

การพัฒนาวิธีการตรวจและศึกษาความสัมพันธ์ของ antinucleosome antibody  
ในผู้ป่วย systemic lupus erythematosus

นางสาว สุพรรณิกา สายสูง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2729-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 20968760

DEVELOPMENT AND DETECTION OF ANTINUCLEOSOME ANTIBODY BY AN  
ELISA FOR STUDYING THE CORRELATION IN SYSTEMIC LUPUS  
ERYTHEMATOSUS PATIENTS



Miss Supannika Saisoong

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology  
Inter-Departmental Program in Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-2729-1

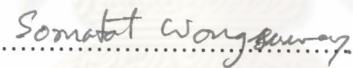
Thesis Title Development and detection of antinucleosome antibody by an ELISA for studying the correlation in systemic lupus erythematosus patients  
By Miss Supannika Saisoong  
Field of Study Medical Microbiology  
Thesis Advisor Associate Professor Orrawadee Hanvivatvong  
Thesis Co-advisor Professor Somchai Eiam-ong, M.D.

---

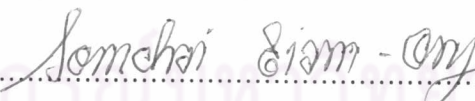
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree


  
..... Dean of Graduate School  
(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

  
..... Chairman  
(Associate Professor Somatat Wongsawang, DVM., Dr. med. vet)

  
..... Thesis Advisor  
(Associate Professor Orrawadee Hanvivatvong)

  
..... Thesis Co-advisor  
(Professor Somchai Eiam-ong, M.D.)

  
..... Member  
(Professor Suchela Janwityanujit, M.D.)

นางสาว สุพรรณิกา สายสูง : การพัฒนาวิธีการตรวจและศึกษาหาความสัมพันธ์ของ antinucleosome antibody ในผู้ป่วย systemic lupus erythematosus (DEVELOPMENT AND DETECTION OF ANTINUCLEOSOME ANTIBODY BY AN ELISA FOR STUDYING THE CORRELATION IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS PATIENTS)

อาจารย์ที่ปรึกษา:รศ.อรวิดี หาญวิวัฒน์วงศ์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม:ศ.นพ. สมชาย เอี่ยมอ่อง  
124 หน้า ISBN 974-17-2729-1

การตรวจหาแอนตินิวคลีโอโซมแอนติบอดีในผู้ป่วย SLE ศึกษาโดยใช้วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยการนำน้ำเหลืองของผู้ป่วย SLE 65 ราย และคนปกติ 115 ราย มาทำการทดสอบ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการหาแอนติบอดีต่ออีเอ็นเอสายคู่ในผู้ป่วยกลุ่มเดียวกันนี้ พร้อมทั้งระดับคอมพลีเมนต์ C3 และ C4 ร่วมด้วย จากการศึกษาพบว่า มีการตรวจพบแอนตินิวคลีโอโซมแอนติบอดีในผู้ป่วยสูงกว่าแอนติบอดีต่ออีเอ็นเอสายคู่ (ร้อยละ 52.3 และ 36.9 ตามลำดับ) ในกลุ่มเดียวกัน และเมื่อศึกษาในกลุ่มที่มีการกำเริบของโรคกับกลุ่มที่มีอาการสงบ พบว่าให้ผลเช่นเดียวกัน คือมีการตรวจพบแอนตินิวคลีโอโซมร้อยละ 64.4 และแอนติบอดีต่ออีเอ็นเอสายคู่ในอัตราร้อยละ 46.7 ในกลุ่มที่โรคกำเริบและเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีอาการสงบของโรคจะพบเพียงร้อยละ 25 และ 15 ตามลำดับ ซึ่งจะพบว่า แอนตินิวคลีโอโซมสามารถตรวจพบในอัตราที่สูงกว่าแอนติบอดีต่ออีเอ็นเอสายคู่ทั้ง 2 กลุ่ม คือกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดและกลุ่มที่โรคมีการกำเริบ นอกจากนี้ยังพบว่า ร้อยละ 46.1 ของผู้ป่วย SLE ที่มีการตรวจพบแอนติบอดีต่อนิวคลีโอโซมไม่พบแอนติบอดีต่ออีเอ็นเอสายคู่ จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า แอนตินิวคลีโอโซมแอนติบอดีอาจจะเป็นตัวบ่งชี้ที่ดีในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่ออีเอ็นเอสายคู่ และในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอนตินิวคลีโอโซมแอนติบอดีกับการดำเนินของโรค โดยใช้คะแนนจาก SLEDAI ซึ่งใช้เป็นตัววัดการดำเนินของโรคในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าแอนติบอดีต่อนิวคลีโอโซมมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ SLEDAI score นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างแอนตินิวคลีโอโซมแอนติบอดีกับระดับ C3 ร่วมด้วย อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์กับระดับ C4 ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า แอนตินิวคลีโอโซมแอนติบอดีที่ตรวจพบในผู้ป่วย SLE อาจจะมีประโยชน์ในการใช้ประกอบการวินิจฉัยโรค SLE ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มผู้ป่วย SLE ที่ให้ผลแอนติบอดีต่ออีเอ็นเอสายคู่เป็นลบ

สาขาวิชา..จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (สหสาขาวิชา)..  
ปีการศึกษา.....2545.....

ลายมือชื่อนิติ..... สุพรรณิกา สายสูง  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อ.อรวิดี หาญวิวัฒน์วงศ์  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... ศ.นพ. สมชาย เอี่ยมอ่อง



# #4389125020: MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: ANTINUCLEOSOME ANTIBODY, ANTI-dsDNA ANTIBODY,  
SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS, ELISA, SLEDAI

SUPANNIKA SAISOONG: DEVELOPMENT AND DETECTION OF  
ANTINUCLEOSOME ANTIBODY BY AN ELISA FOR STUDYING THE  
CORRELATION IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS PATIENTS.  
THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. ORRAWADEE HANVIVATVONG, THESIS  
COADVISOR: PROF. SOMCHAI EIAM-ONG, M.D., 124 pp. ISBN 974-17-2729-1

To study the prevalence of antinucleosome antibody in systemic lupus erythematosus patients, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect technique, was developed. In addition, the association of antinucleosome and other laboratory parameters (i.e., anti-dsDNA, C3 and C4 levels) were also evaluated. Sixty-five patient sera with systemic lupus erythematosus (SLE) were recruited. One hundred and fifteen sera were used as controls. When antinucleosome and anti-dsDNA ELISA were performed, the prevalence of antinucleosome and anti-dsDNA were 52.3% and 36.9%, respectively, indicating the frequency of antinucleosome antibody in SLE patients was higher than in anti-dsDNA antibody lupus patients. The similar results were obtained when studied in the active SLE (64.4% and 46.7% for antinucleosome and anti-dDNA positive sera, respectively). Sixteen of 34 sera (47.1%) were shown antinucleosome without anti-dsDNA activity, suggesting that antinucleosome antibody may be a useful marker for diagnosis in anti-dsDNA negative SLE. In contrast to the active group, only 25% and 15% of the inactive SLE patients were positive for antinucleosome and anti-dsDNA antibody, respectively. Further studied in correlation analysis, we found that antinucleosome antibody activity were significantly correlated with the disease activity (SLEDAI) scores and C3 levels, however, no correlation was found between antinucleosome antibody activity and C4 levels. We conclude that antinucleosome antibody may be a useful marker in diagnosis of SLE, particularly in SLE patient whose reactivity to dsDNA is absent.

Field of Study...Medical Microbiology....

Academic year .....2002.....

Student's signature.....*Supannika Saisoong*.....

Advisor's signature.....*Orrawadee Hanvivatvong*.....

Co-advisor's signature.....*Somchai Eiam-ong*.....

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author wished to express her deepest gratitude to her advisor, Assoc. Prof. Orrawadee Hanvivatvong, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and Professor Somchai Eiam-ong, M.D., Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, her co-advisor for their kind excellent supervision and invaluable advice, indispensable help, constructive criticism, guidance and encouragement throughout the period of the study.

I also would like to thanks to Assoc. Prof. Somchai Attasilpa, M.D., Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for his valuable advice, Dr. Somphon Boorana-o-sot, M.D., Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for his help in collecting the clinical information of SLE patients, Mr. Pongsak Pansin and staffs in nephrology laboratory unit for their kindness in collecting the patient sera.

I would like to thanks to National Blood Bank Center; Thai Red Cross Society for providing the healthy blood donors using as controls in this study. I am grateful to Miss Yada Kaew-o-pas and Miss Nontida Chantachot for their kindness in guidance throughout the laboratory and providing the beneficial instrument for this study. The author wish to extend her acknowledgement to all staffs of immunology unit, Department of Microbiology, King Chulalongkorn Memorial Hospital, for their kindness and help.

I am indebted to my external examiner, Prof. Sucheela Janwityanujit, M.D., Department of Medicine, Faculty of Medicine, Mahidol University for her useful suggestions and comments for this study.

Most sincerely, I would like to express my deepest appreciation to my parents, my friends. The eternity of loves, encouragement, kindness and adoration will always be remembered.

## CONTENTS

|  | Page |
|--|------|
| THAI ABSTRACT.....                               | iv   |
| ENGLISH ABSTRACT.....                            | v    |
| ACKNOWLEDGEMENT.....                             | vi   |
| LISTS OF TABLES.....                             | x    |
| LISTS OF FIGURE.....                             | xi   |
| ABBREVIATIONS.....                               | xiii |
| <br>CHAPTER                                      |      |
| I. INTRODUCTION.....                             | 1    |
| II. OBJECTIVES.....                              | 5    |
| III. REVIEW LITERATURE.....                      | 6    |
| Epidemiology and natural history.....            | 7    |
| Classification of SLE.....                       | 7    |
| Clinical symptoms.....                           | 10   |
| Laboratory tests.....                            | 11   |
| Autoimmunity in SLE.....                         | 15   |
| The nucleosome.....                              | 17   |
| Apoptosis in SLE.....                            | 18   |
| Phagocytosis of apoptotic cells in SLE.....      | 20   |
| Immunogenicity of nucleosomes.....               | 21   |
| Nucleosome-specific autoantibodies.....          | 25   |
| Roles of nucleosomes in pathogenesis of SLE..... | 26   |

|     |   |    |
|-----|---|----|
|     | Clinical relevance of antinucleosome antibodies.....  | 30 |
| IV. | MATERIALS AND METHODS.....  | 32 |
|     | Study groups.....   | 32 |
|     | Specimen collection.....  | 34 |
|     | Nucleosome preparation.....   | 34 |
|     | Examination of nucleosomal DNA.....   | 38 |
|     | Examination of nucleosomal histones.....  | 39 |
|     | Checkerboard titration.....   | 41 |
|     | Precision study.....  | 43 |
|     | Determination of antinucleosome antibodies .....  | 43 |
|     | Determination of anti-dsDNA antibodies.....   | 43 |
|     | C3 and C4 determination.....  | 45 |
|     | Statistical analysis.....   | 46 |
| V.  | RESULTS .....   | 47 |
|     | Development of antinucleosome ELISA.....  | 47 |
|     | The optimal conditions for antinucleosome and<br>Anti-dsDNA ELISA.....                        | 51 |
|     | Precision study of antinucleosome and<br>Anti-dsDNA ELISA.....                                | 54 |
|     | Detection of antinucleosome and anti-dsDNA<br>Antibodies in SLE patients.....                 | 55 |
|     | Levels of C3 and C4 complement in SLE patients.....   | 63 |
|     | Association of antinucleosome with anti-dsDNA antibodies<br>and complement C3, C4 levels..... | 65 |



|  |     |
|--|-----|
| Correlation between antinucleosome antibody and SLEDAI.....                      | 70  |
| Correlation between antinucleosome and anti-dsDNA antibodies....                 | 71  |
| Correlation between antinucleosome antibody<br>and complement C3, C4 levels..... | 72  |
| Correlation between anti-dsDNA antibody and SLEDAI.....                          | 75  |
| Correlation between anti-dsDNA antibody<br>and complement C3, C4 levels.....     | 76  |
| VI. DISCUSSION.....  | 79  |
| VII. CONCLUSION.....   | 85  |
| REFERENCES.....  | 87  |
| APPENDICES   |     |
| APPENDIX I.....  | 98  |
| APPENDIX II.....   | 102 |
| APPENDIX III.....  | 104 |
| APPENDIX IV.....   | 108 |
| APPENDIX V.....  | 109 |
| CURRICULUM VITAE.....  | 111 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LISTS OF TABLES

| Table  | Page |
|--|------|
| 1. Epidemiologic and genetic characteristics<br>of systemic lupus erythematosus.....   | 8    |
| 2. Revised American Rheumatism Association criteria<br>for classification of systemic lupus erythematosus.....                           | 9    |
| 3. Cumulative incidence of clinical symptoms<br>in systemic lupus erythematosus.....   | 10   |
| 4. Cumulative incidence of autoantibody formation in<br>systemic lupus erythematosus .....   | 13   |
| 5. Prevalence of antinucleosome reactivity in SLE.....   | 31   |
| 6. SLEDAI: data collection sheet.....  | 33   |
| 7. Checkerboard titration for antinucleosome ELISA.....  | 52   |
| 8. Checkerboard titration for anti-dsDNA ELISA.....  | 53   |
| 9. The mean antinucleosome and anti-dsDNA antibodies<br>in SLE patients.....   | 56   |
| 10. Association of low complement component C3 and C4 levels in SLE.....   | 64   |
| 11. Association of the presence of antinucleosome antibodies (with or<br>without anti-dsDNA) with disease stage in 34 SLE patients ..... | 68   |
| 12. Association of antinucleosome and anti-dsDNA antibodies<br>with complement component C3, C4 levels.....                              | 69   |

## LISTS OF FIGURES

| Figure  | Page |
|---|------|
| 1. Hypothesis for the immune dysregulation in SLE<br>and the development of lupus nephritis.....  | 16   |
| 2. Chromatin (left part) is a polymer structure of nucleosomes<br>connected by protein-free DNA.....  | 17   |
| 3. Mechanism of epitope spreading.....  | 23   |
| 4. Antigen-dependent antibody production.....   | 24   |
| 5. The summary of the mechanisms leading to autoimmunity<br>to nucleosomes in SLE and the development of lupus nephritis.....   | 29   |
| 6. Procedure of nucleosome preparation.....   | 36   |
| 7. Elution profile of nucleosomes from a column<br>chromatography on Sephacryl S-300.....   | 37   |
| 8. Principle of indirect ELISA.....   | 40   |
| 9. Scheme for checkerboard titration to determine optimal<br>Ag coating concentration and peroxidase-conjugated rabbit<br>immunoglobulin of human IgG (gamma-chain) dilution..... | 42   |
| 10. The presence of nucleosomal DNA.....  | 49   |
| 11. SDS-PAGE of nucleosomal core proteins.....  | 50   |
| 12. The antinucleosome antibody reactivity in SLE patients<br>and healthy controls.....   | 58   |

|  |    |
|--|----|
| 13. The antinucleosome antibody reactivity in SLE patient<br>with active and inactive group.....           | 59 |
| 14. The anti-dsDNA antibody reactivity in SLE patients<br>and healthy controls.....                        | 61 |
| 15. The anti-dsDNA antibody reactivity in SLE patient<br>with active and inactive group.....               | 62 |
| 16. Prevalence of antinucleosome and anti-dsDNA antibodies<br>in SLE patients versus healthy controls..... | 66 |
| 17. Association of antinucleosome and anti-dsDNA antibody<br>with active and inactive SLE patients.....    | 67 |
| 18. Correlation between antinucleosome antibody and SLEDAI.....  | 70 |
| 19. Correlation between antinucleosome and anti-dsDNA antibody.....  | 71 |
| 20. Correlation between C3 levels and antinucleosome antibody activity.....                                | 73 |
| 21. Correlation between C4 levels and antinucleosome antibody activity.....                                | 74 |
| 22. Correlation between anti-dsDNA antibody and SLEDAI.....  | 75 |
| 23. Correlation between C3 levels and anti-dsDNA antibody activity.....                                    | 77 |
| 24. Correlation between C4 levels and anti-dsDNA antibody activity.....                                    | 78 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ABBREVIATIONS

|               |   |  |
|---------------|---|--|
| °C            | = | celcius  |
| µg            | = | microgram  |
| µl            | = | microlitter  |
| Ag            | = | Antigen  |
| Ab            | = | Antibody   |
| bp            | = | base pair  |
| C             | = | Complement   |
| CV            | = | Coefficient of variation                                     |
| dsDNA         | = | Double-stranded deoxyribonucleic acid                        |
| DW            | = | Distilled water  |
| ELISA         | = | Enzyme-linked immunosorbent assay                            |
| e.g.          | = | exempli gratia   |
| <i>et al.</i> | = | et alii  |
| etc.          | = | et cetera  |
| Fig.          | = | Figure   |
| hr            | = | hour   |
| IgG           | = | Immunoglobulin G   |
| i.e.          | = | id est   |
| kDa           | = | Kilodalton   |
| l             | = | litter   |
| M             | = | Molar  |
| mg            | = | milligram  |
| mM            | = | Millimolar   |
| min           | = | minute   |
| ml            | = | milliliter   |
| OD            | = | Optical density  |
| SD            | = | Standard deviation   |
| SDS           | = | Sodium dodecyl sulfate                                       |
| SDS-PAGE      | = | Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel<br>electrophoresis |
| SLE           | = | Systemic lupus erythematosus                                 |