

Ковалентно- связывающиеся антитела подавляют глубокое гликирование: врожденный компонент системы приобретенного иммунитета

Т. Щеглова¹, С.П. Маккер², А.Трамонтано^{2*}

¹ Институт цитологии и генетики, Сибирский филиал РАН, 630090, Россия, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, д. 10

² Отдел педиатрии, Университет штата Калифорния, Дэвис – Медицинская школа Дэвис, Калифорния, США

*E-mail: tramontano@ucdavis.edu

РЕФЕРАТ Неферментативное гликирование белков является причиной метаболического стресса, который приводит к цитотоксичности и вызывает повреждение тканей. Гипергликемия ведет к увеличению количества продуктов глубокого гликирования, которые и вызывают большую часть проявлений сосудистой патологии, приводя к диабетическим осложнениям. Усиленное гликирование иммуноглобулинов и их ускоренное выведение из кровотока является предполагаемым естественным механизмом предотвращения накопления альтернативных продуктов гликирования и, таким образом, смягчения микро-васкулярной патологии. В данной работе продемонстрировано, что антитела против гликопротеина KLN активно реагируют с гликопептидами сыворотки крови диабетиков. Эти реакции обусловлены ковалентным связыванием легких цепей антител и карбонильными группами гликопептидов. Животные, страдающие диабетом, которые были иммунизированы с целью индукции реактивных антител, имели сниженные уровни циркулирующих и связанных в почках продуктов гликирования, что коррелировало с ослаблением диабетической нейропатии. Молекулярный анализ процесса гликирования антител показал, что модифицировались в основном легкие цепи, несущие закодированные в зародышевой линии переменные районы лямбда. Ранее мы наблюдали, что фрагменты антител, несущие переменные районы в зародышевой конфигурации, могут быть выявлены в человеческой Fv библиотеке по способности ковалентно связываться с реактивным фосфорным эфиром. Модификация этих Fv фрагментов происходила по специфическим остаткам в области переменных районов легких цепей, которые соответствовали комбинированному сайту связывания в области взаимодействия легких и тяжелых цепей. Эти данные позволяют предположить, что ковалентное связывание – это естественное свойство антител, которое сохранилось для выполнения определенных физиологических функций. Эта гипотеза обсуждается в связи с современными данными о природных антителах, которые распознают окисленные молекулы собственного организма, и о каталитических аутоантителах, которые обнаруживаются при аутоиммунных заболеваниях.

Ключевые слова: метаболический стресс, цитотоксичность, природные аутоантитела, KLN-иммунизированные крысы.

Список сокращений: OP (organophosphorus compound) – фосфорорганические соединения, LDL (Low Density Lipoprotein) – липопротеин низкой плотности, nAbs (natural autoantibodies) – природные аутоантитела, AGE (advanced glycation end-products) – конечные продукты глубокого гликирования, RAGE – AGE-рецептор, KLN – пируват-гаптен, конъюгированный с гемодианином миноги, PAMPs (pathogenassociated molecular patterns) – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, TLR – Toll-like рецептор.

ВВЕДЕНИЕ

Появление огромного разнообразия антител для защиты от всего разнообразия возможных антигенов – это характерная черта приобретенного иммунитета. Структурной основой приобретенного иммунитета является вариабельность сайтов связывания антигенов на В-клеточных рецепторах и антителах. Соответственно, антитела тесно связаны с генетической рекомбинацией и накоплением мутаций, которые ступенчато улучшают связывание между вариабельными районами антител и комплементарными участками антигена. В отличие от аффинности, которая постепенно усиливается за счет множества слабых взаимодействий, крепкая связь, например ковалентная, могла бы обеспечивать быстрый и эффективный способ захвата некоторых антигенов. Известны ли случаи, когда антитела связываются именно таким образом, и какой цели служит такой механизм связывания?

Существование антител, которые ковалентно связываются со своими лигандами, уже давно является предметом исследований, направленных на разработку ферментоподобных каталитических антител [1]. Ферменты используют ковалентные связи, чтобы стабилизировать промежуточные продукты во множестве типов реакций. Реактивная иммунизация считалась многообещающей стратегией для получения антител, которые связывались бы со своими лигандами путем образования ковалентных комплексов [2]. Предполагалось, что такие антитела могут имитировать промежуточные стадии ферментативных реакций, когда фермент связан с субстратом ковалентной связью. Эта гипотеза основана на том, что такая форма связывания может достигаться посредством обычного процесса созревания аффинности при индукции антител. При этом предполагается, что связывание и каталитические функции экспериментально полученных антител являются искусственными и, таким образом, не играют иммунологической роли в природе. Один из первых и наиболее изученных примеров – это иммунизация синтетическими антигенами, содержащими активную дикарбонильную группу. В результате индуцируются антитела, которые связываются через основание Шиффа с образованием енаминовых аддуктов. Было показано, что ковалентно-реактивные клоны обладают значительной альдозазной активностью. Так же как и при обычном созревании аффинности, функция ковалентного связывания кодируется соматически мутированными вариабельными районами иммуноглобулиновых генов, у которых в антиген-связывающем сайте возникает один или более нуклеофильных остатков лизина [3].

РОЛЬ КОВАЛЕНТНО-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ АНТИТЕЛ В ГЛИКИРОВАНИИ И ПАТОЛОГИИ

Альтернативная гипотеза утверждает, что ковалентно-связывающиеся антитела могут существовать в природе, если такая активность полезна для организма-хозяина. Мы предположили, что связь с антителом посредством одного сильного взаимодействия может быть подходящим механизмом для захвата и выведения измененных субстратов, образующихся при повреждении белков и обновлении клеток. Это может происходить в ситуации с встречающимися в природе, естественными, антителами, которые рас-

познают структуры, образующиеся в собственных клетках в результате окислительных модификаций [4]. Например, некоторые IgM антитела, которые принимают участие в разборке окисленных LDL (Low Density Lipoprotein – липопротеин низкой плотности) частиц, опознают определенные химические структуры в составе окисленных фосфолипидов, в т.ч. фосфорилхолиновую группу в головке липида. Эти антитела, гены которых не подвергаются соматической мутации, кодируются филогенетически консервативными генами зародышевой линии [5]. Считается, что такие природные аутоантитела (nAbs – natural autoantibodies), имеющие такую «врожденную» реактивность, служат постоянно работающей системой очистки, нацеленной на уничтожение собственных измененных антигенов, т.н. «неантигенов», которые появляются в поврежденных клетках и тканях [6]. Эти nAbs также реагируют с фосфорилхолиновыми группами, присутствующими на полисахаридах клеточных стенок бактерий, что позволяет им защищать организм от инфекции [7]. Такая двойная функция может объяснить, почему это свойство антител сохранилось в зародышевой линии в ходе эволюции. Механизм взаимодействия окисленных фосфолипидов с V-зоной nAbs на данном этапе изучается.

Еще одна разновидность цитотоксического метаболита образуется при гликировании или гликоксилировании, поскольку сахара и другие углеводы постоянно окутывают белки и клетки, модифицируя их в ходе неспецифических реакций по экспонированным карбонильным группам. Гликирование – это медленный, но постоянный процесс, который в норме происходит по ходу старения. Однако при диабете процесс гликирования происходит быстрее, поскольку нарушен гликемический контроль, и часто наступает гипергликемия. Важность этого механизма оказалась весьма значительной, поскольку на данном этапе роль конечных продуктов глубокого гликирования (AGE – advanced glycation end-products) в сосудистых осложнениях при диабете сейчас уже твердо установлена [8–10]. Необычайное разнообразие AGE-белков образует особый класс измененных собственных антигенов хозяина, которые пока слабо охарактеризованы. AGE участвуют в развитии патологии сосудистой ткани через два основных механизма: изменение архитектуры внеклеточного матрикса из-за сшивки белков и модуляция клеточных функций путем взаимодействия со специфическими рецепторами на клеточной поверхности. В разнообразные механизмы развития тканевой токсичности вовлечены многочисленные рецепторы, участвующие в связывании AGE-продуктов, включая AGE-рецептор (RAGE), скавенджер-рецептор макрофагов, галектин-3 и мегалин [11–15]. Совместно это процессы вносят вклад в прогрессию патологических осложнений диабета, включая сердечно-сосудистые заболевания, нефропатию и микроваскулярные заболевания (рис. 1). На данный момент рассматривается несколько подходов к терапии связанного с AGE патогенеза, в том числе фармакологическое ингибирование формирования AGE [16] и биофармакологическое блокирование AGE-рецепторов [17]. Теоретически природный компенсаторный механизм, устраняющий цитотоксические AGE-продукты из циркуляции, мог бы, таким образом, уменьшать патологический эффект продолжающегося или чрезмерного гликирования. Такой сценарий, скорее

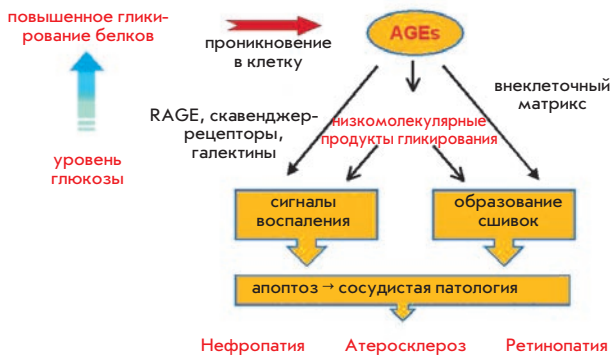


Рис. 1. Продукты глубокого гликирования при патологии. Продукты гликирования белков в результате гипергликемии или в ходе старения модифицируются и образуют продукты глубокого гликирования. Эти AGE-продукты впоследствии могут распадаться на гликированные пептиды и низкомолекулярные AGE. И высоко- и низкомолекулярные AGE могут сорбироваться в сосудистой ткани, на клеточных рецепторах и путем сшивки с внеклеточным матриксом. Такие модификации вызывают цитотоксичность и некроз тканей, что в итоге приводит к сосудистым патологиям, которые часто являются осложнениями при диабете

всего, включал бы регуляторные элементы, усиливающие защиту в моменты повышенного стресса.

Существует ли молекулярный механизм, с помощью которого антитела могли бы выполнять такую роль для поддержания нормальной клеточной функции? Хотя AGE-продукты весьма гетерогенны, их общим свойством является то, что промежуточные продукты, возникающие при их образовании, часто содержат химически реактивную карбонильную группу, происходящую из сахаров. Первичное возникновение карбонильной группировки на белках происходит в ходе реакции Амадори. После этого карбонилы сохраняются в разнообразных белковых аддуктах, образующихся в ходе реакции Майларда. Их дальнейшая деградация приводит к образованию низкомолекулярных альдегидов, диальдегидов и гликированных пептидов, которые могут снова вступать в реакцию, модифицируя новые остатки в белках (рис. 2). Таким образом, сформировалось понятие карбонильного стресса, которое означает хронические патологии, возникающие в результате гликирования и окисления. Очевидным механизмом, способным подавлять образование цитотоксических AGE-продуктов, является снижение карбонильной нагрузки. В организме это может происходить путем продукции естественных гасителей карбонила, способствующих выведению этих продуктов из циркуляции. Тем самым выполняется функция, сходная с действием фармакологических препаратов, испытываемых для AGE-терапии [18]. Ковалентное связывание с антителами имело бы в этом отношении существенные преимущества, которых нет у антител, связывающихся по обычному механизму. В этом гипотетическом иммунном процессе узнавание разнообразных молекул одним антителом достигается в результате прямого ковалентного связывания одного и того же реактивного остатка, представляющего «химический автограф» измененного собственного или чужеродного антигена. В этом отличие

от узнавания обычных эпитопов, определяющихся несколькими отличающимися структурами во всех возможных модифицированных мишенях.

Благоприятное химическое взаимодействие продуктов гликирования с пулом нормальных антител было предложено в более ранних работах по гликированию легких цепей нормальных иммуноглобулинов. Гликированные легкие (L) цепи являются одним из трех основных белков плазмы крови у больных диабетом [19]. Более того, оказалось, что гликированные пептиды животных, страдающих диабетом, реагируя с нормальными IgG, преимущественно модифицируют легкие цепи [20]. В то время как большинство белков гликируются до какого-то уровня, некоторые могут быть более активны, чем другие. Таким образом, модификация иммуноглобулинов сама по себе не является сюрпризом. Но избирательность по отношению к легким цепям показывает, что высокореактивные остатки могут быть локализованы в специфическом участке, рядом или внутри варибельного района легких цепей. Предметом дальнейшего исследования может явиться зависимость вариации химической реактивности IgG от белковой последовательности в варибельном районе. Из вышесказанного следует, что должно быть возможным получение специфических антител с повышенной реактивностью на продукты гликирующего стресса.

ИНДУКЦИЯ КОВАЛЕНТНО-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ АНТИТЕЛ

Чтобы проверить приведенную выше гипотезу, мы попытались показать, что ковалентно-связывающиеся антитела могут индуцироваться во время обычного иммунного ответа, и это может снижать гликирующий стресс путем уменьшения карбонильной нагрузки. Реактивная иммунизация

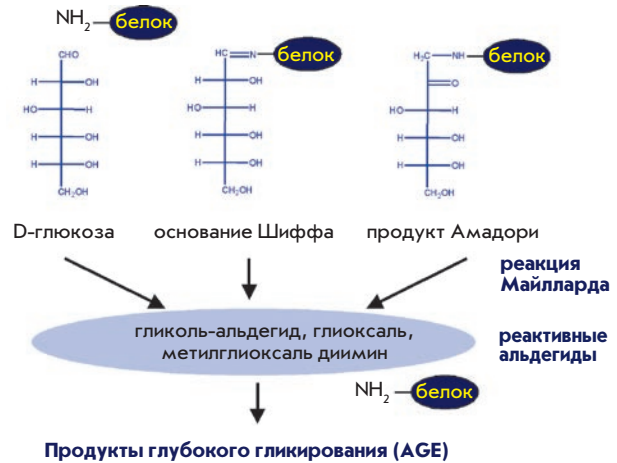


Рис. 2. Реактивные карбонилы и альдегиды являются промежуточными продуктами реакции при образовании цитотоксических AGE. Продукты неглубокого гликирования в основном получаются в результате реакции Амадори при реакции белков с восстанавливающими сахарами. Дальнейший, неферментативный распад этих продуктов приводит к образованию дополнительных реактивных альдегидов, которые сами могут модифицировать белки и образовывать сшивки. Эти процессы объединяются под общим названием реакции Майларда и приводят к образованию AGE

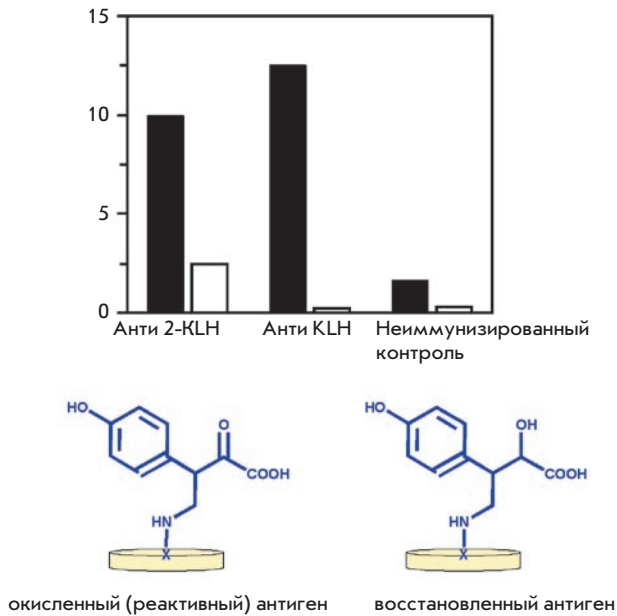


Рис. 3. Ковалентно-связывающая ELISA. Антитела, полученные против конъюгата пирувата и KLH (анти-2 KLH) или против немодифицированного KLH, специфично реагировали (по данным ELISA) с пируватом (2), конъюгированным с BSA (столбцы с заливкой). Связывание с химически восстановленным пируват-BSA (незалитые столбцы) наблюдалось в случае анти-2 KLH антител, но не в случае анти-KLH антител. Нормальные, неиммунные IgG плохо связывались с обеими молекулами. Мы предположили, что это связывание основано на реакции ковалентного связывания карбонильной группы пирувата с анти-KLH антителами. Титр – 1/разведение $\times 10^3$

могла бы привести к увеличению популяции карбонил-реактивных антител. В более раннем исследовании, используя иммунодетекцию, мы показали, что антитела, индуцированные в ответ на пируват-гаптен, конъюгированный с гемоцианином миноги (KLH), могут связывать антиген, опознавая только его карбонильную группировку в составе гаптена [21]. При этом большая часть анти-KLH антител была представлена антителами, реагирующими с карбонилом. Антитела к KLH связывались с реактивным пируватом таким же образом, что было показано с помощью дифференциального связывания с восстановленным гаптен (рис. 3). Предполагается, что это точечное связывание обусловлено образованием ковалентных аддуктов с основанием Шиффа в результате взаимодействия антитела и пируватного остатка. Для проверки способности этих антител реагировать также и с карбонильными группами продуктов гликирования мы сравнили скорость образования аддукта при использовании анти-KLH IgG и нормальных IgG в реакции с гликированными пептидами из сыворотки крыс, страдающих диабетом. Оказалось, что легкие цепи антител против KLH реагируют лучше нормального IgG [22]. По всей видимости, за это взаимодействие ответственны именно карбонильные группы, поскольку химически восстановленные пептиды не образовывали ковалентных аддуктов (рис. 4). Протеомный анализ продуктов, полученных из легких цепей, с помощью масс-спектрометрии показал,

что основные пептиды переменных районов легких цепей происходили из легких цепей типа лямбда, несмотря на то что более 90 % IgG крысы имеет легкие цепи каппа. Кроме того, легкие цепи лямбда, как оказалось, имели последовательности, идентичные неперестроенным переменным районам зародышевой линии [22]. Эти результаты замечательны в том отношении, что они указывают на возможность повышения реактивности легких цепей с помощью соматических мутаций. Несмотря на то что масс-спектрометрический анализ обнаружил только пептиды немутированных районов легких цепей, мало представленные легкие цепи с модифицированными остатками или другими мутациями могли остаться незамеченными в ходе протеомного анализа. Альтернативное объяснение состоит в том, что легкие цепи с природной реактивностью могут рекрутироваться совместно с переменными районами тяжелых цепей, обуславливая специфичность к KLH и гликированным пептидам.

РЕАКТИВНЫЕ АНТИТЕЛА СМЯГЧАЮТ ПАТОЛОГИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ГЛИКИРОВАНИЯ

Возможность блокирования образования AGE-продуктов развитием реактивного иммунного ответа *in vivo* была продемонстрирована на крысах с стрептозотоцин-индуцированным диабетом, при котором развитие диабетической нефропатии коррелирует с гликированием белков. По сравнению с животными, иммунизированными чистым адьювантом, KLH-иммунизированные крысы имели значительно сниженный уровень AGE-продуктов, который коррелировал со снижением нефропатии [22]. Улучшенная функция почек определялась по морфологии клубочков и уровню протеинурии, а также гистологически, по уменьшению уровня AGE-продуктов в почечной ткани. Мы предполагаем, что такой терапевтический эффект может быть связан с захватом циркулирующих продуктов гликирова-

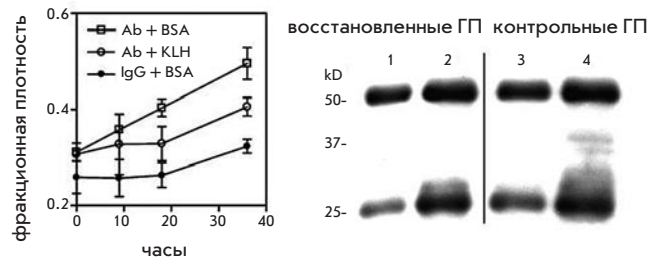


Рис. 4. Реакция анти-KLH антител с гликированными пептидами (ГП) в сыворотке больных диабетом. (Правая панель) Плотность полос, соответствующих продуктам с весом около 30 – 34 kDa, визуализированных методом SDS-PAGE и последующим иммуноблотом нанесена как доля от общей плотности легких цепей. Образование легких цепей с большей массой было отмечено при реакции антител из нормальных и KLH-иммунизированных крыс. Скорость последней реакции снижалась в присутствии KLH. (Левая панель) Реакция легких цепей с гликопептидами из сыворотки диабетических крыс в нулевой точке времени (дорожки 1 и 3) и после 24 часов (дорожки 2 и 4). Гликопептиды, восстановленные с помощью боргидрида натрия, за это время не прореагировали (дорожки 1 и 2), в то время как необработанные гликопептиды образовывали аддукты с легкими цепями весом около 30 – 34 kDa (дорожки 3 и 4)

ния реактивными антителами. Этот механизм предполагает, что гликирование самих иммуноглобулинов имеет меньший патогенный эффект, чем гликирование других белков. Гликированные антитела образуются у больных диабетом, и накопление легких цепей в сыворотке [19] указывает на то, что эти молекулы играют роль в патогенезе, вызванном AGE. Более того, гликированные IgG более эффективно удаляются из циркуляции, чем немодифицированные IgG [23]. Также было предложено, что существенные отличия в удалении различных гликированных молекул имеют место только в почечной ткани. Модифицированные легкие цепи также удаляются через почки, поскольку они обнаруживаются в моче и у здоровых, и у больных диабетом [24, 25]. Фильтрационные свойства низкомолекулярных гликированных белков также могут способствовать их избирательному удалению [26]. Таким образом, эти данные могут указывать на роль молекул иммуноглобулинов в удалении продуктов гликирования путем селективного поглощения и удаления в почках. Эти свойства, возможно, говорят о положительной роли молекул иммуноглобулинов в противодействии токсическому эффекту неферментативного гликирования.

Данные исследования также показывают, что способность антител к образованию ковалентных связей усиливается адаптивным иммунитетом. Отсутствие разнообразия в ковалентно-связывающихся легких цепях, зарегистрированное масс-спектрометрией, указывает на то, что AGE-реактивность кодируется генами зародышевой линии [22]. Однако этот метод не позволяет идентифицировать конкретные места, где произошла модификация, которые могут быть связаны с реактивными аминокислотами, меняющими последовательность прототипа. Считается, что гликозилированные остатки КЛН отвечают за кросс-реактивность анти-КЛН антител с углеводными эпитопами *Cryptococcus neoformans* [27]. Таким же образом реактивность анти-КЛН антител в отношении гликозилированных эпитопов опухолей может объяснять терапевтический эффект КЛН при карциноме мочевого пузыря [28]. И так же гликан-специфический ответ может объяснять специфическое реагирование анти-КЛН антител с гликированными пептидами. Эта специфичность может быть закодирована тяжелой цепью или может осуществляться естественным антителом, индуцированным КЛН, действующим в качестве суперантигена. Это интересные вопросы, заслуживающие дальнейшего исследования.

ПОЛУЧЕНИЕ КОВАЛЕНТНО-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ АНТИТЕЛ С ПОМОЩЬЮ РЕАКТИВНОЙ СЕЛЕКЦИИ И РЕАКТИВНОЙ ИММУНИЗАЦИИ

В дальнейших исследованиях мы использовали синтетические субстраты в качестве реактивных антигенов для поиска антител, способных образовывать ковалентные связи. Эта работа была основана на предположении, что антитела, которые селективировались по нуклеофильности в отношении химически-реактивного субстрата, также могли проявлять ферментативную активность посредством ковалентного катализа. Небольшой фосфорорганический (ОР) эфир использовался в качестве зонда селекции при изучении библиотеки фагового дисплея одноцепочечных VH-VL фрагментов на предмет необратимого ковалентного связывания [29]. Среди селективированных клонов несколько ковалентно связывали субстрат. Оказалось, что все эти ковалентно-связывающиеся Fv молекулы реагируют своими VL цепями и могут быть описаны двумя каноническими последовательностями. Более реактивный клон A.17 использовал VL продукт зародышевой линии DPL-5, который был фосфорилирован по остатку Tyr37, находящемуся в каркасном районе FR-L2. Напротив, остальные реактивные клоны использовали продукт зародышевой VL линии DPL-3 и реагировали по Tyr32 в районе CDR-L1. Эти нуклеофильные остатки тирозина, которые консервативны в зародышевой линии, в трехмерной структуре оба могут ориентироваться так, чтобы контактировать с антигеном в центре связывания. Однако структурные модели также указывают на то, что нуклеофильный Tyr37 в участке контакта между VL и VH доменами в A.17 может быть стерически недоступен для связывания с лигандом без существенных конформационных изменений (рис. 5). Поскольку библиотека была создана путем случайного комбинирования фрагментов генов VL и VH, мы не ожидали найти природных пар в scFv. Однако VH цепи реактивных клонов были в основном представлены высокотопологичными последовательностями семейства VH4. В общем, весьма вероятно, что тяжелая цепь играет очень важную роль в реактивности Fv. Было показано, что Fv может связывать структурно неродственные фосфорорганические соединения, в т.ч. реактивные нейро-соединения, что говорит об отсутствии строгой специфичности к лиганду. В ходе изучения способности A.17 Fv к каталитической активности была продемонстрирована слабая гидролитическая активность по отношению к пептидным амидам и простым карбоксильным эфирам в ка-

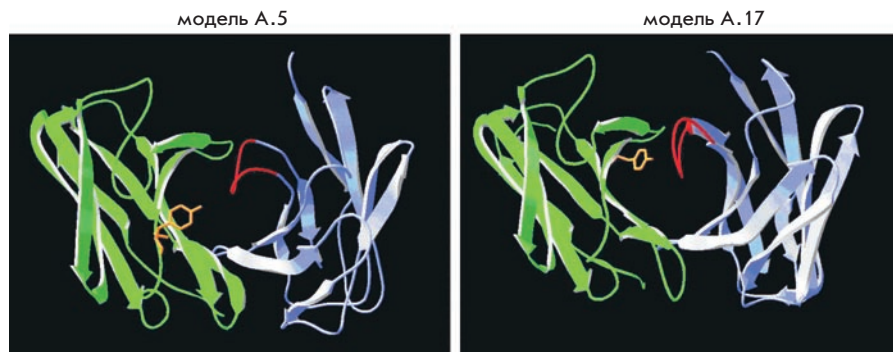
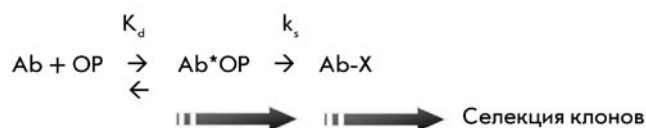


Рис. 5. Молекулярные модели переменных участков Fv фрагментов ковалентно-связывающихся антител. Желтым цветом обозначены нуклеофильные боковые цепи тирозина, участвующие в нуклеофильной атаке фосфорорганического реагента. Тирозин в сайте VL32 на модели A.5 является частью CDR1, расположенного близко к поверхности Fv домена, в то время как тирозин в сайте VL37 в A.17 находится в FR1 на стыке между VL и VH. Эта модель предполагает консервативный активный центр в глубокой впадине в A.17

честве субстратов. Таким образом, вариабельный район иммуноглобулинов по всей видимости служит в качестве примитивного ковалентного катализатора. Особенно интересно то, что активные центры такого катализатора могут быть закодированы парами VL-VH, которые присутствуют в геноме зародышевой линии. Дальнейшее изучение моноклональных фрагментов имеет большое значение, поскольку эти структуры могут помочь выяснить происхождение и биохимические функции химической реактивности вариабельных доменов.

Методы химической селекции *in vitro* могут повторять процессы первого этапа адаптивного ответа при реактивной иммунизации. Однако вклад необратимого ковалентного связывания в селекцию клонов *in vivo* еще до конца не выяснен. Используя реактивный фосфорорганический эфир (ОР) в качестве антигена и наш метод анализа ковалентного связывания, мы изучили возможность получения иммунного ответа в виде антител, изменяющихся в результате взаимодействия с антигеном. Мыши, которых иммунизировали фосфорорганическим эфиром, конъюгированным с белком-носителем, продуцировали антитела IgG, которые можно было детектировать прямо в сыворотке по их реакции с биотинилированным фосфорорганическим соединением [21]. Удивительным образом, эти поликлональные антитела модифицировались в основном по легким цепям. Оказалось, что эта активность усиливается созреванием афинности. Это позволяет предположить, что реактивные легкие цепи можно селективировать при адаптивном ответе. Однако, неясно, влияло ли ковалентное связывание с легкими цепями на эту афинность, или она просто обусловлена нековалентным связыванием. Если описать данную задачу как ферментативную систему, то скорость модификации (ковалентного захвата антигена) должна возрастать при уменьшении K_d . Нековалентного связывания, выраженного как K_d комплекса Михаелиса Ab^*OP (Антитело*ОР) должно быть достаточно для созревания афинности. Однако последующее необратимое ковалентное связывание, модифицирующее антитело ($Ab-X$), может обеспечивать кинетическую селекцию для клональной экспансии В клеток путем увеличения скорости k_s (схема). В конечном счете вопрос состоит в том, играет ли ковалентный захват антигена какую-то естественную роль в иммунитете или в защите организма-хозяина.

Схема



ХИМИЗМ ОБРАЗУЮЩИХСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ ОКИСЛЕНИЯ КАРБОНИЛЬНЫХ ЭПИТОПОВ ДЛЯ ПРИРОДНЫХ АНТИТЕЛ

Известно, что nAbs, кодируемые генами зародышевой линии, могут связываться с консервативными детерминантами на патогенах, также называемыми PAMPs (pathogen-associated molecular patterns – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны). IgM nAbs в основном продуцируются популяциями долгоживущих и самовозобновляющихся В-клеток, в том числе фракциями В-1 и В-1а

[5]. Считается, что этот В-клеточный репертуар был сохранен в ходе эволюции, поскольку он выполняет функции защиты организма-хозяина [6]. Недавно было показано, что nAbs также могут связывать измененные эпитопы апоптотических клеток и собственных белков [30]. Эти данные подтверждают концепцию гомеостатической функции nAbs, обеспечивающей выведение дедбриса, возникающего при смерти клеток, и продуктов распада белков [6, 31]. Таким образом, химические структуры, которые образуются при окислении и гликооксидации фосфолипидов мембраны, являются естественными мишенями для связывания nAbs, что указывает на еще один случай, в котором карбонильная природа боковых групп может быть связана с иммунными механизмами. Взаимодействие с фосфорилхолиновой (РС) головкой окисленных фосфолипидов и РС остатками на полисахаридах бактериальной клеточной стенки указывает на общую молекулярную детерминанту для иммунной и гомеостатической функций nAbs [7]. В качестве молекулярного рецептора PAMPs вариабельный район nAb может считаться родственным эволюционно-консервативному Toll-like рецептору (TLR), участвующему во врожденном иммунитете [32]. Эта парадигма получает все новые подтверждения и имеет далеко идущие последствия для понимания связи между врожденным и адаптивным иммунитетом.

Окисленные фосфолипиды, которые накапливаются в атеросклеротических повреждениях, служат мишенями и для врожденного, и для адаптивного иммунитета [33]. Роль реактивной кислородной группировки в формировании эпитопов для nAb или соматически модифицированных антител продолжает исследоваться. Окисление *syn*-2 ненасыщенных цепей жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов, приводит к образованию реактивных, в том числе и альдегидных, групп в составе липидных молекул. Одна гипотеза утверждает, что карбонильные группы служат реактивными якорями для модификации собственных белков фосфолипидными остатками. Небольшие альдегиды, в том числе 4-гидроксиноненал и 4-гидроксигексенал, образующиеся при перекисном окислении липидов, также участвуют в повреждении белков и цитотоксичности, что говорит о возможной роли в аутоиммунном ответе [34]. Более того, малондиальдегид, гликоальдегид и другие реактивные альдегиды, образующиеся при неполном гликировании, вызывают модификацию LDL и продукцию аутоантител в патологических случаях [35]. Взаимодействие небольших альдегидов с остатками на поверхности белков, в том числе с боковыми цепями лизина и гистидина, часто используется для объяснения возникновения неозпитопов для аутоантител, происходящих из популяции nAbs. Например, было показано, что гистиридиновые аддукты альдегидов, образующиеся при окислении липидов, вызывают образование антител, которые также связывают ДНК. Эти антитела демонстрируют высокий уровень гомологии аминокислотной последовательности с природными аутоантителами против ДНК, а также родство с nAbs [36]. Было предложено, что связывание ДНК происходит за счет структурной мимикрии между гистидин-альдегидными аддуктами и 2-дезоксирибонуклеозидами. Таким образом, роль карбонильных остатков в формировании иммунного ответа на измененные соединения организма-хозяина

может иметь несколько уровней. В общем случае сайты на собственных белках, модифицированные ди- или трикарбонным альдегидом или другими реактивными веществами, часто служат лигандами для рецепторов врожденного иммунитета, например для сквенджер-рецептора макрофагов и RAGE. Хотя в ранних исследованиях и рассматривалось ковалентное связывание альдегид-модифицированных белков со сквенджер-рецепторами через основание Шиффа, карбиноламин или другие аддукты [37], такие взаимодействия с этими или другими рецепторами врожденного иммунитета и в особенности с паратопами антител до сих пор не показаны.

ХИМИЧЕСКАЯ РЕАКТИВНОСТЬ, КАТАЛИЗ И ПРИРОДА ПОЛИРЕАКТИВНЫХ АНТИТЕЛ

Полиреактивностью nAbs называется нестрогая специфичность связывания мультвалентных молекул IgM с самыми разнообразными молекулами, например с внутриклеточными белками и нуклеиновыми кислотами [38]. Такая способность к связыванию, которую также можно называть аутореактивностью к собственным молекулам, до сих пор плохо осмыслена в структурном отношении. Повышенная avidность, обусловленная распознаванием повторяющихся структур на собственных молекулах или мембранах, является правдоподобным механизмом для полиреактивности. В рамках этой концепции повторяющиеся структуры могли бы служить особой формой молекулярной поверхности, идентифицирующей поврежденные ткани или собственные измененные антигены. Так, высокая плотность PC групп на окисленных фосфолипидах и полисахаридах клеточных стенок представляет собой общий сигнал для связывания nAb с апоптотическими клетками и с инфекционными агентами. Сходным образом, фосфатные цепочки или последовательности нуклеотидов ДНК могут служить паттерном распознавания для ДНК-распознающих антител, связывающих остатки ядра поврежденных клеток [39, 40].

Сообщения, демонстрирующие, что аутоантитела к ДНК, встречающиеся при волчанке и других аутоиммунных заболеваниях, имеют фосфодиэстеразную активность, служат дополнительным примером того, как распознавание молекул переменными районами Ig осуществляется с помощью химической реактивности [41]. Эти антитела используют аминокислотные остатки, расположенные в сайтах связывания, для катализа гидролитического расщепления ДНК лигандов. Удивительное свойство ДНК-гидролизующих аутоантител – это их зависимость от ионов металлов, что делает их похожими на обычные ДНКазы [42, 43]. Несмотря на это, ферментоподобные антитела не демонстрируют особой специфичности к нуклеотидной последовательности и неспецифично гидролизуют одноцепочечные и двуцепочечные ДНК [42, 44]. Структурные исследования указывают на то, что каталитический сайт для гидролиза ДНК может быть закодирован в переменном районе легкой цепи в конфигурации, близкой к зародышевой [44]. Новые исследования показывают, что мутации в переменных районах легких и тяжелых цепей, которые улучшают связывание с ДНК, также могут улучшать гидролитическую активность [42]. Твердо установлено, что IgG аутоантитела против ДНК сильно диверсифицируются при помощи процессов антиген-

направленного адаптивного иммунитета [45, 46]. Например, положительно заряженные остатки лизина и аргинина в сайте связывания повышают сродство к отрицательно заряженной молекуле ДНК. Однако появление этих остатков может быть связано с изменением предпочтительности использования VH или VL генов зародышевой линии [47, 48]. Данные кристаллографических исследований говорят о том, что ДНК-связывающие аутоантитела взаимодействуют с ДНК посредством стандартного сайта связывания, состоящего из CDR петель [49, 50]. Мутации в VL и VH областях приводят к введению остатков, содействующих непосредственному контакту с антигеном или изменяющих конформацию молекулы, что косвенно улучшает комплементарность. Несмотря на это, онтогенез ДНК аутоантител также может отражать врожденную способность nAbs к связыванию ДНК. Распознавание ДНК может происходить напрямую из распознавания природными антителами PC групп, что подтверждается приобретением способности к связыванию ДНК и потерей способности к связыванию PC в результате точечной мутации в моноклональном мышине nAb T15 [51]. Более ранние исследования также показали, что ДНК-связывающие аутоантитела проявляют ограниченное использование VH генов [52] и могут целиком кодироваться зародышевыми V генами без каких-либо соматических изменений [53–55]. Предполагается, что реактивность переменных районов, закодированных в зародышевой линии, также может объяснять протеолитическую активность природных аутоантител [56]. В целом эти данные подкрепляют гипотезу о том, что каталитические активности переменных районов Ig существуют в качестве врожденной и естественной функции иммуноглобулинов. Тот факт, что каталитическая активность аутоантител в основном работает с пептидными или олигонуклеотидными субстратами, делает менее выраженным различие между врожденным и адаптивным иммунитетом, поскольку эти субстраты могут вступать в глубокое взаимодействие с обычным антиген-связывающим участком и предполагаемыми реактивными сайтами. Соответственно, специфичность к модификациям собственных антигенов говорит о том, что вовлечен адаптивный иммунитет, однако нестрогая специфичность к структурам субстрата, фланкирующим место гидролиза, предполагает неспецифическую реактивность примитивного активного сайта. Более подробные биохимические и структурные исследования реактивных или каталитических сайтов nAbs должны прояснить биологическое значение этой новой функции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ковалентно-связывающиеся антитела, полученные с помощью иммунизации или реактивной селекции, а также каталитические антитела, образующиеся при аутоиммунных патологиях, по всей видимости, имеют много общего с nAbs. Например, это распознавание сходных молекулярных функциональных групп, таких как реактивные карбонильные и фосфорные группы, образовавшиеся в результате окисления, а также сохранение VH и VL районов в конфигурации, близкой к зародышевой. Эти черты могут быть связаны на самом глубоком уровне, поскольку логично предположить, что и химическая, и ферментативная реактивность – это признаки, подвергавшиеся активному и дол-

гому отбору, и поэтому сохраненные в репертуаре V генов. В то время как nAbs – это IgM, которые распознают молекулярные паттерны на белках и клеточных стенках с помощью мультивалентного связывания, реактивные и природные каталитические антитела являются IgG. При всем этом слабое нековалентное связывание обычно также является атрибутом ферментативного катализа. В процессе катализа, по теории переходного состояния, самое сильное взаимодействие происходит между ферментом и продуктом реакции переходного состояния. В ковалентном комплексе связывание по большей части происходит за счет химической связи между остатком в активном центре фермента и функциональной группой лиганда. То, что nAbs связываются множеством слабых взаимодействий с небольшими, минимально измененными эпитопами, хорошо согласуется с распознаванием функциональности субстрата для дальнейшей реакции. Таким образом, химическая реактивность может служить механизмом для перехода от слабого нековалентного связывания к прочному связыванию или каталитической активности. Физиологическая роль реактивных и каталитических антител должна быть полнее осмыслена, учитывая то, что их роль в иммунитете и гомеостазе постепенно начинает проясняться. Участие nAbs в ответе на окислительный стресс и в разборке продуктов апоптоза говорит о том, что эта жизненно важная роль в поддержании гомеостаза могла существовать еще до возникновения адаптивного иммунитета. Те же соображения могут быть применимы к ковалентно-связывающимся антителам,

которые служат для защиты от гликемического стресса. Возникновение реактивных и каталитических функций антител в адаптивных и аутоиммунных ответах может объясняться реальной биологической ролью или дефектом регулирования иммунитета. Тот факт, что продукцию таких антител можно индуцировать с помощью адаптивного иммунитета, дает возможность вызвать благотворный защитный ответ на окислительный или гликоокислительный стресс. С другой стороны, роль природных каталитических аутоантител остается неясной, а их существование может просто свидетельствовать о нарушении переключения репертуара V генов при индукции IgG аутоантител [57, 58]. Получение каталитических антител с заданными свойствами возможно с помощью адаптивного иммунного ответа в результате процесса созревания аффинности, увеличивающей реактивность к субстрату или связывание с промежуточным продуктом реакции. В какой степени каталитические антитела с заданными свойствами имитируют функции природных каталитических аутоантител? Важные данные о такой возможности были получены в раннем исследовании, которое показало высокий уровень гидролитической активности в моноклональных антителах аутоиммунного репертуара [59]. Дальнейшие исследования ковалентной реактивности антител, получаемых при иммунизации или обнаруженных в зародышевом репертуаре, должны привести к более глубокому пониманию полезной или патологической роли этого необычного и нового свойства антител, и дать ему техническое применение. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lerner R.A., Benkovic S.J., Schultz P.G.// At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. *Science*. 1991. 252. 659–667.
- Wagner J., Lerner R.A., Barbas C.F. 1 Efficient aldolase catalytic antibodies that use the enamine mechanism of natural enzymes// *Science*. 1995. 270. 1797–1800.
- Zhu X., Tanaka F., Hu Y., Heine A., Fuller R., Zhong G., Olson A.J., Lerner R.A., Barbas C.F., Wilson I.A. The origin of enantioselectivity in aldolase antibodies: crystal structure, site-directed mutagenesis, and computational analysis// *J Mol Biol*. 2004. 343. 1269–1280.
- Chou M.Y., Fogelstrand L., Hartvigsen K., Hansen L.F., Woelkers D., Shaw P.X., Choi J., Perkmann T., Backhed F., Miller Y.I. et al.// Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. 2009.119. 1335–1349.
- Kearney J.F. Innate-like B cells.// *Springer Semin Immunopathol*. 2005. 26. 377–383.
- Lutz H.U., Binder C.J., Kaveri S. Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease// *Trends Immunol*. 2005. 30. 43–51.
- Briles D.E., Forman C., Hudak S., Claflin J.L.// Anti-phosphorylcholine antibodies of the T15 idiotype are optimally protective against *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp Med*. 1982. 156. 1177–1185.
- Vlassara H., Palace M.R.// Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med*. 2002. 251. 87–101.
- Brownlee M.// Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*. 1992. 15. 1835–1843.
- Cerami A., Vlassara H., Brownlee M.// Role of advanced glycosylation products in complications of diabetes. 1988. 11 Suppl 1. 73–79.
- Saito A., Nagai R., Tanuma A., Hama H., Cho K., Takeda T., Yoshida Y., Toda T., Shimizu F., Horiuchi S. et al.// Role of megalin in endocytosis of advanced glycation end products: implications for a novel protein binding to both megalin and advanced glycation end products. *J Am Soc Nephrol*. 2003. 14. 1123–1131.
- Zhu W., Sano H., Nagai R., Fukuhara K., Miyazaki A., Horiuchi S.// The role of galectin-3 in endocytosis of advanced glycation end products and modified low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001. 280. 1183–1188.
- Vlassara H. //The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev*. 2001. 17. 436–443.
- Pricci F., Leto G., Amadio L., Iacobini C., Romeo G., Cordone S., Gradini R., Barsotti P., Liu F.T., Di Mario U. et al.// Role of galectin-3 as a receptor for advanced glycosylation end products. *Kidney Int Suppl*. 2000. 77. S31–39.
- Smedsrod B., Melkko J., Araki N., Sano H., Horiuchi S.// Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. *Biochem J*. 1997. 322 (Pt 2). 567–573.
- Vasan S., Foiles P.G., Founds H.W.// Therapeutic potential of AGE inhibitors and breakers of AGE protein cross-links. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001. 10. 1977–1987.
- Bucciarelli L.G., Wendt T., Qu W., Lu Y., Lalla E., Rong L.L., Goova M.T., Moser B., Kislinger T., Lee D.C. et al.// RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation*. 2002. 106. 2827–2835.
- Soulis-Liparota T., Cooper M., Papazoglou D., Clarke B., Jerums G.// Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes*. 1991. 40. 1328–1334.
- Mitsuhashi T., Li Y.M., Fishbane S., Vlassara H.// Depletion of reactive advanced glycation endproducts from diabetic uremic sera using a lysozyme-linked matrix. *J Clin Invest*. 1997. 100. 847–854.
- Gugliucci A., Menini T.// Circulating advanced glycation peptides in streptozotocin-induced diabetic rats: evidence for preferential modification of IgG light chains. *Life Sci*. 1998. 62. 2141–2150.
- Armentano F., Knight T., Makker S., Tramontano A.// Induction of covalent binding antibodies. *Immunol Lett*. 2006. 103. 51–57.
- Shcheglova T., Makker S., Tramontano A.// Reactive immunization suppresses advanced glycation and mitigates diabetic nephropathy. 2009. 20. 1012–1019.
- Kennedy D.M., Skillen A.W., Self C.H.// Glycation increases the vascular clearance rate of IgG in mice. *Clin Exp Immunol*. 1993. 94. 447–451.
- Groop L., Makiperna A., Stenman S., DeFronzo R.A., Teppo A.M.// Urinary excretion of k light chains in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int*. 1990. 37. 1120–1125.
- Hutchison C.A., Harding S., Hewins P., Mead G.P., Townsend J., Bradwell A.R., Cockwell P. 2008. Quantitative assessment of serum and urinary polyclonal free light chains in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008. 3. 1684–1690.
- Kowluru A., Kowluru R.A.// Preferential excretion of glycosylated albumin in C57BL-

- Ks-J mice: effects of diabetes. *Experientia*. 1992. 48. 486–488.
27. May R.J., Beenhouwer D.O., Scharff M.D.// Antibodies to keyhole limpet hemocyanin cross-react with an epitope on the polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* and other carbohydrates: implications for vaccine development. *J Immunol*. 2003. 171. 4905–4912.
 28. Harris J.R., Markl J.// Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*. 1999. 30. 597–623.
 29. Reshetnyak A.V., Armentano M.F., Ponomarenko N.A., Vizzuso D., Durova O.M., Ziganshin R., Serebryakova M., Govorun V., Gololobov G., Morse H.C. et al.// Routes to covalent catalysis by reactive selection for nascent protein nucleophiles. *J Am Chem Soc*. 2007. 129. 16175–16182.
 30. Shaw P.X., Goodyear C.S., Chang M.K., Witztum J.L., Silverman G.J.// The autoreactivity of anti-phosphorylcholine antibodies for atherosclerosis-associated neo-antigens and apoptotic cells. *J Immunol*. 2003. 170. 6151–6157.
 31. Quartier F., Potter P.K., Ehrenstein M.R., Walport M.J., Botto M.// Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro. *Eur J Immunol*. 2005. 35. 252–260.
 32. Pasare C., Medzhitov R.// Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol*. 2005. 560. 11–18.
 33. Binder C.J., Shaw P.X., Chang M.K., Boullier A., Hartvigsen K., Horkko S., Miller Y.I., Woelkers D.A., Corr M., Witztum J.L.// The role of natural antibodies in atherogenesis. *J Lipid Res*. 2005. 46. 1353–1363.
 34. Toyoda K., Nagae R., Akagawa M., Ishino K., Shibata T., Ito S., Shibata N., Yamamoto T., Kobayashi M., Takasaki Y. et al.// Protein-bound 4-hydroxy-2-nonenal: an endogenous triggering antigen of anti-DNA response. *J Biol Chem*. 2007. 282. 25769–25778.
 35. Younis N., Sharma R., Soran H., Charlton-Menys V., Elseweidy M., Durrington P.N.// Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Curr Opin Lipidol*. 2008. 19. 378–384.
 36. Akagawa M., Ito S., Toyoda K., Ishii Y., Tatsuda E., Shibata T., Yamaguchi S., Kawai Y., Ishino K., Kishi Y. et al.// Bispecific abs against modified protein and DNA with oxidized lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. 103. 6160–6165.
 37. Horiuchi S., Murakami M., Takata K., Morino Y.// Scavenger receptor for aldehyde-modified proteins. *J Biol Chem*. 1986. 261. 4962–4966.
 38. Zhou Z.H., Tzioufas A.G., Notkins A.L.// Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. *J Autoimmun*. 2007. 29. 219–228.
 39. Kawarada Y., Miura N., Sugiyama T.// Antibody against single-stranded DNA useful for detecting apoptotic cells recognizes hexadeoxynucleotides with various base sequences. *J Biochem*. 1998. 123. 492–498.
 40. Frankfurt O.S., Robb J.A., Sugarbaker E.V., Villa L.// Monoclonal antibody to single-stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis. *Exp Cell Res*. 1996. 226. 387–397.
 41. Shuster A.M., Gololobov G.V., Kvashuk O.A., Bogomolova A.E., Smirnov I.V., Gabibov A.G.// DNA hydrolyzing autoantibodies. *Science*. 1992. 256. 665–667.
 42. Kim Y.R., Kim J.S., Lee S.H., Lee W.R., Sohn J.N., Chung Y.C., Shim H.K., Lee S.C., Kwon M.H., Kim, Y.S.// Heavy and light chain variable single domains of an anti-DNA binding antibody hydrolyze both double- and single-stranded DNAs without sequence specificity. *J Biol Chem*. 2006. 281. 15287–15295.
 43. Gololobov G.V., Chernova E.A., Schourov D.V., Smirnov I.V., Kudelina I.A., Gabibov A.G.// Cleavage of supercoiled plasmid DNA by autoantibody Fab fragment: application of the flow linear dichroism technique. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. 92. 254–257.
 44. Gololobov G.V., Rumbley C.A., Rumbley J.N., Schourov D.V., Makarevich O.I., Gabibov A.G., Voss E.W., Jr., Rodkey L.S.// DNA hydrolysis by monoclonal anti-ssDNA autoantibody BV 04-01: origins of catalytic activity. *Mol Immunol*. 1997. 34. 1083–1093.
 45. Wellmann U., Letz M., Herrmann M., Angermuller S., Kalden J.R., Winkler T.H.// The evolution of human anti-double-stranded DNA autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. 102. 9258–9263.
 46. Demaison C., Chastagner P., Theze J., Zouali M.// Somatic diversification in the heavy chain variable region genes expressed by human autoantibodies bearing a lupus-associated nephritogenic anti-DNA idiotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. 91. 514–518.
 47. Harada T., Suzuki N., Mizushima Y., Sakane T.// Usage of a novel class of germ-line Ig variable region gene for cationic anti-DNA autoantibodies in human lupus nephritis and its role for the development of the disease. *J Immunol*. 1994. 153. 4806–4815.
 48. O'Keefe T.L., Datta S.K., Imanishi-Kari T.// Cationic residues in pathogenic anti-DNA autoantibodies arise by mutations of a germ-line gene that belongs to a large VH gene subfamily. *Eur J Immunol*. 1992. 22. 619–624.
 49. Tanner J.J., Komissarov A.A., Deutscher S.L.// Crystal structure of an antigen-binding fragment bound to single-stranded DNA. *J Mol Biol*. 2001. 314. 807–822.
 50. Herron J.N., He X.M., Ballard D.W., Blier P.R., Pace P.E., Bothwell A.L., Voss E.W., Jr., Edmundson A.B.// An autoantibody to single-stranded DNA: comparison of the three-dimensional structures of the unliganded Fab and a deoxynucleotide-Fab complex. *Proteins*. 1991. 11. 159–175.
 51. Giusti A.M., Chien N.C., Zack D.J., Shin S.U., Scharff, M.D.// Somatic diversification of S107 from an antiphosphocholine to an anti-DNA autoantibody is due to a single base change in its heavy chain variable region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987. 84. 2926–2930.
 52. Kieber-Emmons T., von Feldt J.M., Godillot A.P., McCallus D., Srikantan V., Weiner D.B., and Williams W.V.// Isolated VH4 heavy chain variable regions bind DNA: characterization of a recombinant antibody heavy chain library derived from patient(s) with active SLE. *Lupus*. 1994. 3. 379–392.
 53. Siminovitch K.A., Chen P.P.// The biologic significance of human natural autoimmune responses: relationship to the germline, early immune and malignant B cell variable gene repertoire. *Int Rev Immunol*. 1990. 5. 265–277.
 54. Siminovitch K.A., Misener V., Kwong P.C., Song Q.L., Chen P.P.// A natural autoantibody is encoded by germline heavy and lambda light chain variable region genes without somatic mutation. *J Clin Invest*. 1989. 84. 1675–1678.
 55. Sanz I., Dang H., Takei M., Talal N., Capra J.D.// VH sequence of a human anti-Sm autoantibody. Evidence that autoantibodies can be unmutated copies of germline genes. *J Immunol*. 1989. 142. 883–887.
 56. Planque S., Bangale Y., Song X.T., Karle S., Taguchi H., Poindexter B., Bick R., Edmundson A., Nishiyama Y., Paul S.// Ontogeny of proteolytic immunity: IgM serine proteases. *J Biol Chem*. 2004. 279. 14024–14032.
 57. Matejuk A., Beardall M., Xu Y., Tian Q., Phillips D., Alabyev B., Mannoor K., Chen C.// Exclusion of natural autoantibody-producing B cells from IgG memory B cell compartment during T cell-dependent immune responses. *J Immunol*. 2009. 182. 7634–7643.
 58. Brown M., Schumacher M.A., Wiens G.D., Brennan R.G., Rittenberg M.B.// The structural basis of repertoire shift in an immune response to phosphocholine. *J Exp Med*. 2000. 191. 2101–2112.
 59. Tawfik D.S., Chap R., Green B.S., Sela M., Eshhar Z.// Unexpectedly high occurrence of catalytic antibodies in MRL/lpr and SJL mice immunized with a transition-state analog: is there a linkage to autoimmunity? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. 92. 2145–2149.