

УДК 577.152.1

КИНЕТИКА ГИДРОЛИЗА АТФ АПИРАЗОЙ А *SOLANUM TUBEROSUM*

Г.Ю. Ломакина^{1,2}, П.А. Коник¹, Н.Н. Угарова^{1*}

(¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; ²Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана; e-mail: nugarova@gmail.com)

Кинетика гидролиза АТФ апиразой А картофеля *Solanum tuberosum* изучена при pH 6,5 и 25 °С биолюминесцентным методом. Определены $K_m = 33$ мкМ и $V = 0,37$ мкМ/с по АТФ. Показано, что гидролиз АТФ протекает в две стадии. «Быстрая» и «медленная» стадии реакции описываются экспонентами псевдопервого порядка. Согласно предложенной гипотезе, промежуточный комплекс апиразы с АДФ, который образуется на быстрой стадии реакции, обладает каталитической активностью в реакции гидролиза АТФ, но более низкой по сравнению со свободной апиразой. Этот комплекс гидролизует АТФ на «медленной» стадии реакции.

Ключевые слова: апираза, аденозин-5'-трифосфат, АТФ, аденозин-5'-дифосфат, АДФ, биолюминесцентный анализ.

Апираза (ЕС 3.6.1.5) – фермент, который катализирует гидролиз аденозин-5'-трифосфата (АТФ) до аденозин-5'-дифосфата (АДФ) и последующий гидролиз АДФ до аденозинмонофосфата (АМФ) с образованием на каждой стадии неорганического фосфат-иона [1, 2].

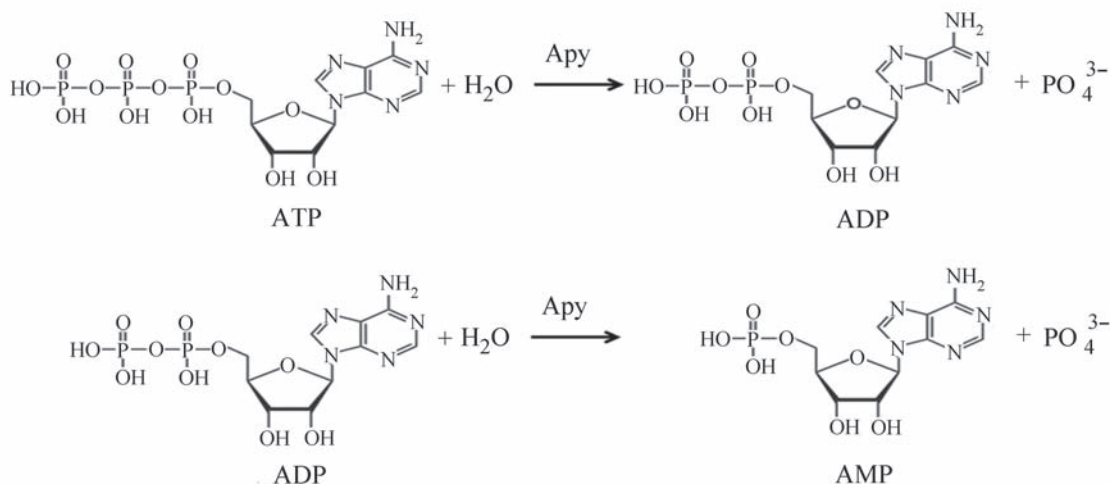
Апиразы (Апу) обнаружены во многих эукариотических системах. Показана их важная роль в агрегации тромбоцитов и биологии опухолей [3–5]. В зависимости от источника кинетические свойства апираз и их чувствительность к различным эффекторам сильно различаются из-за различий в структуре ферментов. Одной из коммерчески доступных апираз является апираза А из картофеля *Solanum tuberosum*, гидролизующая АТФ на порядок с большей скоростью, чем АДФ [1, 2]. Благодаря этому фермент находит применение для удаления внеклеточного АТФ из клеточных суспензий, а также в пироксвенировании [6]. Этот белок состоит из одной полипептидной цепи (454 а.о.), образующей двухдоменную третичную структуру. Каталитический механизм действия апиразы до сих пор не совсем ясен. В литературе обсуждаются две основные модели гидролиза АТФ апиразой. Согласно первой модели АТФ и АДФ гидролизуются на одном и том же активном сайте фермента [1]. Вторая модель базируется на предположении, что АДФ, продуцируемый на первой стадии реакции, переходит на другой сайт, на котором происходит гидролиз его до АМФ. Обе модели вызывают сомнения, не находя полного подтверждения данными кинетических исследований [7]. Так, при гидролизе экви-

молярных количеств АТФ и АДФ не наблюдается аддитивности скоростей гидролиза.

Известны разные методы определения активности апиразы и изучения кинетики катализируемых ферментом реакций. Наиболее распространен колориметрический метод определения продукта реакции – неорганического фосфата, который образуется и на первой, и на второй стадиях реакции. Метод основан на реакции неорганического фосфата и молибдата аммония с образованием комплекса, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству фосфата [8]. Колориметрический метод позволяет определять суммарное содержание фосфата – продукта реакций 1 и 2 (схема 1), но не дает возможности корректно регистрировать кинетику гидролиза АТФ. К недостаткам колориметрического метода можно также отнести высокую трудоемкость и малую чувствительность, что не позволяет следить за концентрациями субстрата и продуктов реакции в начальный период реакции гидролиза АТФ. Хорошо известный биолюминесцентный метод определения АТФ, отличающийся высокой чувствительностью и специфичностью по отношению к АТФ [9], был применен лишь в двух работах, но не для изучения кинетики гидролиза АТФ апиразой, а для скрининга различных эффекторов апиразы [10, 11]. В этих работах не были корректно определены кинетические параметры реакции гидролиза АТФ.

Цель настоящей работы состояла в исследовании кинетики гидролиза АТФ апиразой с использованием биолюминесцентного метода

Схема реакций гидролиза АТФ апиразой



определения АТФ, что позволило корректно выявить кинетические параметры данного процесса, выяснить некоторые особенности катализа апиразой и оптимизировать условия удаления внеклеточного АТФ из анализируемых образцов с помощью апиразы А.

Методы исследования

Материалы и оборудование. В работе использовали апиразу картофеля (А6410, «Sigma Aldrich», США), АТФ-реагент (люцифераза светляков, D-люциферин, ионы магния) («Люмтек», Россия), аденозин-5'-трифосфат, АТФ («Sigma», США), аденозин-5'-дифосфат, АДФ («Reanal», Венгрия), хлорид натрия, NaCl («Хеликон», Россия), хлорид кальция, CaCl₂ («ICN», США), перегнанный безводный диметилсульфоксид (DMSO) («Люмтек», Россия), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES) («Sigma», США), маннитол («Aldrich», США). Растворы готовили с использованием высокоочищенной дистиллированной деионизованной воды, полученной на установке «Labconco» (США). Реакции проводили в буфере НВ, содержавшем 0,05 М HEPES; 0,15 М NaCl и 8 мМ CaCl₂ (рН 6,5). Интенсивность биолюминесценции регистрировали на люцинометрах FB 12 Femtomaster («Berthold», Германия) и ЛЮМ-1 («Люмтек», Россия). Для измерения рН использовали рН-метр GLP-21 («Crison», Испания) с точностью до 0,01 ед. рН. Микробиологические эксперименты проводили в ламинарном боксе GS («Vabcock», Германия).

Приготовление и реконструкция лиофилизованных препаратов апиразы. Во флакон от

производителя, содержащий 0,2 мг лиофилизованной апиразы, добавляли 2 мл стерильного физраствора. Полученный раствор апиразы (100 ед/мл) хранили в аликвотах при -70 °С. Для получения лиофилизованных препаратов раствор апиразы (0,1 мг/мл или 2 мкМ), полученный, как описано выше, разбавляли в 10 раз физраствором, содержавшем 2% маннитола и 16 мМ CaCl₂, замораживали в аликвотах по 50 мкл и лиофилизовали. Хранили при -18 °С. Перед использованием лиофилизованный препарат апиразы реконструировали в 100 мкл воды, получая раствор фермента с концентрацией 100 нМ.

Измерение биолюминесцентного сигнала для АТФ. В микрокювету люцинометра вносили 20 мкл образца, содержащего АТФ, добавляли 100 мкл АТФ-реагента и измеряли биолюминесцентный сигнал, RLU (число импульсов в 1 с).

Изучение кинетики гидролиза АТФ в присутствии апиразы биолюминесцентным методом. Готовили раствор АТФ в буфере НВ (рН 6,5) и раствор апиразы в физрастворе, содержавшем 8 мМ CaCl₂ и 1% маннитола. К 100 мкл раствора АТФ добавляли 25 мкл раствора апиразы и инкубировали при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени отбирали по 10 мкл реакционной смеси и помещали в 50 мкл DMSO. Биолюминесцентный сигнал для полученного образца (RLU_{обр.}) измеряли, как описано выше. Для расчета концентрации АТФ в реакционной смеси использовали контрольный раствор с известной концентрацией АТФ в буфере НВ. 10 мкл контрольного раствора АТФ помещали в 50 мкл

DMSO и измеряли биолюминесцентный сигнал для раствора контрольного образца АТФ в DMSO, ($RLU_{\text{контр.}}$), как описано выше. Концентрацию АТФ в реакционной среде рассчитывали по формуле:

$$[ATP]_{\text{обр.}} = [ATP]_{\text{контр.}} \cdot (RLU_{\text{обр.}} / RLU_{\text{контр.}}).$$

Варьировали концентрацию АТФ в реакционной смеси в интервале от 8 нМ до 160 мкМ, а концентрацию апиразы – в интервале 0,4–4,0 нМ. Разбавленные растворы готовили методом последовательных разбавлений исходного раствора АТФ буфером НВ, а растворы апиразы готовили методом последовательных разбавлений исходного раствора фермента – физиологическим раствором, содержащим 8 мМ $CaCl_2$ и 1% маннитола.

Изучение влияния на кинетику гидролиза АТФ апиразой добавок апиразы и АТФ в ходе реакции. Регистрировали кинетику гидролиза АТФ, как описано выше, для реакционной смеси, содержащей 80 мкМ АТФ и 2 нМ апиразы. Через 200 с реакции, когда прореагировало ~50% субстрата, к 100 мкл реакционной смеси добавляли 2,5 мкл 100 нМ апиразы или 5 мкл 1 мМ АТФ и продолжали регистрацию кинетической кривой гидролиза АТФ.

Изучение влияния АДФ на кинетику гидролиза АТФ апиразой. К 100 мкл 1 мМ раствора АДФ в буфере НВ (рН 6,5), содержавшего 10 мкМ АТФ, добавляли 25 мкл 10 нМ апиразы и регистрировали кинетику гидролиза АТФ, как описано выше.

Изучение влияния пирофосфата на кинетику гидролиза АТФ апиразой. К 100 мкл 0,1 мМ раствора АТФ в буфере НВ (рН 6,5), содержавшем 0,09 мМ пирофосфат натрия, добавляли 25 мкл 10 нМ раствора апиразы и регистрировали кинетику гидролиза АТФ, как описано выше.

Биолюминесцентный анализ суспензий бактериальных клеток с использованием апиразы. При определении содержания внеклеточного АТФ 20 мкл суспензии клеток вводили в 1 мл 0,15 М NaCl и перемешивали. В микрокювету люминометра помещали 20 мкл разбавленной клеточной суспензии, добавляли 100 мкл АТФ-реагента и измеряли биолюминесцентный сигнал. Параллельно измеряли биолюминесцентный сигнал для раствора контрольного образца АТФ в 0,15 М NaCl. При определении общего содержания АТФ к 120 мкл суспензии клеток добавляли 1 мл DMSO для разрушения клеточных стенок и экстракции внутриклеточного АТФ. 20 мкл полученного экстракта вносили в кювету люминометра, добавляли 100 мкл АТФ-

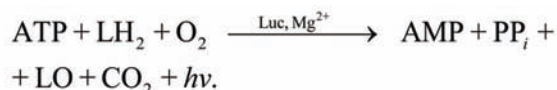
реагента и измеряли биолюминесцентный сигнал. Параллельно измеряли биолюминесцентный сигнал для раствора контрольного образца АТФ в DMSO. При определении содержания внутриклеточного АТФ к 100 мкл клеточной суспензии добавляли 20 мкл 100 нМ апиразы для гидролиза внеклеточного АТФ и инкубировали в течение 10 мин. Затем добавляли 1 мл DMSO для инактивации апиразы и экстракции внутриклеточного АТФ. В микрокювету люминометра помещали 20 мкл полученного экстракта, добавляли 100 мкл АТФ-реагента и измеряли биолюминесцентный сигнал. Параллельно измеряли биолюминесцентный сигнал для раствора контрольного образца АТФ в DMSO.

Каждый эксперимент, описанный выше, повторяли не менее двух раз. Ошибка определения кинетических величин не превышала $\pm 5\%$.

Обработку полученных экспериментальных данных и расчет кинетических констант проводили с использованием программ Microsoft Excel 2007 и 2010 и Origin Pro 8.

Результаты и обсуждение

Определение кинетических параметров реакции гидролиза АТФ апиразой. Для изучения кинетики гидролиза АТФ апиразой мы использовали биолюминесцентный метод определения АТФ, основанный на применении люциферин-люциферазного реагента [9, 12]:



Благодаря высокой чувствительности (предел обнаружения АТФ 10^{-13} М), специфичности, простоте и простоте выполнения данный метод позволяет получать кинетические кривые гидролиза АТФ в широком интервале концентраций АТФ и фермента. Ранее биолюминесцентный метод был применен для мониторинга эффекторов активности апиразы [10, 11]. Исследования проводили при выбранных, постоянных концентрациях АТФ и апиразы, при этом концентрации эффекторов варьировались. В работе [10] реакционная смесь во время инкубации апиразы с эффектором содержала как апиразу, так и люциферазный реагент и имела рН 7,75, в то время как рН-оптимум активности апиразы, функционирующей в узком диапазоне рН, наблюдается при рН 6,5. В работе [11] специальный формат HTS-анализа активности апиразы с применением 384-луночного планшета и коммерческих наборов для измерения активности апиразы также был неприменим для

решения задач, поставленных в данной работе. Получаемые авторами [11] результаты были некими эффективными величинами, которые позволяли сравнивать влияние различных эффекторов на апиразу, но не давали возможности определять кинетические параметры для реакции гидролиза АТФ апиразой в рН-оптимуме ее активности.

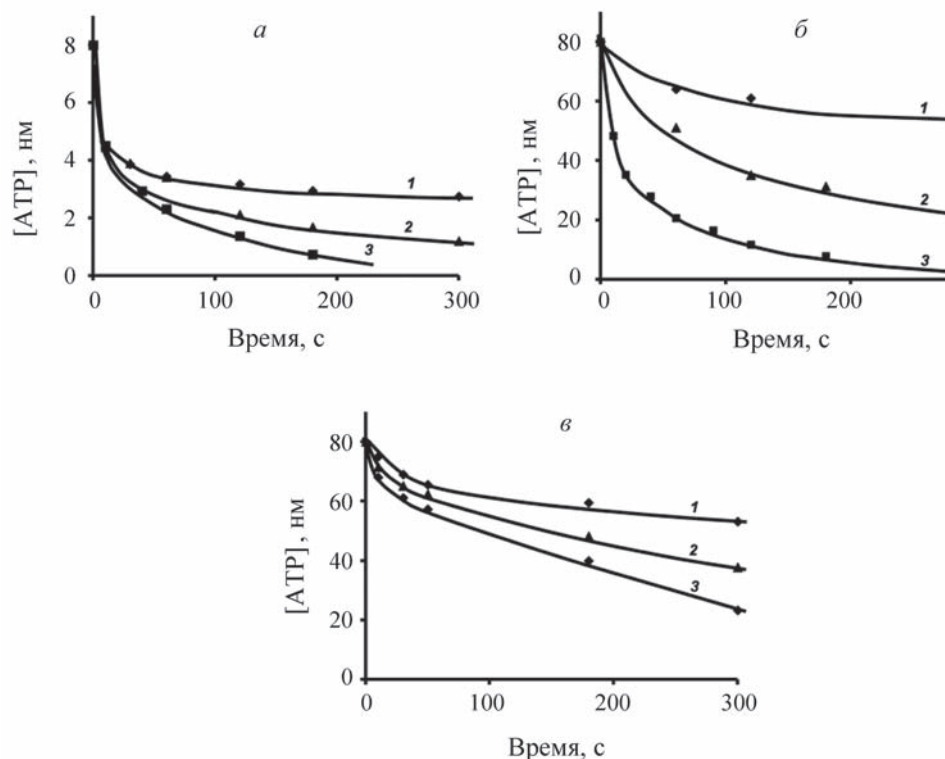
Мы разделили стадии гидролиза АТФ апиразой и измерения остаточной концентрации АТФ, применив разработанный нами ранее биолюминесцентный метод измерения АТФ в биологических системах [9]. Сущность метода заключается в следующем. В раствор АТФ с рН 6,5 добавляется апираза, и реакционная смесь инкубируется при постоянной температуре. Через определенные интервалы времени отбираются пробы и помещаются в 100%-й DMSO. Конечная концентрация DMSO в получаемой смеси составляет не менее 80%. При такой высокой концентрации DMSO происходит мгновенная остановка реакции гидролиза за счет инактивации апиразы. При этом фиксируется и сохраняется длительное время неизменной концентрация АТФ: не менее 8 ч при комнатной температуре и в течение нескольких месяцев при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Концентрацию АТФ определяют биолюминесцентным методом, как

описано в экспериментальной части. Быстрый отбор проб и их быстрая обработка позволили регистрировать изменение концентрации АТФ в реакционной смеси в секундном и минутном интервалах реакции, а также проводить гидролиз апиразой и измерение биолюминесценции в условиях, оптимальных для каждого процесса.

Для определения кинетических параметров реакции гидролиза АТФ апиразой при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ были получены кинетические кривые при фиксированной концентрации апиразы (4 нМ) и варьируемой концентрации АТФ (от 0,8 до 160 мкМ). Реакционная смесь содержала 0,05 М HEPES, 0,15 М NaCl, 8 мМ CaCl₂ (рН 6,5). Из полученных величин начальных скоростей реакции были рассчитаны константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции:

$$K_m = (33 \pm 6) \text{ мкМ} \text{ и } V = (0,37 \pm 0,03) \text{ мкМ/с.}$$

Величина K_m , измеренная нами, оказалась в $\sim 1,5$ раза ниже, чем значение K_m , определенное колориметрическим методом [2]. Это может быть объяснено тем, что мы измеряли K_m для первой реакции (схема 1), а не для суммарной реакции образования неорганического фосфата. Меньшая величина K_m служит показателем большего



Кинетика гидролиза АТФ апиразой при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Состав реакционной среды: 0,05 М HEPES, 0,15 М NaCl, 8 мМ CaCl₂ (рН 6,5). Концентрация АТФ: 8 нМ (а); 80 нМ (б); 80 мкМ (в). Концентрация апиразы, нМ: 1 – 0,8; 2 – 2,0; 3 – 4,0 (а); 1 – 1,2; 2 – 2,0; 3 – 4,0 (б); 1 – 1,0; 2 – 2,0; 3 – 4,0 (в)

средства апиразы к АТФ, чем к АДФ. Были получены кинетические кривые гидролиза АТФ в широком интервале концентраций АТФ (от 8 нМ до 80 мкМ) и апиразы (от 0,8 до 4,0 нМ), примеры которых показаны на рисунке.

Вид полученных кинетических кривых и глущина гидролиза АТФ зависят от соотношения концентраций субстрата и фермента. При низких концентрациях апиразы (0,8–1,2 нМ) при всех использованных концентрациях АТФ за 300 с реакции гидролизуется не более 50% АТФ. При концентрации апиразы ≥ 2 нМ за это же время гидролиз АТФ протекает на 80–90%. Как показано на рисунке, на кинетических кривых гидролиза АТФ апиразой наблюдаются две стадии – быстрая и медленная, каждая из которых протекает по псевдопервому порядку. Сравнение начальных скоростей быстрой и медленной стадий гидролиза АТФ (табл. 1) показывает, что эти величины линейно зависят от концентрации фермента в использованном интервале концентраций апиразы. Исключение составляют данные, полученные при очень низкой концентрации АТФ (8 нМ), когда быстрая стадия протекает за несколько секунд при всех использованных концентрациях апиразы, и ее точное определение оказывается невозможным. При наномолярных концентрациях АТФ начальная скорость быстрой стадии в десятки раз превышает начальную скорость медленной стадии. При насыщающей концентрации АТФ (80 мкМ) эти скорости различаются в ~ 9 раз.

Двухстадийную кинетику образования фосфата наблюдали в ранних работах по изучению

кинетических свойств апиразы А [13], было введено понятие о «быстрой» и «медленной» стадиях гидролиза АТФ апиразой. Отмечено, что после гидролиза $\sim 50\%$ АТФ скорость образования фосфата уменьшается и становится равной скорости образования фосфата при гидролизе АДФ. С использованием ^{32}P -меченых субстратов в работе [1] было обнаружено, что на быстрой стадии отщепляется преимущественно γ -фосфат (из молекулы АТФ) с небольшой примесью β -фосфата (из молекулы АДФ). Когда использовали АТФ, меченный в β -положение, то на быстрой стадии наблюдали образование небольшого количества меченого фосфата (из АДФ), а основное количество меченого фосфата выделялось на медленной стадии процесса. Полученные результаты позволили выдвинуть предположение, что АТФ выступает конкурентным ингибитором в реакции гидролиза АДФ, причем константа ингибирования близка к K_m для АТФ [1].

Влияние добавок на кинетику гидролиза АТФ апиразой. Чтобы получить более подробную информацию о природе быстрой и медленной стадии гидролиза АТФ, мы провели ряд дополнительных экспериментов. При высокой начальной концентрации АТФ (80 мкМ) во время медленной стадии реакции (через 200 с, когда гидролизовалось $\sim 50\%$ АТФ) к реакционной смеси добавляли раствор апиразы, так что концентрация фермента удваивалась. При этом и скорость реакции также возрастала в ~ 2 раза. Добавки апиразы, хотя и повышали скорость процесса пропорционально повышению концентрации фермента, но не изменяли вида кинетической кривой. Наблюдалась

Т а б л и ц а 1

Начальные скорости и константы скорости быстрой и медленной стадии реакции гидролиза АТФ в присутствии апиразы в разной концентрации (условия представлены в подписи к рисунку)

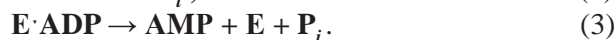
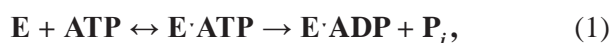
$[\text{АТФ}]_0$	$[\text{Е}]_0$, нМ	v_0 (быстр.), мкМ/с	v_0 (медл.), мкМ/с	$k_{\text{быстр.}}$, с ⁻¹	$k_{\text{медл.}}$, с ⁻¹
8 нМ	1,2	0,36	0,0028	0,06	0,0017
	2	0,36	0,0055	0,06	0,006
	4	0,35	0,008	0,058	0,010
80 нМ	0,8	1,79	0,04	0,015	0,002
	2	3,24	0,07	0,032	0,006
	4	3,16	0,05	0,043	0,012
80 мкМ	1	0,50	0,06	0,0065	0,0009
	2	0,86	0,10	0,0114	0,002
	4	1,20	0,14	0,0162	0,0035

только медленная стадия процесса, без быстрой стадии. В следующем эксперименте во время медленной стадии реакции добавляли АТР в реакционную смесь, так что концентрация АТР становилась равной начальной концентрации АТР. При этом скорость реакции не изменялась и оставалась равной скорости медленной стадии. Таким образом, добавки АТР также не влияли на скорость медленной стадии процесса.

Для объяснения полученных результатов была предложена схема 2.

С х е м а 2

**Предполагаемая схема гидролиза
АТР-апиразой**



Согласно схеме 2, на быстрой стадии апираза взаимодействует с АТР, образуется комплекс $E \cdot ATP$, трансформация которого в активном центре апиразы приводит к выделению фосфата и формированию комплекса $E \cdot ADP$ (реакция 1). Дальнейшее превращение комплекса $E \cdot ADP$ может приводить к образованию АМР и фосфата (реакция 3). Известно, что каталитическая константа гидролиза АТР апиразой А в ~ 10 раз меньше, чем каталитическая константа гидролиза АТР [1, 2], поэтому в реакционной системе по мере протекания реакции (1) накапливается комплекс $E \cdot ADP$. Этот комплекс обладает ферментативной активностью по отношению к АТР, но более низкой по сравнению с активностью свободного фермента (реакция 2). На медленной стадии именно комплекс $E \cdot ADP$ катализирует гидролиз АТР. При низких концентрациях АТР и на начальной стадии гидролиза АТР реализуется быстрая стадия гидролиза АТР апиразой. В этих условиях концентрация комплекса $E \cdot ADP$ в реакционной среде незначительна. При высоких концентрациях АТР и глубине гидролиза АТР $\geq 50\%$ накапливается достаточное количество комплекса $E \cdot ADP$ для реализации медленной стадии гидролиза АТР.

Чтобы проверить эту гипотезу, мы получили кинетические кривые гидролиза 10 мкМ АТР в присутствии 2 нМ апиразы в исходной реакционной среде, не содержащей АДФ, и в среде, в которую предварительно было добавлено 0,8 мМ АДФ. Таким образом, мы создали условия, при которых концентрация АДФ намного выше, чем начальная концентрация АТР. В присутствии большого избытка АДФ отсутствовала быстрая стадия, в то время как скорости медленной стадии в обоих случаях были равны. Следовательно,

медленная стадия реакции наблюдается при накоплении в реакционной среде достаточно высокой концентрации комплекса $E \cdot ADP$. Не исключено, что структура комплекса $E \cdot ADP$, который образуется по реакции (1) (схема 2) отличается от структуры комплекса $E \cdot ADP$, который образуется при реакции апиразы с АДФ. На это указывают литературные данные по изучению ингибирующего действия АДФ на гидролиз АТР апиразой А. Десятикратный избыток АДФ оказывал лишь небольшой ингибирующий эффект на образование фосфата из АТР, меченного по γ -фосфатной группе [1]. Стократный избыток АДФ, использованный нами, позволил полностью элиминировать быструю стадию гидролиза АТР даже при низкой концентрации субстрата.

Важно было выяснить, какие группы в молекуле нуклеотида участвуют в образовании комплекса АДФ с апиразой. Мы изучили влияние на гидролиз АТР апиразой пирофосфата, который является аналогом субстратов апиразы, поскольку в его строении присутствуют те же связи $O-P$, что и в нуклеозидтри- и дифосфатах, которые служат мишенью для апиразы [14, 15]. Кинетические кривые реакции гидролиза АТР апиразой были получены при 80 мкМ АТР и 2 нМ апиразы в отсутствие и в присутствии 72 мкМ пирофосфата натрия. Скорость реакции гидролиза АТР в присутствии пирофосфата, как и в случае с АДФ, равна скорости медленной стадии реакции в отсутствие пирофосфата. Вероятно, связывание фермента и АДФ с образованием активного комплекса $E \cdot ADP$ протекает по пирофосфатным связям, которые существуют как в АДФ, так и в пирофосфате.

Таким образом, апираза А катализирует ряд последовательных превращений АТР в АМР, важная роль в которых принадлежит активному комплексу $E \cdot ADP$. Благодаря его участию, кинетика гидролиза АТР описывается двухэкспоненциальной зависимостью – по мере накопления первичного продукта реакции (АДФ) скорость реакции снижается. Для корректного определения времени удаления АТР неизвестной концентрации необходимо использовать кинетические характеристики медленной стадии. Особенно это важно при гидролизе высоких концентраций АТР. Расчет показывает, что для гидролиза 80 мкМ концентрации АТР в присутствии 4 нМ апиразы время реакции составляет не более 10 мин.

Использование апиразы для удаления внеклеточного АТР. Определение жизнеспособности клеток играет важную роль в биохимии и биотехнологии. Существует множество методов определения жизнеспособности клеток,

Т а б л и ц а 2

Содержание общего, внеклеточного и внутриклеточного АТФ в суспензии клеток для различных экспериментальных образцов жидкой (образцы 1 и 2) и реконструированной после лиофилизации (образцы 3–14) вакцины БЦЖ

Образцы вакцины	Концентрация АТФ в суспензии клеток вакцины, нМ			Содержание внеклеточного АТФ в общем АТФ, %
	общий АТФ	внутриклеточный АТФ	внеклеточный АТФ	
1	341	330	11	3,2
2	516	386	130	25,2
3	24	16	8	33,3
4	27	22	5	18,5
5	35	28	7	20,0
6	37	30	7	18,9
7	40	27	13	32,5
8	42	18	24	57,1
9	43	30	13	30,2
10	43	37	6	13,9
11	44	21	23	52,3
12	44	38	6	13,6
13	51	38	13	25,5
14	55	34	21	38,2

одним из которых является биолюминесцентная АТФ-метрия, основанная на определении внутриклеточного АТФ как универсального источника энергии в живых организмах [9]. По содержанию внутриклеточного АТФ определяют число живых клеток, например, в лекарственных препаратах противотуберкулезной БЦЖ вакцины [16, 17]. В ходе получения, лиофилизации и хранения клеточной суспензии некоторое число клеток разрушается, и в реакционной среде накапливается внеклеточный АТФ, что мешает правильному определению содержания внутриклеточного АТФ. Для удаления внеклеточного АТФ из суспензии клеток применяется апираза [16–18]. В табл. 2 приведены данные по измерению внутриклеточного и внеклеточного АТФ в экспериментальных образцах вакцины БЦЖ, которые были получены при варьировании условий пробоподготовки и лиофилизации на предприятии по производству данного лекарственного препарата [17, 18]. Содержание внеклеточного АТФ определяли биолюминесцентным методом без предварительного разрушения клеточных стенок. Для измерения содержания внутриклеточного АТФ суспензию клеток обрабатывали апиразой,

а затем помещали в DMSO для разрушения клеточных стенок, инактивации апиразы и высвобождения внутриклеточного АТФ. Концентрацию внутриклеточного АТФ измеряли биолюминесцентным методом, как описано в данной работе.

Как видно из табл. 2, концентрация внеклеточного АТФ в образцах вакцины варьирует от 5 до 24 нМ. Исключение составляет экспериментальный образец жидкой вакцины № 2, в котором степень разрушения клеток достаточно высока. Содержание внутриклеточного АТФ для реконструированных образцов вакцины изменяется в ~2 раза, а содержание внеклеточного АТФ – в ~5 раз. Следовательно, биолюминесцентное определение внутриклеточного АТФ без предварительной обработки анализируемого образца апиразой может приводить к сильно завышенным результатам о содержании живых микроорганизмов в образце. Анализируемые суспензии клеток содержали наномолярные концентрации АТФ, которые существенно ниже K_m апиразы по АТФ. На основании результатов, полученных в данной работе, можно заключить, что в этих условиях будет наблюдаться, в основном, быстрая ста-

дия гидролиза АТР вплоть до глубокой степени гидролиза.

Работа выполнена в рамках госрегистрационной темы МГУ имени М.В. Ломоносова № АААА-А16-116052010081-5: «Молекулярный дизайн, структурно-функциональный

анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды».

Конфликта интересов нет.

Дополнительных материалов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Traverso-Cori A., Chaimovich H., Cori O.* // Arch. Biochem. Biophys. 1965. Vol. 109. P. 173.
2. *Kettlun A.M., Uribe L., Calvo V., Silva S., Rivera J., Mancilla M., Valenzuela M.A., Traverso-Cori, A.* // Phytochem. 1982. Vol. 21. P. 581.
3. *Frassetto S.S., Dias R.D., Sarkis J.J.F.* // Mol. Cell. Biochem. 1993. Vol. 129. P. 47 (doi:10.1007/bf00926575).
4. *Okuhata R., Takishima T., Nishimura N., Ueda S., Tsuchiya T., Kanzawa N.* // Plant Physiol. 2011. Vol. 157. P. 464 (doi.org/10.1104/pp.111.180414).
5. *Riewe D., Grosman L., Fernie A.R., Wucke C., Geigenberger P.* // Plant Physiol. 2008. Vol. 147. P. 1092 (doi.org/10.1104/pp.108.117564).
6. *Svantesson A., Nordström T., Kotaleski H.J., Nyrén P.* // TRITA-NA-P0509, CBN Report. 2005. P. 1.
7. *Kozakiewicz A., Neumann P., Banach M., Komoszyński M., Wojtczak A.* // Acta Biochimica Polonica. 2008. Vol. 55. P. 141.
8. *Baginski E.S., Epstein E., Zak B.* // Ann. Clin. Sci. 1975. Vol. 5. P. 399.
9. *Угарова Н.Н., Кокишаров М.И., Ломакина Г.Ю.* // РФ пат. № 2420594. 2009.
10. *Ломакина Г.Ю., Модестова Ю.А., Угарова Н.Н.* // Биохимия. 2015. Vol. 80. P. 420.
11. *Karamohamed S., Guidotti G.* // BioTechniques. 2001. Vol. 31. P. 420.
12. *Veloria J.R., Devkota A.K., Cho E.J., Dalby K.N.* // SLAS Discovery. 2017. Vol. 22. P. 94 (doi:10.1177/1087057116675859).
13. *Molnar J., Lorand L.* // Arch. Biochem. Biophys. 1961. Vol. 93. P. 353 (doi.org/10.1016/0003-9861(61)90278-8).
14. *Del Campo G., Puente J., Valenzuela M.A., Traverso-Cori A., Cori O.* // Biochem. J. 1977. Vol. 167. P. 525 (doi: 10.1042/bj1670525).
15. *Kettlun A.M., Espinosa V., Garcí'a L., Valenzuela M.A.* // Phytochemistry. 2005. Vol. 66. P. 975 (doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.03.015).
16. *Jensen S.E., Hubrechts P., Klein B.M., Hasløv K.A.* // Biologicals. 2008. Vol. 36. P. 308 (doi:10.1016/j.biologics.2008.05.001).
17. *Ugarova N.N., Lomakina G.Yu., Modestova Yu., Chernikov S.V., Vinokurova N.V., Otrashkevskaya E.V., Gorbachev V.Y.* // J. Microbiol. Meth. 2016. Vol. 130. P. 48 (doi.org/10.1016/j.mimet.2016.08.027).
18. *Угарова Н.Н., Ломакина Г.Ю., Перевышина Т.А., Отрашевская Е.В., Черников С.В.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2019. Т. 60. P. 254.

Поступила в редакцию 10.01.2020

Получена после доработки 12.01.2020

Принята к публикации 20.01.2020

KINETICS OF THE ATP HYDROLYSIS BY APYRASE A FROM *SOLANUM TUBEROSUM*

G.Yu. Lomakina^{1,2}, P.A. Konik¹, N.N. Ugarova^{1*}

(¹Lomonosov Moscow State University, Chemistry Faculty; ²Bauman Moscow State Technical University; e-mail: nugarova@gmail.com)

Kinetics of the ATP hydrolysis by apyrase A from *Solanum tuberosum* has been studied at pH 6.5 and 25 °C by bioluminescent method. The K_m for ATP was defined by 33 μM and the V was 0.37 $\mu\text{M/s}$. It was shown that the ATP hydrolysis by apyrase takes place in two stages. The “fast” and “slow” stages were described by each of the pseudo-first-order kinetics. According to the hypothesis proposed, an intermediate complex of apyrase with ADP which is formed at the fast stage of the reaction, has catalytic activity in the reaction of the ATP hydrolysis, but lower compared to free apyrase. This complex hydrolyzes ATP in the “slow” stage of the reaction.

Key words: apyrase, adenosine-5'-triphosphate, ATP, adenosine-5'-diphosphate, ADP, bioluminescent analysis.

Сведения об авторах: Ломакина Галина Юрьевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (lomakinagalina@yahoo.com); Коник Петр Алексеевич – выпускник кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (enzyme.peter@gmail.com); Угарова Наталья Николаевна – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (nugarova@gmail.com).