

НАПРАВЛЕННАЯ ТВЕРДОФАЗНАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ КРЕАТИНКИНАЗЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОГО БИОКАТАЛИЗАТОРА

И.С. Стреха, Ю.А. Лесникович, Я.В. Фалетров, Е.А. Чернявский,
В.В. Сенчук*, В.М. Шкуматов**

*НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск,
Республика Беларусь*

**Белорусско-голландское совместное предприятие «Фармлэнд», Минск, Республика Беларусь*

*** Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

Введение

Креатинфосфат представляет собой продукт *N*-фосфорилирования креатина и является эндогенным макроэргическим соединением, выполняющим ключевую роль в энергетическом обеспечении мышечного сокращения [1]. Данное соединение образуется под действием фермента креатинкиназы (КрК) (АТФ:креатин *N*-фосфотрансфераза, КФ 2.7.3.2), который катализирует обратимый перенос фосфатного остатка между креатинфосфатом и АДФ. Практический интерес к креатинфосфату обусловлен его применением в кардиологии для уменьшения частоты развития сердечной недостаточности, нарушений ритма сердца, развития постинфарктной стенокардии и формирования аневризмы сердца [2, 3]. Кроме того, креатинфосфат перспективен в спортивной медицине для профилактики развития синдрома физического перенапряжения и улучшения адаптации к экстремальным физическим нагрузкам [4].

В настоящее время субстанцию креатинфосфата получают из природного сырья или химическим синтезом. Первый подход имеет ряд недостатков: варьирование содержания креатинфосфата в исходном сырье, его нестабильность в разбавленных растворах, большое количество стадий, необходимость использования установок большой единичной мощности и др. Химический синтез включает использование токсичных реагентов, прежде всего на стадиях фосфорилирования [4]. Альтернативным решением при получении субстанции креатинфосфата является использование высокоэффективных, высокоспецифичных и стабильных препаратов ферментов. Для повышения эффективности ферментов как биокатализаторов используют подходы инженерии ферментов, оптимизации и модификации реакционной среды и субстратов. Стратегия инженерии ферментов основывается на их иммобилизации с использованием растворимых и нерастворимых полимерных носителей, химической модификации природных ферментов и проведении модификации катализатора на уровне ДНК (сайт-направленный мутагенез). Иммобилизация в настоящее время наиболее широко используется для улучшения операционной стабильности ферментов, а также дает дополнительные преимущества в виде облегченного получения продукта без потери биокатализатора, рационального конструирования реактора и контроля реакций. Селективная химическая модификация природных ферментов, как и иммобилизация, может быть использована для улучшения параметров селективности, стабильности, активности, изменения субстратной специфичности; в ряде случаев она позволяет осуществить дополнительную функционализацию боковых аминокислотных радикалов природного фермента.

В настоящей работе путем селективной химической модификации КрК и использования различных полимерных активированных носителей был осуществлен синтез функционально-активных биокатализаторов для получения субстанции креатинфосфата.

Методы исследования

В работе использовали следующие реактивы: сефароза 4В, сефадекс G-25, тиопропил-сефароза (Pharmacia Biotech, Швеция), бромциан активированная-сефароза, эпихлоргидрин, этилендиамин, нингидрин, бромуксусная кислота, моноэтаноламин, *N,N'*-дициклогексил

карбодииимид, (1-этил-3(3'-диметиламинопропил)карбодииимид, диэтилпирокарбонат, аденозин-5'-дифосфата динатриевая соль (АДФ), креатин моногидрат, пируваткиназа из мышц кролика, фосфоенолпируват моносодиевая соль, тетрабутиламмония фосфат (Sigma, США). Применяли препарат КрК типа 3 из сердца быка с чистотой не менее 95% по данным электрофореза в полиакриламидном геле и удельной ферментативной активностью 150–180 мкмоль АТР/мин на 1 мг белка в прямой реакции образования креатинфосфата (Sigma, США). Концентрацию растворимой КрК определяли спектрофотометрически при 280 нм с использованием коэффициента $A^{1\%} = 8,96$ и относительной молекулярной массы фермента 82000 [5].

Молекулярный докинг

Предварительное построение структур креатина и АДФ было осуществлено с помощью программ ChemDraw и Chem3D версии 8.0 (ChembrigeSoft). Минимизация энергии конформации структур и расчет частичных зарядов на атомах малых молекул проводилась согласно полуэмпирическому методу частичного пренебрежения дифференциальным перекрыванием орбиталей в программе HyperChem 7.01 (Hypercube, Inc.) по алгоритму Полака–Райбера (градиент – не более 0,01). Структура КрК взята из базы данных PDB (www.rcsb.org) (pdb id: 1GOW). Ригидный докинг осуществлен посредством Autodock 4.0 в составе AutoDockTools, используя генетический алгоритм Ламарка.

Химическая модификация КрК

Химическую модификацию КрК в растворе проводили по ранее описанным методам с небольшими модификациями [6–8]. ϵ -Аминогруппы остатков Lys сукцинилировали 100 мМ янтарным ангидридом в течение 4 ч, поддерживая постоянное значение pH = 7,0 с помощью 1 М NaOH. Карбоксильные группы остатков Glu и Asp в белке модифицировали в течение 0,5–4 ч 0,25 М этилендиамином в присутствии 5 мМ (1-этил-3(3'-диметиламинопропил)карбодииимида (ЭДК) при pH 7,0 и 25°C. Избыток ЭДК деактивировали эквивалентным количеством 2 М ацетата натрия. После обессоливания на колонке с сефадексом G-25 определяли активность КрК, а убыль или возрастание количества первичных аминогрупп оценивали по реакции с тринитробензосульфоновой кислотой. Для модификации остатков His использовали 0,2–0,5 М раствор диэтилпирокарбоната (ДЭПК) в ацетонитриле, время инкубации – от 10 мин до 2 ч. Перед контролем активности КрК избыток ДЭПК деактивировали добавлением гистидина в конечной концентрации 10 мМ. Степень модификации оценивали спектрофотометрически, используя значение $\epsilon_{235 \text{ нм}} = 3200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. В ряде случаев модифицированный белок обрабатывали 0,1 М гидроксиламином (pH 7,0, 12 ч, 4°C) с последующим обессоливанием и контролем активности. Для введения дополнительных сульфгидрильных групп фермент модифицировали 4-меркаптобутиримидатом по ранее описанному методу [9]; при этом белок обогащался дополнительными сульфгидрильными группами (в среднем 3,7 моль на 1 моль КрК).

Получения твердофазных носителей для ковалентной иммобилизации КрК

Получение Амино-Сефарозы осуществляли путем активации матрицы эпихлоргидрином с последующим аминированием этилендиамином. Концентрацию первичных аминогрупп сорбента (30–40 мкмоль на 1 мл геля) определяли по реакции с нингидрином. Бромацетилирование Амино-Сефарозы осуществляли в 1,0 М растворе бромуксусной кислоты в диоксане, используя для активации 0,1 М N,N'-дициклогексилкарбодииимид [10]. Согласно спектрофотометрическому определению с нингидрином более чем 98% первичных аминогрупп подверглось бромацетилированию; следовательно, содержание бромацетильных остатков составило около 35 мкмоль на 1 мл геля.

Иммобилизация КрК

Иммобилизацию на BrCN-активированной сефарозе проводили согласно инструкции фирмы-производителя.

Иммобилизацию на аминокислотном сепарозе осуществляли, используя активацию свободных карбоксильных групп фермента водорастворимым карбодиимидом [11].

Связывание КрК с Бромацетил-Сепарозой. Около 5 мл геля Бромацетил-Сепарозы промывали 0,3 М ацетатным буфером, pH 5,7, содержащим 0,1 М KI и ресуспендировали в 10 мл 0,15 мМ раствора КрК в этом же буфере. Суспензию непрерывно перемешивали в течение 24 ч при 20 °С и промывали пятикратным объемом буферной смеси и затем десятикратным объемом воды на стеклянном фильтре. Концентрацию иммобилизованного фермента рассчитывали как разницу между общим содержанием взятого для иммобилизации фермента и количеством не связанного белка. Остаточные бромацетильные группы блокировали при pH 8,0 в течение 6 ч 0,5 М моноэтаноламином в 0,2 М бикарбонатном буфере, содержащем 0,1 М KI [10].

Связывание тиолированной КрК с Тиопропил-Сепарозой вели в течение 2 ч в условиях образования аналога комплекса переходного состояния в присутствии 2 мМ АДФ, 2 мМ MgCl₂, 3 мМ креатина и 10 мМ NaNO₃ в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,5 при 25 °С. В результате был получен конъюгат, содержащий 70 нмоль фермента в 1 мл уплотненного геля.

Гель-электрофорез в денатурирующих условиях выполняли по методу [12] в 10% полиакриламидном геле. После проведения электрофореза гели помещали на 30 мин в 10% трихлоруксусную кислоту, затем отмывали смесью изопропанол : уксусная кислота : вода (1 : 2,5 : 7,5, по объему) и окрашивали 0,1% раствором кумасси голубого G-250 в 3,5% растворе HClO₄. Стандарты для электрофореза (фосфорилаза b 94 кДа, альбумин из бычьей сыворотки 67 кДа, овальбумин 43 кДа, карбоангидраза 30 кДа, соевый ингибитор трипсина 20 кДа, α-лактальбумин 14,4 кДа, «Pharmacia Biotech», Швеция).

ВЭЖХ в варианте гель-проникающей хроматографии осуществляли на хроматографе LC-10AT «Shimadzu» (Япония), хроматографические кривые получали и обрабатывали с использованием детектора SPD-M10A (220–900нм) и программного обеспечения CLASS-VP, «Shimadzu». Применяли колонку Zorbax GF-250 (4,6 × 250 мм) («Agilent», США).

Определение ферментативной активности.

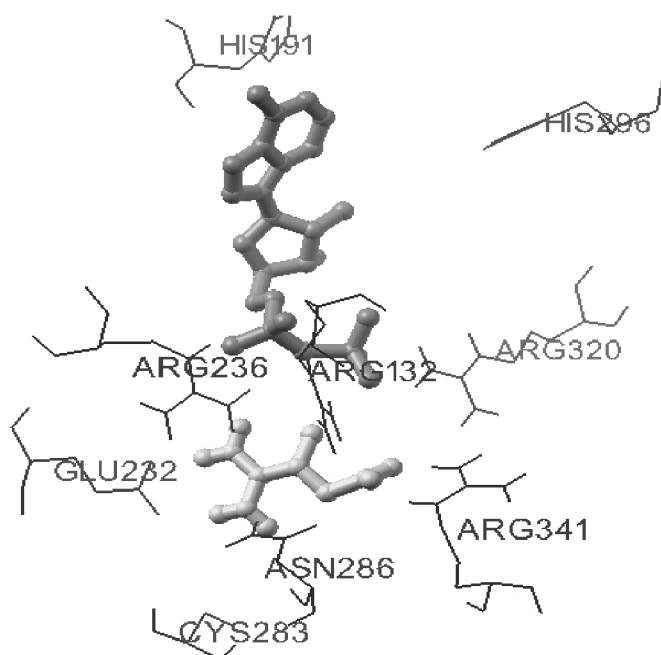
Удельную активность КрК измеряли в реакции образования креатинфосфата с использованием сопряженной ферментативной системы, включающей пируваткиназу и лактатдегидрогеназу [13]. Каталитические параметры растворимой КрК и иммобилизованной КрК для ее субстратов (креатин и MgATФ) определяли в координатах Лайнуивера-Берка из зависимостей активности фермента от концентрации одного из субстратов при нескольких фиксированных концентрациях другого субстрата.

Результаты и обсуждение

Химическая модификация КрК в растворе

Химическая модификация нативного белка позволяет выяснить не только функциональную значимость отдельных аминокислотных остатков, но и ввести дополнительные функциональные группы для последующей иммобилизации на активированных нерастворимых носителях. Необходимым условием для проведения селективной модификации являются данные о пространственной организации фермента и доступности тех или иных функционально-значимых аминокислотных остатков.

На рисунке 1 показано рассчитанное взаиморасположение креатина и АДФ в активном центре КрК. Из рисунка видно, что положение креатина в фермент-субстратном комплексе стабилизируется за счет взаимодействия его гуанидиновой и карбоксильной групп с боковыми заряженными группами Glu232 и Arg341, соответственно. Энергии связывания АДФ и креатина в активном центре данного фермента составляли -7,1 ккал/моль и -4,7 ккал/моль, соответственно. Расстояние N-атома гуанидиновой группы креатина от S-атома Cys283 в модельном комплексе составило около 4,4 ангстрем, а расстояние другого N-атома его гуанидиновой группы до P-атома дистальной фосфатной группы АДФ – 5,7 ангстрем.

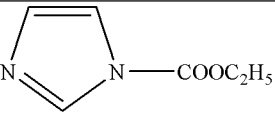
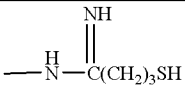


Модель получена в результате докинга с использованием программ Autodock 4.0 и AutodockTools. Использована 3D-структура КрК из базы данных PDB (pdb id: 1GOW).

Рисунок 1 – Модель взаиморасположения и аминокислотного окружения креатина и АДФ в активном центре КрК

В таблице 1 приведены данные по влиянию избирательной химической модификации остатков Lys, Asp, Glu и His на функциональную активность КрК.

Таблица 1 – Влияние химической модификации на активность КрК

| Аминокислотные остатки | Модифицирующий реагент | Структурная формула модифицированного остатка (боковая цепь) | Число модифицированных остатков, моль/моль белка | Активность, % |
|------------------------|-----------------------------|---|--|---------------|
| Lys | Янтарный ангидрид | $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ | 6,1 | 90–92 |
| Asp, Glu | Этилендиамин + ЭДК | $-\text{CH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ | 5,7 | 5–10 |
| His | Диэтилпирокарбонат |  | 3,6 | 80–90 |
| Lys | Метил-4-меркаптобутиримидат |  | 3,7 | 80–90 |

Модификация остатков Lys янтарным ангидридом в указанных выше условиях приводит к сукцинированию в среднем 6 остатков Lys (табл. 1) и, судя по вторым производным спектров поглощения в УФ-области [14] модифицированного белка, не затрагивает его общий фолдинг. В то же время тринитробензолсульфоновая кислота реагирует с 15 ε-аминогруппами Lys денатурированной в 8 М мочеvine КрК. Поскольку КрК содержит 19 остатков Lys, можно предположить, что в нативном белке 13 остатков Lys стерически не доступны для янтарного ангидрида и, возможно, находятся в зоне контакта протомеров в димере. Даже в условиях денатурации около 20–25% ε-аминогрупп недоступны, что обусловлено как неполной диссоциацией исходного димера, так и не оптимальными условиями для реакции ацилирования. Функциональная активность сукцинированной КрК снижается не более, чем на 8–10% (таблица 1). По-видимому, свободные ε-NH₂-группы КрК не принимают непосредственного участия в реализации функциональной активности, но вносят существенный вклад в образование димерной формы белка и стабилизацию нативной конформации.

Карбоксильные группы КрК модифицировали этилендиамином в присутствии ЭДК. Оценка степени модификации на основании количества дополнительно введенных аминогрупп не учитывает возможность образования N-ацилмочевины при взаимодействии СООН-групп с ЭДК, однако выбранное соотношение реагентов, рН среды и относительная доступность карбоксильных групп не благоприятны для протекания этой побочной реакции. Анализ временного хода модификации позволил установить, что амидирование одной «усредненной» карбоксильной группы приводит к 20–30% потере активности КрК. За 2 часа модифицировалось около 6 кислотных остатков, что вызывало 90–95%-ную инактивацию белка. Необходимо отметить, что в выбранных условиях модификации подвергаются наиболее реакционно-способные и стерически доступные карбоксильные группы. Несмотря на столь значительное уменьшение активности, значение кажущейся K_m по АТФ изменилось незначительно по сравнению с нативным ферментом. Это говорит о том, что остаточная активность, скорее всего, связана с наличием небольшого количества не модифицированного белка. Одновременно с уменьшением активности наблюдались значительные изменения вторых производных спектров поглощения в УФ-области, свидетельствующие о существенном нарушении нативной конформации КрК в результате замены отрицательного заряда модифицированных карбоксильных групп положительным зарядом свободной аминогруппы этилендиамина. Модификация карбоксильных групп сопровождалась лишь минорным образованием ковалентных межмолекулярных сшивок на уровне 5% (данные гель-электрофореза в присутствии ДДС-Na). По данным высокоэффективной гель-проникающей хроматографии в результате модификации свободных карбоксильных групп не обнаружено диссоциации исходной преимущественно димерной формы до мономера белка. Согласно данным сайт-направленного мутагенеза [15] определено, что остатки Glu226, Glu227 и Asp228 важны для координации Mg-АТФ и для связывания креатина. Эти три аминокислотных остатка находятся в высоко консервативной области изоферментов КрК в непосредственной близости от пептидных областей 236–241 и 279–291, формирующих связывающий домен для аденина. Таким образом, полученные результаты и литературные данные свидетельствуют о том, что причиной инактивации КрК в результате модификации свободных карбоксильных групп является нарушение структуры связывающего участка, ответственного за взаимодействие с субстратами: АДФ, АТФ, креатином.

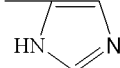
Остатки His модифицировали диэтилпирокарбонатом (ДЭПК), предпочтительно реагирующим при нейтральных значениях рН с имидазольным кольцом. Концентрацию образующегося N-этоксиформильного производного можно определить спектрофотометрически, однако при избытках реагента однозначная интерпретация результатов титрования осложняется возможностью этоксиформилирования второго атома азота в имидазольном кольце. Моно- и диэтоксиформильные производные His существенно различаются по спектральным характеристикам, а также по отношению к обработке гидроксиламином: в первом случае регенерируется исходный гистидин, а во втором происходит разрыв имидазольного цикла. Следовательно, содержание диэтоксиформилированного продукта реакции можно корректно оценить по убыли гистидина в аминокислотном составе белка, модифицированного ДЭПК и обработанного гидроксиламином. Установлено, что однократное этоксиформилирование 3,6 доступных остатков His незначительно уменьшает активность модифицированного белка. Вторые производные спектров поглощения в УФ области были близки к параметрам для нативного белка; также не было обнаружено диэтоксиформилированных имидазольных групп.

Иммобилизация КрК через различные функциональные группы боковых радикалов аминокислот

Способы иммобилизации фермента представлены в таблице 2. В некоторых случаях твердофазную иммобилизацию КрК проводили в условиях образования аналога комплекса переходного состояния в присутствии 2 мМ АДФ, 2 мМ $MgCl_2$, 3 мМ креатина и 10 мМ $NaNO_3$ в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,0 при 25 °С. Иммобилизация КрК через

свободные ϵ -аминогруппы Lys с использованием BrCN-сефарозы приводила к быстрому образованию нерастворимого конъюгата с высокой концентрацией иммобилизованного белка, достигающей 120 нмоль на 1 мл геля. Удельная активность фермента составила 80–90% от активности растворимого фермента (контроль). Эти данные соответствуют результатам по химической модификации свободных ϵ -аминогрупп Lys (таблица 1), а также результатам по ковалентной иммобилизации креатинкиназы на BrCN-активированную сефарозу [16].

Таблица 2 – Сравнение различных способов получения иммобилизованной КрК

| Матрица и ее пространственная группа | Реакционная группа креатинкиназы | Дополнительная химическая модификация креатинкиназы | Условия проведения иммобилизации | Количество связавшейся креатинкиназы (нмоль/мл геля) | Активность, % |
|---|---|---|--|--|---------------|
| BrCN-активированная Сефароза 4В -OCN | -NH ₂ | – | pH 8,3, 20 °С, 2 ч | 120 | 80–90 |
| Амино-Сефароза -OCH ₂ CH(OH)CH ₂ - NH(CH ₂) ₂ NH ₂ | -COOH | – | pH 4,8, 20 °С, 20 ч; 4 М мочевины; 0,1 М ЭДК | 5–10 | <5 |
| Бромацетил-Сефароза -OCH ₂ CH(OH)CH ₂ - NH(CH ₂) ₂ NHCOS H ₂ Br |  | – | pH 5,7, 20 °С, 24 ч; 0,1 М КJ | 30 | 20–25 |
| Тиопропил-Сефароза | Дополнительно введенные через ϵ -аминогруппы Lys сульфгидрильные группы | Метил-4-мер-каптобутири мидат | 2 мМ АДФ, 2 мМ MgCl ₂ , 3 мМ креатин, 10 мМ NaNO ₃ , pH 7,0, 25 °С | 70 | 45–50 |

Иммобилизация КрК через свободные карбоксильные группы остатков Glu и Asp с использованием Амино-Сефарозы сопровождалась низкой степенью иммобилизации фермента (примерно 5–10 нмоль на 1 мл геля). Низкий уровень иммобилизации может быть связан как с неоптимальными условиями для активации карбоксильных групп, так и с низкой концентрацией нуклеофильного агента (первичных аминогрупп Амино-Сефарозы). Кроме того, иммобилизованный таким образом препарат КрК был практически полностью лишен каталитической активности. Полученные данные находились в соответствии с большим значением консервативных кислотных остатков Glu и Asp для реализации каталитической функции КрК и свидетельствовали о том, что в процесс ковалентной иммобилизации были вовлечены функционально-важные остатки.

Поскольку модификация КрК по остаткам гистидина не сопровождалась значительной инактивацией фермента, были получены нерастворимые производные белка с помощью Бромацетил-Сефарозы. Выбор этого носителя был обусловлен способностью галоген-замещенных кислот и их производных алкилировать остатки His в белках (побочная реакция – по остаткам Met). Эта процедура приводила к образованию конъюгата с концентрацией 30 нмоль КрК на 1 мл геля. Это значение в 4 раза меньше, чем для данных по иммобилизации с помощью BrCN-Сефарозы, что свидетельствует о меньшей доступности остатков His по сравнению с остатками Lys в димере КрК. Гидрофобный характер остатков Met позволил исключить их участие в связывании с полимерным носителем. Активность иммобилизованного препарата составила 20 – 25% от активности растворимого белка. Это снижение может быть обусловлено «многоточечным» связыванием полимерной матрицы и остатков His, что сопровождалось нарушением конформационной подвижности фермента,

необходимой для связывания субстратов и переносе γ -фосфорильного остатка с АТФ на креатин.

Используя модификацию свободных аминогрупп метил-4-меркаптобутиримидатом, можно добиться обогащения белка сульфгидрильными группами. Ранее было установлено, что в условиях образования комплекса переходного состояния наблюдается защита реакционно-активного остатка Cys282 от инактивации йодацетамидом [16]. В специальных опытах было установлено, что при проведении реакции в течение 1 час в этих условиях остатки Cys в молекуле фермента практически недоступны для связывания с Тиопропил-Сефарозой. Была проведена дополнительная модификация фермента метил-4-меркаптобутиримидатом, который в мягких условиях быстро присоединялся к аминогруппам. Количество дополнительно введенных SH по данным спектрофотометрического титрования *n*-хлормеркурийбензоатом составило при ограниченной модификации в среднем 3,7 моль на моль белка (табл.1), что значительно ниже, чем при исчерпывающем ацилировании остатков Lys. В ходе ковалентного связывания модифицированного белка с Тиопропил-Сефарозой был получен конъюгат с концентрацией иммобилизованного белка 70 нмоль/мл геля и удельной активностью на уровне 45–50% по сравнению с контролем. Заметное уменьшение активности обусловлено, очевидно, тем, что реакционно-активный остаток Cys283 также частично вовлекался в образование нерастворимого конъюгата.

Выводы

Таким образом, результаты по твердофазной иммобилизации находились в соответствии с данными 3D-структуры, сайт-направленного мутагенеза, молекулярного докинга и химической модификации молекулы КрК. Наибольшая концентрация иммобилизованной КрК с сохранением функциональной активности достигалась при связывании нативного белка с бромциан-активированной сефарозой. Это обусловлено отсутствием снижения активности фермента при его модификации по доступным ϵ -аминогруппам. Химическая модификация по свободным COOH-группам и конъюгирование КрК с Амино-Сефарозой сопровождалась практически полной инактивацией фермента. Дополнительное обогащение КрК SH-группами через свободные ϵ -аминогруппы остатков Lys не сопровождалось заметным снижением активности. Это позволило использовать тиолированный фермент для реакции конъюгирования с полимерной матрицей (Тиопропил-Сефароза) используя реакцию тиол-дисульфидного обмена. Хотя активность в последнем случае была ниже, чем при связывании нативного белка с бромциан-активированной сефарозой, в качестве положительного момента следует отметить большую стабильность связи лиганда с матрицей. Это может оказаться полезным при разработке метода выделения КрК, основанного на обратимом образовании олигомерных комплексов белка с иммобилизованной субъединицей, а также для многократного использования иммобилизованного фермента при биотрансформациях креатина в креатинфосфат.

Список литературы

1. Saks, V. A. Role of creatine phosphokinase in cellular function and metabolism / Saks V. A., Rosenshtraukh L. V., Smirnov, V. N., Chazov E. I. // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1978. – Vol. 56 – P. 691–706.
2. Терапевтические возможности применения фосфокреатина при осложненном инфаркте миокарда. / А.П. Голиков [и др.] // Тер. архив. – 1987. – № 5. – С. 50–53.
3. Алессандро Л.С., Чини Р. Фосфокреатин в кардиоплегическом растворе. Защитные эффекты в практике кардиохирургии. / Фосфокреатин: биохимическое и фармакологическое действие и клиническое применение. / Под редакцией Сакса В.А., Бобкова Ю. Г., Струмиа Е. – М.89, – С.338–350.
4. Salomons, G.S. Creatine and creatine kinase in health and disease // Springer. – 2007. – P. 27–65.

5. Noda, L. The enzymatic activity and inhibition of adenosine 5'-triphosphate-creatine transphosphorylase. / T.Nihei, M.F. Morales // *J. Biol.Chem.* –1960. – Vol. 235. – P. 2830–2834.
6. Ахрем, А.А. Выяснение природы аминокислотных остатков, участвующих в комплексообразовании адренодоксина и адренодоксинредуктазы. Химическая модификация остатков лизина, глутаминовой и аспарагиновой кислот адренодоксина / А.А. Ахрем, В.М. Шкуматов, В.Л. Чащин // *Биоорган. химия.* – 1977. – Т. 3, № 8. – С. 1054–1059.
7. Имобилизованный цитохром *c* – эффективный лиганд для аффинной хроматографии электронтранспортных белков / В.М. Шкуматов [и др.] // *Биоорган. химия.* – 1983. – Т. 9, № 9. – С. 1237–1246.
8. Сравнительное изучение С27-стероидгидроксилирующей системы печени быка / С.Н. Гилевич [и др.] // *Биохимия.* – 1987. – Т. 52, № 2. – С. 198–213.
9. Способ получения [¹⁴C]прегненолона / В.М. Шкуматов [и др.] // Авторское свидетельство SU № 1365709 от 28 июня 1987 г.
10. С27-стероидгидроксилирующая система из митохондрий печени быка. Выделение ферредоксина (гепаторедоксина) аффинной хроматографией на цитохром *c*-сефарозе / В.М. Шкуматов [и др.] // *Биоорган. химия.* – 1983. – Т. 9, № 9. – С. 1231–1236.
11. Selectively immobilized cytochrome *c* as an effective affinity ligand for electron transfer proteins / A. A. Akhrem [et al] // *Biomed. Biochim. Acta.* – 1984. – V. 43, № 2. – P. 165–177.
12. Davis, B.J. Disc electrophoresis. Method and application to human serum proteins. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1964. – Vol. 121. – P.404–427.
13. Bickerstaff, G.F. Evidence for active subunits of matrix-bound creatine kinase. / N.C. Price // *FEBS Lett.* – 1976. – Vol. 64. – P. 319–322.
14. Quantitation of interactions between cytochrome P450_{scc} and adrenodoxin – analysis in the median UV-region by second derivative spectroscopy / V.M. Shkumatov [et al] // *Chem-Biol Interactions.* – 1988. – V. 68. – P. 71–83.
15. A conserved negatively charged cluster in the active site of creatine kinase is critical for enzymatic activity / M. Eder [et al] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275, № 35. – P. 27094–27099.
16. Bickerstaff, G.F. Properties of matrix-bound dimer and monomer derivatives of immobilized creatine kinase from rabbit skeletal muscle / N.C. Price // *Biochem. J.* –1978. – Vol. 173. – P. 85–93.

DIRECT SOLID-PHASE IMMOBILIZATION OF CREATINE KINASE FOR CREATION OF EFFECTIVE BIOCATALYST

**I.S. Strakha, Yu.A. Lesnikovich, Ya.V. Faletrov, E.A. Cherniavsky,
V.V. Senchuk*, V.M. Shkumatov****

Institute of Physico-Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk, Belarus

**Belarusian-Dutch joint venture "Farmland", Minsk, Belarus*

*** Belarusian State University, Minsk, Belarus*

Using different selective chemical modification of protein molecules, polymer matrix activation, *in silico* calculations and functional activity measurements various preparations of immobilized creatine kinase was obtained and characterized. The highest concentration of functionally-active creatine kinase was achieved in the case of the protein binding with bromcyan-sepharose. Chemical modification of carboxylic groups and creatine kinase conjugation with amino-sepharose were accompanied with practically complete inactivation of the enzyme. Additional saturation of creatine kinase by thiol groups via free ε-aminogroups of Lys residues allowed us to realize conjugation of the protein thiolated with thiopropyl-sepharose. The developed approaches allowed us to create stable and functionally-active preparation of creatine kinase for creatine phosphate biosynthesis.