



The cysteine bonding in TSH receptor and its function in autoantibodies recognition

Grażyna Adler, Urszula Piotrowska

Department of Biochemistry, Medical Center of Postgraduate Education, Warsaw, Poland

Abstract

The majority of epitopes for TSH receptor (TSHR) stimulating autoantibodies are clustered around the N-terminal region of the TSH receptor. The characteristic feature of this region is the presence of four cysteine residues. It was proposed that cysteines in positions 29 and 41 in the receptor are connected by disulfide bonds and they are the target for receptor stimulating antibodies. The present study was aimed to check this possibility.

The synthetic peptides: peptide corresponding to the part of TSHR containing the above 29-41 cysteine bond, the peptide similar to this peptide but without disulfide bond and the control peptide, containing sequence absent in the receptor were used for rabbit immunization. The thyroid status of all immunized rabbits was the same. Rabbits immunized with peptides related to TSHR generated antisera reactive with TSHR in immunoenzymatic assay. To check specificity of this reaction the influence of the peptides and the antisera on TSH binding to the receptor in competitive assay (TRAK) and their influence on adenylate cyclase activity were studied. It was found that neither synthetic peptides nor antiserum from any rabbit influenced TSH binding to the receptor in TRAK. In contrast low, but significant adenylate cyclase stimulating activity was noticed for antisera from two of six rabbit immunized by peptide containing the disulfide bond. We concluded that such a bond between cysteine residues 29 and 41 are present in TSHR in the site of stimulating antibodies epitope.

(Pol J Endocrinol 2005; 5(56): 766-772)

Key words: *TSH receptor, peptides, antibodies, autoantibodies, epitope*



Występowanie mostka dwusiarczkowego w receptorze TSH i jego udział w wiązaniu autoprzeciwciał

Grażyna Adler, Urszula Piotrowska

Zakład Biochemii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Streszczenie

W N-końcowej części receptora TSH występują epitopy rozpoznawane przez autoprzeciwciała chorych. Cechą charakterystyczną tego fragmentu cząsteczki receptora jest obecność czterech reszt cysteinowych. Proponowano, że reszty cystein w pozycjach 29 i 41 powiązane są mostkiem dwusiarczkowym i, że epitop rozpoznawany przez autoprzeciwciała obejmuje to wiązanie. Obecna praca miała na celu zbadanie tej możliwości.

Stosowaliśmy syntetyczne peptydy: peptyd zawierający powyższe, potencjalnie aktywne wiązanie dwusiarczkowe oraz peptyd podobny ale nie zawierający wiązania dwusiarczkowego, a imitujący sekwencję powstałą w wyniku wytworzenia takiego wiązania. Peptydy te, oraz peptyd kontrolny o sekwencji nie występującej w receptorze TSH zostały użyte do immunizacji królików. Stan czynnościowy tarczyc wszystkich immunizowanych królików był taki sam. Króliki immunizowane peptydami pochodnymi receptora wytworzyły przeciwciała rozpoznające w teście immunoenzymatycznym receptor TSH z transfekowanych komórek owadnich. Celem stwierdzenia, czy antypeptydowe przeciwciała królicze posiadały aktywność autoprzeciwciał stymulujących zbadano wpływ peptydów oraz wpływ przeciwciał na wiązanie TSH z receptorem w teście kompetycyjnym (TRAK) oraz wpływ peptydów i przeciwciał na aktywność cyklazy adenylanowej w wytwarzających receptor TSH komórkach jajowych chomika chińskiego.

Stwierdzono, że żaden z peptydów ani żadna z surowic immunizowanych królików nie hamowała wiązania

TSH do receptora w teście TRAK. W przeciwieństwie do tych negatywnych wyników, w teście stymulacji cyklazy adenylanowej surowica dwóch z 6 królików immunizowanych peptydem zawierającym mostek S-S wykazywała słabą, lecz znamiennej statystycznie aktywność. Otrzymane wyniki wykazały, że receptor TSH zawiera mostek dwusiarczkowy łączący cysteiny 29-41 oraz, że peptyd zawierający ten mostek może wywołać syntezę przeciwciała stymulującego cyklazę adenylanową. Peptyd ten obejmuje więc epitop dla przeciwciał stymulujących

(*Endokrynol Pol* 2005; 5(56): 766-772)

Słowa kluczowe: receptor TSH, peptydy, przeciwciała, autoprzeciwciała, epitopy



Dr hab. G. Adler Prof. w CMKP
Zakład Biochemii Klinicznej, Centrum Medyczne
Kształcenia Podyplomowego,
ul Marymoncka 99, 01 813 Warszawa,
tel: (22)8340165
fax: (22)8640834
e mail: grad@cmkp.edu.pl

Praca wykonana w ramach tematu statutowego CMKP: 501-1-1-01-04/02

Wstęp

Przyczyną nadczynności w chorobie Gravesa-Basedowa jest patologiczna stymulacja tarczycy przez autoprzeciwciała chorych reagujące z receptorem dla tyreotropiny (TSHR). Działanie autoprzeciwciał nie podlega regulacji przez oś podwzgórzowo-przysadkiowo-tarczycową. Autoprzeciwciała te nazywamy skrótowo przeciwciałami stymulującymi, a towarzyszą im czasem przeciwciała nie prowadzące do stymulacji receptora lecz uniemożliwiające wiązanie TSH z receptorem nazwane przeciwciałami blokującymi. Autoprzeciwciała rozpoznają epitopy zlokalizowane na pozabłonowej części receptora przy czym większość autoprzeciwciał stymulujących rozpoznaje fragment N-końcowy [1, 2]. Również w mysim modelu choroby Gravesa-Basedowa N-końcowy fragment receptora jest

immunologicznie dominujący [3]. Cechą charakterystyczną N-końcowego fragmentu cząsteczki jest obecność czterech reszt cysteinowych. Reszty te są przestrzennie oddalone od pozostałych reszt cysteinowych w cząsteczce receptora i prawdopodobnie są powiązane pomiędzy sobą mostkami dwusiarczkowymi. Szczególną uwagę zwraca się na cysteinę w pozycji 41, gdyż jej delecja lub zamiana na inny aminokwas obniża zarówno wiązanie TSH jak i wiązanie autoprzeciwciał do komórek z wbudowanym genem receptora TSH [4, 5]. Chen i wsp. na podstawie wyników badań mutagenyzy reszt cysteinowych w pozycjach 24, 29, 31 i 41 zaproponowali, że epitop rozpoznawany przez niektóre z autoprzeciwciał stymulujących obejmuje wiązanie S-S pomiędzy resztami cystein w pozycjach 29 i 41 [6, 7]. W obecnej pracy zajęto się zbadaniem takiej możliwości. W tym celu skonstruowano peptyd

„podwójny” imitujący fragment N-końcowy receptora TSH, a więc zawierający powyższe, potencjalnie aktywne wiązanie dwusiarczkowe i użyto go do immunizacji królików. W teście stymulacji cykazy adenylanowej surowice dwóch z sześciu immunizowanych królików cechowała słaba aktywność stymulująca. Wykazano więc, że receptor posiadała mostek dwusiarczkowy łączący cysteiny w pozycjach 29 i 41, mostek, który może wchodzić w skład epitopu przeciwciał stymulujących.

Materiał i metody

Peptydy

Następujące peptydy w formie zredukowanej, zostały zakupione w Yale University (New Haven USA):

kontrolny peptyd Nr 20, aminokwasy 25-29,42-61: w receptorze TSH: SPSPCKDIQRIPSLPPSTQTLK LIE.

kontrolny peptyd Nr 18 nie występujący w receptorze TSH, aminokwasy 46-32: RQIDKCTVRFDEEQH (uszeregowane w odwrotnej kolejności w stosunku do występującej w receptorze)

peptyd Nr 12, aminokwasy 37-61 w receptorze TSH: FRVTCKDIQRIPSLPPSTQTLK LLE

peptyd Nr 19, aminokwasy 25-30 w receptorze TSH: SPSPCE

Peptyd „podwójny” 19+12 otrzymaliśmy poprzez mieszanie w ciągu godziny w obecności 0,003% perhydrolu równych molowo ilości peptydów 12 i 19.

Przeciwciała królicze

Peptyd 18 został sprzęgnięty z hemocyjaniną (KLH, Sigma, ST Louis, USA) poprzez grupę SH z użyciem sukcylnylo 4-(N-maleimidometylo) cykloheksano-1-karboksyłanu (SMCC, Pierce, Rockford, USA) zgodnie z dwustopniową metodą podaną przez producenta. Peptydy 19 i 20 sprzęgnięto z KLH poprzez wolną grupę aminową z użyciem aldehydu glutarowego (Sigma) metodą dwustopniową [8]. Celem uniknięcia utlenienia grup SH wszystkie etapy reakcji sprzęgania wykonywano w atmosferze argonu a obecność grup SH monitorowano metodą Ellmana, używając cysteinę (Sigma) jako standard. Następnie, przed użyciem do immunizacji, peptyd 19 powiązany z KLH mieszano przez 1 godzinę z roztworem peptydu 12 w obecności 0,003% perhydrolu. Proces utleniania, w wyniku którego otrzymano „podwójny” peptyd 19+12, monitorowano metodą Ellmana. Koniugaty z KLH peptydu „podwójnego” oraz pozostałych peptydów 20 i 18 zemułgowane z adjuwantem Freund (Sigma) użyto do immunizacji królików. Dawki przypominające podawano w odstępach dwutygodniowych, a następnie, dwa tygodnie po drugiej dawce przypominającej króliki skrwawiono,

surowice oznaczono odpowiednio symbolami Ap 19+12A-Ap 19+12F, Ap 20A-Ap 20F, Ap18A-Ap 18F i zamrożono do dalszych badań.

Autoprzeciwciała

Stosowano pulę 10 surowic chorych na chorobę Gravesa-Basedowa diagnozowanych na podstawie objawów klinicznych, oznaczeń fT_3 , fT_4 , TSH oraz obecności przeciwciał przeciwko receptorowi TSH zgodnie z wynikami testu kompetycyjnego TRAK (BRAHMS, Henningsdorf, Niemcy)).

Receptor TSH

Receptor TSH został uzyskany metodą uprzednio opisaną [9, 10] z komórek owadzie Trichoplusia ni H5 (Invitrogen Corporation, San Diego, USA) z wbudowanym za pośrednictwem bakulowirusa genem kodującym część pozabłonową ludzkiego receptora TSH (dar od prof. Paula Banga z Kings College School of Medicine w Londynie). W skrócie: komórki owadzie były solubilizowane przez 1% Nonidet ((NP-40, Calbiochem, La Jolla, CA, USA) w obecności inhibitorów proteaz i wirowane przy 2300 x g. Osad inkubowano z nukleazami (DNase, RNase A oraz RNase T1, Boehringer Mannheim, Niemcy) i ponownie odwirowywano. Osad tego wirowania rozpuszczano w 6M moczniku (Sigma) zawierającym 1% mercaptoethanol (Bio Rad, Richmond, USA) i oczyszczano metodą chromatografii cieczowej (HPLC) w odwróconej fazie na kolumnie Vydac C4 (Alltech Applied Science Laboratories, Deerfield, IL, USA). Receptor eluowano 43 % acetonitrylem w 0,1% kwasie trójfluoroctowym (Merck, Darmstadt, Niemcy), acetonitryl odparowywano, a receptor rozpuszczano w moczniku.

Test immunoenzymatyczny-ELISA

Płytki (Nunc maxisorp) opłaszczano peptydami 12, 18 lub 20 w stężeniu 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ w buforze węglanowym pH 9 lub opłaszczano oczyszczonym receptorem TSH w stężeniu 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rozpuszczonym w 0,6 M moczniku. Następnie wolne miejsca na płytkach wysycano 0,2% albuminą wołową. Płytki inkubowano przez 1 godz z odpowiednio rozcieńczonymi surowicami odpornościowymi królików, płukano i inkubowano godzinę z przeciwciałem przeciwko immunoglobulinom króliczym sprzęgniętym z peroksydazą chrzanową (Dako, A/S, Dania) Barwę wywoływano dodając roztwór tetrametylobenzydyny (TMB, Serva, Heidelberg, Niemcy), reakcję hamowano kwasem siarkowym i wynik odczytywano przy 450 nm.

Oznaczanie fT_3 i fT_4

Poziom hormonów w surowicy ludzkiej oraz w surowicach królików oznaczano metodą elektroluminescencyjną z użyciem analizatora ELECSYS 2010 firmy Roche.

Badanie reakcji z receptorem

Konkurencja peptydów i przeciwciał oraz TSH w wiązaniu z receptorem

Badania przeprowadzono z użyciem zestawu TRAK przeznaczonego do monitorowania obecności przeciwciał anty receptorowych u pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa. Wykonano dwa rodzaje oznaczeń. W pierwszym, mającym na celu stwierdzenie czy peptydy wiązane są przez autoprzeciwciała chorych, pulę surowic pacjentów zawierających przeciwciała anty receptorowe preinkubowano 1 godzinę z kolejnymi peptydami w stężeniu 500 nM, a następnie prowadzono, zgodnie z instrukcją producenta, test hamowania wiązania TSH do receptora przez wzbogaconą o peptyd pulę surowic. Wyniki uzyskane w obecności peptydów porównywano do wyniku dla puli surowic pacjentów do której nie dodano peptydu. Drugi rodzaj oznaczeń mający na celu stwierdzenie czy surowice królików immunizowanych konkurują z TSH w wiązaniu z receptorem polegał na wykonaniu testu według instrukcji producenta z modyfikacją polegającą na zastąpieniu surowic pacjentów surowicami immunizowanych królików.

Aktywacja cykazy adenylanowej

Do badań użyto transfekowane komórki jajowe chomika chińskiego (CHO JP 09) z wbudowanym genem kodującym receptor TSH. Stężenie cAMP mierzono z użyciem zestawu firmy Amersham. Oznaczenia wykonano w laboratorium BioAssays Diagnostica GmbH, (Henningsdorf, Niemcy) metodą opisaną przez Morgenthaler'a i wsp [11, 12]. Zbadano, tak jak w przypadku TRAK, hamujący wpływ na aktywację cykazy adenylanowej peptydu dodanego do puli surowic pacjentów oraz aktywację cykazy adenylanowej przez surowice immunizowanych królików. Aktywność surowic króliczych wyliczano w formie indeksu SI otrzymanego przez podzielenie ilości cAMP wytworzonego przez komórki CHO w obecności surowicy królika immunizowanego przez ilość cAMP wytworzoną przez te komórki w obecności surowicy krwi tego samego królika, lecz pobranej przed immunizacją. Ponadto wyliczano indeks względny (RSI) dzieląc wartość SI dla danej surowicy przez średnią wartość SI uzyskaną dla grupy królików kontrolnych immunizowanych peptydem 18.

Wyniki

Wszystkie króliki dobrze odpowiedziały na immunizację, a stan czynnościowy tarczycy wszystkich immunizowanych królików był podobny. W szczególności u żadnego z królików immunizowanych peptydem stanowiącym fragment cząsteczki receptora TSH nie stwierdzono podwyższenia poziomu ft_3 lub ft_4 w porównaniu do

poziomu obserwowanego u królików kontrolnych immunizowanych peptydem 18 (Tabela I).

Podczas przygotowywania peptydów do immunizacji zwracano uwagę na utrzymanie właściwych warunków oksydo-redukcyjnych tak, aby w planowanych miejscach wytworzone zostały wiązania S-S. Bezpośrednio po sprzęgnięciu z KLH w peptydzie 19 występowały, jak to wykazał wynik testu Ellmana, wolne grupy SH, peptyd 19 był więc w formie zredukowanej. Po inkubacji koniugatu peptyd 19-KLH z peptydem 12 wolnych grup SH nie wykryto, doszło zatem do ich utlenienia i powstał zawierający mostek dwusiarczkowy „podwójny” peptyd 19+12. W peptydzie tym występowało zaplanowane połączenie pomiędzy resztami cystein odpowiadającym pozycjom 29 i 41 w receptorze TSH. Obok tego peptydu podczas inkubacji w porównywalnych ilościach powstał też: koniugat KLH-peptyd „podwójny” 19+19 i „podwójny” peptyd 12+12. Ich obecność nie przeszkadzała w dalszych etapach badań. Dodatkowym dowodem na to, że w opracowanych przez nas warunkach otrzymano połączenie peptydów 19 i 12 przez reszty cysteinowe była specyficzność reakcji surowic immunizowanych królików wykazana w teście ELISA. Wszystkie immunizowane króliki wytworzyły przeciwciała o znacznym mianie. Badając obecność przeciwciał przeciwko „podwójnemu” peptydowi 19+12 do opłaszczania płytek używano peptydu 12, a więc peptydu, który nie był bezpośrednio sprzęgnięty z KLH a do kompleksu peptydu 19 z KLH został dołączony przez mostek dwusiarczkowy. Przeciwciała królików immunizowanych peptydem „podwójnym” rozpoznały ten peptyd co wskazuje że rzeczywiście peptyd ten został związany z immunogenem. Wolny, nie związany z KLH peptyd 12, tak jak żaden niskocząsteczkowy peptyd, nie wywołuje reakcji odpornościowej u królików nie mógł więc spowodować pozytywnego wyniku testu ELISA. Przeciwciała od każdego z królików immunizowanych peptydami odpowiadającymi sekwencjom występującym w receptorze rozpoznawały w teście ELISA receptor TSH izolowany z wytwarzających ten receptor komórek owadzych. Jednakże miano przeciwciał w tej reakcji było znacznie niższe niż w reakcji z odpowiednim peptydem. Receptora nie rozpoznawały surowice kontrolne królików immunizowanych peptydem 18 (Tabela I).

Żaden z peptydów dodany do mieszaniny inkubacyjnej zarówno w teście wiązania TSH z receptorem (TRAK) jak i w teście stymulacji cykazy adenylanowej nie wpływał na aktywność autoprzeciwciał pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa (nie pokazano). Surowice żadnego z immunizowanych królików nie spowodowały zmiany wiązania TSH przez receptor w teście TRAK (Tabela II).

W przeciwieństwie do tych negatywnych wyników test stymulacji cykazy adenylanowej

Tabela I. Charakterystyka surowic odpornościowych królików**Table I.** The characteristic of rabbit antisera

Surowica odpornościowa Antiserum	Stężenie fT ₃ F T ₃ concentration pmol/L	Stężenie fT ₄ F T ₄ concentration pmol/L	Miano z receptorem TSH Titer with TSH receptor	Peptyd użyty do opłaszczenia Coated peptide	Miano z peptydem Titer with the peptide
Ap 19+12A	4,35	18,54	1 600	12	50 000
Ap 19+12B	4,21	9,05	100	12	16 000
Ap 19+12C	3,70	8,93	200	12	8 000
Ap 19+12D	4,12	12,10	100	12	10 000
Ap 19+12 E	6,91	17,93	100	12	25 000
Ap 19+12 F	6,13	19,91	300	12	30 000
Ap 18A	8,06	27,37	neg	18	15 000
Ap 18B	3,79	8,71	neg	18	50 000
Ap 18C	3,73	11,48	neg	18	70 000
Ap 18D	5,79	21,00	neg	18	25 000
Ap18E	5,55	14,81	neg	18	10 000
Ap18F	7,72	19,75	neg	18	25 000
Ap 20A	4,29	17,21	1000	20	60 000
Ap 20B	3,75	13,63	200	20	8 000
Ap 20 C	5,60	23,02	200	20	8 000
Ap. 20D	6,44	24,06	100	20	70 000
Ap 20E	5,21	18,24	300	20	1 000
Ap 20F	5,11	16,53	100	20	10 000

Tabela II. Wpływ surowic odpornościowych na wiązanie TSH z receptorem oraz na stymulację cykazy adenylanowej.**Table II.** The influence of antisera on TSH-receptor binding and on adenylate cyclase stimulation

Surowica odpornościowa Antiserum	% wiązania TSH-receptor % of TSH-receptor binding	Indeks stymulacji cykazy adenylanowej (SI) Adenylate cyclase stimulation indeks (SI)	Relatywny indeks stymulacji cykazy adenylanowej (RSI) Relative adenylate cyclase stimulation indeks (RSI)
Ap 19 +12A	95	4,04*	3,07*
Ap 19+12B	95	0,99	0,76
Ap 19+12C	94	2,53	1,92
Ap 19+12D	94	1,12	0,86
Ap 19+12E	94	1,07	0,81
Ap19+12F	93	4,48*	3,41*
Ap 18A	92	1,29	0,98
Ap 18B	101	1,38	1,04
Ap 18C	101	1,77	1,35
Ap 18D	99	1,43	0,88
Ap 18E	95	0,90	0,69
Ap 18F	101	1,35	1,02
Ap 20A	90	1,61	1,29
Ap 20B	93	1,61	1,22
Ap 20C	89	0,88	0,67
Ap 20D	104	1,76	1,34
Ap 20E	95	1,55	1,19
AP20F	99	1,27	0,96

* $p < 0,05$ w stosunku do średniej dla kontroli Ap 18A-Ap18F

* $p < 0,05$ in relation to mean for the control Ap 18A-Ap 18F

wykazał, że surowice dwóch z sześciu królików immunizowanych peptydem podwójnym, Ap 19+12A i Ap 19+12F, stymulowały, zależną od receptora TSH cyklastę adenylanową w transfekowanych komórkach CHO. Test ten jest powszechnie przyjętym modelem doświadczalnym dla badania aktywności przeciwciał stymulujących receptor TSH. Zarówno indeks stymulacji cykazy adenylanowej przez surowice tych królików jak i relatywny indeks stymulacji był znamienne wyższy w porów-

naniu do indeksu stymulacji przez surowice królików kontrolnych Ap 18A-Ap 18F. Indeks ten był również wyższy, choć w niewielkim stopniu, od indeksu SI=2, przyjętego jako norma dla surowic zdrowych osób. Przeciwciała stymulujące nie powstały u żadnego z królików immunizowanych kontrolnym peptydem 20 czyli peptydem, którego skład w znacznej części odpowiada peptydowi podwójnemu, jednak pozbawiony jest mostka dwusiarczkowego (Tabela II).

Dyskusja

Struktura receptora TSH nie jest do końca poznana choć nagromadzono wiele wstępnych informacji na jej temat. Już w 1995 roku, w oparciu o strukturę inhibitora rybonukleazy, zaproponowano model przestrzenny bogatej w reszty leucyny centralnej części fragmentu pozabłonowego receptora (aminokwasy 36-281) [13]. Znany jest też model części transbłonowej cząsteczki (aminokwasy 410-699). Podobny jest on do części transbłonowej w receptorach innych hormonów współpracujących z regulatorowym białkiem G, a model opracowany został na podstawie analogii budowy z cząsteczką rodopsyną [14, 15]. Przez podobieństwo z tkankowym inhibitorem metaloproteazy 2 zaproponowano model fragmentu cząsteczki receptora pomiędzy częścią transbłonową a częścią bogatą w leucyny [16]. Ostatnio Miguel i wsp [17] uwzględniając powyższe modele oraz dokładnie charakteryzując epitop przeciwciała monoklonalnego o aktywności blokującej wiązanie TSH z receptorem i stymulującego cyklazę adenylanową stworzyli model przestrzenny kompleksu TSH-receptor. Powyższe modele, mimo iż charakteryzują znaczną część cząsteczki receptora, mają wiele luk i jedną z nich jest struktura fragmentu N-końcowego podjednostki A receptora. Dlatego też wydawała się warta zbadania koncepcja Chen i wsp [6] dotycząca występowania w cząsteczce receptora mostka dwusiarczkowego pomiędzy aminokwasami 29 i 41 oraz sugestia, że mostek ten wchodzi w skład epitopu dla autoprzeciwciał występujących u chorych. Obecnie wykazaliśmy, że z 2 z 6 królików immunizowanych peptydem „podwójnym” zawierającym mostek dwusiarczkowy odpowiadający pozycjom 29 i 41 w receptorze TSH wytworzyły przeciwciała stymulujące cyklazę adenylanową w komórkach prezentujących receptor. Kontrolny peptyd 20, o podobnym składzie aminokwasowym, lecz bez mostka dwusiarczkowego odpowiedzi takiej nie wywołał. Otrzymane wyniki wykazały, że peptyd 19+12 może spowodować powstanie przeciwciał stymulujących cyklazę adenylanową. Obejmuje on więc strukturę występującą w receptorze i stanowiącą epitop dla przeciwciał stymulujących, a strukturą tą jest mostek łączący cysteiny 29 i 41.

Stan czynnościowy tarczycy królików syntetyzujących przeciwciała stymulujące nie odbiegał od stanu czynnościowego tarczycy wszystkich pozostałych królików. Pozwalało to przypuszczać, że stymulacja pochodzi rzeczywiście od przeciwciał, a nie od ewentualnego podwyższonego poziomu TSH u tych królików. Fakt, że reakcję uzyskano tylko u dwóch z sześciu immunizowanych królików można tłumaczyć tym, że odpowiedź odpornościowa każdego zwierzęcia jest inna. Natomiast brak wpływu peptydu „podwójnego” na aktywację

cyklazy adenylanowej oraz wpływu tego peptydu i surowic odpornościowych 19+12 A i F na wiązanie TSH w teście TRAK prawdopodobnie wynikają z różnic czułości testów wykonanych w różnych warunkach eksperymentalnych.

Od szeregu lat prowadzono próby stworzenia modelu zwierzęcego choroby Gravesa-Basedowa poprzez immunizację zwierząt preparatami białkowymi lub peptydowymi pochodnymi receptora TSH. Próby te kończyły się niepowodzeniem: zwierzęta nie syntetyzowały przeciwciał stymulujących o wysokim mianie, które by powodowały nadczynność tarczycy [18]. Podobnie w obecnej pracy, uzyskaliśmy wyniki, wskazujące na budowę epitopu przeciwciał stymulujących, lecz nie stworzyliśmy modelu doświadczalnego nadczynności Gravesa-Basedowa. Do stworzenia modelu doświadczalnego tej choroby doprowadziło nowe podejście do immunizacji zwierząt a mianowicie zastąpienie klasycznej immunizacji oczyszczonym antygenem przez immunizację żywymi komórkami prezentującymi antygen [18], a ostatnio, z większym powodzeniem, przez immunizację materiałem genetycznym kodującym antygen. Stymulujące przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko epitopom o charakterze konformacyjnym uzyskano u myszy i u chomika stosując do immunizacji wektor z wbudowanym cDNA całej cząsteczki receptora. [19-23]. Nie stwierdzono, tak jak w naszym przypadku, żeby wytworzenie przeciwciała o aktywności stymulującej tarczycę prowadziło do podwyższenia poziomu wolnej tyroksyny u zwierząt [24]. U myszy uzyskano również stymulujące przeciwciała poliklonalne przy czym większą wydajność otrzymano stosując do immunizacji adenowirus z wektorem kodującym podjednostkę A receptora niż z wektorem kodującym całą cząsteczkę [25, 26]. Stwierdzono też, że immunodominujący dla tych przeciwciał epitop zlokalizowany jest na N-końcu cząsteczki [3]. Obecnie otrzymane wyniki wskazują, że ten N-końcowy epitop przeciwciał stymulujących może obejmować wiązanie cystein w pozycjach 29 i 41 podjednostki A receptora TSH.

Piśmiennictwo

1. Kohn LD, Harii N. Thyrotropin receptor autoantibodies (TSHRABs): epitopes, origins and clinical significance. *Autoimmunity* 2003; 36: 331-337.
2. Kosugi S, Ban T, Kohn LD. Identification of thyroid-stimulating antibody-specific interaction sites in the N-terminal region of thyrotropin receptor. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 114-130.
3. Schwarz-Lauer L, Pichurin PN, Chen CR, Nagayama Y, Paras C, Morris JC, Rapoport B, McLachlan SM. The cysteine-rich amino terminus of the thyrotropin receptor is the immunodominant linear antibody epitope in mice immunized using naked deoxyribonucleic acid or adenovirus vectors. *Endocrinology* 2003; 144: 1718-1725.
4. Kosugi S, Ban T, Akamizu T, Kohn LD. Identification of separate determinants on the thyrotropin receptor reactive with Graves' thyroid-stimulating antibodies and with

thyroid-stimulating blocking antibodies in idiopathic myxedema. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 168-180.

5. Wadsworth HL, Russo D, Nagayama Y, Chazenbalk GD, Rapoport B. Studies on the role amino acids 38-45 in the expression of a functional thyrotropin receptor *Mol Endocrinol* 1992; 6: 394-398.
6. Chen CR, Tanaka K, Chazenbalk GD, McLachlan SM, Rapoport B. A full biological response to autoantibodies in Graves' disease requires a disulfide-bonded loop in the thyrotropin receptor N terminus homologous to a laminin epidermal growth factor-like domain. *J Biol Chem* 2001; 276: 14767-14772.
7. Chazenbalk GD, Latrofa F, McLachlan SM, Rapoport B. Thyroid stimulation does not require antibodies with identical epitopes but does involve recognition of a critical conformation at the N terminus of the thyrotropin receptor A-subunit. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1788-1793.
8. Harlow E, Lane D. *Antibodies, a laboratory manual*, wydawca: Cold Spring Harbor Laboratory 1988
9. Seetharamaiah GS, Kurosky A, Desai B, Dallas JS, Prabhakar BS. A recombinant extracellular domain of the thyrotropin (TSH) receptor binds TSH in the absence of membranes. *Endocrinology* 1994; 134: 549-554.
10. Piotrowska U, Adler G, Gardas A, Gietka-Czernel M, Kaniewski M, Banga JP. Cross-reactivity of a monoclonal antibody to the amino terminal region of thyrotropin receptor with the serum protein alpha1-antitrypsin. *Thyroid* 2002; 12: 563-570.
11. Morgenthaler NG, Pampel I, Aust G, Seissler J, Scherbaum WA. Application of a bioassay with CHO cells for the routine detection of stimulating and blocking autoantibodies to the TSH-receptor. *Hor Metab Res* 1998; 30: 162-168.
12. Morgenthaler NG. New assay systems for thyrotropin receptor antibodies. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes* 1999; 6: 251-260.
13. Kajava AV, Vassart G, Wodak SJ. Modeling of the three-dimensional structure of protein with the typical leucine-rich repeats. *Structure* 1995; 3: 867-877.
14. Biebermann H, Schoneberg , Schulz A, Krause G, Gruters A, Schultz G, Gudermann T. A conserved tyrosine residue (Y601) in transmembrane domain 5 of the human thyrotropin receptor serves as a molecular switch to determine G-protein coupling. *FASEB J* 1998; 12: 1461-1471.
15. Neumann S, Krause G, Chey S, Paschke R. A free carboxylate oxygen in the side chain of position 674 in transmembrane domain 7 is necessary for TSH receptor activation. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 1294-1305.
16. Miguel RN, Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, Blundell TL, Furmaniak J, Rees Smith B. Thyrotropin receptor cleavage domain and tissue inhibitor of metalloprotease-2. *Thyroid* 2003; 13: 665-666.
17. Miguel RN, Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, Evans M, Richards T, Blundell TL, Rees Smith B, Furmaniak J. Analysis of the thyrotropin receptor-thyrotropin interaction by comparative modeling. *Thyroid* 2004; 14: 991-1011.
18. McLachlan SM, Rapoport B. Thyroid stimulating monoclonal antibodies: overcoming the road blocks and the way forward. *Clin Endocrinol* 2004; 61: 10-18.
19. Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, Richards T, Evans M, Kiddie A, Brereton K, Groenen M, Oda Y, Furmaniak J, Rees Smith B. Thyroid-stimulating monoclonal antibodies. *Thyroid* 2002; 12: 1043-1050.
20. Costagliola S, Franssen JD, Bonomi M, Urizar E, Willnich M, Bergmann A, Vassart G. Generation of a mouse monoclonal TSH receptor antibody with stimulating activity. *Biochim Biophys Res Commun* 2002; 299: 891-896.
21. Ando T, Latif R, Pritsker A, Moran T, Nagayama Y, Davies TF. A monoclonal thyroid-stimulating antibody. *J Clin Invest* 2002; 110: 1667-1674.
22. Ando T, Latif R, Davies TF. Concentration-dependent regulation of thyrotropin receptor function by thyroid-stimulating antibody. *J Clin Invest* 2004; 113: 1589-95
23. Barrett K, Liakata E, Rao PV, Watson PF, Weetman AP, Lymberi P, Banga JP, Carayanniotis G. Induction of hyperthyroidism in mice by intradermal immunization with DNA encoding the thyrotropin receptor. *Clin Experimental Immunol* 2004; 136: 413-19.
24. Costagliola S, Rodien P, Many MC, Ludgate M, Vassart G. Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor. *J Immunol* 1998; 160: 1458-1465
25. Chen CR, Pichurin P, Chazenbalk GD, Aliesky H, Nagayama Y, McLachlan SM, Rapoport B. Low-dose immunization with adenovirus expressing the thyroid-stimulating hormone receptor A-subunit deviates the antibody response toward that of autoantibodies in human Graves' disease. *Endocrinology* 2004; 145: 228-233.
26. Chen CR, Pichurin P, Nagayama Y, Latrofa F, Rapoport B, McLachlan SM. The thyrotropin receptor autoantigen in Graves disease is the culprit as well as the victim. *J Clin Invest* 2003; 111: 1897-1904.