



УДК 577.112;612.115

© 2012

**Л. П. Урвант, Є. М. Макогоненко, Г. К. Березницький,
Н. Е. Луговська, член-кореспондент НАН України Е. В. Луговської,
І. М. Колеснікова, М. О. Пидюра, Т. А. Позняк,
Н. С. Сторожилова, академік НАН України С. В. Комісаренко**

Відщеплення фібринопептиду А викликає структурні перебудови в 118-134 ділянці В β -ланцюга молекули фібрин(оген)у

Досліджено механізм експонування виявленої раніше неоантигенної детермінанти (NAD) фібринспецифічного моноклонального антитіла (монАТ) I-3с у 118-134 ділянці В β -ланцюга фібрину. З використанням електрофоретичного і паралельно ІФА та ППР аналізу взаємодії фібрину desA з монАТ I-3с у присутності пептиду GPRP показано, що експонування NAD є результатом внутрішньомолекулярної перебудови E-регіону мономера молекули фібрин(оген)у, яка ініціюється відщепленням фібринопептиду А.

Фібриноген (Fg) — мультидоменний білок з багатьма внутрішньомолекулярними взаємодіями, що підтримують його нативну конформацію. Відщеплення фібринопептидів А (FrA) тромбіном супроводжується перебудовою структури молекули: звільненням А сайтів полімеризації, дисоціацією α C-регіонів від FrA та один від іншого, експозицією прихованих сайтів міжмолекулярної взаємодії, серед яких є і нещодавно знайдена неоантигенна детермінанта (NAD) фібринспецифічних моноклональних антитіл I-3с у 118-134 ділянці В β -ланцюга молекули, що містить також сайт латеральної асоціації (SLA) [1], та полімеризацією фібрину дезА.

За даними літературних джерел [2–5], після відщеплення FrA структурні перебудови в молекулі фібрину відбуваються внаслідок зміни взаємного розташування та структури нестабільних і рухливих В β N-доменів E-регіону та α C-регіонів молекули [2–5]. Структурні перебудови в D-регіоні, що проявляються в експонуванні сайтів латеральної асоціації [4] та сайтів зв'язування P_g, t-PA, Mas-1 рецепторів [6, 7], є результатом взаємодії молекул фібрин(оген)у за участю А:а й В:в сайтів полімеризації [4, 6, 7]. Однак у науковій літературі відсутні відомості про структурні зміни в лейкоподібному і суперспіральних доменах E-регіону молекули в процесі полімеризації фібрину [8]. Враховуючи ці дані, нами зроблено припущення про те, що експонування неоантигенної детермінанти 118-134 у В β -ланцюзі

після відщеплення FpA відбувається завдяки структурній перебудові α C-регіонів молекули і відходженню їх від E-регіону молекули Fg, що призводить до відкриття 118-134 ділянки в β -ланцюзі (NAD/SLA) на поверхні міжрегіонної суперспіральної області молекули для взаємодії з монАТ і для латеральної асоціації з сусідніми протофібрилами [1]. У даному повідомленні представлено результати експериментального аналізу цієї гіпотези.

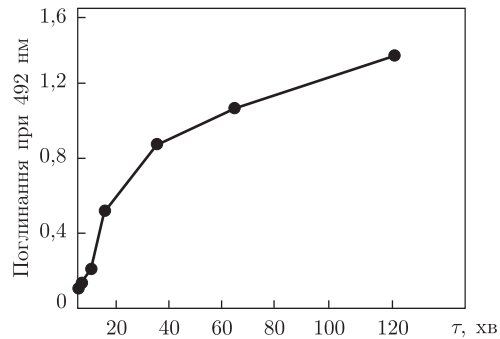
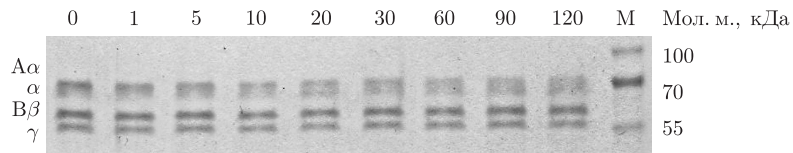
Фібриноген, тромбін, X_1 -, X_2 -фрагменти Fg було отримано з плазми крові донорів методом Варецької [9], Fenton [10] і Медведя [11] відповідно. Плазмін був люб'язно наданий д-ром біол. наук Т. В. Гриненко, а анцистрон Н — д-ром біол. наук Т. М. Платоновою (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України). Електрофорез у ПААГ з SDS виконували методом Laemmli [12].

Експозицію неоантигенної детермінанти в Fg, X_1 -, й X_2 -фрагментах визначали методом імуноферментного аналізу (ІФА). Спочатку білок (Fg, X_1 -, X_2 -фрагменти) додавали в середовище, що містило 0,02 моль/л НЕРЕС, рН 7,4 з 0,3 моль/л NaCl, у концентрації 0,2 мг/мл. Реакцію розпочинали додаванням тромбіну або анцистрону Н у концентрації 0,005 NIH/мл. У вказані моменти часу реакцію зупиняли додаванням інгібіторів тромбіну — PMSF (до концентрації 1 ммоль/л) та плазміну — контрикалу (до концентрації 10 мг/мл). Аліквоти вносили в лунки мікропланшета, експонований епітоп визначали, використовуючи монАТ I-3с як первинні, а овечі антимишині IgG-HRP кон'югати як вторинні антитіла. Гідроліз Fg і фібрину проводили в тих самих умовах, молярні співвідношення Fg (фібрин) : плазмін відповідно 1000 : 1.

Експозицію неоантигенної детермінанти в реальному часі детектували методом плазмонного резонансу за допомогою приладу “Плазмон 3” (виробництво Інституту фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України). На біосенсорний чіп ковалентно імібілізували монАТ I-3с. У контрольній комірці знаходився Fg (X_1) у концентрації 5 мг/мл у 0,02 моль/л НЕРЕС, рН 7,4 з 0,3 моль/л NaCl, у вимірювальній комірці — Fg (X_1) та анцистрон Н (0,01 NIH/ml) у тому самому середовищі з доданим синтетичним пептидом GPRP у концентрації 1 ммоль/л.

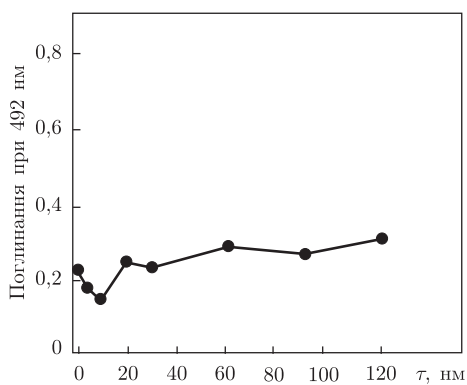
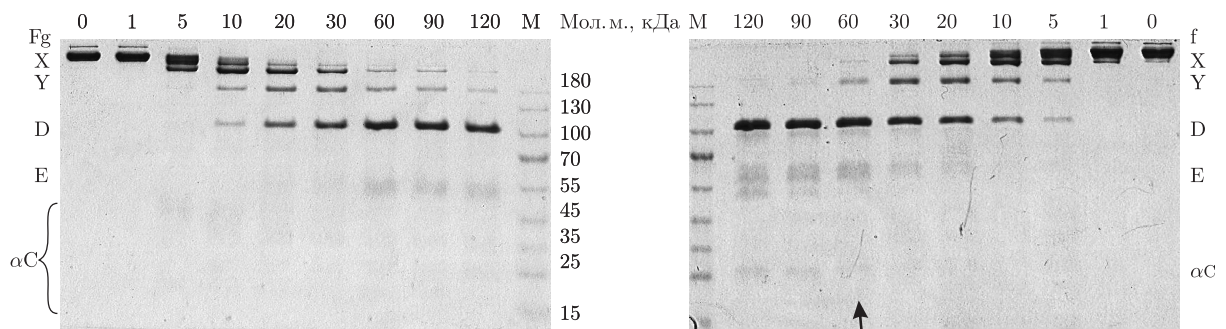
Кінетику експозиції NAD у Fg під дією тромбіну досліджували при дуже малих концентраціях тромбіну (0,001–0,0005 NIH/мл), коли відщепляється тільки FpA [13]. За цих умов, як свідчить електрофореграма (рис. 1), зменшується інтенсивність зони α -ланцюга Fg і зростає така α -ланцюга, що вказує на відщеплення тромбіном FpA та утворення фібрину desA. У паралельному експерименті з застосуванням ІФА спостерігали зростання кількості зв'язаних монАТ I-3с з продуктами реакції зі збільшенням часу інкубації та інтенсивності зони α -ланцюга фібрину. Наведені дані свідчать, що відщеплення тромбіном FpA від Fg та поява фібрину desA супроводжується одночасним зростанням експозиції епітопу монАТ I-3с. Як зазначалося раніше, видалення FpA викликає зміни в положенні α C-регіонів відносно E-регіонів Fg [14], що може спричинювати відкриття доступу монАТ I-3с до епітопу, прихованого в нативній молекулі α C-регіоном.

Для з'ясування ролі α C-регіонів молекули в експонуванні NAD було досліджено зв'язок між руйнуванням Fg й фібрину desAB під дією плазміну і експозицією NAD. Як відомо, гідроліз Fg плазміном і фібрину desAB починається з відщеплення від молекул α C-регіонів і утворення X-фрагментів. Руйнування Fg плазміном не приводить до появи NAD у жодному з утворюваних фрагментів (X, Y, D, E) (рис. 2, а, в), що свідчить про відсутність NAD у молекулі Fg та непричетність α C-регіонів до механізму експозиції NAD, а також, імовірно, й SLA на молекулі фібрину. Гідроліз фібрину desAB вказує на те, що NAD спостерігається тільки в фібрині та X-фрагментах фібрину — молекулах з цілісною короною

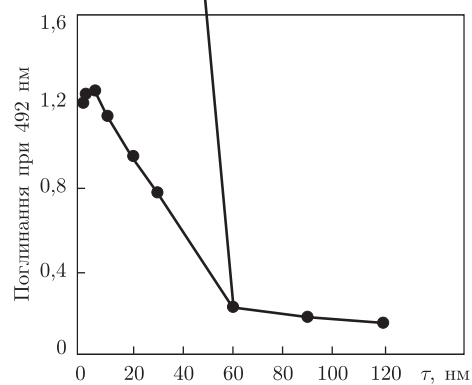


б

Рис. 1. Електрофоретичний аналіз (*а*) та ELISA аналіз (*б*) експозиції NAD у процесі активації Fg тромбіном при концентрації 0,0005 NIH/мл. Електрофорез зразків Fg зроблено у відновлювальних дисульфідні зв'язки білків умовах. М — маркери молекулярної маси



б



з

Рис. 2. Електрофоретичний аналіз (*а*, *б*) та ІФА (*в*, *з*) експозиції NAD у процесі руйнування Fg (*а*, *в*) і фібрину desAB (*б*, *з*) під дією плазміну. *f* — фібрин desAB

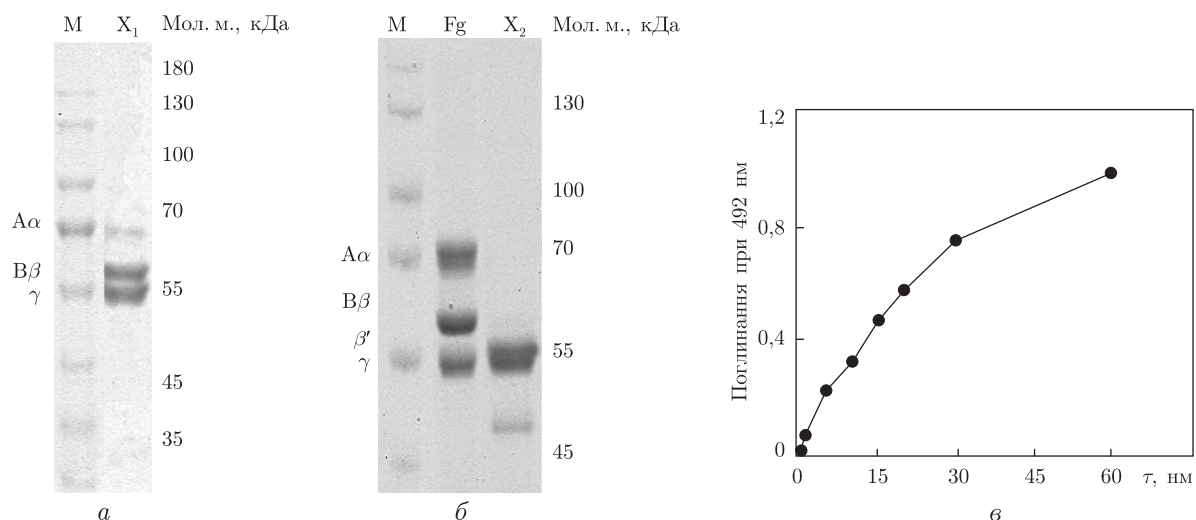


Рис. 3. ІФА експозиції NAD у процесі активації X₂-фрагмента Fg анцистроном (б). Електрофоретичний аналіз препаратів X₁ (а), X₂ (б) у відновлювальних дисульфідні зв'язки умовах

суперспіральною міждоменною структурою (рис. 2, б, з). Розщеплення X-фрагмента до Y- й D-фрагментів руйнує Bβ-ланцюг та інактивує NAD. Ці дані дозволили припустити про те, що NAD не експонована в Fg і експозиція NAD є результат внутрішньомолекулярної перебудови структури E-регіону після відщеплення FpA тромбіном.

У зв'язку з цим припущенням постало питання про те, в якій молекулярній формі фібрину експонується NAD після видалення FpA — в мономерному або олігомерному фібрині desA? Розв'язання цього питання важливе для розуміння механізму, за яким відбувається експозиція NAD, а саме: внаслідок взаємодії E- і D-регіонів за участю A:a й C:c сайтів полімеризації в процесі утворення протофібрил, або як результат перебудови E-регіону в мономерній молекулі після відщеплення FpA від Fg. З цією метою ми використали X₂-фрагмент Fg, який не мав αC-регіонів і 1-42 ділянок Bβ-ланцюга молекули (рис. 3, б). X₂-фрагмент Fg після активації анцистроном і утворення desA X₂-фрагмента в ІФА продемонстрував здатність взаємодіяти з монАТ І-Зс (рис. 3, в).

Оскільки desA X₂-фрагмент позбавлений здатності утворювати олігомери [11, 15], ці дані побічно вказували на можливість експозиції NAD у мономерному фібрині. Прямий доказ експозиції NAD у мономерному X₁-фрагменті та фібрині desA був отриманий в процесі ППР аналізу взаємодії X₁-фрагмента (рис. 4, а) та фібрину desA (рис. 4, б), що утворювався *in situ* з Fg під дією анцистронон з імобілізованими на імуносенсерному чіпі монАТ І-Зс, у присутності/відсутності 1 ммоль/л пептиду GPRP, який утримує фібрин desA в мономерній формі, повністю блокуючи його полімеризацію. Ці дані свідчили про те, що кінетика взаємодії фібрину desA з монАТ І-Зс не залежала від мономерної або олігомерної форми фібрину, а значить, і від взаємодії A:a й C:c сайтів полімеризації. Таким чином, отримані дані вказують на те, що *відщеплення FpA викликає структурну перебудову в E-регіоні мономерного фібрину desA і спричинює появу NAD/SLA, яка детектується монАТ І-Зс.*

Отримані результати дозволяють стверджувати, що відщеплення FpA від Fg тромбіном/анцистроном індукує експозицію NAD й SLA у Bβ-ланцюзі 118-138 регіоні молекули. NAD/SLA не експоноване в молекулі Fg і не приховується її αC-регіоном. Експозиція NAD/SLA також не є результатом взаємодії A:a й C:c сайтів полімеризації в процесі

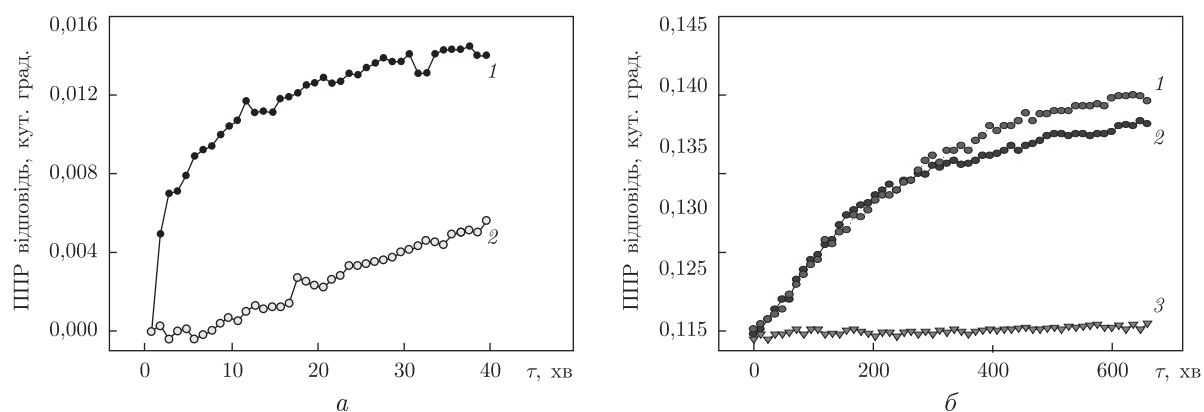


Рис. 4. ППР аналіз зв'язування X_1 -фрагмента Fg (а: 1 — 0,3 моль/л NaCl; 2 — 0,5 моль/л NaCl) і Fg (б: 1 — Fg + анцистрон + GPRP; 2 — Fg + анцистрон; 3 — Fg), що активуються анцистроном, з монАТ І-Зс, імобілізованими на імуносенсорний чіп. Активацію X_1 -фрагмента Fg (а) проведено у присутності 0,3 й 0,5 моль/л NaCl, уповільнюючого швидкість полімеризації; активацію Fg — у присутності/відсутності 1 ммоль/л GPRP

формування олігомерів фібрину, оскільки експонується в мономерному фібрині; вказана експозиція є результатом внутрішньомолекулярної перебудови лейкоподібного та суперспіралізованого доменів Е-регіону Fg після відщеплення F α A.

Повертаючись до питання про структурні перебудови в молекулі Fg після відщеплення F α A, можна відзначити, що, згідно з отриманими експериментальними даними, вперше показано: структурні зміни проходять також і в Е-регіоні молекули та зачіпають, ймовірно, лейкоподібний і суперспіральний домени. Внаслідок цієї перебудови в 118-134 ділянці В β -ланцюга фібрину виникає нова стабільна структура, яка руйнується або шляхом гідролізу плазміном або денатурацією SDS. За попередніми даними [1], ця структура бере участь у латеральній асоціації протофібрил. З певною мірою обережності можна відзначити, що відщеплення F α A не тільки відкриває на мономерному фібрині сайт А, необхідний для первинної полімеризації фібрину desA — утворення протофібрил, а й формує сайт латеральної взаємодії, необхідний молекулі фібрину для забезпечення подальшого етапу полімеризації — латеральної асоціації протофібрил та утворення фібрил.

1. *Lugovskoy E. V., Gritsenko P. G., Kolesnikova I. N. et al.* A neoantigenic determinant in coiled coil region of human fibrin β -chain // *Thromb. Res.* – 2009. – **123**, No 5. – P. 765–770.
2. *Pandya B. V., Gabriel J. L., O'Brien J., Budzynski A. Z.* Polymerization site in the beta chain of fibrin: mapping of the B beta 1–55 sequence // *Biochemistry.* – 1991. – **30**, No 1. – P. 162–168.
3. *Doolittle R. F., Kollman J. M.* Natively unfolded regions of the vertebrate fibrinogen molecule // *Proteins.* – 2006. – **63**, No 2. – P. 391–397.
4. *Kollman J. M., Pandi L., Sawaya M. R. et al.* Crystal structure of human fibrinogen // *Biochemistry.* – 2009. – **48**, No 18. – P. 3877–3886.
5. *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.
6. *Yakovlev S., Makogonenko E., Kurochkina N. et al.* Conversion of fibrinogen to fibrin: mechanism of exposure of tPA – and plasminogen-binding sites // *Ibid.* – 2000. – **39**, No 51. – P. 15730–15741.
7. *Lishko V. K., Podolnikova N. P., Yakubenko V. P. et al.* Multiple binding sites in fibrinogen for integrin α 5 β 1 // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, No 43. – P. 44897–44906.

8. Yang Z., Mochalkin I., Doolittle R. F. A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2000. – **97**, No 26. – P. 14156–14161.
9. Варецька Т. В. Мікрогетерогенність фібриногену. Кріофібриноген // Укр. біохім. журн. – 1960. – **32**, № 1. – С. 13–24.
10. Thompson A. R., Enfield D. L., Ericsson L. H. et al. Human thrombin: partial primary structure // Arch. Biochem. and Biophys. – 1977. – **178**, No 2. – P. 356–367.
11. Медведь Л. В., Горкун О. В., Маняков В. Ф., Белицер В. А. α C-Домены молекулы фибриногена как структуры, ускоряющие самосборку фибрина // Молекул. биология. – 1986. – **20**, № 2. – С. 461–470.
12. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – **227**, No 5259. – P. 680–685.
13. Belitser V. A., Lugovskoi E. V., Ugarova T. P., Derzhskaia S. G. Interaction of fibrinogen with two forms of fibrin differing in the degree of activation by thrombin // Biokhimiia. – 1985. – **50**. – P. 1336–1341.
14. Gorkun O. V., Veklich Y. I., Medved L. V. et al. Role of the α C domains of fibrin in clot formation // Biochemistry. – 1994. – **33**. – P. 6986–6997.
15. Siebenlist K. R., DiOrio J. P., Budzynski A. Z., Mosesson M. W. The polymerization and thrombin-binding properties of des – (Bbeta 1–42)-fibrin // J. Biol. Chem. – 1990. – **265**, No 30. – P. 18650–18655.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 13.01.2012

Л. П. Урвант, Е. М. Макогоненко, Г. К. Березницький, Н. Э. Луговская,
член-корреспондент НАН України **Э. В. Луговской, И. Н. Колесникова,**
Н. А. Пыдюра, Т. А. Позняк, Н. С. Сторожилова,
академик НАН України **С. В. Комисаренко**

Отщепление фибринопептида А вызывает структурные перестройки в 118-134 участке В β -цепи молекулы фибрин(оген)а

Исследован механизм экспонирования обнаруженной ранее неоантигенной детерминанты (NAD) фибринспецифического моноклонального антитела (монАТ) I-3c в 118-134 участке В β -цепи фибрина. С использованием электрофоретического и параллельно ИФА и ППР анализа взаимодействия фибрина desA с монАТ I-3c в присутствии пептида GPRP показано, что экспонирование NAD является результатом внутримолекулярной перестройки E-региона мономера молекулы фибрин(оген)а, инициируемой отщеплением фибринопептида А.

L. P. Urvant, E. M. Makogonenko, G. K. Bereznitskiy, N. E. Lugovskaya,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **E. V. Lugovskoy, I. M. Kolesnikova,**
N. A. Pydiura, T. A. Pozniak, N. S. Storozhylova,
Academician of the NAS of Ukraine **S. V. Komisarenko**

Cleavage of fibrinopeptide A induces structural changes in 118-134 site of В β -chain of fibrin(ogen)

The mechanism of exposition of monoclonal antibody I-3c neoantigenic determinant (NAD) previously localized within 118-134 site of fibrinogen В β -chain has been investigated. Data obtained with the use of electrophoretic and parallel ELISA analyses and SPR analysis of the desA fibrin to monAb I-3c interaction in the GPRP peptide presence demonstrate that the NAD exposition is a result of the intramolecular rearrangement in the E region of a fibrin(ogen) monomer molecule triggered by the fibrinopeptide A cleavage.