

## АФФИННАЯ ОЧИСТКА ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ ИЗ ОПУХОЛЕВЫХ И НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ЛЕГКИХ И ПОЧЕК

Л.Г. ПОГОСЯН, Ж.И. АКОПЯН

*Институт молекулярной биологии НАН РА, 375044, Ереван*

Впервые выделена пурииннуклеозидфосфорилаза из опухолевых и нормальных тканей легких и почек человека методом биоспецифической аффинной хроматографией. В результате очистки получены электрофоретически гомогенные препараты.

Աֆինային քրոմատոգրաֆիայի միջոցով առաջին անգամ մարդու երիկամի և թոքի ուռուցքային և նորմալ հյուսվածքներից անջատված է պուրիննուկլեոզիդֆոսֆորիլազ: Ատացված են էլեկտրոֆորետիկ հոմոգեն պատրաստուկներ:

For the first time purine nucleoside phosphorylase from human kidney and lung normal and tumour tissues have been isolated, including biospecific affinity chromatography. As a result of the purification electrophore homogenous enzymes have been received.

### *Пурииннуклеозидфосфорилаза - опухоль - человек*

Возросший интерес к пурииннуклеозидфосфорилазе (КФ – 2.4.2.1.) обусловлен тем обстоятельством, что недостаточность клеточного иммунитета связана также с понижением уровня активности этого фермента [7, 9]. Пурииннуклеозидфосфорилаза (ПНФ) выделена из ряда биологических объектов [3, 4, 6, 10, 11, 13]. Наиболее удачные из описанных методов очистки включают аффинную хроматографию, при которой в качестве лиганда использовались аналоги инозина, а именно, 6-гидрокси-9- $\beta$ -бензиламинопурин, связанный на трихлоротриазин активированной сефарозе CL-6B, который был использован для очистки ПНФ из эритроцитов человека [5, 8].

Разработка и совершенствование новых эффективных методов очистки ПНФ-азы из различных источников актуальны в связи с интенсивным поиском малотоксичных ингибиторов этого фермента. Многие из них находят применение в создании Т-клеточного иммунодефицитного статуса организма при трансплантациях органов и тканей, а также при химиотерапии многих патологий [1].

Данные об очистке ПНФ из опухолевых и нормальных тканей легких и почек человека, полученные методом биоспецифической аффинной хроматографии, представляются впервые.

**Материал и методика.** ПНФ была выделена нами из опухолевых и нормальных тканей легких и почек человека методом биоспецифической аффинной хроматографии. Тип опухоли почек – гипернефроидная, светлоклеточная, легкого – плоскоклеточная, умеренно-дифференцированная аденокарцинома. Операции по очистке фермента проводили при температуре 3°-6° с использованием хроматографической системы “ЛКБ” и колонок фирмы “Фармация” (Швеция). На этапах очистки центрифугирование проводили при 12000 g в течение 40 мин на центрифуге “К-24” Janetzki (ГДР). Все колонки были предварительно уравновешены стартовыми буферами. Кровь из тканей удаляли перфузией 20 mM Na-P-буфером, pH-6,0, затем промывали тем же буфером, размельчали в гомогенизаторе MPW302 (ПНР) в течение 5-8 мин. Затем гомогенат отстаивали в

холодильнике 1,5 ч, фильтровали через стерильную марлю и центрифугировали при 12000 g в течение 40 мин. Белки надосадочной жидкости фракционировали сульфатом аммония (40-80% насыщения). Осадок растворяли в 20 мМ Na-P-буфере и диализовали 14 ч против того же буфера. В диализованный экстракт добавляли CM-Sephadex, из расчета на 300 мл экстракта 6 г CM-Sephadex. Затем материал отфильтровывали с помощью двойной фильтровальной бумаги. Отфильтрованный материал диализовали 14 ч, но уже против 50мМ трис-HCl буфера, pH-7,6. Полученный экстракт наносили на колонку (0,9x7,1см) с лигандом – 9 (P- аминобензил) гипоксантином. Колонку промывали сначала 500 мл 50мМ трис-HCl буфером, pH-7,6, затем 200 мл 0,5M NaCl в 0,1M трис-HCl буфере, pH-8,0. Стартовым буфером перед нанесением материала служил 50мМ трис-HCl буфер, pH-7,6 + 1мМ меркаптоэтанола. После такой промывки связанная с сорбентом ПНФ была элюирована 100 мл 50 мМ Na-P-буфером ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ ), pH-6,9, содержащим 4 мМ инозина. Объединенные активные фракции диализовали против 100-кратного объема 50мМ трис-HCl буфера, pH-7,6 в течение 20 ч с четырьмя сменами диализного буфера. Диализованный препарат фермента концентрировали, используя колонку (0,9x2,5 см) с гидроксил апатитом. Сконцентрированный препарат ПНФ хранили в 40%-ном глицерине при -18°. После каждого этапа очистки определяли количество белка и активность фермента.

Аффинный сорбент индивидуальной специфичности получали путем связывания аналога субстрата ПНФ - 9 (p-аминобензила) гипоксантина на BgCN-активированной сефарозе 4В. Для этого к матрице BgCN- активированной сефарозы 4В в качестве спейсера добавляли 6-аминокапроновую кислоту в буфере V + 0,5M NaCl (перемешивая при комнатной температуре в течение 10 ч). Соотношение 6-аминокапроновой кислоты к матрице брали 20 мк моль/1мл. Затем матрицу с присоединенным спейсером промывали дважды следующей последовательностью растворов: 100мМ ацетатный буфер, pH-4,5, 100мМ  $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3\text{-NaCl}$  (pH=9,0)+H<sub>2</sub>O. Для создания прочной пептидной связи между свободной аминогруппой лиганда и свободной концевой карбоксильной группой спейсера, использовали карбодимид, катализирующий эту реакцию. Стандартная процедура [9] включала следующее: гель промывали разбавленным до 50% и подкисленным до pH-4,5 диоксаном (0,5 л.). Лиганд растворяли (50мк Моль/1мл геля) также в 50%-ном диоксане (pH-4,5). Карбодимид растворяли в воде и доводили pH до 4,5 разбавленным HCl. Концентрацию карбодимида брали из расчета 10мг на 1мл геля. Растворы лиганда, карбодимида и гель смешивали и, контролируя pH, оставляли при комнатной температуре на магнитной мешалке. После 20-часового перемешивания оставшиеся спейсеры блокировали добавлением этаноламина, а затем обильно промывали 50%-ном этанолом и использовавшимися буферами, а также 0,1 M  $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ , pH-9,0 + 0,5 M NaCl перед нанесением фермента на аффинный сорбент.

Ферментативную активность в процессе очистки определяли колориметрически по приросту гуанина (по цветной реакции этого основания с реактивом Фолина) [2]. Гуанин, накапливающийся в ходе реакции фосфорилиза, с помощью реактива Фолина дает с ним соединение сине-голубого цвета. Реакцию фосфорилиза проводили при 37°, за единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее 1мк Моль субстрата за 1 мин.

При очистке были использованы: DS-Na – “Сигма” (США), BgCN – активированная сефароза 4В- “Формация”(Швеция), глицерин – “Мерк” (ФРГ).

**Результаты и обсуждение.** Большинство изученных до настоящего времени ПНФ из различных биологических источников были выделены с помощью многоэтапной очистки, включающей в себя фракционирование сульфатом аммония, хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе и гидроксил апатите с небольшими модификациями. При получении гомогенных препаратов ПНФ из опухолевых и нормальных тканей легких и почек человека были использованы эти и другие подходы к очистке. Схемы очисток приведены в таблицах 1, 2, 3, 4.

В результате очисток были получены препараты ПНФ из опухолевых и нормальных тканей легких и почек человека с удельными активностями: опухоль легкого на гидроксил апатите – 8Е/мг, на аффинной колонке –

Таблица 1. Схема типичной очистки ПНФ из опухолевой ткани легкого человека.

Этапы очистки	Объем, мл	Общая активность	Общий белок, мг	Уд. активность, Е/мг	Выход, %	Степень очистки
Экстракт	75	19,5	510	0,038	100	1,0
Сульфат аммония	27	15,12	113,4	0,13	77,5	3,42
Аффинная колонка	11	1,65	0,275	6	8,46	158
Гидроксил-апатит	1	0,2	0,025	8	1	210

Таблица 2. Схема аффинной очистки ПНФ из опухолевой ткани легкого человека.

Этапы очистки	Объем, мл	Общая активность	Общий белок, мг	Уд. активность, Е/мг	Выход, %	Степень очистки
Экстракт	90	24,3	558	0,059	100	1,0
Сульфат аммония	35,5	15,3	490	0,031	63	0,72
СМ-Sefadex	6,2	5,146	78	0,066	21,2	1,53
Аффинная колонка	10	2	1,3	1,5	8,2	34,9

Таблица 3. Схема аффинной очистки ПНФ из нормальной ткани легкого человека.

Этапы очистки	Объем, мл	Общая активность	Общий белок, мг	Уд. активность, Е/мг	Выход, %	Степень очистки
Экстракт	151	27,18	1510	0,018	100	1,0
Сульфат аммония	62	28,52	731,6	0,039	104,7	2,2
СМ-Sefadex	27	11,6	221,4	0,052	42,6	2,9
Аффинная колонка	9	1,53	0,855	1,79	5,6	99,4

Таблица 4. Схема аффинной очистки ПНФ из опухолевой ткани почек человека.

Этапы очистки	Объем, мл	Общая активность	Общий белок, мг	Уд. активность, Е/мг	Выход, %	Степень очистки
Экстракт	90	22,5	1044	0,021	100	0
Сульфат аммония	38	19	296,4	0,064	84,4	3,04
СМ-Sefadex	7	4,27	56	0,076	18,9	3,6
Аффинная колонка	6	1,5	0,36	4,16	6,6	198

1,5Е/мг, нормальная ткань легкого на аффинной колонке – 1,79Е/мг; опухолевая ткань почек – 4,16Е/мг, нормальная ткань почек – 3,9Е/мг, соответственно субстрат – гуанозин. Как видно из табл. 1, 2, 3 – при использовании такой очистки удалось получить высокий процент выхода обшей

активности — 6,6; 8,46; 5,6 соответственно. Таким образом, биоспецифическая и аффинная хроматография ПНФ из опухолевой и нормальной тканей легкого и почек человека на колонке с сефарозой, иммобилизованной лигандом 9 (p-аминобензил) гипоксантином оказалась высокоэффективной. Кроме того, аффинный гель можно использовать многократно, без видимых потерь специфичности. Аффинный лиганд - 9 (p-аминобензил) гипоксантин является аналогом инозина и конкурентно ингибирует фермент с  $K_i = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ . Бензильная группа иммобилизованного ингибитора эффективно связывается в том участке активного центра, с которым обычно связывается рибоза и дезоксирибоза. В отсутствие фосфатных ионов ПНФ настолько хорошо связывается с аффинным гелем, что выдерживает промывку колонки буфером с очень высокой молярностью, содержащим свыше 0,5M NaCl. При этом элюируются неспецифически связанные белки.

В процессе очисток активность определяли I методом, субстрат — гуанозин.

Удельная активность ПНФ из нормальной ткани почек человека составляла 3,9 Е/мг.

Активное участие ингибиторов ПНФ при целом ряде патологий, в том числе и опухолевых, указывает на важность и перспективность исследований как самого фермента, так и соединений, воздействующих на его активность. Эти соединения, обладающие химиотерапевтическим действием, должны быть высокоспецифичны и метаболически инертны. Рассчитано, что для ингибирования активности ПНФ на 99,9% требуется биологически активный ингибитор с величиной  $K_i = 10^{-8} \text{ M}$  [13]. Однако лучшие биологически активные ПНФ-ингибиторы, известные на данный момент, имеют величину  $K_i$  только в пределах  $10^{-7} \text{ M}$ . Именно для продолжения исследований по взаимодействию чистых ферментных препаратов с потенциальными его ингибиторами была предпринята эта работа, в частности из опухолевых тканей человека.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ананьев А.В., Акопян Ж.И. Журнал экспериментальной и клинической медицины АН Арм.ССР, 29, 3, 266-273, 1989.
2. Ahmad S.J., Pritchard R.H. Mol. Genet., 104, 351-359, 1969.
3. Edwards Y.H., Edwards P.A., Hopkinson D.A. FEBS letters, 3, 235-244, 1973.
4. Lewis A.S., Lowy B.A. J. Biol. Chem. 254, 19, 9927-9932, 1979.
5. Ling F., Inuo Y., and Rimura A., Process Biochem., 29, 355-361, 1994.
6. Luic M., Koellner G., Shugar D., Bzowska A., Acta Cryst D 57 (Part 1), 30-36, 2001.
7. Martin D., W., Jr. In: Ann. Drev. Biochem., 50, 351-356, 1981.
8. Osborne W., R., J. Biol. Chem. 255, 7089-7092, 1980.
9. Porter D.J., J. Biol. Chem. 267, 7342-7351, 1992.
10. Savage B., Spenser N., Biochemistry, 15, 20, 4451-4457, 1976.
11. Savage B., Spenser N., Biochemistry, 179, 21-27, 1979.
12. Stoekler J.D., Ealick S.E., Bugg C.E., Parks R.E., Feder. Prcc., 45, 12, 2773, 1986.
13. Stoekler J.D., Poirot A.F., and others, Biochemistry 36, 11749-1175, 1997.