



УДК 577.152.276

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НУКЛЕОЗИДДИФОСФАТКИНАЗЫ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА БЫКА

© 1999 г. Г. Н. Карашук[#], Д. Л. Какуев, В. И. Попов*, И. О. Гайдаров, Н. Г. АбдулаевИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Институт биофизики клетки РАН, Пущино Московской обл.

Поступила в редакцию 19.11.98 г. Принята к печати 11.03.99 г.

Нуклеозиддифосфаткиназа (NDP-киназа; АТФ : NDP-фосфотрансфераза, КФ 2.7.4.6) выделена в чистом виде из сетчатки глаза быка. Молекулярная масса нативного фермента составила 72 кДа, а составляющих его субъединиц – 17.5 и 18.5 кДа. Определены кинетические характеристики фермента. Показано, что NDP-киназа присутствует в сетчатке глаза как в растворимой, так и мембраносвязанной форме.

Ключевые слова: нуклеозиддифосфаткиназа; фосфотрансфераза; сетчатка глаз быка; олигомер; очистка ферментов.

Нуклеозиддифосфаткиназа (NDP-киназа; АТФ : NDP-фосфотрансфераза, КФ 2.7.4.6) катализирует перенос терминального γ -фосфата с нуклеозидтрифосфатов на нуклеозиддифосфаты с низкой специфичностью к субстрату [1]. Этот фермент чрезвычайно широко распространен в природе. Он обнаружен у животных [2], растений [3] и микроорганизмов [4]. Ранее полагали, что NDP-киназа необходима только для создания в клетке запасов нуклеозидтрифосфатов [1, 5]. В последние годы показано, что этот фермент играет важную роль в осуществлении целого ряда функций клеток. Показано, что экспрессия гена *nm23-H1* [6], кодирующего NDPK-A-изоформу фермента [7] и, по-видимому, являющегося геном супрессора метастазов [8], сильно увеличена в опухолевых тканях [9, 10]. Кроме того, другая изоформа NDPK-B, кодируемая геном *nm23-H2* [11], связывается с промотором онкогена *c-myc* и стимулирует его транскрипцию *in vitro* [12]. NDP-киназа является фактором ингибирования дифференцировки миелоидных лейкозных клеток мыши [13]. В клетках *Escherichia coli* ген, кодирующий NDP-киназу, функционирует как ген-антимутатор [14]. Показано также, что NDP-киназа непосредственно взаимодействует с внутриклеточными белками, такими как тубулин [15] и G-белки [16].

NDP-киназа сетчатки – гликопротеин с низким содержанием углеводов [17], является основным ферментом, катализирующим синтез внутриклеточного GTP, субстрата трансдуцина и гуанилатциклазы, который контролирует процессы возбуждения и десенситизации зрительных клеток

[18]. Цель настоящей работы – получение высокоочищенной NDP-киназы сетчатки глаз быка и исследование ее биохимических свойств.

Для получения высокоочищенного препарата NDP-киназы экстракт растворимых белков сетчатки фракционировали с помощью насыщенного раствора сульфата аммония с последующей аффинной хроматографией на Blue-сефарозе (табл. 1). В результате осаждения сульфатом аммония происходила 5-кратная очистка фермента без заметного уменьшения общей активности. При последующей хроматографии на Blue-сефарозе NDP-киназа связывалась с сорбентом и затем избирательно элюировалась буфером, содер-

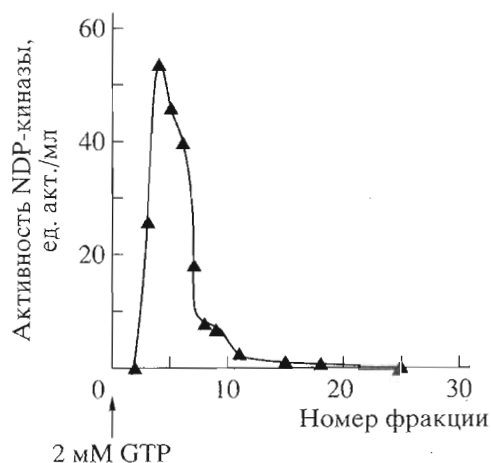


Рис. 1. Аффинная хроматография на колонке с Blue-сефарозой (10 × 44 мм) фракционированного сульфатом аммония экстракта растворимых белков сетчатки. Элюция TMEB-буфером, содержащим GTP. Контроль осуществляли по активности NDP-киназы. Объем фракций 1.5 мл. Скорость элюции 1 мл/мин.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-63-47; e-mail: karas@ibch.siobc.ras.ru).

Таблица 1. Выделение высокоочищенной NDP-киназы из сетчаток быка*

Фракция	Общая активность, ед. акт.	Содержание белка, мг	Удельная активность, ед. акт./мг белка	Степень очистки	Выход NDP-киназы, %
Грубый экстракт	6910	3840	1.8	1.0	100
Супернатант после первого высаливания (NH ₄) ₂ SO ₄	6828	1015	6.7	3.7	99
Осадок после второго высаливания (NH ₄) ₂ SO ₄	5316	595	8.9	5.0	77
Очищенная NDP-киназа после хроматографии на Blue-сефарозе	840	1	763.2	424.0	12

* Взято 200 сетчаток.

жащим 2 мМ GTP (рис. 1), что приводило к получению высокоочищенного препарата фермента (рис. 2). Такой простой и эффективный способ очистки позволил получить около 1 мг NDP-киназы из 200 сетчаток.

При SDS-электрофорезе в 15% ПААГ NDP-киназа обнаруживала две полипептидные полосы с молекулярными массами 17.5 и 18.5 кДа (рис. 2). Для доказательства того, что обе полосы принадлежат NDP-киназе, проводили реакцию аутофосфорилирования выделенного нативного фермента путем его инкубации с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Полученный радиоактивный белок анализировали электрофорезом с последующей радиоавтографией. Обе полосы обладали характерным для NDP-киназы свойством фосфорилироваться. Таким образом, NDP-киназа сетчатки быка состоит из двух типов неидентичных субъединиц, как и все NDP-киназы эукариот [7, 19, 20].

В результате гель-фильтрации NDP-киназы сетчатки быка в неденатурирующих условиях на колонке TSK-G3000 получен единственный пик

белка с молекулярной массой 72 кДа (рис. 3а, б). Таким образом, нативная NDP-киназа представляет собой в растворе олигомер, состоящий из 4 субъединиц. Олигомерная структура характерна для всех NDP-киназ, известных в настоящее время, однако большинство эукариотических ферментов являются гексамерами [21–23]. Тетрамерная структура более присуща NDP-киназам из бактерий [24].

Вопрос о локализации NDP-киназы в клетках сетчатки представляет значительный интерес с точки зрения прояснения истинной роли этого фермента в клеточных процессах. Для проведения исследования ультратонкие срезы сетчатки инкубировали с антителами к NDP-киназе, а затем обрабатывали белком А (см. “Эксперимент. часть”), маркированным коллоидным золотом. На рис. 4 представлены электронные микрофотографии сетчатки, меченной таким образом. Частицы золота локализованы как вдоль мембран дисков (некоторые из них отмечены стрелками на рис. 4б), так и в цитоплазме наружных сегментов палочек, что указывает на существование двух форм фермента: мембраносвязанной и растворимой.

Наличие цитозольной и мембранной форм характерно и для NDP-киназ из других источников [25, 26]. Так, мембраносвязанная NDP-киназа и G-белок из печени крысы экстрагируются в виде комплекса, и образование этого комплекса регулируется гуаниловыми нуклеотидами и гормонами, активирующими аденилатциклазу [27, 28]. Интересно, что при обработке клеток нейробластомы человека ретиноевой кислотой наблюдается транслокация NDP-киназы из цитозоля в мембрану [29]. Возможно, некоторые биологические функции связаны с переходом фермента из цитозольной фракции в мембранную, как это происходит в случае протеинкиназы С [29].

Значительное количество NDP-киназы находится также и во внутренних сегментах палочек, где происходят основные процессы, обеспечивающие жизнедеятельность клетки (рис. 4б).

Кинетические характеристики NDP-киназы определяли по методу Флорини–Вестлинга [30], используемому для двухсубстратных реакций. Константы Михаэлиса измеряли при различных

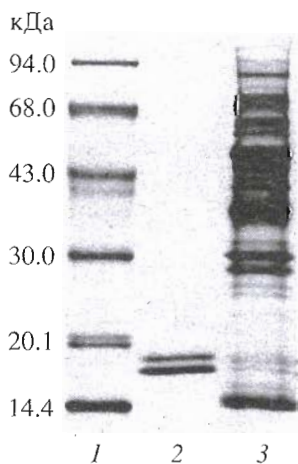


Рис. 2. Электрофорез в 15% SDS-ПААГ препарата NDP-киназы сетчатки быка, очищенной на Blue-сефарозе (2), и фракции растворимых белков сетчатки до нанесения на Blue-сефарозу (3). 1 – стандарты молекулярных масс. Условия электрофореза см. в разделе “Эксперимент. часть”.

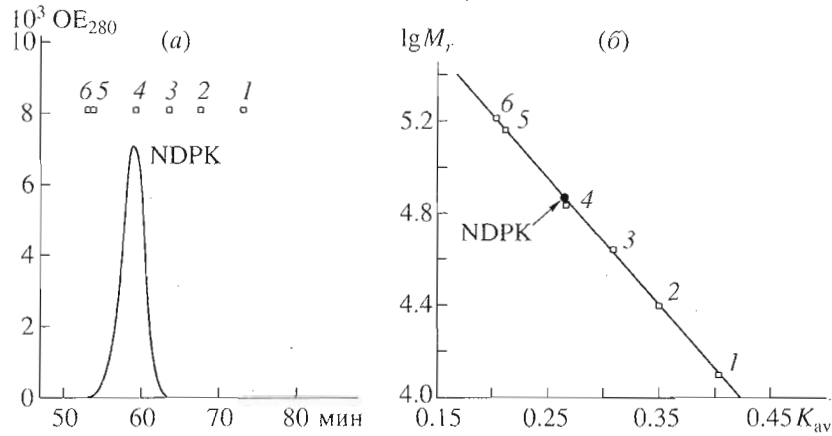


Рис. 3. Гель-хроматография NDP-киназы на колонке TSK-G3000 в неденатурирующих условиях (а) и определение молекулярной массы нативной NDP-киназы (б). Скорость элюции 0.2 мл/мин. K_{av} – коэффициент распределения между жидкой фазой и фазой геля. 1–6 – белки-маркеры молекулярной массы (M_r , кДа): 1 – цитохром с (12.5), 2 – химотрипсиноген А (25), 3 – овальбумин (44), 4 – бычий сывороточный альбумин (68), 5 – лактатдегидрогеназа (140), 6 – альдолаза (158). NDPK-NDP-киназа сетчатки быка.

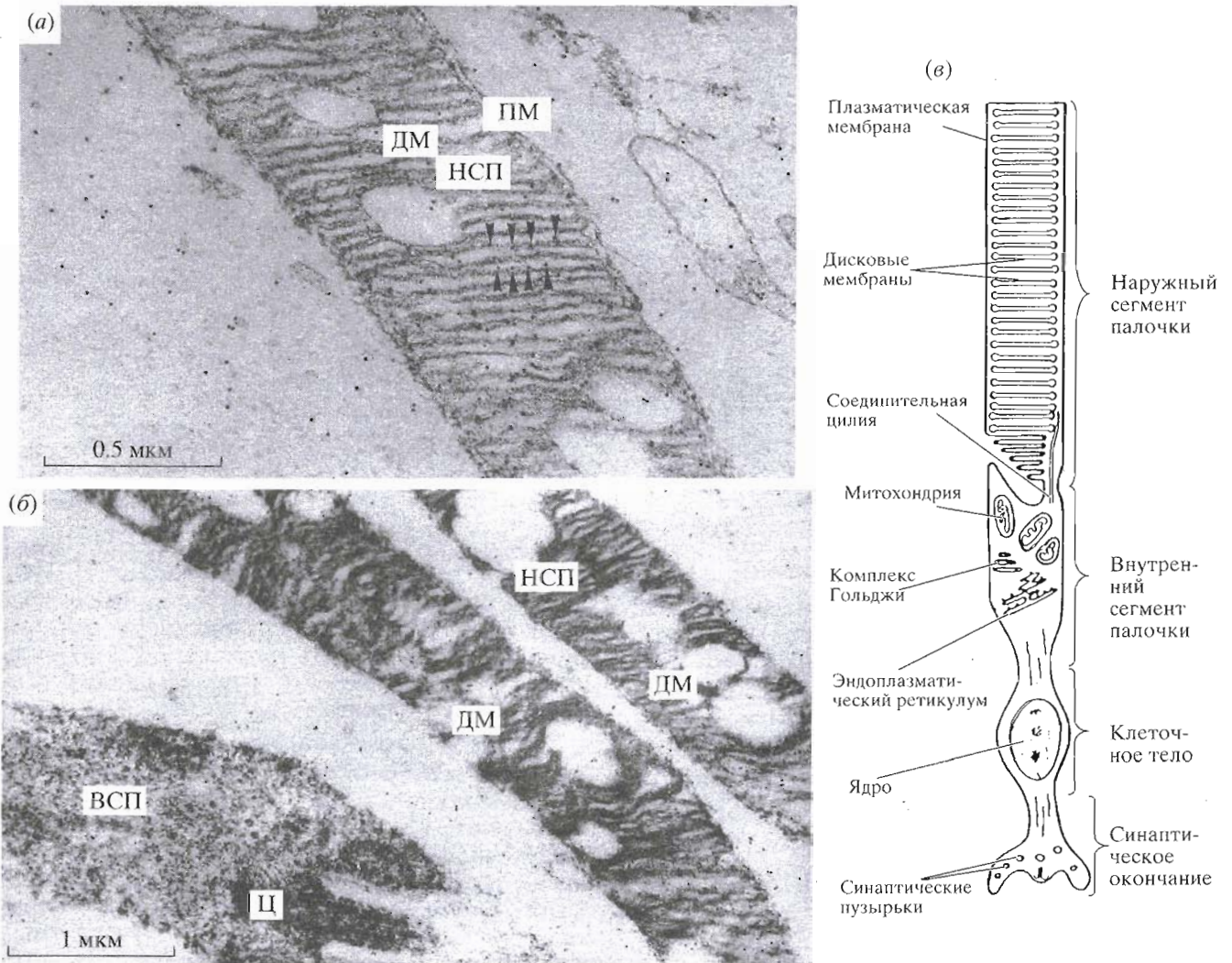


Рис. 4. Электронные микрофотографии срезов сетчатки, меченной коллоидным золотом. НСП – наружные сегменты палочек, ДМ – дисковые мембраны, ПМ – плазматическая мембрана, ВСП – внутренние сегменты палочек, Ц – цитоплазма. Стрелками указаны частицы коллоидного золота, расположенные вдоль мембран дисков. Увеличение 60000 (а) и 30000 раз (б); (в) – схема палочки сетчатки глаза.

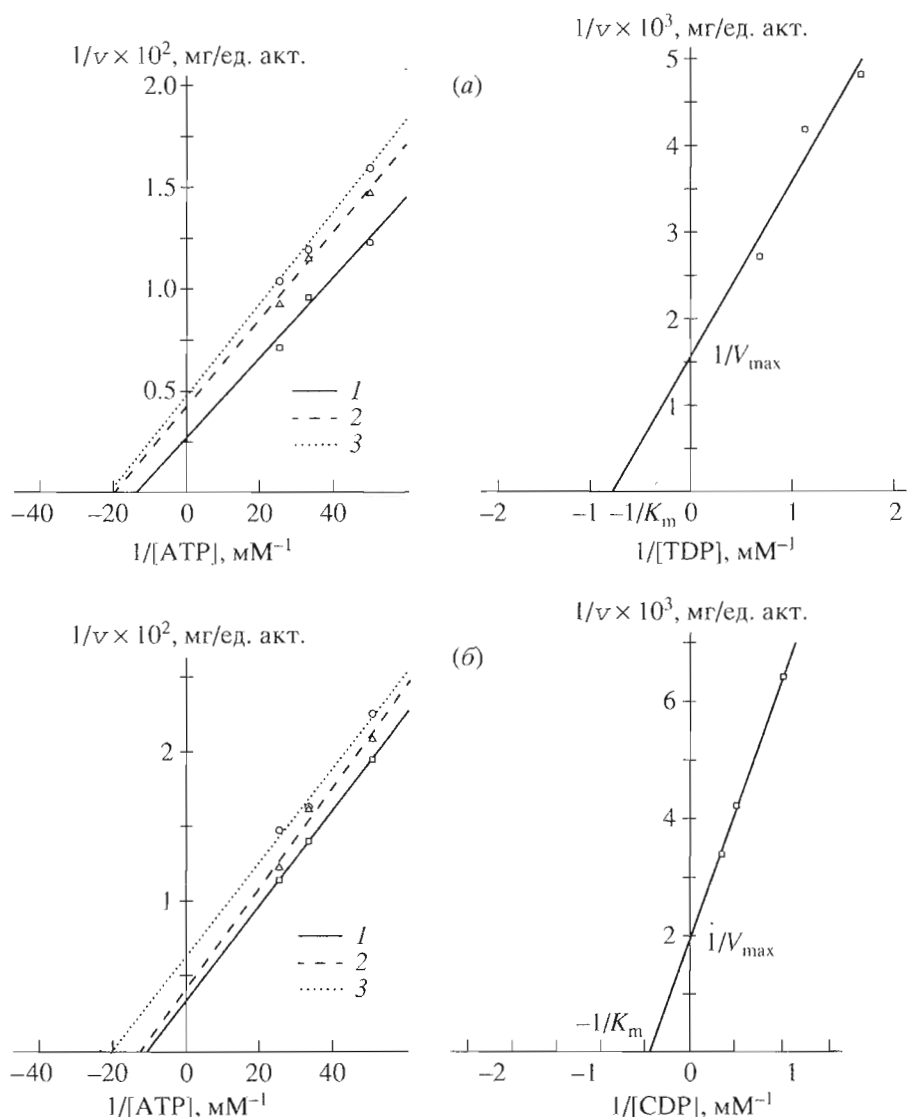


Рис. 5. Графическое определение величин K_m и V_{max} для нуклеозиддифосфатов TDP (а) и CDP (б) при концентрациях TDP 1.5 (1), 0.9 (2), 0.6 мМ (3) и CDP 1.5 (1), 1 (2), 0.5 мМ (3).

фиксированных и изменяющихся концентрациях ди- и трифосфатнуклеотидов. Чтобы оценить величины K_m и V_{max} для нуклеозиддифосфатов (CDP и TDP), в качестве нуклеозидтрифосфата с изменяющейся концентрацией использовали АТР. Для определения значений K_m и V_{max} для нуклеозидтрифосфатов (GTP и АТР) использовали CDP (рис. 5, 6). На основании данных рис. 5 и 6 можно

сделать вывод о механизме реакции. Линии этих графиков параллельны, следовательно реакция следует пинг-понговому механизму, т.е. один из продуктов отщепляется от фермента до связывания второго субстрата.

Результаты измерений суммированы в табл. 2. NDP-киназа из сетчатки быка обладает широкой специфичностью к субстрату, однако ее особенностью является способность функционировать с достаточно высокой скоростью в условиях низких концентраций АТР (K_m для АТР равна 0.1 мМ). Это свойство, вероятно, важно именно для зрительных клеток, где возможны значительные колебания концентраций нуклеотидов.

Удельная активность очищенного фермента составила 763 ед./мг белка, что существенно выше, чем удельные активности других ферментов

Таблица 2. Кинетические характеристики NDP-киназы

Субстрат	K_m , мМ	V_{max} , ед. акт./мг
АТР	0.1	819
GTP	0.3	324
CDP	1.2	517
TDP	1.3	634

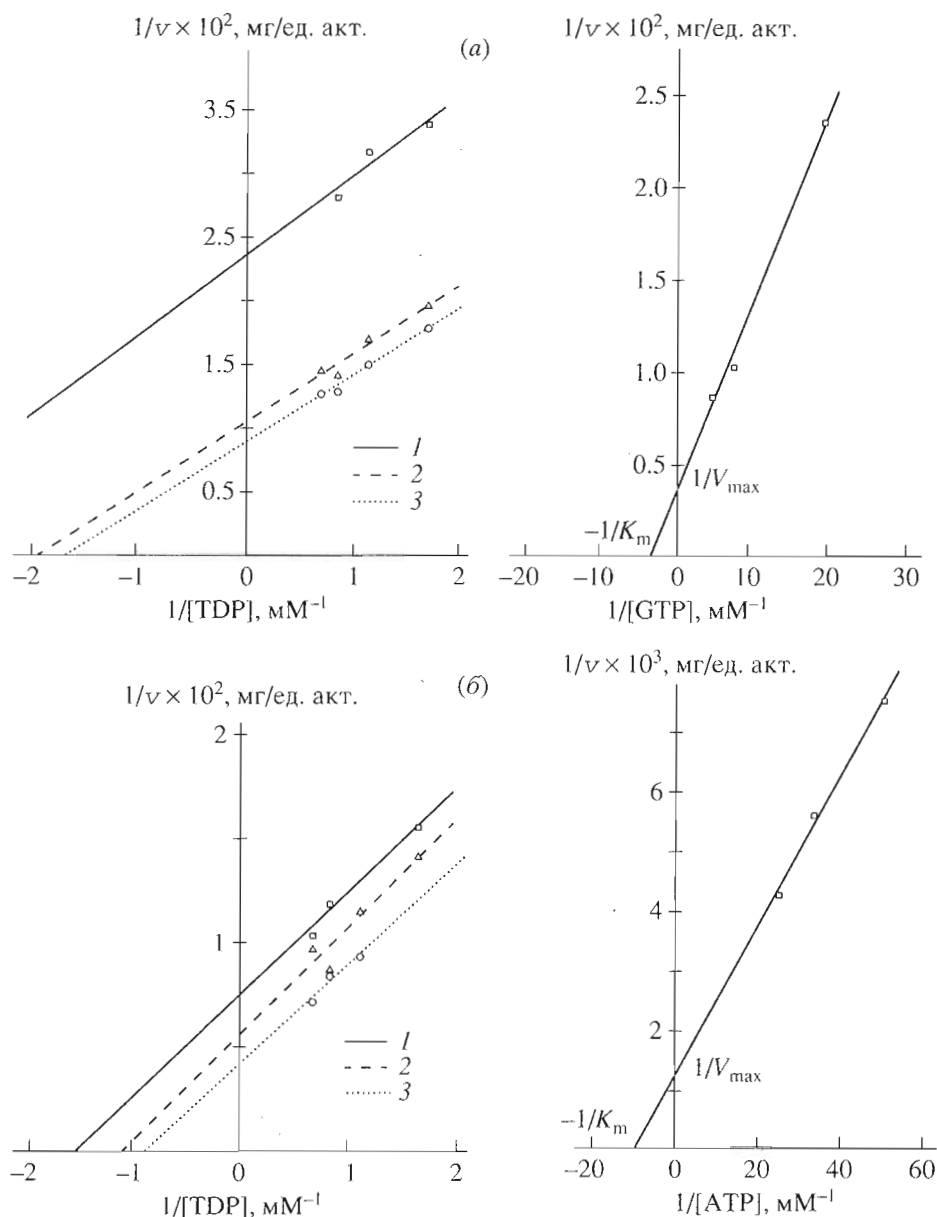


Рис. 6. Графическое определение величин K_m и V_{max} для нуклеозидтрифосфатов GTP (а) и АТР (б) при концентрациях GTP 50 (1), 125 (2), 200 мкМ (3) и АТР 20 (1), 30 (2), 40 мкМ (3).

cGMP-цикла. Для сравнения, гуанилаткиназа из сетчатки быка имеет удельную активность, равную 340 [31], а гуанилатциклаза – 3 (ед./мг белка) [32].

С учетом молекулярной массы нативной NDP-киназы (72 кДа) мы определили число оборотов для фермента. Оно составило 916 моль образующегося СТР/(моль белка с), что в 7 раз больше, чем число оборотов гуанилаткиназы (130 моль образующегося GDP/(моль белка с)) [31]. Это свойство фермента еще раз подчеркивает, что NDP-киназа, будучи основным поставщиком нуклеозидтрифосфатов в клетке, может принимать участие также в регулировании различных клеточных процессов. Изучение молекулярных ме-

ханизмов функциональной активности NDP-киназы – предмет наших дальнейших исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: акриламид, *N,N'*-метиленбисакриламид, персульфат аммония, *N,N,N',N'*-тетраметилендиамин, додецилсульфат натрия (SDS) (Bio-Rad, США); ацетонитрил (артикул 30), трис(гидроксиметил)аминометан (Merck, ФРГ); Na_2 -EDTA, $MgCl_2$, пируваткиназу (300 ед. акт./мл белка) (Serva, ФРГ), кумасси R-250, (этилендиокси)диэтилендинитрилтетрауксусную кислоту (EGTA), фенолметансульфонилфторид (PMSF)

(Sigma, США); Blue-сефарозу CL-6B (Pharmacia, Швеция), лактатдегидрогеназу (550 ед. акт./мг белка), фосфоенолпируват, никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (NADH), белки-маркеры молекулярных масс для хроматографии (Boehringer Mannheim, ФРГ). Все остальные реагенты имели квалификацию "ос. ч".

Выделение NDP-киназы сетчатки быка. К 100 размороженным сетчаткам добавляли 170 мл буфера, содержащего 10 мМ (Na,K,H)PO₄, pH 7.6, 0.2 мМ MgCl₂, 0.2 мМ EGTA, 0.2 мМ PMSF и 0.02% NaN₃, встряхивали в течение 30 с и оставляли при 4°C на 30 мин. Затем добавляли NaCl и MgCl₂ до конечной концентрации 150 мМ и 4 мМ, соответственно. Смесь оставляли еще на 30 мин при 4°C с перемешиванием и центрифугировали (22000 g, 60 мин). Супернатант речентрифугировали (100000 g, 30 мин) для удаления остаточного мембранного материала. К супернатанту добавляли равный объем раствора сульфата аммония, насыщенного при 60°C, и оставляли с перемешиванием на 1 ч. После центрифугирования (40000 g, 40 мин) осадок удаляли и к супернатанту еще раз добавляли равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. Смесь оставляли с перемешиванием на ночь при 4°C. После центрифугирования (12000 g, 40 мин) осадок суспендировали в минимальном объеме буфера TMED (10 мМ Трис-HCl, pH 7.3, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 0.3 М NaCl и 0.05% (по объему) диизопропилфторфосфат) и центрифугировали 30 мин при 40000 g. Прозрачный супернатант наносили на колонку с Blue Sepharose CL-6B, уравновешенную буфером TMED. Колонку промывали 1 л буфера и элюировали NDP-киназу 2 мМ раствором GTP в этом же буфере. Фракции, содержащие NDP-киназу, идентифицировали путем определения ферментативной активности. Концентрацию белка во фракциях элюата определяли с помощью BCA Protein Assay Reagent (Pierce).

Электрофорез проводили по методу Лэмбли [33] с небольшими модификациями на приборе "Midget" (LKB, Швеция) при силе тока 20 мА в пластинках толщиной 0.75 мм с 15% ПААГ или с градиентом акриламида в разделяющем геле от 10 до 20%. Концентрация акриламида в концентрирующем геле достигала 5%.

Измерение активности NDP-киназы проводили спектрофотометрически по методу, описанному в работе [5], в основу которого положена реакция образования нуклеозидтрифосфатов, сопряженная с окислением NADH в присутствии фосфоенолпирувата, пируваткиназы и лактатдегидрогеназы. Состав реакционной смеси (конечный объем 1 мл): 50 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 250 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 3 мМ фосфоенолпируват, 2 мМ АТР, 0.25 мМ NADH, 1 ед. акт. пируваткиназы, 5 ед. акт. лактатдегидрогеназы. Реакцию проводили при 30°C. Регистрировали падение поглощения реакционной смеси при 340 нм на спектрофо-

тометре Jasco, модель 7850 (Япония). После добавления dTDP до конечной концентрации в смеси 0.7 мМ сначала измеряли фоновое падение поглощения, а затем добавляли 100 мкл образца, содержащего фермент, и регистрировали падение поглощения, соответствующее активности NDP-киназы. Для неочищенных препаратов сетчатки измерение проводили дополнительно без добавления dTDP для определения падения поглощения за счет интерферирующих реакций. За 1 ед. акт. фермента принимали количество белка, катализирующее образование 1 мкмоль NTP за 1 мин (что соответствует окислению 1 мкмоль NADH).

Для проведения реакции аутофосфорилирования к 1 мкл нативной NDP-киназы (2 пмоль/мкл) добавляли 1 мкл [γ -³²P]АТР (10 мкКи, 5000 Ки/ммоль) и 15 мкл буфера TE (10 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 1 мМ EDTA) и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем проводили электрофорез реакционной смеси в 15% SDS-ПААГ и с помощью радиоавтографии идентифицировали белковые полосы, содержащие радиоактивный фосфат.

Гель-фильтрацию нативного фермента проводили на колонке TSK-G3000, уравновешенной 50 мМ фосфатным буфером, pH 7.3, содержащим 0.1 М NaCl, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 1.4 мМ меркаптоэтанол, 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Скорость потока 0.2 мл/мин. Колонку калибровали, используя голубой декстран 2000 и маркерные белки. Молекулярную массу нативной NDP-киназы определяли графическим методом [34].

Локализация NDP-киназы в клетках сетчатки. Сетчатки фиксировали в течение ночи 4% параформальдегидом и 0.5% глутаральдегидом в буфере К (100 мМ какодилат натрия, pH 7.4) и отмывали буфером К при 0–4°C. Затем образцы тканей обезживали, погружая в этанольные растворы повышающейся концентрации: 25, 40, 50, 60, 70, 80, 90% и 3 раза 100% по 15–20 мин при 0–4°C. Сетчатки помещали в полиэтиленовые капсулы, которые пропитывали LR Gold Resin (Polysciences, Warrington, Pa., США) следующим образом: сначала погружали их в смесь LR Gold Resin: 100% этанол (1 : 1) на 2–4 ч, а затем в LR Gold Resin на 1–2 ч при 4–6°C. Пропитывание LR Gold Resin проводили повторно при 4–6°C в течение ночи. Пропитанные смолой полиэтиленовые капсулы закрепляли в проволочном держателе, помещали на алюминиевую фольгу и проводили полимеризацию под источником УФ-света с длиной волны 360 нм при 12–14°C. Тонкие срезы (70–90 нм) получали с помощью стеклянных ножей LKB Ultratome. Затем для уменьшения неспецифического окрашивания инкубировали срезы в 100 мМ PBS-буфере (100 мМ (Na, K, H)PO₄, pH 7.4, 138 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl), содержащем 0.1% овальбумин и 0.02% NaN₃ в течение 4 ч при 4–6°C. Срезы инкубировали с поликлональными кроличьими анти-

телами к NDP-киназе в течение 3–4 сут. После этого промывали образцы PBS-буфером 3 раза по 15–20 мин и обрабатывали Protein A-10 mm Colloidal Gold Labeled (Sigma) в течение 1–2 сут. Срезы, меченные таким образом, промывали в воде, окрашивали в растворе 70% этанола, насыщенного ацетатом урана и цитратом свинца, и исследовали на электронном микроскопе JEM 100B (Япония).

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 97-04-49953).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parks R.E., Agarwal R.P. // *The Enzymes* / Ed. P.D. Boyer; New York; Acad. Press, 1973. V. 8. P. 307–333.
2. Markland F.S., Wadkins C.L. // *J. Biol. Chem.* 1966. V. 241. P. 4124–4135.
3. Ganguli N.C. // *J. Biol. Chem.* 1958. V. 232. P. 337–345.
4. Argyrakis-Vomvovannis M.P. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1968. V. 166. P. 593–595.
5. Agarwal R.P., Robison B., Parks R.E., Jr. // *Methods Enzym.* 1978. V. 51. P. 376–386.
6. Steeg P.S., Bevilacqua G., Kopper L., Thorgeirsson U.P., Talmsdge J. E., Liotta L. A., Sobel M. E. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1988. V. 80. P. 200–204.
7. Gilles A.-M., Presecan E., Vonica A., Lascu I. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 8784–8789.
8. Rosengard A.M., Krutzsch H.C., Shearn A., Biggs J.R., Barker E., Margulies I.M.K., King C.R., Liotta L.A., Steeg P.S. // *Nature.* 1989. V. 342. P. 177–180.
9. Hailat N., Keim D.R., Melhem R.F., Zhu X.-X., Eckerskorn C., Brodeur G.M., Reynolds C.P., Seeger R.C., Lottspeich F., Strahler J.R., Hanash S.M. // *J. Clin. Invest.* 1991. V. 88. P. 341–345.
10. Hennessy C., Henry J.A., May F.E.B., Westley B.R., Angus B., Lennard T.W.J. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1991. V. 83. P. 281–285.
11. Stahl J.A., Leone A., Rosengard A.M., Porter L., King C.R., Steeg P.S. // *Cancer Res.* 1991. V. 51. P. 445–449.
12. Postel E.H., Berberich S.J., Flint S.J., Ferrone C.A. // *Science.* 1993. V. 261. P. 478–480.
13. Okabe-Kado J., Kasukabe T., Hozumi M., Honma Y., Kimura N., Baba H., Urano T., Shiku H. // *FEBS Lett.* 1995. V. 363. P. 311–315.
14. Lu Q., Zhang X., Almaula N., Mathews C.K., Inouye M. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 254. P. 337–341.
15. Nickerson J.A., Wells W.W. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 11297–11304.
16. Kikkawa S., Takahashi K., Takahashi K.-I., Shimada N., Ui M., Kimura N., Katada T. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 21536–21540.
17. Карацук Г.Н., Какуев Д.Л., Яхъяев А.В., Абдулаев Н.Г. // *Биоорг. химия.* 1996. Т. 22. С. 472–473.
18. Lagnado L., Baylor D. // *Neuron.* 1992. V. 8. P. 995–1002.
19. Shimada N., Ishikawa N., Munakata Y., Toda T., Watanabe K., Kimura N. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 2583–2589.
20. Urano T., Takamiya K., Furukawa K., Shiku H. // *FEBS Lett.* 1992. V. 309. P. 358–362.
21. Presecan E., Vonica A., Lascu I. // *FEBS Lett.* 1989. V. 250. P. 629–632.
22. Dumas C., Lascu I., Morera S., Glaser P., Fourme R., Wallet V., Lacombe M.-L., Veron M., Janin J. // *EMBO J.* 1992. V. 11. P. 3203–3208.
23. Lascu I., Chaffotte A., Limbourg-Bouchon B., Veron M. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 12775–12781.
24. Williams R.L., Oren D.A., Munoz-Dorado J.M., Inouye S., Inouye M., Arnold E. // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 234. P. 1230–1247.
25. Blevins G.T., Vandewesterlo E.M.A., Williams J.A. // *Amer. Journ. of Physiology – Gastrointestinal Liver Physiology.* 1994. V. 30. G866–G874.
26. Heidbuchel H., Callewaert G., Vereecke J., Carmeliet E. // *Circulation Res.* 1992. V. 71. P. 808–820.
27. Kimura N., Shimada N. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. V. 168. P. 99–106.
28. Kimura N., Shimada N. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 151. P. 248–256.
29. Pulido-Cejudo G., Slack R., Hebert R.L., Proulx P. // *Biochim. Biophys. Acta – Molecular Cell Research.* 1995. V. 1266. P. 201–206.
30. Florini J.R., Vestling C.S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1957. V. 25. P. 575–578.
31. Hall S.W., Kuhn H. // *Eur. J. Biochem.* 1986. V. 161. P. 551–556.
32. Aparicio J.G., Applebury M.L. // *Protein Expression & Purification.* 1995. V. 6. P. 501–511.
33. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
34. Маршелл П.К., Инглис А. С. // *Практическая химия белка* / Ред. А. Дарбре. Пер. с англ. М.: Мир, 1989. С. 15–81.

Biochemical Properties of Nucleoside Diphosphate Kinase from Bovine Retina

G. N. Karaschuk*#, D. L. Kakuev*, V. I. Popov**, I. O. Gaidarov*, and N. G. Abdulaev*

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

Nucleoside diphosphate kinase (NDP kinase; ATP : NDP phosphotransferase; EC 2.7.4.6) was purified from bovine retina. The molecular mass of the native enzyme was found to be 72 kDa, and those of its subunits were 17.5 and 18.5 kDa. Kinetic characteristics of the enzyme were determined. It was shown that NDP kinase exists in retina in both soluble and membrane-bound forms.

Key words: nucleoside diphosphate kinase, phosphotransferase, bovine retina, oligomer, enzyme purification

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-6347; e-mail: karas@ibch.siobc.ras.ru.