

АНОТАЦІЯ

Кучерявий Є.П. Дослідження структури та функцій α C-регіонів та B β N- доменів фібрин(оген)у за допомогою молекулярних ефекторів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2025.

Процеси полімеризації фібрину та агрегації тромбоцитів є центральними етапами формування фібриново-тромбоцитарного згустку, що лежить в основі тромбоутворення. У фізіологічних умовах тромбоутворення є критично важливим для зупинки кровотечі у відповідь на ушкодження судинної стінки та ініціації репаративних процесів. Водночас, розвиток тромбів у непошкоджених ділянках судинного русла становить серйозну патофізіологічну загрозу, спричиняючи ішемічне ураження органів і тканин. У зв'язку з цим, дослідження молекулярних механізмів, що регулюють полімеризацію фібрину та агрегацію тромбоцитів, має важливе значення для розробки стратегій селективної модуляції тромбоутворення – з метою інгібування патологічного внутрішньосудинного тромбогенезу та стимуляції фізіологічного екстрасудинного гемостазу.

У дисертаційній роботі вперше проведено комплексне дослідження функції окремих структурно-функціональних одиниць фібрин(оген)у – α C-регіону та B β N-домену – з використанням молекулярних ефекторів, які відрізняються за принципом дії. Порівняння ефектів протеолітичного відщеплення, прямого блокування антитілами або конкуренції з пептидами за сайти взаємодій дозволило зробити висновки щодо особливостей функціонування активних сайтів молекули, розміщених у межах α C-регіону та B β N-домену.

Реалізація запланованого дослідження передбачала отримання протеїназ, здатних гідролізувати фібриноген, приготування зразків частково гідролізованих форм фібриногену, продукцію моноклональних антитіл до визначених епітопів фібриногену та отримання протеолітичних низькомолекулярних пептидів.

Протеїназа з отрути *Echis multisquamatis* гідролізує пептидний зв'язок В β 42-43 з утворенням частково гідролізованої форми фібриногену desВ β 1-42. Ця форма, позбавлена N-кінця В β -ланцюга не має центрів полімеризації «В» та «С». Окрім того, вона має дисоційовані α С-регіони.

Протеїназа з отрути *Agkistrodon halys halys* гідролізує пептидний зв'язок А α 413-414, призводячи до утворення частково гідролізованої форми фібриногену – desА α 414-610. Ця форма має нативні В β N-домени, які не поєднуються з α С-регіонами. Втім, така молекула має обидві пари фібринопептидів А та В, які можуть бути відщеплені з формуванням центрів полімеризації «А» та «В», експоновані центри полімеризації «а» та «b», нативну послідовність, що включає центр полімеризації «С» та комплементарний йому центр «с». Водночас, фібрин(оген) desА α 414-610 не має доменної частини α С-регіонів, а конекторна частина α С-регіонів, що не має сайтів між- та внутрішньомолекулярних взаємодій, вільно дисоціює від остову молекули.

Протеїназа з культурального середовища *Bacillus thuringiensis var israeliensis*, яка гідролізує пептидний зв'язок А α 504-505, дозволяє отримати унікальну частково гідролізовану форму фібриногену desА α 505-610, позбавлену С-кінцевого субдомену α С-регіону, а також і сам пептид А α 505-610. Вочевидь, у такій формі фібриногену залишок α С-регіону не формує комплекс з В β N-доменом та є вільним. Імовірно також α С-регіони фібриногену desА α 505-610 не формують зв'язки одне з одним.

Використані протеїнази також дозволяють отримати пептиди.

Пептид В β 1-42 зберігає якщо не структурні, то принаймні функціональні особливості В β N-домену. Зокрема, він містить центр полімеризації «С», а отже здатен зв'язуватися і з комплементарним йому центром «с» в D-регіоні молекули.

Пептид А α 414-610 зберігає сайти міжмолекулярних взаємодій, властиві доменній частині α С-регіону. Завдяки цьому, він конкурентно зв'язуватися з сайтами, комплементарними до доменної частини α С-регіону. Зокрема, імовірно

його зв'язування з фібринопептидом В, а також з фрагментами α С-регіону нативної молекули фібрин(оген)у.

Пептид A α 505-610 представляє собою С-кінцевий субдомен α С-регіону. Відкритим лишається питання, чи може цей фрагмент формувати внутрішньомолекулярні комплекси з В β N-доменом та α С-регіоном. Якщо таке зв'язування можливе, то фрагмент конкуруватиме з відповідними регіонами нативної молекули в процесі полімеризації фібрину та інших протеїн-протеїнових взаємодій.

Моноклональне антитіло 2d2a здатне прямо блокувати В β 14-15 сайт. Антитіло здатне взаємодіяти з фібриногеном, а отже зв'язується зі своїм епітопом незалежно від наявності комплексу з α С-регіонами.

Моноклональне антитіло I-5A, специфічне до епітопу A α 535-595. Таким чином, воно здатне зв'язуватися з С-кінцевим субдоменом, перешкоджаючи його міжмолекулярним та внутрішньомолекулярним взаємодіям.

Моноклональне антитіло I-5B специфічне до фрагменту A α 414-492, отже взаємодіє з N-кінцевим субдоменом α С-регіону, імовірно блокуючи опосередковані ним міжмолекулярні взаємодії. Імовірно, структура та функціональні риси інших фрагментів молекули фібрин(оген)у змін не зазнають.

Застосування зазначених ефекторів у комбінації з турбідиметрією, трансмісійною електронною мікроскопією та агрегатометрією дозволило отримати унікальні результати, що дають відповіді на низку питань щодо структури та функцій окремих субдоменів молекули фібрин(оген)у.

Фібриноген, позбавлений фрагменту В β 1-42, втрачав здатність до полімеризації. Внесення до середовища інкубації вільного пептиду В β 1-42 не впливало на здатність фібрину формувати протофібрили та фібрили, хоча моноклональне антитіло, специфічне до цієї ділянки, суттєво пригнічувало процес фібриноутворення. Такі результати, підтверджені як турбідиметрією, так і електронною мікроскопією, дозволили зробити припущення, що центр

полімеризації «С» у В β N-домені функціонує лише в комплексі з α C-регіонами. Відщеплення В β N-домену або його блокування антитілом 2d2a призводить до втрати здатності до полімеризації, що свідчить про важливість цього комплексу. Натомість, пептид В β 1-42, який міг би взаємодіяти з комплементарним центром полімеризації «с», не показав ефективності, що вказує на критичну роль саме комплексу В β N-домену з α C-регіоном у реалізації взаємодії центрів «С»:«с».

За допомогою турбідиметрії та електронної мікроскопії було показано, що протеолітичне відщеплення як N- так і С-кінцевих субдоменів α C-регіонів подовжує lag-період полімеризації фібрину, а отже гальмує формування протофібрил. Ефекту втрати субдоменів α C-регіонів на швидкість латеральної асоціації протофібрил не виявлено. Натомість, пептиди A α 414-610, A α 505-610, а також моноклональні антитіла I-5B, I-5A, що здатні блокувати взаємодії α C-регіонів, не впливають на lag-період, але суттєво пригнічують латеральну асоціацію протофібрил. Це вказує на відмінність механізмів залучення α C-регіонів на різних етапах полімеризації: на етапі побудови протофібрил вони функціонують у комплексі з В β N-доменами, імовірно стабілізуючи їхню структуру, а на етапі латеральної асоціації протофібрил – залучають сусідні протофібрили завдяки α C: α C взаємодіям.

Дослідження агрегації тромбоцитів за присутності описаних вище молекулярних ефекторів також дозволило сформулювати висновок, щодо залучення α C-регіонів у цьому процесі. Зокрема, втрата В β N-доменів не інгібувало швидкості та ступеня агрегації тромбоцитів, тоді як втрата молекулою фібриногену субдоменів α C-регіонів дещо знижувала ступінь агрегації. Зроблено припущення, що α C-регіони сприяють агрегації тромбоцитів, збільшуючи кількість та протяжність контактів між клітинами. Їхня дія реалізується після відщеплення фібринопептидів, що супроводжується дисоціацією α C-регіонів від остову молекули. Саме тому блокування α C-регіонів антитілами чи пептидами не впливає на швидкість агрегації, але знижує її ступінь і сприяє дезагрегації, а втрата В β N-домену призводить лише до дезагрегації.

Отримані результати дозволяють запропонувати нову модель участі α C-регіонів і V β N-домену у фібриноутворенні та тромбоцитарній агрегації, що є важливим для розуміння механізмів формування фібриново-тромбоцитарного тромбу.

Ключові слова: фібриноген, тромбоцити, фібрин, протеїни, структурна біологія, полімеризація фібрину, агрегація тромбоцитів, міжмолекулярна взаємодія, кінетика, електронна мікроскопія, тромбоутворення, інгібування, мікроскопія.

ANNOTATION

Kucheriavyi Ye.P. Investigation of the structure and functions of the α C-regions and B β N-domains of fibrin(ogen) using molecular effectors. – Qualification scientific work as a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 "Biology". – Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, 2025.

Fibrin polymerization and platelet aggregation are central stages in the formation of the fibrin-platelet clot, which underlies thrombogenesis. Under physiological conditions, thrombus formation is essential for the cessation of bleeding in response to vascular injury and the initiation of reparative processes. However, the development of thrombi in undamaged areas of the vasculature poses a serious pathophysiological threat, leading to ischemic damage of organs and tissues. Therefore, the study of molecular mechanisms regulating fibrin polymerization and platelet aggregation is crucial for the development of strategies for the selective modulation of thrombogenesis – aimed at inhibiting pathological intravascular thrombosis and stimulating physiological extravascular hemostasis.

This dissertation presents the first comprehensive study of the functions of specific structural-functional domains of fibrin(ogen) – the α C-region and the B β N-domain – using molecular effectors that differ in their mechanism of action. Comparison of the effects of proteolytic cleavage, direct antibody blocking, or peptide competition for interaction sites allowed conclusions to be drawn about the functional roles of active sites located within the α C-region and the B β N-domain.

The implementation of the study involved the preparation of proteases capable of hydrolyzing fibrinogen, the preparation of partially hydrolyzed fibrinogen forms, the generation of monoclonal antibodies against specific fibrinogen epitopes, and the isolation of proteolytic low-molecular-weight peptides.

A protease from *Echis multisquamatis* venom hydrolyzes the B β 42–43 peptide bond, generating a partially hydrolyzed form of fibrinogen – desB β 1-42 – that lacks polymerization centers "B" and "C" and possesses dissociated α C-regions.

A protease from *Agkistrodon halys halys* venom hydrolyzes the A α 413–414 bond, yielding desA α 414–610 fibrinogen. This form retains native B β N-domains unbound to α C-regions but possesses both fibrinopeptides A and B, capable of exposure and interaction. It retains polymerization centers "A", "B", "a", and "b", along with sequences for center "C" and its complementary site "c", but lacks the domain part of the α C-region, with its connector region freely dissociating.

A protease from the culture medium of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, which cleaves the A α 504-505 bond, produces a unique form – desA α 505-610 – lacking the C-terminal α C-subdomain and yielding peptide A α 505-610. In this form, the α C-region likely does not interact with the B β N-domain or other α C-regions.

The proteases also allow the isolation of peptides B β 1-42, which preserves at least the functional features of the B β N-domain and binds via polymerization center "C".

Peptide A α 414-610, containing intermolecular interaction sites of the α C-domain, may bind fibrinopeptide B and native α C-region fragments.

Peptide A α 505-610, representing the C-terminal α C-subdomain, may form intramolecular complexes with the B β N-domain or other α C-regions.

Monoclonal antibody 2d2a directly blocks site B β 14-15 and binds its epitope on fibrinogen independently of α C-region complexation.

Antibody I-5A binds A α 535-595, potentially inhibiting intermolecular and intramolecular interactions of the C-terminal subdomain.

Antibody I-5B targets A α 414-492, likely blocking N-terminal α C-subdomain interactions.

The combination of these effectors with turbidimetry, transmission electron microscopy, and aggregometry allowed for unique insights into the structure and function of fibrin(ogen) subdomains.

Fibrinogen lacking B β 1-42 loses its polymerization capacity. Free B β 1-42 peptide did not restore protofibril/fibril formation, but monoclonal antibody 2d2a significantly inhibited fibrin formation. This suggests that polymerization center "C" is functional only in complex with α C-regions. Neither isolated peptide nor antibody could substitute this interaction, highlighting the B β N- α C complex's importance.

Proteolytic removal of either α C-subdomain delayed the fibrin polymerization lag phase, without affecting lateral protofibril association. Peptides A α 414-610, A α 505-610, and antibodies I-5A and I-5B had no effect on the lag phase but significantly inhibited lateral protofibril association. This indicates different roles for α C-regions: in protofibril formation (via B β N-complex stabilization) and in lateral association (via α C: α C interactions).

Platelet aggregation studies revealed that B β N-domain loss had no effect on aggregation rate or extent, whereas α C-subdomain loss moderately decreased aggregation extent. α C-regions likely increase platelet contact area post-fibrinopeptide cleavage, and their blockage or removal primarily affects aggregation extent and reversibility, not initiation.

These findings support a new model for α C-region and B β N-domain involvement in fibrin formation and platelet aggregation, relevant for understanding fibrin–platelet thrombus formation mechanisms.

Keywords: fibrinogen, platelets, fibrin, proteins, structural biology, fibrin polymerization, platelet aggregation, intramolecular complexes, kinetics, electron microscopy, thrombosis, inhibition, microscopy.

ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ

1. Platonova T.M., Hrabovskyi O.O., Chernyshenko V.O., Stohnii Y.M., **Kucheryavyi Y.P.**, Korolova D.S., Komisarenko S.V. (2025). Alternative role of B:b knob-hole interactions in the fibrin assembly. *Biochemistry* 2025, 64, 4, 791 - 800. <https://10.1021/acs.biochem.4c00695> (Q1).

Платонова Т.М. – ідея досліджень, супровід експериментальної роботи, аналіз даних;

Грабовський О.О. – комп'ютерне моделювання;

Чернишенко В.О. – планування досліджень, підготовка рукопису;

Стогній Є.М. – підготовка протейнових препаратів;

Кучерявий Є.П. – електронна мікроскопія, написання статті, редагування;

Корольова Д.С. – аналіз та візуалізація даних;

Комісаренко С.В. – загальне керівництво роботою, формування висновків.

2. **Kucheriavyi, Y.P.**, Panas, I.D. (2023). Transmission electron microscopy for the direct analysis of fibrin clot structure. *Biotechnologia Acta*, 16(2), 30-31. <https://10.15407/biotech16.02.030>

Кучерявий Є.П. – електронна мікроскопія, написання статті, редагування;

Панас І.Д. – електронна мікроскопія.

3. Stohnii, Y.M., Yatsenko, T.A., Nikulina, V.V., **Kucheriavyi, Y.P.**, Hrabovskyi, O.O., Slominskyi, O.Y., Savchenko, K.S., Garmanchuk, L.V., Varbanets, L.D., Tykhomyrov, A.O., & Chernyshenko, V.O. (2023). Functional properties of individual sub-domains of the fibrin(ogen) α C-domains. *BBA advances*, 1867(3), 100072. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2023.100072> (Q3).

Стогній Є.М. – турбідиметричні та електрофоретичні дослідження;

Яценко Т.А. – вивчення функції системи фібринолізу;

Нікуліна В.В. – робота з культурами клітин;

Кучерявий Є.П. – електронна мікроскопія, турбідиметрія, агрегація тромбоцитів, редагування та написання статті;

Грабовський О.О. – молекулярне моделювання;

Сломінський О.Ю. – хроматографічні дослідження;
Савченко К.С. – робота з культурами клітин;
Гарманчук Л.В. – робота з культурами клітин;
Тихомиров А.О. – робота з компонентами системи фібринолізу;
Комісаренко С.В. – загальне керівництво роботою, формування висновків, підготовка статті до друку.

4. Zhelavskiy, M.A., Platonov, O.M, **Kucheryavyi, Y.P.**, Stohnii, Y.M. (2023). Aprobation of platelet aggregation inhibitor from Echis multisquamatis snake venom in vitro, in vivo and ex vivo. Biotechnologia Acta, 16(5). <https://doi.org/10.15407/biotech16.05>

Желавський М.А. – агрегація тромбоцитів;
Платонов О.М. – хроматографічні дослідження;
Кучерявий Є.П. – дослід на тваринах, редагування та написання статті.

5. **Kucheriavyi Y.**, Hrabovskyi O., Rebriev A.V., Stohnii Y. Limited proteolysis of fibrinogen α C-region reveals its structure. Biotechnologia Acta T. 15, No. 2, 2022. P. 60-61. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.060>

Кучерявий Є.П. – електронна мікроскопія, турбідиметрія, редагування та написання статті;

Грабовський О.О. – молекулярне моделювання;

Ребрієв А.В. – мас-спектрометрія;

Стогній Є.М. – електронна мікроскопія.

6. Iskandarov E., Zinenko O., Tupikov A., Pitishkina A., Platonov O., Gryshchuk V., **Kucheriavyi Y.**, Stohnii Y. (2022) Action of venom of Vipera snake of Ukraine on blood coagulation in vitro. Biotechnologia Acta. 15(2):56-57. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.056>

Іскандаров Е. – підготовка рукопису, хроматографія;

Зіненко О. – отримання та характеристика отрути змії;

Тупіков А. – отримання та характеристика отрути змії;

Пітішкіна А. – підготовка рукопису;

Платонов О. – хроматографія;

Гришук В. – ідеологія досліджень, загальне керівництво;

Кучерявий Є. – агрегація тромбоцитів, редагування та написання статті;

Стогній Є. – електрофоретичні дослідження.

7. Iskandarov E., Gryshchuk V., Platonov O., **Kucheriavyi Y.**, Slominskyi O., Stohnii Y., Vartanov V., Chernyshenko V. Fractionation of Vipera berus berus snake venom and detection of bioactive compounds targeted to blood coagulation system. Southeastern European Medical Journal. 6 (2022) 20-31.
<https://doi.org/10.26332/seemedj.v6i2.256>

Іскандаров Е. – підготовка рукопису, хроматографія;

Гришук В. – ідеологія досліджень, загальне керівництво;

Платонов О. – хроматографія;

Кучерявий Є. – агрегація тромбоцитів, аналіз даних;

Сломінський О.Ю. – хроматографічні дослідження;

Стогній Є.М. – електронна мікроскопія;

Вартанов В.Г. – хроматографічні дослідження;

Чернишенко В.О. – ідеологія досліджень, редагування рукопису.

8. Stohnii Y., Baidakova K., Platonov O., **Kucheryavyi Y.**, Iskandarov E., Zinenko O., Gryshchuk V. Fibrinogenases from the animal venoms in the study of fibrinogen structure and fuctions / 26th Congress of the International Society for Fibrinolysis and Proteolysis, October 11-14, 2023, Budapest, Hungary. Plasminogen activation and fibrinolysis workshop of the Hungarian society of thrombosis and haemostasis. Abstracts. P. 55.
9. **Kucheriavyi Y.**, Didkivskyi V., Selikhova A., Tokmakova Y., Cherenok S., Zhminko P., Chernyshenko V. Antithrombotic action of sodium salt of 5,11,17,23-bis(dihydroxyphosphoryl)methylcalix[4]arene in vivo. RECOOP 16th Bridges in Life Sciences Video Conference. 16 April 2021. P. 53.