



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ
ΜΕ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΔΙΕΙΣΔΥΣΗΣ ΣΕ ΖΩΝΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΣΑΛΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

2014



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ
ΜΕ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΔΙΕΙΣΔΥΣΗΣ ΣΕ ΖΩΝΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΣΑΛΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

2014

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

Γιώργος ΘΥΦΡΟΝΙΤΗΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής
Πανεπιστημιούπολη Ιωαννίνων
45110 Ιωάννινα
Τηλ. +30-26510-97123
FAX: +30-26510-97064
E-mail : gthyfron@uoi.gr

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
Αριθμ. Πρωτ. 1291
Ημερομηνία 4-7-2008

Ιωάννινα 4/7/2008

Προς τη Γενική Συνέλευση
του τμήματος ΒΕΤ

Θέμα: Ορισμός συμβουλευτικής επιτροπής και θέματος διδακτορικής διατριβής της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Αγγελικής Σαλή.

Σας παρακαλώ όπως προχωρήσετε στις απαραίτητες ενέργειες για τον ορισμό Συμβουλευτικής επιτροπής και θέματος Διδακτορικής Διατριβής της μεταπτυχιακής φοιτήτριας κ. Αγγελικής Σαλή για την οποία έχω οριστεί επιβλέπων καθηγητής.

Προτεινόμενο θέμα: Μελέτη της βιολογικής δράσης μονοκλωνικών αντισωμάτων που διεισδύουν σε ζωντανά κύτταρα.

Προτεινόμενη Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Θυφρονίτης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής, τμήματος ΒΕΤ
Λυμπέρη Πηγή, Ερευνήτρια Α', Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
Μαμαλάκη Αυγή, Ερευνήτρια Α', Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Με τιμή

Γ. Θυφρονίτης

Προσωρινή Γ.Σ. αριθμ. 119/4-7-2008

Ιωάννινα, 24 Ιουνίου 2014
Αριθμ. Πρωτ.: 516

Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 451 10
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 07265, 07294
FAX: (26510) 07064
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ: Άννα Υφαντή

Προς τους κ.κ.

1. **Θυφρονίτη Γεώργιο,**
Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήματος Βιολογικών
Εφαρμογών & Τεχνολογιών
Παν/μίου Ιωαννίνων.
2. **Λυμπέρη Πηγή,** Ερευνήτρια Α',
Ελληνικό Ινστιτούτο ΠΑΣΤΕΡ.
3. **Μαμαλάκη Αυγή,** Ερευνήτρια
Α', Ελληνικό Ινστιτούτο
ΠΑΣΤΕΡ.
4. **Γεωργοπούλου Ουρανία,**
Ερευνήτρια Β', Ελληνικό
Ινστιτούτο ΠΑΣΤΕΡ.
5. **Μιχαηλίδη Θεολόγο,**
Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήματος Βιολογικών
Εφαρμογών και Τεχνολογιών
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
6. **Φώτη Θεόδωρο,** Καθηγητής
Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
7. **Χριστοφορίδη Σάββα,**
Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος
Ιατρικής Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων.

ΘΕΜΑ: «Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής της κα. Αγγελικής Σάλη.

Σας γνωρίζουμε ότι η Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύνοψης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών στη Συνεδρίασή της αριθμ. 215/13-6-14, σας όρισε μέλη της 7μελούς εξεταστικής επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής που εκπόνησε η κα Αγγελική Σάλη με τίτλο «Χαρακτηρισμός και μελέτη της βιολογικής δράσης φυσικών αυτοαντισωμάτων με ικανότητα διείσδυσης σε ζωντανά κύτταρα».

Πρόεδρος της Επιτροπής ορίζεται ο Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος κ. Γεώργιος Θυφρονίτης.

Κοινοποίηση:
- κα Αγγελική Σάλη



Με εντολή του Προέδρου
Η Γραμματέας του Τμήματος

ANNA YΦANTH

Ημερομηνία ορισμού έναρξης της εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής της Βιολόγου Σαλή Αγγελικής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 101^Α/16-11-2007

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 119^Α/04-07-2008

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

-Δρ. Θυφρονίτη Γεώργιο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

-Δρ. Λυμπέρη Πηγή, Ερευνήτρια Α΄, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

-Δρ. Μαμαλάκη Αυγή, Ερευνήτρια Α΄, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 119^Α/04-07-2008

Θέμα: «Χαρακτηρισμός και μελέτη της βιολογικής δράσης φυσικών αυτοαντισωμάτων με ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα».

Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 215^Α/13-6-2014

1. Δρ. Θυφρονίτη Γεώργιο, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Πρόεδρος της Επιτροπής
2. Δρ. Λυμπέρη Πηγή, Ερευνήτρια Α΄, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Μέλος.
3. Δρ. Μαμαλάκη Αυγή, Ερευνήτρια Α΄, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Μέλος.
4. Δρ. Γεωργοπούλου Ουρανία, Ερευνήτρια Β΄, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Μέλος.
5. Δρ. Μιχαηλίδη Θεολόγο, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος.
6. Δρ. Φώτση Θεόδωρο, Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος.
7. Δρ. Χριστοφορίδη Σάββα, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΔΕΚΑ» στις 28-07-2014

Ο Πρόεδρος του Τμήματος
Θεώνη Τράγκα

Η Γραμματέας του Τμήματος
Άννα Υφαντή

ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η υποψήφια έλαβε δυο υποτροφίες κατόπιν γραπτών εξετάσεων από:

1. Το κληροδότημα 'Ζωής Σούτσου', που διαχειρίζεται το Υπουργείο Παιδείας και Θρησκευμάτων, για το ακαδημαϊκό έτος 2007-2008.
2. Το κληροδότημα 'Νικόλαου Δ. Χρυσοβέργη', που διαχειρίζεται το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών, για τα ακαδημαϊκά έτη 2009-2012.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	1
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. ΦΥΣΙΚΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (NAbs)

Εισαγωγή.....	9
1. Φυσική Αυτοανοσία-NAbs.....	13
2. Ανακάλυψη των NAbs.....	16
3. Παρουσία των NAbs στη εξέλιξη.....	24
4. Χαρακτηριστικά των NAbs.....	29
4.1. Κύτταρα που τα παράγουν.....	29
4.1.1. Λεμφοκύτταρα B-1.....	32
4.1.2. Λεμφοκύτταρα B-2.....	32
4.1.3. Λεμφοκύτταρα MZ-B.....	33
4.2. Πολυδραστικότητα.....	35
4.2.1. Αλληλουχία μεταβλητής περιοχής.....	37
4.2.2. Τρισδιάστατη δομή μεταβλητής περιοχής.....	41
4.2.3. Αντιγόνα - στόχοι.....	47
5. Βιολογικός ρόλος των NAbs.....	52
5.1. Απομάκρυνση προϊόντων καταβολισμού.....	53
5.2. Δράση έναντι παθογόνων παραγόντων.....	57
5.2.1. Ο συνεργιστικός ρόλος της πρωτεΐνης TRIM21.....	61
5.3. Ανοσορρύθμιση.....	64
5.4. NAbs και παθολογικές καταστάσεις.....	67
6. Εφαρμογές στη βιοϊατρική.....	70
6.1. Ενδοφλέβια Ανοσοσφαιρίνη (IVIg).....	70
6.1.1. Μηχανισμοί δράσης του Fc τμήματος μέσω υποδοχέων.....	73
6.1.2. Αλληλεπίδραση με το σύστημα του συμπληρώματος.....	75
6.1.3. Ρύθμιση της έκφρασης και της λειτουργίας κυτταροκινών.....	76
6.1.4. Εξουδετέρωση αυτοαντισωμάτων.....	77
6.1.5. Ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης.....	78
6.2. Υποπλυθυσμοί της IVIg.....	80
6.2.1. IVIg αντισώματα έναντι ιδιοτύπων.....	81

6.2.2. IVIg αντισώματα έναντι πυρηνικών αντιγόνων.....	82
6.2.3. IVIg αντισώματα έναντι πρωτεϊνών του ορού.....	83
6.2.4. IVIg αντισώματα έναντι λιπιδίων ή υδατανθράκων.....	83
6.2.5. IVIg αντισώματα έναντι μορίων του ανοσιακού συστήματος.....	83
6.2.6. IVIg αντισώματα έναντι μορίων κυταρικής προσκόλλησης.....	85
6.2.7. IVIg αντισώματα έναντι πρωτεϊνών του νευρικού συστήματος.....	86
6.2.8. IVIg αντισώματα έναντι απτενίων.....	87

II. ΚΥΤΤΑΡΟ-ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (CPAbs)

Εισαγωγή.....	89
1. Ανακάλυψη και ιστορία των CPAbs.....	90
2. Χαρακτηριστικά των CPAbs	93
2.1. Αντιγόνα και κύτταρα στόχοι των CPAbs.....	93
2.2. Ενδοκυττάριος εντοπισμός των CPAbs.....	94
2.3. Αλληλουχία της μεταβλητής περιοχής των CPAbs.....	95
3. Μηχανισμοί κυτταρικής διείσδυσης.....	97
3.1. Ενεργο-εξαρτώμενη κυτταρική διείσδυση - Ενδοκυττάρωση.....	98
3.1.1. CPAbs αναγνωρίζουν μόρια της κυτταρικής μεμβράνης που δρούν ως υποδοχείς.....	100
3.1.2. CPAbs αναγνωρίζουν ενδοκυττάρια μόρια που έχουν εναποτεθεί στην κυτταρική επιφάνεια.....	103
3.2. Ενεργο-ανεξάρτητη κυτταρική διείσδυση.....	105
4. Παθοφυσιολογικός ρόλος	106
4.1. Μηχανισμοί επαγωγής απόπτωσης από τα CPAbs	108
4.2. Ρύθμιση της έκφρασης κυταροκινών από τα CPAbs.....	113
4.3. Επίδραση στην ενεργοποίηση κυττάρων από τα CPAbs.....	113
4.4. Άλλες δράσεις.....	114
5. Εφαρμογές των CPAbs στην βιοϊατρική	116
5.1. CPAbs ως θεραπευτικοί παράγοντες.....	117
5.2. CPAbs ως ενδοκυττάριοι μεταφορείς.....	120
5.2.1. Μεταφορά δραστικών-φαρμακευτικών ουσιών.....	121
5.2.2. Μεταφορά πρωτεϊνών.....	122
5.2.3. Μεταφορά γονιδίων.....	123
5.2.4. Μεταφορά ραδιοϊσότοπων.....	124

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ : ΣΚΕΠΤΙΚΟ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΣ

ΣΚΕΠΤΙΚΟ & ΣΤΟΧΟΣ.....	125
------------------------	-----

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

I. ΥΛΙΚΑ

1. Αναλώσιμα.....	130
2. Διαλύματα - Χημικά.....	130
3. Αντιγόνα και χρήση τους	134
4. Ανθρώπινο βιολογικό υλικό μελέτης.....	135
5. Αντισώματα και συζεύγματα.....	135
6. Κυτταρικές σειρές και πειραματόζωα.....	135
7. Συσκευές - Όργανα.....	136

II. ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Κυτταροκαλλιέργεια.....	137
2. Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων - Στάδια.....	138
2.1. Πρωτόκολλο ανοσοποίησης.....	138
2.2. Παραγωγή υβριδωμάτων.....	139
2.3. Υποκλωνισμός υβριδωμάτων.....	141
2.4. Παραγωγή ασκίτη.....	142
3. Απομόνωση αντισωμάτων με χρωματογραφία συγγένειας	143
3.1. Χρωματογραφία συγγένειας με στήλη Πρωτεΐνης A.....	144
3.2. Χρωματογραφία συγγένειας με στήλη Πρωτεΐνης G.....	144
3.3. Χρωματογραφία συγγένειας με στήλη ανοσοπροσροφητών ιστονών, ηπαρίνης και DNA.....	145
3.3.1. Παρασκευή ανοσοπροσροφητών.....	145
3.3.2. Απομόνωση αντισωμάτων σε ανοσοπροσροφητές.....	146
4. Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA).....	146
5. Προσδιορισμός της ενδοκυττάρια συγκέντρωσης από εκχυλίσματα κυττάρων με ELISA.....	147
6. Έλεγχος της διείσδυσης.....	148
6.1. Ανοσοκυτταροχημική Τεχνική - Έμμεσος Ανοσοφθορισμός in vitro.....	148
6.2. Βιντεοσκόπηση της διείσδυσης αντισωμάτων στο Time-lapse Olympus μικροσκόπιο.....	150
6.3. Ενζυμο-ανοσοκυτταροχημική τεχνική.....	150
6.4. Έλεγχος διείσδυσης με κυτταρομετρία ροής (FACS).....	151
7. Έλεγχος έκφρασης του CD 25 με ενεργοποιημένα σπληνοκύτταρα.....	151

8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE).....	152
9. Σύζευξη IgG αντισωμάτων με FITC.....	153
10. Παρασκευή θραυσμάτων F(ab') ₂ με πεψίνη.....	153
11. Ιστολογία.....	153
12. Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....	154
12.1. Δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυττάρων με MTS.....	154
12.2. Δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυττάρων με 5'- βρωμο-2'δεοξυ- ουριδίνης (BrdU).....	155
13. Έλεγχος υδρόλυσης	155
14. Έλεγχος κατακερματισμού του DNA και συμπύκνωσης χρωματίνης.....	156
14.1. Έλεγχος κατακερματισμού του DNA.....	156
14.2. Μελέτη της συμπύκνωσης της χρωματίνης με χρώση Hoechst.....	156

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

I. ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΑΠΟ ΥΓΙΕΙΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΜΕ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

ΔΙΕΙΣΥΣΗΣ - ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ (IVIg)

1. Μελέτη <i>in vitro</i>	158
1.1. Χαρακτηρισμός ως προς την αντισωματική δράση.....	158
1.2. Έλεγχος ως προς τη κυτταρο-δισιδυτική ικανότητα.....	159
1.2.1. Ενδοκυττάριος εντοπισμός της IVIg.....	162
1.2.2. Συγκέντρωση της ενδοκυττάριας IVIg.....	163
1.2.3. Ποσοστό κυττάρων θετικών για ενδοκυττάρια IVIg.....	164
1.3. Μηχανισμός διείσδυσης της IVIg	165
1.4. Απομόνωση υποπληθυσμών της IVIg με κυτταρο-δισιδυτική ικανότητα.....	167
1.4.1. Απομόνωση υποπληθυσμών IgG έναντι ιστονών, ηπαρίνης και DNA..	167
1.4.2. Χαρακτηρισμός ως προς την αντισωματική δράση.....	167
1.4.3. Έλεγχος ως προς την κυτταρο-δισιδυτική ικανότητα.....	169
1.4.3.1. Ενδοκυττάριος εντοπισμός.....	169
1.4.3.2. Συγκέντρωση των ενδοκυττάριας υποπληθυσμών της IVIg.....	170
1.4.3.3. Ποσοστό θετικών κυττάρων	171
1.5. Βιολογική δράση των φυσικών πολυκλωνικών CPAbs	172
1.5.1. Έλεγχος της επίδρασης στην έκφραση λεμφοκυτταρικού δείκτη ενεργοποίησης.....	172
1.5.2. Έλεγχος της επίδρασης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2.	175
2. Μελέτη <i>in vivo</i>	176
2.1. Έλεγχος της κυτταρο-δισιδυτικής ικανότητας της IVIg.....	176

2.1.1. Ενδοκυττάριος εντοπισμός της IVIg.....	176
2.1.2. Ποσοστό θετικών κυττάρων για ενδοκυττάρια IVIg από όργανα.....	178
II. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΑΠΟ ΥΓΙΕΙΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ ΜΕ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΔΙΕΙΣΔΥΣΗΣ	
1. Παραγωγή mAbs ποντικού.....	180
1.1. Ανοσοποίηση με το μόριο της Tg και έλεγχος του τίτλου στον ορο.....	180
1.2. Ιστολογικός έλεγχος των θυρεοειδών αδένων των ανοσοποιημένων ποντικών.....	183
1.3. Παραγωγή υβριδωμάτων.....	184
1.4. Έλεγχος των υβριδωμάτων.....	184
1.4.1. Έλεγχος της αντισωματικής δράσης των υβριδωμάτων.....	184
1.4.2. Έλεγχος της διεισδυτικής ικανότητας των υβριδωμάτων.....	187
1.5. Υποκλωνισμός υβριδωμάτων, μαζική παραγωγή και απομόνωση mAbs.....	187
2. Χαρακτηρισμός των mAbs ως προς τα ανοσολογικά τους χαρακτηριστικά.....	188
3. Έλεγχος των mAbs ως προς τη διεισδυτική ικανότητα	189
3.1. Μηχανισμός διείσδυσης των CPAbs.....	192
4. Βιολογική δράση των μονοκλωνικών φυσικών CPAbs.....	192
4.1. Έλεγχος της επίδρασης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.....	193
4.2. Έλεγχος της υδρόλυσης πλασμιδιακού DNA.....	194
4.3. Έλεγχος κατακερματισμού του γονιμικού DNA.....	197
4.4. Επαγωγή μορφολογικών αλλαγών στον πυρήνα.....	198
ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
Εισαγωγή.....	202
I. ΠΑΡΟΥΣΙΑ CPAbs ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΥΓΙΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ (ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΑ ΦΥΣΙΚΑ CPAbs)	
1. Χαρακτηριστικά πολυκλωνικών φυσικών CPAbs.....	203
2. Βιολογική δράση των πολυκλωνικών φυσικών CPAbs.....	206
II. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ CPAbs ΑΠΟ ΥΓΙΕΙΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ	
1. Χαρακτηριστικά μονοκλωνικών φυσικών CPAbs.....	207
2. Βιολογική δράση των μονοκλωνικών φυσικών CPAbs.....	209
III. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	215

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστερ (ΕΙΠ) σε συνεργασία με το τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων υπό την άμεση καθοδήγηση της διευθύντριας του εργαστηρίου Δρ. Λυμπέρη Πηγή και την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή Δρ. Θυφρονίτη Γεώργιου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Δρ. Θυφρονίτη Γεώργιο, για την ευκαιρία που μου προσέφερε να πραγματοποιήσω τη διατριβή αυτή στο Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Ιωαννίνων. Σε όλη τη διάρκεια της διατριβής, η παρακολούθηση της προόδου μου καθώς και οι συμβουλές του σχετικά με την πορεία και τη σημασία της μελέτης υπήρξαν καθοριστικές. Επίσης, δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω τη φροντίδα του σε οποιοδήποτε γραφειοκρατικό θέμα του τμήματος, που προέκυπτε και απαιτούσε τη φυσική μου παρουσία στο τμήμα, η οποία ήταν αδύνατη λόγω της χιλιομετρικής απόστασης.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου στη Δρ. Λυμπέρη Πηγή που μου υπέδειξε και μου εμπιστεύτηκε το συγκεκριμένο θέμα μελέτης. Η συνεργασία μαζί της αποτέλεσε μία πηγή γνώσεων, κριτικής σκέψης πάνω στην Ανοσολογία και εμβάθυνσης στο γραπτό και προφορικό επιστημονικό μου λόγο. Επίσης, η πολύτιμη υποστηρικτική βοήθεια που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκειά της εκπόνησης της διατριβής με βοήθησε στην επιτυχή ολοκλήρωσή της. Πέρα όμως από το επιστημονικό σκέλος, οι συμβουλές της και οι καθοδηγήσεις για τη ζωή γενικότερα, είναι ανεκτίμητα εφόδια που θα κουβαλάω για πάντα.

Παράλληλα, ως μέλος του εργαστηρίου Ανοσολογίας του ΕΙΠ, είχα την ευκαιρία να συνεργαστώ με έναν διεθνώς καταξιωμένο ερευνητή, τον καθηγητή Αβραμέα Στράτη, ο οποίος καθιέρωσε τα φυσικά αυτοαντισώματα και εμπνεύστηκε την τεχνική της πολυεφαρμοσμένης ELISA. Αστείρευτη πηγή γνώσεων και νέων ιδεών ο καθηγητής Αβραμέας μου προσέφερε πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση και μια εξαιρετική συνεργασία και τον ευχαριστώ θερμά για αυτό. Η πολυετής εμπειρία του στον τομέα της Ανοσολογίας, το ανήσυχο και ανοιχτό, σε νέες ιδέες, επιστημονικό του πνεύμα, αλλά και η ταπεινότητα που τον διέπουν αποτέλεσαν ιδιαίτερη έμπνευση για μένα.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στις ερευνήτριες του ΕΙΠ Δρ. Μαμαλάκη Αυγή και Δρ. Γεωργοπούλου Ουρανία, μέλη της συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής μου, για τη συνολική υποστήριξη στη πρόοδο της διατριβής μου μέχρι και τη τελευταία στιγμή. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου και μέλη ΔΕΠ του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Δρ. Μιχαηλίδη Θεολόγο, Δρ.

Φώτση Θεόδωρο και Δρ. Χρτιστοφορίδη Σάββα για την πολύτιμη συμμετοχή τους και τη συμβολή τους στη διαδικασία αξιολόγησης της εργαςίας μου.

Ακόμη, ευχαριστώ όλα τα μέλη που πέρασαν από το εργαστήριο Ανοσολογίας του ΕΙΠ κατά τη διάρκεια της μελέτης μου και ιδιαίτερα τους υποψήφιους διδάκτορες Χατζηϊωάννου Αικατερίνη, Κάνιστρα Ιωάννη και Ζαννίκου Μαρκέλλα, για την άριστη συνεργασία, την αμοιβαιότητα και το άψογο φιλικό περιβάλλον. Επιπροσθέτως, ευχαριστώ για την καλή συνεργασία τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, παλαιότερα και τωρινά, την ερευνήτρια Δρ. Λιακατά Ελισάβετ, την ειδική λειτουργική επιστήμονα Δρ. Ψαρρού Ευγενία, τον ειδικό τεχνικό επιστήμονα Δρ. Ηλιάδη Πέτρο και τον παρασκευαστή κ. Μπαλάφα Απόστολο.

Επίσης, ευχαριστώ τους φίλους μου για την κατανόηση και την ψυχολογική υποστήριξή τους. Επιπλέον, τίποτα από αυτά δεν θα είχε γίνει χωρίς την υποστήριξη των γονιών μου, Δημήτρη και Κυπαρισσία. Τους οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ, τόσο γιατί στάθηκαν δίπλα μου, ψυχολογικά και οικονομικά, σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, όσο και γιατί με τις δικές τους στερήσεις κατάφερα εγώ να ολοκληρώσω τον κύκλο σπουδών μου.

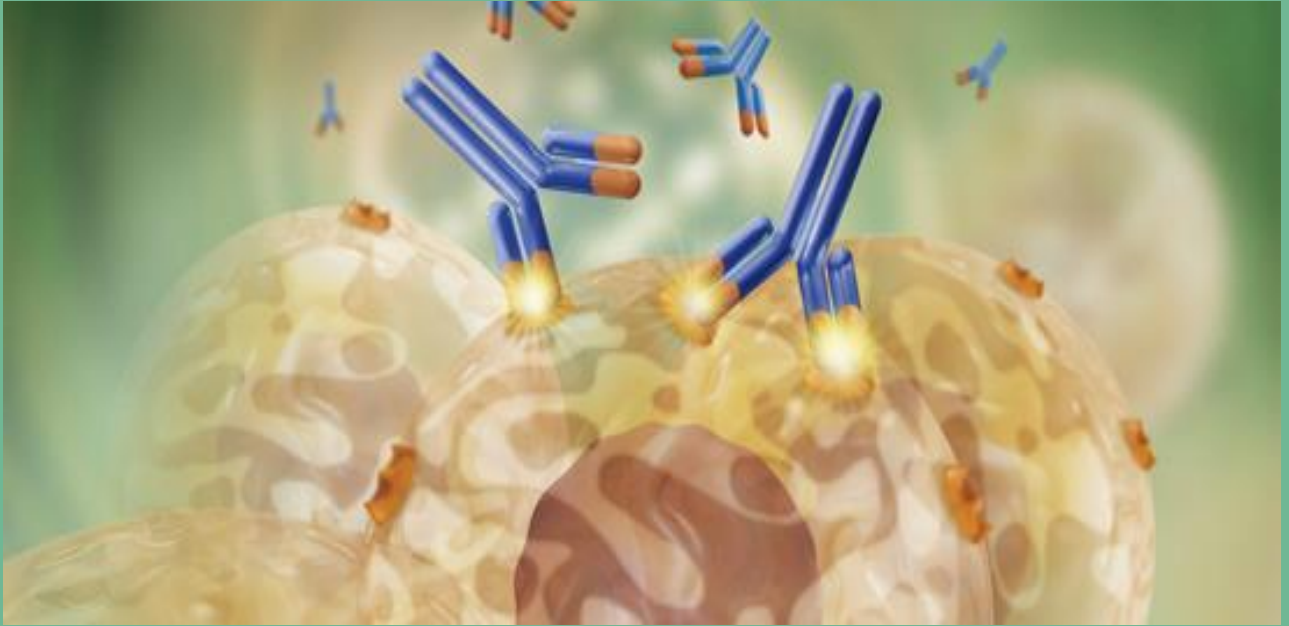
Τέλος, ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στο σύντροφό της ζωής μου Γιώργο, στον οποίο και αφιερώνω το διδακτορικό αυτό, για την πραγματικά τεράστια υπομονή του, αλλά και για την αισιοδοξία που πάντα μου προσέδιδε στις πιο δύσκολες στιγμές μου.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

αAbs:	Αυτοαντισώματα (auto-Antibodies)
ADCC:	Κυτταροτοξικότητα μεσολαβούμενη από αντίσωμα (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)
ANCA:	Κυτταροπλασματικά αντιγόνα ουδετερόφιλων (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antigen)
ANA:	Αντιπυρηνικά αντισώματα (Anti-Nuclear Antibodies)
APC:	Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells)
APS:	Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (Anti-Phospholipids Syndrome)
ΑΣ:	Ανοσιακό σύστημα
BCR:	Υποδοχέας Β-κυττάρων (B-Cell Receptor)
bp:	Ζεύγη βάσεων (base pairs)
BSA:	Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin)
CD:	Cluster of Differentiation
CDR:	Συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές (Complementary Determining Regions)
CPAbs:	Κυτταρο-δισιδητικά αντισώματα (Cell-Penetrating Antibodies)
DCs:	Δενδριτικά κύτταρα (Dendritic cells)
DNA:	Δεσοξυ-ριβονουκλεϊκό οξύ (Deoxyribo-Nucleic Acid)
ds DNA:	Διπλής έλικας DNA
DNP:	Δινιτροφαινόλη (Dinitrophenol)
EDTA:	Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EthyleneDiamine Tetraacetic Acid)
FBS:	Ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum)
Ig:	Ανοσοσφαιρίνη (Immunoglobulin)
IL:	Ιντερλευκίνη (Interleukine)
ITP:	Ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura)
IVIg:	Ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη (Intravenous Immunoglobulin)
mAbs:	Μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal Antibodies)
NAbs:	Φυσικά αντισώματα (Natural Antibodies)
NAAbs:	Φυσικά αυτοαντισώματα (Natural AutoAntibodies)
MFI:	Μέση ένταση φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity)
MHC:	Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility complex)
NF-κB:	Πυρηνικός παράγοντας κB (Nuclear Factor-κB)
PBS:	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphatate Buffered Saline)
RNP:	Ριβονουκλοεοπρωτεΐνη (RiboNucleoProtein)
SCID:	Σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (Severe Combined Immunodeficiency)

SLE: Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (Systemic Lupus erythematosus)
TCR: Υποδοχέας Τ-κυττάρων (T-Cell Receptor)
TLRs: Υποδοχείς ομοιάζοντες με τους υποδοχείς Toll (Toll-like Receptors)
TRIM21: Tripartite Motif-containing 21
TNF: Παράγοντας νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor)
TNP: Τρινιτροφαινόλη (Trinitrophenol)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυσικά αυτοαντισώματα (natural autoantibodies, NAbs) ανευρίσκονται σε υγιείς οργανισμούς, χωρίς προηγούμενη εξωγενή διέγερση, ανήκουν κυρίως στις τάξεις IgM, IgG, και IgA και παίζουν ρόλο στην ανοσορρύθμιση και στην προστασία έναντι παθογόνων παραγόντων. Κύρια χαρακτηριστικά τους είναι η πολυδραστικότητα, αναγνωρίζοντας πολλά διαφορετικά αντιγόνα, «εαυτά» και μη, και η κωδικοποίησή τους, συχνά, από γονίδια της βλαστικής σειράς με λίγες ή καθόλου μεταλλάξεις. Τα χαρακτηριστικά αυτά φέρουν συχνά και τα αυτοαντισώματα με ικανότητα να διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα (cell-penetrating autoantibodies, CPAbs), τα οποία ανευρίσκονται σε αυτοάνοσα νοσήματα. Αυτά έχουν μελετηθεί κυρίως στον ορό ασθενών με Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ) (πολυκλωνικά αντισώματα) αλλά και σε πειραματικά μοντέλα της νόσου (μονοκλωνικά αντισώματα, mAbs), ποτέ όμως στη φυσιολογική κατάσταση. Τα CPAbs είναι τάξης IgG, πολυδραστικά, αναγνωρίζοντας κυρίως το DNA, εντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου και φαίνεται να επεμβαίνουν σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως στην απόπτωση και στην έκφραση κυτταροκινών. Η ύπαρξη κοινών χαρακτηριστικών ανάμεσα σε αυτές τις δύο ομάδες αυτοαντισωμάτων, τα NAbs και τα CPAbs, μας οδήγησε στη παρούσα εργασία με στόχο τη διερεύνηση καταρχήν της ύπαρξης, και στη συνέχεια των ιδιοτήτων των CPAbs σε υγιείς οργανισμούς, στον άνθρωπο και στον ποντικό, σε πολυκλωνικό και μονοκλωνικό επίπεδο, αντίστοιχα.

Ειδικότερα μελετήθηκαν:

- 1) οροί υγιών ατόμων και συγκεκριμένα θεραπευτικά σκευάσματα ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης (intravenous immunoglobulin, IVIg), που προέρχονται από μίγμα ορών πολύ μεγάλου αριθμού υγιών ατόμων (≥ 50.000) και αποτελούν πλούσια πηγή NAbs. Επιπλέον, η IVIg έχει ως γνωστόν ευρεία θεραπευτική εφαρμογή σε ποικίλα νοσήματα.
- 2) mAbs που παρήχθησαν με τη διαδικασία της υβριδοποίησης σπληνοκυττάρων από υγιείς ποντικούς BALB/c με μη εκκριτικά μυελωματικά κύτταρα. Για να ευνοηθεί η παραγωγή IgG NAbs και όχι IgM (που συνήθως προκύπτουν από σπληνοκύτταρα μη ανοσοποιημένων ποντικών) προηγήθηκε ανοσοποίηση με θυρεοσφαιρίνη παρουσία ανοσοενισχυτικού.

Τα κύρια ευρήματα συνοψίζονται ως εξής:

1. Προσδιορίστηκαν και απομονώθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα (IgG) από τον ορό υγιών ανθρώπων (IVIg) με:

- α) αντιγόνο στόχο τις ιστόνες, την ηπαρίνη και το DNA και βρέθηκαν να είναι πολυδραστικά.

- β) ικανότητα να διεισδύουν, *in vitro*, σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, καθώς και *in vivo* σε κύτταρα από διάφορα όργανα ποντικών που έλαβαν ενδοφλέβια IVIg (ήπαρ, νεφρό, σπλήνας, πνεύμονας, καρδιά και εγκέφαλο). Σε όλους τους τύπους κυττάρων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, η IVIg εντοπιζόταν στο κυτταρόπλασμα και η ιδιότητα αυτή ήταν εξαρτώμενη από τη μεταβλητή περιοχή F(ab')₂.
- γ) βιολογική δράση, *in vitro*, αφού αναστέλλουν την έκφραση του λεμφοκυτταρικού δείκτη ενεργοποίησης CD25 στα σπληνοκύτταρα.

2. Παρασκευάστηκαν και απομονώθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα (τάξης IgG) από υγιείς ποντικούς με:

- α) ικανότητα να διεισδύουν, *in vitro*, σε ζώντα κύτταρα διαφορετικών σειρών και να εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και λιγότερο συχνά στον πυρηνίσκο. Τα mAbs αυτά ανήκαν στις υποτάξεις IgG1 και IgG2b, και ήταν πολυδραστικά.
- β) βιολογική δράση, *in vitro*, αφού ορισμένα από αυτά υδρολύουν το πλασμιδιακό DNA (pBluescript), κατακερματίζουν το γενωμικό DNA και επάγουν μορφολογικές αλλαγές στον πυρήνα των κυττάρων HeLa.

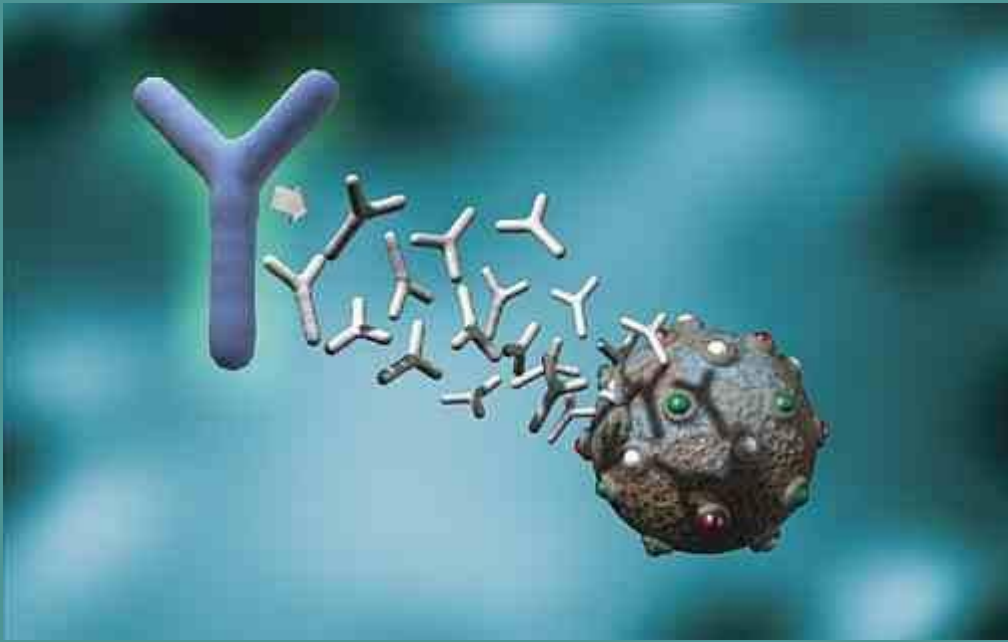
Κύρια συμπεράσματα:

- Τεκμηριώνεται για πρώτη φορά η παρουσία φυσικών CPAbs σε υγιείς ανθρώπους και ποντικούς, τόσο σε πολυκλωνικό όσο και σε μονοκλωνικό επίπεδο. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα φυσικά CPAbs παρουσίαζαν διακριτά χαρακτηριστικά ως προς την κυτταρική διείσδυση και τη βιολογική δράση.
- Αποδεικνύεται μια βασική διαφορά ανάμεσα στα φυσικά και στα παθολογικά CPAbs, αυτή του ενδοκυτταρικού εντοπισμού τους. Τα πρώτα εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, σε αντίθεση με τα μέχρι σήμερα γνωστά CPAbs στον ΣΕΛ που εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων. Πολύ πιθανά αυτή η διαφορά στην ενδοκυτταρική συσσώρευση των CPAbs να σχετίζεται με το ρόλο τους, ο οποίος στα παθολογικά CPAbs συνδέεται με την παθογένεια της νόσου ΣΕΛ, ενώ στα φυσικά μένει να διερευνηθεί αν συνδέεται ή όχι με τη φυσιολογία του οργανισμού.

Μακροπρόθεσμα, τα φυσικά CPAbs μπορεί να βρουν εφαρμογές στη βιοϊατρική, για τη χρήση τους ως θεραπευτικοί παράγοντες τόσο *per se*, όσο και σαν ενδοκυττάριοι μεταφορείς δραστικών ουσιών, με στόχευση στο κυτταρόπλασμα, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που αντενδεικνύεται η πυρηνική στόχευση. Τέτοια εργαλεία μπορεί να είναι, είτε τα μονοκλωνικά φυσικά CPAbs της μελέτης μετά από εξανθρωποποίηση, είτε νέα αντίστοιχα μονοκλωνικά ανθρώπινης προέλευσης. Επίσης, η νέα γνώση που κατακτήθηκε για το εμπορικό σκεύασμα της IVIg, μπορεί μελλοντικά να οδηγήσει στην παραγωγή νέων ενισχυμένων σε δράση σκευασμάτων—εμπλουτισμένα με τα φυσικά CPAbs. Τέλος, ένα νέο πεδίο βασικής έρευνας ανοίγεται για την περαιτέρω διερεύνηση τόσο του ρόλου των

φυσικών CPAbs, όσο και της σχέσης μεταξύ των δύο διαφορετικών ομάδων, εάν δηλαδή τα κύτταρα που παράγουν φυσικά CPAbs συνιστούν τους πρόδρομους αυτών που παράγουν παθολογικά CPAbs.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ



ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. ΦΥΣΙΚΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (NAbs)

Εισαγωγή

Φυσικά ή φυσιολογικά αντισώματα (Naturally- or physiologically-occurring Antibodies, NAbs), είναι τα αντισώματα που ανευρίσκονται σε υγιείς οργανισμούς και παράγονται χωρίς προηγούμενη σκόπιμη εξωγενή διέγερση (επιμόλυνση, εμβολιασμό, σκόπιμη ανοσοποίηση ή άλλη εξωγενή έκθεση αντιγόνου) [1]. Μελέτες έδειξαν ότι αυτά ανιχνεύονται ακόμα και σε νεογέννητα ποντίκια ή ποντίκια που γεννήθηκαν και μεγάλωσαν σε συνθήκες αυστηρά απαλλαγμένες από αντιγονικούς και παθογονικούς παράγοντες (germ-free and antigen free mice), χωρίς δηλαδή το ανοσοποιητικό τους να έχει αποκριθεί σε κάποιο αντιγόνο [1]. Τα τελευταία περίπου 30 χρόνια η θεμελίωση της ύπαρξης αυτοαντισωμάτων, όπως π.χ. έναντι αντιγόνων των ερυθροκυττάρων, των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC), κλπ., κατέρριψε οριστικά τη θεωρία ότι τα αντισώματα που αναγνωρίζουν εαυτά συστατικά δεν μπορούν να είναι παρόντα σε φυσιολογικές, μη παθολογικές, καταστάσεις. Παρόλα αυτά μέχρι και το 1970 η πλειοψηφία της επιστημονικής κοινότητας αμφισβητούσε την παρουσία τους και τα κατονόμαζε ως θόρυβο «background noise», ψευδώς θετικά σήματα «false positive», μη ειδική πρόσδεση «non specific», κολλώδη μόρια «sticky molecules» κλπ.

Τα NAbs ανήκουν κυρίως στις τάξεις IgM, IgG και IgA, ενώ έχουν πρόσφατα προσδιοριστεί και NAbs τάξης IgE [2]. Στην πλειοψηφία τους τα NAbs ανευρίσκονται στη κυκλοφορία, καθώς και σε άλλα βιολογικά υγρά, όπως είναι το πρωτόγαλα (colostrum), το σάλιο, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό [9], ενώ υπάρχουν και εργασίες που αναφέρουν ότι NAbs εντοπίζονται σε διάφορους φυσιολογικούς ιστούς, όπως τους σιελογόνους αδένες, τον πλακούντα, τη μήτρα, το πάγκρεας κ.α. [3]. Τα αντισώματα αυτά είναι γνωστά και ως φυσικά αυτοαντισώματα (natural autoantibodies, NAAbs), αφού αναγνωρίζουν ποικίλα εαυτά αντιγόνα, ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια, με εξελικτικά συντηρημένους επιτόπους, όπως η τουμπουλίνη, η ακτίνη, κ.α. [4-6]. Παράλληλα, τα NAbs αναγνωρίζουν και μια σειρά από μη εαυτά, δηλαδή εξωγενή, αντιγόνα με αντιπροσωπευτική ομάδα τα απτένια. Η παράλληλη αναγνώριση όλων αυτών των διαφορετικών δομικά αντιγόνων από τα NAbs ορίζεται ως πολυδραστικότητα ή πολυειδικότητα και χαρακτηρίζεται από διαφορετικού βαθμού συγγένεια για το κάθε αντιγόνο. Συνήθως, ο βαθμός συγγένειας των NAbs είναι σημαντικά χαμηλότερος από τον αντίστοιχο ενός μονοειδικού αντισώματος (αποκλειστική αναγνώριση ενός αντιγόνου) που έχει προέλθει από υπερανοσοποίηση με ένα αντιγόνο και έχει υποστεί υπερμεταλλάξεις στη μεταβλητή του περιοχή. Παρόλα αυτά, η συγγένεια

των NAbs όπως έχει μελετηθεί *in vitro* δεν αντανάκλα πλήρως τη συγγένεια αυτών όταν βρίσκονται μέσα στον οργανισμό. Εκεί τα NAbs μπορούν να αλληλεπιδρούν, εκτός της τεράστιας συγκέντρωσης επιτόπων και με τρισδιάστατες δομές αλλά και με φορτία, τα οποία δεν μπορούν να αποδοθούν παρά μερικώς στις *in vitro* μελέτες.

Επιπλέον, τα NAbs θεωρούνται μια συνιστώσα μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης γραμμής άμυνας του οργανισμού, σε αντίθεση με τα επαγόμενα αντισώματα, τα οποία αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια μιας επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης και λειτουργούν αποκλειστικά στη δεύτερη γραμμή άμυνας [7]. Μελέτες στα NAbs, έδειξαν ότι αυτά συνεχίζουν να βρίσκονται και σε υπερ-ανοσοποιημένους οργανισμούς και μάλιστα ότι τα B-κύτταρα που τα παράγουν ανιχνεύονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από ότι σε μη ανοσοποιημένους οργανισμούς [8]. Μετά την αποδοχή της παρουσίας των NAbs στις φυσιολογικές καταστάσεις, όλο και μεγαλύτερος αριθμός μελετών αποδεικνύει την παρουσία τους σε παθολογικές καταστάσεις, όπως σε αυτοάνοσα νοσήματα, μολύνσεις από παθογόνους παράγοντες, καρκίνο κ.ά. Αρχικές μελέτες έδειξαν ότι τα B λεμφοκύτταρα που τα εκκρίνουν, φέρουν γονίδια της βλαστικής σειράς, δηλαδή τα NAbs κωδικοποιούνται από μη μεταλλαγμένα γονίδια ή γονίδια που φέρουν ένα μικρό αριθμό μεταλλάξεων (~8 μεταλλάξεις), αν και σχετικά πρόσφατες εργασίες ανέφεραν ότι υπάρχουν και NAbs που κωδικοποιούνται από γονίδια που φέρουν μεγαλύτερο αριθμό μεταλλάξεων (15-20 μεταλλάξεις).

Η παρουσία των NAbs προσδιορίστηκε στη συνέχεια και σε ένα μεγάλο αριθμό φυσιολογικών ζώων, όπως σε χοίρους, ψάρια, καρχαρίες κ.ά., γεγονός που υποδηλώνει τη διατήρηση αυτής της ανοσολογικής ιδιότητας μεταξύ των γναθωτών σπονδυλωτών. Ο αριθμός, η ποικιλομορφία, και η εμφανής εξελικτική διατήρηση των NAbs δείχνουν ότι αυτά διαδραματίζουν ποικίλους και σημαντικούς ρόλους. Μια πλειάδα μελετών έχει προσπαθήσει να ρίξει φως στη σημασία τους, που από ότι φαίνεται είναι πολυδιάστατη, αναδεικνύοντας ρόλους κυρίως ανοσορρυθμιστικούς (εξουδετέρωση αυτοαντισωμάτων, ρύθμιση κυτταροκινών κλπ.), αλλά και άλλους (ως μεταφορείς προϊόντων καταβολισμού-housekeeping). Όλες αυτές οι ιδιότητες των NAbs (**Πίνακας 1**), τα καθιστούν εξαιρετικά ενδιαφέροντα και προσελκύουν την προσοχή των επιστημόνων ερευνητικά τόσο σε επίπεδο βασικής έρευνας (διερεύνηση ρόλων, σημασίας, εξέλιξης), όσο και σε επίπεδο εφαρμοσμένης έρευνας χρησιμοποιώντας τα ως θεραπευτικά και διαγνωστικά εργαλεία.

Πίνακας 1. Ιδιότητες των NAb

Ερωτήματα	Απαντήσεις	Επεξηγήσεις
Τι είναι;	Είναι αντισώματα που ανευρίσκονται σε υγιείς οργανισμούς - σε όλα τα είδη που έχουν ως σήμερα μελετηθεί	Γναθωτά Σπονδυλωτά: από τον καρχαρία έως τον άνθρωπο
Που έχουν εντοπιστεί;	Σε διάφορα βιολογικά υγρά καθώς και σε ιστούς	Στην κυκλοφορία, στο πρωτόγαλα, στο σάλιο, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, στους σιελογόνους αδένες, στον πλακούντα, στη μήτρα, στο πάγκρεας κ.α.
Ποια είναι τα χαρακτηριστικά τους;	Παρουσιάζουν πολυειδικότητα-πολυδραστικότητα, δηλαδή αναγνωρίζουν διαφορετικά, δομικά και μοριακά, αντιγόνα (πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, φωσφολιπίδια και απτένια)	Αναγνωρίζουν: <u>> εαυτά αντιγόνα:</u> α) σημαντικά και φυλογενετικά διατηρημένα συστατικά του οργανισμού (ακτίνη, αλβουμίνη, μυοσίνη, κερατίνη, DNA, RNA, MBP), β) ορμόνες (θυεοσφαιρίνη, ινσουλίνη) γ) μόρια ρυθμιστές (gelectin, ubiquitin, ιντερλευκίνες, ιντερφερόνη, TNF), δ) πρωτεΐνες στρες (HSP40, 47, 60,70) ε) φωσφολιπίδια <u>> εξωγενή αντιγόνα</u> απτένια (DNP, TNP)
	Συχνά κωδικοποιούνται από γονίδια της βλαστικής σειράς	Συνήθως χωρίς ή με ελάχιστες σωματικές μεταλλάξεις στην υπερμεταβλητή τους περιοχή
	Ανήκουν κυρίως σε τρεις τάξεις: IgG, IgM, IgA.	Υπάρχουν πρόσφατες αναφορές και για ισότυπο IgE
Γιατί μας ενδιαφέρουν;	Για τους ρόλους και τις εφαρμογές τους	- Απομάκρυνση παραπροϊόντων καταβολισμού (housekeeping) - Αντιλοιμώδη δράση: έναντι ιών, βακτηρίων κ.α. - Ανοσορρύθμιση (σε αυτοάνοσα, φλεγμονώδη, νοσήματα κ.α.

1. Φυσική Αυτοανοσία - NAbs

Από τον προηγούμενο αιώνα η επιστημονική κοινότητα πραγματευόταν το θέμα της αναγνώρισης των συστατικών του οργανισμού από τον ίδιο τον οργανισμό, χωρίς την επαγωγή παθολογικής κατάστασης, δηλαδή την αναγνώριση του εαυτού ή αλλιώς τη Φυσική Αυτοανοσία. Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες όμως ο όρος της Φυσικής Αυτοανοσίας καθιερώθηκε με μελέτες που περιελάμβαναν τα NAbs προερχόμενα από αυτοδραστικά Β λεμφοκύτταρα, καθώς και με την παρουσία αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων, και μάλιστα με πολυδραστικούς υποδοχείς TCR (T-cell receptor) [9-11]. Τα αυτοδραστικά αυτά λεμφοκύτταρα ανιχνεύονταν όλα ανεξαιρέτως σε φυσιολογικές καταστάσεις και συνεπώς δεν προκαλούσαν βλάβη στον οργανισμό, πάρα το ότι αναγνώριζαν εαυτά συστατικά.

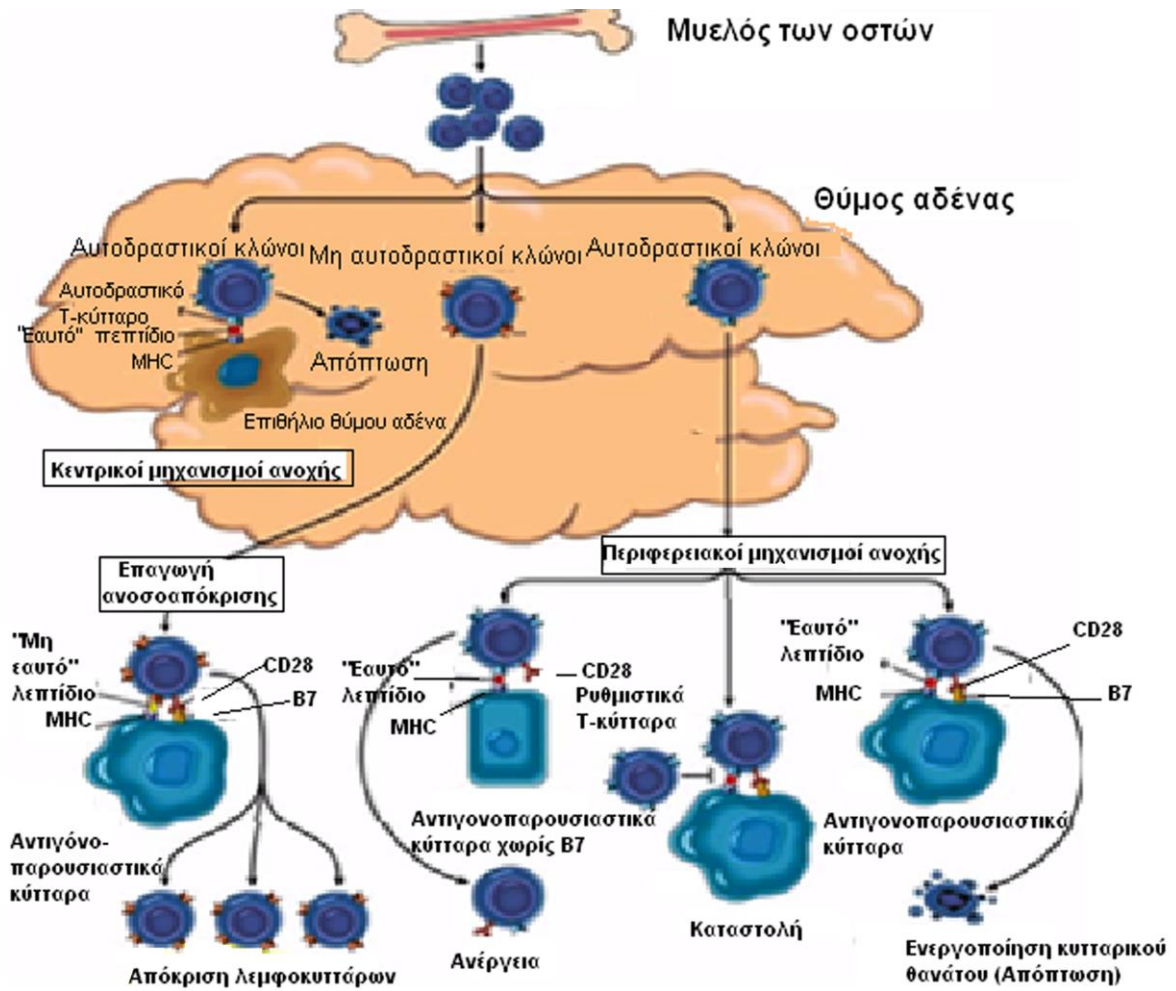
Η ανακάλυψη της Φυσικής Αυτοανοσίας έφερε πάρα πολλές αντιδράσεις, καθώς προκαλούσε ερωτήματα και αμφισβητήσεις για τις ήδη θεμελιωμένες και ευρέως αποδεκτές θεωρίες της Ανοσολογίας, όπως είναι η “εκπαίδευση” του οργανισμού να μην αναγνωρίζει εαυτά συστατικά, ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος εκδήλωσης αυτοάνοσου νοσήματος. Οι θεωρίες της ανοσολογικής αυτοανοχής επέβαλαν λοιπόν την απομάκρυνση και καταστροφή τέτοιων αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, οι μηχανισμοί ανοχής του ανοσιακού συστήματος που είναι ευρέως αποδεκτοί ανήκουν σε δυο κατηγορίες, τους κεντρικούς, που περιλαμβάνουν την αρνητική επιλογή αυτοδραστικών Τ ή Β λεμφοκυττάρων στο θύμο αδένα ή στο μυελό των οστών, αντίστοιχα [12, 13], οδηγώντας τα σε απόπτωση, καθώς και τους περιφερειακούς, όπου τα αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα υπόκεινται σε κλωνική ανέργεια, άγνοια, καταστολή, αναδιοργάνωση των γονιδίων των ελαφριών αλυσίδων τους (receptor editing) και εξάλειψη στους λεμφαδένες της περιφέρειας [14] (**Εικόνα 1.**).

Τα αυτοδραστικά Β λεμφοκύτταρα στην περιφέρεια γίνονται ανεργικά, που σημαίνει μη ευαίσθητα- ενεργοποιούμενα σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο, λόγω της απουσίας ενός συνδιεγερτικού σήματος από τα CD4+ Τ λεμφοκύτταρα. Ανεργικά Β-κύτταρα μπορεί να δεσμεύσουν αντιγόνα, αλλά δεν είναι σε θέση να μεταφέρουν ενδοκυτταρικά σήματα. Μερικά αυτοδραστικά προ-Β λεμφοκύτταρα μπορούν να ξεπεράσουν τους μηχανισμούς της ανοχής, με κίνδυνο ανάπτυξης αυτοανοσίας και να υποστούν αλλαγή τάξης/ισότυπου. Αυτή η αλλαγή τάξης απαιτεί αλληλεπίδραση του CD40-συνδέτη (CD40-ligand) στα Τ λεμφοκύτταρα με το CD40 στα Β λεμφοκύτταρα, οδηγώντας έτσι σε ανασυνδυασμό των γονιδίων. Ο σχηματισμός πλασματοκυττάρων (plasmablasts), που εκκρίνουν αντισώματα, βρίσκεται στη βλαστική περιοχή των λεμφαδένων. Τα πλασματοκύτταρα τυπικά έχουν διάρκεια ζωής μόνο λίγες ημέρες, εκκρίνοντας σημαντικές ποσότητες αντισωμάτων υψηλής συγγένειας. Ωστόσο, ορισμένα πλασματοκύτταρα απέκτησαν την ικανότητα να μεταναστεύουν πίσω στο μυελό των οστών και να παραμένουν εκεί ως μακρόβια

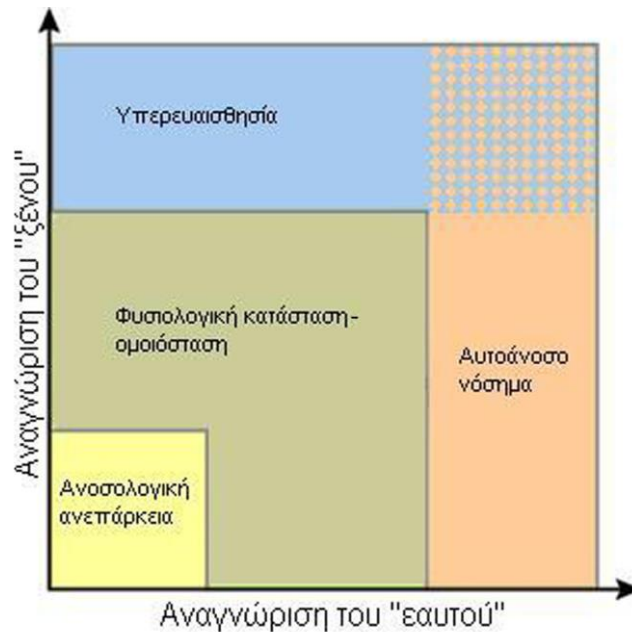
πλασματοκύτταρα, που δέχονται μια αλληλεπίδραση από τον υποδοχέα του παράγοντα ενεργοποίησης B-κυττάρων (BAFF, B-cell activating factor) και από το συνδέτη επαγωγής πολλαπλασιασμού APRIL ή το BAFF επί των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών. Εκτός από το σχηματισμό των πλασματοκυττάρων που εκκρίνουν αντισώματα, μια πρωτογενής απόκριση σε ένα αντιγόνο οδηγεί στο σχηματισμό των B-κυττάρων μνήμης, τα οποία έχουν ένα πολύ χαμηλότερο όριο για την ενεργοποίηση από ότι τα παρθένα/αθώα B-κύτταρα (naive B-cells) και τα οποία μπορεί να μετατραπούν ανεξάρτητα των T-κυττάρων σε πλασματοκύτταρα, που εκκρίνουν αντισώματα όταν υποβάλλονται σε ένα αντιγόνο για δεύτερη φορά.

Οι πρώτες σκέψεις λοιπόν στην ανακάλυψη των φυσικών, μη-παθολογικών, αυτοδραστικών κλώνων ήταν ότι πρέπει να υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί διαφυγής από τους παραπάνω ελέγχους. Αυτοί οι μηχανισμοί εξασφαλιζόνταν από τη χαμηλή συγγένεια για τα εαυτά αντιγόνα που παρουσίαζαν αυτά τα αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα, ή από τη δυνατότητα που είχαν τα αυτοδραστικά B λεμφοκύτταρα στο μυελό των οστών να αναδιοργανώνουν τα γονίδια της ελαφριάς αλυσίδας (receptor editing) για να αποφύγουν την απόπτωση, ή από την ενεργοποίηση με υπεραντιγόνα ανεργικών αυτοδραστικών B λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια. Με αυτούς τους τρόπους λοιπόν τα αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα κατάφεραν και διέφευγαν από τον κεντρικό και περιφερικό έλεγχο και διαπερνούσαν ή παρέμεναν στην κυκλοφορία.

Σήμερα και μετά από μια πληθώρα δημοσιεύσεων σχετικά με το ρόλο -κυρίως ανοσορρυθμιστικό- που τέτοιοι φυσικοί αυτοδραστικοί κλώνοι διαδραματίζουν, η ανοσολογική σκέψη αρχίζει να αποκλίνει από τη θεωρία ότι αυτά κρυφά, ως άλλοι λαθρεπιβάτες, περνούν τους αυστηρούς ελέγχους και βρίσκονται στην κυκλοφορία και αρχίζει να συγκλίνει περισσότερο με τη θεωρία ότι απαραίτητοι μηχανισμοί επιτρέπουν και προωθούν την παρουσία τέτοιων κλώνων ώστε αυτά να επιβλέπουν ανοσολογικά τον οργανισμό και να τον προφυλάσσουν από οποιαδήποτε απορρύθμιση του ανοσιακού συστήματος που μπορεί να επιφέρει την Παθολογική Αυτοανοσία (**Εικόνα 2.**).



Εικόνα 1. Κεντρικοί και περιφερικοί μηχανισμοί ανοχής. Στο πάνω μέρος φαίνονται οι κεντρικοί μηχανισμοί ανοχής (στο μυελό των οστών και στο θύμο αδένος) που οδηγούν τα αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα σε απόπτωση ή σε αναδιοργάνωση του υποδοχέα τους (στην περίπτωση των Β λεμφοκυττάρων) και τα μη-αυτοδραστικά στην περιφέρεια για την υποβολή τους στη διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης. Στο δεύτερο μέρος στους περιφερικούς λεμφαδένες συμβαίνουν οι περιφερικοί μηχανισμοί άμυνας οδηγώντας τυχόν διαφυγόντα λεμφοκύτταρα σε ανέργεια, καταστολή ή απόπτωση.



Εικόνα 2. Η φυσιολογική ανοσολογική ομοιόσταση. Η ομοιόσταση συνίσταται στην ισορροπία της αναγνώρισης και διάκρισης του «εαυτού» από το «ξένο». Νόσος προκύπτει όταν υπάρχει ανισορροπία στην απόκριση του ανοσιακού συστήματος: α) η πολύ περιορισμένη αναγνώριση των «ξένων» και «εαυτών» αντιγόνων οδηγεί σε ανοσολογική ανεπάρκεια (κίτρινο), β) η πολύ μεγάλη απόκριση σε μη αυτά αντιγόνα οδηγεί σε αλλεργία ή υπερευαισθησία (μπλε), γ) η πολύ μεγάλη αναγνώριση των εαυτών αντιγόνων οδηγεί σε αυτοάνοσο νόσημα (ροζ).

2. Ανακάλυψη των NAbS

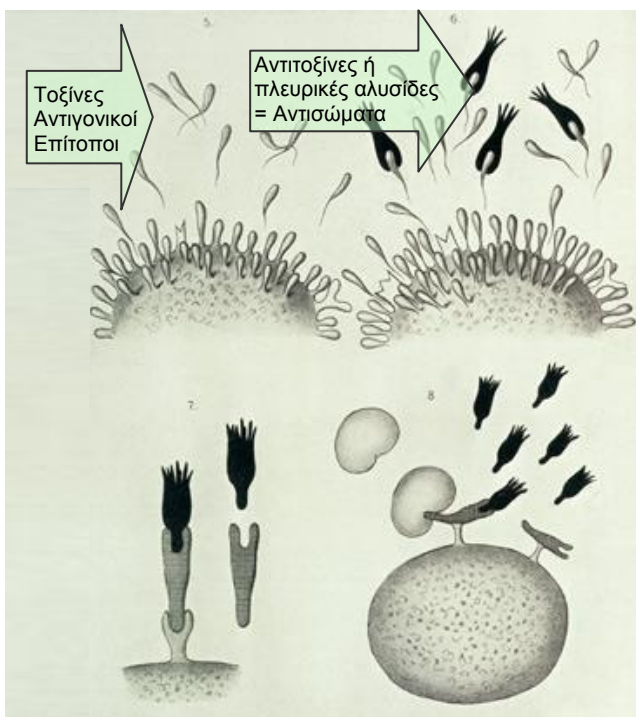
Η ιστορία της ανακάλυψης των φυσικών αντισωμάτων χρονολογείται τόσο παλιά όσο περίπου και η ανακάλυψη του ανοσιακού συστήματος, τότε που ανακαλύφθηκαν αντισώματα έναντι τοξινών, βακτηρίων και ερυθροκυττάρων σε ορούς ανοσοποιημένων αλλά και υγιών οργανισμών [15-17]. Αρχικά, το 1890 ο Kitasato Shibasaburo και ο Emil von Behring άνοιξαν το δρόμο για τη διερεύνηση του χημικού σκέλους της ανοσίας με πειράματα εμβολιασμού ζώων με τη νόσο του τέτανου ή της διφθερίτιδας με ορούς άλλων ζώων που είχαν ευαισθητοποιηθεί από τα αντίστοιχα βακτήρια. Ακολούθησε ο Richard Pfeiffer, που το 1894 μελετώντας το φαινόμενο της βακτηριολύσης που προκαλούσε ο ορός των ζώων τα οποία είχαν εμβολιαστεί με νεκρά βακτήρια χολέρας, συμπέρανε ότι κάποιο συστατικό του αίματος είχε βακτηριοκτόνο δράση [18]. Το 1895 συνέχισε τα πειράματα και διαπίστωσε ότι αναλόγως με το βακτήριο που είχε επιμολύνει το ζώο, ο ορός του ήταν κατά χίλιες φορές πιο αποτελεσματικός στη λύση του αντίστοιχου βακτηρίου συγκριτικά με τον ορό ζώων εμβολιασμένων με άλλο βακτήριο ή ζώων μη εμβολιασμένων. Ήδη με αυτά τα πειράματα ο Pfeiffer είχε διαπιστώσει ότι ο ορός από υγιή ζώα περιέχει κάποια ουσία με βακτηριοκτόνο δράση και ότι αυτή διέφερε από την αντίστοιχη στους ορούς των εμβολιασμένων ζώων. Πρότεινε τότε ότι ο ορός των μη

ανοσοποιημένων οργανισμών περιέχει ουσίες που είναι λιγότερο ειδικές αλλά ανάλογες με τις "εξαιρετικά ειδικές" ουσίες που βρίσκονται στον ορό ανοσοποιημένων ζώων και συμμετέχουν στη διαδικασία καταστροφής βακτηριδίων. Φυσικά, τα συμπεράσματα του Pfeiffer αμφισβητήθηκαν από διάφορους ερευνητές εκείνη την εποχή.

Το 1897 ο Paul Ehrlich θεώρησε ότι στους ορούς μολυσμένων ζώων υπάρχουν κάποιου είδους μόρια που αναγνωρίζουν και καταστρέφουν βακτήρια και βλαβερά σωματίδια και έτσι διατύπωσε τη θεωρία των πλευρικών αλυσίδων (side-chain-theory), δηλαδή διακριτές μοριακές δομές που φέρουν εξειδικευμένους υποδοχείς με ακριβώς την κατάλληλη δομή για να αντιδράσουν με τις βακτηριακές τοξίνες που απελευθερώνονται (**Εικόνα 3.**). Πρότεινε ότι τοξίνη και πλευρική αλυσίδα συνδέονται μαζί όπως το κλειδί σε μια κλειδαριά. Ένα διαφορετικό κλειδί δεν θα ταίριαζε στην ίδια κλειδαριά και αντιστρόφως [17]. Παρά τα αποτελέσματα του Pfeiffer που είχαν προηγηθεί, ο Ehrlich θεώρησε ότι οι πλευρικές αλυσίδες -αντισώματα- δεν υπάρχουν πριν την αντιγονική διέγερση, κάτι με το οποίο ήρθε αντιμέτωπος αργότερα όταν σε πειράματα αιμόλυσης διαπίστωσε ότι οι φυσιολογικοί οροί παρουσίαζαν παρεμφερή αιμολυτική δράση με τους ορούς των ανοσοποιημένων ζώων. Πρότεινε τότε ότι οι αιμολυτικές ιδιότητες των φυσιολογικών ορών πρέπει να οφείλονται σε πιθανές αλλοιώσεις που υφίστανται οι οροί.

Στη συνέχεια, το 1900 ο Ehrlich διατύπωσε τη θεωρία του «Horror Autotoxicus» σύμφωνα με την οποία ήταν επικίνδυνο και τοξικό ένας υγιής οργανισμός να αναγνωρίζει τον εαυτό του. Κατά τη θεωρία αυτή, κάθε οργανισμός έχει τη δική του ταυτότητα και δεν γίνεται τα δικά του συστατικά να την αναγνωρίζουν και κατ' επέκταση να την απειλούν. Αν αυτό συμβεί τότε είναι αποκλειστικά

αποτέλεσμα παθολογικής κατάστασης. Αργότερα, το 1906 ο Ehrlich διατύπωσε μια άλλη θεωρία που αφορούσε τη δημιουργία «μαγικών σφαιρών» (magic bullets) οι οποίες θα



Εικόνα 3. Η υπόθεση των πλευρικών αλυσίδων από τον Paul Ehrlich. Αυτές είναι οι απεικονίσεις του ίδιου του Paul Ehrlich για τις πλευρικές αλυσίδες σε μια από τις διαλέξεις του, όπου η περιγραφόμενη τότε παρουσία τοξινών αντανάκλα την παρουσία αντιγονικών επιτόπων και οι πλευρικές αλυσίδες τα αντισώματα.

ήταν ειδικές να καταστρέφουν παθογόνους οργανισμούς, ενώ δεν θα είχαν καμία συγγένεια για τα φυσιολογικά συστατικά του σώματος και έτσι δεν θα είχαν επιβλαβείς συνέπειες για τον ίδιο τον οργανισμό.

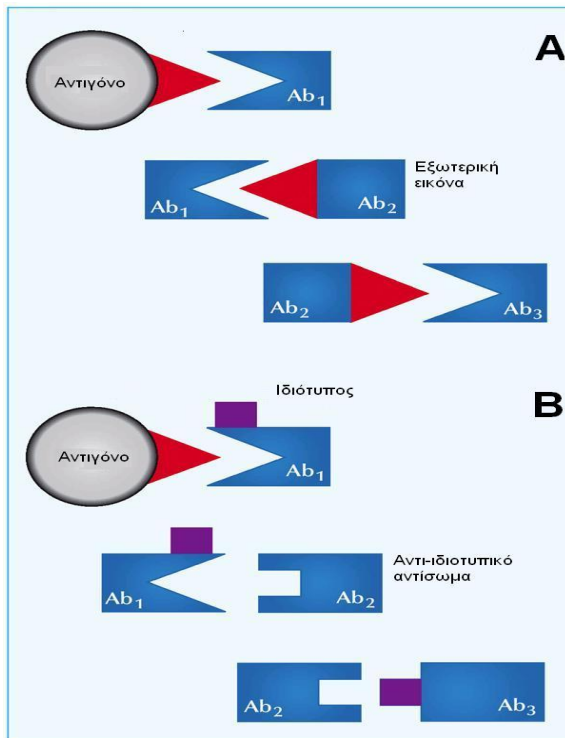
Ο Jules Bordet που περιέγραψε πρώτος το 1896 την παρουσία του συμπληρώματος στον ορό, προχώρησε το 1899 σε ένα πείραμα το οποίο χαρακτήρισε αργότερα ως «αρκετά περίεργο». Για να μελετήσει την αιμοσυγκόλληση (agglutination, κατακρήμνιση ανοσοσυμπλόκων) δοκίμασε να προσθέσει βακτήρια χολέρας στον ορό υγιούς αλόγου και στη συνέχεια στο υπερκείμενο πρόσθεσε βακτήρια χολέρας χωρίς κανένα αποτέλεσμα αιμοσυγκόλλησης, όταν όμως πρόσθεσε βακτήρια τύφου στο ίδιο υπερκείμενο τότε παρατήρησε αιμοσυγκόλληση. Ο Bordet συμπέρανε ότι η εξειδίκευση των αιμοσυγκολλητινών (agglutinins), η οποία χαρακτηρίζει τον ορό των εμβολιασμένων ζώων, υπάρχει ήδη σε μια βασική-βλαστική μορφή (germinal form) και στους ορούς των μη εμβολιασμένων-υγιών ζώων. Υπέθεσε έτσι ότι ο εμβολιασμός έναντι ενός συγκεκριμένου μικροβίου συνοδεύεται από την παραγωγή σε μεγάλη ποσότητα της αντίστοιχης αιμοσυγκολλητίνης, η οποία πρέπει να προϋπάρχει αλλά σε πολύ μικρή ποσότητα. Δύο χρόνια αργότερα, βέβαια ο Bordet άλλαξε την απόφασή του, λέγοντας ότι το "θέμα ήταν πάρα πολύ ασαφές", φοβούμενος και αυτός όπως και άλλοι ερευνητές της εποχής την αμφισβήτηση και τον πιθανό αποκλεισμό τους από την υπόλοιπη επιστημονική κοινότητα.

Ο Karl Landsteiner επηρεασμένος από τη θεωρία του Ehrlich για τη μη ύπαρξη προϋπαρχόντων αντισωμάτων προσπάθησε να εξηγήσει τις διαφορές στις αντιδράσεις που έβλεπε στο φυσιολογικό και στον παθολογικό ορό. Παραλλήλως τις ουσίες του ανοσιακού συστήματος στη φυσιολογική κατάσταση σαν τα γράμματα της αλφαβήτου και τις αντίστοιχες στην παθολογική κατάσταση σαν λέξεις που σχηματίζονται από τα προϋπάρχοντα γράμματα. Ο Landsteiner θεώρησε ότι υπάρχει μια συνέχεια στα συστατικά του ανοσιακού συστήματος μεταξύ φυσιολογικής και παθολογικής κατάστασης, χωρίς η διαφορά μεταξύ τους να είναι ποσοτική. Για πρώτη φορά το 1901 ο Landsteiner χρησιμοποίησε τον όρο «αντισώματα», μετάφραση του γερμανικού όρου *antikörper*, και τότε επίσης ορίστηκαν ως «αντιγόνα» οι ουσίες που προκαλούν την εμφάνιση των αντισωμάτων. Ο Landsteiner πρώτος ανακάλυψε την κατηγοριοποίηση των ομάδων αίματος σύμφωνα με το σύστημα A-B-O μετά την παρατήρηση ότι στους ορούς υγιών ατόμων με ομάδα αίματος A (με αυτοαντιγόνα A στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων) υπάρχουν αντι-B αιμοσυγκολλητίνες (αντισώματα έναντι των B αντιγόνων στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων) και αντιστρόφως. Το έργο του εδραίωσε εκτός των άλλων και την παρουσία σε ορούς από υγιείς οργανισμούς αντισωμάτων με ικανότητα να αντιδρούν με μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών και χημικών συστατικών. Αυτά τα αντισώματα

ονομάστηκαν «κανονικά ή φυσικά αντισώματα», με τον τελευταίο όρο να χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά.

Από το 1900 λοιπόν ο ιατρικός κόσμος γνώριζε ότι ο οργανισμός είχε ένα ολοκληρωμένο σύστημα άμυνας κατά των λοιμώξεων που βασιζόταν στην παραγωγή των αντισωμάτων, ωστόσο, δεν ήξερε ούτε πως ήταν αυτά τα αντισώματα, ούτε πως αλληλεπιδρούσαν με τα αντιγόνα. Το 1926 οι Lloyd D. Felton και G.H Bailey κατάφεραν να προσδιορίσουν ότι τα αντισώματα ανήκουν στις πρωτεΐνες. Οι μελέτες στη συνέχεια επικεντρώθηκαν στο πώς τα αντισώματα αλληλεπιδρούν με τα αντιγόνα. Το 1934 ο John R. Marrack έδωσε τη σωστή εξήγηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος [19]. Ο Marrack διατύπωσε τη θεωρία του δικτύου (lattice theory), η οποία αναφερόταν στο ότι τόσο το αντιγόνο όσο και το αντίσωμα έχουν περισσότερες από μία θέσεις σύνδεσης, έτσι ώστε ένα μόριο αντισώματος να μπορεί να συνδεθεί σε παραπάνω από ένα μόρια αντιγόνου και αντίστροφα.

Το 1955 ο Niels Jerne δημοσίευσε τη θεωρία «της φυσικής επιλογής» (natural selection theory) διατυπώνοντας την άποψη ότι όλα τα αντισώματα σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής και είναι παρόντα στο σώμα κατά τη γέννηση, πρότεινε έτσι ότι όταν ένα αντιγόνο εισέρχεται στο σώμα, δεσμεύεται σε ένα προϋπάρχον συμπληρωματικό αντίσωμα και έτσι διεγείρεται η ταχεία παραγωγή πανομοιότυπων αντισωμάτων [20]. Ενώ το 1974 ο Jerne πρότεινε την θεωρία του «Δικτύου» (Network Theory) ή αλλιώς του «Ιδιοτυπικού Δικτύου» (Βραβείο Nobel, 1984), υποθέτοντας ότι ένα αντίσωμα μπορεί να δεσμεύεται στην αντιγόνο-ειδική μεταβλητή περιοχή ενός άλλου αντισώματος, προκαλώντας ιδιοτυπική-αντι-ιδιοτυπική αλληλεπίδραση [21]. Το ανοσιακό σύστημα θεώρησε ότι αποτελείται από ένα δίκτυο συμπληρωματικών ιδιοτυπικών αντιδράσεων, όπου οι ιδιοτυπικοί καθοριστές των αντισωμάτων μπορούν να μιμηθούν τη δομή εξωγενών αντιγόνων. Το δίκτυο αυτό είναι ιδιαίτερα πολύπλοκο (έκφραση των ιδιοτύπων στα μόρια των αντισωμάτων του ορού και στους υποδοχείς για το αντιγόνο στην επιφάνεια των Β και Τ λεμφοκυττάρων). Έτσι, το ανοσιακό σύστημα διαθέτει μέσω του δικτύου αυτού ένα μηχανισμό αυτορρύθμισης (**Εικόνα 4.**). Τυχόν διαταραχή του, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση ή την καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης. Με αυτή τη θεωρία αναδείχτηκε η Φυσική Αυτοανοσία ως μια συνεχής διαδικασία επιτήρησης και όχι ως μια “ανώμαλη” καταστροφική διαδικασία.



Εικόνα 4. Η θεωρία του ιδιοτυπικού δικτύου του N. Jerne. (a) Η απόκριση σε ένα αντιγόνο οδηγεί στην παραγωγή όχι μόνο των ειδικών για αυτό αντισωμάτων (Ab_1), αλλά και αντισωμάτων που αναγνωρίζουν το Ab_1 (Ab_2). Αυτό συμβαίνει γιατί η θέση δέσμευσης του αντιγόνου του Ab_1 μιμείται τη δομή του αντιγόνου του Ab_2 και έτσι επάγει την παραγωγή του τελευταίου. Αντίστοιχα ακολουθεί η παραγωγή του Ab_3 κ.ο.κ.. Τα Ab_1 και Ab_3 έχουν παρόμοιες ικανότητες δέσμευσης και ορισμένες φορές πανομοιότυπες αμινοξικές αλληλουχίες στη θέση σύνδεσης του αντιγόνου. (b) Όπως επίσης προτείνεται από τον Jerne, ο ιδιότυπος του Ab_1 μπορεί να διεγείρει το ιδιοτυπικό δίκτυο. Έτσι, το ανοσιακό σύστημα διαθέτει μέσω του δικτύου αυτού ένα μηχανισμό αυτορρύθμισης.

Το 1959-1961 η δομή των αντισωμάτων διευκρινίστηκε από τον Rodney R. Porter και Gerald Edelman [22, 23]. Το 1957 ο Frank MacFarlane Burnet διατύπωσε τη θεωρία της «Επιλογής των κλώνων» (clonal selection theory) ή αλλιώς το μηχανισμό ανοχής του ανοσιακού συστήματος. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, οι κλώνοι των λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα, εξαφανίζονται ή αδρανοποιούνται (επιλογή κλώνων ή ανέργεια) στα λεμφικά όργανα μετά το πέρας της εμβρυϊκής ζωής. Ενεργοποίηση 'απαγορευμένων κλώνων' που έχουν διαφύγει της επιλογής έχει σαν συνέπεια την ανάπτυξη αυτοάνοσης παθολογικής κατάστασης [17]. Συνολικά σε όλα τα χρόνια η αναγνώριση του εαυτού από τα ίδια του τα κύτταρα θεωρούνταν «επικίνδυνη» για τον οργανισμό, πιστεύοντας ότι θα καταλήξει σε παθολογική κατάσταση. Αυτή η θεωρία στιγμάτισε την Ανοσολογική σκέψη για πολλά χρόνια, ενώ ενισχύθηκε ιδιαίτερα με τη θεωρία του P. Ehrlich «Horror autotoxicus». Μετά από αυτές τις θεωρίες και ερμηνείες ακολούθησε μια σειρά πειραμάτων με σκοπό να μελετηθούν συστηματικά τα NAbs. Συγκεκριμένα, το 1977 η ομάδα του καθηγητή Stratis Avrameas στην προσπάθεια παραγωγής ειδικών αντισωμάτων έναντι τουμπουλίνης διαπίστωσαν ότι τέτοια αντισώματα υπήρχαν ήδη στον ορό διαφόρων ζώων, χωρίς να έχει προηγηθεί κάποια πειραματική ανοσοποίηση [24]. Το 1981 πάλι από την ίδια επιστημονική ομάδα ακολούθησε η εντόπιση και απομόνωση από φυσιολογικό ορό ανθρώπων, αντισωμάτων έναντι μιας σειράς φυλογενετικά σταθερών αυτοαντιγόνων: τουμπουλίνη, ακτίνη,

θυρεοσφαιρίνη, αλβουμίνη, τρανσφερίνη, κυτόχρωμα C, φετουΐνη και κολλαγόνο. Τα αντισώματα αυτά ανήκαν στις τάξεις των ανοσοσφαιρινών IgG, IgM και IgA. Σε αντίθεση με ό,τι ήταν ως τότε γνωστό για τα πειραματικά επαγόμενα αντισώματα, το κύριο χαρακτηριστικό αυτών των φυσιολογικά ανευρισκόμενων αντισωμάτων ήταν η δυνατότητα να συνδέονται με περισσότερα από ένα αντιγόνα, που πολλές φορές περιελάμβαναν και εαυτά αντιγόνα [25]. Το 1982 ο S. Avrameas πρότεινε ότι τα NAbS αλληλεπιδρώντας με έναν μεγάλο αριθμό εαυτών συστατικών που βρίσκονται στον οργανισμό, δημιουργούν ένα εκτεταμένο δυναμικό δίκτυο/πλέγμα που συμβάλλει στη γενική ομοιοστάση του οργανισμού [26, 27]. Παράλληλα, το 1982 ο H.U. Lutz προσδιόρισε NAbS έναντι των ζωνών 1 και 2 της σπεκτρίνης στον ορό υγιών ατόμων [28]. Το 1988-9 η ομάδα του A.L. Notkins προσπάθησε να χαρακτηρίσει τα B λεμφοκύτταρα που εκκρίνουν NAbS (Leu-1+, CD5+ B λεμφοκύτταρα) [29, 30]. Το 1989 ο Charles Janeway πρότεινε ότι η ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσιακής απόκρισης πρέπει να ελέγχεται από ένα πιο πρωτόγονο έμφυτο ανοσιακό σύστημα. Πρότεινε μια γενική θεωρία της φυσικής ανοσίας (pattern recognition theory) και σύστησε τις αρχές της φυσικής ανοσίας και τη συσχέτισή της με την επίκτητη.

Το 1991 ο S. Avrameas πρότεινε τη θεωρία του «γνώθι σ' εαυτόν» (Natural autoantibodies: from horror autotoxicus to gnothi seauton), που συνοψίζεται στη θεωρία ότι η γνώση του «εαυτού» αποτελεί πρωταρχική ιδιότητα του ανοσιακού συστήματος του οργανισμού, απαραίτητη πριν αναγνωρίσει το «ξένο» [31]. Τα NAbS αναγνωρίζοντας τον «εαυτό» και τον «ξένο» δημιουργούν ένα εκτενές και πολύπλοκο πλέγμα, εξαιτίας της τεράστιας ποικιλίας των αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται και έτσι η ανοσιακή ομοιοστάση του οργανισμού εγκαθιδρύεται. Εδραιώθηκε έτσι η παρουσία των NAbS στον ορό υγιών οργανισμών και προσδιορίστηκε το βασικό χαρακτηριστικό τους, η πολυδραστικότητα, δηλαδή η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με μια μεγάλη ποικιλία μορίων, δομών και αλληλουχιών. Επίσης, έγινε προφανές η παρουσία των NAbS και στο ορό ασθενών όπως και οι μεταβολές στα επίπεδα τους. Τέλος, πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με 600 ορούς ασθενών που έπασχαν από μονοκλωνική γαμμαπάθεια IgG ή μακροσφαιριναιμία Waldenström έδειξαν ότι ορισμένες από τις μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες είχαν ειδικότητες όμοιες με αυτές των NAbS, υποδηλώνοντας ότι σε αυτούς τους ασθενείς, η μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη ανήκε στα NAbS [20, 21]. Μέχρι σήμερα έχει καλά περιγραφεί και μελετηθεί διεξοδικά η παρουσία αυτοδραστικών B λεμφοκυττάρων στον ορό υγιών ανθρώπων και ζώων. Για πολλά χρόνια οι επιστήμονες πίστευαν ότι η παραγωγή των NAbS ήταν κυρίως αποτέλεσμα διασταυρούμενων αντιδράσεων με εξωγενή, περιβαλλοντικά αντιγόνα, ή από μη ειδικούς μηχανισμούς που συνοδεύουν τις ανοσοαποκρίσεις. Πλέον, υπάρχουν αποδείξεις ότι η

αναγνώριση των αυτοαντιγόνων και η παραγωγή αντισωμάτων έναντι αυτών τοποθετείται μέσα στα πλαίσια της φυσιολογικής λειτουργίας του ανοσιακού συστήματος [22] (**Πίνακας 2.**).

Παρά τις τόσες μελέτες ακόμα και σήμερα πολλοί αμφισβητούν τη Φυσική Αυτοανοσία προτείνοντας άλλες θεωρίες όπως η Polly Matzinger που υποστήριξε ότι η ανοσολογική απόκριση εννορηστρώνεται όχι εξαιτίας της γνώσης του εαυτού από την εμβρυική ηλικία αλλά από μια δυναμική και διαρκώς ανανεούμενη απόκριση σε σήματα κινδύνου που προκαλούνται από κυτταρικές-ιστικές βλάβες (danger model, 1994). Άλλοι ερευνητές αναδιατύπωσαν τις ήδη υπάρχουσες θεωρίες για τη Φυσική Αυτοανοσία και τα Φυσικά Αυτοαντισώματα, όπως ο I.Cohen το 1990 που διατύπωσε το “Homunculus” αναφέροντας ότι το ανοσολογικό ρεπερτόριο των υγιών ατόμων περιλαμβάνει μία υψηλή συχνότητα αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων (το ανοσολογικό Homunculus) και ο A.B. Poletaeen που το 2000 ανέφερε το “Immunological Homunculus =Immunculus” που επαναλάμβανε και αυτός την παρουσία των NAb's στους υγιείς οργανισμούς και τις μεταβολές στο σύνολό τους που μπορεί να αντικατοπτρίζουν τη λειτουργικότητα και τις παθοφυσιολογικές διαταραχές στον οργανισμό.

Πίνακας 2. Σημαντικοί σταθμοί στην ιστορία των φυσικών αντισωμάτων.

1890	<p>Emil von Behring & KitasatoShibasaburō</p> 	<p>Αντισωματική δραστικότητα στον ορό υγιών ζώων. Επίδειξη της αντισωματικής δραστικότητας ορών από ανοσοποιημένα και μη ζώα, έναντι της διφθερίτιδας και του τετάνου.</p>
1895	<p>Richard F. J. Pfeiffer</p> 	<p>Βακτηριοκτόνο ουσία στον ορό υγιών ζώων. Διαπίστωση σε πειράματα βακτηριόλυσης, ότι ο ορός υγιών ζώων περιέχει κάποια ουσία με βακτηριοκτόνο δράση "σχετικά σταθερή και λιγότερο δραστική" συγκριτικά με την "εξαιρετικά δραστική" βακτηριοκτόνο ουσία στον ορό ανοσοποιημένων ζώων.</p>
1899	<p>Jules Bordet</p> 	<p>Βασική μορφή εξειδίκευσης αιμοσυγκολλητινών στον ορό υγιών ζώων. Υπόθεση από πειράματα αιμοσυγκόλλησης με φυσιολογικούς ορούς ότι η εξειδίκευση των αιμοσυγκολλητινών (agglutinins), η οποία χαρακτηρίζει τον ορό των εμβολιασμένων ζώων, υπάρχει ήδη σε μια βασική-βλαστική μορφή (germinal from) και στους ορούς των υγιών ζώων.</p>
1900	<p>Paul Erlich</p> 	<p>Θεωρία του "Horror Autotoxicus". Επικίνδυνη η αναγνώριση του εαυτού από τα ίδια του τα συστατικά, όταν συμβεί έχουμε εμφάνιση νόσου.</p>
1901	<p>Karl Landsteiner</p> 	<p>Ορισμός του όρου 'αντισώματος' (antikörper) και κατηγοριοποίηση των ομάδων αίματος. Υγιείς και ασθενείς οργανισμοί φέρουν αντισώματα έναντι των αντιγόνων των ερυθροκυττάρων (ομάδες αίματος ABO).</p>
1934	<p>John R. Marrack</p>	<p>"Lattice theory" – Θεωρία πλέγματος/δικτύου. Αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος με περισσότερες από μία θέσεις αλληλεπίδρασης.</p>
1955	<p>Niels Kaj Jerne</p> 	<p>"Natural selection theory"- Θεωρία της φυσικής επιλογής. Όλα τα αντισώματα επιλέγονται και σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και είναι παρόντα στο σώμα κατά τη γέννηση.</p>
1957	<p>Frank M Burnet</p> 	<p>"Clonal selection theory"- Θεωρία της επιλογής των κλώνων - Μηχανισμός ανοχής. Οι κλώνοι των αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων αυτοαντιγόνα, εξαφανίζονται ή αδρανοποιούνται (εξάλειψη ή ανέργεια) στα λεμφικά όργανα</p>
1974	<p>Niels Kaj Jerne</p>	<p>"Immune Network Hypothesis"- Θεωρία ιδιοτυπικού-αντιιδιοτυπικού δικτύου.</p>
1991	<p>Stratis Avrameas</p> 	<p>"Natural autoantibodies: from "horror autotoxicus" to "gnothi seauton". Ο οργανισμός πρέπει να γνωρίζει τα εαυτά συστατικά και αυτό δεν είναι επικίνδυνο. Τα NABs αλληλεπιδρούν μέσα σε ένα πλέγμα και εγκαθιδρύουν την ομοιόσταση του οργανισμού.</p>

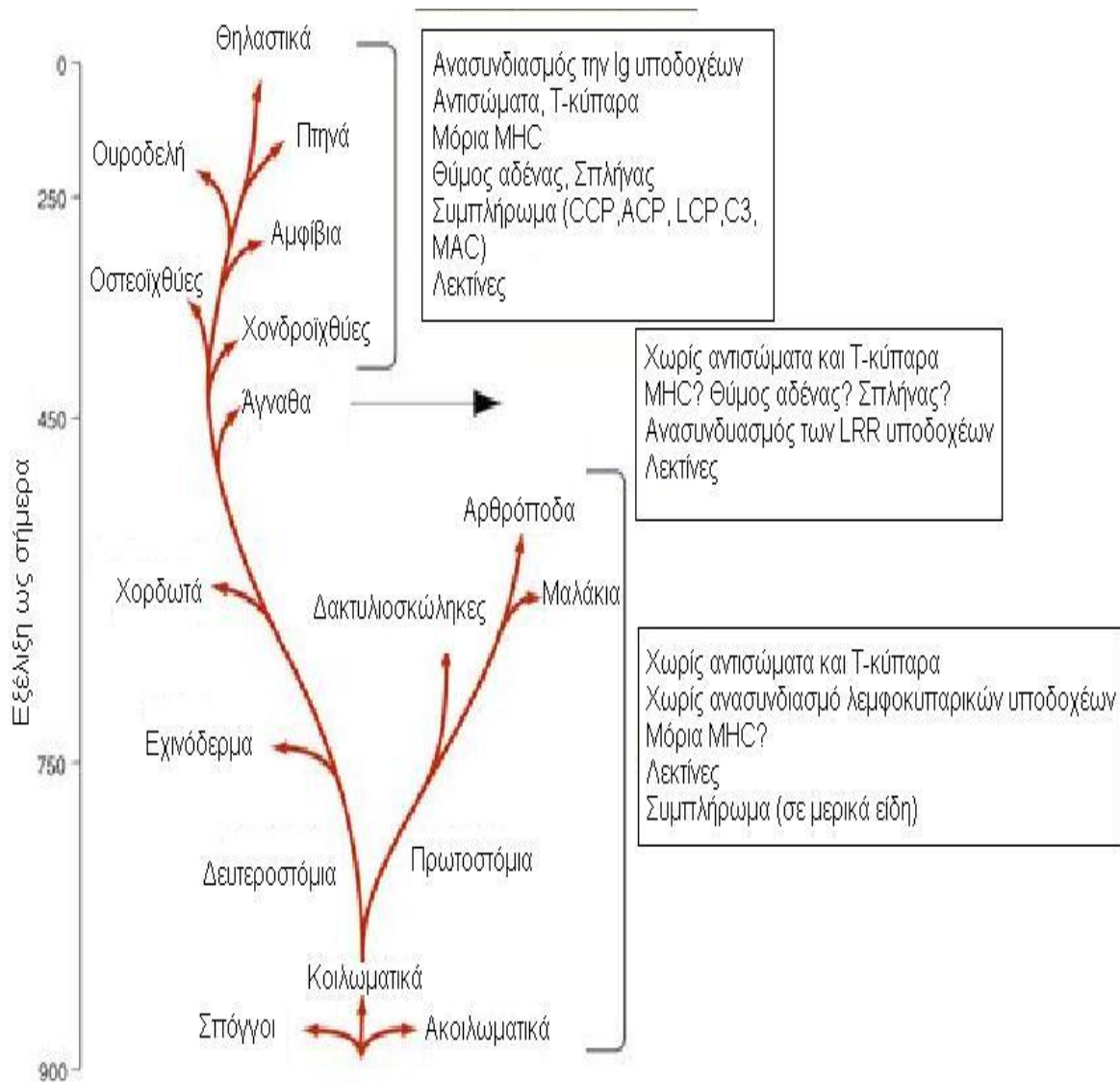
3. Παρουσία των NAbS στην εξέλιξη

Μετά την απομόνωση και το χαρακτηρισμό των NAbS, καθώς και τη διαφοροποίησή τους από τα επαγόμενα αντισώματα ως προς την πολυδραστικότητά τους, προέκυψε μια άλλη θεωρία σχετικά με το διαχωρισμό έμφυτου και επίκτητου ανοσιακού συστήματος. Συγκεκριμένα, μέχρι πρότινος το έμφυτο ανοσιακό σύστημα περιελάμβανε τους μη ειδικούς μηχανισμούς άμυνας (π.χ. φαγοκυττάρωση) και το επίκτητο, τους αντίστοιχους ειδικούς έναντι παθογονικών παραγόντων, οι οποίοι χωρίζονταν σε δύο σκέλη, στο χυμικό σκέλος (αντισώματα, κυτταροκίνες) και στο κυτταρικό (λεμφοκύτταρα). Με την αποδοχή των NAbS προτάθηκε η θεωρία ότι αυτά ανήκουν στην πρώτη γραμμή άμυνας, δηλαδή στην έμφυτη αφού προϋπάρχουν και δεν προκαλούνται από την εισβολή παθογόνων [32].

Το έμφυτο ανοσιακό σύστημα υπάρχει σε όλους τους ασπόνδυλους και σπονδυλωτούς οργανισμούς. Παρά το γεγονός ότι η ζωή άρχισε στη γη περίπου 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια πριν, οι υποδοχείς του ανοσιακού συστήματος που είχαν ικανότητα να ανασυνδυάζονται, όπως οι ανοσοσφαιρίνες (Igs), οι υποδοχείς των T λεμφοκυττάρων (TCR), τα μόρια μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) και τα γονίδια RAG (Recombinase Activator Genes), φαίνεται να προέκυψαν περίπου 450 εκατομμύρια χρόνια πριν, με την εμφάνιση των πρώτων γναθωτών (γναθόστομων) σπονδυλωτών, δηλαδή κατατάσσονται εξελικτικά στο φυλογενετικό επίπεδο των χονδροϊχθύων (καρχαρίες) και έπειτα [33-35] (**Εικόνα 5**). Έτσι το έμφυτο ανοσιακό σύστημα φαίνεται τελικά να βασίζεται σε ένα σύνολο από υποδοχείς που κληρονόμησε και εκφράζονται πάνω σε κύτταρα όπως είναι τα NK (natural killers), τα δενδριτικά, τα μαστικά κύτταρα (mast cells), τα μακροφάγα, τα gd- T- κύτταρα και τα CD5+ B λεμφοκύτταρα που παράγουν φυσικά αντισώματα, και τα οποία αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών αντιγόνων [36]. Επίσης, στα τελευταία συμπεριλαμβάνεται και η οικογένεια των υποδοχέων Toll-like (Toll-like receptors, ομόλογα με την πρωτεΐνη Toll της *Drosophila*), που αναγνωρίζουν εξελικτικά συντηρημένα μοτίβα και εκφράζονται σε ομάδες παθογόνων οργανισμών (**Εικόνα 6**) [37].

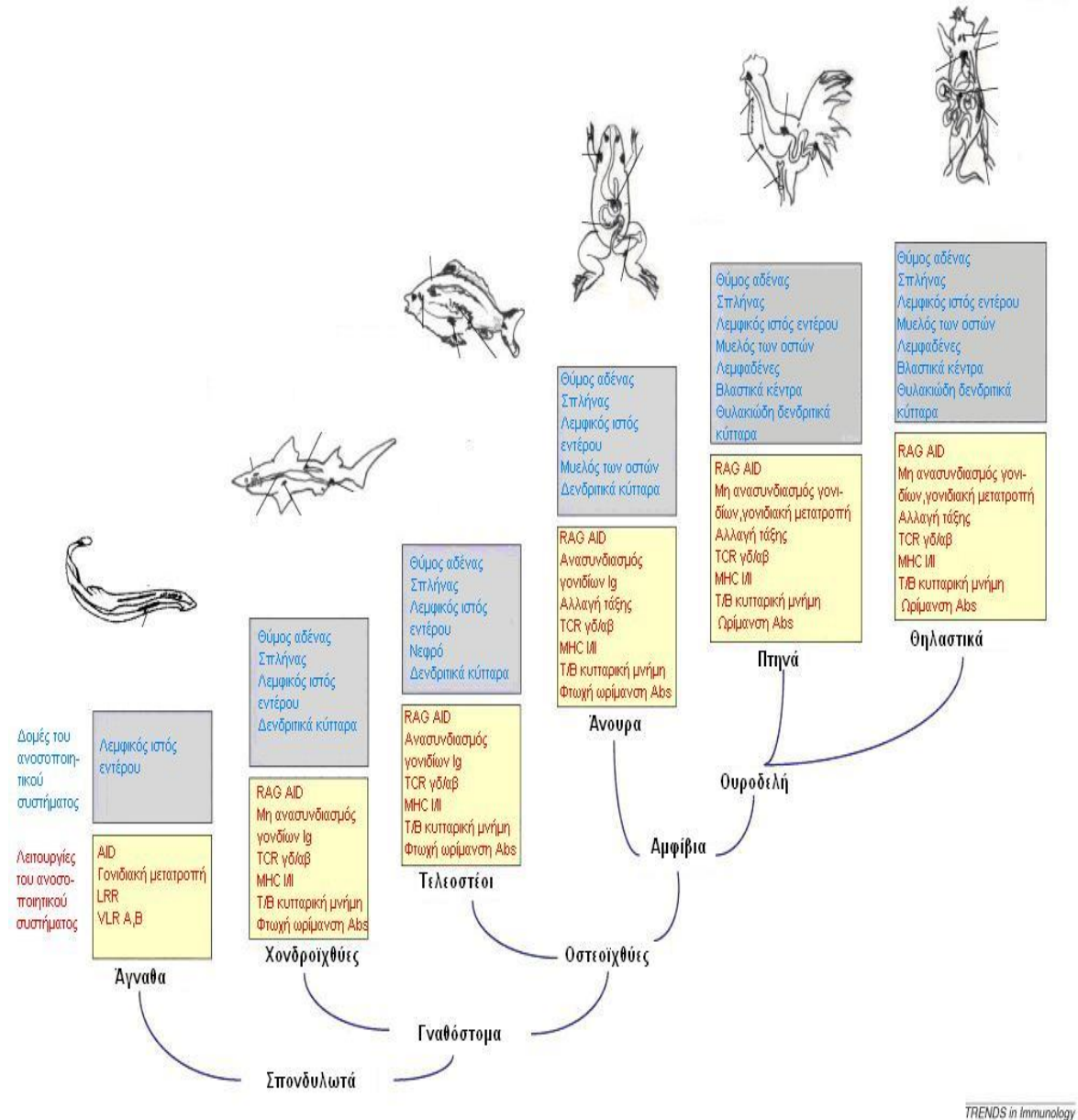
Σε όλα τα είδη ζώων από τα ασπόνδυλα έως και τα σπονδυλωτά βρίσκονται πολυμερή αντισώματα της τάξης IgM που αναγνωρίζουν συγχρόνως εαυτά και ξένα αντιγόνα και άρα φαίνεται αυτός να είναι και ο πιο πρωτόγονος ισότυπος των NAbS. Στα ανώτερα θηλαστικά βρίσκονται επίσης υψηλές συγκεντρώσεις IgG αντισωμάτων που αναγνωρίζουν συγχρόνως εαυτά και ξένα αντιγόνα, και σε χαμηλότερες όμως συγκεντρώσεις, IgA και IgE αντισωμάτων (**Εικόνα 7**) [38]. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η αναγνώριση των αντιγόνων του εαυτού και του ξένου από τον ίδιο ανοσοϋποδοχέα είναι μια λειτουργία του ανοσιακού συστήματος, που διατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της εξελικτικής διαδικασίας. Επίσης, στα ανώτερα θηλαστικά βρίσκονται και μονοειδικά IgG

NAbs που αναγνωρίζουν, είτε αντιγόνα του εαυτού, είτε ξένα, σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις όμως από τα πολυειδικά IgG αντισώματα [38].



Εικόνα 5. Η εξέλιξη του ανοσιακού συστήματος. Μελέτες στο ανοσιακό σύστημα ενός μεγάλου φάσματος σπονδυλωτών και ασπόνδυλων έχουν αποκαλύψει ότι ακόμα και τα πιο πρωτόγονα ασπόνδυλα φέρουν συστατικά έμφυτης ανοσίας (π.χ. αναγνώριση μοτίβων μέσω λεκτίνης και υποδοχέων Toll-like, αντιμικροβιακά πεπτιδία και πρωτεΐνες συμπληρώματος). Το έμφυτο ανοσιακό σύστημα προέκυψε νωρίς στην εξέλιξη των πολυκύτταρων οργανισμών ενώ το επίκτητο εμφανίστηκε μετά την εμφάνιση των καρχαριών. (Συντομογραφίες: ACP, *alternative complement pathway*; CCP, *classic complement pathway*; Ig, *immunoglobulin*; LCP, *lectin-activated complement pathway*; LRR, *leucine-rich repeat domain*; MAC, *membrane attack complex*; MHC, *major histocompatibility complex*) [39].

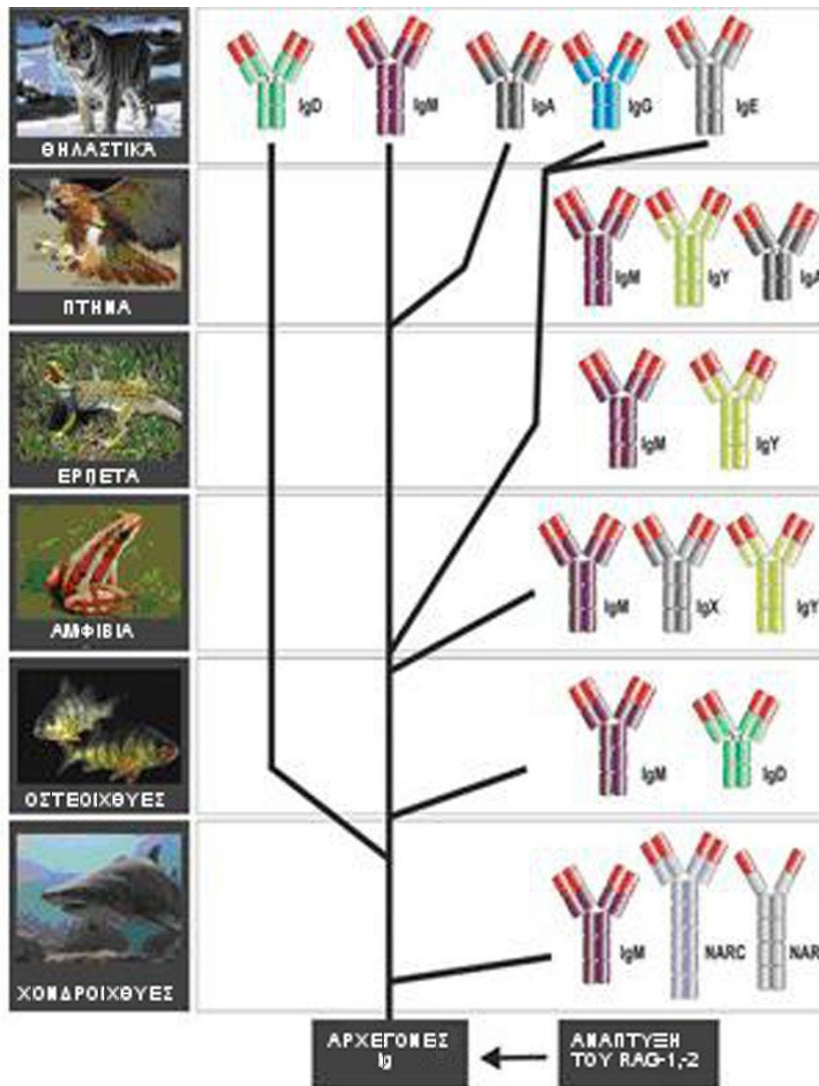
Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία χρόνια έχουν δείξει ότι πολλά NAbS έχουν βρεθεί σε ορούς από υγιείς οργανισμούς: ανθρώπους, κουνέλια, ποντικούς, αρουραίους και διάφορα είδη οστεοίχθυν και χονδροίχθυν που μπορούν να αντιδράσουν με εαυτά συστατικά [15] (Πίνακας 3.).



TRENDS in Immunology

Εικόνα 6. Η εξέλιξη και η πολυπλοκότητα της ανοσιακής απόκρισης στα σπονδυλωτά. Υποδεικνύονται ειδικευμένοι λεμφικοί ιστοί μοναδικοί για κάποιες ομάδες, π.χ. typhlosole (σε προνύμφη μύραινα), όργανο Leydig (σε καρχαρία), και στην Bursa (Galt =συναφείς με το λεμφικό ιστό του έντερου) (στα πτηνά). (Συντομογραφίες: Ab ωρίμανση της αντισωματικής συγγένειας, AID, που προκαλείται από ενεργοποίηση κυτιδινική απαμινάση, DC: δενδριτικά κύτταρα, FDC: των ωθυλακίων δενδριτικών κυττάρων, Gene conn: γονιδιακή μετατροπή, Ig comb: δυνατότητα συνδυαστικής ένωση V (D) J στοιχείων, LRR: πλούσιες σε λευκίνη επανάληψη, MHC: μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, RAG: ανασυνδιασμό γονιδίων ενεργοποίησης, TCR: T-κυττάρου υποδοχέα, VLR: Μεταβλητή περιοχή του υποδοχέα).

Για παράδειγμα, στο φυσιολογικό άνθρωπο πάνω από το 60% των IgG ανοσοσφαιρινών του αντιστοιχεί σε πολυειδικά αντισώματα που αναγνωρίζουν συγχρόνως αντιγόνα του εαυτού και του ξένου. Έτσι λοιπόν συγκριτικές μελέτες στο ρεπερτόριο των NAbs ανάμεσα σε καρχαρίες και ανθρώπους -δύο είδη που αντιπροσωπεύουν τα άκρα στην εξέλιξη του ανοσιακού συστήματος- έχουν δείξει ότι ακόμη και αν έχουν απόκλιση περισσότερο από 450 εκατομμύρια χρόνια, οι αντιγονοδεσμευτικές θέσεις τους κατασκευάστηκαν με τις ίδιες αρχές και εκφράζουν παρόμοιο προφίλ αναγνώρισης εξελικτικά συντηρημένων αυτοαντιγόνων (π.χ. θυρεοσφαιρίνη, ακτίνη, μυοσίνη κ.α.) και εμπλέκονται σε ρυθμιστικές ή αμυντικές λειτουργίες. Στον άνθρωπο και στον ποντικό, που εκφράζονται πέντε τάξεις Igs, έχουν προσδιοριστεί NAbs (κυρίως τάξης IgM και IgG) ανάλογων ειδικοτήτων και συγκρίσιμων βαθμών συγγένειας [40].



Εικόνα 7. Η παρουσία αντισωμάτων διαφορετικών ισότυπων στα ζωικά είδη. Ο ισότυπος IgM είναι ο πιο πρωτόγονος και ο πιο συντηρημένος εξελικτικά. Από τα κατώτερα γναθωτά σπονδυλωτά τους χονδροιχθύες (καρχαρίες) εμφανίζονται τρεις ισότυποι IgM, NARC, NAR, τους τελεοστέους (ψάρια) IgM IgG, τα αμφίβια IgM, IgX, IgY, τα πτηνά IgM, IgY, IgA και τα θηλαστικά IgM, IgY, IgA

Οι πρώτοι «έμφυτοι» ανοσιακοί μηχανισμοί προέκυψαν λοιπόν κατά τη διάρκεια μεγάλων εξελικτικών περιόδων δισεκατομμυρίων ετών ενσωματώνοντας στοιχεία κυτταρικής διαφοροποίησης και προστασίας έναντι ξένων. Εξελικτικά, ή πιο πιθανή υπόθεση περιλαμβάνει μόρια, όπως οι πρωτεΐνες που ίσως να επιλέχθηκαν στις αρχικές φάσεις της οντογένεσης για τη δόμηση των οργανισμών, μετά ορισμένες από αυτές ίσως επιλέχθηκαν να αναλάβουν το ρόλο της αναγνώρισης-επιτήρησης του ίδιου του οργανισμού και στη συνέχεια μέρος από αυτές προχώρησαν και στην αναγνώριση-αντιμετώπιση περιβαλλοντικών αντιγόνων, συμβάλλοντας έτσι στην προστασία του οργανισμού από επιβλαβή ερεθίσματα. Αυτές οι πρωτεΐνες παρέμειναν εξαιρετικά συντηρημένες κατά τη διάρκεια της εξέλιξης και αποτέλεσαν τα πολυδραστικά NAbs [41]. Επιπλέον, η προκύπτουσα μεταφορά μικροβιακών γονιδίων πιθανά να επέτρεψε τον ανασυνδυασμό διαφορετικών γονιδιακών περιοχών και έτσι το ανοσιακό σύστημα απέκτησε τα χαρακτηριστικά ανασυνδυαζόμενων υποδοχέων. Αυτό προέκυψε και επικράτησε στα πρώτα γναθωτά σπονδυλωτά και έπειτα διατήρησε την ικανότητα να αναγνωρίζει και να διακρίνει τα αντιγόνα του «εαυτού» από τα «ξένα». Συνεπώς, τα NAbs κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, απέκτησαν την ικανότητα να αλλάζουν τάξη Ig και έτσι π.χ. από πολυμερή IgM να μετατρέπονται σε μονομερή IgG (Ig-class switching), να φέρουν σωματικές υπερμεταλλάξεις στο μεταβλητό τους τμήμα ώστε να υπόκεινται σε καλύτερη αναγνώριση τρισδιάστατων δομών ή σε ωρίμανση συγγένειας (affinity maturation) μετά από κατάλληλη αντιγονική πρόκληση [42]. Ο συνδυαστικός αυτός χαρακτήρας εξασφάλισε στο ανοσιακό σύστημα των σπονδυλωτών ένα ολοκληρωμένο ρεπερτόριο αναγνώρισης και την ικανότητα να αλλάζει ώστε να προσαρμόζεται, να ρυθμίζει και να αντιμετωπίζει την ποικιλία των μικροβιακών εισβολέων καθώς και να εξασφαλίζει την ομοιόστασή του.

Η συνύπαρξη της έμφυτης και της επίκτητης ανοσιακής απόκρισης οδήγησε σε ένα προφανές πλεονέκτημα για την άμυνα του οργανισμού έναντι των μολύνσεων. Τα NAbs βρέθηκαν να παίζουν ρόλο και στα δύο σκέλη, αναγνωρίζοντας εαυτά αντιγόνα όπως είναι οι κυτταροκίνες, ρυθμίζοντας έτσι συγκεκριμένες λειτουργίες του οργανισμού και παράλληλα, αναγνωρίζοντας «ξένα» αντιγόνα του περιβάλλοντος με αποτέλεσμα την προστασία από παθογόνους παράγοντες. Η σημασία της παρουσίας των NAbs κατά την εξέλιξη διαφαίνεται και από μελέτες που δείχνουν πως αυτά αναγνωρίζουν με διαφορετική συγγένεια τα βακτήρια, τόσο τα Gram- όσο και τα Gram+, και πως βοηθούν στην πρόσδεση των συστατικών του συμπληρώματος, προκαλώντας λύση ή φαγοκυττάρωση των Gram- βακτηρίων από μακροφάγα. Αυτός ο μηχανισμός δράσης είναι φυλογενετικά διατηρημένος, καθώς συναντάται και σε διάφορα είδη ψαριών, όπου υπάρχει μόνο μια κύρια τάξη ανοσοσφαιρινών, χωρίς να υπάρχει η δυνατότητα αλλαγής τάξης και συνεπώς τα πολυδραστικά NAbs πιθανόν να αποτελούν το μοναδικό μηχανισμό άμυνας. Αντίθετα,

σε οργανισμούς με ανεπτυγμένο τόσο το μη ειδικό όσο και το ειδικό σκέλος της ανοσίας, τα NAbs συνεισφέρουν στην άμυνα έναντι των παθογόνων, καθώς μελέτες σε ποντίκια που δεν εκκρίνουν IgM δείχνουν πως είναι περισσότερο ευάλωτα στις μολύνσεις. Το ανοσιακό σύστημα προέκυψε πριν εκατομμύρια χρόνια και κατά τη διάρκεια της εξέλιξης εμφάνισε χαρακτηριστικά, τα οποία είτε τροποποιήθηκαν για να προσαρμοστούν στις νέες συνθήκες διαβίωσης που συνεχώς άλλαζαν, είτε ορισμένα από αυτά διατηρήθηκαν μέχρι και σήμερα [38].

Πίνακας 3. Είδη στα οποία έχουν εντοπιστεί NAbs

Είδη οργανισμών	Τάξη NAbs
Άνθρωποι [43, 44]	IgM, IgG
Τρωκτικά (ποντικοί, αρουραίοι, κουνέλια) [1, 43-46]	IgM, IgG
Πτηνά (όρνιθες, <i>Gallus gallus</i>) [44, 47]	IgM, IgG
Χονδροϊχθύες (καρχαρίες) [48, 49]	IgM
Οστεϊχθύες (<i>Cyprinus carpio</i> L. Goldfish <i>Carassius auratus</i> L) [50]	IgM
Καμηλοειδή (camels, llamas and related species)[51]	IgM
Βοοειδή [43, 44, 52]	IgM, IgG
Κυνοειδή (σκυλιά) [46, 52]	IgM
Χοιροειδή (γουρούνια, guinea-pigs)[43, 44, 46, 53]	IgM, IgG
Ερπετοειδή (φίδια) [54]	IgM
Πιθηκοειδή (μπαμπούνι, <i>Papio anubis</i>)	IgM, IgG
Ιπποειδή (άλογα, μουλάρια) [44, 52]	IgM

4. Χαρακτηριστικά των NAbs

Μετά την ανίχνευση των NAbs στον ορό υγιών ατόμων, ξεκίνησε μια νέα προσπάθεια προσδιορισμού των βασικών χαρακτηριστικών τους. Τα NAbs που έχουν μελετηθεί ανήκουν κυρίως σε τρεις τάξεις ανοσοσφαιρινών, τις IgM, IgG, IgA ενώ πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει και NAbs τάξης IgE [2]. Τα NAbs χαρακτηρίζονται από: α) τους υποπληθυσμούς B λεμφοκυττάρων που τα παράγουν και είναι οι B-1, B-2 και MZ-B (Marginal zone B cells) ή B-κύτταρα της οριακής ζώνης, β) την πολυδραστικότητα, δηλαδή την αναγνώριση διαφορετικών δομικά αντιγόνων και γ) την κωδικοποίηση μερικών από αυτά τα αντισώματα από γονίδια της βλαστικής σειράς με καθόλου ή λίγες μεταλλάξεις σε αρκετά από αυτά.

4.1. Κύτταρα που τα παράγουν

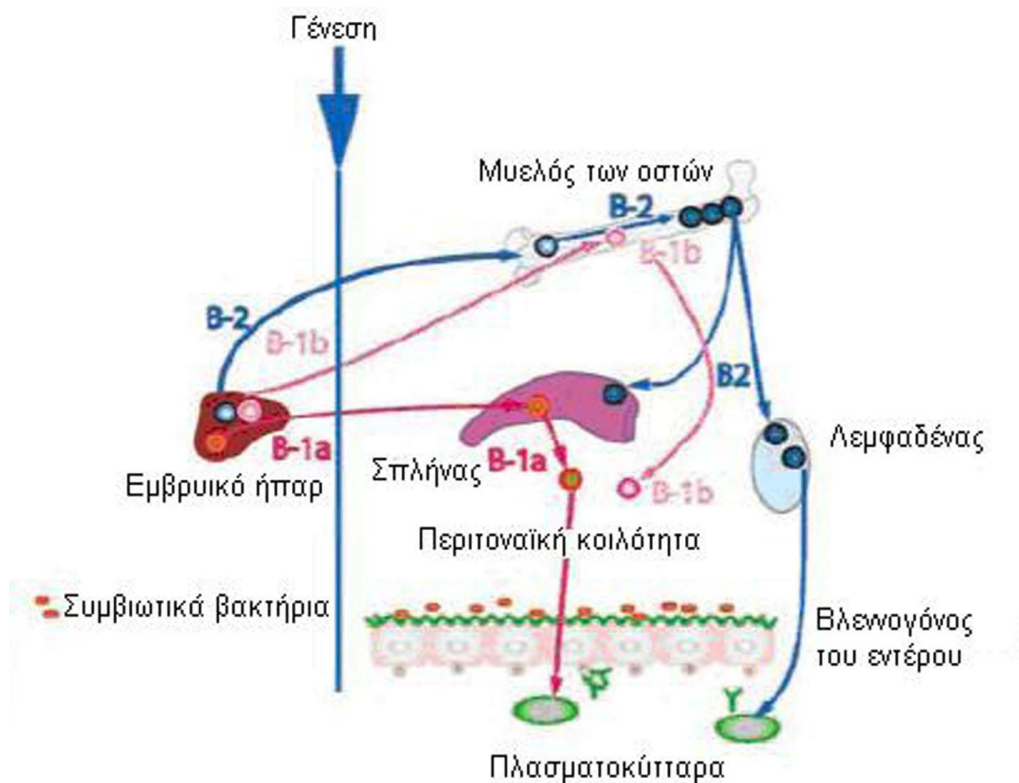
Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές εργασίες που παρουσιάζουν B λεμφοκύτταρα που εκκρίνουν NAbs, πολλά από τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και επομένως η εικόνα για την παραγωγή NAbs από υποομάδες των B-κυττάρων δεν είναι τελείως ξεκάθαρη. Μέσω της διαδικασίας αθανατοποίησης με επιμόλυνση με τον ιό Epstein Barr ή μέσω

υβριδοποίησης, έχουν απομονωθεί και χαρακτηρισθεί Β λεμφοκύτταρα που παράγουν πολυδραστικά NAbs. Συνολικά, φαίνεται πως τα NAbs, ανάλογα με τον ισότυπο στον οποίο ανήκουν, μπορεί να προέρχονται από ένα διαφορετικό υποσύνολο Β λεμφοκυττάρων. Η ομάδα του Notkins αναλύοντας Β λεμφοκύτταρα με πολυειδικούς υποδοχείς- πολυειδικά αντισώματα (PAB+), βρήκαν ότι τα κύτταρα αυτά είναι ευρέως κατανομημένα σε διάφορους λεμφικούς ιστούς, όπως είναι οι πλάκες Peyer (Peyer's patches), ο χιτώνας lamina propria του εντέρου, η περιφερική ζώνη του σπλήνα (marginal zone), και ο θύμος αδένας [55].

Ενώ δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί τα κύτταρα που εκκρίνουν NAbs, η πλειοψηφία των επιστημόνων φαίνεται να συγκλίνει σε τρεις κύριες υποομάδες: 1) τα B1 λεμφοκύτταρα, που είναι και τα πιο μελετημένα, φέρουν επιφανειακά CD5+ και εκκρίνουν κυρίως IgM NAbs, 2) τα B2 λεμφοκύτταρα, που φέρουν επιφανειακά CD5-, B220+ και εκκρίνουν κυρίως IgG και συχνά IgA NAbs και 3) τα MZ-B λεμφοκύτταρα ή Β λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης (Marginal zone B cells), που φέρουν επιφανειακά CD5-, B220+, CD21+ και εκκρίνουν κυρίως IgM NAbs (**Πινάκας 4.**) [56]. Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι κάποιοι ερευνητές εντάσσουν τα B-2 λεμφοκύτταρα στην κατηγορία των B-1, ενώ κάποιοι άλλοι διαφωνούν, θεωρώντας ότι είναι δυο διαφορετικές σειρές κυττάρων, σε αντίθεση με τα MZ-B λεμφοκύτταρα που αντιστοιχούν σε άλλη κυτταρική σειρά. Τα διαφορετικά υποσύνολα αυτών των Β λεμφοκυττάρων ποικίλλουν όσον αφορά την περιοχή προέλευσής τους, ωρίμανσης, εντοπισμού, την ικανότητα μετανάστευσης, και την εξάρτησή τους από τα Τ λεμφοκύτταρα για την ενεργοποίησή τους (**Εικόνα 8.**). Έχει προσδιοριστεί ότι και τα τρία υποσύνολα μπορούν να προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών και μετά να μετακινούνται προς το σπλήνα για διαφοροποίηση ή/και επιπλέον τα δύο υποσύνολα, (MZ-B και B-1), να προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του εμβρυικού ήπατος και να μετακινούνται για περαιτέρω επεξεργασία στο σπλήνα. Τα B-1 λεμφοκύτταρα εντοπίζονται κυρίως στη περιτοναϊκή και πλευρική κοιλότητα, τα συμβατικά B-2 λεμφοκύτταρα ανευρίσκονται στην κυκλοφορία, στα θυλάκια των λεμφαδένων και στην οριακή ζώνη του σπλήνα, και τα MZ-B λεμφοκύτταρα βρίσκονται στην οριακή ζώνη του σπλήνα.

Πίνακας 4. Κύτταρα που παράγουν NAbS

B λεμφοκύτταρα	Επιφανειακοί δείκτες	Τάξη NAbS	Περιοχή εντοπισμού
B1	CD5+ (Ly-1), B220 ^{lo} CD1d, Mac1+	IgM ^{hi} IgD ^{lo} Εκκρίνουν IgM και είναι ανεξάρτητα από τα T-κύτταρα	Περιτοναϊκή κυρίως κοιλότητα και σπλήνα
B2	CD5-, B220 ^{hi} , Mac1-	IgM ^{lo} IgD ^{hi} Εκκρίνουν IgM, IgG, IgA (αλλαγή υπόταξης) και είναι εξαρτώμενα από τα T-κύτταρα	Μυελό των οστών, θυλάκια και οριακή ζώνη του σπλήνα (όπου γίνεται η αλλαγή υπόταξης)
MZ-B (Marginal zone B cells) ή της οριακής ζώνης του σπλήνα	CD5-, B220 ^{hi} , CD1d, CD21 ^{hi}	IgM ^{hi} IgD ^{lo} Εκκρίνουν IgM και είναι κυρίως ανεξάρτητα από τα T-κύτταρα	Οριακή ζώνη του σπλήνα



Εικόνα 8. Προέλευση και εντοπισμός των B λεμφοκυττάρων που προκύπτουν από διαφορετικά πρόδρομα κύτταρα του ήπατος. Τα B-2 λεμφοκύτταρα (μπλε) και B-1b (ροζ) ενσωματώνονται στο σύνολο των πρόδρομων κυττάρων του μυελού των οστών και από τη γέννηση παράγουν αποκρίσεις στο σπλήνα, στους λεμφαδένες και στα Peyer's patches. Τα B-1a (κόκκινα) μεταναστεύουν από το εμβρυικό ήπαρ στο σπλήνα όπου και παραμένουν στην ενήλικη ζωή. Πολύ πιθανά τα B-1a να μεταναστεύουν στο σπλήνα στο έντερο μέσω του omentum και της περιτοναϊκής κοιλότητας.

4.1.1. Λεμφοκύτταρα B-1

Η πλειοψηφία της γνώσης για το υποσύνολο B-1 προέρχεται από μελέτες με τρωκτικά, στις οποίες αντιπροσωπεύει έως και το 5% του συνόλου των B λεμφοκυττάρων. Μια ποικιλία επιφανειακών δεικτών αντιστοιχεί στο φαινότυπο B-1, IgM^{hi}, Igd^{lo}, B220^{lo}, Mac-1^{hi}, CD23^{lo} με χαρακτηριστικότερο το CD5⁺ (Ly-1). Ένα υψηλό ποσοστό κυττάρων που εκκρίνουν NAbs εκφράζουν δείκτες επιφανείας B-1+ και παράγουν κυρίως IgM NAbs με την απουσία εξωτερικής διέγερσης. Αυτά τα αντισώματα παράγονται με περιορισμένο ανασυνδυασμό των γονιδίων V, D, J (Variable, Diversity, Joining). Τα B-1 λεμφοκύτταρα παράγονται νωρίς στην ανάπτυξη από πρόδρομα εμβρυϊκά κύτταρα του ήπατος και κατά συνέπεια πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα των T-κυττάρων. Η έκφραση του ρυθμιστικού μορίου CD5 αποτρέπει τα αυτοδραστικά B-1 κύτταρα να ενεργοποιηθούν από αδύναμα ερεθίσματα και ως εκ τούτου αυξάνει το όριο της ενεργοποίησής τους. Η ικανότητα μετανάστευσης των B-1 κυττάρων εξαρτάται από την έκφραση της ιντεγκρίνης και της τετρασπανίνης (tetraspanin) που ρυθμίζονται από υποδοχείς Toll-like [57, 58].

4.1.2. Λεμφοκύτταρα B-2

Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια που παρήγαγαν ένα πολυδραστικό NAb κωδικοποιημένο από γονίδια της βλαστικής σειράς (VH, Vλ1), έδειξαν ότι τα B-κύτταρα που ήταν υπεύθυνα για την παραγωγή του ήταν CD5- και συνεπώς ήταν διαφορετικά από τα γνωστά B1 (CD43-, sIgD και CD23^{high} CD69, B7.2^{high}, CD79b^{low}), ενώ δεν ανευρίσκονταν στην περιτοναϊκή κοιλότητα, αλλά στα θυλάκια του σπλήνα και των λεμφαδένων και μέρος αυτών κυκλοφορούσε στο περιφερικό αίμα [59]. Παρά την αυτοδραστικότητα αυτών των κυττάρων αυτά περνούσαν από θετική επιλογή στο μυελό των οστών και βρισκονταν σε μεγάλο αριθμό στους λεμφαδένες της περιφέρειας.

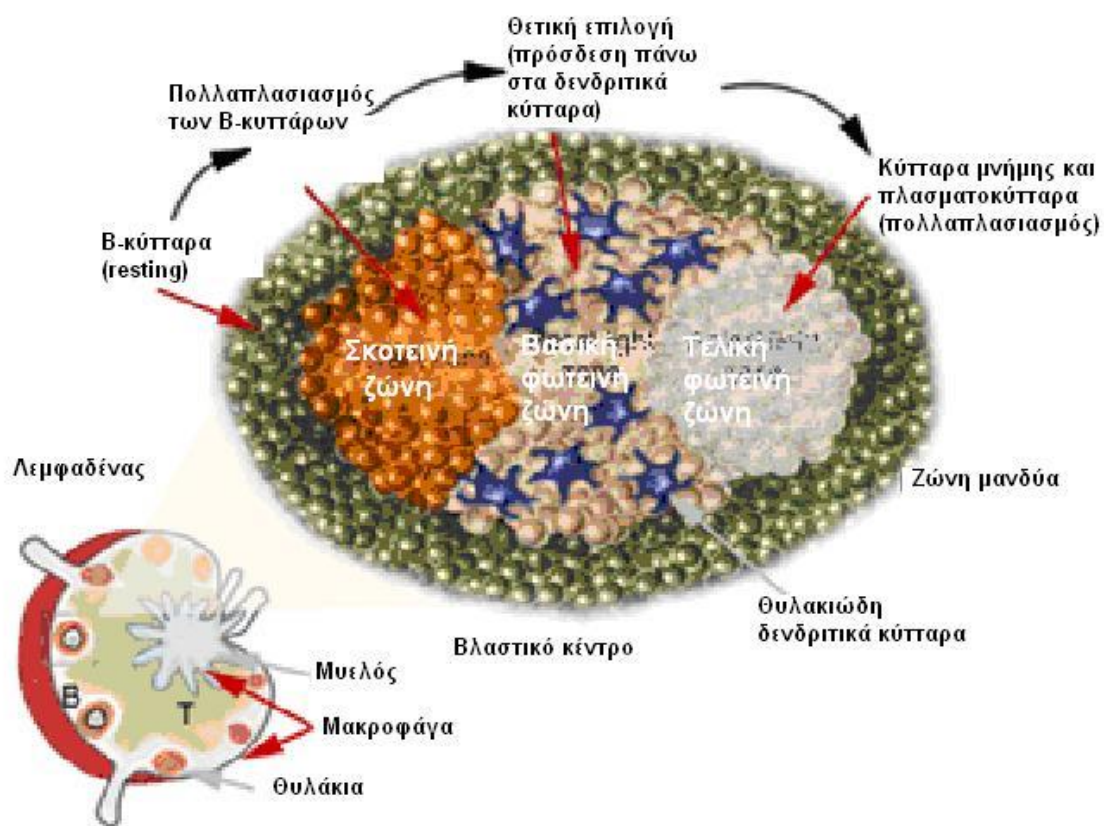
Τα κύτταρα B-2 παράγουν IgM, IgG ή και IgA NAbs -τα περισσότερα ανανεώσιμα B λεμφοκύτταρα- και παράγονται από λεμφοειδή πρόδρομα κύτταρα στο μυελό των οστών σε όλη τη διάρκεια της ζωής και απαιτούν τη συμβολή των T λεμφοκυττάρων για την κλωνική επέκταση και για την αλλαγή τάξης από IgM σε IgG ή IgA (Πίνακας 5.). Αυτά, αφού αναπτυχθούν στο μυελό των οστών, διαφοροποιούνται και μεταναστεύουν ως ανώριμα B λεμφοκύτταρα στην περιφέρεια στα θυλάκια των λεμφαδένων. Έως το 75% των πρώιμων ανώριμων B λεμφοκυττάρων που βρίσκονται στο μυελό των οστών παράγουν αυτοδραστικά αντισώματα και για αυτό περνούν από ακριβείς ελέγχους-μηχανισμούς ανοχής. Ενεργοποίηση των B-κυττάρων οδηγεί σε κλωνική επέκταση και είναι επίσης εξαρτώμενη από τα T λεμφοκύτταρα. Επίσης, υπάρχουν αναφορές B-2 κυττάρων που βρίσκονται στην οριακή ζώνη (MZ) του σπλήνα χωρίς να ανήκουν στα MZ-B κύτταρα.

Πίνακας 5. Σύγκριση των λεμφοκυττάρων B-2 και B-1

	B2	B1	Βιβλιογραφικές Πηγές
Προέλευση	Μυελός των οστών	Εμβρυϊκά: μυελός των οστών, σπλήνας	Holodick et al.(2009), Kantor and Herzenberg(1993), Monteeino – Rodriguez and Dorshkind(2012)
Εντοπισμός	<ul style="list-style-type: none"> • Θυλάκια λεμφαδένων • Επανακυκλοφορία • Baff - εξαρτώμενο • Σπληνο - ανεξάρτητο 	<ul style="list-style-type: none"> • Κοιλότητες του σώματος • Επανακυκλοφορία? • Baff - ανεξάρτητο • Σπληνο - εξαρτώμενο 	Kantor and Herzenberg(1993) Kantor and Herzenberg(1993) Mackay and Browning (2002) Wardemann et al (2002)
Φαινοτυπικοί δείκτες	Mac1- και CD5-	Mac1+ και/ή CD5+	Hastings et al.(2006), Hayakawa et al.(1984),Stall et al.(1992)
Λειτουργίες	<ul style="list-style-type: none"> • Υψηλής συγγένειας IgG αντισώματα • Ωρίμανση συγγένειας • Be1 και Be2 κυτταροκίνες • εξαρτώμενο από T-κύτταρα - • Επίκτητη ανοσία 	<ul style="list-style-type: none"> • Χαμηλής συγγένειας IgM αντισώματα • Κωδικοποίηση από γονίδια Βλαστικής σειράς • IL-10/GM-CSF/IL-3 • ανεξάρτητο από T-κύτταρα • Έμφυτη ανοσία 	Binder(2010), Kantor and Herzenberg(1993) Kantor and Herzenberg(1993) Harris et al.(2000),O'Garra et al.(1992),Rauch et al.(2012) Kantor and Herzenberg(1993) Kantor and Herzenberg(1993)

4.1.3. Λεμφοκύτταρα MZ-B

Αυτό το υποσύνολο των B λεμφοκυττάρων εντοπίζεται στην οριακή ζώνη του σπλήνα. Παρόμοια με τα B-1 λεμφοκύτταρα, τα MZ-B λεμφοκύτταρα είναι έμφυτα και ως αποτέλεσμα έχουν ένα σχετικά περιορισμένο ρεπερτόριο και μια περιορισμένη ικανότητα να παράγουν IgM αντισώματα. Τα MZ-B λεμφοκύτταρα, λόγω της θέσης τους στον σπλήνα, είναι οι ιδανικοί αγωνιστές έναντι των αντιγόνων που μεταδίδονται με το αίμα, αλλά επίσης αναγνωρίζουν εαυτά αντιγόνα και μπορούν να ενεργοποιηθούν πολύ γρήγορα, ανεξάρτητα από τη βοήθεια των T λεμφοκυττάρων. Εμπλέκονται επίσης και σε εξαρτώμενη από T κύτταρα ανοσία, μέσω της αντιγονοπαρουσίασης σε θυλακιώδη B λεμφοκύτταρα και T λεμφοκύτταρα [52]. Τα MZ-B λεμφοκύτταρα για να διαφοροποιηθούν χρειάζονται την αλληλεπίδραση του BCR με το σήμα Notch2. Επιπρόσθετα τα MZ-B λεμφοκύτταρα επίσης μπορεί να αποτελέσουν σημαντική πηγή παραγωγής NAbs αφού τα B λεμφοκύτταρα με χαμηλή αυτοδραστικότητα ή με δραστικότητα έναντι βακτηρίων βρίσκονται περισσότερο στην οριακή ζώνη [60] (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9. Περιοχές εντόπισης λεμφοκυττάρων στους λεμφαδένες και των θυλακίων τους. Στη περιφέρεια των λεμφαδένων υπάρχουν τα θυλάκια (follicles), όπου εντοπίζονται τα B λεμφοκύτταρα και στη περιοχή των λεμφαδένων που ονομάζεται μυελός (medulla) εντοπίζονται τα T λεμφοκύτταρα. Και στις δυο περιοχές εντοπίζονται μακροφάγα που συντελούν στην ωρίμανση και στη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων. Ένα θυλάκιο περιλαμβάνει τις εξής περιοχές α) τη ζώνη μανδύα (mantle zone) περιφερική ζώνη όπου εντοπίζονται τα ηρεμούντα (resting) B λεμφοκύτταρα, β) τη σκοτεινή ζώνη (dark zone) όπου γίνεται ο πολλαπλασιασμός των B λεμφοκυττάρων, γ) τη βασική φωτεινή ζώνη (basal light zone) όπου γίνεται η θετική επιλογή των B μετά από αλληλεπίδραση με τα δενδριτικά κύτταρα και δ) την τελική/κορυφαία φωτεινή ζώνη (apical light zone) όπου γίνεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μνήμης).

Παρόλο που αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει την παραγωγή NAbs από πολλούς υποπληθυσμούς B κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των B1 και B2, έχει διατυπωθεί ότι τα NAbs παράγονται κατά πλειοψηφία από τα B1 CD5+ κύτταρα (~50% των IgM στον ορό) [61], ενώ από τα κύτταρα B-2 -που έχουν την ικανότητα ανασυνδυασμού των γονιδίων- παράγονται IgM αλλά κυρίως IgG και IgA αντισώματα [41, 42] υπάρχουν αναφορές και για IgE. Σημαντικό είναι και το ερώτημα αν τα B-κύτταρα που παράγουν NAbs συνιστούν την πηγή από όπου προκύπτουν τα παθολογικά αντισώματα μετά από ωρίμανση συγγένειας από κάποιο αντιγόνο. Σε κάποια πειραματικά μοντέλα έχει δειχθεί ότι μολυσματικοί παράγοντες μπορεί να οδηγήσουν στην ειδική ενεργοποίηση κάποιων B

λεμφοκυττάρων που εκκρίνουν NAbs. Επίσης, υπάρχουν μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες σε χρόνιες λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες που παρουσιάζουν πολυδραστικότητα και δεν φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια που τις κωδικοποιούν. Άλλες πάλι μελέτες προτείνουν ότι τα παθολογικά αντισώματα δεν προκύπτουν από προϋπάρχοντα αυτοδραστικά αντισώματα, αλλά προκύπτουν κατά τη διαδικασία αντιγονικής πρόκλησης με σωματικές υπερμεταλλάξεις της μεταβλητής τους περιοχής [62], παρόλα αυτά δεν υπάρχει μέχρι σήμερα ξεκάθαρη απόδειξη.

4.2. Πολυδραστικότητα

Ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά των NAbs, ίσως και το κυριότερο, είναι η ικανότητα αναγνώρισης πολλών και διαφορετικών δομικά αντιγόνων, δηλαδή η πολυδραστικότητα ή αλλιώς πολυειδικότητα. Πολλές θεωρίες είχαν προσπαθήσει να προσεγγίζουν την αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Μια από τις πρώτες θεωρίες υποστήριζε ότι το αντιγόνο υπηρετεί το ρόλο «εκμαγείου» για τη σύνθεση της συμπληρωματικής θέσης πρόσδεσης του αντισώματος. Αργότερα διατυπώθηκε η θεωρία «κλειδί-κλειδαριά» που αντιπροσώπευε την απόλυτη συνάφεια και συμπληρωματικότητα μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος, όπου κάθε αντίσωμα συνδεόταν αποκλειστικά με ένα αντιγόνο, όπως ένα κλειδί με μια κλειδαριά. Έπειτα, ακολούθησε η θεωρία της επιλογής των κλώνων, όπου κάθε λεμφοκύτταρο παράγει ένα αντίσωμα ειδικό για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο, οι κλώνοι επιλέγονται με βάση τη συγγένεια των αντισωμάτων τους και οι αυτοδραστικοί κλώνοι απομακρύνονται πριν βγουν στην περιφέρεια.

Αυτό που χαρακτηρίζει την ισχύ ενός συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος είναι η πολλαπλή συγγένεια σύνδεσης (avidity) του αντισώματος, η οποία εξαρτάται από τρεις παραμέτρους: 1) τη συγγένεια (affinity) του παρατόπου του αντισώματος (θέση δέσμευσης του αντιγόνου σε ένα αντίσωμα) για έναν επίτοπο, 2) το σθένος του αντισώματος και του αντιγόνου και 3) τη δομική διάταξη των τμημάτων που αλληλεπιδρούν. Η συγγένεια των πολυδραστικών NAbs έχει προσδιοριστεί να είναι χαμηλότερη από αυτήν των επαγόμενων μονοειδικών αντισωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, η συγγένεια των πολυδραστικών NAbs για διάφορα αντιγόνα μπορεί να διαφέρει ως και χίλιες φορές, με τη σταθερά διάστασης K_d να κυμαίνεται μεταξύ 10^{-4} - 10^{-7} mol/l, σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μονοειδικών αντισωμάτων για τα συγγενικά τους αντιγόνα, όπου η K_d κυμαίνεται μεταξύ 10^{-7} - 10^{-11} mol/l [63] (Πίνακας 6.).

Πίνακας 6. Ιδιότητες μονοκλωνικών πολυδραστικών NAbs συγκριτικά με αυτές των μονοκλωνικών μονοειδικών επαγόμενων Abs

	Πολυδραστικά mAbs	Μονοειδικά mAbs
Αντιγόνο	Δομική ποικιλομορφία αντιγόνων (πχ. πρωτεΐνες, βακτήρια, DNA, απτένια)	
Συγγένεια Αλληλουχία	Χαμηλή ($K_d: 10^{-4} - 10^{-7}$) Γονίδια βλαστικής σειράς ή με λίγες μεταλλάξεις	Υψηλή ($K_d: 10^{-7} - 10^{-11}$) Σωματικές μεταλλαγές
Ig κατηγορία	Κυρίως IgM αλλά και IgG και IgA	IgM, IgG και IgA
Χρόνος ημιζωής	IgM:~8h, IgA:~8h και IgG:~10h	IgM:~35h, IgA:~26h και IgG:~280h

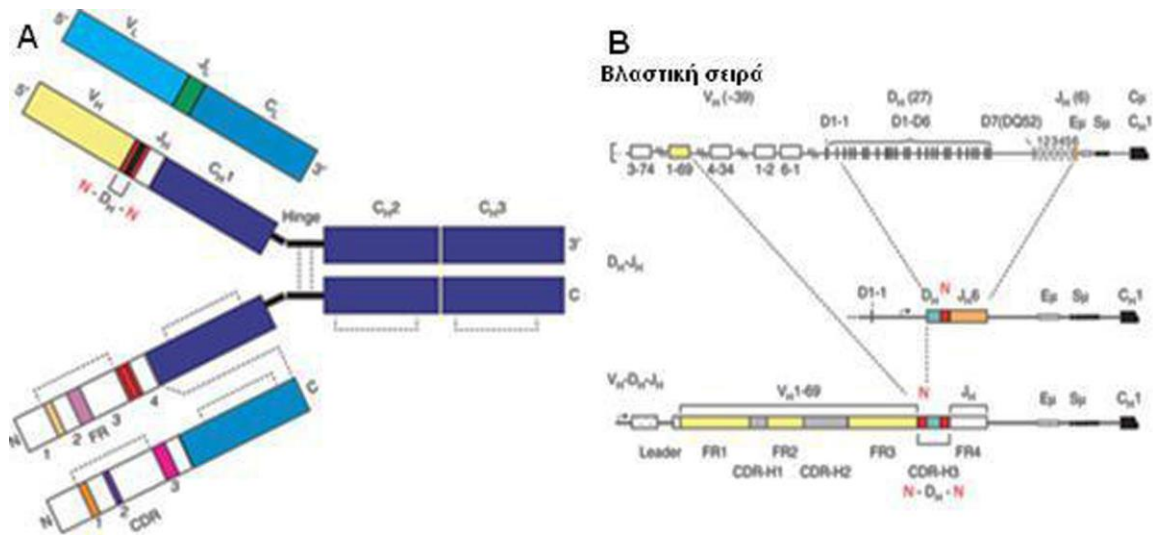
Τα φυσικά πολυδραστικά αντισώματα αναγνωρίζουν ξένα και εαυτά αντιγόνα και κωδικοποιούνται συχνά από γονίδια της βλαστικής σειράς φέροντας συνήθως λίγες ή καθόλου μεταλλάξεις. Επιπλέον, στον ορό των υγιών ατόμων έχουν ανευρεθεί και φυσικά μονοειδικά αντισώματα, τα γονίδια των οποίων επίσης εντάσσονται σε αυτά της βλαστικής σειράς, ο αριθμός τους όμως είναι πολύ πιο περιορισμένος από αυτόν των φυσικών πολυδραστικών αντισωμάτων και συνήθως αναγνωρίζουν κυτταροκίνες (**Πίνακας 7.**) [64]. Αυτά πολύ πιθανά να ξεκίνησαν από πολυειδικά αντισώματα και έγιναν μονοειδικά στην πορεία. Έτσι, τα πολυδραστικά αλλά και τα μονοειδικά NAbs έναντι ξένων αντιγόνων αντιπροσωπεύουν μέρος από το φυσιολογικό ρεπερτόριο των ανθρώπινων Β λεμφοκυττάρων. Επίσης, οι υπερμεταβλητές περιοχές όχι μόνο των πολυδραστικών αλλά και των μονοειδικών NAbs μπορεί να κωδικοποιούνται από μη μεταλλαγμένα ή ελάχιστα μεταλλαγμένα γονίδια, και, ενδεχομένως τα NAbs να αποτελούν πρόδρομους για τα ειδικά αντισώματα υψηλής συγγένειας που προκύπτουν έναντι εαυτών ή ξένων αντιγόνων [64]. Συνολικά, η πολυδραστικότητα των NAbs φαίνεται να εξαρτάται και να καθορίζεται από αρκετούς παράγοντες, οι βασικότεροι από τους οποίους είναι η αλληλουχία της μεταβλητής περιοχής, η τρισδιάστατη δομή της και τα αντιγόνα-στόχοι.

Πίνακας 7. Διαφορές ως προς τη δραστικότητα φυσικών και επαγόμενων αντισωμάτων

<p>1) Φυσικά Πολυειδικά Αντισώματα:</p> <ul style="list-style-type: none">i. Ανευρίσκονται σε φυσιολογικές καταστάσειςii. Αναγνωρίζουν εαυτά και ξένα αντιγόναiii. Κωδικοποιούνται από γονίδια βλαστικής σειράς:<ul style="list-style-type: none">- χωρίς μεταλλάξεις- με 7-8 μεταλλάξεις- με 15-20 μεταλλάξεις [εξουδετερωτικά αντισώματα (Neutralizing Abs), αναστέλλουν ιούς]
<p>2) Φυσικά Μονοειδικά Αντισώματα:</p> <ul style="list-style-type: none">i. Ανευρίσκονται σε φυσιολογικές καταστάσειςii. Αναγνωρίζουν ομόλογο εαυτό αντιγόνο<ul style="list-style-type: none">- έναντι κυτταροκινών ή μεταβολικών παραπροϊόντωνiii. Κωδικοποιούνται από γονίδια βλαστικής σειράς
<p>3) Επαγόμενα Μονοειδικά Αντισώματα:</p> <ul style="list-style-type: none">i. Ανευρίσκονται σε παθολογικές καταστάσεις ή μετά από αντιγονική διέγερσηii. Αναγνωρίζουν ομόλογο αντιγόνο, είτε «εαυτό», είτε «ξένο»iii. Φέρουν μεγάλο αριθμό σωματικών μεταλλάξεων

4.2.1. Αλληλουχία μεταβλητής περιοχής

Ένα άλλο βασικό χαρακτηριστικό των NAb που συμβάλλει στην πολυδραστικότητά τους είναι η νουκλεοτιδική και κατά συνέπεια η αμινοξική αλληλουχία τους. Γενικά, η μεταβλητή περιοχή (V, Variable region) της βαριάς αλυσίδας (HC, Heavy chain) προκύπτει από το συνδυασμό των γονιδιακών τμημάτων V, D και J (πρώτα γίνεται ο συνδυασμός D-J και μετά ο συνδυασμός V-DJ), ενώ της ελαφριάς (LC, Light chain) από το συνδυασμό των γονιδιακών τμημάτων V και J (ή VL και JL). Σωματικές μεταλλάξεις, που μεταβάλλουν τις βάσεις στη μεταβλητή περιοχή των αντισωμάτων, παρέχει περαιτέρω ποικιλομορφία και οδηγεί σε αυξημένη συγγένεια. Στη μεταβλητή περιοχή των αντισωμάτων οι συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές CDR (Complementarity determining regions) είναι σημαντικές για την πολυειδικότητα ή μονοειδικότητά τους. Η βαριά και η ελαφριά αλυσίδα φέρουν τρεις περιοχές CDR τις CDR -1, -2 και -3 και τέσσερις σταθερές περιοχές πλαισίου FR (framework). Η δομική βάση της πολυδραστικότητας σχετίζεται με τις ιδιότητες της μεταβλητής περιοχής και κυρίως της βαριάς αλυσίδας. Στη βαριά αλυσίδα η θέση δέσμευσης αντιγόνου σχηματίζεται από την παράθεση των CDR -H1, H2 και H3 και την περιοχή πλαισίου 3 (FR3) (**Εικόνα 10.**) [65, 66].



Εικόνα 10. Σχηματική δομή IgG. Ο συνδυασμός των τμημάτων της βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας. (α) Οι βαριές αλυσίδες κωδικοποιούνται για τη μεταβλητή περιοχή τους από τα γονίδια V, D, J (V_H , D_H , J_H) και για τη σταθερή περιοχή C (C_{μ} , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2\beta$, $\gamma 2\alpha$, ϵ , α), ενώ οι ελαφριές από τα γονίδια V και J (V_L και J_L). Στις κάτω αλυσίδες υποδεικνύονται οι περιοχές πλαισίου (FR) και οι συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές (CDR). Οι διακεκομμένες γραμμές δηλώνουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς. (β) Ο ανασυνδυασμός των γονιδιακών τμημάτων. Τα γονίδια της βαριάς αλυσίδας αποτελούνται από πολλαπλά (~200) τμήματα V (variable segments), μια σειρά από τα τμήματα D (diversity segments), τμήματα J (joining segments) (~6) και μια σειρά τμημάτων σταθερής περιοχής (C). Οι ελαφριές αλυσίδες φέρουν τη CDR-H1 (10αα από το 24 έως το 34), CDR-H2 (6αα από το 50 έως το 56) και CDR-H3 (8αα από το 89 έως το 97) και οι βαριές αλυσίδες φέρουν τη CDR-L1 (4αα από το 31 έως το 35), CDR-L2 (15αα από το 50 έως το 65) και CDR-L3 (6αα από το 96 έως το 102).

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλά αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά την αλληλουχία των NAb. Συνολικά, φαίνεται πως τα πολυδραστικά αντισώματα μπορεί να κωδικοποιούνται είτε από γονίδια βλαστικής σειράς, είτε από γονίδια που φέρουν μεταλλάξεις. Το ένα- τρίτο περίπου των πολυδραστικών NAb φέρει στις μεταβλητές περιοχές των βαριών V_H (Variable Heavy) και ελαφριών V_L (Variable Light) αλυσίδων τους αλληλουχίες ταυτόσημες ή συγγενείς με τη βλαστική αλληλουχία, ενώ οι αντίστοιχες των μονοειδικών αντισωμάτων παρουσιάζουν πάντα πολύ μεγάλο αριθμό σωματικών μεταλλάξεων [67]. Σε αρκετά μονοκλωνικά NAb εκφράζονται τα γονίδια V_H της οικογένειας V_{H3} και V_{H4} ($V_{H4.11}$, $V_{H4.21}$ $V_{H4.18}$) [64]. Στη γονιδιακή οικογένεια V_{H3} , τα γονίδια βλαστικής σειράς DP47 και DP49 υπερεκφράζονται, αντιπροσωπεύοντας περισσότερο από το 70 % όλων των γονιδίων V_H [68]. Γενετικός περιορισμός δεν συμβαίνει μόνο στην περίπτωση των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας, αλλά και στην περίπτωση των V_L γονιδίων. Ο βαθμός ομοιότητας των V_L περιοχών αυτών των αντισωμάτων στα πιο ομόλογα V_L γονίδια βλαστικής σειράς κυμαίνεται μεταξύ 97,2-100%,

αντισώματος με τις έξι περιοχές CDR. β) Στερεοδομική αναπαράσταση που αναδεικνύει την παρουσία μεγάλου ποσοστού αρωματικών καταλοίπων (καφέ) που βρίσκονται στην περιοχή δέσμευσης αντιγόνου. Τα κατάλοιπα της L αλυσίδας 1-103 και της H αλυσίδας 104-217. γ) Επιφάνεια Connolly (Connolly surface) του αντισώματος που απεικονίζει την ομαδοποίηση των αρωματικών αμινοξέων τα οποία είναι χρώματος καφέ.

Χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις με γονιδιακή αναπροσαρμογή (gene reassortment) και τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση δείχθηκε ότι η πολυδραστικότητα των αντισωμάτων είναι μια ιδιότητα που ορίζεται κυρίως από τη περιοχή CDR3 της HC. Αυτή η περιοχή είναι επίσης γνωστή για τον κεντρικό ρόλο στην αναγνώριση των αντιγόνων από την πλειονότητα των αντισωμάτων. Πειράματα κλωνοποίησης έδειξαν ότι σε πολλά NAbs η περιοχή CDR3 της βαριάς αλυσίδας εμφάνιζε σε όλα τα mAbs ακριβώς το ίδιο μήκος των πέντε αμινοξέων αργινίνη (R), φαινυλαλανίνη (F), λευκίνη (L), γλουταμικό οξύ (E) και τρυπτοφάνη (W). Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα κατάλοιπα από την ελαφριά αλυσίδα των αντισωμάτων παίζουν βοηθητικούς ρόλους στον καθορισμό της πολυδραστικότητας των αντισωμάτων. Μελέτες, χρησιμοποιώντας τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση της περιοχής CDR3 της βαριάς αλυσίδας (CDR-H3) ενός πολυειδικού αντισώματος, έδειξαν ότι μερικές μόνο από αυτές τις αντικαταστάσεις αμινοξέων αρκούν για να καταστήσουν ένα πολυδραστικό αντίσωμα, μονοειδικό [70-72]. Ορισμένες μεταλλάξεις στην περιοχή CDR-H3 δεν επηρεάζουν την πολυδραστικότητα, ενώ άλλες την αυξάνουν ακόμη περισσότερο. Έδειξαν επιπλέον ότι το απομονωμένο Fab θραύσμα των πολυδραστικών αντισωμάτων διατηρεί την πολυδραστικότητά του, ενώ με την αντικατάσταση του CDR-H3 ενός μονοειδικού αντισώματος με εκείνο ενός πολυδραστικού αντισώματος, το πρώτο επιδεικνύει ιδιότητες πολυδραστικότητας καθώς και ότι οι αντικαταστάσεις αμινοξέων στην CDR3 περιοχή με σημειακές μεταλλαξογενέσεις μετάβαλλε τις ιδιότητες σύνδεσης του αντιγόνου με το πολυδραστικό αντίσωμα [66, 73-75]. Μάλιστα τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι μια και μόνο αντικατάσταση αμινοξέος θα μπορούσε να καταργήσει εντελώς την πολυδραστικότητα [27, 63]. Οι περισσότερες αναφορές υποστηρίζουν πως μέρος των πολυδραστικών NAbs παρουσιάζει μεγαλύτερη σε μήκος περιοχή V_H και ιδιαίτερα τη CDR-H3 από εκείνη των μονοειδικών αντισωμάτων και συνήθως στις CDR περιοχές τους φέρουν συχνά υδρόφιλα και θετικά φορτισμένα αμινοξέα, όπως κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης, βοηθώντας στην αλληλεπίδραση με διάφορα αρνητικά φορτισμένα αντιγόνα. Φαίνεται πιο πιθανό ότι, παρά το χαρακτηριστικό μοτίβο αλληλουχίας της περιοχής CDR-H3, είναι η εγγενής ικανότητα της αντιγονοδεσμευτικής περιοχής να λαμβάνει διάφορες διαμορφώσεις που καθορίζουν την πολυδραστικότητα. Αυτή η ιδιότητα μπορεί να παρέχεται από πολλές πιθανές ακολουθίες CDR-H3. Οι υπόλοιπες περιοχές CDR καθώς και οι περιοχές πλαισίου μπορεί επίσης να επηρεάζουν την ικανότητα του CDR-H3 να

λάβει διάφορες διαμορφώσεις. Παρά το γεγονός ότι μερικές μελέτες δείχνουν διαφορές στην αλληλουχία και το μέγεθος της CDR-H3, καθώς και με την παρουσία των ειδικών μοτίβων αλληλουχίας ή υπολείμματα αμινοξέων στην περιοχή αυτή, άλλα έργα απέτυχαν να βρουν μοναδικές αλληλουχίες ή δομικά χαρακτηριστικά της CDR-H3 για πολυδραστικά αντισώματα [76, 77].

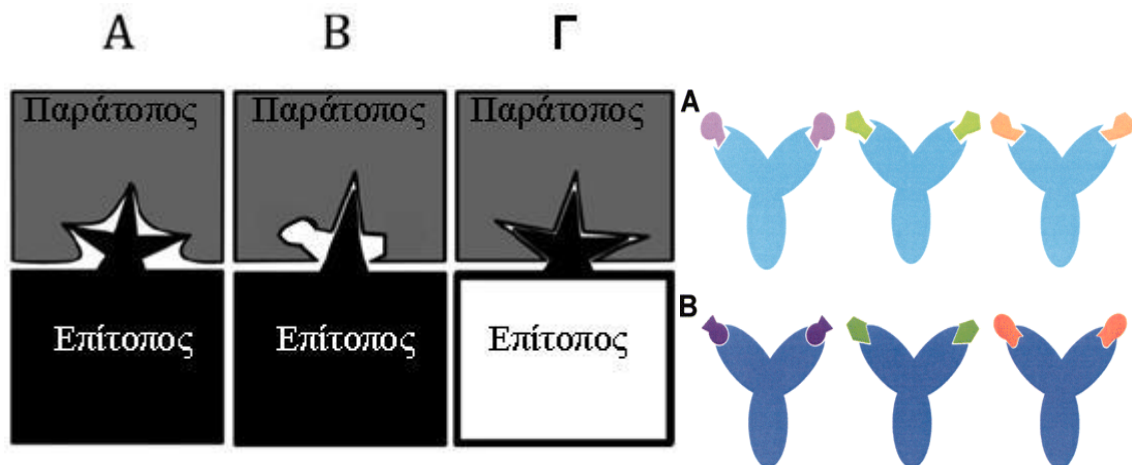
Έτσι, η ανάλυση των αλληλουχιών των νουκλεοτιδίων των Ig γονιδίων δεν έχει αποκαλύψει καμία ιδιαίτερη οικογένεια γονιδίων που κωδικοποιεί H ή L αλυσίδας μεταβλητές περιοχές που χρησιμοποιείται αποκλειστικά από πολυδραστικά αντισώματα. Επίσης, η επίδραση των περιοχών που είναι απομακρυσμένες από την αντιγονοδεσμευτική περιοχή παίζει ρόλο στον καθορισμό της πολυδραστικότητας. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι η υπόταση της βαριάς αλυσίδας μπορεί να επηρεάσει την ειδικότητα και τη συγγένεια καθώς και την τάση ανάμεσα στα πολυδραστικά αντισώματα που φέρουν πανομοιότυπο παράτοπο. Συνολικά, για τις υποτάξεις έχει αναφερθεί ότι τα πολυδραστικά NAbs τάξης IgM κωδικοποιούνται συνήθως από γονίδια, χωρίς ή με ελάχιστες μεταλλάξεις, ενώ τα NAbs τάξης IgG και IgA κωδικοποιούνται από γονίδια που συνήθως φέρουν 7-11 μεταλλάξεις. Δεν είναι σπάνια όμως και NAbs τάξης IgG και IgA που κωδικοποιούνται από γονίδια με πολλές μεταλλάξεις (πάνω από 20). Έχει περιγραφεί πως 15-20 μεταλλάξεις δίνουν αντισώματα που αναγνωρίζουν καλλίτερα τρισδιάστατες δομές, τέτοια συνήθως αντισώματα είναι τα γνωστά ως «εξουδετερωτικά» (neutralizing antibodies) όπως τα αντισώματα εναντίον του ιού HIV που τον αδρανοποιούν [78]. Η πιθανή εξήγηση αυτής της αντίφασης στην ύπαρξη πολυδραστικών αντισωμάτων χωρίς και με μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις μεταβλητές περιοχές θα μπορούσε να είναι ότι ορισμένα αντισώματα είτε διατηρούν είτε αυξάνουν τη δομική ευελιξία των θέσεων πρόσδεσης των αντιγόνων τους ως αποτέλεσμα της ωρίμανσης συγγενείας. Συνολικά, τα τελευταία βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι η πολυδραστικότητα δεν περιορίζεται μόνο στα αντισώματα που κωδικοποιούνται από γονίδια βλαστικής σειράς, αλλά μπορεί επίσης να χαρακτηρίζει αντισώματα που έχουν υποστεί ωρίμανση συγγενείας, ενώ δεν έχει βρεθεί κάποια συγκεκριμένη αλληλουχία που να μπορεί κανείς να προβλέψει εάν θα προκύψει ένα πολυδραστικό ή ένα μονοειδικό αντίσωμα.

4.2.2. Τρισδιάστατη δομή μεταβλητής περιοχής

Η ικανότητα των NAbs να αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα από πολλά και διαφορετικά μεταξύ τους αντιγόνα δείχνει ευθέως τη δομική ιδιαιτερότητα της μεταβλητής τους περιοχής. Το γεγονός ότι η ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών δεν έδωσε ξεκάθαρα αποτελέσματα για το πώς τα πολυδραστικά αντισώματα μπορούν να αναγνωρίζουν τόσα πολλά, διαφορετικά και δομικά άσχετα μεταξύ τους αντιγόνα φαίνεται να εξηγείται εάν

ληφθεί υπόψη ότι η δέσμευση του αντιγόνου στο αντίσωμα βασίζεται στην αναγνώριση τρισδιάστατων δομών. Σε αυτό το πλαίσιο, είναι ενδιαφέρον ότι μέσω φυσικο-χημικών επεξεργασιών, η αντιγονο-δεσμευτική ικανότητα των πολυδραστικών αντισωμάτων μπορεί να τροποποιηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι εκείνη των μονοειδικών αντισωμάτων. Οι αλληλεπιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος είναι μη-ομοιοπολικές και αναστρέψιμες και σε αυτές συμμετέχουν δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, και δυνάμεις Van der Waals. Έτσι, η πολυδραστικότητα φαίνεται να εξαρτάται και από τη συνολική δομή της μεταβλητής περιοχής των αντισωμάτων.

Αρκετοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν αυτό το φαινόμενο. Τέσσερις υποθέσεις μέχρι σήμερα είναι οι πιο επικρατείς στην προσπάθεια να κατανοηθεί η πολυδραστικότητα των NAb (Εικόνα 12. & Πίνακας 8.). Αυτές έχουν σχέση με: 1) την ελαστικότητα-πλαστικότητα του παρατόπου, 2) τον παράτοπο, που φέρει πολλές διαφορετικές περιοχές δέσμευσης διαφορετικών επιτόπων, 3) των κοινών συστατικών στους επιτόπους (δημόσιοι επίτοποι) και 4) την μοριακή μίμηση.



Εικόνα 12. Σχηματική παρουσίαση των κύριων θεωριών σχετικά με την πρόσδεση πολυδραστικών αντισωμάτων. Το γκρι χρώμα αντιπροσωπεύει το σημείο πρόσδεσης των αντιγονικών επιτόπων επάνω στο αντίσωμα. Α) πρόσδεση με ελαστικότητα-πλαστικότητα, Β) παράτοπος με πολλές θέσεις πρόσδεσης και Γ) δημόσιος επίτοπος.

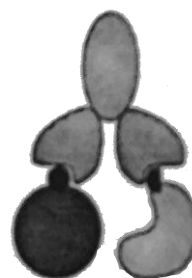
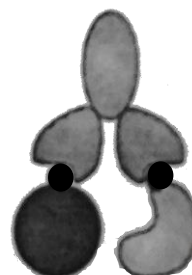
Πίνακας 8. Υποθέσεις για την πολυδραστικότητα των NABs.

1) Πλαστικότητα παρατόπου (Paratope plasticity): αναγνώριση από έναν παράτοπο διαφορετικών επιτόπων πάνω σε διαφορετικά αντιγόνα, χάρη στην πλαστικότητα που διαθέτει και έτσι μπορεί να προσαρμόσει την περιοχή δέσμευσης του αναλογικά με το εκάστοτε αντιγόνο.

2) Παράτοπος με πολλές διαφορετικές περιοχές δέσμευσης (Big paratope with many binding sites): ένας παράτοπος φέρει περισσότερα από ένα σημεία με τα οποία μπορούν να αλληλεπιδράσουν διαφορετικά αντιγόνα και να δεσμευτούν.

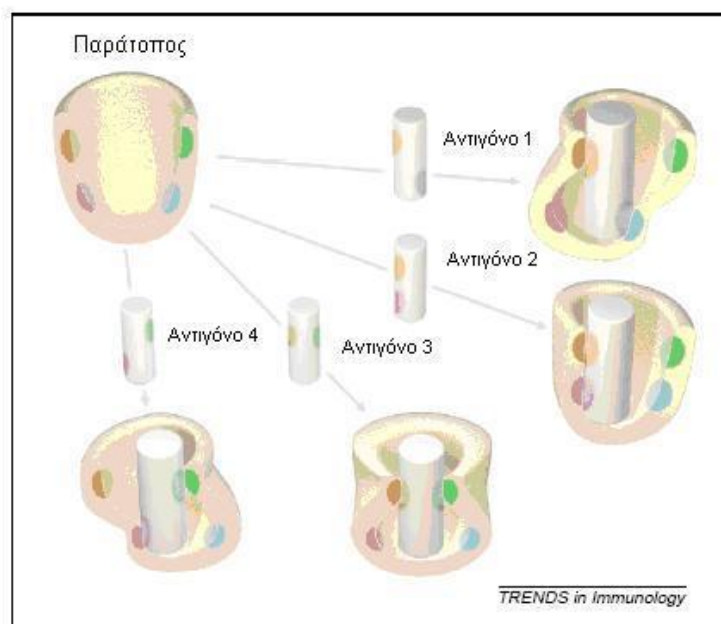
3) Κοινά συστατικά στους επίτοπους (δημόσιοι επίτοποι): επίτοποι που φέρουν κοινά συστατικά πάνω σε διαφορετικά αντιγόνα, οι οποίοι αναγνωρίζονται από έναν παράτοπο.

4) Μοριακή μίμηση (Molecular mimicry): διαφορετικοί αλλά παρόμοιοι δομικά επίτοποι πάνω σε διαφορετικά αντιγόνα, οι οποίοι αναγνωρίζονται από έναν παράτοπο.



Το κλασικό μοντέλο «κλειδί-κλειδαριά» που εξηγεί την αλληλεπίδραση μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος, προτείνει άκαμπτες δομές των αλληλεπιδρώντων μορίων και έχει χρησιμοποιηθεί για χρόνια για να εξηγήσει τη μονοειδικότητα των αντισωμάτων. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ο παράτοπος πολλών αντισωμάτων είναι πιο ελαστικός-πλαστικός από ότι θεωρείτο παλιότερα και ως εκ τούτου τα αντισώματα μπορούν να προσδέσουν διαφορετικές αντιγονικές δομές. **Η πρώτη υπόθεση που αφορά τη**

διαμόρφωση πλαστικότητας του παρατόπου και η οποία είναι αρκετά επικρατής, προτείνει ότι η περιοχή πρόσδεσης των αντιγόνων είναι ελαστική, φέρει δηλαδή πλαστικότητα και αλλάζει στερεοδομή για να προσδέσει τα διάφορα αντιγόνα (**Εικόνα 13**). Στην περίπτωση των πολυδραστικών αντισωμάτων, η αντιγονοδεσμευτική περιοχή πιστεύεται ότι είναι σχετικά εύκαμπτη. Δομικές και βιοφυσικές αναλύσεις αποκαλύπτουν ότι η σύνδεση των αντιγόνων-στόχων σε πολλά αντισώματα βλαστικής σειράς συνοδεύεται από σημαντικές διαμορφωτικές αλλαγές στον παρατόπό τους, με αποτέλεσμα η ενισχυμένη δομική προσαρμοστικότητα του παρατόπου να προσδιορίζει την πολυδραστικότητά τους. Πολλαπλές τρισδιάστατες διαμορφώσεις του αντισώματος μπορεί να υφίστανται ακόμη και πριν από την έκθεση σε αντιγόνα. Εναλλακτικά, όταν ένα αντιγόνο έρχεται σε επαφή με την αντιγονοδεσμευτική περιοχή, διαμορφωτικές αλλαγές στη περιοχή θα μπορούσαν να λάβουν χώρα για να προσδέσουν το αντιγόνο. Αλλαγές έχουν παρατηρηθεί με κρυσταλλογραφικές μελέτες στη τρισδιάστατη δομή ενός αντισώματος κωδικοποιημένου από γονίδια βλαστικής σειράς κατά την αλληλεπίδρασή του με διαφορετικά απτένια [79]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι κατά την αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος, διαφορετικές θέσεις του παρατόπου μπορεί να καταληφθούν από διαφορετικά αντιγόνα. Έτσι, διαμορφωτικές αλλαγές φαίνεται να είναι η πιο εύλογη εξήγηση για την πολυδραστικότητα, αν και ακόμα δεν είναι ξεκάθαρο τι χαρακτηριστικό στην αλληλουχία ή στη δομή ενός πολυδραστικού αντισώματος προσδίδει μεγαλύτερη ευελιξία από αυτήν ενός μονοειδικού αντισώματος.

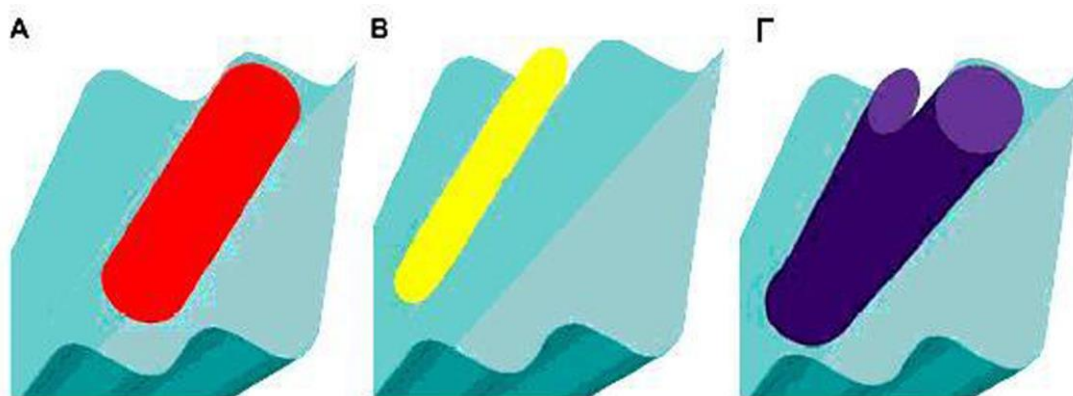


Εικόνα 13. Υπόθεση της ελαστικότητας ενός παρατόπου. Στην εικόνα φαίνονται τέσσερις διαφορετικοί τρόποι αλληλεπίδρασης διαφορετικών θέσεων του παρατόπου ενός

πολυδραστικού αντισώματος. Κάθε αλληλεπίδραση μεταβάλλει την αναδίπλωση ή τη διαμόρφωση της αντιγόνο-δεσμευτικής περιοχής με διαφορετικό τρόπο.

Οι παράτοποι των NAbs είναι πολύ πιο ευαίσθητοι στις μεταβολές της θερμοκρασίας ή στην παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων, κάτι που υποδηλώνει ότι ο παράτοπος των πολυδραστικών NAbs παρουσιάζει περισσότερη πλαστικότητα από εκείνη των μονοειδικών αντισωμάτων. Μελέτες έδειξαν ότι η ωρίμανση του αντισώματος συνοδεύεται από μείωση της ελαστικότητας του παρατόπου. Η θέση πρόσδεσης των αντιγόνων βρίσκεται στις έξι συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές (complementary determining regions, CDR) των αντισωμάτων, που βρίσκονται στη μεταβλητή περιοχή των αντισωμάτων. Αντίθετα με την κλασική θεώρηση «κλειδιού-κλειδαριάς», οι CDR στα πολυδραστικά αντισώματα φαίνεται να είναι πιο ευέλικτες και μπορούν να υποστούν στερεοδιατακτικές αλλαγές, έτσι ώστε να δεσμεύσουν διαφορετικά αντιγόνα. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από ευρήματα που δείχνουν ότι στις υπερμεταβλητές περιοχές πολυδραστικών μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού υπάρχουν μεγάλου μήκους H-CDR3 περιοχές, κάτι το οποίο συνεισφέρει στην ευελιξία της διαμόρφωσής τους στο χώρο. Οι περιοχές αυτές περιέχουν επίσης υδρόφιλα αμινοξέα, όπως κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης, βοηθώντας στην αλληλεπίδραση με διάφορα αρνητικά φορτισμένα αντιγόνα.

Η δεύτερη υπόθεση περιλαμβάνει έναν παράτοπο, που φέρει πολλές διαφορετικές περιοχές δέσμευσης διαφορετικών αντιγονικών επιτόπων. Σε προηγούμενες μελέτες δείχθηκε ότι μια δεδομένη τρισδιάστατη δομή ενός παρατόπου πολυδραστικού NAb μπορεί να συνδέσει ανόμοιους επιτόπους σε διαφορετικές χωροταξικά θέσεις της αντιγόνο-δεσμευτικής περιοχής του (Εικόνα 14.).



Εικόνα 14. Διαφορετικοί επιτόποι προσδένονται σε διαφορετικές θέσεις του ίδιου παρατόπου.

Στην περίπτωση αυτή, ένα πολυδραστικό NAb που έχει προσδεμένες όλες, ή σχεδόν όλες τις θέσεις του σε ένα αντιγόνο, που παρουσιάζει του επιτόπους του με κατάλληλη χωροταξική κατανομή, τότε αυτό το πολυδραστικό NAb συμπεριφέρεται σαν μονοειδικό, αναγνωρίζοντας μια δεδομένη τρισδιάστατη δομή. Ωστόσο, το ίδιο αντίσωμα θα μπορούσε να θεωρηθεί ως "μη ειδικό" λόγω των πολυαντιγονικών ικανοτήτων δέσμευσης, που οφείλονται σε μερική ή ολική συμμετοχή της διακριτής του περιοχής επάνω στον παράτοπο. Έτσι, από αυτές τις μελέτες αρχίζει μάλλον να διαφαίνεται ότι κάθε Nab, αφού παρουσιάζει ένα ξεχωριστό προφίλ πολυδραστικότητας, που είναι μοναδικό, μπορεί και να αναγνωρίσει στενά συνδεδεμένες τρισδιάστατες δομές. Επιπλέον, η παρατήρηση ότι οι σωματικές μεταλλάξεις που εμπλέκονται στη συγγένεια ωρίμανσης ενός αντισώματος μετατρέπουν ένα αντίσωμα σε μονοειδικό φαίνεται να είναι σύμφωνη με αυτήν την υπόθεση, και έτσι πολύ πιθανά κάποια B-κύτταρα που παράγουν πολυδραστικά NAbs μπορεί να είναι πρόδρομοι των κυττάρων που παράγουν μονοειδικά αντισώματα.

Η τρίτη υπόθεση είναι αυτή των κοινών συστατικών στους επίτοπους (δημόσιοι επίτοποι) (Εικόνα 15A.). Τέτοια αποτελέσματα αφορούν επιτόπους που περιέχουν προλίνη. Συγκεκριμένα βρέθηκαν πως NAbs που αναγνώριζαν τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF- α , τον sTNF-R (55 kDa, εξωκυτάρια επικράτεια του υποδοχέα) συνδεόταν σε αυτά μέσω αναγνώρισης των κατάλοιπων προλίνης. Σε μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν αυτά τα πολυδραστικά αντισώματα μετά από σάρωση πεπτιδικών βιβλιοθηκών σε φάγους (screening) και έλεγχο της δραστηριότητάς τους βρέθηκε ότι τα περισσότερα από τα πεπτίδια που αλληλεπιδρούσαν με τα φυσικά αντισώματα, περιείχαν προλίνη είτε προέρχονταν από πρωτεΐνες εαυτού είτε όχι.

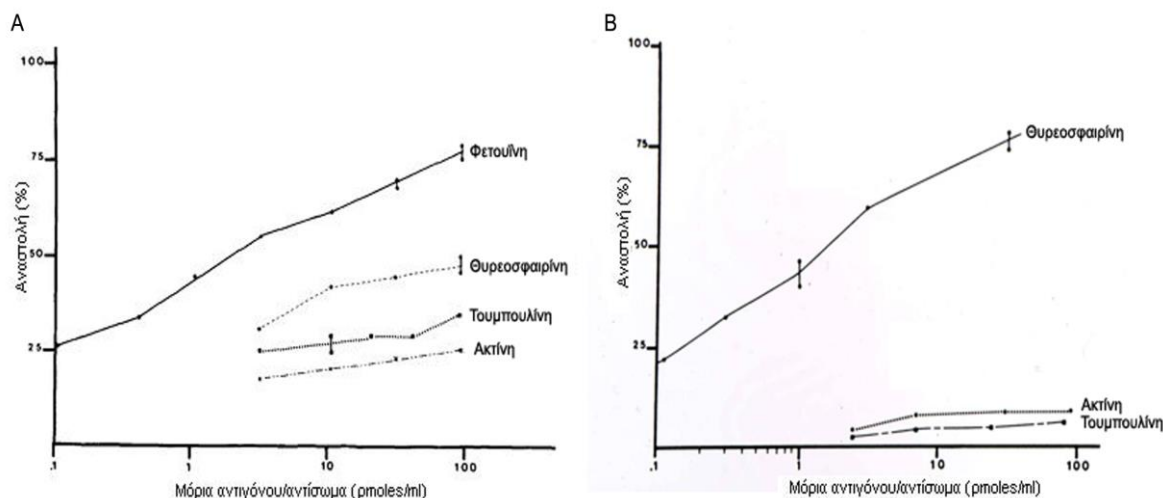
Η τέταρτη υπόθεση είναι αυτή της Μοριακής Μίμησης ή Μιμητισμού. Σε αυτή την υπόθεση ένα αντίσωμα αναγνωρίζει διαφορετικά αντιγόνα που φέρουν όμως παρόμοιους τρισδιάστατους δομικούς επιτόπους, όπως είναι στρεπτοκοκκική πρωτεΐνη M, μμοσίνη, α -ελικοειδή πρωτεϊνών και υδατανθράκων. Αυτή η υπόθεση αναφέρεται σε λιγότερο ελαστικές και περισσότερο ειδικές περιοχές της μεταβλητής περιοχής ενός αντισώματος (Εικόνα 15B.).



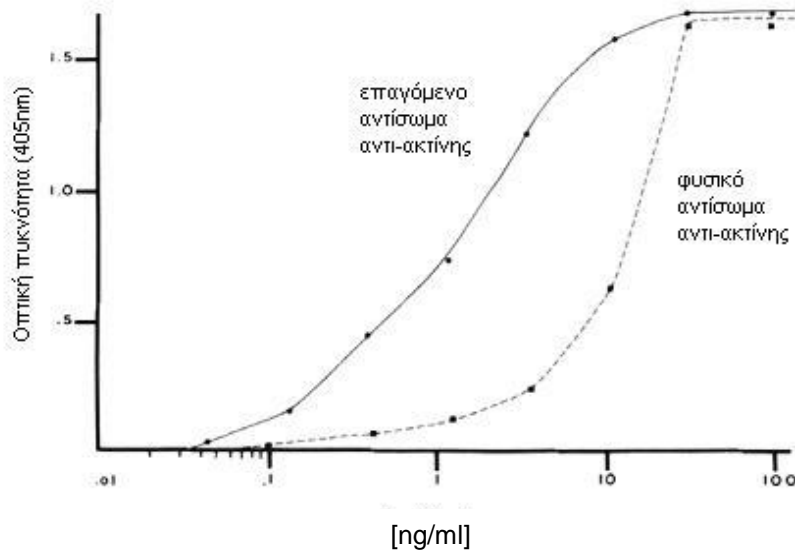
Εικόνα 15. Κοινοί-δημόσιοι επίτοποι και Μοριακή μίμηση. Α) Δημόσιοι επίτοποι, δηλαδή ίδιοι επίτοποι πάνω σε διαφορετικά αντιγόνα αναγνωρίζονται από πολυδραστικά. Β) Μοριακή μίμηση μεταξύ διαφορετικών επιτόπων, οι οποίοι φέρουν όμοιες/παρόμοιες αρωματικά αμινοξέα και έτσι αναγνωρίζονται από τα αντισώματα.

4.2.3. Αντιγόνα - στόχοι

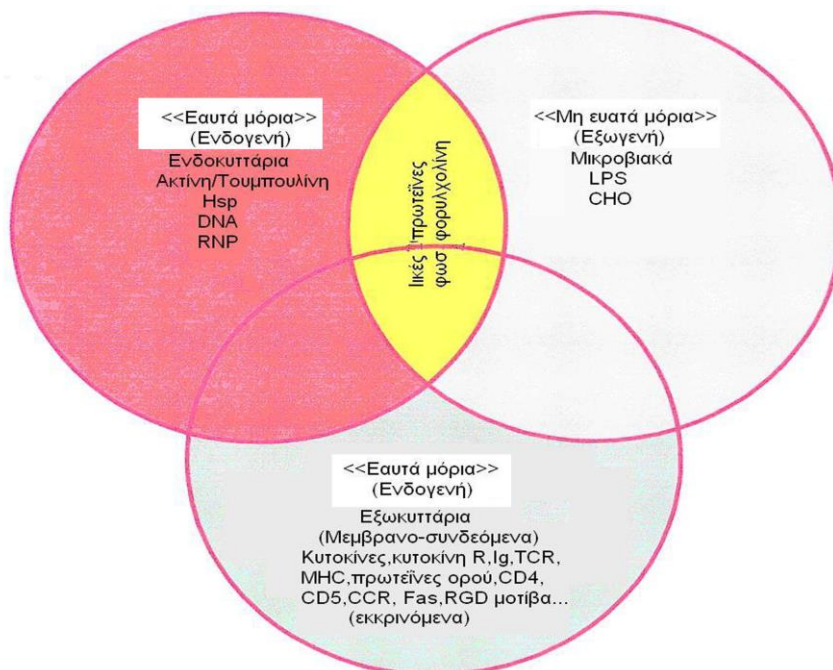
Τα NAbS αναγνωρίζουν διαφορετικά δομικά άσχετα μεταξύ τους αντιγόνα, εαυτά και ξένα, όπως είναι οι πρωτεΐνες (πχ. του κυτταρικού σκελετού), τα νουκλεϊνικά οξέα (DNA, RNA), τα φωσφολιπίδια, οι πολυσακχαρίτες, τα απτένια (πχ. TNP, τρινιτροφαινόλη) κ.ά. Για το λόγο αυτό, οι επίτοποι που αναγνωρίζουν τα NAbS δεν μπορεί παρά να σχετίζονται με τρισδιάστατες δομές ή φορτία και όχι με κοινούς επιτόπους. Την πρώτη φορά που πραγματοποιήθηκε απομόνωση NAbS από ανθρώπινο ορό, χρησιμοποιήθηκαν ανοσοπροσοφοητές που έφεραν διάφορα αντιγόνα, όπως τουμπουλίνη, ακτίνη, θυρεοσφαιρίνη, μυσσφαιρίνη, φετουΐνη, τρανσφερίνη και αλβουμίνη. Με τον τρόπο αυτό, απομονώθηκαν από μίγμα ορών 800 υγιών ατόμων, NAbS που αναγνώριζαν όλα τα αντιγόνα (**Εικόνα 16. & Εικόνα 17.**). Συγκεκριμένα, τα αντισώματα που απομονώθηκαν έναντι της ακτίνης, της μυσσφαιρίνης και της φετουΐνης παρουσίαζαν πολυδραστικότητα, αναγνωρίζοντας το ομόλογο αλλά και ετερόλογα αντιγόνα (**Εικόνα 16Α.**), ενώ αντισώματα που απομονώθηκαν έναντι της θυρεοσφαιρίνης και της τουμπουλίνης παρουσίασαν ειδικότητα μόνο για τα αυτόλογά τους αντιγόνα (**Εικόνα 16Β.**). Αναγνωρίζουν, επομένως, μια ποικιλία αντιγονικών επιτόπων, που βρίσκονται σε ενδοκυττάρια διαμερίσματα όσο και στην κυτταρική επιφάνεια, ενώ φαίνεται να αναγνωρίζουν και κυκλοφορούντα μακρομόρια και απτένια, που χαρακτηρίζονται από μεγάλη συντηρητικότητα κατά την διάρκεια της εξέλιξης. Τα NAbS μπορούν να προσδέσουν ένα μεγάλο εύρος από διαφορετικά σε δομή και σύσταση αντιγόνα [πρωτεΐνες, υδατάνθρακες (πολυσακχαρίτες), λιπίδια (φωσφολιπίδια) και νουκλεϊνικά οξέα] (**Εικόνα 18. & Πίνακας 9.**).



Εικόνα 16. Διαγράμματα ανταγωνιστικής ELISA: A) NAb που απομονώθηκαν έναντι φετουΐνης αναστέλλονται από το αυτόλογο αντιγόνο, καθώς και από άλλα ετερόλογα αντιγόνα, όπως θυρεοσφαιρίνη, τουμπουλίνη και ακτίνη, με χαμηλότερη όμως συγγένεια, και B) NAb που απομονώθηκαν έναντι της θυρεοσφαιρίνης αναστέλλονται μόνο από το αυτόλογο αντιγόνο.



Εικόνα 17. Διάγραμμα της αντισωματικής δραστηριότητας έναντι της ακτίνης, πολυκλωνικών φυσικών και επαγόμενων αντισωμάτων, απομονωμένων σε ανοσοπροσροφητή ακτίνης μετά από έλεγχο με ELISA.



Εικόνα 18. Το φάσμα των εαυτών και μη-εαυτών μορίων που αναγνωρίζονται από τα φυσικά αντισώματα. Στα αντιγόνα που αναγνωρίζονται από τα πολυδραστικά φυσικά αντισώματα περιλαμβάνονται ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια αντιγόνα (μεμβρανοσυνδεδεμένα αντιγόνα καθώς και αντιγόνα ελεύθερα στην κυκλοφορία), (PC: φωσφορυλοχολίνη, LPS: λιποπολυσακχαρίτης, CHO: μικροβιακοί υδατάνθρακες, HSP: πρωτεΐνη θερμικού σοκ, DNA: δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ, RNP: ριβονουκλεοπρωτεΐνη,

Cytokine R: υποδοχείς κυτταροκινών, Ig: ανοσοσφαιρίνη, TCR: υποδοχέας T κυττάρου, MHC: μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, CD4 και CD5: δείκτες κυτταρικής επιφάνειας, CCR5: συνυποδοχέας 5 (coreceptor 5), RGD: Arg- Gly-Asp μοτίβο των ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΩΝ.

Πίνακας 9. Αντισώματα έναντι εξελικτικά συντηρημένων μορίων που ανευρίσκονται στο ορό υγιών ατόμων

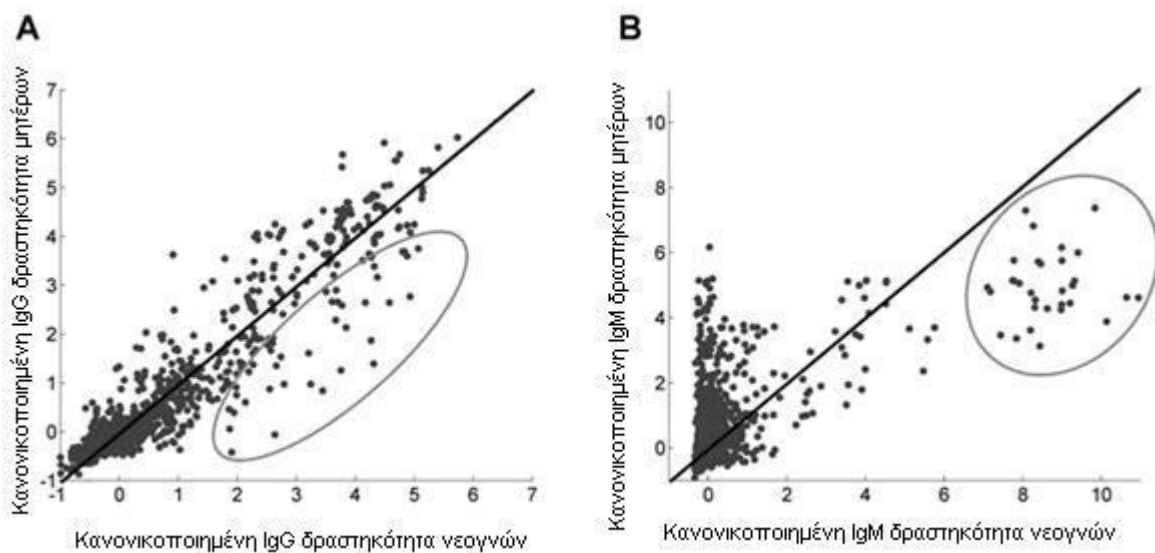
Αλληλεπίδραση αντισωμάτων με:	Ισότυπος	Αναφερθείσα πολυδραστικότητα
Ενδοκυτταρικά συστατικά :		
• Ακτίνη, τουμπουλίνη, μυσίνη, κερατίνη, DNA, μυσσφαιρίνη, κυτόχρωμα c, κολλαγόνο, βασική πρωτεΐνη μυελίνης	• IgM, IgG και IgA	• Ναι
• Πρωταμίνη	• IgM	• Όχι
Μεμβρανικά συστατικά:	• IgG	• Όχι
• β ₂ -μικροσφαιρίνη, σπεκτρίνη, ζώνη-πρωτεΐνης 3, εκκριτικά συστατικά	• IgM, IgG και IgA	• Ναι
• Κυκλοφορούσες πρωτεΐνες		
• Αλβουμίνη, τρανσφερίνη, IgG		
Κυτταροκίνες:		
• Ιντερφερόνες, ιντελευκίνη 1α,	• IgG	• Όχι
• Νεκρωτικοί παράγοντες όγκων	• IgM και IgG	• Όχι
Ορμόνες και συναφή μόρια:		
• Ινσουλίνη	• IgG	• Όχι
• Θυρεοσφαιρίνη	• IgM και IgG	• Ναι
Μικρά μόρια:		
• VIP, χοληστερόλη, Gal α1-3 Gal γλυκοσιδικός επίτοπος	• IgG	• Όχι
• Διφωσφατιδυλγλυκερόλη, φωσφατιδικό οξύ, φωσφατιδυλσερίνη	• IgM, IgG και IgA	• Ναι

Η **προλίνη** που αποτελεί ένα αμινοξύ με το οποίο αλληλεπιδρούν συχνά πολυδραστικά αντισώματα είναι συνήθως παρούσα σε εκτεθειμένες περιοχές των πρωτεϊνών, όπως βρόγχους (loops), με αποτέλεσμα δομές που φέρουν προλίνη να χρησιμεύουν ως δομικοί/διαμορφωτικοί τρισδιάστατοι επίτοποι για τα πολυδραστικά NAb [80]. Επίσης, τα πολυδραστικά αντισώματα αναγνωρίζουν β-γαλακτοζιδάση (Kd-10⁻⁷M), τοξοειδή τέτανο (tetanus toxoid), αντιγόνα σε παθογονικά βακτήρια και ιούς [64], λιποπολυσακχαρίτες (LPS lipopolysaccharide), ανεξίνη IV (Annexin IV) [81], επίτοπους που έχουν υποστεί οξειδωση [82], όπως και αντιγόνα του κεντρικού νευρικού συστήματος (Πίνακας 10.).

Πίνακας 10. Φυσικά αυτοαντισώματα στο κεντρικό νευρικό σύστημα

Ονομασία	Αντιγόνο	Τάξη Ig	Λειτουργία	Ασθένεια
Καταλυτικό αντι-β αμυλοειδές	β-αμυλοειδές	IgM	Τεμαχισμός του β-αμυλοειδούς αναστέλλει τις εναποθέσεις και τη νευροτοξικότητα	Αυξημένο στη νόσο του alzheimer
Αντι-β-αμυλοειδές	β-αμυλοειδές	IgG	Αποτρέπει εναποθέσεις αμυλοειδούς	Μειωμένο στη νόσο του alzheimer
Αντι-α-συνουκλείνη	α-συνουκλείνη	IgG	Μείωση της συσσώρευσης των εναποθέσεων της α-συνουκλείνης	Μειωμένο στη νόσο του Parkinson
Αντι- PrP	Πρωτεΐνη prion	IgG	Άγνωστη	Άγνωστο
sHlgM22, sHlgM46	Επιφάνεια των ολιγοδενδροκυττάρων, μυελίνη	IgM	Η πρόσδεση των αντιγόνων στην επιφάνεια των ολιγοδενδριτών οδηγεί σε ενδοκυτταρικά προώθηση σημάτων επιδιόρθωσης	Σκλήρυνση καταπλακάς
sHlgM12, sHlgM42	Επιφάνεια νευρώνων	IgM	Προάγει την ανάπτυξη των νευραξόνων <i>in vitro</i>	Σκλήρυνση καταπλακάς
Αντι-Tau	Tau	IgM, IgG	Άγνωστη	Νόσος του alzheimer
Αντι-Φωσφορυλιωμένο Tau	Φωσφορυλιωμένο Tau	IgM> IgG	Άγνωστη	Άγνωστο (νόσος του alzheimer?)

Οι δραστικότητατες αυτοαντισωμάτων που υπάρχουν στο αίμα του ομφάλιου λώρου αποτελούν το ρεπερτόριο της φυσικής αυτοανοσίας με το οποίο οι υγιείς άνθρωποι αρχίζουν τη ζωή τους και η δραστικότητα των μητέρων αντανάκλα την ανάπτυξη του ρεπερτορίου στους υγιείς ενήλικες. Σε μελέτες όπου εξέτασαν τις δραστικότητατες IgM και IgG αυτοαντισωμάτων σε ορούς από μητέρες και από τα νεογνά τους (ομφάλιο λώρο) έναντι 300 αυτο-αντιγόνων βρήκαν ότι το ρεπερτόριο των IgG έδειξε υψηλή συσχέτιση μεταξύ κάθε μητέρας και του νεογέννητου της, ενώ το ρεπερτόριο των IgM των νεογέννητων ήταν παρόμοιο αλλά διέφερε από αυτό των μητέρων τους (**Εικόνα 19**). Φαίνεται λοιπόν πως διαφορετικοί άνθρωποι όταν γεννιούνται φέρουν παρόμοια IgM αυτοαντισώματα, που παράγονται εντός της μήτρας, αλλά με αντισώματα IgG που μοιάζουν πολύ με αυτά των μητέρων τους. Το ρεπερτόριο των αυτοαντισωμάτων φαίνεται να είναι δομημένο σε σετ αντιδραστικότητας που οργανώνεται σε ομάδες δραστικότητας (cliques-reactivities) έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων και στα οποία ορισμένες βασικές δραστικότητατες έναντι αντιγόνων κυριαρχούν [83].

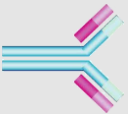
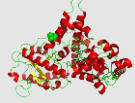
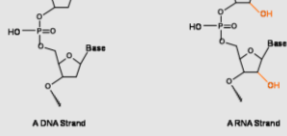
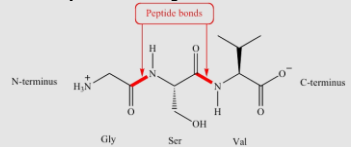
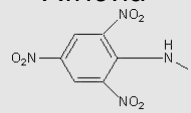
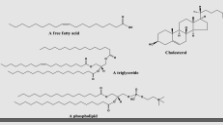



Εικόνα 19. Κανονικοποιημένες δραστικότητατες αντισωμάτων τάξης IgG (A) και IgM (B) των νεογνών (άξονας x) και των μητέρων τους (άξονας y). (A) Για τα περισσότερα από τα αντιγόνα παρουσίαζαν παρόμοιες δραστικότητατες οι IgG των νεογνών και των μητέρων, ενώ μόνο ένα μικρό κλάσμα των αντιγόνων δείχνει σημαντικές αποκλίσεις από αυτή την τάση, παρουσιάζοντας υψηλότερες δραστικότητατες μόνο από τις IgG των νεογνών (κυκλωμένο). (B) Δυο τύποι αντιγονικών πληθυσμών μπορούν να ανιχνευθούν. Ο πρώτος πληθυσμός είναι η συντριπτική πλειοψηφία των αντιγόνων που χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλή δραστικότητα από τις IgM των νεογνών σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των μητέρων τους. Η δεύτερη ομάδα χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα της δραστικότητατες των IgM των νεογέννητων και έλλειψη δραστικότητα από τις μητέρες [83].

Επίσης, μελέτες έχουν αναφερθεί στην αλληλεπίδραση πολυδραστικών NAb με φορτισμένα μόρια είτε θετικά είτε αρνητικά. Αναλυτικότερα έχει προσδιοριστεί πως NAb

με μεταβλητές περιοχές πλούσιες σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα μπορούν να αναγνωρίσουν και να αλληλεπιδράσουν καλύτερα με αρνητικά φορτισμένα μόρια, όπως το DNA ή η καρβονική ανυδράση, αλλά και το αντίθετο, όπως με τις ιστόνες. Συνολικά, τα πολυδραστικά NAbs δεσμεύονται σε ένα ευρύ φάσμα μορίων, εαυτών και ξένων, αλληλεπιδρώντας είτε με τη σύσταση, είτε με τη δομή τους, είτε με το φορτίο τους (Πίνακας 11.).

Πίνακας 11. Πολυδραστικότητα φυσικών αυτοαντισωμάτων

ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ		
	ΔΟΜΗ	Τρισδιάστατη δομή 
	ΣΥΣΤΑΣΗ	Νουκλεϊνικά οξέα 
		Πρωτεΐνες-πεπτίδια 
		Απτένια 
		Λιπίδια 
		Αρνητικά ή θετικά φορτισμένα μόρια Electrostatic Attraction/Repulsion Attraction 
ΦΟΡΤΙΑ		

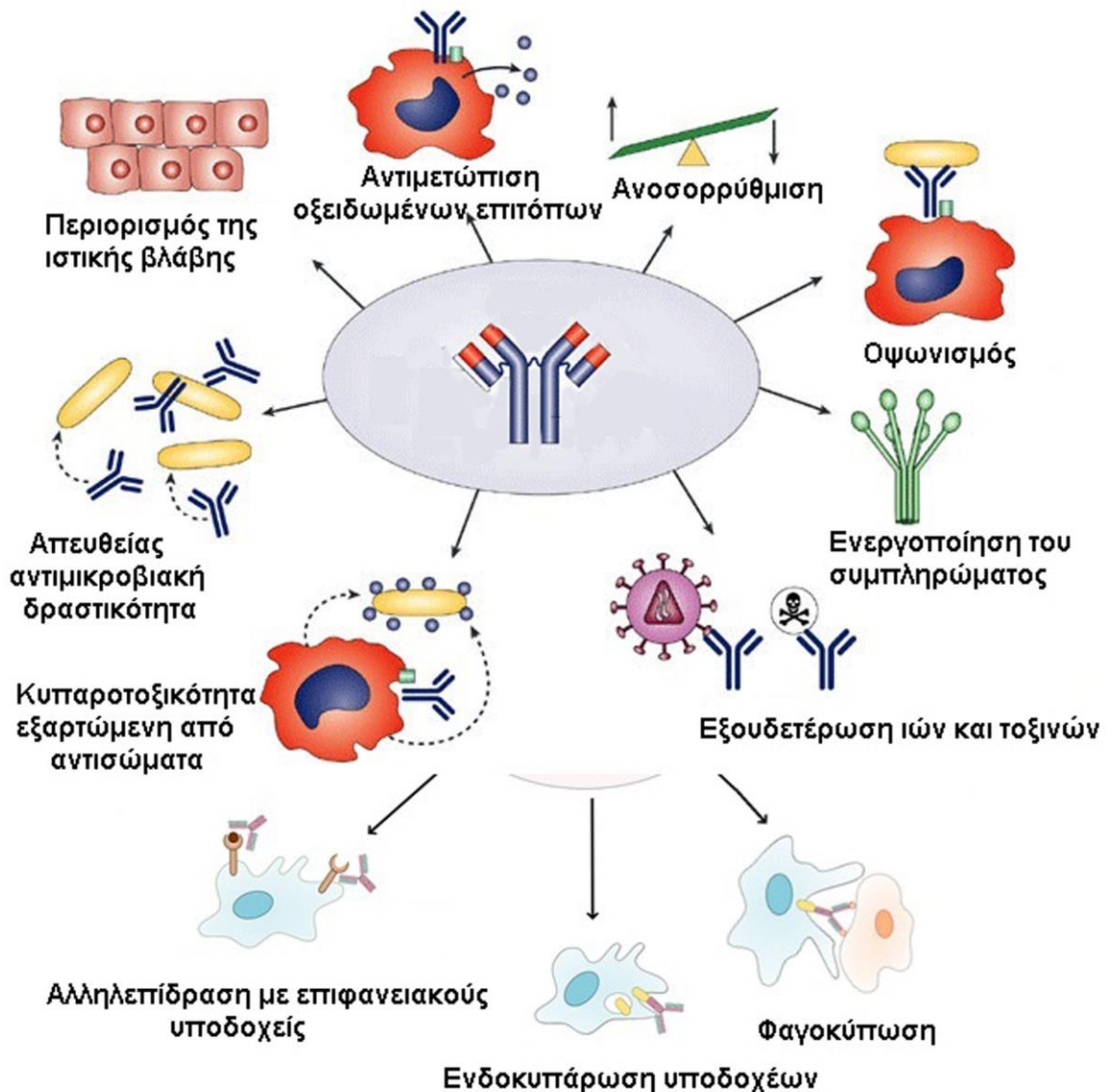
5. Βιολογικός ρόλος των NAbS

Τα χαρακτηριστικά των NAbS συνδέονται με ποικίλες βιολογικές δράσεις. Η διάκριση αυτού από το ξένο καθώς και η πολυδραστικότητα μπορεί να οδηγήσει είτε σε μια φυσιολογική κατάσταση, είτε σε μια παθολογική, όπως καρκίνο, καρδιακές νόσους και αυτοανοσία. Η πολυδραστικότητα που σχετίζεται στενά με την αυτοδραστικότητα και είναι μια υψηλά συντηρημένη ιδιότητα του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Πολυδραστικά Β-κύτταρα και τα αντισώματα που εκκρίνουν, μετέχουν σε πολλαπλές αλληλεπιδράσεις κυρίως με ενδογενή αλλά και με εξωγενή συστατικά. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα τεράστιο ενεργό δίκτυο που εξασφαλίζει την ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος. Από τη στιγμή φυσικά που το δίκτυο αυτό συνδέεται με όλα τα βιολογικά συστήματα του οργανισμού είναι πιθανό το ανοσοποιητικό σύστημα με τον τρόπο αυτό να συμβάλλει στην ομοιόσταση όλου του οργανισμού.

Ο ακριβής ρόλος των NAbS δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, αλλά σύμφωνα με τα ως τώρα δεδομένα, φαίνεται ότι το κύριο μέρος του ρόλου τους είναι να απομακρύνουν μεταβολικά παραπροϊόντα (housekeeping), να δρουν ενάντια σε μολύνσεις από παθογόνους παράγοντες και να συμμετέχουν στην ανοσορύθμιση, στην ομοιόσταση, την επιλογή ρεπερτορίου, καθώς και στη μεταφορά και λειτουργική διαφοροποίηση βιολογικά δραστικών μορίων [84]. (Πίνακας 12. & Εικόνα 20.).

Πίνακας 12. Οι βιολογικοί ρόλοι των NAbS

Ομοιοστατικός ρόλος των NAbS	
Απομάκρυνση μεταβολικών προϊόντων (Housekeeping) π.χ. anti-DNA, anti-Tg, anti-SCA, anti-NFkB, anti-rel	Συμβάλλουν στην απομάκρυνση αποπτωτικών, καρκινικών ή και γηρασμένων κυττάρων
Αντιμολυσματικός -Αντιμετώπιση παθογόνων π.χ. anti-gp160/ 120/ 41, anti-Tat, anti-V3 loop, anti-phosphorylcholine	Συμμετέχουν στην άμυνα έναντι βακτηρίων, ιών και άλλων παθολογικών παραγόντων
Ανοσορρυθμιστικός π.χ. anti-Ig, anti-TCR CD4/CD8	Συμβάλλουν στη ρύθμιση της δραστηριότητας των Β και Τ λεμφοκυττάρων
	Ενέχονται στον έλεγχο της δράσης των κυτταροκινών, της παρουσίασης αντιγόνων στα Τ-κύτταρα
	Συμμετέχουν σε ένα μεγάλο ιδιοτυπικό αντι-ιδιοτυπικό δίκτυο μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους

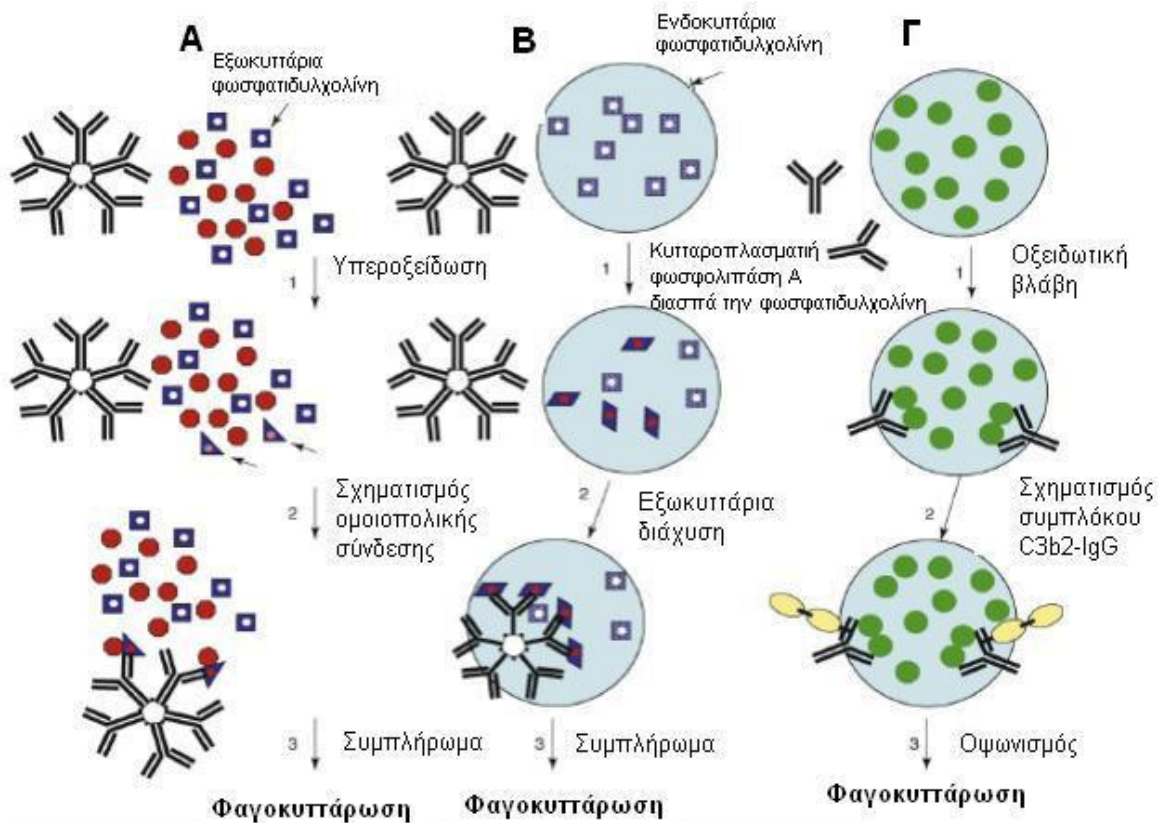


Εικόνα 20. Οι διαφορετικοί βιολογικοί ρόλοι των NAbs. Απεικονίζονται οι κύριες λειτουργίες των NAbs, όπως συμμετοχή: α) στον περιορισμό της ιστικής βλάβης, β) στην αντιμετώπιση οξειδωμένων επιτόπων, γ) στην ανοσορρύθμιση, δ) στη διαδικασία του οψωνισμού, ε) στην ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος, ζ) στην εξουδετέρωση ιών και τοξινών, η) στη φαγοκύτωση, θ) στην ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχών, ι) στην αλληλεπίδραση με επιφανειακούς υποδοχείς, κ) στην κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από αντισώματα και λ) στην απευθείας αντιμικροβιακή δράση. (Casadevall et al. 2004)

5.1. Απομάκρυνση προϊόντων καταβολισμού

Μια από τις ιδιαίτερες ικανότητες των NAbs είναι η απομάκρυνση προϊόντων μεταβολισμού. Αυτός ο σπουδαίος ρόλος προτάθηκε από τον P. Grabar το 1975 και αναφερόταν στην αυξανόμενη παρουσία αυτοαντισωμάτων όταν υπήρχε καταστροφή ιστού ή αλλοίωσή του από εξωγενείς παράγοντες [85]. Ο P. Grabar υπέθεσε ότι τα ανοσολογικά φαινόμενα όταν συμβαίνουν δεν είναι μέρος ενός «αμυντικού μηχανισμού»,

αλλά μάλλον μέρος ενός φυσιολογικού συστήματος χειρισμού του μεταβολισμού και των καταβολικών προϊόντων του. Έτσι, τα "εαυτά" συστατικά αποικοδομούνται συνήθως από αυτολυτικά ένζυμα, αλλά σε περιπτώσεις μαζικής καταστροφής ιστών, αυτά τα ένζυμα μπορεί να ανασταλούν από παράγοντες, όπως η περίσσεια υποστρώματος. Τότε τα κύτταρα που εκκρίνουν NAbS ενεργοποιούνται, με αποτέλεσμα τα NAbS να εμφανίζονται και να διευκολύνουν τη φαγοκυττάρωση. Ο ίδιος μηχανισμός λειτουργεί και για τα «μη εαυτά» συστατικά, εάν δεν αντιμετωπιστούν από τα υπάρχοντα ένζυμα (Εικόνα 21.) [86].



Εικόνα 21. Τρόποι απομάκρυνσης προϊόντων καταβολισμού από τα NAbS. Τα NAbS αναγνωρίζουν τα αλλοιωμένα εαυτά αντιγόνα και μεσολαβούν στην εκκαθάριση των παραγόμενων καταβολικών προϊόντων. (α) Πολυδραστικά IgM NAbS συνδέονται με οξειδωμένους επιτόπους [μόρια φωσφατιδυλοχολίνης (PC, τετράγωνα) μετά την υπεροξείωση εκθέτουν ελεύθερες αλδεΐδες (τρίγωνα) με τις οποίες αντιδρούν ομοιοπολικά πρωτεΐνες όπως η LDL (κύκλοι), και δημιουργούν νεοαντιγόνα] πάνω σε κύτταρα και σωματίδια και ενεργοποιούν την κλασική οδό του συμπληρώματος (+CP), (β) Απομάκρυνση αποπτωτικών κυττάρων [μόρια PC (τετράγωνα) διασπώνται από φωσφολιπάση A2 και διαχέονται γρήγορα στην εξωπλασματική πλευρά εκθέτοντας κεφαλές φωσφορυλοχολίνης (ρόμβος)] από τα φαγοκύτταρα μετά την αναγνώριση και δέσμευσή τους από πολυδραστικά IgM NAbS, (γ) Οψωνοποίηση των γηρασμένων ερυθροκυττάρων (RBC) μετά από τη δέσμευση IgG NAbS στη ζώνη 3 των RBC (κύκλοι) και προσέλκυση του συμπληρώματος C3b (διμερή μορφή, κίτρινο)

Έτσι ως σήμερα έχει αναφερθεί ότι τα NAbS συμμετέχουν στην απομάκρυνση από τον οργανισμό προϊόντων καταβολισμού:

- **έναντι αλλοιωμένων - μη λειτουργικών πρωτεϊνών του πλάσματος.** Υπάρχουν NAbs, τα οποία δεν αντιδρούν με τη φυσιολογική μορφή της αλβουμίνης αλλά με αλλοιωμένες μορφές της αναγνωρίζοντας γενικά μοτίβα που εκτίθενται πάνω στις μορφές αυτές [26]. Επίσης, ανάλογες δράσεις έχουν και NAbs που αναγνωρίζουν ειδικά δομές β-φύλλου (β sheet) που φέρουν αμυλοειδογενείς πρόδρομοι (precursors), όπως το αμυλοειδές A ορού, η τρανσθυρετίνη (transthyretin) κ.α. Με αυτό τον τρόπο αυτά τα NAbs συντελούν στην απομάκρυνση μεγάλης συγκέντρωσης αμυλοειδών, όπως συμβαίνει στη νόσο Alzheimer [87].

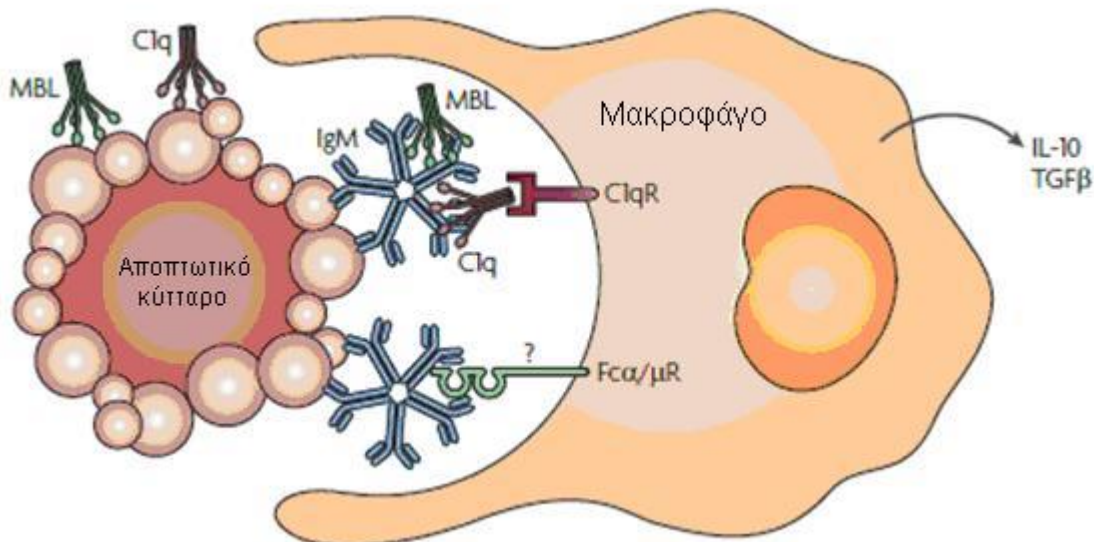
- **έναντι της Ζώνης 3 του κυτταροσκελετού των ερυθροκυττάρων.** NAbs που δεσμεύονται σε συσσωματώματα της Ζώνης 3 του κυτταροσκελετού των ερυθροκυττάρων έχουν βρεθεί να συντελούν στην απομάκρυνσή τους. Τέτοια συσσωματώματα ερυθροκυττάρων δημιουργούνται σε γηρασμένα ερυθροκύτταρα και τα NAbs αντιδρώντας με αυτά επάγουν τη δέσμευση συστατικών του συμπληρώματος, με αποτέλεσμα την αποτελεσματική φαγοκύττωσή τους από μονοκύτταρα.

- **έναντι της φωσφορυλχολίνης πάνω σε οξειδωμένες λιπο/πρωτεΐνες (oxidatively damaged lipid/protein adducts).** NAbs τάξης IgM έναντι επιτόπων που έχουν υποστεί οξείδωση (OxPC, oxidation-specific epitopes; neoself epitopes) φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία από την αθηροσκλήρωση. Αυτά δεσμεύονται στην κεφαλή της φωσφατιδυλοχολίνης μόνο όταν η πλευρική αλυσίδα στη θέση 2 του σκελετού γλυκερόλης, έχει υποστεί οξειδωτική βλάβη και η παραγόμενη αλδεΐδη (1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine, POVPC) έχει σχηματίσει συνδέσεις με κάποιο κοντινό λιπίδιο ή πιο συχνά πρωτεΐνη. Επιπλέον, η πρόσδεση NAbs τάξης IgM σε οξειδωμένη LDL (Low-Density Lipoprotein) εμποδίζει την εναπόθεσή της στις αθηρωματικές πλάκες και συνεπώς προστατεύει από την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης [88].

- **έναντι αποπτωτικών και γηρασμένων κυττάρων.** Πολλά κύτταρα υποβάλλονται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, απελευθερώνοντας κύστες (blebs) και αποπτωτικά σωματίδια, που αναγνωρίζονται από διάφορους παράγοντες και τελικά φαγοκυτταρώνονται. Η μη αποτελεσματική κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε αυτοάνοση ασθένεια, όπως στο συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο. Ως εκ τούτου, η κάθαρση των προϊόντων καταβολισμού πρέπει να γίνεται αποτελεσματικά, χωρίς τη διάσπαση του κυττάρου και την παρουσίαση του αντιγονικού υλικού στο ανοσιακό σύστημα. Τα NAbs τάξης IgM, με την ικανότητα να σχηματίζουν πολυμερή, εμφανίζουν 1000-φορές μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης στο συμπλήρωμα από ότι οι IgG. Η πρόσδεση των IgM NAbs στα αποπτωτικά κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος και πιο συγκεκριμένα του συστατικού

C1q που οδηγεί στην προσέλκυση μακροφάγων, τα οποία φαγοκυτταρώνουν τα αποπτωτικά κύτταρα με τελικό αποτέλεσμα την κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων (**Εικόνα 22**). Τα NAbS τάξης IgM αναγνωρίζουν και προσδένονται πάνω σε αποπτωτικά κερατινοκύτταρα και κινούν τη διαδικασία οψωνοποίησης των αδιάλυτων εξωκυττάρων ινιδίων κερατίνης, μέσω της ενεργοποίησης του C1q, όπως έχει δειχθεί με *in vivo* και *in vitro* μελέτες φαγοκυττάρωσης παρουσία ορού και IgM ή C1q με ανεπάρκεια ορού.

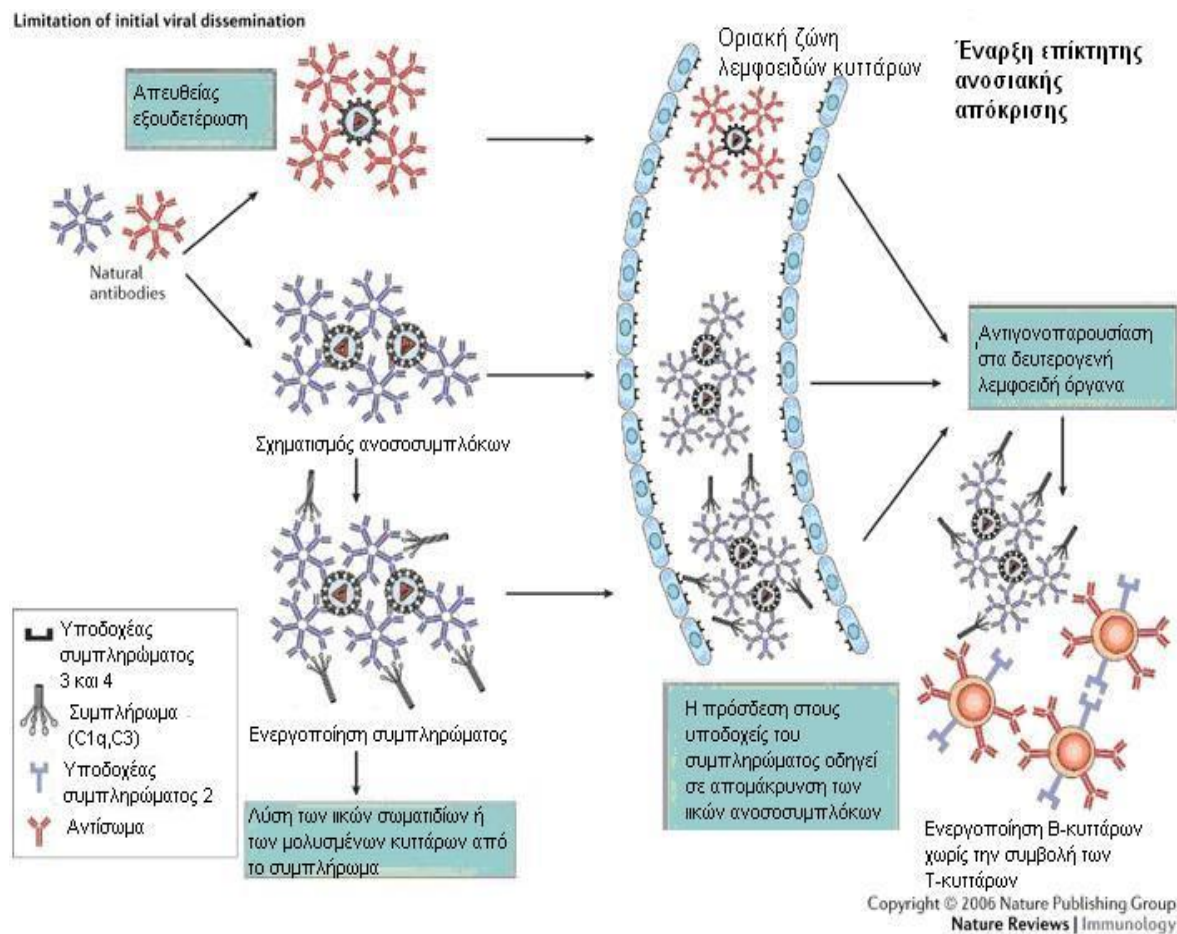
Παρά την πληθώρα υποδοχέων (scavenger receptors) που είναι γνωστό ότι συνδέονται στα αποπτωτικά κύτταρα, η πρόσληψή τους από τα μακροφάγα είναι μειωμένη τρεις έως τέσσερις φορές απουσία NAbS τάξης IgM, επιδεικνύοντας έτσι ένα σημαντικό ρόλο των φυσικών IgM σε αυτή τη διαδικασία [89]. Αποπτωτικά κύτταρα μπορούν επίσης να αναγνωριστούν από τη λεκτίνη που προσδένεται στη μανόζη (MBL, mannose-binding lectin), η οποία με τη σειρά της μπορεί να συνδέεται με φυσικά IgM μέσω N- γλυκανών.



Εικόνα 22. Ρόλος των NAbS τάξης IgM στη δέσμευση και τον οψωνισμό αποπτωτικών κυττάρων. Τα NAbS τάξης IgM προσδένονται στην επιφάνεια των αποπτωτικών κυττάρων μαζί με το συστατικό του συμπληρώματος C1q και τη λεκτίνη MBL (mannose-binding lectin), οδηγώντας τα στα μακροφάγα για απομάκρυνση. Το C1q δεσμεύεται στο Fc τμήμα του IgM και, μαζί με την MBL, λειτουργούν από κοινού για να προωθήσουν τη φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων. Η φαγοκύτωση αποπτωτικών κυττάρων από μακροφάγα προωθεί την ανοσορρύθμιση, επάγοντας την έκκριση από τα τελευταία αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως της ιντερλευκίνης 10 (IL-10), και του αυξητικού παράγοντα TGFβ (transforming growth factor-β), καθώς και την απομάκρυνση πιθανών αυτοάνοσων επιτόπων από τους ιστούς του σώματος.

5.2. Δράση έναντι παθογόνων παραγόντων

Σε ό,τι αφορά τις βακτηριακές και ιικές λοιμώξεις, τα πολυδραστικά NAbS μπορεί να διευκολύνουν την πρόσληψη, επεξεργασία και παρουσίασή τους στα μακροφάγα. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι τα πολυδραστικά NAbS συνεργούν μαζί με το σύστημα του συμπληρώματος στην οψωνοποίηση ιών, βακτηρίων και άλλων παθογόνων παραγόντων κατευθύνοντάς τα έτσι στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και διευκολύνοντας στην έναρξη της απόκρισης, με αποτέλεσμα αφενός μεν να προστατεύουν τους ιστούς-στόχους, αφ' ετέρου να επιταχύνουν την ανοσολογική απόκριση (**Εικόνα 23.**) [90].



Εικόνα 23. Η σημασία των NAbS στην αντιμετώπιση των ιών. Τα NAbS παρέχουν τη γεφύρωση μεταξύ έμφυτης και επίκτητης ανοσιακής απόκρισης. Πριν ενεργοποιηθεί το επίκτητο ανοσιακό σύστημα, περιορίζουν τη διάδοση των ιών με άμεση εξουδετέρωση, ενεργοποίηση συμπληρώματος και την εξάλειψη του ιού στις περιφερικές ζώνες των δευτερογενών λεμφικών οργάνων. Επιπλέον, τα NAbS συμμετέχουν και στο επίκτητο ανοσιακό σύστημα, συμβάλλοντας ουσιαστικά στην πρόσληψη αντιγόνου στα δευτερογενή λεμφικά όργανα [91].

Μετά από εξωγενή ερεθίσματα, όπως είναι η είσοδος μολυσματικών παραγόντων, λαμβάνει χώρα μια αναπροσαρμογή του υπάρχοντος δικτύου των NAbS προκειμένου να αντιμετωπίσει τη νέα εισβολή. Δεδομένου ότι οι παράγοντες αυτοί φέρουν ποικίλους

όμοιους επιτόπους, δεσμεύονται από τα πολυδραστικά NAbs με μεγαλύτερη συγγένεια από ότι τα ήδη παρόντα αυτοαντιγόνα ενεργοποίηση αυτή, που αφορά κατά κύριο λόγο τα B-κύτταρα που φέρουν IgM NAbs και σε μικρότερο βαθμό εκείνα που φέρουν IgG, καταλήγει στη δέσμευση των μολυσματικών παραγόντων και τη διευκόλυνση της φαγοκυττάρωσής τους από τα μακροφάγα και της απομάκρυνσής τους από την κυκλοφορία, με τη βοήθεια του συμπληρώματος.

Ο σημαντικότερος μηχανισμός δράσής τους είναι μέσω ενεργοποίησης του συμπληρώματος, αν και έχει αναφερθεί ότι ορισμένα βακτήρια απομακρύνονται από IgM NAbs με διαδικασίες ανεξάρτητες του συμπληρώματος. Ωστόσο και σε οργανισμούς με ανεπτυγμένο τόσο το μη ειδικό όσο και το ειδικό σκέλος της ανοσίας, τα NAbs συνεισφέρουν γενικά στην άμυνα έναντι των παθογόνων, καθώς μελέτες σε ποντίκια που δεν εκκρίνουν IgM δείχνουν πως αυτά είναι πιο ευάλωτα στις μολύνσεις. Σε περίπτωση παρατεταμένης παραμονής του μολυσματικού παράγοντα στον ξενιστή θεωρείται ότι τα κύτταρα που παράγουν πολυδραστικά NAbs θα διαφοροποιηθούν μετά από σωματικές μεταλλάξεις, επιτρέποντας την αναδιάρθρωση των αντίστοιχων γονιδίων. Έτσι, φαίνεται ότι με τη συνεχή επιλογή όλο και περισσότερο ειδικών αντισωμάτων θα επιτευχθεί τελικά μια ειδική ανοσιακή απόκριση έναντι του παθογόνου παράγοντα [61]. Αυτός ο μηχανισμός δράσης είναι φυλογενετικά διατηρημένος, καθώς συναντάται και σε διάφορα είδη ψαριών, όπου υπάρχει μόνο μια κύρια τάξη ανοσοσφαιρινών, χωρίς να υπάρχει η δυνατότητα αλλαγής τάξης και συνεπώς τα πολυδραστικά NAbs πιθανόν να αποτελούν το μοναδικό μηχανισμό άμυνας.

Τα NAbs φαίνεται να επιταχύνουν την ανοσολογική απόκριση έναντι ιών, όπως ο VSV (Vesicular Stomatitis Virus) αλλά και ο ιός της γρίπης καθώς και έναντι βακτηρίων όπως η *Listeria* (**Πίνακας 13**). Σε μελέτες με διαγονιδιακά ποντίκια που εμφάνιζαν ανεπάρκεια στην έκκριση IgM μετά από μόλυνση με λοιμώδους παράγοντες, όπως βακτήρια (*peritonitis*, *Borrelia* spp ή *Brugia pahangi*), ιούς (ιός της γρίπης, φουσαλιδώδης ιός αφθώδους στοματίτιδας (VSV), λεμφοκυτταρική χοριομηνιγγίτιδα ιού της γρίπης και *virus*), με παρασιτικούς σκώληκες ή μύκητες (*Cryptococcus neoformans*) αποκάλυψε ότι απουσία των IgM οι μολύνσεις επεκτείνονταν περισσότερο ή αργούσαν πολύ να αντιμετωπιστούν από το ανοσιακό σύστημα, δείχνοντας πως οι IgM μπορεί να μεσολαβούν στην ανοσία διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ των παθογόνων και των φαγοκυττάρων [92].

Εκτός από το μηχανισμό μέσω ενεργοποίησης του συμπληρώματος, τα NAbs τάξης IgM έχει αναφερθεί ότι προστατεύουν από τις μολύνσεις και με έμμεσο τρόπο, ανεξάρτητα του συμπληρώματος. Συγκεκριμένα, μονοκλωνικά πολυδραστικά NAbs ποντικού βρέθηκε πως ρυθμίζουν τη δράση της ιντερφερόνης και κατά συνέπεια την ιική μόλυνση από

Vesicular Stomatitis Virus μέσω της πρόσδεσής τους στην επιφάνεια των μολυσμένων κυττάρων του ζώου. Με παρόμοιο τρόπο, πολυκλωνικά NAbs πέστροφας προστατεύουν ινοβλάστες από την ιική μόλυνση από ραβδοϊούς και μπιρναϊούς *in vitro*. Θεωρείται πως τα αντισώματα αυτά αλληλεπιδρούν με νέους επιτόπους που δημιουργούνται στην επιφάνεια των κυττάρων μετά τη μόλυνσή τους από τους ιούς.

Πίνακας 13. Οι ρόλοι των NAbs τάξης IgM στις λοιμώξεις

Παθογόνο	Ρόλος των IgM
Ιός της γρίπης	Φυσικά IgM από B1 B λεμφοκύτταρα και IgM από B2 B λεμφοκύτταρα προσφέρουν προστασία IgM εξουδετερώνουν τον ιό
Ιός του Δυτικού Νείλου Ιός της Λεμφοκυτταρικής χοριομηνιγγίτιδας (Lymphocytic choriomeningitis virus) Ιός της ελκώδους στοματίτιδας (Vasicular stomatitis virus)	Απαιτείται IgM για την εξάλειψη του ιού.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Διασπορά του ιού σε μη λεμφικά όργανα συμβαίνει κατά την απουσία IgM
<i>Ehrlichia muris</i>	Η ιντερλευκίνη-18 ενισχύει τη παραγωγή προστατευτικών φυσικών IgM από B1 B λεμφοκύτταρα Πλασματοκύτταρα (CD _{11c} ^{low}) που εκκρίνουν IgM είναι προστατευτικά
<i>Nocardia brasiliensis</i> <i>Borrelia hermsii</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	IgM περιορίζουν τη βακτηριακή διασπορά IgM περιορίζουν την εξέλιξη της νόσου Η έλλειψη των IgM προάγει την εξέλιξη της νόσου και τη θνησιμότητα, τα φυσικά IgM προσφέρουν προστασία
<i>Cryptococcus neoformans</i>	IgM προσφέρει προστασία όταν η λοίμωξη είναι πνευμονική αλλά δυσχεραίνει την έκβαση της νόσου όταν η μόλυνση είναι ενδοπεριτοναϊκή
<i>Toxoplasma gondii</i>	IgM ενισχύουν τη φαγοκυττάρωση των παρασίτων και τη αντιμικροβιακή λειτουργία των ουδετερόφιλων
<i>Trypanosoma evansi</i>	IgM ελέγχουν την παρουσία παρασίτων στο αίμα και βελτιώνουν την επιβίωση του ξενιστή
<i>Trypanosoma brucei</i>	B λεμφοκύτταρα μειώνουν τα επίπεδα παρασίτων, IgM έχουν περιορισμένο ρόλο
<i>Brugia pahangi</i>	IgM είναι απαραίτητα για τη προσκόλληση των περιτοναϊκών κυττάρων στα παράσιτα
<i>Plasmodium falciparum</i> <i>Plasmodium chabaudi</i>	Πολυμερή IgM προσδένονται στο παράσιτο ???? IgM προσφέρουν προστασία

Τα πολυδραστικά NAbs τάξης IgG είναι ένα σημαντικό συστατικό της έμφυτης απόκρισης στον άνθρωπο κατά τη διάρκεια τόσο της πρωτογενούς όσο και της δευτερογενούς μόλυνσης από τον ιό του δάγκειου πυρετού. Δείγματα αίματος που λήφθηκαν από ασθενείς με δάγκειο πυρετό εξετάστηκαν κατά την πρωτογενή ή τη δευτερογενή μόλυνση, κατά τη διάρκεια της οξείας νόσου και στην ανάρρωση και συγκρίθηκαν με δείγματα από ασθενείς που παρουσίαζαν πυρετό μη σχετιζόμενο με τον δάγγειο ιό. Κατά την πρωτογενή απόκριση, τα NAbs περιόριζαν τον ιό δεσμεύοντάς τον, ενώ στη δευτερογενή απόκριση συμμετείχαν στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος (C1q). Ο δάγκειος ιός προκαλούσε μαζικό πρώιμο σχηματισμό πλασματοβλαστών, που συσχετιζόταν με την εμφάνιση των πολυκλωνικών φυσικών IgG τόσο για τη πρωτογενή όσο και για τη δευτερογενή μόλυνση. Απροσδόκητα στις 4-7 ημέρες μετά την έναρξη του πυρετού ο τίτλος των IgG αντισωμάτων που εξουδετερώναν τον ιό ήταν περισσότερο από 50%, ακόμη και μετά την πρωτογενή μόλυνση. Τα πολυδραστικά αντισώματα είναι ένα κοινό ορολογικό χαρακτηριστικό ορισμένων μολύνσεων στον άνθρωπο,

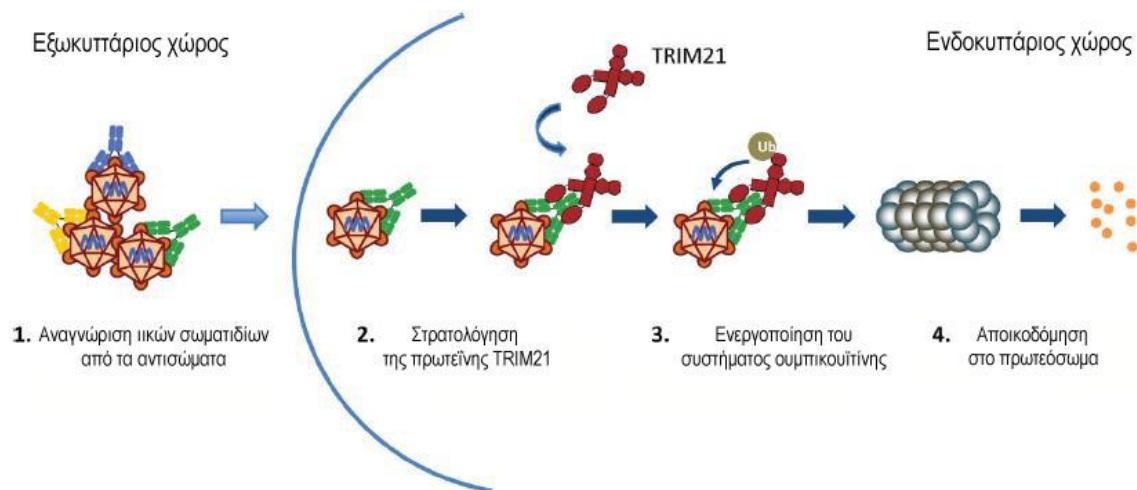
συμπεριλαμβανομένου του HIV, του ιού Epstein-Barr και τον ιό της ηπατίτιδας C. Το 75% των μονοκλωνικών αντισωμάτων (π.χ. αντί -HIV -gp140) που έχουν απομονωθεί από ασθενείς με υψηλό τίτλο αντισωμάτων που εξουδετερώνουν τον ιό (neutralizing antibodies) ήταν πολυδραστικά. Μελέτες έδειξαν ότι κατά τη διάρκεια της παραγωγής αντισωμάτων για την αντιμετώπιση του HIV, τα αποκρινόμενα B λεμφοκύτταρα αθώα/παρθένα και μνήμης παρήγαγαν πολυδραστικά αντισώματα (αναγνωρίζαν και άλλες πρωτεΐνες, δηλαδή ιστόνες, Ro και φωσφολιπίδια), τα οποία ήταν ικανά να αναγνωρίζουν δυο διαφορετικά αντιγόνα, με υψηλή συγγένεια την επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη gp140 του HIV και με χαμηλότερη συγγένεια μια άλλη αντιγονική δομή του ιού HIV [93]. Επίσης, έχουν δείξει ότι τα περισσότερα από τα αντι- gp120 αντισώματα που απομονώνονται από ασθενείς με υψηλούς αντισωματικούς τίτλους και που εξουδετερώναν τον HIV, ήταν πολυδραστικά. Αυτό το είδος της συνδέσεως, δηλαδή ένα αντίσωμα να αναγνωρίζει δυο διαφορετικά μόρια-αντιγόνα, είναι ιδιαίτερα πλεονεκτικό στην περίπτωση της μόλυνσης από τον ιό HIV. Αυτά τα αντισώματα φαίνεται να εξουδετερώνουν τον ιό HIV με την ταυτόχρονη δέσμευση της μεμβράνης και της gp41, ή της gp120. Αποτελεσματική εξουδετέρωση του ιού, ήταν δυνατή μόνο μετά την ταυτόχρονη δέσμευση των gp120 και CD4. Η αποτελεσματική εξουδετέρωση του HIV με πολυδραστικά αντισώματα μπορεί να εμφανιστεί αναπάντεχη, δεδομένου ότι πολυδραστικά αντισώματα συχνά θεωρείται ότι έχουν χαμηλότερη συγγένεια πρόσδεσης από ότι τα μονοειδικά αντισώματα, όμως λόγω της αυξημένης μοριακής ευκαμψίας των πολυδραστικών παρατόπων η εντροπία των αντισωμάτων αυξάνεται. Σημαντικότερο στοιχείο είναι ότι η συγγένεια και μόνο, δεν υπαγορεύει την ιδιαιτερότητα και τη λειτουργία αυτών των αντισωμάτων, οι οποίες σε μεγάλο βαθμό καθορίζονται από το συνολικό πλαίσιο της αλληλεπίδρασης [94].

Πολυδραστικά ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του ιού της ηπατίτιδας C (HCV), και συγκεκριμένα έναντι διατηρημένων επιτόπων στην επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη E2 του ιού, αποτελούν βασικά εργαλεία για την κατανόηση της αλληλεπίδρασης ιού-ξενιστή, και για το σχεδιασμό στρατηγικών για την πρόληψη και την αντιμετώπιση της λοίμωξης. Τα δεδομένα δείχνουν ότι τα αντισώματα που εξουδετερώνουν τον ιό HCV, αναγνωρίζουν επιτόπους οι οποίοι εκφράζονται σε όλους τους γονότυπους του ιού και άρα απαντώνται σε όλα τα στελέχη του. Η διαθεσιμότητα τέτοιων πολυδραστικών αντισωμάτων μπορεί να ανοίξει νέους δρόμους για την κατανόηση της επιμόλυνσης από ιό HCV και την ανάπτυξη στρατηγικών για τον ανοσιακό έλεγχο αυτής [95]. Επιπλέον, τα αντισώματα που εξουδετερώνουν τον κυτταρομεγαλοϊό (cytomegalovirus, CMV) εισέρχονται μέσα στα κύτταρα και κατευθύνονται κυρίως έναντι επιτόπων όπως των ιικών γλυκοπρωτεϊνών που απαιτούνται για την προσκόλληση και την είσοδό τους. Έχει βρεθεί ότι οι οροί ασθενών με CMV είχαν κατά μέσο όρο 48 φορές

υψηλότερη δράση εξουδετέρωσης του ιού, όταν ο ιός επιμόλυνε *in vitro* επιθηλιακά κύτταρα συγκριτικά με την επιμόλυνση ινοβλαστών, αποδεικνύοντας ότι τα εξουδετερωτικά αντισώματα του ιού αλληλεπιδρούσαν ειδικά με τα κύτταρα-ξενιστές και αντιμετώπιζαν τη λοίμωξη [96].

5.2.1. Ο συνεργιστικός ρόλος της πρωτεΐνης TRIM21

Πρόσφατα έχει αναφερθεί ένας νέος ενδιαφέρον μηχανισμός σχετικά με την αντιμετώπιση ιικών και βακτηριακών μολύνσεων από αντισώματα σε συνδυασμό με τη δράση μιας ενδοκυττάριας κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης της TRIM21 (tripartite motif-containing 21) [97]. Η πρωτεΐνη TRIM21 ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών που φέρουν ένα τριμερές μοτίβο (tripartite motif family), δηλαδή περιλαμβάνει τρεις επικράτειες με δομή: α) δακτύλου ψευδαργύρου (B-box type 1 and type 2 zinc finger domains), β) δακτυλιδιού (RING finger domain), και γ) υπερελικωμένης σπείρας (coiled coil region). Η TRIM21 διαθέτει υψηλή συγγένεια -εξελικτικά συντηρημένη- για το Fc τμήμα των αντισωμάτων, μέσω της PRYSPRY αλληλουχίας στο καρβοξυτελικό του άκρο. Βρέθηκε ότι φυσικά αντισώματα από υγιείς, μετά από επώαση με ιικά σωματίδια χωρίς φάκελο (αδενοϊό) δημιουργούν ανοσοσύμπλοκα, τα οποία εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα ζώντων κυττάρων, όπου και συνδέονται εκεί με την TRIM21 μέσω του Fc τμήματός τους και οδηγούνται σε ταχεία αποικοδόμηση μέσω του συστήματος ουμπικουΐνης (**Εικόνα 24.**). Μάλιστα, η απουσία έκφρασης της TRIM21, είτε με αποσιώπησή της με siRNAs, είτε με κυτταρικές σειρές που δεν την εξέφραζαν (knockdown cell lines), φάνηκε να καθιστά τα κύτταρα πιο δεκτικά στην επιμόλυνση του ιού, συγκριτικά με τα κύτταρα που εξέφραζαν την TRIM21. Επίσης, βρέθηκε ότι η TRIM21 συνδέεται με το Fc-τμήμα των αντισωμάτων της τάξης IgG αλλά και της τάξης IgM, παρουσιάζοντας παρόμοια αντι-ιική δράση και υποδηλώνοντας έτσι ότι αυτός ο μηχανισμός προστασίας είναι σημαντικός, όχι μόνο στη δευτερογενή φάση της μόλυνσης αλλά και στην πρωτογενή.



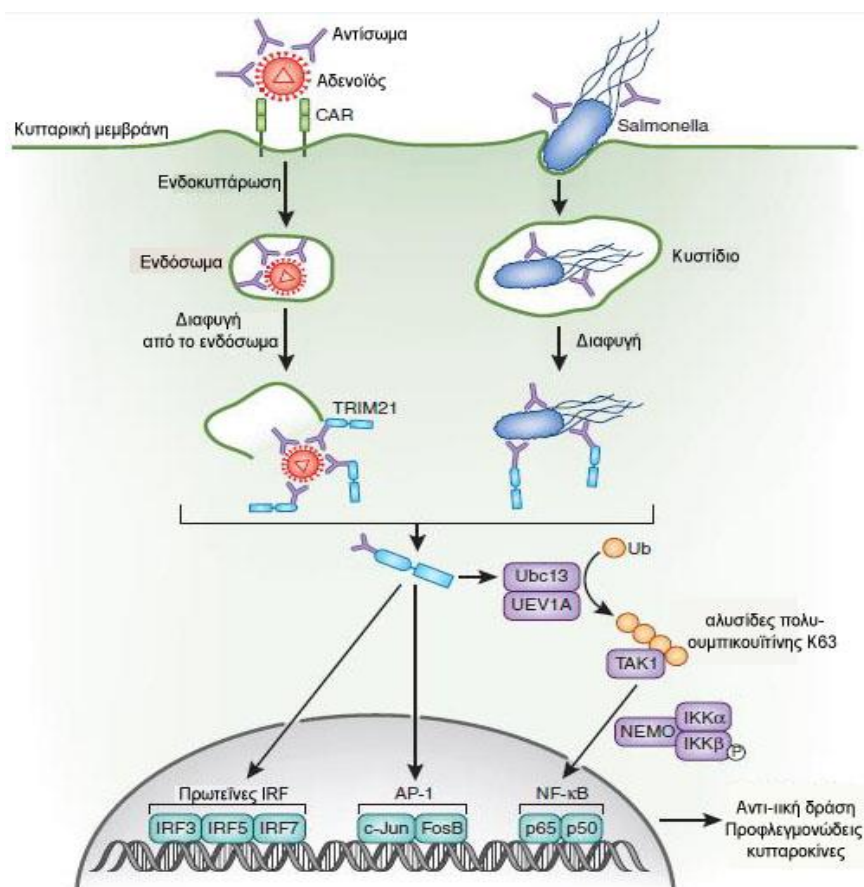
Εικόνα 24. Συνεργιστική δράση της πρωτεΐνης TRIM21 με αντισώματα έναντι ιικών μολύνσεων. Τα ιικά σωματίδια δεσμεύονται από τα αντισώματα πριν από τη μόλυνση των κυττάρων. Μετά την μόλυνση, τα επικαλυμμένα με αντίσωμα ιικά σωματίδια μεταφέρονται εντός του κυττάρου και ανιχνεύονται από τον ενδοκυτταρικό υποδοχέα TRIM21, ο οποίος στρατολογεί το σύστημα ουμπικουϊτίνης-πρωτεοσώματος, και οδηγεί στην απομάκρυνση του ιού και στην εξουδετέρωση της μόλυνσης.

Προσδιορίστηκε ο υποκείμενος μηχανισμός και βρέθηκε ότι η TRIM21 παρουσιάζει, στην RING επικράτειά του, δράση E3 λιγάσης ουμπικουϊτίνης (E3 ubiquitin ligase activity), η οποία είναι απαραίτητη στη σήμανση, με αλυσίδες πολυ-ουμπικουϊτίνης, μορίων-στόχων για την απομάκρυνσή τους μέσω προτεοσωμάτων-πρωτεόλυσης. Βρέθηκε, ότι η TRIM21 συνθέτει αλυσίδες K63 πολύ-ουμπικουϊτίνης παρουσία ειδικών για το K63 E2-ενζύμων του συστήματος της ουμπικουϊτίνης (Ubc13 και UEV1A) και ότι με αυτές σημαίνονται τα ιικά σωματίδια που εισέρχονται καλυμμένα με τα αντισώματα στο κύτταρο για να απομακρυνθούν στη συνέχεια μέσω της πρωτεόλυσης.

Εκτός από το σύστημα της ουμπικουϊτίνης, η TRIM21 φάνηκε να ενεργοποιεί και κάποιους μεταγραφικούς παράγοντες, ενισχύοντας έτσι την έκφραση αντι-ιικών μορίων. Πιο συγκεκριμένα, η TRIM21 μέσω του συστήματος ουμπικουϊτίνης φαίνεται να ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB (υπομονάδες p65 και p50) αλλά και απευθείας τους μεταγραφικούς παράγοντες, AP-1 (c-Jun, FosB) και IRF (IRF3, IRF5, IRF7) με αποτέλεσμα την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και την επαγωγή αντι-ιικής προστασίας (**Εικόνα 25.**) [98]. Αναλυτικά, η ενεργοποίηση του NF-κB γίνεται μέσω των αλυσίδων πολύ-ουμπικουϊτίνης K63 που συντίθεται από το TRIM21 και οι οποίες επάγουν την ενεργοποίηση ενός συστήματος κινασών (TAK1-TAB1-TAB2 & IKKα-IKKβ-NEMO). Η φωσφοριλίωση της κινάσης IKKβ από την κινάση TAK1 οδηγεί με τη σειρά της στη φωσφοριλίωση του αναστολέα του NF-κB, του IκB, ο οποίος αποδεσμεύει τον NF-κB ώστε να εισέλθει στον πυρήνα και να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων για την έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Προσδιορίστηκε, ότι η ενεργοποίηση των διαφόρων οδών σηματοδότησης από την TRIM21 επάγει την έκφραση της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης ιντερλευκίνης 6, των χημειοκινών CXCL10, CCL2 και CCL4, και της ιντερφερόνης-β. Επίσης, βρέθηκε ότι η TRIM21 επάγει την έκφρασή της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης ιντερλευκίνης 12 και 6 αλλά και του TNF και από κύτταρα του ανοσιακού συστήματος, όπως είναι τα μακροφάγα.

Επιπλέον, παρόμοια δράση της TRIM21 βρέθηκε, εκτός από τους ιούς χωρίς φάκελο και σε περιπτώσεις μόλυνσης με ενδοκυττάρια βακτήρια, όπως η σαλμονέλα, όπου και πάλι παρατηρήθηκε η ενεργοποίηση του NF-κB. Ως εκ τούτου, είναι πιθανόν ότι παθογόνα που διαφεύγουν από τα ενδοσώματα και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα να

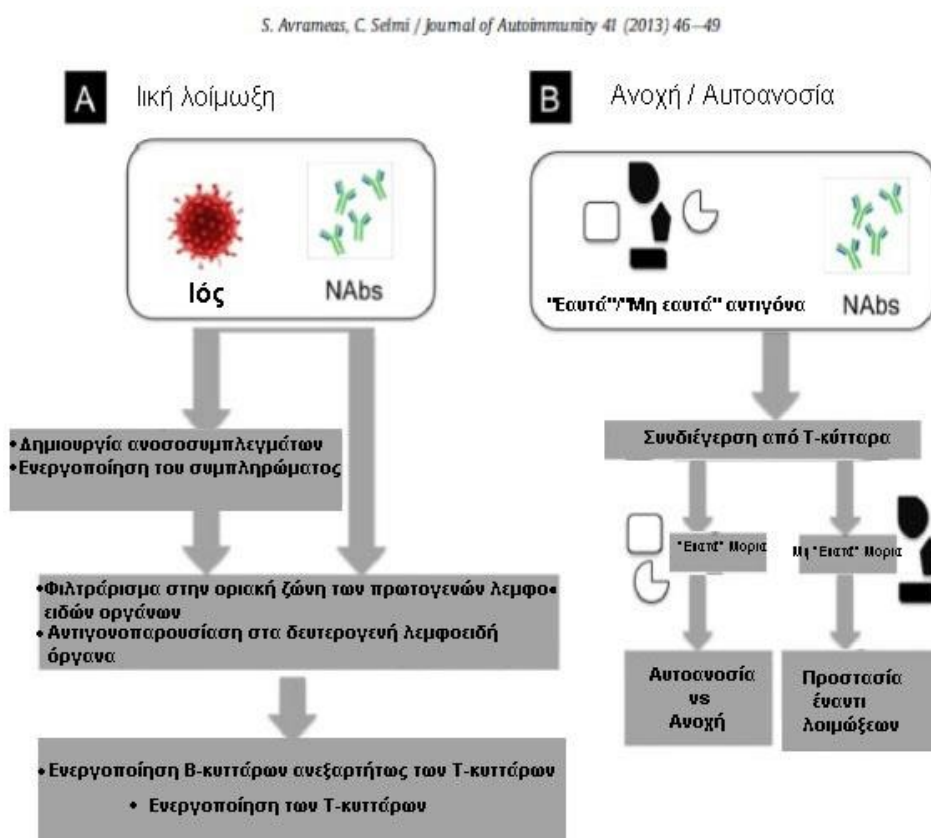
ενεργοποιούν την TRIM21 μέσω των αντισωμάτων που τα έχουν καλύψει και οδηγούν σε ενεργοποίηση του NF-κΒ.



Εικόνα 25. Ο μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης TRIM21 έναντι παθογόνων παραγόντων. Επικαλυμμένα με αντίσωμα παθογόνα (αδενοϊοί ή βακτηρίδια σαλμονέλας) εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα και εκεί δεσμεύονται από την TRIM21, το οποίο καταλύει τη σύνθεση αλυσίδων πολυ-ουμπικουϊτίνης K63 παρουσία των Ubc13 και UEV1A. Οι K63 αλυσίδες ενεργοποιούν το σύστημα κινάσων TAK1-IKKα-IKKβ-NEMO(IKKγ) διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο τη διαδοχική φωσφορυλίωσή τους. Η κινάση IKKβ φωσφορυλιώνει τον IκB, που είναι ο αναστολέας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ και έτσι ο NF-κΒ εισέρχεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Η ενεργοποίηση της TRIM21 οδηγεί επίσης στην ενεργοποίηση των παραγόντων μεταγραφής AP-1, που αποτελείται από τα διμερή c-Jun και Fos B, καθώς και την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών IRF3, IRF5 και IRF7.

Έτσι, ένα νέο κομμάτι της επίκτητης ανοσίας προκύπτει, στο οποίο η προστασία που προκαλείται από τα αντισώματα δεν τελειώνει στην κυτταρική μεμβράνη, αλλά συνεχίζει στο εσωτερικό του κυττάρου για να παρέχει μια τελευταία γραμμή άμυνας κατά της λοίμωξης. Επίσης, η TRIM21 έχει βρεθεί να αποτελεί έναν από τους αντιγονικούς στόχους των αυτοαντισωμάτων που ανιχνεύονται στο σύνδρομο Sjögren και στον ΣΕΛ. Οι ανοσορρυθμιστικές επιδράσεις του υποστηρίζεται από το γεγονός ότι ποντικοί που δεν εκφράζουν την TRIM21 (knock-out) αναπτύσσουν συστηματικό αυτοάνοσο νόσημα παρόμοιο με τον ΣΕΛ, ενώ μια Β-κυτταρική σειρά ποντικού που υπερεκφράζει την

πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει μειωμένο πολλαπλασιασμό και αυξημένη απόπτωση. Η προέκταση αυτών των ευρημάτων σε αυτοάνοσες ασθένειες, ανεξάρτητα από το αν η TRIM21 (SSA/Ro52) είναι ή δεν είναι στόχος των αυτοαντισωμάτων, μας οδηγεί να υποθέσουμε την ύπαρξη πρόσθετων μηχανισμών με τους οποίους αυτοαντισώματα σε ενδοκυτταρικά αντιγόνα ρυθμίζουν την απόκριση του ανοσιακού συστήματος μόλις εισέλθουν στα κύτταρα [99]. Συνολικά λοιπόν, τα πολυδραστικά NAbs φαίνεται να διαθέτουν μηχανισμούς προστασίας έναντι των ιών αλλά και ανοσορρύθμισης (**Εικόνα 26.**).



Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση των δύο διαφορετικών ομοιοστατικών μηχανισμών με βάση την παρουσία των φυσικών αντισωμάτων. Α) το μονοπάτι που οδηγεί στην αντιμετώπιση ιικής λοίμωξης από τα NAbs και Β) ο ομοιοστατικός ρόλος των NAbs όπου αναλόγως με την αναγνώριση των «εαυτών» αντιγόνων μπορούν να συμβάλλουν στη αυτοανοσία ή στην ανοχή, ενώ με την αναγνώριση των «ξένων» αντιγόνων μπορούν να επιδείξουν αποτελεσματική ανοσοαπόκριση σε λοιμώξεις.

5.3. Ανοσορρύθμιση

Ένας σημαντικός αριθμός μελετών υπογραμμίζει έναν επίσης σημαντικό ρόλο των NAbs στην ανοσιακή ρύθμιση. Τα πολυδραστικά NAbs έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν «ξένα» αλλά και «εαυτά» αντιγόνα και παίζουν σημαντικό ρόλο στο φυσιολογικό

ρεπερτόριο του ανοσιακού συστήματος. Ιδιότυποι μπορεί να καλύπτονται από **αντι-ιδιοτυπικά αντισώματα**, τα οποία εμποδίζουν έτσι την αναγνώριση ανταγωνικών επιτόπων. Πράγματι, έχει παρατηρηθεί πως η χορήγηση αντιιδιοτυπικών NAbs σε ποντικούς προκαλεί την αναστολή της αυτοδραστικότητας των αντίστοιχων ενδογενών αντισωμάτων. Για παράδειγμα, χορήγηση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν ιδιότοπους των NAbs έναντι του υποδοχέα ακετυλοχολίνης, προκαλεί αναστολή της πρόσδεσης στον συγκεκριμένο υποδοχέα, με αποτέλεσμα την προφύλαξη των ζώων από την εκδήλωση αυτοάνοσων συμπτωμάτων, τύπου βαριάς μυασθένειας, όταν αυτά ανοσοποιούνται με τον υποδοχέα ακετυλοχολίνης. Ο ίδιος μηχανισμός δράσης συναντάται και σε φυσιολογικές συνθήκες στην αναστολή της αυτοδραστικότητας των IgG από τις IgM, καθώς και στην εξουδετέρωση αυτοαντισωμάτων ασθενών με χορήγηση IVIg (ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη) για θεραπευτική χρήση. Ιδιότυποι που βρίσκονται εκτός της περιοχής δέσμευσης του αντιγόνου συμμετέχουν στο σχηματισμό του δικτύου και στην ανοσορρυθμιστική λειτουργία του. Διαταραχή της ισορροπίας του ιδιοτυπικού δικτύου με την είσοδο στον οργανισμό ενός αντιγόνου μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής αντισωμάτων έναντι αυτού του αντιγόνου. Αυτό συμβαίνει γιατί οι ιδιότοποι λειτουργούν ως «εικόνες» των ενδογενών αντιγόνων αλλά και των ξένων, με αποτέλεσμα να υπάρχουν ήδη αντισώματα που αναγνωρίζουν το αντίστοιχο αντιγόνο και όταν αυτό εισάγεται στο σύστημα να ενισχύεται η έκφραση των αντισωμάτων. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως ανοσοποίηση ποντικών με αυτοαντισώματα (πχ. αντι-DNA) που φέρουν χαρακτηριστικούς ιδιοτόπους προκαλεί την εκδήλωση αυτοάνοσων συνδρόμων όπως το σύνδρομο του λύκου, που προσομοιάζει την ανθρώπινη νόσο. Θεωρείται πως η παρουσία του ιδιοτόπου στο αντί-DNA (A1) προκαλεί την αύξηση των αντισωμάτων που τον αναγνωρίζουν (A2) και αυτά με τη σειρά τους προκαλούν την αύξηση της παραγωγής αντισωμάτων (A3) που προσδένονται στο A2 και είναι πανομοιότυπα με το αρχικό παθογόνο αντίσωμα (A3=A1). Επομένως, αυξάνονται τα ενδογενή αντι-DNA αντισώματα, τα οποία προκαλούν τα συμπτώματα του συνδρόμου Λύκου.

Ένας άλλος τρόπος ρύθμισης του ανοσιακού συστήματος από τα NAbs είναι μέσω της **ρύθμισης των κυτταροκινών**. Υπάρχουν αντισώματα που αντιδρούν με διάφορες κυτταροκίνες και εμποδίζουν την πρόσδεσή τους στους υποδοχείς τους. Μέσω αυτού του μηχανισμού περιορίζεται η ένταση της ανοσιακής απόκρισης που μπορεί να προκληθεί λόγω της περίσσειας κυτταροκινών. Τα NAbs μπορούν ακόμη να λειτουργούν ως μεταφορείς των κυτταροκινών και να αυξάνουν το χρόνο ημιζωής τους στην κυκλοφορία, ενώ τα σύμπλοκα κυτταροκινών-αντισωμάτων μπορεί να συνεισφέρουν σημαντικά στην ενεργοποίηση κυττάρων του ανοσιακού συστήματος. Η ταυτοποίηση των NAbs που δεσμεύουν κυτταροκίνες ή τους υποδοχείς τους αναδεικνύει την πιθανότητα τα

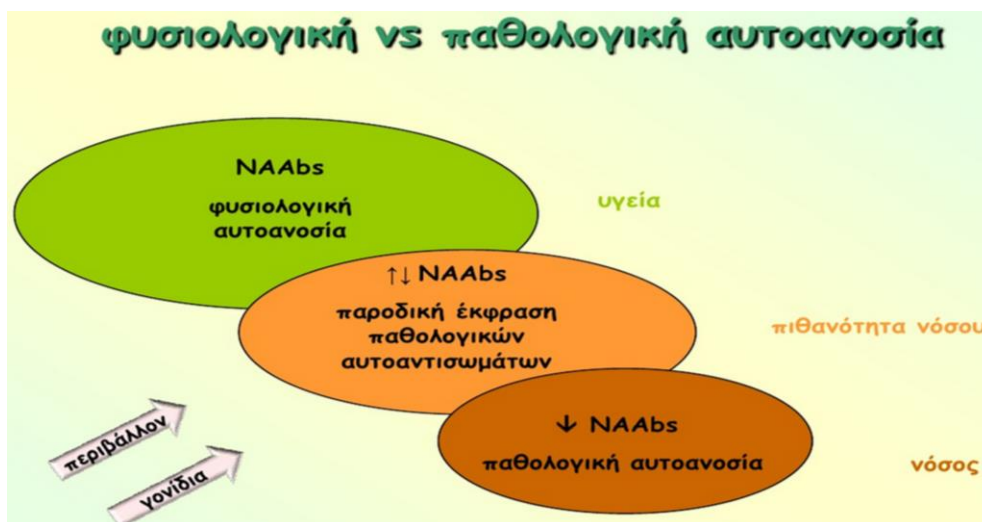
κυκλοφορούντα αυτά αντισώματα να μετέχουν στη μεταφορά τους, να επηρεάζουν το χρόνο ημιζωής τους και να ρυθμίζουν τη λειτουργία τους.

Επίσης, υπάρχουν NAbs που συμμετέχουν στη ρύθμιση των T- και B-κυττάρων. Η χορήγηση IgG από ορό φυσιολογικών μη ανοσοποιημένων ποντικών σε υγιή ποντίκια, οδηγεί σε μείωση του αριθμού των B και προ-B-κυττάρων στο μυελό των οστών, υποδεικνύοντας πως υπάρχει ένας μηχανισμός αρνητικής ανάδρασης στην παραγωγή των B-κυττάρων με τον οποίο τα NAbs ρυθμίζουν την παραγωγή των κυτταρικών σειρών των B λεμφοκυττάρων, μέρος του γενικού μηχανισμού διατήρησης της ομοιόστασης του ανοσιακού συστήματος. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι η ρύθμιση της παραγωγής των B-κυττάρων από τα NAbs είναι εξαρτώμενη από τη μεταβλητή περιοχή, καθώς υπάρχουν ενδείξεις πως η απαλοιφή των B-κλώνων οφείλεται σε ιδιοτυπικές αλληλεπιδράσεις, προτείνοντας το ρόλο των NAbs στην επιλογή του ρεπερτορίου. Επιπλέον, τα NAbs μέσω του τμήματος $F(ab')_2$ αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων T κυττάρων (CD8+ και CD4+) εμποδίζοντας την πρόσδεση με τον υποδοχέα των T-κυττάρων (TCR). Ακόμη, τα NAbs και τα κύτταρα που τα παράγουν συμμετέχουν στη μεταφορά και την παρουσίαση των αντιγόνων στα T-κύτταρα.

Έχουν επίσης παρατηρηθεί και άλλοι, λιγότερο διαδεδομένοι ρόλοι των NAbs. Για παράδειγμα, NAbs έναντι των υποδοχέων IgE που βρίσκονται σε βασεόφιλα, προκαλούν αποκοκκίωση και απελευθέρωση μεσολαβητών της φλεγμονής, ανταγωνιζόμενα *in vitro* τις IgE. NAbs που αναγνωρίζουν τους οπιοειδείς υποδοχείς, οι οποίοι συμμετέχουν στην ομοιόσταση του ανοσιακού συστήματος, έχουν δράση παρεμφερή με αυτή της μορφίνης, δηλαδή εμποδίζουν τη δέσμευση του αγωνιστή του υποδοχέα με τελικό αποτέλεσμα την αναλγησία, αλλά επιδρούν και στο νευροενδοκρινές οπιοειδές σύστημα καθώς και σε κύτταρα του ανοσιακού συστήματος που φέρουν τέτοιους υποδοχείς. Αυτό υποδεικνύει σχέση μεταξύ ανοσιακού και περιφερικού νευρικού συστήματος που μεσολαβείται από αντισώματα. Επίσης, έχουν βρεθεί NAbs τα οποία έχουν ενζυμική δράση, με χαρακτηριστικότερη την υδρόλυση πεπτιδίων. Συνολικά, έχουν προταθεί πολλοί ρόλοι για τα NAbs, αλλά η μελέτη τους συνεχίζεται με σκοπό την πλήρη διευκρίνιση του ρόλου και του τρόπου δράσης τους. Απώτερος στόχος φαίνεται να είναι η εύρεση και η βελτίωση των πρακτικών εφαρμογών τους.

Σε μελέτες που έγιναν σε υγιείς αρουραίους, φάνηκε ότι οι παράτοποι των NAbs ήταν δεσμευμένοι ήδη με αυτοαντιγόνα και ο προσδιορισμός της δραστικότητάς τους ήταν αδύνατος. Προέκυψε έτσι το συμπέρασμα πως η δεσμευτική ικανότητα των NAbs μέσα στον οργανισμό είναι καλυμμένη («masking») και πως διαταραχή της ισορροπίας δέσμευσης μεταξύ NAbs και αυτοαντιγόνων μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις. Σε περιπτώσεις ανοσοποίησης ενός οργανισμού με αντιγόνα άλλου είδους,

Β λεμφοκύτταρα τα οποία φέρουν ως υποδοχείς ειδικά μονοειδικά NAbS και τα οποία κατευθύνονται έναντι εξωγενών αντιγόνων, θα ενεργοποιηθούν και θα παράξουν υψηλές συγκεντρώσεις του αντίστοιχου ειδικού αντισώματος. Όμως, τα γεγονότα αυτά που τροποποιούν το δίκτυο και έχουν σαν αποτέλεσμα τη συνεχή αυξομείωση των αποκρίσεων στα ερεθίσματα δεν είναι αρκετά για να οδηγήσουν σε μια ανοσιακή απόκριση έναντι αυτοαντιγόνων. Ο λόγος είναι ότι δεν αρκούν για να αντιμετωπίσουν ένα σύνολο μηχανισμών που αποτρέπουν την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων από τα αυτοαντιγόνα. Ωστόσο, σε περιπτώσεις όπως αυτή των νεογέννητων, των οποίων οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί δεν έχουν εγκαθιδρυθεί πλήρως, η ανοσοποίηση τους με ενδογενή αντιγόνα μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα μια ειδική ανοσιακή απόκριση έναντι αυτοαντιγόνων. Σε γενικότερο πλαίσιο όλα τα δεδομένα υποδεικνύουν μια δυναμική ομοιοστατική ισορροπία στα επίπεδα των NAbS, όπου όταν διαταραχτεί προκύπτουν είτε μηχανισμοί απόκρισης και επαναφορά της ισορροπίας, είτε πλήρης αποδιοργάνωση και εμφάνιση νόσου (Εικόνα 27.).



Εικόνα 27. Ομοιοστατικός ρόλος των NAbS.

5.4. NAbS και παθολογικές καταστάσεις

Τα NAbS είναι μια σημαντική συνιστώσα του φυσιολογικού ανοσιακού συστήματος και για το λόγο αυτό δεν μπορεί να θεωρηθεί ως κριτήριο για την διάκριση της παθολογικής από την φυσιολογική κατάσταση. Ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις, οι τίτλοι συγκεκριμένων αυτοαντισωμάτων σχετίζονται με την παρουσία και τη σοβαρότητα ενός αυτοάνοσου νοσήματος, σε άλλες περιπτώσεις ούτε οι συγκεντρώσεις ούτε η ειδικότητα των εκάστοτε παρατόπων των NAbS διαφοροποιούνται μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών. Επιπροσθέτως, οι τίτλοι και το προφίλ της δραστηριότητας των NAbS μεταβάλλεται σε ασθένειες, που δεν σχετίζονται με το ανοσιακό σύστημα. Ωστόσο, στην βιβλιογραφία

αφθονούν οι περιγραφές νέων αυτοαντισωμάτων, που συνδέονται άμεσα με αυτοάνοσα νοσήματα.

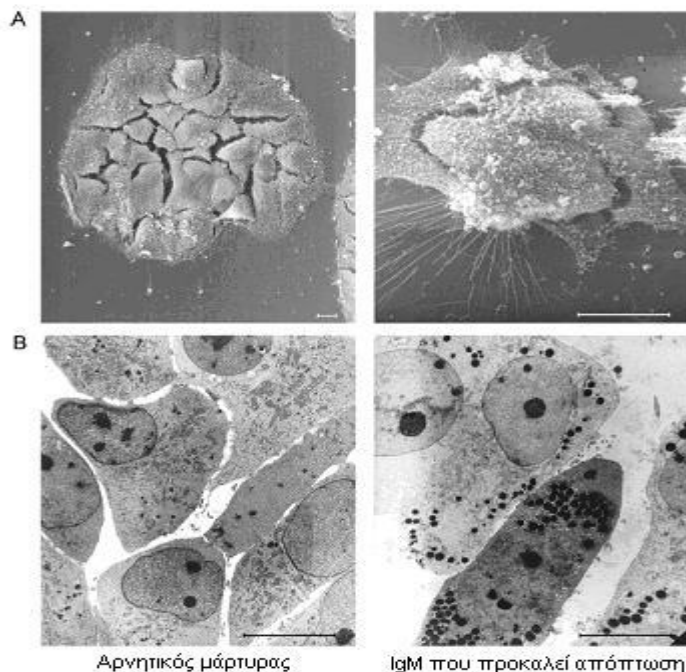
Άτομα που χαρακτηρίζονται από προδιάθεση σε αυτοάνοσα νοσήματα μπορεί να αναπτύξουν κάποια ανοσοπαθολογική κατάσταση, ειδικά μετά από λοίμωξη με κάποιο παθογόνο παράγοντα, που συνήθως προκαλεί έντονη διέγερση και ενεργοποίηση των κυττάρων που παράγουν NAbs. Τέτοια ερεθίσματα συνήθως τροποποιούν το προαναφερθέν δίκτυο και διαταράσσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ Β και Τ λεμφοκυττάρων, διευκολύνοντας έτσι την επαγωγή μιας ανοσοπαθολογικής κατάστασης. Δείχθηκε έτσι, ότι προσβολές από βακτήρια ή ιούς μπορεί να οδηγήσουν στην εγκαθίδρυση αυτοάνοσων καταστάσεων, στις οποίες συμμετέχουν και τα NAbs.

Σημαντικές μεταβολές του ρεπερτορίου και των ισοτύπων των NAbs έχουν αναφερθεί σε πολλά συστηματικά αλλά και οργανοειδικά αυτοάνοσα νοσήματα. Παραδείγματα αποτελούν ο ινσουλοεξαρτώμενος διαβήτης, η αιμολυτική αναιμία και η ηπατίτιδα αυτοάνοσης αιτιολογίας. Σε άλλες νόσους όπως, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο ΣΕΛ και η χρόνια λεμφογενής λευχαιμία, δεν παρατηρείται μεταβολή του ρεπερτορίου των NAbs αλλά αύξηση της συγκέντρωσης ορισμένων αυτοαντισωμάτων. Υπάρχουν ωστόσο και δεδομένα που υποδηλώνουν ότι αυτά τα NAbs μπορούν να παρέμβουν ή ακόμη και να καταστείλουν αυτοάνοσες ασθένειες. Πολυδραστικά NAbs φαίνεται να προστατεύουν από την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων σε πειραματικά μοντέλα *in vivo*. Τέλος, όχι μόνο πολυκλωνικά αλλά και μονοκλωνικά NAbs μπορούν να παρέμβουν στην ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η εξάλειψη των περιφερικών Β-κυττάρων μέσω της χρήσης μονοκλωνικών χειμερικών αντισωμάτων, που κατευθύνονται έναντι του μορίου CD20, έχει θετικά αποτελέσματα σε ό,τι αφορά τη ρύθμιση της δραστηριότητας συγκεκριμένων Β-κυττάρων και ποικίλες σχετιζόμενες με αυτοαντισώματα ασθένειες. Όλα αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα NAbs εμπλέκονται στην εξέλιξη πολλών ανοσοπαθολογικών καταστάσεων και με τον ένα ή τον άλλο τρόπο η χορήγησή τους επηρεάζει τις παθολογικές διεργασίες.

Επίσης τα NAbs παίζουν ρόλο και για τις νόσους του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Εφόσον στη παθολογική κατάσταση τα επίπεδά τους διαταράσσονται, μπορούν να λειτουργήσουν ως ορολογικοί δείκτες για διαγνωστικούς σκοπούς, χωρίς να συμβάλλουν στην παθολογική διαδικασία ή/ και στην εξέλιξη της νόσου. Πέρα από αυτό όμως, NAbs που στοχεύουν σε συσσωματώματα πρωτεϊνών έχουν ανιχνευθεί εντός του εγκεφάλου, και θα μπορούσε να είναι ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις στις νευροεκφυλιστικές ή νευροαυτοάνοσες διαταραχές. Περαιτέρω στοιχεία απέδειξαν την ύπαρξη NAbs που στόχευαν σε αντιγόνα επάνω στους νευρώνες και στα

ολιγοδενδροκύτταρα, προωθώντας έτσι την ανάπτυξη νευραξόνων (axonal outgrowth) και την επαναμυελίνωσή τους [100].

Σε κακοήθειες, πολύ συχνά διαφοροποιημένα (abnormal) γλυκολιπίδια και γλυκοπρωτεΐνες συντίθενται από εξαλλαγμένα επιθηλιακά κύτταρα και παρουσιάζονται στην κυτταρική επιφάνειά τους [101, 102]. Αυτές οι τροποποιημένες υδατανθρακικές δομές μπορούν να δράσουν ως συνδέτες για τα NAbS τάξης IgM, τα οποία σε ασθενείς με καρκίνο, αναγνωρίζουν αντιγόνα μετα-μεταγραφικά τροποποιημένα [103]. Οι επίτοποι είναι ογκοειδικές δομές από αμινοσυνδεόμενους υδατάνθρακες (N-linked carbohydrate) της κυτταρικής επιφάνειας, όπως είναι το DAF/CD55 ή το CFR-1 [103]. Πολυδραστικά αντισώματα τάξης IgM από ασθενείς με καρκίνωμα του στομάχου, βρέθηκαν να δεσμεύονται σε τροποποιημένη δομή του μετα-μεταγραφικά τροποποιημένου υποδοχέα CFR-1 και να προκαλούν απόπτωση [103, 104] (**Εικόνα 28.**). Αυτός ο υποδοχέας υπερεκφράζεται στα περισσότερα καρκινικά επιθήλια κάθε είδους και προέλευσης, αλλά δεν εκφράζεται στους υγιείς ιστούς. Τα ανοσοσύμπλοκα CFR-1/IgM είναι επίσης παρόντα σε μια τεράστια ποικιλία κυτταρικών διαφοροποιήσεων που συναντώνται στη γαστρίτιδα από *Helicobacter pylori*, στην εντερική μεταπλασία και δυσπλασία στομάχου, στην ελκώδη κολίτιδα που σχετίζεται με δυσπλασία και αδένωμα του παχέος εντέρου, στη μεταπλασία Barrett και στη δυσπλασία του οισοφάγου, στη μεταπλασία πλακωδών κυττάρων, στη δυσπλασία του πνεύμονα και στη νεοπλασία του ενδοθηλίου του τραχήλου της μήτρας, στη νεοπλασία του ενδοθηλίου του προστάτη και στον καρκίνο του μαστού [103]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αντισώματα τάξης IgM που απομονώθηκαν από υγιείς ανθρώπους αντιδρούσαν με ογκοειδικούς επίτοπους με παρόμοια δραστηριότητα όπως τα IgM αντισώματα από τους ασθενείς [36].



Εικόνα 28. Παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία πολυκλωνικών NAbs τάξης IgM που επάγουν απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα. Α) Η καρκινική σειρά καρκινώματος στομάχου 23132/87 επώαστηκε με ένα NAb τάξης IgM (10μg/ml) που απομονώθηκε από έναν ασθενή με καρκίνο του στομάχου για 24 ώρες. Βρέθηκε ότι παρουσία του NAb τα καρκινικά κύτταρα συρρικνώθηκαν και εμφανίστηκαν μεμβράνικά κυστιδία, αποπτωτικά σώματα, συγκεντρωμένα και τεντωμένες κυττρικές ίνες. Β) μεγαλύτερη μεγέθυνση ZEISS 902 Bars: 50 μm.

6. Εφαρμογές στη βιοϊατρική

Εκτός από τη μελέτη του ρόλου των NAbs, το ενδιαφέρον έχει στραφεί και προς τη χρήση τους σε θεραπευτικές εφαρμογές. Η χορήγηση των NAbs ως θεραπευτικά σκευάσματα έχει ως κύριο τρόπο δράσης την ανασορύθμιση. Αν και υπάρχουν αναφορές για θεραπευτικές εφαρμογές μονοκλωνικών NAbs, η πιο διαδεδομένη χρήση τους αφορά σκευάσματα που περιέχουν πολυκλωνικά NAbs και τα οποία είναι ευρέως γνωστά ως σκευάσματα ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης [39, 61, 84].

6.1. Ενδοφλέβια Ανοσοσφαιρίνη (IVIg)

Ένα λοιπόν από τα σημαντικότερα παραδείγματα θεραπευτικής εφαρμογής των NAbs είναι η χορήγηση της ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης (Intravenous Immunoglobulin-IVIg). Η ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη είναι ένα θεραπευτικό παράγωγο του αίματος που χορηγείται ενδοφλεβίως. Αποτελεί μείγμα ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών τάξης IgG, οι οποίες προέρχονται από μεγάλο αριθμό υγιών δοτών (πάνω από 50.000) και περιέχει NAbs. Χορηγείται κυρίως σε περιπτώσεις ανοσοανεπάρκειας, αλλά και αυτοάνοσων και φλεγμονωδών νοσημάτων. Η ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη αποτελείται από υψηλές

ποσότητες NAbS τάξης IgG και τα θεραπευτικά αποτελέσματα της χορήγησής της αντανακλούν τις βιολογικές δράσεις αυτών των αντισωμάτων. Σήμερα κυκλοφορούν πολλά θεραπευτικά παρασκευάσματα της IVIg, που διαφέρουν μεταξύ τους γενικά ως προς τα στάδια παραγωγής τους, τη σύστασή τους ως προς τις Ig και τα σακχαρικά σταθεροποιητικά έκδοχα, τη μορφή τους (διαλυτοποιημένη ή σε σκόνη) και τον αριθμό δοτών. Σήμερα, οργανισμοί όπως ο FDA (Food and Drug Administration) και ο PPTA (Plasma Protein Therapeutics Association) ορίζουν πως ένα παρασκεύασμα IVIg πρέπει να προέρχεται από τουλάχιστον 15.000 υγιείς δότες, το πλάσμα των οποίων πρέπει να έχει ελεγχθεί ως προς την παρουσία συγκεκριμένων παθογόνων (έλεγχοι για αντιγόνα επιφανείας ηπατίτιδας B, αντιγόνο p24 του HIV και αντισώματα έναντι σύφιλης, HIV-1, HIV-2, και ηπατίτιδας C) [105, 106].

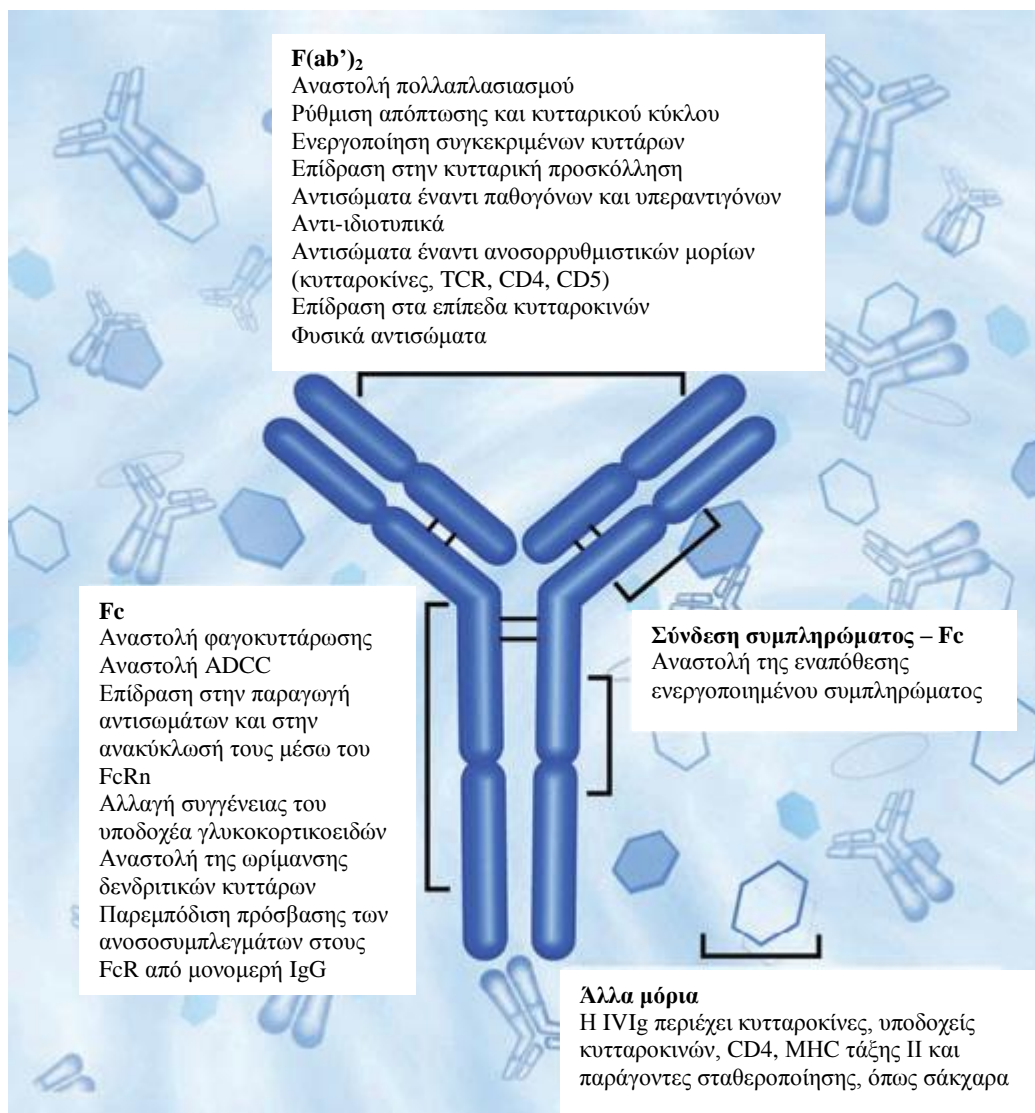
Το φάσμα των ασθενειών στις οποίες χρησιμοποιείται η IVIg συνεχώς διευρύνεται (Πίνακας 14.). Χορηγείται σε χαμηλές δόσεις των 200 – 400 mg/kg βάρους σώματος ανά τρεις περίπου εβδομάδες, ως θεραπεία υποκατάστασης, σε ασθενείς με σύνδρομο πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας, όπως συγγενής αγαμμασφαιριναιμία και υπογαμμασφαιριναιμία, κοινή ποικίλουσα ανοσοανεπάρκεια (common variable immunodeficiencies, CVID), σύνδρομο Wiscott Aldrich ή με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (severe combined immunodeficiency, SCID), στην οποία η έλλειψη T-κυττάρων προκαλεί ταυτόχρονα και ανεπάρκεια των B-κυττάρων. Επιπλέον, χορηγείται και σε περιπτώσεις δευτερογενών ανοσοανεπάρκειών, όπου η μειωμένη παραγωγή αντισωμάτων μπορεί να οφείλεται σε άλλους παράγοντες, όπως είναι οι ιικές μολύνσεις (π.χ. μόλυνση με HIV), αιματολογικές κακοήθειες (π.χ. μυέλωμα ή χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία) ή η ανοσοκατασταλτική θεραπεία. Σε περιπτώσεις αλλογενούς μεταμόσχευσης μυελού των οστών χορηγείται IVIg για τη θεραπεία λοιμώξεων και προφύλαξη από την αντίδραση μοσχεύματος έναντι ξενιστή (graft versus host disease). Ο στόχος στη θεραπεία υποκατάστασης είναι η διατήρηση ενός ελάχιστου επιπέδου IgG από 4 έως 6 g/L [107]. Παράλληλα, η IVIg, χορηγούμενη σε υψηλές δόσεις (μέχρι 2 g/kg/μήνα), διαθέτει και έναν ανοσορρυθμιστικό ρόλο, αποτελώντας έτσι ένα χρήσιμο θεραπευτικό εργαλείο για φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες διαταραχές, όπως το σύνδρομο Guillain – Barré (GBS), η ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) και η νόσος Kawasaki. Κλινικές μελέτες έχουν επίσης δείξει πως η ανοσορρυθμιστική θεραπεία με IVIg έχει θετικά αποτελέσματα σε πάρα πολλές νόσους, όπως χρόνια φλεγμονώδης απομυελινωτική πολυνευροπάθεια, δερματομυοσίτιδα, πέμφιγα, αγγειίτιδα, βαριά μυασθένεια, σκλήρυνση κατά πλάκας, και ΣΕΛ. Επίσης χορηγείται και σε γυναίκες με ιστορικό αυτόματων αποβολών [108].

Ο τρόπος δράσης της IVIg δεν είναι πλήρως κατανοητός και οι πιθανοί μηχανισμοί που εμπλέκονται εξαρτώνται τόσο από την παθογένεια της εκάστοτε νόσου, όσο και από τη χορηγούμενη δόση. Σε περιπτώσεις ανοσοανεπάρκειας ο μηχανισμός δράσης είναι αυτός της υποκατάστασης. Η έλλειψη αντισωμάτων ειδικών για ξένα αντιγόνα και παθογόνους μικροοργανισμούς υποκαθίσταται από την δεξαμενή αντισωμάτων της IVIg που περιέχει ένα ευρύ φάσμα ειδικοτήτων, ικανών να αναγνωρίσουν και να αδρανοποιήσουν ένα πλήθος ξένων αντιγόνων [109]. Η ανοσορρυθμιστική δράση της IVIg είναι πιο περίπλοκη και οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως. Οι IgG προάγουν τόσο προφλεγμονώδεις όσο και αντιφλεγμονώδεις αποκρίσεις, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους. Σε χαμηλές δόσεις (500mg/kg σωματικού βάρους) προκαλείται ενεργοποίηση του συμπληρώματος τόσο μέσω της κλασικής όσο και μέσω της εναλλακτικής οδού, κυρίως με την ενεργοποίηση του θραύσματος C3b [110]. Αντίθετα, χορηγούμενη σε υψηλές δόσεις, η IVIg έχει αντιφλεγμονώδη δράση, για την οποία έχουν προταθεί διάφοροι πιθανοί και ίσως αλληλεπικαλυπτόμενοι μηχανισμοί.

Πίνακας 14. Κλινικές εφαρμογές της IVIg [111]

<p>A. Θεραπεία υποκατάστασης (χαμηλή δόση)</p> <p><u>I. Πρωτογενείς ανοσοανεπάρκειες</u></p> <p><u>II. Δευτερογενής ανοσοανεπάρκεια</u></p> <p>B-κυτταρικές κακοήθειες (XLL, MM)</p> <p>Μόλυνση με HIV</p> <p>B. Ανοσορρυθμιστική (υψηλή δόση) θεραπεία</p> <p><u>I. Αιματολογικές παθήσεις</u></p> <p>Ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα (ITP)^a</p> <p>Επίκτητη ανοσολογική θρομβοπενία</p> <p>Αυτοάνοση ουδετεροπενία</p> <p>Αυτοάνοση αιμολυτική ανααιμία</p> <p>Ραβονίριος B19-σχετιζόμενη</p> <p>Ερυθροκυτταρική απλασία</p> <p>Αυτοάνοση νόσος με αντιπαράγοντα VIII</p> <p>Επίκτητη νόσος του von Willebrand</p> <p><u>II. Νευροανοσολογικές παθήσεις</u></p> <p>Σύνδρομο Guillain-Barré (GBS)^a</p> <p>Χρόνια φλεγμονώδης απομυελινωτική πολυνευροπάθεια (CIDP)^a</p> <p>Πολυεστιακή κινητική νευροπάθεια (MMN)^a</p> <p>Σκλήρυνση κατά πλάκας</p> <p>Μυασθένεια Gravis^a</p> <p>Σύνδρομο Lambert-Eaton</p>	<p>Σύνδρομο Stiff person</p> <p><u>III. Ρευματικές παθήσεις</u></p> <p>Σύνδρομο Kawasaki^a</p> <p>Συστηματική αγγειίτιδα ANCA-θετική</p> <p>Πολυμυοσίτιδα</p> <p>Δερματομυοσίτιδα s^a</p> <p>Σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων</p> <p>Επαναλαμβανόμενες αυτόματες αποβολές</p> <p>Ρευματοειδής αρθρίτιδα και σύνδρομο του Felty</p> <p>Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (SLE)</p> <p>Εφηβική ιδιοπαθής αρθρίτιδα (JIA)</p> <p><u>IV. Δερματολογικές παθήσεις</u></p> <p>Τοξική επιδερμική νεκρόλυση (TEN)</p> <p>Αυτοάνοσες πομφολυγώδεις νόσοι (BP, PF, PV)^a</p> <p>Σύνδρομο Στρεπτοκοκκικού τοξικού σοκ</p> <p>Στεροειδοεξαρτώμενη σοβαρή ατοπική δερματίτιδα</p> <p><u>V. Άλλες παθολογικές καταστάσεις</u></p> <p>Αντίδραση μοσχεύματος έναντι ξενιστή^a</p> <p>Απόρριψη μοσχεύματος μεσολαβούμενη από αντισώματα (AMR)</p> <p>Σηπτικό σύνδρομο</p>
<p>^a Παθήσεις στις οποίες ενδείξεις για την επίδραση της IVIg προέρχονται από ελεγχόμενες δοκιμές.</p>	

Ως σήμερα οι κύριοι γνωστοί μηχανισμοί δράσης της IVIg είναι μέσω: 1) των Fc τμημάτων και της σύνδεσής τους με τους υποδοχείς FcγR, 2) της αλληλεπίδρασης με το σύστημα του συμπληρώματος, 3) της ρύθμισης της έκφρασης και της λειτουργίας των κυτταροκινών, 4) της εξουδετέρωσης αυτοαντισωμάτων (αAbs) και 5) της ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης (**Εικόνα 29.**).



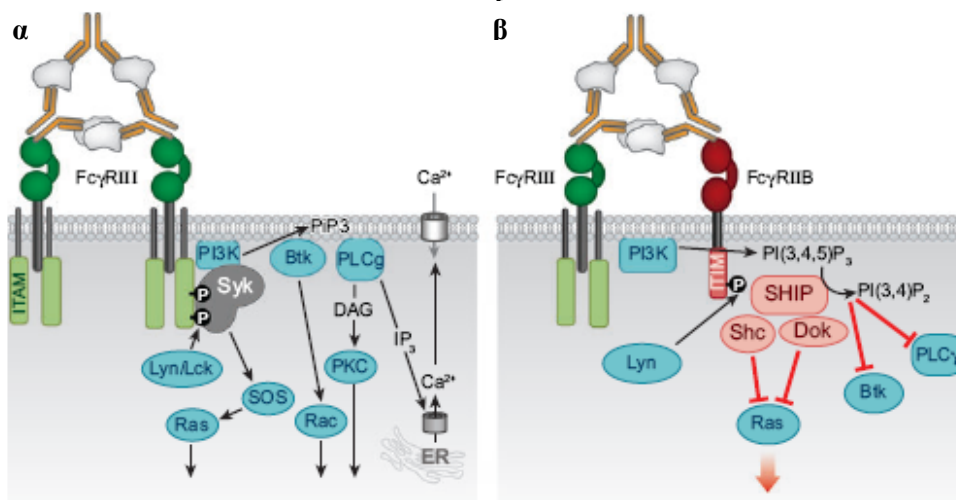
Εικόνα 29. Ανοσορρυθμιστικές δράσεις της IVIg

6.1.1. Μηχανισμοί δράσης του Fc τμήματος μέσω υποδοχέων

Μέσω του Fc τμήματος, οι IgG προσδένονται στους υποδοχείς τους (FcγRs) οι οποίοι βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια των κυττάρων της φυσικής ανοσίας (π.χ. φαγοκύτταρα). Η οικογένεια των FcγRs περιλαμβάνει αρκετά ενεργοποιητικά μέλη και μόνο ένα κατασταλτικό, τον FcγRIIb. Το τελικό αποτέλεσμα στη λειτουργία του κυττάρου εξαρτάται από την ισορροπία ανάμεσα σε ενεργοποιητικούς και κατασταλτικούς υποδοχείς (**Εικόνα**

30.) [109]. Σε ασθενείς με αυτοάνοσες διαταραχές η IVIg μπορεί να δράσει ως ανταγωνιστής των αυτοαντισωμάτων τους, εμποδίζοντας τη σύνδεση τους στους υποδοχείς και αναστέλλοντας έτσι τη φαγοκυττάρωση, την κυτταροτοξικότητα μεσολαβούμενη από αντίσωμα (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) και άλλες αντιδράσεις που προκαλούνται από τη σύνδεση του Fc τμήματος με ενεργοποιητικούς υποδοχείς [111, 112]. Η διασταυρούμενη σύνδεση (crosslinking) των IgG στους ενεργοποιητικούς FcγRs οδηγεί σε φωσφορυλίωση των ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, αύξηση στα ενδοκυττάρια επίπεδα ιόντων ασβεστίου και ενεργοποίηση του κυττάρου. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων *in vivo* δεν προκαλείται μόνο από μονομερή της IgG, αλλά και από ανοσοσυμπλέγματα, ή, ακόμα θεωρείται πως γίνεται μέσω των διμερών της IgG που υπάρχουν στο παρασκεύασμα [112, 113]. Αντίθετα, σύνδεση με τον ανασταλτικό FcγRIIb οδηγεί σε φωσφορυλίωση των ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs), προσελκύοντας φωσφατάσες που παρεμβαίνουν και αναστέλλουν διάφορα βήματα του σηματοδοτικού μονοπατιού ενεργοποίησης (**Εικόνα 31**).

Ένας μηχανισμός μέσω του οποίου η IVIg ασκεί την αντιφλεγμονώδη δράση της είναι μέσω της επαγωγής της έκφρασης του FcγRIIb σε μακροφάγα-τελεστές (effector cells). Η επαγωγή αυτή οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού κατασταλτικών υποδοχέων σε σχέση με τους ενεργοποιητικούς και κατά συνέπεια σε καταστολή των κυττάρων, τα οποία παύουν να εκκρίνουν τις κυτταροκίνες που προάγουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις (ιντερλευκίνη IL-1, IL-6 και παράγοντας νέκρωσης όγκων TNF-α). Ωστόσο η δράση της IVIg σε αυτή την περίπτωση δεν ασκείται μέσω της άμεσης σύνδεσής της με τον FcγRIIb, για τον οποίο έχει μικρή συγγένεια, αλλά έμμεσα, μέσω της επίδρασής της σε κάποιο υποπληθυσμό μακροφάγων με ρυθμιστικό ρόλο. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως σε ποντίκια από τα οποία απουσιάζει ο αυξητικός παράγοντας CSF-1 (colony stimulating factor-1) και κατά συνέπεια απουσιάζουν κάποιοι υποπληθυσμοί μονοκύτταρων και μακροφάγων, δεν παρατηρείται αντιφλεγμονώδης δράση της IVIg. Αυτό οδηγεί στην υπόθεση πως υπεύθυνος για την ενίσχυση της έκφρασης του FcγRIIb στα μακροφάγα-τελεστές είναι κάποιος CSF-1-εξαρτώμενος πληθυσμός μακροφάγων με ρυθμιστική λειτουργία [112]. Η πρόσδεση των IgG στον του FcRn (neonatal–νεογνικός FcR), του οποίου ο ρόλος είναι η διατήρηση των IgG σε σταθερά επίπεδα, προκαλεί μπλοκάρισμα και κορεσμό του συγκεκριμένου υποδοχέα. Αυτό μπορεί να ενισχύσει τον καταβολισμό των ενδογενών IgG, που λόγω ανταγωνισμού προσδένονται σε μικρότερο ποσοστό στον FcRn, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων σε πολλά νοσήματα [108, 112, 114].



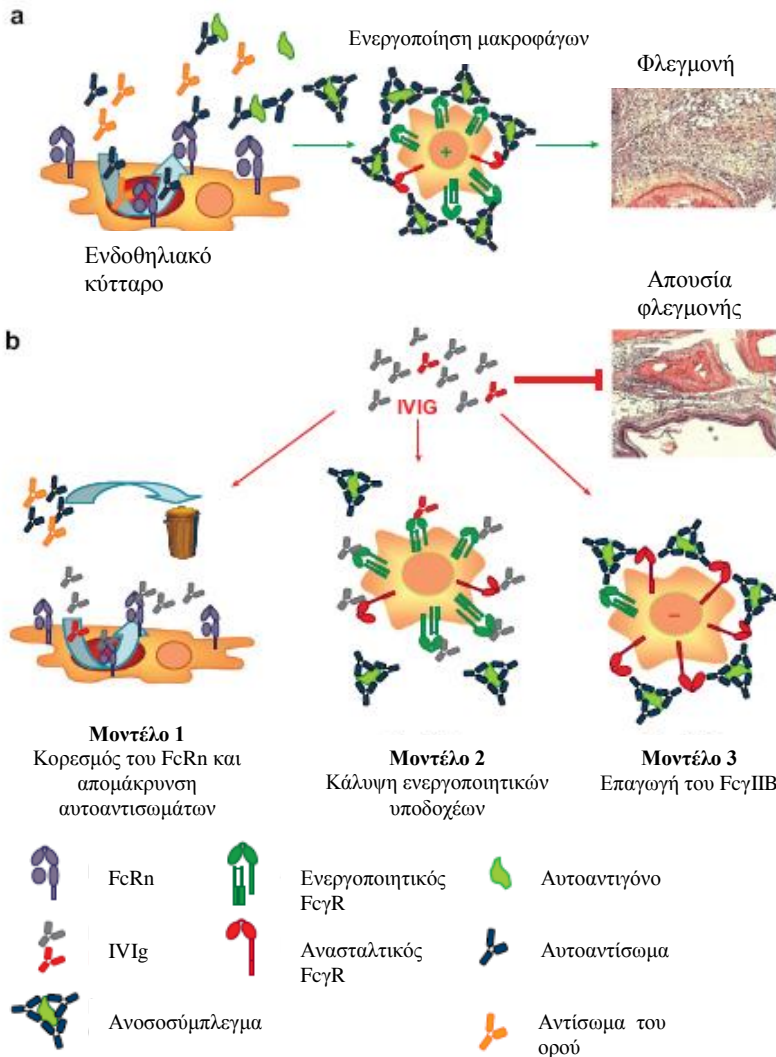
Ενεργοποίηση κυττάρου/πολλαπλασιασμός

Αναστολή ενεργοποίησης/πολλαπλασιασμού

Εικόνα 30. Ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης από τους ενεργοποιητικούς και ανασταλτικούς υποδοχείς [112]

6.1.2. Αλληλεπίδραση με το σύστημα του συμπληρώματος

Τα αντισώματα που περιέχονται στην IVIg έχουν την ιδιότητα να προσδένουν μέσω του Fc τμήματός τους συστατικά του συμπληρώματος, κυρίως τα C3b και C4b, και τα απομακρύνουν, εμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό του συμπλέγματος μεμβρανικής επίθεσης C5b-9 και την καταστροφή των ιστών μέσω του συμπληρώματος. Παίζουν έτσι το ρόλο μεταφορέα άχρηστων ή επιβλαβών για τον οργανισμό προϊόντων [115]. Παράλληλα έχει αναφερθεί πως η IVIg προσδένει τις αναφυλατοξίνες C3a και C5a μέσω των τμημάτων F(ab')₂ κι εμποδίζει την πρόσδεσή τους στους αντίστοιχους υποδοχείς που βρίσκονται σε μακροφάγα, μαστοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα κ.λ.π., περιορίζοντας έτσι τη φλεγμονή [116].



Εικόνα 31. . Μηχανισμοί δράσης της IVIg μέσω πρόσδεσης του Fc σε υποδοχείς [112]

6.1.3. Ρύθμιση της έκφρασης και της λειτουργίας των κυτταροκινών

Η IVIg έχει επίσης την ικανότητα να μειώνει τη φλεγμονώδη απόκριση μέσω φυσικών αντισωμάτων που περιέχονται στα παρασκευάσματα και αναγνωρίζουν συγκεκριμένες κυτταροκίνες, ανταγωνιστές κυτταροκινών και υποδοχείς κυτταροκινών. Τα παρασκευάσματα της IVIg περιέχουν επιπλέον και μικρό ποσοστό κυτταροκινών, αλλά δεν είναι αρκετό για να αιτιολογήσει την ευεργετική επίδρασή της. Συμπεραίνεται λοιπόν πως κύριο ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων των κυτταροκινών και των ανταγωνιστών τους παίζουν τα αντισώματα [117]. Έχουν βρεθεί αντισώματα που αναγνωρίζουν τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1, IL-6 και TNF-α, καθώς και την ιντερφερόνη IFN-γ. Σε πολλές διαταραχές οι οποίες χαρακτηρίζονται και από απορρύθμιση του δικτύου των κυτταροκινών, όπως για παράδειγμα η υπερέκφραση IL-2 στο ΣΕΛ, η IVIg ρυθμίζει την

παραγωγή, απελευθέρωση και δράση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Μελέτες σε *in vitro* μοντέλα έχουν δείξει πως η IVIg αναστέλλει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-2, IL-3, IL-5 και CSF-1) σε καλλιέργειες περιφερειακών μονοπύρηνων. Σε συμφωνία με αυτά τα αποτελέσματα, κλινικές μελέτες σε ασθενείς έδειξαν πως ενώ αρχικά τα επίπεδα κάποιων κυτταροκινών στον ορό ήταν υψηλά, αυτά μειώθηκαν μετά την αγωγή με IVIg [118]. Παράλληλα, έχει δειχθεί πως η IVIg μέσω των F(ab')₂ και των Fc τμημάτων των αντισωμάτων της επάγει την παραγωγή του ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (IL-1ra) καθώς και την παραγωγή της IL-8 [119]. Επιπλέον, εκτός από την αναστολή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών, η IVIg προκαλεί και την επαγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο TGF (transforming growth factor) [120].

6.1.4. Εξουδετέρωση αυτοαντισωμάτων

Ένας σημαντικός μηχανισμός που εξηγεί την αντιμετώπιση αυτοάνοσων νοσημάτων τα οποία οφείλονται σε αυτοδραστικά B λεμφοκύτταρα, είναι η εξουδετέρωση των αυτοαντισωμάτων μέσω αντι-ιδιοτυπικών αντισωμάτων που περιέχονται στην IVIg. Αυτά τα αντι-ιδιοτυπικά αντισώματα αναγνωρίζουν, μέσω των F(ab')₂ τμημάτων τους, περιοχές στη μεταβλητή (V) περιοχή αυτοαντισωμάτων που ανευρίσκονται στον ορό ασθενών. Στην IVIg έχουν βρεθεί και απομονωθεί αντι-ιδιοτυπικά αντισώματα έναντι πολλών παθολογικών αυτοαντισωμάτων. Τα τελευταία αναγνωρίζουν κύρια αυτοαντιγόνα, όπως το DNA [121], τον παράγοντα VIII, τα κυτταροπλασματικά αντιγόνα ουδετερόφιλων (Anti-neutrophil cytoplasmic antigen, ANCA) [122], και άλλα. Αντίθετα, στην IVIg δεν έχουν βρεθεί αντι-ιδιοτυπικά Abs που να αναγνωρίζουν αυτοαντισώματα, τα οποία εμφανίζονται σε σπάνιες αυτοάνοσες διαταραχές, όπως αυτά έναντι της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (παράγονται στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση) ή του κολλαγόνου τύπου IV (παράγονται στο σύνδρομο Goodpasture) [115, 118]. Εκτός από την απομάκρυνση των αυτοαντισωμάτων και την αναστολή της πρόσδεσης αυτών στα αυτοαντιγόνα, τα αντι-ιδιοτυπικά πιθανόν έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν την παραγωγή αυτοαντισωμάτων μέσω της πρόσδεσής τους σε μεμβρανικά IgM ή IgG και τη μετάδοση κατασταλτικών μηνυμάτων [123]. Η επωφελής επίδραση των αντι-ιδιοτυπικών αυτοαντισωμάτων της IVIg εμπλέκεται σε αρκετές αυτοάνοσες διαταραχές, όπως ΣΕΛ, αντφωσφολιπιδικό σύνδρομο, ITP και πολυεστιακή κινητική νευροπάθεια [118]. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός των αντι-ιδιοτυπικών έναντι αντι-DNA, έχει χορηγηθεί σε ζωικά μοντέλα ΣΕΛ (ποντίκια NZBxNZW F1) [121] καθώς σε ασθενείς που πάσχουν από ΣΕΛ [124], σε πολύ χαμηλότερες δόσεις από αυτές στις οποίες χορηγείται η IVIg, με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων αντι-DNA αυτοαντισωμάτων στον ορό και την υποχώρηση των συμπτωμάτων αυτοανοσίας.

6.1.5. Ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης

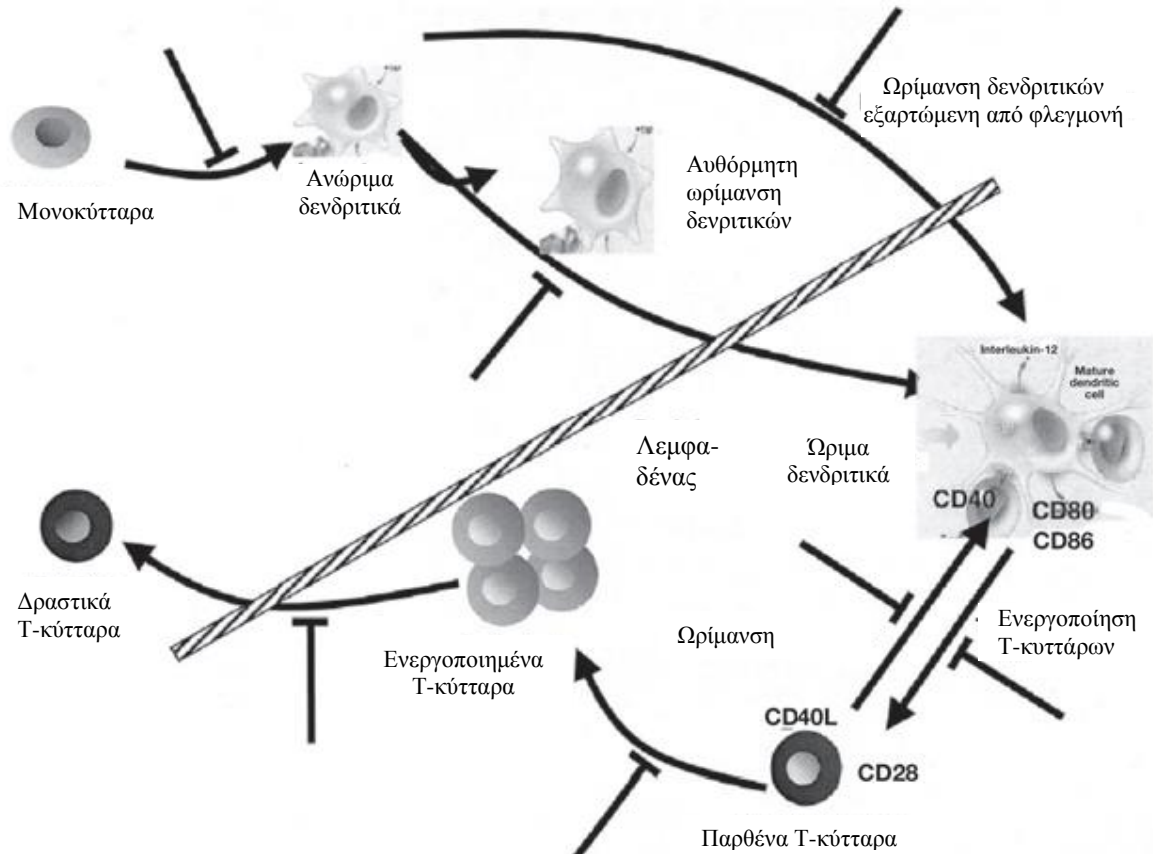
Η IVIg έχει σημαντική επίδραση και στα ίδια τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος, είτε αυτά ανήκουν στο σκέλος της ειδικής ανοσίας, όπως τα Β και Τ λεμφοκύτταρα, είτε στο σκέλος της μη ειδικής ανοσίας, όπως τα δενδριτικά, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Έχει δειχθεί *in vitro* πως η IVIg, σε συγκεντρώσεις που προκύπτουν μετά από χορήγηση μεγάλης δόσης, αναστέλλει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των Τ λεμφοκυττάρων όταν αυτός επάγεται από μιτογόνα όπως η φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA) [125]. Η αναστολή αυτή είναι δοσοεξαρτώμενη και προκαλείται ανεξαρτήτως από τον αν ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι αντιγονοεξαρτώμενος ή αντιγονοανεξάρτητος, αλλά είναι αναστρέψιμη και δεν οφείλεται σε κυτταροτοξική δράση της IVIg [126]. Συνήθως η IVIg δεν προκαλεί απόπτωση, αλλά σταματά τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G0/G1 κι εμποδίζει την είσοδο των κυττάρων στη φάση S [127]. Ωστόσο, έχει βρεθεί πως υπάρχουν στην IVIg αυτοαντισώματα αντι-Siglec-9 (anti-sialic acid-binding Ig-like lectin-9), τα οποία αναγνωρίζουν αυτό το μόριο της κυτταρικής επιφάνειας και επάγουν τον κυτταρικό θάνατο ηωσινόφιλων παρουσία κυτταροκινών, ανεξάρτητα από το μονοπάτι των κασπασών.

Επιπλέον, στην IVIg περιέχονται αυτοαντισώματα που αναγνωρίζουν τον διαμεμβρανικό υποδοχέα θανάτου Fas. Αυτά τα αντισώματα είναι είτε ανταγωνιστές του υποδοχέα, κι έτσι εμποδίζουν τη σύνδεση του συνδέτη Fas και προστατεύουν τα κύτταρα από την απόπτωση, είτε αγωνιστές και συνδέονται με τον υποδοχέα ενεργοποιώντας τον και προκαλώντας απόπτωση. Το τελικό αποτέλεσμα, δηλαδή αν θα γίνει απόπτωση ή όχι και σε ποιο τύπο κυττάρων, εξαρτάται από τις εκάστοτε συνθήκες [118].

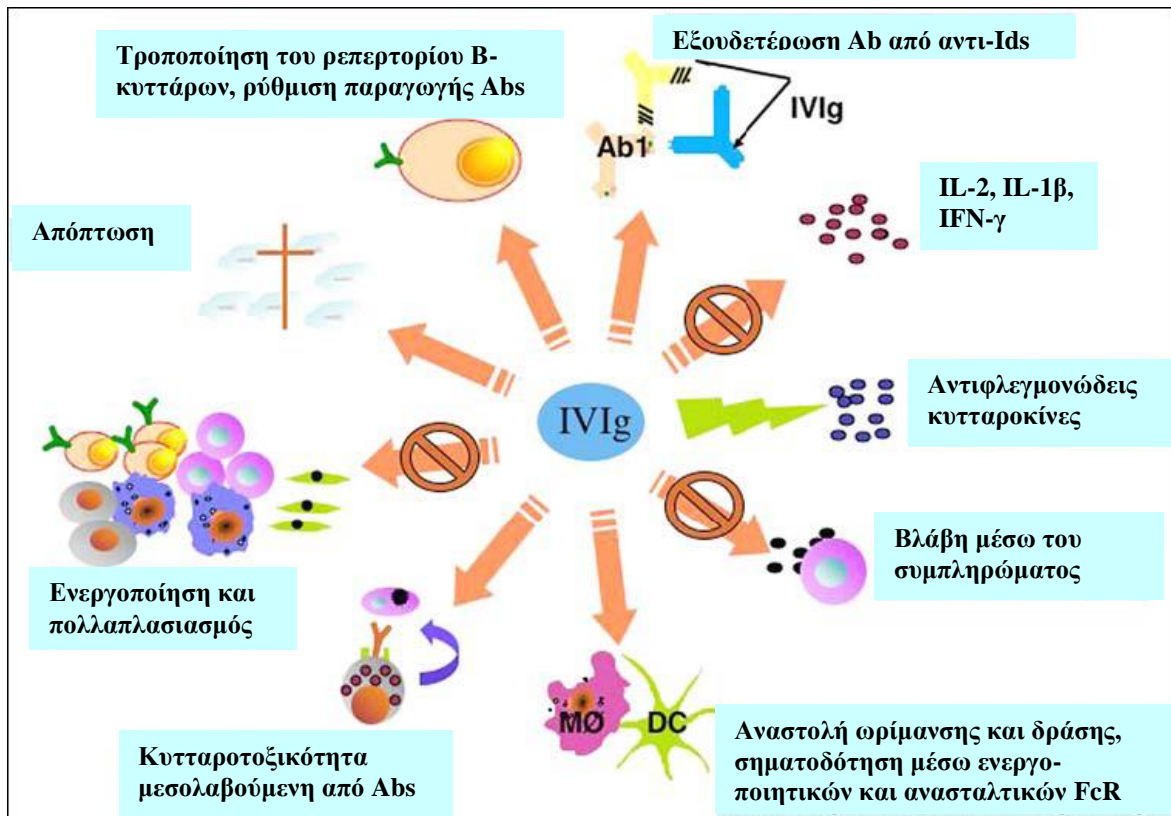
Ένας άλλος μηχανισμός δράσης είναι μέσω της ρύθμισης του αριθμού και της δράσης των κυττάρων NK, τα οποία εμπλέκονται σε κάποιες από τις καταστάσεις στις οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί η IVIg ως θεραπευτικό μέσο. Αυτή η ρύθμιση γίνεται μέσω της μεταβολής της έκκρισης της IL-12, αύξηση της οποίας προκαλεί και αυξημένη ενεργοποίηση των κυττάρων NK. Αυτός ο μηχανισμός ανοίγει δρόμους για θεραπεία του καρκίνου, καθώς τα κύτταρα NK σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα. Αντίθετα, σε γυναίκες με συχνές αυτόματες αποβολές παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα κυττάρων NK, που μπορεί να βλάψουν το έμβρυο, και σε αυτή την περίπτωση η IVIg προκαλεί μείωση της δράσης των κυττάρων αυτών [118].

Επίσης, έχει διαπιστωθεί πως η IVIg επιδρά σε αυτούς τους δυο τύπους κυττάρων έμμεσα επηρεάζοντας τα δενδριτικά κύτταρα (**Εικόνα 32.**), τα οποία, ως αντιγονοπαρουσιαστικά, συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων και αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα NK. Ένας εμπλεκόμενος μηχανισμός είναι η δέσμευση πολυμερών της IgG στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων, και η προσέλκυση των κυττάρων NK μέσω του FcγRIII που οδηγεί σε θανάτωση των δενδριτικών μέσω ADCC.

Συνέπεια αυτού είναι η ενεργοποίηση των κυττάρων NK και η αναστολή της ενεργοποίησης των T-κυττάρων [128]. Γενικά, η IVIg προκαλεί αναστολή της διαφοροποίησης και της ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων τόσο με το Fc όσο και με το F(ab')₂ τμήμα, ενώ σε χαμηλή δόση επάγει τη διαφοροποίησή τους [109].



Εικόνα 32. Επίδραση της IVIg στην ωρίμανση, διαφοροποίηση και λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων [118]



Εικόνα 33. Μηχανισμοί δράσης της IVIg σε αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις διαταραχές [111].

6.2. Υποπληθυσμοί της IVIg

Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με την IVIg έχουν βρεθεί και απομονωθεί ειδικά αντισώματα που αναγνωρίζουν διάφορες αντιγονικές δομές, όπως εξελικτικά συντηρημένα αυτοαντιγόνα (π.χ. DNA), εξωγενή αντιγόνα (π.χ. απτένια) και άλλα. Οι υποπληθυσμοί αυτοί απομονώνονται με χρωματογραφία συγγένειας και η αντιγονική τους δράση πιστοποιείται συνήθως με ELISA. Στις περισσότερες περιπτώσεις έχει μελετηθεί η δράση των υποπληθυσμών αυτών *in vivo* ή/και *in vitro* και έχει περαιτέρω συσχετιστεί η παρουσία τους στην IVIg με τη θεραπευτική της δράση. Στα αντιγόνα που αναγνωρίζονται από τους απομονωμένους υποπληθυσμούς της IVIg περιλαμβάνονται οι ιδιότυποι αυτοαντισωμάτων, πυρηνικά αντιγόνα (π.χ. DNA), πρωτεΐνες του ορού, αντιγόνα λιπιδικής ή υδατανθρακικής φύσης, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη ρύθμιση του ανοσιακού συστήματος, μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και μόρια του νευρικού συστήματος, τα οποία αποτελούν και πιθανούς στόχους δράσης της IVIg. Ο κάθε υποπληθυσμός αντιστοιχεί σε ένα πολύ μικρό ποσοστό των αντισωμάτων που περιέχονται στην IVIg, όπως για παράδειγμα τα αντι-Gal αντισώματα, που αναγνωρίζουν διάφορες υδατανθρακικές αντιγονικές δομές και φτάνουν γύρω στο 0,15% [129].

6.2.1. IVIg αντισώματα έναντι ιδιοτύπων

Όπως προαναφέρθηκε, στην IVIg έχουν βρεθεί και απομονωθεί αντιϊδιοτυπικά αντισώματα, που αντιδρούν με δομές που βρίσκονται στους παρατόπους άλλων αντισωμάτων και παρεμποδίζουν έτσι την επιβλαβή δράση τους όταν αυτά εμφανίζονται σε αυτοάνοσες διαταραχές (π.χ. αντι-DNA στο ΣΕΛ, αντι-θυρεοσφαιρίνης στη θυρεοειδίτιδα Hashimoto και αντι-δεσμογλεΐνης στην πέμφιγα). Συγκεκριμένα, αναστέλλουν την πρόσδεση των αυτοαντισωμάτων στα αυτοαντιγόνα-στόχους κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο [130]. Οι ιδιότοποι που αναγνωρίζονται από τα αντιϊδιοτυπικά αντισώματα υπάρχουν πολλές φορές μόνο στα αυτοαντισώματα που ανευρίσκονται σε ασθενείς με αυτοάνοσες νόσους και είναι κοινοί μεταξύ ίδιων τύπων αυτοαντισωμάτων (π.χ. αντι-DNA). Για την απομόνωση των αντιϊδιοτυπικών αντισωμάτων απαιτείται συνήθως η παρασκευή ανοσοπροσροφητή, ο οποίος φέρει ως αντιγόνο είτε ολόκληρο το αυτοαντίσωμα, απομονωμένο από ορό ασθενών (π.χ. με ΣΕΛ), είτε πεπτίδια που αντιστοιχούν στη μεταβλητή περιοχή των αυτοαντισωμάτων. Η ποσότητα ειδικών αντισωμάτων που απομονώνεται από την IVIg είναι πολύ μικρή, αν και αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς στο μίγμα αντισωμάτων περιέχεται ένα μεγάλο φάσμα ειδικοτήτων, από το οποίο επιλέγεται μόνο μία. Για παράδειγμα, κατά την απομόνωση από την IVIg αντιϊδιοτυπικών έναντι των αντι-DNA αυτοαντισωμάτων, το ποσοστό των αντιϊδιοτυπικών αυτοαντισωμάτων αντιστοιχεί μόλις στο 0,05% [131]. Η δράση των αντιϊδιοτυπικών αντισωμάτων στην IVIg έχει μελετηθεί *in vitro* με ανταγωνιστική ELISA και έχει δείχθει πως αναστέλλουν την πρόσδεση των αντίστοιχων αυτοαντισωμάτων στο αντιγόνο-στόχο τους. Η αναστολή αυτή από τα αντιϊδιοτυπικά αντισώματα πραγματοποιείται με πολύ λιγότερη ποσότητα σε σύγκριση με την IVIg. Επιπλέον, *in vivo* μελέτη της δράσης των αντιϊδιοτυπικών αντισωμάτων ππυ περιέχονται στην IVIg έχει πραγματοποιηθεί με τη χορήγησή τους σε ποντίκια που αποτελούν μοντέλα αυτοάνοσων νοσημάτων. Συγκεκριμένα, αντιϊδιοτυπικά έναντι των αντι-DNA αυτοαντισωμάτων έχουν χορηγηθεί σε ποντίκια (NZWxNZB)F1, τα οποία αναπτύσσουν αυθόρμητα σύνδρομο λύκου και παράγουν υψηλά επίπεδα αντιπυρηνικών αντισωμάτων. Το αποτέλεσμα της χορήγησης σε νεαρά ζώα που δεν είχαν αναπτύξει την ασθένεια ήταν τα μειωμένα επίπεδα αντι-DNA αυτοαντισωμάτων σε σύγκριση με τα ποντίκια-μάρτυρες, ενώ αντίστοιχα σε μεγαλύτερης ηλικίας ζώα ήταν η σταθεροποίηση των επιπέδων αντι-DNA αυτοαντισωμάτων. Παράλληλα, τα συμπτώματα της νόσου, όπως η σπειραματονεφρίτιδα και η πρωτεϊνουρία, φάνηκε να μειώνονται [121]. Επίσης έχουν μελετηθεί στην IVIg αντι-ϊδιοτυπικά αντισώματα που αναγνωρίζουν τη δεσμογλεΐνη και έχουν χορηγηθεί σε ποντίκια που αποτελούν πειραματικά μοντέλα της πέμφιγας. Σε αυτή τη νόσο, αντισώματα έναντι της δεσμογλεΐνης εμποδίζουν την κυτταρική πρόσδεση στις βασικές μεμβράνες, όπως στο δέρμα, με

αποτέλεσμα την δημιουργία δερματικών φυσαλίδων. Η χορήγηση αντιδιοτυπικών αντισωμάτων στα ζωικά μοντέλα φάνηκε να προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης των δερματικών προβλημάτων και μάλιστα σε ποσότητες πολύ μικρότερες από αυτές που θα χρειάζονταν στην περίπτωση της IVIg. [91]

6.2.2. IVIg αντισώματα έναντι πυρηνικών αντιγόνων

Πολλές μελέτες έχουν βασιστεί στην απομόνωση από την IVIg ειδικών Abs για διάφορα αυτοαντιγόνα, όπως το DNA, και στην περαιτέρω διερεύνηση της δράσης αυτών των υποπληθυσμών *in vivo*. Με αφορμή το γεγονός ότι η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων στον ορό χαρακτηρίζει πολλές αυτοάνοσες διαταραχές, ελέγχθηκε κατά πόσο αντίστοιχα αυτοαντισώματα σε φυσιολογικές συνθήκες εκδηλώνουν παρόμοια δράση. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως αντι-DNA mAbs από ασθενείς με ΣΕΛ προκαλούν σύνδρομο Λύκου όταν χορηγούνται σε υγιή ποντίκια, σε αντίθεση με τα F(ab')₂ θραύσματα της IVIg, που είναι ειδικά για το DNA αλλά δεν προκαλούν τα συμπτώματα της διαταραχής [132].

6.2.3. IVIg αντισώματα έναντι πρωτεϊνών του ορού

Αντισώματα της IVIg έχουν απομονωθεί και έναντι του παράγοντα VIII της πήξης του αίματος. Σε φυσιολογικές καταστάσεις ο παράγοντας VIII είναι αδρανής και σε περιπτώσεις τραυματισμών ενεργοποιείται και συμβάλλει στην πήξη του αίματος. Στην αυτοάνοση αιμορροφιλία έχει βρεθεί πως υπάρχουν αυτοαντισώματα έναντι του παράγοντα VIII, τα οποία δεσμεύονται σε αυτόν και τον εμποδίζουν να δράσει. Αντίστοιχα αντισώματα έχουν βρεθεί και σε υγιή άτομα, καθώς και σε παρασκευάσματα IVIg. Ο απομονωμένος από την IVIg υποπληθυσμός, σε αντίθεση με τα παθολογικά αυτοαντισώματα, διαπιστώθηκε πως αναστέλλει μερικώς τη δράση του παράγοντα VIII *in vitro*. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως ένα μέρος των αντισωμάτων του υποπληθυσμού προσδένεται στο τμήμα του παράγοντα VIII που αλληλεπιδρά με άλλα συστατικά, προκαλώντας την αναστολή του, ενώ ένα άλλο μέρος αντισωμάτων προσδένεται σε άλλα σημεία του παράγοντα VIII χωρίς να τον αναστέλλει. Προέκυψε λοιπόν το συμπέρασμα πως σε φυσιολογικές συνθήκες τα Abs αυτά δεν εμποδίζουν τη δράση του παράγοντα VIII, λόγω του πολύ μικρού ποσοστού τους στην κυκλοφορία [133]. Τα αυτοαντισώματα της IVIg έχουν συσχετιστεί και με άλλους μηχανισμούς δράσης. Συγκεκριμένα, αντισώματα έναντι ιστονών, και συγκεκριμένα έναντι της ιστόνης H1, έχουν βρεθεί και απομονωθεί από τον ορό υγιών ατόμων [134]. Μελετώντας τη δράση των υποπληθυσμών αυτών φάνηκε ότι είναι πλειοτροπικά ανοσοκατασταλτική, καθώς καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων, αναστέλλουν την ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων, μπλοκάρουν τη μεταγραφή γονιδίων προφλεγμονωδών κυτταροκινών και διακόπτουν την

κυτταροτοξική δράση των κυτάρων NK. Τα αντισώματα αυτά, όπως έχει βρεθεί, αναστέλλονται από διάφορες πρωτεΐνες του ορού, όπως οι IgM και άλλες [135]. Από την IVIg έχουν απομονωθεί και μελετηθεί αντισώματα έναντι πρωτεϊνών του ορού και έχει βρεθεί πως προάγουν το σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων. Τα αντισώματα αυτά συναντώνται σε ποσοστό μικρότερο του 3% και προάγουν το σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις από αυτές στις οποίες η ολική IVIg προκαλεί το αντίστοιχο φαινόμενο. Θεωρείται πως τα ανοσοσυμπλέγματα, τα οποία εμφανίζονται σε ασθενείς μετά τη χορήγηση της IVIg, παίζουν σημαντικό ρόλο στη δράση της, ιδιαίτερα στην περίπτωση της ITP, καθώς και σε άλλες αυτοάνοσες διαταραχές και γενικά συνεισφέρουν στη μείωση των παθολογικών αυτοαντισωμάτων [136].

6.2.4. IVIg αντισώματα έναντι λιπιδίων ή υδατανθράκων

Στην IVIg, δεν περιέχονται μόνο αντισώματα που αναγνωρίζουν πρωτεϊνικής φύσεως αυτοαντιγόνα, αλλά και λιπίδια ή υδατάνθρακες. Αντισώματα έναντι της καρδιολιπίνης που προέρχονται από την IVIg έχουν συγκριθεί με αντίστοιχα από ασθενείς με ΣΕΛ ως προς την ικανότητά τους να επάγουν συμπτώματα αυτοάνοσης νόσου σε υγιή ποντίκια. Βρέθηκε ότι αυτά τα αντισώματα προκαλούν σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων (anti-phospholipids syndrome), σε αντίθεση με τα αντισώματα από την IVIg, τα οποία δεν είναι ικανά να προκαλέσουν την εκδήλωση των συμπτωμάτων [132]. Παρομοίως, απομονωμένα Abs που αναγνωρίζουν το λιπίδιο φωσφατιδυλχολίνη έχουν βρεθεί πως είναι ικανά να λύουν ερυθροκύτταρα παρουσία συστατικών του συμπληρώματος *in vitro*, αλλά δεν είναι γνωστό ακόμα κατά πόσο η παρουσία τους σχετίζεται με την ανάπτυξη αυτοάνοσης αιμολυτικής αναιμίας [136]. Επίσης έχουν απομονωθεί και μελετηθεί υποπληθυσμοί έναντι αντιγόνων μικροοργανισμών, οι οποίοι σχετίζονται με τη θεραπευτική δράση της IVIg σε μολυσματικές ασθένειες. Συγκεκριμένα, αντισώματα που αναγνωρίζουν τους λιποπολυσακχαρίτες των κυτταρικών τοιχωμάτων του μηνιγγιτιδίοκοκκου έχουν βακτηριοκτόνο δράση σε συνδυασμό με συστατικά του συμπληρώματος [137].

6.2.5. IVIg αντισώματα έναντι μορίων του ανοσιακού συστήματος

Στην IVIg έχουν μελετηθεί κι απομονωθεί πληθυσμοί, που αναγνωρίζουν κι άλλα σημαντικά μόρια του ανοσιακού συστήματος. Αυτά τα μόρια μπορεί να είναι διαλυτά, όπως οι κυτταροκίνες, και τα αντισώματα που τις αναγνωρίζουν και θεωρείται πως συμβάλλουν στην εκδήλωση των ανεπιθύμητων αντιδράσεων που παρατηρούνται με τη χορήγηση της IVIg. Έχουν βρεθεί στην IVIg αντισώματα έναντι του GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), της ιντερφερόνης- $\alpha 2\alpha$ (IFN- $\alpha 2\alpha$) και της

ιντερλευκίνης-1α (IL-1α), τα οποία προσδένονται σε αυτά και εμποδίζουν τη βιολογική τους δράση *in vitro*. Σε μελέτες *in vivo* έχειδειχθεί πως χορήγηση IL-6 σε πειραματόζωα αυξάνει τα επίπεδα αντι-IL-6 αντισωμάτων στον ορό, οδηγώντας σε επιλεγμένη ανεπάρκεια IL-6, της οποίας η δράση αναπληρώνεται όμως από άλλες κυτταροκίνες. Για να διαπιστωθεί αν η ανασταλτική επίδραση των αντι-IL-6 αντισωμάτων, που προέρχονται από υγιείς δότες, πραγματοποιείται και στον άνθρωπο, τα αντισώματα αυτά χορηγήθηκαν σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα, στους οποίους παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της κυκλοφορούσας IL-6, καθώς αυτή δεσμεύεται από τα αντισώματα. [] Ένα άλλο αντιγόνο που αναγνωρίζεται από ειδικά Abs της IVIg είναι η κυτταροκίνη BAFF (B-cell-activating factor of the TNF family). Η δράση της BAFF στην προστασία της περιφερειακής εξάλειψης αυτοδραστικών B-κυττάρων και η υπερπαραγωγή της σε κάποιες αυτοάνοσες διαταραχές την καθιστούν ως σημαντικό θεραπευτικό στόχο. Έχειδειχθεί πως τα αντισώματα της IVIg που αναγνωρίζουν τη BAFF εμποδίζουν την αντι-αποπτωτική της δράση *in vitro*, σε καλλιέργειες B κυττάρων [138].

Άλλα μόρια που αναγνωρίζονται από συγκεκριμένους υποπληθυσμούς της IVIg και συμμετέχουν στη λειτουργία του ανοσιακού συστήματος μπορεί να είναι μεμβρανικά. Με τη χρήση ενός ανασυνδυασμένου πεπτιδίου που αντιστοιχεί σε τμήμα του TCR απομονώθηκε ένας πληθυσμός της IVIg, ο οποίος προσδένεται στον TCR των T-κυττάρων [139]. Παρόμοιας ειδικότητας αντισώματα βρίσκονται σε ασθενείς με ΣΕΛ ή ρευματοειδή αρθρίτιδα και ορισμένα απ' αυτά αναστέλλουν την παραγωγή IL-2 από TH1 κύτταρα και κατά συνέπεια τη φλεγμονώδη δράση τους [140]. Επιπλέον, Abs απομονωμένα από την IVIg έναντι του μορίου CD4 έχειδειχθεί πως προκαλούν αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που ενεργοποιείται από τα CD4+ κύτταρα, ενώ αναστέλλουν και τη μόλυνση από τον ιό HIV των CD4+ κυττάρων, ο οποίος χρησιμοποιεί το CD4 μόριο για την πρόσδεση και την είσοδό του στα κύτταρα. Η δράση αυτού του υποπληθυσμού θεωρείται πως είναι άλλος ένας τρόπος με τον οποίο η IVIg ασκεί ανοσορρυθμιστική δράση [141].

Τα μόρια MHC τάξης I, τα οποία παρουσιάζουν αντιγονικούς επιτόπους στα CD8+ T-κύτταρα, αποτελούν έναν ακόμα υπό μελέτη στόχο της IVIg. Με τη χρήση ενός πεπτιδίου που αντιστοιχεί σε μια εξελικτικά συντηρημένη περιοχή των MHC τάξης I έχει απομονωθεί ένας πληθυσμός Abs της IVIg που αναγνωρίζει διαλυτά και μεμβρανικά μόρια MHC. Η πρόσδεση των Abs πάνω στα MHC μόρια κυττάρων που έχουν μολυνθεί με ιό της γρίπης προκαλεί αναστολή της ενεργοποίησης και της κυτταροτοξικής δράσης των ειδικών CD8+ T-κυττάρων. Αυτός ο τρόπος δράσης είναι πιθανόν σημαντικός στη χρήση της IVIg σε αυτοάνοσες διαταραχές που χαρακτηρίζονται από την παρουσία αυτοδραστικών κυτταροτοξικών κλώνων, καθώς και στην πρόληψη της αντίδρασης

μοσχεύματος έναντι ξενιστή [142]. Ακόμη, Abs έναντι του μορίου Fas έχουν απομονωθεί κι έχει διαπιστωθεί πως επάγουν απόπτωση σε κύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνειά τους Fas, όπως T και B-κύτταρα καθώς και μονοκύτταρα. Όπως παρατηρήθηκε, η IVIg επάγει απόπτωση τόσο σε όσο και σε μη ενεργοποιημένα κύτταρα, που εκφράζουν σε μεγαλύτερο βαθμό μόρια Fas. Ο υποπληθυσμός αντι-Fas όμως επάγει απόπτωση μόνο στα ενεργοποιημένα κύτταρα, υποδεικνύοντας ότι η IVIg επάγει απόπτωση μέσω περισσότερων του ενός μονοπατιών [143].

6.2.6. IVIg αντισώματα έναντι μορίων κυταρικής προσκόλλησης

Αντισώματα έναντι μορίων κυταρικής προσκόλλησης μπορεί να συνεισφέρουν και αυτά σημαντικά στη θεραπευτική δράση της IVIg. Σε μια μελέτη απομονώθηκαν αντισώματα έναντι ενός δεκαπεπτιδίου που περιείχε το μοτίβο RGD (Arg-Gly-Asp), το οποίο βρίσκεται σε πολλές πρωτεΐνες της κυταρικής επιφάνειας και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Στο μοτίβο αυτό προσδένονται πολλές πρωτεΐνες κυταρικής προσκόλλησης, όπως οι ιντεγκρίνες και κατά συνέπεια, όπως παρατηρήθηκε, η πρόσδεση των αντισωμάτων στο συγκεκριμένο μοτίβο εμποδίζει την κυταρική προσκόλληση. Συγκεκριμένα, τα αντισώματα που απομονώθηκαν από την IVIg αναγνώριζαν φιμπρονεκτίνη, ινωδογόνο, λαμινίνη και βιτρονεκτίνη, όπως έδειξαν πειράματα με ELISA. Επιπλέον, αναστέλλουν *in vitro* την προσκόλληση B-κυττάρων στη φιμπρονεκτίνη, την εξαρτώμενη από ιντεγκρίνη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων και την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ινωδογόνο, ακόμα και μετά την ενεργοποίησή τους από θρομβίνη. Θεωρείται πως η αναστολή της προσκόλλησης κυττάρων του ανοσιακού συνεισφέρει στην αναστολή της μετανάστευσης των λευκοκυττάρων και επομένως μειώνεται η φλεγμονώδης απόκριση. Επίσης, είναι πιθανό τα συγκεκριμένα αντισώματα να αναστέλλουν και τη μετανάστευση καρκινικών κυττάρων [144]. Επιπλέον, έχουν βρεθεί και απομονωθεί από την IVIg αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν ένα μόριο κυταρικής προσκόλλησης της οικογένειας των λεκτινών, ειδικό για τα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, DC-SIGN), και το οποίο χρησιμεύει για την πρόσδεση του ιού HIV σε αυτά. Από τα δενδριτικά ο HIV μπορεί να μεταδοθεί στα CD4+ κύτταρα. Τα αντισώματα έναντι του DC-SIGN προσδέονται στα δενδριτικά κύτταρα που το φέρουν και εμποδίζουν την πρόσδεση του ιού σε αυτά και τη μετάδοσή του από τα δενδριτικά στα T-κύτταρα, όπως παρατηρήθηκε σε συνκαλλιέργειες κυττάρων *in vitro* [145]. Με παρόμοιο τρόπο, αντισώματα απομονωμένα από την IVIg έναντι του υποδοχέα κυταροκινών CCR5, ο οποίος χρησιμεύει ως συνυποδοχέας για την είσοδο του HIV στα T-κύτταρα, εμποδίζουν τη μόλυνση από στελέχη του HIV. Ο φυσιολογικός ρόλος των αντισωμάτων αυτών διερευνάται ακόμα, αλλά θεωρείται πιθανό πως θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για

τον περιορισμό της μετάδοσης του ιού *in vivo*, για παράδειγμα από μια μητέρα στο παιδί της [146].

6.2.7. IVIg αντισώματα έναντι πρωτεϊνών του νευρικού συστήματος

Έχουν επίσης απομονωθεί από την IVIg αντισώματα έναντι πρωτεϊνών που σχετίζονται πρωτίστως με το νευρικό σύστημα, και, θεωρείται, ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ αυτού και του ανοσιακού συστήματος. Έχει μελετηθεί η δράση αντισωμάτων απομονωμένων έναντι του νευρικού αυξητικού παράγοντα (nerve growth factor, NGF), ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των νευροτροφινών. Οι νευροτροφίνες πιστεύεται πως δεν είναι μόνο αυξητικοί παράγοντες νευρικών κυττάρων, αλλά παίζουν σημαντικό ρόλο και σε πολλές φλεγμονώδεις νόσους. Προάγουν την απελευθέρωση φλεγμονοδών νευροπεπτιδίων και είναι σε αυξημένα επίπεδα σε κάποιες αυτοάνοσες νόσους, όπως ΣΕΛ, ρευματοειδής αρθρίτιδα, νόσος Kawasaki και σκλήρυνση κατά πλάκας. Τα αντισώματα έναντι του NGF αναστέλλουν *in vitro* τη δράση του NGF στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση σε δένδριτικές κυτταρικές σειρές, που απαιτούν τον NGF για την ανάπτυξή τους. Θεωρείται πως αυτός ο τρόπος δράσης τους στην IVIg συνεισφέρει στον περιορισμό των συμπτωμάτων αυτοάνοσων νόσων στις οποίες υπερεκφράζεται ο NGF [147]. Ένας ακόμα υποπληθυσμός αAbs που έχουν απομονωθεί από την IVIg αναγνωρίζει τον δέλτα υποδοχέα οπιοειδών (delta opioid receptor, DOR). Οι υποδοχείς και οι προσδέτες τους συμμετέχουν σε φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η αναλγησία, η ρύθμιση του αυτόνομου νευρικού συστήματος και η νευροενδοκρινής δράση, αλλά επηρεάζουν και τη λειτουργία του ανοσιακού συστήματος, καθώς υποδοχείς βρίσκονται και σε περιφερειακά λευκοκύτταρα, όπως τα Β και Τ κύτταρα [148]. Σε συνθήκες στρες τα κύτταρα του ανοσιακού εκκρίνουν οπιοειδή και αυτά, όπως έχει δειχθεί, ασκούν ανοσορρυθμιστική δράση (πολλαπλασιασμός, παραγωγή κυτταροκινών, χημειοταξία, ρύθμιση της λειτουργίας των υποδοχέων κυτταροκινών, κ.λ.π.) στα Τ-κύτταρα, τα οποία αυξάνουν την έκφραση του υποδοχέα DOR με την ενεργοποίησή τους. Ο υποπληθυσμός των αντι-DOR, όπως και οι αγωνιστές του συγκεκριμένου υποδοχέα, ενεργοποιούν *in vitro* το σηματοδοτικό μονοπάτι (όπως δείχνει η μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων cAMP) και ασκούν ανοσορρυθμιστική δράση, μέσω της ρύθμισης της έκφρασης διαφόρων υποδοχέων κυτταροκινών στην επιφάνεια των κυττάρων. Λόγω της ανοσορρυθμιστικής δράσης των αντι-DOR Abs θεωρείται πως αυτά συμμετέχουν στη διατήρηση της ομοιόστασης του ανοσιακού συστήματος [149]. Ακόμη, έχουν βρεθεί και απομονωθεί από την IVIg αντισώματα που αναγνωρίζουν τα αμυλοειδή-β (Αβ) ινίδια και ολιγομερή, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer, αλλά δεν αναγνωρίζουν το φυσιολογικό μονομερές της

αμυλοειδούς-β πρωτεΐνης. Σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο του Alzheimer έχει βρεθεί πως έχουν μειωμένα επίπεδα αντι-Aβ Abs στον ορό τους σε σχέση με τους υγιείς, επομένως η αναγνώριση των παθολογικών πρωτεϊνών από τα αντι-Aβ Abs καθιστά τη χρήση της IVIg ως μια πιθανή θεραπευτική προσέγγιση [150]. Τέλος, αντισώματα της IVIg έναντι της άλφα-συνουκλεΐνης θεωρείται πως μπορεί να συνεισφέρουν στην προστασία των νευρώνων στη νόσο του Parkinson. Η α-συνουκλεΐνη αποτελεί συστατικό των σωμάτων Lewy, που είναι χαρακτηριστικό παθολογικό εύρημα της νόσου του Parkinson, και συνεισφέρει στον τραυματισμό και το θάνατο των νευρώνων. Τα αντισώματα έναντι αυτής της πρωτεΐνης που βρίσκονται στην IVIg διαταρράσουν *in vitro* το σχηματισμό συσσωματωμάτων α-συνουκλεΐνης και θεωρείται πως *in vivo* θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην απομάκρυνση της από τον εγκέφαλο, όταν αυτή μετακινείται διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [151].

6.2.8. IVIg αντισώματα έναντι απτενίων

Επιπλέον, χρησιμοποιώντας το απτενίο δινιτροφαινόλη (DNP) απομονώθηκαν από την IVIg πολυδραστικά αντισώματα που αναγνωρίζουν μεταξύ άλλων τα Fas, CD4, IL-1, IL-2, IFN-γ και TNF-α. Σε *in vitro* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, τα αντι-DNP Abs φάνηκε να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό μονοκύτταρων κυττάρων και μάλιστα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις από ότι με την ολική IVIg. Επιπλέον, ο υποπληθυσμός αντι-DNP φάνηκε να έχει και αντιφλεγμονώδη δράση, αφού προκαλεί αναστολή της έκκρισης διαφόρων κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα, όπως IL-2, IL1-β, IL-4, IFN-γ και TNF-α, ενώ αντίθετα επάγει την έκφραση του IL-1ra, κάτι το οποίο δεν έχει βρεθεί να συμβαίνει με ολόκληρη την IVIg. Ο συγκεκριμένος υποπληθυσμός μελετήθηκε και *in vivo*, χορηγούμενος σε ζωικά μοντέλα αυτοάνοσων διαταραχών, όπως η επαγόμενη από κολλαγόνο αρθρίτιδα (collagen-induced arthritis) και η πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (experimental autoimmune encephalomyelitis) και παρατηρήθηκε πως εμποδίζει την εμφάνιση των συμπτωμάτων αυτών των διαταραχών [152].

Συνολικά λοιπόν έχουν προσδιοριστεί στην IVIg και άρα στο φυσιολογικό ανθρώπινο ορό ένας πολύ μεγάλος αριθμός αντισωμάτων που αναγνωρίζουν αντιγόνα του οργανισμού και του περιβάλλοντος και πολλά από αυτά παρουσιάζουν ποικίλες βιολογικές δράσεις. Πολλές φορές μια δραστηριότητα δεν φαίνεται στο αρχικό παρασκεύασμα της IVIg αλλά μόνο μετά την απομόνωση αντισωμάτων, που υποδηλώνει ότι πολλά από τα αντισώματα έχουν καλυμμένους τους ιδιότυπους τους από άλλα αντισώματα ή άλλες ουσίες στη κυκλοφορία του αίματος.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι στην IVIg ανευρίσκεται μια μεγάλη ποικιλία υποπληθυσμών αντισωμάτων, τα οποία ασκούν διαφορετική δράση ανάλογα με το

αντιγόνο που αναγνωρίζουν και συνεισφέρουν στο θεραπευτικό αποτέλεσμα της IVIg. Η απομόνωσή τους και η εξειδικευμένη χορήγησή τους ανάλογα με την παθολογία της εκάστοτε νόσου μπορεί στο μέλλον να αποβεί πιο αποτελεσματική από ότι αυτή της ολόκληρης IVIg.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

II. ΚΥΤΤΑΡΟ-ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (CPAbs)

Εισαγωγή

Τα τελευταία τριάντα χρόνια έχει ανατραπεί η αντίληψη ότι τα αντισώματα μπορούν να εντοπίζονται μόνο στην επιφάνεια των ζώντων κυττάρων, αν και αρχικά η κυτταρο-δισιδυτική τους ικανότητα αντιμετώπισε αρκετή κριτική. Πλέον, ένα μεγάλο εύρος πειραματικών ευρημάτων και κλινικών παρατηρήσεων αποδεικνύει την παρουσία τους σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα ή στα αντίστοιχα πειραματικά μοντέλα. Σήμερα πια είναι γνωστό ότι τα CPAbs (cell-penetrating antibodies, CPAbs) είναι αυτοαντισώματα με ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα, που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και εντοπίζονται στον πυρήνα ή και στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Τα CPAbs ανευρίσκονται σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η μεικτή νόσος του συνδετικού ιστού (ΜΝΣΙ) και η ρευματοειδής αρθρίτιδα, αλλά στο νόσημα που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα είναι ο ΣΕΛ και τα πειραματικά του μοντέλα στον ποντικό. Από μελέτες φαίνεται ότι τα CPAbs αφού διεισδύσουν σε ζώντα κύτταρα εμπλέκονται στην παθογένεση του ΣΕΛ και παρεμβαίνουν σε κυτταρικές λειτουργίες, προκαλώντας απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση. Παρά το γεγονός ότι οι ακριβείς μηχανισμοί του τρόπου εισόδου δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί, τα τελευταία χρόνια τα CPAbs αντιμετωπίζονται ως μια νέα εκμεταλλεύσιμη θεραπευτική πηγή, αφού τα ίδια ή παράγωγά τους, όπως θραύσματα $F(ab')_2$, scFv, ή πεπτιδία που αντιστοιχούν σε μέρη της μεταβλητής τους περιοχής, έχουν επιτυχώς χρησιμοποιηθεί για να μεταφέρουν σε ενδοκυττάρια διαμερίσματα ένζυμα, φαρμακευτικές ουσίες, ισότοπα και γονίδια [153].

Κατά καιρούς στα CPAbs έχουν αποδοθεί διάφορες ονομασίες με βάση την ικανότητά τους για κυτταρική διείσδυση, όπως “cell-translocating” ή “cell-internalizing antibodies”. Εκτός από τα CPAbs που παράγονται στους οργανισμούς και άρα συνιστούν «φυσικά προϊόντα», υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία και για «τεχνητά προϊόντα», δηλαδή αντισώματα ή παράγωγά τους, χημικά συντεθειμένα ή τροποποιημένα, τα οποία χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές μεταφοράς βιοδραστικών μορίων στην ενδοκυττάρια περιοχή (πχ. Intrabodies, Superantibodies, Cell Penetrating Antibodies, Intracellular antibodies, transmab, cell penetrating peptides) (Πίνακας 1.).

Πίνακας 1. Αντισώματα και παράγωγα αυτών με ικανότητα κυτταρο-διείσδυσης, που χρησιμοποιούνται για ενδοκυττάρια μεταφορά

Cell-penetrating antibodies / Cell-translocating antibodies / Cell-internalizing antibodies	Αντισώματα που έχουν προκύψει από οργανισμούς (κυρίως με ΣΕΛ)
Intrabodies / Superantibodies / Cell-Penetrating Alphanbodies / Intracellular antibodies / transmab / Cell-penetrating peptides	Αντισώματα που προέρχονται κυρίως από φάγους και είναι χημικά τροποποιημένα για να εισέρχονται μέσα στο κύτταρο

1. Ανακάλυψη και ιστορία των CPAbs

Η ανακάλυψή τους είναι χρονικά πιο πρόσφατη σε σύγκριση με αυτήν των NAb. Το μακροχρόνιο δόγμα που υπήρχε ότι τα αντισώματα αντιδρούν αποκλειστικά στο επιφανειακό τμήμα των ζώντων κυττάρων με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους, αναιρέθηκε μετά την πρώτη ξεκάθαρη περιγραφή το 1978 από τον Alargon-Segovia και τους συνεργάτες του, ότι αυτοαντισώματα τάξης IgG που αναγνώριζαν πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες από τον ορό ασθενούς με ΜΝΣΙ, είχαν την ικανότητα να εισέρχονται και να αντιδρούν με αντιγόνα-στόχους στον πυρήνα ζώντων λεμφοκυττάρων ανθρώπου [154, 155]. Η ανακάλυψη αυτή ήρθε να αντικρούσει την μέχρι τότε δογματική άποψη, ότι η χυμική απόκριση περιορίζεται σε λιγότερο από το ένα τρίτο του συνολικού χώρου του νερού στο σώμα.

Μετά την πρώτη περιγραφή των CPAbs, ένας αυξανόμενος αριθμός εργασιών άρχισε να δημοσιεύεται με αντικείμενο την κυτταρική διείσδυση διαφόρων αντισωμάτων σε ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπινων και ζωικών κύτταρων[156]. Οι μελέτες αυτές, επιβεβαίωσαν την ύπαρξη των CPAbs και έδωσαν στοιχεία για τις αλληλεπιδράσεις τους με τα ενδοκυττάρια αντιγόνα και για την επίδρασή τους σε κυτταρικές λειτουργίες, που συνδέονταν με παθοφυσιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά αυτοάνοσων νόσων [157, 158]. Συγκεκριμένα, οι μελέτες επεκτάθηκαν πρώτα στη διερεύνηση των CPAbs σε πολυκλωνικό επίπεδο, εξετάζοντας τον ορό ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα. CPAbs βρέθηκαν στον ορό ή σε βιοψίες ασθενών με σκληρόδερμα, ρευματοειδή αρθρίτιδα, αντι-φωσφολιπιδικό σύνδρομο κ.α., σε χαμηλότερη όμως συχνότητα σε σχέση με την πολύ υψηλή συχνότητα εντοπισμού τους στον ΣΕΛ (Πίνακας 2.) [159, 160]. Οι μελέτες αυτές επιβεβαίωσαν τον εντοπισμό αυτών των αντισωμάτων κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων, καθώς και την επίδρασή τους στον κυτταρικό κύκλο.

Πίνακας 2. Μελέτες των CPAbs στην ανθρώπινη και πειραματική νόσο

<u>Ανθρώπινη νόσος</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Ασθενείς με μικτή νόσο συνδετικού ιστού (ΜΝΣΙ) • Ασθενείς με ΣΕΛ • Ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα • Ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο • Ασθενείς με σύνδρομο Sjögren • Ασθενείς με λεύκη
<u>Πειραματική νόσος</u>	Ποντίκια με αυθόρμητο σύνδρομο λύκου ή επαγόμενο μοντέλο συστηματικών αυτοάνοσων (πχ. με χορήγηση υδραργύρου)

Από το 1987 και ύστερα, αναλυτικότερες μελέτες επάνω στα CPAbs έγιναν σε μονοκλωνικό επίπεδο και κυρίως σε ποντικούς με αυθόρμητο σύνδρομο λύκου [(NZBxNZW)F₁ και MRL/lpr] [161, 162]. Προσδιορίστηκαν τα χαρακτηριστικά τους, όπως η νουκλεοτιδική τους αλληλουχία και μελετήθηκε επισταμένα η κυτταρική τους διείσδυση ως προς τον τρόπο εισόδου τους και τη βιολογική δράση τους.

Πίνακας 3. Βιβλιογραφική αναφορά - Ιστορία των CPAbs έως το 2000

CPAbs / Δραστηριότητα	Συγγραφείς/ Χρονολογία	Τύπος κυττάρων / Δράσεις
Πολυκλωνικά αντι-nRNP	Alarco-Án-Segovia et al, 1978	Από ασθενείς με ΜΝΣΙ, διεισδύουν σε ανθρώπινα μονοκύτταρα μέσω Fc υποδοχέων [154]
	Galoppin and Seurat, 1981	Διεισδύουν σε επιδερμικά επιθηλιακά κύτταρα, χωρίς τη μεσολάβηση Fc υποδοχέων [102]
	Ma et al, 1987*	Διεισδύουν σε λεμφοκύτταρα από υγιείς (54% θετικά) [155]
	Alarco-Án-Segovia et al, 1982	Διεισδύουν σε μονοκύτταρα και T-κύτταρα, προκαλώντας παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S και G2 [163]
Πολυκλωνικά αντι-DNA	Golan et al, 1993	Από ασθενείς με ΣΕΛ, διεισδύουν σε επιδερμικά επιθηλιακά κύτταρα (COLO-16) [164]
Μονοκλωνικά αντι-DNA	Okudaira et al, 1987	Από ποντικούς MRL-lpr/lpr, διεισδύουν σε μονοκύτταρα ανθρώπου και ποντικού, λόγω της παρουσίας DNA στις κυτταρικές μεμβράνες [161]
	Vlahacos et al, 1992	Από ποντικούς MRL-lpr/lpr & (NZBxSWR)F ₁ , χορηγήθηκαν σε υγιείς ποντικούς και βρέθηκαν να διεισδύουν στο πυρήνα σε κύτταρα διαφόρων οργάνων. Ο πυρηνικός εντοπισμός στα κύτταρα του σπειράματος σχετίστηκε με μορφολογικές και λειτουργικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένου: υπερκυτταρικότητα, σύντηξη των επιθηλιακών ποδοκυττάρων, νέο σχηματισμό ινών στα μεσαγγειακά κύτταρα, προωθώντας έτσι τη σύνθεση κολλαγόνου και την πρωτεϊνουρία [165].
	Avrameas et al, 1998*	Από ποντικούς (NZB x NZW)F ₁ , διεισδύουν στο

		πυρήνα κυττάρων. Συντέθηκε πεπτιδίο (30aa) από CDR-H2 & CDR-H3, το οποίο μετέφερε το πλασμίδιο της λουσιφεράσης, και μετασχημάτισε τα κύτταρα 3T3 [166]
Πολυκλωνικά αντι-λεμφοκυτταρικά (anti-lymphocytic)	Okudaira et al, 1982	Από ασθενείς με ΣΕΛ έναντι T-κυττάρων διεισδύουν στο εσωτερικό της μεμβράνης και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων [167]
Πολυκλωνικά αντι-Ro (SSA)	Herrera et al, 1996	Από ασθενείς με αυτοάνοσο νόσημα, χορήγησαν τον ορό σε νεογέννητα ποντίκια BALB/c mice και βρέθηκε να διεισδύουν στον πυρήνα κυττάρων από ήπαρ, σπλήνα, νεφρό και δέρμα [168]
Πολυκλωνικά αντι-συναπτικά (Anti-Synaptosomal)	Fabian et al, 1988*	Διεισδύουν σε κινητικούς νευρώνες αρουραίων (ventral horn motoneurons in rats) [169]
Πολυκλωνικά αντι-μεταφορέα ADP-ATP (anti-ADP-ATP carrier)	Schulze et al, 1989	Διεισδύουν στο εσωτερικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, αναστέλλοντας τη μεταφορά νουκλεοτιδίων <i>in vitro</i> και το μεταβολισμό της ενέργειας καρδιακών κυττάρων <i>in vivo</i> . [170]
Πολυκλωνικά αντι-La (SSB)	Ma et al, 1991	[171, 172]
Πολυκλωνικά cANCA αντι-πρωτεϊνάσης 3 (PR3)	Csernok et al, 1993*	Διεισδύουν στο κυτταρόπλασμα σε ουδετερόφιλα από ασθενείς με νόσο Wegener, αγγειίτιδα και σήψη μέσω της επιφανειακής PR3 [173]
Πολυκλωνικά αντι-Hu πυρηνικού αντιγόνου (έναντι νευρώνων)	Hormigo and Lieberman, 1994	Διεισδύουν σε κύτταρα θετικά για το Hu χωρίς να προκαλούν παρουσία συμπληρώματος ούτε λύση μέσω αυτού, ούτε ADCC, ενώ δεν επηρέαζαν ούτε τον πολλαπλασιασμό [174]
Πολυκλωνικά αντι-νουκλεολίνης (nucleolin)	Deng et al, 1996*	Από ασθενείς με ΜΝΣΙ και ΣΕΛ, διεισδύουν μέσω της νουκλεολίνης της κυτταρικής μεμβράνης με μηχανισμό πινοκυττάρωσης [175]
Πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντι-P0,1,2 ριβοσωμικών πρωτεϊνών (anti-ribosomal protein P)	Koscek et al, 1997*	
Πολυκλωνικά αντι-ρικοβερίνης (Anti-recoverin)	Adamus et al, 1997*	Από ασθενείς με καρκίνο που σχετίζεται με αμφιβληστροειδοπάθεια ή από ορούς ανοσοποιημένων ζώων με ρικοβερίνη, διεισδύουν σε θετικά για τη ρικοβερίνη κύτταρα του αμφιβληστροειδούς αρουραίου (E1A.NR3). Μόνο ορισμένα CPAbs προκαλούσαν καταστροφή του κυττάρου σε δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο, με κατακερματισμό του DNA και απόπτωση [176]
Πολυκλωνικά αντι-μιτοχονδριακά (IgA) απομονωμένα	Malmborg et al, 1998	Από ασθενείς με πρωτογενείς χολική κίρρωση, διεισδύουν μέσω Fc υποδοχέων, σε κύτταρα νεφρού σκύλου (Madine-Darby canine kidney) μετασχηματισμένα να εκφράζουν το βασικό αντιγόνο της νόσου, E2. Σε τομές από ήπαρ ασθενών με κίρρωση βρέθηκαν να συνδέονται με το E2 και να εντοπίζονται στη μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα [177]
Πολυκλωνικά αντι-MAG γλυκοπρωτεϊνής της μυελίνης(IgM)	Ritz et al, 1999*	Σε βιοψίες εγκεφάλου από ασθενείς με απομυελίνωση από αντι-MAG, διεισδύουν σε μυελωματικές ίνες χωρίς τη μεσολάβηση του συμπληρώματος και συνεννοτιάζονται με τη μυελίνη [178]
Μονοκλωνικά αντι-πυρηνισκικά	Abedi-Valugerdi et al, 1999	Από μοντέλο συστηματικού νοσήματος, επαγόμενο με υδράργυρο, διεισδύουν στον πυρηνίσκο κυττάρων από νεφρό και ήπαρ <i>in vivo</i> , ενώ καρδιά, στομάχι, έντερο και σπλήνας ήταν αρνητικά αλλά και <i>in vitro</i> στον πυρηνίσκο κυττάρων νεφρού (A-498 κύτταρα), ινοβλαστών (3T3 κύτταρα) και λυμφοειδή. Στη μελέτη <i>in vitro</i> η διείσδυση τους δεν προκάλεσε αλλαγή στη σύνθεση του DNA αλλά βρέθηκε να είναι εξαρτημένη από τον χρόνο, τη θερμοκρασία και σχετιζόμενη με υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων [179]

Μονοκλωνικά αντι-HER2	Park et al, 1999*	
Μονοκλωνικά αντι-λανγκερινης (Langerin)	Valladeau et al, 1999*	Διεισδύουν στο κυτταρόπλασμα ενός υποπληθυσμού των δενδριτικών κυττάρων [Langerhans cell (LC)] μέσω του επιφανειακού αντιγόνου langerin και χωρίς να συνεντοπίζεται με μόρια MHC II, ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια, και με λυσοσώματα [180]
Αντι-ενδοθηλιακών κυττάρων	Myzykantov et al, 1999*	Διεισδύουν σε ενδοθηλιακά κύτταρα και χρησιμοποιήθηκαν ως ενδοκυτταρικοί μεταφορείς καταλάσης προστατεύοντας τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες, επαγόμενο από υπεροξειδίο. Η χορήγηση του συζεύγματος ενδοφλεβίως σε αρουραίους, έδειξε τον εντοπισμό του στους πνεύμονες και την προστατευτική τους δράση μετά από οξειδωτικό στρες [181]
Μονοκλωνικά αντι-Sm & αντι-La	Deng et al, 2000	Διεισδύουν στον πυρήνα μιας ποικιλίας κυτταρικών τύπων διαφορετικής προέλευσης, χωρίς τη μεσολάβηση μηχανισμών ενδοκυττάρωσης. Μόνο τα πολυδραστικά αντι-dsDNA διεισδύουν. [182].

2. Χαρακτηριστικά των CPAbs

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των CPAbs που θα αναπτυχθούν παρακάτω αφορούν τα αντιγόνα που αναγνωρίζουν, τον εντοπισμό τους μέσα στα κύτταρα καθώς και τη νουκλεοτιδική αλληλουχία των μεταβλητών περιοχών τους.

2.1. Αντιγόνα και κύτταρα στόχοι των CPAbs

Τα CPAbs που έχουν μελετηθεί περισσότερο μέχρι σήμερα είναι έναντι διπλής έλικας DNA (dsDNA) στο ΣΕΛ και είναι τάξης IgG. Αυτά τα αντισώματα φαίνεται να φέρουν συχνά κοινά χαρακτηριστικά με τα NAbs, όπως είναι η πολυδραστικότητα. Μελέτες έδειξαν πως κάποια αντι-Sm και αντι-La mAbs ποντικών για να είναι ικανά για κυτταροδιείσδυση, πρέπει να αναγνωρίζουν εκτός των άλλων απαραίτητα το DNA, καθώς αυτά που δεν το αναγνώριζαν δεν είχαν διεισδυτική ικανότητα. Την ικανότητα της κυτταρικής διείσδυσης δεν την διαθέτουν όμως όλα τα αντι-dsDNA αντισώματα του ΣΕΛ, αλλά μόνο αυτά που παρουσιάζουν πολυδραστικότητα, και αναγνωρίζουν εκτός από το DNA και άλλα μόρια, όπως ριβονουκλεϊνικά οξέα, πρωτεΐνες και απτένια [156, 166]. Πράγματι, μελέτες σε αντι-DNA mAbs τα οποία προέρχονταν από ποντικούς (NZBxNZW)F₁, έδειξαν ότι η πολυδραστικότητα αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ικανότητα διείσδυσης. Τα αντισώματα αυτά αναγνώριζαν ισχυρά το dsDNA, με χαμηλότερη συγγένεια το μονόκλωνο DNA (ssDNA) και διάφορα εαυτά (ακτίνη, μυσίνη, μυσφαιρίνη ιστόνες, τουμπουλίνη) και ξένα αντιγόνα (TNP).

Τα μονοκλωνικά αντι-DNA CPAbs αντιδρούν με μεμβρανικά μόρια του κυττάρου, όπως είναι η μυσίνη 1, η α-ακτίνη, η λαμίνη, το κολλαγόνο τύπου IV, η ινονεκτίνη (φιμπρονεκτίνη) και διάφορες θειϊκές αμινογλυκάνες. Παράλληλα, αναγνωρίζουν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες όπως η ακτίνη, η τουμπουλίνη και η βιμεντίνη αλλά και

πυρηνικά αντιγόνα, όπως οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες (RNP) Sm, Ro(SS-A) και La (SS-B) [182]. Δομές που υπάρχουν στις κυτταρικές μεμβράνες και προσομοιάζουν τη δομή του DNA μπορεί να επίσης να αναγνωρίζονται από τα CPAbs. Για παράδειγμα, η α-ακτινίνη περιέχει πολλά κατάλοιπα αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων, με αποτέλεσμα το συνολικό της φορτίο να είναι αρνητικό και η στερεοδιάταξή της να χαρακτηρίζεται από αντιπαράλληλες διμερείς έλικες. Έτσι, η α-ακτινίνη πολύ πιθανά μιμείται δομικά το DNA και πιο συγκεκριμένα το σκελετό σακχάρου-φωσφόρου της διπλής έλικας του DNA. Επίσης, έχει βρεθεί σε κυτταροκαλλιέργειες ότι στην επιφάνεια των κυττάρων υπάρχουν μόρια DNA, που προέρχονται από νεκρά γειτονικά κύτταρα και τα οποία αναγνωρίζονται από τα αντι-DNA CPAbs και με αυτόν τον τρόπο εισέρχονται στα κύτταρα. Απομάκρυνση των νουκλεοσωμάτων από την επιφάνεια των κυττάρων με DNase, έδειξε πως η είσοδος των CPAbs αναστέλλεται, επιβεβαιώνοντας το προηγούμενο αποτέλεσμα.

Ως προς τον τύπο των κυττάρων όπου διεισδύουν, έχει διαπιστωθεί πως μονοκλωνικά αντισώματα ποντικών και πολυκλωνικά αντισώματα ανθρώπων με ΣΕΛ διεισδύουν σε κυτταρικές σειρές τόσο του ανθρώπου όσο και του ποντικού. Η διεισδυτική ικανότητά των CPAbs έχει δοκιμαστεί σε μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών σειρών, που περιλαμβάνουν επιθηλιακές προσκολλητικές σειρές (π.χ. HeLa, 3T3, Hep2, πρωτογενείς επιθηλιακές κυτταρικές καλλιέργειες), και μη προσκολλητικές (π.χ. θυμοκύτταρα ποντικού, ανθρώπινα T-κύτταρα και περιφερειακά μονοπύρηνια, μακροφάγα. Η διείσδυση δεν πραγματοποιείται στο ίδιο ποσοστό σε όλα τα είδη κυττάρων. Επίσης, η διείσδυση φαίνεται να επηρεάζεται από το αναπτυξιακό στάδιο των κυττάρων. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί πως ανώριμα B-κύτταρα ενηλίκων και B-κύτταρα από αίμα ομφάλιου λώρου προσλαμβάνουν μεγαλύτερο ποσοστό αντισωμάτων από ότι τα ώριμα B-κύτταρα. Η διείσδυση αντισωμάτων δεν παρατηρείται μόνο σε κυτταρικές σειρές ή πρωτογενείς καλλιέργειες, αλλά και *in vivo*, σε ασθενείς και πειραματόζωα. Έτσι, έχουν βρεθεί αντισώματα στον πυρήνα δερματικών κυττάρων από ασθενείς με ΜΝΣΙ, νόσος που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα αντι-RNP αυτοαντισωμάτων, καθώς και αντι-DNA αντισώματα στον πυρηνίσκο ηπατικών και νεφρικών κυττάρων.

2.2. Ενδοκυττάριος εντοπισμός των CPAbs

Ο εντοπισμός των CPAbs που έχουν προκύψει από τα πειραματικά μοντέλα αυτοάνοσων ασθενειών είναι κυρίως πυρηνικός, ενώ υπάρχουν και ορισμένες αναφορές για παράλληλο κυτταροπλασματικό, εκτός από πυρηνικό, εντοπισμό των IgG από ορούς ασθενών με ΣΕΛ, ρευματοειδή αρθρίτιδα και ΜΝΣΙ. Αντισώματα έναντι της ριβοσωμικής πρωτεΐνης P από ασθενείς με ΣΕΛ και ΜΝΣΙ εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα μαζί με μια μεμβρανική φωσφοπρωτεΐνη, την Ρο. Αντισώματα έναντι dsDNA, εντοπίζονται στη

μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα σε δομές όπως των μιτοχονδρίων, αλλά κυρίως στον πυρήνα [183, 184]. Επίσης, μονοκλωνικά αντι-dsDNA CPAbs που έχουν παραχθεί από πειραματικό μοντέλο συστηματικού αυτοάνοσου νοσήματος, επαγόμενο με υδράργυρο, εντοπίζονται κυρίως στον πυρηνίσκο ζώντων κυττάρων, *in vitro* (σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες ποντικού) αλλά και *in vivo* (σε κύτταρα νεφρών και ήπατος). Οι περισσότερες μελέτες ωστόσο έχουν δώσει μεγαλύτερη έμφαση στα αντιγόνα των μονοπατιών εισόδου των CPAbs.

2.3. Αλληλουχία της μεταβλητής περιοχής των CPAbs

Έχει δειχθεί πως η μεταβλητή περιοχή των CPAbs είναι η κύρια υπεύθυνη για την ικανότητά τους να διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα, χωρίς να χρειάζεται η μεσολάβηση του Fc. Ειδικότερα, από τη σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών από διεισδυτικά και μη αντι-dsDNA αντισώματα, προέκυψε ότι οι αλληλουχίες που εμπλέκονται στην αναγνώριση του dsDNA εδράζονται στη CDR2 περιοχή, ενώ εκείνες που είναι υπεύθυνες για τη διείσδυση και τη μεταφορά των αντισωμάτων στον πυρήνα βρίσκονται στη CDR2 και στη CDR3 περιοχή (**Εικόνα 1.**). Τα μονοκλωνικά αντι-dsDNA CPAbs που προέρχονται από ποντικούς (NZB x NZW) F₁ εμφανίζουν μια μεγάλη ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία των CDR2 και CDR3 περιοχών των βαριών αλυσίδων τους, και μια ποικιλία από γονιδιακές οικογένειες VH βλαστικής σειράς [157, 158]. Σε μελέτη στην οποία αναλύθηκαν οι γονιδιακές VH αλληλουχίες πολλών μονοκλωνικών αντι-dsDNA CPAbs ποντικών δείχθηκε ότι αυτά δεν φέρουν συσσωρευμένες μεταλλαγές και ότι αντιστοιχούν σε προϊόντα κωδικοποίησης από γονίδια βλαστικής σειράς [61, 182]. Επιπλέον, συνθετικά πεπτίδια, τα οποία προέκυψαν από τις αλληλουχίες CDR2 και CDR3 των αντι-dsDNA CPAbs, ήταν ικανά να διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα και να μετατοπίζονται στον πυρήνα είτε μόνα τους είτε ως φορείς άλλων μορίων, σε αντίθεση με αντίστοιχα πεπτίδια από αλληλουχίες CDR2 και CDR3 μη-διεισδυτικών αντισωμάτων [166]. Μελέτες με τρία CPAbs από ποντικούς MRL-lpr/lpr έδειξαν ότι όλα εντοπίζονται στον πυρήνα και μοιράζονται μια κοινή τριτοταγή δομή που είναι διαφορετική από αυτήν των αντι-dsDNA αντισωμάτων που δεν έχουν την ικανότητα διείσδυσης [157, 182].

CDR2	CDR3	mAbs
VAYYISRGGVST YY SDTVKGRFTRQKYNKRA		F4.1
AYISRGGGIF YY QDISKGRFTREKYGKRGMDY		J20.8
AISRGGVYS YY LDVKRTARATWDWFA Y		F14.6

Εικόνα 1. Αλληλουχίες CDR2 και CDR3 διεισδυτικών και μη, αντισωμάτων. Οι αλληλουχίες CDR2 και CDR3 τριών μονοκλωνικών αντι-dsDNA CPAbs από ποντικούς (NZBxNZW) F₁. Τα mAbs F4.1 και J20.8 είναι ικανά να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να εντοπίζονται στον πυρήνα, ενώ το mAb F14.6 δεν είναι διεισδυτικό. Από την ανάλυση των γονιδίων VH προέκυψε ότι τα αντισώματα αυτά κωδικοποιούνται από γονίδια της βλαστικής σειράς, τα οποία δεν έχουν υποστεί μεταλλάξεις ή γεγονότα ανασυνδυασμού. Μόνο τα CPAbs F4.1 και J20.8 φέρουν κοινά αμινοξέα στη CDR3 περιοχή (K: λυσίνη, Y: τυροσίνη, R: αργινίνη)

Από άλλη μελέτη της αμινοξικής αλληλουχίας μονοκλωνικών αντι-dsDNA CPAbs βρέθηκε ότι η CDR3 περιοχή όλων των αντισωμάτων περιέχει ένα υψηλό αριθμό αμινοξέων τυροσίνης και άλλων θετικά φορτισμένων αμινοξικών καταλοίπων, όπως λυσίνη και κυρίως αργινίνη [30]. Ένα από αυτά τα CPAbs φέρει ένα ακόμη θετικά φορτισμένο αμινοξύ (ιστιδίνη) κοντά στα κατάλοιπα αργινίνης και λυσίνης συνεισφέροντας έτσι στη δημιουργία ενός αρκετά μεγάλου θετικού φορτίου. Είναι επομένως πιθανό οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των αμινοξέων και των αρνητικά φορτισμένων πολυσακχαριτών της κυτταρικής επιφάνειας να παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διείσδυση [185]. Αντίθετα, τα μη διεισδυτικά αντισώματα που δεν έφεραν τέτοια κατάλοιπα στη CDR-H3 περιοχή δεν έφεραν υψηλό φορτίο. Μια ακόμα επιβεβαίωση ότι η ύπαρξη θετικά φορτισμένων αμινοξέων σε αυτές τις περιοχές συνεισφέρει στην κυτταρική διείσδυση, έρχεται και από τα αποτελέσματα μιας μελέτης, όπου στοχευμένη μεταλλαξογένεση στη CDR-H3 περιοχή αντι-DNA CPAbs, απομάκρυνε τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα με αποτέλεσμα την αναστολή της αναγνώρισης του DNA από αυτά και της κυτταρικής τους διείσδυσης. Αντίθετα μια άλλη μελέτη με ένα CPAb, στο οποίο αντικατέστησαν στην περιοχή CDR-H1 ένα αμινοξύ, αυτό του ασπαρτικού οξέος (αρνητικά φορτισμένο) με ένα άλλο, αυτό της ασπαραγίνης (μη φορτισμένο), έδειξε να αυξάνεται σε σημαντικό βαθμό η αποτελεσματικότητα της διείσδυσης του συγκεκριμένου CPAb.

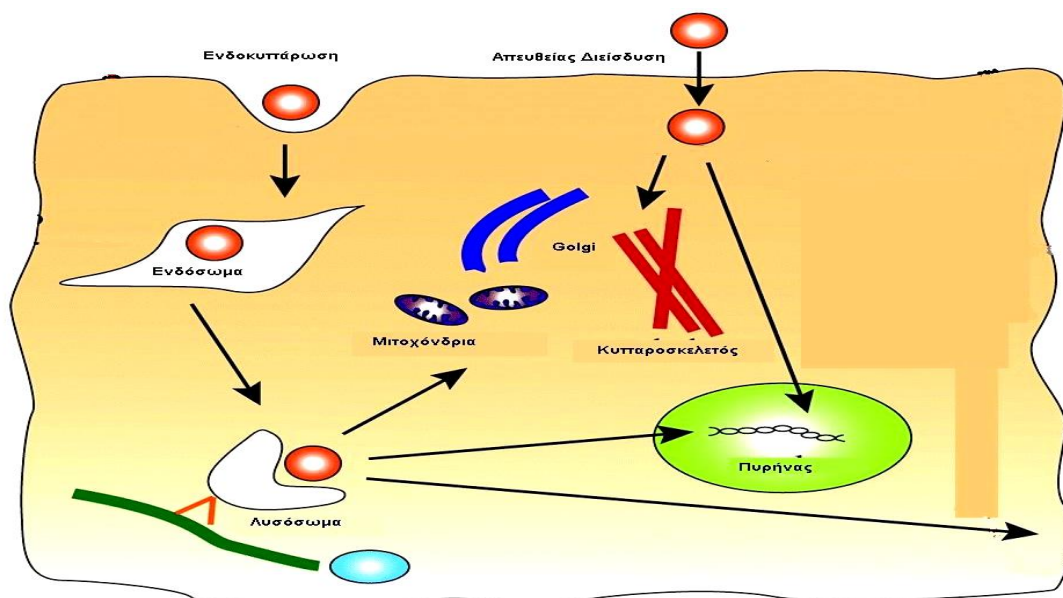
Επιπλέον, η μελέτη της αμινοξικής αλληλουχίας αντι-dsDNA CPAbs από ποντικούς MRL-lpr/lpr έδειξε την παρουσία συγκεκριμένης αλληλουχίας «πυρηνικού εντοπισμού» (NLS, nuclear localization-like signal) στις CDR-H3 περιοχές. NLS είναι μια αλληλουχία θετικά φορτισμένων αμινοξέων (λυσίνες ή αργινίνες) που εκτίθεται στην επιφάνεια των πρωτεϊνών και παίζει ρόλο στην είσοδό τους στον πυρήνα του κυττάρου. Διαφορετικές

πρωτεΐνες που μετακινούνται στον πυρήνα μπορεί να φέρουν την ίδια αλληλουχία NLS. Επομένως, οι CDR περιοχές των CPAbs που περιέχουν πολλά κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης, είναι πιθανόν να παίζουν το ρόλο αλληλουχίας NLS και να οδηγούν τα αντισώματα στον πυρήνα.

Συνολικά, τα αποτελέσματα της ανάλυσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των CPAbs δείχνουν την παρουσία αλληλουχιών που προσομοιάζουν αυτήν του NLS στη CDR3 περιοχή της βαριάς αλυσίδας. Όλα αυτά τα αντισώματα φέρουν θετικά φορτισμένα αμινοξέα στις CDR2 και CDR3 περιοχές, αναδεικνύοντας το ρόλο των θετικά φορτισμένων αμινοξέων στη μεταφορά των αντισωμάτων στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα.

3. Μηχανισμοί κυτταρικής διείσδυσης

Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα αντισώματα διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, και διεισδύουν στο κυτταρόπλασμα για να φτάσουν, είτε στον πυρήνα, είτε σε άλλα κυτταρικά οργανίδια δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί. Υπάρχουν όμως αρκετές ενδείξεις για τους πιθανούς τρόπους εισόδου των CPAbs, μέσω ενδοκυττάρωσης ή απευθείας κυτταρικής διείσδυσης, ενώ είναι πολύ πιθανόν ο ένας να μην αποκλείει τον άλλο (**Εικόνα 2**). Οι μηχανισμοί αυτοί χωρίζονται σε δυο κατηγορίες: την ενεργειακά-εξαρτώμενη μεταφορά, που περιλαμβάνει την φαγοκυττάρωση και την πινοκύτωση (μακροπινοκύτωση και ενδοκυττάρωση) και την ενεργειακά-ανεξάρτητη ή απευθείας μεταφορά διαμέσου της λιπιδικής διπλοστοιβάδας (**Πίνακας 4**.) [186].



Εικόνα 2. Μονοπάτια διείσδυσης των CPAbs σε ζώντα κύτταρα. Τα CPAbs διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα, είτε μέσω ενδοκυττάρωσης, είτε με απευθείας διείσδυση χωρίς την κατανάλωση ενέργειας. Αφού εισέλθουν μπορούν να εντοπιστούν σε διάφορα οργανίδια του κυττάρου, αλλά κυρίως στον πυρήνα.

Πίνακας 4. Μηχανισμοί κυτταρικής διείσδυσης

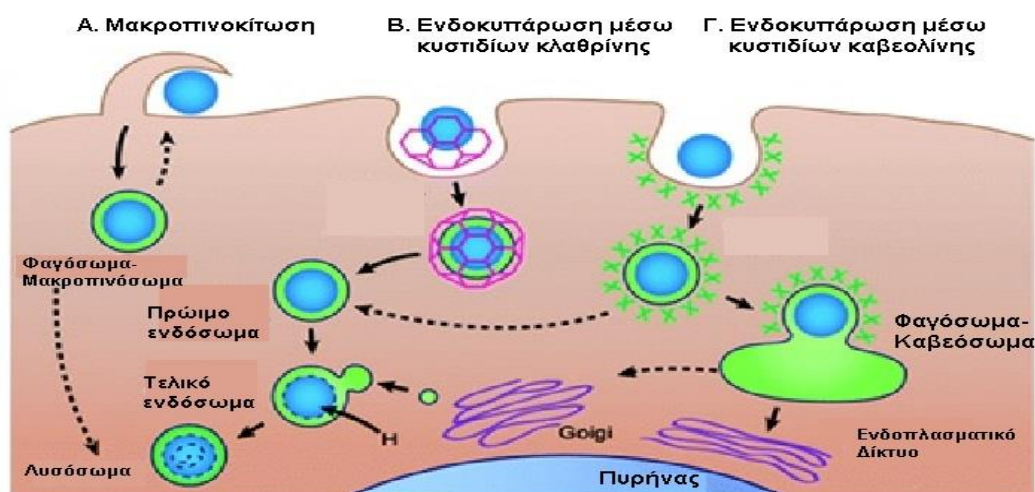
Τύπος κυτταρικής διείσδυσης	Τρόποι εισόδου
Ενεργο-εξαρτώμενη διείσδυση, μέσω κατανάλωσης ATP/GTP - Ενδοκυττάρωση	<ul style="list-style-type: none"> - Φαγοκυττάρωση - Πινοκύτωση: <ul style="list-style-type: none"> i) <u>Μακροπινοκύτωση</u> ii) <u>Ενδοκυττάρωση μεσολαβούμενη από υποδοχείς:</u> <ul style="list-style-type: none"> α) ενδοκυττάρωση μεσολαβούμενη από κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη (clathrin) β) ενδοκυττάρωση μεσολαβούμενη από κυστίδια καλυμμένα με καβεολίνη (caveolin) γ) ανεξάρτητη από καλυμμένα κυστίδια
Ενεργο-ανεξάρτητη διείσδυση (απευθείας διείσδυση)	<ul style="list-style-type: none"> - ανεστραμμένο μικκύλιο (inverted micelle formation) - σχηματισμός πόρων (pore formation) <ul style="list-style-type: none"> i) μοντέλο βαρέλι (barrel stave model) ii) σπειροειδές μοντέλο (toroidal model) - μοντέλο χαλιού (the carpet-like model) - μοντέλο λέπτυνσης μεμβράνης (the membrane thinning model)

3.1. Ενεργο-εξαρτώμενη κυτταρική διείσδυση - Ενδοκυττάρωση

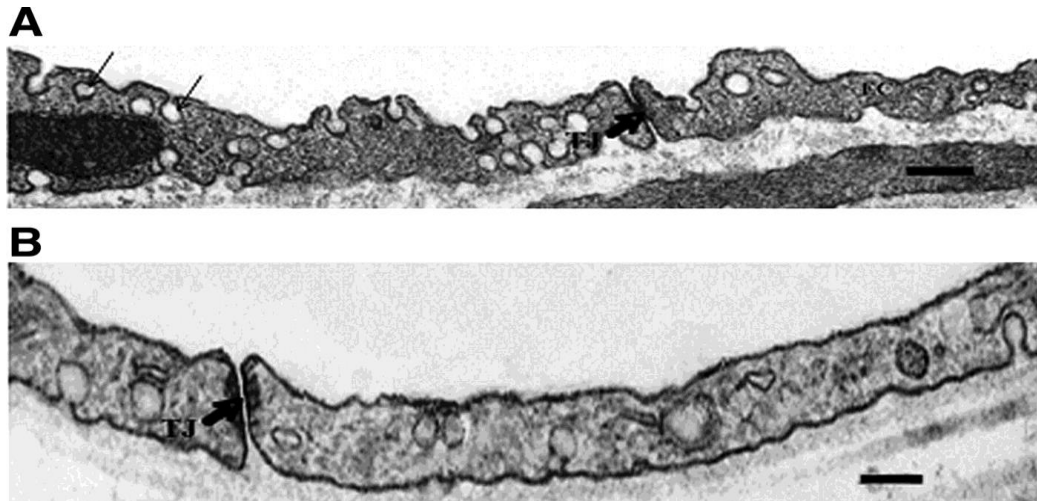
Αρκετές προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η κυτταρική διείσδυση των αντισωμάτων είναι μια διαδικασία η οποία απαιτεί ενέργεια, εξαρτάται από το χρόνο και τη θερμοκρασία, ενώ παράλληλα συμβαίνει σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων που φέρουν ειδικούς υποδοχείς, όπως τους FcR. Έτσι, σε ορισμένες μελέτες, φάνηκε ότι συχνά οι μηχανισμοί διείσδυσης ήταν εξαρτημένοι από το μεταβολισμό του κυττάρου, δηλαδή απαιτούσαν τη δαπάνη ATP/GTP, με αποτέλεσμα η μείωση της θερμοκρασίας να προκαλούσε περιορισμό της κυτταρικής διείσδυσης. Επίσης, μελέτες έδειξαν ότι τα αντισώματα διεισδύουν καλύτερα σε ορισμένους τύπους κυττάρων, πιθανά λόγω του ότι αυτά έφεραν συγκεκριμένα επιφανειακά μόρια. Για παράδειγμα, αντι-πυρηνισκικά mAbs ποντικού μπορούσαν να διεισδύουν σε μεγαλύτερο ποσοστό επιθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών, παρά σε λεμφοκύτταρα, όπου το ποσοστό ήταν αρκετά μικρότερο [164], ενώ μονοκλωνικά αντι-dsDNA CPABs μετά τη χορήγησή τους σε υγιείς ποντικούς,

παρουσίαζαν διείσδυση μόνο σε κύτταρα του νεφρού και όχι του ήπατος ή της καρδιάς [187].

Οι απαιτούμενοι ενεργο-εξαρτώμενοι μηχανισμοί διείσδυσης συμπεριλαμβάνουν τη φαγοκυττάρωση για την πρόσληψη μεγάλων μορίων (διαμέτρου $\geq 250\text{nm}$) με τη δημιουργία φαγοσωμάτων και τη σύντηξή τους με λυσοσώματα, και την πινοκύτωση για την πρόσληψη διαλυτών ουσιών-μορίων (διαμέτρου $\leq 150\text{nm}$) μέσω κυστιδίων. Η πινοκύτωση διακρίνεται σε μακροπινοκύτωση και σε ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχέων, όπου εμπλέκονται κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη ή καβεολίνη, είτε μη-καλυμμένα κυστίδια (**Εικόνα 3.**) Η μακροπινοκύτωση συνδέεται με την προς τα έξω αναδίπλωση της εξωτερικής επιφάνειας της μεμβράνης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κυστιδίων που περιβάλλονται από μεμβράνη παρόμοια με την κυτταρική και ονομάζονται μακροπινοσώματα (macropinosomes), ενώ η πρωτεΐνη δυναμίνη (dynamin) απαιτείται για την εγκόλπωση του μεμβρανικού κυστιδίου. Κυστίδια κλαθρίνης ή καβεολίνης εμπλέκονται στο μηχανισμό της ενδοκυττάριας πρόσληψης μέσω υποδοχέων [188]. Η κλαθρίνη ή η καβεολίνη καλύπτουν το εσωτερικό μέρος των κυστιδίων και απαιτούνται για την εγκόλπωση της κυτταρικής μεμβράνης, συντελώντας στο σχηματισμό κυστιδίων μετά τη σύνδεση του αντισώματος εξωκυττάρια στον υποδοχέα της μεμβράνης (**Εικόνα 4.**) Στη συνέχεια το περιεχόμενο των κυστιδίων απελευθερώνεται με την αλλαγή του pH ή με υποτονική λύση των πινοσωμάτων. Τα κυστίδια με υμένιο κλαθρίνης είναι περίπου 200 nm σε διάμετρο, ενώ αυτά με υμένιο καβεολίνης είναι περίπου 50-80 nm σε διάμετρο.



Εικόνα 3. Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης. Μέσω μακροπινοκύτωσης ή ενδοκυττάρωσης μέσω υποδοχέων και δημιουργίας κυστιδίων καλυμμένων είτε με κλαθρίνη, είτε με καβεολίνη.

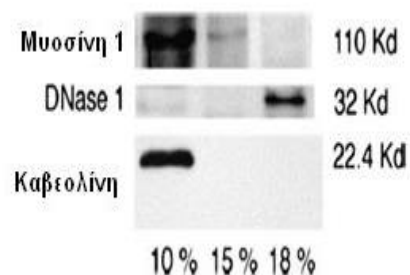


Εικόνα 4. Σχηματισμός κυστιδίων με καβεολίνη. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σε τριχοειδή του πνεύμονα ποντικών: A) σχηματισμός κυστιδίων (λεπτά βέλη) με τη συμμετοχή της καβεολίνης 1 (Caveolin-1) και B) καταστολή της καβεολίνης μετά από 96 ώρες χορήγησης siRNA (small interfering RNA), με αποτέλεσμα τη μείωση των κυστιδίων και τη διαστολή των ενδοθηλιακών συνδέσεων (interendothelial junctions, χοντρά βέλη) και τη μείωση του αριθμού των κυστιδίων A) 250 nm, και B) 175 nm [189].

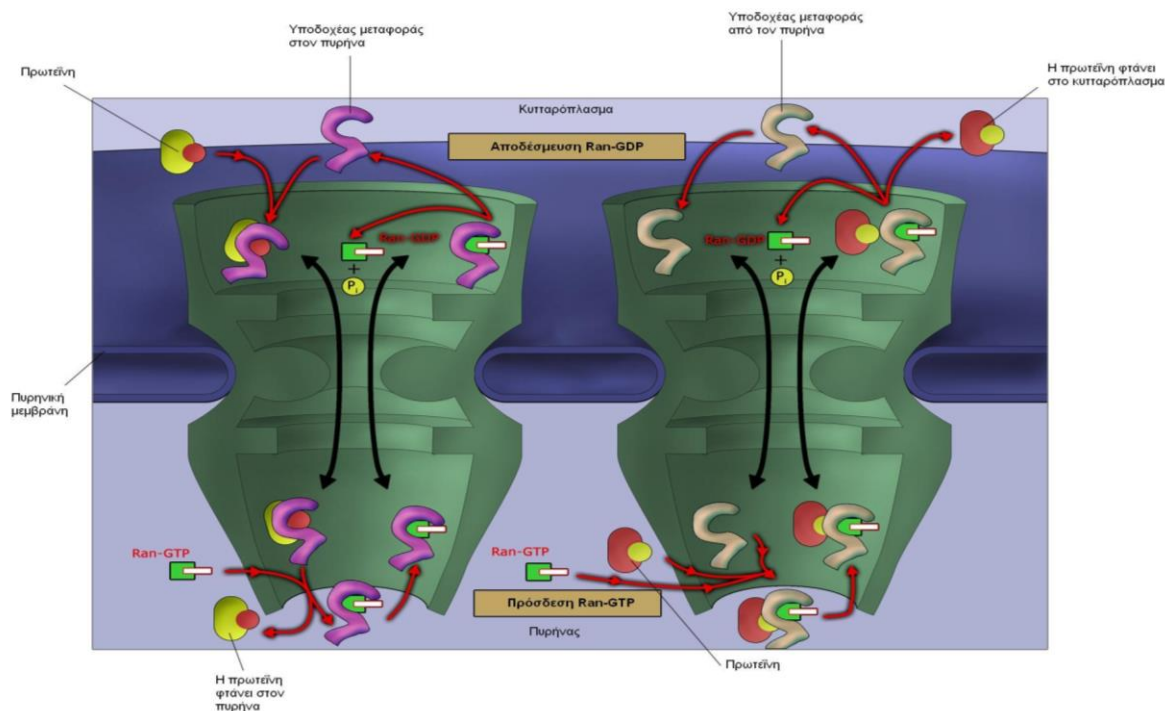
3.1.1. CPAbs αναγνωρίζουν μόρια της κυτταρικής μεμβράνης που δρουν ως υποδοχείς

Η πρώτη αναφορά στα CPAbs περιέγραφε τη διείσδυση IgG αυτοαντισωμάτων σε ζώντα κύτταρα μέσω υποδοχών Fc του τμήματος των IgG (FcR). Τα αυτοαντισώματα αυτά αναγνώριζαν πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες και είχαν την ικανότητα να διεισδύουν με αυτόν τον τρόπο σε ανθρώπινα μονοκύτταρα και να εντοπίζονται στον πυρήνα τους. Διείσδυση αντισωμάτων λάμβανε χώρα και σε κύτταρα που δεν διαθέτουν Fc-υποδοχείς, αλλά φέρουν στην επιφάνειά τους μόρια, μεμβρανικά ή μη, που συμπεριφέρονται ως υποδοχείς για την ενδοκυττάρωση των αντισωμάτων. Έτσι, έχουν περιγραφεί μηχανισμοί κυτταρικής διείσδυσης που εμπλέκουν αντιδράσεις αντισωμάτων με: 1) συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης, όπως είναι η μυοσίνη 1, η α-ακτινίνη, η θειική ηπαράνη, η αννεξίνη II, 2) ενδοκυττάρια μόρια που δεν ανήκουν στην κυτταρική μεμβράνη αλλά έχουν εναποτεθεί πάνω σε αυτή, όπως είναι η ακτίνη, η τουμπουλίνη, η βιμεντίνη, η καρλετικουλίνη (calreticulin), το SS-B/La [190], τα νουκλεοσώματα [191], η λαμινίνη, οι ριβοσωμικές φωσφοπρωτεΐνες, το κολλαγόνο τύπου IV, η φιμπρονεκτίνη και η NR2 υπομονάδα του υποδοχέα του γλουταμικού.

Σε ότι αφορά τη μυσίνη 1, βρέθηκε ότι αντι-DNA CPAbs από ποντικούς MRL-lpr/lpr εισέρχονται μέσω ενδοκυττάρωσης σε ζώντα κύτταρα και μετατοπίζονται στον πυρήνα, μετά από την πρόσδεσή τους στη μυσίνη 1, που παίζει το ρόλο υποδοχέα. Η κυτταρική είσοδος μέσω αυτού του υποδοχέα παρέχει τη δυνατότητα στα CPAbs να αλληλεπιδρούν με τη DNase 1 εντός του κυτταροπλάσματος, να μετατοπίζονται στους πυρηνικούς πόρους και να εισέρχονται στον πυρήνα, ή να ανακυκλώνονται πίσω στην επιφάνεια του κυττάρου. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι ένα μονοκλωνικό CPAb (mAb H7) από ποντικούς MRL-lpr/lpr, λίγο μετά την κυτταρική διείσδυση συνεντοπιζόταν με τη μυσίνη 1, και στη συνέχεια με την καβεολίνη μέσα στα καλυμμένα με αυτή κυστίδια (Εικόνα 5.) [192, 193]. Τα CPAbs βρέθηκαν να προσδένονται επιφανειακά στη μυσίνη 1 και να εισέρχονται μέσα στο κύτταρο σε κυστίδια καβεολίνης, έπειτα αυτά διέφευγαν από τα κυστίδια προς στο κυτταρόπλασμα κι από εκεί, με δαπάνη ATP, στον πυρήνα μέσω των πυρηνικών πόρων, στον οποίο κατευθύνονταν μέσω των θετικά φορτισμένων αμινοξέων της CDR3-περιοχής τους (Εικόνα 6.).



Εικόνα 5. Η μυσίνη 1 και η καβεολίνη εντοπίζονται μαζί στο ίδιο κυτταρικό κλάσμα, αλλά διαφέρουν από αυτό της DNase 1. Φαίνεται ότι το mAb H7 αφού προσδένοντας στη μυσίνη 1, ενδοκυττώνεται με κυστίδια καβεολίνης και έπειτα διαφευγει από εκεί και πάει και πιανει τη DNase 1 στο κυτταρόπλασμα.

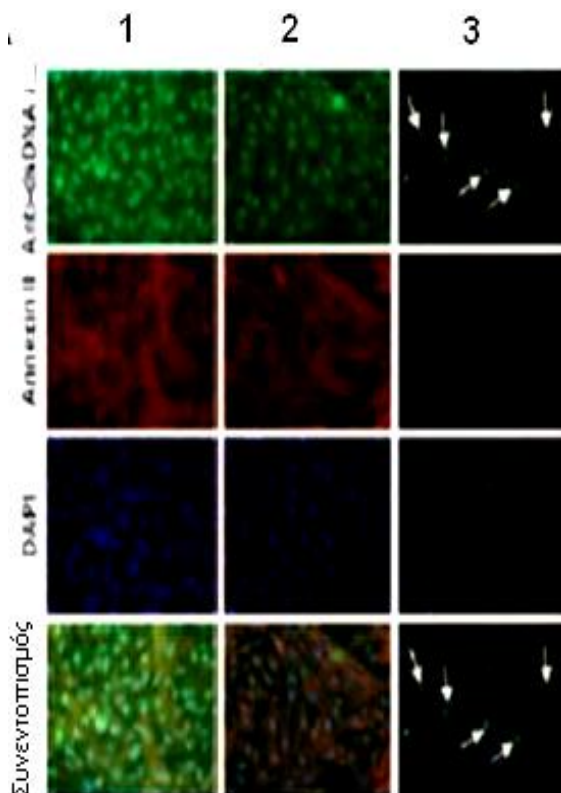


Εικόνα 6. Πυρηνική μεταφορά (Ran-GTP nuclear transport cycle). Πρωτεΐνες προσδένονται σε υποδοχείς μεταφοράς (importin) στα κανάλια των πυρηνικών πόρων και

ως σύμπλοκο μεταφέρονται ενεργά εντός ή εκτός του πυρήνα. Σε αυτό το σημείο, το Ran-GTP θα δεσμεύεται στο σύμπλοκο, και η σύνδεση θα προκαλέσει την απομάκρυνση του υποδοχέα από την πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη έτσι απελευθερώνεται, και το σύμπλεγμα Ran-GTP/υποδοχέα θα κινηθεί πίσω όπου GTPase (GAP) στο κυτταρόπλασμα υδρολύει το Ran-GTP σε GDP, και αυτό απελευθερώνει τον υποδοχέα.

Άλλο mAb αντι-DNA (R4A), από MRL-lpr/lpr ποντικό προσδενόταν πάνω στη επιφάνεια μεσαγγειακών κυττάρων νεφρού μέσω της ακτινίνης α (alpha-actinin), μιας επιφανειακής πρωτεΐνης που φαίνεται να εκφράζεται στα κύτταρα ποντικών με νεφρίτιδα και όχι υγιών (υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων έναντι της ακτινίνης-α ανευρίσκονται σε ποντικούς με λύκο). Επίσης, η θειϊκή ηπαράνη είναι μια γλυκοζαμινογλυκάνη, που αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων έναντι της θειϊκής ηπαρίνης ανευρίσκονται συχνά στο ΣΕΛ). Μελέτες με mAbs αντι-DNA από ποντικούς με λύκο έδειξαν ότι επίσης αναγνώριζαν ισχυρά τη θειϊκή ηπαράνη και αυτή μπορούσε να αναστείλει την πρόσδεσή τους στο DNA, ενώ βρέθηκε να τα mAbs να σχηματίζουν ανοσοσύμπλοκα με αυτήν σε νεφρικά εκχυλίσματα τέτοιων ποντικών με λύκο.

Μελέτες σε ασθενείς με ΣΕΛ βρήκαν ότι απομονωμένα αντι-dsDNA IgG CPABs προσδένονταν πάνω στην επιφάνεια ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων (human mesangial cells) μέσω της αννεξίνης II, η οποία μεσολαβούσε για την είσοδό τους στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα. Γονιδιακή σίγηση (silencing) της αννεξίνης II έδειξε μειωμένη πρόσδεση αυτών των αντισωμάτων επάνω στα κύτταρα και κατά συνέπεια μειωμένη κυτταρική, αποκαλύπτοντας τη συμβολή της στην παθογένεια της νεφρίτιδας στον ΣΕΛ (Εικόνα 7.) [194].



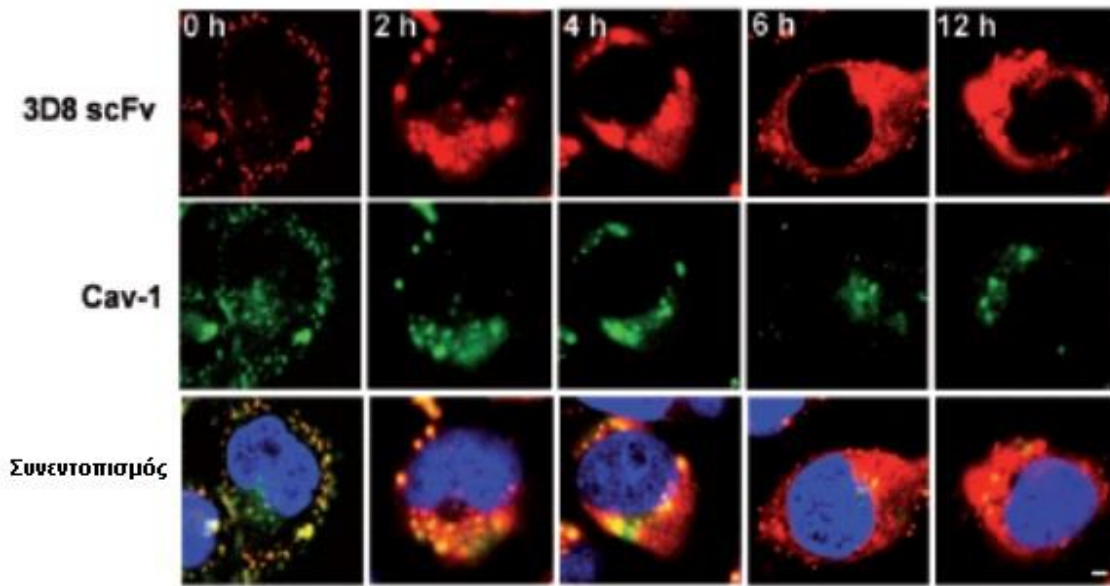
Εικόνα 7. Η καταστολή της έκφρασης της αννεξίνης II με RNAi (interfering RNA) προκαλεί μειωμένη επιφανειακή δέσμευση και διείσδυση των αντι-dsDNA σε ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα. Η καταστολή με RNAi της σύνθεσης annexin II οδήγησε σε αναστολή της πρόσδεσης των αντι-dsDNA αντισωμάτων στα κύτταρα και σημαντική μείωση της διείσδυσης τους στον πυρήνα (βέλη) (μετά από 30 λεπτά επώασης, X 200). 1) χωρίς καταστολή της αννεξίνης II, 2) αρνητικός μάρτυρας για το RNAi και 3) με καταστολή της αννεξίνης II μέσω RNAi.

3.1.2. CPAbs αναγνωρίζουν ενδοκυττάρια μόρια που έχουν εναποτεθεί στην κυτταρική επιφάνεια

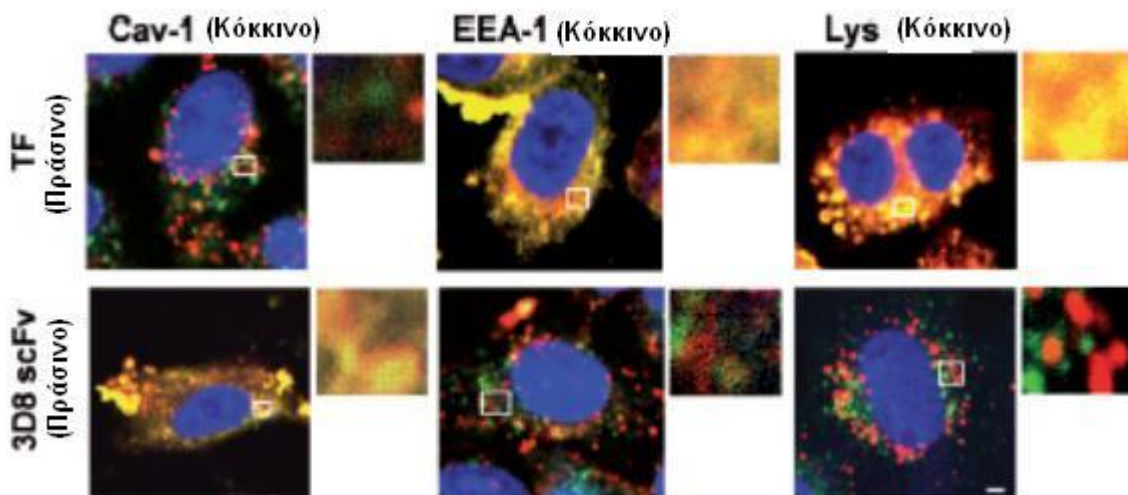
Η ικανότητα διείσδυσης ορισμένων μονοκλωνικών αντι-DNA CPAbs έχει αποδοθεί στην παρουσία ενδοκυττάρων αντιγόνων που εκτίθενται στις κυτταρικές μεμβράνες, όπως είναι το DNA ή δομές που το προσομοιάζουν. Πράγματι, έχει δειχθεί ότι μετά από θάνατο γειτονικών κυττάρων νουκλεοσώματα από εξωγενές DNA εναποτίθεται στις κυτταρικές μεμβράνες ουδετεροφίλων και μονοπύρηνων γεγονός που επιτρέπει σε ορισμένα αντι-DNA αντισώματα να εισέρχονται στα κύτταρα. Η καλρετικουλίνη (calreticulin), είναι ένα ενδοκυττάριο μόριο (ενδοκυτταροπλασματική δεξαμενή ασβεστίου), το οποίο μεσολαβεί στη διείσδυση των αντισωμάτων στα κύτταρα. Δείχτηκε ότι αντι-DNA CPAbs από (NZBxNZW)_{F1} ποντικούς προσδένονταν πάνω στην καλρετικουλίνη, στην κυτταρική μεμβράνη και με αυτό τον τρόπο διείσδυαν στο εσωτερικό του κυττάρου [195]. Άλλα ενδοκυττάρια αντιγόνα, όπως το La, αλλά και το snRNP, έχουν βρεθεί ότι επικάθονται στην κυτταρική επιφάνεια, όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε ορισμένους παράγοντες (όπως η UV ακτινοβολία, ο TNF-α και τα οιστρογόνα). Αυτά επιτρέπουν πολλαπλή πρόσδεση παθολογικών αυτοαντισωμάτων στη μεμβράνη και διευκολύνουν την ενδοκυττάρωσή τους.

Μερικοί ερευνητές έχουν αναφέρει ότι τα αντι-dsDNA αυτοαντισώματα αντισώματα εισέρχονται με κυστίδια κλαθρίνης και στη συνέχεια απελευθερώνονται από όξινο pH ή υποτονική λύση των πινοσωμάτων [196]. Άλλοι, έχουν παρατηρήσει ότι μόνο μερικά μόρια αντι-dsDNA αντισωμάτων συνεντοπίζονται με κλαθρίνη, όπως έχει δειχθεί με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ενώ άλλα μόρια των ίδιων αντισωμάτων εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα χωρίς να μεταφέρονται από κυστίδια κλαθρίνης. Επίσης, η ενδοκυττάρια είσοδος θραύσματος scFv ενός μονοκλωνικού CPAb (3D8) βρέθηκε να συνεντοπίζεται με κυστίδια καβεολίνης. Μελέτες στην κινητική έδειξαν ότι το 3D8 scFv αμέσως μετά την είσοδο του διέφευγε απευθείας από τα φαγοσώματα (caveosomes) και κατευθυνόταν προς το κυτταρόπλασμα, όπου και παρέμενε χωρίς να εντοπίζεται ξανά στα ενδοσώματα ή στα λυσοσώματα (**Εικόνα 8**).[188].

A



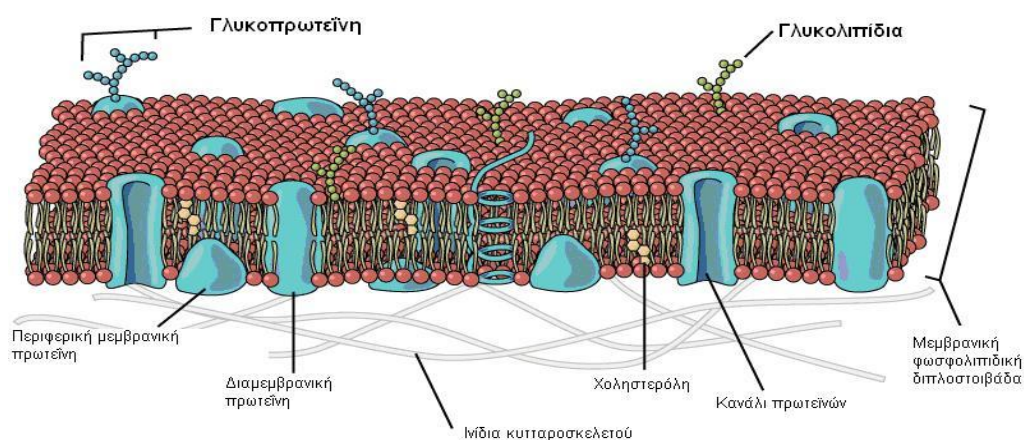
B



Εικόνα 8. Θραύσμα scFv από το CPAb 3D8 διεισδύει με κυστίδια καβεολίνης, διαφεύγει από τα φαγοσώματα (caveosome) και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των HeLa κυτάρων. A) Η κινητική μετά από επώαση των HeLa για 30 λεπτά με το scFv (10 μ M) και μετά απομάκρυνση και επώαση για 0-12 ώρες. B) Το εντοπιζόμενο ενδοκυττάρια θραύσμα scFv δεν εντοπίζεται στο ενδοσωμικό ή λυσοσωμικό μονοπάτι. Επώαση είτε με τρανσφερίνη για 30 λεπτά ή με το scFv για 2 ώρες.

3.2. Ενεργο-ανεξάρτητη κυτταρική διείσδυση

Εκτός των γνωστών μηχανισμών ενδοκυττάρωσης, που αναφέρθηκαν προηγουμένως, πρόσφατες μελέτες έχουν υποδείξει ότι η κυτταρική διείσδυση των CPAbs είναι άμεση και ο μηχανισμός εισόδου ενεργειακά ανεξάρτητος. Αυτό αποδείχθηκε με την κυτταρική διείσδυση των CPAbs στους 4°C, όπου δεν γίνεται κατανάλωση ενέργειας καθώς, και με την παρουσία μορίων που αναστέλλουν την ενδοκυττάρωση (π.χ. κυτοχάλασίνη κ.α.). Οι ενεργειακά-ανεξάρτητοι μηχανισμοί εισόδου για τα CPAbs δεν έχουν εξακριβωθεί, αλλά στη βιβλιογραφία υπάρχει μια ποικιλία από μελέτες που περιγράφουν διάφορους μηχανισμούς εισόδου πρωτεϊνών-μορίων, σχετιζόμενους με την λιποπρωτεϊνική διπλοστοιβάδα του κυττάρου (**Εικόνα 9**).



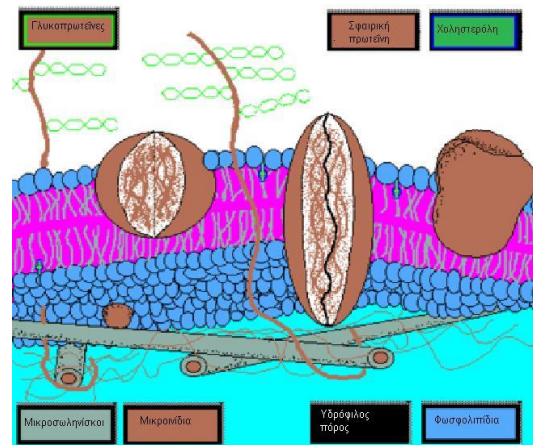
Εικόνα 9. Ετερογένεια της σύστασης της λιπο-πρωτεϊνικής διπλοστοιβάδας του κυττάρου.

Η απευθείας κυτταρική διείσδυση μέσω ενεργειακά ανεξάρτητων οδών μπορεί να περιλαμβάνει διάφορους μηχανισμούς (**Πίνακας 4**), όπως το σχηματισμό ανεστραμμένου μικκυλίου (inverted micelle formation) [[197], το σχηματισμό πόρων (pore formation), το μοντέλο χαλιού (carpet like model) και το μοντέλο λέπτυνσης της κυτταρικής μεμβράνης (membrane thinning model). Το πρώτο βήμα σε όλους αυτούς τους μηχανισμούς είναι η αλληλεπίδραση της θετικά φορτισμένης πρωτεΐνης-μορίου με αρνητικά φορτισμένα συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης, όπως είναι η θειική ηπαράνη. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως συνέπεια μια μόνιμη ή παροδική αποσταθεροποίηση της μεμβράνης, που σχετίζεται με την “φόρτωση - αναδίπλωση” του μορίου επάνω της. Ο επακόλουθος μηχανισμός της ‘εσωτερίκευσης’ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την συγκέντρωση του μεταφερόμενου μορίου, την πεπτιδική του αλληλουχία, και τη σύνθεση των λιπιδίων της μεμβράνης στους τύπους των κυττάρων που μελετώνται κάθε φορά.

Το ανεστραμμένο μικκύλιο (inverted micelle) είναι ένα από τα πρώτα μοντέλα που προτάθηκε για την άμεση διείσδυση της πεντετρατίνης (αποτελεί δομή έλικας της

πρωτεΐνης antennapedia που μετακινείται ενδοκυττάρια). Εκτός από την αλληλεπίδραση μεταξύ των θετικά φορτισμένων μορίων και των αρνητικά φορτισμένων συστατικών της λιπιδικής μεμβράνης, η αλληλεπίδραση μεταξύ των υδρόφοβων υπολειμμάτων της πρωτεΐνης, όπως είναι η τρυπτοφάνη και το υδρόφοβο τμήμα της μεμβράνης, φαίνεται επίσης να εμπλέκεται σε αυτόν τον μηχανισμό. Ως εκ τούτου, ο μηχανισμός αυτός δεν είναι πιθανός για κατιονικά μόρια.

Ο σχηματισμός πόρων (pore formation) περιλαμβάνει περιγραφές, όπως το μοντέλο 'βαρέλι' (barrel stave model) και το 'σπειροειδές' μοντέλο (toroidal model). Στο μοντέλο 'βαρέλι', ελικοειδή μόρια της μεμβράνης σχηματίζουν ένα βαρέλι στο οποίο τα υδρόφοβα κατάλοιπα είναι κοντά στις μεμβρανικές λιπιδικές αλυσίδες και τα υδρόφιλα κατάλοιπα σχηματίζουν το κεντρικό πόρο (**Εικόνα 10.**). Στο 'σπειροειδές' μοντέλο, τα λιπίδια μετακινούνται με τέτοιο τρόπο ώστε τα μόρια να είναι πάντα κοντά τους και έτσι και τα δυο, δηλαδή λιπίδια και μόρια, να σχηματίζουν έναν πόρο. Σε αμφότερους τους μηχανισμούς, οι πόροι εμφανίζονται ανάλογα με τη συγκέντρωση τού μορίου-πεπτιδίου.



Εικόνα 10. Μεμβρανικά βαρέλια μεταφορείς (transporters barells) μορίων στο ενδοκυττάριο διαμέρισμα, ανεξάρτητα της ενέργειας

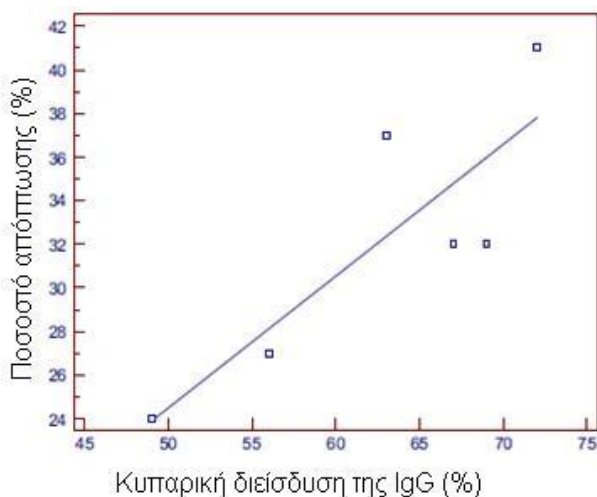
Στο μοντέλο που μοιάζει με χαλί (carpet-like mode) και στο μοντέλο 'λέπτυνσης' της μεμβράνης, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αρνητικών φορτισμένων φωσφολιπιδίων και κατιονικών μορίων παίζουν κύριο ρόλο. Η μετατόπιση των μορίων επιτυγχάνεται όταν η συγκέντρωσή τους είναι πάνω από ένα συγκεκριμένο όριο. Όλα τα ευρήματα φαίνεται να υποδεικνύουν ότι πολύ πιθανά να υπάρχουν πολλά διαφορετικά μονοπάτια μέσω των οποίων τα αντισώματα μπορούν να διασχίζουν το ενδοκυττάριο διαμέρισμα του κυτταροπλάσματος.

4. Παθοφυσιολογικός ρόλος

Η παρατήρηση ότι στους ορούς ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα ανιχνεύονται αντισώματα ικανά να διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα οδήγησε στην υπόθεση ότι τα αντισώματα αυτά μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεια των νόσων αυτών, επηρεάζοντας τις λειτουργίες των κυττάρων. Εφόσον τα CPAbs έχουν μελετηθεί επισταμένα στο ΣΕΛ, αρκετές μελέτες επικεντρώθηκαν στο να συνδέσουν την παρουσία των CPAbs με την παθογένεια της νόσου. Μονοκλωνικά αντι-DNA αντισώματα από ποντικούς με αυθόρμητο σύνδρομο λύκου (MRL/lpr) βρέθηκαν να διεισδύουν στα κύτταρα

διαφόρων οργάνων, συμπεριλαμβανομένων και των νεφρών, μετά τη χορήγησή τους σε υγιείς ποντικούς προκαλώντας αύξηση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του σπειράματος (hypercellularity), σύντηξη των νεφρικών ποδοκυττάρων (podocytes) και πρωτεϊνουρία [165, 193, 198]. Επίσης, μονοκλωνικά αντι-dsDNA αντισώματα ποντικών (NZB/NZW F1) και πολυκλωνικά από ασθενείς με ΣΕΛ βρέθηκαν να διεισδύουν σε νεφρικά κύτταρα χοίρου (κυτταρική σειρά PK15) και να προκαλούν κυτταρική λύση παρουσία συμπληρώματος. Αυτά αναγνώριζαν εκτός από το dsDNA και ριβονουκλεοπρωτεΐνες snRNP (A και D) και εντοπίζονταν στους πυρήνες και στο κυτταρόπλασμα, ενώ υπήρχαν και mAbs αντι-dsDNA, που δεν παρουσίαζαν διείσδυση και εντοπίζονταν στην κυτταρική επιφάνεια (μάρτυρες). Παρουσία συμπληρώματος, τα mAbs προκαλούσαν μαζική κυτταρική λύση, ενώ οι μάρτυρες δεν είχαν ζημιογόνες επιδράσεις. Παρόμοιες ιδιότητες με τα mAbs του ποντικού έδειξαν αντι-dsDNA αυτοαντισώματα που απομονώθηκαν από δύο ασθενείς με ΣΕΛ με υψηλούς τίτλους αντι-dsDNA και κλινικά ενεργή νεφρίτιδα. Από τις μελέτες φάνηκε ότι τα αντι-dsDNA ποντικού ή αντι-dsDNA του ανθρώπου, είχαν ζημιογόνο επίδραση στα νεφρικά κύτταρα μετά τη διείσδυσή τους είτε μέσω μηχανισμών κυτταροτοξικότητας μέσω του συμπληρώματος είτε μέσω πιθανών δυσλειτουργιών στον κυτταρικό κύκλο [199].

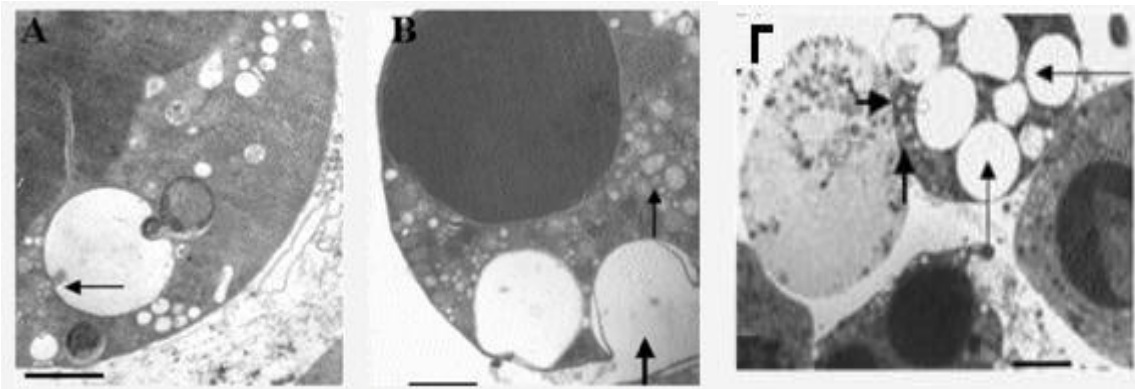
Άλλες μελέτες, έδειξαν πως αντισώματα έναντι του πυρηνικού αντιγόνου Hu που ανευρίσκονται στους ορούς ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα διεισδύουν στα κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος και φαίνεται να συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της παρανεοπλασματικής νευροπάθειας [157, 158]. Επίσης, σε βιοψίες δέρματος ασθενών με αυτοάνοση λεύκη έδειξαν ότι αντισώματα τάξης IgG, ήταν ικανά να διεισδύσουν σε καλλιεργημένα μελανοκύτταρα *in vitro*, με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης αποπτωτικών δεικτών και την πυροδότηση της απόπτωσης και της απαλοιφής τους (**Εικόνα 11.**) [159].



Εικόνα 11. Συσχέτιση απόπτωσης με κυτταρο-διείσδυση αντισωμάτων.

Ποσοτικοποίηση της συσχέτισης της διεισδυτικής ικανότητας των IgG από ορό έξι ασθενών με λεύκη και της απόπτωσης σε μελανοκύτταρα.

Δεδομένου ότι η κυτταρική διείσδυση των αυτοαντισωμάτων συνδέεται με την απόπτωση ελέγχθηκε επίσης η πιθανότητα ότι η διείσδυση των αντι-ουδετερόφιλων κυτταροπλασματικών αντισωμάτων (ANCA, Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies) σε πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (PMN) να προκαλεί απόπτωση και ως εκ τούτου να μπορούν να επηρεάζουν την έκφραση του επιφανειακών αντιγόνων. Βρέθηκε ότι οι IgG έναντι-PR3 (proteinase 3) διεισδύουν στα PMN και εντοπίζονται στα κοκκία και στις περιοχές όπου οι διεργασίες καταστροφής (εκτεταμένα αποπτωτικά γεγονότα) των PMN λαμβάνουν χώρα. Έχει επιβεβαιωθεί ότι η απόπτωση συνδέεται με την μετατόπιση των κυτταροπλασματικών κοκκίων στην επιφάνεια του κυττάρου, και με την έκφραση αντιγόνων στόχων των ANCA. Συμπερασματικά, τα PR3-ANCA διεισδύουν στα PMNs μέσω της αλληλεπίδρασης τους με την PR3 και προκαλούν αποπτωτικές διαδικασίες (**Εικόνα 12.**) [200].



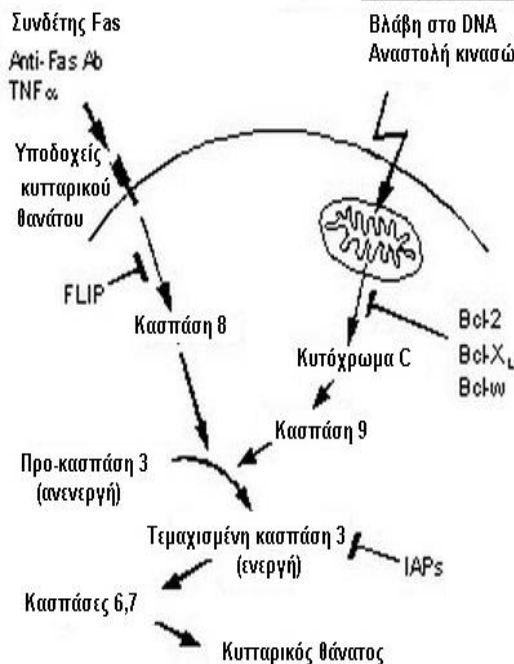
Εικόνα 12. Αποπτωτικά ουδετερόφιλα από καλλιέργεια PMN μετά από επώαση 12 ωρών με PR3-ANCA. Α) Αποπτωτικά ουδετερόφιλα (τα βέλη δείχνουν την απελευθέρωση των περιεχομένων των κυστιδίων) Λυσοσώματα είναι επίσης παρόντα. Β) Αποπτωτικά ουδετερόφιλα (τα βέλη δείχνουν κυστιδία που έχουν διασπαστεί ή που απελευθερώνουν εξωκυττάρια το περιεχόμενό τους) Γ) Ουδετερόφιλο στην τελική φάση απόπτωσης κυστιδία και κοκκία κοντά στην επιφάνεια. (Κλίμακα 2 μm)

4.1. Μηχανισμοί επαγωγής απόπτωσης από τα CPABs

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται ότι η πιο χαρακτηριστική δράση των CPABs είναι η επαγωγή του κυτταρικού θανάτου μέσω **απόπτωσης**. Η επαγωγή απόπτωσης από τα CPABs μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαφορετικών, πιθανά αλληλεπικαλυπτόμενων, μηχανισμών εξωγενών ή ενδογενών. Η εξωγενής οδός ξεκινά έξω από το κύτταρο μέσω, είτε υποδοχέων του συστήματος (Receptor Systems), είτε άλλων ερεθισμάτων, όπως το κυτταροτοξικό στρες. Η Ενδογενής απόπτωση αρχίζει όταν ένας τραυματισμός συμβεί εντός του κυττάρου, ή προκύψει εσωτερικό στρες όπως άμεση βλάβη του DNA, υποξία, καθώς και στέρση παράγοντα επιβίωσης(**Εικόνα 13.**).

Ενδογενές μονοπάτι απόπτωσης

Εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης



Εικόνα 13. Τα αποπτωτικά μονοπάτια.

Υπάρχουν τουλάχιστον δύο βασικά μονοπάτια που οδηγούν στην απόπτωση, ένα «εξωγενές» και ένα «ενδογενές». Στα δύο μονοπάτια, η σηματοδότηση οδηγεί στην ενεργοποίηση κασπασών μιας οικογένειας πρωτεασών κυστεΐνης (Cysteine Proteases), που δρουν σε ένα πρωτεολυτικό καταρράκτη.

Αντισώματα τάξης IgG ειδικά για ριβονουκλεοπρωτεΐνες (U1snRNP) από ορούς ασθενών με ΜΝΣΙ διεισδύουν σε ανθρώπινα μονοκύτταρα και Τ λεμφοκύτταρα και προκαλούν τον κατακερματισμό του γενωμικού τους DNA, την παύση του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις S /G2 και τελικά οδηγούν τα κύτταρα σε **απόπτωση** [163, 201, 202]. Άλλη μελέτη με mAbs έναντι ριβοσωμικής πρωτεΐνης P έδειξε τη διείσδυση σε 50-90% των αστροκυττάρων, Τ-κυττάρων (Jurkat) και καρκινικών κυττέρων του πνεύμονα. Στα Jurkat η κυτταρική διείσδυση προκαλούσε παύση του κυτταρικού κύκλου τους στη φάση G1 (14,8%) και στη συνέχεια απόπτωση (21,3%). Συμπερασματικά, τα αντι-P CPAs μπορεί να παίζουν ρόλο στην παθογένεση του ΣΕΛ λόγω της δυσλειτουργίας που προκαλούν στα λεμφοκύτταρα [203].

Σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα μετά τη διείσδυση των αντι-dsDNA αντισωμάτων και ταυτόχρονη ενεργοποίηση με μιτογόνα βρέθηκε να υπερεκφράζεται ο CD95/Fas, υποδεικνύοντας ότι η αλληλεπίδραση Fas με τον συνδέτη του (Fas ligand) εμπλέκεται στην επαγωγή απόπτωσης από CPAs. Όταν τα λεμφοκύτταρα δεν είναι ενεργοποιημένα (resting) και εκτεθούν με τον ίδιο τρόπο στα αντι-dsDNA CPAs, τα κύτταρα υφίστανται απόπτωση χωρίς όμως την εμπλοκή του δείκτη CD95/Fas [202, 204, 205].

Επίσης, αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης hsp27 (heat shock protein 27) επάγουν απόπτωση αφού διεισδύσουν στα κύτταρα εμποδίζοντας τη σταθεροποίηση της δομής του κυτταροσκελετού [206]. Τα αντισώματα αυτά αφού είχαν διεισδύσει σε νευρώνες ανθρώπινου αμφιβληστροειδούς, συνεντοπιζόνταν με την ακτίνη στο κυτταρόπλασμα και

στον πυρήνα και συντελούσαν στον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων, προκαλώντας αλλοίωση της κυτταρικής μορφολογίας, κατακερματισμό του DNA, και ενεργοποίηση κασπασών (πρωτεασών κυστεΐνης - ασπαρτικού οξέος). Τα αντισώματα αυτά βρέθηκαν να προσδένονται στην ακτίνη, με αποτέλεσμα τον αποπολυμερισμό και την πρωτεόλυση της με έναν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο [206]. Αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης hsp27, που έχουν ανευρεθεί σε ασθενείς με γλαύκωμα εισέρχονται σε νευρικά κύτταρα του ανθρώπινου αμφιβληστροειδούς προκαλώντας κυτταρικό θάνατο, πιθανότατα μέσω της δέσμευσης της hsp27 με αποτέλεσμα να μην παρουσιάζει πια την ικανότητα να σταθεροποιεί την ακτίνη του κυτταροσκελετού, υποδηλώνοντας έτσι ένα παθογενετικό ρόλο αυτών των αντισωμάτων [206].

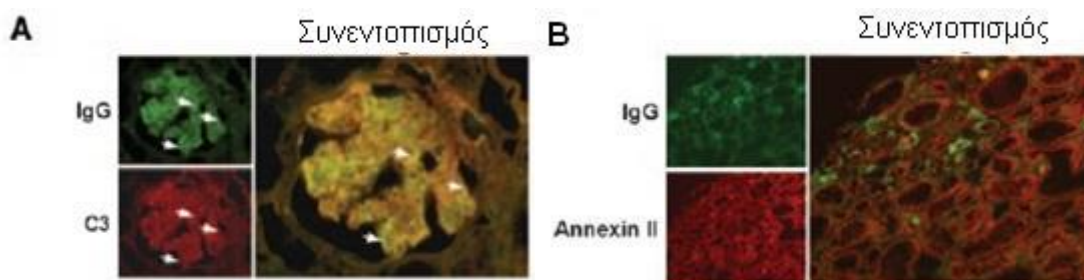
Από την άλλη αντισώματα έναντι της κασπάσης 3 (caspase-3, cistein aspartate protease-3), εκτελεστή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, έχουν δείξει να επάγουν αυτο-ενεργοποίηση επικρατειών της κασπάσης 3, που οδηγεί σε μη αναστρέψιμο θάνατο του κυττάρου [207]. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με την ιδέα ότι όταν τα αντισώματα βρεθούν μέσα στα κύτταρα, μπορούν να διεγείρουν άλλα προ-αποπτωτικά μονοπάτια, ανάλογα με την αντιγονική τους ειδικότητα. Επαγωγή απόπτωσης προκαλείται επίσης από μονοκλωνικά, αντι-DNA CPAbs ποντικού σε ανθρώπινα κύτταρα του περιφερικού αίματος και στην καρκινική κυτταρική σειρά HL60 μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών 2, 3 και 8, της Bax και Bcl-2 [208, 209]. Μερικά από αυτά τα αντισώματα βρέθηκαν ικανά να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, να μετατοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου και να αντιδρούν με τα αντιγόνα τους. Φαίνεται λοιπόν ότι μετά τη διείσδυση στα κύτταρα ακολουθεί σηματοδότηση της ενεργοποίησης της κυτταρικής απόπτωσης. Αναλυτική μελέτη στα αποπτωτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται, έδειξε ότι εκτός από το μιτοχονδριακό μονοπάτι, εμπλέκεται και το μονοπάτι μέσω της μεμβράνης -κασπάσες 2 και 8- σε μικρότερο όμως ποσοστό κυττάρων. Διεσδυτικά αντι-dsDNA αντισώματα δείχνουν εκτός από την ενεργοποίηση της απόπτωσης να προκαλούν και προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο δρώντας πάνω στην κυτταρική μεμβράνη (Πίνακας 5.) [210].

Πίνακας 5. Έκφραση αποπτωτικών δεικτών μετά από επώαση με mAbs αντι-dsDNA αντισώματα διεσδυτικά και μη

	Ποσοστά κυττάρων							
	24h				48h			
	mAb 31.F1		mAb F4.1		mAb 31.F1		mAb F4.1	
	Mean	±sd	Mean	±sd	Mean	±sd	Mean	±sd
PBMC								
Κασπάση 3	3.8	1.6	17.0*	0.9	1.2	0.1	1.6	0.6
Κασπάση 2	5.2	1.6	35.5*	2.8	3.9	2.1	14.6*	2.4
Κασπάση 8	2.4	1.4	8.7*	4.0	1.4	1.5	1.0	0.2
Bcl2	2.2	1.4	17.4*	7.9	2.2	1.0	18.0*	4.2
Bax	4.4	2.4	27.5*	5.6	4.2	2.0	12.0	5.1
Jurkat								

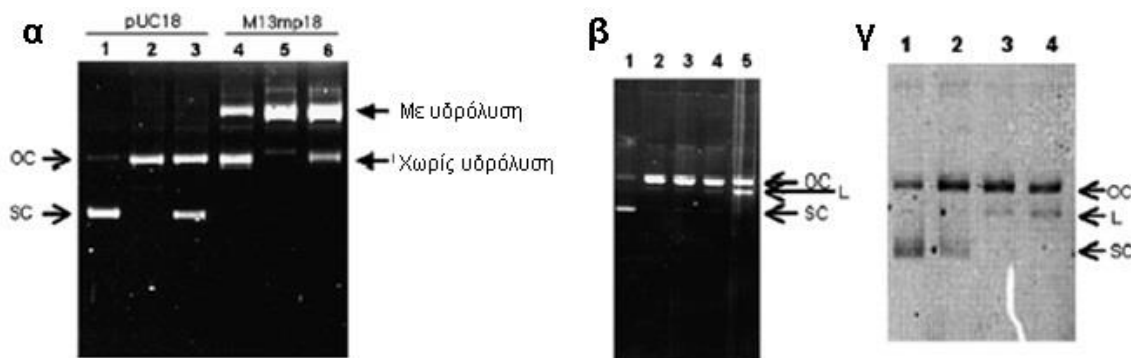
Κασπάση 3	3.2	1.3	19.3*	0.8	0.9	0.7	1.9	1.0
Κασπάση 2	4.5	1.8	32.1*	1.8	4.1	0.9	18.5*	1.8
Κασπάση 8	4.7	1.5	9.1*	3.4				0.7
Bcl2	3.8	2.0	13.6*	5.2	1.8	1.6		3.4
Bax	3.9	1.9	22.8*	4.8	2.7	1.8	9.9	4.1

Η παραγωγή αντι-dsDNA αντισωμάτων χαρακτηρίζει τη νεφρίτιδα του λύκου, αλλά παραμένει άγνωστο το πώς αυτά τα αντισώματα δημιουργούν εναποθέσεις στα όργανα και προκαλούν φλεγμονώδη βλάβη. Επίσης, στα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα (HMC) βρήκαν ότι τα αντι-dsDNA αντισώματα από ασθενείς με ΣΕΛ διεισδύαν στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα και οδηγούσαν στην επαγωγή της έκκρισης IL-6 και σύνθεσης αννεξίνης II, μέσω της ενεργοποίησης της ρ38 MAPK (Mitogen Activating Protein Kinase), JNK (Jun N-terminal kinases) και AKT (protein kinase B). Συμπερασματικά, τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η αννεξίνη II μεσολαβεί στην πρόσδεση των αντι-dsDNA αντισωμάτων στα μεσαγγειακά κύτταρα, συμβάλλοντας στην παθογένεια της νεφρίτιδας λύκου (**Εικόνα 14.**) [194].



Εικόνα 14. Η αννεξίνη II συνεντοπίζεται με σπειραματική IgG και C3 εναπόθεση σε βιοψίες νεφρού ασθενών με νεφρίτιδα του λύκου. Αντιπροσωπευτικές εικόνες που δείχνουνΑ: (Α) την εναπόθεση IgG και C3 στο σπείραμα και (Β) την αννεξίνης II και εναπόθεση IgG ενδιάμεσα των νεφρικών σωληναρίων (ubulointerstitium). (X 400).

Σε μελέτη για την καταλυτική δράση ενός κυτταροτοξικού διεισδυτικού mAb αντι-DNA, του G1-5, το οποίο προήλθε από ποντικό MRL-lpr/lpr, βρέθηκε ότι αυτό προκαλεί υδρόλυση στο ssDNA και dsDNA (**Εικόνα 15.**), παρουσιάζοντας μεγαλύτερη εξειδίκευση για τη θυμίδη παρά για την αδενίνη διασπώντας είτε τους β-γλυκοσιδικούς δεσμούς είτε τους φωσφοδιεστερικούς. Ο ρυθμός υδρόλυσης παρουσίασε μέγιστη τιμή και δεν αυξήθηκε παραπέρα σε όξινες συνθήκες pH, υποδηλώνοντας ότι η καταλυτική περιοχή στο αντίσωμα περιέχει πολλές καρβοξυλικές ομάδες. Επώαση των κυττάρων με το mAb προκάλεσε κυτταρικό θάνατο μέσω ενεργοποίησης κασπασών. Έτσι δείχθηκε συνολικά, ότι το CPAb G1-5 αφού διεισδύσει στα κύτταρα και συγκεκριμένα στον πυρήνα, υδρολύει το DNA, ενεργοποιώντας τις κασπάσες και προκαλώντας κυτταρικό θάνατο [209].

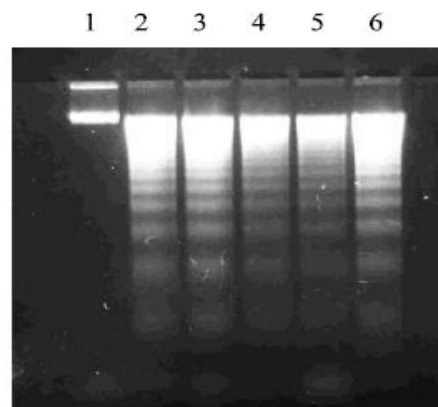


Εικόνα 15. Υδρόλυση του πλασμιδίου rUC18 DNA ή του M13mp18 dsDNA. Τεμαχισμός της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου από το mAbG1-5. Διάσπαση υπερελιγμένου ή M13mp18 dsDNA από mAbG1-5. (α) rUC18 ή M13mp18 dsDNA (1 Ig) επωάστηκε χωρίς (1 και 4) ή με 100 μg/ml του G1-5 IgG (2 και 5), ή G1-5 Fab (3 και 6) για 3 h. (β) rUC18 DNA (1 Ig) επωάστηκε με 0 (1), 30 (2), 50 (3), 100 (4), ή 300 (5) Ig/ml G1-5 για 3 ώρες. (γ) rUC18 DNA (1 Ig) επωάστηκε για 1, 3, 6, ή 16 ώρες (1-4, αντιστοίχως) με 100 μg/ml G1-5. SC, OC, και L αντιπροσωπεύουν την υπερελικωμένη (supercoiled), την ανοιχτή κυκλική ισομορφή (open circular) και τη γραμμική μορφή (linear forms) του πλασμιδίου, αντίστοιχα.

Κυτταροτοξικότητα των αντι-DNA αυτοαντισωμάτων από ορούς ασθενών με ΣΕΛ και χρόνια λεμφοειδής λευχαιμία αναλύθηκαν στις κυτταρικές σειρές L929, HL-60, Raji και K562. Τα κύτταρα L929 ήταν η πιο ευαίσθητη σειρά στα αντισώματα. Τα στοιχεία που προκύπτουν παρουσιάζουν συσχέτιση μεταξύ της

κυτταροτοξικότητας και της υδρολυτικής ιδιότητας για το DNA των αυτοαντισωμάτων. Δείχθηκε ότι η επώαση των κυττάρων με κυτταροτοξικά αντι-DNA αυτοαντισώματα προκαλούσε τον κατακερματισμό του DNA στον πυρήνα και τη δέσμευση της αννεξίνης V στην επιφάνεια του κυττάρου, χαρακτηριστικό της αποπτωτικού

θανάτου. Ένα χρονο-εξαρτώμενο προφίλ τοξικότητας προκαλούμενο από το αντίσωμα στα L929 κύτταρα έδειξε την ενεργοποίηση τουλάχιστον δύο διακριτών μηχανισμών κυτταρικού θανάτου. Η πρώτη ένδειξη του κυτταρικού θανάτου που παρατηρήθηκε στις 3 ώρες επώασης, ανεστάλη πλήρως με προεπώαση των κυττάρων με τον αναστολέα της κασπάσης YVAD-CHO, ενώ το δεύτερο συνεχίστηκε (18-30 ώρες). Μετά από 1 ώρα επώασης στους 37°C το 30 έως 50 % των κυττάρων έδειξε εντοπισμό των αντισωμάτων



Εικόνα 16. Κατακερματισμός του DNA από αντι-DNA αυτοαντισώματα. HL-60 κύτταρα επωάστηκαν: 1) για 24 ώρες με θρεπτικό υλικό, 2) 10^{-7} M αντι-DNA αντισώματα από ασθενή με ΣΕΛ, 3) 10^{-7} M αγωνιστή αντι-Fas αντίσωμα IPO-4, 4) 10^{-7} και 10^{-8} M TNF-a

στον πυρήνα, ενώ το 20 % των κυττάρων είχαν μόνο μεμβρανικό εντοπισμό. Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ της διείσδυσης των κυτταροτοξικών και μη-κυτταροτοξικών αντι-DNA CPAbs που χρησιμοποιήθηκαν (**Εικόνα 16.**) [211] [188]. Προκαταρκτικά πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι ορισμένα αντι-dsDNA αντισωμάτων που προκαλούν απόπτωση θα μπορούσαν να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες ακολουθίες νουκλεοτιδίων στο DNA και ως εκ τούτου, η άμεση αλληλεπίδραση των αυτοαντισωμάτων με το DNA δεν μπορεί να αποκλειστεί ως πρόσθετος προ-αποπτωτικός μηχανισμός.

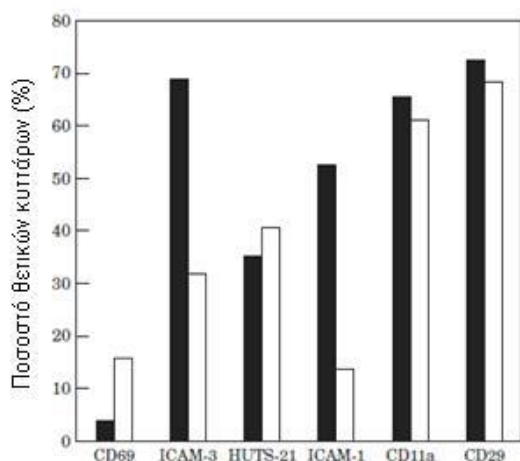
4.2. Ρύθμιση της έκφρασης κυτταροκινών από τα CPAbs

Μονοκλωνικά αντι-DNA αντισώματα ποντικού διεισδύοντας σε T λεμφοκύτταρα και μονοπύρηνα κύτταρα επάγουν τη μεταγραφή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1β, IL-6 και IL-8 [212]. Επίσης, έχει δειχθεί ότι τα αντισώματα αυτά διεισδύουν σε μακροφάγα κύτταρα RAW264.7, ενεργοποιούν τον NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) και διεγείρουν την παραγωγή του TNF-α (tumor necrosis factor alpha) [213]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τουλάχιστον κάποια αυτοαντισώματα έναντι dsDNA πιθανά παίζουν ρόλο στην παθογένεση του ΣΕΛ διεισδύοντας σε κύτταρα μακροφάγων και στους πυρήνες τους, και στη συνέχεια επάγοντας την έκφραση της προφλεγμονώδους κυταροκίνης, TNF-α [213]. Στις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες και CPAbstπου δεν επηρέαζαν όμως τις λειτουργίες των κυττάρων. Συνεπώς, φαίνεται ότι η διείσδυση των αντισωμάτων σε ένα κύτταρο δεν συνεπάγεται υποχρεωτικά και την τροποποίηση των κυτταρικών λειτουργιών του.

4.3. Επίδραση στην ενεργοποίηση κυττάρων από τα CPAbs

Πολυκλωνικά αντι-DNA αντισώματα από ασθενείς με ΣΕΛ καθώς και mAbs από πειραματικό μοντέλο ποντικού, βρέθηκαν να διεισδύουν *in vitro* σε ανθρώπινα μονοκύτταρα και να επάγουν την ενεργοποίησή τους, όπως έδειξε η αύξηση της έκφρασης του μορίου CD69 και της β-1 ιντεγκρίνης [204]. Ανθρώπινα πολυκλωνικά αντι-DNA, IgG, μετά τη διείσδυση σε μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells PBMNC), ήταν σε θέση να επάγουν *in vitro* την έκφραση διαφορετικών αντιγόνων ενεργοποίησης λεμφοκυττάρων, όπως CD69, CD71 ή CD98. Ωστόσο, ο φαινότυπος ενεργοποίησης των κυττάρων θεωρήθηκε μη φυσιολογικός, επειδή η έκφραση ορισμένων δεικτών ενεργοποίησης -που έπρεπε να ήταν αυξημένη- δεν ήταν. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν χρησιμοποιώντας διαφορετικά μονοκλωνικά αντι-DNA CPAbs ποντικού. Τα αντισώματα αυτά φάνηκε να έχουν μεγαλύτερη επίδραση στην ενεργοποίηση των PBMNC και να προκαλούν μια αξιοσημείωτη έκφραση του δείκτη CD95/Fas. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι τα αντι-DNA CPAbs μπορούν να επάγουν μια

φυσιολογική κατάσταση ενεργοποίησης *in vitro* σε ένα σημαντικό κλάσμα των PBMNC. Επίσης είναι δυνατόν τα αποτελέσματα αυτά να λαμβάνουν χώρα *in vivo* και να συμβάλλουν στην παθογένεση της ανοσιακής ρύθμισης όπως στον ΣΕΛ (**Εικόνα 17.**) [204].



Εικόνα 17. Επίδραση στην έκφραση δεικτών αντι-DNA ανθρώπινης πολυκλωνικής IgG στην έκφραση διαφορετικών επιφανειακών αντιγόνων από φυσιολογικά PBMNC. PBMNC από υγιείς επωάστηκαν 72 ώρες παρουσία IgG από υγιείς (μαύρη μπάρα) ή αντι-DNA IgG από ασθενείς με ΣΕΛ (λευκή μπάρα).

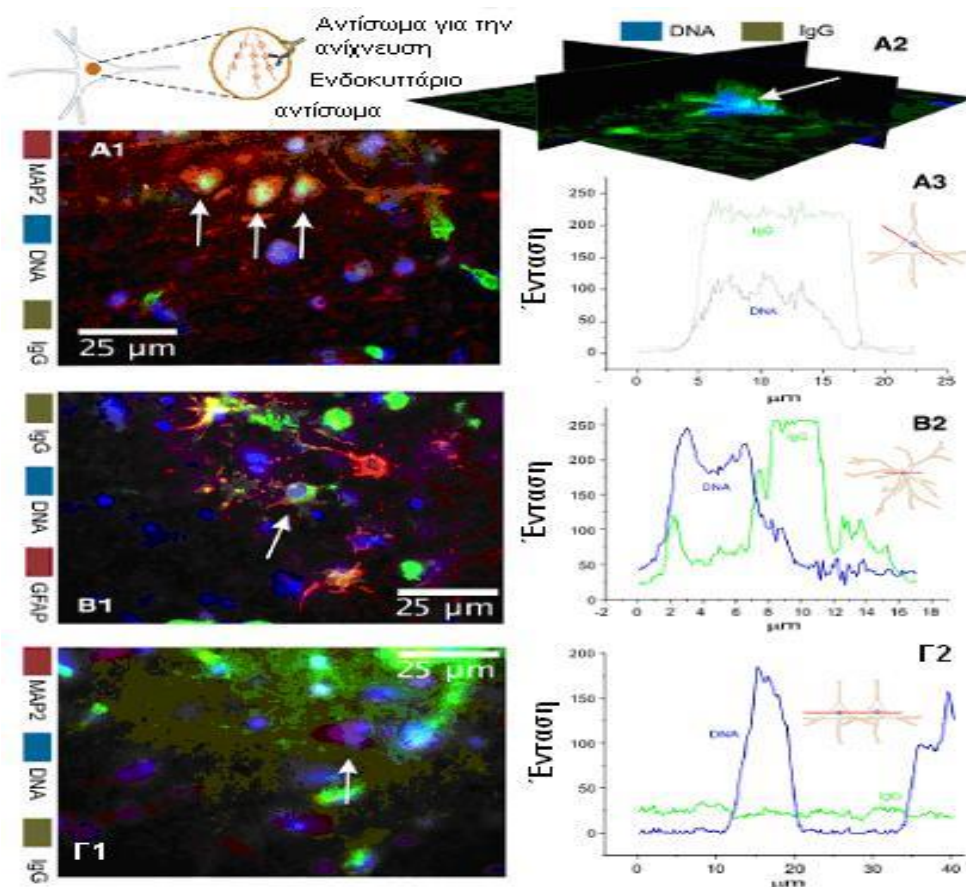
4.1.2. Άλλες δράσεις

Στα CPAbs έχουν αποδοθεί η τροποποίηση και άλλων κυτταρικών λειτουργιών που ποικίλουν αναλόγως το μοντέλο της εκάστοτε μελέτης. CPAbs έναντι αντιγόνου Hu, ρικοβερίνης, hsp27, MAG (myelin-associated glycoprotein) και άλλων, συμβάλλουν στο θάνατο κυτταρών του νευρικού συστήματος και κατά συνέπεια στην παθογονικότητα και στα κλινικά χαρακτηριστικά νευρολογικών νοσημάτων. Παρομοίως, αντισώματα έναντι των Ro/SSa αντιγόνων και της αντλίας ADP/ATP που διεισδύουν σε καρδιακά κύτταρα συμμετέχουν ως καθυστερημένοι τελεστές (late effectors) της παθοφυσιολογίας του καρδιακού εμφράγματος και της μυοκαρδίτιδας [170]. Επιπλέον, αντισώματα ειδικά για τη ριβοσωμική πρωτεΐνη P από ορούς ασθενών με ΣΕΛ διεισδύουν στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων και προκαλούν αναστολή της έκκρισης της απολιποπρωτεΐνης B, συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους και αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης [214] (**Πίνακας 6.**) [183].

Πίνακας 6. Βιοχημικές και κυτταρικές επιδράσεις αντι-P CPAbs στα HepG-2

1. Η ποσοστιαία μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της απολιποπρωτεΐνης B επηρεάζεται
2. Η ποσοστιαία μείωση της έκκρισης της απολιποπρωτεΐνης B από τα HepG-2 κύτταρα εμφανίζει σημαντική μείωση
3. Καταστολή της σύνθεσης σφαιρινών σε ζωντανά κύτταρα
4. Μεγάλη αύξηση στα ουδέτερα λιπίδια των κυττάρων με αποτέλεσμα την επαγωγή «fatty liver cell»
5. Μεγάλη αύξηση της ενδοκυτταρικής χοληστερόλης (300% αύξηση)

Επίσης, πρόσφατες μελέτες σε ασθενείς με επιληψία, χωρίς ιστορικό αυτοάνοσης νόσου (Rasmussen's encephalitis και limbic encephalitis) έδειξαν εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια εναποθέσεις IgG σε δείγματα ιστού εγκεφάλου, μετά από εκτομή περιοχής του για την αντιμετώπιση των επιληπτικών κρίσεων. Μάλιστα οι νευρώνες παρουσίαζαν σε μεγαλύτερο ποσοστό πυρηνικό εντοπισμό IgG σε σύγκριση με τη νευρογλοία, όπου τα αστροκύτταρα παρουσίαζαν έντονο εντοπισμό IgG στο κυτταρόπλασμα, όχι όμως και στον πυρήνα. Ενδοκυτταρικά αντισώματα βρέθηκαν σε επιληψία (n=13/13), αλλά όχι σε πολλαπλή σκλήρυνση του εγκεφάλου (n=4/4). Τα αντισώματα αυτά βρέθηκαν να αναγνωρίζουν τη χρωματίνη και τις ιστόνες, και ο τίτλος τους στον ορό των ασθενών ήταν ιδιαίτερα υψηλός. Έτσι, δείχτηκε ότι τα ενδοπυρηνικά αντισώματα μπορεί να συνδέονται με έναν πιθανό μηχανισμό επιληπτικών κρίσεων που προκαλούν θάνατο των νευρικών κυττάρων (Εικόνα 18.) [215].



Εικόνα 18. Πυρηνικός εντοπισμός IgG σε νευρώνες εγκεφάλου ασθενών με επιληψία. Δείγματα ιστών εγκεφάλου ασθενών με: (Α-Β) επιληψία, (Γ) σκλήρυνση κατα πλάκας. Αριστερά φαίνεται ο εντοπισμός και δεξιά διάγραμμα της έντασης του φθορισμού για τις IgG (σε πράσινο) και τον πυρήνα DNA (μπλε). Οι νευρώνες σημάνθηκαν ειδικά έναντι του δείκτη MAP2, και τα αστροκύτταρα για το δείκτη GFAP. Αριστερά: πυρηνικός εντοπισμός IgG στους νευρώνες από τον εγκέφαλο ασθενών με επιληψία, και κυτταροπλασματικός εντοπισμός των IgG στα αστροκύτταρα. Δεξιά πάνω: (Α2) Πυρηνικός συνεντοπισμός παρατηρείται επίσης μετά από 3D απεικόνιση του εγκεφαλικού ιστού από

έναν ασθενή με επιληψία. Αντίθετα ιστός από εγκεφάλους ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας (κροταφικό λοβό Γ) δεν παρουσίαζαν ενδοκυττάριο εντοπισμό.

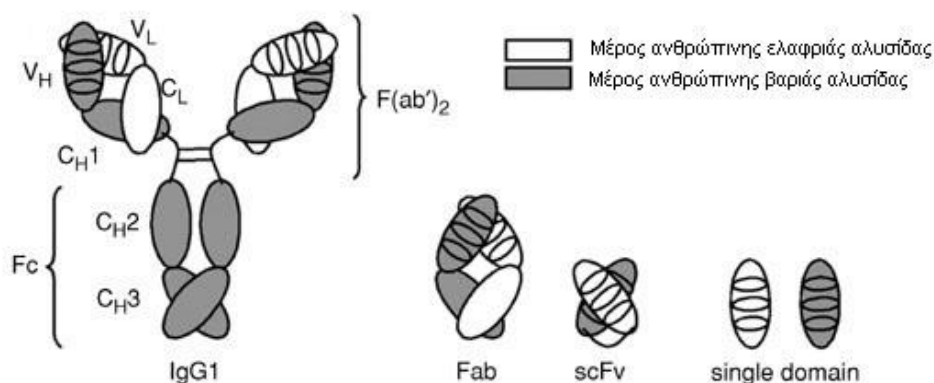
Επίσης, σε μελέτες στο ρόλο των CPAbs έναντι των φωσφολιπιδίων στην προεκλαμψια, βρήκαν ότι αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (aPL) πολύκλινα ανθρώπου και μονοκλωνικά ποντικού, διεισδύαν γρήγορα σε συγκυτιοτροφοβλάστες (syncytiotrophoblast), μέσω ενδοκύτταρωσης. Μετά τη διείσδυση αυτά προκαλούσαν την απελευθέρωση νεκρωτικών υπολειμάτων τροφοβλάστη (με την απελευθέρωση κυτοχρώματος), τα οποία στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονταν από τα ενδοθηλιακά κύτταρα στο μητρικό αγγειακό σύστημα, προκαλώντας ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμβάλλοντας έτσι στην παθογένεια της προεκλαμψίας [216].

Τέλος, αντίθετα με τα παραπάνω, έχει χαρακτηριστεί ένα mAb ποντικού, το οποίο διεισδύει στον πυρήνα ηπατοκυττάρων και αυξάνει τα επίπεδα της καβεολίνης και με αυτό τον τρόπο τα προστατεύει από την επαγόμενη από δεξαμεθαζόνη (dexamethasone) απόπτωση [193]. Το αντι-DNA mAb (H7 mAb) που προέρχεται από ποντικούς MRL-lpr/lpr διεισδύει *in vitro* σε ζώντα κύτταρα, μέσω πρόσδεσης της μυοσίνης 1 και κυστιδίων καβεολίνης, μεταφέρεται στον πυρήνα και αναστέλλει την επαγόμενη από δεξαμεθαζόνη (dexamethasone, DEX) απόπτωση. Σε αυτό το πειραματικό μοντέλο, η απόπτωση που παρατηρείται μετά από την έκθεση των κυττάρων στη δεξαμεθαζόνη συνδέεται με αναστολή έκφρασης της p53 και υπερέκφραση της καβεολίνης. Εκτιμήθηκε επομένως ότι η αναστολή της απόπτωσης οφείλεται στην παρουσία του ενδοκυττάρου mAb H7, όπως και η υπερκινητικότητα που προκαλείται μετά τη χορήγηση του mAb H7 σε φυσιολογικά ποντίκια. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η αναστολή των αποπτωτικών οδών κατά τη διάρκεια της φλεγμονής ή/και της αυτοανοσίας θα μπορούσε να επηρεάσει τις επικείμενες εκδηλώσεις της νόσου. Ο νέος μηχανισμός της κυτταρικής διαταραχής είναι έμμεσος και εξαρτάται από διάφορα αποπτωτικά ερεθίσματα, που μπορεί να ευθύνονται για την παρουσία ενδοπυρηνικών αντισωμάτων σε φλεγμονώδεις και φυσιολογικούς ιστούς των ατόμων με λύκο [193].

5. Εφαρμογές των CPAbs στην βιοϊατρική

Από την ανακάλυψη των E von Behring και S Kitsato ότι οι οροί από εμβολιασμένα ζώα περιέχουν εξουδετερωτικά αντισώματα (neutralizing antitoxin antibodies), τα αντισώματα άρχισαν να κυριαρχούν στην επιστήμη της ανοσολογίας. Αρκτά βραβεία Nobel απονεμήθηκαν σε ανοσολόγους που συνέβαλαν στην αποσαφήνιση της δομής, της λειτουργίας και της γενετικής των αντισωμάτων, τονίζοντας το σημαντικό ρόλο της χυμική ανοσίας για την ευζωία ανθρώπων και ζώων. Επιπλέον, τα αντισώματα έχουν αναδειχθεί ως το μεγαλύτερο τμήμα της αγοράς των θεραπευτικών σκευασμάτων ανοσορρύθμισης

[217]. Η χρήση των αντισωμάτων προσφέρει πλεονεκτήματα γιατί ο χρόνος ημιζωής της πρωτεΐνης είναι μεγαλύτερος από πεπτίδια και το σημαντικότερο, μία πρωτεΐνη έχει περισσότερες από μία επικράτειες για αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες/μόρια και έτσι είναι δυνατόν να αναπτυχθεί ένα αντιδραστήριο το οποίο αποτρέπει συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις αλλά και επιτρέπει άλλες εναλλακτικά. Αυτές οι ποικίλες μορφές δράσης των αντισωμάτων αυτών έχουν μεγάλες προοπτικές στον τομέα της ιατρικής. Τα αντισώματα έναντι ενδοκυττάρων αντιγόνων που ανευρίσκονται στον ορό ασθενών με διάφορες αυτόνοσες ασθένειες, χρησιμοποιούνται ευρέως στην διάγνωση. Κατά την τελευταία δεκαετία, ένας μεγάλος αριθμός ενδοκυττάρων αντισωμάτων ή τμημάτων αυτών (Fab, scFv κ.α.) έχει αναπτυχθεί για τη χρήση τους ως θεραπευτικών παραγόντων καθώς και ως ενδοκυττάρων μεταφορέων μορίων όπως ενζύμων, φαρμάκων, ραδιοϊσοτόπων ή και γονιδίων (**Εικόνα 19**).



Εικόνα 19: Τα διάφορα τμήματα των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς.

5.1. CPAbs ως θεραπευτικοί παράγοντες

Τα CPAbs μπορούν να καλύψουν ένα ευρύ θεραπευτικό φάσμα συμπεριλαμβανομένων καρκίνου, μολυσματικές ασθένειες, μεταμόσχευση, και άλλες ασθένειες που σχετίζονται με την υπερέκφραση πρωτεϊνών ή μεταλλαξογένεση [218]. Η ιδέα της θεραπευτικής χρήσης των CPAbs, ως δραστικούς παράγοντες, βασίζεται στην ικανότητά τους να προσδένονται σε αντιγόνα, επιφανειακά ή ενδοκυττάρια, και είτε να αναστέλλουν τη λειτουργία τους, είτε να τα εκτρέπουν από την κανονική τους ενδοκυττάρια θέση. Σε ορισμένες περιπτώσεις CPAbs έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για να αποκαταστήσουν τη λειτουργία ενός στοχευόμενου αντιγόνου-στόχου και ως εκ τούτου τη διάσωση του αντίστοιχου φαινότυπου. Σε αντίθεση με την άμεση χορήγηση ενός θεραπευτικού φάρμακου, η προσέγγιση αυτή εμπλέκει τη λειτουργία του κυττάρου για την παραγωγή του θεραπευτικού αποτελέσματος (**Πίνακας 7**).

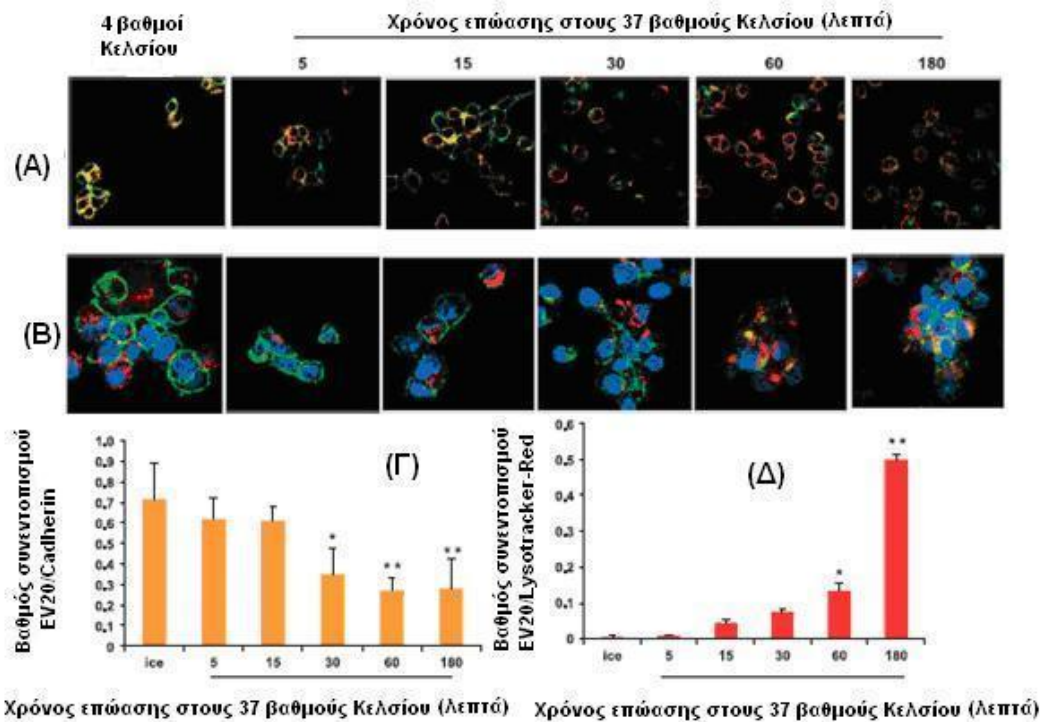
Πίνακας 7. Θεραπευτικές εφαρμογές ενδοκυττάρων αντισωμάτων

Αντιγόνα–στόχοι στις ασθένειες	Εφαρμογές για Μονοκλωνικό Fv(scFv)
AIDS	
Gp 120 (HIV–1 πρωτεΐνη φακέλου)	Αναστολή του σχηματισμού του ιικού φακέλου συγκρατώντας το πρόδρομο gp120 στο ενδοπλασματικό δίκτυο
Tat (HIV–ενεργοποιητής μεταγραφής)	Αναστολή της ιικής αντιγραφής απομονώνοντας το Tat στο κυτόπλασμα
CCR5 (υποδοχέας χυμοκινών, που απαιτείται για την είσοδο του ιού)	Προστασία των T λεμφοκυττάρων κατά της μόλυνσης από HIV–1 αποτρέποντας την έκφραση του CCR5 στην επιφάνεια
HIV–1 αντίστροφη μεταγραφάση HIV–1 ιντεγκράση	Αναστολή της σύνθεσης της διπλής έλικας του DNA Πρόληψη της ενσωμάτωσης του ιικού DNA εξουδετερώνοντας την ιντεργκράση
Rev (ρυθμιστής των ιικών γονιδίων)	Αναστολή της αντιγραφής του HIV–1 εμποδίζοντας την λειτουργία της Rev
Vif (ιικός μολυσματικός παράγοντας)	Πρόληψη της μολυσματικότητας του HIV–1 και της αντίστροφης μεταγραφάσης μέσω της απενεργοποίησης της Vif
hCyclin T1 (υπομονάδα του μεταγραφικού συμπλόκου)	Αναστολή της αντιγραφής του HIV–1 διακόπτοντας τη μοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ Tat και hCyclin T1
Όγκοι στον άνθρωπο	
Ras (συνήθως μεταλλαγμένη πρωτεΐνη μεταγωγής σήματος)	Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επαγωγή της απόπτωσης <i>in vitro</i>
erbB-2 (υποδοχέας του επιδερμικού παράγοντα αύξησης)	Καταστολή της έκφρασης του erbB-2 στην επιφάνεια του κυττάρου
IL-2Ra (α υπομονάδα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-2)	Μείωση της έκφρασης IL-2Ra στα T λεμφοκύτταρα και στα B λεμφοκύτταρα σε λευχαιμίες αναστέλλοντας την έκφραση στην κυτταρική επιφάνεια
p53 (πρωτεΐνη σίγασης του όγκου)	Αποκατάσταση της μεταγραφικής δραστηριότητας του μεταλλαγμένου p53 προκειμένου να προκληθεί απόπτωση και να σταματήσει την αύξηση του όγκου
Cyclin E (πρωτεΐνη του κυτταρικού κύκλου)	Αναστολή της αύξησης των κυτταρικών γραμμών του καρκίνου του μαστού εμποδίζοντας τη λειτουργία της Cyclin E
EGFR (υποδοχέας του επιδερμικού παράγοντα αύξησης)	Απενεργοποίηση της δυνατότητας μετασχηματισμού του EGFR αποτρέποντας τη μεταφορά αυτού στην επιφάνεια του κυττάρου
Άλλες ασθένειες	
Huntingtin (πρωτεΐνη υπεύθυνη για τη νόσο του Huntington)	Αναστολή της συσσώρευσης της ανώμαλης πρωτεΐνης στο <i>in vitro</i> μοντέλο της νόσου Huntingtin στοχεύοντας την Huntingtin στο πυρήνα
MHC βαριάς αλυσίδας (MHC 1)	Φαινοτυπικό νοκ-αουτ των κερατινοκυτταρικών αλλομοσχευμάτων συγκρατώντας τα MHC1 στο ενδοπλασματικό δίκτυο για την αποφυγή απόρριψης του αλλομοσχεύματος

Ο συνδυασμός που προσφέρουν τα CPABs δηλαδή να διεισδύουν στα κύτταρα και να τροποποιούν τις λειτουργίες τους είναι εξαιρετικά δελεαστικός για πληθώρα εφαρμογών. Προς αυτή την κατεύθυνση πρόσφατες προσπάθειες αφορούν την παρασκευή αντισωμάτων που να παρέχουν μια στοχευμένη ενδοκυττάρια δράση. Το μονοκλωνικό CPAb 3E10 που προέρχεται από αυτοάνοσο ποντικό αναγνωρίζει κατά προτίμηση το ssDNA και αναστέλει βασικά βήματα στη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA (DNA repair). Έτσι, έχει βρεθεί να διεισδύει σε καρκινικά κύτταρα *in vitro* καθώς και σε

ξενομοσχεύματα ανθρώπινων όγκων και να προκαλεί ανεπάρκεια στην επιδιόρθωση του DNA των κυττάρων, με αποτέλεσμα το θάνατό τους. Επίσης, παρουσιάζει ευεργετικά αποτελέσματα σε συνδυασμό με τη δοξορουβικίνη ή με τη χρήση ακτινοβολίας, ειδικά στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα με BRCA2-ανεπάρκεια. Τέτοιες μελέτες καθορίζουν μια προσέγγιση στην θεραπεία του καρκίνου που θα είναι ιδιαίτερα εφαρμόσιμη σε κακοήθειες όπως του μαστού, των ωοθηκών και του προστάτη [219].

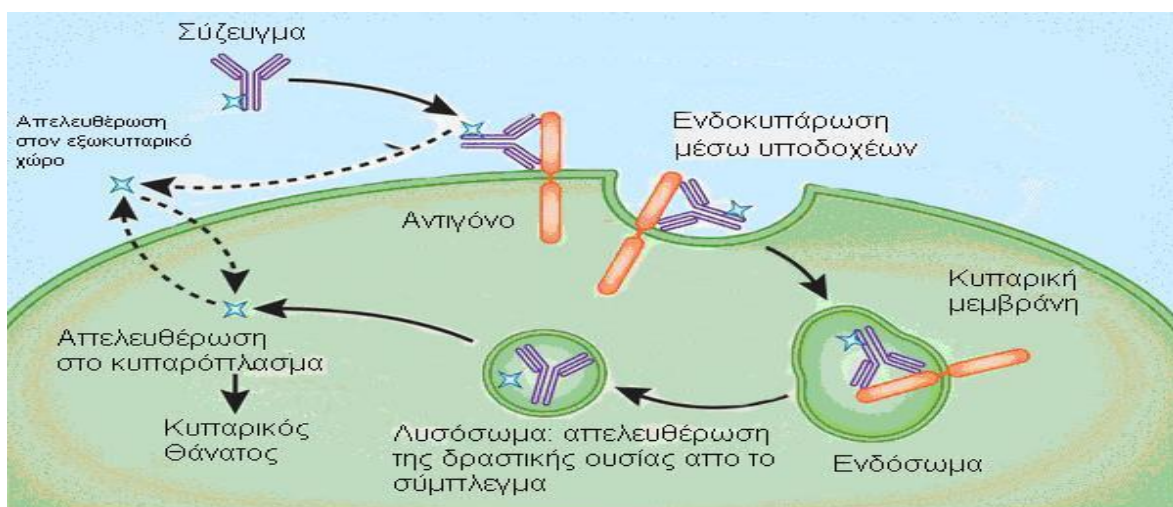
Το MP-RM-1, είναι ένα μονοκλωνικό CPAb που αναγνωρίζει τον υποδοχέα ErbB-3 (HER-3, human epidermal growth factor receptor 3), που εκφράζεται στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων και έχει δείξει αντικαρκινική δραστηριότητα σε προκλινικά μοντέλα. Με σκοπό την παροχή νέων φαρμάκων για κλινική χρήση, έχει δημιουργηθεί με επιτυχία μια ανθρωποποιημένη εκδοχή του MP-RM-1 αντισώματος ποντικού. Το εξανθρωπισμένο αντίσωμα, που ονομάζεται EV20, εισέρχεται στα κύτταρα του όγκου, αποτελεσματικά και γρήγορα (**Εικόνα 20.**), και καταργεί τόσο την εξαρτώμενη από τον συνδέτη, όσο και την ανεξάρτητη, σηματοδότηση του ErbB-3 σε διάφορους τύπους ογκοκυττάρων (αναστέλλει την ενεργοποίηση της AKT και το διμερισμό του ErbB-2/ErbB-3 χωρίς να ανταγωνίζεται με το NRG-1β για την πρόσδεση σε ErbB-3), με αποτέλεσμα να προκαλεί τη μειωμένη έκφρασή του (down-regulation). Επιπλέον, η θεραπεία με EV20 αναστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων σε αθυμικούς ποντικούς που προέρχονται από καρκίνους προστάτη, ωοθηκών και παγκρέατος, καθώς και από μελάνωμα. Το διεισδυτικό EV20 αποτελεί έναν ιδανικό υποψήφιο για την ανάπτυξη φαρμάκων που στοχεύουν τον καρκίνο [220].



Εικόνα 20. Το EV20 διεισδύει σε IR-8 κύτταρα. IR-8 κύτταρα επώαστηκαν με EV20 (10 μg/ml) στον πάγο για 1 ώρα ή στους 37°C για 5, 15, 30, 60 και 180 λεπτά. Αντιπροσωπευτικές εικόνες του EV20 (πράσινο), των πυρήνων (μπλέ) και των της καδερίνης (A, cadherin κόκκινο) ή των λυσοσώματων (B, LysoTracker, κόκκινο). Γ) Τιμές συνεντοπισμού της EV20/cadherin και Δ) EV20/LysoTracker Κόκκινο (Κλίμακα 10 μm).

5.2. CPABs ως ενδοκυττάριοι μεταφορείς

Εκτός από την απευθείας χρήση των CPABs ως θεραπευτικών παραγόντων, υπάρχει και η δυνατότητα για χρήση τους ως ενδοκυττάριων μεταφορέων βιολογικών ουσιών. Η χρήση αντισωμάτων καθώς και τμημάτων και πεπτιδίων αυτών, προερχόμενα από αντισώματα, για τη μεταφορά ουσιών είναι ένα πεδίο εντατικών ερευνών (**Εικόνα 21.**).



Εικόνα 21. Μεταφορά δραστικής ουσίας από CPAb. Κατά τη σύνδεση με αντιγόνα της επιφανείας των κυττάρων, ένα CPAb συζευγμένο με μια δραστική ουσία διεισδύει μέσω ενδοκυττάρωσης, και στη συνέχεια το σύζευγμα περνά από το μονοπάτι των λυσοσωμάτων και οδηγείται στην απελευθέρωση της ουσίας στο εσωτερικό του κυττάρου.

5.2.1. Μεταφορά δραστικών-φαρμακευτικών ουσιών

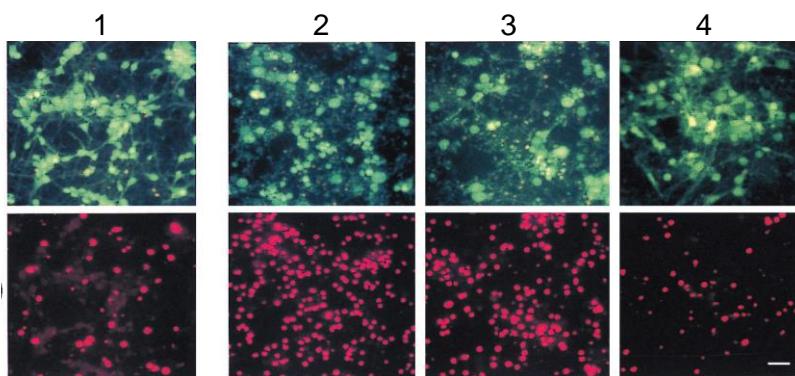
Μία προσέγγιση αφορά την ενδοκυττάρωση του συζεύγματος CPAb-ουσίας με αποτέλεσμα όλο το σύμπλεγμα να οδηγείται εντός του κυττάρου. Μια τέτοια εκδοχή συνιστά και το εμπορικό Gemtuzumab [Gemtuzumab-ozogamicin (MylotargR)], ένα αντι-CD33 αντίσωμα συζευγμένο με καλιχεαμυκίνη (calicheamycin), με μια ιδιαίτερα ισχυρή κυτταροτοξική αντιβιοτική ουσία. Το σκεύασμα χρησιμοποιείται σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (acute myeloid leukaemia) και μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου (myelodysplastic syndrome). Μετά τη χορήγηση, το αντίσωμα δεσμεύεται στο CD33, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που εσωτερικοποιείται. Μετά την ενδοκυττάρωση και τα μονοπάτια ενδοσωμάτων, η ουσία καλιχεαμυκίνη απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και το καταλυτικό της κέντρο υπεύθυνο για την κυτταροτοξικότητα, αποκαλύπτεται. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η πρόσληψη του συζεύγματος από θετικά CD33-κύτταρα είναι 77.000 φορές μεγαλύτερη από ότι τα αρνητικά CD33 κύτταρα. Επίσης, σύζευξη της φαρμακευτικής ουσίας αουρισταίνης (auristatin) με ένα CPAb που αναγνωρίζει το CD20 έδειξε ελπιδοφόρα αποτελέσματα σε ένα μοντέλο λεμφώματος (CD20 positive lymphoma model), ενώ παρόμοιες προσεγγίσεις έχουν περιγραφεί χρησιμοποιώντας προϊόντα σύζευξης αντισώματος με μαΐτανσινοειδές (maytansinoid). Ένα επίσης ενδιαφέρον παράδειγμα συστήματος μεταφοράς φαρμάκου είναι αυτό ενός συζεύγματος που παρασκευάστηκε από ένα CPAb έναντι του καρκινικού υποδοχέα HER2 και μια δραστική ουσία, τη γελνταμυκίνη (geldanamycin), και δείχθηκε ότι αναστέλλει δραματικά την έκφραση του HER2 και την αύξηση του όγκου. Σύζευγμα-μάρτυρας προερχόμενο από ένα μη-διδεισδυτικό mAb αντι-HER2 δεν είχε τα ίδια αποτελέσματα, υποδεικνύοντας ότι η διείσδυση του συζεύγματος είναι απαραίτητη για να είναι αποτελεσματικό [221, 222].

Μια άλλη προοπτική δόθηκε από την ομάδα του Schnitzer που πρότεινε τη στόχευση CPAbs έναντι αντιγόνων των κυστιδίων, όπως αυτών καλυμμένων με καβεολίνη, για την επιλεκτική και την ποσοτική *in vivo* διανδοθηλιακή μεταφορά τους στα κύτταρα. Σύζευξη φαρμάκων σε ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει ειδικές θέσεις επί των κυστιδίων καβεολίνης αυξήσε την πρόσληψη του φαρμάκου στον πνεύμονα έως 172-φορές και πέτυχε μια πιο εντοπισμένη βιοδραστικότητα. Με βάση τα ευρήματα βγήκε το συμπέρασμα ότι η στόχευση των κυστιδίων καβεολίνης μπορεί να παρέχει μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση [223].

5.2.2. Μεταφορά πρωτεϊνών

Ορισμένα αντι-dsDNA αντισώματα, και τμήματα αυτών, δηλαδή Fab και κάποια πεπτιδία που φέρουν τις CDR2 και CDR3 περιοχές της βαριάς αλυσίδας, έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν στον πυρήνα των κυττάρων ομοιοπολικά συνδεδεμένες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, ένα πεπτιδίο που περιέχει τις αλληλουχίες των υπερμεταβλητών περιοχών CDR2 και CDR3 ενός μονοκλωνικού αντι-DNA CPAb ποντικού ήταν ικανό να μεταφέρει βιοτίνη αλλά και υπεροξειδάση στο εσωτερικό ζώντων κυττάρων (PtK2, Hep-2 και CCL-39). Τα ίδια αποτελέσματα έδωσε το σύζευγμα του πεπτιδίου αυτού με την υπεροξειδάση, *in vivo*, όταν χορηγήθηκε σε ποντίκια BALB/c.

Ως φορείς βιομορίων έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί υπερμεταβλητές περιοχές των βαριών και ελαφριών αλυσίδων του αντι-DNA διεισδυτικού αντισώματος 3E10 (Fv 3E10). Το Fv 3E10 αποδείχθηκε ικανό να μεταφέρει *in vitro* και *in vivo* στο εσωτερικό καρκινικών κυττάρων την πρωτεΐνη p53 (με ελαττωματική έκφραση στα κύτταρα αυτά) [224, 225] και χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για να μεταφέρει τη μικροδυστροφίνη (έλλειψη της πρωτεΐνης αυτής σε νευρομυϊκές ασθένειες π.χ. μυϊκή δυστροφία του Duchenne) σε κύτταρα με έλλειψη αυτής της πρωτεΐνης [225]. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε ότι τα μικρότερα Fab τμήματα του τροποποιημένου αντισώματος είχαν την ικανότητα να διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα τουλάχιστον εξίσου αποτελεσματικά όπως το ακέραιο mAb 3E10. Πιο συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι τα Fab-τμήματα μπορούσαν να μεταφέρουν σύμπλοκα του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση με αντισώματα στον πυρήνα ζώντων κυττάρων. Το scFv (single chain fragment) τμήμα του mAb 3E10 διεισδύει σε ζώντα κύτταρα εξίσου αποτελεσματικά όπως ολόκληρο το mAb 3E10, ενώ εμφανίζει επιπλέον την ικανότητα να διεισδύει εύκολα στον πυρήνα αυτών των κυττάρων. Το σύμπλοκο scFv-GFP (green fluorescent protein), που προκύπτει μετά από σύντηξη του scFv με την πρωτεΐνη GFP, βρέθηκε να εισέρχεται στα κύτταρα και εντοπίζεται στον πυρήνα αυτών. Μετά την ταυτοποίηση του τμήματος scFv και την επιβεβαίωση της απουσίας κυτταροτοξικότητας, πολλές μελέτες χρησιμοποίησαν τέτοια τμήματα για τη μεταφορά θεραπευτικών πεπτιδίων και πρωτεϊνών μέσα στα κύτταρα. Επίσης, το ακέραιο mAb 3E10 μετέφερε σε πρωτογενείς νευρώνες του φλοιού το ενζύμο της καταλάσης, με αποτέλεσμα την προστασία των νευρώνων από τον επαγόμενο, με υπεροξειδίο, κυτταρικό θάνατο. Αυτή η εφαρμογή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, όπως στην παθοφυσιολογία νευροεκφυλιστικών νόσων (πχ. νόσος Alzheimer) (Εικόνα 22.)



Εικόνα 22: Το σύμπλοκο mAb 3E10-καταλάση προστατεύει τους πρωτοπαγείς νευρώνες του φλοιού από τις επαγόμενες με υπεροξειδίο (H_2O_2) βλάβες. Νευρώνες μετά από επώαση με 1) θρεπτικό υλικό 2) καταλάση, παρουσία H_2O_2 , 3) το mAb 3E10, παρουσία H_2O_2 , 4) σύζευγμα 3E10-καταλάσης, παρουσία H_2O_2 .

5.2.3. Μεταφορά γονιδίων

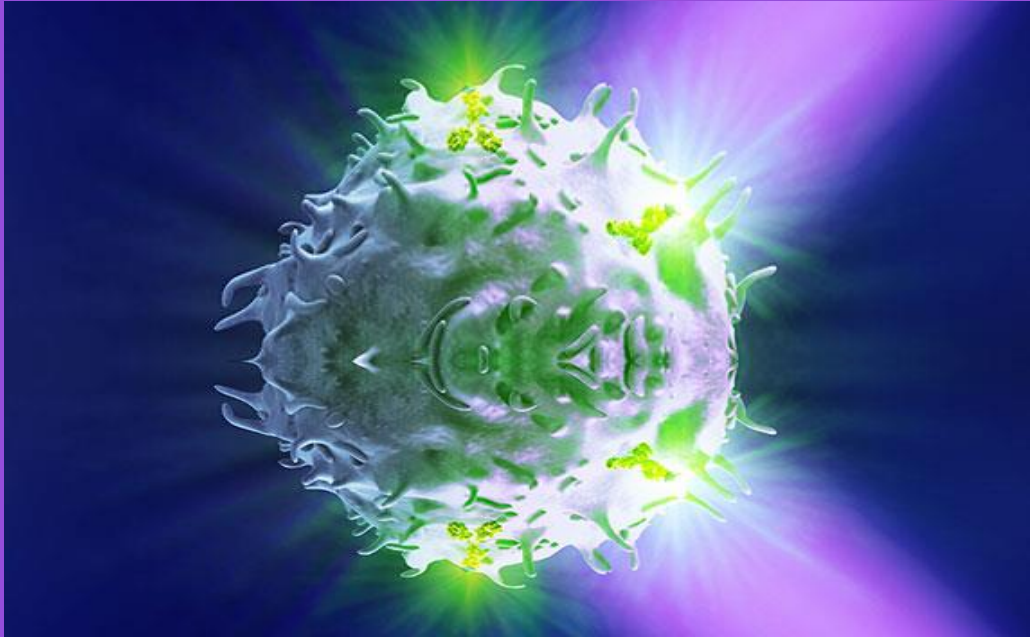
Η μεταφορά γονιδίου μπορεί να επιτευχθεί με μία σειρά μεθόδων αλλά αυτές που χρησιμοποιούν ιούς (π.χ. ρετροϊούς, αδενοϊούς, και αδενο-σχετιζόμενους ιούς), λιποσώματα, ή μοριακά συζεύγματα είναι οι πλέον μελετημένες. Όλα τα συστήματα έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που συνδέονται με την αποτελεσματικότητα, την ειδικότητα για κύτταρα-στόχους, την ανοσογονικότητα, την τοξικότητα, και τα θέματα ασφαλείας [218]. Σε ότι αφορά τη μεταφορά γονιδίων σε ζώντα κύτταρα με τη χρήση CPAbs, αρχικά δείχθηκε ότι δύο mAbs αντι-dsDNA, το F4.1 και το J20.8, που προέρχονταν από (NZBxNZW) F_1 ποντικούς, όταν συνδέονται με κατάλοιπα λυσίνης μπορούν να μεταφέρουν γονίδια. Ειδικότερα, στην ίδια μελέτη ένα πεπτίδιο 30 αμινοξέων που αντιστοιχεί στις συνδεδεμένες CDR2 και CDR3 περιοχές του αντισώματος F4.1 και το οποίο φέρει 19 κατάλοιπα λυσίνης στο αμινοτελικό του άκρο μπορεί να αποτελέσει έναν ικανό φορέα του γονιδίου της λουσιφεράσης (luciferase) σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η προσθήκη των καταλοίπων λυσίνης σε ένα διεισδυτικό πεπτίδιο μπορεί να το μετατρέψει σε πεπτίδιο φορέα [166, 226]. Ένα άλλο παράδειγμα επιτυχημένης *in vitro* μεταφοράς γονιδίων είναι το mAb G250, που αναγνωρίζει ένα ογκοσχετιζόμενο αντιγόνο TAA, το οποίο είναι παρόν στις περισσότερες νεφρικές ανθρώπινες καρκινικές σειρές. Σύζευξη του mAb G250 με ένα πλασμίδιο-cDNA που κωδικοποιεί την ιντερλευκίνη-2 είναι ικανό να διεισδύει σε κύτταρα ανθρώπινου καρκινώματος και να ενεργοποιεί την έκκριση της IL-2. Κύτταρα που εκτίθενται σε μη συζευγμένο πλασμιδιακό DNA και mAb G250, αποτυγχάνουν να παράγουν την κυτταροκίνη IL-2. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η κυτταρο-διείσδυση του mAb G250 θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση της μεταφοράς γονιδίων σε νεφρικά καρκινικά κύτταρα ως μια νέα προσέγγιση γονιδιακής θεραπείας του καρκίνου [227].

5.2.4. Μεταφορα ραδιοϊσότοπων

Η χρήση αντισωμάτων αντι-CEA (carcinoembryonic antigen) στην ανοσοθεραπεία έναντι του καρκίνου έχει οδηγήσει στη βιοτεχνολογία αρκετών οχημάτων μεταφοράς [228]. Ορισμένα CPAbs έχουν σημανθεί με ραδιο-ισότοπα για να χρησιμοποιηθούν σε κύτταροκατευθυνόμενες ακτινοθεραπείες. Ανάλυση της αποτελεσματικότητας κατά των όγκων ενός διεισδυτικού mAb, του CO17-1A συζευγμένο με ραδιοσημασμένο ¹²⁵I, έχει δείξει ότι τέτοια συζεύγματα εμφανίζουν μια υψηλή *in vivo* αντικαρκινική δραστηριότητα από ό,τι εκείνα που παρασκευάζονται από αντι-CEA μη διεισδυτικά αντισώματα. Η επιλεκτική μεταφορά των εν λόγω ραδιοϊσοτόπων από διεισδυτικά αντισώματα αντι-CEA σε καρκινικά κύτταρα, και όχι σε αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση [229]. Επίσης, η ανασυνδυασμένη μονή αλυσίδα αντισώματος αντι-CEA χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία σε χειρουργική ραδιοανοσοκατευθυνόμενη επέμβαση. Το ραδιοσημασμένο αντίσωμα (¹²⁵I-MFE-23-his) χορηγήθηκε ενδοφλέβια σε ασθενείς με καρκίνο πριν υποβληθούν σε χειρουργική επέμβαση, και ένας ανιχνευτής γ-ακτινοβολίας χειρός χρησιμοποιήθηκε για να εντοπίσει τα όρια του όγκου στο χειρουργικό πεδίο. Η ταχεία κάθαρση του αίματος και η καλή διείσδυση στον όγκο της μονης αλυσίδας του αντισώματος προσέφεραν πλεονεκτήματα για αυτή την εφαρμογή. Επιπροσθέτως, το σύντομο διάστημα που μεσολάβησε μεταξύ της χορήγησης και της εγχείρησης, η απουσία σημαντικών παρενεργειών και η σχετικά απλή παραγωγή του αντισώματος κάνουν το ραδιοσημασμένο MFE-23-his κατάλληλο για τέτοιου είδους διαδικασία [230]. Επίσης άλλη προσέγγιση αφορά τη σύζευξη ενός υδροφιλικού παράγωγου της πορφυρίνης, (Hydrophilic sensitizer, TrisMPyP-Ph₃CO₂H) σε διεισδυτικά mAbs, το U36 και το 425, όπου αποδείχθηκαν αποτελεσματικοί φωτο-τοξικοί παράγοντες *in vitro*, ενώ συζευγμα του ίδιου παραγώγου με μη διεισδυτικά mAbs δεν απέφερε κανένα αποτέλεσμα. *In vivo* μελέτες βιοκατανομής σε αθυμικούς ποντικούς με όγκο έδειξαν ότι τα παραπάνω συζεύγματα σε αναλογίες μορίων 1:1 έως 3:1 συγκεντρώνονταν επιλεκτικά στην περιοχή των όγκων [231].

Τέλος, πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για τη διευκόλυνση της ταχείας ταυτοποίησης και επιλογής μονοκλωνικών ή ογκοειδικών αντισωμάτων από βιβλιοθήκες φάγων, τα οποία μπορούν να διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα και ως εκ τούτου να χρησιμεύσουν στη στόχευση ενδοκυττάρων αντιγόνων για θεραπευτικούς σκοπούς, υποδηλώνοντας ότι μια ευρεία και νέα ποικιλία εφαρμογών των CPAbs μπορούν να αναμένονται στο εγγύς μέλλον [232].

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΣΚΕΠΤΙΚΟ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΣ



ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΣΚΕΠΤΙΚΟ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΣ

Σε αυτοάνοσες καταστάσεις είναι γνωστή η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων τάξης IgG έναντι πυρηνικών συστατικών και κυρίως έναντι του DNA με ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα (cell-penetrating antibodies, CPAbs). Τα CPAbs ανιχνεύονται κυρίως στον ορό ασθενών με Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ) και ποντικών με σύνδρομο λύκου. Τα κύρια χαρακτηριστικά διείσδυσής τους είναι η ικανότητα να εισέρχονται σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών τύπων, να εντοπίζονται στον πυρήνα και να επιδρούν σε κυτταρικές λειτουργίες, σχετιζόμενα με την παθογένεια της νόσου. Ένα ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι τα CPAbs φέρουν συχνά κοινά χαρακτηριστικά με τα φυσικά αυτοαντισώματα (natural autoantibodies, NAbs), τα οποία ανευρίσκονται σε υγιείς οργανισμούς. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι η πολυδραστικότητα, δηλαδή η αναγνώριση δομικά διαφορετικών αντιγόνων, «εαυτών» και μη, και η κωδικοποίησή τους συχνά από γονίδια βλαστικής σειράς με λίγες ή καθόλου μεταλλάξεις. Παρά τις ομοιότητες, η ύπαρξη CPAbs σε φυσιολογικές καταστάσεις δεν είχε μέχρι σήμερα εξεταστεί.

Βασικός σκοπός της διατριβής ήταν η διερεύνηση της ύπαρξης φυσικών αυτοαντισωμάτων με ικανότητα κυτταρικής διείσδυσης σε υγιείς οργανισμούς, στον άνθρωπο (σε πολυκλωνικό επίπεδο) και στον ποντικό (σε μονοκλωνικό επίπεδο). Η μελέτη περιλάμβανε τον προσδιορισμό των ανοσολογικών ιδιοτήτων και του βιολογικού ρόλου των φυσικών CPAbs, ώστε να προσδιοριστούν τυχόν διαφορές με τα CPAbs των παθολογικών καταστάσεων. Οι επιμέρους στόχοι ήταν οι εξής:

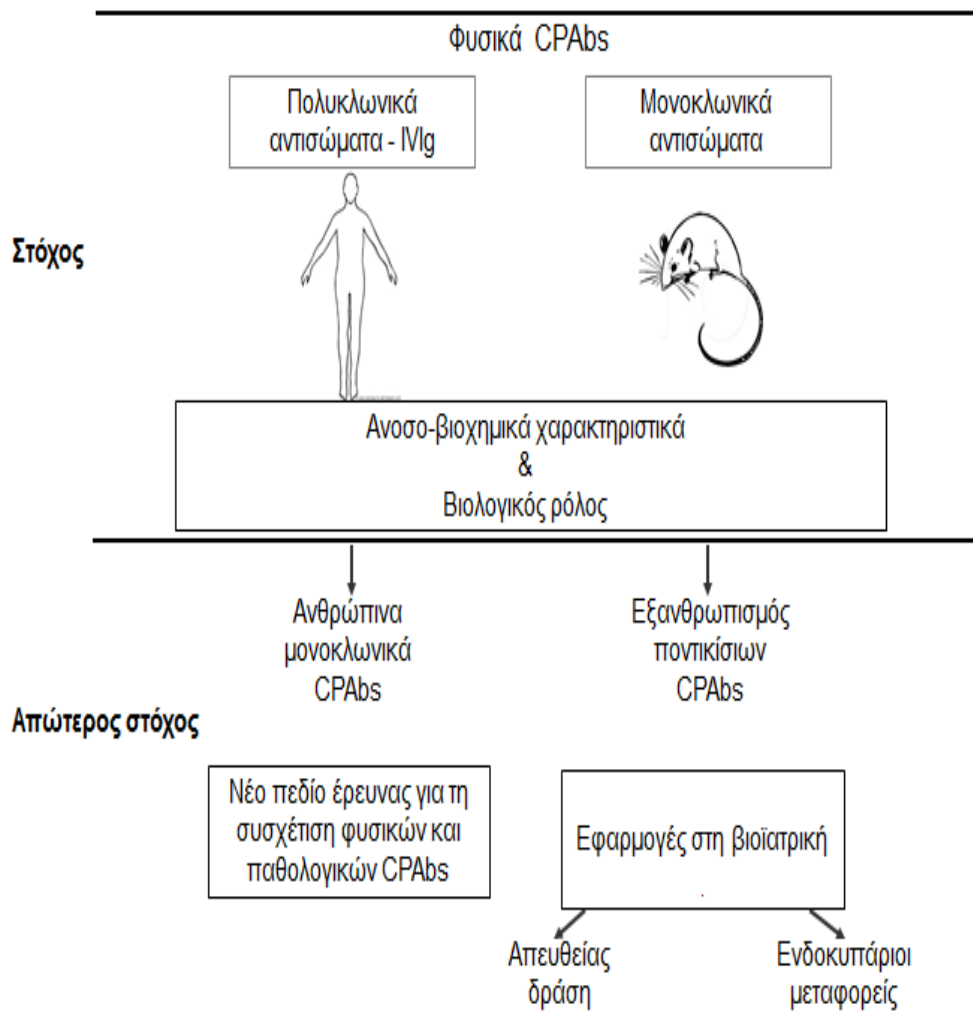
1) Στη μελέτη πολυκλωνικών φυσικών CPAbs στον υγιή άνθρωπο:

- η διερεύνηση της κυτταρο-δισδυτικής ικανότητας *in vitro* (σε ποικίλες κυτταρικές σειρές και *in vivo* πολυκλωνικού μείγματος IgG-NAbs από πολύ μεγάλο αριθμό υγιών δοτών (θεραπευτικό σκεύασμα ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης, IVIg).
- η απομόνωση, από αυτό το σκεύασμα, των υποπληθυσμών IgG που φέρουν την κυτταρο-δισδυτική ιδιότητα και ο προσδιορισμός των ανοσοχημικών χαρακτηριστικών τους
- η εξέταση της βιολογικής τους δράσης σε κυτταρικές λειτουργίες

2) Στη μελέτη μονοκλωνικών φυσικών CPAbs στον υγιή ποντικό:

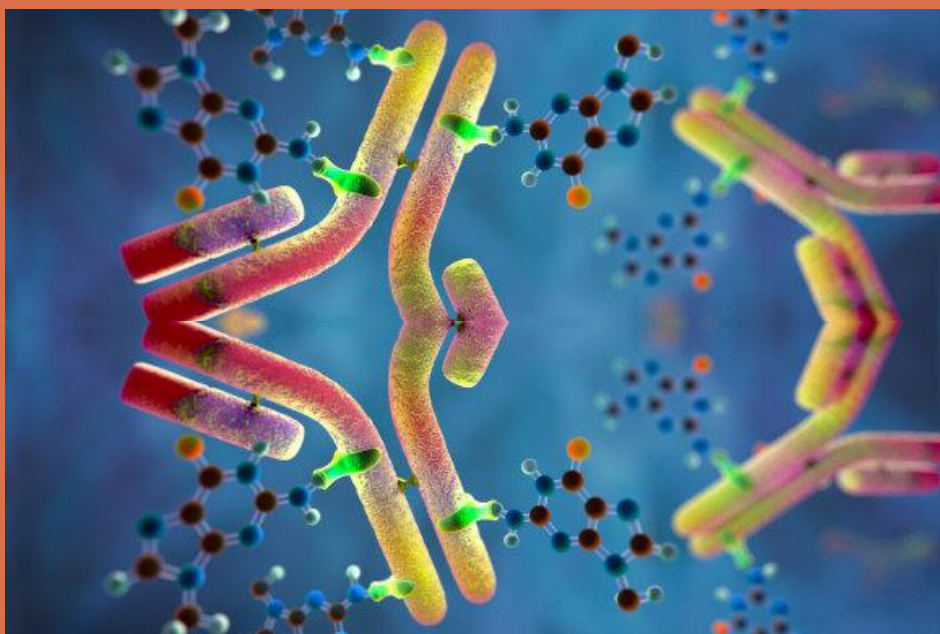
- η παραγωγή φυσικών μονοκλωνικών CPAbs, τάξης IgG, με την τεχνική των υβριδωμάτων
- ο προσδιορισμός των ανοσοχημικών χαρακτηριστικών τους και η διερεύνηση της κυτταρο-δισδυτικής ικανότητας *in vitro*
- η εξέταση της βιολογικής τους δράσης σε κυτταρικές λειτουργίες

Απώτερος στόχος της διατριβής ήταν η νέα γνώση που θα κατακτηθεί να ανοίξει ένα νέο πεδίο έρευνας σχετικά με την προέλευση και τη σημασία των CPAbs στις φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις και να θέσει τις βάσεις για μελλοντικές βιοϊατρικές εφαρμογές τους, τόσο ως νέων θεραπευτικών παραγόντων όσο και ως ενδοκυττάριων μεταφορέων δραστικών μορίων.



Εικόνα 1. Ο σκοπός της μελέτης σχηματικά.

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

I. ΥΛΙΚΑ

1. Αναλώσιμα

- Σωληνάρια τύπου falcon 50 και 15 ml (Greiner bio one, Switzerland)
- Σωληνάρια τύπου errendorf 1,5 ml (Sarstedt, France)
- Σωληνάρια για απομόνωση αντισωμάτων 5 ml (Sarstedt)
- Σωληνάρια κατάψυξης κυττάρων 1 ml (CryoTube Vials, Nunc)
- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας 75 και 25 ml (Nunc, Denmark)
- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 24 και 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα (Corning, USA)
- Πλαστικές πιπέτες των 10 ml, 5 ml και 2ml (Sarstedt, France).
- Πιπέτες Pasteur κλειστές (CEB, France)
- Τρυβλία Petri (BIBE, Ελλάδα)
- Καλυπτρίδες στρογγυλές Ø 13 mm (Γνοή)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες (VWR International, UK)
- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (Sigma, Germany)
- Πλάκες πολυστυρενίου μικροπιλοποίησης 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα για ELISA (Nunc)
- Στήλες χρωματογραφίας econocolumn Ø2,5 x 20 cm (Bio-Rad, USA)
- Φίλτρα 0,8 µm, 0,45 µm και 0,2 µm (Sarstedt) (Millipore, USA)
- Μembrάνη συμπύκνωσης PM 30 (Millipore)
- Μembrάνες για διαπίδυση - Dialysis tubing (Sigma)
- Σύριγγες πλαστικές 20 ml, 10 ml, 5 και 1ml (Γνοή, Ελλάδα)
- Σύριγγες Γυάλινες (Becton Dickinson & Co., USA).
- Βελόνες 0,90 x 25 mm, 20G x 1' (PiC indolor, Italy).
- Μεταλλική σήτα (60 µm και 200 µm άνοιγμα, Sigma).

2. Διαλύματα – Χημικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (KP) 1 M και 0,1M, pH 7,4:
Σε διάλυμα K_2HPO_4 1M προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος KH_2PO_4 1M έτσι ώστε το pH του τελικού διαλύματος να γίνει 7,4. Για διάλυμα 0,1 M προστίθενται 100 ml διαλύματος KP 1M και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L. Αναλυτικά, διάλυμα μονόξινου φωσφορικού καλίου (K_2HPO_4) 1M [228 gr $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ M.B. 228,23 g/mol (Merck) και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με απεσταγμένο νερό (dH_2O)] & Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) 1M [136 gr KH_2PO_4 M.B. 136,08 g/mol (Merck) και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με απεσταγμένο νερό]
- Διάλυμα γλουταραλδεΐδης:
Σε 10 ml γλουταραλδεΐδης 25% (Serva, Germany) προστίθενται 30 ml KP, χρησιμοποιείται για την ενεργοποίηση των σφαιριδίων ACA
- Διάλυμα γλυκίνης 0,1M:
Σε 7,51 gr γλυκίνης M.B. 75,1 g/mol (Serva) συμπληρώνεται απεσταγμένο νερό στο 1L
- Ρυθμιστικό διάλυμα υδροχλωρίου-γλυκίνης (HCl – Gly) 0,2N pH 2,8, ή pH 2,2:
Στα 100 ml διαλύματος HCl 2N προστίθεται διάλυμα γλυκίνης 2M μέχρι το pH να γίνει 2,8 ή 2,2 αντίστοιχα και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με απεσταγμένο νερό. Αναλυτικά, σε 17,54 ml HCl 37% (11N) (Merck) προστίθεται απεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml, ώστε να παραχθούν 100 ml διαλύματος HCl 2N. Παρασκευάζεται

- διάλυμα γλυκίνης 2M [150,2 gr γλυκίνης (Serva) και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με απεσταγμένο νερό].
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών παρουσία χλωριούχου νατρίου [Phosphate Buffered Saline (PBS)]:
Σε 9 gr χλωριούχου νατρίου (NaCl) M.B. 58,4 g/mol (Merck) προστίθενται 10 ml ρυθμιστικό διάλυμα KP 1M, pH 7,4 και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με απεσταγμένο νερό
 - PBS – Tween 0,1%:
Σε 1 L PBS προστίθεται 1 ml Tween 20 (Merck)
 - Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl παρουσία χλωριούχου νατρίου [Tris Buffered Saline (TBS)]:
Σε 9 gr NaCl (Merck) προστίθενται 3 gr Tris M.B. 121,1 g/mol (Merck). Η ρύθμιση του pH στο 7,4 γίνεται με προσθήκη διαλύματος HCl 25% (Merck) και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με απεσταγμένο νερό
 - TBS – Tween 0,1%:
Σε 1 L TBS προστίθεται 1 ml Tween 20 (Merck)
 - Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού-διπτανθρακικού νατρίου [Carbonate BiCarbonate (CBC)] 1M, pH 9,6:
Σε 35 gr ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) (Merck, Germany) προστίθενται 56 gr όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3) (Merck) και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το 1 L με απεσταγμένο νερό. Για χρήση αραιώνεται 10 φορές με απεσταγμένο νερό
 - Υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης:
Σε 20 mg π-νιτροφαινόλη (PNPP) (Sigma) προστίθενται 20 ml διαλύματος αλκαλικής φωσφατάσης, 0,1 M διάλυμα γλυκίνης – καυστικού νατρίου (NaOH) pH 10,4, 1 mM MgCl_2 (Merck) και 1 mM ZnCl_2 (Merck)
 - Διάλυμα SDS/Tris-HCl 1,5M pH 8,8:
Σε 182 gr/L Tris (Merck) προστίθενται 40 ml SDS 10% και η ρύθμιση του pH στο 8,8 με HCl 25%
 - Διάλυμα SDS/Tris-HCl 0,5M pH 6,8:
Σε 60,6 gr/L Tris (Merck) προστίθενται 40 ml SDS 10% (Sigma) και η ρύθμιση του pH στο 6,8 με HCl 25%
 - Ακρυλαμίδη-δισακρυλαμίδη (Acr/Bis):
Σε 300 gr ακρυλαμίδη προστίθενται 8 gr δισακρυλαμίδη και 1 L απεσταγμένο νερό
 - Πήκτωμα διαχωρισμού (Seperating gel) 10%:
Σε 1,7 ml dH_2O προστίθενται 1,25 ml Tris pH 8,8, 2 ml Acr/Bis, 50 μl AP, 5 μl TEMED
 - Πήκτωμα επιστοίβαξης (Stacking gel) 3%:
Σε 1,55 ml dH_2O προστίθενται 0,625 ml Tris pH 6,8, 0,3 ml Acr/Bis, 30 μl AP, 5 μl TEMED
 - Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) (4x):
Σε 12 gr Tris (Merck) προστίθενται 56 gr γλυκίνη (Serva), 4 gr SDS (Sigma) και συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό στο 1 L, ενώ το pH ρυθμίζεται στο 8,3
 - Διάλυμα πρωτεϊνών για ηλεκτροφόρηση (Sample Buffer):
Σε 0.0625M Tris-HCl pH 6,8 προστίθενται 10% SDS (Sigma), 30% γλυκερόλη (Serva), 25% β-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma) μόνο για τις αναγωγικές συνθήκες, 0,01% μπλε της βρωμοφαινόλης (Sigma) και συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 10 ml

- Διάλυμα χρώσης για ηλεκτροφόρηση (Stain solution):
Σε 225 ml αιθανόλη (Sigma) προστίθενται 1,25 gr Coomassie Blue (Sigma), 45 ml οξικό οξύ (VWR International, UK) και 230 ml απεσταγμένο νερό
- Διάλυμα αποχρωματισμού για ηλεκτροφόρηση (Destain solution):
Σε 10% οξικό οξύ (VWR International) προστίθενται 20% αιθανόλη (Sigma Aldrich) και 70% απεσταγμένο νερό
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 10x για πήκτωμα αναρόζης:
Για την παρασκευή ενός λίτρου διαλύματος TBE 10x αναμειγνύονται σε 800 ml ddH₂O 108 g Tris Base, 55g Boric acid και 7.44g EDTA. Το pH προσαρμόζεται στο 8,3 με HCl και συμπληρώνεται ογκομετρείται ddH₂O στο 1 L
- Θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Minimal essential medium):
Σε 50 ml DMEM (10X) (Biochrom, Germany) προστίθενται 420 ml H₂O (απεσταγμένο, αποστειρωμένο), 5 ml L-glutamine 2 mM (Gibco, UK), 5 ml ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 1M (Biochrom), 18 ml Sodium Bicarbonate 7,5% (Gibco), 5 ml Sodium pyruvate 100 mM (Gibco), 5x10⁵ IU Πενικιλίνη (Κόπερ Α.Ε., Ελλάδα), 5x10⁵ IU Στρεπτομυκίνη (Κόπερ Α.Ε.), 5x10⁻⁵M 2-μερκαπτοαιθανόλη (2-ME) (Sigma, USA) και 500 μl μη απαραίτητα αμινοξέα. Για την καλλιέργεια κύτταρων το θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτίζεται με 10% του συνολικού όγκου FBS
- Διάλυμα κατάψυξης κυττάρων στους -80°C:
Σε FBS προστίθεται DMSO 10% του συνολικού όγκου
- Παραφορμαλδεΐδη 2% (PFA) (Sigma):
Για την παρασκευή διαλύματος 4% w/v PFA: σε 8 gr PFA (αποθήκευση στους 4°C) προστίθενται 200 ml PBS. Ακολουθεί ανάμειξη σε θερμαινόμενο αναδευτήρα, στους 65°C, μέχρι να θολώσει το διάλυμα και προσθήκη λίγων σταγόνων NaOH 10N ώσπου να γίνει διαυγές. Μόλις έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, φιλτράρεται σε διηθητικό χαρτί Whatman και αποθηκεύεται στους -20°C. Πριν τη χρήση το διάλυμα αραιώνεται με ίσο όγκο PBS
- Διάλυμα διαπερατοποίησης κυττάρων και κορεσμού (Permeabilization Blocking Buffer):
Για πρόκληση διαπερατότητας σε κυτταρόπλασμα και πυρήνα μονιμοποιημένων κυττάρων. Σε διάλυμα BSA 1 mg/ml σε Triton X-100 0,1% v/v, φιλτράρεται πριν χρησιμοποιηθεί
- Mowiol 4-88 Reagent (Calbiochem):
Παχύρρεστο διάλυμα για τοποθέτηση καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Παρασκευάζεται ως εξής: σε 6 gr γλυκερόλη προστίθενται 2,4 gr Mowiol και 6 ml dH₂O. Αφήνεται σε ολονύκτια ανάδευση, ακολουθεί προσθήκη 10 ml διαλύματος Tris-HCl 0,2 M pH 8,5, θέρμανση του μείγματος στους 50°C, με συχνή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί και φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 15 λεπτά, αποθήκευση στους -20°C
- Διάλυμα φωσφορικών NaP 0,1M pH 8:
Στο διάλυμα Na₂HPO₄ 0.1M προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος NaH₂PO₄ 0.1M έτσι ώστε το pH του τελικού διαλύματος να γίνει 8. Αναλυτικά, Διάλυμα μονόξινου φωσφορικού νατρίου (Na₂HPO₄) 0.1M [14,196 gr Na₂HPO₄ M.B. 141,96 g/mol και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με απεσταγμένο νερό (* χρειάζεται θέρμανση για να διαλυθεί γιατί είναι άλυτο).] Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού νατρίου (NaH₂PO₄) 0.1M [13,8 gr NaH₂PO₄ H₂O M.B. 137,99 g/mol και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με απεσταγμένο νερό]
- Διάλυμα οξικού οξέος 0,1N pH 3 με 0.15M NaCl:

Σε διάλυμα οξικού οξέος 1N [σε 5,3ml CH₃COOH 100% (18,9N) προστίθεται απεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml, ώστε να παραχθούν 100 ml διαλύματος οξικό οξύ 1 N] προστίθεται 8.76 gr NaCl M.B. 58,4 g/mol και ο όγκος συμπληρώνεται στο 900ml με απεσταγμένο νερό. Αναμιγνύω τα 900ml NaCl και τα 100ml CH₃COOH και το pH βγαίνει 3

- Διάλυμα κιτρικών 0,1M pH 6 ή pH 4.5:
Σε διάλυμα κιτρικού οξέος 1M stock [σε 210,14gr C₆H₈O₇ H₂O M.B. 210.14 g/mol και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με απεσταγμένο νερό] προστίθεται 29.41 gr κιτρικό νάτριο C₆H₅Na₃O₇ 2H₂O M.B. 294.10 g/mol. Ο όγκος συμπληρώνεται στο 800ml με απεσταγμένο νερό και ρύθμιση pH 6 ή pH 4.5 με διάλυμα κιτρικού οξέος 1M. Ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με απεσταγμένο νερό
- Θειικό οξύ H₂SO₄ 2N:
Σε 56ml H₂SO₄ 95% (35.6N) προστίθεται απεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1L
- Διάλυμα MgCl₂ 5M pH 7:
Αναμιγνύω τη σκόνη του MgCl₂ στο διάλυμα 0.05M Tris μέχρι τελικό όγκο 100ml και το pH βγαίνει 7. Σε διάλυμα 0.05M Tris [0.605 gr ή 605.5 mg Tris M.B. 121,1 g/mol ο όγκος συμπληρώνεται στα 100ml με απεσταγμένο νερό] προσθέτω 101,65 gr MgCl₂ MB 203,3 g/mol
- 1,5 M Tris-HCl pH 8,8:
Σε 90.85 gr Tris M.B. 121,14 g/mol 400ml απεσταγμένο νερό και ρύθμιση pH 8.8 με διάλυμα HCL 37 %. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 500ml με απεσταγμένο νερό
- 0,5 M Tris-HCl pH 6,8:
Σε 30.28 gr Tris M.B. 121,14 g/mol προστίθενται 400ml απεσταγμένο νερό. Η ρύθμιση pH 6.8 με διάλυμα HCL 37 % και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500ml με απεσταγμένο νερό
- Διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων (ACK):
Σε 8.02 gr NH₄Cl M.B.53.49 (0.15M) προστίθενται 1 gr KHCO₃ M.B. 100,1 (10mM), 0.037 gr EDTA M.B.372,2 (0.1mM) και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1L με απεσταγμένο νερό και ελέγχεται το pH να είναι ~7.2-7.4. Φιλτράρισμα με 0.2μm φίλτρο και διατήρηση στους 4oC
- Βακτηριοστατικό αζίδιο [Azide (NaN₃)] 2% w/v (Merck)
- Διάλυμα βόιας αλβουμίνης [Bovine Serum Albumin (BSA)] (Sigma):
1% w/v σε PBS για τον κορεσμό των μη ειδικών θέσεων (blocking buffer) στο πολυστυρένιο στην πλάκα για ELISA και 0,1% w/v σε PBS για την δέσμευση των μη ειδικών θέσεων (blocking buffer) στη δοκιμασία ανοσοφθορισμού
- Διάλυμα ζελατίνης (Merck):
Διάλυμα 0,5% w/v σε TBS για τον κορεσμό των μη ειδικών θέσεων (blocking buffer) στην πλάκα για ELISA
- Υπόστρωμα υπεροξειδάσης (TMB, Seramun, Germany)
- Διάλυμα Δωδεκυλοθειϊκού νατρίου [Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)] 10% (Sigma)
- TEMED (N,N,N,N-Tetramethyl-ethylenediamine) (Sigma)
- Υπερθειϊκό αμμώνιο [Ammonium Persulfate (AP) ((NH₄)₂S₂O₈):
Σε 0,05 gr AP (Sigma) προστίθεται 500 μl απεσταγμένο νερό
- Μάρτυρες μοριακών βαρών για ηλεκτροφόρηση (Markers Low Molecular Weight) (Pharmacia, Sweden)

- Ορός εμβρύου βοός [Fetal Bovine Serum (FBS), Gibco], θερμικά αδραντοποιημένος στους 56° C για 30 λεπτά
- DMSO [Dimethyl sulfoxide (C₂H₆OS)] (Serva)
- Trypan Blue Solution 0,4% (Fluka):
- Διάλυμα Θρυψίνης 0,5% (10x) με EDTA 4Na 0,2% (Gibco)
- Αντιδραστήριο Bradford (5x) (BioRad)
- Πλήρες ανοσοενισχυτικό έκδοχο του Freund [Complete Freund's Adjuvant (CFA), Sigma]
- Ατελές ανοσοενισχυτικό έκδοχο του Freund [Incomplete Freund's adjuvant (IFA), Sigma]
- Πρωτεΐνη A - Sepharose CL-4B (Pharmacia, USA):
Πρωτεΐνη A συνδεδεμένη με σφαιρίδια Sepharose για την πλήρωση της στήλης χρωματογραφίας
- Πρωτεΐνη G - Sepharose CL (Pharmacia, USA):
- Αιθανόλη 100% (Riedel-de Haen): Για τη μονιμοποίηση κυττάρων και πρόκληση διαπερατότητας σε κυτταρόπλασμα και πυρήνα
- Πολυαιθυλενογλυκόλη [Polyethylene Glycol 1500 (PEG 1500)] 50%, w/v (Roche, USA):
Πολυαιθυλενογλυκόλη για την παραγωγή υβριδωμάτων
- Hydroxanthine Aminopterin Thymidine (HAT) (50x) (Gibco):
Μέσο επιλογής υβριδωμάτων που προέκυψαν από σύντηξη μυελωματικών κυττάρων με σωματικά
- Hydroxanthine Thymidine (HT) (50x) (Gibco):
Μέσο αναίρεσης του μέσου HAT στην καλλιέργεια των υβριδωμάτων.
- Θρεπτικό συμπλήρωμα υβριδωμάτων [Hybridoma Fusion and Cloning Supplement (HFCS)] (50x) (Roche):
Ενισχυτικό παραγωγής και ανάπτυξης υβριδωμάτων
- Σφαιρίδια Ultrogel ACA 34 (IBF Biotechnics, USA)
- Triton X-100 (Fluka):
Μη ιοντικό απορρυπαντικό σε αναλογία 0,1% v/v σε PBS

3. Αντιγόνα και χρήση τους

- Αντιγόνα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή ανοσοπροσροφητών:
 - ολική ιστόνη (from calf thymus) (Sigma)
 - DNA (native DNA from calf thymus) (Sigma)
 - ηπαρίνη; ανοσοπροσροφητής σεφαρόζης με ακινητοποιημένη ηπαρίνη (Heparin-Sepharose) (GE Healthcare)
- Αντιγόνο που χρησιμοποιήθηκε στην ανοσοποίηση:
 - Για την ανοσοποίηση χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το μόριο της ανθρώπινης θυρεοσφαιρίνης (h-Tg), το οποίο απομονώθηκε από αδένες δοτών με καρκίνο, έχοντας πρώτα απομακρυνθεί το παθολογικό μέρος (16-23 μόρια ιωδίου ανά μονομερές Tg)
- Αντιγόνα που χρησιμοποιήθηκαν στην ELISA για τον έλεγχο ειδικότητας της IVIg και των απομονωμένων υποπληθυσμών:
 - ολική ιστόνη (from calf thymus)
 - DNA (native DNA from calf thymus)
 - ανθρώπινη θυρεοσφαιρίνη (παρασκευάστηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας)

- ακτίνη F βοός (Sigma)
- τουμπουλίνη βοός (Sigma)
- καρβονική ανυδράση (Sigma)
- ηπαρίνη (Sodium Salt, Porcine Intestinal Mucosa) (Merck)
- τρινιτροφαινόλη σε φορέα αλβουμίνης (TNP-BSA)
- IVIg θραύσμα F(ab)₂ (παρασκευάστηκε με χρήση πεψίνης στο εργαστήριο Ανοσολογίας)
- καρβονική ανυδράση από βόια ερυθροκύτταρα (Sigma)

4. Ανθρώπινο βιολογικό υλικό μελέτης

- Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:
- Τρία εμπορικά παρασκευάσματα IVIg:

Εμπορική ονομασία	Εταιρεία	Περιεκτικότητα σε IgG	Αριθμό δοτών
Intraglobin F	Biotest	95 %	≥50.000
Sandoglobulin	Sandoz	96%	≥60.000
Kiovig	Baxter	98%	≥100.000

- Οροί από πέντε υγιείς δότες ηλικίας 27-40 και τεσσάρων ασθενών με ΣΕΛ, που ήταν θετικοί σε κλινικό εργαστηριακό έλεγχο για ANA και RIA.

5. Αντισώματα και συζεύγματα

- Στην ELISA χρησιμοποιήθηκαν:
- Αντισώματα προβάτου που αναπτύχθηκαν έναντι ανοσοσφαιρινών ανθρώπου τάξης IgG, συζευγμένα με το ένζυμο υπεροξειδάση (anti-human IgG- HRP conjugated, developed in sheep, AH P003P, Serotec, UK).
- Αντισώματα κατσίκας που αναπτύχθηκαν έναντι ανοσοσφαιρινών ανθρώπου τάξης IgG, συζευγμένα με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση [anti-human IgG (γ-chain specific) - AP conjugated, developed in goat, A-3188, Sigma]
- Στην ELISA χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα κατσίκας που αναπτύχθηκαν έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού τάξης IgG, συζευγμένα με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (anti-mouse IgG-AP conjugated, developed in goat, A-3688, Sigma, USA).
- Στα πειράματα ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν:
- Αντίσωμα κατσίκας έναντι IgG (H+L) ανθρώπου συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική ALEXA fluor 488 2 mg/ml (Invitrogen).
- Αντίσωμα κατσίκας έναντι IgG (H+L) ποντικού συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική ALEXA fluor 488 2 mg/ml (Invitrogen).
- TO-PRO-3 iodide (642/661) (Invitrogen) – 1mM διάλυμα σε DMSO, φθορίζουσα χρωστική που εισέρχεται σε πυρήνες μονιμοποιημένων κυττάρων, προσδένεται στο DNA και απορροφά ακτινοβολία στα 642 nm ενώ εκπέμπει στα 661 nm δίνοντας μπλε φθορισμό.

6. Κυτταρικές σειρές και πειραματόζωα

- Μυελωματικές σειρές: κύτταρα NSO και SP2/O Ag14
- Για την υβριδοποίηση χρησιμοποιήθηκε η μυελωματική σειρά B λεμφοκυττάρων ποντικού NSO και SP2/O Ag14 [Hypoxanthine Guanine Phospho Ribosyl Transferase

(HGPR^T), Antibodies (Ab⁻)], ώστε να αποκλείεται τόσο η παραγωγή αντισωμάτων από τα κύτταρα αυτά, όσο και ο πολλαπλασιασμός των μη συντηγμένων μυελωματικών Β-κυττάρων παρουσία του ειδικού θρεπτικού μέσου HAT.

- Προσκολλητικές κυτταρικές σειρές
 - HeLa: Καρκινική σειρά ανθρώπου, που προέρχεται από επιθηλιακό ιστό του τραχήλου της μήτρας.
 - NIH-3T3: Μη καρκινική σειρά ποντικού, που προέρχεται από πρόδρομα κύτταρα του αρχέγονου σπληνικού ιστού - αθανατοποιημένοι ινοβλάστες.
 - Πρωτογενείς ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες από υγιείς δότες
 - N2a: κύτταρα από νευροϊνοβλάστωμα ποντικού
 - Vero: επιθηλιακά κύτταρα νεφρού από πίθηκο
 - HepG2: επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπου με ηπατικό καρκίνωμα.
- Πειραματόζωα
 - Για την ανοσοποίηση με hTg και τις ενδοφλέβιες χορηγήσεις με IVIg χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια BALB/c, ηλικίας 9 εβδομάδων, από το ζωοτροφείο του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.
 - Για την παραγωγή ασκίτη χρησιμοποιήθηκαν ποντικοί ανοσοκατεσταλμένοι SCID (NOD.CB17-Prkdcscid/J)

7. Συσκευές – Όργανα

- Συσκευή συμπύκνωσης 50 ml (Amicon)
- Φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους (LKB Biochrom Ultrospec II, UK)
- Φασματοφωτόμετρο πλακών ELISA (Dynatech Laboratories MRX, UK)
- Φυγόκεντρος (4K10 Sigma, USA)
- Φυγόκεντρος για eppendorf (202 MK Sigma, USA)
- Συσκευή μέτρησης του pH (Thermo Electron Corporation, USA)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad)
- Thermoblock (Bioblock Scientific)
- Υδατόλουτρο (Julabo, Germany)
- Κλίβανος κυττάρων (Thermo Electron Corporation)
- Θάλαμος νηματικής ροής (Thermo Electron Corporation)
- Φωτονικό μικροσκόπιο (Zeiss)
- Ανάστροφο μικροσκόπιο (Bausch & Lomb, Germany)
- Συνεστιακό μικροσκόπιο (TCS-SP Leica, Germany) εφοδιασμένο με Argon Laser και Helium-Neon Laser, καλύπτοντας έτσι μήκη κύματος από 450-650 nm
- Στήλη χρωματογραφίας Econo-column 2,5 x 20 cm (Bio-Rad, USA)
- Φασματοφωτόμετρο πλακών ELISA (Dynatech Laboratories MRX, UK)
- Κυτταρομετρητή ροής FACSCalibur εξοπλισμένο με Argon laser 488 nm και κόκκινο laser 635 nm.
- Κρουστόμος (Leica CM1900) & Μικροτόμος (Leica RM2135)
- Μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου OLYMPUS Time lapse Cell R IX-81 εξοπλισμένο με λάμπα αλογόνου 100W και λάμπα φθορισμού Xenon

II. ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Κυτταροκαλλιέργεια

• Ανακαλλιέργεια κυττάρων με χρήση θρυψίνης

Για τη συντήρηση της κυτταροκαλλιέργειας, όταν τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και καταλαμβάνουν πλήρως την επιφάνεια της φλάσκας κυτταροκαλλιέργειας, γίνεται ανακαλλιέργεια με χρήση διαλύματος θρυψίνης, το οποίο είναι ένα ένζυμο που προκαλεί αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της πλάκας κυτταροκαλλιέργειας.

- Απομάκρυνση του υπάρχοντος θρεπτικού υλικού
- 2 πλύσεις με PBS για απομάκρυνση των υπολειμμάτων ορού
- Αφαίρεση PBS και προσθήκη 1 ή 0,5 ml διαλύματος θρυψίνης
- Επώαση για περίπου 1-3 λεπτά στους 37°C και αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα με ελαφρά χτυπήματα
- Προσθήκη τετραπλάσιου όγκου πλήρους θρεπτικού υλικού (εμπλουτισμένου με 10% FBS, που απενεργοποιεί τη θρυψίνη)
- Αναδεύσεις του διαλύματος με πιπέτα μιας χρήσεως, ώστε να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα κυττάρων
- Μεταφορά του επιθυμητού ποσοστού κυττάρων σε νέες φλάσκες (ή πάγωμα και αποθήκευσή τους)
- Προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού στην κάθε φλάσκα
- Επώαση των κυττάρων στους 37°C, όπου προσκολλώνται ξανά στο υπόστρωμα

• Αποθήκευση κυτταρικών σειρών

- Φυγοκέντρηση κυτταρικού εναιωρήματος στις 1000 rpm για 5 λεπτά
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναιώρηση ιζήματος σε διάλυμα αποθήκευσης, σε τελική συγκέντρωση 10^6 κύτταρα/ml
- Μεταφορά από 1 ml σε ειδικά σωληνάρια κατάψυξης και αποθήκευση σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) για λίγες εβδομάδες κι έπειτα σε υγρό άζωτο (-170°C), όπου διατηρούνται για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα. Το διάλυμα αποθήκευσης είναι τοξικό για τα κύτταρα, γι' αυτό τα σωληνάρια πρέπει να ψύχονται αμέσως μετά την προσθήκη του στο κυτταρικό ίζημα

➤ Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

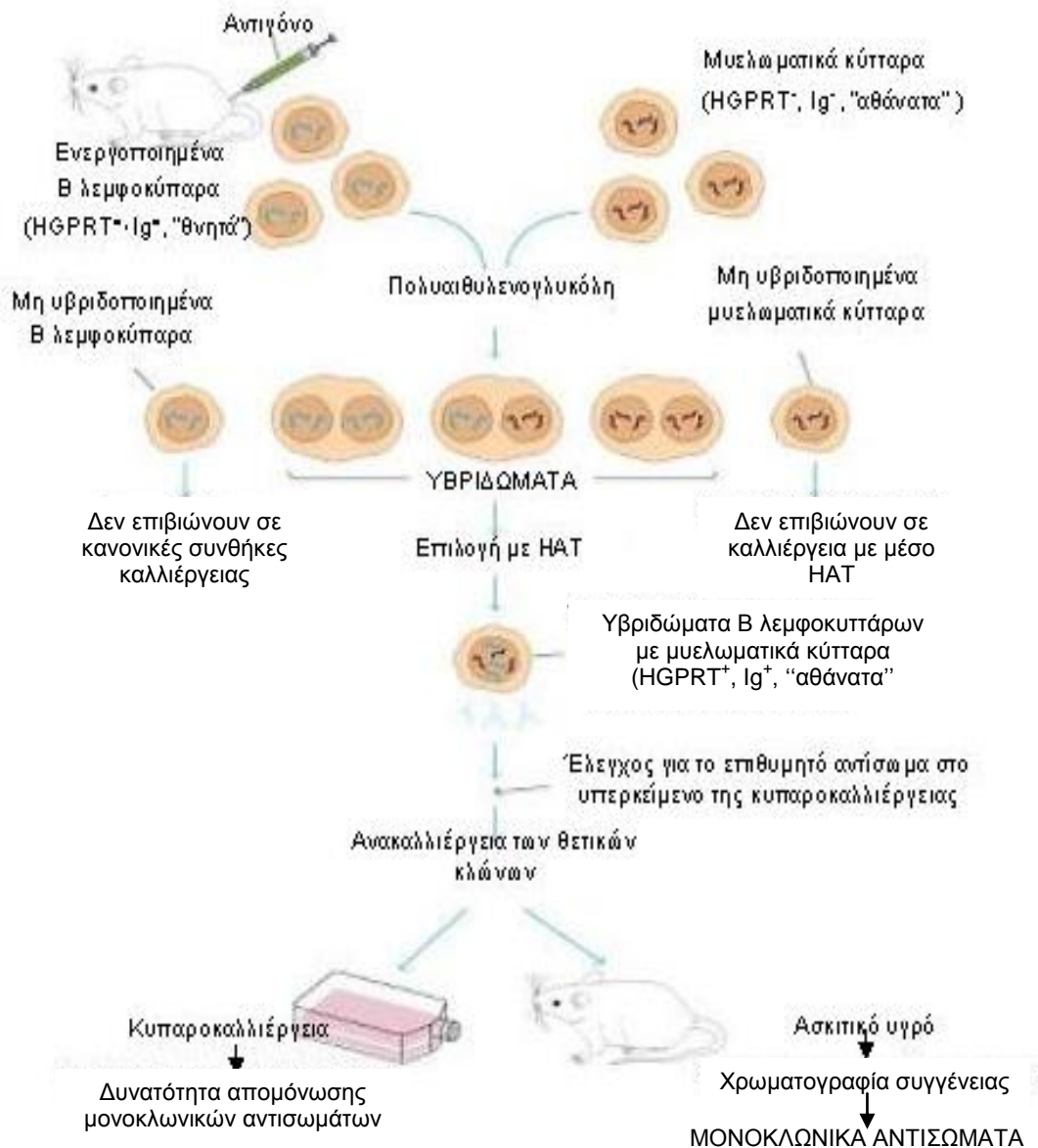
Ο αριθμός κυττάρων που απαιτείται σε κάθε περίπτωση υπολογίζεται σε Neubauer με τη βοήθεια της χρωστικής Trypan Blue, η οποία βάφει τα νεκρά κύτταρα. Η αναλογία του κυτταρικού διαλύματος ως προς τον τελικό όγκο διαλύματος μέτρησης είναι συνήθως 1:5, αλλά σε περίπτωση μικρής ποσότητας κυττάρων εφαρμόζεται και 1:2.

Ο τύπος υπολογισμού είναι ο εξής: $\text{Κύτταρα/ml} = \frac{N \times T \times A}{10^{-4} \times 25}$ όπου :

- N, ο αριθμός κυττάρων που μετρήθηκαν
- T, ο αριθμός τετραγώνων που μετρήθηκαν
- A, η αραιώση του δείγματος
- 10^{-4} , ο όγκος σε ml ενός τετραγώνου
- 25, ο συνολικός αριθμός τετραγώνων

2. Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων - Στάδια

Η διαδικασία περιλαμβάνει την ανοσοποίηση ποντικών, την απομόνωση των σπληνοκυττάρων και υβριδοποίηση με μυελωματική σειρά, τον υποκλωνισμό των υβριδωμάτων και τον μαζική παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων (Εικόνα 1.).



Εικόνα 1. Διαδικασία παραγωγής υβριδωμάτων και απομόνωση μονοκλωνικών αντισωμάτων.

2.1. Πρωτόκολλο ανοσοποίησης

- Πραγματοποιείται ενδοπεριτοναϊκή ανοσοποίηση με γαλάκτωμα που περιέχει το μόριο h-Tg (50 μg ανά ποντίκι αραιωμένο με PBS) και ίσο όγκο πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund (CFA, 50/50), σε τελικό όγκο χορήγησης 500 μl ανά ποντίκι.

- Το γαλάκτωμα παρασκευάζεται με παλινδρομικές κινήσεις μέχρι αυτό να αποκτήσει γαλακτώδη υφή.
- Μεταφορά του γαλακτώματος σε γυάλινη σύριγγα του 1cc και ενδοπεριτοναϊκή χορήγησή του στα τρία ποντίκια BALB/c.
- Μετά από δεκαπέντε μέρες ακολουθεί η δεύτερη ανοσοποίηση με την ίδια ακριβώς ποσότητα αντιγόνου, αλλά αυτή τη φορά έχει αναμιχθεί με ίσο όγκο ατελούς ανοσοενισχυτικού του Freund (IFA).
- Οχτώ ημέρες μετά, γίνεται αιμοληψία από την ουρά των ποντικών και ακολουθεί τιτλοποίηση των αντιορών με ELISA, για την πιστοποίηση υψηλού τίτλου αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου ανοσοποίησης h-Tg.
- Στα ποντίκια έγινε και τρίτη ανοσοποίηση (είκοσι ημέρες μετά την δεύτερη ανοσοποίηση) για να επαναληφθεί η διαδικασία της παραγωγής υβριδωμάτων.
- Αναλυτικά η διαδικασία συνοψίζεται στον παρακάτω πίνακα

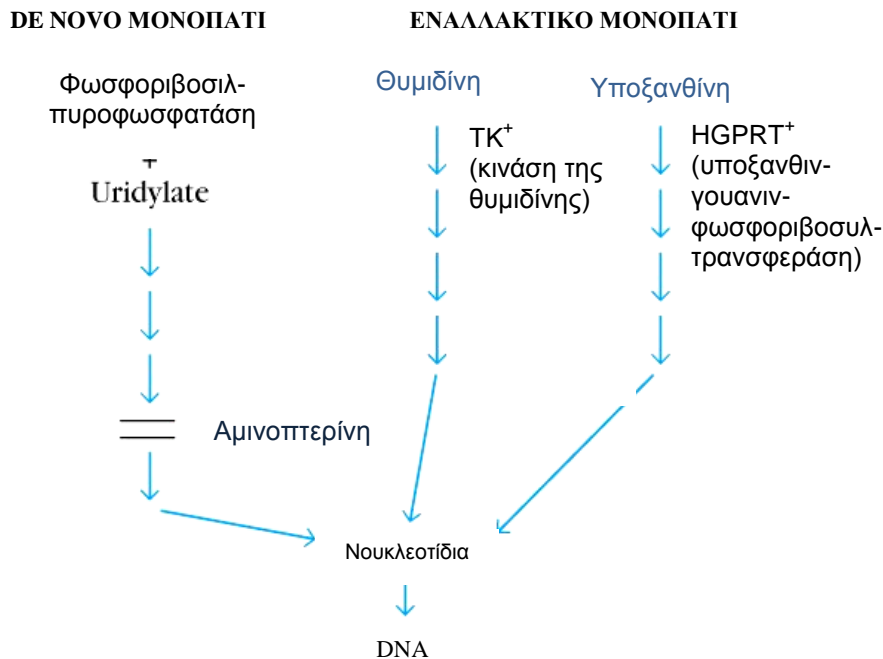
Ημέρα 0 ^η 21/4/08	1 ^η Αιμοληψία από την βάση της ουράς 1 ^η Ανοσοποίηση παρουσία CFA
Ημέρα 11 ^η 2/5/08	2 ^η Αιμοληψία από την βάση της ουράς
Ημέρα 15 ^η 6/5/08	2 ^η Ανοσοποίηση παρουσία σε IFA
Ημέρα 25 ^η 16/5/08	3 ^η Αιμοληψία από την βάση της ουράς
Ημέρα 36 ^η 27/5/08	3 ^η Ανοσοποίηση παρουσία σε IFA
Ημέρα 46 ^η 6/6/08	4 ^η Αιμοληψία από την βάση της ουράς
Ημέρα 65 ^η 25/6/08	4 ^η Ανοσοποίηση παρουσία σε IFA
Ημέρα 74 ^η 4/7/08	5 ^η Αιμοληψία από την βάση της ουράς
Ημέρα 84 ^η 14/7/08	5 ^η Ανοσοποίηση παρουσία σε IFA
Ημέρα 87 ^η 17/7/08	Υβριδοποίηση

2.2. Παραγωγή υβριδωμάτων

Βασική αρχή:

Μετά την ανοσοποίηση του πειραματόζωου απομονώνονται τα ενεργοποιημένα σπληνικά κύτταρα. Η σύντηξη των σπληνικών με τα μυελωματικά κύτταρα επιτυγχάνεται με την προσθήκη πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG), η οποία ρευστοποιεί τις μεμβράνες, προάγοντας τη σύντηξη. Με την τεχνική παραγωγής υβριδωμάτων και την προσθήκη PEG συντήκονται αυτά (HGPR^{T+}, Ab⁺) με επιλεγμένα μυελωματικά κύτταρα ποντικού της ίδιας φυλής (HGPR^{T-}, Ab⁻). Ακολουθεί επιλογή των υβριδωμάτων με θεραπευτικό μέσο HAT. Το μέσο επιλογής που περιέχει την αμινοπτερίνη και τις εξωγενείς βάσεις υποξανθίνη και θυμιδίνη (Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine, HAT) επιβιώνουν και αναπτύσσονται μόνο τα

υβριδώματα που έχουν προκύψει από τη σύντηξη των πατρικών κυττάρων και όχι τα ίδια τα πατρικά. Αυτό συμβαίνει γιατί οι μυελωματικές σειρές που χρησιμοποιούνται στην τεχνική δεν διαθέτουν δυο βασικά ένζυμα την υποξανθιν-γουανιν-φωσφοριβοσυλ-τρανσφεράσης (HGPRT⁻), της κινάσης της θυμιδίνης (TK⁻). που έχουν βασικό ρόλο στις παράπλευρες οδούς βιοσύνθεσης DNA. Η αμινοπτερίνη μπλοκάρει το βασικό μονοπάτι σύνθεσης DNA, οπότε όταν τα μυελωματικά κύτταρα αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αμινοπτερίνη (μια ισχυρή τοξίνη που αναστέλλει την κύρια οδό σύνθεσης πουρινών), δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν την κύρια οδό βιοσύνθεσης του DNA τους ούτε κάποια παράπλευρη, αφού δε διαθέτουν τα κατάλληλα ένζυμα (Εικόνα 2). Τα φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα διαθέτουν όλα τα απαραίτητα ένζυμα για τη βιοσύνθεση του DNA τους με την παράπλευρη οδό, εάν τους χορηγηθούν εξωγενώς οι βάσεις υποξανθίνη και θυμιδίνη, ενώ δεν διατηρούνται σε πρωτογενή καλλιέργεια για περισσότερες από οκτώ έως δέκα ημέρες. Υβριδώματα που τυχόν προκύψουν από περισσότερα από δύο πατρικά κύτταρα δεν καταφέρνουν να επιζήσουν για μεγάλο διάστημα λόγω γενετικών ανωμαλιών. Μόνο τα υβριδώματα που προκύπτουν από τη σύντηξη ενός σπληνικού και ενός μυελωματικού κυττάρου με την προσθήκη PEG μπορούν να επιβιώσουν και να πολλαπλασιάζονται *in vitro*.



Εικόνα 2. Κύρια και εναλλακτικά μονοπάτια βιοσύνθεσης του DNA

Διαδικασία:

Προετοιμασία των σπληνοκυττάρων

- Τρεις ημέρες μετά την τελευταία ανοσοποίηση το ανοσοποιημένο ποντίκι θανατώνεται.
- Απομονώνεται ασηπτικά ο σπλήνας (του ανοσοποιημένου ποντικού) και τοποθετείται σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό υλικό DMEM (χωρίς 2-ME), όπου και ομογενοποιείται με σήτα
- Το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 1000 στροφές.
- Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 ml DMEM (χωρίς 2-ME).

- Ο αριθμός των σπληνοκυττάρων μετρήθηκε σε Neubauer με την βοήθεια της χρωστικής Trypan Blue σε αραιώση 1:5.

Προετοιμασία των μυελωματικών κυττάρων

- Τα μυελωματικά κύτταρα NSO αποκολλώνται με έντονη ανάδευση, από τον πυθμένα φλασκών καλλιέργειας και στη συνέχεια τα φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 1500 στροφές.
- Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 ml DMEM (χωρίς 2-ME).
- Ο αριθμός των NSO μετρήθηκε σε Neubauer με χρωστική Trypan Blue σε αραιώση 1:5.

Σύντηξη σπληνοκυττάρων με μυελωματικά κύτταρα

➤ Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας προέλευσης της πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG 1500), ακολούθησε σύντηξη των σπληνοκυττάρων με τη μυελωματική σειρά NSO.

- Τα σπληνικά με τα μυελωματικά κύτταρα αναμιγνύονται σε αναλογία 2:1
- Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 1000 στροφές για 5 λεπτά.
- Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και τοποθετούμε το ίζημα σε υδατόλουτρο στους 37°C, όπου και παραμένει εκεί κατά τη διάρκεια της παραγωγής υβριδωμάτων.
- Στο ίζημα των κυττάρων προστίθεται 1,5 ml PEG 1500 προθερμασμένη στους 37°C, στάγδην για 1 λεπτό με συνεχή ανάδευση.
- Στη συνέχεια αναδεύεται για 1 λεπτό επιπλέον, στους 37°C.
- Προστίθεται με ταυτόχρονη ανάδευση, προθερμασμένο στους 37°C θρεπτικό υλικό DMEM, με την εξής διαδικασία :

1 ml για 30-60 δευτερόλεπτα

3 ml για 30-60 δευτερόλεπτα

16 ml για 60-120 δευτερόλεπτα

- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 5 λεπτά.
- Το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται με 600 ml θρεπτικού DMEM παρουσία 20% FBS, 1x HAT και 1x HFCS.
- Το εναιώρημα των κυττάρων προστίθεται σε πιάτα καλλιέργειας των 24 φρεατίων (1,5-2,0 ml / φρεάτιο).
- Τοποθέτηση των κυτταροκαλλιεργειών στο κλίβανο για επώαση στους 37°C, με 5% CO₂ και 90% υγρασία.

Διαδικασία επιλογής των υβριδωμάτων με HAT

- Στη διάρκεια των επόμενων οχτώ ημερών γίνεται επιλογή των υβριδωμάτων με θρεπτικό μέσο επιλογής που περιέχει HAT, σύμφωνα με γνωστή μέθοδο ('Current Protocols in Immunology' (1991), Vol. 1: Unit 2.5-2.6). Οι κυτταροκαλλιεργείες παρακολουθούνται κάθε μέρα για έλεγχο του ρυθμού ανάπτυξης, πιθανής μόλυνσης και επιτυχίας της διαδικασίας επιλογής.
- Πέντε ημέρες μετά την παραγωγή υβριδωμάτων και αφού έχει πραγματοποιηθεί η επιλογή τους, αντικαθιστούμε στο θρεπτικό υλικό των κυτταροκαλλιεργειών το HAT με HT ως εξής: απομακρύνουμε το 50% του υπερκείμενου της καλλιέργειας με αναρρόφηση και προσθέτουμε 0,5-0,8 ml καινούριο θρεπτικό που περιέχει HT.

2.3. Υποκλωνισμός υβριδωμάτων

Βασική αρχή:

Μετά την ταυτοποίηση μιας καλλιέργειας ως προς την ειδικότητα του εκκρινόμενου αντισώματος, ακολουθεί η διαδικασία του υποκλωνισμού με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων ή με τη μέθοδο των περιοριστικών αραιώσεων, ώστε να προκύψει μονοκλωνική καλλιέργεια. Στις μεγαλύτερες αραιώσεις του δείγματος επιτυγχάνεται η απομόνωση ενός μόνο κυττάρου, το οποίο θα διαιρεθεί και θα δώσει μια αποικία, δηλαδή ένα κλώνο κυττάρων. Ο κλώνος αυτός θα είναι ενιαίος και ομοιογενής ως προς την προέλευση και τις ιδιότητες του. Το στάδιο αυτό είναι ιδιαίτερα κρίσιμο, διότι καθορίζει το τελικό αποτέλεσμα.

Διαδικασία:

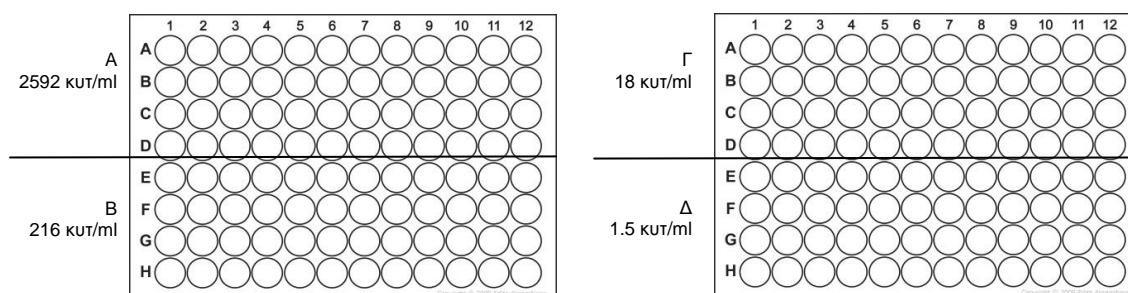
A) Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

Μετά τον εντοπισμό των θετικών καλλιεργείων, γίνεται η απομόνωση των κλώνων, με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων (limiting dilution).

- Σε όλα τα φρεάτια πλάκας μικροπιλοποίησης 96 φρεατίων, με επίπεδο πυθμένα, τοποθετούνται 100 μl DMEM 10% FBS.
- Παράλληλα δημιουργείται εναιώρημα σε θρεπτικό υλικό υβριδωμάτων, προερχόμενων από τη θετική καλλιέργεια, σε συγκέντρωση 10.000 κύτταρα/ml. Τοποθετούνται 100 μl εναιωρήματος στην πρώτη στήλη της πλάκας μικροπιλοποίησης, εκεί όπου υπήρχαν ήδη 100 μl DMEM 10% FBS με αποτέλεσμα τελικό όγκο 200 μl στα φρεάτια της πρώτης στήλης
- Μετά από καλή ανάδευση, μεταφέρονται 100μl από κάθε φρεάτιο της πρώτης στήλης, στα αντίστοιχα φρεάτια της δεύτερης στήλης, διπλασιάζοντας έτσι την αραιώση. Συνεχίζουμε με τον ίδιο τρόπο μέχρι να φτάσουμε στη τελευταία στήλη.
- Στόχος είναι διπλασιάζοντας την αραιώση σε κάθε φρεάτιο, να φτάσουμε σε αραιώσεις όπου θα υπάρχει το πολύ ένα κύτταρο ανά φρεάτιο, στις τελευταίες στήλες.
- Η πλάκα καλύπτεται, αναδεύεται ήπια και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C μέχρι την ανάπτυξη αποικίας προερχόμενης από ένα μόνο κύτταρο.

B) Μέθοδος περιοριστικών αραιώσεων

Η καλύτερη συγκέντρωση είναι να έχω 1 κύτταρο στα 3 φρεάτια, δηλαδή 0,3 κύτταρα/φρεάτιο (200λ) ή 1.5 κύτταρα/ml. Για το σκοπό αυτό έγιναν οι εξής συγκεντρώσεις: A: 2592 κύτταρα/ml, B:216 κύτταρα/ml, Γ:18 κύτταρα/ml και Δ:1.5 κύτταρα/ml. Οι αραιώσεις των κυττάρων μπήκαν σε 96αρα πλάκα κυτταροκαλλιέργειας (Εικόνα 3.).



Εικόνα 3. Απεικόνιση της μεθόδου υποκλωνισμού με περιοριστικές αραιώσεις

2.4. Παραγωγή ασκίτη

Βασική αρχή:

Οι κλώνοι αυτοί επανελέγχονται για επιβεβαίωση της ειδικότητάς τους έναντι του αντιγόνου ανοσοποίησης και χορηγούνται στην ενδοπεριτοναϊκή κοιλότητα πειραματόζων για

δημιουργία ασκίτη, προκειμένου να ληφθούν μεγάλες ποσότητες μονοκλωνικών αντισωμάτων. Σε συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας οι ποσότητες των εκκρινόμενων αντισωμάτων από τους υβριδωματικούς κλώνους είναι σχετικά μικρές (10-100μg/ml) και ταυτόχρονα η όλη διαδικασία αρκετά δαπανηρή, γι' αυτό συνηθίζεται η χορήγηση των υβριδωμάτων στην περιτοναϊκή κοιλότητα ιστοσυμβατού ζώου (συνήθως της ίδιας φυλής που έγινε η ανοσοποίηση). Ως αποτέλεσμα, είναι η ανάπτυξη ασκίτικου υγρού, το οποίο χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του μονοκλωνικού αντισώματος (συνήθως 1-10mg/ml).

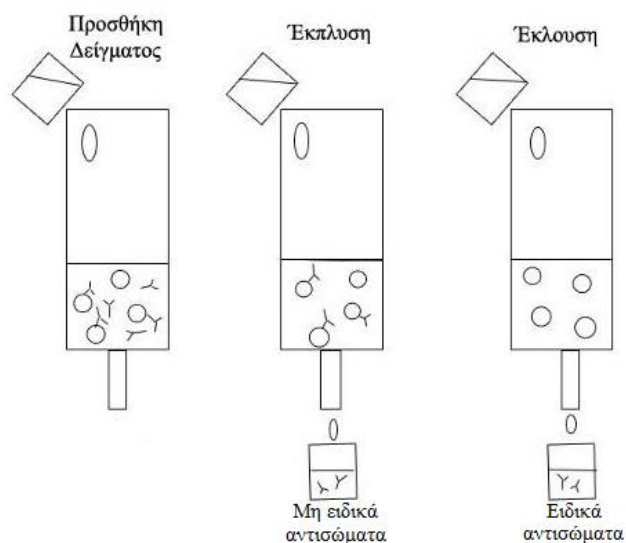
Διαδικασία:

- Μία ημέρα πριν, χορηγούνται σε ποντίκια BALB/c 0,5 ml IFA
- Ακολουθεί ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση στα ποντίκια 0,5 ml εναιωρήματος υβριδωματικών κλώνων
- Δύο εβδομάδες μετά έχει αναπτυχθεί αρκετή ποσότητα ασκίτη, την οποία και αφαιρούμε με σύριγγα από την κοιλιά των ποντικών.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 10 λεπτά και συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος.

3. Απομόνωση αντισωμάτων με χρωματογραφία συγγένειας

Βασική αρχή:

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την απομόνωση υποπληθυσμών αντισωμάτων ειδικών για συγκεκριμένα αντιγόνα, από ένα μείγμα πολυκλωνικών αντισωμάτων. Το αντιγόνο στο οποίο δεσμεύονται τα επιθυμητά αντισώματα είναι ομοιοπολικά προσδεμένο σε ένα πήκτωμα αποτελούμενο από σφαιρίδια ακρυλαμιδίου-αγαρόζης (AcA) ή σεφαρόζης (Εικόνα 4.). Αυτό το πήκτωμα αποτελεί τον ανοσοπροσροφητή, δηλαδή τη στερεή φάση. Καθώς η υγρή φάση, δηλαδή το διάλυμα τού δείγματος προς διαχωρισμό, περνά μέσα από το πήκτωμα, τα αντισώματα που αναγνωρίζουν το αντιγόνο δεσμεύονται στο πήκτωμα. Όλα τα υπόλοιπα συστατικά ξεπλένονται και απομακρύνονται (έκπλυση), ενώ τα δεσμευμένα αντισώματα εκλύονται με προσθήκη κατάλληλων διαλυμάτων (με χαμηλό pH ή με ανταγωνιστικά μόρια ή με αποδιατακτικούς παράγοντες) και συλλέγονται (έκλουση). [116]



Εικόνα 4. Στάδια απομόνωσης αντισωμάτων σε στήλη ανοσοπροσροφητή

3.1. Χρωματογραφία συγγένειας με στήλη Πρωτεΐνης A

Βασική αρχή:

Για την απομόνωση ανοσοσφαιρινών τάξης IgG χρησιμοποιείται ευρέως ως παράγοντας σύνδεσης η πρωτεΐνη A, συνδεδεμένη σε σφαιρίδια σεφαρόζης (A-Sepharose) ως στερεά φάση του ανοσοπροσροφητή. Η πρωτεΐνη A αποτελεί συστατικό της επιφάνειας του *Staphylococcus aureus* και έχει την ιδιότητα να δεσμεύει ισχυρά τη σταθερή περιοχή των ανοσοσφαιρινών τάξης IgG. Η διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση mAbs από ασκτικό ή συμπυκνωμένο θρεπτικό υλικό.

Διαδικασία:

- Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εξολοκλήρου σε θερμοκρασία 4°C, με παγωμένα όλα τα διαλύματα έκπλυσης και έκλουσης. Ενώ ταυτόχρονα τα κλάσματα που εκλούονταν διατηρήθηκαν σε πάγο μέχρι το πέρας της διαδικασίας.
- Σε στήλη πρωτεΐνης A-Sepharose χορηγείται διάλυμα έκπλυσης pH 8,9 (εξισορρόπηση της στήλης).
- Στη στήλη τοποθετείται 2 ml ασκτικό υγρό που έχει φιλτραριστεί ή φυγοκεντρηθεί προηγουμένως και αραιωθεί σε αναλογία 1:1 με το διάλυμα έκπλυσης pH 8,9.
- Αφού το διάλυμα του ασκτικού υγρού διεισδύσει πλήρως στη στήλη, χορηγείται το διάλυμα έκπλυσης pH 8,9 μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα των κλασμάτων της έκπλυσης στα 280 nm ελαττωθεί και γίνει μικρότερη από 0.050.
- Διαβιβάζεται το διάλυμα έκλουσης κιτρικού οξέος 0.1 M pH 4,5 μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα των κλασμάτων γίνει μικρότερη από 0.050.
- Με τον ίδιο τρόπο γίνεται η έκλυση λοιπών ανοσοσφαιρινών που πιθανόν να υπάρχουν μέσα στο ασκτικό υγρό διαβιβάζοντας το διάλυμα κιτρικού οξέος 0,1 M pH 3.
- Η στήλη εξουδετερώνεται με το διάλυμα έκπλυσης pH 8,9.
- Οι ανοσοσφαιρίνες που εκλούνται, εξουδετερώνονται αμέσως με μερικές σταγόνες διαλύματος Tris 2M και στη συνέχεια υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι PBS.

3.2. Χρωματογραφία συγγένειας με στήλη Πρωτεΐνης G

Βασική αρχή:

Η πρωτεΐνη G αποτελεί συστατικό της επιφάνειας των *G Streptococcal bacteria* και έχει την ιδιότητα να δεσμεύει ισχυρά τη σταθερή περιοχή των ανοσοσφαιρινών τάξης IgG. Χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση IgG από ανθρώπινους ορούς.

Διαδικασία:

- Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εξολοκλήρου σε θερμοκρασία 4°C, με παγωμένα όλα τα διαλύματα έκπλυσης και έκλουσης. Ενώ ταυτόχρονα τα κλάσματα που εκλούονταν διατηρήθηκαν σε πάγο μέχρι το πέρας της διαδικασίας.
- Σε στήλη πρωτεΐνης G-Sepharose χορηγείται διάλυμα έκπλυσης PBS pH 7.4 (εξισορρόπηση της στήλης).
- Στη στήλη τοποθετείται ορός ανθρώπου που έχει φιλτραριστεί ή φυγοκεντρηθεί προηγουμένως και αραιωθεί σε αναλογία 1:1 με το διάλυμα έκπλυσης pH 8,9.
- Αφού το διάλυμα του ορού διεισδύσει πλήρως στη στήλη, χορηγείται το διάλυμα έκπλυσης PBS pH 7.4 μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα των κλασμάτων της έκπλυσης στα 280 nm ελαττωθεί και γίνει μικρότερη από 0.050.
- Διαβιβάζεται το διάλυμα έκλουσης 0,2N HCL-γλυκίνη pH 2,8 μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα των κλασμάτων γίνει μικρότερη από 0.050.

- Με τον ίδιο τρόπο γίνεται η έκλουση λοιπόν ανοσοσφαιρινών που πιθανόν να υπάρχουν μέσα στο ορό διαβιβάζοντας το διάλυμα 0,2N HCL-γλυκίνη pH 2,2. Η στήλη εξουδετερώνεται με το διάλυμα έκπλυσης PBS pH 7.4.
- Οι ανοσοσφαιρίνες που εκλούνται, εξουδετερώνονται αμέσως με μερικές σταγόνες διαλύματος Tris 2M και στη συνέχεια υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι TBS.

3.3. Χρωματογραφία συγγένειας με στήλη ανοσοπροσροφητών ιστονών, ηπαρίνης και DNA

3.3.1. Παρασκευή ανοσοπροσροφητών

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τριών ειδών ανοσοπροσροφητές: ένας εμπορικά διαθέσιμος ανοσοπροσροφητής σεφαρόζης με αντιγόνο ηπαρίνη κι δυο με αντιγόνο ολική ιστόνη, συνδεδεμένο σε σφαιρίδια ακρυλαμιδίου – αγαρόζης (UltroGel ACA 34) ή DNA συνδεδεμένο σε σφαιρίδια ACA 2.2, που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το εξής πρωτόκολλο [116]:

- Ακινητοποίηση πρωτεϊνών σε σφαιρίδια πολυακρυλαμιδίου-αγαρόζης με τη χρήση γλουταραλδεΐδης.

Ενεργοποίηση των σφαιριδίων

- 12 ml σφαιριδίων τοποθετούνται σε γυάλινη κωνική φιάλη
- Τρεις πλύσεις με dH₂O, κάθε φορά γίνεται ήπια ανάδευση με γυάλινη ράβδο και αναρρόφηση του υπερκειμένου με αντλία
- Μία πλύση με KP 0,1M, pH 7,4
- Προσθήκη 30 ml KP και 10 ml γλουταραλδεΐδης 25%
- Επώαση O/N (overnight) στους 37°C υπό συνεχή ήπια ανάδευση στο σκοτάδι σε δοχείο ερμητικά κλειστό
- Μεταφορά σφαιριδίων σε σωλήνα Falcon των 50 ml
- Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 λεπτά και απομάκρυνση υπερκειμένου
- Ξέπλυμα ιζήματος με KP
- Επανάληψη της πλύσης 10 με 20 φορές ώσπου να απομακρυνθεί η οσμή της γλουταραλδεΐδης
- Τα ενεργοποιημένα σφαιρίδια μπορούν να αποθηκευτούν σε διάλυμα KP που περιέχει 0,5% γλουταραλδεΐδη

Πρόσδεση πρωτεϊνών (ιστόνες) ή DNA στο ενεργοποιημένο πηκτωμα

- Απομάκρυνση υπερκειμένου και προσθήκη διαλύματος ιστονών 5 mg/ml ίσου όγκου με τον όγκο του ιζήματος των σφαιριδίων
- Επώαση O/N σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ήπια ανάδευση (σε ειδική περιστρεφόμενη ρόδα)
- Φυγοκέντρηση και φύλαξη υπερκειμένου
- Τέσσερις πλύσεις με KP και φύλαξη υπερκειμένου
- Τα υπερκείμενα φιλτράρονται με φίλτρα 0,8 μm για απομάκρυνση τυχόν σφαιριδίων και γίνεται φωτομέτρησή τους στα 280 nm
- Οι πλύσεις των σφαιριδίων συνεχίζονται μέχρι η OD στα 280 nm να γίνει μικρότερη από 0,050
- Επαναιώρηση ιζήματος σε διάλυμα γλυκίνης 0,1 M pH 7,4 (κορεσμός των ελεύθερων αλδεϋδομάδων της προσδεδεμένης στα σφαιρίδια γλουταραλδεΐδης)
- Επώαση O/N στους 4°C
- Φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 5 λεπτά και πλύσεις του ιζήματος με PBS

- Το ιζήμα επαναιωρείται σε διάλυμα HCl-γλυκίνη 0,2N pH 2,8, επωάζεται για 10 λεπτά στους 4°C και έπειτα φυγοκεντρείται.
- Το όξινο περιβάλλον του ιζήματος εξουδετερώνεται με 5 ml K₂HPO₄ 1M και 45 ml PBS
- Ακολουθούν 5 πλύσεις με PBS ώσπου το pH του ιζήματος να επανέλθει στο 7,4
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 40 ml TBS και μεταφορά του σε στήλη χρωματογραφίας
- Πλύσεις του ιζήματος στη στήλη με TBS
- Προσθήκη διαλύματος TBS με 0,1% Azide (NaN₃) και αποθήκευση του ανοσοπροσροφητή στους 4°C

3.3.2. Απομόνωση αντισωμάτων σε ανοσοπροσροφητές

- Η στήλη αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου
- Πλύση της στήλης με TBS (θερμοκρασίας δωματίου) για απομάκρυνση του azide 0,1%
- Αραίωση δείγματος σε συγκέντρωση περίπου 3 mg/ml και προσθήκη στη στήλη
- Επώαση του δείγματος για 2h υπό ήπια ανάδευση σε μηχανική ρόδα
- Η στήλη αφήνεται να σταθεί και η διαδικασία συνεχίζεται σε ψυχρό θάλαμο (4°C)
- Έκπλυση:
Πλύση της στήλης με συνεχή διαβίβαση κρούου (4°C) TBS και συλλογή της εξόδου της στήλης μέχρι η OD στα 280 nm να γίνει μικρότερη από 0,010
- Έκλουση:
A) Για τον ανοσοπροσροφητή ιστονών/ηπαρίνης:
Προσθήκη 2-3 ml διαλύματος MgCl₂ pH 7 και ανάδευση με γυάλινη ράβδο. Επώαση για 20-30 λεπτά, Συνεχής διαβίβαση διαλύματος MgCl₂ και συλλογή κλασμάτων 1 ml σε σωληνάρια των 5 ml στα οποία περιέχονται 115 μl Tris 2M για εξουδετέρωση του όξινου pH. Η συλλογή συνεχίζεται μέχρι η OD στα 280 nm να γίνει μικρότερη από 0,010
B) Για τον ανοσοπροσροφητή DNA:
Συνεχής 20mM CBC με 5% DMSO pH 10,5 διαβίβαση διαλύματος και συλλογή κλασμάτων 1 ml σε σωληνάρια των 5 ml. Η συλλογή συνεχίζεται μέχρι η OD στα 280 nm να γίνει μικρότερη από 0,010
- Αναγέννηση της στήλης:
 - Πλύση με διάλυμα HCl-γλυκίνης 0,2N pH 2,2
 - Πλύση της στήλης με TBS, έως ότου το pH επανέλθει στο 7,4
 - Η στήλη ξεπλένεται με διάλυμα TBS με 0,1% Azide
 - Τα κλάσματα της έκλουσης με OD μεγαλύτερη από 0,020 συλλέγονται και υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι TBS O/N στους 4°C Το παρασκεύασμα της έκλουσης συμπυκνώνεται σε συσκευή συμπύκνωσης υπό πίεση αζώτου με μεμβράνη PM30, σε τελική συγκέντρωση ~1 mg/ml και φυλάσσεται στους -20°C. Το παρασκεύασμα της έκπλυσης συμπυκνώνεται

4. Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA)

Βασική αρχή:

Η κλασική δοκιμασία ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) στηρίζεται στη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος. Τα αντισώματα που βρίσκονται στο δείγμα αντιδρούν με αντιγόνα που είναι ακινητοποιημένα σε φρεάτια πλακών μικροτιπλοδότησης. Μετά την απομάκρυνση των ελεύθερων αντισωμάτων με πλύσεις, η παρουσία και η ποσότητα του προσδεδμένου αντισώματος ανιχνεύεται με την προσθήκη αντι-ισοτυπικού αντισώματος,

το οποίο είναι συζευγμένο με κάποιο ένζυμο. Η περίσσεια του δευτερογενούς αντισώματος απομακρύνεται με πλύσεις και προστίθεται το άχρωμο υπόστρωμα του ενζύμου, το οποίο με τη βοήθεια του ενζύμου μετατρέπεται σε έγχρωμο προϊόν. Στα ένζυμα που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνονται η αλκαλική φωσφατάση, η υπεροξειδάση και η β-γαλακτοζιδάση. Η ποσότητα του έγχρωμου προϊόντος μετράται σε ειδικό φασματοφωτομετρικό μετρητή πλακών.

Διαδικασία:

Ο έλεγχος της ειδικότητας των υποπληθυσμών αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων της μελέτης πραγματοποιήθηκε με απλή μη ανταγωνιστική ELISA, σύμφωνα με γνωστή μέθοδο [116]. Οι πλάκες επιστρώθηκαν με ολική ιστόνη (2,5 µg/ml), θυρεοσφαιρίνη (10 µg/ml), F ακτίνη (5 µg/ml), τουμπουλίνη (5 µg/ml), καρβονική ανυδράση (5 µg/ml), ηπαρίνη (2 µg/ml), TNP-BSA (10 µg/ml) και F(ab)₂ (1 µg/ml) σε CBC 0,1M pH (9,6) και με DNA (10 µg/ml) και πλασμιδιακό DNA (10 µg/ml) σε PBS pH 6,85.

Τοποθετούνται 100 µl διαλύματος αντιγόνων σε κάθε φρεάτιο της πλάκας μικροπιλοδότησης 96 φρεατίων. Για το DNA επωάζουμε ο/η σε RT και για τα υπόλοιπα αντιγόνα 1h στους 37 °C σε ξηρό κλίβανο και O/N στους 4°C

- Τα φρεάτια αδειάζονται και ξεπλένονται 4 φορές με PBS ή, αν το αντιγόνο είναι ιστόνες, με TBS
- Προστίθενται σε όλα τα φρεάτια 200 µl PBS 1% BSA, ή PBS 0,5% ζελατίνη για αντιγόνο F(ab)₂, ή TBS 0,5% ζελατίνη για αντιγόνο ιστόνες. Επώαση για 1h στους 37°C σε ξηρό κλίβανο
- Τα φρεάτια αδειάζονται και ξεπλένονται 4 φορές με PBS-Tween ή, αν το αντιγόνο είναι ιστόνες, με TBS-Tween
- Προστίθενται 100 µl δείγματος και γίνεται επώαση για 2h στους 37°C σε ξηρό κλίβανο
- Τα φρεάτια αδειάζονται και ξεπλένονται 4 φορές με PBS-Tween ή, αν το αντιγόνο είναι ιστόνες, με TBS-Tween
- Προστίθενται 100 µl του συζευγμένου αντισώματος. Στις πλάκες με αντιγόνο F(ab)₂ χρησιμοποιείται αντίσωμα συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση σε αραιώση 1:2000 σε διάλυμα PBS-Tween 0,5% ζελατίνη, και στις υπόλοιπες αντίσωμα συζευγμένο με HRP σε αραιώση 1:2500 σε διάλυμα PBS-Tween 1% BSA ή σε TBS-Tween 0,5% Ζελατίνη αν το αντιγόνο είναι ιστόνες. Επώαση για 1,5h στους 37°C σε ξηρό κλίβανο
- Τα φρεάτια αδειάζονται και ξεπλένονται 3 φορές με PBS-Tween και 1 με PBS ή, αν το αντιγόνο είναι ιστόνες, 3 φορές με TBS-Tween και 1 με TBS
- Για το αντίσωμα συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση προστίθενται 100 µl διαλύματος του υποστρώματος της αλκαλικής φωσφατάσης (PNPP) και γίνεται φωτομέτρηση στα 405 nm ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι να αναπτυχθεί καλά η αντίδραση.)
- Για το αντίσωμα συζευγμένο με HRP προστίθενται 100 µl TMB και γίνεται φωτομέτρηση στα 620 nm (reference). Αφού αναπτυχθεί η αντίδραση, διακόπτεται με προσθήκη 50 µl H₂SO₄ 2M και γίνεται φωτομέτρηση στα 450 nm.

5. Προσδιορισμός της ενδοκυττάρια συγκέντρωσης από εκχυλίσματα κυττάρων με ELISA

Διαδικασία:

- Επίστρωση κυττάρων 70.000 κύτταρα/ml για 48h σε πιάτα 6 φρεατίων (ανά δείγμα/8 ή 12 wells)
- Πλύση με DMEM (x1)

- Προσθήκη δείγματος V=900μl /well και επώαση για 2h 37°C
- Πλύση με PBS (x2)
- Επώαση με 0.5% Θρυψίνη V=300μl /well για 1-2 λεπτά
- Προσθήκη PBS V=600μl /well
- Μεταφορά σε erpendorfs
- Επιπλέον ξέπλυμα wells με PBS V=300μl /well
- Μεταφορά στα ίδια erpendorfs
- Φυγοκέντρηση 6.000 rpm για 5 λεπτά
- Επαναιώρηση των ιζημάτων με PBS και συγκέντρωση σε ένα erpendorf ανά δείγμα
- Φυγοκέντρηση 6.000 rpm για 5 λεπτά
- Απομάκρυνση του υπερκλειμένου
- Επαναιώρηση των ιζημάτων με PBS V=~500μl / erpendorf κατευθείαν στον πάγο
- Μέτρηση κυττάρων στο κυτταρόμετρο με Trypan Blue
- Φυγοκέντρηση 8.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C
- Απομάκρυνση του υπερκλειμένου και ανακίνηση του ιζήματος
- Προσθήκη 120μl Διαλύματος I (850 μl Διάλυμα A + 150 μl mini EDTA protease inhibitors-Roche), ανάδευση με 200άρα πιπέτα (x5), ανακίνηση με το χέρι και επώαση για 15 λεπτά στον πάγο (εντωμεταξύ ετοιμάζω erpendorfs για το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα)
- Φυγοκέντρηση 16.000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C (εντωμεταξύ ετοιμάζεται το Διάλυμα B)
- Απομόνωση του υπερκλειμένου, το οποίο είναι το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα
- Προσθήκη 120μl Διαλύματος II (850 μl Διάλυμα C + 150 μl mini EDTA protease inhibitors-Roche) και επώαση για 30 λεπτά στους 4°C υπό ανάδευση
- Φυγοκέντρηση 16.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C
- Απομόνωση του υπερκλειμένου, το οποίο είναι το πυρηνικό εκχύλισμα
- Τα εκχυλίσματα είτε φυλάσσονται στους -80°C, είτε για λίγο στον πάγο ώστε να γίνει απευθείας μέτρηση με ELISA (διαδοχικές αραιώσεις 1/3 σε PBS Tween-BSA)

Διάλυμα A	
1M HEPES-KOH pH 7.9	25 μl
1M MgCl ₂	3.75 μl
3.6M KCl	6.9 μl
ddH ₂ O	2.457 μl
0.5M DTT	2.5 μl
0.25M PMSF	5 μl

Διάλυμα B	
1M HEPES-KOH pH7.9	50 μl
4M NaCl	262.5 μl
1M MgCl ₂	3.75 μl
0.45M EDTA	1.1 μl
40% glycerol	1.5625 μl
ddH ₂ O	0.59275 μl
0.5M DTT	2.5 μl
0.25M PMSF	5 μl

6. Έλεγχος της διείσδυσης

6.1. Ανοσοκυταροχημική Τεχνική - Έμμεσος Ανοσοφθορισμός in vitro

Βασική αρχή:

Σημαντικός παράγοντας σε αυτή την τεχνική είναι η χρήση φθοριοχρωμάτων, δηλαδή φθορίζουσες χρωστικές, που εκπέμπουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος όταν διεγερθούν από φως υψηλότερης ενέργειας. Τα φθοριοχρώματα αυτά είναι συνδεδεμένα

στην Fc περιοχή αντισωμάτων, ώστε να μην επηρεάζουν την ειδικότητά τους. Μερικά από τα πιο γνωστά φθοριοχρώματα είναι η φλουορεσκεΐνη, η ροδαμίνη και η φυκοερυθρίνη, αλλά και τα πιο ανθεκτικά παράγωγά τους, όπως το ALEXA fluor. Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντιγόνων σε κύτταρα ή ιστολογικές τομές μέσω του συζεύγματος αντισώματος-φθοριοχρώματος. Το πρώτο αντίσωμα είναι μη σημασμένο και ανιχνεύεται με ένα δεύτερο αντι-ισοτυπικό αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα. Το φως που εκπέμπεται από τα φθοριοχρώματα μπορεί να γίνει ορατό με απλό μικροσκόπιο, το οποίο είναι εξοπλισμένο με μια λάμπα φθορισμού, ή σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

Διαδικασία:

Αποτελεί μια τροποποιημένη εκδοχή του έμμεσου ανοσοφθορισμού που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας. Η βασική διαφορά είναι πως ζωντανά κι όχι μονιμοποιημένα κύτταρα επωάζονται με το πρώτο αντίσωμα, το οποίο είναι το δείγμα. Η μονιμοποίηση πραγματοποιείται μετά την επώαση των κυττάρων με το δείγμα. Με την εφαρμογή αυτής της τεχνικής και τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου εξετάζεται η παρουσία των αντισωμάτων στο εσωτερικό των κυττάρων.

- Αποστειρωμένα DMEM, DMEM-10% FBS και PBS φιλτράρονται με φίλτρα 0,45 μm
- 2 πλύσεις των κυττάρων με 500 μl φιλτραρισμένο DMEM σε κάθε φρεάτιο και άδειασμα με αντλία

Προσθήκη δειγμάτων:

- Τα δείγματα αραιώνονται σε φιλτραρισμένο DMEM-10% FBS και φιλτράρονται
- Προστίθενται 300 μl δείγματος σε κάθε φρεάτιο
- Επώαση στους 37°C για 1 ώρα
- 3 πλύσεις με 500 μl φιλτραρισμένο PBS σε κάθε φρεάτιο

Μονιμοποίηση με :

A) PFA 2%

- 300 μl για 20 λεπτά σε 25°C (αραίωση του stock 4% PFA 1:1 με PBS και φιλτράρισμα)
- 2 πλύσεις με 500 μl φιλτραρισμένο PBS σε κάθε φρεάτιο
- 3 πλύσεις με 500 μl φιλτραρισμένο PBS-0,1% BSA (δ/μα κορεσμού) σε κάθε φρεάτιο ανά 5 λεπτά
- Διαπερατοποίηση με 300 μl φιλτραρισμένο 0,1% Triton-PBS – 0,1% BSA για 2 λεπτά σε 25°C
- 2 πλύσεις με 500 μl φιλτραρισμένο PBS σε κάθε φρεάτιο
- Τα δείγματα αραιώνονται σε φιλτραρισμένο DMEM-10% FBS και φιλτράρονται
- Προστίθενται 300 μl δείγματος σε κάθε φρεάτιο
- Επώαση στους 37°C για 1 ώρα
- 1 πλύση με 500 μl φιλτραρισμένο PBS σε κάθε φρεάτιο
- 3 πλύσεις με φιλτραρισμένο 0,1% Triton-PBS-0,1% BSA ανά 5 λεπτά
- Προσθήκη 300 μl του 2ου αντισώματος συζευγμένου με Alexa-488 (1 μg/ml, σε αρραίωση 1:2000) σε φιλτραρισμένο 0,1% Triton-PBS – 0,1% BSA για 60 λεπτά στους 25°C στο σκοτάδι
- 3 πλύσεις με 500 μl φιλτραρισμένο 0,1% Triton-PBS ανά 5 λεπτά
- 2 πλύσεις με 500 μl φιλτραρισμένο PBS σε κάθε φρεάτιο

B) Αιθανόλη 100%

- 500 μl για 20 λεπτά σε -20°C

- Πλύσεις με 500 μl φιλτραρισμένο PBS σε κάθε φρεάτιο (x2). Η πρώτη πλύση χωρίς αφαίρεση της αιθανόλης
- Πλύσεις με 500 μl φιλτραρισμένο PBS-0.1% BSA (δ/μα κορεσμού) σε κάθε φρεάτιο ανά 5 λεπτά (x3)
- Πλύσεις με 500 μl φιλτραρισμένο PBS σε κάθε φρεάτιο (x2)
- Προσθήκη 300 μl 2ου αντισώματος συζευγμένου με Alexa-488 (1 μg/ml, σε αραιώση 1:2000) σε φιλτραρισμένο PBS - 0,1% BSA για 60 λεπτά σε 25°C στο σκοτάδι
- Πλύσεις με 500 μl φιλτραρισμένο PBS ανά 5 λεπτά (x3)
- Τοποθέτηση λαμελών επάνω σε πάραφιλμ
- Προσθήκη 100 μl Το-Pro-3 σε αραιώση 1:2000 σε φιλτραρισμένο PBS για 10 λεπτά σε 25°C στο σκοτάδι
- Πλύσεις με 200 μl φιλτραρισμένο PBS (x3)
- Πλύσιμο της κάθε λαμέλας διαδοχικά σε 100 ml φιλτραρισμένο α) PBS, β) PBS και γ) H₂O
- Προσθήκη μιας σταγόνας mowiol (πάντα παγωμένο γιατί αλλιώς πολυμερίζεται) πάνω στην αντικειμενοφόρο και τοποθέτηση της λαμέλας με την πλευρά των κυττάρων προς τα κάτω
- Φύλαξη στους 4°C
- Την επόμενη μέρα η λαμέλα σταθεροποιείται στην αντικειμενοφόρο με στερεωτικό και αφού στεγνώσει, η πάνω πλευρά της καθαρίζεται με λίγο οινόπνευμα. Τα δείγματα είναι έτοιμα για παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

6.2. Βιντεοσκόπηση της διείσδυσης αντισωμάτων στο Time-lapse Olympus μικροσκόπιο

Διαδικασία:

- Κυτταροκαλλιέργεια NIH-3T3 48h (σε τρυβλίο με ενσωματωμένη λαμέλα)
- Πλύση με άχρωμο DMEM 4°C (x2)
- Προσθήκη δείγματος συζευγμένο με FITC σε άχρωμο DMEM (1.6 mg/ml) για 1h στους 4°C
- Πλύση με άχρωμο DMEM 4°C (x2)
- Προσθήκη άχρωμο DMEM 4°C
- Απευθείας παρακολούθηση στο μικροσκόπιο στους 37 °C.

6.3. Ενζυμο-ανοσοκυτταροχημική τεχνική

Βασική αρχή:

Η μέθοδος αυτή είναι παρόμοια με τη μέθοδο ανοσοφθορισμού για τον έλεγχο της διείσδυσης, με τη διαφορά ότι στο τέλος, το διεισδυτικό αντίσωμα ανιχνεύεται με την προσθήκη 2^{ου} αντισώματος, ειδικό για το Fc τμήμα του, συζευγμένο με HRP. Το αποτέλεσμα γίνεται ορατό μετά την προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος υπεροξειδίου και η παρατήρηση γίνεται σε απλό φωτονικό μικροσκόπιο.

Διαδικασία:

- Κατάλληλος αριθμός κυττάρων τοποθετείται σε πλάκα πολυστυρενίου 24 φρεατίων παρουσία πλήρους θρεπτικού υλικού, έτσι ώστε να δημιουργούνται μονοστιβάδες κυττάρων.

- Όλη η διαδικασία που ακολουθεί γίνεται μέσα στα φρεάτια της πλάκας. Πραγματοποιούνται τα στάδια του πρωτόκολλου του έμμεσου ανοσοφθορισμού μέχρι και τη μονιμοποίηση
- Πραγματοποιείται προσθήκη 300 μl 2^{ου} αντισώματος συζευγμένου με HRP 1 μg/ml σε φιλτραρισμένο PBS - 0,1% BSA για 60 λεπτά σε 25°C στο σκοτάδι
- Πλύσεις με 500 μl φιλτραρισμένο PBS ανά 5 λεπτά (x3)
- Προσθήκη υποστρώματος DAPI (25 mg DAPI και 60 μl H₂O₂ διαλυτοποιημένα σε 50 ml PBS), το οποίο προηγουμένως έχει φιλτραριστεί και επώαση για περίπου 5-10 λεπτά, μέχρι να εμφανιστεί καφέ χρώση
- Πλύσεις με 500 μl φιλτραρισμένο PBS και παρατήρηση στο μικροσκόπιο (x3)

6.4. Έλεγχος διείσδυσης με κυτταρομετρία ροής (FACS)

- Ενδοφλέβια χορήγηση του αντισώματος σε ποντικούς
- Απομόνωση οργάνων (εγκέφαλος, λεμφαδένες, σπλήνα, νεφρό, ήπαρ, πνεύμονες και καρδιά)
- Ομογενοποίηση των οργάνων
- Πλύση των κυττάρων με DMEM (x2) (Φυγοκέντρηση 2.000 rpm για 10 λεπτά)
- Επώαση υπό αργή ανάδευση για 3 λεπτά με 2 ml ACK (RBC lysis) και τερματισμός της δράσης με προσθήκη ίσου όγκου DMEM (Φυγοκέντρηση 2.000 rpm για 10 λεπτά)
- Πλύση των κυττάρων με PBS (Φυγοκέντρηση 2.000 rpm για 10 λεπτά)
- Επώαση για 10 λεπτά με 2 ml Θρυψίνη x1-EDTA στους 37°C
- Τερματισμός δράσης με τη προσθήκη 3 ml PBS-1% BSA (Φυγοκέντρηση 2.000 rpm για 10 λεπτά)
- Πλύση των κυττάρων με PBS (Φυγοκέντρηση 2.000 rpm για 10 λεπτά)
- Προσθήκη 1-2 ml PBS και μέτρηση ζωντανών/νεκρών με Trypan Blue
- Φυγοκέντρηση 2.000 rpm για 10 λεπτά
- Μονιμοποίηση με 1ml αιθανόλη για 12 λεπτά στους -20°C & μετά προσθήκη 1ml PBS
- Φυγοκέντρηση 2.000 rpm για 10 λεπτά
- Πλύση των κυττάρων με PBS-1% BSA (Φυγοκέντρηση 2.000 rpm για 10 λεπτά)
- Διατήρηση στους 4°C
- Την επόμενη μέρα, φυγοκέντρηση 2.000 rpm για 10 λεπτά
- Επώαση με Alexa conjugate σε PBS-1% BSA (2μg ανά 10⁶ κύτταρα) & επώαση 40 λεπτά στον πάγο στο σκοτάδι
- Φυγοκέντρηση 2.000 rpm για 10 λεπτά
- Πλύση των κυττάρων με PBS (Φυγοκέντρηση 2.000 rpm για 10 λεπτά)
- Μεταφορά σε ειδικά σωληνάκια για FACS
- Ανάλυση στο FACS Calibur και επεξεργασία με το λογισμικό CellQuest Pro

7. Έλεγχος έκφρασης του CD25 με ενεργοποιημένα σπληνοκύτταρα

Διαδικασία:

Σπλήνες από επτά ενήλικους ποντικούς BALB/c απομονώθηκαν και ομογενοποιήθηκαν ξεχωριστά. Τα κύτταρα που προέκυψαν πλύθηκαν με RPMI, επώαστηκαν με διάλυμα λύσης των ερυθροκυττάρων (ACK) για 3-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, πλύθηκαν με RPMI και αξιολογήθηκε η βιωσιμότητά τους με trypan blue. Στη συνέχεια, 5x10⁶ κύτταρα ανά φρεάτιο καλλιεργήθηκαν σε πιάτα των 6 φρεατίων με RPMI που περιέχει 10% FBS παρουσία 4 mg/ml των πολυκλωνικών αντισωμάτων για 90 λεπτά, στους 37°C. Σε μέρος

των κυττάρων προστέθηκαν 10 ng/ml PMA παρουσία ιονομυκίνης (1 µg/ml ή 100 ng/ml, Sigma) για 5 ώρες, και έπειτα ακολούθησε πλύση με PBS -BSA. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 40 λεπτά στον πάγο με αντίσωμα έναντι του επιφανειακού υποδοχέα CD25 (IL-2 υποδοχέα α αλυσίδα), το οποίο ήταν συζευγμένο με φυκοερυθρίνη (1µg/ml σε PBS-BSA, BioLegend, CA), ξεπλύθηκαν με PBS και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Η μέση ένταση φθορισμού (MFI) προσδιορίστηκε με το πρόγραμμα λογισμικού CellQuest-Pro. Για να εξεταστεί η διείσδυση των αντισωμάτων, μέρος των κυττάρων που υποβλήθηκαν στην παραπάνω διαδικασία απλώθηκαν σε καλυπτρίδες, στέγνωσαν στον αέρα και μονιμοποιήθηκαν με αιθανόλη. Ακολούθησε επώαση με αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης IgG συζευγμένο με Alexa Fluor-488 και παρατήρηση των αποτελεσμάτων στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

8. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Βασική αρχή:

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου προσφέρει τη δυνατότητα διαχωρισμού πρωτεϊνών με βάση το μοριακό μέγεθός τους. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα που δημιουργείται από τον πολυμερισμό μονομερών ακρυλαμιδίου και μορίων δισακρυλαμιδίου, ο οποίος γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια του TEMED, το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών από το ammonium persulfate. Τα δείγματα αραιώνονται σε διάλυμα που περιέχει SDS, το οποίο είναι ανιοντικό απορρυπαντικό που αποδιατάσσει και φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες, οι οποίες μετακινούνται στο πήκτωμα από την άνοδο προς την κάθοδο, με ταχύτητα ανάλογη της μάζας τους.

Διαδικασία:

- Στήσιμο κάθετα συστήματος γυάλινων πλακών έτσι ώστε να μην υπάρχει διαρροή
- Κατασκευή πήκτωματος διαχωρισμού 10%
- Το μείγμα τοποθετείται στο σύστημα των γυάλινων πλακών και στην επιφάνειά του προστίθεται απεσταγμένο νερό για να ευθυγραμμιστεί η στάθμη
- Το πήκτωμα αφήνεται 1 ώρα για να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του
- Κατασκευή πήκτωματος επιστοίβαξης 3%
- Απομάκρυνση του νερού και προσθήκη του διαλύματος του πήκτωματος επιστοίβαξης στο σύστημα των γυάλινων πλακών. Έπειτα τοποθετείται το ειδικό «χτενάκι» για τη δημιουργία πηγαδιών.
- Το πήκτωμα αφήνεται 1 ώρα για να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του
- Γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις των δειγμάτων
- Ετοιμάζονται οι μάρτυρες μοριακών βαρών (MW, Markers). Για τις αναγωγικές συνθήκες χρησιμοποιούνται εμπορικά διαθέσιμοι μάρτυρες και αραιώνονται 1:2 με απεσταγμένο νερό. Για τις μη αναγωγικές συνθήκες χρησιμοποιούνται μάρτυρες που παρασκευάζονται με προσθήκη 4 µl τρανσφερίνης, 3 µl BSA, 3 µl μονοκλωνικού αντισώματος και 10 µl απεσταγμένο νερό
- Σε 20 µl δείγματος προστίθενται 4 µl Sample buffer μη αναγωγικών ή αναγωγικών συνθηκών που περιέχει μερκαπτοαιθανόλη και ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ κυστεϊνών. Τα δείγματα των αναγωγικών συνθηκών θερμαίνονται στους 100°C για 5 λεπτά
- Το «χτενάκι» αφαιρείται και το σύστημα των γυάλινων πλακών που περιέχει το πήκτωμα τοποθετείται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης

- Προστίθεται διάλυμα ηλεκτροφόρησης
- Τα δείγματα τοποθετούνται στα πηγάδια
- Διαβιβάζεται στη συσκευή ρεύμα τάσης 120 Volt
- Όταν το μέτωπο της χρωστικής φτάσει στο κάτω άκρο του πηκτώματος, διακόπτεται η παροχή ρεύματος και το πήκτωμα αφαιρείται από της γυάλινες πλάκες και τοποθετείται στο διάλυμα χρώσης που περιέχει coomasie blue, υπό ανάδευση για μια νύχτα.
- Το διάλυμα χρώσης απομακρύνεται και προστίθεται διάλυμα αποχρωματισμού υπό ανάδευση
- Μετά τον αποχρωματισμό το πήκτωμα ξεπλένεται και διατηρείται σε νερό μέχρι να φωτογραφηθεί

9. Σύζευξη IgG αντισωμάτων με FITC

Για την σύζευξη των IgG αντισωμάτων με FITC (Fluorescein isothiocyanate) πρώτα πραγματοποιήθηκε διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα CBC 0,5M pH 9,5 και ακολούθησε επώαση με το διαλυτοποιημένο σε DMSO FITC σε αναλογία 25 µg FITC /1mg IgG για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση. Έπειτα, ακολούθησε διαπίδυση σε TBS και μέτρηση στα 280 nm και 495 nm για εύρεση της αναλογίας μορίων FITC (F) προς μόρια IgG (P)Q:[F/P=2,77x A_{495nm}/A_{280nm} -(0.35x A_{495nm})].

10. Παρασκευή θραυσμάτων F(ab')₂ με πεψίνη

Για την παρασκευή των τμημάτων F(ab')₂ από την IVIg, πρώτα αραιώθηκε σε διάλυμα οξικού νατρίου 0,1M σε τελική συγκέντρωση 5 mg/ml. Τα τμήματα F(ab')₂ προέκυψαν μετά από πέψη της IVIg με διάλυμα του πρωτεολυτικού ενζύμου πεψίνη σε αναλογία 1mg πεψίνη/50mg IgG για 16 ώρες στους 37°C, αφού πρώτα το pH είχε ρυθμιστεί στο 3,53. Η ενζυμική αντίδραση διακόπτεται έπειτα, με την αύξηση του pH στο 7,4 και διαπίδυση του δείγματος σε TBS.

11. Ιστολογία

A) Τομές παραφίνης στη μικροτόμο

Χρησιμοποιούνται ευρύτατα ιδιαίτερα σε κλινικά δείγματα. Η μικροτόμος, επιτρέπει τη δημιουργία πολύ λεπτών τομών, πάχους 3 µm-10 µm. Τα δείγματα που πρόκειται να κοπούν στο μικροτόμο θα πρέπει να έχουν προηγουμένως μονιμοποιηθεί και να έχουν υποστεί επιπλέον επεξεργασία, η οποία περιλαμβάνει θέρμανση και επώαση με ξυλένιο και αλκοόλη, αντιδραστήρια τα οποία συνήθως οδηγούν στην «απόκρυψη» των επιτόπων. Καθώς όμως η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται ευρύτατα στα κλινικά δείγματα, τα τελευταία 20 χρόνια έχουν αναπτυχθεί τεχνικές ανάκτησης των επιτόπων.

Προετοιμασία ιστών για εγκλεισμό σε παραφίνη

Τα δείγματα των ιστών αρχικά μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 4% και στη συνέχεια εγκλείστηκαν σε ειδικές θήκες παραφίνης

Παραφίνοποίηση

- Αιθανόλη 50% για 30 λεπτά / Αιθανόλη 70% για 30 λεπτά / Αιθανόλη 70% για 30 λεπτά
- Αιθανόλη 85% για 30 λεπτά / Αιθανόλη 95% για 30 λεπτά / Αιθανόλη 100% για 30 λεπτά
- Αιθανόλη 100% για 30 λεπτά / Ξυλόλη για 45 λεπτά / Ξυλόλη για 30 λεπτά / Παραφίνη για 1 ώρα / Παραφίνη μέχρι την έγκληση σε πλαστικά μπλοκ

Μικροτόμηση

Από το κάθε μπλοκ ελήφθησαν τομές πάχους 4μm και ακολούθησε μεταφορά των τομών σε έτοιμες προς χρήση αντικειμενοφόρους πλάκες.

Αποπαραφινοποίηση και χρώση με αιματοξυλίνη/ ηωσίνη

- Ξυλόλη για 5 λεπτά / Ξυλόλη για 5 λεπτά / Αιθανόλη 96% για 2,5 λεπτά
- Αιθανόλη 96% για 2,5 λεπτά / Νερό βρύσης / Αιματοξυλίνη για 5 λεπτά
- Νερό βρύσης / Οξυνισμένη αιθανόλη για 5 δευτερόλεπτα / Νερό βρύσης / Ηωσίνη για 1 λεπτό
- Νερό βρύσης / Αιθανόλη 70% για 10 δευτερόλεπτα / Αιθανόλη 80% για 10 δευτερόλεπτα / Αιθανόλη 96% για 10 δευτερόλεπτα / Αιθανόλη 100% για 10 δευτερόλεπτα / Αιθανόλη 100% για 10 δευτερόλεπτα
- Ξυλόλη για 10 δευτερόλεπτα / Ξυλόλη για 10 δευτερόλεπτα / Στέγνωμα, DePex και τοποθέτηση καλυπτρίδας

B) Τομές σε κρουτόμο

Το μηχάνημα που χρησιμοποιείται ονομάζεται κρουστάτης ή κρουτόμος (Εικόνα 7), αποτελείται από μια μικροτόμο που διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία (περίπου -20°C) μέσω κατάλληλου συστήματος ψύξης και επιτρέπει τη δημιουργία τομών πάχους 7-20 microns. Τα δείγματα που πρόκειται να τεμαχιστούν θα πρέπει να είναι μονιμοποιημένα ή απλώς κατεψυγμένα. Σε σχέση με τη μικροτόμο, οι τομές σε κρουτόμο είναι πιο δύσκολο να πραγματοποιηθούν, ενώ η μορφολογία τους είναι χαμηλότερης ποιότητας συγκριτικά με τις τομές παραφίνης, ωστόσο προσφέρουν καλύτερη διατήρηση των αντισωμάτων.

Προετοιμασία ιστών για εγκλεισμό σε OCT

Τα δείγματα των ιστών εγκλείστηκαν σε OCT (αντιδραστήριο εγκλεισης ιστών), σε ειδικές θήκες και ψύξη με υγρό άζωτο.

Παρασκευή κρουτομών

Από το κάθε μπλοκ ελήφθησαν τομές πάχους 10μm και ακολούθησε μεταφορά των τομών σε έτοιμες προς χρήση αντικειμενοφόρους πλάκες. Για την ανοσοϊστοχημεία ακολούθησε μονιμοποίηση με ακετόνη 100% στους -20°C και χρώση όπως περιγράφεται για το συνεστιακό μικροσκόπιο.

12. Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού

12.1. Δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυττάρων με MTS

Βασική αρχή:

Η δοκιμασία αυτή βασίζεται σε μια χρωμογόνο μέθοδο για τον προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων που έχουν πολλαπλασιαστεί. Το MTS περιέχει μια ένωση τετραζολίου [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS και ένα αντιδραστήριο σύζευξης ηλεκτρονίων (phenazine ethosulfate; PES). Το PES έχει αυξημένη χημική σταθερότητα, η οποία του επιτρέπει να συνδυάζεται με MTS για να σχηματίζει ένα σταθερό διάλυμα. Η δοκιμασία χρησιμοποιεί φαιναζίνη (phenazine methosulfat, PMS) ως αντιδραστήριο σύζευξης ηλεκτρονίων.

Διαδικασία:

Τα κύτταρα σε συγκέντρωση 20.000 κύτταρα/ml τοποθετήθηκαν ανά φρεάτιο πλάκας 96 φρεατίων, για 24 ώρες, στη συνέχεια επωάστηκαν με 100 μl από τα δείγματα για 6, 24 και 48 ώρες και ακολούθως, στα κύτταρα προστέθηκαν 20 μl ανά φρεάτιο MTS για 4 ώρες και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 492nm.

12.2. Δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυττάρων με 5'-βρωμο-2'δεοξουριδίνης (BrdU)

Βασική αρχή:

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μετρήθηκε χρησιμοποιώντας χρώση της βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine). Η BrdU είναι ένα συνθετικό νουκλεοτίδιο ανάλογο της θυμιδίνης, που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση της ικανότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε ζωντανούς ιστούς [76]. Η BrdU μπορεί να ενσωματωθεί στο DNA των νεοσυντιθέμενων κυττάρων κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA (στη φάση S του κυτταρικού κύκλου), αντικαθιστώντας τη θυμιδίνη. Ειδικά αντισώματα για την BrdU μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την ανίχνευση της χημικής ενσωμάτωσης, υποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα που έχουν αναπαράγει ενεργά το DNA τους. Προκειμένου να δεσμευθούν τα αντισώματα, απαιτείται προηγουμένως να αλλοιωθεί το DNA μέσω έκθεσης των κυττάρων σε θερμότητα ή οξύ [77].

Διαδικασία:

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται η διαδικασία για το συνεστιακό μικροσκόπιο. Για την ακρίβεια, 12.000 κύτταρα τοποθετήθηκαν ανά φρεάτιο πλάκας 24 φρεατίων, που περιείχε καλυπτρίδα για 24 ώρες, στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν για 48 ώρες και ακολούθως, τα κύτταρα επισημάνθηκαν για 6 ώρες με διάλυμα BrdU (20 μg/ml) και ακολουθεί επώαση στους 37°C. Μετά τη μονιμοποίηση με παραφορμαλδεΐδη, τα κύτταρα επώαστηκαν με HCl 2N, 0,1% και Triton X-100 για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώαση με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης βορικού οξέος 0,1 M για 20 λεπτά και 3 πλύσεις με PBS, πριν από την επώαση κάλυψης των μη-ειδικών θέσεων με PBS-1%BSA. Ύστερα από την αφαίρεση του θρεπτικού μέσου, τα κύτταρα σταθεροποιήθηκαν και επώαστηκαν με αντίσωμα έναντι του BrdU συζευγμένο με Alexa 546. Επανα-μονιμοποιήθηκαν για 10 λεπτά σε παραφορμαλδεΐδη και έπειτα επώαστηκαν με αντίσωμα έναντι της IgG (H+L αλυσίδα) ποντικού συζευγμένο με πράσινη ουσία Alexa 488 και TO-PRO-3 για χρώση πυρήνα (μπλε). Παρατήρηση σε μικροσκόπιο εξοπλισμένο με λάμπα UV.

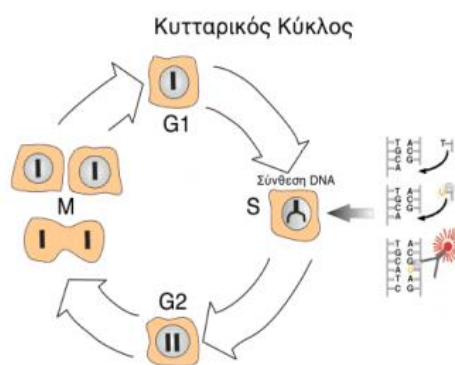
13. Έλεγχος υδρόλυσης

Το πλασμίδιο pBluescript KS II, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για τον έλεγχο της DNA υδρολυτικής ικανότητας των αντισωμάτων.

Διαδικασία:

Επώαση δειγμάτων με το πλασμιδιακό DNA

Το πλασμίδιο επώαστηκε με τα αντισώματα για 4 και 24 ώρες στους 37°C, στις εξής αναλογίες 2:1, 10:1 και 30:1 (μg αντισώματος/ μg πλασμιδίου), σε TBS που περιείχε 2 mM MgCl₂. Οι επώσεις τερματίστηκαν με την προσθήκη θρυψίνης (20 μg/ml) για 1 ώρα στους 37°C και τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αγαρόζης 2%.



Εικόνα 2.1: Ενσωμάτωση της BrdU στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα δείγματα DNA αναμειγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης σε αναλογία 1:10 και ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας ανάλογης του μεγέθους των αναλυόμενων μορίων DNA σε διάλυμα TBE 0,5x. Το πήκτωμα περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο προσδένεται στο DNA και καθιστά δυνατή την παρατήρηση αυτού υπό υπεριώδες φως λυχνίας UV. Τα δείγματα του DNA φωτογραφήθηκαν με την κάμερα KODAK Digital Science 1D και το λογισμικό EDAS 1201D.

14. Έλεγχος κατακερματισμού του DNA και συμπύκνωσης χρωματίνης

14.1. Έλεγχος κατακερματισμού του DNA

Διαδικασία:

Για τον έλεγχο κατακερματισμού του DNA, 2×10^5 κύτταρα HeLa επωάστηκαν με 300 μg/ml αντισωμάτων επί 48 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 3000g για 5 λεπτά. Ακολούθησε επώαση με υποτονικό διάλυμα λύσης A (Διάλυμα λύσης A: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mg/ml διαλύματος πρωτεΐνάσης K) για 2 ώρες στους 50°C και έπειτα πέψη του RNA με την προσθήκη 0,1 mg/ml RNase για 1 ώρα στους 37°C. Η εκχύλιση του DNA πραγματοποιήθηκε με μίγμα φαινόλης και χλωροφορμίου ενώ κατακρημνίστηκε με ίσο όγκο ισοπροπυλικής αλκοόλης. Τα DNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C για ένα βράδυ, και μετά φυγοκεντρήθηκαν στις 12000 g για 15 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα που προέκυψε στέγνωσε στον αέρα και επαναιωρήθηκε σε 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος [Tris acetate-EDTA, που περιείχε 2 μl διαλύματος sample buffer (0.25% μπλέ βρωμοφαινόλης, 30% γλυκερικό οξύ)]. Στη συνέχεια, τα δείγματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% που περιέχει 1 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο και κατέστησαν ορατά υπό υπεριώδες φως (UV).

14.2. Μελέτη της συμπύκνωσης της χρωματίνης με χρώση Hoechst

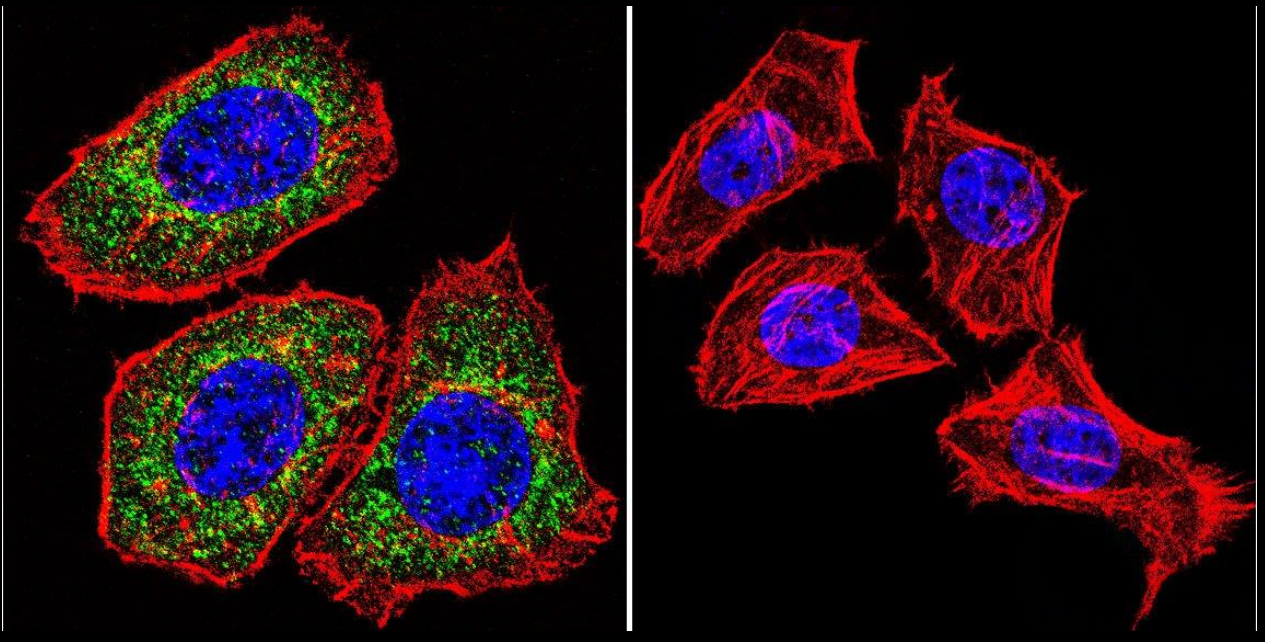
Βασική αρχή:

Για τη μελέτη του βαθμού συμπύκνωσης της χρωματίνης χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Hoechst [2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-bezimidazole] γνωστή και ως Bis-Benzimidide, η οποία είναι φθορίζουσα ουσία που συνδέεται εξωτερικά με τρεις ή περισσότερες διαδοχικές βάσεις αδενίνης-θυμιδίνης της διπλής έλικας του DNA, επιτρέποντας έτσι τον εντοπισμό της χρωματίνης του κυττάρου. Έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε μόρια DNA, προκαλώντας έντονη μπλέ φθορίζουσα χρώση στο υπεριώδες φως.

Διαδικασία:

Κύτταρα HeLa (12.000 κύτταρα/ml) τοποθετήθηκαν ανά φρεάτιο πλάκας 24 φρεατίων, που περιείχε καλυπτρίδα για 24 ώρες, στη συνέχεια επωάστηκαν τα δείγματα για 48 ώρες και ακολούθησε η διαδικασία που περιγράφεται στη συνεστιακή μικροσκοπία. Μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων, προστέθηκε σε αυτά διάλυμα χρώσης πυρήνων με Hoechst (1:500) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα επωάστηκαν με το αντίσωμα έναντι της IgG ποντικού (H+L αλυσίδα) συζευγμένο με πράσινη ουσία Alexa 488. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

I. ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΜΕ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΔΙΕΙΣΔΥΣΗΣ ΣΕ ΖΩΝΤΑ

ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΠΟ ΥΓΙΕΙΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ - ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ (IVIg)

Σε πρώτη φάση διερευνήθηκε σε πολυκλωνικό επίπεδο η παρουσία CPAbs στους υγιείς ανθρώπους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη η ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη (IVIg), σκεύασμα το οποίο περιέχει σχεδόν αποκλειστικά ανοσοσφαιρίνες, τάξης IgG (IVIg-IgG), που προέρχονται από μεγάλο αριθμό ορών υγιών ατόμων (>50.000) και το οποίο χρησιμοποιείται ήδη στη θεραπεία πληθώρας ασθενειών, όπως ανοσοανεπαρκειών, αυτοάνοσων και φλεγμονωδών νοσημάτων. Η μελέτη ως προς τη διεισδυτική ικανότητα της χωρίστηκε σε δυο σκέλη, στη μελέτη *in vitro* σε μια ποικιλία κυτταρικών σειρών και στη μελέτη *in vivo* σε διαφορετικά όργανα από ποντικούς όπου τους χορηγήθηκε ενδοφλεβίως.

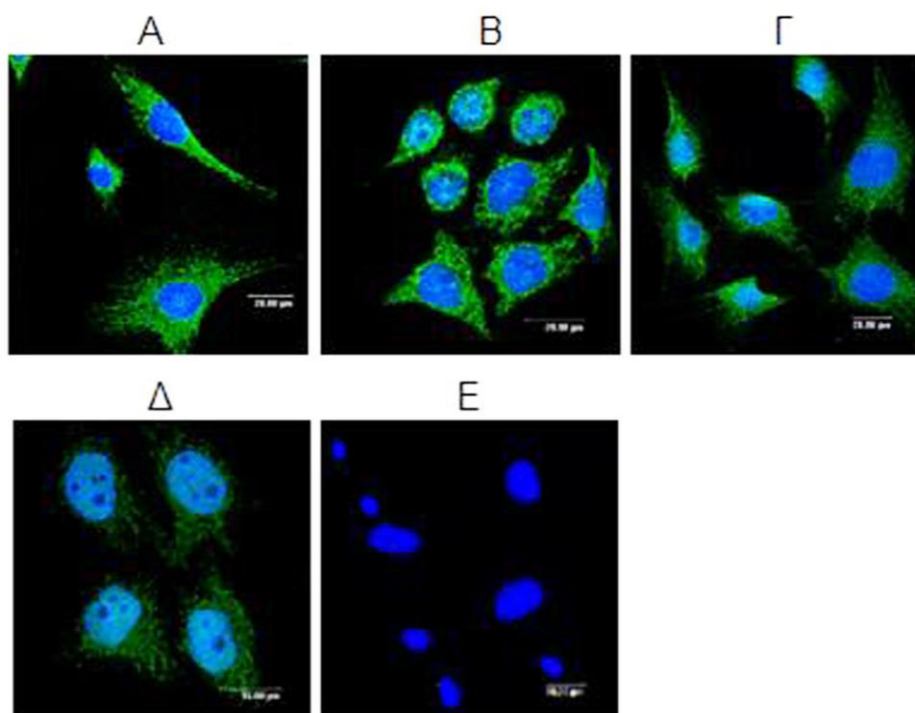
1. Μελέτη *in vitro*

Στην *in vitro* μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρία θεραπευτικά εμπορικά σκευάσματα IVIg-IgG, το Intraglobin, το Sandoglobulin και το Kionig, στα οποία διερευνήθηκε η ύπαρξη κυτταρο-διεισδυτικών αντισωμάτων.

1.1. Χαρακτηρισμός ως προς την αντισωματική δράση

Αρχικά θελήσαμε να διερευνήσουμε την δραστικότητα της IVIg έναντι συστατικών που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα ή/και στον πυρήνα των κυττάρων, με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα δύο διαφορετικών τύπων, επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπου (HeLa) και ινοβλάστες ποντικού (NIH-3T3), τα οποία μονιμοποιήθηκαν είτε με αιθανόλη ώστε να κατακρημνιστούν τα λιπίδια, είτε με παραφορμαλδεΰδη (PFA) για τη καλύτερη διατήρηση της τρισδιάστατης δομής τους (για την PFA ακολούθησε και διαπερατοποίηση με απορρυπαντικό Triton). Για την ανίχνευση της αντισωματικής δράσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε δεύτερο αντίσωμα, που αναγνώρισε τη βαριά και την ελαφριά αλυσίδα ανθρώπινων IgG, συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία Alexa 488 (1 µg/ml), ενώ για τους πυρήνες των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική TO-PRO-3 (1 µM, μπλε χρώμα). Η IVIg δοκιμάστηκε στις συγκεντρώσεις 800, 400, 200 και 100 µg/ml για 1 ώρα στους 37°C και φάνηκε πως η ιδανική συγκέντρωση είναι στα 400 µg/ml, ανεξάρτητα από το εμπορικό σκεύασμα. Η παρατήρηση και η ανάλυση του ανοσοφθορισμού στο συνεστιακό μικροσκόπιο έδειξε ότι η IVIg, στην ιδανική συγκέντρωση, ανεξάρτητα του τύπου κυττάρων και του

μονιμοποιητικού μέσου αντιδρά με συστατικά του κυτταροπλάσματος με ομοιογενή ινώδη χρώση, ενώ δεν αναγνωρίζει συστατικά του πυρήνα (**Εικόνα 1**).

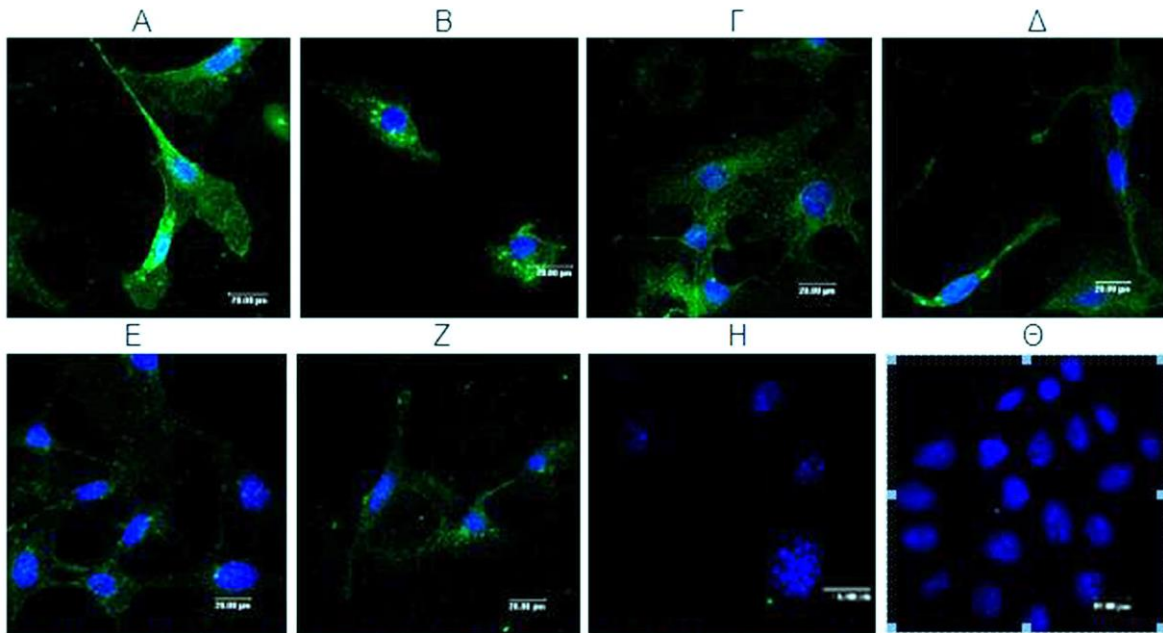


Εικόνα 1. Αντισωματική δράση της IVIg με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Μονιμοποιημένα κύτταρα NIH-3T3 και HeLa -είτε με αιθανόλη 100% είτε με PFA 2%- επωάστηκαν με την IVIg (400 μg/ml) για 1 ώρα στους 37°C. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα με θρεπτικό υλικό. Ο εντοπισμός της IVIg έγινε με τη χρήση αντισώματος έναντι της ανθρώπινης IgG (H+L αλυσίδας) συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία Alexa 488 (1 μg/ml), του πυρήνα με χρήση TOPRO3 (1μM, μπλε) και η παρατήρηση έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica Confocal TCS SP. Εικόνες μέγιστης έντασης από κύτταρα NIH-3T3 (A: με αιθανόλη, Γ: με PFA) και HeLa (B: με αιθανόλη, Δ: με PFA). Φακός x63, κλίμακα 20 μm.

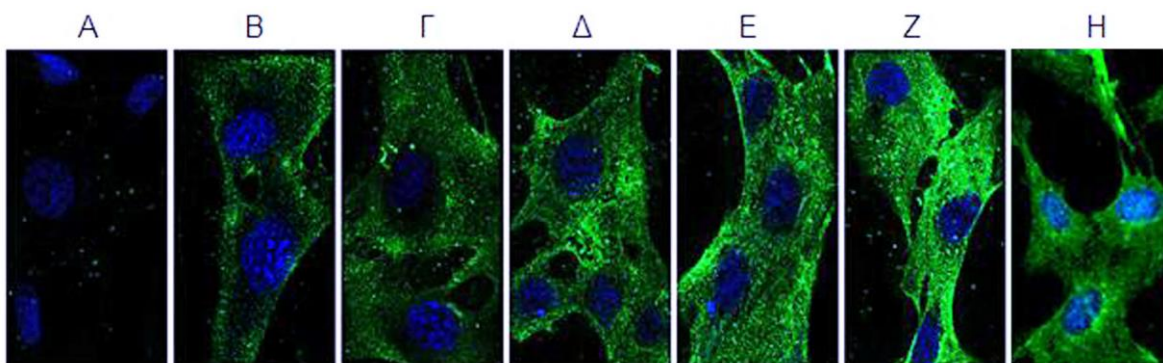
1.2. Έλεγχος ως προς τη κυτταρο-διεισδυτική ικανότητα

Για τον έλεγχο της κυτταρο-διεισδυτικής ικανότητας της IVIg, πρώτα προσδιορίστηκαν οι άριστες συνθήκες, ως προς τη συγκέντρωσή της και τη διάρκεια επώασής της με τα κύτταρα. Για την εύρεση της άριστης συγκέντρωσης κύτταρα NIH-3T3 επωάστηκαν για δύο ώρες στους 37°C (συνθήκες που έχουν περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες των CPAbs), με διαφορετικές συγκεντρώσεις της IVIg 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 και 0.05 mg/ml (**Εικόνα 2**). Φάνηκε ότι η διείσδυση της IVIg, ανεξάρτητα από το εμπορικό σκεύασμα, ήταν ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωσή της. Αναλυτικά η άριστη συγκέντρωση της IVIg προσδιορίστηκε στο 1.6 mg/ml (πάνω από αυτήν, το φαινόμενο παρέμενε σταθερό), ενώ στη χαμηλότερη συγκέντρωση των 0.05 mg/ml το φαινόμενο είχε σχεδόν εξαφανισθεί.

Μετά την εύρεση των άριστων συνθηκών της διείσδυσης, θελήσαμε να διερευνήσουμε την κινητική του φαινομένου στα κύτταρα NIH-3T3. Τα κύτταρα επώαστηκαν με την IVIg σε διάφορους χρόνους 2, 15, 30, 60, 120 και 240 λεπτά (**Εικόνα 3.**). Η κινητική της διείσδυσης αποκάλυψε ότι η IVIg εντοπιζόταν ενδοκυττάρια από τα πρώτα 2 λεπτά (**Εικόνα 3B.**), και στη συνέχεια το φαινόμενο ενισχυόταν προοδευτικά μέχρι και τις 2 ώρες (**Εικόνα 3Z.**), όπου και παρέμενε σταθερό μέχρι τις 4 ώρες επώασης (**Εικόνα 3H.**).



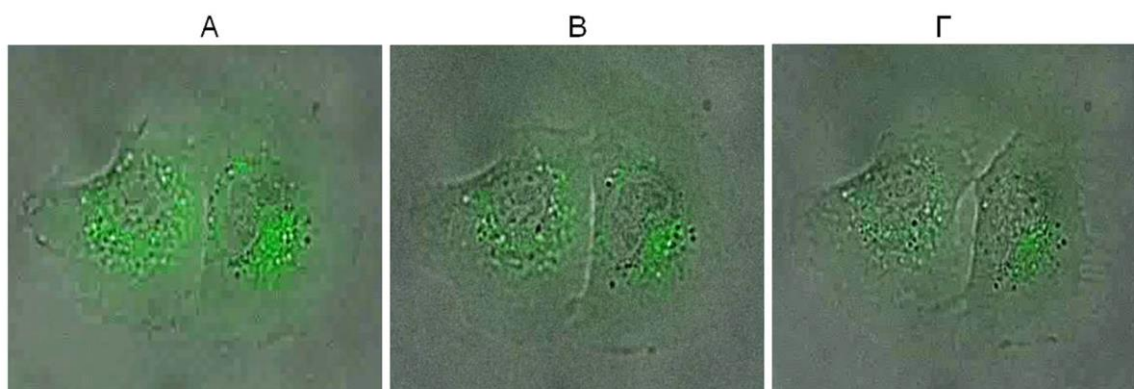
Εικόνα 2. Εύρεση άριστης συγκέντρωσης της IVIg για τη διείσδυσή της σε κύτταρα NIH-3T3. Κύτταρα NIH-3T3 επώαστηκαν με την IVIg σε διάφορες συγκεντρώσεις (3.2-0.05 mg/ml) για 2 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε μονιμοποίηση με 100% αιθανόλη, προσθήκη αντισώματος έναντι της ανθρώπινης IgG (H+L αλυσίδας) συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία Alexa 488 (1 µg/ml), χρώση του πυρήνα με TOPRO3 (1µM, μπλε) και η παρατήρηση έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica Confocal TCS SP. Εικόνες μέγιστης έντασης κυττάρων NIH-3T3, μετά από επώαση της IVIg στις εξής συγκεντρώσεις: A) 3.2 mg/ml, B) 1.6 mg/ml, Γ) 0.8 mg/ml, Δ) 0.4 mg/ml, E) 0.2 mg/ml, Z) 0.1 mg/ml, H) 0.05 mg/ml. Θ) Κύτταρα με θρεπτικό υλικό (αρνητικός μάρτυρας). Φακός x63, κλίμακα 20 µm.



Εικόνα 3. Κινητική διείσδυσης της IVIg σε κύτταρα NIH-3T3. Κύτταρα NIH-3T3 επώαστηκαν με την IVIg (1.6 mg/ml) σε διάφορους χρόνους (0-240 λεπτά) στους 37°C.

Ακολούθησε μονιμοποίηση με 100% αιθανόλη, προσθήκη αντισώματος έναντι της ανθρώπινης IgG (H+L αλυσίδας) συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία Alexa 488 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), χρώση του πυρήνα με TOPRO3 (1 μM , μπλε) και η παρατήρηση έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica Confocal TCS SP. Εικόνες μέγιστης έντασης κυττάρων NIH-3T3, μετά από επώαση της IVIg στους εξής χρόνους: Α) 0 λεπτά, Β) 2 λεπτά, Γ) 15 λεπτά, Δ) 30 λεπτά, Ε) 60 λεπτά, Ζ) 120 λεπτά και Η) 240 λεπτά. Φακός x63, κλίμακα 20 μm .

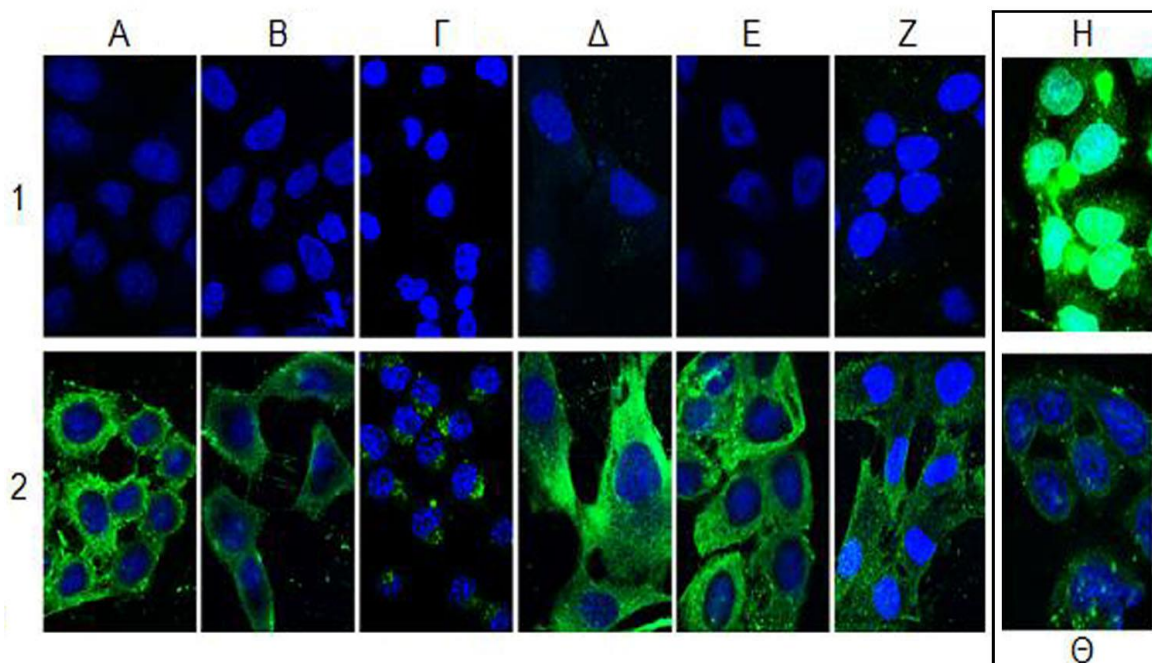
Παράλληλα, έγινε και μια προσπάθεια βιντεοσκόπησης της κυτταρικής διείσδυσης της IVIg σε μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου OLYMPUS Time lapse. Για το σκοπό αυτό, η IVIg συζεύχθηκε με φθορίζουσα πράσινη ουσία FITC (IVIg-FITC). Ζωντανά -μη μονιμοποιημένα- κύτταρα NIH-3T3 επώαστηκαν με την IVIg-FITC (2mg/ml) για 1 ώρα στους 4°C και στη συνέχεια για 20 λεπτά στους 37°C. Η βιντεοσκόπηση του φαινομένου στο μικροσκόπιο ξεκίνησε στα πρώτα 10 λεπτά στους 37°C. Από τη βιντεοσκόπηση φάνηκε ότι στα 10 λεπτά η IVIg είχε ήδη εισχωρήσει στα κύτταρα και στα 20 λεπτά εντοπιζόταν στο κυτταρόπλασμα, σε περιοχές γύρω από τον πυρήνα (**Εικόνα 4.**). Τα παραπάνω αποτελέσματα μας απέδειξαν ότι η IVIg διαθέτει κυτταρο-διεισδυτική ικανότητα, ανεξάρτητα από το εμπορικό σκεύασμα και τον τύπο κυττάρων που δοκιμάστηκαν. Το φαινόμενο της κυτταρικής διείσδυσης της IVIg είναι ταχύτατο, συμβαίνει από τα πρώτα λεπτά και είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της IVIg, παρουσιάζοντας πλατό στη συγκέντρωση των 1.6 mg/ml μετά από 2 ώρες. Επίσης, η ενδοκυττάρια IVIg συσσωρεύεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα, όπως φάνηκε και στη βιντεοσκόπηση. Τέλος, το φαινόμενο αυτό δεν είναι «artifact», αφού διαπιστώθηκε με διαφορετικές μεθόδους, που περιελάμβαναν έμμεσο και άμεσο ανοσοφθορισμό.



Εικόνα 4. Βιντεοσκόπηση της διείσδυσης της IVIg σε κύτταρα NIH-3T3. Κύτταρα NIH-3T3 επώαστηκαν με την IVIg συζευγμένη με πράσινη φθορίζουσα ουσία FITC (IVIg-FITC) (2mg/ml) για 1 ώρα στους 4°C και στη συνέχεια στους 37°C. Η βιντεοσκόπηση στο μικροσκόπιο ξεκίνησε στα πρώτα 10 λεπτά και διήρκησε μέχρι τα 20 λεπτά επώασης. Η βιντεοσκόπηση έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου OLYMPUS Time lapse Cell R IX-81. Καρέ από τα πρώτα: Α) 10 λεπτά, Β) 15 λεπτά και Γ) 20 λεπτά επώασης. Φακός X40.

1.2.1. Ενδοκυττάριος εντοπισμός της IVIg

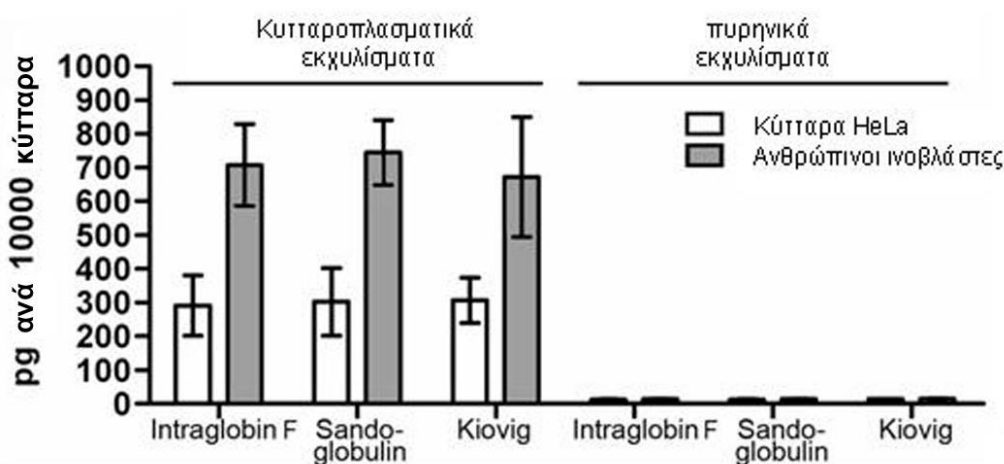
Από τα παραπάνω αποτελέσματα, το ενδιαφέρον μας τράβηξε ο ενδοκυττάριος εντοπισμός της IVIg, που ήταν κυτταροπλασματικός, σε αντίθεση με αυτόν των παθολογικών CPAbs που είναι κατεξοχήν πυρηνικός. Έτσι, θελήσαμε να διερευνήσουμε τον ενδοκυττάριο εντοπισμό της IVIg σε διάφορες κυτταρικές σειρές, οι οποίες επωάστηκαν με την IVIg, στις άριστες συνθήκες, δηλαδή σε συγκέντρωση 1.6 mg/ml, για 2 ώρες στους 37°C (**Εικόνα 5.**). Τα κύτταρα που δοκιμάστηκαν ήταν ινοβλάστες από δέρμα ποντικού (NIH-3T3) και ανθρώπου (πρωτογενείς ινοβλάστες), νευροϊνοβλάστωμα ποντικού (N2a), και επιθηλιακά κύτταρα από ήπαρ ανθρώπου (HepG2), νεφρό πιθήκου (Vero) και μήτρα ανθρώπου (HeLa). Βρέθηκε ότι ανεξάρτητα από τον τύπο κυττάρων που εξετάσαμε η IVIg είχε την ικανότητα να διεισδύει και να συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, αλλά όχι στον πυρήνα τους. Αντίθετα, οροί από 4 ασθενείς με ΣΕΛ (αραίωση ορών 1/10), που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, έδειξαν κύριο πυρηνικό εντοπισμό, επιβεβαιώνοντας την υπάρχουσα γνώση περί πυρηνικού εντοπισμού των CPAbs στη νόσο, αλλά και την επάρκεια της μεθόδου ως προς τη δυνατότητα να παρατηρούμε διακριτό κυτταροπλασματικό και πυρηνικό εντοπισμό. Παράλληλα, για να διαπιστωθεί εάν η διείσδυση της IVIg ήταν αποτέλεσμα του μεγάλου εύρους αντισωματικών δραστηριοτήτων που περιέχονται στο σκεύασμα (προέλευση από >50.000 δότες), δοκιμάστηκαν ολικές IgG που απομονώθηκαν ξεχωριστά από τον ορό 5 υγιών δοτών, στην ίδια με την IVIg συγκέντρωση 1.6 mg/ml. Βρέθηκε, πως οι IgG των ξεχωριστών δοτών, παρουσιάζουν επίσης ικανότητα διείσδυσης και εντοπισμού στο κυτταρόπλασμα, αλλά σε με μικρότερη ένταση και με διαφορετικό προφίλ χρώσης σε σχέση με την IVIg.



Εικόνα 5. Διείσδυση της IVIg σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό (1) ή με την IVIg [1.6 mg/ml, (2)] για 2 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε μονιμοποίηση με αιθανόλη 100%, προσθήκη αντισώματος έναντι της ανθρώπινης IgG (H+L αλυσίδας) συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία Alexa 488 (1 µg/ml), χρώση του πυρήνα με TOPRO3 (1µM, μπλε) και η παρατήρηση έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica Confocal TCS SP. Εικόνες μεσαίας τομής κυττάρων: Α) HeLa, Β) Vero, Γ) N2a, Δ) ανθρώπινοι ινοβλάστες (πρωτογενείς), Ε) HepG2 και Ζ) NIH-3T3. Κύτταρα HeLa μετά από επώαση για 2 ώρες στους 37°C με: Η) ορό από ασθενή με ΣΕΛ (αραίωση 1/10) και Θ) IgG από έναν υγιή δότη ενδεικτικά (1.6 mg/ml). Φακός x63, κλίμακα 20 µm.

1.2.1.1. Συγκέντρωση της ενδοκυττάριας IVIg

Στη συνέχεια, θελήσαμε να προσδιορίσουμε την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της IVIg, σε δύο από τις κυτταρικές σειρές όπου διαπιστώθηκε προηγουμένως η διείσδυσή της. Η μέτρηση της ενδοκυττάριας IVIg στα κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε με ELISA, μετά από επώαση της IVIg με τις κυτταρικές σειρές HeLa και NIH-3T3, θρυψινοποίηση και λύση των κυττάρων (**Εικόνα 6.**). Διαπιστώθηκε ότι ανιχνεύσιμα επίπεδα της IVIg εντοπίζονταν μόνο στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα και των δυο κυτταρικών τύπων. Συγκεκριμένα, στα κύτταρα NIH-3T3 η συγκέντρωση της ενδοκυττάριας IVIg ήταν 700 pg/10³ κύτταρα και στα κύτταρα HeLa 300 pg/10³ κύτταρα. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται να επιβεβαιώσει τα προηγούμενα σχετικά με τον εντοπισμό της IVIg στο κυτταρόπλασμα και όχι στον πυρήνα. Ακόμα προσθέτει τη γνώση ότι οι ινοβλάστες περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες ενδοκυττάριας IVIg σε σχέση με τα καρκινικά επιθήλια, πιθανά λόγω μεγέθους (τα NIH-3T3 είναι μεγαλύτερα κύτταρα με μεγαλύτερο κυτταρόπλασμα σε σχέση με τα HeLa) και μεμβρανικής σύστασης.

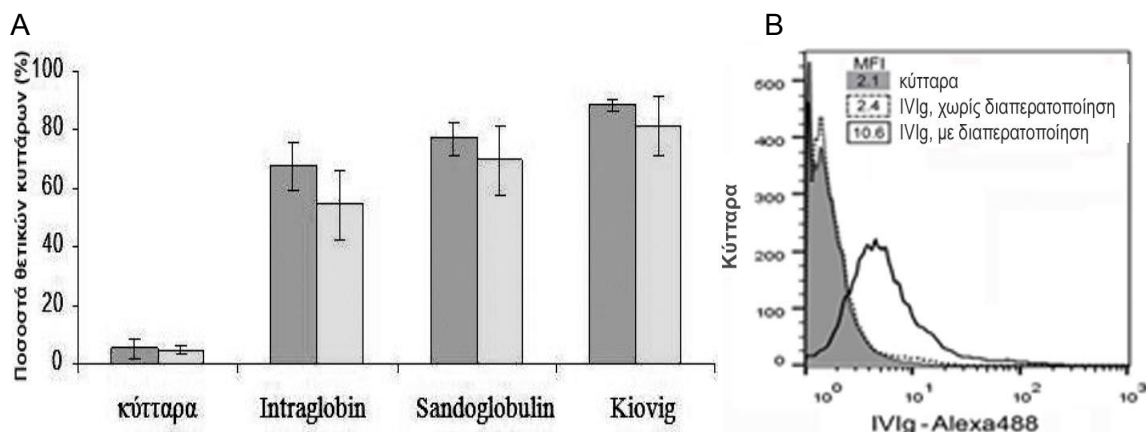


Εικόνα 6. Συγκέντρωση της ενδοκυττάριας IVIg σε κύτταρα HeLa και NIH-3T3. Κύτταρα NIH-3T3 και HeLa επώαστηκαν με την IVIg (1.6 mg/ml) για 2 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε, θρυψινοποίηση των κυττάρων, λύση τους με υποοσμωτικά διαλύματα, απομόνωση των κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων και μέτρηση της ανθρώπινης IgG με ELISA. Διάγραμμα συγκέντρωσης ενδοκυττάριας IVIg, εκφρασμένης

σε ρg ανά 10.000 κύτταρα κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα HeLa (σκιασμένη μπάρα) και κύτταρα NIH-3T3 (λευκή μπάρα).

1.2.3. Ποσοστό κυττάρων θετικών για ενδοκυττάρια IVIg

Πραγματοποιήθηκε επίσης ο προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων στα οποία είχε διεισδύσει η IVIg, με κυτταρομετρία ροής (FACs). Στις άριστες συνθήκες, κύτταρα HeLa και NIH-3T3 επωάστηκαν με την IVIg (1.6 mg/ml) για 2 ώρες στους 37°C και μετά τη θρυψινοποίησή τους, μονιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν στο FACs (**Εικόνα 7A.**). Βρέθηκε πως ανεξάρτητα από το εμπορικό σκεύασμα και την κυτταρική σειρά, η IVIg εντοπίζεται σε ένα υψηλό ποσοστό κυττάρων. Συγκεκριμένα, για τα κύτταρα NIH-3T3 το ποσοστό ήταν 55-82%, ενώ για τα HeLa ήταν 67-88%, επιβεβαιώνοντας και τα αποτελέσματα από το συνεστιακό μικροσκόπιο, όπου μεγάλο ποσοστό κυττάρων περιείχε στο κυτταρόπλασμα την IVIg. Επιπλέον, σε συμπληρωματικό πείραμα ελέγχθηκε εάν το αντίσωμα ανίχνευσης που χρησιμοποιήσαμε προσδένεται στην επιφάνεια των κυττάρων και σε τι ποσοστό. Για το σκοπό αυτό κύτταρα NIH-3T3, στα οποία είχε διεισδύσει η IVIg, επεξεργάστηκαν ακριβώς όπως παραπάνω (δηλ. θρυψινοποίηση, μονιμοποίηση και προσθήκη του ίδιου αντισώματος ανίχνευσης), με τη διαφορά ότι μετά τη μονιμοποίηση με PFA δεν διαπερατοποιήθηκαν. Βρέθηκε πως η χρώση που προέκυπτε από το αντίσωμα ανίχνευσης ήταν αποκλειστικά ενδοκυττάρια -και καθόλου επιφανειακή- αφού τα μη διαπερατοποιημένα κύτταρα δεν παρουσίαζαν φθορισμό (MFI=2.4), όπως τα σκέτα κύτταρα (MFI=2.1) (**Εικόνα 7B.**).



Εικόνα 7. Ποσοστό κυττάρων θετικών για ενδοκυττάρια IVIg. Κύτταρα NIH-3T3 και HeLa επωάστηκαν με την IVIg (1.6 mg/ml) για 2 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε θρυψινοποίηση, μονιμοποίηση των κυττάρων με αιθανόλη 100%, προσθήκη αντισώματος έναντι της ανθρώπινης IgG (H+L αλυσίδας) συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία Alexa 488 (1 μg/ml) για τον εντοπισμό της IVIg και ανάλυση με κυτταρομετρητή ροής FACSCalibur. A) Διάγραμμα ποσοστού θετικών κυττάρων HeLa (σκούρο γκρι) και NIH-3T3 (ανοιχτό γκρι) για ενδοκυττάρια IVIg, B) Διάγραμμα φθορισμού κυττάρων που επωάστηκαν με θρεπτικό υλικό (γκρί), με IVIg χωρίς να διαπερατοποιηθούν (διακεκομμένη γραμμή), και με IVIg και διαπερατοποίηση.

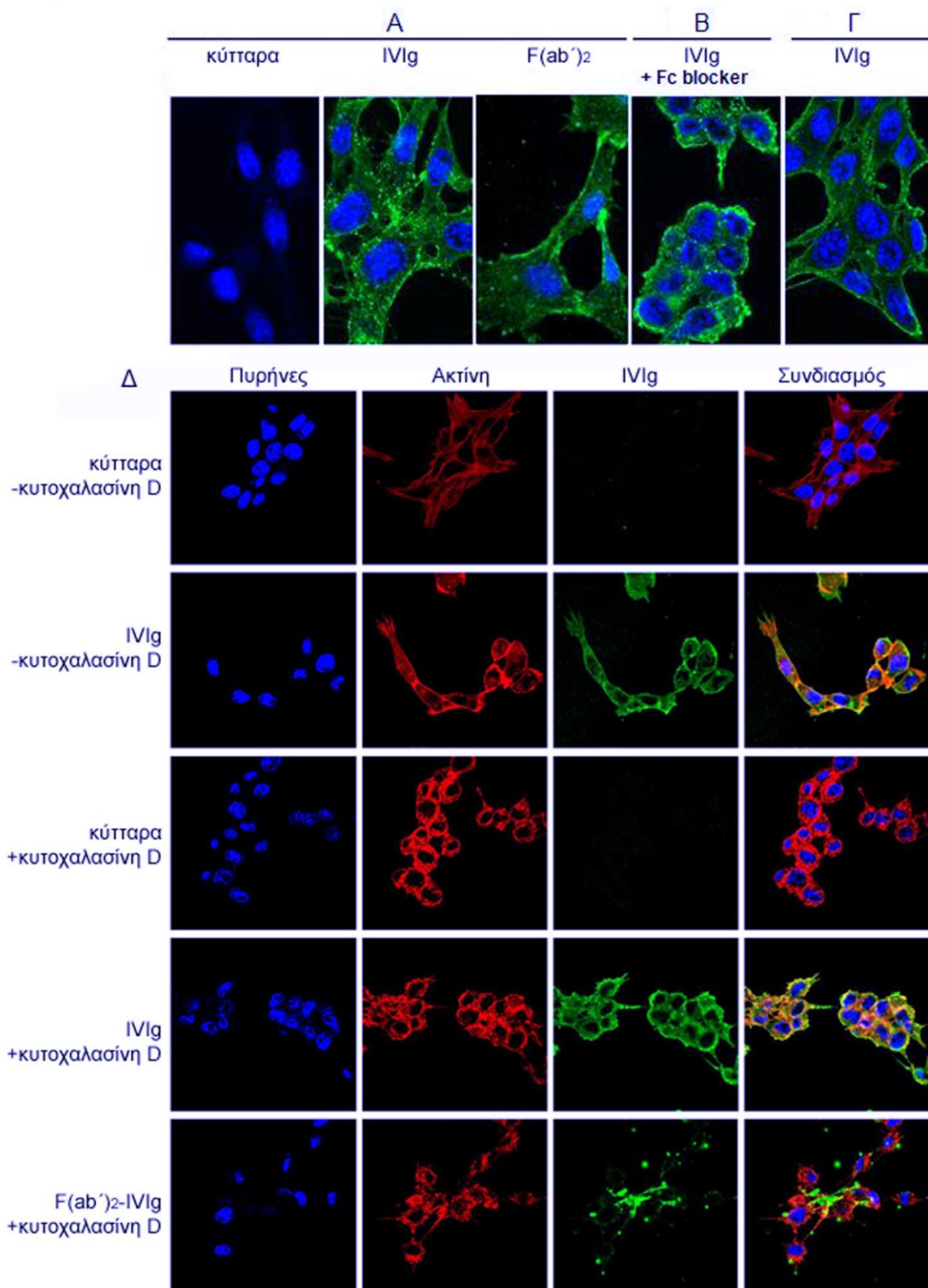
1.3. Μηχανισμός διείσδυσης της IVIg

Ως προς τον μηχανισμό της κυτταρικής διείσδυσης της IVIg διερευνήσαμε την εξάρτηση του φαινομένου από: 1) τη μεταβλητή περιοχή της IVIg, δηλαδή το τμήμα F(ab')₂, 2) τους Fc υποδοχείς των κυττάρων και συνεπώς έμμεσα από το Fc τμήμα της IVIg, και 3) την κατανάλωση ενέργειας με επώαση των κυττάρων στους 4°C ή παρουσία αναστολέα για την μακροπινोकύτωση.

1) Σχετικά με τον πρώτο στόχο, θραύσματα F(ab')₂ της IVIg [F(ab')₂-IVIg] παρασκευάστηκαν και η κυτταρο-διεισδυτική τους ικανότητα προσδιορίστηκε με συνεστιακό μικροσκόπιο, συγκριτικά με αυτήν της IVIg. Έτσι, κύτταρα NIH-3T3 επωάστηκαν με F(ab')₂-IVIg ή IVIg στις άριστες συνθήκες, δηλαδή σε συγκέντρωση 1,6 mg/ml για 2 ώρες στους 37°C. Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός αυτή τη φορά ανιχνεύτηκε με αντίσωμα έναντι του τμήματος Fab της ανθρώπινης IgG συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία FITC. Διαπιστώθηκε ότι τα θραύσματα F(ab')₂-IVIg έδιναν παρόμοια εικόνα διείσδυσης με αυτήν της IVIg στο κυτταρόπλασμα, συμπεραίνοντας ότι η κυτταρική διείσδυση της IVIg είναι ευθέως εξαρτώμενη από το τμήμα F(ab')₂, που φέρει τη μεταβλητή περιοχή (**Εικόνα 8Α.**).

2) Εξετάστηκε αν η κυτταρική διείσδυση συνέβαινε μέσω Fc-υποδοχέων. Κύτταρα NIH-3T3 προεπώαστηκαν με αντίσωμα έναντι του Fc-υποδοχέα (FcR blocker) (10μg/ml) και στη συνέχεια, παρουσία του αναστολέα επωάστηκαν με την IVIg για 2 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε η διαδικασία για την παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο και βρέθηκε ότι η IVIg εντοπιζόταν ενδοκυττάρια παρουσία του FcR-αναστολέα, αναδεικνύοντας ότι η κυτταρική της διείσδυση δεν εξαρτάται από τους Fc υποδοχείς του κυττάρου, και άρα ούτε από το Fc τμήμα της (**Εικόνα 8Β.**).

3) Διερευνήθηκε αν ο μηχανισμός εισόδου της IVIg εξαρτάται από την κατανάλωση ενέργειας, μειώνοντας τη θερμοκρασία επώασης στους 4°C. Κύτταρα NIH-3T3 προεπώαστηκαν για 45 λεπτά στους 4°C και έπειτα επωάστηκαν με την IVIg (1.6 mg/ml) για 2 ώρες στους 4°C. Παρατηρήθηκε ότι η διεισδυτική ικανότητα της IVIg στους 4°C ήταν παρόμοια με αυτή στους 37°C και άρα ότι είναι ανεξάρτητη της κατανάλωσης ενέργειας από το κύτταρο (**Εικόνα 8Γ.**) Ένα άλλο πείραμα που επιβεβαίωσε την ανεξάρτητη της μακροπινोकύτωσης είσοδο της IVIg στα κύτταρα ήταν αυτό με την παρουσία κυτοχλασίνης D, η οποία αναστέλλει τον πολυμερισμό της ακτίνης. Κύτταρα NIH-3T3 που είχαν προεπωαστεί με την κυτοχλασίνη D (1 μg/ml) για 30 λεπτά στους 37°C, επωάστηκαν παρουσία της κυτοχλασίνης με την IVIg (1.6 mg/ml) για 2 ώρες στους 37°C. Το αποτέλεσμα της διείσδυσης παρέμενε αμετάβλητο με την παρουσία κυτοχλασίνης, αποδεικνύοντας ότι η κυτταρο-διείσδυση της IVIg είναι ανεξάρτητη της μακροπινोकύτωσης (**Εικόνα 8Δ.**).



Εικόνα 8. Μηχανισμός κυτταρο-διδείσδυσης της IVIg. Κύτταρα NIH-3T3 επωάστηκαν με την IVIg (1.6 mg/ml) για 2 ώρες στους 37°C (A,B,Δ) και 4°C (Γ) σε διάφορες συνθήκες. Ακολούθησε μονιμοποίηση με αιθανόλη 100%, προσθήκη αντισώματος έναντι του Fab τμήματος της ανθρώπινης IgG (A) και έναντι της ανθρώπινης IgG (H+L αλυσίδας) (B-Δ),

συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία Alexa 488 (1 µg/ml), χρώση του πυρήνα με TOPRO3 (1µM, μπλε), της ακτίνης με χρήση ροδαμίνης-φαλοϊδίνης-TRITC (κόκκινο 1/100 αραιώση) και η παρατήρηση έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica Confocal TCS SP. Εικόνες μεσαίας τομής κυττάρων NIH-3T3 μετά από επώαση με: Α) F(ab')₂ (1.6 mg/ml), Β) IVIg παρουσία Fc-αναστολέα (10µg/ml), Γ) IVIg στους 4°C και Δ) IVIg παρουσία κυτοχλασίνης D (1 µg/ml). Φακός x63, κλίμακα 20 µm.

1.4. Απομόνωση υποπληθυσμών της IVIg με κυτταρο-δισιδυτική ικανότητα

Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα, τα οποία έδειχναν ξεκάθαρα την ικανότητα διείσδυσης της IVIg σε ζώντα κύτταρα, επόμενος στόχος ήταν η διερεύνηση της ύπαρξης συγκεκριμένων υποπληθυσμών που φέρουν αυτή την ιδιότητα μέσα στο πολυκλωνικό μίγμα IgG.

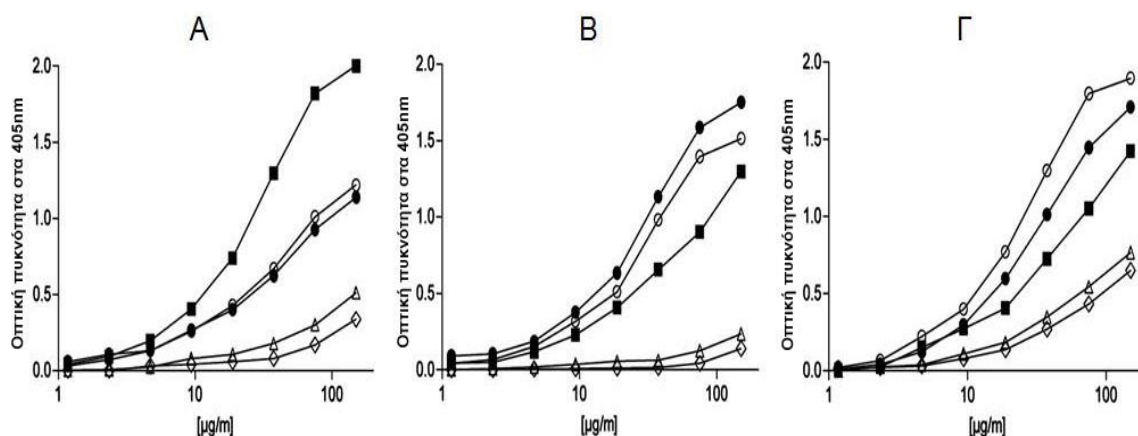
1.4.1. Απομόνωση υποπληθυσμών IgG έναντι ιστονών, ηπαρίνης και DNA

Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν κατάλληλοι ανοσοπροσροφητές με αντιγόνα, που έχουν προηγουμένως συσχετιστεί με τα γνωστά στη νόσο CPAbs όπως είναι οι ιστόνες, το DNA και η ηπαρίνη. Αναλυτικά, 100 mg της IVIg προσροφήθηκαν εξαντλητικά (μέχρι να μην υπάρχει άλλη έκλυση, δηλαδή η οπτική πυκνότητά της να είναι μηδέν) από κάθε κολώνα και οι εκλούσεις που προέκυψαν αποτέλεσαν τους τρεις διαφορετικούς υποπληθυσμούς. Στη συνέχεια, η έκπλυση περάστηκε διαδοχικά και εξαντλητικά από τους τρεις διαφορετικούς ανοσοπροσροφητές και προέκυψε η IVIg τελείως απαλλαγμένη από αυτούς (συνολική έκπλυση). Οι απομονωμένοι υποπληθυσμοί καθώς και η IVIg απαλλαγμένη από αυτούς μελετήθηκαν συγκριτικά με την ακέραια IVIg τόσο ως προς την αντισωματική τους δράση όσο και ως προς τη διεισδυτική τους ικανότητα.

1.4.2. Χαρακτηρισμός ως προς την αντισωματική δράση

Μετά την απομόνωση των υποπληθυσμών IgG ακολούθησε έλεγχος με ELISA ως προς την αντισωματική τους δράση, συγκριτικά με την ακέραια IVIg και την IVIg απαλλαγμένη από τους τρεις υποπληθυσμούς. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η αναγνώριση μιας σειράς αντιγόνων, αυτόλογων -που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωσή τους- (ιστόνες, ηπαρίνη και DNA) (**Εικόνα 9.**), αλλά και έναντι άλλων κλασικών στόχων των NAb [ακτίνη, τουμπουλίνη, F(ab')₂, καρβονική ανυδράση, τρινιτροφαινόλη (TNP) και Tg] (**Πίνακας 1.**). Διαπιστώθηκε ότι ο κάθε απομονωμένος υποπληθυσμός αναγνώριζε το αυτόλογο αντιγόνο, αλλά διατηρούσε και την πολυδραστικότητά του, αφού αναγνώριζε, σε διαφορετικό βαθμό μεταξύ τους, και τα υπόλοιπα αντιγόνα. Ποσοτικά οι τρεις διεισδυτικοί υποπληθυσμοί μαζί αποτελούσαν περίπου το 2% της ακέραιας IVIg, δηλαδή από τα 100mg IVIg τα κυτταρο-δισιδυτικά αντισώματα ήταν 2mg. Η IVIg απαλλαγμένη από

αυτούς, δηλαδή η συνολική έκπλυση που περάστηκε διαδοχικά και εξαντλητικά από τους τρεις διαφορετικούς ανοσοπροσροφητές, δεν παρουσίασε σημαντικές αλλαγές στην αντισωματική δράση της σε σχέση με την ολόκληρη.



Εικόνα 9. Αντισωματική δράση των υποπληθυσμών της IVIg έναντι των αυτόλογων αντιγόνων. Οι υποπληθυσμοί αντισωμάτων που απομονώθηκαν με ανοσοπροσροφητές ιστονών (■), ηπαρίνης (●) και DNA (ο), εξετάστηκαν σε σύγκριση με την ακέραια IVIg (Δ) και την IVIg απαλλαγμένη από τον εκάστοτε υποπληθυσμό (◇), ως προς τη δραστηριότητά τους με ELISA. Τα διαγράμματα δείχνουν την οπτική πυκνότητα στα 450 nm δειγμάτων που ελέγχθηκαν από 150 μg/ml έως 1,1 μg/ml, έναντι των: Α) ιστονών, Β) ηπαρίνης και Γ) DNA.

Πίνακας 1. Απομονωμένα αντισώματα: προφίλ πολυδραστικότητας (ELISA)

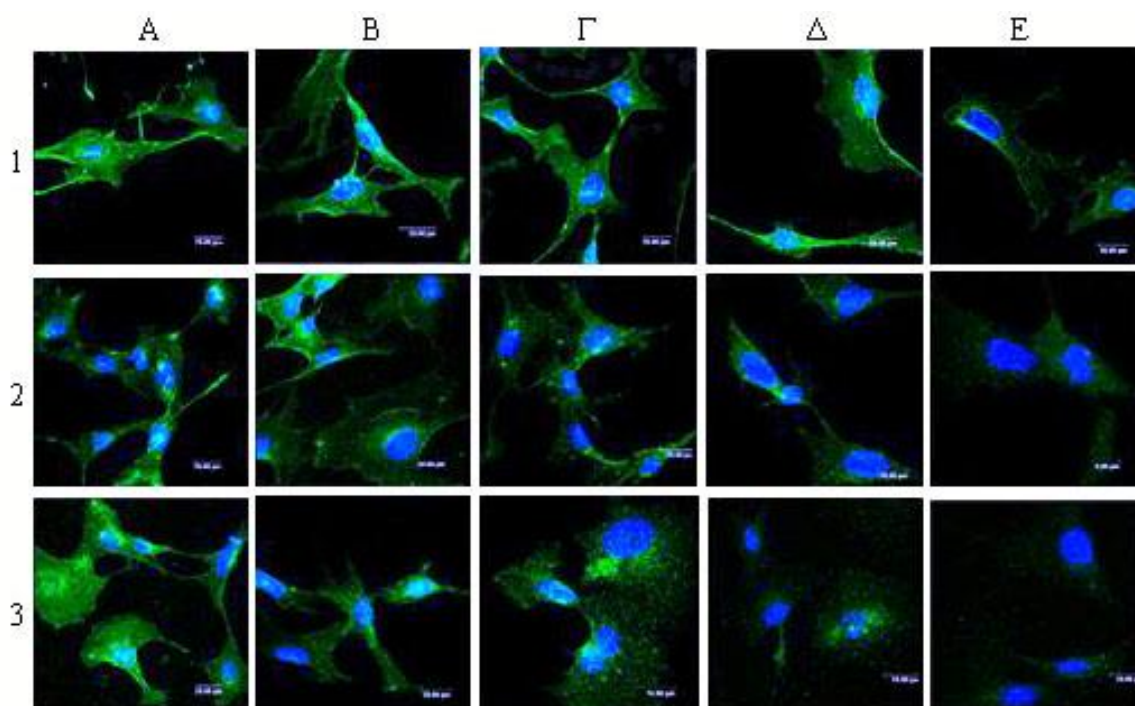
Δείγματα	Απομονωμένη ποσότητα IgG (%) ^α	Αντισωματική δραστηριότητα ^β								
		Ηπαρίνη	Ιστόνες	DNA	Ακίνητη Τουμπου-λίνη	F(ab') ₂	Καρβονική ανυδράση	TNP BSA	Θυρεό-σφαιρίνη	
IVIg	–	0.06	0.18	0.346	0.18	0.06	0.06	0.17	0.40	0.29
Abs έναντι ιστονών	1.20	0.65	1.31	0.72	1.02	0.86	0.72	0.93	0.43	0.33
Abs έναντι ηπαρίνης	0.48	1.13	0.62	1.01	0.68	0.82	0.59	0.81	0.35	0.35
Abs έναντι DNA	0.45	0.98	0.67	1.30	0.65	0.58	0.70	0.71	0.30	0.36

^α Η ποσότητα του κάθε υποπληθυσμού IgG που απομονώθηκε από 100 mg IVIg, μετά από 3-4 φορές επανάληψη της ανοσοπροσρόφησης

^β Η αντισωματική δραστηριότητα έναντι μιας σειράς αντιγόνων με ELISA, εκφρασμένη σε τιμές οπτικής πυκνότητας στην ιδανική συγκέντρωση των 37,5 μg/ml.

1.4.3. Έλεγχος ως προς την κυτταρο-διδεισδυτική ικανότητα

Για τον έλεγχο της κυτταρικής διείσδυσης των απομονωμένων υποπληθυσμών, προσδιορίστηκε πρώτα η άριστη συγκέντρωσή τους στις προαναφερθείσες συνθήκες και παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Έτσι, κύτταρα NIH-3T3, επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις των απομονωμένων υποπληθυσμών (800, 400, 200, 100 και 50 $\mu\text{g/ml}$) για 2 ώρες στους 37°C (**Εικόνα 10.**). Βρέθηκε ότι η άριστη συγκέντρωση και για τους τρεις υποπληθυσμούς ήταν τα 200 $\mu\text{g/ml}$, πολύ μικρότερη -υποοχταπλάσια- σε σχέση με την αντίστοιχη της ολόκληρης IVIg, που ήταν 1.6 mg/ml . Επιπλέον, ο εντοπισμός των τριών υποπληθυσμών ήταν κυτταροπλασματικός, όπως αυτός της IVIg.

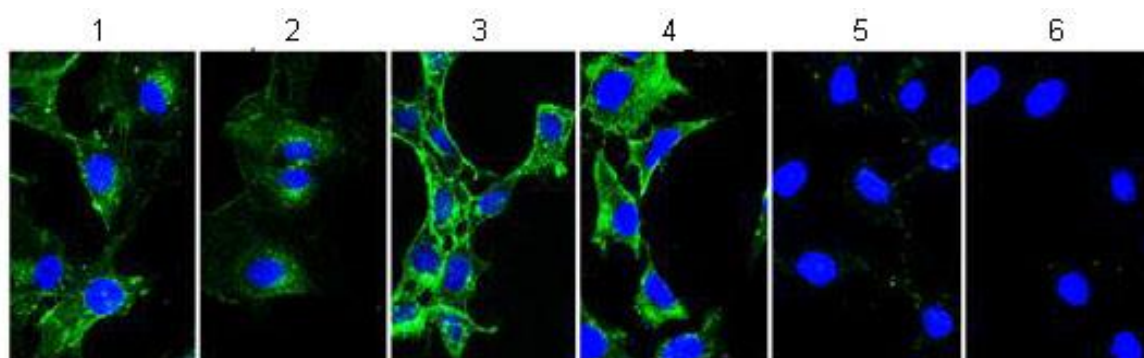


Εικόνα 10. Άριστη συγκέντρωση της IVIg σε κύτταρα NIH-3T3. Κύτταρα NIH-3T3 επώαστηκαν με τους τρεις υποπληθυσμούς σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (800 – 50 $\mu\text{g/ml}$) για 2 ώρες στους 37°C . Ακολούθησε μονιμοποίηση με αιθανόλη 100%, προσθήκη αντισώματος έναντι της ανθρώπινης IgG (H+L αλυσίδας) συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία Alexa 488 (1 $\mu\text{g/ml}$), χρώση του πυρήνα με TOPRO3 (1 μM , μπλε) και η παρατήρηση έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica Confocal TCS SP. Εικόνες μέγιστης έντασης NIH-3T3 κυττάρων μετά από επώαση των υποπληθυσμών: 1) αντι-ιστονών, 2) αντι-ηπαρίνης και 3) αντι-DNA στις συγκεντρώσεις: A) 800 $\mu\text{g/ml}$, B) 400 $\mu\text{g/ml}$, Γ) 200 $\mu\text{g/ml}$, Δ) 100 $\mu\text{g/ml}$, E) 50 $\mu\text{g/ml}$. Φακός $\times 63$, κλίμακα 20 μm .

1.4.3.1. Ενδοκυττάριος εντοπισμός

Οι τρεις απομονωμένοι υποπληθυσμοί ελέγχθηκαν για διεισδυτική ικανότητα στην άριστη συγκέντρωση (200 $\mu\text{g/ml}$) συγκριτικά με την ολική IVIg (1.6 mg/ml) και την IVIg απαλλαγμένη από τους υποπληθυσμούς (1.6 mg/ml) (**Εικόνα 11.**). Κύτταρα NIH-3T3 επώαστηκαν με τα πέντε διαφορετικά δείγματα για 2 ώρες στους 37°C και ακολούθησε

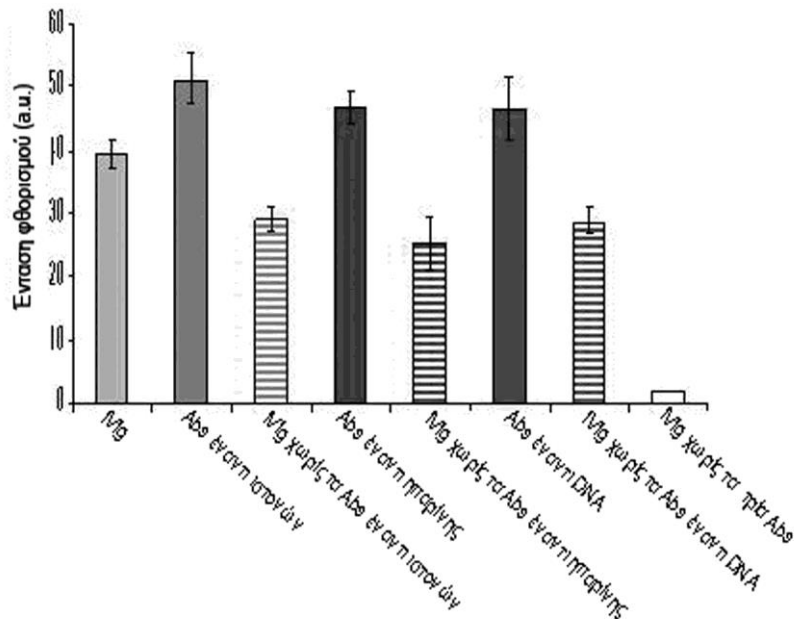
παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Οι τρεις υποπληθυσμοί της IVIg εντοπίζονταν στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, παρουσιάζοντας διαφορετικό προφίλ χρώσης, πιθανά γιατί αναγνωρίζουν διαφορετικά συστατικά. Επιπλέον, οι υποπληθυσμοί, αν και σε χαμηλότερη συγκέντρωση, 0.2 mg/ml, έδιναν παρόμοιο σε ένταση προφίλ διείσδυσης με την IVIg στα 1.6 mg/ml. Ακόμα, η IVIg μετά την απομάκρυνση και των τριών υποπληθυσμών παρουσίασε εξάλειψη της κυτταρο-δισιδυτικής της ικανότητας, αποδεικνύοντας τη σημασία τους στην IVIg.



Εικόνα 11. Διείσδυση των απομονωμένων υποπληθυσμών της IVIg σε κύτταρα NIH-3T3. Κύτταρα NIH-3T3 επώαστηκαν με τους τρεις υποπληθυσμούς (200μg/ml), την ολική IVIg (1.6 mg/ml), την IVIg απαλλαγμένη από τους τρεις υποπληθυσμούς (1.6 mg/ml) για 2 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε μονιμοποίηση με αιθανόλη 100%, προσθήκη αντισώματος έναντι της ανθρώπινης IgG (H+L αλυσίδας) συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία Alexa 488 (1 μg/ml), χρώση του πυρήνα με TOPRO3 (1μM, μπλε) και η παρατήρηση έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica Confocal TCS SP. Εικόνες μεσαίας τομής κυττάρων NIH-3T3 μετά από επώαση των υποπληθυσμών: 1) αντι-ιστονών, 2) αντι-ηπαρίνης και 3) αντι-DNA στα 200 μg/ml και της 4) IVIg και 5) IVIg χωρίς τους τρεις υποπληθυσμούς στα 1.6 mg/ml και 6) χωρίς δείγμα παρά μόνο με θρεπτικό υλικό. Φακός x63, κλίμακα 20 μm.

1.4.3.2. Συγκέντρωση των ενδοκυττάρων υποπληθυσμών της IVIg

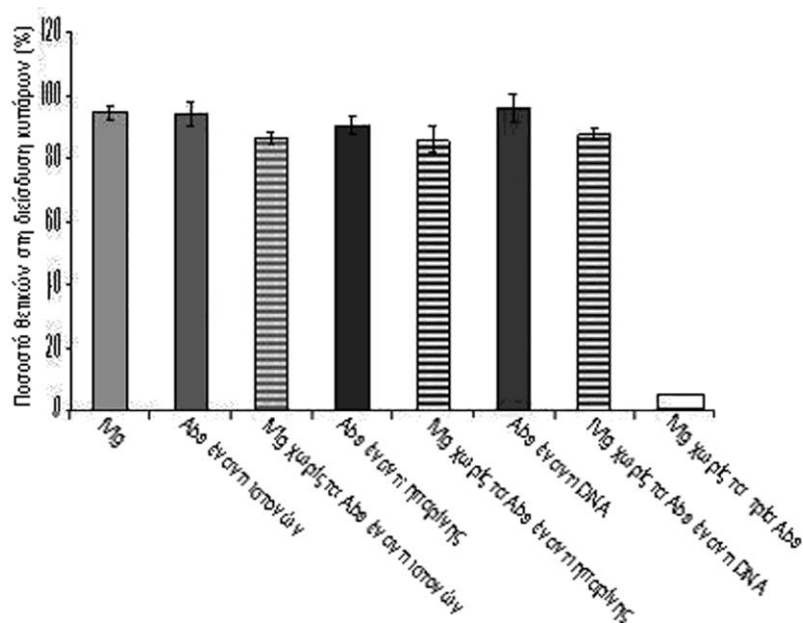
Μετά τη διαπίστωση της κυτταρικής διείσδυσης των IgG υποπληθυσμών και του εντοπισμού τους στο κυτταρόπλασμα, μετρήθηκε η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή τους. Για το σκοπό αυτό, οι εικόνες που λήφθηκαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο αναλύθηκαν με ειδικό λογισμικό επεξεργασίας εικόνων (Image Pro Plus). Συγκεκριμένα, αναλύθηκε η ένταση των τριών υποπληθυσμών σε σχέση με την IVIg και με την IVIg απαλλαγμένη από τον έναν ή από τους τρεις υποπληθυσμούς (**Εικόνα 12.**). Ανάλογα με τα παραπάνω αποτελέσματα, διαπιστώθηκε ότι η ένταση της χρώσης των υποπληθυσμών στα 200 μg/ml ήταν συγκρίσιμη με αυτήν της IVIg στα 1,6 mg/ml, δηλαδή 40-50 αυθαίρετες μονάδες (a.u). Η IVIg απαλλαγμένη από έναν υποπληθυσμό παρουσίαζε μείωση στην ένταση του φθορισμού κατά 20-30% σε σχέση με την ολόκληρη IVIg, ενώ όταν δοκιμάστηκε απαλλαγμένη και από τους τρεις υποπληθυσμούς, παρουσίαζε δραματική πτώση στην ένταση του φθορισμού κατά 92%.



Εικόνα 12. Συγκέντρωση των ενδοκυττάρων υποπληθυσμών της IVIg σε κύτταρα NIH-3T3. Κύτταρα NIH-3T3 επωάστηκαν με τους τρεις υποπληθυσμούς (200μg/ml), την ολική IVIg (1.6 mg/ml), την IVIg απαλλαγμένη από τους τρεις υποπληθυσμούς (1.6 mg/ml) για 2 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε μονιμοποίηση με αιθανόλη 100%, προσθήκη αντισώματος έναντι της ανθρώπινης IgG (H+L αλυσίδας) συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία Alexa 488 (1 μg/ml), χρώση του πυρήνα με TOPRO3 (1μM, μπλε) και η παρατήρηση έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica Confocal TCS SP. Η ένταση του φθορισμού (a.u., arbitrary units) μετρήθηκε με ειδικό λογισμικό επεξεργασίας εικόνων Image Pro Plus, από τις εικόνες που λήφθηκαν με το συνεστιακό μικροσκόπιο.

1.4.3.3. Ποσοστό θετικών κυττάρων

Μετά τη μελέτη των υποπληθυσμών ως προς την ένταση, προσδιορίστηκε επιπλέον το ποσοστό των κυττάρων στο οποίο είχαν διεισδύσει. Για αυτό το σκοπό, τα αποτελέσματα από τις εικόνες που λήφθηκαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο αναλύθηκαν με ειδικό λογισμικό επεξεργασίας εικόνων (Photoshop S3). Συγκεκριμένα αναλύθηκε το ποσοστό των κυττάρων που ήταν θετικά για τη διείσδυση των τριών υποπληθυσμών σε σχέση με την IVIg, με την IVIg χωρίς τον εκάστοτε πληθυσμό και με την IVIg χωρίς τους τρεις υποπληθυσμούς μαζί (**Εικόνα 13.**). Διαπιστώθηκε ότι σε όλες τις περιπτώσεις, τα ποσοστά των κυττάρων που ήταν θετικά για διείσδυση ήταν υψηλά, εκτός από την περίπτωση της IVIg απαλλαγμένης από τους τρεις υποπληθυσμούς. Τα δείγματα της IVIg απαλλαγμένα από έναν από τους τρεις υποπληθυσμούς έδειξαν υψηλά ποσοστά, ανάλογα με αυτά της IVIg, υποδεικνύοντας ότι με την απομάκρυνση του εκάστοτε υποπληθυσμού μειώνεται η ποσότητα των αντισωμάτων που διεισδύουν στα κύτταρα (όπως φάνηκε πιο πάνω), αλλά δεν επηρεάζεται ο αριθμός των θετικών, σε διείσδυση, κυττάρων.



Εικόνα 13. Ποσοστό θετικών στη διείσδυση κυττάρων NIH-3T3 των τριών IgG υποπληθυσμών της IVIg. Κύτταρα NIH-3T3 επωάστηκαν με τους τρεις απομονωμένους υποπληθυσμούς (200μg/ml), την ολική IVIg (1.6 mg/ml), την IVIg απαλλαγμένη από τους τρεις υποπληθυσμούς (1.6 mg/ml) για 2 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε μονιμοποίηση με αιθανόλη 100%, προσθήκη αντισώματος έναντι της ανθρώπινης IgG (H+L αλυσίδας) συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία Alexa 488 (1 μg/ml), χρώση του πυρήνα με TOPRO3 (1μM, μπλε) και η παρατήρηση έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica Confocal TCS SP. Ο αριθμός των θετικών στη διείσδυση κυττάρων μετρήθηκε με ειδικό λογισμικό επεξεργασίας εικόνων Photoshop S3, από τις εικόνες που λήφθηκαν με το συνεστιακό μικροσκόπιο.

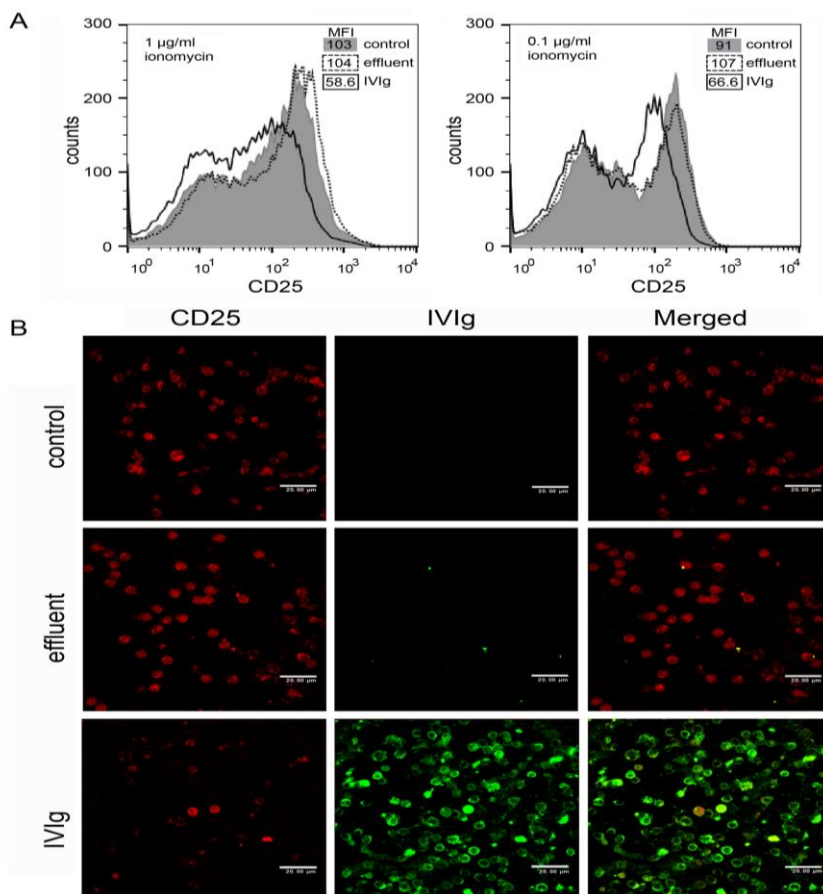
1.5. Βιολογική δράση των φυσικών πολυκλωνικών CPAbs

Αφού διαπιστώθηκε η ικανότητα διείσδυσης τόσο της ακέραιας IVIg όσο και των υποπληθυσμών της και άρα η ύπαρξη φυσικών πολυκλωνικών CPAbs, διερευνήσαμε τις κυτταρικές λειτουργίες που μπορεί αυτά να επηρεάζουν μετά την είσοδό τους. Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκε η επίδραση των φυσικών CPAbs που περιέχονται στην IVIg ως προς την έκφραση του λεμφοκυτταρικού δείκτη ενεργοποίησης CD25 και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών ηπατικών κυττάρων HepG2.

1.5.1. Έλεγχος της επίδρασης στην έκφραση λεμφοκυτταρικού δείκτη ενεργοποίησης

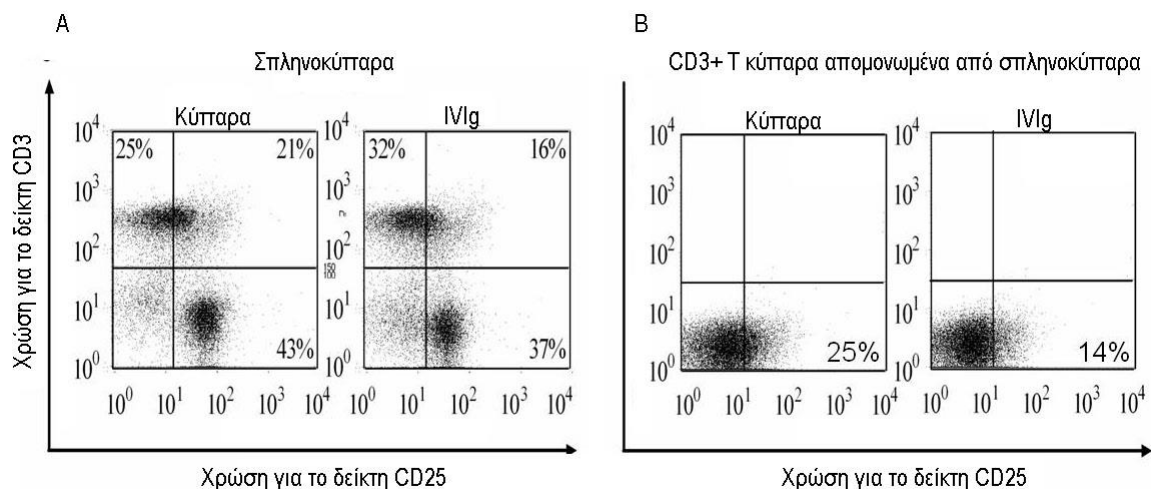
Η ρύθμιση της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων έχει αναφερθεί όχι μόνο για τα CPAbs αλλά και ως μια από τις πολλές γνωστές δράσεις της IVIg. Για να διερευνηθεί εάν η διείσδυση της IVIg σε σπληνοκύτταρα επηρεάζει την κατάσταση ενεργοποίησής τους, πραγματοποιήθηκε επώαση της IVIg ή της IVIg απαλλαγμένης από τους τρεις υποπληθυσμούς (4 mg/ml) σε σπληνοκύτταρα και έπειτα ακολούθησε η ενεργοποίησή

τους με μιτογόνα (1μg/ml, PMA/ιονομυκίνη). Η αξιολόγηση της έκφρασης του λεμφοκυτταρικού δείκτη ενεργοποίησης CD25, πριν και μετά τη διέγερσή τους, έγινε με FACS και συνεστιακή μικροσκοπία (**Εικόνα 14.**). Η ακέραια IVIg βρέθηκε να αναστέλλει την υπερέκφραση του δείκτη CD25, ενώ η IVIg απαλλαγμένη από τους τρεις υποπληθυσμούς δεν είχε καμία επίδραση σε αυτήν (**Εικόνα 14A.**). Συγκεκριμένα, η IVIg παρουσία μιτογόνων, ανέστειλε την έκφραση του CD25 σε ποσοστό κατά περίπου 43,3% (MFI μετατόπιση 103,3 - 58,6±8,5), ενώ η IVIg χωρίς τους τρεις υποπληθυσμούς δεν είχε καμία σημαντική επίδραση (MFI 104.2±16.3). Η ίδια επίδραση της IVIg παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα διεγέρθηκαν με PMA, αλλά με χαμηλότερη συγκέντρωση ιονομυκίνης (0,1 μg/ml), οπότε δείχθηκε αναστολή σε ποσοστό 26,8% του δείκτη CD25 (μετατόπιση MFI 91,05 - 66,6 ±12,5), ενώ η IVIg απαλλαγμένη από τους τρεις υποπληθυσμούς δεν έδειξε καμία σημαντική επίδραση (MFI 107±8,6) (**Εικόνα 14A.**). Ανάλυση των σπληνοκυττάρων με συνεστιακή μικροσκοπία, μετά από χρώση για το δείκτη CD25 και για την IVIg, επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα από το FACS και επέτρεψε τον ταυτόχρονο εντοπισμό τους (**Εικόνα 14B.**). Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της συνεστιακής μικροσκοπίας φάνηκε ότι η IVIg εντοπιζόταν στη συντριπτική πλειοψηφία των κυττάρων παράλληλα με τη δραματική μείωση της έκφρασης του δείκτη CD25 σε αντίθεση με το μη δεισοδυτικό κλάσμα της IVIg που δεν ήταν ικανό να αναστείλει την υπερέκφρασή του δείκτη CD25.



Εικόνα 14. Επίδραση της διείσδυσης της IVIg στην έκφραση λεμφοκυτταρικών δεικτών ενεργοποίησης. Σπληνοκύτταρα από ποντικούς BALB/c ($n = 7$) επωάστηκαν για 90 λεπτά με: 1) 4 mg/ml IVIg (Intraglobin F) (μαύρη γραμμή), 2) 4 mg/ml της IVIg χωρίς τους 3 υποπληθυσμούς (διακεκομμένη γραμμή) ή 3) θρεπτικό υλικό (μάρτυρας, γκρίζα περιοχή) και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνα [PMA (1 ng/ml) & ιονομυκίνη (1 ή 0,1 µg/ml)] για 5 ώρες στους 37°C. (A) Ένταση φθορισμού και μέση ένταση φθορισμού (MFI) της χρώσης για το CD25 (χρώση PE) σε διεγερμένα σπληνοκύτταρα μετά από την επώασή τους με τα παραπάνω δείγματα και ανάλυση με FACS. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα. (B) Φωτογραφίες των σπληνοκυττάρων από συνεστιακό μικροσκόπιο (μέγιστη ένταση), IVIg (πράσινο) και CD25 (κόκκινο). Φακός x63 HCX PLΑρο, κλίμακα 20 µm. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Στη συνέχεια προσπαθήσαμε να εξακριβώσουμε εάν το φαινόμενο της μείωσης της έκφρασης του δείκτη CD25 στα σπληνοκύτταρα συνέβαινε και σε απομονωμένα T-κύτταρα CD3+ από σπληνοκύτταρα (**Εικόνα 15.**). Για το σκοπό αυτό ακολουθήσαμε το ίδιο πρωτόκολλο με παραπάνω, αφού πρώτα είχαν απομονωθεί με ειδικές στήλες εμπλουτισμού τα CD3+ T-κύτταρα. Διαπιστώθηκε ότι σε ένα μέρος των T-κυττάρων επηρεαζόταν η έκφραση του CD25 (από 25% μειωνόταν στο 14% θετικών για CD25), υποδεικνύοντας έμμεσα ότι και τα B-κύτταρα επηρεάζονταν σημαντικά ως προς την έκφραση του δείκτη.

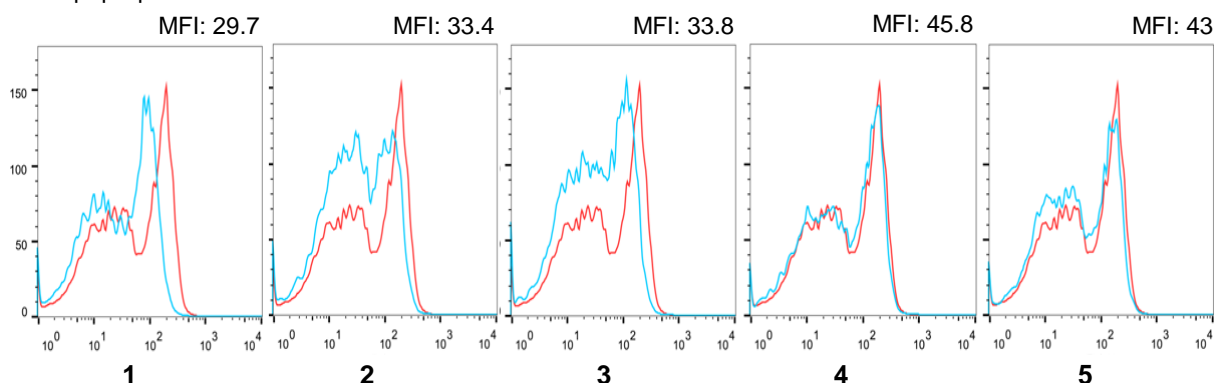


Εικόνα 15. Έλεγχος επίδρασης της IVIg στην έκφραση του δείκτη CD25 σε ενεργοποιημένα απομονωμένα T-κύτταρα CD3+ από σπληνοκύτταρα. Σπληνοκύτταρα από ποντικούς BALB/c ($n = 3$) και απομονωμένα από αυτά T-κύτταρα CD3+ επωάστηκαν για 90 λεπτά με 4 mg/ml IVIg (Intraglobin F) και θρεπτικό υλικό, και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνα [PMA (1 ng/ml) & ιονομυκίνη (1 µg/ml)] για 5 ώρες στους 37°C. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με FACS. Ένταση φθορισμού των ενεργοποιημένων: A) σπληνοκυττάρων σημασμένων για το δείκτη CD25 (χρώση PE) και το δείκτη CD3 (χρώση APC) και B) απομονωμένων T-κυττάρων CD3+ από σπληνοκύτταρα, σημασμένων για το δείκτη CD25 (χρώση PE).

Τέλος, διερευνήθηκε εάν η δράση της IVIg στα ενεργοποιημένα σπληνοκύτταρα μπορούσε να παρατηρηθεί και με τους απομονωμένους από αυτή υποπληθυσμούς.

Δοκιμάστηκε η επώαση των σπληνοκυττάρων με τους απομονωμένους υποπληθυσμούς (0,4 mg/ml) συγκριτικά με την IVIg ή την IVIg χωρίς τους τρεις υποπληθυσμούς (4 mg/ml) και ακολούθησε η ενεργοποίησή τους με μιτογόνα και η εκτίμηση της έκφρασης του CD25 με FACs (**Εικόνα 16.**). Οι απομονωμένοι υποπληθυσμοί έναντι των ιστονών και του DNA, βρέθηκαν να μειώνουν την ενεργοποίηση των κυττάρων, ανάλογα με την IVIg, ενώ αντίθετα ο υποπληθυσμός έναντι της ηπαρίνης δεν έδειξε καμία επίδραση.

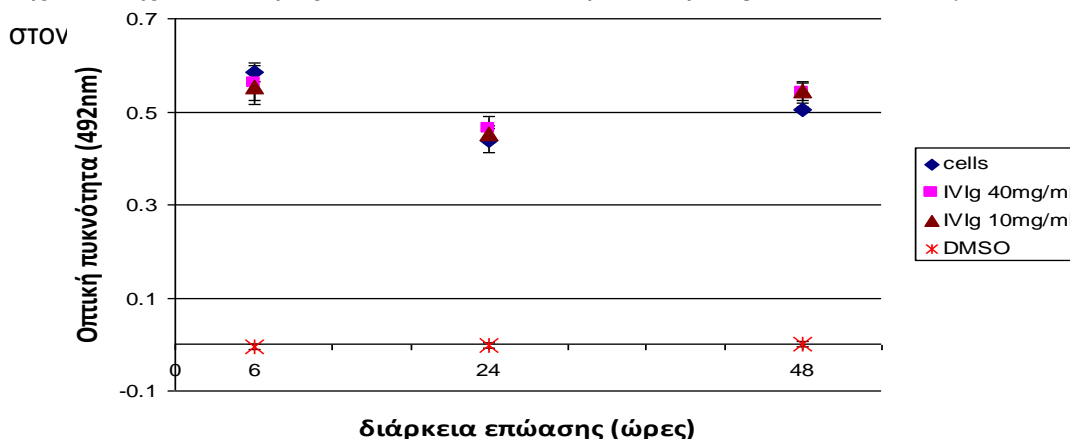
MFI μάρτυρα: 46



Εικόνα 16. Επίδραση της διείσδυσης των υποπληθυσμών της IVIg στην έκφραση λεμφοκυτταρικών δεικτών ενεργοποίησης. Σπληνοκύτταρα από ποντικούς BALB/c (n = 7) επώαστηκαν για 90 λεπτά με τα δείγματα (μπλε γραμμή): 1) IVIg (Intraglobin F, 4 mg/ml), 2) αντι-ιστόνες (0.4 mg/ml), 3) αντι-DNA (0.4 mg/ml) 4) αντι-ηπαρίνη (0.4 mg/ml) και 5) της IVIg χωρίς τους τρεις υποπληθυσμούς (4 mg/ml) ή με θρεπτικό υλικό (μάρτυρας, κόκκινη γραμμή) και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με μιτογόνα PMA (1ng/ml) & ιονομυκίνη (1μg/ml) για 5 ώρες στους 37°C. Διαγράμματα που δείχνουν τη μέση ένταση φθορισμού (MFI) της χρώσης για το δείκτη CD25 (χρώση PE) ενεργοποιημένων σπληνοκυττάρων μετά από επώαση με τα δείγματα και ανάλυση στο FACs.

1.5.2. Έλεγχος της επίδρασης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2

Η ενδοκυττάρια παρουσία της IVIg στα ηπατικά κύτταρα HepG2, μας οδήγησε στο να διερευνήσουμε εάν η διείσδυσή της επιδρούσε στον πολλαπλασιασμό τους (**Εικόνα 17.**). Σε κυτταροκαλλιέργεια δυο ημερών προστέθηκε η IVIg σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (10 και 40 mg/ml) και χρόνους επώασης (6, 24 και 48 ώρες). Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός εκτιμήθηκε με την προσθήκη MTS (χρωμογόνος μέθοδος) και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 492 nm. Βρέθηκε ότι η IVIg δεν παρουσίαζε καμία επίδραση στον



Εικόνα 17. Επίδραση της διείσδυσης της IVIg στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2. Κύτταρα HepG2 (20.000 κύτταρα/ml) καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες και έπειτα επωάστηκαν με την IVIg (10 ή 40 mg/ml), DMSO ως κυτταροτοξικό μάρτυρα ή με θρεπτικό υλικό σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (6, 24 και 48 ώρες). Ο πολλαπλασιασμός εκτιμήθηκε μετά την προσθήκη MTS και τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 492 nm.

2. Μελέτη *in vivo*

Μετά την ολοκλήρωση της *in vitro* μελέτης σχετικά με την παρουσία φυσικών CPAbs σε τρία γνωστά εμπορικά σκευάσματα IVIg, διερευνήθηκε *in vivo* η ικανότητά τους να διεισδύουν σε κύτταρα διαφόρων οργάνων από φυσιολογικούς ποντικούς BALB/c, ηλικίας 8 εβδομάδων. Επειδή η IVIg χορηγείται ενδοφλεβίως στους ασθενείς, ακολουθήσαμε την ίδια οδό χορήγησης αλλά και θεραπευτική δόση της IVIg (2gr/kg, όπως και την ίδια θεραπευτική δόση με τον άνθρωπο) σε υγιείς ποντικούς BALB/c, και μετά απομονώσαμε διάφορα όργανα και ελέγξαμε την ενδοκυττάρια IVIg.

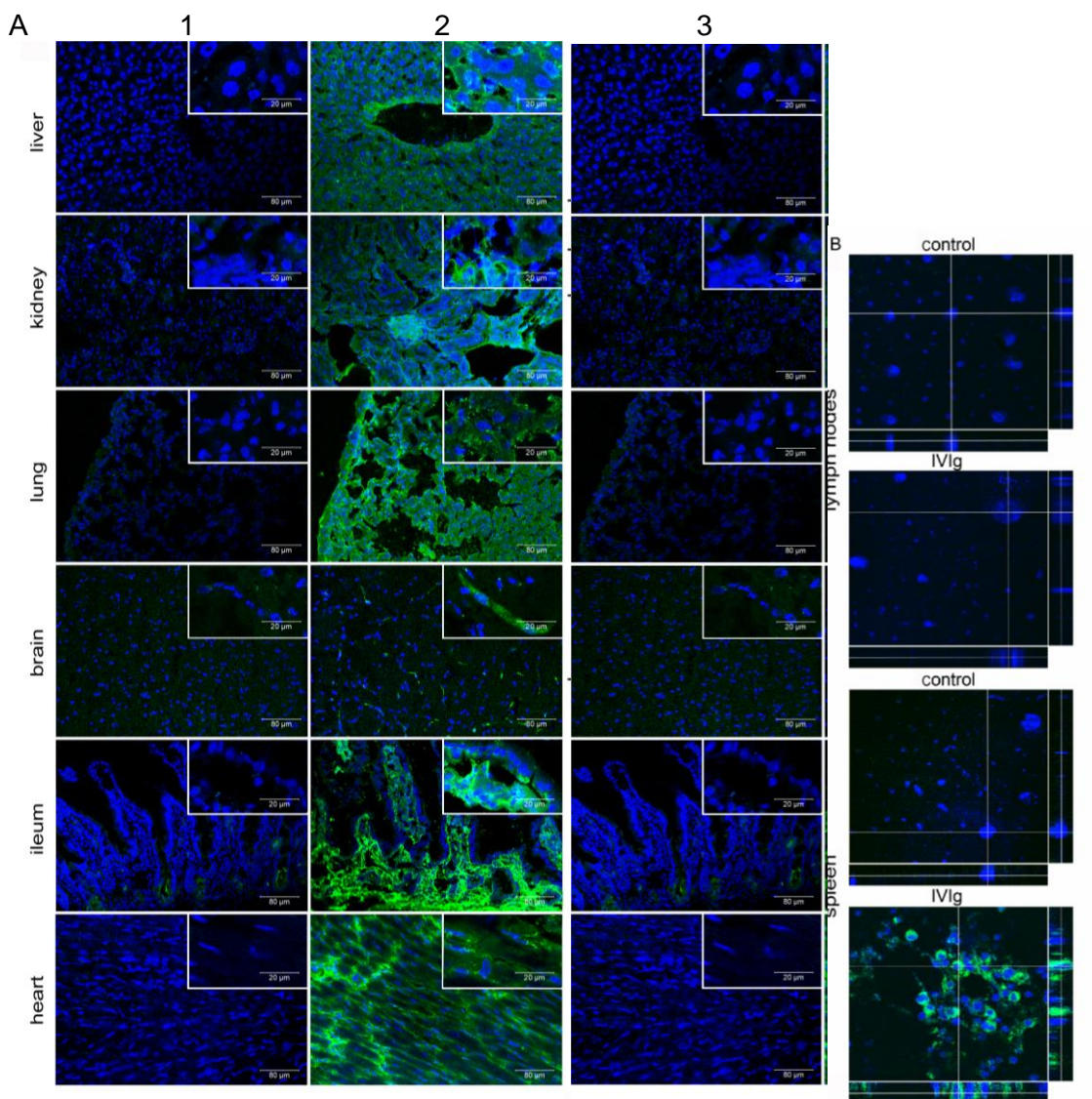
2.1. Έλεγχος της κυτταρο-διεισδυτικής ικανότητας της IVIg

Για τον *in vivo* έλεγχο της κυτταρο-διεισδυτικής ικανότητας προσδιορίστηκαν αρχικά οι άριστες συνθήκες ως προς το χρόνο που μεσολαβεί από τη χορήγηση της IVIg έως την απομόνωση των οργάνων. Έτσι, η IVIg (2gr/kg) χορηγήθηκε ενδοφλεβίως σε ποντικούς BALB/c και μετά από 3 και 6 ώρες, απομονώθηκαν τα εξής όργανα: λεμφαδένες, σπλήνας, νεφρό, ήπαρ, καρδιά, πνεύμονες και εγκέφαλος. Τα θρυψινοποιημένα κυτταρικά εναιωρήματα από τα διάφορα όργανα, μετά από ανάλυση στο FACs έδειξαν ότι το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν μεγαλύτερο στις τρεις ώρες από ότι στις έξι ώρες.

2.1.1. Ενδοκυττάριος εντοπισμός της IVIg

Τρεις ώρες μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σε ποντικούς BALB/c της ακέραιας IVIg (2 g/kg), της IVIg απαλλαγμένης από τους τρεις υποπληθυσμούς (2 g/kg) ή του φυσιολογικού ορού (διάλυμα αλατιού 0,9%), απομονώθηκαν τα παραπάνω όργανα και μετά από παρασκευή κρυοτομών και χρώση για τον ενδοκυττάριο εντοπισμό της IVIg, αξιολογήθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο (**Εικόνα 18.**). Η ανάλυση έδειξε την ενδοκυττάρια παρουσία της IVIg στα κύτταρα, σχεδόν από όλα τα όργανα που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα του ήπατος παρουσίαζαν έντονη ενδοκυττάρια χρώση για την IVIg, η οποία αυξανόταν στο αγγειακό ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων του ήπατος. Τα νεφρικά σπειράματα έδειξαν επίσης έντονη χρώση για την IVIg, ενώ μικρότερη διείσδυση παρατηρήθηκε στα περιβάλλοντα κύτταρα του νεφρού. Κύτταρα των πνευμόνων και της καρδιάς ήταν ομοιόμορφα βαμμένα ως προς την ενδοκυττάρια IVIg, ενώ ο ειλεός του εντέρου έδειξε διακριτή έντονη χρώση του χιτώνα lamina propria. Σε αντίθεση με την lamina propria, τα

εντερικά επιθήλια ήταν πολύ λίγο βαμμένα. Η ενδοκυττάρια χρώση της IVIg στον εγκέφαλο ήταν αποκλειστικά εντοπισμένη σε δομές που αντιστοιχούν σε αγγεία. Ο σπλήνας και οι λεμφαδένες που εξετάστηκαν με διαφορετικό τρόπο, ως κυτταρικά εναιωρήματα έδειξαν ότι η ενδοκυττάρια IVIg ήταν εντοπισμένη ουσιαστικά στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του σπλήνα, ενώ τα κύτταρα από λεμφαδένες ήταν αρνητικά.

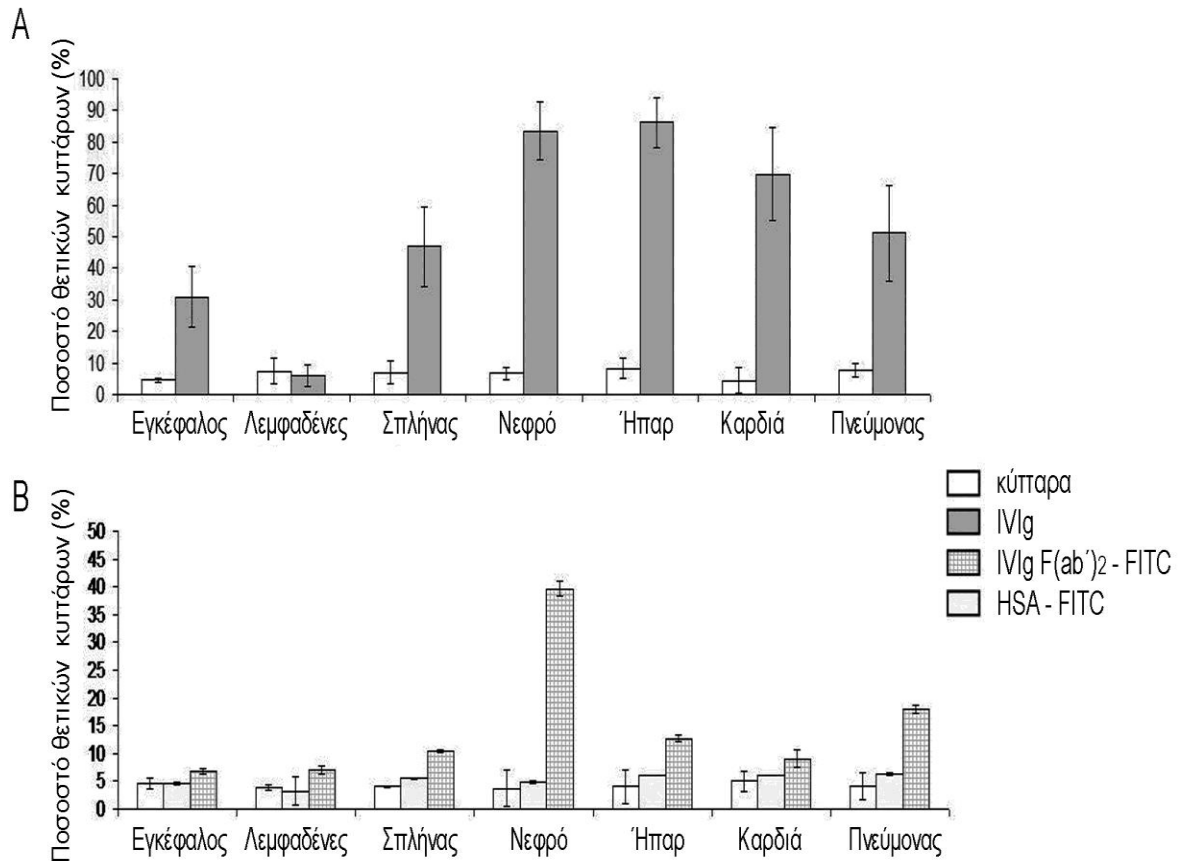


Εικόνα 18. Κυτταρική διείσδυση της IVIg *in vivo*. Σε ποντικούς BALB/c χορηγήθηκε ενδοφλεβίως: 1) φυσιολογικός ορός, 2) IVIg (2g/kg), ή 3) IVIg χωρίς τους τρεις υποπληθυσμούς (2g/kg). Τρεις ώρες αργότερα, διάφορα όργανα απομονώθηκαν και υποβλήθηκαν σε παρασκευή κρυτομών ή σε ομογενοποίηση, θρυψινοποίηση για την παρασκευή κυτταρικών εναιωρημάτων και αξιολόγηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο. (A) Εικόνες μέγιστης έντασης φθορισμού από τομές σε κρυοστάτη οργάνων με επεξεργασία σε κρυοστάτη (ήπαρ, νεφρό, πνεύμονα, εγκέφαλο, ειλέο και καρδιά). (B) Εικόνες μεσαίας τομής από κυτταρικά εναιωρήματα οργάνων (σπλήνας και λεμφαδένες). Ανίχνευση της IVIg μετά από μονιμοποίηση με ακετόνη 100% (τομές) ή αιθανόλη 100% (εναιωρήματα) με την προσθήκη αντισώματος έναντι της ανθρώπινης IgG (H+L αλυσίδας) συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία Alexa 488 (1 μg/ml) και των πυρήνων με TO-PRO-3 (μπλε). Φακοί 20x και 63x, κλίμακα 80 ή 20 μm.

2.1.2. Ποσοστό θετικών κυττάρων για ενδοκυττάρια IVIg από διάφορα όργανα

Η κυτταρική διείσδυση της IVIg στα όργανα ποντικών που είχαν λάβει IVIg, επιβεβαιώθηκε και μετά από FACs των θρυψινοποιημένων κυτταρικών εναιωρημάτων των οργάνων που λήφθηκαν (**Εικόνα 19**). Η ανάλυση με FACs έδειξε διαφορετικά ποσοστά θετικών κυττάρων: 86% στο ήπαρ, 83% στα νεφρά, 70% στην καρδιά, 52% στον πνεύμονα, 47% στο σπλήνα και 31% στον εγκέφαλο, ενώ οι λεμφαδένες ήταν αρνητικοί. Κύτταρα από τα όργανα των ποντικών, στους οποίους είχε χορηγηθεί ενδοφλεβίως φυσιολογικός ορός έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα. Επιπλέον, για να αποκλειστεί η πιθανότητα μη ειδικής πρόσδεσης του συζευγμένου αντισώματος στην επιφάνεια των κυττάρων, επαναλήφθηκε το παραπάνω πείραμα, χωρίς να έχει προηγηθεί η διαπερατοποίηση των κυττάρων, όπου και επιβεβαιώθηκαν τα παραπάνω αποτελέσματα που έδειχναν τον ενδοκυττάριο εντοπισμό της IVIg.

Για να συνδεθεί η κυτταρική διείσδυση της IVIg με τη μεταβλητή περιοχή των αντισωμάτων, χορηγήσαμε σε ποντικούς BALB/c 0.35 g/kg θραύσματα $F(ab')_2$ της IVIg συζευγμένα με πράσινη φθορίζουσα ουσία FITC [IVIg $F(ab')_2$ -FITC], μικρότερη δόση από αυτήν της IVIg (2g/kg), λόγω τεχνικών περιορισμών στην παρασκευή του συζεύγματος. Η αξιολόγηση της κυτταρικής διείσδυσης έγινε στα 90 λεπτά σε σύγκριση με τις 3 ώρες μετά τη χορήγηση. Τρεις ώρες μετά, στα ούρα των ποντικών ανιχνεύθηκε έντονο κίτρινο-πράσινο χρώμα, το οποίο πιθανότατα αντιστοιχούσε στο IVIg $F(ab')_2$ -FITC και το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν πολύ χαμηλό. Έτσι, στα 90 λεπτά η ανάλυση των κυτταρικών εναιωρημάτων από το FACs μας έδειξε ποσοστό θετικών κυττάρων: 13% στο ήπαρ, 40% στα νεφρά, 18% στους πνεύμονες, 10 % σε σπλήνα, και το 9% στην καρδιά (**Εικόνα 19**). Οι λεμφαδένες και ο εγκέφαλος παρέμειναν αρνητικοί. Παράλληλα, χορηγήθηκε σύζευγμα ανθρώπινης αλβουμίνης συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία FITC (HSA-FITC), το οποίο, όπως και ο φυσιολογικός ορός, δεν παρουσίασε θετικά αποτελέσματα.



Εικόνα 19. Ποσοστό θετικών κυττάρων για ενδοκυττάρια IVIg ή IVIg F(ab')₂-FITC από διάφορα όργανα. Σε ποντικούς Balb/c χορηγήθηκε ενδοφλεβίως: φυσιολογικός ορός (λευκή μπάρα), IVIg (2g/kg, γκρί μπάρα), IVIg F(ab')₂-FITC (0.35g/kg, μπάρα με πλέγμα) ή HSA-FITC (0.35g/kg, μπάρα με ανοιχτό γκρι) και τα κυτταρικά εναιωρήματα που προέκυψαν, θρυψινοποιήθηκαν και μετά τη μονιμοποίηση με αιθανόλη 100%, ακολούθησε προσθήκη αντισώματος έναντι της ανθρώπινης IgG (H+L αλυσίδας) συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία Alexa 488 (1 μg/ml), και ανάλυση στο FACS. Το ποσοστό των θετικών κυττάρων για ενδοκυττάρια: Α) IVIg στις 3 ώρες, συγκριτικά με το φυσιολογικό ορό και Β) IVIg F(ab')₂-FITC στα 90 λεπτά, συγκριτικά με την HSA-FITC και το φυσιολογικό ορό.

II. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΜΕ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΔΙΕΙΣΔΥΣΗΣ ΣΕ ΖΩΝΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΠΟ ΥΓΙΕΙΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ

Σε δεύτερη φάση, μετά τη διερεύνηση της παρουσίας φυσικών CPAbs σε πολυκλωνικό επίπεδο στον άνθρωπο, μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής αντίστοιχων μονοκλωνικών CPAbs τάξης IgG από υγιή ποντικό. Υπήρχε όμως μια τεχνική δυσκολία η οποία έπρεπε να ξεπεραστεί, είναι γνωστό ότι η σύντηξη μυελωματικών μη εκκρινικών σειρών με σπληνοκύτταρα από φυσιολογικά, μη ανοσοποιημένα, ποντίκια έχει χαμηλό ποσοστό επιτυχίας και τα υβριδώματα που προκύπτουν παράγουν αποκλειστικά μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) τάξης IgM. Αντίθετα, η σύντηξη σπληνοκυττάρων από φυσιολογικά ποντίκια που έχουν υποστεί αντιγονική διέγερση, είτε μετά από επιμόλυνση με παράσιτο ή υπερανοσοποίηση με αντιγόνο παρουσία ανοσοενισχυτικών, οδηγεί σε μεγάλο αριθμό σταθερών υβριδωμάτων που εκκρίνουν πολυδραστικά φυσικά mAbs κυρίως τάξης IgG. Για τους λόγους αυτούς, επιλέχθηκε η παραγωγή mAbs από ποντικούς BALB/c ανοσοποιημένους με ανθρώπινη θυρεοσφαιρίνη (Tg) παρουσία ανοσοενισχυτικού, και πραγματοποιήθηκε αναζήτηση ανάμεσα στα υβριδώματα, αυτών που παράγουν φυσικά αυτοαντισώματα με ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα και διερεύνηση της επίδρασής τους σε κυτταρικές λειτουργίες.

1. Παραγωγή mAbs ποντικού

Η παραγωγή mAbs περιλαμβάνει τα εξής στάδια: α) ανοσοποίηση των πειραματόζωνων, β) απομόνωση σπληνοκυττάρων και παραγωγή των υβριδωμάτων, γ) έλεγχος της αντισωματικής και κυτταρο-δισιδυτικής δράσης των υβριδωμάτων, δ) υποκλωνισμός των θετικών υβριδωμάτων και ε) μαζική παραγωγή και απομόνωση των mAbs.

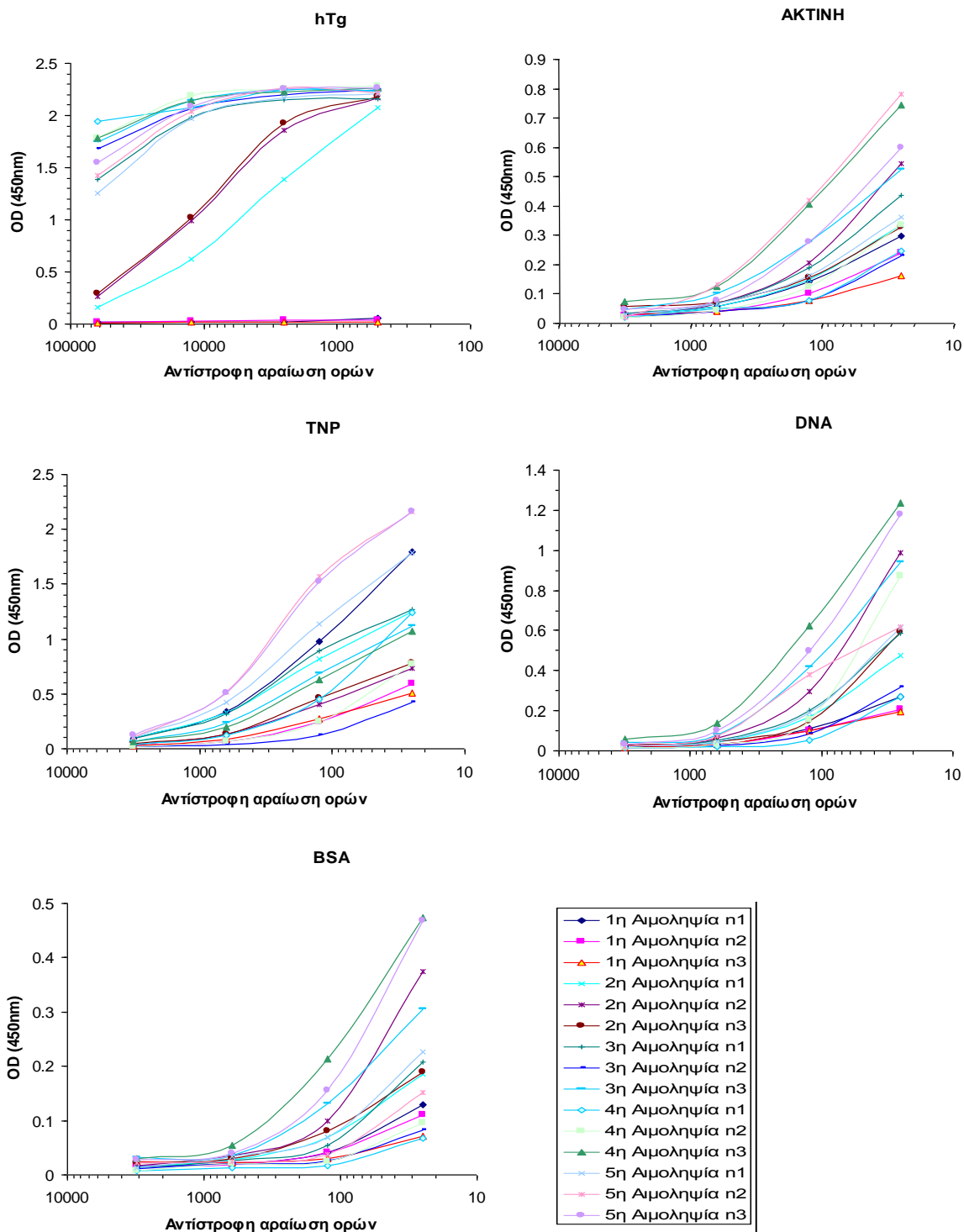
1.1. Ανοσοποίηση με το μόριο της Tg και έλεγχος του τίτλου στον ορό

Σε τρεις ποντικούς BALB/c (n.1, 2, 3) πραγματοποιήθηκαν τέσσερις συνολικά ανοσοποιήσεις με 50 µg hTg, η πρώτη σε πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund (CFA) και οι υπόλοιπες σε ατελές (IFA), αφού πρώτα έγινε αιμοληψία από την ουρά τους για τη χρήση των ορών αυτών ως αρνητικών μαρτύρων, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 2**.

Πίνακας 2. Χρονοδιάγραμμα με τις ανοσοποιήσεις, αιμοληψίες και ελέγχους

Ημέρα 0 ^η	1 ^η Αιμοληψία 1 ^η Ανοσοποίηση με Tg και CFA
Ημέρα 11 ^η	2 ^η Αιμοληψία
Ημέρα 15 ^η	2 ^η Ανοσοποίηση με Tg και IFA
Ημέρα 25 ^η	3 ^η Αιμοληψία
Ημέρα 36 ^η	3 ^η Ανοσοποίηση με Tg και IFA
Ημέρα 46 ^η	4 ^η Αιμοληψία
Ημέρα 65 ^η	4 ^η Ανοσοποίηση με Tg και IFA
Ημέρα 74 ^η	5 ^η Αιμοληψία
Έλεγχος των αντιορών των ποντικών για πολυδραστικότητα	
Ημέρα 84 ^η	Αναμνηστική ανοσοποίηση με Tg και IFA
Ημέρα 87 ^η	Υβριδοποίηση

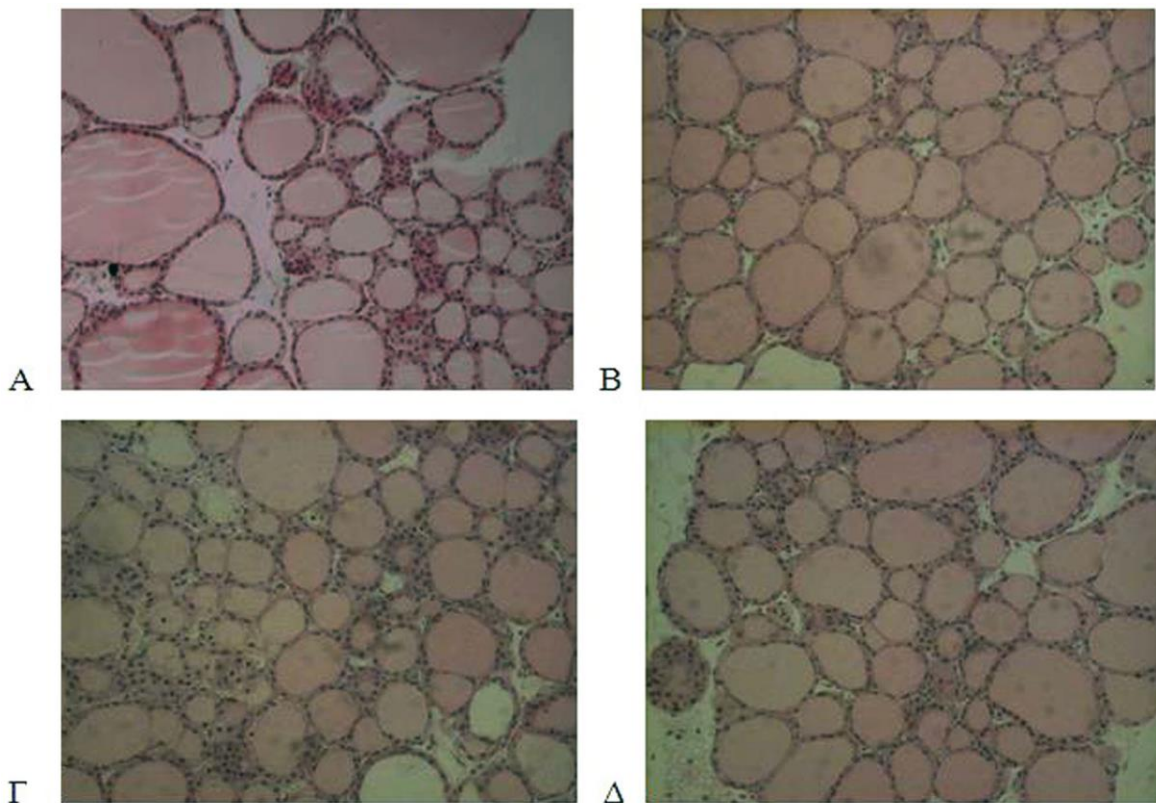
Μετά από τις τέσσερις αναμνηστικές ανοσοποιήσεις, ακολούθησε αιμοληψία από την ουρά και τιτλοποίηση των αντιορών με ELISA, προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη πολυδραστικών IgG αντισωμάτων. Οι αντιοροί ελέγχθηκαν συγκριτικά με τους ορούς προ-ανοσοποίησης έναντι μιας σειράς αντιγόνων που περιλάμβανε το αντιγόνο ανοσοποίησης, την hTg, το DNA, το TNP, την ακίνη και την καρβονική ανυδράση. Από την τιτλοποίηση, διαπιστώθηκε ότι οι επαναλήψεις των ανοσοποιήσεων είχαν ως αποτέλεσμα πολύ υψηλό τίτλο IgG αντισωμάτων για την Tg, είχαν «αγγίξει» δηλαδή τη μέγιστη τιμή (πλατώ), ενώ για τα υπόλοιπα αντιγόνα ο τίτλος αυξανόταν μετά την κάθε ανοσοποίηση και δεν έφτασε με την τέταρτη ανοσοποίηση σε πλατώ (**Εικόνα 21**). Πριν το στάδιο της υβριδοποίησης για όλους τους ποντικούς ακολούθησε και μια πέμπτη αναμνηστική ανοσοποίηση (περίπου δέκα με τριάντα ημέρες μετά).



Εικόνα 21. Πολυδραστικότητα αντιορών ποντικών ανοσοποιημένων με Tg. Έλεγχος με ELISA για την IgG δραστικότητα του ορού και του αντιορού των ποντικών n 1, 2, 3 που ανοσοποιήθηκαν με τη hTg, έναντι του αυτόλογου και ετερόλογων αντιγόνων. Οι αραιώσεις των δειγμάτων για τον έλεγχο δραστικότητας έναντι της Tg ήταν από 1:500 έως 1:62500 και για τα υπόλοιπα αντιγόνα (ακτίνη, TNP, DNA και BSA) από 1:25 έως 1:3125.

1.2. Ιστολογικός έλεγχος των θυρεοειδών αδένων των ανοσοποιημένων ποντικών

Η χορήγηση της Tg έχει περιγραφεί ότι αποτελεί έναν τρόπο επαγωγής του μοντέλου της αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας σε ποντικούς, με συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο - διαφορετικό από αυτό των BALB/c. Για να αποκλείσουμε κάποιο πιθανό ενδεχόμενο ιστικής βλάβης και να πιστοποιήσουμε ότι οι ποντικοί ήταν υγείς πραγματοποιήσαμε ιστολογική μελέτη στους θυρεοειδείς αδένες των BALB/c. Για το σκοπό αυτό μετά την απομόνωση του σπλήνα για τη παραγωγή υβριδωμάτων απομονώθηκε και ο θυρεοειδής αδένας του κάθε ποντικού, ώστε να ελεγχθεί ιστολογικά πιθανή παρουσία διήθησης από ειδικά T-λεμφοκύτταρα. Οι θυρεοειδείς αδένες μετά την παραφίνοποίησή τους, υποβλήθηκαν σε χρώση αιματοξυλίνης/ ηωσίνης, σε μικροτόμηση με πάχος τομών 4 μm και τελικά σε παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Σε κανέναν από τους αδένες δεν παρατηρήθηκε διήθηση από λεμφοκύτταρα και η συνολική μορφολογία τους παρουσιάστηκε φυσιολογική (**Εικόνα 22.**).



Εικόνα 22. Ιστολογική αξιολόγηση των θυρεοειδών αδένων ποντικών ανοσοποιημένων με Tg. Μετά από την παραφίνοποίηση των ιστών λήφθηκαν διαδοχικές τομές πάχους 4 μm. Εδώ παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές τομές των αδένων με μεγέθυνση 125x σε φωτονικό μικροσκόπιο Leica, από ποντικό: A) μη ανοσοποιημένο και B-Δ) ανοσοποιημένο με Tg.

1.3. Παραγωγή υβριδωμάτων

Μετά την διαπίστωση της πολυδραστικότητας των αντι-ορών των ποντικών και της φυσιολογικής εικόνας των θυρεοειδών αδένων τους, ακολούθησε η σύντηξη των σπληνοκυττάρων, από κάθε ποντικό ξεχωριστά, με μη εκκριτική Β-μυελωματική σειρά χρησιμοποιώντας πολυαιθυλενογλυκόλη. Η πρώτη υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη μυελωματική σειρά NSO, ενώ οι άλλες δύο με τη μυελωματική σειρά SP2/O-Ag14, για καλύτερη απόδοση της υβριδοποίησης. Αφού έγινε η επιλογή των υβριδωμάτων με ειδικό μέσο που περιείχε υποξανθίνη-αμινοπτερίνη-θυμιδίνη (HAT), προέκυψε ένας μεγάλος αριθμός υβριδωμάτων για περαιτέρω ελέγχους (**Πίνακας 3.**).

Πίνακας 3. Απόδοση υβριδοποιήσεων

Υβριδοποιήσεις	Υβριδωματικοί κλώνοι	Εκκριτικοί κλώνοι
1 ^η	38	26
2 ^η	40	25i
3 ^η	44	32

1.4. Έλεγχος των υβριδωμάτων

Οι εκκριτικοί υβριδωματικοί κλώνοι που παρήχθησαν, ελέγχθηκαν ως προς την αντισωματική τους δράση και τη διεισδυτική τους ικανότητα, ώστε να επιλεγθούν οι θετικοί και να προχωρήσουν στο στάδιο του υποκλωνισμού, της μαζικής παραγωγής και της απομόνωσης των εκκρινόμενων mAbs.

1.4.1. Έλεγχος της αντισωματικής δράσης των υβριδωμάτων

Τα υπερκείμενα των υβριδωμάτων που παρήχθησαν από τις παραπάνω υβριδοποιήσεις, ελέγχθηκαν με ELISA ως προς την πολυδραστικότητα των αντισωμάτων που περιείχαν. Συγκεκριμένα, υπερκείμενα υβριδωμάτων καλλιέργειας 5-8 ημερών ελέγχθηκαν, χωρίς αραίωση ή με αραίωση 1:2, έναντι μιας σειράς αντιγόνων που περιελάμβανε το αντιγόνο ανοσοποίησης, την Tg, καθώς και γνωστά αντιγόνα-στόχους των NAb (ακτίνη, μυσίνη TNP) αλλά και των CPAbs (DNA και καρβονική ανυδράση). Τα αποτελέσματα για κάθε υβριδοποίηση παρουσιάζονται στους **Πίνακες 4-6.**, όπου (+)= $OD \leq 0.150$, (++)= $0.150 < OD \leq 0.500$ και (+++)= $OD > 0.500$.

Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο της αντισωματικής δραστηριότητας έδειξαν ότι εκτός από τα υβριδώματα που εκκρίναν αντισώματα μονο-ειδικά για το αντιγόνο ανοσοποίησης, υπήρχαν και αυτά που παρήγαγαν πολυδραστικά αντισώματα. Τα τελευταία, φάνηκε να διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες, αυτά που εκκρίναν πολυδραστικά αντισώματα αναγνωρίζοντας όμως και το αντιγόνο ανοσοποίησης και αυτά που δεν

αναγνώριζαν την Tg. Πιο συγκεκριμένα, από την πρώτη υβριδοποίηση προέκυψαν 9 πολυδραστικοί κλώνοι, από τους οποίους οι 2 αναγνώριζαν και την Tg, από τη δεύτερη υβριδοποίηση 6 από τους οποίους 4 αναγνώριζαν και τη Tg και από την τρίτη 5 από τους οποίους 3 αναγνώριζαν την Tg.

Πίνακας 4-6. Αντισωματική δράση κλώνων από την 1^η, 2^η και 3^η υβριδοποίηση

Πίνακας 4. 1^η Υβριδοποίηση					
Υπερκείμενα κλώνων	Tg	Ακτίνη	Μυοσίνη	TNP	DNA
14A3	-	-	-	+	-
6A4	-	+++	+	+	+
11C5	-	+++	+	++	-
15A6	-	+	-	++	-
7C2	-	+++	-	++	+
8A3	-	-	-	+	-
7C3	-	-	-	+	-
14C5	-	+	-	++	+
1C5	-	-	+	+	-
14A1	-	+	-	-	+
13A6	-	-	-	+	-
10D1	-	+	+	++	-
15C4	++	+	+	++	+
3B1	+++	-	-	-	-
10B1	+++	++	++	++	-
Πίνακας 5. 2^η Υβριδοποίηση					
Υπερκείμενα κλώνων	Tg	Ακτίνη		TNP	DNA
1C6	-	-		-	+
2B3	-	-		-	+
3B1	+	-		-	-
4A6	+++	-		-	-
4C3	++	-		-	-
4C4	+	-		-	-
6D6	-	-		-	++
7A1	-	-		-	++
7A2	-	-		-	++
7A3	++	-		-	++
7A4	-	-		-	++
7B6	-	-		-	+
7C4		+		+	++
8B5	+++	+		+	+
8B6		-		-	+
10C1	++	-		-	+
11A3	++	-		-	-
9C3	+	-		-	+
9C6	-	+		-	+
11C2	-	-		-	+
5B4	-	-		-	+
8C4	+++	-		-	-
11B1	++	-		-	-
11C1	++	-		-	-
11B2	+	-		-	-

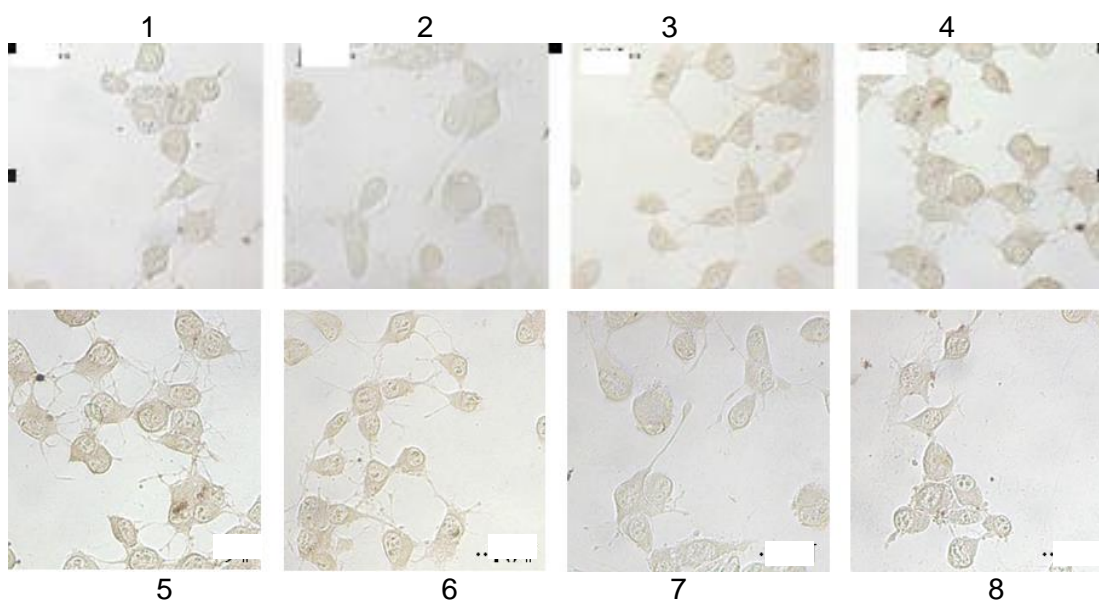
Πίνακας 6.		3 ^η Υβριδοποίηση			
Υπερκείμενα κλώνων	Tg	Ακτίνη	Καρβονική ανυδράση	TNP	DNA
1A1	-	++	++	-	++
1B6	-	-	-	-	+
1C4	-	-	+	-	-
1C5	++	-	-	-	-
2C6	+++	-	-	-	-
2D6	+++	-	-	-	-
3A3	-	-	+	-	-
3A4	+	-	-	-	-
3A6	+/++	-	-	-	-
3C6	-	-	+	-	-
4C3	+	-	-	-	-
4C6	++	-	-	-	-
4D3	++	-	-	-	-
5A4	++	-	-	-	-
5B2	+	-	-	-	-
5C1	+	-	+	-	-
5D1	++	-	-	-	-
5D3	++	-	-	-	-
6B3	++	-	-	-	-
6D2	++	-	-	-	-
6D3	+++	-	-	-	-
6D4	+++	-	-	-	-
8B2	+++	-	-	-	-
9D4	+++	-	-	-	-
9D5	+++	-	-	-	-
10C2	+++	-	-	-	-
TG1	-	++	+	++	+
TG2	+	++	+	+	++
10D6	++	-	-	-	-
10C4	-	-	-	-	+
11B2	++	-	-	-	+
10D5	+++	-	-	-	-

1.4.2. Έλεγχος της διεισδυτικής ικανότητας των υβριδωμάτων

Τα υβριδώματα που ήταν εκκριτικά, είτε παρήγαγαν πολυδραστικά αντισώματα είτε όχι, ελέγχθηκαν στη δοκιμασία διείσδυσης σε κύτταρα HeLa ή NIH-3T3. Το υπερκείμενο καλλιέργειας 5-8 ημερών επώαστηκε χωρίς αραίωση ή σε αραίωση 1:2 για 2-4 ώρες και ο εντοπισμός των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε με ανοσοενζυμική χρώση και παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο. Βρέθηκαν 12 κλώνοι, που ήταν θετικοί σε πολυδραστικότητα (Πίνακας 7.), να παρουσιάζουν ενδοκυττάριο εντοπισμό και μάλιστα στο κυτταρόπλασμα (εννέα) ή στον πυρηνίσκο (τρεις) (Εικόνα 23.).

Πίνακας 7. Οι υβριδωματικοί κλώνοι ανά υβριδοποίηση που βρέθηκαν να παράγουν CPAbs

Υβριδοποιήσεις	Κλώνοι που εκκρίνουν CPAbs
1 ^η	5
2 ^η	3
3 ^η	4



Εικόνα 23. Διεισδυτική ικανότητα των αντισωμάτων που περιέχονται στα υπερκείμενα των υβριδωμάτων. Αντιπροσωπευτικές εικόνες μετά από επώαση 2 ωρών κυττάρων NIH-3T3 με υπερκείμενα καλλιέργειας 5-8 ημερών, των κλώνων: 1) 1A1, 2) TG2, 3) TG1, 4) 15A6, 5) 8B5, 6) 15C4 7) 3B1H10 (αρνητικός μάρτυρας) και 8) 10B1. Μεγέθυνση x40 και λήψη φωτογραφιών με φωτονικό μικροσκόπιο Leica.

1.5. Υποκλωνισμός και ανάπτυξη υβριδωμάτων, παραγωγή και απομόνωση mAbs

Σε αρκετά από τα θετικά υβριδώματα έγινε υποκλωνισμός, ενώ ορισμένα άλλα εμφάνισαν αστάθεια κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους και εξαλλάχτηκαν σε μη εκκριτικά κύτταρα. Δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές υποκλωνισμού, αυτή των διαδοχικών αραιώσεων (serial dilution) και αυτή των περιοριστικών αραιώσεων (limiting dilution) και

καταλήξαμε ότι η τελευταία είναι καλύτερη λόγω της λιγότερης ταλαιπωρίας που υφίστανται τα υβριδώματα. Συνεπώς, κατά την πρώτη φάση της μελέτης, από τους 12 κλώνους που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα στη διεύθυνση μόνο οι 8 παρέμειναν εκκριτικοί, μετά τη διαδικασία του υποκλωνισμού.

Αφού επιτεύχθηκε ο υποκλωνισμός των υβριδωμάτων, δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξής τους στην κυτταροκαλλιέργεια, ώστε να επιλεγθούν οι ιδανικότερες για τον κάθε έναν ξεχωριστά. Έτσι, τα υβριδώματα αναπτύχθηκαν στην κυτταροκαλλιέργεια με ειδικό θρεπτικό υλικό, είτε πλήρως απαλλαγμένο από τα συστατικά του βόιου ορού (serum free medium, SFM), είτε με βόιο ορό, ο οποίος όμως δεν περιείχε προσμείξεις ανοσοσφαιρινών του ζώου. Με αυτό τον τρόπο εξασφάλισαμε την αποφυγή πρόσμιξης από άλλες ζωικές ανοσοσφαιρίνες-φυσικά αντισώματα, από προϊόντα καλλιέργειας ζωικής προέλευσης (π.χ. ο βόιος ορός, FBS). Επίσης δοκιμάστηκαν, εκτός από τις απλές φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας, ειδικές φλάσκες δυο διαμερισμάτων, που επέτρεπαν στο ένα διαμέρισμα την αύξηση των υβριδωμάτων και στο άλλο διαμέρισμα τη συγκέντρωση των αντισωμάτων που αυτά εκκρίναν. Παράλληλα, δοκιμάστηκε και η παραγωγή ασκιδών σε ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς SCID, μετά από τη χορήγηση των υβριδωμάτων ενδοπεριτοναϊκά. Παρατηρήθηκε ότι το 14C5 αναπτυσσόταν ιδιαίτερα καλά με θρεπτικό υλικό SFM σε απλές φλάσκες, ενώ το 1A1, TG1 και TG2 με θρεπτικό που περιείχε ορό απαλλαγμένο από ανοσοσφαιρίνες σε φλάσκες δυο διαμερισμάτων, όλα τα υπόλοιπα αναπτύσσονταν εξίσου καλά στις απλές συνθήκες και προτιμήθηκε η παραγωγή ασκιδών.

Έτσι, στο τέλος της διαδικασίας το υλικό που περιείχε τα επιθυμητά mAbs (συμπυκνωμένο θρεπτικό υλικό ή ασκητικό υγρό) υπεβλήθει πρώτα σε κατακρήμνιση με θειϊκό αμμώνιο, για την απομάκρυνση της πλειονότητας των υπόλοιπων πρωτεϊνών, όπως π.χ. της αλβουμίνης κ.ά., και έπειτα σε διαδικασία απομόνωσης των mAbs. Η απομόνωση των mAbs πραγματοποιήθηκε, είτε με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη με σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης A, για τα αντισώματα τάξης IgG1, είτε με ανιοντοανταλλαγή σε στήλη με σφαιρίδια DEAE-Sephadex, για την απομόνωση αντισωμάτων τάξης IgG2b. Οι μέθοδοι αυτοί επιλέχθηκαν έτσι ώστε τα αντισώματα να μην υποβάλλονται σε πολύ όξινο pH, το οποίο μπορεί να αλλοιώσει ευαίσθητες περιοχές των αντισωμάτων όπως είναι η μεταβλητή τους περιοχή.

2. Χαρακτηρισμός των mAbs ως προς τα ανοσολογικά τους χαρακτηριστικά

Μετά την απόμονωσή τους, τα mAbs που προέρχονταν από τρεις υβριδοποιήσεις ελέγχθηκαν ως προς: 1) την καθαρότητά τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE), 2) τη συγκέντρωσή τους με δύο

τρόπους, με μέθοδο Bradford και με μέτρηση OD στα 280nm, 3) τη συγκέντρωσή τους με ELISA με βάση την υπόταξή τους (IgG1, IgG2a και IgG2b), 4) την ειδικότητά τους με ELISA και 5) το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI) με ισοηλεκτρική εστίαση σε πήκτωμα αγαρόζης. Συνολικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους **Πίνακες 8 & 9**. Τα mAbs βρέθηκαν να ανήκουν σε δύο υποτάξεις, την IgG1 (πέντε mAbs) και IgG2b (τέσσερα mAbs), ενώ το pI τους παρουσίασε μικρή διακύμανση τιμών μεταξύ 6.8 - 7.2. Στην περίπτωση του 14C5 δεν επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός του pI του, αφού κατά τη διαδικασία δημιουργούνταν συμπλέγματα μεταξύ των μορίων, τα οποία δεν επέτρεψαν την εστίαση στο πήκτωμα.

Πίνακας 8. Χαρακτηριστικά των mAbs της μελέτης

mAbs	Υβριδοποίηση	Μυελωματική σειρά	Υπόταξη	pI
14C5	1 ^η	NSO	IgG1	-
8B5B1	2 ^η	NSO	IgG1	6.9
15C4B11	1 ^η	NSO	IgG1	7
10B1D3	1 ^η	SP2/O-Ag 14	IgG1	7.2
1A1E11	3 ^η	SP2/O-Ag 14	IgG2b	6.9
TG1F2	3 ^η	SP2/O-Ag 14	IgG2b	7.1
TG2F10	3 ^η	SP2/O-Ag 14	IgG2b	6.8
15A6E11	1 ^η	SP2/O-Ag 14	IgG2b	7.1
3B1H10	1 ^η	SP2/O-Ag 14	IgG1	6.8

Αφού προσδιορίστηκαν τα χαρακτηριστικά των απομονωμένων mAbs της μελέτης, επανελέγχθηκε η δραστηριότητά τους με ELISA σε συγκέντρωση 10 µg/ml έναντι μιας σειράς αντιγόνων, όπου επιβεβαιώθηκε ότι αυτά διατηρούσαν την πολυδραστηρικότητά τους (**Πίνακας 9**). Τα αντιγόνα που επιλέχθηκαν περιελάμβαναν το αντιγόνο ανοσοποίησης Tg, αλλά και άλλα γνωστά αντιγόνα-στόχοι των NAbs, όπως είναι η ακτίνη και το TNP, καθώς και αρνητικά φορτισμένα αντιγόνα όπως η καρβονική ανυδράση και το DNA. Στα απομονωμένα αντισώματα διαπιστώθηκαν διαφορές ως προς τη δραστηριότητά τους σε σχέση με αυτήν που παρουσίαζαν αρχικά ως υπερκείμενα καλλιέργειας από τα μη υποκλωνισμένα υβριδώματα από τα οποία προήλθαν. Αναλυτικότερα, το 14C5 παρουσίασε ενισχυμένο το προφίλ της πολυδραστηρικότητας σε σχέση με τον αρχικό κλώνο, το 8B5B1 βρέθηκε να αναγνωρίζει την ακτίνη και την Tg σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τον κλώνο από τον οποίο προήλθε. Επιπλέον, το 10B1D3 αναγνωρίζει ασθενέστερα την ακτίνη και καθόλου το TNP σε σχέση με πριν, ενώ παρέμεινε αρνητικό για το DNA. Το 1A1E11 συνέχισε να αναγνωρίζει την ακτίνη αλλά όχι το DNA, ενώ εμφάνισε δραστηριότητα για το TNP και την Tg. Το TG1F2 έχασε τη DNA δραστηριότητα σε σχέση με τον αρχικό κλώνο και παρουσίασε δραστηριότητα για την Tg. Το 15A6E11 παρουσίασε επιπλέον Tg και DNA δραστηριότητα σε σχέση με πριν, ενώ τα TG2F10,

15C4B11 και 3B1H10 παρουσίασαν παρόμοιο προφίλ δραστικότητας με τον αρχικό κλώνο.

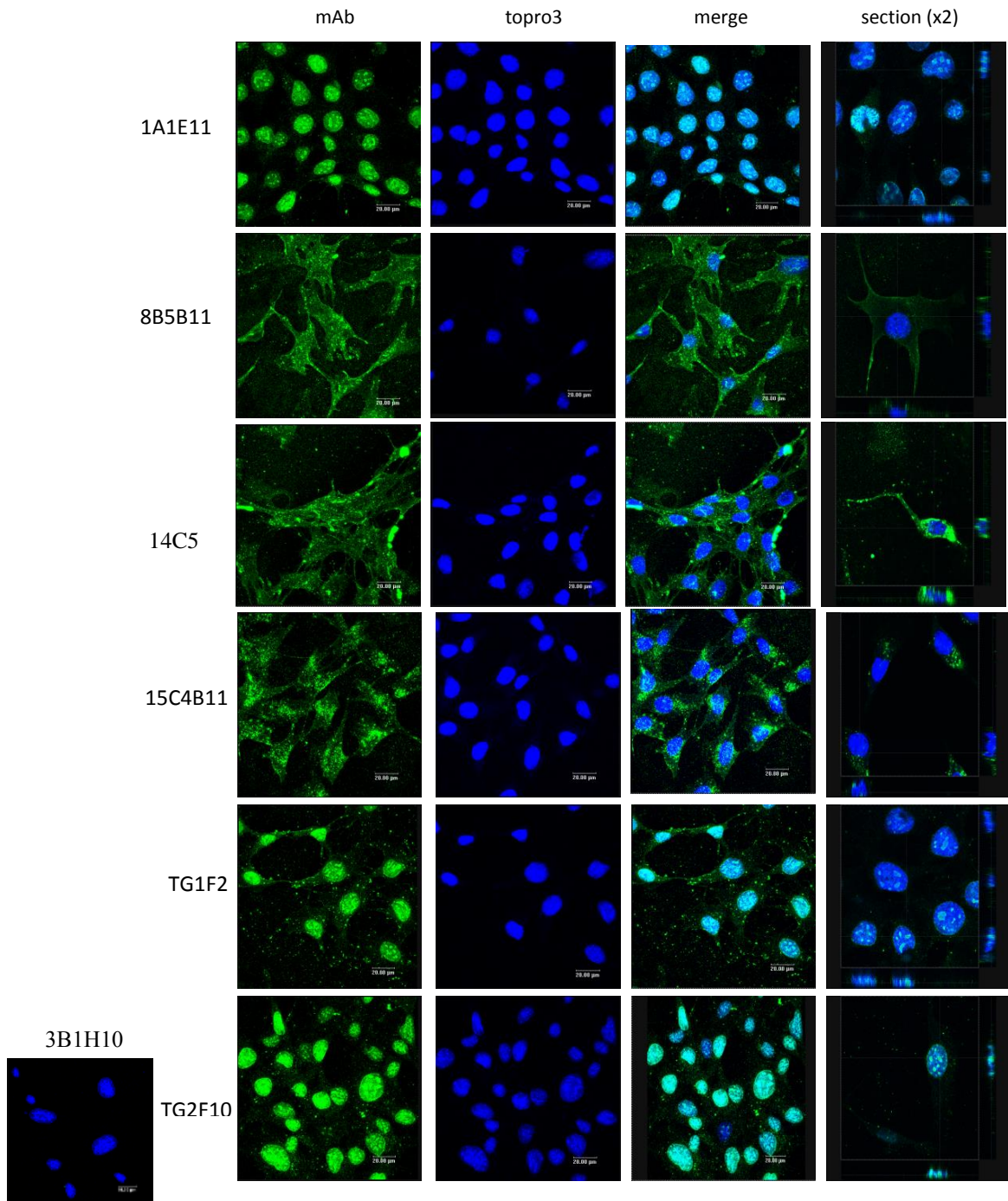
Πίνακας 9. Πολυδραστικότητα των mAbs της μελέτης

mAbs	ELISA				
	Tg	Ακτίνη	Καρβονική ανυδράση	TNP	DNA
14C5	-	+++	++	+++	+++
8B5B1	+++	+	-	-	-
15C4B11	+	+	-	+	+
10B1D3	+++	+	+	-	-
1A1E11	++	++	+	+	-
TG1F2	+	+	+	+	-
TG2F10	+	+	+	+	++
15A6E11	++	++	+	+	+
3B1H10	+++	-	-	-	-

Όπου (+++)= O.D.≥1.100, (++)= 1.100>O.D.≥0.600, (+)= O.D. <0.600.

3. Έλεγχος των mAbs ως προς τη διεισδυτική ικανότητα

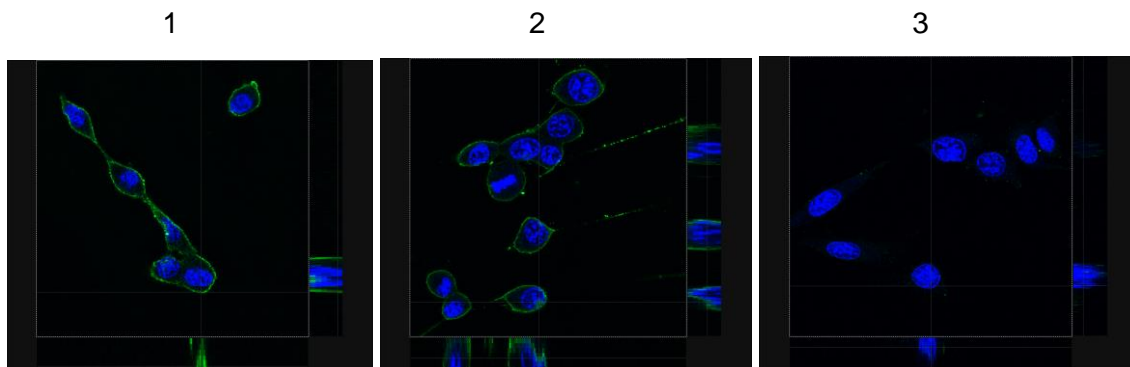
Τα mAbs στη συνέχεια ελέγχθηκαν σε δοκιμασία διείσδυσης, που περιλάμβανε επώασή τους με την κυτταρική σειρά NIH-3T3 για 2 ώρες στους 37°C, μονιμοποίηση-διαπερατοποίηση των κυτάρων, προσθήκη δεύτερου αντισώματος έναντι της IgG ποντικού (H+L αλυσίδα) συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία και παρατήρηση του ενδοκυττάριου εντοπισμού τους με ανοσοφθορισμό στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Για την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης των mAbs, αυτά δοκιμάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις, από 600-50 µg/ml, στον έλεγχο κυτταρικής διείσδυσης. Βρέθηκε ότι τα 300 µg/ml ήταν η βέλτιστη συγκέντρωση, καθώς σε αυτήν τα CPAbs έδιναν έντονη ενδοκυττάρια χρώση, παρόμοια με αυτήν στα 600 µg/ml, και η οποία μειωνόταν στις αμέσως χαμηλότερες συγκεντρώσεις, ενώ στα 50 mg/ml υπήρχε σε πολύ περιορισμένο βαθμό. Στην ιδανική συγκέντρωση τα CPAbs παρουσίαζαν διακριτό πρότυπο χρώσης και εντοπιζόνταν στο κυτταρόπλασμα ή και στον πυρηνίσκο, όχι όμως στον πυρήνα (**Εικόνα 24**). Αναλυτικότερα, το 1A1E11, το TG1F2 και TG2F10 παρουσίαζαν εντοπισμό στο κυτταρόπλασμα με σπικτή χρώση αλλά και χρώση στον πυρηνίσκο, ενώ τα 8B5B11, 14C5, 15C4B11 παρουσίασαν σπικτή χρώση μόνο στην περιοχή του κυτταροπλάσματος. Το 3B1H10 βρέθηκε αρνητικό σε ενδοκυττάρια χρώση και χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.



Εικόνα 24. Διευσδυτική ικανότητα των CPAbs. Τα mAbs (300 µg/ml) επώαστηκαν με τα κύτταρα NIH-3T3 για 2 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε μονιμοποίηση με αιθανόλη 100%, προσθήκη συζεύγματος με πράσινη φθορίζουσα ουσία Alexa 488 για τον εντοπισμό τους και TOPRO3 για τη χρώση των πυρήνων (μπλε) και παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TSC. Εικόνες μεσαίας τομής κυττάρων. Φακός x63, κλίμακα 20 µm ή 10 µm (τελευταία στήλη).

3.1. Μηχανισμός διείσδυσης των CPAbs

Αφού διαπιστώθηκε ότι τα mAbs που παρήχθησαν είχαν κυτταρο-διεισδυτική ικανότητα, διερευνήθηκε εάν ο μηχανισμός διείσδυσης ήταν εξαρτώμενος ή ανεξάρτητος της κατανάλωσης ενέργειας από το κύτταρο. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε επώαση στους 4°C των mAbs, στην ιδανική συγκέντρωση 300 µg/ml, με κύτταρα NIH-3T3, που είχαν προεπωαστεί στους 4°C για μία ώρα. Στους 4°C ο μεταβολισμός του κυττάρου μειώνεται σημαντικά, με αποτέλεσμα να αναστέλλονται τα ενεργειακά εξαρτώμενα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης-φαγοκύτωσης. Παρατηρήθηκε ότι δύο από τα οκτώ CPAbs, το 8B5B11 και το 15C4B11, εντοπίζονταν κατά πλειοψηφία στην επιφάνεια των κυττάρων και ελάχιστα ή καθόλου στον ενδοκυττάριο χώρο τους. Τα υπόλοιπα έξι μονοκλωνικά CPAbs της μελέτης εντοπίζονταν ενδοκυττάρια και δεν παρουσίασαν καμία σημαντική μεταβολή στη διεισδυτική τους ικανότητα. Συνολικά, φάνηκε ότι δύο από τα οκτώ CPAbs διεισδύουν στο κύτταρο με μηχανισμούς ενεργειακά εξαρτώμενους, οι οποίοι μένει να προσδιορισθούν με ειδικούς αναστολείς για το κάθε μονοπάτι, ενώ η συντριπτική πλειοψηφία των απομονωμένων μονοκλωνικών CPAbs παρουσίασε ενεργειακά ανεξάρτητη κυτταρο-διεισδυτική ικανότητα (**Εικόνα 25.**).



Εικόνα 25. Μηχανισμός διείσδυσης των mAbs. Τα mAbs (300 µg/ml) επώαστηκαν με τα κύτταρα NIH-3T3 για 2 ώρες στους 4°C. Ακολούθησε μονιμοποίηση με αιθανόλη 100%, προσθήκη συζεύγματος με πράσινη φθορίζουσα ουσία Alexa 488 για τον εντοπισμό τους και TOPRO3 για τη χρώση των πυρήνων (μπλε) και παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TSC. Εικόνες μεσαίας τομής κυττάρων: 1) 15C4B11, 2) 8B5B11, 3) 3B1H10. Φακός x63.

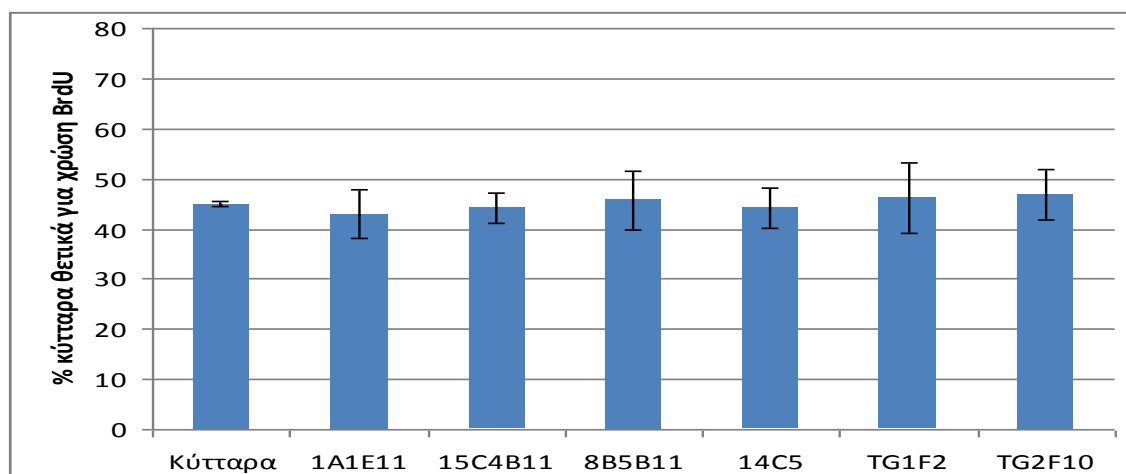
4. Βιολογική δράση των μονοκλωνικών φυσικών CPAbs

Μία από τις ενδιαφέρουσες ιδιότητες των παθολογικών CPAbs είναι ως γνωστόν ότι ορισμένα από αυτά μπορούν να επιδρούν σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Επίσης, ορισμένα από τα παθολογικά CPAbs παρουσιάζουν ικανότητα υδρόλυσης του DNA. Για να διερευνήσουμε το ρόλο των φυσικών CPAbs, τα οποία ανιχνεύονται σε φυσιολογικές καταστάσεις, ελέγξαμε

αντίστοιχες ιδιότητες *in vitro*, δηλαδή εξετάσαμε την επίδρασή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην υδρόλυση πλασμιδιακού DNA, στον κατακερματισμό του γενωμικού DNA και στην επαγωγή αλλαγών σε μορφολογικό-πυρηνικό επίπεδο.

4.1. Έλεγχος της επίδρασης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την ικανότητα των φυσικών CPAbs να επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa με δοκιμασία βρωμοδεόξυ-ουριδίνης (BrdU). Αναλυτικά, κύτταρα HeLa επωάστηκαν για 48 ώρες με τα CPAbs στην ιδανική συγκέντρωση 300 µg/ml και με το μη δεισδυτικό μάρτυρα, 3B1H10, στη συνέχεια τους προστέθηκε για 6 ώρες 100µM BrdU, ώστε να ενσωματωθεί στο DNA των κυττάρων που θα πολλαπλασιαστούν. Ακολούθησε διαδικασία ανοσοφθορισμού, δηλαδή μονιμοποίηση των κυττάρων και χρήση δεύτερου αντισώματος έναντι της BrdU, συζευγμένο με φθορίζουσα ουσία και παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένα από τα CPAbs δεν επηρέασε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa, δηλαδή δεν παρατηρήθηκε μείωση ή αύξηση της ενσωμάτωσης της BrdU σε σχέση με τα σκέτα κύτταρα και τα κύτταρα με τον αρνητικό μάρτυρα (**Εικόνα 26.**).



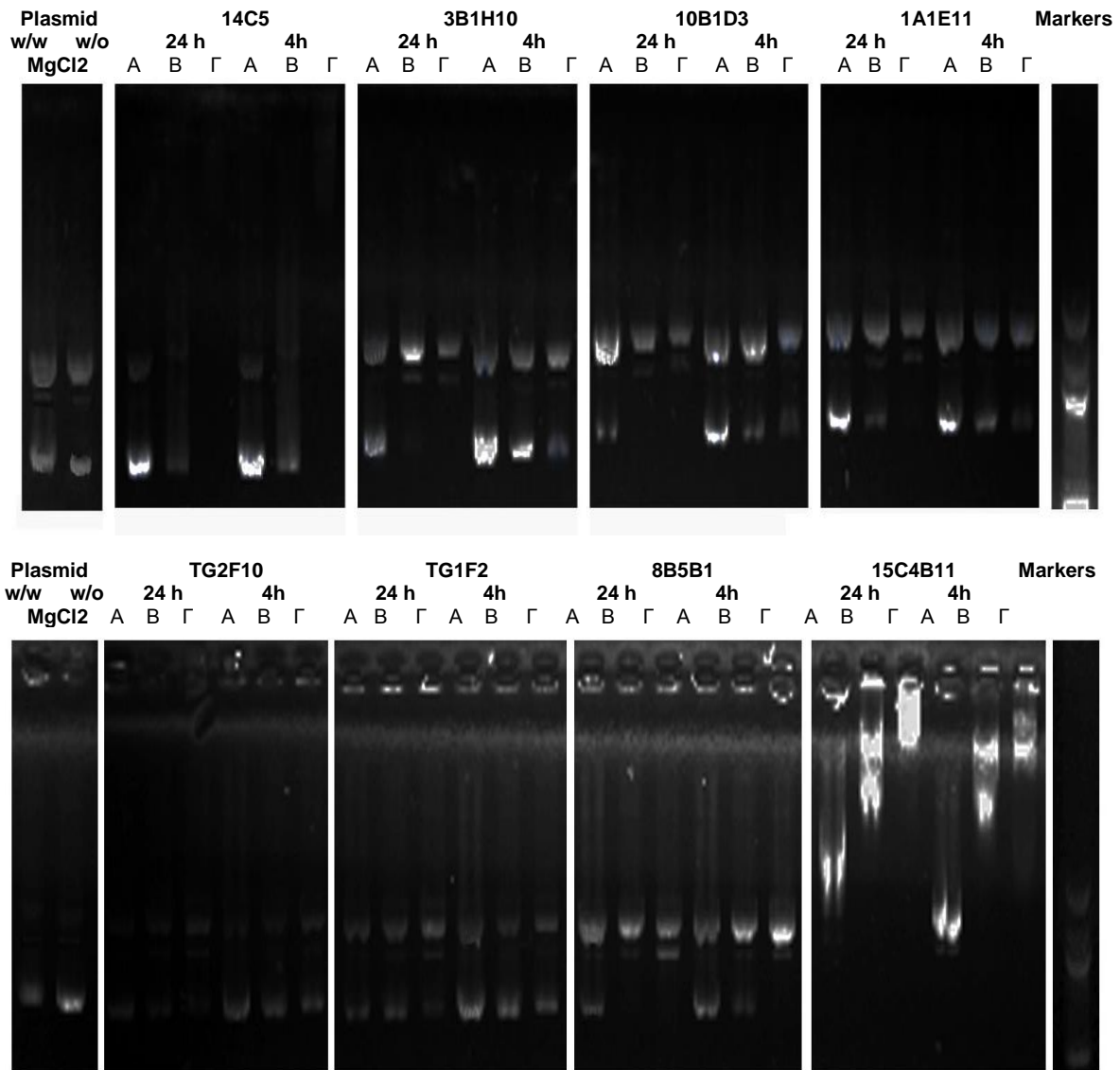
Εικόνα 26. Επίδραση των CPAbs στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa. Κύτταρα HeLa επωάστηκαν για 48 ώρες με τα CPAbs (300µg/ml) και ακολούθησε προσθήκη BrdU (100µM) για 6 ώρες. Το BrdU εντοπίστηκε με τη προσθήκη αντι-BrdU-Alexa 546 (κόκκινο) και η παρατήρηση έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Παρουσιάζεται το ποσοστό των θετικών κυττάρων στην ενσωμάτωση της BrdU σε σχέση με το ολικό αριθμό κυττάρων. Αποτελέσματα από συνολικά τρία πειράματα.

4.2. Έλεγχος της υδρόλυσης πλασμιδιακού DNA

Η ικανότητα των CPAbs να υδρολύουν το DNA ελέγχθηκε μετά από την επώασή τους με το πλασμιδιακό DNA, pBluescript II KS, σε διάφορες αναλογίες $\mu\text{g mAb}$: $\mu\text{g DNA}$ (2:1, 10:1, 30:1) και σε δυο διαφορετικούς χρόνους επώασης, 4 και 24 ώρες στους 37°C. Μετά την προσθήκη θρυψίνης, για τον τερματισμό της αντίδρασης, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Βρέθηκε ότι ορισμένα CPAbs παρουσίασαν υδρόλυση και των δυο αλυσίδων της διπλής έλικας του DNA, δηλαδή δράση DNase, ενώ άλλα άλλαζαν το βαθμό υπερελίκωσης του πλασμιδίου, προκαλώντας θραυσματοποίηση στη μια αλυσίδα του δίκλωνου DNA (**Εικόνα 27**). Αναλυτικά, από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι δύο από τα CPAbs, το 14C5 και το 15C4B11, παρουσίαζαν και στους δύο χρόνους επώασης στη μεγαλύτερη όμως αναλογία 30:1 προσομοίωση της δράσης DNase “εξαφανίζοντας” το DNA, ενώ στις χαμηλότερες αναλογίες παρουσίαζαν αλλαγή του βαθμού υπερελίκωσης του DNA με αποτέλεσμα την αύξηση της γραμμικής μορφής του. Το 8B5B1 και το 10B1D3 στις αναλογίες 10:1 και 30:1 και στους δύο χρόνους άλλαζαν το βαθμό υπερελίκωσης, αυξάνοντας τη γραμμική ισομορφή του πλασμιδίου, ενώ το ίδιο συνέβη και για το 1A1E11 στις 24 ώρες και στις 4 ώρες μόνο στη μεγαλύτερη αναλογία 30:1. Δυο CPAbs, το TG1F2 και το TG2F10, δεν προκαλούσαν υδρόλυση του πλασμιδιακού DNA. Μη αναμενόμενο ήταν το αποτέλεσμα από το μη διεισδυτικό mAb 3B1H10, το οποίο βρέθηκε να αλλάζει τον βαθμό υπερελίκωσης, αυξάνοντας τη γραμμική μορφή κυρίως στις 24 ώρες στις αραιώσεις 1:10 και 1:30, δείχνοντας πως η υδρολυτική ικανότητα με την επώαση *in vitro* με πλασμιδιακό DNA δεν σχετίζεται άμεσα με τη διεισδυτική ικανότητα. Συνοπτικά τα αποτελέσματα φαίνονται και στον **Πίνακα 10**. Η υδρολυτική ικανότητα των mAbs πρέπει να διερευνηθεί ενδελεχώς και με τη χρήση άλλων πλασμιδίων καθώς και γενωμικού DNA, αλλά και με τη χρήση αναστολέων DNase, ώστε να εξασφαλιστεί η μη πρόσμειξή τους με DNase, κάτι το οποίο μάλλον αποκλείεται αφού και τα οχτώ mAbs παρουσιάζουν διακριτό προφίλ υδρόλυσης.

Πίνακας 10. Υδρολυτική δράση των mAbs

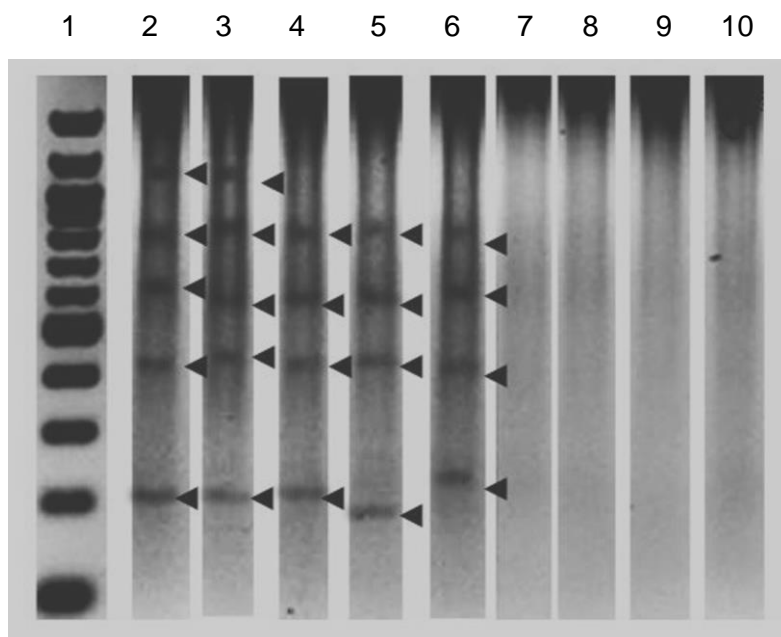
		Υδρόλυση του DNA					
		4 ώρες			24 ώρες		
mAb:DNA		2:1	10:1	30:1	2:1	10:1	30:1
mAbs							
14C5		-	Παρόμοια με DNase δράση	Παρόμοια με DNase δράση	-	Παρόμοια με DNase δράση	Παρόμοια με DNase δράση
8B5B1		-	Αύξηση γραμμικής ισομορφής	Αύξηση γραμμικής ισομορφής	-	Αύξηση γραμμικής ισομορφής	Αύξηση γραμμικής ισομορφής
15C4B11		Παρόμοια με DNase δράση	Παρόμοια με DNase δράση	Παρόμοια με DNase δράση	Παρόμοια με DNase δράση	Παρόμοια με DNase δράση	Παρόμοια με DNase δράση
10B1D3		-	Αύξηση γραμμικής ισομορφής	Αύξηση γραμμικής ισομορφής	-	Αύξηση γραμμικής ισομορφής	Αύξηση γραμμικής ισομορφής
1A1E11		-	-	Αύξηση γραμμικής ισομορφής	-	Αύξηση γραμμικής ισομορφής	Αύξηση γραμμικής ισομορφής
TG1F2		-	-	-	-	-	-
TG2F10		-	-	-	-	-	-
3B1H10 (Μη διεισδυτικό)		-	-	Αύξηση γραμμικής ισομορφής	-	Αύξηση γραμμικής ισομορφής	Αύξηση γραμμικής ισομορφής



Εικόνα 27. Υδρολυτική ικανότητα των CPAbs. Υδρόλυση του πλασμιδίου pBleuscript στους 37°C σε αναλογίες αντισώματος (μg): πλασμιδίου (μg) : A= 2:1, B= 10:1 και Γ=30:1 για 4 και 24 ώρες. Οι αντιδράσεις σταμάτησαν με τη προσθήκη θρυψίνης και η ανάλυση των προϊόντων έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

4.3. Έλεγχος κατακερματισμού του γενωμικού DNA

Η επαγωγή κατάτμησης του DNA ελέγχθηκε μετά από επώαση των CPAbs με κύτταρα HeLa σε 5% FBS για 48 ώρες, ακολούθησε η απομόνωση του DNA από τους πυρήνες τους και ανάλυση του σε πήκτωμα αγαρόζης. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το υπεροξείδιο του υδρογόνου (0.05%), το οποίο προκαλεί οξειδωτική βλάβη στο κύτταρο, με αποτέλεσμα την κατάτμηση του DNA και τελικά την απόπτωση. Στα κύτταρα που επώαστηκαν με τέσσερα από τα επτά CPAbs παρατηρήθηκε το μοτίβο DNA ladder, δηλαδή DNA το οποίο είχε κατακερματιστεί σε πολλαπλά νουκλεοσωματικά κλάσματα μικρού μοριακού βάρους (σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό) (**Εικόνα 28.**). Πιο συγκεκριμένα, το CPAb 15C4B11 φάνηκε να κατακερματίζει το DNA παρουσιάζοντας πέντε θραύσματα, παρόμοια με αυτά που προκάλεσε ο θετικός μάρτυρας, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (0.05%). Ακολούθως τα CPAbs 8B5B11, 14C5 και TG1F2 φάνηκε να κατακερματίζουν το γενωμικό DNA, σε μικρότερο βαθμό, παρουσιάζοντας τέσσερα θραύσματα, ενώ το 1A1E11, το TG2F10 δεν προκάλεσαν καμιά επίπτωση στην ακεραιότητα του γενωμικού DNA των HeLa, αντίστοιχα με το μη διεισδυτικό mAb 3B1H10.



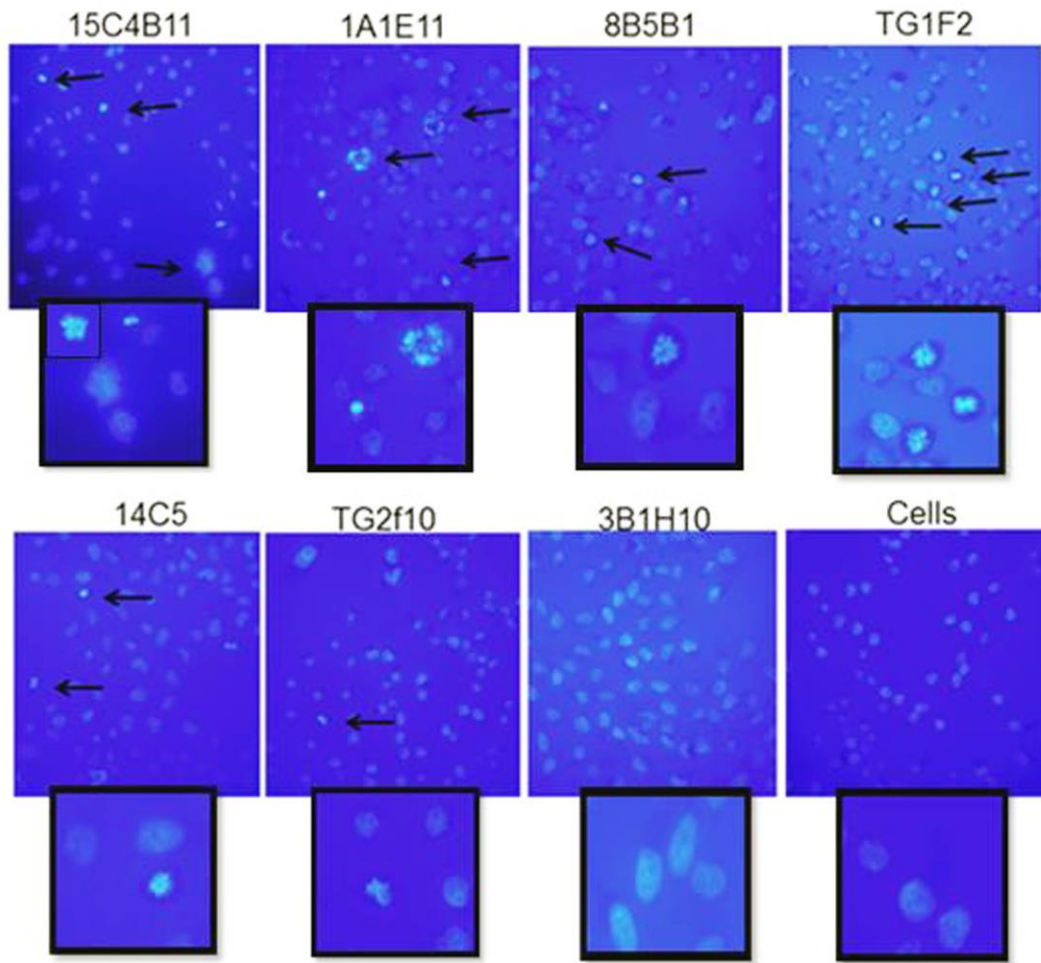
Εικόνα 28. Κατακερματισμός του DNA από τα CPAbs. Τμήματα DNA μικρού μοριακού βάρους, απομονώθηκε από τα κύτταρα HeLa έπειτα από επώαση 48 ώρες με CPAbs (300 mg/ml). 1) Μοριακά βάρη 1Kb, 2) το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2 , 0.05%), 3) 15C4B11, 4) 8B5B11, 5) 14C5, 6) TG1F2, 7) 1A1E11, 8) TG2F10, 9) 3B1H10 και 10) κύτταρα. Αντιπροσωπευτική εικόνα από τρία πειράματα.

4.4. Έλεγχος επαγωγής μορφολογικών αλλαγών στον πυρήνα

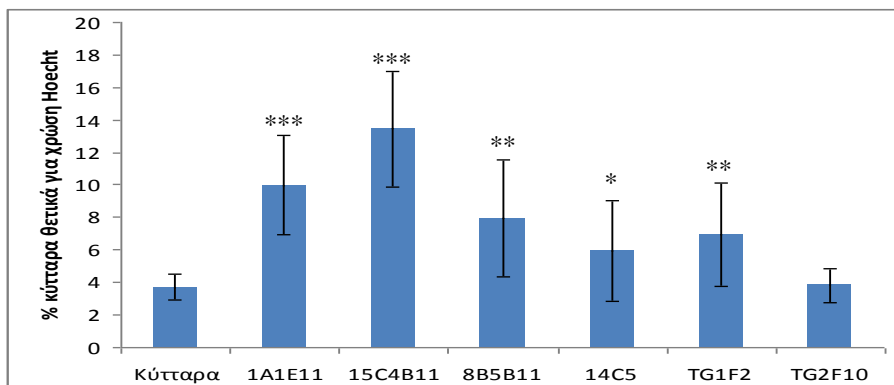
Διερευνήθηκε επίσης η ικανότητα των CPAbs να προκαλούν αλλαγές στη μορφολογία του πυρήνα, και συγκεκριμένα αλλαγές στο βαθμό συμπύκνωσης της χρωματίνης. Τα κύτταρα HeLa επώαστηκαν με τα CPAbs 300μg/ml και τον αρνητικό μάρτυρα 3B1H10 για 48 ώρες, και ακολούθησε η χρώση τους με Hoecht και παρατήρηση σε μικροσκόπιο εξοπλισμένο με λάμπα UV. Η ανάλυση έδειξε ότι αρκετά από τα CPAbs προκαλούσαν αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων συγκριτικά με την φυσιολογική μορφολογία των κυττάρων-μαρτύρων (**Εικόνα 29**). Οι αλλαγές στη συμπύκνωση της χρωματίνης αφορούσαν τον έντονο μπλε χρωματισμό των αποπτωτικών πυρήνων, αντανακλώντας τη διάσπαση του DNA, την ελάττωση ή αύξηση του όγκου του κυττάρου καθώς και άλλες πυρηνικές αλλαγές, όπως η κοκκιώδη μορφή της χρωματίνης, που χαρακτηρίζουν τα αποπτωτικά κύτταρα. Τα κύτταρα μάρτυρες έδειξαν κανονική μορφολογία με τους πυρήνες ομοιόμορφους, στρογγυλούς με χαμηλό μπλε φθορισμό στη χρωματίνη και ένα χαμηλό ποσοστό συμπύκνωσης 3.5%. Συγκριτικά, τα CPAbs φάνηκε να προκαλούν συμπύκνωση της χρωματίνης και τα ποσοστά των θετικών κυττάρων για χρώση Hoecht ήταν: 1)13% για το 15C4B11, 2) 10% για το 1A1E11, 3) 8% για το 8B5B11, 4) 8.5% για το TG1F2, 5) 7% για το 14C5 και τέλος το TG2F10 δεν προκάλεσε αλλαγή σε σχέση με τα κύτταρα χωρίς δείγμα. Συνολικά, οι πυρηνικές αλλαγές του κυττάρου, η ελάττωση του όγκου, η συμπύκνωση της χρωματίνης αλλά και η διόγκωση και η στρογγυλή κυτταρική μορφολογία, υποδηλώνουν πως ορισμένα CPAbs επάγουν απόπτωση στα κύτταρα HeLa.

Εικόνα 29. Κυτταρική και πυρηνική μορφολογία των κυττάρων HeLa μετά από επώαση με τα CPAbs και χρώση με Hoechst. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 48 ώρες με 300 μg/ml mAbs και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε χρώση Hoechst και παρατήρηση σε μικροσκόπιο εξοπλισμένο με λάμπα UV. Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες μετά από τη χρώση με Hoechst και Β) Γράφημα με το ποσοστό των θετικών κυττάρων για την χρώση Hoechst, αυτών δηλαδή που παρουσιάζουν πυκνωτικούς πυρήνες. Αποτελέσματα από τρία πειράματα.

A



B



ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ: ΣΥΣΗΤΗΣΗ



ΜΕΡΟΣ ΠΕΜΠΤΟ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αντιπυρηνικά και κυρίως αντι-DNA αυτοαντισώματα με ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα (cell-penetrating antibodies, CPAbs) έχουν μελετηθεί εκτενώς στον ορό ασθενών με ΣΕΛ (πολυκλωνικά αντισώματα) και σε ποντικούς που εμφανίζουν αυθόρμητα σύνδρομο λύκου (μονοκλωνικά αντισώματα) [157, 164, 233]. Τα CPAbs εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα μιας πληθώρας κυτταρικών τύπων, είναι τάξης IgG και φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεια του λύκου, προκαλώντας απόπτωση σε κύτταρα, όπως αυτά του νεφρού. Εκτός από την επίδρασή τους στον κυτταρικό κύκλο, τα CPAbs έχουν βρεθεί να επηρεάζουν την έκφραση κυτταροκινών, όπως του NFκB [165, 198, 213, 234]. Ο ακριβής τρόπος εισόδου τους παραμένει άγνωστος, με αντιφατικά ευρήματα να υποστηρίζουν είτε ότι γίνεται με την κλασσική ενδοκυττάρωση, δηλαδή με ένα μηχανισμό που χρειάζεται ενέργεια, είτε αντίθετα ότι πρόκειται για ένα μηχανισμό ανεξάρτητο της ενέργειας [164, 191-196]. Φαίνεται πάντως από τη βιβλιογραφία πως η διεισδυτική ικανότητά τους εξαρτάται κυρίως από τη μεταβλητή περιοχή τους και συγκεκριμένα από την πολυδραστικότητα που αυτή επιδεικνύει, καθώς και από την παρουσία θετικά φορτισμένων αμινοξέων στην υπερμεταβλητή περιοχή τους, με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν με διάφορες δομές, κυρίως αρνητικά φορτισμένες, που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και με αυτό τον τρόπο να τη διαπερνούν [157, 182, 190].

Η ικανότητά τους να εισέρχονται σε ζώντα κύτταρα και να παρεμβαίνουν σε λειτουργίες του κυττάρου τα ανέδειξαν σαν εργαλεία στόχευσης χρήσιμα για θεραπευτικές εφαρμογές, είτε απευθείας ως δραστικά μόρια που στόχευαν ενδοκυττάρια στόχους, είτε ως οχήματα ενδοκυτταρικής μεταφοράς βιοδραστικών ουσιών, ή γονιδίων (μετασχηματισμός κυττάρων) [218-227]. Με βάση αυτά τα χαρακτηριστικά των CPAbs, η παρασκευή και η χρήση πεπτιδίων από την υπερμεταβλητή περιοχή τους φάνταζε ως μια δελεαστική πρόκληση με ευρύ φάσμα εφαρμογών στη βιοϊατρική. Αν και αποτελεσματική η χρήση των πεπτιδίων στη μεταφορά βιοδραστικών μορίων *in vitro*, αρκετά γρήγορα έδειξε να παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα στην *in vivo* χρήση τους, αφού αυτά είχαν μικρό χρόνο ημιζωής, ευαισθησία στις πρωτεάσες, κυτταροτοξικότητα και τοπική δράση μόνο στην περιοχή έγχυσης [225-227]. Για αυτούς τους λόγους στη συνέχεια το ερευνητικό ενδιαφέρον μετακινήθηκε στη χρήση ακέραιων μορφών αυτών των αντισωμάτων.

Κι ενώ λοιπόν οι εργασίες σχετικά με τα CPAbs στόχευαν διεθνώς στη μελέτη πεπτιδίων προερχόμενων από αυτά, κανείς δεν διερεύνησε τι συμβαίνει στους υγιείς οργανισμούς ως προς την παρουσία CPAbs αν και οι μελέτες στα παθολογικά CPAbs είχαν δείξει ότι πολλά από αυτά τα αντισώματα είχαν κοινά χαρακτηριστικά με τα φυσικά αυτοαντισώματα (Natural autoantibodies, NAb), τα οποία ανευρίσκονται σε υγιείς

καταστάσεις. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι η πολυδραστικότητα έναντι δομικά διαφορετικών μορίων, όπως DNA, απτεϊνών και πρωτεϊνών και η κωδικοποίηση συχνά από γονίδια της βλαστικής σειράς [61, 64, 156]. Επομένως, αν και υπήρξαν αρκετές αναφορές για τα κοινά χαρακτηριστικά που μοιράζονται αυτές οι δύο ομάδες αυτοαντισωμάτων, η παρουσία κυτταρο-δισιδυτικών αντισωμάτων σε υγιείς οργανισμούς δεν διερευνήθηκε ποτέ. Στόχος λοιπόν της παρούσας διατριβής ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός φυσικών αυτοαντισωμάτων με ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα από υγιείς οργανισμούς, δηλαδή στον άνθρωπο (πολυκλωνικά αντισώματα) και στον ποντικό (μονοκλωνικά αντισώματα) καθώς και η μελέτη του βιολογικού ρόλου τους. Ειδικότερα, στην παρούσα μελέτη τέθηκαν τα εξής ερωτήματα: 1) υπάρχουν CPAbs στους υγιείς οργανισμούς, δηλαδή φυσικά CPAbs; 2) εφόσον υπάρχουν, έχουν τα ίδια ανοσολογικά χαρακτηριστικά (δραστικότητα και τρόπος εισόδου) με τα αντίστοιχα των ασθενών; 3) μοιράζονται τους ίδιους ενδοκυττάριους στόχους - ενδοκυττάριο εντοπισμό; και 4) τις ίδιες βιολογικές δράσεις αυτά παρουσιάζουν;

I. ΠΑΡΟΥΣΙΑ CPAbs ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΥΓΙΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ (ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΑ ΦΥΣΙΚΑ CPAbs) – Ενδοφλέβια Ανοσοσφαιρίνη

1. Χαρακτηριστικά πολυκλωνικών φυσικών CPAbs

Για να διερευνήσουμε την ύπαρξη φυσιολογικά ανευρισκόμενων CPAbs θελήσαμε πρώτα να μελετήσουμε την παρουσία τους σε πολυκλωνικό επίπεδο και συγκεκριμένα στον ορό υγιών δοτών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε 3 σκευάσματα ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης (IVIg), με ευρεία εφαρμογή στη θεραπευτική πρακτική και αποτελούνται από φυσικά πολυδραστικά αντισώματα τάξης IgG προερχόμενα από πολύ μεγάλο αριθμό υγιών δοτών. Την απόφασή μας αυτή ενίσχυσε το γεγονός ότι η IVIg χρησιμοποιείται συστηματικά τα τελευταία τριάντα χρόνια στη θεραπεία ενός μεγάλου εύρους ασθενειών (ανοσοανεπάρκειες, αυτοάνοσα και φλεγμονώδη νοσήματα) και παρόλα αυτά δεν έχουν ακόμα και σήμερα εξακριβωθεί πλήρως οι μηχανισμοί δράσης της.

Στη διερεύνηση των κυτταρο-δισιδυτικών ιδιοτήτων της IVIg *in vitro*, παρατηρήσαμε ότι ανεξάρτητα από το σκεύασμα, η IVIg-IgG είχε την ικανότητα να διεισδύει σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών τύπων από ποντικό και άνθρωπο, όπως συμβαίνει και με τα γνωστά CPAbs στις παθολογικές καταστάσεις. Παράλληλα, εξετάστηκαν συγκριτικά και IgG, που απομονώθηκαν ξεχωριστά, από τον ορό υγιών δοτών. Βρέθηκε ότι όλες οι IgG από τους υγιείς δότες παρουσίαζαν κυτταρική διείσδυση, σε μικρότερο όμως βαθμό από ότι η IVIg, και με διαφορετικό προφίλ διείσδυσης. Η κυτταρική διείσδυση των απομονωμένων IgG δείχνει καθαρά ότι στον ορό των υγιών ατόμων υπάρχουν CPAbs σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και με διαφορετικές διεισδυτικές ιδιότητες, και όταν όλα αυτά ενωθούν σε

ένα σκεύασμα, όπως γίνεται με την IVIg, τότε το φαινόμενο της διείσδυσης εμφανίζεται πολύ πιο έντονο. Το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει επιπλέον ότι η κυτταρική διείσδυση της IVIg δεν είναι ένα επιφαινόμενο προερχόμενο από το σύμπλεγμα λόγω του μεγάλου φάσματος δραστηριοτήτων που περιέχει.

Η είσοδος της IVIg στα κύτταρα, χωρίς να έχει συνδεθεί ποτέ με την παρουσία CPAbs, έχει προηγουμένως περιγραφεί από δύο ερευνητικές ομάδες, που έδειξαν ότι η εσωτερικεύσή της γίνεται είτε μέσω του υποδοχέα FcR σε ενδοθηλιακά και δενδριτικά κύτταρα, είτε ανεξάρτητα υποδοχέων με «αυθόρμητο» τρόπο σε B-κύτταρα [235-237]. Επίσης, στο φαινόμενο της ενδοκυττάριας εισόδου της IVIg δεν δόθηκε καμιά ουσιαστική ερμηνεία πέρα από αυτή της φαγοκυττάρωσης, ούτε συνδέθηκε με τα γνωστά - παθολογικά- CPAbs. Στα αποτελέσματά μας φαίνεται ότι η κυτταρο-διείσδυση της IVIg συμβαίνει σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, χωρίς τη συμμετοχή ενεργειακά εξαρτώμενων μηχανισμών, μιας και το φαινόμενο παρατηρήθηκε: α) σε κύτταρα που δεν φέρουν υποδοχείς FcR (π.χ. N2a και HeLa), β) σε θερμοκρασία 4°C, όπου μειώνεται η κατανάλωση ATP, γ) με την παρουσία αναστολέων της ενδοκυττάρωσης (κυτοχλασίνη), και δ) μετά από παρεμπόδιση (blocking) των FcR- υποδοχέων. Επιπλέον, στη νέα γνώση προστέθηκε και η αποτελεσματική κυτταρική διείσδυση από απομονωμένα θραύσματα $F(ab')_2$ της IVIg, αποδεικνύοντας έτσι την άμεση σύνδεση του φαινομένου με τη μεταβλητή περιοχή των IgG-IVIg.

Παρά τις ομοιότητες σε σχέση με την κυτταρική διείσδυση μεταξύ των παθολογικών και των φυσικών αυτοαντισωμάτων, τα φυσικά CPAbs εντοπίζονται σχεδόν αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα σε αντίθεση με τα παθολογικά, που συσσωρεύονται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα των κυττάρων [157, 164, 165, 198, 233, 238]. Το εύρημα αυτό πολύ πιθανά να υποδεικνύει την ύπαρξη ιδιαίτερων-διακριτών διαφορών μεταξύ των φυσικών και των παθολογικών CPAbs, κυρίως όσον αναφορά τη δομή και τη λειτουργία τους. Στη βιβλιογραφία, έχουν περιγραφεί σημαντικές διαφορές στις θέσεις δέσμευσης των αντιγόνων μεταξύ IgG από παθολογικούς και φυσιολογικούς ορούς [239, 240]. Ο εντοπισμός στο κυτταρόπλασμα των φυσικών CPAbs μπορεί πιθανά να συνδεθεί με το γνωστό ανοσορρυθμιστικό ρόλο της IVIg [241-243], σε αντίθεση με τον πυρηνικό εντοπισμό των παθολογικών CPAbs που έχουν περιγραφεί να εμπλέκονται στην παθογένεια του ΣΕΛ [165, 201, 213].

Εφόσον η IVIg συνιστά ένα πολύπλοκο μίγμα IgG με ευρύτατο φάσμα δραστηριοτήτων, κρίθηκε απαραίτητο να διερευνηθεί εάν εμπεριέχει ειδικούς υποπληθυσμούς αντισωμάτων, οι οποίοι της προσδίδουν αυτήν την κυτταρο-διεισδυτική ικανότητα. Για το σκοπό αυτό, απομονώθηκαν από την IVIg με χρωματογραφία συγγένειας τρεις υποπληθυσμοί IgG έναντι των ιστονών, της ηπαρίνης και του DNA,

αντιγόνων που είχαν προηγουμένως συνδεθεί -ως υποδοχείς- με την κυτταρική διείσδυση των παθολογικών CPAbs. Βρέθηκε, όπως ήταν αναμενόμενο, ότι και οι τρεις υποπληθυσμοί διέθεταν την ικανότητα να διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα. Αυτό που δεν ήταν όμως αναμενόμενο, ήταν το γεγονός ότι η απομάκρυνση αυτών των υποπληθυσμών από την IVIg, θα μείωνε τόσο δραματικά τη διεισδυτική ιδιότητα της IVIg, ενώ και οι τρεις υποπληθυσμοί μαζί αντιπροσώπευαν μόνο το 2% -περίπου- της IVIg (2mg στα 100mg). Η δραματική μείωση της διεισδυτικής ικανότητας της IVIg μετά την πλήρη απομάκρυνση αυτών των αντισωμάτων υποδηλώνει τον κύριο ρόλο στη διείσδυση αυτών των χαμηλών σε συγκέντρωση υποπληθυσμών. Αυτοί οι υποπληθυσμοί εμφάνισαν πολυδραστικότητα (αναγνωρίζοντας μια σειρά από εαυτά και μη, δομικά άσχετα, αντιγόνα), η οποία έχει συνδεθεί από προηγούμενες εργασίες με τη διεισδυτική ικανότητα των παθολογικών αντι-DNA CPAbs από ποντικούς με σύνδρομο λύκου. Απομόνωση ειδικών υποπληθυσμών IgG από την IVIg έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία έναντι πολλών αντιγόνων, όπως το DNA, το ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο (human leukocyte antigen), τη λεκτίνη Siglec-9 (dinitrophenol and sialic acid-binding Ig-like lectin 9), κ.ά. και συνήθως εμφανίζουν αυξημένη ειδική δραστικότητα σε σύγκριση με τα αρχικά σκευάσματα IVIg [129, 138, 141-143, 152]. Μάλιστα, η πλήρης απομάκρυνση των αντι-Siglec-9 αντισωμάτων από την IVIg, μείωσε δραματικά την επαγωγή κυτταρικού θανάτου των ουδετερόφιλων, που προκαλούσε το αρχικό σκεύασμα της IVIg.

Μετά την ολοκλήρωση της *in vitro* μελέτης οδηγηθήκαμε σε *in vivo* μελέτη για την επιβεβαίωση της κυτταρικής διείσδυσης στα κύτταρα διαφόρων οργάνων, όπως έχει δείχθει και για τα παθολογικά CPAbs. Προηγούμενες μελέτες σχετικά με τη βιοκατανομή των παθολογικών CPAbs, είχαν αποκαλύψει εναπόθεση σε διάφορα όργανα, όπως στο νεφρό, στο ήπαρ, στην καρδιά, στο έντερο και στο σπλήνα. Στην παρούσα μελέτη, χορηγήσαμε την IVIg ενδοφλεβίως σε υγιείς ποντικούς και μετά από 3 και 6 ώρες εξετάσαμε όλους τους κύριους ιστούς. Η IVIg, 3 ώρες μετά, εντοπιζόταν μέσα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων διαφόρων οργάνων. Αγγειακά κύτταρα στο ήπαρ, στον εγκέφαλο και στους νεφρούς παρουσίαζαν σε μεγάλο ποσοστό ενδοκυττάρια IVIg, όπως αναμενόταν λόγω της άμεσης επαφής τους με την κυκλοφορία του αίματος. Επίσης, χαρακτηριστικά κύτταρα για το κάθε ένα από τα προαναφερθέντα όργανα παρουσίαζαν ενδοκυττάρια IVIg, όπως ο χιτώνας του εντέρου lamina propria. Οι λεμφαδένες δεν παρουσίασαν θετικό αποτέλεσμα ως προς τη διείσδυση της IVIg, πιθανόν λόγω της μειωμένης ροής του αίματος από και προς αυτούς, αντανακλώντας έτσι την πληθώρα των παραγόντων που επηρεάζουν την βιοκατανομή των αντισωμάτων. Επίσης, διείσδυση δεν παρατηρήθηκε σε νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου, αποτέλεσμα που συμβαδίζει με προηγούμενη μελέτη που αναφέρει ότι περιορισμένες ποσότητες IVIg είναι σε θέση να

διασχίσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB). Ωστόσο, ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός της IVIg που παρατηρήσαμε σε κύτταρα νευροβλαστώματος (κυτταρική σειρά N2a), ενισχύει την πιθανότητα η IVIg να αποκτά ενδοκυττάρια πρόσβαση στα νευρικά κύτταρα σε περιπτώσεις αλλοίωσης και διαρροής του BBB, όπως σε αυτές των εγκεφαλικών διαταραχών. Ενδοκυτταρική IVIg ανιχνεύτηκε και στο έντερο, όπου εντοπίστηκε στο χιτώνια lamina propria, με ελάχιστη όμως διείσδυση στα επιθηλιακά κύτταρα, κάτι που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, αλλά χωρίς να σχολιάζεται ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός της IVIg. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η διείσδυση συνδέεται και *in vivo* με τη μεταβλητή περιοχή της IgG-IVIg, εξετάστηκε ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός της σε διάφορα όργανα, μετά από χορήγηση σε ποντικούς των τμημάτων F(ab')₂ της IVIg συζευγμένα με φθορίζουσα ουσία. Ενδοκυττάρια IVIg εντοπίστηκε σε όλα τα όργανα, εκτός του εγκεφάλου, από τους ποντικούς στους οποίους χορηγήθηκε το σύζευγμα, συγκριτικά με αυτά από τους ποντικούς που έλαβαν φυσιολογικό ορό. Ωστόσο, ο μικρότερος αριθμός των θετικών κυττάρων στα όργανα και το αρνητικό αποτέλεσμα στον εγκέφαλο, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα από ολόκληρη την IVIg θα μπορούσε να αποδοθεί στη χαμηλότερη δόση που χορηγήθηκε (0,35 g/kg), στο μικρότερο χρόνο εξέτασης μετά την έγχυση (90 λεπτά) και στην εγγενή φύση του F(ab')₂, να καταβολίζεται ταχέως από τον οργανισμό, σε σύγκριση με την ακέραια IgG. Το γενικό φαινόμενο της κατανομής της IVIg σε διάφορα όργανα μπορεί να έχει σχέση με μερικές από τις θετικές επιδράσεις της χορήγησής της σε μια σειρά νοσημάτων όπως μεσεντέρια ισχαιμία εντέρου (mesenteric ischemia-reperfusion injury of the intestine), σχηματισμό επικαθίσεων Αβ στον εγκέφαλο (brain Aβ deposit formation), πειραματική θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια (experimental thrombotic microangiopathy), σήψη, πνευμονική ίνωση νόσος Kawasaki και αυτοάνοσα νοσήματα.

2. Βιολογική δράση των πολυκλωνικών φυσικών CPAbs

Αφού διαπιστώθηκε η παρουσία φυσικών πολυκλωνικών CPAbs στην IVIg, επόμενο βασικό ερώτημα ήταν αν η διείσδυση της IVIg στο κύτταρο επιδρά στη λειτουργία του. Βασιζόμενοι στο γεγονός ότι στο παρελθόν έχει περιγραφεί η επίδραση της IVIg στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων *in vitro* [125, 127], εξετάσαμε πρώτα την επίδραση της κυτταρο-διείσδυσης της IVIg στην έκφραση του δείκτη ενεργοποίησης λεμφοκυττάρων CD25, σε ενεργοποιημένα από μιτογόνα (PMA/ ιονομυκίνη) σπληνοκύτταρα. Βρέθηκε ότι η υπερέκφραση του δείκτη ενεργοποίησης CD25 στα διεγερμένα σπληνοκύτταρα ήταν σημαντικά μειωμένη παρουσία της IVIg και πιο συγκεκριμένα, ότι για αυτή τη μείωση ευθύνονταν οι διεισδυτικοί υποπληθυσμοί της IVIg (δύο από τους τρεις, αυτοί που απομονώθηκαν σε ανοσοπροσοφητές ιστονών και DNA). Το τελευταίο επιβεβαιώθηκε

και από το γεγονός ότι η IVIg χωρίς τους τρεις υποπληθυσμούς δεν είχε καμία επίδραση στην έκφραση του δείκτη και δεν παρουσίαζε διείσδυση στα σπληνοκύτταρα. Η ανασταλτική δράση που διαπιστώθηκε είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες των παθολογικών CPAbs, όπου παρατηρήθηκαν μεταβολές της *in vitro* ενεργοποίησης των T- και B-κυττάρων. Αυτή είναι η πρώτη φορά που παρατηρείται μια τέτοια σχέση μεταξύ κυτταρο-διείσδυσης και επακόλουθης δράσης της IVIg, με τους μηχανισμούς να χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Παράλληλα, εξετάστηκε η επίδραση της IVIg στον πολλαπλασιασμό κυττάρων της ηπατικής σειράς HepG2, τα οποία παρουσίασαν μεγάλο ποσοστό ενδοκυττάριας IVIg στο κυτταρόπλασμα. Η IVIg δεν βρέθηκε να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αυτών σε καμία από τις δύο συγκεντρώσεις όπου δοκιμάστηκε. Η IVIg βιβλιογραφικά έχει δείξει πως μπορεί να καταστείλει τον πολλαπλασιασμό B- και T-λεμφοκυτταρικών σειρών καθώς και ενδοθηλιακών κυττάρων [118,125,127]. Ίσως το αποτέλεσμα αυτό να οφείλεται στον τρόπο ανίχνευσης (δοκιμασία MTS), ο οποίος δεν επιτρέπει τη διάκριση μικρών αλλαγών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ είναι εξίσου πιθανόν να οφείλεται και στην κυτταρική σειρά που επιλέχθηκε για τη συγκεκριμένη μελέτη.

II. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ CPAbs ΑΠΟ ΥΓΙΕΙΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ

1. Χαρακτηριστικά μονοκλωνικών φυσικών CPAbs

Η παρουσία CPAbs στον ορό των υγιών ανθρώπων μας οδήγησε στη διερεύνηση των ιδιοτήτων τους σε μονοκλωνικό επίπεδο και για το σκοπό αυτό περάσαμε στον ποντικό, όπου υπάρχει μεγάλος όγκος δεδομένων σχετικά με τα αντίστοιχα, παθολογικά, CPAbs λύκου. Επειδή, τα μονοκλωνικά παθολογικά CPAbs ποντικού που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα ανήκουν στην τάξη IgG, για να καταφέρουμε να απομονώσουμε IgG μονοκλωνικά αντισώματα από τον υγιή ποντικό ώστε να τα μελετήσουμε συγκριτικά, πραγματοποιήσαμε ανοσοποίηση των ποντικών με θυρεοσφαιρίνη (Tg) παρουσία ανοσοενισχυτικού. Είναι γνωστό πως οι υβριδοποιήσεις σπληνοκυττάρων μη ανοσοποιημένων ποντικών με μη εκκριτικές μυελωματικές σειρές παράγουν μόνο υβριδώματα της τάξης IgM, ίσως λόγω της περιορισμένης ενεργοποίησης των B-κυττάρων. Για να γίνει εφικτή η παραγωγή μονοκλωνικών NAbs τάξης IgG προηγήθηκε της υβριδοποίησης αντιγονική διέγερση των πειραματόζων είτε με επιμολύνσεις με παράσιτα είτε με υπερανοσοποιήσεις. Μάλιστα, έχει δείξει ότι η υπερανοσοποίηση ποντικών με αντιγόνα, όπως η αλβουμίνη παρουσία ανοσοενισχυτικών, προκαλούσε την αύξηση των κυττάρων που παρήγαγαν IgG πολυδραστικά NAbs [8]. Γνωρίζοντας ότι η υποδόρια χορήγηση της Tg αποτελεί τρόπο επαγωγής του μοντέλου της αυτοάνοσης

θυρεοειδίτιδας σε ορισμένες μόνο φυλές ποντικών, ενώ σε άλλες, όπως τα BALB/c, όχι, ανοσοποιήσαμε BALB/c ποντικούς με Tg και παρήχθησαν υβριδώματα.

Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν τρεις υβριδοποιήσεις και από κάθε διαδικασία προέκυψαν περίπου 30-44 κλώνοι. Για την επιλογή των κλώνων ενδιαφέροντος, πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι ως προς την αντισωματική τους δράση έναντι μιας σειράς αντιγόνων και την κυτταρο-δισιδυτική ικανότητά τους. Βρέθηκαν 26-32 κλώνοι θετικοί στους ελέγχους δραστηριότητας και από αυτούς προσδιορίστηκαν να είναι πολυδραστικοί το ποσοστό 12-24%, εκ των οποίων 8-15% βρέθηκαν να είναι δισιδυτικοί. Κατά τα στάδια ανάπτυξης και υποκλωνισμού αρκετοί από τους κλώνους κατέληξαν να είναι μη εκκριτικοί ή εμφάνισαν δυσκολία στην ανάπτυξή τους. Συνολικά, επιλέξαμε οκτώ μονοκλωνικά πολυδραστικά αντισώματα με ικανότητα δισίδυσης, υπόταξης IgG1 και IgG2b, και ένα επιλέχθηκε ως μάρτυρας, υπόταξης IgG1, μονοειδικό για τη Tg και μη δισιδυτικό. Μια παρατήρηση που δεν μπορεί να αξιολογηθεί προς το παρόν είναι ότι δεν εντοπίστηκε κανένα CPAb υπόταξης IgG2a, η οποία συναντάται μαζί με την υπόταξη IgG2b, κατά πλειοψηφία στα παθολογικά CPAb του λύκου. Τα αντισώματα αυτά βρέθηκαν ότι είχαν τη δυνατότητα να δισιδύουν σε ζώντα κύτταρα διαφόρων κυτταρικών τύπων (ινοβλάστες ή επιθηλιακά), ποντικίσιας ή ανθρώπινης προέλευσης. Συνολικά, τα mAbs της μελέτης έδιναν διαφορετικό προφίλ δισίδυσης παρουσιάζοντας διακριτό πρότυπο ενδοκυττάρου εντοπισμού.

Ίσως το πιο ενδιαφέρον αποτέλεσμα που λάβαμε από αυτό το μέρος της μελέτης να είναι η διαφοροποίηση που παρουσιάστηκε στον εντοπισμό των CPAbs από τους υγιείς ποντικούς σε σχέση με τα παθολογικά CPAbs. Τα μονοκλωνικά φυσικά CPAbs που παρήχθησαν βρέθηκαν να εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα (πέντε από τα οχτώ mAbs) ή/και στον πυρηνίσκο (τρία από τα οχτώ mAbs) σε αντίθεση με τα παθολογικά CPAbs που εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα. Ο διαφορετικός εντοπισμός αυτών πολύ πιθανά να υποδηλώνει διαφοροποίηση στο ρόλο τους, αφού τα παθολογικά CPAbs του ΣΕΛ που εντοπίζονται στον πυρήνα εμπλέκονται στην παθογένεια του λύκου [199,158, 202-207], ενώ από την άλλη, τα φυσικά αντισώματα είναι γνωστά για τον ρόλο τους στην ανοσορρύθμιση [84,94]. Όσον αφορά τον εντοπισμό στον πυρηνίσκο και στο κυτταρόπλασμα τριών από τα οχτώ CPAbs της μελέτης, είναι πιθανόν αυτά να μεταφέρονται κατά την επικοινωνία του κυτταροπλάσματος με τον πυρηνίσκο. Η συχνή επικοινωνία (cross-talk) των δύο αυτών διαμερισμάτων καθώς και η συνεχόμενη ανταλλαγή υλικού, μιας και ο πυρηνίσκος φέρει τα γονίδια που κωδικοποιούν το ριβοσωμικό RNA καθιστά κάτι τέτοιο πολύ πιθανό. Πιο συγκεκριμένα, το ριβοσωμικό RNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα για να μεταφραστεί, επανεισέρχεται στον πυρήνα για να σχηματιστούν τα ριβοσώματα, τα οποία θα ξαναπεράσουν στο κυτταρόπλασμα για να

βρεθούν στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στη βιβλιογραφία, CPAbs που να εντοπίζονται στον πυρηνίσκο έχουν περιγραφεί σε επαγόμενο με υδράργυρο (HgCl_2) μοντέλο συστηματικής αυτοάνοσης νόσου και δείχθηκε ότι τα αντισώματα αυτά δεν επιδρούν στην κυτταρική σύνθεση του DNA [179]. Είναι πιθανόν, ο διακριτός ενδοκυττάριος εντοπισμός να υποδεικνύει και δομικές διαφορές στη μεταβλητή περιοχή σύνδεσης κάθε αντισώματος, είτε αναγνωρίζοντας με μεγάλη συγγένεια συγκεκριμένα κυτταρικά συστατικά-στόχους, είτε τρισδιάστατες δομές, είτε διαφορές στην πλαστικότητα της μεταβλητής περιοχής.

Τα πειράματα για τη μελέτη του τρόπου εισόδου των μονοκλωνικών CPAbs έδειξαν ότι δύο από τα οχτώ CPAbs διεισδύουν με μηχανισμό εξαρτώμενο της ενέργειας, δηλαδή στους 4°C , όπου αναστέλλεται η κατανάλωση ATP, αυτά παρέμειναν στην επιφάνεια των κυττάρων, ενώ τα υπόλοιπα δεν επέδειξαν ενεργειακή εξάρτηση. Τέτοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για τα παθολογικά CPAbs, αφού ορισμένα από αυτά έχουν περιγραφεί να εισέρχονται μέσω ενεργειακά εξαρτώμενων μονοπατιών ενδοκυττάρωσης [164, 191-196], ενώ σε πιο πρόσφατες μελέτες έχουν επίσης αναφερθεί ανεξάρτητοι τρόποι εισόδου, όπως είναι το μεμβρανικό μοντέλο «carpet-like model», ή ο σχηματισμός ανεστραμμένου μικκυλίου (inverted micelle formation). Στα ενεργειακά μονοπάτια εισόδου των παθολογικών CPAbs, τα πιο συχνά αναφερόμενα είναι αυτά της ενδοκύτωσης, είτε μέσω επιφανειακών υποδοχέων, π.χ. FcR, μυσίνη 1, ηπαρίνη, ακτινίνη, είτε απευθείας μέσω κυστιδίων π.χ. καλυμμένων με κλαθρίνη κ.α. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν ορισμένες μελέτες που προτείνουν ότι τα παθολογικά CPAbs ακολουθούν εναλλαγή μονοπατιών διείσδυσης, δηλαδή, ενώ εισέρχονται μέσω κυστιδίων και προωθούνται στα πρωτεοσώματα-φαγοσώματα, διαφεύγουν από αυτά και εντοπίζονται σε περιοχές του κυτταροπλάσματος ακολουθώντας άλλα μονοπάτια [182, 190-196]. Τέτοια CPAbs, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία θεραπευτικών παραγόντων, όπου ένα CPAb συζευγμένο με μια βιοδραστική/φαρμακευτική ουσία εισέρχεται μέσω κυστιδίων, προωθείται στα πρωτεοσώματα, και το σύζευγμα ή η εν λόγω ουσία απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Ο μηχανισμός εισόδου μέσω κατανάλωσης ενέργειας-ενδοκυττάρωσης έχει ως βασικό μειονέκτημα την πιθανή «παγίδευση» των συζευγμάτων μέσα στα πρωτεοσώματα και τελικά τη μη επίτευξη παράδοσης προϊόντος ενδοκυττάρια.

2. Βιολογική δράση των μονοκλωνικών φυσικών CPAbs

Η παρέμβαση ορισμένων παθολογικών CPAbs στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μας οδήγησε στο να μελετήσουμε την επίδραση των φυσικών CPAbs σε αυτή τη λειτουργία. Μετά από επώαση 48 ωρών, τα φυσικά CPAbs εντοπίζονταν ενδοκυττάρια και δεν βρέθηκε να επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των HeLa κυττάρων, μετά και την προσθήκη βρωμοουριδίνης (BrdU) για 6 ώρες. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση

με μελέτες όπου αντι-RNP CPAbs βρέθηκε ότι μετά την ενδοκυττάρια είσοδό τους μπλόκαραν τον κυτταρικό κύκλο μονοπύρηνων και T λεμφοκυττάρων σταματώντας τον στις φάσεις S και G2 [163, 203]. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για τα NAbs, τα οποία φαίνεται να σταματούν τον κυτταρικό κύκλο λεμφοκυττάρων και καρκινικών σειρών, όπως επιθηλιακών ή ηπατικών στη φάση S [103, 104, 111]. Με βάση τα παραπάνω και επειδή το αποτέλεσμά μας αφορά μια καρκινική επιθηλιακή σειρά, δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα για τη συγκεκριμένη δράση των φυσικών CPAbs. Περαιτέρω μελέτες είναι αναγκαίες για να προσφέρουν περισσότερη πληροφόρηση.

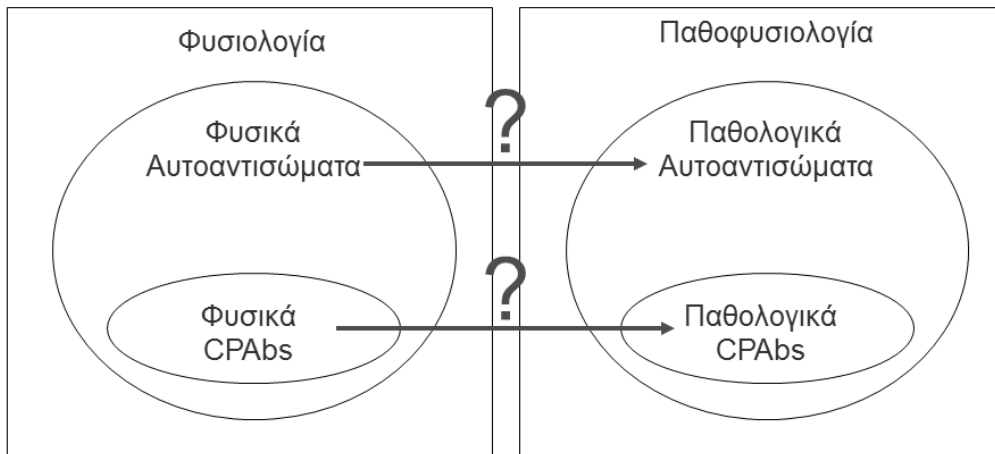
Θέλοντας να διερευνήσουμε σε βάθος τις πιθανές δράσεις αυτών των μονοκλωνικών φυσικών CPAbs που απομονώσαμε, βασιστήκαμε στην υπάρχουσα γνώση ότι φυσικά αντισώματα που ανευρίσκονται σε υγιείς ανθρώπους διαθέτουν ενζυμικές ιδιότητες, όπως δράση πρωτεασών, DNase ή RNase που είναι γνωστά ως καταλυτικά αντισώματα (abzymes). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι καταλυτικά αντισώματα έχει αναφερθεί ότι υπάρχουν στον ορό ασθενών με ΣΕΛ και αντίστοιχων πειραματικών μοντέλων της νόσου, με μια μόνο δημοσιευμένη μελέτη που αφορά στα παθολογικά μονοκλωνικά CPAbs [188, 211], και μια ανεξάρτητη μελέτη στο εργαστήριο Ανοσολογίας (αδημοσίευτα αποτελέσματα), που έδειξε επίσης ότι παθολογικά μονοκλωνικά CPAbs από ποντικούς με αυθόρμητο πειραματικό λύκο φέρουν τέτοια υδρολυτική ιδιότητα. Για αυτό το λόγο μελετήσαμε την πιθανή καταλυτική δράση των φυσικών μονοκλωνικών CPAbs. Η επώασή τους με πλασμίδιο pBleuscript σε διάφορες αναλογίες και σε διάφορα χρονικά διαστήματα προκάλεσε, είτε αλλαγή στις ισομορφές του πλασμιδίου (από την υπερελικωμένη μορφή σε γραμμική), είτε την πλήρη υδρόλυσή του, επιδεικνύοντας δράση DNase. Το καθένα παρουσίαζε ξεχωριστό προφίλ υδρόλυσης, που φαινόταν να είναι ειδικό, καθώς ακολουθούσε την κινητική της συγκέντρωσης και του χρόνου επώασης. Ο προσδιορισμός της περιοχής επάνω στα μόρια αυτών των mAbs που παρουσιάζει την υδρολυτική δράση αξίζει να διερευνηθεί, ενώ η ύπαρξη κοινών ιδιοτήτων στην υδρόλυση του DNA των φυσικών και παθολογικών CPAbs καθιστά αναγκαία τη διερεύνηση της σημασίας και των επιπτώσεων αυτής της δράσης στη φυσιολογία και στην παθοφυσιολογία.

Με βάση την παραπάνω γνώση σχετικά με την υδρόλυση του πλασμιδιακού DNA, διερευνήθηκε η επαγωγή κατακερματισμού του DNA και γενικότερα αλλαγών στη μορφολογία του πυρήνα από τα φυσικά CPAbs μετά από τη διείσδυσή τους σε ζώντα κύτταρα. Η επαγωγή απόπτωσης είναι από τις πιο χαρακτηριστικές δράσεις των παθολογικών CPAbs και ο κατακερματισμός του DNA με τις μορφολογικές αλλαγές στον πυρήνα σχετίζονται άμεσα με την κυτταρική απόπτωση. Έκπληξη προκάλεσε το γεγονός ότι τρία από τα οχτώ CPAbs της μελέτης μετά τη διείσδυσή τους στα κύτταρα HeLa προκαλούσαν κατακερματισμό του DNA και αλλαγή στη μορφολογία των πυρήνων.

Ενδιαφέρον ήταν ότι το ίδιο αποτέλεσμα προκαλούσαν πέρα από τα αντισώματα που εντοπίζονταν στο πυρηνίσκο και ορισμένα από αυτά που εντοπίζονταν μόνο στο κυτταρόπλασμα. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να εξηγηθούν με δυο υποθέσεις, είτε ότι τα CPAbs ενεργοποιούν με την είσοδο τους στο κυτταρόπλασμα έναν καταρράκτη γεγονότων, ενεργοποιώντας ενδονουκλεάσες ή DNase οι οποίες με τη σειρά τους μεταφέρονται στον πυρήνα και υδρολύουν το DNA, είτε ότι τα ίδια τα CPAbs έχουν υδρολυτική δράση, όπως δείχθηκε και, με το πλασμιδιακό DNA. Γενικά, από τη βιβλιογραφία, ο κατακερματισμός του DNA μπορεί να προκληθεί από γεγονότα στο κυτταρόπλασμα, όπως η μεταβολή στα επίπεδα του ασβεστίου, ή η απελευθέρωση DNases που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ή ειδικές πρωτεάσες στο κυτταρόπλασμα να τεμαχίσουν τους αναστολείς ενδονουκλεασών. Ένα από τα γνωστά ένζυμα που προκαλεί κατακερματισμό του DNA είναι η Caspase Activated DNase (CAD) και η οποία ενεργοποιείται όταν η κασπάση 3 διασπάσει τον αναστολέα της ICAD. Επίσης, έχουν αναφερθεί και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα από κύτταρα, που είχαν προηγουμένως ενεργοποιηθεί με ακτινοβολία, να προκαλούν κατακερματισμό του DNA όταν επωάζονταν με υγιή κύτταρα. Η DNase I έχει επίσης ενοχοποιηθεί για τον κατακερματισμό του DNA. Η παρουσία κυτάρων που έφεραν αλλοιωμένες μορφές των πυρήνων επιβεβαίωσε τον κατακερματισμό του DNA. Έτσι, φαίνεται ότι εισερχόμενα στο κύτταρο, τα φυσικά CPAbs μπορούν να προκαλέσουν και αποπτωτικά φαινόμενα. Μια ενδελεχής μελέτη θα μπορούσε να δώσει περισσότερες πληροφορίες για τα μονοπάτια επαγωγής αυτών και να βοηθήσει στην κατανόηση του ρόλου τους.

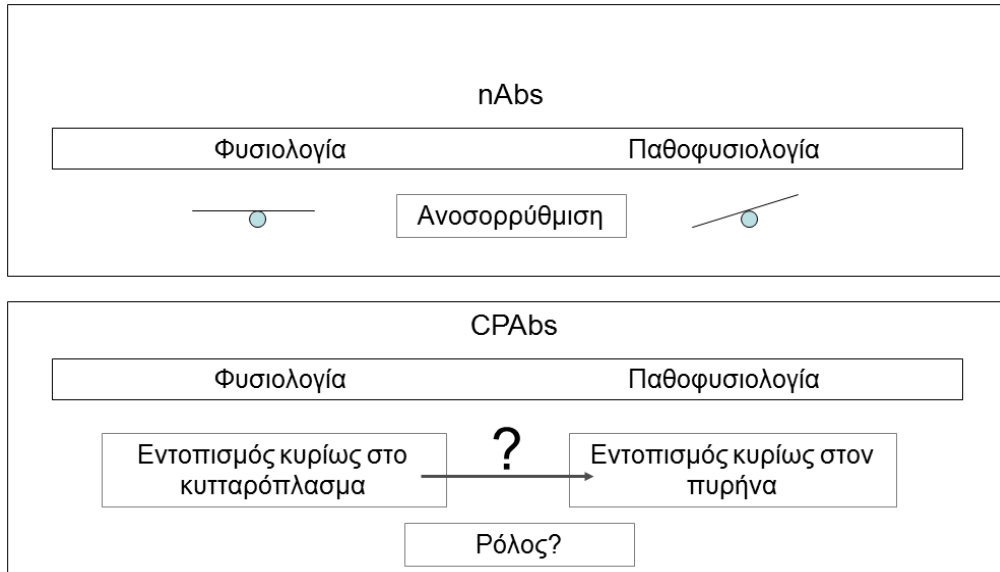
III. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ

Εν κατακλείδι, είναι η πρώτη φορά που τεκμηριώνεται η παρουσία φυσικών CPAbs σε υγιείς ανθρώπους και ποντικούς, τόσο σε πολυκλωνικό όσο και σε μονοκλωνικό επίπεδο. Η κυτταρική διείσδυση των CPAbs φάνηκε να συνδέεται με ορισμένες λειτουργίες του κυττάρου. Τα φυσικά CPAbs φέρουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά με τα παθολογικά CPAbs, ως προς την ικανότητα να διεισδύουν σε πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων, είναι τάξης IgG, παρουσιάζουν πολυδραστικότητα και φέρουν ορισμένες κοινές δράσεις όπως την υδρόλυση και τον κατακερματισμό του DNA. Μια βασική διαφορά όμως που αποδεικνύεται, και που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, είναι ως προς τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό ανάμεσα στα φυσικά και στα παθολογικά CPAbs (**Εικόνα 1.**). Αναλυτικότερα, τα πρώτα εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα σε αντίθεση με τα μέχρι σήμερα γνωστά CPAbs στα αυτοάνοσα νοσήματα που εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων. Η ικανότητά τους να διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα και να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένους στόχους στο κυτταρόπλασμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε



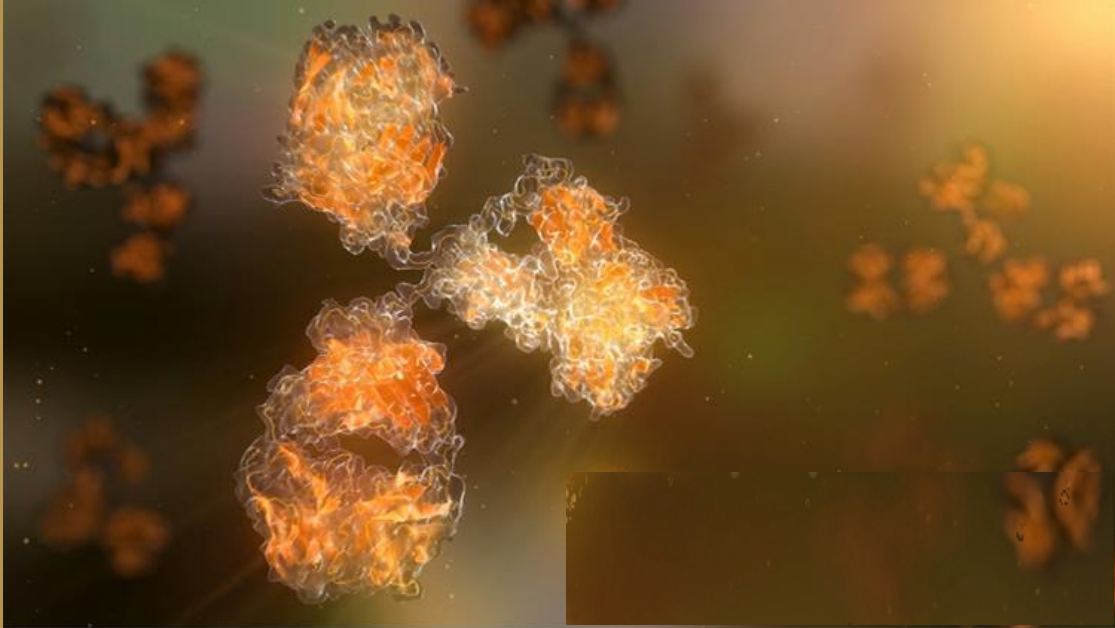
Εικόνα 1. Δεδομένα και ερωτήματα που αναδεικνύονται από τη μελέτη σχετικά με την παρουσία και τον ρόλο των CPAbs στη φυσιολογική και στην παθολογική κατάσταση

εφαρμογές της βιοϊατρικής, είτε μετά από «εξανθρωποποίηση» των mAbs του ποντικού και χρησιμοποιώντας τα σε ενδοκυττάρια μεταφορά θεραπευτικών ουσιών είτε ως απευθείας θεραπευτικά μόρια. Επίσης, η γνώση που κατακτήθηκε, προσφέρεται και ως βάση για την παραγωγή ανθρώπινων μονοκλωνικών φυσικών CPAbs και την περαιτέρω θεραπευτική τους εκμετάλλευση. Η διείσδυση στα κύτταρα διαφόρων οργάνων μπορεί να παίζει ρόλο στις γνωστές θεραπευτικές δράσεις της IVIg, αφού είναι πολύ πιθανό να συμβαίνει όταν χορηγείται στους ασθενείς. Έτσι, η απομόνωση του διεισδυτικού κλάσματος της IVIg μπορεί να συμβάλει στη δημιουργία νέων και πιο ενισχυμένων σε δράση θεραπευτικών σκευασμάτων. Τέλος, ένα νέο πεδίο έρευνας ανοίγεται για την περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης μεταξύ των δύο τύπων αντισωμάτων, εάν δηλαδή τα κύτταρα που παράγουν φυσικά CPAbs αποτελούν τους πρόδρομους των κυττάρων που εκκρίνουν τα παθολογικά CPAbs και του προσδιορισμού του ρόλου τους (**Εικόνα 2.**). Το τελευταίο ερώτημα εντάσσεται σε ένα γενικότερο προβληματισμό, που απασχολεί χρόνια την επιστημονική κοινότητα και αφορά το πόσο διακριτά είναι τα όρια μεταξύ φυσιολογίας και παθοφυσιολογίας.



Εικόνα 2. Ερωτηματικά που προκύπτουν από την παρούσα μελέτη σχετικά με τον ενδοκυττάριο εντοπισμό στο κυτταρόπλασμα των φυσικών CPAbs και τη σημασία του

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. G Dighiero, P Lymberi, D Holmberg, I Lundquist, A Coutinho, S Avrameas: **High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice.** *Journal of Immunology* 1985, **134**:765-71.
2. BA Baldo: **Cross-reactive antigens for natural IgE antibodies: allergens with the potential to transform a dormant to an active allergic response?** *Clin Exp Allergy* 2012, **42**:810-3.
3. ZH Zhou, AG Tzioufas, AL Notkins: **Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells.** *J Autoimmun* 2007, **29**:219-28.
4. L Ardo, Z Jeney, A Adams, G Jeney: **Immune responses of resistant and sensitive common carp families following experimental challenge with *Aeromonas hydrophila*.** *Fish & Shellfish Immunology* 2010, **29**:111-116.
5. B Magnadottir, S Gudmundsdottir, BK Gudmundsdottir, S Helgason: **Natural antibodies of cod (*Gadus morhua* L.): Specificity, activity and affinity.** *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 2009, **154**:309-316.
6. R Gonzalez, J Charlemagne, W Mahana, S Avrameas: **Specificity of natural serum antibodies present in phylogenetically distinct fish species.** *Immunology* 1988, **63**:31-6.
7. N Baumgarth, JW Tung, LA Herzenberg: **Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion.** *Springer Semin Immunopathol* 2005, **26**:347-62.
8. B Guilbert, W Mahana, M Gilbert, JC Mazie, S Avrameas: **Presence of natural autoantibodies in hyperimmunized mice.** *Immunology* 1985, **56**:401-8.
9. NA Danke, DM Koelle, C Yee, S Beheray, WW Kwok: **Autoreactive T cells in healthy individuals.** *Journal of Immunology* 2004, **172**:5967-72.
10. MC Filion, AJ Bradley, DV Devine, F Decary, P Chartrand: **Autoreactive T cells in healthy individuals show tolerance in vitro with characteristics similar to but distinct from clonal anergy.** *European Journal of Immunology* 1995, **25**:3123-7.
11. M Cohn: **A stepwise model of polyreactivity of the T cell antigen-receptor (TCR): its impact on the self-nonsel discrimination and on related observations (receptor editing, anergy, dual receptor cells).** *Cell Mol Life Sci* 2013.
12. PG Ashton-Rickardt, A Bandeira, JR Delaney, L Van Kaer, HP Pircher, RM Zinkernagel, S Tonegawa: **Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus.** *Cell* 1994, **76**:651-63.
13. PG Ashton-Rickardt, S Tonegawa: **A differential-avidity model for T-cell selection.** *Immunol Today* 1994, **15**:362-6.
14. AA Freitas, B Rocha: **Peripheral T cell survival.** *Curr Opin Immunol* 1999, **11**:152-6.
15. S Avrameas: **Natural Autoantibodies - from Horror Autotoxicus to Gnothi Seauton.** *Immunology Today* 1991, **12**:154-159.
16. P Keating, A Ousman: **The Problem of Natural Antibodies, 1894-1905.** *Journal of the History of Biology* 1991, **24**:245-263.
17. HP Vollmers, S Brandlein: **The "early birds": natural IgM antibodies and immune surveillance.** *Histology and Histopathology* 2005, **20**:927-937.
18. DJ Bibel: **Milestones in immunology.** Madison, WI Berlin ; New York: Science Tech ; Springer-Verlag; 1988.
19. JR Marrack: **The chemistry of antigens and antibodies.** Oxford,: Printed by J. Johnson at the University press; 1934.
20. NK Jerne: **The Natural-Selection Theory of Antibody Formation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1955, **41**:849-57.
21. NK Jerne: **Towards a Network Theory of Immune System.** *Annales D Immunologie* 1974, **C125**:373-389.
22. RR Porter: **The hydrolysis of rabbit y-globulin and antibodies with crystalline papain.** *Biochem J* 1959, **73**:119-26.
23. GM Edelman, MD Poulik: **Studies on structural units of the gamma-globulins.** *Journal of Experimental Medicine* 1961, **113**:861-84.

24. E Karsenti, B Guilbert, M Bornens, S Avrameas: **Antibodies to tubulin in normal nonimmunized animals.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**:3997-4001.
25. S Avrameas, B Guilbert, G Dighiero: **Natural antibodies against tubulin, actin myoglobin, thyroglobulin, fetuin, albumin and transferrin are present in normal human sera, and monoclonal immunoglobulins from multiple myeloma and Waldenstrom's macroglobulinemia may express similar antibody specificities.** *Ann Immunol (Paris)* 1981, **132C**:231-6.
26. B Guilbert, G Dighiero, S Avrameas: **Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization.** *Journal of Immunology* 1982, **128**:2779-87.
27. G Dighiero, B Guilbert, S Avrameas: **Naturally occurring antibodies against nine common antigens in humans sera. II. High incidence of monoclonal Ig exhibiting antibody activity against actin and tubulin and sharing antibody specificities with natural antibodies.** *Journal of Immunology* 1982, **128**:2788-92.
28. HU Lutz, G Wipf: **Naturally occurring autoantibodies to skeletal proteins from human red blood cells.** *Journal of Immunology* 1982, **128**:1695-9.
29. P Casali, BS Prabhakar, AL Notkins: **Characterization of multireactive autoantibodies and identification of Leu-1+ B lymphocytes as cells making antibodies binding multiple self and exogenous molecules.** *Int Rev Immunol* 1988, **3**:17-45.
30. P Casali, AL Notkins: **Probing the human B-cell repertoire with EBV: polyreactive antibodies and CD5+ B lymphocytes.** *Annu Rev Immunol* 1989, **7**:513-35.
31. S Avrameas: **Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'.** *Immunol Today* 1991, **12**:154-9.
32. M Kasahara, T Suzuki, LD Pasquier: **On the origins of the adaptive immune system: novel insights from invertebrates and cold-blooded vertebrates.** *Trends Immunol* 2004, **25**:105-11.
33. L Du Pasquier: **Origin and evolution of the vertebrate immune system.** *APMIS* 1992, **100**:383-92.
34. GW Litman, MK Anderson, JP Rast: **Evolution of antigen binding receptors.** *Annu Rev Immunol* 1999, **17**:109-47.
35. JJ Marchalonis, SF Schluter, RM Bernstein, S Shen, AB Edmundson: **Phylogenetic emergence and molecular evolution of the immunoglobulin family.** *Adv Immunol* 1998, **70**:417-506.
36. HP Vollmers, S Brandlein: **The "early birds": natural IgM antibodies and immune surveillance.** *Histology and Histopathology* 2005, **20**:927-37.
37. R Medzhitov, CA Janeway, Jr.: **Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system.** *Science* 2002, **296**:298-300.
38. JJ Marchalonis, S Kaveri, S Lacroix-Desmazes, MD Kazatchkine: **Natural recognition repertoire and the evolutionary emergence of the combinatorial immune system.** *Faseb Journal* 2002, **16**.
39. JO Sunyer, IK Zarkadis, JD Lambris: **Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity?** *Immunol Today* 1998, **19**:519-23.
40. J Hofmann, M Greter, L Du Pasquier, B Becher: **B-cells need a proper house, whereas T-cells are happy in a cave: the dependence of lymphocytes on secondary lymphoid tissues during evolution.** *Trends Immunol* 2010, **31**:144-53.
41. N Baumgarth: **The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions.** *Nature Reviews Immunology* 2011, **11**:34-46.
42. AL Notkins: **Polyreactivity of antibody molecules.** *Trends in Immunology* 2004, **25**:174-179.
43. E Karsenti, B Guilbert, M Bornens, S Avrameas: **Antibodies to Tubulin in Normal Nonimmunized Animals - (Natural Antibodies-Peroxidase-Labeled Antibodies-Auto-Antibodies-Immunoabsorbents).** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977, **74**:3997-4001.
44. JE Butler: **Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals.** *Rev Sci Tech* 1998, **17**:43-70.
45. SM Zhou, CG Xu, B Zhang, SX Feng, LY Zhang, Y Zou, M Liao: **Natural IgG antibodies in normal rabbit serum are involved in killing of the ompP2 mutant of Haemophilus parasuis SC096 strain via the classical complement pathway.** *Vet J* 2012.

46. Y Kaneko, Y Takashima, X Xuaun, I Igarashi, H Nagasawa, T Mikami, H Otsuka: **Natural IgM antibodies in sera from various animals but not the cat kill *Toxoplasma gondii* by activating the classical complement pathway.** *Parasitology* 2004, **128**:123-9.
47. HR Haghghi, J Gong, CL Gyles, MA Hayes, H Zhou, B Sanei, JR Chambers, S Sharif: **Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens.** *Clin Vaccine Immunol* 2006, **13**:975-80.
48. JJ Marchalonis, MK Adelman, IF Robey, SF Schluter, AB Edmundson: **Exquisite specificity and peptide epitope recognition promiscuity, properties shared by antibodies from sharks to humans.** *J Mol Recognit* 2001, **14**:110-21.
49. JJ Marchalonis, VS Hohman, C Thomas, SF Schluter: **Antibody production in sharks and humans: a role for natural antibodies.** *Dev Comp Immunol* 1993, **17**:41-53.
50. BA Katzenback, DA Plouffe, M Belosevic: **Goldfish (*Carassius auratus* L.) possess natural antibodies with trypanocidal activity towards *Trypanosoma carassii* in vitro.** *Fish Shellfish Immunol* 2013.
51. S Muyldermans, M Lauwereys: **Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavy-chain antibodies.** *J Mol Recognit* 1999, **12**:131-40.
52. R Veronesi, B Bizzini, R Focaccia, AL Coscina, CC Mazza, MT Focaccia, F Carraro, MN Honningman: **Naturally acquired antibodies to tetanus toxin in humans and animals from the galapagos islands.** *J Infect Dis* 1983, **147**:308-11.
53. A Jakubowski, V Wicher, R Gruhn, K Wicher: **Natural antibodies to treponemal antigens in four strains of guinea-pigs.** *Immunology* 1987, **60**:281-5.
54. S Kawaguchi, S Muramatsu, S Mitsuhashi: **Natural hemolytic activity of snake serum. I. Natural antibody and complement.** *Dev Comp Immunol* 1978, **2**:287-95.
55. ZH Zhou, AL Notkins: **Polyreactive antigen-binding B (PAB-) cells are widely distributed and the PAB population consists of both B-1+ and B-1- phenotypes.** *Clinical and Experimental Immunology* 2004, **137**:88-100.
56. F Martin, JF Kearney: **B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory".** *Immunol Rev* 2000, **175**:70-9.
57. WD Hastings, JR Tumang, TW Behrens, TL Rothstein: **Peritoneal B-2 cells comprise a distinct B-2 cell population with B-1b-like characteristics.** *European Journal of Immunology* 2006, **36**:1114-23.
58. AM Stall, S Adams, LA Herzenberg, AB Kantor: **Characteristics and development of the murine B-1b (Ly-1 B sister) cell population.** *Ann N Y Acad Sci* 1992, **651**:33-43.
59. Q Tian, M Beardall, Y Xu, J Li, DC Parker, N Casanova, AC Bakke, C Chen: **B cells expressing a natural polyreactive autoantibody have a distinct phenotype and are overrepresented in immunoglobulin heavy chain transgenic mice.** *Journal of Immunology* 2006, **177**:2412-22.
60. F Martin, JF Kearney: **Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk.** *Immunity* 2000, **12**:39-49.
61. S Avrameas, T Ternynck, IA Tsonis, P Lymberi: **Naturally occurring B-cell autoreactivity: a critical overview.** *J Autoimmun* 2007, **29**:213-8.
62. JL Pasquali, T Martin: **Control of B cells expressing naturally occurring autoantibodies.** *Adv Exp Med Biol* 2012, **750**:145-56.
63. AL Notkins: **Polyreactivity of antibody molecules.** *Trends Immunol* 2004, **25**:174-9.
64. N Harindranath, H Ikematsu, AL Notkins, P Casali: **Structure of the VH and VL segments of polyreactive and monoreactive human natural antibodies to HIV-1 and *Escherichia coli* beta-galactosidase.** *Int Immunol* 1993, **5**:1523-33.
65. HJ Ditzel, K Itoh, DR Burton: **Determinants of polyreactivity in a large panel of recombinant human antibodies from HIV-1 infection.** *Journal of Immunology* 1996, **157**:739-49.
66. R Crouzier, T Martin, JL Pasquali: **Heavy chain variable region, light chain variable region, and heavy chain CDR3 influences on the mono- and polyreactivity and on the affinity of human monoclonal rheumatoid factors.** *Journal of Immunology* 1995, **154**:4526-35.
67. S Brandlein, HP Vollmers: **Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumour immunity.** *Histology and Histopathology* 2004, **19**:897-905.

68. HP Brezinschek, RI Brezinschek, PE Lipsky: **Analysis of the Heavy-Chain Repertoire of Human Peripheral B-Cells Using Single-Cell Polymerase Chain-Reaction.** *Journal of Immunology* 1995, **155**:190-202.
69. H Ikematsu, MT Kasaian, EW Schettino, P Casali: **Structural analysis of the VH-D-JH segments of human polyreactive IgG mAb. Evidence for somatic selection.** *Journal of Immunology* 1993, **151**:3604-16.
70. Y Ichiyoshi, P Casali: **Analysis of the structural correlates for antibody polyreactivity by multiple reassortments of chimeric human immunoglobulin heavy and light chain V segments.** *Journal of Experimental Medicine* 1994, **180**:885-95.
71. T Martin, R Crouzier, JC Weber, TJ Kipps, JL Pasquali: **Structure-function studies on a polyreactive (natural) autoantibody. Polyreactivity is dependent on somatically generated sequences in the third complementarity-determining region of the antibody heavy chain.** *Journal of Immunology* 1994, **152**:5988-96.
72. M Polymenis, BD Stollar: **Critical binding site amino acids of anti-Z-DNA single chain Fv molecules. Role of heavy and light chain CDR3 and relationship to autoantibody activity.** *Journal of Immunology* 1994, **152**:5318-29.
73. SC Cheung, S Takeda, AL Notkins: **Both V-H and V-L Chains of Polyreactive Igm Antibody Are Required for Polyreactivity - Expression of Fab in Escherichia-Coli.** *Clinical and Experimental Immunology* 1995, **101**:383-386.
74. Y Ichiyoshi, P Casali: **Analysis of the Structural Correlates for Antibody Polyreactivity by Multiple Reassortments of Chimeric Human-Immunoglobulin Heavy and Light-Chain V-Segments.** *Journal of Experimental Medicine* 1994, **180**:885-895.
75. C Chen, MP Stenzel-Poore, MB Rittenberg: **Natural auto- and polyreactive antibodies differing from antigen-induced antibodies in the H chain CDR3.** *Journal of Immunology* 1991, **147**:2359-67.
76. JD Dimitrov, C Planchais, LT Roumenina, TL Vassilev, SV Kaveri, S Lacroix-Desmazes: **Antibody polyreactivity in health and disease: statu variabilis.** *Journal of Immunology* 2013, **191**:993-9.
77. K Mannoor, Y Xu, C Chen: **Natural autoantibodies and associated B cells in immunity and autoimmunity.** *Autoimmunity* 2013, **46**:138-47.
78. HX Liao, X Chen, S Munshaw, R Zhang, DJ Marshall, N Vandergrift, JF Whitesides, X Lu, JS Yu, KK Hwang, et al: **Initial antibodies binding to HIV-1 gp41 in acutely infected subjects are polyreactive and highly mutated.** *Journal of Experimental Medicine* 2011, **208**:2237-49.
79. GJ Wedemayer, RC Stevens: **Structural insights into the evolution of an antibody combining site (vol 276, pg 1665, 1997).** *Science* 1997, **277**:1423-1423.
80. B Tchernychev, S Cabilly, M Wilchek: **The epitopes for natural polyreactive antibodies are rich in proline.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:6335-9.
81. L Kulik, SD Fleming, C Moratz, JW Reuter, A Novikov, K Chen, KA Andrews, A Markaryan, RJ Quigg, GJ Silverman, et al: **Pathogenic natural antibodies recognizing annexin IV are required to develop intestinal ischemia-reperfusion injury.** *Journal of Immunology* 2009, **182**:5363-73.
82. MY Chou, L Fogelstrand, K Hartvigsen, LF Hansen, D Woelkers, PX Shaw, J Choi, T Perkmann, F Backhed, YI Miller, et al: **Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans.** *J Clin Invest* 2009, **119**:1335-49.
83. A Madi, S Bransburg-Zabary, DY Kenett, E Ben-Jacob, IR Cohen: **The natural autoantibody repertoire in newborns and adults: a current overview.** *Adv Exp Med Biol* 2012, **750**:198-212.
84. A Coutinho, MD Kazatchkine, S Avrameas: **Natural autoantibodies.** *Curr Opin Immunol* 1995, **7**:812-8.
85. P Grabar: **Hypothesis. Auto-antibodies and immunological theories: an analytical review.** *Clin Immunol Immunopathol* 1975, **4**:453-66.
86. HU Lutz: **Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: an overview.** *J Autoimmun* 2007, **29**:287-94.
87. B O'Nuallain, R Hrcic, JS Wall, DT Weiss, A Solomon: **Diagnostic and therapeutic potential of amyloid-reactive IgG antibodies contained in human sera.** *Journal of Immunology* 2006, **176**:7071-8.

88. CJ Binder, PX Shaw, MK Chang, A Boullier, K Hartvigsen, S Horkko, YI Miller, DA Woelkers, M Corr, JL Witztum: **The role of natural antibodies in atherogenesis.** *J Lipid Res* 2005, **46**:1353-63.
89. P Quartier, PK Potter, MR Ehrenstein, MJ Walport, M Botto: **Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro.** *European Journal of Immunology* 2005, **35**:252-60.
90. AF Ochsenbein, T Fehr, C Lutz, M Suter, F Brombacher, H Hengartner, RM Zinkernagel: **Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies.** *Science* 1999, **286**:2156-9.
91. L Hangartner, RM Zinkernagel, H Hengartner: **Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum.** *Nature Reviews Immunology* 2006, **6**:231-43.
92. MR Ehrenstein, CA Notley: **The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator.** *Nature Reviews Immunology* 2010, **10**:778-86.
93. H Mouquet, JF Scheid, MJ Zoller, M Krogsgaard, RG Ott, S Shukair, MN Artyomov, J Pietzsch, M Connors, F Pereyra, et al: **Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heterologation.** *Nature* 2010, **467**:591-5.
94. JD Dimitrov, MD Kazatchkine, SV Kaveri, S Lacroix-Desmazes: **"Rational Vaccine Design" for HIV Should Take into Account the Adaptive Potential of Polyreactive Antibodies.** *Plos Pathogens* 2011, **7**.
95. N Mancini, RA Diotti, M Perotti, G Sautto, N Clementi, G Nitti, AH Patel, JK Ball, M Clementi, R Burioni: **Hepatitis C Virus (HCV) Infection May Elicit Neutralizing Antibodies Targeting Epitopes Conserved in All Viral Genotypes.** *PLoS One* 2009, **4**.
96. X Cui, BP Meza, SP Adler, MA McVoy: **Cytomegalovirus vaccines fail to induce epithelial entry neutralizing antibodies comparable to natural infection.** *Vaccine* 2008, **26**:5760-6.
97. WA McEwan, DL Mallery, DA Rhodes, J Trowsdale, LC James: **Intracellular antibody-mediated immunity and the role of TRIM21.** *Bioessays* 2011, **33**:803-9.
98. DL Mallery, WA McEwan, SR Bidgood, GJ Towers, CM Johnson, LC James: **Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:19985-90.
99. V Racanelli, M Prete, G Musaraj, F Dammacco, F Perosa: **Autoantibodies to intracellular antigens: generation and pathogenetic role.** *Autoimmun Rev* 2011, **10**:503-8.
100. M Gold, R Pul, JP Bach, M Stangel, R Dodel: **Pathogenic and physiological autoantibodies in the central nervous system.** *Immunol Rev* 2012, **248**:68-86.
101. G Egea, C Franci, G Gambus, T Lesuffleur, A Zweibaum, FX Real: **cis-Golgi resident proteins and O-glycans are abnormally compartmentalized in the RER of colon cancer cells.** *J Cell Sci* 1993, **105 (Pt 3)**:819-30.
102. U Karsten, C Diotel, G Klich, H Paulsen, S Goletz, S Muller, FG Hanisch: **Enhanced binding of antibodies to the DTR motif of MUC1 tandem repeat peptide is mediated by site-specific glycosylation.** *Cancer Res* 1998, **58**:2541-9.
103. S Brandlein, T Pohle, N Ruoff, E Wozniak, HK Muller-Hermelink, HP Vollmers: **Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans.** *Cancer Res* 2003, **63**:7995-8005.
104. F Hensel, R Hermann, S Brandlein, V Krenn, B Schmausser, S Geis, HK Muller-Hermelink, HP Vollmers: **Regulation of the new coexpressed CD55 (decay-accelerating factor) receptor on stomach carcinoma cells involved in antibody SC-1-induced apoptosis.** *Lab Invest* 2001, **81**:1553-63.
105. MM Eibl: **History of immunoglobulin replacement.** *Immunol Allergy Clin North Am* 2008, **28**:737-64, viii.
106. JS Orange, EM Hossny, CR Weiler, M Ballou, M Berger, FA Bonilla, R Buckley, J Chinen, Y El-Gamal, BD Mazer, et al: **Use of intravenous immunoglobulin in human disease: a review of evidence by members of the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology.** *J Allergy Clin Immunol* 2006, **117**:S525-53.
107. ER Stiehm: **Human intravenous immunoglobulin in primary and secondary antibody deficiencies.** *Pediatr Infect Dis J* 1997, **16**:696-707.

108. S Jolles, WA Sewell, SA Misbah: **Clinical uses of intravenous immunoglobulin.** *Clinical and Experimental Immunology* 2005, **142**:1-11.
109. A Durandy, SV Kaveri, TW Kuijpers, M Basta, S Miescher, JV Ravetch, R Rieben: **Intravenous immunoglobulins--understanding properties and mechanisms.** *Clinical and Experimental Immunology* 2009, **158 Suppl 1**:2-13.
110. TE Mollnes, K Hogasen, C De Carolis, E Vaquero, EW Nielsen, L Fontana, R Perricone: **High-dose intravenous immunoglobulin treatment activates complement in vivo.** *Scand J Immunol* 1998, **48**:312-7.
111. VS Negi, S Elluru, S Siberil, S Graff-Dubois, L Mouthon, MD Kazatchkine, S Lacroix-Desmazes, J Bayry, SV Kaveri: **Intravenous immunoglobulin: An update on the clinical use and mechanisms of action.** *Journal of Clinical Immunology* 2007, **27**:233-245.
112. F Nimmerjahn, JV Ravetch: **Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin.** *Annu Rev Immunol* 2008, **26**:513-33.
113. TW Jungi, J Eiholzer, PG Lerch, S Barandun: **The Capacity of Various Types of Immunoglobulin for Intravenous Use to Interact with Fc-Receptors of Human-Monocytes and Macrophages.** *Blut* 1986, **53**:321-332.
114. JB Bussel, RP Kimberly, RD Inman, I Schulman, C Cunningham-Rundles, N Cheung, EM Smithwick, J O'Malley, S Barandun, MW Hilgartner: **Intravenous gammaglobulin treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura.** *Blood* 1983, **62**:480-6.
115. J Bayry, S Dasgupta, N Misra, A Ephrem, JPD Van Huyen, S Delignat, G Hassan, G Caligiuri, A Nicoletti, S Lacroix-Desmazes, et al: **Intravenous immunoglobulin in autoimmune disorders: An insight into the immunoregulatory mechanisms.** *International Immunopharmacology* 2006, **6**:528-534.
116. M Basta, F Van Goor, S Luccioli, EM Billings, AO Vortmeyer, L Baranyi, J Szebeni, CR Alving, MC Carroll, I Berkower, et al: **F(ab)'(2)-mediated neutralization of C3a and C5a anaphylatoxins: a novel effector function of immunoglobulins.** *Nature Medicine* 2003, **9**:431-438.
117. Y Sherer, R Wu, I Krause, A Gorstein, Y Levy, JB Peter, Y Shoenfeld: **Cytokine levels in various intravenous immunoglobulin (IVIg) preparations.** *Hum Antibodies* 2001, **10**:51-3.
118. T Sapir, Y Shoenfeld: **Facing the enigma of immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulin.** *Clin Rev Allergy Immunol* 2005, **29**:185-99.
119. V Ruiz de Souza, MP Carreno, SV Kaveri, A Ledur, H Sadeghi, JM Cavaillon, MD Kazatchkine, N Haeffner-Cavaillon: **Selective induction of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 in human monocytes by normal polyspecific IgG (intravenous immunoglobulin).** *European Journal of Immunology* 1995, **25**:1267-73.
120. D Reinhold, E Perlov, K Schrecke, J Kekow, T Brune, M Sailer: **Increased blood plasma concentrations of TGF-beta isoforms after treatment with intravenous immunoglobulins (i.v.Ig) in patients with multiple sclerosis.** *J Neuroimmunol* 2004, **152**:191-4.
121. Y Shoenfeld, L Rauova, B Gilburd, F Kvapil, I Goldberg, J Kopolovic, J Rovensky, M Blank: **Efficacy of IVIG affinity-purified anti-double-stranded DNA anti-idiotypic antibodies in the treatment of an experimental murine model of systemic lupus erythematosus.** *Int Immunol* 2002, **14**:1303-11.
122. F Rossi, DR Jayne, CM Lockwood, MD Kazatchkine: **Anti-idiotypes against anti-neutrophil cytoplasmic antigen autoantibodies in normal human polyspecific IgG for therapeutic use and in the remission sera of patients with systemic vasculitis.** *Clinical and Experimental Immunology* 1991, **83**:298-303.
123. MC Dalakas: **Intravenous immune globulin therapy for neurologic diseases.** *Ann Intern Med* 1997, **126**:721-30.
124. F Silvestris, O D'Amore, P Cafforio, L Savino, F Dammacco: **Intravenous immune globulin therapy of lupus nephritis: Use of pathogenic anti-DNA-reactive IgG.** *Clinical and Experimental Immunology* 1996, **104**:91-97.
125. K Kawada, PI Terasaki: **Evidence for immunosuppression by high-dose gammaglobulin.** *Exp Hematol* 1987, **15**:133-6.
126. IN Vanschaik, I Lundkvist, M Vermeulen, A Brand: **Polyvalent Immunoglobulin for Intravenous Use Interferes with Cell-Proliferation In vitro.** *Journal of Clinical Immunology* 1992, **12**:325-334.

127. IN Vanschaik, M Vermeulen, A Brand: **In-Vitro Effects of Polyvalent Immunoglobulin for Intravenous Use.** *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 1994, **57**:15-17.
128. T Tha-In, HJ Metselaar, HW Tilanus, ZM Groothuisink, EJ Kuipers, RA de Man, J Kwekkeboom: **Intravenous immunoglobulins suppress T-cell priming by modulating the bidirectional interaction between dendritic cells and natural killer cells.** *Blood* 2007, **110**:3253-62.
129. N Barreau, G Blancho, C Boulet, A Martineau, P Vusio, J Liaigre, N Bovin, D Bouhours, J Bouhours: **Natural anti-Gal antibodies constitute 0.2% of intravenous immunoglobulin and are equally retained on a synthetic disaccharide column or on an immobilized natural glycoprotein.** *Transplant Proc* 2000, **32**:882-3.
130. F Rossi, G Dietrich, MD Kazatchkine: **Antiidiotypic suppression of autoantibodies with normal polyspecific immunoglobulins.** *Res Immunol* 1989, **140**:19-31.
131. D Mimouni, M Blank, AS Payne, GJ Anhalt, C Avivi, I Barshack, M David, Y Shoenfeld: **Efficacy of intravenous immunoglobulin (IVIg) affinity-purified anti-desmoglein anti-idiotypic antibodies in the treatment of an experimental model of pemphigus vulgaris.** *Clinical and Experimental Immunology* 2010, **162**:543-9.
132. I Krause, M Blank, Y Shoenfeld: **Anti-DNA and antiphospholipid antibodies in IVIG preparations: in vivo study in naive mice.** *J Clin Immunol* 1998, **18**:52-60.
133. A Moreau, S Lacroix-Desmazes, N Stieltjes, E Saenko, SV Kaveri, R D'Oiron, Y Sultan, D Scandella, MD Kazatchkine: **Antibodies to the FVIII light chain that neutralize FVIII procoagulant activity are present in plasma of nonresponder patients with severe hemophilia A and in normal polyclonal human IgG.** *Blood* 2000, **95**:3435-3441.
134. A Bustos, R Boimorto, JL Subiza, LF Pereira, M Marco, MA Figueredo, EG de la Concha: **Inhibition of histone/anti-histone reactivity by histone-binding serum components; differential effect on anti-H1 versus anti-H2B antibodies.** *Clinical and Experimental Immunology* 1994, **95**:408-14.
135. LW Hsu, S Goto, T Nakano, CY Lai, YH Kao, YC Lin, S Kawamoto, K Ono, R Lord, T Goto, et al: **The effects of anti-histone H1 antibody on immune cells responsible for rejection reaction.** *Mol Immunol* 2005, **42**:1155-64.
136. J Lamoureux, E Aubin, R Lemieux: **Autoantibodies purified from therapeutic preparations of intravenous immunoglobulins (IVIg) induce the formation of autoimmune complexes in normal human serum: a role in the in vivo mechanisms of action of IVIg?** *Int Immunol* 2004, **16**:929-36.
137. MM Estabrook, GA Jarvis, J McLeod Griffiss: **Affinity-purified human immunoglobulin G that binds a lacto-N-neotetraose-dependent lipooligosaccharide structure is bactericidal for serogroup B *Neisseria meningitidis*.** *Infect Immun* 2007, **75**:1025-33.
138. L Le Pottier, B Bendaoud, M Dueymes, C Daridon, P Youinou, Y Shoenfeld, JO Pers: **BAFF, a new target for intravenous immunoglobulin in autoimmunity and cancer.** *J Clin Immunol* 2007, **27**:257-65.
139. DF Lake, WJ Landsperger, RM Bernstein, SF Schluter, JJ Marchalonis: **Characterization of autoantibodies directed against T cell receptors.** *Adv Exp Med Biol* 1995, **383**:223-9.
140. MK Adelman, SF Schluter, IF Robey, JJ Marchalonis: **Natural and autoantibodies to human T-cell receptor Vbeta segments: potential roles in immunomodulation.** *Crit Rev Immunol* 2007, **27**:221-32.
141. V Hurez, SV Kaveri, A Mouhoub, G Dietrich, JC Mani, D Klatzmann, MD Kazatchkine: **Anti-CD4 activity of normal human immunoglobulin G for therapeutic use. (Intravenous immunoglobulin, IVIg).** *Ther Immunol* 1994, **1**:269-77.
142. S Kaveri, T Vassilev, V Hurez, R Lengagne, C Lefranc, S Cot, P Pouletty, D Glotz, MD Kazatchkine: **Antibodies to a conserved region of HLA class I molecules, capable of modulating CD8 T cell-mediated function, are present in pooled normal immunoglobulin for therapeutic use.** *J Clin Invest* 1996, **97**:865-9.
143. NK Prasad, G Papoff, A Zeuner, E Bonnin, MD Kazatchkine, G Ruberti, SV Kaveri: **Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIg) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: a novel mechanism of action of IVIg involving the Fas apoptotic pathway.** *Journal of Immunology* 1998, **161**:3781-90.
144. TL Vassilev, MD Kazatchkine, JP Duong Van Huyen, M Mekrache, E Bonnin, JC Mani, C Lecroubier, D Korinth, D Baruch, F Schriever, et al: **Inhibition of cell adhesion by antibodies to Arg-Gly-Asp (RGD) in normal immunoglobulin for therapeutic use (intravenous immunoglobulin, IVIg).** *Blood* 1999, **93**:3624-31.

145. M Requena, H Bouhlal, N Nasreddine, H Saidi, JC Gody, S Aubry, G Gresenguet, MD Kazatchkine, RP Sekaly, L Belec, et al: **Inhibition of HIV-1 transmission in trans from dendritic cells to CD4+ T lymphocytes by natural antibodies to the CRD domain of DC-SIGN purified from breast milk and intravenous immunoglobulins.** *Immunology* 2008, **123**:508-18.
146. H Bouhlal, H Hocini, C Quillent-Gregoire, V Donkova, S Rose, A Amara, R Longhi, N Haeffner-Cavaillon, A Beretta, SV Kaveri, et al: **Antibodies to C-C chemokine receptor 5 in normal human IgG block infection of macrophages and lymphocytes with primary R5-tropic strains of HIV-1.** *Journal of Immunology* 2001, **166**:7606-11.
147. RJ Warrington, KE Lewis: **Biologically active anti-nerve growth factor antibodies in commercial intravenous gammaglobulin.** *J Autoimmun* 2007, **28**:24-9.
148. R Vallejo, O de Leon-Casasola, R Benyamin: **Opioid therapy and immunosuppression: a review.** *Am J Ther* 2004, **11**:354-65.
149. P Ranganathan, H Chen, MK Adelman, SF Schluter: **Autoantibodies to the delta-opioid receptor function as opioid agonists and display immunomodulatory activity.** *Journal of Neuroimmunology* 2009, **217**:65-73.
150. B O'Nuallain, L Acero, AD Williams, HP Koeppen, A Weber, HP Schwarz, JS Wall, DT Weiss, A Solomon: **Human plasma contains cross-reactive Abeta conformer-specific IgG antibodies.** *Biochemistry* 2008, **47**:12254-6.
151. LM Patrias, AC Klaver, MP Coffey, DA Loeffler: **Specific antibodies to soluble alpha-synuclein conformations in intravenous immunoglobulin preparations.** *Clinical and Experimental Immunology* 2010, **161**:527-35.
152. M Bruley-Rosset, L Mouthon, Y Chauseaud, F Dhainaut, J Lirochon, D Bourel: **Polyreactive autoantibodies purified from human intravenous immunoglobulins prevent the development of experimental autoimmune diseases.** *Lab Invest* 2003, **83**:1013-23.
153. A Ruiz-Arguelles, D Alarcon-Segovia: **Penetration of autoantibodies into living cells, 2000.** *Israel Medical Association Journal* 2001, **3**:121-+.
154. D Alarcon-Segovia, A Ruiz-Arguelles, E Fishbein: **Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors.** *Nature* 1978, **271**:67-9.
155. JA Ma, GV Chapman, SL Chen, R Penny, SN Breit: **Flow cytometry with crystal violet to detect intracytoplasmic fluorescence in viable human lymphocytes. Demonstration of antibody entering living cells.** *J Immunol Methods* 1987, **104**:195-200.
156. T Ternynck, A Avrameas, J Ragimbeau, G Buttin, S Avrameas: **Immunochemical, structural and translocating properties of anti-DNA antibodies from (NZBxNZW)F1 mice.** *J Autoimmun* 1998, **11**:511-21.
157. A Ruiz-Arguelles, D Alarcon-Segovia: **Penetration of autoantibodies into living cells, 2000.** *Isr Med Assoc J* 2001, **3**:121-6.
158. K Conrad, EM Tan, RL Humbel, Y Shoenfeld: **Autoantibodies--diagnostic, pathogenic and prognostic relevance.** *Clin Exp Rheumatol* 1997, **15**:457-65.
159. A Ruiz-Arguelles, GJ Brito, P Reyes-Izquierdo, B Perez-Romano, S Sanchez-Sosa: **Apoptosis of melanocytes in vitiligo results from antibody penetration.** *J Autoimmun* 2007, **29**:281-6.
160. AR Cabral, D Alarcon-Segovia: **Autoantibodies in systemic lupus erythematosus.** *Curr Opin Rheumatol* 1997, **9**:387-92.
161. K Okudaira, H Yoshizawa, RC Williams, Jr.: **Monoclonal murine anti-DNA antibody interacts with living mononuclear cells.** *Arthritis Rheum* 1987, **30**:669-78.
162. K Yanase, RM Smith, B Cizman, MH Foster, LD Peachey, L Jarett, MP Madaio: **A subgroup of murine monoclonal anti-deoxyribonucleic acid antibodies traverse the cytoplasm and enter the nucleus in a time-and temperature- dependent manner.** *Lab Invest* 1994, **71**:52-60.
163. D Alarcon-Segovia, L Llorente, A Ruiz-Arguelles: **Antibody penetration into living cells. III. Effect of antiribonucleoprotein IgG on the cell cycle of human peripheral blood mononuclear cells.** *Clin Immunol Immunopathol* 1982, **23**:22-33.
164. TD Golan, AE Gharavi, KB Elkon: **Penetration of autoantibodies into living epithelial cells.** *J Invest Dermatol* 1993, **100**:316-22.

165. D Vlahakos, MH Foster, AA Ucci, KJ Barrett, SK Datta, MP Madaio: **Murine monoclonal anti-DNA antibodies penetrate cells, bind to nuclei, and induce glomerular proliferation and proteinuria in vivo.** *J Am Soc Nephrol* 1992, **2**:1345-54.
166. A Avrameas, T Ternynck, F Nato, G Buttin, S Avrameas: **Polyreactive anti-DNA monoclonal antibodies and a derived peptide as vectors for the intracytoplasmic and intranuclear translocation of macromolecules.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:5601-6.
167. K Okudaira, RP Searles, K Tanimoto, Y Horiuchi, RC Williams, Jr.: **T lymphocyte interaction with immunoglobulin G antibody in systemic lupus erythematosus.** *J Clin Invest* 1982, **69**:1026-38.
168. R Herrera-Esparza, L Guzman-Enriquez, E Avalos-Diaz: **Fate of human IgG from lupus erythematosus antinuclear antibody positive sera passively transferred to mice.** *Rev Rhum Engl Ed* 1996, **63**:111-8.
169. RH Fabian: **Uptake of plasma IgG by CNS motoneurons: comparison of antineuronal and normal IgG.** *Neurology* 1988, **38**:1775-80.
170. K Schulze, BF Becker, HP Schultheiss: **Antibodies to the ADP/ATP carrier, an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy, penetrate into myocardial cells and disturb energy metabolism in vivo.** *Circ Res* 1989, **64**:179-92.
171. J Ma, GV Chapman, SL Chen, G Melick, R Penny, SN Breit: **Antibody penetration of viable human cells. I. Increased penetration of human lymphocytes by anti-RNP IgG.** *Clinical and Experimental Immunology* 1991, **84**:83-91.
172. J Ma, N King, SL Chen, R Penny, SN Breit: **Antibody penetration of viable human cells. II. Anti-RNP antibodies binding to RNP antigen expressed on cell surface, which may mediate the antibody internalization.** *Clinical and Experimental Immunology* 1993, **93**:396-404.
173. E Csernok, WH Schmitt, M Ernst, DF Bainton, WL Gross: **Membrane surface proteinase 3 expression and intracytoplasmic immunoglobulin on neutrophils from patients with ANCA-associated vasculitides.** *Adv Exp Med Biol* 1993, **336**:45-50.
174. A Hormigo, F Lieberman: **Nuclear localization of anti-Hu antibody is not associated with in vitro cytotoxicity.** *J Neuroimmunol* 1994, **55**:205-12.
175. JS Deng, B Ballou, JK Hofmeister: **Internalization of anti-nucleolin antibody into viable HEp-2 cells.** *Mol Biol Rep* 1996, **23**:191-5.
176. G Adamus, M Machnicki, GM Seigel: **Apoptotic retinal cell death induced by antirecoverin autoantibodies of cancer-associated retinopathy.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997, **38**:283-91.
177. AC Malmborg, DB Shultz, F Luton, KE Mostov, E Richly, PS Leung, GD Benson, AA Ansari, RL Coppel, ME Gershwin, et al: **Penetration and co-localization in MDCK cell mitochondria of IgA derived from patients with primary biliary cirrhosis.** *J Autoimmun* 1998, **11**:573-80.
178. MF Ritz, B Erne, F Ferracin, A Vital, C Vital, AJ Steck: **Anti-MAG IgM penetration into myelinated fibers correlates with the extent of myelin widening.** *Muscle Nerve* 1999, **22**:1030-7.
179. M Abedi-Valugerdi, H Hu, G Moller: **Mercury-induced anti-nucleolar autoantibodies can transgress the membrane of living cells in vivo and in vitro.** *Int Immunol* 1999, **11**:605-15.
180. J Valladeau, V Duvert-Frances, JJ Pin, C Dezutter-Dambuyant, C Vincent, C Massacrier, J Vincent, K Yoneda, J Banchereau, C Caux, et al: **The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface.** *European Journal of Immunology* 1999, **29**:2695-704.
181. VR Muzykantov, M Christofidou-Solomidou, I Balyasnikova, DW Harshaw, L Schultz, AB Fisher, SM Albelda: **Streptavidin facilitates internalization and pulmonary targeting of an anti-endothelial cell antibody (platelet-endothelial cell adhesion molecule 1): a strategy for vascular immunotargeting of drugs.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:2379-84.
182. SX Deng, E Hanson, I Sanz: **In vivo cell penetration and intracellular transport of anti-Sm and anti-La autoantibodies.** *Int Immunol* 2000, **12**:415-23.
183. M Reichlin: **Cellular dysfunction induced by penetration of autoantibodies into living cells: cellular damage and dysfunction mediated by antibodies to dsDNA and ribosomal P proteins.** *J Autoimmun* 1998, **11**:557-61.

184. KH Sun, WT Liu, CY Tsai, SJ Tang, SH Han, CL Yu: **Anti-dsDNA antibodies cross-react with ribosomal P proteins expressed on the surface of glomerular mesangial cells to exert a cytostatic effect.** *Immunology* 1995, **85**:262-9.
185. YC Song, GH Sun, TP Lee, JC Huang, CL Yu, CH Chen, SJ Tang, KH Sun: **Arginines in the CDR of anti-dsDNA autoantibodies facilitate cell internalization via electrostatic interactions.** *European Journal of Immunology* 2008, **38**:3178-90.
186. F Madani, S Lindberg, U Langel, S Futaki, A Graslund: **Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides.** *J Biophys* 2011, **2011**:414729.
187. DJ Zack, M Stempniak, AL Wong, C Taylor, RH Weisbart: **Mechanisms of cellular penetration and nuclear localization of an anti-double strand DNA autoantibody.** *Journal of Immunology* 1996, **157**:2082-8.
188. JY Jang, JG Jeong, HR Jun, SC Lee, JS Kim, YS Kim, MH Kwon: **A nucleic acid-hydrolyzing antibody penetrates into cells via caveolae-mediated endocytosis, localizes in the cytosol and exhibits cytotoxicity.** *Cell Mol Life Sci* 2009, **66**:1985-97.
189. W Van Driessche, JL Kreindler, AB Malik, S Margulies, SA Lewis, KJ Kim: **Interrelations/cross talk between transcellular transport function and paracellular tight junctional properties in lung epithelial and endothelial barriers.** *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2007, **293**:L520-L524.
190. M Bachmann, S Chang, A Bernd, W Mayet, KH Meyer zum Buschenfelde, WE Muller: **Translocation of the nuclear autoantigen La to cell surface: assembly and disassembly with the extracellular matrix.** *Autoimmunity* 1991, **9**:99-107.
191. S Koutouzov, A Cabrespines, Z Amoura, H Chabre, C Lotton, JF Bach: **Binding of nucleosomes to a cell surface receptor: redistribution and endocytosis in the presence of lupus antibodies.** *European Journal of Immunology* 1996, **26**:472-86.
192. K Yanase, RM Smith, A Puccetti, L Jarett, MP Madaio: **Receptor-mediated cellular entry of nuclear localizing anti-DNA antibodies via myosin 1.** *J Clin Invest* 1997, **100**:25-31.
193. K Yanase, MP Madaio: **Nuclear localizing anti-DNA antibodies enter cells via caveoli and modulate expression of caveolin and p53.** *J Autoimmun* 2005, **24**:145-51.
194. S Yung, KF Cheung, Q Zhang, TM Chan: **Anti-dsDNA antibodies bind to mesangial annexin II in lupus nephritis.** *J Am Soc Nephrol* 2010, **21**:1912-27.
195. N Seddiki, F Nato, P Lafaye, Z Amoura, JC Piette, JC Mazie: **Calreticulin, a potential cell surface receptor involved in cell penetration of anti-DNA antibodies.** *Journal of Immunology* 2001, **166**:6423-9.
196. JL Goldstein, RGW Anderson, MS Brown: **Coated Pits, Coated Vesicles, and Receptor-Mediated Endocytosis.** *Nature* 1979, **279**:679-685.
197. D Derossi, S Calvet, A Trembleau, A Brunissen, G Chassaing, A Prochiantz: **Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent.** *J Biol Chem* 1996, **271**:18188-93.
198. MP Madaio, K Yanase: **Cellular penetration and nuclear localization of anti-DNA antibodies: mechanisms, consequences, implications and applications.** *J Autoimmun* 1998, **11**:535-8.
199. E Koren, M Koscec, M Wolfson-Reichlin, FM Ebling, B Tsao, BH Hahn, M Reichlin: **Murine and human antibodies to native DNA that cross-react with the A and D SnRNP polypeptides cause direct injury of cultured kidney cells.** *Journal of Immunology* 1995, **154**:4857-64.
200. M Deutsch, L Guejes, N Zurgil, O Shovman, B Gilburd, E Afrimzon, Y Shoenfeld: **Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies penetrate into human polymorphonuclear leukocytes and modify their apoptosis.** *Clin Exp Rheumatol* 2004, **22**:S35-40.
201. D AlarconSegovia, L Llorente, A RuizArguelles: **The penetration of autoantibodies into cells may induce tolerance to self by apoptosis of autoreactive lymphocytes and cause autoimmune disease by dysregulation and/or cell damage.** *Journal of Autoimmunity* 1996, **9**:295-300.
202. A Ruiz-Arguelles, B Perez-Romano, L Llorente, D Alarcon-Segovia, JM Castellanos: **Penetration of anti-DNA antibodies into immature live cells.** *Journal of Autoimmunity* 1998, **11**:547-556.
203. KH Sun, SJ Tang, ML Lin, YS Wang, GH Sun, WT Liu: **Monoclonal antibodies against human ribosomal P proteins penetrate into living cells and cause apoptosis of Jurkat T cells in culture.** *Rheumatology (Oxford)* 2001, **40**:750-6.

204. D Portales-Perez, D Alarcon-Segovia, L Llorente, A Ruiz-Arguelles, C Abud-Mendoza, L Baranda, H de la Fuente, T Ternynck, R Gonzalez-Amaro: **Penetrating anti-DNA monoclonal antibodies induce activation of human peripheral blood mononuclear cells.** *J Autoimmun* 1998, **11**:563-71.
205. S Schmidt-Acevedo, B Perez-Romano, A Ruiz-Arguelles: **'LE cells' result from phagocytosis of apoptotic bodies induced by antinuclear antibodies.** *J Autoimmun* 2000, **15**:15-20.
206. G Tezel, MB Wax: **The mechanisms of hsp27 antibody-mediated apoptosis in retinal neuronal cells.** *J Neurosci* 2000, **20**:3552-62.
207. E Tse, TH Rabbitts: **Intracellular antibody-caspase-mediated cell killing: an approach for application in cancer therapy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:12266-71.
208. L Rivadeneyra-Espinoza, A Ruiz-Arguelles: **Cell-penetrating anti-native DNA antibodies trigger apoptosis through both the neglect and programmed pathways.** *Journal of Autoimmunity* 2006, **26**:52-56.
209. EJ Lee, EJ Jang, E Lee, J Yu, HY Chung, YJ Jang: **Cell-penetrating autoantibody induces caspase-mediated apoptosis through catalytic hydrolysis of DNA.** *Bioorg Med Chem* 2007, **15**:2016-23.
210. L Rivadeneyra-Espinoza, A Ruiz-Arguelles: **Cell-penetrating anti-native DNA antibodies trigger apoptosis through both the neglect and programmed pathways.** *J Autoimmun* 2006, **26**:52-6.
211. AV Kozyr, LP Sashchenko, AV Kolesnikov, NA Zelenova, SV Khaidukov, AN Ignatova, TV Bobik, AG Gabibov, ZS Alekberova, SV Suchkov, et al: **Anti-DNA autoantibodies reveal toxicity to tumor cell lines.** *Immunol Lett* 2002, **80**:41-7.
212. KH Sun, CL Yu, SJ Tang, GH Sun: **Monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody stimulates the expression and release of IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha from normal human mononuclear cells involving in the lupus pathogenesis.** *Immunology* 2000, **99**:352-60.
213. EJ Jang, DH Nahm, YJ Jang: **Mouse monoclonal autoantibodies penetrate mouse macrophage cells and stimulate NF-kappaB activation and TNF-alpha release.** *Immunol Lett* 2009, **124**:70-6.
214. M Koscec, E Koren, M Wolfson-Reichlin, RD Fugate, E Trieu, IN Targoff, M Reichlin: **Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture.** *Journal of Immunology* 1997, **159**:2033-41.
215. PH Iffland, 2nd, J Carvalho-Tavares, A Trigunaite, S Man, P Rasmussen, A Alexopoulos, C Ghosh, TN Jorgensen, D Janigro: **Intracellular and circulating neuronal antinuclear antibodies in human epilepsy.** *Neurobiol Dis* 2013, **59**:206-19.
216. CA Viall, Q Chen, B Liu, A Hickey, S Snowise, JE Salmon, PR Stone, LW Chamley: **Antiphospholipid antibodies internalised by human syncytiotrophoblast cause aberrant cell death and the release of necrotic trophoblast debris.** *J Autoimmun* 2013, **47**:45-57.
217. S Muller, Y Zhao, TL Brown, AC Morgan, H Kohler: **TransMabs: cell-penetrating antibodies, the next generation.** *Expert Opin Biol Ther* 2005, **5**:237-41.
218. RE Kontermann: **Intrabodies as therapeutic agents.** *Methods* 2004, **34**:163-170.
219. JE Hansen, G Chan, Y Liu, DC Hegan, S Dalal, E Dray, Y Kwon, Y Xu, X Xu, E Peterson-Roth, et al: **Targeting cancer with a lupus autoantibody.** *Sci Transl Med* 2012, **4**:157ra142.
220. G Sala, IG Rapposelli, R Ghasemi, E Piccolo, S Traini, E Capone, C Rossi, A Pelliccia, A Di Risio, M D'Egidio, et al: **EV20, a Novel Anti-ErbB-3 Humanized Antibody, Promotes ErbB-3 Down-Regulation and Inhibits Tumor Growth In Vivo.** *Transl Oncol* 2013, **6**:676-84.
221. R Mandler, C Wu, EA Sausville, AJ Roettinger, DJ Newman, DK Ho, CR King, D Yang, ME Lippman, NF Landolfi, et al: **Immunoconjugates of geldanamycin and anti-HER2 monoclonal antibodies: antiproliferative activity on human breast carcinoma cell lines.** *J Natl Cancer Inst* 2000, **92**:1573-81.
222. JM Park, X Yang, JJ Park, OW Press, MF Press: **Assessment of novel anti-p185HER-2 monoclonal antibodies for internalization-dependent therapies.** *Hybridoma* 1999, **18**:487-95.
223. E Trachsel, D Neri: **Antibodies for angiogenesis inhibition, vascular targeting and endothelial cell transcytosis.** *Adv Drug Deliv Rev* 2006, **58**:735-54.

224. RH Weisbart, JE Hansen, G Chan, R Wakelin, SS Chang, E Heinze, CW Miller, PH Koeffler, F Yang, GM Cole, et al: **Antibody-mediated transduction of p53 selectively kills cancer cells.** *Int J Oncol* 2004, **25**:1867-73.
225. JE Hansen, LK Fischer, G Chan, SS Chang, SW Baldwin, RJ Aragon, JJ Carter, M Lilly, RN Nishimura, RH Weisbart, et al: **Antibody-mediated p53 protein therapy prevents liver metastasis in vivo.** *Cancer Res* 2007, **67**:1769-74.
226. A Avrameas, T Ternynck, L Gasmi, G Buttin: **Efficient gene delivery by a peptide derived from a monoclonal anti-DNA antibody.** *Bioconjug Chem* 1999, **10**:87-93.
227. A Durrbach, E Angevin, P Poncet, M Rouleau, G Chavanel, A Chapel, D Thierry, A Gorter, R Hirsch, B Charpentier, et al: **Antibody-mediated endocytosis of G250 tumor-associated antigen allows targeted gene transfer to human renal cell carcinoma in vitro.** *Cancer Gene Ther* 1999, **6**:564-71.
228. A Mayer, KA Chester, AA Flynn, RH Begent: **Taking engineered anti-CEA antibodies to the clinic.** *J Immunol Methods* 1999, **231**:261-73.
229. TM Behr, M Behe, M Lohr, G Sgouros, C Angerstein, E Wehrmann, K Nebendahl, W Becker: **Therapeutic advantages of Auger electron- over beta-emitting radiometals or radioiodine when conjugated to internalizing antibodies.** *Eur J Nucl Med* 2000, **27**:753-65.
230. A Mayer, E Tsiompanou, D O'Malley, GM Boxer, J Bhatia, AA Flynn, KA Chester, BR Davidson, AAM Lewis, MC Winslet, et al: **Radioimmunoguided surgery in colorectal cancer using a genetically engineered anti-CEA single-chain Fv antibody.** *Clinical Cancer Research* 2000, **6**:1711-1719.
231. MB Vrouenraets, GWM Visser, C Loup, B Meunier, M Stigter, H Oppelaar, FA Stewart, GB Snow, GAMS van Dongen: **Targeting of a hydrophilic photosensitizer by use of internalizing monoclonal antibodies: A new possibility for use in photodynamic therapy.** *International Journal of Cancer* 2000, **88**:108-114.
232. MA Poul, B Becerril, UB Nielsen, P Morisson, JD Marks: **Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries.** *J Mol Biol* 2000, **301**:1149-61.
233. D Alarcon-Segovia: **Antinuclear antibodies: to penetrate or not to penetrate, that was the question.** *Lupus* 2001, **10**:315-8.
234. A Ruiz-Arguelles, L Rivadeneyra-Espinoza, D Alarcon-Segovia: **Antibody penetration into living cells: Pathogenic, preventive and immuno-therapeutic implications.** *Current Pharmaceutical Design* 2003, **9**:1881-1887.
235. N Ronda, R Gatti, G Orlandini, A Borghetti: **Binding and internalization of human IgG by living cultured endothelial cells.** *Clinical and Experimental Immunology* 1997, **109**:211-6.
236. DP Proulx, E Aubin, R Lemieux, R Bazin: **Spontaneous internalization of IVIg in activated B cells.** *Immunol Lett* 2009, **124**:18-26.
237. E Aubin, DP Proulx, P Trepanier, R Lemieux, R Bazin: **Prevention of T cell activation by interference of internalized intravenous immunoglobulin (IVIg) with MHC II-dependent native antigen presentation.** *Clin Immunol* 2011, **141**:273-83.
238. D Alarconsegovia, A Ruizarguelles, E Fishbein: **Antibody Penetration into Living Cells .1. Intranuclear Immunoglobulin in Peripheral-Blood Mononuclear-Cells in Mixed Connective-Tissue Disease and Systemic Lupus-Erythematosus.** *Clinical and Experimental Immunology* 1979, **35**:364-375.
239. IA Tsonis, S Avrameas, HM Moutsopoulos: **Autoimmunity and pathophysiology.** *J Autoimmun* 2007, **29**:203-5.
240. PM Johnson, J Watkins, PM Scopes, BM Tracey: **Differences in serum IgG structure in health and rheumatoid disease. Circular dichroism studies.** *Ann Rheum Dis* 1974, **33**:366-70.
241. R Schwartz-Albiez, RC Monteiro, M Rodriguez, CJ Binder, Y Shoenfeld: **Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation.** *Clinical and Experimental Immunology* 2009, **158**:43-50.
242. J Bayry, S Lacroix-Desmazes, C Carbonneil, N Misra, V Donkova, A Pashov, A Chevailler, L Mouthon, B Weill, P Bruneval, et al: **Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin.** *Blood* 2003, **101**:758-65.
243. C Jacobi, M Claus, B Wildemann, S Wingert, M Korporal, J Romisch, S Meuer, C Watzl, T Giese: **Exposure of NK cells to intravenous immunoglobulin induces IFN gamma release and degranulation but inhibits their cytotoxic activity.** *Clinical Immunology* 2009, **133**:393-401.

