آنتی‌بادی‌های پروتئولیتیک در سرم خانم‌های باردار: مطالعه شاهد- موردی

مهسا رحیم‌زاده جهرمی[۱]
منوچهر میرشاهی[۲*]
فرشته شمسی‌پور[۲]
ملیحه محمدی[۲]

۱- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بندرعباس.
۲- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس.

*نویسنده مسئول، تهران دانشگاه تربیت مدرس
تلفن: ۸۸۰۰۹۷۳۰
email: mirshahi @modares.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر آنتی‌بادی‌های کاتالیتیک مختلفی در افراد مبتلا به بیماری‌های خود ایمن یافت شده‌اند، به علاوه وجود آنتی‌بادی‌های مختلف با فعالیت DNase و RNase در شیر و سرم مادران سالم گزارش گردیده است. در این مطالعه به بررسی وجود آنتی‌بادی‌هایی با فعالیت پروتئولیتیک پرداخته شده است. ***روش بررسی:*** آنتی‌بادی‌های موجود در سرم ۳۰ خانم باردار در سه ماهه اول بارداری و ۱۰ فرد کنترل توسط کروماتوگرافی تمایلی و ژل فیلتراسیون خالص‌سازی شدند. همگی خانم‌ها اولین بارداری خود را سپری می‌کردند و کلیه نمونه‌ها شامل افراد باردار و کنترل در محدوده سنی ۲۵ تا ۳۵ سال قرار داشتند. سپس به بررسی بهترین شرایط از نظر بافر، دما و pH برای مشاهده فعالیت پروتئازی پرداخته شد. فعالیت پروتئازی این آنتی‌بادی‌ها توسط زیموگرافی در ژل حاوی سوبسترای ژلاتین نشان داده شد. ***یافته‌ها:*** نتایج حاصل از تیمار آنتی‌بادی‌ها در شرایط مناسب نشان داد که تعدادی از نمونه‌های آنتی‌بادی افراد باردار فعالیت آنزیمی دارند. داده‌های حاصل از بررسی زیموگرام وجود فعالیت پروتئازی در نمونه‌های مربوطه را تایید کرد. انجام وسترن بلات تایید کرد که قطعات ایجاد شده ناشی از هیدرولیز خود آنتی‌بادی‌ها بوده و آلودگی پروتئینی نمی‌باشند. ***نتیجه‌گیری:*** به علت شرایط خاص سیستم ایمنی در خانم‌های باردار، آنزیم‌هایی با فعالیت‌های آنزیمی مختلف می‌توانند تولید شوند. در رابطه با نقش احتمالی این آبزیم‌ها می‌توان گفت ممکن است چنین آنتی‌بادی‌هایی با فعالیت پروتئولیتیک در حذف مستقیم آنتی‌ژن‌ها از خون نقش داشته باشند.

کلمات کلیدی: آبزیم، بارداری، کاتالیتیک آنتی‌بادی

مقدمه

ایمنوگلوبولین‌ها (Immunoglobulins) در پاسخ به تحریک آنتی‌ژن‌ها توسط پلاسموسیت‌ها تولید شده و دارای تنوع بسیار زیادی می‌باشند.[۱] آنتی‌بادی‌ها همانند آنزیم‌ها، قادرند به تعداد زیادی از لیگاندها اتصال یابند. مکانیسم‌هایی که منجر به ایجاد تنوع در سطح تکاملی برای آنزیم‌ها می‌شوند با مکانیسم‌هایی که منجر به ایجاد تنوع در آنتی‌بادی‌ها در طی مراحل تولیدشان می‌گردند مشابه بوده و شامل مکانیسم‌هایی همچون مضاعف‌شدن ژنی و نوآرایی‌های ژنتیکی می‌باشند.[۲] اخیرا گزارشاتی مبنی بر وجود آنتی‌بادی‌های کاتالیتیک طبیعی در برخی بیماران خودایمن و برخی بیماران مبتلا به عفونت‌های ویروسی ارائه شده است که این آنتی‌بادی‌های با فعالیت کاتالیتیک را آبزیم (abzyme) نامند.[۳] در بیماری‌های خودایمن، منشاء تولید آبزیم‌ها تحریک شبکه آنتی‌ایدیوتیپی است که منجر به ایجاد آنتی‌بادی‌هایی علیه جایگاه فعال آنزیم‌ها می‌شود که در نتیجه چنین آنتی‌بادی‌هایی دارای فعالیت آنزیمی خواهند بود.[۴] اولین آنتی‌بادی‌های کاتالیتیک طبیعی در بیماران مبتلا به آسم یافت شدند که قابلیت هیدرولیز Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) را داشتند.[۵] تا کنون آنتی‌بادی‌هایی با فعالیت هیدرولیز پروتئین،[۶و۷] RNA و DNA در سرم بیماران مبتلا به برخی بیماری‌های خودایمن نظیر اسکلروز متعدد[۸] (MS)، روماتوئید آرتریت[۹] و lupus erythematosus[۱۰] یافت شده‌اند. همچنین در شیر مادران سالم نیز sIgA هایی با فعالیت پروتئین کیناز و لیپید کیناز[۱۱]، DNase و RNase[۱۲] و پروتئازی یافت شده‌اند که وجود چنین آنتی‌بادی‌هایی می‌تواند در ایجاد ایمنی برای نوزاد نقش داشته باشد[۱۳] در انسان، بارداری و شیردهی با تولید

Archive of SID
www.SID.ir

آنتی‌بادی‌های کاتالیتیک در شیر و سرم توأم است. در طول دوران بارداری سیستم ایمنی مادران در وضعیتی مشابه با سیستم ایمنی در بیماران خودایمن قرار می‌گیرد. این شرایط خودایمن می‌تواند عامل تولید آبزیم‌های مختلف در افراد باردار باشد.[۱۴] تا کنون گزارشاتی مبنی بر وجود آنتی‌بادی‌هایی با فعالیت DNase و RNase در سرم افراد باردار ارائه شده است.[۲] با توجه به مطالعات یاد شده و به منظور بررسی اثرات فیزیوپاتولوژیک آبزیم‌ها در دوران بارداری، در این مطالعه وجود آنتی‌بادی‌هایی با فعالیت پروتئولیتیکی در سرم مادران باردار برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

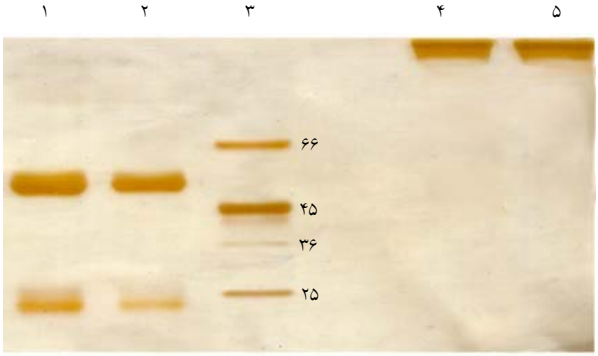
در این مطالعه شاهد موردی نمونه‌های سرمی مربوط به ۳۰ خانم باردار و ۳۰ فرد کنترل که شامل خانم‌ها در شرایط نرمال و آقایان بودند در آزمایشگاه تشخیص طبی آریا در تهران جمع‌آوری شدند. فرم رضایت نامه از افراد مورد مطالعه جمع آوری شده و اطلاعات افراد به‌صورت محرمانه محفوظ می‌باشد. میزان خطای نوع اول (α) مساوی ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای تهیه نمونه‌های سرمی، پس از جلب رضایت افراد مورد مطالعه، خون‌گیری به میزان پنج میلی‌لیتر از هر فرد و در عدم حضور مواد ضد انعقادی انجام گرفت. پس از انعقاد خون، نمونه‌ها با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس نمونه‌های سرمی به‌صورت مجزا جمع‌آوری و در دمای $-20^{\circ C}$ نگهداری شدند. نمونه‌های سرمی افراد باردار مربوط به بارداری اول و نیز سه ماهه اول بارداری بوده و همگی خانم‌ها از لحاظ فیزیولوژیکی بارداری نرمالی را سپری می‌کردند (به این معنی که مبتلا به بیماری‌های عفونی و یا بیماری‌های خود ایمن و یا سایر عوارضی که در دوران بارداری بروز می‌کنند نمی‌باشند). افراد کنترل افراد سالم فاقد بیماری‌هایی نظیر آلرژی یا بیماری‌های خودایمن بودند. به علاوه تمامی نمونه‌ها شامل افراد باردار و کنترل در محدوده سنی ۲۵ تا ۳۵ سال قرار داشتند. آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال موجود در نمونه‌های سرمی افراد کنترل و باردار ابتدا بوسیله رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات ۵۰٪ تغلیظ شدند و سپس جهت تخلیص بیشتر IgGها، نمونه‌های تغلیظ شده بر روی ستون تمایلی پروتئین G و سپس ستون ژل فیلتراسیون سفکریل S-۳۰۰ خریداری شده از شرکت فارماسیا انتقال یافتند. نمونه‌های آنتی‌بادی خارج شده از ستون علیه بافر PBS در دمای $4^{\circ C}$ دیالیز شدند.[۱۵و۱۶] میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و با استفاده از قانون بیر-لامبرت غلظت نمونه‌های پروتئینی محاسبه گردید. خلوص IgG های خالص شده به‌وسیله SDS-PAGE در ژل ۱۰٪ در شرایط احیایی و غیراحیایی مورد بررسی قرار گرفت.[۱۷] برای انجام وسترن بلات، پروتئین‌های جداسازی شده روی ژل SDS- PAGE به کاغذ نیتروسلولز انتقال یافتند. سپس فرایند Blocking با BSA ۱٪ انجام شد و در مرحله بعد باندهای IgG به‌وسیله antihuman- IgG نشان‌دار با HRP پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای محیط و استفاده از غلظت ۰/۵mg/ml دی‌آمینوبنزیدین و ۰/۰۵H2O2٪ به مدت ۱۰ دقیقه آشکارسازی شدند.[۱۸] در مرحله بعد تمام ظروف و بافرهای استفاده شده به وسیله اتوکلاو (دمای $20^{\circ C}$، ۱۲۱ دقیقه) یا فیلتراسیون از طریق فیلترهای ۰/۲ میکرون استریل شدند. فرایند اتولیز آنتی‌بادی‌ها در دمای $37^{\circ C}$ پس از سه هفته انکوباسیون به‌وسیله SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی نیترات نقره با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت Biorad و وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. سپس هیدرولیز سوبسترای پروتئینی به‌وسیله ژل SDS-PAGE حاوی سوبسترا انجام شد. در این مرحله از ژل SDS-PAGE حاوی ۱mg/ml ژلاتین به عنوان سوبسترا استفاده شد. پس از الکتروفورز، ژل حاوی سوبسترای ژلاتین به مدت ۲۴ ساعت در دمای $37^{\circ C}$ در بافری که شامل ۵۰mM Tris، ۱۵۰Mm NaCl، ۲۰Mm CaCl2 بود تیمار گردید. جهت آشکارسازی فعالیت پروتئازی، ژل حاوی سوبسترا به‌وسیله ۰/۵٪ آبی‌کوماسی (در بافر آب، اسید استیک و متانول ۵:۱:۴) رنگ‌آمیزی شد و به‌وسیله محلول رنگ بر حاوی آب، اسید استیک و متانول ۵:۱:۴ آشکارسازی گردید. پس از گذشت ۳-۲ دقیقه باندهای فعالیت پروتئازی به‌صورت نواحی روشن در زمینه آبی قابل رؤیت بودند.[۱۶]

یافته‌ها

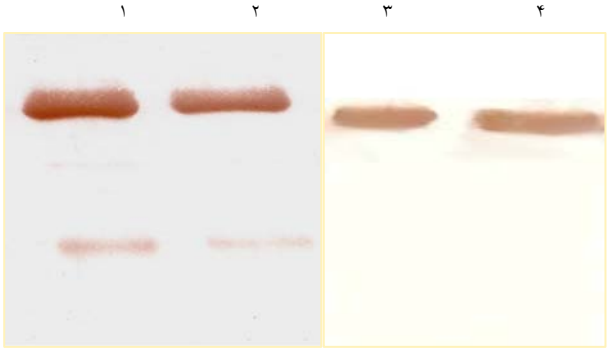
آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال موجود در نمونه‌های سرمی توسط دو مرحله کروماتوگرافی روی ستون تمایلی پروتئین G و ستون ژل فیلتراسیون سفکریل S-۳۰۰ خالص‌سازی شدند. نتایج حاصل از SDS-PAGE نشان‌دهنده یک باند ۱۵۰kD در شرایط غیراحیایی و دوباند ۵۰kD و ۲۵kD در شرایط احیایی بودند (شکل ۱). جهت تایید خلوص آنتی‌بادی‌ها و اطمینان از اینکه باندهای مشاهده‌شده مربوط به

Archive of SID

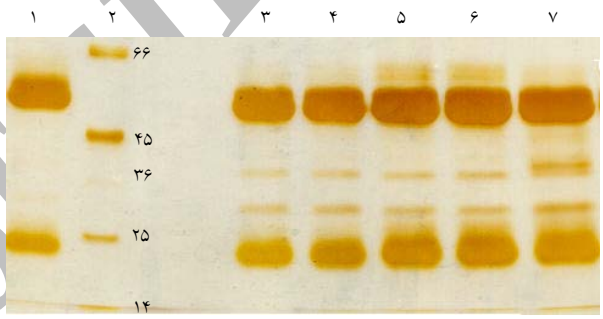
www.SID.ir



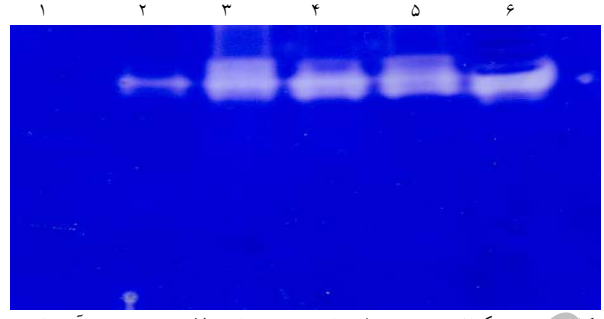
شکل- ۱: SDS-PAGE برروی ژل ۱۰٪ با رنگ‌آمیزی نیترات نقره در شرایط احیایی و غیراحیایی. ۱- نمونه فرد باردار در شرایط احیایی، ۲- نمونه کنترل در شرایط احیایی، ۳- مارکر وزن مولکولی، ۴- نمونه فرد باردار در شرایط غیر احیایی، ۵- نمونه کنترل در شرایط غیراحیایی



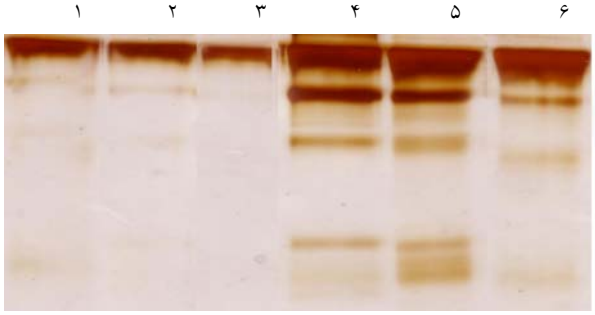
شکل- ۲: وسترن بلات آنتی‌بادی‌های خالص‌شده و آشکارسازی با آنتی‌بادی نشان‌دار ضد IgG انسانی. ۱- نمونه فرد باردار در شرایط احیایی، ۲- نمونه کنترل در شرایط احیایی، ۳- نمونه فرد باردار در شرایط غیراحیایی، ۴- نمونه کنترل در شرایط غیراحیایی



شکل- ۳: الکتروفورز آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال پس از سه هفته انکوباسیون در PHهای مختلف با رنگ‌آمیزی نیترات نقره: ۱-آنتی‌بادی در PH خنثی بدون انکوباسیون، ۲- مارکر وزن مولکولی، نمونه‌های سه تا هفت پس از سه هفته انکوباسیون در PHهای مختلف: ۳- آنتی‌بادی در PH=۷، ۴- آنتی‌بادی در PH =۸ ۵- آنتی‌بادی در PH= ۹، ۶- آنتی‌بادی در PH=۱۰، ۷- آنتی‌بادی در PH=۱۱

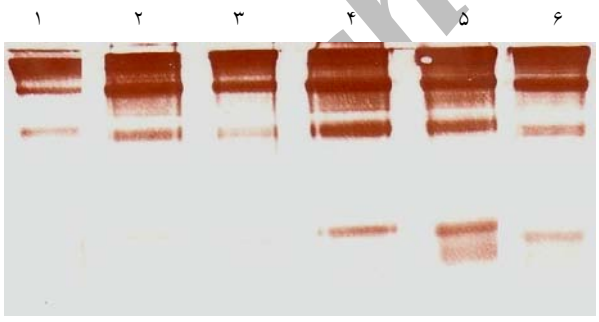


شکل- ۴: زیموگرافی بر روی ژل حاوی سوبسترای ژلاتین: ۱- نمونه آنتی‌بادی فرد کنترل، ۶-۲: نمونه آنتی‌بادی‌های افراد باردار



الف

شکل- ۵: الف: SDS-PAGE بر روی ژل ۱۰٪ با رنگ‌آمیزی نیترات نقره در شرایط غیراحیایی. ۳-۱: نمونه‌های باردار بدون انکوباسیون، ۶-۴: نمونه‌های باردار پس از سه هفته انکوباسیون.



ب

ب: وسترن بلات همان نمونه‌ها مطابق با الگوی قسمت الف.

IgG می‌باشند وسترن بلات در شرایط احیایی و غیراحیایی انجام شد. نتایج نشان دادندکه در شرایط غیراحیایی یک‌باند ۱۵۰kD و در شرایط احیایی دوباند ۲۵kD و ۵۰kD مربوط به IgG می‌باشند (شکل ۲). سپس به بررسی شرایط مورد نیاز برای مشاهده فعالیت پروتئولیتیکی

Archive of SID
www.SID.ir

IgGهای خالص شده پرداخته شد. پس از بررسی شرایط زمانی و بافرهای مختلف و همچنین pHهای مختلف، شرایط بافر PBS و سه هفته انکوباسیون در دمای $37^{\circ}C$، به عنوان بهترین شرایط برای مشاهده فعالیت پروتئولیتیکی انتخاب گردید. نتایج نشان می‌دهد که انکوباسیون آنتی‌بادی‌ها در این شرایط منجر به ایجاد اتولیز شده و باندهای ایجادشده پس از SDS-PAGE قابل مشاهده می‌باشند (شکل ۳). سپس در مرحله بعد جهت تایید فعالیت آنزیمی آنتی‌بادی‌ها، زیموگرام در ژل SDS-PAGE حاوی ژلاتین انجام شد. نتایج نشان می‌دهند که در افراد باردار آنتی‌بادی‌هایی با فعالیت پروتئولیتیکی وجود دارند که قادر به هیدرولیز ژلاتین می‌باشند (شکل ۴). جهت اطمینان از اینکه قطعات ایجاد شده ناشی از اتولیز آنتی‌بادی‌ها بوده و آلودگی پروتئینی نمی‌باشند، ژل الکتروفورز و وسترن بلات انجام شد. نتایج حاصل از آشکارسازی با آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد IgG انسانی نشان می‌دهد که قطعات ایجاد شده ناشی از هیدرولیز آنتی‌بادی‌ها بوده و آلودگی نمی‌باشند (شکل ۵). نتایج نشان داد که در ۱۶ نمونه از ۳۰ نمونه افراد باردار و دو نمونه از ۳۰ نمونه افراد کنترل، فعالیت پروتئولیتیکی قابل مشاهده بوده و در واقع آبزیم‌هایی با فعالیت پروتئولیتیکی موجود می‌باشند. بین درصد افراد دارای آنتی‌بادی‌های پروتئولیتیک تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p<0/001$) به گونه‌ای که در گروه مورد ۵۳/۳٪ افراد دارای آنتی‌بادی‌های پروتئولیتیک بودند در حالی‌که این نسبت در گروه شاهد ۶/۷٪ بود.

بحث

آنتی‌بادی‌ها گلیکوپروتئین‌هایی هستند که در پاسخ به تحریک آنتی‌ژن‌ها توسط پلاسموسیت‌ها ساخته می‌شوند. هر فرد قادر به تولید انواع بسیار متنوع (۱۰۹) آنتی‌بادی می‌باشد که از نظر ساختاری و اختصاصیت با یکدیگر تفاوت دارند. ساز و کارهای ژنتیکی که باعث ایجاد چنین گنجینه عظیمی از آنتی‌بادی‌ها می‌شوند تنها در لنفوسیت‌ها فعالیت دارند که منجر به ایجاد مجموعه بسیار متنوعی از انواع آنتی‌بادی‌ها خواهند شد. بدین ترتیب وجود انواع و اقسام آنتی‌بادیها با نواحی متغیر مختلف امکان‌پذیر می‌باشد که از این میان بخشی از آنها می‌توانند دارای فعالیت آنزیمی باشند.[1] اولین نمونه از آبزیم‌های طبیعی در سال ۱۹۸۹ توسط Paul در ایمونوگلوبولین‌های جدا شده از خون بیماران مبتلا به آسم یافت شد که قادر به هیدرولیز VIP بودند.[5] تاکنون ایمونوگلوبولین‌هایی با فعالیت DNase'[9,19] و RNase'[20] نوکلئازی،[21] فسفاتازی[22,23] و آمیدولیتیک[24] در خون بیماران خود ایمن همانند آسم، لوپوس، MS و برخی بیماری‌های ویروسی مثل هپاتیت[25] و ایدز[26] گزارش شده‌اند که همگی نمونه‌ای از حضور آبزیم‌ها می‌باشند. از طرفی می‌توان برای آبزیم‌ها نقش فیزیولوژیک نیز در نظر گرفت.[27] مثلا در برخی افراد مسن IgG و IgMهایی یافت شده‌اند که قادر به برش فیبریل‌های آمیلوئیدی هستند و می‌توان حضور این آبزیم‌ها را یک پاسخ پروتئولیتیک اختصاصی به ایجاد این فیبریل‌ها دانست.[28] یکی از مثال‌های بارز فیزیولوژیک از حضور آبزیم‌ها، بارداری است که طی آن بدن مادر در شرایطی بسیار مشابه با بیماری‌های خود ایمن قرار می‌گیرد. در شرایط بارداری سیستم ایمنی سلولی سرکوب شده و سیستم ایمنی هومورال فعال است. بدین ترتیب بدن مادر می‌تواند به‌وسیله ترکیبات مختلف به‌طور کارآمدی ایمن شود و بنابراین وجود انواع آنتی‌بادی‌ها با ساختارهای بسیار متنوعی محتمل خواهد بود.[4] تاکنون آنتی‌بادی‌هایی با فعالیت DNase و RNase در سرم افراد باردار نشان داده شده است. میزان فعالیت این آنتی‌بادی‌ها دارای گستره بسیار متنوعی است و در افراد مختلف تنوع بسیار زیادی دارد.[2] در این مطالعه حضور آنتی‌بادی‌هایی با فعالیت پروتئازی در سرم افراد باردار برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت. جهت مقایسه درصد افراد دارای آبزیم‌های پروتئولیتیک در دو گروه شاهد و مورد از آزمون دقیق فیشر استفاده شد. آنتی‌بادی‌های موجود در سرم افراد باردار خالص‌سازی شده و خلوص آنها به‌وسیله SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی نیترات نقره تایید شد. تیمار این نمونه‌های آنتی‌بادی به مدت سه هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH فیزیولوژیک نشان داد که از ۳۰ نمونه باردار، در ۱۶ نمونه فرایند اتولیز اتفاق می‌افتد و از آنجا که نمونه‌های آنتی‌بادی کاملا خالص هستند این فعالیت ناشی از فعالیت آنزیمی خود آنتی‌بادی‌ها است. از آنجا که آنتی‌بادی‌ها می‌توانند دارای ساختارهای بسیار متنوعی باشند، بنابراین امکان وجود آبزیم‌هایی با انواع فعالیت‌های پروتئازی مثل: Ser پروتئازی، تیول پروتئازی، متالوپروتئازی و غیره وجود دارد که جایگاه برش آنها می‌تواند روی خود آنتی‌بادی و یا ژلاتین قرار گرفته باشد. به همین دلیل پس از تیمار، فرایند اتولیز در این آنتی‌بادی‌ها دیده می‌شود و این فعالیت در زیموگرام روی ژل حاوی ژلاتین نیز قابل مشاهده است. بدین ترتیب

Archive of SID

www.SID.ir

وجود فعالیت پروتئازی در آنتی‌بادی‌های خالص شده نشان داده شد. به‌علاوه از ۳۰ نمونه کنترل نیز دو نمونه دارای فعالیت پروتئازی بودند. مشاهده فعالیت پروتئازی در افراد نرمال تاییدکننده نتایج قبلی مبنی بر وجود آنتی‌بادی‌هایی با فعالیت کاتالیتیکی در افراد نرمال می‌باشد. یکی از فرضیات موجود در ارتباط با نقش فیزیولوژیکی چنین آنتی‌بادی‌هایی با فعالیت پروتئولیتیک، این است که فعالیت پروتئازی ممکن است در حذف مستقیم آنتی‌ژن‌ها از خون نقش ایفا کنند[۲۹و۲۰] و بدین ترتیب تامین‌کننده مصونیت فرد باردار در برابر عوامل مهاجم خارجی باشند. با توجه به نتایج به‌دست آمده و اطلاعات موجود، می‌توان این فرضیه را مطرح ساخت که آبزیم‌های پروتئولیتیک در خانم‌های باردار می‌توانند دارای نقش فیزیولوژیک یا پاتولوژیک باشند و در موارد پاتولوژیک وجود چنین آبزیم‌هایی ممکن است توجیهی برای وقوع برخی از سندرم‌های خودایمن در طول بارداری برخی افراد باشد.

References

1. Nezlin R. The The Immunoglobulins. Structure and Function. New York: Academic Press: 1992.
2. Keinan E. Catalytic Antibodies. Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH and Co: 2005.
3. Nevinsky GA, Kanyshkova TG, Buneva VN. Natural catalytic antibodies (abzymes) in normalcy and pathology. *Biochemistry (Mosc)* 2000; 65: 1245-55.
4. Nevinsky GA, Buneva VN. Catalytic antibodies in healthy humans and patients with autoimmune and viral diseases. *J Cell Mol Med* 2003; 7: 265-76.
5. Paul S, Volle DJ, Beach CM, Johnson DR, Powell MJ, Massey RJ. Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody. *Science* 1989; 244: 1158-62.
6. Paul S, Karle S, Planque S, Taguchi H, Salas M, Nishiyama Y, et al. Naturally occurring proteolytic antibodies: selective immunoglobulin M-catalyzed hydrolysis of HIV gp120. *J Biol Chem* 2004; 279: 39611-9.
7. Odintsova ES, Baranovskii AG, Buneva VN, Nevinsky GA. Proteolytic activity of antibodies from human milk. Federation of European Biochemical Societies 2005; 272: Abstract number: D3-021P.
8. Polosukhina DI, Kanyshkova TG, Doronin BM, Tyshkevich OB, Buneva VN, Boiko AN, et al. Hydrolysis of myelin basic protein by polyclonal catalytic IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 359-68.
9. Matsuura K, Ikoma S, Sugiyama M, Funauchi M, Sinohara H. Amidase and peptidase activities of polyclonal immunoglobulin G present in the sera of patients with rheumatoid arthritis. *Appl Biochem Biotechnol* 2000; 83: 107-13.
10. Andrievskaya OA, Buneva VN, Baranovskii AG, Gal'vita AV, Benzo ES, Naumov VA, et al. Catalytic diversity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgG antibodies from the sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 2002; 81: 191-8.
11. Kanyshkova TG, Babina SE, Semenov DV, Isaeva N, Vlassov AV, Neustroev KN, et al. Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin. *Eur J Biochem* 2003; 270: 3353-61.
12. Nevinsky GA, Buneva VN. Human catalytic RNA- and DNA-hydrolyzing antibodies. *J Immunol Methods* 2002; 269: 235-49.
13. Odintsova ES, Baranovskii AG, Buneva VN, Nevinsky GA. Proteolytic activity of antibodies from human milk. *FEBS J* 2005; 272: Abstract number: D3-021P.
14. Nevinsky GA, Kanyshkova TG, Buneva VN. Natural catalytic antibodies (abzymes) in normalcy and pathology. *Biochemistry (Mosc)* 2000; 65: 1245-55.
15. Howard GC, Bethell DR. Basic Methods in Antibody Production and Characterizatio. New York: CRC Press: 2001.
16. Copeland RA. Methods for Protein Analysis: A Practical Guide to Laboratory Protocols. New York: Chapman and Hall: 1994.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
18. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4.
19. Buneva VN, Kanyshkova TG, Vlassov AV, Semenov DV, Khlimankov DYu, Breusova LR, et al. Catalytic DNA- and RNA-hydrolyzing antibodies from milk of healthy human mothers. *Appl Biochem Biotechnol* 1998; 75: 63-76.
20. Vlassov A, Florentz C, Helm M, Naumov V, Buneva V, Nevinsky G, et al. Characterization and selectivity of catalytic antibodies from human serum with RNase activity. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 5243-50.
21. Nevinsky GA, Kanyshkova TG, Semenov DV, Vlassov AV, Gal'vita AV, Buneva VN. Secretory immunoglobulin A from healthy human mothers' milk catalyzes nucleic acid hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol* 2000; 83: 115-29.
22. Kit YYa, Semenov DV, Nevinsky GA. Phosphorylation of different human milk proteins by human catalytic secretory immunoglobulin A. *Biochem Mol Biol Int* 1996; 39: 521-7.
23. Nevinsky GA, Kit YYa , Semenov DV, Khlimankov DYu , Buneva VN. Secretory immunoglobulin A from human milk catalyzes milk protein phosphorylation. *Appl Biochem Biotechnol* 1998; 75: 77-91.
24. Neustoev KN, Ivanen DR, Kulminskaya AA, Brumer IH, Saveliev AN, Nevinsky GA. Amylolytic activity and catalytic properties of IgM and IgG antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Antibodies* 2003; 12: 31-4.
25. Baranovsky AG, Matushin VG, Vlassov AV, Zabara VG, Naumov VA, Giege R, et al. DNA- and RNA-hydrolyzing antibodies from the blood of patients with various forms of viral hepatitis. *Biochemistry (Mosc)* 1997; 62: 1358-66.
26. Paul S, Kalaga RS, Gololobov G, Brenneman D. Natural catalytic immunity is not restricted to autoantigenic substrates: identification of a human immunodeficiency virus gp 120-cleaving antibody light chain. *Appl Biochem Biotechnol* 2000; 83: 71-82.
27. Avalle B, Friboulet A, Thomas D. Enzymes and abzymes relationships. *J Mol Catal* 2000; 10: 39-45.
28. Savel'ev AN, Eneyskaya EV, Shabalin KA, Filatov MV, Neustroev KN. Antibodies with amylolytic activity. *Protein Peptide Letter* 1999; 6: 179-84.
29. Paul S, Nishiyama Y, Planque S, Karle S, Taguchi H, Hanson C, et al. Antibodies as defensive enzymes. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26: 485-503.
30. Gabibov AG, Ponomarenko NA, Tretyak EB, Paltsev MA, Suchkov SV. Catalytic autoantibodies in clinical autoimmunity and modern medicine. *Autoimmun Rev* 2006; 5: 324-30.

Archive of SID
www.SID.ir

Tehran University Medical Journal; Vol. 66, No. 4, July 2008: 251-256

Proteolytic antibodies in the sera of pregnant women: a case control study

Rahimzadeh jahromi M.[1]
Mirshahi M[2*]
Shamsipour F.[2]
Mohamadi M.[2]

1-Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas.
2-Department of Biochemistry, Faculty of Science Tarbiat Modares University Tehran.

*Corresponding author: Tarbiant Modarres University
Tel: +98-21-88009730
email: mirshahi @modares.ac.ir

Abstract

***Background*:** The induction of catalytic antibodies (abzymes) was first postulated by Pauling in 1948. Various catalytic antibodies have been detected recently in the sera of patients with several autoimmune pathologies such as systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. In addition, antibodies with DNase and RNase activity have been discovered in the milk and sera of healthy human mothers, which shows the physiologic role of these antibodies. In this study, we examined the proteolytic activity of antibodies in the sera of pregnant women.

***Methods*:** IgG antibody fractions were isolated from the sera of 30 healthy pregnant women in the first trimester of pregnancy and 10 control samples (men and nonpregnant women) by subsequent steps of chromatographic purification on Protein G sepharose and sephacryl S-300. All patients were in their first pregnancy and aged 25-35 years. The conditions for proteolytic activity, such as type of buffer, pH and temperature, were optimized. The proteolytic activity of these antibodies was demonstrated by in-gel assay with gelatin as the substrate.

***Results*:** Antibody treatments at the optimum temperature showed that some samples from pregnant women contain proteolytic abzymes, as demonstrated by in-gel assays. Western blot results confirmed that the proteolytic activity is an intrinsic property of the antibodies.

Conclusions: During pregnancy and immediately after delivery women very often experience autoimmune processes similar to those in patients with autoimmune disease. Because of their specific immune status, pregnant women can produce various catalytic antibodies with different enzymatic activity. These proteolytic abzymes might be involved in the direct clearance of antigens from blood.

Keywords: Abzyme, pregnancy, catalytic antibody.

Archive of SID
www.SID.ir