

УДК 615.277

**РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА, ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ***А.В. Зубков, Н.С. Кузьмина, М.А. Андреева, А.В. Сидоров, Л.Г. Бутова**ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия*

**Введение.** В патогенезе диффузного токсического зоба (ДТЗ) ведущую роль играет рецептор тиреотропного гормона (рТТГ), обнаруженный *Pastan I. et all* в 1966 году на мембране тиреоцитов [1]. В соответствии с современными представлениями, рТТГ локализуется на мембране тиреоцитов и является членом суперсемейства рецепторов, которые связаны с G-белками. Активация G-белков комплексом гормон-рецептор приводит к стимуляции продукции циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) аденилакциклазой по инозитолфосфатному пути. В процессе развития этого заболевания (ДТЗ) вырабатываются антитела, стимулирующие рТТГ (АТС рТТГ), активирующие сигнальные пути тиреоцита, приводящие к экспрессии гена ТПО и увеличивающие синтез гормонов ЩЖ; антитела, блокирующие рТТГ (АТБ рТТГ), препятствующие осуществлению биологических эффектов ТТГ, соответственно, снижающие синтез гормонов ЩЖ; антитела, расщепляющие рТТГ (АТР рТТГ), при связывании с линейными эпитопами в шарнирной области рТТГ, приводящие к активации каскада каспаз и активирующие процессы апоптоза [2].

Впервые молекулярное клонирование гена рТТГ собаки было выполнено *Parmentier M., et all* в 1989 г.: была получена кДНК размером 4,9 Кб, кодирующая пептид, состоящий из 744-х аминокислотных остатков [3]. В последние годы появились новые данные о функциональных и биохимических особенностях рТТГ и основных аутоантигенов щитовидной железы при ряде аутоиммунных патологий [2].

Одним из современных подходов к выявлению функциональных сайтов белка является изучение его антигенных детерминант (эпитопов) с помощью рекомбинантных белков и моноклональных антител. Главное преимущество рекомбинантных белков состоит в том, что в них представлены отдельные линейные эпитопы (участки поверхности) антигенов, состоящие из 15–25 аминокислотных остатков. Эти участки могут находиться вблизи функциональных сайтов молекулы или топографически совпадать с ними, что позволяет исследовать взаимосвязи между структурой и функциями молекул и проводить детальное картирование их антигенных детерминант, распознаваемых аутоантителами при аутоиммунной патологии. Патогенетическая значимость отдельных эпитопов антигенов щитовидной железы в настоящее время остаётся предметом пристального изучения. Применение моноклональных антител позволяет детально охарактеризовать конкретные эпитопы поверхности белков, проводить анализ гетерогенности аутоантител в сыворотке крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

Получение рекомбинантных белков рецептора тиреотропного гормона (рТТГ) человека открывает новые возможности в исследовании взаимосвязи структуры аутоантигенов щитовидной железы и аутоантител в патогенезе аутоиммунных заболеваний: диффузный токсический зоб и аутоиммунный тиреодит (АИТ).

В данной работе клонировали фрагменты последовательности мРНК рТТГ, не содержащие нуклеотидных замен. Получены рекомбинантные векторы для экспрессии фрагментов рецептора тиреотропного гормона.

**Актуальность и цель работы:** основную роль в патогенезе диффузного токсического зоба – аутоиммунного заболевания щитовидной железы (АИЗ ЩЖ), играет рецептор тиреотропного гормона, что проявляется гиперпродукцией аутоантител (аутоАТ) к рТТГ, приводящей к устойчивому гипертиреозу [4].

В рТТГ можно выделить три домена: внутриклеточный, внеклеточный и трансмембранный. Наиболее интересная область для изучения взаимодействия между антителами и рецептором – внеклеточный домен рТТГ, содержащий обогащённый аминокислотой лейцином фрагмент, и, также, включающий шарнирную область, непосредственно связанную с трансмембранным доменом. Расщепление рецептора, приводит к образованию ( $\alpha$ ) – субъединицы, состоящей из шарнирной области и обогащённого лейцином участка, а также ( $\beta$ ) – субъединицы, содержащей трансмембранный домен и С-концевую часть рецептора. Основным участком рецептора, к которому направлены аутоАТ является  $\alpha$ -субъединица рецептора тиреотропного гормона [2, 4–6].

Одним из ключевых направлений исследований в этой области является изучение механизмов взаимодействия аутоантител с участками рТТГ, выявление взаимосвязи между мутациями в гене рТТГ и изменением аминокислотной последовательности эпитопов, приводящих к развитию аутоиммунного заболевания. Для детального изучения эпитопов рТТГ, принимающих участие во взаимодействии с антителами, необходимо выявить отдельные популяции аутоантител стимулирующих (стимулирующие аутоАТ), блокирующих (блокирующие аутоАТ) либо расщепляющие рецептор и приводящие к активации сигнальных путей от рецептора к внутриклеточным эффекторам тиреоцита.

Выявление в сыворотке крови пациентов аутоантител к рТТГ при аутоиммунных заболеваниях: ДТЗ, АИТ являются одним из критериев при постановке диагноза аутоиммунного заболевания.

Целью настоящей работы является клонирование фрагментов гена рТТГ человека, получение и анализ рекомбинантных белков, содержащих участки рецептора тиреотропного гормона, что позволит расширить понимание патогенеза аутоиммунных заболеваний щитовидной железы.

**Материалы и методы.** Объект исследования: ткань ЩЖ, полученная от пациента с ДТЗ. Выделение мРНК: ткань ЩЖ замораживали в жидком азоте и гомогенизировали. Нуклеиновые кислоты очищали от белков и разделяли методом ультрацентрифугирования при 100 000 g в градиенте цезия хлорида. Для получения кДНК использовали ферментативный синтез двухцепочечной кДНК на poly (A)<sup>+</sup> – мРНК.

Для трансформации использовали компетентные клетки *E. coli*, штамм *DH5a*.

Олигонуклеотидные праймеры были подобраны на основе последовательностей нуклеотидов, собранных в Gen Bank с использованием онлайн-программы Primer Blast. Синтезировали пять пар праймеров на участок, соответствующий внеклеточному домену рТТГ, «Синтол» (Россия).

Методом ПЦР проведена амплификация фрагментов ДНК различной длины, содержащих участки нуклеотидной последовательности внеклеточного домена рТТГ, для последующего клонирования в векторные системы. проводили с помощью ПЦР – амплификатора Т-100 (Bio-Rad). Полученные ПЦР-продукты и пробы ДНК (на этапах клонирования) разделяли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле. ПЦР – продукты выделяли из геля агарозы с помощью набора реактивов Cleanup Standart по методике, рекомендованной производителем.

Реакцию лигирования проводили с помощью набора Quick-TA kit без предварительной обработки рестриктазами в соответствии с инструкцией к набору. Для клонирования полученных ПЦР – продуктов и контроля экспрессии были использованы векторы: рAL2-Т, рVax1 и рTurboRFP-С.

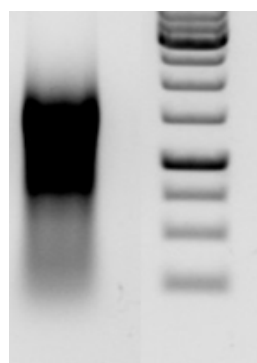
**Результаты и обсуждение.** На первом этапе наших экспериментов было проведено выделение РНК из ткани ЩЖ человека. Полученные образцы содержали 0,7 мкг/мкл РНК, что было подтверждено методом электрофореза проб РНК в 1,5 % агарозном геле (рис. 1).

Для получения генно-инженерных конструкций, содержащих фрагменты гена рТТГ, соответствующие внеклеточному домену, нуклеотидная последовательность которого включает в себя (1 – 1239) п.н. синтезировали пять пар праймеров. В указанной области были выбраны пять участков, на которые были синтезированы специфические олигонуклеотиды: 1-й участок – 1160 п.н.; 2-й участок – 1156 п.н.; 3-й участок – 432 п.н.; 4-й участок – 414 п.н.; 5-й участок – 389 п.н. (рис. 2.)

На следующем этапе была синтезирована кДНК на матрице РНК в двух вариантах, с oligo(dT) и random праймерами. На матрице кДНК, полученной с random праймерами для рТТГ, удалось синтезировать ПЦР – продукты длиной: 1160 п.н., 1156 п.н., 432 п.н., 389 п.н.

Амплифицированные продукты были клонированы в плазмидный вектор рAl-2Т, который трансформировали в компетентные клетки *E. coli*, штамм *DH5a*.

Наличие в векторах рAl-2Т фрагментов гена рТТГ проверяли методом ПЦР с праймерами М13 с дальнейшей визуализацией ПЦР – продуктов и исходных векторов в 1,5 % геле агарозы. В итоге, были получены три варианта вектора рAL2-Т, содержащие фрагменты рТТГ – векторы рAL2-Т с ПЦР-продуктами участка 1 (1160 п.н.), участка 3 (432 п.н.) и участка 5 (389 п.н.). Нуклеотидные последовательности трех различных клонов, содержащих различные последовательности фрагментов гена рТТГ были секвенированы. В результате секвенирования нуклеотидной последовательности векторов показали, что фрагменте 432 п.н. содержал 5 замен нуклеотидов; фрагменты, размером 1160 п.н. и 389 п.н., были полностью идентичны опубликованным нуклеотидным последовательностям из GenBank. Протяжённый участок гена рТТГ (1160 п.н.), кодирующий участок внеклеточного домена рТТГ, реклонировали в вектор рVax1, предназначенный для работы с клеточными линиями млекопитающих.



1 2

Рисунок 1. Электрофореграмма в 1,5 % геле агарозы мРНК, выделенной из ткани щитовидной железы

Трек 1 – проба мРНК 0,7 мкг/ мкл. Трек 2 – 10 kВ Gene Ruler DNA Ladder маркер

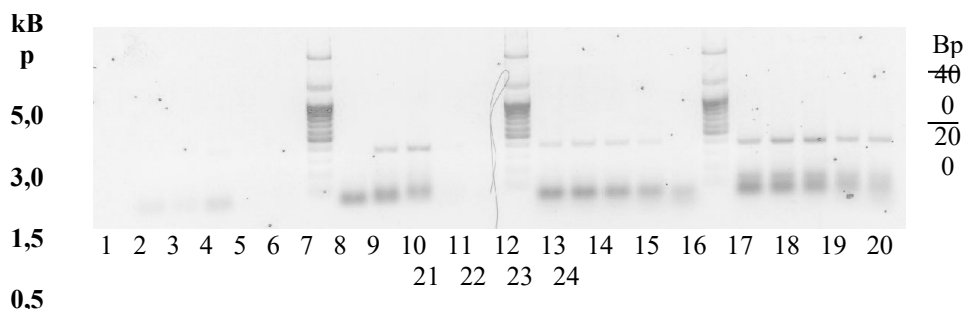
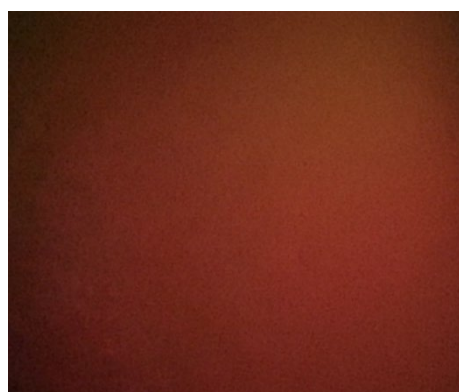


Рисунок 2. Электрофореграмма в 1,5 % геле агарозы ПЦР – продуктов

трек: 1 – пусто  
треки 7,13,19 – маркер 1 kВ Gene Ruler DNA Ladder маркер.  
треки 2,3,4,5,6 – ПЦР-продукт (432 п.н. градиент температуры 58–68 °С random матрица) треки 8,9,10,11,12 – ПЦР-продукт (432 п.н. градиент температуры 58–68 °С, Oligo(dT) матрица) треки 14,15,16,17,18 – ПЦР-продукт (389 п.н. градиент температуры 58–68 °С random матрица) треки 20,21,22,23,24 – ПЦР-продукт (489 п.н. градиент температуры 58–68 °С, Oligo(dT) матрица)

Трансфекцию векторов pVax1 и pTurboRFP-C проводили в клеточной линии СНО химическим методом, с помощью Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™). Время трансфекции составляло 72 ч. Контроль трансфекции проводился с помощью вектора pTurboRFP-C, кодирующего красный флуоресцентный белок TurboRFP, который визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM18 (рис. 3). Контроль полученных рекомбинантных белков, содержащих фрагменты внеклеточного домена рТТГ, проводили методом ИФА. Уровень сигнала в лунках планшета, сорбированных полученными рекомбинантными фрагментами после взаимодействия с аутоантителами из сывороток крови пациентов с диффузным токсическим зобом (уровень АТ к рТТГ – 10 – 40 Ед./л) составлял не менее 0,7 о.е., при уровне сигнала в лунках планшета, сорбированных материалом, полученным от нетрансфицированных клеток СНО не превышал 0,1 о.е.



А



Б

Рис. 3. Визуализация рекомбинантного белка RFP-C после трансфекции в клеточной линии СНО с вектором pTurboRFP-C, увеличение X 400. А – 0 ч, начало трансфекции, Б – через 72 ч после начала трансфекции.

**Заключение.** Методом трансфекции векторы pVax1 и pTurboRFP-C были внесены в клеточную линию СНО. Рекомбинантные белки, содержащие фрагменты внеклеточного домена рТТГ, были выделены из клеток СНО и проверены на образцах сывороток крови пациентов с диффузным токсическим зобом, содержащим специфические антитела к рецептору тиреотропного гормона. В иммуноферментном анализе подтверждено взаимодействие рекомбинантных белков с аутоАТ из сывороток крови пациентов с ДТЗ. Это подтверждает экспрессию фрагментов рТТГ клеточной линии СНО и позволит применять полученные препараты рекомбинантных белков, содержащие фрагменты внеклеточного домена рТТГ в создании высокочувствительных иммунохимических тестов нового поколения, для выявления специфических аутоантител в сыворотке крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы. Дальнейшие исследования в этом направлении будут направлены на изучение отдельных групп аутоантител (блокирующие, стимулирующие АТ), направленных к основному аутоантигену щитовидной железы – рецептору тиреотропного гормона. Это позволит детально картировать специфические участки внеклеточного домена рТТГ, вызывающие ответ иммунной системы на разных этапах развития аутоиммунной заболевания щитовидной железы для ранней персонализированной помощи пациентам с патологией щитовидной железы.

#### **Литература**

- Pastan I., Rot J.H, Macchia V. Binding of hormone to tissue: the first step in polypeptide hormone action // Proc Natl Acad Sci USA, 1966; 56(6):1802–1809.
- Furmaniak J., Sanders J., Núñez Miguel R., B. Rees Smith. Mechanisms of Action of TSHR Autoantibodies //Horm Metab Res, 2015; 47: 735–752.
- Parmentier M., Libert F., Maenhaut C., Lefort A., Gerard C., Perret J., Van Sande J., Dumont J.E., Vassart G. //Molecular cloning of the thyrotropin receptor. Science. 1989; 246 (4937): 1620–1622.
- Smith T.J. TSHR as a therapeutic target in Graves' disease. // Expert Opin Ther Targets. 2017; 21(4): 427–432.
- Rapoport B., McLachlan S.M. TSH receptor cleavage into subunits and shedding of the A-subunit; a molecular and clinical perspective. //Endocrine Reviews, 2016; 37(2): 114–34.
- Sanders J., Bolton J., Sanders P., Jeffreys J., Nakatake N., Richards T., Evans M., Kiddie A., Summerhayes S., Roberts E., Miguel R.N., Furmaniak J., Smith B.R. Effects of TSH receptor mutations on binding and biological activity of monoclonal antibodies and TSH. // Thyroid. 2007; 17(2): 1195–1206.
- Gardas A., Watson P.F., Hobby P., Smith A., Weetman A.P., Sutton, B.J. and Banga J.P. Human thyroid peroxidase: mapping of autoantibodies, conformational epitopes to the enzyme surface. //Redox. Rep., 2000; 5, p. 237–241.