

На правах рукописи



ЕРМАКОВ ЕВГЕНИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ПРИРОДНЫЕ КАТАЛИТИЧЕСКИЕ
ИММУНОГЛОБУЛИНЫ КЛАССА G ПРИ
ШИЗОФРЕНИИ**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Научные руководители:

Бунева Валентина Николаевна, д.б.н., профессор

Институт химической биологии и фундаментальной медицины
СО РАН, г.н.с. лаборатории ферментов репарации

Смирнова Людмила Павловна, к.м.н.

Научно-исследовательский институт психического здоровья
Томского НИМЦ, с.н.с. лаборатории молекулярной генетики и биохимии

Официальные оппоненты:

Тикункина Анна Викторовна, д.б.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
зав. лабораторией молекулярной микробиологии

Селедцов Виктор Иванович, д.м.н., профессор

Федеральное государственное бюджетное учреждение
здравоохранения Центральная клиническая больница Российской
академии наук, г.н.с.

Попова Нэлли Александровна, к.б.н., профессор

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и
генетики СО РАН, с.н.с. лаборатории регуляции экспрессии генов

Защита состоится «25» декабря 2020 г. в 12 часов на заседании
диссертационного совета ИХБФМ.03.01 на базе Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Института химической
биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090,
Новосибирск, проспект академика 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 «25» ноября 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент



Коваль В.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Шизофрения – тяжелое психическое расстройство, от которого страдают более 20 миллионов человек во всем мире. Это заболевание сочетает в себе комбинацию таких симптомов, как галлюцинации, бред, расстройства мышления и поведения, которые ухудшают качество жизни пациентов и могут приводить к инвалидности. Несмотря на более чем столетнюю историю изучения шизофрении, общая картина патогенеза этого заболевания далека от полного понимания.

Известно, что в основе характерных клинических проявлений шизофрении лежит дисрегуляция нейромедиаторных систем мозга [Carlsson A., et al., 1999]. Считается, что к нейромедиаторным нарушениям могут приводить различные факторы окружающей среды и генетическая предрасположенность. Но в последнее время все большее число исследований сосредоточено на роли иммунных изменений в патогенезе шизофрении.

Исследования гуморальной иммунной системы при шизофрении в основном сосредоточены на поиске антител к различным антигенам. Однако детального исследования свойств образующихся при шизофрении иммуноглобулинов не проведено.

Иммуноглобулины являются главными эффекторными молекулами гуморальной иммунной системы. Долгое время считалось, что иммунная система хозяина вырабатывает только высокоспецифичные антитела против различных внешних патогенов. Тем не менее выяснилось, что в сыворотке здоровых людей присутствует широкий спектр антител, распознающих, в том числе, аутоантигены собственного организма [Nagele E. P., et al., 2013]. Благодаря своей полиреактивности и низкой аффинности, такие антитела служат для нейтрализации широкого спектра антигенов и называются природными или естественными иммуноглобулинами (от англ. «natural antibodies»).

С развитием исследовательских технологий и благодаря применению сложных модельных систем в последние годы открыт ряд новых неканонических функций антител [Dimitrov J. D., Lacroix-Desmazes S., 2020]. Такие функции включают в себя либо нетипичные стратегии нейтрализации патогенов, либо проявление свойств, характерных для других белков (например, цитокинов или ферментов). Каталитическая активность иммуноглобулинов – это один из наиболее распространенных примеров неканонических функций антител различных классов.

Среди природных каталитических антител (абзимов) наиболее изучены иммуноглобулины класса G (IgG), поскольку они обладают наибольшим спектром активности, а также широко представлены в кровотоке. Учитывая вовлеченность иммунных нарушений в патогенез

шизофрении, исследование спектра каталитических антител и их биологической роли при данном заболевании является актуальной научной проблемой.

Цель настоящей работы заключалась в изучении разнообразия каталитических активностей и ферментативных свойств иммуноглобулинов класса G при шизофрении. В ходе работы планировалось решить следующие **задачи**:

1. Получить гомогенные препараты IgG больных шизофренией и здоровых доноров; доказать, что исследуемые препараты антител обладают каталитическими активностями; сопоставить уровни активностей IgG пациентов и здоровых доноров; сравнить ферментативные свойства (pH- и металло-зависимость, специфичность, сродство к субстрату, кинетические параметры) изучаемых каталитических IgG с известными свойствами канонических ферментов с аналогичной каталитической активностью.

2. Исследовать окислительно-восстановительные активности препаратов IgG: пероксидазную, H_2O_2 -независимую оксидоредуктазную и каталазную.

3. Изучить гидролитические активности препаратов IgG в реакциях гидролиза олигосахарида, АТФ, ДНК, РНК и микроРНК, а также гистонов.

4. Провести поиск природных ингибиторов IgG с протеолитической активностью.

Научная новизна и практическая значимость работы.

В работе впервые изучено разнообразие каталитических активностей IgG больных шизофренией. Показано, что IgG пациентов обладают пероксидазной, H_2O_2 -независимой оксидоредуктазной и каталазной активностью, что может указывать на роль каталитических антител в регуляции окислительно-восстановительного баланса в организме. Обнаружена способность каталитических антител больных шизофренией гидролизовать ДНК, РНК и гистоны. Кроме того, впервые обнаруженная способность $\alpha 1$ -антитрипсина и апротинина ингибировать протеолитическую активность антител указывает на то, что активность системы каталитических антител в организме тонко регулируется специфическими природными ингибиторами.

Полученные данные создают основу для разработки критериев стратификации больных шизофренией на основе иммунных показателей. Это позволит персонально рекомендовать применение противовоспалительной терапии у больных с выраженными иммунными нарушениями. Данный подход позволит скорректировать лечение пациента с учётом патогенетических особенностей заболевания и увеличить эффективность проводимой терапии.

Положения, выносимые на защиту:

1. IgG больных шизофренией проявляют широкий спектр каталитических активностей, которые являются собственным свойством антител. IgG пациентов с шизофренией обладают более высокой каталитической активностью по сравнению со здоровыми донорами. Биохимические свойства каталитических антител значительно отличаются от свойств канонических ферментов с аналогичной каталитической активностью. Сродство к субстрату всех исследуемых абзимов выше на 2–4 порядка, по сравнению с каноническими ферментами.

2. IgG больных шизофренией проявляют *in vitro* пероксидазную, H₂O₂-независимую оксидоредуктазную и каталазную активности.

3. IgG пациентов с шизофренией обладают ДНК-, РНК- и гистон-гидролизующими активностями. IgG гидролизуют ДНК, микроРНК и гистоны с сопоставимой эффективностью, что подтверждается результатами корреляционного анализа. Уровни микроРНК- и гистон-гидролизующей активности коррелируют с клиническими особенностями шизофрении.

4. Гистон-гидролизующая активность IgG в присутствии сывороточных ингибиторов сериновых протеаз α 1-антитрипсина и апротинина снижается пропорционально их концентрации.

Публикации и опробация работы.

По результатам работы опубликовано 8 публикаций, среди которых 6 статей, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, 1 статья, индексируемая в РИНЦ, а также глава в коллективной монографии. Основные результаты работы представлены на 20-ти российских и международных конференциях, в том числе: 27th, 29th, 30th, 31st ECNP Congress (Берлин, Германия, 2014; Вена, Австрия, 2016; Париж, Франция, 2017; Барселона, Испания, 2018), 34th FEBS Congress (Прага, Чехия, 2018), 19th WPA World Congress of Psychiatry (Лиссабон, Португалия, 2019).

Структура и объем работы.

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 172 страницах, содержит 36 рисунков, 11 таблиц и приложение, включающее 6 рисунков и 2 таблицы. Список цитированной литературы содержит 442 источника.

Вклад автора.

Основная часть результатов, представленных в диссертации, получены автором лично. MALDI-масс-спектрометрический анализ препаратов антител проведен в ТИБОХ ДВО РАН с участием проф. Невинского Г.А. и к. б. н. Дмитренко П.С. Автор выражает благодарность Воробьевой М.А.

(ЛХРНК ИХБФМ) за помощь в подборе условий регистрации продуктов гидролиза микроРНК.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Выделение IgG здоровых доноров и больных шизофренией из сыворотки крови

Индивидуальные препараты поликлональных IgG выделены из сыворотки крови 50-ти больных шизофренией и 25-ти здоровых доноров методом аффинной хроматографии на колонке с Protein G-Sepharose. Ранее показано, что такой способ позволяет получить гомогенные препараты IgG без примесей других белков сыворотки крови [Nevinsky G.A. et al., 2000-2020]. Чистота и гомогенность полученных препаратов IgG доказана с помощью SDS-PAGE (рис. 1). MALDI масс-спектрометрический анализ полученных IgG представлен в диссертации.

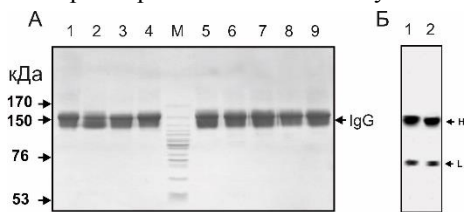


Рис. 1. Анализ гомогенности выделенных препаратов IgG в SDS-ПААГ. А – градиентный 4–18 % ПААГ электрофорез. Дор. 1–4 – IgG здоровых доноров, 5–9 – IgG больных шизофренией. Окраска Coomassie R-250. Б – 12 % ПААГ электрофорез в восстанавливающих условиях. Дор. 1 – смесь IgG здоровых доноров, 2 – смесь IgG больных шизофренией. Окраска коллоидным серебром.

2. Анализ разнообразия каталитических активностей IgG при шизофрении

Степень иммунологических нарушений при различных заболеваниях отражается в разнообразии каталитических активностей образующихся антител. Для выяснения роли каталитических антител в патогенезе заболевания необходимо детальное исследование всего спектра их активности. Согласно литературным данным известные природные каталитические IgG в норме и при различных патологиях обладают окислительно-восстановительными, а также гидролитическими активностями [Nevinsky G.A. et al., 1992-2020; Gabibov A.G. et al., 1992-2020]. Поэтому в данной работе исследована способность IgG пациентов с шизофренией катализировать данные реакции.

2.1. Исследование окислительно-восстановительных активностей IgG

2.1.1. Пероксидазная и оксидоредуктазная активности антител

Ранее Толмачевой А.С. с соавторами показано, что небольшие фракции IgG из сыворотки здоровых людей окисляют 3,3'-диаминобензидин (ДАБ) в присутствии H_2O_2 (пероксидазная активность)

и в отсутствие H_2O_2 (H_2O_2 -независимая оксидоредуктазная (ОР) активность) [Tolmacheva A.S. et al., 2015].

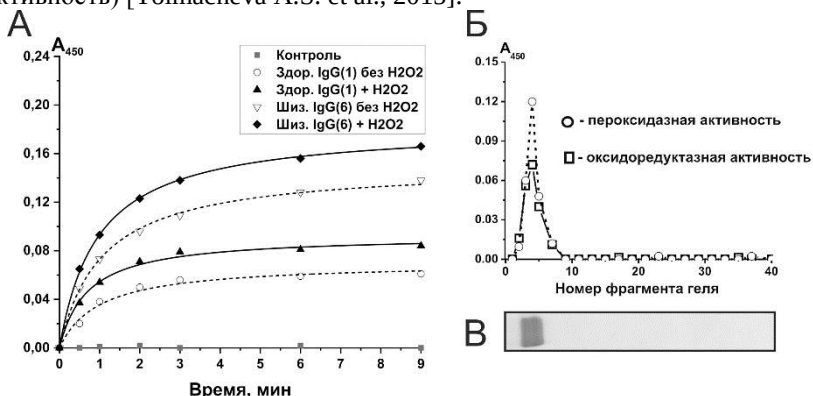


Рис. 2. Анализ пероксидазной и H_2O_2 -независимой оксидоредуктазной активности IgG больных шизофренией. А – типичные кинетические кривые накопления окрашенного продукта (A_{450}) окисления ДАБ (0,2 мг/мл) под действием 670 нМ IgG(1) здорового донора и IgG(6) больного шизофренией в присутствии H_2O_2 и в отсутствие H_2O_2 . Б, В – SDS-ПААГ анализ пероксидазной (○) и оксидоредуктазной (□) активностей IgG во фракциях после экстракции белков из геля. Вторая полоса этого же геля использована для определения положения интактного IgG_{mix} (Б); гель окрашен Coomassie R-250.

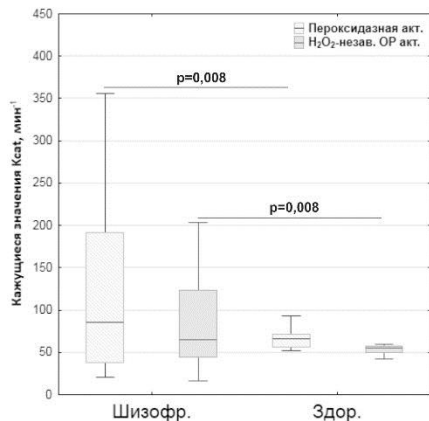


Рис. 3. Относительные значения, выраженные в величинах кажущихся значений k_{cat} , пероксидазной и H_2O_2 -независимой оксидоредуктазной активностей препаратов IgG больных шизофренией и здоровых доноров. Значимость отличий оценена согласно критерию Вальда-Вольфовица.

С помощью данного спектрофотометрического метода проанализирована пероксидазная и ОР активности препаратов IgG больных шизофренией (рис. 2 А). Обнаружено увеличение оптической плотности с течением времени при инкубации ДАБ с препаратами IgG здорового донора и IgG больного шизофренией. Методом анализа активности во фракциях, полученных после разделения и экстракции белков из SDS-ПААГ (рис. 2 Б, В) доказано, что регистрируемая активность является собственным свойством исследуемых IgG.

Скрининг активности (рис. 3) среди 18-ти препаратов IgG здоровых людей показал, что

пациентов и 14-ти препаратов IgG

медианный уровень относительной пероксидазной активности IgG у больных шизофренией статистически значимо выше в 1,3 раза ($p=0,008$), а ОР активности в 1,2 раза выше ($p=0,008$), чем у здоровых доноров. При этом уровень пероксидазной активности IgG оказался выше уровня ОР активности во всех случаях. Следовательно, IgG больных шизофренией и здоровых доноров более эффективно окисляют ДАБ в присутствии H_2O_2 .

2.1.2. Каталазная активность IgG

Учитывая высокое сходство окислительно-восстановительных реакций, катализируемых каноническими пероксидазами и каталазами, далее проанализирована каталазная активность IgG.

Спектрофотометрическим методом [Aebi H, 1984] показано, что при добавлении препаратов IgG больных шизофренией или здоровых доноров регистрируется уменьшение оптической плотности при $\lambda = 240$ нм, вызванное разложением H_2O_2 (рис. 4 А). Таким образом, впервые обнаружено, что препараты IgG больных шизофренией и здоровых людей обладают каталазной активностью.

Для доказательства, что обнаруженная каталазная активность является свойством исследуемых IgG, проверены ряд жестких критериев. Гель-фильтрацией смеси IgG в кислых условиях ($pH = 2,6$) с последующим определением каталитической активности в полученных фракциях показано, что как в случае IgG пациентов (рис. 4 Б), так и IgG здоровых доноров (рис. 4 В), наблюдается совпадение профилей гель-фильтрации и активности. Кроме того, методом SDS-ПААГ-анализа каталазной активности IgG во фракциях после экстракции белков из геля показано, что активностью обладают как легкие, так и тяжелые цепи IgG (данные представлены в диссертации). Таким образом, полученные результаты однозначно указывают на то, что каталазную активность проявляют анализируемые IgG.

Для количественной оценки каталазной активности IgG проведен скрининг активности 26 препаратов IgG больных шизофренией и 21 препарата IgG здоровых доноров. Предварительно для каждого препарата были подобраны условия реакции, соответствующие условиям реакции псевдо-первого порядка в линейных областях зависимости скорости реакции от концентрации IgG. По результатам скрининга показано, что медианные значения удельной каталазной активности IgG пациентов с шизофренией статистически значимо ($p<0,05$) в 3,8 раз выше активности IgG здоровых доноров (рис. 5). Значения $Me [Q1; Q3]$ составили: 1,01 [0,42; 3,8] удельных единиц (УЕ – $mM H_2O_2/мин/мг$ IgG) и 0,27 [0,11; 0,39] УЕ для IgG пациентов и здоровых доноров. Таким образом, IgG пациентов с шизофренией обладали большим уровнем каталазной

активности и эффективнее разлагали H_2O_2 , чем IgG здоровых доноров. Однако выраженной зависимости активности от клинических особенностей заболевания не обнаружено.

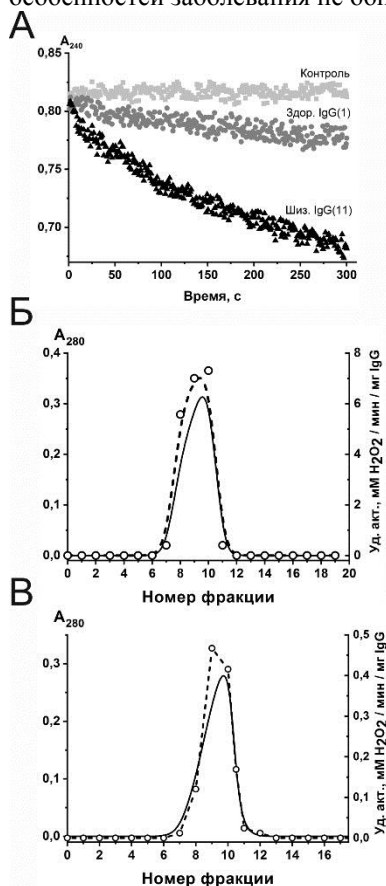


Рис. 4. Каталазная активность IgG. **А** – типичная зависимость снижения оптической плотности 30 mM H_2O_2 при $\lambda = 240$ нм в присутствии 200 нМ препаратов IgG больных шизофренией и здоровых доноров. **Б, В** – профили гель-фильтрации смесей препаратов IgG больных шизофренией (**А**) и здоровых доноров (**В**) в буфере Gly-HCl pH 2,6 и каталитической активности в полученных фракциях: (—) – оптическая плотность при $\lambda = 280$ нм (A_{280}); (○) – удельная каталазная активность IgG.

В целом полученные данные указывают на то, что IgG здоровых доноров и больных шизофренией обладают значительно меньшим (более чем на три порядка) уровнем удельной каталазной активности, чем классические каталазы [Aebi H, 1984]. Кроме того, поскольку в эксперименте используются поликлональные IgG, удельная каталазная активность отдельных субфракций IgG может быть значительно выше других. Однако используемые методы не позволяют идентифицировать эти субфракции, а также определить, какой процент антител обладает активностью. Учитывая эти данные можно предположить важную роль таких антител в защите от оксидативного стресса.

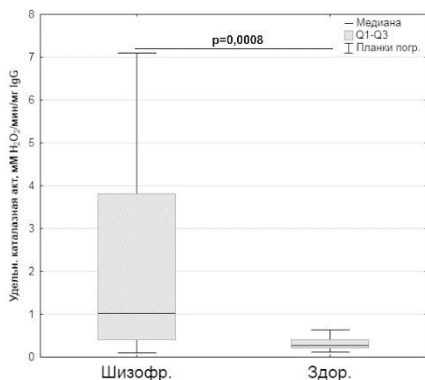


Рис. 5. Удельная каталазная активность препаратов IgG больных шизофренией и здоровых доноров. Значимость различий оценена по критерию Манна-Уитни.

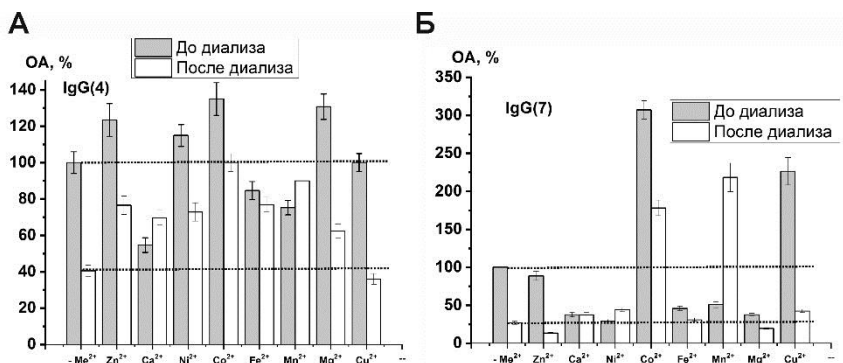


Рис. 6. Влияние диализа, а также ионов различных металлов на относительную каталазную активность двух препаратов IgG больных шизофренией: IgG(4) – А; IgG(7) – Б. Относительную каталазную активность (ОА, %) для каждого недиализованного препарата IgG принимали за 100%. Используемые ионы металлов указаны на рисунке.

Известно, что каталаза млекопитающих является гем-Fe²⁺-зависимым ферментом [Goyal M. M., Basak A., 2010]. Кроме того, различные металлы с переменной степенью окисления могут также участвовать в реакциях, катализируемых IgG. Поэтому в данной работе проведен анализ влияния диализа против хелатирующего ионы металлов агента (ЭДТА) на каталазную активность IgG, а также анализ зависимости активности от добавления ионов металлов (рис. 6). Показано, что диализ препаратов IgG больных шизофренией против буфера, содержащего 0,3 М ЭДТА, приводил к снижению каталазной активности в 2,5–3,7 раза. Добавление ионов металлов в концентрации 1,5 мМ к диализованным и недиализованным антителам приводило к различным эффектам в зависимости от препарата IgG больных шизофренией (рис. 6). В целом, среди ионов металлов с переменной валентностью лучшим активатором для всех проанализированных IgG больных шизофренией оказался Co²⁺.

Каталаза является одним из самых эффективных ферментов и способна разлагать миллионы молекул H₂O₂ в секунду. Полученные значения K_m и k_{cat} (Таблица 1) для препаратов IgG пациентов оказались на три-четыре порядка ниже, чем для классической каталазы эритроцитов.

Таблица 1. Величины K_m и k_{cat} для двух препаратов IgG, обладающих каталазной активностью, полученных от пациентов с шизофренией, в сравнении с величинами для каталазы эритроцитов.

Параметры	IgG(7)	IgG(14)	Каталаза эритроцитов*
K _m , mM	19,2 ± 1,5	9,4 ± 0,7	1390
k _{cat} , с ⁻¹	(5,7 ± 0,3) × 10 ³	(3,2 ± 0,16) × 10 ³	(2,27) × 10 ⁷

*Данные из литературного источника [Ogura Y., Yamazaki I., 1983].

2.2. Исследование гидролитических активностей IgG при шизофрении

Известно, что различные патологические и физиологические состояния сопровождаются образованием абзимов с гидролитическими активностями, поэтому в данной работе исследована способность IgG больных шизофренией катализировать гидролитические реакции, в частности, гидролиз олигосахарида, АТР, ДНК, различных РНК и микроРНК, гистонов и других белков.

2.2.1. Олигосахарид- и АТР-гидролизующая активности антител

Методом ТСХ показано, что препараты IgG больных шизофренией практически не обладают олигосахарид-гидролизующей и АТРазной активностями (рис. 7). Из 18-ти проанализированных препаратов IgG пациентов только один препарат обладал олигосахарид-гидролизующей активностью, то есть гидролизовал α -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидные связи в мальтоолигосахариде, в то время как АТРазная активность не обнаружена ни у одного препарата. Отсутствие олигосахарид-гидролизующей и АТРазной активностей практически у всех препаратов IgG больных шизофренией является важной индивидуальной особенностью этого заболевания. При аутоиммунных заболеваниях уровни данных активностей IgG значительно повышаются. Следовательно, полученные данные указывают на различия в механизмах образования каталитических антител при шизофрении по сравнению с аутоиммунными заболеваниями.

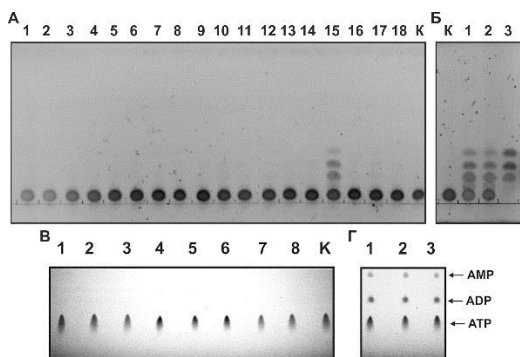


Рис. 7. Анализ олигосахарид-гидролизующей (А, Б) и АТРазной (В, Г) активностей IgG методом ТСХ. А, В – анализ активности IgG больных шизофренией (дор. 1–18). Б, В – положительные контроли гидролиза олигосахарида в присутствии антител из крови двух аутоиммунных мышей (дор. 1 и 2) и sIgA молока здоровых женщин (дор. 3). Дор. К – инкубация олигосахарида в отсутствие IgG.

2.2.2. ДНК-гидролизующая активность IgG

Различные варианты клеточной гибели (апоптоз, некроз, пироптоз, ферроптоз, нетоз) способствуют высвобождению свободных нуклеиновых кислот, а также их комплексов с белками, либо в составе везикул, во внеклеточное пространство и кровотока [Брызгунова О.Е., Лактионов П.П 2015]. При шизофрении обнаружено нарушение процессов

апоптотической гибели клеток, что приводит к значительному увеличению концентрации внеклеточной ДНК (вкДНК) в крови [Jiang J., et al., 2018; Ershova E. S., et al. 2019]. Известно, что вкДНК выступает в качестве молекулярного фрагмента, связанного с повреждением клетки (DAMPs) и стимулирует воспалительные реакции, а также образование аутоантител. Имеются данные об увеличении концентрации аутоантител к ДНК при шизофрении [Sirota P., et al., 1993; Смирнова Л.П., и др., 2015].

Генерация аутоантител сопровождается образованием каталитических антител. Поэтому в данной работе проанализирована способность IgG расщеплять ДНК. Анализ ДНК-гидролизующей активности показал, что IgG здоровых людей обладают очень низкой или недетектируемой активностью (рис. 8 А, дор. 1), в то время как препараты IgG пациентов с шизофренией обладали выраженной ДНКазной активностью (рис. 8 А, дор. 2–8). С помощью зимографического анализа ДНКазной активности в геле, содержащем сополимеризованную ДНК, доказано, что активность проявляют анализируемые IgG (рис. 8 Б). Этот анализ также позволил установить, что ДНКазной активностью обладают легкие цепи IgG, что согласуется с литературными данными [Baranovskii A. G., et al., 2001].

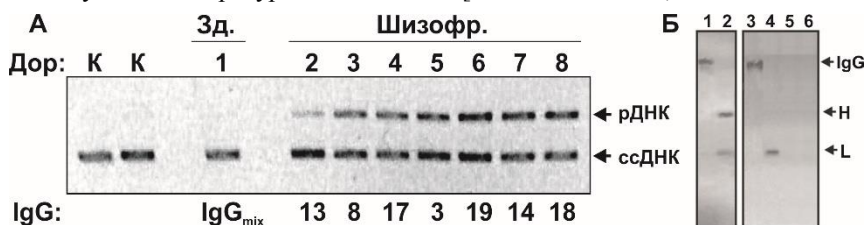


Рис. 8. Анализ ДНКазной активности IgG больных шизофренией. А – анализ продуктов реакции гидролиза двуцепочечной суперскрученной плазмидной ДНК (ссДНК) pBluescript, приводящей к образованию релаксированной плазмидной ДНК (рДНК), в агарозном геле. Дор. «К» – ссДНК, инкубированная без IgG. Дор. 1 – ссДНК, инкубированная в присутствии смеси IgG здоровых доноров (IgG_{mix}). Дор. 2–8 – ссДНК инкубированная с IgG пациентов, номера которых указаны на рисунке. В – зимографический анализ ДНКазной активности смеси препаратов IgG в геле, содержащем сополимеризованную ДНК. Дор. 3, 4 – IgG пациентов до и после восстановления ДТТ; дор. 5, 6 – смесь IgG здоровых доноров до и после обработки ДТТ. Окраска бромистым этидием. Контрольную часть геля окрашивали Coomassie R-250. Дор. 1, 2 – IgG пациентов до и после восстановления ДТТ.

Для количественной оценки ДНК-гидролизующей активности препаратов IgG больных шизофренией и здоровых доноров провели скрининг удельной ДНКазной активности всех препаратов (рис. 9). Обнаружено, что уровень удельной ДНК-гидролизующей активности препаратов IgG больных шизофренией значительно выше уровня активности здоровых доноров ($p=0,0002$), которые практически не обладали активностью (медианное значение активности 0 пМ ДНК/ч/мг

IgG). При этом 16 из 20 препаратов IgG пациентов (80%) обладали детектируемой или высокой ДНКазной активностью.

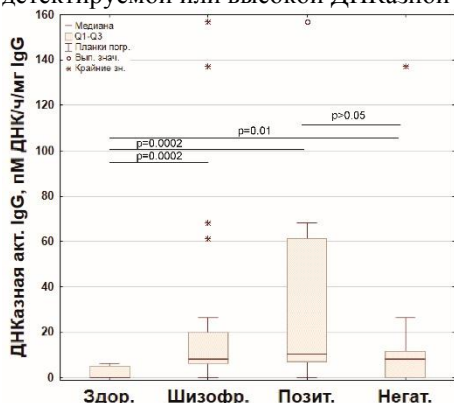


Рис. 9. Сравнение удельной ДНК-гидролизующей активности препаратов IgG здоровых доноров, общей группы больных шизофренией, а также больных с различной преобладающей симптоматикой. Значимость различий (p) между группами рассчитана по критерию Манна-Уитни.

оценены кинетические зависимости начальных скоростей реакции гидролиза от концентрации плазмидной ДНК. Полученная зависимость соответствовала кинетике Михаэлиса-Ментен. Величины K_m и k_{cat} для препаратов IgG(19) и IgG(1) представлены в таблице 2. Препарат IgG(6) продемонстрировал (при тех же условиях) более сложные зависимости, соответствующие сумме двух гиперболических кривых насыщения каталитического антитела ДНК-субстратом. Первая гиперболическая кривая соответствует $K_m = 80,0 \pm 12,0$ нМ и $k_{cat} = (3,0 \pm 0,3) \times 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$, тогда как в случае второй части зависимости, соответствующей меньшему значению K_m и более высокому значению k_{cat} определить эти значения не удалось. В целом, полученные значения K_m указывают на высокую аффинность IgG пациентов к субстрату (ссДНК) и соответствуют типичным значениям K_m (и K_d) для взаимодействий антиген-антитело. Однако полученные значения K_m оказались на 3–4 порядка ниже, чем значения K_m , характеризующие сродство ДНКазы I к ссДНК.

Таблица 2. Величины K_m и k_{cat} для двух препаратов IgG, обладающих ДНКазной активностью, полученных от пациентов с шизофренией, в сравнении с величинами для ДНКазы I.

Параметры	IgG(19)	IgG(1)	ДНКазы I*
K_m , нМ	$95,0 \pm 18,0$	$85,0 \pm 12,0$	$46 \pm 8,6 \times 10^3$
k_{cat} , мин^{-1}	$(2,7 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	$(7,9 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	$(2,5 \pm 0,5) \times 10^5$

*Данные из литературного источника [Gololobov G. V., et al., 1995].

2.2.3. РНК-гидролизующая активность антител

Способность антител гидролизовать как ДНК, так и РНК показана при рассеянном склерозе, системной красной волчанке и других заболеваниях [Nevinsky G.A., et al., 1998–2020]. Для исследования РНК-гидролизующей активности препаратов IgG больных шизофренией использовали модельные субстраты для РНКаз, гидролиз которых регистрировали спектрофотометрическим методом (рис. 10).

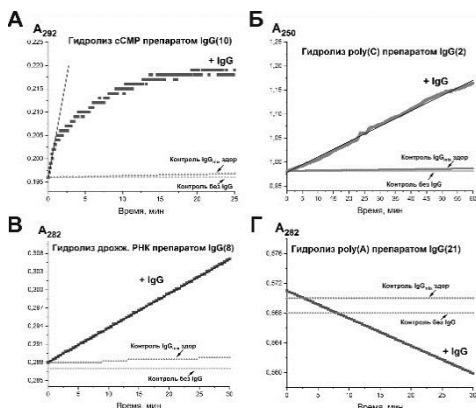


Рис. 10. Типичные кинетические графики зависимости изменения оптической плотности раствора от времени при гидролизе cCMP (А), poly(C) (Б), дрожжевой РНК (В) и poly(A) (Г) под действием различных препаратов IgG больных шизофренией.

активности препаратов IgG здоровых людей на данных субстратах согласуются с литературными данными [Andrievskaya O. A., et al., 2000].

Зимографический анализ РНКазной активности в геле, содержащем дрожжевую РНК использован, чтобы доказать, что регистрируемая активность принадлежит антителам (рис. 11). В результате установлено, что исчезновение окраски, вызванное гидролизом РНК, происходит в области геля, соответствующей положению интактных IgG (рис. 11, дор. 6). На дорожке с антителами, предварительно обработанными ДТТ, гидролиз РНК произошел в областях, соответствующих фрагментам полного или частичного восстановления дисульфидных связей IgG: НН-, НL-фрагменты, Н- и L- цепи (рис. 11, дор. 6). Полученные результаты, во-первых, доказывают, что анализируемые препараты больных обладают РНКазной активностью, а во-вторых, что активность проявляют как легкие, так и тяжелые цепи иммуноглобулинов.

С помощью этого метода показано, что различные препараты IgG больных шизофренией эффективно гидролизуют РНК-субстраты, в то время как смесь IgG здоровых доноров (IgG_{mix} здор) приводила к незначительному изменению оптической плотности, соответственно эти IgG практически не обладали РНКазной активностью. Аналогичные зависимости получены для всех 35-ти проанализированных IgG пациентов и 20-ти антител здоровых доноров. Полученные данные об отсутствии РНКазной

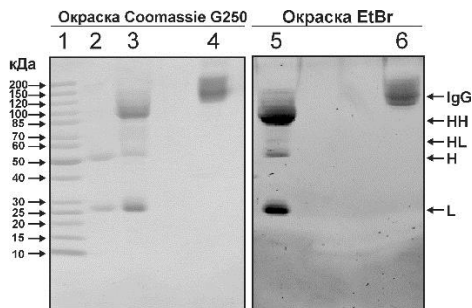


Рис. 11. Зимографический анализ РНК-гидролизующей активности смеси препаратов IgG больных шизофренией в геле, содержащем дрожжевую РНК. Дор. 1 – маркеры молекулярной массы белков. Дор. 2, 3 – IgG после полного и неполного восстановления ДТТ. Дор. 4 – интактные IgG. Окраска Coomassie R-250. Дор. 5–6 – IgG пациентов до и после неполного восстановления ДТТ; окраска бромистым этидием.

Анализ удельной РНКазной активности показал, что все 35 проанализированных образцов IgG (100%) демонстрировали тестируемую или высокую РНКазную активность (рис. 12), в то время как препараты IgG здоровых доноров практически не гидролизуют РНК (медианное значение 0 ОЕ/мин/мг IgG). Эффективность гидролиза модельных субстратов РНК в используемых условиях реакции уменьшалась в ряду: cCMP > poly(C) > poly(A) > суммарная дрожжевая РНК.

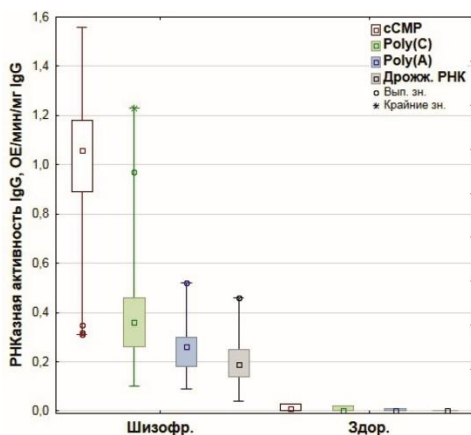


Рис. 12. Сравнение удельной РНКазной активности препаратов IgG больных шизофренией и здоровых доноров на различных модельных субстратах. Во всех случаях различия между группами здоровых доноров и больных шизофренией, рассчитанные по критерию Манна-Уитни, статистически значимы ($p < 0,01$).

используемые методы не позволяют идентифицировать продукты гидролиза, поэтому далее исследована способность IgG гидролизовать гомеолигорибонуклеотиды и микроРНК.

Корреляционный анализ показал, что уровень cCMP-гидролизующей активности положительно коррелировал с возрастом больных ($r = 0,369$, $p < 0,05$). Других корреляций с клиническими данными не выявлено. Таким образом, обнаружено, что препараты IgG больных шизофренией способны гидролизовать не только ДНК, но и РНК. Важно отметить, что РНКазной активностью обладали 100% препаратов IgG пациентов, в то время как ДНК-гидролизующая активность выявлена у 80% больных. Однако

2.2.4. Гидролиз микроРНК антителами больных шизофренией

Для анализа отобраны четыре нейроспецифических микроРНК (miR-137, miR-9-5p, miR-219-2-3p и miR-219-5p), которые регулируют экспрессию генов клеток нервной системы и играют важную роль в развитии шизофрении. Образующиеся паттерны гидролиза флуоресцентно-меченых микроРНК анализировали электрофорезом в денатурирующих условиях (рис. 13).

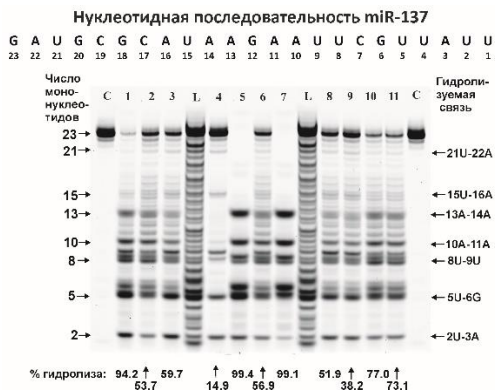


Рис. 13. Анализ продуктов реакции гидролиза miR-137 под действием IgG пациентов с шизофренией в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. Дор. С – контрольная реакционная смесь, не содержащая IgG. Дор. 1–11 – реакционные смеси, содержащие IgG различных пациентов. Дор. L – маркеры фрагментов miR-137 различной длины, полученные путем статистического щелочного гидролиза.

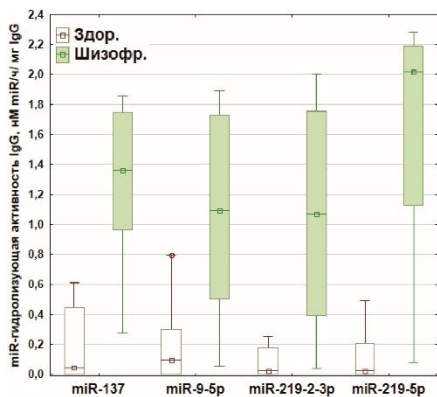


Рис. 14. Сравнение уровня удельной микроРНК-гидролизующей активности препаратов IgG больных шизофренией и здоровых доноров для четырех нейроспецифических микроРНК. Во всех случаях различия между группами здоровых доноров и больных шизофренией, рассчитанные по критерию Манна-Уитни, статистически значимы ($p < 0,0008$).

Установлено, что все препараты IgG больных шизофренией обладают микроРНК-гидролизующей активностью (рис. 14). Процент гидролиза микроРНК различными препаратами IgG в одинаковых условиях отличался, а медианные значения уменьшались в следующем порядке: miR-219a-5p (медиана [IQR] = 88,4 [46,6]%) > miR-137 (73,1 [42,2]%) > miR-9-5p (57,5 [64,2]%) > miR-219a-2-3p (53,2 [67,7]%). Важно отметить, что препараты IgG здоровых доноров также обладали детектируемой, но низкой активностью. Удельная

микроРНК-гидролизующая активность препаратов IgG пациентов

оказалась значительно выше ($p < 0,0008$), чем активность IgG здоровых людей (рис. 14).

Для препарата IgG(14) больного шизофренией с высокой РНКазной активностью оценены кажущиеся значения K_m и k_{cat} в реакции гидролиза микроРНК (таблица 3). Полученные значения k_{cat} были на порядок ниже, чем для IgG из крови пациентов с СКВ [Andrievskaya O. A., et al., 2000].

Таблица 3. Величины K_m и k_{cat} , характеризующие реакцию гидролиза различных нейроспецифических микроРНК под действием препарата IgG пациента с шизофренией.

Параметры	<i>miR-137</i>	<i>miR-9-5p</i>	<i>miR-219a-2-3p</i>	<i>miR-219a-5p</i>
K_m , μM	$3,5 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,13$	$1,7 \pm 0,12$	$4,5 \pm 0,2$
k_{cat} , $мин^{-1}$	$0,14 \pm 0,009$	$0,083 \pm 0,003$	$0,10 \pm 0,008$	$0,17 \pm 0,02$

Также выявлено, что уровень РНКазной активности IgG в реакции гидролиза *miR-219-2-3-p* и *miR-219-5p* коррелировал ($r > 0,44$; $p < 0,05$) с баллами по шкале общих симптомов и суммой баллов по шкале PANSS.

2.2.5. Гидролиз гистонов антителами больных шизофренией

Поскольку образование антител к нуклеиновым кислотам происходит при иммунизации ядерными компонентами, в том числе гистонами, далее исследована способность IgG гидролизовать эти белки.

SDS-PAGE-анализом показано, что инкубация смеси гистонов (H1, H2a, H2b, H3 и H4) с препаратами IgG пациентов приводила к снижению интенсивности полос исходных гистонов на геле и появлению их различных фрагментов с более низкой молекулярной массой (рис. 15). Таким образом обнаружено, что IgG больных гидролизуют все гистоны.

Гель-фильтрацией IgG_{mix} в кислых (pH 2,6) условиях с последующим определением активности во фракциях

элюата доказано, что регистрируемая активность является неотъемлемым свойством исследуемых IgG (рис. 16), поскольку профили гель-фильтрации (A_{280}) и профили протеолитической активности IgG_{mix} при гидролизе пяти гистонов совпадают.

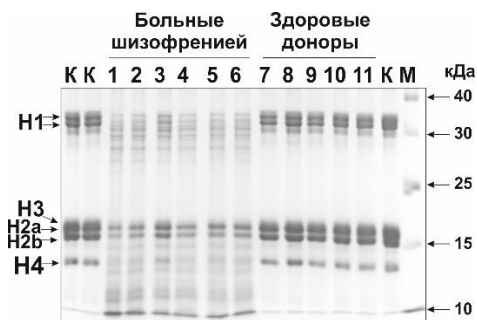


Рис. 15. SDS-PAGE-анализ гистон-гидролизующей активности препаратов IgG больных шизофренией и здоровых доноров при гидролизе гистонов H1, H2a, H2b, H3, H4. Дор. 1-6 – IgG больных шизофренией; дор. 7-11 – IgG здоровых доноров; дор. К – контрольная реакционная смесь без IgG; дор. М – маркеры молекулярной массы белков.

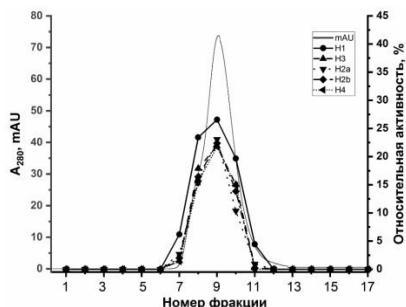


Рис. 16. Профиль гель-фильтрации IgG_{mix} пациентов на Superdex 200 в условиях диссоциации нековалентных комплексов (10 mM Gly-HCl, pH 2,6) и относительная активность (%) полученных фракций в гидролизе гистонов: (—) – поглощение при 280 нм (A₂₈₀); обозначение гидролизуемых гистонов показано на рисунке. Полный гидролиз каждого из пяти гистонов в течение 20 ч в присутствии 5 мкл каждой фракции элюата принимали за 100%.

Скрининг 50-ти препаратов IgG больных шизофренией и 25-ти препаратов IgG здоровых доноров, показал, что уровень гидролиза всех пяти гистонов антителами пациентов с шизофренией статистически значимо ($p < 0,0006$) в 6,1–20,2 раза выше, чем IgG здоровых людей (рис. 17). В зависимости от гистона различия оказались следующими (кратно): H1 (7,3), H2a (8,2), H2b (6,5), H3 (6,1) и H4 (20,2). При этом среди препаратов пациентов наблюдалась гетерогенность как по уровню активности, так и по гидролизуемым гистонам. Например, 20 % больных обладали наиболее высоким уровнем активности ($>20\%$ гидролиза субстрата) в гидролизе всех гистонов.

Примечательно, что обнаружена положительная корреляция между относительной активностью IgG в гидролизе гистона H2b и H4 с баллами по шкале общих симптомов шкалы PANSS ($r = 0,288$ и $r = 0,314$, $p < 0,05$). Также значимая положительная корреляция обнаружена между относительной активностью IgG в гидролизе гистонов H1, H2a и H4 с ДНКазной активностью IgG ($r > 0,4$; $p < 0,05$). Кроме того, уровень гидролиза гистонов H1 и H4 положительно коррелировал с уровнем

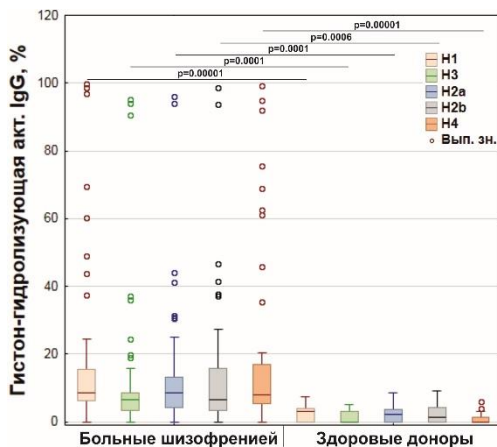


Рис. 17. Сравнительный анализ относительной гистон-гидролизующей активности IgG больных шизофренией и здоровых людей. Уровень активности IgG нормирован на стандартные условия (46–89 мкМ гистонов, в зависимости от гистона; 0,67 mM IgG; 20 ч инкубации при 37°C). Полный гидролиз гистонов принят за 100%. Достоверность различий (p), рассчитанная по критерию Манна-Уитни, указана на рисунке.

РНКазной активности IgG при гидролизе miR-219a-5p и miR-219a-2-3p ($r > 0,4$; $p < 0,05$). Однако других корреляций не выявлено. Таким образом, IgG пациентов эффективно гидролизуют как ДНК, РНК, так и гистоны.

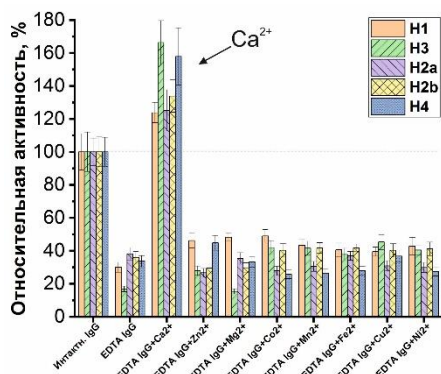


Рис. 18. Влияние диализа смеси препаратов пациентов IgG_{mix} против ЭДТА и добавления различных ионов металлов (2 мМ) к реакционным смесям на относительный уровень активности при гидролизе пяти гистонов. Используемые ионы металлов показаны на рисунке. Уровень гидролиза гистонов интактными препаратами IgG_{mix} (до диализа) принят за 100%.

Анализ биохимических свойств IgG пациентов показал, что наибольшую активность в реакции гидролиза гистонов IgG проявляют при pH 5,5. Кроме того, впервые выявлен активирующий эффект ионов Ca^{2+} на гистон-гидролизующую активность (рис. 18). Другие ионы незначительно влияли на активность. Исходя из полученных величин K_m и k_{cat} следует, что IgG больных шизофренией обладают более высоким средством, чем канонические протеазы.

Ингибиторный анализ гистон-гидролизующей активности IgG показал, что основная часть антител проявляет свойства сериновых протеаз (рис. 19). Но также присутствуют IgG, проявляющие свойства кислых, тиоловых и металл-зависимых протеаз. Таким образом, антитела, гидролизующие гистоны при шизофрении представляют собой смесь абзимов с различным типом протеолитической активности, причем для каждого гистона нарабатывается индивидуальный пул абзимов с различным соотношением типов протеолитической активности.

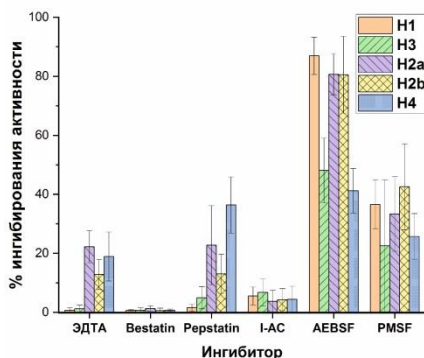


Рис. 19. Ингибиторный анализ гистон-гидролизующей активности IgG больных шизофренией. За 100% принято полное отсутствие гидролиза соответствующего гистона.

2.2.6. Ингибирование протеолитической активности IgG α 1-антитрипсином и апротинином

Поскольку выше показано, что основная часть IgG при шизофрении обладают свойствами протеаз серинового типа, далее исследовано влияние сывороточных ингибиторов протеаз α 1-антитрипсина и апротинина на протеолитическую активность антител.

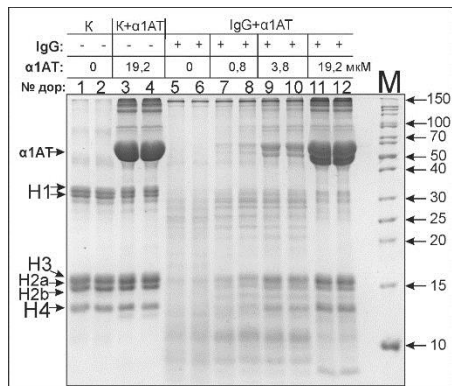


Рис. 20. Ингибирование гистон-гидролизующей активности препарата IgG больного шизофренией под действием α 1-антитрипсина. Дор. К (1, 2) – интактные гистоны (H1, H2a, H2b, H3 и H4). Дор. «K+ α 1-AT» (3, 4) – реакционные смеси, содержащие гистоны и α 1-антитрипсин. Дор. 6–12 – в повторах нанесены реакционные смеси, содержащие гистоны, IgG (0,67 мМ) и α 1-антитрипсин в указанной на рисунке концентрации. Дор. М – маркеры молекулярной массы белков.

Установлено, что с увеличением концентрации α 1-антитрипсина в реакционной смеси наблюдается увеличение степени ингибирования протеолитической активности (рис. 20). Ингибирование наблюдается уже при концентрации 0,8 мкМ α 1-антитрипсина, но более выражено – при его концентрации, равной 3,8 мкМ. Аналогичный ингибирующий эффект обнаружен для апротинина. Важно отметить, что гидролиз различных гистонов ингибируется в разной степени. Подобная зависимость обнаружена также для препаратов IgG больных РС и СКВ (рис. 21). Эти данные объясняются тем, что для

анализа использован суммарный пул препаратов IgG, среди которых присутствуют антитела не только с сериновым типом протеолитической активности, но и другими типами активности.

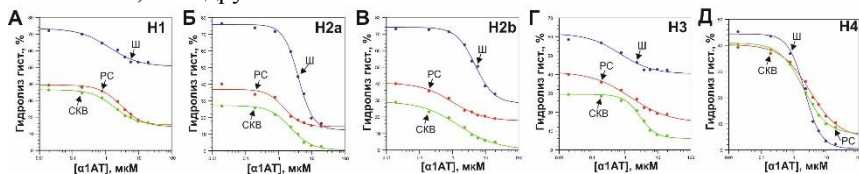


Рис. 21. Зависимость уровня гидролиза гистонов (%) препаратами IgG больных шизофренией (Ш), рассеянным склерозом (РС) и системной красной волчанкой (СКВ) от концентрации α 1-антитрипсина. А, Б, В, Г, Д – гидролиз гистонов H1, H2a, H2b, H3 и H4 соответственно.

Заключение

Дисфункция иммунной системы при шизофрении показана многочисленными исследованиями [Drexhage H. A., et al., 2014; Pape K., et al., 2019]. Однако изучению гуморальной иммунной системы при шизофрении уделено недостаточно внимания. В данной работе впервые исследовано разнообразие каталитических активностей IgG при шизофрении. Выявленное широкое разнообразие каталитических активностей антител является новым доказательством нарушений гуморальной иммунной системы при этом заболевании.

Полученные в работе данные значительно расширяют представления о неканонических функциях иммуноглобулинов человека [Dimitrov J. D., Lacroix-Desmazes S., 2020]. Полученные доказательства о способности IgG пациентов с шизофренией и здоровых доноров катализировать окислительно-восстановительные реакции позволяют предположить участие таких антител в защите организма от оксидативного стресса.

Исследования в области каталитических антител ранее были сосредоточены на их негативной роли при различных заболеваниях. Учитывая важную роль воспаления в патогенезе шизофрении, а также данные о дисфункции апоптотической гибели клеток, что приводит к выходу ДНК, РНК и гистонов во внеклеточное пространство, можно предположить, что обнаруженные в данной работе антитела, гидролизующие эти молекулы, играют протективную роль при шизофрении. Поскольку образование каталитических антител связано с активацией иммунной системы и иммунологическими нарушениями, поэтому полученные данные о каталитической активности могут быть использованы, наряду с другими клинико-лабораторными показателями, для разработки критериев стратификации больных шизофренией по степени иммунной дисрегуляции.

Впервые выявленная способность сывороточных ингибиторов сериновых протеаз $\alpha 1$ -антитрипсина и апротинина ингибировать каталитическую активность IgG указывает на систему тонкой регуляции каталитической активности антител в организме. Возможно, $\alpha 1$ -антитрипсин и апротинин являются лишь первыми примерами специфических *природных ингибиторов каталитических антител*.

ВЫВОДЫ

1. Гомогенные препараты IgG больных шизофренией проявляют широкий спектр каталитических активностей, которые являются собственным свойством антител. Во всех случаях IgG обладают высокой каталитической активностью по сравнению со здоровыми донорами. Изученные биохимические свойства (рН- и металло-зависимость, специфичность, кинетические параметры) каталитических антител значительно отличаются от свойств канонических ферментов с аналогичной каталитической активностью. Сродство к субстрату всех исследуемых абзимов выше на 2–4 порядка, по сравнению с каноническими ферментами.
2. IgG больных шизофренией катализируют окислительно-восстановительные реакции.
 - Уровень пероксидазной и H_2O_2 -независимой оксидоредуктазной активности IgG пациентов в реакции окисления 3,3'-диаминобензидина в 1,3 и 1,2 раза выше соответственно, чем IgG здоровых доноров.
 - Каталазная активность IgG больных шизофренией в 3,8 раза выше по сравнению со здоровыми донорами. Каталазная активность зависит от присутствия двухвалентных катионов.
3. Препараты IgG больных шизофренией обладают ДНК-, РНК- и гистон-гидролизующей активностями, но при этом не проявляют олигосахарид- и АТФ-гидролизующие активности.
 - Антитела с ДНК-гидролизующей активностью выявлены у 80% IgG больных шизофренией.
 - Все препараты IgG обладают РНК-гидролизующей активностью. Гидролиз микроРНК под действием IgG больных шизофренией является сайт-специфическим, поскольку основные сайты гидролиза различными антителами совпадают. Уровни сСМР- и микроРНК-гидролизующих активностей коррелируют с клиническими параметрами шизофрении.
 - Уровень гистон-гидролизующей активности препаратов IgG пациентов в 6,1–20,2 раза выше, чем у здоровых доноров; показана его корреляция с клиническими особенностями заболевания. Впервые обнаружен активирующий эффект ионов Ca^{2+} на активность.
 - IgG пациентов гидролизуют ДНК, микроРНК и гистоны с сопоставимой эффективностью, что подтверждается результатами корреляционного анализа.
4. Образование каталитических антител при шизофрении указывает на некоторые общие механизмы иммунных нарушений, характерных для аутоиммунных заболеваний.

5. Гистон-гидролизующая активность IgG снижается в присутствии сывороточных ингибиторов сериновых протеаз α 1-антитрипсина и апротинаина пропорционально их концентрации, что, по-видимому, указывает на систему тонкой регуляции каталитической активности антител организмом.

Список основных публикаций по теме диссертации

Статьи в научных журналах

1. **Ermakov E.A.**, Parshukova, D.A., Nevinsky G.A., Buneva V.N. Natural Catalytic IgGs Hydrolyzing Histones in Schizophrenia: Are They the Link between Humoral Immunity and Inflammation? // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – №. 19. – P. 7238. (IF=4.556, Q1)
2. **Ermakov E.A.**, Nevinsky G.A., Buneva V.N. Immunoglobulins with Non-Canonical Functions in Inflammatory and Autoimmune Disease States // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – №. 15. – P. 5392. (IF=4.556, Q1)
3. **Ermakov E.A.**, Ivanova S.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Hydrolysis by catalytic IgGs of microRNA specific for patients with schizophrenia // *IUBMB Life.* – 2018. – V. 70. – №. 2. – P. 153-164. (IF=3.236, Q1)
4. **Ермаков Е.А.**, Иванова С.А., Бунева В.Н., Невинский Г.А. РНК- И микроРНК-гидролизующие IgG антитела из крови больных шизофренией // *Биохимия.* – 2018. – Т. 83. – №. 5. – С. 673-694. (IF=1.724, Q2)
5. **Ermakov E.A.**, Smirnova L.P., Bokhan N.A., Semke A.V., Ivanova S.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Catalase activity of IgG antibodies from the sera of healthy donors and patients with schizophrenia // *PloS One.* – 2017. – V. 12. – №. 9. – P. e0183867. (IF=2.806, Q1)
6. **Ермаков Е.А.**, Толмачева А.С., Смирнова Л.П., Иванова С.А., Бунева В.Н., Невинский Г. А. Особенности окислительно-восстановительных, амилазной и АТРазной активностей IgG антител из крови больных шизофренией // *Российский иммунологический журнал.* – 2017. – Т.11(20). – №4 – С. 37-50.
7. **Ermakov E.A.**, Smirnova L.P., Parkhomenko T.A., Dmitrenok P.S., Krotenko N.M., Fattakhov N.S., Bokhan N.A., Semke A.V., Ivanova S.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. DNA-hydrolysing activity of IgG antibodies from the sera of patients with schizophrenia // *Open Biology.* – 2015. – V. 5. – №. 9. – P. 150064. (IF=5.784, Q1)

Глава в монографии:

8. Buneva V.N., **Ermakov E.A.**, Nevinsky G.A. Immune System Dysregulation and Autoimmunity in Schizophrenia: IgGs from Sera of Patients with Several Catalytic Activities. In *Psychotic Disorders–An Update*; InTechOpen: London, UK, 2018; pp. 41–101. DOI: 10.5772/intechopen.73194