

Виявлення аутоантитіл до тирозил-тРНК синтетази при серцевих дисфункціях

Ю. Ю. Кондратюк^{1,2}, Л. Л. Сидорик¹, В. І. Бобик¹,
Д. В. Рябенко³, О. І. Корнелюк¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, Україна, 01033

³Національний науковий центр «Інститут кардіології ім. акад. Н. Д. Стражеска» АМН України
Вул. Народного Ополчення, 5, Київ, Україна, 03680

kondratyuk_yulya@ukr.net

Мета. Дослідити рівень специфічних аутоантитіл проти тирозил-тРНК синтетази та її окремих модулів у сироватках крові людей із серцевою недостатністю, спричиною дилатативною кардіоміопатією, хронічним міокардитом та ішемічною хворобою серця, порівняно зі здоровими донорами. **Методи.** Рекомбінантні білки експресували, використовуючи штами-продуценти, трансформовані відповідними плазмідними векторами, та очищували методами металхелатуючої хроматографії на Ni-NTA-агарозній колонці. Рівень специфічних аутоантитіл вивчали методом ELISA. **Результати.** Виявлено підвищення титрів специфічних аутоантитіл до повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази, її каталітичного N-кінцевого модуля та некаталітичного C-модуля у сироватках крові хворих порівняно з цим же показником у здорових донорів. **Висновки.** Одержані результати демонструють можливу роль тирозил-тРНК синтетази в адаптаційних змінах міокарда за дії стресових чинників.

Ключові слова: аутоантитіла, тирозил-тРНК синтетаза, серцева недостатність.

Вступ. Захворювання, пов'язані із серцевою недостатністю, є однією з основних причин смертності та вважаються «серцевою епідемією XXI століття» [1]. Хоча причини серцевих дисфункцій все ще невідомі, але вони, безперечно, є наслідком змін генної експресії та спектрів білків у кардіоміоцитах [2]. Варто зазначити, що останнє десятиріччя характеризується бурхливим розвитком досліджень молекулярно-генетичних основ серцево-судинних захворювань. Особливу увагу дослідників зосереджено на різних видах кардіоміопатій, серед яких найрозповсюдженішою та найважчою є дилататив-

на кардіоміопатія (ДКМП), причини виникнення і розвитку якої ще недостатньо вивчено. Тому пріоритетом у дослідженні ДКМП є аналіз порушень функціонування міокарда на молекулярному рівні.

На сьогодні наявність аутоімунних процесів при розвитку серцевих захворювань не викликає сумніву [3, 4]. У сироватках крові хворих виявлено підвищений рівень аутоантитіл до низки антигенів, зокрема, до білків скоротливого апарату, основних структурних білків, таких як актин, міозин, і регуляторних білків – тропоміозину, тропонінів.

Відомо, що компоненти білоксинтезувального апарату клітини можуть бути причетними до процесів виникнення і розвитку багатьох хвороб. Нашу

увагу привернули аміноацил-тРНК синтетази (АРСази) – ключові ферменти дорибосомного етапу біосинтезу білка, які завдяки притаманним їм неканонічним функціям пов'язані з етіологією деяких захворювань, включаючи ракові, неврологічні патології, аутоімунні захворювання, порушення метаболізму [5–7].

Аутоантитіла проти цих ферментів вперше описано у хворих на поліміозит/дерматомиозит та міозит-асоційований синдром [8]. Найчастіше зустрічаються аутоантитіла до гістидил-тРНК синтетази [8, 9]. Вивченню властивостей аутоантитіл проти треонінової, аспарагінової, аланінової, ізолейцинової і гліцинової тРНК-синтетаз присвячено роботи [9–11]. У хворих з системним червоним вовчаком та ревматоїдним артритом знайдено аутоантитіла проти тирозинової, фенілаланінової, триптофанової тРНК синтетаз [12, 13].

Раніше нами показано, що наявність аутоантитіл проти тирозил-тРНК синтетази, афінно очищених із сироваток хворих на ревматоїдний артрит і системний червоний вовчак, спричиняла посилення ферментативної активності даного білка [12]. Тому логічним було перевірити, чи присутні такі антитіла в крові людей з серцевою недостатністю і якщо так, то яку роль вони виконують у розвитку цього захворювання.

Мета досліджень, представлених у даній статті, полягала в ідентифікації і вивченні рівня аутоантитіл проти повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази, її N-кінцевого каталітичного модуля (міні-TyrRS) та C-кінцевого некаталітичного домену (С-TyrRS) в сироватках крові людей на початковій стадії захворювання (ішемічна хвороба), в гострій фазі (міокардит) та при хронічному перебігу хвороби (ділятаційна кардіоміопатія).

Матеріали і методи. Для отримання рекомбінантних білків повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази, її N-кінцевого каталітичного та C-кінцевого некаталітичного модулів *Bos taurus* використано штами-продуценти на основі реципієнта *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE. Штами *E. coli* трансформували за загальноприйнятою методикою [14] відповідними сконструйованими плазмідними векторами *pET30a-59K* TyrRS, *pET30a-39K* TyrRS, *pET30a-20K* TyrRS.

Рекомбінантні білки одержували із супернатантів лізованих клітин методом металхелатуючої хроматографії на Ni-NTA-агарозній колонці. Бактеріальні білки аналізували SDS-гель-електрофорезом за Леммлі в денатуруючих умовах (12 % розділяючий гель) [15], використовуючи суміш маркерних білків фірми «Fermentas» (Литва).

Рівень специфічних аутоантитіл досліджували методом ELISA в сироватках крові хворих з хронічною серцевою недостатністю (ХСН). У 20 хворих ХСН була спричинена ділятаційною кардіоміопатією (група ДКМП), у 44 – хронічним міокардитом (група ХМ), у 18 – ішемічною хворобою серця (група ІХС). Контролем слугувала сироватка крові 20 здорових донорів. Сироватки крові люб'язно надано Національним кардіологічним центром «Інститут кардіології імені М. Д. Стражеско» Академії медичних наук України. В лунки планшета вносили по 1 мкг антигену, іммобілізували протягом ночі за $t = 4$ С у натрій-фосфатному буфері (0,75 М NaCl, 0,025 М NaH_2PO_4 , рН 7,4). Потім планшети ретельно відмивали натрій-фосфатним буфером, що містив 0,1 %-й твін-20, вільні сайти адсорбції блокували цим же буфером з додаванням 0,5 % желатини. Сироватки крові вносили в об'ємі 100 мкл у розведеннях 1:100, 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ і т. д. Інкубували протягом 2 год за $t = 37$ С. Далі планшети 5 разів відмивали PBS-T та інкубували упродовж 1 год за $t = 37$ С з антитілами проти IgG людини, кон'югованими з пероксидазою хрому («Promega», США). Після п'ятиразового відмивання PBS-T реакцію візуалізували додаванням субстрату (0,05 мг/мл АВТS з 0,05 % H_2O_2 в 50 мМ цитрат-фосфатному буфері, рН 4,5–5,2) та кількісно обраховували на ридері Titertek («Multiscan», Велика Британія).

Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою пакету статистичних програм STATISTICAL 6.0. Для порівняння показників досліджуваних груп застосовано *t*-критерій Ст'юдента. Значення $P < 0,05$ розглядали як критерій значущості різниці. Одержані результати представлено у вигляді середніх значень з урахуванням середніх квадратичних відхилень.

Результати і обговорення. Для ідентифікації аутоантитіл проти тирозил-тРНК синтетази у крові

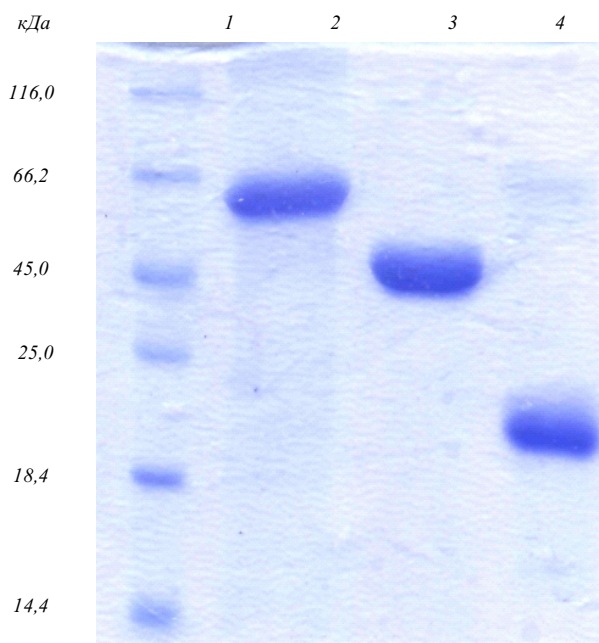


Рис. 1. Електрофоретичний контроль чистоти рекомбінантних білків, використаних для ідентифікації аутоантитіл: 1 – білковий маркер молекулярної маси («Fermentas», Литва); 2 – TyrRS; 3 – мініTyrRS (N-TyrRS); 4 – C-TyrRS

людей нами використано рекомбінантні тирозил-тРНК синтетазу бика та її фрагменти. Гомологія амінокислотних послідовностей тирозил-тРНК синтетаз достатньо висока для всіх еукаріотних ферментів і становить більше 50 %. При парному зіставленні амінокислотних послідовностей цитоплазматичних тирозил-тРНК синтетаз людини і *B. taurus* показано, що ці послідовності мають однакову кількість амінокислотних залишків і відрізняються за 26 позиціями: їхня ідентичність становить 95 %, а гомологія – 98 %. Ще одним доказом їхньої ідентичності є наявність імунологічного перехресту, визначеного при взаємодії обох синтетаз з моноклональними антитілами проти тирозил-тРНК синтетази *B. taurus* [16].

Як видно з даних рис. 1, чистота рекомбінантних білків, отриманих і використаних у нашому дослідженні, виявилася досить високою, що дозволило нам із впевненістю констатувати специфічність аутоантитіл, знайдених методом твердофазного імуоферментного аналізу.

При дослідженні сироваток крові методом ELISA з використанням виділених рекомбінантних білків як антигенів з'ясувалося, що антитіла, здатні

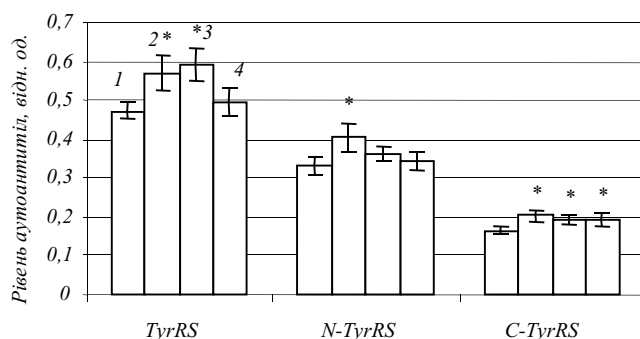


Рис. 2. Рівень специфічних анти-TyrRS аутоантитіл у сироватці крові людей з серцевою недостатністю: 1 – контрольна група; 2 – група з дилатативною кардіоміопатією; 3 – група з хронічним міокардитом; 4 – група з ішемічною хворобою серця; *P < 0,05 порівняно з контрольною групою

впізнавати тирозил-тРНК синтетазу та її модулі, присутні в крові як здорових людей, так і хворих з ХСН. Найвищий рівень аутоантитіл показано для повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази, а найнижчий – для її С-кінцевого модуля. Вміст таких антитіл у сироватках крові хворих був достовірно вищим порівняно з контролем (рис. 2).

Отже, достовірний приріст аутоантитіл проти повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази спостерігається у хворих на хронічний міокардит і ДКМП, приріст антитіл проти N-кінцевого каталітичного модуля – лише у хворих з ДКМП, а рівень антитіл проти С-кінцевого модуля був достовірно підвищеним в усіх групах хворих порівняно з контролем. Таким чином, у хворих з ДКМП відмічено найширший спектр аутоантитіл проти тирозил-тРНК синтетази.

Аутоімунітет не є специфічним видом імунітету і фундаментально не відрізняється від імунної відповіді на чужорідні антигени. Він являє собою нормальний механізм для транспорту та утилізації аутоантигенів, не деградованих системою аутолітичних ферментів організму. Відповідно і аутоантитіла в певних невеликих кількостях завжди циркулюють в організмі для тієї ж утилізації компонентів власних клітин, що руйнуються чи мутують. Такі низькі рівні антитіл не викликають за норми патологічних порушень [17]. Кількість аутоантитіл підвищується за умов патології, зокрема, при різних проявах серцевої недостатності. З прогресуванням хвороби рівні аутоантитіл до повнороз-

мірного білка та його окремих модулів зростають. У початковій фазі рівень аутоантитіл достовірно вищий відносно контролю лише для С-модуля TyrRS, при хронічному міокардиті він збільшується ще й для повнорозмірної синтетази, а при дилататійній кардіоміопатії підвищений рівень аутоантитіл спостерігається для всіх форм TyrRS.

У наших попередніх дослідженнях властивостей анти-TyrRS аутоантитіл при системних аутоімунних хворобах (системний червоний вівчак, ревматоїдний артрит) показано, що специфічні аутоантитіла впливають на аміноацилюючу активність тирозил-тРНК синтетази *in vitro* [12]. Таким чином, не можна виключити, що вони виконують певну регуляторну функцію *in vivo*. Щодо органоспецифічних кардіоваскулярних патологій (таких, наприклад, як міокардит чи дилататійна кардіоміопатія) подібних досліджень не проводили.

Відомо, що N-кінцевий та С-кінцевий модулі тирозил-тРНК синтетази функціонально різні. Так, ізольований N-кінцевий каталітичний модуль, який відповідає вкороченій формі ферменту (міні-TyrRS), має повну ферментативну активність в експериментах *in vitro* і в той же час може функціонувати як цитокін, подібний до інтерлейкіну-8, та стимулювати ангиогенез [18]. С-кінцевому модулю також притаманна подвійна функція: він бере участь у взаємодії з тРНК як фактор, що підсилює специфічність зв'язування тРНК з синтетазою, та після протеолітичного розщеплення виконує функцію цитокіну, подібного до ЕМАРІІ, що стимулює хемотаксичну активність моноцитів, а також підсилює прокоагуляційну активність ендотеліальних клітин [18–20]. Відповідно антитіла проти кожного із модулів чинитимуть різні фізіологічні ефекти.

Питання про те, чому і яким чином компоненти білоксинтезувального апарату клітини можуть залучатися до процесів виникнення і розвитку хвороб, залишається відкритим і дуже актуальним. Можна сказати, що зв'язок аміноацил-тРНК синтетаз з хворобами обумовлений спадковими мутаціями в генах аміноацил-тРНК синтетаз, які не впливають на стабільність ферменту та його аміноацилюючу активність, тобто мутації стосуються лише функцій, не пов'язаних з аміноацилюванням тРНК.

Наприклад, ферменти, які секретуються як про-цитокіни, після активації можуть залучатися до імунних процесів та ангиогенезу. Крім того, в клітинах аміноацил-тРНК синтетази здатні формувати мультибілкові комплекси і таким чином контролювати різні сигнальні шляхи [7, 21]. У зв'язку з цим можлива роль тирозил-тРНК синтетази в адапційних змінах міокарда за дії стресових чинників (розвиток серцевої недостатності) представляє значний інтерес.

Підвищення кількості аутоантитіл проти тирозил-тРНК синтетази при розвитку серцевої недостатності може бути одним із ускладнюючих факторів цього захворювання, тому виявлення причин і механізмів залучення тирозил-тРНК синтетази до аутоімунного процесу та пошук її можливих білків-партнерів дозволить поглибити інформацію щодо структури і функцій АРСазі, зокрема, неканонічних, а також допоможе у пошуку нових альтернативних підходів до лікування серцевої недостатності.

Iu. Iu. Kondratiuk^{1, 2}, L. L. Sidorik¹, V. I. Bobyk¹, D. V. Ryabenko³, A. I. Kornelyuk¹

Identification of autoantibodies to tyrosyl-tRNA synthetase in heart disfunctions

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

²Taras Shevchenko National University of Kyiv
64, Volodymyrska Str., Kyiv, Ukraine, 01033

³National Scientific Centre «M. Strazhesko Institute of Cardiology»
AMS of Ukraine
5, Narodnoho Opolchennya Str., Kyiv, Ukraine, 03151

Summary

Aim. To investigate the levels of specific autoantibodies against tyrosyl-tRNA synthetase and its individual modules in the blood serum of people with heart failure caused by dilated cardiomyopathy, myocarditis and ischemic heart disease compared with healthy donors. **Methods.** Recombinant proteins were obtained using bacterial strains transformed with appropriate plasmid vectors and were purified by chromatography on Ni-NTA-agarose. The levels of specific autoantibodies were investigated by ELISA. **Results.** The increased levels of autoantibodies specific to tyrosyl-tRNA synthetase, its N-terminal catalytic module and non-catalytic C-module, were found in the blood serum of patients, compared with healthy donors. **Conclusions.** The results obtained demonstrate the possible role of tyrosyl-tRNA synthetase in adaptive changes of the myocardium in response to stress factors.

Keywords: autoantibodies, tyrosyl-tRNA synthetase, heart failure.

Ю. Ю. Кондратюк, Л. Л. Сидорик, В. И. Бобык, Д. В. Рябенко, А. И. Корнелюк

Выявление аутоантител к тирозил-тРНК синтетазе при сердечных дисфункциях

Резюме

Цель. Исследовать уровень специфических аутоантител против тирозил-тРНК синтетазы и ее отдельных модулей в сыворотках крови людей с сердечной недостаточностью, вызванной дилатационной кардиомиопатией, хроническим миокардитом и ишемической болезнью сердца, по сравнению со здоровыми донорами. **Методы.** Рекомбинантные белки экспрессировали, используя штаммы-продуценты, трансформированные соответствующими плазмидными векторами, и очищали методами металхелатирующей хроматографии на Ni-NTA-агарозной колонке. Уровень специфических аутоантител анализировали методом ELISA. **Результаты.** Выявлено повышение титров специфических аутоантител к полноразмерной тирозил-тРНК синтетазе, ее каталитическому N-концевому модулю и некаталитическому C-модулю в сыворотках крови больных в сравнении с этим же показателем у здоровых доноров. **Выводы.** Полученные результаты демонстрируют возможную роль тирозил-тРНК синтетазы в адаптационных изменениях миокарда при действии стрессовых факторов.

Ключевые слова: аутоантитела, тирозил-тРНК синтетазы, сердечная недостаточность.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Cleland J. G. F., Khand A., Clark A. The heart failure epidemic: exactly how big is it? // *Eur. Heart J.*—2001.—**22**, N 8.—P. 623–626.
2. Dos Remedios C. G., Liew C. C., Allen P. D., Winslow R. L., Van Eyk J. E., Dunn M. J. Genomics, proteomics and bioinformatics of human heart failure // *J. Muscle Res. Cell Motil.*—2003.—**24**, N 4–6.—P. 251–260.
3. Rose N. R., Neumann D. A., Herskowitz A. Autoimmune myocarditis: concepts and questions // *Immunol. Today.*—1991.—**12**, N 8.—P. 253–255.
4. Fu M., Matsui S. Is cardiomyopathy an autoimmune disease? // *Keio J. Med.*—2002.—**4**, N 51.—P. 208–212.
5. Ibba M., Francklyn Ch., Cusack S. The aminoacyl-tRNA synthetases.—Georgetown: Landes Biosci., 2005.—437 p.
6. Park S. G., Schimmel P., Kim S. Aminoacyl-tRNA synthetases and their connections to disease // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2008.—**105**, N 32.—P. 11043–11049.
7. Schimmel P. Development of tRNA synthetases and connection to genetic code and disease // *Protein Sci.*—2008.—**17**, N 10.—P. 1643–1652.
8. Mathews M. B., Bernstein R. M. Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity // *Nature.*—1983.—**304**, N 5922.—P. 177–179.
9. Howard O. M., Dong H. F., Yang D., Raben N., Rosen A., Casciola-Rosen L., Hartlein M., Kron M., Yang D., Yidom K., Dwivedi S., Plotz P. H., Oppenheim J. J. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells // *J. Exp. Med.*—2002.—**196**, N 6.—P. 781–791.
10. Mathews M. B., Reichlin M., Hughes G. R., Bernstein R. M. Anti-threonyl-tRNA synthetase, a second myositis-related autoantibody // *J. Exp. Med.*—1984.—**160**, N 2.—P. 420–434.
11. Hirakata M., Suwa A., Nagai S., Kron M. A., Trieu E. P., Mimori T., Akizuki M., Targoff I. N. Anti-KS: Identification of autoantibodies to asparaginyl-tRNA synthetase associated with interstitial lung disease // *J. Immunol.*—1999.—**162**, N 4.—P. 2315–2320.
12. Sidorik L. L., Rodnin N. V., Savinskaya L. A., Ribkinskaya T. A., Rozhko O. T., Kornelyuk O. I., Matsuka G. Kh. Autoantibodies directed against tyrosyl-tRNA synthetase modulate its aminoacylating activity // *Biopolym. Cell.*—1996.—**12**, N 5.—P. 21–28.
13. Betteridge Z., Gunawardena H., North J., Slinn J., Mc Hughl N. Anti-synthetase syndrome: a new autoantibody to phenylalanyl transfer RNA synthetase (anti-Zo) associated with polymyositis and interstitial pneumonia // *Rheumatology.*—2007.—**46**, N 6.—P. 1005–1008.
14. Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E. F. Molecular cloning: A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. publ., 1982.—545 p.
15. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—**227**, N 259.—P. 680–685.
16. Ribkinska T. A., Kornelyuk O. I., Beresten S. F., Matsuka G. Kh. The immunochemical approach for studies of structure tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver // *Biopolym. Cell.*—1991.—**7**, N 5.—P. 33–37.
17. Sidorik L. L. The protein biosynthesis and autoimmunity // *Biopolym. Cell.*—1992.—**8**, N 4.—P. 3–19.
18. Wakasugi K., Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase // *Science.*—1999.—**284**, N 5411.—P. 147–151.
19. Kornelyuk A. I., Tas M. P., Dubrovsky A., Murray C. J. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // *Biopolym. Cell.*—1999.—**15**, N 2.—P. 168–172.
20. Ivakhno S. S., Kornelyuk A. I. Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis // *Exp. Oncol.*—2004.—**26**, N 4. P. 250–255.
21. Guo M., Schimmel P., Yang X.-L. Functional expansion of human tRNA synthetases achieved by structural inventions // *FEBS Lett.*—2009.—**584**, N 2.—P. 434–442.

UDC 577.27 + 616.12

Received 04.06.10