



УДК 577.112.7:612.017.1

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА КАК ИНСТРУМЕНТ  
ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ ФИБРИНА© 2000 г. Э. В. Луговской, С. В. Комисаренко<sup>#</sup>

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, 01601, Киев, ул. Леонтьевича, 9

Поступила в редакцию 26.03.2000 г. Принята к печати 20.06.2000 г.

В обзоре рассмотрены примеры использования мАТ для исследования механизма полимеризации фибриногена. Для рассмотрения выбраны прежде всего те мАТ, эпитопы для которых находятся в центрах полимеризации фибриногена или в сайтах узнавания ферментов – функциональных партнеров фибриногена: тромбина, плазминогена и фактора XIII. Описываются последовательно мАТ к эпитопам, расположенным на разных участках полипептидных цепей А $\alpha$ , В $\beta$  и Г, входящих в состав функционально важных Е-, D- и  $\alpha$ С-доменов фибриногена.

**Ключевые слова:** фибриноген; полимеризация фибриногена; моноклональные антитела.

## ВВЕДЕНИЕ

Гибридомная техника позволяет получать долгоживущие клетки, способные синтезировать и секретировать моноклональные антитела (мАТ), т.е. индивидуальные иммуноглобулины с заданной уникальной специфичностью [1, 2]. Активный центр мАТ (паратоп) против белкового антигена различает на поверхности белка соответствующую антигенную детерминанту (эпитоп), обычно образованную 5–6 а.о. Эти остатки расположены в полипептидной цепи антигена либо последовательно, либо разнесены друг от друга (иногда они находятся даже на разных полипептидных цепях), но пространственно сближены на поверхности белка за счет сил, формирующих его вторичную и третичную структуру [3]. Антитела можно получить против любого участка белка (как экспонированного на поверхности, так и скрытого, но появляющегося в результате денатурации или фрагментирования) или против синтетических пептидов, имитирующих эпитоп. И поскольку паратоп антитела чувствует даже незначительные изменения в конформации эпитопов, мАТ могут быть уникальным инструментом для исследования структуры белков или мультибелковых комплексов. Они также могут служить молекулярными зондами для выявления и локализации различных функционально важных участков белков или для изменения свойств таких участков. Изменения могут происходить за счет формирования стерического препятствия или нарушения конформации соответствующей белковой молекулы при ее взаимодействии с антителами и (или) их фрагментами

и может выражаться в ингибировании биологической активности белка или ее модификации.

Одна из самых важных мультибелковых систем животных – система свертывания крови – очень сложна для исследования. Центральный белок этой системы – фибриноген.

На рисунке представлена схема молекулы фибриногена. Из схемы видно, что макромолекула фибриногена представляет собой димер. Каждая мономерная единица состоит из трех цепей: А $\alpha$ , В $\beta$  и Г, соединенных между собой дисульфидными связями. Мономерные единицы также ковалентно соединены дисульфидными связями. В молекуле фибриногена различают несколько функциональных и структурно-обособленных доменов. Центральный Е-димерен, содержит N-концы всех 6 полипептидных цепей. Периферические D-домены состоят из С-концевых участков В $\beta$  и Г-цепей и включают небольшие участки из середины А $\alpha$ -цепей. Однако две трети А $\alpha$ -цепей, включая и С-концы, формируют  $\alpha$ С-домены, которые находятся вне основного каркаса молекулы фибриногена.  $\alpha$ С-домены взаимодействуют между собой и Е-доменом фибриногена.

Образование фибринового сгустка есть результат спонтанной самосборки молекул мономерного фибриногена, который образуется после действия тромбина на фибриноген, отщепляющего от последнего четыре аминоконцевых фибринопептида – два фибринопептида А (1–16) и два фибринопептида В (1–14). Межмолекулярное связывание мономерного фибриногена, обусловливающее его полимеризацию, определяется взаимодействием активных локусов молекул, которые называются центрами полимеризации.

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: svk@biochem.kiev.ua; тел.: (044) 2245974, (044) 2464394; факс: (044) 2296365.

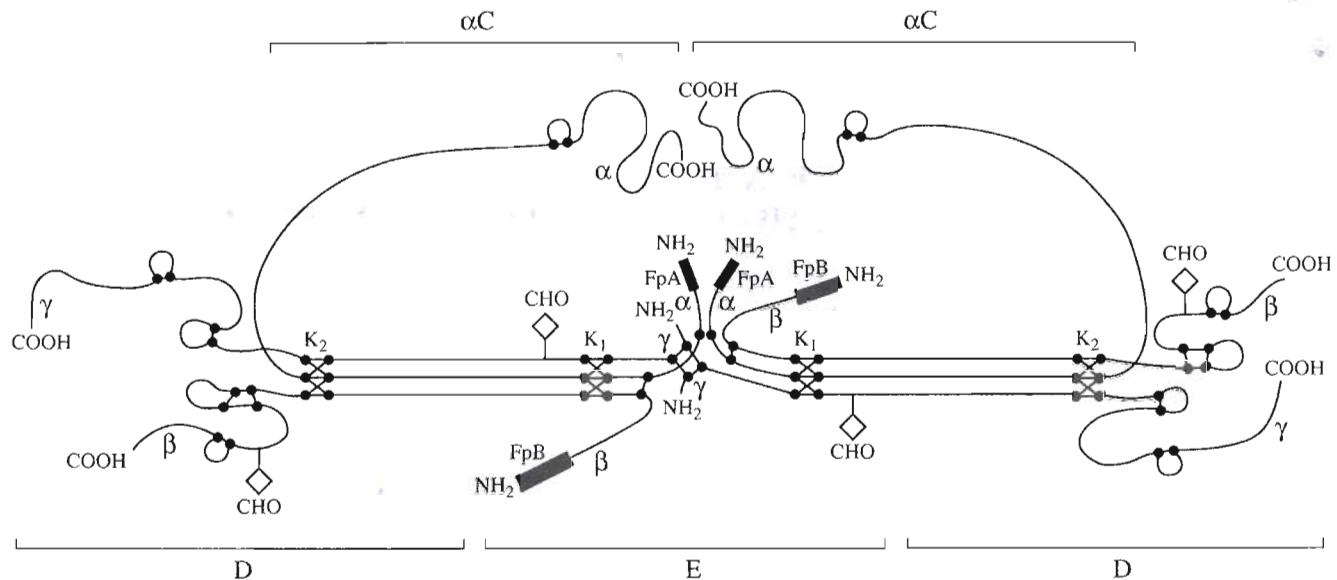


Схема строения молекулы фибриногена. FpA, FpB – отщепляемые фибринопептиды А и В; K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> – дисульфидные узлы; CHO – углеводный фрагмент. Остальные обозначения см. в тексте.

Основная движущая сила полимеризации фибрина – взаимодействие центрального домена Е одной молекулы фибрина с периферическим D-доменом другой молекулы [4–6]. В результате образуется двухнитчатая протофибрилла толщиной в две молекулы, в которой молекулы одной нити сдвинуты наполовину относительно молекул другой нити, а периферические домены D молекул каждой нити находятся в межмолекулярном контакте [7]. При этом центральный домен Е каждой молекулы, принадлежащей одной нити, взаимодействует с двумя контактирующими D-доменами двух молекул другой нити.

При достижении определенной длины протофибриллы ассоциируют латерально с образованием фибрилл и трехмерной сети фибрина [8].

D–E-связывание обеспечивается двумя парами комплементарных центров “А” – “а” и “В” – “б”. Принято считать, что центры “А” и “В” формируются в результате отщепления фибринопептидов от N-концевых участков цепей A $\alpha$  и B $\beta$ . Комплементарные центры “а” и “б” располагаются в D-доменах и не нуждаются в дополнительной активации [9].

Существует информация об участии в полимеризации также и  $\alpha$ C-доменов фибрина [10, 11]. В последнее время благодаря работам группы Р. Дулитла по рентгеноструктурному анализу [12] в D-домене локализованы аминокислотные участки, входящие в центры “а” и “б” и сформировано представление о центрах полимеризации, обеспечивающих межмолекулярное взаимодействие D–D-доменов. Современная информация о центрах полимеризации фибрина и их функциональных назначениях изложена в обзоре М. Мосесона [13].

Первые публикации по исследованию полимеризации фибрина с применением мАТ относятся к 1984 г. [14]. Достаточно быстро выяснилось, что присоединение мАТ к фибрину чаще всего не приводит к нарушению процесса его полимеризации и упаковки в строго упорядоченный фибриновый сгусток. Это наблюдается только для антител, взаимодействующих со специфическими центрами полимеризации фибрина или участками вблизи них, при эквимольном и даже меньшем содержании антител к фибрину в реакционной смеси резко нарушается процесс самосборки белка.

Данный обзор является попыткой описать ряд характерных примеров из литературы, касающихся использования мАТ для получения информации о природе молекулы фибрин(оген)а и механизме его трансформации в фибриновый сгусток, а также собственные экспериментальные данные. Нас особенно интересовали те мАТ, эпитопы для которых находятся в функционально активных участках молекулы фибрина – в домене Е, особенно в N-концевых участках его цепей A $\alpha$  и B $\beta$ , в  $\alpha$ C-домене и в домене D.

## ОБЗОР ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Моноклональные антитела, узнающие эпитопы в Е-домене фибрин(оген)а*

1. Моноклональные антитела, направленные к N-концевому участку A $\alpha$ -цепи фибриногена.

Группой В. Ньювенхьюзена были получены мАТ против фрагмента Y фибриногена (фрагмент Y является промежуточным продуктом плазмино-

вого расщепления фибрин(оген)а, который имеет в своем составе фрагменты D и E). Одного из антител (мАТ-Y18) распознавало эпитоп, состоящий из аминокислотных остатков фибринопептида A. Особенно важным из них оказался  $\text{A}\alpha\text{Arg}16$  [15]. Однако с изолированным пептидом A мАТ-Y18 не реагировали. Они взаимодействовали лишь с фибриногеном и его фрагментами, сохраняющими в своей структуре фибринопептид A. Если исключить по причине малой вероятности тот вариант, что весь эпитоп находится в фибринопептиде A в составе цепи  $\text{A}\alpha$  (а с чистым пептидом A антитела не реагируют из-за появления отрицательного заряда карбоксильной группы C-концевого Arg), то остается предположить, что в состав эпитопа входит и пептидная связь  $\text{A}\alpha\text{Arg}16-\text{Gly}17$ . Эти антитела сильно задерживали свертывание фибриногена тромбином, очевидно, блокируя расщепление тромбином этой пептидной связи и препятствуя отщеплению фибринопептида A.

Группа П. Гэффни [16] использовала в качестве антигена коктейль из трех денатурированных и изолированных цепей фибриногена. Авторы предположили, что в данном случае можно получить мАТ, эпитопы к которым экспонируются при переходе фибриногена в фибрин или при денатурации отдельных цепей и которые будут обладать специфичностью к фибрину без перекрестной реакции с фибриногеном. Предположение оправдалось и были получены два мАТ (12B3.B10 и 12B3.A11) с эпитопами к ним в  $\text{A}\alpha$ -цепи, специфичные только к фибрину, но не к фибриногену.

Ц. Демпл и сотр. [17] получили моноклональные антитела изотипа IgG1 против синтетического гексапептида Gly-Pro-Arg-Val-Val-Glu, конъюгированного с гемоцианином. Этот пептид представляет собой фрагмент 17–22  $\text{A}\alpha$ -цепи фибрина, который становится аминоконцевым и экспонируется после отщепления фибринопептида A тромбином. Эти мАТ были высокоспецифичны к фибрину, причем их сродство к эпитопу сильно возрастало после денатурации фибрина NaSCN или после его нагревания в растворе, содержащем SDS. Если подобным образом обработать плазму крови, то наряду с увеличением сродства этого антитела к своему эпитопу в фибрине, происходит диссоциация растворимых комплексов фибрина с фибриногеном, формирующихся на начальных этапах активации свертывания крови. Такая обработка плазмы позволяет точнее определять количество фибрина в плазме иммуноферментным анализом. Интересно, что другие авторы, используя этот гексапептид, но конъюгированный с альбумином, получили антитела уже IgM-класса, специфичные к фибрину, которые также могли быть использованы для иммунодиагностики растворимого фибрина в плазме крови [18].

М. Матсуда и сотр. [19] получили мАТ IF-43 против фибрина, растворенного в мочевине, которые реагировали со своим антигеном, не реагировали с фибриногеном (обработанным в мочевине или без нее) и не реагировали с фибрин-мономером, растворенным в слабой уксусной кислоте (“кислотный” фибрин-мономер). В то же время эти мАТ IF-43 реагировали с “кислотным” фибрин-мономером после его соединения с фибриногеном с образованием так называемого комплекса растворимого фибрина, в котором две молекулы фибриногена нековалентно соединяются с одной молекулой фибрина. Этот факт доказывает, что при присоединении молекулы “кислотного” мономерного фибрина к фибриногену происходят конформационные перестройки, которые приводят к экспонированию соответствующего эпигоппа. Этот эпигопп (для мАТ IF-43) находится в участке  $\text{A}\alpha(\text{Gly}17-58)$ , входящем в Е-фрагмент.

## 2. Моноклональные антитела, направленные к N-концевому участку $\text{B}\beta$ -цепи фибрин(оген)а.

$\text{B}\beta$ -цепь фибриногена, точнее ее N-концевая часть, оказалась наиболее иммуногенной. Против фрагментов, расположенных в этой области, был получен целый ряд мАТ, интересных как с исследовательской точки зрения, так и для клинической практики.

К. Хью, Э. Хейбер и Г. Матсуэда [20] присоединили к C-концу синтетического гептапептида Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys, который соответствует аминоконцевому пептиду Gly15–21  $\text{B}\beta$ -цепи фибрина, остаток цистеина и полученный восьмичленный пептид конъюгировали с гемоцианином улитки. Используя конъюгат в качестве антигена, они получили мАТ (59D8), специфичное к фибрину без перекрестной реакции с фибриногеном. Интересно, что мАТ 59D8 реагировало не только с мономерным, но и с полимерным фибрином при отсутствии фибриногена *in vitro* и *in vivo*. Это явилось первым указанием на то, что N-концевая аминокислотная последовательность  $\beta$ -цепи фибрина, ранее считавшаяся центром полимеризации “B”, не блокирована комплементарным центром “b” в D-домене другой молекулы фибрина, а остается свободной и сохраняет способность к взаимодействию. Позднее Ф. Чен, Э. Хейбер и Г. Матсуэда [21] с помощью этого и трех других антител показали, что эпигопп для мАТ 59D8 остается доступным на сгустке фибрина на первых стадиях его разрушения плазмином и что этот фрагмент не переходит в раствор прежде, чем солюбилизируется сам сгусток. Таким образом, антифибриновые антитела, такие, как 59D8, могут с успехом применяться для детекции тромба и в качестве векторных молекул для доставки к тромбу активаторов плазминогена.

Однако есть и предостерегающее мнение. Так, в другой работе [22] при исследовании взаимодействия

вия антител с эпитопами на прошитом фактором ХІІІ транспептидными связями фибриновом сгустке было показано, что активность антитела T2G1 к участку  $\beta$ 15–21 фибрина могла падать до 14% в зависимости от степени экспонированности данных эпитопов в фибриновом сгустке, полученном при разных экспериментальных условиях (в данном случае при разной ионной силе). Это весьма существенно, так как мАТ T2G1 проходили клинические испытания в качестве иммуновекторной молекулы для выявления тромбов.

Ц. Чернявский и Дж. Понятовский [23] получили антитела против синтетического пентапептида Ala-Arg-Pro-Ala-Lys, имитирующего аминокислотную последовательность  $\beta$ 43–47 фибриногена. Для этого авторы конъюгиравали этот пептид с альбумином и тиреоглобулином. После иммунизации кроликов объединенными конъюгатами из антисыворотки двухступенчатой аффинной хроматографией – вначале на фибриногене, а затем на пентапептиде, ковалентно связанными с сефарозой 4B, были выделены антитела класса G. Полученные антитела и их Fab-фрагменты оказались сильными ингибиторами полимеризации фибринов. Fab-фрагменты угнетали полимеризацию фибринов на 50% при молярном соотношении Fab/фибрин = 1.5. Авторы считают, что данный участок  $\beta$ -цепи фибринов является одним из центров полимеризации или находится в непосредственной близости от него. В  $N$ -концевом участке  $\beta$ -цепи фибриногена находится триплет  $\beta$ 30–32 с последовательностью Arg-Pro-Ala, которая соответствует триплету  $\beta$ 44–46, входящему в вышеуказанный пентапептид. Мы предполагаем, что  $\beta$ 30–32 также может обладать функциональной активностью, обнаруженной для  $\beta$ 44–46. Интересно, что фрагмент  $\beta$ 31–45 содержит 5 остатков пролина и может быть отнесен к так называемым пролинбогатым участкам, которые, как правило, важны для белок-белкового взаимодействия [24].

Группа В. Ньювенхьюзена [25] после иммунизации мышей смесью продуктов деградации фибринов плазмином получила мАТ FDP14, которые не реагировали с интактным фибриногеном или фибрином, но распознавали неоантigenную детерминанту, которая формируется в участке цепи фибриногена  $\beta$ 54–118 после восстановления S–S-связей фибриногена. Оказалось, что эта неоантигенная детерминанта формируется еще в двух случаях: после расщепления плазмином пептидной связи Lys53–Lys54 в  $\beta$ -цепи фибринов с образованием E-содержащих фрагментов или (с меньшей активностью к АТ) после расщепления бромцианом пептидной связи  $\beta$ Met118–Tyr119 с формированием  $N$ -концевого дисульфидного узла.

Нами были получены три моноклональных антитела против  $N$ -концевых дисульфидных уз-

лов фибриногена и фибринов, эпитопы к которым были расположены во фрагменте 1–53 цепи  $\beta$  [26]. Одно из них, мАТ 2d–2a, находясь в среде полимеризации фибринов desAA (являющегося промежуточной формой фибринов, сохраняющей два фибринопептида  $\beta$ ) или в смеси фибриноген + тромбин, не влияло на образование протофибрилл, но снижало на 60% скорость их латеральной ассоциации. Эпитоп для этих мАТ включал в себя аминокислотные остатки, расположенные вокруг расщепляемой тромбином связи  $\beta$ Arg14–Gly15. При определении с помощью ВЭЖХ количества отщепляемых фибринопептидов  $\beta$  было показано, что одна молекула мАТ 2d–2a присоединяется к одной из двух связей  $\beta$ Arg14–Gly15. Вторая  $\beta$ Arg14–Gly15-связь остается доступной действию тромбина. Два других мАТ, эпитопы для которых расположены во фрагменте  $\beta$ 15–53, не обладали ингибирующими свойствами в отношении полимеризации фибринов: одно из них было полностью инертно, а другое, напротив, обладало ускоряющим полимеризацию действием. Позднее мы показали [27], что Fab-фрагменты мАТ 2d–2a блокируют обе пептидные связи  $\beta$ 14–15 и на 100% останавливают полимеризацию фибринов. Из этих данных был сделан вывод, что один из центров латеральной ассоциации протофибрилл расположен около пептидной связи  $\beta$ Arg14–Gly15. Также возможно, что функционирование этого центра не зависит от отщепления фибринопептида  $\beta$ , однако это требует специальных доказательств.

К. Москович и А. Будзинский с помощью мАТ получили дополнительную информацию о структуре активных центров, локализованных в  $N$ -концевом участке  $\beta$ -цепи фибринов [28]. Моделью послужил комплекс (DD)E, в котором связывание фрагментов DD и E осуществляется, как было показано авторами, специфическими центрами первичной полимеризации. Таким образом, комплекс является структурой, в которой реализованы взаимодействия типа “A” – “a” и “B” – “b”, участвующие в построении протофибриллы. Изучив диссоциацию этого комплекса в присутствии коротких пептидов –  $N$ -концевых фрагментов  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей фибринов, авторы обнаружили, что комплекс распадается только в присутствии пептидов  $\alpha$ 17–19 и  $\beta$ 40–54. Было также показано, что мАТ, полученные против синтетического пептида GPRVV – аналога  $N$ -концевой последовательности аминокислот  $\alpha$ -цепи фибринов, – не реагируют со своим эпиптом в составе комплекса (DD)E. Напротив, мАТ, специфичные к последовательности GHRPL, аналогичной  $N$ -концевому фрагменту  $\beta$ -цепи фибринов, узнают свой эпипт в составе комплекса. Это позволило авторам предположить, что если центр “A” находится, как было показано и ранее, в  $N$ -концевой части  $\alpha$ -цепи фибринов, то центр “B”, вопреки прежним представлениям, расположен не в  $N$ -

концевой части В $\beta$ -цепи фибрлина, амещен в сторону С-конца и локализован в области аминокислотных остатков В $\beta$ 20–49. Эти центры за счет взаимодействия с комплементарными центрами "а" и "б" в домене D вносят вклад в стабилизацию (DD)E-комплекса и принимают участие в первичном акте полимеризации – в построении протофибриллы. Тогда аминокислоты В $\beta$ 15–19, по мнению авторов, участвуют в латеральной агрегации протофибрилл.

**3. Моноклональные антитела, направленные к N-концевому участку  $\gamma$ -цепи фибрин(оген)а.**

С помощью мАТ J88B, эпитоп для которого расположен во фрагменте  $\gamma$ (63–70), было показано, что ионы кальция стабилизируют этот участок фибриногена [29], который чувствителен к действию плазмина, аналогично стабилизации С-концевой области  $\gamma$ -цепи [30–32].

*Моноклональные антитела к различным участкам периферического D-домена фибрин(оген)а*

**1. мАТ к фрагменту А $\alpha$ -цепи, входящему в D-домен.**

Такие антитела, получены В. Ньювенхьюзеном с сотр. к участку А $\alpha$ (148–160). Ранее эти авторы обнаружили, что последовательность аминокислот А $\alpha$ (148–197) имеет большое значение для ускоряющего действия фибрлина на активацию плазминогена тканевым активатором плазминогена [33]. Позднее ими была показана определяющая роль последовательности А $\alpha$ (148–160) и аминокислотного остатка Lys157 в этом процессе [34]. Фибриноген таким ускоряющим свойством не обладал. По предположению авторов, последовательность А $\alpha$ (148–160) находится внутри молекулы фибриногена, но при превращении фибриногена в фибрин экспонируется на поверхности белка. Эту гипотезу авторы блестяще доказали, получив мАТ к синтетическому пептиду А $\alpha$ (148–160), которые реагировали с фибрином и не взаимодействовали с фибриногеном [35].

**2. мАТ к фрагменту В $\beta$ -цепи, входящему в D-домен.**

Семь мАТ были получены против цельной молекулы фибриногена, которые в иммуноблоттинге узнавали восстановленную и алкилированную  $\beta$ -цепь фибриногена. Электронно-микроскопические данные показали, что все 7 мАТ были направлены к дистальному субдомену периферического домена D фибриногена [36]. Интересно, что все они не ингибировали полимеризацию фибрлина, т.е. эпитопы к ним были удалены от центров полимеризации. С помощью одного из антител (F7) было показано, что эпитопы к нему, расположенные в С-концевых участках двух В $\beta$ -цепей фибриногена, находятся в дистальных субфраг-

ментах, равно удаленных от центра молекулы. Более того, эти узелки-субдомены не колinearны с продольной осью молекулы, а расположены по разные стороны от нее, т.е. по принципу двойной симметрии. Учитывая моноклональность антител и димерную природу фибриногена, авторы заключили, что дистальные субдомены двух В $\beta$ -цепей фибриногена расположены так же, как эти эпитопы, т.е. сама молекула фибриногена имеет двойную симметрию.

В нашем отделе получено мАТ III-3b против DD-фрагмента фибрлина. Это антитело реагировало с DD-фрагментом с высокой аффинностью ( $K_D = 1.4 \times 10^{-10}$  М) и не имело перекрестной реакции с фибрин(оген)ом. Эпитоп для мАТ III-3b находится в N-концевой области фрагмента В $\beta$ -цепи, входящей в состав DD-димера, и не зависит от нативной конформации белка. Антитела III-3b могут быть использованы как основа иммунологической тест-системы для определения концентрации DD-димера в плазме крови, которая возрастает у больных с диссеменированным внутрисосудистым свертыванием, эмболиями, атеросклерозом, диабетом и т.д. [37].

**3. мАТ к фрагменту  $\gamma$ -цепи, входящему в состав D-домена.**

Группа В. Ньювенхьюзена нашла, что наряду с фибрином и бромциановым фрагментом фибриногена FCB-2, в состав которого входит функционально активная последовательность А $\alpha$ (148–160) [33], эффектом ускорения активации плазминогена с помощью t-PA (тканевого активатора плазминогена) обладает также FCB-5, который состоит из двух фрагментов  $\gamma$ (311–336) и  $\gamma$ (337–379), связанных между собой дисульфидным мостиком [38]. Авторы обратили внимание на одинаковое распределение зарядов в аминокислотных последовательностях А $\alpha$ (150–158) и  $\gamma$ (315–322), входящих в состав А $\alpha$ (148–160) и  $\gamma$ (311–336)-фрагментов соответственно. Поэтому из двух субфрагментов, составляющих фрагмент FCB-5, функциональная активность, присущая фрагменту А $\alpha$ (148–160), должна была принадлежать и субфрагменту  $\gamma$ (311–336). Были получены мАТ против синтетического пептида  $\gamma$ (312–324), конъюгированного с бычьим сывороточным альбумином. Полученные моноклональные антитела, как и мАТ против А $\alpha$ (148–160), реагировали с фибрином без перекрестной реакции с фибриногеном. Был сделан вывод, что аминокислотная последовательность  $\gamma$ (312–324), как и А $\alpha$ (148–160), также является фибринспецифическим неоэпипотопом, формирующимся при переходе фибриногена в фибрин. В дальнейшем эти данные были использованы для выяснения механизмов межмолекулярного связывания фибрина, плазминогена и тканевого активатора плазминогена [39, 40].

Известна гетерогенность  $\gamma$ -цепей фибриногена человека, обусловленная альтернативным сплайсингом РНК, при котором образуются два вида мРНК, кодирующих  $\gamma$ -цепи с молекулярными массами около 50 кДа ( $\gamma 50$ ) и 57.5 кДа ( $\gamma 57.5$ ). Благодаря посттрансляционной модификации часть цепей  $\gamma 57.5$  превращается в  $\gamma 55$ . С помощью синтетических пептидов были получены моноклональные антитела L2B, эпитоп для которых находился во фрагменте  $\gamma(408-416)$  цепи  $\gamma 57.5$  (или  $\gamma 55$ ) [41]. L2B не оказывало никакого влияния на агрегацию тромбоцитов, активированных ADP, которая наблюдается под влиянием фибриногена или его отдельных цепей  $\gamma 50$  или  $\gamma 57.5$ . Эти данные указывают на то, что последовательность аминокислотных остатков  $\gamma(408-416)$  в удлиненном варианте  $\gamma$ -цепи фибриногена не связывается с фибриногеновым рецептором тромбоцитов. Доступность эпитопа для антитела L2B в прошитом активированным фактором XIII фибрине, содержащем  $\gamma 57.5$  или  $\gamma 55$ , свидетельствует об экспонированности этой части молекулы.

Ряд исследователей затратили большие усилия на получение мАТ, эпитопы для которых находятся в области изопептидных связей, определяющих  $\gamma-\gamma$ -прошивку фибрина фактором XIII, поскольку это давало возможность определять в ИФА концентрацию продуктов плазминового расщепления прошитого фибрина в крови. Однако проблема состояла в том, что поперечную  $\gamma-\gamma$ -прошивку содержит не только конечный продукт фибринолиза – димерный фрагмент DD, но и начальный его продукт высокой молекулярной массы – растворимый поперечно-прошитый полимер X-фрагмента, в котором каждая мономерная молекула представляет собой фибрин, с отщепленными плазмином и  $\alpha$ C-доменами и N-концевыми участками (15–42) В $\beta$ -цепи [42]. При различных заболеваниях соотношения концентраций этих молекулярных образований различны.

П. Гэффни и сотр. были получены мАТ, которые преимущественно реагируют с ранними продуктами плазминовой деградации прошитого фибрина высокой молекулярной массы [43].

В. Мардер и сотр. при использовании мАТ DD/3B6, эпитоп для которых находится около  $\gamma-\gamma$ -изопептидной связи [44], была обнаружена разница в иммунореактивности антител к своему эпитопу в продуктах плазминовой деградации фибрина в зависимости от степени деградации и молекулярного состава гидролизата [45]. Показано, что иммунореактивность в ходе плазминового расщепления прошитого фибрина возрастает практически в 40 раз. Таким образом, DD-димер имел максимальную иммунную активность, а продукты раннего плазминового расщепления прошитого фибрина высокой молекулярной массы – минимальную. Был сделан вывод, что в процессе дегра-

дации увеличивается экспонированность эпитопа, расположенного возле  $\gamma-\gamma$ -изопептидных связей, или изменяется степень его связывания с антителами из-за конформационных изменений фибриновой молекулы в ходе плазминового расщепления прошитого XIII фактором фибрина.

Г. Матсуэда с сотр. получили мАТ 4A5 против конъюгата гемоцианином улитки с двойным пептидом, имитирующим прошитые фактором XIII  $\gamma$ -цепи фибрина [46]. Схема конъюгата приведена ниже:



Оказалось, что эпитоп для мАТ 4A5 расположен в пептиде  $\gamma(402-411)$ . После присоединения к своему эпитопу это антитело препятствовало образованию в фибрине  $\gamma-\gamma$ -димеров под действием фактора XIII<sup>a</sup>, что предотвращало стабилизацию фибрина и приводило к образованию растворимого сгустка. С помощью этого мАТ 4A5 была также показана консервативность фрагмента аминокислотной последовательности, включающей исследуемый эпитоп, у млекопитающих. Антитела 4A5 явились хорошим инструментом для формирования экспериментальной геморрагии [46].

При использовании фибриногена в качестве антигена были получены мАТ, эпитоп для которых находился в D-домене фибрина. Этот эпитоп сохранялся в мономерном D<sub>1</sub>-фрагменте, но исчезал при последовательной его деградации плазмином в отсутствие Ca<sup>2+</sup> с отщеплением C-концевого участка  $\gamma$ -цепи с молекулярной массой 13 кДа [47]. Иммунореактивность исчезала также при  $\gamma-\gamma$ -прошивке фактором XIII, т.е. в DD-димере она полностью отсутствовала. Был сделан вывод, что в C-концевой области  $\gamma$ -цепи фибриногена существует уникальный эпитоп, который теряет способность реагировать с антителом или при изменении своей конформации, связанном с образованием  $\gamma-\gamma$ -изопептидных связей и упрочнением сгустка, или, напротив, с его дальнейшей плазминовой деградацией и потерей C-концевой последовательности  $\gamma$ -цепи.

4. мАТ к конформационно-зависимым эпитопам, расположенным в домене DD.

Группа В. Ньювенхьюзена с сотр. получила мАТ Y22 субкласса G1 против плазминового фрагмента Y фибриногена человека, которые активно реагировали с фибрином и очень слабо – с фибриногеном. Эти мАТ также хорошо реагировали с продуктами деградации фибрин(оген)а, но не реагировали с изолированными его цепями A $\alpha$ , B $\beta$  и  $\gamma$  [48]. Авторами был сделан вывод, что эпитоп для этих мАТ конформационно зависим и находится в D-домене фибрина. Была показана принципиальная возможность применения этих мАТ, меченых изотопами, для мониторинга лечения тромбов тканевым активатором плазминогена. Оказалось

также, что мАТ Y22 и его  $F(ab')_2$ -фрагмент сильно изменяли структуру фибринового сгустка, который при их добавлении в среду полимеризации состоял лишь из коротких и тонких фибрилл. Одновалентный и меньшей массы Fab-фрагмент этого мАТ не обладал антиполимеризационным действием. Авторы считают, что описанный эффект мАТ Y22 или его  $F(ab')_2$ -фрагмента происходит за счет стерического препятствия ассоциации мономерных фибринов. Что касается активации плазминогена с помощью t-pA, которая инициируется фибрином, то Fab-фрагмент мАТ Y22 сильно тормозил активацию,  $F(ab')_2$ -фрагмент обладал слабым ингибирующим эффектом, а сами антитела Y22 были полностью инертны [49].

Интересные результаты получили японский биохимик М. Матсуда с сотр., выделившие мАТ, эпипот для которого представляет собой структуру, зависящую от тонкого конформационного состояния небольшого, но функционально важного фрагмента молекулы фибриногена. Это мАТ, обозначенное IF-1, различало конформацию  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего участка D-домена фибриногена. Это мАТ, обозначенное IF-1, различало конформацию  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего участка D-домена фибриногена [50]. Давно было показано, что присутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  стабилизирует молекулу фибриногена и предотвращает отщепление плазмином субфрагмента массой 13 кДа от C-концевого участка  $\gamma$ -цепи [30–32]. Оказалось, что мАТ IF-1 реагирует с фибриногеном в растворе в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  или таких двухвалентных катионов, как  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ , но не реагирует в присутствии  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ .

Если принять во внимание данные Р. Дулитла с сотр., показавших на основании данных рентгеноструктурного анализа, что в C-концевых последовательностях  $\text{B}\beta$ - и  $\gamma$ -цепей, входящих в D-домены фибриногена, находятся  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие конформационно-зависимые центры, включающие  $\text{B}\beta\text{Asp}381$ ,  $\text{B}\beta\text{Asp}383$ ,  $\text{B}\beta\text{Trp}385$  и  $\gamma\text{Asp}318$ ,  $\gamma\text{Asp}320$ ,  $\gamma\text{Phe}322$  соответственно [51], то можно сделать следующее предположение: эпипот для мАТ IF-1 находится в области  $\text{B}\beta(379–409)$  или  $\gamma(316–341)$ , которые относят к  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим центрам. МАТ IF-1 были также успешно использованы для выделения лабильного дефектного фибриногена из плазмы крови с помощью иммуноаффинной хроматографии. Для этого фибриноген или его D1-фрагмент сорбировали на иммобилизованных мАТ IF-1 в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ , а затем элюировались с помощью EDTA.

В нашем отделе были получены два мАТ II-4d и II-3b против DD-фрагмента фибриногена, которые в эквимолярном отношении к фибрину тормозили его полимеризацию на 100 и 60% соответственно [37]. Эпипоты в молекуле фибриногена для этих антител конформационно-зависимы и находятся в субфрагменте D46, который выщепляется из D-фрагмента плазмином и включает N-концевые участки его A $\alpha$ -, B $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей [52]. Поскольку

МАТ II-4d и II-3b и их  $F(ab)$ -фрагменты являются высокоспецифическими ингибиторами полимеризации фибриногена, а распознаваемые ими эпипоты в D-домене фибриногена пространственно удалены от известных центров полимеризации [51], то можно предположить, что эпипоты этих антител находятся вблизи или совпадают с неизвестными ранее сайтами полимеризации фибриногена.

### *Моноклональные антитела, направленные к $\alpha$ C-домену фибриногена*

Ц. Черняевский и А. Будзинский получили три моноклональных антитела 9C3, 7B1 и 9E9 против нативного фибриногена человека [53]. Антитела реагировали лишь с C-концевым доменом A $\alpha$ -цепи. Фрагментация этой цепи с последующим извлечением соответствующих пептидов с помощью антител, иммобилизованных на сефарозе 4B, позволила локализовать эпипоты для этих мАТ в участках  $\alpha(240–268)$ ,  $\alpha(425–440)$  и  $\alpha(541–574)$  соответственно. Все три мАТ сильно ингибировали полимеризацию фибриногена. Уменьшение скорости полимеризации фибриногена на 50% происходило при молярном соотношении IgG/фибрин = 0.1. Экстраполяция к полному 100% ингибирированию давало значение молярного соотношения IgG/фибрин = 0.2. Авторы считали, что одна молекула антитела присоединяется к пяти молекулам мономерного фибриногена. Поскольку протофибрилл состоит из двух нитей линейных олигомеров фибриногена, то в присутствии данных антител образуется протофибрилл, состоящая из 10 мономерных единиц с двумя молекулами IgG по обоим концам. Авторы делают вывод, что такие структуры быстро образуются в процессе полимеризации и что C-концевые участки  $\alpha$ -цепей фибриногена играют важную роль в процессе полимеризации фибриногена, вероятнее всего, на стадии латеральной ассоциации протофибрилла.

Г. Самохин, О. Миткевич и сотр. получили мАТ 5A2, которое узнавало фрагмент A $\alpha$ 529–539 фибриногена и ингибировало  $\alpha$ - $\alpha$ -прошивку фибриногена фактором XIII [54], очевидно потому, что A $\alpha$ Lys539 участвует в изопептидной прошивке этого типа. Поскольку плазминовый гидролиз фибриногена начинается с отщепления  $\alpha$ C-домена, то данные мАТ могут применяться не только в исследовательских целях, но и для определения интактности фибриногена.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, моноклональные антитела явились эффективными молекулярными зондами для исследования структуры молекул фибриногена и фибриногена, а также для изучения механизма превращения фибриногена в фибриновый сгусток. Последнее оказалось возможным потому, что моле-

кулы IgG и (или) их Fab-фрагменты способны присоединяться к фибрину без нарушения тонкой структуры сгустка. Ингибиование полимеризации фибрина происходит чаще всего в том случае, когда антитело связывается с соответствующим эпитопом, находящимся вблизи сайта полимеризации или в самом сайте.

Описанный метод молекулярного зондирования с помощью мАТ дает информацию, которую порой невозможно получить другими способами. Метод особенно полезен при исследовании поверхностной структуры белков. В частности, при изучении степени экспонированности отдельных фрагментов в исходной белковой молекуле или конформационных переходов в ней. Например, оказалось возможным выявление неоантигенных детерминант при многостадийной трансформации фибриногена в фибрин.

Этот метод может также дополнять или подтверждать информацию, полученную биохимическими методами. Так, ранее было показано, что C-концевой участок  $\gamma$ -цепи D-домена в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  находится в особой стабильной конформации, не отщепляется от фибрина плазмином и отщепляется в отсутствие этого иона [30–32]. Эти данные были подтверждены с помощью мАТ, которые узнавали эту стабилизированную кальцием конформацию и не реагировали с D-доменом в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [50].

Однако в некоторых случаях интерпретация полученных результатов затруднена. Например, есть данные, когда мАТ (обычно IgG) тормозят полимеризацию фибрина, а их Fab-фрагменты – нет [48]. Тем не менее анализ данных позволяет сделать выбор между пространственной помехой за счет большей величины ингактной молекулы мАТ и блокировкой специфического центра.

Отметим, что во многих случаях моноклональные антитела, с помощью которых была получена информация о структуре молекулы или о ее функциональных сайтах, с успехом используются и в практических целях, например, в иммунодиагностике, для аффинной хроматографии или в качестве иммуновекторных молекул, но этот раздел не был целью данного обзора.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kochler G., Milstein C. // Nature. 1975. V. 256. P. 495–497.
2. Lerner B.H. // Yale J. Biol. Med. 1981. V. 54. P. 387–402.
3. Komisarenko S.V. // Chemistry of Peptides and Proteins / Eds W. Voelter, E. Bayer, Y. Ovchinnikov, V. Ivanov. Berlin-N.Y.: Walter de Gruyter and Co., 1986. P. 235–247.
4. Kudryk B., Reuterby J., Blomback B. // Thromb. Res. 1973. V. 2. P. 297–303.
5. Mattias F.R., Heele D.L., Konradi E. // Thromb. Res. 1973. V. 3. P. 657–664.
6. Kudryk B.J., Collen D., Woods K.R., Blomback B. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. P. 3322–3325.
7. Fowler W.E., Hantgan R.R., Hermans J., Erickson H.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 4872–4876.
8. Hantgan R., McDonagh J., Hermans J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1983. V. 403. P. 344–366.
9. Olexa S.A., Budzynski A.Z. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 1374–1378.
10. Медведь Л.В., Горкун О.В., Маняков В.Ф., Белицер В.А. // Молекул. биология. 1986. Т. 20. С. 1515–1523.
11. Veklich Y.I., Gorkun O.V., Medved L.V., Weisel J.W. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 6986–6997.
12. Spraggan G., Everse S.J., Doolittle R.F. // Nature. 1997. V. 389. P. 455–462.
13. Mosesson M.W. // Blood Coagul. Fibrinolysis. 1997. V. 8. P. 257–267.
14. Wisloff F., Michaelsen T.E., Godal H.L. // Thromb. Res. 1984. V. 35. P. 81–90.
15. Koppert P.W., Huijsmans C.M.G., Nieuwenhuizen W. // Blood. 1985. V. 66. P. 503–507.
16. Tymkewycz P.M., Creighton Kempsford L.J., Gaffney P.J. // Blood Coagul. Fibrinolysis. 1993. V. 4. P. 211–221.
17. Dempfle C.E., Dollman M., Lill H., Puzzovio D., Desauver A., Heene D.L. // Blood Coagul. Fibrinolysis. 1993. V. 4. P. 79–86.
18. Sheefers-Borchel U., Muller-Berghaus G., Eberle P.F., Heimburger P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 7091–7095.
19. Soe G., Kohno I., Inuzuka K., Itoh Y., Matsuda M. // Blood. 1996. V. 88. P. 2109–2117.
20. Hui K.Y., Haber E., Matsueda G.R. // Science. 1983. V. 222. P. 1129–1132.
21. Chen F., Haber E., Matsueda G.R. // Thromb. Haemostas. 1992. V. 67. P. 335–340.
22. Procyk R., Kudryk B., Callender S., Blomback B. // Blood. 1991. V. 77. P. 1469–1475.
23. Cierniewski C.S., Poniatowski J. // Acta Biochimica Polonica. 1990. V. 37. P. 31–37.
24. Williamson M.P. // Biochem. J. 1994. V. 297. P. 249–260.
25. Keppet P.W., Koopman J., Havercate F., Nieuwenhuizen W. // Blood. 1986. V. 68. P. 437–441.
26. Lugovskoi E.V., Makogonenko E.M., Chudnovets V.S., Derzskaja S.G., Gogolinskaja G.K., Kolesnikova I.N., Bukhanevich A.M., Sitak N., Liashko E.D., Komisarenko S.V. // Biomed. Sci. 1991. V. 2. P. 249–256.
27. Lugovskoi E.V., Makogonenko E.M., Chudnovets V.S., Derzskaja S.G., Gogolinskaja G.K., Kolesnikova I.N., Mihalovska I.I., Komisarenko S.V. // Ukr. Biochim. Zhurn. 1995. V. 1. P. 64–71.
28. Moskowitz K.A., Budzynski A.Z. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 12937–12944.
29. Odrljin T.M., Rybarczyk B.J., Francis C.W., Lawrence S.O., Hamaguchi M., Simpson-Haidars P.J. // Biochim. Biophys. Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology. 1996. V. 1298. P. 69–77.

30. Belitser V.A., Varetska T.V., Tolstykh V.M., Tsaryuk L.A., Pozdnyakova T.M. // Thromb. Res. 1975. V. 7. P. 797–806.
31. Purves L.R., Lindsey G.G., Brown G., Franks J. // Thromb. Res. 1978. V. 12. P. 473–484.
32. Haverkate F., Nieuwenhuizen W. // Protides Biol. Fluids. 1980. V. 28. P. 321–324.
33. Nieuwenhuizen W., Vermond A., Voskuilen M., Traas D.W., Verheijen J.H. // Biochim. Biophys. Acta. 1983. V. 748. P. 86–92.
34. Voskuilen M., Vermond A., Veeneman G.H., van Boom J.H., Klassen E.A., Zegers N.D., Nieuwenhuizen W. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 5944–5946.
35. Schielen W.J., Voskuilen M., Tesser G.I., Nieuwenhuizen W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 8951–8954.
36. Mendez J.A., Alvares M.V., Aznares J.A., Gonzales-Rodriges J. // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 634–637.
37. Lugovskoi E.V., Kolesnikova I.N., Komisarenko C.V., Gaffney P.J., Cederholm-Williams S.A., Nieuwenhuizen W. // Abstract of XVth Intern. Fibrinogen Workshop, № 76. Cleveland; OH USA, 1998.
38. Schielen W.J., Adams H., van Leuven K., Voskuilen M., Tesser G.I., Nieuwenhuizen W. // Blood. 1991. V. 77. P. 2169–2173.
39. Bosma P.J., Rijken D.C., Nieuwenhuizen W. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 172. P. 399–404.
40. Yonekawa O., Voskuilen M., Nieuwenhuizen W. // Biochem. J. 1992. V. 283. P. 187–191.
41. Haidars P.J., Peercqche E.I.B., Marder V.J., Francis C.W. // Blood. 1989. V. 74. P. 2437–2444.
42. Francis C.W., Marder V.J., Barlow G.H. // J. Clin. Invest. 1980. V. 66. P. 1033–1043.
43. Gaffney P.J., Creighton L.J., Perry M.J., Callus M., Thorpe R., Spitz M. // Br. J. Haematol. 1988. V. 68. P. 83–90.
44. Rylatt D.B., Blake A.S., Cottis L.E. et al. // Thromb. Res. 1983. V. 31. P. 767–778.
45. Brenner B., Francis C.W., Marder V.J. // J. Labor. Clin. Medic. 1989. V. 6. P. 682–688.
46. Taubenfeld S.M., Yeqing Song, DeQuan Sheng, Ball E.L., Matsueda G.R. // Thromb. Haemostas. 1995. V. 74. P. 923–927.
47. Wilner G.D., Mudd M.S., Kun-hwa Hsien, Thomas D.W. // Biochemistry. 1982. V. 21. P. 2687–2692.
48. Wasser M.N.J.M., Pauwels E.K.J., Nieuwenhuizen W. // Thromb. Res. 1990. Supplement X. P. 91–104.
49. Nieuwenhuizen W., Voskuilen M., Hermans J. // Biochim. Biophys. Acta. 1982. V. 707. P. 190–192.
50. Takebe M., Soe G., Kohno I., Matsuda M. // Thromb. Haemostas. 1995. V. 73. P. 662–667.
51. Everse S.J., Spraggan G., Veerapandian L., Riley M., Doolittle R.F. // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 8637–8642.
52. Furlan M., Kemp G., Beck E. // Biochim. Biophys. Acta. 1975. V. 400. P. 95–111.
53. Cierniewski C.S., Budzynski A.Z. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 4248–4253.
54. Mitkevich O.V., Sobel J.H., Shainoff J.R., Vlasik T.N., Kalantarov G.F., Trakht I.N., Streletsova Z.A., Samokhin G.P. // Blood Coagul. Fibrinolysis. 1996. V. 7. P. 85–92.

## The Use of Monoclonal Antibodies for Studying the Fibrin Polymerization

E. V. Lugovskoi and S. V. Komisarenko<sup>#</sup>

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Leontovicha 9, Kiev, 01601 Ukraine

Examples of using monoclonal antibodies (MAb) for studying the fibrin polymerization mechanism are considered. MAb with epitopes situated in the fibrin polymerization sites or in the recognition sites of enzymes thrombin, plasminogen, and factor XIII, which are the functional partners of fibrin, are primarily discussed. The MAb to epitopes in various regions of  $\alpha$  $\alpha$ ,  $\beta$  $\beta$ , and  $\gamma$  polypeptide chains of the functionally important E, D, and  $\alpha$ C domains of fibrin are successively described.

**Key words:** fibrinogen, fibrin polymerization, monoclonal antibodies

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; e-mail: svk@biochem.kiev.ua; phone: (044) 224-5974, (044) 246-4394; fax: (044) 229-6365.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 12. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.