

Л. П. Урвант, Є. М. Макогоненко, М. О. Пидюра,  
І. М. Колеснікова, Н. Е. Луговська,  
член-кореспондент НАН України Е. В. Луговської,  
академік НАН України С. В. Комісаренко

## Локалізація епітопу фібринспецифічного моноклонального антитіла І-3с у В $\beta$ 118–134 фрагменті фібрину людини

*Уточнено локалізацію неоантигенної детермінанти фібрину людини в межах його фрагмента В $\beta$ 118–134. Порівняльний аналіз інгібіторної дії пептидів В $\beta$ 109–126 і В $\beta$ 121–138 на полімеризацію фібрину та імуноферментний аналіз зв'язування монАТ І-3с з фібрином людини, бика, коня, щура та кроля вказали на локалізацію епітопу у фрагменті В $\beta$ 126–135 фібрину людини. На основі біоінформативного аналізу молекул фібриногену і фібрину висловлено припущення, що експонування неоантигенної детермінанти при переході фібриногену у фібрин відбувається внаслідок ослаблення взаємодії між  $\beta$ -,  $\alpha$ - та  $\gamma$ -ланцюгами у фрагменті суперспіралі, що включає В $\beta$ 73–138 ділянку молекули фібрину.*

Раніше нами було встановлено, що епітоп фібринспецифічного моноклонального антитіла (монАТ) І-3с експонується в ділянці В $\beta$ 118–134 фібрину [1]. Було виявлено, що експозиція епітопу монАТ І-3с пов'язана зі структурними перетвореннями в Е-регіоні і суперспіральній ділянці молекули фібриногену після відщеплення фібринопептидів А у процесі трансформації її у фібрин [2]. Оскільки ділянка В $\beta$ 118–134 має великий для епітопу розмір, ми ставили за мету більш точно локалізувати епітоп монАТ І-3с та дослідити механізм його експонування.

Фібриноген людини й бика отримували з плазми крові людини і бика шляхом фракційного висолоювання сульфатом натрію [3], фібриноген коня використовували виробництва фірми "Sigma". Тромбін виділяли за методом Fenton [4]. Пептиди QTSSSSQFVMVLLKDLWQ та LKDLWQKRQKQVKDNENV, які відповідають В $\beta$ 109–126 та В $\beta$ 121–138 послідовності молекули фібрину, були синтезовані в лабораторії хімії пептидів Інституту молекулярної біології ім. О. В. Енгельгарда РАН.

Забір крові кроля проводили з вушної вени за допомогою катетера. Кров щура лінії Wistar отримували з яремної вени після декапітації. Свіжоотриману кров кроля та щура одразу змішували з антикоагулянтом (0,02 М  $\epsilon$ -АКК та 3,8% цитрат Na) у співвідношенні 9 : 1. Плазму отримували шляхом центрифугування крові при 1500 об/хв протягом 15 хв. До плазми додавали тромбін до концентрації 1 NIH/мл і витримували протягом 30 хв. Сформований фібриновий згусток вимотували за допомогою скляної палички, промивали в 0,15 М NaCl та розчиняли в 20 мМ оцтовій кислоті.

Електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності SDS здійснювали за методом Laemmli [5].

---

© Л. П. Урвант, Є. М. Макогоненко, М. О. Пидюра, І. М. Колеснікова, Н. Е. Луговська, Е. В. Луговської, С. В. Комісаренко, 2013

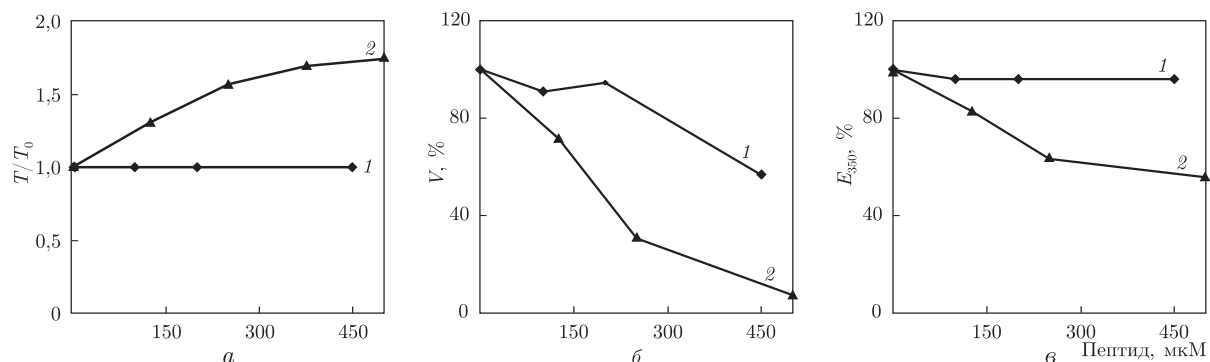


Рис. 1. Вплив синтетичних пептидів V $\beta$ 109–126 (1) та V $\beta$ 121–138 (2) на різні стадії полімеризації фібрину: швидкість самоскладання протофібрил (а); швидкість латеральної асоціації протофібрил (б); кінцеву мутність згустка (в)

Полімеризацію фібрину досліджували турбідиметричним методом при довжині хвилі 350 нм. Концентрація desAB фібрину становила 0,1 мг/мл. Реакцію полімеризації проводили в 0,05 М амоній-ацетатному буфері, рН 7,4, що містив 0,1 М NaCl і 0,1 мМ CaCl<sub>2</sub>.

Імуноферментний аналіз проводили у мікропланшетах ("Sarstedt", Німеччина) за загальною методикою для розчинних білків [6]. Фібриноген людини, бика та коня, а також фібрин щура та кроля вносили в лунки мікропланшета по 100 мкл кожного при концентрації 0,01 мг/мл в 0,02 М HEPES, рН 7,4, з 0,15 М NaCl. В лунки з фібриногеном людини, бика та коня додавали тромбін до концентрації 1 NIH/мл. Зв'язування монАТ І-3с, специфічних до фібрину людини, з фібринами досліджуваних видів тварин детектували, використовуючи як вторинні антитіла овечі антимишині IgG-HRP кон'югати.

Комп'ютерні моделі молекул X-фрагментів фібриногену та фібрину було отримано в програмі Modeller [7]. Надалі дані моделі були досліджені методом конформаційного аналізу за допомогою програми CONCOORD [8]. Комп'ютерний аналіз моделей та візуалізацію виконано з використанням програм VMD [9] та PyMol [10].

#### Вплив пептидів V $\beta$ 109–126 та V $\beta$ 121–138 на полімеризацію фібрину людини.

Раніше нами було показано, що епітоп для монАТ І-3с і сайт латеральної асоціації протофібрил фібрину розташовані в ділянці V $\beta$ 118–134 фібрин(ген)у людини. Для більш точної локалізації сайту латеральної асоціації в цій ділянці фібрину людини досліджували інгібуючий вплив на полімеризацію фібрину синтетичних пептидів QTSSSSQFVMVLLKDLWQ та LKDLWQKRQKQVKDNENV, які ідентичні відповідно N-термінальній (V $\beta$ 109–126) та C-термінальній (V $\beta$ 121–138) частині послідовності V $\beta$ 118–134 молекули фібрину. За допомогою методу турбідиметричного аналізу ми встановили, що пептид V $\beta$ 109–126 у концентрації до 0,5 мМ не впливав на полімеризацію фібрину (рис. 1). Водночас синтетичний пептид, що відповідав послідовності V $\beta$ 121–138, при тих самих концентраціях інгібував полімеризацію фібрину. При цьому його дія на окремі етапи полімеризації була різною за величиною. Так, він майже в 2 рази гальмував швидкість самоскладання протофібрил і в 2 рази зменшував кінцеву мутність згустка, що вказувало на зменшення товщини фібрил (див. рис. 1, а, б). Найбільшу гальмівну дію цей пептид чинив на швидкість латеральної асоціації протофібрил, яка зменшувалася більш ніж у 20 разів (див. рис. 1, б). Пептид V $\beta$ 121–138 також зв'язувався з монАТ І-3с, що свідчило про ідентичність структури пептиду в розчині з його структурним аналогом в молекулі фібрину [2]. Останній результат свідчить про те, що ділянка V $\beta$ 121–138 містить сайт латеральної взаємодії протофібрил

і підтверджує отримані раніше дані про інгібування полімеризації фібрину монАТ І-Зс [1]. Наявність у пептиду Вβ121–138 і монАТ І-Зс подібної інгібуючої дії на процес латеральної асоціації протофібрил і відсутність такої у пептиду Вβ109–126 дає можливість припустити, що епітоп моноклонального антитіла і, можливо, сайт латеральної асоціації сформовано тими ж самими амінокислотними залишками, які зосереджені в ділянці Вβ126–138 фібрину.

**Зв'язування монАТ І-Зс з фібрином людини і тварин.** Для визначення більш точної локалізації епітопу монАТ І-Зс у ділянці Вβ118–134 фібрину ми дослідили зв'язування монАТ І-Зс з фібрином людини, бика, коня, щура та кроля, первинна структура яких з'ясована. За допомогою методу ELISA встановлено, що монАТ І-Зс зв'язувалося з фібрином людини, кроля й коня, іммобілізованими в лунках мікроплашки, і не зв'язувалося з фібрином бика і щура (рис. 2). Величина зв'язування монАТ І-Зс з фібрином коня і кроля була відповідно в 1,2 і 1,4 раза більша за таку з фібрином людини.

Порівняння первинної структури ділянки Вβ121–138 фібрину людини і фібринів тварин показало, що найбільша гомологія для цих послідовностей спостерігається у фрагменті Вβ118–125. Розглянемо первинну структуру Вβ121–138 ділянки фібрину людини і гомологічних їй ділянок фібрину кроля, коня, щура та бика:

Фібрин	126										130			134							
людини	М	У	Л	Л	К	Д	Л	В	Q	К	Р	Q	К	Q	В	К	Д	Н	Е	Н	В
кроля	М	Т	Л	Л	К	Д	М	В	Q	К	Р	Q	К	Q	А	К	Д	Н	Е	Н	А
коня	І	Т	А	Л	К	Е	М	В	К	К	Р	Е	К	Q	Л	К	Д	Н	Е	Н	В
щура	Л	Т	Л	Л	К	Д	М	В	К	К	К	Q	А	Q	В	К	Д	Н	Е	Н	В
бика	І	Т	Л	Л	К	Н	М	В	К	Г	Р	Q	Н	Q	В	Q	Д	Н	Е	Н	В

Очевидно, що ділянка Вβ118–125 не є важливою для взаємодії монАТ І-Зс з фібрином. Навпаки, в ділянці Вβ126–138 фібрину людини мають місце відмінності в амінокислотних послідовностях фібринів, які зв'язують і не зв'язують монАТ І-Зс. Провідну роль у процесі зв'язування монАТ І-Зс зі своїм епітопом, імовірно, відіграє К130, який присутній у фібрині людини, кроля та коня і заміщений у фібрині бика та щура на аспарагін та аланін відповідно. Важливими для зв'язування монАТ І-Зс можуть бути також К127, R128, Q131, K133, D134 і N135 амінокислотні залишки, положення яких у фібрині людини, коня і кроля повністю збігаються. Це підтверджує припущення про локалізацію епітопу в ділянці Вβ126–135 фібрину. Оскільки ділянка Вβ126–138 утворює α-спіраль, то висловлене припущення узгоджується з тим фактом, що вказані амінокислотні залишки розташовані на поверхні α-спіралі, оберненій до водного середовища, що оточує молекулу, і є типовим для взаємодії антиген–антитіло (рис. 3, б).

**Механізм експозиції неоантигенної детермінанти в ході трансформації фібриногену у фібрин.** Механізм експонування неоантигенної детермінанти, до якої були отримані фібринспецифічні монАТ І-Зс, досліджено з використанням комп'ютерного моделювання структури молекули фібриногену і фібрину [11, 12]. На основі структурного аналізу ділянки Вβ126–138 в моделях фібриногену і фібрину, проведеного із застосуванням методу конформаційної динаміки CONCOORD, показано, що в молекулі фібриногену амінокислотні залишки D134 і N135, а також K130 екрановані сусідньою частиною

Фібрин	людини	бика	коня	щура	кроля
Поглинання при 492 нм	0,306 ± 0,014	0,001 ± 0,001	0,36 ± 0,012	0,019 ± 0,014	0,428 ± 0,018

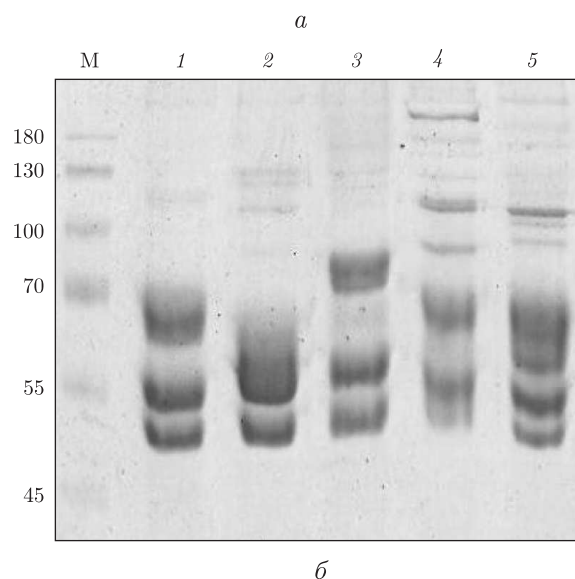


Рис. 2. Імуноферментний аналіз зв'язування монАТ I-3с з фібрином людини і різних видів тварин, іммобілізованим у лунках мікроплашки (а). Електрофоретичний аналіз (б) фібриногену людини (1), бика (2), коня (3) і фібрину щура (4), кроля (5) у відновлюючих дисульфідні зв'язки умовах. М — маркери молекулярної маси

$\alpha$ -спіралі В $\beta$ 137–140 (див. рис. 3, б). З рисунка видно, що в цьому місці існує перегин в  $\alpha$ -спіралі В $\beta$ -ланцюга. Було визначено та порівняно доступність амінокислотних залишків В $\beta$ 126–138 для розчинника (води) у молекулах фібриногену та фібрину під час конформаційної динаміки (див. рис. 3, а). Після трансформації фібриногену у фібрин, що ініціюється відщепленням фібринопептидів А [1], доступність до розчинника амінокислотних залишків В $\beta$ 126–128 у N-кінцевій частині ділянки зменшується, а в центральній — В $\beta$ 129–133 і С-кінцевій частині — В $\beta$ 134–136 вона збільшується (див. рис. 3, а). Це вказує на те, що в молекулі фібрину відбуваються конформаційні зміни, направлені на випрямлення перегину  $\alpha$ -спіралі в ділянці В $\beta$ 126–135 у напрямку розчинника, що, в свою чергу, призводить до зміни доступності до розчинника радикалів амінокислот, форми поверхні ділянки, перерозподілу зарядів і, як наслідок, формування неоантигенної детермінанти монАТ I-3с.

Для з'ясування можливої причини зміни конформації  $\alpha$ -спіралі ділянки В $\beta$ 121–138 фібрину за допомогою програми VMD було проведено комп'ютерний аналіз ймовірності утворення нековалентних зв'язків між амінокислотними залишками пар ланцюгів  $\beta$ - $\alpha$ ,  $\beta$ - $\gamma$  та  $\alpha$ - $\gamma$  фібриногену і фібрину в ділянці суперспіралі, яка відповідає області В $\beta$ 73–138 молекули (рис. 4). Виявлено, що ймовірність міжланцюгової взаємодії в парах  $\beta$ - $\alpha$  та  $\beta$ - $\gamma$  зменшується на 14 та 15% відповідно, а в парі  $\alpha$ - $\gamma$  — зростає на 36% (див. рис. 4). Ці дані вказують на послаблення взаємодії між  $\beta$ -,  $\alpha$ - та  $\gamma$ -ланцюгами фібрину, що може призводити до зміни конформації в В $\beta$ 126–135 ділянці  $\alpha$ -спіралі В $\beta$ -ланцюга молекули фібрину.

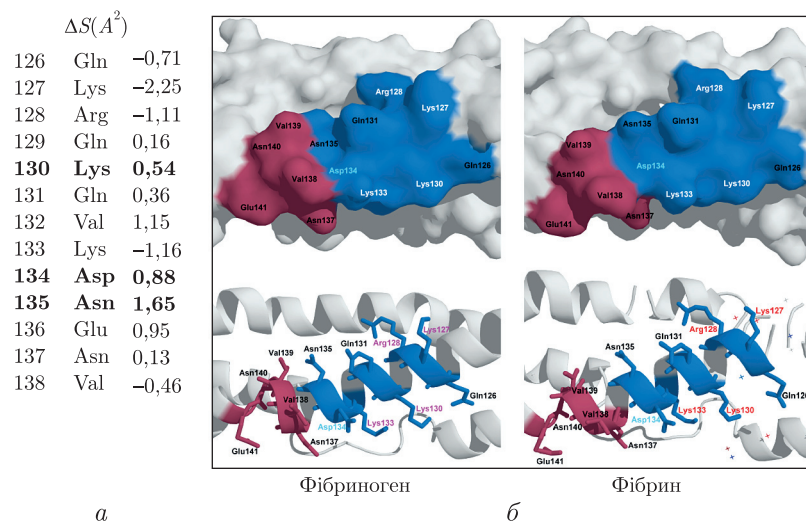


Рис. 3. Зміна доступності до розчинника поверхні амінокислотних залишків ділянки Вβ126–138 молекули фібриногену до і після її трансформації у молекулу фібрину (а). Атомна модель поверхні та поліпептидного ланцюга ділянки Вβ126–138 в молекулі фібриногену до і після її трансформації у молекулу фібрину (б). Синім зображено епітоп монАТ І-Зс, вишневим — ділянка, що, ймовірно, частково екранує даний епітоп

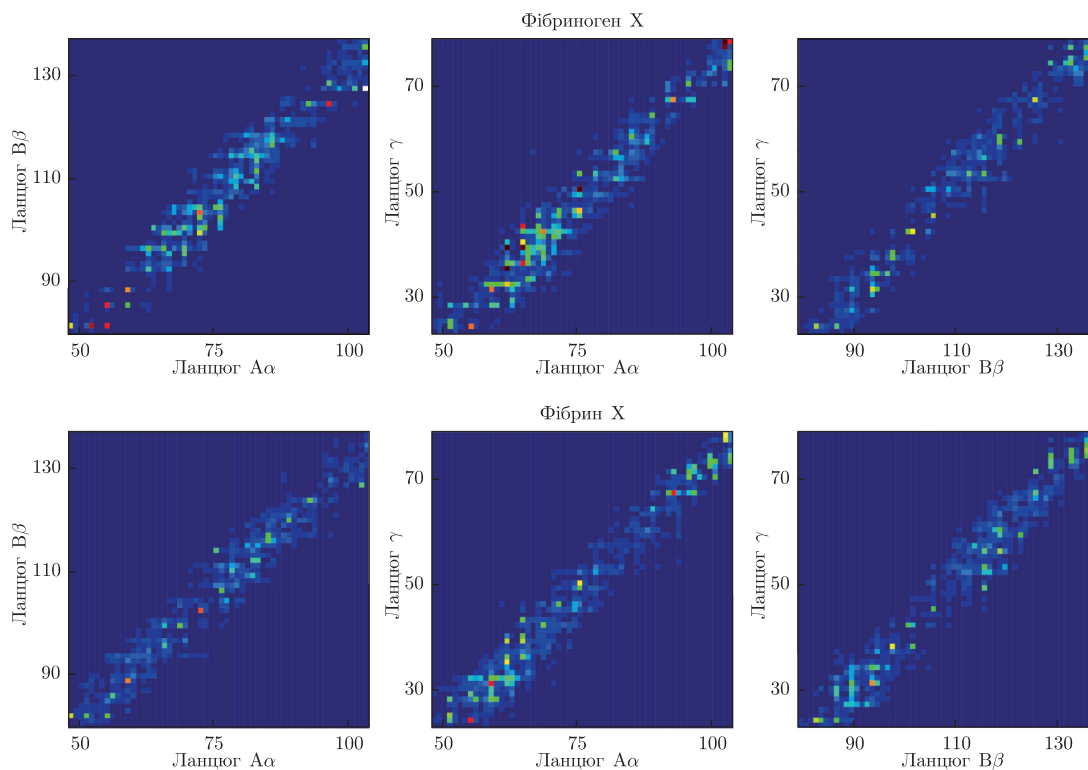


Рис. 4. Ймовірність утворення нековалентних зв'язків між амінокислотними залишками β і α, β і γ та α і γ ланцюгів у молекулі фібриногену до і після її трансформації у фібрин в області суперспіралі, яка включає Вβ73–138 ділянку молекули

Таким чином, отримані нами дані вказують на те, що неоантигенна детермінанта, до якої отримано фібринспецифічне моАТ І-Зс, і пов'язаний з нею сайт латеральної асоціації протофібрил розташовані в ділянці В $\beta$ 126–135 фібріну.

1. *Lugovskoy E. V., Gritsenko P. G., Kolesnikova I. N. et al.* A neoantigenic determinant in coiled coil region of human fibrin  $\beta$ -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 118–138 ділянці В $\beta$ -ланцюга молекули фібрин(оген)у // *Доп. НАН України.* – 2012. – № 7. – С. 170–175.
3. *Варецька Т. В.* Мікрогетерогенність фібриногену. Кріофібриноген // *Укр. біохім. журн.* – 1960. – **32**, № 1. – С. 13–24.
4. *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.
5. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – **227**, No 5259. – P. 680–685.
6. *Harlow E., Lane D.* Antibodies. A laboratory manual. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. – 726 p.
7. *Eswar N., Webb B., Marti-Renom M. A. et al.* Comparative protein structure modelling using Modeller // *Curr. Protoc. Bioinformatics.* – 2006. – Chapter 5, Unit 5.6.
8. *de Groot B. L., van Aalten D. M., Scheek R. M. et al.* Prediction of protein conformational freedom from distance constraints // *Proteins.* – 1997. – **29**, No 2. – P. 240–251.
9. *Humphrey W., Dalke A., Schulten K.* VMD: visual molecular dynamics // *J. Mol. Graph.* – 1996. – **14**, No 1. – P. 33–38.
10. *DeLano W. L.* The PyMOL Molecular Graphics System. – San Carlos, CA: DeLano Scientific, 2002.
11. *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. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – **97**, No 26. – P. 14156–14161.
12. *Kollman J. M., Pandi L., Sawaya M. R. et al.* Crystal structure of human fibrinogen // *Biochemistry.* – 2009. – **48**, No 18. – P. 3877–3886.

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

*Надійшло до редакції 23.04.2013*

**Л. П. Урвант, Є. М. Макогоненко, Н. А. Пыдюра, И. Н. Колесникова,  
Н. Э. Луговская, член-корреспондент НАН Украины Э. В. Луговской,  
академик НАН Украины С. В. Комисаренко**

### **Локализация эпитопа фибринспецифического моноклонального антитела І-Зс в В $\beta$ 118–134 фрагменте фибрина человека**

*Уточнена локалізація неоантигенної детермінанти фібрина человека в пределах его фрагмента В $\beta$ 118–134. Сравнительный анализ ингибирующего действия пептидов В $\beta$ 109–126 и В $\beta$ 121–138 на полимеризацию фибрина и иммуноферментный анализ связывания моАТ І-Зс с фибрином человека, быка, лошади, крысы и кролика указали на локализацию эпитопа во фрагменте В $\beta$ 126–135 фибрина человека. На основе биоинформативного анализа молекул фибриногена и фибрина высказано предположение, что экспонирование неоантигенной детермінанти при переходе фибриногена в фибрин происходит вследствие ослабления взаимодействия между  $\beta$ -,  $\alpha$ - и  $\gamma$ -цепями во фрагменте суперспирали, который включает В $\beta$ 73–138 участок молекулы фибрина.*

**L. P. Urvant, E. M. Makogonenko, N. A. Pydura, I. N. Kolesnikova,**  
**N. E. Lugovskaya,** Corresponding Member of the NAS of Ukraine **E. V. Lugovskoi,**  
Academician of the NAS of Ukraine **S. V. Komisarenko**

**Localization of epitope of fibrin specific monoclonal antibody I-3c  
within B $\beta$ 118–134 fragment of human fibrin**

*Localization of the neoantigenic determinant within B $\beta$ 118–134 fragment of human fibrin has been clarified. Comparative analysis of the inhibitory influence of B $\beta$ 109–126 and B $\beta$ 121–138 peptides on fibrin polymerization, immuno-enzyme assay of mAb I-3c to human, bovine, horse, rat and rabbit fibrins binding indicated the location of epitope within B $\beta$ 126–135 part of B $\beta$ 118–138 fragment of a molecule. Based on the bioinformatic analysis of fibrinogen and fibrin molecules, we suggested that the neoantigenic determinant exposure at the fibrinogen-to-fibrin transition occurred due to weakening the interaction between  $\beta$ -,  $\alpha$ -, and  $\gamma$ -chains of the coiled-coil region, including B $\beta$ 73–138 fragment of a fibrin molecule.*