

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. акад. М.М. ШЕМЯКИНА и Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

на правах рукописи

ОСИПОВ АЛЕКСЕЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ МАЛОПРЕДСТАВЛЕННЫХ В ЯДАХ КОБР
БЕЛКОВ
НОВЫХ СТРУКТУРНЫХ ТИПОВ**

02.00.10 - Биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук**

МОСКВА-2004

Работа выполнена в лаборатории рецепции нейропептидов Института
биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии Наук.

Научный руководитель

доктор химических наук
Уткин Юрий Николаевич

Официальные оппоненты

доктор химических наук, профессор
Румш Лев Давидович

кандидат химических наук
Сурин Александр Михайлович

Ведущая организация

Институт молекулярной генетики РАН

Защита диссертации состоится " 9 " июня 2004 г. в 10 час. на заседании
Специализированного совета Д 002.019.01 при Институте биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по адресу: 117997, ГСП-7, г.
Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической
химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН.

Автореферат разослан « 7 » мая 2004 г.

Учёный секретарь
Специализированного совета
доктор химических наук, профессор



Б.А. Несмеянов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Яды кобр представляют собой сложные многокомпонентные смеси белков, содержащихся в разных количествах. Наиболее обильно представлены в ядах кобр высокотоксичные α -нейротоксины, цитотоксины и фосфолипазы A2. К настоящему времени их структуры, в целом схожие внутри каждой группы, а также механизмы действия изучены достаточно подробно. Однако яд кобр содержит множество минорных компонентов иных структурных типов. Диапазон биологической активности этих соединений весьма обширен, а токсичность зачастую на порядки ниже по сравнению с нейро- и цитотоксинами. Многие из них обладают уникальным набором фармакологических эффектов и воздействуют на различные функциональные системы организма животных.

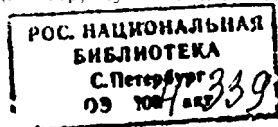
Так, в частности, в ядах кобр идентифицированы белки, влияющие на рост и дифференцировку нейронов (например, фактор роста нервов), систему комплемента сыворотки крови (фактор яда кобры), систему свёртывания крови (различные факторы с про- и антикоагулянтной активностью) на мускариновые ацетилхолиновые рецепторы, опиоидные рецепторы, на клеточную адгезию, репродуктивную систему и многое другое, а также разнообразные ферменты и ингибиторы ферментов. Благодаря своим уникальным свойствам такие соединения ядов всё более интенсивно применяются как биохимические инструменты для исследования биологических процессов, особенно в силу того, что их, как правило, низкая токсичность позволяет проводить опыты не только *in vitro*.

На основании вышеизложенного весьма актуальным является идентификация и выделение минорных белковых компонентов из яда кобр с последующим исследованием их биологической активности.

Цели и задачи исследования

Цель данной работы - идентификация и выделение из ядов кобр ранее неизвестных минорных белков, обладающих новыми структурными характеристиками.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи: оптимизировать условия фракционирования ядов четырёх видов кобр для выделения максимального числа новых компонентов; провести идентификацию известных и поиск новых соединений при помощи анализа полученных фракций методом MALDI масс-спектрометрии и установления полных или частичных аминокислотных последовательностей; усовершенствовать методику определения общей токсичности минорных компонентов ядов кобр; изучить биологическую активность выделенных полипептидов.



Научная новизна и практическая ценность работы

Предложенная эффективная схема идентификации минорных белков, основанная на комбинации различных видов высокоэффективной жидкостной хроматографии и MALDI масс-спектрометрии, позволила идентифицировать в ядах кобр ряд новых белков. Так, из яда кобры *Naja kaouthia* выделен гликозилированный цитотоксин - первый гликозилированный представитель семейства трёхпетельных токсинов, установлены его первичная структура, участок и тип гликозилирования. Установлено влияние гликозилирования на некоторые свойства цитотоксина. Впервые в ядах кобр обнаружен белок семейства CRISP (Cysteine-Rich Secretory Proteins - белки с высоким содержанием цистеина). Показано, что в ядах кобр *Naja kaouthia* и *Naja haje* белки этого семейства представлены в виде набора нескольких нетоксичных гомологов. В яде кобры *Naja oxiana* впервые найден гликопротеин, относящийся к репролизинам яда змей. Этот белок является первым репролизином, для которого обнаружено ингибирование системы комплемента сыворотки крови по классическому пути. Фактор яда кобры (CVF) впервые выделен из яда кобры *Naja melanohuca* в виде двух форм, различающихся по активности. Эти соединения могут быть использованы при исследовании механизма функционирования системы комплемента. Предложено тестирование общей токсичности минорных компонентов яда кобр на насекомых, что сокращает расход исследуемого вещества.

Апробация полученных данных и публикации.

По материалам диссертации опубликовано 10 работ. Результаты были доложены на XIII Международном конгрессе Международного общества по токсинологии (Париж, 2000), на V чтении, посвященном памяти академика Ю.А. Овчинникова (Москва-Пушино, 2000), на X и XI Международной конференции «Новые информационные технологии в медицине и экологии» (Ялта-Гурзуф, 2002; 2003) и на III съезде биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002).

Структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 139 страницах машинописного текста и состоит из введения, трёх глав основной части (обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части), выводов и списка цитируемой литературы, включающего 131 ссылку. Материал иллюстрирован 26 рисунками и 3 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Выбор рациональной схемы выделения минорных компонентов ядов.

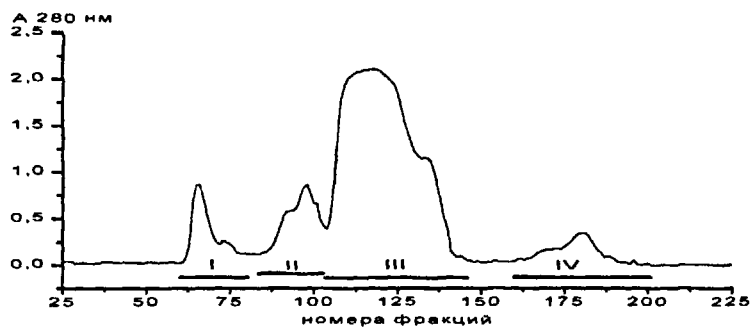
Белки новых структурных типов можно обнаружить в малоисследованных ядах или только среди минорных компонентов достаточно детально изученных ядов. Содержание различных компонентов в ядах кобр варьирует от долей процента до 10% (цитотоксины) и более (25% - α -кобротоксин) от массы сухого яда. Поэтому для выделения малопредставленных компонентов требуется многостадийная схема очистки, основанная на сочетании различных видов хроматографии с чувствительным методом идентификации белков.

Белки новых структурных типов с большой вероятностью должны отличаться по массе от уже известных. Основным способом первичной идентификации белка яда нами было выбрано определение молекулярной массы методом MALDI масс-спектропии (MALDI MC), высокая чувствительность которого позволяет анализировать минорные компоненты сложных белковых смесей. Наиболее полно охарактеризованные компоненты яда кобр перекрывают следующие диапазоны масс: 6.4-8.3 кДа - трёхпетельные токсины; 13-14 кДа - фосфолипазы A2. Молекулярные массы белковых компонентов новых структурных типов должны, очевидно, находиться за пределами этих диапазонов. Исходя из этой характеристики, в качестве первого этапа схемы разделения ядов кобр мы использовали гель-фильтрацию, позволяющую фракционировать белки по молекулярной массе.

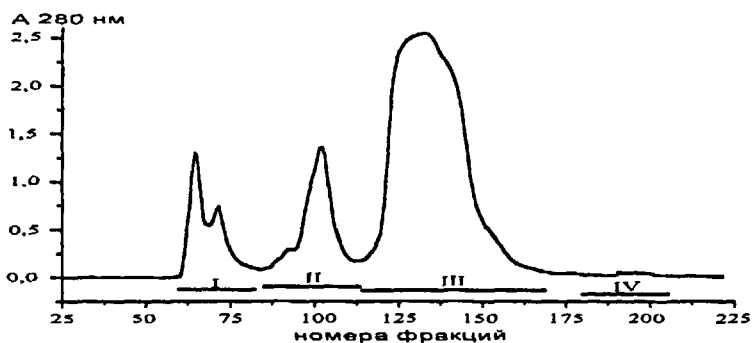
Наилучшие результаты при разделении яда кобр гель-фильтрацией были получены с использованием большой (4.5x150 см) колонки, допускающей нанесение до 1 г яда за этап, с сефадексом G-50 sf (этот носитель оказался оптимальным). В результате гель-фильтрации нам удалось разделить яды кобр *Naja kaouthia*, *N. haje* и *N. melanoleuca* (рис.1-а,б,в, соответственно) на следующие фракции: I - содержащую соединения с массами более 30 кДа; II - 9-30 кДа; III - содержащую основные токсические компоненты с массами 6-8 кДа и кислые фосфолипазы A2 и IV - содержащую низкомолекулярные вещества; основные компоненты этой фракции нами были идентифицированы как аденозин, гуанозин и инозин. Таким образом мы отделяли соединения с массами свыше 9 кДа от большинства компонентов яда, в первую очередь от высокотоксичных.

Фракцию II, содержащую главным образом соединения основного характера, разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на катионообменной колонке НЕМА ВЮ 1000 СМ. Полученные после этого фракции анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПАГЭ) и MALDI MC. Наряду с уже известными соединениями (фактор роста нервов, 13.1 кДа, фосфолипазы A2, 13.4-13.6 кДа, таикобрин, 12.1 кДа), в яде *N. kaouthia* были (рис. 2-а)

а)



б)



в)

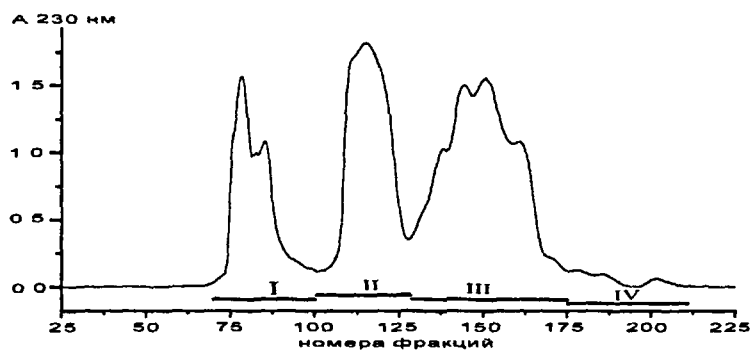
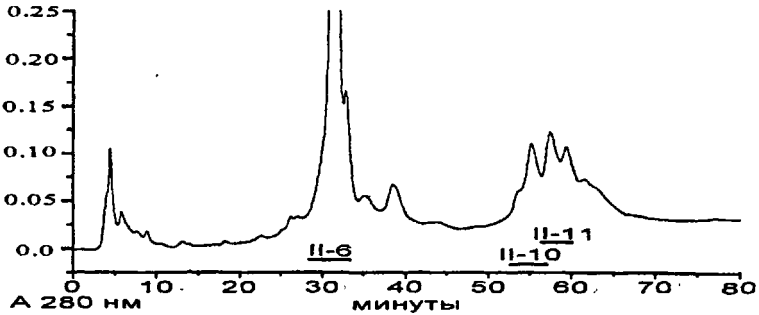
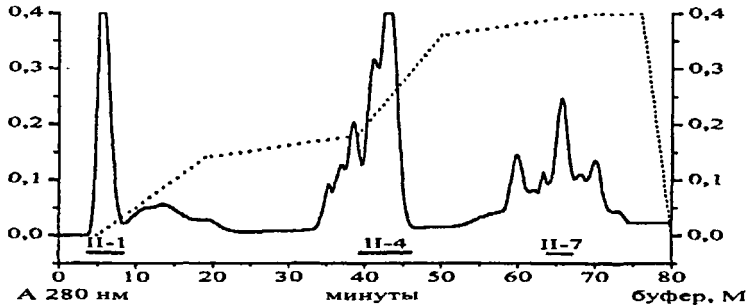


Рисунок 1. Разделение целого яда кобр *N. kaouthia* (а), *N. haje* (б) и *N. melanoleuca* (в) методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G50 sf в 0.1 М аммонийно-ацетатном буфере, pH 6.2. Арабские цифры – номера пробирок, римскими цифрами обозначены объединённые фракции.

а)



б)



в)

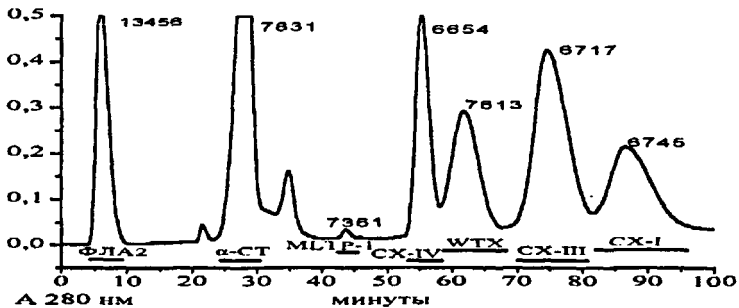


Рисунок 2. Катионообменная ВЭЖХ на колонке НЕМА 1000ВЮ СМ (8×250 мм, скорость потока 1.4 мл/мин): а) – фракции II яда *N. kaouthia* в линейном градиенте концентрации аммонийно-ацетатного буфера (рН 7.5) от 6 до 650 мМ за 60 мин; б) – фракции II яда *N. haje* в нелинейном градиенте концентрации буфера (точечная линия); в) – фракции III яда кобры *N. Kaouthia* в линейном градиенте концентрации буфера от 5 мМ до 1 М за 100 мин (обозначены компоненты, использованные для тестирования на насекомых. У вершин соответствующих хроматографических пиков обозначены молекулярные массы соединений в Дальтонах).

обнаружены ранее не описанные основные соединения с массами 25.0 кДа (фракция П-6), 23.6 и 23.7 кДа (фракция II-10) и 24.2, 24.3 и 9.3 кДа (фракция II-11), а в яде *N. haje* (рис. 2-б) - с массами 25.0 (фракция И-4), 23.6 (фракция И-7) и смесь соединений кислотного характера (фракция II-1), содержащая вещество с массой 25.0 кДа. Фракцию II-1 далее разделяли на анд

ионообменной колонке БИЕМА В10 1000 DEAE (рис. 3-а). Компоненты указанных фракций подвергали дальнейшей очистке методом обращённо-фазовой ВЭЖХ на колонке Vydac C18 (рис. 3-б,в) и определяли молекулярные массы белков с помощью MALDI MS. В результате из яда *N. kaouthia* выделены белки Nk25 (молекулярная масса 24953 Да, основной компонент фракции П-6), Nk24 (MALDI масс-спектр характеризуется наличием двух близких по интенсивности сигналов, соответствующим массам 24080 и 24179 Да; компонент фракции II-11, рис. 3-б), Nk23 (также два сигнала, 23621 и 23704 Да; компонент фракции II-10, рис. 3-в) и гликопротеин (GP, рис. 3-б) с массой ~9.3 кДа. Из яда *N. haje* выделены белки Nh24 (23590 Да, основной компонент фракции И-7), Nh25 (24960 Да, основной компонент фракции И-4) и кислый белок Nh25A (25006 Да, компонент фракции И-1, рис. 3-а).

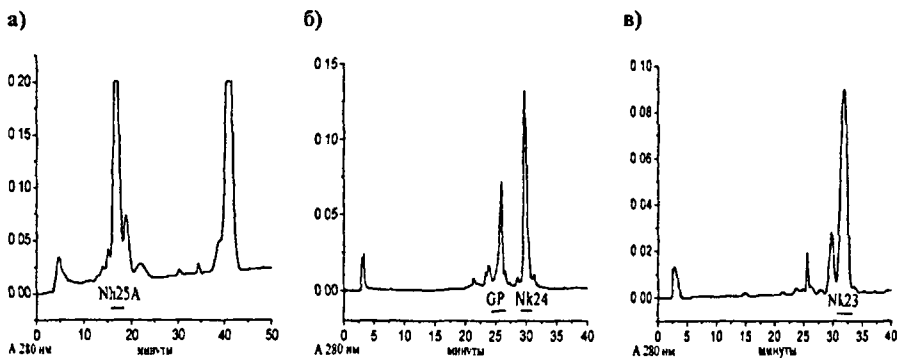


Рисунок 3. Разделение фракции II-1 яда кобры *N. haje* методом анионообменной ВЭЖХ на колонке НЕМА 1000В10 DEAE в линейном градиенте концентрации аммонийно-ацетатного буфера (pH 7.5) от 5 до 400 мМ за 40 мин (а), а также фракций II-11 (б) и II-10 (в) яда кобры *N. kaouthia* методом обращённо-фазовой ВЭЖХ на колонке Vydac C18.

С целью разработки условий тестирования общей токсичности компонентов яда кобр на насекомых мы выделили несколько известных компонентов ядов *N. kaouthia* (цитотоксины (CX) I, III и IV, длинный нейротоксин α -кобротоксин (α -СТ), слабый нейротоксин WTX, мускариновый токсин MTLPI, фосфолипазу A2 СМИ) и *N. oxiana* (цитотоксины I и II и короткий нейротоксин II). Для этого основные токсические фракции III (рис. 1) ядов разделяли на катионообменной колонке НЕМА В10 1000 CM (показано на

примере фракции III яда *N. kaouthia*, рис. 2-в), дальнейшую очистку полученных белков проводили при помощи обращённо-фазовой ВЭЖХ на колонке Vidas C18. Идентификацию компонентов осуществляли посредством MALDI MC и определения N-концевой аминокислотной последовательности.

Фракции I ядов *N. kaouthia* и *N. melanoleuca*, содержащие в основном кислые белки с молекулярными массами свыше 30 кДа, разделяли при помощи анионообменной ВЭЖХ на колонке HEMA BIO 1000 DEAE (рис. 4-а,б). Анализ полученных фракций методами ДСН-ПАГЭ и MALDI MC показал наличие в яде *N. melanoleuca* двух белков, близких по физико-химическим свойствам ранее охарактеризованному CVF из яда *N. kaouthia*.

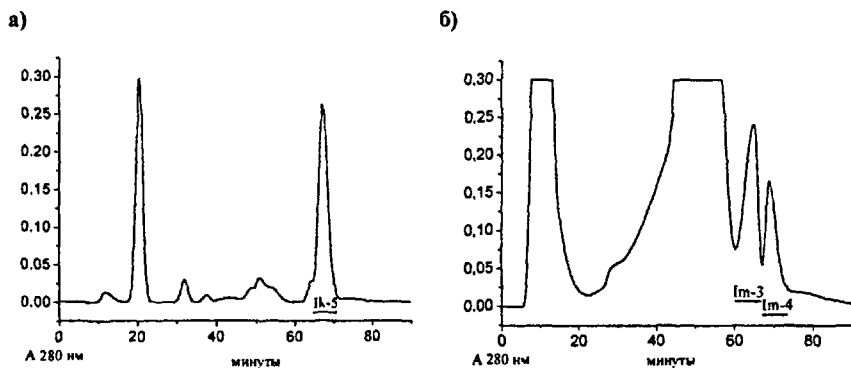


Рисунок 4. Разделение фракции I яда кобр *N. kaouthia* (а) и яда *N. melanoleuca* (б) анионообменной ВЭЖХ на колонке HEMA 1000BIO DEAE в линейном градиенте аммонийно-ацетатного буфера (pH 7.5) от 5 до 700 мМ за 70 мин.

Для выделения нового белка с антикомплементарной активностью из яда кобры *N. oxiana* была применена другая схема, выбор которой был продиктован необходимостью повторения стадий, описанных ранее другими авторами [Козлов и соавт., 1989]. Согласно такому подходу, для получения фракции CFB-III, содержащей белки, ингибирующие систему комплемента сыворотки крови, яд фракционировали на колонках с DEAE-Сефарозой CL-6B и затем CM-Сефарозой CL-6B. Далее эту фракцию мы разделяли методом обращённо-фазовой ВЭЖХ на колонке Vidas C18 (рис. 5). В итоге был выделен новый гликопротеин (фракция V) – ингибитор системы комплемента. Поскольку мы обнаруживали антикомплементарное действие по ингибированию лизиса эритроцитов под действием комплемента сыворотки, то для удаления следов цитотоксина фракция V подвергалась рехроматографии в тех же условиях.

Наличие углеводной части в составе всех белков определяли по окрашиванию полосы белка в геле реактивом Шиффа.

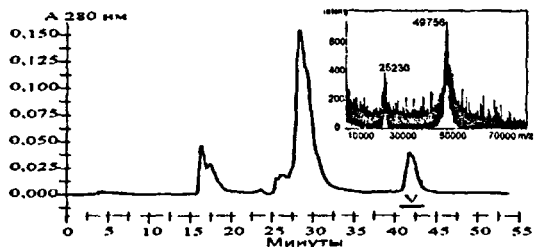


Рисунок 5. Разделение фракции CFB-III яда кобры *N. oxiana* методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Vydac C18. Вставка: MALDI масс-спектр оксиагина (фракция V).

2. Использование насекомых для определения общей токсичности соединений.

Поскольку яд кобры высокотоксичен, можно ожидать, что и многие выделенные соединения окажутся в большей или меньшей степени токсичными. Проведение испытания на общую токсичность на млекопитающих требует наличия достаточно большого количества исследуемого вещества. Кроме того, неизбежно возникают этические вопросы о правомочности использования подобной модели. Руководствуясь этими соображениями, мы проверили возможность проведения испытаний общей токсичности на насекомых. В литературе имеются отрывочные данные по токсичности отдельных компонентов ядов кобр на насекомых, однако систематического исследования не проводилось.

С этой целью мы выделили ряд известных компонентов ядов кобр *N. kaouthia* и *N. oxiana* разных структурных типов, для которых имеются данные по общей токсичности, полученные в опытах на мышах. Эти соединения, а также целые яды кобр, были протестированы на тараканах *Gromphadorhina portenlosa*. Это - крайне неприхотливые насекомые, довольно крупные (5-9 г), и при том умеренно подвижные, что облегчает наблюдение за их состоянием и поведением.

Полученные результаты (в сравнении с известными данными для мышей) приведены в таблице 1. Видно, что целые яды и цитотоксины имеют LD₅₀ для тараканов на порядок выше, чем для мышей (цитотоксин I из яда *N. oxiana* для тараканов оказался наименее токсичным). Степень токсичности фосфолипазы для тараканов и мышей близка.

Как короткий, так и длинный α -нейротоксины яда кобр не проявили токсичности в отношении тараканов в дозах, превышающих LD₅₀ для мышей более чем на 3 порядка. Это можно объяснить тем, что при выбранном нами способе введения нейротоксины не достигают своих мишеней в ЦНС таракана, а легко доступная для них нервно-мышечная передача не является у насекомых холинэргической. MTLP-1, представитель мускариновых токсинов, для тараканов тоже оказался нетоксичным. Практически нетоксичный для мышей

WTX оказался нетоксичным и для тараканов, причём в концентрации почти на 2 порядка выше.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что насекомых можно использовать для тестирования токсичности некоторых компонентов ядов кобр, в частности, цитотоксинов и фосфолипаз A2.

Таблица 1.

Токсичность ядов кобр и их компонентов для тараканов и мышей.

Соединение	Кобра	LD ₅₀ *			
		Тараканы		Мыши, внутривенно	
		нмоль/г	мкг/г	нмоль/г	мкг/г
Цельный яд	<i>N.oxiana</i>	-	16	-	0.96
	<i>N.kaouthia</i>	-	7	-	0.4
Цитотоксин I	<i>N.oxiana</i>	>5	>35	0.16	1.1
Цитотоксин II	<i>N.oxiana</i>	1.5	10.5	0.25	1.75
Цитотоксин I	<i>N.kaouthia</i>	2	13.4	0.11	0.75
Цитотоксин III	<i>N.kaouthia</i>	2	13.4	0.18	1.2
		5.8**	38.8**		
Цитотоксин IV	<i>N.kaouthia</i>	2.3	15.4	0.22	1.48***
ФЛА2 СМII	<i>N.kaouthia</i>	2.85	38.5	7.4	10±3
Нейротоксин II	<i>N.oxiana</i>	>15	>100	0.02	0.13
α-кобротоксин	<i>N.kaouthia</i>	>15	>117	0.01	0.1
WTX	<i>N.kaouthia</i>	>15	>114	>0.27	>2
MTLP-1	<i>N.kaouthia</i>	>16	>117	-	-

LD₅₀* - доза вещества, вызывающая гибель половины подопытных животных

** данные для сверчков

*** внутрибрюшинно.

Нами была проверена общая токсичность некоторых белков семейства CRISP (см. раздел 4), цитотоксина III, GP и его дегликозилированной формы (см. раздел 3) на сверчках *Grillus assimilis*. Их вес составляет 0.3-0.5 г, соответственно, снижается расход вещества. Сходство результатов, полученных во время испытаний на тараканах и сверчках, говорит о возможности использования более мелких насекомых, например, сверчков, в случае ограниченного количества испытываемого вещества

3. Гликозилированный цитотоксин из яда кобры *N. kaouthia*

После катионообменной ВЭЖХ фракции II яда *N. kaouthia* ДСН-ПАГЭ показал во фракции II-11 и, в намного меньшей степени, в II-10 присутствие гликопротеина (GP) с молекулярной массой около 9 кДа. Полученная после очистки на обращенной фазе (рис. 3-6) фракция GP дала на MALDI-масс-спектре группу пиков в диапазоне 8900-9400 Да.

Суммарный выход GP из фракций II-11 и II-10 составил 0.17%.

GP, после восстановления дитиоэритритом, был подвергнут пиридилэтилированию с последующим прямым автоматическим определением N-концевой аминокислотной последовательности. Установленная последовательность из 24-х аминокислотных остатков полностью совпала с N-концевой последовательностью цитотоксина Ш (CX3), содержащегося в яде этой же кобры в значительно большем количестве (выход 5.1%). Для проверки идентичности полных последовательностей и локализации участка гликозилирования, пиридилэтилированный GP был расщеплен трипсином, и, после разделения методом обращённо-фазовой ВЭЖХ, полученные пептиды анализировали методом MALDI-МС (таблица 2). Проведённый анализ обнаружил пептид, имеющий в спектре группу пиков в диапазоне масс 2600-3000 Да (рис. 6-а). Деграцией по Эдману установлена его последовательность MFMVSXK, где X - неизвестный остаток. Данная последовательность соответствует фрагменту Met24-Lys30 цитотоксина CX3, с допущением, что X - это Asn29, содержащий углеводную часть. В следующем эксперименте анализировали методом MALDI-МС смесь продуктов триптического гидролиза пиридилэтилированного GP без их предварительного разделения. Полученные данные показывают присутствие всех триптических фрагментов (таблица 2), которые можно получить при гидролизе CX3 (за исключением массы 856,5 Да, соответствующей фрагменту 24-30 CX3). Не обнаруженные фрагменты (1-2, 3-5, 31-35, 59-60) с массами менее 600 Да входят в состав более крупных (1-5, 31-36, 51-60). Дегликозилирование GP с помощью протеин-N-гликозидазы F (PNG-F) привело к полипептиду с массой 6710 (по данным MALDI-МС), что практически совпадает с массой CX3 (6708 Да), тем более, что превращение гликозилированного остатка аспарагина в остаток аспарагиновой кислоты под действием PNG-F увеличивает массу на 1 Да. В спектре дегликозилированного GP наблюдался также сигнал с m/z 6724, что может быть объяснено частичным окислением одного из остатков метионина. MALDI-МС триптического гидролизата дегликозилированного GP показала присутствие всех расчётных триптических фрагментов CX3, в том числе сигналов m/z 857 и 873 Да (рис. 6-б), соответствующих фрагменту 24-30 CX3 (+1 Да) и его форме с одним окисленным остатком метионина (+ ещё 16 Да). Таким образом, данные деградации пептида по Эдману и MALDI-МС показывают, что аминокислотные последовательности GP и CX3 совпадают.

Углеводный анализ GP обнаружил присутствие в молекуле маннозы, галактозы, N-ацетилглюкозамина, фукозы и N-ацетилпептраминовой кислоты, позволяя определить углеводную часть как N-гликан сложного типа. Разница в 145-147 Да между сигналами в масс-спектре для интактной молекулы GP и в 146 Да в спектре пептида Met24-Lys30 (рис. 6-

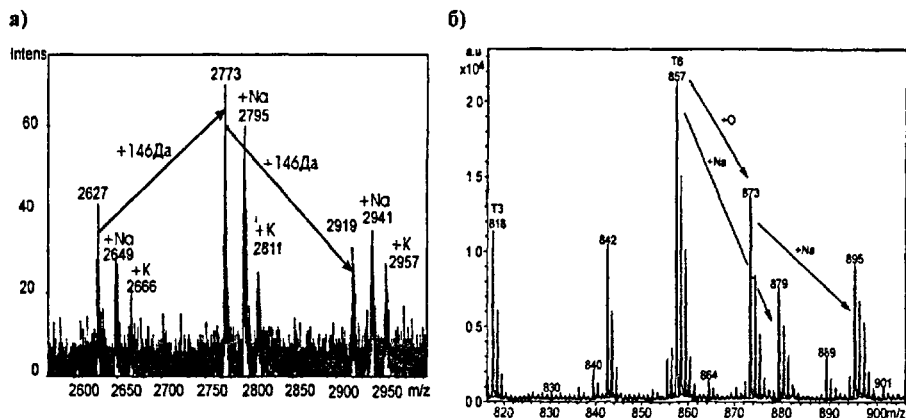


Рисунок 6. MALDI масс-спектр триптического фрагмента GP MFMVSXK (а); фрагмент спектра триптического гидролизата дегликозилированного GP (б).

Таблица 2
Молекулярные массы триптических пептидов пиридилэтилированных GP и CX3

Фрагмент пептидной цепи CX3	Масса, рассчитанная исходя из последовательности CX3	Определённая масса			
		для пептида, выделенного посредством ВЭЖХ	для триптического гидролизата без разделения		
			после короткой инкубации GP с трипсином	после длительной инкубации GP с трипсином	после инкубации CX3 с трипсином
1-2	260.2	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
3-5	469.2	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
6-12	817.5	817.4	816.9	817.4	817,6
13-18	681.3	681.3	680.9	681.2	681,4
19-23	745.4	н.о.	744.8	745.2	745,5
24-30	856.4	2627-3017 ^{а)}	857.3 ^{б)}	н.о.	856,5
31-35	543.3	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
37-44	1016.5	1016.5	1015.9	1016.3	1016,6
45-50	673.4	н.о.	672.9	673.3	673,5
51-58	1183.5	1183.5	н.о.	1183.3	1183,7
59-60	341.1	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
1-5	710.4	н.о.	709.8	710.3	710,5
31-36	699.5	н.о.	698.9	699.3	699,5
51-60	1505.6	н.о.	1504.7	1505.5	1505,8
6-23	2206.2	н.о.	2205.7	н.о.	н.о.
45-60	2160.0	н.о.	2159.7	2160.7	2160,2

^{а)} Гликозилированный пептид (см. рис. 6-а).

^{б)} Масса, определённая в триптическом гидролизате дегликозилированного GP (см. рис. 6-б). н.о. – не обнаружено.

б) позволяет предположить, что гетерогенность гликозилирования может быть обусловлена различным содержанием терминальных остатков дезоксигексозы (фукозы) или частичным её отщеплением в условиях хроматографии на обращенной фазе или снятия MALDI масс-

спектров. Обработка UP смесью галактозидаз и фукозидаз привела, по данным MALDI-МС, к удалению по меньшей мере одного остатка дезоксигексозы. Это значит, что фукоза является одним из терминальных остатков Сахаров углеводной части молекулы GP.

Итак, GP представляет собой CX3, содержащий углевод на остатке Asn29, расположенном в «консенсусном» участке N-гликозилирования белков Asn29-Lys30-Ser31 на верхушке центральной петли молекулы (рис. 7). Этот гликопротеин является пока единственной существующей моделью для изучения влияния гликозилирования токсина трёхпетельного типа на его свойства.

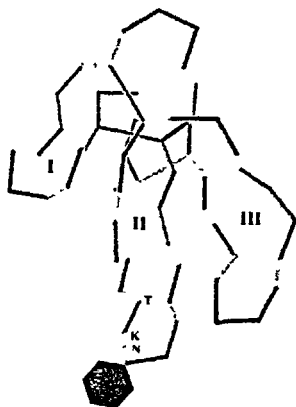


Рисунок 7. Схематическое изображение молекулы цитотоксина 3 яда *N. kaouthia* с углеводным заместителем при остатке аспарагина-29

В первую очередь было проверено влияние гликана на токсические свойства цитотоксина. Цитотоксичность GP была определена на клеточной линии HL60 (промиелоцитарные лейкемические клетки человека), а общая токсичность – на насекомых (сверчках *Gryllus assimilis*). Концентрации, при которых погибает 50% клеток, равны 21 цМ и 0.16 цМ для GP и CX3, соответственно, т.е. гликозилирование приводит более чем к 100-кратному понижению токсичности в отношении этих клеток. Стоит заметить, что дегликозилирование GP с помощью PNG-F полностью возвращает соединению цитотоксичность CX3, несмотря на превращение нейтрального остатка аспарагина в отрицательно заряженный остаток аспарагиновой кислоты. Разница в значениях LD50 для GP и CX3, установленных в опытах на сверчках, оказалась не столь разительна (13.4 и 5.8 нмоль/г, соответственно).

О влиянии гликозилирования на физические свойства цитотоксина можно судить по хроматографическому поведению и спектрам кругового дихроизма (КД) соответствующих белков. Обращенно-фазовая ВЭЖХ показала, что углевод практически не влияет на общую гидрофобность белка (данные не приведены), однако при проведении катионообменной ВЭЖХ чётко видно следующее (рис. 8): дегликозилированный GP оказывается более кислым,

чем CX3 (это объясняется заменой **Asn29**→**Asp29** под действием PNG-II, а сам GP является более кислым, чем и его дегликозилированная форма, и CX3 (что может быть объяснено присутствием остатка(ов) N-ацетилнейраминовой кислоты в углеводной части молекулы).

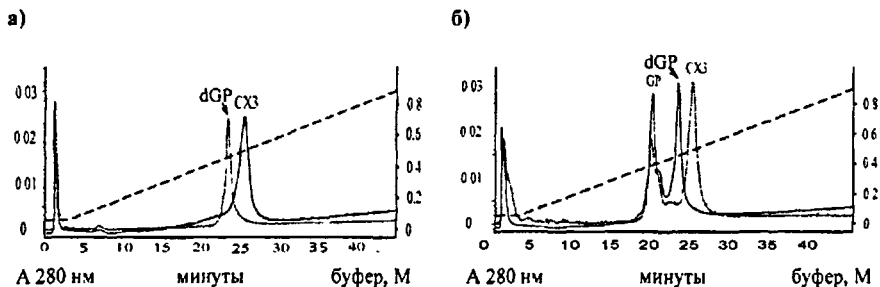


Рисунок 8. Аналитическая катионообменная ВЭЖХ GP, его дегликозилированной формы (dGP, указано стрелкой) и CX3 на колонке НЕМА 1000ВІО СМ (30×3 мм). пунктирная линия - концентрация аммонийно-ацетатного буфера: а) - раздельная инъекция CX3 (сплошная линия) и дегликозилированной формы (точечная линия); б) - совместные инъекции GP с дегликозилированной формой (сплошная линия) и GP с CX3 (точечная линия).

Нами были получены спектры КД для GP, его дегликозилированной формы и CX3 (рис. 9). Существенное сходство этих спектров, типичных в целом для трёхпетельных токсинов, указывает на незначительное влияние гликозилирования токсина на его конформацию.

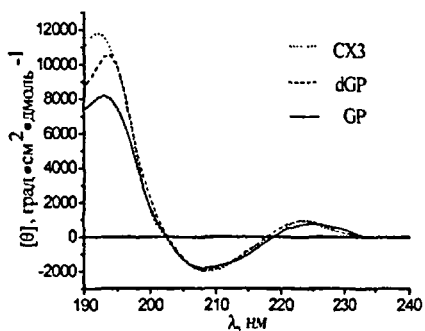


Рисунок 9. Спектры кругового дихроизма GP, его дегликозилированной формы (dGP) и цитотоксина CX3 яда *N. kaouthia*

В связи с обнаружением GP встаёт вопрос о биологическом смысле наличия гликана в структуре цитотоксина. Имеющиеся данные [Dubovskii et al. 2001] свидетельствуют о том, что при взаимодействии с фосфолипидной мембраной центральная петля цитотоксинов погружена в липидный бислой. Гликозилирование Asn29, расположенного на верхушке

центральной петли, вводит объёмный заместитель, что должно существенно затруднять такое взаимодействие. Поскольку гликозилирование приводит к более чем 100-кратному снижению цитотоксичности, можно предположить, что это является защитным механизмом для самих секреторных клеток (подобный механизм самозащиты используется в случае никотинового ацетилхолинового рецептора кобры: гликозилирование делает его нечувствительным к α-нейротоксинам); дегликозилирование может происходить потом в другом отделе ядовитой железы. Однако из 90 известных аминокислотных последовательностей цитотоксинов элапид только у 13 (все - из ядов азиатских кобр) имеется «консенсусный» участок для N-гликозилирования (рис. 10).

1	10	20	30	40	50	60
LKCNKLIPLA	YKTCSPAGKNL	CYKMFVSNK	TVPVKRGCID	ACPKNSLLVK	YVCCNTDRCN	CX3Nk(P01446)
LKCNKLIPLA	YKTCSPAGKNL	CYKMFVSNK	TVPVKRGCID	VCPKNSLLVK	YVCCNTDRCN	CX2Nk(P01445)
LKCNKLIPLA	YKTCSPAGKNL	CYKMYVSNK	TVPVKRGCID	VCPKNSLVK	YECCNTDRCN	CX1Nn(P01447)
LKCNKLIPLA	YKTCSPAGKNL	CYKMFVSNK	TVPVKRGCID	VCPKNSLVK	YVCCNTDRCN	CX3Nn(P24780)
LKCNKLVPFL	YKTCSPAGKNL	CYKMFVSNL	TVPVKRGCID	VCPKNSALVK	YVCCNTDRCN	CX2Na(P01442)
RKCNKLVPFL	YKTCSPAGKNL	CYKMFVSNL	TVPVKRGCID	VCPKNSALVK	YVCCNTDRCN	CX4Na(P01443)
LKCNKLVPFL	YKTCSPAGKNL	CYKMFVSNL	TVPVKRGCID	VCPKNSALVK	YVCCNTDRCN	tr073857
LKCNKLVPFL	YKTCSPAGKNL	CYKMFVSNK	TVPVKRGCID	VCPKNSALVK	YVCCNTDRCN	tr073858
LKCNKLVPFL	YKTCSPAGKNL	CYKMFVSNK	TVPVKRGCID	VCPKNSALVK	YVCCNTDRCN	tr073859
LKCNKLVPFL	YKTCSPAGKNL	CYKMFVSNL	TVPVKRGCID	VCPKNSALVK	YVCCNTDRCN	trnewAAC27691
LKCNKLVPFL	YKTCSPAGKNL	CYKMFVSNL	TVPVKRGCID	VCPKNSALVK	YVCCNTDRCN	trnewAAC27692
RKCNKLVPFL	YKTCSPAGKNL	CYKMFVSNL	TVPVKRGCID	VCPKSSLLVK	YVCCNTDRCN	trQ9W6W9
LKCNKLIPLA	YKTCSPAGKNL	CYKMYVSNK	TVPVKRGCID	VCPKNSLLVT	YECCNTDRCNL	trQ9PSN2

Рисунок 10. Аминокислотные последовательности цитотоксинов змей, содержащие консенсусный участок N-гликозилирования Asn29-X30-Thr31 (жирный шрифт). CX2Nk и CX3Nk – цитотоксины 2 и 3 *N. kaouthia*; CX1Nn и CX3Nn – цитотоксины 1 и 2 *N. naja*; CX2Na и CX4Na – цитотоксины 2 и 4 *N. atra*; tr07857, tr07858 и tr07859 – кардиотоксины 5A, 6 и 7 *N. sputatrix*; trnewAAC27691 и trnewAAC27692 – кардиотоксины 5a и 5b *N. sputatrix*; trQ9W6W9 – кардиотоксин 4N *N. atra*; trO9PSN2 – цитотоксин-подобный основной белок *N. naja*.

Из токсинов трёхпетельного типа консенсусные участки N-гликозилирования в аминокислотной последовательности имеют также отдельные α-нейротоксины - как короткие, так и длинные, - однако ни один из них не включает Asn-29.

Другое возможное объяснение наличия GP - гликан необходим для стабилизации какого-то другого компонента яда (сами цитотоксины - легко растворимые и очень устойчивые белки) при его кооперативном взаимодействии с GP. Также не исключено, что для GP имеется пока не идентифицированная мишень.

4. Белки семейства CRISP в ядах кобр *TV. kaouthia* и *N. haje*

Для проведения структурной характеристики выделенные из ядов кобр *N. kaouthia* и *N. haje* белки с молекулярными массами в диапазоне 23-25 кДа после восстановления дитиоэритритом подвергали пиридилэтилированию с последующим анализом производных

методом MALDI MS и определением N-концевой аминокислотной последовательности. Разница в молекулярных массах между пиридилэтилированными производными и интактными белками составила 1600-1650 Да для всех соединений, что соответствует включению 15,5-16 моль остатков винилпиридина на 1 моль белка и показывает содержание остатков цистеина в полипептидной цепи. Основываясь на данных по молекулярной массе и содержанию остатков цистеина в молекуле, можно предположить, что выделенные нами белки принадлежат к семейству белков CRISP (cysteine-rich secretory proteins - секреторные белки с высоким содержанием остатков цистеина), для которых характерно наличие в аминокислотной последовательности 16 остатков цистеина, образующих 8 дисульфидных связей.

Для определения аминокислотной последовательности пиридилэтилированное производное белка Nk25 подвергали триптическому гидролизу с последующим разделением и анализом образующихся пептидов методами MALDI масс-спектрометрии и деградации по Эдману. Установленные аминокислотные последовательности включают 101 остаток, сумма их молекулярных масс соответствует 47% молекулярной массы белка. Сравнение установленных фрагментов последовательности Nk25 (рис. 11-а) с известными первичными структурами белков убедительно указывает на его принадлежность к белкам семейства CRISP, ранее в ядах кобр не выявлявшихся. Последовательности фрагментов Nk25 полностью повторяются в последовательности открытого позже CRVP-1 (Q7T1K6) из яда кобры *N. atra*, а из белков млекопитающих Nk25 имеет наибольшее сходство (42% идентичных остатков) с последовательностью CRISP-белка TPX1 (Q8HX97) из семенников лошади.

Результат сравнения N-концевых аминокислотных последовательностей выделенных нами и известных белков семейства CRISP представлен на рис. 11-б. N-концевая аминокислотная последовательность Nk25 совпадает с CRVP-1 из яда *N. atra* (на 100%) офанином (Q7ZT98) из яда королевской кобры (на 96%), Белок Nk24 гомологичны белку CRVP-2 (Q7ZZN8) из яда *N. atra* (95% идентичных остатков), букарину (P81993) из яда крайты *Bungarus candidus* (94%) и латисемину (Q8JI38) из яда морской змеи *Laticauda semifasciata* (91%). Установленная последовательность белка Nk23 совпадает с таковой букарина, CRVP-2 и латисемина, имея расхождение с последней лишь в позиции 11. Белок Nh25 гомологичен Nk25 и CRVP-1 (96% идентичных остатков) и офанину (92%), так же, как и единственный выделенный из ядов белок CRISP кислого характера (Nh25A) - 82% и 79%, соответственно. N-концевая последовательность Nh24 наиболее близка таковой букарина (71% совпадений). Отчетливо видно, что все белки семейства CRISP в N-концевой области гомологичны друг другу}.

a)

10	20	30	40	50	60	70	
NVDFNSESTR	RKKQKEIVD	LHNSL	VS PTASNMLKME	WYPEAASNAE	KWANTCSLNH	SPDNLR	Nk25
DPAFSALLTT	QTCVQREIVN	KHNELPKSVS	PPASNMLKME	WSREATANAQ	KWANKCTLEH	SSADDRKTST	TPX1
NVDFNSESTR	RKKQKEIVD	LHNSLRRRV	PTASNMLKME	WYPEAASNAE	KWANTCSLNH	SPDNLRVLEG	IQCGE CRVP1
TADFASES-S	NKKYQKEIVD	KHNALRRSVK	PTARNMLQMK	WNSRAACNAK	KWANRCTFAH	SPPNKRTVGK	LRCGE Pseud
80	90	100	110	120	130	140	150
TWTEII HLWHEDEK							Nk25
NIYMS SDPTFWSCAI	QSWYDESIDF	TYGVGPKSAG	SVVGHYTQAV	WYSSYRVGCG	IAYCPNQESL	KYYVVCQYCP	TPX1
SIYMS SNARTWTEII	HLWHEDEKNE	VYGVGANPPG	SVTGHYTQIV	WYQTYRAGCA	VSYCPSSAWS	-YFYVCQYCP	CRVP1
NIYMS SQPFWSGVV	QAWYDEIKNF	VYGIKAKPPG	SVIGHYTQVV	WYKSYLIGCA	SAKC-SS-S-	KYLYVCQYCP	Pseud
160	170	180	190	200	210	220	
TAT FYK				QS SCQDDWIKSN CPASCF			Nk25
VGNNVNGKNT	FYQGGTPCAS	CPGNCNDGLC	TNSCEYEDLL	SNCDSLKKA	GCEHELLKEK	CKATCRCEKN	IY TPX1
SGNFQGTAT	FYKLGPPCGD	CPSACDNGLC	TNPFCTIYNKL	TNCDLLKQS	SCQDDWIKSN	CPASCFCRNK	II CRVP1
AGNIRGSIAT	FYKSGPPCAD	CPSACVKNLC	TNPFCKRNDF	SNCKSLAKS	KQTEWIKKK	CPASCFCHNK	II *Pseud

б)

Белок	Поз.	Аминокислотная последовательность
25Nk	1-25	NVDFNSEESTRRK - - KKKQKEIVDLHNSL
24Nk**	1-23 (V)	DFASESXNKRENQ - - Q - - IVDKHNAL
23Nk	1-13	ESSNKRENQ - KQ - - IV
Nh24	1-14	DSSNLPNQN - KQ - - IVD
Nh25	1-25	NVDFNSEESTRRK - - KKKQKEIVDLXNSL
Nh25A	1-29	DVDFNSEESTRRK - N - KQKEIVDLHNSLKKTV
CRVP-1	19-47	NVDFNSEESTRRK - - KKKQKEIVDLHNSLRRRV
CRVP-2	20-48	TVDFASESSNKRENQ - KQ - - IVDKHNALLRRSV
Офанин	1-29	NVDFNSEESTRR - - QKKQKEIVDLHNSLRRSV
Букарин	1-25	ESSNKRENQ - KQ - - IVDKHNALLRRSV
Латисемин	20-48	TVDFASESSNKRENQ - K - - EIVDKHNALLRRSV
TPX1	2-31	DPAFSALLTT - - QTQV - QREIVNKHNELRKSV

Рисунок 11. Сравнение аминокислотных последовательностей выделенных нами белков с полными последовательностями (а) и N-концевыми участками (б) известных белков, относящихся к семейству CRISP. Жирным шрифтом выделены остатки, занимающие одинаковые положения в Nk25 и одном из белков CRISP (а) или совпадающие не менее чем в половине приведенных последовательностей (б).

*Pseud - псевдехетоксин.

**В Nk24 определены две последовательности, у одной из которых отсутствует N-концевой остаток валина.

Спектры флюоресценции как основного (Nh25), так и кислого (Nh25A) белка имеют $\lambda_{\max}$ 348.8 нм и $\Delta\lambda_{1/2}$ 67.5 нм и $\lambda_{\max}$ 344 нм и $\Delta\lambda_{1/2}$ 56.4 нм, соответственно. Эти величины указывают на экспонированность в растворитель всех имеющихся остатков триптофана в обоих полипептидах.

Поскольку имеется заметное сходство (рис. 11-а) фрагментов последовательностей белка Nk25 и псевдехетоксина (Q8AVA4) из яда австралийской змеи рода ехидн *Pseudechis australis*, являющегося блокатором кальциевых каналов, управляемых циклическими нуклеотидами [Brown et al. 1999], мы проверили действие белка Nk25 на обонятельные

каналы, активируемые ц-АМФ и ц-ГТФ (совместно с проф. С. Фрингсом. Университет Гейдельберга, Германия). При использовании Nk25 в концентрации 1 μM , наблюдали лишь очень слабое (не более 5%) уменьшение тока. Известно, что псевдехетоксин в этой концентрации полностью подавляет функцию таких каналов. Было проверено также влияние Nk25 на каналы фоторецепторных клеток быка, однако эффект не был более выраженным.

Учитывая низкое содержание изучаемых соединений в яде (выход Nk25 и Nh25 - не более 0.5% от массы сухого яда, остальных - существенно ниже), испытание на токсичность проводили выборочно для наиболее представленных белков. Белок Nk24 испытывался на тараканах *Gromphadorhina portentosa*, белок Nk25 - на тараканах и на самцах мышей линии NMRI, а все CRISP из яда *N. haje* - на сверчках *Gryllus assimilis*. В дозах до 5 нмоль/г не было отмечено гибели ни одного животного. Принимая во внимание близость физико-химических свойств этих соединений, можно предполагать, что вся группа белков CRISP ядов кобр *N. haje* и *N. kaouthia* практически нетоксична как для мышей, так и для насекомых.

Обнаружение такого числа нетоксичных CRISP-белков в яде обоих видов кобр и их консервативность, хорошо прослеживающаяся теперь во всех семействах змей, секретирующих нейротоксические яды, неизбежно ставят вопрос об их роли в повреждающем действии ядов. Однако следует отметить, что данные о биологических эффектах CRISP малочисленны, разрозненны и противоречивы.

Известно, что белки CRISP из репродуктивного тракта самцов млекопитающих совершенно необходимы для процессов созревания сперматозоидов и слияния гамет. Но, к примеру, ятя CRISP из слюны млекопитающих функция не известна. Псевдехетоксин является блокатором каналов, управляемых циклическими нуклеотидами, а белок Nk25 на них практически не действует, несмотря на заметное сходство фрагментов последовательностей. Офанин, как и некоторые другие CRISP, умеренно ингибирует сокращение мышц хвостовой артерии крысы, вызываемое высокой концентрацией ионов калия, а CRISP-белки из яда *N. atra* не ингибируют такое сокращение мышц. Для них биологическая активность вообще не установлена. Мы надеемся, что обнаружение в общей сложности шести новых членов этого семейства и их дальнейшее исследование позволит установить настоящий биологический смысл их присутствия в ядах змей.

5. Репролизин из яда кобры *N. oxiana*

Из нескольких фракций, полученных при разделении фракции CFB-III обращённо-фазовой ВЭЖХ, только фракция V (рис. 5) обладала выраженной антикомплементарной активностью (основной белок фракции CFB-III, цитотоксин II, имел по сравнению с ней

удельную активность на 3 порядка ниже). Выход целевого белка из фракции V. названного оксиагином, составил 1.3% от массы сухого яда.

Анализ оксиагина методом ДСН-ПАГЭ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях показал, что он содержит единственную гликозилированную полипептидную цепь с молекулярной массой около 50 кДа. MALDI-МС дала величину 49.7 кДа (рис. 5, вставка). Анализ углеводного состава показал присутствие галактозы, N-ацетилглюкозамина, фукозы и маннозы в молярном соотношении 2:2:1:5, характеризующим углеводную часть молекулы как N-гликан сложного типа. Видимо, гликан совершенно необходим очищенному белку для поддержания его в растворимом состоянии, поскольку при добавлении PNG-F в отсутствие детергента белок полностью и довольно быстро выпадает в осадок вне зависимости от pH раствора.

N-концевые последовательности пиридилэтилированного белка и некоторых фрагментов его расщепления бромцианом были определены деградацией по Эдману. Сравнение установленных последовательностей с таковыми известных белков показало, что наш белок имеет выраженное сходство с репролизинами из ядов змей, которых на основании данных по первичной структуре относят к металлопротеиназам (рис. 12). N-концевая последовательность оксиагина соответствует N-концевой последовательности металлопротеазного домена репролизина (особенно велико сходство с мокархагином из яда кобры *N. mossambica*). Один из бромциановых фрагментов оказался гомологичен части C-концевой области богатых цистеином доменов мокархагина и каоутиагина из яда *N. kaouthia*. Эти два белка имеют металлопротеиназный, дизинтегрин-подобный и богатый цистеином домены и, таким образом, относятся к репролизинам класса Р-Ш [Bjarnason and Fox 1995]. Длина полипептидной цепи оксиагина сопоставима с длиной полипептидных цепей зрелого мокархагина и каоутиагина, а гомология с этими белками как в N-, так и в C-концевой области позволяет рассматривать его как репролизин класса Р-Ш. Однако для двух бромциановых фрагментов оксиагина не удалось установить гомологичные участки ни в одной из известных последовательностей металлопротеиназ. Вероятно, оксиагин является новым структурным аналогом репролизина класса Р-Ш.

Для ряда репролизина (например, TRO42138, TrQ9PT47-50) протеолитическая активность не установлена. С использованием некоторых обычных субстратов протеиназ (фибриноген, β -казеин, гемоглобин, миоглобин, ферритин, химотрипсинаген и мелиттин) для оксиагина также не удалось обнаружить протеолитическую активность.

Оксиагин обладал способностью эффективно ингибировать активацию системы комплемента сыворотки крови по классическому пути. Для установления механизма антикомплемментарного действия оксиагина мы (в совместной работе с к.х.н. Б.Б. Шойбоновым) использовали метод, основанный на лизисе эритроцитов барана сывороткой

Белок	Фрагмент	Аминокислотная последовательность	Идентичность, %
Оксиагин	1-22	T N T P R E Q Q C Y L Q A - K C Y I E F Y V V V	-
Мокархагин I, прдш.	192-213	T N T P R E Q D R Y L Q A K K - Y I E F Y V V V	86
Мокархагин, N-фр.	1-22	T K C P E L I P Y L Q - K K C Y I E F Y V V V	73
Каоутиагин	1-22	T N T P R E Q D R Y L Q A E K - Y I E F Y V I V	78
Кобрин, предш.	180-201	T N T P R E Q D R Y L Q A E K - Y I E F Y M V V	78
МП, 451, предш.	29-48	T P E Q D R Y L Q A P K - Y I E F Y V V V	76
МД-подобн. блок	188-206	T P E Q Q A Y L D A K K - Y V E F - V V V	75
Беритрактиваз	189-207	T P E Q Q A Y L D A K K - Y V E F - V V V	75
МП, 400	1-16	E - - R Y L Q A P K - Y I E F Y V V V	68
МП, 230	10-31	T T T T E Q D S Y L K A P K - Y I E F Y V V V	65
Ярагаин, предш.	149-167	T A E Q Q R Y - D P Y K - Y I E F F V V V	65
МП, 604, предш.	186-207	T N T S A Q D R Y L H S K K - Y I E F Y V V V	63

Белок	Фрагмент	Аминокислотная последовательность	Идентичность, %
Оксиагин	??	(M) D E P G T K C G	-
каоутиагин	376-384	M A E P G T K C G	89
Мокархагин I, предш.	588-596	M V A P G T K C G	78

Мокархагин (N-концевая последовательность, TrQ10749, и предшественник-1, TrQ8JGN1) из яда кобры *Naja mossambica mossambica*; каоутиагин (SpP82942) из яда *Naja kaouthia*; предшественник кобрина (TrQ9PVK7) из яда *Naja naja*; предшественники металлопротеиназ (МП) длиной в 451 (TrQ9PT49) и 604 аминокислотных остатка (TrQ9PT48), и металлопротеиназы длиной в 230 (TrQ9PT50) и 400 аминокислотных остатков (TrQ9PT47) из яда *Atractaspis engaddensis*; металлопротеиназо-дизинтегрин-подобный белок (TrO42138) из яда *Agkistrodon contortrix laticinctus*; беритрактиваз (TrQ8UVG0) из яда *Bothrops erythromelas*, предшественник ярагаина (SpP30431) из яда *Bothrops jararaca*.

Рисунок 12. Сравнение фрагментов аминокислотных последовательностей оксиагина и репролизина змей. Остатки, совпадающие в последовательностях оксиагина и любого другого репролизина, выделены жирным шрифтом.

крови морской свинки. Было выявлено, что оксиагин ингибирует классический путь активации системы комплемента дозо-зависимым образом. Эта его способность снижалась после предварительной 30-минутной инкубации с сывороткой, что может объясняться медленной инактивацией оксиагина некоторыми компонентами сыворотки (например, при связывании с иммуноглобулинами). Эритроциты барана, сенсibilизированные иммуноглобулинами кролика, (ЕЛ) инкубировались с оксиагином и затем центрифугированием отделялись от избытка оксиагина. После ресуспендирования осадка в литической системе наблюдался ингибирующий эффект оксиагина, лишь слегка сниженный центрифугированием, а также гемагглютинация. Это означает, что оксиагин первоначально связывается с ЕА, а не с компонентами комплемента

Оксиагин в значительной мере ингибирует функционирование ЕАС4b (комплекса ЕА с активированным компонентом комплемента С4) и в некоторой степени - формирование

ЕАС4б. Это означает, что оксиагин практически не влияет на иницирующие стадии процесса, т.е. не затрагивает активацию компонента С1.

Количество С3-конвертазы ЕАС4б2а, сформировавшейся во время инкубации ЕАС4б с сывороткой, дефицитной по компоненту С3, в присутствии NiCl_2 , зависит от концентрации оксиагина в смеси (рис. 13-а, колонка 1). В то же время добавление оксиагина (до 0.2 мкМ) к уже сформированной и стабилизированной ионами никеля С3-конвертазе не влияло на её активность (рис. 13-а, колонка 2). Следовательно, оксиагин не влияет на последующие стадии каскада активации комплемента.

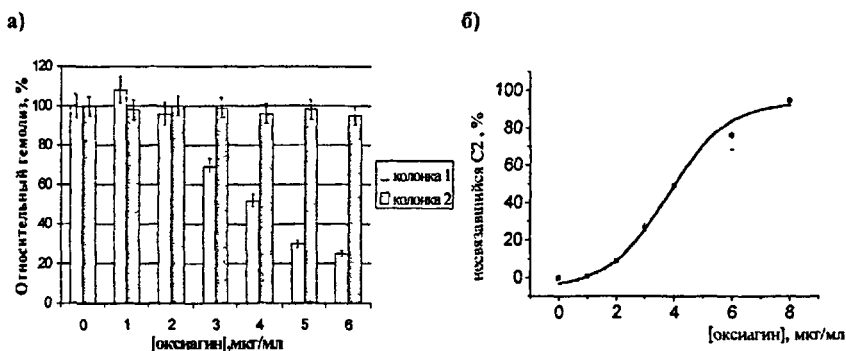


Рисунок 13. Ингибирование комплемента под действием оксиагина: а) - влияние оксиагина на формирование и функционирование С3-конвертазы, стабилизированной ионами никеля: колонка 1 – оксиагин присутствует при образовании С3-конвертазы; колонка 2 - оксиагин добавлен после формирования С3-конвертазы; б) - ингибирование оксиагином связывания компонента С2 с комплексом ЕАС4б

Ингибирование формирования С3-конвертазы вероятно происходит на стадии связывания компонента С2 с комплексом ЕАС4б. После осаждения центрифугированием комплекса ЕАС4б2а (С3-конвертазы), сформировавшегося в присутствии оксиагина, в супернатанте было определено количество активного не связавшегося С2 с использованием отдельной гемолитической системы с сывороткой, дефицитной по компоненту С2. Оксиагин ингибировал связывание С2 с ЕАС4б с IC_{50} 4 мкг/мл (80 нМ) (рис. 13-б). То, что мы наблюдали повышающийся уровень активного С2 в супернатанте при повышении концентрации оксиагина, говорит скорее о появлении стерических или конформационных препятствий для связывания компонента С2, чем о его ферментативной инактивации.

Оксиагин (в концентрации 1.2 мкМ) вызывал гемагглютинацию эритроцитов кролика, барана (0.6 мкМ) и ЕА (0.15 мкМ). Эти данные подтверждают прямое взаимодействие оксиагина с поверхностью эритроцитов, более сильное в случае ЕА, т.е. в присутствии иммуноглобулинов. Важно также то, что оксиагин в концентрациях до 1.2 мкМ не влияет на

активацию комплемента по альтернативному пути, т.е. для проявления своего эффекта ему требуется активация классического пути с участием антител.

Обобщая изложенные данные, можно сделать вывод: новый репролизин из яда кобры ингибирует активацию системы комплемента по классическому пути, связываясь с иммуноглобулинами в составе ЕА в тесной близости от места посадки компонента С4b и вызывая этим стерические или конформационные препятствия для последующего связывания и активации компонента С2. Впервые доказано, что репролизины яда кобр могут ингибировать систему комплемента.

6. CVF из яда *N. melanoleuca*

Анализ фракций I ядов *N. kaouthia* и *N. melanoleuca* методом ДСН-ПАГЭ показал, что фракция 5 яда *N. kaouthia* (Ik-5, рис. 4-а) и две фракции - 3 и 4 яда *N. melanoleuca* (Im-3 и Im-4, рис. 4-б) содержат белки с кажущимися массами 140-150 кДа (ДСН-ПАГЭ в невосстанавливающих условиях), которые в восстанавливающих условиях распадались на три субъединицы с кажущимися массами 65-70, 50 и 28-30 кДа. Эти массы соответствуют α , β и γ -субъединицам охарактеризованных ранее CVF. Окрашивание геля реактивом Шиффа показало, что субъединицы с массами 70 и 50 кДа гликозилированы (рис. 14). С помощью MALDI-МС удаюся установить молекулярные массы целых молекул. Они оказались равны 147.4 кДа для Ik-5, 142.6 кДа для Im-3 и 143.1 кДа для Im-4. Выход белков составил 0.6% для Im-3 и 0.2% для Im-4.

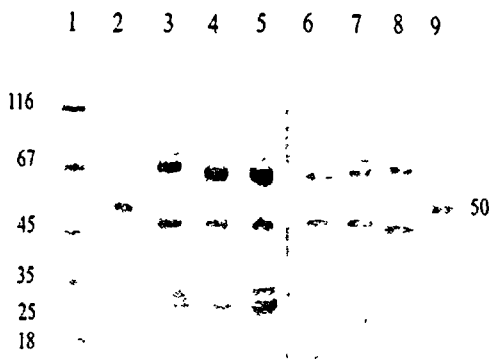


Рисунок 14. ДСН-ПАГЭ фракций Ik-5 яда *N. kaouthia* (дорожки 3 и 8), Im-3 (дорожки 4 и 7) и Im-4 (дорожки 5 и 6) яда *N. Melanoleuca*, в восстанавливающих условиях. Левая половина геля (дорожки 1-5) окрашена кумасси-синим R-250, правая половина (дорожки 6-9) – реактивом Шиффа. Дорожка 1 - молекулярные маркеры (мол. вес в кДа указан на полях геля). В качестве углевод-содержащего маркера использован оксиагин (дорожки 2 и 9).

Биологическая активность каждой из выделенных форм CVF яда *N. melanoleuca* проверялась в опытах *in vivo* и *in vitro* в сравнении с хорошо охарактеризованным CVF из яда

N, *kaouthia*. Исследование *in vivo* показало, что обе формы CVF яда п. *melanoleuca* истощали содержание компонента СЗ в сыворотке мышей по меньшей мере так же эффективно, как и CVF из яда N. *kaouthia*. Во всех случаях наблюдалось сильное и примерно равное снижение количества СЗ с самого начала наблюдений (8 ч.), продолжавшееся 4-5 дней. Однако методом иммуноферментного анализа было показано, что в отношении сыворотки человека Im-3 превосходит по активности Im-4; при этом обе формы оказались активнее, чем Ik-5, с соотношением уровней активностей 2.5:1.6:1.0. Исследование кинетики истощения комплемента показало, что Im-3 действует быстрее, чем Im-4, в среднем в 3.1 раза.

Чтобы установить, определяются ли различия в свойствах белка аминокислотной последовательностью или углеводной частью молекулы, был проведён триптический гидролиз субъединиц Im-3 и Im-4 в геле с последующим анализом гидролизатов методом MALDI-МС. Выяснилось, что наборы масс триптических пептидов γ -субъединиц этих белков совпадают менее, чем в половине значений, хотя расхождения в наборах масс α - и β -субъединиц незначительны (однако наборы масс всех субъединиц обеих форм CVFm менее чем на 50% совпадают с наборами масс соответствующих субъединиц CVF из яда N. *kaouthia* (Q91132), рассчитанными на основании известной аминокислотной последовательности). Поскольку установлено, что CVF может содержать только три или четыре углеводные цепи, а большая доля различий в наборах масс приходится на негликозилированные γ -субъединицы, следует признать, что наблюдаемые различия в свойствах этих белков обусловлены, прежде всего, значительными расхождениями в их первичной структуре.

CVF, идентифицированные к настоящему времени в ядах четырёх видов кобр, выделены каждый как индивидуальный белок. Полученные нами данные означают, что CVF может быть представлен в яде одного вида кобры по меньшей мере двумя структурными формами, различающимися по биологической активности.

Таким образом, использованная в данной работе схема разделения сложных белковых смесей позволила выделить из яда четырех видов кобр ряд малопредставленных белков с новыми элементами структуры. Так, впервые был выделен гликозилированный цитотоксин, присутствующий в яде в существенно меньших количествах, чем «обычный» цитотоксин, впервые обнаружены в ядах кобр белки нового структурного типа (белки семейства CRISP) и белки с новыми биологическими (оксиагин) и структурными (CVF) особенностями.

ВЫВОДЫ

1. С использованием разработанной эффективной схемы идентификации и фракционирования минорных белков из яда кобры *N. kaouthia* выделен первый гликозилированный токсин трёхпетельного типа. Установление структуры этого токсина показало, что он является цитотоксином 3 из этого же яда, гликозилированным по остатку аспарагина-29, расположенному на окончании центральной петли. Показано, что наличие углеводного остатка в молекуле цитотоксина приводит к снижению его токсичности.
2. Впервые в яде кобры обнаружены белки, принадлежащие к семейству CRISP. Показано, что представители этого семейства присутствуют в ядах кобр в виде набора нескольких нетоксичных гомологов, включающих как основные, так и кислые белки.
3. Из яда кобры *N. oxiana* выделен новый гликопротеин оксиагин - гомолог репролизина ядов змей, способный ингибировать активацию системы комплемента сыворотки крови по классическому пути. Оксиагин является первым представителем репролизина ядов змей, для которого доказана такая активность.
4. Впервые комплемент-активирующий фактор (CVF) выделен из яда кобры *N. melanoleuca* в виде двух форм, имеющих отличия в физико-химических свойствах и биологической активности.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Osipov A.V., Astapova M.V., Tsetlin V.I., Utkin Yu.N. The first representative of glycosylated three-fingered toxins. Cytotoxin from the *Naja kaouthia* cobra venom. // *Eur. J. Biochem.* - 2004.-V. 271.-P. 2018-2027.
2. Osipov A.V., Starkov V.G., Utkin Yu.N. Toxicity of cobra venom components to cockroach *Gromphadorhina portentosa*. // *Toxicon.* - 2002. - V. 40. - P. 1507-1509.
3. **Осипов А.В.**, Вайзе К., Франке П., Кухтина В.В., Фрингс С, Хухо Ф., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н. Яд кобры содержит белок CRISP-типа. // *Биоорганическая химия.* - 2001. • № 27. - с. 224-226.
4. Кухтина В.В., Вайзе К., **Осипов А.В.**, Старков В.Г., Титов М.И., Есипов С.Е., Овчинникова Т.В., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н. MALDI-масс-спектрометрия для идентификации новых белков в яде змей. // *Биоорганическая химия.* - 2000. - № 26. - с. 803-807.
5. Уткин Ю.Н., Шойбонов Б.Б., Зинченко А.А., **Осипов А.В.**, Мордвинцев Д.Ю., Галевская Л.В., Рюмина Е.В., Дайя С, Цетлин В.И. Новые гликопротеины яда кобр для иммунологических исследований. Тезисы докладов XI международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии», Ялта-Гурзуф, 2003, с.344-345.
6. Уткин Ю.Н., Коротана А.С., Азеева Е.А., Евдокимова Е.Г., **Осипов А.В.**, Мурашев А.Н., Цетлин В.И. Возможности применения компонентов змеиных ядов в создании новых лекарственных препаратов. Тезисы докладов X международной конференции «Новые информационные технологии в медицине и экологии», Ялта-Гурзуф, 2002, с.347-348.
7. Kukhtina V., **Osipov A.**, Weise C, Franke P., Frings S., Hucho F., Tsetlin V., Utkin Yu. Cobra venom contains protein of CRISP family. *Journal of Neurochemistry*, 2001, vol.32, suppl.1, p.172.
8. Уткин Ю.Н., **Осипов А.В.**, Вайзе К., Старков В.Г., Цетлин В.И. Яды кобр содержат белки семейства CRISP. Тезисы докладов III съезда Биохимического Общества, Санкт-Петербург, 2002, с.383.
9. Utkin Yu., Kukhtina V., Weise IC, Gillen C, **Osipov A.**, Tsetlin V. New polypeptides from cobra venom Abstracts of the XIth world congress of the International Society on Toxinology. *Toxins from animals, plants and microbes.* Paris, 2000, p. 164.
10. Уткин Ю.Н., Кухтина В.В., **Осипов А.В.**, Старков В.Г., Цетлин В.И. Новые полипептиды из яда кобры. Тезисы докладов V чтений, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова, «Биоорганика-2000», Москва-Пушино, 2000, с.9.

Принято к исполнению 06/05/2004
Исполнено 07/05/2004

Заказ № 174
Тираж: 100 экз.

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Балаклавский пр-т, 20-2-93
(095)318-40-68
[www. autoreferat.ru](http://www.autoreferat.ru)

W-8461