

В. О. Чернишенко, Є. М. Макогоненко,
член-кореспондент НАН України Е. В. Луговської,
Т. М. Чернишенко, Т. М. Платонова, Л. І. Михаловська,
академік НАН України С. В. Комісаренко

Кінетика гідролізу В β -ланцюга молекули фібриногену, мономерного та полімерного фібрину desA фібриногеназою з отрути *Echis multisquamatis*

Досліджено кінетику відщеплення 1–42 пептиду В β -ланцюга фібриногену, мономерного й полімерного фібрину desA фібриногеназою з отрути *Echis multisquamatis* з використанням електрофоретичного та денситометричного методів визначення швидкості розщеплення субстрату. Встановлено, що швидкість гідролізу В β -ланцюга зменшується в такому ряді: фібриноген, мономерний фібрин, полімерний фібрин desA. Кінетичні параметри реакції становили: K_M 8,0, 9,6, 60 мкмоль/л; k_{cat} 0,13, 0,08, 0,0041 с⁻¹ відповідно вказаного ряду. Зроблено припущення про те, що зменшення спорідненості (K_M) та каталітичної ефективності гідролізу полімерного фібрину desA ферментом залежить від зменшення концентрації доступного субстрату в фібрилах та від залучення В β N-домени у взаємодію з D-регіоном у ході формування протофібрил і фібрил.

Раніше було виділено серинову фібриногеназу з отрути *Echis multisquamatis* (ефи багатолускової) та показано її здатність гідролізувати В β -ланцюг молекули фібриногену та X-X-R-pNa похідні трипептидів [1]. Мета даного дослідження — порівняння швидкості гідролітичної дії фібриногенази на фібриноген, полімерний і мономерний фібрин desA.

Фібриноген отримували з плазми крові донорів методом, описаним у статті [2]. Мономерний фібрин desA отримували з використанням тромбінподібного ферменту анцистрону, згідно з модифікованою методикою [2]. Фібриногеназу виділяли методом, описаним у статті [1]. Акриламід, ДСН, TEMED були придбані у GE Healthcare (Великобританія), хромогенний субстрат S2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNa) — у Chromogenix (Швеція), маркери SM0671, що містили поліпептиди з молекулярними масами, кДа: 170, 130, 100, 72, 55, 40, 33, 24, — у Fermentas (Литва), тетрапептид (GPRP) (H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH) — у Merck-Biosciences (Німеччина).

Гідроліз фібриногену, взятого в концентрації від 1,4 до 4,0 мкмоль/л, фібриногеназою (0,25 мкмоль/л) проводили в 0,05 моль/л трис-НСІ буфері, рН 7,4, при 25 °С. Пробі відбирали через 2,5, 5, 10 й 15 хв. Реакцію гідролізу зупиняли додаванням буфера для електрофоретичних зразків, що містив 2% ДС-На, 5% сахарози та 0,2% β -меркаптоетанолу, та прогріванням при 100 °С впродовж 3 хв. Зразки піддавали електрофоретичному розділенню в 12 і 10% ПАГ методом Лемлі. Білкові зони ідентифікували після фарбування Coomassie R-250.

N-кінцевий аналіз В β -ланцюга молекули фібриногену після гідролізу фібриногеназою було здійснено на приладі ABI ProCise 494HT Protein Sequencer у відділі біохімії факультету біологічних наук у Кембриджському університеті (University of Cambridge, School of the Biological Sciences, Department of Biochemistry).

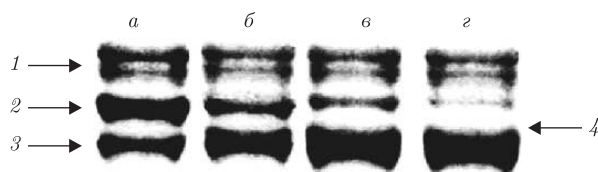


Рис. 1. Електрофореграма препаратів фібриногену (а) та гідролізатів фібриногену фібриногеназою, відібраних через 2,5 хв (б); 5 хв (в), 10 хв (г) інкубації.

Тут і на рис. 2: А α -ланцюг фібриногену (1); В β -ланцюг фібриногену (2); γ -ланцюг фібриногену (3); частково гідролізований В β -ланцюг фібриногену (4)

Гідроліз фібрину *desA* проходив за тих самих умов, що й гідроліз фібриногену. Реакцію гідролізу ініціювали додаванням до розчину фібриногенази мономерного фібрину *desA*, який одразу полімеризувався у нейтральному середовищі. Реакцію гідролізу зупиняли так само, як описано вище. Проби відбирали через 5, 10, 15 хв. Зразки піддавали електрофоретичному розділенню в ПАГ з ДС-Na.

Гідроліз мономерного фібрину *desA* фібриногеназою проводили при концентрації фібриногенази 0,18 мкмоль/л у присутності пептиду GPRP, що блокує “а”-центри полімеризації фібрину. Перебіг реакції відбувався в 0,05 моль/л *трис*-HCl буфері, рН 7,4, при 25 °С у діапазоні концентрацій фібрину від 1,7 до 3,7 мкмоль/л та концентрації пептиду GPRP — 1 ммоль/л. Реакцію гідролізу зупиняли через 5, 10, 15 хв так само, як описано вище. Зразки піддавали електрофоретичному розділенню в ПАГ з ДС-Na.

З урахуванням початкової швидкості реакції гідролізу (v_0) для кожної концентрації субстрату визначали K_M реакції розщеплення фібриногену та фібрину *desA* фібриногеназою та будували криві залежності v_0/S_0 . K_M встановлювали методом лінеаризації графіка у координатах Лайнуївера–Берка, каталітичну активність k_{cat} оцінювали за формулою: $k_{cat} = v_{max}/[E]$, де E — концентрація ферменту. Для отримання кінетичних кривих електрофореграми сканували і визначали спад інтенсивності забарвлення зони нативного β -ланцюга фібриногену в часі за допомогою денситометричної програми Totallab TL100. Електрофореграми та відповідні денситограми, що отримано для фібриногену та його гідролізатів при вихідній концентрації субстрату 2,9 мкмоль/л, демонструють рис. 1 й 2. За результатами обчислень денситограм у програмі Totallab TL100 отримано криву гідролізу фібриногену фібриногеназою, за кутом нахилу початкової ділянки даної кривої визначено v_0 .

Дія фібриногенази на фібриноген. Як було встановлено раніше, фібриногеназа при короткочасній інкубації відщеплює від N-кінцевої ділянки В β -ланцюга молекули фібриногену пептид молекулярною масою ($5,1 \pm 0,5$) кДа (В β N-домен [3]), що дало змогу віднести її до β -фібриногеназ [1]. Проведений N-кінцевий аналіз *desV β (1–42)₂*-фібриногену показав, що мішенню гідролітичної дії фібриногенази є пептидний зв'язок В β R42-A43, тобто відщеплюваним фрагментом є пептид В β 1–42. Оскільки за даних умов А α -ланцюг не зазнавав змін, які могли б бути зареєстровані з використанням електрофоретичного аналізу, нами поставлено за мету визначення й порівняння швидкості відщеплення В β N-домену від фібриногену, мономерного і полімерного фібрину *desA*.

Встановлення швидкості реакції гідролізу різних форм фібрин(оген)у проводили впродовж 10 хв. Продукти реакції гідролізу ідентифікували за допомогою електрофорезу в ПАГ у присутності ДСН (див. рис. 1).

За даними денситометричного аналізу відсканованих електрофореграм гідролізатів фібрин(оген)у (див. рис. 2) було обчислено v_0 В β -ланцюга фібрин(оген)у для різних вихідних

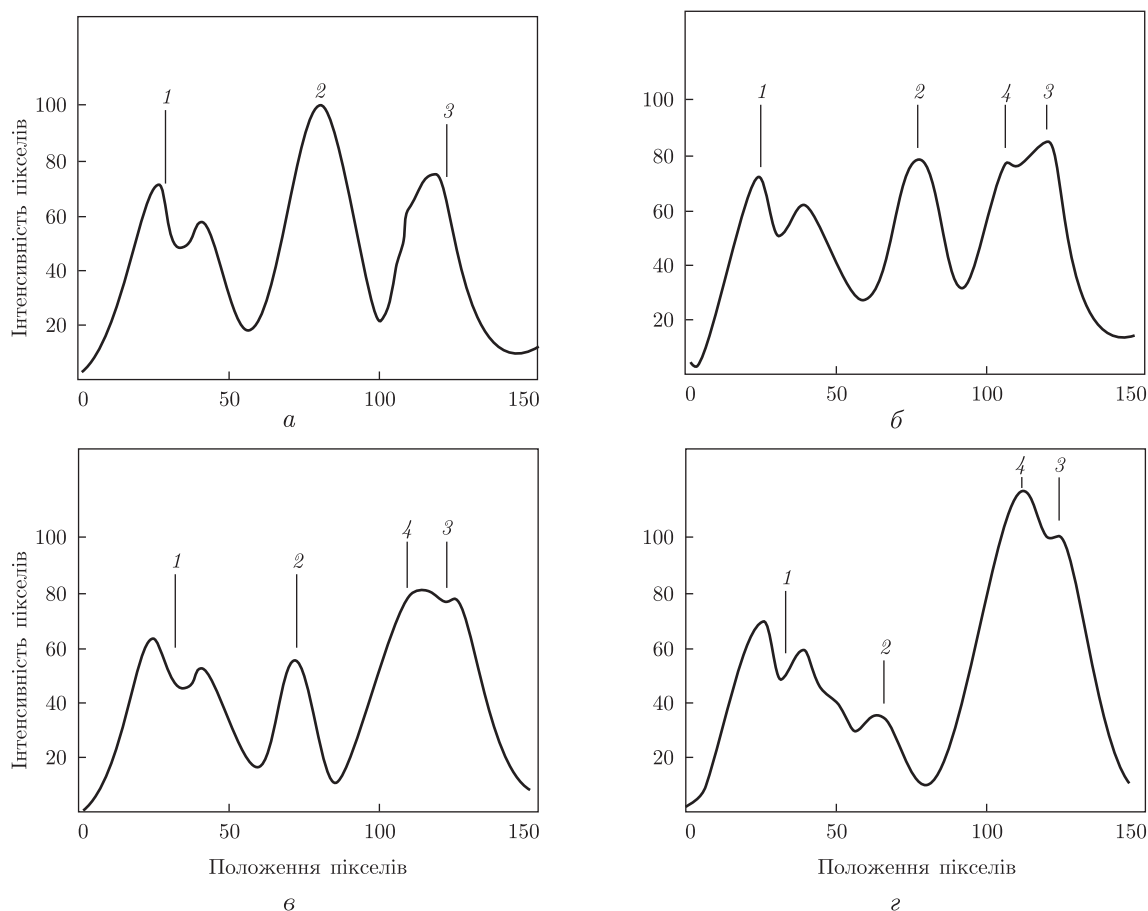


Рис. 2. Денситограми препаратів фібриногену (а) та продуктів гідролізу фібриногену фібриногеназою через 2,5 хв (б); 5 хв (в), 10 хв (г) інкубації, що отримано за результатами обробки у програмі Totallab TL100

концентрацій субстрату та отримано залежності швидкості гідролізу V_{β} -ланцюга від концентрації фібриногену, фібрину desA у мономерному і полімерному стані (рис. 3). Слід відзначити, що обчислені кінетичні параметри гідролізу фібриногену, мономерного та полімерного фібрину desA фібриногеназою, які наведено у табл. 1, близькі до відповідних констант реакції відщеплення фібринопептидів А й В від фібриногену тромбіном [4].

Дія фібриногенази на полімерний фібрин desA. Для визначення швидкості гідролізу фібрил полімерного фібрину фібриногеназою було проведено полімеризацію фібрину desA у присутності фібриногенази, щоб фермент однорідно розподілився в об'ємі згустку. Порівняно з процесом розщеплення нативного фібриногену гідроліз полімерного фібрину desA

Таблиця 1

Субстрат реакції гідролізу	K_M , мкмоль/л	k_{cat} , s^{-1}	k_{cat}/K_M , $(\text{мкмоль} \cdot \text{с})^{-1}$
Фібриноген	$8,0 \pm 0,4$	0,130	0,016
Фібрин desA + GPRP	$9,6 \pm 2,1$	0,080	0,0083
Фібрин desA	$60 \pm 1,1$ 10,800*	0,041	0,0007 0,004*

*Параметри, що обчислені з урахуванням теоретичної концентрації фібрину desA, доступної для гідролізу в фібрилі.

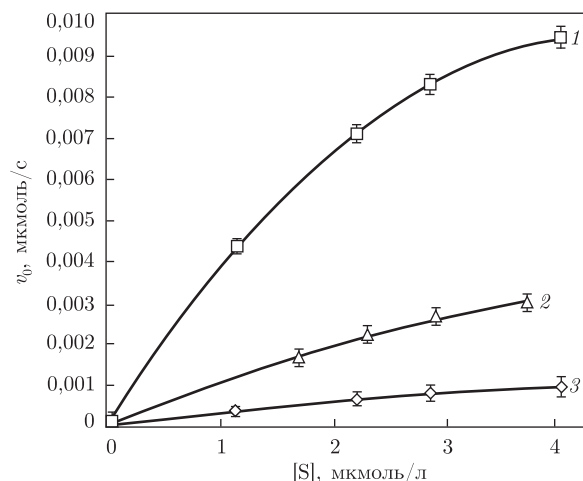


Рис. 3. Залежність початкової швидкості гідролізу фібриногену (1), мономерного (2) та полімерного (3) фібрину desA фібриногеназою від концентрації субстрату

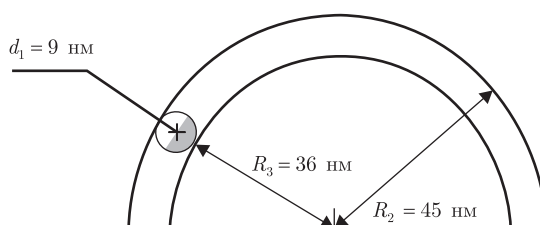


Рис. 4. Схема поперечного перерізу фібрили: d_1 — діаметр протофібрили, яка знаходиться в поверхневому шарі фібрили; R_2 — радіус фібрили; $R_3 = R_2 - d_1$ — радіус фібрили без урахування поверхневого шару протофібрили

проходив значно повільніше. K_M збільшувалася майже в 7,5 раза, а k_{cat} зменшувалася в 3,2 раза, що в цілому зменшувало ефективність гідролізу в 59 разів (див. табл. 1). Оскільки фібриногеназа не зв'язувалася з фібрином і не включалася в структуру фібрили, ми припустили, що зменшення швидкості гідролізу відбувалося завдяки зменшенню кількості доступних для гідролізу фібриногеназою молекул фібрину внаслідок утворення фібрил.

Виходячи з просторових параметрів фібрили (рис. 4), нами розраховано теоретичну концентрацію фібрину desA на поверхні фібрили, яка є доступною для гідролізу ферментом. Відомо [5], що середній діаметр фібрили (85–90 нм) є приблизно однаковим як для фібрину desA, так і для фібрину desAB та істотно не змінюється у діапазоні вихідних концентрацій фібриногену від 1,4 до 4 мкмоль/л, використаних у наших дослідженнях [6]. Вважаючи, що протофібрила має циліндричну форму, приймаємо її діаметр за 9 нм (див. рис. 4). Тоді площа поперечного перерізу фібрили S_1 дорівнює: $S_1 = \pi R_2^2 = 6,34 \text{ мкм}^2$. Площа перерізу, яку займають протофібрили, що контактують з розчином, дорівнює: $S_2 = (\pi R_2^2 - \pi R_3^2) = 6,36 \text{ мкм}^2 - 4,07 \text{ мкм}^2 = 2,29 \text{ мкм}^2$.

Фібрила утворюється за рахунок латеральної асоціації протофібрил, тому лише 50% молекул фібрину в протофібрилах поверхневого шару звернуті в розчин та є доступними для гідролізу в початковий момент часу. Площа перерізу, яку вони умовно займають, дорівнює: $S_2/2 = 1,15 \text{ мкм}^2$. Припускаючи, що щільність молекул фібрину в фібрилі незмінна по всьому перерізу, відсоток доступних для гідролізу в фібрилі молекул фібрину (початкова

концентрація субстрату в реакції гідролізу) становить 18% загальної концентрації фібрину desA.

З урахуванням концентрації доступного для гідролізу фібрину в фібрилі спорідненість фібриногенази до $V\beta N$ -доменів у фібрилі становитиме $K_M^* = 10,8$ мкмоль/л, а константа ефективності $(k_{cat}/K_M)^*$ гідролізу цих доменів у випадку полімерного фібрину desA становитиме $0,004$ (мкмоль \cdot с) $^{-1}$. K_M гідролітичного процесу майже однакова для обох субстратів фібриногенази — фібриногену й полімерного фібрину desA та істотно не залежить від форми і стану фібрин(оген)у. Константа ефективності реакції гідролізу полімерного фібрину desA у чотири рази нижча, ніж у випадку гідролізу фібриногену.

Дія фібриногенази на мономерний фібрин desA. Проведені дослідження дозволили припустити, що гальмування швидкості відщеплення $V\beta N$ -домену полімерного фібрину desA фібриногеназою є концентраційним ефектом і не пов'язане з конформаційними змінами, що супроводжують відщеплення фібринопептиду А. Для перевірки цього припущення було отримано фібрин desA у мономерній формі, додаючи в інкубаційну суміш пептид GPRP.

Як було показано, GPRP не інгібував амідазну активність фібриногенази. Так, активність фібриногенази відносно хромогенного субстрату S2302 у присутності пептиду GPRP становила $(0,126 \pm 0,06)$ ммоль/(хв \cdot мг), а при його відсутності — $(0,131 \pm 0,06)$ ммоль/(хв \cdot мг).

Виявилось, що величина K_M для мономерного фібрину desA (див. табл. 1; рис. 2) майже збігається з K_M для фібриногену та полімерного фібрину desA. Водночас, константа ефективності реакції гідролізу фібрину desA фібриногеназою вдвічі менша для мономерного фібрину desA та в чотири рази — для полімерного фібрину desA, порівняно з такою для фібриногену. Ці дані вказують на зменшення каталітичної ефективності фібриногенази при перетворенні фібриногену у фібрин та фібриновий гель.

Відомо, що фібриногенази з отрут змій розщеплюють $A\alpha$ - і/або $V\beta$ -ланцюги фібриногену. Виділена нами фібриногеназа з отрути *E. multisquamatis* у даних умовах розщеплювала тільки $V\beta$ -ланцюг фібриногену (див. рис. 1) [1]. Секвенування N-кінцевої послідовності $V\beta$ -ланцюга в молекулі деградованого фібриногену дозволило встановити, що гідролізу зазнає пептидний зв'язок $V\beta R42$ -E43 і в реакційне середовище вивільняється пептид $V\beta 1$ -42. Відщеплення цього фрагмента спричинює практично повну втрату здатності фібриногену до полімеризації [7].

Вважають, що $V\beta 1$ -42 фрагмент фібриногену утворює домен, який підтримує структуру його молекули [7-9], взаємодіє з αC -доменами [10] та бере участь у формуванні протофібрил та фібрил [1-13], тобто є надзвичайно важливою ділянкою протеїнової молекули. Порівняння кінетичних параметрів гідролізу фібриногену, мономерного та полімерного фібрину desA фібриногеназою вказує на різну доступність для ферменту пептидного зв'язку $V\beta R42$ -E43 $V\beta N$ -домену в молекулах фібриногену та фібрину. Було показано, що перетворення фібриногену в фібрин desA та полімеризація останнього майже не зменшує спорідненість ферменту до субстрату, проте зменшує k_{cat} активного центру і ефективність каталізу (k_{cat}/K_M) в цілому.

Константа ефективності (k_{cat}/K_M) та каталітична константа гідролізу фібрину desA, порівняно з такими гідролізу фібриногену (див. табл. 1), зменшується для мономерного фібрину вдвічі, а для полімерного — у чотири рази.

Розрахунок концентрації доступного субстрату в полімерному фібрині desA дозволив припустити, що основною причиною цього явища є просторові перешкоди, які виникають після перетворення фібриногену на полімерний фібрин. Ці перешкоди можуть бути частково пов'язані з конформаційними перебудовами молекули фібрину після відщеплення фіб-

ринопептидів, а саме — з дисоціацією α C-регіонів від фібринопептидів А та одне відносно іншого [10, 14], а також з участю В β N-домену в формуванні протофібрил та їх латеральній асоціації [9, 11].

Таким чином, застосування фібриногенази з отрути *E. multisquamatis* як інструмента аналізу структури субстрату [15] — фібрин(оген)у — вказує на те, що у В β N-доміні фібрин(оген)у лише один пептидний зв'язок (В β R42-A43) є доступним для гідролізу цим ферментом. Утворення фібрину desA та його полімеризація знижує ефективність дії фібриногенази, завдяки виникненню просторових перешкод у ході послідовних структурних перебудов молекули фібрину desA при формуванні її надмолекулярних комплексів — протофібрил, фібрил і полімерної сітки фібрину.

1. Чернишенко В. О., М'ясникова М. П., Платонова Т. М. та ін. Виділення та характеристика біохімічних властивостей фібриногенази з отрути ефі багатолускової (*Echis multisquamatis*) // Біотехнологія. – 2010. – **3**, № 1. – С. 27–34.
2. Варецька Т. В. Одержання фібрин-мономеру та вивчення його властивостей // Укр. біохім. журн. – 1965. – № 37. – С. 194–206.
3. Medved L., Weisel J. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin // J. Thromb. Haemost. – 2009. – **7**. – Р. 355–359.
4. Higgins D. L., Lewis S. D., Shafer J. A. Steady state kinetic parameters for the thrombin-catalyzed conversion of human fibrinogen to fibrin // J. Biol. Chem. – 1983. – **258**, No 15. – P. 9276–9282.
5. Weisel J. W. Fibrin assembly. Lateral aggregation and the role of the two pairs of fibrinopeptides // Biophys. J. – 1986. – **50**, No 6. – P. 1079–1093.
6. Blombäck B., Carlsson K., Hessel B. et al. Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – **997**. – P. 96–110.
7. Pandya B. V., Cierniewski C. S., Budzynski A. Z. Conservation of human fibrinogen conformation after cleavage of the B beta chain NH₂ terminus // J. Biol. Chem. – 1985. – **260**, No 5. – P. 2994–3000.
8. Siebenlist K. R., DiOrio J. P., Budzynski A. Z., Mosesson M. W. The polymerization and thrombin-binding properties of des – (B beta 1–42)-fibrin // Ibid. – 1990. – **265**, No 30. – P. 18650–18655.
9. Pandya B. V., Gabriel J. L., O'Brien J. et al. Polymerization site in the β chain of fibrin: mapping of the B β 1–55 sequence // Biochemistry. – 1991. – **30**. – P. 162–168.
10. Litvinov R. I., Yakovlev S., Tsurupa G. et al. Direct evidence for specific interactions of the fibrinogen α C domains with the central E region and with each other // Ibid. – 2007. – **46**, No 31. – P. 9133–9142.
11. Lugovskoy E. V., Gritsenko P. G., Kapustianenko L. G. et al. Functional role of B β -chain N-terminal fragment in the fibrin polymerization process // FEBS J. – 2007. – **274**. – P. 4540–4549.
12. Moskowitz K. A., Budzynski A. Z. The (DD)E complex is maintained by a composite fibrin polymerization site // Biochemistry. – 1994. – **33**, No 44. – P. 12937–12944.
13. Moen J. L., Gorkun O. V., Weisel J. W., Lord S. T. Recombinant B β Arg14His fibrinogen implies participation of N-terminus of B β chain in desA fibrin polymerization // Blood. – 2003. – **102**, No 7. – P. 2466–2471.
14. Veklich Y. I., Gorkun O. V., Medved L. V. et al. Carboxy terminal portions of the α -chains of fibrinogen and fibrin: localization by electron microscopy and the effects of isolated α C fragments on polymerization // J. Biol. Chem. – 1993. – **268**, No 18. – P. 13577–13585.
15. Fontana A., Polverino de Lauro P., Spolaore B. et al. Probing protein structure by limited proteolysis // Acta biochim. pol. – 2004. – **51**, No 2. – P. 299–321.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ
Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка
Брайтонський університет, Великобританія

Надійшло до редакції 27.01.2012

В. А. Чернышенко, Е. М. Макогоненко,
член-корреспондент НАН Украины **Э. В. Луговской, Т. М. Чернышенко,**
Т. Н. Платонова, Л. И. Михаловская,
академик НАН Украины **С. В. Комисаренко**

Кинетика гидролиза В β -цепи молекулы фибриногена, мономерного и полимерного фибрина desA фибриногеназой из яда *Echis multisquamatis*

*Исследована кинетика отщепления 1–42 пептида В β -цепи фибриногена, мономерного и полимерного фибрина desA фибриногеназой из яда *Echis multisquamatis* с использованием электрофоретического и денситометрического методов определения скорости расщепления субстрата. Установлено, что скорость гидролиза В β -цепи уменьшается в следующем ряду: фибриноген, мономерный фибрин, полимерный фибрин desA. Кинетические параметры реакции составляли: K_M 8,0, 9,6, 60 мкмоль/л; k_{cat} 0,13, 0,08, 0,0041 с⁻¹ соответственно указанного ряда. Сделано предположение, что уменьшение сродства (K_M) и каталитической эффективности гидролиза полимерного фибрина desA ферментом связано с уменьшением концентрации доступного субстрата в фибриллах и с вовлечением В β N-домена во взаимодействие с D-регионом в ходе формирования протофибрилл и фибрилл.*

V. O. Chernyshenko, E. M. Makogonenko,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **E. V. Lugovskoi,**
T. M. Chernyshenko, T. M. Platonova, L. I. Mikhalovska,
Academician of the NAS of Ukraine **S. V. Komisarenko**

Kinetics of fibrinogen, monomeric and polymerized fibrin desA В β -chain hydrolysis by *Echis multisquamatis* venom fibrinogenase

*Kinetics of fibrinogen, monomeric and polymerized fibrin desA 1–42 В β -chain peptide cleavage by *Echis multisquamatis* venom fibrinogenase has been studied using electrophoretic and densitometric methods of substrate cleavage rate determination. It is found that the rate of В β -chain hydrolysis decreases in the range: fibrinogen, monomeric and polymerized fibrin desA. Kinetic parameters of the reaction are: $K_M = 8.0, 9.6, 60 \mu\text{mol/l}$; $k_{cat} = 0.13, 0.08, 0.0041 \text{ s}^{-1}$ for fibrinogen, monomeric and polymerized desA fibrin, respectively. It is suggested that decreasing the affinity (K_M) and the catalytic efficiency of the enzyme toward the polymeric fibrin desA depends on the decrease of the substrate concentration available in fibrils and on the involvement of В β N-domain in the interaction with the D-region during the protofibril and fibril formations.*