

Аутоантитела к тирозил-тРНК синтетазе модулируют ее аминокцилирующую активность

Л. Л. Сидорик*, Н. В. Роднин, Л. А. Савинская, Т. А. Рибкинска, О. Т. Рожко, А. И. Корнелюк, Г. Х. Мацука

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

При системных аутоиммунных заболеваниях выявляются аутоантитела против многих белков и рибонуклеопротеидов — компонентов аппарата трансляции. Ранее нами было сообщено о выявлении аутоантител против серил-тРНК синтетазы у больных системной красной волчанкой и ревматоидным артритом. В данной работе нами охарактеризованы аутоантитела против другого компонента аппарата трансляции — тирозил-тРНК синтетазы. В то время как поликлональные антитела ингибировали аминокцилирующую активность фермента до 30 % базового уровня, аутоантитела из аутоиммунных сывороток активировали фермент до 280 % базового уровня, чего не наблюдалось для других исследованных в этом направлении аминокцил-тРНК синтетаз. Обсуждаются возможные причины подобного феномена.

Введение. Аминокцил-тРНК синтетазы (АРСазаы, КФ 6. 1. 1) образуют самую многочисленную группу ферментов, участвующих в реализации генетической информации. Они играют ключевую роль в биосинтезе белка, катализируя высокоспецифическое формирование аминокцил-тРНК [1, 2]. Удивительное сочетание единства функций (активация аминокцилот и перенос их на специфичные тРНК) с разнообразием размеров (от 40 до 300 кДа) и субъединичного строения (α_1 -, α_2 -, $\alpha_2\beta_2$ - и α_4 -типы), описанные неканонические функции некоторых синтетаз [3] и широкое распределение их не только в цитоплазме, но и в ядре эукариотической клетки вызвало в последнее время волну повышенного интереса исследователей [4, 5].

Клеточная биология и клеточная физиология синтетаз эукариот практически не изучены: это обусловлено, в первую очередь, несовершенством и неразвитостью методов детального изучения функционирования и значения эукариотических АРСаз *in vivo*. Нам кажется весьма перспективным исследование белоксинтезирующего аппарата клетки с применением комплексного подхода — разумного сочетания молекулярно-биологических, биохимических и иммуно-химических методов. Неоценимым инструментом исследований здесь являются аутоантитела, возникающие как при аутоиммунных патологиях против собственных антигенов, так и существующие у здоровых особей (так называемые natural antibodies — NAA). Последние данные о свойствах NAA [6], отличных от таковых у антител, получаемых иммунизацией подопытных животных (известных как provoke antibodies),

*Correspondence address.

© Л. Л. СИДОРИК, Н. В. РОДНИН, Л. А. САВИНСКАЯ, Т. А. РИБКИНСКА, О. Т. РОЖКО, А. И. КОРНЕЛЮК, Г. Х. МАЦУКА, 1996

а также новые представления о природе антигенности и иммуногенности компонентов клетки и организма позволяют более корректно экстраполировать данные, полученные с помощью NAA, на условия *in vivo* [7, 8].

Аутоантитела к АРСазам (антисинтетазы) впервые описаны у больных полимиозитом/дерматомиозитом (ПМ/ДМ) и миозит-ассоциированным синдромом [9, 10]. Наиболее часто встречались аутоантитела к гистицил-тРНК синтетазе (>30 % пациентов), реже — к другим синтетазам [10]. Описаны свойства аутоантител к треонил-, аланил-, изолейцил- и глицил-тРНК синтетазам при ПМ/ДМ [11—14], есть сообщение об обнаружении аутоантител против фенилаланил-, триптофанил- и тирозил-тРНК синтетаз у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) и ревматоидным артритом (РА), хотя детально их свойства исследованы не были [15].

В последнее время нами проводятся интенсивные исследования аутоантителогенеза против синтетаз двух основных структурных классов: тирозиновой (I класс) и сериновой (II класс) при системных аутоиммунных заболеваниях. Ранее были изучены некоторые характеристики эукариотической тирозил-тРНК синтетазы (КФ 6. 1. 1. 1) на примере ТирРС печени быка с помощью поликлональных и моноклональных антител, полученных нами, а также иммунологический перекрест ТирРС у представителей различных таксонов про- и эукариот [16]. В данной работе представлены результаты исследования влияния аутоантител к ТирРС, очищенных из сывороток пациентов с СКВ и РА, на ферментативную активность антигена в реакции аминокислотирования.

Материалы и методы. Функционально активную протеолитически модифицированную форму тирозил-тРНК синтетазы (М, 2×39 кДа) получали по методу [17] с некоторыми модификациями, используя фракционирование белков 50 %-м раствором ПЭГ-6000 («Ferah», ФРГ); хроматографию полученного осадка (6—9 %) осуществляли на ДЭАЭ-целлюлозе «Whatman» (Англия) в трис-НСl-буфере, рН 7,9; фосфоцеллюлозе в калий-фосфатном буфере, рН 6,8; гепарин-сефарозе в трис-НСl-буфере, рН 7,5. Тирозил-тРНК синтетазную активность определяли по начальной скорости образования аминокислот-тРНК [17].

Чистоту полученного белка контролировали электрофоретически в ПА-АГ по методу Лэммли [18] в денатурирующих условиях.

Исследовали 10 сывороток крови больных РА, 17 — СКВ и 10 — от здоровых доноров, любезно предоставленные Институтом кардиологии им. Стражеско Минздрава Украины (Киев).

Наличие аутоантител в сыворотках крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) [20].

Контрольными антигенами служили миозин и актин сердца человека, полученные нами по описанному методу [19], ДНК спермы лосося («Sigma», USA) и гаптен тринитрофенол — TNP («Sigma»).

Иммуноферментный анализ. Антиген сорбировали на 96-луночные планшеты в концентрации 10 мкг/мл в PBS-буфере (0,05 М Na-фосфат, 0,15 М NaCl, рН 7,3) в течение 14 ч при температуре 4 °С или 2 ч при 37 °С. ELISA проводили по описанному методу [20]. В качестве блокирующего буфера использовали PBS с 0,1 %-м Tween-20 и 0,5 %-й желатиной (PBS-T-Gel).

Оптическую плотность при длине волны 405 нм измеряли на спектрофотометре «Multiscan» фирмы «Titertek» (Англия). В качестве проявляющего агента использовали биотинилированные иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов классов IgG и IgM человека и конъюгат авидин — пероксидаза («Amersham», Англия). Для контроля неспецифической сорбции использовали сывороточный альбумин человека (ЧСА) («Sigma»).

Данные по ELISA обсчитывали, как описано [20].

Выделение аутоантител методом аффинной хроматографии. Аффинную колонку готовили следующим образом: аффигель-10 (0,5 мл суспензии) помещали в бюкхнеровскую воронку и последовательно промывали 2-пропанолом, водой и 0,1 М раствором NaHCO_3 , pH 8,6. Белок диализовали в течение ночи против этого же раствора, затем смешивали с аффигелем в соотношении 1:1 (по объему), ставили на качалку на 15–20 ч для связывания белка с носителем. Для блокирования свободных сайтов сорбент промывали последовательно 0,2 М раствором этаноламина, а затем PBS, pH 7,2. Концентрация иммобилизованного антигена 1 мг/мл геля.

Сыворотки, имеющие наиболее высокий титр аутоантител, разбавляли раствором PBS до суммарной концентрации белка 8–9 мг/мл и наносили на аффинную колонку по циклу в течение ночи. Емкость аффинной колонки — 60–70 мг суммарного белка сыворотки в 1 мл сорбента. Колонку промывали последовательно пятью объемами PBS с 0,5 М NaCl , 10 объемами PBS, фракции элюировали 0,2 М глицином, pH 2,5, нейтрализуя немедленно 2 М раствором трис- HCl , pH 10,0. Фракции объединяли и диализовали в течение ночи против раствора PBS, pH 7,3, с одновременным концентрированием (PBS с 10 % ПЭГ-20000).

Чистоту полученных аутоантител контролировали электрофорезом по Лэммли, а их специфичность — методом ELISA.

Получение поликлональных антител и их аффинная очистка. Кроликов иммунизировали высокоочищенным препаратом ТирРС по методу [21] с некоторыми модификациями. Одному кролику вводили 50 мкг фермента в полном адьюванте Фрейнда. Через 8 недель кроликов повторно иммунизировали тем же количеством антигена, спустя 4 недели в третий раз вводили 100 мкг фермента в PBS-буфере. На 8-й день после третьей иммунизации проверяли титр сыворотки крови кроликов на содержание специфических антител к ТирРС методом ELISA. Фракцию иммуноглобулинов получали из антисыворотки трехкратным последовательным высаливанием насыщенным раствором сульфата аммония до 50 % насыщения. Осадок диализовали против PBS и очищали на аффинной колонке по вышеописанному методу.

Влияние аутоантител на ферментативную активность ТирРС в реакции аминокислотирования. Высокоочищенный препарат фермента (ТирРС, 1 мкг) инкубировали (15 мин, 20 °С) с варьирующими количествами аутоантител, аффинно очищенных из сывороток пациентов с СКВ и РА. Объем смеси 20 мкл. Затем добавляли смесь для аминокислотирования до конечного объема 0,1 мл и инкубировали 3 мин при 37 °С (условия, оптимальные для ТирРС в реакции аминокислотирования). Антитела предварительно диализовали против калий-фосфатного буфера, поскольку PBS снижает активность ТирРС. Состав смеси для аминокислотирования: 100 мМ трис- HCl , pH 8,0, 4 мМ MgCl_2 , 2 мМ АТФ, 200 мкг суммарной дрожжевой τ РНК («Boehringer», ФРГ), 18 мкМ [^{14}C]-Тир. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл холодной 10 %-й ТХУ. Пробы наносили на фильтры GF/C («Whatman»), промывали холодной 5 %-й ТХУ, подсушивали и просчитывали включение метки в толуольном сцинтилляторе на жидкостном счетчике «Rack Beta» («LKB», Швеция). Положительным контролем служили пробы фермента, инкубированные со смесью для аминокислотирования в отсутствие аутоантител. Для контроля на специфичность влияния аутоантител пробы инкубировали с аутоантителами против СерРС, аффинно очищенными из сывороток пациентов с СКВ и РА, влияющими на ферментативную активность СерРС при аминокислотировании. Отрицательный контроль — пробы аутоантител, инкубированные со смесью для аминокислотирования ТирРС без фермента. В качестве контрольных антигенов использовали СерРС печени быка, выделенную нами по методу [22] и ЧСА.

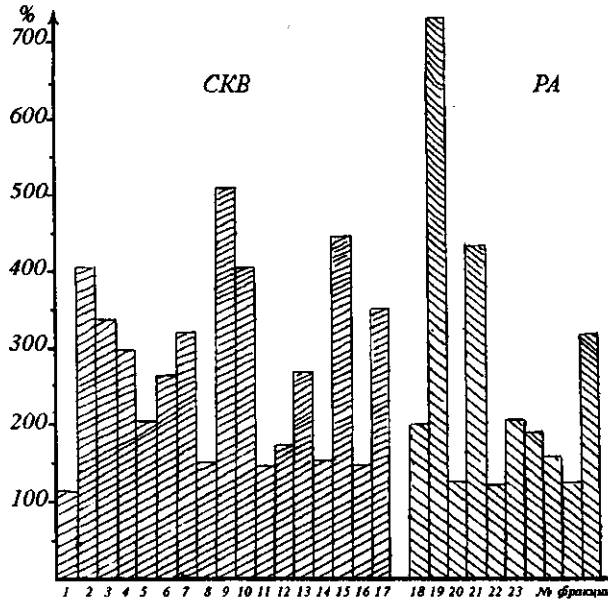


Рис. 1. Иммунореактивность сывороток крови больных системными аутоиммунными заболеваниями (системная красная волчанка и ревматоидный артрит) против ТирРС, определяемая в реакции ELISA

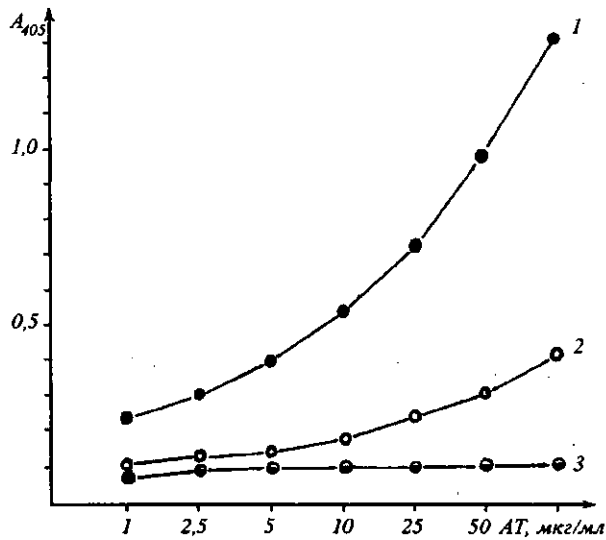


Рис. 2. Определение иммунореактивности антител против ТирРС: 1 — поликлональные моноспецифические антитела; 2, 3 — аффинно очищенные аутоантитела против ТирРС и СерРС соответственно

Результаты и обсуждение. На рис. 1 и 2 представлены данные, характеризующие иммунореактивность сывороток пациентов с СКВ и РА против ТирРС в реакции ELISA по отношению к уровню иммунореактивности здоровых доноров. Предварительно нами были определены концентрации IgG и IgM во всех исследуемых сыворотках [25]. Так как уровень иммунного ответа против ТирРС не зависел от относительного содержания IgG и IgM, можно считать, что выделенные нами аутоантитела против ТирРС являются высокоспецифичными по отношению к исследуемому антигену.

По данным ELISA, наибольший титр аутоантител к ТирРС содержали сыворотки №-№ 9 и 15 больных СКВ и № 2 — РА, из которых методом аффинной хроматографии аутоантитела были очищены для дальнейших исследований. Аффинно очищенные аутоантитела принадлежали к IgG-типу.

Поликлональные и аутоантитела очищали методом аффинной хроматографии на синтезированной нами колонке. На рис. 2 приведены результаты сравнительного иммунотитрования моноспецифических (аффинно очищенных поликлональных антител) и аутоантител, аффинно очищенных по ранее описанному методу. Из них следует, что аутоантитела (рис. 2, б) обладают более низкой аффинностью, чем поликлональные антитела (рис. 2, а), что согласуется с литературными данными о природе и свойствах аутоантител.

Влияние антител на функциональную активность ТирРС в реакции аминокислотирования. На рис. 3 представлена зависимость активности ТирРС в реакции аминокислотирования от концентрации вносимых в инкубационную смесь аффинно очищенных ауто- и поликлональных антител. Аффинно очищенные поликлональные антитела (рис. 3, кривая 2) ингибировали действие ТирРС в реакции аминокислотирования (30,2 % остаточной активности при концентрации антител 300 мкг/мл), что совпадает с литературными данными о влиянии поликлональных антител на ферментативную активность других синтетаз в реакции аминокислотирования [23, 24]. Неполное ингибирование ферментативной активности исследуемого антигена моноспецифическими антителами даже при большом их избытке можно объяснить, исходя из свойств provoked antibodies и autoantibodies [7, 8]. Поскольку поликлональные антитела направлены преимущественно против детерминант линейного типа функционально несущественных доменов антигена, то и влияние их на ферментативную активность исследуемых антигенов (в нашем случае ТирРС) проявляется в неполном ингибировании аминокислотизирующей активности.

Аутоантитела, аффинно очищенные из сывороток пациентов с РА и СКВ, оказывали активирующее действие на реакцию аминокислотирования

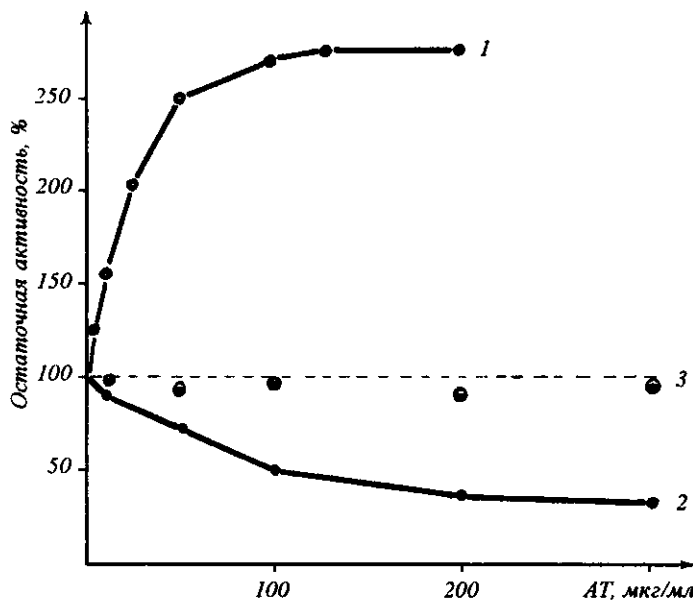


Рис. 3. Влияние антител на аминокислотизирующую активность ТирРС: 1 — аффинно очищенные аутоантитела против ТирРС; 2 — поликлональные моноспецифические антитела; 3 — аффинно очищенные аутоантитела против СерРС

(рис. 3, кривая 1). Чтобы исключить предполагаемое энзиматическое действие аутоантител, их инкубировали в смеси без фермента, что дало отрицательный результат — аминокцилирования не происходило. Из литературы известен ряд аутоантител против аминокцил-тРНК синтетаз, обладающих ингибирующим действием на соответствующий фермент (His-, Thr-, Ala-, SerRS) [11—14, 25]. В данном случае аутоантитела оказывали противоположное действие, подобных примеров не встречалось ни для одной из описанных антисинтетаз. Данный феномен можно объяснить исходя из того, что все описанные антисинтетазы иммунопреципитировали одну или более изоакцепторных тРНК из лизата клеток HeLa. Это свидетельствует о связи селектированных тРНК с антигенами. В большинстве случаев аутоантитела не реагируют с этими тРНК прямо, хотя взаимодействуют с аминокцил-тРНК синтетазами даже при удалении тРНК [12]. Вероятно, иммунопреципитация тРНК является непрямым результатом связывания синтетазных белков, которые высокоаффинны к их специфичным тРНК. С другой стороны, на примере аутоантител к AlaRS и тРНК^{Ala} показано, что все тестированные анти-AlaRS сыворотки реагировали со сходным участком тРНК (от 7 до 12 пар оснований), включая антикодон [13]. Но после удаления аутоантител к тРНК^{Ala} оставшиеся тРНК были способны иммунопреципитировать AlaRS, но не тРНК, что может служить индикатором реакции на тРНК-связующий сайт. Вероятно, аутоантитела способны защищать тРНК-связующие сайты и могут увеличивать аффинность тРНК к синтетазе. Это может быть одним из возможных объяснений активирующего влияния аутоантител к тирозил-тРНК синтетазе на ее ферментативную активность в реакции аминокцилирования. Но в этом случае нам предстоит выяснить природу данных аутоантител, так как подобный феномен возможен, скорее всего, если данные аутоантитела имеют антиидиотипическую природу [26].

Исследуемые антитела — natural antibodies, которые взаимодействуют в организме с огромным количеством собственных компонентов, формируют при этом экстенсивные иммунные цепи. Через эти цепи NAA вовлекаются во множественные взаимодействия с молекулами и клетками, участвующими в общем гомеостазе организма.

Пока неясно, играют ли аутоантитела к синтетазам при системных аутоиммунных заболеваниях патологическую роль, но выяснение механизма формирования этих аутоантител было бы важным для понимания этиологии и патогенеза названных заболеваний.

Л. Л. Сидорик, М. В. Роднін, Л. О. Савинська, Т. О. Рибкінська, О. Т. Рожко, О. І. Корнелюк, Г. Х. Мацука

Аутоантитіла до тирозил-тРНК синтетази модулюють її аміноацилюючу активність

Резюме

При системних аутоімунних захворюваннях виявляються аутоантитіла проти багатьох білків та рибонуклеопротеїдів — компонентів апарату трансляції. Раніше нами було повідомлено про виявлення аутоантитіл проти серил-тРНК синтетази у хворих на системну червону вовчанку та ревматоїдний артрит. У даній роботі нами виявлено аутоантитіла проти іншого компоненту апарату трансляції — тирозил-тРНК синтетази. У той час як поліклональні антитіла пригнічували аміноацилюючу активність ферменту до 30 % від базового рівня, аутоантитіла з аутоімунних сироваток мали активуючий вплив на фермент до 280 % від базового рівня, чого не спостерігалось для інших досліджених у цьому напрямі аміноацил-тРНК синтетаз. Обговорюються можливі причини цього феномену.

L. L. Sidorik, N. V. Rodnin, L. A. Savinskaya, T. A. Ribkinska, O. T. Rozhko, A. I. Korneliuk, G. H. Matsuka

Autoantibodies directed against tyrosyl-tRNA synthetase modulate its aminoacylating activity

Summary

The autoantibodies directed against many proteins and ribonucleoproteids, the components of translation apparatus, have been detected at several systemic autoimmune diseases. Earlier we revealed the autoantibodies against seryl-tRNA synthetase in the blood sera of patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. In the present paper we report about the autoantibodies directed against tyrosyl-tRNA synthetase, the other translation apparatus component. While the polyclonal antibodies inhibited the aminoacylating activity of TyrRS down to 30%, the autoantibodies from autoimmune sera activated it up to 280% that hasn't been observed for any other synthetase. The possible reasons of this phenomenon are discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоксил-тРНК.—М.: Наука, 1984.—408 с.
2. Schimmel P. Aminoacyl-tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationship in the polypeptide and recognition of tRNAs // *Annu. Rev. Biochem.*—1987.—56.—P. 125—158.
3. Киселев Л. Л. Аминоксил-тРНК синтетазы (кодазы) и их неканонические функции (Энгельгардтовские чтения) // *Молекуляр. биология.*—1990.—24.—С. 1445.
4. Попенко В. И., Черни Н. Е., Берестень С. Ф. и др. Иммуноэлектронно-микроскопическое определение локализации триптофанил-тРНК синтетазы в клетках бактерий и высших эукариот // Там же.—1989.—23, № 6.—С. 1669—1681.
5. Сидорик Л. Л., Попенко В. И., Черни Н. Е. и др. Иммуноэлектронно-микроскопическая локализация серил-тРНК синтетазы в клетках эукариот // *Биополимеры и клетка.*—1990.—6, № 2.—С. 72.
6. Avrameas S. Natural autoantibodies: from horror autotoxins to gnothi seation // *Immunol. Today.*—1991.—12.—P. 154.
7. Chan E. K. L., Tan E. M. Human autoantibody-reactive epitopes of SS-B/La are highly conserved in comparison with epitopes recognized by murine monoclonal antibodies // *J. Exp. Med.*—1987.—166.—P. 1627.
8. Tan E. M., Reimer G., Sullivan K. Intracellular autoantigens: Diagnostic fingerprints but aetiological dilemmas // *Ciba foundation symp. «Autoimmunity and Autoimmune Disease».*—Chichester: Wiley, 1987.—P. 25—42.
9. Mathews M. B., Bernstein R. M. Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity // *Nature.*—1983.—304.—P. 177.
10. Targoff I. N. Autoantibodies in polymyositis // *Antinuclear antibodies.*—New York: Acad. press, 1993.—686 p.
11. Mathews M. B., Reichlin M., Hughes G. R. V., Bernstein R. M. Anti-threonyl-tRNA synthetase, a second myositis-related autoantibody // *J. Exp. Med.*—1984.—160.—P. 420.
12. Bunn C. C., Bernstein R. M., Mathews M. B. Autoantibodies against alanyl-tRNA synthetase and tRNA coexist and are associated with myositis // *Ibid.*—1986.—163.—P. 1281.
13. Bunn C. C., Mathews M. B. Autoreactive epitope defined as the anticodon region of alanine transfer RNA // *Science.*—1987.—238.—P. 1116—1119.
14. Targoff I. N. Autoantibodies to aminoacyl-transfer RNA synthetases for isoleucine and glycine: two additional synthetases are antigenic in myositis // *J. Immunol.*—1990.—144.—P. 1743.
15. Вартамян О. А. Выявление в сыворотках больных аутоиммунными заболеваниями аутоантител против фенилаланил-, тирозил- и триптофанил-тРНК синтетаз и антидиотипических антител к ним // *Молекуляр. биология.*—1991.—25.—С. 1033.
16. Рибкинска Т. А., Корнелюк А. И., Берестень С. Ф., Мацука Г. Х. Иммунохимический подход к изучению структуры тирозил-тРНК из печени быка // *Биополимеры и клетка.*—1991.—7, №5.—С. 33—36.
17. Корнелюк А. И., Курочкин И. В., Мацука Г. Х. Тирозил-тРНК-синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства // *Молекуляр. биология.*—1988.—22, № 1.—С. 176—186.
18. Laemmli U. K. Cleavage proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—227.—P. 680—685.
19. Бобык В. И., Веберов А. В., Рябенко Д. В. и др. Выделение основных тканеспецифических белков из миокарда здоровых лиц и больных дилатационной кардиомиопатией // *Биополимеры и клетка.*—1993.—9, № 6.—С. 91.

20. Ternynck T., Bleux C., Gregoire Y. et al. Comparison between autoantibodies during *Trypanosoma cruzi* infection in mice and natural autoantibodies // J. Immunol.—1990.—144.—P. 1504.
21. Baily B. S. The production of antisera // Meth. Mol. Biol.—1984.—P. 295—300.
22. Гудзера О. И., Сидорик Л. Л., Золотухина И. М. и др. Выделение серил-тРНК синтетазы из печени животных экспресс-методом // Биополимеры и клетка.—1990.—6, № 2.—С. 105.
23. Sidorik L. L., Gudzera O. I., Dragovoz V. A. et al. Immunochemical non-cross-reactivity between eukaryotic and prokaryotic seryl-tRNA synthetases // FEBS Let.—1991.—292.—P. 76.
24. Берестень С. Ф., Филоненко В. В., Фаворова О. О. Иммунохимическое изучение триптофанил-тРНК синтетаз // Биохимия.—1991.—56, № 7.—С. 1155—1189.
25. Сидорик Л. Л. Серил-тРНК синтетаза — новый аутоантиген при системных аутоиммунных заболеваниях // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 3—4.—С. 68—74.
26. Dang C. V., Dang C. V. Higher eukaryotic aminoacyl-tRNA in physiologic and pathologic states // Mol. and Cell. Biochem.—1986.—71.—P. 107—120.