

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

АФФИННАЯ ВЭЖХ КАК МЕТОД АНАЛИЗА РЕГУЛЯЦИИ  
АКТИВНОСТИ ФДЭ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ  
НА УРОВНЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

АБРАМЯН Г. Э., ЧАИЛЯН С. Г., ИСАДЖАНЫН М. А.,

КИРАКОСОВА А. С., ГАЛОЯН А. А.

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

В настоящей работе показано, что кинетические параметры взаимодействия биологически активных соединений и  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулинзависимой ФДЭ можно оценить с помощью параметров элюирования этого фермента с аффинных матриц, содержащих иммобилизованные взаимодействующие компоненты. Рассмотрены основные экспериментальные особенности и подходы аналитической аффинной ВЭЖХ с зональным элюированием. Обсуждаются свойства аффинной матрицы и растворенного реагента в отношении их применимости для аналитических экспериментов. Представлены примеры, показывающие возможности рассматриваемого метода для изучения физико-химических параметров взаимодействия биологически активных соединений с  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулинзависимой ФДЭ циклических нуклеотидов.

Общей задачей в аффинной ВЭЖХ  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулинзависимой ФДЭ является получение иммобилизованного лиганда, сохраняющего способность биоспецифически связывать фермент, находящийся в подвижной фазе. На такой специфичности основаны эффективные методы препаративного выделения этого фермента из сложных смесей, которые могут содержать примеси, близкие по другим свойствам, часто используемым для очистки, таким, как размер и небiosoцифические характеристики поверхности. Аффинная ВЭЖХ может служить не только методом препаративного выделения, но и быть гибким аналитическим методом, так как степень хроматографического удерживания подвижного реагирующего вещества на иммобилизованном лиганде позволяет определять равновесную константу связывания для взаимодействия аффинной матрицы с подвижным компонентом [1, 2]. Кроме того, если в ходе зонального элюирования в подвижную фазу включаются биологически активные вещества, влияние на связывание с аффинной матрицей путем прямого взаимодействия с элюирующим подвижным компонентом (например, вследствие конкуренции с иммобилизованным ФДЭ), то могут быть измерены также параметры взаимодействия этих эффекторов. И поскольку для аффинной матрицы можно варьировать конкурирующие вещества и другие эффекторы, а также химическую природу подвижного аффината, то возможно определение

специфичности связывания и его зависимости от влияния различных биоактивных соединений. Поэтому константы связывания для иммобилизованного лиганда можно сравнить с таковыми для растворимого аналога. Сопоставление взаимодействий в случае аффинной матрицы и раствора может быть использовано для конструирования модели и оценки механизма регуляции ферментативной активности ФДЭ.

### Материалы и методы

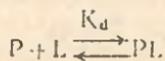
Эксперименты проводили на двухкомпонентной системе ВЭЖХ «Biogonik BT-8100» (ФРГ). Система оснащена инжектором «Rheodyne» с петлей для образца объемом 50 мкл и детектором с изменяемой длиной волны. Спектральный диапазон дейтериевой лампы составлял 190—370 нм. Все растворы постоянно дегазировали гелием 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 PDE-Biosphere, cAMP-Biosphere, cGMP-Biosphere и PDE-Biosphere (4,6×150 мм) «Biosphere» (Армения).

На колонку, предварительно уравновешенную соответствующим буфером, содержащим или не содержащим эффектор, наносили образец (50 мкл). Элюирование продолжали уравнивающим буфером (+/— эффектор) и определяли кривую элюирования первоначально введенного подвижного компонента.

Температура процесса зависела главным образом от стабильности компонентов биоспецифической системы и природы нековалентных взаимодействий между подвижным и иммобилизованным компонентами.

В оптимальных условиях ряд физических параметров колонки, например, скорость потока  $V_0$  (объем элюирования не взаимодействующего, проникающего в поры сорбента вещества, размер молекул которого близок таковому для компонента взаимодействующей системы) и  $V_m$  (исключающий объем) остаются постоянными для серии экспериментов с зональным элюированием. Это дает возможность сравнивать результаты большого количества хроматографических анализов и исключает необходимость повторного определения  $V_0$  и  $V_m$ . Элюирование в небольших аналитических колонках осуществляли при скорости 0,3—0,5 мл/мин.

Реакцию конкурентного моновалентного связывания можно представить следующей формулой:





где  $P$ —подвижный компонент,  $L'$ —лиганд, иммобилизованный на матрице,  $L$ —растворимый компонент, конкурирующий с иммобилизованным лигандом за связывание с  $P$ :  $PL$  и  $PL'$ —нековалентные комплексы между соответственно подвижными и иммобилизованными компонентами системы:  $K_d$  и  $K_d'$  для  $PL$  и  $PL'$ .

Опираясь на уравнение 1 и учитывая общие положения ВЭЖХ с взаимодействующими компонентами, можно вывести следующую зависимость:

$$\frac{1}{V - V_0} = \frac{K_d}{(V_0 - V_m)[L]} + \frac{K_d'[L]}{K_d(V_0 - V_m)[L']} \quad (2)$$

Это выражение устанавливает связь между изменением элюируемого объема элюирования подвижного компонента и концентрациями иммобилизованного и растворимого концентрирующих лигандов  $L$  и  $L'$ , а также  $K_d$  и  $K_d'$ . Для систем с моновалентным взаимодействием с помощью уравнения 2 можно определить  $K_d$  непосредственно по хроматографическим данным. Для специфической аффинной матрицы с фиксированной концентрацией иммобилизованного лиганда  $L'$  проводили ряд экспериментов с изменяющимися значениями  $L$  в элюенте. Объемы элюирования зон подвижной макромолекулы определяются при различных значениях  $L$ . Строили зависимость  $1/(V - V_0)$  от  $L$ . Тогда  $K_d'$  можно найти по тангенсу угла наклона прямой, а  $K_d$ —по отсекаемому отрезку на оси ординат.  $K_d$  и  $K_d'$  рассчитывали также аналитически, обработав полученные данные по элюированию линейным методом наименьших квадратов.

Важное условие зональной аналитической аффинной ВЭЖХ состоит в том, что концентрация  $P$  по мере прохождения зоны через слой адсорбента постоянно изменяется. Поэтому члены, содержащие  $P$ , не включаются в выражения, относящиеся к объемам элюирования и  $K_d$ . Пренебрежение  $P$  допустимо только в том случае, если этот параметр мал по сравнению с  $K_d$ . Проведение экспериментов по зональному элюированию при низком  $P$  обычно легко осуществимо и особенно желательно при труднодоступных биомолекулах. Использование низких  $P$  в зональном анализе аналогично применению низких концентраций фермента в твердофазном ферментативном анализе [3]. Было экспериментально показано [4], что при низком (по отношению к  $K_d'$ ) количестве фермента, введенного в аффинную матрицу, рассчитанные  $K_d$  практически не зависят от количества использованного подвижного компонента. В то же время в работе Nichol и соавт. [5] предложены уравнения расчетов по методу постоянного фронтального анализа, в которые входит точное значение концентрации подвижного компонента, нанесенного на аффинную колонку.

Аффинная ВЭЖХ с зональным элюированием может быть также использована для расчетов в системах бивалентного связывания, включая представленные в уравнении 3:

$$\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d'}{(V_0-V_m) [L']} \quad (3)$$

Как описано для систем моновалентного связывания, это уравнение приводит к уравнению 4, позволяющему оценить  $K_d$  и  $K_d'$  для бивалентных веществ  $P_2$  путем измерения  $V$  при различных значениях  $L$ . Однако, в отличие от систем моновалентного связывания, для бивалентных систем зависимость  $1/(V-V_0)$  от  $L$  нелинейна. Таким образом,  $K_d$  и  $K_d'$  находят по данным конкурентного элюирования путем обработки нелинейной зависимости методом наименьших квадратов. Несмотря на различие, методика для получения данных в случае систем бивалентного связывания полностью аналогична таковой для моновалентной системы:

$$\frac{1}{V-V_0} = \frac{1 + 2 \frac{[L]}{K_d} + \left(\frac{[L]}{K_d}\right)^2}{(V-V_m) \left[ 2 \frac{[L']}{K_d} + \left(\frac{[L']}{K_d}\right)^2 + 2 \frac{[L][L']}{K_d \cdot K_d} \right]} \quad (4)$$

Если зональное элюирование осуществляется в отсутствие растворимого лиганда ( $L=0$ ), уравнение 4 упрощается. При  $V=0$   $K_d$  можно найти непосредственно по объему элюирования при одном зональном элюировании.

### Результаты и обсуждение

С использованием аффинной ВЭЖХ с зональным элюированием были изучены взаимодействующие системы ФДЭ-регулятор и ФДЭ-регулятор-регулятор. Ниже приведены несколько типичных примеров, показывающих обычные хроматографические результаты, получаемые при изучении моновалентных, бивалентных и кооперативных взаимодействующих систем.

На рис. 1 представлены результаты, полученные при элюировании зон ФДЭ с cAMP-Biosphere при различных концентрациях растворимого конкурентного лиганда. Линейность зависимости  $1/(V-V_0)$  от  $L$  отражает 1:1-природу взаимодействия ФДЭ-субстрат; эта зависимость может быть использована для расчета  $K_d$  и  $K_d'$  с использованием моновалентных моделей (уравнение 2).

Таким образом, этим методом можно установить сразу несколько констант равновесного взаимодействия для ряда конкурентных лигандов и благодаря этому оценить специфичность взаимодействия.

При конкурентном элюировании cGMP-зависимой ФДЭ с cGMP-Biosphere при концентрации лиганда  $10^{-4}$  моль/л (функциональная емкость) в присутствии cGMP зависимость  $1/(V-V_0)$  от концентрации растворимого конкурентного лиганда нелинейна

(рис. 2), что согласуется с вероятностью бивалентного связывания субстрата с ферментом. Вследствие этого параметры взаимодействия  $K_d$  и  $K_d'$  были рассчитаны с использованием многоцентровой модели (уравнение 4). Если ФДЭ элюируется с колонки при концентрации 20 мкМ, изменение объема элюирования при изменении концентрации растворимого лиганда согласуется с моновалентной моделью (рис. 3). В этом случае при уменьшенной плотности связывающих положений матрицы исключается сколь-нибудь значительная возможность одновременного связывания по двум положениям матрицы. Таким образом, как моновалентная, так и бивалентная модели могут быть использованы для расчета значений  $K_d$  и  $K_d'$ .

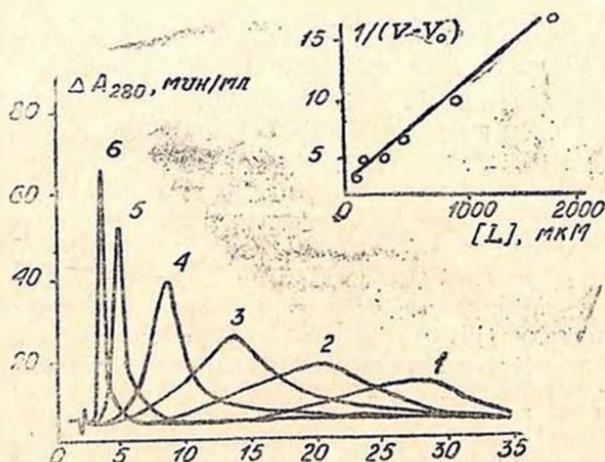


Рис. 1. Аффинная ВЭЖХ с конкурентным зональным элюированием для системы с моновалентным связыванием. Зоны, содержащие равные количества ФДЭ, наносили на колонку cAMP-Biosphere ( $4,6 \times 150$  мм), уравновешенную 25 мМ трис-HCl буфером, pH 7,0, содержащим растворимый конкурентный лиганд cAMP в концентрации (в мкМ): 1—1, 2—10, 3—100, 4—500, 5—1000, 6—2000. Элюирование осуществляли при комнатной температуре со скоростью потока 0,5 мл/мин. Обнаружение продукта при  $\lambda$  280 нм. Здесь и на рис. 2, 3 по оси абсцисс—объем элюирования в мл. В правом верхнем углу построена зависимость  $1/(V-V_0)$  от концентрации cAMP. Из этого графика с использованием уравнения 2 рассчитана  $K_d$ . По оси абсцисс—концентрация cAMP в мкМ.

В то время как элюирование ФДЭ при более высокой концентрации аффинной матрицы приводит к нелинейным зависимостям  $1/(V-V_0)$  от  $L$ , элюирование при малых концентрациях растворимого лиганда с той же самой матрицы свидетельствует о линейном поведении. Это подтверждает вывод о том, что отклонение от линейности в случае высоких концентраций cGMP на самом деле обусловлено возникающим многоцентровым ФДЭ с cGMP.

Поведение кальмодулина при зональном элюировании с CaM-Biosphere соответствует схеме кооперативного связывания, отличаю-

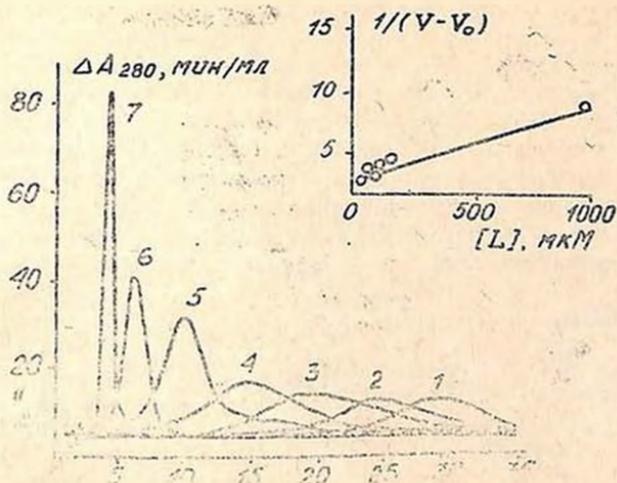


Рис. 2. Аффинная ВЭЖХ с конкурентным зональным элюированием для системы с бивалентным связыванием. Зоны (50 мкл) ФДЭ наносили на колонку сGMP-Biosphere ( $4.6 \times 150$  мм), уравновешенную 25 мМ трис-НСI буфером, pH 7.0, содержащим сGMP в концентрации (п мкМ): 1—1, 2—10, 3—20, 4—50, 5—100, 6—500, 7—1000. Элюирование осуществляли тем же буфером, содержащим указанное количество растворимого лиганда со скоростью потока 0,5 мл/мин при комнатной температуре. Обнаружение продукта при  $\lambda$  280 нм. В правом верхнем углу построена зависимость  $1/(V-V_0)$  от концентрации сGMP в мкМ.  $K_{m1}$  рассчитана с использованием уравнения

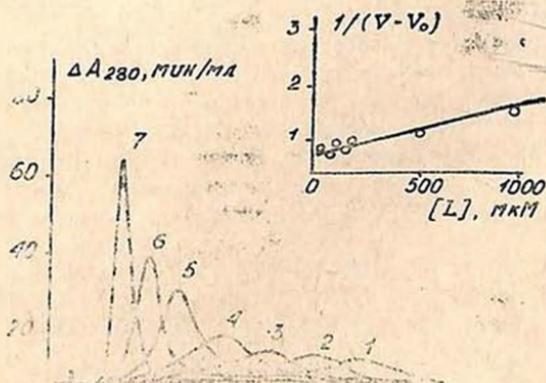


Рис. 3. Конкурентное зональное элюирование комплекса кальмодулин-ФДЭ с сGMP-Biosphere с высоким содержанием конкурентного лиганда. Условия эксперимента аналогичны приведенным на рис. 2. В правом верхнем углу построена зависимость  $1/(V-V_0)$  от концентрации сGMP в мкМ

щегося от строго моновалентных и бивалентных моделей. Объемы элюирования обычно уменьшаются с увеличением концентрации антагониста кальмодулина W-7 в элюирующем буфере. Однако, когда полученные при конкурентном элюировании данные были выражены графически как  $1/(V-V_0)$  от  $L$ , в большинстве случаев наблюдалось отклонение от линейности при низких  $L$  (рис. 4). Причина этого поведения объясняется тем фактом, что кальмодулин имеет несколько центров связывания с антагонистами с низким и высоким сродством. Таким образом, в то время как элюирование кальмодулина в отсутствие антагониста отражает аффинное связывание с матрицей,

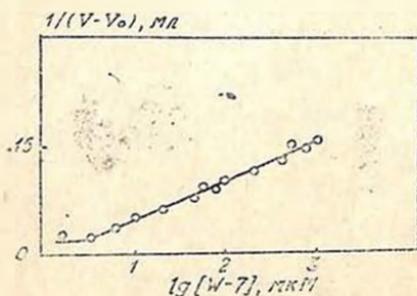


Рис. 4. Линейный график данных конкурентного элюирования кальмодулина с CaM-Biosphere ( $4,6 \times 150$ ). Зависимость  $1/(V-V_0)$  от концентрации антагониста кальмодулина W-7 в мкМ. Прямая построена путем обработки экспериментальных данных по методу наименьших квадратов.  $K_d$  рассчитана по линейным графикам с использованием уравнений 2 и 3.

элюирование в присутствии низкой концентрации антагониста кальмодулина оказалось более замедленным, чем обычно, что вызвано связыванием W-7 с центрами с высоким сродством. Увеличение низких концентраций антагониста приводит к более плавному уменьшению объемов элюирования, чем ожидалось на основании степени конкурирования W-7 и аффинной матрицы за связывание с кальмодулином, находящимся в растворе.

Таким образом, аналитическая аффинная ВЭЖХ с зональным элюированием была изучена на многих макромолекулярных системах. Было показано, что этот метод достаточно простой в экспериментальном отношении и весьма полезен для оценки взаимодействий ФДЭ и биорегуляторов и позволяет изучить биомолекулярные взаимоотношения и в этой связи молекулярные основы функционирования не только ФДЭ, но многих  $Ca^{2+}$ -зависимых ферментов.

#### AFFINITY HPLC AS A METHOD FOR THE ANALYSIS OF REGULATION OF CYCLIC NUCLEOTIDES PDE ACTIVITY ON THE LEVEL OF MOLECULAR INTERACTION

ABRAHAMIAN G. E., CHAILIAN S. G., ISADJANIAN M. A.,  
KIRAKOSOVA A. S., GALOYAN A. A.

H. Ch. Buntatian Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Armenia, Yerevan

In the present investigation it is demonstrated that the kinetic parameters of biologically active compounds interaction with  $Ca^{2+}$ -CaM-dependent PDE can be estimated with the parameters of the enzyme elution from the affinity matrix containing the immobilized interacted

components. There are studied the main experimental peculiarities and approaches of analytical affinity HPLC with zonal elution. There are discussed the properties of affinity matrix and of dissolved reagent in reference to their usage for analytical experiments. There are shown the possibilities of the method studied for investigating the physico-chemical parameters of biologically active compounds interaction with  $Ca^{2+}$ -CaM-dependent cyclic nucleotides PDE.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Dunn B. M., Chaiken I. M.* Proc. Nat. Acad. Sci USA, v. 71, p. 2382, 1974.
2. *Chaiken I. M.* Anal. Biochem., v. 97, p. 1-10, 1977.
3. *Bender M. L., Brudacher L. J.*—In: Catalysts and Enzyme Action, p. 25-39 N. Y., 1973.
4. *Chaiken I. M., Taylor H. C. J.* Biol. Chem., v. 251, p. 2044-2053, 1978.
5. *Nichol L. W., Ogsion A. G., Winzor D. J., Sawyer W. H.* Biochem. J., v. 143 p. 435-443, 1974.

Поступила 29. VII. 1991