

Sprememba specifičnosti imunoglobulinov razreda G pod vplivom elektro-oksidiacije

Changes in specificity of class G immunoglobulins after electro-oxidation

Jasna Omersel, Borut Božič

Povzetek Oksidacija protiteles povzroči spremembe tudi v hipervariabilni regiji, kar lahko vodi do spremenjenih vezalnih sposobnosti protiteles - njihove afinitete in specifičnosti. V naši raziskavi elektro-oksidiacije IgG frakcije serumov 21 krvodajalcev in 9 bolnikov z anti-fosfolipidnim sindromom smo ugotovili, da 1./ se specifičnost protiteles spremeni iz naravnih v patogena proti β_2 -glikoproteinu I, 2./ povzroči elektro-oksidiacija protiteles proti β_2 -glikoproteinu I zmanjšanje imunoreaktivnosti, in 3./ podaljšana oksidacija povzroči izgubo imunoreaktivnosti zaradi denaturacije. Naši rezultati odpirajo možno razlago, da do avtoimunskih odzivov ne pride samo zaradi sprememb v antigenih ampak tudi zaradi oksidacijskih sprememb v protitelesih.

Ključne besede: protitelesa, elektro-oksidiacija, specifičnost, imunoreaktivnost

Abstract Oxidation of antibodies causes changes in the hypervariable region also leading to altered binding properties of antibodies – their affinity and specificity. In our research of electro-oxidation of IgG fraction from sera of 21 blood donors and 9 patients with antiphospholipid syndrome we found out that 1./ specificity of IgG has been changed from normal to pathogenic anti- β_2 -glycoprotein I antibodies, 2./ electro-oxidation has caused decrease in immunoreactivity of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies, and 3./ prolonged oxidation has led to loss of immunoreactivity due to denaturation. Our results have opened the possibility that autoimmune reactions could also appear in consequence of oxidative changes in antibodies.

Key words: antibodies, electro-oxidation, specificity, avidity, immunoreactivity

1. Uvod

1.1. Oksidacija proteinov

Oksidacija proteinov je dobro poznan proces kemične nestabilnosti peptidov in tekočih ter trdnih proteinskih farmacevtskih pripravkov. Spremembe v kovalentnih vezeh lahko povzročijo spremembo terciarne in kvartane strukture proteina, kar najpogosteje vodi do izgube njegove biološke aktivnosti (1). Oksidacija lahko poteče pod vplivom neradikalnih ali radikalnih oksidantov. Posledica je nastanek in sproščanje novih reaktivnih snovi, spremenjena regulacija in ekspresija genov, modulacija celičnega signaliziranja, indukcija nekroze ali apoptoze (2). Dvig znotrajcelične koncentracije teh oksidirajočih spojin in kopičenje pod njihovim vplivom spremenjenih bioloških molekul vodi v organizmu do stanja oksidativnega stresa (3).

Večina radikalov ima elektrofilni značaj, zato reagirajo z aminokislinami, ki imajo v stranski verigi veliko elektronsko gostoto (2). Med najlažje oksidirajoče aminokislino tako spadajo aromatske

(tirozin, triptofan, fenilalanin) in žveplo vsebujoči aminokislini metionin in cistein (4).

1.2 Oksidacija protiteles

Enostavno protitelo sestavljata po dve identični lahki in dve težki verigi, med seboj povezane z nekovalentnimi hidrofobnimi in kovalentnimi disulfidnimi vezmi. Na N-terminalnem koncu molekule se nahaja variabilni predel. Z rentgensko difrakcijsko spektroskopijo je bilo ugotovljeno, da so aminokislino v tem predelu organizirane v tri hipervariabilne zanke, v katerih je le 5-10 aminokislin odgovornih za vezavo z imunogenom, t.j. molekulo, ki sproži imunski odziv (5, 6).

Hipervariabilne regije so hkrati tudi najbolj izpostavljen in zato najobčutljivejši del molekule protitelesa, saj aminokislino tam niso dodatno stabilizirane s hidrofobnimi interakcijami (5, 6). Oksidacija aminokislin v hipervariabilnih regijah protiteles tako lahko vodi do spremembe v zgradbi same regije in s tem posledično do spremembe imunoreaktivnosti, afinitete ali celo specifičnosti molekule

protitelesa. Ker je specifično razlikovanje med lastnim in tujim osnova imunskega sistema, vpliva sprememba v specifičnosti protiteles tudi na (ne)zmožnost tolerance do posameznikovih lastnih antigenov. Slednje pa predstavlja začetek procesa, ki lahko vodi v različne sistemske ali organsko specifične avtoimunske bolezni (5, 6).

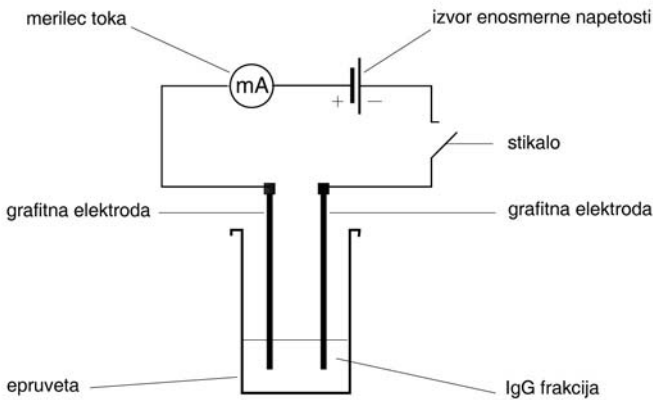
2. Namen raziskave

Z raziskavo smo nameravali ugotoviti, ali lahko z elektro-oksidacijo povzročimo spremembo v specifičnosti naravnih ali protimikrobnih protiteles, ki so prisotna v serumu klinično zdravih ljudi in protiteles proti β_2 -glikoproteinu I iz seruma bolnikov z antifosfolipidnim sindromom. Preverjali smo vpliv napetosti in časa izpostavitve protiteles elektro-oksidaciji na imunoreaktivnost vzorcev in specifičnost protiteles razreda G.

3. Materiali in metode

3.1 Imunoglobulinske frakcije

Protitelesa razreda G smo izolirali iz 21 serumov zdravih krvodajalcev in 9 serumov bolnikov z dokazanim antifosfolipidnim sindromom (7). Predhodna analiza je potrdila, da so bili vsi serumi krvodajalcev negativni na prisotnost protiteles proti β_2 -glikoproteinu I, serumi bolnikov pa pozitivni primerjano s koncentracijo monoklonskih protiteles HCAL (8).



Slika 1. Shema aparature za elektro-oksidacijo
Figure 1. Scheme of electro-oxidation instrument

Preglednica I: Čas trajanja elektro-oksidacije pri različnih vzorcih in napetostih.
Table I: Duration of electro-oxidation in different samples using different potencial.

4,5 V	IgG krvodajalcev	15 s	30 s	1 min	5 min			
1,5 V	IgG krvodajalcev in bolnikov	15 s	30 s	1 min	5 min	10 min	15 min	20 min

3.2 Afinitetna kolonska kromatografija

Izolacijo protiteles razreda G iz seruma smo izvedli z uporabo analiznega kompleta ImmunoPure (G) IgG Purification Kit, po predpisanem postopku proizvajalca (9). Sama izolacija temelji na afinitetni kromatografiji, pri kateri je na matriks (premrežena agaroz) kot ligand kovalentno vezan protein G. To je protein, izoliran iz celične stene bakterij *Streptococcus*, ki se veže pretežno na konstantne predele težke verige (Fc predel) protiteles in omogoča učinkovito izolacijo protiteles razreda G, vključno z vsemi podrazredi. Eluirane frakcije IgG smo nanesti še na razsoljevalno kolono, kjer je po principu izključitvene kromatografije potekla zamenjava acetatnega pufra s fosfatnim (pH= 7,4).

3.3 Elektro-oksidacija

Izolirane frakcije IgG smo izpostavili električnemu toku pri napetosti 4,5 V in 1,5 V (vzorci krvodajalcev) ali 1,5 V (vzorci bolnikov) (Preglednica I). Primerljive pogoje smo dosegli z uporabo enakega volumna, enake razdalje med elektrodama, enake dolžine potopljenega dela elektrode in hlajenjem. Z ampermetrom smo merili časovno odvisnost toka (Slika 1).

3.4 Indirektna encimsko imunska metoda

Spremembo v imunoreaktivnosti in specifičnosti protiteles smo določali z encimsko imunsko metodo (ELISA), ki se rutinsko uporablja v laboratorijski diagnostiki antifosfolipidnega sindroma. Antigen je predstavljal β_2 -glikoprotein I, kot kontrolni material pa smo uporabili himerna monoklonska protitelesa razreda IgG (HCAL) (8).

Na visokovezavne mikrotitrne plošče smo kot antigen nanesti po 50 μ L β_2 -glikoproteina I v koncentraciji 1mg/mL. Po inkubaciji in spiranju s PBS-0,05% Tween 20 smo na plošče nanesti a/ vzorce (serume), b/ izolirane neoksidirane in c/ pripadajoče oksidirane IgG frakcije. Zaradi redčenja vzorcev kot posledice izolacije IgG in razsoljevanja je bilo potrebno uvesti korekcijska faktorja, ki sta omogočila izračun volumna IgG frakcije s primerljivo koncentracijo protiteles, kot bi jih sicer vseboval predpisani volumen seruma (4 μ L).

3.5 Protitočna imunoelektroforeza

Možno spremembo imunoreaktivnosti protiteles proti β_2 -glikoproteinu I smo preverjali z uporabo protitočne imunoelektroforeze (8). S slednjo odkrivamo prisotnost predvsem protiteles proti znotrajceličnim antigenom (Ro, La, Sm, Jo-1, Scl-70...) (10, 11). Na stekleno ploščo z agaroznim gelom (1%) smo v izrezane luknjice nanesti vzorce, t.j. serume, izolirane neoksidirane in pripadajoče oksidirane IgG frakcije, izolirane iz seruma zdravih krvodajalcev. Kot antigen smo uporabili kunčji timusni ekstrakt in v laboratoriju pripravljen ekstrakt iz človeške vranice (11).

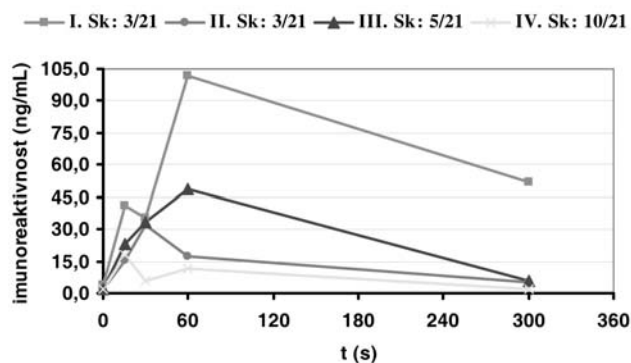
4. Rezultati in razprava

Oblikovanje množice različnih protitelesnih vezišč razlagamo na genski ravni s preurejanjem genskih segmentov za variabilni del težke in lahke verige protiteles, z nenatančnostjo rekombinacij, dodajanjem nukleotidov, s somatskimi mutacijami, na proteinski ravni pa s konformacijskimi prilagoditvami. Post-translacijske spremembe protiteles so vezane predvsem na glikozilacijo, vendar pa v to skupino sodijo tudi neželene spremembe proteina zaradi oksidacije. Obsežna oksidacija proteinov praviloma vodi v izgubo njihove biološke aktivnosti, omejena oksidacija pa ne. Posebnost je oksidacija aminokislin v vezišču protiteles, ki lahko teoretično vodi v spremenjene vezalne sposobnosti protitelesa do različnih antigenov in celo v spremembo specifičnosti protitelesa. McIntyre je s sodelavci poročal o spremembah imunoreaktivnosti in specifičnosti protiteles v pripravku za intravensko aplikacijo po oksidacijsko-redukcijskih procesih (12). Ugotovili so, da je oksidacija potekla pod vplivom ene izmed komponent i.v. pripravka, in sicer hemina (derivat hemoglobina, ki vsebuje Fe^{3+} ione). Dokazali so, da se pod vplivom nekaterih oksidantov (hemin, KMnO_4) kot tudi pri uporabi enosmerne napetosti (4,5 V in 9 V) v i.v. pripravkih lahko pojavijo mnoga avtoprotelesa, ki jih pred tem z istimi laboratorijskimi metodami niso zaznali (13).

V okviru naše študije smo preverjali, ali je možno z elektro-oksidacijo pri nižjih napetostih in posledično nižjih tokovih spremeniti specifičnost naravnih protiteles v diagnostično pomembna (patogena) in obratno. Osredotočili smo se izključno na izolirana protitelesa, saj smo želeli izključiti možne vplive serumskih sestavin, ki bi lahko spremenile ali preprečile potek oksidacije protiteles (12). Elektro-oksidacijo smo izbrali zato, ker z njo lahko ponazarjamo oksidacijsko redukcijske reakcije *in vivo*, ne da bi v sistem uvajali dodatne snovi. Med samim potekom elektro-oksidacije smo merili spremembe toka. Ugotovili smo, da je pri vseh vzorcih, oksidiranih pri napetosti 4,5 V, tok v odvisnosti od časa naraščal. Razpon vrednosti izmerjenega toka je bil od 5,93-14,65 mA. Pri vzorcih, oksidiranih pri napetosti 1,5 V, je tok s časom ostajal konstanten in je, glede na vzorec, zavzemal vrednosti od 0,012-0,025 mA.

Po elektro-oksidaciji smo z ELISA preverjali spremembo specifičnosti oksidiranih protiteles. V vseh 21 oksidiranih vzorcih krvodajalcev so se protitelesa vezala na $\beta_2\text{GPI}$, čeprav vezave pred elektro-oksidacijo nismo zaznali. Klinično pomembno zvišanje imunoreaktivnosti je bilo prisotno kar pri 20/21 vzorcev. Pri IgG frakcijah krvodajalcev, oksidiranih pri napetosti 1,5 V je do nastanka protiteles proti $\beta_2\text{GPI}$ v klinično pomembnih koncentracijah prišlo pri polovici testiranih vzorcev (4/8). Sama sprememba v specifičnosti protiteles pod vplivom elektro-oksidacije se je izkazala kot dinamičen in zelo raznolik proces, odvisen od časa, napetosti in izvora vzorca. Ugotovili smo, da čas izpostavitve vzorca določeni napetosti vpliva tudi na spremembo imunoreaktivnost protiteles proti $\beta_2\text{GPI}$. Imunoreaktivnost je izražena kot koncentracija monoklonskih protiteles, ki so izkazovala številčno enako absorbanco kot določani vzorci. Krivulje na sliki 2 ponazarjajo štiri skupine, v katere smo lahko razdelili oksidirane vzorce krvodajalcev, ki so bili izpostavljeni enaki napetosti in so imeli podoben potek sprememb v imunoreaktivnosti. Vsem 21 vzorcem zdravih krvodajalcev, oksidiranih pri 4,5 V, je skupen izrazit padec imunoreaktivnosti po 5 min v primerjavi z maksimalno vrednostjo,

doseženo pri enem od merjenih časov. Devetnajstim vzorcem je imunoreaktivnost po 5 min padla pod klinično pomembno vrednost. Do klinično pomembnega povišanja imunoreaktivnosti pa je prišlo tudi po oksidaciji vzorcev krvodajalcev z napetostjo 1,5 V, in sicer pri 4-ih od 8-ih vzorcev. Manjše spremembe, ne pa tudi pomembnega povišanja imunoreaktivnosti, smo zaznali po oksidaciji (1,5 V) IgG frakcij, izoliranih iz seruma bolnikov z antifosfolipidnim sindromom.



Slika 2: Spremembe imunoreaktivnosti pri različnih skupinah vzorcev krvodajalcev, oksidiranih pri 4,5 V

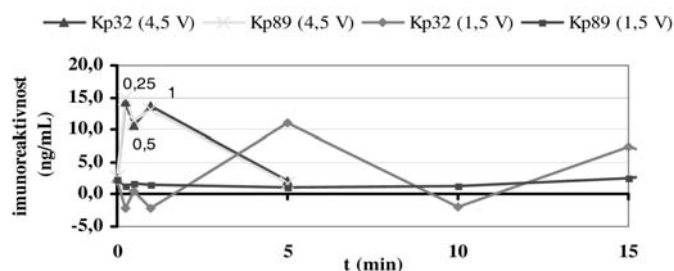
Figure 2: Changes of immunoreactivity in different groups of healthy-donors samples, oxidized with 4,5 V

Spremembe v imunoreaktivnosti po kratki izpostavitvi oksidacije so posledica preoblikovanja v hipervariabilnih regijah, kar utemeljujemo z naslednjimi opažanji: prvič, začetne spremembe imunoreaktivnosti so bile prisotne v obeh smereh (povečanje in zmanjšanje), torej ni šlo zgolj za »okvaro« protiteles; drugič, v primeru povečevanja nefunkcionalnosti protiteles zaradi oksidacije, bi pričakovali zmanjševanje imunoreaktivnosti vzorcev bolnikov s časom izpostavitve električnemu toku – pa temu ni bilo tako. Celo več, v vzorcih zdravih oseb so se pojavila protitelesa proti $\beta_2\text{GPI}$, ki imajo diagnostični pomen za avtoimunske tromboze. Tega pojava ne moremo pripisati zgolj nespecifičnim vezavam, saj so bila zaznana z metodo, ki se uporablja v rutinski laboratorijski diagnostiki in je redno medlaboratorijsko primerjana (14, 15). Po daljšem času, sploh pri višjih napetostih (4,5 V), pa verjetno pride tudi do prestrukturiranja oz. porušitve interakcij med aminokislinami še v drugih delih protitelesa in s tem do znatnega znižanja imunoreaktivnosti ter končno do denaturacije.

V sami hipervariabilni regiji so kemične in strukturne lastnosti posamezne aminokisline odločilne pri oblikovanju antigen vezavnega mesta in za interakcije z antigenom. Najbolj zastopana aminokislinska ostanka v samem vezavnem mestu pa sta tirozin (25%) in triptofan (10,2%) (16). Sposobnost tvorbe vodikovih vezi, hidrofobnih interakcij in privlačnih elektrostatskih sil med pozitivno nabitimi skupinami in samim aromatskim obročem ter fleksibilnost obroča, omogočajo, da tirozin in triptofan tvorita interakcije s strukturno zelo različnimi antigeni (16). Prav ti dve aminokislini oz. njuni stranski verigi, sta tudi najbolj dovzetni za oksidacijo.

Naši rezultati kažejo tudi na to, da je imunoreaktivnost in z njo sprememba v specifičnosti pod vplivom elektro-oksidacije odvisna od same strukture vezavnega mesta antigena. Vzorci, ki so pri 4,5 V

izkazovali enako časovno odvisnost in bili pozitivni, so se pri 1,5 V odzvali popolnoma različno (slika 2). V predhodnih raziskavah, ki so nakazovale celo na možnost elektro-oksidacije kot novega sinteznega pristopa, je bilo ugotovljeno, da je oksidacija posameznih aminokislin odvisna od uporabljene napetosti, s čimer je možno zagotoviti tudi selektivnost oksidacije (17). Očitno je, da v naših poskusih tok, povzročen z napetostjo 4,5 V, ni povzročil enakih sprememb kot tok pri napetosti 1,5 V in da so se pri posamezni napetosti oksidirale le določene aminokisliline v hipervariabilnih regijah protiteles iz različnih vzorcev. Repertoar prisotnih naravnih protiteles t.j. polireaktivnih protiteles prisotnih v serumu zdravih posameznikov brez predhodne imunizacije, je vsekakor dovolj raznolik, da to omogoča (18).



Slika 3: Primerjava sprememb imunoreaktivnosti vzorcev krvodajalcev oksidiranih pri 4,5 V in 1,5 V.

Figure 3: Comparison of immunoreactivity changes between healthy blood donors samples oxidized with 4,5 V and 1,5 V.

Pri preverjanju sprememb v specifičnosti z metodo protitočne imunoelektroforeze nismo dobili pozitivnega rezultata. Odsotnost oborine pomeni, da oksidirane IgG frakcije, izolirane iz seruma zdravih krvodajalcev, niso vsebovale protiteles, ki bi se vezala na znotrajcelične antigene. Glede tega se naši rezultati razlikujejo s poročilom McIntyre in sodelavcev, ki so po oksidaciji IgG frakcije zdravih ljudi s heminom odkrili tudi protitelesa proti jedrnim antigenom (13). Ugotavljamo lahko, da vodi oksidacija protiteles do različnih rezultatov tako glede uporabljene napetosti (naši rezultati: 4,5 V ali 1,5 V), kakor tudi glede uporabljenega oksidacijskega sredstva (npr. hemin).

Zaključimo lahko, da naravna protitelesa niso enako dovzetna za oksidacijo, kar posledično pomeni tudi različno dovzetnost posameznika za pojav avtoimunskih reakcij, ki ob prisotnosti še nekaterih drugih dejavnikov vodijo v razvoj avtoimunske bolezni. Pogoji ob elektro-oksidaciji seveda niso enaki tistim *in vivo*, dejstvo pa je, da se v telesu vsakodnevno odvijajo oksidacijski procesi. S tem se ponovno odpira vprašanje o pomenu dodatnega vnosa antioksidantov v telo, kar je lahko v pomoč telesu lastnim antioksidativnim mehanizmom, da ob nastanku oksidativnega stresa preprečijo oksido-redukcijske pretvorbe naravnih protiteles v avtoproteles in s tem morebitni razvoj avtoimunskih bolezni pri dovzetnejših posameznikih.

5. Sklep

Z našimi raziskavami smo potrdili, da elektro-oksidacija vodi tudi do spremembe specifičnosti protitelesa, kar je posledica strukturne

spremenbe v molekuli protitelesa, predvsem v hipervariabilnih regijah. Pomembno je, da smo spremembo specifičnosti zaznali tudi pri nizki napetosti (1,5 V). Sprememba specifičnosti je odvisna tako od napetosti in časa oksidacije, kot tudi od same sestave protiteles. Ugotovili smo, da se pod vplivom električne napetosti spremeni imunoreaktivnost v serumu prisotnih patogenih protiteles, vendar klinično pomembnih sprememb pri danih pogojih nismo dokazali. Dokazali pa smo, da naravno prisotna protitelesa z oksidacijo pridobijo sposobnost vezave z novimi, celo telesu lastnimi, antigeni, oziroma pridobijo lastnosti patogenih avtoproteles.

6. Zahvala

Raziskave so bile opravljene v okviru raziskovalnega programa Sistemske avtoimunske bolezni, ki ga sofinancira MZŠS Republike Slovenije (št. P3-0314). Avtorja se zahvalujeta dr. Tanji Kveder, dr. Saši Čučnik in Poloni Žigon za pomoč pri delu.

7. Literatura

1. Yoshioka S, Stella VJ. Stability of drugs and dosage forms. New York, Boston, Dordrecht, London Moscow: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000: 187-203.
2. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. Biochimica Biophysica Acta. 2005; 1703(2): 93-109.
3. Pochernich CB, Sultana R, Mohmmad-Abdul H et al. HIV-dementia, Tat-induced oxidative stress, and antioxidant therapeutic considerations. Brain Research Reviews 2005; 50: 14-26.
4. Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. International Journal of Pharmaceutics 1999; 185: 129-188.
5. Vozelj M. Temelji imunologije, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 2000: 53-54, 92-97, 275-304.
6. Alberts B, Bray D, Lewis J et al. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York: Garland Publishing, 1994: 89-136, 1195-1251.
7. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et.al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report on international workshop. Arthritis & Rheumatism 1999; 42 (7): 1309-11.
8. Čučnik Ambrožič A, Božič B, Skitek M, Kveder T. Anti-beta₂-glycoprotein I ELISA: methodology, determination of cut off values in 434 healthy Caucasians and evaluation of monoclonal antibodies as possible international standards. Clinical Chemistry Laboratory Medicine 2000; 38(8): 777-783.
9. Pierce. Pierce Instructions- ImmunoPure (G) IgG Purification Kit
10. Kveder T, Božič B. The quality assurance and organization of autoantibody laboratory. The 5th FESCC Continuous Postgraduate Course in Clinical Chemistry, New trends in classification, monitoring and management of autoimmune diseases 2005: 67-76.
11. Bunn C, Kveder T. Counterimmunoelectrophoresis and immunodiffusion for the detection of antibodies to soluble cellular antigens. In: vanVenrooij WJ, Maini RN (eds) Manual of Biological Markers of Disease. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996, A3:1-12.

12. McIntyre JA. The appearance and disappearance of antiphospholipid autoantibodies subsequent to oxidation-reduction reactions. *Thrombosis Research* 2004; 114: 579-587.
13. McIntyre JA, Wagenknecht DR, Page Faulk W. Autoantibodies unmasked by redox reactions. *Journal of Autoimmunity* 2005; 24: 311-317.
14. Reber G, Tincani A, Sanmarco M, de Moerloose P, Boffa MC. Proposals for the measurement of anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Standardization group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. *Journal of thrombosis and haemostasis* 2004; 2(10): 1860-1862.
15. Tincani A, Allegri F, Balestrieri G, Reber G, Sanmarco M, Meroni P, Boffa MC. Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies *Thrombosis Research* 2004; 114 (5-6): 553-558.
16. Mian I.S, Bradwell A.R, Olson A.J. Structure, Function and Properties of Antibody Binding Sites. *Journal of Molecular Biology* 1991; 217: 133-151.
17. Walton DJ, Richards PG, Heptinstall J, Coles B. Electrosynthetic modification of proteins: electrooxidations at methionine and tryptophan in hen egg-white lysozyme. *Electrochimica Acta* 1997; 42: 2285-2294.
18. Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L, Ayoub A, Malanchère E, Coutinho A, Kazatchkine MD. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *Journal of Immunological Methods* 1998; 216: (1-2) 117-137.