



Clinical Chemistry 63:1  
343-350 (2017)

Proteomics and Protein Markers

## Anti-Cardiac Troponin Autoantibodies Are Specific to the Conformational Epitopes Formed by Cardiac Troponin I and Troponin T in the Ternary Troponin Complex

Alexandra V. Vylegzhanina,<sup>1\*</sup> Alexander E. Kogan,<sup>1,2</sup> Ivan A. Katrukha,<sup>1,3</sup> Olga V. Antipova,<sup>2</sup> Andrey N. Kara,<sup>3</sup> Anastasia V. Bereznikova,<sup>1,2</sup> Ekaterina V. Koshkina,<sup>4</sup> and Alexey G. Katrukha<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> HyTest Ltd. Research and Development Department, Turku, Finland; Departments of <sup>2</sup> Bioorganic Chemistry and <sup>3</sup> Biochemistry, School of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia; <sup>4</sup> 67th City Hospital, Moscow, Russia.

\* Address correspondence to this author at: HyTest Ltd., Intelligat 1, 6th Floor, Joukahaisenkatu 6, FIN-20520 Turku, Finland. Fax: +358-2-512-0909; e-mail: alexandra.vylegzhanina@hytest.fi.

Received June 7, 2016; accepted October 13, 2016.

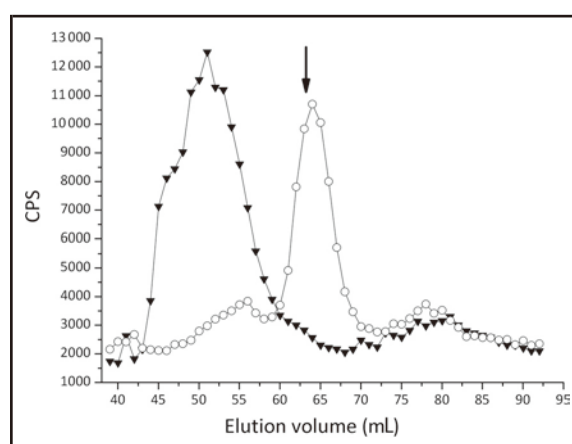
Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2016.261602

© 2016 American Association for Clinical Chemistry

<sup>5</sup> Nonstandard abbreviations: TnI, troponin I; TnT, troponin T; TnC, human cardiac/slow skeletal troponin C; cTnI, human cardiac troponin I; cTnT, human cardiac troponin T; AMI, acute myocardial infarction; TnAAbs, autoantibodies specific to human cardiac troponins; I-T-C, human cardiac troponin ternary complex; aa, amino acid residues; I-C, human cardiac troponin binary complex; mAb, monoclonal antibody; ECG, electrocardiogram; GF, gel filtration.

### 肌钙蛋白自身抗体特异性识别位于三元复合中由TnI和TnT所形成的构象位点

在正常人群中，约有8%的个体血清中含有肌钙蛋白自身抗体（后简称TnIAABs）。当使用对肌钙蛋白自身抗体敏感的肌钙蛋白检测试剂时（该类试剂中使用的抗体至少有一株的识别位点位于TnI 30-110aa的中间区域），自身抗体的存在会对检测结果产生负面影响。关于肌钙蛋白自身抗体的存在和产生的影响，在数年前便已经被广泛报道，但是关于自身抗体的识别位点却研究甚少。本篇研究中，研究者使用若干不同位点的肌钙蛋白抗体，通过免疫检测和凝胶过滤方法对肌钙蛋白自身抗体的特异性及其对不同形式的肌钙蛋白的检测结果的影响进行了系统性研究。



**Fig. 1. Representative GF profiles of the I-T-C complex spiked into the plasma samples with low and high cTnI recovery.**

The immunoreactivity of cTnI in GF profiles was measured by the TnAAbs-insensitive TnI625-TnIMF4 immunoassay. GF profiles are shown for plasma samples with 4% (●) and 77% (○) recoveries of I-T-C detected by TnAAbs-sensitive TnI19C7-TnI560 assay. The retention volume of purified I-T-C spiked into buffer B (50 mmol/L Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 g/L BSA, and 1 g/L NaN<sub>3</sub>) marked by the arrow.

**实验材料：**

抗原：天然人TnI-T-C复合物，天然人cTnI，重组人cTnT以及TnI-C复合物（由天然TnI和TnC合成）。

cTnI单抗：TnI 19C7 (41-49), TnI 560 (83-93), TnI 625 (169-178)和TnI MF4 (190-196)。

cTnT单抗：TnT124 (41-60), TnT25 (54-73), TnT175 (67-86), TnT8 (80-99), TnT122 (119-138), TnT9 (132-152), TnT 1A11 (145-164), TnT2 (171-190), TnT105 (184-203), TnT 7E7 (223-242)和TnT199 (275-288)。

样本：191例健康人群柠檬酸钠血浆（年龄分布为20-45岁）和15例AMI病人的35份血浆（AMI由心电图和罗氏TnT试剂确诊）。

**实验方法：**

夹心免疫，添加回收率分析，凝胶过滤分析。

数据分析采用Mann-Whitney U-test

\*详细信息请参考原文

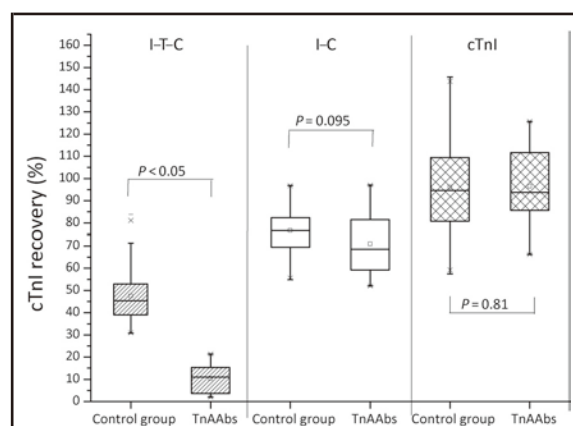
**结果分析：****血浆中TnIAABs的鉴定**

该实验使用了两组夹心免疫分析系统。抗体配对为对TnIAABs敏感的19C7-560，和对TnIAABs不敏感的625-MF4。分别使用这两组分析系统对191例血浆样本进行TnI-T-C的添加回收率测定。

根据19C7-560抗体配对的测试结果，将回收率低于35%的血浆样本（21例）和高回收率的样本（51%，77%和84%）进行凝胶过滤蛋白分离。然后用625-MF4抗体配对测试分离物中TnI的免疫活性。相比于添加到缓冲液中的TnI，有12例血浆样本的TnI-T-C的洗脱峰向较高分子量的位置偏移。提示较高分子量的洗脱产物可能是某种免疫复合物。同时其他血浆样本的洗脱产物没有出现洗脱峰偏移的现象（如图1所示）。

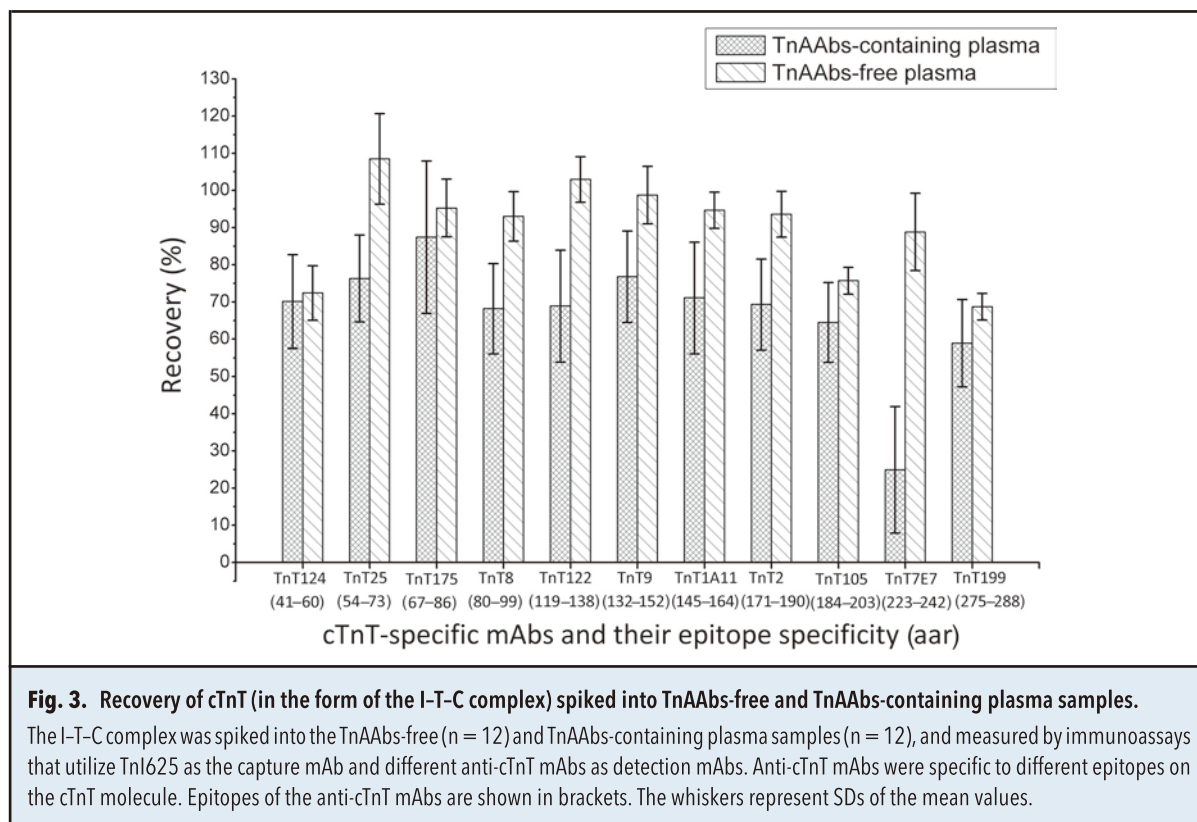
对于这12例出现洗脱偏移的样本，19C7-560的回收率测定结果仅为1.9%-21.3%（平均值为10.3%），而用对TnAABs不敏感的625-MF4对该12例样本进行测试，回收率为58.3%-80.5%。提示这些血浆中可能含有TnAABs。

为了做更进一步的确认，研究者从12例样本中选取了回收率分别为1.9%，2.5%和3.1%的3例样本进行了IgG分离（方法为Protein G纯化）。同时作为对照，还选取了3例高回收率的样本也进行了IgG分离。对去除IgG的血浆样本再次用19C7-560进行添加回收率测定，低回收率样本的回收率升高至13.0%-25.1%，高回收率样本的回收率升高至80.3%-91.1%。IgG分离后的血浆用凝胶过滤分析，并没发现之前的洗脱峰偏移现象。因此可以判断，导致回收率下降的原因正是因为TnAABs与TnI-T-C结合所致。



**Fig. 2. Recoveries of different forms of cTnI spiked into the TnAABs-free or TnAABs-containing plasma samples.**

The I-T-C complex, I-C complex, and free cTnI were spiked into the TnAABs-free ( $n = 179$ ) or TnAABs-containing plasma samples ( $n = 12$ ) at a concentration of  $50 \mu\text{g/L}$  and were measured by the TnI19C7-TnI560 immunoassay. The boxes indicate the 25th-75th percentiles; whiskers represent minimum and maximum recoveries; inner unshaded boxes indicate the mean recoveries; and lines, the median values.



### TnAAbs对于TnT免疫检测的影响

上述的数据分析推断出TnAAbs的识别位点可能位于TnT上，因此研究者对TnAAbs对TnT免疫检测的影响进行了分析。该研究使用的配对为对TnAAbs不敏感的TnI625搭配不同位点的TnT抗体。通过对TnAAbs阳性和阴性的各12例血浆进行添加回收率分析。结果显示，所有TnAAbs阳性血浆的添加回收率均低于对照，其中TnT7E7抗体的回收率显著低于对照（结果如图3所示）。因此提示，TnT7E7的识别位点为受TnAAbs影响的主要位点。

为了进一步验证TnAAbs对于游离TnT和TnI-T-C中TnT的影响，研究者将游离TnT和TnI-T-C分别加入含有TnAAbs的12例血浆中，用两组抗体配对进行添加回收率分析，同时以无TnAAbs的12例血浆作为对照。两组抗体配对分别为对TnAAbs敏感的TnT105-TnT7E7和对TnAAbs不敏感的TnT105-TnT9。

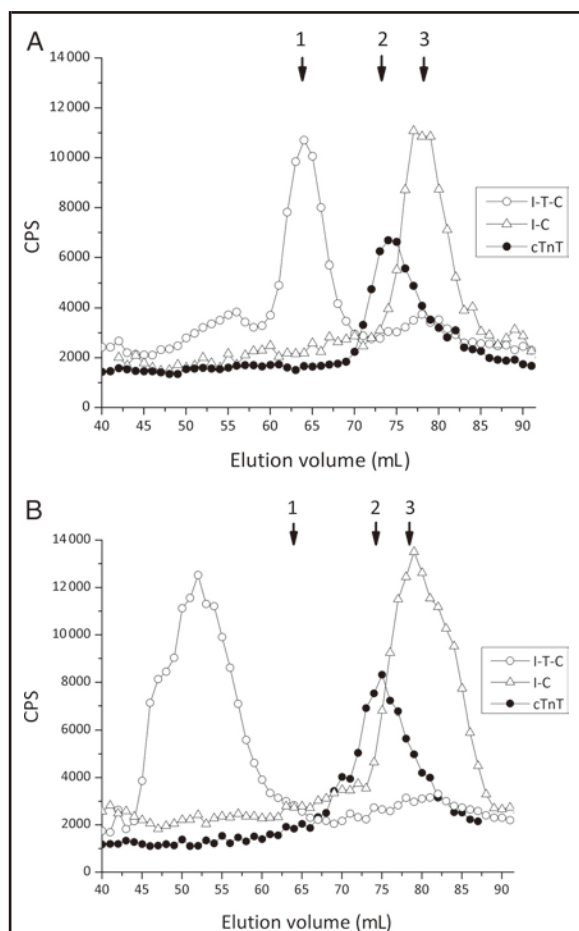
结果显示，对TnAAbs敏感的TnT105-TnT7E测定添加了TnI-T-C的TnAAbs阳性血，添加回收率显著低于对照组。而测定添加游离TnT的TnAAbs阳性血，添加回收率相比于对照组无显著差异。同时，对TnAAbs不敏感的

TnT105-TnT9测定游离TnT和TnI-T-C的添加回收率，实验组和对照组均无显著差异。因此可以得出结论，TnAAbs仅影响复合物中TnT的免疫测定，对于游离TnT无影响。

### TnAAbs血浆中添加肌钙蛋白的凝胶过滤分析

为了确认TnAAbs仅与TnI-T-C反应，而不和TnI-C或者TnT等其他形式的肌钙蛋白反应。研究者通过将TnI-T-C、TnI-C和TnT分别添加到TnAAbs阳性血（n=12）和TnAAbs阴性血（n=6）中，并进行凝胶过滤分析。在经过蛋白分离后，用TnAAbs不敏感的TnI625-TnIMF4和TnT9-TnT1A11对cTnI和cTnT的免疫活性进行测定。

结果显示，TnAAbs阳性血中TnI-C和TnT的洗脱峰和TnAAb阴性血的结果一致（如图4所示）。而如之前实验结果所示，TnAAbs阳性血中的TnI-T-C的洗脱峰向较高分子量的位置偏移。因此，可以推断TnAAb仅与TnI-T-C形成免疫复合物。

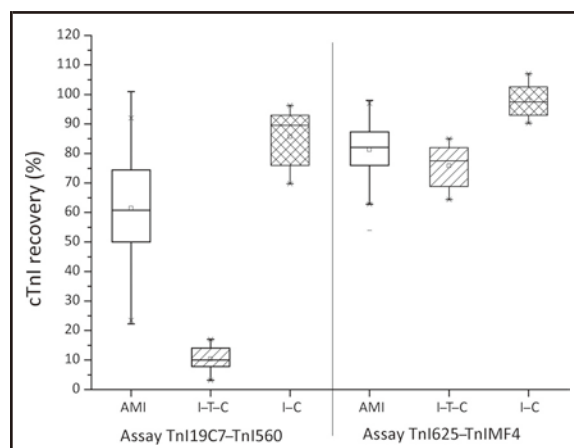


**Fig. 4.** (A), Representative gel-filtration (GF) profiles of the I-T-C complex, I-C complex, and cTnT spiked into the TnAAbs-free plasma sample; (B), representative GF profiles of the I-T-C complex, I-C complex, and cTnT spiked into the TnAAbs-containing plasma sample.

The immunoreactivity of cTnI in the I-T-C complex (○) and I-C complex (△) was measured by the TnI625-TnIMF4 immunoassay; the immunoreactivity of cTnT (●) was measured by the TnT9-TnT1A11 immunoassay. The retention volumes of purified proteins spiked into buffer B are marked by the arrows: 1, I-T-C; 2, cTnT; 3, I-C.

#### TnI-T-C复合物中TnI和TnT回收率的相关性分析

研究者用对TnAAb敏感的TnI19C7-TnI560和TnT105-TnT7E7对添加于TnAAbs阳性血中的TnI-T-C进行了TnI和TnT回收率测定。结果显示两者的相关性 $r=0.97$ 。说明位于复合物中的TnI和TnT分子表面的一些位点同时被TnAAb封闭了。



**Fig. 5.** The influence of TnAAbs on the recovery of endogenous cTnI in the plasma samples of AMI patients.

The 35 plasma samples from 15 AMI patients were mixed 1:1 with the individual TnAAbs-containing samples ( $n=4$ ). As a control, the I-T-C complex or I-C complex in TnAAbs-free plasma were mixed 1:1 with the individual TnAAbs-containing samples ( $n=4$ ); final concentration: 25  $\mu\text{g/L}$ . Recoveries were measured by the TnI19C7-TnI560 and TnI625-TnIMF4 immunoassays. AMI: the recovery of cTnI from the plasma samples of AMI patients after mixing with TnAAbs-containing plasma samples. I-T-C: the recovery of the I-T-C complex spiked into the TnAAbs-free and mixed with the TnAAbs-containing plasma samples. I-C: the recovery of the I-C complex spiked into the TnAAbs-free plasma and mixed with the TnAAbs-containing plasma samples. The boxes indicate the 25th-75th percentiles; the whiskers represent minimum and maximum recoveries; the small unshaded boxes inside indicate the mean recovery; and lines, the median values.

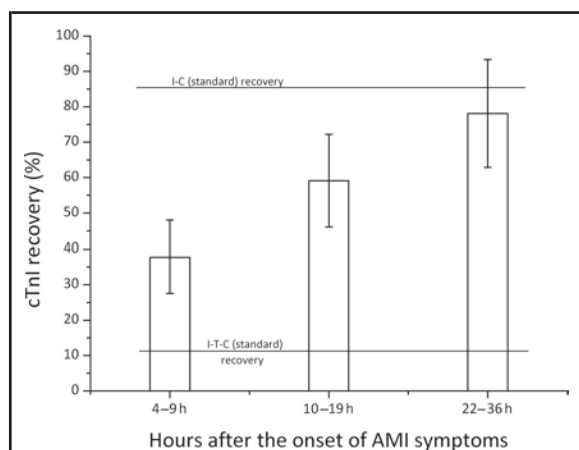
#### TnAAbs对AMI患者血浆中内源性cTnI检测的影响

为了研究TnAAbs对AMI患者血浆中内源性cTnI检测的影响，研究者将TnI阳性的AMI患者血浆与TnAAbs阳性血浆进行了混合。同时将TnI阳性的AMI患者血浆与TnAAbs阴性血浆混合作为参考。此外，将分别添加了TnI-T-C和TnI-C的TnAAbs血浆作为对照。之后用TnI19C7-TnI560和TnI625-TnIMF4对混合血浆进行测试。

结果显示，用TnAAbs敏感的TnI19C7-TnI560测定内源性TnI的回收率显著高于TnI-T-C的添加回收率，同时略低于TnI-C的添加回收率。用TnAAbs不敏感的TnI625-TnIMF4测试不同形式的TnI，回收率差异不明显（结果如图5所示）。

使用对TnAAbs敏感的TnI625-TnT7E7对AMI患者血浆内源性的TnI-T-C进行测定，浓度约为总TnI的36.6%-82.5%。当AMI患者血浆与TnAAbs阳性血浆混合后，TnI-T-C的浓度占比下降至0.9%-31%。因为该配对仅检测TnI-T-C，因此可以证明TnI-T-C在血浆中的存在。

研究者进而将AMI患者胸痛发作后4-9小时，10-19小时和22-36小时采血的样本分别与TnAAbs阳性血浆混合，并用用TnAAbs敏感的TnI19C7-TnI560对其回收率进行测定。结果显示，三个不同时间段采血的样本的TnI回收率依次为22.3%-44.9%，32.1%-74.1%和50.3%-101.2%（结果如图Fig 6所示）。因此提示，早期AMI患者血浆样本中的TnI主要为TnI-T-C和TnI-C混合物，但是随着时间的推移，两者的比例逐渐发生变化而TnI-C变为了主要形式。



**Fig. 6. The influence of TnAAbs on cTnI recovery in the plasma samples of AMI patients at different times following the onset of AMI symptoms.**

Each of the samples of the AMI patients (6 patients; 3 time points for each patient) was mixed 1:1 with 4 individual TnAAbs-containing plasma samples. Recoveries obtained for each time point were averaged. For control, the I-T-C complex or I-C complex (used as reference antigens) were spiked into the TnAAbs-free plasma and mixed 1:1 with the TnAAbs-containing samples ( $n = 4$ ) to a final concentration of 25  $\mu\text{g/L}$  (depicted as horizontal lines). Recoveries were measured in TnI19C7-TnI560 assay. Error bars represent SD of mean recovery at each time point.

## 启示与讨论：

抗体选择对于开发肌钙蛋白免疫检测试剂而言一直是一个艰巨的挑战。目前商业化的TnI试剂所选择的抗体位点大多位于TnI分子的中间区域，但是该区域却对TnAAbs更加敏感。另外，本研究所鉴别的TnAAbs位点，只是TnAAbs家族中的一部分，更多有关TnAAbs家族的研究有待进一步开展。

通过使用凝胶过滤分析，研究者证实了TnAAbs仅结合TnI-T-C复合物的假设。这也提示我们，凝胶过滤分析可以用于检测样本中TnAAbs的存在。

实验结果表明，TnAAbs不仅会影响TnI的检测，也同样会影响TnT的检测。但是对于两者的影响，均主要存在于TnI-T-C复合物中。从三元复合物的结构来看，TnI分子的中间区域（42-136aa）和TnT的203-271区域会形成所谓的IT臂。因此，可以推断TnAAbs的结合位点很可能是IT臂所形成的构象位点。

目前认为血液循环中肌钙蛋白的主要形式是I-C复合物，因此理论上肌钙蛋白的检测并不会受到TnAAbs的影响。然而，本研究发现在胸痛发作的早期，TnAAbs依然会对肌钙蛋白的检测产生影响。因此可以推断，在AMI发作初期，血液循环中肌钙蛋白I的存在形式主要以I-T-C和I-C两种复合物的混合形式存在，随着时间的推移I-C复合物逐渐变为肌钙蛋白的主要存在形式。考虑到胸痛发作的后的1-3小时的黄金窗口期，关于肌钙蛋白释放进入血液的形式及演变还有受TnAAbs的影响，有待进一步的深入研究。

