



УДК 571.27

## ВПЛИВ ДЕФІЦИТУ ГЕНА *pttg-1* НА РОЗВИТОК АУТОІМУННИХ ПРОЦЕСІВ У МИШЕЙ

С. В. Афанасьєв<sup>1</sup>, Є. З. Філяк<sup>2</sup>, Р. С. Стойка<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: serhiy-aspirant1@rambler.ru

<sup>2</sup>Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна

Pituitary tumor transforming gene (*pttg-1*) – це протоонкоген, що експресується в яєчках, товстому і тонкому кишківнику, а також в активованих лімфоцитах. Білковий продукт цього гена бере участь у регуляції мітозу та клітинного циклу. Дефіцит гена *pttg* (*pttg-KO*) у мишей призводить до гіперплазії тимусу і гіпоплазії селезінки. Метою даної роботи було виявлення аутоантитіл до ДНК і корових гістонів, а також визначення афінності продукованих аутоантитіл мишей дикого типу та з дефіцитом гена *pttg-1*. Досліджено рівень аутоантитіл до одноланцюгової та дволанцюгової ДНК, а також до корових гістонів у мишей із дефіцитом гена *pttg-1*. Вивчено афінність антитіл до дволанцюгової нативної ДНК. На підставі виявлених змін рівня аутоантитіл до дволанцюгової ДНК і корових гістонів зроблено висновок про те, що дефіцит гена *pttg-1* сприяє розвиткові аутоімунних процесів.

**Ключові слова:** *pttg-1*, аутоімунні процеси, афінність.

### ВСТУП

Біологічна роль імунної системи полягає у знешкодженні та усуненні чужорідних організмів, їхніх частин (клітин) або продуктів життєдіяльності, а також трансформованих і пошкоджених клітин. Для здійснення цієї функції необхідним є баланс між різними популяціями та субпопуляціями імунокомпетентних клітин [1, 2]. Патологічні зміни у шляхах, відповідальних за регуляцію імунної відповіді, можуть призводити до важких розладів. Зокрема, порушення толерантності до власних антигенів призводить до аутоімунних захворювань [3, 4]. Ці процеси можуть бути зумовлені проліферацією клонів аутоагресивних Т-кілерних клітин, або продукцією антитіл проти нормальних, здорових клітин і тканин організму [5, 6]. На розвиток аутоімунних захворювань впливає спадкова схильність, несприятлива дія чинників зовнішнього середовища, порушення імунітету. Для багатьох аутоімунних захворювань виявлено зв'язок із успадкуванням певних генів HLA, генів імуноглобулінів і рецепторів Т-лімфоцитів. Поєднання генетичної схильності з дією несприятливих

чинників зовнішнього середовища, ймовірно, стимулює продукування цитокінів Т-лімфоцитами, які, у свою чергу, стимулюють аутогенну проліферацію і диференціювання В-лімфоцитів і утворення аутоантитіл [7, 8]. Розвиток аутоімунних реакцій може бути зумовлений порушенням продукції антиідіотипічних антитіл, що контролюють вираженість і тривалість імунної відповіді. При багатьох аутоімунних захворюваннях відзначається підвищення активності саме тих клонів Т-хелперів, які стимулюють утворення аутоантитіл [6, 7].

Більшість аутоімунних захворювань є хронічними. У їхньому розвитку є періоди загострення і ремісії. Як правило, хронічні аутоімунні захворювання призводять до серйозних порушень функції внутрішніх органів і часто закінчуються інвалідністю хворого. Аутоімунні реакції також можуть супроводжувати різні захворювання чи прийом лікарських засобів. Аутоімунні явища спостерігаються при різноманітних гематологічних захворюваннях, зокрема при лімфопроліферативних і мієлодиспластичних синдромах [8]. Встановлено, що при мієлодиспластичному 5q синдромі супутні аутоімунні розлади спостерігаються у 13–30% випадків [8], зокрема, характерними є васкуліт, піодермія, гемолітична анемія, аутоімунна тромбоцитопенія, ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак [9].

Pituitary tumor transforming gene (*pttg-1*) був відкритий у 1997 р. у клітинах пухлини гіпофізу щура [10]. Проте дослідження тотальної кДНК різних тканин щура та людини показало, що мРНК РТТГ присутня також і у нормальних тканинах (яєчках, товстому і тонкому кишківнику та ін.) ссавців [10, 11]. Вважають, що секурін (інша назва РТТГ) є важливим регулятором розходження сестринських хроматид в анафазі мітозу. Він також бере участь у процесах репарації ДНК, апоптозі та регуляції диференційної експресії генів [12, 13].

Показаний зв'язок продукту *pttg-1* з активацією лімфоцитів, зокрема, після антигензалежної (CD3-опосередкованої) активації Т-лімфоцитів спостерігали залежну від часу індукцію синтезу мРНК цього білка [14]. Дефіцит гена *pttg-1* у мишей призводить до описаних вище порушень імунологічних органів (гіпоплазії тимусу та гіперплазії селезінки), а також до збільшення кількості анеуплоїдних клітин. У мишей із дефіцитом гена *pttg-1* також виявлено аномалії у розвитку бета-клітин острівців Лангерганса, гіпоплазію яєчок, тромбоцитопенію з нормальним рівнем мегакаріоцитів [16, 17]. Окрім того, дефіцит гена *pttg* зумовлює порушення синтезу імуноглобулінів класів М та G1a [17].

Метою нашого дослідження було виявити вплив дефіциту гена *pttg-1* на виникнення аутоімунних процесів шляхом аналізу наявності аутоантитіл у крові мишей із дефіцитом гена *pttg-1*.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Схрещування та генотипування мишей.** Об'єктом дослідження були миші дикого типу (*pttg-WT*) і миші із дефіцитом гена білка РТТГ (*pttg-KO*). Мишей було отримано з Дослідного інституту при Медичному центрі Синайський кедр (Лос Анджелес, США). Досліди проводили згідно з етичним кодексом МОЗ України. Тваринам було забезпечено вільний доступ до їжі та води із перебуванням у стандартних умовах (12-годинна зміна світла і темряви). 9 гетерозиготних самців (*pttg+/-*) схрещували з 12 гетерозиготними самками. Потомків першого покоління генотипували, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), зі специфічними праймерами до гена *pttg-1* і до вставки, введеної в геном мишей при отриманні мишей із дефіцитом гена *pttg-1* (табл. 1).

**Таблиця 1. Праймери, які використовували для генотипування мишей**  
**Table 1. Primers used for genotyping of mice**

Ген <i>pttg</i>	Forward	5'-TAGGCTTTTCGGCAACTCTGT-3'
	Reverse	5'-TTCTGGGGACTGAATTCAGG-3'
Вставка	Forward	5'-GTGCTACTTCCATTTGTCACGTCC-3'
	Reverse	5'-TTAGCTGTGAGCTCGTCGTG-3'

Продукти ПЛР розділяли електрофорезом в 1,5% агарозі в 0,5-кратному трис-боратному буфері (ТБЕ). Після генотипування для подальших досліджень відібрали 7 *pttg-WT* та 8 *pttg-KO* самців віком 4 місяці.

**Виділення антитіл.** У мишей дослідної (*pttg-KO*) та контрольної групи (*pttg-WT*) проводили забір 200–300 мкл крові для виділення антитіл. Антитіла виділяли методом висолювання насиченим розчином амонію сульфату з подальшим діалізом проти однократного фосфатного буферу.

**Імуноферментний аналіз.** Титр антитіл визначали імуноферментним аналізом (ELISA) за стандартним протоколом. Для цього двониткову фрагментовану ДНК з тимусу теляти розчиняли у фосфатному буфері до концентрації 100 мкг/мл і сорбували її на планшеті для ELISA з високою сорбційною здатністю. Для визначення афінності анти-ДНК антитіл останні вносили в лунки планшета в розчині NaCl з різною концентрацією (0,25 М; 0,5 М; 1 М). Для підтверження специфічної взаємодії антитіл з ДНК використовували конкурентне інгібування зв'язування антитіл зі сорбованою на планшеті ДНК різними концентраціями розчиненої дволанцюгової фрагментованої ДНК (розмір фрагментів становив 1500–4000 пар нуклеотидів). Для визначення рівня антигістонових аутоантитіл використовували препарат корових гістонів із концентрацією білка 100 мкг/мл.

**Статистична обробка результатів.** Для статистичної обробки одержаних результатів обчислювали стандартний розкид даних у межах однієї групи і статистичну достовірність різниці між двома групами даних із урахуванням коефіцієнта Стьюдента (t-test). Статистично достовірною вважали різницю при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

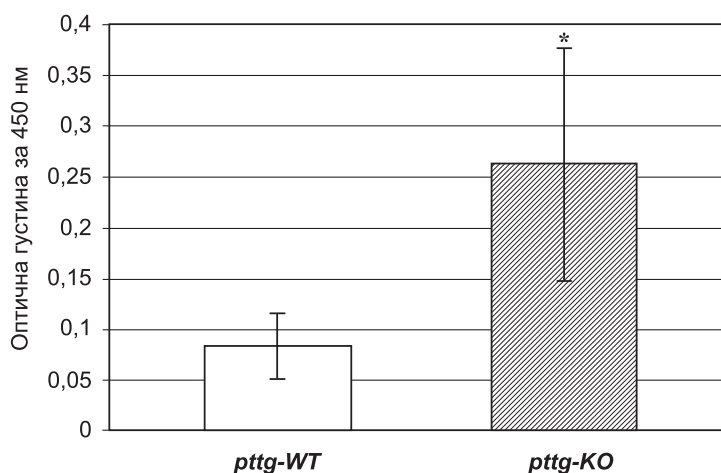
Проведені нами спостереження за мишами із дефіцитом гена *pttg-1* виявили, що ці миші проявляють фенотипові ознаки, характерні для схильності до розвитку аутоімунних процесів (рис. 1). Зокрема, у них спостерігали висипання на носі, патологічну алопецію та ульцерацію. Для характеристики аутоімунних розладів у цих тварин визначали наявність аутоантитіл до ДНК і до корових гістонів.

ELISA на наявність анти-ДНК антитіл показав, що у мишей із дефіцитом гена *pttg-1* спостерігається достовірно вищий титр антитіл до дволанцюгової ДНК порівняно з мишами дикого типу (рис. 2). Встановлено, що у них не змінений рівень аутоантитіл до одностанцюгової ДНК (рис. 3). Аналіз афінності анти-ДНК антитіл за умов підвищення іонної сили розчину інкубації показав, що зростання кількості антитіл, які зв'язуються з дволанцюговою нативною ДНК у крові мишей *pttg-KO*, відбувається за рахунок збільшення кількості низькоафінних антитіл (рис. 4).



**Рис. 1.** Типова фотографія миші з дефіцитом гена *pttg-1*

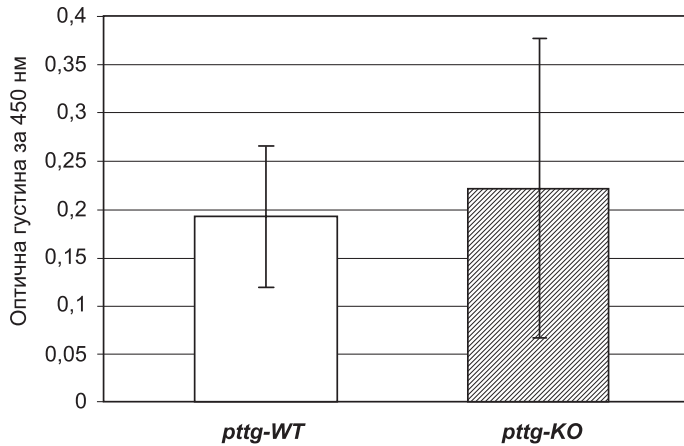
**Fig. 1.** Typical photograph of mice with of *pttg-1* gene deficit



**Рис. 2.** Продукція антитіл до двониткової ДНК у мишей із дефіцитом гена *pttg* (*pttg-KO*) і мишей дикого типу (*pttg-WT*)

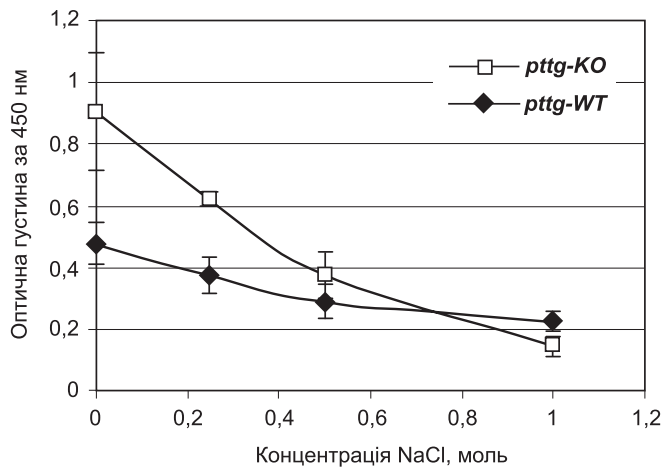
**Fig. 2.** Production of antibody to double strand DNA in wild type mice (*pttg-WT*) and mice with lacking of *pttg-1* (*pttg-KO*)

Наведені дані підтверджені при використанні фрагментованої ДНК для конкурентного інгібування зв'язування антитіл із дволанцюговою нативною ДНК (рис. 5). Показано, що зростання кількості анти-ДНК антитіл у крові мишей з дефіцитом гена *pttg-1* відбувається, ймовірно, саме за рахунок збільшення кількості аутоантитіл із низькою афінністю. Одержані результати дають змогу припускати, що дефіцит експресії гена *pttg-1* призводить до появи у крові низькоафінних аутоантитіл до дволанцюгової нативної ДНК. Слід відзначити, що відсутність змін кількості антитіл до одноланцюгової ДНК у *pttg-KO* мишей може свідчити про неможливість перехресної реактивності виявлених низькоафінних анти-ДНК антитіл до денатурованої ДНК. Тому можна припускати відсутність перехресної реактивності й до інших негативно заряджених молекул, що опосередковано свідчить про специфічність цих антитіл саме до дволанцюгової нативної ДНК.



**Рис. 3.** Продукція антитіл до одностричкової ДНК у мишей із дефіцитом гена *pttg* (*pttg-KO*) і мишей дикого типу (*pttg-WT*)

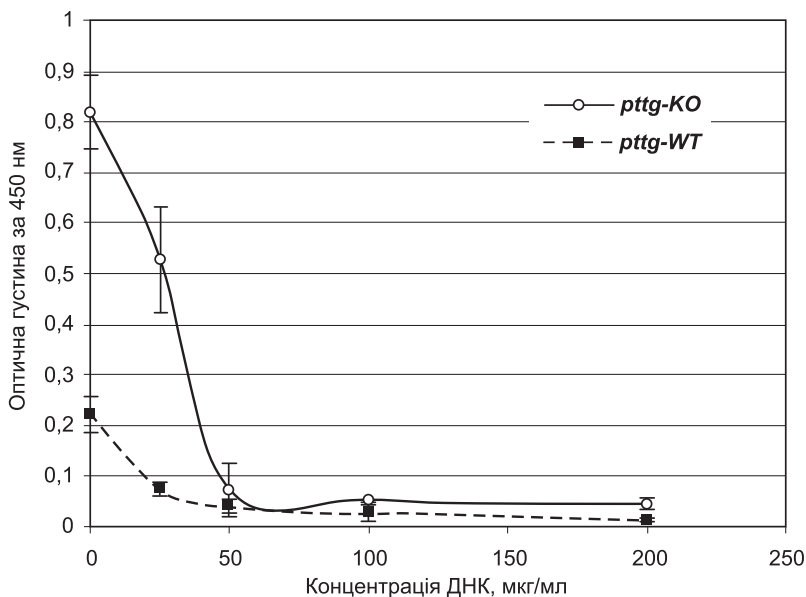
**Fig. 3.** Production of antibody to single strand DNA in wild type mice (*pttg-WT*) and mice lacking *pttg-1* (*pttg-KO*)



**Рис. 4.** Вплив іонної сили розчину на афінність аутоантитіл до нативної дволанцюгової ДНК, отриманих з плазми крові мишей із дефіцитом гена *pttg* (*pttg-KO*) і мишей дикого типу (*pttg-WT*)

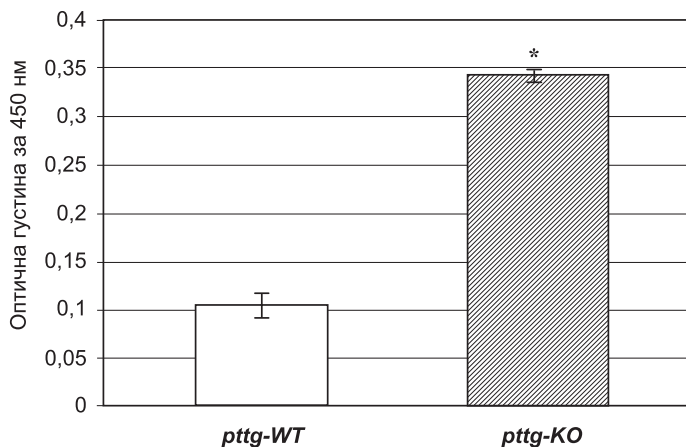
**Fig. 4.** Influence of Ion strength on anti-DNA autoantibody affinity obtained from blood plasma of wild type mice (*pttg-WT*) and mice lacking *pttg-1* (*pttg-KO*)

Для визначення кількості аутоантитіл, специфічних до інших макромолекул, які, за даним літератури, можуть виступати як мішені при аутоімунних порушеннях (червоному системному вовчаку, аутоімунній тромбоцитопенії), нами досліджено наявність у крові мишей із дефіцитом гена *pttg-1* аутоантитіл до корових гістонів (рис. 6). Встановлено, що у крові мишей *pttg-KO* рівень антигістонових аутоантитіл є на 350% вищим порівняно з диким типом. Ці дані можуть свідчити про схильність мишей *pttg-KO* до розвитку патологічного стану, що нагадує системний червоний вовчак людини [5]. При цьому відсутність зростання кількості антитіл, специфічних до одностричкової ДНК, може опосередковано слугувати контролем наявності у мишей *pttg-KO* аутоімунних процесів.



**Рис. 5.** Конкурентне інгібування зв'язування анти-ДНК антитіл нативною, фрагментованою ДНК з тимусу теляти

**Fig. 5.** Competitive inhibition of binding anti-double strand DNA autotitres by native fragmenting DNA from calf thymus



**Рис. 6.** Рівень антитіл до корових гістонів у плазмі крові мишей із дефіцитом гена *pttg* (*pttg-KO*) і мишей дикого типу (*pttg-WT*)

**Fig. 6.** Level of autoantibody to core histons in wild type mice (*pttg-WT*) and mice lacking *pttg-1* (*pttg-KO*)

Одержані нами дані вказують на те, що у мишей із дефіцитом гена *pttg-1* мають місце порушення функціонування імунної системи, що виявляються у підвищеній продукції аутоантитіл до дволанцюгової ДНК, і до корових гістонів. У нормі у мишей синтезуються анти-ДНК антитіла класу IgM, які в основному зв'язуються з одностанцюговою ДНК. Проте антитіла, які продукуються у мишей *pttg-KO*, є специфічними до дволанцюгової ДНК, що підтверджено конкурентним інгібуванням зв'язування

анти-ДНК антитіл. Усе це може свідчити про підвищену схильність мишей *pttg-KO* до розвитку аутоімунних процесів. Ген *pttg-1* у хромосомі людини міститься в локусі 5q35.3, який може втрачатися при мієлодиспластичному 5q-синдромі людини. Тому наші дані можуть частково пояснити схильність до аутоімунної патології у пацієнтів із цим захворюванням.

## ВИСНОВКИ

Дефіцит гена *pttg-1* супроводжується зростанням титру аутоантитіл до дволанцюгової ДНК, а також до корових гістонів. Показано, що зростання кількості анти-ДНК антитіл у крові мишей із дефіцитом гена *pttg-1* відбувається саме за рахунок зростання кількості аутоантитіл із низькою афінністю.

## ПОДЯКИ

Автори вдячні доктору Shlomo Melmed за надання мишей із дефіцитом гена *pttg-1*.

Роботу виконано за часткової підтримки Західно-Українського Біомедичного Дослідницького Центру.

1. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология.* Москва: Мир, 2000.
2. *Якобсик М. Иммунология.* Вінниця: Нова книга, 2004. 672 с.
3. *Li M., Wan Y., Sanjabi S., Robertson A.* Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. **Annu. Rev. Immunol**, 2006; 24: 99–146.
4. *Li M.O., Wan Y.Y., Sanjabi S. et al.* Regulation of Immune Responses by TGFβ. **Annu. Rev. Immunol**, 2006; 24: 99–146.
5. *Murphy K. M., Ouyang W., Farrar J. D. et al.* Signaling and transcription in T helper development. **Annu. Rev. Immunol**, 2000; 18: 451–494.
6. *Szabo S.J., Sullivan B.M., Peng S.L., Glimcher L.H.* Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. **Annu. Rev. Immunol**, 2003; 21: 713–58.
7. *Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J.C.* Cellular responses to interferon-γ. **Annu. Rev. Immunol**, 1997; 15: 749–95.
8. *Tasaka T., Tohyama K., Kishimoto M. et al.* Myelodysplastic syndrome with chromosome abnormalities: a nationwide survey in Japan. **Leukemia**, 2008; 22: 1874–1881.
9. *Ronald Feitosa Pinheiro, Maria Regina Rr egis Silva, Maria de Lourdes L.F. Chauffaille.* The 5q- syndrome and autoimmune phenomena: Report of three cases. **Leukemia Research**, 2006; 30: 507–510.
10. *Pei L., Melmed S.* Isolation and Characterization of aPituitary Tumor-Transforming Gene (PTTG). **Molecular Endocrinology**, 1997; 11(4): 433–41.
11. *Smith V.E., Franklyn J.A., McCabe C.J.* Pituitary tumor-transforming gene and its binding factor in endocrine cancer. **Expert Rev. Mol. Med**, 2010; 12: 38.
12. *Grossman A.B.* The molecular biology of pituitary tumors: a personal perspective. **Pituitary**, 2009; 12(3): 265–70.
13. *Yu R., Melmed S.* Pathogenesis of pituitary tumors. **Prog. Brain Res**, 2010; 182: 207–27.
14. *Zhang X., Horwitz G.A., Presant T.R. et al.* Structure, Expression and Function of Human Pituitary Tumor Transforming Gene (PTTG). **Molecular Endocrinology**, 1999; 13(1): 156–166.
15. *Stoika R., Yu R., Melmed S.* Expression and function of pituitary tumor transforming gene for T-lymphocyte activation. **British Journal of Hematology**, 2002; 119: 1070–1074.
16. *Wang Z., Moro E., Kovacs K. et al.* Pituitary tumor transforming gene-null male mice exhibit impaired pancreatic beta cell proliferation and diabetes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2003; 100(6): 3428–32.



17. Wang Z., Yu R., Melmed S. Mice lacking Pituitary Tumor Transforming Gene Show Testicular and Splenic Hypoplasia, Thymic Hyperplasia, Trombocytopenia, Aberrant Cell Cycle Progression, and Premature Centromere Division. **Molecular Endocrinology**, 2001; 15(11): 1870–1879.

## EFFECT OF LACK OF *pttg-1* on DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNE PROCESSES

S. Afanasyev<sup>1</sup>, Y. Filak<sup>2</sup>, R. Stoyka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: serhiy-aspirant1@rambler.ru

<sup>2</sup>Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

PTTG (Pituitary Tumour Transforming gene-1) is a protooncogene which is expressed in testes, thick and thin bowel, and in activated lymphocytes. Protein product of this gene is involved in mitosis and cell cycle regulation. Lack of *pttg* in mice (*pttg-KO*) leads to thymic hyperplasia and splenic hypoplasia. Specific aim of this work was to investigate presence of anti-dsDNA, anti-core histons antibodies and also check affinity of produced antibodies of wild type mice and mice wit lack of *pttg-1*. The level of antibodies to single strand, double strand DNA and core histons of wild type and mice lacking *pttg* were investigated. Affinity of autoantibodies to double strand native DNA was studied. The revealed changes of autoantibodies level to double strand DNA and core histones suggest that the lack of *pttg-1* causes the development of autoimmune processes.

**Key words:** *pttg-1*, autoimmune processes, affinity.

## ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА ГЕНА *pttg-1* НА РАЗВИТИЕ АУТОИММУННЫХ ПРОЦЕССОВ У МЫШЕЙ

С. В. Афанасьев<sup>1</sup>, Е. З. Філяк<sup>2</sup>, Р. С. Стойка<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: serhiy-aspirant1@rambler.ru

<sup>2</sup>Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина

Pituitary tumor transforming gene (*pttg-1*) – протоонкоген, который экспрессируется в яичках, тонком и толстом кишечнике, а также в активированных лейкоцитах. Белковый продукт этого гена принимает участие в регуляции митоза и клеточного цикла. Дефицит гена *pttg* у мышей *pttg-KO* приводит к гиперплазии тимуса и гипоплазии селезенки. Целью данной работы было определение присутствия аутоантител к ДНК, коровым гистонам, а также определение афинности продуцированных антител у мышей дикого типа и мышей с дефицитом гена *pttg*. Исследован уровень аутоантител к одноцепочечной и двухцепочечной ДНК, а также к коровым гистонам у мышей с дефицитом гена *pttg*. Изучена афинность антител к двухцепочечной нативной ДНК. На основании проведенных исследований сделан вывод, что дефицит гена *pttg* способствует развитию аутоиммунных процессов.

**Ключевые слова:** *pttg-1*, аутоиммунные процессы, афинность.

Одержано: 08.06.2011