

## Особенности ДНКазной и БАПНА-амидазной активности поликлональных IgG

И. И. Генералов, Н. В. Железняк, А. Г. Генералова, Е. В. Кундер, И. В. Жильцов  
Витебский государственный медицинский университет, Республика Беларусь

## Some peculiarities of DNase and BAPNA-amidase activity of polyclonal IgG

I. I. Generalov, N. V. Zheleznyak, A. G. Generalova, E. V. Kunder, I. V. Zhylytsou  
Vitebsk State Medical University, Republic of Belarus

### Аннотация

В работе изучены некоторые параметры ДНКазной и амидазной активности каталитических иммуноглобулинов (абзимов) выделенных от больных аутоиммунными заболеваниями. Показано, что IgG с ДНКазной активностью могут иметь несколько оптимумов pH, их активность зависит от ионной силы. Каталитические антитела с амидазным действием активны в широком диапазоне pH с максимумом в нейтральной зоне. При хроматографии на анионообменных матрицах препарат IgG с ДНКазной активностью разделялся на две фракции, причем адсорбированная минорная фракция IgG сохраняла большую часть ДНКазной активности.

Полученные данные подтверждают значительное разнообразие параметров каталитической активности поликлональных иммуноглобулинов.

### Ключевые слова

Поликлональные IgG человека, абзимы, ДНКазная активность, амидазная активность.

В последнее десятилетие моноклональные и поликлональные антитела (АТ), проявляющие собственную каталитическую (абзимную) активность, стали предметом углубленного изучения со стороны исследователей, работающих на стыке иммунологии, биохимии, генной инженерии, биотехнологии и медицины. Оказалось, что абзимы катализируют химические реакции по тем же принципам, что и истинные ферменты: стабилизация переходного состояния субстрата, сближение реагирующих группировок со сдвигом электронных плотностей химических связей, снижение энтропии реагентов, и т.д. [9, 11]. Однако процесс абзимного катализа до настоящего времени изучается в основном на моноклональных абзимах. Механизмы же действия природных каталитических антител до сих пор исследованы недостаточно. Среди поликлональных каталитических АТ наибольший интерес вызывают

### Summary

Some characteristics of DNase and amidase activity of catalytic immunoglobulins (abzymes) derived from patients with autoimmune diseases were investigated. IgG with DNase activity were shown to have several optimal pH values for their action; their activity is strongly dependent on ionic strength. Catalytic antibodies with amidase action are active in broad range of pH. After anionic exchange chromatography IgG preparation with DNase activity revealed two protein fractions; the absorbed minor fraction of IgG demonstrated the highest DNase activity.

The received data confirmed the great variability of catalytic action of polyclonal immunoglobulins.

### Keywords

Polyclonal human IgG, abzymes, DNase activity, amidase activity.

абзимы, обладающие деполимеризующим действием (в первую очередь, активирующие протеолиз и гидролиз нуклеиновых кислот).

Такие абзимы интенсивно изучаются многими группами исследователей [8, 12, 13]. Некоторые авторы указывают, что поликлональные абзимы могут проявлять гетерогенность в отношении катализируемых реакций. Например, если первоначально утверждалось, что абзимы-ДНКазы являются строго Mg- и Mn-металлозависимыми [1, 7], то впоследствии оказалось, что активность может быть самой многообразной. Препараты АТ, выделенные из молока, максимально активировались ионами цинка, а некоторые не требовали катионов и более того — активировались ЭДТА. [3, 5]. Вариабельность абзимного действия была продемонстрирована и для реакций протеолиза [10].

Из этих данных следует, что особенности абзимного действия поликлональных ИГ зависят как от источника и способа получения препарата АТ (например, путем выделения от больных с различной патологией или в результате иммунизации животных), так и от субстрата катализируемой реакции. В каждом из таких случаев они могут значительно отличаться, что требует дополнительного исследования параметров данных реакций.

В настоящей работе мы изучили некоторые особенности действия поликлональных абзимов с ДНКазной и протеолитической (амидазной) активностью, выделенных от больных аутоиммунными заболеваниями (ревматоидным артритом (РА), системной красной волчанкой (СКВ), аутоиммунным тиреоидитом (АИТ)).

В качестве субстрата ДНКазной реакции в работе использовали высокополимерную ДНК из тимуса теленка. Для оценки амидазной (как аналога протеолитической) активности применяли бензоил-DL-аргинин-*p*-нитроанилид (БАПНА). Оба эти субстрата широко используются при характеристике соответствующих типов реакций.

### Материалы и методы

В работе были использованы бензоил-DL-аргинин-*p*-нитроанилид (БАПНА) производства фирмы Sigma, агароза, конъюгированная с белком А золотистого стафилококка (институт им.Пастера, г.С.-Петербург, Россия), ДНК тимуса теленка (Sigma), Остальные реактивы — отечественного производства квалификации «хч» и «чда»

В качестве материала для исследования использовались препараты иммуноглобулинов класса G, выделенные из сывороток крови больных ревматоидным артритом (РА), системной красной волчанкой (СКВ), аутоиммунным тиреоидитом (АИТ), а также доноров крови комбинированным методом.

Контроль чистоты полученных ИГ проводили, как описано в [4], включая иммуноэлектрофорез, электрофорез в градиентном 4–20% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с окрашиванием Кумасси R250 или нитратом серебра.

Микробиологический контроль препаратов IgG осуществляли при помощи посева полученного пре-

парата IgG на кровяной агар и среду Сабуро. После инкубации в течение 5 суток при 37°C роста колоний обнаружено не было.

Концентрацию IgG в сыворотках определяли по методу Манчини, концентрацию белка в очищенных препаратах IgG оценивали спектрофотометрией при 280 нм, а также микромодификацией метода Бредфорд [6].

Ионообменную хроматографию очищенных препаратов IgG проводили на колонке объемом 8 мл, заполненной DEAE-акрилексом А-50 (в фосфатной форме). Сорбент был уравновешен 0,01М ФБР, рН 6,0.

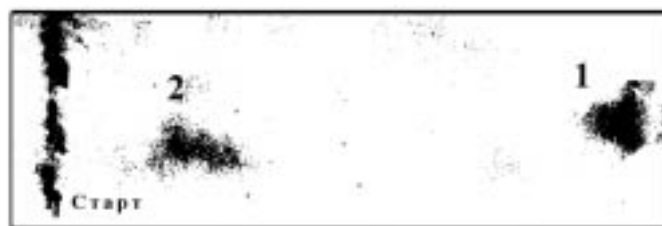
Имуноглобулины в количестве 2 мг нагружали на колонку и элюировали тем же буфером со скоростью 0,5 мл/мин. Дальнейшую элюцию проводили ступенчатым градиентом хлорида натрия (0,5–1,0–2,0 М раствор NaCl на 0,01М ФБР, рН 6,0). Концентрацию белка в элюатах после хроматографии измеряли по методу Бредфорд.

В полученных препаратах и фракциях IgG изучали ДНКазную и БАПНА-амидазную активность абзимов и сывороток по методам, изложенным в [4]. Результаты определения ДНКазной активности выражали в единицах оптической плотности (ЕОП) или в единицах активности фермента ДНКазы (ЕД), определенных по коммерческому препарату энзима. Результаты определения БАПНА-амидазной активности выражали в единицах оптической плотности (ЕОП).

### Результаты и обсуждение

Полученные после очистки препараты иммуноглобулинов оказались гомогенными по результатам диссоциирующего электрофореза. Препараты содержали только IgG без примесей других классов иммуноглобулинов, IgM или IgA. Микробиологический контроль полученных препаратов ИГ бактериальной контаминации не выявил.

Наличие собственной ДНКазной активности у IgG было подтверждено электрофорезом продуктов деградации ДНК в 1% геле агарозы. Результаты электрофореза в агарозе свидетельствуют, что IgG действительно вызывают распад ДНК на низкомолекулярные фрагменты [Рис. 1], при этом IgG большой СКВ вызвали глубокую деградацию субстрата с образованием быстро мигрирующих в электрическом поле фрагментов.



**Рис. 1. Агарозный электрофорез продуктов распада ДНК под действием IgG большой СКВ (окраска бромидом этидия, 1 мкг/мл).**

1 — Инкубация IgG с ДНК в течение 24 ч (опытная проба)

2 — Буферный раствор (24-часовая инкубация, контрольная проба)

При обработке препарата абзимов свободным протеином А оказалось, что его ДНКазная активность не изменяется. Это подтверждает предположение, что ДНКазная активность IgG связана с их Fab-участками

Результаты экспериментов по фрагментированию IgG папаином свидетельствовали, что удаление Fc-фрагментов из раствора не приводит к исчезновению ДНКазной и БАПНА-амидазной активности IgG. В частности, исходный препарат IgG обладал ДНКазной активностью, равной 90.4 УЕ. Активность же Fab-фрагментов в соответствующей концентрации составила 79,62 УЕ. Адсорбция препаратов ИГ на сорбенте со стафилококковым протеином А выражено (до 5–20% от исходной) снижала абзимную активность поликлональных IgG.

Следующие проведенные эксперименты выявили некоторые дополнительные особенности абзимного действия поликлональных IgG.

Степень превращения всех субстратов, как и ожидалось, была пропорциональна концентрации ИГ, взятых в реакцию. В свою очередь, кинетические кривые абзимных реакций продемонстрировали (по крайней мере в первые часы инкубации) линейный характер зависимостей, что свидетельствует об условиях насыщения абзима субстратом (Рис. 2 и Рис. 3).

При исследовании влияния теплового фактора на абзимные реакции оказалось, что температурный оптимум у различных реакций несколько отличается. Для препарата IgG с ДНКазной активностью оптимум совпадал с физиологическим и был равен 37°C. При увеличении температуры инкубации до 56°C активность заметно снижалась. Эти результаты в целом подтверждаются данными других авторов

по изучению термостабильности абзимных нуклеаз. В частности, при прогреве при 60°C IgG с РНКазным действием активность последних снижалась на 90% от исходной [3].

Для БАПНА-амидазной активности картина была несколько иная. Наибольшая активность изученного препарата IgG наблюдалась при 41°C (выше, чем при 37°C).

При анализе зависимости активности от рН между абзимами также были обнаружены отличия.

По данным литературы [1], ДНКазные абзимы функционируют в широком интервале рН со слабым максимумом при 7.0–8.0. Часть из выделенных нами ДНКазных препаратов IgG обладала подобным действием. Однако некоторые из них проявляли 2 оптимума активности — больший в слабощелочной зоне и меньший — в слабокислой. Это подтверждает каталитическую гетерогенность абзимного препарата.

БАПНА-амидазные IgG были активны в широком диапазоне от кислой до слабощелочной среды с невыраженным максимумом в нейтральной зоне.

ДНКазная абзимная активность существенно снижалась после превышения некоторой пороговой концентрации NaCl в среде (около 0.1–0.3М и выше). Это свидетельствует о существенном вкладе ионных взаимодействий в связывание таких абзимов с субстратом.

В свою очередь, для БАПНА-амидазных абзимов такие взаимодействия имели меньшее значение — с увеличением ионной силы активность снижалась менее выражено.

С учетом обнаруженных отличий препаратов ДНКазных абзимов в отношении оптимума рН, а также существенного влияния на их активность ионной

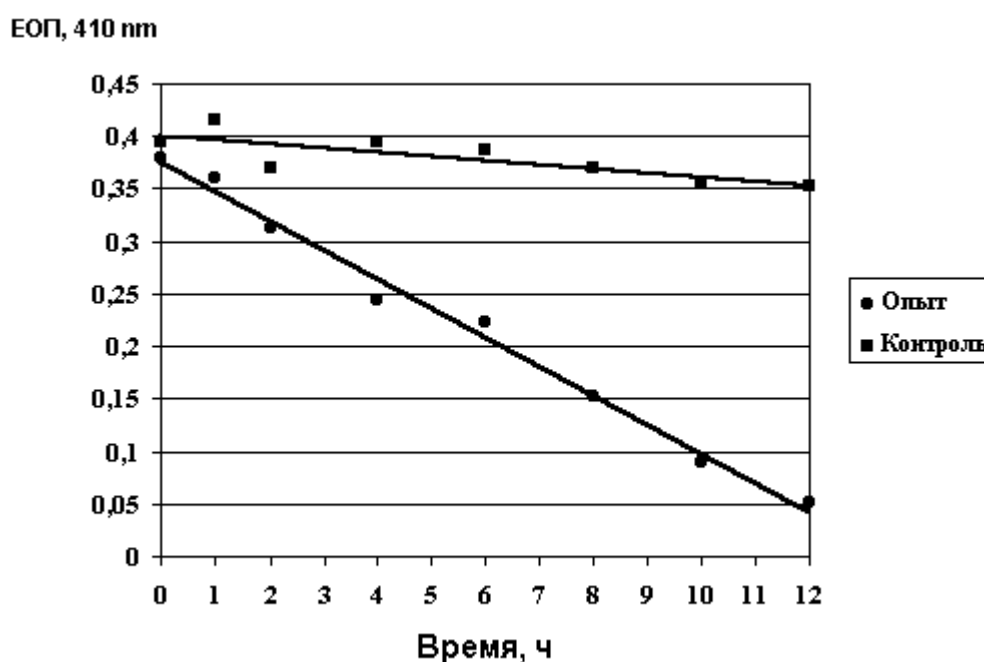


Рис. 2. Кинетика деполимеризации ДНК в результате действия абзимных IgG.

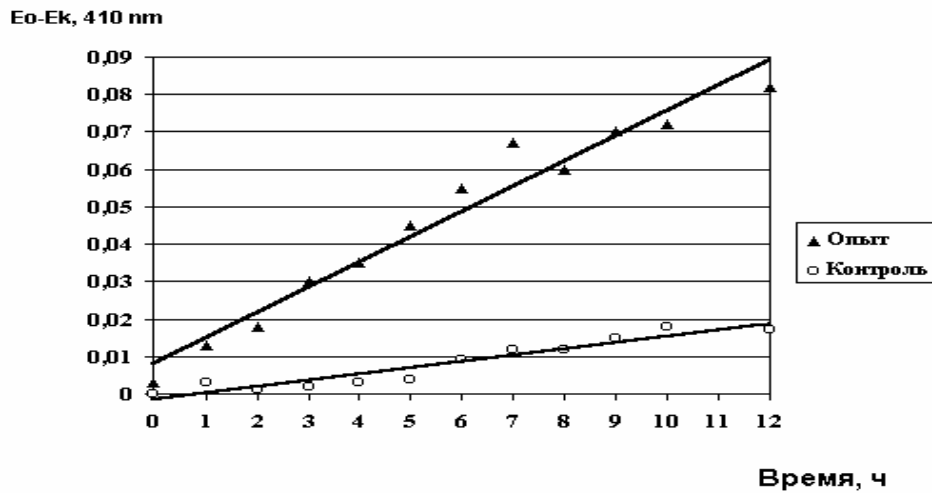


Рис. 3. Кинетика гидролиза БАПНА под влиянием абзимных IgG.

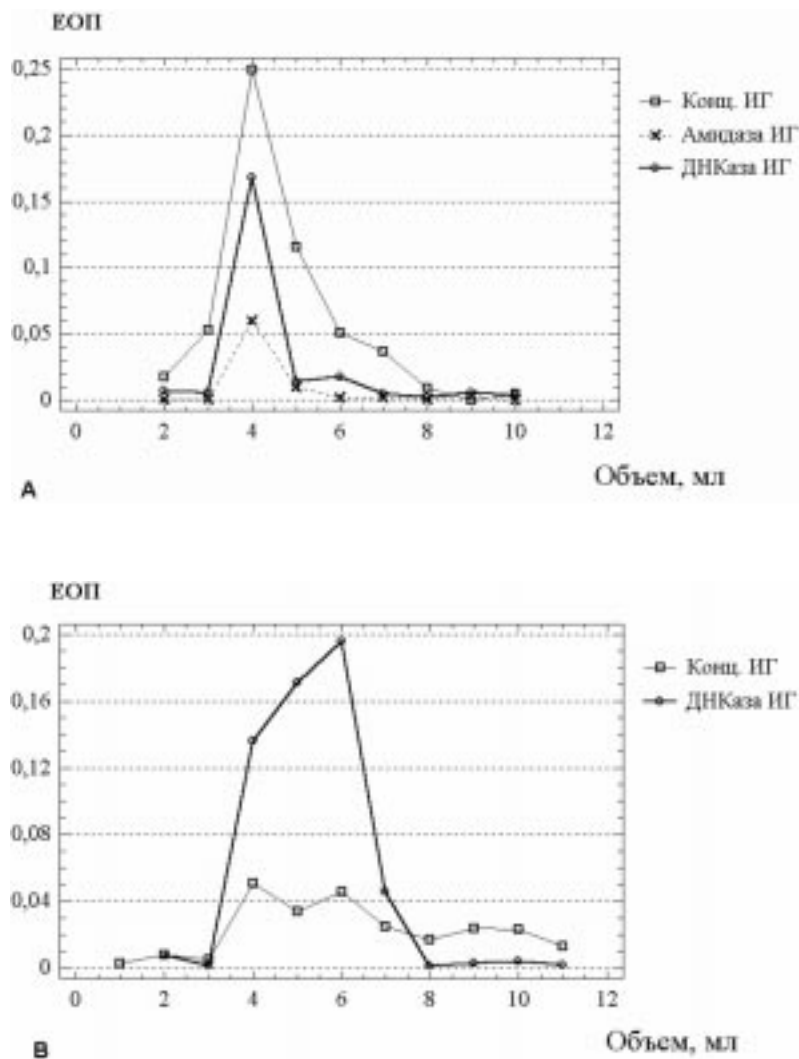


Рис. 4. Фракционирование абзимов с ДНКазной активностью при хроматографии на DEAE-акрилексе А-50.

А. Абзимная активность фракций свободного объема.

Б. ДНКазная абзимная активность минорной фракции IgG, элюированной 0,5 М раствором NaCl.

силы, мы провели фракционирование абзимного препарата IgG с ДНКазной активностью методом анионообменной хроматографии. Как известно, разделение макромолекул с помощью данного метода базируется на различии в заряде изучаемых белков.

Результаты эксперимента представлены на рис. 4А и 4В. Из них следует, что данный препарат IgG содержит не менее двух фракций ИГ, обладающих ДНКазной абзимной активностью. Выходящая в свободном объеме фракция IgG с основными свойствами (более 90% от общей белковой нагрузки на колонку), сохраняла около 25% исходной ДНКазной активности. В свою очередь, после элюции 0,5 М раствором NaCl оказалось, что на матрице сорбировалось всего 6–8% АТ, обладающих кислыми свойствами в условиях хроматографии при pH 6,0. Связанная с сорбентом фракция сохраняла до 75% от исходной суммарной ДНКазной активности абзима (рис. 4В).

Дальнейшее повышение концентрации NaCl не привело к появлению дополнительных белковых фракций в элюенте.

В целом обнаружение не менее чем 2-х разных по свойствам фракций ИГ с ДНКазной активностью подтверждает наличие нескольких вероятных механизмов гидролиза ДНК антителами.

Например, кислая фракция абзимов может связывать катион металла (Mg (II), Mn (II) или иной ион). В этом случае катион выступает в роли электрофильного катализатора — льюисовой кислоты. Сходно с действием природных нуклеаз, катион металла в активном центре абзима может связаться с двумя оксианион-фосфатами, частично нейтрализуя их общий отрицательный заряд. Тем самым увеличивается вероятность атаки фосфодиэфирной связи со стороны нуклеофильного гидроксил-аниона.

С другой стороны не исключено, что фракция абзимов с основными свойствами, может проявлять

ДНКазную активность и в отсутствие катионов металла. Вместо катионов металла у таких ИГ в роли общекислотного катализатора может выступать, в частности, имидазольное кольцо гистидина.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что поликлональные абзимы могут проявлять значимые отличия даже в отношении одних и тех же катализируемых реакций. Как упоминалось выше, сходные результаты были получены и рядом других авторов. Они позволяют хотя бы частично объяснить данные по клиническим исследованиям абзимной активности, где препараты, выделенные от разных больных с одной и той же патологией или даже у одного больного в разные сроки заболевания могли существенно отличаться по уровню активности и условиям протекания реакций [2, 3, 4].

### Выводы

1. Параметры ДНКазной и БАПНА-амидазной активности препаратов IgG, выделенных из сывороток больных аутоиммунными заболеваниями являются переменными и зависят от источника получения IgG.
2. ДНКазная абзимная активность зависит от ионной силы раствора, имеет температурный оптимум действия при 37°C. Часть ДНКазных абзимов являются гетерогенными по активности, на что указывает отсутствие четко определенного оптимума pH. БАПНА-амидазная абзимная активность обладает широким оптимумом pH с максимумом действия в нейтральной зоне.
3. Некоторые препараты IgG с ДНКазной активностью проявляют гетерогенность при взаимодействии с анионообменниками, при этом задерживающаяся на сорбенте минорная фракция IgG с кислыми свойствами сохраняет до 75% от исходной активности абзима.

*Ἐπισημαίνεται ἡ ἀντιδραστικὴ ἰδὴ ἰσότης τῶν ἀβζιμῶν Ἀαὐτοδρόνηται Δαπνιόαεὲδαίνεται Ὅτιῦα  
δοῦταιἰδὲαὐτῶν ἐπισημαίνεται, ἀδαῖο ἌΔὍὍÈ Ἄ03–345*

### Литература

1. Барановский А.Г., Канышкова Т.Г., Могельницкий А.С. и др. Поликлональные антитела из крови и спинномозговой жидкости больных рассеянным склерозом эффективно гидролизуют ДНК и РНК. Биохимия 1998; 63 (11): 1459–69.
2. Барановский А.Г., Матюшин В.Г., Власов А.В. и др. ДНК и РНК гидролизующие антитела из крови больных различными формами вирусного гепатита. Биохимия 1997; 62 (12): 1590–9.
3. Власов А.В., Барановский А.Г., Канышкова Т.Г. и др. Субстратная специфичность ДНК и РНК гидролизующих антител из крови больных полиартритом и аутоиммунным тиреоидитом. Мол биол 1998; 32: 559–69.
4. Генералов И.И., Сидорская Е.В. Абзимная активность препаратов IgG у больных ревматоидным артритом и системной красной волчанкой. Иммунология 1998; 3: 54–6.
5. Канышкова Т.Г., Семенов Д.В., Власов А.В. и др. ДНК и РНК гидролизующие антитела из молока человека и их возможная биологическая роль. Мол биол 1997; 31 (6): 1082–91.
6. Практическая химия белка: пер. с англ. Под ред. А. Дарбре. М.: Мир, 1989; 298.
7. Шустер А.М., Гололобов Г.В., Кващук О.А. и др. Взаимодействие каталитически активных антител с ДНК. Докл АН СССР 1991; 319 (6): 1504–7.

8. Bayry J., Lacroix-Desmazes S., Pashov A. et al. Autoantibodies to factor VIII with catalytic activity. *Autoimmun Rev* 2003; 2 (1): 30–5.
9. Blackburn G.M., Datta A., Denham H., Wentworth P. Catalytic Antibodies. *Adv Phys Org Chem* 1998; 31: 249–392.
10. Paul S., Li L., Kalaga R. et al. Natural catalytic antibodies: peptide hydrolyzing activities of Bence Jones proteins and VL fragments. *J Biol Chem* 1995; 270: 15257–61.
11. Schultz P.G., Lerner R.A. From molecular diversity to catalysis: lessons from the immune system. *Science* 1995; 269: 1835–44.
12. Stephens, R.E. Thomas, J.F. Stanton, B.L. Iverson D.B. Polyclonal antibody catalytic variability. *Biochem J* 1998; 332 (1): 127–34.
13. Zhou Y.X., Karle S., Taguchi H. et al. Prospects for immunotherapeutic proteolytic antibodies. *J Immunol Meth* 2002; 269 (1–2): 257–68.