

АКТИВАЦІЯ ПЛАЗМІНОГЕНУ В КОМПЛЕКСІ ПЛАЗМІНОГЕН-АНТИПЛАЗМІНОГЕНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО IV-1c

Антиплазміногенове моноклональне антитіло IV-1c (IV-1c) здатне утворювати комплекс із плазміногеном та індукувати каталітичну активність в плазміногеновій складовій Пг-IV-1c комплексу. Амідазна активність в комплексі з'являється після двогодинного лаг-періоду. Реакція утворення Пг-СК комплексу інгібується повністю IV-1c при молярному відношенні до Пг, рівному 1:2. Збільшення концентрації IV-1c при постійній концентрації глу-Пг до еквімолярної супроводжувалося зростанням швидкості активації Пг. При концентраціях IV-1c, більших за таку глу-Пг спостерігалося різке зменшення швидкості активації Пг. В той же час глу-Пг при концентраціях, більших за концентрацію IV-1c не інгібував активацію Пг в Пг-IV-1c комплексі. Швидкість активації глу-Пг зростала від концентрації глу-Пг-IV-1c комплексу. Розглянуто вірогідну модель і дискутується молекулярний механізм реакції активації Пг в Пг-IV-1c комплексі.

Активация плазміногену фізіологічними активаторами відбувається шляхом розщеплення пептидного зв'язку Arg561-Val562 з наступною структурною перебудовою активного центру молекули, що супроводжується експозицією активного центру: появою нового N-кінцевого амінокислотного залишку і формуванням сольового містка, що звичайно властивий переходові профермента в активну форму [1]. Існують активатори плазміногену, до яких відносять стрептокіназу, які активують профермент, викликаючи конформаційні зміни в молекулі плазміногену без розщеплення пептидного зв'язку. Стрептокіназа — білок, який екзогенно продукують стрептококи патогенних груп А, С, G [2, 3]. Вона виділена як гомогенний білок і широко використовується як тромболітичний препарат для лікування інфаркту міокарда, тромбозів і тромбоемблій різного походження і локалізації в організмі хворих [4]. Відповідно до існуючих уявлень про молекулярний механізм активації плазміногена стрептокіназою, стрептокіназа утворює еквімолярний комплекс із плазміногеном, що призводить до конформаційних змін та експозиції активного центру в протеазному домені плазміногену без розщеплення Arg561-Val562 пептидного зв'язку. Зміни конформації у протеазному домені молекули плазміногену під дією СК стабільні і необоротні. Було знайдено, що подібну активуючу дію на плазміноген має антиплазміногенове моноклональне антитіло IV-1c [5].

МКА IV-1c не належить до каталітичних антитіл. Його епітоп локалізовано на ділянці вал709-глу718 В-ланцюга плазміну, що утворює протеазний домен молекули [6]. Швидкість і хід активації плазміногену МКА IV-1c значно відрізняється від таких для стрептокінази [5]. Проте, концентраційні залежності утворення каталітичного активного комплексу Пг-IV-1c ще достатньо не досліджені.

Метою цієї роботи було виділити, очистити та більш детально дослідити концентраційну залежність взаємодії моноклональних антитіл IV-1c з плазміногеном.

Матеріали та методи

У роботі було використано такі матеріали та реактиви: N-гідроксисукцинімідобіотин, авідин-лужну фосфатазу, авідин, козячі антимишачі імуноглобуліни, кон'юговані з пероксидазою хрому, тетраметилбензидин дигідрохлорид, n-нітрофеніл фосфат (пНФФ) трис(гідроксиметил) амінометан, аротинін, соєвий інгібітор трипсину. Протеїн-А-сефарозу, плазміновий хромогенний субстрат S-2251(H-D-Val-Leu-Лиз-pNa), γ -казеїн, діізопропілфторфосфат (DFP), p-нітрофенілгуанідінобензоат (p-NПГВ) (Sigma, США); стрептокіназу Kabikinase (Pharmacia AG, Швеція), цибакрон-сефароза і сефакрил S-300 (Pharmacia, Швеція), альбумін сироватки бика (Calbichem, США). Решта реактивів ступеню чистоти 'хч' чи вище. Планшети для ІФА (Costar).

Одержання плазміногену. Глу-плазміноген одержували із донорської плазми на лізін-сефарозі [7]. Ліз-форму плазміногену виділяли із фракції $Ш_{2,3}$ по Кону також на лізін-сефарозі [8]. Препарати плазміногенів зберігали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Препарати плазміногену людини мали потенційну протеолітичну активність 17—22 казеїнолітичних одиниць на 1 мг білка, що визначали казеїнолітичним методом [9]. Спонтанна активність не виявлялась ні казеїнолітичним методом, ні за допомогою хромогенного субстрату S-2251. Чистоту одержаних препаратів контролювали електрофоретично в 10 % ДСН-ПААГ [10], плазміноген був електрофоретично гомогенним. глу- і ліз-форми не мали домішків одне одного відповідно до даних електрофорезу в 10 % ДСН-ПААГ з оцтовою кислотою і сечовиною за рН 3.2 [11], рис. 1.

Реакцію активації плазміногену контролювали за вивільненням паранітроаніліну з хромогенного субстрату S-2251 (H-D-Val-L-Leu-L-Лиз-p-nitroanilide), яке реєстрували в двохвильовому режимі при 405 та 492 нм на мікрорідері для імуоферментного аналізу Titertek Multiskan MC (Фінляндія). Реакцію проводили при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в планшетах для імуоферментного аналізу в 50 мМ трис-НСІ буфері рН 7,4, який містив 150 мМ NaCl.

Концентрація компонентів реакційної суміші складала: плазміногену — 0,1 мкМ, активатора плазміногену (СК) — 10 IU/мл і S-2251- 0,3 мМ. Кінцевий об'єм складав 250 мкл. Про відсутність домішків плазміну в препаратах свідчила відсутність підвищення абсорбції у контрольних пробах, що містили плазміноген і S-2251 протягом 6 годин.

Електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності ДСН. Проводили за методом Леммлі [12]. Суміш білків (Pharmacia, Швеція) з масою: 94 кДа — фосфорилаза В, 67 кДа — альбумін, 43 кДа — овалбумін, 30 кДа — карбоангідраза, 20,1 кДа — соєвий інгібітор трипсину та 14,4 кДа — а-лактальбумін було використано як маркери.

Одержання стрептокінази. Стрептокіназу, звільнену від домішків альбуміну, виділяли з комерційного препарату (Kabikinase Швеція), з двократним застосуванням афінної хроматографії на Blue Sepharose CL-4b [12]. Питома активність препаратів стрептокінази складала не менш ніж 95 000 IU/мг білка. За даними електрофорезу всі препарати гомогенні.

Виділення моноклональних антитіл IV-1с. Моноклональні антитіла IV-1с отримували з клітинних супернатантів, люб'язно наданих Є. В. Луговським, провідним науковим співробітником відділу молекулярної імунології Інституту

біохімії НАНУ. До клітинного супернатанту, що містив антитіла, додавали сульфат амонію (до кінцевої концентрації 45 % — 50 %), і залишали на ніч при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Потім висол центрифугували протягом 30 хвилин при 2000 об./хв. на центрифугі РС-6. Супернатант видаляли, а до осаду додавали 0,05М трисовий буфер рН 7,4 з 0,13М NaCl (TBS) до повного розчинення осаду. Висол діалізували проти TBS. Фракції IgG з діалізату отримували методом афінної хроматографії на колонці з протеїн А-Сефарозою. На колонку наносили 10 мл віддіалізованого висолу. Незв'язаний білок відмивали 0,05М трис-НСІ буфером рН 7,4 0,13М NaCl. Елюцію проводили послідовно 0,1М гліциновим буфером рН 2,8 [13] (об'єм фракції 1 мл), а потім 0,1М гліциновим буфером рН 2,2, який одразу нейтралізували 1М трис до рН 7,8. Фракції діалізували проти 0,05М трис-НСІ, рН 7,4, 0,13М NaCl протягом ночі при температурі $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Подальша очистка IgG була проведена шляхом афінної хроматографії на колонці Пг-Сефарозою. На врівноважену TBS колонку наносили супернатант. Незв'язаний білок відмивали тим самим буфером із загальним об'ємом 300 мл. Елюцію проводили послідовно 0,1М гліциновим буфером рН 2,8 та рН 2,2 [14]. Елюат на виході із колонки нейтралізували 1М трис, до рН 7,6. Отримані антиплазміногенові IgG діалізували протягом ночі за $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ проти 0,05М трис — НСІ буфера рН 7,4, 0,13М NaCl. Елюйовані при рН 2,2 антитіла IV-1с були здатні інгібувати активацію плазміногену стрептокіназою. Фракція IgG, елюйована при рН 2,8 була неактивною і, очевидно, містила в собі антитіла з розширеною специфічністю [15].

При електрофорезі у поліакриламідному гелі, у відновлюючих умовах виявлялися 2 смуги. Одна з них відповідала вазі легкого ланцюга (26 кДа), інша — важкого (55 кДа) (рис. 2.1). Інших смуг на треках не було виявлено, що свідчить про відсутність домішків плазміногену або плазміну в антитілах. Для подальшої перевірки наявності у препараті антитіл плазміногену використали фермент урокіназу (Uk). У лунку планшета наносили антитіла (150 мкг/мл), урокіназу (3 IU/мл), субстрат S-2251 (0,3 мМ). Амідазну активність не було виявлено протягом 10 годин інкубації. Таким чином, одержані препарати плазміногену, стрептокінази та моноклональних антитіл були електрофоретично гомогенні, не містили в собі домішків (плазміну — плазміноген, плазміногену — антитіла) і зберігали функціональну активність (рис. 1). **Інгібування моноклональним антитілом IV-1с активації плазміногену стрептокіназою.** Для вивчення впливу моноклональних антитіл на активацію плазміногену стрептокіназою послідовно додавали в лунку

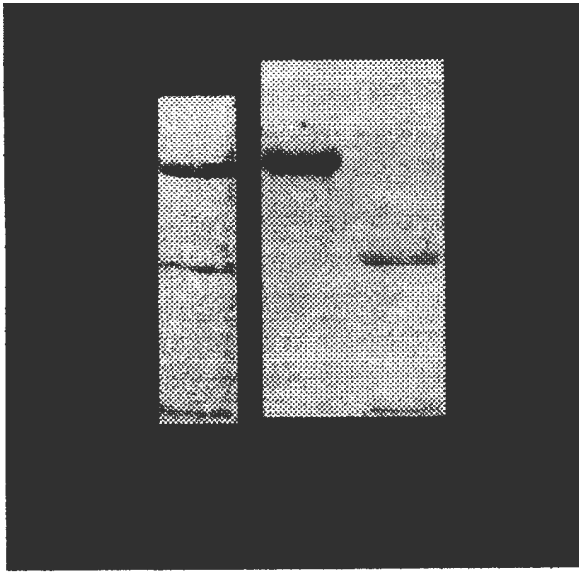


Рис. 1. Електрофорез препаратів глу-плазміногену при рН 3,2, антиплазміногенового моноклонального антитіла IV-1с.

плазміноген (10 мкг/мл), TBS, антитіло IV-1с в концентрації 0—50 мкг/мл, субстрат S-2251 (0,3 мМ). Об'єм реакційної суміші дорівнював 250 мкл. Активацію проводили розчином стрептокінази (10 од./мл). Реакційну суміш інкубували в термостаті при 37 °С. Вимірювали оптичне поглинання при довжині хвилі 492—405 нм на рідері MultiScan MC. В залежності від досліду застосовували такі контролю: 1) плазміноген (10 мкг/мл), субстрат S-2251 (0,3 мМ), стрептокіназа (10 од./мл), об'єм суміші доводили до 250 мкл TBS, 2) антитіла IV-1с (15 мкг/мл), субстрат (0,3 мМ), стрептокіназа (10 од./мл), об'єм суміші доводили до 250 мкл TBS.

Результати й обговорення

Моноклональне антиплазміногенове антитіло IV-1с утворює міцний комплекс з глу-плазміногеном з $K_d \approx 4$ нМ [6]. Еквімолярний комплекс з Пг-IV-1с характеризується тим, що внаслідок інкубацій при 37 °С протягом двох годин в його плазміногеновій складовій з'являється каталітична активність [6].

На рис. 2 зображені криві, що характеризують активацію плазміногену антитілом IV-1с. Активність визначали за руйнуванням субстрату S2251. При активації плазміногену стрептокіназою (крива 1) утворення активного плазміну починається без лаг-періоду. На відміну від стрептокінази, моноклональні антитіла активують плазміноген з затримкою (крива 3). Як було показано раніше, великий проміжок часу потрібний для завершення формування активного центру в комплексі Пг-IV-1с. Характер кривих свідчить про досить високу стабільність комплексу, автоліз не спостерігається щонайменше протя-

гом 4 годин, рис.1. Через те що IV-1с не проявляють ні амідазну активність по відношенню до хромогенного субстрату плазміну S2251, ні протеолітичну активність до плазміногену, їх не можна віднести до каталітичних антитіл. Тому активація плазміногену є наслідком утворення комплексу Пг-IV-1с. Це свідчить про те, що IV-1с, подібно до стрептокінази, викликає активацію Пг шляхом конформаційних змін у молекулі Пг.

Для комплексу глу-плазміноген-IV-1с лаг-період витіснення IV-1с стрептокіназою складає біля 40 хв. рис. 2,2. IV-1с, додане у реакційне середовище одночасно зі СК, випереджає СК у швидкості утворення комплексу з плазміногеном, маючи в той же час меншу, порівняно зі СК, спорідненість до Пг. (K_d відповідно дорівнюють $2 \cdot 10^{-9}$ — $5 \cdot 10^{-11}$ і $4 \cdot 10^{-9}$ М-1). Можна припустити, що k (кінетична константа) реакції утворення комплексу Пг-IV-1с більша за k реакції Пг-СК. Досить ймовірно, з точки зору молекулярного механізму, реакція асоціації Пг і СК відрізняється від такої Пг та IV-1с наявністю в першій реакції проміжної стадії взаємодії СК з лізин-зв'язуючими ділянками Пг. Про це свідчить також інгібуючий вплив аміногексанової кислоти на швидкість реакції асоціації Пг та СК [11]. Крім того, IV-1с та СК є конкурентами за ділянку зв'язування на Пг, які перекриваються на 8 амінокислотні залишки. Епітоп для IV-1с визначений як Val 709 — Gly 718 перекривається з ділянкою зв'язування для СК Asn 711 — Gly 724 [6].

Конкурентний характер взаємодії СК та IV-1с з Пг підтверджується інгібуючим впливом збільшення концентрації IV-1с на активацію глу-плазміногену стрептокіназою, що представлено на рис. 3. IV-1с при молярному співвідношенні до глу-Пг, рівному 1:2 інгібує на 95 % утворення еквімолярного комплексу Пг:СК. Молярне співвідношення IV-1с до Пг, що блокує активацію Пг СК, свідчить, що обидві антиген-зв'язуючі ділянки молекули IV-1с зайняті молекулами плазміногену. Молекули Пг, очевидно, не створюють стеричних перешкод одна одній при взаємодії з антитілами.

Досліди по вивченню залежності швидкості активації глу-Пг від концентрації IV-1с підтверджують, що лізин-зв'язуючі ділянки (ЛЗД) глу-Пг у розчині при концентрації останнього до 0,1 мкМ ефективно не конкурують за С-кінцеві лізини γ -ланцюгів IV-1с з лізин-зв'язуючими ділянками зв'язаного в комплексі Пг, рис. 4. Так, крива зростання швидкості утворення активних центрів в Пг при концентрації IV-1с, меншій за концентрацію Пг, має експоненціальний характер. У цьому випадку концентрація комплексу Пг-IV-1с менша за концентрацію Пг, і швидкість

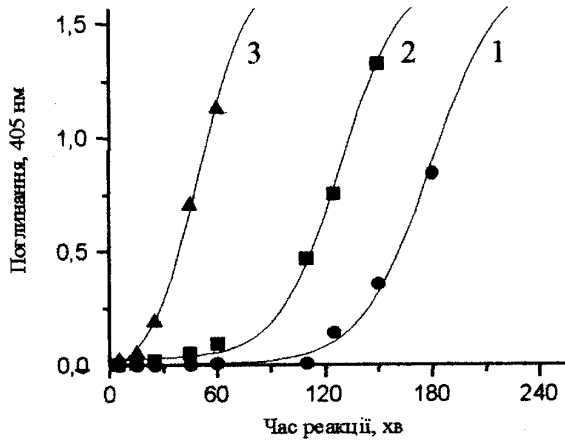


Рис. 2. Активация глy-плазминогена IV-1c (1), стрептокиназой (3) та стрептокиназоу у присутності антитіл IV-1c (2).

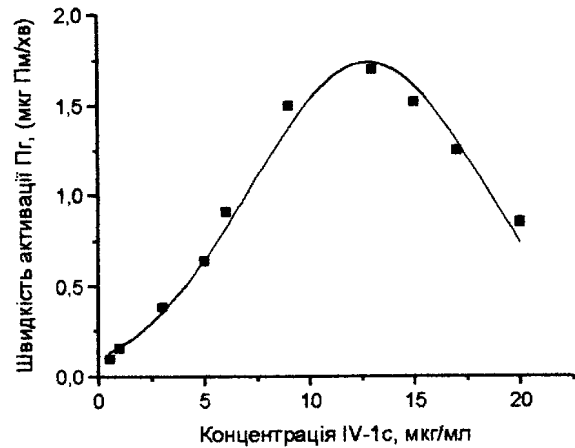


Рис. 3. Залежність швидкості активації глy-Пг від концентрації IV-1c.

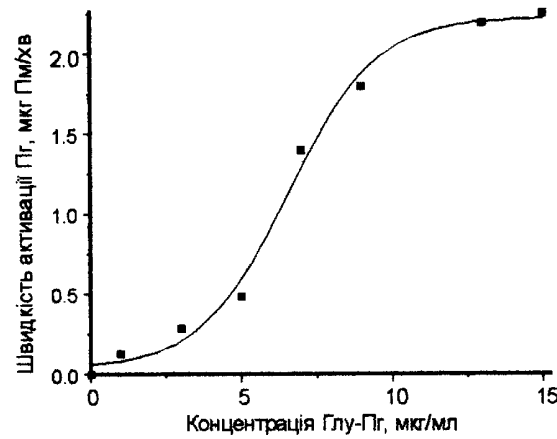


Рис. 4. Залежність активації глy-Пг в комплексі глy-Пг-IV-1c від концентрації глy-Пг. Концентрація IV-1c постійна (15 мкг/мл).

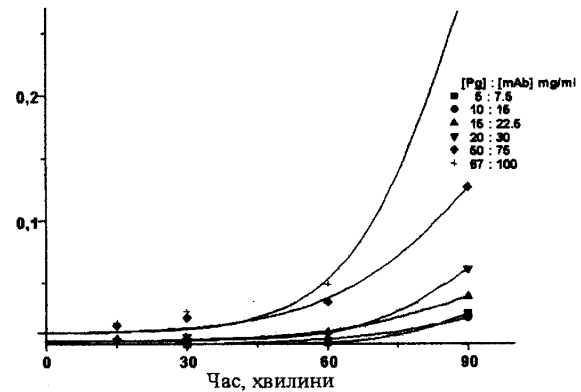


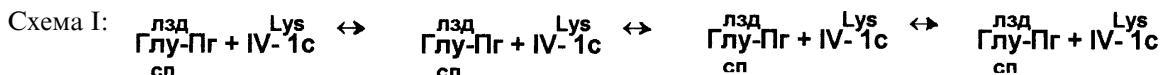
Рис. 5. Кінетика вивільнення ПНА при руйнуванні субстрата S2251 еквімолярним комплексом P6*IV-1c t.

індукції активного центру в Пг-IV-1c комплексі дещо пригнічується вільним плазміногеном. При концентрації IV-1c, еквімолярній або більшій за концентрацію Пг, “надлишок” С-кінцевих лізинів IV-1c значно помітніше інгібує взаємодію ЛЗД Пг з кінцевими лізинами в комплексі Пг-IV-1c. Це проявляється в різкому падінні швидкості активації Пг IV-1c, що спостерігається на рис. 3. Тому, при концентрації IV-1c вищій за концентрацію Пг, інгібуюча дія антитіл швидко зростає. Дещо відмінно виглядає крива активації глy-Пг IV-1c при зростанні концентрації глy-Пг і постійній концентрації IV-1c, рис. 4. При концентраціях глy-Пг до 2,5 мкг/мл, коли концентрація IV-1c не перебільшує концентрацію глy-Пг, не спостерігається активація глy-Пг, що, по суті, є відображенням ділянки кривої (рис. 3) з надлишком IV-1c. IV-1c в обох випадках діє подібно до ε — АГК за рахунок С-кінцевих лізинів

γ-ланцюгів молекули. Відсутність інгібуючої дії надлишкових концентрацій глy-Пг, рис. 4, можна віднести, найвірогідніше, на рахунок закритої конформації глy-Пг, в якій ЛЗД глy-Пг недоступні для С-кінцевих лізинів γ-ланцюгів IV-1c.

В окремому досліді було визначено швидкість утворення активних центрів в глy-Пг — складовій комплексу глy-Пг-IV-1c зі зростанням концентрації комплексу. Отримана залежність швидкості появи активних центрів представлена на рис. 5. Вони свідчать, що зростання концентрації комплексу призводить до зростання швидкості утворення активних центрів у комплексі Пг-IV-1c. Отримані дані можна більш детально пояснити за допомогою схеми (див. схему I).

Як згадувалось, взаємодія Пг і IV-1c проходить за участю двох центрів на кожній із молекул: на Пг такими є лізинзв'язуючі ділянки (ЛЗД) кринглів К1, К4 або К5 і протеазний до-



мен (СП), а в IV-1с — це одна з двох ділянок зв'язування антигену (А) і С-кінцеві лізини γ -ланцюгів антитіла [6]. Тому глу-Пг представили у вигляді Глу-Пг, де СП — протеазний домен, а IV-1с у вигляді IV-1с, де Lys — С-кінцеві лізини, Агіперваріабельні ділянки зв'язування антигенів. На етапі I формується комплекс антитіла з антигеном; на етапі II глу-Пг в комплексі переходить в ліз-конформацію (*Глу-Пг); на третьому — одна з ЛЗД плазміногену — взаємодіє з С-кінцевим лізином γ -ланцюга IV-1с, що викликає експозицію активного центру в протеазному домені Пг.

Антиплазміногенове — моноклональне антитіло IV-1с не має амідолітичної, протеолітичної або естеразної активності [6]. Його епітоп V₇₀₉-G₇₁₈ частково перекривається з ділянкою зв'язування стрептокінази на протеазному доме-

ні плазміногена N₇₁₁-E₇₂₄ [17]. Епітоп розташований на значній відстані від тріади активного центру проферменту [18]. Тому взаємодія IV-1с тільки з протеазним доменом по антигенній ділянці не викликає появи каталітичної активності в Пг компоненті Пг-СК комплексу. Другою ділянкою взаємодії є ЛЗД і С — кінцевий лізин γ -ланцюга IV-1с. Нещодавно було знайдено [19], що в кристалізованому мікроплазміноген-стрептокіназному комплексі протеазний домен і стрептокіназа взаємодіють двома ділянками, розташованими в α - і γ -доменах СК і V₇₀₉-G₇₂₄ і R₆₂₀-L₆₄₀ ділянках протеазного домену Пг відповідно. Іншими словами, можна припустити, що конформаційні зміни в молекулі плазміногену відбуваються під впливом механічних сил, що виникають у протеазному домені внаслідок двохцентрового зв'язування активуючих агентів: СК або IV-1с.

1. Parry M. A., Fernandez-Catalan C., Bergner A. The ternary microplasmin-streptokinase complex is a proteinase — cofactor — substrate complex in action // Nature.— 1998.— № 10.— P. 917—923.

2. Collen D. C., Gold H. K. New developments in thrombolytic therapy // Tromb. Res.— 1990.— Suppl. X.— 10.— P. 105—131.

3. Kenneth W. Jackson, Naomi Esmon and Jordan Tang. Streptokinase and Staphylokinase // Methods in Enzymology.— 1970.— 19.— P. 184—186.

4. Reddy K. N. N. Streptokinase — Biochemistry and Clinical Application // Enzyme.— 1988.— 40.— P. 79 — 89.

5. Яковлев С. А. Роль отдельных участков плазминогена в активации его стрептокиназой. Автореферат диссертации ... канд. биол. наук — 1997.— 135 с.

6. Druzhina N. N., Makogonenko E. M., Yakovlev S. A., et al. Investigation of the plasminogen-streptokinase interaction. // Ukr Biokhim Zh.— 1996.— 4.— P. 20.

7. Sottrup-Jensen L., Claeys H., Zajdel M., et al. The primary structure of human plasminogen: Isolation of two lysine-binding fragments and one “miniplasminogen” (MW 38, 000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis // Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis (V. F. Davidson, R. H. Rowan, M. M. Samama, D. C. Desnoyers, eds).— 1978.— 3.— P. 191—209, Raven Press, N.-Y.

8. Deutsch D., Mertz E. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography // Science.— 1970.— 170, № 3962.— P. 1095—1096.

9. Robbins V., Summaria L. Human plasminogen and plasmin // Methods in Enzymology.— 1970.— 19.— P. 184—186.

10. Laemli K. U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.— 1970.— 227.— P. 680—685.

11. Panyim S., Chalkley R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones // Arch. Biochem. Biophys.— 1969.— 130.— P. 337—346.

12. Castellino F. G., Sodetz J. M., Brockway W. J., Siefring G. F. Streptokinase // Methods in Enzymology.— 1976.— 45.— P. 244—257.

13. Ey P. L., Prowse S. J., Jenkin C. R. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using Protein A-Sepharose // Immunochemistry — 1978.— 15.— P. 429—436.

14. Affinity chromatography. Principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals, Sweden, 1983.— P. 112.

15. Бобровник С. А. Активация “молчащих” антител и их взаимодействие с антигенами // Укр. Биохим. Журн.— 1990.— Т. 62 — № 5.— С. 86 — 89.

16. Hantgan R., McDonagh J., Hermans J. Fibrin assembly // Ann N Y Acad Sci.— 1983.— 408.— P. 344—66.

17. Druzhina N., Makogonenko E., Yakovlev S. A streptokinase binding site is located in the Val709-Glu724 sequence of plasmin B — chain // Fibrinolysis.— 1996.— supp. 3.— abs. 24.— P. 8.

18. Dawson KM, Marshall JM, Raper RH et al. Substitution of arginine 719 for glutamic acid in human plasminogen substantially reduces its affinity for streptokinase // Biochem.— 1994.— 33.— 12042—12047.

19. Xiaoqiang Wang., Xinli Lin., Jeffrey Loy et al. Crystal Structure of the Catalytic Domain of Human Plasmin Complexed with Streptokinase // Science.— 1998.— 281.— P. 1662—1665.

Slominskiy O. Yu., Yakubenko N. P.

**PLASMINOGEN ACTIVATION
IN PLASMINOGEN-ANTIPLASMINOGEN
MONOCLONAL ANTIBODY IV-1c COMPLEX**

Antiplasminogen monoclonal antibody IV-1c (IV-1c) can induce catalytic activity in plasminogen (Pg) part Pg-IV-1c complex. Catalytic activity appeared in Pg-IV-1c complex after 2h lag-period Pg-Sk equimolar complex amidolytic activity was completely inhibited by IV-1c at 2:1=Pg:IV-1c molar ratio. At the constant Glu-Pg concentration IV-1c concentration increasing to Pg equimolar accelerated Pg activation rate. IV-1c concentration subsequent increasing inhibited the Pg activation sharply. Glu-Pg concentration increasing at constant IV-1c one did not inhibit Glu-Pg activation in Pg-IV-1c complex. The Pg activation rate increased from Glu-Pg-IV-1c complex concentration increasing. Kinetic scheme is proposed and Pg activation reaction molecular mechanism in Pg-IV-1c complex is discussed.