

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

УДК 577.112.083+577.322+57.083.3

**СЕРЧЕНЯ**  
**Татьяна Сергеевна**

**ВЫДЕЛЕНИЕ, СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И  
ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
АЛЬФА-1-МИКРОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук  
по специальности 03.00.04 – Биохимия

Минск, 2008

Работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»

**Научный руководитель:** **Свиридов Олег Васильевич**,  
доктор химический наук,  
заведующий лабораторией химии  
белковых гормонов,  
Институт биоорганической химии  
НАН Беларуси

**Официальные оппоненты:** **Киселев Петр Андреевич**,  
доктор химический наук, профессор,  
заведующий лабораторией механизмов и  
кинетики ферментативных процессов,  
Институт биоорганической химии  
НАН Беларуси

**Щербин Дмитрий Григорьевич**,  
кандидат биологических наук,  
и.о. старшего научного сотрудника  
лаборатории протеомики,  
Институт биофизики и клеточной  
инженерии НАН Беларуси

**Оппонирующая организация:** Учреждение Белорусского  
государственного университета «Научно-  
исследовательский институт физико-  
химических проблем»

Защита состоится «24» февраля 2009 г. в 13.00 часов на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Институте биоорганической химии НАН Беларуси по адресу: 220141, г. Минск, ул. акад. В.Ф. Купревича, 5/2, тел.: 375(017) 267-85-53, факс: 375(017) 267-87-61, e-mail: babitskaya@iboch.bas-net.by

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я.Коласа Национальной академии наук Беларуси.

Автореферат разослан «20» января 2009 г.

Ученый секретарь  
Совета по защите диссертаций,  
кандидат химических наук

С.В. Бабицкая

## ВВЕДЕНИЕ

Альфа-1-микроглобулин (А1М) человека – это гликопротеин с молекулярной массой около 30 кДа, присутствующий в плазме крови и некоторых тканях организма человека. Физиологическая функция этого белка в организме в настоящее время не определена. Установлено, что А1М проявляет иммуносупрессорные свойства *in vitro*. В плазме крови более 50 % А1М находится в составе высокомолекулярных комплексов с другими белками (иммуноглобулином А, альбумином и протромбином), биологическая роль которых до сих пор не выяснена.

А1М относится к семейству липокалинов, представители которого характеризуются способностью связывать и транспортировать низкомолекулярные гидрофобные соединения. Лигандсвязывающая функция липокалинов обусловлена их консервативной пространственной структурой из 8  $\beta$ -тяжей, формирующих гидрофобную полость (так называемый «липокалиновый карман»). Лигандсвязывающие свойства А1М в настоящее время изучены недостаточно. Третичная структура А1М и его комплексов с лигандами, а также структура лигандсвязывающего сайта белка не установлены.

А1М является высокочувствительным маркером нефрологических заболеваний. Нарушение функционального состояния проксимальных канальцев почек приводит к увеличению содержания А1М в моче, которое наблюдается уже на ранних стадиях патологического процесса. Содержание А1М в моче отражает степень и тяжесть поражения почечных канальцев, вызванного инфекционными заболеваниями мочевой системы, приемом нефротоксических препаратов, воздействием солей тяжелых металлов. Присутствие А1М в моче является чувствительным индикатором доклинической патологии почек, развивающейся при осложнении гипертонической болезни, сахарного диабета, ревматоидного артрита, патологии беременности. Снижение концентрации А1М в моче после пересадки почки считается одним из основных показателей восстановления ее функции. В отличие от других микроглобулинов мочи, например,  $\beta$ 2-микроглобулина и ретинолсвязывающего белка, А1М характеризуется высокой стабильностью при кислых значениях рН. В этой связи разработка диагностических тест-систем для количественного определения экскретируемого с мочой А1М является весьма актуальной задачей для современной медицины.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами.** Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2006–2010 гг. (Постановление Совета Министров

Республики Беларусь № 512 от 17.05.2005 г.): «3. Физические, химические, биологические и генетические методы и технологии получения новых веществ, материалов, модифицированных биологических форм, наноматериалы и нанотехнологии»; «4. Разработка новых лечебных, диагностических, профилактических и реабилитационных технологий, приборов и изделий медицинского назначения, лекарственных и иммунобиологических препаратов, клеточных и молекулярно-биологических технологий».

Диссертационная работа является частью плановых исследований лаборатории химии белковых гормонов Института биоорганической химии НАН Беларуси, выполненных в соответствии с ГПОФИ «Биооргсинтез-2», задание 2.02 «Химические и биотехнологические основы создания иммуноаналитических систем», № госрегистрации 2004774 (2003–2005 гг.); ГПОФИ «Физиологически активные вещества», задание № 2.15 «Разработка способов выделения, изучение структурно-динамического состояния и иммунореактивности природных лигандсвязывающих белков человека с целью их использования в качестве диагностических маркеров и компонентов иммуноаналитических систем», № госрегистрации 20061880 (2006–2007 гг.); ГКПНИ «Биологическая инженерия и биобезопасность», задание № 14 «Исследование лигандсвязывающих белков человека и микроорганизмов методами биоспецифической хроматографии и люминесцентного анализа с целью конструирования диагностических тест-систем для практической медицины», № госрегистрации 20065399 (2006–2010 гг.); проект X05-278 БРФФИ на тему «Исследование взаимодействия альфа-1-микроглобулина человека с антителами в иммунохимических системах», № госрегистрации 20052010 (2005–2007 гг.); проект Б07М-142 БРФФИ на тему «Структурно-химические аспекты лигандсвязывающей активности – нового функционального свойства альфа-1-микроглобулина человека», № госрегистрации 20071692 (2007–2009 гг.)

**Цель и задачи исследования.** Цель работы: разработать способы выделения и очистки А1М человека, определить основные структурные характеристики белка и установить качественные и количественные параметры комплексообразования А1М с низкомолекулярными лигандами. Получить и охарактеризовать моноклональные антитела (МАТ) для иммуноаффинной хроматографии и иммуноанализа А1М.

Задачи исследования.

1. Разработать способы получения высокоочищенного А1М, основанные на методах хроматографического и нехроматографического фракционирования белков.

2. Получить и охарактеризовать МАТ к А1М.

3. Изучить конформационную стабильность и иммунореактивность А1М при действии различных химических факторов.

4. Исследовать взаимодействие А1М с низкомолекулярными физиологически активными соединениями.

5. Разработать иммунохимические системы для количественного определения А1М для научных исследований и практического применения.

Объектом исследования являлся А1М человека. Предмет исследования – методы выделения объекта в чистом виде, спектрально-люминесцентные характеристики, конформационная стабильность, лигандсвязывающие и иммунохимические свойства А1М человека.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Новый эффективный метод выделения А1М из мочи человека, основанный на избирательном осаждении белковой фракции сульфатом аммония и изопропиловым спиртом с последующей гель-фильтрацией, и способ получения препаративных количеств высокоочищенного А1М иммуноаффинной хроматографией на сорбенте с иммобилизованным МАТ к А1М.

2. Получение и свойства МАТ клонов G6, F9, H8 и B2 против А1М человека, которые по показателям сродства ( $K_a \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) и эпитопной специфичности могут использоваться в иммуноаффинной хроматографии и иммуноанализе А1М.

3. Впервые изучена конформационная стабильность А1М при действии денатурирующих агентов (мочевины, гуанидингидрохлорида, рН). Установлена высокая способность А1М к ренатурации.

4. Впервые установлено свойство А1М связывать йодированные производные тиронина, тирозина и эстрадиола.

5. Разработаны конструкции, определены аналитические параметры и медико-диагностические показатели новых иммуноферментных тест-систем для количественного определения А1М в моче человека.

**Личный вклад соискателя.** Все исследования по выделению и очистке А1М, определению лигандсвязывающих и иммунохимических свойств А1М, характеристике специфических МАТ и разработке иммуноаналитических систем для количественного определения А1М выполнены автором самостоятельно в лаборатории химии белковых гормонов Института биоорганической химии НАН Беларуси под научным руководством д.х.н. О.В. Свиридова.

Гибридомы, продуцирующие МАТ к А1М, получены на базе Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии» МЗ РБ. Часть спектральных исследований А1М выполнена на базе Государственного научного учреждения «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси». На стадиях планирования отдельных этапов работы и критического обсуждения полученных результатов соискатель пользовался методической и консультативной помощью член-корр., д.б.н. В.М. Мажуля, к.б.н. А.Г. Прядко, к.б.н. С.Ж. Кананович, к.б.н. А.П. Дрожденюка и к.х.н. И.И. Вашкевич.

**Апробация результатов диссертации.** Материалы диссертационной работы были представлены на I, II и III Международной научной конференции «Химия, структура и функции биомолекул» (Минск, 2004, 2006, 2008), на Международных научных конференциях молодых ученых «Молодежь в науке – 2004» и «Молодежь в науке – 2006» (Минск, 2004, 2006), на Международной научно-практической конференции «Перспективы и проблемы развития

биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран содружества» (Нарочь, 2005), на VII съезде Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 2006), на Четвертом московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2007), на Международной научной конференции молодых ученых и студентов «Современные проблемы микробиология и биотехнологии» (Одесса, 2007). Результаты диссертации неоднократно обсуждались на семинарах лаборатории химии белковых гормонов Института биоорганической химии НАН Беларуси.

**Опубликованность результатов диссертации.** По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 4 статьи в научных журналах (3,7 авторских листа), 3 – в сборниках материалов конференций и тезисы 6 докладов. Общий объем опубликованных материалов составляет 41 страницу.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, четырех глав, заключения, списка цитируемой литературы и 5 приложений. В главе 1 приводится обзор литературных данных по структуре, химическим свойствам, биологической роли и диагностической значимости А1М как представителя семейства липокалинов. В главе 2 изложены материалы и экспериментальные методы исследований. В главе 3 представлены результаты получения А1М и специфических МАТ, изучения свойств МАТ, важных для использования в иммуноаффинной хроматографии и иммунохимических системах, исследования конформационной стабильности, лигандсвязывающих и иммунохимических свойств А1М, а также результаты использования А1М и специфических МАТ для создания новых иммуноаналитических тест-систем. В главе 4 обсуждаются полученные результаты. Работа изложена на 162 страницах рукописного текста, содержит 27 рисунков и 8 таблиц. Список цитируемой литературы включает 233 ссылки.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **АЛЬФА-1-МИКРОГЛОБУЛИН ЧЕЛОВЕКА И РОДСТВЕННЫЕ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА ЛИПОКАЛИНОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

В литературном обзоре рассматриваются особенности структурной организации и общие молекулярные свойства А1М и белков семейства липокалинов, к которому он относится, а также обсуждается биологическая роль и диагностическая значимость А1М. К настоящему времени накоплено большое количество данных о структурно-функциональных свойствах белков семейства липокалинов. Что касается А1М, то отсутствуют сведения о фолдинге белковой глобулы, недостаточно изучены многие аспекты лигандсвязывающих свойств и методология иммуноанализа А1М.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали N-оксисукцинимидный эфир биотинил-ε-аминокапроновой кислоты, гуанидингидрохлорид, мочевины, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, 3,3',5,5'-тетрайодтиронин (тироксин, T<sub>4</sub>), 3,3',5-трийодтиронин (T<sub>3</sub>), тирозин (Tyr), 3-монойодтирозин (Tyr-I), 3,5-дийодтирозин (Tyr-I<sub>2</sub>), эстрадиол (E<sub>2</sub>) («Sigma», США), пероксидазу из корней хрена («Biozyme», Великобритания), 3,5-дийодтиронин (T<sub>2</sub>), диметилсульфоксид, каприловую кислоту («Fluka», Германия), сефарозу 4В, активированную CNBr («Pharmacia», Швеция).

Гибридомы, продуцирующие МАТ к А1М, получены в результате гибридизации спленоцитов мышей BALB/c, иммунизированных А1М человека, и клеток мышинной миеломы Р3Х63-Аg8 653. Выбранные культуры прививали внутрибрюшинно мышам линии BALB/c. МАТ выделяли из асцитической жидкости мышей по известному методу [M. Steubach, 1969].

Для получения конъюгатов биотина с А1М и МАТ использовали универсальную методику биотинилирования в мягких условиях с помощью N-оксисукцинимидного эфира биотинил-ε-аминокапроновой кислоты [F. Miralles, 1991]. Конъюгаты антител с пероксидазой хрена синтезировали по общепринятому методу [M.V. Wilson, 1978]. Аффинные сорбенты для хроматографической очистки А1М получали иммобилизацией МАТ G6 и F9 на сефарозе 4В, активированной CNBr, через полипептидный компонент антител в соответствии с инструкцией производителя хроматографического сорбента.

Диск-электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия проводили в полиакриламидном геле по методу [U.K. Laemmli, 1970].

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили в полистирольных планшетах марки ЕВ («Labsystems», Финляндия), оптическую плотность в лунках определяли с использованием спектрофотометра АИФ-М/340 (НПО «Витязь», Беларусь).

Флуоресцентные и абсорбционные измерения выполняли на приборе СМ 2203 («Solar», Беларусь). Спектры кругового дихроизма (КД) записывали на спектрополяриметре J-20 («Jasco», Япония). Моделирование взаимодействия А1М с тироксином осуществляли с помощью программы MolSoft ICM 3.5.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Получение и свойства альфа-1-микроглобулина и специфических моноклональных антител

В диссертационном исследовании разработан способ получения высокоочищенного препарата А1М человека, включающий избирательное осаждение белков мочи сульфатом аммония и изопропанолом с последующей гель-хроматографией на акрилексе П-60. Схема выделения состоит из простых в исполнении стадий, не требует дорогостоящих реактивов и оборудования и

позволяет получить целевой белок за два рабочих дня. Выход А1М из источников, обогащенных этим белком, превышал 50 % (таблица 1), что выгодно отличает разработанный метод от ряда описанных схем выделения с выходами в диапазоне 10–20 % [В. Ekstrom 1977; А.О. Grubb, 1983; Н. Wakui, 1989]. По данным ИФА с применением стандартизированной антисыворотки К:323 [L.E. Logdberg, 2000] высокоочищенный препарат А1М полностью сохранял антигенные свойства, что является необходимым условием использования белка в качестве иммуногена для получения МАТ и компонента иммунохимических систем для определения А1М в физиологических жидкостях организма человека.

Таблица 1 – Характеристика стадий выделения А1М человека

Стадии очистки	Общий белок, мг	А1М, мг	Чистота, %	Выход, %
Исходное сырье	380	10,5	2,7	100
Осаждение сульфатом аммония (осадок)	220	7,6	3,5	72
Осаждение изопропанолом (осадок)	30	6,5	22	62
Гель-фильтрация, акрилекс П-60 (фракция 3)	5,5	5,5	>95	52

Примечание – В качестве исходного сырья использовали 0,4 л мочи больных хронической почечной недостаточностью, находящихся на гемодиализе

МАТ к А1М получали с использованием традиционных приемов гибридной технологии. С использованием очищенного А1М была проведена иммунизация мышей линии BALB/c и осуществлены все необходимые этапы получения антителопродуцирующих клонов гибридных клеток. Путем селекции с применением ИФА были выбраны четыре клона гибридных клеток G6, F9, H8 и B2 с высокими уровнями продукции антител.

Количественную оценку сродства полученных МАТ к А1М осуществляли по результатам конкурентного взаимодействия биотинилированных МАТ G6, F9, H8 или B2 и соответствующих немеченых МАТ в возрастающих концентрациях с иммобилизованным на твердой фазе А1М (таблица 2). В работе был проведен анализ природы антигенных эпитопов А1М (линейные или конформационные) и аддитивности связывания МАТ с А1М [В. Friguet, 1983] с целью обнаружения иммунных пар и выбора иммунных зондов для структурных исследований антигена и для количественного определения А1М

Таблица 2 – Константы связывания МАТ с А1М

МАТ	Субкласс IgG	$K_a \times 10^{-9}, M^{-1}$
G6	IgG1	1,10±0,05
F9	IgG1	1,0±0,05
H8	IgG1	0,85±0,03
B2	IgG1	0,55±0,03

прямым ИФА. Рассчитанные индексы аддитивности связывания МАТ каждой пары F9/H8, G6/F9, G6/H8, G6/B2 и F9/B2 приближались к 100 %, что указывает на отсутствие конкуренции между двумя МАТ и отражает одновременное связывание антигена с обоими антителами. МАТ H8 и B2 конкурировали за антигенные сайты, что свидетельствовало о

взаимодействии двух МАТ с одним общим или двумя перекрывающимися эпитопами на А1М. Воздействия химических и физических факторов, нарушающих вторичную и третичную структуру А1М, приводили к снижению связывания этого липокалина с МАТ F9 и практически не влияли на взаимодействие с МАТ G6, H8 и B2. Полученные данные позволяют сделать вывод о конформационной природе антигенных детерминант А1М для МАТ F9 и линейности эпитопов для МАТ G6, H8 и B2.

С целью получения важных для практики структурных характеристик МАТ были проанализированы спектры КД и собственной флуоресценции антител в средах, наиболее часто используемых в качестве элюентов в иммуноаффинной хроматографии. При рН 2,3 и 11,5 происходило изменение вторичной и третичной структур МАТ G6. В тоже время среда с рН 11,5 практически не влияла на конформацию МАТ F9. МАТ G6 полностью ренатурирует после его перевода в буферный раствор с нейтральным рН, а МАТ F9, обработанное при рН 2,3, частично теряет нативную структуру.

Параметры антигенсвязывающей активности и структурные характеристики изученных МАТ позволяют использовать их как иммунные зонды для структурно-функциональных исследований липокалина А1М, а также в качестве реагентов для биоспецифической хроматографии А1М и компонентов иммуноаналитических систем для количественного определения этого белка.

С целью определения условий, которые обеспечивают эффективное высвобождение А1М из комплексов с МАТ без повреждения молекулярных структур антигена и антитела, мы оценили возможность использования ряда химических реагентов в качестве элюентов в иммуноаффинной хроматографии А1М на сорбентах с иммобилизованными МАТ F9 и G6 (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние химических агентов на иммунореактивность А1М и антигенсвязывающую активность МАТ и эффективность элюентов в иммуноаффинной хроматографии А1М

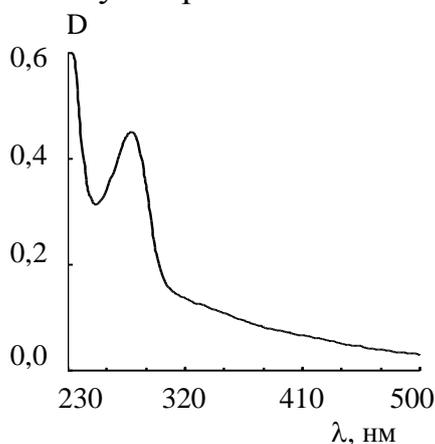
Реагент	Активность, %				Эффективность элюции, %		
	А1М	МАТ F9		МАТ G6		МАТ F9	МАТ G6
		1	2	1	2		
0,1 М глицин-HCl, рН 2,3	95±5	85±5	25±5	95±5		80	85
0,1 М глицин-HCl, рН 2,3 + 1 М NaCl						95	100
0,1 М NH <sub>4</sub> OH, рН 11,5	90±5	95±5		95±5		100	30
0,1 М NH <sub>4</sub> OH, рН 11,5 + 1 М NaCl						100	30
30 % пропиленгликоль	95±5	90±10		90±10		0	10
30 % пропиленгликоль+ 1 М NaCl						0	15
1 М NaI						0	5
0,1 М Дийодсалицилат лития, рН 7,5		10±2	10±2	30±5	20±5	45	60

Примечание - Цифрами обозначены способы обработки МАТ перед определением связывающей активности методом ИФА. 1 – инкубация МАТ с реагентами в растворе и последующая иммобилизация прямой адсорбцией. 2 – иммобилизация МАТ прямой адсорбцией в лунках и последующая инкубация с изучаемыми реагентами.

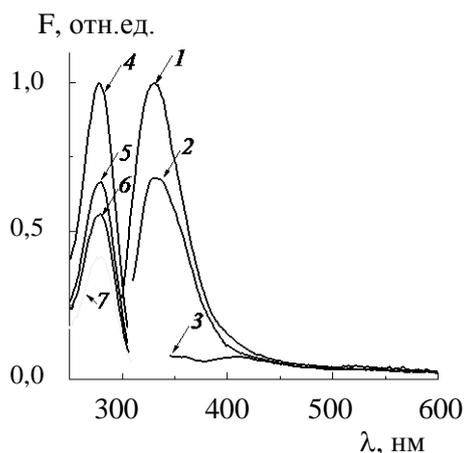
С практической точки зрения элюция А1М с иммобилизованного МАТ G6 при рН 2,3 в присутствии 1 М NaCl или десорбция антигена с твердофазного МАТ F9 при рН 11,5 обеспечивают получение с высоким выходом функционально активного А1М человека и способствуют многократному использованию биоспецифических сорбентов в иммуноаффинной хроматографии. Характеристики аффинноочищенного препарата А1М позволяют применять его в структурно-функциональных исследованиях и использовать в качестве компонента в тест-системах для количественного определения А1М методом ИФА.

### Конформационная стабильность альфа-1-микроглобулина

В данной работе проведен люминесцентный анализ А1М человека. А1М поглощает свет в ультрафиолетовой и видимой областях (240–500 нм), имеет максимум при 280 нм и плечо в области 310–370 нм (рисунок 1). Спектр флуоресценции А1М при возбуждении светом с длинами волн 280 нм и 297 нм имеет один максимум при 332 нм, присущий триптофансодержащим белкам.



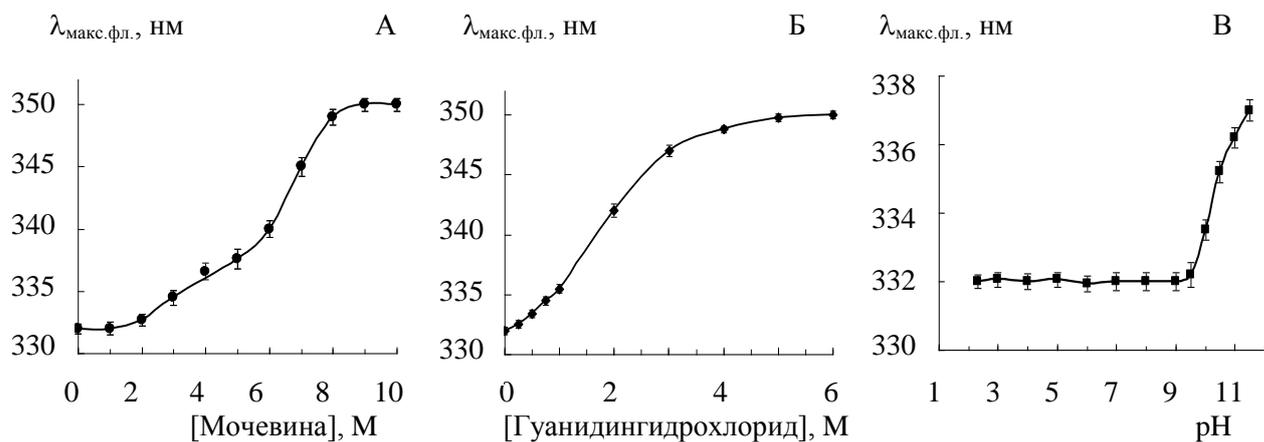
**Рисунок 1 – Спектр поглощения А1М**



1 –  $\lambda_{\text{возб.фл.}} = 280$  нм, 2 –  $\lambda_{\text{возб.фл.}} = 297$  нм,  
3 –  $\lambda_{\text{возб.фл.}} = 320$  нм, 4 –  $\lambda_{\text{рег.фл.}} = 332$  нм,  
5 –  $\lambda_{\text{рег.фл.}} = 340$  нм, 6 –  $\lambda_{\text{рег.фл.}} = 350$  нм,  
7 –  $\lambda_{\text{рег.фл.}} = 360$  нм

**Рисунок 2 – Спектры испускания (1-3) и возбуждения (4-7) флуоресценции А1М**

При возбуждении вне полосы поглощения триптофана белок практически не флуоресцирует (рисунок 2). Измерения положения максимума спектра триптофановой флуоресценции ( $\lambda_{\text{макс.фл.}}$ ) позволили оценить конформационное состояние белка в нативном состоянии и при его структурных модификациях под действием мочевины, гуанидин-гидрохлорида и рН среды. А1М одностадийно денатурирует при воздействии мочевины в концентрации 2–8 М (рисунок 3 А) и гуанидингидрохлорида в интервале концентраций 0,25–5 М (рисунок 3 Б) с переводом компактной глобулы белка в состояние рыхлого клубка. Анализ конформационной стабильности А1М в интервале рН 2,3–9,5 по данным триптофановой флуоресценции показал отсутствие изменения третичной структуры. При увеличении рН наблюдается небольшой длинноволновый сдвиг  $\lambda_{\text{макс.фл.}}$ , что свидетельствует о конформационной перестройке А1М (рисунок 3 В).



**Рисунок 3 – Стабильность третичной структуры А1М в присутствии мочевины (А), гуанидингидрохлорида (Б), при различных значениях рН (В) по данным триптофановой флуоресценции**

По данным спектроскопии КД в ультрафиолетовой области (200–260 нм) вторичная структура А1М является преимущественно  $\beta$ -складчатой. Об этой свидетельствуют положение максимума оптической активности при 213–214 нм и небольшие абсолютные величины молярной эллиптичности (в пересчете на аминокислотный остаток), не характерные для  $\alpha$ -спиралей. Для вторичной структуры белка свойственна высокая устойчивость к воздействию растворов с различными значениями рН. При рН 2,3 и 11,5 спектры КД А1М практически не изменяются. В условиях денатурирующего воздействия гуанидингидрохлорида и мочевины вторичная структура менее устойчива.

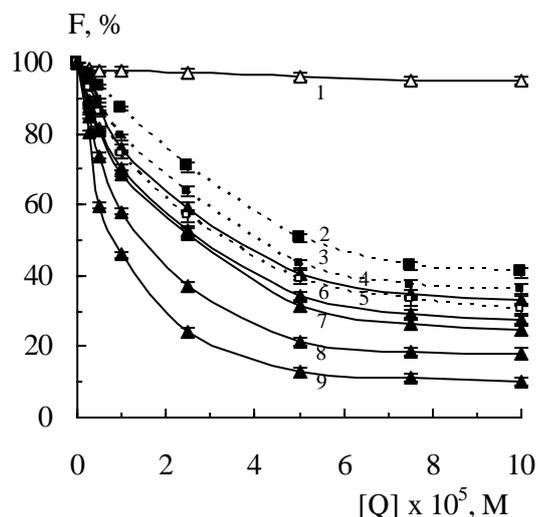
Изучение действия денатурантов на быструю (наносекундную) внутримолекулярную динамику А1М было проведено методом вращательной деполаризации триптофановой флуоресценции. А1М в буферном растворе с рН 7,4 имеет значение поляризации триптофановой флуоресценции ( $P_{\text{фл.}}$ ) 21 %, что указывает на существенное ограничение (вследствие стерических препятствий) амплитуды крутильных колебаний триптофанилов в глобуле А1М. Снижение значений  $P_{\text{фл.}}$  А1М до 14 % в 10 М мочевины свидетельствует о значительном усилении внутримолекулярной динамики на уровне аминокислотных остатков. Гуанидингидрохлорид значительно сильнее, чем мочевина, лабилизирует наносекундную внутримолекулярную динамику А1М, на что указывает наблюдаемое снижение значений  $P_{\text{фл.}}$  до 7 %, соответствующее денатурированным белкам с полностью развернутой структурой, при достижении концентрации гуанидингидрохлорида 3 М. Особенностью действия гуанидингидрохлорида является максимальное усиление наносекундной внутримолекулярной динамики А1М до завершения денатурационного конформационного перехода.

А1М характеризуется высокой способностью к ренатурации. Все структурные превращения А1М, происходящие под действием мочевины, гуанидингидрохлорида и щелочных значений рН среды полностью обратимы. Об этом свидетельствует возвращение к исходным значениям спектральных характеристик А1М после удаления денатурантов из растворов с помощью диализа.

## Лигандсвязывающие свойства альфа-1-микроглобулина

Для оценки лигандной специфичности А1М были проведены анализ литературных данных, касающихся структурной и филогенетической взаимосвязи этого белка с другими представителями семейства липокалинов, а также собственные исследования с использованием компьютерных баз данных и соответствующих программ. Наиболее гомологичным по аминокислотной последовательности липокалином по отношению к А1М оказалась простагландин-Д-синтетаза. Основными описанными в литературе лигандами этого липокалина являются ретиноиды, желчные пигменты и тироидные гормоны [Т. Tanaka, 1997; С.Т. Veuckmann, 1999]. Как известно, А1М также способен связывать ретинол и гемсодержащие соединения [J. Escribano, 1988; J. Larsson, 2004]. На основании высокой гомологии аминокислотной последовательности этих белков и некоторого перекрытия спектра известных лигандов мы предположили, что А1М также способен взаимодействовать с соединениями тирониновой структуры. Для установления факта связывания А1М с лигандами и определения структурных особенностей этих взаимодействий мы использовали ряд соединений, включающий йодтиронины и йодтирозины. Кроме того, в работе использовали эстрадиол и его йодпроизводные. Литературным указанием для такого дополнения послужило то, что хорошо изученный липокалин альфа-1-кислый гликопротеин связывает эстрадиол и другие стероиды [J. Kerkay, 1968].

Для изучения взаимодействий А1М с низкомолекулярными лигандами было использовано несколько независимых методов. Для установления факта и доказательства обратимости лиганд-белковых взаимодействий применяли методы гель-хроматографии и электрофореза [Г. Детерман, 1970; Т.Л. Hardy, 1962; Р. Fernlund, 1990]. Параметры комплексообразования лигандов с А1М были определены с помощью флуоресцентной спектроскопии [С.Т. Veuckmann, 1999; R.L. Levine, 1977; U. Cogan, 1976; R. Verni, 1993]. Установлено, что значения констант ассоциации имеют порядок  $10^4$ – $10^6$   $M^{-1}$  (таблица 3), причем сродство лигандов к А1М изменяется в ряду  $T_4 > T_3 > Tyr-I_2 > T_2 \approx Tyr-I \approx 2-I-E_2 > 4-I-E_2 > E_2$ . Исследуемые физиологически активные вещества в разной степени тушат триптофановую флуоресценцию А1М по статическому механизму в результате образования лиганд-белковых комплексов, за исключением тирозина, который не связывается с А1М (рисунок 4).



**Рисунок 4 – Зависимость максимальной интенсивности флуоресценции А1М от концентраций Tyr (1), E<sub>2</sub> (2), 4-I-E<sub>2</sub> (3), Tyr-I (4), 2-I-E<sub>2</sub> (5), T<sub>2</sub> (6), Tyr-I<sub>2</sub> (7), T<sub>3</sub> (8) и T<sub>4</sub> (9)**

Таблица 3 – Характеристики лиганд-белкового взаимодействия А1М

Лиганд	$(F_0-F)/F_0$ , %	$\Delta\lambda_{1/2}$ , нм	$K_q \cdot 10^{-12}$ , $M^{-1} c^{-1}$	$n$	$K_a \cdot 10^{-5}$ , $M^{-1}$
Тур	1	-	0,015	-	-
Тур-I	24	1	1,7	1	1,4
Тур-I <sub>2</sub>	32	2	3,0	1	2,4
T <sub>2</sub>	30	1	2,0	1	1,8
T <sub>3</sub>	42	2	3,6	1	3,0
T <sub>4</sub>	54	3	7,0	1	8,8
E <sub>2</sub>	13	2	1,2	1	0,6
2-I-E <sub>2</sub>	26	3	1,8	1	1,5
4-I-E <sub>2</sub>	21	3	1,5	1	1,2

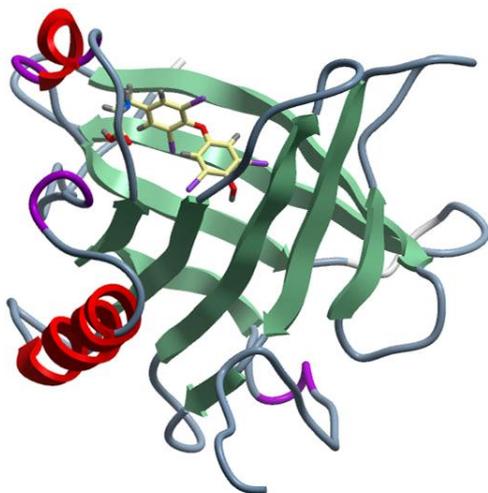
Примечание – Измерения проведены при  $\lambda_{\text{возб.фл.}} = 297$  нм, 20 °С, рН 7,4.  $(F_0-F)/F_0$  – степень тушения флуоресценции А1М при соотношении белок/лиганд, равном 1/1.  $\Delta\lambda_{1/2}$  – полуширина спектра флуоресценции А1М в лиганд-белковом комплексе относительно ширины спектра свободного А1М при соотношении белок/лиганд, равном 1/1.

Известно, что связывание тироидных гормонов со специфическими белками происходит за счет образования водородной связи с фенольным гидроксилем в положении 4' [V. Cody, 1981]. Йодтиронины характеризуются различной степенью ионизации 4'-ОН, которая зависит от рН среды. При физиологических значениях рН фенольный гидроксил T<sub>4</sub> ионизирован на 80 %, тогда как в T<sub>3</sub> он ионизирован только на 10 %. Мы предположили, что, возможно, данный факт определяет существенные различия в константах взаимодействия этих лигандов с А1М при физиологическом значении рН. Согласно уравнению Хендерсона-Хассельбаха при рН 6,3 фенольный гидроксил T<sub>4</sub> будет ионизован на 10 %, а при рН 9,4 группа 4'-ОН в T<sub>3</sub> ионизируется на 80 %. Для определения роли 4'-ОН в образовании связи с белком были определены константы ассоциации А1М с T<sub>4</sub> и T<sub>3</sub> при рН 6,3 и рН 9,4 соответственно. Было установлено, что константы взаимодействия лигандов с А1М являются одинаковыми при различной степени диссоциации фенольного гидроксила обоих йодтиронинов. Полученные данные позволяют утверждать, что степень ионизации 4'-ОН не влияет на взаимодействие данных лигандов с А1М и фенольный гидроксил, по-видимому, не участвует в комплексообразовании.

Для определения вклада других элементов структуры молекулы тироксина в связывание с белком мы анализировали изменение значений констант ассоциации с А1М в следующем ряду соединений: T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>2</sub>, Тур-I<sub>2</sub> и Тур-I. В отличие от T<sub>4</sub> и T<sub>3</sub> их аналог T<sub>2</sub> не содержит йодных заместителей во втором (внешнем) кольце и характеризуется несколько меньшей константой связывания с А1М по сравнению с T<sub>3</sub>. Экспериментальные данные могут свидетельствовать в пользу вовлечения атомов йода во взаимодействие с белком. Тур-I<sub>2</sub> отличается от T<sub>2</sub> тем, что не содержит внешнего кольца, и кислород присутствует в молекуле в виде гидроксила, а не в форме эфирной связи. Отсутствие второго кольца и наличие гидроксильного, а не эфирного кислорода у Тур-I<sub>2</sub> не приводит к значимому изменению аффинности

связывания по сравнению с  $T_2$ , что позволяет исключить вклад во взаимодействие с белком эфирного кислорода молекулы  $T_4$ . Потеря одного из йодов  $Tyr-I_2$  с образованием  $Tyr-I$  приводит к незначительному снижению константы ассоциации, тогда как потеря второго йода в случае  $Tyr$  полностью лишает соединение способности связываться с белком.

На основании анализа полученных данных можно предположить, что основной вклад во взаимодействие с А1М вносят йодные заместители в положении 3,3',5 и 5' молекулы  $T_4$ , тогда как другие функциональные группы лиганда не вносят существенного вклада в комплексообразование. Косвенным доказательством отсутствия роли аминокислотной группировки тироксина в



**Рисунок 5 – Модель взаимодействия А1М с  $T_4$**

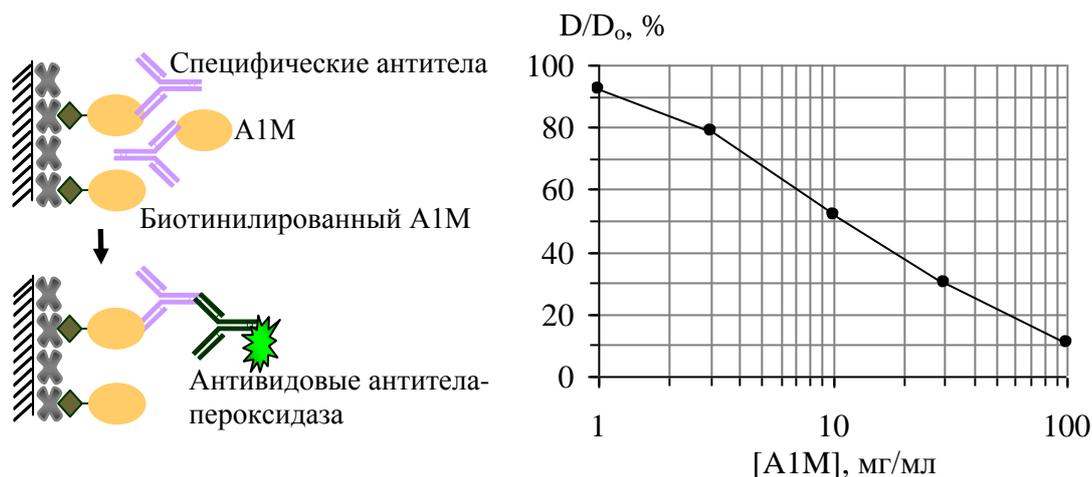
стабилизации комплекса может служить сходство констант взаимодействия  $Tyr-I$  и йодэстрадиолов. Обусловленные йодом взаимодействия по своей природе являются гидрофобными.

Компьютерное моделирование позволяет предположить несколько структур комплексов А1М- $T_4$ , в которых взаимодействие лиганда и белка обусловлено только связями гидрофобной природы и происходит без образования ионных и водородных связей между компонентами комплекса (рисунок 5). В данных структурах тироксин находится в липокалиновом кармане.

Детально определить структуру связывающего сайта А1М и ответственные за взаимодействие аминокислотные остатки будет возможно только посредством рентгеноструктурного анализа его комплексов. Подходящим лигандом для таких исследований А1М может оказаться  $T_4$ .

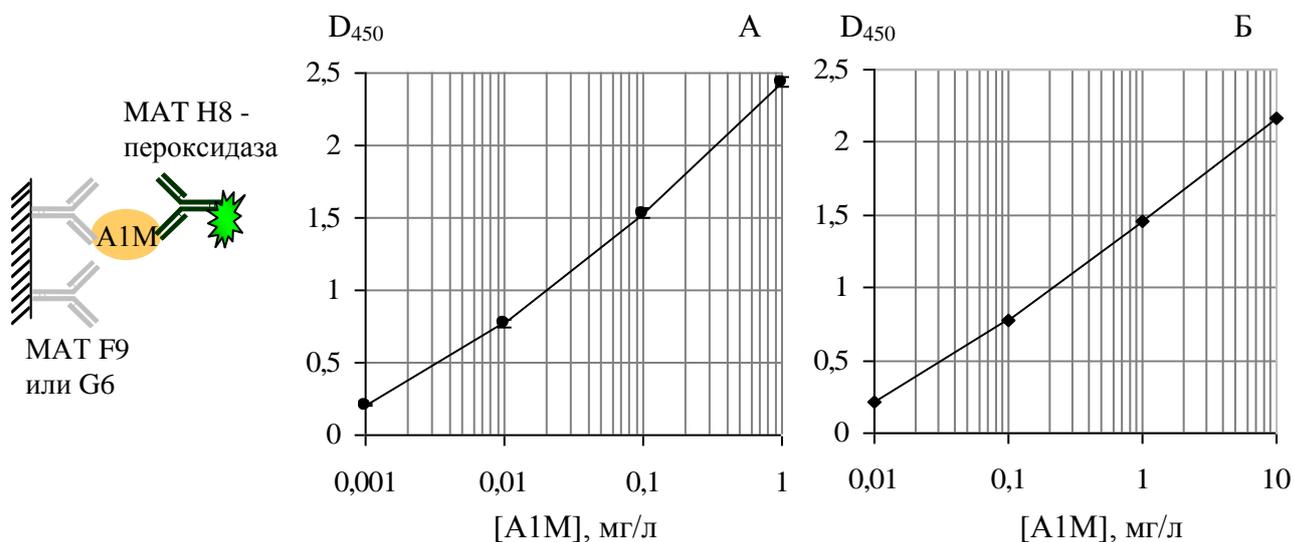
### **Иммуноаналитические системы для определения альфа-1-микроглобулина**

В рамках настоящего исследования получены основные компоненты и разработаны конструкции конкурентного и прямого ИФА для измерения концентрации А1М человека в биологических жидкостях. Для оценки эффективности нового метода выделения А1М была разработана система количественного определения этого белка с использованием очищенного А1М, его биотинилированного аналога и поликлональных антител к А1М. Система основана на принципе конкурентного ИФА (рисунок 6), состоящем в распределении антител между антигеном в составе анализируемой пробы и его биотинилированным аналогом. Типичная калибровочная кривая конкурентного иммуноферментного анализа А1М представлена на рисунке 6.



**Рисунок 6 – Схема и типичная калибровочная кривая конкурентного ИФА А1М**

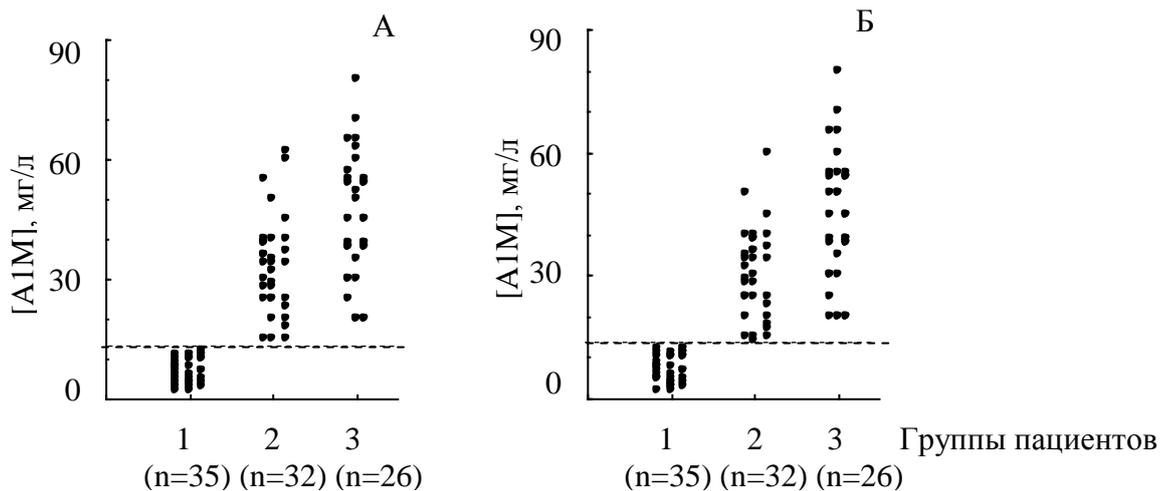
Пары МАТ G6/H8 и F9/H8, взаимодействующие с пространственно изолированными эпитопами антигена, были использованы для создания системы количественного определения А1М методом прямого твердофазного ИФА. Молекулярной основой анализа является образование комплексов А1М в составе калибровочных проб или исследуемых образцов с парой МАТ, одно из которых иммобилизовано на твердой фазе, а другое конъюгировано с пероксидазой из корней хрена и находится в жидкой фазе. Выявляемая с помощью хромогена ферментативная активность пероксидазы пропорциональна содержанию А1М (рисунок 7).



**Рисунок 7 – Схема и калибровочные графики прямого ИФА А1М на основе пар МАТ F9/H8 (А) и G6/H8 (Б)**

Установлено, что применение тест-систем на основе пар МАТ F9/H8 и G6/H8 позволяет достоверно различать здоровых людей от пациентов с нефрологическими заболеваниями (рисунок 8). Технические и аналитические

параметры двух тест-систем соответствуют современным международным требованиям. Аналитическая чувствительность (минимальная определяемая концентрация) тест-системы с МАТ G6/H8 составила 5 мкг/л, тогда как система с МАТ F9/H8 имеет более высокую чувствительность – 0,5 мкг/л. Тест-системы характеризуются хорошей воспроизводимостью результатов, так как коэффициент вариации не превышает 10 %, и открытие находится в диапазоне 85–115 %. Анализ А1М с использованием разработанных тест-систем является простым и быстрым в исполнении.



**Рисунок 8 – Определение с помощью ИФА-систем на основе МАТ F9/H8 (А) и МАТ G6/H8 (Б) концентрации А1М в моче здоровых доноров (1), больных хронической почечной недостаточностью (2) и пациентов после пересадки почки (3)**

Разработанные тест-системы для одностадийного прямого ИФА А1М с использованием собственных тщательно изученных реагентов могут эффективно использоваться в биомедицинских исследованиях. Кроме того, они могут служить основой создания промышленно выпускаемого набора реагентов для клинической диагностики нефрологических заболеваний.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

## Основные научные результаты диссертации

1. Разработан новый метод получения высокоочищенного препарата А1М из мочи человека. Схема выделения состоит из простых в исполнении стадий осаждения белков сульфатом аммония и изопропиловым спиртом с последующим разделением выделенной белковой фракции геле-хроматографией и позволяет получить целевой белок в короткие сроки, с достаточно хорошим выходом (более 50 %) без применения дорогостоящих реактивов и оборудования [1, 6, 8].

Для препаративной наработки чистого А1М в целях научных исследований и технологий иммуноанализа разработан способ, основанный на иммуноаффинной хроматографии с использованием двух различных по свойствам МАТ и элюции целевого продукта при рН 2,3 или 11,5 [3].

2. Получены и охарактеризованы четыре МАТ клонов G6, F9, H8 и B2 против А1М человека. Показатели сродства ( $K_a \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$ ), эпитопной специфичности (аддитивно связывающиеся пары G6/F9, G6/H8, G6/B2, F9/H8, F9/B2) и обнаруженный эффект обратимости структурных изменений, индуцированных химическими агентами, позволяют использовать эти МАТ в биоспецифических методах очистки и количественного определения А1М [2, 9].

3. Охарактеризовано влияние химических воздействий, моделирующих условия иммуноаффинной хроматографии, на пространственные структуры А1М и МАТ G6 и F9 и их способность образовывать иммунные комплексы. На основании этих данных выбраны оптимальные режимы проведения иммуноаффинной хроматографии, обеспечивающие получение с высоким выходом очищенного иммунореактивного антигена [2, 7].

4. Методами электронной спектроскопии показано наличие у А1М преимущественно  $\beta$ -складчатой вторичной структуры и компактной третичной структуры. Установлена способность А1М к восстановлению исходной, характерной для нативного белка, конформации и внутримолекулярной динамики после разворачивания глобулы под действием сильных денатурирующих агентов (10 М мочевины, 6 М гуанидингидрохлорид, рН 11,5). Показано, что разворачивание А1М под действием денатурантов сопряжено с выраженным усилением наносекундной внутримолекулярной динамики белка [2, 4, 7].

5. Установлена способность А1М образовывать комплексы с йодированными производными тиронина и тирозина, эстрадиолом и его йодпроизводными. Значения  $K_a$  А1М с новыми лигандами находятся в диапазоне  $10^4$ – $10^6 \text{ M}^{-1}$ , и главный вклад в энергию комплексообразования дают гидрофобные взаимодействия [10, 12, 13].

6. Разработан метод конкурентного ИФА А1М с использованием биотинилированного А1М, твердофазного биотинсвязывающего белка стрептавидина и поликлональных антител к А1М для количественного

определения А1М в моче и ее фракциях на разных стадиях идентификации, выделения и очистки целевого продукта [5, 11].

Созданы новые конструкции тест-систем для прямого ИФА А1М, базовыми компонентами которых являются пары МАТ G6/H8 и F9/H8, направленные к различным антигенным детерминантам белка. Анализ проходит в одну стадию, характеризуется быстротой и малой трудоемкостью. Эти иммуноаналитические системы могут эффективно использоваться в биомедицинских исследованиях и служить основой создания набора реагентов для определения А1М в биологических жидкостях организма человека методом ИФА [2, 11].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

Результаты изучения конформационной стабильности и активности А1М и специфических МАТ, методы очистки А1М и его количественного определения, а также образцы этих биополимеров используются в научных и прикладных исследованиях Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Результаты исследования конформационной стабильности А1М важны для понимания механизмов стабилизации и формирования пространственной структуры белков.

Полученные знания о структурных аспектах комплексообразования А1М с йодтиронинами, йодтирозинами, эстрадиолом и его йодпроизводными могут быть полезными для дальнейшего изучения строения лигандсвязывающего сайта этого липокалина.

Разработанные иммуноаналитические системы могут использоваться в технологии выделения и очистки А1М, применяться в биомедицинских исследованиях и служить основой создания промышленно выпускаемого набора реагентов для определения А1М в биологических жидкостях организма человека.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

### Статьи в журналах:

1. Серченя, Т.С. Выделение, идентификация и антигенные характеристики альфа-1-микроглобулина человека / Т.С. Серченя, А.П. Дрожденюк, А.Г. Прядко, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2006. – № 2. – С. 60–64.
2. Серченя, Т.С. Структурные изменения антигена и моноклональных антител в условиях иммуноаффинной хроматографии альфа-1-микроглобулина человека / Т.С. Серченя, О.В. Свиридов // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2006. – Т. 50, № 6. – С. 59–65.
3. Серченя, Т.С. Исследование и практическое применение иммуноаффинной хроматографии альфа-1-микроглобулина человека / Т.С. Серченя // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2006. – № 5. – С. 86–89.
4. Мажуль, В.М. Люминесцентный анализ структурно-динамического состояния альфа-1-микроглобулина человека / В.М. Мажуль, С.Ж. Кананович, Т.С. Серченя, О.В. Свиридов // Биофизика. – 2007. – Т. 52, № 3. – С. 425–435.

### Статьи в сборниках материалов конференций:

5. Серченя, Т.С. Конкурентный иммуноферментный анализ белковых антигенов: новые подходы / Т.С. Серченя // Сборник трудов молодых ученых НАН Беларуси: материалы Междунар. научн. конф. «Молодежь в науке – 2004», Минск, 8–13 ноября 2004 г.: в 4 т. / НАН Беларуси; науч. ред.: И.Д. Волотовский, Ф.А. Лахвич. – Минск, 2004. – Т. 2 – С. 67–71.
6. Серченя, Т.С. Идентификация димерной формы альфа-1-микроглобулина в процессе его выделения из биологических жидкостей / Т.С. Серченя, А.Г. Прядко, А.П. Дрожденюк, В.Д. Свирид, О.В. Свиридов // Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран содружества: материалы Междунар. научн. – практ. конф., Минск-Нарочь, 25–28 мая 2005 г. / Белорус. гос. ун-т, НАН Беларуси, гос. конц. «Белбиофарм»; сост. и общ. ред.: А.Н. Евтушенкова. – Минск, 2005. – С. 220–221.
7. Серченя, Т.С. Структурные изменения альфа-1-микроглобулина человека в условиях иммуноаффинной хроматографии / Т.С. Серченя, О.В. Свиридов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем, VII съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков: материалы Междунар. научн. конф., Минск, 21–23 июня 2006 г.: в 2 т. / Ин-т биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Белорус. гос. ун-т, Белорус. общест. объедин. фотобиологов и биофизиков; редкол.: И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2006. – Т. 2. – С. 132–134.

## Тезисы докладов:

8. Серченя, Т.С. Выделение и химическая модификация альфа-1-микроглобулина человека для технологий иммуноанализа / Т.С. Серченя, А.П. Дрожденюк, А.Г. Прядко, И.И. Вашкевич, В.Д. Свирид, О.В. Свиридов // Химия, структура и функции биомолекул: тез. докл. на Межд. научн. конф., посвящ. 30-летию Института биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, 28–30 июня 2004 г. / Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2004. – № 2. – С. 101–102.

9. Серченя, Т.С. Характеристика и применение моноклональных антител к альфа-1-микроглобулину человека / Т.С. Серченя, А.Г. Прядко, О.В. Свиридов // Химия, структура и функция биомолекул: тез. докл. на II Межд. научн. конф., Минск, 3–5 октября 2006 г. / НАН Беларуси, Ин-т биоорганической химии НАН Беларуси, Беларус. хім. о-во; редкол.: Н.Б. Хрипач [и др.]. – Минск, 2006. – С. 127.

10. Михайлопуло, К.И. Лигандсвязывающая активность альфа-1-микроглобулина человека и эффекты ксенобиотиков / К.И. Михайлопуло, Т.С. Серченя, И.И. Вашкевич, А.Г. Прядко, О.В. Свиридов // Химия, структура и функция биомолекул: тез. докл. на II Межд. научн. конф., Минск, 3–5 октября 2006 г. / НАН Беларуси, Ин-т биоорганической химии НАН Беларуси, Беларус. хім. о-во; редкол.: Н.Б. Хрипач [и др.]. – Минск, 2006. – С. 97.

11. Серченя, Т.С. Разработка аналитических тест-систем для иммуноферментного определения альфа-1-микроглобулина человека и возможности их практического применения / Т.С. Серченя, А.Г. Прядко, О.В. Свиридов // Биотехнология: состояние и перспективы развития: тез. докл. на Четвертом Московском международном конгрессе, Москва, 12–16 марта 2007 г. / РАН, Рос. академия мед. наук, Рос. хим.-тех. ун-т им. Д.И. Менделеева, Рос. хим. о-во, ЗАО «Экспо-биохим-технологии». – Москва, 2007. – С. 132.

12. Serchenya, T.S. New ligand for an old lipocalin: the binding of estradiol and its derivatives to human alpha-1-microglobulin / T.S. Serchenya, I.I. Vashkevich, O.V. Sviridov // Modern Problems of Microbiology and Biotechnology: abstract book of the Young scientists' and students' international scientific conference, Odesa, Ukraine, 28–31 may 2007 / Mechnikov Odessa National University, Zabolotny Institute of microbiology and Virology, Vinogradsky Society of Microbiology; eds.: V.O. Ivanytsya [et al.]. – Odesa, 2007. – P. 132.

13. Серченя, Т.С. Связывание йодтиронинов и йодтирозинов с альфа-1-микроглобулином человека / Т.С. Серченя, К.И. Михайлопуло, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов // Химия, структура и функция биомолекул: тез. докл. на III Межд. научн. конф., посвящ. 80-летию Национальной академии наук Беларуси и 95-летию академика А.А. Ахрема, Минск, 1–3 октября 2008 г. / Ин-т биоорганической химии НАН Беларуси. – Минск, 2008. – С. 219–220.

## РЭЗЮМЭ

Сярчэня Таццяна Сяргееўна

Выдзяленне, структурныя характарыстыкі і імунахімічныя ўласцівасці альфа-1-мікраглабуліна чалавека

**Ключавыя словы:** альфа-1-мікраглабулін, монакланальныя антыцелы, імунаафінная храматаграфія, флуарэсцэнтная спектраскапія, канфармацыйная стабільнасць, ліганд-бялковае узаемадзеянне, імунааналіз, ныркавая няздатнасць.

**Аб'ект даследавання:** альфа-1-мікраглабулін (A1M) чалавека.

**Прадмет даследавання:** метады атрымання чыстых аб'ектаў, спектр-люмінесцэнтныя характарыстыкі, канфармацыйная стабільнасць, лігандзвязвальныя імунахімічныя ўласцівасці A1M чалавека.

**Мэта работы:** распрацаваць спосаб выдзялення і ачысткі A1M чалавека, вызначыць асноўныя спектр-люмінесцэнтныя характарыстыкі і устанавіць якасныя і колькасныя параметры комплексафарміравання A1M з нізкамалекулярнымі лігандамі. Атрымаць і ахарактэрызаваць монакланальныя антыцелы (МАЦ) для імунаафіннай храматаграфіі і імунааналізу A1M.

**Метады даследавання:** гель-храматаграфія, імунаафінная храматаграфія, імунахімічны аналіз, спектрафотаметрыя, флуарэсцэнтная спектраскапія, кругавы дыхраізм, камп'ютэрнае мадэліраванне.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна.** Распрацаваны новы метады выдзялення A1M з мачы чалавека. Атрыманы і ахарактэрызаваны чатыры МАЦ G6, F9, H8 і B2 да A1M. Устаноўлена здольнасць A1M да аднаўлення зыходнай канфармацыі і унутрымалекулярнай дынамікі пасля расхілення глобулы пры дзеянні мачавіны, гуанідзінгідрахларыда, рН. Вызначаны характарыстыкі комплексаў A1M з новымі лігандамі – ёдзіраванымі вытворнымі тыраніна, тыразіна і эстрадыёла. Створаны канструкцыі тэст-сістэм для імунаферментнага аналізу A1M як навукова-тэхнічная аснова набору рэактываў для медыцынскай дыягностыкі ныркавай няздатнасці.

**Ступень выкарыстання.** Вынікі даследавання канфармацыйнай стабільнасці A1M важны для разумення механізму стабілізацыі і фарміравання прасторавай структуры бялкоў. Атрыманая веды а структурных аспектах комплексафарміравання A1M з лігандамі могуць быць карыснымі для далейшага вывучэння будовы звязвальнага цэнтра. Створаныя тэст-сістэмы могуць эфектыўна выкарыстоўвацца у біямедыцынскіх даследаваннях і з'яўляцца асновай прамыслова выпускаемага набору рэактываў для выяўлення A1M у біялагічных вадкасцях арганізма чалавека.

**Галіна выкарыстання:** біяхімія, біяфізіка, клінічная медыцына.

## РЕЗЮМЕ

Серченя Татьяна Сергеевна

Выделение, структурные характеристики и иммунохимические свойства альфа-1-микроглобулина человека

**Ключевые слова:** альфа-1-микроглобулина человека, моноклональные антитела, иммуноаффинная хроматография, флуоресцентная спектроскопия, конформационная стабильность, лиганд-белковое взаимодействие, иммуноанализ, почечная недостаточность.

**Объект исследования:** альфа-1-микроглобулин (A1M) человека.

**Предмет исследования** – методы выделения объекта в чистом виде, спектрально-люминесцентные характеристики, конформационная стабильность, лигандсвязывающие и иммунохимические свойства A1M человека.

**Цель работы:** разработать способы выделения и очистки A1M человека, определить основные спектрально-люминесцентные характеристики белка и установить параметры комплексообразования A1M с низкомолекулярными лигандами. Получить и охарактеризовать моноклональные антитела (МАТ) для иммуноаффинной хроматографии и иммуноанализа A1M.

**Методы исследования:** гель-хроматография, иммуноаффинная хроматография, иммунохимический анализ, спектрофотометрия, флуоресцентная спектроскопия, круговой дихроизм, компьютерное моделирование

**Полученные результаты и их новизна.** Разработан новый метод получения высокоочищенного препарата A1M из мочи человека. Получены и охарактеризованы четыре МАТ клонов G6, F9, H8 и B2 против A1M человека. Установлена способность A1M к восстановлению исходной конформации и внутримолекулярной динамики после разворачивания глобулы под действием мочевины, гуанидингидрохлорида и pH. Определены характеристики комплексов A1M с новыми лигандами – йодированными производными тиронина, тирозина и эстрадиола. Созданы конструкции тест-систем для прямого иммуноферментного анализа A1M как научно-техническая основа набора реактивов для медицинской диагностики почечной недостаточности.

**Степень использования или рекомендации по использованию.** Результаты исследования конформационной стабильности A1M важны для понимания механизмов стабилизации и формирования пространственной структуры белков. Полученные знания о структурных аспектах комплексообразования A1M с лигандами могут быть полезными для дальнейшего изучения строения связывающего центра. Сконструированные тест-системы могут эффективно использоваться в биомедицинских исследованиях и служить основой создания промышленно выпускаемого набора реагентов для определения A1M в биологических жидкостях организма человека.

**Область применения:** биохимия, биофизика, клиническая медицина.

## SUMMARY

Serchenya Tatyana Sergeevna

Purification, structural characteristics and immunochemical properties of human alpha-1-microglobulin

**Key words:** human alpha-1-microglobulin, monoclonal antibodies, immunoaffinity chromatography, fluorescence spectroscopy, conformation, stability, ligand-protein interaction, immunoassay, renal failure.

**The object of research:** human alpha-1-microglobulin (A1M).

**The subject of research:** the methods for object purification, spectra-luminescent characteristics, stability, ligand-binding and immunochemical properties of A1M.

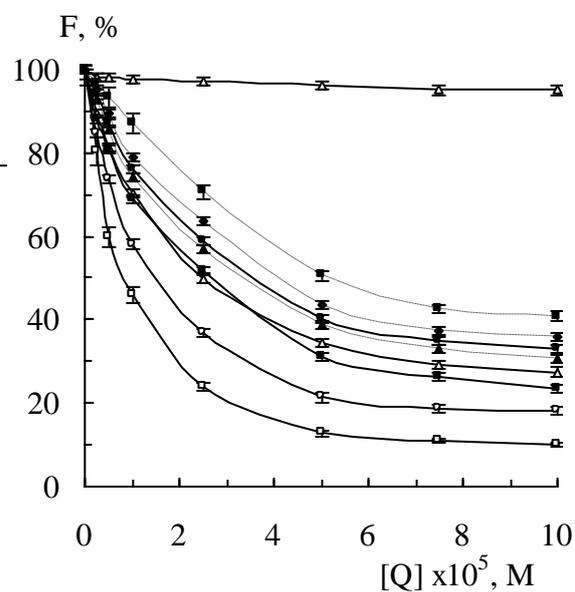
**The aim of work:** to develop the isolation and purification methods of human A1M, to determine the main spectra-luminescent characteristics of the protein and to establish qualitative and quantitative parameters of A1M-ligand complex formation. To obtain and characterize monoclonal antibodies (mAbs) for the immunoaffinity chromatography and immunoassay of A1M.

**Research methods:** gel chromatography, immunoaffinity chromatography, immunoassay, spectra-photometry, fluorescence spectroscopy, circular dichroism, molecular modeling and docking.

**The obtained results and their novelty.** The new method has been developed for obtaining a highly purified A1M preparation from human urine. Four mAbs G6, F9, H8 and B2 against human A1M have been obtained and characterized. A1M can regain the initial conformation and internal dynamics typical of native protein after denaturation unfolding of the globule with 10 M urea, 6 M guanidine hydrochloride or pH. The characteristics of the A1M complexes with new ligands – iodinated derivations of thyronine, iodotyrosine and estradiol. The constructions of immunoenzyme test-systems for quantitative determination of urinary A1M was developed as the scientific and technical basis of a medical diagnostics kit for detection of renal failure.

**The extent of use.** The results of the study of the conformational stability of A1M is important for understanding of the mechanisms of stabilization and formation of three-dimensional structure of proteins. The obtained data concerning the structural aspects of A1M-ligand complexation are useful for the further study of conformation of the ligand-binding site of this lipocalin. The test-systems may efficiently use in biomedical research and be the basis of a medical diagnostics kit.

**Areas of application:** biochemistry, biophysics, clinical medicine.



Научное издание

СЕРЧЕНЯ Татьяна Сергеевна

ВЫДЕЛЕНИЕ, СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ  
СВОЙСТВА АЛЬФА-1-МИКРОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук  
по специальности 03.00.04 – Биохимия

Подписано в печать 09.01.2009 г. Формат 60x84/16. Бумага офсетная.  
Гарнитура Times New Roman. Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,4.  
Тираж 60 экз. Заказ № 19.

Отпечатано в Республиканском унитарном предприятии  
«Информационно-вычислительный центр  
Министерства финансов Республики Беларусь».  
ЛП 02330/0056683 от 29.03.2004.  
220004, г. Минск, ул. Кальварийская, 17.