



УДК 577.155.2

РІВЕНЬ СІАЛУВАННЯ АНТИГІСТОНОВИХ АНТИТІЛ СИРОВАТКИ КРОВІ ХВОРИХ НА СИСТЕМНИЙ ЧЕРВОНИЙ ВОВЧАК

*І. Б. Магорівська¹, Р. О. Білий¹, Л. Муноз²,
М. Геррманн², Р. С. Стойка¹, Ю. Я. Кім¹*

¹ Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна
e-mail: kit@cellbiol.lviv.ua

² Інститут клінічної імунології (Університетська клініка 3)
Глюкштрассе, 4а, Ерланген 91054, Німеччина

Антигістонові аутоантитіла є одними із маркерних антитіл, які використовують у діагностиці хворих на системний червоний вовчак (СЧВ). Поширеним явищем при аутоімунних захворюваннях, зокрема при СЧВ, є запальні процеси, зумовлені високим титром аутоантитіл. Відомо, що відсутність термінальних сіалових кислот у молекул IgG сприяє їх прозапальним властивостям. Метою роботи було дослідити рівень сіалових кислот у вуглеводних залишках антигістонових IgG-антитіл сироватки крові хворих на СЧВ. Роботу виконували за двома методичними підходами. У першому випадку антитіла очищали зі сироватки крові послідовними хроматографіями на гістон-сефарозі та протеїн G-сефарозі із подальшою детекцією сіалових кислот у складі вуглеводних молекул IgG вестерн-блотингом з використанням сіалоспецифічного, попередньо біотинільованого, лектину бузини чорної (SNA). У другому випадку IgG-антитіла виділяли зі сироватки крові хроматографією на протеїн G-сефарозі, очищену фракцію розділяли на сіаловмісні та несіаловмісні АТ хроматографією на SNA-сефарозі із подальшою перевіркою їх спорідненості до гістонів за допомогою IEA. У результаті досліджень було встановлено, що рівень сіалування вуглеводних детермінант антигістонових IgG-антитіл сироватки крові хворих на СЧВ значно нижчий, ніж у контрольних препаратів АТ. Отримані дані вказують на те, що низький рівень (або відсутність) сіалування антигістонових аутоантитіл сприяє прозапальній дії цих імуноглобулінів в організмі хворих на системний червоний вовчак.

Ключові слова: сироватка крові, антигістонові аутоантитіла, системний червоний вовчак, вуглеводні детермінанти, сіалові кислоти.

Скорочення: IEA – імуноензимний аналіз, АТ – антитіла, авто-АТ – аутоантитіла.

ВСТУП

Імуноглобуліни класу G (IgG) сироватки крові людини – це гетеротетрамерні глікопротеїни, які складаються з двох важких (γ) і двох легких (λ або κ) ланцюгів, з'єднаних між собою дисульфідними зв'язками [1, 2]. Молекула IgG складається з двох функціональних доменів: двох Fab ('fragment antigen binding') фрагментів, що специфічно розпізнають антиген, і Fc ('fragment crystallizable') ділянки, що забезпечує ефекторні функції антитіл [1, 3, 4]. До важких ланцюгів фрагменту Fc ($C\gamma 2$ домен) молекули IgG ковалентно приєднані гетерогенні вуглеводні детермінанти у положенні аспарагіну 297 [1, 3, 5]. Центральна частина вуглеводних ланцюгів молекули IgG представлена залишками N-ацетилглюкозаміну, манози і фукози. Термінальною частиною вуглеводних ланцюгів цих АТ є залишки галактози і сіалової кислоти [6, 7]. На сьогоднішній день достовірно встановлено, що наявність N-кінцевих олігосахаридів у Fc-фрагменті є важливим для ефекторних функцій IgG-антитіл [1, 3, 5, 8]. Встановлено, що видалення вуглеводних ланцюгів призводить до конформаційних змін у Fc-фрагментів молекул IgG і, як наслідок, до зростання афінності цих АТ до Fc γ Rs рецепторів лейкоцитів, а також до компоненту комплементу C1q, залучених у розвиток запальних процесів в організмі людини [3, 8, 9].

У нормі IgG відіграють важливу роль у захисті організму від патогенних мікроорганізмів [1]. При аутоімунних захворюваннях (системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз і т.д.) у крові пацієнтів продукуються IgG-антитіла, які розпізнають антигени власного організму (автоантигени) і тому є аутоантитілами (ауто-АТ). Такі ауто-АТ, через зв'язування із аутоантигенами, опсонізують тканини власного організму, що призводить до руйнування цих тканин і розвитку хронічних запальних процесів [2, 8]. Найбільш дослідженими серед ауто-АТ є імуноглобуліни класу G, що розпізнають антигени клітинного ядра (антинуклеарні ауто-АТ). Антинуклеарні ауто-АТ зустрічаються у 80% хворих на СЧВ і слугують молекулярними маркерами як прогнозу важкості перебігу цього захворювання, так і ефективності його лікування. Серед антинуклеарних ауто-АТ важливе діагностичне і прогностичне значення мають ауто-АТ зі спорідненістю до двоспіральної ДНК (анти-ДНК АТ), а також ауто-АТ до гістонів (антигістонові ауто-АТ) [10–13]. Володіючи перехресною реактивністю до різних білкових аутоантигенів ауто-АТ можуть бути задіяні в різноманітні механізми розвитку патогенезу, в тому числі в індукції апоптозу імунокомпетентних клітин, що є ключовою ланкою в розвитку аутоімунного синдрому і захворювання загалом [13, 14]. Нещодавно було встановлено, що наявність термінальних сіалових залишків у складі N-кінцевих олігосахаридів Fc-фрагменту молекули IgG забезпечує протизапальні властивості АТ, тоді як відщеплення сіалових кислот від цих олігосахаридів призводить до появи прозапальних властивостей АТ, пов'язаних із активацією клітинного імунітету і системи комплементу [5, 6, 9, 15]. На основі вищенаведених даних можна припустити, що сукупність прозапальних і аутологічних властивостей антитіл сироватки крові хворих на СЧВ робить їх високопатогенними чинниками щодо організму людини. Згідно з цим, метою нашої роботи було дослідити рівень сіалування антигістонових IgG-аутоантитіл сироватки крові хворих на СЧВ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Сироватку крові хворих на системний червоний вовчак (СЧВ) одержували згідно з умовами спільного Німецько-Українського проекту ІБК НАН України з Інститутом

клінічної імунології (Університетська клініка м. Ерланґен, Німеччина). СЧВ у пацієнтів діагностовано на основі критеріїв Американської колегії ревматологів (ACR, 1997). Зразки сироватки крові зберігали при -20°C .

Фракціювання IgG-антитіл за спорідненістю до гістон-сефарози. Препарат загальних гістонів тимусу теляти, люб'язно наданий д.б.н. М.Д. Луциком, іммобілізували на активовану сефарозу („Sigma”, США) відповідно до протоколу виробника. Для отримання антигістонових антитіл зразки сироватки крові піддавали афінній хроматографії на колонці, що містила 1 мл гістон-сефарози, попередньо урівноваженої у 20 мМ трис-НСІ-буфері, що містив 150 мМ NaCl, рН 7,5 (ТБС). На колонку вносили 1 мл сироватки й інкубували впродовж 10 хв при кімнатній температурі. Колонку промивали ТБС, рН 7,5. Фракцію білків зі спорідненістю до сорбенту елюювали 3М NaCl, діалізували впродовж 18 год проти ТБС і антигістонові IgG-антитіла додатково очищали хроматографією на колонці із протеїн G-сефарозою згідно з [16]. IgG елюювали 0,1 М гліцин-НСІ, рН 2,6 і нейтралізували 1,5 М трис-НСІ, рН 8,8, після чого АТ діалізували проти 20 мМ трис-НСІ, рН 7,5 протягом 18 год.

Фракцію білків сироватки крові, яка не зв'язалася з гістон-сефарозою, також піддавали хроматографії на протеїн G-сефарозі („Sigma”, США), IgG-антитіла елюювали 0,1 М гліцин-Cl, рН 2,6, і діалізували проти ТБС. У подальшому цю фракцію АТ використовували як препарат IgG, збіднений щодо антигістонових антитіл (негістонові-АТ). Концентрацію білка у зразках вимірювали спектрофотометром NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, США). Одержані препарати антигістонових і негістонових АТ аналізували електрофорезом у 12% ПААГ за присутності 0,1% додецилсульфату натрію (ДСН).

Фракціювання IgG-антитіл за спорідненістю до SNA-сефарози. Препарати IgG із високим (сіаловані АТ) і низьким (несіаловані АТ) вмістом термінальних сіалових кислот отримували афінною хроматографією на колонці, наповненій SNA-сефарозою, з фракції IgG, попередньо очищених із сироватки крові хворих на СЧВ хроматографією на протеїн G-сефарозі згідно з роботою [17]. Колонку промивали ТБС, який містив 0,1 М CaCl_2 , після чого на неї наносили 2–3 мг IgG у тому ж буфері. Колонку інкубували при кімнатній температурі упродовж 10 хв і IgG, які зв'язались з афінним сорбентом, елюювали 0,5 М лактозою, розчиненою у 0,2 М оцтової кислоті. Фракції IgG діалізували у 20 мМ трис-НСІ, рН 7,5 протягом 18 год. За необхідності фракцію, що не зв'язалася з носієм колонки, повторно наносили на афінний сорбент. Концентрацію білка у зразках вимірювали на спектрофотометрі NanoDrop ND-1000. Препарати сіалованих і несіалованих IgG аналізували електрофорезом у 12% ПААГ за присутності 0,1% ДСН і в подальшому використовували для дослідження їхньої імунореактивності щодо гістонів тимусу теляти.

Імуноензимний аналіз. Препарати сіалованих і несіалованих IgG-антитіл, попередньо отримані зі сироватки крові хворих на СЧВ хроматографією на SNA-сефарозі, тестували на імунореактивність щодо тотальних гістонів тимусу теляти. Для цього на 96-лункові планшети (Nunc, США) сорбували гістони тимусу теляти (8 мкг/мл) у 0,1 М карбонатному/бікарбонатному буфері, рН 9,6 при 4°C упродовж 18 год. Планшети тричі промивали ТБС, що містив 0,05% твін-20, і блокували 5% БСА („Sigma”, США) у цьому ж буфері впродовж 2 год при 37°C . У лунки вносили препарати АТ (5 мкг/мл) та інкубували 2 год при 37°C у ТБС-буфері, що містив 2% БСА та 0,05% твін-20. Після завершення інкубації лунки промивали ТБС, що містив

0,05% твін-20 (3 рази). Наявність АТ детектували після інкубації з антитілами кози, моноспецифічними щодо важких ланцюгів IgG людини, кон'югованих із пероксидазою хрону („Jackson Labor”, Німеччина). Імунокон'югати виявляли розчином субстрату, який містив: 0,1% ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) у ДМСО (диметилсульфоксид) („Sigma”, США) розчиненого у 100 мМ Na₂HPO₄ та 50 мМ лимонній кислоті, рН 4,5. Розчин ТМВ і субстратний буфер змішували у співвідношенні 1:10 і додавали 0,006% розчину пероксиду водню. Реакцію зупиняли внесенням у лунки 25% сірчаної кислоти (1:1). Вміст АТ визначали за оптичною густиною розчину при 450 нм на сканері мікропланшетів BioTek (США).

Електрофорез білків у поліакриламідному гелі. Електрофорез білків проводили у 12% поліакриламідному гелі (ПААГ) за присутності 0,1% ДСН у трис-гліциновому буфері рН 8,3 при 100 В протягом 3 год, використовуючи камеру для електрофорезу Mini-PROTEAN Tetra Cell („Bio-Rad”, США). Для проведення електрофоретичного розділення препарати білків прогрівали впродовж 1 хв за температури 95°C у буфері Леммлі. Для визначення молекулярної маси білків використовували стандарти молекулярних мас білків фірми „Fermentas” (Литва). Після розділення білків гелі фарбували розчином Кумасі R-250 або використовували для електропереносу і подальшого лектиноблот-аналізу білків.

Лектиноблот-аналіз. Рівень сіалування отриманих препаратів АТ оцінювали за їх спорідненістю до біотинільованого лектину бузини чорної (SNA-біотин). Препарати АТ (8–2 мкг білка на лунку) розділяли у 12% ПААГ за присутності 0,1% ДСН і електроблотингом переносили на PVDF мембрану („Roth”, Німеччина) [17]. Після перенесення білків мембрану промивали ТБС із 0,05% твін-20 і 0,1 М CaCl₂, та блокували 5% БСА, розчиною у тому ж буфері протягом 18 год при 4°C. Мембрану промивали тричі й інкубували з кон'югатом SNA-біотин у розчині ТБС із 0,05% твін-20 і 0,1 М CaCl₂ у розведенні 1:1 000. Після відмивки мембрани інкубували 1 год в цьому ж розчині у присутності кон'югата авідин-пероксидази хрону („Vector”, Німеччина) за розведення 1:20 000. Після відмивки (3 рази по 5 хв) візуалізацію білків проводили за допомогою набору реактивів для хемілюмінесценції (Sigma, США).

Статистична обробка результатів досліджень. Усі досліди повторювали тричі. У роботі наведено середні значення величин (M), розрахованих за результатами трьох вимірювань. Середню похибку (m) отриманого результату вираховували за значенням середньої квадратичної похибки (σ). Статистичний аналіз проводили, користуючись критерієм Стьюдента (t). Вірогідними вважали дані у випадку, коли p≤0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що антигістонові АТ є патогенними чинниками, залученими в опсонізацію тканин організму пацієнтів, хворих на СЧВ [18]. При цьому відсутність у вуглеводних ланцюгах молекул IgG термінальних залишків сіалових кислот (десіалованих IgG) може суттєво підсилювати прозапальний, а значить, відповідно, і патогенний ефект цих аутоантитіл при захворюванні на СЧВ. Для перевірки цієї гіпотези нами було вибрано два альтернативні методичні підходи. У першому випадку ми визначали рівень сіалування антигістонових IgG-антитіл сироватки крові хворих на СЧВ щодо контрольних препаратів IgG. Для цього сироватку крові

хворих на СЧВ тестували на наявність антигістонових АТ імуноензимним аналізом (рис. 1). Імунопозитивні зразки сироватки крові хворих на СЧВ було використано нами для поетапного афінного очищення антигістонових IgG-антитіл, що включало хроматографію білків на гістон-сефарозі та подальшу хроматографію елююваних з колонки АТ на колонці із протеїн G-сефарозою. На рис. 2, А показано дані електрофоретичного аналізу препаратів IgG, очищених на протеїн G-сефарозі із фракції АТ, що зв'язалися із гістон-сефарозою (рис. 2, А доріжки 1) та препаратів IgG, очищених із фракції АТ, які не володіли спорідненістю щодо цього афінного сорбенту (рис. 2, доріжка 2). Присутність антигістонових АТ в препаратах IgG тестували за допомогою ІЕА (рис. 2, Б). Із отриманих даних видно, що IgG фракції АТ, елююваних з гістон-сефарози, мають високу спорідненість до гістонів тимусу теляти порівняно з IgG фракції АТ, яка не зв'язалася з цим сорбентом. Це свідчить про те, що препарати IgG, очищені зі сироватки крові хворих на СЧВ послідовними хроматографіями на колонках з гістон-сефарозою і протеїн G-сефарозою, містять у своєму складі антигістонові IgG-антитіла.

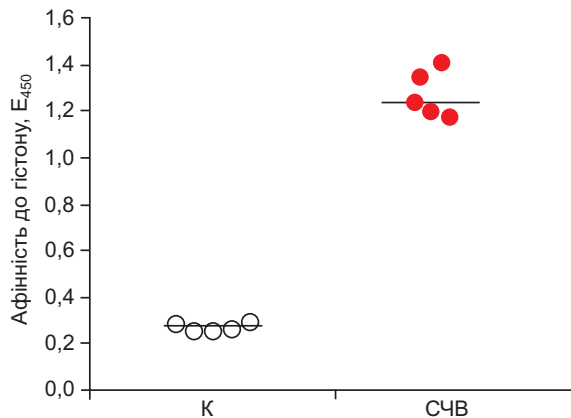


Рис. 1. Рівень антигістонових IgG антитіл у сироватці крові хворого на системний червоний вовчак (СЧВ) і клінічно здорового донора (К). Кожна точка на графіку відповідає розведенню сироватки: 1:100–1:1 600. Лінії на точках відображають усереднене значення вмісту антигістонових антитіл у досліджуваних сироватках крові

Fig. 1. ELISA quantification of anti-histone antibodies in blood serum of a systemic lupus erythematosus (SLE) patient and normal healthy donor (HND). Each dot on the figure correspond to sera dilutions: 1:100–1:1 600. Lines on the dots present median measurements of anti-histone antibodies

Відомо, що лектин бузини чорної (*Sambucus nigra* agglutinin, SNA-лектин) має спорідненість до термінальних сіалових кислот глікопротеїнів [6, 17, 19]. Ці літературні дані дають змогу використати біотинілований кон'югат SNA для визначення вмісту залишків сіалової кислоти в положенні α 2,6 N-глікану Fc-фрагментів [6, 17, 19] препаратів антигістонових і неантигістонових IgG-антитіл лектиноблот-аналізом.

На рис. 3 видно, що антигістонові IgG-антитіла, на відміну від фракції АТ, що не виявляли спорідненості до гістон-сефарози, не зв'язувалися зі сіалоспецифічним SNA-лектином. Отримані дані вказують на те, що рівень термінальних залишків сіалових кислот антигістонових АТ сироватки крові хворих на СЧВ значно нижчий, ніж у контрольних препаратах IgG.

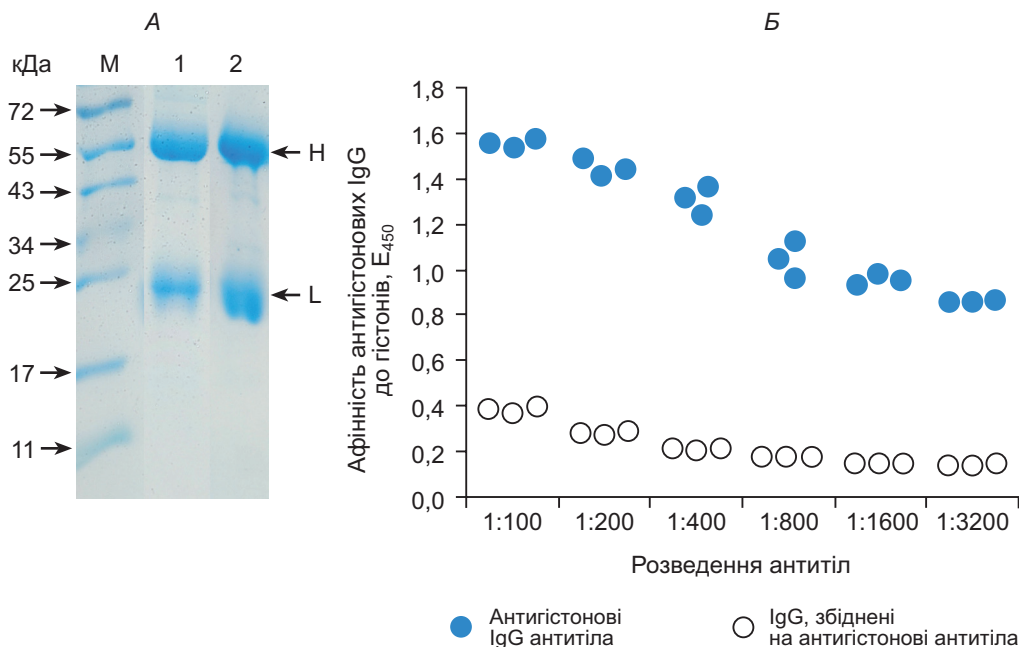


Рис. 2. Очищення й аналіз антигістонових IgG сироватки крові хворого на СЧВ: А – SDS-електрофорез у 12% ПААГ фракції антигістонових IgG (доріжка 1) і фракції IgG, збіднених на антигістонові АТ (доріжка 2). М – маркери молекулярної маси білків. Справа стрілками показано положення на гелі важких (H) і легких (L) ланцюгів IgG. Б – IEA спорідненості до гістонів препаратів АТ, очищених із сироватки крові хворих на СЧВ. Розведення IgG: 1:100–1:3 200

Fig. 2. Analysis of anti-histone IgGs purified from blood serum of SLE patient: A – SDS-electrophoresis in 12% PAGE of anti-histone IgG (line 1) and IgG of flow through of anti-histone antibodies (line 2). M – molecular weight marker. Position of heavy (H) and light (L) chains of IgG in the gel are shown by arrows. Б – ELISA measurement of the affinity to histones of Ab preparations purified from blood serum of patients with SLE. IgG dilutions: 1:100–1:3 200

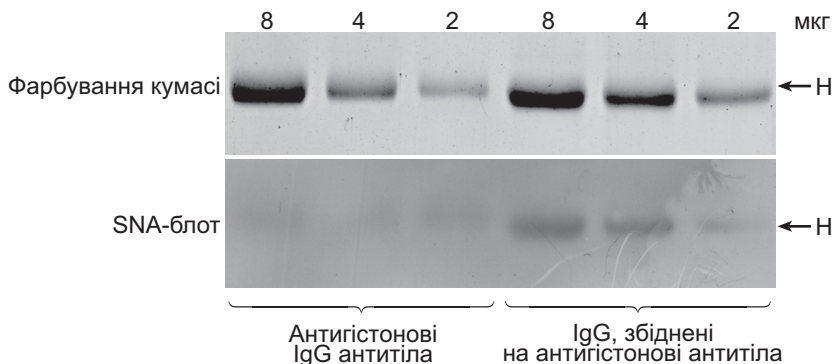


Рис. 3. Лектиноблот-аналіз рівня термінальних сіалових кислот вуглеводних детермінант у важких (H) ланцюгах фракції IgG зі спорідненістю до гістон-сефарози (антигістонові IgG) та фракції АТ за відсутності спорідненості до цього сорбенту. 8, 4, 2 мкг відповідають кількості АТ нанесених на доріжки ПААГ при аналізі

Fig. 3. Lectin-blot analysis of terminal sialic acid of N-linked glycans in the heavy (H) chains of IgG fractions after histone-sepharose chromatography (anti-histone IgG) fraction and flow through of anti-histone antibodies. 8, 4, 2 μg – the amount of antibodies on PAGE, which were used for lectin-blot analysis

Рівень сіалування антигістонових АТ сироватки крові хворих на СЧВ досліджували також альтернативним підходом, який включав отримання препаратів IgG із сироватки крові хворих на СЧВ хроматографією на протеїн G-сефарозі, подальшим їх розділенням на сіаловмісні та несіаловмісні АТ хроматографією на колонці зі SNA-сефарозою і аналізом спорідненості IgG-антитіл отриманих фракцій щодо гістонів за допомогою IEA. У результаті фракціонування білків сироватки крові за цим методом нами було отримано два препарати АТ, що відрізнялися за спорідненістю до SNA (рис. 4, А). Ці фракції АТ було досліджено за допомогою IEA на імунореактивність щодо гістонів тимусу теляти (рис. 4, Б). Із рис. 4, Б видно, що фракція несіалованих IgG-антитіл має суттєво більшу спорідненість до гістонів порівняно з фракцією сіалованих IgG-антитіл. Отримані дані вказують на те, що фракція несіалованих IgG-антитіл сироватки крові хворих на СЧВ збагачена антигістоновими авто-АТ.

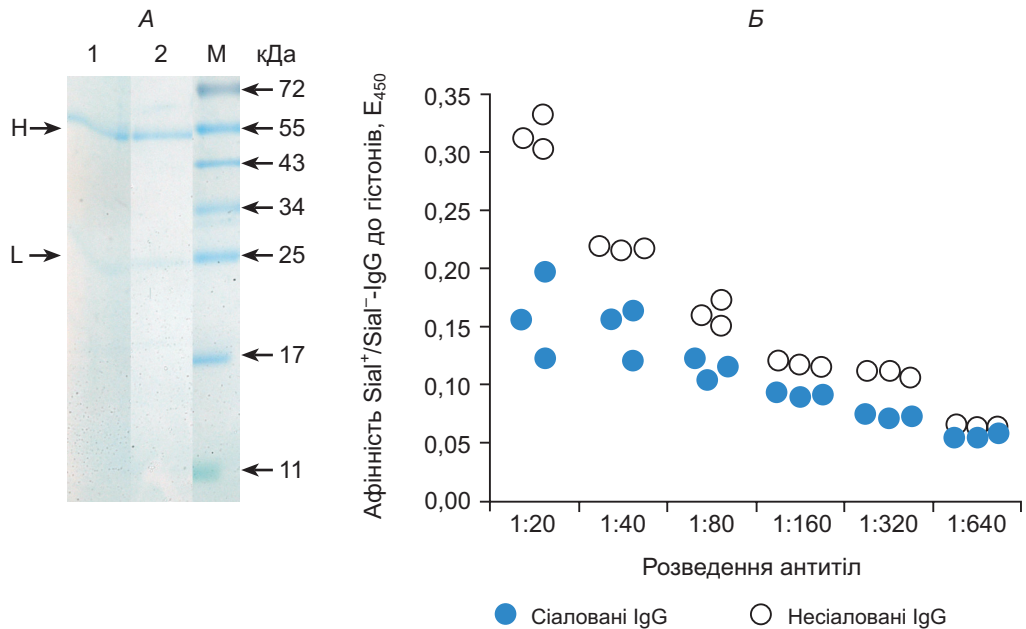


Рис. 4. Аналіз препаратів сіалованих і несіалованих IgG-антитіл, очищених із сироватки крові хворих на СЧВ хроматографією на протеїн G-сефарозі і SNA-сефарозі щодо спорідненості до гістонів тимусу теляти: А – SDS-електрофорез у 12% ПААГ фракції сіалованих IgG (доріжка 1) і несіалованих IgG (доріжка 2). М – маркери молекулярної маси білків. Н – важкі та L – легкі ланцюги IgG. Б – IEA спорідненості до загальних гістонів фракції сіалованих і несіалованих IgG-антитіл

Fig. 4. Analysis of IgG fractions purified from blood serum of SLE patient on protein G-sepharose and SNA-sepharose column: А – SDS-electrophoresis in 12% PAGE of sialylated IgG (line 1) and not sialylated IgG (flow through) (line 2). М – molecular weight marker. Н – heavy chains of IgG. L – light chains of IgG. Б – ELISA measurement of the affinity to histones of sialylated (black dots) (Sial⁺-IgG) and not sialylated (white dots) (Sial⁻-IgG) fractions of IgG-antibodies. IgG dilutions: 1:20–1:640

На основі отриманих нами даних можна стверджувати, що антигістонові антитіла сироватки крові хворих на СЧВ характеризуються низьким вмістом (або відсутністю) термінальних залишків сіалових кислот вуглеводних ланцюгів їхніх Fc-фрагментів. Причини, за яких відбувається десіалування олігосахаридів АТ при СЧВ, на сьогодні не встановлена. У першу чергу, це може бути пов'язано із дефектами

глікозилювання, або високою активністю внутрішньоклітинних сіалідаз В-лімфоцитів, продуцентів авто-АТ. З іншого боку, не виключено, що десіалювання імуноглобулінів відбувається у крові пацієнтів за участю мембранозв'язаних або розчинних форм сіалідаз. До перших можна віднести сіалідази мембран апоптичних клітин і їхніх мікровезикул, залучених у процес ефероцитозу (усунення відмираючих клітин) [20, 21]. Як розчинні (сироваткові) сіалідази можуть використовуватися каталітично активні антитіла (абзими), виявлені нами в сироватці крові хворих на множинну мієлому і СЧВ [20, 22]. Ці абзими здатні відщеплювати сіалільні залишки у глікопротеїнів еритроцитарних мембран і очищених гангліозидів.

Необхідно відзначити, що механізми десіалювання вуглеводних детермінант АТ і участь у цьому процесі сіалідаз потребує детального дослідження. Встановлення особливостей будови глікозильних залишків антитіл необхідне для своєчасної діагностики автоімунного синдрому, що, у свою чергу, стане підставою для призначення відповідного лікування і запобігання прогресуванню автоімунного процесу.

ВИСНОВКИ

У вуглеводних ланцюгах Fc-фрагментів антигістонових IgG-антитіл сироватки крові хворих на системний червоний вовчак відсутні термінальні сіалові кислоти. Рівень сіалювання антигістонових IgG може бути маркером прозапальних процесів у хворих на СЧВ.

Дану роботу виконано за підтримки білатерального Німецько-Українського проекту та проекту, наданого Західно-Українським біомедичним дослідницьким центром (WUBMRC).

1. Dimitrov J.D., Bayry J., Siberil S., Kaveri S.V. Sialylated therapeutic IgG: a sweet remedy for inflammatory diseases? **Nephrol. Dial. Transplant**, 2007; 22(5): 1301–4.
2. Lim P.L., Zouali M. Pathogenic autoantibodies: emerging insights into tissue injury. **Immunol. Lett**, 2006; 103(1): 17–26.
3. Scanlan C.N., Burton D.R., Dwek R.A. Making autoantibodies safe. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, 2008; 105(11): 4081–2.
4. Anthony R.M., Ravetch J.V. A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. **J. Clin. Immunol**, 2010; 30(Suppl 1): S9–14.
5. Albert H., Collin M., Dudziak D. et al. *In vivo* enzymatic modulation of IgG glycosylation inhibits autoimmune disease in an IgG subclass-dependent manner. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2008; 105(39): 15005–9.
6. Kaneko Y., Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. **Science**, 2006; 313(5787): 670–3.
7. Butler M., Quelhas D., Critchley A.J. et al. Detailed glycan analysis of serum glycoproteins of patients with congenital disorders of glycosylation indicates the specific defective glycan processing step and provides an insight into pathogenesis. **Glycobiology**, 2003; 13(9): 601–22.
8. Nimmerjahn F., Anthony R.M., Ravetch J.V. Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for *in vivo* activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2007; 104(20): 8433–7.
9. Anthony R.M., Wermeling F., Ravetch J.V. Novel roles for the IgG Fc glycan. **Ann NY Acad. Sci**, 2012; 1253: 170–80.
10. Bach J.F., Koutouzov S., Van Endert P.M. Are there unique autoantigens triggering autoimmune diseases? **Immunol. Rev**, 1998; 164: 139–55.
11. Isenberg D.A. Systemic lupus erythematosus: immunopathogenesis and the card game analogy. **J. Rheumatol. Suppl**, 1997; 48: 62–6.

12. Tan E.M. Antinuclear antibodies: diagnostic markers and clues to the basis of systemic autoimmunity. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 1988; 7(5 Suppl): S3–9.
13. Kubota T. [Advances in systemic lupus erythematosus]. *Nihon Rinsho*, 1999; 57(2): 329–32.
14. Nezlin R., Alarcon-Segovia D., Shoenfeld Y. Immunochemical determination of DNA in immune complexes present in the circulation of patients with systemic lupus erythematosus. **J. Autoimmun.**, 1998; 11(5): 489–93.
15. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. The antiinflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. **J. Exp. Med.**, 2007; 204(1): 11–5.
16. Magorivska I.B., Bilyy R.O., Havrylyuk A.M. et al. Anti-histone H1 IgGs from blood serum of systemic lupus erythematosus patients are capable of hydrolyzing histone H1 and myelin basic protein. **J. Mol. Recognit.**, 2010; 23(5): 495–502.
17. Anthony R.M., Nimmerjahn F., Ashline D.J. et al. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. **Science**, 2008; 320(5874): 373–6.
18. Tan E.M. Pathophysiology of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus and related diseases. **Adv. Dent. Res.**, 1996; 10(1): 44–6.
19. Stadlmann J., Weber A., Pabst M. et al. A close look at human IgG sialylation and subclass distribution after lectin fractionation. **Proteomics**, 2009; 9(17): 4143–53.
20. Bilyy R., Tomin A., Tolstyak Ya. et al. Cell Surface Glycans at SLE – Changes during cells death, utilization for disease detection and molecular mechanism underlying their modification. In **Autoimmune Disorders – Pathogenetic Aspects** / ed.: Mavragany C.P. InTech, Rijeka, Croatia, 2011. P. 89–110.
21. Shkandina T., Herrmann M., Bilyy R. Sweet kiss of dying cell: Sialidase activity on apoptotic cell is able to act toward its neighbors. **Autoimmunity**, 2012 (PMID: 22928616).
22. Bilyy R., Tomin A., Mahorivska I. et al. Antibody-mediated sialidase activity in blood serum of patients with multiple myeloma. **J. Mol. Recognit.**, 2011; 24: 576–584.

SIALYLATION OF ANTI-HISTONE ANTIBODIES IN BLOOD SERUM OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS PATIENTS

I. B. Mahorivska¹, R. O. Bilyy¹, L. Muñoz²,
M. Herrmann², R. S. Stoika¹, Yu. Ya. Kit¹

¹*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14/16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: kit@cellbiol.lviv.ua*

²*Institute of Clinical Immunology (University Hospital) 3
4a, Glückstrasse, Erlangen 91054, Germany*

Anti-histone autoantibodies belong to main marker antibodies used in the diagnostics of systemic lupus erythematosus (SLE) patients. During autoimmune diseases, especially SLE, prevalent process of inflammation is caused by high titers of the auto-antibodies. It is known that the level of IgG sialylation affect their anti-inflammatory properties. The aim of the experiments was to investigate the level of sialylation of anti-histone IgG-antibodies from blood serum of patients with SLE. Investigation was carried out by two methodological approaches. In the first case, the antibodies were purified from blood serum by affinity chromatography on histone-Sepharose and protein G-Sepharose followed by Western blot detection of sialic acid residues in the carbohydrate chains of IgG molecules using sialospecific lectin of that was *Sambucus nigra* (SNA) previously biotinylated. In the second case, IgG-antibodies were isolated from blood serum by affinity chromatography on protein G-Sepharose, this fraction was separated on sialylated and not sialylated IgG by SNA-Sepharose chromatography followed by measuring their affinity to histones by ELISA. In this manuscript, it is shown that the level of sialylation of

anti-histone IgG is lower than in control preparation of antibodies. Our data showed that anti-histone autoantibodies that devoid of sialic acid residues at the ends of the carbohydrate chains of Fc-fragments possess their inflammatory properties in patients with SLE.

Keywords: blood serum, anti-histone auto-antibodies, systemic lupus erythematosus, carbohydrate chains, sialic acid residues.

Comments: ELISA – enzyme linked immunosorbent assay, Ab – antibodies, auto-Ab – auto-antibodies.

УРОВЕНЬ СИАЛИРОВАНИЯ АНТИГИСТОНОВИХ АНТИТЕЛ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

*І. Б. Магорівська¹, Р. А. Білий¹, Л. Муноз²,
М. Геррманн², Р. С. Стойка¹, Ю. Я. Кім¹*

¹ Інститут біології клітки НАН України, ул. Драгоманова, 14/16, Львов, 79005, Україна
e-mail: kit@cellbiol.lviv.ua

² Інститут клінічної імунології (Університетська клініка 3)
Глюкштраسه, 4а, Ерланген 91054, Германия

Антигистоновы аутоантитела являются одними из маркерных антител, используемых в диагностике пациентов с системной красной волчанкой (СКВ). Распространённым явлением при аутоиммунных заболеваниях, в частности при СКВ, являются воспалительные процессы, обусловленные высоким титром аутоантител. Известно, что отсутствие терминальных сиаловых кислот у молекул IgG способствует их провоспалительным свойствам. Целью работы было исследовать уровень сиаловых кислот в углеводных детерминантах антигистоновых IgG-антител сыворотки крови больных СКВ. Работу выполняли по двум методическим подходам. В первом случае антитела очищали с сыворотки крови на гистон-сефарозе и протеин G-сефарозе с последующей детекцией сиаловых кислот в составе углеводов IgG молекул вестерн-блотингом с использованием сиалоспецифического, предварительно биотинилированного лектина бузины черной (SNA). Во втором случае IgG-антитела выделяли из сыворотки крови хроматографией на протеин G-сефарозе. Препарат IgG разделяли на сиалированные и несиалированные антитела хроматографией на SNA-сефарозе с последующей проверкой их сродства к гистонам с помощью ИФА. В результате исследований было установлено, что уровень сиалирования углеводных детерминант антигистоновых IgG-антител сыворотки крови больных СКВ значительно ниже, чем у контрольных препаратов антител. Полученные данные указывают на то, что низкий уровень (или отсутствие) сиалирования антигистоновых аутоантител способствует провоспалительным действиям этих иммуноглобулинов в организме больных системной красной волчанкой.

Ключевые слова: сыворотка крови, антигистоновые аутоантитела, системная красная волчанка, углеводные детерминанты, сиаловые кислоты.

Сокращения: ИФА – иммуноферментный анализ, АТ – антитела, авто-АТ – аутоантитела.

Одержано: 04.10.2012