
ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

АНТИГЕННЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ТИРЕОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

© 2008 г. В.Б. Климович, А.А. Пиневиц, И.Я. Руденко,
О.А. Шашкова

*ФГУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий
(РНЦ РХТ) Росмедтехнологий, Санкт-Петербург, Россия*

Поступила: 03.12.07 г. Принята: 18.12.07 г.

Методами иммуноферментного и иммуногистохимического анализа изучена перекрестная реактивность 52 моноклональных антител против тиреоглобулина человека, их эпипотная специфичность и зависимость распознаваемых ими эпитопов от конформации. Большинство антител взаимодействовали с тиреоглобулинами животных одного или нескольких видов. Девять реагентов распознавали эпитопы, специфичные для тиреоглобулина человека. Двадцать моноклональных антител ингибировали связывание с антигеном только одноименных меченых реагентов, из чего следовало, что они распознают отдельные пространственно изолированные эпитопы. Тридцать два антитела были объединены в 14 групп взаимного ингибирования связывания. Для анализа состава групп взаимного ингибирования впервые применен подход, основанный на сопоставлении данных об эпипотной специфичности моноклональных антител и их перекрестной реактивности. В пределах первых семи групп моноклональные антитела обладали одинаковыми спектрами видовой специфичности, из чего следовало, что каждая группа содержит антитела с идентичной эпипотной специфичностью. Антитела семи оставшихся групп, взаимно ингибируя связывание с антигеном, различались по видовой специфичности. Это позволило заключить, что антитела в указанных группах направлены против разных, но топографически сближенных эпитопов. Суммарно изученная совокупность моноклональных антител распознает на молекуле тиреоглобулина человека 41 эпитоп, из которых 15 охарактеризованы как линейные, а 26 как конформационные. Используемый подход к анализу групп взаимного ингибирования может быть применен при изучении эпитопов различных эволюционно консервативных антигенов. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48862-а).

Ключевые слова: тиреоглобулин, антигенные детерминанты, эпипотный анализ, моноклональные антитела

ВВЕДЕНИЕ

Тиреоглобулин (ТГ), йодированный гликопротеин, синтезируемый клетками эпителия щитовидной железы [1, 2], является предшественником тиреоидных гормонов. Молекулы ТГ человека и ряда млекопитающих представляют собой гомодимеры с молекулярной массой 660 кДа, построенные из полипептидных цепей длиной около 2770 аминокислотных остатков [3]. Синтезированные молекулы ТГ претерпевают множественные по-

стратрансляционные модификации (присоединение атомов йода, фосфатных, сульфатных и углеводных групп) и транслокации (экспорт из тиреоцитов, включение в состав коллоида, импорт в тиреоциты и транскитоз), взаимодействуя при этом с рядом рецепторов, транспортных белков и ферментов. В настоящее время идентифицированы лишь некоторые сайты молекул ТГ, участвующие в этих взаимодействиях [4, 5].

Одним из подходов к выявлению функциональных сайтов белков, в том числе и ТГ, является изучение его антигенных детерминант (эпитопов) с помощью моноклональных антител (МКАТ). Преимущество МКАТ состоит в том, что они распознают отдельные участки

Адрес: 197758 Санкт-Петербург, Ленинградская ул., 70/4, Песочный-2. E-mail: vklim@sertolovo.ru

поверхности (эпитопы) антигенов. Эти участки могут находиться вблизи функциональных сайтов молекулы или топографически совпадать с ними, что позволяет исследовать связи между структурой и функциями молекул [6]. МКАТ дают также возможность определить, относится ли распознаваемый ими эпитоп к категории линейных или зависимых от конформации молекулы [7, 8].

Панели МКАТ против ТГ человека и животных получены в нескольких лабораториях [7, 8, 9, 10]. Число включенных в них реагентов обычно не превышает двадцати. Гибридомы-продуценты этих МКАТ происходят от иммунных лимфоцитов мышей линии BALB/c (H-2d).

В лаборатории гибридной технологии ФГУ «РНЦРХТ Росмедтехнологий» (ранее ЦНИРРИ) создана уникальная панель МКАТ против ТГ человека, частично описанная в предшествующих публикациях [11, 12, 13]. Панель состоит из МКАТ, синтезируемых гибридами, полученными на основе иммунных лимфоцитов мышей линии SJL/J. Животные указанной линии отличаются от BALB/c главным локусом гистосовместимости (H-2s), аллотипом иммуноглобулинов и репертуаром иммунного ответа [14, 15].

Цель настоящей работы состояла в изучении перекрестной реактивности МКАТ с ТГ животных разных видов, их эпитопной специфичности и зависимости распознаваемых ими антигенных детерминант от конформации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антитела. В работе использованы 52 МКАТ против ТГ человека, часть которых описана ранее. Для получения асцитных жидкостей штаммы гибридных клеток прививали мышам F1(SJL/J×BALB/c), поддерживаемым в виварии лаборатории. В экспериментах использовали МКАТ в нативной форме и в виде приготовленных в лаборатории конъюгатов с пероксидазой [16] или изотиоцианатом флуоресцеина [17] (Sigma, США и Serva, Германия, соответственно).

Антигены. Были использованы коммерческие препараты ТГ быка и свиньи (Sigma, США). Препараты ТГ человека, крысы, мыши и курицы были получены в лаборатории из гомогенатов щитовидных желез солевой экстракцией с последующей очисткой методом гель-фильтрации [18]. Денатурированный ТГ

человека получали восстановлением дисульфидных связей 0,01% 1,4-дитиотреитолом (ДТТ) (Serva, Германия) с последующим алкилированием йодацетамидом (Serva, Германия).

Перекрестную реактивность МКАТ с очищенными препаратами ТГ человека и животных исследовали методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). В лунки планшетов с иммобилизованным ТГ вносили растворы, содержащие МКАТ. Для выявления МКАТ, связавшихся с ТГ, использовали полученные в лаборатории аффинно очищенные кроличьи антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой.

Взаимодействие МКАТ с ТГ на срезах тканей щитовидной железы выявляли методом иммунофлуоресценции или иммуногистохимически при помощи меченных щелочной фосфатазой козьих антител против иммуноглобулинов мышей (Sigma, США). Для проведения ферментной реакции использовали субстрат-хромогенную смесь Fast red TP/Naphthol AS-MX-phosphate (Sigma, США). Образцы ткани щитовидной железы человека (n = 10), собаки (n = 8), кошки (n = 9), кролика (n = 2), крысы (n = 10), мыши (n = 14), курицы (n = 3), голубя (n = 1) и лягушки (n = 4) фиксировали в 10%-ном водном формалине (Вектон, Россия), заливали в парапласт (Sigma, США) и готовили срезы толщиной 3–5 мкм. Сохранность гистологической структуры щитовидной железы контролировали на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Иммунореактивность ТГ восстанавливали при помощи демаскирующей обработки путем нагревания в течение 5 мин в 0,01М цитратном буфере (pH 6,0) при 90–100 °С. Для блокирования неспецифического связывания срезы инкубировали в фосфатно-солевом буфере с 10% сыворотки крупного рогатого скота (БиолоТ, Россия).

Эпитопную специфичность МКАТ исследовали методом конкурентного ИФА. Оценивали способность немеченых МКАТ ингибировать связывание меченных пероксидазой конъюгатов с адсорбированным на твердой фазе ТГ человека [19]. Оптическую плотность при взаимодействии меченых МКАТ с ТГ в отсутствие немеченых антител принимали за 100%. Достоверным считали ингибирование связывания, при котором оптическая плотность проб снижалась не менее чем на 70%.

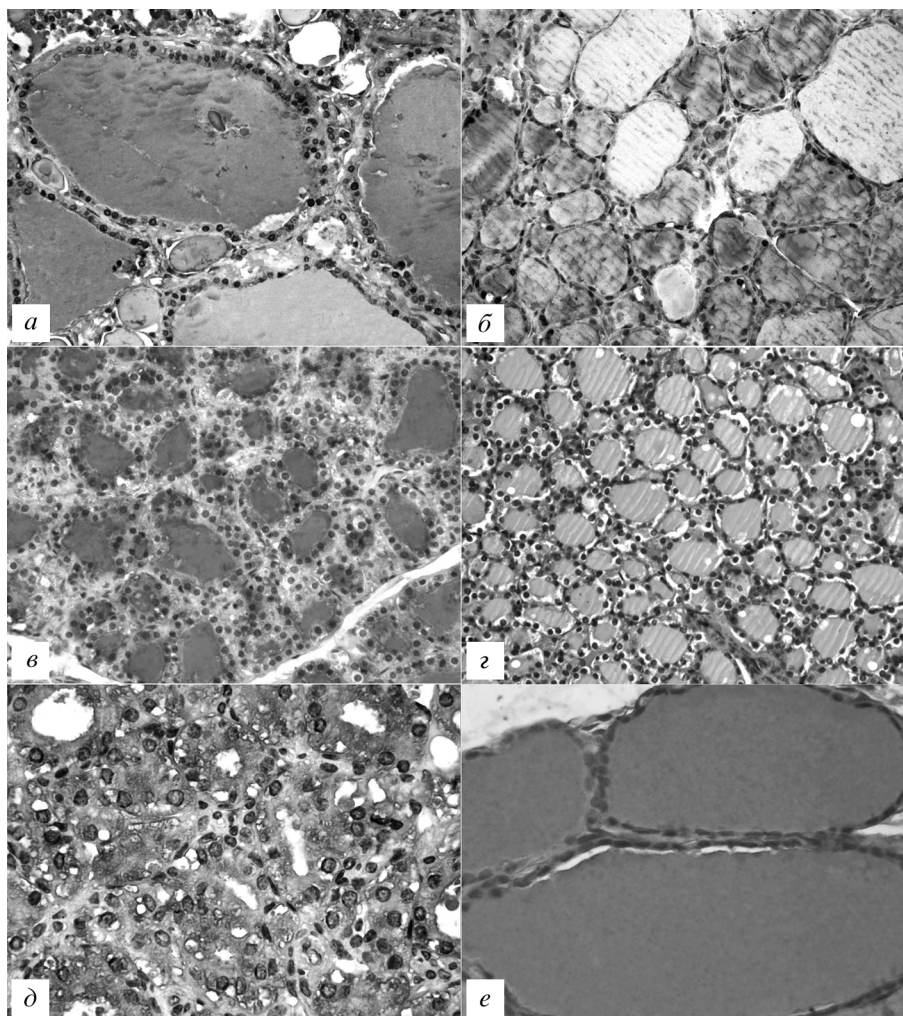


Рис. 1. Иммуногистохимическое выявление ТГ (красное окрашивание) при помощи МКАТ 12G9 на срезах ткани щитовидной железы человека (а), мыши (б), кошки (в), кролика (г), голубя (д) и лягушки (е). Ядра окрашены гематоксилином. Увеличение 200× (б, в, г), 400× (а, д) и 800× (е).

Зависимость от конформации эпитопов, связывающих МКАТ, определяли путем сопоставления реакции МКАТ с нативным и денатурированным ТГ человека в непрямом твердофазном ИФА [19]. Показатели оптической плотности при взаимодействии каждого из МКАТ с нативным ТГ (контроль) принимали за 100%. Оптическую плотность при связывании МКАТ с денатурированным антигеном выражали в процентах от контроля.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Перекрестные реакции МКАТ с ТГ животных

Изучение реакций МКАТ с очищенными ТГ человека и животных методом ИФА, а также путём выявления ТГ на срезах щитовид-

ной железы методами иммунофлуоресценции и иммуногистохимии дало совпадающие результаты. Суммарные данные о взаимодействии каждого из МКАТ с ТГ животных разных видов представлены в разделах I таблиц 1, 2 и 3. Из полученных результатов следует, что большинство МКАТ наряду с ТГ человека взаимодействует также с ТГ животных одного или нескольких видов. Наиболее выражена перекрестная реактивность МКАТ с ТГ млекопитающих, меньшее число МКАТ реагирует с ТГ птиц и только четыре взаимодействуют с ТГ лягушки. Эпитоп, распознаваемый МКАТ 2F2 и 12G9, был обнаружен на ТГ животных всех изученных видов. На рис. 1 представлены примеры иммуногистохимического выявления ТГ с помощью МКАТ 12G9 на срезах ткани щитовидной железы млекопитающих, птицы и амфибии.

Таблица 1. Перекрестная реактивность МКАТ, не входящих в группы взаимного ингибирования, их эпитопная специфичность и характеристика распознаваемых ими эпитопов.

	Коды нативных МКАТ																			
	1F10	2A2	5D11	5N6	6E7	8E11	4B1	5E6	1G1	5G5	6B2	2A4	2F5	7F12	8F10	4C3	2C12	2G9	8B9	8B1
Тиреоглобулины	I. Взаимодействие с ТГ *																			
Человека																				
Быка																				
Свиньи																				
Собаки																				
Кошки																				
Кролика																				
Крысы																				
Мыши																				
Курицы																				
Голубя																				
Коды меченых МКАТ	II. Ингибирование связывания меченых МКАТ с ТГ человека **																			
1F10																				
2A2																				
5D11																				
5N6																				
6E7																				
8E11																				
4B1																				
5E6																				
1G1																				
5G5																				
6B2																				
2A4																				
2F5																				
7F12																				
8F10																				
4C3																				
2C12																				
2G9																				
8B9																				
8B1																				
Эпитоп ТГ	III. Характеристика эпитопов ***																			
Конформационный																				
Линейный																				

Примечание: (*) присутствие на антигене эпитопа, распознаваемого МКАТ, обозначено заливкой; (**) ингибирование обозначено заливкой; (***) символом (●) отмечена принадлежность эпитопа к категории конформационных или линейных.

2. Эпитопная специфичность МКАТ

Двадцать МКАТ ингибировали взаимодействие с антигеном только одноименных меченых реагентов (раздел II табл. 1). Отсутствие конкуренции с другими антителами свидетельствовало о том, что эти МКАТ распознают на молекуле ТГ человека отдельные

пространственно изолированные антигенные детерминанты. Остальные 32 МКАТ ингибировали связывание с антигеном не только одноименных, но и еще одного, двух или трех меченых реагентов. Эти МКАТ были объединены в 14 групп взаимного ингибирования связывания (разделы II таблиц 2 и 3).

Таблица 2. Перекрестная реактивность МКАТ групп взаимного ингибирования №№ 1–7, их эпитопная специфичность и характеристика распознаваемых ими эпитопов.

	Коды нативных МКАТ													
	3A8	5F12	1G11	3B7	3F11	7A3	5G8	10A11	1B10	7G5	1F7	8A9	2F2	12G9
Тиреоглобулины	I. Взаимодействие с ТГ *													
Человека														
Быка														
Свиньи														
Собаки														
Кошки														
Кролика														
Крысы														
Мыши														
Курицы														
Голубя														
Лягушки														
Коды меченых МКАТ	II. Ингибирование связывания меченых МКАТ с ТГ человека **													
3A8	1													
5F12														
1G11			2											
3B7														
3F11					3									
7A3														
5G8							4							
10A11														
1B10									5					
7G5														
1F7														
8A9											6			
2F2														
12G9													7	
Эпитоп ТГ	III. Характеристика эпитопов ***													
Конформационный	•		•		•				•					•
Линейный							•				•			

Примечание: (*) присутствие на антигене эпитопа, распознаваемого МКАТ, обозначено заливкой; (**) ингибирование обозначено заливкой; (***) символом (•) отмечена принадлежность эпитопа к категории конформационных или линейных.

3. Анализ специфичности МКАТ в группах взаимного ингибирования

Сопоставление перекрестной реактивности МКАТ с ТГ животных разных видов и их способности конкурировать за связывание с антигеном позволило проанализировать эпитопную специфичность МКАТ в пределах групп взаимного ингибирования.

Согласно данным, приведенным в таблице 2, МКАТ каждой из групп №№ 1–7 обладают одинаковыми спектрами видовой специфичности: распознаваемые ими эпитопы представ-

влены на ТГ животных одних видов и отсутствуют у других. Это позволяет с большой долей вероятности предполагать, что каждая из семи групп содержит по два МКАТ с идентичной эпитопной специфичностью.

Из данных, представленных в таблице 3, следует, что МКАТ в группах №№ 8, 10 и 14 взаимно ингибируют реакции с антигеном в пределах групп, но часть МКАТ обладает одинаковой видовой специфичностью. Так, в группе № 8 два МКАТ (1A8/10B2) имеют одинаковый профиль перекрестной реактив-

Таблица 3. Перекрестная реактивность МКАТ групп взаимного ингибирования №№ 8–14, их эпитопная специфичность и характеристика распознаваемых ими эпитопов.

	Коды нативных МКАТ																	
	1A8	10B2	4D9	4T4	5F3	8G2	5F5	5F9	1B1	2B1	5A6	8E12	3G5	4B12	5A4	6H8	8C4	5G4
Тиреоглобулины	I. Взаимодействие с ТГ *																	
Человека																		
Быка																		
Свиньи																		
Собаки																		
Кошки																		
Кролика																		
Крысы																		
Мыши																		
Курицы																		
Голубя																		
Лягушки																		
Коды меченых МКАТ	II. Ингибирование связывания меченых МКАТ с ТГ человека **																	
1A8																		
10B2	8																	
4D9																		
4T4	9																	
5F3																		
8G2																		
5F5	10																	
5F9																		
1B1																		
2B1																		
5A6	11																	
8E12																		
3G5	12																	
4B12																		
5A4																		
6H8																		
8C4	13																	
5G4																		
Эпитоп ТГ	III. Характеристика эпитопов ***																	
Конформационный																		
Линейный																		

Примечание: (*) присутствие на антигене эпитопа, распознаваемого МКАТ, обозначено заливкой; (**) ингибирование обозначено заливкой; (***) символом (●) отмечена принадлежность эпитопа к категории конформационных или линейных.

ности, а третье (4D9) отличается от них. Это дает повод предположить, что группа 8 содержит два МКАТ, направленные к одному эпитопу, и третье, распознающее второй эпитоп. Аналогичным образом, МКАТ группы № 10 распознают четыре близко расположенных эпитопа (4T4, 5F3/8G2, 5F5 и 5F9), а группа № 14 содержит МКАТ против двух эпитопов (5A4/6H8/8C4 и 5G4).

МКАТ, составляющие группы №№ 9, 11, 12 и 13, взаимно ингибируя связывание с антигеном, различаются по спектрам перекрестной реактивности. Это может быть следствием того, что ингибирующие друг друга МКАТ направлены против различных, но топографически сближенных антигенных детерминант. При этом присоединение антитела к одному эпитопу создает препят-

Таблица 4. Количество эпитопов, общих для ТГ человека и животных разных видов

Тиреоглобулин	Число эпитопов, общих с тиреоглобулином									
	Быка	Свиньи	Собаки	Кошки	Кролика	Крысы	Мыши	Курицы	Голубя	Лягушки
Человека	22	18	18	19	24	20	21	15	7	3
Быка		15	12	14	18	17	17	12	6	3
Свиньи			13	13	14	12	14	11	6	3
Собаки				16	13	10	11	8	3	2
Кошки					14	11	11	10	4	2
Кролика						16	17	11	6	3
Крысы							18	10	5	3
Мыши								11	6	3
Курицы									6	3
Голубя										1

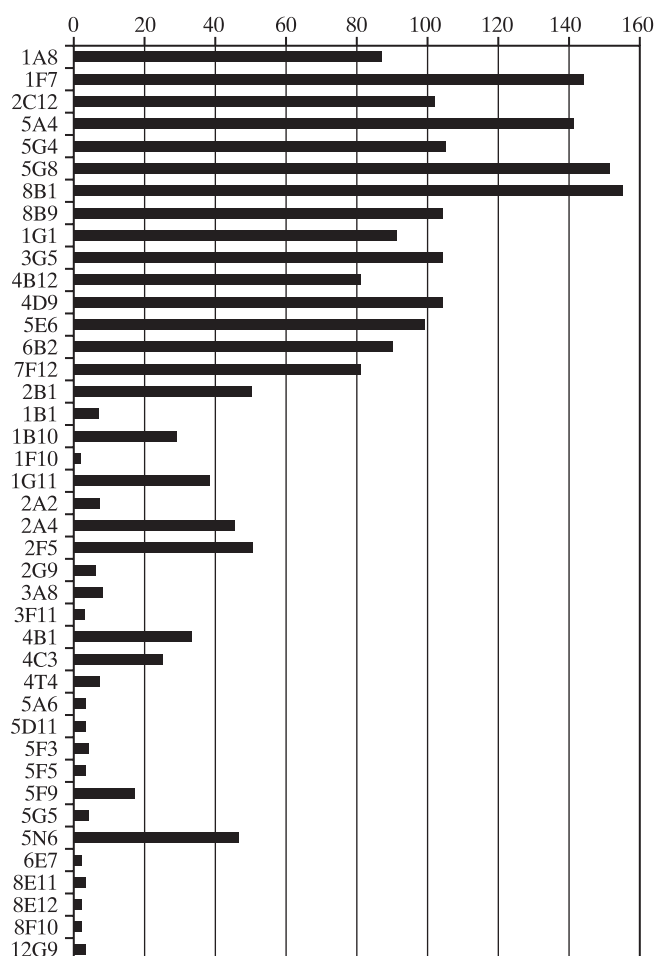


Рис. 2. Взаимодействие МКАТ с ТГ человека, денатурированным восстановлением ДТГ с последующим алкилированием.

По оси ординат — коды МКАТ против ТГ.

По оси абсцисс — связывание МКАТ с денатурированным ТГ человека в % к контролю.

ствие для реакции второго антитела с другим эпитопом.

На основании результатов анализа групп взаимного ингибирования можно заключить, что МКАТ, объединённые в группы №№ 1 — 7, позволяют выявлять 7 антигенных детерминант ТГ, а отнесённые к группам №№ 8 — 14 — четырнадцать эпитопов, локализованных на удаленных друг от друга или частично перекрывающихся участках поверхности молекулы ТГ.

Таким образом, в целом совокупность изученных МКАТ распознаёт 41 эпитоп молекулы ТГ человека, из которых только 8 являются видоспецифичными. Число общих эпитопов ТГ человека, других млекопитающих, птиц и амфибий, выявляемых изученной панелью МКАТ, приведено в таблице 4.

4. Выявление линейных и зависимых от конформации эпитопов ТГ

В исследовании было использовано 41 МКАТ, каждое из которых направлено к отдельному эпитопу молекулы ТГ человека. Среди них 15 МКАТ (от 1A8 до 7F12) взаимодействовали одинаково с нативным и денатурированным ТГ. В ряде случаев реакция с денатурированным ТГ была сильнее, чем с нативным. В то же время 26 МКАТ (от 2B1 до 12G9) реагировали с нативным препаратом в 2–20 раз сильнее, чем с денатурированным (рис. 2). Это позволило отнести 15 эпитопов, распознаваемых МКАТ, к числу линейных, а остальные — к зависимым от конформации (разделы III табл. 1, 2 и 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

ТГ является высоко консервативным белком, представленным у всех позвоночных животных. Идентичность последовательностей аминокислот в молекулах ТГ животных разных видов достигает 70–80% [20, 21, 22]. Следствием структурного подобия является перекрестное взаимодействие антител (в том числе и МКАТ), полученных против ТГ животных одного вида, с ТГ других видов [7, 23]. На основании представленных данных только девять из 52 МКАТ можно считать специфичными в отношении ТГ человека. При расширении видового состава обследованных животных эта оценка может измениться.

Представляет интерес выявление на ТГ человека эволюционно высоко консервативных антигенных детерминант, обнаруженных также у амфибии, птиц и всех изученных видов млекопитающих. Следует отметить, что наиболее консервативные эпитопы ТГ (5F9, 8E12 и 12G9) оказались зависимыми от конформации, а не линейными.

Способность одних МКАТ конкурировать с другими за связывание с антигеном может указывать либо на совпадение их эпитопных специфичностей, либо на топографическую близость распознаваемых ими эпитопов на молекуле антигена. Для анализа состава групп взаимного ингибирования обычно используют природные, синтетические или рекомбинантные фрагменты антигена, которые позволяют уточнить эпитопную направленность МКАТ. В случае ТГ такой подход трудно применить, поскольку структура многих эпитопов зависит от конформации и при фрагментировании молекулы утрачивается.

Подход к анализу эпитопной специфичности МКАТ, основанный на привлечении данных об их перекрестной реактивности, ранее не использовался и в настоящей работе применен впервые.

Проведенное исследование позволило установить, что среди 52 МКАТ против ТГ человека 34 реагента распознают 27 топографически изолированных эпитопов, а 18 МКАТ направлены к 14 эпитопам, образующим группы из 2–4 пространственно сближенных антигенных детерминант.

Полученные данные согласуются с гипотезой, которая постулирует существование на молекуле ТГ не менее 40 антигенных детерминант [10].

Усиление взаимодействия ряда МКАТ с денатурированным ТГ, вероятно, объясняется

тем, что при разворачивании полипептидной цепи вследствие денатурации некоторые линейные детерминанты становятся более доступными для присоединения МКАТ или сродство последних к этим эпитопам увеличивается. Выявление линейных эпитопов молекулы ТГ позволяет в дальнейшем соотнести распознаваемые МКАТ антигенные участки с образующими их аминокислотными последовательностями молекул ТГ человека и животных.

Несмотря на то, что в настоящее время известны аминокислотные последовательности ТГ человека и нескольких видов животных, модели трехмерной структуры этих молекул пока не предложено. Сведения об участках полипептидной цепи, экспонированных на поверхности молекулы ТГ, данные о близком соседстве или топографической удаленности эпитопов, их зависимости или независимости от конформации молекулы могут быть полезными при решении этой задачи.

Данные о топографической удаленности эпитопов ТГ являются основанием для отбора комплементарных сочетаний МКАТ при конструировании двухдетерминантных систем детекции и количественного определения ТГ человека и животных.

МКАТ, распознающие эпитопы ТГ животных разных видов, могут использоваться в экспериментальных и сравнительно-биологических исследованиях развития, структуры, функции и патологии щитовидной железы. Описанные МКАТ позволяют также выявлять, выделять и анализировать структуру ТГ животных, относящихся по крайней мере к трем классам позвоночных животных.

Все выявляемые изученными МКАТ линейные антигенные детерминанты относятся к числу эволюционно консервативных, т.к. присутствуют на ТГ животных, принадлежащих к филогенетически удаленным видам. Это позволяет говорить о том, что консервативность молекулы ТГ проявляется в сохранении в ходе эволюции определенных элементов первичной структуры, что хорошо согласуется с данными, полученными другими авторами [3, 21, 22, 24]. В то же время результаты настоящего исследования показали, что многие из выявленных эволюционно консервативных детерминант ТГ зависимы от конформации. Из этого можно сделать вывод, что в ходе эволюции происходил отбор и таких элементов первичной структуры ТГ, которые обеспечивают поддержание определенной конформации отдельных участков молекулы ТГ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 05-04-48862-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dunn J.T. The amino acid neighbors of thyroxine in thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* 1970, 245, 5954–5961.
2. Vali M., Rose N.R., Caturegli P. Thyroglobulin as autoantigen: structure-function relationships. *Rev. Endocrine Metab. Disord.* 2000, 1, 69–77.
3. Malthiery Y., Lissitzky S. Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448-base complementary DNA. *Eur. J. Biochem.* 1987, 165, 491–498.
4. El Hassani R.A., Estienne V., Blanchin S., Durand-Gorde J.-M., Mallet B. et al. Antigenicity and immunogenicity of the C-terminal peptide of human thyroglobulin. *Peptides* 2004, 25, 1021–1029.
5. Marinò M., McCluskey R.T. Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000, 279, C1295–C1306.
6. Абелев Г.И., Карамова Э.П. Автоматика на пленках: противоточный изотахофорез и иммуноэлектрохроматография. 1996, 61, 1984–1994.
7. Bresler H.S., Burek C.L., Rose N.R. Autoantigenic determinants on human thyroglobulin. I. Determinant specificities of murine monoclonal antibodies. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1990, 54, 64–75.
8. Chan C.T.J., Byfield P.G.H., Himsworth R.L., Shepherd P. Human autoantibodies to thyroglobulin are directed towards a restricted number of human specific epitopes. *Clin. Exp. Immunol.* 1987, 70, 516–523.
9. De Baets M.H., Theunissen R., Kok K., de Vijlder J.J.M., van Breda Vriesman P.J.C. Monoclonal antibodies to human thyroglobulin as probes for thyroglobulin structure. *Endocrinology* 1987, 120, 1104–1111.
10. Ruf J., Henry M., De Micco C., Carayon P. Characterization of monoclonal and autoimmune antibodies to thyroglobulin: applications to clinical investigation. In: *Thyroglobulin and Thyroglobulin Autoantibodies in the Follow-up of Thyroid Cancer and Endemic Goitre*. Hüfner M. and Reiners S. (eds.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1987, 21–30.
11. Климович В.Б., Руденко И.Я., Грязева И.В. Моноклональные антитела против тиреоглобулина человека: исследование специфичности. *Биотехнология*. 1998, 4, 51–56.
12. Климович В.Б., Самойлович М.П., Грязева И.В., Крутецкая И.Ю., Пашкова С.Ф., Руденко И.Я. Моноклональные антитела на основе иммунного репертуара мышей линии SJL/J. *Медицинская иммунология*. 1999, 1, 47–58.
13. Пиневич А.А., Руденко И.Я., Львова О.А., Климович В.Б. Эволюционно консервативные и видоспецифические антигенные детерминанты тиреоглобулинов млекопитающих. *Журнал Эволюционной Биохимии и Физиологии*. 2005, 41, 414–420.
14. Kumar R.K., Hodgkin's disease. SJL/j murine lymphoma. *Am. J. Pathol.* 1983, 110, 393–396.
15. Herzenberg L.A., Jones P.P., Herzenberg L.A. Mouse immunoglobulin allotypes: characterization and cellular immunology. *Ann. Immunol.* 1974, C125, 1–2, 71–83.
16. Nakane P.R., Kawaoi A. Peroxidase labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974, 22, 1084–1091.
17. Джонсон Д. Методы иммунофлуоресценции. В кн.: *Антитела*. Мир, Москва 1991, 268–300.
18. Saboori A.M., Rose N.R., Kuppers R.C., Butscher H.C., Bresler H.R. et al. Immunoreactivity of multiple molecular forms of human thyroglobulin. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1994, 72, 121–128.
19. Кэтти Д., Райкундалиа Ч. Иммуноферментный анализ (ИФА). В кн.: *Антитела*. Мир, Москва 1991, 152–238.
20. Malthiery Y., Marriq C., Bergé-Lefranc J.-L., Franc J.-L., Henry M. et al. Thyroglobulin structure and function: recent advances. *Biochimie* 1989, 71, 195–210.
21. Rose N.R., Burek C.L. Autoantibodies to thyroglobulin in health and disease. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000, 83, 245–254.
22. Vali M., Rose N.R., Caturegli P. Thyroglobulin as autoantigen: structure-function relationships. *Rev. Endocrine Metab. Disord.* 2000, 1, 69–77.
23. Stylos W.A., Rose N.R. Rabbit thyroid autoantibody produced by intravenous injections of papain-treated rabbit thyroid extract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1968, 127, P. 784–786.
24. Carayanniotis G., Rao V.P. Searching for pathogenic epitopes in thyroglobulin: parameters and caveats. *Immunol. Today*. 1997, 18, 83–88.

ANTIGENIC DETERMINANTS OF HUMAN AND ANIMAL THYROGLOBULINS DEFINED BY MONOCLONAL ANTIBODIES

**V.B. Klimovich, A.A. Pinevich, I.Y. Rudenko,
O.A. Shashkova**

*Federal State Institution «Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technologies»,
Rosmedtechnology Agency, St-Petersburg, Russia*

The cross-reactivity of 52 monoclonal antibodies to human thyroglobulin, their epitope specificity and conformation dependency of epitopes recognized by them were investigated by means of immunohistochemistry and ELISA methods. The majority of monoclonal antibodies interacted with thyroglobulins of one or more animal species. Nine monoclonal antibodies recognized human-specific thyroglobulin epitopes. Twenty monoclonal antibodies inhibited the binding with the antigen of the same labeled reagents only. It was concluded that each of these antibodies recognize separate spatially isolated thyroglobulin epitope. Thirty two antibodies were subdivided into 14 separate groups of mutual binding inhibition. In order to analyze the composition of the groups the new approach based on the comparison of epitope specificity and cross-reactivity of monoclonal antibodies was used. Within first seven groups of mutual inhibition monoclonal antibodies had similar spectra of cross-reactivity indicating identical epitope specificity of antibodies within each group. Antibodies belonging to the rest seven groups mutually inhibited binding with thyroglobulin but had different profiles of species specificity. It was concluded that these antibodies are directed towards spatially close but different epitopes. Totally the panel of monoclonal antibodies under study defines 41 epitopes on human thyroglobulin. Among them 15 determinants were identified as linear ones whereas other 26 epitopes were characterized as conformation dependent. The approach to analysis mutual inhibition groups used in this study can be applied also for the investigation of various evolutionary conserved antigens. The study was supported by Russian foundation for basic research, grant № 05-04-48862-a.