

ОБЗОР

УДК 615.31:547:857:616

©Погосян, Акопян

ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗА

Л.Г. Погосян, Ж.И. Акопян*

Институт молекулярной биологии, Национальной Академии наук РА,
Асратяна, 7, Ереван, 0014 Армения; тел.: + 37410281572;
факс: + 37410282061; эл.почта: lina-edu@mail.ru, imb@sci.am

Пуриннуклеозидфосфорилаза (ПНФ) является одним из важнейших ферментов метаболизма пуринов, который способствует утилизации пуриновых оснований. В настоящее время актуальным является поиск эффективных ингибиторов этого фермента, необходимых для создания селективного Т-клеточного иммунодефицитного статуса организма при трансплантации органов и тканей, а также при химиотерапии ряда патологий. Для их успешного практического применения необходимо глубокое всестороннее изучение самого фермента, его структуры, механизма реакции, функций.

В обзоре суммированы новые данные по структуре ПНФ, проведён анализ физиологической роли фермента, рассмотрены основные механизмы реакции и действия этого фермента, представлены результаты работ по исследованию его физико-химических, кинетических и каталитических свойств.

Ключевые слова: пуриннуклеозидфосфорилаза, свойства, структура, специфичность, активность, субстраты.

ВВЕДЕНИЕ. Пуриннуклеозидфосфорилаза (пуриннуклеозид: ортофосфатрибозилтрансфераза – ПНФ, КФ 2.4.2.1) катализирует обратимую реакцию фосфорилиза пуриновых дезокси- и рибонуклеозидов с образованием (d)Rib-1-P и соответствующих оснований. ПНФ играет ведущую роль в усвоении клеткой нуклеозидов и нуклеотидов. Возросший интерес к исследованиям ПНФ вызван рядом причин: 1) ПНФ используется для энзиматического синтеза биологически активных соединений с выраженными противоопухолевыми и противовирусными свойствами [1, 2]; 2) обнаружены генетические мутанты с пониженной или отсутствующей ферментативной функцией, связанной с иммунодефицитными состояниями; 3) но наиболее значимая из причин – стремление охарактеризовать субстрат-связывающий центр ПНФ для конструирования эффективных, малотоксичных ингибиторов этого фермента (некоторые уже нашли своё применение в медицине, например, ацикловир), необходимых для создания в ряде случаев Т-клеточного иммунодефицитного статуса, при трансплантации органов и тканей, а также в химиотерапии [3, 4].

* - адресат для переписки

ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗА

Так как иммунная система характеризуется чрезвычайно высокой лабильностью и страдает от многих неблагоприятных факторов среды, анализ её состояния служит высокочувствительным индикатором оценки сдвигов биологического равновесия. В свою очередь, те или иные дефекты иммунной системы, как врождённые так и приобретенные, служат существенным, а в определенных случаях решающим фактором возникновения патологического состояния. В силу этого одним из значимых элементов суждения о состоянии организма следует считать оценку функций иммунной системы, иммунного статуса [5]. ПНФ играет ведущую роль в поддержании иммунного статуса организма, Т-клеточного звена иммунной системы. Тщательный анализ большого числа параметров, по которым может оцениваться состояние иммунной системы в целом и её отдельных звеньев, позволил выделить наиболее информативные из них. Это привело к созданию стройной системы оценки иммунного статуса, которая в настоящее время всё шире внедряется в практику лечебных и лечебно-профилактических учреждений. Наиболее рациональным для оценки функций иммунной системы человека является комплексное изучение клеточных и гуморальных факторов иммунитета. Значение комплексного иммунологического обследования в клинике трудно переоценить. С одной стороны, оно выявляет явные дефекты различных звеньев иммунной системы, требующие соответствующей иммунокоррекции. С другой стороны, представляется возможным обнаружить начинающийся дисбаланс в состоянии иммунного гомеостаза, свидетельствующий о сдвигах биологического равновесия в организме, а следовательно, о развитии патологического процесса. В настоящее время для клинической оценки Т-клеточного звена иммунной системы в качестве весьма доступных методик используются различные тесты, характеризующие состояние клеточной популяции Т-лимфоцитов, являющиеся достаточно информативным показателем изменений реактивности организма на клеточном уровне [5].

Известно, что недостаточность клеточного иммунитета связана с понижением активности ПНФ. Кроме того, показано, что определение активности ПНФ в различных органах и тканях человека может быть использовано в качестве специфического диагностического теста при ряде заболеваний, особенно связанных с иммунодефицитными состояниями: например, уровни активности ПНФ могут служить маркерами дифференцировки нормальных и лейкозных клеток, а также диагностики вариантов острого лейкоза [6, 7]. Больные с недостаточностью ПНФ подвержены различным инфекциям, формы проявления которых подобны таковым при синдроме приобретенного иммунодефицита (СПИД). Большинство больных без пересадки костного мозга как правило умирают от последствий таких инфекций [3, 8].

Таким образом, учитывая актуальность изучаемой проблемы, очевидно, что комплексное исследование самого фермента ПНФ, т.е. его структуры, физико-химических, кинетических и каталитических свойств из различных живых организмов является приоритетным.

1. ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ, ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ.

ПНФ катализирует обратимую фосфоролитическую реакцию, при которой расщепляются пуриновые рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозиды с образованием свободного основания и (d) Rib-1-P:

Пуриновый нуклеозид + P_i ↔ пуриновое основание + (d)рибозо-1- фосфат.

Термодинамически равновесие реакции в клетках человека и других млекопитающих смещено в сторону синтеза нуклеозидов [9]. Тем не менее, в условиях целого организма реакция протекает, главным образом, в фосфоролитическом направлении, из-за быстрого последующего использования всех продуктов расщепления, благодаря двум сопряжённым реакциям, а именно, окислению и фосфорилированию освобожденных пуриновых оснований ксантинооксидазой и гипоксантин–гуанин–фосфорилибузилтрансферазой, соответственно [10]. Примечательно, что гистохимическая локализация ПНФ в клетках печени крысы и человека поразительно схожа с ксантинооксидазой [11]. Rib-1-P превращается в 5-фосфорилибузил-1-пирофосфат, который является необходимым косубстратом при синтезе пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов из соответствующих оснований. Важно, что единственный альтернативный путь для нерасщепленного ПНФ 2'-дезоксигуанозина (dGuO) – это превращение в гуанозинтрифосфат (GTP). Таким образом, воздействуя на активность ПНФ можно регулировать биосинтез дезоксирибонуклеотидов, и, в частности, создавать избыток GTP, что может привести клетку к летальному исходу [9].

Распределение ПНФ в различных тканях и органах описали Parks и Agarwall [12]. Carson и соавт. показали, что во всех тканях человека кроме тимуса активность ПНФ выше, чем аденозиндезаминазы (АДА) [13]. У человека самая высокая активность обнаружена в почках, в лимфоцитах и гранулоцитах периферической крови [9]. Однако, если учесть объёмы клеток, эритроциты проявляют такую же активность, как и лимфоциты периферической крови. В связи с этим следует отметить, что эритроциты человека, лишённые возможности синтезировать пурины *de novo* и потому полностью зависящие от их утилизации, являются богатейшим источником ПНФ. В то же время содержание ПНФ в эритроцитах мышей, крыс и других лабораторных животных значительно ниже, чем в эритроцитах человека, что необходимо учитывать при экстраполяции экспериментальных данных от лабораторных животных к человеку. Так, например, в эритроцитах кошек и собак активность ПНФ очень низкая или отсутствует [9], а активность ПНФ в эритроцитах человека в 4–5 раз выше, чем в эритроцитах мыши, и в 15 раз выше, чем в эритроцитах крысы [14]. В то же время установлено, что в почках крысы активность фермента высока в цитозоле клубочков, в печени крысы и человека, в эндотелиальных клетках [11]. В желудочно-кишечном тракте мышей наивысший уровень катаболических ферментов, включая ПНФ, определяется в проксимальной части тонкой кишки [15].

Уровень активности фермента в клетках млекопитающих зависит от многих факторов, в том числе и от условий окружающей среды. Например, у крыс, содержащихся 7 дней при давлении 405 мм Hg, уровень активности ПНФ в “лёгкой” фракции эритроцитов повышается на 67%. Но через 5 дней после прекращения гипоксического воздействия, активность фермента уже не отличается от нормы [16].

В экстрактах печени и мозга крыс R-1-P, полученный при фосфорилизе ПНФ инозина и гуанозина, может быть перенесен на урацил, предположительно уридинфосфорилиазой с последующим фосфорилированием образовавшегося уридина в урациловые нуклеотиды. Кроме того, в экстрактах мозга крыс R-1-P, образующийся из уридина, вероятно, используется для превращения аденина и гипоксантина в соответствующие нуклеотиды [17, 18]. Это указывает на возможную дополнительную роль ПНФ в утилизации пуриновых

ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗА

и пиримидиновых оснований. Перенос пентозного кольца между пуриновыми основаниями с помощью ПНФ *in vitro* описан в литературе [19, 20] и такие реакции переноса, комбинированные с фосфоролизом пиримидиновых нуклеозидов, широко используются для лабораторного синтеза пуриннуклеозидных аналогов, которые трудно поддаются химическому синтезу.

Генетические исследования показали, что у высших организмов фермент кодируется единичным генным локусом. У человека и мыши, например, этот единичный локус расположен на 14 хромосоме. Этому локусу соответствует один нормальный аллель. У европейской ручьевой миноги ПНФ кодируется также единичным генным локусом, но с двумя аллелями с частотами 0,98 и 0,02. В эритроцитах овцы продуктами двух кодоминантных аутосомальных аллелей являются 2 изофермента. В эритроцитах быка обнаружено 3 изофермента [21, 22].

Структурный ген ПНФ человека картирован, клонирован и секвенирован. Он охватывает 9 т.п.н. ДНК на хромосоме 14g13, его масса (мРНК) составляет 1700 нуклеотидов в шести экзонах, а соответствующий протеин содержит 289 аминокислотных остатка [23, 24]. Ген был клонирован из клеток человека линии HeLa. Он является гомотримерическим ферментом с массой примерно 96 кДа. Молекулярная масса субъединиц фермента, рассчитанная на основании секвенированной сДНК из клеток человека линии HeLa, равна 32,003 кДа [25, 26]. Проведённые эксперименты по секвенированию гена ПНФ выявили новые мутации в результате досрочного образования стоп-кодона. Эта гомозиготная мутация – с.199С>Т, РNP р.67R>Х выявлена при секвенировании кодирующего региона и фланговых последовательностей интронов гена ПНФ и приводит к преждевременному образованию стоп-кодонов на третьем конце экзона [27].

1.1. Классификация ПНФ.

Очищенные препараты ПНФ выделены и изучены из органов и тканей различных организмов: прокариот, рыб, птиц, млекопитающих, человека. ПНФ очищена до гомогенного состояния из разных органов и тканей высших организмов: эритроцитов, гранулоцитов, клеток плаценты человека, селезёнки, мозга, вилочковой железы, хрусталика глаза быка, печени и селезёнки кролика, печени цыплёнка, селезёнки телёнка [9]. В лаборатории молекулярной энзимологии Института молекулярной биологии (ИМБ) НАН РА, методом аффинной хроматографии впервые выделена ПНФ из здоровых и опухолевых тканей лёгких и почек человека, определены некоторые их физико-химические, каталитические свойства фермента, дан их сравнительный анализ, который будет представлен ниже [28, 29]. На основании субъединичного строения и молекулярной массы, а также некоторых других свойств большинство из ПНФ могут быть отнесены к одному из следующих двух классов: гомотримеры или гомогексамеры, которые являются представителями семейства белков нуклеозидфосфорилазы-1, имеющие α/β структуру. Они могут также классифицироваться соответственно их субстратной специфичности и аминокислотной последовательности. Белки семейства нуклеозидфосфорилазы-2 являются димерами, у которых каждая субъединица содержит маленький α -домен, отделённый от α/β -домена большой щелью [30]. Несмотря на то, что ПНФ, выделенная из клеток млекопитающих, имеет тримерное строение, в некоторых сообщениях описана ПНФ, выделенная из клеток млекопитающих в виде димера [9].

Гомотримеры характеризуются молекулярной массой около 80-100 кДа, субстратами их являются 6-оксопурины и их нуклеозиды. Энзимы этого класса

были выделены из многих тканей млекопитающих и некоторых микроорганизмов, как например, ПНФ-I из *Bacillus stearothermophilus* TH-6/2 [31, 32]. Методом рентгеноструктурного анализа установлена трёхмерная структура ПНФ из эритроцитов человека с разрешением 3,2 Å. Активный центр фермента локализован на границе субъединиц тримера и включает семь сегментов одной субъединицы и один короткий сегмент соседней субъединицы [33]. Данные, полученные в разных лабораториях, свидетельствуют о том, что для ПНФ из высших организмов характерны гомотримерные структуры. С помощью электрофореза в ПААГ в присутствии DS-Na для фермента из эритроцитов, лейкоцитарных гранулоцитов и плаценты человека определены Mg, равные 30-33 кДа [34]. Mg нативного фермента, определенные различными методами, находятся в диапазоне от 87 до 102 кДа. Электрофорез фермента, конъюгированного диметилсуперимидатом в ПААГ подтвердил тримерную структуру [35]. Электрофоретические образцы генетических вариантов и гибриды, сформированные между ферментами из печени эмбриона человека и из кроличьих эритроцитов, указывают на то, что ферментный белок состоит из трёх субъединиц. Тримерная структура была определена также для ПНФ из печени и эритроцитов кролика, из селезенки, печени и щитовидной железы быка, из печени цыпленка. Во всех этих случаях Mg нативного фермента и его субъединиц находятся в тех же пределах, что и у ПНФ человека, причем субъединицы по Mg идентичны [9].

Гомогексамеры характеризуются высокой молекулярной массой равной, примерно 110-160 кДа, а также широкой субстратной специфичностью, так как они взаимодействуют как с 6-оксо-, так и с 6-аминопуринами. Для некоторых из них аденозин является гораздо лучшим субстратом, чем инозин и гуанозин [9]. Этот класс включает ПНФ из *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella* [36] и *Sulfolobus solfataricus* [37]. Гексамерная структура встречается чаще всего среди бактериальных ПНФ. Особенно интересен гексамерный фермент с Mg равным примерно 150-180 кДа, так называемая ксантозинфосфоорилаза (*E. coli* ПНФ II), индуцируемая в *E. coli*, культивируемой в присутствии ксантозина [38]. Она отличается от других высокомолекулярных энзимов своей неспособностью использовать в качестве субстрата аденозин, в то время как 6-оксипуриновый нуклеозид – ксантозин, является отличным субстратом [39]. Однако, в литературе описаны организмы имеющие обе формы. У некоторых видов бактерий, например, у *E. coli*, *Bacillus subtilis* и у *B. stearothermophilus* ПНФ имеют как тримерную, так и гексамерную форму. Предварительные исследования показали, что гексамерная ПНФ имеет два активных центра в каждом димере [30]. Известно, что физические свойства и субстратная специфичность ПНФ *Trichomonas vaginalis* идентичны по этим же показателям ПНФ *E. coli*. Однако, результаты последних экспериментов показали, что хотя четвертичная и третичная структуры мономера и активный центр ПНФ *T. vaginalis* и ПНФ *E. coli* похожи, но есть и различие, которое заключается в том, что в активном центре ПНФ *T. vaginalis* Thr-156, а у *E. coli* в этом положении остаток Ala [40].

Выяснена кристаллическая структура ПНФ иридовруса окуня (grouped iridovirus-giv). Общая структура giv-ПНФ очень напоминает ПНФ млекопитающих. Она содержит четыре протомера в каждой асимметричной единице. Giv-ПНФ имеет α/β -структуру с девятицепочным смешанным β -стволом, окружённым девятью α -спиралями. Предполагаемые фосфат-связывающий и рибозо-связывающий сайты соответственно

окупированы фосфат-ионом и молекулой трис. Геометрическое расположение и водород-связывающие участки фосфат-связывающего сайта у *giv*-ПНФ идентичны с сайтом ПНФ млекопитающих. Исследование каталитической активности *giv*-ПНФ показало, что субстратом этого фермента служит только 6-оксопурин нуклеозид. Эти результаты указывают на то, что *giv*-ПНФ гомологичен с аминокислотной последовательностью, молекулярной массой, субстратной специфичностью и общей структурой, а также строением активного центра ПНФ млекопитающих [41].

Ранее, в лаборатории молекулярной энзимологии ИМБ НАН РА была исследована субъединичная структура ПНФ-II из *E. coli* K-12 и ПНФ из почек, селезенки, печени и эмбрионов кролика. Оказалось, что ПНФ-II из *E. coli* K-12 имеет две молекулярные формы: тримерную и гексамерную. Mr высокомолекулярной формы составила 150кДа, а для её DS-Na субъединиц – 25 кДа; для низкомолекулярной формы – 85 кДа и 28 кДа, соответственно [42]. ПНФ из указанных выше органов кролика мигрировала в ПААГ в присутствии DS-Na как одна белковая полоса, что свидетельствует об идентичности субъединиц по молекулярной массе, которая была равна 31 кДа. Соответствующие нативные ферменты имели Mr, равные 90-92 кДа, что позволило заключить, что эти ферменты имеют трёхмерную структуру с идентичными субъединицами [43].

2. СТРУКТУРА ПНФ.

В настоящее время получены кристаллические препараты ряда ПНФ, принадлежащих к группе как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных ПНФ [44]. Для четырёх из них, а именно эритроцитарной ПНФ человека, ПНФ из селезенки телёнка и *Cellulomonas*, а также ПНФ из *E. coli* описаны их трёхмерные структуры. Например, фермент селезенки телёнка кристаллизуется в кубической пространственной группе P213 с одним мономером в асимметричном кристаллическом элементе. В этой пространственной группе мономеры тримерной ПНФ связаны через тройную кристаллографическую ось таким образом, что различия между мономерами невозможны. Отсюда следует, что кристаллографическая структура этого фермента не даёт ответа на вопрос об отрицательной кооперативности, неоднородности активных центров, наблюдаемой при связывании некоторых лигандов [45, 46]. Это относится и к ПНФ из эритроцитов человека (пространственная группа R32), которая, к сожалению, не позволяет получить кристаллы высокого дифракционного качества. Несмотря на то, что методом рентгеновской дифракции изучены ряд ПНФ-лиганд комплексов, однако, в настоящее время в банке данных протеинов депонированы лишь структуры ПНФ из *Cellulomonas* и как гомотримерная, так и гомогексамерная ПНФ *E. coli* [47, 48].

Таким образом, имеющиеся кристаллографические данные свидетельствуют о том, что ПНФ из селезенки телёнка, эритроцитов человека и *Cellulomonas* являются тримерами в целом с похожими структурами. При этом ферменты из селезенки телёнка и эритроцитов человека имеют высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей, тогда как ПНФ из *Cellulomonas* и селезенки телёнка проявляют только 33% идентичности. Предполагается, что тримерная ПНФ селезенки телёнка диссоциирует в растворе на высокоактивные мономерные субъединицы [49]. Исследования последних лет показали, что бинарный комплекс тримерной ПНФ селезенки телёнка гомологичен ПНФ человека. Водородные связи, обнаруживаемые в сайте связывания основания, указывают на то,

что специфичность тримерной ПНФ определяют N1-H, а не O6 пуринового основания. Фактически доказано, что контакт O6-гуанина с Asp243 Одельта1 не прямой, а опосредован молекулой воды [50, 51].

Каталитически активная молекула ПНФ *E. coli* состоит из 6 субъединиц и представляет собой плоский цилиндр толщиной в 60 Å с внутренним каналом диаметром 20 Å, заполненным молекулами воды. Эта структура представляется в качестве тримера, состоящего из димеров, поскольку связи между димерами слабее, чем внутри каждого из димеров [52].

Сравнение структур низкомолекулярных и высокомолекулярных ПНФ указывает на наличие многих общих свойств: например, это касается расположения активных центров относительно центральной β-цепи и пространственной организации связываемых лигандов в активном центре, что не мешает, однако, существованию различий в архитектуре ферментов этих двух классов. Основное различие состоит в том, что у тримерных ферментов активный центр состоит из аминокислотных остатков (за одним исключением, Phe168 для *Cellulomonas* и Phe159 для млекопитающих), принадлежащими одному отдельному мономеру, тогда как в гексамерной ПНФ *E. coli* в каждом из 3 функциональных димеров одна из соседних субъединиц предоставляет другой по 2 аминокислотных остатка, Arg43 и His4, для образования активного центра. Фосфат-связывающий участок гексамерного фермента заряжен более положительно, чем таковой тримерной ПНФ, поскольку в его состав входят 3 аргининовых остатка (Arg24, Arg87 и Arg43), с которыми соседствует Arg217, против одного аргининового остатка тримерной ПНФ [53]. Важным отличием тримерных ПНФ является то обстоятельство, что связывание основания или нуклеозида индуцирует конформационное изменение фермента, что приводит к переходу от витка к спирали в районе 241-260 остатков. Такое изменение не происходит у ПНФ *E. coli*, так как соответствующая петля намного короче (201-213) и вполне упорядоченна [54].

Необходимо подчеркнуть, что успехи в определении субъединичной структуры ПНФ во многом обусловлены применением наряду с гель-фильтрацией и электрофорезом современных методов рентгеновской кристаллографии и измерения кристаллической плотности [55, 56], а также усовершенствованием методов ультрацентрифугирования [57], позволяющими измерения по разнице скоростей оседания порядка 1% [49].

В последние годы ведутся интенсивные исследования структуры ПНФ человека (human PNP - HsPNP) в комплексе с некоторыми соединениями, используя синхротронное излучение с разными значениями разрешающей способности. А именно: изучаются два комплекса - кристаллическая структура HsPNP с инозином и 2',3'-дидезоксиинозином (HsPNP:inosine and ddi) и HsPNP с 2-меркапто-4(3H)-хинозолином (HsPNP:MQU) с разрешением в 2,8 Å и 2,7 Å, соответственно. Полученные данные анализа структурных различий между системами помогут в объяснении лигандной связи, уточнении места пуринового остатка, оценке степени аффинного сродства, в молекулярном подсчете функций и соотношении результатов, в достижении виртуального скрининга направленного на HsPNP, что в дальнейшем будет использовано при конструировании ингибиторов ПНФ человека [58, 59].

3. ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПНФ.

ПНФ из эритроцитов, плаценты, мозга и фибробластов человека, а также ферменты других млекопитающих (например, крыс) показывают электрофоретическую гетерогенность, что является результатом

ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗА

посттрансляционных модификаций. Гетерогенность фермента была определена с помощью изоэлектрического фокусирования в ПААГ. Эти данные важны с точки зрения понимания сложного кинетического поведения ПНФ [49].

Как и у большинства белков, изоэлектрическая точка ПНФ эукариот лежит в пределах рН 4,2-6,8. У прокариот разброс этих значений бывает большим. В эритроцитах человека обнаружено семь форм фермента, имеющих одинаковую молекулярную массу, но различные заряды, при этом необходимо отметить, что более отрицательно заряженные формы фермента обладали большей ферментативной активностью. ПНФ других тканей человека также имела несколько электрофоретических форм с наибольшей активностью для более щелочных форм [49, 60].

Электрофорез ПНФ из эритроцитов человека в присутствии 8,5 М мочевины продемонстрировал наличие четырех основных и двух минорных типов субъединиц, отличающихся по изоэлектрической точке. Была найдена корреляция между старением эритроцитов *in vivo* и потерей щелочных форм фермента и появлением кислотных вариантов. Подобный процесс протекал в экстрактах культивируемых фибробластов при их инкубации в течение 35 ч, являлся необратимым и ингибировался реагентами, восстанавливающими SH-группы [9, 26].

Описаны две новые щелочные субъединицы у фермента из эритроцитов гетерозиготных родителей, ребенок которых имел дефицит по ПНФ [9]. Мг мутантных субъединиц были примерно на 0,5 кДа выше, чем у нормальных, их пептидные карты не отличались. Предполагалось, что замены расположены, вероятно, во внутренних участках полипептидной цепи мутантной субъединицы, а не в терминальных участках [9, 49].

Как уже было сказано выше, ПНФ большинства высших организмов является тримером с молекулярной массой около 100 кДа и состоит из идентичных субъединиц. Молекулярные массы ПНФ опухолевых тканей лёгких и почек человека, определенные гель-фильтрацией через калиброванную колонку с сефадексом G-150 сверхтонкий, лежат в пределах 125-127 кДа и не отличаются от таковых здоровых тканей лёгких и почек [29], а также эритроцитов человека [9]. Небольшие отклонения в значениях Мг находятся в пределах ошибки эксперимента, поэтому можно допустить идентичность фермента из различных органов человека по молекулярной массе [29].

3.1. рН оптимум.

Все ПНФ, за небольшим исключением, имеют широкий диапазон рН-оптимума для проявления ферментативной активности и в зависимости от источника фермента он находится в пределах 5,0 и 8,5 [61]. Исключение составляет ПНФ из *Bacillus stearotherophilus*, для которой оптимальные значения рН находятся в пределах 7,0 и 11,0, а также ПНФ из *Brevibacterium acetilicum* с оптимумом рН 8,5 [30, 62]. Значительный интерес представляет ПНФ из *Cellulomonas*, который при рН-оптимуме, колеблющемся между 6,0 и 8,5, устойчив в течение 1 ч при рН 11,0 [61].

Оптимальные значения рН для реакций фосфоролиза, катализируемых ПНФ не специфичными к нуклеозидам аденина, сдвинуты несколько в кислую сторону (от 5,2 до 5,5 для ксантозина и от 5,8 до 7,5 для инозина) в сравнении с рН-оптимумом (от 7,0 до 8,5) для ПНФ, специфичных к ним [9, 49]. Ферменты из опухолевых и здоровых тканей лёгких и почек человека наиболее стабильны в диапазоне рН 7,5–8,3 с максимумом при рН 8,0 [29].

3.2. Термостабильность.

Отличительным свойством ПНФ является высокая термостабильность. Например, ферментный препарат из *S. typhimurium* после 11 минут

преинкубации при 69°C в диапазоне оптимума pH теряет свою активность на 50% [63]. Такое же влияние оказывает 10 минутная преинкубация при 62°C на активность ПНФ из *E. coli* и 10 минутная преинкубация при 40°C на активность ПНФ из селезёнки телёнка. При этом для ПНФ из этих биологических объектов характерна наибольшая термостабильность, наблюдаемая в интервале pH 7,3-7,7 [9].

Термостабильность ферментов из опухолевых и здоровых тканей лёгких и почек человека была изучена при pH 8,0. Максимальная температура преинкубации, при которой сохраняется 100% активность фермента, равна 52°C. Температура, при которой активность падает на 50%, составляет 70°C [29].

Высокомолекулярные ПНФ более термостойки, чем их низкомолекулярные “коллеги”: например, фермент из *Klebsiella* устойчив при 60°C в течение 16 ч [64]. Исключением является ПНФ из *Sulfolobus solfataricus*, которая сохраняет полную активность после 2 ч преинкубации при 100°C, что объясняется, по-видимому, присутствием 6 дисульфидных связей между субъединицами. Некоторые низкомолекулярные ПНФ как, например, из *Cellulomonas*, напоминают по термостойкости высокомолекулярные ПНФ [65-67].

Значения термостабильности ПНФ используются при очистке фермента и его хранении. В течение многих месяцев очищенные препараты ПНФ можно хранить при температуре 4°C в виде суспензий в растворе сульфата аммония без заметной потери активности [26]. Для защиты от окисления функционально важных сульфогидрильных групп ПНФ в препаратах необходимо присутствие 2-меркаптоэтанола, ДТТ или других тиоловых восстановителей. Фермент из эритроцитов человека, печени кролика и мозга быка можно хранить в течение нескольких недель при 4°C, а ПНФ *E. coli* и *S. typhimurium*, хранились в фосфатном буфере при 4°C в течение 2-х лет без заметной потери активности. Замораживание-оттаивание приводит к инактивации очищенных ферментных препаратов. Интересно, что замораживание в присутствии ДТТ приводит к большей потере активности ПНФ человека, чем в отсутствие тиоловых реагентов [9, 49].

3.3. Коэффициенты экстинкции.

Адсорбция в ультрафиолетовом спектре для низкомолекулярных и высокомолекулярных ПНФ, является типичным для большинства белков, с максимальными значениями оптического поглощения при 278-280 нм. Однако, ферменты резко отличаются по значениям коэффициентов поглощения, так как некоторые ПНФ (например, энзим *E. coli*) не содержат остатков триптофана. Коэффициенты поглощения для ПНФ из эритроцитов человека и из селезёнки телёнка равны $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%} = 9,6$ и для ПНФ из *E. coli* и *Cellulomonas* соответственно $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%} = 2,7$ и 5,9. Флуоресцентно-эмиссионные спектры энзимов *E. coli* и селезёнки телёнка имеют максимум поглощения при 304 и 340 нм соответственно, что, по-видимому, связано с тем обстоятельством, что первая содержит только остаток тирозина, а последняя – и тирозина, и триптофана. Эти эмиссионные спектры были использованы для изучения взаимодействия энзимов с субстратами и ингибиторами в растворах, а также при комплексном исследовании нуклеозид гидролазы из *Leishmania* [68, 69].

4. СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА.

Природными субстратами низкомолекулярных ПНФ служат 6-оксипурины (гуанозин и гипоксантин) и их рибозиды и 2'-дезоксирибозиды, в то время как высокомолекулярные энзимы дополнительно используют в качестве субстрата и 6-аминопурин (аденин) и его нуклеозиды.

ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗА

Скорость фосфорилиза и/или синтеза аденозина на 1% меньше скорости таковой для инозина [70]. Однако, некоторые ПНФ конкурентно ингибируются аденином и/или аденозином, а, следовательно, связывают их, как например, ПНФ из клеток саркомы 180, *Cellulomonas*, *Proteus vulgaris* [67]. Ферменты, которые демонстрируют более чёткую специфику, ограниченную в большей степени или исключительно 6-аминопуринами и их нуклеозидами, называются аденозинфосфорилазами.

В клетках *E. coli*, культивируемых в присутствии ксантозина, обнаружено наличие фермента, индуцированного последним и названного ксантозинфосфорилазой. Этот гомогексамер с субстратной специфичностью и аминокислотной последовательностью, характерной для низкомолекулярных ПНФ, дополнительно использует в качестве субстрата и ксантозин. В связи с этим следует отметить, что при физиологических значениях рН ксантозин, имеющий $pK_a=5,7$, выступает как моноанион и, хотя остаётся 6-оксипуриновым нуклеозидом, по способу связывания с ферментом отличается от нейтрального нуклеозида. Изучение его субстратной активности в зависимости от рН представляет значительный интерес [39].

Хотя долгое время считалось, что пиримидины не являются субстратами ПНФ, в настоящее время убедительно показано, что никотинамид рибозид с положительным зарядом (NR^+) является субстратом ПНФ из селезёнки телёнка и *E. coli*. Более того, его субстратные свойства, изученные на примере взаимодействия ПНФ из селезёнки телёнка, согласуются с недавно предложенным для фермента механизмом катализа [71, 72]. Однако, до сих пор неизвестно имеет ли фосфорилиз NR^+ физиологическое значение. Кроме NR^+ и некоторые другие аналоги нуклеозидов, такие как, например, 7-метилгуанозин, MESG, 7-(β -D-рибофуранозил)Gua, являются субстратами ПНФ из разных источников. Последние подвергаются необратимому фосфорилированию или имеют настолько ничтожную константу равновесия, что реакция по существу необратима. Есть аналоги, которые резистентны к фосфорилизу, но их основания могут быть субстратами в обратной, синтетической реакции, как например, аллопуринол, 8-азопурины. Существуют нуклеозидные аналоги, которые являются селективными субстратами для ПНФ из *E. coli*. К ним относятся: метилинозин, 1-метилгуанозин, нейтральная форма 1-метиладенозина, пуриновый рибозид, селективность которых объясняется их структурными особенностями. Что касается пентозного компонента, изменения гидроксильных групп при С(2) или С(3) уменьшают или лишают исследуемый аналог субстратной активности в отношении ПНФ из эритроцитов человека. С другой стороны, существует значительная толерантность к 5'-позиции, в отношении ориентации 5'- CH_2OH или отсутствия её, или замены галогенной группой. В отличие от человеческого фермента, ПНФ *E. coli* не проявляет активность в случае замены пентозного кольца бензильным компонентом. Из вышесказанного следует, что низкомолекулярные ПНФ имеют более строгую специфичность для компонента основания и более низкую специфичность для пентозного компонента, чем высокомолекулярная ПНФ *E. coli* [9].

Особенностью ферментативной реакции, катализируемой ПНФ, является не-Михаэлисовская кинетика, наблюдаемая с некоторыми субстратами, которая выражается характерным изгибом прямой зависимости $1/v_0$ от $1/c_0$ в координатах Лайнуивера-Берка. Такое поведение наблюдается для всех ПНФ, когда варибельным субстратом является P_i и ряд нуклеозидов [9]. Это явление определяется как "субстратная активация при высоких

концентрациях субстрата” и “отрицательная кооперативность”. В таком случае на соответствующем графике выделяются линейные участки для низких и высоких концентраций переменного субстрата и отдельно для каждого диапазона концентраций рассчитывают кинетические константы на основании допущения, что классическая Михаэлисовская кинетика справедлива для отдельных диапазонов концентраций [73].

Кинетика реакций, катализируемых ПНФ из эритроцитов человека подчиняется упорядоченному Vi-Vi механизму, в котором первым связывается пуриновый субстрат и последним освобождается пуриновый продукт.

ПНФ катализирует реакции, в основе которых лежит SN2 каталитический механизм:

1) пуриновый/дезоксирибонуклеозид + P_i = основание + (d) Rib-1-P;

2) [пуриновый/дезоксирибонуклеозид]₁ + [пуриновое основание]₂ = [пуриновый/дезоксирибонуклеозид]₂ + [пуриновое основание]₁.

Указанный механизм реакции был определен с помощью изучения начальных скоростей связывания субстратов и анализа продуктов ингибирования для фермента из эритроцитов человека, селезенки теленка, щитовидной железы, мозга быка и печени кролика [9]. В отсутствие P_i ПНФ селезенки теленка катализирует медленный гидролиз гуанозина и инозина, образуя прочно связанный комплекс фермента с пуриновым основанием [74]. С природными субстратами и некоторыми аналогами, где фосфоролитический обратимый, равновесие термодинамически смещено в сторону нуклеозидного синтеза. С ферментами из эритроцитов человека, селезенки теленка и *E. coli*, константа равновесия (K_p) равна ~50 [9]. В живых организмах (*in vivo*), фосфоролитическая реакция, благодаря сопряжению с другими ферментами. По-видимому, этим и объясняется тот факт, что большая часть кинетических данных относится к фосфоролитическим реакциям [75].

Имеющиеся литературные данные не дают основание для однозначной трактовки механизма реакции транскрибозилирования (реакция 2). Кинетические исследования, а также применение метода ³¹P-ЯМР показали отсутствие промежуточной фосфорилированной и рибозилированной форм фермента, что означает, что реакция 2 протекает в два этапа с образованием промежуточного соединения (d)Rib-1-P за счёт существующих примесей неорганического фосфата. Такое течение реакции справедливо и со стереохимической точки зрения [76]. С другой стороны, допускается, что реакция 2 является результатом прямого переноса рибозы. Некоторые авторы утверждают, что эта реакция идет в отсутствие фосфата (P_i), однако, этому нет однозначного экспериментального подтверждения и реакция может быть общим результатом фосфоролитической и синтеза [9, 77].

В ряде работ показано, что ПНФ катализирует реакцию обратимого фосфоролитического, который становится необратимым при замене P_i арсенатом. Арсенолитический ведет к формированию химически нестабильного соединения рибозо-1-арсената, таким образом предотвращая обратимую реакцию [78]. Необратимость арсенолитического помогает достичь хороших результатов в исследованиях механизма реакции с помощью аналогов комплексов переходного состояния [79].

Для ферментов из селезенки теленка и эритроцитов человека рентгеноструктурными методами показано существование тройных комплексов фермент/нуклеозид/фосфат и фермент/основание/R-1-P/(сульфат) [75, 80, 81]. Для комплекса фермента из *E. coli* также имеются данные о кристаллической структуре фермент/нуклеозид/фосфат(сульфат) [82].

ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗА

Таким образом, как для низкомолекулярных, так и для высокомолекулярных ПНФ экспериментально подтверждён последовательный механизм реакции с образованием тройного комплекса фермента с обоими субстратами. Однако, остается невыясненным протекает ли реакция через упорядоченный или случайный механизм.

Механизм катализируемой ПНФ реакции изучался различными методами на низкомолекулярных ПНФ, в основном, на ферментах из эритроцитов человека, селезенки теленка и *Cellulomonas*. На основании этих данных предложены три различных механизма, подробное обсуждение которых представлено в следующих работах [9, 83].

Нами, совместно с польскими коллегами из Варшавского Университета было проведено сравнительное изучение субстрат-ингибиторных свойств ПНФ из опухолевых тканей легких и почек человека, а также с ПНФ эритроцитов человека с целью выявления сходств и различий между ними, которые могли бы быть учтены при синтезе эффективных ингибиторов фермента [84]. Существенных различий в свойствах обнаружено не было, однако выявленные различия в ингибиторном действии некоторых ациклических аналогов гуанозина, ранее апробованных на эритроцитарной ПНФ человека, а сейчас и на ПНФ из опухолевых тканей легких и почек человека, помогли обнаружить соединение, которое ингибирует опухолевый фермент почки в 5 раз эффективнее, чем фермент из здоровой почки, что и служит основанием для рекомендации более тщательного изучения этого аналога в дальнейшем, поскольку практический интерес представляют именно такие соединения, сильнее ингибирующие опухолевый фермент, чем фермент из здоровой ткани [84].

Данные по изучению биологически активных ингибиторов ПНФ, а также клинической роли ПНФ и его ингибиторов были опубликованы в нашей обзорной статье [4].

Из приведённых выше литературных данных, представляется интересным и актуальным дальнейшее исследование физико-химических и каталитических свойств ПНФ тканей человека и животных, а также поиск новых ингибиторов, в первую очередь среди производных пурипнуклеозидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Canduri F., dos Santos D.M., Silva R.G. et al.* (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **313**, 907-914.
2. *Galmarini C.M.* (2006) *IDrugs*, **9**(10), 712-722.
3. *Myers L.A., Hershfield M.S., Neale W.T., Escobar M., Kurtzberg J.* (2004) *J. Pediatr.*, **145**, 710-712.
4. *Погосян Л.Г., Нерсесова Л.С., Газарянц М.Г., Мкртчян З.С., Меликсетян Г.О., Акопян Ж.И.* (2008) *Укр. биохим. ж.*, **80** (5), 95-104.
5. *Бакунц Г.О.* (2011) Эндогенные факторы церебрального инсульта. ГЕОТАР-Медиа, Москва.
6. *Bantia S., Ananth S.L., Parker C.D., Horn L.L., Upshaw R.* (2003) *Intern. Immunopharmacol.*, **3**(6), 879-887.
7. *Larson R.A.* (2007) *Semin. Oncol.*, **34**(6 Suppl 5), 13-20.
8. *Patrick F., Drummond D., Pappas W., Hollister J., Alan S.* (2010) *Arthritis Rheumatism*, **62**, 6-11.
9. *Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D.* (2000) *Pharmacology Therapeutics*, **88**, 349-425.

10. *Stoychev G., Kierdaszuk B., Shugar D.* (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**(16), 4048-4057.
11. *Frederiks W.M., Bosch K.S., van Gulik T.* (1993) *Histochem. J.*, **25**, 86-91.
12. *Parks R.E.Jr., Agarwall R.P.* (1972) In: *The Enzymes*, 3rd ed., (Boyer P.D., ed.) N.Y.: Acad.Press, **7**, 483-514.
13. *Carson D.A., Kaye J., Seegmiller J.E.* (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5677-5682.
14. *Burgess F.W., el Konni M.H., Parks R.E.Jr.* (1985) *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 3061-3070.
15. *Mohamedali K.A., Guicherit O.M., Kellems R.E., Rudolph F.B.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 23728-23733.
16. *Hosek B., Bohacek J., Kautska J.* (1986) *Biomed. Biochem. Acta*, **45**(3), 281-284.
17. *Mascia L., Cotrufo T., Cappiello M., Ipata P.L.* (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1472**, 93-98.
18. *Mascia L., Cotrufo T., Cappiello M., Ipata P.L.* (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1474**, 70-74.
19. *Traut T.W.* (1994) *Mol. Cell Biol.*, **140**, 1-22.
20. *Schramm V.L.* (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1587**(2-3), 107-117.
21. *George D.L., Franck U.* (1976) *Science*, **194**(4267), 851-852.
22. *Womack J.K., Davisson M.T., Eicker E.M., Kendall D.A.* (1977) *Biochem. Genet.*, **15**(2), 347-354.
23. *Jonsson J.J., Williams S.R., McIvor R.S.* (1996) *Nucl. Acids Res.*, **19**, 5015-5020.
24. *Silva R.G., Carvalho L.P., Oliveira J.S., Pinto C.A., Mendes M.A., Basso L.A., Santos D.S.* (2003) *Protein Expr. Purif.*, **27**(1), 158-164.
25. *Williams S.R., Goddard J.M., Martin Jr., David W.* (1984) *Nucl. Acids Res.*, **12**(14), 5779-5787.
26. *Jonsson J.J., Converse A., McIvor R.S.* (1994) *Gene*, **140**, 187-193.
27. *Manisha Rajan Madkaikar, Shilpa Kulkarni et al.* (2011) *BMJ Case Reports*, doi:**10.1136/bcr.09.2011.4804**.
28. *Погосян Л.Г., Акопян Ж.И.* (2003) *Биол. журн. Армении*, **1-2**(55), 29-32.
29. *Погосян Л.Г.* (2003) *Биол. журн. Армении*, **4**(55), 267-271.
30. *Grenha R., Levdikov V.M., Fogg M.J., Blagova E.V., Brannigan J.A., Wilkinson A.J., Wilson K.S.* (2005) *Acta Cryst.*, **F61**, 459-462.
31. *Hamamoto T., Noguchi T., Midorikawa Y.* (1996) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 1179-1180.
32. *Hamamoto T., Noguchi T., Midorikawa Y.* (1997) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 276-280.
33. *Ealick S.E., Babu Y.S., Narayana S.V.L., Cook W.J., Bugg C.E.* (1990) *Crystallographic and Modeling Methods in Molecular Design*. New York: Springer-Verlag, pp. 43-55.
34. *Osborne W.R.A.* (1990) *J. Biol. Chem.*, **255**, 7089-7092.
35. *Adam T., Sevcik J., Fairbanks L.D., Batrak P.* (1998) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **431**, 759-763.
36. *Takehara M., Ling F., Izawa S., Inoue Y., Kinura A.* (1995) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1987-1990.
37. *Cacciapuoti G., Porcelli M., Bertoldo C., De Rosa M., Zappia V.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 24762-24769.
38. *Seeger C., Poulsen C., Dandanell G.* (1995) *J. Bacteriol.*, **177**, 5506-5516.
39. *Hassan A.E., Shortnacy A.T., Montgomery J.A., Secrist J.A.* (2000) *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **19**, 559-565.

ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗА

40. *Zang Y., Wang Wen-Hu, Wu Shaw-Wen, Ealick S.E., Wang C.C.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 22318-22325.
41. *Kang Y.-N., Zhang Y., Allan P.W., Parker W.B., Ting J.-W., Chang C.-Y., Ealick S.E.* (2010) *Acta Cryst.*, **D66**, 155-162.
42. *Безирджян Х.О., Кочарян Ш.М., Акопян Ж.И.* (1987) *Биохимия*, **52**, 1624-1631.
43. *Ананьев А.В., Безирджян Х.О., Акопян Ж.И.* (1987) *Биохимия* **52**, 2022-2028.
44. *Ealick S.E., Greenhough T.J., Babu Y.S., Cook W.J., Bugg C.E., Rule S.A., Habash J., Helliwell J.R.* (1985) *9 Eur. Crystallogr. Meet., Torino*, **2**, 371-372.
45. *Bzowska A., Shugar D. et al.* (1995) *FEBS Lett.*, **367**, 214-218.
46. *Tebbe J., Bzowska A. et al.* (1999) *J. Mol. Biol.*, **294**, 1239-1255.
47. *de Azevedo W.F. Jr., Canduri F., dos Santos D.M. et al.* (2003) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **308**(3), 452-454.
48. *Koellner G., Luič M., Shugar D., Saenger W., Bzowska A.* (1997) *J. Mol. Biol.*, **265**, 202-216.
49. *Sakiyama T., Hironouchi K.* (2003) *Nippon Rinsho*, **62**, 3220-3225.
50. *Luič M., Koellner G., Shugar D., Saenger W., Bzowska A.* (2001) *Acta Crystallogr. D*, **57**(1), 30-36.
51. *Luič M., Koellner G., Yokomatsu T., Shibuya S., Bzowska A.* (2004) *Acta Crystallogr. D*, **60**(8), 1417-1424.
52. *Cook W.J., Ealick S.E., Krenitsky T.A., Stoeckler J.D., Helliwell H.R., Bugg Ch.W.* (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 12968-12969.
53. *Erion M.D., Takabayashi K. et al.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 11725-11734.
54. *Mao C., Cook W.J. et al.* (1997) *Structure*, **5**, 1373-1383.
55. *Bzowska A. et al.* (1998) *Acta Crystallogr. D*, **54**, 1061-1063.
56. *Filgueira de Azevedo W. Jr. et al.* (2003) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **309**, 923-928.
57. *Schuster T.M., Toedt J.M.* (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 650-658.
58. *Canduri F. et al.* (2004) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **313**, 907-914.
59. *Caceres R.A., Vivan Ana Luiza, Gava L.M. et al.* (2008) *Arch. Biochem. Biophys.*, **479**, 28-38.
60. *Wiginton D.A., Coleman M.S., Hutton J.J.* (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 6663-6669.
61. *Wielgus-Kutrowska B., Tebbe J. et al.* (1999) *Nucleosides Nucleotides*, **18**, 871-872.
62. *Shirae H., Yokozeki K.* (1999) *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 493-499.
63. *Jensen K.E., Nygaard P.* (1975) *Eur. J. Biochem.*, **51**(1), 253-265.
64. *Ling F., Inuo Y., Kimura A.* (1994) *Process Biochem.*, **29**, 350-361.
65. *Cacciapuoti G., Porcelli M., Bertoldo C., Fusco S., De Rosa M., Zappia V.* (1996) *Eur. J. Biochem.*, **239**, 632-637.
66. *Cacciapuoti G., Fusco S., Caiazzo N., Zappia V., Porcelli M.* (1999) *Protein Expr. Purif.*, **16**, 125-135.
67. *Wielgus-Kutrowska B., Tebbe J. et al.* (1998) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **431**, 259-264.
68. *Kierdaszuk B., Modrak-Wojcik A., Shugar D.* (1997) *Biophys. Chem.*, **63**, 107-118.
69. *Shi W., Schramm V.L., Almo S.C.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 21114-21120.
70. *Stoeckler J.D., Poirot A.F. et al.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 11749-11756.
71. *Wielgus-Kutrowska B., Kulikowska E., Wierzchowski J., Bzowska A., Shugar D.* (1997) *Eur. J. Biochem.*, **243**, 408-414.

72. *Cappiello M., Mascia L., Scolozzi C., Giogelli F., Ipata P.L.* (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1425**, 273-281.
73. *Диксон М., Уэбб Э.* (1982) Ферменты, "Мир", Москва.
74. *Cheng J., Farutin V. et al.* (1999) *Bioorg. Chem.*, **27**, 307-325.
75. *Erion M.D., Stoeckler J.D., Guida W.C., Walter R.L., Ealick S.E.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 11735-11748.
76. *Salamone S.J., Jordan F., Jordan R.R.* (1982) *Arch. Biochem. Biophys.*, **217**(1), 139-143.
77. *Mora M., Bozal J.* (1985) *Comp. Biochem. Physiol.*, **82B**(4), 805-813.
78. *Kline P.C., Schramm V.L.* (1993) *Biochemistry*, **32**, 13212-13219.
79. *Schramm V.L.* (1999) *Methods Enzymol.*, **308**, 301-355.
80. *Tebbe J., Wielgus-Kutrowska B. et al.* (1997) *Protein Eng.*, **10**(suppl), 90.
81. *Mao C., Cook W.J., Zhou M., Federov A.A., Almo S.C., Ealick S.E.* (1998) *Biochemistry*, **37**, 7135-7143.
82. *Koellner G., Luič M., Shugar D., Saenger W., Bzowska A.* (1998) *J. Mol. Biol.*, **280**, 153-166.
83. *Canduri F., Fadel V. et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **327**, 646-649.
84. *Bzowska A., Pogosian L., Ananiev A.V., Kulikowska E., Shugar D.* (1995) *Nucleosides Nucleotides*, **14**, 517-520.

Поступила: 19. 04. 2012.

PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE

L.H. Pogosian, J.I. Akopian

Institute of Molecular Biology of NAS RA, Laboratory of molecular enzymology, Hasratyan st., 7, Yerevan, 0014, Republic Armenia; tel.: +37410281572; e-mail: lina-edu@mail.ru, imb@sci.am

Purine nucleoside phosphorylase (PNP) is one of the most important enzymes of the purine metabolism, which promotes the recycling of purine bases. Nowadays is the actual to search for effective inhibitors of this enzyme which is necessary for creation T-cell immunodeficient status of the organism in the organs and tissues transplantation, and chemotherapy of a number pathologies as well. For their successful practical application necessary to conduct in-depth and comprehensive study of the enzyme, namely a structure, functions, and an affinity of the reaction mechanism.

In the review the contemporary achievements in the study of PNP from various biological objects are presented. New data describing the structure of PNP are summarised and analysed. The physiological role of the enzyme is discussed. The enzyme basic reaction mechanisms and actions are considered. The studies on enzyme physicochemical, kinetic, and catalytic research are presented.

Key words: purine nucleoside phosphorylase, property, structure, specificity, activity, substrates.