



УДК 577.112.5:598.126-145.

## ЯД КОБРЫ СОДЕРЖИТ БЕЛОК CRISP-ТИПА

© 2001 г. А. В. Осипов, К. Вайзе\*, П. Франке\*, В. В. Кухтина,  
С. Фрингс\*\*, Ф. Хухо\*, В. И. Цетлин, Ю. Н. Уткин<sup>#</sup>

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\* Институт химии и биохимии Свободного университета Берлина, Берлин, ФРГ;

\*\* Институт обработки биологической информации, Исследовательский центр Юлиха, Юлих, ФРГ

Поступило в редакцию 15.01.2001 г. Принято к печати 22.01.2001 г.

Установление структур фрагментов аминокислотной последовательности белка (25к) с молекулярной массой 24953 Да, выделенного ранее из яда кобры *Naja kaouthia* (Кухтина и др., Биоорган. химия. 2000. Т. 26. С. 803–807), и сравнение их с первичными структурами известных белков показало, что белок 25к относится к семейству CRISP. Это первый идентифицированный в яде кобр белок такого типа.

Ключевые слова: яд кобры; новый белок семейства CRISP.

Яд кобры представляет собой сложную смесь компонентов, проявляющих различные виды биологической активности. Несомненно, наиболее хорошо исследованными являются нейротоксины и цитотоксины, молекулярные массы которых находятся в диапазоне 6000–8000 Да. Гораздо меньше известно о белковых компонентах яда кобр с молекулярными массами более 20000 Да. Ранее [1] нами с использованием MALDI-масс-спектрометрии в яде кобры *Naja kaouthia* был идентифицирован белок с молекулярной массой 24953 Да и установлена в нем последовательность 25 N-концевых аминокислотных остатков. Определенная последовательность имела наибольшее сходство с последовательностью белка TPX1 из семенников мыши (рисунок). TPX1 принадлежит к белкам семейства CRISP (cysteine-rich secretory proteins – секреторные белки с высоким содержанием остатков цистеина), для которых характерно наличие в молекуле 16 остатков цистеина, образующих 8 дисульфидных связей. Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного и пиридилэтилированного производного выделенного нами белка свидетельствуют также о наличии 16 остатков цистеина. Для определения аминокислотной последовательности пиридилэтилированное производное подвергли триптическому гидролизу с последующим разделением образующихся пептидов методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке Vydac C18. Выделен-

ные пептиды анализировали методами MALDI-масс-спектрометрии и деградации по Эдману.

Установленные аминокислотные последовательности приведены на рисунке. Они включают 101 остаток, суммарная молекулярная масса этих фрагментов соответствует 47% молекулярной массы белка. Сравнение установленных фрагментов последовательности белка 25к с первичными структурами белков семейства CRISP показало, что наибольшее сходство наш белок имеет с токсином хелотермином (helothermine), выделенным из секрета мексиканской ящерицы *Heloderma horridum horridum* [2, 3]. Хелотермин токсичен для мышей (LD<sub>50</sub> в диапазоне от 1.25 до 2.5 мкг/г) и является блокатором рианодиновых рецепторов саркоплазматического ретикулума. Белок 25к оказался не токсичным для мышей в дозах до 4.5 мкг/г, что отличает его от хелотермина.

Следует отметить, что наличие белков CRISP-типа установлено в ядах змей, относящихся к другим семействам и родам. Один из таких белков идентифицирован в ядовитой железе тайваньской змеи рода куфий *Trimeresurus microsquamatus* (семейство Crotalidae) [4]. Аминокислотная последовательность этого белка, названного CRVP (cysteine-rich venom protein – богатый цистеинами белок яда) (рисунок), была выведена из последовательности кДНК [4]. Данные о биологической активности CRVP отсутствуют.

Еще один белок, псевдехетоксин (pseudechetoxin), был выделен из яда австралийской змеи рода ехидн *Pseudechis australis* [5]. Как видно из рисунка, имеется заметное сходство структур фрагментов

Сокращение: CRISP – cysteine-rich secretory proteins.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 330-73-74; факс: (095) 335-57-33; e-mail: utkin@ibch.ru).

		*	*	*	** *	* **	* **	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	10	20	30	40	50	60	70	80	90										
TPX1	KDPDFTSLL	TNQLQVQREI	VNKHNELRRS	VNPTGSDILK	MEWSIQATTN	AQKWANKCIL	EHSSKDDRKI	-NIRCGENLY	MSTDPTLWST										
25к	NVDFNSE	TRRKKQKEI	VDLHNSL	VSPTASNMLK	MEWYPEAASN	AERWANTCSL	NHSPDNL		TWTE										
Helo	EASPKLGLM	TSNPDQTEI	TDKHNNLRR	VEPTASNMLK	MTWSNKIAQN	AQRSANQCTL	EHTSKEERTI	DGVECGENLF	FSSAPYTSY										
Pseud		SNKKYQK	DKHNALRRS	VKPTARNMLQ															
CRVP								HSSRDSRVI	GGIKCGENIY	MSPYPAKWTD									
		*	*	*															
	100	110	120	130	140	150	160	170	180										
TPX1	VIQSWYNENE	DFVYGVGAK-	PNSAVGHYQ	LVWYSSFKIG	CGIAYCPNQD	NLKYFYVCHY	CPMGNVMMK	STPYQQGTPC	ASCPNNCENG										
25к	IIHLWHDEYK							T	ATPYK										
Helo	AIQNWFDERK	YFRFNYPGTA	QNVMIGHYQ	VVWYSYELG	CAIAYCPDQP	TYKYYQVCQY	CPGGNIRSRK	YTPYISGPPC	GDCPDACDNG										
CRVP	IIHAWHGEYK	DFKYGVGAVP	SNAATGHYQ	IVWYKSYRGG	CAAAAYCPSSK	-YRYFYVCQY	CPAGNMIGKT	ATPYTSGPPC	GDCPSDCDNG										
			*	*	*	*	*												
	190	200	210	220															
TPX1	LCTNSCDFED	LLSNCESLKT	SAGCKHELLK	TKCOATCLCE	DKIH														
25к			QSSCQDDWIK	SNCPCASCF															
Helo	LCTNPCKQND	VYNNCPDLKK	QVGCQHPIMK	D-CMATCKCL	TEIK														
CRVP	LCTNPCTQNN	TYSNCSLVQ	QSSCQDNNMK	TKCPASCFCQ	NKII														

Аминокислотные последовательности белков, относящихся к семейству CRISP: TPX1 – белок из семенников мыши [8]; 25к – фрагменты выделенного нами белка; Helo – хелотермин мексиканской ящерицы [3]; Pseud – псевдехетоксин австралийской змеи [5]; CRVP – богатый цистеинами белок тайваньской змеи [4]. Жирным шрифтом выделены остатки, занимающие одинаковые положения в 25к и в одном из CRISP-белков. Звездочками отмечены остатки, одинаковые для всех белков.

последовательностей белка 25к и частично определенной последовательности псевдехетоксина. Поскольку последний является блокатором каналов, управляемых циклическими нуклеотидами [5], мы проверили действие белка 25к на такие каналы. Для этих целей ДНК, соответствующую главной субъединице обонятельных каналов, управляемых циклическими нуклеотидами, экспрессировали в клетках НЕК 293, в результате чего получали гомомерные каналы, активируемые сAMP и сGMP [6]. Влияние белка 25к на эти каналы проверяли, используя метод фиксации потенциала в конфигурации “внешняя поверхность клетки снаружи” [7]. Каналы активировали 30 мкМ сGMP, в качестве позитивного контроля использовали 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, являющийся блокатором каналов. При этом, используя белок 25к в концентрации 1 мкМ, наблюдали лишь очень слабое (не более 5%) уменьшение тока. Псевдехетоксин при такой концентрации полностью подавлял функцию обонятельных каналов [5]. В описанных выше условиях было проверено также влияние белка 25к на каналы фоторецепторных клеток быка [6], однако эффект не был более выраженным.

Таким образом, нами впервые в яде кобры идентифицирован белок 25к, принадлежащий к семейству CRISP-белков и отличающийся по своей биологической активности от уже известных белков такого типа.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 00-04-48889) и Fonds der Chemischen Industrie.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кухтина В.В., Вайзе К., Осипов А.В., Старков В.Г., Тутов М.И., Есипов С.Е., Овчинникова Т.В., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н. // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С. 803–807.
2. Mochca-Morales J., Martin B.M., Possani L.D. // Toxicon. 1990. V. 28. P. 299–309.
3. Morrissette J., Kraetzschmar J., Haendler B., El-Hayek R., Mochca-Morales J., Martin B.M., Patel J.R., Moss R.L., Schleuning W.-D., Coronado R., Possani L.D. // Biophys. J. 1995. V. 68. P. 2280–2288.
4. Chang T.Y., Mao S.H., Guo Y.W. // Toxicon. 1997. V. 35. P. 879–888.
5. Brown R.L., Haley T.L., West K.A., Crabb J.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 754–759.
6. Dzeja C., Hagen V., Kaupp U.B., Frings S. // EMBO J. 1999. V. 18. P. 131–144.
7. Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. // Pflugers Arch. 1981. V. 391. P. 85–100.
8. Kasahara M., Gutknecht J., Brew K., Spurr N., Goodfellow P.N. // Genomics. 1989. V. 5. P. 527–534.

## Cobra Venom Contains a Protein of the CRISP Family

**A. V. Osipov\***, **C. Weise\*\***, **P. Franke\*\***, **V. V. Kukhtina\***,  
**S. Frings\*\*\***, **F. Hucho\*\***, **V. I. Tsetlin\***, and **Yu. N. Utkin\***

*e-mail: utkin@ibch.ru.*

\**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia*

\*\**Institut für Chemie–Biochemie, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany*

\*\*\**Institut für Biologische Informationsverarbeitung, Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany*

Amino acid sequences of several fragments of the 25k protein (molecular mass 24 953 Da) previously isolated from cobra *Naja kaouthia* (Kukhtina *et al.* *Bioorg. Khim.*, 2000, vol. 26, pp. 803–807) were determined. Their comparison with the primary structures of known proteins showed that the 25k protein belongs to the CRISP family and is the first protein of this type identified in cobra venoms. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words: cobra venom, CRISP, new protein*