



УДК 577.112:612.115

© 2012

**Т. А. Позняк, І. М. Колеснікова, Є. М. Макогоненко,
Л. М. Литвинова, О. П. Костюченко, Г. К. Гоголінська,
М. О. Пидюра, С. І. Андріанов,**
член-кореспондент НАН України **Е. В. Луговської,**
академік НАН України **С. В. Комісаренко**

Зміни просторової орієнтації α C-регіонів фібриногену в процесі його трансформації в полімерний фібрин

Отримано моАТ F α II-2M, епітоп для яких знаходиться в фрагменті A α 240–491 α C-регіону фібрин(оген)у людини. З використанням імуноферментного аналізу та методу поверхнево-плазмонного резонансу було показано, що моАТ F α II-2M не реагували з фібриногеном, мономерним і полімерним фібрином desA, але реагували з фібрином desAB. Отже, лише після відщеплення фібринопептидів B епітоп для моАТ F α II-2M стає доступним. Отримані результати дають змогу припустити, що в фібриногені та мономерному й полімерному фібрині desA α C-регіони зв'язані з фібринопептидами B і відходять від остова молекули лише після їх відщеплення. На підставі отриманих результатів та наведених в науковій літературі даних комп'ютерно побудовано моделі просторової орієнтації α C-регіонів у молекулах фібриногену, фібрину desA й desAB.

Молекула фібриногену є центральним білком системи зсідання крові, в якому розрізняють центральний регіон E, два периферичних регіони D та два α C-регіони (A α 220–610). В α C-регіоні умовно виділяють конекторну (A α 220–391) та доменну (A α 392–610) частини. Тромбін, який утворюється при активації системи зсідання крові, відщеплює від фібриногену два фібринопептиди A та перетворює його на фібрин desA, що спонтанно полімеризується з утворенням протофібрил [1]. При подальшій дії тромбіну фібрин desA у протофібрилах перетворюється в фібрин desAB, що прискорює їх латеральну асоціацію з утворенням більш товстих фібрил. На сьогодні повністю ще не з'ясовано механізми внутрішньомолекулярної перебудови фібриногену в фібрин та міжмолекулярних взаємодій останнього в процесі формування фібринового каркасу тромбу. Наприклад, важливим і до кінця не з'ясованим залишається питання про функціональну роль та просторову орієнтацію α C-регіонів у молекулі фібриногену на різних етапах його перетворення в полімерний фібрин.

В. О. Беліцер вперше вказав на важливу роль α C-регіонів (A α 220–610) молекули фібрин(оген)у в процесі полімеризації фібрину [2]. Через високу рухливість структуру α C-регіонів у нативній молекулі фібрин(оген)у методом рентгеноструктурного аналізу візуалізувати не вдалося [3]. Р. І. Літвіновим із співробітниками [4], досліджуючи рекомбінантні α C-фрагменти фібриногену, встановлено, що рекомбінантні α C-домени ділянки взаємодіють з фібринопептидами В, між собою та меншою мірою з фібринопептидами А. Однак на сьогодні не було встановлено просторову орієнтацію α C-регіонів у мономерному й полімерному фібрині desA.

У даному повідомленні викладено результати дослідження зміни просторової орієнтації α C-регіонів при послідовному перетворенні фібриногену в фібрини desA й desAB та функціональної ролі α C-регіонів у процесі полімеризації фібрину з використанням моноклональних антитіл (монАТ) з епітопом у α C-регіоні фібрин(оген)у.

Для отримання монАТ з епітопом в α C-регіоні молекули фібриногену як антигени для імунізації двох груп мишей лінії BALB/c було використано частково денатурований фібрин (3 моль/л сечовини) та фрагмент (A α 240–491) α C-регіону молекули фібрин(оген)у в кількості 100 мкг на дослідну тварину (мишу). α C-фрагмент виділяли з плазмінового гідролізату фібриногену людини шляхом гель-фільтрації на колонці Superdex G-75 із застосуванням хроматографічної системи FPLC. Молекулярна маса α C-фрагмента дорівнювала 24 кДа, що відповідає ділянці α C-регіону фібрин(оген)у людини з амінокислотною послідовністю A α 240–491 [5].

Методом турбідиметричного аналізу було встановлено, що отриманий α C-фрагмент (A α 240–491), як і його аналог, описаний в статті [5], інгібує полімеризацію фібрину людини в системі фібриноген + тромбін, підвищуючи лаг-період (час побудови протофібрил) та істотно знижуючи швидкість зростання мутності (швидкість латеральної асоціації протофібрил), а також кінцеву мутність утвореного згустку. Отже, цей фрагмент зберігає сайт нативної молекули фібрину, який бере участь в його полімеризації.

Отримані нами гібридами продукували монАТ, що реагували з фрагментом фібриногену A α 240–491, фібрином desAB і не реагували з фібриногеном у розчині. МонАТ належать до імуноглобулінів класу М та отримали назву “FnII-2M”.

Імунохімічну специфічність монАТ FnII-2M характеризували за допомогою методу твердофазного імуноферментного аналізу (тІФА) з використанням таких білків та їх фрагментів, як фібриноген [6], фібрин desAB [7], E₃-фрагмент фібрину [8], D-димер [9] та фрагмент A α 240–491 α C-регіону. Вказані білки в концентрації 10 мкг/мл адсорбували на полістирольних мікропланшетах впродовж 18 год при 4 °С за таких оптимальних умов: для фібриногену — 0,2 моль/л ацетатного буфера, рН 8,5; для фібрину і α C-фрагмента цей буфер з 3 моль/л сечовиною; для E₃-фрагмента і D-димеру — 0,02 моль/л бікарбонатного буфера з рН 9,5. Після відмивання білків, які не адсорбувалися на плашці, вносили очищені монАТ FnII-2M та інкубували при 37 °С впродовж 1 год. Далі мікропланшети відмивали, а монАТ, які зв'язалися з білками, виявляли за допомогою мічених пероксидазою антитіл кроля проти всієї молекули Ig G миші (“Sigma”, США). МонАТ FnII-2M найсильніше реагували з α C-фрагментом (A α 240–491), фібрином desAB, слабше з адсорбованим на мікропланшеті фібриногеном та зовсім не реагували з D-димером й E₃-фрагментом (рис. 1, а).

МонАТ FnII-2M, згідно з результатами подальших досліджень, проявляють вибірково специфічність відносно фібрину: вони реагували з фібрином desAB і не реагували з фібриногеном у розчині (див. б на рис. 1). Наявність реакції монАТ FnII-2M у тІФА з сорбованим на мікропланшетах фібриногеном пов'язана, очевидно, з його частковою денатурацією

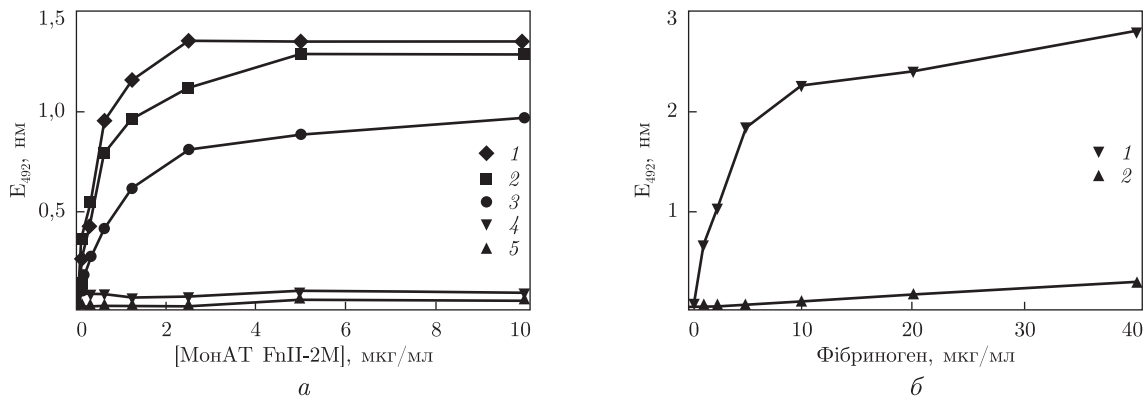


Рис. 1. Імуноферментний аналіз зв'язування монАТ FhII-2 М (*tag*-АТ) з різними білками та їх фрагментами: *a* – з іммобілізованими на мікропланшеті [1 – α С-фрагмент; 2 – фібрин desA; 3 – фібриноген; 4 – Е-фрагмент; 5 – D-димер]; *б* – з фібриногеном, який знаходиться в розчині (“catch”-антитіла – фібриногенспецифічні монАТ 2d-2a) [1 – “tag”-антитіла – монАТ II-4d (позитивний контроль зв'язування фібриногену з монАТ 2d-2a); 2 – “tag”-антитіла – монАТ FhII-2М]

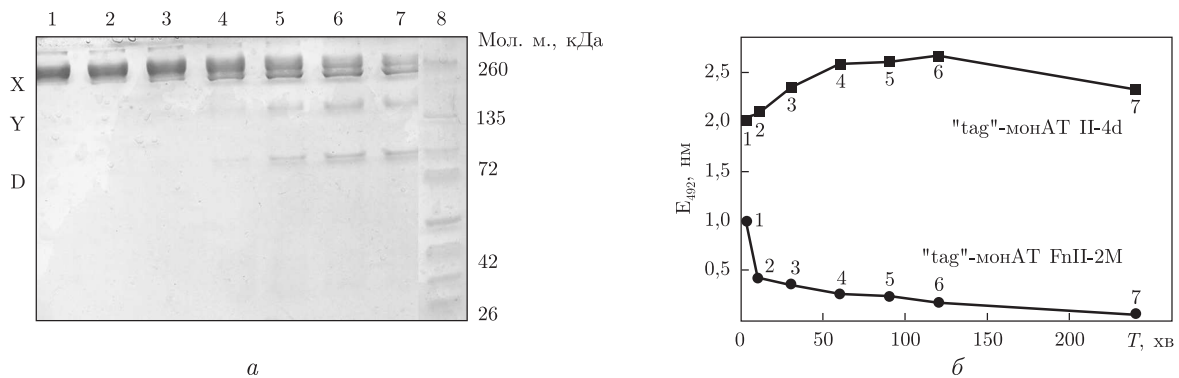


Рис. 2. Електрофореграма (10%-й ПААГ з 0,1%-м ДС-Na, Coomassie R-250) (*a*) та імуноферментний аналіз (*б*) кінетики гідролізу фібрину desAB плазміном у різні проміжки часу: 1 – 0 хв, 2 – 10 хв, 3 – 30 хв, 4 – 60 хв, 5 – 90 хв, 6 – 120 хв, 7 – 240 хв при молярному співвідношенні фібрин desAB : плазмін – 1000 : 1; 8 – маркери молекулярної маси

внаслідок сорбції на поверхню мікропланшета, що змінює його конформацію та експонує епітоп [10].

Для встановлення локалізації епітопа монАТ FhII-2М у молекулі фібрину було проведено Вестерн-блот аналіз із використанням фібрину desAB, відновленого β -меркаптоетанолом як антигену. Виявилося, що монАТ FhII-2М реагують лише з α -ланцюгом фібрину (α 17–610).

В імуноферментному аналізі була показана відсутність зв'язування монАТ FhII-2М з X_2 -фрагментом, який утворювався в результаті відщеплення α С-регіонів плазміном від молекули фібрину desAB (рис. 2).

У цьому експерименті за “catch”-антитіла було використано раніше отримані фібринспецифічні монАТ FhI-3С [11], за “tag”-АТ – монАТ FhII-2М, що мічені біотином. Дані імуноферментного аналізу, демонструють зниження інтенсивності реакції монАТ FhII-2М з фібрином desAB у міру перетворення фібрину у X_2 -фрагмент (див. *б* на рис. 2). При цьому загальна кількість плазмінових фрагментів фібрину, зв'язаних з “catch”-АТ FhI-3С, не зменшувалася.

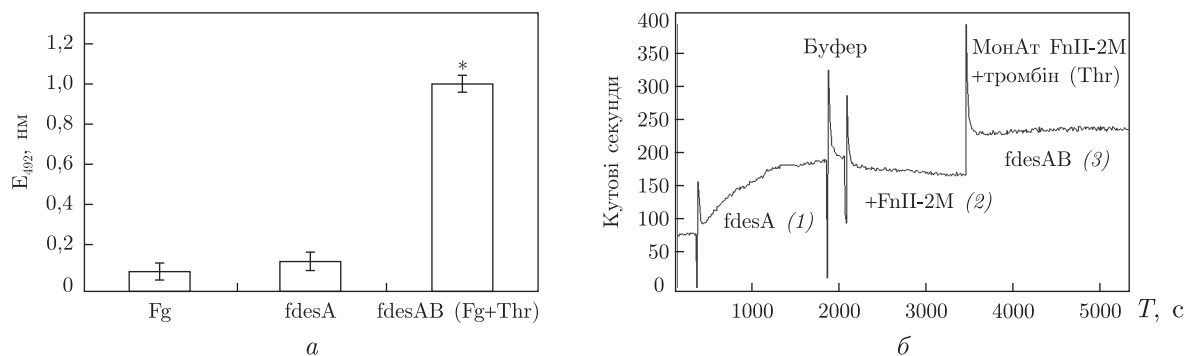


Рис. 3. Зв'язування монАТ FnII-2М з фібриногеном, фібрином desA та фібрином desAB (фібриноген + тромбін 0,25 NIH/1 мг білка) за допомогою методу: а — des тІФА (“catch”-АТ — фібринспецифічні монАТ I-3С, “tag”-АТ — монАТ FnII-2М); * — $p < 0,05$ порівняно з фібриногеном (Fg) та фібрином desA (fdesA); б — ППР-аналіз (монАТ FnI-3С, що ковалентно іммобілізовані на поверхні імуносенсорного біочіпа

Таким чином, отримані результати свідчать, що монАТ FnII-2М є фібрин desAB-специфічними і не реагують з нативним фібриногеном та фрагментами фібрин(оген)у, в яких відсутні α С-регіони: X₂-фрагментом, D-димером, E₃-фрагментом. Враховуючи, що монАТ FnII-2М реагували з α -ланцюгом фібрину (A α 17–610) та найсильніша реакція спостерігалась з фрагментом A α 240–491 α С-регіону молекули, можна стверджувати таке: епітоп для них знаходиться в A α 240–491. Однак у ході дослідження виявилось, що монАТ FnII-2М не реагують з плазмою крові хворих людей, в якій було виявлено значну кількість розчинного фібрину. Як відомо, розчинний фібрин є олігомерами фібрину desA та його комплексами з фібриногеном [12]. Оскільки було показано, що монАТ FnII-2М не реагують з фібриногеном у розчині, ми припустили, що вони не реагують і з фібрином desA. Це припущення виявилось вірним і було підтверджене двома методами: т-ІФА та поверхнево-плазмонного резонансу (ППР) (рис. 3).

Дослідження взаємодії фібринів desA, desAB з монАТ FnI-3С у реальному часі проводили методом ППР-аналізу на двоканальному оптичному спектрометрі “Плазмон-6” (виготовлений в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України). У робочу комірку імуносенсорного біочіпа, що містив фібринспецифічні ковалентно іммобілізовані монАТ FnI-3С, вводили розчин фібриноген + анцистрон (5 мкг/мл фібриногену та 0,05 NIH/мл анцистрону), в якому *in situ* утворювався фібрин desA. Зв'язування фібрину desA з монАТ FnI-3С проводили до досягнення насичення антитіл фібрином desA (див. 1 на рис. 3, б). Після відмивання біочіпа буфером (0,02 моль/л HEPES, рН 7,4, 0,15 моль/л NaCl, 0,005% Tween-20) у робочу комірку додавали монАТ FnII-2М (1 мкг/мл), реакція зв'язування була повністю відсутня (див. 2 на рис. 3, б). Однак після оброблення іммобілізованого фібрину desA підвищеною концентрацією тромбіну (1 NIH/1 мл), що призводить до утворення фібрину desAB, спостерігалось збільшення зв'язування монАТ FnII-2М з утвореним фібрином desAB (див. 3 на рис. 3, б). Цей результат вказує на експозицію епітопа для монАТ FnII-2М у α С-регіонах молекули фібрину desA після відщеплення фібринопептидів В та перетворення його на фібрин desAB. Методом тІФА отримали аналогічні результати (див. а на рис. 3). Отже, двома незалежними методами було доведено, що монАТ FnII-2М не реагують з фібрином desA, але реагують з фібрином desAB, в якому відщеплені фібринопептиди В (див. рис. 3).

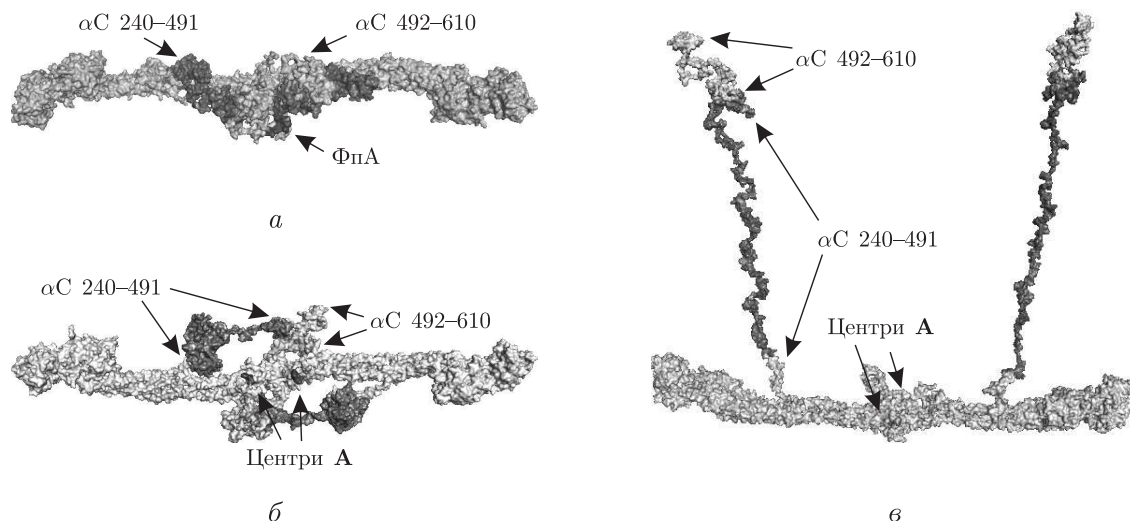


Рис. 4. Структурні моделі просторової орієнтації α C-регіонів у молекулі фібриногену (а); фібрину desA (б) та фібрину desAB (в)

За допомогою тІФА було також показано, що монАТ FhII-2М не реагують не тільки з мономерним фібрином desA, а й з полімерною його формою, яку отримували в системі фібриноген+тромбін (0,0025 NIH/1 мг фібриногену) у 0,03 моль/л *tris*-ацетатного буфера, рН 5,3, 0,3 моль/л NaCl на різних проміжках часу: 5, 10, 20, 30 хв (дані не наведено) [13]. Дію тромбіну зупиняли сумішшю антитромбіну з гепарином в 5%-му сухому знежиреному молоці [14]. У цих дослідях як "catch"-антитіла використовували фібринспецифічні монАТ FhI-3С, а як "tag"-АТ — монАТ FhII-2М (у позитивному контролі — монАТ FhII-4d). Оскільки отримані монАТ FhII-2М не реагували з фібриногеном та мономерним і полімерним фібрином desA, то цілком очевидно, що в цих білках епітоп є закритим внаслідок взаємодії α C-регіонів з фібринопептидами В [5]. Лише після відщеплення фібринопептидів В від молекули фібриногену та утворення фібрину desAB епітоп для монАТ FhII-2М відкривається.

При конкурентному імуоферментному аналізі в лунках мікропланшета з адсорбованим фібрином desAB змішували різні концентрації розчинів (від 200 мкг/мл до 1 мкг/мл): 1) фібрину desAB; 2) α C-фрагмента A α 240-491 з однаковою кількістю біотинильованих монАТ FhII-2М. Результати тІФА показали, що епітоп для монАТ FhII-2М (A α 240-491) відкритий у молекулі фібрину desAB, але закривається у фрагменті A α 240-491, α C-регіону, коли він знаходиться в розчині. Це можна пояснити схильністю фрагментів A α 240-491 до утворення гетеродимерів, як і у випадку утворення субфрагментів α C-регіону A α 221-610, A α 221-391 й A α 392-610 [3]. Крім того, як відомо, фрагменти A α 221-610 здатні утворювати олігомери [15]. Отже, внаслідок димеризації або олігомеризації фрагментів A α 240-491 епітопи для монАТ FhII-2М закриваються і фрагменти втрачають здатність до конкуренції. Саме у фрагменті A α 240-491 α C-регіону молекули фібрину знаходиться сайт, яким вони взаємодіють один з одним.

На підставі отриманих даних та комп'ютерного моделювання було спроектовано три можливі моделі просторової орієнтації α C-регіонів у молекулі фібриногену, фібрину desA та фібрину desAB (рис. 4). Так, у молекулі фібриногену α C-регіони зв'язані з фібринопептидами А й В та між собою (див. а на рис. 4). Відщеплення фібринопептидів А від

фібриногену в утвореній молекулі фібрину desA спричинює їх розходження один від одного (див. б на рис. 4), відкриваючи центр полімеризації **A**, під час полімеризації фібрину, і лише після відщеплення фібринопептидів В α C-регіони відходять від остова молекули (див. в на рис. 4).

Таким чином, за допомогою монАТ FhII-2М з епітопом у α C-фрагменті A α 240–491 фібрин(оген)у людини отримано прямий експериментальний доказ того, що в молекулі фібриногену людини, а також в мономерних та полімерних формах фібрину desA α C-регіони зв'язані з фібринопептидами В. При цьому, очевидно, що зона контакту знаходиться в фрагменті A α 240–491. Після відщеплення фібринопептидів А α C-регіони відходять один від одного, відкриваючи центри **A**, однак залишаються зв'язаними з фібринопептидами В та можливо беруть участь у первинній полімеризації. Після відщеплення фібринопептидів В α C-регіони відходять від остова молекули, що супроводжується переключенням внутрішньомолекулярних зв'язків на міжмолекулярні, та залучаються до процесу полімеризації фібрину, прискорюючи латеральну асоціацію протофібрил і фібрил.

1. Ryan E. A., Mockros L. F., Weisel J. W., Lorand L. Structural origins of fibrin clot rheology // *Biophys. J.* – 1999. – **77**. – P. 2813–2826.
2. Медведь Л. В., Горжун О. В., Маняков В. Ф., Беллицер В. А. α C-домены молекулы фибриногена как структуры, ускоряющие самосборку фибрина // *Молекул. биология.* – 1986. – **20**, вып. 2. – P. 461–470.
3. Doolittle R. F. X-ray crystallographic studies on fibrinogen and fibrin // *J. Thromb. Haemost.* – 2003. – **1**(7). – P. 1559–1565.
4. 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 each other // *Biochem.* – 2007. – **46**(31). – P. 9133–9142.
5. Lau H. K. F. Anticoagulant function of a 24-Kd fragment isolated from human fibrinogen A chain // *Blood.* – 1993. – **81**, No 12. – P. 3277–3284.
6. Varetskaya T. V. Microheterogeneity of fibrinogen. Cryofibrinogen // *Ukr. Biokhim. Zhurn.* – 1960. – **32**. – P. 13–24.
7. Belitser V. A., Varetskaja T. V., Malneva G. V. Fibrinogen – fibrin interaction // *Biochim. et Biophys. Acta.* – 1968. – **154**(2). – P. 367–375.
8. Ugarova T. P., Budzynski A. Z. Interaction between complementary polymerization sites in the structural D and E domains of human fibrin // *J. Biol. Chem.* – 1992. – **267**, No 19. – P. 13687–13693.
9. Marder V. J., Budzynski A. Z., Barlow G. H. Comparison of the physiochemical properties of fragment D derivatives of fibrinogen and fragment D-D of cross-linked fibrin // *Biochim. et Biophys. Acta.* – 1976. – **427**(1). – P. 1–14.
10. Riedel T., Suttner J., Brynda E. et al. Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation // *Blood.* – 2011. – **117**, No 5. – P. 1700–1706.
11. Колеснікова І. М., Луговська Н. Е., Луговської Е. В. та ін. Моноклональні антитіла, специфічні до фібрину людини // *Доп. НАН України.* – 2006. – № 9. – С. 181–185.
12. Луговской Э. В., Гриценко П. Г., Комисаренко С. В. Молекулярные механизмы полимеризации фибрина и формирования его трехмерной сети // *Биоорган. химия.* – 2009. – **35**, № 4. – С. 437–456.
13. Lougovskoi E. V., Gogolinskaya G. R. Preparation of fibrin desA by thrombin // *Укр. біохім. журн.* – 1999. – **71**, No 4. – P. 107–108.
14. Desai U. R. New antithrombin-based anticoagulants // *Med. research Rev.* – 2003. – **24**, No 2. – P. 151–181.
15. Tsuruba G., Mahid A., Veklich Y. et al. Structure, Stability and Interaction of fibrin α C-Domain Polymers // *J. Biochem.* – 2011. – **50**. – P. 8028–8037.

Т. А. Позняк, И. Н. Колесникова, Е. М. Макогоненко, Л. М. Литвинова,
Е. П. Костюченко, Г. К. Гоголинская, Н. А. Пыдюра, С. И. Андрианов,
член-корреспондент НАН Украины Э. В. Луговской,
академик НАН Украины С. В. Комисаренко

Изменения пространственной ориентации α C-регионов фибрина(оген)а в процессе его трансформации в полимерный фибрин

Получены моноклональные антитела (monAb) F α II-2M, эпитоп для которых находится во фрагменте A α 240–491 α C-региона фибриногена человека. С использованием иммуноферментного анализа и метода поверхностно-плазмонного резонанса было показано, что моноклональные антитела F α II-2M не реагируют с фибриногеном, мономерным и полимерным фибрином desA, но реагируют с фибрином desAB. Следовательно, лишь после отщепления фибринопептидов B эпитоп для моноклональных антител F α II-2M становится доступным. Полученные результаты позволяют предположить, что в фибриногене, мономерном и полимерном фибрине desA α C-регионы связаны с фибринопептидами B и отходят от остова молекулы лишь после их отщепления. На основе полученных результатов и данных, приведенных в научной литературе, компьютерно построено модели пространственной ориентации α C-регионов в молекулах фибриногена, фибрина desA и desAB.

T. A. Pozniak, I. N. Kolesnikova, E. M. Makogonenko, L. M. Litvinova,
O. P. Kostiuchenko, G. K. Gogolinskaya, M. O. Pydiura, S. I. Andrianov,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine E. V. Lugovskoy,
Academician of the NAS of Ukraine S. V. Komisarenko

Changes of the spatial orientation of α C-regions of fibrinogen during its transformation in polymeric fibrin

Monoclonal antibody (monAb) F α II-2M with the epitope for them in human fibrin(ogen) fragment A α 240–491 of the α C-region has been obtained. It is shown by ELISA and the method of surface plasmon resonance that monAb F α II-2M doesn't react with fibrinogen, monomeric and polymeric fibrin desA, but reacts with fibrin desAB. Thus, this proves that the accessibility of the epitope for this monAb appears only in fibrin desAB. These results are a direct experimental evidence that the α C-regions (A α 220–610) are bound with fibronopeptide B of fibrinogen and fibrin desA molecules but move away from the framework of a molecule only after the removal of fibronopeptides B by thrombin. These data and the results of other authors allow us to design the computer models of spatial orientation of α C-regions in fibrinogen, fibrin desA, and fibrin desA.