



УДК 547.962.4;612.115

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

Зв'язування монАТ II-5с з $A\alpha 20-78$ ділянкою фібриногену інгібує експозицію неоантигенної детермінанти в $B\beta 126-135$ сайті молекули

Досліджено вплив монАТ II-5с, епітоп якого локалізований в $A\alpha 20-78$ фрагменті E-регіону молекули фібриногену, на експозицію неоантигенної детермінанти монАТ I-3с у ході трансформації фібриногену в фібрин. Із застосуванням ІФ, ППР і електрофоретичного аналізу встановлено, що монАТ II-5с інгібує зв'язування монАТ I-3с з фібрином, тромбіну з фібрином і відщеплення фібринопептиду А від фібриногену в системах фібриноген + тромбін і X-фрагмент фібриногену + тромбін. Ці дані підтверджують нашу гіпотезу про тромбін-фібриногеновий субстратний комплекс як тригер структурної перебудови E-регіонів молекули фібриногену, що супроводжується формуванням у $B\beta 126-135$ ділянці фібрину неоантигенної детермінанти монАТ I-3с.

Раніше було встановлено, що експозиція неоантигенної детермінанти монАТ I-3с (НАД) і сайту латеральної асоціації протофібрил у фібриногені (Fg) відбувається внаслідок відщеплення від молекули тромбіном (Thr) або рептилазою фібринопептиду А (FrA) [1, 2]. Було знайдено, що НАД локалізована в $B\beta 126-135$ фрагменті фібрину (Fn) і не існує в Fg [2, 3]. Її експозиція не пов'язана з віддаленням αC -регіону від суперспірального конектора молекули або із взаємодією "А"–"а" сайтів полімеризації Fn, а є результатом структурних перебудов в E-регіоні молекули [2]. Було висловлено припущення, що тригером структурної перебудови E-регіону молекули Fg, яка супроводжується формуванням у віддаленій на $\sim 9,5$ нм від FrA $B\beta 126-135$ ділянці Fg стабільного сайту НАД, є фермент-фібриногеновий субстратний комплекс — ES-комплекс. Для перевірки цієї гіпотези нами досліджено вплив моноклонального антитіла II-5с, епітоп якого локалізовано в $A\alpha 20-78$ фрагменті E-регіону молекули і яке інгібувало полімеризацію Fn, на зв'язування монАТ I-3с з Fn і desA X_1 -фрагментом,

© Л. П. Урвант, Є. М. Макогоненко, Т. А. Позняк, М. О. Пидюра, І. М. Колеснікова, П. Ю. Цап,
Г. К. Березницький, Е. В. Луговської, С. В. Комісаренко, 2014

на зв'язування Thr з Fn та на відщеплення Thr або анцистроном H FrA від Fg і X₁-фрагмента Fg.

МонАТ II-5с було отримано за раніше описаним методом [4]. Епітоп монАТ знаходився в ділянці Aα20–78 Fn. Константа дисоціації для реакції асоціації його з фібрином становила $2,8 \cdot 10^{-9}$ моль/л [5]. Отримані монАТ та його Fab-фрагменти інгібували полімеризацію Fn desAB.

Фібриноген і тромбін були виділені з плазми крові донорів методами Варецької [6] і Fenton [7] відповідно. X-Фрагмент Fg отримано, згідно з методом, описаним у статті [8]. Анцистрон очистили з отрути *Agkistrodon halys halys* [9]. Електрофорез в ПААГ з SDS виконували методом Laemli [10].

Експозицію неоантигенної детермінанти в Fg і X-фрагменті визначали методом імуноферментного аналізу (ІФА). Спочатку Fg або X-фрагмент додавали до концентрації 5 мкг/мл в 0,02 моль/л HEPES буфер (рН 7,4), що містив 0,3 моль/л NaCl, 0,005% твін 20, в якому було присутнє в концентрації 1,25 мкг/мл або відсутнє монАТ II-5с. Після 10 хв передінкубації при 25 °С реакцію відщеплення фібринопептидів від Fg і X-фрагмента розпочинали додаванням Thr або анцистроном H до концентрації 0,03 NIH/мл. У вказані моменти часу реакцію зупиняли додаванням інгібіторів Thr до концентрації 1 ммоль/л (PMSF) і плазмину — 10 мкг/мл (контрикал). Аліквоти (100 мкл) вносили в лунки мікропланшетів, в яких іммобілізовані монАТ I-3с слугували “catch”-антитілом. Наявність епітопу встановлювали за кількістю Fn, що зв'язався з монАТ I-3с. Фібрин визначали за допомогою монАТ II-4d, міченого біотином, і стрептавідин-HRP кон'югата.

Експозицію неоантигенної детермінанти в реальному часі детектували методом поверхневого плазмонного резонансу (ППР) на приладі Плазмон-6 (виробництво Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України). На біосенсорний чип ковалентно іммобілізували монАТ I-3с. У контрольній комірці знаходився Fg або X-фрагмент у концентрації 5 мкг/мл в 0,02 моль/л HEPES (рН 7,4), 0,3 моль/л NaCl, 0,005% твін 20, у вимовіральній комірці — Fg або X-фрагмент і монАТ II-5с у концентрації 1,5 мкг/мл. Реакцію активації Fg або X-фрагмента у вимовіральній комірці ініціювали анцистроном H в концентрації 0,01 NIH/мл. В обидві комірки додавали синтетичний пептид GPRP у концентрації 1 ммоль/л.

Імуноферментний та ППР аналіз інгібування моноклональним АТ II-5с експозиції епітопу моноклонального АТ I-3с. У попередніх роботах було отримано дані, які вказували на відщеплення FrA від Fg, X₁- і X₂-фрагментів Fg тромбіном або анцистроном H як ініціюючий момент експозиції НАД сайту в молекулах Fn desA і desAB, desA X₁- і X₂-фрагментах, що при цьому утворюються [1, 2]. Відщеплення FrA є результатом каталітичного акту, який здійснюється Thr і анцистроном H у складі ES-комплексу (тромбін(анцистрон H)-фібриногенового). Для Thr і батроксобіну (ферменту, подібному за специфічністю до анцистроном H) виявлено дві ділянки зв'язування на Fg, які важливі для утворення ES-комплексу [11, 12]. Одна з ділянок локалізована на FrA і взаємодіє з “аполярним” сайтом активного центру Thr [12, 13]. Друга утворена амінокислотними залишками Trp33, Fen35, Asp38, Глу39 Aα-ланцюга, Ala68, Asp69 Bβ-ланцюга і Asp27 і Глу30 γ-ланцюга, зв'язується з екзосайтом 1 Thr [12]. Для батроксобіну (або анцистроном H) друга ділянка зв'язування на Fg відрізняється від такої для Thr і точно місце її локалізації не встановлено [13]. Тому першим нашим завданням було з'ясувати, яким шляхом здійснює монАТ II-5с інгібування полімеризації Fn у системі Fg або X₁-фрагмент Fg + фермент: шляхом створення стеричних перешкод для взаємодії сайтів полімеризації Fn (A-a і C-c),

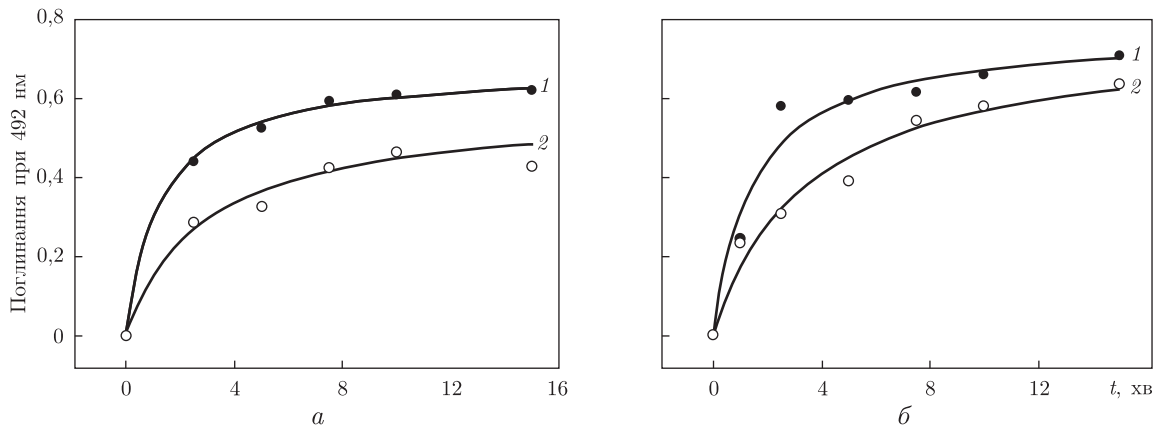


Рис. 1. Імуноферментний аналіз інгібування моноклональним АТ ІІ-5с зв'язування монАТ І-3с з Fg (а) і X₁-фрагментами Fg (б), активованими тромбіном і іммобілізованими в комірках мікропланшета.
Криві: 1 — у відсутності та 2 — у присутності монАТ ІІ-5с

як у випадку desAB фібрину, або також шляхом блокування утворення і функціонування ES-комплексу?

Для вирішення цього питання нами досліджено методом ІФА вплив монАТ ІІ-5с на зв'язування Fg та його X-фрагмента після обробки тромбіном та іммобілізації в комірках мікропланшета з монАТ І-3с. Fg і X₁-фрагмент попередньо інкубували з монАТ ІІ-5с у молярному співвідношенні 2 : 1 впродовж 30 хв при 25 °С. В обох системах — Fg + монАТ ІІ-5с та X₁-фрагмент + монАТ ІІ-5с — спостерігали інгібування зв'язування монАТ І-3с з іммобілізованими в комірках мікропланшета F_n і desA X₁-фрагментом Fg (рис. 1). Величина пригнічення їх зв'язування, яке характеризує рівень експозиції НАД, становила 30 і 15% для Fg + Th_r та X₁-фрагмент + Th_r систем відповідно. Цей дослід показує, що монАТ ІІ-5с інгібує (частково) експозицію віддалених від F_rA НАД сайтів, а отже, й ES-комплексу. Звідси випливає, що монАТ ІІ-5с інгібує полімеризацію F_n у системах Fg + Th_r і X₁-фрагмент Fg + Th_r також шляхом блокування, можливо частково, ES-комплексу.

Для того щоб виключити можливий вплив полімеризації молекул фібрину або desA X₁-фрагментів на доступність сайту НАД до монАТ І-3с, нами досліджено *in situ* в реальному часі зв'язування F_n і desA X₁-фрагментів, які формувались у системах Fg + анцистрон Н + GPRP та X₁-фрагмент Fg + анцистрон Н + GPRP, з іммобілізованим на чип монАТ І-3с із використанням методу ППР (рис. 2).

За цих умов олігомеризація і полімеризація F_n і desA X₁-фрагментів були повністю блоковані пептидом GPRP і інгібуючий вплив монАТ ІІ-5с міг повністю проявити себе. Раніше було показано, що GPRP пептид не впливає на експозицію НАД у системі Fg + анцистрон Н [2]. Як свідчать результати, що представлені на рис. 2, монАТ ІІ-5с зменшувало рівень експозиції НАД в F_n і desA X₁-фрагменті Fg на 49 і 43% відповідно. Оскільки молярне відношення монАТ ІІ-5с до Fg/X₁-фрагмента становило 1 до 2, то рівень інгібування експозиції НАД, коли фібриноген/X₁-фрагмент знаходяться в *мономерній формі* і антиполімеризаційна компонента дії монАТ ІІ-5с відсутня, наближається до теоретично можливого рівня. Цей експеримент підтверджує висновок про те, що монАТ ІІ-5с інгібує експозицію НАД, ймовірно, перешкоджаючи роботі ES-комплексу Th_r(анцистрон Н)-Fg. Крім того, стає очевидним, що інгібування полімеризації F_n монАТ ІІ-5с в умовах експерименту відбувається також і шляхом блокування роботи ES-комплексу.

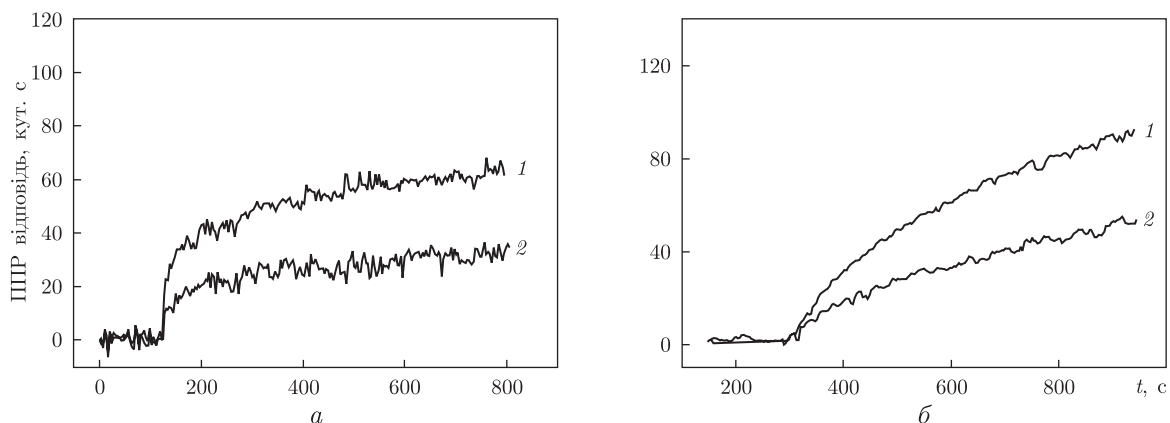


Рис. 2. ППР аналіз інгібування моноклональним АТ ІІ-5с зв'язування Fg (а) і Х-фрагмента Fg (б), активованих анцистроном Н, до монАТ І-3с, іммобілізованого на імуносенсорний чип, у відсутності (1) і в присутності (2) монАТ ІІ-5с за умов блокування полімеризації фібрину і desA X₁-фрагмента пептидом GPRP

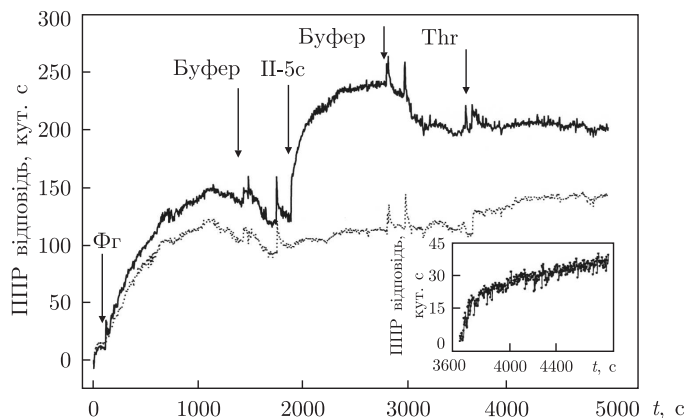


Рис. 3. ППР аналіз інгібування моноклональним АТ ІІ-5с зв'язування тромбіну з фібриногеном, сорбованим на монАТ ІІ-4d, яке ковалентно іммобілізоване на імуносенсорний чип.

Суцільною лінією позначено сенсограму з робочої комірки, пунктирною — сенсограму з контрольної комірки. Стрілками показано момент введення в комірки Fg, буферу для промивки, тромбіну. До контрольної комірки монАТ ІІ-5с не додавали.

На вставці представлено різницю між сенсограмами, отриманими з контрольної і робочої комірок після введення в них тромбіну впродовж 3600–4800 с

ППР аналіз впливу монАТ ІІ-5с на зв'язування тромбіну з фібрин(оген)ом, іммобілізованим на імуносенсорний чип. Для з'ясування питання, на якому етапі функціонування ES-комплексу, а саме: утворення комплексу, каталітичного акту або передачі структурних змін від лейкоподібного домену Е-регіону до Вβ126–135 ділянки Fg, — монАТ ІІ-5с блокує його роботу, було досліджено вплив останнього на зв'язування Thr з іммобілізованим на імуносенсорний чип Fg. Зв'язування Thr з Fg є перший етап формування тромбін-фібриногенового субстратного комплексу.

Для цього на чип було ковалентно іммобілізовано фібриноген-специфічне монАТ ІІ-4d [14]. Потім в робочу і контрольну комірки одночасно був введений Fg в 0,02 моль/л HEPES буфері, рН 7,4, що містив 0,3 моль/л NaCl, 0,005% твін 20, у концентрації 5 мкг/мл (рис. 3). Після відмивання комірок буфером в робочу комірку було введено монАТ ІІ-5с

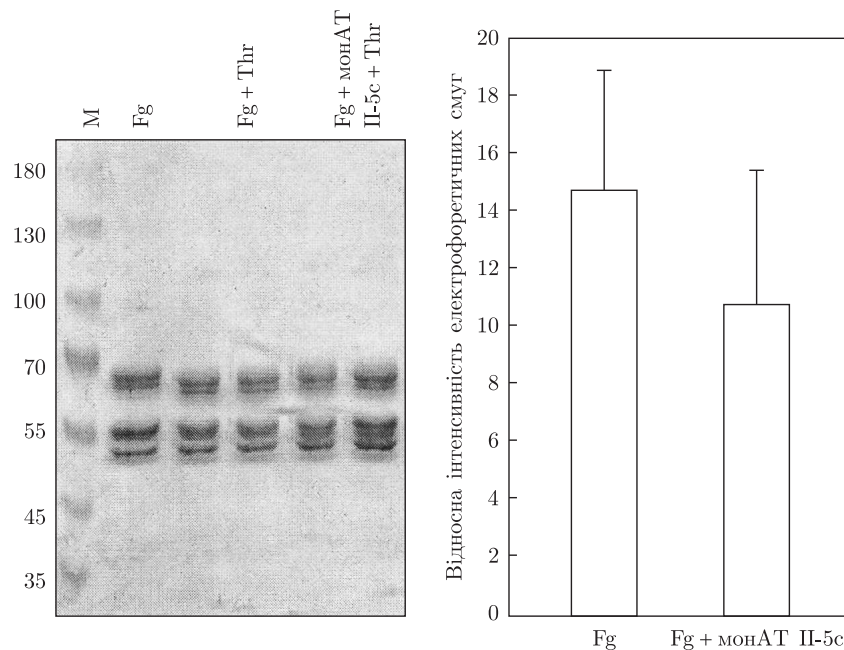


Рис. 4. Електрофоретичний і денситометричний аналіз пептидної смуги α -ланцюга фібриногену, активованого тромбіном, у присутності та відсутності монАТ ІІ-5с. Активацію тромбіном проведено у присутності 1 ммоль/л GPRP

в тому самому буфері в концентрації 1,5 мкг/мл, а в контрольну комірку — тільки буферний розчин. Обидві комірки були відмиті буфером, що містив 0,15 моль/л NaCl, і в них вводили розчин Thr у концентрації 10 NIH/мл (0,28 мкмоль/л) у цьому буфері. Як свідчать сенсограми, що представлені на рис. 3, в контрольній комірці у відсутності монАТ ІІ-5с зв'язування Thr було значно більше у порівнянні з таким у робочій комірці. На вставці рис. 3 наведено різницю у відповідях, зареєстрованих з контрольної і робочої комірок після введення у них Thr. Отримані дані вказують на те, що зв'язування монАТ ІІ-5с з фібриногеном істотно блокує зв'язування Thr з Fg за участю екзосайта 1 Thr. У результаті двосайтова взаємодія Thr у субстратному Thr-Fg комплексі істотно порушується і це викликає порушення в роботі ES-комплексу, що призводить до зменшення експозиції епітопу монАТ І-3с (див. рис. 2). Результати дослідження також дозволяють припустити, що в епітопі монАТ ІІ-5с входять амінокислотні залишки Trp33, Fen35, Asp38, Глу39 $A\alpha$ -ланцюга Fg, які належать петлі, що охоплює лейкоподібний домен E-регіону молекули, і входять до ділянки зв'язування Thr на Fg [11].

Електрофоретичний аналіз інгібування монАТ ІІ-5с відщеплення FpA від Fg і X-фрагмента Fg тромбіном. Зв'язування монАТ ІІ-5с з Fg істотно блокує зв'язування Thr з Fg (див. рис. 3) і пригнічує експозицію НАД (див. рис. 1, 2). Для з'ясування питання, який з подальших етапів роботи ES-комплексу — відщеплення тромбіном FpA від молекули або передачу структурних змін від лейкоподібного домену до B β 126–135 ділянки Fg — інгібує монАТ ІІ-5с, було досліджено вплив останнього на відщеплення тромбіном FpA від Fg і X₁-фрагмента Fg (рис. 4). Для цього Fg або X₁-фрагмент, які додавали до концентрації 0,2 мг/мл у 0,02 моль/л HEPES (рН 7,4), що містив 0,3 моль/л NaCl і 0,005% твін 20, інкубували у присутності або відсутності монАТ ІІ-5с впродовж 10 хв. Потім в інкубаційне сере-

довище додавали 1 ммоль/л GPRP, 0,1 ммоль/л ПХМБ і Thг до концентрації 0,1 НИН/мл. Реакцію зупиняли додаванням інгібіторів Thг до концентрації 1 ммоль/л (PMSF) і плазміну — 10 мкг/мл (контрикал). Продукти реакції Fg і X₁-фрагмента Fg з Thг у присутності та відсутності монАТ II-5с піддавали електрофоретичному аналізу у відновлювальних дисульфідні зв'язки умовах. Денситометричний аналіз білкової смуги α -ланцюга Fg показав зменшення її інтенсивності на 12% у присутності монАТ II-5с (див. рис. 4). Інтенсивність смуги 24 кДа фрагмента α -ланцюга X₁-фрагмента Fg у системі X₁-фрагмент Fg + Thг зменшувалась на 24% (не подано). Привертають увагу близькі значення пригнічення рівня експозиції НАД та рівня відщеплення FpA монАТ II-5с незалежно від того, заблокована або ні полімеризація та олігомеризація Fп і desA X₁-фрагментів Fg пептидом GPRP (див. рис. 1). Отримані результати свідчать, що монАТ II-5с інгібує стадію відщеплення FpA тромбіном від молекули Fg, проте рівень пригнічення відщеплення FpA менше рівня інгібування зв'язування Thг з Fп і пригнічення експозиції НАД на мономерному Fп.

Таким чином, результати проведеного дослідження підтверджують гіпотезу про ES-комплекс як тригер експозиції НАД у Fп. Вони дозволяють припустити, що двоцентрова взаємодія Thг з Fg, ймовірно, не є важливою для експозиції НАД, оскільки інгібування зв'язування Thг, опосередкованого взаємодією екзосайту 1 з сайтом, утвореним амінокислотними залишками Trp33, Fen35, Asp38, Глу39 A α -ланцюга, Ala68, Asp69 B β -ланцюга і Asp27 і Глу30 γ -ланцюга, істотно не порушує каталітичну функцію субстратного комплексу — відщеплення FpA — і експозицію НАД. Це погоджується з даними про те, що пептид A α 27–50 Fg інгібує полімеризаційну активність Thг, але не впливає на каталітичну активність його активного центру [15]. З іншого боку, блокування активного центру Thг не впливає на його зв'язування з E-гементиновим фрагментом Fg [11]. Обидва факти вказують на важливість каталітичного акту як тригера експозиції НАД. Очевидно, що ключовою подією для необоротної індукції експозиції НАД у Fg є взаємодія FpA з аполярним сайтом і активним центром Thг і відщеплення FpA. Можна очікувати, що ділянка A α 1–27 молекули Fg, яка включає FpA і фрагмент A α 17–27 у комплексі з ферментом, утворюють з лейкоподібним доменом E-регіону тимчасову структуру, яка стабілізує конформацію усього E-регіону молекули (A α 1–110, B β 1–138 і γ 1–58)₂. α C-регіони і B β 1–42 пептиди не входять до цієї структури, оскільки в X₂-фрагменті Fg також експонується сайт НАД після відщеплення FpA [2]. Відщеплення FpA руйнує цю структуру і індукує структурні перебудови у воронкоподібному субдомени E-регіону, які за участю α -спіралей A α -, B β - і γ -ланцюгів транслокуються до B β 126–135 сайтів молекули фібрину.

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. *Урвант Л. П., Макогоненко Є. М., Березницький Г. К. та ін.* Відщеплення фібринопептиду А викликає структурні перебудови в 118–134 ділянці B β -ланцюга молекули фібрин(оген)у // *Доп. НАН України.* – 2012. – № 7. – P. 170–175.
3. *Урвант Л. П., Макогоненко Є. М., Пидюра М. О. та ін.* Локалізація епітопу фібрин-специфічного моноклонального антитіла I-3с в ділянці 118–134 B β -ланцюга фібрину // *Там само.* – 2013. – № 10. – С. 177–181.
4. *Колеснікова І. М., Луговська Н. Е., Луговської Е. В. та ін.* Моноклональні антитіла, специфічні до фібрину людини // *Там само.* – 2006. – № 9. – С. 181–185.
5. *Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ochaniance Z., Goldberg M. E.* Measurement of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay // *J. Immunol. Meth.* – 1985. – **77**, No 2. – P. 305–319.

6. *Варецька Т. В.* Мікрогетерогенність фібриногену. Кріофібриноген // Укр. біохім. журн. – 1960. – **32**, № 1. – С. 13–24.
7. *Thompson A. R., Enfield D. L., Ericsson L. H. et al.* Human thrombin: partial primary structure // Arch. Biochem. Biophys. – 1977. – **178**, No 2. – P. 356–367.
8. *Медведь Л. В., Горжун 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.
9. *Solov'ev D. A., Ugarova T. P.* Isolation and characteristics of alpha-specific thrombin-like enzymes from venoms of the common pit viper (*Agkistrodon halys halys*) and the eastern pit viper (the central Asian subspecies *Agkistrodon halys blomhoffii*) // Biokhimiia. – 1993. – **58**, No 8. – P. 1221–1233.
10. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – **227**, No 5259. – P. 680–685.
11. *Pechik I., Madrazo J., Mosesson M. W. et al.* Crystal structure of the complex between thrombin and the central “E” region of fibrin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – **101**, No 9. – P. 2718–2723.
12. *Vu T. T., Stafford A. R., Leslie B. A. et al.* Batroxobin binds fibrin with higher affinity and promotes clot expansion to a greater extent than thrombin // J. Biol. Chem. – 2013. – **288**, No 23. – P. 16862–16871.
13. *Stabbs M. T., Bode W. A.* A player of many parts: a spotlight falls on thrombin structure // Thromb. Res. – 1993. – **69**, No 1. – P. 1–59.
14. *Lugovskoy E. V., Gritsenko P. G., Kolesnikova I. N. et al.* Two monoclonal antibodies to D-dimer-specific inhibitors of fibrin polymerization // Thromb Res. – 2004. – **113**, No 3/4. – P. 251–259.
15. *Biennie C. D., Lord S. T.* A synthetic analog of fibrinogen alpha 27–50 is an inhibitor of thrombin // Thromb. Haemost. – 1991. – **65**, No 2. – P. 165–168.

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

Надійшло до редакції 18.11.2013

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

Связывание моАТ II-5с с А α 20–78 участком фибриногена ингибирует экспозицию неоантигенной детерминанты в В β 126–135 сайте молекулы

Исследовано влияние моАТ II-5с, эпитоп которого локализован в А α 20–78 фрагменте E-региона молекулы фибриногена, на экспозицию неоантигенной детерминанты моАТ I-3с в ходе трансформации фибриногена в фибрин. С применением ИФ, ППР и электрофоретического анализа установлено, что моАТ II-5с ингибирует связывание моАТ I-3с с фибрином, тромбина с фибрином и отщепление фибринопептида А от фибриногена в системах фибриноген + тромбин и X-фрагмент фибриногена + тромбин. Эти данные подтверждают нашу гипотезу о тромбин-фибриногеновом субстратном комплексе как триггере структурной перестройки E-регионов молекулы фибриногена, что сопровождается формированием в В β 126–135 участке фибрина сайта неоантигенной детерминанты моАТ I-3с.

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

Binding of mAb II-5c to A α 20–78 fragment of fibrinogen inhibits a neoantigenic determinant exposure within B β 126–135 site of a molecule

The influence of mAb II-5c, epitope of which was localized within A α 20–78 fragment of the E-region of fibrinogen molecule, on the exposure of mAb I-3c neoantigenic determinant at the transformation of fibrinogen to fibrin has been investigated. Using ELISA, SPR, and electrophoretic analysis, we have found that mAb II-5c inhibited the binding of mAb I-3c to fibrin, thrombin to fibrin, and thrombin cleavage of fibrinopeptide A from fibrinogen in fibrinogen + thrombin and X-fragment fibrinogen + thrombin systems. These data support our hypothesis that the thrombin-fibrinogen substrate complex is a trigger of the restructuring of a fibrinogen molecule at the transformation in fibrin, which is accompanied by the formation of neoantigenic determinants of mAb I-3c within B β 126–135 site of a molecule.