

УДК 578.828.6

## Каталитическая полиспецифичность IgG абзимов из молока лактирующих женщин

С.Е. Седых, В.Н. Бунева, Г.А. Невинский

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

## Catalytic polyspecificity of IgG abzymes in milk of lactating women

S.E. Sedykh, V.N. Buneva, G.A. Nevinsky

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian branch of Russian Academy of Sciences

### Аннотация

Ранее в молоке здоровых рожениц были обнаружены IgG антитела (АТ), гидролизующие ДНК, а также уникальные иммуноглобулины, фосфорилирующие белки, липиды и полисахариды. В данной работе впервые показано, что электрофоретически и иммунологически гомогенные IgG при хроматографии на ДНК-целлюлозе, АТФ-сефарозе, казеин-сефарозе и липид-сорбенте при элюции солью в различных концентрациях распределяются в случае каждого сорбента по всему профилю хроматографии. Все полученные фракции, включая элюируемые в условиях разрушения сильных комплексов белков и ферментов со специфическими лигандами, а также комплексов антител с антигенами, проявляли высокую активность в гидролизе ДНК, фосфорилировании казеина и липидов. Полученные данные свидетельствуют в пользу каталитической полиспецифичности поликлональных IgG, которая может быть обусловлена обменом HL компонентами или отдельными легкими и тяжелыми цепями между разными (HL)<sub>2</sub> молекулами IgG антител, ведущим к образованию химерных молекул АТ.

### Ключевые слова

IgG абзимы, материнское молоко, каталитическая полиреактивность.

Антитела против химически стабильных аналогов переходных состояний, а также природные Ig с каталитическими активностями получили название абзимов и достаточно хорошо описаны в литературе (для обзора см. [1-6]). Наличие в крови абзимов, согласно

### Summary

It was shown earlier that small fractions IgGs from the milk of healthy women can hydrolyze DNA and catalyze unique reactions of phosphorylation of proteins, lipids, and polysaccharides. Here it is shown for the first time that electrophoretically and immunologically homogeneous IgGs under chromatographies on DNA-cellulose, ATP-Sepharose, casein-Sepharose, and lipid-adsorbent at elution by different concentration of salt in all cases are distributed all over the profiles of the chromatographies. All the fractions obtained, including eluted in conditions of the destroying of strong complexes between proteins and enzymes with specific ligands as well as complexes of antibodies with antigens, demonstrated high activity in the hydrolysis of DNA and phosphorylation of casein and lipids. The data obtained indicate for catalytic polyspecificity of polyclonal IgGs, which may be a consequence of the exchange by HL components of light and heavy chains between different (HL)<sub>2</sub> molecules of IgG antibodies, leading to a formation of chimerical molecules of antibodies.

### Key words

IgG abzymes, human mother's milk, catalytic polyreactivity

сложившимся представлениям, является четким признаком протекания в организме человека аутоиммунных (АИ) процессов [2-6]. IgG и/или IgA, IgM антитела, гидролизующие ДНК, РНК, белки и полисахариды были обнаружены в крови пациентов с различными

АИЗ: СКВ, тиреоидит Хашимото, полиартрит, рассеянный склероз, лимфопролиферативные заболевания, злокачественные опухоли, а также вирусный гепатит и ВИЧ-инфекция (для обзора см. [2–6]).

Долгое время из-за отсутствия явной иммунизации существование природных абзимов у доноров без каких-либо АИ патологий считалось невозможным. Тем не менее, было показано, что кровь здоровых доноров может содержать абзимы, расщепляющие некоторые белки и полисахариды, активность которых на несколько порядков ниже, чем у пациентов с АИЗ [7-9]. Особой группой здоровых людей являются женщины, у которых в период беременности и сразу после родов есть склонность к протеканию иммунных реакций, подобных АИ – процессам у пациентов с АИЗ ([10-12] и ссылки в них). Во время беременности кровь женщин (также как и кровь больных АИЗ) содержит ДНК в повышенных концентрациях, а также клетки плода в небольших концентрациях; установлена корреляция повышенной частоты встречаемости клеток плода в периферической крови матери с заболеваемостью некоторыми АИЗ. В последний триместр беременности женщины характеризуются повышенным уровнем апоптоза клеток.

В течение первых нескольких месяцев жизни иммунная система новорожденных еще не сформирована: слизистые поверхности респираторного и гастроэнтерологического трактов младенцев лишены антител (АТ) [2-6]. Защитные механизмы новорожденных (пассивный иммунитет) в значительной степени обеспечены АТ материнского молока, которые покрывают слизистые поверхности ребенка и действуют против компонентов бактерий, вирусов и т.д. Показано, что IgG молока могут проникать в кровь новорожденных.

Во время беременности и сразу после родов происходит перестройка иммунной системы женщин. Важным фактором перестройки иммунной системы является «включение функционирования» специфической «иммунопямяти» беременных женщин, которая накапливает данные обо всех вредных для ребенка внутренних и внешних иммуногенах, поступающих в их организм женщины с пищей или в результате контакта с вирусами или бактериями [10-12]. В момент начала лактации происходит «запуск» работы «им-

мунопямяти» и синтеза АТ, включая абзимы, ко всем инородным антигенам, что ведет к сильному увеличению титров АТ (в крови и особенно молоке) к белкам, полисахаридам, нуклеиновым кислотам и т. д., которые поступали в организм женщины любым путем в последний триместр беременности.

Как показано нами с использованием мышей, иммунизация животных в период беременности приводит в первую очередь к изменению уровня пролиферации и профиля дифференцировки стволовых клеток костного мозга, в то время как иммунизация обычных самцов и самок не затрагивает иммунной системы костного мозга, а наработка АТ, включая абзимы, в повышенной концентрации является следствием увеличения уровня пролиферации лимфоцитов в селезенке, тимусе, лимфатических узлах и других внутренних органах [13]. Эти данные могут говорить о том, что у беременных и лактирующих женщин иммунная система может производить АТ, которые отличаются по своим функциям и свойствам от таковых для обычных женщин и мужчин.

Первым примером абзимов здоровых по медицинским показаниям женщин были sIgA молока здоровых рожениц, катализирующие фосфорилирование казеина и ряда других белков молока [14]. Молоко оказалось уникальным источником абзимов как с типичными, так и уникальными ферментативными активностями. Было показано, что небольшие субфракции поликлональных IgG и sIgA молока человека способны катализировать реакции гидролиза ДНК-, РНК [15-16], рибо- и дезокси-NMP, NDP и NTP [11], а также отщепление 5'-концевого фосфата ДНК и РНК (фосфатазная активность) [15-16], гидролиз полисахаридов [9] и казеина [17]. В молоке здоровых рожениц были обнаружены sIgA и IgG с уникальными не только протеин- [14] но и липид- [18] и полисахарид-киназными [19] активностями, фосфорилирующие минорные липиды и полисахариды с ранее неопи-санной структурой.

В данной работе впервые сделана попытка анализа структуры IgG абзимов и природы их полиреактивности с помощью хроматографии на разных аффинных сорбентах и последующего сравнения профилей различных каталитических активностей между собой, а также с профилями оптической плотности АТ.

## Материалы и методы

### Реактивы и материалы.

В работе использовали реактивы фирм «Sigma» (США) и «Pharmacia» (Швеция). Устойчивая к ДНКазам (сшивая глутаровым альдегидом) ДНК-целлюлоза производства «НИКТИ БАВ» (Россия), пластины Kieselgel 60 – «Merck» (Германия). Растворители и соли были квалификации ос.ч., Россия.

### Выделение антител.

Электрофоретически и иммунологически гомогенные препараты IgG были получены с помощью последовательных аффинных хроматографий белков материнского молока на протеин G-сефарозе и высокоэффективной гель-фильтрации в условиях разрушения неспецифических комплексов согласно [12, 14-19].

### Хроматография IgG на аффинных сорбентах.

Липид-сорбент получен насыщением силикагеля экстрактом липидов и жиров (хлороформ-метанол) из жирной фракции молока. Препараты IgG, предварительно отдиализованные против 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, наносили на одну из аффинных колонок (8 мл ДНК-целлюлозы, 10 мл казеин-сефарозы, 7 мл АТР-сефарозы, 10 мл липид-сорбента), которые были уравновешены этим же буфером. Элюцию АТ проводили последовательным пропусканием через колонку 20 мМ Трис-НСl буфера, рН 7,5, содержащего 50, 150, и 3 М NaCl, а также 3 М MgCl<sub>2</sub>. В случае липид-сорбента АТ элюировали 150, и 1,2 М NaCl. Полученные фракции диализовали против 100-кратного избытка буфера 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, после чего оценивали их относительную активность в реакциях гидролиза ДНК, а также фосфорилирования липидов и казеина (см. ниже).

### Анализ ДНК-гидролизующей активности АТ.

ДНКазную активность АТ определяли по степени уменьшения ДНК в полосе суперскрученной ДНК плазмиды рBluescript при ее переходе в гидролизованные формы согласно [15-16]. Реакционную смесь (20 мкл), содержащую 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ЭДТА, 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 10 мкг/мл ДНК и 5-100 мкг/мл АТ, инкубировали 3-10 мин при 37°C. К реакционной смеси добавляли 5 мкл раствора, содержащего 0,1% красителя бромфенолового синего, 50% глицерин, 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5. Продукты реакции анализировали с помощью электро-

фореза в 0,8% агарозном геле (буфер для электрофореза: 40 мМ Трис-ацетат, рН 7,5, 1 мМ ЭДТА). После проведения электрофореза ДНК окрашивали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Для обработки результатов использовали программу Image Quant.

### Фосфорилирование липидов, связанных с АТ.

Реакционная смесь (10 мкл) содержала: 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,05-0,2 мг/мл АТ, и 1 мкМ [g-<sup>32</sup>p]АТР с удельной активностью 0,2 МБк/ммоль согласно [18]. Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч, реакцию останавливали добавлением равного объема 10 % ТХУ, липиды экстрагировали смесью хлороформ: метанол — 2:1 (по объему). Липидную фракцию упаривали в вакууме на ротонном испарителе и наносили на пластинки для ТСХ. Восходящую хроматографию липидов проводили при комнатной температуре в системе хлороформ: метанол: вода – 14:6:1 (по объему), на пластинках Kieselgel 60. Пластинки высушивали и подвергали радиоавтографии. Относительную активность фосфорилирования липидов определяли путем анализа радиоавтографов с помощью программы Image Quant.

### Фосфорилирование казеина.

Высокоочищенный казеин получали как описано ранее [17]. Реакционная смесь (20 мкл) содержала: 20 мМ трис-НСl, рН 6,8, 50 мМ NaCl, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,3 мМ ЭДТА, 0,54 мг/мл казеина, 1 мкМ [g-<sup>32</sup>p]АТР с удельной активностью 0,2 МБк/ммоль и 0,01-0,2 мг/мл АТ согласно [14]. Смесь инкубировали при 37°C в течение 1,5 ч. Фосфорилирование казеина анализировали с помощью SDS-электрофореза в 12 %-ном ПААГ с последующим радиоавтографированием гелей. Радиоавтографы анализировали с помощью программы Image Quant.

## Результаты и обсуждение

IgG-зависимое фосфорилирование казеина анализировали по относительному включению в него [<sup>32</sup>P]метки с последующим радиоавтографированием гелей согласно [13]. Инкубация IgG с g-[<sup>32</sup>P]АТР в отсутствие казеина приводит к фосфорилированию минорных липидов, прочно связанных с АТ [18]. Разрушение нековалентных комплексов АТ с липидами и экстракцию липидов проводили с помощью смеси метанол-хлороформ [18]. Относительный уровень фосфорилирования липидов анализировали с помощью ТСХ, как описано ранее [18].

ДНКазную активность IgG тестировали по уменьшению суперскрученной ДНК за счет ее перехода в гидролизованные формы (электрофорез в агарозном геле) согласно [10].

IgG антитела, обладающие казеин- и липидкиназной активностями, используют в качестве второго субстрата АТФ и, как было показано ранее [14], обладают сродством к АТФ-сефарозе. В то же время, белки, ферменты и АТ имеющие высокое сродство к ДНК, обычно не обладают высоким сродством к АТФ-сефарозе и, как следствие, должны элюироваться с этого сорбента при нанесении в 20-50 мМ буфере или низкими концентрациями NaCl (0,1-0,3 М) [20-24]. Чаще всего, белки, ферменты и АТ, взаимодействующие с АТФ или ДНК, не имеют высокого сродства к аффинным сорбентам с иммобилизованными липидами и если и могут взаимодействовать с такими сорбентами неспецифически, то эти взаимодействия очень слабые и разрушаются при концентрациях соли до 0,1-0,2 М [20-24].

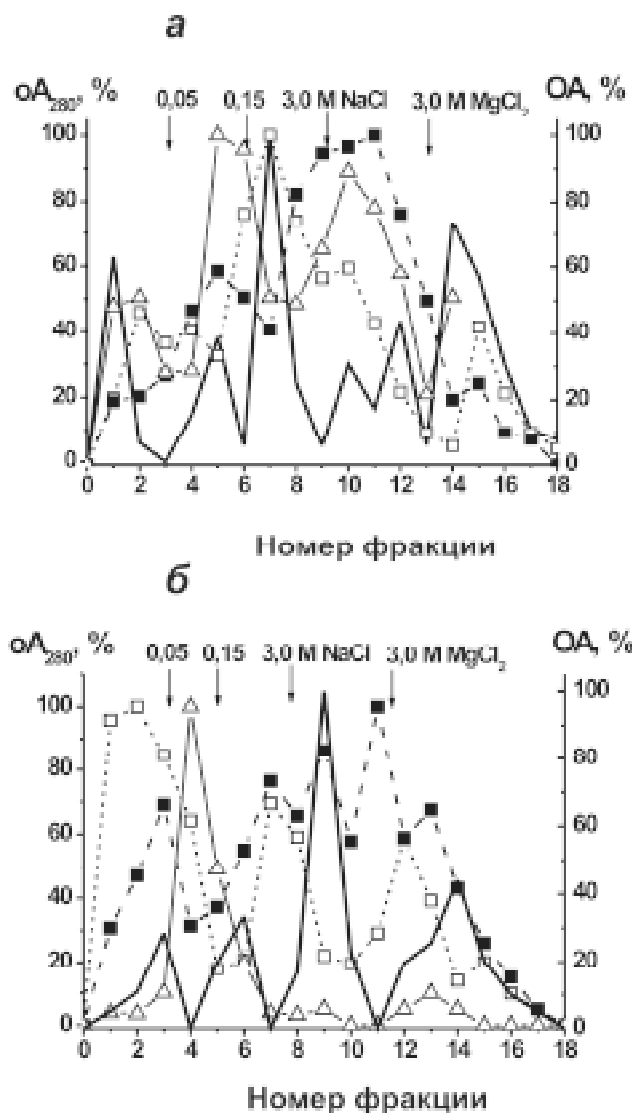
Учитывая это, одной из задач данного исследования было разделение абзимов на субфракции, обладающие сродством к разным лигандам: казеину, ДНК, АТФ и липидам. Сначала было проведено разделение по сродству к ДНК электрофоретически гомогенных препаратов IgG хроматографией на ДНК-целлюлозе. С этим сорбентом должны были эффективно взаимодействовать субфракции поликлональных ДНК-связывающих АТ, включая ДНК-гидролизующие IgG. Как было показано ранее, поликлональные IgG из крови людей и животных с АИЗ [25-27], IgG и sIgA из женского молока [6, 10], а также IgG из крови кроликов, иммунизированных ДНК или ферментами, гидролизующими ДНК и РНК [28-31], содержат очень большое число субфракций ДНК-гидролизующих АТ, отличающихся по сродству к ДНК. Некоторые из взаимодействующих с ДНК фракций при хроматографии на ДНК-целлюлозе элюируются при низких (0-50 мМ), а другие при повышенных (100-300 мМ) концентрациях соли. В то время как есть субфракции, которые элюируются только в условиях разрушения сильных комплексов антител с антигенами (3 М NaCl или 3 М MgCl<sub>2</sub>).

Как видно из рис. 1А, профили относительного оптического поглощения ( $oA_{280}$ ) для IgG препаратов от двух разных доноров молока заметно отличаются. При нанесении и элюции IgG1 (от первого донора) 50 и 150 мМ NaCl (в

условиях разрушения неспецифических и очень слабых специфических комплексов) с ДНК-целлюлозы элюируется разное количество IgG, но около 20-50 % АТ элюируется 3 М NaCl и 3 М MgCl<sub>2</sub>, которые разрушают и достаточно прочные специфические комплексы, включая комплексы антигенов с антителами. Подобно тому, что было показано ранее при анализе АТ с ДНКазной активностью [6-10, 19-25], ДНК-гидролизующая активность АТ распределилась по всему профилю хроматографии с максимальной активностью во фракциях, элюируемых 50 и 150 мМ NaCl (рис. 1). Но высокая активность была обнаружена также и во фракциях, элюируемых 3 М NaCl и 3 М MgCl<sub>2</sub>, особенно в случае первого донора (рис. 1).

Интересно, что казеинкиназная активность АТ также распределилась по всему профилю хроматографии (рис. 1). Очень неожиданным является то, что фракции элюируемые 3 М NaCl и 3 М MgCl<sub>2</sub>, характеризуются достаточно высокой относительной активностью в фосфорилировании казеина. Антитела с липидкиназной активностью также есть во всех фракциях, хотя наиболее активными являются фракции, элюируемые 3,0 М NaCl (рис. 1). Представлялось трудным объяснить высокое сродство к ДНК-целлюлозе некоторых фракций АТ, катализирующих фосфорилирование липидов и казеина.

Фракции, фосфорилирующие липиды и казеин, которые используют АТФ в качестве второго субстрата, могут иметь высокое сродство к АТФ-сефарозе, в то время как ДНК-гидролизующие АТ высокого сродства к этому сорбенту иметь не должны. Сначала хроматографии на АТФ-сефарозе (рис. 2) были подвергнуты фракции, с самым высоким сродством к ДНК целлюлозе (фракции 9-18, рис. 1). В основном IgG антитела элюировались с колонки при их элюции 50-150 мМ NaCl, но в целом оптическая плотность распределилась по всему профилю хроматографии (рис. 2). При этом, основной части антител соответствовала низкая активность, а основная активность АТФ-зависимых АТ с липид- и протеинкиназной активностями элюировались с АТФ-сефарозы 3 М NaCl и 3 М MgCl<sub>2</sub> в условиях разрушения сильных комплексов белков с лигандами. Но удивительным было то, что эти же 8-16 фракции (рис. 2) содержали АТ с максимальной ДНКазной активностью. Для двух препаратов IgG наблюдались в целом близкие картины распределе-

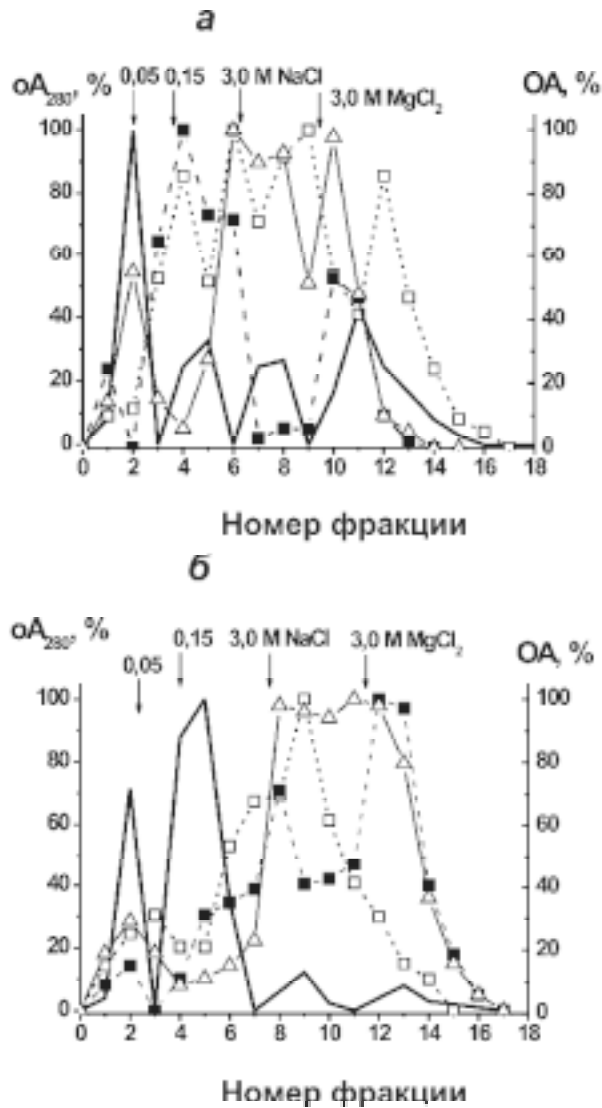


**Рис. 1.** Аффинная хроматография IgG-1 (а) и IgG-2 (б) из молока двух здоровых рожениц на ДНК-целлюлозе: (–) – относительное поглощение (%) белка при 280 нм ( $oA_{280}$ ); относительная активность (ОА, %) АТ в гидролизе ДНК ( $\Delta$ ), фосфорилировании казеина ( $\square$ ) и липидов ( $\blacksquare$ ). За 100 % каждого из анализируемых показателей принята его максимальная величина, соответствующая одной из фракций.

ния анализируемых активностей при хроматографии на АТР-сефарозе, хотя и наблюдались небольшие различия, включая заметную разницу в распределении липидкиназной активности по пикам белковой плотности.

При хроматографии IgG антител, соответствующих фракциям 1-7, которые обладали низким сродством к ДНК-целлюлозе (рис. 1), при хроматографии на АТР-сефарозе во фракциях, элюируемых 3 М NaCl и 3 М MgCl<sub>2</sub>, также были обнаружены АТ, проявля-

ющие высокую активность в фосфорилировании липидов, казеина и гидролизе ДНК. Картины распределения белковой плотности и трех анализируемых активностей были сходными с таковыми для IgG, имеющих повышенное сродство к ДНК (рис. 2). Это свидетельствовало о том, что при хроматографии на ДНК-целлюлозе происходит распределение АТ с протеин- и липидкиназной активностью, имеющих высокое сродство к АТР, по всему профилю хроматографии. Далее были

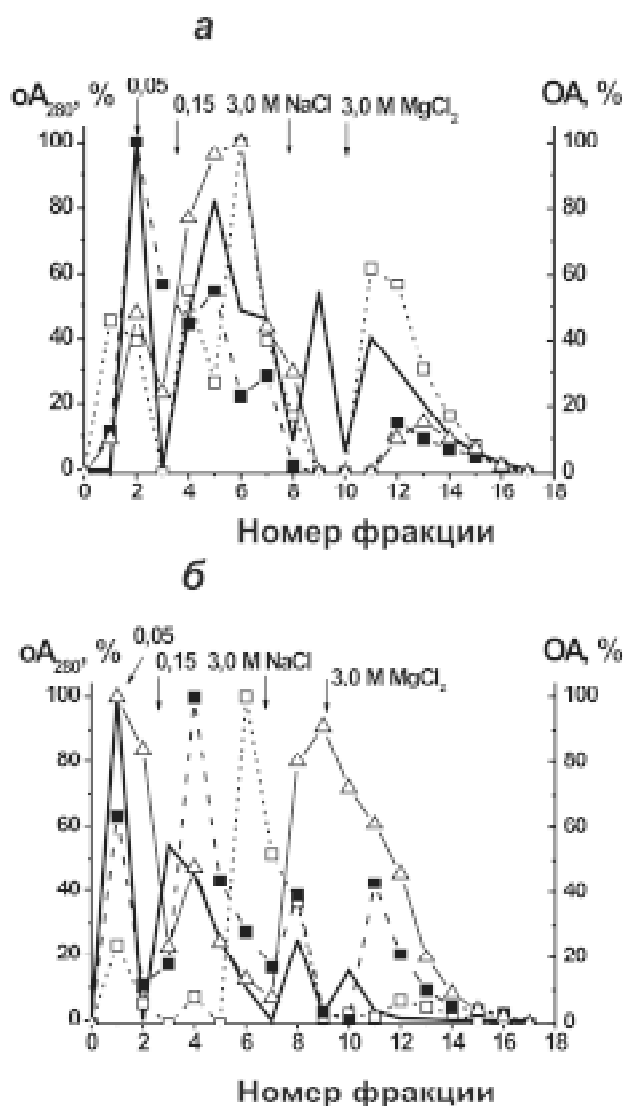


**Рис. 2. Аффинная хроматография IgG-1 (а) и IgG-2 (б) из молока двух рожениц на АТФ-сефарозе: (–) – относительное поглощение (%) белка при 280 нм ( $oA_{280}$ ); относительная активность (ОА) АТ в гидролизе ДНК ( $\Delta$ ), фосфорилировании казеина ( $\square$ ) и липидов ( $\square$ ). На колонку нанесены АТ, соответствующие фракциям 9-18 после хроматографии на ДНК-целлюлозе (рис. 1). За 100 % каждого из анализируемых показателей принята его максимальная величина, соответствующая одной из фракций.**

исследованы только фракции IgG с высоким сродством к различным сорбентам.

Фракции обогащенные АТ, имеющими повышенное сродство к АТФ (фракции 8-17, рис. 2), были нанесены на казеин-сефарозу, к которой высокое сродство должны были иметь только АТ, имеющие сродство к казеину, включая абзимы с казеинкиназной активностью. Как видно из рис. 3, основная часть АТ элюируется 50-150 мМ NaCl, профили белковой плотности при хроматографии

на казеин-сефарозе АТ, соответствующих фракциям 8-17 после хроматографии двух препаратов IgG на АТФ-сефарозе (рис. 2), в некоторой степени похожие. Тем не менее, заметная часть IgG снова элюировалась 3 М NaCl и 3 М MgCl<sub>2</sub> и эти фракции обладали ДНКазной, липид- и протеинкиназной активностями. Это свидетельствовало о том, что АТ, с этими тремя активностями имеют в своем составе какие-то специфические компоненты, обуславливающие с одной



**Рис. 3.** Аффинная хроматография IgA-1 (а) и IgG-2 (б) из молока двух рожениц на казеин-сефарозе: (–) – относительное поглощение (%) белка при 280 нм (oA<sub>280</sub>); относительная активность (OA, %) АТ в гидролизе ДНК (Δ), фосфорилировании казеина (□) и липидов (■). На колонку нанесены АТ, соответствующие фракциям 8-17 после хроматографии на АТР-сефарозе (рис. 2). За 100 % каждого из анализируемых показателей принята его максимальная величина, соответствующая одной из фракций.

стороны их высокое сродство к казеину, а с другой - каталитические центры, способные катализировать разные химические реакции (рис. 3).

Обнаруженное нами распределение всех трех активностей по всему профилю хроматографии и элюция IgG с ДНКазной, липид- и протеинкиназными активностями с любого из трех сорбентов (ДНК-целлюлозы, АТР- и казеин-сефарозы) в условиях разрушения сильных специфических фермент-субстрат

и антиген-антитело комплексов оказалось достаточно неожиданным. Эти данные невозможно было объяснить на основе классических представлений о структуре моноклональных IgG антител, в которые входят два одинаковых НL компонента, состоящих из легкой и тяжелой цепей.

Известно, что теоретически иммунная система человека может вырабатывать на один антиген вплоть до 10<sup>6</sup> вариантов различных АТ, которые могут иметь существенные раз-

личия в структуре их переменных участков легких и тяжелых цепей. Именно исключительность структурного разнообразия переменных участков легких и тяжелых цепей IgG может обеспечить исключительную гетерогенность АТ по сродству к каждому из иммобилизованных субстратов, наработку АТ без каталитической активности и возможность образования абзимов, отличающихся по относительным скоростям гидролиза субстратов. Однако наблюдаемая гетерогенность абзимов по сродству к каждому из использованных аффинных сорбентов по отдельности не может объяснить их высокоэффективное связывание с другими аффинными сорбентами, которые несут чужеродный иммобилизованный антиген (субстрат).

В настоящее время в литературе описан феномен полиреактивности или перекрестной активности антител [32-35]. Он заключается в том, что АТ к какому-либо антигену могут взаимодействовать не только с этим антигеном, но и с рядом других антигенов, которые обычно содержат в себе структурные элементы специфического антигена. Это выявляется при анализе моноклональных АТ методом иммуноферментного анализа или аффинной хроматографией на сорбентах, содержащих различные иммобилизованные лиганды: например, антитела против ДНК могут взаимодействовать с РНК, фосфолипидами, некоторыми ДНК-связывающими белками и ферментами [32-35]. Такие неспецифические взаимодействия обычно низкоэффективные и могут осуществляться разными путями. Так, известны белки, типа сывороточных альбуминов человека и животных, которые имеют определенного рода «универсальный» центр связывания, с которым с относительно низким сродством могут взаимодействовать лиганды различной природы: нуклеотиды, олигонуклеотиды, гормоны, пептиды, олигосахариды и т.д. Такие взаимодействия сывороточных альбуминов с его лигандами разрушаются при относительно низких (< 50-100 мМ NaCl) концентрациях соли. Полиреактивность моноклональных АТ к какому-либо лиганду, например ДНК, объясняют на основе представлений о повышенной пластичности (гибкости) антигенсвязывающего участка, который в зависимости от лиганда может изменять свою конформацию [35]. Однако вы-

сокое сродство ферментов к ДНК, РНК, полисахаридам и т.д. достигается в результате образования большого числа неспецифических аддитивных контактов, обеспечивающих от 5 до 8 порядков сродства, а сродство к одному звену не может быть высоким; сродство ДНК-, РНК-, полисахаридсвязывающих ферментов и белков к мономерам, типа АТР, обычно не превышает 1-3 порядков ( $K_d = 10^{-1}-10^{-3}$  М) [21-24]. Близкая ситуация наблюдается и для моноклональных АТ против какого-либо антигена, которые проявляют полиспецифичность; сродство к антигену, например ДНК, существенно выше, чем к другим лигандам, с которыми могут взаимодействовать АТ, например, к фосфолипидам. Таким образом, очень высокое сродство АТ, обладающих всеми тремя активностями ко всем трем иммобилизованным лигандам не возможно объяснить ни неспецифической адсорбцией этих АТ, как в случае сывороточных альбуминов, ни конформационной пластичностью антигенсвязывающих участков АТ.

В данной работе впервые обнаружена энзиматическая полиреактивность IgG антител. Однако ни низкое, ни высокое сродство лиганда к ферменту не может обеспечить протекания химической реакции в случае неспецифического лиганда. Основой специфичности действия ферментов является не стадия комплексообразования фермента с близкими по структуре, длине и числу контактов субстратам, а следующая за ней стадия взаимной адаптации структуры субстрата и фермента, на которой происходит подгонка орбиталей взаимодействующих атомов со стороны фермента и субстрата с точностью до 10-15° [21-24]. Такая точная подгонка возможна только в случае специфического субстрата и ее реализация ведет к возрастанию скорости реакции для специфического по сравнению с родственным или неспецифическим субстратом на 5-8 порядков. В связи с этим обычно ферменты не способны катализировать две или более различных химических реакций, за исключением небольшого числа редких энзимов, в которых совмещены два активных центра для катализа двух последовательно протекающих реакций или ферменты имеют два активных центра, предназначенных для катализа разных реакций [21-24].



Распределение трех активностей по всему профилю хроматографии на ДНК-целлюлозе, АТР- и казеин-сефарозах и высокое сродство АТ со всеми активностями ко всем этим сорбентам свидетельствует о том, что одни и те же молекулы АТ могут катализировать несколько различных химических реакций. Полученные данные можно объяснить, если предположить, что в IgG, состоящие из двух НL димеров, могут содержать НL фрагменты, которые отличаются по структуре и каталитическим функциям. Одним из путей образования полиреактивных IgG в случае поликлональных абзимов может быть обмен легкими и тяжелыми цепями или НL фрагментами между двумя (НL)<sub>2</sub> молекулами IgG димеров с двумя различными активностями. Такой путь образования полиреактивных молекул, которые могут связываться с двумя различными антигенами, в настоящее время уже открыт для антител, относящихся к четвертому подклассу антител класса G (IgG4) [36]. В то же время возможность этого пути химеризации молекул АТ нельзя исключить и для IgG других классов и подклассов АТ. Возможность существования такого пути образования полиреактивных абзимов и существование таких химерных абзимов хорошо согласуется с данными по хроматографии IgG антител из материнского молока на разных аффинных сорбентах.

В молоке человека присутствуют IgG антитела не только к ДНК, АТР, казеину но и к другим самым разным антигенам. Если рассмотренный механизм формирования полиреактивных IgG антител существует, то в состав димеров могут попадать изолированные легкие и тяжелые цепи, или НL-фрагменты против самых разных антигенов как без, так и с каталитической функцией. В таком случае заметное количество полиреактивных IgG антител может иметь высокое сродство к самым разным антигенам.

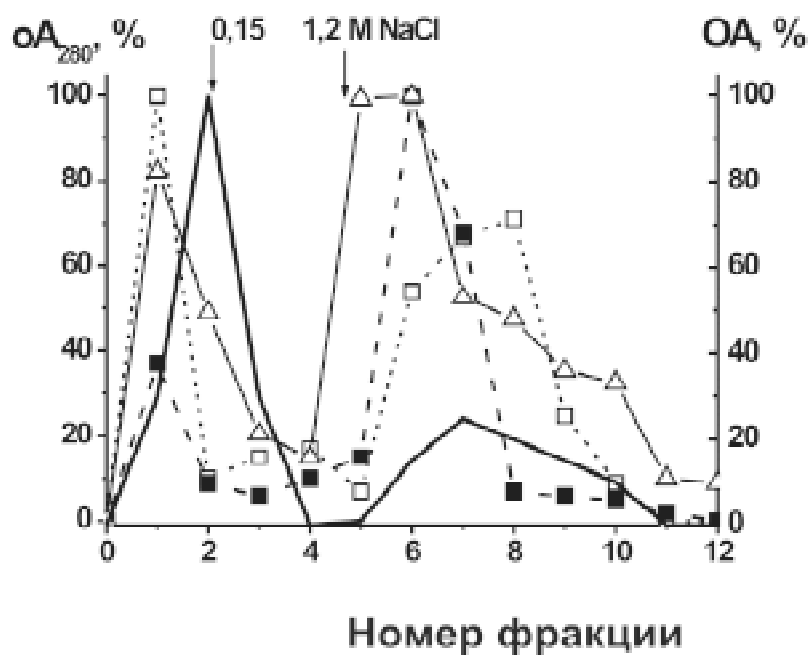
Известно, что молоко содержит большое количество самых разных гидрофобных липидов и жиров, которые по своей природе отличаются от заряженных молекул ДНК, АТР и белков и на которые вырабатываются АТ. Учитывая это, мы получили липид-адсорбент насыщением силикагеля фракцией липидов и жиров, полученной экстракцией молочного жира с помощью

смеси хлороформ-метанол. Двойная последовательная экстракция одной и той же жировой фракции молока этой смесью исключала попадание в нее заряженных ДНК, РНК, АТР и белков. При хроматографии на таком сорбенте высокое сродство к нему должны были иметь только АТ против самых разных липидов и жиров, а остальные элюироваться при нанесении. Интересно, что при хроматографии на липид-сорбенте фракции IgG, обогащенной после хроматографии на казеин-сефарозе АТ с высоким сродством к ДНК, АТР и казеину (фракции 7-16, рис. 3) опять произошло высокоэффективное связывание некоторой части белковой плотности АТ; как фракции, элюированные с липид-сорбента при нанесении, так и при большой концентрации NaCl обладали высокой активностью во всех трех реакциях (рис. 4).

Одним из путей обмена легкими цепями и НL фрагментами между молекулами IgG может быть дисульфидный обмен, который обнаружен при хранении АТ *in vitro* [37]. Известно, что в ряде случаев химические реакции катализируют как изолированные легкие, так и тяжелые цепи IgG [13-14, 38]. В связи с этим нельзя исключить, что даже молекулы IgG, в которые будет в результате обмена включена хотя бы одна из легких или тяжелых цепей абзимов может стать каталитически активными.

Как показано в работе [36], исключительно эффективный обмен НL фрагментами в крови мышей в случае IgG4 стимулируется протеин-дисульфид-изомеразой и/или FcRn (Fc рецептором, структурно сходным с главным комплексом гистосовместимости класса I во время перехода IgG4 через эндотелиальные клетки. Не исключено, что молочная железа и материнское молоко могут содержать дополнительные компоненты, ферменты или факторы, восстанавливающие дисульфидные связи между НL фрагментами IgG и, как следствие, стимулирующие дисульфидный обмен. Известно, что при прохождении гемато-молочного обмена IgA превращаются в sIgA. Возможно, что обмен НL фрагментами или отдельными цепями может происходить и при прохождении гемато-молочного обмена.

Таким образом, в данной работе впервые обнаружен феномен каталитической



**Рис. 4.** Аффинная хроматография IgG (смесь препаратов из молока двух рожениц) на липид-сорбенте: (—) — относительное поглощение (%) белка при 280 нм ( $oA_{280}$ ); относительная активность (OA, %) АТ в гидролизе ДНК ( $\Delta$ ), фосфорилировании казеина ( $\square$ ) и липидов ( $\square$ ). На колонку нанесены АТ, соответствующие фракциям 7-16 после хроматографии на казеин-сефарозе (рис. 3). За 100 % каждого из анализируемых показателей принята его максимальная величина, соответствующая одной из фракций.

полиреактивности IgG абзимов. Кроме того, полученные данные указывают в пользу того, что в крови и/или молочной железе, молоке здоровых женщин может происходить обмен ЛН фрагментами или отдельными цепями между двумя  $(LH)_2$  молекулами самых разных IgG антител.

Выполнение работы поддержано грантами Программ фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (№ 10.5) и «Фундаментальные науки – медицине» (№ 11.9), а так же РФФИ (07-04-00387), РФФИ-БФФИ (04-04-81017) и Интеграционным грантом Президиума СО РАН.

## Литература

1. Catalytic antibodies. (E. Keinan Eds) Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KgaA, Germany, 2005, pp.1-586.
2. Невинский Г.А., Канышкова Т.Г., Бунева В.Н. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии. Биохимия, 2000, 65: 1473-1487.
3. Nevinsky G.A., Favorova O.O., Buneva V.N. In: Protein-protein interactions. A molecular cloning manual (Golemis, E., ed.), Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, 2002, pp. 523-534.
4. Nevinsky G.A. Buneva V.N. Catalytic antibodies in healthy humans and patients with autoimmune and viral pathologies. J. Cell Mol. Med. 2003; 7: 265-276.
5. Nevinsky G.A., Buneva V.N. Human catalytic RNA- and DNA-hydrolyzing antibodies. J. Immunol. Methods 2002; 269: 235-249.
6. Nevinsky G.A., Buneva V.N. Natural catalytic antibodies - abzymes. In: Catalytic antibodies (E. Keinan, Eds). VCH-Wiley press, Germany, 2005, pp. 503-567.
7. Paul S., Volle D.J., Beach C.M., Johnson D.R., Powell M.J., Massey R.J. Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody. Science 1989; 244: 1158-1162.
8. Kalaga R., Li L., O'Dell J. R., Paul S. Unexpected presence of polyreactive catalytic antibodies in IgG from unimmunized donors and decreased levels in rheumatoid arthritis. J. Immunol. 1995; 155: 2695-2702.
9. Savel'ev A.N., Kanyshkova T.G., Kulminskaya A.A., Buneva V.N., Eneyskaya E.V., Filatov M.V., Nevinsky G.A., Neustroev K.N. Amylolytic activity of IgG and sIgA immunoglobulins from human milk. Clin. Chim. Acta 2001; 314: 141-152.

10. Nevinsky G.A., Kanyshkova T.G., Semenov D.V., Vlassov A.V., Gal'vita A.V., Buneva V.N. Secretory immunoglobulin A from healthy human mothers' milk catalyzes nucleic acid hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000; 83: 115–129.
11. Semenov D.V., Kanyshkova T.G., Karataeva N.A., Krasnorutskii M.A., Kuznetsova I.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Catalytic nucleotide-hydrolyzing antibodies in milk serum of clinically healthy human mothers. *Med. Sci. Monit.* 2004; 10: BR23–BR33.
12. Бунева В.Н., Кудрявцева А.Н., Гальвита А.В., Дубровская В.В., Хохлова О.В., Калинина И.А., Галенок В.А., Невинский Г.А. Динамика уровня нуклеазной активности антител крови женщины во время беременности и лактации. *Биохимия.* 2003; 68: 1088–1100.
13. Andryushkova A.S., Kuznetsova I.A., Buneva V.N., Toporkova L.B., Sakhno L.V., Tichonova M.A., Chernykh E.R., Orlovskaya I.A., Nevinsky G.A. Formation of different abzymes in autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice is associated with changes in colony formation of haematopoietic progenitors. *J. Cell. Mol. Med.* 2007; 11: 531–551.
14. Nevinsky G.A., Kit Y.Ya., Semenov D.V., Khlimankov D., Buneva V.N. Secretory immunoglobulin A from human milk catalyzes milk protein phosphorylation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998; 75: 77–91.
15. Kanyshkova T.G., Semenov D.V., Khlimankov D., Buneva V.N., Nevinsky G.A. DNA-hydrolyzing activity of the light chain of IgG antibodies from milk of healthy human mothers. *FEBS Lett.* 1997; 416: 23–26.
16. Канышкова Т.Г., Семенов Д. В., Власов А.В., Хлиманков Д.Ю., Барановский А.Г., Шипицын М.В., Ямковой В.И., Бунева В.Н., Невинский Г.А. ДНК- и РНК-гидролизующие антитела из молока человека и их возможная биологическая роль. *Молекулярн. биология* 1997; 31: 1086–1096.
17. Odintsova E.S., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Casein-hydrolyzing activity of sIgA antibodies from human milk. *J. Mol. Recognit.* 2005; 18: 413–421.
18. Gorbunov D.V., Karataeva, N.A. Buneva V.N., Nevinsky G.A. Lipid kinase activity of antibodies from milk of clinically healthy human mothers. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1735: 153–166.
19. Karataeva N.A., Gorbunov D.A., Prokudin I.V., Buneva V.N., Kulminskaya A.A., Neustroev K.N., Nevinsky G.A. Human milk antibodies with polysaccharide kinase activity. *Immunol. Lett.* 2006; 103: 58–67.
20. Туркова Я. Аффинная хроматография. Мир, Москва 1980: 1–471.
21. Невинский Г.А. Важная роль слабых взаимодействий при узнавании ферментами протяженных молекул ДНК и РНК. *Молекуляр. биол.* 1995; 29: 16–37.
22. Бугреев Д.В., Невинский Г.А. Возможности метода постадийного усложнения лиганда в исследовании белково-нуклеиновых взаимодействий: механизмы функционирования некоторых ферментов репликации, репарации, топоизомеризации и рестрикции. *Биохимия* 1999; 64: 291–305.
23. Nevinsky G.A. Structural, thermodynamic, and kinetic basis of DNA- and RNA-dependent enzymes functioning. Important role of weak nonspecific additive interactions between enzymes and long nucleic acids for their recognition and transformation. In: *Protein Structures. Kaleidoscope of Structural Properties and Functions* (Uversky V.N. Ed.) Research Signpost 2003: 133–222.
24. Невинский Г.А. Роль слабых специфических и неспецифических взаимодействий в узнавании и превращении ферментами протяженных ДНК. *Молекуляр. ,иол.* 2004; 38: 756–785.
25. Andrievskaya O.A., Buneva V.N., Naumov V.A., Nevinsky G.A. Catalytic heterogeneity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgM from sera of patients with lupus erythematosus. *Med. Sci. Monit.* 2000; 6: 460–470.
26. Andrievskaya O.A., Buneva V.N., Baranovskii A.G., Gal'vita A.V., Benzo E.S., Naumov V.A., Nevinsky G.A. Catalytic diversity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgG antibodies from the sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol. Lett.* 2002; 81: 191–198.
27. Kuznetsova I. A., Orlovskaya I.A., Buneva V.N., Nevinsky G. A. Activation of DNA-hydrolyzing antibodies from the sera of autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice by different metal ions. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1774: 884 – 896.
28. Краснорутский М.А., Бунева В.Н., Невинский Г.А. Антитела против ДНК гидролизуют ДНК и РНК. *Биохимия.* 2008; 11: 1547–1560.
29. Krasnorutskii M.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Antibodies against pancreatic ribonuclease A hydrolyze RNA and DNA. *Int. immunol.* 2008; 20: 1031–1040.
30. Krasnorutskii M.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Immunization of rabbits with DNase I produces polyclonal antibodies with DNase and RNase activities. *J. Mol. Recognit.* 2008; 21: 233–242.
31. Krasnorutskii M.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Immunization of rabbits with RNA produces polyclonal antibodies with DNase and RNase activities. *J. Mol. Recognit.* 2008; 21: 338–347.
32. Berneman A., Cuilbert B., Enschrich S., Avrameas S. IgG auto- and polyreactivities of normal human sera. *Mol. Immunol.* 1993; 30: 1499 - 1510.
33. Coutinho A., Kazatchkine M. D, Avrameas S. Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 1995; 7: 812 - 818.
34. Raz E., Ben-Bassat H., Davidi T., Shlomoz Z., Eilat D. Cross-reactions of anti-DNA autoantibodies with cell surface proteins. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 383 - 390.
35. Notkins A.L. Polyreactivity of antibody molecules. *Trends in Immunology* 2004; 25: 174–179.
36. Van der Neut Kolfshoten M., Schuurman J., Losen M., Bleeker W.K., Martinez Martinez P., Vermeulen E., den Bleker T.H., Wiegman L., Vink T., Aarder L.A., De Baets M.H., van de Winkel J.G., Aalberese R.C., Parren P.W. Antibodies by dynamic Fab arm exchange anti-inflammatory activity of human IgG4. *Science* 2007; 317: 1554–1557.
37. Гальвита А.В., Барановский А.Г., Кузнецова И.А., Виншу Н.В., Галенок В.А., Бунева В.Н., Невинский Г.А. Особенности гидролиза ДНК антителами из крови пациентов с сахарным диабетом. *Российский иммунологический журнал.* 2007; 1: 116–131.
38. Paul S. Mechanism and functional role of antibody catalysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998; 75: 13–23