

0721765-1

На правах рукописи

УДК 612.017.1:616.5-002.525.2:616-097:577.123.2:612-092.4

Темников Дмитрий Алексеевич

**ДНК-ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ АУТОАНТИТЕЛА
И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РОСТ КЛЕТОК IN VITRO**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

**НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
КФУ**



0000977377

Казань 2001

Работа выполнена на кафедре биохимии
Казанского государственного университета

- Научные руководители: Доктор биологических наук,
профессор **Винтер В.Г.**
Кандидат медицинских наук,
врач высшей категории
Куренева М.М.
- Официальные оппоненты: Академик АН РТ,
доктор медицинских наук,
профессор **Зубаиров Д.М.**
Доктор биологических наук,
профессор **Гильмутдинов Р.Я.**
- Ведущая организация: Нижегородский
государственный
университет

Защита состоится « 17 » мая 2001 года в
14-30 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08
по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора
биологических наук при Казанском государственном университете
(420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 209)

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке имени
Н.И.Лобачевского при КГУ

Автореферат разослан « 6 » апреля 2001 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук *Аскарова* Аскарова А.Н.

0721765-1

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

ПРОВЕРЕНО
2008 г.

Актуальность проблемы

Выяснению роли аутоантител (ААТ) в системе иммунного ответа при аутоиммунной патологии и в норме посвящено много исследований в области биохимии, иммунологии, аллергологии. На сегодняшний день идентифицировано большое число антигенов, к которым чаще всего обнаруживаются ААТ – энзимы основных метаболических путей, рецепторы различных клеток, внутриклеточные компоненты, нуклеиновые кислоты и нуклеопротеиды, фосфолипиды (Габибов и др., 1991; Насонова, 1995). Обнаружены антитела, способные проявлять ферментативную активность (Lerner, Schultz, 1988, 1991, 1995; Щуров, 1997). Такие антитела называют каталитическими антителами или абзимами.

При многих системных аутоиммунных заболеваниях (ревматоидном артрите, синдроме Шегрена, антифосфолипидном синдроме и, особенно, при системной красной волчанке) у больных наблюдается образование абзимов - аутоантител с ДНК-гидролизующей активностью (Шустер, Гололобов, Габибов, 1991).

Системная красная волчанка (СКВ) – тяжелое хроническое рецидивирующее воспалительное заболевание соединительной ткани. Клинические проявления заболевания зависят от остроты болезни и локализации поражений. Наблюдаются изменения со стороны кожи, суставов, легких, сердца, ЦНС. Более чем в 50% случаев у больных СКВ развивается тяжелое поражение почек – люпус-нефрит. В особо тяжелых, поздно диагностированных случаях волчанка может приводить к смертельному исходу в короткие сроки. В многочисленных исследованиях было показано, что важное значение в патогенезе этого заболевания играют аутоантитела. Отмечено, что одним из характерных клинических признаков данного заболевания является появление так называемых антинуклеарных антител (Чучалин, 1997; Pisetsky, 1998). Однако, биологическая роль аутоантител к ДНК при СКВ остается до конца не ясной, в частности, не выяснено их действие на ткани почки при люпус-нефрите. Полученные разными авторами (Vlahakos, Foster, 1992; Reichlin, Hahn, Koren, 1995) данные свидетельствуют о том, что АТ к ДНК, обнаруживаемые у больных СКВ, способны действовать на живые клетки. В результате наблюдается повреждение и последующее разрушение клеток.

Следует отметить, что для СКВ отдаленный прогноз благоприятен только при ранней диагностике, что позволяет остановить развитие болезни в самом начале. Поэтому всесторонние исследования ААТ к ДНК при СКВ необходимы как для диагностики и понимания патогенеза данного заболевания, так и для постоянного контроля за эффективностью проводимого лечения.

Одной из причин противоречивости результатов о содержании ААТ к ДНК у больных СКВ (Ермекова, 1981; Козырь, 1996) является отсутствие общепринятого способа выделения ААТ к ДНК из крови. Актуальной также является разработка методов оценки ДНК-гидролизующей активности

аутоантител. Как показали наши исследования, определение ДНКазной активности ААТ к ДНК может быть использовано как для ранней диагностики, так и для оценки эффективности проводимого лечения.

Исследования ферментативной активности ААТ к ДНК несомненно будут способствовать расширению наших познаний о биологической роли каталитических антител – абзимов и при нормальном развитии организма.

Целью данной работы является исследование влияния ДНК-гидролизующих аутоантител из крови больных системной красной волчанкой на рост клеток *in vitro*. Нами были поставлены следующие задачи:

- получение из сыворотки крови больных СКВ высокоочищенных фракций IgG, содержащих аутоантитела к ДНК;
- определение ДНК-гидролизующей способности полученных фракций IgG;
- характеристика ДНК-гидролизующей активности ААТ к ДНК;
- исследование влияния фракций ААТ на рост клеток *in vitro*.

Научная новизна

Установлено, что популяция аутоантител к ДНК у больных СКВ гетерогенна: существуют по крайней мере два типа (субклона) ААТ к ДНК, различающихся по способности связываться с анионообменником. Показано, что аутоантитела к ДНК, аффинно связывающиеся с ПротеинА-сефарозой, являются каталитическими антителами с дезоксирибонуклеазной активностью. Установлено, что ДНКазная активность аутоантител к ДНК при СКВ термостабильна, является металлозависимой и имеет оптимум pH 7,5.

Впервые показано, что ААТ к ДНК при СКВ обладают рост стимулирующей активностью в отношении клеток линии СПЭВ в условиях *in vitro*. Аутоантитела предотвращают гибель клеточного монослоя в бессывороточной среде, стимулируют деление клеток и рост клеточной культуры в среде со стандартным содержанием сыворотки.

Установлена корреляция между наличием у аутоантител ДНК-гидролизующей активности и их способностью стимулировать рост клеток *in vitro*. При ремиссии СКВ у больных, прошедших краткий курс гормональной терапии, ДНКазная активность АТ снижается и антитела теряют способность стимулировать пролиферацию клеток.

Практическая значимость

Разработан метод многоступенчатой очистки аутоантител к ДНК из сыворотки крови больных системной красной волчанкой. Метод позволяет получать не менее двух фракций антител, различающихся по способности связываться с анионообменником и содержанию ДНК-гидролизующих антител.

Предложен метод определения ДНК-гидролизующей активности ААТ при СКВ, который может быть использован при ранней диагностики заболевания и оценки эффективности проводимого лечения.

Разработана методика и соответствующее программное обеспечение для анализа электрофореграмм с использованием компьютерного сканера.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
им. Н. И. ЛОБАЧЕВСКОГО
КАЗАНСКОГО ГОС. УНИВЕРСИТЕТА

Апробация работы

Основные результаты исследования докладывались на III Республиканской научно-технической конференции молодых ученых и специалистов (г. Казань, 1997); IX Международной конференции молодых ученых «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений», (г. Казань, 1998); III Пушкинской конференции молодых ученых (г.Пушино, 1998); Всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре» (г.Санкт-Петербург, 1998); V Международной конференции «Биохимия здоровья и болезней» (г. Иерусалим, Израиль, 1998); XIII Всероссийском симпозиуме «Структура и функции клеточного ядра» (г.Санкт-Петербург, 1999); I научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века» (г. Казань, 2000); Международной научно-практической конференции «Современная техника и технологии в медицине и биологии» (г. Новочеркасск, 2001), а также на ежегодных итоговых научных конференциях Казанского государственного университета в 1997-2000 гг.

По материалам диссертации опубликовано 12 работ.

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения результатов работы, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц и 23 рисунка. Список использованной литературы включает 171 наименование, из них 96 отечественных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлись аутоантитела к ДНК, полученные из крови больных СКВ на различных стадиях заболевания. Кровь больных СКВ была получена от 7 пациентов (5 женщин от 17 до 52 лет и 2 мужчин – 48 и 62 лет) с первично выявленным заболеванием. Все больные находились в острой фазе заболевания. У пяти из них (4 женщины и 1 мужчина) кровь забиралась повторно после проведения кратковременного курса гормональной терапии (преднизолон, 60 мг/сут, 3 суток) до наступления заметной ремиссии. В качестве контроля использовали кровь 10 здоровых людей.

Процесс выделения фракций аутоантител к ДНК включал в себя получение сыворотки крови, высаливание белковой фракции сульфатом аммония, гель-фильтрацию на Сефадексе G-25, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе в градиенте NaCl от 0,03 до 0,3 М и аффинную хроматографию на ПротеинА – сефарозе (белок А *Staphylococcus aureus*), специфически связывающей Fc-фрагмент IgG. Состав препаратов белка на каждой стадии очистки исследовали методом электрофореза в ПААГ в

недиссоциирующих и диссоциирующих условиях. Наличие АТ к ДНК в белковых фракциях определяли с помощью иммуноферментного анализа.

Каталитическую активность ААТ к ДНК оценивали по их способности гидролизовать суперскрученную ДНК плазмиды рВВ-322. Для контроля результатов реакции использовали электрофорез в агарозе. Анализ электрофореграмм проводили по разработанной нами методике с использованием компьютерного сканера.

Для определения оптимальной величины рН реакции гидролиза ДНК антителами к ДНК готовили реакционные смеси (12мкл), содержащие модификации буфера 1 (25мМ трис-НСl; 50 мМ NaCl; 5 мМ MgCl₂; 0,5 мМ ЭДТА) с различными значениями рН (5.0 – 9.0), 0,2 мг/мл суперскрученной плазмидной ДНК и 0,4 мг/мл IgG, прогретых при 56°С в течение 40 минут.

С целью оценки влияния ионов двухвалентных металлов и АТФ на активность антител к ДНК плазмидную ДНК гидролизовали в реакционной смеси объёмом 12 мкл при 37°С в течение 1,5 часа. Реакционная смесь содержала буфер 2 (25 мМ трисНСl; 50 мМ NaCl; 0,5 мМ ЭДТА; рН 7.5), 0,2 мг/мл суперскрученной формы рВВ 322 и 0,4 мг/мл IgG, прогретых при 56°С в течение 40 минут. На базе буфера 2 составляли серию буферов, содержащих различные компоненты (Mn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ в концентрациях 2,5, 5, 10 мМ; АТФ в концентрациях 0,05 и 0,5 мМ). Реакцию останавливали замораживанием раствора.

Гидролиз ДНК антителами к ДНК осуществляли в реакционной смеси, содержащей буфер 3 (25 мМ трисНСl; 50 мМ NaCl; 5 мМ MgCl₂; 0,5 мМ ЭДТА; рН 7.5) и 0,2 мг/мл суперскрученной ДНК. Использовали прогретые при 56°С в течение 40 минут белки. Внесение АТ осуществляли до конечной концентрации 0,4 – 0,8 мг/мл. Во время инкубации при 37°С из реакционных смесей отбирали аликвоты по 12 мкл через фиксированные временные интервалы в течение 1-27 часов, которые замораживали для предотвращения дальнейшего гидролиза. В качестве контроля использовали исходную плазмидную ДНК, инкубированную при 37°С.

Для количественной оценки результатов электрофореза нами была разработана методика обработки фотокопий электрофореграмм с помощью компьютерного сканера. Использовали сканер "HP ScanJet Plus" фирмы Hewlett Packard, обеспечивающий максимальное разрешение 300 точек на дюйм, что соответствует расстоянию ~ 85 мкм между соседними точками. Результатом сканирования являлся растровый графический файл в формате BMP, который затем преобразовывали в файл данных, доступный для стандартных программ математической обработки. Программа преобразования была написана на языке Microsoft QuickBASIC, позволяющем легко выполнять различные файловые операции. Дальнейшую обработку (усреднение шумов, вычитание нулевой линии, определение площади пиков) проводили с помощью программы Microsal Origin. Разработанная методика позволила обнаружить перераспределение форм ДНК, начиная с уровня 2%.

В экспериментах по изучению влияния антител к ДНК на рост клеток была использована клеточная линия СПЭВ. Линия была любезно предоставлена сотрудниками ВНИВИ (г.Казань). Культивирование клеток проводили в многокомпонентной питательной среде (МЕМ, среда 199, гидролизат лактальбумина, глутамин) с добавлением (1:1) фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и эмбриональной сыворотки в конечной концентрации 8%. На отдельных этапах исследования использовали бессывороточную среду. Культура клеток достигала состояния монослоя ко 2-м суткам. Монослой не деградировал в течение 4-х суток, пассирование проводили на 5-е сутки. Концентрация клеток при пересеве составляла 600 тыс. кл./мл. Предварительные эксперименты по выяснению действия ФСБ на клеточную культуру показали, что добавление в питательную среду ФСБ в соотношении 1:1 не оказывало влияния на рост клеток по сравнению с контролем. Данные результаты позволили нам в дальнейших экспериментах использовать разбавленные ФСБ питательные среды, что упростило процедуру внесения ААТ в среду с клетками. Перед внесением в клеточную культуру фракции антител диализовали против ФСБ, определяли концентрацию белка в пробах, прогревали при 56°C в течение 40 минут и стерилизовали фильтрованием через микропористый капроновый фильтр. Подсчет клеток и оценку жизнеспособности производили в гемоцитометре через 18, 24, 48, 72 часов после внесения АТ к ДНК. Оценка жизнеспособности проводили после окрашивания клеток трипановым синим. Прижизненное наблюдение за состоянием клеточной культуры проводили с помощью инвертированного микроскопа. Для документирования результатов экспериментов клетки фотографировали после окрашивания метиленовым фиолетовым или индиго.

Полученную после пересева суспензию клеток в питательной среде рассеивали в лунки планшета в конечной концентрации 1,2 млн. кл./мл. Суспензии клеток разбавляли ФСБ (1:1), содержащим антитела (опыт) или не содержащим АТ к ДНК (контроль). Фракции 16 и 26 вносили в конечной концентрации 0,08 мг/мл.

Монослой получали в 24-х луночных планшетах при культивировании клеток в течение 2-х суток. Затем питательную среду удаляли, монослой в лунках 3-кратно обрабатывали ФСБ. После этого в планшеты разливали питательные среды (с концентрацией эмбриональной сыворотки 8% и 0%), содержащие АТ к ДНК в конечной концентрации 0,08 мг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение высокоочищенных фракций IgG, содержащих антитела к ДНК

При разделении белков сыворотки крови на ДЭАЭ-целлюлозе было установлено, что около 45% нанесенного белка не сорбируется, а 55% фиксируется на колонке. Фракция белка, не сорбирующаяся на анионообменнике и выходящая одним пиком (фракция 1), по данным

электрофореза представляет собой иммуноглобулин G. Электрофоретический анализ белков, элюирующихся при использовании градиента концентрации NaCl несколькими пиками, показал, что в их состав входят IgG, гемопексин, гаптоглобин, церулоплазмин, альбумин, низкомолекулярные белки, и, возможно, IgA. Для исследования были отобраны фракции, содержащие максимальное количество IgG. Эти белки обозначены далее как **фракция 2**.

Иммуноферментный анализ показал что белки, связывающие ДНК, присутствуют в обеих фракциях IgG, полученных с помощью ионообменной хроматографии из сыворотки крови больных СКВ в активной фазе заболевания, хотя во фракции 2 максимум АТ к ДНК, приходящийся на максимум концентрации IgG, элюируемого с ДЭАЭ-целлюлозы, почти в 1,5 раза меньше, чем во фракции 1. Таким образом, популяция АТ к ДНК у больных СКВ гетерогенна: существуют по крайней мере два типа (субклона) аутоантител к ДНК, отличающиеся сродством к анионообменнику.

В ходе аффинной хроматографии на ПротеинА-сефарозе были выделены 4 фракции:

- **фракция 1а**, являющаяся частью фракции 1, не сорбирующейся на Протеине А;
- **фракция 1б** – часть фракции 1, элюируемая с сорбента кислым буфером;
- **фракция 2а**, представляющая собой основную часть фракции 2, не сорбирующуюся на Протеине А при посадке с двукратной рециркуляцией;
- **фракция 2б** – часть фракции 2, связавшаяся с аффинным сорбентом.

Электрофорез в недиссоциирующих условиях показал, что фракции 1б и 2б, связавшиеся с сорбентом, содержат только один белок, соответствующий IgG с М.М. 160 кДа. После электрофореза фракций 1б и 2б в диссоциирующих условиях окрашиваются две белковые полосы, соответствующие по молекулярной массе лёгкой и тяжёлой цепям IgG.

С помощью иммуноферментного анализа антитела к ДНК были выявлены во фракциях 1б, 2б и 1а, причем относительное содержание антител во фракции 1б почти в 5 раз больше, чем во фракции 2б и в 10 раз больше, чем во фракции 1а.

Как известно, ПротеинА-сефароза обладает высоким сродством к IgG подклассов 1, 2, 4 человека. Это позволило отнести фракции 1б и 2б, связавшиеся с Протеином А, к IgG подклассов 1, 2 и 4. Во фракциях 1а и 2а содержатся IgG подкласса 3.

При связывании с ДНК антител фракций 1 и 1б главную роль по-видимому играют электростатические взаимодействия. Не связывающиеся с анионообменником антитела, несущие положительный заряд, обладают способностью электростатически связываться с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. Связывание с ДНК антител фракции 2 и 2б по-видимому обусловлено их аффинным сродством; электростатические взаимодействия в данном случае не являются определяющими.

Изучение дезоксирибонуклеазной активности ААТ к ДНК

Изучение ферментативной активности поликлональных антител - одно из новых, активно развивающихся направлений иммунологии. Результаты таких исследований дают возможность по-новому рассмотреть процесс становления и развития иммунного ответа. Особый интерес представляет исследование препаратов иммуноглобулинов, обладающих деполимеризующим действием, учитывая потенциальную патогенетическую роль подобных антител в развитии аутоиммунных заболеваний. Сыворотки крови больных АИЗ содержат значительное количество антител к различным аутоантигенам, в том числе и к ДНК, что дает основания для поиска среди этого многообразия антител, обладающих каталитической активностью.

В связи с тем, что результаты ИФА показали наличие ДНК-связывающих антител во фракциях 1а, 1б и 2б, была проведена оценка способности этих аутоантител гидролизовать ДНК плазмиды рBR 322. Концентрацию различных форм ДНК в плазмиде рBR-322 определяли по данным электрофореза в агарозном геле. Эксперименты показали, что условия инкубации (37°C, 10 часов) не влияют на содержание суперскрученной плазмидной ДНК. Содержание линейной формы ДНК в инкубированном образце не превышало 2%.

Доказательство действия на ДНК непосредственно АТ к ДНК, а не нуклеаз сыворотки крови, является одной из наиболее сложных задач при исследовании ДНК-гидролизующей способности аутоантител. Это связано с относительно низкой удельной активностью ААТ по сравнению с обычными ферментами. В данной работе мы решали эту проблему в два этапа: тщательной многоступенчатой очисткой фракций IgG и, затем, прогревом полученных образцов при 56°C в течение 40 минут. При инкубировании ДНК с сывороткой, не подвергшейся температурной обработке, практически вся суперскрученная ДНК переходила в кольцевую и линейную формы, что является результатом действия нуклеаз сыворотки крови. В то же время в образцах, проинкубированных с прогретой сывороткой, перераспределения форм ДНК не наблюдалось. Таким образом, под действием прогревания нуклеаза сыворотки утрачивает свою активность и гидролиза ДНК не происходит.

Исследование влияния тепловой обработки на каталитическую активность АТ показало, что фракции 1 и 2, выделенные в ходе ионообменной хроматографии из сыворотки крови больных СКВ, сохраняют способность гидролизовать ДНК и после прогревания. При этом большей активностью обладают АТ фракции 2. Антитела фракций 1б и 2б, полученные в процессе аффинной хроматографии, после прогревания также демонстрируют ДНК-гидролизующую активность. Отсутствие нуклеазной активности позволило более точно определить активность аутоантител и выявить особенности гидролиза ДНК.

Одной из задач нашего исследования было изучение влияния ионов двухвалентных металлов на активность АТ к ДНК. Для фракций 1б и 2б, было установлено, что ионы Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} и АТФ не влияют на ДНКазную активность АТ. Ионы Mg^{2+} в концентрации 5 мМ активируют реакцию

гидролиза. Активность этих фракций IgG имеет выраженный максимум при рН 7,5.

Исследования кинетики гидролиза ДНК были проведены с антителами фракций 16 и 26. Во всех случаях кинетические кривые имели ступенчатый характер (Рис.1). На начальном этапе наблюдалось незначительное (в пределах 10-15%) уменьшение содержания суперскрученной формы плазмидной ДНК, сопровождающееся увеличением, в основном, линейной ее формы. На втором этапе снижение доли суперскрученной формы ДНК вело к увеличению (на 15-25%) кольцевой формы; содержание линейной формы при этом практически не изменялось. На этом этапе времена полупревращения ДНК при ее инкубации с антителами разных фракций значительно различались: 10-12 часов для фракции 16 и 6-7 часов для фракции 26. К концу инкубации содержание суперскрученной формы ДНК падало до 30-40%. Содержание линейной ДНК во всех случаях составляло около 13%.

Для характеристики активности антител при гидролизе ДНК использовали величину: $A = (n_0 - n_k) \cdot 100\% / n_0$, где n_0 и n_k – относительное содержание суперскрученной ДНК в опытном и контрольном образцах после окончания гидролиза. Рассчитанная таким образом активность антител фракции 26 в целом была несколько выше, чем фракции 16. Наибольшие различия наблюдались для первой стадии гидролиза: относительное изменение содержания суперскрученной ДНК в ходе первой стадии гидролиза аутоантителами фракции 26 в 2 раза больше, чем для АТ фракции 16. Основное уменьшение относительного содержания суперскрученной ДНК происходит на второй стадии гидролиза, когда наблюдается образование кольцевой ДНК.

При исследовании действия на плазмидную ДНК белковой фракции 1а заметных изменений в содержании конформаций ДНК не происходило. Исследования действия белков фракции 2а на ДНК плазмиды рBR-322 показали, что происходит превращение незначительной части (в пределах экспериментальной ошибки) суперскрученной ДНК в кольцевую, без появления линейной формы ДНК.

Наблюдаемый сложный ступенчатый характер кинетики гидролиза ДНК может быть связан с наличием нескольких подфракций АТ к ДНК. Среди них имеются высокоактивные АТ, обладающие высокой специфичностью к двухцепочечной ДНК, которые гидролизуют суперскрученную ДНК до линейной формы. Вероятно действие АТ к ДНК носит непроецессивный характер, т.е. часть АТ, взаимодействуя с суперскрученной ДНК, делает разрыв в месте взаимодействия и остается связанными с ДНК. Связывание с ДНК остальной части антител не приводит к ее быстрому гидролизу. Это может быть объяснено тем, что антитело связывается с ДНК участком, пространственно удаленным от активного центра. Для начала гидролиза молекуле АТ необходимо изменить свою конформацию, на что требуется определенное время, которое различно для разных молекул антител. Наряду с изменением конформации антител могут происходить локальные изменения конформации самой ДНК, вызванные присоединившимися АТ.

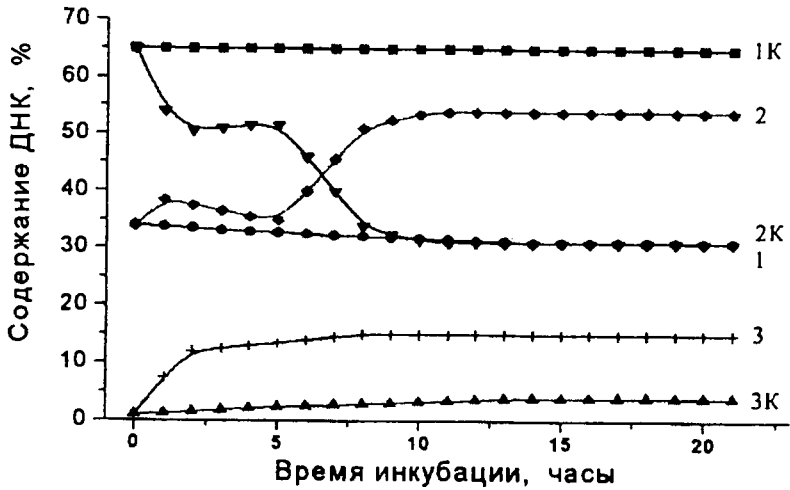
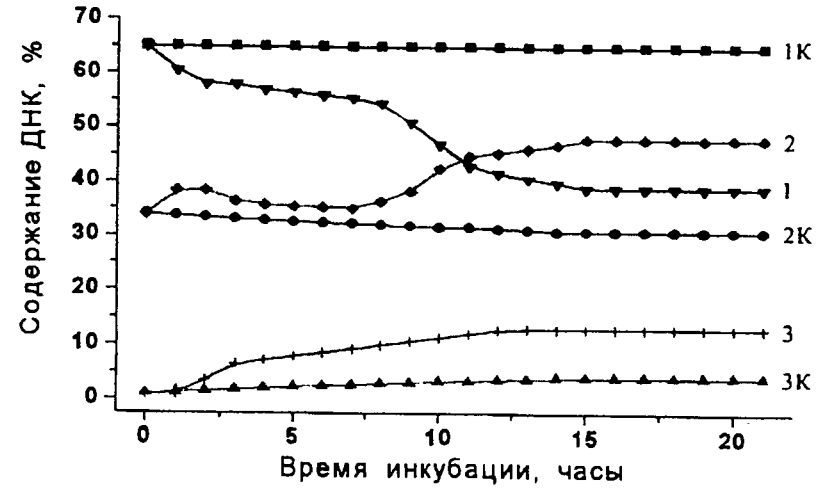


Рис. 1. Кинетика гидролиза плазмидной ДНК антителами фракций 16 (вверху) и 26 (внизу).
1-суперскрученная ДНК, 2-кольцевая ДНК, 3-линейная ДНК
1К, 2К, 3К-то же для контрольного образца плазмидной ДНК

До тех пор пока фосфодиэфирные связи ДНК не станут доступными для гидролиза, АТ не могут начать действовать.

Антителам фракции 16 необходимо больше времени для перевода суперскрученной ДНК в кольцевую форму. Это может свидетельствовать о различных скоростях конформационных изменений молекул АТ и/или ДНК. Возможно, что определенную роль играет также конкуренция между антителами различных подфракций за взаимодействие с ДНК. Как установлено, относительное содержание ДНК-гидролизующих антител во фракции 16 меньше, чем во фракции 26. Это снижает вероятность взаимодействия ДНК-гидролизующих антител фракции 16 по сайтам гидролиза ДНК и приводит к увеличению времени перевода суперскрученной формы ДНК в кольцевую форму.

Сравнительное исследование ДНК-гидролизующей активности препаратов белков фракций IgG 16 и 26, выделенных в ходе аффинной хроматографии из сыворотки крови больных СКВ в период обострения заболевания и после кратковременной гормональной терапии (преднизолон, 3-ое суток, 60 мг/сут) показало, что при инкубации ДНК с аутоантителами, выделенными из сыворотки крови больных СКВ, получивших лечение, заметного перераспределения форм плазмидной ДНК относительно контрольных образцов не происходит, в то время как обе фракции антител, полученные из сыворотки крови больных СКВ в активной фазе заболевания, демонстрируют высокий уровень ДНК-гидролизующей активности.

Рост клеток линии СПЭВ в присутствии АТ к ДНК

При гломерулонефритах - поражении почек (в том числе и при люпус-нефрите) в организме имеет место пролиферация эпителиальных клеток. Вопрос о роли антиядерных антител в этом процессе, на наш взгляд, является одним из важнейших для выяснения механизма патогенеза аутоиммунных заболеваний. До настоящего времени на этот вопрос нет однозначного ответа: имеются данные как об ингибирующем так и стимулирующем действии иммуноглобулинов G на рост эпителиальных клеток. Расхождение результатов, представленных разными авторами, может быть обусловлено множеством причин: особенностями процесса выделения и очистки IgG, типом используемой клеточной культуры, ее состоянием (монослой или суспензия) в момент внесения ААТ. В данной работе мы провели исследование влияния различных фракций АТ к ДНК на рост клеток с учетом указанных факторов.

Эксперименты по инкубации клеточной культуры с фракциями 1 и 2, вносимых при пассировании (содержание эмбриональной сыворотки 8%), показали, что при использовании фракций, полученных от здоровых людей, а также в контрольных образцах на начальной стадии эксперимента погибает почти четвертая часть клеток; первоначальное количество жизнеспособных клеток восстанавливается лишь к исходу 3-их суток. При добавлении в среду антител фракции 2, полученных от больных СКВ, кривые роста клеточной культуры заметно отличаются от контрольных: скорость роста клеточной

популяции в опыте значительно превосходит скорость роста контрольной культуры, и уже к 30-ти часам опытная культура достигает состояния монослоя.

Внесение фракции 2, полученной от больных СКВ, предотвращало деградацию клеточного монослоя (бессывороточная среда): общее количество клеток в этом случае оставалось практически постоянным в течение всего эксперимента; количество жизнеспособных клеток сокращалось приблизительно вдвое за первые сутки, но в дальнейшем почти не изменялось. В контрольных образцах наблюдалась деградация монослоя.

Зависимости общего количества клеток от времени, полученные в экспериментах по инкубации клеток линии СПЭВ с высокоочищенными фракциями IgG, совпадают (в пределах экспериментальной погрешности) с аналогичными зависимостями для фракций 1 и 2 (Рис. 2). В течение первых 18-ти часов инкубации количество клеток в контрольной культуре, а также в образцах, содержащих фракции IgG 1б и 2б, полученные от здоровых людей, уменьшается на 25%. В то же время, при инкубации клеточной культуры с фракцией IgG 1б, выделенной из сыворотки крови больных СКВ, количество клеток на начальном этапе снижается менее, чем на 10%. В образце, содержащем фракцию IgG 2б, полученную от больных СКВ, снижения количества клеток не наблюдается, – в течение первых 18-ти часов их число даже несколько увеличивается, затем количество клеток быстро растет и уже к началу 2-х суток культура достигает состояния монослоя. Внесение фракции IgG 2б предотвращает деградацию клеточного монослоя: общее количество клеток в этом случае остается практически постоянным в течение всего эксперимента (72 часа), в то время как в остальных образцах монослоя деградирует к исходу 2-х суток. Таким образом, эффекты стимуляции клеточного роста, наблюдаемые для фракции 2б, при культивировании клеток с момента посева и в монослое аналогичны тем, которые наблюдаются для фракции 2.

Тот факт, что в наших исследованиях наблюдается пролиферация эпителиоподобных клеток почки эмбриона свиньи *in vitro* под действием АТ к ДНК, может свидетельствовать о том, что антитела к ДНК являются одним из основных агентов, вызывающих пролиферацию эпителиальной ткани при гломерулонефритах. При этом в ряде случаев антитела могут выступать лишь медиаторами или инициаторами процессов, ведущих к пролиферации, в других случаях пролиферация обусловлена прямым действием АТ на клетку. *In vitro* принципиально возможно осуществление следующих механизмов:

1. Повреждение живых клеток в результате связывания АТ с их поверхностью; оставшись связанными с клеточными мембранами, АТ индуцируют комплемент-зависимую смерть клеток.
2. Проникновение АТ внутрь эпителиальных клеток почечных канальцев, где антитела связываются с ядром или компонентами цитоплазмы и могут влиять на клеточную пролиферацию, синтез белка и апоптоз.

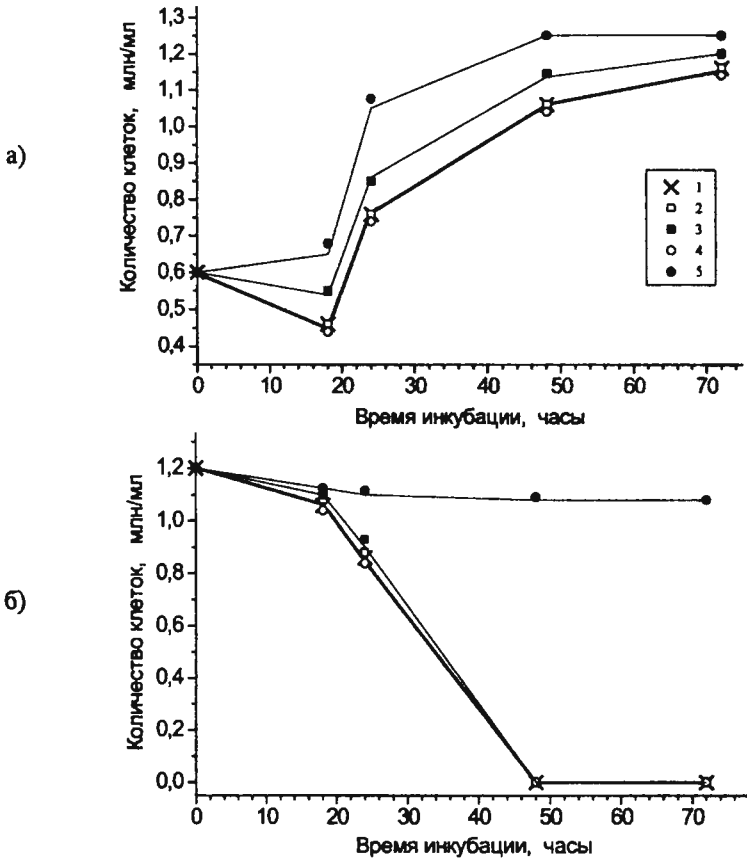


Рис. 2. Кривые роста клеточной культуры СПЭВ при инкубации с антителами различных фракций.

а) внесение антител в культуру при пассировании (содержание сыворотки 8 %)

б) внесение антител к клеточному монослою (содержание сыворотки 0 %)

Сплошные линии построены по данным, полученным для фракций 1 и 2, выделенных ионообменной хроматографией. Точками представлены данные для фракций 16 и 26, полученных аффинной хроматографией.

1 - контроль

2 - фракция 16 (здоровый донор) 3 - фракция 16 (СКВ)

4 - фракция 26 (здоровый донор) 5 - фракция 26 (СКВ)

Известно, что антитела к нативной ДНК, проникающие в клетку и связывающиеся с цитоплазмой и ядром, вызывают незначительный лизис клеток, по сравнению с АТ, остающимися связанными с клеточной поверхностью. В ходе проведенных нами исследований лизиса клеток не наблюдалось. Этот факт свидетельствует об отсутствии в изучаемых образцах антител, локализующихся на клеточной поверхности. Вероятнее всего, полные АТ могут проникать в клетку, связываться с компонентами ядра и влиять на клеточный цикл.

Фракция 1а не влияет на рост клеточной культуры. В то же время известно, что входящие в состав этой фракции IgG3 часто обнаруживаются в почках больных СКВ, обладают способностью фиксировать комплемент и, наряду с IgG1, являются наиболее патогенными иммуноглобулинами. При исследовании действия на плазмидную ДНК антител к ДНК фракции 1а, заметных изменений в содержании конформаций ДНК не происходило. Таким образом, IgG3 не гидролизуют ДНК, но, как показал ИФА, связываются с ней. Исходя из этих фактов, можно предположить, что вероятным механизмом действия ААТ к ДНК фракции 1а *in vivo* является связывание АТ с ДНК, последующая фиксация и активация комплемента и повреждение ткани.

Следует отметить, что на рост клеток *in vitro* оказывают влияние именно те ААТ к ДНК, которые обладают способностью гидролизовать ДНК. Прослеживается, таким образом, определенная корреляция между этими свойствами ААТ к ДНК. Так, фракция 2б, обладающая большей ДНК-гидролизующей активностью, оказывает и наибольшее стимулирующее действие на клетки. Наличие такой корреляции подтверждается в ходе сравнительного изучения указанных свойств ААТ к ДНК, полученных от больных СКВ в активную фазу заболевания и после непродолжительного приема преднизолона. Сравнительные данные по динамике роста клеток линии СПЭВ при инкубации с фракциями аутоантител 1б и 2б, полученными от больных СКВ до и после лечения преднизолоном (Таблица 1) говорят о том, что даже непродолжительная гормональная терапия больных СКВ в активной фазе заболевания приводит к потере аутоантителами к ДНК способности стимулировать пролиферацию эпителиальных клеток почки *in vitro*. То, что в данном случае речь идет именно об антителах к ДНК, подтверждается тем, что при волчаночном нефрите под воздействием глюкокортикоидов титр антител к ДНК снижается значительно быстрее, чем уровни других антител. Можно предположить, что разрастание эпителиальной ткани почки *in vivo* при СКВ обусловлено прямым стимулирующим пролиферацию действием аутоантител к ДНК, однако механизм этого процесса еще предстоит выяснить.

Обнаруженная корреляция между ДНК-гидролизующей активностью ААТ к ДНК и их способностью стимулировать рост клеток может быть объяснена на основе следующих соображений. Известна прямая зависимость начала репликации от суперспирализации реплицирующего кластера ДНК. Показано также, что ДНК-полимеразы неспособны работать на суперспирализованной ДНК, если в нее не внесены разрывы. Для этого требуется эндонуклеаза,

Таблица 1. Динамика роста клеток линии СПЭВ при инкубации с фракциями, полученными аффинной хроматографией на ПротеинА-сефарозе.

| Количество клеток*** | Контроль | Больной СКВ (активная фаза) | | Больной СКВ (после лечения) | | Здоровый донор | |
|-------------------------|-----------|--------------------------------|-----------|--------------------------------|-----------|-------------------|-----------|
| | | фр.16 | фр. 26 | фр.16 | фр. 26 | фр.16 | фр. 26 |
| 0 | 600 / 85 | 600 / 85 | 600 / 85 | 600 / 85 | 600 / 85 | 600 / 85 | 600 / 85 |
| 18 | 460 / 64 | 540 / 75 | 650 / 77 | 480 / 65 | 520 / 67 | 480 / 64 | 440 / 65 |
| 24 | 760 / 73 | 860 / 85 | 1050 / 87 | 770 / 73 | 800 / 75 | 780 / 73 | 740 / 72 |
| 48 | 1060 / 83 | 1150 / 88 | 1270 / 93 | 1070 / 83 | 1090 / 85 | 1080 / 83 | 1030 / 83 |
| 72 | 1160 / 90 | 1190 / 90 | 1270 / 93 | 1150 / 90 | 1140 / 90 | 1180 / 90 | 1140 / 90 |

* В числителе – общее количество клеток, тыс. / мл;

в знаменателе – количество жизнеспособных клеток, % .

** Относительная ошибка определения количества клеток не превышает 6 %.

вносящая однопочечные разрывы в двупочечную ДНК. Такие эндонуклеазы были обнаружены и выделены (Беляева, Винтер, Аскарлова и др., 1970, 1986). Было показано, что нейтральная Mn^{2+} -зависимая ДНКаза способна инициировать репликативный синтез ДНК в ядрах, внося специфические разрывы в ДНК. При добавлении нейтральной ДНКазы в инкубационную среду для синтеза ДНК, интенсивность синтеза возрастала в 3-4 раза. В работах, проведенных на клетках микроорганизмов установлено, что добавление в культуральную среду ДНКаз стимулирует синтез ДНК, рост и деление клеток микроорганизмов. ДНКаза I, собственные ДНКазы *Bacillus subtilis*, ДНКаза *Serratia marcescens*, гидролизующие молекулу ДНК по 3'-фосфатным связям и делающие в нативной молекуле ДНК односторонние разрывы, обладают способностью стимулировать синтез ДНК. При этом наблюдается увеличение количества жизнеспособных клеток и накопление биомассы. Таким образом, процесс репликации ДНК зависит от наличия в клетке активных ДНКаз.

Характеристики полученных нами фракций антител с точки зрения их каталитической активности близки к таковым для описанных выше ДНКаз. Как установлено, ААТ к ДНК активируются ионами Mg^{2+} в концентрации 5 мМ, имеют выраженный оптимум рН 7,5 и являются эндонуклеазами, так как способны вносить разрывы в суперскрученную ДНК. Весьма вероятно, что при проникновении в ядро клеток АТ к ДНК способны действовать подобно нуклеазам, индуцируя репликацию ДНК, что является неременным условием пролиферации клеток.

ВЫВОДЫ

1. В сыворотке крови больных системной красной волчанкой выявлены две фракции IgG, различающиеся по способности связываться с анионообменником и по содержанию аутоантител к ДНК.
2. Аутоантитела к ДНК, связывающиеся с ПротеинА-сефарозой, являются каталитическими антителами с дезоксирибонуклеазной активностью. ДНКазная активность аутоантител при СКВ имеет оптимум рН – 7,5 и является металлотривисимой. Оптимальная концентрация ионов Mg^{2+} в реакционной среде составляет 5 мМ.
3. Аутоантитела к ДНК при СКВ обладают рост стимулирующей активностью в отношении клеток линии СПЭВ в условиях *in vitro*. Аутоантитела предотвращают гибель клеточного монослоя в бессывороточной среде, стимулируют деление клеток и рост клеточной культуры в среде со стандартным содержанием сыворотки.
4. Установлена корреляция между наличием у аутоантител ДНК-гидролизующей активности и их способностью стимулировать рост клеток *in vitro*. При ремиссии СКВ у больных, прошедших краткий курс

гормональной терапии, ДНКазная активность АТ снижается и антитела теряют способность стимулировать пролиферацию клеток.

5. Разработана методика и соответствующее программное обеспечение для анализа электрофореграмм с использованием компьютерного сканера.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Темников Д.А., Невзорова Т.А., Невзорова Л.В., Винтер В.Г. О методике выделения и очистки иммуноглобулинов G из сыворотки больных аутоиммунными заболеваниями // Тезисы докладов III республиканской научно-технической конференции молодых ученых и специалистов – Казань, 10-11 октября 1997. – С.76.
2. Темников Д.А., Невзорова Т.А., Невзорова Л.В. О методике выделения антител к ДНК из сыворотки крови больных аутоиммунными заболеваниями // Тезисы докладов III Пущинской конференции молодых ученых. – Пущино, 27-30 апреля 1998. – С.177.
3. Темников Д.А., Невзорова Т.А., Винтер В.Г. Фракционирование белков сыворотки крови методом ионообменной хроматографии // Тезисы докладов 9-ой международной конференции молодых ученых «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений». – Казань, 19-21 мая 1998. – С.269.
4. Темников Д.А. Компьютерное сканирование электрофореграмм белков // Тезисы докладов 9-ой международной конференции молодых ученых «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений». – Казань, 19-21 мая 1998. – С.270.
5. Temnikov D.A., Nevzorova T.A., Nevzorova L.V., Vinter V.G. Different fractions of anti-DNA antibodies can affect growth of cultured cells // Abstr. 5th PUBMB Conference on the Biochemistry of Health and Diseases. Jerusalem, Israel. – October 18-22, 1998. – P. 89.
6. Темников Д.А., Невзорова Т.А., Винтер В.Г. Влияние антител к ДНК на рост клеточной культуры *in vitro* // Тезисы докладов Всероссийского симпозиума «Биология клетки в культуре», Санкт-Петербург, 22-24 октября 1998 г. – Цитология. – 1999. – т. 41. – № ¼. – С. 316.
7. Темников Д.А. Применение компьютерного сканера для анализа электрофореграмм // Приборы и техника эксперимента. – 1999. – №6. – С.59-62.
8. Темников Д.А., Невзорова Т.А., Винтер В.Г. Характеристика антител к ДНК как маркеров аутоиммунного процесса // III Вавиловские чтения «Социум в преддверии XXI века: итоги пройденного пути, проблемы настоящего и контуры будущего»: Материалы постоянно действующей Всероссийской междисциплинарной научной конференции. – Йошкар-Ола, 3-5 февраля 1999. – часть II. – С.8-11.

9. Temnikov D.A. Use of a Digital Scanner for the Analysis of Electrophoregrams // Instruments and Experimental Techniques. – 1999. – V.42. – №6. – P.52-55.
10. Невзорова Т.А., Темников Д.А., Винтер В.Г. Выделение аутоантител к ядерной ДНК из сыворотки крови больных системной красной волчанкой и исследование характера действия этих аутоантител на ДНК // Тезисы докладов XIII Всероссийского симпозиума «Структура и функции клеточного ядра», Санкт-Петербург, 19-21 октября 1999 г. – Цитология. – 2000. – т. 42. – № 3. – С. 299.
11. Невзорова Т.А., Темников Д.А. Дезоксирибонуклеазная активность аутоантител к ДНК при системной красной волчанке // Тезисы докладов I научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века», Казань, 20-21 октября 2000 г. – С.74-75.
12. Темников Д.А. Анализ электрофореграмм с помощью компьютерной техники // Материалы международной научно-практической конференции «Современная техника и технологии в медицине и биологии», Новочеркасск, 2001. – С.27.



1-00

Подписано в печать 2.04.2001 г.. Формат 60x84/16
Усл. печ. л. 1,25. Дог.№ 3 от 2.04.2001 г. Тираж 100.
Лаборатория оперативной печати ТГГИ
420036, г. Казань, ул. Побежимова 47а, тел.544373