

УДК 577.112:57.083.3

ОДЕРЖАННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИТІЛ ПРОТИ ФРАГМЕНТА K1-3 ПЛАЗМІНОГЕНУ ЛЮДИНИ

А. О. Тихомиров
О. І. Юсова
С. І. Діордієва
В. В. Корса
Т. В. Гриненко

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

E-mail: artem_tykhomyrov@ukr.net

Отримано 20.09.2012

Компоненти плазміноген/плазмінової системи відіграють ключову роль у процесах фібринолізу, а також залучаються до регуляції активності клітин у нормі та за різних патологічних станів. Зокрема, кринглімисні протеолітичні фрагменти плазміногену, відомі як ангіостатини, беруть участь у процесах, пов'язаних з неоваскуляризацією, метастазуванням, пухлинним ростом, запальними реакціями. Ангіостатини розглядають як потенційні маркери низки захворювань, асоційованих з патологією судин, тому велику увагу приділяють розробленню специфічних та чутливих методів їх детекції.

У роботі описано підходи до отримання фрагментів плазміногену шляхом його обмеженого протеолізу панкреатичною еластазою і подальшого очищення протеолітичних похідних за допомогою гель-фільтрації та афінної хроматографії на Lys-сефарозі. Одержано поліклональні антитіла проти фрагмента K1-3 та досліджено їхні основні імунохімічні властивості. Встановлено, що антитіла, очищені на імуноафінному сорбенті, виявляють різну афінність до плазміногену та його фрагментів, а саме: Glu-Pg > Lys-Pg > K1-3 > міні-Pg > K4. На основі отриманих даних обговорюються імунологічні особливості кринглових доменів плазміногену. Антитіла проти фрагмента плазміногену K1-3 можуть бути застосовані в імунохімічному аналізі, зокрема імуноблотингу, для детекції ангіостатинів як маркерів пухлинного росту, метастазування, серцево-судинних захворювань і запальних процесів, а також як молекулярний інструмент для дослідження функціонування плазміноген/плазмінової системи у нормі та за патології.

Ключові слова: плазміноген, кринглові домени, фрагменти плазміногену, ангіостатини, поліклональні антитіла.

Глікопротеїн плазміноген (Pg) є зимогеном плазміну (Pm) (3.4.21.7) — ключового ензиму фібринолітичної системи. Головною функцією плазміноген/плазмінової системи (Pg/Pm) є розщеплення фібринових згустків і підтримка рідкого стану крові [1]. Проте дослідження останніх років свідчать, що фізіологічна роль Pg/Pm не обмежується участю лише в гемостатичних процесах. Встановлено, що Pg залучається до регуляції активності широкого кола клітин у нормі та за патології, ідентифіковано низку протеїнів-рецепторів Pg на поверхні плазматичної мембрани клітин різних гістотипів [2–4]. У свою чергу Pm відіграє важливу роль у патофізіологічних процесах, пов'язаних з активацією запальних реакцій, в онкогенезі та метастазуванні [5, 6].

Нативною формою Pg є Glu-Pg, який має молекулярну масу 92 кДа, складається з одного поліпептидного ланцюга (791 амінокислотний залишок) і містить 2% вуглеводів [7]. У разі відщеплення Pm від молекули Glu-Pg N-кінцевого пептиду утворюється ще одна форма Pg — Lys-Pg, що відрізняється від нативної форми конформаційно [8]. Характерною рисою будови молекули Pg є наявність п'яти кринглових доменів. Крингли мають високу структурну та імунохімічну гомологію. Вони містять лігандзв'язувальні ділянки, які опосередковують специфічні міжмолекулярні взаємодії Pg/Pm [9]. Обмежений протеоліз Pg металопротеїназами, еластазою та іншими протеазами призводить до появи як окремих кринглів, так і цілого спектра більш складних похідних

(K1-3, K2-3, K1-4, K1-4,5, K1-5) [10]. Відкриття можливості генерації кринглівмісних фрагментів Pg в організмі (1994 р.) пов'язано з дослідженнями причин інтенсивної неоваскуляризації та росту метастазів після оперативного видалення первинної пухлини. Встановлено, що клітини деяких типів солідних пухлин здатні зв'язувати та гідролізувати Pg з утворенням фрагментів, які, у свою чергу, інгібують утворення нових кровоносних судин, пригнічуючи тим самим метастазування [11, 12]. З'ясувалося, що протеолітичні похідні Pg, які отримали назву ангіостатинів (АС), є одними з найпотужніших фізіологічних інгібіторів ангіогенезу, а їх застосування як принципово нових засобів для терапії онкологічних захворювань має великий потенціал [13].

На сьогодні накопичено достатній об'єм експериментальних даних, що дозволяють розглядати АС як маркери пухлинного росту, визначення яких у фізіологічних рідинах пацієнтів може бути корисним для оцінки ефективності терапії, моніторингу перебігу захворювання, ідентифікації резидуальних та рецидивних пухлин [14–16]. Встановлено, що зміни рівня ізоформ ангіостатинів спостерігаються не лише при онкологічних захворюваннях, але й за патології, що супроводжується активацією запальних процесів (цукрового діабету, ревматоїдного артрити, псоріазу, атеросклерозу тощо) [17–20]. Крім того, велику увагу приділено пошукові та ідентифікації клітин, які здатні генерувати АС за нормальних фізіологічних умов, а отже й залучатися до підтримки ангіогенного балансу тканин [21, 22]. Концентрація АС у біологічному матеріалі часто не перевищує 10^{-9} М [23], тому імунохімічна детекція АС є практично єдиним високочутливим підходом, який не потребує попереднього виділення фрагментів Pg з аналізованого матеріалу. Отже, отримання та характеристика антитіл до Pg та його фрагментів є необхідними умовами для створення специфічних і чутливих тест-систем, що можуть набути широкого застосування як у клінічній діагностиці, так і при оцінюванні ефективності лікування серцево-судинних та онкологічних захворювань, а також моніторингу перебігу хронічних запальних процесів. Окрім того, ці антитіла можуть бути використані як молекулярні інструменти для дослідження особливостей міжпротеїнових взаємодій, ідентифікації клітинних рецепторів для Pg та його фрагментів, розкриття молекулярних механізмів функціонування АС у різних фізіологіч-

них та патофізіологічних процесах, модуляції активності та субстратної специфічності Pm. Характеристика імунохімічних властивостей, насамперед антигенної специфічності антитіл, отриманих проти таких гомологічних полівалентних антигенів, якими є крингли Pg, може надати цінну інформацію щодо імунологічних особливостей цього протеїну та його доменів.

Метою цієї роботи було одержання та характеристика імунохімічних властивостей поліклональних антитіл проти одного з фрагментів Pg, що найбільш інтенсивно утворюється в організмі людини, а саме K1-3.

Матеріали і методи

Отримання фрагментів плазміногену

Препарат Pg людини отримували з нативної плазми із застосуванням афінної хроматографії на Lys-сефарозі, як описано вище [24]. Lys-форму Pg одержували за методикою [25], чистоту препарату перевіряли за допомогою електрофорезу за кислих значень рН [26]. Отримання фрагмента Pg K1-3 проводили за схемою, запропонованою Sottrup-Jensen та ін. [27] з модифікаціями, основні етапи якої наведено на рис. 1.

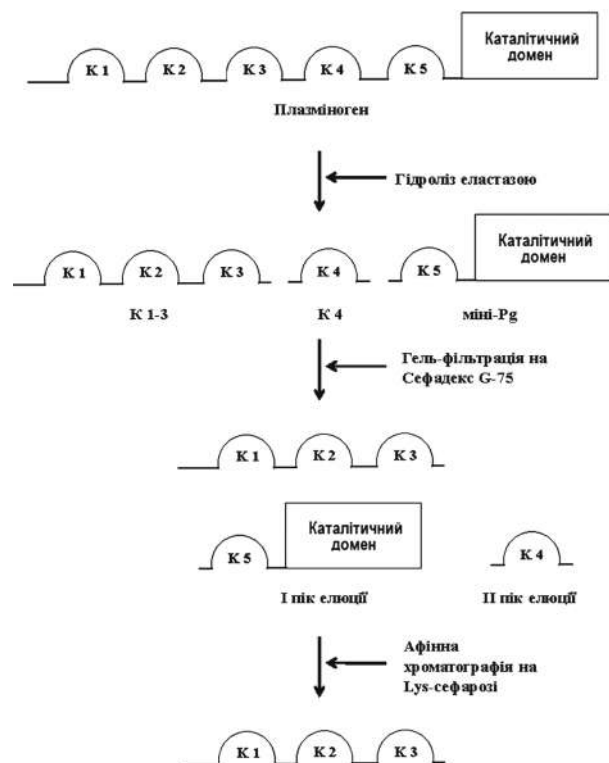


Рис. 1. Схема отримання фрагментів плазміногену за допомогою обмеженого гідролізу панкреатичною еластазою

Обмежений протеоліз P_g проводили з використанням панкреатичної еластази (Sigma, США) (3.4.21.36). P_g та еластазу в масовому співвідношенні 50:1 інкубували у 50 мМ трис-НСl-буфері (рН 8,5), що містив 0,13 М NaCl (TBS), протягом 5 год при 37 °С. Для підбору умов проведення процесу перед препаративним одержанням фрагментів здійснювали аналітичний гідроліз з невеликою кількістю P_g і еластази у тому самому співвідношенні. Інтенсивність та глибину гідролізу контролювали за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) у присутності додецилсульфату натрію (ДСН). Кількість протеїну, який вносили до лунки гелю, не перевищувала 6 мкг. Наприкінці гідролізу до суміші додавали інгібітор паранітрофенілгуанідобензоат (п-НФГБ) до кінцевої концентрації $5 \cdot 10^{-4}$ М.

Розділення продуктів гідролізу проводили методом гель-фільтрації на сефадексі G-75. Елюцію протеїнів здійснювали за допомогою TBS (рН 8,5), швидкість елюції становила 30 мл/год. Концентрацію протеїну в елюаті оцінювали спектрофотометрично на приладі СФ-2000 при $\lambda = 280$ і 320 нм. Елюат, що містив фрагменти P_g K1-3 і Val442-P_g, або міні-P_g (протеолітичне похідне з K5 у своєму складі) висолювали сульфатом амонію протягом 12–16 год за 4 °С. Далі осад відділяли від рідкої фази центрифугуванням при 10 тис. об/хв протягом 45 хв. Отриманий осад розчиняли у трис-лізиновому буфері (ТЛБ), рН 9,0, такого складу: 50 мМ трис-НСl, 20 мМ лізин, 0,13 М NaCl, 1 мМ етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА).

Подальше очищення фрагментів P_g базувалося на різній афінності функціональних груп у складі кринглових доменів стосовно лізину. Для розділення K1-3 і міні-P_g, що мають приблизно однакову молекулярну масу і виходять одним піком на сефадексі G-75, їх суміш, розчинену в ТЛБ, наносили на колонку з Lys-сефарозою, врівноважену 50 мМ Na-фосфатним буфером (рН 7,4), що містив 0,13 М NaCl (NaPBS). Міні-P_g виходив у вільному об'ємі (промивній фракції), оскільки K5 не зв'язується з Lys-сефарозою. Елюцію K1-3 з носія проводили 0,1 М розчином 6-аміногексанової кислоти (6-АГК). Ізольований K4, що вийшов окремим піком на сефадексі G-75, очищували аналогічно із застосуванням хроматографії на Lys-сефарозі.

Після очищення на афінному сорбенті препарати фрагментів P_g діалізували проти TBS і концентрували за допомогою центрифужних фільтрів Amicon[®] Ultra (Millipore,

Ірландія), M_m 30 (для K1-3 та міні-P_g) і 10 кДа (для K4). Отримані препарати фрагментів зберігали при –20 °С і використовували в подальшому для імунохімічних досліджень, а K1-3 — як антиген для отримання антитіл.

Імунізація кролів та отримання імунної антисироватки

Основні етапи отримання поліклональних антитіл проти K1-3 P_g людини подано на рис. 2. Для одержання поліклональних антитіл проти K 1-3 використовували двох дорослих кролів вагою 3,5–4 кг, яких утримували на стандартному раціоні в умовах віварію Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ. Антиген масою 0,75 мг, який містився в 0,75 мл TBS, рН 7,4, емульгували з рівним об'ємом повного ад'юванту Фрейнда (Sigma, США). Отриману емульсію вводили у шість точок уздовж парахребетної ділянки тварин. Повторну імунізацію (I буст) виконували через два тижні за тих самих умов, але з використанням неповного ад'юванту Фрейнда (Sigma, США). Взяття крові (блідинг) проводили на 12-ту добу після попереднього введення антигену. Кров з вушної вени в об'ємі, що не перевищував 40 мл з кожної тварини, збирали до скляних центрифужних пробірок і давали утворитися згустку, утримуючи пробірки при 4 °С протягом 12 год. Сироватку відділяли від згустку і центрифугували для видалення формених елементів при 1000 g протягом 15 хв.

Глобулінову фракцію імунної сироватки отримували висолюванням протеїнів у 50% - му за насиченням розчині сульфату амонію при 4 °С протягом 16 год. Осаджені протеїни відділяли центрифугуванням при 3 000 g за



Рис. 2. Стандартна схема отримання поліклональних антитіл проти фрагмента K1-3

4 °С упродовж 30 хв. Супернатант зливали, осад розчиняли у TBS, рН 7,4. Для видалення залишків сульфату амонію розчин глобулінів діалізували проти тієї самої буферної системи за 4 °С при постійному перемішуванні (200 мл по 30 хв · 5 разів). Після діалізу до розчину глобулінів додавали інгібітор протеаз п-НФГБ до кінцевої концентрації 10^{-5} М.

Отримання фракції IgG на протеїн А-сефарозі

Колонку з протеїн А-сефарозою (Protein A-sepharose from *Staphylococcus aureus*, Sigma, США) об'ємом 2 мл врівноважували 10-кратним об'ємом TBS, рН 7,4. Розчинений осад глобулінової фракції наносили на колонку у співвідношенні 0,8–1,0 мл/мл носія і промивали TBS (рН 7,4) для видалення протеїну, що не зв'язався. Елюцію IgG, що сорбувалися на протеїні А, проводили 0,1 М гліциновим буфером, рН 2,8. Фракції збирали по 1 мл й відразу нейтралізували 1 М розчином трис-НСl, рН 8,5. Концентрацію протеїну у фракціях контролювали спектрофотометрично при $\lambda = 280$ нм. Фракції, що містили IgG, об'єднували й діалізували проти TBS, рН 7,4 (200 мл по 30 хв · 3 рази) за 4 °С. Концентрування препарату IgG перед нанесенням на колонку з імуноафінним сорбентом здійснювали з використанням центрифугальних фільтрів Amicon® Ultra M_m 30 кДа (Millipore, Ірландія).

Хроматографія на імуноафінному сорбенті K1-3-сефарозі

Синтез імуноафінного сорбенту з ковалентно пришитим фрагментом K1-3 проводили на основі сефарози, активованої BrCN (Amersham Biosciences, Швеція), згідно з інструкціями виробника. Колонку із синтезованою K1-3-сефарозою об'ємом 4,5 мл врівноважували 10-кратним об'ємом PBS (0,05 М NaPBS з 1 М NaCl), рН 7,2. Розчин IgG, отриманий на протеїн А-сефарозі, наносили на колонку з імуноафінним сорбентом у співвідношенні 1,2–1,4 мл на 1 мл гелю і промивали PBS, рН 7,2, для видалення протеїну, що не зв'язався. Специфічні IgG, що зв'язалися з імуносорбентом, елюювали 0,2 М гліциновим буфером, рН 2,8. Фракції збирали по 1 мл й відразу нейтралізували 1 М розчином трису, рН 8,5. Концентрацію протеїну у фракціях контролювали спектрофотометрично при $\lambda = 280$ нм. Фракції, що містили IgG, які специфічно зв'язувалися з K1-3-сефарозою, об'єднували й діалізували проти TBS, рН 7,4 (200 мл по 30 хв · 5 разів)

за 4 °С. Для зменшення об'єму розчину, в якому містились антитіла, перед їх зберіганням проводили концентрування з використанням центрифугальних фільтрів Amicon® Ultra M_m 50 кДа (Millipore, Ірландія). Антитіла зберігали у суміші з гліцеролом (1:1) при –20 °С.

Імуноензимний аналіз (ІЕА)

За допомогою ІЕА встановлювали наявність антитіл у сироватці крові імунізованих кролів, а також оцінювали взаємодію очищених антитіл з гомологічними протеїнами (молекулами Pg та їхніми крингльвмісними фрагментами). Для цього до лунок 96-лунокового мікропланшета Multi-Sorp (NUNC™, Данія) вносили Glu-Pg, Lys-Pg, K1-3, K4 та міні-Pg, розчинені в NaPBS, у кількості 1 мкг в об'ємі 100 мкл на лунку, або 3%-й розчин бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (Sigma, США) у тому самому об'ємі (контроль неспецифічного зв'язування досліджуваних антитіл). Кожен антиген наносили у двох паралелях, аналіз проводили у трьох повторях. Сорбція протеїнів на поверхні лунок тривала 14–16 год при 4 °С. Після іммобілізації антигени, що не зв'язалися, видаляли, промиваючи плашку 5 разів дистильованою водою і 5 разів NaPBS, рН 7,4. Далі до лунок вносили 3%-й розчин БСА в об'ємі 200 мкл/лунка й інкубували протягом 1 год за 37 °С для блокування неспецифічного зв'язування антитіл. Імунну сироватку в серії розведень (1/100 — 1/200 000) або очищені анти-K1-3 антитіла у кількості від 10 до 0,1 мкг/мл вносили в об'ємі 100 мкл/лунка. Для контролю специфічності імунової відповіді паралельно проводили аналіз сироватки не імунізованого кроля. Інкубацію з первинними антитілами здійснювали при 37 °С протягом 1 год. Антитіла, що не зв'язалися, видаляли 10-разовим промиванням NaPBS, рН 7,4. Вторинні антитіла проти IgG кроля, кон'юговані з лужною фосфатазою (Sigma, США) (3.1.3.1), розводили в NaPBS, рН 7,4, з 0,025% Tween-20 (NaPBST) у співвідношенні 1:10 000, вносили до лунок мікропланшета в об'ємі 100 мкл та інкубували при 37 °С протягом 1 год. Для контролю неспецифічного зв'язування вторинних антитіл анти-IgG кроля, мічені лужною фосфатазою, вносили відразу до лунок з антигенами без попереднього додавання антисироватки або антитіл проти K1-3. Відмивання від вторинних антитіл, що не зв'язалися, проводили у 10 змінах дистильованої води, 5 змінах NaPBST, рН 7,4, і 2 змінах карбонат/бікарбонатного

буфера, рН 9,6 (КББ). Комплекси антиген-антитіло виявляли, використовуючи субстрат лужної фосфатази динатрієвої солі пара-нітрофенілфосфату (п-НФФ) (Sigma Diagnostics, США). Для цього одну таблетку (5 мг) п-НФФ розчиняли в 10 мл КББ, рН 9,6, і вносили розчин до лунок в об'ємі 100 мкл. Оптичну густину вимірювали при $\lambda = 405$ і 492 нм на ридері Multiscan EX (Thermo Electron Corporation, Фінляндія) з використанням відповідного програмного забезпечення через 20 хв після внесення розчину субстрату.

Електрофорез в ПААГ у присутності ДСН

Електрофорез в ПААГ у присутності 0,1% ДСН проводили за класичною методикою [28] за невідновлювальних умов у камері Helicon VE-10 (Російська Федерація). Електрофоретичне розділення протеїнів у цьому експерименті здійснювали з метою контролю ступеня гідролізу Pg еластазою, оцінювання чистоти препаратів отриманих фрагментів, перевірки гомогенності препарату антитіл після очищення на імуноафінному сорбенті. Крім того, електрофорез проводили для попереднього розділення протеїнів перед перенесенням їх на нітроцелюлозну мембрану з подальшою імунодетекцією із застосуванням специфічних антитіл (імуноблотинг). Залежно від мети аналізу електрофорез здійснювали в гелях з фіксованою концентрацією акриламідом (10%) або в градієнті концентрації мономера (7–18%), який готували за допомогою перистальтичного насоса та змішувача. Як електродний буфер використовували розчин, що містив 25 мМ трис-НСІ (рН 8,3), 0,192 М гліцину, 0,1% ДСН. Концентрування зразків проводили за сили струму, що не перевищувала 15 мА, розділення — 30–35 мА. Для візуалізації поліпептидних зон після електрофорезу гелі фіксували в 5% -му розчині трихлороцтової кислоти і забарвлювали в 0,1% -му розчині кумасі яскраво-синього Р-250, розчиненого в суміші 50% -го етанолу та 15% -ї оцтової кислоти. Знебарвлювали у тому самому розчині, якій не містив барвника. Гелі висушували між двома целофановими плівками і сканували для отримання цифрового зображення. Денситометричний аналіз треків проводили з використанням програми EF Manager 2.0. Гелі, які в подальшому застосовували для імуноблотингу, після закінчення електрофорезу обережно виймали з камери та промивали у трьох змінах дистильованої води для вилучення надлишків ДСН.

Імуноблотинг

Використання імуноблот-аналізу дає змогу виявляти гомологічні антигени, що перехресно реагують з відповідними антитілами, але відрізняються за молекулярною масою. Імуноблотинг Pg та його фрагментів проводили за загальноприйнятою методикою [29]. Після попереднього електрофоретичного розділення Pg та його фрагментів на пластину гелю накладали нітроцелюлозну мембрану з діаметром пор 0,45 мкм (GE Healthcare, Amersham, Велика Британія) і розміщували між стопками вологого фільтрувального паперу. Отриманий «сендвіч» вкладали між двома поролоновими прокладками і затискали між жорсткими плексигласовими пластинками, які мали отвори для вільного доступу електродів до гелю, забезпечуючи проходження струму через систему. Конструкцію розташовували між електродами в камері (Bio-Rad, США) з 12,5 мМ трис-НСІ буфером (рН 8,3), який додатково містив 0,198 М гліцину та 20% метанолу. Перенесення проводили протягом 90 хв за сили струму 150 мА і постійного охолодження. Після завершення трансферу протеїнів мембрани відмивали від залишків метанолу в п'яти змінах забуференого фізіологічного розчину (NaPBS), рН 7,4. Місця неспецифічної сорбції антитіл блокували в 5% -му розчині знежиреного сухого молока (Carnation, США) упродовж 2 год при 37 °С. Після блокування нітроцелюлозну мембрану інкубували 16 год за 4 °С зі специфічними кролячими антитілами проти К1-3 (~ 60 мкг на мембрану), розведеними в NaPBS. Потім мембрану промивали в 5 змінах NaPBS, після чого інкубували 60 хв за 37 °С з розведеними у співвідношенні 1:1 500 у NaPBS, який додатково містив 0,025% Triton X-100, козиними антитілами до IgG кроля, кон'югованими з пероксидазою хрому (Sigma, США) (1.11.1.7). Неспецифічно сорбовані вторинні антитіла відмивали у 7 змінах того самого буфера. Для візуалізації імуних комплексів, що відповідають поліпептидним зонам Pg та його фрагментів, нітроцелюлозну мембрану обробляли протягом 15 хв за кімнатної температури в 50 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,4), який містив діамінобензидин (0,01%) і пероксид водню (0,02%). Після проведення реакції мембрану ретельно промивали під струменем водопровідної води, висушували током повітря і сканували для отримання цифрового зображення.

Статистична обробка результатів

Значення оптичної густини, одержані під час виконання ІЕА, виражали у вигляді середньої величини ± стандартна похибка ($M \pm m$). Статистичну вірогідність різниці між груповими середніми оцінювали за допомогою *t*-критерію Стьюдента після перевірки гіпотез про рівність генеральних дисперсій та нормальності розподілення. Різницю вважали вірогідною за $P < 0,05$.

Результати та обговорення

В експериментальній роботі наведено дані щодо отримання протеолітичних фрагментів Pg (за [27] з модифікаціями), одержання поліклональних антитіл проти фрагмента К1-3 та характеристики їхніх імунохімічних властивостей. Сутність модифікації методу одержання фрагментів Pg полягала в тому, що спочатку здійснювали розділення продуктів гідролізу Pg на колонці з Сефадекс G-75, а потім — очищення отриманих фрагментів на афінному сорбенті Lys-сефарозі. Оскільки фрагменти, що зв'язуються з Lys-сефарозою — К1-3 і К4, виходять у різних піках елюції під час гел'фільтрації, то завдяки попередньому їх розділенню можна досягти більш високого ступеня очищення К1-3 в ході афінної хроматографії.

Електрофореграму продуктів обмеженого протеолізу Pg еластазою подано на рис. 3. Результати електрофорезу свідчать, що головними продуктами гідролізу Pg еластазою є крингльвімісні фрагменти К1-3, К4 та Val442-Pg (міні-Pg). Спираючись на результати аналітичного гідролізу Pg, у подальших дослідях для напрацювання препаративних кількостей фрагментів протеоліз проводили протягом 5 год. Вихід (за масою) продуктів обмеженого протеолізу Pg становить 33% для міні-Pg, 28% — К1-3 та 6,5% — К4. Гомогенність препаратів фрагментів Pg перевіряли електрофоретично (рис. 4). Слід зазначити, що після стадії очищення на Lys-сефарозі К1-3 виявляли в електрофорезі у вигляді декількох поліпептидних зон у діапазоні M_m 38–26 кДа. Це спостереження пояснюється рівновірогідним гідролізом еластазою пептидних зв'язків Val338-Ser339 та Val354-Val355 між К3 і К4, а також наявністю різних глікозильованих ізоформ фрагмента, оскільки у плазмі людини приблизно в рівних кількостях присутні дві глікоформи Pg: тип I (глікозильований як за Asn289, так і за Thr346) і тип II (глікозильований лише за Thr346).

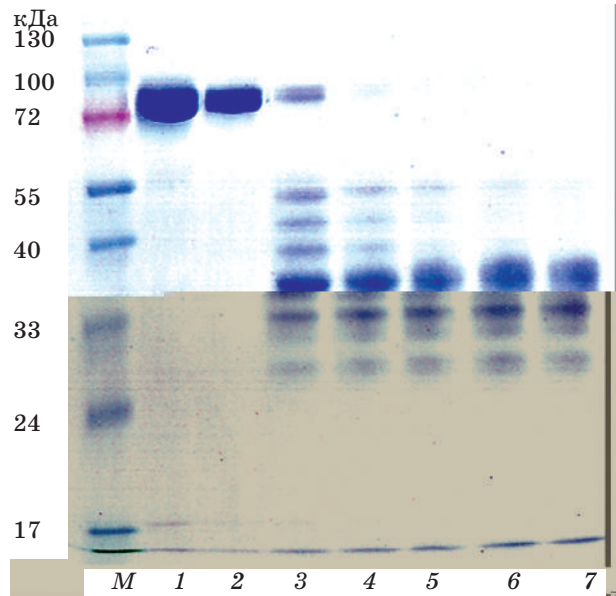


Рис. 3. Електрофореграма (10% ПААГ) Pg та продуктів його протеолізу панкреатичною еластазою:

M — маркери молекулярної маси, 1 — Pg, 2–7 — гідролізати Pg, отримані в ході протеолізу еластазою (0–5 год)

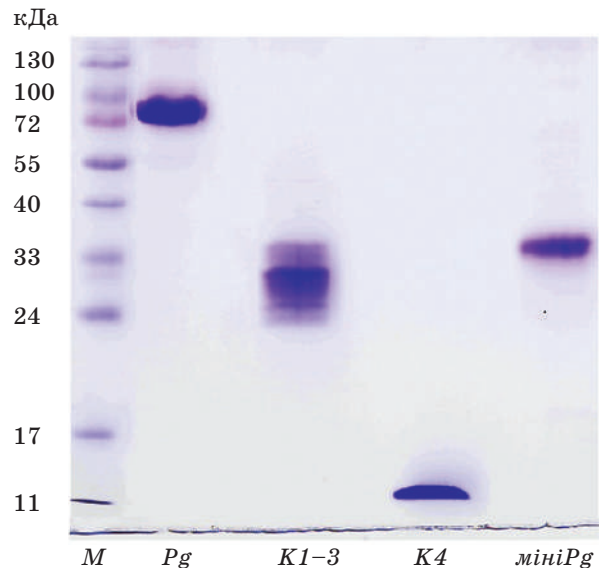


Рис. 4. Електрофореграма (12% ПААГ) Pg та його протеолітичних похідних, очищених за допомогою гел'фільтрації та афінної хроматографії (*M* — маркери молекулярної маси)

Фрагмент Pg К1-3 використовували як антиген для імунізації кролів з метою отримання антитіл. Кінцевий вихід антитіл проти К1-3 становив 6,6% від фракції IgG. Чистоту препарату специфічних антитіл перевіряли електрофоретично (рис. 5). Денситометричним аналізом встановлено, що поліпептид з молекулярною масою 150 кДа, що відповідає молекулам IgG, очи-

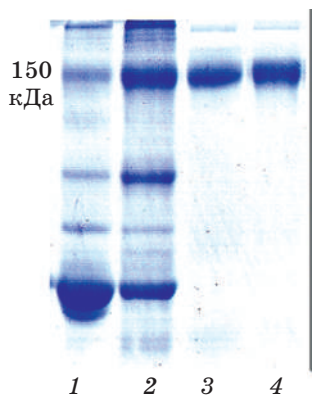


Рис. 5. Електрофореграма (10% ПААГ) протеїнів імунної сироватки (1), глобулінової фракції (2), загальної фракції IgG (3) та препарату IgG, очищених на афінному сорбенті K1-3-сефарозі (4); поліпептидна зона M_m 150 кДа відповідає молекулам IgG

щеним на афінному сорбенті K1-3-сефарозі, становить 99,5% від сумарної кількості протеїнів препарату антитіл.

Результати ІЕА сироватки кролів, імунізованих K1-3, подано на рис. 6. Отримані дані свідчать про наявність імунної відповіді на повторне введення антигену й присутність антитіл, які специфічно реагують з Pg та його фрагментами у такому порядку: Glu-Pg > Lys-Pg > K1-3 > міні-Pg > K4. Зв'язування IgG сироватки не імунізованого кроля, що використовувалася для контролю специфічності імунної відповіді, із зазначеними антигенами не відбувалося (дані не наведено).

Сироваткові антитіла за максимального розведення, обраного в експерименті (1/200 000), реагують з усіма антигенами, за

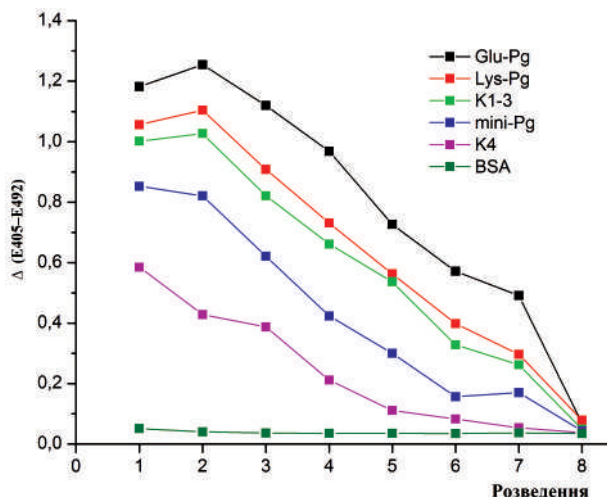


Рис. 6. Взаємодія антисироватки кролів, імунізованих K1-3, з Pg та його фрагментами: розведення: 1 — 1/100; 2 — 1/1000; 3 — 1/5000; 4 — 1/10000; 5 — 1/50000; 6 — 1/100000; 7 — 1/200000; 8 — антисироватка відсутня

винятком K4. У діапазоні розведень від 1/1000 до максимального значення спостерігається лінійна залежність між ступенем розведення сироватки та імунореактивністю. У разі внесення антисироватки у найменшому розведенні (1/100) значення оптичної густини лунок з Glu-Pg, Lys-Pg та K1-3 є нижчими за такі для більшого розведення (1/1000), що свідчить про присутність надлишку сироваткових протеїнів у реакційній суміші й маскуванню місць взаємодії вторинних антитіл з IgG, які зв'язалися з Pg та його фрагментами, або наявність в антисироватці антиідіотипічних антитіл [30].

Залежно від кількості очищені антитіла зберігають аналогічну тенденцію до перехресної взаємодії з вихідними молекулами Pg та їхніми фрагментами: вони виявляють найбільшу афінність до Glu-Pg і найменшу — до фрагмента K4 (рис. 7). Слід зауважити, що очищеним антитілам притаманна дещо менша афінність до антигену K1-3, ніж відповідним специфічним IgG у складі імунної антисироватки. Цей факт можна пояснити отриманням пулу антитіл на колонці з K1-3-сефарозою, які сорбувалися на іммобілізованому антигені, що міг зазнати конформаційних змін унаслідок ковалентної іммобілізації. Дані, отримані за допомогою ІЕА, свідчать, що зі збільшенням концентрації антитіл криві відхиляються від прямої лінії та виходять на плато, оскільки має місце ефект насичення ділянок зв'язування, що вказує на перевищення стехіометричного співвідношення «антиген/антитіло».

Детально проаналізовано зв'язування антитіл за їх максимальної (10 мкг/мл) та мінімальної (0,5 мкг/мл) кількості, за якої вже не спостерігається статистично вірогідної різниці у взаємодії їх з одним із досліджуваних

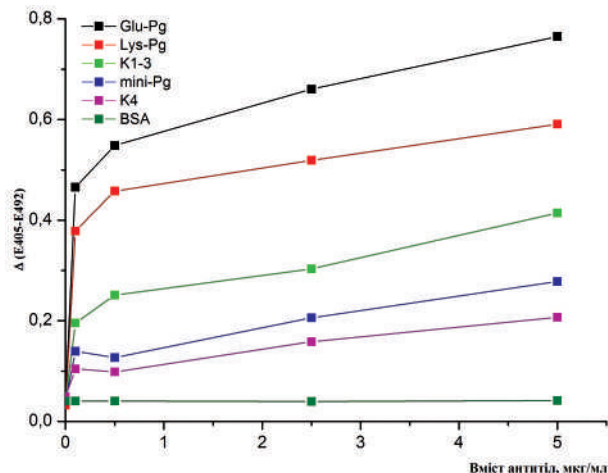


Рис. 7. Взаємодія очищених антитіл (0,1–5 мкг/мл) з Pg та його фрагментами

фрагментів (у даному разі — К4) порівняно з протеїном-контролем БСА (рис. 8). Слід зауважити, що зв'язування антитіл з антигеном К1-3 та міні-Pg і К4 зменшується зі зниженням кількості антитіл у реакційному середовищі відносно даного показника для Glu- та Lys-Pg. Так, за кількості антитіл 10 мкг/мл (рис. 8, А) зв'язування анти-К1-3-IgG з антигеном у 1,3 ($P < 0,05$) та 1,1 раза нижче, ніж з Glu- та Lys-Pg відповідно; з іншого боку, взаємодія К1-3 з отриманими антитілами знаходиться на одному рівні з даним показником для міні-Pg і перевищує його для К4 в 1,6 раза ($P < 0,05$). Найменш афінним з досліджуваних антигенів, що містять гомологічні епітопи, виявився К4, який за кількості антитіл 0,5 мкг/мл виявив реактивність, у 2,2 ($P < 0,05$) раза нижчу порівняно з цим показником для К1-3, тимчасом як міні-Pg зв'язувався з цими антитілами в 1,7 ($P < 0,05$) раза менш ефективно, ніж власне антиген (рис. 8, Б). Встановлено, що взаємодія антитіл за їх вмісту 0,5 мкг/мл з Glu- і Lys-Pg відносно даного показника для К1-3 зростає в 2,6 ($P < 0,05$) та 2,1 ($P < 0,05$) раза відповідно.

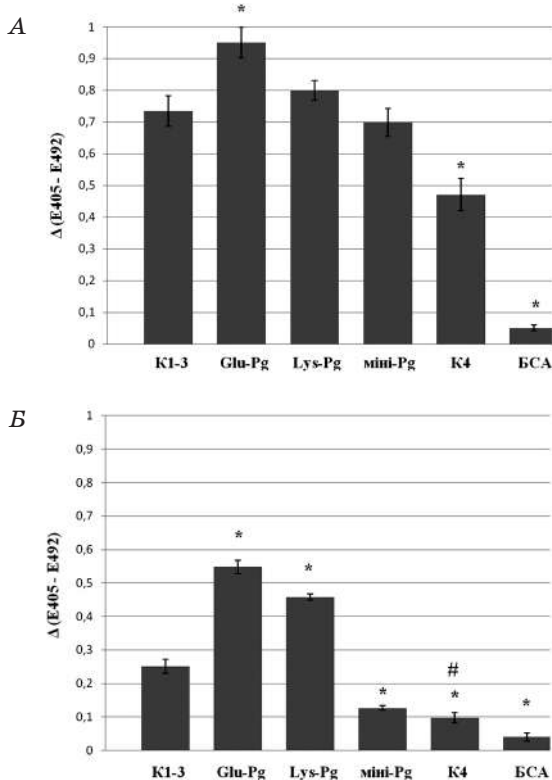


Рис. 8. Взаємодія очищених антитіл у кількості 10 (А) та 0,5 (Б) мкг/мл з Pg та його фрагментами:

* — різниця вірогідна стосовно К1-3 ($P < 0,05$);
— відсутність вірогідної різниці відносно БСА ($P > 0,05$)

Узагальнюючи результати ІЕА, слід наголосити, що реактивність отриманих антитіл відносно обох форм Pg перевищувала реактивність усіх досліджуваних фрагментів, у тому числі до власне антигену — К1-3. Це зумовлено наявністю у складі вихідної молекули ділянок (К4 і К5), структурно та імунологічно гомологічних таким у фрагменті К1-3, які роблять адитивний внесок у загальну імуореактивність молекули Pg. Відомо, що Lys-формі Pg притаманна більш розгорнута конформація, ніж Glu-формі, з потенційно більш відкритими і доступними для взаємодії з антитілами антигенними детермінантами. Отже, можна було припустити, що специфічні антитіла у сироватці імунізованих тварин взаємодіють з Lys-Pg з більшою афінністю порівняно з Glu-формою. Проте результати ІЕА продемонстрували, що антитіла сироватки кролів, а також і очищені антитіла краще розпізнавали Glu-форму Pg. Це спостереження можна пояснити особливостями просторового розташування саме тих антигенних детермінант у складі ізолюваного К1-3, які розпізнаються імунокомпетентними клітинами і є конформаційно й імунологічно ближчими ділянці К1-3 у складі молекули Glu-Pg, ніж Lys-форми.

Результати аналізу антигенної специфічності одержаних антитіл є корисними для оцінки імунологічних властивостей окремих кринглових доменів. Відомо, що всі крингли Pg людини містять близько 80 амінокислотних залишків, стабілізовані трьома дисульфідними містками і характеризуються високою гомологією первинної структури, що зумовлює значну подібність просторової будови. Амінокислотна послідовність перших трьох доменів у середньому на 50% подібна до такої у К4. Більш того, за своєю первинною структурою К5 демонструє ще більшу ідентичність стосовно К1 — близько 60%. Дані, отримані в досліді із застосуванням ядерного магнітного резонансу та рентгеноструктурного аналізу показали, що найбільш унікальним за своєю будовою серед усіх кринглів Pg є К4. Цей домен має виняткову структурну рису — два кластери позитивно заряджених залишків лізину, що прилягають до Cys22 і Cys80, які відсутні в будь-якому іншому кринглі. Встановлено, що особливості будови певних кринглів опосередковують їхні унікальні функціональні можливості. Зокрема, К4 найбільше відрізнявся від інших доменів не лише структурно, але й функціонально: цей крингл сам по собі не здатен пригнічувати

ріст ендотеліальних клітин [9, 10]. Очевидно, структурні відмінності кринглів зумовлюють їхні імунологічні характеристики. Дані ІЕА, отримані у цій роботі, значною мірою підтверджують наявні в літературі відомості стосовно особливостей будови кринглів. Так, за своїми антигенними властивостями К4 є найбільш відмінним як від фрагмента, що несе перші три домени, так і від К5, який входить до складу міні-Pg, що використовувався для дослідження. З другого боку, К5 за зв'язування з антитілами виявився більш подібним до К1-3, ніж К4. Тому можна припустити, що за антигенними властивостями К5 є близьким до кринглів 1, 2 та/або 3.

Істотною проблемою для кількісного визначення у біологічному матеріалі поліпептидів — продуктів фрагментації Pg, зокрема тих, яким притаманна антиангіогенна активність (АС), є високий рівень структурної спорідненості кринглових доменів. Ця обставина стає перешкодою для отримання високоспецифічних полі- або навіть моноклональних антитіл проти кринглів, які б не розпізнавали вихідну молекулу Pg. Так, у роботах [31, 32] було показано, що моноклональні антитіла VAP та GMA086, отримані проти певних епітопів К1-3, розпізнавали як Pg, так і фрагмент К1-4,5. Використання більш специфічних антитіл дасть змогу проводити кількісне визначення АС будь-яким рутинним імунохімічним методом, зокрема ІЕА, без процедури попереднього вилучення Pg або ізолювання його фрагментів із проби. Отримання специфічних антитіл до кринглів Pg залишається важливим напрямом роботи сучасних галузей біохімії та імунології.

У цій роботі було показано, що антитіла, виділені із сироваток кролів, імунізованих К1-3, перехресно взаємодіють з гомологічними крингльовими фрагментами Pg, а також із самими вихідними молекулами. Цей факт унеможлиблює ідентифікацію окремих протеолітичних похідних Pg у біологічному матеріалі за допомогою ІЕА. Практично єдиним доступним методом, який дозволяє проводити диференційований аналіз АС у пробах навіть за присутності Pg з використанням поліклональних

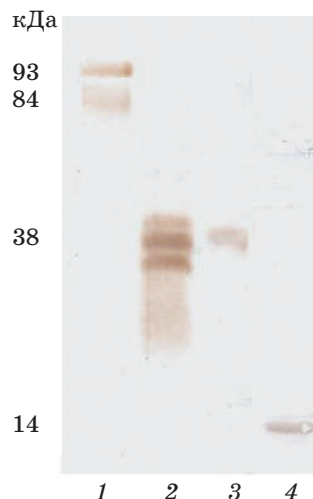


Рис. 9. Імуноблотинг Pg та його фрагментів з використанням антитіл проти К1-3 (попереднє електрофоретичне розділення у градієнті ПААГ (7–18%): 1 — суміш Glu- та Lys-Pg; 2 — К1-3; 3 — міні-Pg; 4 — К4

антитіл, є імуноблотинг. Результат ідентифікації тих самих п'яти антигенів методом імуноблот-аналізу подано на рис. 9.

Картина імунохімічної детекції Pg та його фрагментів є аналогічною результатам електрофоретичного аналізу очищених фрагментів Pg, наведених на рис. 4.

Таким чином, отримані антитіла можуть бути використані в імунохімічному аналізі, зокрема імуноблотингу, для виявлення АС у біологічному матеріалі та дослідження їх маркерної ролі за пухлинного росту, метастазування, при серцево-судинних захворюваннях і запальних процесах. Перспективи використання цих антитіл не обмежуються суто прикладним аспектом, пов'язаним з діагностикою захворювань, до яких залучається Pg/Pm. Сучасні уявлення про функціонування Pg/Pm системи роблять актуальним застосування специфічних антитіл як інструменту дослідження ролі її компонентів у сигнальних механізмах, що лежать в основі таких фізіологічних процесів, як міграція клітин, ремоделювання тканин, загоєння ран, регенерація нервової тканини, запліднення тощо.

ЛІТЕРАТУРА

1. Луговой Э. М. Молекулярные механизмы образования фибрина и фибринолиза. — К.: Наук. думка, 2003. — 224 с.
2. Zhang L., Seiffert D., Fowler B. J. et al. Plasminogen has a broad extrahepatic distribution // *Thromb. Haemost.* — 2002. — V. 87, N 3. — P. 493–501.
3. Ranson M., Andronicos N. M. Plasminogen binding and cancer: promises and pitfalls // *Front. Biosci.* — 2003. — V. 8. — P. 294–304.
4. Miles L. A., Hawley S. B., Baik N. et al. Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation // *Ibid.* — 2005. — V. 10. — P. 1754–1762.

5. *Lijnen H. R.* Patophysiology of the plasminogen/plasmin system // *Int. J. Clin. Lab. Res.* — 1996. — V. 26, N 1. — P. 1–6.
6. *Sharma M., Ownbey R. T., Sharma M. C.* Breast cancer cell surface annexin II induces cell migration and neoangiogenesis via tPA dependent plasmin generation // *Exp. Mol. Pathol.* — 2010. — V. 88, N 2. — P. 278–286.
7. *Новохатний В. В., Мацука Ю. В.* Плазминоген: структура и физико-химические свойства // *Биохимия животных и человека.* — 1989. — Т. 13. — С. 36–45.
8. *Markus G., Evers J. L., Hobika G. H.* Comparison of some properties of native (glu) and modified (lys) human plasminogen // *J. Biol. Chem.* — 1978. — V. 253, N 3. — P. 733–739.
9. *Castellino F. J., McCance S. G.* The kringle domains of human plasminogen // *Ciba. Found Symp.* — 1997. — V. 212. — P. 46–60.
10. *Cao Y., Xue L.* Angiostatin // *Semin. Thromb. Hemost.* — 2004. — V. 30, N 1. — P. 83–93.
11. *O'Reilly M. S., Holmgren L., Shing Y. et al.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma // *Cell.* — 1994. — V. 79, N 2. — P. 315–328.
12. *Doll J. A., Soff A.* Angiostatin // *Cancer Treat. Res.* — 2005. — V. 126. — P. 175–204.
13. *Wahl M. L., Moser T. L., Pizzo S. V.* Angiostatin and anti-angiogenic therapy in human disease // *Recent Prog. Horm. Res.* — 2004. — V. 59. — P. 73–104.
14. *Клысь Ю. Г., Зайцева Н. В., Кузим А. И., Вережка С. В.* Протеолитические производные плазминогена и их возможное диагностическое значение при онкологических процессах // *Лаб. диагностика.* — 2008. — Т. 2, N 44. — С. 52–58.
15. *Drenberg C. D., Saunderson B. O., Wilbanks G. D. et al.* Urinary angiostatin levels are elevated in patients with epithelial ovarian cancer // *Gynecol. Oncol.* — 2010. — V. 117, N 1. — P. 117–124.
16. *Pour L., Svachova H., Adam Z. et al.* Levels of angiogenic factors in patients with multiple myeloma correlate with treatment response // *Ann. Hematol.* — 2010. — V. 89, N 4. — P. 385–389.
17. *Sodha N. R., Clements R. T., Boodhwani M. et al.* Endostatin and angiostatin are increased in diabetic patients with coronary artery disease and associated with impaired coronary collateral formation // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* — 2009. — V. 296, N 2. — P. 428–434.
18. *Szekanecz Z., Besenyei T., Paragh G., Koch A. E.* Angiogenesis in rheumatoid arthritis // *Autoimmunity.* — 2009. — V. 42, N 7. — P. 563–573.
19. *Chang P. C., Wu H. L., Lin H. C. et al.* Human plasminogen kringle 1-5 reduces atherosclerosis and neointima formation in mice by suppressing the inflammatory signaling pathway // *J. Thromb. Haemost.* — 2010. — V. 8, N 1. — P. 194–201.
20. *Chavakis T., Athanasopoulos A., Rhee J. S. et al.* Angiostatin is a novel anti-inflammatory factor by inhibiting leukocyte recruitment // *Blood.* — 2005. — V. 105, N 3. — P. 1036–1043.
21. *Xu Z., Shi H., Li Q. et al.* Mouse macrophage metalloelastase generates angiostatin from plasminogen and suppresses tumor angiogenesis in murine colon cancer // *Oncol. Rep.* — 2008. — V. 20, N 1. — P. 81–88.
22. *Jurasz P., Santos-Martinez M. J., Radomska A., Radomski M. W.* Generation of platelet angiostatin mediated by urokinase plasminogen activator: effects on angiogenesis // *J. Thromb. Haemost.* — 2006. — V. 4, N 5. — P. 1095–1106.
23. *Shantha Kumara H. M., Tohme S. T.* Plasma levels of angiostatin and endostatin remain unchanged for the first 3 weeks after colorectal cancer surgery // *Surg. Endosc.* — 2011. — V. 25, N 6. — P. 1939–1944.
24. *Deutsch D. G., Mertz E. T.* Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography // *Science.* — 1970. — V. 170, N 3962. — P. 1095–1096.
25. *Nesheim M., Fredenburgh J. C., Larsen G. R.* The dissociation constants and stoichiometries of the interactions of Lys-plasminogen and chloromethyl ketone derivatives of tissue plasminogen activator and the variant delta FEIX with intact fibrin // *J. Biol. Chem.* — 1990. — V. 265, N 35. — P. 21541–21548.
26. *Panyim S., Chalkley R.* High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1969. — V. 130, N 1. — P. 337–346.
27. *Sottrup-Jensen L., Claeys H., Zajdel M. et al.* The primary structure of human plasminogen: isolation of two lysine-binding fragments and one mini-plasminogen (M.W. 38000) by elastase catalyzed specific limited proteolysis. — *Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis.* — New York: Raven Press, 1978. — V. 3. — P. 191–209.
28. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* — 1970. — V. 227, N 5259. — P. 680–685.
29. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1979. — V. 76, N 9. — P. 4350–4354.
30. *Бобровник С. А.* Анализ кривых титрования сывороточных антител, полученных с помощью метода ELISA // *Укр. биохим. журн.* — 2012. — Т. 84, № 2. — С. 105–110.
31. *Tarui T., Majumdar M., Miles L. A. et al.* Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin // *J. Biol. Chem.* — 2002. — V. 277, N 37. — P. 33564–33570.
32. *Wang H., Schultz R., Hong J. et al.* Cell surface-dependent generation of angiostatin4.5 // *Cancer Res.* — 2004. — V. 64, N 1. — P. 162–168.

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА
АНТИТЕЛ ПРОТИВ ФРАГМЕНТА K1-3
ПЛАЗМИНОГЕНА ЧЕЛОВЕКА**

*А. А. Тихомиров
Е. И. Юсова
С. И. Диордиева
В. В. Корса
Т. В. Гриненко*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: artem_tykhomyrov@ukr.net

Компоненты плазминоген/плазминовой системы играют ключевую роль в процессах фибринолиза, а также вовлечены в регуляцию активности клеток в норме и при различных патологических состояниях. В частности, кринглсодержащие протеолитические фрагменты плазминогена, известные как ангиостатины, принимают участие в процессах, связанных с неоваскуляризацией, метастазированием, опухолевым ростом, воспалительными реакциями. Ангиостатины рассматривают как потенциальные маркеры ряда заболеваний, ассоциированных с патологией сосудов, поэтому большое внимание уделяется разработке специфических и чувствительных методов их детекции.

В работе описаны подходы, связанные с получением фрагментов плазминогена путем его ограниченного протеолиза панкреатической эластазой и дальнейшей очистки протеолитических производных с помощью гель-фильтрации и аффинной хроматографии на Lys-сефарозе. Получены поликлональные антитела против фрагмента K1-3 и исследованы их основные иммунохимические свойства. Установлено, что антитела, очищенные на иммуноаффинном сорбенте, демонстрируют разную аффинность к Pg и его фрагментам, а именно: Glu-Pg > Lys-Pg > K1-3 > мини-Pg > K4. На основании полученных данных обсуждаются иммунологические особенности крингловых доменов плазминогена. Антитела против фрагмента K1-3 могут быть использованы в иммунохимическом анализе, в частности иммуноблоттинге, для детекции ангиостатинов в качестве маркеров опухолевого роста, метастазирования, сердечно-сосудистых заболеваний и воспалительных процессов, а также как молекулярный инструмент для исследования функционирования плазминоген/плазминовой системы в норме и при патологии.

Ключевые слова: плазминоген, крингловые домены, фрагменты плазминогена, ангиостатины, поликлональные антитела.

**PRODUCTION AND CHARACTERISTICS
OF ANTIBODIES AGAINST K1-3 FRAG-
MENT OF HUMAN PLASMINOGEN**

*A. A. Tykhomyrov
E. I. Yusova
S. I. Diordieva
V. V. Corsa
T. V. Grinenko*

Palladin Institute of Biochemistry of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: artem_tykhomyrov@ukr.net

Components of plasminogen/plasmin system play crucial role in fibrinolytic processes. They are also involved in regulation of cell activity in normalcy and various pathological conditions. In particular, kringle-containing proteolytic plasminogen fragments, which are denoted as angiostatins, participate in processes during neovascularization, metastasis, tumor growth, inflammation. Angiostatins are considered to be potential markers of diseases associated with vascular pathologies. Therefore, elaboration of specific and sensitive methods for their detection is still important area of inquiry. In the present study, approaches for obtaining of plasminogen fragments through its limited proteolysis by pancreatic elastase and further purification of proteolytic derivatives by means of gel filtration and affinity chromatography on Lys-Sepharose are described. Polyclonal antibodies raised to fragment K1-3 have been produced, and their principal immunochemical properties have been studied. It has been found that antibodies purified on immunoaffine sorbent demonstrate different affinity toward plasminogen and its fragment, as follows: Glu-Pg > Lys-Pg > K1-3 > mini-Pg > K4. Based on the data obtained, immunological features of plasminogen kringle domains are discussed. Antibodies against fragment K1-3 could be applied in immunochemical analysis, in particular, Western blot, for detection of angiostatins as markers of tumor growth, metastasis, cardiovascular diseases and inflammation processes, and used as molecular tool for investigation of plasminogen/plasmin system functioning in health and disease.

Key words: plasminogen, kringle domains, plasminogen fragments, angiostatins, polyclonal antibodies.