

УДК 615.277

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА И ТИРЕОПЕРОКСИДАЗЫ ЧЕЛОВЕКА*А.В. Zubkov, Н.С. Кузьмина, М.А. Андреева, А.В. Сидоров, Л.Г. Бутова**НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия***ВВЕДЕНИЕ**

Получение рекомбинантных белков рецептора тиреотропного гормона (рТТГ) и тиреопероксидазы (ТПО) человека открывает новые возможности в исследовании взаимосвязи антигенной структуры аутоантигенов щитовидной железы и аутоантител в патогенезе таких аутоиммунных заболеваний как диффузный токсический зоб (ДТЗ) и аутоиммунный тиреоидит (АИТ). В представленной работе были клонированы фрагменты последовательности мРНК α -субъединицы рТТГ, и фрагменты внеклеточного домена ТПО, не содержащие нуклеотидных замен. Получены рекомбинантные векторы для экспрессии белков α -субъединицы рецептора тиреотропного гормона и фрагментов внеклеточного домена ТПО.

Рецептор тиреотропного гормона играет основную роль в патогенезе ДТЗ – аутоиммунного заболевания щитовидной железы (АИЗ ЩЖ), характеризующейся гиперпродукцией аутоантител (аутоАТ) к рТТГ, вызывающей, в свою очередь, устойчивый гипертиреоз [1].

В структуре рТТГ выделяют три домена: внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный. Внеклеточный домен содержит обогащённый лейцином участок и шарнирную область, связанную с трансмембранным доменом. рТТГ, при расщеплении рецептора, выделяется фрагмент (α)-субъединицы, состоящей из обогащённого лейцином участка и шарнирной области, и (β)-субъединицы, состоящей из С-концевой части рецептора и трансмембранного домена. Для понимания механизмов взаимодействия антител и эпитопов рТТГ, необходимо выявить отдельные популяции аутоантител стимулирующие (стимулирующие аутоАТ), блокирующие (блокирующие аутоАТ) либо регулирующие передачу сигнала от рецептора к внутриклеточным эффекторам тиреоцита. Известно, что α -субъединица рТТГ является основным участком рецептора, к которому формируются аутоАТ [2–4]. Определение аутоантител, может быть использовано как для прогноза клинических исходов болезни Грейвса, так и для коррекции состояния пациентов с помощью специфической терапии. В настоящее время, усилия многих ученых направлены на создание лабораторных тестов нового поколения для раздельного выявления блокирующих и стимулирующих аутоАТ к рТТГ.

Тиреопероксидаза человека – основной фермент в процессе синтеза гормонов щитовидной железы: трийодтиронина и тироксина. Аутоантитела к ТПО выявляются в сыворотке крови пациентов при ряде аутоиммунных заболеваний: ДТЗ, АИТ и являются одним из важных показателей для постановки диагноза аутоиммунного заболевания.

Клонирование фрагментов рТТГ и ТПО позволяет расширить возможности для изучения аутоиммунных заболеваний щитовидной железы. Целью работы являлось клонирование фрагментов рТТГ и ТПО человека, получение и анализ рекомбинантных белков аутоантигенов щитовидной железы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали: ткань ЩЖ оперированного пациента с ДТЗ. Для получения 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)+–мРНК.

Для трансформации использовали компетентные клетки *E. coli*, штамм DH5 α .

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

Для амплификации участков ДНК, необходимых для создания конструкций, содержащих участки ЭД рТТГ и ЭД ТПО различной длины, использовали метод ПЦР, который проводили с помощью ПЦР – амплификатора T-100 (Bio-Rad). Полученные ПЦР-продукты и на этапах клонирования пробы ДНК разделяли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле. ПЦР – продукты очищали из агарозного геля, используя набор реактивов Cleanup Standart по методике, рекомендованной производителем.

Лигирование проводили с помощью набора Quick-TA kit без предварительной обработки рестриктазами в соответствии с инструкцией к набору. Для клонирования полученных ПЦР – продуктов были использованы векторы: pUC19, pAL2-T.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые молекулярное клонирование гена рТТГ собаки было выполнено Парментье и его коллегами в 1989 г.: была получена кДНК 4,9 Кб, кодирующий пептид, состоящий из 744-х аминокислотных остатков. [5].

На первом этапе наших экспериментов было проведено выделение РНК из ткани ЩЖ человека. Полученные образцы содержали (от 0, 2 до 0,7) мкг/мкл РНК, что было подтверждено методом электрофореза проб РНК в 1,5 % агарозном геле.

Для получения генно-инженерных конструкций, содержащих фрагменты гена рТТГ, соответствующие ЭД, нуклеотидная последовательность которого включает в себя (1 – 1239) п.н. синтезированы 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. Для получения рекомбинантных фрагментов ТПО были выбраны участки нуклеотидной последовательности, соответствующие аминокислотным участкам: 599–617, 606–629 и 706–720 а.о.

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

Аmplифицированные продукты были клонированы в плазмидный вектор рAl-2Т, который трансформировали в компетентные клетки *E.coli*, штамм DH5α.

Содержание плазмиды со вставкой проверяли методом ПЦР с праймерами M13 и дальнейшей визуализацией ПЦР – продуктов и исходных плазмид в агарозном геле. В результате 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.). Для секвенирования были отобраны три клон. Секвенирование нуклеотидной последовательности клонов показало, что на фрагменте 432 п.н. обнаружены 5 замен нуклеотидов; фрагменты, размером 1160 п.н. и 389 п.н., полностью идентичны опубликованным последовательностям (GenBank). Затем протяжённый участок (1160 п.н.), кодирующий фрагмент альфа – субъединицы рТТГ, переведен в экспрессирующий вектор рVAX1, предназначенный для работы с клеточными линиями млекопитающих.

Антигенные детерминанты ТПО были выбраны на основании литературных данных. Два участка соответствуют линейным антигенным детерминантам молекулы ТПО, находящимся в иммунодоминантной области А (513–633) а.о. и иммунодоминантной области В (633–933) а.о., и играют важную роль при формировании гуморального ответа у больных с АИЗ ЩЖ [12]. Первая и вторая детерминанты (иммунодоминантная область А) были перекрывающимися и несли в своем составе фрагменты ТПО рекомбинантный белок А1 (599–617) а.о. и рекомбинантный белок А2 (606–629) а.о., соответственно. Третья детерминанта (из иммунодоминантной области В) – рекомбинантный белок А3 включала последовательность (706–720) а.о. Электрофореграммы рекомбинантных белков А1, А2 и А3 ТПО в 12,5 % ПААГ подтвердили отсутствие примесей в препаратах рекомбинантных белков, что позволило считать препарат пригодным для дальнейшей работы.

На ограниченной коллекции образцов сывороток крови больных с заболеваниями ЩЖ (n=90) с уровнем АТ к ТПО в диапазоне (100 – 10 000) МЕ/мл изучали эпитопную специфичность аутоантител в сыворотках с использованием трех рекомбинантных белков ТПО: А1, А2, А3.

В конкурентном ИФА исследовали образцы рекомбинантных белков ТПО, белка носителя без детерминант ТПО и нТПО в концентрации 3 мкг/мл и образцы сыворотки крови в конечном разведении 1:100.

Данные наших опытов подтверждают, что химерные белки А1, А2 вызывали 30–60 % торможение связывания аутоантител из образцов сыворотки крови больных с АИЗ ЩЖ с повышенным содержанием аутоантител к ТПО. При этом наблюдалось ингибирование связывания аутоантител сыворотки крови пациента с субклиническим гипотиреозом (низкое содержание антител) только на 20 %. Это позволило сделать предположение, что у пациентов с АИЗ ЩЖ присутствуют аутоантитела, направленные к линейной детерминанте (599–629) а.о. ТПО.

Аналогичные данные представлены в работе Gardas A. et al [6]. При изучении эпитопной специфичности аутоантител из сывороток крови больных с АИЗ ЩЖ с 14-ю рекомбинантными белками также было установлено, что химерный белок и пептид, содержащие детерминанту ТПО (599–626) а.о., вызывали торможение связывания на (30 – 40) % в 60 % сывороток. Очевидно, что этот участок ТПО может быть вовлечён в патогенез различных аутоиммунных заболеваний щитовидной железы. Это позволяет подтвердить предположение, что у пациентов с АИЗ ЩЖ присутствуют аутоантитела, направленные к линейной детерминанте (599–629) а.о. ТПО.

Постановка конкурентного ИФА с химерным белком АЗ, ТПО и белком-носителем на планшете, сенсibilизированном нативной ТПО в концентрации 10 мкг/мл, использованной для исследования химерных белков А1, А2, не выявила торможения связывания аутоАТ из сывороток крови пациентов с АИЗ ЩЖ. Однако при сенсibilизации планшета химерным белком АЗ в оптимальной концентрации 10 мкг/мл, были выявлены образцы сыворотки крови пациентов с ДТЗ с высоким уровнем АТ к ТПО (3600 МЕ/мл, 10 000 МЕ/мл), которые имели титры 160 и 640, соответственно, и содержание аутоАТ было пропорционально тяжести заболевания (рис. 1). Исследования сыворотки крови пациентов с высоким уровнем АТ к ТПО: АИТ (1074,2 МЕ/мл) и ДТЗ (10 000 МЕ/мл) – в иммуноблоттинге с химерным белком АЗ подтвердили, что в сыворотке крови больного ДТЗ, с очень высоким уровнем АТ к ТПО, содержатся аутоантитела, направленные к (710–720) а.о. ТПО.

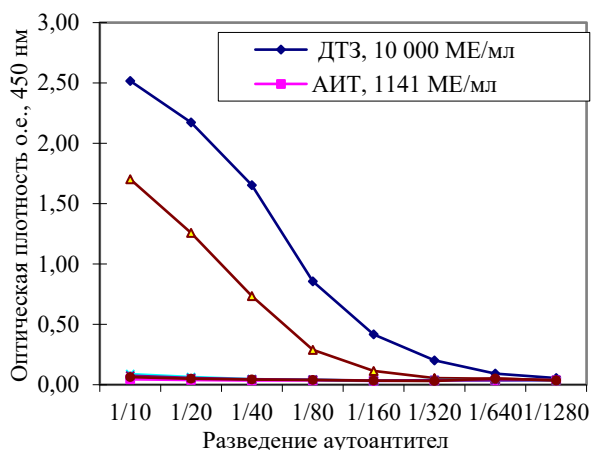


Рис. 1. Результаты титрования сывороток крови на сорбенте – химерном белке АЗ ТПО в концентрации 10 мкг/мл

На рис. 1 представлены результаты титрования 5 сывороток крови пациентов и одного донора. В сыворотках крови пациентов с ДТЗ (10 000 МЕ/мл) и ДТЗ (3600 МЕ/мл) выявлены антитела к рекомбинантному белку АЗ ТПО, в титрах 1/640 и 1/160, соответственно. В других представленных образцах, включая сыворотку здорового донора, эти антитела не выявляются.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные рекомбинантные белки рТТГ и ТПО могут быть использованы для создания высокочувствительных иммунохимических тестов нового поколения, позволяющих определять специфические аутоантитела в сыворотке пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы. Дальнейшие исследования на расширенной панели сывороток

крови больных с различными формами патологии щитовидной железы и изучение гетерогенности аутоантител к основным аутоантигенам щитовидной железы: рецептору тиреотропного гормона и тиреопероксидазе человека позволит выявить новые эпитопы, ответственные за формирование аутоантител при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы и определить критические точки для ранней эффективной диагностики и лечения этих заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith T.J. TSHR as a therapeutic target in Graves' disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2017; 21(4): 427–432.
2. 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.
3. 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.
4. Furmaniak J., Sanders J., Núñez Miguel R., B. Rees Smith. Mechanisms of Action of TSHR Autoantibodies. *Horm Metab Res*. 2015; 47: 735–752.
5. 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.
6. 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