

## ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ РАСТВОРИМОЙ НУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТАЗЫ (АПИРАЗЫ) ИЗ МОЗГА БЫКА

© 2008 г. В.Ф. Сивук<sup>1</sup>, И.М. Русина<sup>1,2</sup>, А.Ф. Макаrchиков<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория биохимической токсикологии и наркологии  
Института фармакологии и биохимии НАН Беларуси,  
230030 Гродно, Беларусь; факс: +375(152)434-121,  
электронная почта: office@biochem.unibel.by

<sup>2</sup>Инженерно-технологический факультет Гродненского  
государственного аграрного университета, 230008 Гродно,  
ул. Терешковой, 28, Беларусь; факс: +375(152)721-365,  
электронная почта: a\_makarchikov@yahoo.com

Поступила в редакцию 18.02.08  
После доработки 11.04.08

Из мозга быка очищена до гомогенного состояния растворимая нуклеозидтрифосфатаза (НТФаза), отличающаяся по своим свойствам от известных белков с НТФазной активностью. Фермент имеет рН-оптимум 7,5, проявляет абсолютную зависимость от катионов двухвалентных металлов и широкую субстратную специфичность по отношению к нуклеозид-5'-три- и дифосфатам, характерную для апираз. Установлено, что молекулярная масса фермента по данным гель-фильтрации и электрофореза в Ds-Na-ПААГ составляет 60 кДа и НТФаза локализована в цитозольной фракции и экспрессирована в различных органах и тканях быка. Обнаружено, что общая НТФазная активность экстрактов из органов и тканей быка уменьшается в следующем порядке: печень > сердце > скелетная мускулатура > легкое > мозг > селезенка > почка ≈ тонкий кишечник. Активность фермента может регулироваться ацетил-СоА, α-кетоглутаратом и фруктозо-1,6-дифосфатом, которые при физиологических концентрациях действуют как активаторы, тогда как пропионат обуславливает ингибирующий эффект.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** нуклеозидтрифосфатаза, апираза, очистка, кинетические свойства, специфичность, регуляция, субклеточная локализация, мозг быка.

Помимо универсальной аденилатной системы запасаения и трансформации энергии в биосинтетических путях и клеточной сигнализации участвует ряд других нуклеозид-5'-трифосфатов [1]. В биологических объектах наряду с АТРазами Р-, F-, V-типов и АТРазами цитоскелета обнаружено несколько различных фосфатаз, способных к гидролизу нуклеозид-5'-три- и дифосфатов. Одна из групп этих белков, классифицируемых как НТФазы, занимает в Списке ферментов порядковый номер 3.6.1.15. НТФаза объединяет ряд неродственных ферментов, кодируемых геномами эукариотных и прокариотных организмов, а также вирусов [2–4]. Было показано, что НТФазы локализованы в разных компартментах клетки и, по-видимому, участвуют в различных аспектах жизненной активности [5–8]. Тем не менее биологические функции большинства НТФаз эукариотного происхождения, за исключением фермента ядерной оболоч-

ки, не установлены. В настоящее время сведений о молекулярной структуре этих ферментов мало для того, чтобы отнести их к определенному белковому семейству. Например, некоторые фосфатазы, ранее относившиеся к НТФазам, подобно эктоапиразе [9] или НТФазе из *Toxoplasma gondii* [10], затем были идентифицированы как апиразы (КФ 3.6.1.5) на основании наличия у них апиразных консервативных мотивов [11].

В настоящей работе описаны очистка, кинетические и регуляторные свойства растворимой НТФазы, обнаруженной в мозге быка. Фермент имеет широкую субстратную специфичность по отношению к нуклеозид-5'-три- и дифосфатам, причем СТР – предпочтительный субстрат, и явно отличается от всех известных растворимых белков с НТФазной активностью. В отличие от другой растворимой НТФазы, экспрессируемой преимущественно в печени, почках и тонком кишечнике [12], исследуемый фермент широко распространен в тканях быка. Нами также по-

\* Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

казана цитозольная локализация НТФазы. Поскольку несопряженный гидролиз НТФ следует рассматривать как нежелательный процесс, мы предполагаем, основываясь на эффектах фруктозо-1,6-дифосфата, пропионата и ацетил-СоА, что данный фермент может участвовать в регуляции скорости глюконеогенеза посредством изменения локальных концентраций ГТР (ИТР) – субстратов фосфоенолпируваткарбоксикиназы.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы сефадекс G-100, сефакрил S-200 («Amersham», «Pharmacia Biotech», Финляндия); гидроксипатит («Fluka», Швейцария); ДЭАЭ-тойоперл 650 М, тойоперл HW-60 («Toyo Soda Co.», Япония); белки-стандарты («Serva», Германия); нуклеозидфосфаты, пируват, пропионат («Sigma-Aldrich GmbH», США); фруктозо-1,6-дифосфат, глюкозо-6-фосфат, оксалоацетат, фосфоенолпируват («Reanal», Венгрия); все остальные реагенты – аналитической квалификации.

НТФазную активность определяли по образованию  $P_i$ . Стандартная реакционная смесь содержала 50 мМ Tris-HCl-буфер, pH 7,0, 0,5 мМ UTP, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мкг БСА и образец фермента в конечном объеме 0,2 мл. Реакцию проводили при 37° в течение 10–30 мин и останавливали добавлением 1 мл реагента для определения  $P_i$  в соответствии с методом Ланцетта и др. [13]. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль  $P_i$  за 1 мин в стандартных условиях испытания.

Молекулярную массу фермента определяли методом электрофореза [14] и гель-фильтрации на калиброванной белками-стандартами колонке (2,2 × 46 см) с сефакрилом S-200. Электрофорез осуществляли в вертикальных пластинах 10%-ного ПААГ в фосфатной буферной системе с окраской кумасси бриллиантовым голубым R-250. Молекулярную массу денатурированной НТФазы рассчитывали по калибровочному графику, построенному с использованием белков-стандартов. Гель-фильтрацию проводили при 4° в 20 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7,5, содержащем 0,1 М NaCl. Образцы наносили на колонку в объеме 3 мл и элюировали при скорости потока 5 см/ч.

В целях исследования тканевого распределения НТФазы образцы органов быка, хранившиеся при –20°, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в четырех объемах 50 мМ Tris-HCl-буфера, pH 7,3, содержащего 0,15 М KCl, 0,2 мМ ЭДТА, и центрифугировали при 105 000

g в течение 90 мин. Эритроциты выделяли из крови, разведенной 5%-ным натрий-цитратным буфером (pH 6,0) в соотношении 4 : 1. Красные кровяные клетки дважды отмывали в трех объемах изотонического раствора NaCl, разрушали замораживанием-оттаиванием. Затем удаляли мембраны высокоскоростным центрифугированием. Для определения молекулярных масс, соответствующих пикам НТФазной активности, экстракты хроматографировали на колонке с сефакрилом S-200, как описано выше.

Для выделения субклеточных фракций образцы свежей ткани мозга гомогенизировали 10 циклами в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком при 600 об/мин в девяти объемах 10 мМ Tris-HCl-буфера, pH 7,4, содержащего 0,32 М сахарозу и 0,5 мМ ЭДТА. Гомогенат фильтровали через восемь слоев влажной марли и подвергали дифференциальному центрифугированию в целях получения ядерной (1000 g, 10 мин), митохондриальной (10 000 g, 20 мин), микросомальной (105 000 g, 60 мин) и цитозольной (конечный супернатант) фракций. Каждый осадок дважды промывали средой выделения. Часть осадков суспендировали в 50 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7,3, содержащем 0,15 М KCl, 0,2 мМ ЭДТА, и замораживали при –20°. Затем оттаявшие суспензии гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе и центрифугировали при 105 000 g в течение 60 мин для разделения мембранной и растворимой фракций. Перед определением НТФазной активности осадки суспендировали в исходном буфере, содержащем 0,32 М сахарозу.

Белок определяли методом Брэдфорд [15] с БСА в качестве стандарта и по поглощению при 280 или 215/225 нм [16].

Очистку НТФазы проводили при 4–6°. Образец мозга быка массой 200 г, хранившийся при –80°, размораживали и гомогенизировали в 400 мл 50 мМ Tris-HCl-буфера (pH 7,4), содержащего 0,15 М KCl и 1 мМ ЭДТА, в размельчителе тканей РТ-1 при 4 000 об/мин в течение 2 мин. Полученный гомогенат центрифугировали 60 мин при 5000 g. Надосадочную жидкость фильтровали через 10 слоев влажной марли, доводили pH до 7,4 1 М Tris-HCl-буфером (pH 8,9) и добавляли (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до 35%-ного насыщения (208,4 г/л). После перемешивания в течение 30 мин осадок удаляли центрифугированием при 5000 g в течение 60 мин. Супернатант пропускали через колонку (3,4 × 19 см) с тойоперлом HW-60, уравновешенную 20 мМ Tris-HCl-буфером (pH 7,5), содержащим 50 мМ KCl, 0,2 мМ ЭДТА и (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (35% насыщения), при скорости потока 10 см/ч. Колонку промывали четырьмя объемами буфера, и элюировали адсорбирован-

ный белок линейным понижающимся градиентом  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (по 250 мл в камере) от 35% насыщения до нуля в том же буфере со скоростью 10 см/ч. Фракции с удельной активностью фермента, которая была в 10–15 раз выше таковой в предыдущей стадии, объединяли, осаждали  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (390 г/л). Осадок растворяли в 20 мМ Tris-HCl-буфере (рН 7,5), содержащем 50 мМ KCl, 0,2 мМ ЭДТА, и хроматографировали на колонке (3,6 × 67 см) с сефадексом G-100 со скоростью потока 9 см/ч. Фракции, удельная активность которых возрастала в 3–4 раза, объединяли, добавляли глицерин до 20%-ной концентрации. Затем белковый раствор наносили на колонку (1,5 × 19 см) с ДЭАЭ-тойоперлом 650 М, уравновешенным 20 мМ Tris-HCl-буфером (рН 7,5), содержащим 0,2 мМ ЭДТА, 50 мМ KCl и 20%-ный глицерин. Связавшийся с носителем белок элюировали линейным повышающимся градиентом KCl (по 150 мл в камере) от 50 до 400 мМ со скоростью 10 см/ч. Фракции, выходящие из колонки при концентрации соли 78–96 мМ, объединяли и наносили на колонку (1,7 × 7,5 см) с гидроксиапатитом, уравновешенным 1 мМ К-фосфатным буфером (рН 7,2). Примесные белки элюировали линейным повышающимся градиентом KCl (по 100 мл в камере) от 0 до 0,5 М. Десорбцию НТФазы проводили линейным повышающимся градиентом (по 100 мл в камере) К-фосфатного буфера (рН 7,2) от 1 до 300 мМ со скоростью потока 5 см/ч. Фракции с высокой удельной активностью, вышедшие из колонки при концентрации К-фосфатного буфера 135–160 мМ, объединяли, концентрировали с помощью центрифужных фильтров Centriplus 10 («Amicon Inc.», США) и хроматографировали на колонке (2,2 × 46 см) с сефакрилом S-200 в 20 мМ Tris-HCl-буфере (рН 7,5), содержащем 0,1 мМ NaCl и 0,2 мМ ЭДТА, со скоростью 5 см/ч. На заключительном этапе очистки сконцентрированные фракции наносили на колонку (0,8 × 3,0 см) с голубой сефарозой, уравновешенной 20 мМ Tris-HCl-буфером (рН 7,5), содержащим 0,2 мМ ЭДТА и 50 мМ NaCl. Адсорбированный белок элюировали линейным повышающимся градиентом рН (от 7,5 до 8,5) и глицерина (от 0 до 40%) (по 20 мл в камере). Фракции с одинаковой удельной активностью объединяли, концентрировали до объема 0,5 мл, замораживали и использовали для анализа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученный после очистки препарат фермента имел удельную активность 639 Е/мг, что в 4915 раз выше, чем в экстракте (табл. 1). В про-

Таблица 1. Очистка НТФазы из мозга быка

Препарат	Объем, мл	Общий белок, мг	Удельная активность, Е/мг
Экстракт	385	4080	0,13
Тойоперл HW-60	100	336	1,7
Сефадекс G-100	35	63,0	6,1
ДЭАЭ-Тойоперл 650 М	15	24,6	14,8
Гидроксиапатит	3	3,4	69
Сефакрил S-200	5	1,0	211
Голубая сефароза	0,5	0,07	639

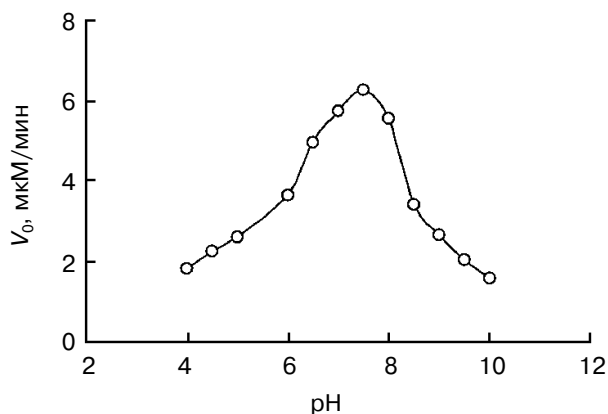
цессе гель-фильтрации на колонке с сефакрилом S-200 (предпоследняя стадия очистки) НТФаза из мозга быка элюировалась в виде симметричного пика активности, соответствовавшего белку с молекулярной массой 58,6 кДа. При электрофорезе очищенного фермента в ПААГ в присутствии Ds-Na была выявлена одна белковая полоса, соответствовавшая массе 60,2 кДа (данные не показаны).

**Кинетические свойства и субстратная специфичность НТФазы.** Влияние концентрации ионов водорода на НТФазную активность исследовали при рН от 4,0 до 10,5, проводя реакцию в стандартных условиях, за исключением того, что для поддержания рН были использованы ацетатный (20 мМ, рН 4,0–5,5), малеатный (25 мМ, рН 6,0–6,5), Tris-малеатный (50 мМ, рН 7,0), Tris-HCl (50 мМ, рН 7,5–8,9) или глициновый (50 мМ, рН 9,2–10,5) буферы. Из рисунка следует, что фермент имеет рН-оптимум 7,5.

НТФаза не проявляла активности в отсутствие ионов двухвалентных металлов. Как показано в табл. 2, среди исследованных катионов максимальным активирующим свойством обладает  $\text{Mg}^{2+}$ . Катионы других металлов, такие как  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ , менее эффективны; ионы  $\text{Ba}^{2+}$  не способны активировать фермент.

В табл. 3 приведены данные по субстратной специфичности НТФазы. Как видно, фермент катализирует гидролиз широкого спектра нуклеозид-5'-три- и дифосфатов, причем СТР является предпочтительным субстратом. При тестировании в качестве субстратов нуклеозид-5'-монофосфатов, таких как UMP и IMP, количество высвобождающегося  $\text{P}_i$  составило <10% по сравнению с СТР, тогда как с GMP, AMP и CMP реакция не протекала.

Нами исследовано влияние возрастающих концентраций субстрата на начальную скорость



Влияние pH на активность НТФазы из мозга быка

НТФазной реакции при фиксированной 10 мМ концентрации ионов  $Mg^{2+}$ . В качестве субстратов были использованы СТР, УТР, ИТР, ГТР, АТР и СДР. Во всех случаях в исследованных диапазонах концентраций реакция соответствовала кинетике Михаэлиса–Ментен, за исключением УТР, увеличение концентрации которого до 0,6 мМ вызывало частичное ингибирование фермента. Значения  $K_m$  каж., рассчитанные по графикам Хейнса, составили  $150 \pm 20$ ,  $86 \pm 2$ ,  $25 \pm 1$ ,  $41 \pm 3$ ,  $260 \pm 30$  и  $500 \pm 40$  мкМ соответственно для СТР, УТР, ИТР, ГТР, АТР и СДР (данные не показаны).

**Влияние различных соединений на активность НТФазы.** В качестве возможных модуляторов фермента исследован ряд внутриклеточных соединений, включающих в себя некоторые метаболиты гликолиза и цикла Кребса (глюкозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, 2-фосфоглицерат, фосфоенолпируват, пируват, цитрат, изоцитрат,  $\alpha$ -кетоглутарат, сукцинат и оксалоацетат), а также пропионат и ацетил-СоА. Все перечисленные вещества использовались в 0,5 мМ концентрациях. Интермедиаты гликолиза не оказывали заметного действия на активность НТФазы, за исключением фруктозо-1,6-дифосфата, который повышал скорость гидролиза ГТР на 55%. Практически в равной степени фермент активировался  $\alpha$ -кетоглутаратом и ацетил-СоА, хотя другие метаболиты цикла Кребса, такие как цитрат и сукцинат, были ингибиторами. Кроме того, активность фермента снижалась под действием пропионата (табл. 4). Эти эффекты фруктозо-1,6-дифосфата,  $\alpha$ -кетоглутарата, ацетил-СоА и пропионата отчетливо заметны и при 0,05 мМ концентрации.

**Субклеточная локализация и распределение НТФазы в органах и тканях быка.** Примерно 44%

общей НТФазной активности обнаруживалось в растворимом экстракте, полученном в результате высокоскоростного центрифугирования (105 000 g, 60 мин) гомогената, приготовленного из образцов замороженной ткани мозга. При хроматографии этого экстракта на колонке с сефакилом S-200 элюировались два НТФазных пика вне зависимости от того, какой субстрат был использован для определения активности – ГТР, УТР, СТР или АТР (данные не показаны). Один из пиков выходил в свободном объеме колонки, тогда как другой, содержащий до 78% ферментативной активности, соответствовал белку с молекулярной массой 60,5 кДа. По данным дифференциального центрифугирования цитозольная фракция из мозга быка содержала ~43% общей НТФазной активности гомогената. Остальная активность НТФазы обнаруживалась в осадке субклеточных частиц.

НТФазная активность была обнаружена в экстрактах из всех исследованных органов и тканей быка, при этом удельная активность варьировала от 0,09 Е/мг в эритроцитах до 0,47 Е/мг в печени. Общая НТФазная активность, выраженная на 1 г ткани, незначительно различалась для экстрактов скелетной мышцы, сердца, селезенки, почек, мозга, легких и тонкого кишечника (2,5–4,8 Е/г), тогда как активность фермента в экстракте печени составила 21,9 Е/г. При гель-фильтрации экстрактов из различных тканей во всех случаях, за исключением эритроцитов, элюировались пики НТФазной активности, соответствовавшие белку с молекулярной массой 60 кДа (данные не показаны). Кроме того, на хроматограммах экстрактов из печени, почек и тонкого кишечника выявлялись большие пики, соответствовавшие белку с молекулярной массой 146 кДа. Количество высокомолекулярной НТФазы было значительно меньше в селезенке, сердце и легком. В головном мозге, скелетной мышце и эритроцитах данный белок не был обнаружен. В соответствии с площадями пиков распределение НТФазы с молекулярной массой 60 кДа в тканях быка выглядит следующим образом: печень > сердце > скелетная мышца > легкие > мозг > селезенка > почки  $\approx$  тонкий кишечник.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нуклеозид-5'-трифосфаты служат источником энергии для разнообразных жизненных функций. Среди соединений этого класса главную роль играет АТР, обеспечивающий энергией биосинтез важнейших компонентов клетки, активный транспорт через мембраны, двига-

**Таблица 2.** Влияние ионов металлов на активность НТФа-зы из мозга быка

Катион (5 мМ)	Относительная активность, %
—	0
Mg <sup>2+</sup>	100
Mn <sup>2+</sup>	73 ± 6
Co <sup>2+</sup>	60 ± 5
Ca <sup>2+</sup>	52 ± 11
Cu <sup>2+</sup>	46 ± 4
Zn <sup>2+</sup>	34 ± 9
Ba <sup>2+</sup>	0

тельные процессы и экспрессию генов. Кроме того, в некоторых процессах и биосинтетических путях используются GTP, UTP, CTP и ИТР [1]. Наряду с энергопреобразующими АТРазами [17, 18] в клетках обнаружены ферменты, вероятно осуществляющие несопряженный гидролиз нуклеозид-5'-трифосфатов. Две основные группы таких ферментов, субстратная специфичность которых преимущественно ограничена нуклеозид-5'-три- и -дифосфатами, классифицируются как НТФаза (КФ 3.6.1.15) и апиразы (КФ 3.6.1.5).

Отличительной чертой представителей апиразного семейства является наличие в их структуре четырех мотивов, известных как апиразные консервативные участки [11]. Хотя апиразы были первоначально описаны как эктоферменты, подобно CD39 [19] или другим экто-НТФазам [9, 20], они могут встречаться и внутри клетки [21–23]. Полагают, что главная задача апираз, локализованных на клеточной поверхности, состоит в завершении физиологического действия высвобожденных из клеток нуклеотидов [24, 25]; биологические функции эндоапираз менее очевидны. Возможно, эндоапиразы принимают участие в процессах гликозилирования белков, контроля концентраций сахаров и регуляции целостности мембран [21, 26]. Апиразы широко распространены в эукариотных клетках различных типов — от дрожжей до млекопитающих [9, 21, 26, 27]. Большинство исследованных апираз локализовано в мембранных структурах клеток, однако известны и растворимые белки, принадлежащие к данному семейству [10, 28].

В литературе описано несколько растворимых НТФаз эукариотного происхождения. Так, было показано, что в печени крысы содержатся две цитозольные НТФаза с рН-оптимумами 4,0–4,5 и 8,6–9,9, молекулярные массы которых равны соответственно 65 и 125 кДа [6, 29]. Металлнеза-

висимая НТФаза с рН-оптимумом 3,0 и массой 75-кДа была изолирована из сыворотки крови человека [3]. Другая кислая НТФаза, проявляющая максимальную активность при рН 5,0–5,5, была обнаружена в лизосомах печени и почек крысы [5]. Сравнительно недавно нами была очищена растворимая НТФаза из почек быка — белок с молекулярной массой 146 кДа, рН-оптимумом 7,0 и строгой специфичностью к GTP, UTP и ИТР. В настоящей работе показано, что в тканях быка присутствует еще один растворимый фермент, обладающий апиразной активностью.

Применение стандартных методов очистки позволило получить из головного мозга быка препарат растворимой НТФазы с удельной активностью 639 Е/мг белка (табл. 1). Молекулярная масса фермента по данным гель-фильтрации и электрофореза в Ds-Na-ПААГ составляет 60 кДа. Кинетические исследования показали, что фермент характеризуется рН-оптимумом при 7,5 (рисунок) и абсолютно зависим от катионов двухвалентных металлов (табл. 2). Сочетание перечисленных выше свойств дает основание дифференцировать НТФазу из мозга быка от всех ранее описанных растворимых НТФаз эукариотного происхождения, поскольку последние либо имеют более высокую массу [10, 29], иной рН-оптимум [5, 6], либо зависят от металлов [3].

**Таблица 3.** Субстратная специфичность НТФазы из мозга быка

Субстрат, 0,5 мМ	Относительная активность, %
CTP	100 ± 3
UTP	66 ± 10
ИТР	58 ± 3
CDP	41 ± 3
IDP	41 ± 3
XTP	40 ± 5
АТР	32 ± 2
UDP	32 ± 1
GTP	30 ± 5
ADP	25 ± 3
GDP	19 ± 2
UMP	8,2 ± 1,0
IMP	5,3 ± 1,5
GMP	0
AMP	0
СМР	0

**Таблица 4.** Влияние различных соединений на активность НТФазы из мозга быка

Эффектор	Концентрация, мМ	Активность, %
—	—	100
Ацетил-СоА	0,5	148 ± 1
«	0,05	127 ± 1
Цитрат	0,5	80 ± 1
α-Кетоглутарат	0,5	148 ± 2
«	0,05	128 ± 6
Сукцинат	0,5	45 ± 1
«	0,05	98 ± 3
Фруктозо-1,6-дифосфат	0,5	155 ± 4
«	0,05	126 ± 1
Пропионат	0,5	39 ± 2
«	0,05	63 ± 6

НТФаза из мозга быка характеризуется широкой специфичностью к различным нуклеозид-5'-три- и дифосфатам и полностью индифферентна по отношению к GMP, AMP и CMP. В то же время данный фермент способен в незначительной степени ускорять гидролиз UMP и IMP (табл. 3). Подобная картина субстратной специфичности характерна для апираз. Между тем, насколько нам известно, в литературе до сих пор не описана ни одна растворимая апираза из тканей млекопитающих. Как и некоторые мембраносвязанные апиразы [30, 31], фермент из мозга быка имеет высокое кажущееся сродство к нуклеозид-5'-фосфатам.

Эксперименты по дифференциальному центрифугированию гомогенатов мозга свидетельствуют о цитозольной локализации изучаемого фермента. В связи с этим можно предположить, что он вовлечен в несопряженный с выполнением работы гидролиз нуклеозидфосфатов. Очевидно, что сам по себе такой процесс бесполезен для клетки. Для получения какой-либо информации о возможной биологической роли НТФазы мы исследовали действие ряда внутриклеточных соединений, имеющих отношение к энергетическому метаболизму. Как оказалось, некоторые из них влияют на активность фермента (табл. 4). По нашему мнению, особенно интересен тот факт, что НТФаза чувствительна к физиологическим концентрациям фруктозо-1,6-дифосфата и пропионата, первый из которых является активатором, а второй характеризуется ингибирующим действием.

Известно, что пропионат служит предшественником в биосинтезе глюкозы, и этот процесс имеет особое значение для жвачных животных [32]. Несмотря на то что бактерии рубца способны эффективно расщеплять целлюлозу растительного корма, образующаяся глюкоза не поступает непосредственно в кровь. Вместо этого она сбраживается до летучих жирных кислот (ЛЖК), среди которых заметную роль играет пропионат [33]. Транспортируемый в кровь пропионат в основном метаболизируется печенью; часть его разносится по тканям, где может превращаться в глюкозу в процессе глюконеогенеза. Было показано, что перенос ЛЖК через мембраны клеток желудочно-кишечного тракта опосредован монокарбоксилатным переносчиком 1, принадлежащим к семейству генов SLC16 [34]. Этот же белок широко экспрессирован в различных органах и тканях, в том числе в центральной нервной системе, где вместе с монокарбоксилатным переносчиком 2 участвует в транспорте ЛЖК в эндотелиальных клетках гематоэнцефалитического барьера, астроцитах и нейронах [35, 36]. Возрастание концентрации пропионата в клетке, очевидно, должно благоприятствовать синтезу глюкозы. В то же время пропионат ингибирует НТФазу. Это может приводить к росту локальных концентраций GTP (ИТР), которые являются субстратами фосфоенолпируваткарбоксикиназы — фермента, катализирующего образование фосфоенолпирувата в обходном пути пируваткиназной реакции. Однако повышение содержания фруктозо-1,6-дифосфата в условиях энергодифицита могло бы вызвать подъем активности НТФазы, ускоренный гидролиз GTP (ИТР) и, как следствие, снижение скорости синтеза глюкозы. Исходя из этих противоположных эффектов фруктозо-1,6-дифосфата и пропионата, предположим, что исследуемый фермент может участвовать в реципрокной регуляции скоростей гликолиза и глюконеогенеза. В связи с этим надо отметить, что хотя метаболизм мозга чрезвычайно зависим от глюкозы крови, тем не менее клетки нервной ткани способны к синтезу собственной глюкозы из неуглеводных предшественников, но в гораздо меньшей степени чем, например, клетки печени или почек [37].

В свете данной гипотезы мы могли бы найти объяснение активирующему действию ацетил-СоА (табл. 4). При некоторых состояниях (например, при липолизе) наблюдается повышение внутриклеточной концентрации ацетил-СоА, который должен подвергаться ускоренному метаболизму в цикле Кребса. Для этого необходимо непрерывное поступление регенерирующегося субстрата — оксалоацетата, синтезируемого из пирувата пируваткарбоксилазой. Таким обра-

зом, ацетил-СоА, будучи положительным эффектором НТФазы, способен тормозить образование фосфоенолпирувата из оксалоацетата (глюконеогенез), что в рассматриваемой ситуации должно благоприятствовать увеличению скорости гликолиза.

В заключение следует отметить, что, какова бы ни была функция исследуемой НТФазы, этот фермент, очевидно, не имеет отношения к специфике выполняемых нервными клетками функций, поскольку характеризуется широким распространением в органах и тканях.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Metzler, D.E. (2001) *Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells*, Harcourt/Academic Press, N.Y., 1973 с.
- Nishimune, T., Ito, S., Abe, M., Kimoto, M., and Hayashi, R. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.*, **923**, 74–82.
- Dahlmann, N., and Kirchgesser, M. (1990) *Biochem. Int.*, **20**, 317–327.
- Borowski, P., Niebuhr, A., Mueller, O., Bretner, M., Felczak, K., Kulikowski, T., and Schmitz, H. (2001) *J. Virol.*, **75**, 3220–3229.
- Brightwell, R., and Tappel, A.L. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**, 333–343.
- Нарыжный С.Н., Крутяков В. М. (1982) *Биохимия*, **47**, 569–574.
- McCarty, D.R., and Selman, B.R. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.*, **248**, 523–531.
- Schroder, H.C., Rottmann, M., Bachmann, M., and Muller, W.E.G. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 663–668.
- Plesner, L. (1995) *Int. Rev. Cytol.*, **158**, 141–214.
- Asai, T., O'Sullivan, J., and Tatibana, M. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 6816–6822.
- Handa, M., and Guidotti, G. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **218**, 916–923.
- Makarchikov, A.F. (2001) *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.*, **5**, 525–531.
- Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S., and Candia, O.A. (1979) *Anal. Biochem.*, **100**, 95–97.
- Weber, K., and Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406–4412.
- Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- Wolf, P. (1983) *Anal. Biochem.*, **129**, 145–155.
- Скулачев В.П. (1989) *Энергетика биологических мембран*, Изд-во МГУ, Москва.
- Schliwa, M., and Woehlke, G. (2003) *Nature*, **422(6933)**, 759–765.
- Maliszewski, C.R., DeLepesse, G.L.T., Schroenborn, M.A., Armitage, R.J., Fanslow, W.C., Nakajama, T., Baker, E., Sutherland, G.R., Poindexter, K., Birks, C., Alpert, A., Friend, D., Gimpel, C.D., and Gayle, R.B. (1994) *J. Immunol.*, **153**, 3574–3583.
- Kegel, B., Braun, N., Heine, P., Maliszewski, C.R., and Zimmermann, H. (1997) *Neuropharmacology*, **36**, 1189–1200.
- Gao, X.D., Kaigorodov, V., and Jigami, Y. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 21450–21456.
- Biederbick, A., Kosan, C., Kunz, J., and Elsasser, H.-P. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 19018–19024.
- Shi, J.-D., Kukar, T., Wang, C.-Y., Li, Q.-Z., Cruz, P.E., Davoodi-Semiromi, A., Yang, P., Gu, Y., Lian, W., Wu, D.H., and She, J.-X. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 17474–17478.
- Zimmermann, H. (1996) *Prog. Neurobiol.*, **49**, 589–618.
- Marcus, A.J., Broekman, M.J., Drosopoulos, J.H.F., Islam, N., Pinsky, D.J., Sesti, C., and Levi, R. (2003) *J. Pharmacol. Experim. Therap.*, **305**, 9–16.
- Wang, T.F., and Guidotti, G. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 11392–11399.
- Komoszynski, M., and Wojtczak, A. (1996) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1310**, 233–241.
- Komoszynski, M.A. (1996) *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, **113**, 581–591.
- Lewis, M., and Weissman, S. (1965) *Arch. Biochem. Biophys.*, **109**, 490–498.
- Boeck, C.R., Sarkis, J.J., and Vendite, D. (2002) *Neurochem. Int.*, **40**, 449–453.
- Bigonnesse, F., Levesque, S.A., Kukulski, F., Robson, S.C., Fernandes, M.J., and Sevigny, J. (2004) *Biochemistry*, **43**, 5511–5519.
- Baird, G.D., Lomax, M.A., Symonds, H.W., and Shaw, S.R. (1980) *Biochem. J.*, **186**, 47–57.
- Freetly, H.C., and Ferrell, C.L.J. (1998) *Anim. Sci.*, **76**, 3133–3145.
- Kirat, D., Taniyama, H., Kato, S., Masuoka, J., Hayashi, H., Iwano, H., and Yokota, H. (2006) *J. Physiol.*, **576**, 635–647.
- Pierre, K., Parent, A., Jayet, P.Y., Halestrap, A.P., Scherrer, U., and Pellerin, L. (2007) *J. Physiol.*, **583**, 469–486.
- Simpson, I.A., Carruthers, A., and Vannucci, S.J. (2007) *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **27**, 1766–1791.
- Bhattacharya, S.B., and Datta, A.G. (1993) *Mol. Cell. Biochem.*, **125**, 51–57.

**PURIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION  
OF A SOLUBLE NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATASE  
(APYRASE) FROM BOVINE BRAIN**

**V. F. Sivuk<sup>1</sup>, I. M. Rusina<sup>1,2</sup>, A. F. Makarchikov<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Laboratory of Biochemical Toxicology and Narcology,  
Institute of Pharmacology and Biochemistry, National Academy  
of Sciences of Belarus, Grodno 230030, Belarus; fax: +375(152)434-121,  
E-mail: office@biochem.unibel.by*

<sup>2</sup> *Technological Faculty, Grodno State Agricultural University,  
ul. Tereshkovoy 28, Grodno 230008, Belarus; fax: +375(152)721-365,  
E-mail: a\_makarchikov@yahoo.com*

Received February 18.2008

Revision received April 11, 2008

A soluble NTPase differing in its properties from known proteins with NTPase activity has been purified to an electrophoretic homogeneity from bovine brain. The enzyme has a pH optimum of 7.5, shows an absolute dependence on divalent metal cations and a broad substrate specificity towards nucleoside phosphates-5'-tri and diphosphates, characteristic of apyrases. Molecular mass of the enzyme was 60 kDa as estimated by gel-filtration and Ds-Na-PAGE. NTPase is localized in the cytosol fraction and expressed in different bovine organs and tissues, with the amount of the enzyme activity decreases in the following order: liver > heart > skeletal muscle > lung > brain > spleen > kidney ≈ intestine. The activity of the enzyme seems to be highly regulated, such compounds as acetyl-CoA,  $\alpha$ -ketoglutarate and fructose-1,6-diphosphate, tested at physiological concentrations, being activators, whereas propionate shows inhibitory effect.

*Key words:* nucleoside triphosphatase, apyrase, purification, kinetic properties, substrate specificity, regulation, sub-cellular localization, bovine brain