

Исследование сополимеров фибриногена с N-концевым дисульфидным узлом фибрина методом трансмиссионной электронной микроскопии

Т. М. Позднякова, В. И. Чернышов, Е. М. Макогоненко,
Т. М. Чернышенко, С. А. Седерхольм-Вильямс

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины
252030, Киев, ул. Леонтовича, 9

Методом трансмиссионной электронной микроскопии негативно контрастированных образцов исследована структура сополимеров фибриногена (F) с N-концевым дисульфидным узлом дез-ААВВ-фибрина (tN-ДСУ). Показано, что первичным продуктом сополимеризации является нить из молекул фибриногена, расположенных по типу конец-к-концу. Молекулы tN-ДСУ, связывающие между собой молекулы фибриногена, на электроннограммах не просматриваются ввиду, как мы полагаем, их малого размера и отсутствия глобулярной структуры. Образующиеся однонитчатые сополимеры латерально агрегируют в фибриллы различной толщины, создающие трехмерную фибриллярную сеть. Полученные данные подтверждают ранее предложенную гипотезу о структурной основе F-tN-ДСУ сополимера как нити расположенных конец-к-концу молекул фибриногена, соседние D-домены которых связаны молекулами tN-ДСУ по центрам полимеризации фибрина а-А и b-В. Показанный нами многостадийный процесс сборки сополимера подобен таковому полимеризации фибрина, что свидетельствует о лежащем в их основе едином механизме самосборки путем связывания друг с другом комплементарных центров полимеризации фибрина.

Введение. Известно, что основным механизмом полимеризации фибрина является нековалентное межмолекулярное связывание центральных доменов E и периферических доменов D его молекул двумя парами комплементарных центров полимеризации фибрина а-А и b-В [1]. Для детального изучения механизма полимеризации фибрина используются различные модельные системы, одной из которых является смесь фибриногена (F) с N-концевым дисульфидным узлом фибрина (tN-ДСУ). В D-доменах фибриногена локализованы активные центры полимеризации фибрина а и b. Комплементарные им центры в E-доменах фибриногена неактивны. Они активируются с возникновением центров А и В при отщеплении тромбином от фибриногена двух пар фибринопептидов А и В в образующемся мономерном дезААВВ-фibrине. В молекуле tN-ДСУ, являющейся моделью E-домена

дезААВВ-фибрина, также находятся активные центры А и В.

Ранее было показано, что фибриноген образует комплекс с tN-ДСУ, представляющий собой регулярный сополимер с формулой $[F(tN-ДСУ)_2]_n$ [2]. Было доказано, что этот сополимер образуется вследствие междоменного D—E-связывания центров полимеризации фибрина а-А и b-В [3, 4]. На основании этих данных была предложена гипотетическая модель структурной основы F-tN-ДСУ-сополимера как нити расположенных конец-к-концу молекул фибриногена, соседние домены D которых связаны двумя молекулами tN-ДСУ по центрам полимеризации фибрина (рис. 1).

В настоящей работе мы исследовали структуру F-tN-ДСУ-сополимера на различных стадиях комплексообразования фибриногена с tN-ДСУ методом трансмиссионной электронной микроскопии негативно контрастированных образцов.

Материалы и методы. Фибриноген из донор-

© Т. М. ПОЗДНЯКОВА, В. И. ЧЕРНЫШОВ,
Е. М. МАКОГОНЕНКО, Т. М. ЧЕРНЫШЕНКО,
С. А. СЕДЕРХОЛЬМ-ВИЛЬЯМС, 1997

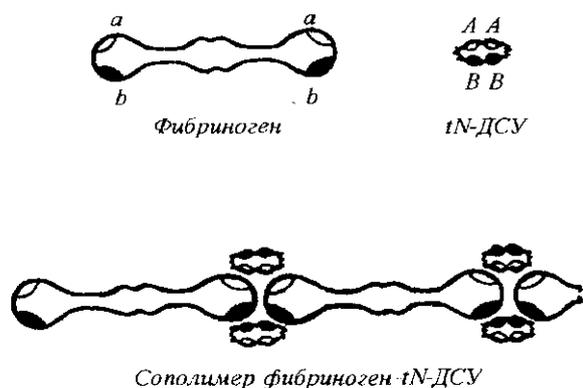


Рис. 1. Гипотетическая модель F-tN-DSC-сополимера

ской крови (98 % свертываемости) получали высаливанием сульфатом натрия [5].

Мономерный дезААВВ-фибрин получали растворением фибринового сгустка, образуемого тромбином из фибриногена, в 0,02 н. уксусной кислоте [6].

N-концевой дисульфидный узел дезААВВ-фибрина получали расщеплением фибринового сгустка из реполимеризованного дезААВВ-фибрина с помощью CNBr в 70 %-й муравьиной кислоте и последующей гельфильтрации лиофилизированного продукта на сефадексе G-100 в аммоний-формиатном буфере, pH 2,5 [7].

Образцы F-tN-DSC-сополимера для электронной микроскопии готовили, вводя раствор tN-DSC в буфере (pH 2,5) в раствор фибриногена в буфере (0,05 М трис-HCl, pH 7,6, 0,15 М NaCl, 0,001 М CaCl₂, 0,001 М NaN₃). Объем раствора tN-DSC должен составлять не более 1/30 объема раствора фибриногена во избежание сдвига pH в смеси. Молярная концентрация фибриногена была равна или вдвое ниже таковой tN-DSC.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Молекулы фибриногена и их сополимеры исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии после их негативного контрастирования. За основу взята методика контрастирования, предложенная Вильямсом [8], с небольшими изменениями.

Негативным контрастером был уранилацетат («Merck», ФРГ), растворенный в дистиллированной воде (1—2 %) без регулирования концентрации водородных ионов (pH).

Сетки для электронного микроскопа (IGC100, «PELCO», США) покрывали слоем формвара

(Formvar 15/95 Resin, «PELCO») из 0,3 %-го раствора в дихлорэтаноле, укрепляли распыленным в вакууме углем с помощью вакуумного испарителя HUS-5GB («Hitachi», Япония) и перед использованием делали их гидрофильными в ионном испарителе IB-3 («EIKO», Япония).

На сетку, удерживаемую микропинцетом, помещали каплю (5—10 мкл) раствора белка. После инкубации (до 5 мин) сетку промывали вначале в 100 мМ аммоний-ацетатном буфере, pH 7,9, затем в 10 мМ аммоний-ацетатном буфере, pH 8,5. Последний раствор с сетки удаляли с помощью фильтровальной бумаги до объема тонкой пленки жидкости. Затем сетку клали на каплю контрастера, ранее помещенного на поверхность тefлонового блока. Излишек контрастера под сеткой отсасывали наконечником (100 мкл), соединенным с водным вакуумным насосом. После высушивания контрастера на воздухе белок исследовали в электронном микроскопе H-600 («Hitachi») при увеличении 50000.

Результаты и обсуждение. На рис. 2 представлены молекулы фибриногена и первичного полимера дезААВВ-фибрина. Видно, что молекулы фибриногена имеют вид прямых или слегка изогнутых палочек длиной около 45 нм, в которых четко выделяются три глобулы, связанные нитевидным сердечником (рис. 2, а). Первичным продуктом полимеризации мономерного фибрина, составляющим структурную основу сети фибринового полимера, является двухнитчатая протофибрилла (рис. 2, б).

На различных фазах сополимеризации фибриногена с tN-DSC мы обнаружили разные структурные формы F-tN-DSC-сополимера. Наиболее ранние из них представляют собой короткие нити, в которых можно различить до четырех расположенных по типу конец-к-концу молекул фибриногена, утративших трехглобулярную структуру (рис. 3). Молекул tN-DSC на всех электроннограммах не видно, поскольку они не выявляются использованным нами методом.

Это можно объяснить не только их относительно малым размером, но и отсутствием у tN-DSC глобулярной структуры, разрушенной при обработке фибрина 70 %-м раствором муравьиной кислоты (персональное сообщение Л. В. Медведя о результатах микрокалориметрических исследований tN-DSC).

В некоторых образцах смесей фибриногена с tN-DSC мы обнаружили длинные вытянутые нити, в которых можно различить отдельные молекулы фибриногена без характерных глобул, выстроенные конец-к-концу (рис. 4). На представленном рисунке нить соединена с «клубком», образованным из молекул фибриногена. Однако единичные нити сополимера в наших экспериментах встречаются до-

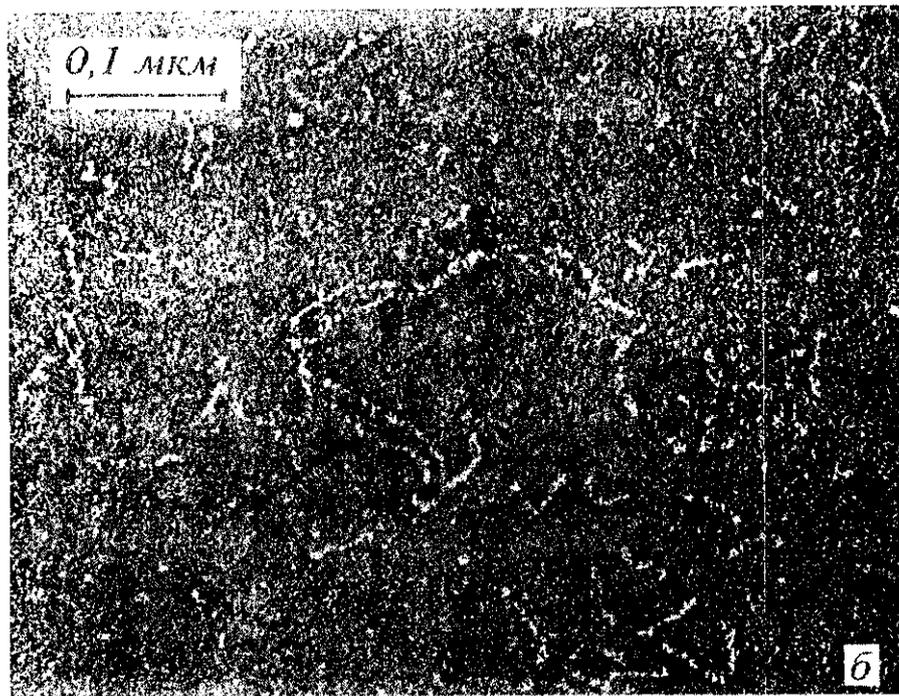
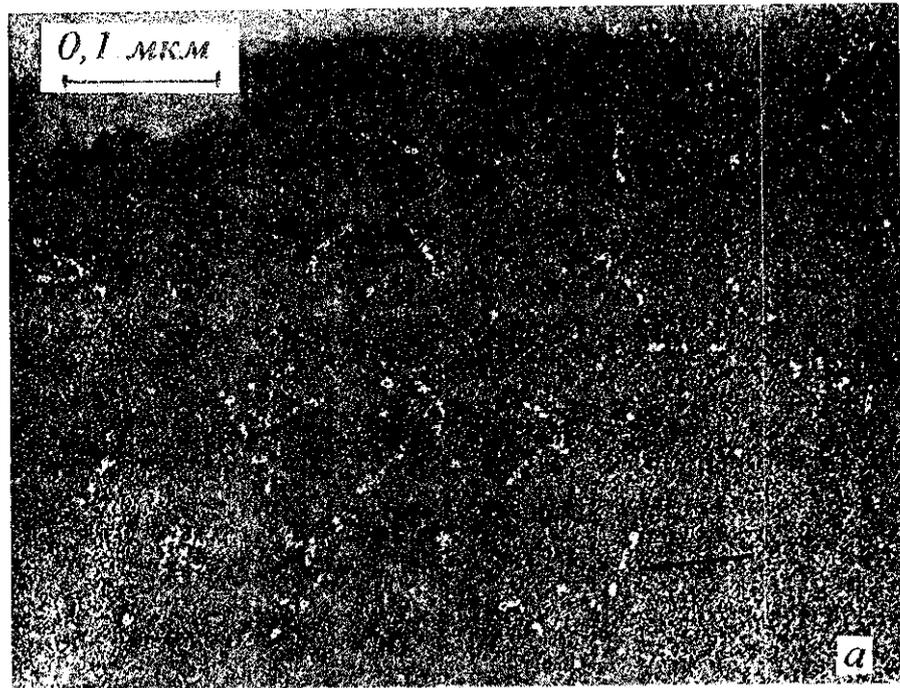


Рис. 2. Индивидуальные молекулы фибриногена (а) (указаны стрелкой, концентрация белка 5 мкг/мл; $\times 210000$ структуры (б), образовавшиеся в смеси фибриногена с тромбином (стрелка, концентрация фибриногена 5 тромбина 0,05 ед/мл; время инкубации 15 мин; $\times 210000$)

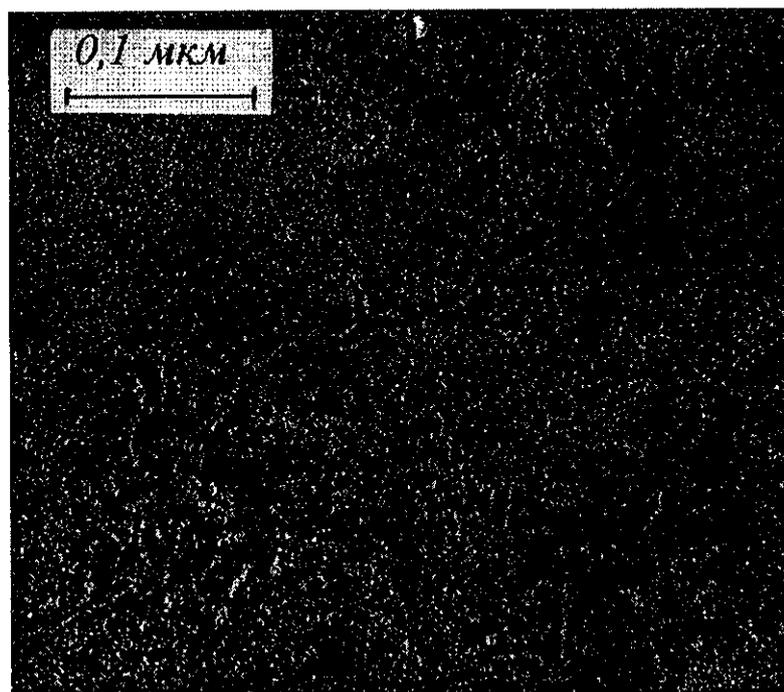
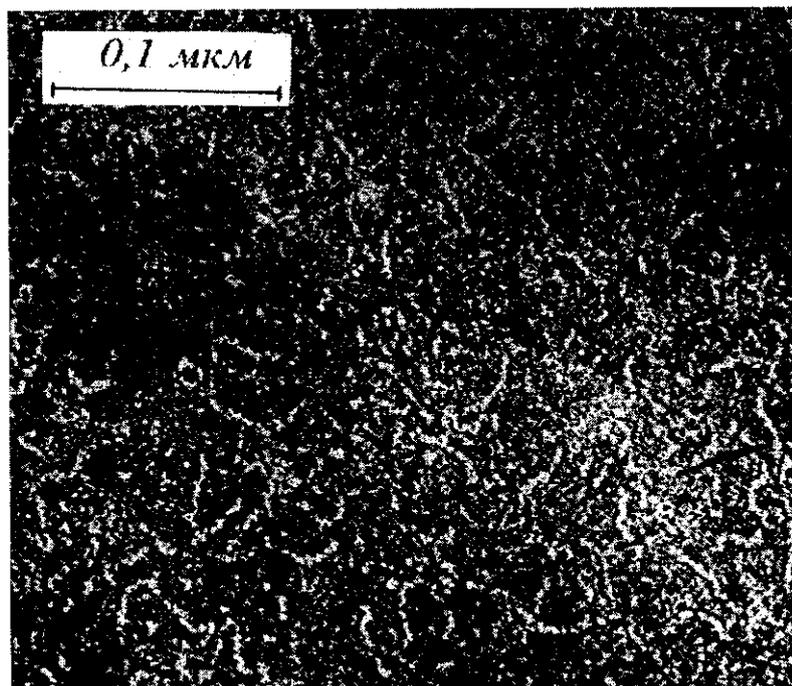


Рис. 3. Нитевидные структуры, образовавшиеся при 5-мин инкубации фибриногена (F) с tN-ДСУ белка 5 мкг/мл, F/tN-ДСУ = 1/2, М/М; $\times 300000$
Рис. 4. Нитевидная структура, образовавшаяся в смеси F с tN-ДСУ (стрелка). Концентрация белка : $\times 260000$

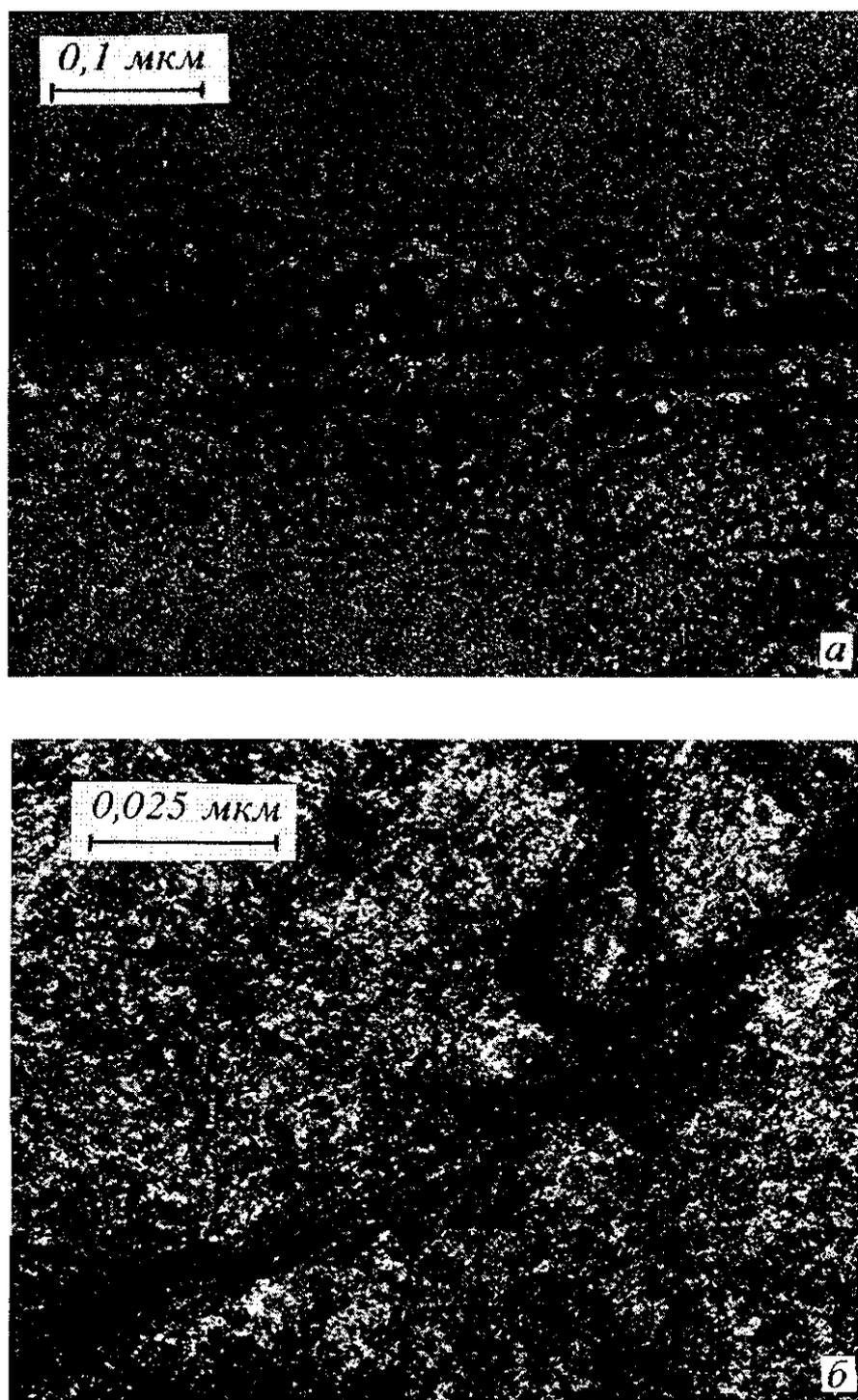


Рис. 5. Однонитчатый F-tN-ДСУ-сополимер, указан стрелкой, и пучки нитей сополимера, двойная стрелка (а) (концентрация 5 мкг/мл, F/tN-ДСУ = 1/2, М/М; $\times 190000$), и фибриллы твердофазного F-tN-ДСУ-сополимера (б), стрелка (концентрация исходной смеси 500 мкг/мл, F/tN-ДСУ = 1/2, М/М, инкубация в течение 24 ч; $\times 1000000$)



Рис. 6. Фибриллярная сеть F-tN-DCU-сополимера. Концентрация белка 5 мкг/мл, F/tN-DCU = 1/2, М/М; $\times 40000$

вольно редко. Обычно процесс разрастания сополимера в длину сопровождается латеральной агрегацией нитей в пучки, напоминающие фибриновые фибриллы (рис. 5, а). Но в отличие от фибриновых, фибриллы F-tN-DCU-сополимера не обнаруживают регулярной поперечной исчерченности (с периодом идентичности около 23 нм), обусловленной латеральными Д—Е-контактами протофибриллополимеризующегося фибрина. Кроме того, в представленной на рис. 5, а, фибрилле сополимера, помимо нитевидных, видны клубкообразные структуры. Последние не обнаружены в фибриллах твердофазного сополимера из длительно инкубированных смесей фибриногена с tN-DCU (рис. 5, б). Мы предполагаем, что клубкообразные структуры образуются в результате произвольного сворачивания одностреччатого сополимера, и эти «клубки» могут в дальнейшем разворачиваться в ходе латеральной агрегации нитей. Поэтому в окончательно сформированном твердофазном сополимере видны только латерально агрегировавшие нити, а клубкообразные структуры отсутствуют.

Фибриллы F-tN-DCU сополимера впоследствии формируют трехмерную сеть (рис. 6). Известно, что полимеризация мономерного фибрина также

завершается образованием трехмерной сети фибрилл, представляющей собой фибриновый сгусток.

На основании представленных данных можно заключить, что сополимеризация фибриногена с tN-DCU, как и полимеризация мономерного фибрина, является многофазным процессом, причем последовательные фазы этих процессов однотипны. В обоих случаях первичным полимером является нитевидная структура. У полимеризующегося фибрина это двухнитчатая протофибрилла, образующаяся в результате сборки молекул по типу конец-к-середине за счет межмолекулярных Д—Е-контактов по центрам полимеризации а-А и b-В. Сополимеризация фибриногена с tN-DCU обусловлена теми же взаимодействиями центров полимеризации фибрина. Однако здесь центры А и В находятся в tN-DCU. Их связывание с а- и b-центрами Д-доменов фибриногена приводит к образованию одностреччатого F-tN-DCU-сополимера.

Таким образом, данные электронной микроскопии подтверждают приведенную на рис. 1 гипотетическую модель структурной основы F-tN-DCU сополимера как нити расположенных конец-к-концу молекул фибриногена, связанных через tN-DCU по центрам полимеризации фибрина. Этот сополи-

мер может рассматриваться как аналог фибриновой протофибриллы. Обнаруженная нами латеральная агрегация одонитчатых сополимеров, завершающаяся образованием трехмерной сети фибрилл, свидетельствует о том, что не только первичная сборка молекул фибриногена и tN-ДСУ, но и последующие фазы сополимеризации подобны фазам полимеризации фибрина. Это подобие процессов сборки F-tN-ДСУ-сополимера и фибринового полимера вполне естественно, поскольку в их основе лежит единый механизм нековалентного связывания молекул фибрин(оген)а через комплементарные центры полимеризации фибрина.

Т. М. Позднякова, В. І. Чернишов, О. М. Макогоненко,
Т. М. Чернишенко, С. А. Седерхольм-Вильямс

Дослідження сополімерів фібриногена з N-кінцевим дисульфідним вузлом фібріну методом трансмісійної електронної мікроскопії

Резюме

Методом трансмісійної електронної мікроскопії негативно контрастованих зразків досліджено структуру сополімерів фібриногена (F) з N-кінцевим дисульфідним вузлом дезААВВ-фібріну (tN-ДСВ). Показано, що первинним продуктом сополімеризації є нитка з молекул фібриногена, розміщених по типу кінець-до-кінця. Молекули tN-ДСВ, які зв'язують між собою молекули фібриногена, на електронограмах не виявляються через, як ми вважаємо, їх малий розмір та відсутність глобулярної структури. Утворені одониткові сополімери латерально агрегують у фібрили різної товщини, що створюють трьохмірну фібрілярну сітку. Отримані дані підтверджують раніше запропоновану гіпотезу стосовно структурної основи F-tN-ДСВ сополімеру як нитки розташованих кінець-до-кінця молекул фібриногена, сусідні D-домени яких зв'язані молекулами tN-ДСВ по центрах полімеризації фібріну а-А і б-В. Показаний нами багатостадійний процес складання сополімеру подібний до такого полімеризації фібріну, що свідчить про єдність їх механізмів самоскладання шляхом зв'язування однієї з одним комплементарних центрів полімеризації фібріну.

Т. М. Pozdnjakova, V. I. Chernishov, E. M. Makogonenko,
Т. М. Chernishenko, S. A. Cederholm-Williams

Transmission electron microscopy study of co-polymers of fibrinogen with N-terminal disulfide knot of fibrin

Summary

The structure of co-polymers of fibrinogen (F) with N-terminal disulfide knot of desAABB fibrin (tN-DSK) was investigated by

transmission electron microscopy of their negatively contrasted samples. It was shown that the co-polymers initial forms were represented by short threads of 2–4 end-to-end arranged F molecules, in which tN-DSK molecules could't be visualized by the used method. Then long single-threaded structures formed which aggregated laterally in fibril-like bunches of varying thickness. The network of fibrils have arisen finally. In control experiments when in the fibrinogen containing samples tN-DSK was substituted for thrombin, one could observe the double-threaded twisted protofibrils but not any of the single-threaded end-to-end arranged molecules. These studies confirm the hypothetical model of F-tN-DSK co-polymer structure as the thread of end-to-end arranged fibrinogen molecules, the adjacent D-domain of which are bound by tN-DSK molecules via the fibrin polymerization sites. The lateral aggregation of co-polymer strains into fibrils and fibril network formation revealed in this study is the evidence of similarity between F-tN-DSK co-polymers and fibrin polymer structures. It is not wonder because both structures are formed by the unique self-assembly mechanism in which the noncovalent binding of fibrin(ogen) molecules by the complementary fibrin polymerization sites is involved.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Blomback B. Fibrinogen and fibrin formation // Plasma proteins / Eds B. Blomback, L. A. Hanson.—New York: John Wiley and Sons, 1979.—P. 223—253.
2. Позднякова Т. М., Рыбачук В. М. Комплексы N-концевого дисульфидного узла фибрина с фибриногеном // Укр. биохим. журн.—1985.—57, № 1.—С. 3—8.
3. Позднякова Т. М., Рыбачук В. М., Ильина А. В. и др. Влияние пептидов — структурных аналогов NH₂-концевых участков а и б-цепей фибрина на специфическое связывание NH₂-концевого дисульфидного узла фибрина с фибриногеном // Там же.—1986.—58, № 2.—С. 10—15.
4. Позднякова Т. М., Рыбачук В. М., Угарова Т. П. Роль D₂—E₂-центров междоменного связывания мономерного фибрина при сополимеризации фибриногена с NH₂-концевым дисульфидным узлом фибрина // Биохимия.—1987.—52, № 4.—С. 592—598.
5. Варецкая Т. В. Микрорегетерогенность фибриногена. Крио-фибриноген // Укр. биохим. журн.—1960.—32, № 1.—С. 13—24.
6. Pozdnjakova T. M., Musjalkovskaya A. A., Ugarova T. P. et al. On the properties of fibrin monomer prepared from fibrin clot with acetic acid // Tromb. Res.—1979.—16, N 1/2.—P. 283—288.
7. Позднякова Т. М., Рыбачук В. М., Вовк Э. В. Растворимые комплексы NH₂-концевого дисульфидного узла фибрина с молекулами, содержащими домены D // Укр. биохим. журн.—1983.—55, № 6.—С. 614—621.
8. Williams R. C. Morphology of bovine fibrinogen monomers and fibrin oligomers // J. Mol. Biol.—1981.—150.—P. 283—288.

УДК 577.112.7.352

Поступила в редакцию 10.02.97