

На правах рукописи

ПАРХОМЕНКО ТАИСИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ПРИРОДНЫЕ КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ
АНТИТЕЛА ПРИ ВИРУСНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ
ИНФЕКЦИЯХ**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2011

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной
медицины Сибирского отделения РАН

Научный руководитель:

д.б.н. доцент Бунева Валентина Николаевна

Официальные оппоненты:

д.б.н. Рубцов Николай Борисович

к.б.н. доцент Попова Нелли Александровна

Ведущая организация:

Институт клинической иммунологии СО РАМН

Защита состоится «__» _____ 2011 г. в ____ ч
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при
Институте химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения РАН
по адресу: 630090, г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета д.х.н.



В.В. Коваль

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение антител, проявляющих каталитическую активность, является новым направлением иммунологии и энзимологии. Количество работ, посвященных данной проблеме, быстро увеличивается, так как результаты исследований вносят существенный вклад в исследование механизмов формирования иммунного ответа. Антитела с ДНК-гидролизующей активностью были впервые обнаружены в крови больных аутоиммунными заболеваниями (системная красная волчанка, рассеянный склероз и др.), а также при инфекциях, сопровождающихся аутоиммунными реакциями (гепатиты, ВИЧ-инфекция). Исследования показали, что абзимы крови таких больных являются не только маркерами аутоиммунных процессов, но также играют роль в патогенезе заболеваний. В то же время, кровь здоровых доноров и пациентов с заболеваниями, не приводящими к сильному нарушению иммунного гомеостаза (язва двенадцатиперстной кишки, тонзиллит, лейкопения), либо не содержит ДНК-абзимов, либо их активность крайне низка. Единственным примером ДНК-гидролизующих антител с высокой активностью в норме являются антитела из крови беременных и кормящих женщин.

Инфекционные агенты вызывают в здоровом организме иммунный ответ, направленный как на вирусные или бактериальные антигены, так и на аутоантигены, в том числе и нуклеиновые кислоты. Известно, что некоторые инфекции могут приводить к срыву иммунной толерантности организма и развитию аутоиммунных реакций. Исследования каталитических свойств иммуноглобулинов, продуцирующихся в ответ на инфекции, необходимы для выяснения функций таких антител и их роли в патогенезе заболеваний.

Цель настоящей работы заключалась в детальном исследовании каталитических свойств ДНК-гидролизующих антител, образующихся при клещевом энцефалите и бактериальных инфекциях.

В процессе работы необходимо было решить следующие задачи:

- скрининг ДНК-гидролизующей активности препаратов поликлональных антител крови больных инфекционными заболеваниями и проверка выполнения критериев отнесения каталитической активности непосредственно иммуноглобулинам;
- исследование ферментативных свойств абзимов с ДНКазной активностью (металл-зависимость, кинетические параметры реакции гидролиза, родство к субстрату);
- изучение вклада иммуноглобулинов различных подклассов в суммарную активность общего пула поликлональных антител из крови больных инфекционными заболеваниями, а также иммуноглобулинов, содержащих разные типы легких цепей;

– тестирование цитотоксичности препаратов IgG крови больных клещевым энцефалитом.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые показано, что антитела из крови больных клещевым энцефалитом и бактериальными инфекциями (урогенитальный хламидиоз, уrogenитальный уреapлазмоз, гнойная хирургическая инфекция, рожистое воспаление, шигеллез и др.) обладают ДНК-гидролизующей активностью. Установлено, что, как и при аутоиммунных заболеваниях, образующиеся ДНК-абзимы исключительно гетерогенны по каталитическим свойствам, однако их активность значительно ниже, и они не обладают цитотоксическим действием в отношении раковых клеток линии MCF-7. Впервые показано, что при аутоиммунных и инфекционных заболеваниях антитела всех подклассов IgG могут проявлять ДНК-гидролизующую активность. Полученные данные вносят существенный вклад в развитие представлений об особенностях формирования иммунного ответа на различные инфекционные агенты, а также о механизмах, лежащих в основе образования ДНК-гидролизующих антител при инфекционных и аутоиммунных заболеваниях.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ. Результаты были представлены на российских и международных конференциях, в том числе: «Физико-химическая биология» (Новосибирск, 2006), "Фундаментальные науки - биотехнологии и медицине" (Новосибирск, 2006), «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2007), «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, 2007, 2010), "Медицинская геномика и протеомика" (Новосибирск, 2009), XIV-ый Всероссийский форум «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2011).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 114 страницах, содержит 28 рисунков и 7 таблиц. Библиография включает 246 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Выделение иммуноглобулинов из крови человека

Антитела (АТ) крови больных бактериальными инфекциями были выделены согласно разработанной в лаборатории ферментов репарации методике, и любезно предоставлены Генераловым И.И. (Витебский государственный медицинский университет). Препараты крови 15 больных клещевым энцефалитом были предоставлены сотрудниками Новосибирской государственной медицинской академии.

Иммуноглобулины класса G из сыворотки крови больных клещевым энцефалитом (КЭ) выделяли аффинной хроматографией на колонке с Protein G-Sepharose.

Выделенные препараты IgG были электрофоретически и иммунологически гомогенны согласно окраске белков серебром и иммуноблоттингу после их разделения в градиентном SDS-ПААГ и переноса на ПВДФ-мембрану (рис. 1). После всех стадий очистки АТ были каталитически активными в реакциях гидролиза ДНК и белков.

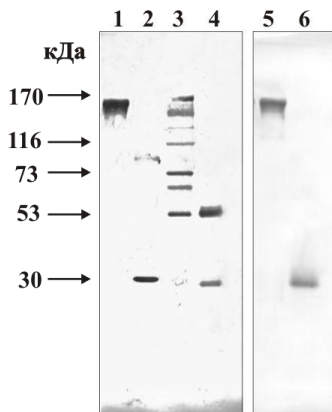


Рис. 1. Анализ гомогенности препаратов IgG с помощью SDS-гель-электрофореза в градиентном 4–15% ПААГ. Дорожки 1 и 4 – IgG из крови больного КЭ до и после инкубации с 10 мМ ДТТ соответственно (мембрана окрашена серебром), 5 и 6 – до и после инкубации с 10 мМ ДТТ, соответственно (мембрана окрашена конъюгатом пероксидазы хрена с моноклональными антителами против легких цепей иммуноглобулинов человека), 2 и 3 – белковые маркеры с известной молекулярной массой.

2. Скрининг ДНК-гидролизующей активности в препаратах антител из крови больных инфекционными заболеваниями

Для оценки уровня ДНКазной активности препаратов АТ в качестве субстрата использовали суперскрученную форму плазмидной ДНК, что обеспечивало высокую чувствительность метода детекции. Для всех исследованных препаратов АТ наблюдалось образование только кольцевой и линейной форм ДНК, но не было заметно их более глубокого гидролиза. Относительный уровень активностей АТ сильно варьировал от пациента к пациенту (табл. 1). В целом относительные активности АТ из крови больных инфекционными заболеваниями оказались ниже, чем у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, но в отличие от здоровых доноров они достоверно тестируемы.

3. Доказательства наличия у антител крови больных инфекционными заболеваниями каталитических функций

Для исследования каталитических свойств иммуноглобулинов необходимо доказать, что каталитическая активность является их

собственным свойством, а не обусловлена примесями ферментов, которые могут совыделяться с антителами. Согласно современным представлениям, отнесение каталитической активности непосредственно к абзимам требует проверки большого числа критериев. Для доказательства принадлежности исследуемых активностей антителам использовали наиболее активные препараты, поскольку гель-фильтрация в кислых условиях и электрофорез в присутствии SDS ведут к денатурации АТ и снижению их активности. Выполнение первого из этих критериев – гомогенность препаратов АТ по данным электрофореза с последующей окраской белков серебром – описано выше.

Таблица 1. Относительная ДНК-гидролизующая активность АТ из крови больных инфекционными заболеваниями

Заболевание	Количество препаратов АТ	ОА (среднее значение ± стандартное отклонение), %
Стрептококковая инфекция (рожистое воспаление)	19	17,2 ± 7,0
Гнойная хирургическая инфекция (возбудители – <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>)	14	32,8 ± 10,9
Бактериальная дизентерия (шигеллез)	11	21,3 ± 13,7
Менингококковый менингит	5	19,0 ± 13,7
Внегоспитальная пневмококковая пневмония	3	13,3 ± 6,6
Сальмонеллез	1	12,2
Урогенитальный хламидиоз	5	9,2 ± 2,4
Урогенитальный хламидиоз, ассоциированный с реактивным артритом (болезнь Рейтера)	7	27,7 ± 8,4
Урогенитальный уреоплазмоз, ассоциированный с реактивным артритом	2	95,5 97,0
Иерсиниоз, ассоциированный с реактивным артритом	2	9,0 11,2
Болезнь Лайма	1	22,5
Клещевой энцефалит	15	16,6 ± 7,3

Гель-фильтрация в условиях «кислого шока»

Одним из общепринятых методов доказательства наличия у АТ каталитической активности является гель-фильтрация препаратов антител в условиях «кислого шока», поскольку обеспечивает диссоциацию и

последующее разделение всех компонентов иммунокомплексов, состоящих из иммуноглобулинов разных классов и антигенов. Для всех исследованных препаратов АТ крови больных КЭ и бактериальными инфекциями (урогенитальный уреоплазмоз, уrogenитальный хламидиоз, рожистое воспаление) профиль оптической плотности совпадал с профилем ДНК-гидролизующей активности (рис. 2).

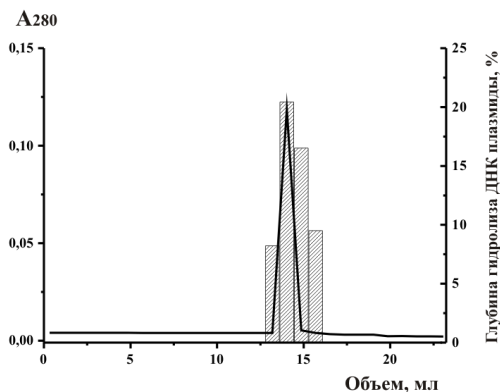


Рис. 2. Высокоэффективная гель-фильтрация препарата IgG из крови больного КЭ на колонке Superdex-200 в Gly-HCl, pH 2,6. (—) — Оптическое поглощение элюата при $\lambda = 280$ нм; высота столбцов соответствует относительной активности АТ в гидролизе плазмидной ДНК.

Взаимодействие абзимов с аффинными сорбентами

Одним из показателей, подтверждающих наличие каталитической активности у антител, является специфическое взаимодействие абзимов с аффинными сорбентами. При аффинной хроматографии иммуноглобулинов из крови больных инфекционными заболеваниями на колонке с анти-L-Sepharose происходило количественное связывание с сорбентом. Профиль ДНК-гидролизующей активности совпадал с профилем элюции белка. В качестве примера на рис. 3 приведены данные для препарата IgG из крови больного КЭ.

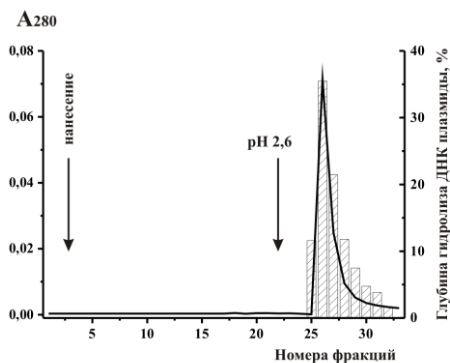


Рис. 3. Профиль аффинной хроматографии препарата IgG из крови больного КЭ на колонке с иммобилизованными мышиными моноклональными антителами против легких цепей иммуноглобулинов человека; высота столбцов соответствует относительной активности АТ в гидролизе плазмидной ДНК.

Определение ферментативной активности абзимов в геле in situ

Метод определения ферментативной активности белка *in situ* в геле, содержащем субстрат, дает возможность не только продемонстрировать, что каталитическая активность принадлежит иммуноглобулинам, а также определить, какие именно субъединицы белка участвуют в катализе. В настоящее время данный подход считается одним из наиболее наглядных, достоверных и однозначных критериев при доказательстве принадлежности каталитической активности непосредственно антителам. Для тестирования ДНКазной активности в геле были взяты препараты АТ крови больных урогенитальным хламидиозом, урогенитальным уреаплазмозом, гнойной хирургической инфекцией (возбудитель *S. aureus*) и КЭ, обладающие наибольшей ДНК-гидролизующей активностью. Участки геля, не окрашенные бромистым этидием, соответствовали иммуноглобулинам класса G (рис. 4, б, дор. 6-11).

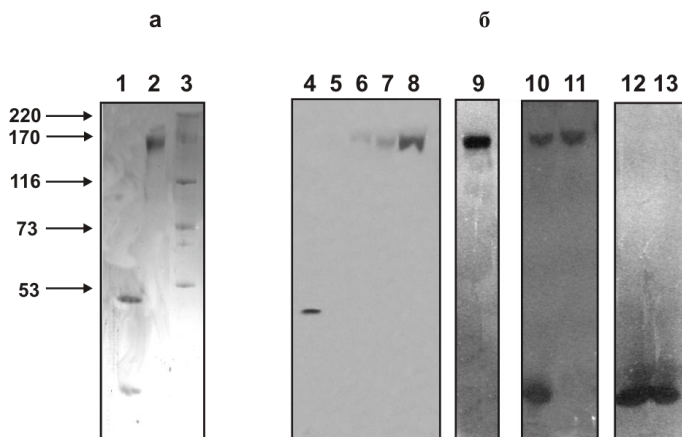


Рис. 4. Тестирование ДНК-гидролизующей активности антител из крови больных инфекционными заболеваниями *in situ* в геле, содержащем субстрат.

а – Окраска геля Coomassie Brilliant Blue 250. Дор. 1 – АТ (урогенитальный уреаплазмоз, ассоциированный реактивный артрит)+ДТТ; 2 – АТ (урогенитальный уреаплазмоз, ассоциированный реактивный артрит); 3 – белковые маркеры с известной молекулярной массой;

б – Окраска геля бромистым этидием. Дор. 4 – чДНКазaI, дор. 5 – АТ из крови здоровых доноров, дор. 6–8 – АТ из крови больных КЭ, дор. 9–11 АТ из крови больных гнойной хирургической инфекцией, урогенитальным уреаплазмозом и хламидиозом, осложненными реактивным артритом, соответственно, дор. 12–13 – АТ из крови больных урогенитальным уреаплазмозом и хламидиозом, осложненными реактивным артритом + ДТТ.

ДНК-гидролизующая активность иммуноглобулинов класса G из крови здоровых доноров не выявлялась (рис. 4, б, дор. 5). После обработки препаратов АТ восстанавливающим агентом (ДТТ) ДНКазная активность наблюдалась только в области легких цепей (рис.4, б, дор. 12, 13).

В качестве положительного контроля был использован препарат чДНКазы I (рис. 4, б, дор. 4). В данном случае активность наблюдалась в области 35 кДа, что соответствует молекулярной массе фермента (35-36 кДа).

Полученные данные свидетельствуют о том, что ДНК-гидролизующая активность является собственным свойством иммуноглобулинов из крови больных вирусными и бактериальными инфекциями, а не обусловлена примесями сывороточных ДНКаз.

4. Исследование зависимости каталитической активности антител от концентрации ионов металлов

Для определения оптимальных условий реакции была изучена металл-зависимость гидролиза ДНК антителами, образующимися при бактериальных инфекциях (менингит, рожистое воспаление (РВ), гнойная хирургическая инфекция (ГХИ), шигеллез) и при клещевом энцефалите. При отсутствии экзогенных ионов Mg^{2+} существенный гидролиз суперскрученной ДНК плазмиды препаратами IgG происходил только за 20 ч инкубации, а после добавления в реакционную смесь ЭДТА антитела полностью теряли свою активность.

Антитела из сыворотки крови больных различными бактериальными инфекциями демонстрировали разный характер зависимости глубины гидролиза ДНК от концентрации ионов Mg^{2+} (рис. 5).

ДНК-абзимы больных шигеллезом и менингитом проявляли гиперболическую зависимость гидролиза ДНК от концентрации ионов Mg^{2+} (рис. 5, а), причем реакция гидролиза проходила даже при концентрации экзогенного металла, близкой к нулю (0,005 мМ), что указывает на наличие эндогенных металлов, связанных с иммуноглобулинами. Для препаратов антител крови больных РВ зависимость гидролиза ДНК от концентрации ионов Mg^{2+} была менее выражена (рис. 5, б). Более сложная зависимость реакции гидролиза ДНК от концентрации ионов Mg^{2+} наблюдалась для препаратов антител больных ГХИ (рис. 5, в): она имела колоколообразную форму с максимумом ДНК-гидролизующей активности при концентрации ионов Mg^{2+} около 14 мМ.

Таким образом, антитела крови больных различными бактериальными инфекциями по характеру Mg^{2+} -зависимости реакции гидролиза ДНК существенно отличаются друг от друга.

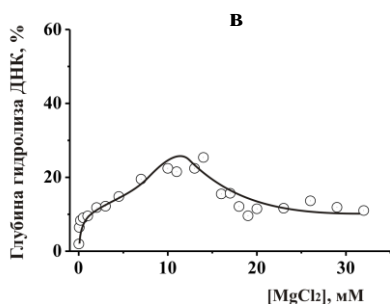
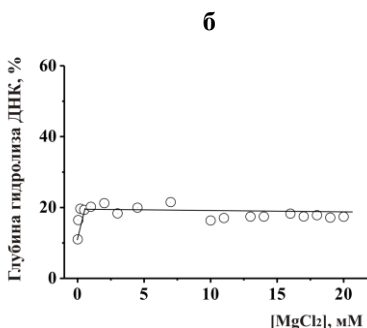
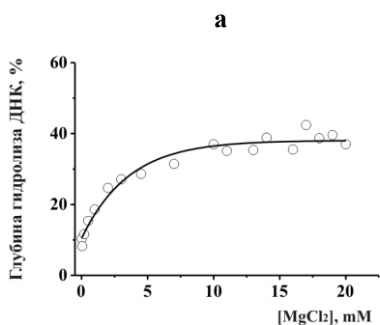


Рис. 5. Зависимость реакции гидролиза плазмидной ДНК антителами крови больных бактериальными инфекциями от концентрации ионов Mg^{2+} : **а** – АТ крови больных менингитом и шигеллезом; **б** – АТ крови больных рожистым воспалением; **в** – АТ крови больных гнойной хирургической инфекцией

Детально были проанализированы семь препаратов IgG крови больных КЭ, обладающих сопоставимыми уровнями относительной ДНК-гидролизующей активности. Удаление эндогенных ионов металлов антитела проводили диализом сначала против ЭДТА, затем против раствора 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5. При отсутствии экзогенных ионов Me^{2+} относительная активность недиализованных против ЭДТА IgG варьировала от 0,05 до 3,7% (табл. 2). После добавления $MgCl_2$ (до концентрации в реакционной смеси 5 мМ) активность увеличивалась до 11,8–26,5% в зависимости от препарата IgG. Удаление эндогенных ионов металлов диализом против ЭДТА приводило к полной потере каталитической активности, а добавление $MgCl_2$ к антителам восстанавливало их ДНКазную активность ($15,2 \pm 7,9\%$, табл. 2). Среднее значение ДНК-гидролизующей активности в присутствии ионов Mg^{2+} недиализованных препаратов АТ было в $1,6 \pm 0,8$ раз больше такового для диализованных против ЭДТА препаратов.

Таблица 2. Относительные активности препаратов IgG из крови больных КЭ, диализованных и недиализованных против ЭДТА*

Номер препарата IgG	ОА препаратов IgG, недиализованных против ЭДТА, %			ОА препаратов IgG, диализованных против ЭДТА, %		
	В отсутствие ионов Mg ²⁺ (I)	В присутствии 5 mM Mg ²⁺ (II)	Отношение (II) к (I)	В отсутствие ионов Mg ²⁺	В присутствии 5 mM Mg ²⁺ (II)	Отношение (II) к (I)
	IgG1	0,1**	12,5	103,6	0	17,4
IgG2	0,5	11,8	24,6	0	4,0	2,9
IgG3	1,1	26,6	25,1	0	13,3	2,0
IgG4	1,1	25,6	23,4	0	23,3	1,1
IgG5	0,1	24,1	482,0	0	24,2	1,0
IgG6	3,7	23,6	6,4	0	18,2	1,3
IgG7	0,8	12,1	15,5	0	6,1	2,0
Ср, значение ± ст, откл,	1,1 ± 1,2	19,5 ± 6,9	97,2 ± 172,7	0	15,2 ± 7,9	1,6 ± 0,8

*ОА, определяющиеся в присутствии каждого металла (3 mM), были пересчитаны для стандартных условий, и полный гидролиз 17 мкг/мл суперскрученной ДНК плазмиды за 1 ч инкубации в присутствии 0,1 мг/мл IgG был принят за 100%.

**Для каждого значения представлено среднее по трем измерениям; ошибка не превышала 7 – 10%

Была проанализирована зависимость ДНК-гидролизующей активности четырех диализованных против ЭДТА образцов антител (IgG8–IgG11) от ионов различных металлов. Ионы Na^+ , K^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} и Ni^{2+} не активировали гидролиз суперскрученной ДНК антителами. Относительная активность в присутствии Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} и Ca^{2+} значительно варьировала между препаратами IgG, средние значения относительной активности увеличивались в ряду $\text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Co}^{2+} \ll \text{Mn}^{2+}$ (рис. 6). Исследование влияния комбинаций различных ионов металлов на каталитическую активность препаратов IgG больных КЭ показало, что добавление в реакцию смесь одновременно ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} приводило к активации гидролиза (в 1,5–4 раза в зависимости от препарата IgG) и более выраженному накоплению линейной формы ДНК, тогда как Mg^{2+} и Ca^{2+} не оказывали значительного влияния на Mn^{2+} -зависимый ДНК-гидролиз (рис. 6).

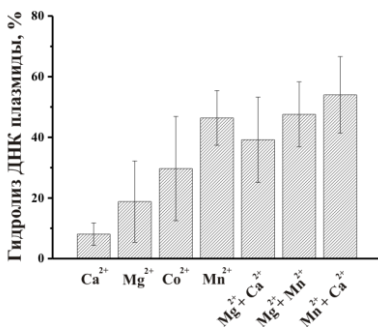


Рис. 6. Влияние комбинаций металлов на активность препаратов IgG из крови больных КЭ.

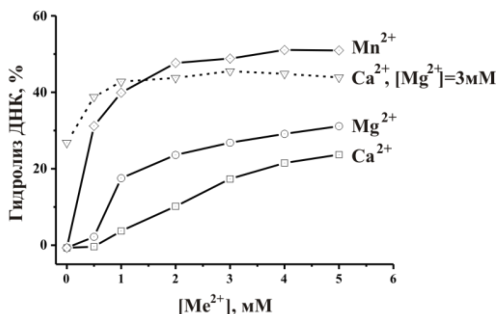


Рис. 7. Зависимость относительной активности препарата AT крови больного КЭ от концентрации различных ионов металлов.

Все исследуемые препараты AT крови больных КЭ, диализованные против ЭДТА, проявляли гиперболическую зависимость ДНК-гидролизующей активности от концентрации различных ионов металлов (рис. 7). Повышение концентрации Ca^{2+} при фиксированной концентрации Mg^{2+} , равной 3 мМ, значительно усиливает гидролиз ДНК, эта зависимость достигает максимума при 1 мМ CaCl_2 , тогда как Mg^{2+} и Ca^{2+} по отдельности максимально активируют IgG только при концентрации 5 мМ (рис. 7).

5. Взаимодействие ДНК-абзимов из крови больных клещевым энцефалитом с ДНК-целлюлозой

ДНК- и РНК-гидролизующие поликлональные IgG обычно очень гетерогенны по сродству к ДНК, и их можно разделить хроматографией на ДНК-целлюлозе на несколько подфракций, отличающихся по своим каталитическим свойствам. Для анализа гетерогенности по сродству к ДНК АТ из крови больных КЭ были проведены аффинные хроматографии на колонке с ДНК-целлюлозой. В первом случае была взята смесь шести препаратов АТ из крови больных КЭ, обладающих наибольшей ДНК-гидролизующей активностью (рис. 8, а), а во втором – семи препаратов АТ с наименьшими уровнями каталитической активности (рис. 8, б).

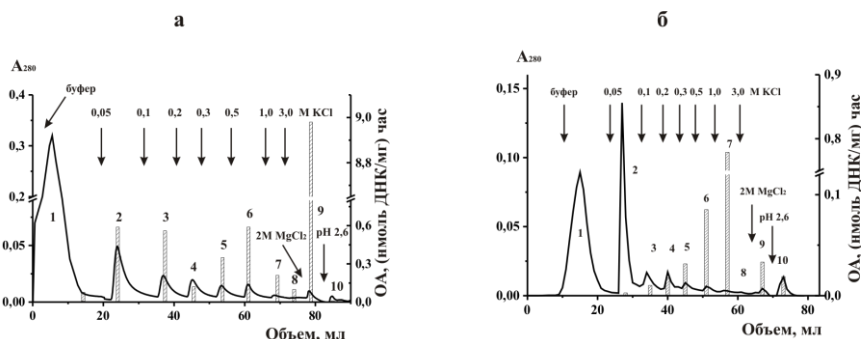


Рис. 8. Аффинная хроматография препаратов IgG(1)_{mix} (а) и IgG(2)_{mix} (б) на ДНК-целлюлозе.

(—) – Оптическое поглощение элюата при $\lambda = 280$ нм. Уровень удельной ДНК-гидролизующей активности (количество гидролизованной ДНК плазмиды на 1 мг антител за 1 ч) представлен в виде гистограммы.

В результате элюции белка ступенчатым градиентом KCl в обоих случаях было получено десять пиков, соответствующих иммуноглобулинам с разным сродством к сорбенту. Анализ ДНКазной активность этих пиков показал, что антитела каждой фракции обладали каталитической активностью, за исключением первого и восьмого пиков хроматографии номер 2 (рис. 8). Наличие ДНК-гидролизующих антител во фракциях хроматографии, элюированных с помощью 3 M NaCl, 2 M MgCl₂ или кислым буфером (рН 2,6) указывает на то, что в суммарном пуле абзимов присутствуют антиидиотипические антитела против активных центров ДНК- и РНК-гидролизующих ферментов, имеющих высокое сродство к ДНК.

6. Кинетические параметры реакции гидролиза ДНК препаратами IgG из крови больных инфекционными заболеваниями

Для определения кинетических характеристик реакции гидролиза суперскрученной ДНК плазмиды абзимами крови больных инфекционными заболеваниями были взяты препараты АТ из крови больных КЭ, рожистым воспалением (РВ), урогенитальным уреоплазмозом, ассоциированным с реактивным артритом, и шигеллезом. Для суммарного препарата АТ из крови больных КЭ обнаружено по одному значению величин K_m , (98 ± 35) -нМ, и k_{cat} , $(0,3 \times 10^{-3}) \cdot \text{мин}^{-1}$ (табл. 3, рис. 9, а). Препарат IgG больного шигеллезом с низкой ОА демонстрировал также только по одной величине K_m и k_{cat} для суперскрученной ДНК ($K_m = 104 \pm 25$ нМ, $k_{cat} = (1 \pm 0,25) \times 10^{-5} \text{мин}^{-1}$). Два других препарата IgG со значительно более высокими относительными активностями демонстрировали более сложную зависимость скорости реакции от концентрации субстрата, соответствующую сумме двух гиперболических кривых насыщения абзимов субстратом (рис. 9, б). Один из IgG препаратов больного урогенитальным уреоплазмозом, ассоциированным с реактивным артритом демонстрировал $K_m(1) = (38 \pm 7)$ нМ, $k_{cat} = (3,6 \pm 0,7) \times 10^{-3} \text{мин}^{-1}$, и $K_m(2) = (204 \pm 50)$ нМ, $k_{cat} = (1,4 \pm 0,05) \times 10^{-2} \text{мин}^{-1}$. Две величины K_m и k_{cat} были также получены для IgG с наибольшей активностью от пациента со стрептококковой инфекцией (рожистое воспаление): $K_m(1) = (41 \pm 8)$ нМ ($k_{cat} = (1,3 \pm 0,4) \times 10^{-3} \text{мин}^{-1}$) и $K_m(2) = (360 \pm 45)$ нМ ($k_{cat} = (7,0 \pm 1,0) \times 10^{-2} \text{мин}^{-1}$).

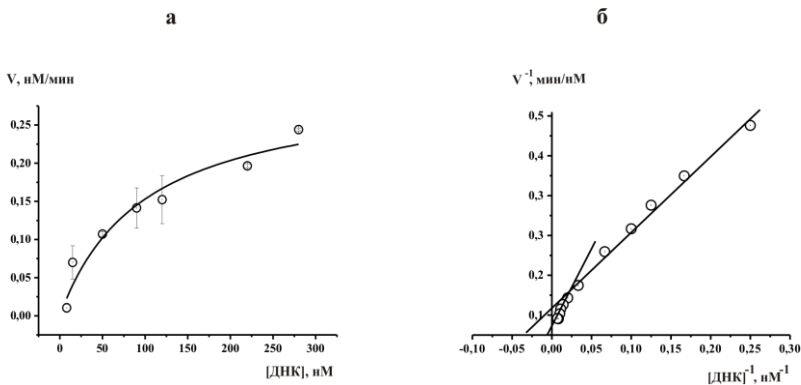


Рис. 9. а – Зависимость начальной скорости реакции гидролиза ДНК суммарным препаратом IgG крови больных КЭ от концентрации субстрата.

б – Зависимость начальной скорости гидролиза ДНК препаратом IgG крови больного урогенитальным уреоплазмозом (ассоциированный реактивный артрит) от концентрации субстрата в координатах Лануивера-Берка.

В целом, величины K_m для абзимов крови больных инфекционными заболеваниями лежат в диапазоне 10^{-9} – 10^{-6} М, что характерно для взаимодействий типа "антиген-антитело" (табл. 3).

Таблица 3. Кинетические характеристики реакции гидролиза суперскрученной ДНК плазмиды препаратами IgG крови больных инфекционными заболеваниями

Заболевание	K_m, М	k_{cat}, мин⁻¹
Клещевой энцефалит	$(98 \pm 35) \times 10^{-9}$	$(0,3 \pm 0,1) \times 10^{-3}$
Шигеллез	$(104 \pm 25) \times 10^{-9}$	$(1 \pm 0,25) \times 10^{-5}$
Урогенитальный уреоплазмоз, ассоциированный с реактивным артритом	$K_m(1) = (38 \pm 7) \times 10^{-9}$ $K_m(2) = (204 \pm 50) \times 10^{-9}$	$k_{cat}(1) = (3,6 \pm 0,7) \times 10^{-3}$ $k_{cat}(2) = (1,4 \pm 0,05) \times 10^{-2}$
Рожистое воспаление	$K_m(1) = (41 \pm 8) \times 10^{-9}$ $K_m(2) = (360 \pm 45) \times 10^{-9}$	$k_{cat}(1) = (1,3 \pm 0,4) \times 10^{-3}$ $k_{cat}(2) = (7,0 \pm 1,0) \times 10^{-2}$

Значения k_{cat} исследуемых препаратов АТ были на 2–4 порядка меньше известных величин k_{cat} для природных каталитически активных антител из крови больных аутоиммунными заболеваниями ($0,001$ – $15,6$ мин⁻¹). Значения k_{cat} для абзимов из крови ВИЧ-инфицированных больных были сравнимы с таковыми для наиболее активных препаратов IgG из крови больных урогенитальным уреоплазмозом, ассоциированным с реактивным артритом, и рожистым воспалением – заболеваниями, при которых в организме могут развиваться аутоиммунные реакции. Абзимы из крови больных КЭ и шигеллезом демонстрировали значения k_{cat} на 2–3 порядка меньше, чем при ВИЧ-инфекции.

7. Определение типа легких цепей антител, участвующих в гидролизе ДНК

Для определения типов легких цепей ДНК-гидролизующих абзимов из крови больных КЭ и бактериальными инфекциями (гнойная хирургическая инфекция (ГХИ), рожистое воспаление (РВ)), были приготовлены смеси из эквимольных количеств 11 препаратов АТ больных РВ, 9 препаратов АТ больных ГХИ и 10 препаратов АТ больных КЭ. Иммуноглобулины, содержащие легкие цепи κ - и λ - типа, были получены аффинной хроматографией на колонках с иммобилизованными моноклональными антителами против различных типов легких цепей АТ человека (рис. 10).

Далее была оценена активность полученных фракций в реакции гидролиза ДНК плазмиды. В случае IgG больных КЭ и ГХИ относительная активность антител, содержащих легкие цепи λ -типа, была в 2–2,5 раза

выше таковой для антител с κ-легкими цепями. Для антител из крови больных РВ относительные активности IgG с κ- и λ- легкими цепями значительно не отличались друг от друга (46 и 53 % соответственно).

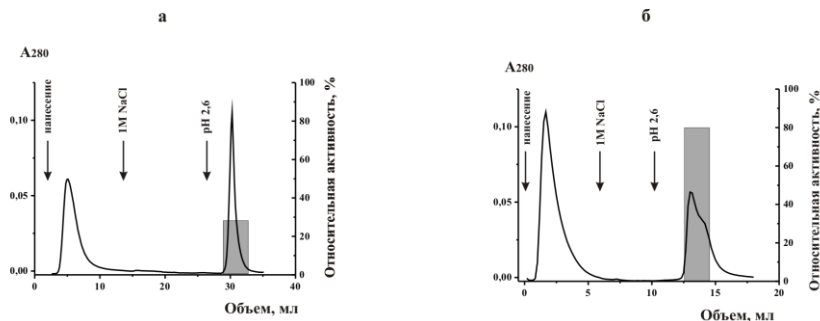


Рис. 10. Профили аффинной хроматографии препарата IgG_{mix} из крови больных КЭ на анти-κ-Sephrose (а) и анти-λ-Sephrose (б).

(—) – оптическая плотность элюата при 280 нм, столбиками обозначена глубина гидролиза ДНК фракциями хроматографии.

Согласно литературным данным, процентное содержание иммуноглобулинов с κ- и λ-легкими цепями составляет в среднем 70 и 30% соответственно. С учетом этого можно оценить вклад иммуноглобулинов, содержащих различные типы легких цепей, в каталитическую активность суммарного пула антител. В случае КЭ и ГХИ вклад IgG с κ и λ-легкими цепями сопоставим, тогда как при РВ больший вклад вносят антитела, содержащие κ-легкую цепь.

8. Определение изотипов антител (IgG1–IgG4), участвующих в гидролизе ДНК

Для исследования эффективности гидролиза ДНК изотипами IgG были приготовлены смеси из эквимольных количеств 11 препаратов АТ больных РВ, 9 препаратов АТ больных ГХИ и 10 препаратов АТ больных КЭ, а также из препаратов IgG крови больных аутоиммунными заболеваниями: РС (20 препаратов) и СКВ (20 препаратов). Иммуноглобулины различных подклассов были получены аффинной хроматографией на анти-IgG1-, анти-IgG2-, анти-IgG3- и анти-IgG4-Sephrose.

Анализ каталитической активности полученных фракций показал, что иммуноглобулины всех подклассов гидролизуют суперскрученную ДНК плазмиды с различной эффективностью, исключением являлась фракция IgG3, выделенная из крови больных РВ – она была полностью неактивна (рис. 11). Для получения сопоставимых результатов в качестве препарата сравнения при анализе данных использовали наиболее активную фракцию – IgG4 из крови больных СКВ. Удельную активность этой фракции (12,9 пмоль ДНК на 1 мг АТ за 1 ч) принимали за 100%.

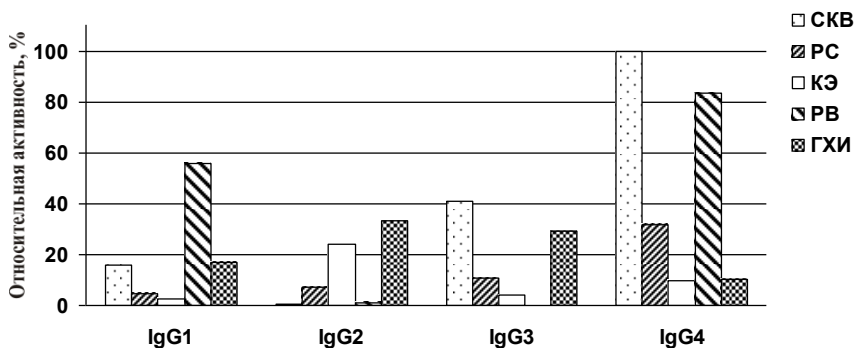


Рис. 11. Относительная ДНК-гидролизующая активность различных подклассов иммуноглобулинов. За 100% принята активность IgG4 из крови больных СКВ (12,9 пмоль ДНК на 1 мг АТ за 1 ч). РС – рассеянный склероз, КЭ – клещевой энцефалит, РВ – рожистое воспаление, ГХИ – гнойная хирургическая инфекция.

Приблизительную оценку относительного вклада ДНКазной активности IgG1–IgG4 в общую активность суммарного препарата IgG можно сделать на основании литературных данных. Известно, что содержание подклассов антител в крови может колебаться в пределах: IgG1 – 34–87%, IgG2 – 5–56%, IgG3 – 0,5–12%, IgG4 – 7–12%. Учитывая это, можно оценить вклад АТ различных подклассов в суммарную активность общего пула антител (рис. 12).

Особое внимание обращает на себя то, что в эквиволярной смеси 11 препаратов IgG из крови больных РВ не обнаружено достоверно тестируемой ДНКазной активности IgG3, в то время как удельная активность IgG3 из крови больных ГХИ, КЭ, РС и СКВ была достоверно тестируема и сопоставима с таковыми для иммуноглобулинов трех других подклассов (рис. 12).

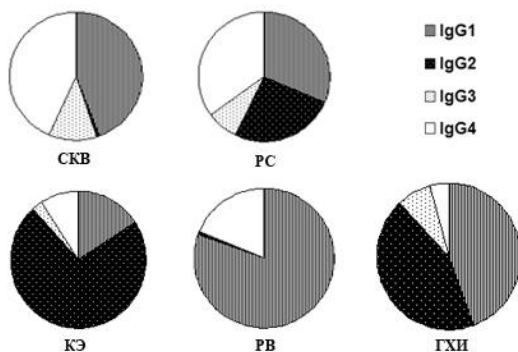


Рис. 12. Вклад различных подклассов IgG в суммарную каталитическую активность общего пула антител при разных заболеваниях. РС – рассеянный склероз, КЭ – клещевой энцефалит, РВ – рожистое воспаление, ГХИ – гнойная хирургическая инфекция.

В случае АТ из крови РС и СКВ наибольшей ДНК-гидролизующей активностью обладали IgG4 и IgG3 (рис. 11), и их вклад в суммарную активность общего пула антител сопоставим с таковым для IgG1 и IgG2. Основной вклад в общую ДНК-гидролизующую активность в группе больных РВ вносят IgG1 ($80,3 \pm 35,2\%$), при КЭ – IgG2 ($72,6 \pm 28,0\%$), при ГХИ – IgG1 ($44,3 \pm 19,4\%$) и IgG2 ($43,7 \pm 36,5\%$), на долю иммуноглобулинов остальных подклассов приходится 15–30% активности.

9. Исследование цитотоксичности препаратов IgG из крови больных КЭ

Группой исследователей под руководством Габибова А.Г. было показано, что препараты поликлональных АТ, выделенные из сыворотки крови СКВ, оказывают цитотоксическое действие на культуру клеток, причем наблюдалась положительная корреляция между уровнем ДНК-гидролизующей активности препаратов АТ и цитотоксичностью. Ранее в нашей лаборатории было показано цитотоксическое действие препаратов поликлональных АТ из крови больных СКВ на клетки линии MCF-7. В связи с этим представляло интерес исследовать цитотоксические свойства 15 препаратов поликлональных IgG, обладающих ДНК-гидролизующей активностью, из крови больных КЭ. Исследование проводили на культуре клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Клетки инкубировали в течение 3 суток с АТ-КЭ в различных концентрациях (0,05–1,66 мкМ), затем живые клетки окрашивали МТТ. Выживаемость клеток оценивалась как отношение оптической плотности клеток, инкубированных с АТ, к контролю (инкубация в буфере), в процентах.

Из всех исследованных препаратов ни один не продемонстрировал цитотоксического эффекта (рис. 13).

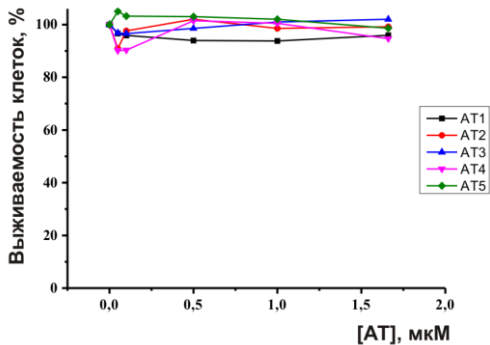


Рис.13. Исследование цитотоксичности препаратов АТ крови больных КЭ на культуру клеток линии MCF-7. Ошибка метода не превышала 15%.

Отсутствие в суммарном пуле ДНК-гидролизующих АТ, образующихся в ответ на вирус КЭ, иммуноглобулинов с цитотоксической активностью, позволяет предположить, что ДНК-абзимы нарабатываются по различным механизмам в норме и при аутоиммунных патологиях.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что антитела крови больных клещевым энцефалитом (КЭ) и бактериальными инфекциями обладают ДНК-гидролизующей активностью. Проверка ряда общепринятых критериев показала, что ДНКазная активность является их собственным свойством.

2. Установлено, что ДНК-гидролизующие абзимы из крови больных инфекционными заболеваниями активируются ионами металлов. Активирующее действие металлов для абзимов из крови больных КЭ возрастает в следующем порядке: $\text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Mg}^{2+} + \text{Ca}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Mg}^{2+} + \text{Mn}^{2+} < \text{Mn}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$. Показано, что абзимы больных клещевым энцефалитом и бактериальными инфекциями гетерогенны по сродству к ДНК и скоростям гидролиза субстрата.

3. Установлено, что ДНК гидролизуют IgG-абзимы, содержащие легкие цепи как κ -, так и λ -типа. Впервые показано, что IgG всех четырех подклассов (IgG1–IgG4) из крови больных КЭ, бактериальными инфекциями, а также аутоиммунными заболеваниями обладают ДНКазной активностью; их относительная активность варьирует в зависимости от заболевания. Вклад в суммарную активность различных изотипов IgG с учетом их содержания в крови также сильно отличается.

4. Показано, что ДНК-гидролизующие IgG крови больных клещевым энцефалитом не обладают цитотоксичным действием на клетки MCF-7.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Одинцова Е.С., Пархоменко Т.А., Бунева В.Н., Генералов И.И., Невинский Г.А. ДНК-гидролизующие IgG антитела из крови больных некоторыми инфекционными заболеваниями // Иммунопатология. Аллергология и инфектология. – 2006. – Т. 2. – С. 23-31.
2. Parkhomenko T.A., Odintsova E.S., Buneva V.N., Kunder E.V., Zhylytsov I.V., Senkovich S.A., Generalov I.I., Nevinsky G.A. DNA-hydrolyzing activity of IgG antibodies from the sera of patients with diseases caused by different bacterial infections // J. Cell. Mol. Med. – 2009. – V. 13. – P. 2875-2887.
3. Parkhomenko T.A., Buneva V.N., Tyshkevich O.B., Generalov I.I., Doronin B.M., Nevinsky G.A. DNA-hydrolyzing activity of IgG antibodies from the sera of patients with tick-borne encephalitis // Biochimie. – 2010. – V. 92. – P. 545-554.
4. Parkhomenko T.A., Legostaeva G.A., Doronin B.M., Buneva V.N., Nevinsky G.A. IgGs containing light chains of the λ and κ type and of all subclasses (IgG1-IgG4) from sera of patients with multiple sclerosis hydrolyze DNA // J. Mol. Recognit. – 2010. – V. 23. – P. 486-494.
5. Пархоменко Т.А., Бунева В.Н., Кундер Е.В., Жильцов И.В., Генералов И.И., Невинский Г.А. ДНКазная активность IgG антител, содержащих легкие цепи I- и k-типа, а также подклассов IgG1-IgG4 у больных с некоторыми инфекционными заболеваниями // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – № 2. – С. 99-109.
6. Гусев Е.И., Пархоменко Т.А., Бунева В.Н., Доронина О.Б., Доронин В.Б. Генералов И.И., Доронин Б.М., Невинский Г.А. Клещевой энцефалит: иммунологические показатели возможного перехода острой стадии в хроническое течение болезни // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 4. – С. 5-18.