

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈԼԵԿՎՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ ԼՈՒԻԶԱ ԳԱՐԵԳԻՆԻ

ԱԴԵՆՈԶԻՆԴԵԱՄԻՆԱԶԻ ՑԻՏՐՈՒԼԻՆԱՑՄԱՆ ԲԱՑԱՀԱՅՏՈՒՄԸ ՍԻՆՈՎԻԱԼ
ՀԵՂՈՒԿՈՒՄ ԵՎ ԴՐԱ ՆՈՒՅՆԱԿԱՆԱՑՈՒՄԸ ՈՐՊԵՍ ՆՈՐ ԱՌԻՏՈՀԱԿԱԾԻՆ
ՌԵՎՄԱՏՈՒԴ ԱՐԹՐԻՏԻ ԴԵՊՔՈՒՄ

Գ.00.04 - «Կենսաքիմիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի
հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 2022

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

КАРАПЕТЯН ЛУИЗА ГАРЕГИНОВНА

ВЫЯВЛЕНИЕ ЦИТРУЛЛИНИРОВАННОСТИ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ В
СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И ЕЕ ИДЕНТИФИКАЦИЯ В КАЧЕСТВЕ НОВОГО
АУТОАНТИГЕНА ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности

03.00.04 - «Биохимия»

ЕРЕВАН - 2022


Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիայանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝	Կ.գ.թ. Ալվարդ Ադիբեկի Անտոնյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	Կ.գ.դ., պրոֆ. Կոնստանտին Բորիսի Ենկոյան Կ.գ.թ. Նինա Սերգեյի Ալչուջյան
Առաջատար կազմակերպություն՝	Մ. Հերացու անվ. Երևանի պետական բժշկական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2022 թ. դեկտեմբերի 16-ին, ժամը 14:00-ին, ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ 0014, ք. Երևան, Հասարայան 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և <http://molbiol.sci.am/> կայքում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2022 թ. նոյեմբերի 4-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու  Զ.Ա. Խաչատրյան

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института биохимии имени Г. Бунятына НАН РА.

Научный руководитель:	к.б.н. Антонян Алвард Адиековна
Официальные оппоненты:	д.б.н., проф. Енкоян Константин Борисович к.б.н. Алчуджян Нина Сергеевна
Ведущая организация:	Ереванский государственный медицинский университет им. Мхитара Герацци

Защита диссертации состоится 16 декабря 2022 г. на заседании специализированного совета 042, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии НАН РА и на сайте <http://molbiol.sci.am>.

Автореферат разослан 4 ноября 2022 г.

Ученый секретарь специализированного совета 042
кандидат биол. наук.

Хачатрян З.А.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Суставные заболевания (артриты) являются одним из самых распространенных причин инвалидности в мире. Воспалительные заболевания суставов – гетерогенная группа расстройств, поражающая не только суставные, но и другие ткани организма. В мире более 54,4 млн. людей страдают этими заболеваниями, и к 2040 году ожидается, что это число достигнет 78 млн. Существует около 100 различных форм артрита.

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое аутоиммунное заболевание, которое характеризуется деградацией костной ткани и потерей хряща [Scott DL, et al. 2010; Sweeney SE, et al. 2004].

Аденозиндезаминаза (АДА, К.Ф. 3.5.4.4) является одним из основных ферментов пуринового обмена, представленным во всех тканях млекопитающих. В числе многочисленных функций АДА – обеспечение пролиферации и созревания клеток лимфоидной ткани, развитие клеточного иммунитета и лимфоидной системы.

Повышение активности АДА в биологических жидкостях наблюдается при разных патологиях: туберкулезе (лимфоцитарный выпот в пораженной ткани), новообразованиях, в синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом и т. д. Применение АДА-теста (оценка уровня АДА активности) в дифференциальной диагностике является оправданным подходом при ряде заболеваний. Имеется ряд исследований посвященных применению АДА активности (АДА-тест) для дифференциальной диагностики суставных заболеваний. В частности, в нашей лаборатории было показано, что уровень АДА-активности в СЖ можно применить в качестве биомаркера для дифференциальной диагностики двух наиболее распространенных форм артрита, РА и ОА, как чувствительный (96%), специфичный (89%), высокоэффективный (93%) и недорогой тест [Antonyan A, et al. 2013].

В организме животных имеется два изофермента АДА – АДА1 и АДА2, различающиеся по генетическим и каталитическим характеристикам [Hirschhorn R, et al. 1980]. Настоящая работа посвящена исследованию изофермента АДА1 (далее АДА). Известны две молекулярные формы этого изофермента. В тканях млекопитающих АДА представлена внутриклеточной, цитоплазматической, низкомолекулярной формой (нАДА), которая является монопептидом с молекулярной массой 32-42 кДа [Dong RP, et al. 1996]. В межклеточной среде АДА представлена высокомолекулярной формой (вАДА) с молекулярной массой 280–300 кДа, которая является комплексом каталитически активной единицы нАДА со связывающим белком, идентичным ферменту дипептидилпептидаза 4 (ДППИВ) [Kameoka J, et al. 1993]. Эта форма АДА обнаруживается в тканях и биологических жидкостях млекопитающих как в локализованном на клеточных мембранах, так и в свободно циркулирующем состоянии.

Цитруллинирование, одна из форм пост-трансляционной модификации белков, представляет собой ферментативную трансформацию остатков аргинина в остаток цитруллина. Эта модификация влияет на молекулярные и функциональные характеристики белков. Цитруллинирование может инициировать иммунный ответ, формирование антител к пептидам, которые после цитруллинирования становятся чужеродными для организма антигенами. Этим обусловлена необходимость изучения цитруллинирования, как и других посттрансляционных модификаций, приводящих к появлению новых антигенов и аутоантител, инициирующих развитие аутоиммунных заболеваний [Gyorgy B, et al. 2006; van Venngooij WJ, et al. 2000]. Белковое цитруллинирование привлекает внимание ревматологов, поскольку в синовиальной оболочке, синовиальной жидкости и в крови больных РА отмечено повышение уровней катализирующих цитруллинирование ферментов, цитруллин содержащих белков и аутоантител к ним.

Идентификация цитруллинированных белков в качестве ауто-антигенов и разработка новых методов анализа, основанных на обнаружении цитруллинированных белков, стали

крупным прорывом в лабораторной диагностике ревматологии. Ожидается, что выявление новых цитруллинированных белков и расширение их семейства приведет к разработке новых стратегий диагностики и лечения РА с улучшением качества жизни больных.

Цель и задачи работы:

Целью настоящей диссертационной работы является выделить из СЖ больных артритами АДА и сравнить степень ее цитруллинированности при различных типах артрита. Оценить возможность применения цитруллинированной АДА в клинической диагностике в качестве нового аутоантигена.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Сравнить АДА-активность в СЖ больных РА, ОА, реактивным артритом (РеА), анкилозирующим спондилоартритом (АС), ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА) и подагрой.
2. Сравнить уровни высокомолекулярной и низкомолекулярной форм АДА в СЖ при указанных артритах.
3. Получить в высокоочищенном состоянии высокомолекулярную и низкомолекулярную формы АДА из СЖ больных РА, РеА, ОА, АС, ЮИА и подагрой.
4. Выявить и сравнить степень цитруллинированности двух форм АДА при этих артритах.
5. Исследовать возможность ингибирования АДА в СЖ больных РА синтетическими соединениями.
6. Выделить и очистить АДА из легких быка и катализировать его *in vitro* цитруллинирование используя коммерческий фермент ПАД2.
7. Исследовать значение цитруллинирования АДА для его связывания с ДППИВ: сравнить взаимодействие ДППИВ с очищенной из легких быка АДА нативной и цитруллинированной *in vitro*, а также с цитруллинированной *in vivo* АДА, выделенной из СЖ больных РА.
8. Поучить антитела (иммуноглобулин IgG) к цитруллинированной АДА выделенной из СЖ больных РА.
9. Показать применимость полученных антител для выявления цитруллинированной АДА в СЖ, а также возможность использования цитруллинированного АДА в качестве нового анти-ЦЦП индекса.

Научная новизна и практическая значимость работы:

В данной работе показано, что у больных различными типами артрита, в СЖ с близкими значениями АДА активности, отношение нАДА/вАДА при РА существенно выше, чем при других артритах. Это свидетельствует о том, что возрастание АДА активности в СЖ при РА сопровождается накоплением нАДА, а при других артритах – накоплением вАДА.

Мы впервые показали, что при РА нАДА в СЖ цитруллинирована, а вАДА при всех исследованных артритах, включая РА, не цитруллинирована.

Мы показали, что накопление нАДА в РА СЖ является результатом ее цитруллинированности, поскольку в ее трансформации в вАДА, т.е. в образовании комплекса с ферментом ДППИВ, участвуют остатки аргинина, в частности Arg142. Поэтому цитруллинирование АДА (т.е. модификация остатков аргинина в цитруллин) препятствует трансформации нАДА в вАДА. Для сравнения сродства ДППИВ к трем образцам нАДА: выделенной из легких быка нативной АДА_{НАТ}, цитруллинированной *in vitro* АДА_{ЭМ}, цитруллинированной *in vivo* АДА_{СЖ} из СЖ больных РА выделенной были использованы три биофизических метода: резонансный биосенсорный метод, флуоресцентная анизотропия и гель-фильтрационная хроматография. Результаты исследования показали, что сродство к цитруллинированным образцам нАДА в 4.5 меньше, чем к нативной нАДА.

Нами получены и охарактеризованы специфические антитела (иммуноглобулин IgG) к цитруллинированной форме нАДА из СЖ больных РА.

Полученные результаты дают основание для предположения, что эта система "аутоантиген-аутоантитело" может участвовать в патогенезе РА и, следовательно, являться мишенью терапии заболевания, а также может быть использована в различных форматах иммуноанализа для специфичной и ранней диагностики РА.

Кроме того, антитела к цитруллинированной АДА могут быть применены для выявления этой формы фермента не только в СЖ, но и в других биологических жидкостях.

Теоретическая и практическая значимость работы:

Исходя из полученных результатов, можно сказать, что цитруллинированная АДА, после проведения соответствующих исследований и оценки параметров диагностической чувствительности и специфичности, может стать дополнительным, применимым в рутинной лабораторной диагностике, анти-ЦЦП индексом.

Апробация результатов. Результаты, полученные в исследованиях, проведенных в рамках поставленных в диссертации задач, доложены и обсуждены на следующих международных конференциях: (1) The First International Conference of Rheumatology and Medical Rehabilitation, Erbil, Kurdistan, Iraq, 2015; (2) EULAR, London, UK. Ann Rheum Dis, 2016; (3) EULAR, Madrid, Spain, June 14-17, 2017; (4) International Young Scientific Conference dedicated to the 110-th Anniversary of academician H. Buniatian "The past, present and future of biochemistry", Yerevan, Armenia, November 2-3, 2018. (5) The 44th FEBS Congress, Krakov, Poland, July 6-11, 2019, а также на семинарах и заседаниях Ученого совета Института биохимии им. Г.Х. Бунятыяна НАН РА (2017-2022).

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из списка сокращений введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, заключения, выводов и списка литературы, включающего 220 источника. Работа оформлена на русском языке, изложена на 111 страницах, иллюстрирована 17 рисунками, 4 таблицами и одной схемой.

Публикации результатов исследования. Основные результаты диссертации изложены в 11 научных работах, включая 6 научных статей, опубликованных в республиканских и международных научных изданиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологический материал: Образцы СЖ пациентов диагностированных по различным типам артрита были предоставлены клиникой «Наири», «Эребуни» и «Мурацан». Образцы СЖ хранились при -20°C до использования. Количество исследованных синовиальных жидкостей больных: ревматоидным артритом n=115, реактивным артритом n=97, остеоартритом n=130, подагрой n=95, анкилозирующим спондилоартритом n=71, ювенильным идиопатическим артритом n=52.

Реактивы: Субстраты АДА аденозин (Адо) и ДППИВ Gly-Pro п-нитроанилид п-толуенсульфонатная соль (Gly-Pro- p-NA), диацетилмоноксим (ДАМО), тиосемикарбазид (ТСК), пептидиларгинининдеминаза-2 (ПАД-2), L-цитруллин, флуоресцентные маркеры N-(iodoacetyl-aminoethyl)-5-naphthylamine-1-sulfonic acid (1,5-IAEDANS), полный и неполный адьюванты Фрейда, агароза и кумасси синий G-250 приобретены у Sigma-Aldrich Ltd. (США). Используются: целлюлоза DEAE-50 фирмы Whatman (Англия); Сефадекс G200, G100, G75 и G25 фирмы Pharmacia Biotech (Швеция); стандартные белки для оценки молекулярной массы методом электрофореза – бычий сывороточный альбумин (БСА), яичный овальбумин (ОВА) и химотрипсिनоген А (ХТА) фирмы Serva (Германия); центрифужные фильтры Centrifugal Filter Ultra-4 фирмы Amicon, (Germany). Все другие реагенты были наивысшей доступной чистоты.

Использованные приборы: Спектральные измерения проводили при 25°C на спектрофотометре Cary 60, (США). Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметрах Shimadzu RF 5301PC (Япония) и Varian-Cary Eclipse PC Varian (USA), снабженных поляризатором. Для исследования методом биосенсорного резонанса использовали прибор IAsys plus (Affinity Sensors, Великобритания), снабженном компьютерной программой. Электрофорез проводили на приборе Bio-Rad Power Pac™ Basic, центрифугирование проводили на центрифуге BioSan (Latvia).

Статистический анализ: и обработку данных проводили с помощью программы InStat (version 3 for Windows). Достоверность различий определяли с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Результаты выражены как средние \pm ст. ошибка, n – число независимых экспериментов.

Ферменты и их активности: АДА из легких быка и из СЖ больных артритами, а также ДПП4 из коры почек быка выделяли и очищали до электрофоретически гомогенного состояния, используя процедуры ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе и гель-фильтрации на сефадексе-содержащих колонках. Изоформы НАДА и ВАДА разделяли гель-фильтрацией СЖ различных типов артрита на колонках с сефадексом G200 и очищали, используя процедуры ионообменной хроматографии и гель-фильтрации [А. А. Antonyan et al. 2014; А.А. Antonyan et al. 2017; Sharoyan S. et al, 2008; Mardanyan S. et al. 2001]. Активность АДА оценивали колориметрическим фенол-гипохлоритным методом по количеству аммиака, выделяющегося при катализе ферментативной реакции дезаминирования аденозина [А. А. Antonyan et al. 2014; А.А. Antonyan et al. 2017]. Выделение и очистка ДПП4 из коры почек быка и оценка ее активности спектрофотометрическим методом проводили согласно работе [Sharoyan S. et al. 2008]. Активности ферментов выражали в международных единицах: мкмоль продукта/мин/м(И/Л).

Цитруллин: Наличие цитрулина в белках оценивали с использованием метода колориметрического анализа, основанного на специфической реакции ДАМО с уреидной группой в кислой среде [Boyd TR et al. 1980]. Очищенная из легких крупного рогатого скота АДА_{НАТ} была цитруллинирована *in vitro* в присутствии фермента ПАД-2 согласно протоколу производителя [Damgaard D. et al. 2014]. В качестве стандарта использовали коммерческий L-цитруллин, Степень цитруллинированности белков и АДА выражали как отношение $A(530)/A(280)$ и моль цитрулина/моль АДА, соответственно.

Электрофорез: Чистоту исследуемых белков оценивали методом электрофореза на пластинках полиакриламидного геля (ПААГ-электрофорез). Для оценки молекулярной массы белковых препаратов использовали электрофорез в денатурирующих условиях по методу Laemmli U.K. 1970. Электрофорез в нативных условиях проводили согласно методу Davis B.J. 2006. После завершения процесса нативного фореза 2 дорожки отделяли, окрашивали раствором кумасси синий G-250 (0,3%) и промывали 7,5% раствором уксусной кислоты для удаления красителя. Оставшиеся дорожки гелевой пластинки разрезали на слои по 2 мм и помещали в пробирки Эппендорфа, содержавшие 350 мкл 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4, для экстракции фермента. После инкубации в течении ночи (14 часов) при 4°C, в аликвотах экстракта измеряли цитруллинирование и АДА активность. В этих опытах активность АДА оценивали методом спектральной регистрации превращения Адо(аденозина) в инозин (Ино) в результате ферментативной реакции дезаминирования по формуле: $[Ино] = \Delta A_{240} / (\epsilon_{ино,240} - \epsilon_{адо,240})$. Здесь ΔA_{240} – увеличение поглощения инозина в течении времени инкубации, $\epsilon_{ино,240} = 12930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\epsilon_{адо,240} = 5740 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ – молярные коэффициенты поглощения Ино и Адо при 240 нм [Pospisilova, H., et al. 2008]. В аликвотах супернатанта цитруллин определяли по вышеописанному методу [Boyd TR et al. 1980].

Взаимодействие АДА с ДПП4: Исследовали взаимодействие ДПП4 с тремя образцами НАДА: очищенной из легких быка нативной, АДА_{НАТ}; идентичным препаратом,

цитруллинированным *in vitro* в присутствии фермента ПАД2 (модифицированным ферментом) АДА_{МФ}, выделенным из СЖ больных РА (цитруллинированным *in vivo*) АДА_{СЖ}. Для исследования использовали методы: биосенсорного резонанса, флуоресцентной анизотропии и гель-фильтрационной хроматографии.

Получение и характеристика антител к АДА_{СЖ}: С целью получения антител (*IgG*) к выделенной из СЖ больных РА *in vivo* цитруллинированной АДА_{СЖ}, в лимфоидные узлы кролика, весом 1,5 кг, трехкратно вводили смесь АДА_{СЖ} с адьювантами Фрейда в соотношении 1:1. Из плазмы крови выделяли антитела по методу Mark Page et al. 2002. Концентрацию *IgG* оценивали по поглощению при 280 нм, используя микромолярный коэффициент экстинкции при этой длине волны $210 \text{ мкМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [Спицын А.Н. и др. 2020]. Наличие в крови кролика антител и их титр к антигену (АДА_{СЖ}) проверяли и оценивали методом двойной иммунодиффузии (метод Ухтерлони) [Waggett В.Е. et al. 2010].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. СООТНОШЕНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ И ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФОРМ АДА ПРИ АРТРИТАХ

1.1 НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ И ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ АДА ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

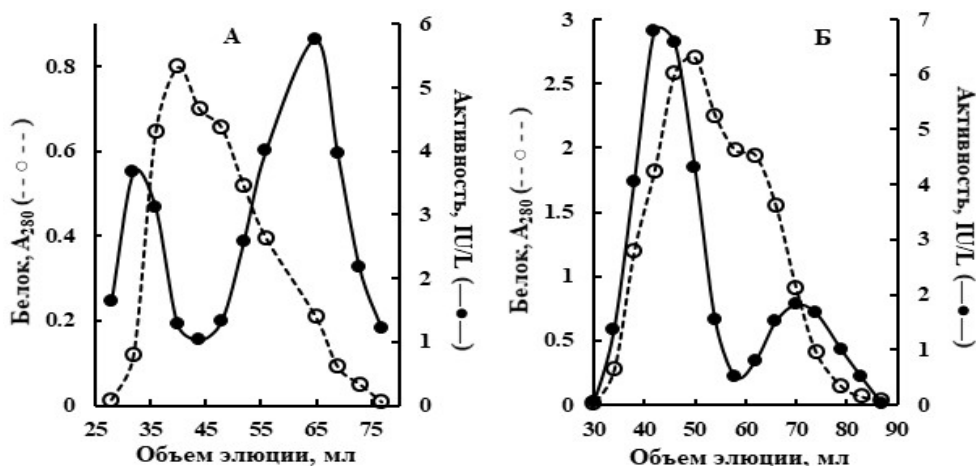


Рис. 1. Диаграммы элюции при гель-фильтрации на колонках с Сефадексом G-200sf образцов СЖ больных РА с активностями АДА: А – 98,9 мкмоль/мин/л, Б – 30,5 мкмоль/мин/л. Концентрация белка (---○---) представлена поглощением при 280, активность АДА (—●—) – в мкмоль/мин/л.

Оказалось, что увеличение АДА активности в СЖ при РА сопровождается значительным увеличением активности низкомолекулярной формы, нАДА. Для демонстрации этого наблюдения на Рис. 1 представлены примеры диаграмм гель-фильтрации на колонках с сефадексом G-200sf образцов СЖ больных РА с активностями АДА 98,9 мкмоль/мин/л (А) и 30,5 мкмоль/мин/л (Б). Диаграммы показывают, что при низкой исходной активности АДА (Рис.1, Б) отношение нАДА/вАДА $\approx 0,3$, но при трехкратном увеличении этой активности (Рис.1, А) это отношение возрастает почти в 5 раз ($\approx 1,6$).

В наших следующих исследованиях было обнаружено, что отношение нАДА/вАДА в СЖ больных РА зависит от исходной активности фермента. Многократные процедуры гель-фильтрации показали, что с увеличением АДА активности в СЖ больных РА в интервале 25-190 $\mu\text{моль/мин/л}$, отношение нАДА/вАДА увеличивается. На основании данных этих опытов были построены корреляционные зависимости между отношением нАДА/вАДА и активностью АДА в СЖ больных РА, одна из которых показана на Рис. 2.

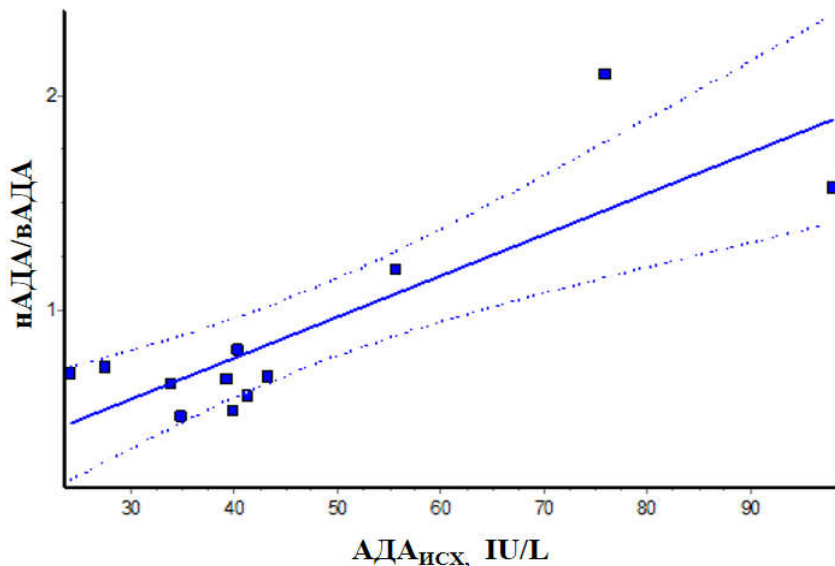


Рис. 2. Линейная корреляционная зависимость отношения нАДА/вАДА от активности АДА в РА СЖ; $r = 0.84$; $p = 0.0006$.

Корреляционная зависимость приведенная на Рис. 2 подтверждает увеличение доли активности нАДА при ее возрастании в СЖ больных РА.

Соотношение форм нАДА и вАДА было оценено в СЖ РА с активностью АДА в интервале 35-190 $\mu\text{моль/мин/л}$. Содержание нАДА в образцах с активностью ниже этого интервала было незначительным. В образцах с исходной активностью АДА между 35-65 $\mu\text{моль/мин/л}$ доля нАДА составляла около 35% от общей активности. В СЖ РА с активностью АДА в пределах 70-190 $\mu\text{моль/мин/л}$, доля нАДА составляла около 52% от суммарной АДА активности.

Эти результаты подтверждают вышеприведенные выводы о том, что возрастание АДА активности в СЖ при РА сопровождается накоплением нАДА.

1.2 НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ И ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ АДА ПРИ ДРУГИХ ТИПАХ АРТРИТА

Измерение АДА активности в СЖ больных с такими формами артрита, как ОА, РеА, АС, ЮИА и подагра показало, что иногда и при этих артритах наблюдается повышение уровня АДА активности. Поэтому в таких случаях были сравнены соотношения двух форм АДА.

Примеры диаграмм гель-фильтрации СЖ больных вышеупомянутыми формами артрита на колонках, заполненных сефадексом G-200sf приведены на Рис. 3.

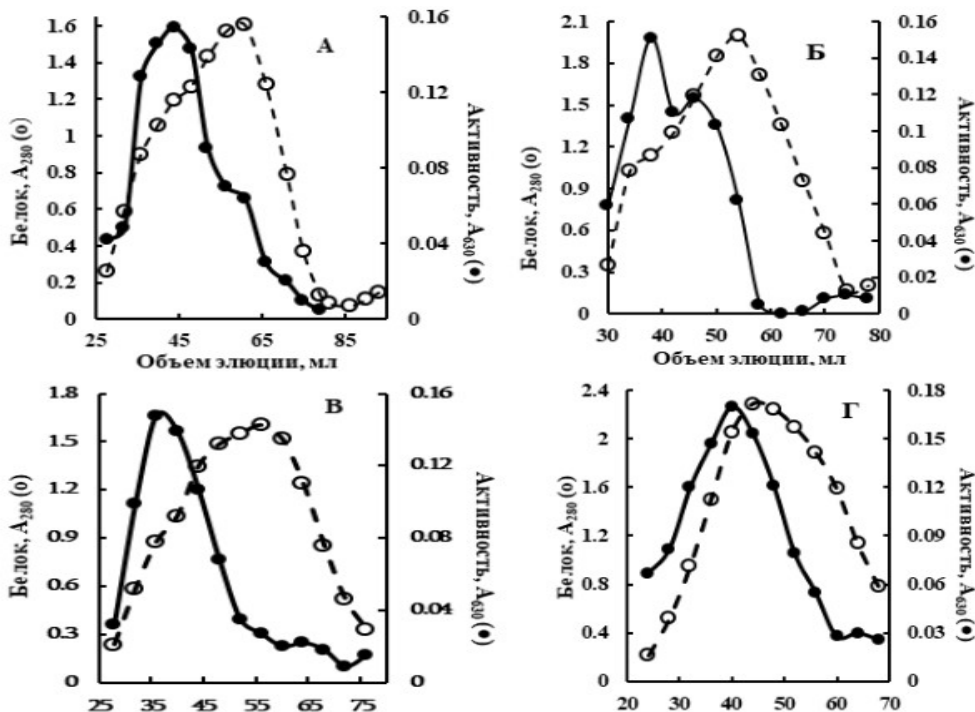


Рис. 3. Элюционные диаграммы гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-200sf СЖ больных: А – подагрой (начальная АДА активность 53,7 мкмоль/мин/л); Б – ЮИА (43,9); В – АС (56,9); Г – РеА (63,5). Концентрация белка и АДА активность фракций выражены поглощением при 280 и 630 нм, соответственно.

Из Рис. 3 можно увидеть, что при всех других типах артрита, в отличие от РА (Рис. 1), в образцах СЖ с близкими активностями фермента ($\approx 44-64$ $\mu\text{моль/мин/л}$), активность нАДА незначительна по сравнению с вАДА.

Многочисленные опыты по гель-фильтрации показали, что в СЖ исследованных типов артрита, за исключением РА, при низких исходных активностях АДА ($\approx 28-40$ $\mu\text{моль/мин/л}$) активность нАДА практически не регистрируется. Эта форма АДА проявляется в какой-то мере в СЖ с более высокими активностями АДА ($\approx 50-97$ $\mu\text{моль/мин/л}$). Следовательно, можно предположить, что при этих артритах повышение АДА активности в СЖ не сопровождается увеличением активности ее низкомолекулярной формы.

В Таблице 1 сравниваются значения отношений нАДА/вАДА после гель-фильтрации СЖ пяти типов артрита с близкими активностями АДА на колонках с сефадексом G-200sf. Данные таблицы показывают, что в СЖ больных РеА, АС, ЮИА и подагрой с активностью АДА в пределах 54-64 $\mu\text{моль/мин/л}$ отношение нАДА/вАДА находится в пределах 0,15-0,31. При этом в СЖ РА с АДА активностью 55,7 $\mu\text{моль/мин/л}$ это отношение значительно выше, равно 1,12.

Таблица 1. Отношение нАДА/вАДА в СЖ при разных артритах.

Типы артрита	АДА в СЖ ($\mu\text{моль/мин/л}$)	нАДА/вАДА
ревматоидный артрит	58,9	1,12
реактивный артрит	53,5	0,20
анкилозирующий спондилоартрит	56,9	0,15
подагра	53,7	0,31
ювенальный идиопатический артрит	56,7	0,26

Сравнивали усредненные по четырем пробам (с наибольшими и наименьшими исходными АДА активностями) уровни активностей нАДА и вАДА в СЖ двух типов артритов (РеА и РА) после разделения на колонках с сефадексом G-200sf. В Таблице 2 приведены полученные результаты.

Таблица 2. Сравнение усредненных активностей вАДА и нАДА в СЖ с наименьшими (строки 1 и 3) и наибольшими (строки 2 и 4) АДА активностями при РА и РеА (n = 4).

Тип артрита		АДА, IU/L		вАДА, A_{630}		нАДА, A_{630}		нАДА/вАДА
РА	1	$40,23 \pm 0,92$	$p = 0,011$	$0,52 \pm 0,13$	$p = 0,757$	$0,27 \pm 0,08$	$p = 0,023$	0,52
	2	$130,75 \pm 25$		$0,44 \pm 0,17$		$0,7 \pm 0,12$		1,58
РеА	3	$26,8 \pm 1,62$	$p < 0,0001$	$0,47 \pm 0,58$	$p = 0,016$	$0,14 \pm 0,02$	$p = 0,747$	0,29
	4	$72,25 \pm 4,42$		$0,88 \pm 0,11$		$0,12 \pm 0,03$		0,14

Сравнение данных Таблицы 2 показывает, что при РА, примерно трехкратное увеличение в СЖ активности АДА (строки 1 и 2, $p=0,011$), привело к увеличению активности нАДА примерно в 2,6 раз ($p=0,023$) по сравнению с СЖ с низкой АДА активностью. При этом активность вАДА оказалась незначительно ниже ($p=0,757$). В результате, отношение нАДА/вАДА увеличилось в ≈ 3 раза.

В случае РеА, почти такое же увеличение (в 2,7 раз, строки 3 и 4, $p<0,0001$) АДА активности в СЖ сопровождалось возрастанием активности вАДА в 1,9 раз ($p = 0,016$), а активность нАДА практически не изменялась ($p = 0,747$). В результате отношение нАДА/вАДА уменьшилось вдвое.

Результаты этих расчетов говорят о том, что возрастание АДА активности в РА СЖ сопровождается накоплением нАДА, а в случае РеА - накоплением вАДА.

Далее, статистическое сравнение показало, что усредненное отношение нАДА/вАДА в 30 случаях СЖ РА составило $0,76 \pm 0,1$. В 32 образцах СЖ четырех других типов артрита среднее отношение нАДА/вАДА ($0,24 \pm 0,02$) значительно ($\approx 3,1$ раза, $p < 0,0001$) ниже, чем в СЖ РА. Увеличение этого отношения в СЖ РА указывает на накопление в этом случае нАДА, в отличие от СЖ других типов артрита, где возрастание АДА активности сопровождается накоплением вАДА.

2. ЦИТРУЛЛИНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ СИНОВИЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ АРТРИТАХ

РА-хроническое аутоиммунное заболевание, при котором в синовиальных тканях повышается уровень цитруллинированных белков с превращением остатков аргинина в цитруллин [Jörg J Goronzy; 2005]. Известно, что нАДА и вАДА формы трансформируются

одна в другую путем связывания первой с так называемым АДА-связывающим белком, идентичным ферменту ДПП4 [Kameoka J, et al. 1993]. Известно также, что один из 17 остатков аргинина в молекуле нАДА, Arg-142, участвует в этом связывании [Daddona PE, et al. 1984; Richard E, et al. 2002]. Поэтому предполагалось, что цитруллинирование Arg-142 может препятствовать связыванию нАДА с ДПП4 и, следовательно, ее трансформации в вАДА. Практически, это можно рассматривать как биохимический механизм накопления разных форм АДА в СЖ разных типов артрита – нАДА при РА, который характеризуется высокой степенью белкового цитруллинирования, и вАДА при других артритах.

В СЖ разных типов артрита мы исследовали распределение цитруллинированных белков по молекулярной массе. Для этой цели белки в образцах СЖ осаждали в 5 %-ом растворе ТХУ. Белковый осадок промывали и растворяли в 0.1 М Tris-HCl буфере (pH 8.2), затем подвергали гель-фильтрации на колонках с сефадексом G-200sf. В элюированных фракциях определяли степень белкового цитруллинирования. На рисунке 4 показаны два примера полученных элюционных диаграмм для проб СЖ больных РА (А) и АС (Б).

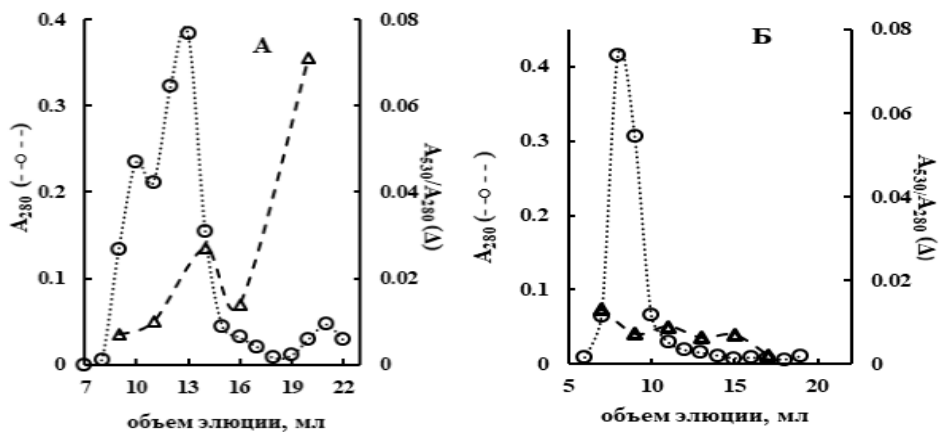


Рис. 4. Элюционные диаграммы гель-фильтрации на колонках с сефадексом белковых растворов из СЖ: А – больных РА и Б – больных АС. Концентрация белка (○) и белковое цитруллинирование (△) выражены оптическим поглощением при 280 нм и отношением поглощения цитрулина при 530 нм к белку, A_{530}/A_{280} , соответственно.

Рисунок 4, А показывает, что в случае СЖ РА, помимо высокомолекулярных цитруллинсодержащих фракций, значительное белковое цитруллинирование наблюдается во фракциях с молекулярной массой в области 36-42 кДа, которая соответствует молекулярной массе нАДА.

Диаграмма на рисунке 4, Б показывает, что в случае СЖ больных АС во всех белковых фракциях регистрируется незначительное цитруллинирование, на уровне ошибки анализа. Картина, аналогичная СЖ больных АС, была получена для СЖ при РеА.

Эти результаты свидетельствуют о том, что в СЖ больных РА белки с молекулярной массой близкой к нАДА цитруллинированы. При других исследованных артритах значительное белковое цитруллинирование в какой-либо фракции СЖ после осаждения в ТХУ не наблюдается.

На Рис. 5 показана элюционная диаграмма гель-фильтрации на колонке с Сефадексом G-200sf нативной СЖ больных РА. В элюатах были определены АДА активность и степень белкового цитруллинирования.

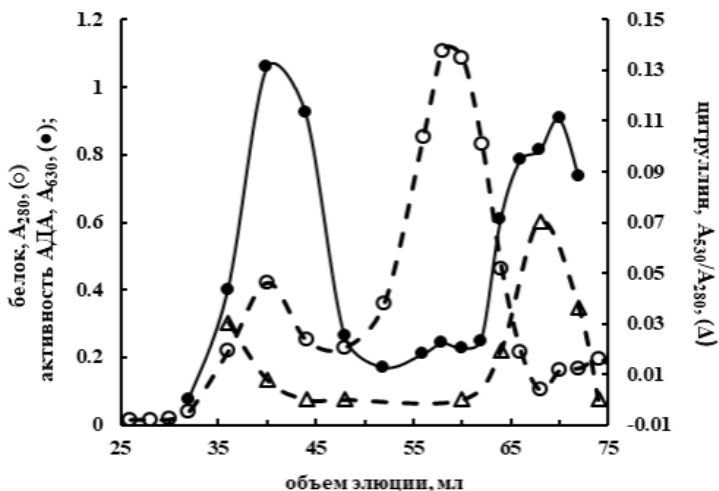


Рис. 5. Элюционная диаграмма гель-фильтрации на колонке с Сефадексом G-200sf нативной СЖ больных РА. Концентрация белка (○), активность АДА (●) и степень белкового цитруллинирования (Δ) выражены оптической плотностью при 280 нм, 630 нм и отношением A_{530}/A_{280} , соответственно.

Согласно приведенной диаграмме, некоторое белковое цитруллинирование обнаружено в предшествующих вАДА высокомолекулярных фракциях ($M_m > 300$ кДа). Цитруллинирование регистрируется также во фракциях с АДА активностью, соответствующих нАДА ($M_m \sim 36-42$ кДа).

После разделения, фракции вАДА и нАДА были подвергнуты очистке с использованием ионообменной хроматографии и гель-фильтрации по представленной схеме 1.

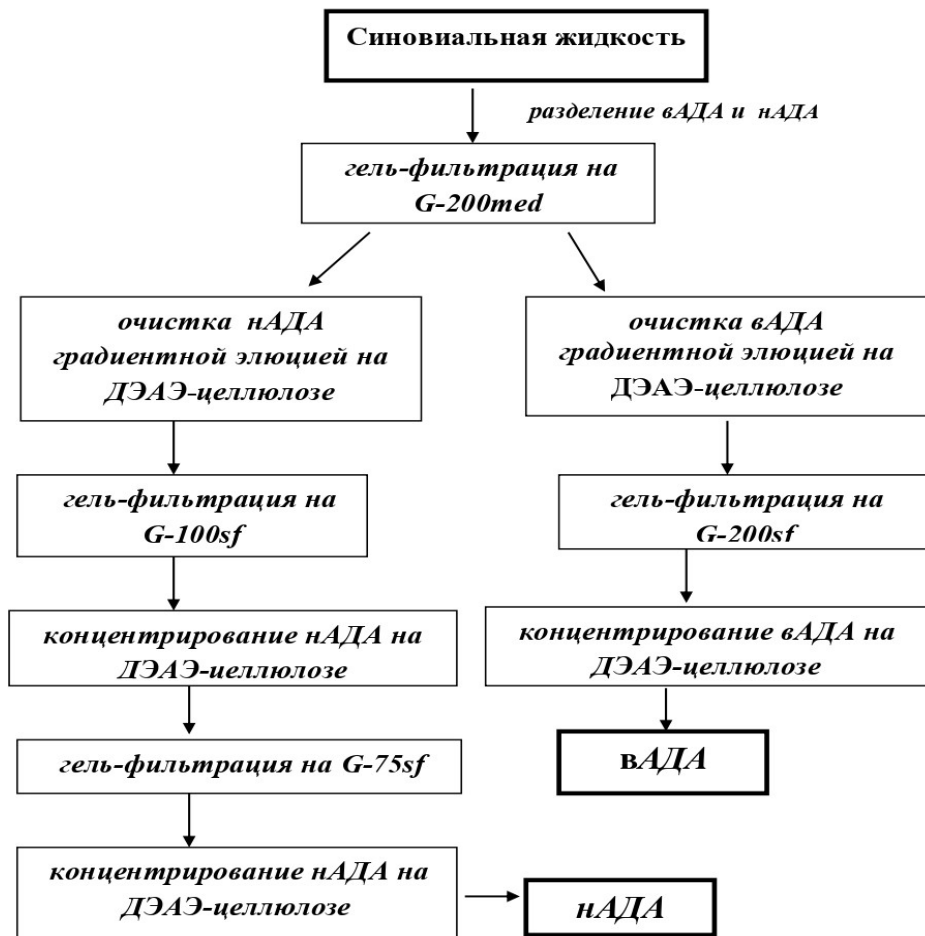
3. РАЗДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ДВУХ ФОРМ АДА ИЗ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ.

Две формы АДА (вАДА и нАДА) из СЖ больных РА разделяли и доводили до электрофоретической степени очистки используя процедуры, представленные на Схеме 1.

Степень очистки препаратов нативного АДА_{НАТ} из легкого быка и цитруллинированного АДА_{СЖ} из СЖ пациентов с артритами оценивали методом электрофореза. Использовали препараты АДА_{НАТ} и АДА_{СЖ} с удельными активностями 380 мкмоль/мин/мг и 50 мкмоль/мин/мг, соответственно. Препараты были подвергнуты электрофорезу в нативных условиях (в 7,5% ПААГ, метод Девиса) и в денатурирующих условиях (в 10% ПААГ, в присутствии Na-ДДС). Результаты представлены на Рис. 6.

Рис. 6, А демонстрирует результат нативного электрофореза образцов АДА_{СЖ} и АДА_{НАТ}. На дорожке АДА_{НАТ} видны три близко расположенные белковые полосы. На дорожке АДА_{СЖ} на уровне этих белковых линий имеются следы идентичных полос. В отличие от АДА_{НАТ}, на дорожке АДА_{СЖ} более ярко выражены белковые полосы с меньшей подвижностью, что по-видимому является результатом изменения как заряда и массы, так и конформации и размера белковой молекулы вследствие ее цитруллинирования.

Схема очистки двух форм АДА из синовиальной жидкости



На Рис.6, Б представлена картина ДДС-электрофореза образцов АДА_{СЖ}, АДА_{НАТ} и стандартных белков. На дорожках АДА_{СЖ} и АДА_{НАТ} видны три идентичные полосы, соответствующие молекулярным массам 42 кДа, 36 кДа и 32 кДа. На дорожке АДА_{НАТ} более интенсивно окрашена линия, соответствующая белку с мол. массой 32 кДа, в то время как для АДА_{СЖ} она незначительна, а интенсивность окраски соответствующая мол. массе 42 кДа, почти одна и та же для обоих образцов. Некоторое различие в интенсивностях линий электрофореграммы, по-видимому, связано с тем, что генетический источник белков различен: АДА_{СЖ} выделен из синовиальной жидкости человека, а АДА_{НАТ}-из легкых крупного рогатого скота. Важно то, что все три полосы соответствуют молекулярным массам низкомолекулярной формы АДА млекопитающих [Daddona P.E., et al 1977; Kelly MA., et al 1996].

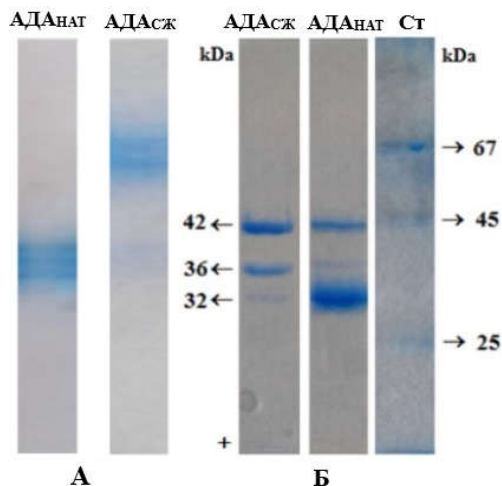


Рис. 6. А – электрофорез образцов АДА_{СЖ} и АДА_{НАТ} в нативных условиях. Б – электрофорез в денатурирующих условиях АДА_{СЖ}, АДА_{НАТ} и стандартных белков (St): БСА, 67 кДа; ОВА, 45 кДа; ХТА, 25 кДа.

После нативного электрофореза, в экстрактах из срезов геля АДА_{НАТ} и АДА_{СЖ}, определяли АДА активность и степень цитруллинирования. Результаты представлены на Рис. 7.

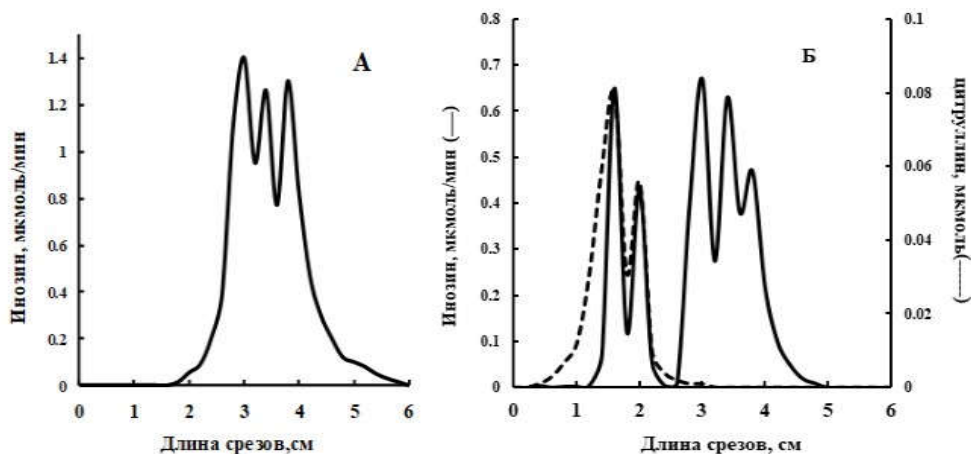


Рис. 7. АДА активность (по количеству образовавшегося инозина) и уровень белкового цитруллинирования в гелевых срезах после нативного электрофореза для: А – АДА_{НАТ} из легких быка, Б – АДА_{СЖ} из СЖ больных РА.

На Рис. 7, А активность АДА в срезах гелевой дорожки в диапазоне подвижности 3-4 см соответствует трем полосам АДА_{НАТ} на Рис. 6, А. Как показывает Рис. 7, Б, в срезах гелевой дорожки АДА_{СЖ} с подвижностью в диапазоне 3-4 см, также выявлена АДА активность. В АДА_{СЖ} активность АДА проявляется также в срезах в диапазоне 1,4-2 см (белковая

составляющая с малой подвижностью, Рис. 6, А). Отметим, что эта составляющая АДА_{СЖ} значительно цитруллинирована: до 0,08 мкмоль цитруллина на один срез геля (Рис. 7, Б).

Этот результат фактически впервые демонстрирует существенные изменения не только заряда, но и конформации белковой молекулы в результате ее цитруллинирования *in vivo*. Эти конформационные изменения, вместе с изменением заряженности белковой молекулы, привели к более низкой электрофоретической подвижности АДА_{СЖ}. Такое явление наблюдалось ранее в специальных опытах с цитруллинированием *in vitro* [Tarcsa E., et al. 1996; J.J. van Beers; et al. 2010].

4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДППИВ С НАТИВНОЙ И ЦИТРУЛЛИНИРОВАННОЙ АДА

Далее наши исследования были продолжены для проверки гипотезы о роли цитруллинирования в образовании комплекса нАДА-ДППИВ. Мы сравнивали связывание ДППИВ с цитруллинированной и нецитруллинированной нАДА тремя методами: биосенсорного резонанса, флуоресцентной анизотропии и гель-фильтрационной хроматографии.

4.1 ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ БИОСЕНСОРНОГО РЕЗОНАНСА

В опытах методом биосенсорного резонанса были использованы следующие формы нАДА: а) не цитруллинированная нативная АДА_{НАТ} очищенная из легких быка (удельная активность 380 мкмоль/мин/мг; б) АДА_{НАТ} из легких быка, *in vitro* цитруллинированная в присутствии коммерческого фермента ПАД2, АДА_{МФ} (удельная активность 305 мкмоль/мин/мг); молярное отношение цитруллин/АДА было 6.35 ± 0.18 в) цитруллинированная *in vivo* АДА_{СЖ}, очищенная из СЖ пациентов РА (удельная активность 50 мкмоль/мин/мг) молярное отношение цитруллин/АДА $\sim 5.8 \pm 0.2$. На Рис. 8 представлены типичные сенсограммы, полученные в этих экспериментах.

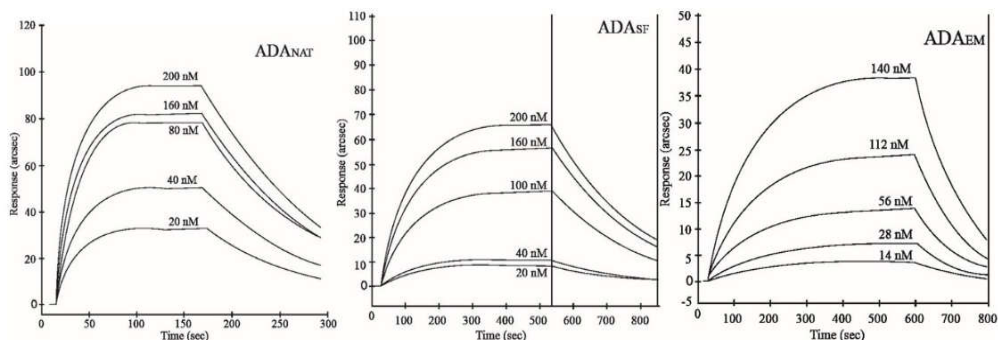


Рис. 8. Сенсограммы, полученные в экспериментах биосенсорного резонанса при связывании с ДППИВ, иммобилизованной на поверхности кюветы, трех форм АДА в указанных на кривых концентрациях.

В экспериментах методом биосенсорного резонанса ДППИВ, в концентрации 300 мкг/мл. была ковалентно иммобилизована на карбоксилатной поверхности кюветы устройства IAsys⁺ и титрована возрастающими концентрациями исследуемой формы АДА.

На основании полученных графических зависимостей компьютерной программой «Fast Fit», прилагаемой к прибору, были рассчитаны кинетические параметры взаимодействия белков. Результаты этих опытов представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Кинетические параметры взаимодействия в комплексе ДППИВ-АДА, представлены средние значения, по крайней мере, трех независимых экспериментов \pm стандартная ошибка.

комплекс	$k_{\text{ass}} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_{\text{diss}} (\text{s}^{-1})$	$K_D (\text{nM})$
АДА _{СЖ} -ДППИВ	25464 ± 5901	0.0041 ± 0.0009	161 ± 51.3
АДА _{МФ} -ДППИВ	43807 ± 13157	0.0075 ± 0.0004	171 ± 52.2
АДА _{НАТ} -ДППИВ	209820 ± 49150	0.008 ± 0.0006	38 ± 9.4

Эти результаты свидетельствуют о кинетической стабильности комплексов трех форм АДА. Напротив, значения k_{ass} оказались одного порядка для АДА_{СЖ} и АДА_{МФ}, но примерно на порядок больше для АДА_{НАТ}, что говорит о более быстром процессе связывания с ДППИВ нативного АДА. Сравнение величин K_D ($K_D = k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}}$), как меры сродства АДА и ДППИВ показало, что комплекс ДППИВ с АДА_{НАТ} приблизительно в четыре раза более стабилен по сравнению с комплексами с цитруллинированными формами АДА: значения K_D для комплексов АДА_{НАТ}-ДППИВ, АДА_{СЖ}-ДППИВ и АДА_{МФ}-ДППИВ равны $38 \pm 9,4$, $161 \pm 51,3$ и $171 \pm 52,2$ нМ, соответственно. Полученные результаты подтверждают нашу гипотезу о том, что цитруллинирование существенно препятствует связыванию АДА с ДППИВ и образованию комплекса ДППИВ-АДА.

4.2 ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Второй метод, который был использован для исследования *in vitro* взаимодействия ДППИВ и АДА – это гель-фильтрационная хроматография на колонках с сефадексом G-200sf. В этих опытах 2 мкМ ДППИВ инкубировали в течении 30 мин при 22°C в присутствии возрастающих концентраций АДА_{НАТ} (от 5 до 250 нМ) или АДА_{СЖ} (от 50 до 1000 нМ). В качестве контрольного эксперимента процедуру гель-фильтрации проводили с идентичным препаратом ДППИВ без добавления АДА. В элюированных фракциях измеряли активности обоих ферментов.

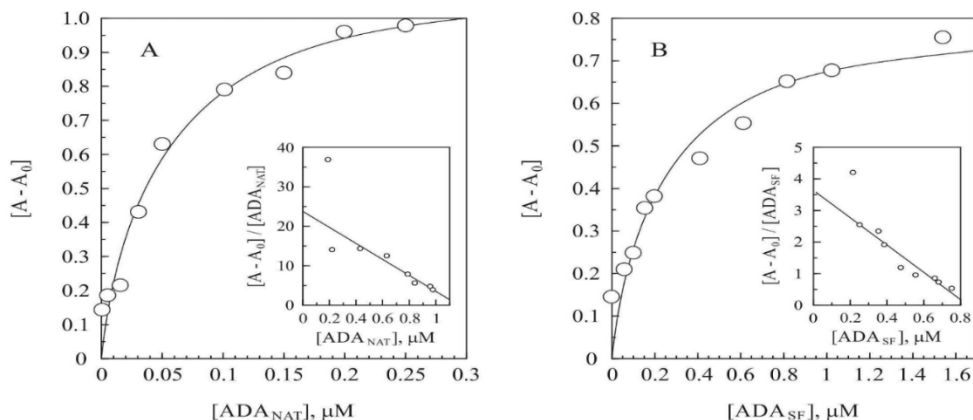


Рис. 9. Зависимости активностей: А – АДА_{НАТ} и В – АДА_{СЖ} в комплексах с ДППИВ от их концентраций в предварительно инкубируемой смеси. Во вкладках представлены нелинейные графики Скетчарда для полученных результатов.

В экспериментах с добавлением АДА ее активность (А) во фракциях содержащих ДППИВ сравнивали с активностью аналогичной фракции в контрольном опыте (A_0). Прирост активности АДА по отношению к активности в контрольном эксперименте, $A-A_0$, рассматривали как меру связывания АДА с ДППИВ и использовали в нелинейном графическом анализе Скэтчарда для определения константы связывания белковых миололекул, K_D . Полученные результаты представлены на рис. 9.

В результате этих экспериментов величины K_D для комплексов ДППИВ с АДА_{НАТ} и АДА_{СЖ} были оценены как 49 ± 11 nM and 225 ± 60 nM, соответственно. Эти величины находятся в согласии с величинами полученными методом биосенсорного резонанса.

4.3 ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ АНИЗОТРОПИИ

В следующей серии исследований с использованием метода флуоресцентной анизотропии, препараты АДА_{НАТ} и АДА_{СЖ} электрофоретической степени очистки предварительно инкубировали в течении 15 часов в присутствии 11.5 mM флуоресцентной метки IEADANS (молярное отношение белок: метка 1:30).

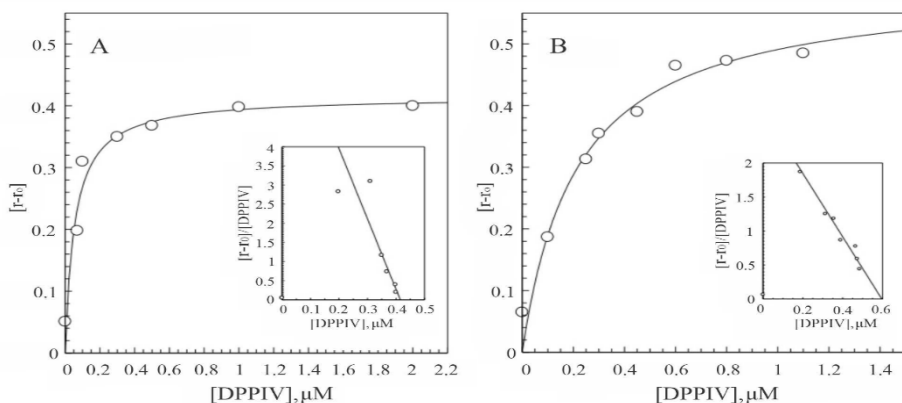


Рис. 10. Зависимости изменения анизотропии от концентрации ДППИВ и графики Скэтчарда для комплексов АДА_{НАТ} - ДППИВ (А) и АДА_{СЖ} - ДППИВ (В).

Полученные фракции EADANS-связанных АДА_{НАТ} и АДА_{СЖ}, в концентрациях 2,3 μM и 2,8 μM , соответственно, титровали возрастающими концентрациями ДППИВ в пределах 0.05-2.0 μM и 0,1-1,1 μM , соответственно. При разных концентрациях ДППИВ регистрировали поляризацию флуоресценции EADANS связанной с АДА. Вследствие образования комплекса АДА- ДППИВ, возрастала степень поляризации флуоресценции метки. Зависимость степени поляризации (анизотропии, r) от концентрации ДППИВ использовали в нелинейном графическом анализе Скэтчарда для определения констант диссоциации комплексов АДА с ДППИВ (Рис. 10). На основе полученных данных, для комплексов АДА_{СЖ}- ДППИВ и АДА_{НАТ}-ДППИВ получены значения K_D $54,4 \pm 14,5$ nM и $214,6 \pm 50,6$ nM, соответственно.

4.4 ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Методом молекулярного моделирования была исследована трансформация структуры ДППИВ-связывающего центра наДА в случае цитруллинирования Arg142. Был разработан PyTMs плагин и использовано программное обеспечение PyMOL для визуализации.

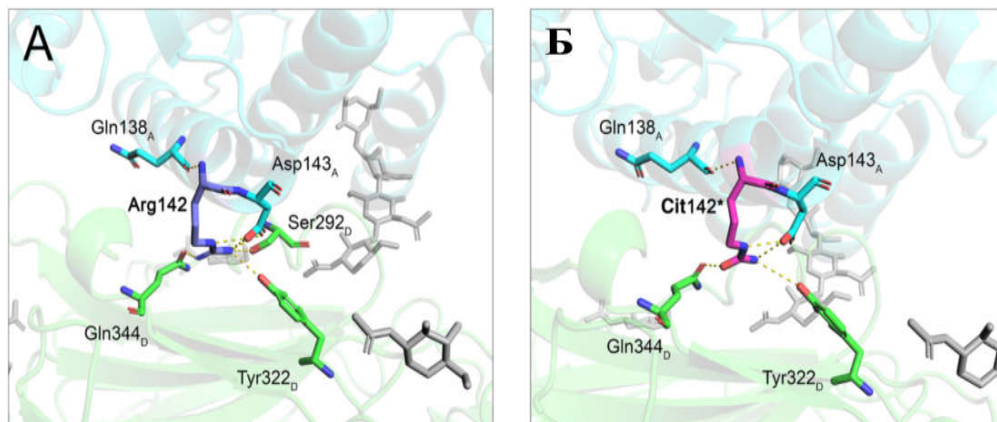


Рис. 11. Сравнительная визуализация аминокислотных остатков участвующих в образовании Н-связей в непосредственной близости от Arg142: А – кристаллографическая структура, В – реконструированная структура при цитруллинировании Arg142. Остатки молекул АДА и ДППИВ отображены светло-голубыми и зелеными палочками, соответственно. Н-связи обозначены желтыми пунктирными линиями.

На Рис. 11 приведен результат сравнительной визуализации аминокислотных остатков вблизи Arg142, непосредственно участвующих в образовании Н-связей при взаимодействии двух белков. Сравнены кристаллографическая структура (панель А) и реконструированная структура при цитруллинировании аминокислотного остатка 142 (панель В).

В Таблице 4 представлены значения разных энергетических вкладов при образовании комплексов АДА_{Arg142}-ДППИВ и АДА_{Cit142}-ДППИВ (Глобальная энергия связывания комплекса, ГЭСК; энергии Ван-дер-Ваальсового притяжения и отталкивания, пВдВ и оВдВ; энергии атомных контактов, ЭАК; водородные и дисульфидные связи).

Таблица 4. Величины энергетического вклада для АДА_{НАТ}- ДППИВ и АДА_{СЖ} – ДППИВ.

комплекс	ГЭСК	пВдВ	оВдВ	ЭАК	ВС
АДА _{Arg142} -ДППИВ	-33.11	-45.94	10.64	9.05	-8.16
АДА _{Cit142} -ДППИВ	-23.68	-35.46	10.46	6.16	0.00

5. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ АНТИТЕЛ К АДА_{СЖ}

Для исследования физиологических последствий цитруллинирования молекулы нАДА, были получены антитела к АДА_{СЖ}. Кролик был иммунизирован смесью цитруллинированной формы нАДА(АДА_{СЖ}), выделенной из СЖ больных РА с полным и неполным адьювантом Фрейда. По достижении определенного титра, из плазмы крови кролика были выделены антитела (фракция IgG). Для характеристики полученных антител была проведена реакция преципитации по методу Ухтерлони. Было проверено взаимодействие использованного для иммунизации препарата АДА_{СЖ} с полученными антителами (IgG), а также с образцом синовиальной жидкости, взятого от больного РА. На Рис. 12 представлен полученный результат.

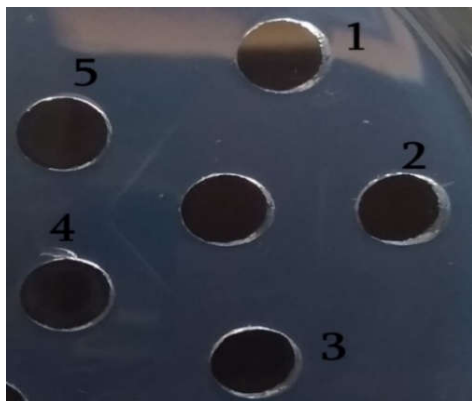


Рис. 12. Реакция преципитации *Ухтерлони* использованной для иммунизации кролика АДА_{СЖ} с полученным IgG с белками СЖ больного РА. В центральную лунку внесено 50μл АДА_{СЖ} с концентрацией 30μМ. Лунки 1, 2, 5 заполнены IgG с концентрацией 50; 100 и 450 μМ, соответственно. В лунки 3 и 4 внесена СЖ разбавленная в 10 раз и исходная.

На Рис. 12 видно, что АДА_{СЖ} дает реакцию преципитации как с IgG полученным иммунизацией кролика, так и с СЖ больных РА. Наличие преципитации между центральной лункой и лункой 4 свидетельствует о том, что синовиальная жидкость от больного РА содержит антитела, идентичные антителам полученным в результате иммунизации кролика очищенным препаратом АДА_{СЖ}. Следовательно, эти антитела можно использовать для обнаружения цитруллинированного АДА в неисследованной биологической жидкости, в частности, в плазме крови или в синовиальной жидкости, т.е. они могут быть пригодны для использования в диагностике РА.

Тем же методом был определен титр антител. Для этого в центральную лунку вносили АДА_{СЖ}, а в лунки 1, 2, 3, 4 и 5 – IgG с концентрациями 360, 240, 180, 100 и 60 μМ, соответственно (Рис. 13).

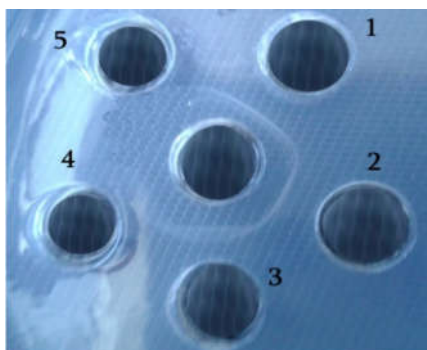


Рис. 13. Определение титра IgG методом преципитации *Ухтерлони*. В центральной лунке – АДА_{СЖ}. Лунки 1, 2, 3, 4 и 5 заполнены IgG в концентрациях: 360, 240, 180, 100 и 60 μМ, соответственно.

На Рис. 13 мы видим наличие полосок преципитации между центральной лункой и лунками 1, 2, 3 и 4. Следовательно, наименьшей концентрацией при которой антитела способны выявить антиген – 100µМ в лунке 4, что соответствует титру полученных антител 4,5(исходная концентрация IgG -450 µМ).

Полученный результат, а именно обнаружение антител в СЖ при РА к цитруллинированной АДА предполагает, что комплекс АДА_{СЖ} и IgG, может участвовать в патогенезе заболевания и следовательно быть мишенью при терапии. Кроме того, полученные антитела могут быть использованы в различных формах иммуноанализа для диагностики РА.

ВЫВОДЫ

1. Повышение активности аденозиндезаминазы (АДА) в синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом (РА) сопровождается повышением уровня активности низкомолекулярной формы фермента (нАДА).
2. В синовиальной жидкости больных остеоартритом, реактивным артритом, ювенильным артритом, анкилозирующим спондилоартритом и подагрой, в отличие от ревматоидного артрита, повышение активности АДА сопровождается повышением уровня высокомолекулярной формы фермента (вАДА).
3. При ревматоидном артрите нАДА в синовиальной жидкости цитруллинирована. Ни при каких перечисленных выше исследованных типах артрита, включая РА, высокомолекулярная форма АДА в синовиальной жидкости не цитруллинирована.
4. Накопление нАДА в синовиальной жидкости при ревматоидном артрите есть следствие ее цитруллинирования, обусловленного повышением уровня белкового цитруллинирования при патогенезе аутоиммунного ревматоидного артрита.
5. Цитруллинирование нАДА как *in vivo*, так и *in vitro* снижает в 4,5 раза сродство АДА к ДППИ_{IV}, что необходимо для трансформации нАДА в вАДА.
6. Цитруллинированная низкомолекулярная АДА может являться аутоантигеном, поскольку в результате иммунного ответа против нее вырабатываются аутоантитела, образуя иммунные комплексы.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

СТАТЬИ

1. Karapetyan L, Sharoyan S, Mardanyan S, Lupidi G, Cuccioloni M, Angeletti M, Markarian S, Shilajyan H, Antonyan A. Citrullination of adenosine deaminase impairs its binding to dipeptidyl peptidase IV. // **Biophys Chem.** 2022; 286:106820. doi: 10.1016/j.bpc.2022.106820.
2. Bakaryan A, Karapetyan L, Hakobyan N, Camaioni E, Mardanyan S, Antonyan A. Adenosine deaminase - A target for new piperazine derivatives. // **Biophys Chem.** 2021; 277:106658. doi: 10.1016/j.bpc.2021.106658.
3. Карапетян Л.Г. Получение и характеристика антител к цитруллинированной аденозиндеаминазе при ревматоидном артрите. // Медицинская наука Армении. 2021; 61(3):73-79.
4. Karapetyan L.G. Adenosine Deaminase at Septic Arthritis. // Медицинская наука Армении. 2020; 60(4):101-107.
5. Karapetyan L, Sharoyan S, Vardanyan V, Antonyan A, Mardanyan S. Adenosine deaminase in synovial fluid at rheumatoid arthritis is citrullinated. // Journal of Biochemistry and Molecular Biology Research. 2019; 4(1):225-229.
6. Antonyan A, Karapetyan L, Sharoyan S, Mardanyan S. Isoforms of adenosine deaminase in synovial fluids at different arthritis. // Biological Journal of Armenia. 2017; 69(1 suppl):92-96.

ТЕЗИСЫ

1. Karapetyan L, Bakaryan A, Hakobyan N, Antonyan A, Mardanyan S, Gevorgyan G. Inhibition of adenosine deaminase activity by novel synthesized piperazine class compounds. 44th FEBS Congress, Krakov 2019, Poland. FEBS Open Bio 9 (Suppl.1), p. 414.
2. Karapetyan L, Sharoyan S, Antonyan A, Mardanyan S. The citrullination of adenosine deaminase isoforms in synovial fluids at arthritis. International Young Scientific Conference dedicated to the 110-th Anniversary of academician H. Buniatian, "The past, present and future of biochemistry", November 2-3, Yerevan 2017, Armenia, Abstract book, p.18-19
3. Sharoyan S, Karapetyan L, Harutyunyan R, Mardanyan S, Antonyan A. Citrullination of adenosine deaminase isoforms in rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases 2017;76:787. <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-eular.1433>
4. Antonyan A, Harutyunyan R, Sharoyan S, Karapetyan L, Mardanyan S. The Adenosine Deaminase Isoforms activity in synovial fluid in patients with different arthritis. The Adenosine Deaminase Isoforms Activity in Synovial Fluid in Patients with Different Arthritis, Annals of the Rheumatic Diseases 2016;75:907-908. <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-eular.3162>
5. Antonyan A, Sharoyan S, Karapetyan L, Mardanyan S. Adenosine deaminase activity and isoforms in synovial fluids in rheumatoid and other types of arthritis. The First International Conference of Rheumatology and Medical Rehabilitation, Erbil, Kurdistan, Iraq, 2015, Abstract book, p.39-40.

Կարապետյան Լուիզա Գարեգինի

Աղետնոզինդեամինազի ցիտրուլինացման բացահայտումը սինովիալ հեղուկում և դրա նույնականացումը որպես նոր աուտոհակածին ռևմատոիդ արթրիտի դեպքում

Ամփոփում

Բանալի բառեր: ռևմատոիդ արթրիտ, ցիտրուլինացված աղետնոզինդեամինազ, սպիտակուց-սպիտակուց փոխազդեցություն, աուտոհակածին, աուտոհակամարմին

Ռևմատոդ արթրիտը (ՌԱ) քրոնիկ աուտոիմուն հիվանդություն է, որն ուղեկցվում է սինովիալ թաղանթի բորբոքումով, հեղուկի կուտակումով, հողերի դետրուկցիայով:

Աղետնոզինդեամինազը (ԱԴԱ) կաթնասունների գրեթե բոլոր հյուսվածքներում տարածված, պուրինների մետաբոլիզմի կարևորագույն ֆերմենտներից է: ԱԴԱ-ն մասնակցում է լիմֆոցիտների առաջացմանը, հասունացմանը և դիֆերենցացիային:

Ներկայացված աշխատանքի հետազոտման օբյեկտն ԱԴԱ1 (հետայսու ԱԴԱ) իզոֆերմենտն է: ԱԴԱ-ի երկու իզոմերն են՝ ցածրամեկուլյար (ՑԱԴԱ, 36-42 kDa), կատալիտիկ ակտիվ սպիտակուցը և բարձրամոլեկուլյար՝ (ԲԱԴԱ, 280 kDa), որն ՑԱԴԱ-ի և բազմաֆունկցիոնալ ֆերմենտ դիպեպտիդիլպեպտիդազ IV-ի (ԴՊՊIV) կոմպլեքսն է:

Մեր ուսումնասիրությունները ցույց են տվել ԱԴԱ ակտիվության բարձրացում ՌԱ, պոդագրա, ռեակտիվ արթրիտ (ՌեԱ), յուվենիլ իդիոպատիկ, անկիլոզիկ սպոնդիլո-, արթրիտների սինովիալ հեղուկներում (ՍՀ): ՍՀ-ում ԱԴԱ-ն ուսումնասիրվել է ըստ ՑԱԴԱ և ԲԱԴԱ իզոմերի: 25-38 մկոմ/րոպե/լ ԱԴԱ ակտիվությամբ ՍՀ-ներում ՑԱԴԱ ակտիվությունը աննշան էր, մինչդեռ 54-60 մկոմ/րոպե/լ-ի դեպքում ՑԱԴԱ/ԲԱԴԱ հարաբերությունը ՌԱ-ի ժամանակ 1.12 է, մնացած դեպքերում 0.15-0.31 է: Սա ցույց է տալիս, որ ՌԱ-ի դեպքում ԱԴԱ-ի ակտիվության բարձրացումը պայմանավորված է ՑԱԴԱ-ով: Բազմաթիվ ՍՀ-ների հել-ֆիլտրման արդյունքում ստացված տվյալների հիման վրա կառուցված կորելացիոն կորը՝ ՍՀ-ում ՑԱԴԱ/ԲԱԴԱ իզոմերի հարաբերության փոփոխության կախումը ԱԴԱ-ի ակտիվությունից ($r=0.84$, $p=0.0006$), հաստատում է, որ ՍՀ-ում ԱԴԱ-ի ակտիվության բարձրացումը պայմանավորված է ՑԱԴԱ-ով: ՌԱ-ով հիվանդների ՍՀ-ներում ԱԴԱ ակտիվության մոտ եռակի աճը ուղեկցվում է ՑԱԴԱ-ի ակտիվության մոտ 2.6 անգամ բարձրացմամբ, մինչդեռ ԲԱԴԱ-ի ակտիվությունը զգալի փոփոխություն չի կրում: Կարելի է ասել, որ այս դեպքում ԱԴԱ ակտիվության աճը պայմանավորված է ՑԱԴԱ-ի ակտիվությամբ: Ի տարբերություն ՌԱ-ի, ՌեԱ-ով հիվանդ-ների ՍՀ-ներում ԱԴԱ ակտիվության մոտ եռակի բարձրացումը ուղեկցվում է ԲԱԴԱ-ի ակտիվության 2.2 անգամ բարձրացմամբ, մինչդեռ ՑԱԴԱ ակտիվությունը մնում է անփոփոխ: Փաստորեն, ի տարբերություն ՌԱ-ի, ՌեԱ-ի դեպքում ֆերմենտի ակտիվության բարձրացումը պայմանավորված է ԲԱԴԱ-ով: Բազմաթիվ հել-ֆիլտրա-ցիաների արդյունքում, ցույց է տրվել, որ ՌԱ-ի ՍՀ-երում բարձր ԱԴԱ ակտիվության դեպքում ՑԱԴԱ/ԲԱԴԱ հարաբերության միջին արժեքը 3.1 անգամ ($p<0.0001$) բարձր է ուսումնասիրած մյուս հողային հիվանդությունների համեմատ, ինչը ևս մեկ անգամ

սպացուցում է՝ այն, որ ի տարբերություն այդ հողային հիվանդությունների, ՌԱ-ի ՍՀ-ներումը ԱԴԱ-ի բարձր ակտիվությունը պայմանավորված է ՅԱԴԱ-ի կուտակումով:

ՌԱ-ի ժամանակ պեպտիդիլարգինինդեհմինազ ֆերմենտների ազդեցությամբ տեղի է ունենում սպիտակուցների ցիտրուլինացում՝ արգինինի մնացորդների վերափոխում ցիտրուլին: Մեր ուսումնասիրած արթրիտների ՍՀ-ներում միայն ՌԱ-ի դեպքում է ՅԱԴԱ-ն ցիտրուլինացված: ՌԱ-ի ՍՀ-ներում ԱԴԱ-ի ակտիվությունից կախված (40-130 մոլ/րոպե/լ) գրանցվել է 5-12 մոլ ցիտրուլին/մոլ ԱԴԱ: ԲԱԴԱ-ն նշված բոլոր արթրիտների ՍՀ-երում, ցիտրուլինացված չէ: Հայտնի է, որ ՅԱԴԱ-ի կազմի մեջ մտնող արգինինի մնացորդները, մասնավորապես Arg-142-ը, պայմանավորում են ՅԱԴԱ-ԴՊՊՊՎ կոմպլեքսի կայունությունը: Ենթադրվում էր, որ ՅԱԴԱ-ի ցիտրուլինացումը կարող է խոչընդոտել այդ երկու սպիտակուցների փոխազդեցությանը՝ կանխելով ԲԱԴԱ-ի առաջացումը: Աշխատանքում հետազոտվել է ՅԱԴԱ-ԴՊՊՊՎ փոխազդեցությունը օգտագործելով ցուլի երկկամների ԴՊՊՊՎ-ը, ցուլի թոքի չցիտրուլինացված ԱԴԱ (ԱԴԱ_{US}) որպես սուզիչ, ՌԱ-ով հիվանդների ՍՀ-ից անջատած *in vivo* ցիտրուլինացված ԱԴԱ_{UK} և *in vitro* ցիտրուլինացված ԱԴԱ_{US}-ը՝ ԱԴԱ_{EL}: Սպիտակուցների փոխազդեցությունը ուսումնասիրվել է ռեզոնանսային բիոսենսոր, ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիա և հել-ֆիլտրման մեթոդներով: ՌԱ-ով հիվանդների ՍՀ-երի և ցուլի թոքի ԱԴԱ-ների մաքրությունը ստուգվել է էլեկտրաֆորետիկ եղանակով՝ նատիվ և դենատուրացվող պայմաններում: Առաջին անգամ նատիվ էլեկտրաֆորեզով ցույց է տրվել, որ ցիտրուլինացման արդյունքում ՍՀ-երից անջատած ԱԴԱ-ն լիցքի և կոմֆորմացիոն փոփոխությունների արդյունքում կորցնում է էլեկտրաֆորետիկ շարժունակությունը: Նշված երեք մեթոդներով ստացված սպիտակուցների փոխազդեցության հաստատումը՝ K_D, ԴՊՊՊՎ-ԱԴԱ_{UK} և ԴՊՊՊՎ-ԱԴԱ_{EL} կոմպլեքսների համար 4.5 անգամ բարձր է ԴՊՊՊՎ-ԱԴԱ_{US} կոմպլեքսի հաստատունից: Ցիտրուլինացման արդյունքում սպիտակուցների խնամակցությունը փոքրանում է 4.5 անգամ, հետևաբար, մեր կողմից առաջարկված հիոպոթեզի համաձայն, ՅԱԴԱ-ի ցիտրուլինացումը խոչնդոտում է ԴՊՊՊՎ-ի հետ փոխազդեցությանը և կանխում ԲԱԴԱ-ի առաջացմանը: Ստացված տվյալները հաստատվել են նաև համակարգչային մոդելավորմամբ, որտեղ ԴՊՊՊՎ-ՅԱԴԱ կոմպլեքսում ԱԴԱ-ի Arg-142-ը փոխարինվել է Cit-142-ով:

ՌԱ-ի ՍՀ-ներից մաքրած ԱԴԱ_{UK}-ն կրկնակի իմունոդիֆուզիոն եղանակով պրեցիպիտացիայի գծեր է տալիս ՌԱ-ի ՍՀ-ների հետ, փաստելով, որ ՌԱ-ի դեպքում ԱԴԱ-ն աուտոհակածին է՝ ՍՀ-ներում դրա նկատմամբ առաջանում են աուտոհակամարմիններ: Ցիտրուլինացված ԱԴԱ-ի նկատմամբ իմունիզացման եղանակով ստացել ենք հակամարմիններ (IgG), որոնք պրեցիպիտացիայի գծեր են տալիս ՌԱ-ի ՍՀ-երի հետ, վկայելով է նրանում առկա ցիտրուլինացված ԱԴԱ-ի մասին: Ենթադրվում է, որ ստացված հակամարմինները նույնական են ՌԱ-ի ՍՀ-ներում պարունակվող աուտոհակամարմիններին: Ցիտրուլինացված ԱԴԱ-ով աուտոհակամարմինների որոշման զգայունության և սպեցիֆիկության դրական արդյունքները կարող են հիմք հանդիսանալ առաջարկելու այն որպես նոր հակա-ՑՑՊ ինդեքս: Ինչպես նաև, ՌԱ-ի ՍՀ-ներից մաքրած ցիտրուլինացված ԱԴԱ-ի նկատմամբ ստացված հակամարմինները կարող են կիրառվել կենսաբանական տարբեր հեղուկներում ցիտրուլինացված ԱԴԱ-ն հայտնաբերելու համար:

Revealing of Adenosine deaminase citrullination in synovial fluid and its identification as a new autoantigen in rheumatoid arthritis

Summary

Key words: rheumatoid arthritis, citrullinated adenosine deaminase, protein-protein interaction, autoantigen, autoantibody

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic autoimmune disease characterized by infiltration of inflammatory cells into synovial tissue followed by progressive joint destruction. Adenosine deaminase is one of the main enzymes of purine metabolism, present in all tissues of mammals. One of the numerous functions of ADA is participation in the proliferation and maturation of lymphoid tissue cells, the development of cellular immunity and lymphoid system. There are two genetically and catalytically different mammalian isoenzymes of ADA, ADA1 and ADA2. The object of our study was ADA1 isoenzyme (hereinafter ADA). Two molecular forms of ADA are known: the small form, SADA, is a catalytically active protein with a molecular mass of 36-42 kDa. The large form of the enzyme, LADA (Mm of 280 -300kDa) represents a complex of SADA with so called ADA binding protein, which is identical to dipeptidyl peptidase IV (DPPIV). DPPIV is a multifunctional enzyme, appearing in many tissues both in the cell membrane immobilized and the circulating forms.

In the present work, the manifestation of SADA and LADA isoforms at different arthritis was studied. After separating the isoforms of ADA from a number of RA SF samples, the positive correlation was revealed between ADA activity in SFs and the SADA/LADA ratio ($r=0.84$, $p=0.0006$). This result suggested the increase of ADA activity was attended with enhance of SADA level.

Continuing the study, we found that the increased level of ADA activity was observed also at some other arthritis: reactive arthritis, ankylosing spondylitis, juvenile idiopathic arthritis, osteoarthritis and gout. Our numerous experiments have shown that at low (25-38 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$) ADA activity in SFs of all the studied arthritis, including RA, the activity of SADA was practically negligible. The comparative analysis showed that at the ADA activity in SFs between 54-60 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{l}$, the ratio of SADA/LADA in the cases of these arthritis was in the range of 0.15-0.31, but at the case of RA, it was much higher, equal to 1.12.

Calculations based on the results of gel filtration separation of ADA isoforms showed that in SFs of RA patients increasing of ADA activity by threefold time was accompanied with 2.6 time rising of SADA activity. In the same SF samples of low and high ADA activities, the LADA activities do not differ significantly. The similar comparison of the activities of SADA and LADA in SFs of ReA patients showed that approximately threefold increase of ADA activity leads to the halving of SADA/LADA ratio. Thus, in RA the threefold increase of ADA activity in SFs was accompanied by a threefold increase of SADA/LADA ratio, which indicated to accumulation of SADA, while in the case of ReA with LADA.

Besides, it was found that in cases of RA SFs with the high ADA activities, the average SADA/LADA ratio was significantly (≈ 3.1 times, $p < 0.0001$) higher, than in cases of ReA, AS, JIA, OA and gout. This observation again manifested that in contrast to RA, in SFs of these patients, the increase of ADA activity was attended with accumulation of LADA.

RA is an autoimmune disease with elevated levels of PAD enzymes catalyzing protein citrullination, i.e. transformation of arginine residues into citrulline. It is known also that namely Arg-142 in SADA is responsible for stability of SADA-DPPIV complex. Hence, one can assume that citrullination of Arg-142 may hinder the binding of SADA to DPPIV and its transformation to LADA. Actually, the citrullination of Arg-142 (as well other arginine residues in SADA) could

explain the observed accumulation of SADA which was caused ADA activity in SFs at RA patients, in contrary with other arthritis where ADA was accumulated as LADA.

To test this assumption, we isolated and purified SADA and LADA from SFs of all investigated types of arthritis. Our studies showed that SADA only at RA was citrullinated. Depends on ADA activity in SFs of RA patients (40-130 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$) the degree of SADA citrullination was 5-12 mol citrulline/mol ADA. The citrullination of LADA was not registered in any of all studied arthritis type including RA.

The purified SADA from RA SFs and bovine lung preparations were studied by native and SDS-PAG electrophoresis. For the first time for ADA from RA SFs the pronounced protein bands with reduced electrophoretic mobility have been obtained in native electrophoresis. It should be noted that the protein extracted from the low mobility bands of native electrophoresis PAAG gels had ADA activity and was citrullinated. Hence, the significant proportion of ADA in RA SFs due to transformation of arginine to citrulline and loss of the charge, undergoes conformational changes that slow down its electrophoretic mobility.

Taking into account the fact that for interaction of SADA and DPPIV were responsible arginine residues of SADA, especially Arg 142, it was natural to think that citrullination could impact that process. We studied the SADA-DPPIV interaction using DPPIV from bovine kidney and three forms of ADA: ADA_{NAT} from bovine lung; ADA_{EM} – *in vitro* citrullinated ADA_{NAT} in the presence of PAD2; ADA_{SF} – *in vivo* citrullinated SADA from RA SFs. For carrying out these experiments, biosensor resonance, fluorescence anisotropy and gel-filtration methods were used.

By three methods the value of the interaction constant, K_D in the complexes of DPPIV with two citrullinated forms of ADA (ADA_{EM} and ADA_{SF}) were 4.5 times higher then in the DPPIV-ADA_{NAT} complex. The obtained by three methods values of K_D , as a measure of the ADA-DPPIV affinity, indicated that the complex of DPPIV with ADA_{NAT} was 4.5 times more stable than the complexes of DPPIV with the citrullinated forms of ADA. These results confirmed our hypothesis that transformation of arginine residues to citrulline in SADA hindered its binding to DPPIV, the formation of the DPPIV-ADA complex, i.e., the formation of LADA. Obtained data were proved by Molecular modeling where in SADA the Arg-142 was replace with the Cit-142.

In the followed part of our study the experimental results carried out by double immunodiffusion showed that citrullinated SADA gave precipitation lines with samples of SF of RA patients. Hence, we could suggest that citrullinated SADA was autoantigen, as toward them the autoantibodies were produced.

The lines of precipitation between antibodies (IgG) obtained from immunization and SFs of RA patients indicated the presence of citrullinated ADA in SFs of RA. By the results of cross-precipitation data suggest that the antibodies produced by immunization are identical to the autoantibodies found in SFs of RA patients.

The positive results of studies of sensitivity and specificity of determination of autoantibodies toward citrullinated ADA may be the basis for its recommending as a new anti-CCP index in diagnostic centers. In addition, antibodies (IgG) to citrullinated ADA purified from SFs of RA patients can be used as a tool to detect citrullinated ADA in various biological fluids.

