

## Nowe mechanizmy regulacji aktywności PAD. Specyficzność substratowa i aktywacja deiminaz peptydyloargininy w kontekście reumatoidalnego zapalenia stawów

Reumatoidalne zapalenie stawów, destruktywna choroba stawów dotyka ok. 1% populacji we wszystkich grupach etnicznych. Jest to najbardziej rozpowszechniona choroba autoimmunologiczna, charakteryzująca się niekontrolowanym stanem zapalnym stawów, który uszkadza chrząstkę, kości i prowadzi do bólu, ograniczonej funkcjonalności i niepełnosprawności. Coraz więcej prac wskazuje na cytrulinację, enzymatyczną modyfikację białek, katalizowaną przez rodzinę deiminaz peptydyloargininy (PAD), jako na istotny czynnik w rozwoju RZS, a obecnie opracowywane leki są oparte na próbach ograniczenia ich aktywności. Niestety, niektóre podstawowe aspekty związane z cytrulinacją i biologią enzymów PAD pozostają niewyjaśnione. Prezentowany projekt podejmuje próbę opisanego podstawowych mechanizmów biologicznych aktywacji PAD, wykorzystując techniki biochemii, stosując linie komórkowe i analizując próbki pacjentów cierpiących na RZS.

Charakterystyczną cechą RZS jest napływ komórek immunologicznych do stawów. Wśród nich przeważają neutrofile i makrofagi, a towarzyszą im limfocyty T and B. Pierwsze z nich napędzają proces zapalny i prowadzą do destrukcji tkanek. Kolejne rozpoznają nowopowstałe białka cytrulinowane i produkują przeciwciała, które atakują własne białka pacjenta, prowadząc do powstania samonapędzającego się cyklu chorobowego. Znaczącą grupę spośród tych przeciwciał stanowią tzw. ACPA, skierowane przeciwko cytrulinowanym: białkom budującym chrząstkę, enzymom metabolicznym i białkom jądrowym. ACPA są wysoce specyficzne w RZS, a ich obecność w krwi pacjentów jest jednym z kryteriów diagnostycznych choroby. U około 60-70% pacjentów cierpiących na RZS, ACPA są wykrywane nawet przed wystąpieniem objawów klinicznych choroby, a ich poziom związany jest z postępem destrukcji stawów.

Cytrulinacja, inaczej deiminacja, jest postranslacyjną modyfikacją białek, w której dodatkowo naładowany boczny łańcuch argininy ulega enzymatycznej modyfikacji do neutralnej cytruliny, aminokwasu niekodowanego w DNA. Modyfikacja ta, ze względu na powstawanie nowej reszty aminokwasowej, jest krytyczna dla wytworzenia ACPA, ponieważ takie modyfikowane sekwencje często stanowią podstawę tzw. neoepitotów; lokacji we własnych białkach organizmu, rozpoznawanych przez układ immunologiczny jako obce. Analizy proteomiczne cytrulinowanych substratów (citrulinomu) wskazały na obecność modyfikowanych białek zewnątrzkomórkowych, a ponad 50 różnych białek zostało zidentyfikowanych w płynie stawowym pacjentów. PAD, grupa enzymów katalizujących cytrulinację jest fundamentalna dla regulacji stanu zapalnego wywołanego obecnością neutrofilii, a ich obecność w stawach prowadzi do zwiększonej destrukcji tkanek i wzrostu poziomu ACPA u pacjentów.

Podstawowymi regulatorami aktywności PAD są jony wapnia. Szereg badań strukturalnych zidentyfikował pięć (PAD4) lub sześć (PAD2) kieszeni wiążących jony  $Ca^{2+}$ . Wiązanie to, prowadzi do aktywacji enzymów PAD w tzw. mechanizmie „*calcium switch*” (ang. „przełącznik wapniowy”). Mechanizm ten wskazuje na szereg zmian strukturalnych, indukowanych wiązaniem wapnia i prowadzących do uruchomienia maszyneryi katalitycznej enzymu. Mimo to, stężenia wapnia wskazywane w tych badaniach wielokrotnie przekraczają poziomy wykrywane w warunkach fizjologicznych, pozostając ok. 100x (w cytoplazmie) lub 5x (serum i płyn stawowy) niższe niż wymagane do pełnej aktywacji enzymów. Postuluje się, że w regulacji aktywności PAD uczestniczą również dodatkowe aktywatory, które albo zastępują wapń w mechanizmie „*calcium switch*”, albo prowadzą do zmniejszenia wymagań co do stężenia wapnia, prowadzących do aktywacji enzymów. Dotychczasowe badania nie pozwoliły na identyfikację biologicznych cząsteczek o takim działaniu.

Przełomowy charakter prezentowanego projektu jest oparty na naszym fundamentalnym odkryciu, które identyfikuje grupę glikozaminoglikanów (GAG), których przykładem jest heparyna, jako aktywatorów PAD, które obniżają wymagane do aktywacji stężenia wapnia do poziomów fizjologicznych, wyjaśniając możliwość ich aktywacji *in vivo*. Te początkowe rezultaty eksperymentalne są potwierdzone wstępными badaniami strukturalnymi *in silico*, które potwierdzają istnienie kieszeni wiążącej GAG o potencjalnie wysokim powinowactwie w enzymach PAD2 i PAD4. Podobna aktywacja jest również obserwowana w obecności innych GAG, na przykład siarczanu heparanu, którego fragmenty są uwalniane podczas migracji neutrofilii do miejsc objętych stanem zapalnym, czy siarczanów chondrytyny, które są powiązane z erozją chrząstek stawowych.

Projekt podejmuje ambitną próbę przedstawienia biochemicznego i funkcjonalnego opisu aktywacji PAD przez GAG, nie tylko w warunkach *in vitro*, ale również przez badanie próbek klinicznych pacjentów. Proponujemy więc nie tylko analizę mechanizmu modyfikującego funkcjonowanie „*calcium switch*”, ale jednocześnie analizę aktywacji PAD w kontekście klinicznego samonapędzającego się cyklu chorobowego, opartego na uwalnianiu aktywujących molekuł wraz z postępem stanu zapalnego. Chcemy więc opisać fundamenty, umożliwiające rozwój specyficznych terapii w przyszłości.