

**БИОТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ:
ТИРЕОГЛОБУЛИНА, ТИРЕОПЕРОКСИДАЗЫ И РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО
ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА****А.В. Зубков, Л.Г. Бутова, А.А. Корноухова, М.В. Потоцкая, Н.С. Кузьмина, О.А. Свитич***ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия*

Введение. В развитии аутоиммунных заболеваний щитовидной железы (ЩЖ) ключевыми антигенами, к которым происходит образование антител, являются тиреоглобулин (ТГ), тиреопероксидаза (ТПО), рецептор тиреотропного гормона (рТТГ) [1–4]. Тиреопероксидаза выполняет роль основного фермента в синтезе гормонов щитовидной железы. При постановке диагноза аутоиммунного заболевания у пациентов берут образцы сыворотки крови, в которой клиническими лабораторными методами анализа определяют аутоантитела к ТПО, рецептору тиреотропного гормона, тиреоглобулину [2]. В настоящее время ведутся исследования, направленные на изучение эпитопной структуры аутоантигенов щитовидной железы и проводится эпитопной специфичности аутоантител формирующихся у пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы [1, 3]. Самым крупным по молекулярной массе аутоантигеном щитовидной железы, играющим основную роль на первом этапе формирования аутоиммунного заболевания ЩЖ, является тиреоглобулин, гликопротеин с молекулярной массой 667 кДа, состоящий из двух субъединиц [8, 9]. В разработке тест-систем, ранее применяли человеческий тиреоглобулин, выделенный из щитовидной железы, но полученные образцы ТГ трудно стандартизовать по антигенным свойствам, что может искажать результат анализа [6,7]. Существуют дополнительные сложности в использовании рекомбинантного тиреоглобулина в применении для конструирования диагностических тест-систем, вызванные очень большим размером молекулы тиреоглобулина, посттрансляционными модификациями, гликозилированием и формированием правильного фолдинга, при образовании дисульфидных связей между отдельными участками молекулы, приводит к большим трудностям при получении рекомбинантный ТГ в прокариотических системах экспрессии [10, 11]. Аналогичные проблемы возникают при экспрессии других основных аутоантигенов щитовидной железы: рецептора тиреотропного гормона и тиреопероксидазы человека. Данная работа посвящена одной из ключевых стадий биотехнологического получения рекомбинантных белков – создании векторов для экспрессии наиболее значимых участков генов ТГ, ТПО и рТТГ, кодирующих иммунологически значимые антигенные детерминанты, распознаваемые аутоантителами пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы.

Ключевые слова: тиреоглобулин, тиреопероксидаза, рецептор тиреотропного гормона, рекомбинантные белки, моноклональные антитела, векторы, клеточные линии.

Цель работы – клонирование фрагментов генов тиреоглобулина, тиреопероксидазы и рецептора тиреотропного гормона человека, создание и анализ генно-инженерных конструкций, содержащих различные участки генов ТГ, рТТГ и ТПО для дальнейшей экспрессии в эукариотических клеточных системах, позволяющих получать гликозилированные белки, содержащие иммунологически значимые антигенные детерминанты основных аутоантигенов щитовидной железы, что позволит усовершенствовать существующие диагностические тест-системы для определения аутоантител и аутоантигенов при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы.

Основные задачи: выделение РНК из материала ЩЖ пациентов с АИЗ ЩЖ и синтез двухцепочной кДНК методом ОТ-ПЦР на матрице мРНК; получение фрагментов экспрессирующей последовательности генов ТПО, ТГ, рТТГ методом ПЦР; создание генно-инженерных конструкций, содержащих участки экспрессирующихся последовательностей генов ТПО, ТГ, рТТГ, клонирование векторов в *E. coli*, штамм XL1-Blue; анализ полученных генно-инженерных конструкций.

Материалы и методы: Объект исследования: ткань ЩЖ, выделенная от пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы. 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) + – мРНК.

Для трансформации использовали компетентные клетки *E. coli*, штамм XL1 Blue («Евроген, Россия»).

Олигонуклеотиды были подобраны на основе последовательностей, депонированных в Gen Bank, с использованием онлайн-программы Primer Blast. Были синтезированы пять пар праймеров на различные участки, соответствующие кДНК гена ТГ, ТПО и рТТГ. Олигонуклеотиды для амплификации участков кДНК генов ТГ, ТПО и рТТГ были синтезированы в компании «СИНТОЛ» (Россия). Дизайн олигонуклеотидов проводили в программе Blast NCBI. Методом ПЦР для последующего клонирования в векторные системы проведена амплификация фрагментов ДНК различной длины, содержащих участки нуклеотидной последовательности кДНК генов ТПО, ТГ, рТТГ с помощью ПЦР – амплификатора T-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 производителя.

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: pAL2-T, pVAX1.

Результаты и обсуждение. Выделение тотальной РНК проводили согласно методике, описанной в разделе материалы и методы. Полученные образцы РНК разделили методом электрофореза в 1,5 % в геле агарозы при напряжении 75 В. Полученная электрофореграмма представлена на рисунке 1.

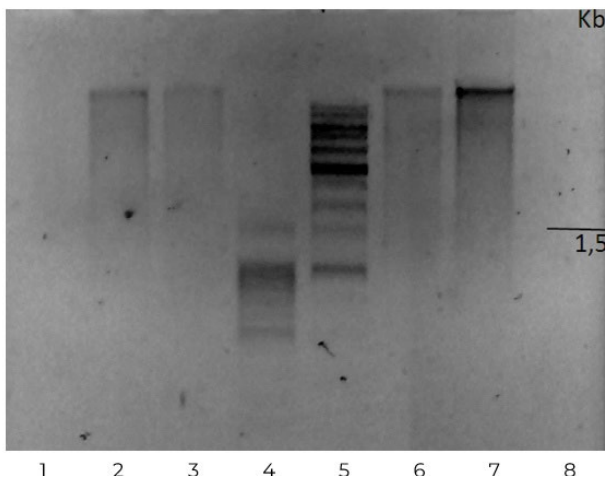


Рисунок 1. Электрофореграмма проб РНК в 1,5 % агарозном геле (образцы № 1–4). Дорожки 1,8 – пустые; дорожка 2 – образец № 1; дорожка 3 – образец № 2; дорожка 4 – маркер длин ДНК 100 bp DNA Ladder; дорожка 5 – маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder; дорожка 6 – образец № 3; дорожка 7 – образец № 4

Из 4 образцов ткани щитовидной железы было получено 4 образца РНК. На матрице, выделенной poly (A) – мРНК, синтезировали 4 образца двухцепочечной ДНК. Для дальнейшей амплификации фрагментов кДНК генов ТПО, ТГ и рТТГ использовали образец № 1, № 2, № 3, № 4.

Для создания генно-инженерной конструкции, содержащей участок кДНК экспрессирующей последовательности гена ТПО использовали фрагмент длиной 634 п.н.

На рисунке 2 показана нуклеотидная последовательность фрагмента кДНК 634 п.н. ТПО после секвенирования.

ПЦР в градиенте температур и электрофорез в 1,5 % агарозном геле проводили в соответствии с методиками, описанными в материалах и методах. В качестве матриц использовали разведённые в 100 раз кДНК-матрицы № 1 и № 4. Объём смеси, приходящийся на одну реакцию, составлял 12,5 мкл.

Электрофореграмма ПЦР – продуктов, полученная в ходе эксперимента, представлена на рис. 3.

В результате из 6 ПЦР продуктов было получено 2 образца. Для дальнейшей процедуры клонирования экспрессирующихся фрагментов гена ТПО длиной 634 п.н. использовали образец № 1, № 2. ПЦР и электрофорез в 1,5 % агарозном геле проводили в соответствии со стандартной методикой. В качестве матриц использовали разведённые в 100 раз кДНК ТПО № 1, № 2, № 3. Объём смеси, приходящийся на одну реакцию, составлял 25 мкл.

Из геля вырезали продукты амплификации длиной ~634 п.н (рис. 3, образец № 1 на дорожке 1), 634 п.н. (рис. 3., образец № 2 на дорожке 3). Выделение продуктов амплификации из геля проводили с помощью набора Cleanup Standard («Евроген») по инструкции производителя. Выделенные и очищенные из агарозного геля продукты амплификации использовали для лигирования в вектор pAL2-T. Было приготовлено 2 реакционные смеси, которые содержали ампликоны 634 № 1, 634 № 2 полученные в ходе ПЦР с образцом кДНК № 1.

ТПО 634_Frw →
 CCAGGTTACAATGAGTGGAGGGAGTTCTGCGGCCTGCCTCGCCTGGAGACCCCGCTGA
 CCTGAGCACAGCCATCGCCAGCAGGAGCGTGGCCGACAAGATCCTGGACTTGTACAAG
 CATCCTGACAACATCGATGTCTGGCTGGGAGGCTTAGCTGAAACTTCCTCCCAAGGGCT
 CGGACAGGGCCCTGTTTGCCTGTCTATTGGGAAGCAGATGAAGGCTCTGCGGGACG
 GTGACTGGTTTTGGTGGGAGAACAGCCACGTCTTACGGATGCACAGAGGCGTGAGCT
 GGAGAAGCACTCCCTGTCTCGGGTCATCTGTGACAACACTGGCCTCACCAGGGTGCCCA
 TGGATGCCTTCCAAGTCGGCAAATTCCTCCGAAGACTTTGAGTCTTGTGACAGCATCACTG
 GCATGAACCTGGAGGCTGGAGGGAAACCTTCTCAAGACGACAAGTGTGGCTTCCCA
 GAGAGCGTGGAGAATGGGGACTTTGTGCACTGTGAGGAGTCTGGGAGGCGCGTGCTG
 GTGTATTCTGCCGGCACGGGTATGAGCTCCAAGGCCGGGAGCAGCTCACTTGCACCCA
 GGAAGGATGGGATTTCCAGCCTCCCTCTGCAAAGACTCCGGGAGG
 ← ТПО 634_Rev

Рисунок 2 – Нуклеотидная последовательность фрагмента кДНК по результатам секвенирования

В результате трансформации клеток *E. coli* (штамм XL1-Blue) лигазными смесями, и бело-голубой селекции, отобрали 10 колоний бактерий, которые перенесли в стерильную среду LB с ампициллином. После инкубации при 37°C в течение ночи бактериальный рост наблюдался в 8 из 8 пробирок.

В табл. 4. представлена характеристика образцов плазмид, выделенных из ночной культуры клеток *E. coli* с помощью набора Plasmid Miniprep («Евроген») по инструкции производителя.

Электрофореграмма рекомбинантных плазмид показана на рис. 4.

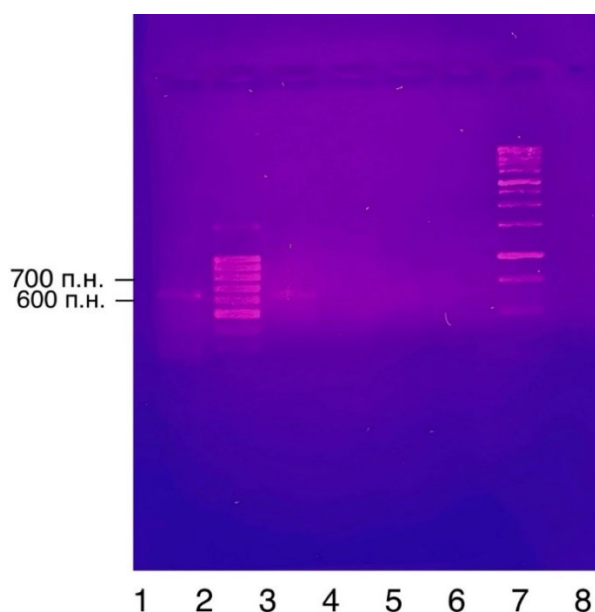


Рисунок 3 – Электрофореграмма ПЦР продуктов в 1,5 % агарозном геле: Дорожка 1 – ПЦР продукт № 1 (матрица 1); дорожка 2 – маркер 100 bp DNA Ladder; дорожка 3 – ПЦР продукт № 2 (матрица 1); дорожка 4 – ПЦР продукт № 3 (матрица 2); дорожка 5 ПЦР продукт № 4 (матрица 2); дорожка 6 ПЦР продукт № 5 (матрица 3); дорожка 7 – маркер 1 kb DNA Ladder; дорожка 8 – ПЦР продукт № 6 (матрица 3)

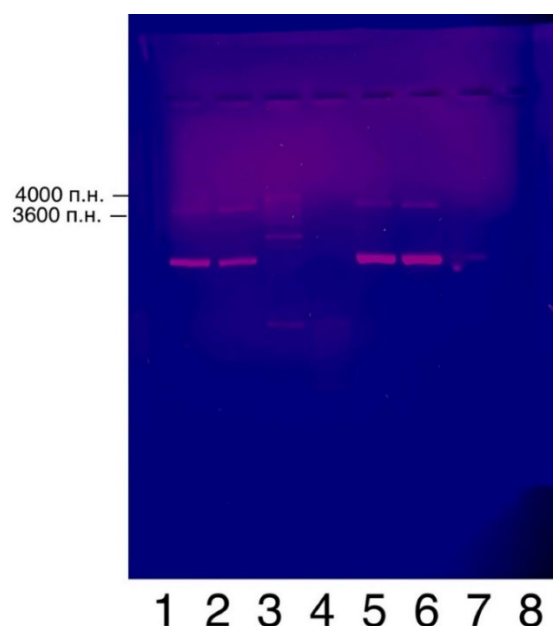


Рисунок 4 – электрофореграмма плазмидных ДНК. Дорожка 1 – образец № 5, дорожка 2 – образец № 4, дорожка 3 – маркер 1 kb DNA Ladder, дорожка 4 – маркер 100 bp DNA Ladder, дорожка 5 – образец № 3, дорожка 6 – образец № 2, дорожка 7 – образец № 1, дорожка 8 – пустая

В результате работы были получены 8 клонов продуцентов *E. coli* штамм XL1-Blue, содержащих генно-инженерные конструкции с фрагментом экспрессирующей апоследовательности гена ТПО человека. Полученные конструкции были реклонированы в вектор pVAX1 для дальнейшей экспрессии участка экспрессирующей последовательности гена ТПО в эукариотических клеточной линии СНО.

Получение генно-инженерных конструкций с фрагментами гена ТГ. На матрице мРНК гена ТГ были синтезированы 5 пар олигонуклеотидов, фланкирующих участки экспрессирующей последовательности: первый участок размером 588 п.н. (7381–7968 п.н.); второй участок размером 770 п.н. (7244–8013 п.н.); третий участок размером 864 п.н. (2297–3160 п.н.); четвертый участок размером 902 п.н. (4629–5530 п.н.); пятый участок размером 833 п.н. (5529–6361 п.н.). В качестве матричной последовательности использовали последовательность мРНК ТГ NM_003235.5, опубликованную в базе данных GeneBank. Все 5 участков последовательности гена ТГ были клонированы в вектор pVAX1.

Были сконструированы генно-инженерные конструкции, содержащие участки экспрессирующей последовательности генов ТГ, ТПО и рТГ, готовые к экспрессии в эукариотической клеточной линии СНО.

Литература

1. Зубков А.В. и др. Получение рекомбинантных белков рецептора тиреотропного гормона и тиреопероксидазы человека // Актуальная биотехнология. – 2020. – №. 3. – С. 559–561.
2. Трошина Е.А., Панфилова Е.А., Михина М.С., Свиридонова М.А. Тиреоидиты. Методические рекомендации (в помощь практическому врачу). ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России, Москва, 2019 г.
3. Haugen B.R., Alexander E.K., Bible K.C., et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer // Thyroid. – 2016. – Vol. 26. – № 1. – P. 1–133.
4. Зубков А.В. и др. КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ КДНК ГЕНА ТИРЕОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА // Актуальная биотехнология. – 2023. – №. 4. – С. 21–25.
5. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России – 2021. – илл. – 252 с.
6. Godlewska M. et al. Thyroid peroxidase (TPO) expressed in thyroid and breast tissues shows similar antigenic properties // PLoS one. – 2017. – Т. 12. – №. 6. – С. e0179066.
7. Srivastava V.K., Singh H. // Association of thyroid peroxidase antibody and dyslipidemia in subclinical hypothyroidism, 2017, Journal of Family Medicine and Primary Care. 6(1) : p. 63–68, DOI: 10.4103/2249–4863.214958
8. Вдовенко М.М., Зубков А.В., Кузнецова Г.И., Сахаров И.Ю., Кузьмина Н.С., определение тиреоглобулина в иммуноферментном анализе с системой усиленной хемилюминесценции при использовании пероксидазы сои
9. Giovanella, L., Feldt-Rasmussen, U., Verburg F.A., Grebe S.K., Plebani M. and Clark P.M. Thyroglobulin measurement by highly sensitive assays: focus on laboratory challenges // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). – 2015. – Vol. 53. – № 9. – P. 1301–1314
10. Netzel B.C., Grebe S.K., Carranza Leon BG, et al. Thyroglobulin (Tg) Testing Revisited: Tg Assays, TgAb Assays, and Correlation of Results With Clinical Outcomes // J Clin Endocrinol Metab. – 2015. – Vol. 100. – № 8. – P. E1074–E1083.
11. Powell R. et al. Recombinant expression of homodimeric 660 kDa human thyroglobulin in soybean seeds: An alternative source of human thyroglobulin // Plant Cell Rep. – 2011. – Vol. 30. – № 7. – P. 1327–1338.