

УДК 577.151.6

## ВИДІЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ФІБРИНОГЕНАЗИ З ОТРУТИ ЕФИ БАГАТОЛУСКОВОЇ (*Echis multisquamatis*)

**В. О. Чернишенко**<sup>1,2</sup>  
**М. П. М'ясникова**<sup>2</sup>  
**Т. М. Платонова**<sup>2</sup>  
**Е. В. Луговської**<sup>2</sup>  
**Є. М. Макогоненко**<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Київський національний університет імені Тараса Шевченка

<sup>2</sup> Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

*E-mail: bio.cherv@gmail.com*

З отрути *Echis multisquamatis* очищено протеїназу, що мала фібриногеназну активність. Молекулярна маса ензиму, визначена електрофорезом у ПААГ за присутності SDS, становила  $35 \pm 1$  кДа. Інгібіторний аналіз показав, що ензим належить до родини серинових ендопептидаз. Він гідролізував X-X-R-pNa похідні трипептидів і розщеплював В $\beta$ -ланцюг фібриногену. Молекулярна маса відщеплюваного пептиду, що становила 3,0 кДа, дозволяє припустити, що фібриногеназа розщеплює пептидний зв'язок В $\beta$ R23-E24.  $K_m$  цієї реакції становила 8  $\mu$ M.

**Ключові слова:**  $\beta$ -фібриногеназа, фібриноген, отрута *Echis multisquamatis*.

**Список використаних скорочень:** ДФФ — діізопропілфторфосфат; ЕДТА — етилендіамінтетраацетат; ПААГ — поліакриламідний гель; SDS — додецилсульфат натрію; ПХМБ — парахлормеркурійбензоат; S2238 — хромогенний субстрат тромбіну (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA); S2251 — хромогенний субстрат плазміну (D-Val-Leu-Lys-pNA); S2765 — хромогенний субстрат фактора Ха (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA); S236 (pyro-Glu-L-Pro-L-Arg-pNA) — хромогенний субстрат протеїну С; S2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNa) — хромогенний субстрат калікреїну; SDS — додецилсульфат натрію.

Зміїна отрута є сумішшю протеїнів, пептидів і ензимів, об'єктом дії яких є переважно нервова система та система гемостазу. Дія ензимів зміїних отрут на останню спрямована головним чином на фактори зсідання крові, мембрани і рецептори ендотеліальних клітин і тромбоцитів [1].

Важливу групу ензимів зміїної отрути становлять фібриногенази, що є ендопептидазами прямої дії. Вони не відщеплюють фібринопептиди від фібриногену і, отже, не ініціюють утворення фібрину [2, 3]. Ці ензими належать до родини металопроїназ або серинових протеїназ. Мішенню їхньої дії є  $\alpha$ - або В $\beta$ -ланцюги молекули фібрин(о)гену, тому вони поділяються відповідно на  $\alpha$ - та  $\beta$ -

фібриногенази. Фібриногенази гальмують формування фібринових згустків, оскільки частково деградований фібриноген втрачає здатність швидко формувати полімерний фібрин [4].

$\alpha$ -Фібриногенази, як правило, є цинквмісними металопроїназами, молекулярна маса яких становить 20–26 кДа. Переважна більшість металозалежних фібриногеназ гідролізують як фібриноген, так і полімерний фібрин [2, 3].  $\beta$ -Фібриногенази здебільшого належать до серинових протеїназ [5, 6]. Деякі з них здатні розщеплювати як фібриноген, так і фібрин, проте фібриногеназна активність для них переважає. Як і всім сериновим протеїназам, їм властива

амідазна та естеразна активність. Молекулярна маса серинових  $\beta$ -фібриногеназ становить 23–32 кДа. На відміну від металопротеїназ, вони є термостабільними протеїнами і зберігають активність у широкому діапазоні рН. Більшість серинових фібриногеназ є глікопротеїнами [2, 3].

Спостерігається висока гомологія у первинній структурі серинових фібриногеназ, екзогенних активаторів плазміногену зі зміїної отрути і тромбіну. Проте  $\beta$ -фібриногенази не виявляють тромбіноподібної активності й не здатні активувати плазміноген [3, 7].

Фібриногенази привертають до себе увагу клінічної медицини як потенційні антикоагуляційні агенти, які шляхом інактивації фібриногену можуть зменшувати ризик утворення тромбів у передтромботичних станах при серцево-судинних захворюваннях [8, 9].

Відомо, що до 20% протеїнового складу отрути змії родини *Viperidae* становлять саме протеїнази, серед яких є і фібриногенази [10]. Враховуючи унікальну специфічність протеїназ зміїної отрути в розщепленні  $\alpha\alpha$ - і  $\beta\beta$ -ланцюгів фібриногену та високу концентрацію таких ензимів у отруті, метою нашої роботи було виділити й охарактеризувати фібриногенази з отрути *Echis multisquamatis*.

### Матеріали і методи

**Очищення фібриногенази.** Цільну отруту (50 мг) розчиняли в 1 мл 0,025 М трис-НСІ-буфера, рН 8,9, наносили на колонку, заповнену Q-сефарозою і зрівноважену тим самим буфером. Об'єм колонки — 3 мл. Після відмивання незв'язаного протеїну адсорбований протеїн елюювали ступінчастим градієнтом 0,125; 0,2; 0,35 та 1М NaCl зі швидкістю  $2,55 \text{ мл} \cdot (\text{хв} \cdot \text{см}^2)^{-1}$ . Фракція, що містила фібриногеназу, елюювалася за іонної сили 0,125 М NaCl.

Отриману фракцію фібриногенази діалізували проти 0,05 М трис-НСІ-буфера, рН 7,4, і наносили на колонку, заповнену гепарин-агарозою типу II (Sigma, США) і зрівноважену тим самим буфером. Об'єм колонки — 2 мл. Протеїни, адсорбовані на гепарин-агарозі, елюювали послідовно 0,1 та 0,3 М NaCl зі швидкістю  $1,27 \text{ мл} \cdot (\text{хв} \cdot \text{см}^2)^{-1}$ . Фібриногеназа елюювалася за іонної сили 0,3 М NaCl.

**Електрофоретичний аналіз** проводили в 12 та 10% ПААГ за методом Лемлі у присутності SDS [11]. Протеїнові зони ідентифікували після фарбування Coomassі R-250.

**Ензимелектрофорез** здійснювали з метою ідентифікації протеїнових зон з фібри-

ногеназною активністю. ПААГ був заповнений у присутності 0,5 мг/мл фібриногену. Після електрофорезу, проведеного за вищезазначеною методикою, SDS видаляли з гелю триразовим промиванням у 2,5%-му розчині тритону X-100. Потім гель інкубували в 0,1 М гліциновому буфері, рН 8,3, упродовж 12 год. Гель забарвлювали Coomassі /R-250 та ідентифікували зони протеолітичної активності за положенням незабарвлених плям на гелі.

**Коефіцієнт екстинкції** 0,1% розчину фібриногенази розраховували після визначення екстинкції при 280 нм та концентрації протеїну в розчині методом Бредфорда [12].

**Амінокислотний склад** визначали на автоматичному амінокислотному аналізаторі Т-339 Mikrotekno (Чехія), у літійцитратному режимі в одноколонковому циклі. Гідроліз протеїну проводили в 6 N HCl у запаяних ампулах при 120 °С протягом 4 год [13].

**Амідазну активність** визначали за розщепленням хромогенних субстратів S2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA), S2251 (D-Val-Leu-Lys-pNA), S2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), S236 (pyro-Glu-L-Pro-L-Arg-pNA), S2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNa). Аналіз проводили в мікропланшетах, у лунки яких послідовно вносили 0,05 М трис-НСІ-буфер, рН 7,4, хромогенний субстрат до 40  $\mu\text{M}$  (у випадку S2302 — до 90  $\mu\text{M}$ ). Реакцію ініціювали, додаючи фібриногеназу до 0,010 мг/мл (у випадку S2302 — до 0,001 мг/мл) при температурі 37 °С. Амідазну активність фібриногенази характеризували за швидкістю вивільнення паранітроаніліну (pNa), яку детектували при довжині хвилі 405 нм за допомогою ридера Multiskan EX [14].

**Інгібіторний аналіз** фібриногенази проводили, визначаючи амідазну активність з використанням хромогенного субстрату тромбіну S2238, як описано вище, за присутності інгібіторів серинових протеїназ — ДФФ, бензамідину; металопротеїназ — ЕДТА та цистеїнових протеїназ — ПХМБ. Інгібітори вносили в лунку безпосередньо перед додаванням фібриногенази до таких кінцевих концентрацій: ЕДТА, бензамідин — 16 мМ, ДФФ — 8 мМ, ПХМБ — 1,6 мМ.

Для визначення **фібриногеназної активності** у фракціях, отриманих під час хроматографії, інкубували фібриноген (1,5 мг/мл) з 0,010 мг протеїну фракції в 0,05 М трис-НСІ-буфері, рН 7,4, протягом 10 хв при температурі 37 °С. Кінцевий об'єм інкубаційного середовища — 0,25 мл. Згортання фібриногену ініціювали тромбіном в кінцевій концентрації 1 НН/мл та фіксували час утворен-

ня згустку. Фібриногеназну активність одержаних фракцій визначали за подовженням часу утворення згустку і виражали у відсотках від контрольного часу згортання нативного фібриногену.

$K_m$  реакції розщеплення фібриногену фібриногеназою розраховували, визначаючи початкову швидкість реакції фібринолізу в діапазоні концентрацій фібриногену від 1,5 до 7,35  $\mu\text{M}$ . Реакцію гідролізу фібриногену проводили за концентрації фібриногенази 0,008 мг/мл в 0,05 М трис-НСІ-буфері, рН 7,4, при температурі 25 °С. Проби відбирали через 2,5; 5; 7,5; 10; 15 хв, реакцію гідролізу зупиняли додаванням буфера для електрофоретичних зразків, що містив 5% сахарози, 2% SDS та 0,2%  $\beta$ -меркаптоетанолу. Зразки піддавали електрофоретичному розділенню в ПААГ з SDS. Електрофореграми сканували і визначали наростання інтенсивності забарвлення зони частково гідролізованого  $\beta'$ -ланцюга фібриногену в часі за допомогою денситометричної програми Totallab TL100. Знаходили початкову швидкість ( $V_0$ ) для кожної концентрації фібриногену і будували криві залежності  $V_0$  від  $S_0$ ,  $K_m$  визначали методом лінеаризації графіка в координатах Лайнуївера–Берка [15].

Обробку фібриногеназою *E. ta* NDSK-фрагментів фібрин(оген)у, взятих у концентрації (1,3 мг/мл), проводили, інкубуючи їх з фібриногеназою у кінцевій концентрації 0,08 мг/мл протягом 45 хв в 0,05М трис-НСІ-буфері, рН 7,4, при температурі 25 °С. Гідролізати аналізували електрофоретично в ПААГ з SDS, як описано вище.

### Результати та обговорення

У процесі фракціонування отрути *E. multiscuamatis* на Q-сефарозі було отримано дві фракції протеїнів, що справляли вплив на компоненти системи гемостазу. Фракція, що елюювалася за іонної сили 0,2 М NaCl, була здатна активувати протромбін. Очевидно, до її складу входив виділений і описаний раніше в нашій лабораторії активатор протромбіну екамулін [16].

Протеїнова фракція, що елюювалася за іонної сили 0,125 М, виявляла фібриногеназну активність та характеризувалася здатністю гідролізувати хромогенний субстрат тромбіну S2238. Оскільки отримана фракція містила домішки інших протеїнів, її наносили на афінну колонку гепарин-агарози типу II та після відмивання елюювали 0,05 М трис-НСІ-буфером, рН 7,4, що містив 0,3 М NaCl.

У такий спосіб з 50 мг цільної отрути *E. multiscuamatis* було отримано 2,04 мг електрофоретично чистого препарату фібриногенази (рис. 1). Молекулярна маса одержаного ензиму становила  $35 \pm 1$  кДа. За даними денситометричних вимірювань і обчислень у програмі Totallab TL100, у цільній отруті 4,5% протеїну припадало на зону фібриногенази (табл. 1).

Таблиця 1. Характеристика фракції фібриногенази на різних етапах очищення

	Цільна отрута	Фракція після Q-сефарози	Фракція після гепарин-агарози
Вміст протеїну, мг	50	4,79	2,04
Фібриногеназна активність, $\mu\text{M}/(\text{хв}\cdot\text{мг})$	3,9	65,3	241,4
Вихід за протеїном, %	100	9,5	4,1
Ступінь очищення	0	16,7	61,89

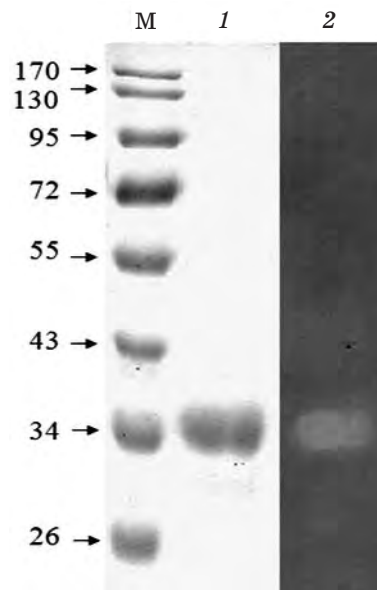


Рис. 1. Електрофореграма (1) та ензімограма (2) очищеного препарату фібриногенази після гепарин-агарози; М — маркери Fermentas #0671

Для порівняння з фібриногеназами інших зміїних отрут було визначено амінокислотний склад фібриногенази (табл. 2). Як свідчать наведені дані, він помітно відрізнявся від амінокислотних складів інших фібриногеназ, зокрема афаацитину [17] ( $\alpha$ -фібриногенази), шедонази [18] та протеази А [19] ( $\beta$ -фібриногеназ).

Таблиця 2. Порівняння амінокислотного складу фібриногенази з отрути *E. multisquamatis* (1) та фібриногеназ: афаацитину (2), шедонази (3) та протеази А (4)

	1		2		3		4	
	N*	%**	N	%	N	%	N	%
Lys	12	4,24	7	2,713	13	5,485	24	6,575
His	7	2,66	8	3,101	7	2,954	12	3,288
Arg	11	4,18	13	5,039	12	5,063	17	4,658
Asx	29	10,48	27	10,47	26	10,97	45	12,33
Thr	18	6,55	15	5,814	15	6,329	nd	nd
Ser	19	7,01	18	6,977	17	7,173	28	7,671
Glx	23	6,63	19	7,364	16	6,751	21	5,753
Pro	16	5,88	16	6,202	19	8,017	22	6,027
Gly	29	10,6	25	9,69	19	8,017	33	9,041
Ala	20	7,3	17	6,589	12	5,063	21	5,753
Cys	10	3,55	12	4,651	12	5,063	20	5,479
Val	10	3,77	15	5,814	12	5,063	18	4,932
Met	2	0,69	6	2,326	3	1,266	4	1,096
Pe	20	7,45	20	7,752	16	6,751	28	7,671
Leu	25	9,25	23	8,915	18	7,595	30	8,219
Tyr	14	5,04	5	1,938	6	2,532	12	3,288
Phe	8	2,84	8	3,101	9	3,797	6	1,644
Trp	nd	nd	4	1,55	5	2,11	nd	nd
Сума	273		258		237		365	

\* N — кількість амінокислот у молекулі; \*\*% — відсотковий вміст амінокислоти.

Аналіз рН-залежності амідазної активності фібриногенази (дані не наведено) показав, що рН-оптимум ензиму становив приблизно 7,4, що вказувало на його належність до серинових протеїназ.

З метою з'ясування природи активного центру фібриногенази було досліджено вплив інгібіторів серинових, метало- та цистеїнових протеїназ на амідазну активність препарату. Як субстрат використовували хромогенний субстрат тромбіну S2238. Було виявлено, що ПХМБ та ЕДТА у концентраціях, що повністю інгібують активність відповідно цистеїнових протеїназ [20] та металопротеїназ [21], відчутно не пригнічували амідазну активність фібриногенази. Водночас інгібітори, що ковалентно (ДФФ) чи нековалентно (бензамідин) блокують активний центр серинових протеїназ, майже повністю пригнічували амідазну активність ензиму (рис. 2). Ці дані підтверджують припущення про належність його до родини серинових протеїназ.

Оскільки фібриногеназа виявляла амідазну активність стосовно тромбінового субстрату, було досліджено субстратну спе-

цифічність ензиму до амідних субстратів деяких ензимів плазми крові (рис. 3). Встановлено, що найбільшу активність фібриногеназа виявляла до хромогенних субстратів калікреїну, тромбіну та фактора Ха, які належали до аргінінових субстратів, загальна формула яких має вигляд: X-X-R-pNa. Таким чином, за специфічністю фібриногеназа належала до серинових протеїназ трипсिनного типу, що більш ефективно розщеплюють амідні зв'язки, утворені COOH-групою аргініну.

Для визначення специфічності фібриногенази стосовно фібриногену досліджували склад гідролізатів фібриногену, отриманих після інкубації з ензимом, методом електрофорезу в ПААГ у присутності 0,2% -го β-меркаптоетанолу. Як свідчать дані електрофорезу (рис. 4), мішенню гідролітичної дії фібриногенази є Вβ-ланцюг фібриногену. У процесі гідролізу через 7,5 хв спостерігається зменшення інтенсивності його зони і накопичення частково деградованої β'-форми Вβ-ланцюга. За допомогою обчислень у програмі Totallab TL100 було встановлено її молекулярну масу — 51,5 кДа. Беручи до уваги, що молекулярна маса Вβ-ланцюга

молекули фібриногену дорівнює 54,5 кДа, можна припустити, що в ході гідролізу від В $\beta$ -ланцюга відщеплюється пептид молекулярною масою 3 кДа.

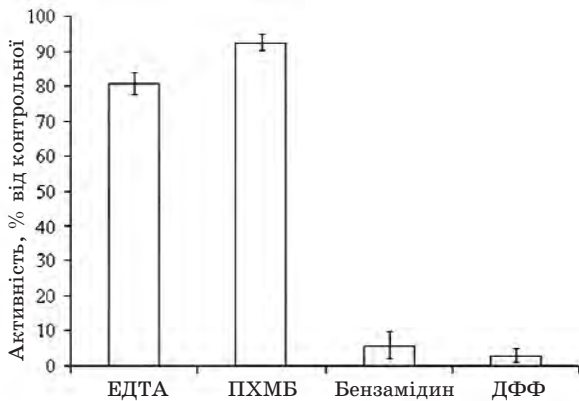


Рис. 2. Вплив інгібіторів на амідазну активність фібриногенази

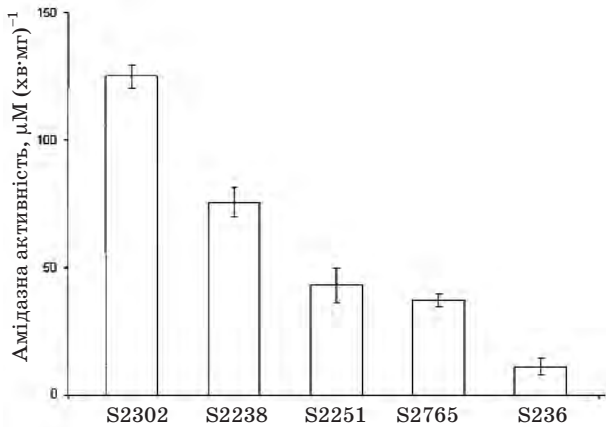


Рис. 3. Амідазна активність препарату фібриногенази щодо хромогенних субстратів калікреїну, тромбіну, фактора Ха, плазміну, протеїну С (зліва направо)

Щоб визначити ділянку В $\beta$ -ланцюга молекули фібриногену, що гідролізується фібриногеназою, порівнювали здатність фібриногенази розщеплювати Е-фрагмент фібрину та NDSK-фрагмент фібриногену. Досліджувані фрагменти різняться між собою N-кінцевими ділянками молекули фібриногену: NDSK-фрагмент включає послідовності А $\alpha$  1-78, В $\beta$  1-121 і  $\gamma$  1-62, Е-фрагмент не містить ділянки А $\alpha$  1-17 та В $\beta$  1-54, відповідно в А $\alpha$ - та В $\beta$ -ланцюгах [22]. Результати, подані на рис. 5, свідчать про те, що Е-фрагмент фібриногену не розщеплювався фібриногеназою, однак у випадку NDSK-фрагмента гідроліз був очевидний.

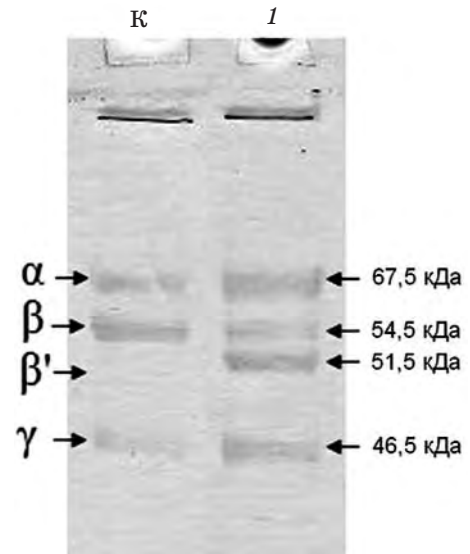


Рис. 4. Електрофореграма продуктів гідролізу фібриногену фібриногеназою з отрути *E. multiquamatis*:

К — нативний фібриноген; 1 — продукти фібриногенолізу через 7,5 хв інкубації з фібриногеназою. Співвідношення ензим-субстрат становило 1:100

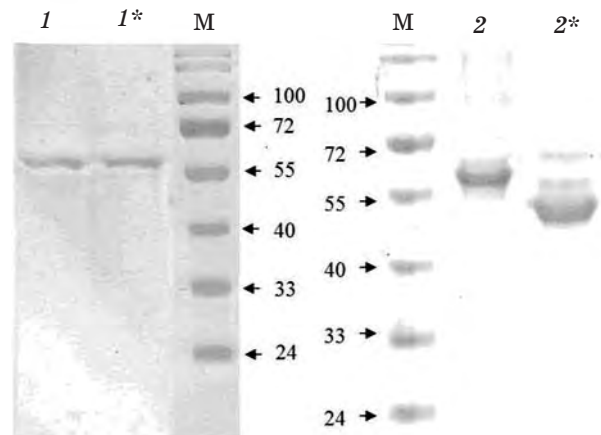


Рис. 5. Електрофореграма продуктів гідролізу фрагментів Е та NDSK фібрин(огену) фібриногеназою з отрути *E. multiquamatis*:

1 — Е-фрагмент фібрин(огену); 1\* — Е-фрагмент фібрин(огену) після інкубації з фібриногеназою; 2 — NDSK-фрагмент фібриногену; 2\* — NDSK-фрагмент фібриногену після інкубації з фібриногеназою; М — маркери Fermentas #0671. Співвідношення ензим-субстрат 1:100. Час інкубації 45 хв

Таким чином, ми дійшли висновку, що, ймовірно, пептидний зв'язок, на який спрямована дія фібриногенази з отрути *E. multiquamatis*, міститься в N-кінцевій ділянці В $\beta$ -ланцюга, а саме в межах послідовності В $\beta$  1-54. Як було виявлено, фібриногеназа переважно гідролізує зв'язки, утворені СООН-групами аргініну, тому ймовірними ділянками гідролізу можуть бути пептидні зв'язки,

утворені амінокислотами R17, R23 та R30. Розрахунки молекулярної маси потенційно відщеплюваних пептидів, подані на рис. 6, свідчать, що пептид з молекулярною масою 3 кДа може утворитися лише в разі розщеплення зв'язку ВβR23-E24.

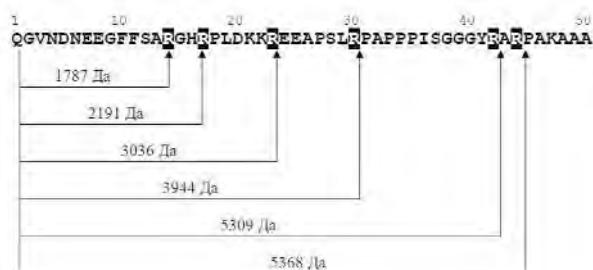


Рис. 6. Локалізація місця ймовірного гідролізу фібриногеназою N-кінцевої Q1-A50 послідовності Вβ-ланцюга фібриногену [24]

Дані, наведені на рис. 4, вказують на досить високу швидкість гідролізу Вβ-ланцюга фібриногену ензимом. Для оцінки спорідненості ензиму до протеїнового субстрату було проаналізовано кінетику гідролізу фібриногену в діапазоні концентрацій від 1,75 до 7,3 μM фібриногену. Гідролізати аналізували методом електрофорезу у ПААГ/SDS-Na у присутності β-меркаптоетанолу.

За допомогою програми Totallab TL100 було обраховано серію отриманих електрофореграм гідролізатів фібриногену та обчислено кінетичні параметри розщеплення зв'язку ВβR23-E24 Вβ-ланцюга фібриногену фібриногеназою, як описано у методах.

Отримана величина  $K_m = 8 \mu M$  гідролізу Вβ-ланцюга молекули фібриногену ензимом дуже близька до величин  $K_m$  для реакцій

відщеплення тромбіном А- та В-фібринопептидів, які знаходяться у межах 8–10 μM [23].

Відомо, що саме в N-кінцевих ділянках Вβ-ланцюга зосереджені важливі функціональні сайти молекули, зокрема центр полімеризації В (β15–18), ділянки зв'язування з тромбоцитами (β15–42), гепарин- та тромбінзв'язувальні ділянки (β19–42) [25], ділянки, відповідальні за міждоменні ДД-Е взаємодії у процесі полімеризації фібрину (β12–46) [26]. Тому використання фібриногенази з отрути *E. multisquamatis* для обмеженого протеолізу [27] дозволить отримувати частково деградовані за N-кінцями Вβ-ланцюга форми фібрин(оген). Можна очікувати, що такі форми фібриногену зберігатимуть близьку до нативної структуру Е-домени молекули та функціональну активність негідролізованих ділянок Вβ-ланцюга [28–29], що є перспективним для вивчення процесу полімеризації фібрину та фібрин(оген)-клітинних взаємодій.

Отже, нами було отримано та охарактеризовано нову фібриногеназу з отрути *E. multisquamatis*. Електрофоретично гомогенний препарат був ізольований завдяки послідовному застосуванню іонообмінної та афінної хроматографії на Q-сефарозі та гепарин-агарозі відповідно. Фібриногеназа належить до β-фібриногеназ, оскільки гідролізує Вβ-ланцюг молекули фібриногену, розщеплює амідні зв'язки, переважно утворені COOH-групою аргініну. Ймовірно, що ензим розщеплює пептидний зв'язок ВβR23-E24 у Вβ-ланцюзі і його можна використовувати у дослідженнях структури та функцій фібриногену-фібрину.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Braud S., Bon C., Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis // *Biochimie*. — 2000. — V. 82, N 9–10. — P. 851–859.
2. Markland F. S. Fibrin(ogen)olytic enzymes from snake venoms / *Haemostasis and Animal Venoms*. Ed. Pirkle H., Markland F. S. — Marcel Dekker, Inc. — 1988. — P. 149–165.
3. Swenson S., Markland F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes // *Toxicon*. — 2005. — V. 45. — P. 1021–1039.
4. Kini R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism // *Biochem. J.* — 2006. — V. 397. — P. 377–387.
5. Jiao H.-M., Yang L.-X., Lu B. et al. Shedaoenase, a Novel Fibrinogenase from the Venom of *Agkistrodon shedaoensis* Zhao // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* — 2005. — V. 37, N 12. — P. 835–842.
6. Samel M., Subban J., Siigur J., Siigur E. Biochemical characterization of fibrinogenolytic serine proteinases from *Vipera lebetina* snake venom // *Toxicon*. — 2002. — V. 40. — P. 51–54.
7. Matsui T., Sakurai Y., Fujimura Y. et al. Purification and amino acid sequence of haly-stase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen // *Eur J. Biochem.* — 1998. — V. 252. — P. 569–575.

8. *Gardiner E. E., Andrews R. K.* The cut of the clot(h): snake venom fibrinogenases as therapeutic agents // *J. Thromb. Haemost.* — 2008. — V. 6, N 8. — P. 1360–1362.
9. *Liu M., Counsell C., Zhao X. L., Wardlaw J.* Fibrinogen-Depleting Agents for Acute Ischemic Stroke // *Stroke.* — 2005. — V. 36. — P. 173–174.
10. *Wisner A., Braud S., Bon C.* Snake venom proteinases as tools in hemostasis studies: structure-function relationship of a plasminogen activator purified from *Trimeresurus stejnegeri* venom // *Haemostasis.* — 2001. — V. 31. — P. 133–140.
11. *Laemli R. V.* Cleavage of structural proteins during of bacteriophage T4 // *Nature.* — 1970. — V. 227. — P. 680–685.
12. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein — dye binding // *Anal. Biochem.* — 1976. — V. 72. — P. 248–254.
13. *Speckmann D., Stein W., Moore S.* Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids // *Anal. Chem.* — 1958. — V. 30. — P. 1190–1196.
14. *Гершкович А. А., Куберев В. К.* Хромогенные и флуорогенные пептидные субстраты протеолитических энзимов // *Биоорг. хим.* — 1988. — Т. 14, № 11. — С. 1461–1488.
15. *Dixon M., Webb E. C.* *Enzymes.* — New York: Academic Press Inc., Publishers, 1964. — 950 p.
16. *Solovjev D. A., Platonova T. N., Ugarova T. P.* Purification and characterization of ecamulin — a new prothrombin activator from the *Echis multisquamatis* snake venom // *Biochemistry.* — 1996. — V. 61. — P. 785–793.
17. *Lababa-Djebari F., Martin-Eauclaire M.-F. I., Mauco G., Marchot P.* Afaacytin, an  $\alpha\beta$ -fibrinogenase from *Cerastes cerastes* (Horned Viper) venom, activates purified factor X and induces serotonin release from human blood platelets // *Eur. J. Biochem.* — 1995. — V. 233. — P. 756–765.
18. *Jiao H. M., Yang L. X., Lu B. et al.* Shedaoenase, a novel fibrinogenase from the venom of *Agkistrodon shedaoentesis* Zhao // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* — 2005. — V. 12. — P. 835–842.
19. *Murayama N., Saguchi K., Mentele R.* The unusual high molecular mass of Bothrops protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content // *Biochim. Biophys. Acta. — Proteins & Proteomics.* — 2003. — V. 1652, N 3. — P. 1–6.
20. *Webster A., Russell W. C., Kemp G. D.* Characterization of the adenovirus proteinase: development and use of a specific peptide assay // *J. Gen. Virol.* — 1989. — V. 70. — P. 3215–3223.
21. *Marcussia S., Bernardesa C. P., Santos-Filho N. A. et al.* Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity // *Peptides.* — 2007. — V. 28, N 12. — P. 2328–2339.
22. *Gardlund B.* Human fibrinogen amino acid sequence of fragment E and of adjacent structures in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains // *Thromb. Res.* — 1977. — V. 5. — P. 689–702.
23. *Higgins D. L., Lewis S. D., Shafer J. A.* Steady state kinetic parameters for the thrombin-catalysed conversion of human fibrinogen to fibrin // *J. Biol. Chem.* — 1983. — V. 258, N 15. — P. 9276–9282.
24. *Watt K. W. K., Takashi Takagi, Doolittle R. F.* Amino acid sequence of the  $\beta$ -chain of human fibrinogen: Homology with the  $\gamma$ -chain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1987. — V. 75, N 4. — P. 1731–1735.
25. *Mosesson M. W.* Fibrinogen and fibrin structure and function // *J. Thromb. Haemost.* — 2005. — V. 3. — P. 1894–1904.
26. *Lugovskoy E. V., Gritsenko P. G., Kapustianenko L. G. et al.* Functional role of  $\beta$ -chain N-terminal fragment in the fibrin polymerization process // *FEBS J.* — 2007. — V. 274. — P. 4540–4549.
27. *Fontana A., Polverino de Laureto P., Spolaore B. et al.* Probing protein structure by limited proteolysis // *Acta Biochim. Polonica.* — 2004. — V. 51, N 2. — P. 299–321.
28. *Fontana A., Fassina G., Vita C. et al.* Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin // *Biochemistry.* — 1986. — V. 25, N 8. — P. 1847–1851.
29. *Zappacosta F., Pessi A., Bianchi E. et al.* Probing the tertiary structure of proteins by limited proteolysis and mass spectrometry: the case of Minibody // *Prot. Sci.* — 1996. — V. 5. — P. 802–813.

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА  
БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ  
ФИБРИНОГЕНАЗЫ ИЗ ЯДА  
ЭФЫ МНОГОЧЕШУЙЧАТОЙ  
(*Echis multisquamatis*)**

В. А. Чернышенко<sup>1, 2</sup>  
М. П. Мясникова<sup>2</sup>  
Т. Н. Платонова<sup>2</sup>  
Э. В. Луговской<sup>2</sup>  
Е. М. Макогоненко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Киевский Национальный университет  
имени Тараса Шевченко

<sup>2</sup> Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев

*E-mail: bio.cherv@gmail.com*

Из яда *Echis multisquamatis* очищена протеиназа с фибриногеназной активностью. Молекулярная масса энзима, определенная с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS, составляла  $35 \pm 1$  кДа. Ингибиторный анализ показал, что энзим принадлежит к семейству сериновых эндопептидаз. Он гидролизировал X-X-R-pNa производные трипептидов и расщеплял B $\beta$ -цепь фибриногена. Молекулярная масса отщепляемого пептида, составляющая 3,0 кДа, позволяет предположить, что фибриногеназа расщепляет пептидную связь B $\beta$ R23-E24.  $K_m$  этой реакции составляла 8  $\mu$ M.

**Ключевые слова:**  $\beta$ -фибриногеназа, фибриноген, яд *Echis multisquamatis*.

**PURIFICATION AND BIOCHEMICAL  
CHARACTERIZATION  
OF FIBRINOGENASE FROM VENOM  
OF *Echis multisquamatis***

V. O. Chernyshenko<sup>1, 2</sup>  
M. P. Myasnikova<sup>2</sup>  
T. M. Platonova<sup>2</sup>  
E. V. Lougovskoi<sup>2</sup>  
E. M. Makogonenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Taras Shevchenko University, Kyiv

<sup>2</sup> Palladin Institute of Biochemistry of National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

*E-mail: bio.cherv@gmail.com*

Proteinase that demonstrated fibrinogenase activity from the venom of *Echis multisquamatis* was purified. Molecular weight of enzyme determined by SDS PAGE was  $35 \pm 1$  kDa. Inhibitory assay showed that fibrinogenase belonged to the serine type of proteinases. It hydrolyzed X-X-R-pNa derivatives of tripeptides and splitted B $\beta$ -chain of fibrinogen. Molecular weight of removed peptide of B $\beta$ -chain allowed to suppose that fibrinogenase splitted B $\beta$ R23-E24 peptide bound. The  $K_m$  value of this reaction was 8  $\mu$ M.

**Key words:**  $\beta$ -fibrinogenase, fibrinogen, venom of *Echis multisquamatis*.