

Прогнозування структури В β N-домену фібриногену за допомогою комп'ютерного моделювання і технології обмеженого протеолізу

В.О. Чернищенко^{1,2}, Г.П. Волинець^{1,3*}

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 60, Київ, 01601, Україна

² Інститут біохімії імені О.В. Палладіна НАН України
вул. Леонтовича, 9, Київ, 01601, Україна

³ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

Резюме. За допомогою сервера для комп'ютерного моделювання I-TASSER отримано просторові моделі фрагментів фібриногену В β 1-60 і мономерного фібрину desAB В β 15-60. На основі кінетичних закономірностей обмеженого протеолізу пептидного зв'язку фібриногену В β 42-43 та фібрину desAB відібрано по одній моделі, що найвірогідніше відображають тривимірну структуру В β N-доменів фібриногену і фібрину.

Ключові слова: фібриноген, фібрин, В β N-домен, кінетика, обмежений протеоліз, комп'ютерне моделювання.

Вступ. Фрагмент В β 1-42 (В β N-домен [1]) фібриногену є просторово гнучким і здатним до конформаційних змін. Найближча структурно стабільна ділянка В β -ланцюга знаходиться в зоні дисульфідного кільця (β 65), тому вивчення його конформації за допомогою рентгеноструктурного аналізу виявилось неможливим [2]. У той же час В β N-домен є поліфункціональним: він бере участь у полімеризації фібрину на різних стадіях, залучений до протеїново-протеїнових і протеїново-клітинних взаємодій за участі фібрин(о)гену [3-6]. Тому важливим є застосування альтернативних підходів для передбачення структури цього домену та його конформаційних змін при перетворенні молекули.

Метою нашої роботи було передбачення структури фрагментів фібриногену В β 1-60 і

В β 15-60 за допомогою методів комп'ютерного моделювання і технології обмеженого протеолізу.

Матеріали і методи

Матеріали. Фібриноген було отримано з плазми крові донорів за методом [7], мономерний фібрин desAB — згідно з [7], фібриногеназу з отрути *Echis multisquamatis* — за методом [8, 9]. Акриламід, ДСН, TEMED були придбані у GE Healthcare (Великобританія), хромогенний субстрат S2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNa) — у Chromogenix (Швеція), маркери, що містили поліпептиди з молекулярними масами 170, 130, 100, 72, 55, 40, 33, 24 кДа — SM0671, — у Fermentas (Литва), тетрапептид H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH (GPRP) — у Merck-Biosciences (Німеччина).

Моделювання тривимірної структури. Варіанти моделей тривимірної структури отримували за допомогою сервера I-TASSER [10]. Для побудови моделей цей Інтернет-ресурс застосовує множинне вирівнювання та

* Corresponding author.

Tel.: +38044-5222458

E-mail address: galina.volinetc@gmail.com

повторюване (багатократне) моделювання. Для кожної моделі пропонується певне значення C-score (*confidence score*, довірчий відлік). Це певна оцінна функція, що визначає якість моделі, тобто вказує на вірогідність її реалізації *in vivo*. Чим вище значення C-score, тим більша ймовірність реалізації [11].

Обмежений протеоліз фібриногену і мономерного фібрину *desAB*. Реакцію проводили за концентрації фібриногенази 0,25 μM (у випадку фібриногену) та 0,38 μM (у випадку мономерного фібрину *desAB*). Полімеризації фібрину *desAB* запобігали додаванням до середовища пептиду GPRP (Gly-Pro-Arg-Pro), що блокує «а»-центри полімеризації [12]. Реакцію проводили в 0,05 М трис-НСІ буфері рН 7,4 при температурі 25 °С у діапазоні концентрацій фібрин(оген)у від 1,7 до 3,7 μM і концентрації GPRP — 1 мМ. Реакцію гідролізу зупиняли через 5, 10, 15 хвилин (як описано вище). Зразки піддавали електрофоретичному розділенню в ПААГ із ДС-На.

Електрофорез у ПААГ. Гель-електрофорез проводили в 12 і 10 % ПААГ за Лемлі в присутності 2,5 % ДСН [13]. Протеїнові фракції ідентифікували за допомогою профарбовування кумасі R 250.

Денситометрія електрофореграм. Отримані електрофореграми сканували за допомогою HP Photosmart C3100 й аналізували в програмі TotalLab TL100 (Phoretix) [14], що є однією з денситометричних програм, які дають змогу ідентифікувати протеїни, аналізувати вміст і співвідношення протеїнів у досліджуваних фракціях [15, 16].

Результати. З використанням сервера I-TASSER моделювали структуру N-кінцевої ділянки β -ланцюга молекули фібриногену (1-60) та мономерного фібрину *desAB* (15-60), що утворюється під дією тромбіну після відщеплення останнім фібринопептидів А і В.

Було отримано 5 моделей для В β 1-60 і 4 моделі для В β 15-60 пептидів, що мали достатнє значення C-score, щоб вважати їхню реалізацію імовірною (рис. 1).

Раніше ми одержали фібриногеназу серинові природи з отрути *Echis multisquamatis* і показали її здатність гідролізувати пептидний зв'язок В β R42-A43 молекули фібриногену та похідні X-X-R-pNa трипептидів [7, 8]. Саме

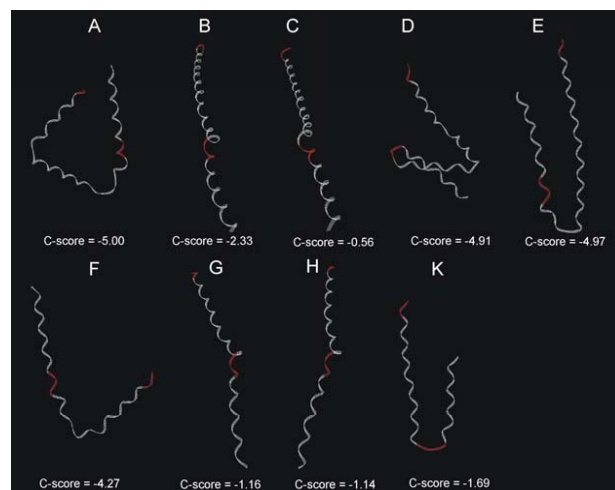


Рис. 1. Тривимірні моделі послідовності фібриногену В β 1-60 (А-Е) та фібрину *desAB* (F-K). Червоним кольором позначено N-кінцеві ділянки пептидів і ділянку В β 41-44, зв'язок R42-A43 якої гідролізується фібриногеназою з отрути *Echis multisquamatis*. Під моделями наведені чисельні значення імовірності реалізації моделі (C-score), розраховані за допомогою сервера I-TASSER.

цей ензим було використано для обмеженого протеолізу фібриногену і мономерного фібрину *desAB*.

Специфічний гідроліз глобулярного протеїну відбувається, як правило, лише в певній кількості сайтів, що обумовлено як специфічністю протеїнази, так і конформацією цієї ділянки протеїнової молекули [17, 18]. Використання протеїназ із різною специфічністю дає змогу отримувати дані про просторову гнучкість та оточення конкретних амінокислотних послідовностей [17, 19], ідентифікувати й характеризувати просторово впорядковані структури протеїнів та оцінювати їх стабільність [20], передбачати існування доменних структур [21], отримувати інформацію про проміжні конформаційні стани протеїнових молекул [22, 23]. Технологія обмеженого протеолізу, використана разом із методами рентгеноструктурного аналізу, кругового дихроїзму, мас-спектрометрії, дозволяє глибше дослідити особливості структури тих чи інших ділянок протеїнової молекули та їх функціональні риси [24-27]. До методів, за допомогою яких можна пояснити і доповнити результати дослідів з обмеженого протеолізу, належать також і методи комп'ютерного моделювання [28, 29].

Ми порівнювали процес гідролізу фібрино-

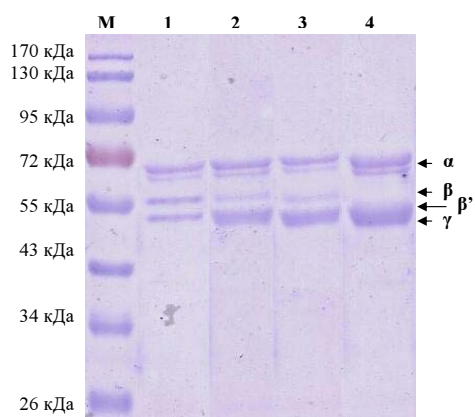


Рис. 2. Електрофореграма препаратів фібрину *desAB* (1) і гідролізатів фібрину *desAB* фібриногеназою з отрути *E. multiscuamatis* через 5 хв (2); 10 хв (3), 15 хв (4) інкубації. α — α -ланцюг фібрину; β — β -ланцюг фібрину; γ — γ -ланцюг фібрину; β' — частково гідролізований β -ланцюг фібрину. М — маркери.

геназою пептидного зв'язку ВβR42-А43 для фібриногену (нативна послідовність Вβ1-60) і мономерного фібрину *desAB* (послідовність Вβ15-60, позбавлена фібринопептиду В). З метою оцінки спорідненості «ензим—субстрат» визначали кінетичні параметри обох гідролітичних процесів. Для цього проводили гідроліз, аналізуючи накопичення продуктів гідролізу в часі. На рис. 2 представлено електрофореграму гідролізу для мономерного фібрину *desAB* — концентрація фібрину 1 мг/мл. Процес гідролізу фібриногену має такі ж закономірності [7, 8].

Денситометрія серії електрофореграм з різною вихідною концентрацією субстрату ензиматичної реакції дала змогу отримати кінетичні криві залежності V_o від S_o , лінеаризація графіків у координатах Лайнуївера-Берка (рис. 3) — визначити K_m і k_{cat} ($k_{cat} = V_{max}/[E]$, де E — концентрація ензиму) [30]. Для фібриногену $K_m = 8 \pm 0,4 \mu M$, $k_{cat} = 0,13 \text{ c}^{-1}$, для мономерного *desAB* фібрину $K_m = 10,38 \pm 0,6 \mu M$, $k_{cat} = 0,019 \text{ c}^{-1}$. Зниження k_{cat} після відщеплення фібринопептидів В може бути пов'язане з конформаційними перебудовами молекули фібрину: дисоціацією α С-доменів, сполучених із фібринопептидами В, від центрального Е-регіону [31, 32]. Однак K_m обох реакцій гідролізу залишається практично незмінною, отже, спорідненість ензиму до субстрату, попри ускладнений процес гідролізу, залишається сталою. Це можливо лише в разі збереження стабільної

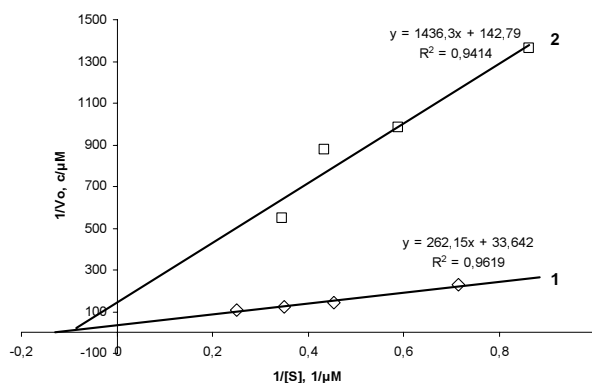


Рис. 3. Графік Лайнуївера-Берка для процесу гідролізу пептидного зв'язку ВβR42-А43 фібриногену (1) і мономерного фібрину *desAB* (2) фібриногеназою.

структури гідролізованої послідовності у фібриногені та фібрині *desAB*.

Обговорення. Аналізуючи моделі просторової будови, наведені на рис. 1, можна відмітити кілька основних мотивів, за яких амінокислоти, що межують із гідролізованим зв'язком ВβR42-А43, утворюють конформаційно близькі структури. Це, зокрема, лінійні структури В, С (фібриноген) і G, Н (фібрин *desAB*), шпилькоподібні структури з перегином у ділянці, відмінній від тієї, що гідролізується, — А, Е (фібриноген) і F (фібрин *desAB*), а також шпильки з перегином, який збігається з ділянкою, що гідролізується, — D (фібриноген) і К (фібрин *desAB*).

Моделі В, С, G і Н мають найвище значення С-Score (від -0,5 до -2,3), а отже, є найімовірнішими для аналізованої амінокислотної послідовності. Проте важко уявити реалізацію лінійної конформації *in vivo*, особливо з огляду на полівалентність послідовності Вβ15-42 [2-6]. Крім того, існують непрямі дані, що вказують на існування в цій зоні мікродоменних структур [32-35]. Нарешті, лінійна конформація поліпептиду залишає питання щодо високої специфічності фібриногенази. Володіючи високою спорідненістю до пептидних зв'язків, утворених карбоксигрупами аргініну та лізину [7, 8], вона розщеплює лише зв'язок ВβR42-А43. Подібних пептидних зв'язків у послідовності Вβ1-60 знаходиться 6, утворених аргініном, і 2 — лізином [36].

Моделі А, Е та F мають дещо нижче значення С-Score (від -4,27 до -5,00), тому їх реалізація є менш імовірною. Вірогіднішим є утворен-

ня структур, представлених моделями D (C-Score=-4,91) і K (C-Score=-1,69), навіть попри низьке значення C-Score моделі D, оскільки розміщення ділянки гідролізу в точці перегину петлі є найбільш обґрунтованим, якщо брати до уваги закономірності протеолітичних механізмів. Зокрема, послідовності, що зазнають гідролізу, найчастіше знаходяться на перегині шпильок і між доменними структурами, які забезпечують жорсткий каркас для невпорядкованої та доступної для гідролізу ділянки [18-22, 27, 37-39].

Таким чином, усі наведені на рис. 1 моделі вторинної структури B β N-домену, отримані за допомогою I-TASSER, потребують детального розгляду й перевірки. Застосування технології обмеженого протеолізу з використанням фібриногенази, специфічної до зв'язку B β R42-A43, дало змогу встановити, що пептидні послідовності, які з ним межують, володіють стабіль-

ною вторинною структурою, яка зберігається після відщеплення фібринопептидів В. З огляду на це в молекулі фібриногену, як і в молекулі фібрину desAB повинні реалізовуватися або лінійна структура, або шпилька з перегином у точці гідролізу. Остання модель узгоджується з даними попередніх досліджень і пояснює надзвичайну вибірковість гідролітичної дії фібриногенази.

Можна припустити, що в молекулі фібриногену реалізується конформація B β -ланцюга (модель D), що має вигин у зоні R42-A43 і замикається опосередковано фібринопептидом В (рис. 1). Після відщеплення фібринопептиду В тромбіном ближчий до N-кінця вигин зникає, з'являється центр полімеризації В [6, 12], натомість конформація послідовності B β 15-60 лишається незмінною (модель K).

Надійшла в редакцію 24.06.2011 р.

Predicting of fibrinogen B β N-domain conformation by computer modeling and limited proteolysis

V.O. Chernyshenko^{1,2}, G.P. Volynets^{1,3}

¹ Taras Shevchenko National University of Kyiv
64 Volodymyrs'ka Str., Kyiv, 01601, Ukraine

² Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine
9 Leontovicha Str., Kyiv, 01601, Ukraine

³ Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150 Zabolotny Str., Kyiv, 03680, Ukraine

Summary. Using computer modeling server I-TASSER some models of fibrinogen (B β 1-60) and desAB fibrin (B β 15-60) fragments were predicted. According to the kinetics of limited proteolysis of B β 42-43 peptide bond one model for fibrinogen and other for desAB fibrin B β N-domains were selected as the most probable.

Keywords: fibrinogen, fibrin, B β N-domain, kinetics, limited proteolysis, computer modeling.

Перелік літератури

1. Medved L., Weisel J. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin // *J. Thromb. Haemost.* — 2009. — Vol. 7. — P. 355-359.
2. Yang Zh., Mochalkin I., Doolittle R.F. A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides // *PNAS.* — 2000. — Vol. 97. — P. 14156-14161.
3. Gorkun O.V., Litvinov R.I., Veklich Y.I., and Weisel J.W. Interactions mediated by the N-terminus of fibrinogen's B β chain // *Biochemistry.* — 2006. — Vol. 45. — P. 14843-14852.
4. Mosesson M.W. Fibrinogen and fibrin structure and functions // *J. Thromb. Haemost.* — 2005. — Vol. 3. — P. 1894-904.
5. Lugovskoy E.V., Gritsenko P.G., Kapustianenko L.G., etc. Functional role of B β -chain N-terminal fragment in the fibrin polymerization process // *FEBS Journal.* — 2007. — Vol. 274. — P. 4540-4549.
6. Pechik I., Yakovlev S., Mosesson M.W., etc. Structural basis for sequential cleavage of fibrinopeptides upon fibrin assembly // *Biochemistry.* — 2006. — Vol. 45, No. 11. — P. 3588-97.
7. 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. — Т. 3, № 1. — С. 27-34.
8. Chernyshenko V., Gornyytska O., Platonova T., Sokolovska L. A new fibrinogenase from *Echis multisquamatis* venom is a perspective agent for limited proteolysis and defibrinogenation // *Advances in Bioscience and Biotechnology.* — 2010. — Vol. 1. — P. 91-96.
9. Варецька Т.В. Одержання фібрин-мономеру та вивчення його властивостей // *Укр. біохім. журн.* — 1965. — № 37. — С. 194-206.
10. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and func-

- tion prediction // *Nat. Protoc.* — 2010. — Vol. 5, No. 4. — P. 725-738.
11. Zhang Y., Skolnick J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score // *Nucleic Acids Res.* — 2005. — Vol. 33, No. 7. — P. 2302-2309.
 12. Луговской Э.В. Молекулярные механизмы образования фибрина и фибринолиза. — К.: Наукова думка, 2003. — 224 с.
 13. Laemli R.V. Cleavage of structural proteins during infection of bacteriophage T4 // *Nature.* — 1970. — Vol. 227. — P. 680-685.
 14. Vrankovic J., Paunovic M., Labus-Blagojevic S. Expression of CYP1A protein in the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Muller) // *Arch. Biol. Sci.* — 2011. — Vol. 63, No. 1. — P. 37-42.
 15. Young N., Chang Z., Wishart D.S. GelScape: a web-based server for interactively annotating, manipulating, comparing and archiving 1D and 2D gel images // *Bioinformatics.* — 2004. — Vol. 20, No. 6. — P. 976-978.
 16. Wu H.C., Yen C.C., Tsui W.H., Chen H.M. A red line not to cross: evaluating the limitation and properness of gel image tuning procedures // *Anal Biochem.* — 2010. — Vol. 396, No. 1. — P. 42-50.
 17. Fontana A., Fassina G., Vita C., etc. Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin // *Biochemistry.* — 1986. — Vol. 25, No. 8. — P. 1847-51.
 18. Fontana A., Polverino de Laureto P., Spolaore B., etc. Probing protein structure by limited proteolysis // *Acta Biochimica Polonica.* — 2004. — Vol. 51, No. 2. — P. 299-321.
 19. Hubbard S.J., Beynon R.J. and Thornton J.M. Assessment of conformational parameters as predictors of limited proteolytic sites in native protein structures // *Protein Engineering.* — 1998. — Vol. 11, No. 5. — P. 349-359.
 20. Carey J. A systematic and general proteolytic method for defining structural and functional domains of proteins // *Methods Enzymol.* — 2000. — Vol. 328. — P. 499-514.
 21. Gao X., Bain K., Bonanno J.B., et al. High-throughput limited proteolysis/mass spectrometry for protein domain elucidation // *Struct Funct Genomics.* — 2005. — Vol. 6, No. 2-3. — P. 129-34.
 22. Tsai C.-J., Polverino de Laureto P., Fontana A., Nussinov R. Comparison of protein fragments identified by limited proteolysis and by computational cutting of proteins // *Protein Science.* — 2002. — Vol. 11. — P. 1753-1770.
 23. Spolaore B., Bermejo R., Zambonin M., Fontana A. Protein interactions leading to conformational changes monitored by limited proteolysis: Apo form and fragments of horse cytochrome C // *Biochemistry.* — 2001. — Vol. 40. — P. 9460-9468.
 24. Zappacosta F., Pessi A., Bianchi E., etc. Probing the tertiary structure of proteins by limited proteolysis and mass spectrometry: the case of Minibody // *Protein Science.* — 1996. — Vol. 5. — P. 802-813.
 25. Polverino de Laureto P., Frade E., Gottardo R., etc. Partly folded states of members of the lysozyme/lactalbumin superfamily: A comparative study by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis // *Protein Science.* — 2002. — Vol. 11. — P. 2932-2946.
 26. Bogan M.J., Agnes G.R., Pio F., Cornell R.B. Interdomain and membrane interactions of CTP: phosphocholine cytidylyltransferase revealed via limited proteolysis and mass spectrometry // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280. — P. 613-624.
 27. Bantscheff M., Weiss V., Glocker M.O. Probing tertiary structure of multidomain proteins by limited proteolysis and mass spectrometry // *Eur. Mass Spectrom.* — 1998. — Vol. 4. — P. 279-285.
 28. Hubbard S.J., Beynon R.J., Thornton J.M. Assessment of conformational parameters as predictors of limited proteolytic sites in native protein structures // *Protein Eng.* — 1998. — Vol. 11, No. 5. — P. 349-359.
 29. Tsai C.-J., Polverino de Laureto P., Fontana A., and Nussinov R. Comparison of protein fragments identified by limited proteolysis and by computational cutting of proteins // *Protein Sci.* — 2002. — Vol. 11, No. 7. — P. 1753-1770.
 30. Dixon M., Webb E.C. *Enzymes.* — New York: Academic Press Inc., Publishers, 1964. — 950 p.
 31. 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. — Vol. 268, No. 18. — P. 13577-13585.
 32. 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 // *Biochemistry.* — 2007. — Vol. 46, No. 31. — P. 9133-9142.
 33. 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. — Vol. 260, No. 5. — P. 2994-3000.
 34. 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 // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265, No. 30. — P. 18650-5.
 35. 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. — Vol. 30. — P. 162-168.
 36. Watt K.W.K., Takashi Takagi, Doolittle R.F. Amino acid sequence of the B β -chain of human fibrinogen: Homology with the γ -chain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1987. — Vol. 75, No. 4. — P. 1731-1735.
 37. Ellison D., Hilton J., Hubbard S.J., Beynon R. Limited proteolysis of native proteins: The interaction between avidin and proteinase K // *Protein Science.* — 1995. — Vol. 4, No. 1. — P. 1337-1345.
 38. Chang W.-S.W., Wardell M.R., Lomas D.A., Carrell R.W. Probing serpin reactive-loop conformations by proteolytic cleavage // *Biochem. J.* — 1996. — Vol. 314. — P. 647-653.
 39. Dentaud A., Goulielmakis A., Cove's J., Pebay-Peyroula E. Differences between CusA and AcrB Crystallisation Highlighted by Protein Flexibility // *PLoS.* — 2009. — Vol. 4, No. 7. — P. 6214.