

УДК 616—008.939.633.2—02:616—008.931:577.152.311

ОЧИСТКА ФДЭ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ  
ГИПОТАЛАМУСА МЕТОДОМ ГИДРОФОБНОЙ ВЭЖХ

АБРАМЯН Г. Э., ЧАИЛЯН С. Г., ИСАДЖАНЫАН М. А.,  
КИРАКОСОВА А. С., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана АН Армении, Ереван

Разработан метод гидрофобной ВЭЖХ ФДЭ циклических нуклеотидов из гипоталамуса, основанный на ЭГТА-зависимой элюции с колонки, где в качестве неподвижной фазы применялся фенол-полиметакрилатный гель. В сравнении с традиционными методами очистки на фенол-сефарозе, предложенный метод позволяет существенно сократить время проводимых процедур и достичь высокой степени эффективности разделения в малых объемах элюции при комнатной температуре.

$Ca^{2+}$ -кальмодулинзависимая ФДЭ циклических нуклеотидов, обнаруженная впервые Kakiushi и Yamasaki в мозговом экстракте, является важнейшим ферментом метаболизма клетки [1, 2]. Способность данного фермента  $Ca^{2+}$ -зависимым образом взаимодействовать с гидрофобными матрицами легла в основу методик очистки ФДЭ на фенол-сефарозе [3--5]. Но поскольку подобное взаимодействие характерно и для других  $Ca^{2+}$ -зависимых белков, неизбежно появляется необходимость дополнительных мер очистки, что существенно увеличивает продолжительность проводимых процедур и, как правило, в подобных случаях усиливается подверженность ФДЭ к воздействию протеолитических ферментов, сопровождающаяся резким снижением индуцированной кальмодулином активности фермента. К тому же, данный метод характеризуется продолжительностью проведения экспериментов при 4°, большими объемами элюции, низким пределом обнаружения и малой разрешающей способностью. Изучая регуляцию активности ФДЭ биоактивными соединениями гипоталамуса, мы пришли к заключению, что традиционные методы хроматографии не приемлемы для очистки фермента в аналитических целях. В этой связи нами предпринята попытка иного подхода к обсуждаемой проблеме и предлагается быстрый метод очистки ФДЭ, основанный на гидрофобной ВЭЖХ, что позволяет идентифицировать пики ферментативной активности в малых количествах (0,3—3 мг

белка) гипоталамической ткани в течение 30 мин при комнатной температуре и малых объемах элюции (1—2 мл на пик ферментативной активности), достигая при этом 200-кратной очистки фермента.

### Материалы и методы

В работе были использованы cAMP, cGMP, ЭГТА, препараты кальмодулина и 5'-нуклеотидазы из яда *Ophioophagus Hannah* («Sigma», США); Dowex 1×2 трис-HCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaN<sub>3</sub> («Serva», Германия); «Phenyl-Sepharose» («Pharmacia», Швеция); 8 [<sup>3</sup>H]cAMP, 8 [<sup>3</sup>H]cGMP; все остальные реактивы—отечественного производства квалификации ос. ч.

Очистку ФДЭ осуществляли по методу, предложенному ранее [3], с некоторыми модификациями [4]. Измельченную ткань гипоталамуса, хранившуюся при температуре -70°, гомогенизировали 3—5 мин в 10 объемах буферного раствора А, содержащего 25 мМ трис-HCl, рН 7,0, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 М NaCl при 4° в стеклянном гомогенизаторе. Гомогенат центрифугировали в течение 60 мин при 24000 г, в супернатант добавляли CaCl<sub>2</sub> в конечной концентрации 2 мМ и наносили на колонку «Phenyl-Sepharose» (1,5×10 см), предварительно уравновешенную буфером В, содержащим 0,2 М NaCl. Скорость элюции 1 мл/мин. ФДЭ элюировали буфером В с добавлением 0,2 мМ ЭГТА. Скорость элюции 1 мл/мин. Контроль осуществляли по изменению оптической плотности (λ—280 нм) и фосфоэстеразной активности. Все операции проводили при 4°.

Фракции с «Phenyl-Sepharose», обладающие наибольшей ферментативной активностью (2 мл), собирали и концентрировали ультрафильтратом «Amicon» (США) на мембране РМ-30 (Pellicon-petbpane 30000). Давление в ячейке поддерживали на уровне 3,5 атм при 0°.

Гидрофобную ВЭЖХ проводил на колонке НИС РН-814 («Shodex», Япония, 75×80 мм), (8×20 мм) предварительно уравновешенную 0,1 М фосфатным буферным раствором С, рН 7,0 1 М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 2 мМ CaCl<sub>2</sub>. Колонку промывали 50 мл буфера С. Элюцию ФДЭ осуществляли линейным градиентом сульфата аммония от 1 до 0 М за 60 мин в присутствии 2 М ЭГТА. Все операции на колонке «Shodex» проводили с постоянной скоростью 1 мл/мин при комнатной температуре с использованием жидкостного хроматографа высокого давления «Knauer» (Германия). Положение ФДЭ на профиле элюции определяли, измеряя ферментативную активность. Фракции, обладающие наибольшей активностью, объединяли и концентрировали с использованием ультрафильтрата «Amicon» на мембране РМ-30.

Активность ФДЭ определяли по методу Thompson и соавт. [6] с применением меченого 8 [<sup>3</sup>H]cAMP или 8 [<sup>3</sup>H]cGMP. Инкубационная смесь (200 мкл) содержала 50 мМ трис-HCl, рН 7,0, 10 мМ

$MgCl_2$ , 2 мМ  $CaCl_2$  ил 2 мМ ЭГТА, 100 кБк 8 [ $^3H$ ]сАМР или 8 [ $^3H$ ]сGMP, 5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол и 5 мкМ сАМР. Реакцию начинали добавлением фермента. Через 5—15 мин инкубации при 30° пробы кипятили 1,5 мин, охлаждали до 30° и добавляли в них 0,2 мг/мл раствора 5'-нуклеотидазы яда *Ophe phagus Hannah*. Реакцию, катализируемую этим ферментом, проводили при 30° в течение 10 мин. Сорбцию негидролизованного субстрата осуществляли на анионообменнике Dowex 1×2 (Cl-форма), добавляя 1 мл суспензии смолы (1:2) в среду инкубации. После перемешивания пробы центрифугировали 5 мин при 12000 g, 0,3 мл супернатанта помещали в 5 мл сцинтиллятора ЖС-7 и проводили измерения радиоактивности на жидкостном сцинтилляционном спектрометре «Intertechnique 2000» (Франция). Скорость ферментативной реакции выражали в относительных единицах активности (о. е. а.)—процент гидролиза субстрата на концентрацию субстрата в пробе за 1 мин на 1 мкл фермента.

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлен профиль элюции ФДЭ с «Phenyl-Sepharose». ФДЭ элюируется двумя симметричными пиками с незначительным запаздыванием относительно общей массы белка. Активность пика I и пика II в присутствии  $Ca^{2+}$  и кальмодулина увеличивалась в 3 и 6 раз соответственно, а для пика I характерным являлась стимуляция гидролиза сАМР под действием микромолярных концентраций сGMP. Следовательно, можно говорить о наличии, по крайней мере, двух изоформ фермента:  $Ca^{2+}$ -кальмодулинзависимой и сGMP-стимулируемой ФДЭ. Таким образом, при помощи гидрофобной хроматографии «Phenyl-Sepharose» удается выделять две формы фермента, отличающиеся по своим физико-химическим и регуляторным свойствам.

На рис. 2 представлен профиль элюции ФДЭ линейным градиентом сульфата аммония (I—0 M) в присутствии 2 мМ ЭГТА с колонки HCl РН-814. Как видно из рисунка, элюция приводит к появлению хорошо различимых трех пиков ферментативной активности—А (0,77 M), В (0,52 M), С (0,4 M). Данные по измерению активности ФДЭ при использовании в качестве субстратов сАМР и сGMP, приведенные в таблице, показывают, что для субстрата сGMP, активность ФДЭ-I не изменяется как под действием свободных ионов кальция, так и  $Ca^{2+}$ -кальмодулина. Скорость гидролиза сGMP при внесении в реакционную среду, содержащую ФДЭ-II и ФДЭ-III,  $Ca^{2+}$  не увеличивается, но возрастает в присутствии  $Ca^{2+}$  и кальмодулина. В присутствии субстрата сGMP активность пика II и пика III увеличивается под действием комплекса  $Ca^{2+}$ -кальмодулин, но при этом отсутствует активация под действием свободных ионов кальция. По регуляторным свойствам ФДЭ-I отличается от ФДЭ-II и ФДЭ-III.

Наряду с сGMP, скорость гидролиза сAMP увеличивалась свободными ионами кальция, что, вероятно, объясняется наличием во фракции пика-I примесей кальмодулинзависимой ФДЭ.

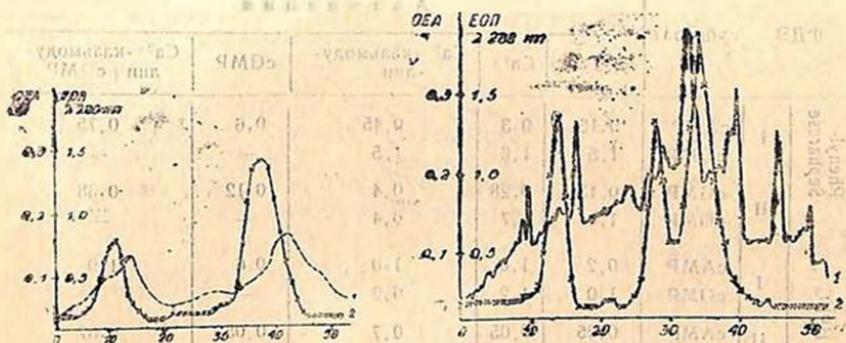


Рис. 1. Очистка ФДЭ методом гидрофобной хроматографии на «Phenyl-Sepharose». Супернатант гомогената гипоталамуса наносился на колонку (8×150 мм), предварительно уравновешенную 25 мМ трис-НСl буфером, рН 7,0, содержащим 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,1 мМ β-меркаптоэтанол, 0,2 М NaCl. Колонку промывали тем же буфером, после чего белок элюировали в присутствии 2 мМ ЭГТА в режиме линейного градиента NaCl от 0,2 до 0 М при скорости потока 1 мл/мин при 4°. Профиль элюции определяли по измерению оптической плотности при λ 280 нм (1) и базальной активности ФДЭ (2)

Рис. 2. Очистка ФДЭ методом гидрофобной ВЭЖХ. Супернатант гомогената гипоталамуса в количестве 500 мкл (1 мг белка) наносили на колонку «Shodex HC PH-814» (0,75×8 см), предварительно уравновешенную 0,1 М фосфатным буфером, рН 7,0, содержащим 1 М сульфата аммония, 5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 2 мМ CaCl<sub>2</sub>. Колонку промывали тем же буфером, после чего элюцию осуществляли в присутствии 2 мМ ЭГТА в режиме линейного градиента сульфата аммония от 1 до 0 М в течение 60 мин при скорости потока 1 мл/мин. Температура комнатная. Обнаружение продукта осуществляли по измерению оптической плотности при λ 280 нм (1) и базальной активности ФДЭ (2)

Таким образом, гидрофобная ВЭЖХ на колонке «Shodex HC PH-814» позволила разделить три формы фермента. Для ФДЭ-I характерно увеличение скорости гидролиза сAMP под действием сGMP, что позволяет отнести ее к сGMP-регулируемой изоформе ФДЭ. ФДЭ-II и ФДЭ-III характеризует Ca<sup>2+</sup>-кальмодулинзависимая модуляция, проявляемая для гидролиза как сAMP, так и сGMP. Следовательно, ФДЭ-II и ФДЭ-III можно отнести к Ca<sup>2+</sup>-кальмодулин-стимулируемым изоформам фермента.

Поскольку хроматография ФДЭ на гидрофобных сорбентах имеет явно выраженный Ca<sup>2+</sup>-зависимый характер, то можно предположить, что комплекс кальмодулин-ФДЭ при избыточных концентрациях Ca<sup>2+</sup> взаимодействует с фенольным лигандом за счет гидрофобных участков, расположение которых связано, по всей видимости, непосред-

Активность ФДЭ, элюированных с колонок «Phenyl-Sepharose» и «Shofex»

ФДЭ		субстрат	Активация				
			ЭГГА	Ca <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup> -кальмодулин	cGMP	Ca <sup>2+</sup> -кальмодулин+cGMP
Phenyl-Sepharose	I	cAMP	0,15	0,3	0,45	0,6	0,75
		cGMP	1,5	1,6	1,5	—	—
	II	cGMP	0,13	0,28	0,4	0,12	0,38
		cGMP	1,8	1,7	0,4	—	—
Shofex HPLC	I	cAMP	0,2	1,0	1,0	0,6	1,9
		cGMP	1,0	1,2	0,9	—	—
	II	cAMP	0,05	0,05	0,7	0,05	0,67
		cGMP	0,5	0,5	7,8	—	—
	III	cAMP	0,08	0,08	1,6	0,07	1,5
		cGMP	1,0	1,1	13,8	—	—

ственно на поверхности кальмодулина либо на индуцированной области на поверхности ФДЭ за счет Ca<sup>2+</sup>-зависимой ассоциации фермента с кальмодулином. При потере Ca<sup>2+</sup> под действием хелатирующего агента происходят изменения в гидрофобных свойствах фермента, приводящей к быстрой потере способности ФДЭ связываться с фенольной матрицей. Таким образом, эксперименты, проведенные с использованием гидрофобных фенольных матриц, показали, что переводом очистки ФДЭ на фенольных матрицах в условиях ВЭЖХ можно достичь более четкого разделения пиков изоформ ФДЭ в малых объемах с достаточно высокой степенью ферментативной активности.

### RESOLUTION OF HYPOTHALAMUS CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASES BY HYDROPHOBIC HPLC

ABRAHAMIAN G. E., CHALILYAN S. G., ISAJANYAN M. A.,  
KIRAKOSOVA A. S., GALOYAN A. A.

G. Ch. Bunyatyany Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of Armenia, Yerevan

A HPLC method has been developed to separate isozymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase. The method employs a phenyl-hydrophilic polymetacrylate based hydrophobic interaction column eluted with a EGTA-dependent ammonium sulfate gradient. Compared to traditional chromatography over Phenyl-Sepharose, the method is more rapid (30 min), dilutes the sample less, achieves better resolution of kinetically distinct forms, may be applied to little of tissue protein and is appropriate for analytical use.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Kahluchi S., Yamasaki R.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 41, p. 1104—1113, 1970.
2. *Devo J. A., Hansen R. S., Harrison S. A., Hurvitz R. L., Martins T. J., Mumby M. C.* Mol. Cell. Endocrinol., v. 28, p. 387—399, 1982.
3. *Gopalokrishna K., Anderson W. B.* J. Biol. Chem., v. 258, N 4, p. 2405—2409, 1983.
4. *Бобрускин И. Д., Шайхин С. М., Муратова М. В., Баранова Л. А., Севастин С. Е.* Биохимия, т. 52, № 8, с. 1344—1351, 1987.
5. *Бобрускин И. Д., Муратова М. В., Киреева Н. Н., Белов А. А., Севастин С. Е.* Биохимия, т. 54, № 9, с. 1499—1507, 1989.
6. *Thompson W. J., Appleman M. M.* Biochemistry, v. 10, p. 311—316, 1971.

Поступила 15. VI 1991