

**БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ**  
**BIOORGANIC CHEMISTRY**

УДК 543.544.17:577.152.28

Поступила в редакцию 16.12.2016  
Received 16.12.2016**С. Н. Гилевич, Ю. В. Бречко, К. Ю. Рипинская***Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь***ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОАКТИВНОЙ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ P1-1  
ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ АФФИННЫХ МЕМБРАН  
И СВОЙСТВА ОЧИЩЕННОГО ФЕРМЕНТА**

Глутатион-S-трансфераза P1-1 (GSTP1-1) человека является диагностически важным ферментом, гиперэкспрессия которого в опухолях и лимфомах приводит к формированию множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Небольшие количества фермента можно выделить из эритроцитов, однако известные методы очистки не позволяют получить препараты с высокой удельной активностью и хорошим выходом. С целью разработки более эффективной процедуры очистки эритроцитарной GSTP1-1 в настоящей работе впервые получены и охарактеризованы глутатионсодержащие аффинные мембраны на основе химически модифицированной целлюлозной бумаги. Мембраны успешно использованы для очистки фермента вместо традиционных агарозно-гелевых адсорбентов. Разработан новый метод выделения и очистки GSTP1-1 из гемолизата эритроцитов, включающий предварительное удаление гемоглобина на анионообменнике и аффинную хроматографию фермента на картридже с глутатионсодержащими мембранами. По эффективности (выход фермента 76,5 %, степень очистки 23589 раз, удельная активность 104,5 Ед/мг белка) предложенный метод значительно превосходит ранее опубликованные. Гомогенность полученного препарата, по данным гель-электрофореза и масс-спектрометрии, составляет не менее 95%. Найдены стационарные кинетические параметры очищенной GSTP1-1 в реакции конъюгации глутатиона (GSH) и 1-хлор-2,4-динитробензола (CDNB) при pH 6,5 и 25 °C: для GSH  $K_m = 0,19$  мМ,  $k_{cat} = 47,8$  с<sup>-1</sup>; для CDBN  $K_m = 0,68$  мМ,  $k_{cat} = 54,3$  с<sup>-1</sup>. Результаты работы представляют интерес для скрининга новых ингибиторов фермента с противоопухолевой активностью. Полученные аффинные мембраны могут быть использованы при выделении нативных и рекомбинантных глутатион-S-трансфераз (GST) из различных источников, а также гибридных белков с GST-доменом.

*Ключевые слова:* глутатион-S-трансфераза P1-1 (GSTP1-1), эритроциты, аффинные мембраны, адсорбция, выделение и очистка фермента, хроматография, удельная активность, кинетические параметры.

**S. N. Gilevich, Yu. V. Brechka, K. Yu. Ripinskaya***Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***PREPARATION OF HIGHLY ACTIVE HUMAN ERYTHROCYTE GLUTATHIONE S-TRANSFERASE P1-1  
USING AFFINITY MEMBRANES, AND PROPERTIES OF THE PURIFIED ENZYME**

Human glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) is an important enzyme in clinical diagnostics since its overexpression in solid tumours and lymphomas largely contributes to multiple drug resistance of cancer cells. Small amounts of the enzyme can also be isolated from erythrocytes. However, known isolation methods are disadvantageous and do not allow to obtain the purified enzyme in good yield and with high specific activity ( $\geq 100$  U/mg protein). In order to elaborate more effective purification procedure for the erythrocyte GSTP1-1, we have for the first time synthesized and investigated glutathione-containing affinity membranes based on chemically modified cellulose paper. The membranes have been shown to successfully replace conventional glutathione-agarose affinity gels in the enzyme purification. To isolate and purify GSTP1-1 from erythrocyte hemolysate, a novel two-step method has been developed involving preliminary hemoglobin removal on a small anion exchange column and further affinity chromatography on the cartridge with glutathione-containing membranes. In terms of activity yield (76.5%), purification factor (23589-fold), and specific activity of the purified enzyme (104.5 U/mg), the method is notably superior to previously published procedures. Gel electrophoretic and MALDI-TOF mass spectrometric analyses reveal apparent homogeneity ( $\geq 95\%$ ) of the obtained preparation. Steady-state kinetic parameters have been determined for the purified GSTP1-1 in the conjugation reaction between glutathione and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene at pH 6.5 and 25 °C: for the former substrate,  $K_m = 0.19$  mM,  $k_{cat} = 47.8$  s<sup>-1</sup>; for the latter,  $K_m = 0.68$  mM,  $k_{cat} = 54.3$  s<sup>-1</sup>. The results of the present work may be useful for screening new enzyme inhibitors with possible antitumour activity. The affinity membranes may also find application in isolating native and recombinant glutathione S-transferase (GST) isoforms from various sources, as well as fusion proteins with GST tag.

*Keywords:* glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1), erythrocytes, affinity membranes, adsorption, enzyme isolation and purification, chromatography, specific activity, kinetic parameters.

**Введение.** К глутатион-S-трансферазам (GST, КФ 2.5.1.18) относится многочисленное семейство ферментов, катализирующих реакции конъюгации восстановленного глутатиона (GSH) с различными электрофильными соединениями. GST выполняют важнейшую защитную функцию в организме, обеспечивая детоксикацию ксенобиотиков (токсины, канцерогены, цитостатики и другие лекарственные препараты) с последующей экскрецией их глутатионовых производных из клетки. В зависимости от локализации все GST подразделяются на три обширные группы: цитозольную, митохондриальную и микросомальную. Цитозольные GST млекопитающих включают не менее 18 изоформ в составе 7 генонезависимых классов, обозначаемых греческими буквами  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\sigma$ ,  $\theta$ ,  $\omega$  и  $\zeta$ ; изоформы отличаются по спектру каталитической активности и уровню экспрессии в органах и тканях [1–3]. У человека важное клинико-диагностическое значение имеет изоформа P1-1 (GSTP1-1), относящаяся к  $\pi$ -классу и обнаруженная в плаценте, головном мозге, кишечнике, легких, молочной железе, матке и других органах, за исключением печени [2]. Гиперэкспрессия GSTP1-1 во многих твердых опухолях и лимфомах приводит к формированию множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Уровень экспрессии GSTP1-1 является одним из прогностических факторов в терапии рака [2, 4]. Изоформа P1-1 также экспрессируется в эритроцитах, где активность фермента служит биомаркером общей интоксикации организма [5].

Для выделения и очистки эритроцитарной GSTP1-1 часто используют колоночную аффинную хроматографию на агарозном геле с иммобилизованным GSH или GSHx (S-гексилглутатион) [6–10]. Стоимость коммерческой GSH-агарозы достаточно высока: около 240 евро за 10 мл геля. По ряду причин (низкое содержание фермента в исходном материале, наличие огромных количеств сопутствующего гемоглобина, групповая специфичность глутатионовых аффинных лигандов ко всему семейству GST) данная процедура не позволяет одностадийно получить гомогенный препарат GSTP1-1 с высокой удельной активностью, лишенный примеси других изоформ GST. Чтобы отделить анионную изоформу P1-1 от катионных и нейтральных изоформ, найденных в крови и относящихся к классам  $\alpha$ ,  $\mu$  и  $\theta$ , аффинную хроматографию дополняют хроматофокусированием или катионообменной хроматографией на производных декстрана и агарозы. Катионообменники обычно применяют на предварительной стадии очистки, где требуется колонка очень большого размера, позволяющая адсорбировать не только примесные изоформы, но и весь гемоглобин из гемолизата эритроцитов; при этом GSTP1-1 не связывается с адсорбентом [6, 7, 9]. Потери активности фермента в ходе многостадийной и трудоемкой очистки достигают 50–90% [8, 11]. Удельная активность очищенных препаратов в стандартной реакции конъюгации GSH и 1-хлор-2,4-динитробензола (CDNB) составляет 24–66 Ед/мг белка [8, 10, 11]. У более изученной GSTP1-1 из плаценты аналогичный показатель значительно выше – 80–136 Ед/мг для нативного фермента [12, 13] и 81–128 Ед/мг для рекомбинантного фермента, экспрессированного в *E. coli* [14, 15]. Значения кинетических параметров эритроцитарной GSTP1-1, найденные разными авторами, отличаются на порядок [8, 10]. Отсюда следует актуальность разработки новых, более эффективных подходов к выделению фермента.

Известно, что биоспецифические мембранные адсорбенты обладают рядом преимуществ по сравнению с аналогичными агарозными гелями и успешно используются для твердофазной экстракции, выделения и очистки природных и рекомбинантных белков [16]. В отношении GST аффинные мембраны до сих пор не применялись; сведений о мембранах с ковалентно иммобилизованным GSH также не имеется. Ранее нами была проведена иммобилизация иминодиацетатных и нитрилтриацетатных лигандов на химически активированных целлюлозных мембранах и показано высокое сродство полученных металлоаффинных адсорбентов к гемоглобину [17, 18]. Идея настоящей работы основана на получении аффинных мембран нового типа путем присоединения GSH к активированному целлюлозному носителю. Цель работы – с помощью глутатионсодержащих аффинных мембран разработать новый, высокоэффективный метод выделения и очистки эритроцитарной GSTP1-1 и охарактеризовать очищенный фермент по физико-химическим и каталитическим свойствам.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали: AGE – аллилглицидиловый эфир, ECH – эпихлоргидрин, BDGE – диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола, DVS – дивинил-

сульфон, DTT – дитиотреит, SDS – додецилсульфат натрыя, 2-меркаптоэтанол, набор белковых маркераў для гелі-электрафорэза («Sigma-Aldrich», США); акрыламід, N,N'-метыленбісакрыламід («Fluka», Швейцарыя); BSA – сывороточны альбумін быка, HSA – сывороточны альбумін чалавека («Seriva», Германія); EDTA – Na<sub>2</sub>-соль этилендіамінтэтрааксунай кіслоты, гліцын, DMSO – дыметылсульфоксід («AppliChem», Германія); tris – тріс(гідрокіметыламінометан) («Melford», Вялікабрытанія); N,N,N',N'-тэтраметылетылендіамін («Alfa Aesar», Германія); DEAE-сефарозу CL-6B («Pharmacia», Швецыя). GSH-агарозу (26,7 мкмоль GSH/мл геля) сінтэзавалі вядомым спосабам [19]. астальныя рэактывы мелі кваліфікацыю «х. ч.» ці «ч. д. а.». N-бромсукцынімід (NBS) перад іспользаваннем перакрысталізавалі з вады.

**Получение глутатионсодержащих аффинных мембран.** Исходным материалом служили листы целлюлозной бумаги для блоттинга Whatman GB003 («GE Healthcare», США). Стадии синтеза и структура целевых продуктов схематически представлены на рис. 1.

При получении мембран Cell-SG-A бумагу активировали AGE, взяв за основу известную реакцию аллилирования полисахаридных гелей [20]; условия реакции (температуру, длительность, концентрацию NaOH и DMSO) предварительно оптимизировали. Далее к двойной связи привитых аллильных групп присоединяли NBS, используя водный раствор реагента; образовавшийся бромгидрин замыкали в эпоксид разбавленным NaOH; эпоксидный цикл селективно раскрывали тиольной группой GSH при pH 7,5; аминогруппа трипептида в этих условиях не реагирует [19]. Целевой продукт содержит гидрофильный семиатомный линкер между иммобилизованным лигандом и носителем.

Мембраны Cell-SG-B синтезировали, используя известный способ активации мембранных фильтров ECH [21] с некоторыми изменениями концентрации реагентов. Эпоксидные группы

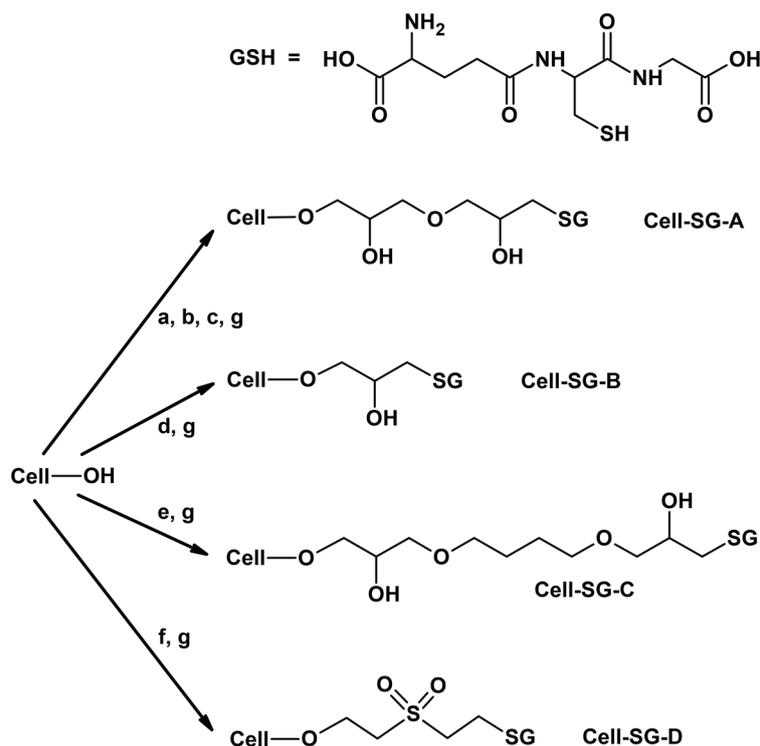


Рис. 1. Схема получения глутатионсодержащих мембран Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C и Cell-SG-D из исходного материала (Cell-OH). Реагенты и условия реакций: *a* – NaOH, DMSO, AGE, 30 °C, 48 ч; *b* – NBS, H<sub>2</sub>O, 25 °C, 2 ч; *c* – 0,01 M NaOH, 25 °C, 1,5 ч; *d* – NaOH, ECH, 25 °C, 6 ч; *e* – NaOH, BDGE, 30 °C, 6 ч; *f* – DVS, pH 11, 25 °C, 4 ч; *g* – GSH, pH 7,5, 30 °C, 24 ч

Fig. 1. Preparation scheme of Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C and Cell-SG-D glutathione-containing membranes from the starting material (Cell-OH). Reagents and conditions: *a* – NaOH, DMSO, AGE, 30 °C, 48 h; *b* – NBS, H<sub>2</sub>O, 25 °C, 2 h; *c* – 0.01 M NaOH, 25 °C, 1.5 h; *d* – NaOH, ECH, 25 °C, 6 h; *e* – NaOH, BDGE, 30 °C, 6 h; *f* – DVS, pH 11, 25 °C, 4 h; *g* – GSH, pH 7.5, 30 °C, 24 h

активированного носителя вводили в реакцию с GSH, как описано выше. Целевой продукт имеет короткий трехатомный линкер между лигандом и носителем.

Синтез мембран Cell-SG-C проводили аналогично, активируя носитель диэпоксидом (BDGE) по методике [17] и далее присоединяя GSH по свободным эпоксидным группам. В целевом продукте лиганд связан с носителем посредством амфифильного 12-атомного линкера.

При получении мембран Cell-SG-D за основу взята методика активации агарозных гелей DVS [22], адаптированная нами для мембранного формата. К винилсульфоновым группам активированного носителя присоединяли GSH (реакция Михаэля); в результате между лигандом и носителем формируется амфифильный пятиатомный линкер.

По окончании синтеза остаточные активные группы всех мембран блокировали 0,35 М 2-меркаптоэтанолом (рН 8,3) в течение 24 ч. Концентрацию иммобилизованного GSH принимали равной концентрации привитых  $\text{NH}_2$ -групп, которую определяли спектрофотометрически по реакции с нингидрином [23]. Длину линкера оценивали как расстояние между проксимальным и дистальным атомами С после 3D-оптимизации структуры в программе ACD ChemSketch.

**Равновесная бэтч-адсорбция GSTP1-1 на аффинных мембранах.** Связывание GSTP1-1 полученными мембранами изучали равновесным бэтч-методом при 10 °С и рН 7,0 в 25 мМ КФБ (калий-фосфатный буфер с добавкой 1 мМ EDTA и 1 мМ DTT). На данном этапе исследований фермент выделяли из осветленного гемолизата эритроцитов колоночной хроматографией на DEAE-сефарозе (методика приведена ниже) и далее очищали на колонке с GSH-агарозой по методике [13]. Эксперименты проводили в пластиковых 1 см-кюветах, содержащих фрагменты мембран 5×5 мм. Для подавления неспецифической адсорбции мембраны предварительно обрабатывали раствором BSA (2 мг/мл) в том же буфере и хорошо промывали чистым буфером. Очищенную GSTP1-1 (0,4–4 Ед активности; 91,5 Ед/мг белка) адсорбировали из объема 0,2 мл в течение 2 ч со встряхиванием на орбитальном шейкере; указанное время необходимо для достижения адсорбционного равновесия. Затем жидкие фазы переносили в отдельные микропробирки на ледяной бане; из микропробирок по очереди отбирали аликвоты содержимого и определяли остаточную активность фермента. Количество адсорбированной GSTP1-1 рассчитывали по разнице между исходной и остаточной активностью с поправкой на медленную инактивацию фермента. Найденная опытным путем степень инактивации GSTP1-1 в выбранных условиях была практически постоянной (15–20% за 2 ч связывания). Некоторые допущения, использованные при расчетах, излагаются ниже. Экспериментальные кривые аппроксимировали гиперболой, согласно уравнению Лэнгмюра [21].

**Выделение и очистка GSTP1-1 из гемолизата эритроцитов.** Осадок эритроцитов из 50 мл крови здорового донора, полученный и промытый по стандартной методике [24], подвергали гемолизу 1 ч при 0 °С в 4 объемах 10 мМ КФБ (рН 6,5). Гемолизат осветляли центрифугированием 1 ч при 27000 g и 4 °С. Супернатант (исходный материал для выделения GSTP1-1) наносили на колонку с DEAE-сефарозой (1,5×16 см), уравновешенную 20 мМ КФБ (рН 6,5). Хроматографию вели при 7 °С со скоростью 18 мл/ч, контролируя поглощение элюата при 280 нм проточным детектором Uvicord SII («ЛКВ», Швеция). Колонку промывали тем же буфером до полного удаления Hb. GSTP1-1 элюировали линейным градиентом концентрации КФБ в интервале значений 20–200 мМ. Фракции с высокой активностью фермента объединяли, концентрировали и обессоливали в центрифужных фильтрах Amicon Ultra-15 «Merck-Millipore» (Германия) с молекулярно-массовым пределом задерживания 10 кДа. Для дальнейшей очистки использовали пластиковый картридж, изготовленный из мини-колонки с внутренним диаметром 1,5 см. На пористое дно картриджа помещали 16 мембранных дисков Cell-SG-A того же диаметра с суммарной толщиной ~ 2,4 см; сверху герметично вставляли адаптер для подачи жидкости перистальтическим насосом. Частично очищенный препарат GSTP1-1 в ~ 3 мл 20 мМ КФБ (рН 6,5) прокачивали через картридж 3 ч в режиме рециклинга со скоростью 12 мл/ч. Далее картридж промывали тем же буфером и им же с добавкой 0,2 М KCl; GSTP1-1 конкурентно элюировали при рН 8,8 щелочным буфером, содержащим 50 мМ tris и 20 мМ GSH. Лучшие фракции объединяли, концентрировали и обессоливали, как описано выше, после чего насыщали аргоном и хранили в закрытой пробирке при рН 6,5 и 0 °С.

**Определение активности GSTP1-1.** Активность фермента в реакции конъюгации GSH и CDNB определяли при pH 6,5 и 25 °C спектрофотометрическим методом [25]. Полная реакционная смесь в опытной кювете имела объем 2,5 мл и содержала 0,1 М КФБ без добавки DTT, 0,5–50 мкл анализируемой пробы, 2 мМ GSH и 1 мМ CDNB. В контрольной кювете пробу заменяли равным объемом КФБ. После прединкубации 10 мин реакцию запускали добавлением 50 мМ растворов субстратов. CDNB вносили из этанольного раствора; конечная концентрация этанола составляла 2%. Накопление продукта реакции в опытной кювете контролировали по росту поглощения при 340 нм в течение первых 4–5 мин. Измерения проводили ежеминутно на двухлучевом спектрофотометре Specord M40 («Carl Zeiss Jena», Германия); при этом автоматически вычитается вклад неферментативной реакции между GSH и CDNB в контрольной кювете. Начальную скорость реакции рассчитывали на линейном участке кинетической кривой, используя величину молярного инкремента экстинкции  $\Delta\epsilon = 9,6 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ . За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль S-(2,4-динитрофенил)глутатиона/мин.

В кинетических экспериментах активность GSTP1-1 определяли аналогичным способом. Измерения проводили на планшетном спектрофотометре SpectraMax i3 («Molecular Devices», США) в 24-луночном планшете, уменьшив объем реакционной смеси до 2 мл. Концентрацию GSH варьировали в диапазоне 0,1–2 мМ на фоне 1 мМ CDNB, а концентрацию CDNB – в диапазоне 0,05–2 мМ на фоне 2 мМ GSH. Очищенную GSTP1-1 брали в количестве 15 мЕд/лунку (вариация по GSH) или 20 мЕд/лунку (вариация по CDNB). Концентрация этанола в среде инкубации не превышала 4%, что не влияет на активность фермента. Каждую пробу анализировали в трех повторностях. Найденные значения начальных скоростей выражали в Ед активности. Для расчета параметров стационарной кинетики использовали уравнение Михаэлиса – Ментен, линеаризованное по Хейнсу [26]:

$$\frac{[S]}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}}[S],$$

где  $[S]$  – начальная концентрация субстрата,  $V$  – начальная скорость реакции,  $K_m$  – константа Михаэлиса,  $V_{\max}$  – максимальная скорость реакции. Величину каталитической константы  $k_{\text{cat}}$  находили делением параметра  $V_{\max}$  на молярное количество фермента, взятого в опыт. Математическую обработку результатов осуществляли в программе SigmaPlot.

**Аналитические методы.** Гель-электрофорез белковых фракций проводили на приборе Mini-Protean Tetra Cell («Bio-Rad», США) по методу Лэммли [27] в 13%-ном полиакриламидном геле на фоне SDS и 2-меркаптоэтанола. Белковые полосы в гелях окрашивали красителем Coomassie R-250. Масс-спектры очищенной GSTP1-1 регистрировали в режиме ионизации MALDI с помощью времяпролетного масс-спектрометра Microflex LRF System («Bruker Daltonics», США). Концентрацию белка определяли методом Бредфорд [28], используя раствор HSA для построения калибровочной кривой.

**Результаты и их обсуждение.** Специальные сорта бумаги для хроматографии и блоттинга, изготовленные из высокоочищенной целлюлозы, в последнее время находят растущее применение как перспективный исходный материал для получения мембран с ковалентно иммобилизованными биомолекулами. Достоинствами целлюлозных мембран являются невысокая стоимость, биосовместимость, биodeградебельность, пористость, эластичность, гидрофильность, а также наличие реакционноспособных гидроксильных групп; к недостаткам относится ограниченная механическая и химическая стойкость [29]. Гидроксильные группы мембран ранее активировали N,N'-карбонилдиимидазолом, BDGE [17, 18], ECH [21] или солями арилдиазония [29] с последующей иммобилизацией лигандов через аминокгруппу. В настоящей работе активацию проводили реагентами, при помощи которых можно синтезировать алифатический линкер с концевой эпоксидной или винилсульфоновой группой, способной избирательно присоединять тиольные нуклеофилы в присутствии аминов при нейтральных значениях pH. Необходимость селективной иммобилизации GSH за тиольную группу обусловлена участием свободной  $\alpha$ -аминогруппы трипептида в образовании комплекса с GST [19]. Чтобы увеличить количество иммобилизованного

лиганда, все мембраны синтезировали на основе бумаги GB003 с повышенной толщиной (0,8 мм в сухом состоянии и 1,5 мм во влажном).

В результате химической модификации исходной бумаги синтезированы глутатионсодержащие аффинные мембраны 4 типов (Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C и Cell-SG-D) с различной длиной и структурой линкера между привитым лигандом и поверхностью носителя (рис. 1). Физико-химические и адсорбционные свойства полученных мембран приведены в табл. 1. Концентрация иммобилизованного GSH убывает в ряду Cell-SG-A > Cell-SG-D ≥ Cell-SG-B > Cell-SG-C, что свидетельствует о более эффективной активации носителя AGE по сравнению с другими реагентами. С учетом толщины влажной мембраны объемная концентрация трипептида на мембранах Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C и Cell-SG-D соответственно равна 38,7, 26,7, 11,3 и 28,0 мкмоль/мл. По данному показателю мембраны не уступают коммерческой GSH-агарозе («Sigma-Aldrich», США), содержащей 10–30 мкмоль GSH/мл уплотненного геля, а мембрана Cell-SG-A несколько превосходит упомянутый гель.

Таблица 1. Физико-химические и адсорбционные свойства мембран Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C и Cell-SG-D

Table 1. Physico-chemical and adsorption properties of Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C and Cell-SG-D membranes

Мембрана	Концентрация GSH, мкмоль/см <sup>2</sup>	Длина линкера, Å	$K_d$ , мкМ
Cell-SG-A	5,8	6,7	5,5 ± 1,4
Cell-SG-B	4,0	2,5	10,2 ± 2,2
Cell-SG-C	1,7	11,1	6,8 ± 1,5
Cell-SG-D	4,2	5,5	7,2 ± 1,4

Примечание. Значения  $K_d$  приведены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка для 2 независимых определений.

При изучении равновесной бэтч-адсорбции GSTP1-1 на полученных мембранах концентрацию свободного (несвязавшегося) фермента находили из величины его активности, сделав обоснованные допущения: 1) в используемых низких концентрациях растворы GSTP1-1 содержат преимущественно мономер с молекулярной массой 23225 Да [30]; 2) за 2 ч инкубации при 10 °C GSTP1-1 во всех пробах одного эксперимента инактивируется в одинаковой степени; 3) с учетом предварительной обработки мембран BSA неспецифическое связывание фермента практически отсутствует; 4) инактивированная GSTP1-1 имеет серьезные нарушения конформации [31] и не обладает сродством к GSH. Обнаружено, что для всех мембран экспериментальные изотермы адсорбции GSTP1-1 (рис. 2) хорошо аппроксимируются уравнением Лэнгмюра:

$$q = \frac{Q_{\max} \cdot C}{K_d + C},$$

где  $q$  – количество связавшейся GSTP1-1, нмоль/см<sup>2</sup>;  $Q_{\max}$  – максимальная адсорбционная емкость, нмоль/см<sup>2</sup>;  $C$  – концентрация внесенной GSTP1-1, мкМ;  $K_d$  – константа диссоциации комплекса GSTP1-1 с иммобилизованным GSH, мкМ.

Значения параметра  $K_d$ , рассчитанные по данному уравнению, приведены в табл. 1. Кривые гиперболической регрессии на рис. 2 имеют коэффициент детерминации  $R^2 \geq 0,99$ . Из полученных результатов следует, что при связывании GSTP1-1 аффинными мембранами всех типов образуется монослой не взаимодействующих молекул адсорбата. Наиболее прочным связыванием обладают мембраны Cell-SG-A с минимальным значением  $K_d$ . В целом найденные величины  $K_d$  (5–10 мкМ) указывают на высокое сродство GSTP1-1 к иммобилизованному GSH при низкой ионной силе раствора (25 мМ КФБ), когда в полной мере реализуются электростатические взаимодействия между трипептидом и связывающим его G-сайтом фермента. Литературные значения  $K_d$  комплекса GSTP1-1 с растворенным GSH в 100 мМ КФБ существенно больше (120–130 мкМ [32]), что отчасти можно объяснить некоторой дестабилизацией комплекса при более высокой ионной силе раствора. Кроме того, амфифильный линкер может повышать сродство иммобили-

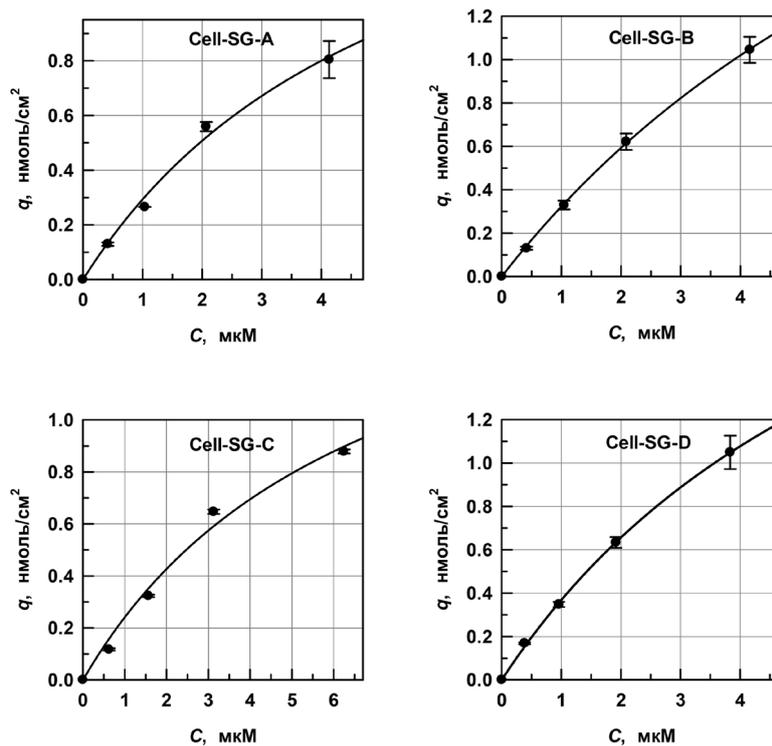


Рис. 2. Изотермы адсорбции GSTP1-1 на мембранах Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C и Cell-SG-D

Fig. 2. GSTP1-1 adsorption isotherms on Cell-SG-A, Cell-SG-B, Cell-SG-C and Cell-SG-D membranes

зованного лиганда к GSTP1-1 путем образования дополнительных контактов с Н-сайтом фермента, связывающим CDNB и другие гидрофобные косубстраты. В пользу данного предположения свидетельствует намного более прочное связывание ферментом S-алкильных производных GSH, для которых значения  $K_d$  составляют 1,5–14,3 мкМ [33], что согласуется с результатами настоящей работы. У изучаемых мембран длина линкера варьирует от 2,5 (Cell-SG-B) до 11,1 Å (Cell-SG-C, табл. 1). Из сопоставления данного параметра с величиной  $K_d$  следует, что линкер длиной не менее 5,5 Å обеспечивает более прочное взаимодействие с Н-сайтом GSTP1-1. Известный конкурентный ингибитор фермента S-гексилглутатион, часто используемый в аффинной хроматографии, содержит гексильный радикал длиной 5,9 Å. Полученные результаты также коррелируют с данными работы [34], согласно которым линкер протяженностью 6,3 Å между носителем (стекло с контролируемым размером пор) и иммобилизованным GSH является оптимальным для прочного и селективного связывания родственного фермента – GST  $\mu$ -класса. В дальнейшей работе использовали мембраны Cell-SG-A, лучшие по совокупности физико-химических и адсорбционных свойств.

Препаративное разделение гемоглобина и GSTP1-1 на первой стадии очистки фермента проводили с помощью анионообменной DEAE-сефарозы при pH 6,5, когда молекулы указанных белков разноименно заряжены. При нанесении осветленного гемолизата на колонку с DEAE-сефарозой и последующей промывке 20 мМ КФБ обнаружено, что анионообменник связывает GSTP1-1 и некоторую часть примесных белков, но практически не взаимодействует с гемоглобином. В материале, не связавшемся с DEAE-сефарозой, также найдено < 2% исходной активности, по-видимому, принадлежащей изоформам GST других классов ( $\alpha$ ,  $\mu$  и  $\theta$ ) с более высоким значением изоэлектрической точки. Предварительный поиск оптимального способа элюции GSTP1-1 из колонки показал, что наилучший результат дает линейный градиент концентрации КФБ (20–200 мМ). В объединенных фракциях элюата найдено 94,7 % исходной активности, а степень очистки фермента на данной стадии возрастает в 241 раз (табл. 2). Анионообменная хроматография гемолизата, в отличие от катионообменной [7, 11], позволяет повысить эффективность очистки GSTP1-1 и использовать колонку намного меньшего размера, что ускоряет хроматографический процесс и снижает потери активности фермента.

Таблица 2. Типичная схема очистки GSTP1-1 из гемолизата эритроцитов  
 Table 2. Typical scheme for GSTP1-1 purification from erythrocyte hemolysate

Стадия очистки	Белок, мг	Активность, Ед	Удельная активность, Ед/мг	Степень очистки	Выход, %
Осветленный гемолизат	6412	28,41	0,00443	1	100
DEAE-сефароза (обессоленный концентрат)	25,22	26,90	1,067	241	94,7
Аффинный картридж (обессоленный концентрат)	0,208	21,74	104,5	23589	76,5

Невысокая удельная активность частично очищенной GSTP1-1 коррелирует с результатами гель-электрофореза, согласно которым в препарате почти нет гемоглобина, но количественно преобладают другие примесные белки (рис. 3, трек *b*). Дальнейшую очистку препарата проводили на картридже с аффинными мембранами Cell-SG-A.

Как выяснилось, при нанесении на картридж обессоленного концентрата рециклинг является необходимой операцией и обеспечивает связывание > 95% активности, так как фермент сравнительно медленно адсорбируется аффинными мембранами. Динамическое адсорбционное равновесие устанавливается за 3 ч, что легко контролировать по прекращению циклических колебаний и выходу на плато кривой поглощения элюата при 280 нм на элюиционном профиле (рис. 4). Медленная аффинная адсорбция GSTP1-1 ранее отмечена в работе [10], где GSH-агарозу оставляли в контакте с ферментом на 24 ч, чтобы увеличить полноту связывания. В процессе оптимизации метода установлено, что сокращение времени рециклинга на картридже до одного часа снижает долю связавшейся GSTP1-1 до 90%. Если вместо картриджа использовать колонку с GSH-сефарозой большего объема (1×8 см) и провести аналогичный рециклинг наносимого материала в течение 3 ч, то доля связавшегося фермента падает до 70–80%. Это указывает на лучшую стерическую доступность иммобилизованного лиганда на мембранах Cell-SG-A по сравнению с гелем GSH-агарозы. После отмывки картриджа от примесных белков связанная GSTP1-1 конкурентно элюируется раствором GSH (pH 8,8) в виде острого пика активности на элюиционном профиле, которому соответствует малоинтенсивный пик  $A_{280}$  (рис. 4). Заключительный подъем величины  $A_{280}$  на плато вызван собственным поглощением элюента. Высокая эффективность очистки фермента на стадии аффинной хроматографии иллюстрируется возрастанием его удельной активности на 2 порядка (табл. 2).

В результате двухстадийной хроматографической очистки нами получен препарат GSTP1-1 с общим выходом 76,5% от исходной активности в гемолизате. Степень очистки фермента составляет 23589 раз, а удельная активность, измеренная в стандартных условиях, – 104,5 Ед/мг (табл. 2). В отдельных циклах выделения удельная активность достигает 125,5 Ед/мг. По сведениям литературы, выходы очищенной GSTP1-1 из эритроцитов варьируют от 11 до 53%, а удельная активность препаратов не превышает 66 Ед/мг [8, 10, 11]. Для GSTP1-1 из плаценты после 5 хроматографических стадий очистки выход составляет 23,6%, а удельная активность равна 105 Ед/мг [35], что совпадает с данными табл. 2. Следовательно, метод очистки эритроцитарной GSTP1-1, предложенный в настоящей работе, превосходит ранее известные как по выходу, так и по удельной активности очищенного фермента, величина которой не уступает эталонным характеристикам GSTP1-1 из плаценты.

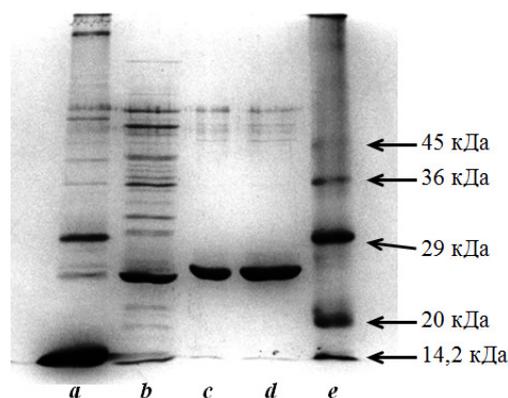


Рис. 3. Гель-электрофореграммы стадий очистки GSTP1-1. Обозначения треков: *a* – гемолизат; *b* – препарат фермента после DEAE-сефарозы; *c*, *d* – очищенный фермент (2 и 4 мкг белка); *e* – маркерные белки с указанием молекулярной массы

Fig. 3. Gel electrophoregrams of GSTP1-1 purification steps. Track designations: *a* – hemolysate; *b* – enzyme preparation after DEAE sepharose; *c*, *d* – purified enzyme (2 and 4 µg of protein); *e* – marker proteins with molecular mass indicated

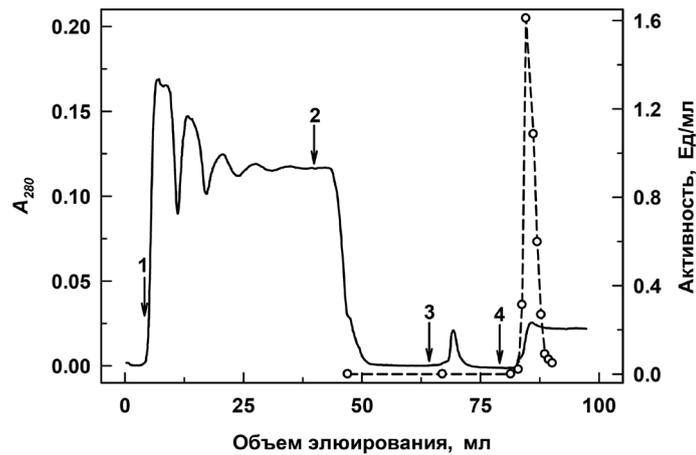


Рис. 4. Элюиционный профиль хроматографии частично очищенной GSTP1-1 на картридже с мембранами Cell-SG-A. Сплошная линия –  $A_{280}$  (поглощение элюата при 280 нм); штриховая – активность фермента. Стрелками указаны: 1 – начало рециклинга; 2 – окончание рециклинга и промывка КФБ; 3 – промывка КФБ + 0,2 М КСl; 4 – элюция (50 мМ tris + 20 мМ GSH, pH 8,8)

Fig. 4. Chromatography elution profile of partially purified GSTP1-1 on a cartridge with Cell-SG-A membranes. Solid line –  $A_{280}$  (eluate absorption at 280 nm); dashed line – enzyme activity. Arrows show: 1 – start of recycling; 2 – end of recycling and washing with potassium phosphate buffer; 3 – washing with potassium phosphate buffer + 0.2 M KCl; 4 – elution (50 mM Tris + 20 mM GSH, pH 8.8)

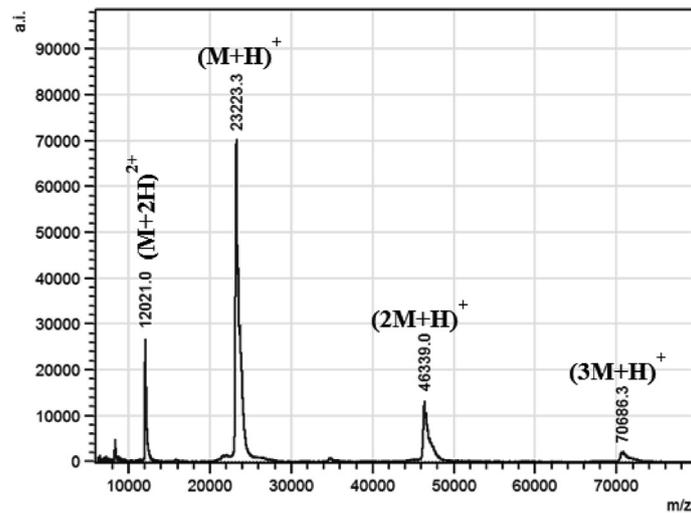


Рис. 5. Масс-спектр (MALDI-TOF) очищенного препарата GSTP1-1

Fig. 5. Mass spectrum (MALDI-TOF) of the purified GSTP1-1 prepare

По данным гель-электрофореза, чистота полученного препарата GSTP1-1 составляет не менее 95%, а электрофоретическая подвижность основной белковой зоны соответствует ожидаемой молекулярной массе 23–24 кДа (рис. 3, треки *c* и *d*). Гомогенность очищенного фермента также подтверждена масс-спектрометрией MALDI-TOF (рис. 5). Наряду с главным пиком протонированного молекулярного иона  $(M+H)^+$  с величиной  $m/z = 23223$  в спектре имеются минорные пики, соответствующие дважды протонированной молекуле  $(M+2H)^{2+}$ , а также протонированным ди- и тримерным молекулярным ассоциатам  $(2M+H)^+$  и  $(3M+H)^+$ . Сигналы от примесных белков практически отсутствуют. Экспериментальное значение молекулярной массы, найденное масс-спектрометрическим методом, равно 23222 Да, что с точностью 3 Да соответствует расчетной массе 23225 Да для доминирующего аллеля GSTP1a, содержащего аминокислотные остатки Ile105 и Ala114 [1].

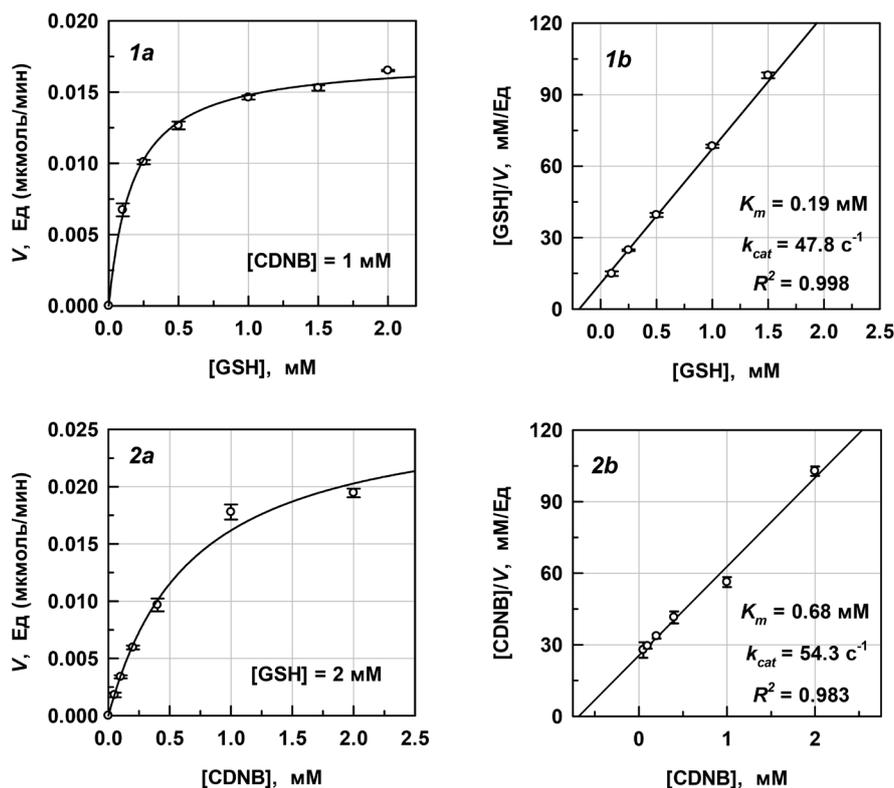


Рис. 6. Зависимость начальной скорости ферментативной реакции  $V$  от концентрации GSH (1) и CDNB (2):  
 а – первичные гиперболические кривые; б – графики Хейнса. Результаты представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение для 3 повторностей

Fig. 6. Dependence of initial enzymatic reaction rate  $V$  on GSH (1) and CDNB (2) concentration:  
 а – primary hyperbolic curves; б – Hanes plots. Results are given as average  $\pm$  standard deviation for 3 repeats

Мембраны Cell-SG-A могут многократно (не менее 5 раз) использоваться для очистки фермента без потери хроматографических свойств и являются намного более экономичным и удобным в работе аффинным адсорбентом по сравнению с GSH-агарозой. В то же время аффинные мембраны, как и агарозные гели, не обладают достаточной механической прочностью для жидкостной хроматографии высокого давления.

При изучении каталитических свойств очищенной GSTP1-1 исходили из ранее предложенного [36] последовательного механизма действия фермента с неупорядоченным присоединением субстратов (GSH и CDNB) и быстрым установлением равновесия. Параметры стационарной кинетики определяли общепринятым для двухсубстратных реакций методом, варьируя начальную концентрацию одного из субстратов при фиксированной начальной концентрации второго субстрата. Установлено, что для каждого субстрата экспериментальная зависимость начальной скорости реакции от его концентрации описывается гиперболой согласно уравнению Михаэлиса – Ментен (рис. 6). Линеаризацию гиперболических кривых проводили в координатах Хейнса, что приводит к меньшей погрешности в расчетах по сравнению с часто используемым графиком Лайнуивера–Берка [26]. Найденные величины параметра  $K_m$  по GSH (0,19 mM) и CDNB (0,68 mM) в целом согласуются с ранее опубликованными данными (соответственно 0,07–0,5 mM и 0,70–2,1 mM [7, 10, 35–37]). Анализируя большой разброс литературных значений  $K_m$  по GSH, следует отметить, что в норме концентрация эритроцитарного GSH составляет 1–2 mM [38]. В связи с этим найденная нами величина не слишком мала по сравнению с уровнем GSH и позволяет рационально объяснить физиологически значимое снижение активности фермента при уменьшении концентрации GSH (например, в условиях окислительного стресса). По величине параметра  $k_{cat}$  для GSH (47,8  $\text{s}^{-1}$ ) и CDNB (54,3  $\text{s}^{-1}$ ) очищенная GSTP1-1 превосходит аналогичные характеристики ранее выделенных препаратов (соответственно 8,8–43,0 и 18,3–32,9  $\text{s}^{-1}$  [8, 10, 39]), что коррелирует с более высокой удельной активностью фермента.

**Заклучение.** В настоящей работе впервые получены и охарактеризованы глутатионсодержащие аффинные мембраны 4 типов на основе химически модифицированной целлюлозной бумаги. Мембраны Cell-SG-A успешно использованы для очистки GSTP1-1 вместо традиционных агарозно-гелевых адсорбентов. Разработан новый метод выделения и очистки изоформы P1-1 из гемолизата эритроцитов, включающий предварительное удаление гемоглобина на анионообменнике и аффинную хроматографию фермента на картридже с мембранами Cell-SG-A. По данным гель-электрофореза и масс-спектрометрии MALDI-TOF, чистота полученного препарата составляет не менее 95%. Определены кинетические параметры очищенной GSTP1-1 в реакции конъюгации GSH и CDNB при pH 6,5 и 25 °С.

По эффективности (выход фермента 76,5%, степень очистки 23589 раз, удельная активность 104,5 Ед/мг белка) предложенный метод очистки эритроцитарной GSTP1-1 превосходит ранее известные, что представляет интерес для исследователей, занятых направленным синтезом новых ингибиторов фермента с противоопухолевой активностью. Результаты работы также могут найти применение при очистке нативных и рекомбинантных изоформ GST из различных источников и гибридных белков с GST-доменом.

### Список использованных источников

- Hayes, J. D. Glutathione transferases / J. D. Hayes, J. U. Flanagan, I. R. Jowsey // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2005. – Vol. 45. – P. 51–88.
- Laborde, E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death / E. Laborde // *Cell Death Differ.* – 2010. – Vol. 17, № 9. – P. 1373–1380.
- Oakley, A. Glutathione transferases: a structural perspective / A. Oakley // *Drug Metab. Rev.* – 2011. – Vol. 43, №2. – P. 138–151.
- Townsend, D. M. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance / D. M. Townsend, K. D. Tew // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22, № 47. – P. 7369–7375.
- Erythrocyte glutathione transferase: a novel biomarker to check environmental pollution hazardous for humans / R. Fabrini [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2012. – Vol. 426, № 1. – P. 71–75.
- Dissociation of a new glutathione S-transferase activity in human erythrocytes / K. R. Schröder [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 1992. – Vol. 43, № 8. – P. 1671–1674.
- The human glutathione S-transferases. Studies on the kinetic, stability and inhibition characteristics of the erythrocyte enzyme / P. A. Hirrell [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1987. – Vol. 913, № 1. – P. 92–96.
- Awasthi, Y. C. Purification and characterization of a new form of glutathione S-transferase from human erythrocytes / Y. C. Awasthi, S. V. Singh // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1984. – Vol. 125, № 3. – P. 1053–1060.
- Howie, A. F. Purification of acidic glutathione S-transferases from human lung, placenta and erythrocyte and the development of a specific radioimmunoassay for their measurement / A. F. Howie, J. D. Hayes, G. J. Beckett // *Clin. Chim. Acta.* – 1988. – Vol. 177, № 1. – P. 65–76.
- Purification and biochemical characterization of glutathione S-transferase from Down syndrome and normal children erythrocytes: a comparative study / R. R. Hamed [et al.] // *Res. Dev. Disabil.* – 2011. – Vol. 32, № 5. – P. 1470–1482.
- Marcus, C. J. Glutathione transferase from human erythrocytes. Nonidentity with the enzymes from liver / C. J. Marcus, W. H. Habig, W. B. Jakoby // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1978. – Vol. 188, № 2. – P. 287–293.
- Electron paramagnetic resonance identification of a highly reactive thiol group in the proximity of the catalytic site of human placenta glutathione transferase / A. Desideri [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266, № 4. – P. 2063–2066.
- Vander Jagt, D. L. Purification and bilirubin binding properties of glutathione S-transferase from human placenta / D. L. Vander Jagt, S. P. Wilson, J. E. Heidrich // *FEBS Lett.* – 1981. – Vol. 136, № 2. – P. 319–321.
- Cytoplasmic and periplasmic production of human placental glutathione transferase in *Escherichia coli* / A. Battistoni [et al.] // *Protein Expr. Purif.* – 1995. – Vol. 6, № 5. – P. 579–587.
- High-level bacterial expression of human glutathione transferase P1-1 encoded by semisynthetic DNA // R. H. Kolm [et al.] // *Protein Expr. Purif.* – 1995. – Vol. 6, № 3. – P. 265–271.
- Zou, H. Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins / H. Zou, Q. Luo, D. Zhou // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2001. – Vol. 49, № 1–3. – P. 199–240.
- Гилевич, С. Н. Аффинные мембраны на основе химически модифицированной целлюлозы для избирательной твердофазной экстракции белков / С. Н. Гилевич, Е. Ю. Завизион // *Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии: Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т химии новых материалов; науч. ред. В. Е. Агабеков, Е. В. Королева, К. Н. Гусак.* – Минск, 2011. – С. 305–319.
- Гилевич, С. Н. Получение и гемоглобинсвязывающие свойства металлоаффинных мембран на основе химически модифицированной хроматографической бумаги / С. Н. Гилевич, Е. Ю. Завизион // *Химия, структура и функция биомолекул: материалы IV Междунар. конф., Минск, 17–19 окт. 2012 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси; редкол.: С. А. Усанов [и др.].* – Минск, 2012. – С. 46–47.

19. Forde, G. M. Preparation, analysis and use of an affinity adsorbent for the purification of GST fusion protein / G. M. Forde // *Methods Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 421. – P. 125–136.
20. Burton, S. C. High-density ligand attachment to brominated allyl matrices and application to mixed mode chromatography of chymosin / S. C. Burton, D. R. K. Harding // *J. Chromatogr. A.* – 1997. – Vol. 775, № 1–2. – P. 39–50.
21. Preparation of the immobilized metal affinity membrane with high amount of metal ions and protein adsorption efficiencies / Y. M. Ke [et al.] // *Process Biochem.* – 2010. – Vol. 45, № 4. – P. 500–506.
22. Scoble, J. A. Assay for determining the number of reactive groups on gels used in affinity chromatography and its application to the optimisation of the epichlorohydrin and divinylsulfone activation reactions / J. A. Scoble, R. K. Scopes // *J. Chromatogr. A.* – 1996. – Vol. 752, № 1–2. – P. 67–76.
23. Friedman, M. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences / M. Friedman // *J. Agric. Food Chem.* – 2004. – Vol. 52, № 3. – P. 385–406.
24. The Molecular Mechanism of Autoxidation for Human Oxyhemoglobin / M. Tsuruga [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 15. – P. 8607–8615.
25. Habig, W. H. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby // *J. Biol. Chem.* – 1974. – Vol. 249, № 22. – P. 7130–7139.
26. Bisswanger H. *Practical Enzymology* / H. Bisswanger – 2nd Ed. – Weinheim: Wiley-Blackwell, 2011. – 378 p.
27. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.
28. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72, № 1–2. – P. 248–254.
29. A one-step and biocompatible cellulose functionalization for covalent antibody immobilization on immunoassay membranes / J. Credou [et al.] // *J. Mater. Chem. B.* – 2013. – Vol. 1, № 26. – P. 3277–3286.
30. Catalytically active monomer of glutathione S-transferase pi and key residues involved in the electrostatic interaction between subunits / Y. C. Huang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, № 47. – P. 32880–32888.
31. Inactivation of human salivary glutathione transferase P1-1 by hypothiocyanite: a post-translational control system in search of a role / R. Fabrini [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 11. – e112797.
32. Monomer-dimer equilibrium in glutathione transferases: a critical re-examination / R. Fabrini [et al.] // *Biochemistry.* – 2009. – Vol. 48, № 43. – P. 10473–10482.
33. Study of chromatographic parameters for glutathione S-transferases on an high-performance liquid chromatography affinity stationary phase / J. B. Wheatley [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 1994. – Vol. 676, № 1. – P. 81–90.
34. Effect of linker for immobilization of glutathione on BSA-assembled controlled pore glass beads / L.-H. Chen [et al.] // *Bull. Korean Chem. Soc.* – 2004. – Vol. 25, № 9. – P. 1366–1370.
35. Mannervik, B. Glutathione Transferase (Human Placenta) / B. Mannervik, C. Guthenberg // *Meth. Enzymol.* – 1981. – Vol. 77. – P. 231–235.
36. Thumser, A. E. Kinetic mechanism of human erythrocyte acidic isoenzyme ρ / A. E. Thumser, K. M. Ivanetich // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1993. – Vol. 1203, № 1. – P. 115–120.
37. Studies on the variability of glutathione S-transferase from human erythrocytes / R. C. Strange [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 1982. – Vol. 120, № 2. – P. 251–260.
38. Forman, H. J. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis // H. J. Forman, H. Zhang, A. Rinna // *Mol. Aspects Med.* – 2009. – Vol. 30, № 1–2. – P. 1–12.
39. Purification of glutathione S-transferase pi from erythrocytes and evaluation of the inhibitory effect of hypericin / S. Turk [et al.] // *Protein J.* – 2015. – Vol. 34, № 6. – P. 434–443.

## References

1. Hayes J. D., Flanagan J. U., Jowsey I. R., “Glutathione transferases”, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2005, vol. 45, pp. 51–88.
2. Laborde E., “Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death”, *Cell Death & Differentiation*, 2010, vol. 17, no. 9, pp. 1373–1380.
3. Oakley A., “Glutathione transferases: a structural perspective”, *Drug Metabolism Reviews*, 2011, vol. 43, no. 2, pp. 138–151.
4. Townsend D. M., Tew K. D., “The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance”, *Oncogene*, 2003, vol. 22, no. 47, pp. 7369–7375.
5. Fabrini R., Bocedi A., Del Grosso E., Morici L., Federici G., Palleschi A., Ricci G., “Erythrocyte glutathione transferase: a novel biomarker to check environmental pollution hazardous for humans”, *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 2012, vol. 426, no. 1, pp. 71–75.
6. Schröder K. R., Hallier E., Peter H., Bolt H. M., “Dissociation of a new glutathione S-transferase activity in human erythrocytes”, *Biochemical Pharmacology*, 1992, vol. 43, no. 8, pp. 1671–1674.
7. Hirrell P. A., Collins M. F., Nimmo I. A., Strange R. C., “The human glutathione S-transferases. Studies on the kinetic, stability and inhibition characteristics of the erythrocyte enzyme”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1987, vol. 913, no. 1, pp. 92–96.
8. Awasthi Y. C., Singh S. V., “Purification and characterization of a new form of glutathione S-transferase from human erythrocytes”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1984, vol. 125, no. 3, pp. 1053–1060.
9. Howie A. F., Hayes J. D., Beckett G. J., “Purification of acidic glutathione S-transferases from human lung, placenta and erythrocyte and the development of a specific radioimmunoassay for their measurement”, *Clinica Chimica Acta*, 1988, vol. 177, no. 1, pp. 65–76.

10. Hamed R. R., Maharem T. M., Abdel-Meguid N., Sabry G. M., Abdalla A.-M., Guneidy R. A., “Purification and biochemical characterization of glutathione S-transferase from Down syndrome and normal children erythrocytes: a comparative study”, *Research In Developmental Disabilities*, 2011, vol. 32, no. 5, pp. 1470–1482.
11. Marcus C. J., Habig W. H., Jakoby W. B., “Glutathione transferase from human erythrocytes. Nonidentity with the enzymes from liver”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1978, vol. 188, no. 2, pp. 287–293.
12. Desideri A., Caccuri A. M., Polizio F., Bastoni R., Federici G., “Electron paramagnetic resonance identification of a highly reactive thiol group in the proximity of the catalytic site of human placenta glutathione transferase”, *Journal of Biological Chemistry*, 1991, vol. 266, no. 4, pp. 2063–2066.
13. Vander Jagt D. L., Wilson S. P., Heidrich J. E., “Purification and bilirubin binding properties of glutathione S-transferase from human placenta”, *FEBS Letters*, 1981, vol. 136, no. 2, pp. 319–321.
14. Battistoni A., Mazzetti A. P., Petruzzelli R., Muramatsu M., Federici G., Ricci G., Lo Bello M., “Cytoplasmic and periplasmic production of human placental glutathione transferase in *Escherichia coli*”, *Protein expression and purification*, 1995, vol. 6, no. 5, pp. 579–587.
15. Kolm R. H., Stenberg G., Widersten M., Mannervik B., “High-level bacterial expression of human glutathione transferase P1-1 encoded by semisynthetic DNA”, *Protein expression and purification*, 1995, vol. 6, no. 3, pp. 265–271.
16. Zou H., Luo Q., Zhou D., “Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins”, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2001, vol. 49, no. 1-3, pp. 199–240.
17. Gilevich S. N., Zavizion E. Yu., “Affinity membranes on the basis of chemically modified cellulose for selective solid-phase protein extraction”, *Trudy XXIII Mezhdunarodnoi nauchno-tekhnicheskoi konferentsii “Khimicheskie reaktivy, reagenty i protsessy malotonnazhnoi khimii”, 27–29 oktiabria 2010 goda, Minsk* [Proc. XXIII Int. Conf. “Chemical reactants, reagents and processes of low-tonnage chemistry”, October 27–29, 2010, Minsk], Belaruskaia navuka, Minsk, BY, 2011, pp. 305–319.
18. Gilevich S. N., Zavizion E. Yu., “Preparation and hemoglobin-binding properties of immobilized metal affinity membranes based on chemically modified chromatographic paper”, *Sbornik dokladov IV Mezhdunarodnoi konferentsii “Khimiya, struktura i funktsiya biomolekul”, 17–19 oktiabria 2012 g., Belarus’, Minsk* [Collection of reports IV International conference “Chemistry, structure and function of biomolecules”, 17–19 October 2012, Belarus, Minsk], Minsk, BY, 2012, pp. 46–47.
19. Forde G. M., “Preparation, analysis and use of an affinity adsorbent for the purification of GST fusion protein”, *Methods in Molecular Biology*, 2008, vol. 421, pp. 125–136.
20. Burton S. C., Harding D. R. K., “High-density ligand attachment to brominated allyl matrices and application to mixed mode chromatography of chymosin”, *Journal of Chromatography A*, 1997, vol. 775, no. 1–2, pp. 39–50.
21. Ke Y. M., Chen C. I., Kao P. M., Chen H. B., Huang H. C., Yao C. J., Liu Y. C., “Preparation of the immobilized metal affinity membrane with high amount of metal ions and protein adsorption efficiencies”, *Process biochemistry*, 2010, vol. 45, no. 4, pp. 500–506.
22. Scoble J. A., Scopes R. K., “Assay for determining the number of reactive groups on gels used in affinity chromatography and its application to the optimisation of the epichlorohydrin and divinylsulfone activation reactions”, *Journal of Chromatography A*, 1996, vol. 752, no. 1–2, pp. 67–76.
23. Friedman M., “Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, vol. 52, no. 3, pp. 385–406.
24. Tsuruga M., Matsuoka A., Hachimori A., Sugawara Y., Shikama K., “The molecular mechanism of autoxidation for human oxyhemoglobin”, *Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol. 273, no. 15, pp. 8607–8615.
25. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B., “Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation”, *Journal of Biological Chemistry*, 1974, vol. 249, no. 22, pp. 7130–7139.
26. Bisswanger H., *Practical Enzymology*, 2nd ed., Wiley-Blackwell, Weinheim, DE, 2011.
27. Laemmli U. K., “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, p. 680–685.
28. Bradford M. M., “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254.
29. Credou J., Volland H., Danob J., Berthelot T., “A one-step and biocompatible cellulose functionalization for covalent antibody immobilization on immunoassay membranes”, *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, vol. 1, no. 26, pp. 3277–3286.
30. Huang Y., Misquitta S., Blond S. Y., Adams E., Colman R. F., “Catalytically active monomer of glutathione S-transferase pi and key residues involved in the electrostatic interaction between subunits”, *Journal of Biological Chemistry*, 2008, vol. 283, no. 47, pp. 32880–32888.
31. Fabrini R., Bocedi A., Camerini S., Fusetti M., Ottaviani F., Passali F. M., Topazio D., Iavarone F., Francia I., Castagnola M., Ricci G., “Inactivation of human salivary glutathione transferase P1-1 by hypothiocyanite: a post-translational control system in search of a role”, *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 11, e112797, doi:10.1371/journal.pone.0112797.
32. Fabrini R., De Luca A., Stella L., Mei G., Orioni B., Ciccone S., Federici G., Lo Bello M., Ricci G., “Monomer-dimer equilibrium in glutathione transferases: a critical re-examination”, *Biochemistry*, 2009, vol. 48, no. 43, pp. 10473–10482.
33. Wheatley J. B., Hughes B., Bauer K., Schmidt D. E., “Study of chromatographic parameters for glutathione S-transferases on an high-performance liquid chromatography affinity stationary phase”, *Journal of Chromatography A*, 1994, vol. 676, no. 1, pp. 81–90.
34. Chen L. H., Choi Y. S., Park Jung W., Kwon J., Wang R. S., Lee T., Ryu S. H., Park Joon W., “Effect of linker for immobilization of glutathione on BSA-assembled controlled pore glass beads”, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2004, vol. 25, no. 9, pp. 1366–1370.

35. Mannervik B., Guthenberg C., “Glutathione Transferase (Human Placenta)”, *Methods in Enzymology*, 1981, vol. 77, pp. 231–235.
36. Thumser A. E., Ivanetich K. M., “Kinetic mechanism of human erythrocyte acidic isoenzyme  $\rho$ ”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, vol. 1203, no. 1, pp. 115–120.
37. Strange R. C., Johnson P. H., Lawton A., Moulton J. A., Tector M. J., Tyminski R. J., Cotton W., “Studies on the variability of glutathione S-transferase from human erythrocytes”, *Clinica Chimica Acta*, 1982, vol. 120, no. 2, pp. 251–260.
38. Forman H. J., Zhang H., Rinna A., “Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis”, *Molecular Aspects of Medicine*, 2009, vol. 30, no 1–2, pp. 1–12.
39. Turk S., Erkmen G. K., Dalmizrak O., Oğus I. H., Ozer N., “Purification of glutathione S-transferase pi from erythrocytes and evaluation of the inhibitory effect of hypericin”, *Protein Journal*, 2015, vol. 34, no. 6, pp. 434–443.

### Информация об авторах

*Гилевич Сергей Нилович* – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. акад. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: gilevich@iboch.bas-net.by.

*Бречко Юлия Владимировна* – мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. акад. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: julia-brechko@yandex.ru.

*Рипинская Кристина Юрьевна* – мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. акад. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kristina.ripinskaya@gmail.com.

### Для цитирования

Гилевич, С. Н. Получение высокоактивной глутатион-S-трансферазы P1-1 из эритроцитов человека с помощью аффинных мембран и свойства очищенного фермента / С. Н. Гилевич, Ю. В. Бречко, К. Ю. Рипинская // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2017. – № 2. – С. 66–79.

### Information about the authors

*Gilevich Syargey Nilavich* – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2 Acad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus. E-mail gilevich@iboch.bas-net.by.

*Brechka Yuliya Vladimirovna* – Junior Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2 Acad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus. E-mail: julia-brechko@yandex.ru.

*Ripinskaya Kristina Yur'evna* – Junior Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2 Acad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus. E-mail: kristina.ripinskaya@gmail.com.

### For citation

Gilevich S. N., Brechka Yu. V., Ripinskaya K. Yu. Preparation of highly active human erythrocyte glutathione S-transferase P1-1 using affinity membranes, and properties of the purified enzyme. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 2, pp. 66–79. (In Russian).