

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

УДК 577.1 + 612.017.1:573.6.086.83:57.083.3

ЦЫГАНОВА
Олеся Васильевна

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ПОЛНОРАЗМЕРНОЙ ФОРМЫ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ
ФРАГМЕНТОВ ТИРОПЕРОКСИДАЗЫ ЧЕЛОВЕКА**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 03.00.04 - Биохимия

Минск, 2006

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

- Научный руководитель** Свиридов Олег Васильевич
доктор химических наук,
заместитель директора по научной и
инновационной работе,
ГНУ «Институт биоорганической химии
НАН Беларуси»
- Официальные оппоненты:** Литвинко Наталья Михайловна
доктор химических наук,
заместитель академика-секретаря,
Отделение химии и наук о Земле НАН
Беларуси
- Сенчук Вадим Валентинович
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник,
Белорусский государственный университет,
НИЛ биохимии обмена веществ
- Оппонирующая организация:** Учреждение образования «Международный
государственный экологический
университет им. А. Д. Сахарова»

Защита состоится «24» января 2007 г. в 10.00 часов на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» по адресу: 220141, г. Минск, ул. акад. В.Ф. Купревича, 5/2.
Тел.: (017)267-72-73.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси».

Автореферат разослан « » декабря 2006 г.

Ученый секретарь
Совета по защите диссертаций,
доктор медицинских наук, профессор

Пивень Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами, темами. Диссертационная работа была выполнена в лаборатории химии белковых гормонов Института биоорганической химии НАН Беларуси в рамках четырех плановых НИР лаборатории: «Аутоантигены щитовидной железы человека: выделение, свойства и реакции со специфическими антителами», 2003-2005 гг., ГПОФИ «Биооргсинтез-2», № госрегистрации 20012625; «Исследование аутоантигенных эпитопов природной полноразмерной тиропероксидазы человека и ее иммунореактивных фрагментов, ориентированное на создание новых способов и средств диагностики заболеваний щитовидной железы», 2004-2005 гг., ГПОФИ «Современные науки о жизни», № госрегистрации 20052105; «Разработать базовую конструкцию и методы получения компонентов, определить биомедицинские параметры диагностических наборов для конкурентного иммунохимического анализа аутоантител к тиропероксидазе человека», 2004 –2005 гг., ГППИ «Биоанализ и диагностика», № госрегистрации 20052187; «Тироидная протеомика: исследования физико-химических свойств, структуры и взаимодействий белков, обеспечивающих функционирование ЩЖ, ориентированные на разработку новых подходов к диагностике и лечению тироидных заболеваний», 2006-2010 гг., ГПОФИ «Физиологически активные вещества», № госрегистрации 20061882.

Цель и задачи исследования. Цель работы: выделить тиропероксидазу человека, охарактеризовать иммунохимические свойства очищенного фермента и его протеолитических фрагментов, разработать иммуноаналитические системы на основе тиропероксидазы.

Задачи исследования.

1. Получить и охарактеризовать моноклональные антитела к различным эпитопам молекулы тиропероксидазы.
2. Выделить, очистить и охарактеризовать аутоантитела к тиропероксидазе.
3. Разработать метод получения высокоочищенной полноразмерной формы и протеолитических фрагментов тиропероксидазы человека.
4. Изучить конформационную стабильность и иммунореактивность тиропероксидазы и моноклональных антител в модельных условиях иммуноаффинной хроматографии;
5. Разработать иммуноаналитические системы, включающие очищенные тиропероксидазу, моноклональные антитела и аутоантитела, для научных исследований и практического применения.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

- Новый эффективный метод выделения и очистки из ткани щитовидной железы полноразмерной формы и протеолитических фрагментов тиропероксидазы человека.
- Характеристика четырех белковых препаратов для научных исследований в области тиропротеомики и применения в иммунодиагностических технологиях: тиропероксидаза человека с молекулярной массой 100 кДа, протеолитический фрагмент тиропероксидазы с молекулярной массой 94 кДа, моноклональное антитело к эпитопу в иммунодоминантной области тиропероксидазы и моноклональное антитело к периферическому эпитопу антигена.
- Параметры взаимодействия тиропероксидазы и специфических антител и факторы, оказывающие влияние на образование и диссоциацию иммунных

комплексов.

- Эффект синергизма в системе, включающей тиропероксидазу и два типа моноклональных антител.
- Конструкция и аналитические параметры новой иммуноферментной системы для количественного определения аутоантител к тиропероксидазе в сыворотке крови человека.

Личный вклад соискателя. Все исследования по выделению, очистке, определению свойств и взаимодействий тиропероксидазы и антител, характеристике конформационной стабильности этих белков, разработке иммуноаналитических систем выполнены автором самостоятельно. Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к тиропероксидазе получены на базе ГУ «Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии» МЗ Беларуси при участии к.б.н., в.н.с. ИБОХ НАН Беларуси А.Г. Прядко и к.х.н., в.н.с. ИБОХ НАН Беларуси И.И. Вашкевич. На стадии планирования работы и критического обсуждения полученных результатов соискатель пользовался консультативной помощью к.х.н., в.н.с. ИБОХ НАН Беларуси Е.П. Киселевой.

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертационной работы были представлены в докладах на Международной конференции «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, 2004), Международной научно-практической конференции «Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран Содружества» (Минск-Нарочь, 2005), XVIII Международной научно-практической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии» (Минск, 2005), III Международной конференции «Экстракция органических соединений» (Воронеж, 2005), Международной научной конференции молодых ученых «Молодежь в науке - 2005» (Минск, 2005), Международной конференции «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, 2006).

Опубликованность результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 5 рецензированных статей в журналах (3,6 авторских листа), 2 статьи в сборниках конференций и тезисы 6 докладов. Общий объем опубликованных материалов составляет 55 страниц.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, четырех глав, заключения, списка цитируемой литературы и шести приложений. В главе 1 приводится обзор литературных данных о структурно-функциональных особенностях тироидных белков человека и молекулярных основах аутоиммунных заболеваний. В главе 2 представлены экспериментальные методы, в главе 3 – результаты исследований, в главе 4 – обсуждение полученных результатов. Работа изложена на 142 страницах рукописного текста, содержит 32 рисунка и 18 таблиц. Список цитируемой литературы включает 206 ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ТИРОАНТИГЕНЫ ЧЕЛОВЕКА: СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СВОЙСТВА, БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В литературном обзоре рассматриваются структурно-функциональные характеристики главных аутоантигенов щитовидной железы (ЩЖ) – тиропероксидазы (ТПО), тироглобулина (ТГ) и рецептора тиротропина: структура

гена и белковой молекулы, особенности посттрансляционной модификации и характеристики изоформ тироантигенов, их субклеточная локализация и роль в биосинтезе тироидных гормонов. Отражены современные представления о молекулярных механизмах возникновения и развития аутоиммунных заболеваний, в том числе тироидного профиля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали N-оксисукцинимидный эфир биотинил-ε-аминокапроновой кислоты, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, казеин фирмы «Sigma» (США), пероксидазу из корней хрена фирмы «Biozyme» (Великобритания), трипсин фирмы «ДиаМ» (Россия), стрептавидин фирмы «Amersham» (Великобритания), каприловую кислоту и детергенты фирмы «Fluka» (Германия), сефарозу 4В, активированную CNBr, и сефадекс G-25 фирмы «Pharmacia» (Швеция), ТПО-специфичные моноклональные антитела (МАТ) 6Н7 фирмы «HyTest» (Финляндия), антитела барана против иммуноглобулинов (Ig) мыши, антитела козы против иммуноглобулинов человека, ТГ-специфичные МАТ 5Н8 и 3Н2, полученные в ИБОХ НАН Беларуси, [¹²⁵I]ТПО и преципитирующий реагент на основе белка А (УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»).

Гибридомы, продуцирующие МАТ, получены в результате гибридизации культивируемых клеток мышинной миеломы P3X63-Ag8 653 и спленоцитов мышей BALB/c, иммунизированных ТПО человека. Выбранные культуры прививали внутрибрюшинно мышам линии BALB/c, обработанным пристаном. МАТ выделяли из асцитической жидкости мышей по методу [M. Steubach, 1969]. Концентрацию антител определяли спектрофотометрически ($A_{280 \text{ нм}}, 1 \text{ см}, 1 \text{ мг/мл} = 1,35$).

Для количественного определения аутоантител (ААТ) к ТПО и ТГ в сыворотке крови человека и высокоочищенных препаратах ААТ использовали наборы ИРМА-АНТИ-ТПО и ИРМА-АНТИ-ТГ-СТ УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», а также Anti-TPO-Ab EIA фирмы «Milenia» (США).

Конъюгаты антител с пероксидазой хрена синтезировали по методу [M.V. Wilson, 1978]. Для получения конъюгатов биотина с МАТ использовали универсальную методику биотинилирования в мягких условиях с помощью N-оксисукцинимидного эфира биотинил-ε-аминокапроновой кислоты.

Параметры связывания антител с иммобилизованной ТПО в неравновесных условиях определяли графически в системе двойных обратных координат. Константы комплексообразования в равновесных условиях определяли по методу [B. Friguet, 1985].

Ферментативную активность ТПО в растворе определяли по методу [S. Ohtaki et al, 1986]. Концентрацию гемопротейна определяли, используя коэффициент молярного поглощения максимума полосы $\text{Core } \epsilon_{413} = 121\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Аффинные сорбенты для хроматографической очистки ТПО получали иммобилизацией ТПО-специфичных МАТ А1, F8 и 6Н7, а также антител козы против Ig человека на сефарозе 4В, активированной CNBr, через полипептидный компонент гликопротеинов 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 EB фирмы «Labsystems» (Финляндия), оптическую плотность в лунках определяли с использованием автоматического многоканального спектрофотометра «Униплан» (Россия). Радиоиммунный анализ (РИА) проводили в полистирольных пробирках марки Hi-Bind фирмы «Greiner Bio-One» (ФРГ) или фирмы «Elkay» (США), для измерения радиоактивности использовали счетчик RIA-Gamma 1274 («LKB-Wallac», Финляндия).

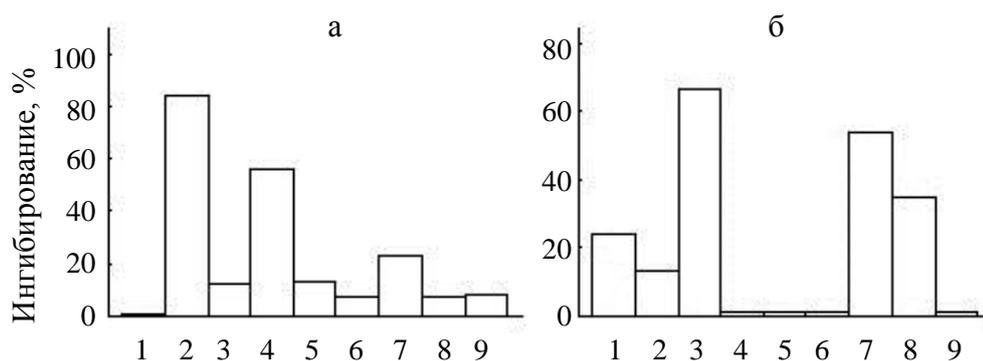
Флуоресценные измерения проведены с использованием спектрофлуориметра SM-2203 («Солар», Беларусь). Спектры кругового дихроизма (КД) записаны на спектрополяриметре J-20 («JASCO», Япония).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и антигенсвязывающая активность антител к тиропероксидазе. Эффект синергизма

Моноклональные антитела (МАТ) к ТПО получали с использованием традиционных приемов гибридомной технологии. Для иммунизации лабораторных животных и первичной характеристики МАТ применяли высокоочищенный антиген с нативной конформацией молекулы, проявляющий ферментативную активность и способность к взаимодействию со специфическими ААТ [И.И. Вашкевич и др., 1999]. На стадии культивирования гибридом были выбраны клоны А1 и F8 с высоким уровнем продукции антител, взаимодействующих со специфическими детерминантами ТПО и индифферентных к эпитопам, общим для ТПО и ТГ. Эти важные свойства позволяют использовать МАТ А1 и F8 для очистки ТПО иммуноаффинной хроматографией из экстрактов ЩЖ, в которых ТГ является доминирующим белковым компонентом.

После культивирования выбранных гибридом *in vivo* и очистки продуцируемых ими МАТ была проведена дополнительная проверка их антигенной специфичности. Показано (рисунок 1), что два типа МАТ специфичны к различным антигенным детерминантам на молекуле ТПО.



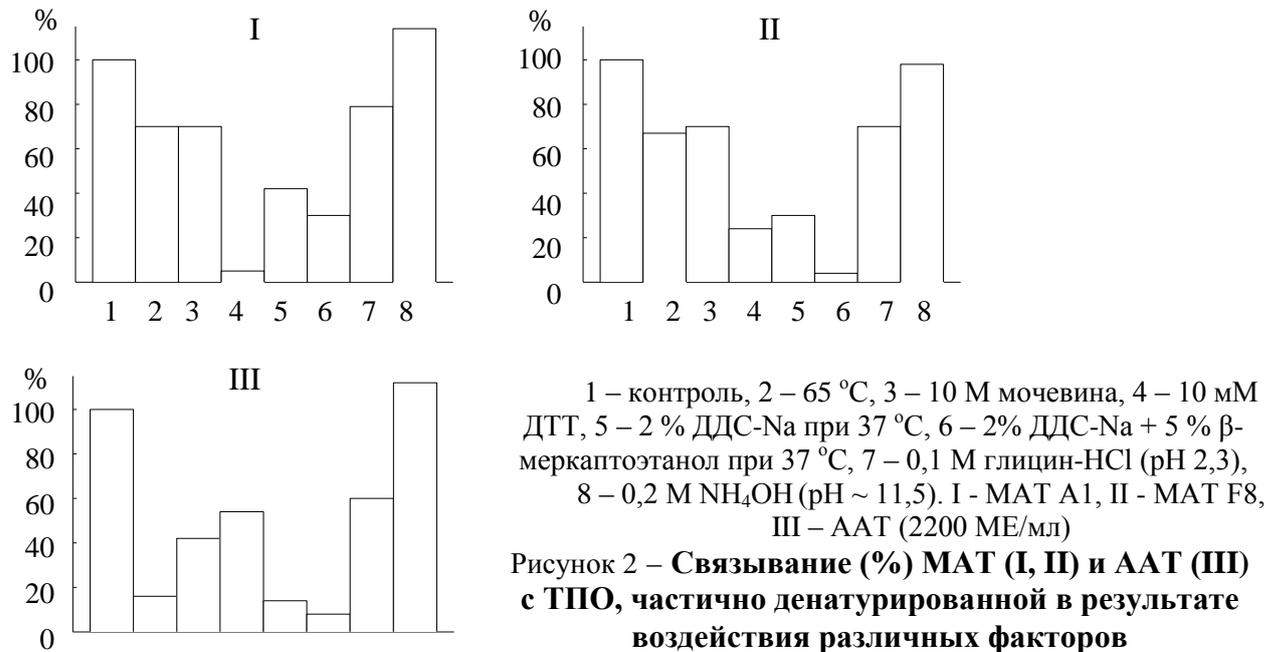
1 – очищенные ААТ к ТПО, 2 – МАТ А1, 3 – МАТ F8, 4 – МАТ 6H7, 5 – сыворотка крови здоровых доноров в разведении 1:60, 6 – та же сыворотка в разведении 1:600, 7 – патологическая сыворотка с ААТ к ТПО (1400 МЕ/мл) в разведении 1:60, 8 – та же сыворотка в разведении 1:600, 9 – очищенные IgG человека

Рисунок 1 – Взаимодействие [¹²⁵I]ТПО с иммобилизованными МАТ А1 (а) и F8 (б) в присутствии МАТ и сывороточных иммуноглобулинов в растворе

Участки молекулы антигена, взаимодействующие с сывороточными ААТ и МАТ F8, перекрываются или расположены в непосредственной близости друг от друга в иммунодоминантной области ТПО и пространственно удалены от участка

связывания МАТ А1, расположенного за пределами этой области. МАТ двух клонов сохраняют способность к образованию иммунных комплексов после иммобилизации на твердой фазе и химической модификации производным биотина, и взаимодействуют как с растворенной, так и с адсорбированной на твердой фазе ТПО.

МАТ А1 и F8 были почти одинаково чувствительны к структурным модификациям ТПО, вызванными денатурирующими факторами - восстановителями дисульфидных связей, высокой температурой, экстремальными значениями рН и реагентами, нарушающими вторичную и третичную структуру молекулы антигена (рисунок 2).



Необратимые конформационные изменения ТПО, вызванные воздействием ДТТ, были выражены в большей степени для МАТ по сравнению с ААТ (снижение связывания на 80-90 % и 30-50 % соответственно). ААТ проявляли большую чувствительность к термической денатурации ТПО (уменьшение связывания на 60-80 % против 30 % в случае МАТ). Это свидетельствует о конформационной природе антигенных эпитопов ТПО и возможном участии дисульфидных связей в их формировании.

Параметры комплексообразования МАТ и ТПО, измеренные в равновесных и неравновесных условиях, совпадали по порядку величины и составляли $\sim 10^8$ - 10^9 М⁻¹ (таблица 1).

Таблица 1 – Параметры связывания ТПО₁₀₀ с МАТ и ААТ.

		$K_a \cdot 10^9, M^{-1}$				
		A1	F8	A1/F8	ААТ, рН 2,5	ААТ, рН 11,5
в равновесных условиях		0,29	0,81	----	----	----
в неравновесных условиях	1	0,26	0,22	4,0	----	----
	2	0,25	0,22	2,4	2,4	1,2

Примечания

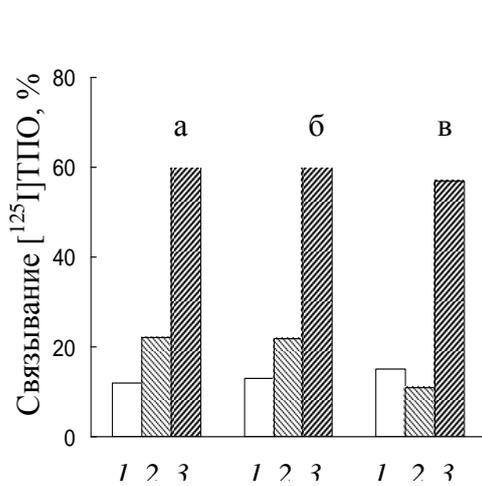
1- неспецифическая адсорбция МАТ

2- биоспецифическая адсорбция биотин-МАТ и биотин-ААТ

Указанная аффинность и высокая специфичность к эпитопам антигена, имеющим

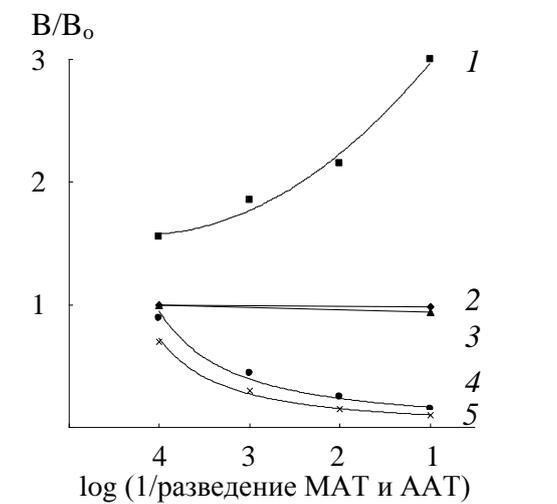
конформационную природу, один из которых локализован в иммунодоминантной области ТПО, позволяют использовать эти иммуноглобулины для синтеза иммуноаффинных сорбентов с целью выделения из природного источника иммунореактивной ТПО, а также в технологии иммуноанализа ТПО и специфических ААТ.

Обнаружено, что количество ТПО, связанной парой МАТ А1/Ф8, примерно в два раза превосходит суммарное количество ТПО, связанной индивидуальными антителами (рисунок 3). Средство к ТПО пары МАТ оказалось в 10-20 раз выше K_a индивидуальных антител (таблица 1). Для выяснения механизма синергизма пары МАТ к ТПО проводили сравнительное исследование взаимодействия иммобилизованных МАТ Ф8 с ТПО в составе предварительно образованных бинарных комплексов с различными антителами (рисунок 4). В основе синергизма двух МАТ лежит их аллостерическое взаимодействие через конформационно гибкую молекулу антигена.



а – МАТ; б, в – биотин-МАТ,
1 – А1, 2 – F8, 3 – А1/Ф8

Рисунок 3 – Связывание $[^{125}\text{I}]$ ТПО с МАТ, находящимися в растворе (а, б) или иммобилизованными на твердой фазе (в)



1 – МАТ А1, 2 – МАТ к ТГ, 3 – МАТ 6Н7,
4 – МАТ Ф8, 5 – ААТ к ТПО

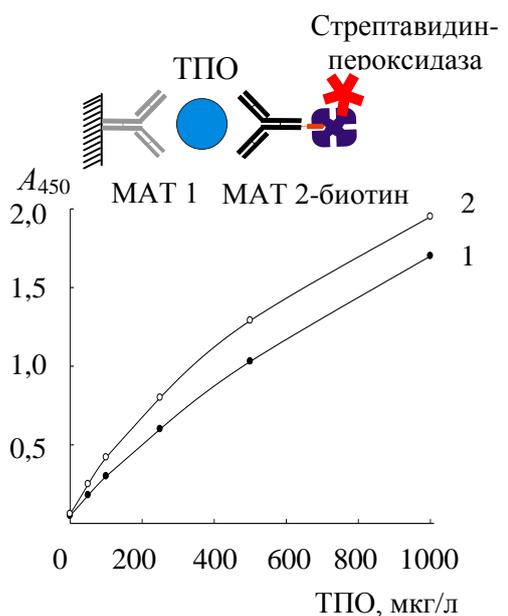
Рисунок 4 – Связывание $[^{125}\text{I}]$ ТПО с иммобилизованными биотин-МАТ Ф8 в отсутствие (V_0) и в присутствии (V) различных антител

Связывание растворимого МАТ А1 с периферическим эпитопом ТПО вызывает изменение конформации иммунодоминантной области антигена, благоприятное для его взаимодействия с МАТ Ф8. Обнаруженный эффект является «однонаправленным» и свидетельствует о структурной динамичности молекулы ТПО.

В экспериментах по исследованию антигенной специфичности МАТ и разработке конкурентной тест-системы для определения ААТ к ТПО использовали высокоочищенные ТПО-специфичные ААТ, выделенные из фракции IgG сыворотки крови больных аутоиммунными заболеваниями ЩЖ в результате двух последовательных антиген-аффинных хроматографий на сорбентах с иммобилизованными ТГ и ТПО. Элюция при pH 2,5 позволяет сохранить способность ААТ к образованию иммунных комплексов с нативной ТПО (таблица 1). Антигенсвязывающая активность ААТ, полученных в таких условиях, в 1,5 – 2 раза выше по сравнению с ААТ, полученными элюцией при pH 11,5. Оба препарата ААТ взаимодействуют с полноразмерной ТПО с более высоким сродством, чем с протеолитическими фрагментами.

Получение и характеристика высокоочищенной полноразмерной формы и протеолитических фрагментов тиропероксидазы человека

Тиропероксидаза ЩЖ человека представляет собой гликозилированный гемопроtein с молекулярной массой 100-110 кДа. Высокоочищенные препараты ТПО широко применяются для моделирования реакций биосинтеза тиреоидных гормонов, в исследованиях биотрансформации ксенобиотиков, а также в качестве базовых реагентов диагностических тест-систем для определения специфическими ААТ в сыворотке крови больных аутоиммунными заболеваниями ЩЖ. В связи со сложной структурной организацией молекулы ТПО, ее низким содержанием в ткани ЩЖ и мембранной локализацией наиболее эффективным способом выделения и очистки белка признана иммуноаффинная хроматография на сорбентах с иммобилизованными МАТ.



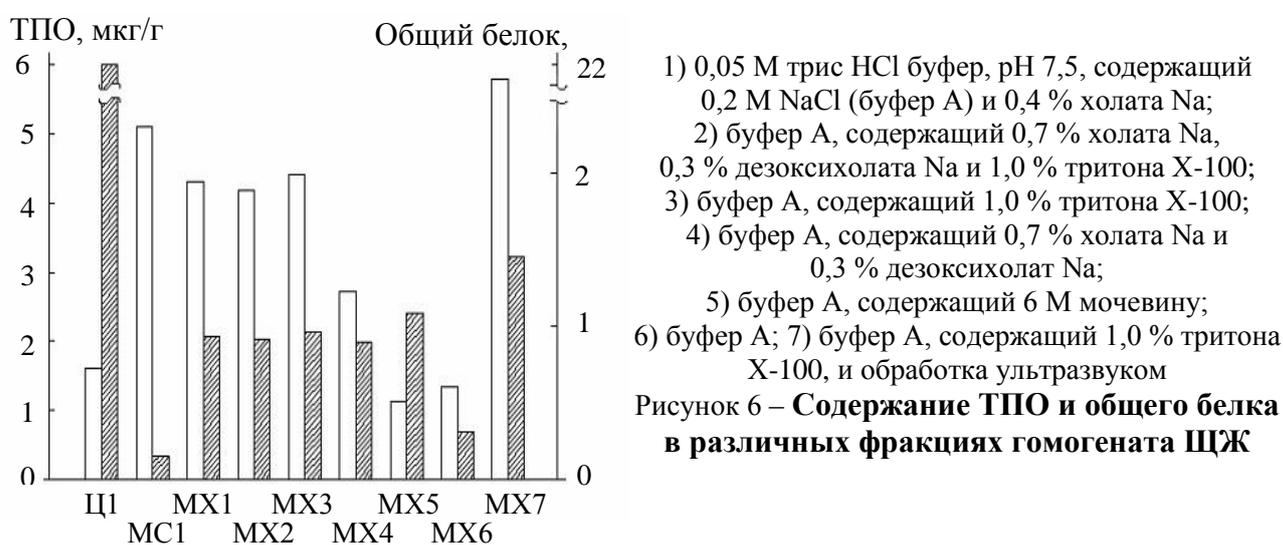
1 и 2 – иммобилизованные МАТ А1 и F8
Рисунок 5 – Калибровочный график количественного определения ТПО методом твердофазного ИФА

Для оценки содержания ТПО в субклеточных фракциях ЩЖ, изучения влияния различных реагентов на антигенные свойства ТПО и разработки метода хроматографической очистки этого белка была разработана система количественного определения ТПО методом твердофазного ИФА (рисунок 5). В основе метода лежит принцип одностадийного «сэндвич» - анализа: количество антигена, связанного адсорбированным на гидрофобной поверхности МАТ1, определяется с использованием МАТ2, меченого биотином. В ходе анализа осуществляется одновременный контроль конформации двух пространственно изолированных эпитопов антигена.

Традиционным источником ТПО человека являются микросомальная фракция послеоперационной ткани ЩЖ больных с диагнозом болезнь Грейвса, поскольку эта патология характеризуется повышенным уровнем экспрессии ТПО, а в указанной фракции тироцитов содержится не менее 58 % общей ТПО ЩЖ. В настоящей работе была использована послеоперационная ткань ЩЖ больных иными тиреоидными патологиями (узловой коллоидный зоб, аденоматозный зоб, хронический лимфоцитарный тиреоидит и др.). Для ЩЖ больных с указанными диагнозами характерно высокое содержание ТПО не только в микросомах (МС), но также в митохондриях (МХ) и цитозоле (Ц) (3,4, 0,5 и 0,01 % от содержания общего белка в указанных фракциях) (рисунок 6).

Фракцию МХ получали из безъядерного гомогената ткани ЩЖ центрифугированием при 12 000 g. МС получали центрифугированием при 26 000 g в присутствии 10 mM CaCl₂. Этот реагент вызывает агрегацию МС, не оказывая влияния на иммунореактивность ТПО. Такой подход позволил отказаться от центрифугирования при 100 000 g, традиционно используемого для получения данной субклеточной фракции тироцитов.

В отсутствие детергентов ТПО находится в составе гидрофобных агрегатов с другими белками и липидами, в связи с чем недоступна для взаимодействия с иммобилизованными на хроматографическом сорбенте МАТ. 1 %-ый тритон X-100 и 0,4 – 0,7 %-ый холат Na обеспечивают высокую эффективность экстракции ТПО и, в отличие от других химических агентов (6 М мочевины, 0,5 %-ый твин 20), не оказывают влияния на антигенные свойства белка. Диспергирование экстрактов МС и МХ ультразвуком увеличивает выход целевого белка на 30 %. Дополнительная экстракция белка протеолитическим ферментом трипсином приводит к отщеплению гидрофобного трансмембранного С-концевого домена ТПО, включающего аминокислотные остатки 848-933 [А. Таурог, 1990], и увеличивает выход белка на 20-50 % (рисунок 6). Оптимальными условиями подготовки биологического материала к хроматографической очистке ТПО была признана солиubilизация МС и МХ сочетанием 1 %-го тритона X-100 и 0,4 %-го холата Na (обработка Ц сочетанием 0,5 %-го тритона X-100 и 0,2 %-го холата Na), диспергирование экстрактов ультразвуком и обработка РНКазой.



В результате ковалентной иммобилизации МАТ на сефарозе 4В, активированной CNBr, были получены два сорбента – МАТ F8-сефароза и МАТ А1-сефароза. На примере сорбента с иммобилизованным МАТ А1 проведен сравнительный анализ возможности применения ряда реагентов для элюции ТПО (таблица 2). Показано, что эффективность элюции ТПО уменьшалась в следующем ряду: 0,2 М NH₃ (pH 11,5) > 0,1 М 3,5-дийодсалицилат Li > 0,1 М глицин-HCl (pH 2,5) > 1 М NaI > 30 % пропиленгликоль + 1 М NaCl > 30 % пропиленгликоль > 1 М NaCl (таблица 2).

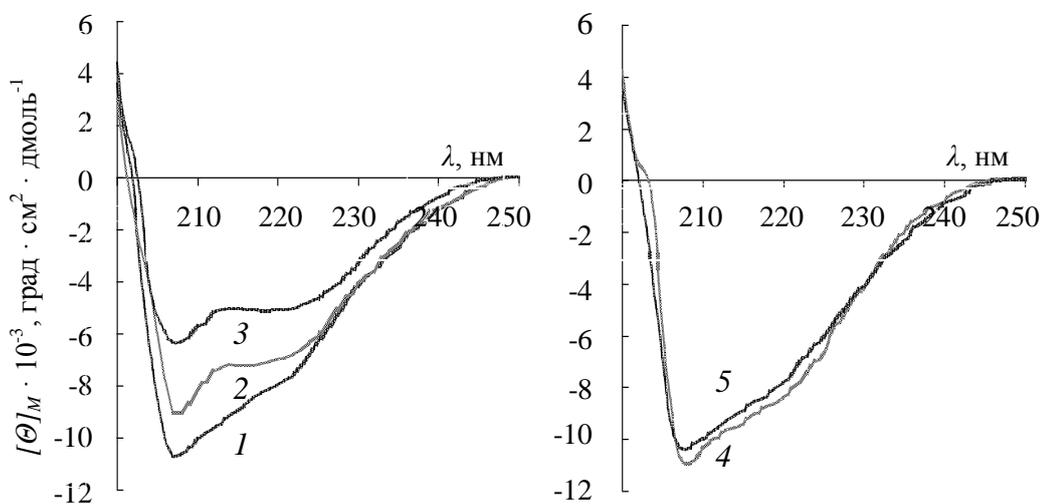
Таблица 2 - Эффективность элюентов в иммуноаффинной хроматографии ТПО

Элюент	Десорбция ТПО, %	Иммунореактивность ТПО, %
0,2 М аммиак, pH 11,5	100	100
0,1 М глицин, pH 2,5	73	41
1 М NaCl	2	100
1 М NaI	43	71
30 % пропиленгликоль	0	73
30 % пропиленгликоль, содержащий 1 М NaCl	5	68
0,1 М дийодсалицилат Li	96	25

Таким образом, три реагента из семи обеспечивают эффективность элюции ТПО, превышающую 75 %. При этом 0,1 М глицин, рН 2,5 и 0,1 М дийодсалицилат Li снижают иммунореактивность ТПО более чем в два раза. Элюция ТПО с использованием 1 М NaI происходит медленно, сопровождается 30 %-ным снижением иммунореактивности антигена, а ее эффективность не превышает 40 %. 0,2 М аммиак, рН 11,5, оказался оптимальным элюентом, поскольку обеспечивал высокую эффективность десорбции антигена и не влиял на иммунореактивность ТПО.

Для оптимизации условий иммуноаффинной хроматографии ТПО проведено исследование конформационной стабильности двух МАТ и антигена (на примере ТПО₉₄) при различных рН, используемых для элюции. Исследование конформационной стабильности МАТ методами спектроскопии флуоресценции и КД показало обратимый характер структурных изменений молекул при различных рН. По данным спектроскопии КД в дальней УФ области, при нейтральном значении рН два МАТ обладают типичной для иммуноглобулинов β-складчатой вторичной структурой. Выраженное изменение амплитуды отрицательного максимума молярной эллиптичности наблюдается только в случае МАТ А1 при рН 2,5, причем это изменение является обратимым. Щелочная среда не оказывает влияния на степень упорядоченности вторичной структуры МАТ F8 и МАТ А1.

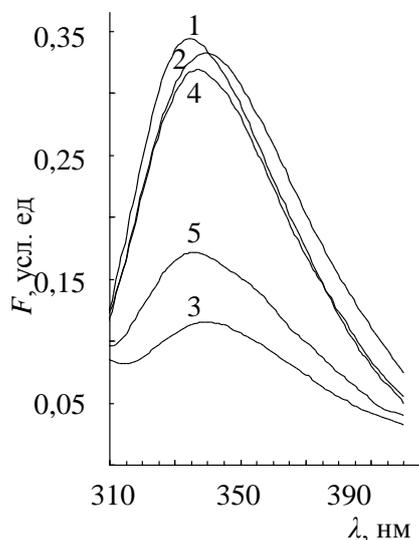
При рН 11,5 в спектре собственной флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 295$ нм) МАТ F8 наблюдается выраженный длинноволновый сдвиг максимума флуоресценции с 335 нм до 342 нм, сопровождающийся снижением интенсивности флуоресценции в 1,5 раза. Изменения положения максимума и интенсивности излучения в спектре МАТ А1 в этих условиях выражены в значительно меньшей степени, что свидетельствует о высокой устойчивости этого МАТ в щелочной среде. При рН 2,5 в спектрах флуоресценции двух антител наблюдается длинноволновое смещение максимума на 1-3 нм и увеличение интенсивности флуоресценции на 70–80 % (МАТ А1) и 20 % (МАТ F8). После нейтрализации белковых растворов происходит восстановление пространственной структуры обоих МАТ, о чем свидетельствует практически полное совпадение спектров триптофановой флуоресценции нативных и ренатурированных антител. ТПО при рН 7,5 обладает всеми характеристиками нативного состояния: α-спиральной вторичной структурой по данным спектроскопии КД (рисунок 7) и компактной третичной структурой, о чем свидетельствует положение максимума триптофановой флуоресценции при 334-335 нм (рисунок 8).



1 – рН 7,5; 2 – рН 2,5; 3 – ренатурация после рН 2,5; 4 - рН 11,5; 5 – ренатурация после рН 11,5

Рисунок 7 – Спектры КД ТПО в дальней УФ области

При повышении рН до 11,5 полностью сохранялась вторичная структура ТПО (рисунок 8) и наблюдался сдвиг максимума триптофановой флюоресценции на 5 нм в длинноволновую сторону, что свидетельствует об изменении пространственной структуры молекулы. Индуцированные изменения не затрагивают антигенные детерминанты ТПО: снижение иммунореактивности по отношению к двум МАТ



1 - рН 7,5; 2- рН 11,5; 3 - рН 2,5;
4 - ренатурация после рН 11,5;
5 - ренатурация после рН 2,5.
Длина волны возбуждения – 295 нм

Рисунок 8 – Спектры собственной флуоресценции ТПО

после щелочной денатурации в течение 24 ч и ренатурации не превышает 10 %.

В кислой среде, напротив, происходит изменение структурной организации ТПО, усиливающееся при последующем переводе белка в буферный раствор с нейтральным значением рН. Об этом свидетельствует снижение значений молярной эллиптичности при длине волны 222 нм в указанных условиях на 10 % и 34 % соответственно по сравнению с нативным белком (рисунок 8), а также смещение максимума триптофановой флуоресценции до 340 нм и тушение флуоресценции на 65 % (рисунок 8). После нейтрализации белковых растворов положение максимума флуоресценции возвращается к 335 нм, при этом значение интенсивности триптофановой флуоресценции составляет 50 % от такового в исходном препарате белка. Изменения конформации ТПО, происходящие при рН 2,5 и последующем диализе, затрагивают антигенные эпитопы

молекулы, что выражается в снижении иммунореактивности белка на 35 % и 45 % соответственно.

Иммуноаффинная хроматография на сорбентах с иммобилизованными МАТ А1 и F8 в оптимизированных условиях предварительной подготовки биологического материала и элюции ТПО позволила получить препараты целевого белка, имеющие чистоту 23 % – 52 % и R_z , равный 0,1 – 0,24, в зависимости от источника выделения; ограниченный протеолиз увеличивал выход ТПО и степень ее чистоты (таблица 3).

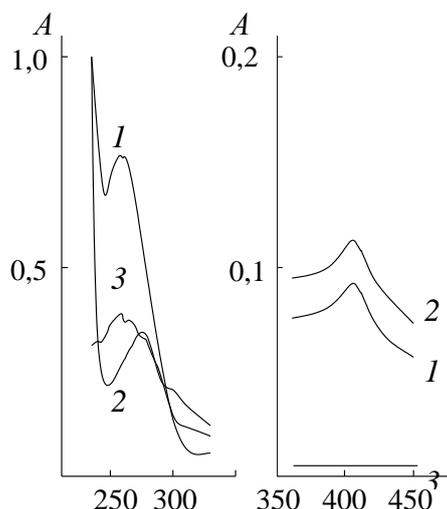
Таблица 3 - Содержание ТПО и степень ее чистоты в элюатах, полученных с использованием различных фракций гомогената ЩЖ на сорбентах с иммобилизованными МАТ F8 и А1

Фракция гомогената	МАТ	ТПО, мг	ТПО/общий белок, %	R_z (A_{413}/A_{280})
МС	F8	1,8	35	0,20
МС (протеолиз)	F8	2,9	52	0,30
МХ	A1	1,8	23	0,09
МХ (протеолиз)	A1	2,3	32	0,13
Ц	F8	1,8	32	0,24

Примечание – R_z – показатель наличия гема в составе молекулы ТПО.

Из литературы известно, что основными примесными белками в препаратах ТПО, полученных методами классической хроматографии, являются ТГ и Ig. По

результатам ИФА и ДДС-электрофореза в денатурирующих условиях, в составе препаратов ТПО, полученных в результате иммуноаффинной хроматографии, присутствуют только примесные Ig. Для их удаления использовали «отрицательную» хроматографию на сефарозе с иммобилизованными антителами животных против Ig человека. На этой стадии очистки происходила потеря части ТПО, находящейся в составе специфических комплексов с ААТ и гидрофобных агрегатов с Ig другой специфичности.



Длина оптического пути – 0,5 см (1 и 2) и 5 см (3)

Рисунок 9 – Спектр поглощения ТПО₁₀₀ до обработки РНКазой и диализа (1) и после диализа (2). 3 – спектр поглощения диализного буфера после диализа

Вторая стадия хроматографической очистки позволила получить препараты ТПО, не содержащие белковых примесей (таблица 4). Для спектра поглощения этих препаратов характерно $A_{260}/A_{280}=1,3$ (рисунок 9), что можно объяснить наличием в их составе нуклеиновых кислот либо описанного в литературе низкомолекулярного диализибельного ингибитора ТПО (инозитол фосфогликана), имеющего максимум поглощения при 250 - 260 нм. Ферментативная обработка препаратов ТПО РНКазой с последующим удалением нуклеотидов и других низкомолекулярных примесей диализом позволила существенно повысить чистоту антигена, о чем свидетельствует уменьшение величины A_{260}/A_{280} до 0,75 и увеличение A_{413}/A_{280} с 0,08 до 0,25 (рисунок 9, таблица 4). Предложенный метод позволяет получать до 80 % ТПО тироидной ткани (примерно 10 мг ТПО из 1 кг биологического сырья).

Таблица 4 - Основные характеристики препаратов ТПО

Препарат	Чистота, %	Молекулярная масса, кДа	Rz (A_{413}/A_{280})	Удельная активность, ед/мг
ТПО ₁₀₀	> 95	100	0,25	110
ТПО ₉₄	> 95	94	0,3	98
ТПО ₆₀	> 95	60	0,23	40

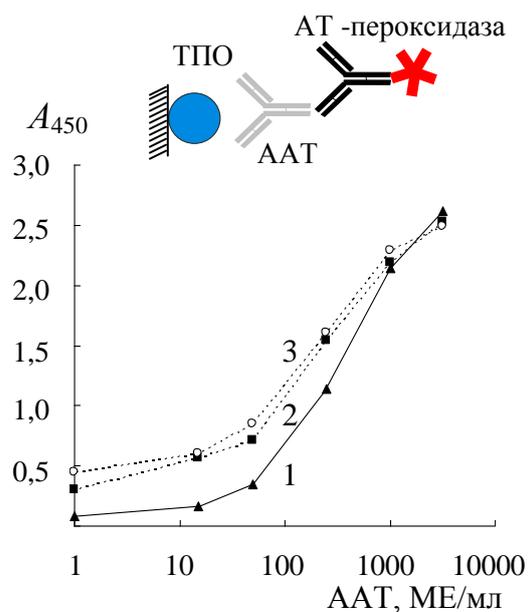
Примечания

1 Чистоту и молекулярную массу ТПО определяли методом электрофореза в 12 %-ом ПААГ в присутствии 0,2 %-ого ДДС-Na.

2 Ферментативную активность ТПО определяли с использованием гваякола в качестве субстрата

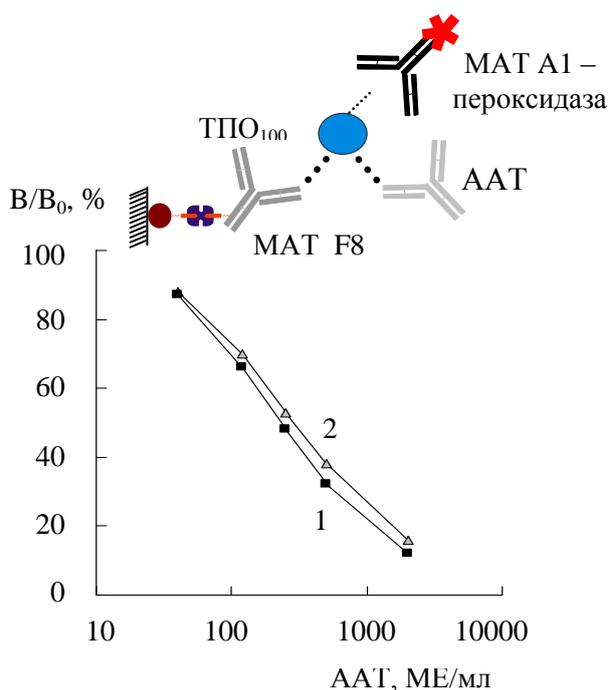
Иммунохимические системы для определения ААТ к ТПО в сыворотке крови

В норме концентрация ААТ к ТПО в сыворотке крови человека составляет не более 50 МЕ/мл. Высокие концентрации ААТ свидетельствуют о развитии тироидной патологии. В настоящей работе подтверждена возможность использования высокоочищенных препаратов полноразмерной ТПО и протеолитического фрагмента



1 – ТПО₉₄, 2, 3 – ТПО₁₀₀
иммобилизованные в лунках планшета из растворов с концентрациями 0,5 мг/л (1, 2) и 0,1 мг/л (3) прямой адсорбцией (1, 2) или через МАТ А1 (3)

Рисунок 10 – Связывание ААТ с ТПО



На пластике иммобилизованы МАТ F8 (1) либо ААТ (2) к ТПО. В и V₀ – связывание ТПО с иммобилизованным антителами в присутствии и в отсутствие ААТ в жидкой фазе

Рисунок 11 – Калибровочные графики конкурентного ИФА ААТ к ТПО

белка в качестве компонентов традиционной тест-системы для иммунометрического анализа ААТ в сыворотке крови человека. В системе такой конструкции ААТ в составе калибровочных проб или неизвестных образцов сыворотки крови взаимодействуют с иммобилизованным антигеном, а для их выявления используют меченые ферментом антивидовые антитела. Анализ с использованием такой тест-системы требует предварительного разведения образцов сыворотки.

Показано, что в качестве основы для промышленной выпускаемой формы диагностического набора медицинского назначения могут быть использованы тест-системы на основе адсорбированного на пластике протеолитического фрагмента ТПО₉₄ либо иммобилизованной через адсорбированные МАТ А1 полноразмерной ТПО₁₀₀.

Последний вариант является предпочтительным, поскольку обеспечивает пятикратную экономию дорогостоящего антигена природного происхождения за счет расхода относительно дешевых и доступных МАТ (рисунок 10).

Кроме того, предложена конструкция набора для количественного определения ААТ к ТПО, основанная на принципе конкурентного ИФА (рисунок 11). В системе такой конструкции анализируемые ААТ в составе калибровочных проб и неизвестных образцов сыворотки крови конкурируют с иммобилизованными ААТ или МАТ F8, идентичными по эпитопной специфичности ААТ, за связывание с антигеном, меченым ферментом. Количество антигена, связанного с антителами на твердой фазе, обратно пропорционально концентрации растворенных ААТ. Получение меченого антигена осуществляется опосредованно, через МАТ А1, конъюгированные с

ферментом. МАТ А1 связываются с эпитопом, не участвующим в конкурентном взаимодействии антигена ни с иммобилизованными антителами, ни с растворенными анализируемыми ААТ. Особенностью такой системы является исследование анализируемых образцов сыворотки крови без их предварительного разведения. Это снижает общую продолжительность анализа и уменьшает вероятность ошибок в ходе его выполнения.

Калибровочные графики конкурентного ИФА, один из которых получен с использованием иммобилизованных высокоочищенных сывороточных ААТ, а другой – с использованием иммобилизованных МАТ F8 (рисунок 11), практически полностью совпадают. Это дает основания считать, что МАТ F8 является адекватной заменой сывороточным поликлональным ААТ в качестве рабочих антител. В качестве твердофазных реагентов были использованы биотинилированные ААТ, полученные элюцией при рН 2,5 и имеющие показатели сродства с антигеном, сравнимые с неочищенными сывороточными ААТ. Следует отметить, что МАТ двух типов имеют относительно небольшое по меркам иммуноанализа сродство. Использование МАТ F8 в конкурентном иммуноанализе ААТ, сродство которых на порядок выше (таблица 1), становится возможным благодаря эффекту синергизма двух МАТ. При совместном использовании двух антител их сродство к антигену увеличивается на порядок и становится сопоставимым со сродством сывороточных ААТ (таблица 1).

Чувствительность системы (минимальная достоверно определяемая концентрация ААТ) составила 30 МЕ/мл. Широкий диапазон определяемых концентраций (0-2000 МЕ/мл) позволяет достоверно дифференцировать группы здоровых людей, пациентов с сомнительным диагнозом и больных с аутоиммунными заболеваниями разной степени тяжести. Коэффициент вариации не превышал 10 %, а открытие стандартной добавки находилось в пределах 80 – 120 %. Корреляционный анализ проб пациентов с использованием применяемой в диагностических лабораториях автоматизированных систем Anti-TPO (Abbott, Германия) и Elecsys (Roche Diagnostics, Швеция) и разработанной тест-системы конкурентного типа показал высокую степень соответствия содержания ААТ (коэффициенты корреляции $r_1 = 0,97$, $r_2 = 0,89$, $n_1 = 30$, $n_2 = 25$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Получены два типа МАТ, взаимодействующие с пространственно разобщенными конформационными эпитопами ТПО ($K_a \sim 10^8-10^9 \text{ M}^{-1}$). Участок связывания МАТ F8 находится в иммунодоминантной области молекулы ТПО вблизи аутоантоантигенных детерминант, тогда как специфичный для МАТ А1 эпитоп локализован вне этой области. Свойства МАТ позволяют использовать их в иммуноаффинной хроматографии ТПО, а также в иммуноанализе ТПО и специфических ААТ (1, 4, 10).

2. Обнаружен эффект синергизма МАТ F8 и А1, который проявляется в 10-кратном увеличении константы связывания пары антител с антигеном по сравнению с показателями аффинности индивидуальных антител. Показано, что взаимодействие МАТ А1 с периферическим эпитопом ТПО индуцирует аллостерические изменения конформации молекулы антигена в пространственно удаленной иммунодоминантной области, благоприятные для его связывания с МАТ F8 (2, 12).

3. Разработан эффективный метод получения в чистом виде природной полноразмерной ТПО и ее крупного протеолитического фрагмента с молекулярными

массаи 100 и 94 кДа. Особенность метода состоит в использовании различных субклеточных фракций ЩЖ в качестве легкодоступного стартового биоматериала, солюбилизации ТПО в оптимальных условиях и сочетании биоспецифических хроматографий для выделения и последующей очистки ТПО (5, 6, 8, 11).

4. Методами спектроскопии кругового дихроизма, собственной флуоресценции и иммуноанализа охарактеризована конформационная стабильность и иммунохимические свойства ТПО и МАТ при различных рН. Выбраны оптимальные условия иммуноаффинной хроматографии (элюция при рН 11,5), обеспечивающие получение с высоким выходом очищенного иммунореактивного тироантигена для научных исследований и иммунохимических технологий (13).

5. Разработана иммунохимическая тест-система для количественного определения иммунореактивной ТПО в препаратах ЩЖ и биологических жидкостях (4).

6. С помощью антиген-аффинной хроматографии сыворотки крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями ЩЖ получены высокоочищенные функционально активные поликлональные ААТ к ТПО. Эти Ig взаимодействуют с полноразмерной ТПО с более высоким сродством, чем с протеолитическим фрагментом. Антигенсвязывающая активность ААТ, полученных элюцией при рН 2,5, в 1,5 – 2 раза выше по сравнению с ААТ, полученными элюцией при рН 11,5 (3).

7. На основе полноразмерной природной ТПО и синергетической пары МАТ F8 и A1 разработан метод и сконструирована тест-система для конкурентного ИФА сывороточных ААТ к ТПО. Данная тест-система послужит основой для создания нового набора реактивов, не имеющего промышленно выпускаемого аналога (7, 9).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах:

1–А Получение и антигенсвязывающие характеристики моноклональных антител к тиропероксидазе человека / О.В. Цыганова, Е.П. Киселева, И.И. Вашкевич, А.Г. Прядко, О.В. Свиридов // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2005. – № 1. – С. 59–65.

2–А Эффект синергизма при связывании пары моноклональных антител с двумя конформационными эпитопами тиропероксидазы человека / О.В. Цыганова, Е.П. Киселева, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов // Доклады НАН Беларусі. – 2005. – Т. 49, № 5. – С. 62–67.

3–А Выделение аутоантител к тиропероксидазе человека антиген-аффинной хроматографией и их применение в иммуноанализе / О.В. Цыганова, Е.П. Киселева, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2006. – № 1. – С. 64–71.

4–А Характеристика моноклональных антител к тиропероксидазе человека для использования в иммуноаффинной хроматографии и иммуноанализе О.В. Цыганова, Е.П. Киселева, И.И. Вашкевич, А.Г. Прядко, О.В. Свиридов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т.42, № 1. – С. 98–105.

5–А Характеристика иммуноаффинной хроматографии и новый метод получения тиропероксидазы человека из субклеточных фракций щитовидной железы / О.В. Цыганова, Е.П. Киселева, И.И. Вашкевич, А.Г. Прядко, О.В. Свиридов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т.42, № 2. – С. 236–346.

Статьи в сборниках материалов конференций:

6–А Цыганова, О.В. Получение и характеристика высокоочищенного препарата тиропероксидазы человека / О.В. Цыганова // Сборник трудов молодых ученых НАН Беларуси: материалы междунар. науч. конф. «Молодежь в науке – 2004», Минск, 8–13 ноября 2004 г. – Минск, 2004. – Т.2. – С. 88–92.

7–А Цыганова, О.В. Конкурентное связывание аутоантител с тиропероксидазой в гетерофазных тест-системах / О.В. Цыганова // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2005. – № 5. – С. 126–128.

Тезисы докладов:

8–А Выделение тиропероксидазы человека иммуноаффинной хроматографией: новые подходы и методы контроля / О.В. Цыганова, Е.П. Киселева, С.В. Халимончик, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов // Химия, структура и функция биомолекул: материалы Междунар. конф., посвящ. 30-летию Института биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, 29-30 июня 2004 г. / Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук – 2004. – № 2.– С. 113.

9–А Тироидные антигены и специфические иммуноглобулины в новой конструкции иммуноферментной системы для конкурентного анализа антитироидных аутоантител / О.В. Цыганова, Е.П. Киселева, А.Г. Прядко, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов // Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран Содружества: Материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск-Нарочь, 25-28 мая 2005 г. / сост. и общ. ред. А.Н. Евтушенкова. – Минск, 2005. – С. 97-98.

10–А Получение и химическая модификация специфических реагентов для иммуноанализа / О.В. Цыганова, Е.П. Киселева, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов // Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии: XVIII Междунар. науч.-практ. конф. Минск, 18-21 октября 2005 г. / редкол.: В.Е. Агабеков [и др.]. – Минск: БГТУ, 2005.– С. 52.

11–А Новые методы экстракции тиропероксидазы человека и ее иммунореактивного рекомбинантного фрагмента / О.Н. Чернуха, О.В. Цыганова, С.В. Халимончик, Е.П. Киселева, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов // Экстракция органических соединений: III Междунар. конф., Воронеж, 17-21 октября 2005 г. – Воронеж, 2005. – С. 189.

12–А Применение эффекта синергетического связывания пары моноклональных антител с тиропероксидазой в иммуноанализе / Е.П. Киселева, О.В. Цыганова, Н.М. Слепцова, И.И. Вашкевич, А.Г. Прядко, О.В. Свиридов // Химия, структура и функция биомолекул: II Междунар. конф., Минск, 3-5 октября 2006 г. / НАН Беларуси, ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», Белорус. хим. о-во; редкол.: Н.Б. Хрипач [и др.]. – Минск, 2006. – С. PR–74.

13–А Структурные изменения и иммунореактивность тиропероксидазы человека в условиях иммуноаффинной хроматографии / Е.П. Киселева, О.В. Цыганова, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов // Химия, структура и функция биомолекул: II Междунар. конф., Минск, 3-5 октября 2006 г. / НАН Беларуси, ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», Белорус. хим. о-во; редкол.: Н.Б. Хрипач [и др.]. – Минск, 2006. – С. PR–75.

РЭЗІЮМЭ

Цыганавя Алеся Васільеўна

«Выдзяленне і імунахімічныя ўласцівасці поўнаразмернай формы і пратэалітычных фрагментаў тырапераксідазы чалавека»

Ключавыя словы: тырапераксідаза, монакланальныя антыцелы, аўтаантыцелы, сінэргізм, імунааналіз, імунаафінная храматаграфія, флуарэсцэнтная спектраскапія, кругавы дыхраізм.

Аб'ектам даследавання з'яўляліся поўнаразмерная прыродная тырапераксідаза (ТПА) чалавека і яе вялікія пратэалітычныя фрагменты, спецыфічныя аўтаантыцелы (ААЦ) і два монакланальныя антыцелы (МАЦ) да розных эпітопаў антыгена.

Прадмет даследавання ўключаў метады атрымання чыстых аб'ектаў, антыгензвязваючыя ўласцівасці МАЦ і ААЦ, эпітопы і імунарэактыўнасць ТПА, канфармацыйная стабільнасць ТПА і МАЦ, імунааналіз ТПА і ААЦ да ТПА.

Мэта работы: выдзяліць ТПА чалавека, ахарактарызаваць імунахімічныя ўласцівасці ачышчанага фермента і пратэалітычных фрагментаў, распрацаваць імунааналітычныя сістэмы на аснове ТПА.

Метады даследавання: імунахімічны аналіз, імунаафінная храматаграфія, кругавы дыхраізм і флуарэсцэнтная спектраскапія.

Атрыманыя вынікі і іх новізна. Атрыманы і ахарактарызаваны МАЦ двух клонаў да прасторна ізалаваных канфармацыйных эпітопаў ТПА. Распрацаваны новыя метады атрымання і колькаснага вызначэння поўнаразмернай формы і пратэалітычных фрагментаў прыроднай ТПО. Паказана высокая стабільнасць ТПО і МАТ у мадэльных умовах імунаафіннай храматаграфіі. Выяўлены эфект сінэргізма пры звязванні двух МАЦ з гэтымі эпітопамі, які заснаваны на аластэрычных ўзаемадзеяннях. З выкарыстаннем МАЦ распрацаваны новыя метады храматаграфічнай ачысткі і колькаснага вызначэння паўнаразмернай формы і пратэалітычных фрагментаў ТПА. Выяўлены змяненні імунахімічных ўласцівасцяў ТПА і МАЦ пад ўздзеяннем фізіка-хімічных фактараў. Выдзялены з сывараткі крыві чалавека і ахарактарызаваны функцыянальна актыўныя ААЦ да ТПА. Распрацавана канструкцыя імунаферментнай тэст-сістэмы канкурэнтнага тыпу для вызначэння ААЦ да ТПА, як навучна-тэхнічная аснова набору рэактываў для медыцынскай дыягностыкі.

Ступень выкарыстання. Вынікі даследавання канфармацыйнай стабільнасці і функцыянальнай актыўнасці ТПА і спецыфічных антыцелаў, метады ачысткі ТПА і ААЦ, селекцыі МАЦ, колькаснага вызначэння ТПА і ААЦ, а таксама прэпараты гэтых біяпазімераў выкарыстоўваюцца ў навучных і прыкладных даследаваннях ІБАН НАН Беларусі. Прэпараты ачышчанага ТПА выкарыстоўваюцца для вырабу вопытных партый дыягнастычнага набору ІРМА-анты-ТПА-СТ на ГРП ІБАН НАН Беларусі.

Тэст-сістэма для канкурэнтнага імунаферментнага аналізу ААЦ да ТПА перададзена для эксперыментальных выпрабаванняў і вырабу вопытных абразцоў дыягнастычнага набору рэактываў на ГРП ІБАН НАН Беларусі.

Галіна выкарыстання: біяхімія, імунахімія, медыцына, імунадыягнастычная індустрыя.

РЕЗЮМЕ

Цыганова Олеся Васильевна

«Выделение и иммунохимические свойства полноразмерной формы и протеолитических фрагментов природной тиропероксидазы человека»

Ключевые слова: тиропероксидаза, моноклональные антитела, аутоантитела, синергизм, иммуноанализ, иммуноаффинная хроматография, флуоресцентная спектроскопия, круговой дихроизм.

Объектом исследования являлись полноразмерная тиропероксидаза (ТПО) человека и ее крупные протеолитические фрагменты, специфические аутоантитела (ААТ) и два моноклональных антитела (МАТ) к разным эпитопам ТПО.

Предмет исследования включал методы получения чистых объектов, антигенсвязывающие свойства МАТ и ААТ, эпитопы и иммунореактивность ТПО, конформационная стабильность ТПО и МАТ, иммуноанализ ТПО и ААТ к ТПО.

Цель работы: выделить ТПО человека, охарактеризовать иммунохимические свойства очищенного фермента и его протеолитических фрагментов, разработать иммуноаналитические системы на основе ТПО.

Методы исследования: иммунохимический анализ, иммуноаффинная хроматография, круговой дихроизм и флуоресцентная спектроскопия.

Полученные результаты и их новизна. Получены и охарактеризованы МАТ двух клонов к пространственно изолированным конформационным эпитопам ТПО. Обнаружен эффект синергизма при связывании двух МАТ с этими эпитопами, который основан на аллостерических взаимодействиях. С использованием МАТ разработаны новые методы хроматографической очистки и количественного определения полноразмерной формы и протеолитических фрагментов ТПО. Выявлены изменения иммунохимических свойств ТПО и МАТ под действием физико-химических факторов. Выделены из сыворотки крови человека и охарактеризованы функционально активные ААТ к ТПО. Разработана конструкция иммуноферментной тест-системы конкурентного типа для определения ААТ к ТПО, как научно-техническая основа набора реактивов для медицинской диагностики.

Степень использования. Результаты изучения конформационной стабильности и функциональной активности ТПО и специфических антител, методы очистки ТПО и ААТ, селекции МАТ, количественного определения ТПО и ААТ, а также образцы этих биополимеров используются в научных и прикладных исследованиях ИБОХ НАН Беларуси. Препараты очищенной ТПО применяются для изготовления опытных партий диагностического набора ИРМА-анти-ТПО-СТ на ХОП ИБОХ НАН Беларуси. Тест-система для конкурентного иммуноферментного анализа ААТ к ТПО передана для экспериментальной апробации и изготовления опытных образцов диагностического набора на ХОП ИБОХ НАН Беларуси.

Область применения: биохимия, иммунохимия, медицина, иммунодиагностическая индустрия.

SUMMARY

Tsyganova Olesya Vasilievna

«Purification and immunochemical properties of full-size form and proteolytical fragments of thyroid peroxidase»

Key words: thyroid peroxidase, monoclonal antibodies, autoantibodies, synergy, immunoassay, immunoaffinity chromatography, fluorescence spectroscopy, circular dichroism.

The objects of research were human full-size thyroid peroxidase (TPO) and its proteolytic fragments, specific autoantibodies (AAB) and two monoclonal antibodies (MAB) to different epitopes on TPO.

The subjects of research were the methods for object purification, antigen-binding properties of MAB and AAB, epitopes and immunoreactivity of TPO, conformation stability of TPO and MAB, immunoassay of TPO and AAB to TPO.

The aim of work was to purify human TPO, to characterize immunochemical properties of purified enzyme and its proteolytical fragments, to develop immunoanalytical systems on basis of TPO.

Research methods: immunoassay, immunoaffinity chromatography, circular dichroism and fluorescence spectroscopy.

Results obtained and their novelty. The MABs of two clones directed to spatially separated conformational epitopes of TPO have been obtained and characterized. A synergistic effect was found upon the binding of the two MABs to these epitopes, which is based on an allosteric interactions. Using MABs, new methods for the chromatographic purification and quantitative determination of a full-size form and proteolytic fragments of TPO were developed. The changes in immunochemical properties of TPO and MABs caused by physico-chemical factors were detected. Functionally active AAB to TPO were isolated from human serum and characterized. The construction of immune-enzyme test-system of competitive type for the determination of AAB to TPO was developed as a scientific and technical basis of a medical diagnostics kit.

The extent of use. The results of the study of the conformational stability and functional activity of TPO and specific antibodies, the methods for TPO and AAB purification, MAB selection, and TPO and AAB quantitative determination as well as the specimens of these biopolymers have been using in basic and applied research at the IBOC NASB. The preparations of purified TPO have been applying in the manufacturing of the development batches of a diagnostic kit IRMA-anti-TPO-CT at the Experimental Production Facility (EPF) of IBOC NASB. The test-system for an anti-TPO AAT competitive enzyme immunoassay have been transferred for testing under manufacturing process conditions and producing kit samples at EPF IBOC NASB.

Areas of application: biochemistry, immunochemistry, medicine and immunodiagnostics industry.