

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА

© 2019 г. А. В. Зубков*, М. А. Андреева, А. В. Сидоров, А. В. Милованова, Л. Г. Бутова

*E-mail: alex_zubkov@list.ru

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия

Поступила: 11.03.2019. Принята: 25.03.2019

Получение рекомбинантных фрагментов рТТГ открывает новые возможности в разработке иммунохимических тестов для определения стимулирующих и блокирующих антител к рТТГ, в исследовании роли антигенной структуры рТТГ в патогенезе аутоиммунных заболеваний щитовидной железы. Клонирована оригинальная последовательность мРНК α -субъединицы рТТГ, не содержащая нуклеотидных замен. Получен рекомбинантный вектор pVAX1-TSHR, подготовленный для трансфекции в клетки млекопитающих и экспрессии рекомбинантного белка α -субъединицы рецептора тиреотропного гормона.

Ключевые слова: аутоантигены щитовидной железы, рТТГ, ампликоны, клонирование, рекомбинантный вектор

DOI: 10.31857/S102872210006600-5

Адрес: 105064 Москва, Малый Казенный пер., дом 5А, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», лаборатория иммунологической диагностики эндокринных заболеваний.

Зубков Александр Владимирович, Тел: +7 495 917 5242

E-mail: alex_zubkov@list.ru

Авторы:

Зубков А. В., к.м.н., заведующий лабораторией иммунологической диагностики эндокринных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Андреева М. А., м.н.с. лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Сидоров А. В., к.б.н., заведующий лабораторией генетики ДНК-содержащих вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Милованова А. В., н.с. лаборатории генетики ДНК-содержащих вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Бутова Л. Г., к.б.н., в.н.с. лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ И ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Рецептор ТТГ играет основную роль в патогенезе диффузного токсического зоба (ДТЗ) или болезни Грейвса — аутоиммунного заболе-

вания щитовидной железы (АИЗ ЩЖ), характеризующееся высокой продукцией аутоантител (аутоАТ) к рТТГ, что вызывает устойчивое состояние гипертиреоза [1].

По данным литературы, в структуре рТТГ три домена: внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный. Внеклеточный домен состоит из обогащённого лейцином участка и шарнирной области, которая связывается с трансмембранным доменом. рТТГ может расщепляться в двух участках, что приводит к выделению (α)-субъединицы, состоящей из обогащённого лейцином участка и шарнирной области, и (β)-субъединицы, состоящей из С-концевой части рецептора и трансмембранного домена. По-видимому, расщепление рецептора происходит после взаимодействия расщепляющих аутоАТ с шарнирной частью рТТГ. α -субъединица рТТГ является основным участком рецептора, к которому формируются аутоАТ [2, 3]. АТ к рТТГ могут либо напрямую стимулировать функцию щитовидной железы (стимулирующие аутоАТ), либо блокировать биологические эффекты ТТГ (блокирующие аутоАТ) [4]. АутоАТ, блокирующие стимуляцию щитовидной железы, могут быть использованы для прогнозирования клинических исходов болезни Грейвса. В связи с этим,

усилия ученых направлены на создание новых тестов для отдельного выявления блокирующих и стимулирующих аутоАТ к рТТГ.

Клонирование фрагментов рТТГ в клетках прокариот позволяет расширить спектр возможностей для его изучения, по сравнению с очисткой нативной формы белка с сохранением антигенных детерминант рТТГ.

Целью работы явилось клонирование гена рТТГ человека, получение и анализ рекомбинантных фрагментов рТТГ.

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 100000 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, в компании «Синтол» (Россия).

Для амплификации участков ДНК, необходимых для создания конструкций, содержащих участки ЭД рТТГ 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: рUC19, рAL2-T, в качестве экспрессирующего вектора использовали плазмиду рVAX1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Работ, посвященных клонированию гена рТТГ человека, нам обнаружить не удалось.

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.

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, удалось синтезировать ПЦР-продукты длиной: 1160 п.н., 1156 п.н., 432 п.н., 389 п.н.

Аmplифицированные продукты были клонированы в плазмидный вектор рAL2-T, который трансформирован в компетентные клетки *E. coli*, штамм DH5 α .

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-T, содержащие фрагменты рТТГ – векторы рAL2-T с ПЦР-продуктами участка 1 (1160 п.н.), участка 3 (432 п.н.) и участка 5 (389 п.н.). Для секвенирования были отобраны три клона. Секвенирование 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 протяженный участок (1160 п.н.), кодирующий фрагмент альфа-субъединицы рТТГ, переведен в экспрессирующий вектор рVAX1, предназначенный для работы с клеточными линиями млекопитающих.

Полученный рекомбинантный белок рТТГ будет использован для создания высокочувствительного иммунохимического теста ново-

го поколения, для определения специфических аутоантител в сыворотке пациентов с ДТЗ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

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.

MOLECULAR CLONING OF HUMAN THYROID STIMULATING HORMONE RECEPTOR GENE

© 2019 **A. V. Zubkov***, **M. A. Andreeva**, **A. V. Sidorov**,
A. V. Milovanova, **L. G. Butova**

*E-mail: alex_zubkov@list.ru

Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia

Received: 11.03.2019. **Accepted:** 25.03.2019

Producing of recombinant TSHR fragments opens up new possibilities in the development of immunochemical tests to detect stimulating and blocking antibodies to TSHR, in studying the role of the antigenic structure of TSHR in the pathogenesis of autoimmune diseases of the thyroid gland. The original mRNA sequence of the α -subunit of the thyroid stimulating hormone receptor, not containing nucleotide substitutions, was cloned. The obtained recombinant vector pVAX1-TSHR, prepared for transfection into cells of mammals and for the expression of the recombinant protein of the α -subunit of the thyroid stimulating hormone receptor.

Key words: thyroid autoantigens, TSHR, amplicons, cloning, recombinant vector

Authors:

Zubkov A. V., ✉ M. D. PhD, Head of the Laboratory for Immunological Diagnostics of Endocrine Diseases, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia. **E-mail:** alex_zubkov@list.ru;

Andreeva M. A., junior researcher, of the Laboratory for Immunological Diagnostics of Endocrine Diseases, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia;

Sidorov A. V., Ph. D. Head of the Laboratory for Genetics of DNA viruses, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia;

Milovanova A. V., researcher of the Laboratory for Genetics of DNA viruses, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia;

Butova L. G., Ph.D., leading researcher, of the Laboratory for Immunological Diagnostics of Endocrine Diseases, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia.