

СРАВНИТЕЛЬНО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИДЕНТИФИКАЦИИ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ МОЛЕКУЛЫ ТИРЕОГЛОБУЛИНА

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

Центральный научно-исследовательский рентгено-радиологический институт, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: vklim@sertolovo.ru

Молекулы тиреоглобулина (ТГ) человека и ряда млекопитающих представляют собой димеры с мол. массой около 660 кДа, построенные из идентичных полипептидов длиной 2760—2770 остатков аминокислот [1]. После синтеза полипептидных цепей и димеризации молекулы ТГ претерпевают множественные посттрансляционные модификации (присоединение углеводных, сульфатных, фосфатных групп и атомов иода) и транслокации (экспорт из тиреоцитов, включение в состав коллоида, импорт в тиреоциты, транскитоз), после чего подвергаются протеолизу в лизосомах [2]. При этом они взаимодействуют с рядом рецепторов, транспортных белков и ферментов. Участки молекулы ТГ, обеспечивающие эти взаимодействия, не идентифицированы.

Один из способов выявления функциональных сайтов любого белка состоит в изучении его антигенных детерминант (эпитопов) с помощью панелей моноклональных антител (МКАТ), распознающих отдельные эпитопы молекул антигенов [3]. Эти участки поверхности могут находиться вблизи функциональных сайтов или топографически совпадать с ними.

При изучении эпитопной специфичности МКАТ зачастую выявляют группы реагентов, взаимно ингибирующих связывание с антигеном [4]. Это может быть следствием либо совпадения эпитопной специфичности нескольких МКАТ, либо топографической близости распознаваемых ими антигенных детерминант. Для анализа состава групп взаимного ингибирования и уточнения эпитопной направленности МКАТ обычно используют протеолитические, рекомбинантные или синтетические фрагменты антигена [5]. В случае ТГ такой подход трудно применить, поскольку структура многих эпитопов этого белка зависит от конформации и при фрагментировании молекулы утрачивается.

Известно, что ТГ позвоночных животных обладают высокой степенью (71—97 %) гомологии первичной структуры [6]. Вследствие этого МКАТ против ТГ одного вида животных перекрестно реагируют с ТГ представителей других видов и даже других таксонов позвоночных. В настоящей публикации описан подход к анализу состава групп взаимного ингибирования, основанный на сопоставлении эпитопной специфичности МКАТ с их перекрестной реактивностью с ТГ животных разных видов.

Объектом исследования служила созданная в лаборатории панель МКАТ против ТГ человека, состоящая из 52 реагентов, которая частично описана в предыдущей публикации [7]. Используемые в работе МКАТ препараты ТГ человека и животных, а также методы иммуноферментного анализа (ИФА) с очищенными препаратами ТГ и иммунофлуоресцентного выявления ТГ на срезах ткани щитовидной железы описаны ранее [4, 7].

При исследовании эпитопной направленности МКАТ было установлено, что 20 из них ингибировали связывание с антигеном только одноименных меченых реагентов [7], из чего следует, что эти МКАТ распознают отдельные пространственно изолированные эпитопы на молекуле ТГ человека. Остальные 32 МКАТ были объединены в 14 групп взаимного ингибирования связывания, в которых каждое из немеченых МКАТ ингибировало взаимодействие с антигеном двух и более меченых МКАТ (табл. 1, 2).

Для того чтобы установить, распознают ли взаимно ингибирующие друг друга МКАТ один эпитоп или направлены к различным близко расположенным антигенным детерминантам, методами ИФА и иммунофлуоресценции было изучено взаимодействие МКАТ с ТГ животных десяти видов.

Анализ полученных данных позволил установить следующее. Группа взаимного ингибирования, обозначенная 1 (табл. 1), содержит три МКАТ, которые отличаются по способности реагировать с ТГ животных. МКАТ 1A8 и 10B2 взаимодействуют с ТГ животных семи видов, но не реагируют с ТГ кошки и собаки. В то же время МКАТ 4D9 не реагируют с ТГ голубя. Это позволяет предполагать, что первые два МКАТ направлены к одному эпитопу, а третье МКАТ — к другому близко расположенному участку молекулы ТГ человека.

Группа 2 также состоит из двух отдельных эпитопов, различно представленных на ТГ животных: участок связывания МКАТ 4D9 найден на ТГ восьми видов, а эпитоп, взаимодействующий с МКАТ 4T4, обнаружен у представителей пяти видов.

Моноклональные антитела, составляющие группы 4, 5 и 6, взаимно ингибируют друг друга при связывании с ТГ человека, но различаются по видовой специфичности. Это указывает на то, что ингибирующие

Таблица 1

**Группы взаимного ингибирования МКАТ и встречаемость связывающих их эпитопов
на ТГ человека и животных разных видов**

Коды нативных МКАТ	Коды сеченых МКАТ																	
	1A8	10B2	4D9	4T4	5F3	8G2	5F5	5F9	1B1	2B1	5A6	8E12	3G5	4B12	5A4	6H8	8C4	5G4
1A8	1																	
10B2																		
4D9																		
4T4				2														
5F3					3													
8G2																		
5F5																		
5F9																		
1B1									4									
2B1										5								
5A6																		
8E12																		
3G5													6					
4B12																		
5A4															7			
6H8																		
8C4																		
5G4																		

Взаимодействие МКАТ с тиреоглобулинами

Человека	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Быка	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Свиньи	+	+	+		+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Собаки			+		+	+	+			+		+	+	+	+	+	+	+
Кошки			+		+	+	+			+		+	+	+	+	+	+	+
Крысы	+	+	+	+				+	+	+	+	+		+				
Мыши	+	+	+	+				+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
Кролики	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+
Курицы							+	+			+	+						
Голубя	+	+																
Лягушки								+				+						

Примечание. Цифрами в рамках обозначены номера групп взаимного ингибирования. Рамками обозначено ингибирование немечеными антителами связывания меченых МКАТ с ТГ человека, знаком «плюс» — присутствие эпитопа, распознаваемого МКАТ, на ТГ исследованного вида животного. То же для табл. 2.

друг друга МКАТ направлены против топографически сближенных, но различных антигенных детерминант.

Анализируя аналогичным образом состав остальных групп, можно видеть, что группа 3 содержит три МКАТ, распознающих отдельные эпитопы, и два реагента (5F3 и 8G2), обладающие одинаковой эпитопной специфичностью; в группу 7 входят три МКАТ со сходной или одинаковой эпитопной специфичностью и одно МКАТ, распознающее отдельную, близко расположенную антигенную детерминанту.

Таким образом, было показано, что МКАТ, составляющие группы взаимного ингибирования 1—7, распознают 14 эпитопов, из которых одни расположены на топографически близких или частично перекрывающихся участках поверхности антигена, а другие пространственно удалены друг от друга.

Данные, приведенные в табл. 2, свидетельствуют о том, что МКАТ в пределах каждой группы взаимного ингибирования 8—14 обладают одинаковой видовой

специфичностью, т. е. распознаваемые ими эпитопы представлены на ТГ животных одних видов и отсутствуют у других. Из этого следует, что, вероятнее всего, каждая группа состоит из МКАТ, обладающих идентичной эпитопной специфичностью.

Таким образом, исследование эпитопной специфичности и перекрестной реактивности МКАТ позволило установить, что среди 52 изученных МКАТ 20 направлены к 20 отдельным эпитопам, 18 МКАТ (табл. 1) направлены к 14 эпитопам, образующим кластеры пространственно сближенных антигенных детерминант, а остальные 14 МКАТ (табл. 2) распознают 7 топографически изолированных эпитопов. Суммарно совокупность изученных МКАТ распознает на молекуле ТГ человека 41 эпитоп. Полученные данные согласуются с гипотезой, постулирующей присутствие на молекуле ТГ человека 40 или более антигенных детерминант [8].

Разработанный в настоящей работе подход к анализу эпитопной специфичности МКАТ может быть ис-

Таблица 2

Группы взаимного ингибирования МКАТ с идентичной эпитопной специфичностью

Коды нативных МКАТ	Коды меченых МКАТ													
	1B10	7G5	1F7	8A9	1G11	3B7	2F2	12G9	3A8	5F12	3F11	7A3	5G8	10A11
1B10	8													
7G5														
1F7			9											
8A9														
1G11					10									
3B7														
2F2							11							
12G9														
3A8									12					
5F12														
3F11											13			
7A3														
5G8													14	
10A11														

Взаимодействие МКАТ с тиреоглобулинами

Человека	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Быка			+	+			+	+						
Свиньи			+	+			+	+						
Собаки	+	+					+	+						
Кошки							+	+			+	+		
Крысы	+	+	+	+			+	+					+	+
Мыши	+	+	+	+			+	+					+	+
Кролика			+	+	+	+	+	+						
Курицы			+	+			+	+			+	+		
Голубя			+	+			+	+						
Лягушки							+	+						

пользован при исследовании эпитопов структурно-родственных белков, обладающих высокой степенью гомологии и встречающихся у животных разных видов и разных таксономических групп.

Список литературы

- [1] Vali M., Rose N. R., Caturegli P. Thyroglobulin as autoantigen: structure-function relationships // *Rev. Endocrine Metab. Disord.* 2000. V. 1. P. 69—77.
- [2] Gentile F., Conte M., Formisano S. Thyroglobulin as an autoantigen: what can we learn about immunopathogenicity from the correlation of antigenic properties with protein structure? // *Immunology.* 2004. V. 112. P. 13—25.
- [3] Абелев Г. И., Карамова Э. Р. Автоматика на пленках: противоточный изотахофорез и иммуноэлектрохроматография // *Биохимия.* 1996. Т. 61. С. 1984—1994.
- [4] Климович В. Б., Руденко И. Я., Грязева И. В. Моноклональные антитела против тиреоглобулина человека: исследование специфичности // *Биотехнология.* 1998. № 4. С. 51—56.
- [5] Saboori A. M., Burek C. L., Rose N. R., Bresler H. S., Taylor M., Kuppers R. C. Tryptic peptides of human thyroglobulin: I. Immunoreactivity with murine monoclonal antibodies // *Clin. Exp. Immunol.* 1994. V. 98. P. 454—458.
- [6] Venkatesh S. G., Desphande V. A comparative review of the structure and biosynthesis of thyroglobulin // *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 1999. V. 122. P. 13—20.
- [7] Пиневиц А. А., Руденко И. Я., Львова О. А., Климович В. Б. Эволюционно консервативные и видоспецифические антигенные детерминанты тиреоглобулинов млекопитающих // *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 2005. Т. 41. С. 414—420.
- [8] Ruf J., Henry M., De Micco C., Carayon P. Characterization of monoclonal and autoimmune antibodies to thyroglobulin: application to clinical investigation // *Thyroglobulin and thyroglobulin antibodies in follow-up of thyroid cancer and endemic goiter* / Eds M. Hufner, S. Reiners, G. Tieme. Stuttgart, 1987. P. 21—30.

Поступило 12 III 2007

COMPARATIVE-BIOLOGICAL APPROACH TO IDENTIFICATION OF ANTIGENIC DETERMINANTS OF THYROGLOBULIN MOLECULE

© I. Ya. Rudenko, A. A. Pinevich, O. A. Shashova, and V. B. Klimovich

Central Research Roentgen-Radiological Institute, St. Petersburg, Russia