

اثر آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد پلاسمینوژن انسانی بر فعال شدن گلو- پلاسمینوژن انسانی به وسیله فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن

چکیده

محمد اکرمی^۱

دکتر منوچهر میرشاهی^{۱*}

دکتر خسرو خواجه^۱

دکتر حسین نادری منش^۱

۱. گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

زمینه و هدف: پلاسمینوژن انسانی یک گلیکوپروتئین پلاسمایی است که به طور عمده در کبد سنتز می‌شود. فعال شدن پلاسمینوژن به پلاسمین، توسط فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن یکی از رویدادهای کلیدی سامانه فیبرینولیتیک انسان است. در این مطالعه ما اثرات دو آنتی‌بادی منوکلونال ضد پلاسمینوژن انسانی، A1D12 و MC2B8 را بر فعال شدن گلو- پلاسمینوژن در حضور فعال‌کننده‌های نوع بافتی (t-PA) و نوع ادراری پلاسمینوژن (u-PA) و همچنین استرپتوکیناز بررسی نمودیم.

روش بررسی: تولید آنتی‌بادی‌های دو رگه به وسیله ادغام سلول‌های طحال موش BALB/C ایمونیزه شده با گلو- پلاسمینوژن انسانی با سلول‌های میلومای NS1، طبق روش Kohler و Milstein انجام شد. فعال شدن پلاسمینوژن با اندازه‌گیری تولید پلاسمین با استفاده از سوبسترای رنگزای S-2251 سنجش شد. پس از آن اثر آنتی‌بادی‌های منوکلونال، A1D12 و MC2B8، بر فعال شدن پلاسمینوژن در محلول ارزیابی گردید. سرعت‌های اولیه و شاخص‌های کینتیکی فعال شدن پلاسمینوژن در حضور آنتی‌بادی‌های منوکلونال نیز محاسبه گردید. اثر آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 بر سرعت هیدرولیز پلاسمین سنجش شد. همچنین اثر بخش $F(ab')_2$ آنتی‌بادی A1D12 بر فعال شدن پلاسمینوژن انسانی به وسیله u-PA با اثر آنتی‌بادی کامل بر این واکنش مقایسه شد.

یافته‌ها: آزمون ELISA نشان داد که آنتی‌بادی‌ها به خوبی با آنتی‌ژن واکنش پذیری دارند. آنتی‌بادی A1D12 سرعت ماکزیمم (V_{max}) فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله هر یک از سه فعال‌کننده را افزایش و آنتی‌بادی MC2B8 آن را کاهش داد. در تمامی واکنش‌های فعال شدن، مقدار K_m فعال شدن پلاسمینوژن در حضور آنتی‌بادی A1D12 تغییر چندانی نکرد در حالی که آنتی‌بادی MC2B8 مقدار K_m فعال شدن به وسیله u-PA، t-PA و ابسته به منومر فیبرین و استرپتوکیناز را کاهش داد. آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 اثر قابل ملاحظه‌ای بر سرعت هیدرولیز سوبسترای سنتزی S-2251 توسط پلاسمین نداشت. سرعت فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله

u-PA در حضور غلظت‌های پایین‌تری از بخش $F(ab)_2$ آنتی‌بادی A1D12 برابر با آنتی‌بادی کامل است.

نتیجه‌گیری: اتصال آنتی‌بادی A1D12 از ناحیه $F(ab)$ خود به گلو-پلاسمینوژن، کارایی کاتالیتیکی فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن را افزایش می‌دهد. بنابراین به لحاظ کلینیکی به کارگیری آنتی‌بادی A1D12 برای درمان رویدادهای انسدادی عروق نظیر سکته قلبی، با انسانی نمودن بخش $F(ab)$ آنتی‌بادی A1D12 ممکن است مفید باشد. الگوی مهار آنتی‌بادی MC2B8، با اتصال احتمالی به جایگاه برش گلوتامین-پلاسمینوژن یا نزدیک آن، از نوع مهار آنزیمی چندگانه می‌باشد.

کلمات کلیدی: پلاسمین (پلاسمینوژن)، آنتی‌بادی منوکلونال موشی، فعال‌کننده پلاسمینوژن نوع بافتی، فعال‌کننده نوع ادراری پلاسمینوژن، استرپتوکیناز

*نشانی: صندوق پستی ۱۷۵-۱۴۱۱۵، تلفن:

۸۸۰۹۷۳۱

پست الکترونیک: mirshahi@modares.ac.ir

مقدمه

بخش کاتالیتیکی سرین پروتئینازی انتهای کربوکسیلی می‌باشد [۱]. مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان داده‌اند که گلو-پلاسمینوژن دارای شکل فضایی بسته و ساختاری فشرده می‌باشد که در اثر بر همکنش PAP با دنباله‌های کرینگلی حاصل شده است [۷-۹]. دومین انتهای آمینی PAP احتمالاً برای تنظیم تغییر شکل فضایی و ویژگی‌های فعال فرم گلو-پلاسمینوژن لازم است [۷، ۱۰، ۱۱]. با رها شدن PAP از گلو-پلاسمینوژن به وسیله عمل برشی پلاسمین، فرم لیز-پلاسمینوژن با شکل فضایی گسترده ایجاد می‌شود که بهتر توسط فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن فعال می‌شود [۱۰، ۱۱]. کرینگل‌ها در ساختار خود دارای جایگاه‌های اتصال لیزین به نام Lysine Binding Site (LBS) می‌باشند که در اتصال اختصاصی پلاسمینوژن به فیبرین، سطوح سلولی و اتصال پلاسمین به مهارکننده پلاسمایی خود به نام آلفا-دو-آنتی‌پلاسمین^۴ نقش دارند [۱]. فعال شدن پلاسمینوژن و

پلاسمینوژن انسانی یک گلیکوپروتئین تک زنجیره‌ای با ۷۹۱ اسید آمینه و وزن ملکولی ۹۲ کیلو دالتون می‌باشد [۱، ۲]. این پیش‌آنزیم سرین پروتئازی به طور عمده در کبد سنتز می‌شود و به صورت غیر فعال در جریان خون به گردش در می‌آید [۱، ۳]. چندین فرم پلاسمینوژن در پلازما مشخص شده‌اند [۴]. فرم طبیعی پلاسمینوژن پلاسمایی دارای گلوتامیک اسید در بخش انتهای آمینی خود بوده و گلو-پلاسمینوژن^۱ نام دارد. دیگر اشکال پلاسمینوژن که طی برش کاتالیتیکی پلاسمینوژن توسط پلاسمین ایجاد می‌شوند و اغلب دارای اسید آمینه لیزین در قسمت انتهای آمینی می‌باشند، لیز-پلاسمینوژن^۲ نام دارند [۵، ۶]. گلو-پلاسمینوژن متشکل از یک پپتید انتهای آمینی به نام Preactivation peptide (PAP) و به دنبال آن ۵ ساختار مشابه به نام دنباله‌های کرینگل^۳ و

1 - Glu-plasminogen

2 - Lys-plasminogen

3 - Kringle domains

4 - α_2 -Antiplasmin

روش بررسی

پروتیین‌ها و معرف‌ها

گلو- پلاسمینوژن انسانی و رپتیلاز^۳ از شرکت stago ، t-PA با نام تجاری Actylase از شرکت Boehringer، اوروکیناز (u-PA) با نام تجاری Actosolv از شرکت Boehringer، استرپتوکیناز با نام تجاری Kabikinase از شرکت Kabi و پلاسمین و سویسترای سنتزی (H-D- S-2251) (Val-Leu-Lys-p-nitroanilide) از شرکت Chromogenix خریداری شد.

منومر فیبرین با انعقاد فیبرینوژن به وسیله آنزیم رپتیلاز به دست آمد. پس از لخته شدن، لخته‌ها به دقت شسته شده و در اوره ۴ مولار حل شد. سپس غلظت منومر فیبرین با اندازه‌گیری جذب آن در ۲۸۲ نانومتر تعیین شد. برای تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال، طبق روش Milstein و Kohler ، سلول‌های طحال موش BALB/C ایمونیزه شده با گلو- پلاسمینوژن با سلول‌های میلوما NSI ادغام شد. محلول رویی سلول‌های هیبریدوما به روش ELISA، به وسیله پلیت‌های پوشیده شده با گلو- پلاسمینوژن و شناسایی ایمونوگلوبین‌ها با استفاده از آنتی‌بادی ثانویه ضد ایمونوگلوبین موشی که با پراکسیداز تریپچه^۴ نشان‌دار شده بود، غربال شد. پس از تکثیر و تزریق سلول‌های هیبریدوما تولید کننده آنتی‌بادی‌های منوکلونال به درون موشی که با پرستان تیمار شده بود، آنتی‌بادی‌های مایع صفاقی موش‌های BALB/C با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی ستون پروتیین G، تخلیص شدند. آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 با توجه به ویژگی مهارکنندگی بالای آن بر فعال شدن پلاسمینوژن طی القای یک فعال کننده پلاسمینوژن، از یک پانل حاوی ۳۹ آنتی‌بادی منوکلونال انتخاب شد. آنتی‌بادی منوکلونال A1D12 از قبل با توجه به

تبدیل آن به پلاسمین، یکی از رویدادهای کلیدی سامانه فیبرینولیز است [۱۲]. دو نوع فعال کننده فیزیولوژیک در خون مشخص شده‌اند: فعال کننده نوع بافتی^۱ (t-PA) و فعال کننده نوع اداری پلاسمینوژن^۲ (u-PA). این دو نوع فعال کننده، سرین پروتئازهای شبه تریپسینی هستند که با برش پیوند Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² موجب فعال شدن پلاسمینوژن می‌شوند، با این تفاوت که فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله t-PA توسط کوفاکتور فیبرین تسهیل می‌شود اما u-PA برای فعال نمودن پلاسمینوژن مستقل از کوفاکتور فیبرین عمل می‌کند [۱۳]. نوعی فعال کننده پلاسمینوژن با منشاء خارجی به نام استرپتوکیناز از گونه‌های مختلف باکتری‌های استرپتوکوک بتا-همولیتیک تولید می‌شود که به طور غیر مستقیم پلاسمینوژن را فعال می‌کند [۱۴، ۱۵]. به عبارت دیگر استرپتوکیناز به خودی خود آنزیم نمی‌باشد بلکه با تشکیل کمپلکس ۱:۱ با پلاسمینوژن و پلاسمین و اعمال تغییر شکل فضایی، ویژگی قابل ملاحظه‌ای را برای فعال نمودن دیگر ملکول‌های پلاسمینوژن کسب می‌کند [۱۶-۱۹]. به علت اهمیت سیستم فیبرینولیز در انحلال لخته، امروزه این فعال کننده‌های پلاسمینوژن به صورت دارو در درمان ترومبولیتیک بیماری‌های انسداد عروقی نظیر سکته قلبی اهمیت به سزایی دارند [۱۴، ۲۰-۲۲]. از آنتی‌بادی‌های منوکلونال نیز به عنوان ابزاری کارآمد در درمان بیماری‌ها، از جمله بیماری‌های انسداد عروقی استفاده شده است [۲۳-۲۵]. در این مطالعه، ما اثرات دو آنتی‌بادی منوکلونال ضد پلاسمینوژن انسانی را بر فعال شدن گلو- پلاسمینوژن به وسیله فعال کننده‌ها بررسی می‌کنیم.

3 - Reptilase
4 - Horseradish peroxidase

1 - Tissue type plasminogen activator
2 - Type plasminogen activator urokinase

میلی گرم در میلی لیتر سوبسترای O- OPD (Phenylenediamine) حل شده در بافر سیترات/فسفات با PH برابر با ۵، محتوی ۰/۶ درصد آب اکسیژنه به آنها اضافه شد. ظهور رنگ که معرف میزان اتصال است پس از توقف واکنش با اسید سولفوریک ۲ طبیعی با اندازه گیری جذب در ۴۹۲ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر ELISA Reader (Anthos 2020) تعیین شد.

فعال شدن پلاسمینوزن و آزمون های سیتیک فعال شدن

پلاسمینوزن در محلول

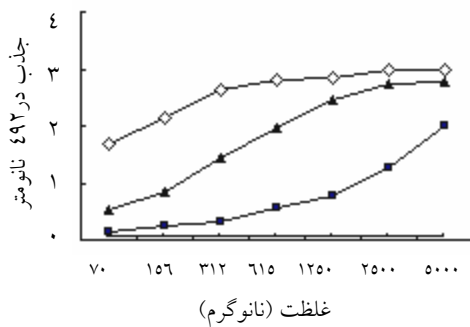
فعال شدن پلاسمینوزن (عاری از پلاسمین) با اندازه گیری پلاسمین تولید شده با استفاده از سوبسترای سنتزی S-2251 سنجش شد و پس از آن اثر هر آنتی بادی منوکلونال بر فعال شدن پلاسمینوزن مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در حجم های یکسان (۱۲۵ میکرولیتر) و در حضور و غیاب آنتی بادی ها انجام شد. ابتدا گلو- پلاسمینوزن انسانی (غلظت نهایی ۵ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت ۱ ساعت با هر یک از آنتی بادی ها (غلظت نهایی ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر) مجاور گردید. سپس سوبسترای S-2251 اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه مجاور شد. برای شروع واکنش فعال سازی در آزمون های جداگانه، u-PA (غلظت نهایی ۴۰ واحد)، استرپتوکیناز (غلظت نهایی ۱۵ واحد) و t-PA (غلظت نهایی ۲۵ نانوگرم در میلی لیتر) در حضور منومر فیبرین (غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) به مخلوط واکنش اضافه شد. افزایش جذب در ۴۰۵ نانومتر طی زمان به علت هیدرولیز سوبسترا توسط پلاسمین تولیدی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ELISA Reader اندازه گیری شد. سرعت اولیه در مرحله پایا اندازه گیری شده و مقادیر پارامترهای V_{max} و K_m فعال شدن پلاسمینوزن از روی نمودار Linweaver-Burk و با استفاده از معادله معکوس Michaelis-Menten (معادله ۱)، محاسبه گردید:

اثرات بالقوه آن بر انحلال لخته فیبرین با القای یک فعال کننده پلاسمینوزن انتخاب شده بود [۱۱]. یک آنتی بادی غیر مرتبط^۱ نیز برای آزمون های کنترل استفاده شد. غلظت پروتیین ها به روش آزمون برادفورد^۲ تعیین شد. قسمت $F(ab')_2$ آنتی بادی منوکلونال A1D12 از طریق هضم با پاپاین حاصل شد. برای تعیین شرایط خلوص آنتی بادی ها، الکتروفورز SDS-PAGE ژل پلی اکریل آمید ۷٪ در شرایط احیایی و غیر احیایی انجام شد.

آزمون ELISA^۳

این آزمون به منظور بررسی فعالیت بیولوژیکی آنتی بادی های منوکلونال ضد پلاسمینوزن انسانی از لحاظ اتصال به گلو- پلاسمینوزن انجام شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر گلو- پلاسمینوزن با غلظت ۲ میکروگرم در میلی لیتر (pH برابر با ۷/۴) به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق بر روی پلیت های ۹۶ خانه ای پوشیده شد. سپس آنتی بادی های منوکلونال A1D12, MC2B8 و قسمت $F(ab')_2$ آنتی بادی منوکلونال A1D12 (غلظت نهایی ۷۰ نانوگرم تا ۵ میکروگرم در میلی لیتر) رقیق شده در محلول محتوی ۰/۰۵ درصد Tween20، ۱ درصد آلبومین سرم گاوی (BSA) در ردیف های جداگانه و در شرایط PH برابر با ۷/۴ به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با گلو- پلاسمینوزن پوشیده شده روی پلیت ۹۶ خانه ای مجاور انکوباسیون شدند. پس از ۳ بار شستشوی پلیت ها برای جلوگیری از اتصال غیر اختصاصی، چاهک ها با محلول BSA یک درصد به مدت ۲ ساعت بلوکه شدند. پس از شستشوی مجدد پلیت، رقت ۱ به ۲۰۰۰ آنتی بادی نشان دار ثانویه به چاهک ها افزوده شده و پس از ۱/۵ ساعت مجاورت، پلیت به دقت شسته شد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵

1 - Irrelevant
2 - Bradford assay
3 - Enzyme linked Immunosorbent assay



نمودار ۱ - منحنی بررسی فعالیت بیولوژیکی آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد پلاسمینوژن انسانی به روش آزمون ELISA، آنتی‌بادی ALD12 (◇)، آنتی‌بادی MC2B8 (▲)، بخش ۲ F(ab) آنتی‌بادی AID ۱۲ (■) و آنتی‌بادی نامربوط (●). هر نقطه میانگین سه بار تکرار آزمون است.

آنتی‌بادی MC2B8 نیز اتصال خوبی با گلو- پلاسمینوژن دارد در حالی که در حضور آنتی‌بادی کنترل غیرمرتبط، اتصالی مشاهده نشد (نمودار ۱).

روی هم رفته این نتایج نشانگر آن است که آنتی‌بادی‌های مورد آزمایش و بخش ۲ F(ab) آنتی‌بادی AID12 به اپی‌توپ خود که روی ملکول پلاسمینوژن می‌باشد، متصل می‌شوند و از فعالیت بیولوژیکی مناسبی برخوردارند.

اثر آنتی‌بادی‌های منوکلونال بر فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن مختلف

اثر آنتی‌بادی‌های مورد مطالعه بر فعال شدن پلاسمینوژن در یک سیستم آزمون مشابه بررسی شد. طبق منحنی پیشرفت واکنش^۱ فعال شدن گلو- پلاسمینوژن به وسیله u-PA در نمودار ۲، در حضور آنتی‌بادی AID12 فاز تأخیری واکنش، قبل از ظهور فعالیت قابل سنجش، اندکی کاهش و در حضور آنتی‌بادی MC2B8 این مرحله اندکی افزایش یافت. سرعت اولیه فعال شدن

$$\frac{1}{v} = \frac{V_{max}}{K_M} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{K_M}$$

معادله ۱: K_{cat} بر اساس معادله ۲ محاسبه شد: معادله ۲:

$$V_{max} = k_{cat} \times E_0$$

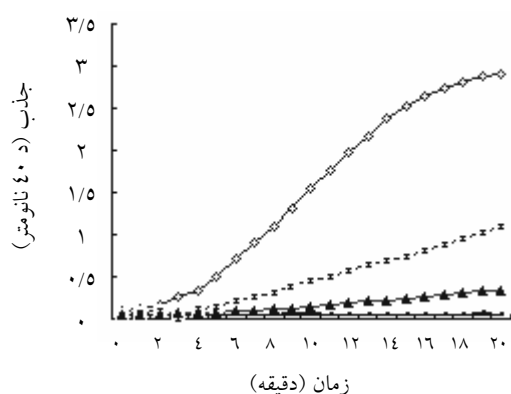
آزمون پلاسمین

به منظور تفسیر بهتر سازوکار عمل آنتی‌بادی MC2B8، اثر این آنتی‌بادی بر سرعت هیدرولیز پلاسمینی سوسترای S-2251 سنجش شد. در این آزمون ابتدا ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر پلاسمین با هر یک از این آنتی‌بادی‌ها به غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر مجاور شد. سپس سوسترای S-2251 افزوده شده و سرعت اولیه محاسبه گردید. لازم به ذکر است هر یک از آزمون‌ها ۳ بار تکرار شده و میانگین نتایج با بهره‌برداری از رایانه و نرم‌افزار Microsoft Excel به صورت نمودار با سطح اطمینان بالای ۹۰٪ ارایه شد.

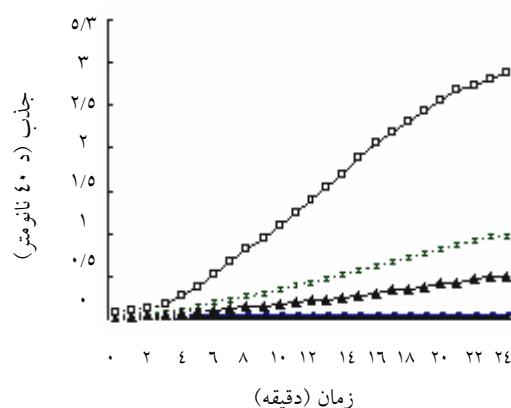
یافته‌ها

طبق نتایج الکتروفورز SDS-PAGE، آنتی‌بادی‌های منوکلونال تخلیص شده با ستون پروتیین G دارای خلوص بالایی بودند (نتایج نشان داده نشده است). پس از تخلیص آنتی‌بادی‌ها، آزمون ELISA برای تعیین واکنش‌پذیری آنتی‌بادی‌ها با گلو- پلاسمینوژن تحت شرایط ثابت نشان داد که آنتی‌بادی منوکلونال AID12 قوی‌تر از سایر آنتی‌بادی‌ها به گلو- پلاسمینوژن متصل می‌شود اما بخش ۲ F(ab) آنتی‌بادی AID12 ضعیف‌تر از بقیه متصل می‌شود.

1 -)Progress curve(



نمودار ۳- منحنی پیشرفت واکنش فعال شدن پلاسمینوژن انسانی به وسیله استرپتوکیناز در حضور آنتی‌بادی‌های متوکلونال A1D12 (◇)، آنتی‌بادی MC2B8 (▲)، عدم حضور آنتی‌بادی (*)، عدم حضور پلاسمینوژن (--) و عدم حضور استرپتوکیناز (-). هر نقطه میانگین سه بار تکرار آزمون است.



نمودار ۲- منحنی پیشرفت واکنش فعال شدن پلاسمینوژن انسانی به وسیله u-PA در حضور آنتی‌بادی‌های متوکلونال A1D12 (◇)، آنتی‌بادی MC2B8 (▲)، عدم حضور آنتی‌بادی (*)، عدم حضور پلاسمینوژن (-)، عدم حضور u-PA (--). هر نقطه میانگین سه بار تکرار آزمون است.

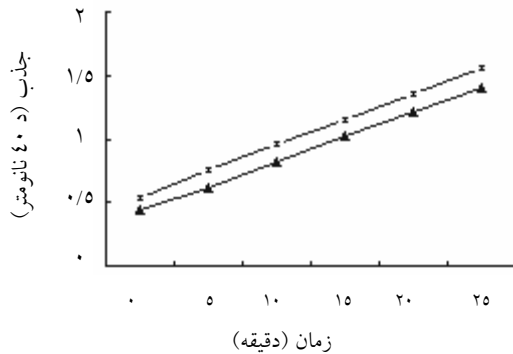
طبق نمودار ۳ و جدول ۱، همانند قبل، آنتی‌بادی A1D12 فاز تأخیری واکنش را کاهش و آنتی‌بادی MC2B8 آن را افزایش داد. در آزمون مقایسه‌ای انجام شده معلوم شد که سرعت اولیه فعال شدن گلو- پلاسمینوژن در حضور آنتی‌بادی A1D12 در غلظت ۱ میلی‌مولار سوستر، ۳/۴ برابر افزایش و در حضور آنتی‌بادی MC2B8 به میزان ۳/۲ برابر کاهش می‌یابد. در حضور فعال‌کننده استرپتوکیناز، آنتی‌بادی A1D12 بر میزان تمایل آنزیم به سوستر تقریباً اثری ندارد اما آنتی‌بادی MC2B8 این تمایل را ۲/۲ برابر کاهش می‌دهد. همچنین سرعت ماکزیمم فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله استرپتوکیناز در حضور آنتی‌بادی A1D12، ۳/۶ برابر افزایش و در حضور آنتی‌بادی MC2B8، ۲/۶۵ برابر کاهش می‌یابد. قابلیت اثر آنتی‌بادی‌های مورد مطالعه بر فعال شدن پلاسمینوژن انسانی به وسیله فعال‌کننده t-PA وابسته به منومر فیبرین در شرایط حضور و غیاب آنتی‌بادی‌ها نیز مورد سنجش قرار گرفت.

پلاسمینوژن به وسیله u-PA در حضور آنتی‌بادی A1D12 در غلظت ۱ میلی‌مولار سوستر، تقریباً ۳/۵ برابر افزایش و در حضور آنتی‌بادی MC2B8، ۲/۲ برابر کاهش یافت.

بر اساس داده‌های جدول ۱، آنتی‌بادی A1D12 میزان سرعت ماکزیمم (V_{max}) فعال شدن پلاسمینوژن توسط u-PA را حدود ۳ برابر افزایش و آنتی‌بادی MC2B8 این مقدار را به میزان ۱/۳ برابر کاهش داد. مقدار K_M (معرف تمایل آنزیم به سوستر) در این نوع واکنش در حضور آنتی‌بادی A1D12 نسبت به شرایط عدم حضور آنتی‌بادی تغییر چندانی نکرد اما این مقدار در حضور آنتی‌بادی MC2B8، ۲/۳ برابر کاهش یافت.

در دوره دوم این آزمایش‌ها، اثر آنتی‌بادی‌های مورد مطالعه بر فعال شدن گلو- پلاسمینوژن انسانی به وسیله فعال‌کننده استرپتوکیناز بررسی گردید.

اثر آنتی‌بادی مهاری MC2B8 بر سرعت هیدرولیز پلاسمین برای تفسیر بهتر سازوکار عمل آنتی‌بادی مهاری MC2B8، اثر این آنتی‌بادی بر فعالیت هیدرولیزی پلاسمین مورد سنجش قرار گرفت. در حضور آنتی‌بادی MC2B8 تفاوت چندانی در سرعت هیدرولیزی پلاسمین مشاهده نگردید.



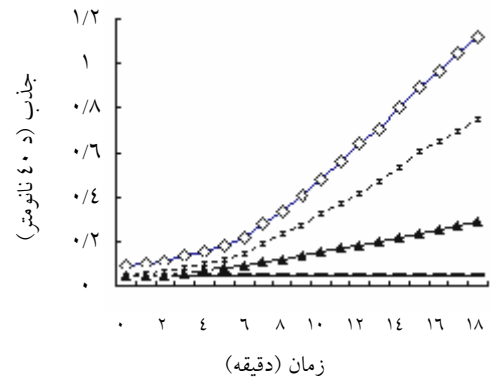
نمودار ۵- نمودار خطی اثر آنتی‌بادی‌های متوکلونال MC2B8 (▲) بر فعالیت هیدرولیزی پلاسمین. عدم حضور آنتی‌بادی (*). هر نقطه میانگین سه بار تکرار آزمون است.

مقایسه اثر ۲ F(ab')₂ آنتی‌بادی AID12 با آنتی‌بادی کامل AID12

آزمون مقایسه‌ای اثر ۲ F(ab')₂ آنتی‌بادی AID12 با آنتی‌بادی کامل نشان داد که ۲ F(ab')₂ در غلظت پایین‌تری از آنتی‌بادی AID12 (۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) دارای همان اثر بر سرعت فعال شدن پلاسمینوژن توسط t-PA می‌باشد (اطلاعات نشان داده نشده است).

بحث

اثرات متفاوت آنتی‌بادی‌های منوکلونال مورد مطالعه در حضور یک نوع فعال‌کننده مربوط به سازوکارهای مختلف



نمودار ۴- منحنی پیشرفت واکنش فعال شدن پلاسمینوژن انسانی به وسیله t-PA وابسته به متومرفیبرین در حضور آنتی‌بادی‌های متوکلونال AID12 (◇)، آنتی‌بادی MC2B8 (▲)، شرایط عدم حضور آنتی‌بادی (*). عدم حضور پلاسمینوژن (-). هر نقطه میانگین سه بار تکرار آزمون است.

منحنی پیشرفت واکنش فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله این فعال‌کننده (نمودار ۴) به همراه داده‌های جدول ۱ نشان می‌دهد که سرعت اولیه فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله t-PA در حضور آنتی‌بادی AID12، ۱/۵ برابر افزایش و در حضور آنتی‌بادی MC2B8، ۳/۲ برابر کاهش می‌یابد. در حضور این فعال‌کننده نیز آنتی‌بادی AID12 بر تمایل آنزیم به سوبسترا اثری ندارد در حالی که آنتی‌بادی MC2B8 مقدار آن را ۱/۳ برابر کاهش می‌دهد. سرعت ماکزیمم فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله t-PA در حضور آنتی‌بادی AID12 و در غلظت ۱ میلی‌مولار سوبسترا، ۱/۶ برابر افزایش و در حضور آنتی‌بادی MC2B8 به میزان ۲/۸ برابر کاهش می‌یابد.

لازم به ذکر است که فعال شدن گلو-پلاسمینوژن به وسیله هر کدام از فعال‌کننده‌ها در حضور آنتی‌بادی غیرمرتبط مشابه شرایط عدم حضور آنتی‌بادی بود. نمودارهای ۲، ۳ و ۴ نشان می‌دهند که پلاسمینوژن و فعال‌کننده‌های آن، هیچ‌کدام به تنهایی بر هیدرولیز سوبسترای S-2251 تأثیر ندارند.

فعال شدن گلو-پلاسمینوژن می‌باشد. این احتمال وجود دارد که عمل مهار به صورت تغییر شکل فضایی صورت گیرد. البته نتایج ما این فرضیه را نیز رد نمی‌کند که ممکن است آنتی‌بادی MC2B8 با جلوگیری از تشکیل کمپلکس بین فعال کننده (t-PA, u-PA) و استرپتوکیناز و گلو-پلاسمینوژن، موجب مهار فعال شدن پیش‌آنزیم پلاسمینوژن شود. در حال حاضر اطلاعات بیشتری برای تفسیر سازوکار بهتر و تعیین اپی‌توپ دقیق آنتی‌بادی MC2B8 بر ملکول پلاسمینوژن وجود ندارد. برای رسیدن به این هدف، مطالعه واکنش پذیری آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 با بخش‌های مختلف گلو-پلاسمینوژن و بررسی اثر این آنتی‌بادی روی بر همکنش بین پلاسمینوژن و فیبرینوژن (همان‌گونه که برای آنتی‌بادی منوکلونال A1D12 انجام شده است) و مطالعه اثر آن بر فعال شدن مینی-پلاسمینوژن¹ لازم است.

کارایی کاتالیتیکی فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله فعال کننده‌های t-PA, u-PA و استرپتوکیناز در حضور یک نوع آنتی‌بادی با هم متفاوت است. این تفاوت به نوع فعال کننده و سازوکارهای مختلف عمل این فعال کننده‌ها نسبت داده می‌شود. به عنوان مثال کارایی کاتالیتیکی فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله t-PA وابسته به منومر فیبرین در حضور آنتی‌بادی A1D12، از فعال شدن پلاسمینوژن توسط فعال کننده‌های u-PA و استرپتوکیناز کمتر است. علت این تفاوت آن است که آنتی‌بادی A1D12 اثرات بالقوه خود را با اعمال تغییر شکل فضایی در ملکول پلاسمینوژن ظاهر می‌کند. بنابراین به دلیل آن که در واکنش فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله t-PA، منومر فیبرین از طریق باقیمانده‌های لیزین به گلوتامین-پلاسمینوژن متصل می‌شود و شکل فضایی آن را بازتر می‌کند، اثرات بالقوه آنتی‌بادی A1D12 از طریق اعمال تغییر شکل فضایی محدود می‌شود. این داده‌ها، نتایج حاصله از مطالعه اثر آنتی‌بادی منوکلونال A1D12 بر لیز لخته

این آنتی‌بادی‌هاست. بر اساس مقادیر V_{max} و K_M به دست آمده، الگوی مهار آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 بر فعال شدن پلاسمینوژن به وسیله t-PA, u-PA و استرپتوکیناز، به علت کاهش تمایل آنزیم به سوبسترا و کاهش سرعت ماکزیمم، از نوع مهار چندگانه می‌باشد. آنتی‌بادی A1D12 به علت عدم تغییر قابل ملاحظه در میزان تمایل آنزیم به سوبسترا و افزایش دادن سرعت ماکزیمم فعال شدن پلاسمینوژن توسط فعال کننده‌ها و در نتیجه افزایش کارایی کاتالیتیکی (k_{cat}/K_M) آنزیم به عنوان یک آنتی‌بادی منوکلونال فعال کننده محسوب می‌شود.

ما قبلاً نشان داده بودیم که آنتی‌بادی A1D12، اپی‌تویی را در ناحیه توالی اسیدآمینه‌ای Arg⁶⁸-Lys⁷⁷ انتهای آمینی گلو-پلاسمینوژن می‌شناسد [۱۱]. براساس نتایج مطالعه حاضر و مطالعات قبلی ما در ارتباط با آنتی‌بادی A1D12، می‌توان گفت که این آنتی‌بادی با اتصال به اپی‌توپ خود به دنبال القای تغییر شکل فضایی در ملکول پلاسمینوژن، منجر به جدایی بر هم کنش داخل ملکولی بین PAP و دومین Kringle4/Proteinase گلو-پلاسمینوژن شده و آرایش فضایی این ملکول را باز می‌نماید. در نتیجه با شکل‌گیری ملکول شبه لیز-پلاسمینوژن، جایگاه‌های اتصال لیزین بهتر در دسترس فعال کننده‌ها قرار گرفته و در نهایت کارایی کاتالیتیکی فعال شدن پلاسمینوژن توسط فعال کننده‌های u-PA, t-PA و استرپتوکیناز در حضور این آنتی‌بادی افزایش می‌یابد.

آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 به نحو مؤثری هر سه واکنش فعال سازی گلو-پلاسمینوژن توسط فعال کننده‌ها را مهار می‌کند اما اثر قابل ملاحظه‌ای بر سرعت هیدرولیز پلاسمین ندارد. این اثرات آنتی‌بادی MC2B8 بسیار شبیه نتایج حاصل از مطالعه آنتی‌بادی α -PG96 می‌باشد که آقای Church در سال ۱۹۹۱ به مطالعه آن پرداخت [۲۶]. از سازوکارهای احتمالی آنتی‌بادی MC2B8، اتصال این آنتی‌بادی به جایگاه برش آنزیم Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶²، یا نزدیک به آن و در نتیجه مهار

1 - Mini-plasminogen

جدول ۱- شاخص‌های کیتیکی فعال شدن پلاسمینوژن انسانی به وسیله فعال کننده‌های پلاسمینوژن در حضور آنتی‌بادی‌های منوکلونال									
آنتی‌بادی MC2B8			آنتی‌بادی A1D12			عدم حضور آنتی‌بادی			فعال کننده
t-PA	استرپتوکیناز	u-PA	t-PA	استرپتوکیناز	u-PA	t-PA	استرپتوکیناز	u-PA	
421±21	762±38	1283±66	338±16	354±17	563±28	325±16	342±17	552±27	K_M (μM)
0.6±0.2	0.9±0.3	1.48±0.5	3.1±1.5	8.65±3.4	6±2.4	1.9±0.7	2.4±0.9	1.94±0.7	V_{\max} ($\mu\text{M}/\text{min} \times 10^{-3}$)
1/18±0.5	1/62±0.8	2/6±1.4	5/6±2.8	15/5±7.7	10/9±5.4	3/42±1.7	4/3±0.2	3/49±1.7	k_{cat} ($\text{s}^{-1} \times 10^{-2}$)
2/8	2/1	2	16/5	44	19/3	10	12/5	6/3	$\frac{k_{cat}}{K_M}$ ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1} \times 10^{-5}$)

سبک تهیه شده و در درمان بیماری سکتة قلبی استفاده می‌شوند [۲۴، ۲۵].

پلاسمایی به وسیله t-PA توسط میرشاهی و همکاران در سال ۱۹۹۷ را تأیید می‌کند [۱۱].

به علت اهمیت سیستم فیبرینولیز در فرایند رگ‌زایی^۱، ممکن است آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 در مهار رگ‌زایی نقش بسزایی داشته باشد. در صورت تعیین دقیق اپی‌توپ آنتی‌بادی MC2B8، ممکن است این آنتی‌بادی به عنوان ابزاری کارآمد جهت تشخیص توالی خاصی از پلاسمینوژن که در فرایند رگ‌زایی درگیر است، سودمند باشد.

نتایج حاصل از آزمایش مقایسه اثر بخش $F(ab')_2$ آنتی‌بادی A1D12 بر فعال شدن گلو- پلاسمینوژن به وسیله u-PA با آنتی‌بادی کامل A1D12 بیانگر آن است که بخش $F(ab')_2$ آنتی‌بادی، عامل اصلی و ضروری در القای تغییرات خواص فعال گلو- پلاسمینوژن انسانی است. پیشنهاد می‌شود که با توجه به اثرات بالای آنتی‌بادی منوکلونال A1D12 بر سرعت فعال شدن گلو- پلاسمینوژن انسانی که فرم پلاسمایی پلاسمینوژن نیز می‌باشد، با انسانی کردن بخش $F(ab')_2$ این آنتی‌بادی، بتوان از آن به عنوان دارویی در درمان بیماری‌های انسداد عروقی نظیر سکتة قلبی استفاده نمود، همان گونه که داروهایی بنام Abciximab و Pexelizumab نیز به همین

1 - Angiogenesis

The effect of anti-human plasminogen monoclonal antibodies on Glu-plasminogen activation by plasminogen activators

M. Akrami,¹
M. Mirshahi,^{1*}
K. Khajeh¹
H. Naderimanesh¹

1. Department of Biochemistry,
Faculty of Basic Sciences, Tarbiat
Modarres University, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background: Human plasminogen is a plasma glycoprotein synthesized mainly in the liver. Conversion of plasminogen to plasmin by plasminogen activators is a key event in the fibrinolytic system. In this study, we investigated the effects of two anti-human plasminogen monoclonal antibodies, A1D12 and MC2B8 on Glu-plasminogen activation in presence of u-PA, t-PA and streptokinase.

Methods: Producing of Hybridoma antibodies was performed by fusion of spleen cells from BALB/C mice immunized with Glu-plasminogen and NS1 myeloma cells. Antibody binding to Human Glu-plasminogen was assessed using an ELISA assay. Activation of plasminogen was determined by measuring plasmin generation using the chromogenic substrate S-2251 and the effect of monoclonal antibodies, A1D12 and MC2B8 on plasminogen activation in solution was then evaluated. Initial rates and kinetic parameters of plasminogen activation in the presence of monoclonal antibodies were calculated. The effect of the monoclonal antibody MC2B8 on the rate of plasmin hydrolysis was measured. The effect of F(ab')₂ fragment of A1D12 on u-PA catalyzed-plasminogen activation also compared with the effect of the whole antibody in this reaction.

Results: ELISA assay showed that the antibodies reacted well with antigens. A1D12 increased the maximum velocity (V_{max}) of plasminogen activation by each of the three plasminogen activators and MC2B8 decreased it. In all activation reactions, the K_M value of plasminogen activation did not significantly change in the presence of antibody A1D12 whereas antibody MC2B8 increased the K_M value of plasminogen activation by u-PA, fibrin monomer dependent t-PA and streptokinase. Monoclonal antibody MC2B8 had no significant effect on plasmin hydrolysis rate of synthetic substrate S-2251. Activation rate of plasminogen by u-PA in the lower concentration of F (ab)₂ fragment of A1D12 was identical to activation in the presence of the whole antibody.

Conclusion: The binding of the A1D12 F(ab) region to Glu-plasminogen increases the catalytic efficiency of plasminogen activation by plasminogen activators. Therefore, it may be useful to apply clinically A1D12 for the therapy of thromboembolic events such as myocardial infarction by humanizing the F(ab) fragment of the A1D12 antibody. Inhibition pattern of antibody MC2B8 obey the mixed type of enzyme inhibition by binding the antibody probably at, or near, the cleavage site of Glu-plasminogen.

Keywords: Plasmin (ogen), Mouse monoclonal antibody, Tissue type plasminogen activator, Urokinase type plasminogen activator, Streptokinase

* Po Box: 14115-175, Tel:+98(21) 88809730,
Email: mirshahi@modares.ac.ir

References

- Collen D, Lijnen H R. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991; 78: 3114-3124.
- Forsgren M, Raden B, Israelsson M, Larsson K, Heden L. Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen. *Federation of Europ Biochem Soci Letters* 1987; 213: 254.
- Raum D, Marcus D, Alper C A, Levey R, Taylor P D, Starzl T E. Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* 1980; 208: 1036-1037.
- Nieuwenhuizen W, Traas DW, A rapid and simple method for the separation of four molecular forms of human plasminogen. *Thromb Haemostasis* 1989; 61: 208-219.
- Wallen P, Wiman B. Characterization of human plasminogen. I. On the relationship between different molecular forms of plasminogen demonstrated in plasma and found in purified preparation. *Biochim Biophys Acta* 1970; 221: 20.
- Wallen P, Wiman B. Characterization of human plasminogen. II. Separation and partial characterization of different molecular forms of human plasminogen. *Biochim Biophys Acta* 1972; 257: 122.
- Ponting CP, Holland SK, Cederholm-Williams SA, Marshall JM, Brawn AJ, Spragon G, Blake CCF. The compact domain conformation of human Glu-plasminogen in solution. *Biochem Biophys Acta* 1992; 1159:155-161.
- Marshall JM, Brown AJ, Ponting CP. Conformational studies of human plasminogen and plasminogen fragments: evidence for a novel third conformation of plasminogen. *Biochemistry* 1994; 33: 3599-3606.
- Mangel WF, Lin BH, Ramakrishnan V. Characterization of an extremely large, ligand-induced conformational change in plasminogen. *Science* 1990; 248:69-73.
- Horrevoets AJG, Smilde AE, Frendenburgh JC, Pannekoek H, Nesheim ME. The activation-resistant conformation of recombinant human plasminogen is stabilized by basic residues in the amino terminal hinge region. *J Biol Chem* 1995; 270:15770-15776.
- Mirshahi M, Soria J, Lijnen H.R, Fleury V, Bertrand O, Drouet L, et al. A monoclonal antibody directed against an epitope in the NH₂-terminal region of native human plasminogen induces a modification of its functional properties. *Fibrinolysis and Proteolysis* 1997; 11: 155-163.
- Parry M A A, Zhang X C, Bode W. Molecular mechanisms of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues. *Trends in Biochem Scien* 2000; 25:53-59.
- Irigoyena J.P, Mun˜oz-Ca˜novesb P, Koziczaka L.M.M, Nagaminea Y. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cellul and Molecul Life Sciences* 1999; 56:104-132.
- Banerjee A, Chisti Y, Banerjee U.C. Streptokinase_ a clinically useful thrombolytic agent. *Biotechnol advan* 2004; 22:287-307.
- Lähteenmäki K, Kuusela P, Korhonen T.K. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMES Microbiol Reviews* 2001; 25: 531-552.
- Reddy K.N.N, Markus G. Mechanism of Activation of Human Plasminogen by Streptokinase: Presence of active center in streptokinase- plasminogen complex. *The Journal of Biological Chemistry* 1972; 247: 1683-1691.
- Wang S, Reed G.L, Hedstrom L. Zymogen activation in the streptokinase-plasminogen complex: Ile1 is required for the formation of a functional active site. *Eur J Biochem* 2000; 267: 3994-4001.
- Young K.C, Shi G.U, Wu D.H, Chang L.C, Chang B.I, Ou C.P, Wu H.L. Plasminogen Activation by Streptokinase via a Unique Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:3110-3116.
- Boxrud P.D, Verhamme I.M.A, Fay W.P, Bock P.E. Streptokinase Triggers Conformational Activation of Plasminogen through Specific Interactions of the Amino-terminal Sequence and Stabilizes the Active Zymogen Conformation. *The J of Biolog Chemis* 2001; 276, 26084-26089.
- Bell W. Therapeutic agents—pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Rev Cardiovasc Med* 2002; 3(suppl 2): 34-44.
- Ouriel K. Safety and efficacy of the various thrombolytic agents. *Rev Cardiovasc Med* 2002; 3(suppl 2): 17-24.
- Verstraete M. Third-generation thrombolytic drugs. *Am J Med* 2000; 109: 52-58.
- Waldmann TA: Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science* 1991; 252: 1657.
- Granger C.B, Mahaffey K.W, Weaver W.D, et al. Pexelizumab, an Anti-C5 Complement Antibody, as Adjunctive Therapy to Primary Percutaneous Coronary Intervention in Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2003; 108: 1184-1190.
- Muhlestein JB, Karagounis LA, Treeha S, Anderson GL. 'Rescue' utilization of abciximab for the dissolution of coronary thrombus developing as a complication of coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1979; 30: 1729-34.
- Church W.R, Meesier T.L. Inhibition of plasminogen activation by monoclonal antibodies to kringle 5-B chain segment of human plasminogen. *Hybridoma* 1991; 10: 659-671.