

ПРОТЕОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ IgG-АНТИТІЛ МИШЕЙ, ІМУНІЗОВАНИХ ГІСТОНАМИ ТИМУСА ТЕЛЯТИ

Ю. Я. КИТ¹, Н. КОРНІЙ^{1,3}, І. Й. КРІЛЬ², І. Б. МАГОРІВСЬКА¹,
В. ТКАЧЕНКО¹, Р. О. БІЛИЙ^{1,2}, Р. С. СТОЙКА¹

¹Інститут біології клітини НАН України, Львів;
e-mail: kit@cellbiol.lviv.ua;

²Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна;

³Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна.

Метою роботи було з'ясувати здатність гістонів спричинювати утворення протеолітично активних IgG у мишей лінії BALB/c. Для цього мишей імунізували препаратом тотальної фракції гістонів тимуса теляти. IgG виділяли із сироватки крові імунізованих і неімунізованих тварин осадженням 33%-им сульфатом амонію з наступною хроматографією протеїнів на колонці із протеїн G-сефарозою. Як субстрати протеолітичної активності використовували гістони, основний протеїн мієліну (ОПМ), лізоцим, БСА, овальбумін, α 2-макроглобулін, казеїн і цитохром с. Встановлено, що препарати IgG сироватки крові імунізованих мишей здатні гідролізувати гістон НІ, корові гістони та ОПМ. IgG сироватки крові неімунізованих мишей не виявляли протеолітичної активності щодо цих протеїнів. Гель-фільтрація антитіл показала, що їхня гідролізуюча активність відносно гістонів властива саме IgG, а не домішкам ензимів. Високий рівень протеолітичної активності препаратів IgG щодо гістонів також виявлено в IgG сироватки крові хворих на ревматоїдний артрит, але не в IgG клінічно здорових донорів. Одержані дані свідчать про те, що гістони позаклітинної локалізації можуть спричинювати утворення протабзимів в організмі ссавців. У роботі розглянуто можливе походження цих протабзимів, а також потенційну біологічну активність їх.

Ключові слова: миші лінії BALB/c, гістони, імунізація, антитіла, антигенна специфічність, протеолітична активність.

Встановлено, що взаємодія антитіл із антигенами може призводити не лише до зв'язування, але і до руйнування або модифікації цих антигенів. Антитіла, які виявляють каталітичну активність, одержали назву каталітично активних антитіл або абзимів [1–4]. Субстратами каталітичної активності абзимів можуть бути протеїни, нуклеїнові кислоти та олігосахариди. Абзими з протеолітичною активністю одержали назву протабзимів [2, 4]. Протабзими класу IgG, здатні гідролізувати інтестинальний вазоактивний пептид, було вперше виявлено в сироватці крові хворих на астму [5]. Також було показано, що рівень цих антитіл у сироватці крові позитивно корелює із загостренням хвороби, що вказує на патогенність цих автоантитіл в організмі людини [6]. Встановлено, що руйнування певних автоантигенів протабзимами тісно пов'язане з розвитком певних автоімунних захворювань. Наприклад,

у хворих на гострий алергічний тиреоїдит антитиреоглобулінові автоантитіла здатні гідролізувати тиреоглобулін [7], у хворих на алергічний міокардит виявлено автоантитіла, які гідролізують міозин [8], а у хворих на розсіяний склероз присутні автоантитіла, здатні гідролізувати основний протеїн мієліну (ОПМ) [8, 9]. Вузька субстратна специфічність робить протабзими перспективними молекулярними маркерами у прогнозуванні розвитку автоімунних захворювань. Протеолітично активні антитіла було виявлено в сироватці крові хворих на деякі онкологічні та спадкові захворювання [10, 11], а також у частини клінічно здорових людей [3, 12–15]. Показано, що в нормі протабзими можуть бути залучені в руйнування і видалення з організму низки патогенних протеїнів, задіяних у розвитку вірусних інфекцій [3] і нейродегенеративних захворювань [12–15]. Ці дані свідчать про захисну функцію протабзимів. Отже, прота-

абзими в організмі людини залежно від їхньої субстратної специфічності можуть виявляти як патогенну, так і захисну функцію.

Нами вперше було встановлено, що в сироватці крові хворих на розсіяний склероз (РС) і хворих на системний червоний вовчак (СЧВ) присутні антитіла, здатні гідролізувати гістон H1 [12, 16, 17]. Антитіла із протеолітичною активністю щодо цього протеїну також було виявлено в сироватці крові хворих на множинну мієлому [12]. У сироватці крові здорових донорів протабзими із протеолітичною активністю щодо гістону H1 не виявлено. На відміну від сироватки крові у молозиві деяких клінічно здорових жінок-породіль було знайдено секреторні антитіла класу IgA (sIgA) із подібною протеолітичною активністю [16]. Порівняльний аналіз антигенної специфічності і протеолітичної активності протабзимів сироватки крові хворих на СЧВ і молозива клінічно здорових породіль показав, що антитіла зі спорідненістю до гістону H1 здатні гідролізувати як гістон H1, так і ОПМ [12, 17, 18]. Також було встановлено, що рівень цих протабзимів у сироватці крові хворих на СЧВ позитивно корелює з тяжкістю перебігу захворювання [19]. Одержані дані вказують на те, що протабзими, здатні гідролізувати гістон H1 і ОПМ, можуть слугувати біомаркерами розвитку деяких аутоімунних захворювань. Процеси утворення цих протабзимів в організмі людини залишаються нез'ясованими. Ми припустили, що однією з причин появи протабзимів, які гідролізують гістон H1 і ОПМ, може бути імунна відповідь на накопичення в організмі людини гістонових комплексів або нуклеосом внаслідок порушення кліренсу продуктів відмирання клітин у хворих на СЧВ.

З метою встановлення етіології та особливостей перебігу аутоімунних процесів широко використовуються тваринні моделі, переважно на мишах [20]. Найпоширенішими у таких дослідженнях є миші ліній NZB/NZW F1, інбредні MRL, BXSB/Yaa, в яких спостерігається вікова спонтанна індукція патологічних процесів, близьких за етіологією до аутоімунних захворювань людини [21–23]. У мишей інших ліній розвиток аутоімунних процесів можна спричинити введенням певних чинників, наприклад, пристану [23, 24]. Для вивчення протеолітично активних антитіл використовують лінії мишей: NZB/W, MRL-lpr/lpr, SJL/J [8, 22–24]. У мишей

лінії BALB/c не спостерігається спонтанний розвиток жодних аутоімунних процесів, і вони нечутливі до дії пристану. Одержано дані про те, що імунізація мишей компонентами хроматину конконавалін А – активованих аллогенних спленоцитів зумовлює появу анти-ДНК і антигістонових аутоантитіл у сироватці крові імунізованих мишей [25]. Виходячи з цих даних, ми припустили, що імунізація мишей гістонами евкаріотичних клітин приводить до індукції в організмі тварин протеолітично активних антитіл із широкою субстратною специфічністю. У нашій роботі охарактеризовано протеолітичну активність антитіл сироватки крові мишей лінії BALB/c, імунізованих гістонами тимуса теляти.

Матеріали і методи

У роботі використовували сироватку периферійної крові 8 хворих на ревматоїдний артрит і 8 здорових донорів, яку було надано кафедрою імунології та алергології Львівського національного медичного університету (зав. кафедри професор В. В. Чоп'як) відповідно до договору про науково-технічну співпрацю.

Імунізацію мишей лінії BALB/c фракцією загальних гістонів із тимуса теляти проводили за раніше розробленою нами схемою, використовуючи повний і неповний ад'ювант Фрейнда [26]. На першому етапі імунізації мишам внутрішньочеревно вводили 50 мкг фракції загальних гістонів тимуса теляти в повному ад'юванті Фрейнда. Цю процедуру повторювали через 2, 4, 6 і 8 тижнів (останні дві імунізації проводили з неповним ад'ювантом Фрейнда і без нього). Через 10 днів після останньої імунізації тварин під наркозом декапітували і брали в них кров.

Очищення IgG-антитіл із сироватки крові мишей проводили за методикою [19]. Для цього 1 мл сироватки крові мишей центрифугували при 5000 g протягом 5 хв, антитіла осаджували 33%-им розчином $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Препарати антитіл діалізували проти буфера ТБС (20 мМ трис-НCl, pH 7,5; 0,15 М NaCl) протягом 18 год і очищали афінною хроматографією на колонці, наповненій протеїн G-сефарозою (Sigma-Aldrich, США). IgG елюювали з колонки 0,1 М буфером гліцин-НCl (pH 2,6) і нейтралізували 1,5 М буфером трис-НCl (pH 8,8), після чого антитіла діалізували проти розчину ТБС протягом 18 год. Концентрацію протеїну в зразках

вимірювали на спектрофотометрі NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, США).

Визначення антигенної специфічності IgG-антитіл імунізованих мишей проводили, використовуючи методи дот-блот і Вестерн-блот аналізу. Антигенами слугували тотальні гістони тимуса теляти (Аххога, ФРН), лізоцим курячого яйця (Reonal, Угорщина) та БСА (Sigma, США). У першому випадку антигени розводили у ТБС. Зразки об'ємом 2 мкл із вмістом антигенів від 8 нг до 2 мкг наносили на нітроцелюлозну мембрану з порами 0,45 мкм і висушували. Мембрану обробляли 1%-им розчином БСА у буфері ТБС упродовж 1 год при кімнатній температурі, після чого інкубували протягом ночі з IgG-антитілами (15 мкг/мл) у буфері ТБСТ (ТБС із додаванням 0,05% твіну 20). Після завершення інкубації мембрану відмивали у буфері ТБСТ (тричі протягом 10 хв) та інкубували 1 год при кімнатній температурі з антитілами, специфічними до мишачого IgG, кон'югованими з пероксидазою хрому (Sigma, США), розведеними у співвідношенні 1 : 6000 у буфері ТБС. Мембрану відмивали тричі буфером ТБС протягом 10 хв, положення імунореактивних протеїнів виявляли фарбуванням у системі 3,3-діамінобензидин/ H_2O_2 .

У другому випадку протеїни розділяли електрофорезом у присутності DSNa у 12%-му ПААГ [27]. Після переносу протеїнів на мембрану останню інкубували з 1%-им БСА у буфері ТБС упродовж 1 год при 25 °С. Після цього мембрану інкубували впродовж ночі з IgG-антитілами (15 мкг/мл) сироватки крові імунізованих мишей у буфері ТБСТ. Мембрану тричі відмивали цим самим буфером та інкубували впродовж 1 год з антитілами, специфічними до мишачого IgG, кон'югованого із пероксидазою хрому (Sigma) і розведеного в буфері ТБС у співвідношенні 1 : 6000. Мембрану промивали буфером ТБС тричі протягом 10 хв і положення імунореактивних протеїнів визначали за допомогою хемілюмінесценції.

Гель-фільтрацію препаратів IgG проводили за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у буфері ТБС (рН 6,8) на колонці Bio-Sil SEC 250 Column (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Франція) на хроматографі Perkin Elmer HPLC Series 200 зі швидкістю потоку елюенту 1 мл/хв. Одержані хроматографічні фракції аналізували за допомогою електрофорезу в 12%-му ПААГ у присутності DSNa. Визначали протеолітичну активність препаратів IgG.

Субстратами протеолітичної реакції слугували комерційні препарати ОПМ мозку бика (Sigma-Aldrich), лізоциму курячого яйця (Reonal, Угорщина), цитохрому *c* серця бика (Reonal, Угорщина) α 2-макроглобуліну сироватки крові людини (люб'язно наданий проф. М. Д. Луциком), казеїну коров'ячого молока, овальбуміну (Сінбіас, Україна), БСА (Sigma, США), а також препарати гістону H1 і тотальних гістонів тимуса теляти (Аххога, ФРН). Протеоліз здійснювали впродовж 3 год при 37 °С в 20 мкл інкубаційного середовища, яке містило 20 мМ трис-НСІ (рН 7,5), 1–3 мкг антитіл і 5–10 мкг протеїну-субстрату. Реакцію зупиняли додаванням до середовища 5 мкл денатураційного буфера, який містив 0,2 М трис-НСІ (рН 6,8), 4% DSNa, 8% 2-меркаптоетанолу та 20% гліцеролу. Реакційну суміш нагрівали при 100 °С протягом 3 хв, а продукти гідролізу розділяли електрофорезом у 15%-му ПААГ за присутності DSNa. Протеїни на гелі фарбували Coomassie R-250.

Для визначення кінетичних параметрів реакції гідролізу до 5,5 мкг IgG-антитіл додавали препарати корових гістонів тимуса теляти в кількості 5–35 мкг, розчинених у 20 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,5). Реакційну суміш інкубували впродовж 6 год при температурі 37 °С, після чого реакцію зупиняли додаванням 4 мкл 4-кратного денатураційного буфера. Продукти гідролізу розділяли електрофорезом у 15%-му ПААГ у присутності DSNa. Протеїни фарбували Coomassie R-250, після чого гелі сканували і здійснювали кількісний аналіз продуктів гідролізу, використовуючи програмне забезпечення GelPro v4,5. K_m і V_{max} реакції визначали за рівнянням Лайнуївера–Берка для одностратної реакції за допомогою програми SigmaPlot (Systay Software Ins., США). Значення величини RI становило 0,994.

Результати та обговорення

Раніше нами було показано, що імунізація мишей тотальними гістонами тимуса теляти призводить до появи антигістонових антитіл у сироватці крові піддослідних тварин [26]. При цьому фізичний стан цих мишей (кваліть і частковий параліч задніх кінцівок) вказував на розвиток у них патологічних процесів із нез'ясованою етіологією. Ми припустили, що імунна відповідь на дію гістонів евкаріотичних клітин може бути причиною появи протеолітично активних

антитіл в організмі ссавців. Оскільки відомо, що гістони є еволюційно консервативними протеїнами [28], як антигени ми використали препарат фракції тотальних гістонів тимуса теляти. Для перевірки зазначеного вище припущення нами було проведено імунізацію мишей лінії BALB/c тотальними гістонами тимуса теляти за раніше розробленою схемою [26].

Після завершення імунізації, IgG-антитіла виділяли із сироватки крові за схемою, що включала осадження імуноглобулінів 33%-им розчином амонію сульфату і наступну афінну хроматографію протеїнів на колонці із протеїн G-сефарозою. Очищені препарати IgG-антитіл досліджували на антигенну специфічність, використовуючи для цього дот-блот та Вестерн-блот аналіз. Антигенами слугували тотальні гістони тимуса теляти, лізоцим курячого яйця, ОПМ бика та БСА. Встановлено, що у сироватці крові імунізованих мишей містяться IgG-антитіла, здатні зв'язуватися із позитивно зарядженими протеїнами (рис. 1). Результати дот-блот (рис. 1, А) і Вестерн-блот-аналізу (рис. 1, Б) вказують на те, що ці антитіла характеризуються вузькою специфічністю до нативних (не денатурованих) і поліреактивністю до денатурованих протеїнів. У першому випадку спостерігали здатність

IgG-антитіл зв'язуватися із гістонами тимуса теляти, а у другому – було виявлено ширшу антигенну специфічність антитіл, оскільки вони зв'язувалися з лізоцимом, гістонами та ОПМ. Ці дані свідчать про те, що імунізація мишей препаратом тотальних гістонів тимуса теляти може спричинити продукування антитіл з антигенною специфічністю щодо широкого спектра позитивно заряджених протеїнів.

Наступним кроком було дослідження IgG-антитіл на протеолітичну активність. Протеїновими субстратами протеолітичної реакції слугували ОПМ, лізоцим, цитохром *c*, макроглобулін, казеїн, овальбумін, БСА, гістон H1 і препарат загальних гістонів (містять гістон H1 і корові гістони). Встановлено, що очищені IgG-антитіла (рис. 2, А) з високою ефективністю руйнують гістон H1, ОПМ і корові гістони тимуса теляти із утворенням низькомолекулярних продуктів реакції (рис. 2, Б). У той самий час ці ж антитіла були неактивні щодо гідролізу решти протеїнових субстратів (лізоцим, цитохром *c*, макроглобулін, казеїн, овальбумін, БСА). Необхідно відмітити, що подібну субстратну специфічність було виявлено також у протабзимів, виділених із сироватки крові хворих на СЧВ [17, 26, 29] та із молока дея-

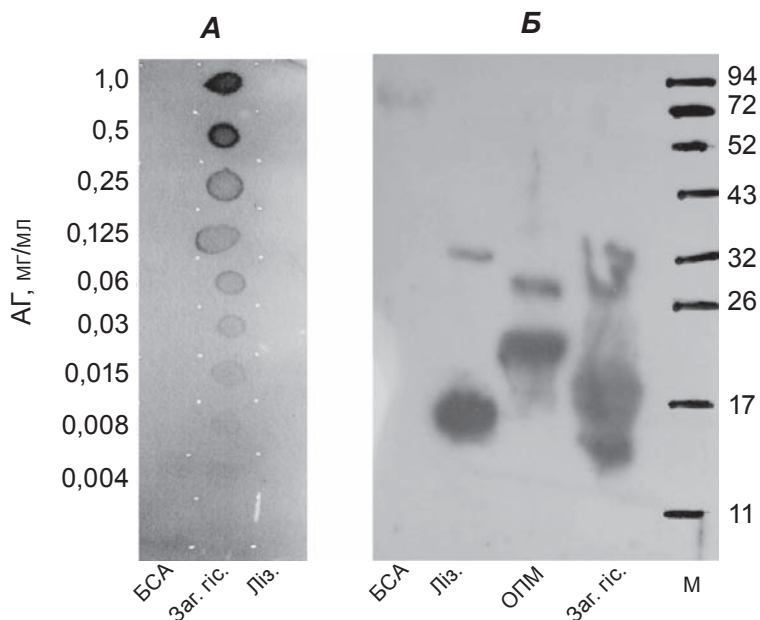


Рис. 1. Дот-блот- (А) і Вестерн-блот-аналіз (Б) антигенної специфічності IgG-антитіл сироватки крові імунізованих мишей. Зліва зазначено кількість антигену, нанесеного на нітроцелюлозну мембрану. БСА – бичачий сироватковий альбумін, Заг. гіс. – фракція сумарних гістонів тимуса теляти, Ліз. – лізоцим курячого яйця, ОПМ – основний протеїн мієліну. М – маркери молекулярної маси протеїнів

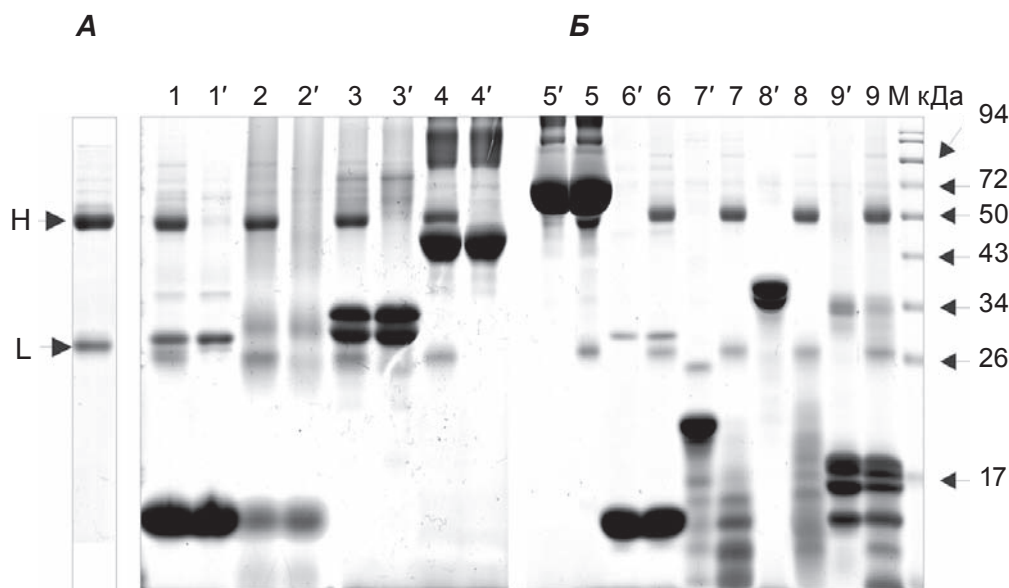


Рис. 2. Визначення протеолітичної активності IgG-антитіл сироватки крові імунізованих мишей. А – DSNa-електрофорез в 15%-му ПАГ IgG-антитіл, очищених хроматографією на протеїн G-сефарозі. Стрілками вказано положення важких (H) і легких ланцюгів (L) IgG на гелі. Б – електрофоретичний аналіз продуктів гідролізу протеїнів: 1, 1' – цитохром с; 2, 2' – макроглобулін; 3, 3' – казеїн; 4, 4' – овальбумін; 5, 5' – бичачий сироватковий альбумін; 6, 6' – лізоцим; 7, 7' – основний протеїн мієліну; 8, 8' – гістон H1, 9, 9' – фракція загальних гістонів. 1–9 – протеїни інкубували із IgG-антитілами, 1'–9' – протеїни інкубували за відсутності антитіл (контроль). М – маркери молекулярних мас протеїнів

ких клінічно здорових жінок-породіль [26]. На відміну від протабзимів сироватки крові хворих на СЧВ, афінно очищені IgG-антитіла сироватки крові імунізованих мишей мали високу протеолітичну активність щодо корових гістонів тимуса теляти. Ці дані заслуговують особливої уваги, оскільки було показано, що позаклітинні гістони є важливим патогенним чинником під час розвитку запальних процесів і сепсису в людини [30, 31].

Для дослідження протеолітичної активності АТ щодо гістонів проводили додатково гель-фільтрацію препаратів IgG. Аналізували хроматографічний пік, який за молекулярною масою відповідав IgG (рис. 3, А). Встановлено, що хроматографічно очищені IgG-антитіла гідролізують корові гістони тимуса теляти (рис. 3, Б), а кінетичні параметри цієї реакції становлять: $K_m = 1,4$ і $V_{max} = 0,11$. Одержані дані вказують на те, що протеолітичну активність щодо корових гістонів мають антитіла із низькою афінністю до протеїнових субстратів. Подібну властивість було виявлено для антигістонових sIgA-антитіл, очищених із молозива клінічно здорових жінок-породіль [19].

Як контроль ми використовували препарати IgG-антитіл, очищених із сироватки крові 10 неімунізованих мишей лінії BALB/c осадженням амонію сульфатом із подальшою хроматографією на колонці із протеїн G-сефарозою. Вивчення одержаних препаратів показало відсутність у них протеолітичної активності щодо ОПМ, а також гістону H1 і корових гістонів тимуса теляти (рис. 4).

Отже, нами було встановлено, що імунізація мишей лінії BALB/c призводить до появи в сироватці крові цих тварин IgG-антитіл із протеолітичною активністю. Ці дані свідчать про те, що позаклітинні гістони здатні індукувати появу протабзимів в організмі мишей.

Відомо, що як гістони, так і антигістонові антитіла можуть брати участь у розвитку запальних та аутоімунних процесів [32, 33]. Тому ми порівняли протеолітичну активність до гістонів тимусу теляти у препаратів IgG-антитіл, очищених із сироватки крові хворих на ревматоїдний артрит і клінічно здорових донорів. Встановлено, що 7 із 8 препаратів IgG-антитіл сироватки крові хворих на ревматоїдний артрит

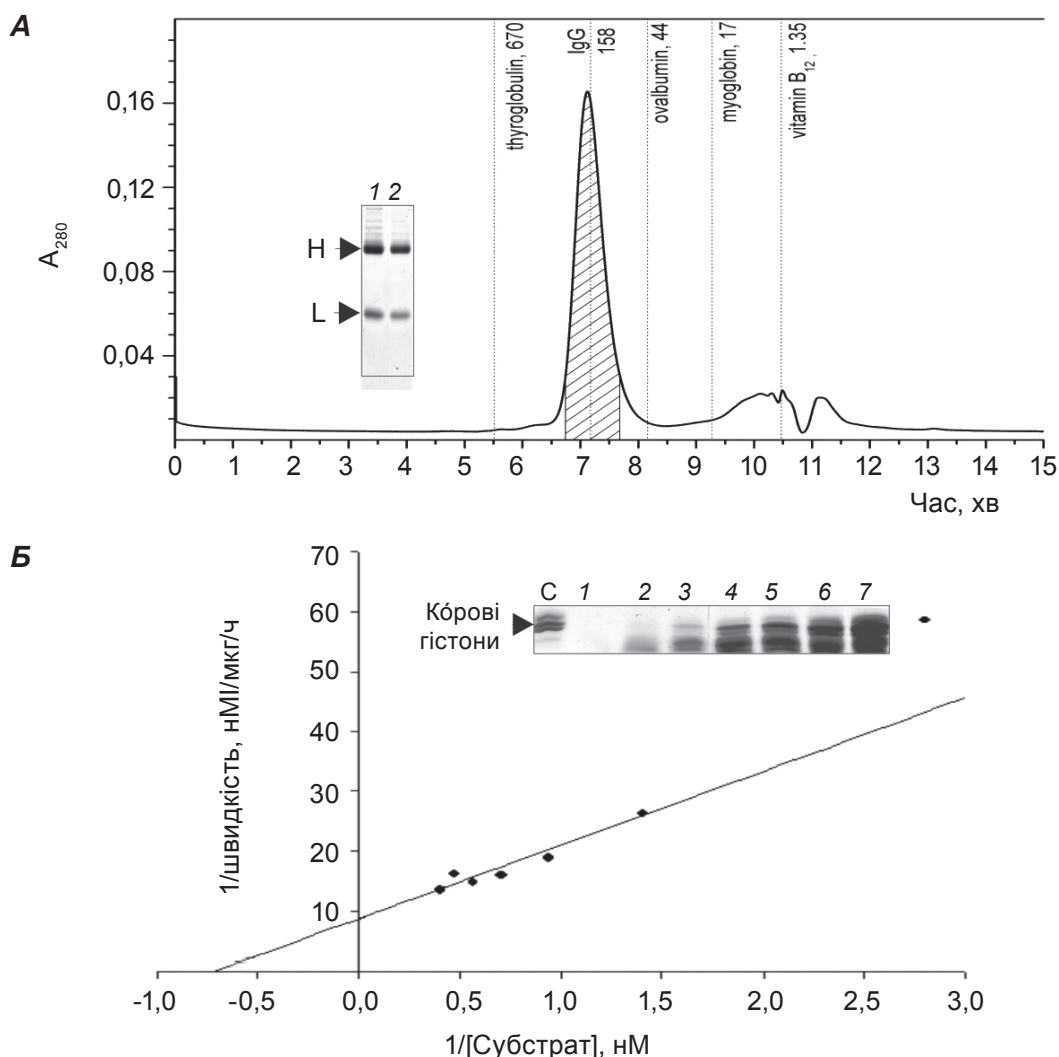


Рис. 3. Аналіз протеолітичної активності IgG-антитіл сироватки крові імунізованих мишей щодо корових гістонів. А – гель-фільтрація IgG-антитіл на колонці Bio-Sil SEC 250 методом ВЕРХ. Фракція, що відповідає піку IgG була використана для дослідження протеолітичної активності. На вставці показано електрофореграма препаратів IgG, очищених хроматографією на протеїн G-сефарозі (доріжка 1) і наступною гель-фільтрацією (доріжка 2). В – кінетичні параметри гідролізу корових гістонів препаратом IgG в координатах Лайнуївера – Берка. На вставці наведено електрофорез продуктів гідролізу у 15%-му ПААГ у присутності 0,1% DSNa. С – гістони за відсутності антитіл (контроль). 1–7 – гістони в концентрації 0,5–3,0 нМ, інкубовані впродовж 6 год із IgG-антитілами

здатні руйнувати корові гістони тимуся теляти (рис. 5, А). При цьому жоден із 8 препаратів IgG-антитіл сироватки крові здорових донорів не виявляв протеолітичної активності щодо цих протеїнів (рис. 5, Б).

Ревматоїдний артрит – це системне захворювання сполучної тканини з переважним ураженням дрібних суглобів за типом ерозійно-деструктивного поліартриту неясної етіології зі складним аутоімунним патогенезом. Нещодавно в сироватці крові хворих на

ревматоїдний артрит було виявлено IgG- і IgM-антитіла, здатні гідролізувати синтетичний пептид Pro-Phe-Arg-4-метил-кумаринімід [34]. При цьому пептидазна активність IgM-антитіл була на порядок вищою, ніж активність IgG-антитіл. На сьогодні ми не можемо однозначно сказати, що висока протеолітична активність до гістонів у препаратів IgG-антитіл сироватки крові хворих на ревматоїдний артрит однозначно пов'язана з дією протабзимів. Можливо, у деяких випадках у препаратах антитіл та-

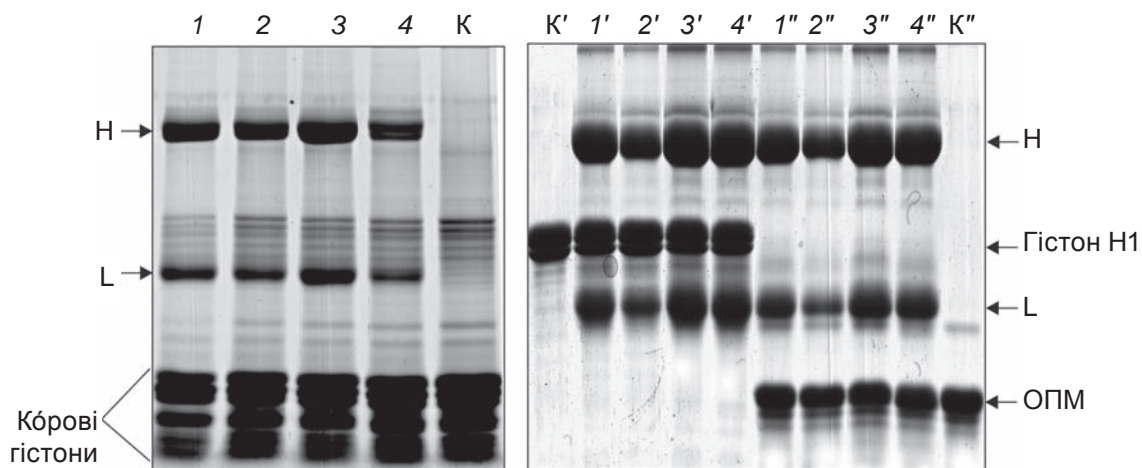


Рис. 4. Протеолітична активність препаратів IgG-антитіл, очищених хроматографією на протеїн G-сефарозі із сироватки крові контрольних (неімунізованих) мишей щодо корових гістонів (1–4), гістону H1 (1'–4') та основного протеїну мієліну (1''–4''). К, К', К'' – в загальні гістони, гістону H1 і ОПМ (контроль). Стрілками вказано положення на гелі важких (H) і легких (L) ланцюгів, корових гістонів, гістону H1 і основного протеїну мієліну (ОПМ)

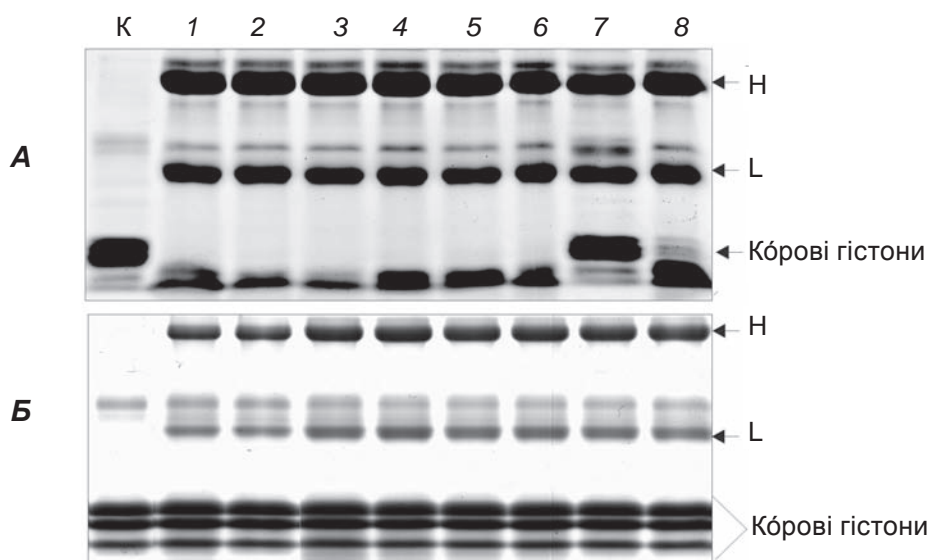


Рис. 5. Протеолітична активність щодо загальних гістонів тимуса теляти препаратів IgG-антитіл, очищених хроматографією на протеїн G-сефарозі із сироватки крові хворих на ревматоїдний артрит (А) та клінічно здорових донорів (Б). Стрілками вказано положення на гелі важких (H) і легких (L) ланцюгів IgG, а також корових гістонів. К – загальні гістони тимуса теляти за відсутності IgG-антитіл

кож можуть бути присутні ензими, що беруть участь у гідролізі гістонів, наприклад, АРС-протеаза [31]. Залишається нез'ясованою роль протабзимів, залучених у гідроліз гістонів, за розвитку аутоімунних процесів в організмі ссавців. Аналіз даних літератури вказує на те, що ці протабзими можуть виявляти захисну (протекторну) дію. На користь цього слугують

дані про те, що у сироватці крові людей із сепсисом міститься високий рівень протеолітично активних IgG-антитіл, здатних гідролізувати, подібно до IgM-антитіл сироватки крові хворих на ревматоїдний артрит [34], синтетичний пептид Pro-Phe-Arg-4-метил-кумаринімід [35, 36]. При цьому титр протабзимів і рівень їхньої каталітичної активності позитивно корелює зі

сприятливим прогнозом клінічного розвитку сепсису в людей.

Зважаючи на функціональну активність позаклітинних гістонів за умов запалення [32, 33], ми припускаємо, що імунізація мишей лінії BALB/c загальними гістонами тимуса теляти зумовлює продукцію протабзимів із протективною функцією, спрямованих на елімінацію цих протеїнів, що попереджає розвиток генералізованого запалення.

Роботу виконано за фінансової підтримки цільовою комплексною міждисциплінарною програмою наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій», проект № 47Ф.

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ IgG-АНТИТЕЛ МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ГИСТОНАМИ ТИМУСА ТЕЛЕНКА

*Ю. Я. Кит¹, Н. Корний^{1,3}, И. И. Криль²,
И. Б. Магоривская¹, В. Ткаченко¹,
Р. А. Билый^{1,2}, Р. С. Стойка¹*

¹Институт биологии клетки НАН Украины, Львов;
e-mail: kit@cellbiol.lviv.ua;

²Львовский национальный медицинский университет имени Даниила Галицкого, Украина;

³Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Украина

Целью работы было выяснить способность гистонов вызывать продукцию протеолитически активных IgG-антител у мышей линии BALB/c. Для этого мышей иммунизировали препаратом тотальной фракции гистонов тимуса телят. IgG из сыворотки крови иммунизированных и неиммунизированных животных очищали осаждением 33%-ым сульфатом аммония с последующей хроматографией протеинов на колонке с протеин G-сефарозой. В качестве субстратов для определения протеолитической активности использовали гистон H1 и коровые гистоны, основной протеин миелина (ОПМ), лизоцим, БСА, овальбумин, макроглобулин и казеин, цитохром *c*. Обнаружено, что IgG сыворотки крови иммунизированных мышей обладают способностью гидролизовать гистон H1, коровые гистоны и ОПМ. В то же время IgG сыворотки крови неиммунизированных мышей не проявляли протеолитической активности к

этим протеинам. Гель-фильтрация антител показала, что гидролитическая активность к гистонам свойственна именно IgG, а не примесям энзимов. Высокий уровень протеолитической активности препаратов IgG к гистонам был также обнаружен в IgG сыворотки крови больных ревматоидным артритом, но не у IgG клинически здоровых доноров. Полученные данные указывают на то, что внеклеточные гистоны могут вызывать появление протабзимов в организме млекопитающих. В работе также рассмотрены возможное происхождение этих протабзимов и их потенциальная биологическая активность.

Ключевые слова: мыши линии BALB/c, гистоны, иммунизация, антитела, антигенная специфичность, протеолитическая активность.

PROTEOLYTIC ACTIVITY OF IgG-ANTIBODIES OF MICE, IMMUNIZED BY CALF THYMUS HISTONES

*Yu. Kit¹, N. Korniy^{1,3}, I. Kril², I. Magorivska¹,
V. Tkachenko¹, R. Bilyy^{1,2}, R. Stoika¹*

¹Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv;
e-mail: kit@cellbiol.lviv.ua;

²Danylo Galytsky Lviv National Medical University, Ukraine;

³Ivan Franko Lviv National University, Ukraine

The main goal of the study was to determine the ability of histones to induce production of the proteolytically active IgG-antibodies in BALB/c mice. In order to perform this study 8 mice were immunized with the fraction of total calf thymus histones. IgGs were isolated from the serum of the immunized and not immunized animals by means of precipitation with 33% ammonium sulfate, followed by affinity chromatography on protein G-Sepharose column. Histones, myelin basic protein (MBP), lysozyme, BSA, ovalbumin, macroglobulin, casein and cytochrome *c* served as substrates for determining the proteolytic activity. It was found that IgGs from the blood serum of immunized mice are capable of hydrolyzing histone H1, core histone and MBP. On the contrary, the proteolytic activity of IgGs from the blood serum of not immunized mice was not detected. The absence of proteolytical enzymes in the fraction of IgGs was proven by HPLC chromatography. High levels of proteolytic

activity toward histones have been also detected in affinity purified IgGs from blood serum of patients with rheumatoid arthritis, but not in healthy donors. These data indicate that eukaryotic histones may induce production of protabzymes in mammals. The possible origin of these protabzymes and their potential biological role in mammals is discussed.

Key words: BALB/c mice, histones, immunization, antibodies, antigenic specificity, proteolytic activity.

1. Gabibov A. G., Ponomarenko N. A., Tretyak E. B. et al. // *Autoimmun. Rev.* – 2006. – **5**, N 5. – P. 324–330.
2. Belogurov A. Jr., Kozyr A., Ponomarenko N., Gabibov A. // *Bioessays.* – 2009. – **26**, N 3. – P. 116–167.
3. Planque S., Nishiyama Y., Taguchi H. et al. // *Autoimmun. Rev.* – 2008. – **7**, N 7. – P. 473–479.
4. Wootla B., Lacroix-Desmazes S., Warrington A. et al. // *J. Autoimmun.* – 2011. – **37**, N 2. – P. 1–15.
5. Paul S., Volle D., Beach C. et al. // *Science.* – 1989. – **244**, N 11. – P. 1158–1162.
6. Paul S., Nishiyama Y., Planque S., Taguchi H. // *Immunol. Lett.* – 2006. – **103**, N 4. – P. 8–16.
7. Li L., Paul S., Tyutyulkova S., Kazatchkine M., Kaveri S. // *J. Immunol.* – 1995. – **154**, N 8. – P. 3328–3332.
8. Ponomarenko N. A., Durova O. M., Vorobiev I. I. et al. // *J. Immunol. Methods.* – 2002. – **269**, N 4. – P. 197–211.
9. Ponomarenko N. A., Durova O. M., Vorobiev I. I. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – **103**, N 1. – P. 281–286.
10. Lacroix-Desmazes S., Wootla B., Delignat S., Dasgupta S. et al. // *Immunol. Lett.* – 2006. – **103**, N 1. – P. 3–7.
11. Paul S., Nishiyama Y., Planque S. et al. // *Immunol. Lett.* – 2006. – **103**, N 1. – P. 8–16.
12. Magorivska I., Bilyy R., Shalay O. et al. // *Exp. Oncol.* – 2009. – **31**, N 2. – P. 97–101.
13. Paul S., Nishiyama Y., Planque S. et al. // *Springer Semin. Immun.* – 2005. – **26**, N 6. – P. 485–503.
14. Taguchi H., Planque S., Nishiyama Y. et al. // *Autoimmun. Rev.* – 2008. – **7**, N 7. – P. 391–397.
15. Paul S., Planque S., Nishiyama Y. // *J. Clin. Immunol.* – 2010. – **30**, N 1. – P. 43–49.
16. Kit Y. Y., Starykovich M. A., Richter V. A., Stoika R. S. // *Biochemistry (Mosc).* – 2008. – **73**, N 4. – P. 950–956.
17. Kim Ю. Я., Магорівська І. Р., Гаврилюк А. М. та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2009. – **81**, № 3. – С. 77–83.
18. Chopyak V., Tolstiyak Y., Magoryvska I. et al. // *Health.* – 2010. – **2**, N 10. – P. 1204–1207.
19. Kit Yu., Starykovich M., Mahorivska I. et al. // *Novel Serine-Protease Like Catalytic Antibodies with Double Substrate Proteolytic Activity in Human Blood Serum and Colostrums.* / In: “Serine Proteases: Mechanism, Structure and Evolution”. – Eds.: Isamu Chiba and Takao Kamio. – Nova Sci. Publ., Inc., Hauppauge – NY. – 2012. – P. 71–89.
20. Muñoz L., Lauber K., Schiller M. et al. // *Nature Rev. Rheumatol.* – 2010. – **6**, N 8. – P. 280–289.
21. Rudofsky U. // *Environ. Health Perspect.* – 1999. – **107**, N 9. – P. 713–721.
22. Dubrovskaya V., Andryushkova A., Kuznetsova A. et al. // *Biochemistry (Moscow).* – 2003. – **68**, N 10. – P. 1081–1088.
23. Perry D., Sang A., Yin Y., Ying-Yi et al. // *J. Biomed. Biotech.* – 2011. – **28**, N 5. – P. 140–158.
24. Pillet D., Paon M., Vorobiev I., Gabibov A.G., et al. // *J. Immunol. Methods.* – 2002. – **269**, N 1–2. – P. 5–12.
25. Li H., Zang Y-Y., Sun U., Huang Y-Y. et al. // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2004. – **25**, N 6. – P. 807–811.
26. Kit Y., Bilyy R., Stoika R., Mitina N., Zaichenko A. et al. // *Immunogenicity and adjuvant properties of novel biocompatible nanoparticles.* In: *Biocompatible Nanomaterials: Synthesis, Characterization and Applications.* – Eds: Kumar S.A., Thiagarajan S., Wang S-F. – Nova Sci. Publ., Inc., Hauppauge – NY. – 2010. – P. 209–223.
27. Laemmly U. K. // *Nature.* – 1970. – **227**, N 5259. – P. 2244–2750.
28. Malik H. S., Henikoff S. // *Nat. Struct. Biol.* – 2003. – **10**, N 5. – P. 882–891.
29. Magorivska I. B., Bilyy R. O., Havrylyuk A. M. et al. // *J. Mol. Recognit.* – 2010. – **23**, N 5. – P. 495–502.
30. Chaput C., Zychlinsky A. // *Nature Med.* – 2009. – **15**, N 11. – P. 1245–1246.
31. Xu J., Zhang X., Pelayo R. et al. // *Nature Med.* – 2009. – **15**, N 11. – P. 1318–1322.
32. Stummvoll G. H., Fritsch R. D., Meyer B. et al. // *Ann. Reum. Dis.* – 2009. – **68**, N 11. – P. 110–106.
33. Sun X. Y., Shi J., Han L. et al. // *J. Clin. Lab. Anal.* – 2008. – **22**, N 6. – P. 271–277.

34. Kamalanathan A., Goulvestre C., Weill B., Vijayalakshmi M. // *J. Mol. Recognit.* – 2010. – **23**, N 4. – P. 577–582.
35. Lacroix-Desmazes S., Bayry J., Kaveri S. V. et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2005. – **102**, N 11. – P. 4109–4113.
36. Lacroix-Desmazes S., Mallet V., Wootla B., Kaveri S. V. // *Discov. Med.* – 2005. – **5**, N 26. – P. 209–212.

Отримано 18.06.2013