

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФОСФАТАЗ У *AMOEBA PROTEUS*

© В. А. Сопина

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; электронный адрес: vsop39@mail.ru

Все три фосфатазы («медленная», «средняя» и «быстрая»), выявляемые у амобы *Amoeba proteus* после диск-электрофореза надосадочной жидкости гомогенатов в ПААГ и при использовании в качестве субстрата 1-нафтилфосфата (рН 9.0), характеризуются широкой субстратной специфичностью. Для всех фосфатаз предпочитаемым субстратом является *n*-НФФ. Все фосфатазы гидролизуют бис-*n*-НФФ и, следовательно, обладают фосфодиэстеразной активностью. Все фосфатазы в большей или меньшей степени гидролизуют О-фосфо-L-тирозин. В субстратной специфичности фосфатаз были обнаружены лишь небольшие различия: 1) «быстрая» и «средняя» фосфатазы слабее, чем «медленная», гидролизуют нафтилфосфаты и О-фосфо-L-тирозин; 2) «быстрая» и «средняя» фосфатазы гидролизуют 1-нафтилфосфат в большей степени, чем 2-нафтилфосфат; 3) «быстрая» и «средняя» фосфатазы по сравнению с «медленной» слабо гидролизуют О-фосфо-L-серин и О-фосфо-L-треонин; 4) «быстрая» фосфатаза в отличие от «средней» и «медленной» почти не гидролизует глюкозо-6-фосфат. Широкая субстратная специфичность «медленной» фосфатазы (рН 9.0) в совокупности с данными ингибиторного анализа и результатами опытов с реактивацией ее ионами Zn^{2+} после инактивации ЭДТА свидетельствует о том, что только эта фосфатаза может классифицироваться как щелочная (ЩФ; КФ 3.1.3.1). ЩФ амоб секретируется в культуральную среду; активность ее в культуральной среде мала. Вопрос о принадлежности «быстрой» и «средней» фосфатаз к определенному классу остается пока нерешенным.

Ключевые слова: амeba *Amoeba proteus*, щелочная фосфатаза, субстратная специфичность.

Принятые сокращения: бис-*n*-НФФ — бис-*n*-нитрофенилфосфат, ПААГ — полиакриламидный гель, *n*-НФФ — *n*-нитрофенилфосфат, ТХУ — трихлоруксусная кислота, ЩФ — щелочная фосфатаза.

Известно, что щелочная фосфатаза (ЩФ; КФ 3.1.3.1) катализирует как расщепление фосфомоноэфиров в щелочной среде с образованием неорганических фосфатов и спиртов, так и реакцию трансфосфорилирования (Лойда и др., 1982). Ранее (Сопина, 2005) у *Amoeba proteus* (штамм В) после диск-электрофореза в ПААГ и при использовании в качестве субстрата 1-нафтилфосфата (рН 9.0) были выявлены «медленная» (1—5 полос), «средняя» (1 полоса) и «быстрая» (1 полоса) фосфатазы. Использование ингибиторного анализа позволило выявить существенные различия между ними. Так, ортованадат натрия, молибдат аммония и $ZnCl_2$ инактивировали «быструю» и «среднюю» фосфатазы полностью, а «медленную» — в значительной степени. «Средняя» фосфатаза отличается от «медленной» и «быстрой» тем, что первая активировалась L-цистеином, а две последние полностью ингибировались им. «Медленная» и «средняя» фосфатазы полностью инактивировались $MnCl_2$, тогда как «быстрая» сохраняла свою активность. L-(+)-тарtrat натрия ингибировал «быструю» фосфатазу полностью, «среднюю» — в значительной степени и не оказывал никакого влияния на активность «медленной». На основании этих данных можно было подразделить фосфатазы (рН 9.0) *A. proteus* на «быструю» Mn -устойчивую, «среднюю» цистеин-устойчивую, «медленную» Zn - или ванадат/молибдат-устойчивую и «медленную» с небольшой примесью «средней» тарtrat-устойчивую. На основании ингибиторного анализа и опытов с реакти-

вацией «медленной» фосфатазы ионами Zn^{2+} после ее инактивации ЭДТА было высказано предположение о том, что из трех основных фосфатаз амоб, выявляемых при рН 9.0, только «медленная» может считаться ЩФ (Сопина, 2005). Множественные электрофоретические формы этой ЩФ вели себя одинаково при воздействии различных ингибиторов. По-видимому, они являются гликоформами одного и того же фермента, различающиеся числом присоединенных углеводных цепочек.

Задачей нашей работы было выяснить, секретируются ли фосфатазы амоб *A. proteus* в окружающую среду, определить субстратную специфичность каждой из четырех указанных выше фосфатаз в надосадочной жидкости гомогенатов и попытаться установить принадлежность «быстрой» и «средней» фосфатаз к определенному классу фосфатаз.

Материал и методика

Работа выполнена на амобах *A. proteus* (штаммы В и Вк). Амоб культивировали при 25 °С (Prescott, Carrier, 1964) и кормили инфузориями *Tetrahymena pyriformis* (штамм GL), которых выращивали в аксенических условиях.

Отмытых голодных амоб (через 3—4 сут после последнего кормления) переносили в микропробирки и осаждали центрифугированием (К-24, 10 000 об/мин,

5 мин, 4 °С). Осажденные клетки после добавления к ним 1%-ного Тритона X-100 разрушали в тех же микропробирках вращением пестика. Полученные гомогенаты центрифугировали при 13 000 об/мин (15 мин, 4 °С). Гомогенаты из тетрахимен, предварительно сконцентрированных центрифугированием (Т32с, 1000 об/мин, 3 мин), получали так же, как и гомогенаты из амёб. Содержание белка в надосадочной жидкости гомогенатов определяли по методу Лоури.

Культуральную среду, собранную из сосуда с большим количеством амёб, дважды центрифугировали при 13 000 об/мин (15 мин, 4 °С). Супернатант смешивали с 40%-ной сахарозой (2 : 1) и подвергали электрофорезу.

Фосфатазную активность в гелях при щелочном значении pH после диск-электрофореза в 10%-ном ПААГ выявляли в среде следующего состава: 100 мг 1-нафтилфосфата, 100 мг соли прочного синего РР, 100 мл 0.1М Трис-НСl-буфера (pH 9.0) и 1 мл 0.01 М MgCl₂; реакцию проводили в течение 30 мин при 37 °С (Серов и др., 1977; Сопина, 2005). Для выявления фосфатазной активности при кислом значении pH гели после электрофореза инкубировали в смеси, состоящей из 100 мг 1-нафтилфосфата, 100 мг соли прочного черного К и 100 мл 0.05 М цитратного буфера (pH 4.0), в течение 20 мин при 30 °С (Серов и др., 1977; Сопина, 1998). Окрашенные гели фиксировали 7.5%-ной уксусной кислотой и сканировали на микроденситометре MD-100. Пики на денситограммах, соответствующие фосфатазной активности электрофоретических форм, нумеровали в порядке уменьшения их подвижности в геле.

При спектрофотометрическом определении фосфатазной активности в качестве субстрата использовали 10 мМ динатриевую соль *n*-НФФ, растворенную в 0.1 М Трис-НСl-буфере (pH 9.0 или 10.0) вместе с 0.1 М NaCl (или без него) либо с 1—10 мМ MgCl₂ (или без него). К 5 мкл надосадочной жидкости гомогената добавляли 5 мкл ингибитора (0.1 М L-(+)-тарtrate натрия, 0.1 М MnCl₂, 20 мМ солянокислого L-цистеина или 10 мМ ZnCl₂) и после выдерживания смеси при комнатной температуре (30 мин) добавляли к ней 990 мкл субстрата. Ферментативную реакцию проводили при 37 °С (30 мин) и останавливали добавлением 20 мкл 3 М NaOH (Вауков et al., 1988). После этого пробы выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин, а затем фотометрировали на спектрофотометре Spekol 211 при 405 нм. Фосфатазную активность оценивали по величине светопоглощения за вычетом экстинкции водного контроля без белка и выражали в микромолях *n*-нитрофенола за 1 мин при 37 °С в расчете на 1 мг белка. Достоверность различий в фосфатазной активности оценивали с помощью *t*-критерия при 5%-ном уровне значимости, предполагая нормальное распределение этой переменной.

Субстратную специфичность фосфатаз (pH 9.0) определяли по освобождению неорганического фосфата (P_i) за вычетом P_i неэнзиматического гидролиза субстрата тремя разными способами. Во всех случаях к 5 мкл надосадочной жидкости гомогената (содержание белка в пробах колебалось от 62.5 до 67.5 мкг) добавляли 5 мкл того или иного ингибитора (см. выше). Пробы выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем добавляли к ним 200 мкл (способы 1 и 2) или 490 мкл (способ 3) 30 мМ субстрата, растворенного в 0.1 М Трис-НСl-буфере (pH 9.0) с 5 мМ MgCl₂ (или без него) и помещали на 40 мин при 37 °С.

Способ 1. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл охлажденной 3.75 мМ ТХУ, после чего пробы помещали в сосуд со льдом на 5 мин. Денатурированный белок осаждали центрифугированием (13 000 об/мин, 4 °С, 10 мин). 200 мкл супернатанта доводили до 1 мл дистиллированной водой и после этого проводили анализ освободившегося P_i (Black, Jones, 1983; Kaija et al., 2002).

Способ 2. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 20 мкл охлажденной 50%-ной ТХУ и помещением проб в сосуд со льдом на 5 мин. Затем пробы центрифугировали так же, как и при способе 1. К 200 мкл супернатанта добавляли 1 мл смеси, содержащей 1.2 М H₂SO₄, 0.5%-ный молибдат аммония и 2%-ную аскорбиновую кислоту (Chen et al., 1956).

Способ 3. Ферментативную реакцию в пробах заканчивали добавлением 150 мкл охлажденной 25%-ной ТХУ и 50 мкл 10%-ного альбумина, после чего пробы помещали в сосуд со льдом. Затем их центрифугировали так же, как и при способах 1 и 2. К 650 мкл супернатанта добавляли 650 мкл такой же смеси, как и при способе 2. При способах 2 и 3 пробы прогревали при 56 °С (15 мин) и сразу же фотометрировали при 750 нм (Mustelin et al., 1989; Vincent et al., 1999; Jeon et al., 2002).

При определении субстратной специфичности фосфатаз использовали 10 соединений: *n*-НФФ (динатриевая соль), 1- и 2-нафтилфосфаты (динатриевые соли), 1- и 2-глицерофосфаты (динатриевые соли), глюкозо-6-фосфат (динатриевая соль), бис-*n*-НФФ (натриевая соль), O-фосфо-L-тирозин, O-фосфо-L-серин и O-фосфо-L-треонин.

Результаты

Известно, что пищеварительный цикл *A. proteus* завершается в течение 3 сут (Charman-Andresen, 1977). Несмотря на то что мы получали гомогенаты из голодных амёб, тем не менее сочли необходимым сравнить спектры фосфатаз амёб и инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (штамм GL), которые служили им пищей, при одном и том же способе получения гомогената и одним и тем же методе электрофореза в ПААГ (рис. 1). Щелочные фосфатазы у тетрахимен ранее не исследовались. Обнаружено, что у этих инфузорий фосфатазы (pH 9.0) обычно представлены 7 электрофоретическими полосами. Значительная доля фосфатазной активности тетрахимен приходится на полосы 1, 2 и 6. 3 из 7 полос (4—6) совпадают по подвижности с основной полосой амёб (5) и двумя минорными (3 и 4), которые часто присутствуют в спектре фосфатаз (pH 9.0) амёб после электрофореза 20—25 мкг белка. Поэтому нельзя использовать в опытах хорошо накармливаемых амёб. Следует также отметить, что ни «быстрая» (1), ни «средняя» (2) фосфатазы амёб не совпадают по подвижности с таковыми тетрахимен.

Известно, что в цитоплазме амёб штамма В присутствуют многочисленные бактерии — свободные и в вакуолях (Сопина, Фокин, 1993), вклад которых в спектр фосфатаз амёб не определялся. Несмотря на то что симбиотические X-бактерии, выделенные из *A. proteus* (штамм D), устойчивы к таким дегергентам, как Тритон X-100 и Brij (Jeon, 1980), мы сравнили спектры фосфатаз амёб штамма Вк, в цитоплазме которого нет бактериальных эндобионтов (Сопина, Фокин, 1993), и штамма В.

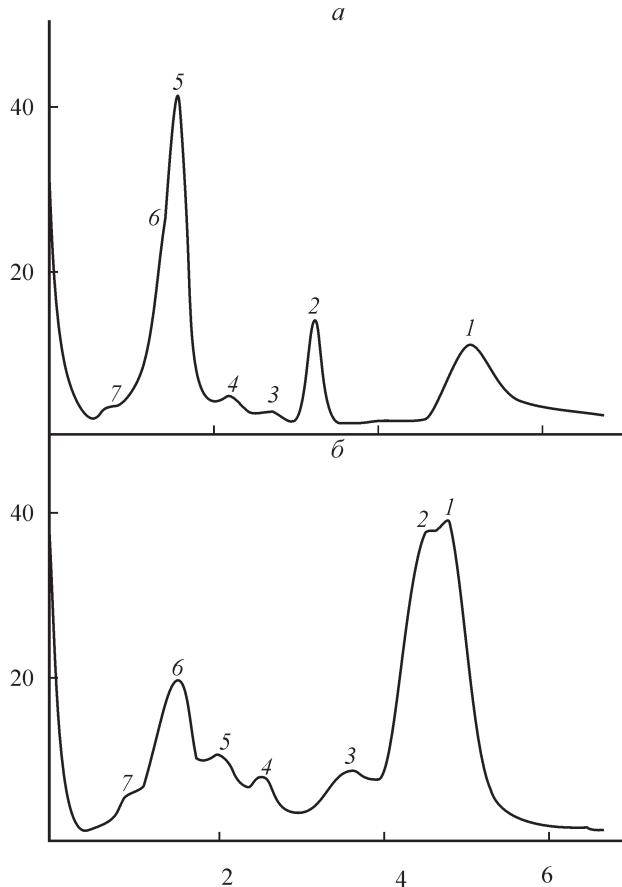


Рис. 1. Электрофоретические формы фосфатазной активности у *Amoeba proteus* штамма В (а) и инфузорий *Tetrahymena pyriformis* штамма GL (б), выявляемые после электрофореза в ПААГ и последующей окраски гелей в инкубационной смеси, содержащей в качестве субстрата 1-нафтилфосфат (рН 9.0).

По оси абсцисс — расстояние от стартовой линии разделяющего геля, усл. ед.; по оси ординат — оптическая плотность геля, % полного поглощения света. 1—7 — номера фракций фосфатазной активности.

Fig. 1. Densitograms of electrophoretic forms of phosphatase activity in *Amoeba proteus* (strain B) (a) and *Tetrahymena pyriformis* (strain GL) (b) after electrophoresis and a subsequent gel staining in 1-naphthyl phosphate containing incubation mixture (pH 9.0).

Abscissa — distance from the origin (a. u.); ordinate — optical density of bands (per cent of total absorption). 1—7 — numbers of bands in decreasing order of electrophoretic mobilities.

Оказалось, что у амёб обоих штаммов при рН 9.0 присутствуют 3 фосфатазы. Следовательно, «быстрая» и «средняя» фосфатазы — амёбного, а не бактериального происхождения.

После электрофореза среды, в которой находились амёбы, была обнаружена единственная фосфатазная полоса, подвижность которой немного замедлена по сравнению с таковой полосы 4 с наибольшей активностью у амёб (рис. 2). Следовательно, только «медленная» фосфатаза амёб секретируется в культуральную среду. Активность ее в культуральной среде мала.

Результаты сравнения фосфатазных активностей при кислом и щелочном значениях рН представлены на рис. 3. Видно, что из 6 фосфатазных фракций, выявляемых при рН 4.0 и при использовании в качестве субстрата 1-нафтилфосфата, 2 (4 и 6) совпадают по подвижности с двумя фосфатазными фракциями, выявляемыми при

рН 9.0 и при использовании того же субстрата, — 1 («быстрая») и 2 («средняя»).

В отличие от работы Кононовой с соавторами (2000) и предыдущей нашей работы (Сопина, 2005) при определении *n*-НФФазной активности амёб 0.1 М NaCl не добавляли к 0.1 М Трис-НСI-буферу (рН 9.0), поскольку активности тартрат-устойчивой фосфатазы («медленной» с небольшой примесью «средней») в присутствии его и без него не различались: 0.076 ± 0.004 ($n = 6$) и 0.087 ± 0.005 ($n = 3$) соответственно.

При определении влияния ионов Mg^{2+} на *n*-НФФазную активность тартрат-устойчивой фосфатазы было обнаружено, что присутствие в буферном растворе 1 или 5 мМ $MgCl_2$ увеличивает эту активность. Однако в присутствии 10 мМ $MgCl_2$ активность тартрат-устойчивой фосфатазы снижается и уже не отличается от ее активности в присутствии 1 мМ $MgCl_2$, хотя и превышает ее в отсутствие ионов Mg^{2+} в буфере (табл. 1).

В отличие от нашей более ранней работы (Сопина, 2005) *n*-НФФазная активность фосфатаз была определена с использованием одного и того же Трис-НСI-буфера (рН 9.0 и 10.0) без добавления к нему ионов Mg^{2+} (табл. 2). Оказалось, что при рН 10.0 по сравнению с рН 9.0 активность всех фосфатаз снижается — в 1.5 раза у «медленной», в 1.9 раза у «средней» и в 2.3 раза у «быстрой». При рН 9.0 наибольшая *n*-НФФазная активность характерна для «быстрой» и «средней» форм и наименьшая — для «медленной». Если при рН 9.0 активность «быстрой» формы выше таковой «средней» формы, то при рН 10.0 эти активности не различаются, но превышают активности как «медленной» фосфатазы, так и «медленной» с примесью «средней».

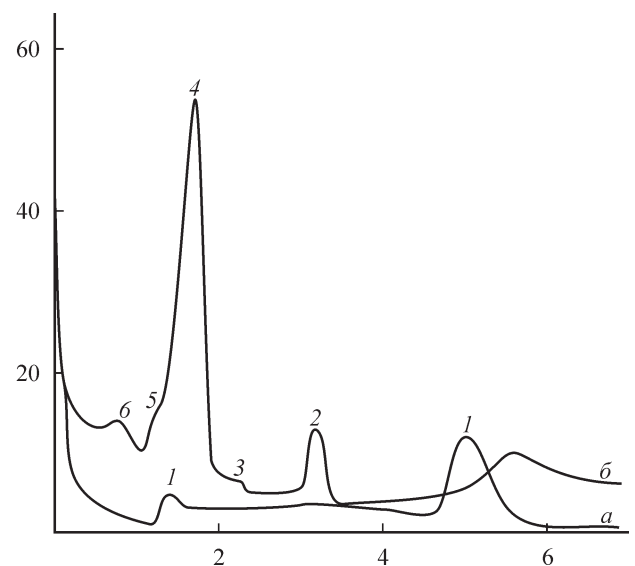


Рис. 2. Электрофоретические формы фосфатазной активности у *Amoeba proteus* штамма В (а) и в культуральной среде (б), в которой находились эти амёбы, выявляемые после электрофореза в ПААГ и последующей окраски гелей в инкубационной смеси, содержащей в качестве субстрата 1-нафтилфосфат (рН 9.0).

Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 2. Densitograms of electrophoretic forms of phosphatase activities in *Amoeba proteus* (strain B) (a) and in culture medium (b) after electrophoresis and a subsequent gel staining in 1-naphthyl phosphate containing incubation mixture (pH 9.0).

Axes are the same as in Fig. 1.

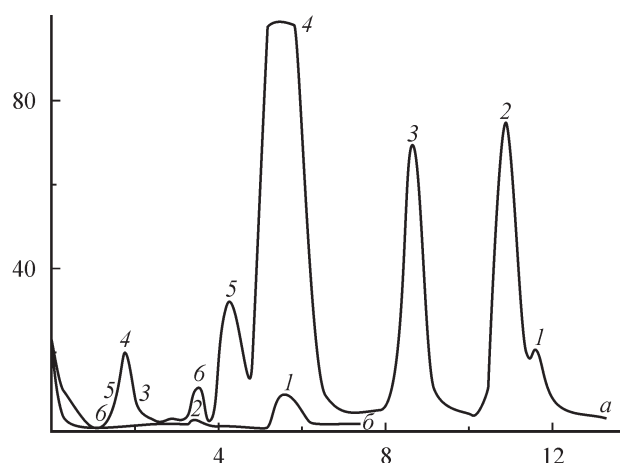


Рис. 3. Электрофоретические формы фосфатазной активности у *Amoeba proteus* штамма В, выявляемые после электрофореза в ПААГ и последующей окраски гелей в инкубационной смеси, содержащей в качестве субстрата 1-нафтилфосфат, при разных значениях рН.

a — 0.05 М цитратный буфер, рН 4.0; *b* — 0.1 М Трис-НСl-буфер, рН 9.0. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 3. Densitograms of electrophoretic forms of phosphatase activity in *Amoeba proteus* (strain В) after electrophoresis and a subsequent gel staining in 1-naphthyl phosphate containing incubation mixture at different рН.

a — 0.05 M citrate buffer, рН 4.0; *b* — 0.1 M Tris-HCl buffer, рН 9.0. Axes are the same as Fig. 1.

При оценке субстратной специфичности тартрат-устойчивой фосфатазы без добавления ионов Mg^{2+} в реакционную смесь была установлена ее широкая субстратная специфичность (табл. 3). Хотя цифры относительной активности и различались при разных способах определения освобождения неорганического фосфата, полученный результат оказался одинаковым. Обнаружено, что тартрат-устойчивая фосфатаза в значительной степени гидролизует *n*-НФФ, 1- и 2-нафтилфосфаты, слабее — глюкозо-6-фосфат и бис-*n*-НФФ и в еще меньшей степени — 1- и 2-глицерофосфаты.

Активность «медленной» фосфатазы крайне низка из-за значительной инактивации ее ионами Zn^{2+} (табл. 2). Для определения субстратной специфичности этой фосфатазы необходимо было увеличить ее активность, что и было сделано с помощью 5 мМ $MgCl_2$ (табл. 4). Включением в буферный раствор ионов Mg^{2+} в этой концентрации удалось довести *n*-НФФазную активность *Zn*-устойчивой фосфатазы до уровня активности тартрат-устойчивой в отсутствие ионов Mg^{2+} в буфере. Однако в присутствии 5 мМ $MgCl_2$ активность тартрат-устойчивой фосфатазы в 1.4 раза превышает таковую *Zn*-устойчивой.

Полученный результат дал возможность определить субстратную специфичность трех фосфатаз, выявляемых при рН 9.0 в надосадочной жидкости гомогенатов амёб, — «медленной» (*Zn*-устойчивой), «средней» (цистеин-устойчивой) и «быстрой» (*Mn*-устойчивой) (табл. 5). Видно, что из 10 испытанных соединений все фосфатазы предпочтительно гидролизуют *n*-НФФ. Относительная активность «медленной» фосфатазы в отношении нафтилфосфатов сравнима с таковой в отношении *n*-НФФ. Если «медленная» фосфатаза примерно в равной степени гидролизует 1- и 2-нафтилфосфаты, то «сред-

Таблица 1

Влияние ионов Mg^{2+} на *n*-НФФазную активность тартрат-устойчивой фосфатазы («медленной») с примесью «средней») у *Amoeba proteus*

Концентрация $MgCl_2$, мМ	<i>n</i> -НФФазная активность, мкмоль <i>n</i> -нитрофенола на 1 мг белка за 1 мин при 37 °С, $\bar{x} \pm s_x^a$
0	0.085 ± 0.003
1	0.098 ± 0.005
5	0.129 ± 0.004
10	0.101 ± 0.004

^a Каждое среднее получено из 6 измерений.

Таблица 2

***n*-НФФазная активность фосфатаз у *Amoeba proteus* при разных рН 0.1 М Трис-НСl-буфера**

Фосфатаза	<i>n</i> -НФФазная активность, мкмоль <i>n</i> -нитрофенола на 1 мг белка за 1 мин при 37 °С, $\bar{x} \pm s_x^a$	
	рН 9.0	рН 10.0
«Быстрая»	0.192 ± 0.001	0.084 ± 0.006
«Средняя»	0.128 ± 0.002	0.066 ± 0.007
«Медленная»	0.043 ± 0.003	0.028 ± 0.003
«Медленная» с примесью «средней»	0.095 ± 0.001	0.050 ± 0.003

^a Каждое среднее получено из 3—6 измерений. $MgCl_2$ не включали в состав реакционной смеси.

Таблица 3

Субстратная специфичность тартрат-резистентной фосфатазы («медленной») с примесью «средней») у *Amoeba proteus*

Субстрат	Относительная активность фосфатазы, определенная тремя разными способами, % ^a		
	1	2	3
1-Нафтилфосфат	78	71	84
2-Нафтилфосфат	74	75	93
Бис- <i>n</i> -НФФ	57	39	66
Глюкозо-6-фосфат	52	43	63
1-Глицерофосфат	38	20	21
2-Глицерофосфат	34	24	20
<i>n</i> -НФФ	100	100	100

^a За 100 % принимали активность фосфатазы при использовании в качестве субстрата *n*-НФФ.

няя» и в особенности «быстрая» из этих двух субстратов отдадут предпочтение первому. На это следует обратить внимание, в связи с тем что ранее (Сопина, 2005) при использовании 2-нафтилфосфата для окраски гелей после электрофореза 10 мкг белка «быстрая» и «средняя» фосфатазы не выявлялись. Причина расхождения полученных результатов заключается, по-видимому, в том,

Таблица 4

Влияние ионов Mg^{2+} на *n*-НФФазную активность фосфатаз

Фосфатаза	Концентрация $MgCl_2$, мМ	<i>n</i> -НФФазная активность, мкмоль <i>n</i> -нитрофенола на 1 мг белка за 1 мин при 37 °С, $\bar{x} \pm s_x^a$
«Медленная»	0	0.043 ± 0.003
	5	0.088 ± 0.004
«Медленная» с примесью «средней»	0	0.090 ± 0.007
	5	0.126 ± 0.001

^a Каждое среднее получено из 3—6 измерений.

Таблица 5

Субстратная специфичность фосфатаз (рН 9.0) у *Amoeba proteus*, определенная способом 2

Субстрат	Относительная активность разных фосфатаз, % ^a		
	«медленная»	«средняя»	«быстрая»
1-Нафтилфосфат	93	47	76
2-Нафтилфосфат	89	37	58
Бис- <i>n</i> -НФФ	43	42	45
Глюкозо-6-фосфат	34	41	9
1-Глицерофосфат	34	43	36
2-Глицерофосфат	30	42	36
О-фосфо-L-тирозин	73	43	52
О-фосфо-L-серин	55	11	7
О-фосфо-L-треонин	63	13	12
<i>n</i> -НФФ	100	100	100

^a За 100 % принимали активность фосфатазы при использовании в качестве субстрата *n*-НФФ. 5 мМ $MgCl_2$ включали в реакционную смесь лишь при определении субстратной специфичности «медленной» фосфатазы.

что при определении освобождения неорганических фосфатов концентрация белка в пробе в 6.2—6.8 раза превышает содержание белка, вносимого в концентрирующий гель перед электрофорезом. В дополнение к этому концентрация нафтилфосфатов при определении освобождения фосфатов в 8 раз больше, чем при окраске гелей. «Быстрая» фосфатаза отличается от «средней» и «медленной» низкой степенью гидролиза глюкозо-6-фосфата. Все три фосфатазы гидролизуют бис-*n*-НФФ, т. е. обладают фосфодиэстеразной активностью, как, например, и секретируемая ЩФ *Bacillus intermedius* (Шарипова и др., 1998). Все фосфатазы гидролизуют О-фосфо-L-тирозин, но «медленная» — наиболее интенсивно. Если «медленная» фосфатаза наряду с О-фосфо-L-тиозином хорошо гидролизует О-фосфо-L-серин и О-фосфо-L-треонин, то «быстрая» и «средняя» гидролизуют последние намного хуже, отдавая предпочтение О-фосфо-L-тиозину.

Результаты определения субстратной специфичности тартрат-устойчивой и Zn-устойчивой фосфатаз

способом 2 различаются лишь тем, что если в первом случае 7 соединений, используемых в качестве субстратов, по относительной активности можно разделить на три группы, то во втором — на две, одна из которых объединяет *n*-НФФ, 1- и 2-нафтилфосфаты, а вторая — бис-*n*-НФФ, глюкозо-6-фосфат, 1- и 2-глицерофосфаты (табл. 3, 5).

Обсуждение

Из беспозвоночных субстратная специфичность ЩФ изучена у 4 видов протистов — *Dictyostelium discoideum*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri* и *Paramecium tetraurella* и у 1 вида насекомых — *Drosophila melanogaster* (Harper, Armstrong, 1972; Klumpp, Schulz, 1990; Quisel et al., 1996; Hallmann, 1999; Ubeidat, Rutherford, 2003).

В отличие от ЩФ перечисленных выше протистов субстратную специфичность фосфатаз (рН 9.0) *A. proteus* определяли в надосадочной жидкости гомогенатов с использованием ингибиторов фосфатазной активности, а не для очищенных ферментов. Поэтому полученные нами результаты нуждаются в дополнительном уточнении. Все фосфатазы *A. proteus*, выявляемые при рН 9.0, как и ЩФ других протистов, характеризуются широкой субстратной специфичностью. Все фосфатазы *A. proteus* в отличие от ЩФ *P. caudatum*, *Ch. reinhardtii* и *V. carteri* обладают фосфодиэстеразной активностью. Как и у других протистов, предпочитаемым субстратом фосфатаз *A. proteus* является *n*-НФФ. Подобно основной и минорной формам ЩФ *V. carteri* все фосфатазы *A. proteus* в большей или меньшей степени гидролизуют О-фосфо-L-тирозин.

В субстратной специфичности фосфатаз *A. proteus* были обнаружены лишь небольшие различия: 1) «быстрая» фосфатаза в отличие от «средней» и «медленной» почти не гидролизует глюкозо-6-фосфат; 2) «быстрая» и «средняя» фосфатазы по сравнению с «медленной» лишь в незначительной степени гидролизуют О-фосфо-L-серин и О-фосфо-L-треонин; 3) «быстрая» и «средняя» фосфатазы слабее, чем «медленная», гидролизуют нафтилфосфаты и фосфо-L-тирозин; 4) «средняя» фосфатаза и в особенности «быстрая» в гидролизе 1- и 2-нафтилфосфатов отдают предпочтение первому.

Ранее (Сопина, 2005) на основании проведенного ингибиторного анализа и реактивации «медленной» фосфатазы *A. proteus* ионами Zn^{2+} после ингибирования ее ЭДТА было высказано предположение о том, что из трех фосфатаз, выявляемых при рН 9.0, только «медленная» является Zn-металлоферментом и может классифицироваться как ЩФ. Широкая субстратная специфичность «медленной» фосфатазы подтверждает это предположение. Из литературных источников известно, что ЩФ многих бактерий и млекопитающих имеют протеинфосфатазную активность (Mellgren et al., 1977; Li et al., 1979; Tabarini, Binstock, 1979; Harada et al., 1981; Yamashita et al., 1990; Ansai et al., 1998). Предполагается, что эти ЩФ могут действовать как протеинфосфатазы *in vivo*. ЩФ *A. proteus*, подобно внеклеточной ЩФ гриба *Aspergillus caespitosus* и аллельными формами ЩФ *Drosophila melanogaster* (Harper, Armstrong, 1972; Guimaraes et al., 2003), гидролизует не только *n*-НФФ, но и фосфорилированные аминокислоты — О-фосфосерин, О-фосфотреонин и О-фосфотиозин. Не исключено, что ЩФ

A. proteus обладает не только фосфомоноэстеразной и фосфодиэстеразной активностями, но и протеинфосфатазной активностью.

Обнаружено, что из трех фосфатаз *A. proteus* только «медленная» секретируется в культуральную среду. Следовательно, секретируемая ЩФ амёб наряду с секретируемыми ЩФ других организмов принимает участие в гидролизе эстерифицированных фосфатов в природных водоемах.

Вопрос о принадлежности «быстрой» и «средней» форм фосфатаз (рН 9.0) к определенному классу фосфатаз остается пока нерешенным. Доказано лишь, что обе эти формы — фосфатазы амёб, а не тетрахимен, которые служили им пищей, и не бактериальных эндобионтов, которые присутствуют в их цитоплазме. У *A. proteus* фосфатазная активность при рН 9.0 крайне низка по сравнению с таковой, выявляемой при кислых значениях рН (Сопина, 1998, 2005). В настоящей работе установлено, что «быстрая» фосфатаза (рН 9.0) совпадает по подвижности с основной фракцией тартрат-чувствительной лизосомной кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2), выявляемой при рН 4.0 и при использовании в качестве субстрата 1-нафтилфосфата. Поэтому не исключено, что ингибируемая тартратом «быстрая» фосфатаза (рН 9.0) представляет собой активность кислой фосфатазы, сохраняющуюся при щелочном значении рН. «Средняя» фосфатаза (рН 9.0) также совпадает по подвижности с минорной фракцией фосфатазы, выявляемой при рН 4.0 и при использовании в качестве субстрата 1-, но не 2-нафтилфосфата (Сопина, 1998). «Средняя» фосфатаза в отличие от «быстрой» ингибируется тартратом не полностью, но в значительной степени. По-видимому, эта фосфатаза, как и «быстрая», катализирует гидролиз эфиров ортофосфорной кислоты в широком диапазоне рН и может быть одной из фракций кислой фосфатазы, для которой характерна большая устойчивость к воздействию тартрата. В обоих случаях против высказанного предположения говорит тот факт, что кислая фосфатаза наряду с фосфомоноэфирами гидролизует пиррофосфатные соединения, но не фосфодиэфиры (Лойда и др., 1982). Для окончательного решения этого вопроса необходимо определить субстратную специфичность разных форм тартрат-чувствительной кислой фосфатазы у *A. proteus*.

Автор благодарит Ю. Я. Соколову, Ф. Л. Виханскую и М. З. Капицкую за помощь в приобретении реактивов и А. А. Самошкина за помощь в подготовке рисунков к печати.

Список литературы

- Кононова С. В., Золов С. Н., Крупянко В. И., Несмеянова М. А. 2000. Первичная структура N-концевой области зрелой щелочной фосфатазы важна для секреции и функционирования фермента. Биохимия. 65 (9) : 1270—1277.
- Лойда З., Госсрай З., Шиблер Т. 1982. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. М.: Мир. 270 с.
- Серов О. Л., Корочкин Л. Н., Манченко Г. П. 1977. Электрофоретические методы исследования ферментов. В кн.: Генетика изоферментов. М.: Наука. 18—64.
- Сопина В. А. 1998. Кислые фосфатазы у амёб *Amoeba proteus*. Цитология. 40 (11) : 980—990.
- Сопина В. А. 2005. Щелочная фосфатаза амёбы *Amoeba proteus*. Цитология. 47 (4) : 357—365.
- Сопина В. А., Фокин С. И. 1993. Полиморфизм глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы свободноживущих амёб сем. Amobidae. Цитология. 35 (3) : 145—164.
- Шарупова М. П., Балабан Н. П., Марданова А. М., Нехотяева Н. В., Дементьев А. А., Вершинина О. А., Гарусов А. В., Лецинская И. Б. 1998. Получение и характеристика секретируемой щелочной фосфатазы *Bacillus intermedius*. Биохимия. 63 (10) : 1385—1390.
- Ansai T., Awano S., Chen X., Fuchi T., Arimoto T., Akifusa S., Takehara T. 1998. Purification and characterization of alkaline phosphatase containing phosphotyrosil phosphatase activity from the bacterium *Prevotella intermedia*. FEBS Lett. 428 : 157—160.
- Baykov A. A., Evtuchenko O. A., Avaeva S. M. 1988. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. Anal. Biochem. 171 : 266—270.
- Black M. J., Jones M. E. 1983. Inorganic phosphate determination in the presence of a labile organic phosphate: assay for carbonyl phosphate phosphatase activity. Anal. Biochem. 135 : 233—238.
- Chapman-Andresen C. 1977. Lysosomes and digestion in fresh-water amoebae. In: The Fifth Int. Congr. of Protozoology. New York: 236.
- Chen P. S., Jr., Toribara T. Y., Warner H. 1956. Microdetermination of phosphorus. Anal. Chem. 28 : 1756—1758.
- Guimaraes L. H., Terensi H. F., Jorge J. A., Leone F. A., Polizeli M. L. 2003. Extracellular alkaline phosphatase from the filamentous fungus *Aspergillus caespitosus*: purification and biochemical characterization. Folia Microbiol. (Praga). 48 : 627—632.
- Hallmann A. 1999. Enzymes in the extracellular matrix of Volvox: an inducible, calcium-dependent phosphatase with a modular composition. J. Biol. Chem. 274 : 1691—1697.
- Harada M., Hiraoka B. Y., Fukasawa K., Fukasawa K. M. 1981. Phosphoprotein phosphatase activity of bovine intestinal alkaline phosphatase. Experientia. 37 : 547—548.
- Harper R. A., Armstrong F. B. 1972. Alkaline phosphatase of *Drosophila melanogaster*. Partial purification and characterization. Biochem. Genetics. 6 : 75—82.
- Jeon K. W. 1980. Symbiosis of bacteria with amoeba. In: Cellular interactions in symbiotic and parasitic relationships. Columbus: Ohio State Univ. Press. 245—262.
- Jeon S.-J., Fujiwara S., Takagi M., Tanaka T., Imanaka T. 2002. Tk-PTP, protein tyrosine/serine phosphatase from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1: enzymatic characteristics and identification of its substrate proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 295 : 508—514.
- Kaija H., Alatalo S. L., Halleen J. M., Lindqvist Y., Schneider G., Väänänen H. K., Vihko P. 2002. Phosphatase and oxygen radical-generating activities of mammalian purple acid phosphatase are functionally independent. Biochem. Biophys. Res. Commun. 292 : 128—132.
- Klump S., Schulz J. E. 1990. Alkaline phosphatase from *Paramecium* cilia and cell bodies: purification and characterization. Biochim. biophys. acta. 1037 : 233—239.
- Li H.-C., Hsiao K.-J., Sampathkumar S. 1979. Characterization of a novel alkaline phosphatase activity which co-purifies with a phosphorylase (phosphoprotein) phosphatase of Mr = 35,000 cardiac muscle. J. Biol. Chem. 254 : 3368—3374.
- Mellgren R. L., Slaughter G. R., Thomas J. A. 1977. Dephosphorylation of phosphoproteins by *Escherichia coli* alkaline phosphatase. J. Biol. Chem. 252 : 6082—6089.
- Mustelin T., Coggeshall K. M., Altman A. 1989. Rapid activation of the T-cell tyrosine protein kinase pp56^{lck} by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 86 : 6302—6306.
- Prescott D. M., Carrier R. F. 1964. Experimental procedures and cultural methods for *Euplotes eurystomus* and *Amoeba proteus*. Methods in Cell Physiol. 1 : 85—95.
- Quisel J. D., Wykoff D. D., Grossman A. R. 1996. Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 111 : 839—848.

Tabarini D., Binstock J. F. 1979. Dephosphorylation of phosphoproteins by various mammalian alkaline phosphatases. Fed. Proc. 38 : 717.

Ubeidat M., Rutherford C. L. 2003. Purification and renaturation of *Dictyostelium* recombinant alkaline phosphatases by continuous elution electrophoresis. Protein Exp. Purif. 27 : 375—383.

Vincent C., Doublet P., Grangeasse C., Vaganey E., Cozzone A. J., Duclos B. 1999. Cells of *Escherichia coli* contain a prote-

in-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. J. Bacteriol. 181 : 3472—3477.

Yamashita Y., Toyoshima K., Yamazaki M., Hanada N., Takehara T. 1990. Purification and characterization of alkaline phosphatase of *Bacteroides gingivalis*. 381. Infect. Immun. 58 : 2882—2887.

Поступила 7 II 2006

SUBSTRATE SPECIFICITY IN *AMOEBIA PROTEUS*

V. A. Sopina

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: vsop39@mail.ru

Three different phosphatases («slow», «middle» and «fast») were found in *Amoeba proteus* (strain B) after PAGE and a subsequent gel staining in 1-naphthyl phosphate containing incubation mixture (pH 9.0). Substrate specificity of these phosphatases was determined in supernatants of homogenates using inhibitors of phosphatase activity. All phosphatases showed a broad substrate specificity. Of 10 tested compounds, *p*-nitrophenyl phosphate was a preferable substrate for all 3 phosphatases. All phosphatases were able to hydrolyse bis-*p*-nitrophenyl phosphate and, hence, displayed phosphodiesterase activity. All phosphatases hydrolysed O-phospho-L-tyrosine to a greater or lesser degree. Only little differences in substrate specificity of phosphatases were noticed: 1) «fast» and «middle» phosphatases hydrolysed naphthyl phosphates and O-phospho-L-tyrosine less efficiently than did «slow» phosphatase; 2) «fast» and «middle» phosphatases hydrolysed 2-naphthyl phosphate to a lesser degree than 1-naphthyl phosphate 3) «fast» and «middle» phosphatases hydrolysed O-phospho-L-serine and O-phospho-L-threonine with lower intensity as compared with «slow» phosphatase; 4) as distinct from «middle» and «slow» phosphatases, the «fast» phosphatase hydrolysed glucose-6-phosphate very poorly. The revealed broad substrate specificity of «slow» phosphatase together with data of inhibitory analysis and results of experiments with reactivation of this phosphatase by Zn²⁺-ions after its inactivation by EDTA strongly suggest that only the «slow» phosphatase is a true alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1). The alkaline phosphatase of *A. proteus* is secreted into culture medium where its activity is low. The enzyme displays both phosphomono- and phosphodiesterase activities, in addition to supposed protein phosphatase activity. It still remains unknown, to which particular phosphatase class the amoeban «middle» and «fast» phosphatases (pH 9.0) may be assigned.