

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.152.3

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАСТВОРИМОЙ НУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТАЗЫ ИЗ ПОЧЕК БЫКА

В. Ф. СИВУК¹, И. М. РУСИНА², Т. А. ЛУЧКО¹, А. Ф. МАКАРЧИКОВ^{1,2}

¹ГУ НПЦ “Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси”, Гродно;
e-mail: office@biochem.unibel.by;

²Гродненский государственный аграрный университет, Беларусь

Из почек быка выделена и частично очищена растворимая нуклеозидтрифосфатаза (НТР-аза), отличающаяся по ряду свойств от известных белков с НТР-азной активностью. Энзим проявляет максимальную активность при рН 7,5, он абсолютно зависим от ионов двухвалентных металлов и по данным гель-хроматографии имеет молекулярную массу 60 кДа. НТР-аза подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен в исследованном диапазоне концентраций субстрата 45–440 мкМ, при этом значение кажущейся K_m для инозинтрифосфата составляет 23,3 мкМ. Исследованный энзим обладает широкой субстратной специфичностью, катализируя гидролиз различных нуклеозид-5'-три- и дифосфатов.

Ключевые слова: нуклеозидтрифосфатаза, субстратная специфичность, кинетические свойства, почки быка.

Нуклеозидтрифосфатаза (НТР-аза, КФ 3.6.1.15) объединяет гетерогенную группу энзимов эукариотного, прокариотного и вирусного происхождения. В эукариотных организмах к представителям данной группы относятся НТР-азы ядерной оболочки и матрикса [1], наружной оболочки хлоропластов [2], лизосом [3], митохондрий [4] и рибосом [5]. Мембраносвязанная НТР-аза выделена и очищена из клеток бактерии *Escherichia coli* [6]. Большинство НТР-аз, кодируемых геномами вирусов, представляют собой геликазы [7–9] или многофункциональные белки, обладающие дополнительно гуанилтрансферазной, метилтрансферазной, РНК-полимеразной или протеазной активностью [10, 11]. Существует также большое число энзимов с широкой субстратной специфичностью в отношении нуклеозидтрифосфатов, которые не относятся к НТР-азам. Это представители Р-, F-, V-типов мембраноассоциированных АТР-аз [12–16] и семейства апиразных белков (КФ 3.6.1.5), содержащих в своем составе консервативные гомологичные регионы АСРs [17, 18].

В настоящее время известно несколько растворимых энзимов эукариотного происхождения, обладающих НТР-азной активностью. Так, было показано, что в печени крысы содержатся цитозольные НТР-азы с молекулярной массой 125 и 65 кДа и рН-оптимумом

8,6–9,6 [19] и 4,0–4,5 соответственно [20]. Из сыворотки крови человека очищена металл-независимая НТР-аза с молекулярной массой 75 кДа и рН-оптимумом 3,0 [12]. Другая кислая НТР-аза, проявляющая максимальную активность при рН 5,0–5,5, выявлена в лизосомах клеток печени и почек крысы [3]. Очень мощная дитиолативируемая апираза присутствует в клетках простейшего паразита *Toxoplasma gondii*. Этот фермент локализован в цитозоле, имеет молекулярную массу 240–260 кДа и рН-оптимум 7,1–7,5 [21]. НТР-азной активностью также обладают механохимические АТР-азы цитоскелета – миозин (КФ 3.6.4.1), кинезин (КФ 3.6.4.4) и цитоплазматический динеин (КФ 3.6.4.2) [22, 23].

Ранее в почках быка нами были обнаружены две растворимые НТР-азы с молекулярной массой 146 и 60 кДа [13]. Цель настоящей работы – исследование субстратной специфичности и кинетических свойств частично очищенного энзима с более низкой молекулярной массой (60 кДа).

Материалы и методы

В работе использовали сефакрил S-200 («Pharmacia», Швеция), гидроксипатит («Fluka», Швейцария), ДЭАЭ-тойоперл 650М, тойоперл HW-60 («Toyo Soda Co», Япония), молселект G-75, альбумин из сыворотки чело-

века (ЧСА), α -химотрипсиноген, гемоглобин, пируваткиназа, лактатдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа, нуклеозидфосфаты («Reanal», Венгрия), овальбумин, миоглобин («Serva», Германия), цитохром *c* («Sigma», США), остальные реагенты производства «Реахим» (Россия). Дополнительную очистку нуклеозидфосфатов проводили методом ионообменной хроматографии на колонке ($\varnothing 2,8 \times 20$ см) с сервацелом ДЭАЭ-32 («Reanal»).

NTP-азную активность измеряли по скорости образования неорганического фосфата (P_i). Стандартная реакционная смесь содержала 50 мМ трис-НСI-буфер (рН 7,5); 10 мМ $MgCl_2$; 0,5 мМ инозинтрифосфат (ИТР); 50 мкг ЧСА и исследуемый образец белка в объеме 0,2 мл. Реакцию осуществляли при 37 °С в течение 10–30 мин и останавливали добавлением 1,5 мл реагента для определения P_i в соответствии с методом [24]. За единицу активности (ед. акт.) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль P_i за 1 мин в стандартных условиях опыта. Удельную активность выражали в ед. акт. \cdot мг⁻¹ белка.

Молекулярную массу и радиус Стокса (r_h) NTP-азы определяли методом гель-фильтрации на откалиброванной белками-стандартами колонке ($\varnothing 2,2 \times 46$ см) с сефакрилом S-200, уравновешенной 20 мМ трис-НСI-буфером (рН 7,5), содержащим 0,1 М NaCl и 0,2 мМ ЭДТА. Свободный (V_0) и общий (V_t) объемы колонки измеряли по объемам элюции голубого декстрана 2000 и P_i соответственно. Коэффициенты распределения (K_{av}) белков-маркеров вычисляли из выражения $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, где V_e – объем элюции. Хроматографию частично очищенного препарата фермента осуществляли со скоростью потока 5 см \cdot ч⁻¹; значения M_r и r_h находили по графикам, построенным соответственно в координатах $\lg V_e/V_0 - \lg M_r$ и $r_h - (-\ln K_{av})^{1/2}$.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм или по методу [25], используя ЧСА в качестве стандарта.

Статистическую обработку данных осуществляли при помощи программы GraphPad Prism 3.0.

Результаты и обсуждение

Все операции по очистке энзима проводились в холодной комнате при 4–6 °С. Для выделения NTP-азы образец почек быка массой 600 г, хранившийся при -20 °С, гомогенизировали в двух объемах 50 мМ трис-НСI-буфера (рН 7,5), содержащего 0,15 М KCl и 1 мМ ЭДТА, в размельчителе тканей РТ-1 в течение

2 мин при 4000 г \cdot мин⁻¹. Затем полученный гомогенат центрифугировали 60 мин при 5000 г и фильтровали надосадочную жидкость через 16 слоев марли. К экстракту добавляли сульфат аммония до 35%-го насыщения и центрифугировали при 5000 г в течение 60 мин для удаления осадка. Супернатант пропускали со скоростью 20 см \cdot ч⁻¹ через колонку ($\varnothing 3,5 \times 17$ см) с тойоперлом HW-60, уравновешенную 20 мМ трис-НСI-буфером (рН 7,5), содержащим 50 мМ KCl, 0,2 мМ ЭДТА и сульфат аммония 35%-ного насыщения. Белок, не связавшийся с носителем, высаливали при 80%-ом насыщении и центрифугировали при 5000 г в течение 60 мин. Осадок растворяли в минимальном объеме 20 мМ трис-НСI-буфера (рН 7,5), содержащего 50 мМ KCl и 0,2 мМ ЭДТА, затем хроматографировали на колонке ($\varnothing 5,0 \times 136$ см) с молселектом G-75 в вышеназванном буфере со скоростью потока 9 см \cdot ч⁻¹. На данном этапе было обнаружено два пика NTP-азной активности, первый из которых вымывался во фракции свободного объема колонки, содержащей белки с молекулярной массой выше 80 кДа, а второй соответствовал интересующему нас энзиму. Фракции этого пика объединяли и наносили на колонку ($\varnothing 1,6 \times 19$ см) с ДЭАЭ-тойоперлом 650 М, уравновешенную тем же буфером. NTP-аза не связывалась с адсорбентом. Для ее дальнейшей очистки раствор пропускали через колонку ($\varnothing 1,6 \times 7,5$ см) с гидроксипатитом, уравновешенную 20 мМ К-фосфатным буфером (рН 7,2), и элюировали адсорбированный белок KCl с возрастающим линейным его градиентом от 50 до 450 мМ со скоростью 2,5 см \cdot ч⁻¹. Фракции с высокой удельной активностью, элюируемые из колонки при концентрации соли 400–430 мМ, объединяли, концентрировали с помощью центрифужных фильтров и хроматографировали на калиброванной белками-стандартами колонке ($\varnothing 2,2 \times 46$ см) с сефакрилом S-200 в 20 мМ трис-НСI-буфере (рН 7,5), содержащем 0,1 М NaCl, со скоростью потока 5 см \cdot ч⁻¹. Полученный частично очищенный препарат NTP-азы из почек быка имел удельную активность 30,3 Ед \cdot мг⁻¹, что в 252,5 раза превышает активность экстракта.

Из полученных результатов очистки (таблица) видно, что наиболее эффективным этапом в данном процессе является адсорбционная хроматография на гидроксипатите, в результате применения которой удельная активность возрастает по отношению к предыдущей стадии в 123,6 раза. Следует отметить, что причина снижения удельной активности NTP-

Поэтапная очистка нуклеозидтрифосфатазы, выделенной из почек быка

Стадия очистки	Объем, мл	Общий белок, мг	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед. · мг ⁻¹	Степень очистки, раз	Выход, %
Экстракт	1060	20818	2498	0,12	—	100
Тойоперл HW-60	900	16380	2457	0,15	1,25	98
Молселект G-75	250	3075	307,5	0,10	0,8	12
ДЭАЭ-тойоперл 650М	250	2100	294	0,14	1,2	12
Гидроксиапатит	15	3,0	53,4	17,8	148,3	2
Сефакрил S-200	5	0,7	21,0	30,3	252,5	1

азы в процессе гель-фильтрации на молселекте G-75 заключается не в инактивации исследуемого энзима, а в присутствии в почках быка нескольких растворимых белков с НТР-азной активностью. Действительно, как уже упоминалось, в процессе разделения компонентов сульфоаммонийного осадка по молекулярной массе было выявлено два пика НТР-азной активности, один из которых элюируется в свободном объеме колонки (предел исключения для молселекта G-75 — 80 кДа), а другой соответствует белку с молекулярной массой 60 кДа. При этом в интересующем нас втором пике локализуется ~ треть активности. Из полученных данных также очевидно, что исследуемая НТР-аза либо относится к категории основных белков, либо ее изоэлектрическая точка лежит в области нейтральных значений pH, поскольку при pH 7,5 исследуемый энзим не способен связываться с анионообменным адсорбентом. Об основной природе НТР-азы может свидетельствовать и ее поведение в процессе хроматографирования на гидроксиапатите. Этот энзим элюируется возрастающим градиентом KCl, что характерно для белков, несущих в условиях фракционирования положительный заряд, тогда как кислые белки при применении для элюции хлоридных солей, таких как KCl, NaCl или CaCl₂, остаются прочно адсорбированными [26].

При хроматографировании на калиброванной белками-маркерами колонке с сефакрилом S-200 (заключительный этап очистки) белок, обладающий НТР-азной активностью, выходит в виде единственного симметричного пика. Молекулярная масса энзима, рассчитанная исходя из его элюионного поведения, составляет 60,4 кДа, радиус Стокса — 3,2 нм (данные не представлены).

Влияние ионов водорода на активность НТР-азы исследовали в интервале pH от 6,0 до 10,0, используя в качестве буферных растворов

25 мМ малеат (pH 6,0), 50 мМ трис—25 мМ малеат (pH 6,5—7,0), 50 мМ трис-HCl (pH 7,5—9,0) и 50 мМ глицин (pH 9,5—10,0). Как видно на графике, изображенном на рис. 1, pH-оптимум энзима находится в области физиологических значений водородного показателя и составляет 7,5.

На рис. 2 в координатах Хейнса показана зависимость начальной скорости НТР-азной реакции от концентрации субстрата (ИТР) в диапазоне 45—440 мкМ. Линейный характер графика свидетельствует о том, что в заданных нами условиях (pH 7,5, 10 мМ Mg²⁺) НТР-аза подчиняется кинетике Михаэлиса—Ментен. Кажущаяся K_m , рассчитанная по уравнениям линейной регрессии для прямых в координатах Хейнса, составляет $23,3 \pm 6,7$ мкМ ($n = 4$).

Эксперименты с катионами двухвалентных металлов показали, что НТР-аза является металлотривалентным энзимом. При этом максимальная активность наблюдается при добавлении в реакционную среду ионов Mg²⁺. Из числа других исследованных катионов Co²⁺, Ca²⁺,

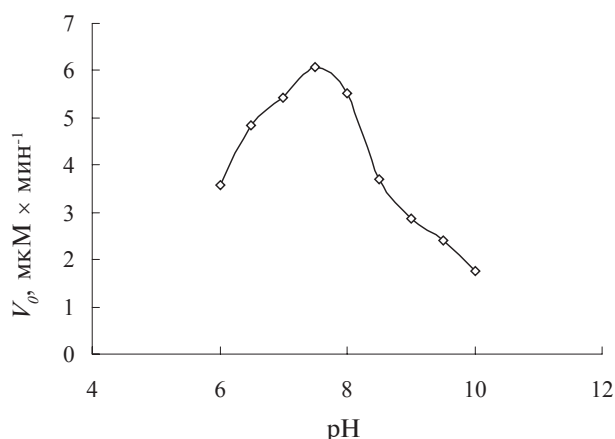


Рис. 1. Зависимость скорости нуклеозидтрифосфатной реакции от pH

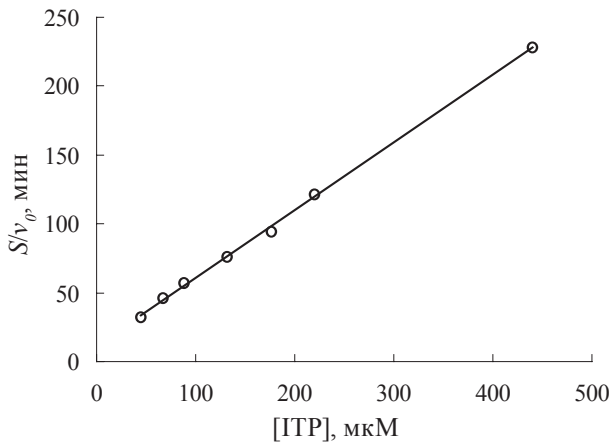


Рис. 2. Залежність початкової швидкості реакції, каталізуваної нуклеозидтрифосфатазою із почек бика, від концентрації ІТР в координатах Хейнса

Cu^{2+} і Zn^{2+} менше ефективні, а катіони Ba^{2+} не оказують помітного активуючого дії (рис. 3).

При вивченні субстратної специфічності встановлено, що НТР-аза з високою швидкістю каталізує гідроліз УТР, ІТР, СТР і ХТР, але не настільки ефективно по відношенню до ГТР. Швидкість гідролізу АТР становить лише 12% від максимальної активності, реєструваної в присутності УТР (рис. 4). На діаграмі видно, що фермент здатний здійснювати розщеплення як нуклеозидтрифосфатів, так і нуклеозиддифосфатів. Однак нуклеозидмонофосфати не є субстратами для даного білка. Таким чином, досліджувані фермент має апиразну активність.

Експериментальні дані, якими ми розпорядимося в даний час, не дозволяють

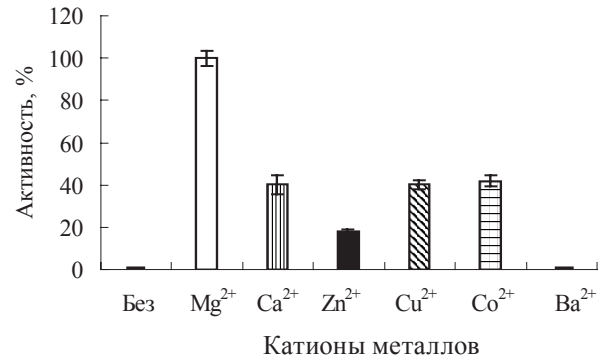


Рис. 3. Вплив катіонів двувалентних металів на активність нуклеозидтрифосфатази із почек бика

визначити на питання, чи є фермент із почек НТР-азою чи він належить до родини апираз. В зв'язі з цим необхідно зазначити, що існуюча нині номенклатура не завжди однозначна і зазвичай один і той же фермент може фігурувати під різними позначеннями. Так, наприклад, ізоформи апирази із клітин паразита *Toxoplasma gondii* також відомі як НТР-аза 1 і НТР-аза 3 [14]. Подібна ситуація продиктована головним чином обставиною, що в основі класифікації ферментів лежить тип каталізуваної реакції (реакційна і субстратна специфічність). В відповідності з цим принципом до НТР-азам відносять ферменти, здійснюють реакцію $\text{NTP} + \text{H}_2\text{O} = \text{NDP} + \text{фосфат}$, при цьому зазначається, що НТР-аза «також гідролізує інші нуклеозидтрифосфати, дифосфати...». Апираза – це фермент, каталізує реакцію $\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O} = \text{AMP} + 2 \text{фосфат}$, який «також діє на АДФ і на інші нуклеозидтрифосфати і дифосфати»

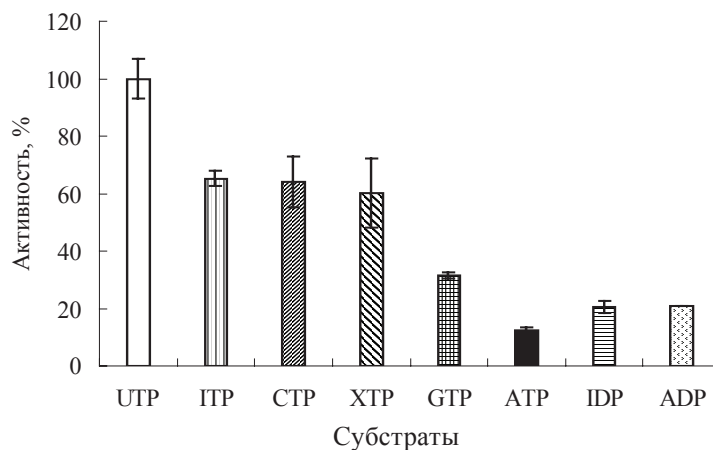


Рис. 4. Субстратна специфічність розчинимої нуклеозидтрифосфатази із почек бика

[27]. Здесь можно указать лишь на тот факт, что известны апиразы, для которых ни АТФ, ни АДФ субстратами не являются [28]. Вероятно, единственным и надежным признаком, позволяющим, обходя все эти двусмысленности и неопределенности, отнести тот или иной фермент к соответствующей группе, может служить информация об аминокислотных последовательностях. Как уже упоминалось, апиразное семейство характеризуется наличием консервативных участков, гомологичных АСР-регионам “классической” картофельной апиразы [17], и именно по этому признаку в категорию апираз теперь попадают многие энзимы, которые исходно считались NTP-азами [21, 29–31]. Однако какова бы ни была природа энзима, описанного нами, ни одна из известных NTP-аз или апираз животного, растительного или бактериального происхождения не обладает всей совокупностью присущих ему характеристик.

Энзимы с NTP-азной активностью вовлечены во многие процессы жизнедеятельности, принимая участие в двигательных процессах, ионном транспорте через мембраны, межклеточной коммуникации, репликации, репарации и рекомбинации ДНК, осуществлении вирусных репликационных циклов, а также могут выполнять некоторые специфические функции в различных типах клеток и отдельных организмах [14, 18, 21, 32–38]. Конечно же, пока еще рано пытаться ответить на вопрос о метаболической роли исследуемой NTP-азы. Тем не менее, исходя из данных о ее субстратной специфичности, нам представляется вероятным, что этот энзим, участвуя в регуляции метаболизма нуклеозид-5'-трифосфатов, мо-

жет иметь отношение к таким биохимическим процессам, как биосинтез активированных сахаров, фосфолипидов или глюконеогенез.

СУБСТРАТНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА КІНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ РОЗЧИННОЇ НУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТАЗИ З НИРОК БИКА

В. Ф. Сівук¹, І. М. Русіна², Т. О. Лучко¹,
О. Ф. Макарчиков^{1,2}

¹ГУ НПЦ “Інститут фармакології і
біохімії НАН Білорусі”, Гродно;
e-mail: office@biochem.unibel.by;

²Гродненський державний аграрний
університет, Білорусь

Із нирок бика виділено та очищено розчинну NTP-азу, яка відрізняється за низкою показників від відомих білків, які мають NTP-азну активність. Цей ензим виявляє максимальну активність при рН 7,5, що абсолютно залежить від наявності іонів двовалентних металів і за показниками гель-хроматографії його молекулярна маса складає 60 кДа. У дослідженому діапазоні концентрацій (45–440 мкМ) субстрата інозин-5'-трифосфату активність NTP-ази підпорядковується кінетиці Міхаеліса–Ментен, а показник уявної K_m для нього дорівнює 23,3 мкМ. Цей фермент має широку субстратну специфічність до каталізу гідролізу різних нуклеозид-5'-три- та дифосфатів.

Ключеві слова: нуклеозидтрифосфатаза, субстратна специфічність, кінетичні властивості, нирки бика.

SUBSTRATE SPECIFICITY AND KINETIC PROPERTIES OF A SOLUBLE NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATASE FROM BOVINE KIDNEYS

V. F. Sivuk¹, I. M. Rusina², T. A. Luchko¹,
A. F. Makarchikov^{1,2}

¹Institute of Pharmacology and Biochemistry,
National Academy of Sciences of Belarus, Grodno;
e-mail: office@biochem.unibel.by

²Grodno State Agricultural University, Belarus

S u m m a r y

Soluble nucleoside triphosphatase differing in its properties from all known proteins with NTPase activity was partially purified from bovine kidneys. The enzyme has pH optimum of 7.5, molecular mass of 60 kDa, as estimated by gel chromatography, and shows an absolute dependence on divalent metal ions. NTPase obeyed Michaelis-Menten kinetics in the range of substrate concentration tested from 45 to 440 μM; the apparent K_m for inosine-5'-triphosphate was calculated to be 23.3 μM. The enzyme was found to possess a broad substrate specificity, being capable of hydrolyzing various nucleoside-5'-tri- as well as diphosphates.

Key words: nucleoside triphosphatase, substrate specificity, kinetic properties, bovine kidney.

1. *Vorbrodt A., Maul G. G.* // J. Histochem. Cytochem. — 1980. — **28**. — P. 27–35.
2. *Mc Carty D. R., Selman B. R.* // Arch. Biochem. Biophys. — 1986. — **248**. — P. 523–531.
3. *Brightwell R., Tappel A. L.* // Ibid. — 1968. — **124**. — P. 333–343.
4. *Kalf G. F., Grece M. A.* // Biochemistry. — 1970. — **9**. — P. 4049–4056.
5. *Matsushita S., Raacke I. D.* // Biochem. Biophys. Acta. — 1968. — **166**. — P. 707–710.
6. *Nishimune T., Ito S., Abe M. et al.* // Ibid. — 1987. — **923**. — P. 74–82.
7. *Bruckner R. S., Crute J. J., Dodson M. S., Lehman I. R.* // J. Biol. Chem. — 1991. — **266**. — P. 2669–2674.
8. *Seki M., Enomoto T., Eki T. et al.* // Biochemistry. — 1990. — **29**. — P. 1003–1009.
9. *Shuman S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — **89**. — P. 10935–10939.
10. *Myette J. R., Niles E. G.* // J. Biol. Chem. — 1996. — **271**. — P. 11945–11952.
11. *Wengler G., Wengler G.* // Virology. — 1993. — **197**. — P. 265–273.
12. *Dahlmann N., Kirchgesser M.* // Biochem. Int. — 1990. — **20**. — P. 317–327.
13. *Makarchikov A. F., Chernikevich I. P.* // Biochem. Mol. Biol. Int. — 1998. — **46**. — P. 115–123.
14. *Nakaar V., Bermudes D., Peck K. R., Joiner K. A.* // Mol. Biochem. Parasitol. — 1998. — **92**. — P. 229–239.
15. *Sato J., Matsukawa R., Takiguchi H.* // Int. J. Biochem. — 1994. — **26**. — P. 905–911.
16. *Warren M., Smith J. A., Apps D. K.* // Biochim. Biophys. Acta. — 1992. — **1106**. — P. 117–125.
17. *Handa M., Guidotti G.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1996. — **218**. — P. 916–923.
18. *Zimmermann H.* // Prog. Neurobiol. — 1996. — **49**. — P. 589–618.
19. *Lewis M., Weissman S.* // Arch. Biochem. Biophys. — 1965. — **109**. — P. 490–498.
20. *Нарыжский С. Н., Крутяков В. М.* // Биохимия. — 1982. — **47**. — С. 569–574.
21. *Asai T., O'Sullivan J., Tatibana M.* // J. Biol. Chem. — 1983. — **258**. — P. 6816–6822.
22. *Kumar S., Lee I. H., Plamann M.* // Biochimie. — 2000. — **82**. — P. 229–236.
23. *See Y. P., Metzals J.* // J. Biol. Chem. — 1976. — **251**. — P. 7682–7689.
24. *Sapru M. K., Geetha H., Shetty T. K.* // Ind. J. Biochem. Biophys. — 1987. — **24**. — P. 340–343.
25. *Bradford M. M.* // Anal. Biochem. — 1976. — **72**. — P. 248–254.
26. *Bernardi G., Giro M. G., Gaillard C.* // Biochim. Biophys. Acta. — 1972. — **278**. — P. 409–420.
27. *Enzyme nomenclature* / www.expasy.ch
28. *Biederbick A., Kosan K., Kunz J., Elsasser H. P.* // J. Biol. Chem. — 2000. — **275**. — P. 19018–19024.
29. *Kegel B., Braun N., Heine P. et al.* // Neuropharmacology. — 1997. — **36**. — P. 1189–1200.
30. *Plesner L.* // Int. Rev. Cytol. — 1995. — **158**. — P. 141–214.
31. *Smith T. M., Kirley T. L.* // Biochim. Biophys. Acta. — 1998. — **1386**. — P. 65–78.
32. *Скулачев В. П.* Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии. — М.: Высш. школа, 1989. — 271 с.
33. *Brennan C. A., Dombroski A. J., Platt, T.* // Cell. — 1987. — **48**. — P. 945–952.
34. *Burnstock G.* // Neuropharmacology. — 1997. — **36**. — P. 1127–1139.
35. *Cerbon J., Olguin T.* // Microbios. — 1997. — **92**. — P. 157–170.
36. *Czaplinski K., Weng Y., Hagan K. W., Peltz S. W.* // RNA. — 1995. — **1**. — P. 610–623.
37. *Deng L., Shuman S.* // Genes Dev. — 1998. — **12**. — P. 538–546.
38. *Levin B.* Genes VII. — Oxford University Press, 2000. — 990 pp.

Получено 20.06.2007