©Ю. А. Панков
УДК 577.112.5.+577.113.5.+577.17.01:591.05

ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ МАРКЕРОВ ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Ю. А. ПАНКОВ

Эндокринологический научный центр РАМН, Москва.

Разработаны генно-инженерные продуценты проинсулина и пептидных фрагментов глутаматдекарбоксилазы (ГДК) - главных антигенов островковых клеток, ответственных за развитие инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД). На основе полученных антигенов разработан метод иммуноферментного определения аутоантител в сыворотке больных. Исследовали сыворотку крови двух групп больных ИЗСД: 1) взрослые пациенты до инсулинотерапии с недавно развившимся ИЗСД; 2) взрослые пациенты с длительно текущим ИЗСД и сопутствующими осложнениями. Антитела к инсулину/проинсулину определялись у 20% больных первой группы и 41,7% больных второй группы. В сыворотке крови больных ИЗСД также определялись антитела к двум фрагментам ГДК, содержащим аминокислотные последовательности 1-80, и 151-585. 16% сыворотки больных с недавно развившимся ИЗСД и 37,5% сыворотки длительно болеющих ИЗСД реагировали с N-концевым фрагментом ГДК. 12% сыворотки больных группы 1 и 45,8% сыворотки группы 2 реагировали с центральным-С-концевым фрагментом ГДК.

Ключевые слова: маркеры инсулин-зависимого сахарного диабета, пептидные фрагменты, глутаматдекарбоксилаза, иммуноферментный анализ

Методы рекомбинантных ДНК и другие методы молекулярной биологии в последние годы получили широкое развитие, они проникли практически во все медико-биологические исследования и полностью определяют современный облик биологической науки. Молекулярная биология оказала большое влияние и на развитие современной эндокринологии. В настоящее время практически все известные белковые гормоны, используемые для научно-исследовательских целей, получаются в лабораторных условиях генно-инженерным способом, а такие рекомбинантные белки как инсулин, соматотропин и др. производятся в качестве лекарственных средств в промышленном масштабе. Экспериментальные данные, накопленные в результате использования методологии рекомбинантных ДНК, заставляют пересмотреть давно сложившиеся представления и концепции в эндокринологии и позволяют сделать вывод о том, что все органы и ткани животных и человека являются эндокринными и секретируют в кровь гормоны пептидной природы [1, 2].

Совершенно естественно, что методы генной инженерии нашли применение и в изучении такой важной проблемы как инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД). Одним из актуальных вопросов диабетологии является изучение аутоантигенов β-клеток, принимающих участие в иммунопатогенезе ИЗСД. Поэтому определение гуморальных маркеров ИЗСД, т.е. аутоантител к антигенам островковых клеток, и разработка достоверной иммунодиагностики доклинических и клинических форм ИЗСД с целью превентивного блокирования патологических процессов, привлекает сейчас большое внимание исследователей. Среди известных гуморальных маркеров наибольшее прогностическое значение имеют антитела к инсулину/проинсулину и 64К антигену, идентифицированному как фермент глутаматдекарбоксилаза (ГДК, английская аббревиатура GAD) [6], поскольку они появляются за несколько лет до манифестации заболевания и обнаруживаются у большого количества больных ИЗСД в дебюте заболевания [5, 7, 9, 11].

Целью настоящего исследования являлось создание генно-инженерных бактериальных штаммов-продуцентов аутоантигенов островковых клеток (проинсулина и пептидных фрагментов ГДК) и разработка иммуноферментных методов определения

гуморальных маркеров, т.е. аутоантител к антигенам β-клеток, с использованием рекомбинантных белков в качестве антигенов.

Создание клонотеки кДНК из индивидуальной инсулиномы человека, использованной в настоящей работе, описано ранее [3]. Скрининг клонотеки, содержащей кДНК-овые копии мРНК белков инсулиномы, проведенный с использованием нуклеотид-ного инсулинового зонда, позволил выделить рекомбинантные клоны, содержащие кДНК проинсулина человека. Зоны гибридизации составляли 0,3% от общего количества рекомбинантных клонов, на основе которых получен бактериальный продуцент, синтезирующий проинсулин в составе гибридного белка с β-галактозидазой [3, 4].

Другая научная проблема, на решение которой было направлено исследование, заключалась в создании генно-инженерных продуцентов антигенных детерминант другого известного аутоантигена - ГДК. Этот фермент катализирует синтез из глутаминовой кислоты γ-аминомасляной кислоты, одного из нейротрансмиттеров центральной нервной системы (ЦНС). ГДК экспрессируется в ЦНС и в β-клетках поджелудочной железы. У человека в ЦНС экспрессируются две изоформы ГДК 65 и 67 кДа, а в β-клетках только изоформа 65 кДа. Наши исследования проведены с полноразмерной кДНК ГДК 65 кДа, любезно предоставленной д-ром Лернмарком (Швеция). С использованием различных рестриктаз полноразмерную кДНК ГДК расщепляли на пять нуклеотидных фрагментов. Кодируемые этими фрагментами аминокислотные последовательности схематически представлены на рис. 1.

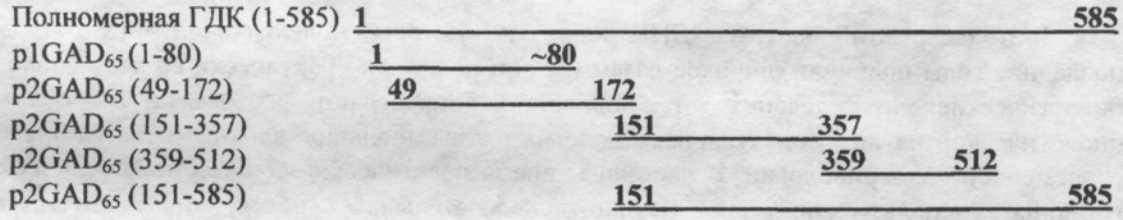

Рис. 1. Схема аминокислотных последовательностей

Будучи встроенными в экспрессирующий вектор, они обеспечивали биосинтез следующих участков аминокислотной последовательности ГДК: 1-80, 49-172, 151-357, 359-512, 151-585. Можно видеть, что синтезируемые пептиды полностью перекрывали аминокислотную последовательность фермента. Фрагменты кДНК клонировали в экспрессирующем плазмидном векторе pUEX по BamH1 сайту. Рекомбинантная плазмида содержала кДНК-овую копию каждого пептида ГДК аналогично полученной ранее плазмиде для биосинтеза проинсулина [3]. Для корректировки рамки считывания и получения экспрессии к-ДНК-овые копии при необходимости клонировали в векторы pUEX 1, 2 или 3. Все пептиды ГДК и проинсулин синтезировались в виде гибридных белков с β-галактозидазой.

Полученные штаммы трудно было использовать для синтеза проинсулина и пептидов ГДК и наработки их в свободном виде без проведения дополнительных экспериментов. Поэтому была предпринята попытка исследовать возможность использования рекомбинантных гибридных белков в качестве антигенов для иммуноферментных методов определения аутоантител к антигенам островковых клеток. Такой подход имел некоторые преимущества, выражавшиеся в легкости посадки гибридных белков на полистироловые планшеты по сравнению с индивидуальными пептидами, но оставался неясным вопрос, какое влияние могло оказывать на связывание пептидов с аутоантителами присутствие в гибридном белке крупномолекулярного

фермента β-галактозидазы. Рекомбинантные белки подвергали частичной очистке; после обработки клеток ультразвуком гибридные белки центрифугировали , и полученный осадок отмывали раствором Тритона Х-100 и ЭДТА. Для разработки иммуноферментного метода были подобраны условия растворения белков и их иммобилизации на полистироловых планшетах.

Поскольку аутоантитела определяли по связыванию с гибридными белками, в каждом опыте сыворотку крови параллельно тестировали на возможное наличие антител к свободной β-галактозидазе.

Разработанный метод достаточно эффективно определял антитела к инсулину в антисыворотке, полученной путем иммунизации морских свинок экзогенным инсулином (Табл. 1).

Таблица 1.

Определение антител к инсулину/проинсулину в антисыворотке морских свинок, иммунизированных инсулином или суммарными белками инсулиномы (оптическая плотность)

Антиген на планшете	Антисыворотка морских свинок, иммунизированных инсулином	Антисыворотка морских свинок, иммунизированных суммарными белками инсулиномы	Контрольная сыворотка морских свинок
β-галактозидаза-инсулин	0, 571	0,385	0,063
β-галактозидаза	0,227	0,228	0

Из-за отсутствия специфической антисыворотки к ГДК разработку метода определения антител к фрагментам ГДК проводили путем изучения сыворотки больных ИЗСД и здоровых людей.

Результаты тестирования 13 сывороток здоровых людей и 49 сывороток больных ИЗСД, разделенных на две клинические группы: 1) вновь выявленный сахарный диабет взрослых до инсулинотерапии (n = 25) и 2) длительный диабет взрослых с осложнениями (n = 24), представлены в таблице 2. Антитела к инсулину/проинсулину обнаружены у 20% больных 1 группы и у 41,7% больных 2 группы.

Таблица 2

Определение антител к проинсулину/инсулину и двум пептидным фрагментам ГДК

	Количество больных	Антитела к инсулину/ проинсулину	Антитела к ГДК (1-80 ао.)	Антитела к ГДК (151-585 а. о.)
Вновь выявленные больные ИЗСД	25	5 (20%)	4 (16%)	3 (12%)
Больные ИЗСД с продолжительностью заболевания 4-33 года	24	10 (41,7%)	9 (37,5%)	11 (45,8%)
Контроль	13	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

В табл. 2 представлены также результаты определения антител к двум пептидным фрагментам ГДК: 1-80 и 151-585. С N-концевым фрагментом реагировали 16% вновь выявленных больных и 37,5% больных со стажем ИЗСД. С центрально-С-концевым фрагментом реагировали 12% больных 1 группы и 45.8% больных 2 группы. Другие пептидные фрагменты ГДК были менее активны или неактивны. По литературным данным, при проявлении ИЗСД у лиц зрелого возраста антитела к инсулину, определяемые радиоиммунным методом, выявляются у 20-50% больных [8, 18]. Естественно, что до инсулинотерапии определяемые антитела вырабатываются к эндогенному инсулину. Повышение процента больных, сыворотка которых содержит антитела к инсулину, при длительном течении диабета, можно объяснить образованием антител к экзогенному инсулину, который вводится больным в течение длительного периода времени. Однако, нельзя исключить, что при длительном диабете продолжают сохраняться антитела и к эндогенному инсулину. Таблица 2. Определение антител к инсулину/про-инсулину и фрагментам ГДК у больных ИЗСД (число больных, имеющих антитела).

Аутоантитела к ГДК обнаруживают за 8 лет до проявления заболевания, что привлекает к ним особое внимание диабетологов [6, 14]. По литературным данным, методом иммунопреципитации антитела к ГДК определяют у 70-80% вновь диагностированных больных и у половины больных с длительным течением ИЗСД [5, 11, 21]. Кроме того, антитела к ГДК обнаруживаются у 100% больных с неврологическим заболеванием - синдромом прогрессирующей необратимой ригидности (Stiff-Man syndrome) [15]. Процент выявления антител к проинсулину и особенно к ГДК в наших исследованиях был несколько ниже, чем описано в литературе. Полученные данные не особенно удивляют, так как присутствие β-галактозидазы в гибридном белке, использованном в качестве антигена, могло мешать его взаимодействию с аутоантителами сыворотки больных и несколько занижало процент выявления аутоантител.

Проведенные исследования вынуждают пока сделать заключение, что разработку эффективных твердофазных иммуноферментных методов определения аутоантител к островковым клеткам поджелудочной железы с использованием рекомбинантных гибридных белков в качестве антигенов следует проводить под постоянным контролем сравнения получаемых разультатов с данными исследования связывания аутоантител больных ИЗСД с антигенами в растворе.

Рихтер и сотр. [20] получили моноклональные антитела к ГДК, используя вновь выявленных больных ИЗСД, и исследовали их на связывание с различными препаратами ГДК, в которых путем мутации были удалены N-концевой, С-концевой или центральный участки аминокислотной последовательности. Два из пяти исследованных образцов моноклональных антител связывались с С-концевым участком ГДК, включавшим 41 аминокислотный остаток, но для их эффективного взаимодействия с ГДК нужно было также присутствие аминокислотной последовательности 244-295. Два других образца связывались с ГДК только при наличии последовательности 245-295, и удаление 110 аминокислотных остатков с С-конца белка не снижало их взаимодействия с модифицированным антигеном. Только один образец моноклональных антител узнавал линейный эпитоп вблизи С-концевого участка молекулы ГДК [20]. На основании полученных данных авторы делают вывод о том, что N-концевой домен ГДК не принимает участие в иммунной реакции при взаимодействии аутоантител больных диабетом с антигеном островковых клеток.

Наши данные о способности центрально-С-концевого участка ГДК (151-585) связываться с антителами больных ИЗСД согласуются с приведенными литературными данными, полученными другими методами, однако обнаруженное связывание N-концевого фрагмента ГДК (1-80) с аутоантителами противоречит им. По данным Ким и сотр.

[15], 25 из 35 пациентов с синдромом прогрессирующей необратимой ригидности, из которых 11 имели также ИЗСД (44%), обнаруживали антитела к N-концевому линейному эпитопу ГДК, состоящему из 8 аминокислотных остатков.

В последние годы проведено молекулярное клонирование и изучено семейство внутриклеточных и трансмембранных белков, обладающих тирозинфосфотазной активностью [16]. Эти ферменты могут принимать участие в механизмах действия инсулина и других белковых гормонов, которые осуществляют свои эффекты через фосфорилирование остатков тирозина в молекулах трансмембранных рецепторов гормонов и цитоплазматических субстратов таких рецепторов. Два трансмембранных белка с тирозинфосфатазной активностью охарактеризованы как новые аутоантигены, принимающие участие в иммунопатогенезе ИЗСД, и обозначены как островковые аутоантигены 2 и 2β (английская аббревиатура IA-2) [16]. Антитела к этим антигенам определяются по связыванию в растворе и наиболее часто выявляются у больных ИЗСД в возрасте до 20 лет [17]. Есть основания полагать, что антиостровковый антиген 2 является предшественником ранее описанного в литературе антигена 37/40 кДа, который является пептидным фрагментом островкового мембранного белка, узнаваемого циркулирующими иммуноглобулинами больных ИЗСД [10, 16, 17]. По совеременным данным, наличие в крови антител одновременно к трем антигенам: инсулину, ГДК (65 кДа) и островковому антигену 2 служат наиболее достоверным показателем предрасположенности родственников больных к развитию ИЗСД в будущем [12].

Рихтер и соавт. [19] показали, что моноклональные антитела к ГДК от больных ИЗСД перестают связываться с антигеном после обработки последнего метанолом и хлороформом. Еще ранее методом иммуноблоттинга было показано, что когда антиген денатурирован, также не происходит его взаимодействие с сывороткой больных ИЗСД, но идет взаимодействие с сывороткой животных, полученной к линейным эпитопам ГДК [13]. Благодаря этим исследованиям в диабетологии утвердилось представление, что аутоантитела у диабетиков вырабатываются главным образом не к линейным, а к конформационным эпитопам ГДК. С другой стороны, некоторые моноклональные антитела связываются и с линейными эпитопами ГДК, а удаление достаточно больших участков аминокислотной последовательности ГДК не препятствует взаимодействию модифицированного антигена с моноклональными антителами от больных ИЗСД [20]. На основании этих данных можно полагать, что использование различных пептидных фрагментов ГДК для определения аутоантител в крови больных позволит выявлять разные субпопуляции антител, распознающие конформационные и/или линейные эпитопы по всей длине молекулы белка, и т.о. отличать их друг от друга. Учитывая возможные различия в агрессивности выявляемых субпопуляций антител к антигенам островковых клеток, такого рода исследования могут внести определенный вклад в понимание особенностей патогенеза ИЗСД.

Настоящее исследование выполнено при частичной поддержке Международного научного фонда (гранты № 46000 и 46300).

Автор выражает благодарность д-ру A. Lernmark и д-ру A. E. Karlsen (Вашингтонский университет, Сиэтл, США) за предоставление фрагментов гена ГДК человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Панков Ю. А.* // Биохимия. - 1996. - Т. 61, №6. - С. 984-992.
2. *Панков Ю. А.* // Вопр. мед. химии. - 1996. - Т. 42, №3. - С. 179-184.
3. *Чехранова М. К., Ильина Е. Н., Шувалова Е. Р. и др.* // Молекул. биол. - 1992. - Т. 26. - С. 596-600.
4. *Чехранова М. К., Шувалова Е. Р., Ильина Е. Н. и др.* // Вестн. РАМН - 1994. - №12. - С. 17-19.
5. *Atkinson M. A., Maclaren N. K., Scharp D. W.* // Lancet. - 1990. - Vol. 335. - P. 1357-1360.
6. *Baekkeskov S., Aanstoot M. J., Christgau S. et al* // Nature. - 1990. - Vol. 347. P. 151-157.
7. *Baekkeskov S., Laudin M., Kristensen J. K. et al* // J. Clin. Invest. - 1987. - Vol. 79. P. 926-934.
8. *Becker F., Helmke K., Seggewiss K.* // Diabetologia. - 1988. - Vol. 20. - P. 87-93.
9. *Bomeier H., McCalloch D. K., Neifing J. L. et al.* // Diabetologia. - 1991. - Vol. 34. P. - 727-733.
10. *Bonifacio F., Lampasona V., Genovese S. et al.* // J. Immunol. - 1995. - Vol. 155. - P. 5419-5426.
11. *Christie M., Laudin-Olssin M., Surdkvist G. et al.* // Diabetologoia. - 1988. - Vol. 31. P. - 597-602.
12. *Gorus F. K., Goubert P., Semakula C. et al.* // Diabetologia. - 1997. - Vol. 40. - P. 95-99.
13. *Gottlieb D. I., Chang Y.-C., Schwob J. E.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1986. - Vol. 83. - P. 8808-8812.
14. *Kaufman D. L., Erlander M. G., Clare-Salzler M. et al.* // J. Clin. Invest. - 1992. Vol. 89. - P. 283-292.
15. *Kim J., Namchuk M., Bugawan T. et al.* // J. Exp. Med. - 1994 - Vol. 180 -. P 595-606.
16. *Lu J., Li Q., Xie H. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1996. - Vol. 93. - P. 2307-2311.
17. *Payton M. A., Hawkes C. J., Christie M. R.* // J. Clin. Invest. - 1995. - Vol. 96. - P. 1506-1511.
18. *Richens F. R., Demard M.E., Hartog M.* // Acta diabet. lat. - 1987. - Vol. 24. - P. 271-282.
19. *Richter W., Eiermann T. M., Endl J. et al.* // Diabetologia. - 1993. - Vol. 36. - P. 785-790.
20. *Richter W., Shi Y., Baekkeskov S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1993. - Vol. 90. - P. 2832-2836.
21. *Trivolet C. M., Tappaz M., Durand A. et al.* // Diabetologia. - 1992. - Vol. 35. - P. 570-576.

GENE-ENGINEERING APPROACHES TO STUDY THE MARKERS FOR INSULINDEPENDENT DIABETES MELLITUS

Yu. A. Pankov

Endocrinoloqikal Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

In the present study, gene-engineering producers for proinsulin and peptide fragments of glutamic acid decarboxylase (GAD), the main autoantigens of islet cells responsible for development of insulindependent diabetes mellitus (IDDM), were prepared. Basing on the obtained antigens, ELISA was developed to determine the autoantibodies in sera of patients. Sera from the following two groups of IDDM patients were studied: 1) adult patients with recently developed IDDM before insulinotherapy, and 2) adult patients with long-lasting IDDM with associated complications. Insulin/proinsulin antibodies were detected in 20% patients of group 1 and 41.7% patients of group 2. In sera from IDDM patients, antibodies to two GAD fragments containing amino acid sequences 1-80 and 151-585 were also detected. 16% of sera from patients with recently developed IDDM and 37.5% of sera from patients with long-lasting IDDM reacted with N-terminal GAD fragment. 12% of sera from group 1 and 45.8% of sera from group 2 reacted with central-C-terminal GAD fragment. The rate of sera of IDDM patients with detected antibodies in this study was some lower than that described in the literature.

Key words: peptide fragment of qltamate decarboxylase, ELISA, markers, insulin-dependent diabetis millitus