

СЕРИЛ-тРНК СИНТЕТАЗА — НОВЫЙ АУТОАНТИГЕН ПРИ СИСТЕМНЫХ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Аутоантитела к компонентам аппарата трансляции, включая некоторые аминокцил-тРНК синтетазы и рибосомные белки, идентифицированы в сыворотках пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), ревматоидным артритом (РА), поли- и дерматомиозитами.

Обнаружены аутоантитела к новому аутоантигену — серил-тРНК синтетазе (КФ 6.1.1.11) — в сыворотках пациентов с СКВ и РА методом ELISA. Определенный уровень данных аутоантител отмечен и в сыворотках здоровых доноров.

Методом ELISA и дот-блот-анализа исследована иммунореактивность данных аутоантител. Выявлено, что аутоантитела к серил-тРНК синтетазе при системных аутоиммунных заболеваниях более выражено ингибируют функциональную активность серил-тРНК синтетазы в реакции аминокцилирования по сравнению с моноспецифическими антителами к тому же антигену. Полученные результаты, а также опубликованные данные о структуре и свойствах аутоантител позволяют считать использование аутоантител перспективным подходом для получения новой информации о структуре и свойствах компонентов белоксинтезирующего аппарата клетки и их функциональной связи в процессе трансляции.

Введение. Использование комплексного подхода в изучении компонентов аппарата трансляции (сочетание биохимических, молекулярно-биологических и иммунохимических методов) позволяет получить новую информацию не только о структуре и свойствах аминокцил-тРНК синтетаз, рибосом, рибосомных белков и факторов, об особенностях их взаимодействия в процессе трансляции, но и расширяет возможности анализа их нетрадиционных функций, отличных от участия в белковом синтезе (как, например, участие аминокцил-тРНК синтетаз в сплайсинге, в регуляции инициации трансляции, в синтезе Ар₄A и др.) [1].

Интересным и важным как с теоретической, так и практической точек зрения представляется исследование функционирования аппарата трансляции в норме и при различных аутоиммунных патологиях [2, 3]. Идиопатические воспалительные миопатии человека были первыми аутоиммунными заболеваниями, при изучении которых обнаружены аутоантитела к компонентам белоксинтезирующего аппарата [4, 18]. Первыми были выявлены аутоантитела к гистидил-, треонил- и аланил-тРНК синтетазам [4—6]. Следующими аутоантигенами, к которым обнаружены аутоантитела, были изолейцил- и глицил-тРНК синтетазы [7]. Позднее появилось сообщение об идентификации в сыворотках больных системной красной волчанкой (СКВ) и ревматоидным артритом (РА) аутоантител к еще трем цитоплазматическим антигенам — фенилаланил-, тирозил- и триптофанил-тРНК синтетазам, а также о выявлении антиидиотипических антител к данным антигенам [8]. Были обнаружены также аутоантитела к рибосомам и рибосомным белкам зукариот [9].

Нами исследованы сыворотки больных СКВ и РА на наличие аутоантител к еще одному ферменту системы трансляции — серил-тРНК синтетазе (КФ 6.1.1.11). Данный фермент относится к аминокцил-тРНК синтетазам второго класса. Ранее мы проанализировали физико-химические и некоторые иммунохимические свойства указан-

ного белка, а также исследовали локализацию СерРС в клетках высших эукариот методом иммуноэлектронной микроскопии [10—12]. Цель нашей дальнейшей работы состояла в идентификации аутоантител в сыворотках аутоиммунных больных к серил-тРНК синтетазе (СерРС), а также в выделении подобных аутоантител методом аффинной хроматографии и исследовании их влияния на ферментативную активность этого аутоантигена. Опубликованные данные о свойствах аутоантител (natural antibodies), отличных от таковых антител, получаемых иммунизацией лабораторных животных (provocated antibodies) [13, 14], а также новые представления о природе антигенности и иммуногенности белков [15] позволяют считать использование аутоантител не только эффективным подходом для решения многих вопросов, связанных с функционированием белоксинтезирующей машины клетки, но и новым направлением исследований в функциональной энзимологии.

Материалы и методы. Исследовали 10 сывороток больных РА, 10 — СКВ и 10 от здоровых доноров. Сыворотки любезно предоставлены Ин-том кардиологии им. Стражеско АМН Украины, Киев.

Наличие аутоантител в сыворотках определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

В качестве антигенов использовали высокоочищенную СерРС печени быка, выделенную по описанному методу [10], и триптофанил-тРНК синтетазу поджелудочной железы быка (ТриРС). Маркерными антигенами служили миозин и актин сердца человека, полученные нами по методу [16], а также ДНК спермы лосося («Sigma», США) и гаптен тринитрофенил — TNP («Sigma», США).

Иммуноферментный анализ. Содержание антител к СерРС определяли методом ELISA. Антигены сорбировали на 96-луночные планшеты («Costar», США) в концентрации 10 мкг/мл в PBS-буфере (0,05 М Na-фосфат, 0,15 М NaCl, pH 7,3) в течение 14 ч при 4 °С или 2 ч при 37 °С. ELISA проводили по описанному методу [17]. 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 Titertek (Англия). В качестве проявляющего агента использовали иммуноглобулины IgG кролика против цельной молекулы IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (БиоС, Новосибирск). Для контроля неспецифической сорбции применяли человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) («Sigma»).

Контролем служили стандартные сыворотки фирмы «Boehringer Mannheim» (Германия).

Обсчет данных по ELISA проводили, как описано [17].

Перед иммунотитрованием в реакции ELISA во всех исследуемых сыворотках определяли содержание IgG и IgM (относительно стандартных сывороток) для дальнейшей стандартизации полученных данных.

Выделение аутоантител методом аффинной хроматографии. Аффинную колонку с антигеном — высокоочищенной СерРС печени быка (95 % чистоты) — синтезировали, как описано ранее [11]. Аффинную очистку аутоантител из сывороток пациентов с аутоиммунными заболеваниями проводили по методу [11].

Влияние аутоантител на ферментативную активность СерРС. Для исследования влияния аутоантител на ферментативную активность СерРС высокоочищенный препарат фермента (1 мкг) инкубировали в течение 15 мин при 20 °С с варьирующими количествами аутоантител, аффинно очищенных из сывороток пациентов с СКВ и РА на колонке с СерРС. Объем инкубационной смеси 20 мкл. Затем добавляли смесь для аминокцилирования [10] до конечного объема 0,1 мл и инкубировали 3 мин при 37 °С — в условиях, оптимальных для работы СерРС в реакции аминокцилирования. Антитела предварительно диализовали против PBS-буфера, не влияюще-

го на активность СерРС. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл холодной 10 %-й ТХУ. Пробы наносили на фильтры CF/C («Whatman», Англия), 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; при отрицательном контроле фермент инкубировали с моноклональными антителами Ам2, влияющими на ферментативную активность

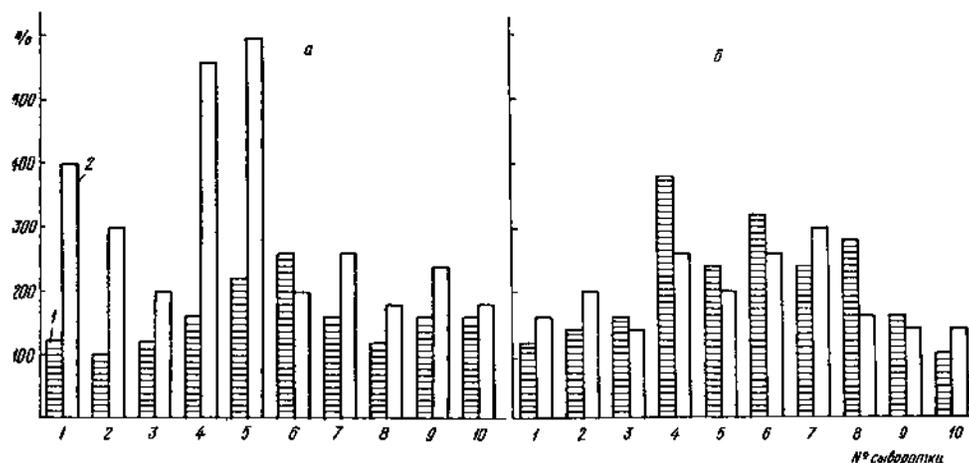


Рис. 1. Иммунореактивность сывороток пациентов с СКВ (а) и РА (б) по данным реакции ELISA: 1 — IgM; 2 — IgG. Обсчет данных проводили, как описано в «Материалах и методах»

ТрпРС. В качестве контрольных антигенов использовали ТрпРС поджелудочной железы быка и ЧСА.

Результаты и обсуждение. В таблице содержатся данные по исследованию иммуноактивности аутоиммунных сывороток против СерРС при системных аутоиммунных заболеваниях (СКВ и РА). Там же приведены значения концентраций IgG и IgM в сыворотках пациентов с аутоиммунными заболеваниями и здоровых доноров. Видно, что содержание IgG и IgM в исследуемых сыворотках различно и не зависит от вида и степени заболевания.

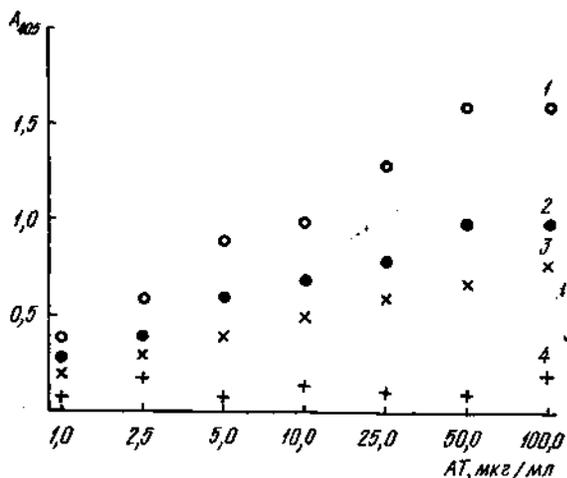
Концентрация иммуноглобулинов классов М и G в сыворотках пациентов с системными аутоиммунными заболеваниями

№ сыворотки	IgM, мг/мл	IgG, мг/мл	№ сыворотки	IgM, мг/мл	IgG, мг/мл
1	1,18	26,43	17	1,3	19,5
2	3,6	23,47	18	2,23	25,6
3	1,7	30,35	19	0,9	13,5
4	3,02	14,63	20	0,92	13,7
5	2,48	14,12	21	1,33	14,65
6	1,9	7,7	22	2,29	18,61
7	1,2	18,77	23	0,98	20,48
8	0,9	14,82	24	1,33	19,92
9	0,5	14,5	25	1,1	22,53
10	0,8	14,08	26	2,1	18,17
11	1,97	11,2	27	0,94	15,17
12	0,95	19,5	28	2,23	17,07
13	1,02	13,2	29	0,5	15,22
14	0,9	26,42	30	1,26	16,56
15	0,95	6,7	K	1,41	12,8
16	0,58	12,24			

Примечание. №№1-10 — сыворотки больных СКВ; №№11-20 — сыворотки больных РА; №№21-30 — сыворотки клинически здоровых доноров; К — стандарт сыворотки.

Рис. 1 и 2 иллюстрируют результаты, дающие представление об иммунореактивности сывороток пациентов с СКВ и РА против СерРС в реакции ELISA по отношению к уровню иммунореактивности сывороток здоровых доноров. Из этих данных видно, что иммунореактивность сывороток пациентов с аутоиммунными заболеваниями в целом значительно выше, чем у здоровых доноров, хотя степень иммунного ответа индивидуальна. Пациенты с СКВ обладают большей иммуно-

Рис. 2. Иммунореактивность аффинно очищенных из СКВ- и РА-сывороток аутоантител по данным реакции ELISA. Аутоантитела очищены на колонке с высокоочищенным препаратом СерРС, как описано в «Материалах и методах»: 1 — моноспецифические антитела к СерРС; 2, 3 — аутоантитела, аффинно очищенные из РА-сыворотки № 6 и СКВ-сыворотки № 4 соответственно; 4 — моноклональные антитела Am2 к ТрпРС



реактивностью по IgG-типу, тогда как пациенты с РА — по IgM-типу аутоантител. При сопоставлении полученных результатов с концентрацией иммуноглобулинов в исследуемых сыворотках видно, что уровень иммунного ответа не зависит от относительного содержания IgG и

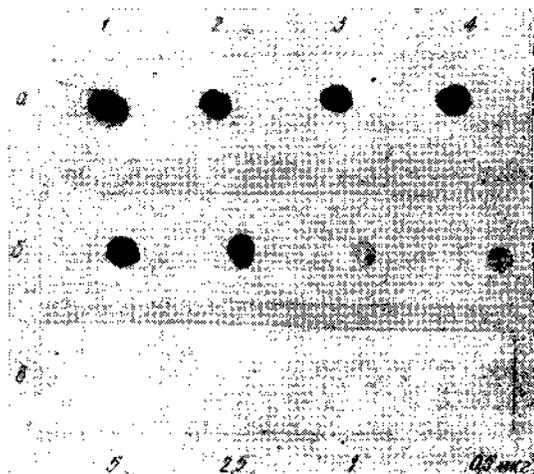


Рис. 3. Сравнение иммунореактивности аутоантител и моноспецифических антител к СерРС по данным дот-анализа: а — моноспецифические антитела к СерРС; б — аффинно очищенные антитела из СКВ-сыворотки № 4; в — контроль неспецифической сорбции аутоантител. В качестве контрольного антигена использовали ЧСА. Антигены (СерРС и ЧСА) растиривали от 5 до 0,5 мкг в точку. Полоски нитроцеллюлозы с нанесованными антигенами инкубировали в течение 2 ч при 37°C антителами, растворенными в PBS-T-Gel в концентрации 20 мкг/мл

IgM, что свидетельствует о специфичности иммунного ответа данных аутоантител к исследуемому антигену — СерРС.

Исследование аутоантител к СерРС, аффинно очищенных из сывороток пациентов с СКВ и РА. Из наиболее иммунореактивных сывороток (1, 4, 5 и 7 для СКВ и 2, 4, 6 и 7 для РА) методом аффинной хроматографии были выделены аутоантитела к СерРС на колонке с высокоочищенным препаратом антигена. Результаты сравнительного иммунотитрования моноспецифических антител (аффинно очищенных поликлональных антител к СерРС, полученных нами ранее по методу [11]) и аффинно очищенных аутоантител к СерРС представлены на рис. 2, б. Из них следует, что аутоантитела (кривые 2 и 3) обладают более низкой аффинностью, чем моноспецифические антитела (кривая 1) (т. е. антитела, полученные при иммунизации лабораторных животных). Это согласует-

ся с литературными данными о природе и свойствах аутоантител, а также подтверждается в экспериментах по исследованию иммунореактивности аутоантител к СерРС методом дот-анализа (рис. 3). Как видно из рис. 3, аутоантитела к СерРС, аффинно очищенные из СКВ-сыворотки № 4 (б), взаимодействуют значительно слабее с исследуемым антигеном по сравнению с моноспецифическими антителами к СерРС (а) в том же диапазоне концентраций антигена.

Исследование влияния аутоантител на функциональную активность СерРС в реакции аминокислотирования. На рис. 4 представлена зависимость активности

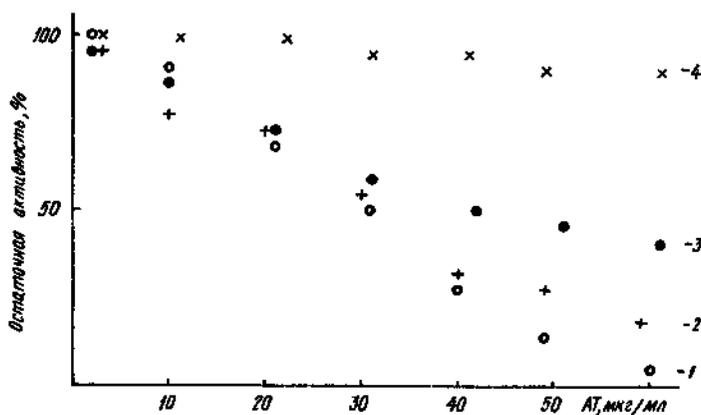


Рис. 4. Зависимость активности СерРС в реакции аминокислотирования от концентрации вносимых в инкубационную смесь антител: 1, 2 — аффинно очищенные аутоантитела из РА- и СКВ-сыворотки № 4 соответственно; 3 — моноспецифические антитела к СерРС; 4 — моноклональные антитела к ТрпРС Ам2;

Условия проведения реакции описаны в «Материалах и методах»; реакцию запускали добавлением фермента

СерРС в реакции аминокислотирования от концентрации вносимых в инкубационную смесь аффинно очищенных антител. Эти данные демонстрируют, что действие аутоантител (равно как и моноспецифических антител) на ферментативную активность СерРС печени быка было дозозависимым. В качестве отрицательного контроля использовали моноклональные антитела Ам2 к ТрпРС, ингибирующую аминокислотирование активность ТрпРС. Видно, что они не влияют на активность СерРС. Полученные результаты свидетельствуют о высокой специфичности выделенных аутоантител.

Ингибирующий эффект аутоантител (выделенных как из сывороток больных СКВ, так и пациентов с РА) на ферментативную активность СерРС был более выраженным, чем моноспецифических антител. Это согласуется с опубликованными ранее данными по исследованию влияния аутоантител на ферментативную активность цитоплазматических антигенов — синтетаз, специфичных к аланину, треонину, глицину и изолейцину [4—7]. При анализе свойств аутоантител к указанным аутоантигенам отмечено, что аутоантитела к ним при системных аутоиммунных заболеваниях синтезируются, в основном, к детерминантам конформационного типа. Активность ферментов существенно зависит именно от конформации. Исходя из вышесказанного, вполне объяснимы полученные нами ранее данные по неполному ингибированию ферментативной активности СерРС моноспецифическими антителами даже при большом их избытке [11]: эти антитела синтезируются преимущественно к детерминантам линейного типа функционально несущественных доменов белка, что подтверждается и исследованиями многих авторов на других антигенах [3, 13, 14].

Нам представляется достаточно обоснованным использование СерРС печени быка в качестве антигена при изучении аутоантителогенеза при системных аутоиммунных заболеваниях человека, так как

в нашей предыдущей работе [11] показано наличие иммунологического перекреста между серил-тРНК синтетазами эукариот (от дрожжей до человека) и отсутствие такового с прокариотическими серил-тРНК синтетазами.

В настоящей работе выявлены и проанализированы свойства аутоантител к еще одному цитоплазматическому антигену — СерРС. Дальнейшие исследования в этом направлении необходимы не только с точки зрения изучения молекулярных особенностей аутоантителогенеза при некоторых распространенных аутоиммунных патологиях, но также могут быть полезны для получения качественно новой информации о структурно-функциональных особенностях белоксинтезирующего аппарата как при патологиях, так и в норме, поскольку существование аутоантител к различным цитоплазматическим и ядерным антигенам отмечено и у клинически здоровых лиц [2, 13, 14, 18].

Весьма перспективными нам представляются дальнейшие исследования СерРС и других компонентов аппарата трансляции эукариот с помощью аутоантител для получения новой информации об их функциональной роли в метаболизме животной клетки. Интересным также является изучение антиидиотипических антител к вышеуказанным антигенам, что может быть весьма значимым не только с теоретической, но и с практической точки зрения — при создании вакцин нового поколения: пептидных и антиидиотипических [18—21].

Автор выражает благодарность Г. К. Ковалевой (ИМБ РАН, Москва) за любезно предоставленный препарат ТрпРС; С. Ф. Берестеню (ИМБ РАН, Москва) — за моноклональные антитела Ам2 к ТрпРС, а также профессору Г. Х. Мацуке (ИМБиГ НАН Украины) и профессору Л. Л. Киселеву (ИМБ РАН) — за содействие в работе и обсуждение полученных результатов.

Л. Л. Сидорик

СЕРИЛ-тРНК СИНТЕТАЗА — НОВИЙ АУТОАНТИГЕН ПРИ СИСТЕМНИХ АУТОІМУННИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ

Резюме

Аутоантитіла до компонентів апарату трансляції (до них віднесено деякі аміноацил-тРНК синтетази і рибосомні білки) ідентифіковано в сироватках пацієнтів з системним червоним вовчаком (СЧВ), ревматоїдним артритом (РА), полі- та дерматоміозитами.

Знайдено аутоантитіла до нового аутоантигена — серил-тРНК синтетази — у сироватках пацієнтів з СЧВ, РА методом ELISA. Незначний рівень даних аутоантитіл відмічено і в сироватках здорових донорів.

Методом ELISA і дот-блот-гібридизації досліджено імунореактивність і деякі функціональні характеристики зазначених аутоантитіл. З'ясовано, що аутоантитіла до серил-тРНК синтетази при системних аутоїмунних захворюваннях виразніше пригнічують функціональну активність серил-тРНК синтетази в реакції аміноацилювання порівняно з моноспецифічними антитілами до цього ж антигена. Отримані результати, а також опубліковані недавно дані щодо структури і властивостей аутоантитіл дозволяють вважати використання аутоантитіл перспективним підходом для отримання якісно нової інформації про структуру та властивості компонентів білок-синтезуючого апарату клітини і їх функціонального зв'язку в процесі трансляції.

L. L. Sidorik

SERYL-tRNA SYNTHETASE — A NOVEL AUTOANTIGEN DURING SYSTEMIC AUTOIMMUNE DISEASES

Summary

Sera of patients bearing autoimmune disease (rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus) and sera of clinically healthy donors were examined for the presence of autoantibodies directed against cytoplasmic autoantigen — seryl-tRNA synthetase. Im-

munoreactivity of autoimmune sera was investigated by ELISA and dot-analysis methods. It was shown, that autoantibodies against Ser-RS possess lower affinity in comparison with monospecific antibodies against the same antigen. We have examined the influence of autoantibodies on the functional activity of Ser-RS in the aminoacylation reaction.

A conclusion have been made that autoantibodies are more active in the inhibition of the enzymatic activity of target antigen then polyclonal antibodies obtained from immunization of laboratory animals.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киселев Л. Л. Аминоацил-тРНК синтетазы (кодазы) и их неканонические функции (Энгельгардтовские чтения) // Молекуляр. биология.—1990.—24.—С. 1445.
2. Cruse J. M., Lewis R. E. Contemporary concepts of autoimmunity.—Basel: Karger, 1985.—P. 1.
3. Avramas S. Natural autoantibodies: from horror autotoxicus to gnothi seauton // Immunol. Today.—1991.—12.—P. 154.
4. Mathews M. B., Bernstein R. M. Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity // Nature.—1983.—304.—P. 177.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Варганян О. А. Выявление в сыворотках больных аутоиммунными заболеваниями аутоантител против Фенилаланил-, лизил-, и триптофанил-тРНК синтетаз и антиидиотипических антител к ним // Молекуляр. биология.—1991.—25.—С. 1033.
9. Absi H., LaVergne I. P., Marzouki A. et al. Heterogeneity of ribosomal autoantibodies from human, murine and canine connective tissue disease // Immunol. Lett.—1989/1990.—23.—P. 35.
10. 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.
11. Sidorik L. L., Gudzera O. I., Dragovoz V. A. et al. Immunochemical non-cross-reactivity between eukaryotic and prokaryotic seryl-tRNA synthetases // FEBS Lett.—1991.—292.—P. 76.
12. Сидорик Л. Л., Попенко В. И., Черни Н. Е. и др. Иммувоэлектронно-микроскопическое определение локализации серил-тРНК синтетазы в клетках высших эукариот // Биополимеры и клетка.—1990.—6, № 5.—С. 72.
13. Matisota P., Druet P., Dosquet P. et al. Natural autoantibodies in systemic lupus erythematosus // Clin. Exp. Immunol.—1987.—69.—P. 79.
14. Matthen T., Wolff A., Soubiran P. et al. Anti-tubulin antibodies. II. Natural autoantibodies and induced antibodies recognize different epitopes on the tubulin molecule // J. Immunol.—1988.—141.—P. 3315.
15. Alexander H., Alexander S., Getzoff E. D. et al. Altering the antigenicity of proteins // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1992.—89.—P. 3352.
16. Бобык В. И., Веберов А. В., Рябенко Д. В. и др. Выделение основных трансспецифических антигенов из миокарда здоровых лиц и больных дилатационной кардиомиопатией // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 6.—С. 91.
17. Ternynck T., Bleux C., Gregoire J. et al. Comparison between autoantibodies during *Trypanosoma cruzi* infection in mice and natural autoantibodies // J. Immunol.—1990.—144.—P. 1504.
18. Сидорик Л. Л. Белковый синтез и аутоиммунитет // Биополимеры и клетка.—1992.—8, № 4.—С. 3.
19. Riechmann L., Clark M., Waldmann H., Winter G. Reshaping human antibodies for therapy // Nature.—1988.—332.—P. 323.
20. Chen J.-J., Sacki Y., Schi L., Kohler H. Tumor idiotype vaccines. VI. Synergistic anti-tumor effects with combined «internal image» anti-idiotypes and chemotherapy // J. Immunol.—1989.—143.—P. 1053.
21. Polonelli L., Lorenzini R., DeBaernardis F. et al. Idiotypic vaccination: immunoprotection mediated by anti-idiotypic antibodies with antibiotic activity // Scand. J. Immunol.—1993.—37.—P. 105.