*НЕЙРОХИМИЯ*
т. 11, № 1, 1992

УДК 577.152.311

# ОЧИСТКА КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМОЙ ФДЭ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ ГИПОТАЛАМУСА МЕТОДОМ АФФИННОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

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

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

В настоящей работе предложен метод очистки кальмодулинзависимой ФДЭ циклических нуклеотидов, основанный на аффинной ВЭЖХ с использованием тандемной системы колонок, где в качестве неподвижной фазы применялся иммобилизованный на силикагеле кальмодулин. В сравнении с традиционными методами хроматографии на колонке CaM-Sepharos предложенный метод позволяет при комнатной температуре существенно уменьшить время проводимых процедур и достичь очистки фермента в гомогенном состоянии с высокой степенью активности.

ФДЭ циклических нуклеотидов обладают видовой и тканевой специфичностью. В мозгу млекопитающих этот фермент представлен несколькими изоформами, одна из которых—$Ca^{2+}$-кальмодулинзависимая ФДЭ—является преобладающей (более 90% активности) и существующей в нескольких формах, различных по своим физико-химическим свойствам [1, 2]. Согласно современным представлениям о механизме регуляции кальмодулином активности ФДЭ, гидрофобному взаимодействию фермента с регулятором при увеличении внутриклеточного уровня содержания ионов Са отводят роль основного фактора, определяющего действие кальмодулина на активность ФДЭ [3].

Многие лаборатории, занимающиеся изучением кальмодулинактивируемой ФДЭ мозга [4—7], сталкиваются с определенными трудностями при очистке и идентификации этого фермента от других кальмодулинзависимых ферментов, в частности от протеинфосфатазы—кальцинейрина [8]. Поскольку эти белки обладают весьма схожими ионными, гидрофобными и гидродинамическими свойствами, традиционные методы хроматографии, в частности аффинной хроматографии на матрицах с иммобилизованным кальмодулином, становятся малоэффективными. В этой связи 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.

Нами предпринята попытка иного подхода к обсуждаемой проблеме и предложен метод, основанный на разнице сродства ФДЭ и кальцинейрина к кальмодулину.

## Материалы и методы

В работе были использованы cAMP, cGMP, ЭГТА, препараты кальмодулина и 5′-нуклеотидазы из яда Opheophagus Hannah («Sigma», США), Dowex 1×2, трис-HCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $NaN_3$ («Serva», Германия), Phenyl-Sepharose («Pharmacia», Швеция), 8[$^3$H]cAMP, 8[$^3$H]-cGAMP; остальные реактивы—отечественного производства квалификации ос. ч.

Эксперименты проводили на двухкомпонентной системе ВЭЖХ «Biotronik BT:8100» (Германия), оснащенной инжектором «Rheodyne» с петлей для образца объемом 1 мл и детектором с изменяемой длиной волны. Спектральный диапазон дейтериевой лампы 190—370 нм. Все растворы постоянно дегазировали гелием для предупреждения образования пузырьков в системе. Для регистрации результатов хроматографии использовали систему хранения и поиска данных, включающую компьютер «IBM PC/AT 286» (США). Для аффинной ВЭЖХ использовали колонки Si-300 CaM-Biosphere (7,5×80 мм) и одноразовый концентрирующий патрон cAMP -Biosphere «Bioservis» (Армения).

Активность ФДЭ определяли по методу Thompson, Appl man [9] с применением меченного 8[$^3$H]cAMP или 8[$^3$H]cGMP. Инкубационная смесь (200 мкл) содержала 50 мМ трис-HCl, pH 7,0, 10 мМ $MgCl_2$, 2 мМ $CaCl_2$ или 2 мМ ЭГТА, 100 кБк 8[$^3$H]cAMP или 8[$^3$H]cGMP, 5 мМ β-меркаптоэтанол и 5 мкМ cAMP. Реакцию запускали 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 Opheophagus 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 (гидролиз субстрата—% · мкМ/мкл · мин).

Ниже представлено подробное описание методики очистки ФДЭ, схематическая диаграмма которой приведена на рис. 1.

Измельченную ткань гипоталамуса (100 г), хранившуюся при температуре —70°, гомогенизировали 3—5 мин в 300 мл буферного раствора А (25 мМ трис-HCl, pH—7,0, содержащего 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ азид натрия, 1%-ный раствор антипенной эмульсии и 1 мМ фенил-метил-сульфонил-фторид при 4° на гомогенизаторе «Политрон». Гомогенат центрифугировали в течение 60 мин при 24000 g,

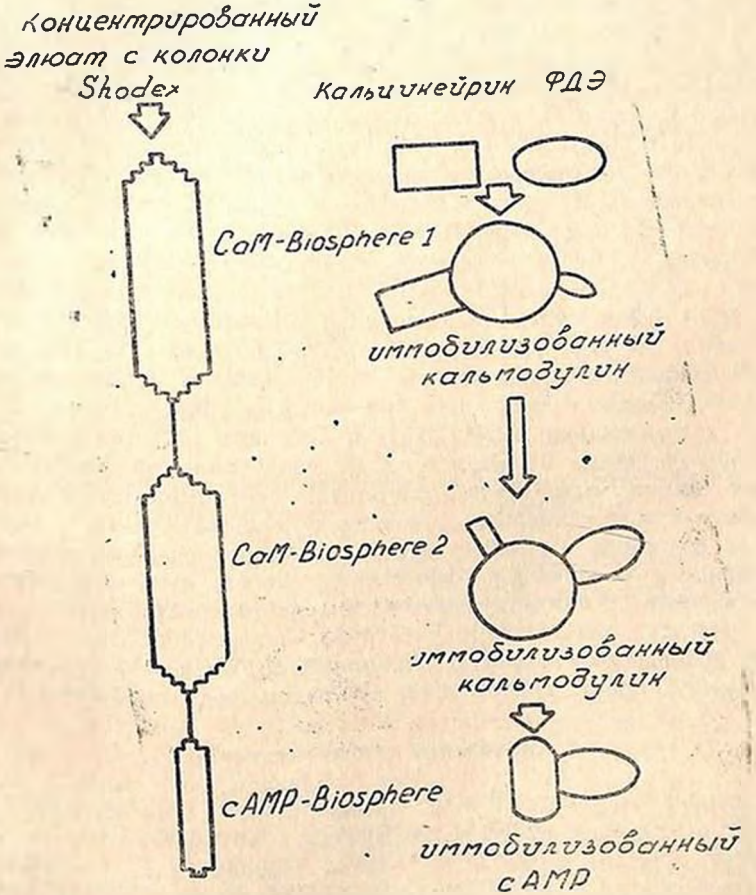


*Рис. 1.* Схематическая диаграмма очистки кальмодулинстимулируемой ФДЭ гипоталамуса методом аффинной ВЭЖХ на тандемной системе колонок CaM-Biosphere

(«Beckman G-21» ротор JA-14, США). В супернатант добавляли $CaCl_2$ в конечной концентрации 2 мМ и наносили на колонку Phenyl-Sepharose (15×20 мм), предварительно уравновешенную буфером В, содержащим 0,2 М NaCl. Скорость элюции 3 мл/мин. ФДЭ элюировали буфером В с добавлением 0,2 мМ ЭГТА. Скорость элюции 2 мл/мин. Контроль осуществляли по изменению оптической плотно-

сти (λ 280 нм) и фосфодиэстеразной активности. Все операции проводили при 4° жидкостным хроматографом — умеренного давления «Knauer» (Германия).

Элюат с Phenyl-Sepharose, обладающий наибольшей ферментативной активностью (30 мл), концентрировали с ультрафильтратором «Amicon» (США) на мембране PM-30 (Pellicon membrane 30000). Давление в ячейке поддерживали на уровне 3,5 атм при 0°.

1 мл наносили на тандемную систему последовательно соединенных аффинных колонок Si-100 CaM-Biosphere (8×75 мм) и Si-300 CaM-Biosphere (8×75 мм), предварительно уравновешенных 0,1 М фосфатным буфером С, pH 7,0, содержащим 0,5 М сульфат аммония, 2 мМ $CaCl_2$, 0,1 мМ ЭГТА и 10%-ный раствор глицерина. Колонки промывали тем же буфером, после чего первую колонку отсоединяли и регенерировали. Колонку 2 промывали пятью объемами буфера С, содержащего 0,1% раствор Brij 35 и дополнительно десятью объемами буфера С. Через инжектор на колонку наносили 1 мл буфера D, (0,1 М Na-фосфат, pH—7,0, содержащего 5 мМ $MgCl_2$, 5 мМ ЭГТА, 0,5 М сульфата аммония и 20%-ный раствор глицерина, после чего останавливали поток. Элюцию ФДЭ с колонки 2 на одноразовый концентрирующий патрон cAMP-Biosphere осуществляли через 20 мин в режиме линейного градиента сульфата аммония от 0,5 до 0 М в присутствии 2 мМ ЭГТА и 20%-ного раствора глицерина при скорости потока 0,8 мл/мин за 60 мин. Концентрирующий одноразовый патрон отсоединяли и хранили при температуре —20° в 40%-ном растворе глицерина в течение двух недель. За это время активность фермента и степень активации существенно не менялись.

Аффинные колонки CaM-Biosphere регенерировали после каждой хроматографии следующим образом: колонки промывали пятью объемами буфера регенерации F (50 мМ натрий-ацетатный буфер, pH 4,5, содержащий 0,5 М NaCl, 10 мМ ЭДТА и 6 М мочевину) с последующей промывкой десятью объемами воды и буфера С.

## Результаты и обсуждение

Для препаративной очистки и идентификации ФДЭ из различных источников часто используют аффинную хроматографию на CaM-Sepharose [10—13]. Подобный подход универсален и, несмотря на ряд существенных недостатков, отмеченных выше, обладает значительными разрешающими способностями. С появлением ВЭЖХ замена обычных матриц на колонки с несравнимо высоким разрешением позволяет значительно повысить эффективность хроматографии. Однако непосредственное нанесение супернатанта гомогената на такие колонки технически затруднено, и возникает необходимость в предварительной очистке грубой фракции фермента. Для этого весьма успешным оказывается гидрофобная хроматография на Phenyl-Sepharose, основанная на комбинации двух методик, предложенных ранее [14—16].

Поскольку хроматография ФДЭ на гидрофобных сорбентах имеет явно выраженный $Ca^{2+}$-зависимый характер, то можно предположить, что комплекс кальмодулин—ФДЭ при избыточных концентрациях $Ca^{2+}$ взаимодействует с фенильным лигандом за счет гидрофобных участков, расположенных, по всей видимости, непосредственно на поверхности кальмодулина либо на индуцированной области на поверхности ФДЭ за счет $Ca^{2+}$-зависимой ассоциации фермента с кальмодулином. При потере ионов $Ca^{2+}$ под действием хелатирующего агента происходят изменения в гидрофобных свойствах фермента, приводящие к быстрой потере способности ФДЭ связываться с фенильной матрицей. Таким образом, эксперименты, прове-

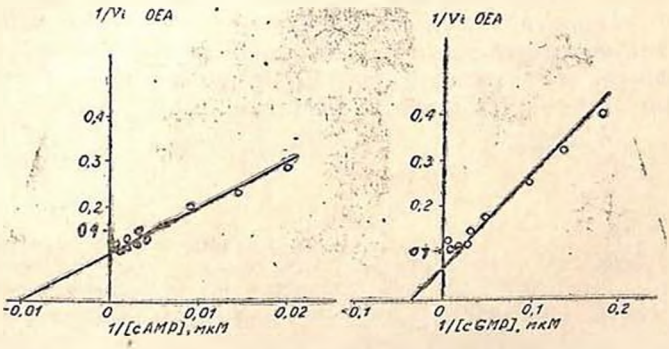


*Рис. 2.* Зависимость активности кальмодулинстимулируемой ФДЭ от концентрации субстратов cAMP *(а)* и cGMP *(б)* в двойных обратных координатах в отсутствие (1) и в присутствии 1 мкМ кальмодулина

денные с использованием гидрофобных фенильных матриц, показали, что с переводом очистки ФДЭ на фенильных матрицах в условиях ВЭЖХ можно достичь 30-кратной очистки фермента, позволяющей использовать на следующей стадии выделения ФДЭ ВЭЖХ на аффинной колонке CaM- Biosphere.

Аффинная ВЭЖХ на тандемной системе колонок CaM-Biosphere основана на способности кальмодулинзависимых белков конкурентно связываться с неподвижной фазой, где в качестве иммобилизованного лиганда выступает кальмодулин. После очистки ФДЭ методом гидрофобной ВЭЖХ в пике ферментативной активности, соответствующем белковому пику ФДЭ, наблюдались значительные примеси другого кальмодулинсвязывающего белка—кальцинейрина (более 30%). Нанесение элюата с гидрофобной колонки на тандемную систему аффинных ВЭЖХ колонок CaM-Biosphere позволяет кальцинейрину связываться с первой колонкой. При этом в профиле элюции наблюдалось лишь 15% фосфодиэстеразной активности. Связывание же основной массы ФДЭ происходит на второй колонке вследствие конкурентного взаимодействия двух белков с иммобилизованным ли-

гандом. ЭГТА-зависимой элюцией в одноразовый концентрирующий патрон cAMP-Biosphere достигалась 5000-кратная очистка ФДЭ до гомогенного состояния, о чем свидетельствовали данные электрофореза в ПААГ и гельпроникающей ВЭЖХ на колонке TSK SW-3000.

Специфическая активноость ФДЭ гипоталамуса для субстрата cGMP при концентрации 0,5 мкМ составляла приблизительно 10—20 мкмоль/мин/мг белка, а в условиях насыщающих концентраций субстрата максимальная активность составляла 30—60 ммоль/мин/мг для cGMP и 100—130 мкмоль/мин/мг для cAMP. На всем диапазоне исследуемых концентраций cAMP (от 1 до 500 мкМ) в координатах Лайнуивера-Бэрка фермент характеризовала линейная кинетика. Величина $K_m$ равна 100 мкМ (рис. 2, *а*). При использовании в качестве субстрата cGMP (1—500 мкМ) прямолинейности не наблюдалось. Данные позволяют определить по крайней мере два значения $K_m$ для cGMP, меньшее из которых ($K_{m1}$) в первом приближении равно 25 мкМ (рис. 2, *б*).

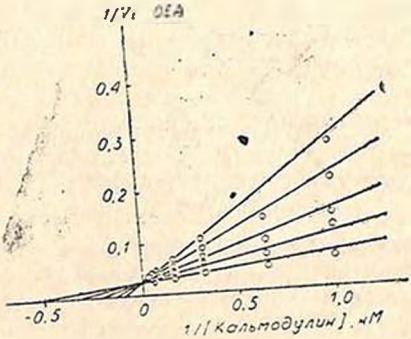


*Рис. 3.* График зависимости начальной скорости гидролиза cAMP от концентрации кальмодулина в присутствии фиксированных концентраций трифторперазина равных (в мкМ): *1*—0, *2*—1, *3*—10, *4*—100, *5*—500 в двойных обратных координатах. Эксперимент проведен в присутствии 2 мМ ЭГТА при концентрации cAMP 5 мкМ

Микромолярные концентрации кальмодулина в присутствии ионов Са (2 мМ) увеличивали скорость гидролиза 5 мкМ cAMP в 15—20 раз, максимальная активация ФДЭ достигалась при 1—5 мкМ кальмодулина, а кажущаяся константа активации была близка 2—2,5 нМ. Стимуляция фермента кальмодулином сопровождалась без существенного изменения $K_m$ для cAMP при одновременном увеличении максимальной скорости гидролиза. В присутствии кальмодулина фосфатидилсерин обратимо стимулировал гидролиз cAMP; при этом наблюдался аддитивный эффект в модуляции активности фермента.

$K_d$ комплекса $Ca^{2+}$-кальмодулин—ФДЭ, равная 2 нМ, существенно увеличивалась в присутствии антагониста кальмодулина, известного нейролептика трифторперазина, свидетельствуя о конкурентном типе ингибирования при образовании комплекса активатор—фермент (рис. 3).

Величина $M_r$ субъединицы ФДЭ гипоталамуса, согласно данным электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-Na, составляла 61 кД (рис 4, *а*). Данные гельпроникающей ВЭЖХ (рис. 4, *б*) свидетельствуют о том, что кажущаяся величина $M_r$ ФДЭ, соответствующая

пику активности фермента на профиле элюции, лежит в области приблизительно 120 кД, что позволяет предположить о димерной организации молекулы ФДЭ с идентичными субъединицами в нативном состоянии.

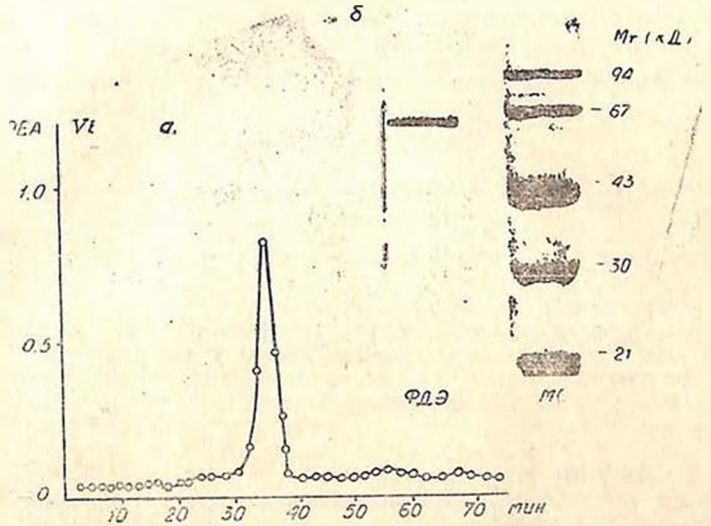


*Рис. 1.* Гельпроникающая ВЭЖХ на колонке TSK SW—3000 (*а*) (4,6×650 мм) и электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС-Na (*б*) элюата с одноразового концентрирующего патрона cAMP-Biosphere.

Таким образом, сопоставляя вышеизложенные результаты с таковыми для традиционных аффинных методов хроматографии, а также с имеющимися на сегодняшний день литературными данными относительно выделения ФДЭ на матрицах с иммобилизованным кальмодулином, становится очевидным, что с переводом аффинной хроматографии в систему ВЭЖХ и заменой обычных матриц на колонки с несравнимо высоким разрешением позволяет значительно повысить эффективность выделения высокоактивного препарата ФДЭ в гомогенном состоянии.

## PURIFICATION OF BOVINE HYPOTHALAMUS CALMODULIN STIMULATED PHOSPHODIESTERASE BY AFFINITY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

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

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of Armenia, Yerevan.

An affinity high performance liquid chromatographic method has been developed to separate calcium and calmodulin stimulated cyclic nucleo-

tide phosphodiesterase from bovine hypothalamus. The method employs a selective. EGTA-dependent elution with ammonium sulfate gradient from silicabased gel to which calmodulin bound. Comparing to traditional chromatography on CaM-Sepharose, the method proposed is more rapid, dilutes the sample to a small degree, achieves better resolution of kinetically distinc froms and is appropriate both for analytical and preparative use.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Kakiuchi S., Yamasaki R.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 41, p. 1104—1113, 1970.
2. *Beavo J. A., Hansen R. S., Harrison S. A., Hurwitz R. L., Martins T. J. Mumby M. C.* Mol. Cell. Endocrinol., v. 28, p. 387—399, 1982.
3. *Huang C. Y., Chau V. E., Chock P. B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 78, p. 871—882, 1981.
4. *Klee C. B., Crouch N. H., Krinks M. H.* Biochemistry, v. 18, p. 722—731, 1979.
5. *Marrill A. E., Thompson S. T., Stellwagen E. A.* J. Biol. Chem., v. 254, p. 4371—4383, 1979.
6. *Sharma R. K., Wang T. H., Wirch E. R., Wang J. H.* J. Biol. Chem., v. 255, p. 5916—5928, 1980.
7. *Kincaid R. L., Vanganiello V. S., Vaughen M. D.* J. Biol. Chem. v. 256, p. 11345—11357, 1981.
8. *Kincaid R. L., Vaughan V. A.* Methods in Enzymology, v. 159, p. 557—573, 1988.
9. *Thompson W. J., Appleman M. M.* Biochemistry, v. 10, p. 311—316, 1971.
10. *Klee T. H., Krinks M. H.* Biochemistry, v. 17, p. 120—131, 1978.
11. *Watterson D. M., Vanaman T. C.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 73, p. 40—52, 1976.
12. *Kincaid R. L., Vaughan M.* Biochemistry, v. 22, p. 826—835, 1983.
13. *Draeta G., Klee K. B.* Methods of Enzymonology, v. 159, p. 573—584, 1988.
14. *Gopalokrishna R., Anderson W. B.* J. Biol Chem., v. 258, № 4, p. 2405—2409 1983.
15. *Бобрускин И. Д., Шайхин С. И., Муратова И. В., Баранова Л. А., Северин С. Е.* Биохимия, т. 52, № 8, с. 1344—1351, 1987.
16. *Абрамян Г. Э., Чаилян С. Г., Исаджанян М. А., Киракосова А. С., Галоян А. А.* Нейрохимия, т. 10, № 3—4, с. 140—145, 1991.


Поступила 20.XII.1991