

УДК 577.152.1
©Коллектив авторов

АТР - ГЕНЕРИРУЮЩАЯ КРЕАТИНКИНАЗА: ВПЕРВЫЕ ОБНАРУЖЕННЫЙ КОМПОНЕНТ ЯДА *Viperidae*.

Д.А.Кузнецов¹, М.А Орлова², А.Г.Бердиева³, П.З. Хасигов³.

¹Институт химической физики им. Н.Н.Семёнова РАН, Москва.

²МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва;

тел/ факс (095)939 - 3187, тел.: 939-3214; эл.почта: orlova@radio.chem.msu.ru

³Медицинская академия им. И.М. Сеченова, Москва

В работе впервые сообщается о присутствии креатинкиназы, АТР-генерирующего фермента, в яде *Vipera xanthia* - ядовитой рептилии семейства гадюковых (*Viperidae*). Активная форма фермента представлена мономером с молекулярной массой 40 кДа, кинетические и каталитические свойства которого описаны с последующим кратким обсуждением перспектив использования полученных данных для понимания молекулярного механизма вызываемой ядом коагулопатии и для применения выделенного фермента как инструмента исследования взаимодействий в системе "тромбин - тромбиновый рецептор". Предложенная процедура очистки включает этапы гидрофобной (фенилсефароза), анионообменной (MonoQ) и аффинной (ADP-сефароза) хроматографии.

Ключевые слова: креатинкиназа, токсические коагулопатии, яд *Viperidae*.

ВВЕДЕНИЕ. Яды рептилий семейства *Viperidae* содержат десятки белков и пептидов, лишь часть которых идентифицирована. Они определяют патофизиологические особенности отравлений, вызываемых у человека и животных [1,2]. Изучение компонентов этих ядов (щелочная фосфолипаза A₂, ацетилхолинэстераза, оксидаза L-аминокислот, многочисленные протеиназы, эстеразы аргининовых эфиров и их пептидные ингибиторы) не только позволило выяснить ряд важных деталей молекулярного механизма токсических кардиопатий и коагулопатий, но и дало возможность использовать препараты этих ферментов в качестве "инструментов" исследования [2,3].

Летальной формой коагулопатии, характерной для последствий укусов гремучих змей и некоторых гадюк, является синдром диссеминированного внутрисосудистого свёртывания крови (ДВС), патогенез которого включает активацию образования калликреина и тромбина, а также модификацию тромбиновых рецепторов различных клеток поражённого организма, что приводит к стремительному развитию тромбозов и геморрагических повреждений жизненно важных органов и тканей [3]. При этом, роль ранее идентифицированных ферментов в составе яда рептилий как участников патогенеза токсических коагулопатий окончательно не выяснена [4]. Одним из регуляторов функций поверхностных клеточных тромбиновых рецепторов, в том числе, и рецепторов клеток крови [2,3], является АТР-генерирующая креатинкиназа (КФ 2.7.3.2), осуществляющая обратимый перенос фосфата с креатинфосфата на ADP [4,5].

КРЕАТИНКИНАЗА ЯДА ГАДЮКИ

В литературе по данному вопросу не содержится сведений о присутствии креатинкиназы в составе яда гадюковых змей. Однако, есть отдельные указания на присутствие этого фермента в экстрактах паренхимы яд-секретирующих желез бунгарусов и коралловых змей [2]. Всё сказанное выше позволяет предположить, что креатинкиназа может присутствовать в составе ядов гадюк, провоцирующих ДВС. В настоящей работе мы предприняли попытку обнаружить в препарате цельного яда *Vipera xanthia lethalis Raddei* (центральноазиатской смертельноядовитой гадюки Радде) присутствие этого фермента. В случае успеха мы предполагали выделить и охарактеризовать его.

МЕТОДИКА. Лиофилизированный препарат цельного яда получен от проф. А. Велхаиди (Guilan University at Rasht, I.R.I.). Препарат растворяли в 15 мМ Na-фосфатном буфере (рН 6,80), содержащем 20 мМ MgCl₂ и 1,0 мМ ЭДТА. Активность креатинкиназы в исходном материале и его фракциях определяли по методу, описанному нами ранее [6]. Для этого реакцию проводили в образцах объемом 100 мкл, содержащих 15 мМ К-фосфатный буфер (рН 6,35), 60 мкг фермент-содержащего белка, 160 мкМ креатинфосфат, 160 мкМ ADP ("Upstate Biotechnology", США), 20 мМ MgCl₂, 12,5 мкМ АТФ ("Bio-Rad", США). После 30 мин инкубации при 30°C реакцию останавливали добавлением 10 объемов холодного (4°C) ацетона. Осадки отделяли фильтрацией через фибerglassовые фильтры Millipore PX10, после чего растворимую в ацетоне фракцию упаривали до 0,2-0,3 мл и определяли содержание ADP и АТФ в аликвотах с помощью высокоразрешающей хроматографии в обращенной фазе, используя следующий режим фракционирования: колонка Altex 2000 DL; 2000 p.s.i.; стационарная фаза - S5CN/ODS; мобильная фаза - линейный 10-65% градиент пиридина (0,18 мл/мин), основанный на смеси метанол-вода (9:1 по объему), 22°C, Shimadzu QSL600 Automatized HPLC System. Содержание нуклеотидов в пмоль определяли А₂₆₀-планиметрией, используя расчетную программу Unix Chemdrive Outset, адаптированную к IBM-совместимому цифровому аналитическому блоку Shimadzu SJ40 [6].

За единицу активности креатинкиназы принимали количество АТФ (пмоль), образованного за 1 мин при 30°C. При определении К_м концентрацию ADP изменяли от 3 до 96 мкМ при постоянной концентрации креатинфосфата (400 мкМ) или концентрацию креатинфосфата изменяли от 3 до 96 мкМ при постоянной концентрации ADP. Содержание белка определяли по методу Бредфорд [7], используя набор реактивов "Bio-Rad" и БСА в качестве стандарта. Для определения оптимальной концентрации MgCl₂ был исследован диапазон концентраций от 1,0 до 100 мМ, рН-оптимум активности фермента (6,35) был установлен при изучении значений рН в интервале от 2,5 до 8,5.

Водный экстракт лиофилизированного яда фракционировали сульфатом аммония (40 - 80% насыщения). Белковый осадок растворяли в минимальном объеме исходного буфера. Полученный раствор диализовали против 0,8 М NaCl при 4°C в течении ночи, 30 мин центрифугировали при 10000 g и наносили на колонку с фенолсефарозой (1,6×10 см, "Pharmacia", Швеция), уравновешенную буфером 10 мМ трис-НСl (рН 7,50)/1,0 М NaCl. Колонку затем промывали двумя объемами буфера и элюировали фермент - содержащую фракцию линейным 1,0 - 0 М градиентом NaCl, сформированном на том же буфере.

Порции элюата, в которых определялась активность фермента, объединяли, концентрировали ультрафильтрацией на мембранах Diaflo YM10 ("Amicon BV" Голландия), доводя объем проб до 1,0 - 1,8 мл, и затем наносили на колонку 0,5×5 см с анионообменником MonoQ ("Pharmacia"), уравновешенную буфером 10 мМ трис-НСl (рН 7,50). Колонку промывали двумя объемами буфера и элюировали фермент линейным 0 - 1 М градиентом NaCl.

Фракцию фермента подвергали диализу против 10 мМ трис-НСl (рН 7,2) при 4°C в течении ночи, и наносили на колонку 1,5×8 см с ADP - сефарозой (11 - атомным спейсером, связанным с 2'- гидроксильными группами рибозы ADP,

служил дигидразид адипиновой кислоты, "Sigma", США), уравновешенную диализационным буфером, двумя объемами которого колонку промывали перед элюцией фермента 0 - 0,8 мМ градиентом NaCl.

Очищенный фермент осаждали из элюата добавлением 10 объемов холодного ацетона, осадки собирали на фиброглассовых фильтрах и растворяли в минимальных объемах 10 мМ трис - глицин (pH 8,0)/0,25% Ds - Na. Образцы инкубировали 5 мин при 90°C и затем гомогенность ферментного белка и величины молекулярных масс фракций оценивали с помощью электрофореза в ПААГ с 0,5% Ds - Na в пластинах 12×13,5×0,075 см, содержащих линейный 4 - 12% градиент акриламида по методу Laemmli [8]. Фракционирование проводили в течении 90 мин, 90 V/гель. Калибровку пластин осуществляли белковыми маркерами "Bio - Rad 611JA": миозин (210 кДа), фосфоорилаза *b* (97 кДа), БСА (67 кДа), овальбумин (45 кДа), карбоксиангидраза (31 кДа). В отдельной серии экспериментов пластины гелей калибровали используя очищенный препарат мономера креатинкиназы из миокарда теленка, $M_r = 44,6$ кДа, предоставленный д-ром С. Lo Nostro (European Centre for Biomedical Research, Варезе, Италия). Гели окрашивали Кумасси R-250. Электрофоретическая гомогенность активной формы очищенного фермента была определена как пул мономеров без примеси посторонних белков с помощью электрофореза в неденатурирующих условиях по модифицированной нами методике Поллака и Кретчмера с использованием 10% ПААГ и 12,5 мМ трис-борат (pH 8,25) разделяющей системы [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Данные, представленные на рис. 1 и 2, свидетельствуют о присутствии креатинкиназы в исследованном объекте, кинетические параметры фермента приведены в табл. Из сопоставления данных, представленных на рис.1 и 2, видно, что высокая степень очистки фермента достигалась уже на стадии анионообменной хроматографии.

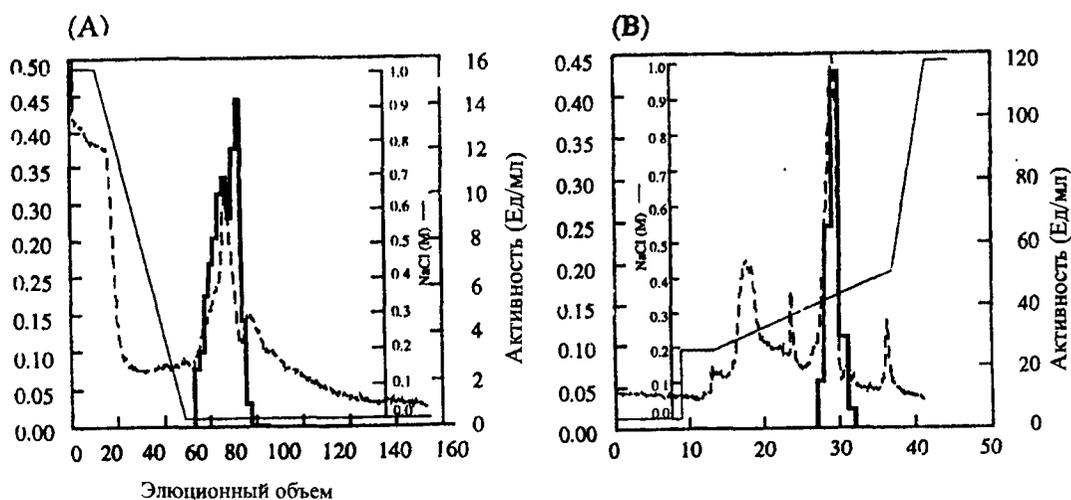


Рисунок 1.

Фракционирование белков яда *Vipera xanthia lethalis R.* с помощью гидрофобной хроматографии на фенол сефарозе (А) и анионообменной хроматографии на сорбенте МоноQ (В).

Таблица. Кинетические константы креатинкиназы яда, *Vipera xanthia lethalis R.*

Субстрат	K_M , мМ	k_{cat} , мкМ/мин на мг
Креатинфосфат	0.020	0.42
ADP	0.040	2.10

Наша методика позволила выделить высокоочищенный фермент, молекулярная масса которого составляет 40 кДа. Активная форма фермента близка

КРЕАТИНКИНАЗА ЯДА ГАДЮКИ

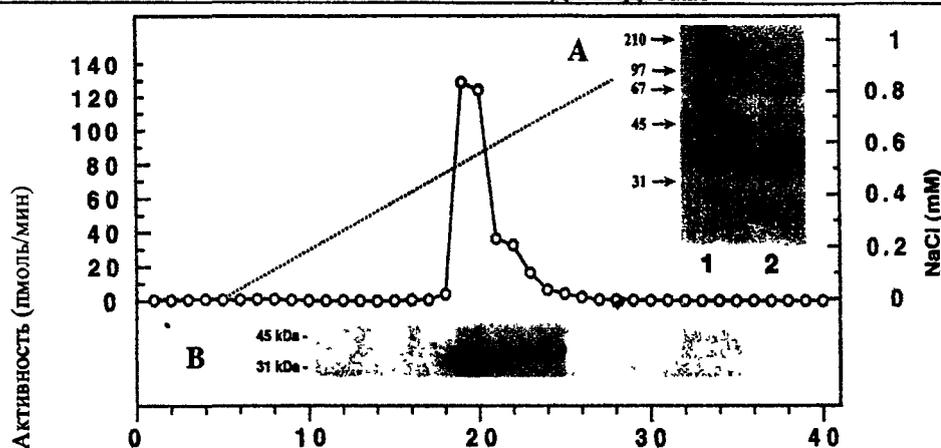


Рисунок 2.

Аффинная хроматография креатинкиназы яда *Vipera xathia lethalis R.* на ADP - сефарозе.

А - ПААГ - электрофорез креатинкиназы миокарда телёнка, $M_r = 44,6$ кДа (1), и креатинкиназы яда, $M_r = 40$ кДа (2). В - ПААГ - электрофорез белковых компонентов фракций элюата с ADP - Сефарозы.

по значению M_r и по каталитическим свойствам к ряду известных тканевых креатинкиназ (мономеров), в том числе и к использованной в качестве стандарта креатинкиназе миокарда телёнка (рис.2) [3].

Выход очищенного фермента составлял 30 - 35 мкг/г общего белка сухого яда, что соответствует степени очистки не менее 28570 раз. Увеличение удельной активности с 0,8 Е/мг белка (исходный материал) до 27600 Ед/мг белка (электрофоретически гомогенный фермент) говорит о том, что, возможно, низкая удельная активность креатинкиназы в исходном материале служила препятствием для достоверного её обнаружения, что, в свою очередь, не позволяло поставить задачу её выделения и изучения. При этом уровень удельной активности очищенного фермента таков, что его невысокое количественное представительство в яде не означает невозможности участия в формировании патофизиологических эффектов *in vivo*.

Оптимум pH для протекания прямой (синтез АТФ) реакции составляет 6,35. Оптимальная концентрация Mg^{2+} - 20 мМ ($MgCl_2$). Температурный оптимум - 25-30°C, при 47-50°C фермент полностью инактивируется. Протекание реакции в оптимальных условиях не приводит к ди- или олигомеризации фермента, что было установлено с помощью электрофореза очищенного препарата креатинкиназы в отсутствие $Ds - Na$ [3].

Сам факт наличия данного фермента в составе яда рептилий, известного своей способностью вызывать коагулопатию сложного генеза, диктует необходимость дальнейших исследований. Он позволяет впервые задуматься как о роли креатинкиназы в цепи событий, определяющих развитие клинической картины токсического поражения, так и о применении данного белка в роли инструмента для изучения взаимодействий в системе "тромбин - тромбиновый рецептор".

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда La Sapienza Biomedica, грант №4336178JQ (Рим - Варезе, Италия). Авторы благодарны В.С. Гельфанду (Gift of Life, Inc., Cranston, RI, США) за беседы, стимулировавшие развитие основной идеи работы. Особую признательность авторы выражают академику РАМН И.П.Ашмарину за ценные замечания, сделанные им при обсуждении результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Otero, R., Nunez, V., Jimenez, S.L., Fonnegra, R. Diaz, A. (2000) J. Ethnopharmacol., **71**, 505 - 511.
2. Nikai, T., Komori, Y., Sugihara, H. (2000) J. Pharm. Soc. Japan, **120**, 315-327.
3. Kouznetsov, D.A., D'Muhála, T. (2001) Progr. Mol. Pharmacol. Toxicol. Res., **16**, 661 - 672.
4. Деруан, С.К., Димиано, Б.П., Д'Андре, М.Р., Андраде - Гордон, П. (2002) БИОХИМИЯ, **67**, 66 - 76.
5. Mahajan, V.B., Pai, K.S., Lau, A. Cunningham, D.D. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 12062 - 12067.
6. Kouznetsov, D.A., Govorkov, A.V., Zavijalov, N.V., Sibileva, T.M., Richter, A.V., Drawczek, J.A. (1986) J. Biochem. Biophys. Methods, **13**, 53 - 56.
7. Bradford, M.M. (1976) Analyt. Biochem., **72**, 348 - 354.
8. Laemmli, U.L. (1970) Nature, **227**, 680 - 685.

Поступила 21.10.02.

ATP - GENERATING CREATINE KINASE: A NEW COMPOUND DISCOVERED
NEWLY IN *Viperidae* VENOM.

D.A.Kouznetsov¹, M.A.Orlova², A.G.Berdleva³, P.Z. Khasigov³.

¹ Semenov Institute of Chemical Physics, RAS, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Russia

³ Sechenov Moscow Medical Academy, Russia

This is a first report on the presence of creatine kinase, ATP- generating enzyme, in the venom of *Vipera xanthia* representing the *Viperidae* family of poisoning snakes. Kinetic and catalytic properties of 40 kD active monomer has been described with a following discussion on the issue of potential of the data listed for further research in either toxic coagulopathy molecular mode or enzyme application dealing with "thrombin - thrombin receptor" interaction studies. An enzyme purification procedure includes hydrophobic (phenyl-Sepharose), anion exchange (MonoQ) and affinity (ADP-Sepharose) chromatographic steps.

Key words: creatine kinase, coagulopathy, *Viperidae* venom.