

УДК 577.112:577.322.7

Ольга В. Степаненко (6 курс, каф. БФ), И.М. Кузнецова, к.б.н, с.н.с. (ИНЦ РАН)

## КИНЕТИКА ОБРАЗОВАНИЯ И СВОЙСТВА ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ЧАСТИЧНО-СВЕРНУТЫХ СОСТОЯНИЙ КРЕАТИН КИНАЗЫ

Креатин киназа – фермент, играющий важную роль в обеспечении клетки энергией, является катализатором в реакции накопления и поддержания на определенном уровне высокоэнергетического соединения фосфокреатина:



Креатин киназа из мышц кролика представляет собой димерный белок, состоящий из двух идентичных полипептидных цепей по 380 аминокислотных остатков. Диссоциация димера может быть вызвана добавлением денатурирующих агентов – гуанидингидрохлорида и мочевины, хлорида лития высокой концентрации и переводом белка в раствор с низкими значениями pH. Мономеры креатин киназы состоят из двух доменов, в щели между которыми находится активный центр фермента. Нарушения активности и уровня содержания в клетке креатин киназы сопровождают ряд тяжелых заболеваний, включая рак, инфаркт, мышечную дистрофию. В ряде работ академика Чен-Лу Цоу и его сотрудников было показано, что активность креатин киназы существенно зависит от конформации фермента и что даже под действием совсем небольших добавок денатурантов, не приводящих к заметным изменениям структуры фермента, регистрируемым другими методами, могут возникать так называемые пред-денатурированные состояния с существенно отличным уровнем каталитической активности [1]. В связи с этим актуальным является изучение процессов сворачивания-разворачивания креатин киназы и свойств, возникающих пред-денатурированных и денатурированных частично-свернутых состояний [2].

Исследованы свойства креатин киназы в промежуточных состояниях, возникающих под воздействием различных концентраций гуанидингидрохлорида. Регистрировались интенсивности триптофановой флуоресценции креатин киназы при длинах волн 320 и 365 нм, величины параметра А, анизотропия флуоресценции и полные спектры флуоресценции при достижении равновесия. На основе этих экспериментальных данных и характера параметрической зависимости между интенсивностями флуоресценции, измеренными при длинах волн 320 и 365 нм, был сделан вывод, что при увеличении концентрации гуанидингидрохлорида от 0 до 5.0 М креатин киназа претерпевает последовательно четыре конформационных перехода. В области концентраций гуанидингидрохлорида от 0 до 0.1 М наблюдается небольшой сдвиг спектра флуоресценции в коротковолновую сторону. В области концентраций от 0.1 до приблизительно 0.5 М гуанидингидрохлорида наблюдается переход во второе промежуточное состояние, сопровождающийся увеличением интенсивности флуоресценции и сдвигом спектра в длинноволновую сторону. При дальнейшем повышении концентрации гуанидингидрохлорида, от 0.5 до 2.5 М, наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции креатинкиназы и дальнейший длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции. При увеличении концентрации гуанидингидрохлорида до 4.0 М креатин киназа переходит в полностью развернутое состояние.

Таким образом, впервые изменение структуры фермента при небольших добавках денатуранта (около 0,1 М) было зарегистрировано не только по изменению ферментативной активности, но и физико-химическим методом [3]. По мере увеличения концентрации гуанидингидрохлорида креатин киназа проходит через состояния типа “molten globule” и затем “pre-molten globule”. При переходе в первое из этих состояний утрачивается третичная структура, но сохраняется нативная вторичная структура. Второе – характеризуется отсутствием упорядоченной вторичной структуры. При высоких концентрациях креатин киназы белок в промежуточных состояниях типа “molten globule” и “pre-molten globule” может накапливаться в виде димеров и олигомеров [4].

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Цоу Ч-Л. (1998) Роль гибкости активного центра в ферментативном катализе. Биохимия 63,300-307.
2. Fan Y.X., Zhou J.M., Kihara H., and Tsou C.L. (1998) Unfolding and refolding of dimeric creatine kinase equilibrium and kinetic studies. Protein Sci. 7(12), 2631-2641.
3. Bushmarina N. A., Kuznetsova I. M., Biktashev A. G., Turoverov K. K., and Uversky V. N. (2001) Partially folded conformations in the folding pathway of bovine carbonic anhydrase II: a fluorescence spectroscopy analysis. CHEMBIOCHEM 2: 812-821.
4. Kuznetsova I.M., Stepanenko O.V., Turoverov K.K., Zhu L., Zhou J.M., Fink A.L., and Uversky V.V. (2002) Unraveling multistate unfolding of rabbit muscle creatin kinase. Biochim. Biophys. Acta. 1596, 138-155.