

Т. А. Позняк, І. М. Колеснікова, **Л. М. Литвинова**,
О. П. Костюченко, Л. П. Урвант, В. Є. Хаджинова,
член-кореспондент НАН України Е. В. Луговської,
академік НАН України С. В. Комісаренко

Моноклональні антитіла, що специфічні до Е-регіону фібрин(оген)у людини

Отримано моноклональні антитіла (монАТ) класу IgG_{2a}, епітоп для яких знаходиться в ділянці E₃-фрагмента фібрину A α 20–78. Турбідиметричним методом аналізу встановлено, що дані монАТ та їх Fab-фрагменти інгібують процес полімеризації фібрину. Методом т-ІФА встановлено, що монАТ реагують з фібриногеном, фібрином та його E₃-фрагментом, однак не реагують з (DD)E-комплексом, в якому реалізована взаємодія центрів полімеризації “А”–“а”, що, очевидно, екранує зону епітопу A α 20–78.

Молекула фібриногену є мультидоменним білком системи зсідання крові, в якому розрізняють центральний регіон Е, два периферичних регіони D та два α C-регіони. При активації системи зсідання крові утворюється фермент тромбін, який перетворює фібриноген на фібрин desA, здатний до спонтанної полімеризації за рахунок міжмолекулярного зв'язування центра “А” (A α 17Gly-18Pro-19Arg) з комплементарним йому “а” (γ Gln-329, γ Asp-330, γ His-340 та γ Asp-364). Надалі відбувається утворення протофібрил, їх латеральна асоціація, формування фібрили та в кінцевому рахунку — утворення тривимірної сітки фібрину, яка є каркасом будь-якого тромбу [1].

Метою цієї роботи було схарактеризувати моноклональні антитіла (монАТ), епітоп для яких знаходиться поблизу центра полімеризації “А”, та дослідити їх вплив на процес полімеризації фібрину.

Для імунізації мишей як антиген використовували суміш поліпептидних ланцюгів фібрину, які отримували методом, описаним у статті [2]. Мишам лінії BALB/c у порожнину черева вводили по 100 мкг антигену у вигляді емульсії з повним ад'ювантом, а через три тижні — з неповним ад'ювантом Фрейнда. Через 10 днів визначали титр специфічних антитіл до фібрин(оген)у в сироватці крові за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (т-ІФА) [3]. Остання імунізація була зроблена за три доби до проведення гібридизації.

Для гібридизації використовували клітини селезінки імунізованої миші та клітини мієломи X63-Ag8.653 (“Flow Laboratories”, Англія). До осаду суміші клітин додавали 1 мл 50%-го поліетиленгліколю (“Sigma”, США). Відразу після цього клітини промивали поживним середовищем Хенкса (“Sigma”, США) шляхом центрифугування при 1 тис. об/хв. Осад клітин суспендували в селективному поживному середовищі RPMI 1640, яке містило 10⁻⁴ моль/л гіпоксантину, 4·10⁻⁷ моль/л аміноптеридину, 1,6·10⁻⁵ моль/л тимідину (ГАТ), 20%-ї ембріональної сироватки великої рогатої худоби, та розсіювали в 24-лункові планшети (“Costar”, США). Через 10 днів у лунках з клітинами поживне середовище з ГАТ замінювали на поживне середовище з ГТ (10⁻⁴ моль/л гіпоксантину, 1,6·10⁻⁵ моль/л тимідину) та проводили скринінг гібридом на наявність специфічних антитіл, використовуючи метод т-ІФА. Як ан-

тигени у лунках планшета були адсорбовані фібриноген або фібрин desAB на планшетах ("Sarsted", США). Позитивні гібридами клонували методом кінцевих розведень. Частину клітин заморожували за загальноприйнятим методом, а частину культивували для нагромадження культуральної рідини.

МонАТ виділяли з культуральної рідини методом афінної хроматографії на сефарозі ("Sigma", США) з імобілізованим фібриногеном, отриманим у лабораторії Ін-ту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України [4]. Зв'язані з сорбентом монАТ елюювали 0,1 моль/л гліцин-НСІ буфером, рН 2,8. Для запобігання процесу денатурації монАТ відразу після елюювання антитіл додавали 1 моль/л розчин K_2HPO_4 . Наявність білка встановлювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 280 нм. Далі проводили діаліз і концентрування розчину антитіл за допомогою ультрафільтрації на концентраторі ("Amicon", США).

Було отримано шість гібридом, які продукують монАТ, що специфічно реагують з фібриногеном, фібрином людини. У табл. 1 наведено значення констант дисоціації монАТ в реакції з E_3 -фрагментом фібрину, що визначали непрямим конкурентним т-ІФА, як описано в [3]. Клас та субклас імуноглобулінів визначали за допомогою антисироваток до ізотопів мишей фірми ("Clinical Credential ICN Immunobiologicals", США). Встановлено, що всі шість монАТ відносяться до ізотипу IgG_{2a}.

Епітоп отриманих монАТ локалізували методом т-ІФА з використанням отриманих у лабораторії нашого інституту білків та їх фрагментів: фібриноген [4], фібрин desAB [5], D-фрагмент [6], фракція αC -фрагмента фібриногену [7], D-димер фібрину [8] та E_3 -фрагмент [9]. Вказані білки та фрагменти в концентрації 10 мкг/мл адсорбували на полістиролових планшетах впродовж 18 год при 4 °С, підбираючи оптимальні умови (для фібриногену та αC -фрагмента — у 0,2 моль/л амонійацетатному буфері, рН 8,5; для фібринів desA та desAB у цьому самому буфері з додаванням 3 моль/л сечовини, для D-димеру та E_3 -фрагмента — 0,02 моль/л бікарбонатному буфері, рН 9,5). Далі в лунки планшета вносили по 100 мкл очищених монАТ з концентрацією 10 мкг/мл. Зв'язані на планшеті монАТ виявляли за допомогою мічених пероксидазою антитіл кроля до IgG миші ("Sigma", США). Усі шість монАТ реагують однаково з перерахованими вище антигенами, рис. 1 ілюструє результати т-ІФА для довільно вибраного монАТ II-5C. З рисунку *a* видно, що монАТ II-5C найкраще реагує з E_3 -фрагментом фібрину, фібрином desAB, слабше — з фібриногеном, і зовсім не реагує з D-димером, D-фрагментом та з 24 кДа фрагментом αC -регіону. Було припущено, що епітоп для всіх отриманих монАТ знаходиться в E_3 -фрагменті фібрину. Для перевірки припущення за допомогою конкурентного імуноферментного аналізу досліджено реакцію отриманих монАТ з E_3 -фрагментом фібрину, сорбованим на основу, та таким, що знаходиться у розчині (див. *b* на рис. 1). Результати, що представлені на рис. 1, свідчать, що епітоп для монАТ II-5C знаходиться в E_3 -фрагменті фібрину.

Таблиця 1. Значення K_D для реакцій зв'язування монАТ із фібрином desAB

монАТ	K_D (фібрин desAB), моль/л
III-6A	$3,2 \cdot 10^{-9}$
IV-3D(6d)	$8,7 \cdot 10^{-10}$
II-5C	$2,8 \cdot 10^{-9}$
II-4A	$4,6 \cdot 10^{-9}$
IV-3D(5d)	$2,2 \cdot 10^{-9}$
IV-3D(6b)	$7,5 \cdot 10^{-10}$

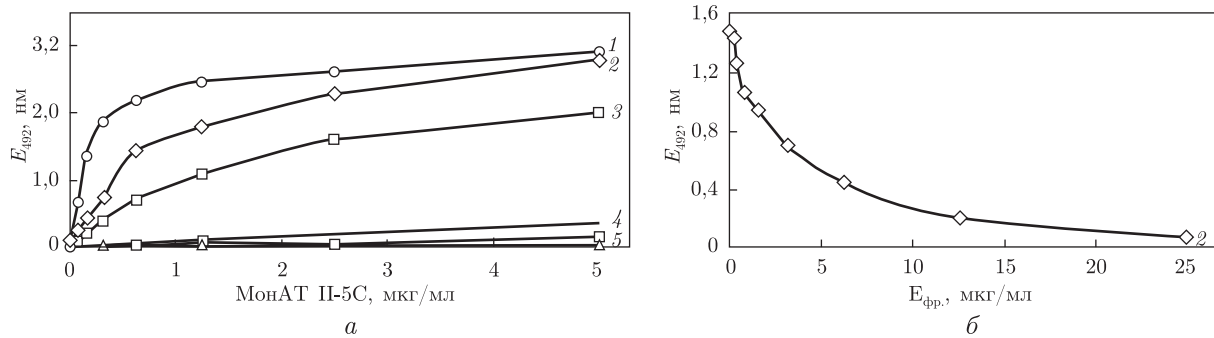


Рис. 1. Імуноферментний аналіз (ELISA) зв'язування: а — монАТ II-5С з іммобілізованими на планшеті різними білками та їх фрагментами [1 — Е₃-фрагмент; 2 — фібрин desAB; 3 — фібриноген; 4 — D-димер; 5 — D-фрагмент]; б — Е₃-фрагмента фібрину, сорбованого на основі, та таким, що знаходиться в розчині з монАТ II-5С

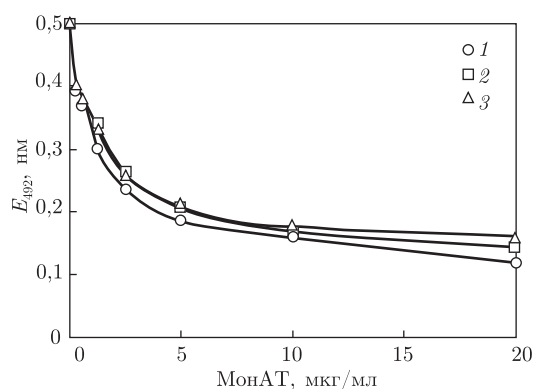


Рис. 2. Конкуренція монАТ III-6А, IV-3D й II-5С з з біотинильованими монАТ II-5С за місце зв'язування на фібрині desAB (т-ІФА):
1 — II-5С; 2 — III-6А; 3 — IV-3D(5d)

Для з'ясування, чи збігаються епітопи отриманих монАТ між собою, було проведено конкурентний імуноферментний аналіз за допомогою т-ІФА. В лунки мікропланшетів з іммобілізованим фібрином desAB вносили по 0,1 мл суміші біотинильованих монАТ II-5С (концентрація 0,4 мкг/мл) з розтитрованими іншими монАТ III-6А, IV-3D або II-5С від 200 до 3,12 мкг/мл. Мікропланшети інкубували впродовж 1 год при температурі +37 °С, потім промивали і подальші маніпуляції проводили аналогічно описаним в публікації [3].

На рис. 2 наведено дані імуноферментного аналізу лише для трьох монАТ, однак й інші отримані монАТ конкурують один з одним за місце зв'язування зі своїм епітопом на фібрині. Отже, для всіх монАТ епітопи збігаються або перекриваються. Дослідження проводились з довільно вибраним клоном II-5С.

Для локалізації епітопу II-5С проводили імуноблот аналіз з ланцюгами фібриногену та Е₃-фрагмента фібрину за методом, наведеним в праці [10]. Результати імуноблот аналізу показали, що монАТ II-5С реагує лише з А α -ланцюгом фібриногену та Е₃-фрагмента (А α 20–78), тобто його епітоп знаходиться в ділянці А α 20–78 [11].

Цікаві дані були отримані при використанні монАТ II-5С як “tag”-антитіла разом з фібрин специфічним “catch”-антитілом I-3С. У цьому випадку реакція монАТ II-5С з мономерним фібрином desAB (у присутності синтетичного пептиду GPRP), зв'язаним з “catch”-ан-

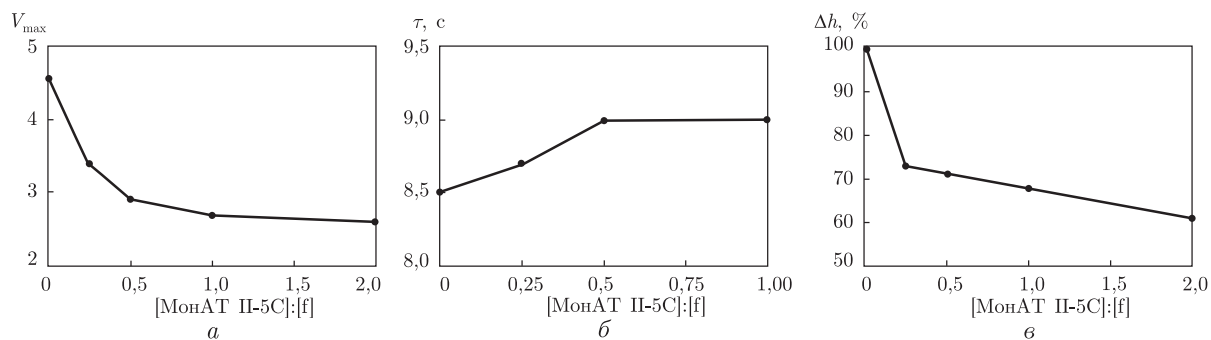


Рис. 3. Залежність максимальної швидкості латеральної асоціації фібрину (а), lag-періоду (б), кінцевої мутності фібринового згустку (в) від молярного співвідношення монАТ II-5С до фібрину (турбідиметричний аналіз)

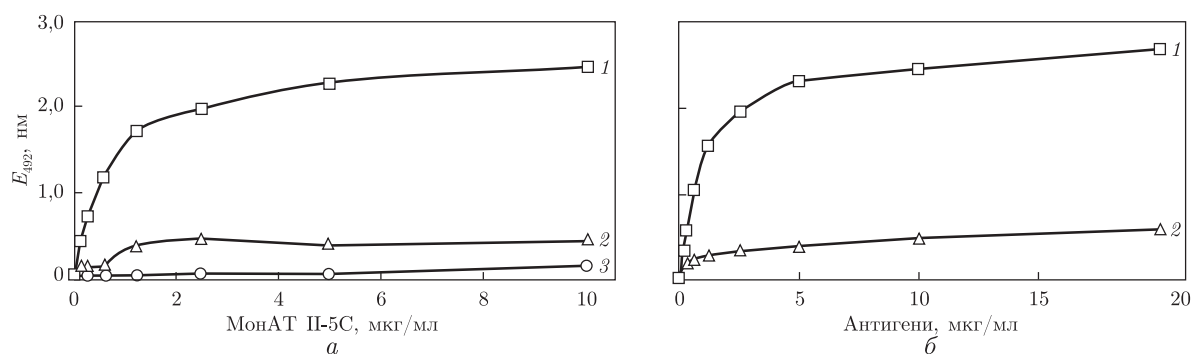


Рис. 4. Зв'язування (DD)Е-комплексу з монАТ II-5С: а — антигени сорбовані: 1 — фібрин desAB; 2 — (DD)Е-комплекс у розчині; 3 — D-димер; б — бісайтовий т-ІФА (“catch”-антитіло — монАТ II-5С, “tag”-II-4d): 1 — фібрин desAB у розчині; 2 — (DD)Е-комплекс у розчині

титілом I-3С, була відсутня. Натомість при використанні монАТ II-5С як “catch”-антитіла, а монАТ I-3С або II-4d як “tag” спостерігалась реакція з фібрином. Було перевірено, чи не конкурують антитіла I-3С й II-5С один з одним за місце зв'язування зі своїм епітопом на молекулі фібрину. Конкуренція була відсутня, якщо фібрин був адсорбований на планшеті. Отже, при зв'язуванні фібрину desAB з монАТ I-3С, епітоп для якого знаходиться у В β 118–134 фібрину [12], певно відбувається структурна перебудова молекули фібрину і ділянка A α 20–78 стає недоступною для монАТ II-5С.

Досліджено вплив монАТ II-5С на процес полімеризації фібрину за допомогою турбідиметричного методу [13]. Встановлено, що отримане монАТ II-5С приблизно вдвічі знижує максимальну швидкість полімеризації фібрину при еквімолярному співвідношенні до білка. При цьому кінцева мутність фібринового згустку зменшувалась у присутності монАТ приблизно на 50%, а lag-період збільшувався приблизно на 30% (рис. 3). Також досліджено інгібуючу дію на полімеризацію фібрину Fab-фрагмента даного монАТ, який становить 1/3 частини його молекули. Fab-фрагмент був отриманий на колонці папаїн-сефароза 4В за раніше описаною методикою [14]. Інгибування процесу полімеризації фібрину монАТ можна пояснити тим, що зв'язування вказаного монАТ/Fab II-5С зі своїм епітопом, який знаходиться в близько розташованій до центра полімеризації “А” (A α 17Gly–18Pro–19Arg) ділянці фібрину A α 20–78, спричинює стеричну перешкоду міжмолекулярній взаємодії “А”–“а”. Також, монАТ II-5С не реагує з ізольованим (DD)Е-комплексом, який є структур-

ною основою утворення полімерного фібрину (рис. 4) [15]. Це свідчить про те, що ділянка фібрину A α 20–78 стає недоступною після зв'язування центрів “А”–”а”.

Таким чином, нами отримано та схарактеризовано монАТ II-5С, епітоп для яких знаходиться в ділянці фібрину A α 20–78. Показано, що взаємодія центрів “А”–”а” при міжмолекулярному зв'язуванні фібрину екранує зону епітопу A α 20–78. Дані монАТ в подальшому можна використовувати для дослідження механізмів структурних перебудов, які відбуваються в процесі перетворення фібриногену в фібрин під дією тромбіну.

1. 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**. – P. 14156–14161.
2. Henschen A., Edman P. Large scale preparation of S-carboxymethylated chains of human fibrin and fibrinogen and the occurrence of α -chain variants // Biochim. Biophys. Acta. – 1972. – **263**, No 2. – P. 351–367.
3. Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ochaniance Z., Goldberg M. E. Measurement of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay // J. Immunol. Meth. – 1985. – **77**, No 2. – P. 305–319.
4. Varetskaya T. V. Microheterogeneity of fibrinogen. Cryofibrinogen // Укр. біохім. журн. – 1960. – **32**. – P. 13–24.
5. Belitser V. A., Varetskaja T. V., Malneva G. V. Fibrinogen-fibrin interaction // Biochim. Biophys. Acta. – 1968. – **154**. – P. 376–380.
6. Medved L. V., Novohatni V. V., Privalov P. L. The preparation and investigation of the structure organization of the active and nonactive form of D fragment of fibrinogen molecule // Mol. Biol. – 1982. – **16**. – P. 1195–1202.
7. Позняк Т. А., Колеснікова І. М., Макогоненко Є. М. та ін. Зміни просторової орієнтації α С-регіонів у молекулі фібриногену під час його трансформації у полімерний фібрин // Доп. НАН України. – 2012. – № 5. – С. 163–169.
8. Marder V. J., Budzynski A. Z., Barlow G. H. Comparison of the physiochemical properties of fragment D derivatives of fibrinogen and fragment DD of cross-linked fibrin // Biochim. Biophys. Acta. – 1976. – **427**. – P. 1–14.
9. Hasan A. K., Chang Won S., Budzynski A. Z. Binding of fibrin fragments to one-chain and two-chain tissue-type plasminogen activator // Blood. – 1992. – **79**, No 9. – P. 2313–2321.
10. Tsang V. C. W., Peralta J. M., Simons A. R. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis // Methods Enzymol. – 1983. – **92**. – P. 377–391.
11. Lottspeich F., Henschen A. Amino acid sequence of human fibrin. Preliminary note on the completion of the N-terminal part of the alpha-chain sequence // Hoppe-Seylers Z. Phys. Chem. – 1978. – **359**, No 11. – P. 1611–1616.
12. 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.
13. Гриценко П. Г., Луговської Е. В., Кошель Т. А. та ін. Вплив каліксарен-метиленбісфосфонових кислот на полімеризацію фібрину // Доп. НАН України. – 2010. – № 1. – С. 175–179.
14. Lugovskoy E. V., Gritsenko P. G., Kapustianenko L. G. et al. Functional role of beta-chain N-terminal fragment in the fibrin polymerization process // FEBS J. – 2007. – **274**, No 17. – P. 4540–4549.
15. Moskowicz K. A., Budzynski A. Z. The (DD)E complex is maintained by a composite fibrin polymerization site // Biochem. – 1994. – **33**, No 44. – P. 12937–12944.

Т. А. Позняк, И. Н. Колесникова, **Л. М. Литвинова**,
О. П. Костюченко, Л. П. Урвант, В. Е. Хаджинова,
член-корреспондент НАН Украины Э. В. Луговской,
академик НАН Украины С. В. Комисаренко

Моноклональные антитела, специфические к E-региону фибрин(оген)а человека

Получены моноклональные антитела (монАТ) класса IgG_{2a}, эпитоп для которых находится в области E₃-фрагмента фибрина A α 20–78. Турбидиметрическим методом анализа установлено, что данные монАТ и их Fab-фрагменты ингибируют процесс полимеризации фибрина. Методом т-ИФА установлено, что эти монАТ реагируют с фибриногеном, фибрином и его E₃-фрагментом, однако не реагируют с (DD)E-комплексом, в котором реализовано взаимодействие центров полимеризации “A”–“a”, что, очевидно, экранирует зону эпитопа A α 20–78.

Т. А. Pozniak, I. N. Kolesnikova, **L. M. Litvinova**,
О. Р. Kostiuchenko, L. P. Urvant, V. E. Khadzhynova,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine E. V. Lugovskoi,
Academician of the NAS of Ukraine S. V. Komisarenko

Monoclonal antibodies specific to the E-region of human fibrin(ogen)

The monoclonal antibodies (mAbs) of IgG_{2a} type have been obtained. The epitope for them is in the E₃ fibrin fragment A α 20–78. The results of turbidity analysis indicate that mAbs and their Fab-fragments inhibit the fibrin polymerization. It has been showed by ELISA that these mAbs react with fibrinogen, fibrin, and its E₃-fragment, but do not react with (DD)E-complex, in which the interaction of polymerization sites “A”–“a” is realized. We suggest that the “A”–“a” binding screens the epitope zone A α 20–78.

Від редакції. У резюме до повідомлення Е. Р. Kostiuchenco, I. N. Kolesnikova, L. M. Litvinova et al. Monoclonal antibodies that recognize new neoantigenic determinant of D-dimer of human fibrin (Доп. НАН України. – 2011. – № 5. – С. 171–175) слід читати Е. Р. Kostiuchenko.