

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000199962



A
(428)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Κ. Χ. ΣΙΑΜΟΠΟΥΛΟΣ

ΑΝΟΣΟΔΡΑΣΤΙΚΟΙ ΕΠΤΟΠΟΙ
ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.
ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

ΕΥΘΑΛΙΑ Ε. ΓΙΑΝΝΑΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1999



" Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα. Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2".



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Παθολογίας/Νεφρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, επιβλέπων.
2. Μουτσόπουλος Χαράλαμπος, Καθηγητής Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Αθηνών, μέλος.
3. Σακαρέλλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Οργανικής Χημείας Χημικού Τμήματος, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος.



ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Παθολογίας/Νεφρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, επιβλέπων.
2. Μουτσόπουλος Χαράλαμπος, Καθηγητής Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Αθηνών, μέλος.
3. Σακαρέλλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Οργανικής Χημείας Χημικού Τμήματος, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος.
4. Σακαρέλου-Δαϊτσιώτου Μαρία, Καθηγήτρια Βιοχημείας Χημικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος.
5. Τσόλας Ορέστης, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος.
6. Δρόσος Αλέξανδρος, Απληρωτής Καθηγητής Παθολογίας/Ρευματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος.
7. Τζιούφας Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Αθηνών, μέλος.



Στους γονείς μου
Ελευθέριο και Δήμητρα.

Στον σύζυγό μου Αλέξανδρο και
στο νεογέννητο μωρό μου.



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Ανοσολογικό εργαστήριο του τομέα Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σε συνεργασία με το εργαστήριο Πεπτιδοχημείας του τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και του Ανοσολογικού εργαστηρίου του τομέα Παθολογικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών την χρονική περίοδο 1994-1999.

Πέραν των γνώσεων και της εμπειρίας που αποκόμισα κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου διδάχθηκα ένα νέο πιο αποτελεσματικό, άμεσο, πρακτικό τρόπο σκέψης και αντιμετώπισης των καταστάσεων και των πιθανών εμποδίων, γεγονός που θα αποτελέσει εφόδιο για την υπόλοιπη ζωή μου. Σε αυτό συνέβαλε καθοριστικά ο καθηγητής του τομέα Παθολογικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Χ.Μ. Μουτσόπουλος που ήταν και ο κύριος εμπνευστής και καθοδηγητής της παρούσας διατριβής, τον οποίο ευχαριστώ και ευγνωμονώ βαθύτατα για την αμέριστη συμπαράσταση και εμπιστοσύνη που μου παρείχε. Ευχαριστώ βαθύτατα επίσης τους καθηγητές του τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κ. Σακαρέλλο και κα Μ. Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου για την πολύτιμη βοήθεια, συμπαράσταση και καθοδήγηση που μου παρείχαν καθ'όλη την διάρκεια της πραγματοποίησης της διδακτορικής διατριβής μου καθώς και την μύηση στον όμορφο κόσμο της σύνθεσης και της πεπτιδοχημείας.

Θερμά ευχαριστώ τον Επίκουρο καθηγητή του τομέα Παθολογικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Α.Γ. Τζιούφα για



τις πολύτιμες, εύστοχες συμβουλές του, την συνεχή και άοκνη παρακολούθηση της πορείας της διατριβής μου και την υπομονή και συμπαράστασή του που οδήγησαν στην ολοκλήρωση της διατριβής αυτής.

Θερμότερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον Καθηγητή Παθολογίας/Νεφρολογίας της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων κ. Κ. Σιαμόπουλο για την ειλικρινή και ανιδιοτελή συμπαράσταση που μου προσέφερε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Χημείας κ. Βασίλειο Τσίκαρη και την Λέκτορα του αντίστοιχου τμήματος κα Ευγενία Πάνου-Πομώνη για την βοήθεια και συμπαράσταση που μου προσέφεραν. Ευχαριστώ θερμά επίσης την γραμματεία του τμήματος Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας την οποία στελεχώνουν οι κυρίες Ελένη Ντάφλου και Ναταλία Παπαστεργίου καθώς και όλους τους μεταπτυχιακούς συνεργάτες του εργαστηρίου Πεπτιδοχημείας για την βοήθεια συμπαράσταση και τις ευχάριστες στιγμές που μοιραστήκαμε.

Ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στους μεταπτυχιακούς συνεργάτες του Ανοσολογικού εργαστηρίου του τμήματος Παθολογίας της Ιατρικής σχολής Ιωαννίνων: Ιωάννη Ρούτσια και Δήμητρα Μπούμπα καθώς και το προσωπικό του εργαστηρίου: Τζ. Σπύρου, Κλ. Γκαραλέα, Αλ. Μάγκου και Γλ. Παπατζήμα για την πολύτιμη συμπαράστασή τους και την άριστη συνεργασία αυτών των χρόνων. Ευχαριστώ θερμά επίσης όλα τα στελέχη του τμήματος της Παθολογικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών για την ηθική και επιστημονική συμπαράσταση που μου παρείχαν τον τελευταίο χρόνο της εκπόνησης της διατριβής μου και κυρίως τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Π. Βλαχογιαννόπουλο και τον Επιστημονικό συνεργάτη κ. Μ Μανουσσάκη.

Ευχαριστίες επίσης οφείλω και στον κ. Πενταφράγκα, την κα Χατζηωάννου τον κ Παπαλόη την κα Χονδρουδάκη και την κα Κουκλή της Φαρμακευτικής εταιρίας



ΕΛΠΙΕΝ για την οικονομική υποστήριξη και την ηθική και επιστημονική βοήθειά που μου παρείχαν.

Θερμά ευχαριστώ τον Φιλόλογο κ. Α. Τσέκο για τον διεξοδικό έλεγχο της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ τους γονείς μου Ελευθέριο και Δήμητρα, τον αδελφό μου Γρηγόρη και τον σύζυγό μου Αλέξανδρο για την υπομονή, ενθάρρυνση, την ηθική υποστήριξη και συμπαράσταση που μου έδειξαν στις δύσκολες στιγμές που αντιμετώπισα καθώς και για τις ευχάριστες στιγμές που μοιραστήκαμε κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

Η εργασία αυτή υποστηρίχθηκε οικονομικά : (1) από το κοινωφελές Ίδρυμα "Γεωργίου Σταύρου" του τμήματος Κληροδοτημάτων της Ιεράς Μητροπόλεως Ιωαννίνων, (2) από το ερευνητικό πρόγραμμα ΓΤΕΤ: 3526 (ΕΡΕ) με τίτλο " Ανάπτυξη μοριακών τεχνικών και ανοσοδραστικών συνθετικών πεπτιδίων για τον προσδιορισμό των αντισωμάτων κατά Ro/SSA" με υπεύθυνους τους Καθηγητές Χ.Μ. Μουτσόπουλο και Κ. Σακαρέλλο, (3) από την φαρμακευτική εταιρεία ΕΛΠΙΕΝ Α.Ε.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος.....	VI
Συνοπμογραφίες.....	4
Εισαγωγή-Σκοπός της μελέτης.....	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	11
1. Αυτοάνοση απόκριση κατά κυτταρικών αντιγόνων.....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	14
2. Τα αντισώματα αντι-La/SSB	14
2.1. Πού συναντώνται;.....	14
2.2. Κλινική συσχέτιση νόσου και παρασίας των αντισωμάτων αντι-La/SSB	16
2.3. Μέθοδοι προσδιορισμού των αντισωμάτων αντι-La/SSB	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	20
3. Αυτοαντιγόνο La/SSB	20
3.1. Τοπολογία.....	20
3.2. Μοριακά, Βιοχημικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά.....	22
3.2.1. Γονίδιο La/SSB	22
3.2.2. Δομικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης La/SSB	24
3.2.3. Σύνδεση της πρωτεΐνης La/SSB με νουκλεϊκά οξέα.....	27
3.2.4. Λειτουργίες της πρωτεΐνης La/SSB	29
3.3. Αντιγονική χαρτογράφηση των επιτόπων της πρωτεΐνης La/SSB	31
3.3.1. Β λεμφοκυτταρικοί επίτοποι της πρωτεΐνης La/SSB	31
3.3.2 Τ λεμφοκυτταρικοί επίτοποι της πρωτεΐνης La/SSB	41
3.4. Εξάπλωση της ανοσολογικής απόκρισης κατά της πρωτεΐνης La/SSB	42



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	49
4.1. Σχεδιασμός, πορεία και μεθοδολογία της χαρτογράφησης αντιγονικών επιτόπων.....	49
4.1.1. Μελέτη αντιγονικών επιτόπων με ενζυμική υδρόλυση.....	49
4.1.2. Μελέτη αντιγονικών επιτόπων με ανασυνδυασμένα πολυπεπτίδια.....	50
4.1.3. Μελέτη αντιγονικών επιτόπων με τη χρήση συνθετικών πεπτιδίων.....	52
4.1.3.1. Παράλληλη σύνθεση πεπτιδίου σε κηλίδες νιτροκυτταρίνης.....	62
4.1.3.2. Παράλληλη σύνθεση πεπτιδίου με την τεχνική των ραβδίων πολυαιθυλενίου.....	64
4.1.3.3. Πολλαπλή σύνθεση πεπτιδίων σε "σακουλάκια τσαγιού".....	70
4.2. Μέθοδοι προσδιορισμού των T λεμφοκυτταρικών επιτόπων.....	71
4.2.1. In vitro καλλιέργεια ανθρωπίνων T λεμφοκυττάρων.....	71
4.2.2. Χαρτογράφηση T λεμφοκυτταρικών επιτόπων με κύτταρα ποντικού.....	73
4.3. Μέθοδοι προσδιορισμού των αυτοαντισωμάτων.....	75
4.3.1. Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	75
4.3.1.1. Ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-La/SSB με τον έμμεσο ανοσοφθορισμό...76	
4.3.2. Ανοσοδιάχυση και αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση.....	78
4.3.2.1. Ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-La/SSB με την ανοσοδιάχυση και την αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση.....	79
4.3.3. Ανοσοαποτύπωση.....	80
4.3.3.1. Ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-La/SSB με την ανοσοαποτύπωση.....	81
4.3.4. Ανοσοκαθίζηση πρωτεϊνικών συμπλόκων με μόρια RNA	84
4.3.4.1. Ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-La/SSB με την ανοσοκαθίζηση πρωτεϊνικών συμπλόκων με μόρια RNA	85
4.3.5.Ανοσοενζυμική μέθοδος στερεάς φάσης ELISA.....	86
4.3.5.1. Ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-La/SSB με την ανοσοενζυμική μέθοδο στερεάς φάσης ELISA.....	92
4.4. Ανοσοποιήσεις με συνθετικά πεπτίδια.....	94
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	100



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....111**

Αντιγονική χαρτογράφηση και χαρακτηρισμός των γραμμικών Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων του αυτοαντιγόνου La/SSB.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....142

Η αξία των γραμμικών συνθετικών πεπτιδικών αναλόγων του αυτοαντιγόνου La/SSB για την αναγνώριση των αυτοαντισωμάτων του La/SSB: Ειδικότητα, ευαισθησία και σύγκριση μεθόδων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....169

Η ανοσοποίηση των λευκών κουνελιών Νέας Ζηλανδίας με μικρά συνθετικά πεπτίδια La/SSB προκαλεί ενδομοριακή εξάπλωση των Β και Τ λεμφοκυτταρικών επιτόπων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.....200

Συζήτηση- Αποτελέσματα.....200

Περίληψη.....213

Summary.....215

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....217

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Ag	αντιγόνο
ABO	αλβουμίνη ορού βοός
ABTS	2,2-αζινο-δισ-3-αιθυλβενζοθειαζολικό θειικό οξύ.
Ab	αντίσωμα
Ao	αμινοξύ
ΑΠΚ	αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
Ala	αλανίνη
ANA	αντιτυρηνικά αντισώματα
ATP	τριφωσφορική αδενοσίνη
Boc	τετρ-βουτυλοξυκαρβονύλιο
BOP	βενζοτριαζολυλοξυτρίρις (διμεθυλαμινο) εξαφθοροφωσφορικό Οξύ.
BSA	αλβουμίνη ορού βοός
cDNA	συμπληρωματικό DNA
CIE	αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (counter immunoelectropho- resis)
C-άκρο	καρβοξυτελικό άκρο
DCC	καρβοδιϊμίδιο
DIEA	δι-ισοπροπυλαμίνη
DKP	δικετοπιπεραζίνη
DMF	διμέθυλοφορμαμίδιο
DNA	δεοξυριβονουκλετίδια
EBV	ιός epstein barr
EDT	αιθανοδιθιόλη
Fmoc	9-φθόρο-φαινυλ-μεθοξυκαρβονύλιο
HF	υδροφθορικό οξύ
HIV	ιός ανθρώπινης επίκτητης ανοσοανεπάρκειας
HLA	ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο



HOBt	υδροξυβενζοτρίαζόλιο
HPLC	υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography)
INF-γ	γ-ιντερφερόνη
KLH	αιμοκυανίνη
LPS	λιποπολυσακχαρίτης
Lys	λυσίνη
MHC	ή ΚΣΙ κύριο σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας
mRNA	αγγελιοφόρο RNA
NES	μήνυμα εξαγωγής από τον πυρήνα (nuclear export signal)
NLS	μήνυμα κατακράτησης στον πυρήνα (nuclear localization Signal)
NMR	Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance)
OA	οπτική απορρόφηση
PBL	λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος
PBS	διάλυμα φωσφορικού νατρίου -
PCR	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
Pfp	πενταφθοροφαινυλεστέρας
PLP	πρωτεϊνολυπιδιακή πρωτεΐνη
Pro	προλίνη
RNA	ριβονουκλεοτίδια
RNP	ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο
RRM	περιοχή πρόσδεσης με RNA μόρια
rRNA	ριβοσωμικό RNA
ScRNA	μικρό κυτταροπλασματικό RNA
Sd	τυπική απόκλιση (standard deviation)
SDS	δωδεκυλοθειϊκό νάτριο
SDS-PAGE	ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειϊκού νατρίου.



SnRNA	μικρό πυρηνικό RNA
SOC	επαναλαμβανόμενος ολιγοπεπτιδιακός φορέας (Sequential Oligopeptide Carrier)
[³ H]T	τριτωμένη θυμιδίνη
TBTU	2-(1 ^H -βενζοτριαζολ-1-υλ)-1,1,3,3-τετραφθοροβορικό τετραμεθυλοουράνιο)
TCR	T λεμφοκυτταρικός υποδοχέας
TFA	τριφθοροξικό οξύ
tRNA	μεταφορικό RNA
Trp (W)	τροπτοφάνη
VSV	ίος της φυσαλιδώδους στοματίτιδας (Vesicular Stomatitis Virus)
ELISA	Ανοσοενζυμική μέθοδος στερεάς φάσης (enzyme linked immunosorbent assay)
ENAs	πυρηνικά αντιγόνα (Extractable nuclear antigens)
ΘΔ	θερμοκρασία δωματίου
IB	ανοσοαποτύπωση (immunoblot)
MBP	ή ΒΠΜ βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (myelin basic protein)
N-άκρο	αμινοτελικό άκρο
Πιν	πίνακας
PKP	ενεργοποιητής της πρωτεϊνικής κινάσης
ΣS	σύνδρομο Sjogren
ΣΕΛ	συστηματικός ερυθματώδης λύκος
Συν	συνεργάτες
Σχ	σχήμα
TOP II	τοποϊσομεράση II



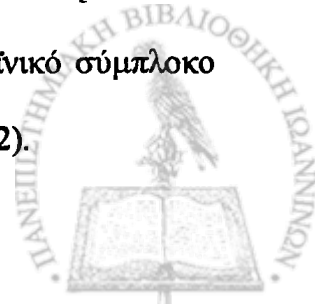
ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το αντιγόνο La/SSB αποτελεί στόχο αντισωμάτων που ανιχνεύονται κυρίως σε ορούς ασθενών με Σύνδρομο Sjogren (σS) και συστηματικό ερυθματώδη λύκο (ΣΕΛ) [Tan EM 1989].

Κατά τις δεκαετίες '60 και '70 αρκετοί ερευνητές, που εργάστηκαν ανεξάρτητα, ασχολήθηκαν με την εξακρίβωση και ταυτοποίηση της πρωτεΐνης La/SSB, δίνοντας διαφορετικά ονόματα και περιγράφοντας διαφορετικά τις βιοχημικές της ιδιότητες, καθώς και την συχνότητα εμφάνισης αντισωμάτων εναντίον της σε ορούς ασθενών. Η πρωτεΐνη La/SSB έχει περιγραφεί ως SjT [Aderson JR et al 1961], ως La [Clark G et al 1969], ως SSB [Alspaugh MA 1975] και ως Ha [Akizuki M 1977]. Εν συνεχεία, διεργαστηριακή ανταλλαγή των ορών, καθώς και των αντιγονικών εκχυλισμάτων που χρησιμοποίησε κάθε ερευνητική ομάδα, απέδειξε ότι τα αντιγόνα SjT, La, SSB και Ha ήταν πανομοιότυπα [Alspaugh MA 1979]. Οι πιο συχνές ονομασίες του αντιγόνου είναι La και SSB.

Πρόκειται για πρωτεΐνη 46.7KD μοριακού βάρους, μήκους 408 αμινοξέων, φωσφορυλιωμένη αποκλειστικά στο καρβόξυ- τελικό άκρο, εδράζεται κυρίως στον πυρήνα όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων όλων των ειδών που έχουν μελετηθεί έως τώρα, ενώ το 20-50% εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα [Habets WJ 1983].

Η πρωτεΐνη La/SSB αποτελεί τμήμα του συμπλόκου RoRNPs, μικρών κυτταροπλασματικών συμπλόκων RNA-πρωτεΐνης άγνωστης έως τώρα λειτουργίας. Τα RNA που συμμετέχουν στο σύμπλοκο είναι τα YRNAs (y= cytoplasmic). Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερα YRNAs: hY1, hY3, hY4 και hY5 [Hendrick JP et al 1981]. Εκτός της πρωτεΐνης La/SSB στο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο συμμετέχουν RoRNP και οι πρωτεΐνες Ro60KD και Ro52KD (Σχήμα 2).



Όπως αναφέρθηκε, οροί ασθενών με σS και ΣΕΛ (καθώς και άλλα σχετικά νοσήματα) περιέχουν συχνά αντισώματα αντι-La/SSB που στρέφονται κατά του αντιγόνου La/SSB. Μέχρι στιγμής, αυτά τα αυτοαντισώματα υπήρξαν σημαντικοί δείκτες αναγνώρισης αυτών των ασθενειών, καθώς και σημαντικά βοηθήματα για την απομόνωση, τον χαρακτηρισμό και την αποσαφήνιση εν μέρει της λειτουργίας αυτού του ενδοκυτταρικού μορίου. Ωστόσο ο πιθανός παθογενετικός ρόλος αυτών των αυτοαντισωμάτων, καθώς και ο πιθανός αντιγονοεπαγόμενος από το ίδιο αντιγόνο La/SSB μηχανισμός δημιουργίας τους δεν έχει εξακριβωθεί.

Στο πρώτο μέρος του ειδικού τμήματος αυτής της εργασίας γίνεται προσπάθεια χαρτογράφησης και χαρακτηρισμού των κύριων αντιγονικών περιοχών του αυτοαντιγόνου La/SSB με την χρησιμοποίηση των αντισωμάτων αντι-La/SSB ασθενών με σS και ΣΕΛ, προκειμένου να συσχετιστούν οι αντιγονικές περιοχές οι ονομαζόμενες επίτοποι με τμήματα άλλων πρωτεϊνών, πχ ιικών πρωτεϊνών, και να διευκρινισθεί ο πιθανός παθογενετικός ρόλος του αυτοαντιγόνου, διαμέσου της μοριακής μίμησης ξένων αυτοαντιγόνων. Επίσης γίνεται αναφορά στην χρήση των επιτόπων της πρωτεΐνης La/SSB για την ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-La/SSB.

Το δεύτερο μέρος της εργασίας διαπραγματεύεται την χρήση των κύριων αντιγονικών επιτόπων του αντιγόνου La/SSB ως του πλέον αποτελεσματικού, ειδικού, ευαίσθητου και εύκολου τρόπου ανίχνευσης των αντι-La/SSB αντισωμάτων σε διάφορες ανοσοενζυμικές τεχνικές, σε σύγκριση πάντα με την χρήση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης La/SSB.

Το τρίτο τμήμα ασχολείται με την αντιγονική φύση των κύριων επιτόπων της ανθρώπινης πρωτεΐνης La/SSB και την ικανότητα αυτών να επάγουν την παραγωγή αντι-πεπτιδικών και αντι-La/SSB αντισωμάτων σε πειραματόζωα. Διερευνάται επίσης



η δυνατότητα ανάπτυξης ενός πειραματικού μοντέλου επαγωγής και εξάπλωσης της αυτοανοσίας.

* UNITED STATES *



❖ ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ

1

1. ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΚΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ

Υπό φυσιολογικές καταστάσεις το ανοσοποιητικό σύστημα είναι σε θέση να ξεχωρίζει τα εαυτά συστατικά του σώματος και να επιτίθεται μόνο στους εισβολείς. Δυστυχώς όμως τα όπλα του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν να στραφούν κατά του εαυτού τους προκαλώντας ασθένειες (αυτοάνοσα νοσήματα).

Δεν είναι γνωστό τι ενεργοποιεί την αυτοάνοση απόκριση. Γενικά ευθύνονται παράγοντες όπως πχ το περιβάλλον. Χαρακτηριστική είναι η έξαρση του συστηματικού ερυθματώδη λύκου μετά από έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία. Επίσης το γενετικό υπόστρωμα κάθε ατόμου και κυρίως ο γονότυπος που κωδικοποιεί το μέγιστο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) έχει χαρακτηριστεί ως ένας από τους παράγοντες που είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη αυτοάνοσου νοσήματος σε άτομα με συγκεκριμένο γονότυπο. Άλλοι παράγοντες υπεύθυνοι για την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων είναι οι ορμόνες πχ οιστρογόνα (το μεγαλύτερο ποσοστό ατόμων που πάσχουν από αυτοάνοσα νοσήματα είναι γυναίκες) και οι ψυχολογικοί παράγοντες, υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ νευροδιαβιβαστών και υποδοχέων ανοσολογικών κυττάρων (άτομα που βρέθηκαν σε κατάσταση έντονης ψυχολογικής πίεσης πχ θάνατος προσφιλούς ατόμου, ανέπτυξαν ξαφνικά αυτοάνοσο νόσημα).

Η αυτοανοσία είναι θυμοεξαρτώμενη διαδικασία. Ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων καθώς και η ενεργοποίηση των μακροφάγων μπορούν να προκαλέσουν ιστική βλάβη. Επίσης η ενεργοποίηση των βοηθών T



λεμφοκυττάρων μπορεί να ενεργοποιήσει την παραγωγή αυτοαντισωμάτων που στρέφονται κατά των αυτοαντιγόνων.

Κατά την πορεία της μελέτης των αυτοάνοσων νοσημάτων έχουν εντοπιστεί και χαρακτηριστεί πολλά αυτοαντιγόνα που εδρεύουν σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα, την κυτταρική μεμβράνη ή και σε διαλυτούς εκκρινόμενους παράγοντες. Κάθε ένα από τα αυτοαντισώματα που στρέφονται κατά συγκεκριμένων αυτοαντιγόνων, αποτελεί δείκτη και ίσως και τον αιτιολογικό παράγοντα της ανάπτυξης του εκάστοτε αυτοάνοσου νοσήματος. Τα αυτοαντισώματα είναι συνήθως τάξης IgG με υψηλή συγγένεια προς το εκάστοτε αυτοαντιγόνο. Ωστόσο δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμη οι πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν στην παραγωγή τους. Δύο θεωρίες έχουν προκύψει οι οποίες προσπαθούν να ερμηνεύσουν την παθολογική ενεργοποίηση της παραγωγής των αυτοαντισωμάτων: ο αντιγονοεπαγόμενος μηχανισμός και ο μηχανισμός μοριακής μίμησης και τροποποίησης των αυτοαντιγόνων [Μουτσόπουλος και συν (1990), Venables (1993)].

Πολλοί επιστήμονες έχουν αποδείξει ότι τα αυτοαντιγόνα διαθέτουν πολλαπλούς επιτόπους [Tzioufas AG (1996), Weng YM (1993), Reichlin M (1991) Lerner (1979), Venables (1991)]. Αυτή η παρατήρηση συνεισφέρει υπέρ του αντιγονοεπαγόμενου μοντέλου παραγωγής αυτοαντισωμάτων. Τα δεδομένα που δείχνουν ότι η ανοσολογική απόκριση κατά των αυτοαντιγόνων είναι παρόμοια αυτής των εξωγενών αντιγόνων, προέρχεται επίσης από το γεγονός ότι τα αυτοαντισώματα αλλάζουν από τάξης IgM σε τάξη IgG, προς τον σχηματισμό δηλαδή αυτοαντισωμάτων υψηλότερης συγγένειας ως προς το αυτοαντιγόνο.

Η μοριακή μίμηση αποτελεί μια θεωρία επαγωγής αυτοάνοσης παθογενετικής απόκρισης σε αυτοαντιγόνο με μακρόχρονη ιστορία. Η λεπτομερής αντιγονική



χαρτογράφηση των επιτόπων των αυτοαντιγόνων έχει βοηθήσει ιδιαίτερα στην εξακρίβωση αλληλουχιών που μιμούνται επιτόπους ξένου αντιγόνου. Ο κατάλογος των ομόλογων αλληλουχιών έχει πλέον γίνει τεράστιος και όλο και περισσότεροι είναι αυτοί που υποστηρίζουν ότι αυτές οι ομολογίες δεν είναι παρά ένα τυχαίο γεγονός. Είναι υποθέσεις που στηρίζονται σε προκαταρκτικά πειραματικά δεδομένα. Για παράδειγμα πώς μπορεί η ομολογία μεταξύ του αυτοαντιγόνου Ro/SSA και του ιού της φυμαλιδώδους στοματίτιδας (VSV) να επάγει σε ένα άτομο την παραγωγή αυτοαντισωμάτων κατά του αυτοαντιγόνου Ro/SSA που οδηγούν σε συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο ή σε σύνδρομο Sjogren μετά από μόλυνση με τον ιό αυτό; [Scofield (1990)].

Οι ρετροϊοί έχουν άμεσα συσχετιστεί με αυτοάνοσα νοσήματα [Venables (1992)]. Διασταυρούμενες αντιδράσεις των αυτοαντισωμάτων Sm, U1RNP, La έχουν αποδειχθεί με την πρωτεΐνη gag των ρετροϊών [Garry (1990), Brookes (1992), Talal (1990), Talal (1990b)]. Η πρωτεΐνη gag αλληλεπιδρά με τα μόρια RNA των κυττάρων ξενιστών, προκειμένου να πολλαπλασιαστεί ο ιός στο κύτταρο ξενιστή και την ίδια αλληλεπίδραση έχουν και τα αυτοαντιγόνα Ro, La, Sm με τα μόρια RNA. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ομολογία περιοχών των αυτοαντιγόνων και της πρωτεΐνης gag μπορεί πραγματικά να είναι ένας σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας για την παραγωγή αυτοαντισωμάτων κατά της συγκεκριμένης ομάδας αυτοαντιγόνων.



2. ΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΑΝΤΙ-La/SSB

2.1. ΠΟΥ ΣΥΝΑΝΤΩΝΤΑΙ

Τα αντισώματα κατά του αυτοαντιγόνου La/SSB εντοπίζονται συχνά σε ορούς ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα. Σε μεγαλύτερη δε συχνότητα απαντώνται σε ασθενείς με σύνδρομο Sjögren (σS) και συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ) [Tan EM 1989, Reichlin M 1991]. Συγκεκριμένα με την χρησιμοποίηση της τεχνικής της απλής ανοσοδιάχυσης βρέθηκε ότι αντισώματα αντι-La/SSB βρίσκονται στο 40% των ασθενών με πρωτοπαθές σS και στο 15% των ασθενών με ΣΕΛ. Εκτός αυτών των νοσημάτων, αντισώματα αντι-La/SSB εντοπίζονται σε χαμηλό ποσοστό σε ορούς ασθενών με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα [Tan et al 1989, Chan et al 1989, Alspaugh et al 1978, Maddison et al 1985, Yamagata et al 1986]. Αντισώματα αντι-La/SSB χαμηλής συγγενείας με το αντιγόνο έχουν ανιχνευθεί σε χαμηλούς τίτλους σε ορούς φυσιολογικών-υγιών ατόμων [Maddison et al 1985, Harley et al 1984, Mamula et al 1989, Gaither et al 1987]. Έχει επίσης παρατηρηθεί in vitro παραγωγή αντισωμάτων αντι-La/SSB από Β λεμφοκύτταρα φυσιολογικών ατόμων μετά από πολυκλωνική ενεργοποίηση των δευτέρων με τη χρήση φυτοαιμοσυγκολιτινών. Όλα τα φυσιολογικά άτομα-δότες των Β λεμφοκυττάρων που παράγααν αντι-La/SSB αντισώματα, εξέφραζαν τον απλότυπο του μεγίστου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας HLA DR3. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του HLA DR3 και της παραγωγής αντισωμάτων αντι-La/SSB χαμηλής συγγενείας από φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα. Τα αντισώματα αυτά



μπορούν να ανιχνευθούν μόνο με την ευαίσθητη τεχνική της ELISA [Venables et al 1988].

Τα αντισώματα αντι-La/SSB συνυπάρχουν σε ορούς ασθενών πάντα με αντισώματα κατά του αυτοαντιγόνου Ro/SSA, με το οποίο η πρωτεΐνη La/SSB σχηματίζει σύμπλοκο, χωρίς να ισχύει το αντίθετο, δηλαδή αντι-Ro/SSA θετικοί οροί ασθενών δεν συνοδεύονται πάντα με αντισώματα αντι-La/SSB [Anderson JR 1961, Mattioli et al 1974, Alspaugh et al 1975, Alspaugh et al 1976]. Η συσχέτιση και η συχνή συνύπαρξη των αντισωμάτων αντι-Ro/SSA και αντι-La/SSB κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στην μοριακή σύζευξη των αντιγόνων Ro/SSA και La/SSB και των hYRNA σε σύμπλοκα. Η ακριβής όμως αιτιολόγηση της εξάπλωσης των αντισωμάτων από το ένα αντιγόνο στο άλλο δεν έχει ακόμη διασαφηνιστεί (βλέπε ενδο- και διαμοριακή εξάπλωση αντισωμάτων)

Μελέτες ασθενών με πρωτοπαθές και δευτεροπαθές σS, στους οποίους ελέγχθηκε ο ορός και ο σπείλος τους ως προς την παρουσία αντισωμάτων αντι-Ro/SSA και αντι-La/SSB ειδικότητας, αποδείξαν ότι ασθενείς με αντισώματα αντι-La/SSB στον ορό περιέχουν αντισώματα αντι-La/SSB και στο σπείλό τους [Ben-Chetrit et al 1991]. Υπήρχε ωστόσο διαφορά στην τάξη της ανοσοσφαιρίνης που εμπεριείχαν τα δύο αυτά βιολογικά υγρά: ο ορός περιείχε ανοσοσφαιρίνες της τάξης IgG και IgM, ενώ ο σπείλος περιείχε τις τάξεις των ανοσοσφαιρινών IgG και IgA [Horsfall et al 1989]. Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιήθηκε ο σπείλος ασθενών για την παρουσία αυτοαντισωμάτων είναι διότι οι σπειλογόνοι αδένες είναι το κυριότερο όργανο-στόχος του ανοσοποιητικού συστήματος στους ασθενείς με σS.

Τα αντισώματα αντι-La/SSB εντοπίζονται επίσης σε ασθενείς με υποξύ δερματικό λύκο και στην πλειοψηφία των βρεφών με νεογνικό λύκο [Keech et al 1996, Owe-Young et al 1992, Harley JB 1989, Bayon JP 1992, Dorner et al 1995].

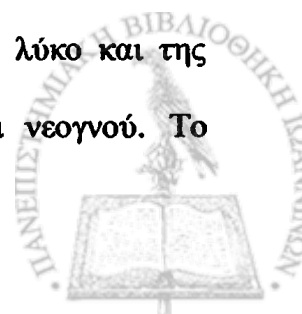


2.2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΝΟΣΟΥ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙ-La/SSB.

Αντισώματα κατά του αντιγόνου La/SSB εντοπίζονται σε ποσοστό 40% σε ασθενείς με σS. Η ύπαρξη των αντισωμάτων αντι-La/SSB σχεδόν πάντοτε συνοδεύεται από την παρουσία αντισωμάτων αντι-Ro/SSA κυρίως του αντιγόνου Ro52KD [Manoussakis et al 1986, Ben-Chetrit et al 1990]. Οι Venables και συν (1989) υποστηρίζουν σε μελέτη τους ότι η συσχέτιση συνύπαρξης αντισωμάτων αντι-La/SSB και σS είναι τόσο στενή, ώστε θα μπορούσε η ανίχνευση και μόνο των αντισωμάτων αντι-La/SSB σε ορό ασθενών να αποτελέσει κριτήριο διάγνωσης του συνδρόμου Sjögren. Τα αυτοαντισώματα αυτά ανιχνεύονται συχνότερα σε ασθενείς που συνδυάζουν συμπτώματα αγγειίτιδας, καθώς και σε ασθενείς με έντονη λεμφοκυτταρική διήθηση των μικρών σιελογόνων αδένων. Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Tarpley το 60% των ασθενών με βαθμό λεμφοκυτταρικής διήθησης 3+ έχει αντισώματα αντι-La/SSB, ενώ το 20% των αντι-La/SSB θετικών ασθενών έχουν βαθμό 1+ [Manoussakis MN 1986, Molina et al 1985].

Ποσοστό 10-20% των ασθενών που πάσχουν από ΣΕΛ έχει αντισώματα αντι-La/SSB ειδικότητας. Αυτοί οι ασθενείς συνήθως παρουσιάζουν κλινικά χαρακτηριστικά δευτεροπαθούς συνδρόμου Sjögren. Το 50% των ασθενών με ΣΕΛ και δευτεροπαθές σS έχει αντι-La/SSB αντισώματα [Andonopoulos et al 1990, Moutsopoulos et al 1980].

Υψηλή συσχέτιση φαίνεται να υπάρχει μεταξύ της εμφάνισης συγγενούς εμφράγματος του μυοκαρδίου σε βρέφη που πάσχουν από νεογνικό λύκο και της παρουσίας των αντισωμάτων αντι-La/SSB στον ορό μητέρας και νεογνού. Το



σύνδρομο του νεογνικού λύκου θεωρείται ότι οφείλεται στα μητρικά αντισώματα αντι-Ro/SSA και αντι-La/SSB, τα οποία διαπερνούν τον πλακούντα, εισέρχονται στο κυκλοφορικό σύστημα του εμβρύου και προκαλούν σειρά ιστικών βλαβών παροδικών, όπως η φωτοευαισθησία, η δερματίτιδα, η αυτοάνοση ηπατίτιδα, η θρομβοπενία, και μόνιμων όπως ο συγγενής κολποκοιλιακός αποκλεισμός [Scott et al 1983]. Τα αντισώματα αντι-Ro/SSA, ιδίως τα αντι-Ro52KD, [Buyon et al 1989] θεωρούνται ως τα πλέον υπεύθυνα για την παθογένεση των βλαβών του μυοκαρδίου που παρουσιάζει το νόσημα [Miyagata et al 1981, Franco et al 1981, Kephart et al 1981]. Ωστόσο έχει βρεθεί ότι το 100% των βρεφών που έπασχαν από νεογνικό λύκο και τελικά πέθαναν από συγγενές έμφραγμα του μυοκαρδίου είχαν στον ορό τους αντισώματα αντι-La/SSB, ενώ αντίθετα το 78% των βρεφών με νεογνικό λύκο που επέζησαν δεν είχαν αντι-La/SSB αντισώματα [Waltcick J, JP Buyon 1994]. Επιπλέον πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα αντι-La/SSB αντισώματα αντιδρούν διασταυρωτά με την πρωτεΐνη λαμινίνη του μυοκαρδίου και αποδίδουν παθογενετικό ρόλο στα αυτοαντισώματα αντι-La/SSB [Li et al 1995].

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει προσπάθειες, από ερευνητές προκειμένου να βρεθούν πιθανές συσχετίσεις των επιπέδων των αντισωμάτων αντι-Ro/SSA και αντι-La/SSB με την κλινική εξέλιξη του σS και του ΣΕΛ. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ορού διαδοχικών αιμοληψιών για κάθε ασθενή. Οι περισσότεροι ασθενείς δεν παρουσίασαν διακύμανση των επιπέδων του τίτλου των αυτοαντισωμάτων τους κατά την πάροδο του χρόνου, ωστόσο υπήρχαν ασθενείς, στους οποίους η αυξομείωση του τίτλου των αυτοαντισωμάτων του ορού τους έμοιαζε να ακολουθεί αυτή της έντασης του νοσήματος (έξαρση της νόσου → άνοδος του τίτλου των αντισωμάτων, ύφεση της νόσου → μείωση του τίτλου των αντισωμάτων). Επίσης παρατηρήθηκε διακύμανση των επιπέδων των αντισωμάτων



αντι-La/SSB που στρέφονται εναντίον διαφορετικών τμημάτων του αυτοαντιγόνου La/SSB κατά την διάρκεια της νόσου, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχουν διαφορετικοί υποπληθυσμοί αντισωμάτων αντι-La/SSB που στρέφονται σε διαφορετικές περιοχές του αυτοαντιγόνου La/SSB [St Clair et al 1990, Wahren et al 1998].

Μελέτες στις οποίες ελέγχθηκε η πιθανότητα συσχέτισης μεταξύ αναγνώρισης διαφορετικών επιτόπων του αυτοαντιγόνου La/SSB από αντισώματα αντι-La/SSB που προέρχονται από ασθενείς που πάσχουν από διαφορετικά αυτοάνοσα νοσήματα (σS και ΣΕΛ), δεν εντόπισαν επιτόπους απόλυτα σχετιζόμενους με συγκεκριμένα νοσήματα. Ωστόσο βρέθηκε διαφορετικό πρότυπο αναγνώρισης ολόκληρων περιοχών του αντιγόνου La/SSB από αντισώματα αντι-La/SSB προερχόμενα από ορούς ασθενών με διαφορετικά νοσήματα. Αντι-La/SSB θετικοί οροί ασθενών με ΣΕΛ αναγνώριζαν κυρίως την αμινοτελική και κεντρική περιοχή του αντιγόνου La/SSB, ενώ αντισώματα αντι-La/SSB ασθενών με σS αναγνώριζαν κυρίως την καρβοξυτελική περιοχή [Tzioufas et al 1997].

Το γεγονός ότι η εμφάνιση των αντισωμάτων αντι-La/SSB συμβαδίζει συνήθως με συγκεκριμένα κλινικά και ορολογικά χαρακτηριστικά, προσδίδει έντονο παθογενετικό ρόλο στα αντισώματα αντι-La/SSB και υποδεικνύει την ύπαρξη αντιγονοεπαγόμενου μηχανισμού αυτοανοσίας (antigen driven mechanism). Τα δεδομένα αυτά δίνουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην μελέτη του μορίου La/SSB, των B και T λεμφοκυτταρικών επιτόπων του και του μηχανισμού επαγωγής των αντι-La/SSB αυτοαντισωμάτων.



2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙ-La/SSB.

Τα αντισώματα αντι-La/SSB του ορού μπορούν να ανιχνευθούν με διάφορες τεχνικές, όπως είναι ο ανοσοφθορισμός, η ανοσοενζυμική τεχνική ELISA, η ανοσοκαθήλωση, η ανοσοαποτύπωση, η ανοσοδιάχυση, η αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση και η ανοσοκαθίζηση. Λεπτομέρειες για την κάθε τεχνική γενικά και ειδικότερα για την χρησιμοποίηση της κάθε τεχνικής για την ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-La/SSB, αναπτύσσονται στο υποκεφάλαιο 4.3

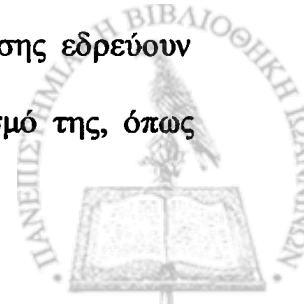


3. ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟ La/SSB**3.1. ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ**

Τα τελευταία χρόνια η χρήση νέων πειραματικών τεχνικών, όπως των μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικών για το αντιγόνο La/SSB [Bachmann et al 1995], της χρωματογραφίας συγγένειας για την απομόνωση μονοειδικών αντισωμάτων αντι-La/SSB από τους ορούς ασθενών, όπου τα αντισώματα αντι-La/SSB πάντοτε συνυπάρχουν με αντισώματα αντι-Ro/SSA, έδωσε την δυνατότητα να παρακαμφθούν πολλές από τις δυσκολίες που εμπόδιζαν την εξακρίβωση της ενδοκυτταρικής τοπολογίας του αντιγόνου La/SSB και των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών του συμπλόκων.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα περισσότερα αντίγραφα της πρωτεΐνης La/SSB (υπολογίζονται σε 10×10^6 - 20×10^6 μόρια ανά κύτταρο [Pruijin GJM et al 1997]) εντοπίζονται στον πυρήνα, όπου και διεξάγεται μία εκ των βασικών λειτουργιών της, δηλαδή του παράγοντα τερματισμού της μεταγραφικής διαδικασίας της RNA πολυμεράσης III.

Με την βοήθεια του ανοσοφθορισμού [Deng JS et al 1981] και της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας [Carmo-Fonseca LA et al 1989] διαπιστώθηκε ότι η ενδοπυρηνική παρουσία της πρωτεΐνης La/SSB δεν περιορίζεται μόνο στο πυρηνόπλασμα, αλλά και γύρω από τα κοκκία της χρωματίνης. Το γεγονός ότι η πρωτεΐνη La/SSB συνδέεται με κυτταροπλασματικά Y RNAs, καθώς και με μικρά μόρια rRNA που αποτελούν δομικά μόρια των ριβοσωμάτων που επίσης εδρεύουν στο κυτταρόπλασμα, δικαιολογεί και τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό της, όπως



έχει αποδειχθεί από άλλους ερευνητές [Peek R et al 1996, Boire G et al 1990, Habets WJ et al 1983, Peek R et al 1993, Simons FHM et al 1994]. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι, όταν η πρωτεΐνη La/SSB είναι συνδεδεμένη με τα Y RNAs, βρίσκεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα λόγω του έντονου κυτταροπλασματικού προσανατολισμού των Y RNAs. Τα “ελεύθερα” μόρια (μη συνδεδεμένα με τα Y RNAs) της πρωτεΐνης La/SSB εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα [Peek R et al (b) 1993, Simons FHM et al 1994, O' Brien CA et al 1993]. Η ποικιλότητα ενδοκυτταρική τοπολογία της πρωτεΐνης La/SSB συσχετίζεται άμεσα με τους ποικίλους ρόλους της στο κύτταρο (βλέπε παρακάτω).

Πολλοί ερευνητές έχουν εντοπίσει κύτταρα, τα οποία με την έκθεση σε συνθήκες καταπόνησης (στρες), όπως μολύνσεις από ιούς [Baboonian C et al 1989, Rother 1991, Smith 1985 Peek R et al 1994, Bachmann M et al 1989, Meerovitch et al 1993], έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία [Bachmann 1990, Furukawa 1990, Golan 1992, Jones SK et al 1992a, Jones SK et al 1992b], κύτταρα που αποπίπτουν [Casiola Rosen LA 1994, Rosen AL 1995], καρκινικά κύτταρα [Bachmann m et al 1986] και κύτταρα (κερατινοκύτταρα, κύτταρα από σιελογόνο αδένες) ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα (σS) [Yannopoulos DI et al 1992, Wilde PCM et al 1996], παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση και ανακατανομή της πρωτεΐνης La/SSB, η οποία μετακινείται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Οι παρατηρήσεις αυτές δίνουν ιδιαίτερη σημασία στο μηχανισμό παραγωγής των πιθανά παθογενετικών αντισωμάτων αντι-La/SSB που συσχετίζονται με τα αυτοάνοσα νοσήματα.



3.2. ΜΟΡΙΑΚΑ, ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

3.2.1 ΓΟΝΙΔΙΟ La/SSB

Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της ανθρώπινης πρωτεΐνης La/SSB, βρίσκεται στο χρωμόσωμα No 2 [Chambers D et al 1988]. Έχει μήκος 9.5 Kbp αρχίζοντας από την περιοχή έναρξης της μεταγραφής έως την θέση πολυαδενυλίωσης και αποτελείται από 11 εξόνια και 10 ιντρόνια. Ο προαγωγέας του γονιδίου La/SSB περιλαμβάνει μια περιοχή πλούσια στις βάσεις G/C και δεν περιέχει το κουτί TATA των συνηθισμένων προαγωγέων. Τα χαρακτηριστικά αυτά του προαγωγέα τοποθετούν το γονίδιο La/SSB στην κατηγορία των γονιδίων-ρυθμιστών "housekeeping genes".

Το συμπληρωματικό γονιδίωμα της ανθρώπινης πρωτεΐνης La/SSB (cDNA), το οποίο έχει χαρτογραφηθεί και εκφραστεί σε διάφορα συστήματα έκφρασης [Chambers et al 1988, Chan et al 1989a, Pruijin et al 1991, Tröster et al 1994], είναι υπεύθυνο για την έκφραση ενός πολυπεπτιδίου 408 αμινοξέων με μοριακό βάρος 46.7KD. Εκτός της φυσιολογικής μορφής του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) που εκφράζεται από το γονιδίωμα La/SSB, έχει περιγραφεί και η ύπαρξη δύο εναλλακτικών ισομορφών mRNA της πρωτεΐνης La/SSB, η έκφραση των οποίων οφείλεται σε αντικατάσταση του εξονίου 1 του 5' άκρου του γονιδίου La/SSB από τα εξόνια που ονομάστηκαν ως 1' και 1'' λόγω αλλαγής του αναγνωστικού πλαισίου. Η μία εκ των δύο εναλλακτικών ισομορφών mRNA βρέθηκε ότι μπορεί να μεταφραστεί, δίνοντας πρωτεΐνη ανάλογη της La/SSB με αλλαγμένο το αμινο-τελικό άκρο. Οι ισομορφές αυτές εντοπίστηκαν σε ιστούς ασθενών με σS και



πιθανολογούνται ως προϊόντα μόλυνσης ιού που ενσωματώθηκε στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου La/SSB [Tröster et al 1994].

Εκτός του ανθρωπίνου γονιδίου La/SSB, έχουν χαρτογραφηθεί, απομονωθεί και χαρακτηριστεί κλώνοι La/SSB που προέρχονται από ιστούς βοδιού, ποντικού, αρουραίου, του αμφιβίου *Xenopus leavis*, του εντόμου *Drosophila melanogaster*, του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, καθώς και το καρβόξυ-τελικό τμήμα του μορίου La/SSB του κουνελιού [Chan et al 1986b, Topfer et al 1993, Semsei et al 1993, Yoo and Wolin 1994, Bai et al 1994, Lin M and Clarkson 1995, Wolin SL, O'Brien et al 1993, Pruijin GJM 1994].



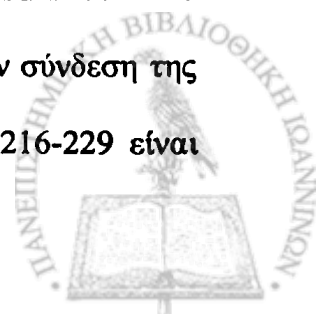
3.2.2 ΔΟΜΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ La/SSB.

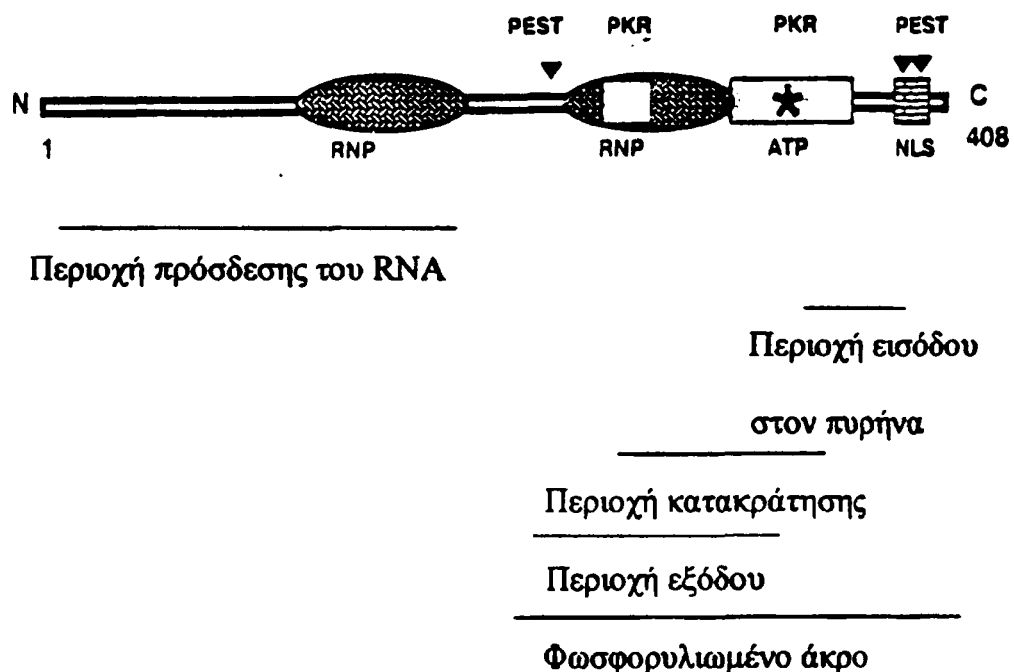
Το μόριο της πρωτεΐνης La/SSB εμπεριέχει μεγάλη αναλογία αμινοξέων σερίνης και θρεονίνης, τα οποία εντοπίζονται αποκλειστικά στο καρβοξυ-τελικό άκρο του και είναι τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνονται. Έχουν καταγραφεί τουλάχιστον 8 ισοηλεκτρικά σημεία για αυτή την πρωτεΐνη (pI 6 έως 8), τα οποία οφείλονται στο διαφορετικό βαθμό φωσφορυλίωσης και κατ'έκταση του συνολικού φορτίου, το οποίο αναγκάζει την πρωτεΐνη να μεταναστεύει σε διαφορετικές θέσεις κατά την ηλεκτροφόρησή της σε γέλη πολυακρυλαμιδίου [Pizer et al 1983, Francoeur et al 1985, Pfeifle et al 1987]. Στο αμινοτελικό άκρο της La/SSB εντοπίζονται αποκλειστικά οι 6 μεθειονίνες που διαθέτει το μόριο.

Το μόριο της πρωτεΐνης La/SSB πρωτεολύομενο διασπάται στην αμινοτελική περιοχή που διαθέτει τις μεθειονίνες και στην φωσφορυλιωμένη καρβοξυτελική περιοχή. Τα πολυπεπτίδια αυτά χαρακτηρίστηκαν ως X και Y και έχουν μοριακό βάρος 28KD και 23KD αντίστοιχα [Chan et al 1986].

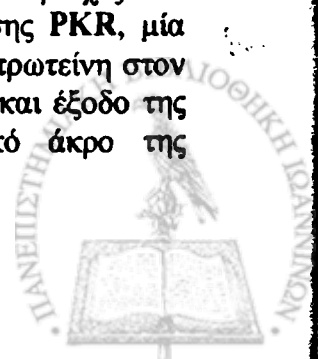
Η πρωτεΐνη La/SSB διαθέτει από το αμινο προς το καρβόξυλο άκρο τα ακόλουθα μορφολογικά χαρακτηριστικά: δύο αλληλουχίες σύνδεσης με μόρια RNA (περιοχές RNP). Οι αλληλουχίες αυτές εντοπίζονται σε όλες σχεδόν τις πρωτεΐνες που συνδέονται μόνιμα ή παροδικά με μόρια RNA [Chan et al 1989], καταλαμβάνουν τις περιοχές 112-187 [Chan et al 1989b] και 230-300 [Birney et al 1993], διαθέτουν τα πλέον υδρόφοβα αμινοξέα και είναι εξελικτικά σταθερές. Η περιοχή RNP 112-187 έχει βρεθεί ότι διαθέτει δομή α έλικας και φέρεται ως υπεύθυνη για την σύνδεση της πρωτεΐνης La/SSB με τα μόρια hY RNA [Pruijn 1991]. Η περιοχή 216-229 είναι



πλούσια στα αμινοξέα προλίνη (P), γλουταμινικό οξύ (E), σερίνη (S) και θρεονίνη (T) και γι'αυτό το λόγο αποκαλείται και ως περιοχή PEST και αποτελεί το κυριότερο πρωτεολυτικό υπόστρωμα των ενδοπεπτιδασών [Rogers et al 1986]. Η πρωτεόλυση της περιοχής PEST διασπά την πρωτεΐνη στα πολυπεπτίδια X και Y. Δύο ακόμη περιοχές PEST έχουν βρεθεί στην πρωτεΐνη La/SSB στην θέση 386-398. Η εξακρίβωση αυτών των περιοχών έδωσε εξήγηση στην εύκολη αποδιάταξη και διάσπαση της πρωτεΐνης La/SSB στα πολυπεπτίδια 23KD, 28KD και 43KD [Habets et al 1983, Chan et al 1986] που ξεχωρίζουν ως διακριτές ζώνες με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Σχ. 1).



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της πρωτεΐνης La/SSB και χαρτογράφηση των λειτουργικών περιοχών της. Στην ανθρώπινη πρωτεΐνη La/SSB (408 αμινοξέων) πολλά δομικά-λειτουργικά χαρακτηριστικά μπορούν να διακριθούν, όπως οι δύο περιοχές RNP εκ των οποίων η αμινοτελική αποτελεί θέση πρόσδεσης του RNA, τρεις περιοχές PEST με αλληλουχίες πλούσιες στα αμινοξέα P, E, S και T (οι περιοχές αυτές είναι εξαιρετικά επιρρεπείς στη πρωτεόλυση), δύο περιοχές που είναι ομόλογες με τμήματα του ενεργοποιητή της πρωτεϊνικής κινάσης PKR, μία περιοχή πρόσδεσης του ATP και η περιοχή NLS που κατακρατεί την πρωτεΐνη στον πυρήνα. Έχουν επίσης εντοπιστεί περιοχές υπεύθυνες για την είσοδο και έξοδο της πρωτεΐνης από τον πυρήνα στο φωσφορυλιωμένο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης.



Στη πρωτεΐνη La/SSB έχουν χαρακτηριστεί επίσης δύο περιοχές ομόλογες με τμήμα της πρωτεϊνικής κινάσης PKR που χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα την διπλή έλικα του RNA και το φωσφορυλιώνει. Αυτές καλύπτουν τις αλληλουχίες 248-261 και 340-363 [Clemens MJ 1993, Clemens et al 1994]. Στην περιοχή 333-339 της ανθρώπινης και βόειας La/SSB έχει αναγνωρισθεί θέση σύνδεσης με το ATP, χωρίς να έχει διασαφηνισθεί απόλυτα η λειτουργική της σημασία [Topfer et al 1993]. Η αλληλουχία GXXXXGK που αντιστοιχεί στο μοντέλο σύνδεσης με ATP έχει βρεθεί σε πρωτεΐνες με αποδεδειγμένη ικανότητα σύνδεσης με ATP [Walker et al 1982, Hodgman T 1988]. Επίσης η πρωτεΐνη La/SSB ποντικού και βοδιού παρουσιάζει δράση ATPάσης, η οποία αποδίδει ενέργεια που είναι απαραίτητη για την αποέλιξη των υβριδίων μορίων DNA/RNA που σχηματίζονται κατά την μεταγραφή του DNA σε RNA από την RNA πολυμεράση III. [Bachmann M et al 1990].

Η πρωτεΐνη La/SSB έχει την ιδιότητα να εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου ενεργοεξαρτώμενα (καταναλώνοντας ενέργεια), με την μεσολάβηση ειδικού μηνύματος NLS (nuclear localization signals) [Dingwall, Laskey 1991] που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο. Το τμήμα NLS της La/SSB καταλαμβάνει την περιοχή 383-400 και αποτελείται από δύο ομάδες βασικών αμινοξέων: $^{383}\text{KRAR}^{386}$ και $^{397}\text{KQQK}^{400}$ οι οποίες χαρακτηρίζονται από εξελικτική σταθερότητα και είναι υπεύθυνες για την είσοδο της πρωτεΐνης La/SSB στον πυρήνα. Η ύπαρξη ωστόσο του μορίου La/SSB και στο κυτταρόπλασμα, καθώς και το γεγονός ότι η μετακίνησή του προς αυτό είναι θερμοεξαρτώμενη δηλώνει την παρουσία ενός σήματος εξαγωγής από τον πυρήνα (NES: nuclear export signal) που πιθανολογείται ότι εντοπίζεται στο κεντρικό τμήμα του μορίου.

Η ισορροπία μεταξύ NLS, NES καθώς και των παραγόντων που κατακρατούν την πρωτεΐνη La/SSB στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα, δεν έχει πλήρως



Τα YRNAs είναι προϊόντα μεταγραφής της RNA πολυμεράσης III. Η πρωτεΐνη La/SSB, συνδέεται επίσης με όλα τα μεταγραφήματα της RNA πολυμεράσης III, τα οποία φέρουν, μόνιμα ή παροδικά, στο 3' άκρο τους την αλληλουχία ολιγοουριδίνης. Μέχρι τώρα έχει περιγραφεί σύνδεση της πρωτεΐνης La/SSB με πρόδρομα μόρια tRNA [Stefano JE 1984, Pruijin et al 1991] με το 5SrRNA [Rinke et al 1982], 7-2S RNA [Hasimoto et al 1982], 7SL RNA [Chambers et al 1983], 4.5S RNA [Hendrick et al 1981], καθώς και με μεταγραφήματα RNA της οικογένειας Alu [Shen et al 1982] και με U6snRNA [Rinke et al 1985].

Η πρωτεΐνη La/SSB συσχετίζεται επίσης με ιϊκά RNA, όπως τα VAI και II RNA του αδενοϊού και τα EBER 1 και 2 RNA του ιού Epstein Barr [Lerner et al 1981, Rosa et al 1981, Lerner et al 1981b]. Οι ιοί αυτοί χρησιμοποιούν την RNA πολυμεράση III του κυττάρου ξενιστή για την μεταγραφή του γονιδιώματός τους.

Έχει επίσης περιγραφεί σύνδεση της πρωτεΐνης La/SSB με RNA που μεταγράφονται από άλλες πολυμεράσες εκτός της III. Καθοδηγητικά μόρια (leader) RNA του ιού της φουσαλιδώδους στοματίτιδας (Vesicular Stomatitis Virus VSV) και του ραβδοϊού, τα οποία μεταγράφονται από την ιϊκή RNA πολυμεράση, RNA πολιοϊών και mRNAs του ανθρωπίνου ιού επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (HIV), συνδέονται με την πρωτεΐνη La/SSB [Kurilla et al 1983, Wilusz et al 1983, Meerovitch et al 1993, Pruijin GSM 1990, Slobbe RL 1991, Chang et al 1994]. Επίσης η La/SSB συνδέεται με το μόριο U1 RNA [Mabore et al 1984], που αποτελεί μεταγράφημα της RNA πολυμεράσης II [Jensen et al 1979].

Παρά το γεγονός ότι η πρωτεΐνη La/SSB συμμετέχει στην δόμηση των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων, όπως του RoRNP σε φυσιολογικά κύτταρα και του EBER RNP συμπλόκου σε κύτταρα μολυσμένα από τον ιό EBV [Clemens MJ



1993], δεν έχει αποδειχθεί ακόμη εάν η πρωτεΐνη La/SSB μπορεί να συνδεθεί άμεσα με κυτταρικές ή ιϊκές πρωτεΐνες, όπως ισχύει με τα μόρια RNA.

3.2.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ La/SSB.

Ο πρωταρχικός ρόλος που αποδόθηκε στην πρωτεΐνη La/SSB, ήταν η χρησιμοποίησή της από το κύτταρο για τον σωστό, ακριβή τερματισμό της μεταγραφικής διαδικασίας που επιτελείται από την RNA πολυμεράση III [Gottlieb E, Steitz 1989a, Gottlieb E, Steitz 1989b]. Εν συνεχεία εξακριβώθηκε ότι η λειτουργία αυτή πραγματοποιείται με την απελευθέρωση και επανεκκίνηση της RNA πολυμεράσης III από την πρωτεΐνη La/SSB [Maraia RJ 1996, Maraia et al 1994].

Η πρωτεΐνη La/SSB εμπλέκεται επίσης στην κατακράτηση εντός του πυρήνα των μεταγραφικών προϊόντων της RNA πολυμεράσης III, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν την κατάλληλη χρονική στιγμή από το κύτταρο. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται από τα δεδομένα πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε ωοκύτταρα *Xenopus* από τους Boelens και συν [1995], στα οποία διαπίστωσαν ότι η απομάκρυνση του 3' ουριδυλιωμένου άκρου του U6 RNA, το οποίο είναι απαραίτητο για την προσέγγισή του με την πρωτεΐνη La/SSB, συνετέλεσε στην έξοδο από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα του 50% των μορίων U6 RNA τα οποία φυσιολογικά εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι μόρια Y RNA, τα οποία δεν διαθέτουν την ολιγοU περιοχή σύνδεσης με την πρωτεΐνη La/SSB, μπορούν να μεταφερθούν πιο γρήγορα στο κυτταρόπλασμα σε σύγκριση με τα ολοκληρωμένα μόρια Y RNA [Simons et al 1996, Boelens et al 1995, Simons et al 1996b]. Οι Grimm και συν. [1997] απέδειξαν ότι η πρωτεΐνη La/SSB χρειάζεται για την μετακίνηση τεχνητών μορίων RNA προς τον πυρήνα και την εκεί παραμονή τους.



Έχει επίσης προταθεί ότι η πρωτεΐνη La/SSB συμβάλλει στην μετάφραση μορίων mRNA. Τον πιθανό αυτό ρόλο της πρωτεΐνης La/SSB υποστηρίζουν εργασίες, κατά τις οποίες παρατηρήθηκε α) ενίσχυση της μετάφρασης mRNA πολιοϊού με την συμβολή της πρωτεΐνης La/SSB [Meerovitch et al 1993, Svitkin et al 1994], β) σύνδεση της La/SSB με την υπομονάδα 40S των ριβοσωμάτων, που είναι τα οργανίδια της πρωτεϊνοσύνθεσης [Peek et al 1996], και γ) *in vitro* σύνδεση με μικρά μόρια RNA έτσι ώστε να “παρουσιάζεται” το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασής τους (AUG) κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να ευοδώνεται η μετάφρασή τους [Mc Bratney S, Sarnow P 1996].

Οι Yoo CJ και Wolin S απέδειξαν, πραγματοποιώντας τα πρώτα *in vivo* πειράματα σε μεταλλαγμένα κύτταρα *S. cerevisiae*, τα οποία δεν φέρουν την πρωτεΐνη Lhp1p, (είναι η ομόλογη με την ανθρώπινη πρωτεΐνη La/SSB των σακχαρομυκητών), ότι αυτά είναι βιώσιμα. Εάν αυτά τα κύτταρα φέρουν επιπλέον μία μετάλλαξη στο αντικωδικόνιο του μεταφορικού RNA της σερίνης (tRNA^{ser}), χρειάζονται την Lhp1p, προκειμένου να σταθεροποιηθούν τα πρόδρομα και επομένως ανώριμα μόρια tRNA^{ser} και να αποκτήσουν την διαμόρφωση που επιτρέπει την σωστή ωρίμανση των tRNA, δηλαδή την απαλοιφή του 3' άκρου τους από τις ενδονουκλεάσες [Yoo CJ, SL Wolin 1997].

Στη πρωτεΐνη La/SSB έχει αποδοθεί επίσης η ικανότητα να αποελίσσει υβρίδια DNA/RNA, λειτουργία η οποία είναι γνωστό ότι πραγματοποιείται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς από τον παράγοντα τερματισμού της μεταγραφής rho [Lowery-Goldhammer et al 1974]. Η ικανότητα αυτή θα μπορούσε να εξηγήσει τον μηχανισμό, με τον οποίο η πρωτεΐνη La/SSB ελευθερώνει τα προϊόντα RNA της RNA πολυμεράσης από την μήτρα του DNA και συντελεί κατ' αυτό τον τρόπο στον τερματισμό της μεταγραφής [Bachmann M 1990, Gottlieb K 1989a, Gottlieb K



1989b]. Αργότερα προτάθηκε και επιβεβαιώθηκε η δράση της πρωτεΐνης La/SSB ως παράγοντα αποέλιξης της διπλής έλικας RNA [Xiao et al 1994, Huhn et al 1997]. Στηριζόμενη η πρωτεΐνη La/SSB στην ικανότητά της να αποελίσει την διπλή έλικα RNA πιθανόν να πραγματοποιεί τη λειτουργία της ως ενεργοποιητής της έναρξης της μετάφρασης [Meerovitch 1993, Van Venrooij 1995].

3.3. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ La/SSB.

3.3.1 Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΕΠΙΤΟΠΟΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ La/SSB.

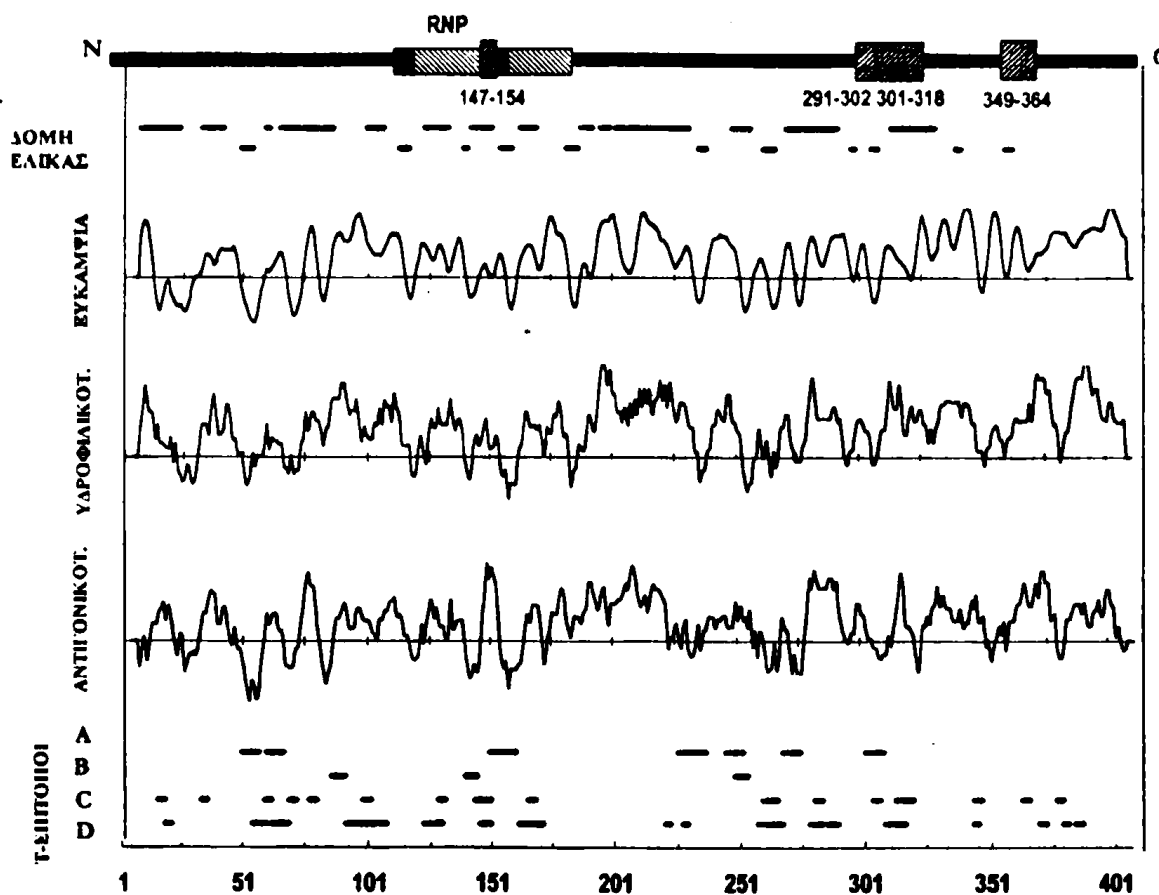
Σε κάθε αντιγονικό μόριο μπορούμε να διακρίνουμε τουλάχιστον δύο ειδών επιτόπους: τους επιτόπους διαμόρφωσης, στον σχηματισμό των οποίων συμβάλλουν μη διαδοχικά τμήματα της πρωτεΐνης καθώς πλησιάζουν μεταξύ τους στο χώρο, και τους γραμμικούς επιτόπους που αποτελούνται από συνεχείς αλληλουχίες αμινοξέων επί του μορίου της πρωτεΐνης.

Οι γραμμικοί επίτοποι είναι σχετικά εύκολο να ανιχνευθούν, διότι εξακολουθούν να υπάρχουν και να διατηρούν την αντιγονικότητά τους, ακόμη και όταν η πρωτεΐνη έχει μετουσιωθεί και έχει καταστραφεί η στερεοδιαμόρφωσή της και κατ'επέκταση έχουν χαθεί οι επίτοποι διαμόρφωσης.

Για να χαρακτηριστεί ένα πεπτίδιο ως επίτοπος, θα πρέπει να υπάρχουν αντισώματα που στρέφονται κατά της πρωτεΐνης και ταυτόχρονα αντιδρούν και με το πεπτίδιο αυτό ή μετά από εμβολιασμό αυτών των πεπτιδίων σε πειραματόζωα θα πρέπει να επάγουν την παραγωγή αντισωμάτων που αναγνωρίζουν και τα πεπτίδια



που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό και την ολική πρωτεΐνη από την οποία προήλθαν αυτά τα πεπτίδια. Αρκετοί αλγόριθμοι έχουν αναπτυχθεί προκειμένου να προβλεφθούν οι γραμμικοί επίτοποι των πρωτεϊνών. Οι αλγόριθμοι αυτοί στηρίζονται σε χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης, όπως η υδροφιλικότητα –υδροφοβικότητα και η αντιγονικότητα βάσει της αλληλουχίας γνωστών επιτόπων. Αυτού του τύπου οι αλγόριθμοι έχουν χρησιμοποιηθεί από την Γιαννάκη και συν 1998 για την πρόβλεψη των Β και Τ λεμφοκυτταρικών επιτόπων της La/SSB πρωτεΐνης. Το προφίλ της La/SSB πρωτεΐνης φαίνεται στο σχήμα 3.



Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση διαφόρων χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης La/SSB. Στην πρώτη σειρά αναγράφονται οι τέσσερις κύριοι Β λεμφοκυτταρικοί επιτόποι όπως εντοπίστηκαν από την Γιαννάκη και συν. Ακολουθεί χαρτογράφηση των περιοχών που έχουν δευτεροταγή δομή έλικας. Ακολουθούν τρία προφίλ ευκαμψίας, υδροφιλικότητας και αντιγονικότητας της πρωτεΐνης La/SSB όπως αυτά ανιχνεύονται από διάφορα υπολογιστικά προγράμματα. Και τέλος φαίνονται οι πιθανές περιοχές που μπορούν να συμπεριφερθούν ως Τ λεμφοκυτταρικοί επίτοποι βάσει δεδομένων τεσσάρων διαφορετικών προγραμμάτων.

Διάφορες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιγονική χαρτογράφηση του αντιγόνου La/SSB. Ενδεικτικά αναφέρεται η πρωτεόλυση της πρωτεΐνης και ο έλεγχος της αντιγονικότητας των πολυπεπτιδίων που προκύπτουν, η έκφραση τμημάτων του γονιδιώματος της πρωτεΐνης La/SSB σε κατάλληλα πλασμίδια, τα οποία εκφράζονται σε διάφορα βακτήρια, τα ανασυνδυασμένα προϊόντα καθαρίζονται και ακολουθεί ο έλεγχος της αντιγονικότητάς τους, και τέλος η σύνθεση ολοκλήρου του μήκους της πρωτεΐνης La/SSB σε μικρά αλληλοεπικαλυπτόμενα πεπτιδία και ο ταυτόχρονος έλεγχος αυτών των πεπτιδίων. Οι τεχνικές αυτές θα αναπτυχθούν λεπτομερέστερα στο κεφ.4 των μεθόδων.

Από τις πρώτες προσπάθειες αντιγονικής χαρτογράφησης των Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων του αυτοαντιγόνου La/SSB ήταν αυτή των Whittingham και συν. και Chan και συν [Whittingham et al 1989, Chan et al 1986]. Μελετήθηκαν τα δύο τμήματα της La/SSB: το 28 KD αμινοτελικό τμήμα και 23 KD καρβοξυτελικό και φωσφορυλιωμένο τμήμα (X και Y αντίστοιχα) που προκύπτουν μετά την πρωτεόλυση της κεντρικής περιοχής PEST της πρωτεΐνης La/SSB από την πρωτεάση V8 και την τρυψίνη του *S. aureus*. Αν και τα δύο τμήματα περιείχαν Β λεμφοκυτταρικούς επιτόπους, ωστόσο υπήρχαν οροί που δεν αναγνώριζαν κανένα από τα δύο αυτά τμήματα ή αναγνώριζαν ένα από τα δύο.

Με δεδομένη την δυσκολία που παρουσιάζει η αντιγονική χαρτογράφηση πρωτεϊνών που έχουν απομονωθεί από κυτταρικό εκχύλισμα, η οποία οφείλεται στο ότι είναι άγνωστη η μορφή των πεπτιδίων που προκύπτουν από την πρωτεόλυση, η έρευνα στράφηκε σε μικρότερα ανασυνδυασμένα τμήματα της πρωτεΐνης La/SSB, για τα οποία ήταν γνωστό τόσο το μήκος, όσο και η αλληλουχία των αμινοξέων τους. Οι Chambers και Keene [Chambers JC, JD Keene 1985] ήταν οι πρώτοι που κλωνοποίησαν το συμπληρωματικό DNA (cDNA) της πρωτεΐνης La/SSB, το



απομόνωσαν, το ανέλυσαν και διαπίστωσαν ότι αναγνωρίζεται από ανθρώπινα αντι-La/SSB αντισώματα. Θεώρησαν ότι το κλωνοποιημένο πεπτιδίο αποτελεί το καρβοξυτελικό άκρο της La/SSB και εντόπισαν τμήμα 55 αμινοξέων ως πιθανό αντιγονικό επίτοπο. Με τη χρησιμοποίηση της βάσης δεδομένων Horp and Woods εντόπισαν ως πιο αντιγονικό ένα δεκαπεπτιδίο εντός του ανασυνδυασμένου μορίου με αλληλουχία: Glu-Asp-Lys-Thr-Lys-Ile-Arg-Arg-Ser-Pro, το οποίο παρουσίαζε έντονη υδροφοβικότητα. Αργότερα διαπιστώθηκε ότι το κλωνοποιημένο πολυπεπτιδίο δεν ανήκε στην καρβοξυτελική περιοχή και το δεκαπεπτιδίο καταλαμβάνει την θέση 84-93 της πρωτεΐνης La/SSB [Sturgess 1988, Nyman 1988].

Με την χρησιμοποίηση κλώνου cDNA του γονιδίου La/SSB που απομονώθηκε από την λgt11-La ιική βιβλιοθήκη και εκφράστηκε από το βακτήριο *E. coli* Y1089, οι Chambers και συν εντόπισαν τρεις διακριτές αντιγονικές περιοχές εντός του μορίου La/SSB [Chambers et al 1988]. Την αμινοτελική LaA περιοχή που καταλαμβάνει το 1/3 του συνολικού μορίου 107 αμινοξέων (1-107 αμινοξέα), το κεντρικό τμήμα LaC, 132 αμινοξέων (111-242 αμινοξέα), το οποίο έχει δομή α-έλικας, περιέχει το μοτίβο RNP για την σύνδεση των μορίων RNA και θεωρήθηκε ότι περιέχει τον ισχυρότερο επίτοπο, και το καρβοξυτελικό τμήμα LaD με 167 αμινοξέα μήκος (242-408 αμινοξέα). Επιπλέον εκφράστηκε το τμήμα LaB2/3, το οποίο είναι το άθροισμα των τμημάτων LaC και D, μήκους 298 αμινοξέων (111-408 αμινοξέα). Στην μελέτη τους αυτή ωστόσο δεν χρησιμοποίησαν μεγάλο αριθμό ορών, για να πιστοποιήσουν τη δραστηριότητα των πεπτιδίων, ενώ χρησιμοποίησαν μεγάλου μήκους πολυπεπτιδία, τα οποία δεν επέτρεψαν την διάκριση των επιτόπων σε διαμόρφωσης ή γραμμικούς.

Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν οι W St Clair και συν [1988]. Χρησιμοποιώντας ενδονουκλεάσες περιορισμού έκοψαν το La cDNA (συνολικού



μήκους 355 αμινοξέων και 40KD μοριακού βάρους) σε μικρότερα τμήματα και τα κλωνοποίησαν εντός βακτηρίων E coli. Το προϊόν του πλασμιδίου συνεκφράσθηκε μαζί με το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση. Κατόρθωσαν να υποκλωνοποιήσουν τρία τμήματα του γονιδίου La/SSB: το LaI (νουκλεοτίδια 1-251), LaII (νουκλεοτίδια 252-755) και LaIII (νουκλεοτίδια 756 έως 3' άκρο). Από τα προϊόντα έκφρασης των τριών αυτών υποκλώνων μόνο το πολυπεπτίδιο LaIII 103 αμινοξέων που αντιστοιχεί στην καρβοξυτελική περιοχή, παρουσίασε αντιγονική δραστικότητα. Το αμινοτελικό άκρο ήταν μικρότερο κατά 55 αμινοξέα από το αντίστοιχο των St Clair και συν και για αυτό το λόγο δεν παρουσίασε την αντιγονικότητα που παρατήρησαν οι άλλοι ερευνητές. Τέλος δεν κατάφεραν να εκφράσουν το πολυπεπτίδιο της κεντρικής περιοχής, προκειμένου να ελέγξουν την δραστικότητά του.

Οι AJG Raub και συν [1988] απομόνωσαν και χαρακτήρισαν μόριο cDNA μήκους 1.2kb προερχόμενο από βιβλιοθήκη cDNA ανθρωπίνων ηπατοκυττάρων που αντιστοιχούσε στο καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης La/SSB μήκους 296 αμινοξέων, 33KD μοριακού βάρους. Υποκλωνοποίηση αυτού του τμήματος απεκάλυψε την ύπαρξη τριών διακριτών αντιγονικών περιοχών. Κάθε μία περιοχή φέρει ένα τουλάχιστο B λεμφοκυτταρικό επίτοπο. Αυτές είναι οι: A (112-180aa) B (181-233aa) και C (234-268aa) και εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης La/SSB.

Έχοντας στη διάθεσή τους το συμπληρωματικό cDNA που καλύπτει το 87% του συνολικά εκφραζόμενου DNA της πρωτεΐνης La/SSB, στο οποίο υπολείπονται τα 54 πρώτα αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου, οι Bini και συν [1990] χαρτογράφησαν την πρωτεΐνη La/SSB και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι αντι-La/SSB θετικοί οροί αναγνωρίζουν δύο τουλάχιστον ανεξάρτητους λεμφοκυτταρικούς επιτόπους με αλληλουχία 112-226 και 226-408, και υποστήριξαν την άποψη ότι πρόκειται για



επιτόπους διαμόρφωσης. Επιπλέον εντόπισαν ένα γραμμικό επίτοπο στην περιοχή που καλύπτουν τα αμινοξέα 226-380, διότι θέρμανση αυτού του πεπτιδίου δεν προκαλούσε απώλεια της αντιγονικής δραστικότητάς του.

Οι Kohsaka και συν [1990] χρησιμοποιώντας πολυπεπίδια, προϊόντα τμημάτων cDNA του γονιδιώματος La/SSB, συνεκφρασμένα με το ένζυμο cito-β-γαλακτοσιδάση, εντόπισαν τρεις κύριες αντιγονικές περιοχές: το τμήμα 88-101, το τμήμα 283-338, το οποίο ήταν και το αντιγονικότερο, και το τμήμα 179-220 που παρουσίαζε τα χαμηλότερο ποσοστό αναγνώρισης από αντι-La/SSB θετικούς ορούς. Ήταν η πρώτη ερευνητική ομάδα που περιέγραψε ομολογία του αντιγονικού πεπτιδίου La/SSB με την αλληλουχία 88-101 με την ιϊκή πρωτεΐνη περιβλήματος gag του ρετροϊού Feline Sarcoma Virus και στήριξαν την θεωρία του μοριακού μιμητισμού ενός αυτοαντιγόνου με ένα ξένο μολυσματικό παράγοντα, χωρίς όμως να αποδείξουν άμεση διασταυρούμενη αντίδραση των αντι-La/SSB αντισωμάτων που αναγνώριζαν το πεπτίδιο La/SSB με το ομόλογο πεπτίδιο της πρωτεΐνης gag.

Οι St Clair και συν [1990], έχοντας ήδη εντοπίσει τρεις τουλάχιστον μη επικαλυπτόμενες αντιγονικές περιοχές της πρωτεΐνης La/SSB, παρατήρησαν ότι τα αντισώματα αντι-La/SSB διαφορετικών ασθενών παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο αναγνώρισης των τμημάτων La/SSB κατά την διάρκεια της νόσου, προτείνοντας ότι η B λεμφοκυτταρική απόκριση μπορεί να ρυθμίζεται συνδυαστικά από διάφορους παράγοντες, γεγονός που ενισχύει την άποψη της αντιγονοκαθοδηγούμενης παραγωγής αυτοαντισωμάτων στα αυτοάνοσα νοσήματα. Ωστόσο στα αρχικά στάδια της αντι-La/SSB απόκρισης, οι Mc Neillage και συν [1990] διαπίστωσαν ότι μόνο η περιοχή 1-107αο (LaA) της πρωτεΐνης La/SSB αναγνωρίζεται από τα αντισώματα αντι-La/SSB και εν συνεχεία, καθώς η νόσος εξελίσσεται, η απόκριση και η αναγνώριση των αντισωμάτων αντι-La/SSB επεκτείνεται και στους άλλους



επίτοπους, 111-242αο (LaC), 346-408αο (LaL 2/3). Οι Gordon και συν [1992] διαπίστωσαν ότι οροί με αντι-La/SSB αντισώματα που αναγνωρίζονται με την τεχνική της ELISA και δεν μπορούν να ανιχνευθούν με την τεχνική της CIE, εμπεριέχουν διαφορετικούς υποπληθυσμούς αντι-La/SSB αντισωμάτων με περιορισμένο πρότυπο αναγνώρισης του αντιγόνου La/SSB (αναγνώριζαν όλο το μόριο La/SSB, λιγότερο το τμήμα LaA, πιο περιορισμένα το τμήμα LaC και καθόλου το τμήμα LaL 2/3), σε σύγκριση με αντι-La/SSB θετικούς ορούς, των οποίων τα αντισώματα αντι-La/SSB ήταν ανιχνεύσιμα και με την τεχνική της CIE.

Η περιοχή LaA χαρακτηρίστηκε από τους Mc Neilage και συν [1992] ως επίτοπος διαμόρφωσης που σχηματίζεται από την συμβολή των περιοχών 12-28αο και 82-99αο και κατ'επέκταση δεν μπορεί η αναγνώρισή του από τα αντισώματα να είναι προϊόν μοριακής μίμησης με την ομόλογη γραμμική περιοχή της πρωτεΐνης gag. Επίσης ο επίτοπος LaA βρέθηκε εξελικτικά πολύ σταθερός [Weng et al 1993], ενώ ο επίτοπος LaL 2/3 που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, είναι πιο ειδικός για τον άνθρωπο και για αυτό τον λόγο η αναγνώρισή του από τα ανθρώπινα αντισώματα αντι-La/SSB θα μπορούσε να αποτελέσει αιτία έναρξης της αυτοανοσίας, στην περίπτωση που υπάρχουν ειδικά λεμφοκύτταρα που έχουν διαφύγει του μηχανισμού αποενεργοποίησης στο θύμο αδένα. Παρομοίως η περιοχή LaC 111-242αο, μολονότι είναι εξελικτικά σταθερή και λειτουργικά σημαντική, διαθέτει επίτοπο που αναγνωρίζεται μόνο από τα ανθρώπινα αντισώματα αντι-La/SSB. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν μεταγενέστερα και οι Rishmueller και συν [1995], οι οποίοι χαρτογράφησαν την περιοχή LaC. Διαπίστωσαν επιπλέον ότι πρόκειται για επίτοπο διαμόρφωσης στον οποίο η πρόσδεση των αντισωμάτων δεν εμποδίζει την σύνδεση της πρωτεΐνης La/SSB με τα μόρια RNA, γεγονός το οποίο πιθανώς συμβάλλει στην εξάπλωση της αυτοανοσίας επί των υπολοίπων μορίων που



συμμετέχουν στη δόμηση του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου που ανήκει η πρωτεΐνη La/SSB [Topfer F 1995].

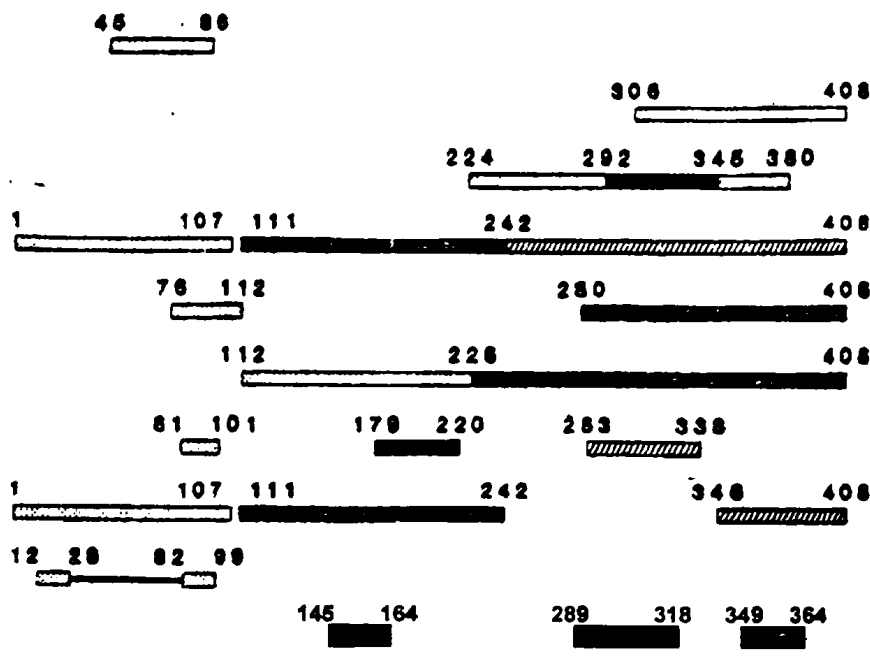
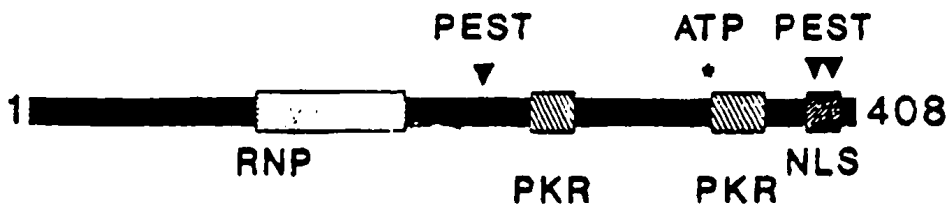
Στις παραπάνω εργασίες χρησιμοποιήθηκαν πρωτεολυμένα κομμάτια της φυσικής ανθρώπινης πρωτεΐνης La/SSB ή ανασυνδυασμένα πολυπεπτίδια La/SSB συνεκφραζόμενα πάντα με πρωτεΐνη του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης (συνήθως την β-γαλακτοσιδάση) για την αντιγονική χαρτογράφηση του αυτοαντιγόνου La/SSB. Στην παρούσα μελέτη έγινε χαρτογράφηση των Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων της πρωτεΐνης La/SSB με την χρήση συνθετικών αλληλεπικαλυπτόμενων εικοσιπεπτιδίων που κάλυπταν ολόκληρο το μήκος της πρωτεΐνης La/SSB. Τα πεπτίδια αυτά ελέγχθηκαν ως προς την δραστικότητά τους με αντι-La/SSB θετικούς ορούς ασθενών με σS και ΣΕΛ. Παρατηρήθηκε ότι αντι-La/SSB οροί προερχόμενοι από ασθενείς με διαφορετικά νοσήματα αναγνώριζαν διαφορετικά τμήματα- πεπτίδια της πρωτεΐνης La/SSB και επιβεβαιώθηκε η πολυκλωνική φύση των αντι-La/SSB θετικών ορών και η ύπαρξη διακριτών πληθυσμών αυτοαντισωμάτων που αναγνωρίζουν διαφορετικές περιοχές του αυτοαντιγόνου La/SSB. Ως κυριότερες αντιγονικές περιοχές αναγνωρίστηκαν η κεντρική και η καρβοξυτελική. Πιο αντιγονικά βρέθηκαν τα πεπτίδια: 145-164αο, το οποίο βρίσκεται εντός της περιοχής RRM σύνδεσης με τα RNA μόρια, 289-308αο, 301-320αο και 349-368αο. Κατόπιν αναλυτικότερης επεξεργασίας των πεπτιδίων αυτών βρέθηκε ότι αφενός μεν είναι γραμμικοί επίτοποι, οι οποίοι ωστόσο διαθέτουν στερεοδιαμόρφωση απαραίτητη για την εκδήλωση της αντιγονικότητάς τους. Ο ισχυρότερος αντιγονικά επίτοπος ήταν ο 349-364αο. Ο έλεγχος των La/SSB πεπτιδίων για ομολογία με ιϊκές ή βακτηριακές πρωτεΐνες δεν απέδωσε σημαντικά αποτελέσματα.

Ακολουθώντας παρόμοια μεθοδολογία που στηρίζεται σε συνθετικά δεκαπεπτίδια οι Haaheim και συν [1994] εντόπισαν αντιγονικά πεπτίδια στην



αμινοτελική και καρβοξυτελική περιοχή με αλληλουχία 21-65αο και 361-405αο. Η μελέτη τους ωστόσο είχε αρκετά μειονεκτήματα όπως το ότι χρησιμοποίησαν αρκετά μικρά πεπτίδια (10 αμινοξέων μήκους) με αποτέλεσμα να μην εντοπίσουν σημαντικούς επιτόπους που άλλοι ερευνητές [Yiannaki et al 1998] απόδειξαν ότι, για να είναι αντιγονικοί, χρειάζεται να έχουν μήκος έως και 20 αμινοξέων. Επίσης δεν χρησιμοποίησαν ως μάρτυρες ορούς φυσιολογικών ή νοσούντων ατόμων χωρίς αντισώματα αντι-La/SSB, για να επιβεβαιώσουν την ειδική αναγνώριση των πεπτιδίων που εντόπισαν, αποκλειστικά από τα αντι-La/SSB αντισώματα. Επιπλέον δεν έλεγξαν τα πεπτίδια που εντόπισαν ως αντιγονικότερα με μεγάλο αριθμό ορών, προκειμένου να επιβεβαιώσουν την καθολικότητα των αποτελεσμάτων τους. Στο σχήμα 4 φαίνονται τα μέχρι τώρα δεδομένα της αντιγονικής χαρτογράφησης του αυτοαντιγόνου La/SSB.





Chambers et al (1985)

Sturgess et al (1988)

Rauh et al (1988)

Chambers et al (1988)

Chan et al (1989)

Bini et al (1990)

Kohsaka et al (1990)

McNeilage et al (1990)

McNeilage et al (1990)

Yiannaki et al (1998)

Σχήμα 4: Χαρτογράφηση των περιοχών της πρωτεΐνης La/SSB που έχουν χαρακτηριστεί ως B λεμφοκυτταρικοί επίτοποι. Οι επίτοποι παρουσιάζονται βάσει της χρονολογίας που εντοπίστηκαν από τις παλαιότερες έως τις πιο πρόσφατες. Οι τρεις πρώτες μελέτες δεν είχαν αναλύσει ολόκληρο το μόριο της πρωτεΐνης La/SSB, αλλά μόνο τμήματά της. Οι περιοχές που έχουν εντοπιστεί μπορεί να περιέχουν γραμμικούς ή / και επίτοπους διαμόρφωσης.



3.3.2 Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΕΠΙΤΟΠΟΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ La/SSB.

Ελάχιστα είναι γνωστά για την ύπαρξη αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων υπεύθυνων για το σS και το ΣΕΛ, δοθέντος ότι πολύ λίγοι ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την ύπαρξη Ro/SSA και La/SSB ειδικών κυκλοφορούντων Τ λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών με σS και ΣΕΛ, ενώ έως τώρα δεν έχουν ελεγχθεί τα λεμφοκύτταρα που εδρεύουν σε ιστούς – στόχους (πχ σιελογόνοι αδένες) για την ύπαρξη αυτού του είδους των λεμφοκυττάρων. Οι AK Halse και συν [1996] προσπάθησαν να εντοπίσουν Τ λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με αντι-Ro/SSA ή/και αντι-La/SSB ειδικότητα, τα οποία υπό την παρουσία αυτοαντιγόνων Ro/SSA ή/και La/SSB στην καλλιέργειά τους θα παρήγαγαν ιντερφερόνη-γ (INF-γ). Δεν διαπίστωσαν ωστόσο καμία διαφορά στην απόκριση των Τ λεμφοκυττάρων που προέρχονταν από ασθενείς ή από φυσιολογικά άτομα. Πιθανόν η συχνότητα των ειδικών La/SSB Τ λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα είναι τόσο μικρή, που ουσιαστικά δεν είναι δυνατό να ανιχνευθούν. Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα δικής μας προσπάθειας εντοπισμού Τ λεμφοκυττάρων απομονωμένων από περιφερικό αίμα ασθενών με σS και φυσιολογικών αιμοδοτών ικανών να αναγνωρίσουν κάποια πεπτίδια από το σύνολο των πεπτιδίων που συνθέτουν την πρωτεΐνη La/SSB (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Τα αποτελέσματα αυτά ωστόσο δεν αποκλείουν την ύπαρξη Τ λεμφοκυττάρων ειδικών για το αυτοαντιγόνο La/SSB σε ιστούς που αποτελούν στόχο του ανοσολογικού συστήματος σε ασθενείς που πάσχουν από αυτοάνοσο νόσημα, πχ σε σιελογόνους αδένες. Το γεγονός ότι δεν έχουν βρεθεί ακόμη ειδικά Τ



λεμφοκύτταρα για τα αντιγόνα Ro/SSA και La/SSB δεν σημαίνει απαραίτητα ότι δεν υπάρχουν και οι αντίστοιχοι T λεμφοκυτταρικοί επίτοποι. Πολλές ενδείξεις συνηγορούν υπέρ της επαγόμενης και εξαρτώμενης από τα T λεμφοκύτταρα αυτοάνοσης απόκρισης, όπως: η πολυκλωνικότητα των ορών ασθενών με αντι-La/SSB αντισώματα, η ύπαρξη διακριτών υποπληθυσμών αντι-La/SSB αντισωμάτων που στρέφονται και αναγνωρίζουν διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης και το ότι τα αντι-La/SSB αυτοαντισώματα είναι τάξης τόσο IgM, όσο και IgG υψηλού τίτλου και συγγένειας με το αντιγόνο [Maddison PJ 1994].

Στην παρούσα μελέτη με την βοήθεια του προγράμματος EPIPLOT [Mendez -Arias et al 1990, Margalit et al 1987, Rothbard et al 1988, Sette et al 1989] πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη των πιθανόν T λεμφοκυτταρικών επιτόπων του αυτοαντιγόνου La/SSB. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα στηρίζεται σε δεδομένα των μέχρι σήμερα γνωστών T λεμφοκυτταρικών επιτόπων, οι οποίοι διαθέτουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά όπως την ύπαρξη συγκεκριμένων αμινοξέων στην αλληλουχία τους, συγκεκριμένο μήκος πεπτιδίων, για την πρόβλεψη νέων πιθανών T επιτόπων. Με βάση το πρόγραμμα βρέθηκαν πεπτίδια πιθανά να εκδηλώσουν δράση T επιτόπου, διάσπαρτα σε όλο το μήκος της πρωτεΐνης (Σχημ 4).

3.4 ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ La/SSB.

Λέγοντας εξάπλωση της ανοσολογικής απόκρισης (Epitope spreading) εννοούμε την ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης σε ενδογενείς επιτόπους ενός αντιγόνου που ακολουθείται από την ελευθέρωση των αυτοαντισωμάτων κατά των



συγκεκριμένων επιτόπων, καθώς και νέων επιτόπων σε όλο το μήκος του αντιγόνου και την ανάπτυξη χρόνιων φλεγμονωδών αντιδράσεων και αυτοάνοσων νοσημάτων. Πρόσφατα δεδομένα που προέρχονται από μοντέλα αυτοανοσίας πειραματόζων, δείχνουν ότι η εξέλιξη της νόσου μπορεί να οφείλεται σε ενεργοποίηση και συσσώρευση αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων, ανεξάρτητα από τον παράγοντα που τα ενεργοποίησε. Σε πειραματικό μοντέλο αυτοανοσίας παρατηρείται ότι η νόσος ενεργοποιείται εξαιτίας της ανοσολογικής απόκρισης και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων κατά ενός γνωστού αυτοεπιτόπου. Η ανοσολογική απόκριση εν συνεχεία επεκτείνεται σε άλλους T και/ή B λεμφοκυτταρικούς επιτόπους της ίδιας πρωτεΐνης (ενδομοριακά) ή διαφορετικών πρωτεϊνών (διαμοριακά), αυτή η εξάπλωση συμβάλει στην εξέλιξη της νόσου. Η χρόνια ιστική βλάβη που επάγεται από υϊκή μόλυνση μπορεί να οδηγήσει επίσης στην εξάπλωση της ανοσολογικής απόκρισης από ένα συγκεκριμένο επίτοπο του ιού σε άλλους επιτόπους του ιού, αλλά και του κυττάρου ξενιστή. Εξάπλωση της ανοσολογικής απόκρισης σε επίπεδο T λεμφοκυττάρων έχει παρατηρηθεί στην πειραματική εγκεφαλομυελίτιδα, σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο ΣΕΛ, σε αντιγονοεπαγόμενα μοντέλα αυτοανοσίας, καθώς και σε ασθένειες που οφείλονται σε υϊκές μολύνσεις, πχ εγκεφαλομυελίτιδα.

Τα αντι-La/SSB και αντι-Ro/SSA αντισώματα συναντώνται συνήθως μαζί, σε αυτό το φαινόμενο πιθανώς να συμβάλει το γεγονός ότι σχηματίζουν κοινό ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο. Αντι-RNA αντισώματα έχουν επίσης εντοπιστεί μαζί σε ορούς με αντι-La/SSB και αντι-Ro/SSA αντισώματα. Τα δεδομένα αυτά έχουν οδηγήσει ερευνητές, όπως τον Hardin, στην υπόθεση ότι το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο Ro/La/RNA “παρουσιάζεται” στο ανοσοποιητικό σύστημα ολόκληρο και όχι με τα επιμέρους συστατικά του [Hoet RM, WJ van Venrooij 1992, F Blanco et al 1991, Hardin JA 1986].



Δύο μοντέλα έχουν προταθεί για να ερμηνεύσουν το φαινόμενο της εξάπλωσης των Β και Τ λεμφοκυτταρικών επιτόπων, τα οποία στηρίζονται σε μελέτες οργανοειδικών αυτοάνοσων αποκρίσεων (αυτοάνοσες αποκρίσεις που έχουν στόχο συγκεκριμένα όργανα).

Το πρώτο μοντέλο υποστηρίζει ότι, αν έστω ένα Τ λεμφοκύτταρο που αναγνωρίζει, μέσω του υποδοχέα του (TCR) ένα μόνο πεπτίδιο μίας πρωτεΐνης που ανήκει σε κάποιο σύμπλοκο, διαφύγει του μηχανισμού απόκτησης ανοχής, είναι αρκετό να επάγει την επέκταση της παραγωγής αυτοαντισωμάτων σε άλλα τμήματα του συμπλόκου μέσω της ενεργοποίησης των Β λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους στο σύμπλοκο. Τα Β λεμφοκύτταρα φέρουν υποδοχείς τάξεως γάμμα (Ig) που αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους στο ίδιο σύμπλοκο και μπορούν με αυτούς να εγκλωβίσουν το σύμπλοκο και να “παρουσιάσουν” διάφορα πεπτίδια σε ανοσοδραστικά CD4 α/β Τ λεμφοκύτταρα συγκεκριμένης ειδικότητας. Τα ενεργοποιημένα αυτά λεμφοκύτταρα μπορούν να παρέχουν βοήθεια σε διαφορετικά Β λεμφοκύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα που παράγουν αυτοαντισώματα εναντίον διαφόρων τμημάτων του συμπλόκου. Υπέρ του μοντέλου αυτού συνηγορεί η εργασία του Milich DR [Milich et al 1987], σύμφωνα με την οποία η ανοσοποίηση ποντικών με τον συνθετικό Τ λεμφοκυτταρικό επίτοπο του καψιδιακού αντιγόνου του ιού της ηπατίτιδας Β (HBcAg) οδήγησε στην ανίχνευση από την πρώτη εβδομάδα αντισωμάτων μόνο κατά του συγκεκριμένου αντιγόνου. Όταν το πειραματόζωο ανοσοποιήθηκε με ολόκληρο τον ιό, ανιχνεύθηκαν από την πρώτη εβδομάδα αντισώματα επιπλέον κατά του επιφανειακού αντιγόνου του ιού HBsAg. Στην προκειμένη περίπτωση εδόθη βοήθεια από το ειδικό ως προς το HBcAg Τ λεμφοκύτταρο μόνο όταν και οι δύο πρωτεΐνες HBcAg και HBsAg είναι φυσιολογικά συνδεδεμένες, όπως συμβαίνει στον ολοκληρωμένο ιό, έτσι ώστε το Β



λεμφοκύτταρο να συνδεθεί με την υϊκή επιφάνεια και να παρουσιάσει το HBcAg στο ειδικό T λεμφοκύτταρο.

Το δεύτερο μοντέλο υποστηρίζει ότι η ποικιλία των αντισωμάτων που στρέφονται κατά πρωτεϊνών ή συμπλόκων είναι αποτέλεσμα εξάπλωσης των T λεμφοκυτταρικών επιτόπων. Τα B λεμφοκύτταρα μπορούν να δράσουν ως πολύ αποτελεσματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και να ενεργοποιήσουν τα “ανώριμα” T λεμφοκύτταρα ποικίλης ειδικότητας μέσω της ικανότητάς τους να εγκλωβίζουν τα μακρομοριακά σύμπλοκα με τους επιφανειακούς Ig υποδοχείς και της αλληλεπίδρασης των συνοδών μορίων B7.1 και B 7.2 με τον υποδοχέα CD28 των T λεμφοκυττάρων.

Το μοντέλο αυτό υποστηρίζεται από το παράδειγμα της επαγωγής πειραματικής εγκεφαλομυελίτιδας σε ποντίκια. Πρόκειται για ένα πειραματικό μοντέλο της σκλήρυνσης κατά πλάκας, η οποία προκαλείται μετά από ανοσοποίηση με την βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (Myelin Basic Protein MBP), ή την πρωτεολιπιδική πρωτεΐνη (Proteolipid protein PLP) σε πειραματόζωα κατάλληλου γενετικού υποστρώματος. Ανοσοποίηση των πειραματόζωων με ένα ισχυρό T λεμφοκυτταρικό επίτοπο της MBP ή PLP προκαλεί ενδομοριακή εξάπλωση των T λεμφοκυτταρικών επιτόπων κατά μήκος των αντιγόνων MBP ή PLP [Craft J S. Fatenejad 1997] και διαμοριακή εξάπλωση των επιτόπων προς την πρωτεΐνη MBP μετά από ανοσοποίηση με τον πεπτίδιο PLP ή/και το αντίστροφο. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εξάπλωση της πειραματικής εγκεφαλομυελίτιδας είναι η καταστροφή του ιστού – στόχου (μυελίνη του νευρικού συστήματος) από το ανοσοποιητικό σύστημα και η απελευθέρωση των πρωτεϊνών που αποτελούν εν συνεχεία τα αυτοαντιγόνα.



Η εξάπλωση των Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων του αυτοαντιγόνου La/SSB έχει αποδειχθεί πειραματικά [Mamula et al 1998, Yiannaki et al in press], ενώ υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι συμβαίνει in vivo κατά την εξέλιξη των αυτοάνοσων νοσημάτων. Το ότι το αυτοαντιγόνο La/SSB αναγνωρίζεται από αυτοαντισώματα, των οποίων ο στόχος επεκτείνεται από λίγους ισχυρούς αντιγονικούς Β λεμφοκυτταρικούς επιτόπους σε νέους, περισσότερους επιτόπους, αποδεικνύεται από τα παρακάτω:

Οι Gordon και συν [1992] απέδειξαν ότι αντι-La/SSB θετικοί οροί, οι οποίοι όμως δεν αναγνωρίζουν το αντιγόνο La/SSB με την τεχνική της CIE, αντιδρούν με την τεχνική της ELISA, κατά κύριο λόγο με το πλήρους μήκους ανασυνδυασμένο αντιγόνο και το αμινοτελικό άκρο του LaA 1-107 αο, λιγότερο με το κεντρικό LaC τμήμα, ενώ δεν αναγνωρίζουν το καρβοξυτελικό άκρο του αυτοαντιγόνου. Επιπλέον οι Mc Neilage και συν [1990] πραγματοποίησαν προκαταρκτικά πειράματα χρησιμοποιώντας δείγματα ορών συγκεκριμένων ασθενών, στους οποίους οι αιμοληψίες έγιναν σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα κατά την πορεία εξέλιξη της νόσου. Παρατήρησαν ότι τα αντι-La/SSB αντισώματα που εμφανίζονται από τα αρχικά στάδια της νόσου, αναγνωρίζουν το αμινοτελικό άκρο του αντιγόνου, ενώ καθώς η νόσος εξελίσσεται, εμφανίσθηκαν στο ορό των ασθενών αντι-La/SSB αντισώματα που αναγνώριζαν το κεντρικό και το καρβοξυτελικό τμήμα του αντιγόνου. Το γεγονός επίσης ότι τα αντι-La/SSB αντισώματα συνυπάρχουν με τα αντι-Ro/SSA αντισώματα, πιθανόν να είναι αποτέλεσμα διαμοριακής επέκτασης της αυτοάνοσης απόκρισης από την μία πρωτεΐνη σε όλο το σύμπλοκο.

Προκειμένου να ελεγχθεί εάν όντως υπάρχει ενδομοριακή ή/και διαμοριακή εξάπλωση της ανοσολογικής απόκρισης μεταξύ των αντιγόνων του συμπλόκου RoRNP, ανοσοποιήθηκαν ποντίκια με το αντιγόνο La/SSB ή το Ro/SSA και



ελέγχθηκε ο ορός τους για την παρουσία αυτοαντισωμάτων [Topfer et al 1995]. Αρχικά παρατηρήθηκε ενδομοριακή επέκταση της ικανότητας αναγνώρισης των αντισωμάτων του αντιγόνου La/SSB από το κεντρικό τμήμα LaC προς το αμινοτελικό και το καρβόξυλοτελικό άκρο του. Εν συνεχεία εντοπίστηκαν αντισώματα κατά του αυτοαντιγόνου Ro/SSA 60KD σε πειραματόζωα που ανοσοποιήθηκαν με το αντιγόνο La/SSB. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από ανοσοποίηση με το αντιγόνο Ro/SSA.

Τα πειράματα αυτά έγιναν με την χρήση ολόκληρων πρωτεϊνών ή/και μεγάλων πολυπεπτιδίων των αυτοαντιγόνων. Τα αντισώματα αντι-La/SSB κατά των διαφόρων επιτόπων δεν αποκλείεται να υπήρχαν από τα αρχικά στάδια της ανοσοποίησης και να αυξήθηκε ο τίτλος τους σε ανιχνεύσιμα επίπεδα εν συνεχεία. Εντυπωσιακά ήταν ωστόσο τα ευρήματα που προήλθαν από την ανοσοποίηση των πειραματόζωων με ένα μόνο πεπτίδιο, τμήμα της πρωτεΐνης La/SSB. Οι Reynolds και συν [1996] ανοσοποιώντας ποντίκια με τον επίτοπο La/SSB 13-30ao, τον οποίο είχαν χαρακτηρίσει σε προηγούμενες εργασίες τους ως τον λιγότερο ανοσοδραστικό, παρατήρησαν T λεμφοκυτταρική απόκριση που σχετιζόταν με την εμφάνιση αυτοαντισωμάτων εναντίον διαφορετικών περιοχών του αυτοαντιγόνου La/SSB, καθώς και του αυτοαντιγόνου Ro/SSA. Στην συγκεκριμένη εργασία, [Yiannaki και συν υπό δημοσίευση] ανοσοποιώντας κουνέλια με τους δραστικούς B λεμφοκυτταρικούς επιτόπους (349-364ao, 301-318ao), παρατηρήσαμε T λεμφοκυτταρική απόκριση εναντίον του πεπτιδίου που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση καθώς και επέκτασή της σε άλλα πεπτίδια La/SSB. Η απόκριση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση αντισωμάτων κατά διαφόρων περιοχών της πρωτεΐνης La/SSB χωρίς όμως να παρατηρηθεί επέκταση σε άλλα αυτοαντιγόνα, όπως το Ro/SSA.



Τα αποτελέσματα αυτά αφενός ενισχύουν την θεωρία περί εξαπλώσεως της αυτοανοσίας με σημείο έναρξης ένα και μόνο αιτιολογικό παράγοντα (αυτοαντιγόνο ή πεπτίδιο), αφετέρου ενισχύουν την άποψη περί περιορισμένης T λεμφοκυτταρικής ανοχής του ανοσοποιητικού συστήματος σε ενδομοριακά αυτοαντιγόνα, όπως τα La/SSB και την υπόθεση ότι το ίδιο το αυτοαντιγόνο La/SSB εν μέρει καθοδηγεί την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος εναντίον του.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ

4

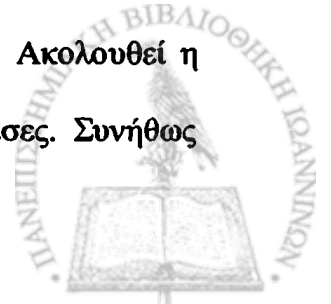
4.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΠΟΡΕΙΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ

ΓΕΝΙΚΑ

Στην προσπάθεια για λεπτομερή εξακρίβωση των αντιγονικών περιοχών πρόδεσης των αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκαν ποικίλες τεχνικές κάθε μία από τις οποίες παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της. Στη συνέχεια γίνεται αναφορά στις τεχνικές χαρτογράφησης των αντιγονικών επιτόπων με υδρόλυση του αντιγόνου σε μικρότερα τμήματα, στην χρήση ανασυνδυασμένων τμημάτων των αντιγονικών μορίων και τέλος στη χρήση συνθετικών πεπτιδίων.

4.1.1. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΜΕ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ.

Η εφαρμογή αυτής της τεχνικής απαιτεί την απομόνωση και τον πλήρη καθαρισμό του υπό μελέτη αντιγόνου από εκχυλίσματα κυττάρων. Η συγκεκριμένη διαδικασία είναι αρκετά επίπονη με πολλά στάδια, στα οποία υπάρχει κίνδυνος απώλειας μεγάλης ποσότητας αντιγόνου ή/και κατακερμάτισης αυτού. Ακολουθεί η υδρόλυση του αντιγόνου με κατάλληλα ένζυμα, γνωστά ως πρωτεάσες. Συνήθως



χρησιμοποιείται η σταφυλοκοκκική πρωτεάση V8. Εν συνεχεία τα πρωτεολυμένα τμήματα που προκύπτουν διαχωρίζονται συνήθως με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης και μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, επί της οποίας εφαρμόζεται η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης, προκειμένου να ανιχνευθούν τα κομμάτια της αντιγονικής πρωτεΐνης που προέκυψαν και σε ποιο βαθμό διατηρούν την αντιγονικότητά τους σε σύγκριση με το ολικό αντιγόνο. Τελικά, εφόσον εντοπιστεί το κατάλληλο αντιγονικό τμήμα, ακολουθεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων του.

Εκτός των δυσκολιών που παρουσιάζει η εκτέλεση της συγκεκριμένης διαδικασίας και της χαμηλής απόδοσής της, δεν προσφέρει λεπτομερή αντιγονική χαρτογράφηση, διότι βοηθά στον προσδιορισμό μεγάλου σχετικά μοριακού βάρους (15-35KD) πεπτιδίων, τα οποία συνήθως περιέχουν περισσότερους από ένα επίτοπο.

4.1.2. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΜΕ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΑ.

Η απευθείας απομόνωση των αυτοαντιγόνων από εκχυλίσματα κυττάρων δεν δίνει πάντα το ολοκληρωμένο αντιγονικό προϊόν, αλλά πρωτεολυμένα τμήματά του λόγω της ύπαρξης ενδοκυτταρικών πεπτιδασών. Μετά την ραγδαία ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών η αντιγονική χαρτογράφηση ευνοήθηκε, ειδικότερα με την εφαρμογή της τεχνικής του ανασυνδυασμένου DNA. Δόθηκε στους ερευνητές η δυνατότητα παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων αντιγόνων καθώς και τμημάτων τους, τα οποία εκφράζονται σε κατάλληλα τροποποιημένα βακτηριακά στελέχη συνήθως του είδους E. Coli. Το πολυπεπτίδιο που μας ενδιαφέρει παράγεται συνδεδεμένο με κάποια άλλη πρωτεΐνη συνήθως β-γαλακτοσιδάση, ή την πρωτεΐνη σύνδεσης της μαλτόζης ή την πολυτρυπτοφάνη. Αυτό το προϊόν προσδίδει σταθερότητα και δίνει την



δυνατότητα ενός εύκολου και αποτελεσματικού καθαρισμού του πολυπεπτιδίου από τα λουπά βακτηριδιακά συστατικά.

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης προϊόντων ανασυνδυασμένου DNA είναι κυρίως ο εύκολος χειρισμός τους, και η δυνατότητα παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων ανασυνδυασμένου προϊόντος της τάξεως των 10-100mg με ελάχιστο κόστος. Τα τμήματα της πρωτεΐνης που προκύπτουν μετά από καθαρισμό τους από κατάλληλες στήλες εξετάζονται ως προς την αντιγονικότητά τους συνήθως με την τεχνική της ELISA. Επιπλέον μετά από πέψη του συμπληρωματικού DNA (cDNA) με κατάλληλες ενδο και εξωνουκλεάσες μπορούν να εκφραστούν μικρότερα κομμάτια πρωτεΐνης και να εντοπιστούν λεπτομερέστερα οι αντιγονικές περιοχές.

Ωστόσο η τεχνική παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα: αρχικά το βακτηριακό σύστημα έκφρασης μιας πρωτεΐνης ευκαρυωτικού κυττάρου δεν διαθέτει τα κατάλληλα οργανίδια για την σωστή αναδίπλωση και χωροδιάταξη της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και κατ'αυτό τον τρόπο χάνονται οι επίτοποι διαμόρφωσης. Συνήθως όλα τα χμαιρικά προϊόντα διαθέτουν μια περιοχή ευαίσθητη σε πρωτεάσες που επιτρέπει την απομάκρυνση της πρωτεΐνης φορέα και της πρωτεΐνης που επιθυμούμε να εκφράσουμε, πολύ συχνά όμως λόγω της διαμόρφωσης που αποκτά το προϊόν δεν είναι προσπελάσιμο το σημείο αυτό από τις πρωτεάσες με αποτέλεσμα τον μη αποχωρισμό των δύο προϊόντων, ή/και αρκετές φορές το ίδιο το πολυπεπτίδιο μπορεί να διασπάται και να πρωτεολύεται από αυτές τις πρωτεάσες κατά τη διάρκεια αποχωρισμού του από τη συνοδό πρωτεΐνη. Ένα άλλο πρόβλημα είναι η παρουσία άλλων βακτηριακών πρωτεϊνών που συνήθως "μολύνουν" το αντιγόνο και αλλοιώνουν το αποτέλεσμα των ανοσολογικών τεχνικών, στις οποίες πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Επιπλέον το χμαιρικό προϊόν μπορεί (ανάλογα πάντα με το μέγεθος της πρωτεΐνης που θέλουμε να εκφράσουμε) να έχει υπερβολικά



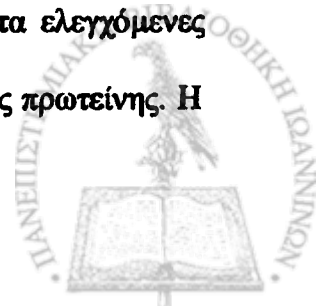
μεγάλο μοριακό βάρος, γεγονός που δημιουργεί προβλήματα διαλυτότητας που εμποδίζουν την παραπέρα επεξεργασία του προϊόντος και κατά συνέπεια τη χρήση του.

Η χρήση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών έχει βοηθήσει στη διερεύνηση και επίλυση πολλών ερωτηματικών. Ωστόσο η χρήση τους για την αντιγονική χαρτογράφηση επιτόπων δεν είναι η πλέον αποδοτική, διότι συνήθως παράγονται μεγάλου μήκους πολυπεπίδια και έτσι η χαρτογράφηση δεν είναι λεπτομερής, ενώ σε ένα ανασυνδυασμένο πολυπεπίδιο μπορεί να υπάρχουν περισσότεροι του ενός επιτόποι. Δυστυχώς το επιχείρημα ότι η χρήση τους βοηθά στην ανίχνευση επιτόπων διαμόρφωσης λόγω του μεγάλου μήκους πεπτιδίων που χρησιμοποιούνται, δεν φαίνεται να είναι αληθές, διότι τα ανασυνδυασμένα αυτά προϊόντα στερούνται της σωστής διαμόρφωσης που έχουν στο βιολογικό σύστημα που εντοπίζονται φυσιολογικά.

4.1.3. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ.

Η ραγδαία εξέλιξη της πεπτιδοχημείας και η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών συνέβαλε σημαντικά στην ευρεία χρήση της μεθόδου της αντιγονικής χαρτογράφησης πρωτεϊνών με την χρήση συνθετικών πεπτιδίων, έτσι ώστε οι ερευνητές να είναι σε θέση πλέον να συνθέτουν εκατοντάδες πεπίδια σε διάστημα ολίγων ημερών.

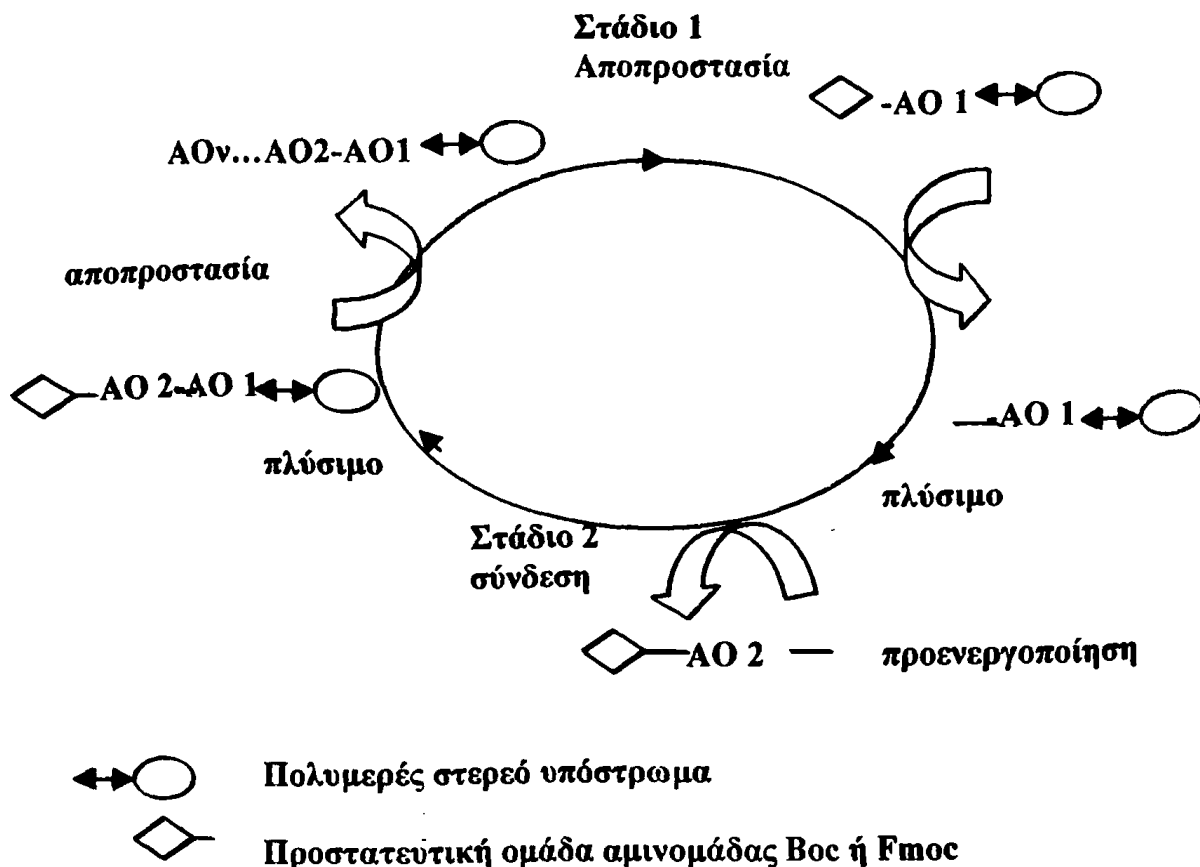
Τα συνθετικά πεπίδια παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα συγκρινόμενα με τα ανασυνδυασμένα πολυπεπίδια, όσον αφορά τη χρήση τους για αντιγονική χαρτογράφηση διότι: η πεπτιδική σύνθεση γίνεται κάτω από απόλυτα ελεγχόμενες συνθήκες, σε αντίθεση με την *in vivo* παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η



Η βασική δομή των αμινοξέων (ΑΟ) έχει την μορφή X-AO(Y)-OH, όπου: X είναι η παροδική προστατευτική ομάδα της α αμινομάδας του αμινοξέως, ΑΟ είναι ένα από τα 20 φυσικά α-L-αμινοξέα (μπορεί να χρησιμοποιηθούν και μη φυσικά αμινοξέα όπως π.χ. το αμινοϊσοβουτυρικό οξύ), Y είναι η "μόνιμη" προστατευτική ομάδα των εκάστοτε παράπλευρων ομάδων που μπορεί να παρεμβληθούν κατά την πορεία της σύνθεσης και -OH είναι η ελεύθερη α καρβοξυλομάδα μέσω της οποίας το πρώτο ΑΟ συνδέεται ομοιοπολικά με την δραστική ομάδα-γέφυρα που βρίσκεται στην επιφάνεια του αδιάλυτου πολυμερούς υλικού, πάνω στο οποίο επιτελείται η πεπτιδική σύνθεση. Η γέφυρα μεταξύ του στερεού πολυμερούς και του πεπτιδίου μπορεί να αποκόπτεται ή να είναι σταθερή κατά περίπτωση, ανάλογα με την φύση του πολυμερούς. Η αμινοπροστατευτική ομάδα απομακρύνεται (στάδιο 1 - αποπροστασία) και η ελεύθερη αμινομάδα συνδέεται με την προενεργοποιημένη, ελεύθερη, δραστική καρβοξυτελική ομάδα του 2^ο αμινοξέος (στάδιο 2 - σύνδεση). Τυχόν εναπομείνουσες αμινομάδες του πρώτου ΑΟ που δεν συνδέθηκαν με το 2^ο ΑΟ ακετυλιώνονται, προκειμένου να αποφευχθούν σχηματισμοί παραπροϊόντων στα επόμενα στάδια που θα μειώσουν την καθαρότητα του τελικού προϊόντος.

Επανάληψη αυτών των δύο σταδίων οδηγεί στην επιμήκυνση από το C- άκρο προς το N- άκρο. Στο τελικό στάδιο απομακρύνονται και οι προστασίες των παράπλευρων ομάδων των αμινοξέων και το πεπτίδιο αποκόπτεται από το στερεό υπόστρωμά του.





Σχήμα 6.: Διαγραμματική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων με την τεχνική της σύνθεσης στερεάς φάσης κατά Merrifield.

Η συνήθης παροδική προστατευτική ομάδα των α αμινομάδων που χρησιμοποιείται είναι η Boc (tert- βουτυλοξυκαρβονυλ), η οποία απομακρύνεται με διάλυμα 20-50% τριφθοροξικού οξέος (TFA) σε διχλωρομεθάνιο (DCM) ενώ η προστασία των παράπλευρων ομάδων γίνεται με ομάδες σταθερές σε διάλυμα TFA. Οι ομάδες αυτές (πχ -oBzl) απαιτούν πολύ ισχυρές όξινες συνθήκες για να απομακρυνθούν, όπως υγρό υδροφθορικό οξύ (HF). Η προστατευτική ομάδα Fmoc (9-φθορο-φαινυλ-μεθοξυ καρβονύλιο) των α-αμινομάδων, μπορεί να απομακρυνθεί με την χρήση οργανικών βάσεων όπως η ππεριδίνη σε διάλυμα διμεθυλοφορμαμιδίου (DMF). Οι παράπλευρες προστατευτικές ομάδες που συνοδεύουν τα αμινοξέα Fmoc είναι συνήθως ομάδες που μπορούν να



απομακρυνθούν σε ήπιες όξινες συνθήκες όπως αυτές του TFA [Fields CB και συν, 1990].

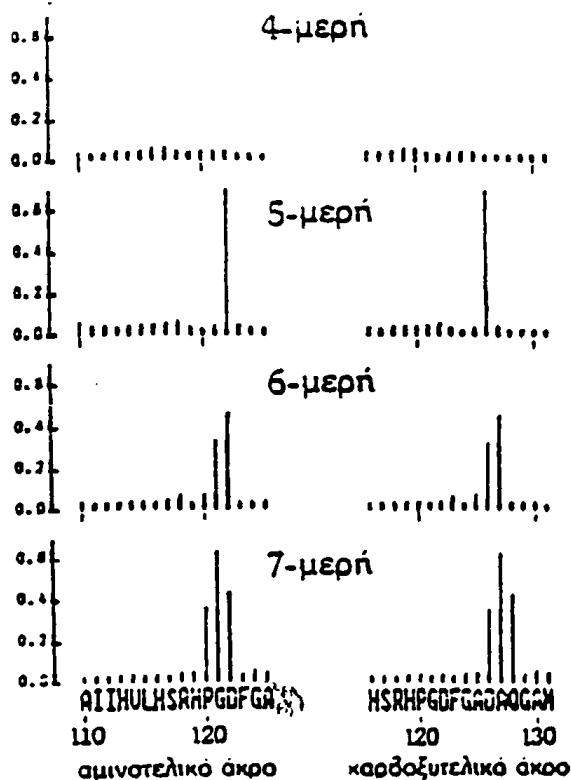
Τα στερεά υποστρώματα που συνήθως χρησιμοποιούνται, αποτελούνται από κόκκους ρητίνης πολυστυρενίου, το οποίο τροποποιείται έτσι, ώστε να φέρουν κατάλληλες δραστικές ομάδες για την πρόσδεση της καρβόξυλο ομάδας του 1^{ου} αμινοξέος του πεπτιδίου σε αυτά. Εκτός από τους κόκκους ρητίνης που χρησιμοποιούνται παράλληλα με ειδικές συσκευές σύνθεσης όπου τα αντιδραστήρια, τα διαλύματα οξέων και οι διαλύτες τοποθετούνται χειρονακτικά ή αυτόματα, η πεπτιδική σύνθεση μπορεί να γίνει επάνω σε ράβδους πολυαιθυλενίου [Geysen HM και συν 1984] ή σε ειδικά επεξεργασμένα φύλλα νιτροκυτταρίνης [Frank R 1992], καθώς και σε άλλα στερεά υποστρώματα (Πίνακας 1).

Τα τελευταία υποστρώματα δίνουν την δυνατότητα της ταυτόχρονης σύνθεσης πολλών πεπτιδίων μαζί, τα οποία μπορούν να ελεγχθούν ανοσολογικά επίσης ταυτόχρονα, είτε παραμένοντας προσδεμένα στο στερεό υπόστρωμα είτε μετά την αποκοπή τους και τον καθαρισμό τους συνήθως με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Τα πεπτίδια μετά την αποκοπή τους μπορούν να επιστρωθούν απευθείας σε πλακίδια ELISA ή να προσδεθούν ομοιοπολικά σε πρωτεϊνικούς φορείς όπως η αλβουμίνη βοός, ή σε κατάλληλους oligopeptidικούς φορείς (SOC) και εν συνεχεία να προσροφηθούν σε πλακίδια ELISA, ή ακόμη και να προσδεθούν ομοιοπολικά, απευθείας σε ειδικά τροποποιημένα πλακίδια. Μπορούν ακόμη να συνδεθούν με μεσολαβητικά μόρια όπως η βιοτίνη, η οποία προσδένεται στα πεπτίδια κατά την πορεία της σύνθεσης και η οποία ενώνεται με υψηλή συγγένεια με την στρεπταβιδίνη που βρίσκεται προεπιστρωμένη στο πλακίδιο. Τα ελεύθερα και καθαρισμένα πεπτίδια μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες εντοπισμού T λεμφοκυτταρικών επιτόπων μετά την προσθήκη τους σε καλλιέργειες T



λεμφοκυττάρων βοηθών ή αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων ή κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την αντιγονική χαρτογράφηση των επιτόπων ενός αντιγόνου είναι η επακριβής γνώση της αλληλουχίας του αντιγόνου. Η σύνθεση των πεπτιδίων που καλύπτουν όλο το μήκος του αντιγόνου, φέρει συγκεκριμένο βήμα επικάλυψης. Το μήκος της επικάλυψης που επιλέγεται είναι των οκτώ αμινοξέων, διότι το σύνηθες μήκος των γραμμικών επιτόπων είναι 8 αμινοξέων, και κατ' αυτό τον τρόπο ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος της απώλειας κάποιου επιτόπου στο σημείο εναλλαγής των πεπτιδίων. Ακολουθώντας την πορεία αυτή μόνο γραμμικοί επίτοποι ή επίτοποι "μερικής" διαμόρφωσης 20-30 αμινοξέων μπορούν να ανιχνευθούν. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν σήμερα πολλές ενδείξεις ότι οι γραμμικοί επίτοποι που προσδιορίζονται με την προαναφερθείσα τεχνική συνιστούν τα τμήματα των διαμορφωτικών επιτόπων.

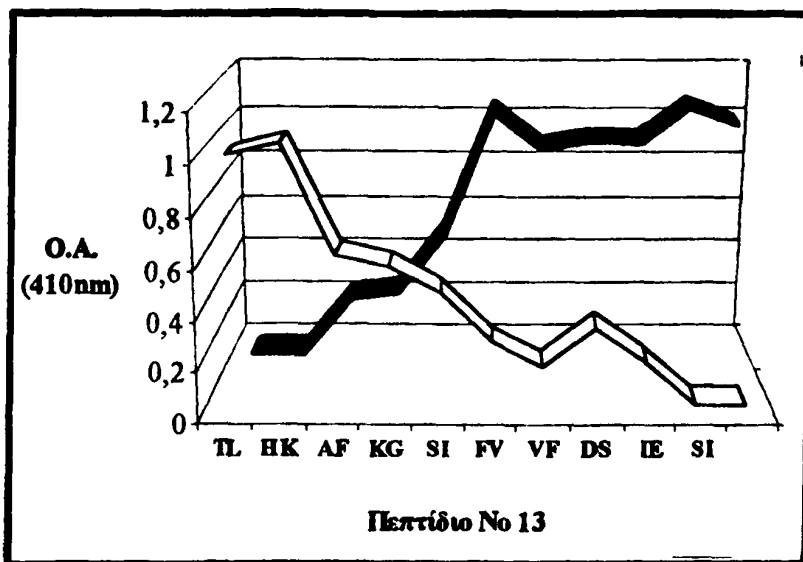


Σχήμα 7: Προσδιορισμός του ελάχιστου δραστικού μήκους του πενταπεπτιδίου DFGAD, όπως αυτή εφαρμόστηκε από τον Geysen 1989.

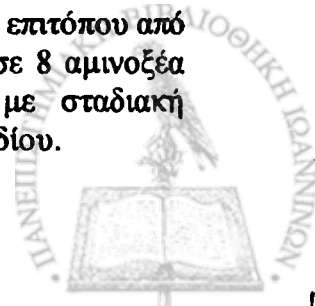


Πολλοί ερευνητές, προκειμένου να μειώσουν το κόστος και το κόπο της σύνθεσης πολλών πεπτιδίων, συμβουλεύονται ειδικά προγράμματα πρόβλεψης της αντιγονικότητας των πεπτιδίων βάσει της πρωτοταγούς δομής του αντιγόνου ή/και της δευτεροταγούς δομής. Υπάρχει ωστόσο ο κίνδυνος να μην συμπεριλάβουν στη μελέτη τους πεπτίδια, τα οποία εντέλει μπορεί να είναι αντιγονικά.

Εν συνεχεία, και εφόσον έχει εντοπιστεί ο επίτοπος, θα πρέπει να εξακριβωθεί το ακριβές μήκος του. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με δύο κυρίως τρόπους ή με την σύνθεση ομάδων ομόλογων αλληλοεπικαλυπτόμενων πεπτιδίων που αντιστοιχούν στον επίτοπο με συνεχώς ελαττούμενο μήκος. Οι ομάδες αυτές ελέγχονται ως προς την ικανότητά τους να διατηρούν ή όχι την δραστηρότητά τους (Geysen και συν 1989 σχήμα 7). Ή πιο απλά και πιο εύχρηστα με την σύνθεση δύο ομάδων πεπτιδίων για κάθε επίτοπο, στις οποίες κάθε πεπτίδιο θα διαφέρει από το προηγούμενό του στο ότι είναι μικρότερο κατά ένα συνήθως αμινοξύ από το άμινοτελικό του άκρου (1^η ομάδα)

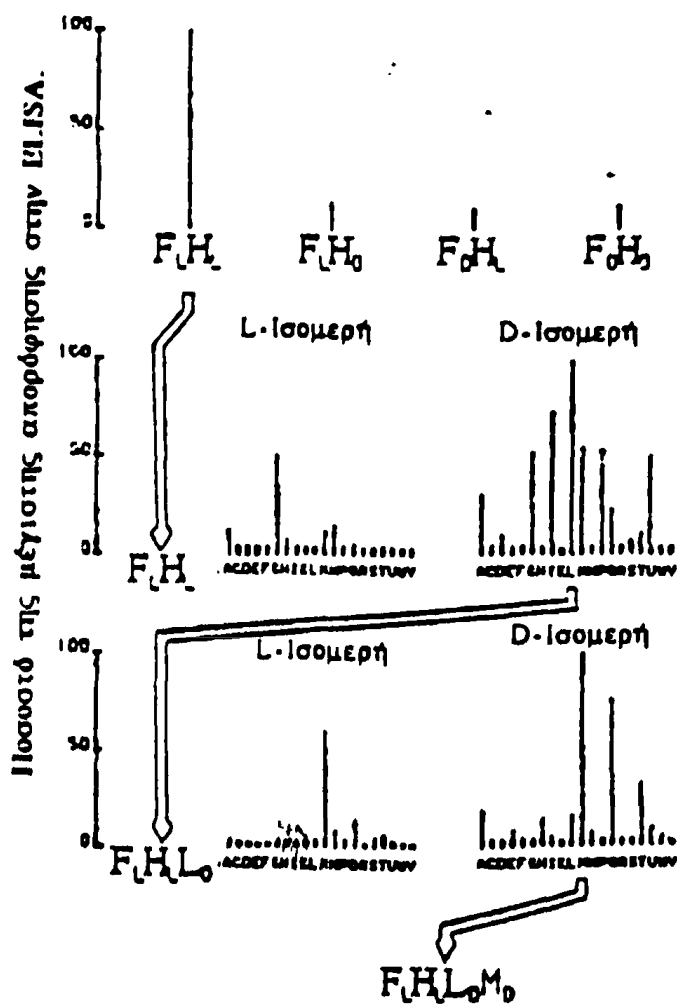


Σχήμα 8: Προσδιορισμός του ελαχίστου δραστικού μήκους του La/SSB επιτόπου από αρχικό μήκος 20 αμινοξέων TLHKAFKGSIFVVFDSIESA (145-164) σε 8 αμινοξέα HKAFKGS (147-154), όπως εφαρμόστηκε στο εργαστήριό μας με σταδιακή απαλοιφή αμινοξέων από το άμινο και καρβόξυλο άκρο του εικοσιπεπτιδίου.



ή από το καρβόξυλοτελικό του άκρο (2^η ομάδα) [Routsias και συν 1996, Γιαννακί και συν 1997]. Το πεπτίδιο της κάθε ομάδας, το οποίο μετά την αφαίρεση ενός αμινοξέος χάνει την δραστικότητα του αποκαλύπτει το ελάχιστο δραστικό μήκος του επιτόπου (Σχήμα 8). Η δεύτερη προσέγγιση πλεονεκτεί της πρώτης στο ότι χρησιμοποιεί λιγότερα πεπτίδια.

Στην περίπτωση που η αλληλουχία ενός αντιγόνου δεν είναι πλήρως γνωστή, ή ακόμη και στην περίπτωση που έχουμε στην διάθεσή μας κάποιο αντίσωμα (συνήθως μονοκλωνικό) που δεν γνωρίζουμε την ειδικότητα του, μπορεί να γίνει χρήση βιβλιοθηκών συνθετικών πεπτιδίων με την τεχνική των μιμοτόπων [Geysen και συν 1986]. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην σύνθεση αρχικά όλων των πιθανών συνδυασμών διπεπτιδίων και στη συνέχεια ακολουθεί η ανίχνευση του



Σχήμα 9: Πορεία σύνθεσης ενός τεχνητού επιτόπου (μιμοτόπου) κατά του μονοκλωνικού αντισώματος του ιού της λύσσας αρχίζοντας από ένα διπεπτίδιο FH και καταλήγοντας στο δραστικό τετραπεπτίδιο FHLM που συμπεριλαμβάνει στην αλληλουχία του L και D ισομερή αμινοξέα (Geysen 1989).



δραστικότερου διπεπτιδίου (έχουν βρεθεί μονοκλωνικά αντισώματα που είναι σε θέση να αντιδρούν με πεπτίδια μήκους μόλις δύο αμινοξέων). Ακολουθεί η σύνθεση όλων των πιθανών τριπεπτιδίων με την προσκόλληση αμινοξέων στο δραστηκότερο διπεπτίδιο κ.ο.κ., έως ότου καταλήξουν στη σύνθεση και την ανίχνευση του δραστηκότερου οκταπεπτιδίου (οκτώ αμινοξέα είναι το σύνθητες μήκος ενός γραμμικού επιτόπου). Το οκταπεπτίδιο αυτό μιμείται έναν φυσικό επίτοπο, ο οποίος μπορεί να είναι γραμμικός ή διαμόρφωσης (σχήμα 9).

Εν συνεχεία θα πρέπει να προσδιοριστούν τα αμινοξέα που είναι απολύτως απαραίτητα για την πρόσδεση του αντιγονικού πεπτιδίου με τις υπερμεταβλητές περιοχές (ιδιότυπους) των ειδικών αντισωμάτων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την σύνθεση μιας ομάδας πεπτιδίων που αντιστοιχούν στον αρχικό επίτοπο, σε κάθε ένα όμως από τα οποία θα έχει γίνει αντικατάσταση ενός αμινοξέος από τα υπόλοιπα 19 φυσικά αμινοξέα. Η αντικατάσταση ενός αμινοξέος του επιτόπου από κάποια άλλα μπορεί να αφήσει ανεπηρέαστη την δραστηκότητά του, ή να την αυξήσει ή να την μειώσει. Κατ' αυτό τον τρόπο, εκτός του ότι εντοπίζονται τα σημαντικότερα για την εκδήλωση της δραστηκότητας αμινοξέα ενός επιτόπου, μπορεί να γίνει και βελτίωση της δραστηκότητάς τους με την αντικατάσταση των αμινοξέων και να συντεθεί ένα δραστηκότερο πεπτιδικό ανάλογο.

Ακολουθεί η περιγραφή ορισμένων εναλλακτικών μεθόδων πολλαπλής πεπτιδικής σύνθεσης, καθώς και η εφαρμογή τους για την χαρτογράφηση των Β ή των Τ επιτόπων. Οι σημαντικότερες μέθοδοι φαίνονται στον πίνακα 1 που ακολουθεί:



Πίνακας 1 Χαρακτηριστικά τεχνικών πολλαπλής πεπτιδικής σύνθεσης.

Μέθοδος	Στερεό υπόστρωμα	Τεχνική *	Βιβλιογραφία
Ραβδία	Πολυαιθυλένιο	Παράλληλη: 8X12 σειρές ραβδίων, οι κεφαλές των ραβδίων ταιριάζουν σε φρεάτια πλακιδίων ELISA.	Geysen και συν 1984
Σακουλάκια τσαγιού	Κόκκοι κλεισμένοι σε πορώδεις πλαστικές Σακούλες.	Πολλαπλή: τα σακουλάκια ομαδοποιούνται σε ειδικές φιάλες, όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση.	Houghten 1985
Φίλτρα	Φύλλα νιτροκυτταρίνης ή βαμβακερά.	Πολλαπλή: οι δίσκοι ομαδοποιούνται μέσα σε φιάλες ή στήλες αντίδρασης.	Frank & Doring 1988 Eichler και συν 1987
Αριθμητήριο	Κόκκοι κλεισμένοι σε πορώδεις σφαίρες Τεφλόν.	Πολλαπλή : οι σφαίρες ομαδοποιούνται σε στήλες αντίδρασης	Beattie & Frost 1991
VLSPS	Γυάλινες επιφάνειες.	Φωτολιθογραφικές συγκεκριμένες θέσεις αντίδρασης.	Fodor και συν 1991
Κηλίδες	Φύλλα νιτροκυτταρίνης.	Παράλληλη: επιτόπου σχηματιζόμενες κηλίδες αντίδρασης.	Frank 1992
Πιλότος	Δίσκοι πολυαιθυλενίου.	Παράλληλα: 10X10 σειρές δισκίων σε ειδικά κατασκευασμένο πλακίδιο.	Gass και συν 1994

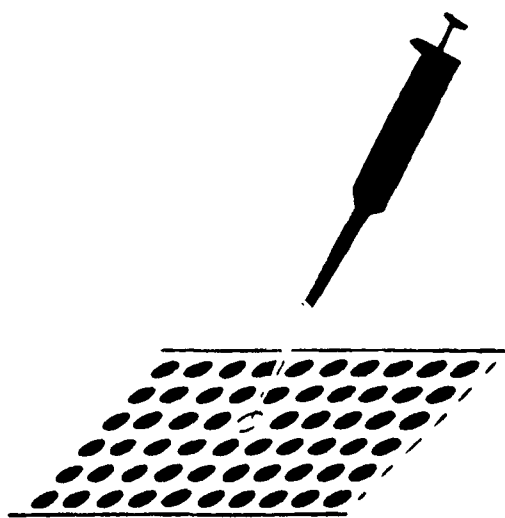
*Παράλληλη: Οι αντιδράσεις σύνδεσης των αμινοξέων πραγματοποιούνται ταυτόχρονα σε διαφορετικά όμως διαμερίσματα με διαφορετικά αμινοξέα για κάθε πεπτίδιο. Πολλαπλή: Τα στερεά υποστρώματα ταξινομούνται σε ομάδες που αντιδρούν με το ίδιο αμινοξύ στο ίδιο δοχείο αντίδρασης



4.1.3.1. ΠΑΡΑΛΛΗΛΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΗΛΙΔΕΣ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ.

Η τεχνική αυτή προσφέρει γρήγορη, φθηνή και μεγάλης κλίμακας σύνθεση πεπτιδίων τόσο σε στερεό υπόστρωμα, όσο και σε ελεύθερη - διαλυτή μορφή για την συστηματική μελέτη των επιτόπων.

Πάνω σε προκαθορισμένες θέσεις της πορώδους μεμβράνης τοποθετούνται μικρές σταγόνες υγρού που σχηματίζουν ξεχωριστές κηλίδες (spots) (σχήμα 10). Ο όγκος του υγρού που τοποθετείται στην μεμβράνη με την βοήθεια μικροσιφωνίων ακριβείας, καθώς και η απορροφητικότητα της μεμβράνης καθορίζουν το μέγεθος της κηλίδας, πάνω στην οποία λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις των διαδοχικών βημάτων της πεπτιδικής σύνθεσης στερεάς φάσης [Frank R .(1992), Frank R (1994), Frank R (1991), Frank και συν (1995), Geysen και συν (1986), Hoffmann και συν (1994), Kramer και συν (1993)].



Σχήμα 10: Σχηματικό διάγραμμα που αναπαριστά την αρχή σύνθεσης πεπτιδίων με την τεχνική SPOT

Εφόσον ολοκληρωθεί η σύνθεση, η μεμβράνη επωάζεται με τον υπό μελέτη ορό και η εξακρίβωση της ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων με το αντιγονικό



πεπτίδιο γίνεται με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης ή με την χρήση ραδιοϊσοτόπων (σχήμα 11). Όταν οι κηλίδες με το ειδικό πεπτίδιο εντοπιστούν, μπορεί να μετρηθεί επακριβώς ο βαθμός πρόσδεσης των αντισωμάτων στα πεπτίδια με μοντέρνα συστήματα ανάλυσης σκίασης (image system analysis). Μετά από κάθε έλεγχο τα πεπτίδια μπορούν να αναγεννηθούν με συγκεκριμένες συνθήκες που μετουσιώνουν και απομακρύνουν τα προσδεμένα αντισώματα από τα πεπτίδια και να χρησιμοποιηθούν αρκετές φορές ακόμη. Τα διαλυτά πεπτίδια που μπορούν να παραχθούν με αυτή την τεχνική μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες T επιτόπων με τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού ή της απελευθέρωσης κυτταροκινών από τα T λεμφοκύτταρα μετά από την επίδραση σε αυτά των κατάλληλων πεπτιδίων.



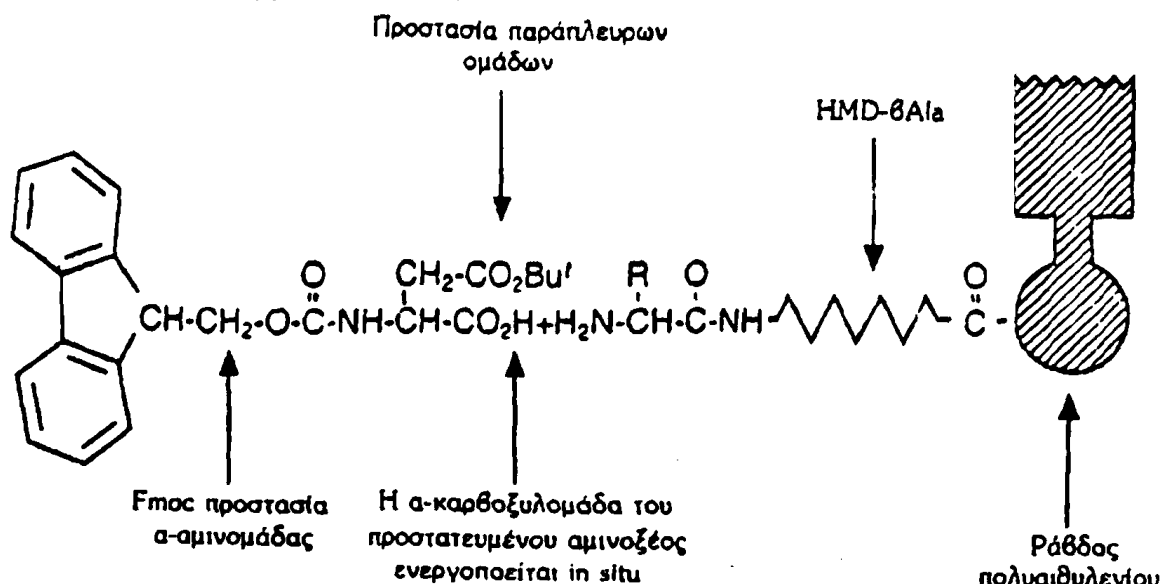
Σχήμα 11: Παράδειγμα προσδιορισμού νέων επιτόπων μέσα από ένα σύνολο 400 Spots εξαπεπτιδίων σε νιτροκυτταρίνη μετά από την επίδραση μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού ID3 που έχει ως φυσικό του επίτοπο το NYGKYE. Η πρόσδεση του αντισώματος έγινε ορατή με την επίδραση δευτέρου αντισώματος προσδεμένου με αλκαλική φωσφατάση (Frank 1992).

4.1.3.2. ΠΑΡΑΛΛΗΛΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΩΝ ΡΑΒΔΙΩΝ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ.

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε στην συγκεκριμένη εργασία τόσο για την αντιγονική χαρτογράφηση των Β επιτόπων της πρωτεΐνης La/SSB, όσο και των T επιτόπων της. Οι ομάδες των ραβδίων πολυαιθυλενίου διατίθενται από την Chiron Mimotopes. Κάθε ομάδα ραβδίων επιτρέπει την σύνθεση 96 διαφορετικών πεπτιδίων ταυτοχρόνως. Η σύνθεση πραγματοποιείται επάνω σε ράβδους πολυαιθυλενίου (4mm διαμέτρου, 40mm μήκους), στην κεφαλή των οποίων το ακρυλικό οξύ έχει πολυμεριστεί και με την επίδραση γ-ακτινοβολίας έχει προσκολληθεί η ομάδα 1, 6 διαμινοεξανίου (1, 6 diaminoheptane HMD) και η β-αλανίνη (β-Ala) (σχήμα 12). Στην αμινομάδα της β-αλανίνης θα γίνει η σύζευξη του πρώτου αμινοξέος, το οποίο θα βρίσκεται σε κάποια απόσταση από την επιφάνεια της ράβδου και έτσι μειώνεται ο κίνδυνος στερικής αλληλεπίδρασης με αυτό και παρεμπόδισης της επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας. Η σύνθεση πραγματοποιείται με την Fmoc στρατηγική (σχήμα .13) επάνω σε ειδικά πλαστικά πλακίδια 96 οπών (σχήμα .14) και με την βοήθεια ειδικού προγράμματος H/Y, το οποίο επιτρέπει την ακριβή, χωρίς λάθη, μεταφορά των διαλυμάτων των αμινοξέων στις κατάλληλες θέσεις. Η ολοκλήρωση της σύζευξης του κάθε αμινοξέος σε κάθε ραβδάκι ελέγχεται με την βοήθεια του δείκτη μπλε της βρωμοφαινόλης, ο οποίος σε αλκαλικές συνθήκες, (όταν οι αμινομάδες των αμινοξέων είναι ελεύθερες) έχει μπλε χρώμα, όταν όμως αυτές συζευχθούν με το επόμενο αμινοξύ, το οποίο έχει προστατευμένη την αμινομάδα του, ο δείκτης παίρνει κίτρινο χρώμα. Τα στάδια της αποπροστασίας της fmoc ομάδας, των διαδοχικών πλυσιμάτων, προ και μετά τη σύζευξη του αμινοξέος και προ και μετά την



αποπροστασία γίνονται ταυτόχρονα για όλα τα ραβδία σε ειδικά πλαστικά δοχεία ανθεκτικά στην διαβρωτική δράση των διαλυτών που χρησιμοποιούνται.

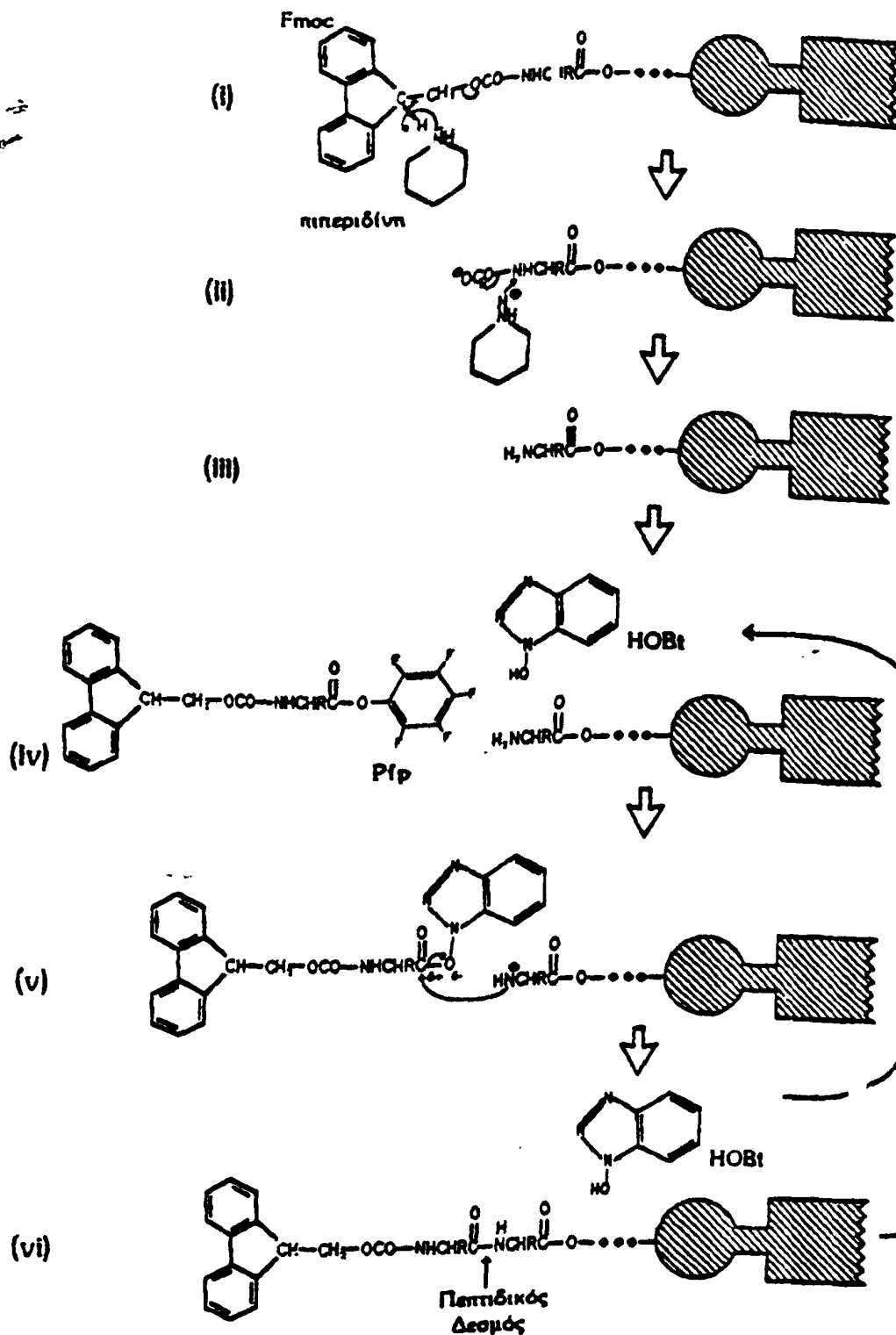


Σχήμα 12: Σχηματική αναπαράσταση του ραβδίου με την HMD-βAla επί της οποίας πραγματοποιείται η σύζευξη του πρώτου αμινοξέος του πεπτιδίου μέσω της ενεργοποιημένης καρβοξυλομάδας του και της αμινομάδας της βAla.

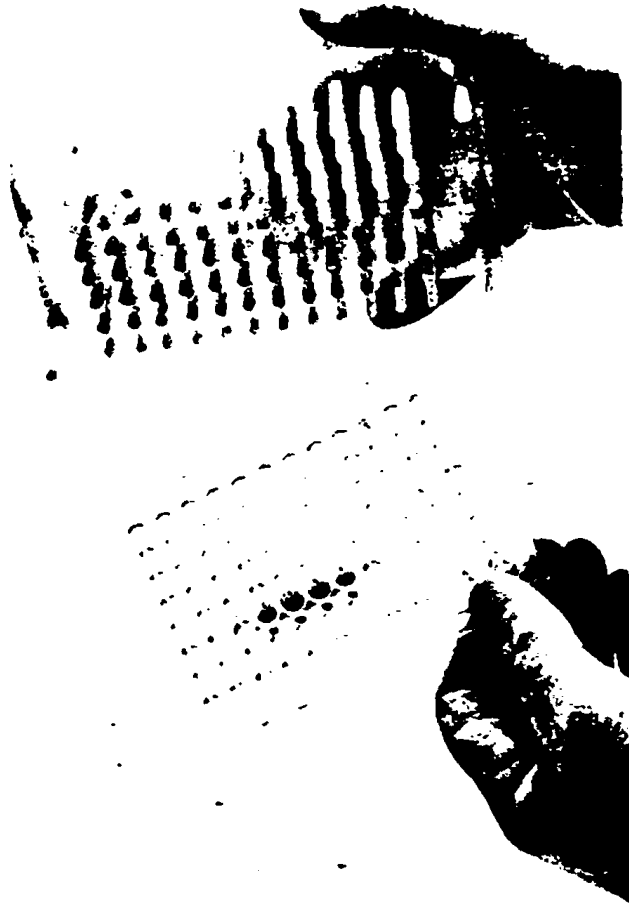
Εφόσον ολοκληρωθεί η σύνθεση των πεπτιδίων, ακολουθεί η ακετυλίωση της ακραίας αμινομάδας, η αποπροστασία των παράπλευρων αλυσίδων με διάλυμα τριφθοροοξικού οξέος 50% σε διμέθυλοφορμαμίδιο και η αποδιάταξη των πεπτιδίων με την βοήθεια υπερήχων και κατάλληλων αποδιατακτικών παραγόντων, όπως του δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS). Τα πεπτίδια, εφόσον έχουν συντεθεί έτσι, ώστε να παραμένουν μόνιμα προσδεμένα επί των ραβδίων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε πειράματα ελέγχου της αντιγονικότητάς τους με την τεχνική της ELISA.

Εάν τα πεπτίδια κατασκευάστηκαν έτσι, ώστε να μπορούν να απελευθερωθούν από τα ραβδία, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα μελέτης T λεμφοκυτταρικών επιτόπων, τότε ακολουθείται διαφορετική πορεία μετά την ολοκλήρωση της πεπτιδικής σύνθεσης. Αρχικά χρησιμοποιούνται ειδικά τροποποιημένα ραβδία δύο τύπων. Στον ένα τύπο ραβδίων έχει εστεροποιηθεί μία Fmoc προστατευμένη προλίνη (Pro) (Σχήμα 15 I, II) και εν συνεχεία απομακρύνεται



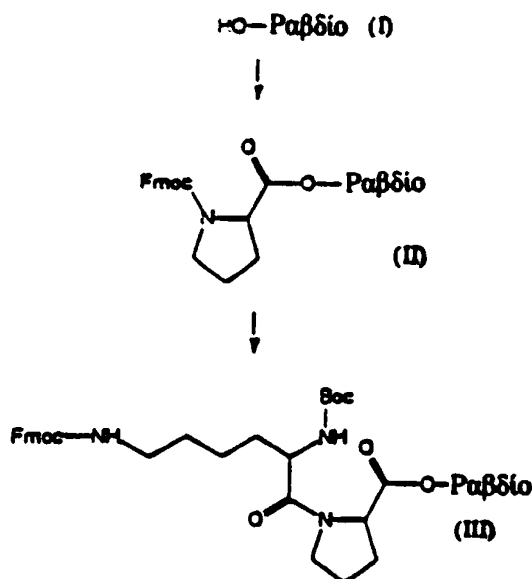


Σχήμα 13: Εφαρμογή της Fmoc στρατηγικής σύνθεσης πεπτιδίων επάνω σε ραβδί. Στάδια (i)-(iii): απομάκρυνση της Fmoc ομάδας με την βοήθεια του βασικού διαλύματος της πιπεριδίνης και απελευθέρωση της α-αμινομάδας του αμινοξέος. Στάδια (iv)-(vi) σύζευξη του ενεργοποιημένου με τον πενταφθοροφαινυλεστέρα (Pfp) αμινοξέος στην πεπτιδική αλυσίδα.



Σχήμα 14: Δομή των ραβδίων του perSCAN. Τα πεπτίδια συντίθενται στη κορυφή των ραβδίων πολυαιθυλενίου. Το σύνολο των ραβδίων μπορεί να τοποθετηθεί σε πλακίδιο, στο οποίο κάθε ραβδίο ταιριάζει σε ένα ξεχωριστό φρεάτιο. Στην φωτογραφία παρουσιάζεται το τελευταίο στάδιο ELISA επί των ραβδίων, της επώασής τους με το υπόστρωμα. Τα ραβδία που έχουν το κατάλληλο πεπτίδιο, στο οποίο προσδέθηκε το αντίσωμα, γίνονται ορατά με την χρήση δεύτερου αντισώματος συνδεδεμένου με το ένζυμο υπεροξειδάση.

η Fmoc προστασία και η ελεύθερη αμινομάδα ενώνεται με την α -Boc, ϵ -Fmoc λυσίνη (Σχήμα 15 III).



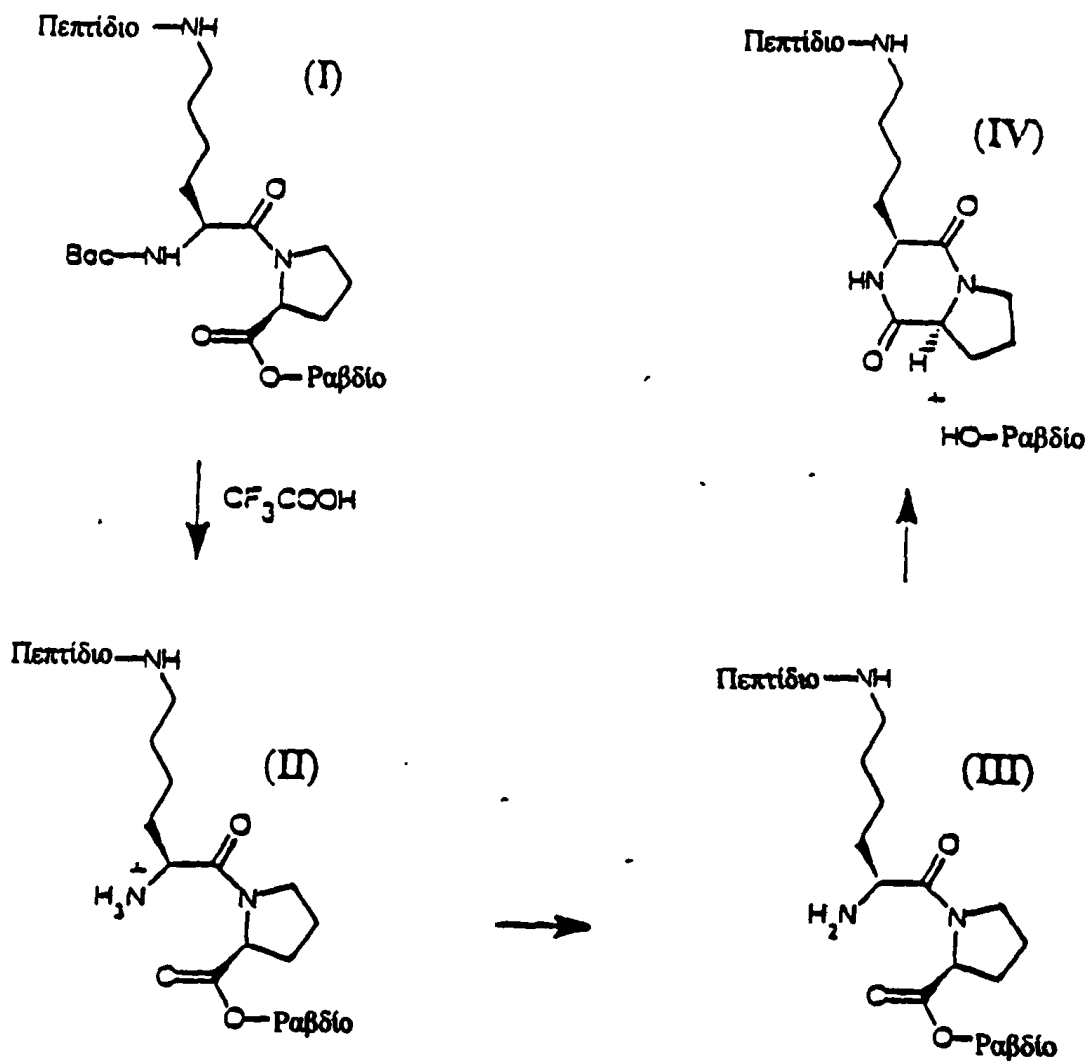
Σχήμα 15 (I-III): Δομή των DKP ραβδίων

Έτσι δημιουργείται η ενεργή επιφάνεια των ραβδίων της δικετοπιτεραζίνης. Η σύνθεση των πεπτιδίων γίνεται στην ϵ -Fmoc προστατευμένη αμινομάδα της λυσίνης. Μετά την ολοκλήρωση της πεπτιδικής σύνθεσης αποπροστατεύεται η α -Boc αμινομάδα της λυσίνης και σε ουδέτερο pH ο παράγων Lys-Pro κυκλοποιείται προς τον σχηματισμό της δικετοπιτεραζίνης (Σχήμα 16 I, II, III, IV) και ταυτόχρονα απομακρύνει το πεπτίδιο από το στερεό του υπόστρωμα

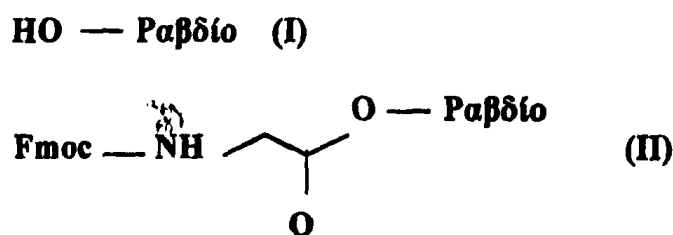
Ο δεύτερος τύπος ραβδίων που δίνει ελεύθερα διαλυτά πεπτίδια, έχει την δομή του Σχήματος 17: επάνω τους έχει εστεροποιηθεί μια Fmoc γλυκίνη, η οποία αποτελεί και την ενεργή μονάδα σύνθεσης των GAP ονομαζόμενων -ραβδίων. Η αποκοπή των πεπτιδίων από αυτά τα ραβδία μπορεί να δώσει τόσο αμίδια όσο και οξέα στο C τελικό τους άκρο. Για να προκύψουν άκρα με την ομάδα COOH, τα πεπτίδια κόβονται με την χρησιμοποίηση 0.1M NaOH σε 40% ακετονιτρίλιου. Το ακετονιτρίλιο απομακρύνεται με λιοφυλίωση των πεπτιδίων. Για να προκύψουν άκρα



αμιδίου, τα πεπτίδια κόβονται με ατμούς διαλύματος αμμωνίας σε οργανικό διαλύτη τετραυδροφουράνιο και τα πεπτίδια διαλύονται στον κατάλληλο διαλύτη.



Σχήμα 16: Ομάδα πρόσδεσης του πεπτιδίου των ραβδίων DKP (i), απομάκρυνση της Boc προστατευτικής ομάδας από την Lys παρουσία διαλύματος TFA (ii), εξουδετέρωση της NH_3^+ -ομάδας (iii), κυκλοποίηση, σχηματισμός του δακτυλίου της δικετοπιπεραζίνης και απόσπαση του πεπτιδίου από το ραβδίο (iv).



Σχήμα 17: Δομή των ραβδίων τύπου GAP.



4.1.3.3. ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ "ΣΑΚΟΥΛΑΚΙΑ ΤΣΑΓΙΟΥ".

Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται ειδικά πορώδη φακελάκια πολυπροπυλενίου, εντός των οποίων τοποθετούνται οι τυπικές ρητίνες σύνθεσης στερεάς φάσης. Κάθε φακελάκι ακολουθεί συγκεκριμένο πρόγραμμα σύνθεσης, ενώ όλα μαζί πλένονται, αποπροστατεύονται και ακετυλιώνονται ταυτοχρόνως στο ίδιο δοχείο. Μπορεί να εφαρμοστεί και η Boc, όσο και η Fmoc στρατηγική πεπτιδικής σύνθεσης και η τεχνική αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει την σύνθεση μεγάλων ποσοτήτων πεπτιδίων (~50mg). Η τεχνική αυτή είναι ιδανική για την σύνθεση βιβλιοθηκών πεπτιδίων, γιατί μπορεί να γίνει ανακατάταξη της ρητίνης που περιέχει κάθε φακελάκι. Ο αρχικός αριθμός από τα φακελάκια με την ρητίνη είναι 19, όσα και τα L αμινοξέα που μπορούν να συζευχθούν ως πρώτα (η κυστεΐνη εξαιρείται λόγω του κινδύνου κυκλοποίησής της και επομένως του τερματισμού της σύνθεσης). Κάθε φακελάκι στεγνώνεται διεξοδικά. Οι ρητίνες από κάθε φακελάκι αναμιγνύονται και χωρίζονται σε ίσες ποσότητες, επανατοποθετούνται στα φακελάκια, όπου προστίθενται τα επόμενα 19 αμινοξέα. Η ανακατανομή αυτή οδηγεί στη σύνθεση $19^2 = 361$ διπεπτιδίων. Επαναλαμβάνοντας ακόμη δύο φορές τα παραπάνω βήματα προκύπτουν $19^4 = 130321$ τετραπεπτίδια κοκ.



4.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία ως προς την τεχνική που μπορεί να ακολουθήσει κάθε εργαστήριο για τον προσδιορισμό των Τ-λεμφοκυτταρικών επιτόπων. Εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως από το είδος των επιτόπων που πρέπει να ανιχνευθούν, αν πρόκειται για επιτόπους Τ λεμφοκυττάρων βοηθών ή κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων, από τον τρόπο που θα ανιχνευθεί η επίδραση των υπό μελέτη πεπτιδίων στις κυτταροκαλλιέργειες αυτό μπορεί να γίνει με την ανίχνευση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων ή την έκκριση κυτταροκινών και τέλος από το είδος προέλευσης των λεμφοκυττάρων (ανθρώπινα ή ποντικού κ.α..)

4.2.1. IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Χρησιμοποιούνται συνήθως λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBL), διότι είναι εύκολη η λήψη τους και η απομόνωσή τους. Μερικές φορές μπορούν να χρησιμοποιηθούν λεμφοκύτταρα από βιοψίες χείλους παρωτίδας ή Τ λεμφοκυτταρικοί κλώνοι κ.α.. Η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε πλακίδια 96 οπών στρογγυλού πάτου σε 200μl όγκου θρεπτικού υλικού και 10^5 - 4×10^5 PBL ανά οπή. Ως θρεπτικό υλικό χρησιμοποιείται κυρίως το RPMI 1640 με 10% ορό εμβρύου βοός ή AB ανθρώπινο ορό, L-γλουταμίνη και αντιβιοτικά. Σε αυτό το μίγμα προστίθεται και η κατάλληλη ποσότητα πεπτιδίου υψηλής καθαρότητας (90% και άνω) σε συγκέντρωση που κυμαίνεται από 0.2-10 μg/ml. Ο χρόνος επώασης των κυττάρων με τα πεπτίδια κυμαίνεται από 5-8 ημέρες πριν την προθήκη της τριτωμένης θυμιδίνης (0.2 - 1 μCi/well). Δεκαοκτώ ώρες μετά την προσθήκη της [3 H] θυμιδίνης τα κύτταρα



συλλέγονται σε δίσκους γυάλινων ινών και μετράται το ποσό της [^3H]T στο DNA των κυττάρων.

Σε περίπτωση που χρειάζεται να γίνει μέτρηση των λεμφοκινών που ελευθερώνονται στο υπερκείμενο των κυτταροκαλλιέργειών, τότε συλλέγεται το υπερκείμενο σε διάφορα χρονικά διαστήματα από 18-144 ώρες, αυτό εξαρτάται αποκλειστικά από της κυτταροκίνη που έχει επιλεγεί για μελέτη. Συχνά τα υπερκείμενα παγώνονται προκειμένου να εξολοθρευτούν πιθανά ζωντανά κύτταρα που μπορεί να υπάρχουν σε αυτό και πιθανόν να αλλοιώσουν την ποσότητα της εκκρινόμενης κυτταροκίνης. Η ποσότητα των κυτταροκινών ελέγχεται εν συνεχεία είτε σε δευτερογενείς καλλιέργειες κυττάρων, τα οποία για να πολλαπλασιαστούν απαιτούν στο θρεπτικό τους υλικό την παρουσία της υπό εξέταση κυτταροκίνης ή με την τεχνική της ELISA, όπου χρησιμοποιούνται ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα κατά των συγκεκριμένων κυτταροκινών.

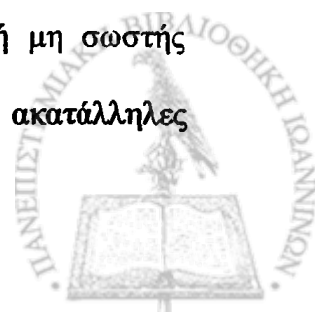
Αν μελετώνται πεπτίδια με κυτταροτοξική δράση, τότε το πρωτόκολλο που θα χρησιμοποιηθεί διαφέρει από αυτό των T λεμφοκυττάρων βοηθών. Τα πεπτίδια θα πρέπει να παρουσιαστούν στα T κυτταροτοξικά κύτταρα συνδεδεμένα με το κύριο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας MHC τάξης I. Κύτταρα όπως οι ινοβλάστες ή τα επιθηλιακά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κύτταρα στόχοι των T κυτταροτοξικών κυττάρων. Τα τεστ κυτταροτοξικότητας είναι γρήγορα (4-6 ωρών) και οι παράμετροι που συνήθως προσδιορίζονται, είναι ή η άμεση παρατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων, ή η έμμεση με την απελευθέρωση ^{51}Cr από τα προσημασμένα κύτταρα στόχους, ή/και η ελευθέρωση κυτταροκινών. Μάρτυρες του τύπου: καλλιέργειες μόνο με κύτταρα στόχους σε θρεπτικό υλικό και η πλήρης λύση όλων των κυττάρων στόχων με απορρυπαντικά θα πρέπει να συμπεριληφθούν στη μελέτη.



4.2.2. ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΝΤΙΚΟΥ, ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ.

Η τεχνική που ακολουθείται είναι παρόμοια με αυτή των ανθρωπίνων κυττάρων . Ωστόσο δίνεται η δυνατότητα να ελεγχθούν Τ κύτταρα από διάφορες πηγές, όπως λεμφαδένες, σπληνοκύτταρα, ακόμη και λεμφοκύτταρα που βρίσκονται σε όργανα -στόχους αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως από σιελογόνους αδένες, αρθρώσεις κ.α..

Η απόκριση των Τ λεμφοκυττάρων σε εξωτερικώς προστιθέμενα πεπτίδια εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως π.χ. η αδυναμία των αντιγονοπαρουσιαστικών (ΑΠΚ) κυττάρων να παρουσιάζουν τα πεπτίδια στα λεμφοκύτταρα. Η μοναδική περίπτωση, κατά την οποία τα πεπτίδια μπορούν να "παρουσιαστούν" παθητικά, χωρίς να ενδοκυττωθούν από τα ΑΠΚ, είναι να συνδεθούν εξωτερικά στο κύριο σύμπλεγμα ιστιοσυμβατότητας (ΚΣΙ). Όσον αφορά τα κυτταροτοξικά Τ κύτταρα, τα πεπτίδια θα πρέπει να έχουν ακριβώς το κατάλληλο μέγεθος (συνήθως εννιαμερή πεπτίδια), για να προσδεθούν παθητικά στο ΚΣΙ τάξης Ι και να παρουσιαστούν σωστά, προκειμένου να αναγνωριστούν από τα Τ κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Η προσθήκη πρωτεασών στην καλλιέργεια μπορεί να βοηθήσει αυτή την διαδικασία [Rodda SL (1997)]. Η ανικανότητα της απόκρισης ακόμη και ενός γνωστού Τ λεμφοκυτταρικού επιτόπου μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες όπως: πολύ χαμηλή συγκέντρωση πεπτιδίου ή πολύ υψηλή (τοξική δόση), ανεπαρκή ή ασύμβατα ΑΠΚ, τα Τ κύτταρα μπορεί να βρίσκονται σε στάδιο ανεργίας την χρονική στιγμή που προσθέτονται τα πεπτίδια, το πεπτίδιο μπορεί να μην έχει τη σωστή μορφή (πολύ μεγάλο, πολύ μικρό ή μη σωστής αλληλουχίας), η ποσότητα του θρεπτικού υλικού να είναι ανεπαρκής, ακατάλληλος



4.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.

Μέχρι σήμερα έχει ανακαλυφθεί μια πλειάδα τεχνικών ανίχνευσης των αυτοαντισωμάτων (και γενικότερα των αντισωμάτων). Από αυτές ξεχωρίζουμε την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού που είναι ίσως η παλαιότερη τεχνική και η πιο γενικευμένη στην αναγνώριση των αυτοαντισωμάτων, την τεχνική της ανοσοδιάχυσης -ανοσοηλεκτροφόρησης, και τις πιο εξειδικευμένες τεχνικές της ανοσοαποτύπωσης, της ανοσοκαθίζησης και της ELISA.

4.3.1. ΕΜΜΕΣΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (ΕΑ) είναι η πιο απλή τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των αντιτυρηνικών αντισωμάτων (ANA) [Mc Carty και συν (1984)]. Η τεχνική αυτή σήμερα χρησιμοποιείται ως αρχική εξέταση ρουτίνας -λόγω της έλλειψης ειδικότητας - και οι οροί που βρίσκονται θετικοί εν συνεχεία εξετάζονται με άλλες τεχνικές που δίνουν λεπτομερέστερες πληροφορίες.

Έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά υποστρώματα, όπως παγωμένες τομές ιστών από ήπαρ, νεφρά ποντικού, ή κύτταρα καλλιέργειών, όπως τα Hep-2 καρκινικά κύτταρα επιθηλίου λάρυγγα. Επί των υποστρωμάτων αυτών επιδρά ο υπό εξέταση ορός, συνήθως αραιωμένος (1: 40 ή 1:80). Αυτό γίνεται για την αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Έχει βρεθεί ότι ποσοστό 4% υγιών ατόμων εμφανίζει αντιτυρηνικά αντισώματα χαμηλού τίτλου. Τα κύτταρα εν συνεχεία πλένονται και



ακολουθεί η προσθήκη του δεύτερου αντισώματος που είναι προσδεμένο με την κατάλληλη φθορίζουσα ομάδα στην κατάλληλη αραίωση.

Συνήθως για δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιείται αντι-ανθρώπινη γ-σφαιρίνη σε κουνέλι ή αίγα, προσδεμένο με ισοθειοκυανική φλουοροεσκεΐνη. Μετά το πλύσιμο της περίσσειας του δεύτερου αντισώματος ακολουθεί η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του φθορισμού που παρατηρείται από το μικροσκόπιο.

Εντοπίζονται συνήθως -και ανάλογα με το αντιγόνο που ανιχνεύεται -οι ακόλουθοι τύποι ανοσοφθορισμού:

Ο πυρηνικός που μπορεί να είναι περιπυρηνικός (σπάνιος), ομοιογενής, στικτός (αδρός ή λεπτός), πυρηνισκικός, αντικεντρομεριδιακός, ετερογενής.

Ο κυτταροπλασματικός, ο οποίος ανάλογα με τα αντιγόνα που τον δημιουργούν μπορεί να είναι λεπτός στικτός, ριβοσωμικός, αδρών κυτταροπλασματικών οργανιδίων (πχ αντιμιτοχονδριακός), ινιδίων ακτίνης, βιμεντίνης. Και τέλος ο ανοσοφθορισμός της μιτωτικής ατράκτου, των κεντριολίων και των κέντρων οργάνωσης της ατράκτου.

4.3.1.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ANTI-La/SSB ΜΕ ΤΟΝ ΕΜΜΕΣΟ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟ.

Ειδικότερα το αντιγόνο La/SSB εντοπίζεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα όλων των ειδών που έχουν ως τώρα ελεγχθεί (άνθρωπο, ποντίκι, αρουραίο, γάτα, σκυλί, βόδι, χοίρο, πρωτεύοντα, *Xenopus laevis* αμφίβιο, *S. cerevisiae* μύκητα κ.α.) [Holborow et al 1957, Friou GJ 1957, Holman et al 1957] σε κύτταρα όπως: ινοβλάστες, ηπατοκύτταρα, κύτταρα μυελού των οστών, ενδοθηλιακά, νευρώνες κ.α. Εντοπίζεται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, στον πυρήνα του κυττάρου και επομένως



οποιαδήποτε κυτταρική σειρά και αν χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα -πηγή αντιγόνου θα μπορέσει να αναδείξει την ύπαρξή τους στον υπό εξέταση ορό. Έχουν περιγραφεί διάφοροι τύποι ανοσοφθορισμού, ο τύπος όμως που επικρατεί, όταν ο ορός περιέχει αντισώματα αντι-La/SSB, είναι ο λεπτός στικτός πυρηνικός ο οποίος χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση φθορίζοντων κοκκίων εντός του πυρήνα. Η χρώση του πυρήνα είναι ομοιόμορφη και μερικές φορές τόσο έντονη, ώστε να φαίνεται ομοιογενής παρά στικτή. Έχει αναφερθεί επίσης και φθορισμός των πυρηνίσκων [Deng et al 1981] από ορό με αντισώματα αντι-La/SSB. Ο Deng και συν παρατήρησαν και διαφορά στην μορφή / τύπο του φθορισμού, όταν ίδιοι τύποι κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετική φάση του κυτταρικού τους κύκλου. Συγκεκριμένα ο στικτός τύπος εμφανιζόταν στην G₀ φάση του κυτταρικού κύκλου, ενώ στην G₁ και S φάση υπήρχε φθορισμός και στον πυρηνίσκο.

Ο τύπος του λεπτού στικτού φθορισμού επί των διαφόρων κυτταρικών υποστρωμάτων που προκαλεί η παρουσία των αντισωμάτων αντι-La/SSB, έχει αποδειχθεί με την χρησιμοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-La/SSB, ο οποίος μάλιστα ανεστάλη, όταν το αντι-La/SSB μονοκλωνικό αντίσωμα προεπωάστηκε με καθαρή πρωτεΐνη La/SSB [Harley et al 1985].

Η τεχνική αυτή ωστόσο δεν είναι ειδική μόνο για τα αντι-La/SSB αντισώματα, διότι στικτό πυρηνικό ανοσοφθορισμό εμφανίζουν σε κυτταρικά υποστρώματα οροί που φέρουν αντισώματα κατά των πυρηνικών αντιγόνων Sm, U1RNP, Scl 70.

Το πιο διαδεδομένο κυτταρικό υπόστρωμα για την ανίχνευση των πυρηνικών αντιγόνων είναι τα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα Hep 2 από λαρυγγικό καρκίνωμα και ακολουθούν οι τομές ήπατος και νεφρών τρωκτικών.



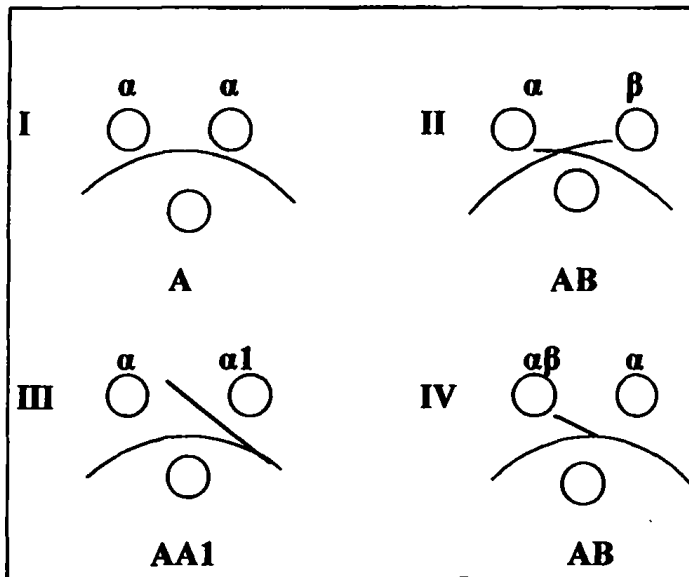
4.3.2. ΑΝΟΣΟΔΙΑΧΥΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΘΕΤΗ ΑΝΟΣΟΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.

Η ανοσοηλεκτροφόρηση (Counterimmunoelectrophoresis CIE) και η διπλή ανοσοδιάχυση (Ouchterlony) είναι δύο από τις μεθόδους που εξυπηρετούν την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων μετά από τον σχηματισμό συμπλόκου με αντιγόνα, κυρίως πυρηνικής προέλευσης (Extractable Nuclear Antigens ENAs) [Ouchterlony et al 1978].

Και οι δύο τεχνικές επιτρέπουν την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων ορού διαφορετικής ειδικότητας, καθώς σχηματίζονται αδιάλυτες ιζηματικές γραμμές σε γέλη αγαρόζης με την χρήση κυτταρικών εκχυλισμάτων ως πηγή αντιγόνου. Οι ιζηματικές γραμμές εν συνεχεία συγκρίνονται με ανάλογες ορών γνωστής ειδικότητας. Όταν οι γραμμές αυτές ενώνονται σχηματίζοντας μια συνεχή γραμμή, τότε τα αυτοαντισώματα των δύο ορών σχηματίζουν ταυτότητα, δηλ. αναγνωρίζουν το ίδιο αντιγόνο. (σχήμα 18 I). Όταν οι ιζηματικές γραμμές τέμνονται, τότε οι οροί έχουν διαφορετικής ειδικότητας αντισώματα (Σχήμα 18 II). Ωστόσο υπάρχει και η περίπτωση οι ιζηματικές γραμμές να τέμνονται μερικώς (Σχήμα 18 III, IV). Στην περίπτωση αυτή οι οροί μπορεί να περιέχουν αντισώματα που στρέφονται εναντίον του ίδιου αντιγόνου, αναγνωρίζουν όμως διαφορετικούς επιτόπους, ή/και μπορεί να αντιδρούν διασταυρωτά με διαφορετικά αντιγόνα. Η CIE τεχνική είναι γρήγορη και μπορεί να ανιχνεύσει ειδικά αντισώματα σε συγκέντρωση τόσο μικρή, όσο 20μg/ml (είναι 10 φορές πιο ευαίσθητη από την ανοσοδιάχυση). Απαραίτητη προϋπόθεση είναι ότι το αντιγόνο πρέπει να είναι αρνητικά φορτισμένο, έτσι ώστε να σχηματίζεται ηλεκτροωσμωτική ροή. Κάτω από αυτές τις συνθήκες αντισώματα και αντιγόνα μετακινούνται αντίθετα, με την βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου, προς τον σχηματισμό



ιζηματικής γραμμής στο σημείο ισοδύναμης αναλογίας τους [Isenberg et al 1987, McCarty et al 1984].



Σχήμα 18. Τυπικές μορφές ιζηματικών γραμμών στην διπλή ανοσοδιάχυση
 α , β , $\alpha 1$, $\alpha \beta$: αντισώματα,
 A , AB , $AA1$: αντιγόνα.

4.3.2.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙ-La/SSB ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΟΣΟΔΙΑΧΥΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΤΙΘΕΤΗ ΑΝΟΣΟΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.

Είναι ίσως οι κλασικότερες μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης των αντι-La/SSB αντισωμάτων. Οι τεχνικές αυτές είναι ικανές να ανιχνεύσουν τα αντι-La/SSB χωρίς να προσδιορίσουν την ποσότητά τους και έχουν υψηλή ειδικότητα, αλλά χαμηλή ευαισθησία.

Ωστόσο η χρήση ιδίως της αντίθετης ανοσοηλεκτροφόρησης (CIE) σε καθημερινή βάση σε εργαστήριο ρουτίνας συγκεντρώνει τα θετικά χαρακτηριστικά της απλότητας – ευχρηστίας και της αρκετά καλής, αποδεκτής ευαισθησίας. Το βασικότερο μειονέκτημά της είναι το γεγονός ότι είναι ποιοτική και όχι ποσοτική



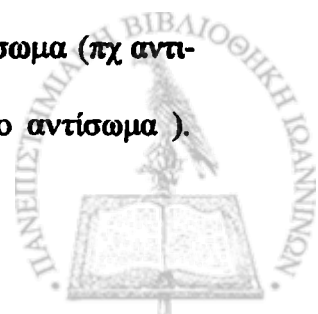
τεχνική, καθώς και η διαρκής εξάρτησή της από ορούς μάρτυρες (controls) [Meilof et al 1990, Manoussakis et al 1993].

Η ευαισθησία της CIE ως προς την ανίχνευση των αντι-La/SSB αντισωμάτων μπορεί να βελτιωθεί, αν χρησιμοποιηθούν εκχυλίσματα που προέρχονται από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές [Manoussakis et al 1996].

4.3.3. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης περιλαμβάνει διάφορα στάδια. Αρχικά το πρωτεϊνικό εκχύλισμα (πυρηνικό, κυτταροπλασματικό ή ολικό) αναλύεται στα επιμέρους συστατικά του, καθώς εξαπλώνεται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σε γέλη πολυακρυλαμιδίου. Ο διαχωρισμός αυτός των πρωτεϊνών γίνεται βάσει του μοριακού βάρους τους, εφόσον το φορτίο τους έχει ουσιαστικά αρνητικοποιηθεί από τα μόρια του αρνητικά φορτισμένου αποδιατακτικού παράγοντα, του απορρυπαντικού δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS). Εν συνεχεία ακολουθεί η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών της γέλης σε χαρτί νιτροκυτταρίνης και η ανοσοαποτύπωση, η οποία χαρακτηρίζεται σε γενικές γραμμές από τα ακόλουθα βήματα:

- Η νιτροκυτταρίνη τεμαχίζεται σε επιμήκεις ταινίες προκειμένου να ελεγχθούν περισσότεροι του ενός οροί. Σε κάθε ταινία δεσμεύονται οι θέσεις εκείνες που δεν έχουν πρωτεΐνες, προκειμένου να εμποδιστεί τυχόν μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων σε αυτή, δεδομένου του ότι και οι ανοσοσφαιρίνες είναι πρωτεΐνες.
- Οι ταινίες επωάζονται με τους υπό εξέταση ορούς-δείγματα (πρώτο αντίσωμα).
- Το σύμπλοκο αντιγόνου αντισώματος ανιχνεύεται με δεύτερο αντίσωμα (πχ αντι-ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη, αν χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο πρώτο αντίσωμα).



Το δεύτερο αντίσωμα είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με κάποιο ανιχνευτή, πχ ένζυμο ή σωματίδιο χρυσού.

- Οι ταινίες επάζονται σε κατάλληλο υπόστρωμα, στο οποίο σχηματίζονται αδιάλυτα, έγχρωμα προϊόντα στην περιοχή ύπαρξης του συμπλόκου αντιγόνο-πρώτο αντίσωμα -δεύτερο αντίσωμα. (στην περίπτωση χρήσης δευτέρου αντισώματος με σφαιρίδια χρυσού οι πρωτεϊνικές θέσεις γίνονται ορατές χωρίς την εκτέλεση του τελευταίου σταδίου.)

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της ανοσοαποτύπωσης σε σύγκριση με τις προαναφερθείσες τεχνικές είναι ότι η πρωτεΐνη επί της νιτροκυτταρίνης είναι απευθείας προσπελάσιμη από τα αντισώματα. Το σύνολο των πρωτεϊνών που αποκτήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση, παραμένει στην νιτροκυτταρίνη και δεν χάνεται λόγω διάχυσης στα επόμενα στάδια. Επιπλέον η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης απαιτεί μικρούς όγκους αντιγόνων και σχετικά μικρό χρόνο προετοιμασίας [Beisiegel U (1986), Gershoni JM (1987), Tovey ER (1987), Garfin D (1989), Hoch SO (1989)].

4.3.3.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ANTI-La/SSB ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (IMMUNOBLOT -IB).

Η ανίχνευση των αντι-La/SSB αντισωμάτων με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης είναι αρκετά ευαίσθητη και αποδοτική. Κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά κυτταρικά εκχυλίσματα τόσο κυτταροπλασματικά, όσο και πυρηνικά προερχόμενα από διάφορες κυτταρικές σειρές [Habets et al 1983, Hoch et al 1984] που έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της ανίχνευσης του La/SSB αντιγόνου με ανοσοαποτύπωση είναι το γεγονός ότι

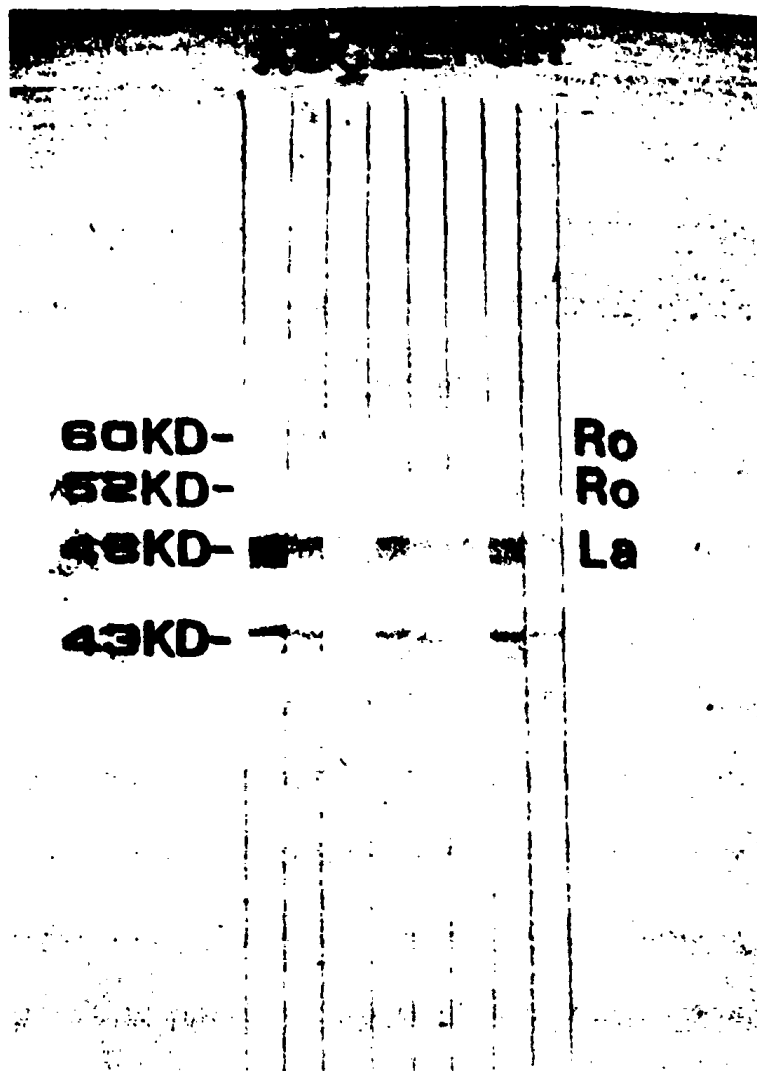


εντοπίζεται σε περισσότερες από μία ζώνες λόγω της εύκολης πρωτεόλυσής του. Η La/SSB πρωτεΐνη κατόπιν πρωτεόλυσης διασπάται στις πεπτιδικές αλυσίδες που αντιστοιχούν σε μοριακό βάρος 23, 28 και 30KD από 48KD αρχικού μοριακού βάρους.

Μειονέκτημα της ανοσοαποτύπωσης θεωρείται το γεγονός ότι η πρωτεΐνη La/SSB (48KD) μετακινείται κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης στην γέλη πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) μαζί με την Ro/SSA (52KD) και δυσχεραίνεται η ταυτοποίησή τους. Ωστόσο αλλαγές στη σύσταση της γέλης έτσι, ώστε οι πόροι της γέλης να αποκτήσουν μικρότερη διατομή (χρήση γέλης με περισσότερη ποσοστιαία σύσταση σε ακρυλαμίδιο από 10% σε 15% και μικρότερη συγκέντρωση δισακρυλαμιδίου) βοήθησαν στο να αποχωριστούν οι δύο πρωτεΐνες σε ξεχωριστές, διακριτές ζώνες [Buyon et al 1990] (Σχημ. 19). Η χρήση εκχυλισμάτων που προέρχονται από κυτταρικές σειρές διαφόρων ειδών, έχουν πρωτεΐνη La/SSB διαφορετικού μοριακού βάρους με συνέπεια να μεταναστεύει σε διαφορετικές περιοχές π.χ. η πρωτεΐνη La/SSB κυτταρικής σειράς ποντικού, η οποία μεταναστεύει ελαφρώς γρηγορότερα (47KD) σε σύγκριση με αυτή του ανθρώπου και της πρωτεΐνης La/SSB βοός (~50KD).

Η ανοσοαποτύπωση θεωρείται ως μια αποτελεσματική και με υψηλή ευαισθησία τεχνική ανίχνευσης των αντισωμάτων αντι-La/SSB. Ωστόσο δεν είναι εξίσου αποτελεσματική στην ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-Ro/SSA, γεγονός το οποίο αποδίδεται στο ότι αντισώματα αντι-Ro/SSA στρέφονται κυρίως σε επιτόπους διαμόρφωσης, ενώ τα αντισώματα αντι-La/SSB αναγνωρίζουν και γραμμικούς επιτόπους, η ανίχνευση των οποίων ευνοείται λόγω των συνθηκών μετουσίωσης, στις οποίες ηλεκτροφορούνται και «παρουσιάζονται» με την ανοσοαποτύπωση.





Σχήμα 19: Διαχωρισμός των πρωτεϊνών του συμπλόκου RoRNP στα επιμέρους συστατικά του (Ro 60KD, Ro 52KD, La 48KD και των προϊόντων της πρωτεόλυσης) όπως αυτό πραγματοποιήθηκε από την Γιαννάκη Ε. και συν. με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Οι ταινίες νιτροκυτταρίνης από Α έως Η έχουν επωαστεί με αντι-La/SSB, αντι-Ro/SSA θετικούς ορούς.

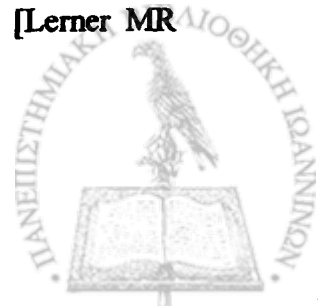
Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, παρόλη την υψηλή ευαισθησία της στην ανίχνευση των αντι-La/SSB και το πλεονέκτημα της άμεσης εξαγωγής συμπερασμάτων, δεν ενδείκνυται για χρήση σε εργαστήριο ρουτίνας λόγω της πολυπλοκότητας της μεθόδου.

4.3.4. ΑΝΟΣΟΚΑΘΙΖΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ ΜΟΡΙΑ RNA.

Η πλειοψηφία των αυτοαντισωμάτων αναγνωρίζει και αντιδρά με αντιγόνα, τα οποία στην φυσική τους κατάσταση είναι συστατικά κυτταρικών οργανιδίων ή συμπλόκων. Τα κύρια συστατικά των συμπλόκων αυτών είναι πρωτεΐνες και μόρια RNA. Η ειδική ανοσοκατακρήμνιση, στην οποία χρησιμοποιούνται συγκεκριμένα αυτοαντισώματα, οδηγεί στην κατακρήμνιση όχι μόνο των αντιγόνων-στόχων, αλλά ολοκλήρου του μοριακού συμπλόκου, στο οποίο συμμετέχει το αντιγόνο-στόχος.

Η τεχνική αυτή συμπεριλαμβάνει τη "βιοσήμανση" των κυτταρικών συστατικών των κυττάρων που βρίσκονται σε καλλιέργεια με ραδιοσημασμένα αμινοξέα, όπως η [³⁵S]-μεθειονίνη. Ακολουθεί η λύση των ραδιοσημασμένων κυττάρων και το εκχύλισμά τους αντιδρά με τα αυτοαντισώματα. Η απομόνωση και ανοσοκατακρήμνιση των ανοσοσυμπλεγμάτων γίνεται με την χρήση σφαιριδίων σεφαρόζης-πρωτεΐνης A του σταφυλόκοκκου *S. aureus*. Η πρωτεΐνη-A συνδέεται ισχυρά με το Fc τμήμα των IgG αντισωμάτων και βοηθά στην αποτελεσματικότερη ανοσοκατακρήμνιση του ανοσοσυμπλόκου. Το σημασμένο αντιγόνο διαχωρίζεται με ηλεκτροφόρηση και εμφανίζεται σε ραδιοευαίσθητο φιλμ [[Kessler MR (1979)].

Η τεχνική της ανοσοκαθίζησης επιτρέπει την ανίχνευση εκτός των πρωτεϊνών και των RNA συστατικών των κυτταρικών συμπλόκων. Τα RNA συστατικά αυτών των συμπλόκων είναι συνήθως πολυάριθμα και μοναδικού μικρού μοριακού βάρους το καθένα. Η ανοσοκατακρήμνιση των RNPs με ορούς ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα και η ανάλυση των RNAs τους αποτελεί μια ευαίσθητη τεχνική υψηλής ειδικότητας ως προς την ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων των ορών [Lerner MR (1979), Pettersoon J (1984), Meilof JF (1990)].



Στην προκειμένη περίπτωση γίνεται ραδιοσήμανση του DNA με ^{32}P ή του RNA με ^3H ουρακίλη, ενώ η ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης με ουρία ως αποδιατακτικό παράγοντα διαχωρίζει τα RNA ή DNA μόρια. Η τεχνική αυτή επιτρέπει τη χρήση μη ραδιενεργών εναλλακτικών υλικών για την ανίχνευση των RNAs, όπως είναι πχ η ευαίσθητη τεχνική χρώσης του αργυρού "silver staining" που χρησιμοποιείται για την χρώση των μορίων RNA σε διάλυμα νιτρικού αργύρου AgNO_3 .

4.3.4.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙ-La/SSB ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΟΣΟΚΑΘΙΖΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ ΜΟΡΙΑ RNA (RNA IMMUNOPRECIPITATION).

Η ανοσοκαθίζηση των RNAs είναι μια ευαίσθητη μέθοδος που στηρίζεται στην ανίχνευση των μικρών μορίων Y RNA, τα οποία βρίσκονται σε σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη Ro/SSA και La/SSB και ανοσοκατακρημνίζονται μαζί με αυτές από τα αντισώματα αντι-Ro/SSA και αντι-La/SSB των ορών. Επιπλέον, τα αντι-La/SSB αντισώματα ανοσοκατακρημνίζουν και άλλα μικρά μόρια RNA, όπως pre-tRNA, 5S RNA, ιικά RNA, μεταγραφήματα της RNA πολυμεράσης III (βλέπε σύνδεση της La/SSB με RNA μόρια) και η ιδιότητα αυτή της La/SSB πρωτεΐνης βοηθά την εύκολη ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-La/SSB, τα οποία επιπλέον διαχωρίζονται και διακρίνονται πιο εύκολα από τα αντισώματα αντι-Ro/SSA, τα οποία κατακρημνίζουν διαφορετικά μόρια RNA [Forman et al 1985, Lerner et al 1979, Lerner et al 1981].

Γενικά η ανοσοκαθίζηση των RNAs είναι ανώτερη από άποψη ευαισθησίας και ειδικότητας στην ανίχνευση των αντι-La/SSB αντισωμάτων, σε σύγκριση με τις



προαναφερθείσες τεχνικές. Η πολυπλοκότητα της εκτέλεσής της ωστόσο, καθώς και η ανάγκη χρησιμοποίησης ραδιοϊσοτόπων, δεν επιτρέπει την καθημερινή εφαρμογή της για διαγνωστικό σκοπό.

Η ανίχνευση των RNA που έχουν καθιζάνει γίνεται συνήθως με ραδιοϊσότοπα. Ο Forman και συν [1985] έδειξαν ότι η χρώση με άργυρο ή με αιθίδιο βρωμίδιο μπορούν επιτυχώς να αντικαταστήσουν την ραδιοσήμανση στην ανίχνευση των RNA που σχηματίζουν σύμπλοκα με την πρωτεΐνη La/SSB. Οι Slobbe και συν [1991] χρησιμοποιώντας εκχύλισμα κυττάρων HeLa μολυσμένων με αδenoϊό τύπου 5 ως πηγή αντιγόνου, αύξησαν την ευαισθησία της τεχνικής ως προς την ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-La/SSB σε σύγκριση με την ευαισθησία της CIE και της ανοσοαποτύπωσης, λόγω του αυξημένου αριθμού των RNA που σχηματίζουν σύμπλοκα με την πρωτεΐνη La/SSB, προστιθέμενων των ιικών RNA [Slobbe et al 1991].

4.3.5. ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Η ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) είναι μια τεχνική πολύ δημοφιλής για την ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων και για την έγκυρη διάγνωση των ρευματικών παθήσεων. Η ELISA απαιτεί σε πρώτο στάδιο την πρόσδεση του αντιγόνου ή του αντισώματος σε στερεή επιφάνεια. Στο επόμενο στάδιο γίνεται η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος και τέλος η ανίχνευση του ανοσοσυμπλόκου, μέσω της ενζυμικής διάσπασης του κατάλληλου υποστρώματος από το συζευγμένο με ένζυμο-αντίσωμα ή αντιγόνο, το οποίο δίνει το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης.



Υπάρχουν πολλές παραλλαγές, με τις οποίες μπορεί να πραγματοποιηθεί η ELISA. Το ποια από αυτές τις παραλλαγές θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το τι ακριβώς θέλουμε να ανιχνεύσουμε το αντιγόνο ή το αντίσωμα. Γενικά διακρίνονται τρεις κατηγορίες: (1) η τεχνική σύζευξης του αντισώματος, (2) η τεχνική σύζευξης του αντιγόνου και (3) η Sandwich ELISA των δύο αντισωμάτων. Η γενική πορεία των τριών αυτών τεχνικών φαίνεται στο σχήμα 20 I, II, III

Στην τεχνική σύζευξης του αντισώματος το αντιγόνο προσκολλάται στο στερεό υπόστρωμα και το σημασμένο αντίσωμα συνδέεται σε αυτό (μπορεί να χρησιμοποιηθεί δεύτερο σημασμένο αντίσωμα για να εντοπιστεί το πρώτο αντίσωμα). Μετά από το πλύσιμο μετράται το ποσό του αντισώματος που παρέμεινε συζευγμένο με το αντιγόνο. Στην τεχνική σύζευξης του αντιγόνου το αντίσωμα προσκολλάται στο στερεό υπόστρωμα και το συζευγμένο αντιγόνο αντιδρά με αυτό. Μετά το πλύσιμο του συμπλόκου και αφού απομακρυνθεί η περίσσεια του αντιγόνου, γίνεται ποσοτική εκτίμηση του αντιγόνου που προσδέθηκε στο αντίσωμα. Στη Sandwich ELISA το αντίσωμα προσκολλάται στο στερεό υπόστρωμα (συνήθως πρόκειται για κάποιο μονοκλωνικό αντίσωμα γνωστής ειδικότητας) και το αντιγόνο αφήνεται να αντιδράσει με το 1^ο αντίσωμα. Η αντίδραση μετράει το ποσό του 2^{ου} σημασμένου αντισώματος που αντιδρά με το αντιγόνο.

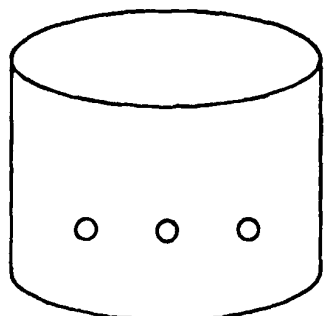
Οποιοσδήποτε τύπος ELISA και αν χρησιμοποιηθεί, υπάρχουν κάποιες γενικές οδηγίες που θα πρέπει να ακολουθούνται:

ΣΤΕΡΕΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ:

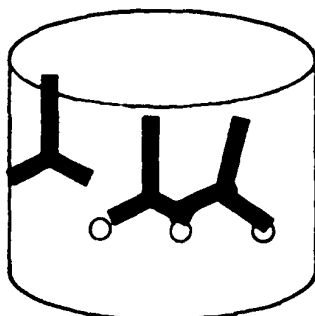
Τα στερεά υποστρώματα, επάνω στα οποία σταθεροποιείται το αντιγόνο αποτελούνται συνήθως ή από πολυστυρένιο ή πολυβινυλοχλωρίδιο. Ως γενικότερος κανόνας ισχύει ότι το πολυστυρένιο μπορεί να σταθεροποιήσει λιγότερες πρωτεΐνες,



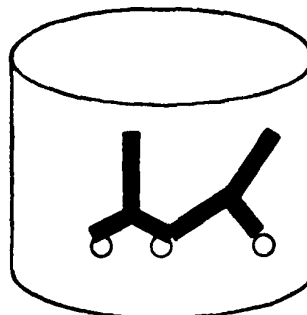
αλλά ο "θόρυβος" (background) που προκύπτει από τις μη ειδικές προσδέσεις είναι μικρότερος. Το πολυβίνυλοχλωρίδιο έχει μεγαλύτερη χωρητικότητα, κάτι όμως που



Πρόσδεση του αντιγόνου στο στερεό υπόστρωμα.

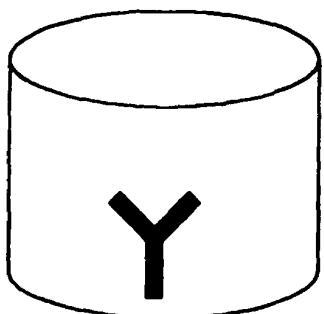


Σύνδεση του αντισώματος στο αντιγόνο

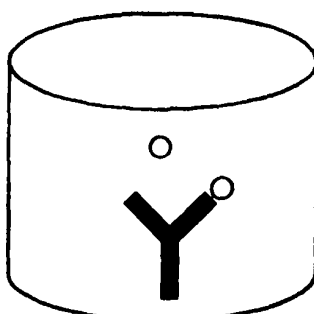


Ποσοτικός προσδιορισμός του αντισώματος.

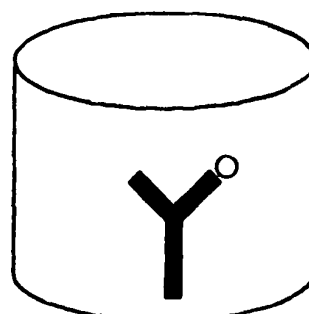
I. ELISA σύζευξης του αντισώματος.



Πρόσδεση του αντισώματος στο στερεό υπόστρωμα.

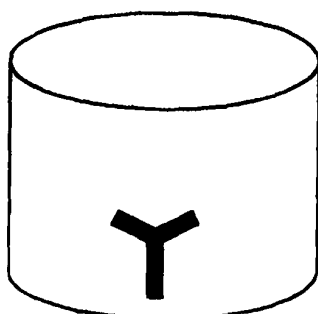


Σύνδεση του αντιγόνου στο αντίσωμα

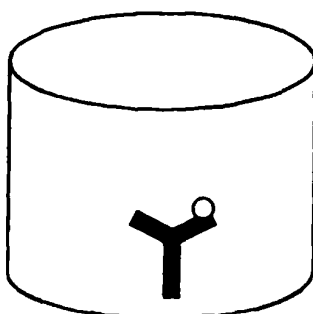


Ποσοτικός προσδιορισμός του αντιγόνου.

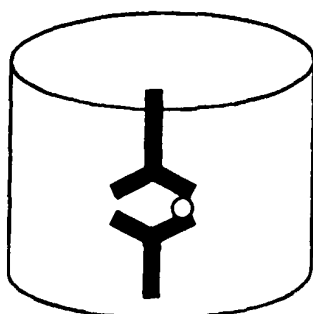
II ELISA σύζευξης του αντιγόνου.



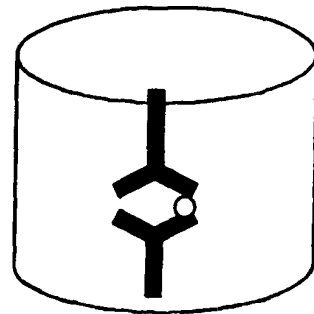
Πρόσδεση του 1ου αντισώματος στο στερεό υπόστρωμα.



Σύνδεση του αντιγόνου στο αντίσωμα



Σύνδεση του 2^{ου} αντισώματος στο αντιγόνο



Ποσοτικός προσδιορισμός του 2^{ου} αντισ.

III Sandwich ELISA

Σχήμα 20: Είδη της ELISA



μπορεί να επιφέρει την ανεπιθύμητη προσρόφηση οποιασδήποτε "ξένης" πρωτεΐνης θα βρεθεί στο διάλυμα. Οποσδήποτε το πολυβύνιλοχλωρίδιο είναι η σωστή επιλογή, όταν υπάρχουν μικρές διαθέσιμες ποσότητες αντιγόνου και απαιτείται η μέγιστη απορρόφηση αυτών. Επιπλέον η προσρόφηση του αντιγόνου σε αυτό απαιτεί μικρότερους χρόνους επώασης.

Η πρόσδεση των πρωτεϊνών επί του πλακιδίου γίνεται με την συμβολή των υδροφοβικών δυνάμεων (δεσμοί Van Der Waals) ή/και δεσμών υδρογόνου. Ωστόσο έχουν κατασκευαστεί ειδικά μικροπλακίδια τα επονομαζόμενα Covalink, τα οποία επιτρέπουν την ομοιοπολική πρόσδεση των συνθετικών κυρίως πεπτιδίων επί των πλακιδίων αυτών [Sndergaard-Anderson J (1996)]. Μία ακόμη παραλλαγή του συνηθισμένου τρόπου κάλυψης των μικροπλακιδίων ELISA είναι με την χρήση του συστήματος βιοτίνης -στρεπταβιδίνης. Τα πλακίδια αρχικά επιστρώνονται με την πρωτεΐνη στρεπταβιδίνη (πρόκειται για πρωτεΐνη με μεγάλο σχετικά μοριακό βάρος και μπορεί να προσροφηθεί αποτελεσματικότερα και χωρίς το κίνδυνο διαφυγής της στα ενδιάμεσα στάδια πλυσίματος), ακολουθεί η προσθήκη σε επόμενο στάδιο των βιοτινιωμένων πεπτιδίων, τα οποία συνδέονται με την στρεπταβιδίνη μέσω της βιοτίνης, με την οποία αλληλεπιδρούν πολύ αποτελεσματικά (η αναλογία δέσμευσης βιοτίνης προς στρεπταβιδίνη είναι 3:1 Σχήμα 21). Κατ' αυτό τον τρόπο τα πεπτίδια προσκολλώνται ισχυρότερα, σίγουρα και με υψηλή σχετικά πυκνότητα κάλυψης του πλακιδίου.

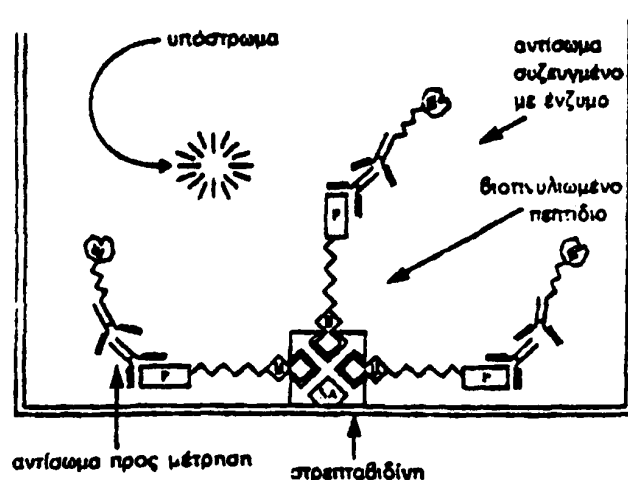
Ιδιαίτερη σημασία στην επίστρωση του πλακιδίου έχει το μέγεθος της πρωτεΐνης, η ιονική ισχύς του διαλύματος στο οποίο διαλύεται η πρωτεΐνη, η παρουσία σ' αυτό απορρυπαντικού όπως το Tween 20, ο χρόνος και η θερμοκρασία.



ΔΕΥΤΕΡΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ

Τα περισσότερα δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιούνται στην ELISA είναι κυρίως ανοσοσφαιρίνες που συνδέονται ομοιοπολικά με κάποιο ένζυμο, το οποίο αντιδρά με ένα χρωμογόνο υπόστρωμα. Το πιο συνηθισμένο ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι η αλκαλική φωσφατάση. Η αλκαλική φωσφατάση δεν απαιτεί την προσθήκη κάποιου άλλου παράγοντα για να αναπτυχθεί το χρώμα, μπορεί να αφηθεί να αντιδράσει με το υπόστρωμα μέχρι η οπτική απορρόφηση του διαλύματος να φτάσει το απαιτούμενο επίπεδο. Άλλα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι η ουρεάση, χρησιμοποιείται κυρίως για άμεση παρατήρηση αλλαγής χρώματος όταν δεν υπάρχει κατάλληλος εξοπλισμός για την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης, η υπεροξειδάση, η β-γαλακτοσιδάση, η οξειδάση της γλυκόζης. Τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιούνται όταν το αντιγόνο παρουσιάζει δράση φωσφατάσης.

Το ένζυμο μπορεί να προσδεθεί αντί των ανοσοσφαιρινών στην πρωτεΐνη-A, μόνο στην περίπτωση που το υπό μελέτη αντιγόνο μπορεί να αντιδράσει με αυτή.



Σχήμα 21: Σχηματική αναπαράσταση σύνδεσης ενός μορίου στρεπταβιδίνης με τρία μόρια βιοτίνης-πεπτιδίου σε φρεάτιο πλακιδίου ELISA.



ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ.

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται, είναι ουσίες που στη φυσική τους μορφή είναι άχρωμες και παράγουν κάποιο έγχρωμο προϊόν, όταν διασπαστούν από κάποιο ένζυμο. Τα περισσότερα απαιτούν την πάροδο ενός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος ενώ κάποια από αυτά την προσθήκη ενός διαλύματος που θα κάνει ορατά τα προϊόντα διάσπασης από το ένζυμο (stop solution).

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΛΥΨΗΣ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΘΕΣΕΩΝ ΤΟΥ ΠΛΑΚΙΔΙΟΥ

Από τη στιγμή που το αντιγόνο έχει προσροφηθεί στο πλακίδιο, κάποιες θέσεις του θα παραμείνουν κενές. Προκειμένου να αποφευχθεί η πρόσδεση του υπό εξέταση αντισώματος στις κενές θέσεις, αυτές καλύπτονται σε προηγούμενο στάδιο από διάλυμα πρωτεϊνών. Τα διαλύματα αυτά περιέχουν πρωτεΐνες με τις οποίες δεν αντιδρούν τα αντισώματα, όπως η καζεΐνη, η αλβουμίνη βοός, η οβαλβουμίνη κ.α.

Κάθε στάδιο της ELISA ωστόσο υπόκειται στους γενικότερους κανόνες αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών, οι οποίοι καθορίζονται από το χρόνο, τη θερμοκρασία και το ρυθμιστικό διάλυμα, στο οποίο βρίσκονται.

Ο χρόνος, στον οποίο αφήνονται να αλληλεπιδράσουν τα αντιγόνα με τα αντισώματα, είναι σημαντικός. Μεγαλύτερος χρόνος επώασης απαιτείται, όταν το σύστημα αντιγόνου-αντισώματος είναι μικρής συγγένειας. Επιπλέον τόσο το αντιγόνο, όσο και το αντίσωμα διατηρούν την τριτοταγή τους διαμόρφωση, η οποία όμως δεν είναι στατική, αλλάζει διαρκώς. Όταν αυτά προσεγγίσουν το ένα το άλλο και εφόσον έχουν ^{ήδη} πάρει την κατάλληλη διαμόρφωση, θα μπορέσουν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους. Η διαδικασία αυτή απαιτεί την πάροδο κάποιου χρονικού διαστήματος. Ωστόσο, μακράς διάρκειας επώαση των πλακιδίων με το



αντιγόνο μπορεί να επιφέρει αντίθετο από το επιθυμητό αποτέλεσμα: όπως το ότι μόρια μπορεί να αρχίσουν να αποκολλώνται από το πλακίδιο και τις θέσεις τους να τις καταλαμβάνουν αντισώματα αυξάνοντας το θόρυβο και τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Η θερμοκρασία είναι ένας σημαντικός παράγοντας, εφόσον μεγάλες σχετικά θερμοκρασίες (37°C) αυξάνουν την κινητικότητα των μορίων και αυτά προσεγγίζονται μεταξύ τους γρηγορότερα και αποτελεσματικότερα. Πάντα όμως υπάρχει ο κίνδυνος μετουσίωσης των πρωτεϊνών σε αυξημένες θερμοκρασίες και κατ'επέκταση της απώλειας της δραστηκής τους διαμόρφωσης.

Η ιονική ισχύς του διαλύματος, στο οποίο είναι διαλυμένη μία πρωτεΐνη, έχει ιδιαίτερη σημασία, όπως και το pH και η παρουσία ή όχι απορρυπαντικών (πχ Tween 20), εφόσον επηρεάζουν άμεσα την διαλυτότητά του σε αυτό και την "παρουσίασή" του στο αντιγόνο ή το αντίσωμα.

4.3.5.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙ-La/SSB ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ELISA

Η ELISA θα μπορούσε να θεωρηθεί η πλέον ενδεδειγμένη μέθοδος για την ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-La/SSB. Συνδυάζει τα χαρακτηριστικά της υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, καθώς και της ευχρηστίας, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την καθημερινή ανίχνευση των εν λόγω αντισωμάτων.

Πολλοί ερευνητές πραγματοποιώντας συγκριτικά πειράματα, για να εξακριβώσουν την καλύτερη τεχνική για την ανίχνευση των αντι-La/SSB αντισωμάτων, είχαν καταλήξει ανεξάρτητα ο καθένας στο κοινό συμπέρασμα ότι η ELISA ήταν η βέλτιστη τεχνική. Οι Venabes και συν [1983], Harley και συν [1984],



Yamagata και συν [1984], Harley και συν [1986] χαρακτήρισαν την ELISA ως καλύτερη τεχνική από την αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (CIE) και την ανοσοκαθίζηση με την χρησιμοποίηση πρωτεΐνης La/SSB υψηλής καθαρότητας. Οι τεχνικές στερεάς φάσης είναι 100 έως 1000 φορές πιο ευαίσθητες από την ανοσοκαθίζηση. Η ELISA επιπλέον έχει το πλεονέκτημα της ποσοτικοποίησης του τίτλου των αντισωμάτων και παρέχει επιπλέον πληροφορίες για τον ισότυπο και την συγγένεια του αντισώματος με το αντιγόνο (avidity) [Maddison et al 1985].

Ωστόσο το τίμημα της υψηλής ευαισθησίας πληρώνεται με χαμηλή ειδικότητα. Για αυτό τον λόγο χρησιμοποιείται πρωτεΐνη υψηλής καθαρότητας προερχόμενη από εκχυλίσματα ανθρωπίνων κυτταρικών σειρών ή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, για να περακαμφθεί το μειονέκτημα της μειωμένης ειδικότητας [Wittingham et al 1987, St Clair et al 1988, Bini et al 1990, St Clair et al 1990].

Τα ανασυνδυασμένα μόρια La/SSB ωστόσο μπορεί να περιέχουν επιμολύνσεις προερχόμενες από το βακτηριακό σύστημα έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και μεταφραστικές αλλαγές, με συνέπεια την αύξηση των ψευδώς θετικών δειγμάτων (μειωμένη ειδικότητα), όπως έχει αποδειχθεί από διάφορους ερευνητές [Yiannaki et al 1998, Van Regemortel MHV 1993, Leach SL 1983]. Τα συνθετικά πεπτιδία, που αντιπροσωπεύουν τα πιο αντιγονοδραστικά τμήματα της πρωτεΐνης, μπορούν να αντικαταστήσουν επιτυχώς το μόριο της πρωτεΐνης La/SSB στις τεχνικές ELISA χωρίς να μειωθεί η ευαισθησία της τεχνικής, ενώ αυξάνεται παράλληλα η ειδικότητά της λόγω απόλυτης καθαρότητας των πεπτιδίων, γεγονός που είναι εύκολο να επιτευχθεί με την χρησιμοποίηση στηλών υψηλής ικανότητας διαχωρισμού (High pressure liquid chromatography) [Yiannaki et al 1998].

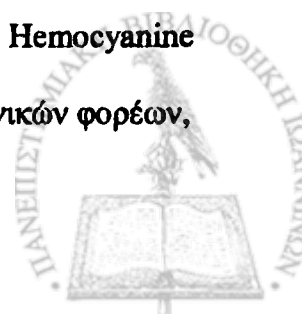


4.4. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΜΕ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ.

Πολλές ουσίες μπορούν να δράσουν ως ανοσογόνα, όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, υδατάνθρακες, νουκλεϊνικά οξέα, λιπίδια. Ένα συστατικό για να ελευθερώσει αρχική ανοσολογική απόκριση και εν συνεχεία δεύτερη ισχυρή απόκριση, θα πρέπει να περιέχει έναν επίτοπο που μπορεί να συνδεθεί σε επιφανειακό υποδοχέα ενός Β λεμφοκυττάρου και θα πρέπει να προάγει την επικοινωνία μεταξύ των Β και των Τ βοηθών λεμφοκυττάρων (απαραίτητη προϋπόθεση για την διαφοροποίηση του Β κυττάρου σε πλασματοκύτταρο).

Ένα καλό ανοσογόνο μόριο θα πρέπει : (1) να έχει έναν επίτοπο που μπορεί να αναγνωρίζεται από τον επιφανειακό υποδοχέα-αντίσωμα ενός Β λεμφοκυττάρου (2) να έχει τουλάχιστον μία θέση αναγνώρισης από τον υποδοχέα του κυρίου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II και ενός Τ λεμφοκυτταρικού υποδοχέα (TCR), (3) να είναι βιοαποικοδομήσιμο, δηλ να διασπάται από τα αποικοδομητικά ένζυμα των λυσοσωμάτων.

Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά εντοπίζονται κυρίως σε μόρια με μεγάλο μοριακό βάρος, όπως π.χ πρωτεΐνες, όμως έχουν βρεθεί πεπτίδια μικρού μάλιστα αριθμού αμινοξέων που συνδυάζουν τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά και αποτελούν άριστα ανοσογόνα. Συνήθως όμως για να ελεγχθεί η αντιγονικότητα / ανοσογονικότητα ενός πεπτιδίου, αυτό πρέπει να προσδεθεί σε κάποια πρωτεΐνη φορέα, πριν εισέλθει στο ζώο. Τέτοιες πρωτεΐνες φορείς είναι η αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin BSA) και η αιμοκυανίνη (Keyhole Limpet Hemocyanine KLH). Το βασικότερο πρόβλημα που προκύπτει από την χρήση πρωτεϊνικών φορέων,



είναι ότι στον ορό των ζώων παράγονται εκτός των επιθυμητών αντι-πεπτιδικών αντισωμάτων και αντισώματα κατά του φορέα, καθώς και αντισώματα κατά των νέων επιτόπων του σημείου σύνδεσης πρωτεΐνης / φορέα - πεπτιδίου. Πρόσφατα έχουν χρησιμοποιηθεί συνδυασμοί των πεπτιδίων που είναι συζευγμένα με συνθετικούς επιτόπους αποδεδειγμένης ικανότητας σύνδεσης με τους υποδοχείς τάξης II-TCR [Francis MJ (1987), Good MF (1987), Borrás-Gueta F (1987), Leclerc C (1987)]. Το πεπτίδιο συνδεδεμένο σε αυτούς τους επιτόπους εισέρχεται στο πειραματόζωο χωρίς να συνδεθεί με κάποιον φορέα. Η τεχνική αυτή επιτρέπει την παραγωγή αντισωμάτων κατά του πεπτιδίου, εμποδίζει ωστόσο την άμεση μελέτη του για την εκδήλωση ενός πιθανού χαρακτήρα T λεμφοκυτταρικού επιτόπου.

Το εργαστήριό μας εισήγαγε την χρήση μιας νέας γενιάς πεπτιδικών φορέων που ονομάζονται επαναλαμβανόμενοι ολιγοπεπτιδικοί φορείς (Sequential Oligopeptide Carrier SOC), οι οποίοι επιτρέπουν την σύνδεση του υπό μελέτη πεπτιδίου σε πολλαπλά αντίγραφα επάνω στην ε-NH₂ ομάδα της Lys που ανήκει στον φορέα SOC. Η δομή του φορέα αυτού αποτελείται από την επαναλαμβανόμενη ολιγοπεπτιδική αλληλουχία (Gly-Aib-Lys)_{n=2-5}. Μελέτες διαμόρφωσης NMR του φορέα αυτού απέδειξαν ότι έχουν δομή παραπλήσια της α-έλικας πεπτιδίου και οι ε αμινομάδες της Lys δεν επικαλύπτουν στο χώρο η μία την άλλη, αλλά διατηρούν μία απόσταση έτσι ώστε τα πεπτίδια που συνδέονται ομοιοπολικά σε αυτές να μην αλληλοεπικαλύπτονται. Μελέτες ανοσοποίησης με σύμπλοκα SOC-πεπτιδίου απέδειξαν την πολύ αποδοτική παραγωγή αντιπεπτιδικών αντισωμάτων υψηλού τίτλου και συγγένειας και την απουσία αντισωμάτων κατά του φορέα SOC. Μία πολύ σπουδαία παρατήρηση είναι ότι πεπτίδια La/SSB που προσδέθηκαν στον φορέα αυτό, τα οποία είχαν γνωστή δράση B λεμφοκυτταρικού επιτόπου, εκδήλωσαν χαρακτηριστικά και T λεμφοκυτταρικών επιτόπων [Yiannaki EE και συν υπό



δημοσίευση 1999]. Επιπλέον τα αντισώματα που αναπτύχθηκαν στον ορό των κουνελιών που ανοσοποιήθηκαν με τα πεπτίδια La/SSB - SOC, μπορούσαν να αναγνωρίσουν ολόκληρη την πρωτεΐνη La/SSB. Όπως είναι γνωστό, απώτερος στόχος όλων των ανοσοποιήσεων με πεπτίδια είναι τα αντισώματα που αναπτύσσονται στα πειραματόζωα, να είναι ικανά να αναγνωρίσουν ολόκληρο το πρωτεϊνικό αντιγόνο στο οποίο ανήκουν.

Ιδιαίτερης σημασίας σε μία ανοσοποίηση είναι η κατάλληλη επιλογή του είδους του ζώου που θα ανοσοποιηθεί. Η επιλογή αυτή εξαρτάται κυρίως από την ποσότητα του ορού που χρειάζεται, το είδος του οργανισμού, από τον οποίο προέρχεται το αντιγόνο, από το αν χρειάζονται μονοκλωνικά αντισώματα και από την διαθέσιμη ποσότητα αντιγόνου που υπάρχει. (Πιν. 3)

Μια άλλη παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπόψη, είναι η χρήση ανοσοενισχυτικών. Ο ακριβής τρόπος δράσης των ανοσοενισχυτικών δεν είναι πλήρως γνωστός. Σε γενικές γραμμές αυτά αποτελούνται από δύο είδους συστατικά: το ένα προστατεύει το αντιγόνο από την γρήγορη μεταβολική διάσπασή του, όπως τα ελαιώδη συστατικά (παραφινέλαιο) ή τα υδροξείδια του αλουμινίου που κατακρημνίζουν το αντιγόνο [Glenny AT (1926)] Το δεύτερο συστατικό είναι η ουσία που θα ενεργοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα μη ειδικά, αυξάνοντας την έκκριση των λεμφοκινών, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν τη διεργασία της αντιγονοπαρουσίασης προκαλώντας τοπική φλεγμονή στην περιοχή που έγινε η ανοσοποίηση. Τέτοιες ουσίες είναι τα νεκρά βακτήρια, όπως *Bordetella pertussis* και *Mycobacterium tuberculosis* [Dienes 1936] και ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS).



Πίνακας 3

Επιλογή πειραματόζωου για ανοσοποιήσεις αντιγόνων.

ΖΩΟ	ΜΕΓΙΣΤΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΟΡΟΥ (ml)	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	ΣΧΟΛΙΑ
Κουνέλια	500	Όχι	Η καλύτερη επιλογή για παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων.
Ποντίκια	2	Ναι	Η καλύτερη επιλογή για παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων.
Αρουραίοι	20	Ναι	Καλή επιλογή για παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων
Hamsters	20	Όχι	Καλή επιλογή για παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων όταν η ποσότητα του αντιγόνου είναι περιορισμένη.
Ινδικά Χοιρίδια	30	Όχι	Δύσκολη η αιμοληψία τους.
Κότες	50	Όχι	Καλή επιλογή για αντιγόνα εξελικτικά σταθερά.



Πλεονεκτήματα της χρησιμοποίησής τους είναι η χρήση μικρών δόσεων αντιγόνων και το γεγονός ότι η παραγωγή αντισωμάτων είναι μακράς διάρκειας. Το ανοσοενισχυτικό του Freud (μίγμα παραφινέλαιου και μυκοβακτηριδίων) που είναι το πιο διαδεδομένο, θα πρέπει να χορηγείται σε περιπτώσεις που υπάρχουν μικρές ποσότητες ανοσογόνου και ποτέ ενδοφλεβίως. [Dienes L (1963), Johnson AG (1956)].

Η οδός της ανοσοποίησης καθορίζεται από τρεις κυρίως παραμέτρους (Πιν 4):
α) τον όγκο του ενέσιμου αντιγόνου β) τι θα συνοδεύει το αντιγόνο γ) πόσο γρήγορα θα πρέπει να ελευθερωθεί το αντιγόνο στο λεμφικό ή κυκλοφοριακό σύστημα. Στον πίνακα δίνονται οι πιθανές δίοδοι των αντιγόνων στα κουνέλια. [Herbert WJ (1986), Poole TB (1987)].



Πίνακας 4

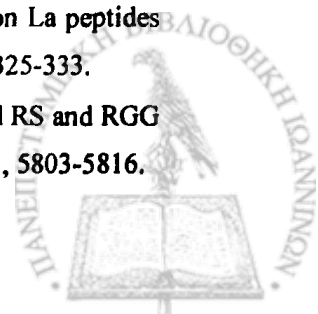
Δίοδοι ανοσοποίησης στα κουνέλια.

Οδός	Μέγιστος όγκος	Ανοσοενισχυτικό (ΑΕ)	Μορφή ανοσογόνου	Σχόλια
Υποδόρια	800μl ανά φορά 10 φορές ανά κουνέλι	+/-	Διαλυτό ή αδιάλυτο	Εύκολη ένεση
Ενδομυϊκή	0.5 ml	+/-	Διαλυτό ή αδιάλυτο	Αργή απελευθέρωση
Ενδοδερμική	100μl ανά φορά 40 φορές ανά κουνέλι	+/-	Διαλυτό ή αδιάλυτο	Σχετικά δύσκολη ένεση. Αργή απελευθέρωση
Ενδοφλέβια	1 ml	Χωρίς ΑΕ	Διαλυμένο σε απορρυπαντικό άλας, ουρία	Δεν είναι αποτελεσματικό σε πρωτογενείς ανοσοποιήσεις.
Λεμφαδένες	Ειδικές χρήσεις	Χωρίς ΑΕ	Διαλυτό ή αδιάλυτο	Καλό σε χέρια έμπειρων χρηστών.
Ενδοπεριτοναϊκά				Κανονικά δεν συνιστάται για κουνέλια.

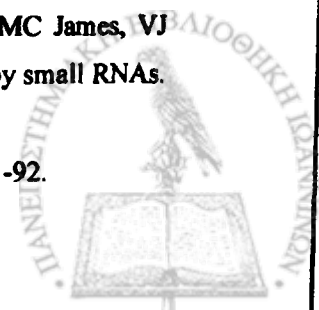


BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

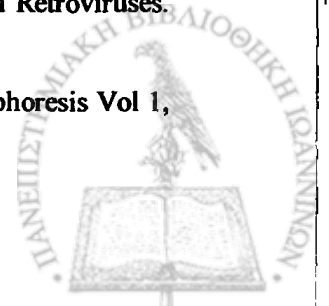
- Akizuki M, R Powers and HR Holman. [1977]. A soluble acidic protein of the cell nucleus which reacts with serum from patients with systemic lupus erythematosus and sjogren's syndrome. *J Clin Invest* 59:264-271
- Alspaugh MA and EM Tan. [1975]. Antibodies to cellular antigens in Sjogren's Syndrome. *J Clin Invest* 55:1067-1073
- Alspaugh MA and PJ Maddison. [1979]. Resolution of the identity of certain antigen-antibody systems in systemic lupus erythematosus and sjogren's syndrome: an interlaboratory collaboration. *Arthritis Rheum* 22:796-798
- Alspaugh MA, WW Buchanan, K Whaley. [1978]. Precipitating antibodies to cellular antigens in Sjogren syndrome, reumatoid arthritis and other organ and non-organ specific autoimmune diseases. *Ann Rheum. Dis.* 37, 244-246.
- Anderson JR, KG Gray, JS Beck and WF Kinnear. [1961]. Precipitating autoantibodies in Sjogren's disease. *Lancet* 2: 456-460.
- Andonopoulos AP, Skopouli FN, Dimou GS, Drosos AA, Moutsopoulos HM. [1990]. Sjogren's syndrome in systemic lupus erythematosus. *J Reumatol.* 17: 201-4.
- Baboonian C, PJ Venables, J Booth, DG Williams, LM Roffe, RN Maini. [1989]. Virus infection induces redistribution and membrane localization of the nuclear antigen La (SS-B): a possible mechanism for autoimmunity. *Clin.Exp.Immunol.* 78, 454-459.
- Bachmann M, D Falke, HC Schroder, WE Muller. [1989]. Intracellular distribution of the La antigen in CV-1 cells after herpes simplex virus type 1 infection compered with the localization of U small nuclear ribonucleoprotein particles. *J.Gen.Virol.* 70,881-891.
- Bachmann M, K Pfeifer, HC Schroder, WEG Muller. [1990]. Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid-dependent ATPase/ dATPase with melting properties. *Cell* 60, 85-92.
- Bachmann M, S Chang, H Slor, J Kukulies, WE Muller. [1990]. Shuttling of the autoang La between nucleus and cell surface after UV irradiation of humman keratinicytes. *Exp.Cell.Res.* 191, 171-180.
- Bachmann M, WJ Mayer, HC Schrider, K Pfeifer, KH Meyer zum Buchenfelde, and WE Muller. [1989]. Association of La and Ro antigens with intracellular structures in Hep-2 carcinoma cells. *Proc.Natl.Acad.sci.* 83, 7770-7774.
- Bai C, Z Li, PP Tolia. [1994]. Developmental characterization of a Drosophila RNA-binding protein homologous to the human systemic lupus erythematosus-associated La/SSB autoantigen. *Mol Cell Biol.* 14, 5123-5129.
- Beisiegel U (1986) *Electrophoresis* 7, 1-18.
- Ben-Cherit E, R Fischel, A Rubinow. [1991]. Anti-SSA/Ro and anti-La/SSB antibodies in serum and saliva of patients with Sjogren's syndrome. *Arth. Rheum* 34 (suppl) 828-834.
- Bini P, J-Chu, C Okolo, K Elkon. [1990]. Analysis of autoantibodies to recombination La peptides in systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome. *J Clin Invest* 85: 325-333.
- Birney E, S Kumar, AR Krainer. [1993]. Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factrors. *Nucl. Acids Res.* 21, 5803-5816.



- Blanco F, J Kalsi, DA Isenberg. [1991]. Analysis of autoab to RNA in patients with systemic lupus erythematosus and the other autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Imm.unol.* 86, 66-70.
- Boelens WC, I Palacios, IW Mattaj [1995]. Molecular retention of RNA as a mechanism for localization. *RNA* 1, 273-283.
- Boire G, J Craft. [1990]. Human Ro ribonucleoprotein particles: characterization of native structure and stable association with the La polypeptide. *J. Clin. Invest.* 85, 1182-1190.
- Borrás-Gueta F, Petit Camurdan and Y Fedon [1987]. Engineering of immunogenic peptides by co-linear synthesis of determinants recognized by B and T cells. *Eur. J. Immunol.* 17, 1213-1215.
- Brookes SM, A Pandolfino, TJ Mitchel et al [1992]. The immune response to end expression of cross-reactive retroviral gag sequence in autoimmune disease. *Br J Rheum.* 31, 735-742.
- Buyon JP. [1992]. Neonatal lupus syndromes. *Am J Reprod.Immunol.* 28, 259-263.
- Buyon JP, SG Slade, EKL Chan, EM Tan, R Winchester. [1990]. Effective separation of the 52Kda SSA / Ro polypeptide from the 48Kda SSB / La polypeptide by altering conditions of polyacrylamide gel electrophoresis. *J Immunol Meth.* 129, 207-210.
- Carmo-Fonseca LA, K Pfeifer, HC Schroder, MF Vaz, JE Fonseca, WE Muller, M Bachmann. [1989]. Identification of La ribonucleoproteins as a component of interchromatin granules *Exp.Cell.Res.* 185, 73-85.
- Casiola-Rosen LA, G Anhalt, A Rosen. [1994]. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocyte. *J.Exp.Med.* 179, 1317-1330.
- Chambers JC, JD Keene. [1985]. Isolation and analysis of cDNA clones expressing human lupus La antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 2115-2119.
- Chambers CJ, MG Kurilla, JD Keene. [1983]. Association between the 7S RNA and the lupus La protein varies among cell types. *J. Biol. Chem.* 258, 11438-11441.
- Chambers JC, D Kenan, BJ Martin, JD Keene. [1988]. Genomic structure and amino acid sequence domain of the human La autoantigen. *J.Biol.Chem.* 263, 18043-18051.
- Chan EKL, AM Francoeur, EM Tan [1986]. Epitopes, structural domains and asymmetry of amino acids residues in SS-B/La nuclear protein. *I Immunol* 136, 3744-3749.
- Chan EKL, KB Sullivan, EM Tan. [1989] Ribonucleoprotein La/SS-B belongs to a protein family with consensus sequences for RNA-binding. *Nucl.Acid.Research* 6, 2233-2244.
- Chan EKL, Tan EM [1989]. Epitopic targets for autoantibodies in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Curr. Opin. Rheum.* 1. 376-387.
- Chang YN, DJ Kenan, JD Keene, A Gatignol, KT Jeang [1994]. Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. *J. Virol.* 68, 7008-7020.
- Clark G, M Reichlin and TB Tomas [1969]. Characterization of soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 102:117-122
- Clemens MJ, KG Laing, IW Jeffrey, A Schofield, TV Sharp, A Elia, V Matys, MC James, VJ Tilleray. [1994]. Regulation of the interferon-inducible eLF-2alpha protein kinase by small RNAs. *Biochimie* 76, 770-778.
- Clemens MJ. [1993]. The small RNAs of Epstein-Barr Virus. *Mol. Biol. Rep.* 17, 81-92.



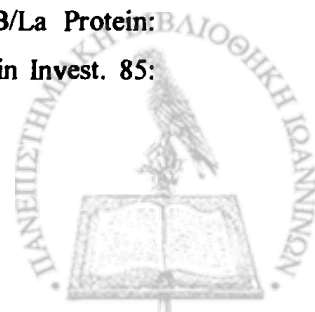
- Craig AWB, YV Svitkin, HS Lee, J Graham, J Belsham, N Sonenberg. [1997]. The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation. *Mol. Cell Biol.* 17, 1,163-169.
- Deng JS, Y Takasaki and EM Tan. [1981] Nonhistone nuclear Ags reactive with autoantibodies. Immunofluorescence studies on distribution in synchronized cells. *J.Cell.Biol.*91, 654-660.
- Dienes L. [1963]. The specific immune response and the healing of infectious diseases. *Arch. Pathol.* 21, 357-386.
- Dingwall C, RA Laskey. [1991]. Nuclear targeting sequences - a consensus? *Trends Biochem. Sci.* 16, 478-481.
- Dorner T, R Chaoui, E Feist, et al [1995]. Significantly increased maternal and fetal IgG autoantibody levels to 52kD Ro (SS-A) and La(SS-B) in complete congenital heart block. *J Autoimmun.* 8, 675-684.
- Francis MJ, GZ Hasting, AD Syred, B McGrinn, F Brown, DJ Rowlands. [1987]. Nonresponsiveness to a foot and mouth disease virus peptide overcome by addition of foreign helper T cell determinants. *Nature* 300, 168-170.
- Franco HL, WL Weston, C Peebles, SL Forstot, P Phanaphak. [1981]. Autoantibodies directed against sicca syndrome antigens in the neonatal lupus syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 4, 67-72.
- Frank R [1992]. Spot -synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48:9217-9232.
- Frank R [1994]. Spot -synthesis: An easy and flexible tool to study molecular recognition. In Epton R, ed. *Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis 1994.* Mayflower Worldwide, Birmingham, pp. 509-512.
- Frank R, Guler S, Krause S, W Lindenmaier. [1991]. Facile and rapid 'spot-synthesis' of large numbers of peptides on membrane sheets. In Giralt E, Andreu D, eds. *Peptides 1990.* ESCOM Leiden, pp.151-152
- Frank R, MKieß, Lahmann H, C Behn, H Gausepohl.[1995].Combinatorial synthesis on membrane supports by the SPOT technique in Maia HLS, eds. *Peptides 1994.* ESCOM Leiden 479-480
- Francoeur AM, EKL Chan, JI Garrels, MB Mathews. [1985] Characterization and purification of lupus antigen La, and RNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 5, 586-590.
- Furukawa F, M Kashiwara Sawami, MB Lyons, DA Norris. [1990] Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVA): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. *J.Invest.Dermatol.* 94,77-85.
- Gaither KK et al [1987] *J. Clin. Invest.* 79, 841-847.
- Garfin D and Bers G. [1989]. In Baldo BA and Tovey ER (eds). *Protein blotting: methodology, research and diagnostic applications* 5-41. Karger AG, Basel.
- Garry RF. [1990]. Extensive mimicry by retrovirus capsid proteins. *AIDS Res hum Retroviruses.* 6, 1361-1362.
- Gershoni JM. [1987]. In: Grambach A, Dunn MJ and Radola BJ (Eds) *Adv. Electrophoresis Vol 1,* 141-175 VCH, Weinheim.



- Geysen HM, SJ Rodda, TJ Mason. [1986]. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol Immunol* 23:709-715
- Glenny AT, CG Poge, H Waddington, U Wallace. [1926]. Immunological notes. *J Pathol* 29:31-40
- Golan TD, KB Elkon, AE Gharavi, JG Krueger. [1992] Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after ultraviolet B / ultraviolet A irradiation. *J.Clin.Invest.* 90, 1067-1076.
- Good MF, WL Maloy, MN Lunde, H Margalit, JL Cornette, GL Smith, B Moss, LH Miller, JA Berzofsky. [1987]. Construction of synthetic immunogen : Use of new T helper epitope on malaria circumsporozoite protein. *Science* 235, 1059-1062.
- Gordon T, C mavrangelos, J Mc Cluskey. [1992]. Restricted epitope recognition by precipitin-negative anti-La/SSB-positive sera. *Arthr rheum.* 35, 6, 663-6.
- Gottlieb E, JA Steitz [1989]. The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro. *EMBO J.* 8, 841-850.
- Gottlieb E, JA Steitz [1989]. Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *EMBO J.* 8, 851-861.
- Graus F, C Cordon-Cardo, E Bonfa, KB Elkon. [1985]. Immunohistochemical localization of La nuclear antigen in brain. Selective concentration of the La protein in neuronal nucleoli. *J Neuroimmunol.* 9, 307-319.
- Grimm C, E Lund, JE Dahlberg [1997]. In vitro selection of RNAs that localize in the nucleus. *EMBO J.* 16, 793-806.
- Guo HC, TS Jardetsky, TPJ Garrett, WS Lane, JL Strominger, DC Wiley. [1992]. Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature* 390, 364-6.
- Haaheim LR, R Kiakestål, B Stern, Ø Normann, R Jonsson. [1994]. Immunodominant epitopes on the La/SSB autoantigen recognized by sera from patients with primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. In *Sjogren's Syndrome - State of the Art*, pp.575-577. Proceedings of the Fourth International Symposium. Tokyo, Japan. Kugler Publ, Amsterdam / New York.
- Habets WJ, JH den Brok, AM Boerbooms, LB van de Putte, WJ van Venrooij. [1983]. Characterization of the SS-B (La) antigen in adenovirus-infected and uninfected HeLa cells. *EMBO J.* 2, 1625-1631.
- Halse AK, M Wahren, R Jonsson. [1996]. Peripheral blood in Sjogren's syndrome does not contain increased levels of T lymphocytes reactive with the recombinant Ro/SSA 52KD and La/SSB 48KD autoantigens. *Autoimmun.* 23, 25-34.
- Hardin JA. [1986]. The lupus autoantigen and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum.* 29, 457-460.
- Harley JB. [1989]. Autoantibodies in Sjogren's syndrome, *J Autoimmun.* 2, 283-394.
- Harley JB, Mo Rosario, H tamagata, OF Fox, E Kwen. [1985]. Immunologic and structural studies of the lupus/ sjogren's syndrome autoantigen La/SSb with a monoclonal antibody. *J Clin Invest.* 76, 801-806.
- Hasimoto C, JA Steitz. [1983]. *J. Biol. Chem.* 258, 1379-1382.



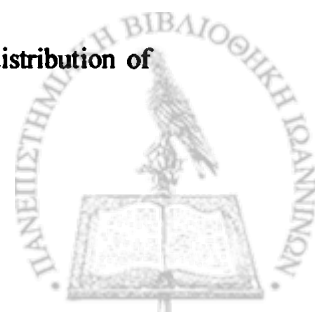
- Hendinck JP, SL Wolin, J Rinke, MR Lerner and JA Steitz. [1981]. Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Mol.Cell.Biol*, 1, 1138-1149.
- Herbert WJ and F Kristensen.[1986].Laboratory animal techniques for immunology. In: Handbook of experimental immunology (ed DM Weir et al) 133, 133.1-133.36. Blackwell Scientific, Oxford.
- Hoet R, van Venrooij W. [1992]. B cell epitopes of RNA autoantigens. *Mol biol Rep*. 16, 199-205.
- Hoch SO. [1989]. In: Baldo BA and Tovey ER ER (eds) Protein blotting: methodology, research and diagnostic application 140-164. Karger AG, Basel.
- Hodgman T [1988]. A new superfamily of replicative proteins. *Nature*. 333, 22-26.
- Hoffmann S, Frank R. [1994]. A new safety-catch peptide-resin linkage for the direct release of peptides into aqueous buffers. *Tetrahedron Lett* 35:7763-7766.
- Horsfall AC, [1992]. Molecular mimicry and autoantigens in connective tissue diseases. *Mol Biol Reports*. 16, 139-147.
- Horsfall AC, LM Rose, RN Maini. [1989]. Autoantibody synthesis in saliva glands of Sjogren's syndrome patients. *J. Autoimmun*. 2, 559-568.
- Huch P, GJM Pruijij, WJ van Venrooij, M Bachmann. [1997]. Characterization of the autoantigen La(SS-B) as a ds RNA unwinding enzyme. *Nucl. Acid. Res*. 25, 2, 410-416.
- Isenberg DA, PJ Maddison. [1987]. Detection of antibodies to double stranded DNA and extractable nuclear antigen. *J Clin Pathol*. 40, 1374-1381.
- Jensen EG, P Hellung-Larsen, S Frederiksen [1979]. *Nucl. Acids Res*. 6, 321-330.
- Johnson AG, S Gaines, M Landy. [1956]. Studies on the O antigen of Salmonella typhosa V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *J Exp Med* 103, 225-246.
- Jones SK. [1992] The effects of hormonal and other stimuli on cell-surface Ro/SSA antigen expression by human keratinocytes in vitro: their possible role in the induction of cutaneous lupus lesions. *Br.J.Dermatol*. 126, 554-560.
- Jones SK. [1993] Ultraviolet irradiation (UVR) induces cell-surface Ro/SSA antigen expression of human keratinocytes in vitro: a possible mechanism for the UVR induction of cutaneous lupus lesions. *Br.J.Dermatol*. 126, 546-553.
- Keech CL, J. Mc Cluskey, TP Gordon [1996]. Autoantibodies. In: JB Peter, Y Shoenfeld eds. *Autoantibodies Amsterdam: Elsevier*. 789-797.
- Kephart DC, AF Hood, TT Provost. [1981]. Neonatal lupus erythematosus: new serologic finding. *J Invest Dermatol*. 77, 331-333.
- Kessler MR, JA Steitz. [1979]. Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein-A antibody adsorbent: Parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J Immunol*. 115, 1617-1624.
- Kohsaka H, K Yamamoto, H Fujii. [1990]. Fine specificity of the human SSB/La Protein: identification of a distinct autoepitope homologous to a viral gag polyprotein. *J clin Invest*. 85: 1566-1574.



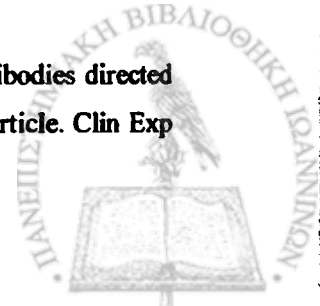
- Kramer A, R Volkmer-Eengert, R Malin, U Reineke, J Schneider-Mergener. [1993]. Simultaneous synthesis of peptide libraries on single resin and continuous cellulose membrane supports: examples for the identification of protein, metal and DNA binding peptide mixtures. *Peptides Res* 6:314-319.
- Kurilla MG, JD Keene [1983]. The leader RNA of vesicular stomatitis virus is bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell* 34 837-845.
- Leclerc C, G Przewlocki, MP Schutze and L Chedid. [1987]. A synthetic vaccine constructed by copolymerization of B and T cell determinants. *Eur J Immunol* 17, 269-273.
- Lerner MP, NC Andreus, G Miller, JA Steitz [1981]. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 805-809.
- Lerner MR, JA Boyle, JA Hardin, JA Steitz [1981]. Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus *Science* 211, 400-402.
- Lerner MR, JA Steitz. [1979]. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic Lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76, 5495-5499.
- Li JM, AC Horsfall, RN Maini. [1995]. Anti-La but not anti-Ro52 antibodies cross-react with laminin-a, role in the pathogenesis of congenital heart block? *Clin Exp Immunol.* 99, 316-324.
- Lin Marq N, SG Clarkson. [1995]. A yeast RNA binding protein that resembles the human autoantigen La. *J Mol Biol.* 245, 81-85.
- Lowery-Goldhammer C, JP Richardson [1974] *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 71, 2003-2007.
- Maddison PJ. [1994]. Autoantibodies in Sjogren's syndrome: Their origin and pathological consequences. In Isenberg DA, Horsfall AC. eds. *Autoimmune diseases: Focus on Sjogren's syndrome*. London: BIOS scientific publishes ltd. pp.89-100.
- Maddison PJ, RP Skinner, P Vlachoyiannopoulos, DM Brennan, D Hough. [1985]. Antibodies to nRNP, Sm, Ro(SSA) and La(SSB) detected by ELISA: their specificity and interrelations in connective tissue diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 62, 337-345.
- Madore SJ, ED Wieben, T Pederson [1984]. Eukariotic small ribonucleoproteins: anti-La human autoantibodies react with UIRNA protein complexes. *J. Biol. Chem.* 259, 1929-1933.
- Mamula MJ, OF Fox, H Yamagata, JB Harley. [1986]. The Ro/SSA autoantigen as an immunogen. Some anti-Ro/SSA antibody binds IgG. *J. Exp. Med.* 86:1889-1891.
- Manoussakis MN, Kg kistis, x Liu, V Aidinis, a guialis, HM Moutsopoulos. [1993]. Detection of anti-Ro/SSA antibodies in autoimmune diseases: comparison of five methods. *Br j rheumatol.* 32 Suppl: 449-455.
- Maraia RJ [1996]. Transcription termination factor La is also an initiation factor for RNA polymerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3383-3387.
- Maraia RJ, DJ kenan, JD Keene [1994]. Eukariotic transcription termination factor La mediates transcript release and facilitates reinitiation by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2147-2158.



- Margalit H, JL Spouge, J Cornette, K Cease, C Delisi, J Berzofsky. [1987]. Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequences. *J Immunol.* 138:2213-2229.
- Mattioli M and M Reichlin [1974]. Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Arth. Rheum.* 17, 421-428.
- Mc Bratney S, P Sarnow [1996]. Evidence for involvement of trans-acting factors in selection of the AUG start codon during eukaryotic translation initiation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3523-3534.
- Mc Carty GA, DW Valenco, MJ Fritzler. [1984]. Antinuclear antibodies contemporary techniques and clinical application to connective tissue diseases. 1-96. Oxford Univ Press NY.
- Mc Neilage LJ, EM Macmillan, SF Whittingham. [1990]. Mapping of epitopes on the La/SSB autoantigen of primary Sjogren's syndrome: identification of a cross-reactive epitope. *J Immunol.* 145, 11, 3829-3835.
- Mc Neilage LJK, E Macmillan, A Guidolin, S Whittingham, T Gordon. [1992]. Definition of a discontinuous immunodominant epitope at the NH₂ terminus of the La/SS-B ribonucleoprotein autoantigen. *J Clin Invest.* 89, 1652-1656.
- Meerovitch K, YV Svitkin, HS Lee, F Lejbkowitz, DJ Kenan, EKL Chan, VI Agol, JD Keene, N Sonenberg. [1993]. La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J. Virol.* 67, 3798-3807.
- Meilof JF, I Bantjes, J De Jong, AP van Dam, RJT Smeenk. [1990]. The detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB antibodies. *J Immunol Meth* 133, 215-226.
- Mendez-Arias L, RA Rodriguez. [1990]. BASIC microcomputer program for prediction of B and T cell epitopes in proteins. *CABIOS.* 6:101-105.
- Milich DR, A McLachlan, GB Thornton, JL Hughes. [1987]. Antibody production to the nucleocapsid and envelope of the hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site. *Nature* 329, 547-549.
- Miyagawa S, W Kitamura, J Yashioka, K Sakamoto. [1981]. Placental transfer of anticytoplasmic antibodies in annular erythema of newborns. *Arch dermatol.* 117, 569-572.
- Μουτσόπουλος ΧΜ, ΑΓ Τζιούφας. [1990]. Αυτοαντισώματα, γιατί; 177-187 στο Ανοσολογία. Αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα ΧΜ Μουτσόπουλος. Εκδ. Αίτσα.
- Mutch DA, SJ Rodda, M Benstead, RM Valerio, HM Geysen. [1991]. Effects of the end groups on the stimulatory capacity of minimal length T cell determinant peptides. *Peptide Res* 4, 132-137.
- O' Brien CA, Margelot K, SL Wolin. [1993]. Xenopus Ro ribonucleoproteins: members of an evolutionary conserved class of cytoplasmic ribonucleoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90, 7250-7254.
- Ouchterlony O, LA Nilsson. [1978]. Immunodiffusion and Immunology (3rd Ed.) Vol I. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Owe-Young RA, S Horn, JP Edmonds, AD Sturgess [1992]. Use of a molecular cloned human SS-B antigen to detect anti-SS-B antibodies. *J Autoimmun.* 5, 351-361.
- Peek R, GJM Pruijijn, AM Van Der Kemp, WJ Van Venrooij. [1993]. Subcellular distribution of Ro ribonucleoprotein complexes and their constituents. *J. Cell. Sci.* 106, 929-935.



- Peek R, GJM Pruijin, WL Van Venrooij. [1996]. Interactions of La (SS-B) autoantigen with small ribosomal subunits. *Eur.J.Biochem* 236, 649-655.
- Peek R, JR Westphal, GJM Pruijin, AJ van der Kemp, WJ van Venrooij. [1994]. Adenovirus infection induces loss of HLA class I and CD3 antigens, but does not induce cell surface presentation of the La (SS-B) autoantigen. *Clin.Exp.Immunol.* 96, 395-402.
- Pettersoon J, M Hinterberger, T Mimori, E Gottlieb, JA Steitz. [1984]. The structure of mammalian small nuclear ribonucleoproteins: Identification of multiple protein components reactive with anti-(U1)RNA and anti-Sm autoantibodies. *J Biol Chem* 259, 5907-5914.
- Pfeifle J, FA Anderer, M Franke. [1987]. Multiple phosphorylation of human SS-B/La autoantigen and its effect on poly (U) and autoantibody binding. *Biochim, Bioph. Acta* 928, 217-226.
- Pizer Li, JS Deng, RM Stenberg, EM Tan. [1983]. Characterization of a phosphoprotein associated with the La/SSB nuclear antigen in adenovirus infected and uninfected KB cells. *Mol.Cell.Biol.* 3, 1235-1245.
- Poole TB. [1987]. *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals* 6th edition. Longman Scientific and Technical, London. England.
- Pruijin GJM, FHM Simons, and WJ Van Venrooij. [1997]. Intracellular localization and nucleocytoplasmic transport of RoRNP components. *Eur.J.Cell.Biol.* 74, 123-132.
- Pruijin GJM, FHM Simons, WJ van Venrooij. [1997]. Intracellular localization and nucleoplasmic transport of Ro RNP components. *Eyr. J. Cell Biol.* 74, 123-132.
- Pruijin GJM, RL Slobbe, WJ van Venrooij. [1991]. Analysis of protein-RNA interactions within Ro ribonucleoprotein complexes. *Nucl. Acids Rep.* 19, 5173-5180.
- Pruijin GJM.[1994] *The La(SS-B) antigen. Manual Biol Markers of Disease B4.2, 1-14 Kluwer Academic Publishers< Netherlands.*
- Rauh AJG, H Hornig, R Luhrmann. [1988]. At least 3 distinct B cell epitopes reside in the C-terminal half of La protein, as determined by a recombinant DNA approach. *J Immunol* 18: 2049-2057.
- Reece JC, HM Geysen, SJ Rodda. [1993]. Mapping the major human T helper epitopes of tetanus toxin. *The emerging picture. J Immunol* 151, 1-10.]
- Reichlin M. [1991]. Antibodies to RNA protein in systemic lupus erythematosus; the significance of paired immune responses. In "molecular autoimmunity" (N Talal ed), academic press, pp 51-63.
- Reichlin M. [1991]. Molecular definition of the Ro/SSA particles: a frequent target of autoimmunity in systemic lupus erythematosus and Sjogren syndrome. *Br J Rheumatol* 1991. 30 (suppl 1), 58-62,
- Rinke J, JA Steitz. [1982]. Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell.* 29, 149-159.
- Rinke J, JA Steitz. [1985]. Association of the lupus antigen La with a subset of U6 snRNA molecules. *Nuc. Acid. Resear.* 7, 2617-2629.
- Rishmueller M, LJ Mc Neilage, J Mc Cluskey, T Gordon. [1995]. Human autoantibodies directed against the RNA recognition motif of La (SS-B) / Ro (SS-A) ribonucleoprotein particle. *Clin Exp Immunol.* 101, 39-44.



- Rodda SL. [1997]. T cell epitope mapping with multiple peptides 2, 827-834. In: Immunology methods manual. Lefkovits (ed)
- Rogers S, R Wells, M Rechsteiner. [1986]. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: PEST hypothesis. *Science*. 234, 364-368.
- Rosa MD, E Gottlieb, MR Lerner, JA Steitz. [1981]. *Mol. Cell. Biol.* 1, 785-796.
- Rosen A, LA Casiola-Rosen, J Ahearn. [1995]. Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J.Exp.Med.* 181, 1557-1561.
- Rothbard JB, WR Taylor.[1988]. A sequence pattern common to T cell epitopes. *EMBO J.* 7:93-0.
- Rother RP, PS Thomas. [1991]. La/SSB ribonucleoprotein levels increase in transformed cells. *Clin.Exp.Immunol.* 83, 369-374.
- Scofield RH, Harley JB. [1990]. Autoantigenicity of Ro/SSA antigen is related to a nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88, 3343-3347.
- Scott JS, PJ Maddison, RV Taylor, E Esscher, O Scott, RP Skinner. [1982]. Connective-tissue disease, antibodies to ribonucleoprotein and congenital heart block. *N Engl J Med* 309, 209-212.
- Semsei I, H Troster, H Bartsch, M Schwemmler, GL Igloi, M Bachmann. [1993]. Isolation of the Rat cDNA clones coding for the autoantigen SS-B/La. Detection of Species Specific Variations. *Gene* 126, 265-268.
- Sette A, S Buus, E Appelal. [1989]. Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis. *Proc.Natl Acad. Sci USA.* 86: 3296-300.
- Shen CJ, T Maniatis. [1982]. *J. Mol. Appl. Gen.* 1, 343-360.
- Simons FHM, GJM Pruijin, WJ Van Venrooij. [1994]. Analysis of the intracellular localization and assembly of ro ribonucleoprotein particles by microinjection into *Xenopus leavis* oocytes.*J.Cell.Biol.* 125, 981-988.
- Simons FHM, SA Rutjes, WJ van Venrooij, GJM Pruijin [1996]. The interaction with Ro60 and La differentially affect nuclear export of hY1 RNA. *RNA* 2, 264-273.
- Simons FHM. [1996]. Assessment and nucleocytoplasmic transport of Ro RNPs. Thesis. Nijmegen.
- Slobbe R, B Van Esch, T Kreder, WJ Van Venrooij. [1991]. The use of adenovirus-infected HeLa cells for the detection of low titer autoantibodies. *J Immunol Meth.* 138, 237-244.
- Smith PR, DG Williams, PJ Venables, RN Maini. [1985] Monoclonal antibodies to the sjogren's syndrome associated antigen SS-B (La). *J.Immunol.Methods*, 77, 63-76.
- Sondergaard-Anderson J, E Lauritzen , K Lind, A Holm. [1996]. Covalently linked peptides for enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods*, 131; 99-104
- St Clair EW, DS Pisetsky, CF Reich, JC Chambers, JD Keene. [1988]. Quantitative immunoassay of anti-La antibodies using purified recombinant La antigen. *Arthrit Rheum.* 31, 506-511.
- St Clair EW, J Burch, MM Ward, JD Keene, DS Pisetsky. [1990]. Temporal correlation of antibody responses to different epitopes of the human La autoantigen. *J Clin Invest.* 85, 515-521.
- Stefano JE, [1984]. Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylylated stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell.* 36, 145-154.



- Sturgess AD, MG Peterson, LJ Mc Neilage, S Whittingham, RL Coppel. [1988]. Characteristics and epitope mapping of a clonal human autoantigen La. *J Immunol* 140: 3212-8.
- Svitkin Y, VA Pause, N Sonenberg. [1994]. La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *J Virol.* 68,7001-7007
- Talal N, MJ Dauphinee, M Dany et al. [1990]. Detection of serum antibodies to retroviral proteins in patients with primary Sjogren's syndrome autoimmune exocrinopathy. *Arth. Rheum.* 33,774-781
- Talal N, RF Garry, PH Schur et al [1990b]. A conserved idiotype and antibodies to retroviral proteins in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 185, 1886-1971.
- Tan EM [1989]. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 44, 93-151.
- Tan EM, Manoussakis MN, AG Tzioufas, PSE Pange, HM Moutsopoulos [1986]. Serological profiles in subgroups of patients with Sjogren's syndrome. *Scan. J. Rheum.* 61, 89-92.
- Topfer F, T Gordon, J Mc Cluskey. [1993]. Characterization of the mouse autoantigen La (SS-B)-identification of conserved RNA-binding motifs, a putative ATP binding site and reactivity of recombinant protein with poly(U) and human autoantibodies. *J. Immunol.* 150, 3091-3100.
- Topfer F, T Gordon, J McCluskey. [1995]. Intra- and intermolecular spreading of autoimmunity involving the nuclear self-antigens La (SSB) and Ro(SSA). *PNAS*, 92: 875-879.
- Tovey ER, BA Baldo. [1987]. *Electrophoresis* 8, 452-463.
- Troster H, TE Metzger, I Semsei, M Schwemmler, A Winterpacht, B Zabel, M Bachmann. [1994]. One gene, two transcripts: Isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-B from a cDNA library of a patient with primary sjogren's syndrome. *J. Exp. Med.* 180, 2059-2067.
- Tzioufas AG, EE Yiannaki, M Sakarellos-Daitsiotis, JR Routsias, C Sakarellos, HM Moutsopoulos. [1997]. Fine specificity of autoantibodies to La/SSB: epitope mapping and characterization. *Clin. Exp. Immunol.* 108: 191-198.
- Van Regenmortel MHV. [1993]. Synthetic peptides versus natural antigens in immunoassays. *Ann Biol Clin* 51, 39-41.
- Van Venrooij, GJM Pruijin. [1995]. Ribonucleoprotein complexes as autoantigens. *Cur. Opin. Immunol.* 7; 819-824.
- Venables PJW, S Rigby, PA Mumford, J Markwick, PN Maini. [1988]. Autoimmunity to La (SS-B) in vitro is related to HLA-DR3 in healthy subjects. *Annals Rheum. Dis.* 47, 22-27.
- Venables PJW [1993]. Epitope mapping of ribonucleoprotein antigens: answers without questions?. *Clin Exp Immunol* 94, 225-226.
- Venables PLW, DG Williams, AC Horsfall, RO Williams. [1991]. The immune response to autoantigens and viruses in autoimmune disease. *Br J Rheum.* 30 (suppl 1) 70-74.
- Walker JE, M Saraste, MJ Runswick, NS Gay. [1982]. Distantly related sequences in the α and β subunits of ATP synthetase, myosin, kinases and other ATP requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1, 945-952.



- Wahren M, P Tengner, I Gunnarsson, I Lundberg, E Hedfors, NR Ringertz, I Pettersson. [1998]. Ro/SSA and La/SSB antibody level variation in patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 11, 29-38.
- Weng YM, JMc Neilage, F Topfer, J Mc Cluskey, T Gordon. [1993]. Identification of a human-specific epitope in a conserved region of the La.SSB autoantigen. *J Clin Invest.* 92, 1104-1108.
- Whittingham S, S Naselli, G Mc Neilage, LJ Coppel, AD Sturgess. [1987]. Serological diagnosis of primary Sjogren's syndrome by means of human recombinant La (SS-B) as nuclear antigen. *Lancet* ii, 1
- Wilde PCM, KC Bodeutsch, FHJ van den Hoogen, LBA van de Putte, WL van Venrooij. [1996]. Aberent expression of the La/SSB antigen in the labial salivary glands of patients with sjogren syndrome. *Arth. Rheum.* 39, 5, 783-791.
- Williams CA. [1971]. Immunoelectrophoresis Analysis. Williams CA, chase MW (eds). *Methods in Immunology and immunochemistry* Vol #, 234-279. Academic press, London.
- Wilusz J, MG Kurilla, JD Keene [1983]. A host protein (La) binds to a unique species of minus-sense leader RNA during replication of vesicular stomatitis virus. *Proc, Natl, Acad. Sci.* 80, 5827-5831.
- Wolin SL, O'Brien Ca, K Margelot, A Becker, CJ Yoo. [1993]. In W Filipowicz, I Mattaj and WJ Van Venrooij (Eds). *Structure of eukariotic RNPs.* p74.
- Xiao Q,TV Sharp, IW Jeffrey, MC James, GJM Pruijin, WJ van Venrooij, MJ Clemens. [1994]. The La antigen inhibits the activation of the interferon inducible protein kinase PKR by sequestering and unwinding double-stranded RNA. *Nucl. Acid Res.* 22, 2512-2518.
- Yamagata H, M Akizuki, T Tojo, M Homma. [1986]. Anti-Ro (SSA) and anti-La (SSB) antibodies in patients with connective tissue diseases. *Scand. J. Rheumatol.* 62, 98-101.
- Yannopoulos Di, S Roncin, A Lamour, YL Pennec, HM Moutsopoulos, P Youinou. [1992]. Conjunctival Epithelial Cells from patients with SS inappropriately express Major Histocompatibility Complex Molecules, La (SSB) antigen and heat Shock Proteins. *J.Clin.Immunol.* 12, 4, 259-265.
- Yiannaki EE, AG Tzioufas, M Bachmann, J Hantoumi, V Tsikaris, M Sakarellos-Daitsiotis, C Sakarellos, HM Moutsopoulos. [1998]. The value of synthetic linear epitope analogues of La/SSB for the detection of autoantibodies to La/SSB. Specificity, Sensitivity and comparison of methods. *Clin. Exp. Immunol.* 112, 152-158.
- Yiannaki EE, AG Tzioufas, PG Vlachoyiannopoulos, MN Mannousakis, C Sakarellos, M Sakarellos-Daitsiotis, HM Moutsopoulos. [1999]. In vivo study of antibodies to the linear epitopes of La/SSB: B and T cell responces. In preparation.
- Yoo CJ, SL Wolin [1997]. The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell* 89; 393-402.



❖ **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



**ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΚΑΙ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΡΑΜΜΙΚΩΝ Β
ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΤΟΥ
ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟΥ LA/SSB**

Α.Γ. Τζιούφας, Ε.Ε. Γιαννάκη, Μ.Σακαρέλλου -Δαιτσιώτου*, Ι.Γ.
Ρούτσιας*, Κ.Σακαρέλλος* και Χ.Μ. Μουτσόπουλος.

Τομέας Παθολογικής Φυσιολογίας, Εθνικό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Αθήνα και * Τμήμα Χημείας, Τομέας Οργανικής Χημείας και
Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Δημοσιεύθηκε στο:
Clin Exp Immunol 1997; 108: 191-198

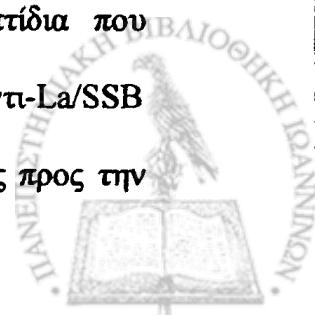


**ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ
ΓΡΑΜΜΙΚΩΝ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΤΟΥ
ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟΥ La/SSB.**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χαρτογράφηση των Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων της πρωτεΐνης La/SSB πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συνθετικών εικοσιπεπτιδίων, τα οποία αλληλεπικαλύπτονται κατά 8 αμινοξέα και καλύπτουν όλο το μήκος της. Κεκαθαρμένη IgG, προερχόμενη από πέντε ασθενείς με Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ) και από τέσσερις ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjögren (πσS), ελέγχθηκε ως προς την ικανότητά της να αναγνωρίζει τα συνθετικά πεπτίδια.

Τα πεπτίδια που αντιδρούσαν εντονότερα με την IgG, είχαν την αλληλουχία 145-164αα, 289-308αα, 301-320αα και 349-368αα. Ο καθορισμός του ελάχιστου δραστικού μήκους που έπρεπε να έχουν τα πεπτίδια προκειμένου να είναι ανοσοδραστικά, απεκάλυψε τους ακόλουθους επιτόπους: $^{147}\text{HKAFKGS}^{154}$, $^{291}\text{NGNLQLRNKEVT}^{302}$, $^{301}\text{VTWEVLEGEVEKEALKKI}^{318}$ και $^{349}\text{GSGKGKVQFQGKTKF}^{364}$. Με τη χρησιμοποίηση βάσεων δεδομένων πρωτεϊνών με πληροφορίες για όλες τις γνωστές πρωτεΐνες, ελέγχθηκαν οι επίτοποι αυτοί ως προς την μοριακή ομολογία τους, καθώς και για τα χαρακτηριστικά διαμόρφωσής τους, με άλλες πρωτεΐνες. Ο επίτοπος $^{147}\text{HKAFKGS}^{154}$ της La/SSB πρωτεΐνης βρέθηκε να έχει ομολογία 83.3% με την περιοχή $^{158}\text{HKGFKGVD}^{177}$ της βασικής πρωτεΐνης της μεσλίνης (BPM) και 72% ομολογία με το πεπτίδιο $^{907}\text{YKNFKGTI}^{926}$ της ανθρώπινης DNA τοποϊσομεράσης II. Τα πεπτίδια που διαθέτουν αυτές τις αλληλουχίες, αντιδρούν διασταυρωτά με αντι-La/SSB αντισώματα. Προκειμένου να ελεγχθεί η ευαισθησία και η ειδικότητα ως προς την



ικανότητα των πεπτιδίων να αναγνωρίζουν αντι-La/SSB αντισώματα, ελέγχθηκαν 63 αντι-La/SSB θετικοί οροί, προερχόμενοι από ασθενείς με σύνδρομο Sjogren και Συστηματικό ερυθματώδη λύκο, 35 οροί προερχόμενοι από ασθενείς με σS και ΣΕΛ χωρίς αντι-La/SSB αντισώματα και 41 οροί φυσιολογικών αιμοδοτών, εναντίον των βιοτινιλωμένων συνθετικών πεπτιδικών αναλόγων της La/SSB πρωτεΐνης. Αντι-La/SSB αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε συχνότητες από 20% για τον επίτοπο $^{147}\text{HKAFKGS}^{154}$ έως 100% για τον επίτοπο $^{349}\text{GSGKGKNVQFQGGKTKF}^{364}$. Η ευαισθησία και ειδικότητα, όπως αυτή προκύπτει από την συνολική εκτίμηση της ικανότητας αναγνώρισης των αντι-La/SSB αντισωμάτων από τα τέσσερα πεπτιδία, ήταν 93.6% και 85.6% αντίστοιχα. Συμπερασματικά, τα αντι-La/SSB αντισώματα συνιστούν ένα ετερογενή πληθυσμό, ο οποίος αναγνωρίζει γραμμικούς B λεμφοκυτταρικούς επιτόπους του La/SSB μορίου.

Ο επίτοπος $^{147}\text{HKAFKGS}^{154}$ είναι ομόλογος με τμήματα δύο άλλων πρωτεϊνών: της ανθρώπινης ΒΜΠ και της DNA τοποϊσομεράσης II. Επιπλέον, οι συνθετικοί επίτοποι παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα ως προς την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν αντι-La/SSB αντισώματα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αυτοαντισώματα κατά του La/SSB αυτοαντιγόνου βρίσκονται συχνά σε ασθενείς με σύνδρομο Sjogren (σS) και Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο (ΣΕΛ). Η La/SSB πρωτεΐνη είναι τμήμα ενός ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου, 408 αμινοξέων και 47KD μοριακού βάρους και μπορεί να συνδεθεί με όλα τα μεταγραφικά προϊόντα της RNA πολυμεράσης III. Κατά συνέπεια, τα σύμπλοκα της La/SSB μπορεί να συμπεριλαμβάνουν ανθρώπινα κυτταροπλασματικά RNAs (hyRNAs Ro RNAs), u1 RNA, 5s RNA, tRNA και αρκετά υικά RNAs,



συμπεριλαμβανομένων των VA-RNAs και EBER-RNAs που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του αδενοϊού Epstein Barr (EBV) [1].

Παρόλη την σημαντική εξέλιξη στον τομέα του πλήρους χαρακτηρισμού και της μοριακής κλωνοποίησης της La/SSB πρωτεΐνης, ο ακριβής καθορισμός των Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων δεν έχει επιτευχθεί. Σε προηγούμενες μελέτες, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές μοριακής βιολογίας για την εξακρίβωση των αντιγονικών περιοχών της La/SSB. Ο Chan και οι συνεργάτες του [2, 3] χρησιμοποιώντας την πρωτεάση V8 του σταφυλόκοκκου αugeus, εφάρμοσαν ελεγχόμενη πρωτεόλυση της La/SSB πρωτεΐνης και διαχώρισαν δύο αντιγονικά ανεξάρτητα τμήματα, ανθεκτικά στην πρωτεόλυση που τα χαρακτήρισαν ως X και Y. Ο Sturgess και οι συνεργάτες του χρησιμοποιώντας συμπληρωματικό DNA (cDNA), το οποίο κωδικοποιούσε το 87% της La/SSB πρωτεΐνης, αναγνώρισαν έναν κύριο αντιγονικό επίτοπο στα 103 αμινοξέα του καρβόξυλου άκρου της πρωτεΐνης [4]. Οι Rauh και Lüthmann [5] πρότειναν τρεις ανεξάρτητες αντιγονικές περιοχές, που περιείχαν τις αλληλουχίες 284-292, 293-345 και 346-383 του La/SSB μορίου. Ο St Clair και οι συνεργάτες του [6], καθόρισαν τρεις αντιγονικές περιοχές που αντιστοιχούν στις αλληλουχίες 1-107, 111-242 και 242-408 (που ονομάστηκαν LaA, LaC και LaD αντίστοιχα) χρησιμοποιώντας τμήματα της La/SSB πρωτεΐνης που είχαν συνμεταφρασθεί με άλλες πρωτεΐνες μέσω της τεχνολογίας του cDNA. Πιο πρόσφατα, ο Bini και οι συνεργάτες του [7] καθόρισαν 2 αντιγονικά ισχυρούς επιτόπους, που κάθε ένας εντοπιζόταν στο άμινο και καρβόξυλο άκρο της πρωτεΐνης.

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να διερευνηθεί η λεπτομερής και ακριβής ειδικότητα των αντι-La/SSB αντισωμάτων που προέρχονται από ασθενείς με πρωτοπαθές σS και ΣΕΛ, έναντι συνθετικών αλληλεπικαλυπτόμενων πεπτιδίων, 20 αμινοξέων μήκους, τα οποία καταλαμβάνουν όλο το μήκος της πρωτεΐνης. Ελέγχθηκε



επίσης η ύπαρξη ομολογίας των προσδιορισμένων επιτόπων με τμήματα άλλων πρωτεϊνών που δεν συσχετίζονται λειτουργικά με την La/SSB πρωτεΐνη. Επιπλέον, γίνεται αναφορά στην ικανή χρήση αυτών των συνθετικών αναλόγων των αντιγονικών επιτόπων της La/SSB για την ανίχνευση των αντι-La/SSB αντισωμάτων και την κλινική τους σημασία.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς

Γάμμα σφαιρίνη (IgG) προερχόμενη, μετά από επεξεργασία με χρωματογραφία σεφαρόζης, στην οποία έχει προσδεθεί πρωτεΐνη A (Pharmacia, Uppsala, Sweden), από ορούς πέντε ασθενών με Συστηματικό Ερυθρηματώδη Λύκο (ΣΕΛ) [8] και τεσσάρων ασθενών με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren (πσS) [9], χρησιμοποιήθηκε για την χαρτογράφηση των επιτόπων της La/SSB πρωτεΐνης. Η ύπαρξη αντι-La/SSB αντισωμάτων επιβεβαιώθηκε με την τεχνική της αντίθετης ανοσοηλεκτροφόρησης, της ανοσοαποτύπωσης και της ανοσοενζυμικής τεχνικής (Shield Diagnostics, London, UK). Τέσσερις οροί περιείχαν επιπλέον αντισώματα κατά των αυτοαντιγόνων Ro52kD και Ro60kD, τρεις οροί περιείχαν αντισώματα έναντι του αυτοαντιγόνου Ro52kD και δύο, έναντι του αντιγόνου Ro60kD. Επίσης χρησιμοποιήθηκε κεκαθαρμένη IgG, με αντι-Ro52kD και αντι-Ro60kD δραστηριότητα χωρίς αντι-La/SSB αντισώματα, προερχόμενη από έναν ασθενή με ΣΕΛ και έναν ασθενή με πσS. Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν μόρια IgG προερχόμενα από τρεις φυσιολογικούς αιμοδότες που δεν παρουσίαζαν δραστηριότητα έναντι κανενός αυτοαντιγόνου. Χρησιμοποιήθηκε IgG αντί ολικού ορού, διότι προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι εξαλείφονται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα.



Η ευαισθησία και η ειδικότητα των καθορισμένων επιτόπων ως προς τα αντι-La/SSB αυτοαντισώματα, προσδιορίστηκε με τη χρησιμοποίηση 39 αντι-La/SSB θετικών ορών ασθενών με πσS (όλοι οι ασθενείς ήταν θήλειες, μέσης ηλικίας 56 ± 7 ετών) και 24 αντι-La/SSB θετικούς ορούς ασθενών με ΣΕΛ (21 ασθενείς ήταν θήλειες, 3 άρρενες, μέσης ηλικίας 42 ± 8 ετών). Είκοσι οροί περιείχαν επιπλέον αντι-Ro60kD αντισώματα, 34 οροί είχαν αντι-Ro52kD αντισώματα επιπλέον και εννέα οροί είχαν επιπλέον αντι-Ro60kD και αντι-Ro52kD αντισώματα. Τριάντα πέντε οροί ασθενών με πσS και ΣΕΛ χωρίς αντι-La/SSB αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σαν αρνητικοί μάρτυρες νόσου. Οι οροί αυτοί περιείχαν τα ακόλουθα αυτοαντισώματα: τριάντα πέντε είχαν αντισώματα έναντι του Ro60kD αυτοαντιγόνου, εννέα είχαν αντισώματα έναντι του Ro52kD, πέντε είχαν αντι-U1RNP αντισώματα, τρεις είχαν αντι-dsDNA αντισώματα και δώδεκα είχαν ρευματοειδή παράγοντα τάξεως IgM. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 41 οροί φυσιολογικών αιμοδοτών ως αρνητικοί μάρτυρες.

Πεπτιδική σύνθεση

Πεπτίδια προσδεμένα σε σταθερό υπόστρωμα: Συντέθηκαν εξήνταοκτώ πεπτίδια, μήκους 20 αμινοξέων και με βήμα επικάλυψης 8 αμινοξέων το ένα από το άλλο, τα οποία κάλυπταν όλο το μήκος της La/SSB πρωτεΐνης, σύμφωνα με την τεχνική που εισήγαγε ο Geysen και οι συνεργάτες του [10]. Κάθε πεπτίδιο συντέθηκε σε δυάδα, προκειμένου ο κάθε ορός να ελεγχθεί εις διπλούν, ταυτόχρονα με την ανοσοενζυμική τεχνική. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε σε προκατασκευασμένα ραβδία πολυαιθυλενίου (Cambridge Research Biochemical Inc., London, UK). Η διαδικασία βασίστηκε στις αρχές σύνθεσης πεπτιδίων στερεάς φάσης, όπως περιγράφηκε από τον Merrifield [11], με τη χρησιμοποίηση ως προστατευτικής ομάδας της α-αμινομάδας των αμινοξέων το φθορομεθυλκαρβοξύλιο (Fmoc). Παράλληλα με την σύνθεση των



πεπτιδίων συντέθηκαν πεπτίδια μάρτυρες που έχουν τις αλληλουχίες PLAG(G)_n και GLAG(G)_n σε ποικίλα μήκη (2 έως 16 αμινοξέα). Τα πεπτίδια PLAG(G)_n αναγνωρίζονται ειδικά από αντι-PLAG(G)_n μονοκλωνικό αντίσωμα (Cambridge Research Biochemical Inc.), ενώ τα πεπτίδια GLAG(G)_n δεν αναγνωρίζονται από το μονοκλωνικό αντίσωμα. Επιπλέον η εξακρίβωση της σωστής σύνθεσης των πεπτιδίων ελέγχθηκε, με ανάλυση των αμινοξέων δύο διαφορετικών πεπτιδίων μετά από αποκοπή των πεπτιδίων από τα ραβδία σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Cohen & Stydous [12].

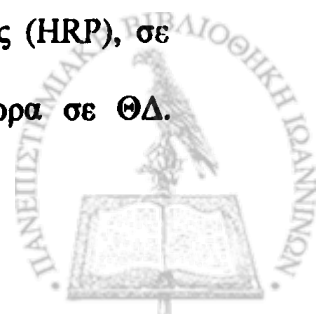
Διαλυτά, βιοτινιωμένα πεπτίδια: Όλα τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στις αλληλουχίες ¹⁴⁷HKAFKGS¹⁵⁴, ²⁹¹NGNLQLRNKEVT³⁰², ³⁰¹VTWEVLEGEVEKEALKKI³¹⁸ και ³⁴⁹GSGKGVQFQGKTKF³⁶⁴ συντέθηκαν έχοντας στο αμινοτελικό άκρο τους το μόριο της βιοτίνης και ακολουθώντας την διαδικασία πεπτιδικής σύνθεσης στερεάς φάσης. Το σταθερό υπόστρωμα, επάνω στο οποίο έγινε η σύνθεση, ήταν η βενζυδριλαμίνη και τα αμινοξέα είχαν ως προστατευτική ομάδα Boc για το α NH₂ άκρο τους [13]. Για την σύζευξη των αμινοξέων χρησιμοποιήθηκε καρβοδιμίδιο (DCC) παρουσία υδροξυβενζοτριάζολιου (HOBT) στην αναλογία αμινοξύ/ DCC/ HOBT/ ρητίνη 3/ 3/ 3/1. Η αποπροστασία της Nat-Boc προστατευτικής ομάδας πραγματοποιήθηκε με την χρήση τριφθοροοξικού οξέος, ενώ ακολούθησε εξουδετέρωση με την βάση δισοπροπυλαμίνη. Η βιοτινίωση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη d-βιοτίνης στο N- άκρο των πεπτιδίων κατόπιν απομάκρυνσης της Boc ομάδας, ακολουθώντας την μέθοδο σύνθεσης στερεάς φάσης. Τα βιοτινιωμένα πεπτίδια αποχωρίστηκαν από την ρητίνη με τη χρήση άνυδρου υδροφθορικού οξέος (HF), παρουσία ανισόλης και φαινόλης (10% v/v) στους 0°C για 1 ώρα, προκειμένου να απομακρυνθούν οι παράπλευρες



προστατευτικές ομάδες των αμινοξέων που αποχωρίζονται το πεπτίδιο στις ισχυρά όξινες συνθήκες. Τα πεπτίδια ανακτώνται από την ρητίνη με τη χρήση 2M οξικού οξέος, λιοφυλιώνονται και καθαρίζονται σε στήλη χρωματογραφίας κατανομής (partition), χρησιμοποιώντας στήλη σέφαντεξ G-25, εξισορροπούνται με διάλυμα 2M οξικού οξέος. Ο διαχωρισμός των κλασμάτων των πεπτιδίων έγινε με την χρήση ομογενούς μίγματος βουτανόλης/ πυριδίνης/ οξικού οξέος/ νερού (BPyAW), σε αναλογίας 4:1:1:2 v/v. Ο καθαρισμός των πεπτιδίων ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε BpyAW (4:1:1:2 v/v), ενώ φάσματα μονοδιάστατου και δυσδιάστατου φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H-NMR}$ και ανάλυση αμινοξέων επιβεβαίωσαν την καθαρότητα και την ταυτότητα των πεπτιδίων.

Παρασκευή κυτταρικού εκχυλίσματος και ανοσοαποτύπωση

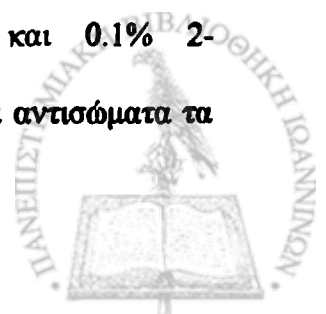
Καλλιεργούμενα καρκινικά κύτταρα HeLa χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων σύμφωνα με την τεχνική που εφάρμοσαν πρώτοι ο Habets και οι συνεργάτες του [14]. Τα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση γέλης πολυακρυλαμίδιου παρουσία του αποδιατακτικού παράγοντα δωδέκυλοθειικό νάτριο (SDS). Ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη κόπηκε σε στενές λωρίδες, οι οποίες υποβλήθηκαν σε ολονύκτια επεξεργασία με άπαχο γάλα 5% στους 4°C , προκειμένου να δεσμευθούν οι κενές θέσεις της νιτροκυτταρίνης. Εν συνεχεία, προστέθηκαν ανθρώπινοι οροί, προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων σε αυτούς, σε αραιώση 1:30 και σε διάλυμα 5% άπαχου γάλακτος, ολονύκτια στους 4°C . Ακόλουθη η προσθήκη δευτέρου αντισώματος αντι-ανθρώπινης γ -ανοσοσφαιρίνης, συνδεδεμένου με ένζυμο υπεροξειδάσης (HRP), σε αραιώση 1:1000 και σε διάλυμα 5% άπαχου γάλακτος, για μία ώρα σε ΘΔ.



Προστέθηκε το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης (4-χλώριο-L- ναφθόλιο και 30% H_2O_2) και αναπτύχθηκε το χρώμα στις περιοχές που προσκολλήθηκαν τα αυτοαντισώματα.

Ανοσοενζυμική τεχνική (ELISA).

Χρησιμοποιώντας ως αντιγόνα, πεπτίδια συνδεδεμένα σε ραβδία: Τα πεπτίδια που συντέθηκαν ομοιοπολικά επάνω σε ράβδους πολυαιθυλενίου, ελέγχθηκαν για την δυνατότητα αναγνώρισής τους από αντισώματα με την ανοσοενζυμική τεχνική ELISA σε πλακίδια 96 οπών. Τα ραβδία εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα φωσφορικού νατρίου (PBS) pH: 7.2, το οποίο περιείχε απορρυπαντικό Tween-20 σε αναλογία 0.1%, 1% αλβουμίνη και 1% οβαλβουμίνη προκειμένου να καλυφθούν οι θέσεις των ραβδίων που δεν είχαν πεπτίδιο. Εν συνεχεία προστέθηκε σε κάθε οπή 100μl IgG 200μg/ml (συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε αραιώση IgG ορού 1:50) και το πλακίδιο με τα εμβαπτισμένα ραβδία επώαστηκαν ολονύκτια στους 4°C. Η συγκέντρωση αυτή της ανοσοσφαιρίνης επιλέχθηκε, γιατί παρουσίαζε την υψηλότερη ειδική αναγνώριση. Τα ραβδία πλύθηκαν σε διάλυμα PBS που περιείχε 0.5% Tween-20 και εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αντι-ανθρώπινης IgG συνδεδεμένης με υπεροξειδάση (1:1000 αραιώση) για 1 ώρα σε ΘΔ, πλύθηκαν και η πρόδεση αντισωμάτων επί των πεπτιδίων των ραβδίων ελέγχθηκε με την ανάπτυξη χρώματος, μετά την προσθήκη του υποστρώματος της υπεροξειδάσης, στα ραβδία που προσδέθηκε η ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν διάλυμα 2.2' άζινο-cis3-αιθυλβενζοθειαζολινθεικού οξέος (ABTS), το οποίο φωτομετρήθηκε στα 405nm. Εν συνεχεία, τα ραβδία υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με υπέρηχους για 30min σε διάλυμα 0.1M δισόξινου φωσφορικού νατρίου, 1% SDS και 0.1% 2-μερκαπτοαιθανόλης στους 60°C, προκειμένου να απομακρυνθούν τα αντισώματα τα



οποία είχαν προσδεθεί στα ραβδία και να επαναχρησιμοποιηθούν, ή να αποθηκευθούν σε ξηρό και ψυχρό (2-8°C) περιβάλλον. Για να επιβεβαιωθεί το γεγονός ότι τα αντισώματα απομακρύνονται πλήρως από τα πεπτίδια των ραβδίων, τα ραβδία υποβλήθηκαν στον ίδιο ανοσοενζυμικό έλεγχο, χωρίς το στάδιο της προσθήκης της ανθρώπινης IgG. Κανένα ραβδίο δεν έδωσε οπτική απορρόφηση μεγαλύτερη από το ανώτερο αρνητικό όριο.

Χρησιμοποιώντας ως αντιγόνα, βιοτινιωμένα πεπτίδια: Ο ανοσοενζυμικός έλεγχος των βιοτινιωμένων πεπτιδίων έγινε ως εξής: Έγινε προεπεξεργασία πλακιδίων πολυστυρενίου (Nunc, Roskilde, Denmark) 96 οπών με 5μg/ml στρεπταβιδίνης (100μl/οπή) ολονύκτια, στους 4°C. 100μl αλβουμίνης Βοείου ορού (ABO), 2% σε PBS, pH: 7.3 προστέθηκαν σε κάθε οπή για 1 ώρα σε ΘΔ. Ακολούθησε η προσθήκη των βιοτινιωμένων πεπτιδίων (5 μg/ml) για 1 ώρα σε ΘΔ. Τα πλακίδια πλύθηκαν 3 φορές με PBS-0.1% Tween 20, οι οροί προστέθηκαν σε αραιώση 1:50, αραιωμένοι σε διάλυμα ABO 2% σε PBS (50μl/οπή). Μετά από 3 ώρες επώαση και τρία πλυσίματα προστέθηκε δεύτερο αντι-ανθρώπινο αντίσωμα, ανεπτυγμένο σε κουνέλι και συνδεδεμένο με ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (Dako, Glostrup, Denmark), σε αραιώση 1:6000 (50μl/οπή). Μετά από επώαση 2 ωρών σε ΘΔ και τρία πλυσίματα, προστέθηκαν 50μl ενζυμικού υποστρώματος (p-φωσφορικό-νιτροφαινύλιο σε διαιθανολαμίνη) και η χρωμοαντίδραση προσδιορίστηκε με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης μετά από 30min χρόνο αντίδρασης στα 405nm. Η μη ειδική προσρόφηση του ορού προσδιορίστηκε με την πραγματοποίηση παράλληλων πειραμάτων, όπου στα πλακίδια δεν προστέθηκε βιοτινιωμένο πεπτίδιο. Η πραγματική πρόσδεση υπολογίστηκε με την αφαίρεση της τιμής της οπτικής απορρόφησης του ορού στις οπές χωρίς το πεπτίδιο από την τιμή της οπτικής



απορρόφησης του ίδιου ορού στις σπές που περιείχαν το πεπτίδιο. Προκαταρκτικά πειράματα, στα οποία ελέγχθηκαν παράμετροι όπως συγκέντρωση όλων των αντιδραστηρίων, πραγματοποιήθηκαν, για να βρεθούν οι καλύτερες πειραματικές συνθήκες. Το ανώτερο αρνητικό όριο υπολογίστηκε ως η μέση τιμή των 41 ορών των φυσιολογικών αιμοδοτών συν 3 τυπικές αποκλίσεις (s.d.).

Τεχνικές αναστολής

Προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των συνθετικών επιτόπων να αναστέλλουν την ικανότητα πρόσδεσης των αντισωμάτων επί της La/SSB πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκε αντι-La/SSB ορός, ο οποίος αναγνώριζε και τους τέσσερις επιτόπους. Ο ορός αραιωμένος σε αναλογία 1:500, προεπωάστηκε για 3 ώρες σε ΘΔ με κάθε ένα από τους συνθετικούς επιτόπους, καθώς και με μίγμα των τεσσάρων επιτόπων σε συγκεντρώσεις από 0.01 έως 5μg/ml. Ο υπό αναστολή ορός ελέγχθηκε με ανοσοενζυμική τεχνική ELISA (Shield Diagnostics) για μείωση της αντι-La/SSB δραστηριότητάς του.

Υποκατάσταση με αλανίνη, προβλέψεις υπολογιστή και έρευνα ομολογίας πεπτιδίων.

Προκειμένου να αποκαλυφθεί η ύπαρξη αμινοξέων στις αλληλουχίες των επιτόπων, σημαντικών για την εκδήλωση της αντιγονικότητάς τους, συντέθηκαν πεπτίδια στα οποία είχαν αντικατάσταση ενός αμινοξέος με αλανίνη. Τα νέα αυτά πεπτίδια ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να συνδέονται με IgG με αντι-La/SSB ειδικότητα. Η αλανίνη επιλέχθηκε, λόγω της χαμηλής αντιγονικότητάς της και του μικρού στερεοχημικού όγκου που καταλαμβάνει το μόριό της.



Η πρόβλεψη του υδρόφοβου προφίλ, της ευελιξίας, της T και B λεμφοκυτταρικής αντιγονικότητας των επιτόπων στηριζόμενη στην πρωτοταγή δομή τους έγινε με τη χρήση του προγράμματος EPIPLOT [15]. Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής των επιτόπων, στηρίχθηκε στη μέθοδο PHDsec [16].

Οι αλληλουχίες των επιτόπων συγκρίθηκαν με αλληλουχίες άλλων πρωτεϊνών των βάσεων δεδομένων Swiss-PROT, NBRF/PIR, PRF και GENPEPT, χρησιμοποιώντας τους αλγόριθμους Fasta [17] και Smith & Waterman [18] στους σταθμούς GENOMENET-FASTA και EMBL-FASTA-BLITZ. Η αρίθμηση των ανόμοιων αμινοξέων έγινε χρησιμοποιώντας τα καλούπια PAM250 και PAM 100 [19]. Ο αλγόριθμος Smith-Waterman επέτρεψε την προσθήκη κενών στην αλληλουχία των πεπτιδίων κατά την σύγκρισή τους με άλλα πεπτίδια.

Στατιστική ανάλυση

Η οπτική απορρόφηση (OA) κάθε ορού, συμπεριλαμβανομένων και των φυσιολογικών ορών, εκφράστηκε σε μονάδες που υπολογίστηκαν βάσει της φόρμουλας:

$$\text{Δείγμα (μονάδες)} = \frac{\text{OA δείγματος} - \text{OA δείγματος χωρίς αντιγόνο}}{\text{Μέση τιμή OA} + 3 \text{ s.d. ορών φυσιολογικών αιμοδοτών}} \times 100$$

Σύμφωνα με αυτό τον τύπο, οι 100 μονάδες είναι το ανώτατο αρνητικό όριο για κάθε τεχνική. Στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων των ασθενών και των φυσιολογικών αιμοδοτών, υπολογίστηκαν με τον έλεγχο t. Η ευαισθησία των συνθετικών επιτόπων υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$\text{Ευαισθησία (\%)} = \frac{\text{Αριθμός των θετικών δειγμάτων}}{\text{Συνολικός αριθμός δειγμάτων}} \times 100$$



Η ειδικότητα των συνθετικών επιτόπων υπολογίστηκε βάσει του τύπου:

$$\text{Ειδικότητα (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Θετικά δείγματα ασθενών χωρίς αντι-La/SSB αντισώματα}}{\text{Συνολικά δείγματα ασθενών χωρίς αντι-La/SSB αντισώματα}}\right) \times 100$$

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αναγνώριση και προσδιορισμός του ελάχιστου δραστικού μήκους των αντιγονικών επιτόπων.

Συντέθηκαν ανά δυάδες 34 πεπτίδια μήκους 20 αμινοξέων, τα οποία αλληλεπικαλύπτονται κατά 8 αμινοξέα και κάλυπταν όλη την αλληλουχία της La/SSB πρωτεΐνης, όπως αυτή προσδιορίστηκε από τον Chambers και τους συνεργάτες του [20] και τον Chan και τους συνεργάτες του [21]. Επιπλέον συντέθηκαν 6 εικοσιπεπτίδια της La/SSB πρωτεΐνης, με διαφορετική αλληλουχία από αυτή που χρησιμοποιήθηκε, σύμφωνα με την περιγραφή άλλων ερευνητών [4, 5, 22]. Τα πεπτίδια αυτά ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να αναγνωρίζονται από IgG με αντι-La/SSB ειδικότητα, προερχόμενη από ασθενείς με πσS και ΣΕΛ. Και οι πέντε IgG ασθενών με ΣΕΛ αναγνώριζαν τα πεπτίδια της La/SSB πρωτεΐνης με την αλληλουχία 145-164 και 289-308. IgG όλων των ασθενών με πσS αναγνώριζε το πεπτίδιο 349-368, ενώ τρεις από τις τέσσερις IgG αναγνώριζαν επιπλέον το πεπτίδιο 301-320 της La/SSB πρωτεΐνης (Σχήμα 1α, β).

Για τον προσδιορισμό του ελάχιστου δραστικού μήκους των αντιγονικών επιτόπων, συντέθηκαν δύο σει πεπτιδίων ποικίλου μήκους για κάθε εικοσιπεπτίδιο. Κάθε σει συμπεριλάμβανε πεπτίδια, στα οποία είχε γίνει σταδιακά αποκοπή δύο αμινοξέων από το άμινο- ή το καρβόξυλο- άκρο του αρχικού ανοσοδραστικού εικοσιπεπτιδίου. Τα πεπτίδια εκείνα, των οποίων το μήκος ήταν απαγορευτικό για την



αναγνώρισή τους από την αντι-La/SSB IgG, θεωρήθηκαν τα άκρα των επιτόπων (Σχήμα 2). Κατ'αυτήν την έννοια, το ελάχιστο δραστικό μήκος του επιτόπου TLHKAFKGSIFVVFDIESA (145-164) βρέθηκε να είναι το $^{147}\text{HKAFKGSI}^{154}$, του επιτόπου ANNGNLQLRNKEVTWEVLEG (289-308) να είναι το $^{291}\text{NGNLQLRNKEVT}^{302}$, του επιτόπου VTWEVLEGEVEKEALKKIIE (301-320) να είναι το $^{301}\text{VTWEVLEGEVEKEALKKI}^{318}$ και του επιτόπου GSGKGVQFQGKTKFASDD να είναι το $^{349}\text{GSGKGVQFQGKTKF}^{364}$.

Η ειδικότητα των προσδιορισμένων επιτόπων επιβεβαιώθηκε με την βοήθεια πειραμάτων αναστολής. Βρέθηκε ότι υπό την παρουσία των συνθετικών πεπτιδίων, μειώθηκε η ικανότητα πρόσδεσης των αντι-La/SSB αντισωμάτων ως προς την ολική La/SSB πρωτεΐνη. Η μείωση αυτή, ήταν αναλογικά εξαρτώμενη από την συγκέντρωση των πεπτιδίων.

Αντικαταστάσεις με αλανίνη, προβλεπόμενα χαρακτηριστικά και μοριακή ομολογία των επιτόπων.

Η διαδοχική αντικατάσταση των αμινοξέων των επιτόπων με αλανίνη δεν επηρέασε την ικανότητά τους να αναγνωρίζονται από αντι-La/SSB ειδική IgG σε τρεις από τους τέσσερις καθορισμένους επιτόπους. Ωστόσο η αντικατάσταση της W303 (τρυπτοφάνης) από αλανίνη προκάλεσε σημαντική απώλεια της ανοσοδραστικότητας του επιτόπου ANNGNLQLRNKEVTW 303 EVLEG (289-308).

Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής των επιτόπων προτείνει ότι οι αλληλουχίες 147-154 και 301-318 έχουν διαμόρφωση έλικας και περιέχουν δομές β-βρόγχων. Επιπλέον ο επίτοπος 147-154 αποτελεί τμήμα της περιοχής πρόσδεσης του RNA με την La/SSB πρωτεΐνη. Και οι τέσσερις επίτοποι παρουσιάζουν χαρακτηριστικά υψηλής αντιγονικότητας [23] και εμπεριέχουν υψηλή αναλογία



υδρόφοβων αμινοξέων, τα οποία συναντώνται συχνά σε Β λεμφοκυτταρικούς επιτόπους [24] και εμφανίζουν μεγάλη ελαστικότητα [25]. Οι επίτοποι ΗΚΑΦΚΓΣΙ (147-154) και VTWEVLEGEVEKEALKKI (301-308) περιέχουν πιθανούς Τ λεμφοκυτταρικούς επιτόπους, όπως προβλέπουν τρεις από τις τέσσερις μεθόδους πρόβλεψης Τ λεμφοκυτταρικών επιτόπων [26-28]. Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των επιτόπων υποδεικνύουν με μεγάλη πιθανότητα ότι βρίσκονται τοποθετημένοι στην επιφάνεια της La/SSB πρωτεΐνης.

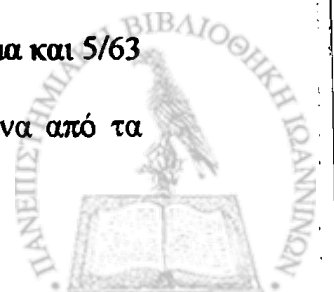
Η εξακρίβωση της πρωτοταγούς δομής των επιτόπων της La/SSB πρωτεΐνης, σε συνδυασμό με την χρήση βάσεων δεδομένων για πρωτεΐνες, έδωσε την δυνατότητα για έλεγχο κοινών ομολογιών με πρωτεΐνες διαφορετικής προέλευσης, δομής και λειτουργίας. Ο επίτοπος ΗΚΑΦΚΓΣΙ (147-154) είναι εξελεκτικά πολύ σταθερός μεταξύ των διαφόρων θηλαστικών. Ο επίτοπος αυτός παρουσίασε 83.3 % ομολογία αλληλουχίας με την περιοχή 164-171 (ΗΚΓΦΚΓΒΔ) της ανθρώπινης βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης και 72% ομολογία αλληλουχίας με το τμήμα 914-921 (ΚΝΦΚΓΤΙΩ) του αυτοαντιγόνου τοποϊσομεράση II. Αυτές οι ομολογίες μας ώθησαν στην κατασκευή νέων πεπτιδίων που περιείχαν τις προαναφερθείσες αλληλουχίες, για να ελεγχθούν εναντίον αντι-La/SSB ειδικής IgG. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 4^α, η ειδική αντι-La/SSB IgG αναγνώριζε όχι μόνο τον La/SSB επίτοπο, αλλά και τα πεπτίδια της ΒΙΠΜ και της Τοποϊσομεράσης II. Επιπλέον προεπώαση της αντι-La/SSB IgG με τον επίτοπο 147-154 σε συγκέντρωση 250μg/ml, κατέληξε σε σημαντική μείωση των επιπέδων πρόσδεσης της IgG με τα πεπτίδια την ΒΙΠΜ και της Τοποϊσομεράσης II. (Σχήμα. 4β). Αντιθέτως προεπώαση της IgG με τον επίτοπο 289-308 της La/SSB πρωτεΐνης δεν προκάλεσε αναστολή της πρόσδεσής της στα πεπτίδια αυτά.



Επικράτηση των αντιπεπτιδικών αντισωμάτων σε ορούς ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα.

Η επικράτηση των αντιπεπτιδικών αντισωμάτων σε ορούς ασθενών με ΣΕΛ και πσS διερευνήθηκε με την χρήση των βιοτινιλιωμένων αντιγονικών επιτόπων με ELISA. Δεδομένου του ότι τα πεπτίδια αναστέλλουν μερικώς την πρόσδεση των αντισωμάτων στην La/SSB πρωτεΐνη, είναι προφανές ότι αυτοί οι επίτοποι είναι στόχοι συγκεκριμένων πληθυσμών αντι-La/SSB αντισωμάτων. Αντισώματα κατά του $^{147}\text{HKAFKGSI}^{154}$ επιτόπου ανιχνεύθηκαν σε 12/24 (50%) ορούς ασθενών με ΣΕΛ και 7/39 (18%) ορούς ασθενών με πσS που είχαν αντι-La/SSB δραστικότητα. Κανένας από τους 35 ορούς ασθενών χωρίς αντι-La/SSB αντισώματα (νοσούντες μάρτυρες) δεν αναγνώρισε τον επίτοπο. Αντισώματα κατά του $^{291}\text{NGNLQLRNKEVT}^{302}$ επιτόπου ανιχνεύθηκαν σε 9/24 (37.5%) ορούς ασθενών με ΣΕΛ και 8/39 (20%) ορούς ασθενών με πσS που είχαν αντι-La/SSB δραστικότητα. Κανένας ορός ασθενούς χωρίς αντι-La/SSB αντισώματα δεν αναγνώρισε τον επίτοπο. Αντισώματα κατά του επιτόπου $^{301}\text{VTWEVLEGEVEKEALKKI}^{318}$ ανιχνεύθηκαν σε 19/24 (79%) ορούς ασθενών με ΣΕΛ και 27/39 (69%) ορούς ασθενών με πσS που είχαν αντι-La/SSB δραστικότητα. Ένας από τους 35 ορούς των νοσοούντων μαρτύρων αναγνώριζε τον επίτοπο. Τέλος, αντισώματα κατά του επιτόπου $^{349}\text{GSGKGKVQFQGKTKF}^{364}$ ανιχνεύθηκαν σε όλους τους ορούς ασθενών με ΣΕΛ (100%) με αντι-La/SSB δραστικότητα, σε 32/39 (82%) ορούς ασθενών με πσS και σε 4/35 (11.4%) ορούς νοσοούντων μαρτύρων (Σχήμα. 5). Τέσσερις από τους 41 ορούς φυσιολογικών αιμοδοτών (9.7%) αντιδρούσαν επίσης με τον επίτοπο αυτό.

Επτά οροί από τους 63 αντι-La/SSB θετικούς αντιδρούν με όλα τα πεπτίδια, 16/63 οροί αντιδρούν με τρία πεπτίδια, 31/63 οροί αντιδρούν με δύο πεπτίδια και 5/63 οροί με ένα πεπτίδιο. Τέσσερις από τους 63 οροί δεν αναγνώριζαν κανένα από τα



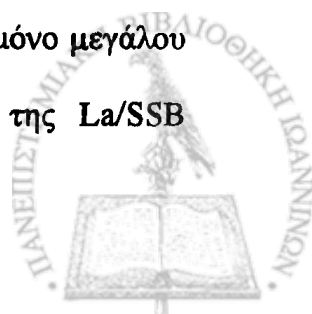
πεπτίδια. Η ανοσοενζυμική τεχνική ELISA του επιτόπου 349-364 παρουσίασε την υψηλότερη ευαισθησία (88%) και υψηλή ειδικότητα (88.6%). Αναγνώριση των αντι-La/SSB αντισωμάτων με τον επίτοπο 301-318 απεκάλυψε ευαισθησία 73% και ειδικότητα 93.1%. Η συσχέτιση μεταξύ των δύο αυτών τεχνικών ήταν 70%. Η ELISA, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν οι δύο άλλοι επίτοποι 147-154 και 291-302, παρουσίασε εξαιρετικά χαμηλότερη ευαισθησία (25% και 27% αντίστοιχα), ωστόσο κανένας από αυτούς τους επιτόπους δεν αντιδρούσε μη ειδικά με ορούς μάρτυρες. Η συνολική ευαισθησία και ειδικότητα, με την χρησιμοποίηση των αποτελεσμάτων και των τεσσάρων επιτόπων, υπολογίστηκε ως 93,6% και 85,6% αντίστοιχα. Κανένας από τους επιτόπους δεν παρουσίασε διαφοροποίηση ως προς την ικανότητα διαχωρισμού μεταξύ θετικών αντι-La/SSB ορών ασθενών με ΣΕΛ και πS.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια εύρεσης των επιτόπων του La/SSB αυτοαντιγόνου. Η ακριβής χαρτογράφηση των Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων του αυτοαντιγόνου La/SSB πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση αλληλοεπικαλυπτόμενων συνθετικών πεπτιδίων. Το μήκος των πεπτιδίων που χρησιμοποιήθηκε, ήταν αρκετά μεγάλο (20 αμινοξέων), διότι προηγούμενες μελέτες αντιγονικής χαρτογράφησης του Ro60kD αυτοαντιγόνου απέδειξαν ότι μεγάλοι μήκους πεπτίδια παρουσιάζουν υψηλότερη ειδικότητα [29] συγκρινόμενα με επικαλυπτόμενα οκταπεπτίδια [30]. Συγκεκριμένα, η αντιγονική χαρτογράφηση του Ro60kD μορίου που έγινε χρησιμοποιώντας εικοσαμερή συνθετικά πεπτίδια, απεκάλυψε δύο αντιγονικούς επιτόπους με ειδικότητα νόσου (ο ένας συσχετίζεται με κσS και ο άλλος με ΣΕΛ), σε αντίθεση με αντίστοιχη μελέτη που απεκάλυψε 14 επιτόπους χρησιμοποιώντας οκταπεπτίδια. Κατ'επέκταση, η αντιγονικότητα ενός επιτόπου πιθανόν καθορίζεται τόσο από την πρωτοταγή, όσο και από την δευτεροταγή δομή του πεπτιδίου. Σε συμφωνία με αυτά, μελέτες πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (ΠΜΣ) απεκάλυψαν ότι ακόμη και μικρά πεπτίδια, όπως ο επίτοπος PPGMRPP του Sm αυτοαντιγόνου [30], μπορεί να έχει παραπάνω από μία διαμόρφωση στο χώρο [31].

Κατά την διάρκεια των τελευταίων ετών, αρκετοί ερευνητές έχουν πραγματοποιήσει αντιγονική χαρτογράφηση του αυτοαντιγόνου La/SSB, χρησιμοποιώντας είτε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ποικίλου μήκους, συνδεδεμένη με άλλα μόρια είτε μεταλλαγμένα συμπληρωματικά μόρια DNA (cDNA) της La/SSB πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματά τους όμως δεν κατέληξαν σε ακριβή διασαφήνισμό των Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων της La/SSB πρωτεΐνης, διότι μελέτησαν μόνο μεγάλου μήκους πολυπεπτίδια. Απέδειξαν ωστόσο, ότι αντισώματα έναντι της La/SSB



πρωτεΐνης που αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο επίτοπο, δεν αντιδρούν με άλλους επιτόπους, προτείνοντας ότι η αντι-La/SSB απάντηση συμπεριλαμβάνει ανεξάρτητους αντι-La/SSB πληθυσμούς αντισωμάτων [32]. Αυτές οι παρατηρήσεις δηλώνουν ότι η παραγωγή αντι-La/SSB αντισωμάτων οφείλεται σε αντιγονοεξαρτώμενο μηχανισμό. Το αντιγόνο διεγέρτης μπορεί να είναι τμήμα της La/SSB πρωτεΐνης, μετουσιωμένης ή μη. Βάσει αυτών, ο ακριβής καθορισμός των Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων είναι εξέχουσας σημασίας, προκειμένου να διασαφηνιστεί ο υπεύθυνος για την παραγωγή αντι-La/SSB αντισωμάτων, μηχανισμός.

Οι επίτοποι που αναφέρονται σε αυτό το άρθρο, είναι γραμμικοί, μήκους 8 έως 18 αμινοξέων. Έχει παλαιότερα αναφερθεί ότι μικρός αλλά σημαντικός πληθυσμός αντισωμάτων που στρέφονται κατά επιτόπων διαμόρφωσης, είναι ικανός να αναγνωρίζει και γραμμικά τμήματα της πρωτεΐνης [33]. Η επικράτηση των γραμμικών επιτόπων που περιγράφεται σε αυτή την μελέτη, επιβεβαιώθηκε με δύο τρόπους. Πρώτον, οι επίτοποι αντιδρούν με μεγάλο αριθμό αυτοάνοσων ορών με αντι-La/SSB αντισώματα, αλλά όχι με ορούς φυσιολογικών αμοδοτών ή νοσούντων μαρτύρων. Δεύτερον, με την χρήση τεχνικών αναστολής αποδείχθηκε ότι στα αντισώματα που αντιδρούν με το μόριο της La/SSB πρωτεΐνης, μειώθηκε η ικανότητα πρόσδεσής τους σε αυτό, παρουσία των συνθετικών επιτόπων. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με άλλες δημοσιεύσεις, όσον αφορά την περιοχή των επιτόπων. Συγκεκριμένα, ο επίτοπος $^{147}\text{HKAFKGSI}^{154}$ εμπεριέχεται στην περιοχή σύνδεσης της La/SSB πρωτεΐνης με RNA μόρια (RNA recognition motif: RRM), αντισώματα που στρέφονται εναντίον αυτού του τμήματος, έχουν περιγραφεί παλαιότερα [34]. Η περιοχή RRM περιλαμβάνει τα αμινοξέα 111-187 και συμπεριλαμβάνεται στον επίτοπο LaC (αμινοξέα 111-242) που είχε περιγραφεί παλαιότερα [20]. Πειράματα με



επικαλυπτόμενα και μη πεπτίδια αυτής της περιοχής, έδειξαν ότι τα αντισώματα που στρέφονται κατά αυτής της περιοχής αναγνωρίζουν επιτόπους διαμόρφωσης [35]. Η μελέτη μας ενισχύει τα δεδομένα της αντιγονικότητας αυτής της περιοχής, καθορίζοντας επιπλέον ένα γραμμικό επίτοπο (147-155) οκτώ αμινοξέων.

Η περιοχή 291-318 της La/SSB πρωτεΐνης αποτελείται από δύο συνεχόμενους γραμμικούς επιτόπους (291-302 και 301-318). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι αυτό το τμήμα περιέχει έναν ισχυρό αντιγονικό επίτοπο, εφόσον και οι Rauh & Lüthmann [5] και οι Sturgess και συνεργάτες [4] βρήκαν ότι αυτή η περιοχή αναγνωρίζεται ισχυρότερα από τα αντι-La/SSB αντισώματα. Αντιθέτως, οι St Clair και συν. [6] στηριζόμενοι σε ποσοτικές αναλύσεις της πρόσδεσης των αντι-La/SSB αντισωμάτων σε τρία τμήματα του μορίου, έδειξαν ότι η LaD περιοχή (αμινοξέα 242-408) παρουσίαζε την χαμηλότερη αντιγονικότητα σε σύγκριση με τα άλλα δύο τμήματα. Ωστόσο δεν είναι δυνατή η απευθείας σύγκριση της αντι-La/SSB δραστηριότητας που παρουσίασαν τα αντιγόνα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις εργασίες, εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού ορών που χρησιμοποιήθηκαν. Ο επίτοπος 349-364 επίσης ανήκει στο LaD τμήμα, και είναι εξέχουσας σημασίας το γεγονός ότι η πλειοψηφία των αντι-La/SSB θετικών ορών ασθενών με ΣΕΛ και πσS αντιδρά με τον επίτοπο αυτό. Το τμήμα αυτό ανήκει σε ισχυρά ανοσοδραστική περιοχή της πρωτεΐνης, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενη μελέτη [20].

Ο επίτοπος $^{147}\text{HKAFKGS}^{154}$ παρουσιάζει ομολογία στην αλληλουχία του με τμήματα δύο διαφορετικών πρωτεϊνών, της ΒΙΜ και της Τοποϊσομεράσης II. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι αντι-La/SSB αντισώματα που προσδέονται με τον επίτοπο αυτό, αντιδρούν διασταυρωτά με τα ομόλογα πεπτίδια της ΒΙΜ και της Τοποϊσομεράσης II. Η ΒΙΜ προκαλεί αλλεργική πειραματική εγκεφαλομυελίτιδα, όταν ενεθεί σε ποντίκια [36], ενώ αντισώματα κατά της Τοποϊσομεράσης II έχουν



περιγραφεί σε ορούς ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση [37]. Μολονότι κανένας ασθενής με ΣΕΛ ή σS από όσους οι οροί χρησιμοποιήθηκαν δεν παρουσίαζε ενδείξεις προσβολής του κεντρικού νευρικού συστήματος ή των πνευμόνων, η διασταυρωτή αυτή αντίδραση των αντι-La/SSB αντισωμάτων με τμήματα αυτών των αυτοαντιγόνων πρέπει να διερευνηθεί εκτενέστερα. Επιπλέον βρέθηκε ομολογία μεταξύ ενός ανοσοδραστικού επιτόπου της La/SSB πρωτεΐνης με τμήμα της λαμνίνης A.

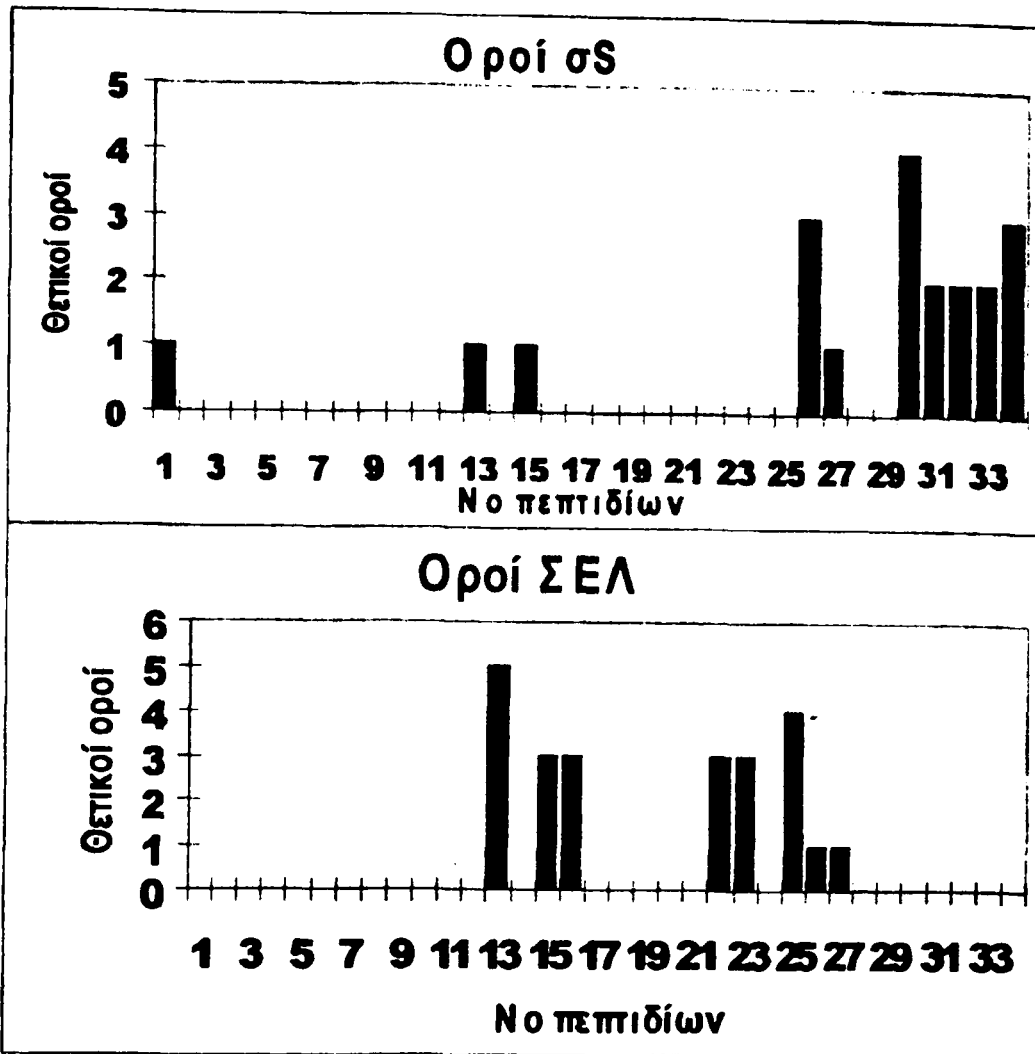
Το σημαντικότερο πιθανώς εύρημα αυτής της εργασίας ήταν το γεγονός ότι όλοι οι οροί (εκτός τεσσάρων) ασθενών με ΣΕΛ ή με σS και αντι-La/SSB αντισώματα αντιδρούν με έναν τουλάχιστον γραμμικό συνθετικό La/SSB επίτοπο. Οι τέσσερις μη αντιδρώντες οροί πιθανόν περιέχουν αντισώματα που στρέφονται κατά επιτόπων διαμόρφωσης ή μεγαλύτερου μήκους γραμμικών επιτόπων της πρωτεΐνης. Οι οροί με την ισχυρότερη αναγνώριση της La/SSB πρωτεΐνης, αναγνωρίζουν τουλάχιστον δύο από τους τέσσερις γραμμικούς επιτόπους, γεγονός που ενδυναμώνει την άποψη ότι το σύνολο των αντι-La/SSB αντισωμάτων ενός ορού αποτελείται από ετερογείς πληθυσμούς αντισωμάτων που στρέφονται σε διαφορετικές περιοχές του αυτοαντιγόνου La/SSB. Το δεύτερο εύρημα είναι ότι η χρήση συνθετικών πεπτιδίων ως αντιγόνων για την ανίχνευση αντι-La/SSB αντισωμάτων είναι μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος. Επιπλέον το ποσοστό των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας φυσιολογικούς αιμοδότες, ήταν πολύ χαμηλό σε σύγκριση με αυτό τεχνικών που στηρίζονται στη χρήση ανασυνδυασμένης La/SSB πρωτεΐνης [38]. Επίσης οροί ασθενών-μαρτύρων (π.χ. οροί ασθενών με ΣΕΛ και με σS χωρίς αντι-La/SSB αντισώματα) παρουσίασαν πολύ χαμηλά επίπεδα αναγνώρισης των La/SSB πεπτιδίων, παραπέμποντας στην υψηλή ειδικότητα των τεχνικών αυτών.



Εν κατακλείδι, η αντιγονική χαρτογράφηση της La/SSB πρωτεΐνης απεκάλυψε ότι τα αντι-La/SSB αντισώματα στρέφονται εναντίον διακριτών γραμμικών επιτόπων του μορίου. Οροί προερχόμενοι από ασθενείς με σS παρουσίαζαν διαφορετική κατανομή αναγνώρισης των πεπτιδίων της La/SSB πρωτεΐνης, συγκρινόμενοι με ορούς ασθενών με ΣΕΛ. Οι γραμμικοί επίτοποι με την υψηλότερη αντιγονικότητα ανήκουν σε μεγαλύτερα τμήματα της πρωτεΐνης που είχαν χαρακτηριστεί ως ισχυροί αντιγονικοί επίτοποι του La/SSB αυτοαντιγόνου. Τεχνικές οι οποίες στηρίζονται στην χρήση μικρών πεπτιδίων για την αναγνώριση αντι-La/SSB αντισωμάτων, ίσως αποδειχθούν πολύτιμες αντί της χρήσης ολόκληρου του μορίου. Για τον λόγο αυτό, διεξάγονται έρευνες, στις οποίες θα χρησιμοποιηθούν: μεγαλύτερος αριθμός ορών και αντιγονικά υποστρώματα συγκεκριμένης στερεοχημικής διαμόρφωσης που θα προσδίδουν στους επιτόπους μεγαλύτερη αντιγονικότητα και καλύτερη αναγνώριση από τα αντισώματα (π.χ. πεπτίδια συνδεδεμένα επάνω σε επαναλαμβανόμενους ολιγοπεπτιδικούς φορείς [39]).



A

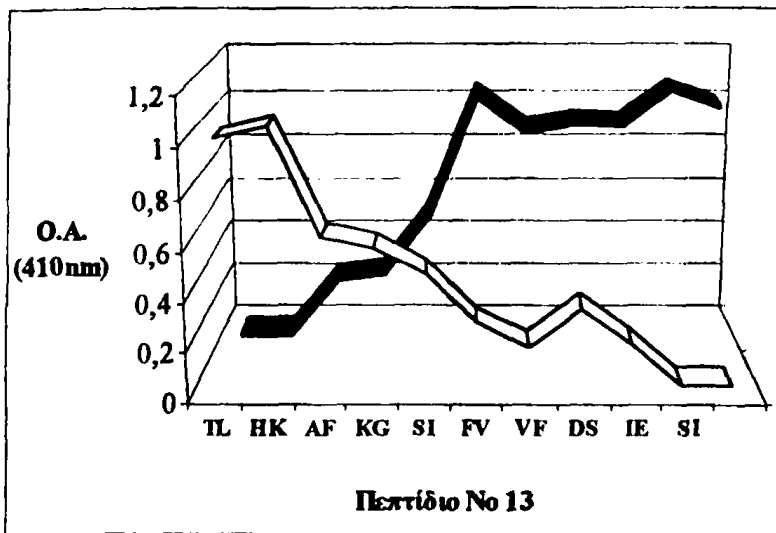


B

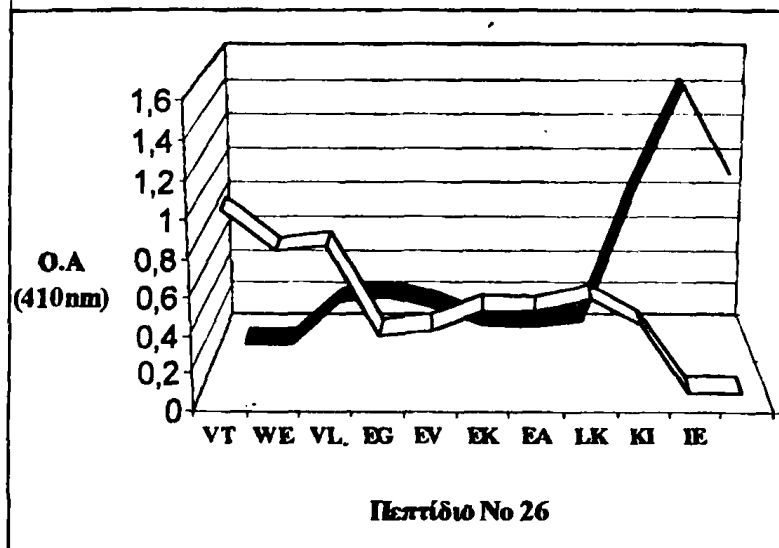
Αντιγονικοί Επίτοποι	ΣΕΛ αντι -La/SSB v=5	ΣS αντι-La/SSB v=4	Φυσιολογικοί v=3	Μάρτυρες νόσου v=2
Μέση τιμή O.A. ± T.A.				O.A.
145-164	0.822 ± 0.201	0.707 ± 0.062	0.167 ± 0.020	0.202
289-308	0.750 ± 0.141	0.549 ± 0.076	0.151 ± 0.043	0.241
301-320	0.527 ± 0.121	1.239 ± 0.433	0.134 ± 0.028	0.232
349-368	0.153 ± 0.046	1.167 ± 0.103	0.087 ± 0.034	0.061

Σχήμα 1. (α) Αντιγονική χαρτογράφηση του La/SSB αυτοαντιγόνου με την χρήση συνθετικών πεπτιδίων. Κεκαθαρμένη ανοσοσφαιρίνη γ προερχόμενη από ασθενείς με σύνδρομο Sjogren (επάνω διάγραμμα) αντιδρούν με τα πεπτιδία 301-320αο και 349-368αο της La/SSB πρωτεΐνης. Αντιθέτως αντι-La/SSB IgG προερχόμενη από ασθενείς με ΣΕΛ (κάτω διάγραμμα), αναγνώρισαν τα πεπτιδία 145-164αο και 289-308αο. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν τρεις φυσιολογικοί οροί και δύο οροί με αντι-Ro/SSA δραστικότητα χωρίς αντι-La/SSB ως αρνητικοί μάρτυρες. (β) Ο πίνακας δείχνει την μέση οπτική απορρόφηση (O.A.) που παρουσίασαν κατά της αντίδρασή τους οι τέσσερις κύριοι αντιγονικοί επίτοποι με IgG προερχόμενη από πέντε αντι-La/SSB θετικούς ορούς ασθενών με ΣΕΛ και τέσσερις αντι-La/SSB θετικούς ορούς ασθενών με σS, τρεις φυσιολογικούς ορούς και δύο ορούς από ασθενείς με ΣΕΛ και ΣS χωρίς αντι-La/SSB αντισώματα.

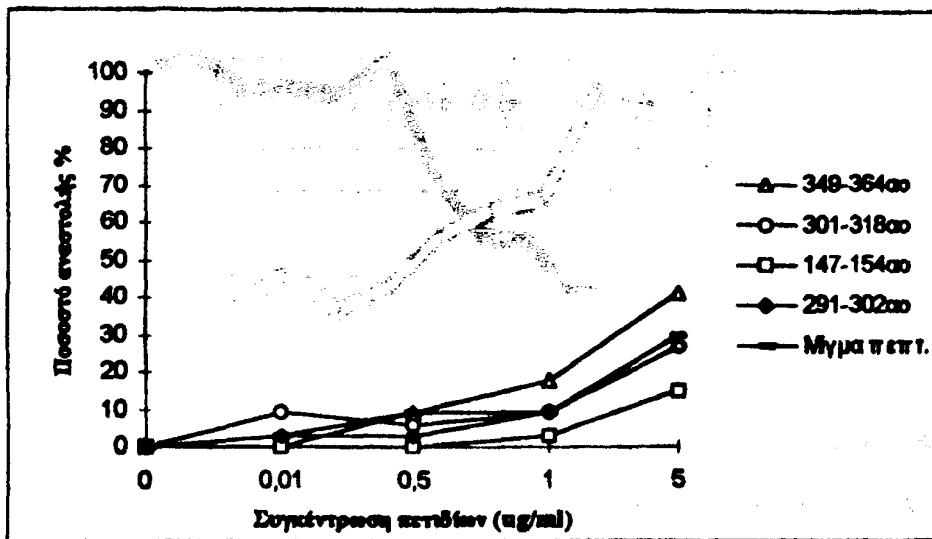
(α)



(β)



Σχήμα 2 Παρουσίαση του περιορισμού του μήκους των επιτόπων στο ελάχιστο δραστικό. (α) Για τον επίτοπο ΗΚΑΦΚΓΣΙ (147-155) και (β) για τον επίτοπο ΤWΕVΛΕΓΕVΕΚΕΑΛΚΚΙ (301-318). Η λευκή καμπύλη αντιπροσωπεύει την οπτική απορρόφηση (O.A) σε ELISA της ομάδας πεπτιδίων του NH- άκρου μετά από διαδοχική μείωσή του κατά δύο αμινοξέα. Το αρχικό μήκος του πεπτιδίου του οποίου η αλληλουχία φαίνεται στο διάγραμμα ήταν 20 αμινοξέα και μειώθηκε έως τέσσερα αμινοξέα. Η μαύρη καμπύλη αντιπροσωπεύει την μείωση του COOH άκρου του πεπτιδίου. Ως όρια του επιτόπου θεωρήθηκαν τα πεπτίδια εκείνα στα οποία η αντι-La/SSB ανοσοσφαιρίνη έχανε την ικανότητά της να τα αναγνωρίζει.

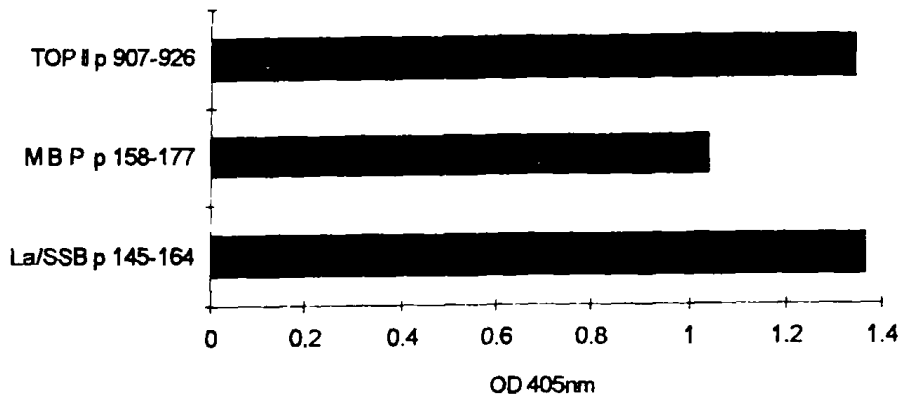


Σχήμα 3. Αναστολή της ικανότητας πρόσδεσης των αντι-La/SSB αντισωμάτων επί της La/SSB πρωτεΐνης, μετά από επώαση των αντι-La/SSB αντισωμάτων με κάθε ένα από τους τέσσερις επιτόπους καθώς και με μίγμα των τεσσάρων επιτόπων (κάθε επίτοπος συμμετείχε κατά 25% της συνολικής συγκέντρωσης του μίγματος).

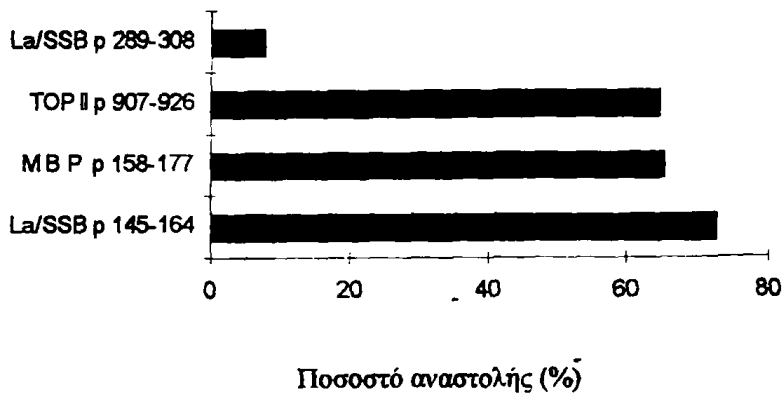


TOP II π 907-926 : HPMLPNYKNFKGTIQELGQN
 MBP π 158-177 : SDYKSAHKGFKGVDAQGTLS
 La/SSB π 145-164 : TLHKAFKGSIFVVFDSIESA

A

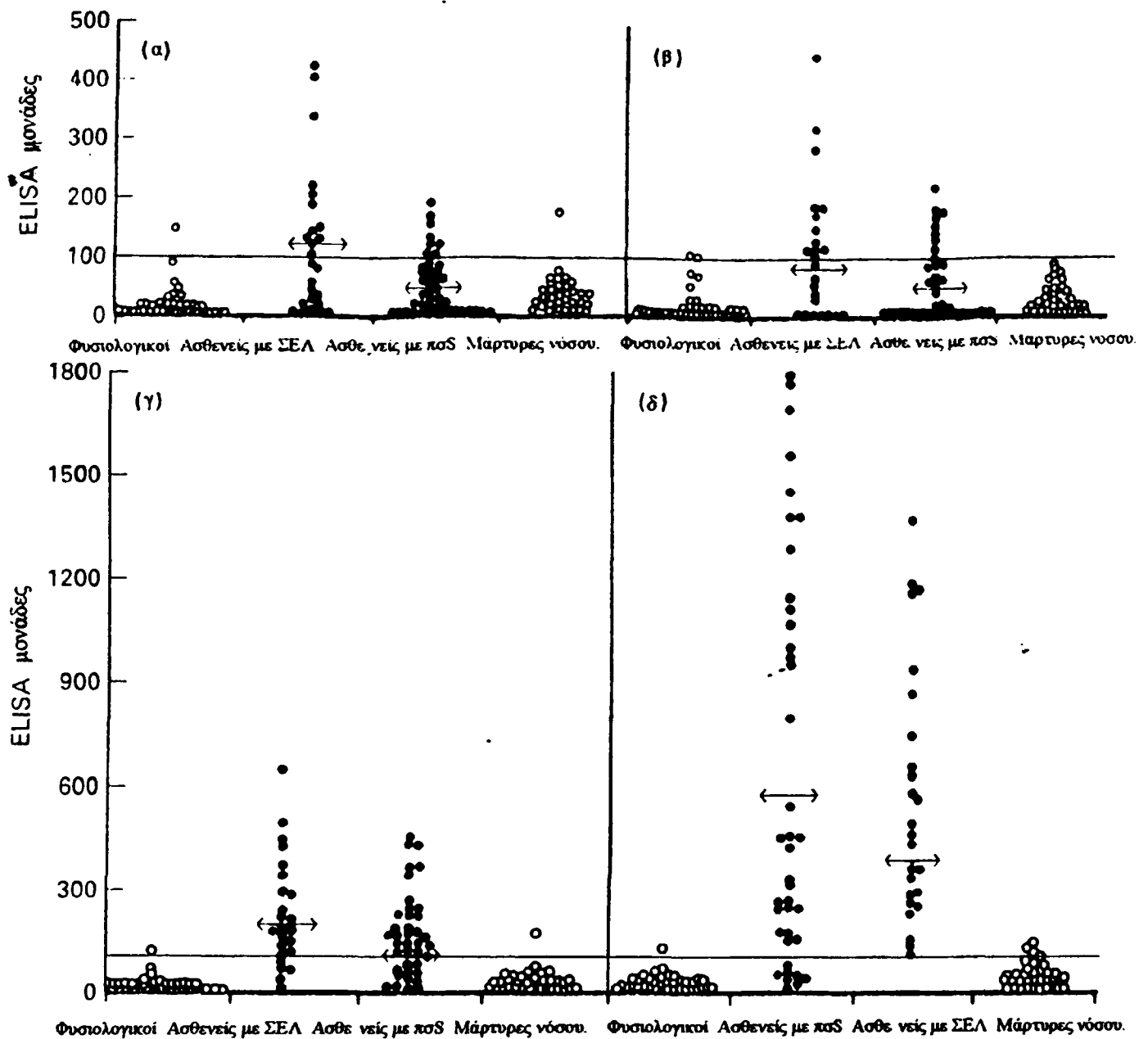


B



Σχήμα 4. (α) Αντίδραση των αντι-La/SSB αντισωμάτων με πεπτίδια - τμήματα της ανθρώπινης βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (MBP) και της τοποισομεράσης II (TOP II). Τα έντονα γράμματα εντοπίζουν την ομολογία μεταξύ του La/SSB επιτόπου 145-164 και των πεπτιδίων MBP και TOP II. Οι δύο φυσιολογικοί οροί αραιωμένοι 1:50 που χρησιμοποιήθηκαν δεν ξεπέρασαν την οπτική απορρόφηση των 150 μονάδων και στα τρία πεπτίδια. **(β)** Αναστολή της ικανότητας πρόσδεσης των αντι-π.145-164 ειδικών αντισωμάτων επί των ραβδίων που είχαν προσδεδεμένα τα πεπτίδια: π.145-164 της La/SSB, π.158-177 της MBP, του π.907-926 της TOP II και του π.289-308 της La/SSB. Η συγκέντρωση της ανοσοσφαιρίνης γ ήταν 200μg/ml. Ο αναστολέας π.147-154 (HKAFKGS I) της La/SSB πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 250 μg/ml. Τα ποσοστά αναστολής ήταν: 73% για το π.1445-164 της La/SSB πρωτεΐνης, 65% για το π.158-174 της MBP, 64% για το π.907-926 της TOP II, το π.289-308 της La/SSB χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό πεπτίδιο μάρτυρας.





Σχήμα 5. Αναγνώριση από τα αντισώματα των: ΗΚΑΦΚΓSI (147-154) (α) NGNLQLRNKEVT (291-302) (β) VTWEVLEGEVEKEALKKI (301-318) (γ) GSGKGKVNQFQGKTKF (349-364) (δ) συνθετικών πεπτιδικών αναλόγων από ορούς ασθενών με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren (πσS) και ΣΕΛ με αντι-La/SSB αντισώματα, ασθενείς με πσS και ΣΕΛ χωρίς αντι-La/SSB αντισώματα (μάρτυρες νόσου) και φυσιολογικούς αιμοδοτές. Το όριο θετικότητας (100) υπολογίστηκε βάση της μέσης τιμής της οπτικής απορρόφησης 41 ορών φυσιολογικών αιμοδοτών + 3 τυπικές αποκλίσεις (δες ασθενείς και μέθοδοι). (○) αντι-La αρνητικοί, (●) αντι-La θετικοί οροί. Ο κατακόρυφος άξονας αντιπροσωπεύει τις μονάδες ELISA

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pruijn CJM, Slobbe RL, van Venrooij WJ. Structure and function of La and RNPs. *Mol Biol Rep* 1990; 14: 43-48.
2. Chan ELK, Francoeur AM, Tan EM. Epitopes, structural domains and asymmetry of amino acid residues in SSB/La nuclear protein. *J Immunol* 1986; 136: 3744-9.
3. Chan EKL, Tan EM. The small nuclear ribonucleoprotein SSB/La binds RNA with a conserved protease-resistant domain of 28 kilodaltons. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 2588-94.
4. Sturgess AD, Peterson MG, McNeilage LJ, Whittingham S, Coppel RL. Characteristics and epitope mapping of a clonal human autoantigen La. *J Immunol* 1988; 140: 3212-8.
5. Rauh AJG, Luhrmann R. At least 3 distinct B cell epitops reside in the C-terminal half of La protein, as determined dy a recombinant DNA approach. *Eur J Immunol* 1988; 18: 2049-57.
6. St Clain EW, Pisetsky DS, Reich CF, Keene JD. Analysis of autoantibody binding to different regions of the human La antigen expressed in recombinant fusion proteins. *J Immunol* 1988; 141: 4173-80.
7. Bini P, Chu J-L, Okolo C, Elkon K. Analysis of autoantibodies to recombination La (SSB) peptides in systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome. *J Clin Invest* 1990; 85: 325-33.
8. Tan EM, Cohen AS, Fries JB et al, The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982, 25: 1271-7
9. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM et al .Preliminary criteria for the classification of sjogren's sundrome. *Arthritis Rheum* 1993, 36: 340-7.



10. Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ, et al. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J Immunol Methods* 1987;202:259.
11. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *JACS* 1963,85:2149-54.
12. Cohen SA, Stydous DJ. Amino acid analysis utilising phenylisothiocyanate derivatives. *Anal Biochem* 1988, 174:1-16.
13. Stewart JM, Young JD, eds. *Solid phase peptide synthesis*. Rockford: Pierce Chemical Co., 1984
14. Habets WJ, De Rooij DJ, Hoet MH, et al. Quantitation of anti-RNP and anti-Sm antibodies in MCTD and SLE patients by immunoblotting. *Clin Exp Immunol* 1985, 59: 457-66.
15. Mendez-Arias L, Rodriguez RA. BASIC microcomputer program for prediction of B and T cell epitopes in proteins. *CABIOS* 1990, 6:101-5.
16. Burkhard R, Sander C. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* 1993, 232:584-99.
17. Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85:2444-8.
18. Smith TF, Waterman MS. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* 1988, 147:195-7.
19. Altschul SE. Amino acid substitution matrices from an information theoretic perspective. *J Mol Biol* 1991, 219:555-65.
20. Chambers JC, Kenan D, Martin BJ, et al. Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen. *J Biol Chem* 1988, 263:18043-51.



21. Chan EKL, Sullivan KF, Tan EM. Ribonucleoprotein SSB/La belongs to a protein family with consensus sequences for RNA binding. *Nucleic Acid Res* ; 1988, 17: 2233-44.
22. Kohsaka H, Yamamoto K, Fujii H et al . Fine specificity of the human SSB/La Protein: identification of a distinct autoepitope homologous to a viral gag polyprotein. *J Clin Invest*. 1990, 85: 1566-74.
23. Welling GM, Weijer WJ, Van der Zee R, Welling-Wester. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Letters* 1985, 188: 215-8.
24. Hopp TP, Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78: 3824-8.
25. Karplus PA, Schultz GE. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften*. 1985, 72: 212-3.
26. Margalit H, Spouge JL, Cornette JL, Cease KB, Delisi C, Berzofsky JA. Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequences. *J Immunol* 1987, 138: 2213-29.
27. Rothbard JB, Taylor WR. A sequence pattern common to T cell epitopes. *EMBO J* 1988, 7: 93-100.
28. Sette A, Buus S, Appela E et al. Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 1989, 86: 3296-300.
29. Routsias JG, Tzioufas AG, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Moutsopoulos HM. Epitope mapping of the Ro/SSA 60KD autoantigen reveals disease specific antibody binding profiles. *Eur J Clin Invest* 1996, 26: 514-21.



30. Scofield RH, Harley JB. Autoantigenicity of Ro/SSA antigen is related to a nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 3343-7.
31. Tsikaris V, Vlachoyiannopoulos PG, Panou E et al. Immunoreactivity and conformation of the PPGMRPP repetitive epitope of the Sm autoantigen. *Int J Pep Res* 1996, 48: 319-27.
32. St Clair EN, Burch JA, Ward MM, Keene JD, Pisetsky DS. Temporal correlation of antibody responses to different epitopes of the human La autoantigen. *J Clin Invest* 1990, 85: 515-21.
33. Van Regenmortel MHV. Protein antigenicity. *Mol Biol Reports* 1992, 16: 133-8.
34. Rischmuller M, Mc Neilage LJ, Mc Cluskey J, Gordon T. Human autoantibodies directed against the RNA recognition motif of La(SSB) bind to conformational epitope present on the intact La(SSB)/Ro(SSA) ribonucleoprotein particle. *Clin Exp Immunol* 1995, 101: 39-44.
35. Topfer F, Gordon T, Mc Cluskey J. Intra- inter- molecular spreading of autoimmunity involving the nuclear self-antigens La(SSB) and Ro(SSA). *Proc Natl AcadSci USA* 1995, 92: 875-9.
36. Muller A, Al Sabbagh A, Santos LMB, Pradhu-Das M, Weiner HL. Epitopes of myelin basic protein (MBP) that trigger TGF- β release following oral tolerization to MBP are from encephalitogenic epitopes and oral tolerization to MBP are different from encephalitogenic epitopes and mediate epitope-driven bystander suppression. *J Immunol* 1993, 151: 7307-15.
37. Meliconi R, Bestagno M, Sturani C et al. Autoantibodies to DNA topoisomerase II in cryptogenic fibrosing alveolitis and connective tissue disease. *Clin Exp Immunol* 1989, 76: 184-9.



38. Owe-Young RA, Horn S, Edmonds JP, Sturgess AD. Use of molecularly cloned human SSB antigen to detect anti-SSB antibodies. *J Autoimmun* 1992, 5: 351-61.
39. Tsikaris V, Sakarellos C, Cung-Marraud M, Sakarellos-Daitsiotis M. Concept and design of a new class of sequential oligopeptide carrier (SOC) for covalent attachment of multiple antigenic peptides. *Biopolymer* 1996. 38: 291-3.



**Η ΑΞΙΑ ΤΩΝ ΓΡΑΜΜΙΚΩΝ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ
ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟΥ
LA/SSB ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΩΝ
ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ LA/SSB: ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ,
ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ.**

Ε.Ε Γιαννάκη, Α.Γ. Τζιούφας, Μ. Bachmann*, Ι.Χαντούμη,
Β.Τσικάρης†, Μ.Σακαρέλλου -Δαϊτσιώτου † , Κ.Σακαρέλλος † και Χ.Μ
Μουτσόπουλος

Τομέας Παθολογικής Φυσιολογίας, Εθνικού Πανεπιστημίου Αθηνών,
Αθήνα, *Institute of Physiologic Chemistry, University of Mainz,
Germany και † Τμήμα Χημείας, Τομέας Οργανικής Χημείας και
Βιοχημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Δημοσιεύθηκε στο:
Clin Exp Immunol 1998;112: 152-158



**Η ΑΞΙΑ ΤΩΝ ΓΡΑΜΜΙΚΩΝ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ
ΤΟΥ LA/SSB ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΩΝ
ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ LA/SSB: ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ , ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ
ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ.**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε προηγούμενη μελέτη αποδείχθηκε ότι το La/SSB αυτοαντιγόνο περιέχει τέσσερις γραμμικούς επιτόπους, π.147-154, π.291-302, π.301-318 και π.349-364. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της αξίας των συνθετικών επιτόπων του La/SSB αυτοαντιγόνου για την ανίχνευση των αντι-La/SSB ειδικών αντισωμάτων, σε σύγκριση με την χρήση ανασυνδυασμένων τμημάτων μεγάλου μοριακού βάρους αυτής της πρωτεΐνης. Συνολικά ελέγχθηκαν 122 οροί με αντι-La/SSB δραστικότητα, προερχόμενοι από ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren (πσS) ή με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ), με ποικίλες τεχνικές βασισμένες στη χρήση πεπτιδίων. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν 62 οροί ασθενών με πσS και ΣΕΛ χωρίς αντι-La/SSB αυτοαντισώματα (μάρτυρες ασθeneίας) και 95 οροί προερχόμενοι από υγιείς αιμοδότες (φυσιολογικοί μάρτυρες). Τα αυτοαντισώματα που έφερε κάθε ορός, ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική της αντίθετης ανοσοηλεκτροφόρησης και της ανοσοαποτύπωσης. Η ELISA των πεπτιδίων παρουσίασε ευαισθησία 78% έως 88.8% και ειδικότητα από 69% έως 94.3%. Η τεχνική του Dot blot έδωσε ευαισθησία κυμαινόμενη από 93.6% έως 97%, με σημαντικά χαμηλά ποσοστά ειδικότητας από 56% έως 88%. Το πλέον ευαίσθητο και ειδικό πεπτίδιο ³⁴⁹GSGKGGKVQFQGGKTKF³⁶⁴ συντέθηκε επιπρόσθετα συνδεδεμένο σε τετραμερή φορέα επαναλαμβανόμενων ολιγοπεπτιδίων SOC₄ και με αυτή την



μορφή χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη τεχνικών αναγνώρισης αυτοαντισωμάτων. Επιπλέον αναπτύχθηκαν τεχνικές χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη La/SSB πρωτεΐνη, το καρβοξυ-τελικό τμήμα αυτής La-C (215 αα) και το αμινοτελικό τμήμα, το οποίο έφερε μετάλλαξη προσθήκης στο ζεύγος βάσεων 640 (εννέα αδενίνες αντί οκτώ), για σύγκριση με τις προαναφερθέντες τεχνικές του SOC-πεπτιδίου. Παρατηρήθηκε ότι 88.1% εκ των αντι-La/SSB θετικών ορών αναγνώριζαν τόσο το συνθετικό πεπτίδιο $\text{SOC}_4\text{-(349-364αα)}_4$, όσο και την ανασυνδυασμένη La/SSB πρωτεΐνη. Παρατηρήθηκε επίσης ότι 83% αυτών των ορών αντιδρούσαν με το αμινοτελικό τμήμα της La/SSB και 67.8% με το La-C τμήμα. Εκ των αντι-Ro θετικών αντι-La αρνητικών ορών, το 37% αντιδρούσε με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, 26% με το La-αμινοτελικό τμήμα, 33% με το La-C τμήμα και μόλις το 11% με το συνθετικό πεπτίδιο. Τα αποτελέσματά αυτά δηλώνουν ότι οι συνθετικοί επίτοποι πεπτιδίων, παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα ως προς την ανίχνευση των αντι-La/SSB αντισωμάτων, όταν χρησιμοποιηθούν σε τεχνικές ELISA και Dot blot. Το πεπτίδιο $\text{SOC}_4\text{-(349-364αα)}_4$ είχε την ίδια ευαισθησία προσδιορισμού των αντι-La/SSB αντισωμάτων, όπως και η ολική ανασυνδυασμένη La/SSB πρωτεΐνη.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

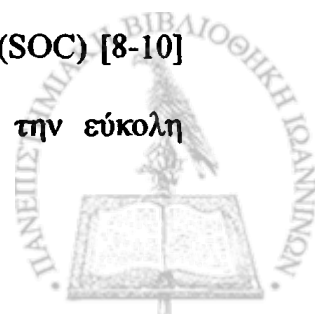
Τα αντι-La/SSB αντισώματα ανήκουν σε μία σημαντική ομάδα αντικυρηνικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν ριβονουκλεοπρωτεϊνικά αντιγόνα [1]. Εντοπίζονται στο 40-87% των ορών ασθενών με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren (πσS) [2, 3] και στο 10-15% των ορών ασθενών με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ) [4].

Αυτά τα αυτοαντισώματα μπορούν να ανιχνευθούν με αρκετές τεχνικές. Με την τεχνική του ανοσοφθορισμού χρωματίζουν τον πυρήνα με τον ίδιο τρόπο, όπως



άλλα αντιπυρηνικά αντισώματα [5], ενώ η τεχνική της ανοσοδιάχυσης (ID) και της αντίθετης ανοσοηλεκτροφόρησης (CIE) είναι πολύ ειδικές ως προς την ανίχνευση των αντι-La/SSB αντισωμάτων [6]. Η ανοσοαποτύπωση είναι μία αποτελεσματική και ευαίσθητη τεχνική για τον προσδιορισμό των αντι-La/SSB αντισωμάτων, αν και είναι αρκετά πολύπλοκη στην εκτέλεσή της και δύσκολη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, διότι η La/SSB πρωτεΐνη μετακινείται σχεδόν στο ίδιο σημείο με την πρωτεΐνη Ro52 λόγω παρόμοιου μοριακού βάρους. Η ανοσοκαθίζηση είναι ειδική και ευαίσθητη τεχνική, η οποία όμως απαιτεί εξειδικευμένες συσκευές και δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε καθημερινή κλινική εφαρμογή. Η ELISA, στην οποία χρησιμοποιείται ανασυνδυασμένη La/SSB πρωτεΐνη ή πρωτεΐνη που έχει προέλθει από καθαρισμό εκχυλίσματος με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας, είναι εύχρηστη μέθοδος, η οποία ωστόσο μειονεκτεί στο γεγονός ότι έχει χαμηλή ειδικότητα.

Πρόσφατα, αναγνωρίστηκαν τέσσερις διακριτοί γραμμικοί B λεμφοκυτταρικοί επίτοποι του La/SSB αυτοαντιγόνου, χρησιμοποιώντας επικαλυπτόμενα συνθετικά πεπτίδια. Οι επίτοποι αυτοί αναγνωρίζονταν από αντι-La/SSB θετικούς ορούς ασθενών με πσS και ΣΕΛ [7] ($^{147}\text{HKAFKGSI}^{154}$, $^{291}\text{NGNLQLRNKEVT}^{302}$, $^{301}\text{VTWEVLEGEVEKEALKKI}^{318}$ και $^{349}\text{GSGKGVQFQGKTKF}^{364}$). Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι τα διαλυτά αυτά πεπτίδια μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για την ανίχνευση αντι-La/SSB αντισωμάτων με δοκιμές, στις οποίες παρουσίασαν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Αυτή η παρατήρηση μας ώθησε στο να διερευνήσουμε αν μεγαλύτερου μήκους πεπτιδικά ανάλογα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ανάλογες εύχρηστες τεχνικές. Χρησιμοποιώντας αυτά τα πεπτιδικά ανάλογα, καθώς και πεπτίδια προσδεμένα σε φορείς επαναλαμβανόμενων ολιγοπεπτιδίων (SOC) [8-10] ως υποστρώματα, αναπτύξαμε τεχνικές ELISA και Dot blot για την εύκολη



ανίχνευση των αντι-La/SSB αντισωμάτων. Οι τεχνικές αυτές συγκρίθηκαν με ELISA, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένη La/SSB πρωτεΐνη.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οροί

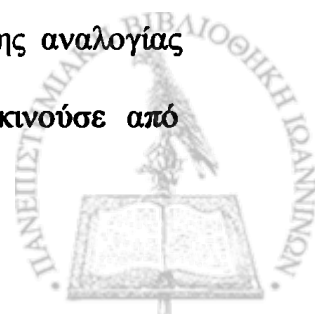
Ελέγχθηκαν 184 ασθενείς με πσS [11] και ΣΕΛ [12] με αντι-La/SSB δραστικότητα. Η αντι-La/SSB δραστικότητα εξακριβώθηκε με CIE και ανοσοαποτύπωση, όπως είχε προηγουμένως εξακριβωθεί [7]. Εξήντα τρεις οροί χρησιμοποιήθηκαν στις τεχνικές ELISA και dot blot που χρησιμοποιούσαν ως υπόστρωμα διαλυτά πεπτίδια [7]. Πενήντα εννέα οροί ελέγχθηκαν με την ανασυνδυασμένη La/SSB πρωτεΐνη, με τμήματα αυτής καθώς και με το πιο δραστικό επίτοπο της La/SSB πρωτεΐνης, το πεπτίδιο 349-364αο, το οποίο ήταν συνδεδεμένο σε φορέα SOC₄. Δεκατέσσερις οροί περιείχαν επιπλέον αντι-Ro60kD και αντι-Ro52kD αντισώματα, 26 οροί είχαν αντι-Ro60kD αντισώματα επιπλέον, 11 οροί είχαν αντι-Ro52kD αντισώματα επιπλέον και 8 οροί είχαν μόνο αντι-La/SSB δραστικότητα. Εξήντα δύο οροί ασθενών με πσS και ΣΕΛ χωρίς αντι-La/SSB αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες νόσου. Οι οροί αυτοί περιείχαν τα ακόλουθα αυτοαντισώματα: 43 είχαν αντισώματα έναντι του Ro60kD αυτοαντιγόνου, 16 είχαν αντισώματα έναντι του Ro52kD, 12 είχαν αντι-U1RNP αντισώματα, 8 είχαν αντι-dsDNA αντισώματα και 8 είχαν αντι-Sm αντισώματα. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 95 οροί φυσιολογικών αιμοδοτών ως αρνητικοί μάρτυρες στις διάφορες τεχνικές.

Σύνθεση πεπτιδίων και καθαρισμός

Οκτώ πεπτίδια συντέθηκαν ακολουθώντας την διαδικασία πεπτιδικής σύνθεσης στερεάς φάσης [13] χρησιμοποιώντας ως σταθερό υπόστρωμα επάνω στο



οποίο έγινε η σύνθεση, τη βενζυδριλαμίνη ενώ τα αμινοξέα είχαν ως προστατευτική ομάδα την N^α-t-Boc/ βενζυλ στο α NH₂ άκρο τους. Για την σύζευξη των αμινοξέων χρησιμοποιήθηκε καρβοδιμίδιο (DCC) παρουσία υδροξυβενζοτριαζολίου (HOBT) στην αναλογία αμινοξύ/ DCC/ HOBT/ ρητίνη 3/ 3/ 3/1. και βενζοτριαζολυλοξίτρις (διμεθυλάμινο) εξαφθοροφωσφορικό (BOP) αντιδραστήριο [14] με την αναλογία αμινοξύ/ BOP/ δι-ισοπροπυλαμίνη (DIEA)/ ρητίνη 2/ 2/ 6/ 1 σε δύσκολες συζεύξεις. Η αποπροστασία της N^α-t-Boc προστατευτικής ομάδας πραγματοποιήθηκε με την χρήση τριφθοροοξικού οξέος (TFA), ενώ ακολούθησε εξουδετέρωση με την βάση δυισοπροπυλαμίνη (DIEA). Η ακετυλίωση μερικών πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 30 ισοδύναμα οξικού ανυδρίτη (CH₃CO)₂O σε πυριδίνη για 25 λεπτά. Τα πεπτίδια αποχωρίστηκαν από την ρητίνη με τη χρήση άνυδρου υρδοφθορικού οξέος (HF), παρουσία ανισόλης και φαινόλης (10% v/v) και αιθανοδιθειόλης (EDT), όταν το πεπτίδιο περιείχε τρυπτοφάνη Trp [15] στους -8°C για 30 λεπτά και στους 0°C για 1 ώρα, προκειμένου να απομακρυνθούν οι παράπλευρες προστατευτικές ομάδες των αμινοξέων που αποχωρίζονται το πεπτίδιο στις ισχυρά όξινες συνθήκες. Τα πεπτίδια ανακτώνται από την ρητίνη με τη χρήση 2M οξικού οξέος, λιοφυλιώνονται και καθαρίζονται σε στήλη χρωματογραφίας κατανομής (partition), χρησιμοποιώντας στήλη σέφαντεξ G-25 και εξισορροπούνται με διάλυμα 2M οξικού οξέος. Ο διαχωρισμός των κλασμάτων των πεπτιδίων έγινε με την χρήση ομογενούς μίγματος η-βουτανόλης/ πυριδίνης/ οξικού οξέος/ νερού (BPyAW), αναλογίας 4:1:1:2 v/v. Ο καθαρισμός των πεπτιδίων ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε BpyAW (4:1:1:2 v/v). Επίσης πεπτίδια καθαρίστηκαν με στήλη υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας υπό πίεση (HPLC). Ο διαχωρισμός των κλασμάτων των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με μίγμα διαβαθμισμένης αναλογίας απεσταγμένου H₂O και ακετονιτριλίου (CH₃CN.) Η διαβάθμιση ξεκινούσε από



σύσταση 95:5 v/v d.H₂O:CH₃CN έως 40:60 v/v d.H₂O:CH₃CN περιέχοντας 0.1% TFA. Φάσματα μονοδιάστατου και δυσδιάστατου πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹H-NMR και ανάλυση αμινοξέων με αναλυτική HPLC επιβεβαίωσαν την καθαρότητα και την ταυτότητα των πεπτιδίων.

Η ρητίνη Boc-GlyOCH₂-Pam χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση του ολιγοπεπτιδικού φορέα. Η σύζευξη των αμινοξέων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του ενεργοποιητή 2-(1H-βενζοτρίαζολ-1-υλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλουρόνιο τετραφθοροβορικό (TBTU) σε αναλογία αμινοξύ/TBTU/HOBt/DIEA/ ρητίνη 3/2.9/3/6/1 [16]. Η λυσίνη Lys που χρησιμοποιήθηκε στις συζεύξεις ήταν η N^ε-Boc-L-Lys (N^ε-Fmoc)-OH. Κατόπιν αποκοπής της N^ε-Fmoc ομάδας, χρησιμοποιώντας 20% v/v πιπεριδίνη σε DMF (διμέθυλοφορμαμίδιο), το αντιγονικό πεπτίδιο χτίστηκε βήμα προς βήμα μέσω σύζευξης του στην Lys-N^εH₂ ομάδας του φορέα SOC₄. Τα επόμενα βήματα σύνθεσης και αποκοπής του SOC₄-(πεπτιδίου)₄ από την ρητίνη έγιναν όπως έχει προαναφερθεί. Στο SOC₄-(πεπτιδίου)₄ έγινε μερικός καθαρισμός με νερό, χρησιμοποιώντας μεμβράνη διατήδησης με μέγεθος πόρων, μικρότερου των 1500 KD μοριακού βάρους και το πεπτίδιο λυοφιλώθηκε.

Όλα τα πεπτίδια συντέθηκαν επίσης στην βιοτινιλωμένη τους μορφή. Η βιοτινίωση πραγματοποιήθηκε μετά την προσθήκη μίας γέφυρας αμινοξέων (-Gly-Ser-Gly-Ser-) [17], με τη προσθήκη d-βιοτίνης στο αμινοτελικό άκρο των πεπτιδίων μετά την απομάκρυνση της Boc προστατευτικής ομάδας της Gly, ακολουθώντας της πορεία σύνθεσης στερεάς φάσης πεπτιδίων. Σε όλα τα πεπτίδια πραγματοποιήθηκε ανάλυση αμινοξέων που επιβεβαίωσε την ταυτότητα και την καθαρότητά τους.



Ανασυνδυασμένα La/SSB πεπτίδια

Τρία ανασυνδυασμένα La/SSB πεπτίδια προετοιμάστηκαν όπως έχει ήδη περιγραφεί [18, 19]. Τα αναγνωστικά πλαίσια των La/SSB πεπτιδίων απομονώθηκαν και ετοιμάστηκαν από το συμπληρωματικό DNA γονίδιο της La/SSB πρωτεΐνης (cDNA), το οποίο περιείχε επιπλέον ένθετο ένα νουκλεοτίδιο A (Dr Stahnke, ELIAS, Freiburg, Germany). Το πλήρους μήκους γονίδιο κλωνοποιήθηκε, όπως περιγράφεται παρακάτω: Η κλωνοποίηση ξεκίνησε από το La cDNA La23 γονίδιο, το οποίο ενσωματώθηκε σε πλασμίδιο-φορέα της γενιάς pBluescript SK(-). Το La23 περιείχε απαλοιφή ενός νουκλεοτιδίου A (αδενίνης) στο εξόνιο 7, η οποία προκαλούσε μετάθεση του αναγνωστικού πλαισίου κατά μία θέση πίσω (-1) εντός της κωδικοποιούμενης περιοχής, η οποία έπρεπε να διορθωθεί με την εισαγωγή ενός νουκλεοτιδίου A.

Αρχικά το πλήρες cDNA του La/SSB γονιδίου (το οποίο καλύπτει το διάστημα του πλασμιδίου μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης των ενδονουκλεασών *KpnI* και *AvaII*) απομονώθηκε. Τροποποιήθηκαν τα 5' και 3' άκρα του με την χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Για το 3' άκρο χρησιμοποιήθηκε η P1 αφετηρία (primer) για την αντιγραφή 3'→5' (P1: CGAAATTTGCTAGTGATGATGAACA), ενώ για την αντιγραφή 5'→3' χρησιμοποιήθηκε η αφετηρία P2 (P2: TGGTTTGGATCCCTACTGGTCTCCAG η τεχνητή θέση αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης *BamHI* που γειτνιάζει το κωδικόνιο τερματισμού TGA (CTA) είναι υπογραμμισμένη). Τα τμήματα που δημιουργήθηκαν, κόπηκαν με τις ενδονουκλεάσες *AvaII* και *BamHI* και κλωνοποιήθηκαν στο πλασμδιακό φορέα pBluescript SK(-). Το 5' άκρο κατασκευάστηκε ως εξής: στην κανονική μορφή του La mRNA η μετάφραση αρχίζει από το κωδικόνιο έναρξης AUG που βρίσκεται στο εξόνιο 2. Κατασκευή με αυτού του είδους 5' άκρου, τέλος,



ετοιμάστηκε από το cDNA La23 με PCR χρησιμοποιώντας την P3 αφετηρία (primer) για την αντιγραφή 3'→5' (P3: ACATAGGATCCATGGCTGAAAATGGT, η τεχνητή θέση αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης *BamHI* που γειτνιάζει το κωδικόνιο έναρξης μεταγραφής ATG είναι υπογραμμισμένη) και την αφετηρία P4 (P4: TGTGTGTAGACGGTTC AACCTGTTG) για την αντιγραφή 5'→3'. Τα προϊόντα της PCR κόπηκαν με τις ενδονουκλεάσες *BamHI* και *KpnI* και κλωνοποιήθηκαν στις αντίστοιχες θέσεις του πλασμιδίου pBluescript SK(-). Το ένθετο απομονώθηκε μέσω των *NcoI/BamHI* θέσεων αναγνώρισης ενδονουκλεασών και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις κλωνοποίησης του pQE-60W πλασμιδιακού φορέα. Κατ'αυτόν τον τρόπο παράχθηκε το καρβόξυ τελικό τμήμα της La/SSB πρωτεΐνης με το πρόσθετο της His. Το ένθετο απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET-3d χρησιμοποιώντας τις ενδονουκλεάσες *NcoI/HindIII*. Τελικά, το αναγνωστικό πλαίσιο διορθώθηκε ως εξής: Το La19cDNA που περιείχε την σωστή αλληλουχία του La/SSB, περιορίστηκε ενζυμικά με την ενδονουκλεάση *BstEII* η οποία κόβει την αλληλουχία La/SSB στο εξόνιο 3. Ο φορέας pET-3d αποελίχθηκε με την ενδονουκλεάση *BstEII* και μετά από την απομόνωση του ευθύγραμμου DNA, πέπτηκε μερικώς με *KpnI*. Το La19 τμήμα που κόπηκε από της θέσεις *KpnI/BstEII*, κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του PET-3D βέκτορα. Οι τελικές αλληλουχίες αναλύθηκαν.

ELISA

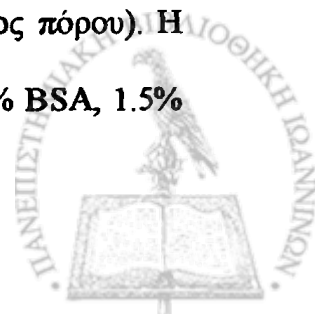
Πλακίδια πολυστυρενίου καλύφθηκαν με 10μg/ml πεπτιδίου (στην περίπτωση των βιοτινιλιωμένων πεπτιδίων έγινε προεπεξεργασία των πλακιδίων με 5μg/ml στρεπταβιδίνης), 5μg/ml SOC₄-(349-364aa)₄ πεπτίδιο, ανασυνδυασμένη La/SSB πρωτεΐνη, του N-τελικού και C-τελικού τμήματός της (100μl/φρεάτιο) και



επωάστηκαν για περίπου 4 ώρες στους 37°C (μέχρι πλήρους εξατμίσεως). Κατόπιν προστέθηκαν σε κάθε φρεάτιο 200μl αλβουμίνης βοείου ορού (BSA) 2% σε διάλυμα φωσφορικών PBS με pH: 7.3, και τα πλακίδια επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (ΘΔ) επί μία ώρα. Ακολούθησαν δύο εκπλύσεις με PBS-0.1% Tween 20 (απορρυπαντικό) και προστέθηκαν οι οροί αραιωμένοι 1:100 σε διάλυμα BSA (100 μl/φρεάτιο). Κάθε δείγμα ορού ελέγχονταν εις διπλούν και σε φρεάτια καλυμμένα με πεπτιδίο ή χωρίς. Οι οροί αφέθηκαν να αντιδράσουν ολονύκτια με τα πεπτιδία στους 4°C, εν συνεχεία τα πλακίδια πλύθηκαν τέσσερις φορές και 100μl αντι-ανθρώπινης γάμμα σφαιρίνης IgG(γ) αναπτυγμένης σε αίγα και συζευγμένης με υπεροξειδάση (Sigma), αραιωμένης 1:1500 σε διάλυμα BSA προστέθηκε ανά φρεάτιο. Μετά από μιας ώρας επώαση σε ΘΔ και πέντε εκπλύσεις, προστέθηκαν 100μl υποστρώματος 2, 2-άζινο-δισ 3-αιθυβενζοθειαζολικού θεϊκού οξέος (ABTS) και η ποσότητα του χρωμοφόρου προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης μετρήθηκε στα 405nm μετά από την πάροδο 30 λεπτών. Πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα καθορισμού των βέλτιστων συνθηκών και συγκεντρώσεων αντιδραστηρίων για κάθε αντιγονικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε. Η απόλυτη τιμή αντιγονικής αναγνώρισης υπολογίστηκε, με την αφαίρεση της μέσης τιμής της οπτικής απορρόφησης (OA) του κάθε ορού στα φρεάτια χωρίς αντιγόνο από την μέση τιμή OA του ορού στα φρεάτια με αντιγόνο. Η ανώτερη αρνητική τιμή (cut off point) προσδιορίστηκε ως η μέση τιμή OA των φυσιολογικών αιμοδοτών συν τρεις τυπικές αποκλίσεις (s.d.).

Dot blot

Ένα μικρόλιτρο πεπτιδίου αραιωμένο σε απεσταγμένο νερό, συγκέντρωσης 4mg/ml, προσροφήθηκε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0.45μm μέγεθος πόρου). Η νιτροκυτταρίνη με τα πεπτιδία επωάστηκε με διάλυμα πρωτεϊνών (0.5% BSA, 1.5%



αλβουμίνης αυγού σε TBS-0.1% Tween 20) επί 1 ώρα, προκειμένου να καλυφθούν οι θέσεις που δεν είχαν πεπτίδιο και εν συνεχεία προστέθηκαν οι αραιωμένοι στο διάλυμα των πρωτεϊνών, οροί (1:50) και αφήθηκαν να αντιδράσουν ολονύκτια στους 4°C. Μετά από τρεις πλύσεις με διάλυμα TBS-0.1% Tween 20 pH:7.3, προστέθηκε αντι-ανθρώπινη γάμα σφαιρίνης IgG(γ) αναπτυγμένη σε αίγα και συζευγμένη με υπεροξειδάση (Sigma), αραιωμένη 1:800 στο διάλυμα των πρωτεϊνών για μία ώρα. Οι μεμβράνες πλύθηκαν και χρωματίστηκαν μετά από την προσθήκη του υποστρώματος της υπεροξειδάσης: 4-χλώρο-1-ναφθόλη.

Πειράματα αναστολής

Οροί που περιείχαν αντι-La/SSB αντισώματα που αναγνώριζαν και τους τέσσερις συνθετικούς επιτόπους, αραιωμένοι 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, επώαστηκαν ολονύκτια στους 4°C, με κάθε ένα από τα διαλυτά πεπτίδια (σε συγκέντρωση 0, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 200 μg/ml). Αυτά τα μείγματα ελέγχθηκαν εναντίον πλακιδίων ELISA επιστρωμένων με πεπτίδια.

Αντι-La/SSB θετικός ορός ασθενούς με πS, που αναγνώριζε και τους τέσσερις συνθετικούς επιτόπους, επώαστηκε για τρεις ώρες στους 37°C και ολονύκτια στους 4°C, με τα πεπτίδια 145-164aa, 289-308aa και με μίγμα των πεπτιδίων 145-164aa, 289-308aa, 301-318aa και 349-364aa χρησιμοποιώντας τις συγκεντρώσεις 0, 0.01, 0.5, 1.5, 10, 50, 100 μg/ml. Εν συνεχεία ελέγχθηκαν για αντι-La/SSB δραστικότητα με τη χρήση La/SSB ELISA (Shield Diagnostics, Diastat, UK) βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή.

Δύο ακόμη αντι-La/SSB οροί επώαστηκαν με 0, 0.01, 0.5, 1.5, 10, 50 μg/ml SOC₄-(349-364aa)₄ πεπτιδίου ολονύκτια στους 4°C. Εν συνεχεία ελέγχθηκαν ως προς την διατήρηση ή όχι της ικανότητας αναγνώρισης της ανασυνδυασμένης



La/SSB πρωτεΐνης και του La C-τελικού τμήματος. Η ανασυνδυασμένη La/SSB πρωτεΐνη και το C-τελικό της τμήμα χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 5μg/ml.

Υπολογισμός της ευαισθησίας και της ειδικότητας των διαφόρων τεχνικών, στατιστική ανάλυση.

Η ευαισθησία των συνθετικών πεπτιδίων με την τεχνική της ELISA υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{Ευαισθησία (\%)} = \frac{\text{Αριθμός των θετικών δειγμάτων}}{\text{Συνολικός αριθμός δειγμάτων}} \times 100$$

Η ειδικότητα των συνθετικών επιτόπων υπολογίστηκε βάσει του τύπου:

$$\text{Ειδικότητα (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Θετικά δείγματα ασθενών χωρίς αντι-La/SSB αντισώματα}}{\text{Συνολικά δείγματα ασθενών χωρίς αντι-La/SSB αντισώματα}}\right) \times 100$$

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ομόλογη αναστολή

Η επώαση των ειδικών για τα συνθετικά πεπτίδια ορών με αυτά τα πεπτίδια (301-318 (18αα), 349-364 (16αα), 145-164 (20αα) και 289-308 (20αα)) έδωσε την υψηλότερη ομόλογη αναστολή σε αραιώση ορού 1:50, 1:100, 1:200 και 1:50 αντίστοιχα, ενώ η συγκέντρωση του κάθε πεπτιδίου ήταν $\geq 50\mu\text{g/ml}$ (Σχ. 1α).

Η επώαση των ορών με τα συνθετικά πεπτίδια μείωσε την αναγνώρισή τους έναντι της ολικής La/SSB πρωτεΐνης όχι περισσότερο από 60%. Η δραστηριότητα του ορού που επώαστηκε με το μείγμα των τεσσάρων πεπτιδίων ανεστάλει κατά 73% (Σχ. 1β).



Το υψηλότερο ποσοστό αναστολής που επέφερε η επώαση ορού με το συνθετικό πεπτίδιο SOC₄-(349-364aa)₄, στην αναγνώριση της ανασυνδυασμένης La/SSB πρωτεΐνης και του La C τελικού τμήματός της, ήταν 60 και 68% αντίστοιχα (Σχ. 1γ).

Ανάκτηση της ευαισθησίας των δύο ολιγοπεπτιδικών επιτόπων

Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία, τα αντιγονικά πεπτίδια 147-154aa και 291-302aa επανασυντέθηκαν στο αρχικό μήκος τους 145-164aa και 289-308aa αντίστοιχα, στο βιοτινιωμένο τους παράγωγο και μη. Και τα δύο παράγωγα ελέγχθηκαν με τους ίδιους ορούς [63 αντι-La/SSB θετικοί οροί, 35 αντι-Ro60kD (θετικοί μάρτυρες νόσου [7]), 41 οροί φυσιολογικών αιμοδοτών] με ELISA. Βρέθηκε ότι τα εικοσα-μερή πεπτίδια ανέκτησαν την ευαισθησία τους. Ο επίτοπος ¹⁴⁵TLHKAFKGSIFVVFDSIESA¹⁶⁴, ο οποίος εμπεριέχει τον προαναφερθέντα περιορισμένο επίτοπο ¹⁴⁷HKAFKGS¹⁵⁴ (αντιδρούσε με το 30% των αντι-La/SSB θετικών ορών), αναγνώριζε τους 49 από τους 63 αντι-La/SSB θετικούς ορούς (78%) (Σχ. 2α). Πενήντα ένα από τους 63 αντι-La/SSB θετικούς ορούς αντιδρούσαν με το πλήρους μήκους επίτοπο ²⁸⁹ANNGNLQLRNKEVTWEVLEG³⁰⁸ (82,5%), ο οποίος εμπεριέχει τον περιορισμένο επίτοπο ²⁹¹NGNLQLRNKEVT³⁰² ευαισθησίας μόλις 27% (Σχ. 2β).

Τέσσερις οροί από την ομάδα των μαρτύρων νόσου αναγνώριζαν τα εικοσαμερή πεπτίδια. Αυτοί οι οροί αναγνωρίστηκαν ως αντι-La/SSB αρνητικοί με την CIE, όμως μετά από προσεκτική εξέταση με την ανοσοαποτύπωση, δύο από αυτούς (με την υψηλότερη οπτική απορρόφηση) βρέθηκαν να έχουν αντι-La/SSB δραστικότητα (η ειδικότητα και των δύο πεπτιδίων ήταν τελικά 94.3%). Η ύπαρξη των αντι-π.145-164 και αντι-π.289-308 αντισωμάτων μεταξύ των αντι-Ro60kD θετικών αντισωμάτων ήταν 5.7%..



Τα επίπεδα των αντιπεπτιδικών αντισωμάτων των δύο πεπτιδίων παρουσίασαν υψηλή συσχέτιση συνύπαρξης [$R=0.868$, $P<0.001$ και συμφωνία (concordance) 92.1%]. Δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση συνύπαρξης μεταξύ οποιουδήποτε άλλου συνδυασμού αντιπεπτιδικών αντισωμάτων. Η συσχέτιση της αποδοτικότητας των διαφόρων πεπτιδο-εξαρτώμενων τεχνικών κυμαινόταν μεταξύ 64 και 79.4%.

Dot blot στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγονικά υποστρώματα La/SSB πεπτίδια.

Το Dot blot χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων που αναγνώριζαν τους περιορισμένους επίτοπους 147-154 (8αα), 291-302 (12αα), 301-318 (18αα), 349-364 (16αα) και τα επιμηκυσμένα πεπτίδια 145-164 (20αα) και 289-308 (20αα).

Εξήντα εκ των 63 αντι-La/SSB θετικών ορών (93.6%) αναγνώριζαν τον επίτοπο 145-164 (20αα) και 61 εκ των 63 αυτών ορών (97%) αναγνώριζαν τον επίτοπο 289-308αα (20αα). Σαράνταέξι και 59 από τους 63 αντι-La/SSB θετικούς ορούς αναγνώριζαν τους επίτοπους 301-318(18αα) και 349-364 (16αα) αντίστοιχα. Η συσχέτιση μεταξύ των τεχνικών ELISA και Dot blot ως προς τον ίδιο επίτοπο ήταν σημαντικά υψηλή (81%, 86%, 78% και 89% για τους επίτοπους 145-164αα, 289-308αα, 301-318αα και 349-364αα αντίστοιχα) (Σχ. 3).

Η τεχνική του Dot blot ήταν πιο ευαίσθητη από την ELISA, όμως παρουσίαζε χαμηλότερη ειδικότητα (ειδικότητα 76% ο επίτοπος 145-164αα, 56% ο επίτοπος 289-308αα, 88% ο επίτοπος 301-318αα και 72% ο επίτοπος 349-364αα). Ο επίτοπος 289-308 παρουσίασε την υψηλότερη ευαισθησία στο Dot blot με την χαμηλότερη ωστόσο ειδικότητα. Τα δύο περιορισμένα πεπτίδια 147-154 (8αα) και 291-302αα (12αα) δεν παρουσίασαν δραστηριότητα.



Σύγκριση της ευαισθησίας και ειδικότητας του συνθετικού επιτόπου SOC_4 -(349-364aa)₄ με την ανασυνδυασμένη La/SSB πρωτεΐνη.

Πενήντα εννέα αντι-La/SSB και αντι-Ro/SSA θετικοί οροί, 27 αντι-Ro/SSA θετικοί οροί ασθενών με πS και ΣΕΛ, καθώς και 54 οροί φυσιολογικών αιμοδοτών χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ELISA εναντίον της ανασυνδυασμένης La/SSB πρωτεΐνης (Σχ. 4β), του La N τελικού τμήματος, του La C-τελικού τμήματος και του SOC_4 -(349-364aa)₄ συνθετικού πεπτιδίου (Σχ. 4α). Έχοντας ορίσει ως ανώτερο αρνητικό όριο την μέση τιμή των οπτικών απορροφήσεων των φυσιολογικών ορών συν τρεις τυπικές αποκλίσεις, βρέθηκε ότι το 88,1%, 83%, 67.8% και 88.1% των αντι-La/SSB θετικών ορών αντιδρούσαν με την ανασυνδυασμένη La/SSB πρωτεΐνη, το La N τελικό τμήμα, το La C-τελικό τμήμα και το SOC_4 -(349-364aa)₄ συνθετικό πεπτίδιο αντίστοιχα. Το συνθετικό πεπτίδιο παρουσίασε την υψηλότερη ειδικότητα (89%), ενώ η ανασυνδυασμένη La/SSB πρωτεΐνη, το La N τελικό τμήμα και το La C-τελικό τμήμα έδωσαν χαμηλότερη ειδικότητα (63%, 74% και 67% αντίστοιχα).

Η ευαισθησία της ανασυνδυασμένης La/SSB πρωτεΐνης και του SOC_4 -(349-364aa)₄ πεπτιδίου έναντι των αντι-La/SSB θετικών ορών ήταν σχεδόν η ίδια. Οι τεχνικές αυτές παρουσίασαν επίσης υψηλό ποσοστό συσχέτισης (80%), όμως η ELISA με το συνθετικό πεπτίδιο ήταν πιο ειδική. Οι ELISAs, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα η ολική ανασυνδυασμένη La/SSB πρωτεΐνη και το La N τελικό τμήμα, παρουσίασαν υψηλή συσχέτιση (85%) και ευαισθησία.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία υποδεικνύει ότι τέσσερα πεπτιδικά ανάλογα που αντιστοιχούν σε κύριους επιτόπους της La/SSB πρωτεΐνης [7] μπορούν επιτυχώς να χρησιμοποιηθούν ως αντιγονικά υποστρώματα σε τεχνικές ELISA και Dot blot, για την ανίχνευση αντι-La/SSB αντισωμάτων σε ασθενείς με πσS και ΣΕΛ. Οι περισσότεροι οροί φυσιολογικών αιμοδοτών και ασθενών χωρίς ανιχνεύσιμα αντι-La/SSB αντισώματα δεν αναγνώριζαν τα πεπτίδια αυτά. Η συσχέτιση της ELISA με το Dot blot και την CIE ήταν υψηλή, η ευαισθησία της ELISA, χρησιμοποιώντας αυτά τα πεπτίδια ως αντιγόνα κυμαίνονταν μεταξύ 73% και 88.1% και για το Dot blot μεταξύ 73% και 97%.

Η τεχνική του Dot blot χρησιμοποιήθηκε επιπρόσθετα, για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ELISA. Αυτή η μέθοδος παρουσίασε υψηλή ευαισθησία, αλλά σημαντικά χαμηλότερη ειδικότητα σε σύγκριση με την ELISA. Τα μικρού μήκους πεπτίδια (8aa και 12aa) δεν αντέδρασαν με κανένα ορό στην τεχνική του Dot blot, πιθανόν διότι οι 0.45 μm πόροι της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης, δεν μπορούσαν να συγκρατήσουν τα μικρού μοριακού βάρους και μεγέθους πεπτίδια [20] και /ή λόγω της ήδη χαμηλής δραστηριότητας που επέδειξαν αυτά τα πεπτίδια με την τεχνική της ELISA [7]. Αντιθέτως τα δύο εικοσαμερή πεπτίδια 289-308aa και 145-164aa, όπως και τα ελαφρώς μικρότερα πεπτίδια 301-318aa και 349-364aa, έδωσαν υψηλή ευαισθησία.

Και οι 63 αντι-La/SSB θετικοί οροί αντιδρούσαν με ένα τουλάχιστον συνθετικό επίτοπο. Ένας αντι-La/SSB θετικός ορός δεν αναγνώριζε το 349-364aa πεπτίδιο με την τεχνική του Dot blot, ο οποίος το αναγνώριζε με την τεχνική της ELISA. Δύο αντι-La/SSB θετικοί οροί ήταν αρνητικοί με την ELISA, αλλά αναγνώριζαν τους επιτόπους 145-164 και 289-308 με την τεχνική του Dot blot. Αυτές



οι διαφορές μπορεί να αποδοθούν στην διαφορετική προσέγγιση των τεχνικών από πρακτικής άποψης καθώς και στον διαφορετικό τρόπο που εντοπίζει τα αντισώματα κάθε τεχνική.

Όπως έχει ήδη αποδειχθεί, οι μικρού μήκους επίτοποι παρουσίαζαν την χαμηλότερη αντιγονικότητα [7]. Η αύξηση του μήκους αυτών των πεπτιδίων στο αρχικό μήκος, με το οποίο είχαν εντοπιστεί (εικοσαμερή πεπτίδια), βελτίωσε σημαντικά τις αντιγονικές ιδιότητές τους. Αυτά τα δεδομένα μπορούν να ερμηνευτούν ως εξής: Πρώτον, αντικατάσταση της W^{303} με αλανίνη προκάλεσε σημαντική μείωση της αντιγονικότητας του επιτόπου $^{289}ANNGNLQLRNKEVTWEVLEG^{308}$ αυτό το αμινοξύ δεν συμπεριλαμβάνονταν στον περιορισμένο επίτοπο των 12aa (291-302). Δεύτερον, ο επίτοπος 145-164 είναι τμήμα της RNP περιοχής [21] της La/SSB πρωτεΐνης η οποία διαθέτει δομή ελικοειδής που εμπεριέχει διαμόρφωση β θηλιάς [7]. Υποστηρίζεται ότι, για να σταθεροποιηθεί η διαμόρφωση α έλικας πεπτιδίου σε υδατικό περιβάλλον, χρειάζονται τουλάχιστον 15 αμινοξέα [22]. Βάσει αυτού, το οκταπεπτίδιο δεν μπορούσε να αποκτήσει την απαραίτητη διαμόρφωση, προκειμένου να αναγνωριστεί από τα αντι-La/SSB αντισώματα [23]. Οι επίτοποι των είκοσι αμινοξέων ανήστειλαν εν μέρει την πρόσδεση των αντισωμάτων στην ολική La/SSB πρωτεΐνη, γεγονός που δηλώνει ότι αποτελούν στόχους συγκεκριμένων αντι-La/SSB αντισωμάτων.

Δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ των πληθυσμών των αντισωμάτων που στρέφονται εναντίον των επιτόπων 289-308 και 301-318, παρόλο που οι επίτοποι μοιράζονται 8 αμινοξέα στην αλληλουχία τους. Κατά συνέπεια αυτές οι περιοχές αποτελούνται από δύο ανεξάρτητους, διαδοχικούς επιτόπους, οι οποίοι είναι στόχοι δύο διαφορετικών πληθυσμών αντισωμάτων.



Για να διερευνηθεί εκτενέστερα η αξία αυτών των La/SSB συνθετικών επιτόπων στην ικανότητα να αναγνωρίζονται από αντι-La/SSB αντισώματα, συγκρίθηκαν με την ανασυνδυασμένη La/SSB πρωτεΐνη, καθώς και με τμήματά της. Οροί ελέγχθηκαν εναντίον της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, του La C τελικού τμήματος (215 αμινοξέων), του La N τελικού τμήματος και του επιτόπου 349-364, ο οποίος παρουσίαζε την υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα σε προηγούμενη μελέτη. Προκειμένου να αυξηθεί η αντιγονικότητα του επιτόπου, προσδέθηκε ομοιοπολικά, επάνω σε επαναλαμβανόμενο oligοπεπτιδικό φορέα SOC. Προηγούμενες μελέτες [8] απέδειξαν ότι αυτός ο φορέας έχει δομή κανονικής 3_{10} έλικας, επί της οποίας τα προσδεμένα αντιγονικά πεπτίδια δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και διατηρούν την κανονική τους διαμόρφωση και έτσι μπορούν να αποκτηθούν ισχυρά αντιγόνα.

Τόσο το συνθετικό πεπτίδιο, όσο και η ανασυνδυασμένη La/SSB πρωτεΐνη παρουσίασαν την ίδια ευαισθησία 88.1%: Η συσχέτιση των δύο τεχνικών ήταν επίσης υψηλή 80%, το συνθετικό πεπτίδιο ωστόσο είχε μεγαλύτερη ειδικότητα 89% έναντι 63% της La/SSB πρωτεΐνης ως προς την αναγνώριση αντι-La/SSB αντισωμάτων και μόνο. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευθεί με δύο τρόπους. Πρώτον αντι-Ro/SSA θετικοί οροί μπορεί να περιέχουν μικρά ποσά αντι-La/SSB αντισωμάτων, τα οποία στρέφονται εναντίον επιτόπων διαφορετικών από τον επίτοπο 349-364. Δεύτερον, ψευδώς θετικά αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε τεχνικές που χρησιμοποιούσαν ανασυνδυασμένα προϊόντα [24]. Αυτό αποδόθηκε στο ότι το ανασυνδυασμένο προϊόν ήταν "μολυσμένο" με άλλες πρωτεΐνες του βακτηριακού συστήματος έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε.

Σημαντικός αριθμός ορών αντιδρούσε επίσης με τα La N και La C τελικά άκρα της πρωτεΐνης. Ενδιαφέρον είναι επίσης το γεγονός ότι η αντιγονικότητα των



δύο πεπτιδίων των 20 αμινοξέων, συσχετίζεται σημαντικά υποδηλώνοντας ότι οι αντι-La/SSB οροί διαθέτουν περιορισμένη ποικιλία αντισωμάτων εναντίον αυτών των επιτόπων. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν περιγραφεί σε προηγούμενες εργασίες, [25], στις οποίες υποδεικνύεται ότι αυτοί οι επίτοποι βρίσκονται στο ίδιο εκτεθειμένο τμήμα του αυτοαντιγόνου, το οποίο αναγνωρίζεται από ειδικούς B λεμφοκυτταρικούς κλώνους. Αυτά τα αποτελέσματα σε συνδυασμό με το υψηλό ποσοστό αναστολής που προκαλούν αυτά τα πεπτίδια της αντιγονικότητας της La/SSB πρωτεΐνης, δηλώνουν ότι η ανίχνευση των αντι-La/SSB αντισωμάτων χρησιμοποιώντας συνθετικά πεπτίδια, παρουσιάζει την ίδια ευαισθησία με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Επιπρόσθετα, επιβεβαιώθηκε ότι μεγάλο ποσοστό αντι-La/SSB θετικών ορών περιέχει αντισώματα που στρέφονται κατά του μεταλλαγμένου N τελικού τμήματος του αυτοαντιγόνου [18].

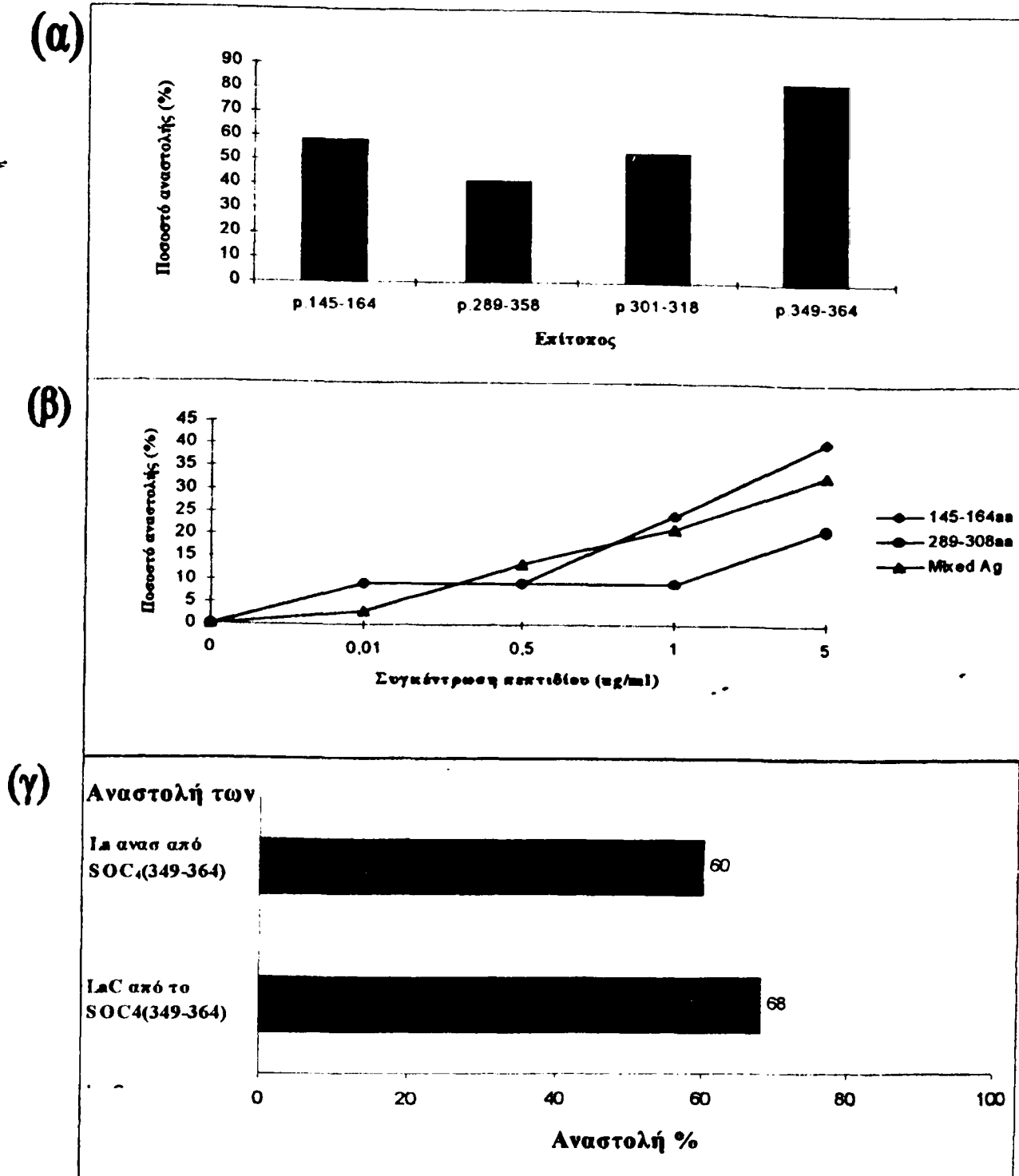
Η συσχέτιση του $\text{SOC}_4\text{-(349-364aa)}_4$ και του La C τελικού τμήματος ήταν χαμηλή (56%), παρόλο το γεγονός ότι το πεπτίδιο είναι τμήμα αυτής της περιοχής. Τρεις οροί αντιδρούσαν με το πεπτίδιο χωρίς να αναγνωρίζουν το ανασυνδυασμένο μόριο ή κάποιο από τα τμήματά του. Παράλληλα πέντε οροί δεν αντιδρούσαν με το συνθετικό πεπτίδιο, ενώ αναγνώριζαν όλα τα ανασυνδυασμένα μόρια. Είναι επομένως πιθανό ότι τα αντισώματα των ορών αυτών να αναγνώριζαν επίτοπους διαμόρφωσης. Η πλειοψηφία των ορών αντιδρούσε με τον συνθετικό επίτοπο, όχι όμως με το La C τμήμα. Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι αυτά τα αντισώματα αναγνωρίζουν ευθύγραμμους μετουσιωμένους επιτόπους της La/SSB πρωτεΐνης, αντί ολοκλήρου του μορίου. Επομένως ο επίτοπος 349-364 είναι ο κύριος επίτοπος του La/SSB αυτοαντιγόνου στο καρβοξυτελικό τμήμα του.

Η χρήση μικρού μήκους συνθετικών πεπτιδίων για την ανίχνευση αντι-La/SSB αντισωμάτων έχει ελεγχθεί σε προηγούμενες εργασίες. Η αποτυχία στην

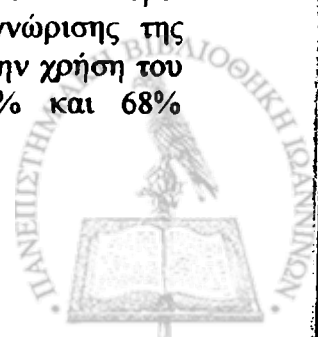


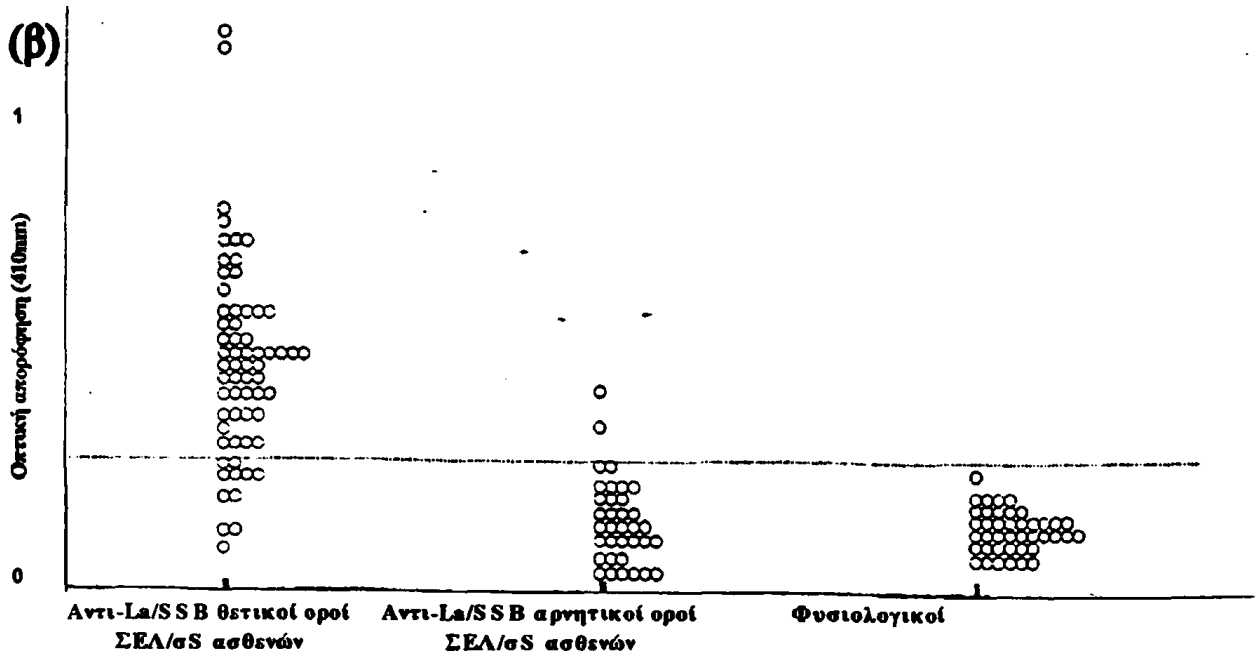
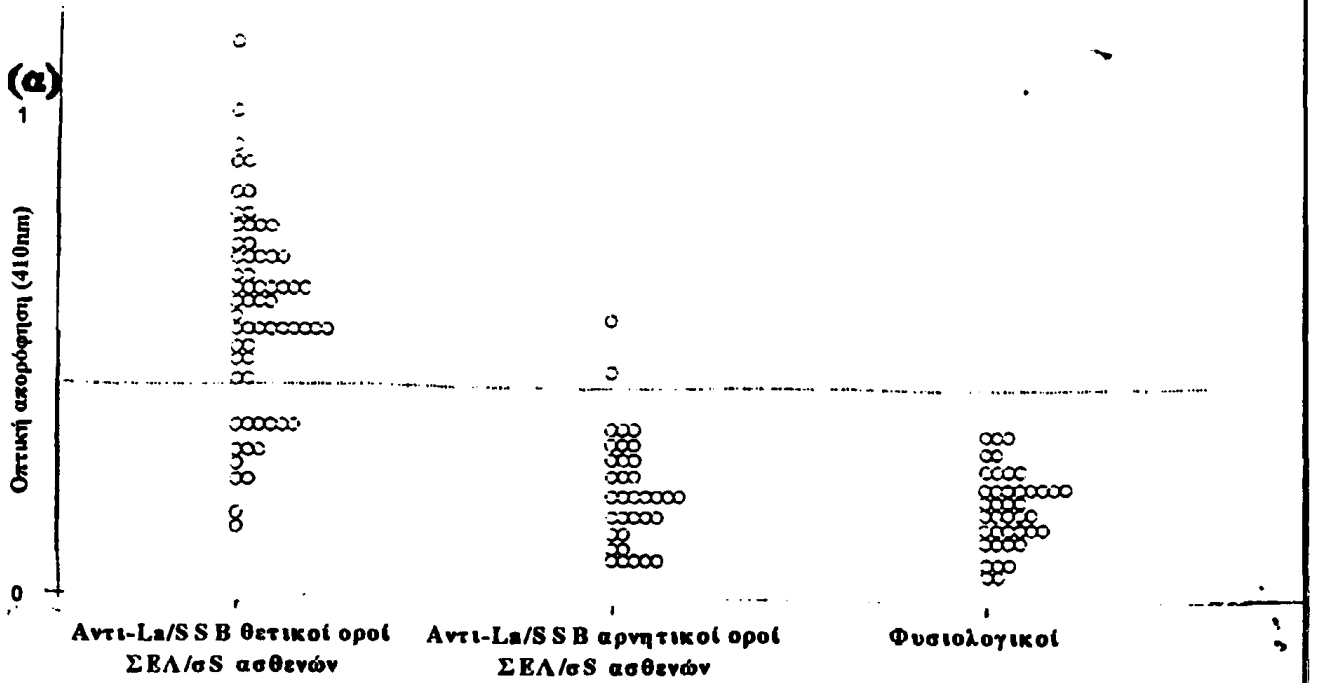
αναγνώριση συνθετικών La πεπτιδίων [26] από αντι-La/SSB θετικούς ανθρώπινους ορούς πιθανόν να οφείλεται στην μη ολοκληρωμένη εξέταση των διαδοχικών επιτόπων, κατά την οποία αποκλείστηκαν πεπτίδια που βρέθηκαν δραστικά στην παρούσα εργασία. Οι τέσσερις La/SSB επίτοποι αποδείχθηκαν πολύ ευαίσθητοί και ειδικοί στην ανίχνευση αντι-La/SSB αντισωμάτων με τις τεχνικές της ELISA και του Dot blot. Η διαλυτότητά τους, η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητά τους, η ευχρηστία τους στην ανίχνευση αντι-La/SSB αντισωμάτων, επιτρέπει την παρασκευή τους σε μεγάλες ποσότητες για καθημερινή κλινική χρήση.



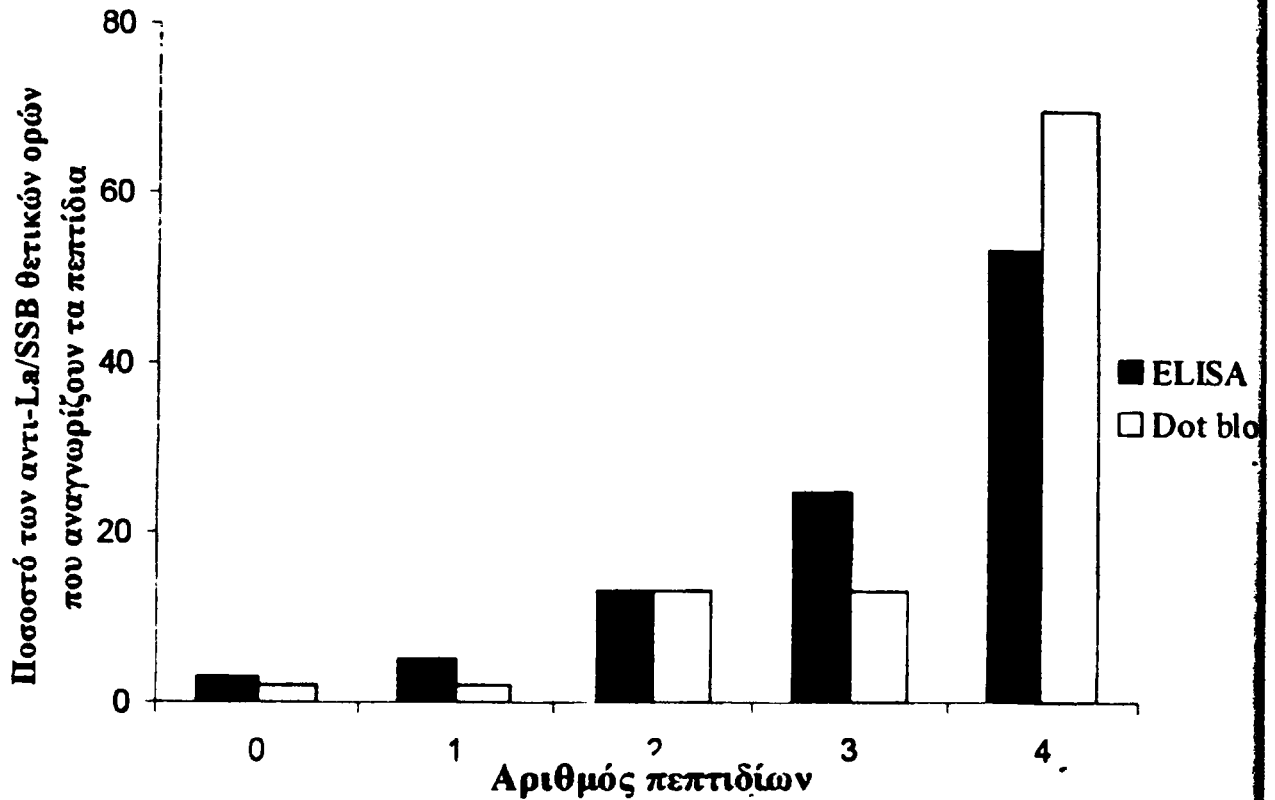


Σχήμα 1 (α): ομόλογη αναστολή της ικανότητας πρόσδεσης των αντι-La/SSB αντισωμάτων επί των πεπτιδίων στα ραβδία μετά από επώασή τους από τα π.145-164, π.289-308, π.301-320 και π.349-368. Τα ποσοστά αναστολής ήταν: 58% για το π.145-164, 41.5% για το π.289-308, 53% για το π.301-318 και 83% για το π.349-364. **(β):** Αναστολή της ικανότητας πρόσδεσης των αντι-La/SSB αντισωμάτων στο La/SSB αντιγόνο, με την χρήση αναστολέων διάφορες συγκεντρώσεις των συνθετικών πεπτιδίων: π.145-164 (♦), π.289-308 (●) και μίγμα των τεσσάρων πεπτιδίων (▲) (κάθε πεπτίδιο είχε 25% συμμετοχή στο διάλυμα). Οι αντι-La/SSB οροί χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:500. **(γ):** Η αναστολή της αναγνώρισης της ανασυνδυασμένης La/SSB πρωτεΐνης και του La C τμήματός της με την χρήση του συνθετικού πεπτιδίου SOC₄(349-364) ως αναστολέα ήταν 60% και 68% αντίστοιχα.

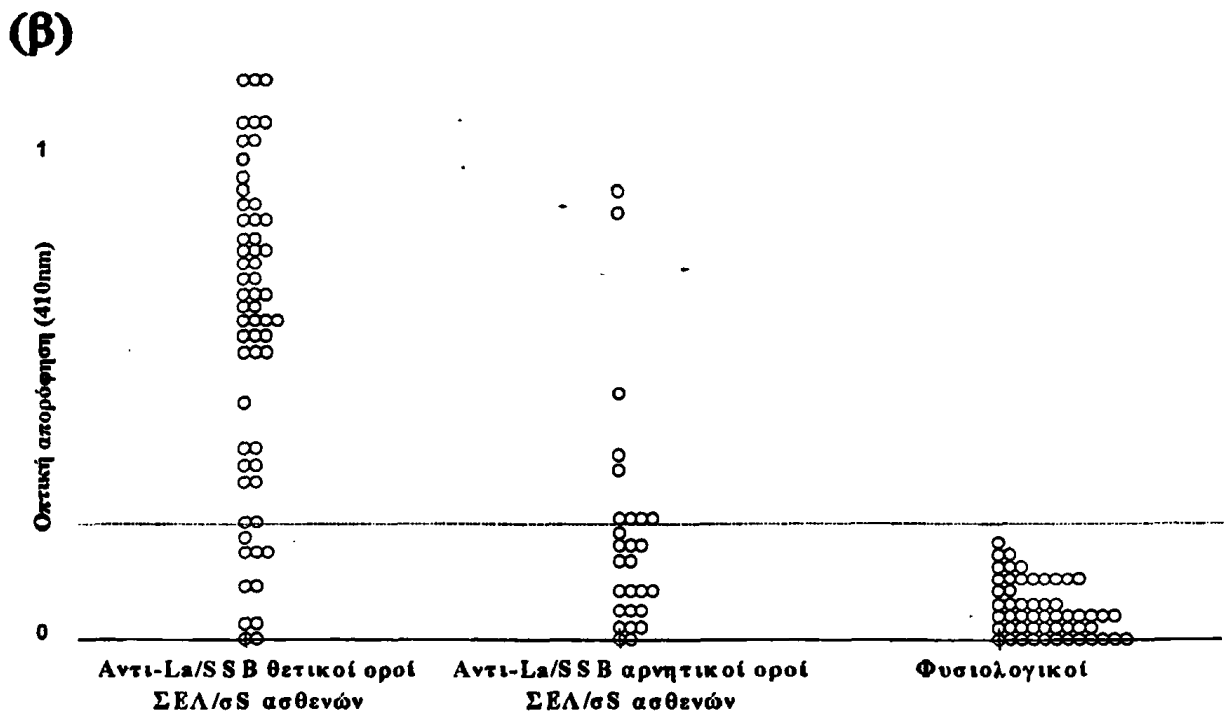
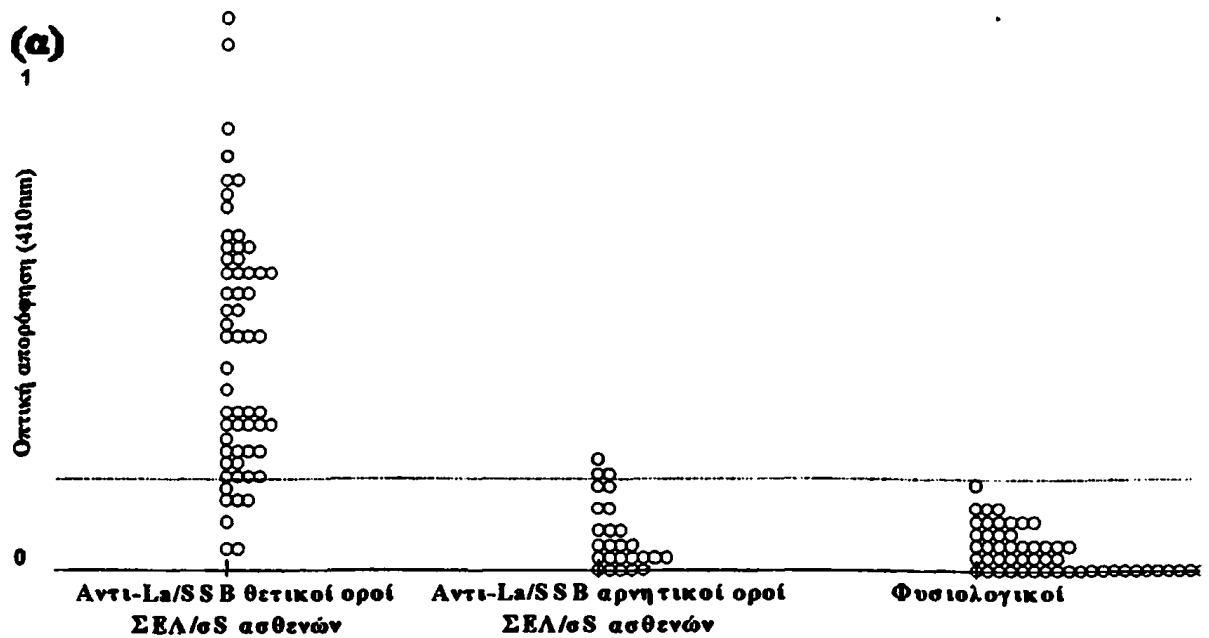




Σχήμα 2. Ικανότητα αναγνώρισης των συνθετικών πεπτιδίων: $^{145}\text{TLHKAFKGSIFVVFDSIESA}^{164}$ (α) και $^{289}\text{ANNGNLQLRNKEVNTWEVLEG}^{308}$ (β) από αντί-La/SSB θετικούς ορούς ασθενών με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren (πσS) και Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ), ασθενείς με πσS και ΣΕΛ χωρίς αντί-La/SSB αντισώματα, και φυσιολογικούς μάρτυρες. Ως όριο θετικότητας ορίστηκε η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης σε ELISA των φυσιολογικών ορών + 3 τυπικές αποκλίσεις.



Σχήμα 3. Σύγκριση της τεχνικής ELISA (μαύρη ράβδος) και του Dot blot (λευκή ράβδος) ως προς την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν τα αντι-La/SSB αντισώματα προερχόμενα από ορούς ασθενών με πσS και ΣΕΛ με την χρήση συνθετικών πεπτιδίων. Η οριζόντια αριθμηση αναπαριστά τον αριθμό των πεπτιδίων που αντιδρούν με κάθε ορό. Δύο από τους 63 αντι-La/SSB θετικούς ορούς (3%) δεν αντιδρούν με κανένα από τα πεπτίδια, 54% των αντι-La/SSB θετικών ορών αντιδρούν και με τα τέσσερα πεπτίδια με την τεχνική της ELISA. Με την τεχνική του Dot blot μόνο ένας από τους 63 (1.6%) αντι-La/SSB θετικούς ορούς δεν αναγνωρίζει κανένα από τα πεπτίδια. Το 71% των αντι-La/SSB θετικών ορών αντιδρούν και με τα τέσσερα πεπτίδια.

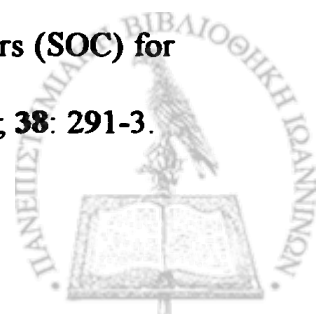


Σχήμα 4. Ικανότητα αναγνώρισης της ανασυνδυασμένης La/SSB πρωτεΐνης (β) και του SOC₄(349-364aa) συνθετικού πεπτιδικού αναλόγου (α) από αντί-La/SSB θετικούς ορούς ασθενών με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren (πσS) και Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ), ασθενείς με πσS και ΣΕΛ χωρίς αντί-La/SSB αντισώματα και φυσιολογικούς μάρτυρες. Ως όριο θετικότητας ορίστηκε η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης σε ELISA των φυσιολογικών ορών + 3 τυπικές αποκλείσεις.

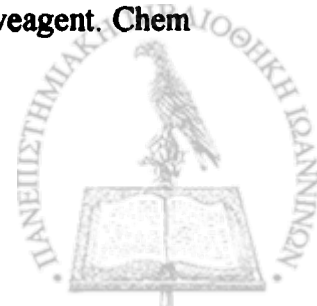


BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune disease and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989; **44**: 93-151.
- 2 Manoussakis MN, Tzioufas AG, Pange PJE, Moutsopoulos HM. Serological profiles in subgroups of patients with Sjogren's syndrome. *Scand J Reumatol* 1986; **61**: 89-92.
- 3 Harley JB, Alexander EL, Bias WB, Fox OF, Provost TT, Reichlin M, Yamagata H, Arnett FC. Anti-Ro(SSA) and anti-La (SS-B) in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1986; **29**: 196-205.
- 4 Andonopoulos AP, Skopouli FN, Dimou GS, Drosos AA, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome in systemic lupus erythematosus. *J Reumatol* 1990; **17**: 201-4.
- 5 Pruijn GJM. The La(SS-B) antigen. *Manual of Biological Markers of Disease B4* 2: 1. Kluwer Academic Publishers Printed in the Netherlands 1994; **2**: 1-14.
- 6 Meilof JF, Bantjes I, De Jong J, Van Dam AP, Smeenk RJT. The detection of anti Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies. A comparison of counterimmunoelectrophoresis with immunoblot, ELISA and RNA-precipitation assays. *J Immunol Methods* 1990; **133** ; 215-26.
- 7 Tzioufas AG, Yiannaki E, Sakarellos-Daitsiotis M, Routsias JG, Sakarellos C, Moutsopoulos HM. Fine specificity of autoantibodies to La/SSB: Epitope mapping Molecular mimicry and clinical applications. *Clin Exp Immunol* 1997; **108**: 191-8.
- 8 Tsikaris V, Sakarellos C, Cung-Thong M, Marraud M, Sakarellos-Daitsiotis M. Concept and design of a new class of sequential oligopeptides carriers (SOC) for covalent attachment of multiple antigenic peptides. *Biopolymer* 1996; **38**: 291-3.



- 9 Tsikaris V, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Cung MT, Marraud M, Konidou G, Tzinia A, Soteriadou KP. Use of sequential oligopeptide carriers (SOC_n) in the design of potent *Leishmania* gp63 immunogenic peptides. *Peptide Res* 1996; 9: 5, 240-7.
- 10 Tsikaris V, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Orlewski P, Marraud M, Cung MT, Vatzaki E, Tzartos S. Construction and application of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC_n) for multiple anchoring of antigenic peptides-application to the acetylcholine receptor (AChR) main immunogenic region. *Biol Macromol* 1996; 19: 195-205.
- 11 Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RM, Bjerrum KB, Braga S, Coll J, De Vita S, Drosos AA, Ehrenfeld M, Harton P Y, Hay EM, Isenberg DA, Janin A, Kalden JR, Kater L, Kontinen YT, Maddison PJ, Maini RN, Manthorpe R, Meyer O, Ostuni P, Pennec Y, Prause JU, Richards A, Sauvezie B, Schiodt M, Sciuto M, Scully C, Shoenfeld Y, Skopouli FN, Smolen JS, Snaith ML, Tishler M, Todesco S, Valesini G, Venables PJW, Wattiaux MJ, Youinou P. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's Syndrome. *Arthr Rheum* 1993; 36: 3, 340-7.
- 12 Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Green Schaller J, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthr Rheum* 1982; 25: 11, 1271-77.
- 13 Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *JACS* 1963; 85: 2149-54.
- 14 Le-Nguyen D, Heitz A, Castro B. (1987) Resin Substrates. Part 2. Rapid Solid Phase synthesis of the ratine sequence tetradecapeptide using BOP veagent. *Chem Soc Perkin Trans* 1987; 1: 1915-19.



- 15 Johnson T, Sheppard RC. Resin Effects in solid phase Peptide Synthesis. Enhanced Purity of Tryptophan-containing Peptides through. Two-step cleavage of Side Chain Protecting Groups and peptide-Resin Linkage. *J Chem Soc Chem Commun* 1991; 1653-5.
- 16 Knorr R, Trzeciak A, Bannwarth W, Gillessen D. New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Let* 1989; **30**: 15, 1927-30.
- 17 ELISA method using biotinylated peptides. Chiron mimotopes. Pinpoints Mimotopes and peptide Technology. September 1992.
- 18 Bachmann M, Tröster H, Bartsch H, Grözl D. A frame shift mutation in a hot spot region of the nuclear autoantigen La/SS-B. *J Autoimmun* 1996; **9**: 747-56.
- 19 Tröster H, Metzger TE, Semsei I, Schwemmle M, Winterpacht A, Zabel B, Bachmann M. One gene, two transcripts: Isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-B from a cDNA library of a patient with primary Sjogrens' syndrome. *J Exp Med* 1994; **180**: 2059-69.
- 20 Stott DI. Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Meth* 1989; **119**: 153-87.
- 21 Chan EKL, Sullivan KF, Tan EM. Ribonucleoprotein SS-B/La belongs to a protein family with consensus sequences for RNA-binding. *Nucl Acid Res* 1989 ;**17**: 2233-44.
- 22 Leach SJ. How antigenic are antigenic Peptides? *Biopolymers* 1983; **22**: 425-40.
- 23 Berzofsky JA. Intrinsic and Extrinsic factors in Protein Antigenic Structure. *Science* 1985; **229**: 932-40.
- 24 Bini P, Chu JL, Okolo C, Elkon K. Analysis of autoantibodies to recombinant La(SS-B) peptides in Systemic Lupus Erythematosus and Primary Sjogren's Syndrome. *J Clin Invest* 1990; **85**: 325-33.



- 25 Rothfield N, Whitaker D, Bordwell B, Weiner E, Semecal JL, Earshaw W.
Detection of anticentromere antibodies using cloned autoantigen. CENP-B. Arthr
Rheum 1987; 30: 1416-9.
- 26 St Clair EN, Burch JA, Ward MM, Keene JD, Risetsky DS. Temporel correlation
of antibody responses to different epitopes of the human La autoantigen. J Clin
Invest 1990; 85: 515-21.



**Η ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΛΕΥΚΩΝ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ ΝΕΑΣ
ΖΗΛΑΝΔΙΑΣ ΜΕ ΜΙΚΡΑ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ,
ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΕΝΔΟΜΟΡΙΑΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΩΝ Β ΚΑΙ Τ
ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ.**

Ε.Ε. Γιαννάκη, Α.Γ. Τζιούφας, Π.Γ. Βλαχογιαννόπουλος, Μ.Ν.
Μανουσάκης, Κ.Σακαρέλλος†, Μ.Σακαρέλλου -Δαϊτσιώτου†, και Χ.Μ.
Μουτσόπουλος

Τομέας Παθολογικής Φυσιολογίας, Εθνικού Πανεπιστημίου Αθηνών,
Αθήνα και † Τμήμα Χημείας, Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Προς δημοσίευση



Η ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΛΕΥΚΩΝ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ ΝΕΑΣ ΖΗΛΑΝΔΙΑΣ ΜΕ ΜΙΚΡΑ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ La/SSB ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΕΝΔΟΜΟΡΙΑΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΩΝ Β ΚΑΙ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η La/SSB πρωτεΐνη είναι ένα αυτοαντιγόνο, συστατικό του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου RoRNP στο οποίο συμμετέχουν επιπλέον δύο πρωτεΐνες (Ro52 και Ro60 KD) και μικρού μοριακού βάρους ΥRNA. Αυτοαντισώματα εναντίον αυτής της πρωτεΐνης υπάρχουν συχνά σε ορούς ασθενών με σύνδρομο Sjögren [1-3]. Η ανοσολογική απόκριση εναντίον του La/SSB συμπλόκου είναι ποικιλόμορφη, πολυκλωνική και εξαπλώνεται εναντίον διαφορετικών τμημάτων του συμπλόκου, αναγνωρίζοντας τόσο γραμμικούς όσο και επίτοπους διαμόρφωσης.

Η χαρτογράφηση των γραμμικών Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων της La/SSB έδειξε ότι τα αντι-La/SSB αυτοαντισώματα στρέφονται κυρίως εναντίον τεσσάρων γραμμικών ανοσοδραστικών επιτόπων που περιέχουν τις ακόλουθες αλληλουχίες αμινοξέων 145-164aa (επίτοπος 1), 289-308aa (επίτοπος 2), 301-318aa (επίτοπος 3) και 349-364aa (επίτοπος 4) [4,5]. Με την χρήση μεγάλου αριθμού ορών, αποδείχθηκε ότι οι επίτοποι 3 και 4 παρουσιάζουν την μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα ως προς την αναγνώριση των αντι-La/SSB αυτοαντισωμάτων. Επίσης οι επίτοποι 1, 2 και 3 βρέθηκε ότι παρουσιάζουν χαρακτηριστικά Τ λεμφοκυτταρικών επιτόπων με την χρήση προγραμμάτων πρόβλεψης Τ επιτόπων.

Προκειμένου να διερευνηθεί η αντιγονικότητα των τεσσάρων ανθρωπίνων Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων του La/SSB αυτοαντιγόνου, αυτοί ενέθηκαν υποδορία



σε θηλυκά φυσιολογικά κουνέλια του γένους Νέας Ζηλανδίας. Τα πεπτιδία ενέθηκαν ως υψηλά ανοσοδραστικές μορφές, συγκεκριμένα κάθε πεπτιδίο συζεύχθηκε ομοιοπολικά σε επαναλαμβανόμενους ολιγοπεπτιδικούς φορείς (sequential oligopeptide carriers SOC) [9, 10, 11]. Διερευνήθηκε και εκτιμήθηκε η χυμική και η κυτταρική απόκριση εναντίον αυτών των πεπτιδίων, καθώς και εναντίον ολοκλήρου του ανθρωπίνου και κουνελίσσιου αντιγόνου La/SSB.



ΥΛΙΚΑ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ανοσοποιήσεις κουνελιών: Δέκα θηλυκά κουνέλια, ηλικίας 6 έως 8 εβδομάδων, Νέας Ζηλανδίας ανοσοποιήθηκαν σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο ανοσοποίησης [12]: στην πρώτη ημέρα μίγμα ολικού ανοσοενισχυτικού του Freud και διάλυμα φωσφορικών pH: 7.4 που περιείχε 0.5mg ανοσογόνου ενέθηκε υποδόρια σε ίσιους όγκους (0.5ml: 0.5ml). Οι επαναλήψεις των ανοσοποιήσεων έγιναν με 0.5mg ανοσογόνου σε ημιτελές μίγμα ανοσοενισχυτικού του Freud, υποδόρια την 26^η, 53^η και 99^η ημέρα. Την 152^η ημέρα η ανοσοποίηση έγινε ενδοφλέβια χωρίς ανοσοενισχυτικό. Διαδοχικές αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν πριν από κάθε ανοσοποίηση και επιπρόσθετα τις ημέρες 205, 240, 293, και 328. Τα ζώα θυσιάστηκαν την 328^η ημέρα.

Σαν ανοσογόνα χρησιμοποιήθηκαν οι τέσσερις γραμμικοί B λεμφοκυτταρικοί επίτοποι του La/SSB αυτοαντιγόνου, στην μορφή τετραμερών συμπλόκων πεπτιδίου-SOC [(πεπτιδίο)₄- SOC₄] ως εξής: Το κουνέλι No1 ανοσοποιήθηκε με διάλυμα φωσφορικών (ζώο μάρτυρας), το κουνέλι No 2 με τον τετραμερή επαναλαμβανόμενο ολιγοπεπτιδικό φορέα SOC, τα κουνέλια No 3, 4 με τον επίτοπο 1, τα κουνέλια No 5, 6 με τον επίτοπο 2, τα κουνέλια No 7, 8 με τον επίτοπο 3 και τα κουνέλια No 9, 10 με τον επίτοπο 4.

Πεπτιδική σύνθεση και καθαρισμός

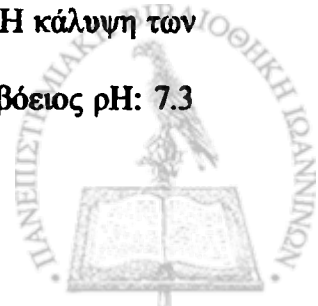
Οι 4 γραμμικοί B λεμφοκυτταρικοί επίτοποι του αυτοαντιγόνου La/SSB :
¹⁴⁵TLHKAFKGSIFVVFDSIESA¹⁶⁴, ²⁸⁹ANNGNLQLRNKEVTWEVLEG³⁰⁸,
³⁰¹VTWEVLEGEVEKEA₁KKI³¹⁸ and ³⁴⁹GSGKGVQFQGKTKF³⁶⁴ συνδεδεμένοι
 στον φορέα SOC: (Gly-Aib-Lys)₄, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τις
 ανοσοποιήσεις, συντέθηκαν και καθαρίστηκαν σύμφωνα με τις αρχές σύνθεσης



στερεάς φάσης όπως έχουν περιγραφεί προηγούμενα [13]. Οι επίτοποι αυτοί ανταποκρίνονται σε πεπτίδια, τμήματα της ανθρώπινης La/SSB πρωτεΐνης τα οποία διαφέρουν από τις αντίστοιχες αλληλουχίες της La/SSB πρωτεΐνης κουνελιού όπως φαίνεται στον πίνακα I

Εικοσιεπτά πεπτίδια, μήκους 23 αμινοξέων, αλληλοεπικαλυπτόμενα κατά 8 αμινοξέα το ένα από το άλλο και τα οποία κάλυπταν όλο το μήκος της ανθρώπινης La/SSB πρωτεΐνης, συντέθηκαν με την τεχνική της πολλαπλής, ταυτόχρονης σύνθεσης πεπτιδίων pepscan της εταιρίας Chiron, σύμφωνα με την μέθοδο του Geysen [14]. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας την στρατηγική F-moc, σύμφωνα με τις αρχές σύνθεσης στερεάς φάσης [13]. Τα πεπτίδια, τα οποία ήταν προσδεδεμένα δια μέσου του καρβοξυτελικού άκρου τους, σε ραβδία πολυπροπυλενίου, αποπροστατεύθηκαν χρησιμοποιώντας μίγμα τριφθοροοξικού οξέος: αιθανοδιθειώλης: ανισόλης 38: 1: 1 (v/v/v) για 2 ½ ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (ΘΔ). Η αποκόλληση των πεπτιδίων από τα ραβδία έγινε χρησιμοποιώντας ήπιες υδατικές διαδικασίες αποκοπής [15] με διάλυμα Hepes 0.05M (pH: 7.6) υπό την επίδραση υπερήχων, διάρκειας 60 λεπτών σε ΘΔ. Η μέθοδος αυτής της αποκοπής προσδίδει στο καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου την ομάδα της δικετοπιπεραζίνης. Ομάδες αυτού του είδους, έχει βρεθεί ότι δεν επηρεάζουν την λειτουργία των T λεμφοκυττάρων [16, 17]. Εν συνεχεία τα πεπτίδια λυοφιλοποιούνται. Τέσσερα αντιπροσωπευτικά πεπτίδια με αλληλουχία δύσκολα συντιθέμενη [18, 19] ελέγχθηκαν με αναλυτική, υγρή, χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) και βρέθηκαν να έχουν καθαρότητα μεταξύ 60% και 95%.

Ανοσοενζυμική μέθοδος: Πλακίδια Elisa (NUNK Denmark) καλύφθηκαν με 5μg/ml SOC-πεπτίδιο (50 μl/ φρεάτιο) και επώαστηκαν ολονύκτια στους 4°C. Η κάλυψη των ελευθέρων θέσεων των φρεατίων έγινε με διάλυμα 10% αλβουμίνης βόειος pH: 7.3



(100μl/ φρεάτιο), ολονύκτια στους 4°C. Εν συνεχεία, οροί κουνελιών προ και μετά των ανοσοποιήσεων επωάστηκαν επί μία ώρα σε ΘΔ με αραιώσεις 1/50 έως 1/200. Ακολούθησε η προσθήκη του δεύτερου αντισώματος συζευγμένου με ένζυμο αλκαλική φωσφατάση που αναγνωρίζει αντισώματα κουνελιού τάξεως IgG επί μία ώρα σε ΘΔ και 1/2500 αραιώση. Η αναγνώριση των πεπτιδίων από τα αντισώματα ελέγχθηκε με την διάσπαση του υποστρώματος φωσφορικού νιτροφαινυλίου από το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης, 30 λεπτά μετά την προσθήκη του και σε θερμοκρασία 37°C. Το χρωμοφόρο προϊόν της ενζυμικής διάσπασης μετρήθηκε στα 405nm. Τα πλακίδια πλενόταν μεταξύ των διαφόρων σταδίων με διάλυμα φωσφορικών και απορρυπαντικού Tween-20 (0.1%) pH: 7.4 (200 μl/φρεάτιο).

Οι οροί ελέγχθηκαν επιπλέον με ειδική αντι-La/SSB ELISA εμπορίου (Shield diagnostics, Diastat, UK) στην οποία ως αντιγόνο χρησιμοποιείται η κεκαθαρμένη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη La/SSB, μαζί με κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα, ειδικό για ορούς κουνελιών.

Ανοσοαποτύπωση: Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα αναγνώρισης των αντισωμάτων των ορών κουνελιών της πρωτεΐνης La/SSB και άλλων πρωτεϊνών, οι οροί επωάστηκαν με ταινίες νιτροκυτταρίνης στις οποίες είχαν προσροφηθεί ανθρώπινα αυτοαντιγόνα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα προερχόμενα από σπληνοκύτταρα κουνελιών και καρκινικά κύτταρα HeLa προετοιμασμένα όπως έχει ήδη περιγραφεί [20]. Τα εκχυλίσματα αναπτύχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) 15% και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.



Οι ταινίες τις νιτροκυτταρίνης επωάστηκαν με τους ορούς των κουνελιών καθώς και με ανθρώπινους ορούς μάρτυρες σε αραιώση 1/30, επί μία ώρα και πλύθηκαν με διάλυμα TBS-Tween 0 0.05% τρεις φορές επί 10 λεπτά. Ακολούθησε επώαση με δεύτερο αντίσωμα (αντι- ανθρώπινο ή αντι- κουνελήσιο) προσδεμένο με ένζυμο αλκαλικής φωσφατάσης επί 2 ώρες σε ΘΔ. Η αντίδραση αναγνωρίστηκε με το χρώμα που αναπτύχθηκε μετά την διάσπαση του υποστρώματος της αλκαλικής φωσφατάσης (φωσφορικό νιτροφαινύλιο).

Έλεγχος αναστολής αντιγονικής αναγνώρισης:

A) Οι οροί που προήλθαν από τα ανοσοποιημένα με τα συνθετικά πεπτίδια κουνέλια, προεπωάστηκαν ολονύκτια σε αραιώσεις 1/200, 1/400 και 1/800 με 0.5, 5, 10 μg/ml συγκέντρωση αναστολέα. Ως αναστολέας χρησιμοποιήθηκε (1) το ομόλογο πεπτίδιο, (2) οι υπόλοιποι Β λεμφοκυτταρικοί επίτοποι. Τα μίγματα αυτά ελέγχθηκαν εναντίον πλακιδίων ELISA προεπιστρωμένων με τα πεπτίδια La/SSB.

Το ποσοστό αναστολής υπολογίστηκε βάσει του τύπου:

% ποσοστό αναστολής = $100 \times [1 - (\text{οπτική απορρόφηση ανασταλμένου ορού} / \text{οπτική απορρόφηση ορού})]$.

B) Οι οροί που αναγνώριζαν ολόκληρο το μόριο της La/SSB προεπωάστηκαν σε συγκέντρωση 1/500, με το πεπτίδιο το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση των ζώων από το οποίο προήλθαν, με τα άλλα 3 πεπτίδια καθώς και με μίγμα όλων των 4 πεπτιδίων σε συγκεντρώσεις 0.5, 5, 10, 50, 100 και 200μg/ml, ολονύκτια στους 4°C. Τα μίγματα αυτά ελέγχθηκαν σε πλακίδια ELISA προεπιστρωμένα με το αντιγόνο La/SSB (Shield diagnostics, Diastat UK).

Έλεγχος πολλαπλασιασμού Τ λεμφοκυττάρων κουνελιών: Τα ζώα Νο 1, 2, 3, 4, 5, 9 και 10 θυσιάστηκαν 328 μέρες μετά την ημέρα έναρξης των ανοσοποιήσεων. Τα



κουνέλια Νο 6, 7, 8 πέθαναν κατά την διάρκεια των ανοσοποιήσεων. Σπληνοκύτταρα και μονοκύτταρα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από τα κουνέλια και συνκαλλιεργήθηκαν με 5μg/ml των 27 La/SSB πεπτιδίων, των 4 Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων και με τον φορέα SOC.

Τα σπληνοκύτταρα καλλιεργήθηκαν για 5 ημέρες σε πληθυσμό 2×10^5 κύτταρα / φρεάτιο σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 που περιείχε επιπλέον 0.2mM L-γλουταμίνη, 100 μονάδες/ml πενικιλίνη και ίση ποσότητα στρεπτομυκίνης, και 10% βόειου εμβρυικού ορού. Ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων ελέγχθηκε με την ενσωμάτωση [3 H] θυμιδίνης (T) 1μCi/ φρεάτιο στο DNA των κυττάρων, η οποία προστέθηκε 18 ώρες πριν το τέλος της καλλιέργειας. Η ενσωματωμένη, ραδιοσημασμένη T μετρήθηκε σε μετρητή β ακτινοβολίας. Ως παράγων διέγερσης των κυττάρων (SI) υπολογίστηκε το πηλίκο των κρούσεων ανά λεπτό (καλ) των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν με πεπτίδιο προς τις (καλ) των κυττάρων χωρίς πεπτίδιο. Τιμή SI μεγαλύτερη του 2 θεωρήθηκε θετική.

Τα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (ΜΠΑ) καλλιεργήθηκαν όπως τα σπληνοκύτταρα στα οποία προστέθηκαν επιπλέον 10^5 /φρεάτιο ακτινοβολημένων σπληνοκυττάρων (3000 rads) προκειμένου ο πληθυσμός των κυττάρων να ενισχυθεί ως προς τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (ΑΠΚ).

Όλοι οι συνδυασμοί καλλιεργούμενων κυττάρων έγιναν εις τριπλούν. Κάθε πείραμα είχε μια τριάδα κυττάρων καλλιεργούμενων με 1μg/ml φυτοαιμοσυγκολητίνης (ΦΑΣ) επί τρεις ημέρες. Τα ακτινοβολημένα σπληνοκύτταρα επίσης καλλιεργήθηκαν μόνα τους καθώς και με την παρουσία ΦΑΣ.

Ακτινοβολημένα και μη σπληνοκύτταρα, ΜΠΑ όλων των κουνελιών καταψύχθηκαν και τα ίδια πειράματα επαναλήφθηκαν.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αντιπεπτιδική Elisa και αντι-La/SSB Elisa: Οι οροί που συλλέχθηκαν πριν την έναρξη της ανοσοποίησης και μετά από κάθε εμβολιασμό στην ημέρα 25, 53, 99, 205, 240, 293, και 328 ελέγχθηκαν εάν περιέχουν αντισώματα, τα οποία αναγνωρίζουν το πεπτίδιο με το οποίο ανοσοποιήθηκαν, ή τα πεπτίδια των άλλων τριών La/SSB επιτόπων.

Τα δείγματα ορού του κουνελιού που εμβολιάστηκε μόνο με ανοσοενισχυτικό (ζώο μάρτυρας) δεν αναγνώριζαν κανένα από τα πεπτίδια καθώς και οροί που προήλθαν από το ζώο που ανοσοποιήθηκε με τον φορέα SOC.

Η ικανότητα των αντισωμάτων των ορών να αναγνωρίζουν τα πεπτίδια με τα οποία ανοσοποιήθηκαν τα κουνέλια, αυξανόταν σταδιακά από την πρώτη ανοσοποίηση έως την τρίτη και παρέμενε σταθερή έως την ημέρα που θυσιάστηκαν (Σχήμα 1 α, β).

Οι οροί, που προήλθαν από τα ανοσοποιημένα με τους επίτοπους 1, 2 και 3 ζώα, αναγνώριζαν επίσης και τους άλλους επίτοπους. Τα ζώα που ανοσοποιήθηκαν όμως με τον επίτοπο 4, είχαν αντισώματα μόνο εναντίον αυτού του επιτόπου (Σχήμα 2 α, β), πίνακας II.

Ομόλογη αναστολή: Προεπώαση όλων των ορών των κουνελιών που ανοσοποιήθηκαν με ένα συγκεκριμένο πεπτίδιο, με αυτό το πεπτίδιο, προκάλεσε σημαντική μείωση της ικανότητας αναγνώρισης του ομόλογου πεπτιδίου.

Πιο συγκεκριμένα, η ομόλογη αναστολή των ορών κουνελιών που ανοσοποιήθηκαν με τον επίτοπο 1, έφτασε το 72% σε αραιώση 1/800 και συγκέντρωση αναστολέα 10μg/ml. Η ομόλογη αναστολή των ορών που προήλθαν από κουνέλια ανοσοποιημένα με τον επίτοπο 2, ήταν 78% σε αραιώση 1/800 και



10μg/ml συγκέντρωση αναστολέα. Ογδόντα πέντε τις εκατό ήταν η υψηλότερη αναστολή του ορού του ανοσοποιημένου με τον επίτοπο 3 κουνελιού σε αραιώση 1/200 και 10μg/ml συγκέντρωση αναστολέα. Η υψηλότερη ομόλογη αναστολή για τον ορό που προήλθε από το ανοσοποιημένο με τον επίτοπο 4 κουνέλι ήταν 82% σε 1/400 αραιώση και 10μg/ml συγκέντρωση αναστολέα. (Σχήμα 3).

Ετερόλογη αναστολή: Όλοι οι οροί που αντιδρούσαν με άλλους επίτοπους εκτός αυτού που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση του κουνελιού από το οποίο προήλθαν, προεπώστηκαν με καθένα από αυτά τα πεπτίδια.

Οι προεπώση αυτή μείωσε την ικανότητα αναγνώρισης των ορών ως προς τα αντίστοιχα πεπτίδια. Συγκεκριμένα, προεπώση ορού κουνελιού ανοσοποιημένου με τον επίτοπο 1 με τους επιτόπους 2, 3 και 4 κατέληξε σε 48%, 51% και 40% αναστολή αντίστοιχα σε αραιώσεις ορού και συγκεντρώσεις αναστολέων 1/800 και 10μg/ml, 1/800 και 10μg/ml και 1/400 και 5μg/ml αντίστοιχα. Προεπώση ορού κουνελιού ανοσοποιημένου με τον επίτοπο 2 με τους επιτόπους 1, 3 και 4 κατέληξε σε αναστολή 95%, 96% και 61% αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας αραιώση ορού και συγκέντρωση αναστολέα, 1/800 και 10μg/ml, 1/800 και 10μg/ml και 1/800 και 5μg/ml αντίστοιχα.

Προεπώση ορού κουνελιού ανοσοποιημένο με τον επίτοπο 3, με τους επιτόπους 1, 2 και 4, έδωσε 76%, 60% και 55% αναστολή αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας αραιώση ορού και συγκέντρωση αναστολέα 1/100 και 10μg/ml, 1/200 και 10μg/ml και 1/100 και 5μg/ml αντίστοιχα (Σχήμα 4), Πίνακας III.

Παράλληλα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με ορούς κουνελιών σε αραιώσεις 1/100 έως 1/800, οι οποίοι προεπώστηκαν με τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοποίηση σε συγκέντρωση 0.5, 5, 10μg/ml. Οι προεπωασμένοι οροί



ελέγχθηκαν για μη ειδική μείωση της αναγνώρισής τους προς τα πεπτίδια που αναγνωρίζουν. Για παράδειγμα ορός από κουνέλι ανοσοποιημένο με τον επίτοπο 1, προεπώαστηκε με αυτόν τον επίτοπο και ελέγχθηκε για μείωση της διασταυρούμενης αντίδρασης του στους επίτοπους 2, 3 και 4. Δεν σημειώθηκε μείωση της διασταυρωτής αντίδρασης αυτού του ορού (ή οποιουδήποτε άλλου ορού) ως προς αυτούς τους επιτόπους, γεγονός που επιβεβαιώνει την αναγνώριση των αντισωμάτων του κάθε ορού ως προς τα άλλα πεπτίδια της πρωτεΐνης La/SSB εκτός αυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοποίηση, επιβεβαιώθηκε επίσης η πολυκλωνική φύση αυτών των ορών.

Αναστολή της ικανότητας αναγνώρισης του ολικού μορίου La/SSB: Οι οροί των ανοσοποιημένων με τους επιτόπους 2 και 3, κουνελιών αναγνώριζαν το ολικό μόριο La/SSB με την τεχνική της ELISA.

Αυτοί οι οροί, σε αραίωση 1/500, προεπώαστηκαν με κάθε έναν από τους επιτόπους σε συγκεντρώσεις 0.5, 5, 10 μg/ml καθώς και με μίγμα όλων των πεπτιδίων.

Ο επίτοπος 2 καθώς και το μίγμα των 4 πεπτιδίων, ανέστειλε πλήρως (100%) την αναγνώριση της πρωτεΐνης La/SSB από τον ορό του κουνελιού που ανοσοποιήθηκε με τον επίτοπο 2. Προεπάωση αυτού του ορού με τα άλλα πεπτίδια δεν επηρέασε την αναγνώριση των αντισωμάτων του ορού της La/SSB πρωτεΐνης.

Παρόμοιες ήταν οι παρατηρήσεις για την αναγνώριση της La/SSB πρωτεΐνης από τον ορό του κουνελιού που ανοσοποιήθηκε με τον επίτοπο 3. Επιπλέον, αναστολή παρατηρήθηκε μετά από προεπάωση αυτού του ορού με τον επίτοπο 2 (30% αναστολή) (Σχήμα 5).



Ανοσοαποτύπωση: Οροί προερχόμενοι από τα κουνέλια που ανοσοποιήθηκαν με τους επιτόπους 2, 3 και 4, αναγνώριζαν την La/SSB πρωτεΐνη τόσο στην ανασυνδυασμένη της μορφή, όσο και την κουνελίσια και την ανθρώπινη, από την 25η ημέρα της ανοσοποίησης. Καμία άλλη αντιγονική αναγνώριση δεν παρατηρήθηκε π.χ. ως προς το Ro/SSA αντιγόνο. Οροί προερχόμενοι από τα κουνέλια που ανοσοποιήθηκαν: με τον επίτοπο 1, με τον φορέα SOC και με το ανοσοενισχυτικό του Freud, δεν αναγνώριζαν κανένα αυτοαντιγόνο. (Σχήμα 6).

Τα La/SSB πεπτίδια διεγείρουν και πολλαπλασιάζουν τα T λεμφοκύτταρα ανοσοποιημένων κουνελιών: Σπληνοκύτταρα και ΜΠΑ απομονώθηκαν από τα ανοσοποιημένα κουνέλια και συνκαλλιεργήθηκαν με 31 La/SSB πεπτίδια. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα σχήματα 7 και 8.

Τα σπληνοκύτταρα που απομονώθηκαν από τα ανοσοποιημένα με τον επίτοπο 1 κουνέλια, διεγείρονταν από τον επίτοπο 1 καθώς και από άλλα La/SSB πεπτίδια τα οποία δεν διέθεταν καμία ομολογία με αυτόν τον επίτοπο. Τα πεπτίδια αυτά έχουν την αλληλουχία αμινοξέων 1-23, 181-203, 376-398, 386-408 και 349-364 (επίτοπος 4). Τα σπληνοκύτταρα του ανοσοποιημένου με τον επίτοπο 2 κουνελιού διεγείρονταν με τον επίτοπο αυτό καθώς και με το πεπτίδιο 286-308αα, που περιέχει την αλληλουχία των αμινοξέων του επιτόπου, και με τον επίτοπο 4. Τα σπληνοκύτταρα των ανοσοποιημένων με τον επίτοπο 4 κουνελιών διεγείρονται από τον επίτοπο 4 καθώς και από τα πεπτίδια 76-98αα, 106-128αα, 121-143αα, 151-173αα, 241-263αα, 346-368αα που περιέχει τον επίτοπο 4, τον επίτοπο 1 και 2.

ΜΠΑ απομονωμένα από τα ίδια ζώα, επίσης διεγείρονται από πεπτίδια La/SSB. Πιο συγκεκριμένα, ΜΠΑ από τα ανοσοποιημένα με τον επίτοπο 1 κουνέλια, διεγείρονται από αυτόν τον επίτοπο, καθώς και από τα πεπτίδια: 1-23αα, 76-98αα,



166-188αα, 181-203αα, 211-233αα, 349-368αα και τον επίτοπο 4. ΜΠΑ από το ανοσοποιημένο με τον επίτοπο 2 κουνέλι δεν παρουσίασαν διέγερση από κανένα πεπτίδιο. ΜΠΑ από τα ανοσοποιημένα με τον επίτοπο 4 κουνέλια διεγείρονται με αυτό τον επίτοπο και με τα πεπτίδια 106-128αα, 241-263αα, 256-278αα και τον επίτοπο 2.

Σπληνοκύτταρα και ΜΠΑ απομονωμένα από το κουνέλι μάρτυρα δεν διεγείρονται από κανένα πεπτίδιο. Κύτταρα από όλα τα κουνέλια δεν παρουσίασαν διέγερση από τον φορέα SOC. Όλα τα κύτταρα είχαν πολύ καλή απόκριση στην ΦΑΣ (>100.000 καλ). Τα ακτινοβλημένα κύτταρα δεν αντιδρούσαν στην ΦΑΣ.

Επανάληψη των ανωτέρων πειραμάτων με κύτταρα από την κατάψυξη, επιβεβαίωσαν τα προαναφερθέντα αποτελέσματα.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ακριβής μηχανισμός που οδηγεί στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων κατά της ανθρώπινης La/SSB πρωτεΐνης δεν έχει διαλευκανθεί, ωστόσο διάφορες εργασίες έχουν αποδείξει ότι η παραγωγή των αυτοαντισωμάτων είναι αντιγονοεπαγόμενη. Δεδομένα που επιβεβαιώνουν την παραπάνω θεωρία προέρχονται από ανεξάρτητες κλινικές και πειραματικές παρατηρήσεις. Πρώτον τα αντι-La/SSB αντισώματα αποτελούν δείκτες νόσου και χαρακτηρίζουν κυρίως ασθενείς με σύνδρομο Sjogren [6], δεύτερον η αντιγονική χαρτογράφηση των Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων αποκάλυψε την ύπαρξη ποικίλων επιτόπων [4] και τέλος η ανοσοποίηση πειραματόζωων με αυτό το αυτοαντιγόνο προκάλεσε την παραγωγή αντισωμάτων τάξεως IgG και εξάπλωση της ειδικότητας των αντί-La/SSB αντισωμάτων από ένα τμήμα της σε ολόκληρο το μόριό της [7]. Χαρακτηριστικά, η ανοσοποίηση με μεγάλα τμήματα της La/SSB πρωτεΐνης φυσιολογικών CEH/HeJ, BALB/c και C57BL ποντικών, κατέληξε σε ενδο- και διαμοριακή εξάπλωση της ανοσολογικής απόκρισης, όπως επιβεβαιώθηκε από την παρουσία των ειδικών αυτοαντισωμάτων.

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η αντιγονικότητα των τεσσάρων ανοσοδραστικών γραμμικών Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων του ανθρώπινου αυτοαντιγόνου La/SSB. Οι ανοσοποιήσεις με τους La/SSB επιτόπους 1, 2 και 3 προκάλεσαν την παραγωγή αντισωμάτων εναντίον όχι μόνο των συγκεκριμένων επιτόπων, αλλά επεκτείνεται και σε άλλες περιοχές της πρωτεΐνης La/SSB. Επιπλέον η ανοσοποίηση με τον επίτοπο 2 προκάλεσε την παραγωγή αντισωμάτων εναντίον ολοκλήρου του La/SSB μορίου, όπως επιβεβαιώθηκε με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης και την χρήση ανθρώπινων και κουνελίσσιων κυτταρικών εκχυλισμάτων, το αυτό ισχύει και για τον επίτοπο 3. Άλλες εργασίες έχουν αποδείξει ότι η ανοσοποίηση με μικρού μήκους πεπτίδια, τμήματα του αυτοαντιγόνου Ro60KD



(πρωτεΐνης μέλους του hYRNPs) οδήγησε στην παραγωγή αντισωμάτων που αναγνωρίζουν τόσο το πεπτίδιο που χρησιμοποιήθηκε στον εμβολιασμό, όσο και ολόκληρο το Ro60KD μόριο, επιπλέον παρατηρήθηκε επέκταση της αυτοάνοσης απόκρισης στο 20% των ανοσοποιημένων πειραματόζωων, στα οποία ανιχνεύθηκαν αντισώματα που αναγνώριζαν και την La/SSB πρωτεΐνη [21]. Στην παρούσα εργασία παρόλο που τα αντισώματα που επάγονται από την ανοσοποίηση με τους επιτόπους 2 και 3 αναγνωρίζουν ολόκληρο το μόριο La/SSB, διαμοριακή επέκταση της ανοσολογικής απόκρισης προς τις άλλες πρωτεΐνες του συμπλόκου RNP δεν παρατηρήθηκε. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι ο επίτοπος 4 παρουσιάζει την μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα ως προς την ανίχνευση των αντί-La/SSB αντισωμάτων σε ορούς ασθενών με ΣΕΛ και σS [4, 5]. Οι οροί των κουνελιών που ανοσοποιήθηκαν με τον επίτοπο 4 δεν περιείχαν αντισώματα που αναγνώριζαν τα άλλα πεπτίδια, γεγονός που δηλώνει ότι η αλληλουχία 349-364aa της ανθρώπινης La/SSB πρωτεΐνης έχει ιδιότητα μόνο Β λεμφοκυτταρικού επιτόπου. Ωστόσο η καλλιέργεια σπληνοκυττάρων από τα ζώα που ανοσοποιήθηκαν με τους La/SSB Β λεμφοκυτταρικούς επιτόπους (1,2 και 4) απεκάλυψε την παρουσία πολλαπλών Τ λεμφοκυτταρικών επιτόπων, δεδομένα που συμφωνούν με τις προβλέψεις των H/Y [4]. Τα πεπτίδια 1, 6, 8, 13, 20, 24 της ανθρώπινης πρωτεΐνης La/SSB, επίσης επάγουν τον πολλαπλασιασμό των Τ λεμφοκυττάρων, υποδεικνύοντας την ετερογένεια της ανοσολογικής απόκρισης κατά του ανθρώπινου μορίου La/SSB και στο επίπεδο των Τ λεμφοκυτταρικών επιτόπων.

Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες ανοσοποίησης, ανταποκρίνονται σε αλληλουχίες του ανθρώπινου μορίου La/SSB, οι οποίες διαφέρουν από αυτές του μορίου La/SSB των κουνελιών. Αυτές οι διαφορές μπορεί να είναι σημαντικές για την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης των



κουνελιών που παρατηρήσαμε. Ο ανθρώπινος La/SSB επίτοπος 349-364αο είναι κατά 43.7% διαφορετικός σε σύγκριση με το ομόλογο πεπτίδιο του κουνελιού. Η διαφορά αυτή στην αλληλουχία, μπορεί πιθανόν να ερμηνεύσει την απουσία της εξάπλωσης της ανοσολογικής απόκρισης σε άλλα τμήματα της πρωτεΐνης La/SSB, εξάπλωση που παρατηρήσαμε όμως μετά από την ανοσοποίηση με τους άλλους επίτοπους που δεν διαθέτουν σημαντικές διαφορές στην αλληλουχία τους σε σύγκριση με τα ομόλογα τμήματα της πρωτεΐνης La/SSB του κουνελιού. Είναι πιθανόν το ανοσοποιητικό σύστημα του κουνελιού να αναγνωρίζει τον επίτοπο 4 ως ξένο αντιγόνο και να παράγει αντισώματα μόνο εναντίον του. Ωστόσο τα αντι-επίτοπου 4 κουνελήσια αντισώματα αναγνωρίζουν τόσο την ανθρώπινη όσο και την κουνελήσια πρωτεΐνη La/SSB με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, γεγονός που οφείλεται αποκλειστικά στην αντίδραση με αυτόν τον επίτοπο, ο οποίος είναι εκτεθειμένος στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης και εύκολα προσπελάσιμος από τα αντι-πεπτιδικά αντισώματα.

Όπως έχει ήδη αποδειχθεί, η πλειοψηφία των ασθενών με ΣΕΛ και σ S με αντι-La/SSB αντισώματα, διαθέτουν στον ορό τους αντισώματα που αναγνωρίζουν ειδικά τον επίτοπο 4 [4, 5]. Γεγονός που δηλώνει ότι πρόκειται για έναν ανοσοδραστικό επίτοπο ο οποίος είναι εκτεθειμένος στην επιφάνεια του La/SSB μορίου. Είναι επομένως πιθανόν τα φυσιολογικά, υγιή άτομα να έχουν αναπτύξει μηχανισμούς εξουδετέρωσης των ανώριμων Β λεμφοκυττάρων, που αναγνωρίζουν το συγκεκριμένο επίτοπο, με το να εμποδίζουν την ανάπτυξη των συγκεκριμένων λεμφοκυττάρων ή με την καταστροφή ολόκληρου του κλώνου αυτών των κυττάρων χωρίς όμως να επηρεάζουν την παρουσία των ειδικών για τον συγκεκριμένο επίτοπο, T λεμφοκυττάρων, γεγονός που εμποδίζει την συνεργασία των Β και T λεμφοκυττάρων [23, 24, 25, 26]. Οι υπόλοιποι τρεις επίτοποι (1, 2, 3) έχουν επίσης διαφορές στην αλληλουχία τους σε σχέση με τα πεπτίδια της κουνελήσιας πρωτεΐνης



La/SSB, σε μικρότερο ωστόσο ποσοστό που επιτρέπει το ανοσοποιητικό σύστημα του κουνελιού να αναγνωρίζει αυτούς τους επιτόπους ως αυτοαντιγόνα, ή πιο σωστά ως αλλοαντιγόνα που μιμούνται πολύ καλά τμήματα της κουνελήσιας πρωτεΐνης La/SSB. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η T λεμφοκυτταρική ανοχή μπορεί να αναιρεθεί από αυτοδραστικά B λεμφοκύτταρα που ελευθερώνονται μετά από ανοσοποίηση με ξένα, αλλά υψηλής ομολογίας με τα αυτοαντιγόνα, πεπτίδια όπως έχει επίσης περιγραφεί και από άλλους ερευνητές [27].

Στο πρωτόκολλο ανοσοποίησης τα πεπτίδια ήταν προσδεδεμένα ομοιοπολικά επί του τετραμερούς ολιγοπεπτιδικού φορέα (SOC) όπως έχει περιγραφεί [10]. Όπως αποδείχθηκε στην παρούσα εργασία η αντιγονικότητα του συμπλόκου φορέα-πεπτιδίου, προκάλεσε την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων υψηλού τίτλου και μακράς διάρκειας παραμονής, καθώς και T λεμφοκυτταρικών αποκρίσεων εναντίον αυτών των συμπλόκων. Οι διαδοχικοί ολιγοπεπτιδιακοί φορείς είναι ένα πολύ χρήσιμο και αποτελεσματικό εργαλείο για μελέτες ανοσοποίησης.



Πίνακας I. Σύγκριση των αλληλουχιών των επιτόπων της ανθρώπινης La/SSB πρωτεΐνης με ομόλογες περιοχές της La/SSB κουνελιού.

<i>Ανθρώπινες/κουνελίσσιες πεπτιδικές αλληλουχίες</i>		<i>Θέσεις αμινοξέων</i>
A	TLHK <u>A</u> FKGSIF <u>V</u> VFDSI <u>E</u> SA	145-164
K	TLHK <u>T</u> FKGSIF <u>A</u> VFDSI <u>Q</u> SA	
A	ANNGNL <u>Q</u> LRN <u>K</u> E <u>V</u> TW <u>E</u> VLEG	289-308
K	ANNGNL <u>L</u> LRN <u>K</u> <u>K</u> VTW <u>K</u> VLEG	
A	VTW <u>E</u> VLEGE <u>V</u> E <u>K</u> E <u>A</u> L <u>K</u> KI	301-318
K	VTW <u>K</u> VLEGH <u>A</u> E <u>K</u> D <u>A</u> M <u>K</u> KI	
A	G <u>S</u> G <u>K</u> G <u>K</u> VQFQG <u>K</u> <u>K</u> T <u>K</u> F	349-364
K	G <u>A</u> P <u>K</u> G <u>R</u> G <u>Q</u> FQGR <u>R</u> T <u>R</u> F	



Πίνακας II: Επαγωγή ανοσολεγκτικής απόκρισης κατά της La/SSB και των επιτόπων της

Κουνέλια που ανοσοποιήθηκαν με τον:					
Οροί που αντιδρούν με :	Επίτοπος 1	Επίτοπος 2	Επίτοπος 3	Επίτοπος 4	Μόνο με AF
Επίτοπο 1	+	+	-	-	-
Επίτοπο 2	+	+	+	-	-
Επίτοπο 3	+	+	+	-	-
Επίτοπο 4	+	+	+	+	-
Πρωτεΐνη La/SSB	-	+	+	+	-

AF : Ανοσοενισχυτικό του Freud.



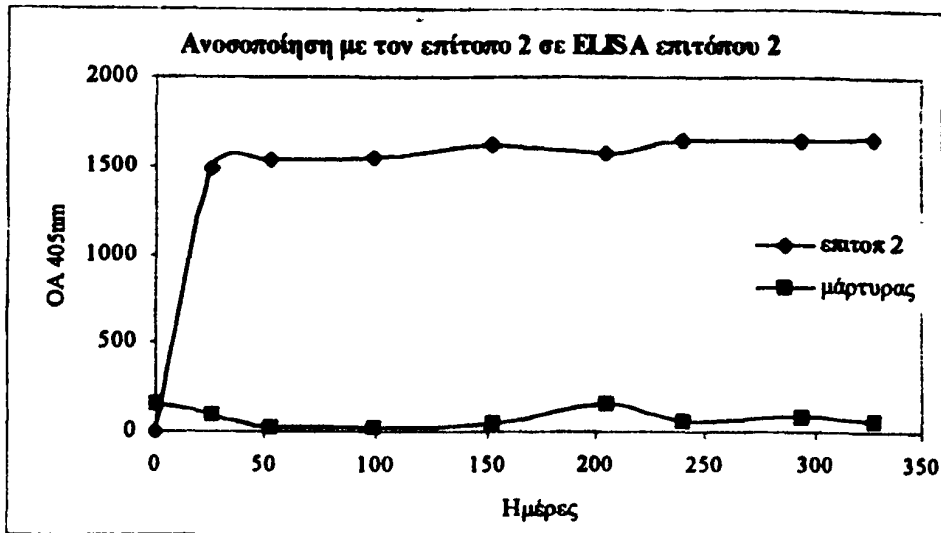
Πίνακας III: Τα υψηλότερα ποσοτά αναστολής της ετερόλογης αναγνώρισης ενός ορού που προέκυψε από την ανοσοποίηση με τον επίτοπο (α) κατά του επιτόπου (β) μετά από επώασή του με τον επίτοπο (β).

Οροί που προέκυψαν από την ανοσοποίηση με :

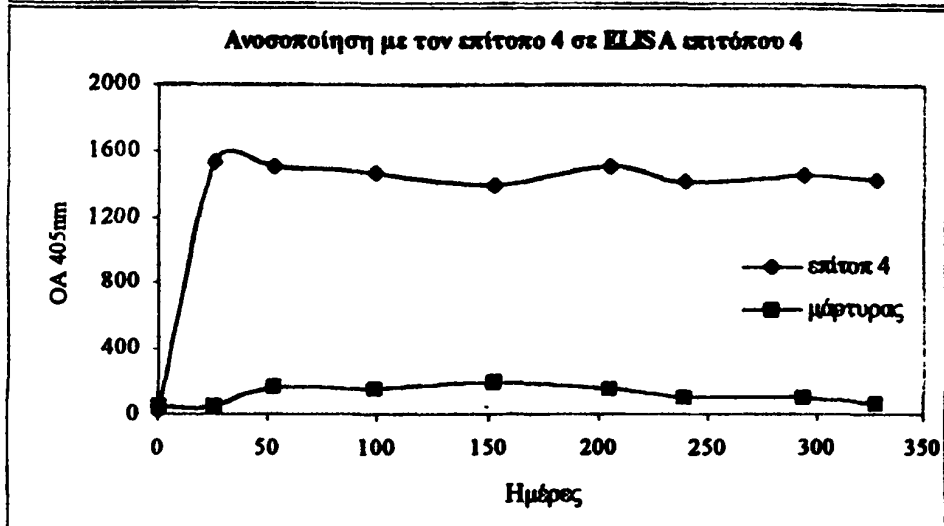
Επίτοπο 1	Επίτοπο 2	Επίτοπο 3	Αναστολή από:
-	95%	76%	Επίτοπο 1
48%	-	60%	Επίτοπο 2
51%	96%	-	Επίτοπο 3
40%	61%	55%	Επίτοπο 4



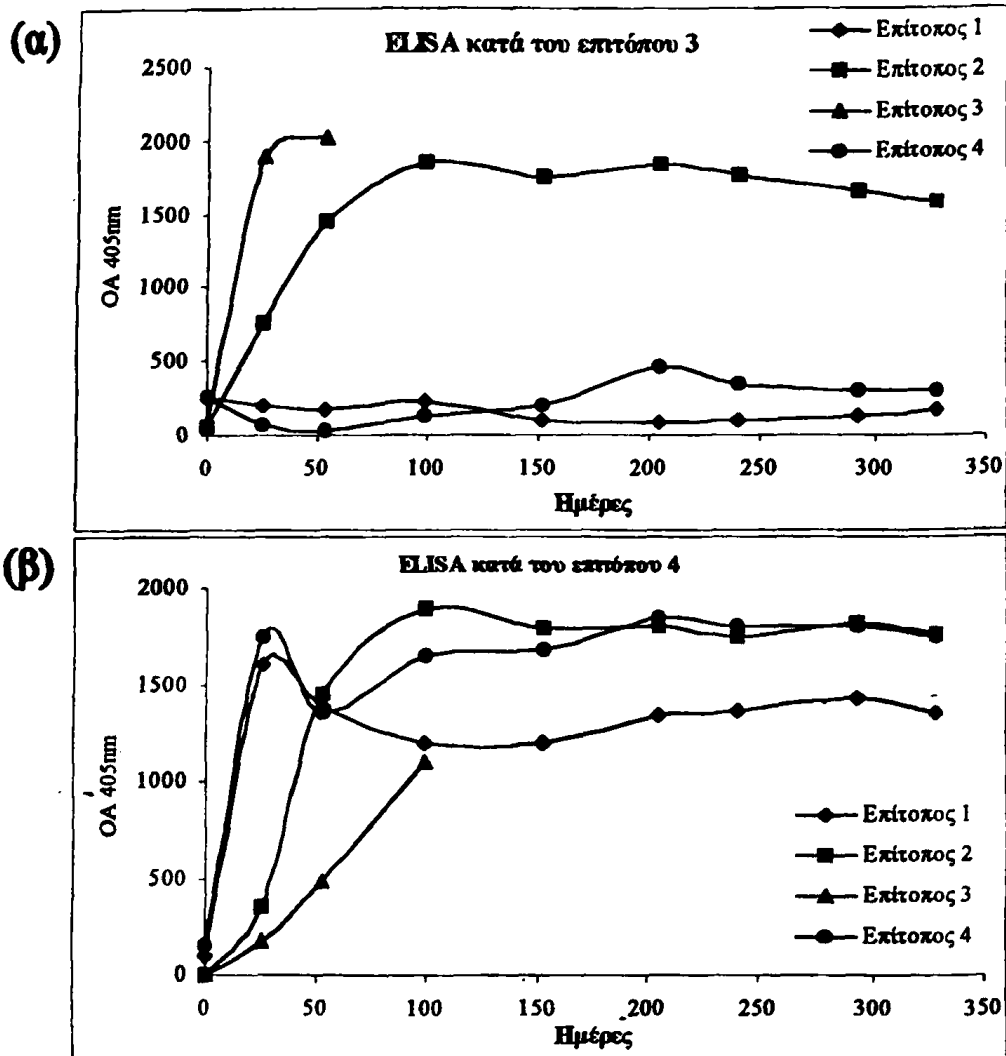
(α)



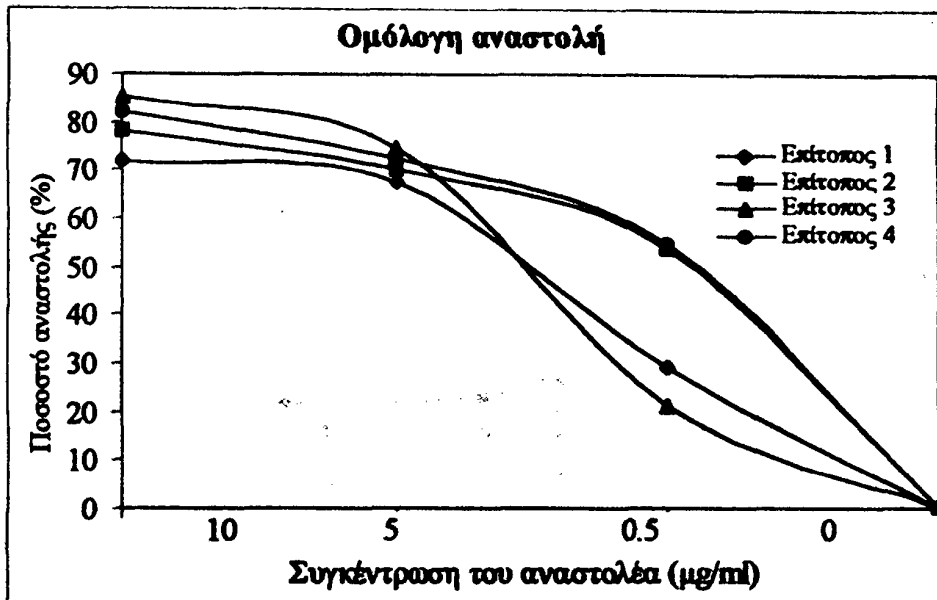
(β)



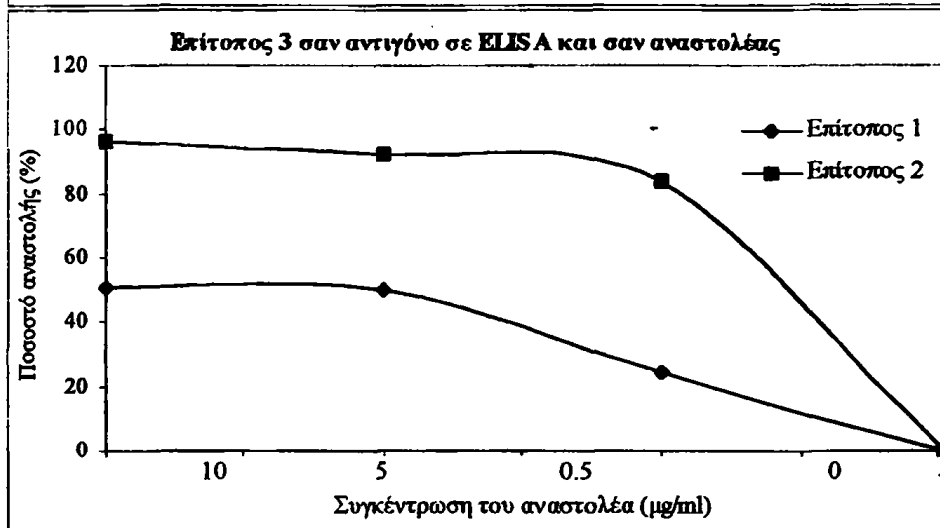
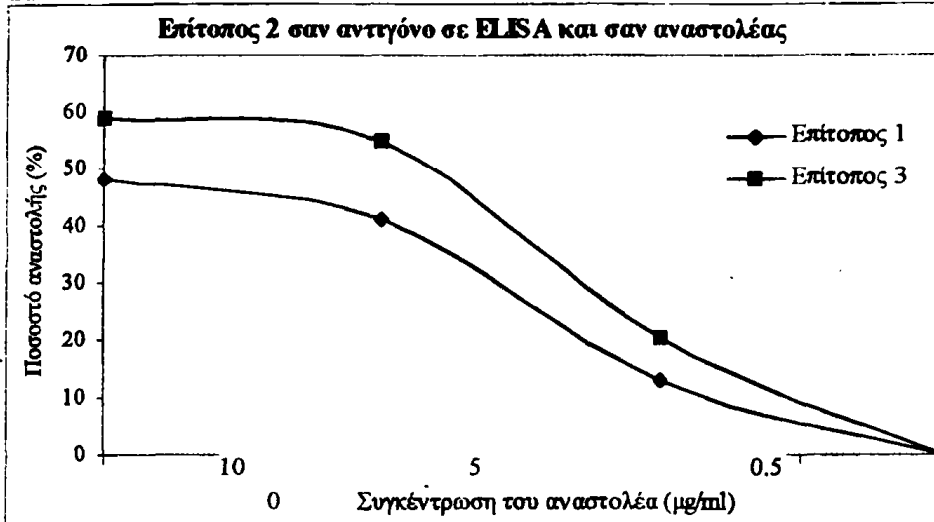
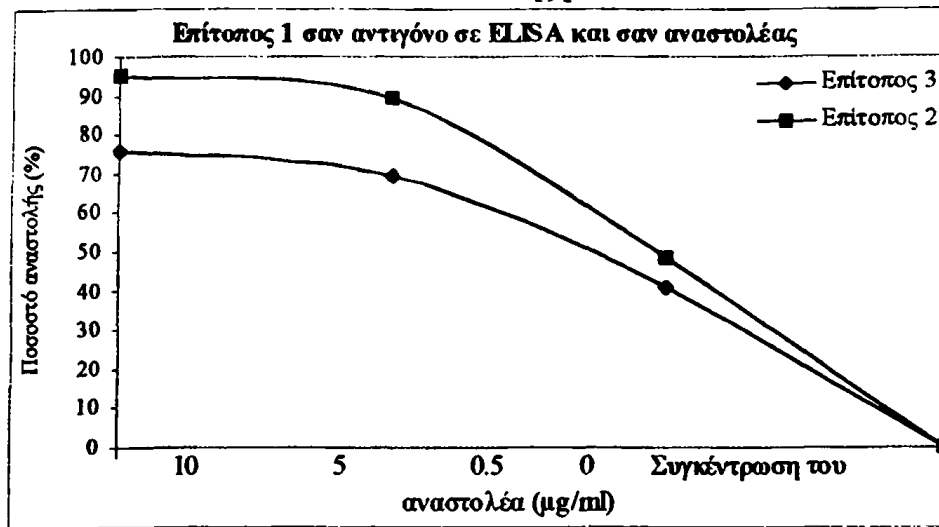
Σχήμα 1: Παραγωγή των αντισωμάτων κατά του επίτοπου 2 (α) και του επίτοπου 4 (β) μετά από ανοσοποίηση των κουνελιών Νεας Ζηλανδίας με αυτούς τους επίτοπους. Ο τίτλος των αντισωμάτων αυξάνεται από την πρώτη κιόλας ανοσοποίηση (ημέρα 1) μέχρι την 2^η (ημέρα 25) και παραμένει στα ίδια υψηλά επίπεδα μέχρι την ημέρα της θυσίας των ζώων (ημέρα 350). Οι ανοσοποιήσεις τερματίστηκαν την ημέρα 152. Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα των ανοσοποιήσεων με τους επίτοπους 1 και 3 (δεν παρουσιάζονται). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε σύγκριση με ορούς κουνελιών τα οποία ανοσοποιήθηκαν μόνο με ανοσοεπιτοπικό του Freud (μάρτυρας).



Σχήμα 2.: Αναγνώριση των επιτόπων 3 (α) και 4 (β) από ορούς κουνελιών ανοσοποιημένων με ένα εκ των τεσσάρων επιτόπων. Οι οροί που προήλθαν από την ανοσοποίηση κουνελιών με τον επίτοπο 4 δεν αναγνώριζαν κανένα άλλο επίτοπο εκτός από αυτόν τον επίτοπο. Οι οροί που προήλθαν από την ανοσοποίηση με τους επιτόπους 1,2 και 3 διέθεταν αντισώματα που αναγνώριζαν επιπλέον τμήματα του La/SSB αυτοαντιγόνου.

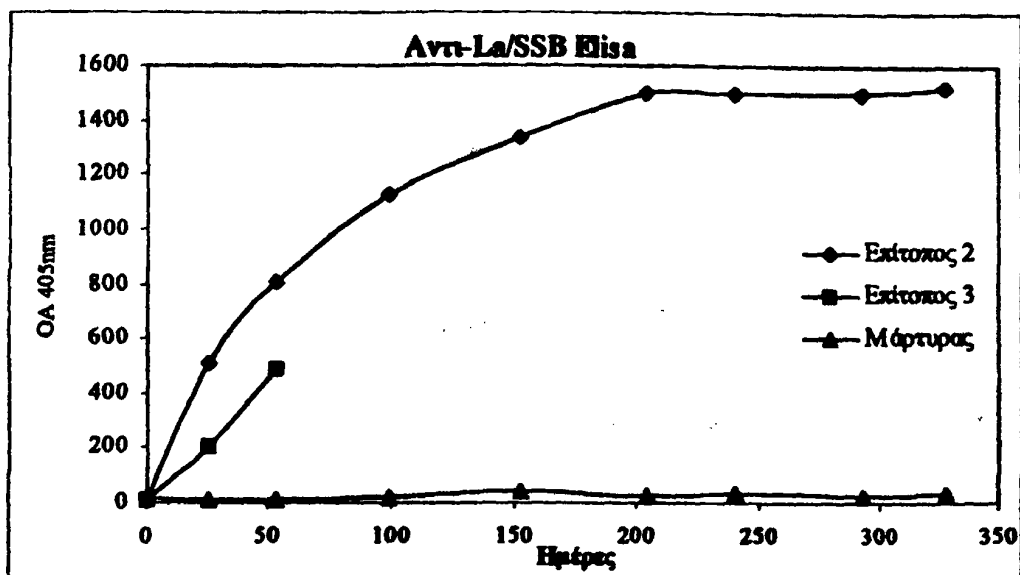


Σχήμα 3.: Προεπάση των ορών κουνελιών που προήλθαν από την ανοσοποίηση με τους επιτόπους 1, 2, 3 και 4 με αυτούς τους επιτόπους αντίστοιχα, κατάληξε σχεδόν στην πλήρη απώλεια της ικανότητάς τους να αναγνωρίζουν τα ομόλογα πεπτίδια.



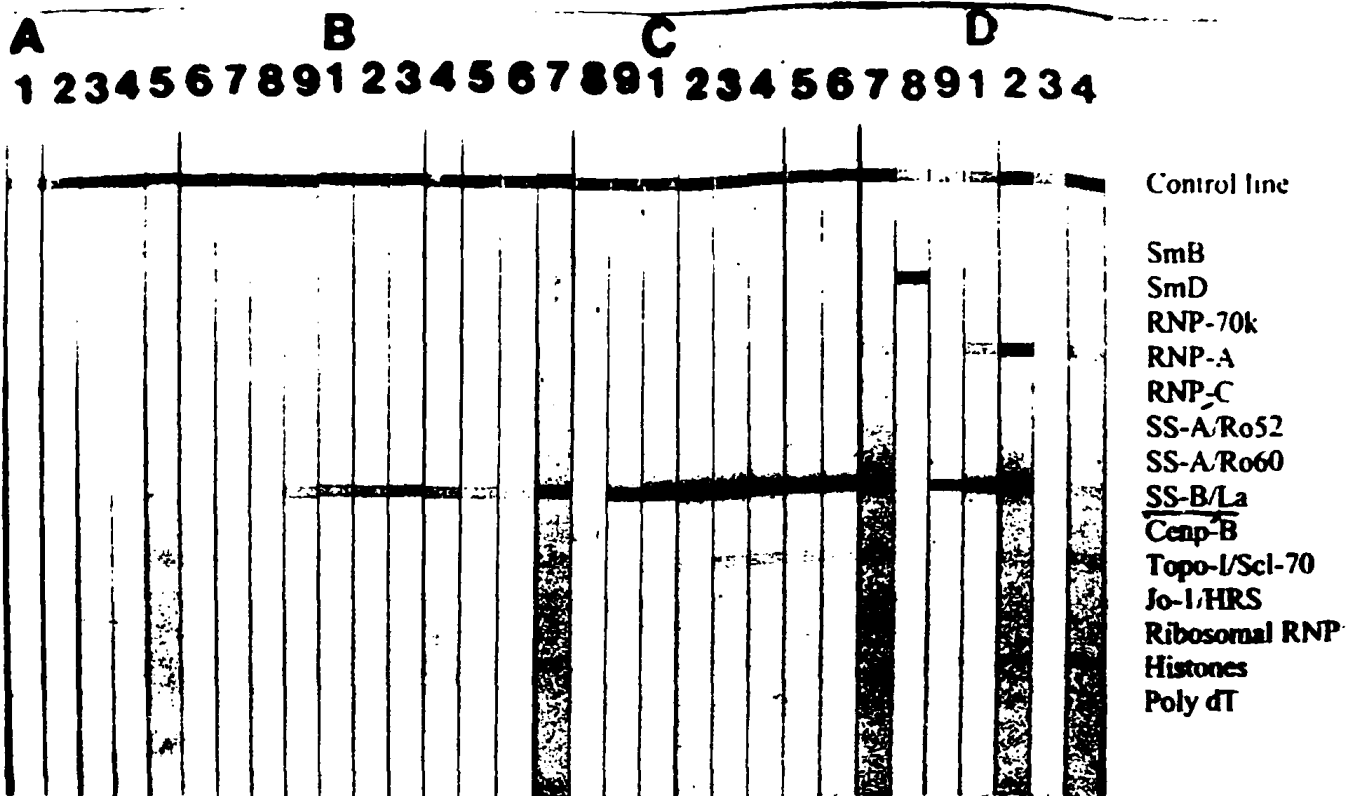
Σχήμα 4: Αναστολή της ετερόλογης αναγνώρισης των πεπτιδίων από τους ορούς (αντιπροσωπευτικά σχήματα). Οι οροί που προήλθαν από την ανοσοποίηση με τον επίτοπο 4 δεν αναγνώριζαν άλλο επίτοπο από τον επίτοπο 4. Κάθε ορός κουνελιού προεπώαστηκε με ένα από κάθε επίτοπο που δεν χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση και ελέγχθηκε ως προς την απώλεια της ετερόλογης αναγνώρισης των άλλων επιτόπων. (α) Οροί από την ανοσοποίηση με τους επιτόπους 2 και 3 επώαστηκαν με τον επίτοπο 1 σε συγκέντρωση 0, 0.5, 5, 10 µg/ml και ελέγχθηκε η απώλεια της ετερόλογης αναγνώρισης κατά του επιτόπου 1. (β) Οροί από την ανοσοποίηση με τον επίτοπο 1 και 3 επώαστηκαν με τον επίτοπο 2 σε συγκέντρωση 0, 0.5, 5, 10 µg/ml και ελέγχθηκε η απώλεια της ετερόλογης αναγνώρισης κατά του επιτόπου 2. (γ) Οροί από την ανοσοποίηση με τον επίτοπο 1 και 2 επώαστηκαν με τον επίτοπο 3 σε συγκέντρωση 0, 0.5, 5, 10 µg/ml και ελέγχθηκε η απώλεια της ετερόλογης αναγνώρισης κατά του επιτόπου 3.



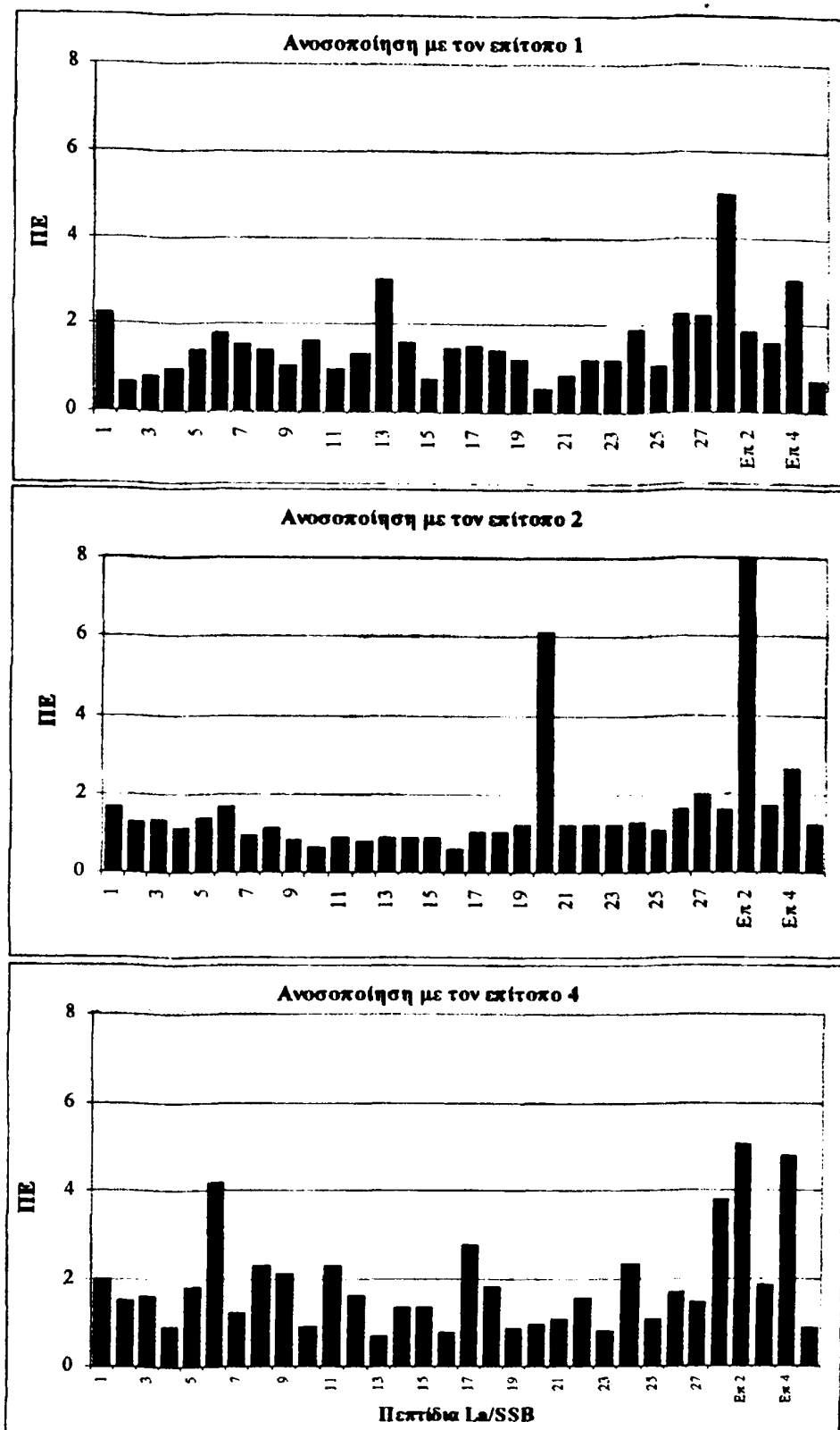


Σχήμα 5: Αναγνώριση με την τεχνική της ELISA του ανασυνδυασμένου La/SSB μορίου από τους ορούς κουνελιάν που ανοσοποιήθηκαν με τον επίτοπο 2 και 3 κατά την διάρκεια εφαρμογής του πρωτοκόλλου της ανοσοποίησης και μετά από αυτό. Οροί από το κουνέλι μάρτυρα ελέγχθηκαν συγκριτικά (Κουνέλι ανοσοποιημένο με ανοσοενισχυτικό του Freud.)



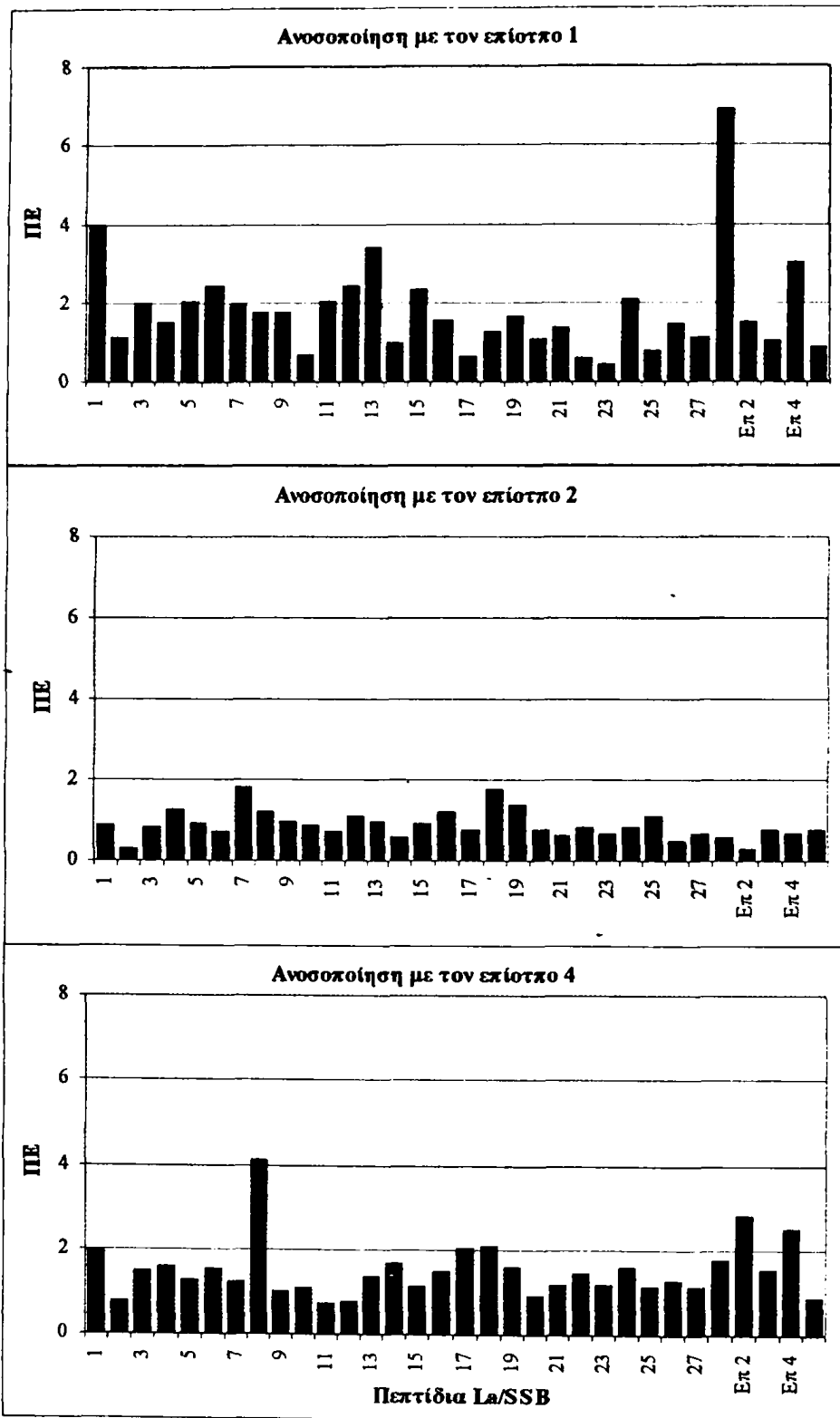


Σχήμα 6: Αναγνώριση του ανασυνδυασμένου La/SSB μορίου με την τεχνική της ανοσοαποτίπωσης σε ταινίες νιτροκυτταρίνης INNOLOA-ANA. Ταινίες A1-6: Οροί από τον κουνέλι μάρτυρα (A1 ορός προ ανοσοποίησης). A7: ορός προ ανοσοποίησης από το κουνέλι που ανοσοποιήθηκε με τον επίτοπο 4, A8-B7: οροί από το κουνέλι που ανοσοποιήθηκε με τον επίτοπο 4, B8: ορός προ ανοσοποίησης από το κουνέλι που ανοσοποιήθηκε με τον επίτοπο 2, B9-C7: οροί από το κουνέλι που ανοσοποιήθηκε με τον επίτοπο 2, C8: ορός προ ανοσοποίησης από το κουνέλι που ανοσοποιήθηκε με τον επίτοπο 3, C9-D2: οροί από το κουνέλι που ανοσοποιήθηκε με τον επίτοπο 3, D3: ορός προ ανοσοποίησης από το κουνέλι που ανοσοποιήθηκε με τον φορέα SOC4. D4: ορός από το κουνέλι που ανοσοποιήθηκε με τον φορέα SOC4



Σχήμα 7: Απόκριση των σπληνοκυττάρων κουνελιών που ανοσοποιήθηκαν με τον επίτοπο 1 (α), επίτοπο 2 (β) και τον επίτοπο 4 (γ), μετά από την προσθήκη των La/SSB πεπτιδίων στην καλλιέργεια. Οι ράβδοι που αναπαριστούν την απόκριση των σπληνοκυττάρων στα πεπτίδια έχουν αριθμηση από 1 έως 27των La/SSB πεπτιδίων, ενώ οι επ. 1, επ.2, επ.3, και επ.4 είναι οι La/SSB επίτοποι που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανοσοποιήσεις. Η τελευταία ράβδος αντιπροσωπεύει την απόκριση των κυττάρων στον SOC4 φορέα.





Σχήμα 8: Απόκριση των κυττάρων περιφερικού αίματος των κουνελιών ομοίως όπως στο σχήμα 7.

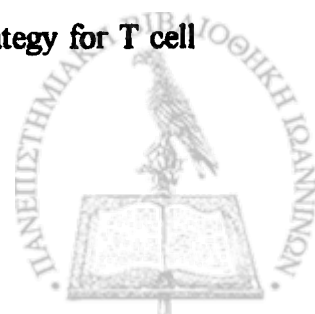


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Manoussakis MN, Tzioufas AG, Pange PJE, Moutsopoulos HM. Serological profiles in subgroups of patients with Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 1986; 61: 89-92.
2. Harley JB, Alexander EL, Bias WB, Fox OF, Provost TT, Reichlin M, Yamagata H, Arnett FC. Anti-Ro(SSA) and anti-La (SS-B) in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 196-205.
3. Andonopoulos AP, Skopouli FN, Dimou GS, Drosos AA, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1990; 17: 201-4.
4. Tzioufas AG, Yiannaki E, Sakarellos-Daitsiotis M, Routsias JG, Sakarellos C, Moutsopoulos HM. Fine specificity of autoantibodies to La/SSB: Epitope mapping Molecular mimicry and clinical applications. *Clin Exp Immunol* 1997; 108: 191-8.
5. Yiannaki EE, AG Tzioufas, M Bachmann, J Hantoumi, V Tsikaris, M Sakarellos-Daitsiotis, C Sakarellos, HM Moutsopoulos. The value of synthetic linear epitope analogues of La/SSB. Specificity, sensitivity and comparison of methods. *Clin Exp Immunol*, 1998; 112: 152-158.
6. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol*, 1989; 44: 93-151.
7. Topfer F, T Gordon, J McCluskey. Intra- and intermolecular spreading of autoimmunity involving the nuclear self-antigens La(SSB) and Ro(SSA). *PNAS*. 1995; 92: 875-879.



8. Reynolds P, TP Gordon, AW Purcell, DC Jackson, J McCluskey. Hierarchical self-tolerance to T cell determinant within the ubiquitous nuclear self-antigen La(SSB) permits induction of systemic autoimmunity in normal mice. *J Exp Med.* 1996; 184: 1857-70.
9. Tsikaris V, Sakarellos C, Cung-Thong M, Marraud M, Sakarellos-Daitsiotis M. Concept and design of a new class of sequential oligopeptides carriers (SOC) for covalent attachment of multiple antigenic peptides. *Biopolymer* 1996; 38: 291-3.
10. Tsikaris V, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Cung MT, Marraud M, Konidou G, Tzinia A, Soteriadou KP. Use of sequential oligopeptide carriers (SOC_n) in the design of potent *Leishmania* gp63 immunogenic peptides. *Peptide Res* 1996; 9: 5, 240-7.
11. Tsikaris V, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Orlewski P, Marraud M, Cung MT, Vatzaki E, Tzartos S. Construction and application of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC_n) for multiple anchoring of antigenic peptides-application to the acetylcholine receptor (AChR) main immunogenic region. *Biol Macromol* 1996; 19: 195-205.
12. James JA, Gross T, H Scofield, JB Harley. Immunoglobulin epitope spreading and autoimmune disease after peptide immunization: Sm B'/B-derived PPGMRPP and PPPGIRGP induce spleen autoimmunity. *J Exp Med.* 1995; 181: 453-61.
13. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *JACS* 1963; 85: 2149-54.
14. Geysen HM, SS Rodda, TJ Mason, G Tribbick, PG Schoofs. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J Immunol Methods.* 1987; 202, 259-
15. Maeji NJ, AM Bray, HM Geysen. Multi-pin peptide synthesis strategy for T cell determinant analysis. *J Immunol Methods* 134: 3-33.



16. Mutch DA, SJ Rodda, M Benstead, RM Valerio, HM Geysen. Effects of end groups on the stimulatory capacity of minimal length T cell determinant peptides. *Peptide RES.* 1991; 4: 132-137.
17. Reece JR, DL McGregor, HM Geysen, SJ Rodda. Scanning for T helper epitopes with human PBMC using pools of short synthetic peptides. *J Immunol Methods.* 1994; 172: 41-54.
18. Milton RC de L, SCF Milton, PA Adams. Prediction of difficult sequences in solid-phase peptide synthesis. *J Am Chem Soc* 1990; 112: 6039-46.
19. Bedford J, C Hyde, T Johnson, W Jun, D Owen, M Quibell, RC Sheppard. Amino acid structure and "difficult sequences" in solid phase peptide synthesis. *Int J Peptide Protein Res.* 1992; 40: 300-307.
20. WJ van Venroij, R. N. Maini. *Manual of biological markers of disease.* 1996 Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London
21. RH Scofield, WE Henry, BT Kevrien, JA James and JB Harley. Immunization with short peptides from the sequence of the Systemic Lupus Erythematosus-Associated 60Kda Ro Autoantigen results in anti-Ro Ribonucleoprotein Autoimmunity. *J Immunol*, 1996, 156: 4059-4066.
22. CL Keech, TP Gordon & J Mc Cluskey. The immune response to 52-Kda Ro and 60Kda Ro is linked in experimental autoimmunity. *J Immunol*, 1996, 157: 3694-99.
23. Nemazee DA, Buerki K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 1989; 337: 562-566.
24. Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA, Harris AW, Ciry S, Basten A, Goodnow CC. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages : arrested development and death. *Cell* 1993; 72: 325-335.



25. Goodnow CC, Cyster JG, Hartley SB, Bell SE, Cooke MP, Healy JI, Akkaraju S, Rathmell JC, Pogue SL, Shokat KP. Self tolerance checkpoints in B lymphocyte development *Adv Immunol* 1995; 59: 279-368.

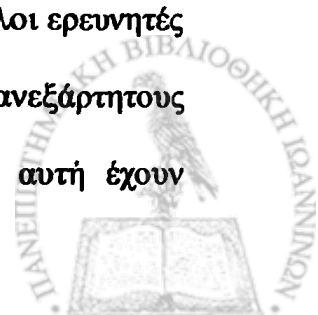
26. Cornall RJ, Goodnow CC, Cyster JG. The regulation of self-reactive B cells. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 804-811.

27. Mamula M., RH Lin, C. Janeway, J Hardin. Breaking T cell tolerance with foreign and self co-immunogens. A study of autoimmune B and T cell epitopes of cytochrome c. *J Immunol*, 1992; 149,3: 789-95.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αντισώματα κατά του αντιγόνου La/SSB εντοπίζονται μη φυσιολογικά κυρίως σε ασθενείς με πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren και συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Ο μηχανισμός παραγωγής αυτών των παθολογικών αυτοαντισωμάτων δεν είναι γνωστός. Πολλοί ερευνητές έχουν πειραματικά ευρήματα, τα οποία συνηγορούν υπέρ ενός αντιγονοεπαγόμενου μηχανισμού παραγωγής αυτών των αντισωμάτων [St Clair 1990]. Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν το μοντέλο του μοριακού μιμητισμού τμημάτων της πρωτεΐνης La/SSB με την γλυκοπρωτεΐνη gag των ρετροϊών ως σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα [Kohsaka 1990]. Οι υπάρχουσες θεωρίες έκαναν επιτακτική την ανάγκη του ακριβούς εντοπισμού και χαρτογράφησης των Β λεμφοκυτταρικών γραμμικών επιτόπων που πραγματοποιήθηκε στο πρώτο μέρος αυτής της εργασίας. Για την χαρτογράφηση των επιτόπων της πρωτεΐνης La/SSB χρησιμοποιήθηκαν εξήνταοκτώ πεπτίδια, μήκους 20 αμινοξέων το καθένα, με βήμα επικάλυψης 8 αμινοξέων, τα οποία συντέθηκαν με την τεχνική χαρτογράφησης πολλαπλών επιτόπων κατά Geysen. Η έρευνά μας απεκάλυψε την ύπαρξη τεσσάρων ανοσοδραστικών γραμμικών επιτόπων, μήκους από οκτώ έως δεκαοκτώ αμινοξέων. Οι επίτοποι αυτοί εντοπίστηκαν εντός των περιοχών που άλλοι ερευνητές χαρακτήρισαν ως αντιγονικές, οι οποίες όμως ήταν πολύ μεγάλου μήκους. Συγκεκριμένα ο επίτοπος 147-155αο αποτελεί τμήμα της περιοχής αλληλεπίδρασης του μορίου La/SSB με μόρια RNA, με τα οποία δημιουργεί σύμπλοκα (περιοχή RRM). Την ευρύτερη αυτή περιοχή χαρακτήρισαν ως αντιγονική και άλλοι ερευνητές [Raschmueller (1995)]. Η περιοχή 291-318αο εμπεριέχει δύο ανεξάρτητους γραμμικούς επιτόπους (291-302 αο και 301-318 αο). Την περιοχή αυτή έχουν



χαρακτηρίσει ως ανοσοδραστική και άλλοι ερευνητές [Rauh (1988), Sturgess (1988)]. Η πλέον αντιγονική περιοχή ήταν το δεκαεξαπεπτίδιο 349-364αο, το οποίο το αναγνώριζε το 98% των αντι-La/SSB θετικών ορών τόσο οS όσο και ΣΕΛ προέλευσης.

Χαρακτηριστικός ήταν ο τύπος αναγνώρισης του μορίου La/SSB από τους πολυκλωνικούς αντι-La/SSB θετικούς ορούς. Κάθε ορός περιείχε ομάδες αντισωμάτων αντι-La/SSB που στρέφονταν εναντίον διαφορετικών περιοχών του αυτοαντιγόνου La/SSB κατά μήκος της πεπτιδικής αλυσίδας. Υπήρχαν πληθυσμοί αυτοαντισωμάτων που αναγνώριζαν το αμινοτελικό άκρο, το κεντρικό ή το καρβοξυτελικό άκρο του μορίου. Την εντονότερη αναγνώριση της πλειοψηφίας των αντι-La/SSB θετικών ορών την παρουσίασαν στους τέσσερις γραμμικούς επιτόπους. Το γεγονός αυτό, της πολυκλωνικότητας των αντι-La/SSB θετικών ορών, όπως αποδείχθηκε από την αντιγονική χαρτογράφηση του αυτοαντιγόνου La/SSB, συνηγορεί υπέρ του αντιγονοεπαγόμενου μηχανισμού παραγωγής των αντισωμάτων αντι-La/SSB και επαγωγής της αυτοανοσίας, που υποστηρίζεται από πολλούς ερευνητές. Παράλληλα θελήσαμε να διερευνήσουμε και την δεύτερη θεωρία επαγωγής της αυτοανοσίας, δηλαδή αυτής που υποστηρίζει ότι το έναυσμα της παραγωγής των αυτοαντισωμάτων δίνεται από ομόλογες περιοχές του αυτοαντιγόνου με ξένα αντιγόνα. Ο έλεγχος πιθανής ομολογίας των κύριων ανοσοδραστικών επιτόπων με άλλα τμήματα ξένων πρωτεϊνών δεν απέδειξε σημαντική ομολογία με ιικά ή βακτηριδιακά αντιγόνα. Αυτό το δεδομένο δεν μπορεί να υποστηρίξει την θεωρία επαγωγής αυτοανοσίας λόγω μοριακού μιμητισμού. Βρέθηκε ωστόσο ομολογία μεταξύ του επιτόπου HKAFKGSI (147-154) με τμήματα άλλων αυτοαντιγόνων, όπως της τοποϊσομεράσης II [Meliconi 1989] και της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (MBP Myeline Basic Protein) [Miller 1993]. Τα αντισώματα



αντι-La/SSB που αντιδρούσαν με τον επίτοπο 147-154αο, μπορούσαν να αντιδράσουν διασταυρωτά και με τα ομόλογα πεπτίδια αυτών των αυτοαντισωμάτων. Εντούτοις θα πρέπει να θεωρηθεί η ομολογία ως ένα τυχαίο γεγονός, διότι τόσο οι αντι-La/SSB θετικοί οροί από ασθενείς με ΣΕΛ, όσο και με σS που χρησιμοποιήθηκαν, δεν είχαν ένδειξη βλάβης του κεντρικού νευρικού τους συστήματος λόγω διασταυρούμενης αντίδρασης της MBP με τα αντισώματα αντι-La/SSB. Επίσης δεν παρουσίαζαν καμία βλάβη των πνευμόνων τους που εμφανίζεται, όταν οι ασθενείς έχουν αντισώματα κατά της DNA τοποϊσομεράσης II.

Ιδιαίτερης σημασίας θα ήταν η χρήση των τεσσάρων προαναφερθέντων επιτόπων για την γρήγορη και έγκυρη διάγνωση των αυτοαντισωμάτων αντι-La/SSB σε ορούς ασθενών. Το δεύτερο τμήμα αυτής της εργασίας διαπραγματεύεται αυτήν ακριβώς την θέση, την έγκυρη δηλαδή και γρήγορη ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-La/SSB σε ορούς ασθενών, προκειμένου να αντιμετωπιστούν γρήγορα και άμεσα τα συμπτώματα που οδηγούν στην αυτοανοσία. Τα πεπτίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα στις τεχνικές ELISA και ανοσοαποτύπωσης. Επίσης χρησιμοποιήθηκε μεγάλος αριθμός ορών που ανήκαν στις κατηγορίες αντι-La/SSB θετικών ασθενών με σS και ΣΕΛ, αντι-La/SSB αρνητικών ασθενών με σS και ΣΕΛ (μάρτυρες νόσου) και φυσιολογικών αιμοδοτών. Προκειμένου οι τεχνικές της ELISA και της ανοσοαποτύπωσης να παράσχουν το μέγιστο της απόδοσής τους, ελέγχθηκαν όλα τα στάδια που απαιτούνται για την ολοκλήρωση των τεχνικών αυτών. Ενδεικτικά αναφέρονται οι παράμετροι: της συγκέντρωσης των πεπτιδίων, οι συνθήκες επίστρωσης των πλακιδίων ELISA ή της νιτροκυτταρίνης με τα πεπτίδια, οι χρόνοι επώασης των αντιγόνων, του πλυσίματος, του ορού με το αντιγόνο, του συμπλόκου με το δεύτερο αντισωμα, οι συγκεντρώσεις των ανωτέρω συστατικών, η προσθήκη ή όχι απορρυπαντικών στο διάλυμα πλύσεων. Εκ των παραμέτρων αυτών επιλέχθηκαν



αυτές που βελτιστοποίησαν την αναγνώριση των πεπτιδίων από τους αντι-La/SSB θετικούς ορούς ασθενών, μειώνοντας παράλληλα την μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων με άλλη ειδικότητα σε αυτά, καθώς και τον "θόρυβο" που προκαλούν τα συστατικά των φυσιολογικών ορών στα πλακίδια ή την νιτροκυτταρίνη. Το τελικό αποτέλεσμα ήταν η ανάπτυξη μιας τεχνικής ELISA με ευαισθησία ως προς την ανίχνευση των αντισώματων αντι-La/SSB που κυμαίνεται από 73% έως 88.1%, και ανοσοαποτύπωσης από 73% έως 97%.

Η σημαντικότερη παράμετρος, η μεταβολή της οποίας βελτιστοποίησε στο μέγιστο τις αποδόσεις των τεχνικών της ELISA και της ανοσοαποτύπωσης, ήταν το μήκος των επιτόπων. Η αύξηση του μήκους των πεπτιδίων από 147-154 (8 αμινοξέων) σε 145-164 (20 αμινοξέων) και του πεπτιδίου 291-302 (12 αμινοξέων) σε 289-308 (20 αμινοξέων) συνέβαλε σημαντικά στη βελτίωση της αντιγονικότητάς τους. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε δύο κυρίως παραμέτρους: α) το αμινοξύ τρυπτοφάνη W³⁰³ στη θέση 303 ήταν σημαντικό για την εκδήλωση της αντιγονικότητας του επιμηκυνθέντος επιτόπου β) τα πεπτίδια δεν είναι παντελώς γραμμικά, αλλά έχουν κάποια διαμόρφωση απαραίτητη για την εκδήλωση της αντιγονικότητά τους, όπως η δομή α-έλικας που έχει ο επιμηκυνθείς επίτοπος 145-164. Τη δευτεροταγή αυτή διάταξη της α-έλικας δεν μπορεί να την αποκτήσει ο μικρότερος επίτοπος 147-154, διότι χρειάζονται τουλάχιστον 15 αμινοξέα, για να σταθεροποιήσουν αυτού του είδους την διάταξη. [Leach SJ (1983)]

Παράλληλα έγινε σύγκριση της ευαισθησίας της ELISA πεπτιδίων και της ELISA, όπου χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το μόριο της πρωτεΐνης La/SSB (ανασυνδυασμένο προϊόν) και το ανασυνδυασμένο αμινοτελικό και καρβοξυλικό τμήμα της. Η σύγκριση των υποστρωμάτων έδειξε ότι τα πεπτίδια μπορούν επιτυχώς να αντικαταστήσουν το ολικό μόριο της πρωτεΐνης La/SSB για τον προσδιορισμό των



αυτοαντισωμάτων αντι-La/SSB. Η ευαισθησία της ELISA των συνθετικών πεπτιδίων και της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης La/SSB ήταν η ίδια. (88,1%). Η ειδικότητά της όμως ως προς την αναγνώριση των αντισωμάτων αντι-La/SSB ήταν αισθητά καλύτερη για τα πεπτίδια. (89%), σε σύγκριση με την ειδικότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης La/SSB. (63%). Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στο θόρυβο που προκαλεί η μη ειδική πρόσδεση αντισωμάτων άλλων ειδικοτήτων (όπως των αντι-Ro/SSA αντισωμάτων που υπάρχουν σε ορούς ασθενών) επί του ανασυνδυασμένου μορίου. [Rothfield (1987)]

Είναι γνωστό ότι τα αυτοαντιγόνα δεν αναγνωρίζονται από τα αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα, γιατί αυτά εξουδετερώνονται διαμέσου ενός φυσιολογικού μηχανισμού κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης του θύμου αδένος [Schwartz 1989, Kappler 1987]. Για λόγους όχι απόλυτα κατανοητούς μερικά αυτοαντιγόνα, όπως οι πρωτεΐνες του συμπλόκου RoRNP, ή του συμπλόκου URNP φαίνεται να μην ακολουθούν αυτόν τον κανόνα. Ασθενείς που πάσχουν από αυτοάνοσα νοσήματα έχουν αυτοαντισώματα, τα οποία στρέφονται εναντίον αυτού του είδους των πρωτεϊνών [Mamula 1993]. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι τα αυτοαντιγόνα διαφεύγουν του μηχανισμού ανοχής, τουλάχιστον εν μέρει, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα πεπτίδιά τους δεν παρουσιάζονται σε επαρκείς ποσότητες [Mamula 1994, Scild 1990] κατά την διάρκεια της διάπλασης του θύμου ή διότι μμούνται ξένα αντιγόνα [Mamula 1992, Scofield 1991].

Στο τρίτο μέρος αυτής της εργασίας ελέγχθηκε η ανοσολογική συμπεριφορά των τεσσάρων ανοσοδραστικών γραμμικών B λεμφοκυτταρικών επιτόπων του ανθρώπινου αυτοαντιγόνου La/SSB μετά από τον εμβολιασμό τους σε φυσιολογικά κουνέλια. Για την ανοσοποίηση τα πεπτίδια συνδέθηκαν ομοιοπολικά σε τετραμερείς φορείς SOC οι οποίοι, όπως έχει αποδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες



[Vlachoyiannopoulos 1998], αυξάνουν την ανοσογονικότητα των πεπτιδίων και προκαλούν την παραγωγή ειδικών αντι-πεπτιδικών αντισωμάτων κατόπιν εμβολιασμού τους.

Οι ανοσοποιήσεις οδήγησαν στην παραγωγή αντισωμάτων που συνδέονται ισχυρά με τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανοσοποιήσεις σε όλα τα κουνέλια. Επιπλέον παρατηρήθηκε επέκταση της ικανότητας αναγνώρισης άλλων τμημάτων του ίδιου μορίου (La/SSB), που δεν έχουν ομολογία με τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοποίηση, με την πάροδο του χρόνου. Τα αντισώματα που αναπτύχθηκαν, δεν ήταν μόνο πολύ ειδικά για τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή τους, αλλά ήταν και πολυκλωνικά κυρίως της τάξης IgG υψηλών τίτλων και παρέμεναν στα κουνέλια μέχρι και τρεις μήνες μετά την τελευταία ανοσοποίηση.

Ενδιαφέρον είναι επίσης το γεγονός ότι οροί από τα ανοσοποιημένα κουνέλια με τον επίτοπο 4, τον πιο ευαίσθητο και ειδικό επίτοπο έναντι των ανθρωπίνων αντισωμάτων αντι-La/SSB [Tzioufas 1997, Yiannaki 1998], περιείχαν αντισώματα κατά του επίτοπου αυτού μόνο. Πιθανώς ο επίτοπος αυτός είναι ισχυρά ανοχογόνος στα κουνέλια και στους ανθρώπους που δεν έχουν αντισώματα αντι-La/SSB. Πιθανόν να είναι αποκλειστικά Β λεμφοκυτταρικός επίτοπος, αντίθετα με τους άλλους επιτόπους που φαίνεται να διαθέτουν και Τ λεμφοκυτταρικούς επιτόπους στην αλληλουχία τους. Η μετουσιωμένη μορφή της πρωτεΐνης La/SSB, μετά από την αποδιατακτική ηλεκτροφόρησή της αναδεικνύει τους γραμμικούς επιτόπους της, όπως τον επίτοπο 4, γεγονός που εξηγεί γιατί οι οροί των ανοσοποιημένων με τον επίτοπο 4 κουνελιών, παρόλο που δεν είναι πολυκλωνικοί, αναγνωρίζουν το μόριο La/SSB με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης και όχι με ELISA.



Προηγούμενες μελέτες [Topfer 1995, Reynolds 1996] επιβεβαίωσαν την μη ολοκληρωμένη μορφή ανοχής του ανοσοποιητικού συστήματος ως προς το αυτοαντιγόνο La/SSB και υπέθεσαν ότι το ανοσοποιητικό σύστημα πιθανόν να αγνοεί αρκετούς επιτόπους εντός του μορίου του. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση και επιπλέον προτείνουν ότι η ανοσολογική απόκριση εναντίον του αυτοαντιγόνου La/SSB, υποκινείται από ένα ελαφρώς αλλαγμένο μόριο La/SSB, τμήματα του οποίου παρουσιάζονται στα T λεμφοκύτταρα. Κατόπιν της ενάρξεως της αντι-La/SSB αποκρίσεως, αυτοαντισώματα πιθανόν να ελευθερώνονται μετά από ενεργοποίηση στο ενδογενές πλέον μορίου, γεγονός που εξηγεί τους υψηλούς τίτλους αντισωμάτων στα κουνέλια για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά το τέλος των ανοσοποιήσεων, κάτι που έχει παρατηρηθεί και σε άλλα αυτοαντιγόνα [Lou 1996].

Η διαδοχή των γεγονότων, που προκάλεσαν την αντι-La/SSB απόκριση και τα οποία πρέπει να διερευνηθούν στο μέλλον, ίσως είναι η ακόλουθη: καταρχήν η ενεργοποίηση των αυτοδραστικών B λεμφοκυττάρων των κουνελιών γίνεται από τα ανθρώπινα πεπτίδια La/SSB, που πιθανόν μιμούνται το κουνελίσιο αυτοαντιγόνο La/SSB [Lin 1991, Mamula 1992]. Αυτά τα ενεργοποιημένα B λεμφοκύτταρα μπορούν επιτυχώς να παρουσιάσουν τα εαυτά-πεπτίδια σε T λεμφοκύτταρα και να προκαλέσουν T λεμφοκυτταρική απόκριση που επεκτείνεται σε άλλα μέρη της πρωτεΐνης La/SSB [Mamula 1994, Mamula 1993]. Από τα πειραματικά δεδομένα συνάγεται επίσης ότι μέσα ή πλησίον αυτών των B λεμφοκυτταρικών επιτόπων υπάρχουν T λεμφοκυτταρικοί επίτοποι, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων, τα οποία όπως και τα B κύτταρα, κυκλοφορούν μεταξύ λέμφου και λεμφαδένων. Το ανοσοποιητικό σύστημα βρίσκεται σε κατάσταση «άγνοιας» ως προς τους επιτόπους αυτούς, εμβολιασμός όμως των



αυτοεπιτόπων μαζί με πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud παρουσιάζει αυτούς του επιτόπους στα T κύτταρα μαζί με τα απαραίτητα συνοδά μόρια για την ενεργοποίησή τους. Θα μπορούσε όμως να υποτεθεί ότι οι ισχυροί αυτοί επίτοποι επί των φορέων SOC με την μορφή με την οποία εισέρχονται, ενεργοποιούν πιο αποτελεσματικά τα B κύτταρα και επιπλέον ο φορέας SOC ενεργοποιεί μη ειδικά τα T κύτταρα μέσω του θυμοανεξάρτητου τύπου II μηχανισμού [Pecanha 1991, Mond 1995]. Η μακράς διάρκειας παραγωγή αντισωμάτων που παρατηρείται, μπορεί να αποδοθεί επιπλέον στην μορφολογία και την χημεία του συμπλόκου πεπτιδίου-φορέα. Όλα τα σύμπλοκα περιέχουν στην αλληλουχία τους το μη φυσικό αμινοξύ αμινοϊσοβουτυρικό οξύ (Aib), το οποίο πιθανόν δεν αναγνωρίζεται από τις πρωτεάσες των κουνελιών. Τα σύμπλοκα αυτά παραμένουν για μεγαλύτερο χρόνο αμετάβλητα στον οργανισμό των κουνελιών και ενεργοποιούν διαρκώς τα T κύτταρα, τα οποία βοηθούν τα B κύτταρα στην παραγωγή αντισωμάτων.



BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andonopoulos AP, Skopouli FN, Dimou GS, Drosos AA, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1990; 17: 201-4.
- Bedford J, C Hyde, T Johnson, W Jun, D Owen, M Quibell, RC Sheppard. Amino acid structure and "difficult sequences" in solid phase peptide synthesis. *Int J Peptide Protein Res.* 1992; 40: 300-307.
- Geysen HM, SS Rodda, TJ Mason, G Tribbick, PG Schoofs. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J Immunol Methods.* 1987; 202, 259-
- Harley JB, Alexander EL, Bias WB, Fox OF, Provost TT, Reichlin M, Yamagata H, Arnett FC. Anti-Ro(SSA) and anti-La (SS-B) in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 196-205.
- James JA, Gross T, H Scofield, JB Harley. Immunoglobulin epitope spreading and autoimmune disease after peptide immunization: Sm B'/b-derived PPGMRPP and PPPGIRGP induce spleen autoimmunity. *J Exp Med.* 1995; 181: 453-61.
- Kappler JW, N Roehm and P Marrack. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell,* 1987; 49: 273-280.
- Kohsaka H, K Yamamoto, H Fujii και συν (1990). Fine epitope mapping of the human SS-B/La Protein. Identification of a distinct autoepitope homologous to a viral Gag Polyprotein. *J Clin Invest.* 85, 1566-1574.
- Leach SJ How antigenic are antigenic Peptides? *Biopolymers.* (1983) 22, 425-40]
- Lin RH, MJ Mamula, JA Hardin, CA Janeway. Induction of autoreactive B cell allows priming of autoreactive B cell allows priming of autoreactive T cells. *J Exp Med* 1991; 173: 1433-39.



- Lou YH, MF McElveen, KM Garza, KSK Tung. Rapid induction of autoantibodies by endogenous ovarian antigens and activated T cells. Implications in autoimmune disease pathogenesis and B cell Tolerance. *J Immunol* 1996; 156: 3535-40.
- Maeji NJ, AM Bray, HM Geysen. Multi-pin peptide synthesis strategy for T cell determinant analysis. *J Immunol Methods* 134: 3-33.
- Mamula M. The inability to process a Self-peptide allows autoreactive T cells to escape tolerance. *J Exp Med.* 1993; 177: 567-571.
- Mamula M, J Craft. The expression of self antigenic determinants: implication for tolerance and autoimmunity. *Current Opin Immunol.* 1994; 6: 882-6.
- Mamula M., RH Lin, C. Janeway, J Hardin. Breaking T cell tolerance with foreign and self co-immunogens. A study of autoimmune B and T cell epitopes of cytochrome c. *J Immunol*, 1992; 149,3: 789-95.
- Mamula M, JS Fatanejad, JA Craft. B cells process and present lupus autoantigens that initiate autoimmune T cell response. *J Immunol* 1994; 152: 1453-
- Mamula MJ, CA Janeway. Do B cells drive the diversification of immune responses? *Immunol Today* 1993; 14: 151-2
- Manoussakis MN, Tzioufas AG, Pange PJE, Moutsopoulos HM. Serological profiles in subgroups of patients with Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 1986; 61: 89-92.
- Meliconi R, Bestagno M, Sturani C και συν (1989). Autoantibodies to DNA topoisomerase II in cryptogenic fibrosing alveolitis and connective tissue disease. *Clin Exp Immunol* 76, 184-189.
- Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis I.. The synthesis of a tetrapeptide. *JACS* 1963; 85: 2149-54.



- Miller A, A Al-Sabbagh, LMB Santos και συν (1993). Epitopes of myelin basic protein (MBP) that trigger TGF- β release following oral tolerization to MBP are different from encephalitogenic epitopes and mediate epitope-driven bystander suppression. *J Immunol*, 151, 7307-7315.
- Milton RC de L, SCF Milton, PA Adams. Prediction of difficult sequences in solid-phase peptide synthesis. *J Am Chem Soc* 1990; 112: 6039-46.
- Mond JJ, A Lees, CM Snapper. T cell independent antigen type 2. *Ann Rev Immunol*. 1995; 13: 655-
- Mutch DA, SJ Rodda, M Benstead, RM Valerio, HM Geysen. Effects of end groups on the stimulatory capacity of minimal length T cell determinant peptides. *Peptide RES*. 1991; 4: 132-137.
- Peconha L, C Snapper, F Finkelman, JJ Mond. Dextran-conjugated anti-Ig antibodies as a model for T cell independent type 2 antigen-mediated stimulation of Ig secretion in vitro Lymphokine dependence. *J Immunol* 1991; 146: 833-39.
- Raschmueller m, LJ Mc Neilage J mc Cluskey and T Gordon (1995). Human autoantibodies directed against the RNA recognition motif of La(SSB)/Ro (SSA) ribonucleoprotein particle. *Clin Exp Immunol*. 101, 39-44.
- Rauh AJG, R Luhrmann (1988). At least 3 distinct B cell epitopes reside in the C terminal half of La protein as detected by a recombinant DNA approach. *Eur J Immunol*. 18, 2049-2057.
- Reece JR, DL McGregor, HM Geysen, SJ Rodda. Scanning for T helper epitopes with human PBMC using pools of short synthetic peptides. *J Immunol Methods*. 1994; 172: 41-54.
- Reynolds P, TP Gordon, AW Purcell, DC Jackson, J McCluskey. Hierarchical self-tolerance to T cell determinant within the ubiquitous nuclear self-antigen



La(SSB) permits induction of systemic autoimmunity in normal mice. *J Exp Med.* 1996; 184: 1857-70.

- Rothfield N, Whitaker D, Bordwell B et al Detection of anticentromere antibodies using cloned autoantigen. *CENP-B Arth. Rheum.* (1987) 30, 1416-9]
- Scild H, O Rotzschke, H Kalbacher, HG Rammensee. Limit of T cell tolerance to self proteins by peptide presentation. *Science*, 1990; 247: 1587-89.
- Schwartz R. Acquisition of immunologic Self-Tolerance. *Cell*, 1989; 57: 1073-81.
- Scofield RH, JB Harley. Autoantigenicity of Ro/SSA antigen is related to a nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci*, 1991; 88: 3343-47.
- St Clair EN, Ja Burch, MM Word et al (1990). Temporal correlation of antibody responses to different epitopes of the human La autoantigen. *J Clin Invest.* 85, 515-521.
- Sturgess AD, MG Peterson, LJ Mc Neilage et al (1988). Characteristics and epitope mapping of a cloned human autoantigen La. *J Immunol* , 140, 3212-3218.
- Topfer F, T Gordon, J McCluskey. Intra- and intermolecular spreading of autoimmunity involving the nuclear self-antigens La(SSB) and Ro(SSA). *PNAS.* 1995; 92: 875-879.
- Tsikaris V, Sakarellos C, Cung-Thong M, Marraud M, Sakarellos-Daitsiotis M. Concept and design of a new class of sequential oligopeptides carriers (SOC) for covalent attachment of multiple antigenic peptides. *Biopolymer* 1996; 38: 291-3.
- Tsikaris V, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Cung MT, Marraud M, Konidou G, Tzinia A, Soteriadou KP. Use of sequential oligopeptide carriers (SOC_n) in the design of potent *Leishmania* gp63 immunogenic peptides. *Peptide Res* 1996; 9: 5, 240-7.



- Tsikaris V, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Orlewski P, Marraud M, Cung MT, Vatzaki E, Tzartos S. Construction and application of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC_n) for multiple anchoring of antigenic peptides-application to the acetylcholine receptor (AChR) main immunogenic region. *Biol Macromol* 1996; **19**: 195-205.
- Tzioufas AG, Yiannaki E, Sakarellos-Daitsiotis M, Routsias JG, Sakarellos C, Moutsopoulos HM. Fine specificity of autoantibodies to La/SSB: Epitope mapping Molecular mimicry and clinical applications. *Clin Exp Immunol* 1997; **108**: 191-8.
- Vlachoyiannopoulos PG, C Petrovas, AG Tzioufas, V Tsikaris, CH Alexopoulos, P. Davaris, L Nakopoulou, A Guialis, M Sakarellos-Daitsiotis, C Sakarellos, HM Moutsopoulos. Autoimmune response to snRNPs and renal damage after immunization with the major Sm epitope PPGMRPP anchored to sequential oligopeptide carriers (SOCs).
- Yiannaki EE, AG Tzioufas, M Bachmann, J Hantoumi, V Tsikaris, M Sakarellos-Daitsiotis, C Sakarellos, HM Moutsopoulos. The value of synthetic linear epitope analogues of La/SSB. Specificity, sensitivity and comparison of methods. *Clin Exp Med, Clin Exp immunol.* 1998.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεΐνη La/SSB αποτελεί στόχο αυτοαντισωμάτων που εντοπίζονται σε ορούς ασθενών που πάσχουν κυρίως από τα αυτοάνοσα νοσήματα του S δ και του ΣΕΛ. Προκειμένου να ανιχνευθούν οι ακριβείς στόχοι των αυτοαντισωμάτων αντι-La/SSB καθώς και η πιθανή σημασία τους στην εξέλιξη των προαναφερθέντων νοσημάτων, έγινε χαρτογράφηση αρχικά των Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων της πρωτεΐνης La/SSB με την τεχνική σύνθεσης πολλαπλών επιτόπων. Ως κύριοι στόχοι των αυτοαντισωμάτων αντι-La/SSB εντοπίστηκαν οι περιοχές 145-164, 289-308, 301-318 και 349-364 οι οποίες αφού συντέθηκαν αποδείχθηκε ότι αναγνωρίζονται με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα από αυτά. Αποδείχθηκε επίσης η ετερογένεια ως προς την ειδικότητα των αντι-La/SSB θετικών ορών.

Η περαιτέρω διερεύνηση της αξίας των συνθετικών επιτόπων La/SSB οδήγησε στον έλεγχο της ειδικότητας και δραστηκότητάς τους με μεγάλο αριθμό ορών με ή χωρίς αντισώματα αντι-La/SSB ειδικότητας. Παράλληλα έγινε σύγκριση της αποτελεσματικότητας ως προς την αναγνώριση των αντι-La/SSB αντισωμάτων μεταξύ των συνθετικών επιτόπων και ανασυνδυασμένων τμημάτων της πρωτεΐνης La/SSB. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία των συνθετικών επιτόπων. Επίσης αποδείχθηκε ότι τα πεπτίδια αποτελούν καλύτερο αντιγονικό υπόστρωμα σε τεχνικές ELISA και ανοσοαποτύπωσης, συγκρινόμενα πάντα με μεγαλύτερα ανασυνδυασμένα τμήματα της πρωτεΐνης La/SSB, τα οποία παρουσίασαν μειωμένη ειδικότητα ως προς την αναγνώριση αποκλειστικά των αντισωμάτων αντι-La/SSB. Επιπλέον επιτεύχθηκε αύξηση της ευαισθησίας και της



ειδικότητας των συνθετικών πεπτιδίων όταν αυτά προσδέθηκαν επάνω σε κατάλληλους συνθετικούς επαναλαμβανόμενους ολιγοπεπτιδιακούς φορείς (SOC).

Το επόμενο βήμα ήταν η διερεύνηση της αντιγονικότητας των τεσσάρων Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων La/SSB μετά από την ανοσοποίηση κουνελιών με αυτούς. Τα πεπτίδια χρησιμοποιήθηκαν συνδεδεμένα στους φορείς SOC. Η ανοσοποίηση των κουνελιών κατέληξε στην παραγωγή υψηλού τίτλου αντιπεπτιδικών αντισωμάτων τάξεως IgG μετά από την πρώτη ανοσοποίηση. Ο τίτλος των αντισωμάτων των κουνελιών παρέμεινε υψηλός ακόμη και τέσσερις μήνες μετά το πέρας του πρωτοκόλλου της ανοσοποίησης και επιπλέον αποδείχθηκε ότι τα αντισώματα αυτά ήταν σε θέση να αναγνωρίζουν ολόκληρη την πρωτεΐνη La/SSB. Τα κουνέλια θυσιάστηκαν και κύτταρα από τον σπλήνα και το περιφερικό αίμα καλλιεργήθηκαν παρουσία των τεσσάρων Β λεμφοκυτταρικών επιτόπων La/SSB καθώς και 27 συνθετικών πεπτιδίων που κάλυπταν ολόκληρο το μήκος της La/SSB πρωτεΐνης και αποδείχθηκε ότι ανοσοποίηση με μικρά La/SSB πεπτίδια μπορεί να επάγει και Τ λεμφοκυτταρικές αποκρίσεις που στρέφονται κατά διαφορετικών περιοχών της πρωτεΐνης La/SSB. Επιπλέον είναι εμφανές ότι όταν κάποιο πεπτίδιο είναι Β επίτοπος δεν είναι απαγορευτικό να παρουσιάζει και χαρακτηριστικά Τ επιτόπου.



SUMMARY

The La/SSB protein is a target of autoantibodies that are found mostly in sera of patients with sS and SEL. In order to investigate the exact targets of the anti-La/SSB autoantibodies as well as the involvement of these in the induction and evolution of the autoimmune diseases the B cell epitope mapping of the La/SSB protein was performed using the pepscan technique. The major antibody targets are found at the positions 145-164, 289-308, 301-318 and 349-364 of the La/SSB protein. The heterogeneity of the anti-La/SSB positive sera is also confirmed.

A large number of anti-La/SSB negative or positive sera were used against the La/SSB synthetic epitopes in order to verify the high specificity and antigenicity of the peptides. There was also performed comparison between the reactivity of the synthetic peptides and large parts of recombinant La/SSB protein. The results verify the high sensitivity and specificity of the synthetic peptides. It was also proven that the La/SSB peptides were specific antigenic substrates than the recombinant large La/SSB peptides when they were used in ELISA and Dot blot technique. The specificity and sensitivity of the La/SSB epitopes were increased when they were attached on the sequential oligopeptide carriers SOC and used in this form as antigenic substrates.

The next step was the investigation of the immunogenicity of the four linear B cell La/SSB epitopes by immunizing them into rabbits. The peptides were immunized, attached on the SOC carriers. The immunization resulted in a specific isotype-switched antipeptide autoantibody production, which was initially directed against the immunized epitope and afterwards recognized the other La/SSB epitopes. The titer of the antibody production remained high, even after four months of the last



immunization and it was spread against the whole La/SSB protein. The rabbits were sacrificed and spleen cells and peripheral blood mononuclear cells were cultured with the 4 La/SSB epitopes and with 27 synthetic peptides that were cover the entire La/SSB protein. It is appeared that immunization with the four La/SSB B cell epitopes is capable to induce antibody and T cell responses, directed against different parts of La/SSB protein. The B cell epitopes presents also T cell epitope properties.

[The following text is extremely faint and illegible due to low contrast and poor scan quality. It appears to be a continuation of the scientific text.]



❖ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Fine specificity of autoantibodies to La/SSB: epitope mapping, and characterization

A. G. TZIOUFAS, E. YIANNAKI*, M. SAKARELLOS-DAITSIOTIS*, J. G. ROUTSIAS*, C. SAKARELLOS* & H. M. MOUTSOPOULOS *Department of Pathophysiology, National University of Athens, Athens, and *Department of Chemistry, Section of Organic Chemistry and Biochemistry, University of Ioannina, Ioannina, Greece*

(Accepted for publication 8 January 1997)

SUMMARY

The B cell epitope mapping of La/SSB was performed using 20 mer synthetic peptides overlapping by eight amino acids covering the whole sequence of the protein. IgG, purified from sera of five patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and four sera from patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) were tested against the overlapping synthetic peptides. Peptides highly reactive with purified IgG were those spanning the regions 145-164, 289-308, 301-320 and 349-368 of the La protein. Determination of the minimum required length of the antigenic determinants disclosed the following epitopes: ¹⁴⁷HKAFKGS¹⁵⁴, ²⁹¹NGNLQLRNKEVT³⁰², ³⁰¹VTWEVLEGEVEKEALKKI³¹⁸ and ³⁴⁹GSGKGVQFQGGKTKF³⁶⁴. Predicted features and molecular similarities of the defined epitopes were investigated using protein databases. The La epitope ¹⁴⁷HKAFKGS¹⁵⁴ presented 83.3% similarity with the ¹³⁹HKGFKGVD¹⁴⁶ region of human myelin basic protein (MBP) and 72% similarity with the fragment YKNFKGTI of human DNA topoisomerase II. Peptides corresponding to these sequences cross-reacted with anti-La/SSB antibodies. Sixty-three sera with anti-La/SSB antibodies from patients with pSS or SLE, 35 sera without anti-La/SSB antibodies from patients with SS or SLE and 41 sera from age/sex-matched healthy blood donors were tested against biotinylated synthetic epitope analogues in order to determine their sensitivity and specificity for the detection of anti-La/SSB antibodies. Anti-La/SSB were detected with various frequencies ranging from 20% to epitope ¹⁴⁷HKAFKGS¹⁵⁴ to 100% to epitope ³⁴⁹GSGKGVQFQGGKTKF³⁶⁴. The overall sensitivity and specificity using all assays with the synthetic peptides were found to be 93.6% and 85.6%, respectively. In conclusion, antibodies to La/SSB constitute a heterogeneous population, directed against different linear B cell epitopes of the molecule. The epitope ¹⁴⁷HKAFKGS¹⁵⁴ presents molecular similarity with fragments of two other autoantigens, i.e. human MBP and DNA topoisomerase II. Finally, synthetic epitope analogues exhibit high sensitivity and specificity for the detection of anti-La/SSB antibodies.

Keywords B cell epitopes La/SSB Sjögren's syndrome molecular mimicry systemic lupus erythematosus

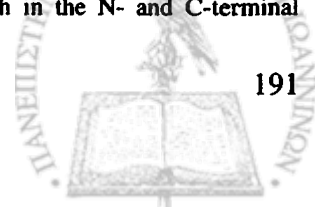
INTRODUCTION

Autoantibodies to La/SSB are often found in sera of patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) and systemic lupus erythematosus (SLE). La/SSB is a ribonucleoprotein particle consisting of a 408 amino acid protein component, with a calculated molecular weight of 47 kD in association with virtually any RNA polymerase III transcripts. Therefore, La/SSB particles can include human cytoplasmic RNAs (hyRNAs-RoRNAs), U1RNA, 5SRNA, tRNA, and several viral RNAs, including VA-RNAs and EBER-RNAs encoded by adenovirus and Epstein-Barr virus (EBV), respectively [1].

Despite progress in the complete characterization and molecular cloning of La/SSB protein, the fine specificity of B

cell epitopes is not well defined. In previous studies, the antigenic regions of La/SSB were detected by molecular biological techniques. In fact, Chan *et al.* [2,3], using controlled proteolytic degradation with *Staphylococcus aureus* V8 protease, identified two antigenically independent sets of protease-resistant peptides termed X and Y. Sturgess *et al.*, using cDNA encoding 87% of La/SSB protein, identified a major antigenic epitope within the 103 aa of the C-terminal portion of the protein [4]. Rauh & Lüthmann [5] suggested three independent immunodominant regions, spanning the 284-292, 293-345 and 346-383 sequences of La/SSB. St Clair *et al.* [6], using fusion proteins encoded by La/SSB cDNA fragments, defined three antigenic regions comprising the sequences 1-107, 111-242 and 242-408 (called LaA, LaC and LaD), respectively. More recently, Bini *et al.* [7] defined two immunodominant epitopes, one each in the N- and C-terminal halves of the protein.

Correspondence: H.M. Moutsopoulos, Department of Pathophysiology, School of Medicine, National University of Athens, 75, Mikras Asias str., 115 27 Athens, Greece.



The purpose of the present study was to investigate the fine specificity of antibodies to La/SSB derived from sera of both pSS and SLE patients, using 20 mer overlapping synthetic peptides covering the entire sequence of the protein. Molecular similarities of the defined epitopes to other unrelated molecules were also investigated. Finally, a potential clinical use of the antigenic epitope synthetic analogues to detect antibodies to La/SSB is also reported.

PATIENTS AND METHODS

Patients

IgG purified by protein A Sepharose chromatography (Pharmacia, Uppsala, Sweden), from five patients with SLE [8] and four patients with pSS [9], was used for the epitope mapping of La/SSB. In all sera anti-La/SSB positivity was evaluated by counterimmunoelectrophoresis, immunoblot and ELISA (Shield Diagnostics, London, UK). Four sera were found to be also positive for both anti-Ro52kD and anti-Ro60kD antibodies, three sera were positive for anti-Ro52kD antibodies and two positive for anti-Ro60kD antibodies. IgG, purified from serum of a patient with SLE and a patient with pSS, positive for anti-Ro60kD and anti-Ro52kD antibodies, respectively, but negative for anti-La/SSB antibodies, as well as IgG from three healthy individuals, negative for autoantibody reactivity, were used as controls for the epitope mapping. IgG was used instead of whole serum, since preliminary experiments showed that the background was substantially reduced.

Sensitivity and specificity of the defined antigenic epitopes, for the detection of anti-La/SSB antibodies, were tested using 39 anti-La/SSB sera of pSS patients (all females, mean age 56 ± 7 years) and 24 anti-La/SSB⁺ sera of SLE patients (21 females, three males, mean age 42 ± 8 years). Twenty sera contained also anti-Ro60kD antibodies, 34 sera had antibodies to Ro52kD and nine sera had, in addition to anti-La/SSB antibodies, antibodies to both Ro60kD and Ro52 proteins. Thirty-five sera of pSS and SLE patients negative for anti-La/SSB antibodies were used as disease controls. These sera contained different autoantibodies, as follows: 35 had antibodies to Ro60kD, nine had antibodies to Ro52, five had antibodies to UIRNP, three antiSm antibodies, eight anti-dsDNA antibodies, and 12 sera had IgM rheumatoid factor. Finally, 41 sera from age- and sex-matched healthy blood donors were used as negative controls.

Peptide synthesis

Pin-bound peptides. Sixty-eight sequential 20 mer peptides overlapping by eight amino acids each one to the other and covering the whole sequence of La/SSB protein were prepared in duplicate according to the method of Geysen *et al.* [10]. The peptides were prepared in duplicate in order for the same serum to be tested twice, at the same time in the ELISA experiments. Synthesis was performed on prederivatized polyethylene pins (Cambridge Research Biochemical Inc., London, UK) and the protocols are based on the principles of solid-phase peptide synthesis, as described by Merrifield [11], using the *N*-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) protecting group strategy. In each cycle of synthesis, control peptides PLAG(G)_n and GLAG(G)_n of various lengths (2 to 16 amino acids) were synthesized. All PLAG(G)_n control peptides were specifically recognized by anti-PLAG MoAbs (Cambridge Research Biochemical Inc.), while GLAG(G)_n control peptides did not bind to MoAbs. In addition, the accuracy of the peptide synthesis was directly

determined by amino acid analysis of two different peptides, after cleavage from the polyethylene pins, according to Cohen & Stydous [12].

Biotinylated soluble peptides. Biotinylated soluble peptides corresponding to the defined epitopes HKAFKGS (147–154), NGNLQLRNKEVT (291–302), VTWEVLEGEVEKEALKKI (301–318) and GSGKGVQGGKTKF (349–364) were synthesized by standard solid-phase methods using benzydrylamine anchor-bond and resin and Na-Boc/benzyl side chain protection [13]. Amino acid couplings were performed by the dicyclohexyl carbodiimide (DCC)/hydroxybenzotriazole (HOBt) procedure using a ratio amino acid /DDC/HOBt/resin 3/3/3/1. Deprotection of the α -amino groups from the Na-Boc protecting groups was performed using trifluoroacetic acid, followed by diisopropylethylamine for neutralization. Biotinylation of the peptides was carried out by coupling *d*-biotin to the N-terminus and, after Boc-deprotection, following the standard solid-phase procedure. The biotinylated peptides were cleaved from the resin with anhydrous hydrogen fluoride (HF) in the presence of anisole and phenol (10% v/v) as scavengers at 0°C for 1 h. The peptides were extracted from the resin using 2 M acetic acid, and after lyophilization they were subjected to partition chromatographic purification, using a Sephadex G-25 column, equilibrated with 2 M aqueous acetic acid. Elution of the peptides was performed using a homogeneous mixture of *n*-butanol/pyridine/acetic acid/H₂O (BPyAW) in a ratio 4:1:1:2 v/v. The homogeneity of the peptides was determined by thin layer chromatography in BPyAW (4:1:1:2 v/v), while 1 and 2D ¹H-NMR spectra as well as amino acid analysis confirmed their purity and identity.

Cell extract and immunoblotting

Cytoplasmic extract was prepared from cultured HeLa cells as described by Habets *et al.* [14]. Samples of extracts were applied to SDS-PAGE, followed by electrotransfer to nitrocellulose. The nitrocellulose blots were cut into strips which were subsequently blocked with non-fat milk 5% at 4°C overnight. Afterwards, anti-human IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) was added (1:1000 in blocking buffer) and allowed to react for 1 h. The colour was developed by adding a substrate solution of 4-chloro-L-naphthol to the strips.

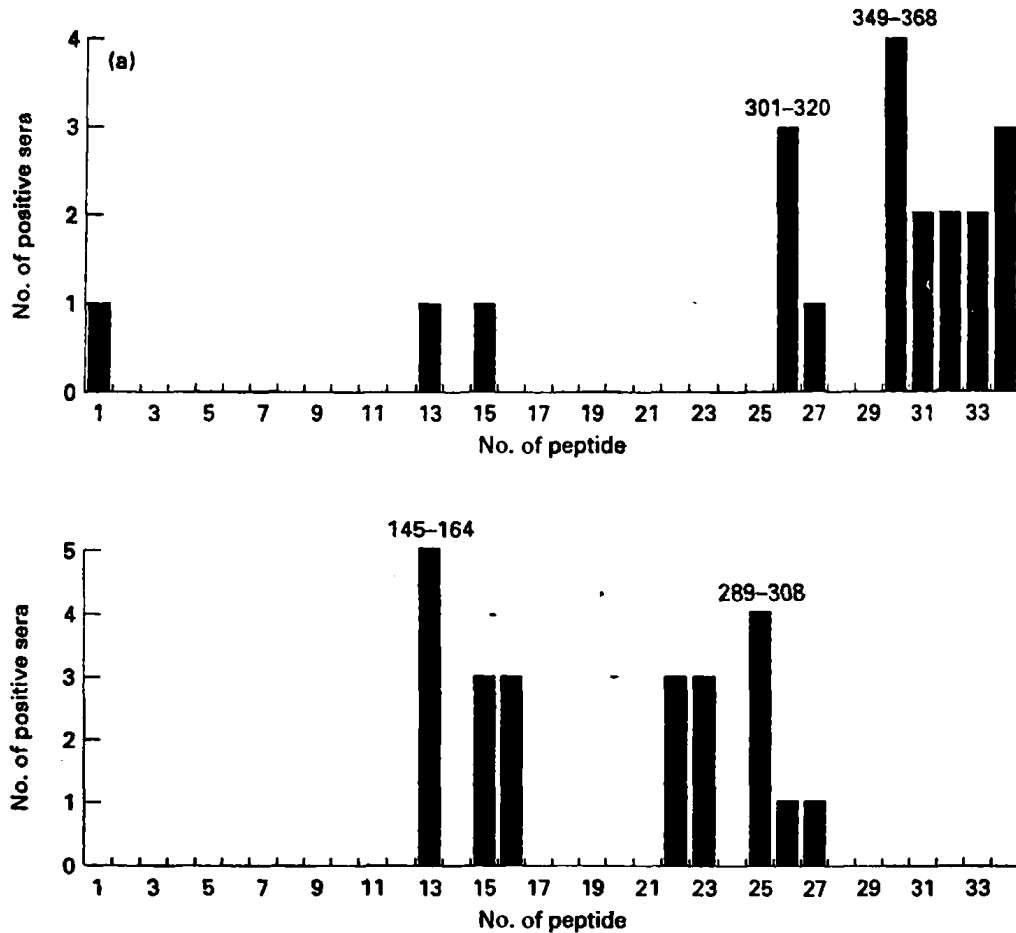
ELISA

Pin-bound peptides. Peptides covalently attached to polyethylene rods were tested for antibody binding by ELISA in 96-well microtitre plates. Rods were immersed in sodium phosphate buffer (PBS) pH 7.2, containing 0.1% Tween 20, 1% albumin and 1% ovalbumin to block non-specific binding. IgG concentration of 200 µg/ml (which corresponds to an estimated IgG concentration in serum dilution 1:50) was added to the wells and incubated overnight at 4°C. This dilution was selected because it exhibited the highest specific binding. After washing with PBS containing 0.5% Tween 20, anti-human IgG, conjugated to HRP (1:1000 dilution) in blocking buffer, was added and incubated for 1 h at 20°C. The rods were again washed and the presence of antibodies was detected using a substrate solution of 2,2'-azino-cis3-ethylbenzothiazoline sulfonic acid (ABTS) and absorbance of the colour was measured at 405 nm. Subsequently, bound antibodies were removed from the rods by sonication for 30 min in water bath with 0.1 M sodium dihydrogen phosphate, 1% SDS and 0.1% 2-mercaptoethanol at 60°C, and the rods were used again or dried for storage. In order to determine whether the antibodies from the previous experiment

were completely dissociated from the peptides. IgG-free rods were incubated with anti-human IgG conjugated to HRP followed by the addition of substrate solution (ABTS). In all cases the final optical density (OD) was equal to the background.

Biotinylated soluble peptides. ELISA, using biotinylated peptides, was as follows. Ninety-six-well polystyrene plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were pretreated with 5 µg/ml streptavidin (100 µl/well) and kept overnight at 37°C. Afterwards, 100 µl bovine serum albumin (BSA) 2% in PBS pH 7.3 were added per well and the plates were incubated at 37°C for 1 h. Biotinylated

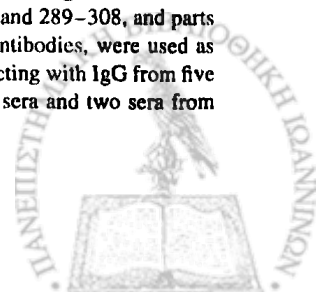
peptides (5 µg/ml) were added in the wells and incubated for 1 h at room temperature. After three washings with PBS-0.1% Tween 20, sera were added in dilution 1:50, in BSA 2% in PBS (100 µl/well). After a 3-h incubation and three washings with PBS-0.1% Tween 20, alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-human IgG (Dako, Glostrup, Denmark), diluted 1:6000 in BSA 2% in PBS, was added per well. Following 2 h incubation at room temperature and three washings, 50 µl substrate (*p*-nitrophenyl-phosphate in diethanolamine buffer) was added and the reaction was read at 405 nm after 30 min. The background of each individual serum was



(b)

Antigenic epitopes	Mean OD ± s.d.			
	SLE anti-La/SSB n = 5	SS anti-La/SSB n = 4	Normals n = 3	OD, disease control n = 2
145-164	0.822 ± 0.201	0.707 ± 0.062	0.167 ± 0.020	0.202
289-308	0.750 ± 0.141	0.549 ± 0.076	0.151 ± 0.043	0.241
301-320	0.527 ± 0.121	1.239 ± 0.433	0.134 ± 0.028	0.232
349-368	0.153 ± 0.046	1.167 ± 0.103	0.087 ± 0.034	0.061

Fig. 1. (a) Epitope mapping of La/SSB autoantigen, using overlapping synthetic peptides. Purified IgG from primary Sjögren's syndrome (pSS) sera (upper panel) reacted with peptides corresponding to 301-320 and 349-368 fragments of La/SSB. In contrast, IgG derived from systemic lupus erythematosus (SLE) sera (lower panel), with anti-La/SSB reactivity, reacted with peptides 145-164 and 289-308, and parts of La/SSB. Three normal sera and two sera from patients with anti-Ro/SSA antibodies, but without anti-La/SSB antibodies, were used as negative controls. (b) The mean optical density produced (OD) from the reaction of four major antigenic epitopes reacting with IgG from five patients with SLE and anti-La/SSB antibodies, four pSS patients and anti-La/SSB antibodies, three normal human sera and two sera from patients with SLE without anti-La/SSB antibodies.



determined with parallel experiments in streptavidin-pretreated, peptide-free ELISA plates. The real binding was calculated by subtracting the mean OD of the sample in the non-peptide-coated wells from the mean OD of the peptide-coated wells. Preliminary experiments, using different concentrations of all reagents, were used to define the optimal conditions of all ELISAs developed. The cut-off point of positivity was calculated as the mean OD of the 41 normal sera + 3 s.d.

Inhibition assays

In order to investigate whether the synthetic epitope analogues can inhibit antibody binding to native La protein, a serum with high anti-La/SSB activity, reacting with all four synthetic epitope analogues, was pretreated in dilution 1:500 for 3 h at 37°C and overnight at room temperature with each peptide individually, and a mixture of all four synthetic peptides (concentrations ranging from 0.01 to 5 µg/ml). Subsequently, all sera were tested in ELISA (Shield Diagnostics) for anti-La/SSB activity.

Alanine substitutions, computer predictions and homology search

In order to define which amino acids play an essential role for the antigenicity of the identified epitopes, residues were individually replaced by alanine and the newly produced peptides were tested against IgG with anti-La/SSB reactivity. Alanine was selected because of its low antigenicity and small stereochemical volume.

Prediction of the hydrophilicity, flexibility and T and B cell antigenic profiles, using the La/SSB primary structure, was achieved by the EPILOT program [15]. Prediction of the secondary structure of La/SSB was made using the PHDsec profile neural network method [16].

The antigenic peptide sequences were compared against the Swiss-PROT, NBRF/PIR, PRF and GENPEPT databases using Fasta [17] and Smith & Waterman [18] algorithms at GENOME-NET-FASTA and EMBL-FASTA-BLITZ servers. The non-identical amino acids were scored with PAM 250 and PAM 100 matrices [19] and the gap inclusions were allowed in Smith-Waterman searching.

Statistical analysis

The OD of each sample including normal sera was expressed in units according to the formula:

$$\text{Sample (units)} = \frac{\text{OD sample} - \text{OD background}}{\text{mean OD} + 3 \text{ s.d. of normal sera}} \times 100$$

According to this formula, 100 U was the cut-off point for each assay. Statistical differences between patients and normals were calculated using the non-parametric *t*-test. The sensitivity of the ELISAs with the synthetic peptides was calculated as follows:

$$\text{Sensitivity (\%)} = \frac{\text{number of positive samples}}{\text{total samples}} \times 100$$

The specificity was calculated according to the formula

$$\text{Specificity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{number of positive disease controls}}{\text{number of total disease controls}} \right) \times 100$$

RESULTS

Identification and restriction pattern of antigenic determinants

Thirty-four 20 mer peptides, overlapping by eight residues

covering the sequence of La/SSB, as determined by Chambers *et al.* [20] and Chan *et al.* [21] were prepared in duplicate. Six additional pairs of 20 mer peptides representing differences in the sequence, as reported by other investigators [4,5,22], were also synthesized. All pin-bound peptides were tested against purified IgG from anti-La/SSB⁺ sera of pSS and SLE patients. Five out of five SLE IgG recognized peptides spanning the 145–164 and 289–308 sequences of La/SSB. Furthermore, all IgG from pSS patients recognized the region 349–368, while three out of four IgG fractions reacted also with the region 301–320 of the La/SSB protein (Fig. 1a,b).

Determination of the minimum required length of the antigenic determinants was performed by the synthesis of two sets of multiple length peptides for each 20 mer antigenic epitope. Each set of peptides was obtained by serially subtracting two amino acids from either the amino or carboxyterminal end of the initially reactive peptides. The points beyond which anti-La/SSB IgG failed to bind were considered the ends of the antigenic epitope (Fig. 2). Thus, refinement of the peptide TLHKAFKGSIFVVFDSIESA (145–164) resulted finally in the peptide HKAFKGS (147–155). Restriction of the peptide ANNGNLQRNKEVTWEVLEG (289–308) revealed the antigenic epitope NGNLQRNKEVT (291–302). Similarly, the initially reactive peptides VTWEVLEGEVEKEALKKIIE (301–320) and GSGKGVQFQGGKTKFASDD (349–368) were finally restricted to VTWEVLEGEVEKEALKKI (301–318) and GSGKGVQFQGGKTKF (349–364), respectively.

The specificity of the defined epitopes was investigated by inhibition experiments. It was shown that in the presence of synthetic peptides the binding of anti-La/SSB antibodies in native La/SSB was reduced in a dose-dependent manner by 12% to 43% (Fig. 3).

Alanine substitutions, predicted features and molecular similarities of the epitopes

The alanine-substituted peptide epitopes were tested against IgG with anti-La/SSB activity, and the antibody-binding capacity in three out of four antigenic epitopes was not affected, except in the case of W303 substitution. Substitution of W303 by alanine resulted in significant loss of antigenicity of the peptide ANNGNLQRNKEVTWEVLEG (289–308).

Prediction of the secondary structure of the epitopes suggested that the sequences 147–154 and 301–308 attain helical conformations containing β-loop structures. In addition, the epitope 147–154 belongs to part of the RNA binding site of La/SSB protein. All four epitopes presented features of high antigenicity [23], had high ratios of hydrophilic amino acids, commonly found in B cell epitopes [24], and moderate to high flexibilities [25]. The epitopes HKAFKGS (147–154) and VTWEVLEGEVEKEALKKI (301–318) possessed features of putative T cell epitopes by three of four methods used for T cell epitope predictability [26–28]. The biochemical characteristics of the epitopes strongly suggested that they are located on the surface of the La/SSB protein.

Identification of the primary structure of La/SSB epitopes made possible the use of protein databases to search for sequences shared with other proteins of unrelated origin. The epitope HKAFKGS (147–154) was found to be highly conserved in mammals. This epitope had an 83.3% similarity to the human myelin basic protein (MBP) in the region 139–146 (HKGFKGVD) and 72% similarity to the fragment 914–921 (KNFKGTIQ) of the autoantigen topoisomerase II. These observations prompted us to construct new peptides containing the above mentioned sequences

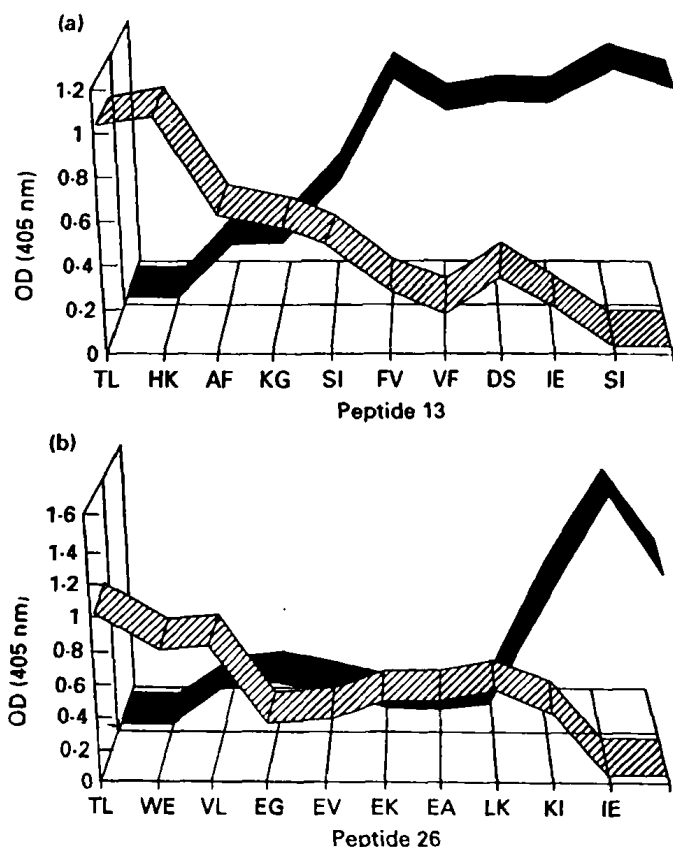


Fig. 2. The refinement of epitopes HKAFKGSI (147–155) (a) and VTWEVLEGEVEKEALKKI (301–318) (b) are shown. The hatched line represents the ELISA optical density (OD) after subtraction of amino acids from the –NH₂ terminus and the black line denotes the ELISA OD after subtraction of amino acids from the –COOH terminus, from the initially reactive 20 mer peptides. The amino acids beyond the points where anti-La/SSB IgG abolished its binding capacity have been considered as the borders of the epitopes, since these amino acids were essential in preserving the antigenicity of the peptides.

and test them against IgG with anti-La/SSB specificity. As shown in Fig. 4a, IgG with anti-La/SSB activity reacted not only with the La/SSB epitope, but also with the peptides derived from human MBP and topoisomerase II sequences. Furthermore, pretreatment of anti-La/SSB IgG reacting with the p147–154, in a concentration 250 µg/ml, resulted in a significant reduction of antibody binding to both topoisomerase II and human MBP-related peptides (Fig. 4b). In contrast, p289–308, which was used as control peptide, of La/SSB did not inhibit anti-La/SSB binding.

Prevalence of anti-peptide antibodies in autoimmune sera

Using the biotinylated antigenic epitope analogues in ELISAs, the prevalence of anti-peptide antibodies in sera of SLE and pSS was investigated. Given that the peptides partly inhibited the binding of antibodies to native La/SSB protein, it is obvious that these epitopes are targets for a significant population of anti-La/SSB antibodies. Antibodies to HKAFKGSI (147–154) were found in 12/24 (50%) of SLE sera with anti-La/SSB reactivity, and 7/39 (18%) of pSS sera with anti-La/SSB antibodies. None of the 35 disease control sera, negative for anti-La/SSB antibodies, was found to be positive to this epitope. Antibodies to NGNLQLRNKEVT (291–302) antigenic epitope were detected in 9/24 (37.5%) of SLE

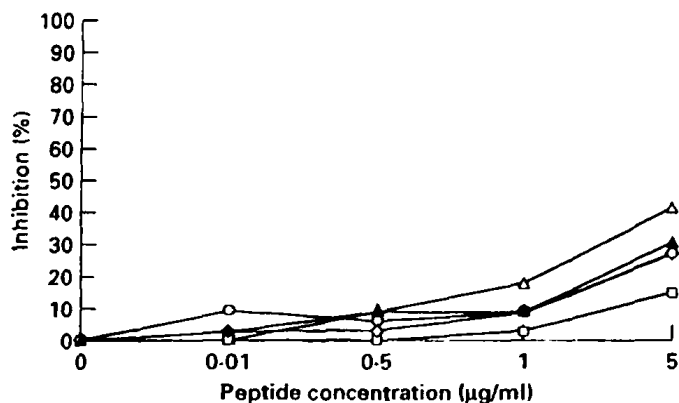


Fig. 3. Inhibition of anti-La/SSB antibody binding in anti-La/SSB ELISA, using as inhibitors different concentrations of all four synthetic epitope analogues. Mixed antigen denotes mixture of all synthetic peptides (each one contributing to the solution by 25%). Anti-La/SSB⁺ serum was used in dilution 1:500. Δ, Amino acids (aa) 349–364; ○, aa 301–318; ◻, aa 147–154; ▲, mixed peptides.

sera and 8/39 (20%) of pSS sera with anti-La/SSB reactivity, and none of the disease control sera. Antibodies to VTWEVLEGEVEKEALKKI (301–318) were found in 19/24 (79%) and 27/39 (69%) of SLE and pSS sera positive for anti-La/SSB antibodies,

Top II p907–926 : **H P M L P N Y K N F K G T I Q E L G Q N**
 MBP p158–177 : **S D Y K S A H K G F K G V D A Q G T L S**
 La/SSB p145–164 : **T L H K A F K G S I F V V F D S I E S A**

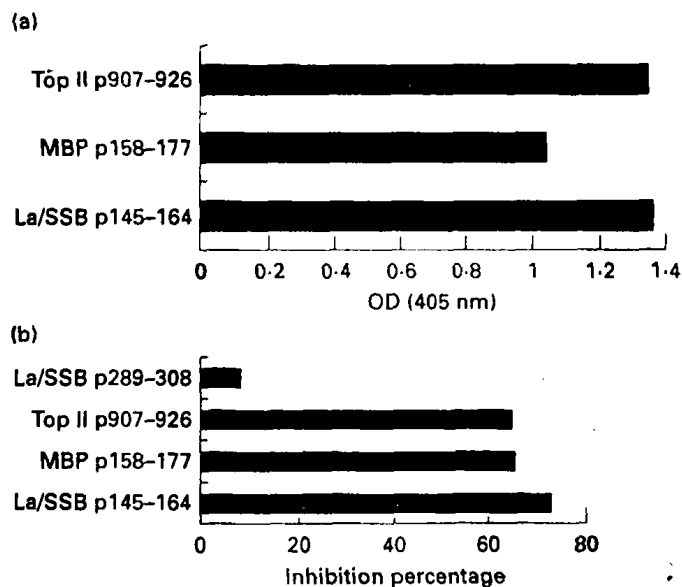


Fig. 4. (a) Reaction of anti-La/SSB antibodies with peptides derived from human myelin basic protein (MBP) and topoisomerase II. Bold letters denote sequence similarities between La/SSB, topoisomerase II and human MBP. Two normal human sera tested in dilution 1:50 did not exceed optical density (OD) of 0.150 in all three peptides. (b) Inhibition of anti-p145–164 antibodies binding in polyethylene pins coated with p145–164 of La/SSB, p158–177 of human MBP, p907–926 of DNA topoisomerase II and p289–308 of La/SSB. IgG concentration 200 µg/ml. As inhibitor p147–154 (HKAFKGSI) of La/SSB was used at a concentration of 250 µg/ml. The inhibition values were: p145–164 of La/SSB, 73%; p158–174 of human MBP, 65%; p907–926 of DNA topoisomerase II, 64%; p289–308 of La/SSB was used as control peptide and did not inhibit the antibody binding substantially.

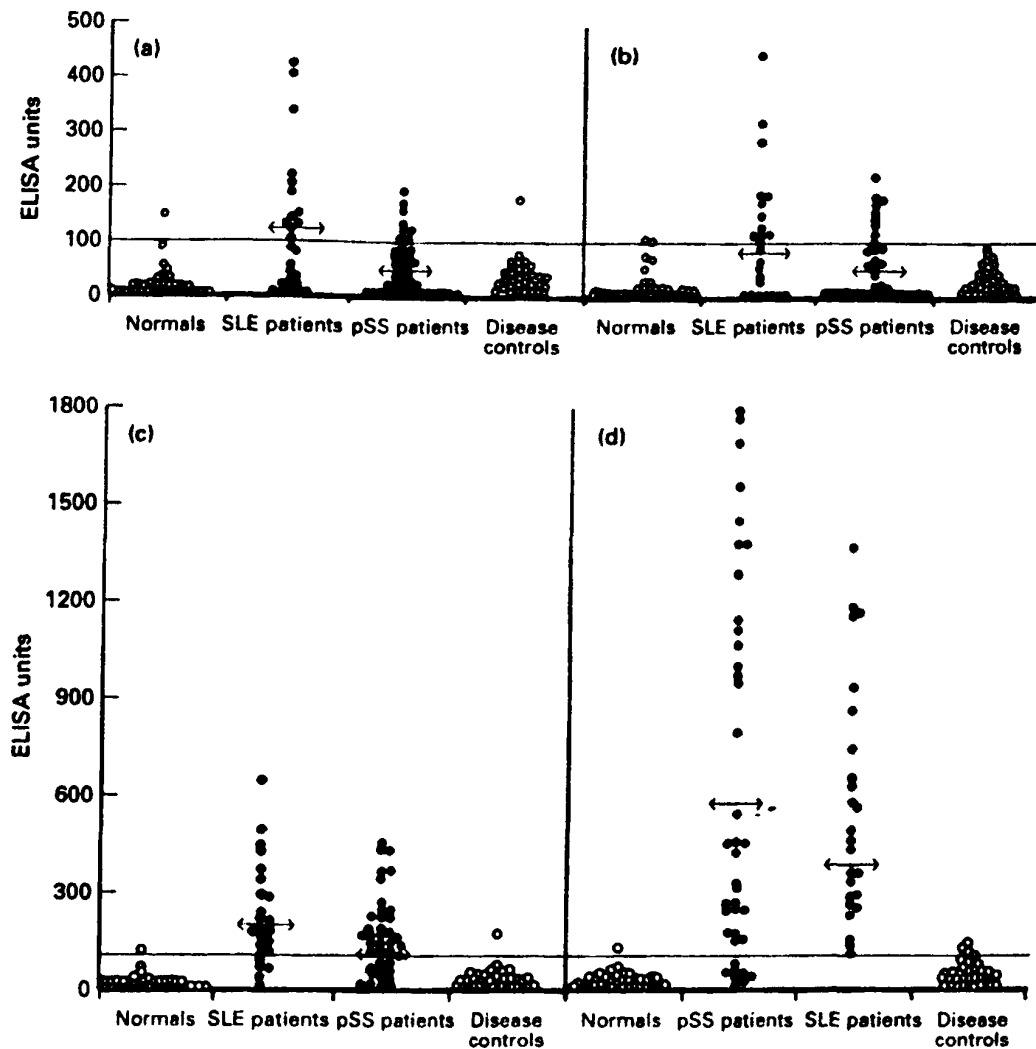


Fig. 5. Prevalence of antibodies to: HKAFKGS I (147–154) (a), NGNLQLRNKEVT (291–302) (b), VTWEVLEGEVEKEALKKI (301–318) (c) and GSGKGVQFQGGKTKF (349–364) (d) synthetic epitope analogues in sera from patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) and systemic lupus erythematosus (SLE) with anti-La/SSB antibodies, patients with pSS and SLE without anti-La/SSB antibody (disease controls) and normal controls. The cut-off point (100) was calculated using the mean binding units (see Patients and Methods) of 41 normal human sera + 3 s.d. ○, α La-negative; ●, α La-positive.

respectively, as well as 1/35 (2.9%) of disease-negative controls. Finally, antibodies to GSGKGVQFQGGKTKF (349–364) peptide were detected in all SLE sera (100%) with anti-La/SSB reactivity and 32/39 (82%) pSS sera and 4/35 (11.4%) disease controls (Fig. 5). Four of 41 normal sera (9.7%) reacted also with the peptides.

Seven of 63 anti-La/SSB⁺ sera reacted with all peptides, 16/63 sera reacted with three peptides, 31/63 reacted with two peptides and 5/63 with one peptide. Four of 63 sera did not react with any of the peptides. ELISA with the peptide 349–364 exhibited the highest sensitivity (88%) and high specificity (88.6%). Detection of anti-La/SSB antibodies using the peptide 301–318 revealed a sensitivity of 73% and specificity of 69%. The concordance between these two assays was 70%. ELISA with the other two peptides, 147–154 and 291–302, showed remarkably lower sensitivities (25% and 27%, respectively); but none of these peptides reacted with either disease control or normal control sera. The overall sensitivity and specificity, using all assays with the synthetic peptides, were found to be 93.6% and 85.6%, respectively. None of the assays could discriminate between pSS and SLE anti-La/SSB⁺ patients.

DISCUSSION

In the present study, an attempt was made to define the linear antigenic epitopes of La/SSB autoantigen. The fine B cell epitope mapping of autoantibodies to La/SSB was performed using overlapping synthetic peptides. The length of the peptides used was rather long (20 amino acids), since in previous studies of Ro60kD epitopes it was shown that long peptides exhibited higher specificity [29] compared with overlapping octapeptides [30]. In fact, the mimotope scanning of Ro60kD molecule, using 22 mer overlapping synthetic peptides, revealed two discrete, disease-specific epitopes (one associated with SS and the other with SLE), compared with 14 epitopes defined by the octapeptides. Thus, antigenic epitope formation is probably influenced by both the primary structure of a given synthetic epitope, along with the peptide secondary structure. In this regard, NMR studies have revealed that even small peptides, such as the PPGMRPP epitope of the Sm autoantigen [30], can possess more than one conformation [31].

During the past few years, several investigators have performed epitope mapping of La/SSB autoantigen, using either fusion proteins of various lengths or c-DNA deletion mutants.

Their results did not lead to a clear definition of B cell epitopes of La/SSB protein, since they were only assigned to long stretches of polypeptides. It was shown, however, that antibodies to La/SSB, binding to a given B cell epitope, did not react with antibodies directed to other epitopes, suggesting that an anti-La/SSB response comprises independent anti-La/SSB antibody populations [32]. These observations strongly suggest that the production of anti-La/SSB antibodies is attributable to an antigen-driven process. The stimulating antigen could be a part of the native or denatured La/SSB protein. In this regard, the definition and the exact determination of B cell epitopes is of particular importance in order to delineate the mechanisms accounting for anti-La/SSB antibody production.

The epitopes reported in this study are linear epitopes varying in length from 8 to 18 amino acids. It has been previously estimated that a small but significant proportion of antibodies directed to discontinuous epitopes of a given antigen are also able to react with linear peptide fragments of the protein [33]. The relevance of the linear epitopes described in this study has been confirmed in two ways. First, they reacted with a large panel of autoimmune sera with anti-La/SSB antibodies, but not with normal or disease control sera. Second, using inhibition assays it was shown that the antibody binding to native La/SSB was reduced in the presence of synthetic-epitope analogues. Our results agree with previous reports regarding the locations of the epitopes. In fact, the epitope HKAFKGS (147–155) belongs to the protein region containing the RNA recognition motif (RRM) of La/SSB; antibodies to this fragment of the protein have been described previously [34]. The RRM, spanning amino acids 111–187 of La/SSB protein, is included in the LaC epitope (amino acids 111–242), as described previously [20]. Experiments with non-overlapping and overlapping peptides corresponding to this region have shown that antibodies directed to this fragment of the protein bind in conformational determinants [35]. Our study adds further to our knowledge of the antigenicity of this region, defining also a linear epitope (147–155) consisting of eight amino acids.

The region 291–318 of La/SSB consists of two different continuous linear epitopes (291–302 and 301–318). Previous studies have shown that this fragment is an immunodominant epitope of the protein, since both Rauh & Lührmann [5] and Sturgess *et al.* [4] have shown that this region exhibits the highest binding of antibodies to La/SSB. In contrast, St Clair *et al.* [6], based on a quantitative analysis of the binding of anti-La/SSB antibodies in three different fragments of the molecule, showed that the LaD region (amino acids 242–408) presented the lowest binding compared with the two other fragments. However, it is not possible to compare directly the levels of anti-La/SSB in these studies, since all of them have used only limited numbers of sera. The epitope 349–364 also belongs to the LaD region. It is noteworthy that the vast majority of sera from both SLE and SS patients reacted with the synthetic peptide corresponding to this epitope. This region belongs also to one of the previously described immunodominant epitopes of the protein [20].

The epitope HKAFKGS (147–154) presented sequence similarity with fragments of two other, unrelated autoantigens, MBP and topoisomerase II. Interestingly, antibodies to La/SSB which bind to 147–154 epitope cross-react with the peptides corresponding to the similar epitopes of MBP and topoisomerase II. MBP can induce experimental allergic encephalomyelitis after immunization [36], while antibodies to topoisomerase II have been described in sera of patients with idiopathic interstitial lung disease [37].

Despite the fact that none of the patients with SLE or SS had evidence of central nervous disease or interstitial lung disease, this cross-reaction between fragments of different autoantigens should be further investigated. Our data add further to this concept, showing that an immunodominant epitope of La/SSB possesses molecular similarity to a fragment of laminin A.

One of the most interesting findings in this study is that all but four of the 63 sera of patients with either pSS or SLE and anti-La/SSB antibodies react at least with one synthetic peptide analogue of the La/SSB linear epitopes. The four non-reacting sera probably contain antibodies directed towards either conformational or long linear epitopes of the protein. Most positive sera bind to two or more synthetic epitope analogues, reinforcing the concept that antibodies to La/SSB consist of heterogeneous groups. The second conclusion is that the use of synthetic peptides as substrates for the identification of anti-La/SSB antibodies is a promising method. In fact, the positivity rate in healthy blood donors is low, comparable to that observed in assays based on recombinant La/SSB [38]. Furthermore, disease control sera (i.e. sera from SS and SLE patients, without anti-La/SSB antibodies) also possessed low reactivity, resulting in the high specificity of the assays.

In conclusion, epitope mapping of La/SSB disclosed that antibodies to La/SSB are directed towards different linear epitopes of the molecule. The binding of antibodies derived from pSS sera presented a different pattern compared with antibodies derived from SLE sera. The linear epitopes with the highest reactivity belong to fragments of the protein which previously have been assigned as immunodominant epitopes of La/SSB. Peptide-based assays may prove useful in the detection of anti-La/SSB antibodies. In this respect, a large number of sera in a prospective study and a higher structural order of peptides used as substrates (i.e. peptides connected in sequential oligopeptide carriers (SOC) [39] are currently under investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was supported by a grant from the Greek Secretariat of Research and Technology (εΡεΤπ-εΚΒΑΝπ-45). The authors wish to thank L. Karayiannopoulos MD, PhD, for reviewing the manuscript, and Ms A. Korba for excellent secretarial assistance.

REFERENCES

- 1 Pruijn CJM, Slobbe RL, van Venrooij WJ. Structure and function of La and Ro RNPs. *Mol Biol Rep* 1990; **14**:43–48.
- 2 Chan EKL, Francoeur AM, Tan EM. Epitopes, structural domains and asymmetry of amino acid residues in SSB/La nuclear protein. *J Immunol* 1986; **136**:3744–9.
- 3 Chan EKL, Tan EM. The small nuclear ribonucleoprotein SSB/La binds RNA with a conserved protease-resistant domain of 28 kilodaltons. *Mol Cell Biol* 1987; **7**:2588–94.
- 4 Sturgess AD, Peterson MG, McNeilage LJ, Whittingham S, Coppel RL. Characteristics and epitope mapping of a cloned human autoantigen La. *J Immunol* 1988; **140**:3212–8.
- 5 Rauh AJG, Lührmann R. At least 3 distinct B cell epitopes reside in the C-terminal half of La protein, as determined by a recombinant DNA approach. *Eur J Immunol* 1988; **18**:2049–57.
- 6 St Clair EW, Pisetsky DS, Reich CF, Keene JD. Analysis of antibody binding to different regions of the human La antigen expressed in recombinant fusion proteins. *J Immunol* 1988; **141**:4173–80.
- 7 Bini P, Chu J-L, Okolo C, Elkon K. Analysis of autoantibodies to recombinant La(SSB) peptides in systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* 1990; **85**:325–33.

- 8 Tan EM, Cohen AS, Fries JB *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-7.
- 9 Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM *et al.* Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1993; 36:340-7.
- 10 Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ, Tribbick G, Schoofs PG. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J Immunol Methods* 1987; 202:259.
- 11 Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *JACS* 1963; 85:2149-54.
- 12 Cohen SA, Stydou DJ. Amino acid analysis utilising phenylisothiocyanate derivatives. *Anal Biochem* 1988; 174:1-16.
- 13 Stewart JM, Young JD, eds. Solid phase peptide synthesis. Rockford: Pierce Chemical Co., 1984.
- 14 Habets WJ, De Rooij DJ, Hoet MH, Van de Putte LB, van Venrooij WJ. Quantitation of anti-RNP and anti-Sm antibodies in MCTD and SLE patients by immunoblotting. *Clin Exp Immunol* 1985; 59:457-66.
- 15 Mendez-Arias L, Rodriguez RA. BASIC microcomputer program for prediction of B and T cell epitopes in proteins. *CABIOS* 1990; 6:101-5.
- 16 Burkhard R, Sander C. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* 1993; 232:584-99.
- 17 Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:2444-8.
- 18 Smith TF, Waterman MS. Identification of common molecular sub-sequences. *J Mol Biol* 1988; 147:195-7.
- 19 Altschul SE. Amino acid substitution matrices from an information theoretic perspective. *J Mol Biol* 1991; 219:555-65.
- 20 Chambers JC, Kenan D, Martin BJ, Keene JD. Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen. *J Biol Chem* 1988; 263:18043-51.
- 21 Chan EKL, Sullivan KF, Tan EM. Ribonucleoprotein SSB/La belongs to a protein family with consensus sequences for RNA binding. *Nucleic Acid Res* 1988; 17:2233-44.
- 22 Kohsaka H, Yamamoto K, Fujii H *et al.* Fine specificity of the human SSB/La protein: identification of a distinct autoepitope homologous to a viral gag polyprotein. *J Clin Invest* 1990; 85:1566-74.
- 23 Welling GM, Weijer WJ, Van der Zee R, Welling-Wester. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Letters* 1985; 188:215-8.
- 24 Hopp TP, Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:3824-8.
- 25 Karplus PA, Schultz GE. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften*, 1985; 72:212-3.
- 26 Margalit H, Spouge JL, Cornette JL, Cease KB, Delisi C, Berzofsky JA. Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequences. *J Immunol* 1987; 138:2213-29.
- 27 Rothbard JB, Taylor WR. A sequence pattern common to T cell epitopes. *EMBO J* 1988; 7:93-100.
- 28 Sette A, Buus S, Appela E *et al.* Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:3296-300.
- 29 Routsias JG, Tzioufas AG, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Moutsopoulos HM. Epitope mapping of the Ro/SSA 60KD autoantigen reveals disease specific antibody binding profiles. *Eur J Clin Invest* 1996 26:514-21.
- 30 Scofield RH, Harley JB. Autoantigenicity of Ro/SSA antigen is related to a nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:3343-7.
- 31 Tsikaris V, Vlachoyiannopoulos PG, Panou E *et al.* Immunoreactivity and conformation of the P-P-G-M-R-P-P repetitive epitope of the Sm autoantigen. *Int J Pep Prot Res* 1996; 48:319-27.
- 32 St Clair EN, Burch JA, Ward MM, Keene JD, Pisetsky DS. Temporal correlation of antibody responses to different epitopes of the human La autoantigen. *J Clin Invest* 1990; 85:515-21.
- 33 Van Regenmortel MHV. Protein antigenicity. *Mol Biol Reports* 1992; 16:133-8.
- 34 Rischmueller M, Mc Neilage LJ, McCluskey J, Gordon T. Human autoantibodies directed against the RNA recognition motif of La(SSB) bind to conformational epitope present on the intact La(SSB)/Ro(SSA) ribonucleoprotein particle. *Clin Exp Immunol* 1995; 101:39-44.
- 35 Topfer F, Gordon T, McCluskey J. Intra- and inter-molecular spreading of autoimmunity involving the nuclear self-antigens La(SSB) and Ro(SSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:875-9.
- 36 Miller A, Al-Sabbagh A, Santos LMB, Pradhu-Das M, Weiner HL. Epitopes of myelin basic protein (MBP) that trigger TGF- β release following oral tolerization to MBP are different from encephalitogenic epitopes and mediate epitope-driven bystander suppression. *J Immunol* 1993; 151:7307-15.
- 37 Meliconi R, Bestagno M, Sturani C *et al.* Autoantibodies to DNA topoisomerase II in cryptogenic fibrosing alveolitis and connective tissue disease. *Clin Exp Immunol* 1989; 76:184-9.
- 38 Owe-Young RA, Horn S, Edmonds JP, Sturgess AD. Use of molecularly cloned human SSB antigen to detect anti SSB antibodies. *J Autoimmun* 1992; 5:351-61.
- 39 Tsikaris V, Sakarellos C, Cung-Thong M, Marraud M, Sakarellos-Daitsiotis M. Concept and design of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC) for covalent attachment of multiple antigenic peptides. *Biopolymer*, 1996; 38:291-3.



The value of synthetic linear epitope analogues of La/SSB for the detection of autoantibodies to La/SSB; specificity, sensitivity and comparison of methods

E. E. YIANNAKI, A. G. TZIOUFAS, M. BACHMANN*, J. HANTOUMI, V. TSIKARIS†, M. SAKARELLOS-DAITSIOTIS†, C. SAKARELLOS† & H. M. MOUTSOPOULOS *Department of Pathophysiology, National University of Athens, Athens, Greece. *Institute of Physiologic Chemistry, University of Mainz, Mainz, Germany, and †Section of Organic Chemistry and Biochemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, Ioannina, Greece*

(Accepted for publication 16 December 1997)

SUMMARY

In a previous study it was shown that La/SSB contains four linear epitopes, p147-154, p291-302, p301-318 and p349-364. The aim of the present study was to investigate the value of the synthetic epitope analogues of the La/SSB autoantigen for the detection of antibodies to La/SSB, in comparison with recombinant La and fragments of this protein. A total of 122 sera with anti-La/SSB activity, from patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) or systemic lupus erythematosus (SLE), were tested in various peptide-based assays. In addition, 62 sera from pSS or SLE patients with other autoantibody specificities and 95 sera from healthy individuals were used as controls. The autoantibody specificity was identified by counter immunoelectrophoresis and immunoblot. The peptide-based ELISA assays presented sensitivities ranging from 78% to 88.8% and specificities from 69% to 94.3%. Dot blot assays exhibited sensitivities ranging from 93.6% to 97%, but remarkably lower specificities from 56% to 88%. The most sensitive and specific peptide $^{349}\text{GSGKGVQFQGGKTKF}^{364}$ was synthesized and attached on a tetramer sequential oligopeptide carrier SOC_4 and used for immunoassay development. Assays based on the recombinant native La protein, the La-C terminal (215 aa), and the N-terminal of La with a mutation at base pair 640 (nine adenines instead of eight) were also developed and compared with the SOC_4 peptide-based assay. Of anti-La-positive sera, 88.1% were reactive with both the synthetic peptide SOC_4 -(349-364aa) and the recombinant La protein. Eighty-three percent of sera were reactive with the La N-terminus and 67.8% of sera were reactive with the La C-terminus. Using sera that were anti-Ro-positive but anti-La-negative, 37% were reactive with the recombinant protein, 26% with the La N-terminus, 33% with the La C-terminus and only 11% with the synthetic peptide. Our results suggest that the synthetic peptide epitopes exhibit high sensitivity and specificity for the detection of anti-La/SSB antibodies in ELISA and dot blot techniques. The peptide SOC_4 -(349-364aa) has the same sensitivity for the detection of anti-La/SSB antibodies as the recombinant protein.

Keywords B cell epitopes La/SSB Sjögren's syndrome systemic lupus erythematosus diagnostic value

INTRODUCTION

Anti-La/SSB antibodies belong to a clinically important group of antinuclear antibodies that recognize ribonucleoprotein autoantigens [1]. These autoantibodies are detected in 40-87% of sera of patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) [2,3] and in 10-15% of sera of systemic lupus erythematosus (SLE) patients [4].

Anti-La/SSB antibodies can be detected by several assays.

Correspondence: A. G. Tzioufas, Department of Pathophysiology, School of Medicine, National University of Athens, 75 Mikras Asias str., 11527 Athens, Greece.

These antibodies give nuclear immunofluorescence pattern identical to the patterns of some other antinuclear antibodies [5]. Immunodiffusion (ID) and counter immunoelectrophoresis (CIE) are rather specific methods for the detection of anti-La/SSB antibodies [6]. Immunoblotting, an efficient and sensitive method for the detection of anti-La/SSB antibodies, is technically laborious and difficult to interpret, since La/SSB co-migrates with one of the Ro/SSA proteins (Ro52). Immunoprecipitation is a specific and sensitive method but needs a specific armamentarium and can not be used as a method for routine clinical practice. ELISA using recombinant or affinity-purified protein is an easy method but gives low specificity.

Recently, four linear distinct B cell epitopes of the La/SSB autoantigen have been detected, using overlapping synthetic peptides. These epitopes were recognized by anti-La/SSB-positive sera from pSS and SLE patients [7] (HKAFKGS1 (147–154), NGNLQLRNKEVT (291–302), VTWEVLEGEVEKEALKKI (301–318) and GSGKGKVFQGGKTKF (349–364)). Preliminary studies showed that soluble free peptides could be used as substrates for the detection of anti-La/SSB antibodies in tests exhibiting high sensitivity and specificity. This observation prompted us to investigate whether larger synthetic peptide analogues can be used in simple, easy to perform assays. Using these antigenic peptide analogues as well as peptides attached on sequential oligopeptide carriers (SOC) [8–10] as substrates we have developed a peptide-based ELISA and dot blot for the detection of anti-La/SSB antibodies. These assays were compared with ELISA using recombinant La/SSB.

PATIENTS AND METHODS

Sera

A hundred and eighty-four patients with pSS [11] and SLE [12] with anti-La/SSB reactivity were tested. Anti-La/SSB reactivity was determined using CIE and Western blot, as previously described [7]. Sixty-three sera were tested against the soluble free peptides, which were immobilized in the ELISA and dot blot techniques [7]. Fifty-nine sera were tested against the recombinant La/SSB protein, parts of this protein and the most sensitive epitope for anti-La/SSB antibody detection, the peptide 349–364aa, attached on SOC₄. Fourteen sera also contained anti-Ro60-kD and anti-Ro52-kD antibodies, 26 sera had anti-Ro60-kD antibodies, 11 sera had antibodies against Ro52-kD and eight had anti-La/SSB reactivity alone. Sixty-two sera of pSS and SLE patients negative for anti-La/SSB antibodies were used as disease controls. These sera contained various autoantibodies, as follows: 43 had antibodies to Ro60-kD, 16 had antibodies to Ro52-kD, eight had antibodies to dsDNA, 12 had antibodies to UIRNP, and eight sera had antibodies to Sm. A total of 95 normal sera were used in different assays to define the cut off point.

Peptide synthesis and purification

Eight peptides were synthesized by the solid-phase synthetic method [13] using benzydrylamine resin as an anchor bond and N^α-t-Boc/benzyl-side chain protection. Amino acid couplings were performed by the dicyclohexyl carbodiimide (DCC)/hydroxybenzotriazole (HOBt) procedure using a molar ratio of amino acid/DCC/HOBt/resin 3:3:3:1, and by the benzotriazolylxytris (dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate (BOP reagent) [14] using a ratio of amino acid/BOP/di-isopropylethylamine (DIEA)/resin 2:2:6:1 for difficult couplings. Deprotection of the α-amino groups from the N^α-t-Boc protecting groups was performed using trifluoroacetic acid (TFA) followed by DIEA for neutralization. Acetylation, in some cases, was carried out using 30 equiv. of (CH₃CO)₂O in pyridine for 25 min. The peptides were cleaved from the resin with anhydrous hydrogen fluoride (HF) in the presence of anisole and phenol (10% v/v) as scavengers and ethanedithiol (EDT) when Trp was present in the amino acid sequence [15] at –8°C for 30 min and 0°C for 1 h. The peptides were extracted from the resin using 2 M acetic acid and after lyophilization they were subjected to partition chromatographic purification using a Sephadex G-25 column equilibrated with 2 M aqueous acetic acid. Elution of the peptides was performed using a

homogeneous mixture of *n*-butanol/pyridine/acetic acid/H₂O (BPyAW) in a ratio 4:1:1:2 v/v. The peptides were subjected to high performance liquid chromatographic purification (HPLC). Elution of the peptide was performed using a gradient mixture of distilled H₂O and acetonitrile spanning from 95:5 v/v d.H₂O:CH₃CN to 40:60 v/v d.H₂O:CH₃CN containing 0.1% v/v TFA. The purity of the peptides was confirmed by analytical HPLC, 1-D and 2-D H-NMR spectroscopy.

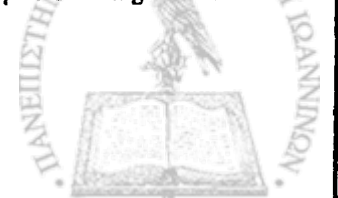
The Boc-Gly OCH₂-Pam resin was used for the synthesis of the sequential oligopeptide carrier. Amino acid couplings were performed by the 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate TBTU/HOBt/DIEA procedure using a ratio of amino acid/TBTU/HOBt/DIEA/resin 3:2.9:3:6:1 [16]. The N^α-Boc-L-Lys (N^ε-Fmoc)-OH was used for lysine coupling. After cleavage of the N^ε-Fmoc groups, using 20% v/v piperidine in DMF, the antigenic peptide was built simultaneously, step by step with attachment to the SOC₄ by the Lys-NH₂ groups. The following steps of synthesis and cleavage from the resin were the same as above. The SOC₄ peptide was dialysed against water using dialysis tubes with molecular mass cut off of ≈ 1500 and lyophilized.

All peptides were also synthesized in biotinylated form. Biotinylation occurred after the addition of a four amino acid spacer (-Gly-Ser-Gly-Ser-) [17], using d-biotin to the N-terminus and after Boc deprotection, following the standard solid-phase procedure. All peptides were subjected to amino analysis, which confirmed their purity and identity.

La recombinant peptides

Three recombinant La peptides were prepared as previously described [18,19]. The La protein reading frames of the La peptides were originally isolated and prepared from a La cDNA containing a single (A)-nucleotide residue insert (Dr Stahnke, ELIAS, Freiburg, Germany). The full-length construct was cloned as follows. The cloning started from the La cDNA La23 in pBluescript SK(-). As La23 contained a deletion of a single (A)-nucleotide residue in the exon 7 which caused a (-1) frame shift mutation within the coding region we had to correct this by inserting an (A)-nucleotide.

First, the core portion of the La cDNA (spanning from the *Kpn*I site to the *Av*II site) was isolated. The 5'- and 3'-portions were modified by use of a polymerase chain reaction (PCR) technique. For the 3'-portion we used P1 (P1: CGAAATTTGCTAGTGATGATGAACA) as the upstream primer and P2 (P2: TGGTTTGGATCCCTACTGGTCTCCAG; the artificial *Bam*HI site neighbouring the stop codon TAG (CTA) is underlined) as downstream primer. The resulting fragment was cut with *Av*II and *Bam*HI and subcloned into pBluescript SK(-). The 5'-end was created as follows. In the regular La mRNA form translation starts at the first AUG located in exon 2. Such a 5'-terminal construct was prepared from the cDNA La23 by PCR using the P3 (P3: ACATAGGATCCATGGCTGAAAATGGT; the artificial *Bam*HI neighbouring the translational start ATG is underlined) as the upstream primer and P4 (P4: TGTTGTTAGACGGTTCAA-CCTGTTG) as the downstream primer. The PCR fragment was cleaved by *Bam*HI and *Kpn*I and cloned into the corresponding sites of pBluescript SK(-). The insert was isolated using the *Nco*I/*Bam*HI sites and cloned into the respective cloning sites of the pQE-60W vector. Thereby a C-terminally His-tagged La protein construct was obtained. The insert was isolated and further subcloned into the expression vector pET-3d using the *Nco*I/*Hind*III



sites. Finally the reading frame was corrected as follows. La19 cDNA containing the correct La coding sequence was restricted with *Bst*EII, which cleaved at exon 10 of the La sequence, and *Kpn*I, which cleaved at exon 3 of the La sequence. The pET-3d construct was linearized with *Bst*EII and after isolation of the linearized DNA partially digested with *Kpn*I. Then the *Kpn*I/*Bst*EII fragment of La19 was cloned in the respective sites of the pET-3d construct. The final construct was sequenced.

ELISA

The 96-well polystyrene plates were coated with 10 µg/ml peptides (in the case of biotinylated peptides the plates were pretreated with 5 µg/ml streptavidin), 5 µg/ml SOC₄-(349–364aa) peptide, recombinant La protein, N-terminus and C-terminus fragment (100 µl/well) and kept for 4 h at 37°C (until complete evaporation). Afterwards, 200 µl of bovine serum albumin (BSA) 2% in PBS pH 7.3 were added per well and the plates were incubated at room temperature for 1 h. After two washing steps with PBS-0.1% Tween 20, sera were added at 1:100 dilution in BSA 2% in PBS (100 µl/well) in duplicate and in both peptide-coated and non-coated wells. After an overnight incubation at 4°C and four washing steps with PBS-0.1% Tween 20, 100 µl of anti-human IgG (γ) peroxidase goat-conjugated antibodies (Sigma) diluted 1:1500 in BSA 2% in PBS were added per well. Following 1 h incubation at room temperature and five washings, 100 µl substrate solution of 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline sulphonic acid (ABTS) were added and the absorbance of the colour was measured at 405 nm after 30 min. Preliminary experiments using different concentrations of all reagents in different tests were used to define the optimal conditions of all ELISA developments. The real binding was calculated by subtracting the mean optical density (OD) of the sample in the non-peptide-coated well from the mean OD of the peptide-coated wells. The cut off point of positivity was calculated as the mean OD of the normal sera + 3 s.d.

Dot blot

One microlitre aliquots of the peptides diluted in distilled water in a concentration 4 mg/ml were spotted on nitrocellulose membranes (0.45 µm pore size), incubated with blocking buffer (0.5% BSA, 1.5% ovalbumin in TBS-0.1% Tween 20) for 1 h and then with diluted sera (1:50) in blocking buffer at 4°C overnight. After three washes with TBS-0.1% Tween 20 pH 7.3, a solution of anti-human IgG (γ) peroxidase goat conjugated antibodies diluted 1:800 in blocking buffer was added and allowed to react for 1 h. The membranes were washed and the colour was developed by adding 4-chloro-1-naphthol as substrate.

Inhibition assays

Anti-La/SSB-positive sera reacting with the four synthetic B cell epitope analogues in dilutions 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 were incubated with the soluble peptides (0, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 200 µg/ml) overnight at 4°C. These mixtures were tested against the peptide-coated ELISA plates.

An anti-La/SSB-positive serum from a pSS patient, with high anti-La/SSB activity, reacting with all four synthetic epitope analogues, was incubated with the peptides 145–164aa, 289–308aa and a mixture of peptides 145–164aa, 289–308aa, 301–318aa and 349–364aa in concentrations of 0, 0.01, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 µg/ml each for 3 h at 37°C and overnight at 4°C. Afterwards they were tested in an anti-La/SSB ELISA (Shield Diagnostics, Diastat, UK) according to manufacturer's instructions.

Two other anti-La/SSB-positive sera were incubated with the SOC₄-(349–364aa) peptide in concentrations 0, 0.01, 0.5, 1, 5, 10, 50 µg/ml overnight at 4°C. Sera preincubated with the synthetic peptide were tested against the recombinant La protein and the La C-terminus. Recombinant La protein and La C-terminus were coated in a concentration of 5 µg/ml.

Intra-assay/interassay specificity and sensitivity, statistical analysis

The sensitivity of the ELISAs with the synthetic peptides was calculated as follows: sensitivity (%) = (number of positive samples/total samples) × 100. The specificity was calculated according to the formula: specificity (%) = (1 – number of positive disease controls/number of total disease controls) × 100.

RESULTS

Homologous inhibition

Preincubation of sera, specific for the antigenic peptides 301–318 (18aa), 349–364 (16aa), 145–164 (20aa) and 289–308 (20aa), with soluble peptides showed the highest homologous inhibition at serum dilutions 1:50, 1:100, 1:200, 1:50, respectively, at a peptide concentration ≥ 50 µg/ml (Fig. 1a).

Preincubation of sera with the synthetic peptides and testing in an anti-La/SSB ELISA showed an inhibition of antibody binding not greater than 60%. Serum preincubated with the mixture of peptides gave a maximum inhibition of 73% (Fig. 1b).

The greatest inhibition of the recombinant La protein and the La C-terminus ELISA, using the SOC₄-(349–364aa) peptide, was 60% and 80%, respectively (Fig. 1c).

Recovery of sensitivity of the two short epitopes

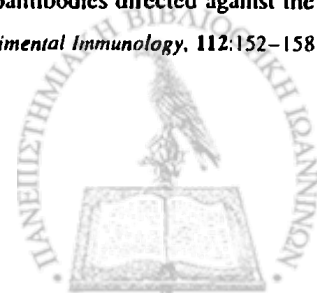
In order to increase the sensitivity, the antigenic peptides 147–154aa and 291–302aa were resynthesized in the initial full length 145–164aa and 289–308aa, respectively, in the biotinylated and non-biotinylated forms. Both forms were tested against the same sera (63 anti-La/SSB-positive, 35 disease controls (all anti-Ro60-kD-positive [7]), 41 healthy blood donor sera) with ELISA. It was found that the two 20mer peptides regained their sensitivity. The epitope TLHKAFKGSIFVVFDSIESA (145–164), which incorporates the previously reported limited epitope HKAFKGS (147–154) (reacting with 30% of sera) was recognized by 49 out of 63 anti-La/SSB-positive sera (78%) (Fig. 2a). Fifty-one out of 63 anti-La/SSB-positive sera reacted with the full length peptide ANGNLQLRNKEVTWEVLEG (289–308) (82.5%), which contained the short epitope NGNLQLRNKEVT (291–302), reacting with 27% of sera (Fig. 2b).

Four sera from the disease control group were found reactive with both 20mer peptides. These four sera have been reported as anti-La/SSB-negative by CIE, but after careful examination with immunoblot two of them (with the higher OD) were found to be anti-La-positive (94.3% specificity for both peptides). Thus, the prevalence of anti-p145–164aa and anti-p289–308aa antibodies among anti-Ro/SSA-positive sera was 5.7%.

Antibody levels against the peptides p145–164 and p289–308 were highly correlated with each other ($r=0.868$, $P<0.001$, concordance 92.1%) There was no correlation of antibody binding between any other combination of peptides. The concordance between peptide-based assays ranged from 64% to 79.4%.

Dot blot using as substrates the La/SSB peptide analogues

The qualitative analysis of the autoantibodies directed against the



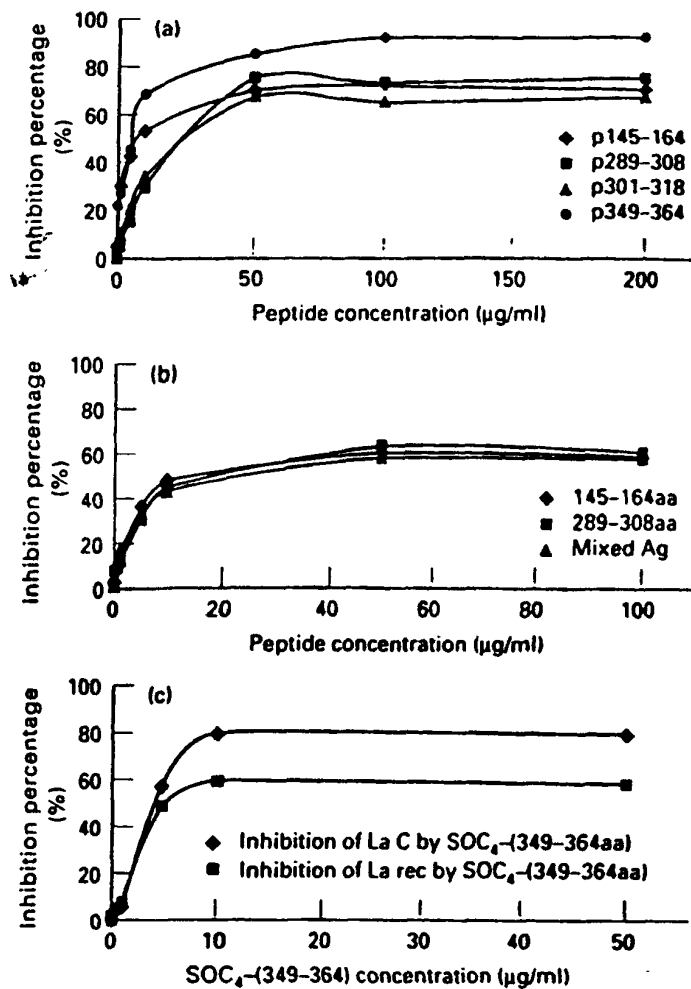


Fig. 1. (a) Homologous inhibition of anti-La/SSB antibodies binding on ELISA plates, coated with p145-164, p289-308, p301-318 and p349-364. The best inhibition values were obtained at sera dilutions: 1:200 for p145-164, 1:50 for p289-308, 1:50 for p301-318 and 1:50 for p349-364. (b) Inhibition of anti-La/SSB antibody binding in anti-La/SSB ELISA, using as inhibitors different concentrations of the synthetic peptides p145-164, p289-308 and a mixture of all four synthetic peptides (each one contributing to the solution by 25%). Anti-La/SSB sera were used in dilution 1:500. (c) Inhibition of antibody binding to recombinant La/SSB protein and La C fragment ELISA, using as inhibitor the synthetic peptide SOC₄-(349-364aa).

short epitopes 147-154 (8aa), 291-302 (12aa), 301-318 (18aa), 349-364 (16aa) and the longer peptides 145-164 (20aa) and 289-308 (20aa) was performed using the dot blot technique.

Sixty out of 63 anti-La/SSB-positive sera (93.6%) bound to the p145-164 (20aa) and 61 out of 63 of these sera (97%) bound the p289-308 (20aa). Forty-six and 59 out of 63 positive anti-La/SSB sera recognized the 301-318 (18aa) and 349-364 (16aa) antigenic peptides, respectively. The interassay concordance in each individual peptide assay was significantly high (81%, 86%, 78% and 89% for the peptides 145-164aa, 289-308aa, 301-318aa and 349-364aa, respectively) (Fig. 3).

The dot blot was more sensitive than ELISA, but with lower specificity (specificity 76% for p145-164, 56% for p289-308, 88% for p301-318 and 72% for p349-364). The p289-308 (20aa) showed the highest sensitivity in dot blot but lower specificity when it was used against disease control sera. The two short

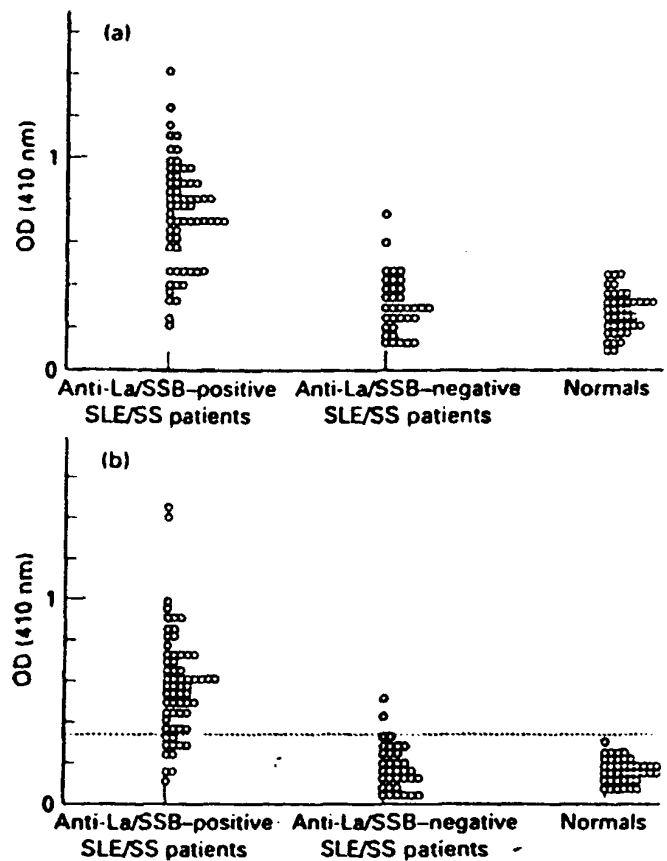


Fig. 2. Prevalence of antibodies to ¹⁴⁵TLHKAFKGSIFVVFDSIESA¹⁶⁴ (a) and ²⁸⁹ANNGLQLRNKEVTWEVLEG¹⁰⁸ (b) synthetic epitope analogues in sera from patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) and systemic lupus erythematosus (SLE) with anti-La/SSB antibodies, patients with pSS and SLE without anti-La/SSB antibodies and normal controls. The cut off point was calculated using the mean optical density (OD) of normal control sera + 3 s.d.

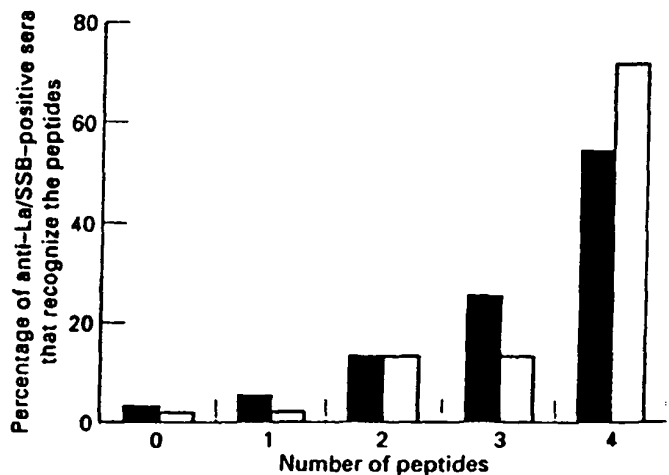


Fig. 3. Comparison of ELISA (■) and dot-blot (□) assays, for the detection of anti-La/SSB antibodies from primary Sjögren's syndrome (pSS) and systemic lupus erythematosus (SLE) patients using synthetic peptides. The numbers on the abscissa represent the number of peptides reacting with each serum. Two out of 63 anti-La/SSB-positive sera (3%) did not react with any of the peptides, while 54% of sera reacted with all four peptides in ELISA. In dot blot one out of 63 (1.6%) serum samples did not react with any of the peptides, while 71% of sera reacted with all four peptides.

peptides 147–154 (8aa) and 291–302 (12aa) showed no reactivity with this technique.

Comparison of the SOC₂-(349–364aa) synthetic epitope analogue with the recombinant La/SSB protein

Fifty-nine anti-La/SSB and anti-Ro/SSA-positive sera, 27 anti-Ro/SSA-positive sera from patients with pSS and SLE as well as 54 normal blood donors were tested by ELISA against recombinant La/SSB (Fig. 4a), La N-terminus, La C-terminus and SOC₂-(349–364aa) synthetic peptide (Fig. 4b). Using a cut off value corresponding to mean OD + 3 s.d., it was found that 88.1%, 83%, 67.8% (not shown) and 88.1% of anti-La/SSB-positive sera reacted with the La/SSB, La N-terminus, La C-terminus and the synthetic peptide, respectively. The synthetic peptide exhibited high specificity (89%), while the recombinant La/SSB, La N-terminus and La C-terminus showed lower specificity (63%, 74% and 67%, respectively).

The sensitivity using recombinant La/SSB or SOC₂-(349–364aa) peptide was almost the same. These assays presented high concordance (80%), but the assay using the synthetic peptide appeared to be more specific. Assays using as antigen the recombinant La/SSB protein or La N-terminus fraction gave high concordance (85%) and high sensitivity.

DISCUSSION

The present study indicates that four synthetic peptide analogues

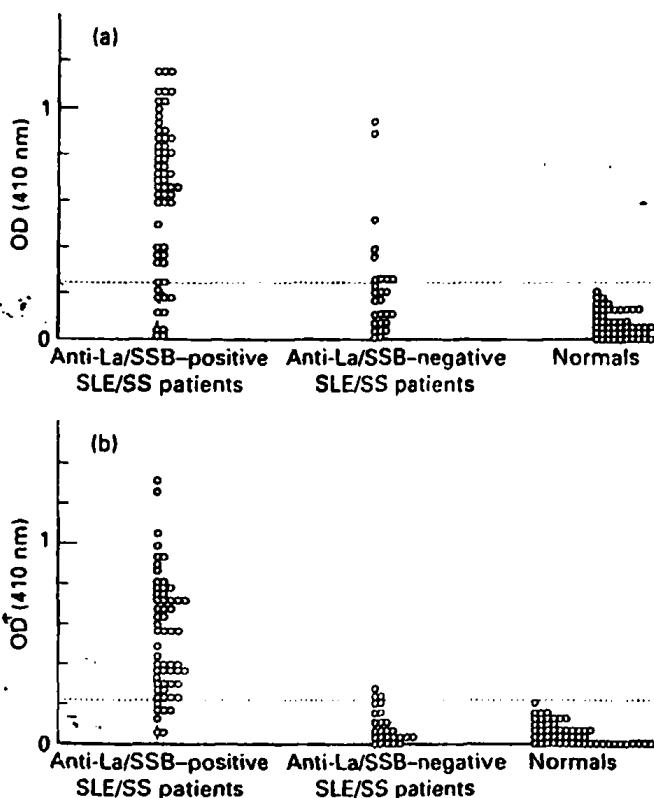


Fig. 4. Prevalence of antibodies to recombinant La/SSB protein (a) and SOC₂-(349–364aa) synthetic epitope analogue (b) in sera from patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) and systemic lupus erythematosus (SLE) with anti-La/SSB antibodies, patients with pSS and SLE without anti-La/SSB antibodies and normal controls. The cut off point was calculated using the mean optical density (OD) of normal control sera + 3 s.d.

corresponding to the previously assigned major linear antigenic epitopes of La/SSB [7] can be used in ELISA and dot blot for the detection of anti-La/SSB antibodies from both pSS and SLE patients. Most healthy controls and disease control sera were found to be negative in these assays. The correlation of ELISA with dot blot and CIE was high: the sensitivity of ELISA, using these peptides as antigens, ranged from 73% to 88.1% and that of dot blot ranged from 73% to 97%.

The dot blot was used as an additional way to confirm the results obtained by ELISA. This method presented higher sensitivity but remarkably lower specificity compared with the ELISA. The short peptides (8aa and 12aa) had no reactivity with this technique, possibly because they were not retained by the 0.45 µm pore size nitrocellulose membrane [20] and/or because of their low antigenicity already evident with the ELISA technique [7]. By contrast, the two 20mer p289–308 and p145–164 peptides and the shorter p301–318 and p349–364 gave high sensitivities.

All 63 anti-La/SSB-positive sera reacted with at least one synthetic epitope analogue. One anti-La/SSB-positive serum did not react in dot blot but was found to be reactive against p349–364, in ELISA. Two other anti-La/SSB-positive sera were negative by ELISA but positive by the p145–164 and p289–308 dot blots. These differences may be explained by interassay variation as well as by differences in the practical approach of each technique.

As shown previously, the restricted epitopes p147–154 and p291–302 presented the lowest antigenicity [7]. Increasing the length of these peptides to the size originally shown to be reactive (20mer peptides) showed a significant recovery of their antigenic properties. This observation can be explained as follows. First, it was shown that substitution of W³⁰³ by alanine resulted in significant loss of antigenicity of the epitope ANNGNLQLRNKEVTWEVLEQ (289–308); this residue was not included in the restricted epitope of the 12aa (291–302). Second, the epitope 145–164 is a part of the RNP motif of the La/SSB protein [21], and it attains a helical conformation containing a β loop structure [7]. It has been postulated that a length greater than 15 residues is rather necessary to stabilize an α helix in water environment [22]. In this regard, the previously synthesized 8mer epitope (147–154) could not adopt the necessary conformation in order to be recognized by the anti-La/SSB antibodies [23]. These two enlarged epitopes inhibited partly the binding of antibodies to native La/SSB protein, being targets for a significant population of anti-La/SSB antibodies.

There was no correlation of antibodies against the peptides 289–308aa and 301–318aa, though these epitopes share 8aa in common. Hence, these regions consist of two different continuous linear epitopes being targets of two distinct antibody populations.

To investigate further the value of these La/SSB synthetic epitope analogues for detecting anti-La/SSB autoantibodies, they were compared with the recombinant La protein and with large fragments of this protein as the antigen. A number of sera were tested against the recombinant native La protein, the La C-terminus part (215aa), the N-terminus fraction of La with a mutation at base pair 640 (nine adenines instead of eight), and with the epitope 349–364aa which presented the highest sensitivity and specificity from previous studies. With the aim of increasing the antigenicity of the 349–364aa epitope, it was anchored on a SOC. Previous studies [8] have shown that this carrier adopts a regular 3₁₀ helical structure, in which the attached antigenic peptides do not interact with each other and retain their original conformation; hence potent antigens can be obtained.

Both the synthetic peptide and the native La protein exhibited the same sensitivity, 88.1%. The concordance between the two assays was also high at 80%, but the synthetic peptide had greater specificity, 89% versus 63%, when anti-Ro-positive but anti-La-negative sera were tested. This observation can be explained in two ways. First, anti-Ro-positive sera may also contain a small amount of anti-La/SSB antibodies, directed against epitopes other than the p349-364 region. Second, false-positive results have been reported in assays using recombinant antigen [25]. This has been attributed to contaminants from the expression system.

A significant number of sera also reacted with the La N-terminus and La C-terminus. It is also interesting that the antigenicity of the two peptides is significantly correlated, implying that the anti-La/SSB sera assay contained constrained autoantibody diversity against these two epitopes. Similar observations have been previously reported [26], suggesting that these epitopes are located on the same exposed portion of the autoantigen, which is recognized by specific autoreactive B cell clones. These results, in conjunction with the high inhibition level produced by the peptide against the native La protein, suggest that the detection of anti-La antibodies using synthetic peptide epitopes presents the same sensitivity as the recombinant protein. In addition, it is confirmed that a large panel of anti-La sera contains antibodies also directed against the mutated N-terminus of the autoantigen [18].

The concordance between SOC₁-(349-364aa) and the La C-terminus was low (56%), despite the fact that the peptide is part of this region. Three sera reacted with the synthetic peptide but they did not bind to recombinant La or any of its fractions. On the other hand, five sera did not react with the synthetic peptide, but they reacted with all recombinant proteins, so it is very probable that antibodies against conformational epitopes occur in these sera. The majority of anti-La/SSB-positive sera reacted with the peptide but not with the recombinant La C-terminus, suggesting that these antibodies are directed towards denatured or degraded parts of La/SSB, rather than the whole molecule. Hence, the 349-364 peptide is the major epitope of La/SSB in its carboxyterminus end.

The use of small length antigenic peptides to detect anti-La/SSB antibodies has been tested in a few previous studies. The failure of binding of anti-La/SSB human positive sera to synthetic La peptides reported previously [26] was probably due to an incomplete survey of sequential epitopes, excluding peptides that we found to be reactive. These four antigenic La peptides proved to be very sensitive and highly specific using the ELISA and dot blot. Their solubility, high sensitivity and specificity, and easy applicability to the detection of anti-La/SSB antibodies permit their production in large amounts for routine use.

ACKNOWLEDGMENTS

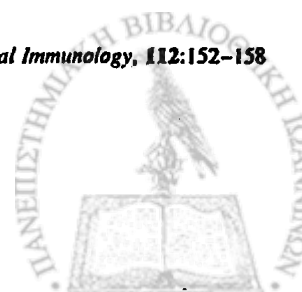
E.E.Y., A.G.T. and J.H. were supported by a grant from the Greek Secretariat of Research and Technology (EKBAN II-45). A.G.T. has been partly supported by a grant from the Hellenic Rheumatology Society.

REFERENCES

- 1 Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune disease and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989; 44:93-151.
- 2 Manoussakis MN, Tzioufas AG, Pange PJE, Moutsopoulos HM. Serological profiles in subgroups of patients with Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 1986; 61:89-92.
- 3 Harley JB, Alexander EL, Bias WB, Fox OF, Provost TT, Reichlin M, Yamagata H, Arnett FC. Anti-Ro (SSA) and anti-La (SS-B) in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1986; 29:196-205.
- 4 Andonopoulos AP, Skopouli FN, Dimou GS, Drosos AA, Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1990; 17:201-4.
- 5 Pruijn GJM. The La (SS-B) antigen. Manual of biological markers of disease. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994; 2:1-14.
- 6 Meilof JF, Bantjes I, De Jong J, Van Dam AP, Smeenk RJT. The detection of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies. A comparison of counterimmunoelectrophoresis with immunoblot, ELISA and RNA-precipitation assays. *J Immunol Methods* 1990; 133:215-26.
- 7 Tzioufas AG, Yiannaki E, Sakarellos-Daitsiotis M, Routsias JG, Sakarellos C, Moutsopoulos HM. Fine specificity of autoantibodies to La/SSB. Epitope mapping molecular mimicry and clinical applications. *Clin Exp Immunol* 1997; 108:191-8.
- 8 Tsikaris V, Sakarellos C, Cung-Thong M, Marraud M, Sakarellos-Daitsiotis M. Concept and design of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC) for covalent attachment of multiple antigenic peptides. *Biopolymer* 1996; 38:291-3.
- 9 Tsikaris V, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Cung MT, Marraud M, Konidou G, Tzinia A, Soteriadou KP. Use of sequential oligopeptide carriers (SOC_n) in the design of potent *Leishmania* gp63 immunogenic peptides. *Peptide Res* 1996; 9:240-7.
- 10 Tsikaris V, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Orlewski P, Marraud M, Cung MT, Vatzaki E, Tzartos S. Construction and application of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC_n) for multiple anchoring of antigenic peptides—application to the acetylcholine receptor (AChR) main immunogenic region. *Biol Macromol* 1996; 19:195-205.
- 11 Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM *et al*. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1993; 36:340-7.
- 12 Tan EM, Cohen AS, Fries JF *et al*. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-77.
- 13 Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *JACS* 1963; 85:2149-54.
- 14 Le-Nguyen D, Heitz A, Castro B. Resin substrates. Part 2. Rapid solid phase synthesis of the ratine sequence tetradecapeptide using BOP reagent. *Chem Soc Perkin Trans* 1987; 1:1915-19.
- 15 Johnson T, Sheppard RC. Resin effects in solid phase peptide synthesis. Enhanced purity of tryptophan-containing peptides through two-step cleavage of side chain protecting groups and peptide-resin linkage. *J Chem Soc Chem Commun* 1991; 1653-5.
- 16 Knorr R, Trzeciak A, Bannwarth W, Gillessen D. New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Let* 1989; 30:1927-30.
- 17 ELISA method using biotinylated peptides. Chiron mimotopes. Pinpoints mimotopes and peptide technology. September 1992.
- 18 Bachmann M, Tröster H, Bartsch H, Grözl D. A frame shift mutation in a hot spot region of the nuclear autoantigen La/SS-B. *J Autoimmun* 1996; 9:747-56.
- 19 Tröster H, Metzger TE, Semsei I, Schwemmler M, Winterpacht A, Zabel B, Bachmann M. One gene, two transcripts: isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-B from a cDNA library of a patient with primary Sjögren's syndrome. *J Exp Med* 1994; 180:2059-69.
- 20 Stott DI. Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Methods* 1989; 119:153-87.
- 21 Chan EKL, Sullivan KF, Tan EM. Ribonucleoprotein SS-B/La belongs to a protein family with consensus sequences for RNA-binding. *Nucl Acid Res* 1989; 17:2233-44.
- 22 Leach SJ. How antigenic are antigenic peptides? *Biopolymers* 1983; 22:425-40.



- 23 Berzofsky JA. Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *Science* 1985; 229:932-40.
- 24 Bini P, Chu JL, Okolo C, Elkon K. Analysis of autoantibodies to recombinant La (SS-B) peptides in systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome. *J Clin Invest* 1990; 85:325-33.
- 25 Rothfield N, Whitaker D, Bordwell B, Weiner E, Senecal JL, Earshaw W. Detection of anticentromere antibodies using cloned autoantigen. CENP-B. *Arthritis Rheum* 1987; 30:1416-9.
- 26 St Clair EN, Burch JA, Ward MM, Keene JD, Pisetsky DS. Temporal correlation of antibody responses to different epitopes of the human La autoantigen. *J Clin Invest* 1990; 85:515-21.



UNIVERSITY OF IOANNINA
MEDICAL SCHOOL
DEPARTMENT OF INTERNAL MEDICINE
DIVISION OF NEPHROLOGY
DIRECTOR: KONSTANTINOS H. SIAMOPOULOS PROF. OF NEPHROLOGY

**IMMUNOREACTIVE EPITOPES OF
AUTOANTIBODIES.
RESPONSE IN AUTOIMMUNE DISEASES**

EFTHALIA E. YIANNAKI
BIOLOGIST

IOANNINA 1999

