

УДК 577.27

ИССЛЕДОВАНИЕ ДНК-ГИДРОЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ К ДНК

Т.А. Невзорова, В.Г. Винтер

Аннотация

Из сыворотки крови больных системной красной волчанкой (СКВ) получено четыре субфракции антител к нативной ДНК класса IgG, различающихся по сорбции на ДЭАЭ-целлюлозе и проявляющих различное сродство к аффинному сорбенту – нативной ДНК-целлюлозе. Показано, что ДНК-гидролизующие антитела к нативной ДНК являются металлозависимыми эндонуклеазами, вносят в ДНК преимущественно одноцепочечные разрывы и проявляют активность в широком диапазоне значений pH. Установлено, что гидроксил-радикал при СКВ не влияет или ингибирует термостабильную ДНК-гидролизующую активность антител к нативной ДНК в отличие от термолабильной ДНКазной активности сывороточных нуклеаз, которая активируется под действием гидроксил-радикала. Для ДНК-гидролизующей активности антител к нативной ДНК характерен непротессивный механизм действия.

Введение

В исследованиях последнего двадцатилетия открыта новая функция антител (АТ) – способность катализировать различные биохимические реакции, т. е. выступать в роли биологических катализаторов [1–3]. По аналогии с ферментами такие АТ были названы абзимы (от англ. *antibody enzyme*) или каталитические АТ. Согласно сложившимся представлениям, наличие в крови абзимов является четким признаком протекания в организме аутоиммунных процессов.

Системная красная волчанка (СКВ) – одно из наиболее тяжелых аутоиммунных воспалительных заболеваний соединительной ткани неясной этиологии. По данным 2002 г. в мире 1 человек из 2000 страдает СКВ. Начало заболевания приурочено к возрасту от 10–15 до 40–50 лет и до 90% всех больных волчанкой страдают женщины. СКВ часто прогрессирует с поражением ряда органов, что и является причиной смерти в течение 10 лет с момента установления диагноза у 28% больных. Повышенная настороженность в отношении слабовыраженных форм СКВ привела во всем мире к увеличению числа сообщений об этом заболевании [4].

Характерным признаком СКВ является высокий уровень содержания в сыворотках крови больных по сравнению с нормой АТ к нативной ДНК (нДНК) класса IgG, определение титра которых имеет важное прогностическое и диагностическое значение. Среди этих АТ к нДНК были обнаружены АТ, которые обладают ДНК-гидролизующей активностью [5].

Изучению как ДНК-связывающих, так и ДНК-гидролизующих АТ посвящено большое количество работ. Многими исследователями признается тот

факт, что именно IgG к нДНК ответственны за развитие заболевания, тогда как относительно роли ДНК-гидролизующих АТ к ДНК однозначного ответа нет. Механизмы реализации патологических свойств абзимов к ДНК и их клиническое значение пока остаются невыясненными. До сих пор среди исследователей нет единого мнения о происхождении, свойствах, структуре, механизмах действия, биологической роли АТ к нДНК при СКВ, в том числе обладающих нуклеазной активностью. Все полученные данные (иммунохимические, ферментативные свойства АТ) говорят в пользу того, что популяция IgG-АТ к нДНК гетерогенна, однако о составе этих фракций среди авторов также нет общего мнения.

Целью настоящей работы явилось изучение ДНК-гидролизующей активности антител к нативной ДНК у больных системной красной волчанкой.

1. Материалы и методы

В работе использовали орто-фенилендиамин, агарозу NA ("Pharmacia", Sweden); ДНК из эритроцитов цыплят ("Reanal", Hungari); твин-20 ("Merch", BRD); конъюгированные с пероксидазой хрена диагностические антитела против IgG человека (конъюгат) ("Вектор-Best", Новосибирск); этидий бромид (Koch-Light, England). Остальные реагенты были квалификации ос. ч.

Сыворотки крови 7-и первично выявленных больных СКВ, находящихся в острой фазе с различной степенью тяжести заболевания и на момент забора крови не получавших лечения преднизолоном (5 женщин в возрасте от 17 до 52 лет и 2 мужчин – 48 и 62 года), были получены из стационаров г. Казани. В качестве контроля использовали сыворотки крови клинически здоровых по медицинским показаниям доноров.

ДНК плазмиды pBR-322 была выделена из клеток *E. coli* HB-101 и очищена методом щелочной экстракции с последующей гель-фильтрацией на сефарозе 4В. Качество плазмидной ДНК на каждой стадии выделения и очистки оценивали спектрофотометрически и электрофоретически [6, 7].

Выделение из сыворотки крови субфракций АТ к нДНК класса IgG проводили по ранее разработанной методике [8]. Все стадии очистки АТ проводили при +4°C в холодильной камере MiniColdLab (LKB, Sweden) с использованием стерильных буферных растворов, приготовленных на деионизованной воде. Все собранные субфракции АТ концентрировали струей воздуха, диализовали против 10 мМ трис-НСl-буфера, рН 7.5, в течение 48 ч при +4°C с периодической сменой буфера и спектрофотометрически рассчитывали концентрацию белка.

ДНК-гидролизующую активность АТ к ДНК оценивали по превращению суперскрученной ДНК плазмиды pBR-322 в кольцевую и линейную формы.

Зависимость ДНК-гидролизующей активности АТ от состава инкубационной среды изучали, варьируя рН реакционной смеси (от 5.0 до 9.8) и концентрации различных ионов двухвалентных металлов.

Гидролиз плазмидной ДНК pBR-322 антителами к ДНК сывороток крови здоровых и больных СКВ людей, после обессоливания, ионообменной и аффинных хроматографий осуществляли в реакционной смеси, содержащей 25 мМ трис-НСl-буфера, рН 7.5, 5 мМ MgCl₂ (или 25 мМ трис-НСl-буфера, рН

7.5, 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 0.5 мМ ЭДТА) 20–75 мкг/мл плазмидной ДНК pBR-322 (содержащей 60–80% суперскрученной формы ДНК). Реакцию начинали добавлением АТ (в различных вариантах): а) до конечной концентрации белка 0.01–0.5 мг/мл, прогретого при +57°C в течение 45 мин. или не подвергнувшегося такому воздействию; б) 0.04–0.1 мг/мл АТ к нДНК; в) двухэтапным внесением АТ к нДНК через определенные временные интервалы, и г) одновременным внесением IgG-АТ к нДНК с конечными концентрациями в смеси 0.08–0.15 мг/мл.

Во время инкубации при +37°C из реакционных смесей отбирали аликвоты по 10 мкл через фиксированные временные интервалы в течение 1–24 ч, которые моментально замораживали для предотвращения дальнейшего гидролиза.

Значения величин кинетических параметров реакции гидролиза плазмидной ДНК pBR-322 антителами к ДНК (V_{max} , K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M) определяли графическими методами [9, 10] с использованием программы Prism 4. Начальные скорости гидролиза ДНК определяли методом электрофореза в агарозном геле. Для оценки приблизительной максимальной концентрации абзимов к ДНК в общем пуле препаратов субфракций АТ к нДНК использовали кинетические методы, предложенные К. Brocklehurst и др. [11, 12].

Оценку влияния активных форм кислорода (АФК) на ДНК-гидролизующую активность АТ к ДНК проводили в реакционной смеси, содержащей: 25 мМ трис-HCl-буфер, рН 7.5, 5 мМ MgCl₂, 20 мкг/мл плазмидной ДНК pBR-322. Реакцию начинали добавлением АФК (7.0 мкМ H₂O₂, 0.4 мкМ аскорбата, 1.25 мкМ Fe(II), 2.5 мкМ ЭДТА), 0.1 мг/мл препаратов АТ к нДНК. Во время инкубации при +37°C из реакционных смесей отбирали аликвоты по 10 мкл в определенные временные интервалы в течение 1–20 ч и добавляли перехватчик электронов – K₃Fe(CN)₆ – до концентрации 0.5 мМ. Влияние АФК на взаимодействие АТ с ДНК исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА), где в качестве антигенов использовали: нДНК из эритроцитов цыплят, дДНК, полученную методом тепловой денатурации, и нДНК, модифицированную АФК (АФК-ДНК) [13, 14]. Препараты АТ вносили в лунки планшета с адсорбированными ДНК и в одном из вариантов к нДНК одновременно с АТ вносили АФК. Планшет интенсивно встряхивали на качалке в течение 1–2 мин. и далее реакцию ИФА проводили по схеме в модификации, предложенной Л.И. Саттаровой и др. [15].

Оценку результатов гидролиза плазмидной ДНК pBR-322 осуществляли методами: электрофореза в 0.7%-ном агарозном геле с окрашиванием ДНК этидий бромидом и получением денситограмм, используя программу Scion Image 4.0.2 (beta).

2. Результаты и обсуждение

Выделение и очистку АТ к нДНК класса IgG из сывороток крови проводили согласно схеме, представленной на рис. 1.

Все полученные препараты субфракций АТ к нДНК обладали термостабильной ДНК-гидролизующей активностью. Таким образом, оптимизированный нами метод выделения АТ к нДНК класса IgG из сыворотки крови больных с дебютом СКВ позволил получить препараты четырех субфракций IgG к

нДНК, проявляющих сродство к аффинному сорбенту нДНК-целлюлозе, обладающих ДНК-гидролизующей активностью, гетерогенных по заряду и различающихся по сорбции на ДЭАЭ-целлюлозе.

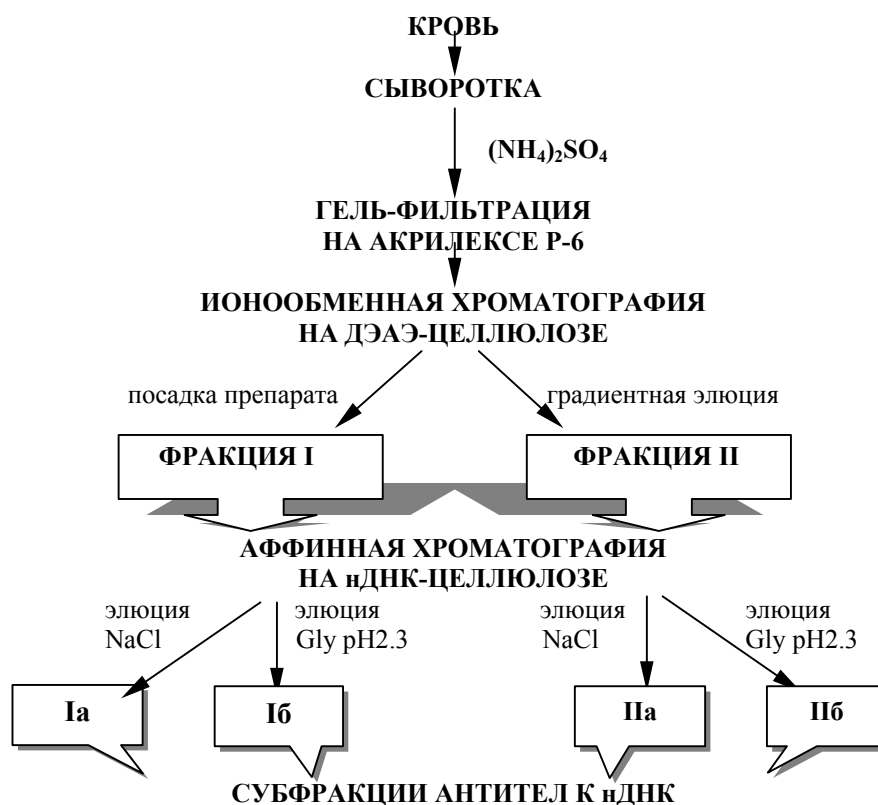


Рис. 1. Схема выделения и очистки АТ к нДНК из сыворотки крови

Несмотря на достаточно жесткие условия выделения АТ к нДНК, мы учитывали потенциальную возможность совыделения незначительных количеств ферментов с исследуемыми АТ, поэтому все последующие исследования проводили после преинкубации АТ при $+57^{\circ}\text{C}$ в течение 45 мин. Наше внимание привлек тот факт, что некоторыми авторами было обнаружено снижение активности ДНКазы I в сыворотке крови больных СКВ [16, 17]. С другой стороны, ДНКазная активность полученных препаратов IgG-АТ к нДНК сохранялась после всех стадий очистки. Если принять во внимание эти факты, то можно предположить, что полученные препараты АТ к нДНК свободны от сывороточных нуклеаз, и ДНКазная активность АТ полностью определяется их собственной гидролитической функцией.

При изучении ДНКазной активности полученных субфракций АТ к нДНК класса IgG (влияние состава реакционной среды и условий инкубации) были выявлены некоторые отличия между АТ и от свойств сывороточных ДНКаз, описанных в литературе. Известно, что ДНКазы проявляют активность при pH 7.3–7.6 для ДНКазы I, а ДНКазы крови II – 5.2 [18]; ионы металлов по активи-

рующему влиянию на активность ДНКазы I можно расположить в следующий ряд: $Mn^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+}$ [19, 20].

АТ к нДНК полученных субфракций проявляли активность в широком диапазоне значений pH, т. е. ДНК-гидролизующая активность АТ не зависит от pH инкубационной среды. Тем не менее, для АТ к нДНК субфракции Ib можно отметить увеличение ДНКазной активности при pH около 6.6 и 7.4, а для АТ из фракции II – при pH около 7.4 с незначительными максимумами активности в низкой и высокой области спектра pH. Полученные данные могут указывать на то, что субфракции АТ к нДНК, в свою очередь, гетерогенны, и отличия могут быть связаны со строением антигенсвязывающего центра АТ, а также ДНК-гидролизующие АТ к нДНК не только термостабильны, но и устойчивы к неспецифической денатурации при воздействии pH.

Все исследованные ионы металлов ускоряли АТ-зависимое расщепление ДНК, но в разной степени. Установлено, что ионы Mg^{2+} (и меньше Mn^{2+}) активируют гидролиз плазмидной ДНК рBR-322 антителами, полученными из фракций I и II в концентрации 5 и 10 мМ соответственно. Однако увеличение концентрации ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} до 10 мМ ингибирует активность АТ субфракции Ib. Ионы Zn^{2+} и Ca^{2+} слабо активируют гидролиз ДНК антителами. Увеличение концентрации Ca^{2+} приводит к ингибированию реакции, катализируемой антителами из фракции I, однако ускоряют гидролиз ДНК антителами подфракции Ia аналогично ионам Mn^{2+} . Возможно, что в ДНКазной активности АТ имеет место нуклеофильная атака гидроксил-ионом, активируемым ионами Mg^{2+} . Однако максимальную активность в реакции гидролиза суперскрученной ДНК проявляли АТ к нДНК всех субфракций в присутствии ионов Co^{2+} . Аналогичных результатов в литературе не описано, что, возможно, связано с отсутствием подобных исследований. Обнаруженный эффект косвенно указывает на то, что в ДНКазной активности АТ класса IgG также может иметь место нуклеофильная атака гидроксил-ионом, только активируемым ионами Co^{2+} .

В литературе накапливаются данные о повышенном содержании в различных органах и тканях у больных СКВ АФК, которые так же, как и АТ к нДНК, могут принимать участие в развитии патологического процесса [21–23]. Поэтому мы провели оценку влияния АФК на активность АТ к нДНК и ДНКаз сывороток крови больных СКВ.

При исследовании влияния АФК (гидроксил-радикала, что было установлено экспериментально) на ДНКазную активность сывороток крови больных СКВ без температурной преинкубации было установлено, что АФК активируют расщепление суперскрученной ДНК сывороточными ДНКазами. Однако, в зависимости от пациента, АФК или ингибировали, так как содержание суперскрученной ДНК было больше по сравнению с вариантом гидролиза ДНК антителами без АФК, или не влияли на активность АТ, так как отличий от результатов ДНКазной активности АТ без добавления АФК не наблюдалось.

Из литературы известно, что в сыворотке крови больных СКВ снижена активность ДНКазы I, поэтому можно предположить, что АФК-зависимое повышение активности ДНКаз может выступать как компенсаторный механизм низкой активности сывороточных ДНКаз. ДНКазы в организме выполняют ряд функций, в том числе инициации апоптоза, поэтому наблюдаемый эффект

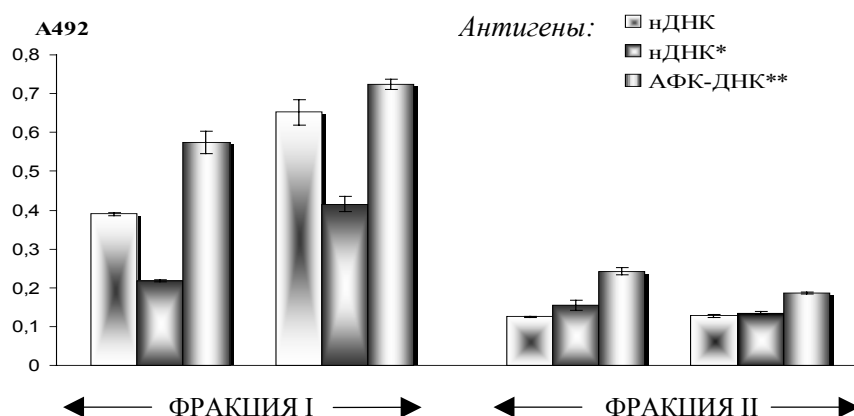


Рис. 2. Зависимость уровня ответа реакции ИФА фракций IgG, полученных из двух сывороток СКВ после ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, от АФК.

*нДНК – модифицированная АФК. **АФК вносили одновременно с АТ.

влияния АФК может способствовать появлению большого количества апоптотических клеток. Так, показано, что у больных СКВ скорость апоптоза лимфоцитов, нейтрофилов, эндотелиальных клеток выше, чем у здоровых людей, и коррелирует с активностью заболевания и уровнем АТ к нДНК [24, 25]. Локализованные на мембране апоптотических клеток нуклеосомы могут выступать в качестве аутоантигена, приводящего к гиперпродукции АТ к ДНК, которые могут обладать нуклеазной активностью.

Особое внимание обращает на себя обнаруженный нами факт, что гидроксил-радикал ингибировал как связывание с нДНК в реакции ИФА (рис. 2), так и ее гидролиз антителами к нДНК из фракции I (АТ с основными свойствами) (рис. 3). Обнаружено, что при увеличении времени инкубации суперскрученной ДНК рBR-322 с АТ субфракции Ia более 6 ч наблюдается уменьшение гидролиза суперскрученной формы ДНК приблизительно на 5%, по сравнению с вариантом, где АФК не были добавлены. При инкубации ДНК с АТ субфракции Ib уже через 3 ч заметно уменьшение активности АТ к нДНК и к окончанию инкубации (15 ч) разница в количестве кольцевой ДНК между вариантами с добавлением АФК и без составила приблизительно 10.5%. В отличие от АТ из фракции I, АФК не влияли на катализ и взаимодействие АТ с нДНК из фракции II (АТ с кислыми свойствами), и в некоторых случаях в реакции ИФА даже отмечалось незначительное увеличение взаимодействия АТ с нДНК. Однако остается неясным механизм влияния АФК на взаимодействие и гидролиз ДНК антителами, так как подобных исследований в мире не проводилось. Выявленные нами эффекты, возможно, обусловлены тем, что АФК являются регуляторами активности антител, модифицируя белковую молекулу, или непосредственно вмешиваются во взаимодействие АТ с ДНК, но не влияют на молекулу ДНК. Такое предположение подкрепляется тем, что уровень ответа АТ к нДНК обеих фракций при взаимодействии с АФК-модифицированной ДНК в реакции ИФА выше, чем с нДНК. Различный эффект влияния АФК на активность АТ, вероятно, обусловлен тем, что мы исследовали отдельные субфракции АТ к нДНК.

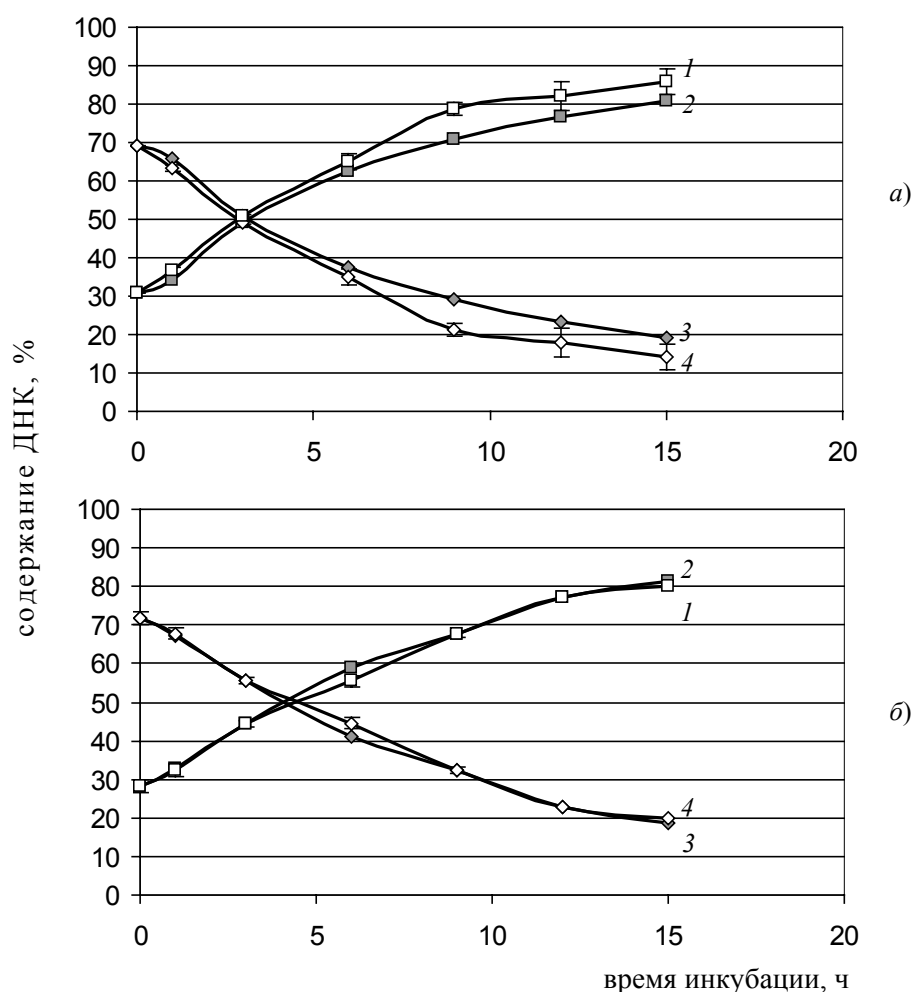


Рис. 3. Влияние АФК на ДНКазную активность антител к ДНК субфракций Ia (а) и IIa (б): одновременное внесение АТ и АФК – (3, ◆) суперскрученная ДНК, (2, ■) кольцевая ДНК; ДНК, инкубированная с АТ без добавления АФК – (4, ◇) суперскрученная ДНК, (1, □) кольцевая ДНК

Для более полной характеристики ДНК-гидролизующей активности АТ к нДНК исследовали кинетические параметры гидролиза плазмидной ДНК pBR-322 антителами четырех субфракций. У всех исследованных препаратов АТ величины K_M изменялись в основном от 10^{-8} до 10^{-7} М, что на несколько порядков меньше величины K_M для известных ДНКаз человека [18], близкой к значению для некоторых рестриктаз (например, для *EcoRI*, *RsrI* и др.) [19] и значению K_M для ДНК-абзимов, полученных другими авторами.

Таким образом, средство IgG с ДНКазной активностью к ДНК очень высоко и характерно для взаимодействий «антиген-антитело». Тем не менее, АТ из фракции I характеризуется большим значением K_M , чем АТ из фракции II, и K_M АТ подфракции Ia выше, чем подфракции Ib. Следует обратить внимание на то, что, несмотря на близкие значения K_M , эти субпопуляции АТ отличаются по способности их вытеснения с аффинной матрицы различными элюентами. Ве-

роятно, эти субпопуляции АТ к нДНК различаются силой электростатического и гидрофобного взаимодействий с нДНК-целлюлозой. Однако скорости гидролиза ($V_{\max} \sim 0.02\text{--}0.48$ нМ/мин.), константы скорости ($k_{\text{cat}} \sim 10^{-3}$ мин.⁻¹) и эффективности гидролиза ($k_{\text{cat}}/K_M \sim 10^{-6}\text{--}10^{-5}$ нМ⁻¹мин.) были на несколько порядков меньше, чем ДНКазы, *EcoRI* и даже некоторых описанных абзимов к ДНК, но в то же время сопоставимыми с таковыми для некоторых из описанных ранее абзимов [26, 27]. Необходимо отметить определенную условность приведенных значений k_{cat} и k_{cat}/K_M , поскольку в их определении использовали максимальное рассчитанное содержание абзимов к ДНК в полученных поликлональных препаратах АТ к нДНК, которое составило приблизительно 1.74–24.88%, так как в настоящее время не известен метод разделения ДНК-гидролизующих и ДНК-связывающих АТ без каталитической активности. Вероятно, содержание каталитически активных IgG в полученных поликлональных препаратах АТ к нДНК может быть значительно меньше. Следовательно, реальная эффективность гидролиза ДНК антителами может быть выше.

Таким образом, анализ литературных данных и полученных нами результатов свидетельствует о том, что реакцию гидролиза катализируют АТ и в реакции расщепления ДНК АТ разных субфракций больных СКВ существенно отличаются от ДНКаз человека.

При сравнении кинетики гидролиза суперскрученной ДНК антителами к нДНК разных субфракций выявлены некоторые сходства и различия между ними. Субфракции АТ к нДНК характеризуются продолжительным временем реакции гидролиза ДНК – 12–15 ч (рис. 4, *внесение одной порции АТ одновременно*). При дальнейшей инкубации достоверных количественных конформационных изменений ДНК не происходит. Исследуемые субфракции АТ к ДНК класса IgG не гидролизуют всю суперскрученную ДНК даже при длительной инкубации АТ с ДНК в течение 22 ч и более. Вероятно, АТ к ДНК являются эндонуклеазами и проводят односторонние разрывы в суперскрученных молекулах ДНК, переводя их в открытые кольцевые молекулы, которые устойчивы к дальнейшему действию АТ, так как накопления линейных форм ДНК не происходит. Из литературы известно, что АТ, как и ферменты, являются конформационно активными и их взаимодействие с ДНК протекает по механизму индуцированного соответствия [28, 29]. Возможными конформационными изменениями можно объяснить продолжительный период гидролиза суперскрученной молекулы ДНК плазмиды pBR-322 антителами к ДНК при СКВ.

Антитела субфракций Ia и IIa, полученные элюцией с нДНК-целлюлозы буфером с 1 М NaCl, гидролизуют суперскрученную ДНК более активно, чем АТ субфракций Ib и IIb, которые были элюированы с аффинного сорбента глицин-HCl с pH 2.3, что приводит к накоплению в продуктах реакции кольцевой формы ДНК на 13–15% больше. Инкубация плазмидной ДНК с АТ субфракций Ia и Ib (рис. 4), внесенными в два раза большей концентрации (*внесение двух порций АТ одновременно*), приводит к увеличению гидролиза молекул суперскрученной ДНК с переходом в кольцевую форму. Однако для АТ к нДНК субфракций IIa и IIb подобного эффекта не обнаружено (рис. 4, б).

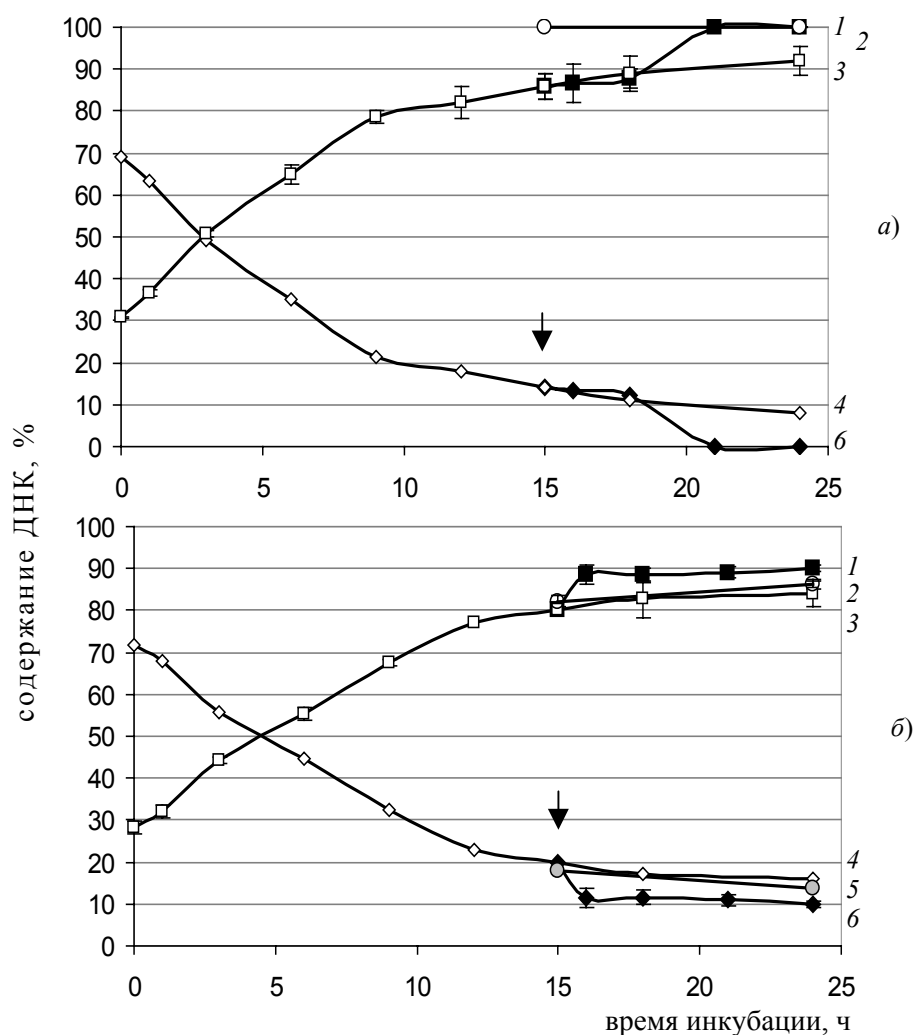


Рис. 4. Кинетические кривые гидролиза плазмидной ДНК рBR-322 антителами к ДНК субфракции Ia (А) и IIa (Б): *внесение одной порции АТ одновременно* – (4, \diamond) суперскрученная ДНК, (3, \square) кольцевая ДНК; *позатпное внесение двух порций АТ* (стрелкой указано время повторного введения антител в инкубационную среду) – (6, \blacklozenge) суперскрученная ДНК, (1, \blacksquare) кольцевая ДНК; *внесение двух порций АТ одновременно* – (5, \bullet) суперскрученная ДНК, (2, \circ) кольцевая ДНК

Учитывая, что в проведенных исследованиях АТ к ДНК не гидролизуют всю суперскрученную ДНК, провели повторное добавление в реакционную среду равной порции IgG-АТ к нДНК через 15 ч инкубации (*позатпное внесение двух порций АТ*). Как видно из графиков, повторное внесение АТ в инкубационную среду приводит к дополнительному уменьшению количества суперскрученной ДНК и увеличению количества открытой кольцевой формы, и этот эффект сильнее даже при сравнении с результатами гидролиза ДНК антителами, внесенными в инкубационную среду в начале эксперимента в той же суммарной концентрации (*внесение двух порций АТ одновременно*). Однако если

для субфракций Ia и Ib повторное внесение АТ приводит к полному гидролизу суперскрученной ДНК через 6 и 9 ч инкубации соответственно, то для АТ к нДНК субфракций IIa и IIb наблюдается увеличение гидролиза суперскрученной ДНК только на 4–10.5% через 1 ч после добавления второй порции АТ, и дальнейшая инкубация не приводит к изменениям в содержании конформаций плазмидной ДНК.

Обнаруженные эффекты необычной кинетики гидролиза ДНК антителами к нДНК при СКВ позволили предположить, что АТ с ДНКазной активностью обладают непроецессивным характером действия.

Наибольшую активность проявляли препараты абзимов к ДНК из фракции I. Эти АТ субфракции Ia и Ib имеют высокое значение изоэлектрической точки (рI 7.16–8.3) и, вероятно, за счет электростатических сил могут взаимодействовать с ДНК. Вопрос о заряде патологических АТ к нДНК остается спорным, тем не менее, в литературе сложилось общее мнение о том, что патологические IgG к нДНК являются положительно заряженными антителами. Данные литературы свидетельствуют о том, что в большинстве случаев каталитически активные центры различных абзимов расположены в переменной части легких цепей Ig [27, 30, 31]. У многих АТ, связывающихся с ДНК, способность взаимодействовать с ДНК присуща тяжелой цепи [32, 33]. Возможно, что в активном антигенсвязывающем центре абзимы имеют два центра: первый – «якорная площадка», которая обуславливает специфичность взаимодействия АТ с молекулой нДНК, и второй – активный центр, ответственный за проявление энзиматической активности. Однако, в отличие от ферментов, после акта гидролиза фосфодиэфирной связи ДНК не происходит освобождения АТ от молекулы ДНК.

Большинство авторов придерживается мнения о том, что патологические АТ к нДНК класса IgG обладают широкой перекрестной реактивностью. Однако в некоторых исследованиях было отмечено, что не всегда перекрестно реагирующий антиген ингибирует связывание АТ с ДНК [34, 35]. Эти данные дают возможность предположить, что перекрестное взаимодействие АТ с разными антигенами может происходить на различных участках антигенсвязывающего центра. Именно наличием двух центров взаимодействия АТ с ДНК, находящихся на различных участках молекулы IgG, можно объяснить наблюдаемый нами непроецессивный характер действия АТ к ДНК, когда после акта гидролиза фосфодиэфирной связи молекула АТ остается связанной с нДНК.

Гетерогенность АТ может быть связана с происхождением абзимов к ДНК: препараты могут содержать как абзимы антиидиотипической природы к активным центрам ферментов (нуклеаз, топоизомераз), так и ДНК-гидролизующие АТ к нуклеиновым кислотам и их комплексам. Принимая во внимание полученные результаты и литературные данные, можно высказать предположение о том, что разные субпопуляции АТ к нДНК с ДНК-гидролизующей активностью могут иметь разное происхождение и выполнять разные функции, которые могут зависеть от окружающих условий. Так как при СКВ снижена активность сывороточных ДНКаз, то, вероятно, некоторые из них могут выполнять компенсаторную функцию, взяв на себя роль нуклеаз. АТ могут выполнять метаболическую и защитную функции в организме при СКВ. Абзимы к ДНК мо-

гут участвовать в утилизации нуклеосомной ДНК апоптозных клеток после их поглощения макрофагами. Учитывая тот факт, что АТ могут проникать в клетку и ядро, абзимы могут участвовать в процессах репликации, репарации и рекомбинации ДНК. Не исключено, что в отличие от обычных ферментов, природные абзимы могут быть антителами с уникальным гидролитическим центром.

Выводы

1. Из сыворотки крови больных системной красной волчанкой выделены четыре субфракции антител к нативной ДНК класса IgG, проявляющих различное сродство к аффинному сорбенту нативной ДНК-целлюлозе, обладающих термостабильной ДНК-гидролизующей активностью и различающихся по сорбции на ДЭАЭ-целлюлозе.

2. ДНК-гидролизующие антитела к нативной ДНК являются металлозависимыми эндонуклеазами, вносят в ДНК преимущественно одноцепочечные разрывы и проявляют активность в широком диапазоне значений pH. Константы ферментативной реакции антителами к нативной ДНК (K_M 10^{-8} – 10^{-7} М) на несколько порядков меньше величины K_M для известных ДНКаз человека.

3. Термостабильная ДНК-гидролизующая активность антител к нативной ДНК не изменяется или ингибируется под действием гидроксил-радикала в отличие от термолабильной ДНКазной активности сывороточных нуклеаз, которая активируется гидроксил-радикалом.

4. ДНК-гидролизующая активность антител к нативной ДНК характеризуется непроточесивным механизмом действия, т. е. после разрыва фосфодиэфирной связи антитело остается связанным с ДНК.

5. В активном антигенсвязывающем центре ДНК-гидролизующие антитела имеют два участка: первый – «якорная площадка», которая обуславливает специфичность взаимодействия антител с молекулой ДНК, и второй – активный центр, ответственный за проявление ферментативной активности.

Summary

T.A. Nevzorova, V.G. Vinter. Examination of the DNA-hydrolyzing activity of the antibodies to DNA.

From the blood serum of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) four subfraction of antibodies to native DNA of IgG were obtained. They are differed by the absorption on the DEAE-cellulose and display different affinity for the sorbent – native DNA-cellulose. We showed that the DNA-hydrolyzing antibodies to native DNA are the metal-dependent endonucleases, they introduce in DNA predominantly single-chain breaks and manifest activity over a wide range of the values of pH. We established that the hydroxyl radical with SLE does not influence or inhibits the thermostable DNA-hydrolyzing activity of antibodies to native DNA in contrast to the thermolabile DNase activity of serum nucleases, which is activated under the action of hydroxyl radical. The DNA-hydrolyzing activity of antibodies to native DNA is characterized by the non-processive mechanism of action.

Литература

1. *Tramontano A., Janda K.D., Lerner R.A.* Catalytic antibodies // *Science*. – 1986. – V. 234. – P. 1566–1570.

2. *Pollack S.J., Jacobs J.W., Schultz P.G.* Selective chemical catalysis by an antibody // *Science*. – 1986. – V. 234. – P. 1570–1573.
3. *Paul S., Volle D.J., Beach C.M. et al.* Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody // *Science*. – 1989. – V. 244. – P. 1158–1162.
4. *Gill J.M., Quisel A.M., Rocca P.V., Walters D.T.* Diagnosis of systemic lupus erythematosus // *Am. Fam. Physician*. – 2003. – V. 68. – P. 2179–2186.
5. *Shuster A.M., Gololobov G.V., Kvashuk O.A. et al.* DNA hydrolyzing autoantibodies // *Science*. – 1992. – V. 256. – P. 665–667.
6. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
7. *Кузнецова Н.Н., Винтер В.Г.* Методы геномной инженерии. – М.: Биоинформсервис, 1997. – 180 с.
8. *Невзорова Т.А., Кулапина Ю.С., Винтер В.Г.* Выделение и фракционирование аутоантител к ДНК при системной красной волчанке // *Новая геометрия природы*. – Казань, 2003. – Т. 2. – С. 422–427.
9. *Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г.* Биокинетика. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.
10. *Келети Т.* Основы ферментативной кинетики. – М.: Мир, 1990. – 350 с.
11. *Brocklehurst K., Resmini M., Topham C.M.* Kinetic and titration methods for determination of active site contents of enzyme and catalytic antibody preparations // *Methods*. – 2001. – V. 24. – P. 153–167.
12. *Topham C.M., Gul S., Resmini M. et al.* The kinetic basis of a general method for the investigation of active site content of enzymes and catalytic antibodies: first-order behaviour under single-turnover and cycling conditions // *J. Theor. Biol.* – 2000. – V. 204. – P. 239–256.
13. *Cooke M.S., Mistry N., Wood C. et al.* Immunogenicity of DNA damaged by reactive oxygen species – implications for anti-DNA antibodies in lupus // *Free Radic. Biol. Med.* – 1997. – V. 22. – P. 151–159.
14. *Ashok B.T., Ali R.* Binding of circulating antibodies to reactive oxygen species modified-DNA and detecting DNA damage by a monoclonal antibody probe // *Mech. Ageing Dev.* – 1998. – V. 103. – P. 69–80.
15. *Саттарова Л.И., Гафиятуллина Л.А., Аглиуллина Д.Г., Винтер В.Г.* Оптимизация иммуноферментной тест-системы для определения антител к ДНК // *Биотехнология*. – 1994. – № 11–12. – С. 38–41.
16. *Napirei M., Karsunky H., Zevnik B. et al.* Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice // *Nature Genetics*. – 2000. – V. 25, No 2. – P. 177–181.
17. *Tsukumo S.-I., Yasutomo K.* DNaseI in pathogenesis of systemic lupus erythematosus // *Clin. Immunol.* – 2004. – V. 113. – P. 14–18.
18. *Шанот В.С.* Нуклеазы. – М.: Медицина, 1968. – 212 с.
19. *Methods in molecular biology. Enzymes of molecular biology / Ed. M.M. Burrell.* – Totowa, New Jersey: Humana Press, 1993. – 356 p.
20. *Барановский А.Г., Бунева В.Н., Невинский Г.А.* Дезоксирибонуклеазы человека // *Биохимия*. – 2004. – Т. 69, № 6. – С. 725–742.
21. *Ames P.R.J., Alves J., Muret I. et al.* Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and allied conditions with vascular involvement // *Rheumatology*. – 1999. – V. 38. – P. 529–534.
22. *Waszczykowska E., Robak E., Wozniacka A. et al.* Estimation of SLE activity based on the serum level of chosen cytokines and superoxide radical generation // *Med. Inflamm.* – 1999. – V. 8. – P. 93–100.

23. *Suwannaraj S., Lagoo A., Keisler D., McMurray R.W.* Antioxidants suppress mortality in the female NZB×NZW F1 mouse model of systemic lupus erythematosus (SLE) // *Lupus*. – 2001. – V. 10. – P. 258–265.
24. *Courtney P.A., Crockard A.D., Williamson K. et al.* Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia // *Ann. Rheum. Dis.* – 1999. – V. 58. – P. 309–314.
25. *Stefanec T.* Endothelial apoptosis: the missing link between atherosclerosis and SLE? // *Blood*. – 2004. – V. 103, No 10. – P. 3608–3609.
26. *Канышкова Т.Г., Семенов Д.В., Власов А.В. и др.* ДНК- и РНК-гидролизующие антитела из молока человека и их возможная биологическая роль // *Молекулярная биология*. – 1997. – Т. 31, № 6. – С. 1082–1091.
27. *Andrievskaya O.A., Buneva V.N., Baranovskii A.G. et al.* Catalytic diversity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgG antibodies from the sera of patients with lupus erythematosus // *Immunol. Lett.* – 2002. – V. 81. – P. 191–198.
28. *Miyazaki S., Shimura J., Hirose S. et al.* Is structural flexibility of antigen-binding loops involved in the affinity maturation of anti-DNA antibodies? // *Int. Immunol.* – 1997. – V. 9. – P. 771–777.
29. *Jang Y.J., Stollar B.D.* Anti-DNA antibodies: aspects of structure and pathogenicity // *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* – 2003. – V. 60. – P. 309–320.
30. *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. – Т. 63, № 11. – С. 1459–1469.
31. *Дубровская В.В., Андрюшкова А.С., Кузнецова И.А. и др.* ДНК-гидролизующие антитела из крови аутоиммунных мышей MRL/MpJ-*lpr* // *Биохимия*. – 2003. – Т. 68, № 10. – С. 1323–1332.
32. *Vargas M.T., Gustilo K.G., D'Andrea D.M. et al.* Structural features of nephritogenic lupus autoantibodies // *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*. – 1997. – V. 11. – P. 62–69.
33. *Radic M.Z., Seal S.N.* Selection of recurrent V genes and somatic mutations in autoantibodies to DNA // *Methods*. – 1997. – V. 11. – P. 20–26.
34. *Sharma A., Isenberg D.A., Diamond B.* Crossreactivity of human anti-dsDNA Antibodies to phosphorylcholine: clues to their origin // *J. Autoimmun.* – 2001. – V. 16. – P. 479–484.
35. *Caponi L., Chimenti D., Pratesi F., Migliorini P.* Anti-ribosomal antibodies from lupus patients bind DNA // *Clin. Exp. Immunol.* – 2002. – V. 130. – P. 541–547.

Поступила в редакцию
15.06.05

Невзорова Татьяна Александровна – ассистент кафедры биохимии Казанского государственного университета.

E-mail: Tatyana.Nevzorova@ksu.ru

Винтер Виктор Георгиевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии Казанского государственного университета.

E-mail: Victor.Vinter@ksu.ru