- [117] Nosaka K., Nishimura H., Kawasaki J., Tsujihara T., Iwashima A.: Isolation and characterization of the *TH16* gene encoding a bifunctional thiamin-phosphate pyrophosphorylase/hydroxyethylthiazole kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 30510–30516
- [118] Onozuka M., Konno H., Kawasaki Y., Akaji K., Nosaka K.: Involvement of thiaminase II encoded by the *THI20* gene in thiamin salvage of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 2008; 8: 266–275
- [119] Onozuka M., Nosaka K.: Steady-state kinetics and mutational studies of recombinant human thiamin pyrophosphokinase. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 2003; 49: 156–162
- [120] Pang S.S., Duggleby R.G., Guddat L.W.: Crystal structure of yeast acetoxyhydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. *J. Mol. Biol.*, 2002; 317: 249–262
- [121] Pang S.S., Duggleby R.G., Showen R.L., Guddat L.W.: The crystal structures of *Klebsiella pneumoniae* acetolactate synthase with enzyme-bound cofactor and with an unusual intermediate. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 2242–2253
- [122] Peppersack T., Garbusinski J., Robberecht J., Beyer I., Willems D., Fuss M.: Clinical relevance of thiamine status amongst hospitalized elderly patients. *Gerontology*, 1999; 45: 96–101
- [123] Pohl M., Lingen B., Müller M.: Thiamin-diphosphate-dependent enzymes: new aspects of asymmetric C-C bond formation. *Chemistry*, 2002; 8: 5288–5295
- [124] Pohl M., Sprenger G.A., Müller M.: A new perspective on thiamine catalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2004; 15: 335–342
- [125] Polovnikova E.S., Mc Leish M.J., Sergienko E.A., Burgner J. T., Anderson N.L., Bera A.K., Jordan F., Kenyon G.L., Hasson M.S.: Structural and kinetic analysis of catalysis by a thiamin diphosphate-dependent enzyme, benzoylformate decarboxylase. *Biochemistry*, 2003; 42: 1820–1830
- [126] Ragsdale S.W.: Pyruvate ferredoxin oxidoreductase and its radical intermediate. *Chem. Rev.*, 2003; 103: 2333–2346

- [127] Raïs B., Comin B., Puigjaner J., Brandes J.L., Creppy E., Saboureau D., Ennamany R., Lee W.P., Boros L.G., Cascante M.: Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cells through inhibition of the pentose cycle. *FEBS Lett.*, 1999; 456: 113–118
- [128] Rapala-Kozik M., Golda A., Kujda M.: Enzymes that control the thiamine diphosphate pool in plant tissues. Properties of thiamine pyrophosphokinase and thiamine-(di)phosphate phosphatase purified from *Zea mays* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.*, 2009; 47: 237–242
- [129] Rapala-Kozik M., Kowalska E., Ostrowska K.: Modulation of thiamine metabolism in *Zea mays* seedlings under conditions of abiotic stress. *J. Exp. Bot.*, 2008; 59: 4133–4143
- [130] Rapala-Kozik M., Olczak M., Ostrowska K., Starosta A., Kozik A.: Molecular characterization of the thi3 gene involved in thiamine biosynthesis in *Zea Mays*: cDNA sequence and enzymatic and structural properties of the recombinant bifunctional protein with 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine (phosphate) kinase and thiamine monophosphate synthase activities. *Biochem. J.*, 2007; 408: 149–159
- [131] Raschke M., Burkle L., Muller N., Nunes-Nesi A., Fernie A.R., Arigoni D., Amrhein N., Fitzpatrick T.B.: Vitamin B1 biosynthesis in plant requires the essential iron sulfur cluster protein, THIC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 19637–19642
- [132] Rathinam T., Chapman H.D.: Sensitivity of isolates of *Eimeria* from turkey flocks to the anticoccidial drugs amprolium, clopidol, diclazuril, and monensin. *Avian Dis.*, 2009; 53: 405–408
- [133] Reddy S.Y., Pullakhandam R., Dinesh Kumar B.: Thiamine reduces tissue lead levels in rats: mechanism of interaction. *Biometals*, 2010; 23: 247–253
- [134] Ribeiro A., Prakekelt U., Akkermans A.D., Meacock P.A., van Kammen A., Bisseling T., Pawlowski K.: Identification of agth1, whose product is involved in the biosynthesis of the thiamine precursor thiazole, in actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*. *Plant J.*, 1996; 10: 361–368
- [135] Rindi G., Patrini C., Nauti A., Bellazzi R., Magni P.: Three thiamine analogues differently alter thiamine transport and metabolism in nervous tissue: an *in vivo* kinetic study using rats. *Metab. Brain Dis.*, 2003; 18: 245–263
- [136] Rodinov D., Vitreschak A., Mironov A., Glefand M.: Comparative genomics of thiamine biosynthesis in prokaryotes. New genes and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 48949–48959
- [137] Ruff M.D., Garcia R., Chute M.B., Tamas T.: Effect of amprolium on production, sporulation, and infectivity of *Eimeria* oocysts. *Avian Dis.*, 1993; 37: 988–992
- [138] Said H.M., Balamurugan K., Subramanian V.S., Marchant J.S.: Expression and functional contribution of hTHTR-2 in thiamin absorption in human intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2004; 286: G491–G498
- [139] Sanchez-Gonzalez M., Rosazza J.P.: Mixed aromatic acyloln condensations with recombinant benzaldehyde lyase: synthesis of  $\alpha$ -hydroxydihydrochalcones and related  $\alpha$ -hydroxyketones. *Adv. Synth. Catal.*, 2003; 345: 819–824
- [140] Schenk G., Duggleby R.G., Nixon P.F.: Properties and function of the thiamin diphosphate dependent enzymes transketolase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1998; 30: 1297–1318
- [141] Schorken U., Sprenger G.A.: Thiamine – dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1385: 229–243
- [142] Schultz C., Niebisch A., Gebel L.: Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007; 76: 691–700
- [143] Schürmann M., Sprenger G.A.: Fructose 6-phosphate aldolase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Escherichia coli* as tools in enzymatic synthesis of 1-deoxysugars. *J. Molec. Catal. B-Enzymatic*, 2002; 19: 247–252
- [144] Schütz A., Golbik R., Tittmann K., Svergun D.I., Koch M.H., Hübner G., König S.: Studied on structure-function relationships of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, a key enzyme of the indole acetic acid pathway. *Eur. J. Biochem.*, 2003; 270: 2322–2331
- [145] Schütz A., Sandalova T., Ricagno S., Hübner G., König S., Schneider G.: Crystal structure of thiamindiphosphate-dependent indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.*, 2003; 270: 2312–2321
- [146] Seo J.G., Park S.W., Park H., Kim S.Y., Ro Y.T., Kim E., Cho J.W., Kim Y.M.: Cloning, characterization and expression of a gene encoding dihydroxyacetone synthase in *Mycobacterium sp.* strain JCI DSM 3803. *Microbiology*, 2007; 153: 4174–4182
- [147] Serganov A., Polanskaia A., Phan A.T., Breaker R.R., Patel D.J.: Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature*, 2006; 441: 1167–1171
- [148] Sevostyanova I.A., Solovieva O.N., Kochetov G.A.: A hitherto unknown transketolase-catalyzed reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 313: 771–774
- [149] Shimon I., Almog S., Vered Z., Seligmann H., Shefi M., Peleg E., Rosenthal T., Motro M., Halkin H., Ezra D.: Improved left ventricular function after thiamine supplementation in patients with congestive heart failure receiving long-term furosemide therapy. *Am. J. Med.*, 1995; 98: 485–490
- [150] Squadrone S., Mauro C., Ferro G.L., Amato G., Abete M.C.: Determination of amprolium in feed by a liquid chromatography – mass spectrometry method. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008; 48: 1457–1461
- [151] Stivers J., Washabaugh M.W.: Catalysis of acetoin formation by brewer's yeast pyruvate decarboxylase isozymes. *Biochemistry*, 1993; 32: 13472–13482
- [152] Strumiło S.: Often ignored facts about the control of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *BAMBED*, 2005; 33: 284–287
- [153] Strumiło S.: Short-term regulation of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by energy-linked and some other effectors. *Biochemistry (Moscow)*, 2005; 70: 726–729
- [154] Strumiło S.: Short-term regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Acta Biochim. Pol.*, 2005; 52: 759–764
- [155] Strumiło S., Czerniecki J., Dobrzyń P.: Regulatory effect of thiamine pyrophosphate on pig heart pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999; 256: 341–343
- [156] Strumiło S.A., Czygier M., Markiewicz J.: Different extent of inhibition of pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase both containing endogenous thiamine pyrophosphate, by some anticenzyme analogues. *J. Enzyme Inhib.*, 1995; 10: 65–72
- [157] Strumiło S.A., Senkevich S.B., Vinogradov V.V.: Effect of oxythiamine on adrenal thiamine pyrophosphate-dependent enzyme activities. *Biomed. Biochim. Acta*, 1984; 43: 159–163
- [158] Sudarsan N., Cohen-Chalamish S., Nakamura S., Emilson G.M., Breaker R.R.: Thiamine pyrophosphate riboswitches are targets for antimicrobial compounds pyrithiamine. *Chem. Biol.*, 2005; 12: 1325–1335
- [159] Suter P.M., Haller J., Hany A., Vetter W.: Diuretic use: a risk for subclinical thiamine deficiency in elderly patients. *J. Nutr. Health. Aging*, 2000; 4: 69–71
- [160] Taylor S.V., Kelleher N.L., Kinsland C., Chiu H.J., Costello C.A., Backstorm A.D., McLafferty F.W., Begley T.P.: Thiamin biosynthesis in *Escherichia coli*. Identification of ThiS thiocarboxylate as the immediate sulfur donor in the thiazole formation. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 16555–16560
- [161] Thauer R.K., Jungermann K., Decker K.: Energy-conservation in hemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 1977; 41: 100–180
- [162] Thomas A.A., Le Huerou Y., De Meese J., Gunawardana I., Kaplan T., Romoff T.T., Gonzales S.S., Condroski K., Boyd S.A., Ballard J., Bernat B., DeWolf W., Han M., Lee P., Lemieux C., Pedersen R., Phenegeer J., Poch G., Smith D., Sullivan F., Weiler S., Wright S.K., Lin J., Brandhuber B., Vigers G.: Synthesis, *in vitro* and *in vivo* activity of thiamine antagonist transketolase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008; 18: 2206–2210
- [163] Thore S., Frick C., Ban N.: Structural basis of thiamine pyrophosphate analogues binding to the eukaryotic riboswitch. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008; 130: 8116–8117
- [164] Thornalley P.J.: The potential role of thiamine (vitamin B1) in diabetic complications. *Curr. Diabetes Rev.*, 2005; 1: 287–298
- [165] Tittmann K.: Reaction mechanisms of thiamin diphosphate enzymes: redox reactions. *FEBS J.*, 2009; 276: 2454–2468
- [166] Tittmann K., Golbik R., Ghisla S., Hubner G.: Mechanism of elementary catalytic step of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *Biochemistry*, 2000; 39: 10747–10757
- [167] Tohsé N., Houzen H., Kanno M.: Inhibition of the delayed rectifier K current in guinea-pig cardiomyocytes by thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1998; 375: 540–547
- [168] Tood K., Butterworth R.: Mechanism of selective neuronal cell death due to thiamine deficiency. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1999; 893: 404–411

- [169] Townsend C.A.: New reactions in clavulanic acid biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2002; 6: 583–589
- [170] Tunc-Ozdemir M., Miller G., Song L., Kim J., Sodek A., Koussevitzky S., Misra A.N., Mittler R., Shintani D.: Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 2009; 151: 421–432
- [171] Tylicki A., Bunik V.I., Strumiło S.: Kompleks dehydrogenazy 2-okso-glutaranowej i jego wielopłaszczyznowa regulacja. *Postępy Bioch.*, 2011 (w druku)
- [172] Tylicki A., Czerniecki J., Dobrzyń P., Matanowska A., Olechno A., Strumiło S.: Modification of thiamine pyrophosphate dependent enzyme activity by oxythiamine in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Can. J. Microbiol.*, 2005; 51: 833–839
- [173] Tylicki A., Lempicka A., Romaniuk-Demonchaux K., Czerniecki J., Dobrzyń P., Strumiło S.: Effect of oxythiamin on growth rate, survival ability and pyruvate decarboxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Basic Microbiol.*, 2003; 43: 522–529
- [174] Volvert M.L., Seyen S., Piette M., Evrard B., Gangolf M., Plumier J.C., Betendorff L.: Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives. *BMC Pharmacol.*, 2008; 8: 10
- [175] Vorhees C.V., Schmidt D.E., Barrett R.J., Schenker S.: Effects of thiamine deficiency on acetylcholine levels and utilization *in vivo* in rat brain. *J. Nutr.*, 1977; 107: 1902–1908
- [176] Voskoboyev A.I., Chernikevich I.P., Luchko V.S.: Studies on thiamin diphosphate kinase (EC 2.7.4.15) from brewer's yeast: purification and some properties. *Biomed. Biochem. Acta*, 1987; 46: 3–13
- [177] Vuralhan Z., Morais M.A., Tai S.L., Piper M.D., Pronk J.T.: Identification and characterisation of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003; 69: 4534–4541
- [178] Wachter A., Tunc-Ozdemir M., Grove B.C., Green P.J., Shintani D.K., Breaker R.R.: Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs. *Plant Cell.*, 2007; 19: 3437–3450
- [179] Wang C., Liang J., Zhang C., Bi Y., Shi X., Shi Q.: Effect of ascorbic acid and thiamin supplementation at different concentrations on lead toxicity in liver. *Ann. Occup. Hyg.*, 2007; 51: 563–569
- [180] Wang G., Ding X., Yuan M., Qiu D., Li X., Xu C., Wang S.: Dual function of rice OsDR8 gene in disease resistance and thiamin accumulation. *Plant Mol. Biol.*, 2006; 60: 437–449
- [181] Webb M.E., Marquet A., Mendel R.R., Rebeille F., Smith A.G.: Elucidating biosynthesis pathways for vitamins and cofactors. *Nat. Prod. Rep.*, 2007; 24: 988–1008
- [182] Webster M.J., Scheett T.P., Doyle M.R., Branz M.: The effect of a thiamin derivative on exercise performance. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 1997; 75: 520–524
- [183] Wen N., Chu Z., Wang S.: Three types of defense-responsive genes are involved in resistance to bacterial blight and fungal blast diseases in rice. *Mol. Genet. Genomics*, 2003; 269: 331–339
- [184] Wilcox C.S.: Do diuretics cause thiamine deficiency? *J. Lab. Clin. Med.*, 1999; 134: 192–193
- [185] Wittorf J., Gubler C.: Coenzyme binding in yeast pyruvate decarboxylase. Kinetic studies with thiamine diphosphate analogues. *Eur. J. Biochem.*, 1971; 22: 544–550
- [186] Woley D.W.: Pyrithiamine and neopyrithiamine. *J. Am. Chem. Soc.*, 1950; 72: 5763–5765
- [187] Wuest H.M.: The history of thiamine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1962; 98: 385–400
- [188] Xiang S., Usunow G., Lange G., Bush M., Tong L.: Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase, a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 2676–2682
- [189] Zenuk C., Healey J., Donnelly J., Vaillancourt R., Almalki Y., Smith S.: Thiamine deficiency in congestive heart failure patients receiving long term furosemide therapy. *Can. J. Clin Pharmacol.*, 2003; 10: 184–188
- [190] Zhang G., Dai J., Lu Z., Dunaway-Mariano D.: The phosphonopyruvate decarboxylase from *Bacterioides fragilis*. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 41302–41308
- [191] Zhao J., Zhong C.J.: A review on research progress of transketolase. *Neurosci. Bull.*, 2009; 25: 94–99
- [192] Zhao R., Gao F., Goldman I.D.: Reduced folate carrier transports thiamin monophosphate: an alternative route for thiamin delivery into mammalian cell. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2002; 282: C1512–C1517
- [193] Ziółkowska G., Tokarzewski S., Strumiło S., Tylicki A.: Antifungal efficacy of oxythiamine – antivitamin derivative of vitamin B1. *Annales UMCS Sectio DD*, 2006; 51: 69–73

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.