

## ОСОБЕННОСТИ ГИДРОЛИЗА АНТИТЕЛАМИ ПРОТИВ ВИРУСНОЙ ИНТЕГРАЗЫ ИЗ КРОВИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ СПЕЦИФИЧЕСКИХ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ И ОЛИГОПЕПТИДОВ\*

© 2015 Е.С. Одинцова<sup>1</sup>, П.С. Дмитренко<sup>2</sup>, С.В. Баранова<sup>1</sup>,  
А.М. Тимофеева<sup>1</sup>, В.Н. Бунева<sup>1,3</sup>, Г.А. Невинский<sup>1,3\*\*</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
СО РАН, 630090 Новосибирск; факс: +7(383)33-3677,  
электронная почта: nevinisky@niboch.nsc.ru

<sup>2</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии ДО РАН,  
690022 Владивосток

<sup>3</sup> Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск;  
факс: +7(383)330-3255, электронная почта: nsu@nsu.ru

Поступила в редакцию 30.06.14

После доработки 18.09.14

Ранее было показано, что в отличие от канонических протеаз абзимы против основного белка миелина (ОБМ) из крови пациентов с рассеянным склерозом и системной красной волчанкой (СКВ) эффективно расщепляют только ОБМ, а антитела (АТ) против интегразы (ИН) из крови ВИЧ-инфицированных больных специфически гидролизуют только ИН. В данной работе все сайты эффективного гидролиза 25-звенного олигопептида (ОП25), соответствующего ОБМ, анти-ИН антителами (IgG и IgM) были идентифицированы сочетанием методов обращенно-фазовой и тонкослойной хроматографий, а также масс-спектрометрии. Показано, что последовательности ОП25 и других неспецифических олигопептидов (ОП), расщепляемых анти-ОБМ абзимами, частично гомологичны нескольким фрагментам полной последовательности ИН. Последовательности олигопептидов ИН, расщепляемые анти-ИН абзимами, гомологичны нескольким фрагментам ОБМ, но анти-ОБМ абзимы не способны эффективно гидролизовать ОП, соответствующие ИН. Выявлены общие черты сайтов расщепления ОП25 и других ОП анти-ОБМ и анти-ИН абзимами. Проведен анализ литературных данных по гидролизу специфических и неспецифических белков и олигопептидов абзимами против разных белков-антигенов. Совокупность этих данных свидетельствует о том, что короткие ОП, включая ОП25, взаимодействуют в основном с легкими цепями поликлональных АТ, которые обладают низким сродством и специфичностью по отношению к субстрату по сравнению с интактными АТ. Однако анти-ИН АТ в настоящее время, по-видимому, являются единственным примером абзимов, способных высокоэффективно (в течение нескольких часов, а не суток) гидролизовать самые разные олигопептиды. Обсуждаются возможные причины эффективного гидролиза чужеродных олигопептидов анти-ИН абзимами ВИЧ-инфицированных больных.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ВИЧ-инфицированные больные, каталитические антитела против вирусной интегразы, интегразы, основной белок миелина, гидролиз пептидов основного белка миелина.

В последние годы в литературе достаточно подробно описаны искусственные каталитически активные антитела (абзимы) против переходных состояний различных химических реакций

(ссылки в [1]), в частности, природные абзимы, гидролизующие ДНК, РНК, полисахариды, олигопептиды (ОП) и белки из крови пациентов с различными аутоиммунными заболеваниями (АИЗ)

Принятые сокращения: АИЗ – аутоиммунное заболевание; АК – аминокислота; АТ – антитела; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ИН – интегразы ВИЧ; ИАП – иммуногенная аминокислотная последовательность; МКА – 4-метилкумарил-7-амин; ОБМ – основной белок миелина; ОП – олигопептид; ОФХ – обращенно-фазовая хроматография; IgG<sub>mix</sub> и IgM<sub>mix</sub> – смеси индивидуальных антител из крови ВИЧ-инфицированных больных; СКВ – системная красная волчанка; РС – рассеянный склероз; X – флуоресцентный остаток 6-О-(карбоксиметил)флуоресцеин этиловый эфир; ЧСА – человеческий сывороточный альбумин.

\* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 14-187, 25.01.2015.

\*\* Адресат для корреспонденции.

(системная красная волчанка (СКВ), тиреоидит Хашимото, полиартрит, рассеянный склероз (РС), астма, ревматоидный артрит и др.) и некоторыми вирусными инфекциями, которые сопровождаются нарушением иммунного статуса (гепатиты, ВИЧ-инфекция, клещевой энцефалит) (ссылки в [2–6]). У здоровых доноров и больных многими другими заболеваниями с незначительными аутоиммунными реакциями накопления абзимов не наблюдается, образуются антитела (АТ) с низкими каталитическими активностями, которые невозможно достоверно детектировать с помощью существующих методов [2–6]. Кроме классических функций АТ, абзимы могут играть как положительную, так и отрицательную роль, вызывая специфические процессы и клинические проявления при различных аутоиммунных состояниях, включая ВИЧ-инфекцию [2–6].

ВИЧ-1 является этиологическим агентом чрезвычайно опасного заболевания человека — СПИД [7]. Цикл репликации ВИЧ-1 включает процесс обратной транскрипции вирусной РНК с последующей интеграцией образующейся ДНК в хозяйский геном [8]. Обратную транскрипцию катализирует ретровирусная РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза, ОТ) [9, 10]. Репликация ретровирусов зависит от эффективности процесса интеграции двухцепочечной ДНК ретровирусного генома в ядерный геном клетки хозяина [8]. Стадия интеграции катализируется вирусным ферментом интегразой (ИН) [11]. ИН и ОТ являются важнейшими «мишенями» для подавления развития ВИЧ.

Кровь ВИЧ-инфицированных больных содержит АТ ко многим различным как вирусным белкам (ОТ и ИН), так и белкам человека [5, 12, 13]. В первом сообщении о том, что кровь ВИЧ-инфицированных больных содержит ДНК-гидролизующие АТ не было приведено доказательства, а именно, проверки известных жестких критериев отнесения активности непосредственно иммуноглобулинам [14]. Позже был проведен детальный анализ и показано, что ДНКазная активность действительно является собственным свойством антител ВИЧ-инфицированных больных [15]. Недавно было показано, что препараты IgG и IgM из крови ВИЧ-инфицированных пациентов после аффинной хроматографии на сорбентах с иммобилизованными ОТ, ИН, ЧСА и казеином гидролизуют только соответствующий субстрат, но не другие белки [16–20]. Длительная инкубация ИН с IgG или IgM-абзимами, обладающими высокой протеолитической активностью, приводит к образованию большого числа пептидов различной длины, включая короткие ОП [19]. Сорок сай-

тов расщепления ИН абзимами ВИЧ-инфицированных больных, определенные MALDI масс-спектрометрией, локализованы в основном в семи известных иммунодоминантных последовательностях ИН [19]. Два 20-звенных ОП, соответствующих иммуногенным последовательностям ИН, содержали 9–10 кластеризованных мажорных, умеренных и минорных сайтов расщепления [19, 20]. Показано, что в общем пуле IgG и IgM крови ВИЧ-инфицированных больных только специфические анти-ИН АТ способны гидролизовать интактные глобулярные молекулы вирусной интегразы.

Рассеянный склероз — это хроническое аутоиммунное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы, ведущее к различным нервным и психиатрическим нарушениям [21]. Его этиология остается неясной, и признанной теорией патогенеза РС основная роль в разрушении миелина отводится воспалению, связанному с аутоиммунными реакциями [21]. Последние исследования показали, что в патогенезе РС важную роль играют В-клетки и ауто-АТ против аутоантигенов миелина, включая основной белок миелина (ОБМ) [21–23]. Недавно показано, что ОБМ-гидролизующая активность является собственным свойством препаратов IgG, IgM и IgA из крови пациентов с РС [24–26], и определены специфические сайты расщепления абзимами ОБМ [27].

Полиэтиологический и полисиндромный характер аутоиммунного диффузного заболевания системной красной волчанкой приводит к разнообразным проявлениям этой патологии с различными биохимическими, иммунологическими и клиническими параметрами [28]. Интересно, что СКВ и РС демонстрируют некоторое подобие медицинских, биохимических и иммунологических характеристик развития этих заболеваний. Например, у 50% пациентов с СКВ развиваются нейropsychиатрические расстройства, которые ведут к негативному прогнозу (ссылки в [21]). СКВ, возможно, в большей степени, чем какое-либо другое системное воспалительное заболевание, преимущественно затрагивает центральную нервную систему и мозг, вызывая психические расстройства [21]. Нарботка разнообразных ауто-АТ, возможно, связана с дефектным функционированием апоптотических клеток.

АТ-опосредованное разрушение нервных клеток и реологические нарушения позволяют предположить два принципиальных механизма повреждения тканей [21]. Взаимодействие между этими процессами, основными наследственными факторами, их модификация гормонами, а также осложнение многими вторичными фак-

торами может объяснить широкий спектр особенностей развития РС и СКВ. Для СКВ и РС выявлено несколько общих, характерных для обеих патологий, параметров, включая появление бляшек в мозге [21].

Как недавно показано, титры АТ против основного белка миелина у пациентов с СКВ в 4,2 раза выше, чем у здоровых доноров, но в 2,1 раза ниже, чем у больных с РС [4]. При этом абзимы крови пациентов с СКВ и РС обладали одинаковыми каталитическими активностями. Показано, что IgG и/или IgM при СКВ и РС эффективно гидролизуют ДНК, РНК и полисахариды [1–4], а также ОБМ [24–27]. Электрофоретически и иммунологически гомогенные препараты IgG из крови больных СКВ и РС после аффинной хроматографии на сефарозе с иммобилизованным ОБМ (ОБМ-сефароза) специфически гидролизуют только ОБМ, а не другие тестируемые белки [29]. Показано, что анти-ОБМ-абзимы крови больных СКВ и РС гидролизуют ОБМ по одним и тем же сайтам [27, 30–34]. При СКВ и РС анти-ОБМ абзимы могут атаковать ОБМ миелино-протеолипидной оболочке аксонов. Показано, что стандартное лекарство при РС – копаксон (Сораконе) является специфическим ингибитором ОБМ-гидролизующей активности абзимов [27]. Следовательно, ОБМ-гидролизующие абзимы могут играть важную негативную роль в патогенезе РС и СКВ.

Ранее было показано, что анти-ИН-абзимы ВИЧ-инфицированных больных эффективно гидролизуют двадцатиодномерный олигопептид, соответствующий одной из четырех иммуногенных последовательностей ОБМ [33]. Оставалось не ясным, является ли это случайным феноменом, особенностью АТ против ИН, или следствием частичной гомологии аминокислотных (АК) последовательностей этих белков и достаточно ли частичной гомологии для эффективного гидролиза олигопептидов анти-ИН-абзимами ВИЧ-инфицированных больных. Для получения ответа на этот вопрос в данной работе был проведен анализ гидролиза двадцати пятизвенного олигопептида (ОП25) ОБМ, соответствующего другой иммуногенной последовательности ОБМ, с помощью анти-ИН-абзимов из крови ВИЧ-инфицированных пациентов. Для анализа были использованы MALDI масс-спектрометрия, обращенно-фазовая (ОФХ), тонкослойная (ТСХ) и аффинная хроматографии. Кроме того, были проведены анализ гомологии АК-последовательностей интегразы ВИЧ и ОБМ, сравнение данных гидролиза глобулярных интактных ОБМ человека и ИН ВИЧ, а также гидролиза их ОП анти-ОБМ- и анти-ИН-абзимами.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Реактивы, доноры и пациенты.** Все использованные реактивы были фирмы «Sigma» (США) или «Pharmacia» (Швеция). Гомогенная интегразы ВИЧ-1 была получена согласно [35]. ИН-сефароза была приготовлена с использованием ВгСN-сефарозы в соответствии со стандартным протоколом производителя.

Кровь была взята у 10 здоровых доноров и 24 ВИЧ-инфицированных пациентов (18–40 лет, мужчины и женщины), включая 16 человек со стадией пре-СПИД и 8 – со стадией генерализованной лимфаденопатии; диагноз поставлен в соответствии с классификацией Centers for Disease Control and Prevention (США, <http://www.cdc.gov/hiv/>); была протестирована специфическая ИН-гидролизующая активность всех препаратов АТ, согласно [17, 18]. В настоящей работе были использованы несколько описанных ранее препаратов каталитически активных IgG и IgM ВИЧ-инфицированных пациентов для изучения гидролиза ОБМ и его пептидов. Протокол забора крови соответствовал рекомендациям регионального комитета по этике человека (Комитет по этике НГМУ, Россия) в соответствии с Хельсинскими рекомендациями комитета по этике.

**Очистка антител.** Электрофоретически гомогенные препараты IgG и IgM были получены из крови здоровых доноров и ВИЧ-инфицированных больных с помощью последовательных аффинной хроматографией белков плазмы крови на протеин А-сефарозе и последующей высокоэффективной гель-фильтрацией на колонке с Superdex 200 HR 10/30 («GE Healthcare», США), как описано в [17, 18].

Плазму крови получали путем добавления к крови (5 мл) цитрата натрия (4%, 1/4 часть объема крови), клетки удаляли центрифугированием. Плазму крови нанесли на колонку с протеин А-сефарозой (5 мл), уравновешенную TBS-буфером (0,15 М NaCl, 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5). Затем колонку промывали этим же буфером до нулевой оптической плотности. Неспецифически адсорбированные белки элюировали тем же буфером, содержащим 1%-ный Triton X-100 и 0,5 М NaCl. Затем колонку промывали TBS и АТ (суммарную фракцию – IgG + IgA + IgM) элюировали 50 мМ глицин-HCl-буфером, pH 2,6. Суммарную фракцию АТ собирали в охлажденную пробирку, содержащую 50 мкл 0,5 М Tris-HCl, pH 9,0. Затем раствор дополнительно нейтрализовали до нейтрального значения pH и диализовали против 10 мМ Tris-HCl, pH 7,5, содержащего 0,1 М NaCl.

IgM были отделены от IgA и IgG высокоэффективной гель-фильтрацией суммарной фрак-

ции АТ на колонке с Superdex 200 HR 10/30, уравновешенной буфером 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, содержащим 0,3 М NaCl согласно [17, 18]. Затем проводили тестирование протеолитической активности препаратов IgG и IgM. Анализ специфического гидролиза ИН только абзимами из крови ВИЧ-инфицированных больных, которые использованы в данной работе, был описан ранее [17, 18].

Для анализа усредненных характеристик протеолитических поликлональных АТ была приготовлена эквимольная смесь электрофоретически гомогенных препаратов IgG (IgG<sub>mix</sub>) и IgM (IgM<sub>mix</sub>) с различной, но относительно высокой, активностью из крови семи ВИЧ-инфицированных пациентов. Препараты индивидуальных IgG и IgM, использованные для получения IgG<sub>mix</sub> и IgM<sub>mix</sub>, описаны ранее [33] и их некоторые характеристики приведены ниже. В контрольных экспериментах была использована смесь из равных количеств препаратов IgG (hd-IgG<sub>mix</sub>) и IgM (hd-IgM<sub>mix</sub>) из крови семи здоровых доноров.

Препараты IgG<sub>mix</sub> и IgM<sub>mix</sub> (ВИЧ-инфицированных пациентов) подвергали аффинной хроматографии на колонке с ИН-сефарозой (1 мл), уравновешенной буфером 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, содержащим 0,1 М NaCl, как описано ранее [33]. После нанесения колонку промывали тем же буфером до нулевой оптической плотности. IgG или IgM элюировали сначала градиентом концентрации NaCl (0,2–2,0 М), а затем раствором 3 М NaCl (АТ<sub>salt</sub>) и, наконец, буфером 40 мМ глицин-HCl, pH 2,6 (АТ<sub>acid</sub>). Все фракции АТ были диализованы против буфера 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, и затем сконцентрированы. После каждой стадии очистки концентрацию во фракциях измеряли по методике Бредфорда, используя стандартную калибровку, построенную с использованием БСА.

**Тестирование протеолитической активности АТ.** Реакционная смесь (10–20 мкл) для анализа гидролиза олигопептидов содержала: 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 30 мМ NaCl, 0%–2,0 мМ ОП и 0,01–0,03 мг/мл IgG<sub>mix</sub> или IgM<sub>mix</sub>, разделенных на ИН-сефарозе (или 0,2 мг/мл hd-IgG<sub>mix</sub> или hd-IgM<sub>mix</sub>). Смеси инкубировали 1–24 ч при 37°. В качестве субстрата был использован неспецифический X-ОП25 (X-AQGTLISKIFKLGGRDS-RSGSPMARR), соответствующий одной из иммуногенных последовательностей ОБМ человека, в котором было обнаружено несколько сайтов специфического расщепления этого белка IgG-абзимами [27, 29–34]. Этот ОП на N-конце содержал флуоресцентный остаток 6-О-(карбоксиметил)флуоресцеин этиловый эфир (X). В качестве контроля были использованы ОП, со-

ответствующие двум иммуногенным последовательностям ИН ВИЧ (ин-ОП1 и ин-ОП2), которые содержали несколько сайтов специфического расщепления ИН-абзимами ВИЧ-инфицированных пациентов [19, 20].

Продукты гидролиза X-ОП25 (0,5–2 мкл реакционной смеси) анализировали тонкослойной хроматографией на пластинках с Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, используя систему: уксусная кислота–*n*-бутанол–H<sub>2</sub>O (1 : 4 : 5). Далее пластинки были высушены и сфотографированы. Для оценки относительной интенсивности флуоресцентных пятен после ТСХ использовали контрольные ОП, инкубированные без АТ. Об интенсивности расщепления X-ОП25 судили по уменьшению (в %) флуоресценции исходного X-ОП25 и накоплению новых флуоресцирующих продуктов. Сумма интенсивностей флуоресценции негидролизуемого ОП и всех образующихся фрагментов расщепления была принята за 100%.

В некоторых экспериментах продукты расщепления специфического X-ОП25 сначала были разделены с помощью обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ) на колонке (4,6 × 250 мм) с сорбентом Nucleosil C-18 с использованием 0,05%-ной трифторуксусной кислоты и градиента ацетонитрила (0–80%). Относительное количество образовавшихся продуктов расщепления было рассчитано по их флуоресценции. Флуоресценцию возбуждали при 320 нм, а эмиссию определяли при 490 нм. Фракции различных пиков были собраны, упарены до минимального объема, продукты гидролиза анализировали с помощью ТСХ (см. выше) и MALDI масс-спектрометрии (см. ниже).

**Анализ АТ-зависимого гидролиза олигопептидов методом MALDI масс-спектрометрии.** Во всех случаях продукты гидролиза X-ОП25 анализировали MALDI-TOF масс-спектрометрией с использованием системы Reflex III («Bruker», Германия), снабженной азотным лазером (337 нм) (VSL-337 ND, «Laser Science», США), с продолжительностью импульса 3 нс. В качестве матрицы был использован насыщенный раствор циано-4-гидрокоричной кислоты в смеси 0,1%-ного ацетонитрила и трифторуксусной кислоты (1 : 2). К 1 мкл реакционной смеси, содержащей гидролизованный ОП до или после разделения продуктов гидролиза с помощью ОФХ или ТСХ, добавляли 1 мкл 0,2%-ной трифторуксусной кислоты и 1 мкл матрицы, затем 1 мкл конечной смеси наносили на мишень для MALDI масс-спектрометрии, мишень высушивали на воздухе. Калибровка MALDI спектров была проведена с использованием стандартных наборов белков и олигопептидов (I и II, «Bruker Daltonic»,

Германия) в качестве внешних и внутренних стандартов.

**Анализ типа протеолитической активности абзимов.** Для анализа типа протеолитической активности  $IgG_{mix}$  и  $IgM_{mix}$  согласно работам [17, 18] препараты этих АТ (0,5 мг/мл) преинкубировали 30 мин при 25° с одним из специфических ингибиторов классических протеаз различного типа: йодацетамидом (4 мМ), пепстатином А (50 мкМ), АЕBSF (0,15 мМ) или ЭДТА (50 мМ). Затем аликвоты (2 мкл) этих смесей добавляли в стандартную реакционную смесь (20 мкл), содержащую 0,3 мг/мл ИН, 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 30 мМ NaCl [17, 18]. Далее продукты реакции анализировали с помощью Ds-Na-электрофореза в 12%-ном ПААГ. Эффективность гидролиза ОБМ оценивали по убыли белкового субстрата в исходной полосе ИН по сравнению с контролем (инкубация ИН без АТ) с помощью компьютерной программы Gel-Pro Analyzer, версия 3.1. Далее рассчитывали уменьшение активности АТ (в %), инкубированных с указанными специфическими ингибиторами, по сравнению с АТ инкубированными без них.

**Анализ гомологии.** Гомологию (% идентичных аминокислотных остатков (АК)) последовательностей олигопептидов, ОБМ и интегразы ВИЧ анализировали с помощью программы *lalign* ([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)). Эта программа позволяет находить в анализируемых последовательностях не только идентичные АК, но и остатки с близкими физико-химическими свойствами. Поиск идентичных и близких по свойствам АК основан на математическом алгоритме, описанном в работе [36].

**Статистический анализ.** Полученные результаты представлены как среднее значение  $\pm$  среднее отклонение как минимум трех независимых экспериментов. Ошибка приведенных значений не превышала 7–12%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Характеризация абзимов.** Электрофоретически гомогенные препараты  $IgG$  и  $IgM$  были получены из крови здоровых доноров и ВИЧ-инфицированных больных с помощью аффинной хроматографии белков плазмы крови на протеин А-сефарозе [17, 18].  $IgM$  были отделены от  $IgA$  и  $IgG$  путем высокоэффективной гель-фильтрации суммарной фракции АТ [17, 18]. Затем проводили тестирование протеолитической активности препаратов  $IgG$  и  $IgM$ . Специфический гидролиз ИН только абзимами из крови ВИЧ-инфицированных больных был описан ранее [33].

В данной работе для анализа усредненных характеристик антител были использованы те же самые смеси равных количеств гомогенных препаратов  $IgG$  ( $IgG_{mix}$ ) и  $IgM$  ( $IgM_{mix}$ ) из крови семи ВИЧ-инфицированных пациентов, а также семи здоровых доноров ( $hd-IgG_{mix}$  и  $hd-IgM_{mix}$ ), которые описаны в работе [33]. Затем  $IgG_{mix}$  и  $IgM_{mix}$ , обладающие сродством к ИН, были разделены аффинной хроматографией на сефарозе с иммобилизованной ИН согласно [33]. Для дальнейших исследований были использованы фракции  $IgG_{mix}$  и  $IgM_{mix}$ , элюированные с ИН-сефарозы раствором 3 М NaCl (АТ<sub>salt</sub>) и кислым буфером с pH 2,6 (АТ<sub>acid</sub>). Для исключения возможности присутствия следов канонических протеаз очищенные препараты  $IgG_{mix}$  и  $IgM_{mix}$ , элюированные солью и кислым буфером, были разделены с помощью Ds-Na-электрофореза в ПААГ в невозстанавливающих и восстанавливающих условиях. Затем была оценена протеолитическая активность во фракциях, соответствующих экстрактам мелких кусочков геля (2–3 мм) по аналогии с работами [17–20]. ИН-гидролизующая активность антител ВИЧ-инфицированных больных была обнаружена в невозстанавливающих условиях только в зонах геля, соответствующих положению интактных  $IgG_{mix}$  (150 кДа), а в восстанавливающих условиях только в зоне изолированных легких цепей  $IgG_{mix}$  и  $IgM_{mix}$  (интактные  $IgM$  с мол. массой 970 кДа не входят в гель). Таким образом, эти данные (в совокупности с отсутствием активности у препаратов  $hd-IgG_{mix}$  и  $hd-IgM_{mix}$  здоровых доноров) являются прямым доказательством того, что все препараты  $IgG_{mix}$  и  $IgM_{mix}$  из крови ВИЧ-инфицированных пациентов, очищенные на ИН-сефарозе, не содержали примесей канонических протеаз. Кроме того, по аналогии с работами [17–20, 33], было показано, что, в отличие от канонических протеаз, препараты  $IgG_{mix}$  и  $IgM_{mix}$ , очищенные на ИН-сефарозе, специфически гидролизуют только глобулярную интегразу, но не другие исследованные глобулярные белки: бычий сывороточный альбумин, лактоферрин и казеин из женского молока, яичный лизоцим, рбб обратную транскриптазу ВИЧ-1), а также ОБМ.

**АТ-зависимый гидролиз олигопептидов.** Ранее было показано, что  $IgG_{mix}$  и  $IgM_{mix}$  из крови ВИЧ-инфицированных пациентов гидролизуют интактную ИН, ее 20-мерные ОП и короткие неспецифические три- и тетрапептиды и 21-мерный ОП (Х-ОП21), соответствующий ОБМ [17–20, 33, 34]. Сначала было показано, что анти-ИН АТ гидролизуют Х-ОП25, соответствующий ОБМ человека, в то время как АТ здоровых доноров этот ОП не расщепляли (рис. 1, б; дорожка К3). Для детального анализа гидролиза

X-ОП25 анти-ИН-абзимами были использованы  $IgG_{(salt)mix}$ ,  $IgM_{(salt)mix}$ ,  $IgG_{(acid)mix}$  и  $IgM_{(acid)mix}$ , элюированные с ИН-сефарозы соответственно 3M NaCl и кислым буфером.

**MALDI масс-спектрометрический анализ гидролиза X-ОП25.** Результаты, представленные на рис. 1, демонстрируют, что практически полный гидролиз специфического X-ОП25 анти-ИН  $IgG_{(acid)mix}$  абзимами после 24 ч инкубации дает два основных, один минорный и несколько слабо флуоресцирующих ОП. Только с помощью ТСХ (рис. 1, б) невозможно было однозначно идентифицировать АК-последовательности продуктов гидролиза, так как их подвижности на пластинке зависит от многих факторов, включая количество АК остатков, относительную гидрофобность, природу концевых АК-остатков и др. Для идентификации основных сайтов IgG-зависимого протеолиза X-ОП25 продукты гидролиза были проанализированы с помощью трех методов: ОФХ (рис. 1, а), ТСХ (рис. 1, б) и масс-спектрометрии (рис. 1, в–д). Видно, что два основных продукта являются 4- и 5-звенными ОП, и один минорный – 6-звенный ОП (рис. 1). Интересно, что только 4- и 5-звенные ОП образуются сразу после начала гидролиза X-ОП25 и остаются основными продуктами вплоть до полного расщепления ОП. Следует обратить внимание, что, согласно данным ОФХ (очень маленькие пики, например, рис. 1, а) и ТСХ (очень слабые пятна, рис. 1, б), конечная реакционная смесь содержала несколько X-ОП в очень маленьких количествах (~0,5%). Такие следовые продукты гидролиза не принимали в расчет при дальнейшем анализе результатов.

Стандартный MALDI-TOF спектрометрический анализ является полуколичественным методом и дает в основном информацию только о молекулярных массах анализируемых соединений. В некоторых случаях для дополнительной идентификации продуктов расщепления X-ОП25 с помощью масс-спектрометрии были проанализированы соединения, соответствующие различным пятнам продуктов после ТСХ. Приблизительное относительное содержание X-ОП различной длины в конечной реакционной смеси оценивали, принимая в расчет соотношение относительной флуоресценции соответствующих пятен после ТСХ (рис. 1, б): 4-звенный ОП > 5-звенный ОП ≥ 6-звенный ОП > все едва видимые, не идентифицированные продукты (табл. 1).

Можно было предположить, что абзимы, элюируемые с ИН-сефарозы раствором NaCl и кислым буфером, будут обладать различной специфичностью при гидролизе X-ОП25. Поэтому дополнительно были проанализированы продукты гидролиза X-ОП25 препаратами  $IgG_{(salt)mix}$ .

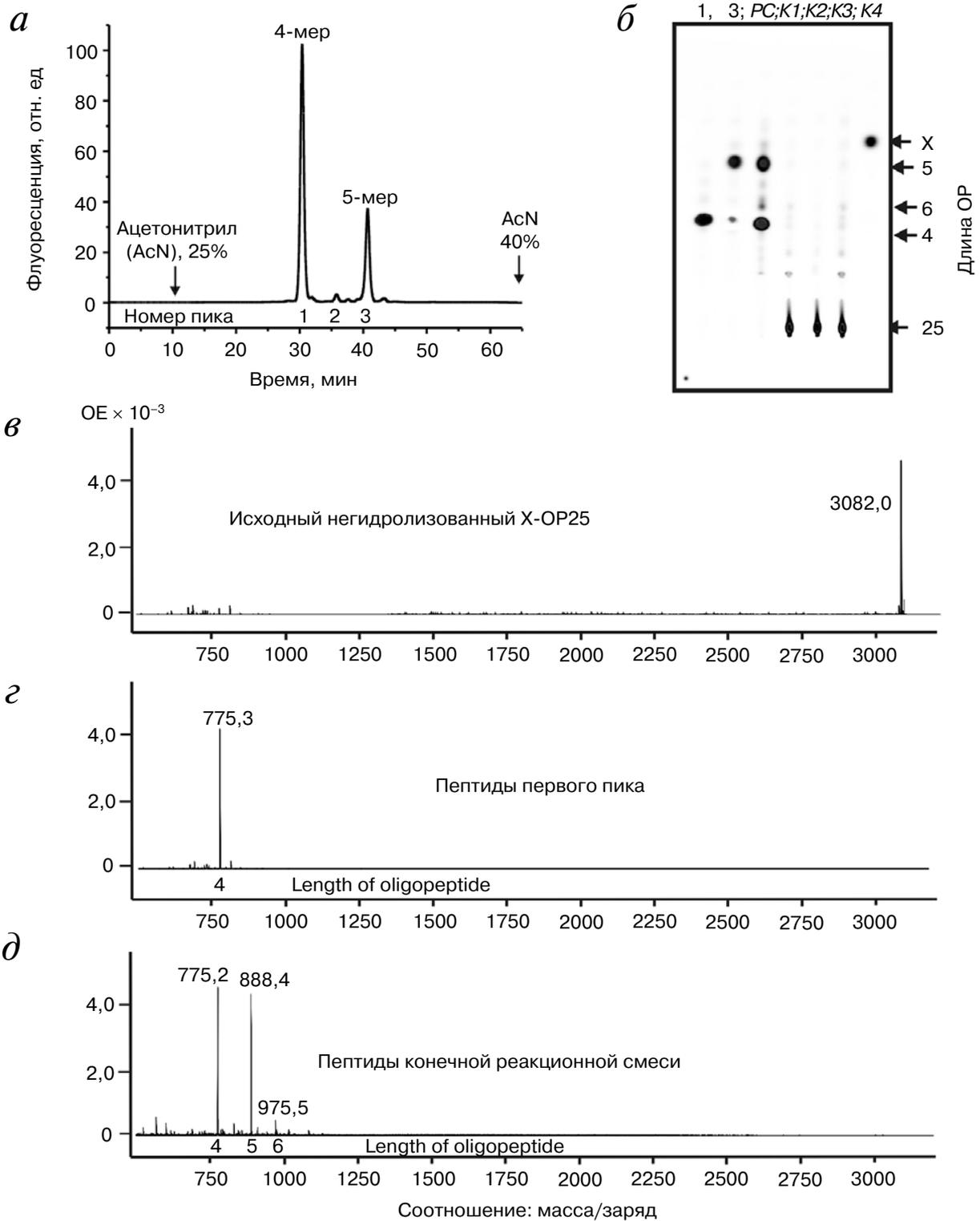
На профиле ОФХ было выявлено семь основных и семь очень маленьких пиков флуоресцентных продуктов гидролиза X-ОП25 (рис. 2, а).

Продукты всех пиков после ОФХ были проанализированы с помощью ТСХ (рис. 2, б) и масс-спектрометрии (например, рис. 2, в и г). Видно, что некоторые пики после ОФХ, согласно данным ТСХ, содержат несколько продуктов гидролиза. Это значит, что некоторые индивидуальные продукты гидролиза X-ОП25 могут элюироваться с сорбента различными концентрациями ацетонитрила. Реакционная смесь содержала Tris-HCl и трифторуксусную кислоту, которые могут взаимодействовать с положительно и отрицательно заряженными АК-остатками продуктов гидролиза X-ОП25. Кроме того, нельзя исключить, что некоторые продукты ОП могут образовывать межпептидные комплексы. Образование многочисленных продуктов гидролиза X-ОП25 приводит к элюции одних и тех же продуктов различными концентрациями ацетонитрила. Продукты гидролиза X-ОП25 были идентифицированы с использованием трех различных методов: ОФХ, ТСХ и MALDI масс-спектрометрии. Относительное содержание X-ОП различной длины в конечной реакционной смеси было оценено, принимая в расчет соотношение относительной флуоресценции соответствующих пятен после ТСХ (рис. 2, б): 5-звенный ОП > 4-звенный ОП > 6-звенный ОП ≥ 7-звенный ОП ≈ 8-звенный ОП ≈ 9-звенный ОП ≥ 21-звенный ОП ≥ 18-звенный ОП ≈ X ≥ 2-звенный ОП (табл. 2).

Иммунная система сначала продуцирует IgM, а позже IgG [1]. Нельзя было исключить, что IgM и IgG могут обладать различной субстратной специфичностью. Сначала нами был проведен анализ продуктов гидролиза X-ОП25 препаратом  $IgM_{(acid)mix}$ , элюированным с ИН-сефарозы с помощью 3 M NaCl как описано выше для препаратов IgG (рис. 3; табл. 3). Оценено относительное содержание продуктов гидролиза X-ОП: 4-звенный ОП ≥ 5-звенный ОП ≥ 6-звенный ОП ≥ 8-звенный ОП ≥ 9-звенный ОП ≈ 18-звенный ОП ≥ 7-звенный ОП ≥ 12-звенный ОП ≈ 21-звенный ОП ≈ 11-звенный ОП ≈ 10-звенный ОП ≈ 2-звенный ОП ≈ X (табл. 3).

Затем были оценены продукты гидролиза X-ОП25 препаратом  $IgM_{(salt)mix}$  (рис. 4; табл. 4). Относительное содержание продуктов гидролиза X-ОП25 уменьшалось в следующем порядке: 5– ≈ 4– ≥ 6– ≥ 7– ≥ 8– ≥ 21– ≥ 9– ≥ 10– ≥ 18– ≈ 1– ≈ 11– ≈ 2-звенный ОП ≈ X (табл. 4).

Эти данные указывают в пользу того, что специфические фракции IgG и IgM с разным сродством к ИН могут содержать абзимы, которые отличаются по эффективности гидролиза олигопептидов по разным сайтам их расщепления.



**Рис. 1.** Профиль ОФХ продуктов глубокого гидролиза X-OP25 (24 ч) анти-ИН-абзимами фракции IgG<sub>(acid)</sub>mix (а) и анализ продуктов гидролиза X-OP25, соответствующих пикам ОФХ (а), с помощью ТСХ (б) и масс-спектрометрии (в–д): (–) – относительная флуоресценция (а). Номера дорожек на пластине ТСХ (б) соответствуют номерам пиков ОФХ (а); дорожка PC – конечная реакционная смесь; дорожки K1 и K2 – X-OP25, инкубированный в отсутствие АТ и до инкубации, соответственно; дорожка K3 – X-OP25, инкубированный с IgG здорового донора; дорожка K4 – свободная флуоресцентная метка X; на графиках (в–д) представлены спектры MALDI: в – исходный X-OP25 ( $m/z = 3082,0$ ); г – продукты пика 1 (а); д – конечная реакционная смесь до ее разделения на фракции

**Таблица 1.** Данные анализа молекулярных масс и относительного количества флуоресцирующих ОП, образующихся после инкубации X-ОП25 с анти-ИН-абзимами IgG<sub>(acid)mix</sub> по данным ОФХ, ТСХ и MALDI масс-спектрометрии (рис. 1)

ОП, число АК-остатков	Сайты расщепления в X-ОП25 (X-ОП, обнаруженные масс-спектрометрией в реакционной смеси и в пиках после ОФХ)	Молекулярная масса, Да (отношение масса/заряд Н <sup>+</sup> -формы)		Пики после ОФХ (рис. 1, а)	Номер пятна после ТСХ (рис. 1, б)	Относительное содержание после глубокого гидролиза X-ОП25*, % (рис. 1, а)
		рассчитанная	экспериментальная			
0	свободное флуор. X**	417,0	417,2	—	PeC	~1,0 ± 0,3
4	X-AQGT	775,13	775,2	<b>1(2,3)</b> ***	1,3; PeC§	60 ± 7**
5	X-AQGTL	888,29	888,4	<b>3</b>	<b>3</b> , PeC	28 ± 3
6	X-AQGTLS	975,36	975,5	1(2); PeC	PeC	8 ± 2
Другие ОП	длина нескольких минорных ОП не определена	—	—	—	PeC	~3 ± 1
25	исходный X-ОП25	3081,84	3082,0	—	—	~0

\* Общее количество продуктов гидролиза принято за 100%; каждая величина рассчитана как среднее по данным трех экспериментов ТСХ.

\*\* Исходный X-ОП25 содержал флуоресцентную метку X.

\*\*\* Номера пиков, содержащих основную часть продукта, отмечены жирным шрифтом, а номера пиков, содержащих этот же ОП, как минорный продукт, даны в скобках.

§ Одни и те же продукты гидролиза X-ОП25 в пиках после ОФХ (рис. 1, а) были выявлены не только MALDI масс-спектрометрией, но также с помощью ТСХ (рис. 1, б). PeC отражает наличие флуоресцирующего пятна этого продукта в общей конечной реакционной смеси, анализируемой с помощью ТСХ (рис. 1, б), и пиках ОФХ (рис. 1, а).

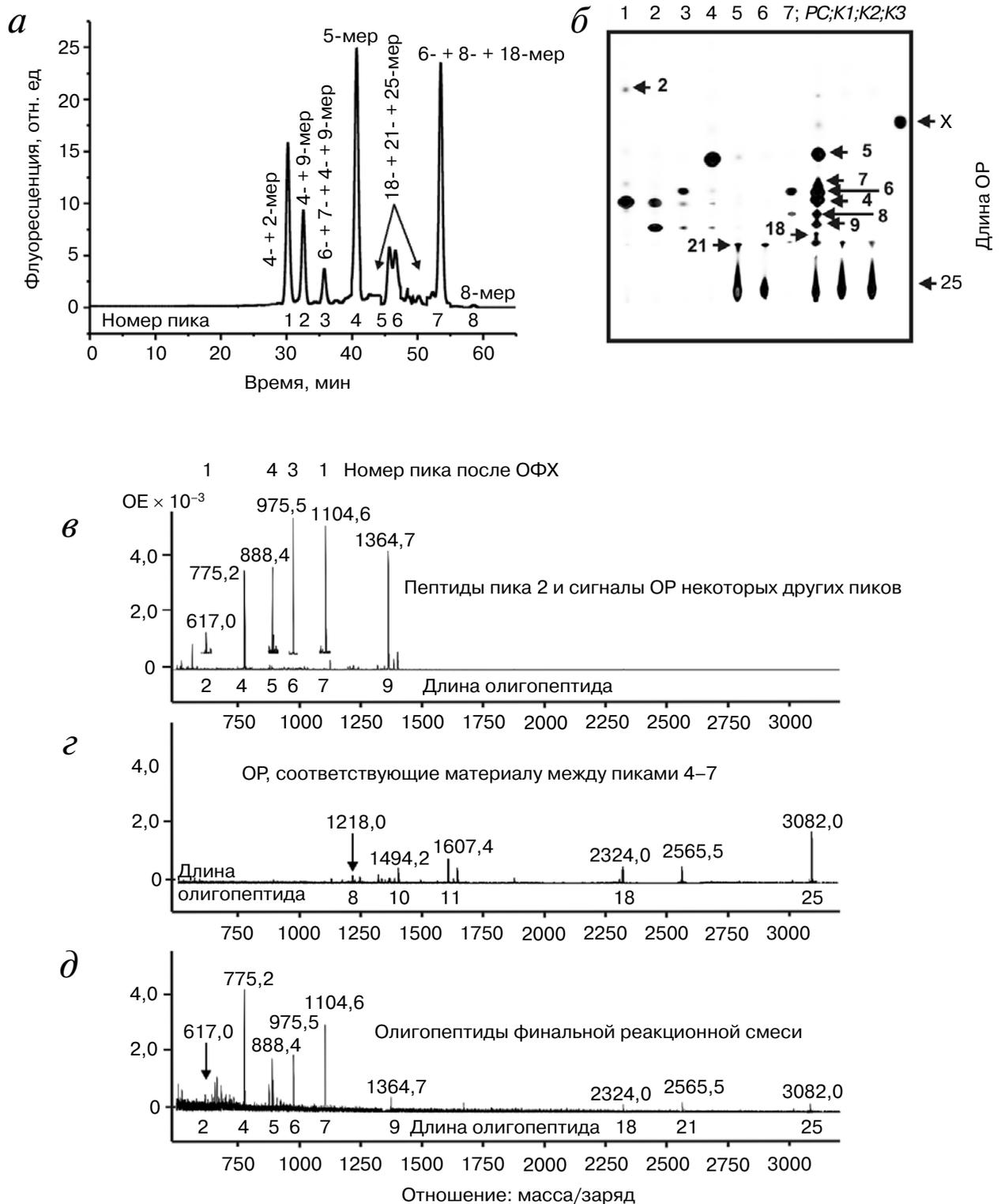
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Недавно было показано, что анти-ОБМ IgG и IgM из крови пациентов с РС [24–26] и СКВ [29, 30] эффективно гидролизуют только глобулярный ОБМ, и анти-ИН IgG и IgM из крови ВИЧ-инфицированных больных эффективно гидролизуют только интактную глобулярную ИН [17–20]. Эти абзимы не расщепляли другие исследованные глобулярные белки. Препараты IgG и IgM из крови здоровых доноров не гидролизуют ОБМ [24–26, 29, 30] или ИН [17–20]. Сайты расщепления ОБМ абзимами РС и СКВ [27, 29–32], также как и гидролиза ИН антителами ВИЧ-инфицированных больных [19], определенные с помощью масс-спектрометрии, локализованы соответственно в четырех и семи известных иммунодоминантных последовательностях ОБМ и ИН.

Следует отметить, что сначала для идентификации сайтов гидролиза ОБМ были использованы только крупные пептиды, которые образовались после АТ-зависимого гидролиза интактного глобулярного ОБМ за короткое время инкубации (рис. 5, в) [27]. Было обнаружено шесть

основных сайтов расщепления, расположенных в четырех иммуногенных последовательностях ОБМ. В то же время нами было показано, что длительная инкубация ОБМ с АТ из крови больных РС и СКВ (48–72 ч), особенно с абзимами с высокой протеолитической активностью, ведет к образованию коротких и очень коротких белковых фрагментов [29, 30]. Подобная ситуация наблюдалась для анти-ИН-абзимов из крови ВИЧ-инфицированных больных при гидролизе вирусной интегразы [19]. Это могло означать, что общий пул различных антител может содержать субфракции АТ против одного из белков, например ОБМ или ИН, которые не могут гидролизовать чужеродные глобулярные белки, но способны гидролизовать специфические белки-антигены и их фрагменты с различной эффективностью, по крайней мере, по нескольким сайтам.

В ряде работ было показано, что короткие неспецифические ОП могут быть субстратами абзимов, которые на уровне глобулярных белков специфически гидролизуют только белки-антигены. Антитиреоглобулин IgG с протеолитической активностью эффективно гидролизует



**Рис. 2.** Профиль ОФХ продуктов глубокого гидролиза X-ОП25 анти-ИН-абзимами фракции IgG<sub>(salt)mix</sub> (а) и анализ продуктов гидролиза X-ОП25, соответствующих пикам ОФХ (а) с помощью ТСХ (б) и масс-спектрометрии (в–д): (–) – относительная флуоресценция (а). Номера дорожек на пластине ТСХ (б) соответствуют номерам пиков ОФХ (а); дорожка PC – конечная реакционная смесь; дорожки K1 и K2 – X-ОП25, инкубированный в отсутствие АТ и до инкубации, соответственно; дорожка K3 – свободная флуоресцентная метка X. На панели в представлены спектры MALDI продуктов пика 2 (а), на панели г – сигналы ОП, элюированных в двух основных и нескольких минорных пиках между пиками 4 и 7 (а); д – пептиды конечной реакционной смеси до ее разделения на фракции

**Таблица 2.** Данные анализа молекулярных масс и относительного количества флуоресцирующих ОП, образующихся после инкубации X-ОП25 с анти-ИН-абзимами IgG<sub>(sal)mix</sub> по данным ОФХ, ТСХ и MALDI масс-спектрометрии (рис. 2)

ОП, число АК-остатков	Сайты расщепления в X-ОП25 (ОП, обнаруженные масс-спектрометрией в реакционной смеси и в пиках после ОФХ)	Молекулярная масса, Да (отношение масса/заряд H <sup>+</sup> -формы)		Пики после ОФХ (рис. 2, а)	Номер пятна после ТСХ (рис. 2, б)	Относительное содержание после глубокого гидролиза X-ОП25*, % (рис. 2, а)
		рассчитанная	экспериментальная			
0	X**	417,0	417,2	1	PeC	1,3 ± 0,5
2	X-AQ	616,97	617,0	1	1, PeC	0,7 ± 0,4
4	X-AQGT	775,13	775,2	<b>1(2)***</b>	<b>1(2), PeC<sup>§</sup></b>	15,0 ± 3,0
5	X-AQGTL	888,29	888,4	<b>4</b>	<b>4, PeC</b>	21,0 ± 4,0
6	X-AQGTL S	975,36	975,5	<b>3(7)</b>	<b>3(7), PeC</b>	12,0 ± 3,0
7	X-AQGTL SK	1104,54	1104,6	3	PeC	8,0 ± 2,0
8	X-AQGTL SK I	1217,7	1218,0	7(8) <sup>†</sup>	<b>7, PeC</b>	8,0 ± 3,0
9	X-AQGTL SK IF	1364,87	1364,7	<b>2(3)</b>	<b>2(3, 4), PeC<sup>§</sup></b>	7,0 ± 2,0
10	X-AQGTL SK IF K	1494,05	1494,2	5(6) <sup>†</sup>	–	<0,5
11	X-AQGTL SK IF KL	1607,21	1607,4	5(6) <sup>†</sup>	–	<0,5
18	X-AQGTL SK IF KL GGR-DSRS	2323,94	2324,0	5(6) <sup>†</sup>	5, 6, <b>PeC</b>	3,5 ± 1,0
21	<b>X-AQGTL SK IF KL GGR-DSRS GSP</b>	2565,18	2565,5	5(6) <sup>†</sup>	5(6), <b>PeC</b>	5,5 ± 1,0
25	<b>X-AQGTL SK IF KL GGR-DSRS GSP MARR</b>	3081,84	3082,0	<b>5(6)<sup>†</sup></b>	<b>5(6), PeC</b>	19,0 ± 4,0

\* Общее количество продуктов гидролиза принято за 100%; каждая величина рассчитана как среднее по данным трех экспериментов ТСХ.

\*\* Исходный X-ОП25 содержал флуоресцентную метку X.

\*\*\* Номера пиков, содержащих основную часть продукта, отмечены жирным шрифтом, а номера пиков, содержащих этот же ОП, как минорный продукт, даны в скобках.

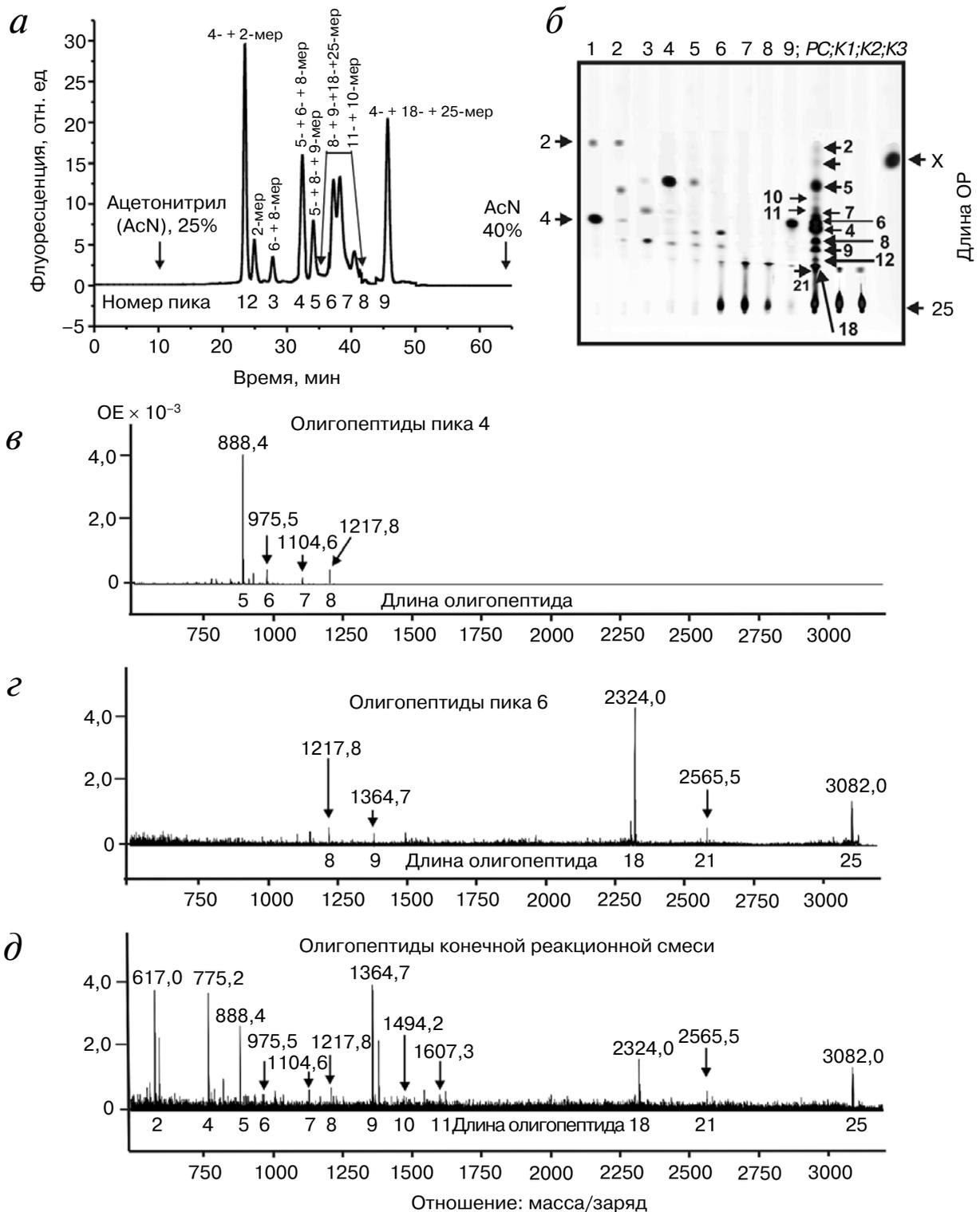
§ Одни и те же продукты гидролиза X-ОП25 в пиках после ОФХ (рис. 2, а) были выявлены не только MALDI масс-спектрометрией, но также с помощью ТСХ (рис. 2, б). PeC отражает наличие флуоресцирующего пятна этого продукта в общей конечной реакционной смеси, анализируемой с помощью ТСХ (рис. 2, б), и пиках ОФХ (рис. 2, а).

† Все основные и минорные пики между 4-м и 7-м, включая 5-й и 6-й (рис. 2, а).

вал не только тиреоглобулин, но также Pro-Phe-Arg-метилкумаринамид (МКА) по связи Arg–МКА со значительно меньшими сродством и эффективностью, чем тиреоглобулин [37]. Препараты IgG из крови пациентов с ревматоидным артритом также проявляли Pro-Phe-Arg-МКА-гидролизующую активность [38]. Белки Бенс-Джонса расщепляли несколько различных МКА-пептидов [39].

Ранее было показано, что анти-ИН-абзимы ВИЧ-инфицированных пациентов эффективно (за 0,5–3 ч инкубации) гидролизуют различные не только специфические ОП, соответствующие

иммуногенным последовательностям вирусной ИН, но и неспецифические три- и тетрапептиды [19, 20, 34]. Кроме того, анти-ИН-абзимы эффективно гидролизуют 20–25-мерные олигопептиды, соответствующие иммуногенным последовательностям обратной транскриптазы ВИЧ [34] и один 21-мерный ОП, соответствующий одной из иммунодоминантных последовательностей ОБМ человека [33]. Следует подчеркнуть, что анти-ОБМ-абзимы из крови больных РС и СКВ неспособны эффективно гидролизовать неспецифические три- и тетрапептиды, а также 20–25-мерные олигопептиды, соответству-



**Рис. 3.** Профиль ОФХ продуктов глубокого гидролиза X-ОП25 анти-ИН-абзимами фракции IgM<sub>(acid)</sub>mix (а) и анализ продуктов гидролиза X-ОП25, соответствующих пикам ОФХ (а) с помощью ТСХ (б) и масс-спектрометрии (в-д): (–) – флуоресценция в относительных единицах (а). Номера дорожек на пластине ТСХ (б) соответствуют номерам пиков ОФХ (а); дорожка PC – конечная реакционная смесь; дорожки K1 и K2 – X-ОП25, инкубированный в отсутствие АГ и до инкубации соответственно; дорожка K3 – X-ОП25, инкубированный с IgG здорового донора. На графиках (в-д) представлены спектры MALDI масс-спектрометрии: в, г – продукты пиков 4 и 6 (а); д – пептиды конечной реакционной смеси до ее разделения на фракции

**Таблица 3.** Данные анализа молекулярных масс и относительного количества флуоресцирующих ОП, образующихся после инкубации X-ОП25 с анти-ИН-абзимами IgG<sub>(acid)mix</sub> по данным ОФХ, ТСХ и MALDI масс-спектрометрии (рис. 3)

ОП, число АК-остатков	Сайты расщепления в X-ОП25 (ОП, обнаруженные масс-спектрометрией в реакционной смеси и в пиках после ОФХ)	Молекулярная масса, Да (отношение масса/заряд Н <sup>+</sup> -формы)		Пики после ОФХ (рис. 3, а)	Номер пятна после ТСХ (рис. 3, б)	Относительное содержание после глубокого гидролиза X-ОП25*, % (рис. 3, а)
		рассчитанная	экспериментальная			
0	X**	417,0	417,2	—	PeC	0,9 ± 0,2
2	X-AQ	616,97	617,0	1	1, PeC	1,1 ± 0,2
4	X-AQGT	775,13	775,2	<b>1(9)***</b>	<b>1(9), PeC<sup>§</sup></b>	15,1 ± 3,0
5	X-AQGTЛ	888,29	888,4	<b>4(5)<sup>†</sup></b>	<b>4(5), PeC<sup>†</sup></b>	14,2 ± 2,5
6	X-AQGTЛS	975,36	975,5	<b>3(4)</b>	<b>3(4), PeC</b>	12,6 ± 1,5
7	X-AQGTЛSK	1104,54	1104,6	4	4, PeC	7,3 ± 0,6
8	X-AQGTЛSKI	1217,7	1218,0	4(5, 6)	4(5, 6), PeC	9,2 ± 1,5
9	X-AQGTЛSKIF	1364,87	1364,7	6	6, PeC	7,8 ± 1,3
10	X-AQGTЛSKIFK	1494,05	1494,2	2	2, PeC	1,0 ± 0,2
11	X-AQGTЛSKIFKL	1607,21	1607,4	3	3, PeC	2,1 ± 0,4
12	X-AQGTЛSKIFKЛG	1664,26	1664,5	4(5)	4(5), PeC	3,0 ± 0,7
18	<b>X-AQGTЛSKIFKЛGGRD-SRS</b>	2323,94	2324,0	<b>7, 8(6)</b>	<b>7, 8(6), PeC</b>	7,8 ± 1,4
21	<b>X-AQGTЛSKIFKЛGGRD-SRSGSP</b>	2565,18	2565,5	7(6)	7(6), PeC	3,0 ± 0,6
25	<b>X-AQGTЛSKIFKЛGGRD-SRSGSPMARR</b>	3081,84	3082,0	<b>7(6, 8)</b>	<b>7(6, 8), PeC</b>	15,0 ± 3,0

\* Общее количество продуктов гидролиза принято за 100%; каждая величина рассчитана как среднее по данным трех экспериментов ТСХ.

\*\* Исходный X-ОП25 содержал флуоресцентную метку X.

\*\*\* Номера пиков, содержащих основную часть продукта, отмечены жирным шрифтом, а номера пиков, содержащих этот же ОП, как минорный продукт, даны в скобках.

§ Одни и те же продукты гидролиза X-ОП25 в пиках после ОФХ (рис. 3, а) были выявлены не только MALDI масс-спектрометрией, но также с помощью ТСХ (рис. 3, б). PeC отражает наличие флуоресцирующего пятна этого продукта в общей конечной реакционной смеси, анализируемой с помощью ТСХ (рис. 3, б), и пиках ОФХ (рис. 3, а).

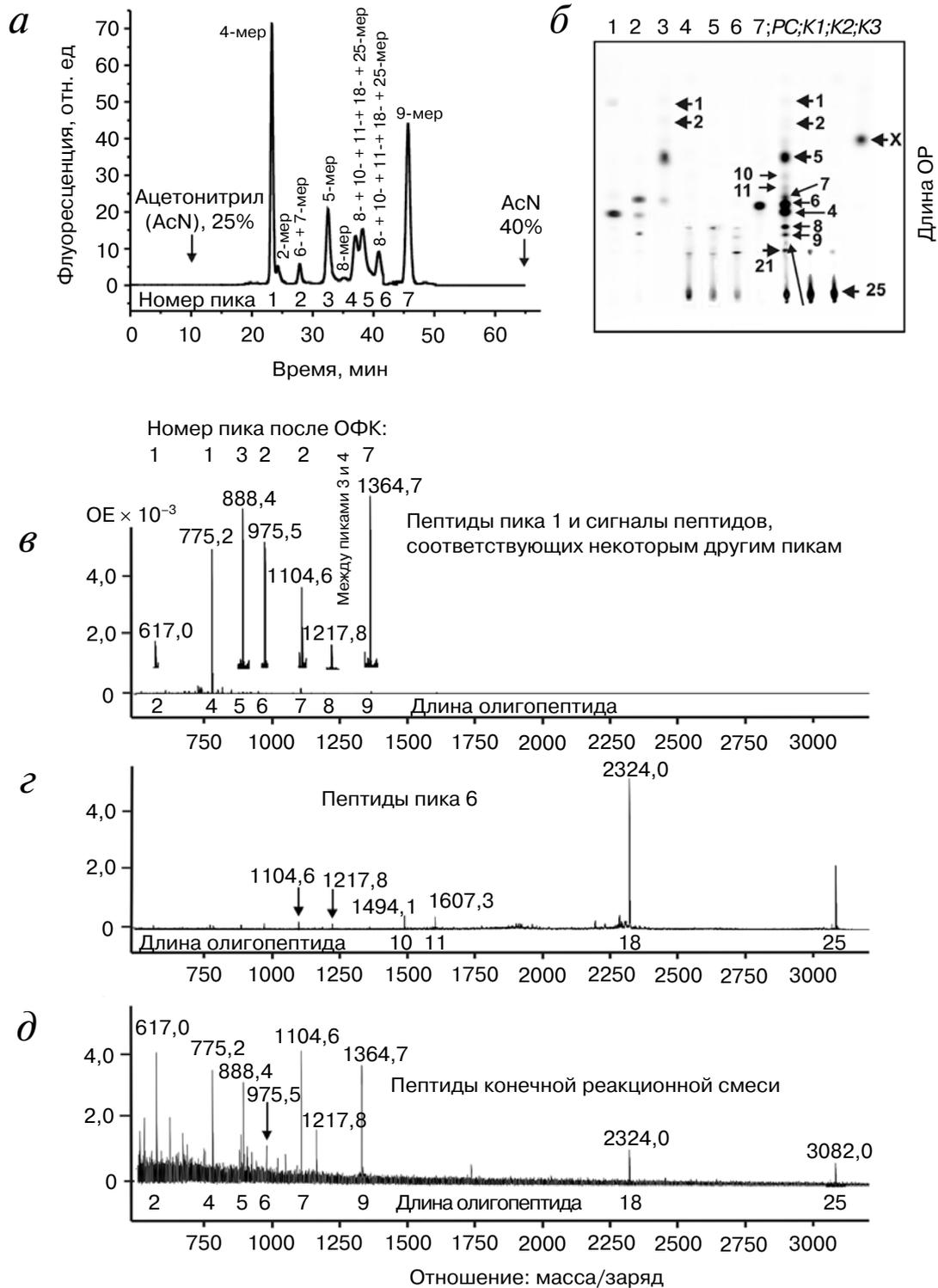
† Все основные и минорные пики между 4-м и 7-м, включая 5-й и 6-й (рис. 3, а).

ющие ОТ и ИН вируса иммунодефицита; заметный гидролиз мог быть достигнут только после 4–6 дней инкубации [30, 31]. В настоящей работе мы попытались провести анализ возможных причин значительных различий гидролиза глобулярных белков, относительно коротких и длинных специфических и неспецифических олигопептидов специфическими антителами против различных белков.

Одной из возможных причин эффективного гидролиза анти-ИН-абзимами X-ОП25 мог быть высокий уровень гомологии между после-

довательностями, эффективно расщепляемыми анти-ИН- и анти-ОБМ-абзимами. Поэтому представлял интерес анализ возможных различий в сайтах расщепления X-ОП25 анти-ОБМ- и анти-ИН-абзимами, а также анализ возможной гомологии последовательностей олигопептидов, расщепляемых анти-ОБМ- и анти-ИН-абзимами, между собой и с полными последовательностями ОБМ и ИН.

На рис. 5, а суммированы данные по гидролизу X-ОП25 (сайтам расщепления) с помощью четырех препаратов анти-ИН-абзимов. Видно,



**Рис. 4.** Профиль ОФХ продуктов глубокого гидролиза X-ОП25 анти-ИН-абзимами фракции IgM<sub>(salt)mix</sub> (а) и анализ продуктов гидролиза X-ОП25, соответствующих пикам ОФХ (а) с помощью ТСХ (б) и масс-спектрометрии (в–д): (–) – относительная флуоресценция (б). Номера дорожек на пластине ТСХ (б) соответствуют номерам пиков ОФХ (а); дорожка PC – конечная реакционная смесь; дорожки K1 и K2 – X-ОП25, инкубированный в отсутствие АТ и до инкубации, соответственно; дорожка K3 – свободная флуоресцентная метка X. На графике в представлены в относительных единицах (ОЕ) спектры MALDI масс-спектрометрии продуктов пика 1 (а); в – сигналы ОП пика 6 (а); г – пептиды конечной реакционной смеси до ее разделения на фракции. В целом сайты расщепления X-ОП25 и X-ОП21 АТ против ОБМ и ИН сгруппированы в два кластера (рис. 5), имеющих высокий уровень гомологии с ин-ОП1 и ин-ОП2 (рис. 7)

**Таблица 4.** Данные анализа молекулярных масс и относительного количества флуоресцирующих ОП, образующихся после инкубации X-ОП25 с анти-ИН-абзимами IgG<sub>(salt)mix</sub> по данным ОФХ, ТСХ и MALDI масс-спектрометрии (рис. 4)

ОП, число АК-остатков	Сайты расщепления в X-ОП25 (ОП, обнаруженные масс-спектрометрией в реакционной смеси и в пиках после ОФХ)	Молекулярная масса, Да (отношение масса/заряд Н <sup>+</sup> -формы)		Пики после ОФХ (рис. 4, а)	Номер пятна после ТСХ (рис. 4, б)	Относительное содержание после глубокого гидролиза X-ОП25*, % (рис. 4, а)
		рассчитанная	экспериментальная			
0	X**	775,13	775,2	—	PeC	0,4 ± 0,2
1	X-A	488,84	489,0	3	3, PeC	0,9 ± 0,4
2	X-AQ	775,13	775,2	3	3, PeC	0,4 ± 0,2
4	X-AQGT	775,13	775,2	<b>1(2)***</b>	<b>1(2), PeC<sup>§</sup></b>	17,3 ± 3,6
5	X-AQGTL	888,29	888,4	<b>3</b>	<b>3, PeC</b>	19,4 ± 4,0
6	X-AQGTL S	975,36	975,5	7(2,3)	7(2, 3), PeC	18,6 ± 3,4
7	X-AQGTL SK	1104,54	1104,6	<b>PeC<sup>§</sup></b>	<b>PeC</b>	8,5 ± 1,6
8	X-AQGTL SKI	1217,7	1218,0	<b>5(4, 6)</b>	<b>5(4, 6), PeC</b>	7,9 ± 1,4
9	X-AQGTL SKIF	1364,87	1364,7	<b>2(6)</b>	<b>2(6), PeC</b>	4,0 ± 0,8
10	X-AQGTL SKIFK	1494,05	1494,2	PeC	PeC	1,6 ± 0,4
11	X-AQGTL SKIFKL	1607,21	1607,4	PeC	PeC	0,6 ± 0,2
18	<b>X-AQGTL SKIFKL GGRD-SRS</b>	2323,94	2324,0	<b>6(4, 5)</b>	<b>6(4, 5), PeC</b>	0,9 ± 0,3
21	<b>X-AQGTL SKIFKL GGRD-SRSGSP</b>	2565,18	2565,5	6	6, PeC	6,8 ± 1,2
25	<b>X-AQGTL SKIFKL GGRD-SRSGSPMARR</b>	3081,84	3082,0	<b>6(4, 5)</b>	<b>6(4, 5), PeC</b>	12,7 ± 2,5

\* Общее количество продуктов гидролиза принято за 100%; каждая величина рассчитана как среднее по данным трех экспериментов ТСХ.

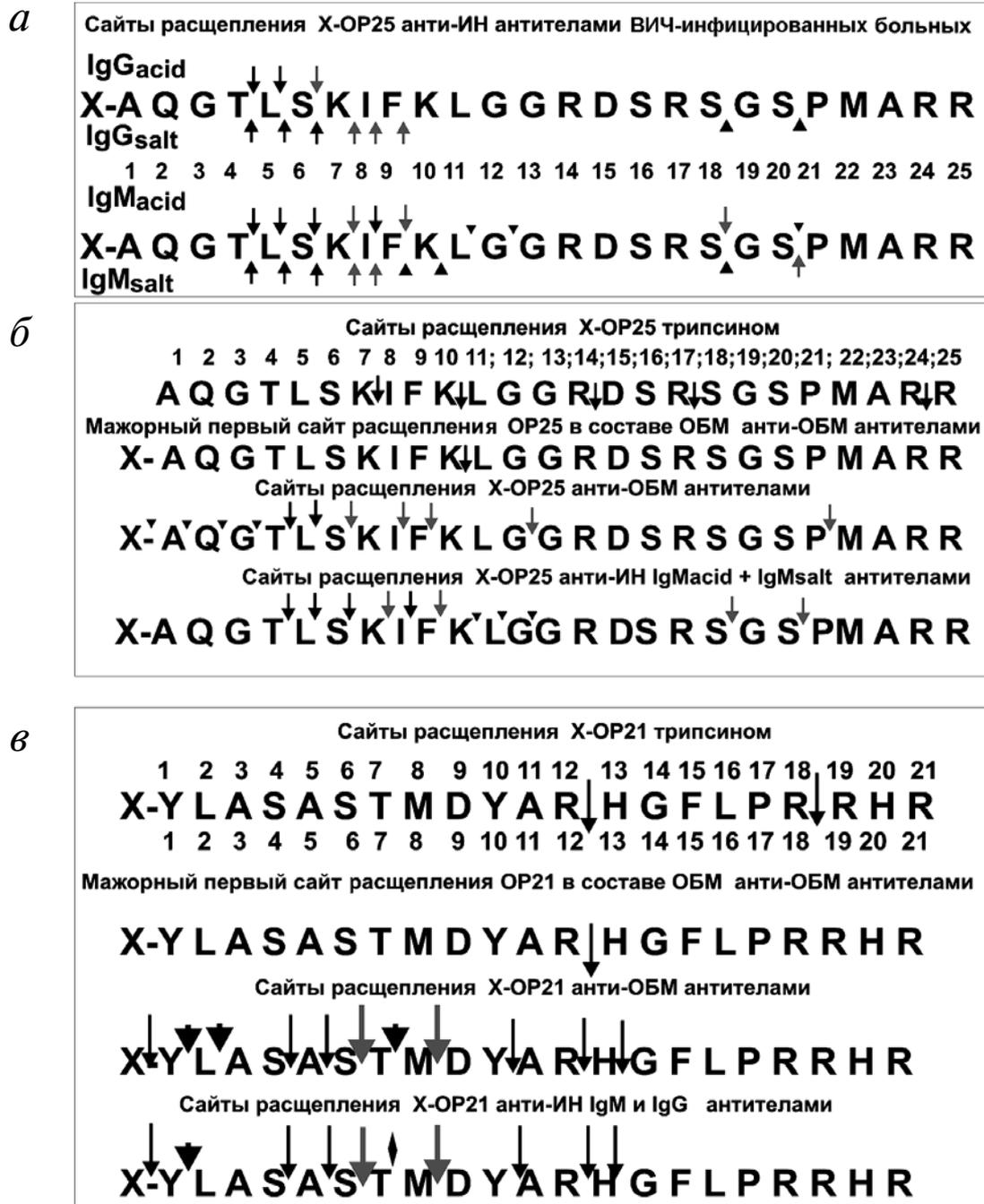
\*\* Исходный X-ОП25 содержал флуоресцентную метку X.

\*\*\* Номера пиков, содержащих основную часть продукта, отмечены жирным шрифтом, а номера пиков, содержащих этот же ОП, как минорный продукт, даны в скобках.

§ Одни и те же продукты гидролиза X-ОП25 в пиках после ОФХ (рис. 4, а) были выявлены не только MALDI масс-спектрометрией, но также с помощью ТСХ (рис. 4, б). PeC отражает наличие флуоресцирующего пятна этого продукта в общей конечной реакционной смеси, анализируемой с помощью ТСХ (рис. 4, б), и пиках ОФХ (рис. 4, а).

что глубокий гидролиз этого ОП IgG<sub>(acid)mix</sub> (24 ч) приводит к образованию двух основных и одного минорного ОП: 4-звенный ОП > 5-звенный ОП > 6-звенный ОП (табл. 1). В начальный период гидролиза обнаруживались только 4-звенный и 5-звенный ОП. Подобная закономерность наблюдалась и для IgG<sub>(salt)mix</sub> (рис. 2; табл. 2). В то же время в последнем случае обнаружены дополнительные продукты расщепления: 7-, 8-, 9-, 18- и 21-звенный олигопептиды. В случае препаратов IgM<sub>(acid)mix</sub> и IgM<sub>(salt)mix</sub> было обнаружено больше сайтов расщепления X-ОП25, чем для

препаратов IgG<sub>(acid)mix</sub> и IgG<sub>(salt)mix</sub>. IgM<sub>(acid)mix</sub> гидролизует X-ОП25 с образованием дополнительно 11-, 12-, 18- и 21-звенные X-ОП. В случае IgM<sub>(salt)mix</sub> 11- и 12-звенные ОП не образуются, но образуется 10-звенный ОП (рис. 5, а; табл. 3 и 4). В целом в совокупности все анти-ИН-абзимы гидролизуют X-ОП25 по 9 кластеризованным сайтам, начиная с 4-го (Thr-Leu) до 12-го (Gly-Gly) АК-остатка ОП-25 (рис. 5, б, нижняя строка). Еще два сайта расщепления ОП соответствовали положениям 18 (связь Ser-Gly) и 21 АК остатка (связь Ser-Pro). Следует отметить,



**Рис. 5.** Сайты расщепления белков и олигопептидов трипсином и абзимами. Для всех последовательностей показаны все мажорные (жирные стрелки), умеренные (ромбы) и слабые (короткие стрелки) сайты расщепления. Сайты гидролиза олигопептида ОБМ X-OP25 с помощью двух препаратов IgG и двух препаратов IgM абзимов из крови ВИЧ-инфицированных больных, идентифицированные сочетанием методов ОФХ, ТСХ и масс-спектрометрией показаны на панели (а). Сайты расщепления ОП кластеризованы в двух в некоторой степени удаленных друг от друга фрагментах последовательностей (показано скобками). На панели б показаны четыре сайта расщепления трипсином последовательности ОП25 в составе глобулярного интактного ОБМ и один сайт гидролиза ОБМ, соответствующий последовательности ОП25 в начальный момент инкубации ОБМ с анти-ОБМ-абзимами из крови больных РС и СКВ; сайты расщепления X-OP25 анти-ОБМ-абзимами больных РС и СКВ, а также все сайты расщепления X-OP25 анти-ИН IgG и IgM абзимами при ВИЧ-инфекции; в – сайты расщепления последовательности ОП21 трипсином, один сайт гидролиза ОБМ, соответствующий последовательности ОП21 в начальный момент инкубации ОБМ с анти-ОБМ-абзимами из крови больных РС и СКВ; все сайты гидролиза X-OP21 IgG и IgM анти-ОБМ-антителами [30], а также все сайты гидролиза X-OP21 IgG и IgM анти-ИН-антителами из крови ВИЧ-инфицированных больных [33]. Для анализа сайтов расщепления ОП21 и ОП25 использованы препараты IgG<sub>mix</sub> и IgM<sub>mix</sub>, описанные в работе [33]

что образование только основных продуктов глубокого гидролиза X-ОП25 наблюдали и после короткого времени инкубации (1–3 ч).

Было проведено сравнение паттернов гидролиза олигопептида X-ОП25 трипсином (сайты расщепления трипсином вычислены теоретически, рис. 5, б, строка первая), анти-ОБМ-антителами из крови больных РС и анти-ИН-абзимами ВИЧ-инфицированных больных, а также гидролиза глобулярного ОБМ анти-ОБМ-антителами пациентов с РС и СКВ (рис. 5, в). Оказалось, что один из сайтов расщепления X-ОП25 анти-ИН АТ совпадал с одним из пяти возможных сайтов расщепления ОП трипсином (рис. 5, б, строки первая и четвертая).

Для абзимов больных РС ранее был идентифицирован основной сайт АТ-зависимого расщепления последовательности ОП25 в составе интактного ОБМ, которому соответствует образование 10-мерного ОП (рис. 5, б, строка вторая) [27]. Анти-ОБМ-антитела не гидролизовали X-ОП25 ни по сайтам трипсинолиза, ни с образованием 10-мерного ОП (рис. 5, б, строка третья). Анти-ИН-абзимы не расщепляли X-ОП25 по трем из пяти трипсин-зависимых сайтов, но гидролизовали с низкой эффективностью связи Lys–Ile и Lys–Leu с образованием 7- и 10-звенных ОП (рис. 5, б).

Несколько сайтов расщепления в первом кластере TLSKIFKLGG олигопептида X-ОП25 оказались одинаковыми, как для анти-ОБМ-абзимов (рис. 5, б, строка третья), так и для анти-ИН-антител (рис. 5, б, строка четвертая). Кроме того, в обоих случаях расщепление TLS-последовательности приводило к образованию 4- и 5-звенных олигопептидов, которые являлись основными продуктами гидролиза. Однако, в отличие от анти-ОБМ АТ, анти-ИН-абзимы не имели сайтов расщепления в первом кластере X-ОП25, соответствующих образованию 1-, 2- и 3-звенных ОП. Во втором кластере, соответствующем образованию 18- и 20-мерных продуктов в случае анти-ИН-абзимов (рис. 5, б, строка четвертая), этих продуктов не было при расщеплении ОП анти-ОБМ-абзимами (строка третья).

На рис. 5, в приведены ранее опубликованные данные по гидролизу X-ОП21 трипсином (строка 1), анти-ОБМ АТ пациентов с РС и СКВ (строка 2), а также анти-ИН IgG<sub>mix</sub> и IgM<sub>mix</sub> абзимами ВИЧ-инфицированных больных (строка 3), которые были использованы ранее [33] и в данной работе. Кроме того, на рис. 5, в (строка 4) приведены данные по гидролизу X-ОП21 анти-ОБМ-абзимами из крови больных СКВ [31]. Видно, что один из двух возможных сайтов расщепления X-ОП21 трипсином совпадает с сайтом расщепления АК последовательности ОП21

в составе интактного ОБМ на ранних стадиях гидролиза этого белка анти-ОБМ АТ из крови пациентов с РС и СКВ (сравни строки 1 и 2). Если сайты расщепления X-ОП25 анти-ОБМ АТ и анти-ИН-абзимами очень похожи, но все же различаются (рис. 5, б), то в случае X-ОП21 они практически (за исключением одного сайта) совпадают (рис. 5, в, ср. строки 3 и 4).

Согласно литературным данным, в ИН ВИЧ есть 7 иммуногенных АК-последовательностей, включающих остатки 5–22 (ИАП1), 14–35 (ИАП2) [40], 58–141 (ИАП3), 141–172 (ИАП4), 248–264 (ИАП5) [41], 208–228 (ИАП6) и 251–271 (ИАП7) [42] (рис. 6). В данной работе мы впервые провели анализ гомологии последовательностей ОП25 и ОП21 с таковой для ИН (рис. 6).

Оказалось, что оба олигопептида (ОП25 и ОП21) на 28–40% гомологичны 10 фрагментам полной последовательности ИН. На рис. 6 приведены данные только для 6 из 10 фрагментов ИН гомологичных ОП25 и ОП21; некоторые АК-остатки полностью совпадали (отмечены звездочкой), в то время как другие имели хорошее соответствие структурных и физико-химических свойств (отмечены двоеточием). Интересно, что ОП25 и ОП21 сами в заметной степени гомологичны, 28,6% (рис. 7).

Как было показано в работе [34], анти-ИН-абзимы эффективно расщепляют олигопептиды, соответствующие сайтам расщепления вирусной обратной транскриптазы, АТ против этого белка из крови ВИЧ-инфицированных больных. Таким образом, не исключено, что частичной гомологии и структурного подобия АК между последовательностями различных ОП и последовательностями ИН, содержащими АТ-зависимые сайты расщепления, может быть достаточно для их эффективного расщепления неспецифических ОП анти-ИН-абзимами.

Согласно литературным данным, в ОБМ есть четыре иммуногенные АК-последовательности, включающие остатки 11–32 (ИАП1), 83–99 (ИАП2), 111–129 (ИАП3), 145–170 (ИАП4) [27] (рис. 6). Интересно, что 20-мерные олигопептиды ин-ОП1 и ин-ОП2, соответствующие иммуногенным последовательностям ИН, которые содержат сайты АТ-зависимого расщепления, также частично гомологичны (20–50%) некоторым фрагментам ОБМ. На рис. 7 приведено только по четыре из семи в разной степени гомологичных фрагментов ОБМ и ин-ОП. Кроме того, два фрагмента по четыре звена ин-ОП1 и ин-ОП2 имеют 50%-ную гомологию (рис. 7).

В целом сайты расщепления X-ОП25 и X-ОП21 АТ против ОБМ и ИН сгруппированы и два кластера (рис. 5), имеющих высокий уровень гомо-

**Аминокислотная последовательность ОБМ человека**

**OP21**

- 1- AAQKRPSQRSKY1LASASTMDHARHGFLPRRHRDTGILDSLGRFFGSDRGAPKRGSGK- 57  
 56-DGHHAARTTHYGSLPQKAQGHHPQDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSW- 116  
 117- GAEGQKPGFGY3GGRASDYKSAHKGLKGHDA4QGTLSKIFKLGGRRDSRSGSPMARR - 170  
 OP25

**Аминокислотная последовательность интегразы ВИЧ-1**

- 1-MALNGIDKAQEDHEKYHSNWRAMVSDFNLPVVAKEIVASCDKCQLKGEAMHGQVDCSPGIWQLDCTH- 68  
 69-LEGKILVAVHVASGYIEAEVIPAETGQETA1YFLKLAGRWPVKTIHTDNGSNFTSTTVKAACWWAGIKQE- 139  
 140-4FGIPYNPOSQGVVESMNNELKKIIGQVRDQAEHLKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGGYSAGERIVDIIATDIQT- 211  
 212-5KELOKQITKIQNFRVYYRDNKDPLWKGPALKLWKGEGAVVIQDNSDIKVVPRR6KAKIIRDYQKQ7MAGDD- 280  
 CVASRODED - 289

*a*

	40	50	100	110	120
ИИ	AKEIVASCDKC-QLKGEAMHGQVDC---SP		AETGQET-A-YFLLKLAGRWPVKTIHTDN--GS		
	*: * * * : * * * : * * **		** * * * * * * * * * * ** **		
OP25	AQGTLS---KIFKL-G----GR-DSRSGSP		AQ-G--TLISKIF--KLGR-----DSRSGS		
	10 20		10 20		
150	160	170	180	220	230
180	190	200	210	240	250
SQGVVESMNNELKKI--IGQVRDQAEHLKTAVQMA				QKQITKIQNFRVYYRDNKDPLWKG-P-AK	
:*:* * ** : * * * : * : * * *				* : * * * : * * * : * * * :	
AQGTLS-S-----KIFKLGGRD-S---RSGSPMA				QGTLSKI--FKLGGRRDSRS---GSPMAR	
	10 20			10 20	
240	250	260	270	280	
KGP-AKLLWK-GEGAVVIQDN-SDIKVVP--RR			AKIIRDYQKQAGDDCVASR		
:* : * : * * * : * : * * **			: * * : * * * * * **		
QGTLSKIF-KLG-G---RDSRSG---SPMARR			SKI---F-K-LGGRD---SR		
	10 20		10		

*б*

	10	20	30	40	50
ИИ	AQE-DHEKYHSNWRAMVSDFNLP			ASC-DKCQLKGEAMHG	
	* ** : * * **			** * : * **	
OP21	ASTMDHAR-HG-----F-LP			ASTMD-----HARHG	
	10			10	
100	110	120	130	140	150
160	170	180	190	200	210
YFLLKLAGRWPVKTI-HTDNGSNF				HLKTAVQ--AVFIHNF--KR	
* ** * * : * : * * *				: * : * * * * * * : *	
Y---LAS---ASTMDHARHG--F				YLASASTMDHAR--HGFLPRR	
	10			10	
250	260	270	280	290	300
AVVIQDNSDIK--VVPRR				YGKQAGDDCVASRQD	
* : * * : * : * * * *				* : * * * *	
ASTM-DHA--RHGFLPRR				Y---LAS---ASTMD	
	10			4	

**Рис. 6.** Полные АК последовательности ОБМ человека и интегразы ВИЧ-1. Подчеркнуты фрагменты четырех и семи известных иммунодоминантных последовательностей соответственно ОБМ и ИИ, а также показано положение последовательностей пептидов OP25 и OP21 в полной последовательности ОБМ (обозначения приведены на рисунке). *a* – Данные гомологии олигопептидов OP25 (*a*) и OP21 (*б*) с различными фрагментами последовательности интегразы ВИЧ; приведены данные гомологии для шести из десяти фрагментов белковых последовательностей. Идентичные аминокислотные остатки (а.о.) обозначены звездочкой (\*), а.о. с близкими физико-химическими свойствами – двоеточием (:)

**Анализ гомологии полной последовательности ОБМ с таковой для 20-мерного ин-ОП1 интегразы ВИЧ: EHEKYHSNWRAMASDFNLPP**

	10	20		60	70
ОБМ	QRSKYLASASTMDHARHGF-LP			GKDGHNAA-RT- THYGS LP	
	:::* * :: : * * : * **			::: *::: * : : : : **	
ин-ОП1	EHEKYHSNWRAM--ASD-FNLP			EHEKYHSNWRAMASDF-NLP	
	1	19		1	19
107	115			127	135
RGLSLSRFS				YGG--RA--SDYK	
* : : * * :				* : ** * : :	
RAMA-SDFN				YHSNWRAMASDFN	
10	17			5	17

**Анализ гомологии полной последовательности ОБМ с таковой для 20-мерного ин-ОП2 интегразы ВИЧ: VESMNKELKKIIGQVRDOAE**

	10	25		70	83
ОБМ	RSKYLASASTMDHARH			SLPQKAQGH-RPQDE	
	::* * : : : : * :			:* : * * : * * : *	
ин-ОП2	MNKELK--KIIGQVRD			EL-KKIIGQVRDOAE	
	4	17		10	20
135	142			150	160
KSAHKGLK				TLSKIFKLGGRD	
:* : * : **				:* : ** : * **	
ESMNKELK				ELKKI--IGQVRD	
1	8			7	17

**Анализ гомологии между олигопептидами ИН и ОБМ, гидролизуемыми АТ против этих антигенов**

25,0% идентичности			46,2% идентичности		
	11	18		7	15
ин-ОП1	AMASDFNL		ин-ОП2	ELKKI--IGQVRD	
	::: * : *			:* : ** : * **	
ОП25	TLSKIFKL		ОП25	TLSKIFKLGGRD	
	4	11		4	15
33,3% идентичности			28,6% идентичности		
	5	19		13	19
ин-ОП1	YHSNWRAM--ASD-FNLP		ин-ОП2	GQVRDQA	
	* : : : * * : : * **			: : * : *	
ОП21	YLASASTMDHARHGF-LP		ОП21	ASTMDHA	
	1	19		5	11

**Анализ гомологии между собой олигопептидов ин-ОП1 - ин-ОП2 и ОП25 - ОП21**

50 и 50% идентичности			28,6% идентичности		
	1	4	10	14	
ин-ОП1	EHEK	RAMA	ОП25	FKLGG--RD-SRSGSPMARR	
	* : *	* : *		: * : : * : * * : : **	
ин-ОП2	ELKK	RDQA	ОП21	Y-LASASTMDHARHGF-LPRR	
	7	10		1	19

Рис. 7. Данные гомологии олигопептидов ин-ОП1 и ин-ОП2 с различными фрагментами полной последовательности ОБМ человека (приведены данные гомологии для четырех из семи фрагментов белковых последовательностей) между олигопептидами ИН (ин-ОП1 и ин-ОП2) и ОБМ (ОП21 и ОП25), гидролизуемыми абзимами против этих белков, а также между собой ин-ОП1 – ин-ОП2 и ОП21–ОП25. Идентичные аминокислотные остатки (а.о.) обозначены звездочкой (\*), а.о. с близкими физико-химическими свойствами – двоеточием (:)

логии с ин-ОП1 и ин-ОП2 (рис. 7); полная идентичность АК-остатков варьирует от 25 до 46,2% (рис. 7). Аналогичного рода частичная гомология (18–50% идентичности АК-остатков) наблюдается и для некоторых фрагментов последовательности ОБМ и ОП, соответствующими расщепляемым последовательностям интегразы ВИЧ (ин-ОП1 и ин-ОП2, рис. 7). Однако, с нашей точки зрения, вопрос о факторах, важных для расщепления чужеродных ОП абзимами, может быть гораздо более сложным. Помимо полной идентичности АК-остатков последовательностей важную роль для эффективного гидролиза может играть пространственная структура олигопептидов, которая зависит не только от полного совпадения некоторых АК, но и наличия в анализируемых последовательностях других АК с близкими физико-химическими свойствами. Если учесть два этих фактора, то схожесть анализируемых последовательностей гораздо выше. Например, для случая 18% идентичности АК (отмечены на рис. 7 звездочкой) с учетом АК с близкими физико-химическими свойствами (отмечены на рис. 7 двоеточием) процент сходства общих физико-химических параметров ОП достигает 71%, а для ОП, демонстрирующих 46–50% идентичных АК – 75–88% близости физико-химических свойств этих последовательностей.

Тем не менее, в случае абзимов против других белков, кроме ИН, частичной гомологии и структурного сходства последовательностей может быть недостаточно для эффективного гидролиза чужеродных ОП. Так, эффективного расщепления пептидов ИН и ОТ анти-ОБМ-абзимами не наблюдается [31, 33, 34]. Следовательно, можно предположить, что в случае каких-то АТ (типа абзимов против ИН) частичная гомология и общее сходство в структуре последовательностей может играть существенную роль в расщеплении «чужеродных» пептидов, а для других – нет.

Интересен вопрос: почему абзимы очень специфичны к глобулярным белкам, но многие из них способны эффективно расщеплять неспецифические три- и тетрапептиды [34, 37–39]. Известно, что каталитические центры протеолитических абзимов обычно локализованы в варибельной части легкой цепи, в то время как тяжелая цепь отвечает за специфическое узнавание антигена и увеличение сродства антигена к АТ. Так, с использованием Ds-Na-электрофореза (диссоциирующие условия, в присутствии ДТТ) и геля, содержащего полимеризованный субстрат, локализация активного центра на легких цепях показана для ДНК- и РНК-гидролизующих АТ из крови больных различными ауто-

иммунными [43–45], бактериальными и вирусными заболеваниями [46, 47], женского молока [48] и крови аутоиммунных мышей [49]. С помощью Ds-Na-электрофореза в диссоциирующих условиях с последующим анализом активности элюатов большого числа фрагментов геля локализация активного центра на легких цепях была показана для АТ гидролизующих ОБМ [29], интегразу ВИЧ-1 [17, 18], олигосахариды [50] и АТР [51]. Кроме того, было показано, что моноклональные легкие цепи активны в гидролизе ДНК [52, 53], вазоактивного нейропептида [54], протромбина [55], бета-амилоида [56], хемокинового рецептора CCR-5 [57], gp120 белка ВИЧ-1 [58], пептида гепатита С [58] и белков *Helicobacter pylori* [60]. Интактные глобулярные белки обычно взаимодействуют с обеими цепями иммуноглобулинов, обеспечивая, таким образом, специфическое узнавание белка и его расщепление [1–6]. Сродство коротких ОП, включая 20–25-звенные олигопептиды [27, 34, 39, 61, 62], а также короткие олигонуклеотиды [52, 53] к интактным абзимам и отдельным легким цепям АТ примерно в 100–1000 раз ниже, чем к соответствующим им глобулярным белкам и протяженным нуклеиновым кислотам. Следовательно, три-, тетрапептиды и более длинные ОП (и короткие олигонуклеотиды) могут взаимодействовать с легкой цепью независимо от тяжелой. Поэтому, в зависимости от АК-последовательности гидролиз ОП может быть менее специфичным или полностью неспецифичным. Более того, сайты гидролиза в случае глобулярных белков могут быть детерминированы их специфическим взаимодействием с тяжелыми цепями. Активные центры легких цепей могут гидролизовать глобулярные белки по тем связям, которые оказываются сближенными с этими центрами в результате специфических взаимодействий глобулярных белков с тяжелыми цепями. В пользу этого указывают данные по отличию в сайтах расщепления глобулярных белков и олигопептидов. Как видно из рис. 5, число сайтов расщепления ОП, соответствующих гидролизующим последовательностям глобулярных белков, намного больше (ср. строку 2 со строками 3 и 4 (б), а также строку 2 со строкой 3 (г)). При этом в случае олигопептидов гидролиза по сайтам расщепления глобулярных белков может и не быть (рис. 5; ср. строку 2 со строкой 3 (б)) или мажорный сайт расщепления в случае ОБМ анти-ОБМ-антителами (строка 2, рис. 5, б) может быть минорным при расщеплении ОП (строка 4, рис. 5, б). Это свидетельствует о существенных различиях во взаимодействии АТ с теми же самыми последовательностями на уровне глобулярных белков и олигопептидов. Следует подчерк-

нуть, что абзимы расщепляют ОП не по всем пептидным связям. В то же время кластерное расположение большого числа сайтов гидролиза олигопептидов (рис. 5) может указывать в пользу образования нескольких альтернативных комплексов с легкими цепями с предпочтительными последовательностями олигопептидов. Интересно, что в случае АТ-зависимого гидролиза ОП не наблюдается какой-либо ярко выраженной специфичности, характерной для трипсина и химотрипсина; абзимы в большей степени похожи на эластазу, расщепляющую белки по самым разным АК-последовательностям.

При наличии описанной выше взаимной гомологии между расщепляемыми последовательностями ИН и ОБМ, анти-ИН-абзимы эффективно расщепляют ОП, соответствующие ОБМ, а анти-ОБМ-антитела практически не активны в отношении олигопептидов ИН. В то же время средство одних и тех же коротких ОП к анти-ИН и к анти-ОБМ-абзимам сопоставимо [20, 31–34]. Следовательно, нельзя исключить, что как и в случае канонических ферментов [63, 64], при близком родстве разных лигандов к активным центрам важную роль в катализе антителами может играть эффективность стадии взаимной конформационной адаптации лиганда и абзима. После связывания с легкой цепью, эффективному расщеплению, скорее всего, могут подвергаться только те короткие ОП, которые способны изменять свою конформацию до оптимальной для катализа.

Как указано выше, ранее было выявлено 40 сайтов расщепления ИН, локализованных в семи известных иммунодоминантных последовательностях ИН [19]. Интересно, что каждый индивидуальный препарат АТ ВИЧ-инфицированных пациентов демонстрировал специфическое соотношение сайтов гидролиза в различных иммунодоминантных последовательностях, а некоторые препараты АТ гидролизуют ИН только в ограниченном наборе сайтов некоторых из них [19]. На рис. 8 в качестве примера приведены данные по различию в сайтах расщепления ИН в случае трех индивидуальных препаратов анти-ИН-абзимов, которые проанализированы ранее в работе [19] и использованы в данной работе для получения IgG<sub>mix</sub>. Видно, что IgG1, IgG6 и IgG7 расщепляют ИН по соответственно 35, 28 и 6 сайтам, некоторые из которых являются присущими только отдельным из этих препаратов абзимов. Подобная ситуация может иметь место и для АТ против других белков и, возможно, что в определенной степени особенности абзимов против одного и того же белка могут зависеть от заболевания. Так, например, поликлональные анти-ОБМ-абзимы из

крови больных РС являются в основном сериновыми протеазами, поскольку активность 12 препаратов более эффективно подавляется после их инкубации с PMSF (в среднем на  $84,5 \pm 10,5\%$ ), но не с ЭДТА (в среднем на  $15,8 \pm 3,5\%$ ) [29]. В то же время пул 12 препаратов АТ из крови пациентов с СКВ в основном содержит абзимы с металл-зависимой протеазной активностью; ЭДТА подавляет их активность в среднем на  $76,3 \pm 11,7\%$ , а PMSF только на  $20,9 \pm 14,0\%$  [29]. Поэтому не было неожиданностью, что четыре препарата IgG<sub>mix</sub> и IgM<sub>mix</sub> (ВИЧ-инфицированных пациентов) с разным родством к ОБМ демонстрировали заметные различия в гидролизе X-ОП25.

Изученные абзимы с протеолитической активностью являются в основном сериновыми протеазами, и их активность существенно снижается при инкубации со специфическими ингибиторами сериновых протеаз PMSF и/или AEBSF. К этим абзимам относятся IgG, гидролизующие вазоактивный интестинальный пептид, тиреоглобулин, протромбин и белковый фактор VIII из крови аутоиммунных больных [38, 55, 65, 66], казеин-гидролизующие АТ из молока человека и из крови ВИЧ-инфицированных пациентов [67], а также IgM, гидролизующие белок gp120 ВИЧ, из крови ВИЧ-инфицированных больных [68]. Кроме того, было показано, что небольшие фракции IgG и IgM из крови пациентов с РС и СКВ обладают не только сериноподобной, но и металл-зависимой протеазной активностью [24, 25, 29–31].

Анти-ИН АТ из крови ВИЧ-инфицированных больных являются особыми абзимами. Специфические ингибиторы сериновых протеаз ингибировали препараты ИН-гидролизующих IgG и IgM только у 20% ВИЧ-инфицированных больных, и активность была невысокой или совсем низкой [17, 18]. Например, AEBSF ингибировал активность IgG у двух из 10 пациентов (снижение составляло 42 и 49%). Общие пулы IgG и IgM у пяти пациентов из 10 содержали АТ с металл-зависимой активностью; для соответствующих 5 препаратов добавление ЭДТА приводило к снижению активности от 0 до 98%. В двух из 10 препаратов активность IgG подавлялась специфическими ингибиторами кислых протеаз (снижение – от 0 до 59%). Йодацетамид, специфический ингибитор тиоловых протеаз, обычно несущественно влиял на активность протеолитических абзимов описанных выше ( $\leq 3-7\%$  ингибирование [17, 18] и ссылки в них). Поэтому оказалось полной неожиданностью, что ИН-гидролизующая активность в 100% препаратах абзимов ВИЧ-инфицированных больных ингибировалась йодацетамидом на 12–98%



рования этого препарата IgG<sub>mix</sub> с помощью четырех ингибиторов хорошо согласуется со средними значениями указанных выше величин для ранее исследованных 10 индивидуальных препаратов IgG. Близкие значения по ингибированию четырьмя специфическими ингибиторами были получены в случае IgM<sub>mix</sub>: AEBSF ( $6 \pm 1\%$ ), пепстатин А ( $20 \pm 2\%$ ), ЭДТА ( $44 \pm 3\%$ ) и йодацетамид ( $80 \pm 4\%$ ).

Таким образом, трипсин-подобная протеолитическая активность не является основной в случае анти-ИН-абзимов, и большинство индивидуальных препаратов вообще не обладают этой активностью [17, 18]. Анти-ИН-абзимы, скорее всего, способны гидролизовать X-ОП25 в дополнительных сайтах по сравнению с анти-ОБМ-антителами благодаря их активностям, подобным кислым, металл-зависимым и особенно тиоловым протеазам; разные моноклональные АТ, входящие в состав суммарных пулов каждого ВИЧ-инфицированного пациента, могут обладать различной субстратной специфичностью.

В целом эффективное расщепление специфической ИН и ее ОП, X-ОП25, X-ОП21 олигопептидов ОБМ, а также неспецифических ди-, три- и тетрапептидов анти-ИН-абзимами ВИЧ-инфицированных пациентов может быть следствием сочетания нескольких факторов: частичной гомологии последовательности аминокислот и структурным сходством ОП с несколькими фрагментами ИН; взаимодействия только легкой цепи абзимов с этими ОП, родство которой существенно ниже по сравнению с глобулярным белком, а также вероятности меньшей специфичности анти-ИН-абзимов за счет проявления ими четырех различных протеолитических активностей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программ фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и РФФИ (гранты 12-04-00315, 13-04-00205, 13-04-00208, 14-04-00735), а также фондами СО РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Keinan, E. (2005) *Catalytic antibodies*, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KgaA, Weinheim, pp. 1–586.
- Nevinsky, G.A., and Buneva, V.N. (2002) Human catalytic RNA- and DNA-hydrolyzing antibodies, *J. Immunol. Methods*, **269**, 235–249.
- Nevinsky, G.A., and Buneva, V.N. (2005) Natural catalytic antibodies – abzymes, in *Catalytic antibodies* (Keinan, E., ed.), VCH-Wiley press, Weinheim, Germany, pp. 503–567.
- Nevinsky, G.A. (2010) Natural catalytic antibodies in norm and in autoimmune diseases, in *Autoimmune Diseases: Symptoms, Diagnosis and Treatment* (Brenner, K.J., ed.), Nova Science Publishers, Inc., N.Y., pp. 1–107.
- Nevinsky, G.A. (2011) Natural catalytic antibodies in norm and in HIV-infected patients, in *Understanding HIV/AIDS Management and Care – Pandemic Approaches the 21st Century* (Kasenga, F.H., ed.) InTech., Rijeka, pp. 151–192.
- Nevinsky, G.A., and Buneva, V.N. (2012) Autoantibodies and natural catalytic antibodies in health, multiple sclerosis, and some other diseases, *Advances in Neuroimmune Biology*, **3**, 157–182.
- Fauci, A.S., Braunwald, E., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., and Jameson, J.L. (2008) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 7th ed., McGraw-Hill Professional, N.Y.
- Katz, A.R., and Skalka, A.M. (1994) HIV-1 integrase: structural organization, conformational changes, and catalysis, *Ann. Rev. Biochem.*, **63**, 133–173.
- Litvak, S. (1996) Retroviral reverse transcriptases, in *Molecular Biology Intelligency Unit Series* (Landes, R., ed.), Chapman & Hall/Springer Verlag, Heidelberg, pp. 1–206.
- Skalka, A.M., and Goff, S.P. (1993) *Reverse transcriptase*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., pp. 432.
- Asante-Appiah, E., and Skalka, A.M. (1999) HIV-1 integrase: structural organization, conformational changes, and catalysis, *Adv. Virus Res.*, **52**, 351–369.
- Verkoczy, L., and Diaz, M. (2014) Autoreactivity in HIV-1 broadly neutralizing antibodies: implications for their function and induction by vaccination, *Curr. Opin. HIV AIDS*, **9**, 224–234.
- Zandman-Goddard, G., and Shoenfeld, Y. (2002) HIV and autoimmunity, *Autoimmun. Rev.*, **1**, 329–337.
- Gololobov, G.V., Mikhlap, S.V., Starov, A.V., Kolesnikov, A.F., and Gabibov, A.G. (1994) DNA-protein complexes. Natural targets for DNA-hydrolyzing antibodies, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **47**, 305–314.
- Одинцова Е.С., Харитоновна М.А., Барановский А.Г., Сизякина Л.П., Бунева В.Н., Невинский Г.А. (2006) ДНК-гидролизующие IgG-антитела из крови больных синдромом приобретенного иммунодефицита человека, *Молекулярная биология*, **40**, 857–864.
- Одинцова Е.С., Харитоновна М.А., Барановский А.Г., Сизякина Л.П., Бунева В.Н., Невинский Г.А. (2006) Протеолитическая активность IgG антител из крови больных синдромом приобретенного иммунодефицита человека, *Биохимия*, **71**, 320–332.
- Baranova, S.V., Buneva, V.N., Kharitonova, M.A., Sizyakina, L.P., Calmels, C., Parissi, V., Andreola, M.L., Buneva, V.N., Zakharova, O.D., and Nevinsky, G.A. (2010) HIV-1 integrase-hydrolyzing IgM antibodies from sera of HIV-infected patients, *Int. Immunol.*, **22**, 671–680.
- Baranova, S.V., Buneva, V.N., Kharitonova, M.A., Sizyakina, L.P., Calmels, C., Andreola, M.L., Parissi, V., and Nevinsky, G.A. (2009) HIV-1 integrase-hydrolyzing antibodies from sera of HIV-infected patients, *Biochimie*, **91**, 1081–1086.
- Odintsova, E.S., Baranova, S.V., Dmitrenok, P.S., Rasskazov, V.A., Calmels, C., Parissi, V., Andreola, M.L.,

- Buneva, V.N., Zakharova, O.D., and Nevinsky, G.A. (2011) Antibodies to HIV integrase catalyze site-specific degradation of their antigen, *Int. Immunol.*, **23**, 601–612.
20. Odintsova, E.S., Dmitrenok, P.S., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2013) Specific anti-integrase abzymes from HIV-infected patients: a comparison of the cleavage sites of intact globular HIV integrase and two 20-mer oligopeptides corresponding to its antigenic determinants, *J. Mol. Recognit.*, **26**, 121–135.
  21. O'Connor, K.C., Bar-Or, A., and Hafler, D.A. (2001) Neuroimmunology of multiple sclerosis, *J. Clin. Immunol.*, **21**, 81–92.
  22. Archelos, J.J., Storch, M.K., and Hartung, H.P. (2000) The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis, *Ann. Neurol.*, **47**, 694–706.
  23. Hemmer, B., Archelos, J.J., and Hartung, H.P. (2002) New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis, *Nature Rev. Neurosci.*, **3**, 291–301.
  24. Polosukhina, D.I., Kanyshkova, T.G., Doronin, B.M., Tyshkevich, O.B., Buneva, V.N., Boiko, A.N., Gusev, E.I., Favorova, O.O., and Nevinsky, G.A. (2004) Hydrolysis of myelin basic protein by polyclonal catalytic IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis, *J. Cell Mol. Med.*, **8**, 359–368.
  25. Polosukhina, D.I., Buneva, V.N., Doronin, B.M., Tyshkevich, O.B., Boiko, A.N., Gusev, E.I., Favorova, O.O., and Nevinsky, G.A. (2005) Hydrolysis of myelin basic protein by IgM and IgA antibodies from the sera of patients with multiple sclerosis, *Med. Sci. Monit.*, **11**, 266–272.
  26. Polosukhina, D.I., Kanyshkova, T.G., Doronin, B.M., Tyshkevich, O.B., Buneva, V.N., Boiko, A.N., Gusev, E.I., Nevinsky, G.A., and Favorova, O.O. (2006) Metal-dependent hydrolysis of myelin basic protein by IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis, *Immunol. Lett.*, **103**, 75–81.
  27. Ponomarenko, N.A., Durova, O.M., Vorobiev, I.I., Belogurov, A.A., Kurkova, I.N., Petrenko, A.G., Telegin, G.B., Suchkov, S.V., Kiselev, S.L., Lagarkova, M.A., Govorun, V.M., Serebryakova, M.V., Avalle, B., Tornatore, P., Karavanov, A., Morse, H.C. 3rd, Thomas, D., Friboulet, A., and Gabibov, A.G. (2006) Autoantibodies to myelin basic protein catalyze site-specific degradation of their antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 281–286.
  28. Hhachn, B.Ch. (1996) Systemic lupus erythematosus, in *Internal diseases* (Braunvald, E.E., Isselbaker, K.D., Petersdorf, R.G., Wilson, D.D., Martin, D.B., and Fauchi, A.S, eds), Medicine, Moscow, pp. 1–407.
  29. Bezuglova, A.M., Konenkova, L.P., Doronin, B.M., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2011) Affinity and catalytic heterogeneity and metal-dependence of polyclonal myelin basic protein-hydrolyzing IgGs from sera of patients with systemic lupus erythematosus, *J. Mol. Recognit.*, **24**, 960–974.
  30. Bezuglova, A.M., Dmitrenok, P.S., Konenkova, L.P., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2012) Multiple sites of the cleavage of 17- and 19-mer encephalytogenic oligopeptides corresponding to human myelin basic protein (MBP) by specific anti-MBP antibodies from patients with systemic lupus erythematosus, *Peptides*, **37**, 69–78.
  31. Timofeeva, A.M., Dmitrenok, P.S., Konenkova, L.P., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2013) Multiple sites of the cleavage of 21- and 25-mer encephalytogenic oligopeptides corresponding to human myelin basic protein (MBP) by specific anti-MBP antibodies from patients with systemic lupus erythematosus, *PLoS One*, **8**, e51600.
  32. Bezuglova, A.M., Konenkova, L.P., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2012) IgGs containing light chains of the  $\lambda$ - and  $\kappa$ -type and of all subclasses (IgG1-IgG4) from the sera of patients with systemic lupus erythematosus hydrolyze myelin basic protein, *Int. Immunol.*, **12**, 759–770.
  33. Odintsova, E.S., Dmitrenok, P.S., Timofeeva, A.M., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2014) Why specific anti-integrase antibodies from HIV-infected patients can efficiently hydrolyze 21-mer oligopeptide corresponding to antigenic determinant of human myelin basic protein, *J. Mol. Recognit.*, **27**, 32–45.
  34. Odintsova, E.S., Baranova, S.V., Dmitrenok, P.S., Calmels, C., Parissi, V., Andreola, M.L., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2012) Anti-integrase abzymes from the sera of HIV-infected patients specifically hydrolyze integrase but nonspecifically cleave short oligopeptides, *J. Mol. Recognit.*, **25**, 193–207.
  35. Caumont, A., Jamieson, G., de Soultrait, V., Parissi, V., Fournier, M., Zakharova, O.D., Bayandin, R., Litvak, S., Tarrago-Litvak, L., and Nevinsky, G.A. (1999) High affinity interaction of HIV-1 integrase with specific and non-specific single-stranded short oligonucleotides, *FEBS Lett.*, **455**, 154–158.
  36. Huang, X., and Miller, W. (1991) Local alignment of two-base encoded DNA sequence, *Adv. Appl. Math.*, **12**, 337–357.
  37. Paul, S., Li, L., Kalaga, R., O'Dell, J., Dannenbring, R.E., Swindells, S., Hinrichs, S., Caturegli, P., and Rose, N.R. (1997) Characterization of thyroglobulin-directed and polyreactive catalytic antibodies in autoimmune disease, *J. Immunol.*, **159**, 1530–1536.
  38. Kalaga, R., Li, L., O'Dell, J.R., and Paul, S. (1995) Unexpected presence of polyreactive catalytic antibodies in IgG from unimmunized donors and decreased levels in rheumatoid arthritis, *J. Immunol.*, **155**, 2695–2702.
  39. Paul, S., Li, L., Kalaga, R., Wilkins-Stevens, P., Stevens, F.J., and Solomon, A. (1995) Natural catalytic antibodies: peptide-hydrolyzing activities of Bence Jones proteins and VL fragment, *J. Biol. Chem.*, **270**, 15257–15261.
  40. Yi, J., Arthur, J.W., Dunbrack, R.L., and Skalka, A.M. (2000) An inhibitory monoclonal antibody binds at the turn of the helix-turn-helix motif in the N-terminal domain of HIV-1 integrase, *J. Biol. Chem.*, **275**, 38739–38748.
  41. Bizub-Bender, D., Kulkosky, J., and Skalka, A.M. (1994) Monoclonal antibodies against HIV type 1 integrase: clues to molecular structure, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **10**, 1105–1115.
  42. Nilsen, B.M., Haugan, I.R., Berg, K., Olsen, L., Brown, P.O., and Helland, D.E. (1996) Monoclonal antibodies against human immunodeficiency virus type 1 integrase: epitope mapping and differential effects on integrase activities *in vitro*, *J. Virology*, **70**, 1580–1587.
  43. Барановский А.Г., Бунева В.Н., Доронин Б.М., Невинский Г.А. (2008) Иммуноглобулины крови больных рассеянным склерозом – каталитически гетерогенные нуклеазы, *Российский иммунологический журнал*, **2**, 405–419.
  44. Andrievskaya, O.A., Buneva, V.N., Baranovskii, A.G., Gal'vita, A.V., Benzo, E.S., Naumov, V.A., and Nevinsky, G.A. (2002) Catalytic diversity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgG antibodies from the sera of patients with systemic lupus erythematosus, *Immunol Lett.*, **81**, 191–198.
  45. Galvita, A.V., Baranovskii, A.G., Kuznetsova, I.A., Vinshu, N.V., Galenok, V.A., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2007) Peculiarities of DNA hydrolysis by antibodies from blood of patients with pancreatic diabetes, *Russ. J. Immunol.*, **1**, 116–131.
  46. Parkhomenko, T.A., Buneva, V.N., Tyshkevich, O.B., Generalov, I.I., Doronin, B.M., and Nevinsky, G.A. (2010) DNA-hydrolyzing activity of IgG antibodies from the sera of patients with tick-borne encephalitis, *Biochimie*, **92**, 545–554.

47. Parkhomenko, T.A., Odintsova, E.S., Buneva, V.N., Kunder, E.V., Zhyltsov, I.V., Senkovich, S.A., Generalov, I.I., and Nevinsky, G.A. (2009) DNA-hydrolyzing activity of IgG antibodies from the sera of patients with diseases caused by different bacterial infections, *J. Cell Mol. Med.*, **13**, 2875–2887.
48. Kanyshkova, T.G., Semenov, D.V., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (1999) Human milk lactoferrin binds two molecules of DNA with different affinities, *FEBS Lett.*, **451**, 235–237.
49. Kuznetsova, I.A., Orlovskaya, I.A., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2007) Activation of DNA-hydrolyzing antibodies from the sera of autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice by different metal ions, *Biochim. Biophys. Acta*, **1774**, 884–896.
50. Andryushkova, A.A., Kuznetsova, I.A., Orlovskaya, I.A., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2006) Antibodies with amylase activity from the sera of autoimmune-prone MRL/MpJ-lpr mice, *FEBS Lett.*, **580**, 5089–5095.
51. Andryushkova, A.A., Kuznetsova, I.A., Orlovskaya, I.A., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2009) Nucleotide-hydrolyzing antibodies from the sera of autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice, *Int. Immunol.*, **21**, 935–945.
52. Botvinovskaya, A.V., Kostrikina, I.A., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2013) Systemic lupus erythematosus: molecular cloning of several recombinant DNase monoclonal kappa light chains with different catalytic properties, *J. Mol. Recognit.*, **26**, 450–460.
53. Kostrikina, I.A., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2014) Systemic lupus erythematosus: molecular cloning of fourteen recombinant DNase monoclonal kappa light chains with different catalytic properties, *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 1725–1737.
54. Sun, M., Gao, Q.S., Kirnarskiy, L., Rees, A., and Paul, S. (1997) Cleavage specificity of a proteolytic antibody light chain and effects of the heavy chain variable domain, *J. Mol. Biol.*, **271**, 374–385.
55. Thiagarajan, P., Dannenbring, R., Matsuura, K., Tramontano, A., Gololobov, G., and Paul, S. (2000) Monoclonal antibody light chain with prothrombinase activity, *Biochemistry*, **39**, 6459–6465.
56. Rangan, S.K., Liu, R., Brune, D., Plaque, S., Paul, S., and Sierks, M.R. (2003) Degradation of beta-amyloid by proteolytic antibody light chains, *Biochemistry*, **42**, 14328–14334.
57. Mitsuda, Y., Hifimi, E., Tsuruhata, R., Fujinami, H., Yamamoto, N., and Uda, T. (2004) Catalytic antibody light chain capable of cleaving a chemokine receptor CCR-5 peptide with a high reaction rate constant, *Biotechnol. Bioeng.*, **86**, 217–225.
58. Nidhiyama, Y., Karle, S., Planque, S., Taguchi, H., and Paul, S. (2007) Antibodies to the superantigenic site of HIV-1 gp120, hydrolytic and binding activities of the light chain subunit, *Mol. Immunol.*, **44**, 2707–2718.
59. Taguchi, H., Keck, Z., Fong, S.K., Paul, S., and Nishiyama, Y. (2004) Antibody light chain-catalyzed hydrolysis of a hepatitis C virus peptide, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 4529–4532.
60. Hifumi, E., Morihara, F., Hatiuchi, K., Okuda, T., Nishisono, A., and Uda, T. (2008) Catalytic features and eradication ability of antibody light-chain UA15-L against *Helicobacter pylori*, *J. Biol. Chem.*, **283**, 899–907.
61. Li, L., Paul, S., Tyutyulkova, S., Kazatchkine, M.D., and Kavery, S. (1995) Catalytic activity of anti-thyroglobulin antibodies, *J. Immunol.*, **154**, 3328–3332.
62. Gao, Q.S., Sun, M., Tyutyulkova, S., Webster, D., Rees, A., Tramontano, A., Massey, R.J., and Paul, S. (1994) Molecular cloning of a proteolytic antibody light chain, *J. Biol. Chem.*, **269**, 32389–32393.
63. Fersht, A. (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd ed., W.H. Freeman, Co., N.Y.
64. Nevinsky, G.A. (2003) 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, Kerala, pp. 133–222.
65. Paul, S., Volle, D.J., Beach, C.M., Johnson, D.R., Powell, M.J., and Massey, R.J. (1989) Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody, *Science*, **244**, 1158–1162.
66. Lacroix-Desmazes, S., Moreau, A., Sooryanarayana, Bonnemain, C., Stieltjes, N., Pashov, A., Sultan, Y., Hoebeke, J., Kazatchkine, M.D., and Kaveri, S.V. (1999) Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A, *Nature Med.*, **5**, 1044–1047.
67. Odintsova, E.S., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2005) Casein-hydrolyzing activity of sIgA antibodies from human milk, *J. Mol. Recognit.*, **18**, 413–421.
68. Paul, S., Karle, S., Planque, S., Taguchi, H., Salas, M., Nishiyama, Y., Handy, B., Hunter, R., Edmundson, A., and Hanson, C. (2004) Naturally occurring proteolytic antibodies: selective immunoglobulin M-catalyzed hydrolysis of HIV gp120, *J. Biol. Chem.*, **279**, 39611–39619.

**FEATURES OF HYDROLYSIS OF SPECIFIC  
AND NONSPECIFIC GLOBULAR PROTEINS  
AND OLIGOPEPTIDES BY ANTIBODIES AGAINST  
VIRAL INTEGRASE FROM BLOOD OF HIV-INFECTED  
PATIENTS**

**E. S. Odintsova<sup>1</sup>, P. S. Dmitrenok<sup>2</sup>, S. V. Baranova<sup>1</sup>,  
A. M. Timofeeva<sup>1</sup>, V. N. Buneva<sup>1,3</sup>, G. A. Nevinsky<sup>1,3\*</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,  
Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk  
630090, Russia; fax: +7(383)33-3677,  
E-mail: nevinsky@niboch.nsc.ru*

<sup>2</sup> *Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division,  
Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia*

<sup>3</sup> *Novosibirsk State University, Novosibirsk 630090,  
Russia; fax: +7(383)330-3255, E-mail: nsu@nsu.ru*

Received June 30, 2014

Revision received September 18, 2014

It was shown previously that unlike canonical proteases, abzymes against myelin basic protein (MBP) from the blood of patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus are effectively cleaved only MBP, while antibodies (Abs) against the integrase (IN) from the blood of HIV infected patients specifically hydrolyze only IN. In this work all sites of effective hydrolysis of 25-mer oligopeptide (OP25) of MBP by anti-IN antibodies (IgG and IgM) were identified by a combination of reversed-phase, thin layer chromatography and mass spectrometry. It is shown that amino acid sequence of OP25 and other oligopeptides (OPs) hydrolyzed by anti-MBP abzymes are partially homologous with several fragments of the complete sequence of IN. The IN oligopeptide sequences cleavable by anti-IN abzymes are homologous with several fragments of MBP, but anti-MBP abzymes cannot effectively hydrolyze OPs corresponding to IN. The general features of the cleavage sites of OP25 and other oligopeptides hydrolyzed by anti-MBP and anti-IN abzyme are revealed. The analysis of literature data on the hydrolysis of specific and nonspecific proteins and oligopeptides by abzyme against different protein antigens was carried out. All the data together suggest that short OPs, including OP25, mainly interact with light chains of Abs, which have lower affinity and specificity toward to the substrate as compared with intact Abs. However, anti-IN Abs are currently the only example of abzymes capable of hydrolyzing a variety of nonspecific oligopeptides with high efficiency. Possible reasons for the efficient hydrolysis of foreign oligopeptides by anti-IN abzyme from HIV-infected patients are discussed.

*Key words:* HIV-infected patients, catalytic antibodies against viral integrase, integrase, myelin basic protein, hydrolysis of peptides of myelin basic protein