



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

*«Αντι-DNA μονοκλωνικά αυτοαντισώματα:*

*επίδραση στην αγγειογένεση και στο δίκτυο των κυτταροκινών»*

**ΖΑΝΝΙΚΟΥ ΜΑΡΚΕΛΛΑ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ–ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

*«Αντι-DNA μονοκλωνικά αυτοαντισώματα:*

*επίδραση στην αγγειογένεση και στο δίκτυο των κυτταροκινών»*

**ΖΑΝΝΙΚΟΥ ΜΑΡΚΕΛΛΑ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014**

*Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).*

Ημερομηνία αίτησης της κ. Ζαννίκου Μαρκέλλας: 28-8-2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 623<sup>α</sup>/18-12-2007

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Φώτσης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Χριστοφορίδης Σάββας Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Λυμπέρη Πηγή Ερευνήτρια Α', Ινστιτούτο Παστέρ

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 3-3-2008

*«Αντί –DNA μονοκλωνικά ανταντισώματα: επίδραση στην αγγειογένεση και στο δίκτυο των κοτταροκινών»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :** 764<sup>α</sup>/17-6-2014

<b>Γαλάρης Δημήτριος</b>	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Φώτσης Θεόδωρος</b>	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Θυφρωνίτης Γεώργιος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Ανοσολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Παπαμαρκάκη Θωμαή</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Χριστοφορίδης Σάββας</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Γεωργοπούλου Ουρανία</b>	Ερευνήτρια Β' Ινστιτούτο Παστέρ Αθήνα
<b>Λυμπέρη Πηγή</b>	Ερευνήτρια Α' Ινστιτούτο Παστέρ Αθήνα

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 11-7-2014

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Ανδρέας Φωτόπουλος

Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας του τμήματος Βιοχημείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ υπό την επίβλεψη του Λειτουργικού, Κλινικο-Εργαστηριακού τομέα, του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλαν και με βοήθησαν, ο καθένας με τον τρόπο του, στην ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντά μου, Καθηγητή Θεόδωρο Φώτση, για την ουσιαστική επίβλεψη της διδακτορικής διατριβής με χρήσιμες συμβουλές και παρεμβάσεις που συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωσή της. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Σάββα Χριστοφορίδη, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Θ. Παπαμαρκάκη, τον Καθηγητή Δ. Γαλάρη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γ. Θυφρονίτη και την Ερευνήτρια Β' Ο. Γεωργοπούλου, για τη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» οφείλω στη Δρ. Λυμπέρη Πηγή, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, η οποία με δέχθηκε σαν μέλος του εργαστηρίου της προκειμένου να εκπονήσω τη διδακτορική μου διατριβή και με την πολύπλευρη επιστημονική της συνεισφορά όλα αυτά τα χρόνια, συνέβαλε τα μέγιστα στην απόκτηση από πλευράς μου πλούσιας εργαστηριακής εμπειρίας και κατάρτισης. Επιπλέον, νιώθω ιδιαίτερα τυχερή που είχα την ευκαιρία να γνωρίσω από κοντά και να συνεργαστώ με τον Καθηγητή Ευστράτιο Αβραμέα, ο οποίος έχει αφήσει το δικό του στίγμα στο χώρο της Ανοσολογίας. Η πολυετής εμπειρία αλλά και οι αστείρευτες ιδέες του απετέλεσαν πηγή έμπνευσης σε όλη τη διάρκεια του διδακτορικού μου. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Δρ. Ηλιάδη Πέτρο, Ειδικό Λειτουργικό Επιστήμονα Γ', πρώην μέλος του εργαστηρίου μας, για τη συνδρομή του στη διεκπεραίωση της διατριβής μέσω της παραγωγής των αντισωμάτων.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» οφείλω σαφώς σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου, Κατερίνα Χατζηγιωάννου, Ιωάννη Κάνιστρα και Αγγελική Σαλή, για την πολύπλευρη προσφορά τους, τη μεταξύ μας αγαστή συνεργασία, αλλά και για τις στιγμές που μοιραστήκαμε εντός και εκτός εργαστηρίου, συμβάλλοντας αποφασιστικά στην ομαλή διεξαγωγή του έργου μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον παρασκευαστή του εργαστηρίου, κο Αποστόλη Μπαλάφα, την τεχνικό κα Τζένη Ψαρρού, καθώς και τη Δρ. Λιακατά Ελισάβετ,

οι οποίοι με βοήθησαν σημαντικά με το δικό τους τρόπο κατά τη διάρκεια της διατριβής μου.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών (ITE-IBE) που με φιλοξένησαν στα πλαίσια της διατριβής για τη διεξαγωγή συγκεκριμένων πειραμάτων και ειδικότερα την Δρ. Carol Murphy Ερευνήτρια Β΄ για την ωφέλιμη συνεργασία σε επιστημονικό/εργαστηριακό επίπεδο αλλά και τη Δρ. Σοφία Μπέλλου για τη συνεισφορά της και το αμείωτο ενδιαφέρον της.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος τη Δρ. Ρεβέκκα Μάτσα, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, η οποία μου παρείχε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω έναν αριθμό σημαντικών πειραμάτων στο εργαστήριό της καθώς και τη Δρ. Μαρία Γαϊτάνου, ερευνήτρια του ίδιου εργαστηρίου, η οποία με χρήσιμες συμβουλές συνέβαλε στην υλοποίησή τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη συνεργασία μας και τον Καθηγητή Χ. Στουρνάρα, Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, στο οποίο και φιλοξενήθηκα για τη διεξαγωγή ορισμένων πειραμάτων στα πλαίσια της διδακτορικής μου διατριβής.

Δεν θα μπορούσα σαφώς να παραβλέψω τη συνεισφορά τόσο του Κοινοφελούς Ιδρύματος Μποδοσάκη (2011-2012) όσο και του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (2007-2011) ως προς την οικονομική στήριξη που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Κλείνοντας, θα ήθελα να πω το μεγαλύτερο «ευχαριστώ» στην οικογένειά μου, τους γονείς μου Μαρίνο και Μαρίνα, που πάντα στήριζαν τις επιλογές μου και χωρίς την αμέριστη ηθική και οικονομική στήριξη των οποίων, δε θα μπορούσα να φέρω εις πέρας τη διατριβή αυτή, όπως και στην αδερφή μου Μαρία που ήταν πάντα εκεί όταν τη χρειάστηκα, να με στηρίζει και να μου δώσει τη δύναμη να επιτύχω τους στόχους μου. Τέλος, ένα ιδιαίτερο «ευχαριστώ» θα ήθελα να πω στον Κωνσταντίνο Τσιώρα, για τις αμέτρητες ώρες, τις δυσκολίες και τις χαρές που περάσαμε μαζί στα πλαίσια της κοινής μας πορείας, στο εργαστήριο και στη ζωή.







3.2	Cat-Abs στη φυσιολογία και στην παθολογία	48
3.3	Cat-Abs με δραστικότητα αντι-DNA	52
4.	ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΥΤΗΣ	53
4.1	Η φυσιολογική αγγειογένεση	53
4.2	Η παθολογική αγγειογένεση	60
4.3	Αγγειοπάθεια στον ΣΕΛ	64
II.	ΣΚΟΠΟΣ	74
III.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	77
1	ΥΛΙΚΑ	77
1.1	Αναλώσιμα	77
1.2	Διαλύματα-Χημικά	78
1.2.1	Υλικά Κυτταροκαλλιέργειας	82
1.3.	Αντισώματα και φθορίζουσες χρωστικές	83
1.4	Αντιγόνα	84
1.5	Κυτταρικές σειρές	84
1.6	Πειραματόζωα	85
1.7	Εργαστηριακός εξοπλισμός	85
1.7.1	Όργανα και συσκευές	85
1.7.2	Γυαλικά και πλαστικά	86
1.7.3	Μικροσκόπια και λογισμικά επεξεργασίας εικόνας	87
2	ΜΕΘΟΔΟΙ	88
2.1	ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	88
2.1.1	Ανάπτυξη των μονοκλωνικών αντισωμάτων σε μεγάλη ποσότητα	88
2.1.1.1	Καλλιέργεια υβριδωμάτων με μέσο απαλλαγμένο από ορό (SFM)	89
2.1.1.2	Καλλιέργεια υβριδωμάτων σε ειδικές φλάσκες	89
2.1.1.3	Χορήγηση υβριδωμάτων σε πειραματόζωα	90
2.1.2	Κυτταρικές σειρές	90
2.1.3	Ανακαλλιέργεια κυττάρων με χρήση θρυψίνης	91
2.1.4	Αποθήκευση κυτταρικών σειρών	91
2.1.5	Τεχνική μέτρησης κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer	92

2.1.6	Φθορισμο-ανοσοκυτταροχημική τεχνική για τον έλεγχο της διείσδυσης _____	93
2.1.7	Απομόνωση πυρηνικού και κυτταροπλασματικού κλάσματος από κύτταρα HeLa _____	97
2.1.8	Πρωτογενείς καλλιέργειες _____	98
2.1.8.1	Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβα ομφάλιου λώρου _____	98
2.1.8.2	Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων _____	98
2.1.8.3	Δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυττάρων HUVEC με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης _____	98
2.1.8.4	Δοκιμασία μετανάστευσης κυττάρων HUVEC _____	99
2.1.8.5	Δοκιμασία επιβίωσης των κυττάρων HUVEC με κυτταρομετρία ροής, (Flow cytometry, FACS): Σήμανση με αννεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο _____	100
2.2	ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ _____	101
2.2.1	Μέθοδοι καθαρισμού αντισωμάτων _____	101
2.2.1.1	Κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο (Ammonium Sulfate Precipitation) _____	101
	Συμπύκνωση και αλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος μονοκλωνικών αντισωμάτων _____	102
2.2.1.2	Χρωματογραφικές μέθοδοι _____	102
2.2.1.2.1	Χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη πρωτεΐνης A _____	103
2.2.1.2.2	Χρωματογραφία ιοντοαλλαγής (Ion Exchange Chromatography) _____	106
2.2.1.3	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου παρουσία SDS (SDS-PAGE) _____	107
2.2.1.4	Ισοηλεκτρική εστίαση (Isoelectric focusing, IEF) _____	109
2.2.1.5	Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA) _____	111
2.2.1.6	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford _____	113
2.2.1.7	Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting) _____	114
2.3	ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ _____	116
2.3.1	Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης _____	116
2.3.2	Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες _____	117
2.3.3	Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού σοκ. _____	117

2.3.4 Παρασκευή και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα	118
2.3.5 Παρασκευή και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxi prep)	119
2.3.6 Έλεγχος υδρόλυσης	120
2.3.7 Έλεγχος κατακερματισμού του DNA	120
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	123
1. Επιλογή, ανάπτυξη και απομόνωση μονοκλωνικών CPAbs από υβριδώματα	123
1.1 Χαρακτηρισμός της αντισωματικής δράσης των CPAbs	125
2. Μελέτη των παραμέτρων και του τρόπου διείσδυσης των CPAbs σε κύτταρα HeLa	128
2.1 Εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης των CPAbs και του χρόνου επώασής τους με τα κύτταρα	128
2.2 Τρόπος εισόδου	131
3 Επίδραση κυτταρικών συστατικών στη διεισδυτική ικανότητα των CPAbs	134
3.1 Συγκριτική μελέτη της διεισδυτικής ικανότητας των CPAbs πριν και μετά την απομόνωσή τους από υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειας	134
3.2 Επίδραση πυρηνικών μορίων στη διεισδυτική ικανότητα των CPAbs	138
3.2.1 Επίδραση nDNA στη διεισδυτική ικανότητα των CPAbs	138
3.2.2 Επίδραση ιστονών στη διεισδυτική ικανότητα των CPAbs	139
3.3.3 Επίδραση nDNA, ιστονών και νουκλεοϊστονών στη διεισδυτική ικανότητα των CPAbs	142
4 Μελέτη του βιολογικού ρόλου των CPAbs	147
4.1 Υδρόλυση πλασμιδιακού και γενωμικού DNA	147
4.2 Επαγωγή απόπτωσης	154
4.3 Κατακερματισμός του DNA	156
4.4 Επαγωγή μορφολογικών και πυρηνικών αλλαγών σε κύτταρα HeLa	157
4.5 Αναδιοργάνωση <i>in vitro</i> του πλέγματος της ακτίνης σε καρκινικά κύτταρα	159
4.6 Επίδραση των CPAbs στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό	162
5. Επίδραση των CPAbs στην αγγειογένεση	163

5.1	Στον πολλαπλασιασμό κυττάρων HUVEC, είτε παρουσία, είτε απουσία VEGF _____	164
5.2	Στο σηματοδοτικό μονοπάτι των κινασών Erk1/2 _____	166
5.3	Στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων _____	166
5.4	Στην απόπτωση σε κύτταρα HUVEC <i>in vitro</i> _____	169
V.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ _____	173
1.	Απομόνωση και χαρακτηρισμός CPAbs _____	173
2.	Μηχανισμός διείσδυσης των CPAbs _____	174
3.	<b>Ο ρόλος των πυρηνικών μορίων στη διεισδυτική ικανότητα των CPAbs</b>	176
4.	Βιολογικός ρόλος των CPAbs (I): Επαγωγή Απόπτωσης _____	179
5.	Βιολογικός ρόλος των CPAbs (II): Αναστολή Αγγειογένεσης _____	182
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ _____	188
	SUMMARY _____	191
VI.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ _____	195



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

αAbs	Αυτοαντισώματα (auto-Antibodies)
ADCC	Κυτταροτοξικότητα μεσολαβούμενη από αντίσωμα (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)
AECA	Αντιενδοθηλιακά αντισώματα (Anti-Endothelial Cell Antibodies)
ANCA	Κυτταροπλασματικά αντιγόνα ουδετερόφιλων – (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antigen)
ANA	Αντιπυρηνικά αντισώματα (Anti-Nuclear Antibodies)
Ang-1	Αγγειοποιητίνη 1 (Angiopoietin 1)
Ang-2	Αγγειοποιητίνη 2 (Angiopoietin 2)
APC	Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells)
APS	Σύνδρομο αντιφωσφολιπιδίων (Anti-Phospholipids Syndrome)
ΑΣ	Ανοσιακό Σύστημα
BCR	Υποδοχέας των Β-κυττάρων (B-Cell Receptor)
bFGF	βασικός Αυξητικός Παράγοντας των Ινοβλαστών (basic Fibroblast Growth Factor)
bp	Ζεύγη βάσεων (base pairs)
BSA	Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin)
CD40L	Συνδέτης του CD40 (CD40 Ligand) (CD154)
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές (Complementary Determining Regions)
Cox-2	Κυκλοοξυγενάση-2 (Cyclo-Oxygenase-2)
DCs	Δενδριτικά κύτταρα (Dendritic cells)
DNA	Δεσοξυ-ριβονουκλεϊκό Οξύ (Deoxyribo-Nucleic Acid)
dsDNA	Διπλής έλικας DNA (double strand DNA)
dNTP	Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxyribonucleotide triphosphate)
DRs	Υποδοχείς Θανάτου (Death Receptors)
ECs	Ενδοθηλιακά κύτταρα (Endothelial Cells)

ENA	Πυρηνικά Αντιγόνα που εκχυλίζονται (Extractable Nuclear Antigens)
EPCs	Ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (Endothelial Progenitor Cells)
EDTA	Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EthyleneDiamineTetraacetic Acid)
eNOS	Ενδοθηλιακή Συνθετάση του Μονοξειδίου του Αζώτου (Endothelial Nitric Oxide Synthase)
FBS	Ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum)
aFGF	όξινο Αυξητικός Παράγοντας Ινοβλαστών (acidic Fibroblast Growth Factor)
bFGF	βασικός Αυξητικός Παράγοντας Ινοβλαστών (basic Fibroblast Growth Factor)
FMD	Αγγειοδιαστολή επαγόμενη από τη ροή (Flow Mediated Dilatation)
GWAS	Μελέτη συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome Wide Association Study)
HCQ	Υδροξυχλωροκίνη (Hydroxy ChloroQuine)
HGF	Αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων (Hepatocyte Growth Factor)
HIF	Παράγοντας επαγόμενος από την υποξία (Hypoxia Inducible Factor)
ICAM-1	Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1 (InterCellular Adhesion Molecule 1)
Ig	Ανοσοσφαιρίνη (Immunoglobulin)
IMT	Πάχος έσω-μέσου χιτώνα (αγγείων) (Intima-Media Thickness)
iNOS	Επαγόμενη Συνθετάση Μονοξειδίου Αζώτου – (inducible Nitric Oxide Synthase)
IL-1	Ιντερλευκίνη 1 (Interleukine 1)
IL-1R1	Υποδοχέας της Ιντερλευκίνης 1 (Interleukine Receptor 1)
IVIg	Ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη (Intravenous Immunoglobulin)
LPS	Λιποπολυσακχαρίτης (Lipopolysaccharite)
mAbs	Μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal Antibodies)
M-CSF	Διεγερτικός παράγοντας σχηματισμού αποικιών μακροφάγων



	(Macrophage-Colony Stimulating Factor)
MFI	Μέση πυκνότητα φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity)
MHC	Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (Major histocompatibility complex)
MMPs	Μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας (Matrix Metalloproteinases)
TGF-β	Αυξητικός Παράγοντας Μετασχηματισμού β (Transforming Growth Factor β)
TIMP	Ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (Tissue inhibitors of metalloproteinases)
NAbs	Φυσικά αντισώματα (natural antibodies)
NO	Νιτρικό οξείδιο (Nitric Oxide)
NF-κB	Πυρηνικός παράγοντας κB (Nuclear Factor-κB)
PA	Ενεργοποιητές πλασμινογόνου (Plasminogen Activators)
PAI	Αναστολείς των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (Plasminogen Activators Inhibitors)
PAF	Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor)
PBS	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffered Saline)
pDCs	Πλασμακυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα plasmacytoid Dendritic Cells
PDGF-BB	Αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια BB (Platelet Derived Growth Factor BB)
PDGFR-β	Υποδοχέας του Αυξητικού παράγοντα προερχόμενου από αιμοπετάλια (Platelet Derived Growth Factor Receptor β)
PI3K	Κινάση της 3- Φωσφατιδυλ-Ινοσιτόλης (Phosphatidy I- Inositol 3 Kinase)
SCID:	Σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (Severe Combined Immunodeficiency)
ΣΕΛ	Συστηματικός ερυθματώδης λύκος (Systemic Lupus Erythematosus)
PIGF	Αυξητικός παράγοντας του πλακούντα (Placental Growth Factor)
RNP	Ριβονουκλεοπρωτεΐνη (RiboNucleoProtein)

ROS	Ενεργές Ρίζες Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species)
SAPK	Πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από στρες (Stress-Activated Protein Kinase)
sCD40L	Διαλυτός CD40L (soluble CD40L)
SDF-1	Παράγοντας προερχόμενος από το στρώμα 1 (Stromal Derived Factor 1)
ΣΕΛ	Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (Systemic lupus erythematosus)
SMCs	Λεία μυϊκά κύτταρα (Smooth Muscle Cells)
SLEDAI	Σύστημα αξιολόγησης ενεργότητας του ΣΕΛ (SLE Disease Activity Index)
TCR	Υποδοχέας Τ λεμφοκυττάρων (T-cell receptor)
TF	Ιστικός Παράγοντας (Tissue Factor)
TLRs	Υποδοχείς ομοιάζοντες με τους Toll (Toll-Like Receptors)
TNF	Παράγοντας Νέκρωσης των Όγκων (Tumor Necrosis Factor)
TNFR1	Υποδοχέας του Παράγοντα Νέκρωσης των Όγκων 1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1)
VCAM-1	Μόριο Προσκόλλησης των Αγγειακών Κυττάρων 1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1)
VE-Cadherin	Καντχερίνη του Αγγειακού Ενδοθηλίου (Vascular Endothelial Cadherin)
VEGF	Αυξητικός Παράγοντας του Αγγειακού Ενδοθηλίου (Vascular Endothelial Growth Factor)
VEGFR2	Υποδοχέας του Αυξητικού Παράγοντα του Αγγειακού Ενδοθηλίου 2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2)
WPB	Σωματίδια Weibel-Palade (Weibel-Palade bodies)

# *Εισαγωγή*

## I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. ΦΥΣΙΚΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (NATURAL AUTOANTIBODIES, NAbS) ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

#### 1.1 Εισαγωγή

Η Ανοσολογία, αποτελεί κλάδο της βιοϊατρικής επιστήμης με αντικείμενο μελέτης τη δομή και τη λειτουργία του ανοσιακού συστήματος (ΑΣ) διαφόρων οργανισμών. Η δράση του ΑΣ, φυσιολογικά είναι προστατευτική, δύναται όμως να οδηγεί και σε παθολογικές καταστάσεις όταν εκείνο δυσλειτουργεί (αυτοάνοσες ασθένειες, υπερευαισθησία, ανοσολογική ανεπάρκεια). Τα βασικά κυτταρικά και χυμικά συστατικά του, αποτέλεσαν πεδίο ενδελεχούς έρευνας τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η ανοσολογική απόκριση είναι μια διαδικασία κατά την οποία ικανά ερεθίσματα επάγουν την παραγωγή πρωτεϊνών και ενεργών κυττάρων σε μία ποικιλία απεριόριστη σε μοριακές δομές. Η Ανοσολογία, έχει τις ρίζες της στην αρχαιότητα, όταν για πρώτη φορά παρατηρήθηκε πως πληθυσμοί που είχαν επιβιώσει από μία μολυσματική νόσο, σπανίως νοσούσαν ξανά από την ίδια αιτία. Αυτό ήταν ήδη γνωστό από τον Θουκυδίδη, ο οποίος περιγράφοντας μία επιδημία πανώλης στην Αθήνα, παρατήρησε ότι όποιος επιβίωνε από την νόσο είχε «ανοσία» σε μία δεύτερη επαφή με το παθογόνο-αίτιο που την προκαλούσε.

Στην περίοδο 1890–1910 αναπτύχθηκε έντονο ενδιαφέρον για την Ανοσολογία και τέθηκαν οι βάσεις για πιο επιστημονική προσέγγιση και επεξήγηση των φαινομένων της, καθορίζοντας έτσι το πεδίο δράσης της καινούριας αυτής επιστήμης. Στις αρχές του 1900 στην Ανοσολογία κυριαρχεί η μορφή του Paul Ehrlich, οποίος, αφού ανακάλυψε την ύπαρξη αντισωμάτων σε κουνέλια έναντι πρωτεϊνών του γάλακτος ή στο λεύκωμα του αυγού, προχώρησε στην διατύπωση ότι το βιολογικό ενδιαφέρον της ανοσοποίησης δεν περιορίζεται μόνον στις λοιμώξεις αλλά και σε άλλα αίτια. Εισήγαγε, λοιπόν, τον όρο «*horror autoxicus*» για να υποδείξει ότι συνήθως τα σπονδυλωτά δεν εκδηλώνουν ανοσολογικές αντιδράσεις απέναντι στα συστατικά στοιχεία του ίδιου τους του οργανισμού, θέτοντας έτσι τις βάσεις για τη διάκριση των γνωστών όρων «*self*» και «*non-self*». Επιπρόσθετα, με τη θεωρία των πλαγίων αλυσίδων διατύπωσε ότι η παραγωγή των αντισωμάτων στηρίζεται στην επιλογή κυττάρων που έχουν τους κατάλληλους υποδοχείς στη μεμβράνη τους για το αντιγόνο.

Ο Landsteiner το 1902 αναμιγνύοντας σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς τον ορό και τα ερυθρά αιμοσφαίρια από 22 δότες και παρατηρώντας ότι μερικοί οροί προκαλούσαν

αιμοσυγκόλληση σε άλλους δότες, προσδιόρισε τις «συγκολλητίνες» τύπου ABO. Στον ορό φυσιολογικών ανθρώπων ομάδας αίματος A υπήρχαν «συγκολλητίνες» που συνδέονταν πάνω στα B αντιγόνα ερυθροκυττάρων, ενώ αντίστροφα σε άτομα ομάδας αίματος B υπήρχαν «συγκολλητίνες» που συνδέονταν στα A αντιγόνα (2). Έτσι γεννήθηκε η ανοσογενετική, της οποίας το πεδίο δράσης ξεκινάει από τη μελέτη της γενετικής των πληθυσμών, μέσω της χρήσης των αντιγονικών δεικτών, έως την ανάλυση του γενετικού ελέγχου της ανοσιακής απόκρισης. Όπως αποδείχθηκε αργότερα, οι «συγκολλητίνες» αυτές ανήκαν στην κατηγορία των φυσικών αντισωμάτων (Natural Antibodies, NABs).

Στις αρχές της δεκαετίας του 1950 εισήχθησαν οι θεωρίες επιλογής των κλώνων από τον Burnet. Το αντιγόνο επιλέγει μέσα από έναν ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό, ορισμένους κλώνους ανοσολογικά ανταγωνιστικούς που παρουσιάζουν στη μεμβράνη τους, τους κατάλληλους υποδοχείς για να το δεσμεύσουν. Η παραγωγή αυτοαντισωμάτων παρεμποδίζεται μέσω της αρνητικής επιλογής των αυτοδραστικών B-κυττάρων στο μυελό των οστών, καθώς τα αυτοαντισώματα αυτά καθίστανται επικίνδυνα για τον οργανισμό και οδηγούν σε αυτοάνοσα νοσήματα (3). Η βασική αρχή αυτής της θεωρίας, διαμορφωμένη από τον Nossal το 1960, καθορίζει ότι κάθε κύτταρο σε κάποια δεδομένη χρονική στιγμή παράγει ένα συγκεκριμένο είδος αντισώματος (4). Αυτό προϋποθέτει ότι το ΑΣ αποτελείται από σχηματισμούς λεμφοκυττάρων, ευαίσθητους ως προς το αντιγόνο, που είναι γενετικώς προγραμματισμένοι για τη σύνθεση ενός ειδικού αντισώματος. Αυτή μάλιστα η εξειδίκευση μπορεί να μεταφερθεί και στα επόμενα θυγατρικά κύτταρα που δύνανται να ενεργοποιηθούν ύστερα από κατάλληλο ερεθισμό. Οι παραπάνω θεωρίες δεν χρησιμοποιήθηκαν μόνο για την κατανόηση των μηχανισμών παραγωγής αντισωμάτων και της διαφοροποίησής τους, αλλά και για την επεξήγηση μηχανισμών, όπως η ανοσολογική ανοχή (tolerance). Ο Burnet υπογραμμίζοντας τη σημασία της θεωρίας του χιμαιρισμού (5) και της ανοσολογικής ανοχής σε διζυγωτικά δίδυμα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα αντιγόνα που έρχονται σε επαφή με το ΑΣ κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής αναγνωρίζονται διαδοχικώς ως «self», δηλαδή προερχόμενα από τον ίδιο τον οργανισμό, και οι κυτταρικοί κλώνοι που παράγουν αυτούς τους ανοσοϋποδοχείς καταστρέφονται ή αδρανοποιούνται παρέχοντας την ανοσολογική ανοχή.

Οι πρώτες μελέτες με τα NABs ξεκίνησαν σχεδόν την ίδια περίοδο με την αρχή της Ανοσολογίας (2, 6)(Landsteiner 1945, Boyden 1965, Michael 1969). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι υπήρχαν αντισώματα σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ορούς που αναγνώριζαν ουσίες του εαυτού, όπως σπερματοζώαρια και ερυθροκύτταρα. Οι μελέτες αυτές όμως σταμάτησαν τη δεκαετία του 1960 με τη γενική αποδοχή από την ανοσολογική κοινότητα

της θεωρίας της επιλογής των κλώνων του Burnet που απαγορεύει την ύπαρξη αυτοαντισωμάτων σε φυσιολογική κατάσταση. Τη δεκαετία του 1980 η ομάδα του Σ. Αβραμέα απομόνωσε για πρώτη φορά από ορούς υγιών ανθρώπων αντισώματα και των τριών κύριων τάξεων (IgM, IgG και IgA) που αναγνώριζαν συγχρόνως διαφορετικά αντιγόνα του εαυτού και του ξένου (7). Τα αποτελέσματα αυτά δεν έτυχαν τότε ευρείας αποδοχής και θεωρήθηκαν ως ψευδώς θετικά. Με την πάροδο του χρόνου όμως έγινε σαφές ότι στον ορό των υγιών ατόμων υπάρχουν πράγματι NAbs που αντιδρούν τόσο με ενδογενή, όσο και με εξωγενή αντιγόνα (8). Τα IgM-NAbs ανιχνεύονται χωρίς δυσκολία στους φυσιολογικούς ορούς, αλλά ένα μέρος από τα IgG- και IgA-NAbs φαίνεται να είναι «μπλοκαρισμένο» από αντιγόνα και μπορούν να ανιχνευθούν μόνο μετά από επεξεργασία των ορών ή μετά από απομόνωση των αντισωμάτων (3, 8-12). Το ρεπερτόριο των NAbs είναι παρόμοιο σε κάθε ζωικό είδος, αλλά φαίνεται να διαφέρει από το ένα άτομο στο άλλο. Επιπλέον, το ρεπερτόριο των IgM-NAbs φαίνεται να παραμένει σταθερό, ενώ αυτό των IgG- και IgA-NAbs να εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα NAbs είναι παρόντα στη μήτρα, στο αίμα των νεογνών, στο γάλα της μητέρας και σε όλη τη διάρκεια της ζωής στο αίμα και σε άλλα βιολογικά υγρά, όπως το σάλιο και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (3, 8-12).

Η παραγωγή πολυδραστικών μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs) από διάφορα φυσιολογικά (υγιή) είδη ζώων επιβεβαίωσε την ύπαρξη των NAbs και επέτρεψε την περαιτέρω μελέτη τους (13). Έτσι, η ανάλυση Β-κυτταρικών κλώνων που προέρχονταν από περιφερικά λεμφοκύτταρα υγιών ανθρώπων μετά από ετεροϋβριδισμό ή αθανатоποίηση με μόλυνση με τον ιό Epstein-Barr, έδειξαν πως έως και το 33% των mAbs που εκκρίνονται αναγνωρίζει πάνω από δύο αντιγόνα. Τα περισσότερα από τα NAbs είναι πολυδραστικά, δηλαδή αναγνωρίζουν τουλάχιστον δύο ή περισσότερα αντιγόνα, και αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό των παραγόμενων αντισωμάτων (11). Κυρίως λόγω της τεχνικής των υβριδωμάτων που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των NAbs, υπήρξε η εσφαλμένη αντίληψη πως αυτά ανήκουν κυρίως στην τάξη IgM. Αυτό οφειλόταν στο ότι πολλές μελέτες σε ποντίκια, βασίζονταν σε πειράματα υβριδοποίησης με τη σύντηξη -με μη εκκριτικές μυελωματικές σειρές- σπληνοκυττάρων από μη ανοσοποιημένα ζώα, που δίνουν σχεδόν αποκλειστικά υβριδώματα IgM. Πιθανώς, τα Β-κύτταρα που παράγουν πολυδραστικά IgM, βρίσκονται σε ένα υψηλότερο επίπεδο ενεργοποίησης από τα αντίστοιχα που παράγουν πολυδραστικά IgG- και IgA-NAbs. Κάθε μονοκλωνικό NAb παρουσιάζει ένα ιδιαίτερο προφίλ αναγνώρισης αντιγόνων του εαυτού και του ξένου. Τα IgM-NAbs κωδικοποιούνται από γονίδια της βλαστικής σειράς, χωρίς ή με λίγες

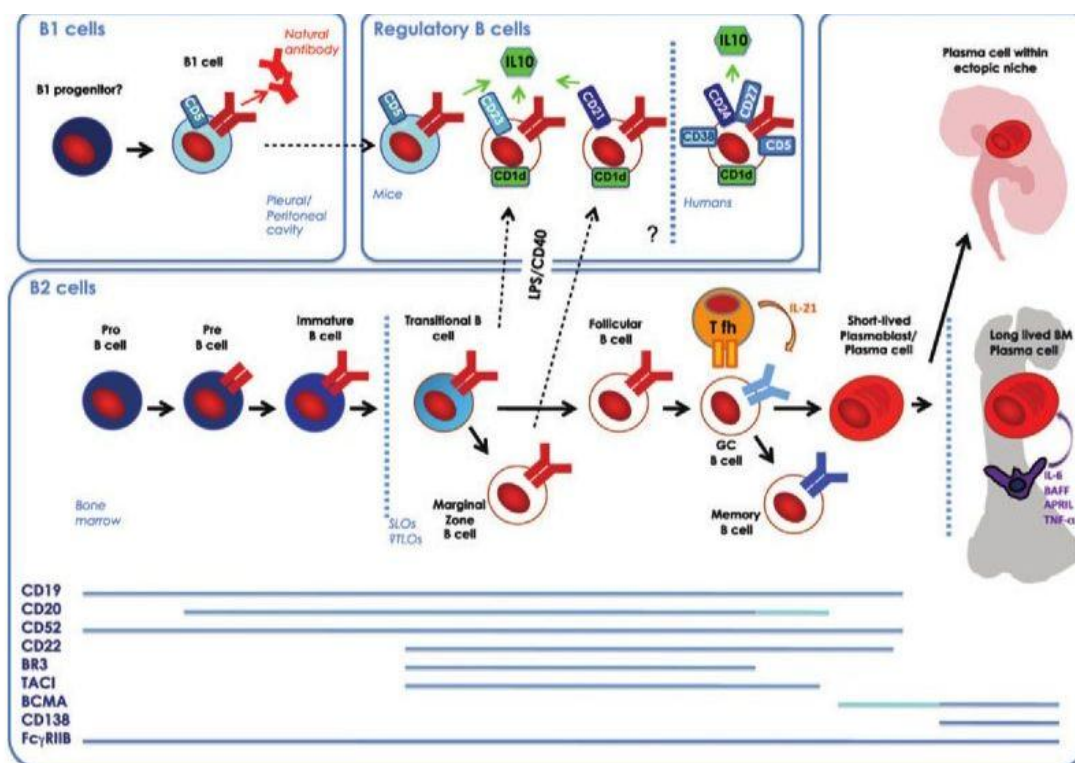
μεταλλάξεις. Τα IgG- και IgA-NAbs φέρουν έναν μεταβλητό αριθμό μεταλλάξεων, συνήθως 7-10, αλλά δεν είναι σπάνιο να βρεθούν IgG- και IgA-NAbs που να έχουν πολύ μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων, συνήθως 15-20. Όλα τα μονοκλωνικά NAbs εκφράζουν πολυδραστικότητα και αναγνωρίζουν δομικά διαφορετικά μόρια, όπως αντιγόνα του κυτταροσκελετού και του πυρήνα (DNA και πρωτεΐνες), καθώς και εξωγενή αντιγόνα, κυκλοφορούντα μακρομόρια και απτένια, των οποίων η δομή έχει συντηρηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (1). Σχεδόν δύο δεκαετίες πριν, η παραγωγή των NAbs θεωρείτο ότι ήταν αποτέλεσμα διασταυρούμενων αντιδράσεων με εξωγενή, περιβαλλοντικά αντιγόνα, ή προϊόν μη ειδικών μηχανισμών που συνοδεύουν την ανοσιακή απόκριση, ή ότι αντιπροσώπευαν αυθόρμητη «διαρροή» του τελικού σταδίου ωρίμανσης του B-κυττάρου. Σε νεογέννητα, καθώς και σε ποντίκια μεγαλωμένα σε συνθήκες απαλλαγμένες από αντιγονικούς και παθογόνους παράγοντες (germ-free and antigen free mice) φάνηκε να παράγονται σε φυσιολογικά επίπεδα IgM-NAbs, γεγονός που καταδεικνύει πως η παραγωγή τους δεν οφείλεται στην αλληλεπίδραση με αντιγόνα του περιβάλλοντος. Σε αυτά τα ποντίκια όμως τα επίπεδα των IgGs είναι μειωμένα κατά περίπου 95%. Κάτι τέτοιο υποδεικνύει ότι το ρεπερτόριο και το επίπεδο των IgM είναι σταθερό και δεν το επηρεάζουν εξωτερικά αντιγονικά ερεθίσματα, ενώ αυτά των IgG απαιτεί την παρουσία εξωτερικών ερεθισμάτων (1, 14).

Μια σειρά από μελέτες έδειξαν ότι τα NAbs παράγονται από κύτταρα  $B_1CD5^+$ , από B-κύτταρα περιφερικής ζώνης (MΖB) και από λεμφοζυδιακά  $B_2$ -κύτταρα. Κύτταρα  $B_1CD5^+$  και MΖB εκφράζουν παρόμοιες, αλλά και συγχρόνως διακριτές ειδικότητες, και παράγουν κυρίως IgM-NAbs (13, 15). Τα κύτταρα  $B_1CD5^+$  είναι παρόντα νωρίς στην οντογένεση, στα έμβρυα και στα νεογέννητα και βρίσκονται πρωτίστως στο περιτόναιο, ενώ τα κύτταρα MΖB ανιχνεύονται στην περιφερική ζώνη του σπλήνα. Τα κύτταρα  $B_2$  παρουσιάζονται αργότερα στην οντογένεση, γύρω στους εννέα μήνες περίπου για τον άνθρωπο (15). Συνθέτουν πολυδραστικά IgM NAbs και μπορούν να μεταβούν (switch) στην παραγωγή IgG- και IgA-NAbs, τα οποία φέρουν ένα αριθμό μεταλλάξεων που ποικίλλει (16) (**Εικόνα 1.1**).

Σύμφωνα με τη θεωρία της επιλογής των κλώνων, η παραγωγή ανοσοϋποδοχέων που αναγνωρίζουν στοιχεία του εαυτού ελέγχεται από αυστηρούς κανόνες. Τα B-κύτταρα που παράγουν αυτοαντισώματα υψηλής συγγένειας εξαλείφονται και όσα διαφεύγουν (παράγοντας αυτοαντισώματα χαμής συγγένειας), καταστέλλονται με μηχανισμούς λειτουργικής ανέργειας (functional anergy) (17-19) και επεξεργασίας υποδοχέων (receptor editing) (20, 21). Τα τελευταία χρόνια όμως πολλές μελέτες έδειξαν ότι τα B-κύτταρα που

παράγουν αυτοαντισώματα και αυτοανοσοϋποδοχείς παίρνουν μέρος στη λειτουργία του ΑΣ και γενικά στην ομοιόσταση του οργανισμού. Αυτά τα Β-κύτταρα επιλέγονται και ενεργοποιούνται από αντιγόνα του εαυτού και του ξένου, και η παρουσία τους είναι απαραίτητη στις αρχικές φάσεις της διαφοροποίησης των Β-κυττάρων για την ομαλή ανάπτυξή τους. Τα αυτοδραστικά (autoreactive) Β-κύτταρα μπορούν να διαφεύγουν όλους τους μηχανισμούς απενεργοποίησής τους και να διαχέονται σε όλα τα λεμφοειδή όργανα (22).

Τα αυτοαντισώματα που παράγονται από τα Β-κύτταρα συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές δράσεις. Πράγματι, μελέτες έδειξαν ότι τα ΝΑbs συμμετέχουν στη ρύθμιση των Β- και Τ-κυττάρων καθώς και στη ρύθμιση των κυτταροκινών. Είναι ικανά να επάγουν ή αντίθετα να καταστείλουν κύτταρα, τα οποία συνθέτουν και εκκρίνουν πρωτεΐνες, ένζυμα ή/και βιολογικούς παράγοντες, όπως ορμόνες, χημειοκίνες και βιοπεπτίδια, να επάγουν την επανασύνθεση της μυελίνης, να εκφράζουν, τα ίδια, βιολογικές ιδιότητες, όπως καταλυτικές, και να είναι ικανά να εισέρχονται σε ζώντα κύτταρα (23-25). Οι διαφορετικές δράσεις τους φαίνεται να οφείλονται, είτε σε τυπικές αντιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος, είτε σε αντιδράσεις που τους επιτρέπουν να μιμούνται παραπλήσιες ιδιότητες με κλασσικούς βιολογικούς παράγοντες.





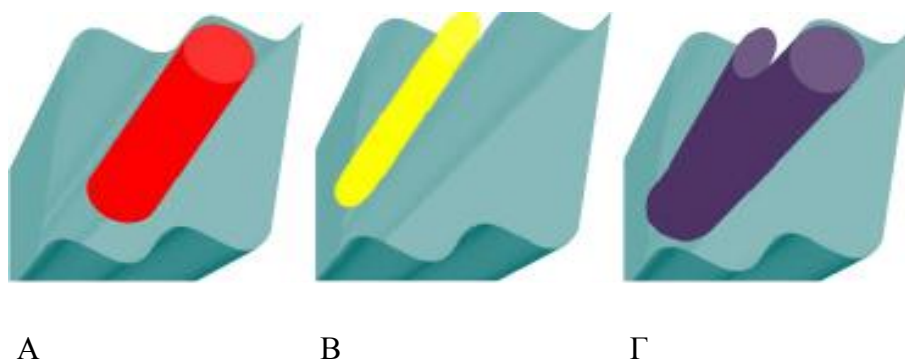
**Εικόνα 1.1 Οντογένεση και διαφοροποίηση B-κυττάρων.** Τα περισσότερα περιφερικά B-κύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών και αναφέρονται ως B<sub>2</sub>-κύτταρα. Ένας μικρός πληθυσμός B-κυττάρων, που είναι γνωστός ως B<sub>1</sub>-κύτταρα (εντοπίστηκαν αρχικά σε ποντίκια και πολύ πρόσφατα στον άνθρωπο), βρίσκονται κυρίως στην υπεζωκοτική και περιτοναϊκή κοιλότητα, αλλά και λιγότερο στον σπλήνα. Τα B<sub>1</sub>-κύτταρα εκφράζουν CD19, υψηλά επίπεδα CD5 και παράγουν χαμηλής συγγένειας φυσικά IgM πολυδραστικά αντισώματα, χωρίς τη βοήθεια των T-κυττάρων. Είναι προς το παρόν ασαφές αν τα B<sub>1</sub>-κύτταρα προκύπτουν από ένα μοναδικό προγονικό κύτταρο ή από κοινό προγονικό τόσο για τα B<sub>1</sub> όσο και για τα B<sub>2</sub>. Τα κύτταρα B<sub>2</sub> που σχηματίζονται στο μυελό των οστών και ανάπτυσσονται από προ-B κύτταρα, σε ανώριμα B κύτταρα τα οποία απελευθερώνονται στην περιφέρεια. Μετά τη συνάντηση με αντιγόνα, τα B-κύτταρα με τη βοήθεια T-κυττάρων, υποβάλλονται σε ανασυνδυασμό-μετάβαση τάξης και παραγωγή πολυδραστικών IgG, IgA και IgE (NAbs). Μπορεί να ακολουθήσει ωρίμανση συγγένειας, μια διαδικασία που περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σωματικής υπερμεταλλάξεως και πολλαπλασιασμού που καταλήγουν στην παραγωγή ειδικών αντισωμάτων υψηλής συγγένειας (26).

## 1.2 Δομικά χαρακτηριστικά των NAbs και ιδιότητες δέσμευσης αντιγόνων

Πολυδραστικά IgM-NAbs βρέθηκαν να αντιδρούν περισσότερο με πρωτεΐνες άλλων ειδών (xenogeneic), παρά με πρωτεΐνες του ίδιου ατόμου ή άλλων ατόμων του ίδιου είδους (allogeneic). Επομένως τα λεμφοκύτταρα, που φέρουν πολυδραστικά IgM-NAbs, και προφανώς και πολυδραστικά IgG-NAbs, επιστρατεύονται και ενεργοποιούνται περισσότερο παρουσία ξένων παρά εαυτών αντιγόνων. Η πολυδραστικότητα των NAbs αποτελεί ιδιότητα της μεταβλητής περιοχής των αντισωμάτων και δεν οφείλεται σε μη ειδική πρόσδεση μεταξύ μοριακών δομών, αφού τα NAbs παρουσιάζουν ξεχωριστό προφίλ αντίδρασης με διαφορετικά αντιγόνα και έχουν διαφορετικές σταθερές συγγένειας για κάθε αντιγόνο. Γενικά, θεωρείται πως η συγγένεια ενός πολυδραστικού NAb για τα διάφορα αντιγόνα μπορεί να διαφέρει ως και χίλιες φορές, με τη σταθερά διάστασης (Kd) να κυμαίνεται από  $10^{-4}$  έως  $5 \times 10^{-10}$  M, ενώ αυτή των μονοδραστικών να κυμαίνεται από  $10^{-8}$  έως  $5 \times 10^{-11}$  M (27). Γενικότερα, η θέση πρόσδεσης των αντιγόνων ορίζεται από έξι συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές (complementary determining regions, CDR) των αντισωμάτων. Στα πολυδραστικά αντισώματα, οι CDR περιοχές είναι πιο ευέλικτες, κυρίως το CDR3 της βαριάς αλυσίδας (H-CDR3) και μπορούν να υποστούν στερεοταξικές αλλαγές ώστε να δεσμεύουν διαφορετικά αντιγόνα. Οι περιοχές H-CDR3 των πολυδραστικών NAbs είναι συνήθως μακριές, γεγονός που συνεισφέρει στην ευελιξία της διαμόρφωσής τους στο χώρο, ενώ είναι και πλούσιες σε υδρόφιλα αμινοξέα (π.χ. λυσίνη, αργινίνη), ευνοώντας την αλληλεπίδρασή τους με διάφορα αρνητικά φορτισμένα αντιγόνα (1, 3). Επιπλέον, η ικανότητα δέσμευσης αντιγόνων στα πολυδραστικά αντισώματα είναι πιο ευαίσθητη στις αλλαγές της θερμοκρασίας και στην επίδραση αποδιατακτικών παραγόντων. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο παράτοπος των αντισωμάτων

αυτών εμφανίζει μεγαλύτερη πλαστικότητα από τον αντίστοιχο των μονοδραστικών αντισωμάτων. Πέραν της ευελιξίας των περιοχών CDR ως προς την ερμηνεία της πολυδραστικότητας, πρόσφατα έχει δειχθεί ότι η διαμόρφωση του παρατόπου ενός πολυδραστικού NAb επιτρέπει τη δέσμευση ανόμοιων επιτόπων σε διαφορετικές θέσεις στην περιοχή σύνδεσης του αντιγόνου. Εάν ισχύει αυτό, ένα πολυδραστικό αντίσωμα που έχει κατειλημμένες όλες, ή τις περισσότερες από τις θέσεις πρόσδεσης κατά την αντίδραση με ένα αντιγόνο, παρουσιάζοντας τους επιτόπους του στην κατάλληλη χωροταξική κατανομή, τότε στην πραγματικότητα θα αντιστοιχεί σε ένα αντίσωμα πολύ ειδικό έναντι του συγκεκριμένου αντιγόνου, δεδομένου ότι μπορεί να αναγνωρίζει την ακριβή τρισδιάστατη δομή του. Ωστόσο, το ίδιο αντίσωμα θα μπορούσε να θεωρηθεί ως «μη ειδικό», λόγω των ικανοτήτων του να δεσμεύει πολλά αντιγόνα στις διαφορετικές αυτές θέσεις που παρουσιάζονται στον παράτοπό του (**Εικόνα 1.2**) (1). Επομένως, αφού κάθε NAb παρουσιάζει ένα μοναδικό προφίλ πολυδραστικότητας, μπορεί να αναγνωρίζει διαφορετικά αντιγόνα με παρόμοιες τρισδιάστατες δομές.

Επιπλέον, η παρατήρηση σωματικών μεταλλάξεων που εμπλέκονται στην ωρίμανση συγγένειας του αντισώματος, είναι σε συμφωνία με την υπόθεση ότι ορισμένα πολυδραστικά B-κύτταρα, που παράγουν NAbs, πιθανώς να είναι πρόδρομα εκείνων που παράγουν μονοδραστικά NAbs.



**Εικόνα 1.2** Διαφορετικοί επίτοποι δεσμεύονται σε διαφορετικές θέσεις του ίδιου παράτοπου (1).

### 1.3 Βιολογικός ρόλος των NAbs

Τα τελευταία χρόνια έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά η παρουσία NAbs τόσο στον άνθρωπο, όσο και σε άλλα είδη οργανισμών που έχουν μελετηθεί (κουνέλια, μύες, επίμυες, διάφορα είδη ψαριών, κ.λπ.). Η παραπάνω παρατήρηση, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα NAbs στρέφονται έναντι σημαντικών και φυλογενετικά διατηρημένων αντιγόνων του οργανισμού, υποδεικνύει ότι διαδραματίζουν κάποιο σημαντικό ρόλο στη

φυσιολογική λειτουργία του ΑΣ και του οργανισμού γενικότερα. Στα NAbs έχουν αποδοθεί διάφορες βιολογικές λειτουργίες, συχνά αντιφατικές μεταξύ τους (**Πίνακας 1.3**)(**Εικόνα 1.3**).

### **1.3.1 Δράση έναντι παθογόνων παραγόντων**

Τα NAbs συμβάλλουν στην άμυνα έναντι βακτηρίων, ιών και άλλων παθογόνων παραγόντων. Σε ό,τι αφορά τις βακτηριακές και ιικές λοιμώξεις, τα NAbs αποτελούν ένα μέρος της φυσικής ανοσίας αλλά και διευκολύνουν την πρόσληψη, επεξεργασία και παρουσίαση του αντιγόνου με τη βοήθεια του συμπληρώματος (27). Πιο συγκεκριμένα φαίνεται να επιταχύνουν την ανοσιακή απόκριση έναντι ιών, όπως ο VSV (vesicular stomatitis virus) και ο ιός της γρίπης, καθώς και έναντι παθογόνων, όπως η *Listeria* (28). Απο μία σειρά πειραματικών δεδομένων φάνηκε ότι τα NAbs διευκολύνουν την πρόσληψη του αντιγόνου, αλλά και την αντιγονοπαρουσίαση από τα μακροφάγα στην περίπτωση ιικών λοιμώξεων (29). Τέλος, επηρεάζοντας την κατανομή των ιών αλλά και καθοδηγώντας τους στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, τα NAbs αφ' ενός προστατεύουν τους ιστούς-στόχους, αφ' ετέρου επιταχύνουν την ανοσιακή απόκριση.

### **1.3.2 Απομάκρυνση προϊόντων καταβολισμού**

Ένας από τους πρώτους ρόλους που προτάθηκαν για τα NAbs είναι η απομάκρυνση προϊόντων καταβολισμού, δηλαδή η πρόσδεσή τους σε μεταλλαγμένες ουσίες του εαυτού και η απομάκρυνσή τους από το σημείο παραγωγής τους. Πράγματι, ο P. Grabar το 1983 πρότεινε ένα φυσιολογικό ρόλο των NAbs, σαν μεταφορείς προϊόντων καταβολισμού του οργανισμού. Για παράδειγμα, η πρόσδεση αυτοαντισωμάτων σε εξωκυττάρια ινίδια κερατίνης αυξάνει την απομάκρυνση των αδιάλυτων ινιδίων κερατίνης μετά το θάνατο των κερατινοκυττάρων (3). Επιπλέον, η πρόσδεση NAbs τάξης M σε οξειδωμένη LDL (Low-Density Lipoprotein) εμποδίζει την εναπόθεσή της στις αθηρωματικές πλάκες και συνεπώς προστατεύει από την ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης (30). Ένας ακόμα ρόλος των NAbs είναι η απομάκρυνση των αποπτωτικών και των γερασμένων κυττάρων. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι με την πρόσδεση των NAbs (έναντι της ζώνης 3, μιας διαμεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης των ερυθροκυττάρων με ρόλο ανιοντοανταλλάκτη) σε γηρασμένα ερυθροκύτταρα, σε συνδυασμό με τα συστατικά του συμπληρώματος, διευκολύνεται η φαγοκυττάρωση των ερυθροκυττάρων από τα μονοκύτταρα (31). Σε κύτταρα που έχουν προγραμματιστεί να οδηγηθούν σε απόπτωση, υδρολύονται κάποια από τα συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την παραγωγή

φωσφορυλοχολίνης (PC), η οποία αναγνωρίζεται από NAb, κυρίως τάξεων IgM και IgG3, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος και την προσέλκυση μακροφάγων, τα οποία φαγοκυτταρώνουν τα αποπτωτικά κύτταρα (32).

**Πίνακας 1.3** Ενδεικτικές βιολογικές ιδιότητες των NAb και πιθανή παθογενετική δράση σε περίπτωση ανεπαρκούς ή ανεξέλεγκτου δικτύου των NAb (1)

Φυσιολογική επίδραση	Ακατάλληλη απόκριση-πιθανή παθογένεση
<b><u>Προστασία από:</u></b>	
<b>Βακτήρια</b>	Σήψη
<b>Ιούς</b>	Χρόνια Λοίμωξη
<b><u>Αντισώματα έναντι υποδοχέων:</u></b>	
<b>Αντι-TSHR</b>	Νόσος του Graves
<b>Αντι-opioid-R</b>	Μειωμένη αίσθηση του πόνου
<b><u>Άλλοι ομοιοστατικοί ρόλοι:</u></b>	
<b>Εκκαθάριση αποπτωτικών κύτταρων</b>	Αυτοάνοσα νοσήματα
<b>Αντι-καρκινική δράση</b>	Καρκινική μετάσταση

### **1.3.3 Ρόλος των NAb στην ανοσιακή ρύθμιση**

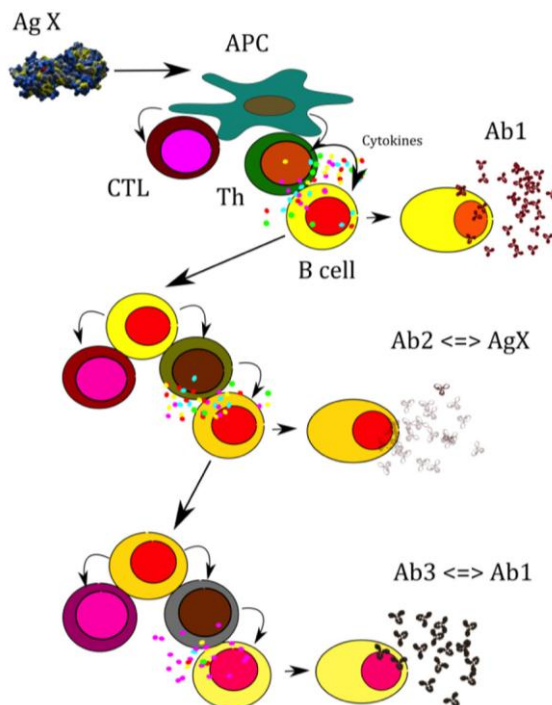
Πειραματικά δεδομένα φαίνεται να δείχνουν ότι τα NAb είναι πρόδρομοι των αντισωμάτων που παράγονται μετά από ανοσοποίηση με εξωγενή αντιγόνα, αλλά και των αυτοαντισωμάτων που χαρακτηρίζουν τα αυτοάνοσα νοσήματα. Υποστηρίζεται, δηλαδή, ότι η ανοσοποίηση με εξωγενές αντιγόνο προκαλεί μια σειρά γεγονότων, μεταξύ των οποίων σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια της βλαστικής σειράς που κωδικοποιούν την παραγωγή των NAb. Τα γεγονότα αυτά ξεκινούν από την αναγνώριση του εαυτού και ολοκληρώνονται με την αναγνώριση και την αντίδραση με τα εξωγενή αντιγόνα. Ενδεχομένως, μόλις ένα εξωγενές αντιγόνο εισέλθει στον οργανισμό, συνήθως με την παρουσία ενός ανοσοενισχυτικού, αναγνωρίζει και διεγείρει B-κύτταρα που φέρουν στην επιφάνειά τους πολυδραστικούς ανοσοϋποδοχείς, που αναγνωρίζουν τόσο εαυτά όσο και ξένα αντιγόνα. Η επιλογή των κλώνων από το αντιγόνο, με σωματική μετάλλαξη των V-γονιδίων, καταλήγει στη μετατροπή των NAb σε αντισώματα έναντι των εξωγενών αντιγόνων (13).

Σύμφωνα με τη θεωρία του «ιδιοτυπικού-αντιιδιοτυπικού δικτύου» που προτάθηκε από τον Jerne το 1974, κάθε αντίσωμα έχει στην περιοχή V μοναδικούς ιδιοτύπους, δηλαδή μια ομάδα αντιγονικών καθοριστών, τους ιδιότοπους (**Εικόνα 1.3.3.1**), που αναγνωρίζονται από άλλα αντισώματα και έτσι σχηματίζεται ένα «ιδιοτυπικό-αντιιδιοτυπικό δίκτυο». Ιδιότοποι που βρίσκονται στη θέση δέσμευσης του αντιγόνου μπορεί να καλύπτονται από αντι-ιδιοτυπικά αντισώματα, τα οποία εμποδίζουν την αναγνώριση του αντιγόνου από τα αντισώματα που φέρουν τους συγκεκριμένους ιδιότοπους (**Εικόνα 1.3.3**) (33). Διαταραχή της ισορροπίας του δικτύου με την εισαγωγή ενός αντιγόνου, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου αυτού. Αυτό συμβαίνει γιατί οι ιδιότοποι λειτουργούν ως «εσωτερικές εικόνες» των ενδογενών αντιγόνων αλλά και των ξένων, με αποτέλεσμα να υπάρχουν ήδη αντισώματα που αναγνωρίζουν το αντίστοιχο αντιγόνο και όταν αυτό εισάγεται στο ΑΣ να ενισχύεται η έκφραση των αντισωμάτων. Κατά κάπως ανάλογο τρόπο προτάθηκε από τους Σ. Αβραμέα και συνεργάτες ότι τα NAbs δημιουργούν ένα σταθερό πολύπλοκο δίκτυο ρύθμισης της ισορροπίας και της ομοιόστασης του ΑΣ και ίσως της ανοσολογικής ανοχής. Τα NAbs μπορούν να θεωρηθούν «αυτοϋποδοχείς», που είτε ελεύθεροι στην κυκλοφορία είτε δεσμευμένοι πάνω σε κυτταρικές μεμβράνες παίζουν ανοσορρυθμιστικό ρόλο, μέσω της αλληλοαναγνώρισής τους καθώς και μέσω αναγνώρισης αντιγόνων του εαυτού και του ξένου, και βρίσκονται είτε στην κυκλοφορία, είτε πάνω στην επιφάνεια κυττάρων του ΑΣ (34).

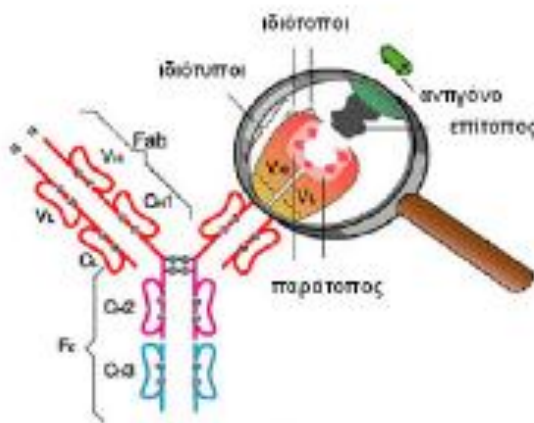
Επίσης, άλλος ένας τρόπος ρύθμισης του ΑΣ από τα NAbs έχει προταθεί μέσω της ρύθμισης των κυτταροκινών. Η ταυτοποίηση των NAbs που δεσμεύουν κυτταροκίνες ή τους υποδοχείς τους, αναδεικνύει την πιθανότητα τα κυκλοφορούντα αυτά αντισώματα να μετέχουν στη μεταφορά τους, να αυξάνουν το χρόνο ημιζωής τους και να ρυθμίζουν τη λειτουργία τους. Αλλά και αντίθετα όμως, αντισώματα που αναγνωρίζουν διάφορες κυτταροκίνες μπορεί να προσδέονται σε αυτές εμποδίζοντας την πρόσδεσή τους στους υποδοχείς κυτταροκινών. Μέσω αυτών των μηχανισμών περιορίζεται η ένταση της ανοσιακής απόκρισης που μπορεί να προκληθεί λόγω της περίσσειας κυτταροκινών (35).

Τα NAbs συμμετέχουν στη ρύθμιση των Β- και Τ-κυττάρων. Αναλυτικότερα, IgG-NAbs επηρεάζουν τον αριθμό των προγονικών Β-κυττάρων και των προ-Β-κυττάρων στο μυελό των οστών, υποδηλώνοντας έτσι έναν πιθανό αναδραστικό μηχανισμό με τον οποίο τα NAbs ρυθμίζουν την παραγωγή των κυτταρικών σειρών των Β λεμφοκυττάρων, μέρος του γενικού μηχανισμού διατήρησης της ομοιόστασης του ΑΣ (36). Ακόμη, τα NAbs αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων Τ-κυττάρων (CD8<sup>+</sup> και CD4<sup>+</sup>) μέσω της πρόσδεσής τους με το τμήμα F(ab')<sub>2</sub> στον υποδοχέα των Τ-κυττάρων (TCR) ή σε

άλλα μόρια, χωρίς να απαιτούν τη βοήθεια κάποιων ρυθμιστικών κυττάρων (37). Καθώς και ότι τα NAb και αντίστοιχα τα κύτταρα που τα παράγουν μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά και την παρουσίαση αντιγόνων προκειμένου για την ενεργοποίηση των T-κυττάρων.



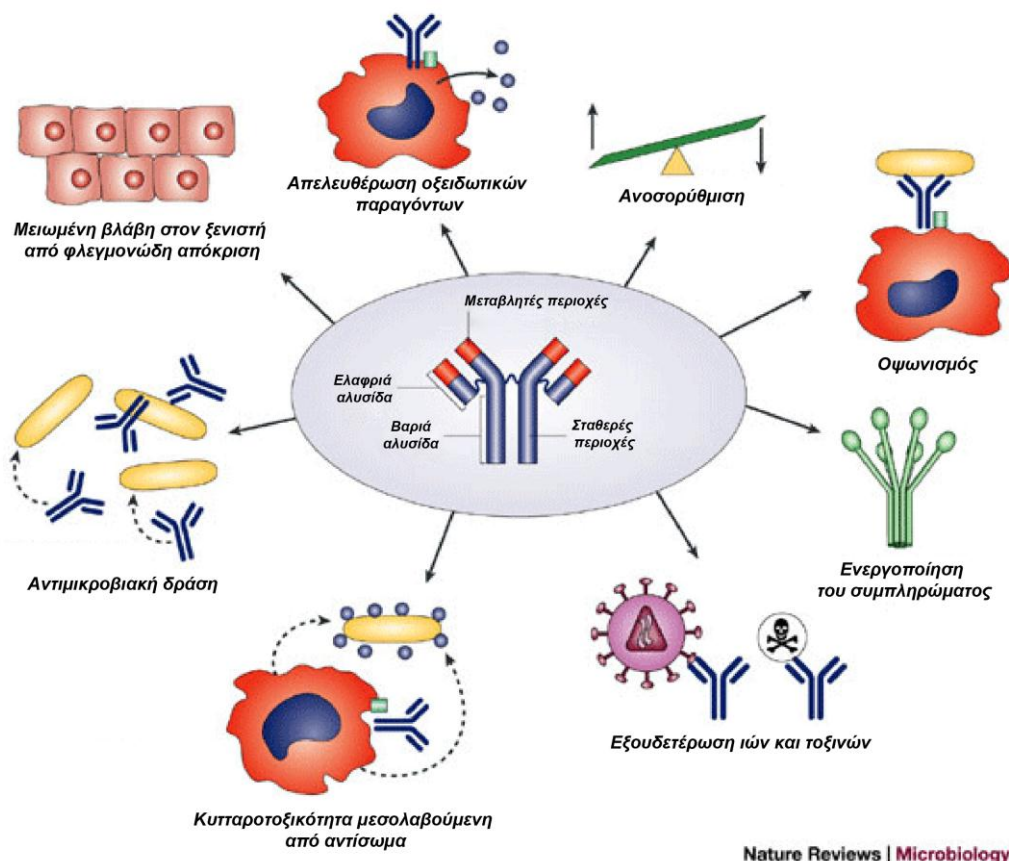
**Εικόνα 1.3.3** Κατά τη θεωρία του ιδιοτυπικού δικτύου, η απόκριση σε ένα αντιγόνο οδηγεί στην παραγωγή όχι μόνο των ειδικών για το αντιγόνο αντισωμάτων ( $Ab1$ ), αλλά και αντισωμάτων που αναγνωρίζουν το  $Ab1$ . Αυτό συμβαίνει γιατί η μοναδική δομή (ιδιότυπος) της θέσης δέσμευσης του αντιγόνου του  $Ab1$  επάγει την παραγωγή του  $Ab2$ , το οποίο μιμείται τη δομή του αντιγόνου. Τελικά ένας παρόμοιος μηχανισμός οδηγεί στην παραγωγή του  $Ab3$ . Τα  $Ab1$  και  $Ab3$  έχουν παρόμοιες ικανότητες δέσμευσης και ορισμένες φορές πανομοιότυπες αμινοξικές αλληλουχίες στη θέση σύνδεσης του αντιγόνου. Μια μοναδική δομή (ιδιότυπος) του  $Ab1$  μπορεί να διεγείρει το ιδιοτυπικό δίκτυο. Έτσι, το ΑΣ διαθέτει μέσω του δικτύου αυτού ένα μηχανισμό αυτορρύθμισης (38).



**Εικόνα 1.3.3.1** Λεπτομερής σχηματική απεικόνιση ενός μορίου αντισώματος και των ξεχωριστών χαρακτηριστικών του (39).

### 1.3.4 Άλλοι ρόλοι των NAb

Στα NAb έχουν αποδοθεί και άλλοι ρόλοι, όπως για τα NAb έναντι των υποδοχέων IgE που βρίσκονται σε βασεόφιλα και προκαλούν αποκοκκίωση και απελευθέρωση ισταμίνης, ανταγωνιζόμενα *in vitro* τις IgE (40). NAb τάξης IgG που αναγνωρίζουν τους οπιοειδείς υποδοχείς, συμμετέχουν στην ομοίωση του ΑΣ, έχοντας δράση όπως 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 ΑΣ που φέρουν τέτοιους υποδοχείς. Αυτό υποδηλώνει σχέση μεταξύ ΑΣ και περιφερικού νευρικού συστήματος που μεσολαβείται από αντισώματα (41). Επίσης, ορισμένα NAb είναι σε θέση να εκφράζουν ενζυμικές δράσεις (υδρόλυση πεπτιδίων), καθώς και να προωθούν την επαναμυελίνωση (36, 42-44).



**Εικόνα 1.3** Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών δράσης των NAb (45).

#### 1.4 NAbS και παθολογικές καταστάσεις

Τα NAbS είναι σημαντική συνιστώσα του φυσιολογικού ΑΣ και γι' αυτό το λόγο δεν μπορεί να θεωρηθεί ως χαρακτηριστικό παθολογικής ή φυσιολογικής κατάστασης. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι τίτλοι συγκεκριμένων αυτοαντισωμάτων σχετίζονται με την παρουσία και τη σοβαρότητα ενός αυτοάνοσου νοσήματος, ενώ σε άλλες περιπτώσεις δεν υπάρχει καθαρός συσχετισμός μεταξύ NAbS και αυτοάνοσου νοσήματος. Επιπλέον, οι τίτλοι και το πρότυπο της δραστηριότητας των NAbS μεταβάλλεται σε ασθένειες, που δεν σχετίζονται με το ΑΣ (8).

Άτομα που χαρακτηρίζονται από προδιάθεση σε αυτοάνοσα νοσήματα μπορεί να αναπτύξουν κάποιας μορφής ανοσοπαθολογία, συνήθως μετά από λοίμωξη από παθογόνο παράγοντα, ο οποίος προκαλεί έντονη διέγερση και ενεργοποίηση των κυττάρων που παράγουν NAbS. Τέτοια ερεθίσματα, συνήθως, τροποποιούν το παραπάνω δίκτυο και διαταράσσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ Β και Τ λεμφοκυττάρων, διευκολύνοντας την επαγωγή ανοσοπαθολογικής κατάστασης. Πράγματι, από μελέτες έχει δειχθεί ότι οι προσβολές από βακτήρια ή ιούς μπορεί να οδηγήσουν στην εγκαθίδρυση αυτοάνοσων καταστάσεων, στις οποίες συμμετέχουν και τα NAbS (1).

Σημαντικές μεταβολές του φυσιολογικού ρεπερτορίου και των ισοτύπων των NAbS έχουν αναφερθεί σε πολλά συστηματικά αλλά και οργανοειδικά αυτοάνοσα νοσήματα (π.χ. διαβήτη, αιμολυτική αναιμία και αυτοάνοση ηπατίτιδα). Σε άλλα, όπως η ρευματοειδής αρθρίτις, ο συστηματικός ερυθρεματώδης λύκος (ΣΕΛ) και η χρόνια λεμφογενής λευχαιμία δεν παρατηρείται χαρακτηριστική μεταβολή του φυσιολογικού ρεπερτορίου των NAbS, παρόλο που αυτά αλλά και τα κύτταρα που τα παράγουν φαίνεται να συμμετέχουν ενεργά στην παθογένεια των νοσημάτων (1).

Μια σειρά παρατηρήσεων υποδηλώνουν ότι σημαντικό μέρος των αυτοαντισωμάτων που εμφανίζονται σε παθολογικές καταστάσεις δεν διαφέρουν ποιοτικά από τα NAbS. Για παράδειγμα, τα περισσότερα αυτοαντισώματα που απαντώνται στον ορό ασθενών με ΣΕΛ είναι πολυειδικά, αντιδρούν δηλαδή με μονόκλωνο DNA (single-stranded DNA, ssDNA), δίκλωνο DNA (double-stranded DNA, dsDNA), υβρίδια DNA-RNA, πρωτεΐνες του κυτταρικού σκελετού, φωσφολιπίδια και απτένια. Επίσης, τα αυτοαντισώματα που ανευρίσκονται στο προϊόν έκλυσης νεφρικού ιστού ασθενών με νεφρίτιδα του λύκου, εμφανίζουν ιδιότητες παρόμοιες με εκείνες των NAbS. Η άποψη αυτή επιβεβαιώνεται και από τις παρατηρήσεις ότι οι ιδιότυποι των φυσικών και των «παθολογικών» αντισωμάτων παρουσιάζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις, ότι τα αντι-DNA αντισώματα σε ζωικά



πρότυπα του ΣΕΛ δεν εμφανίζουν προτίμηση σε ορισμένες γονιδιακές οικογένειες VH, καθώς και ότι τα αντι-DNA αντισώματα στον ΣΕΛ κωδικοποιούνται από γονίδια της βλαστικής σειράς, τα οποία δεν έχουν υποστεί πολλές μεταλλάξεις.

Τόσο ο εντοπισμός NAb στους ιστούς, που αποτελούν στόχους της αυτοάνοσης προσβολής, όσο και η παρουσία κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων με NAb, συνηγορούν για τη συμμετοχή τους στην παθογένεια, αν και ο ακριβής ρόλος τους παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστος.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, υπάρχουν δεδομένα που υποδηλώνουν ότι τα NAb τόσο σε πολυκλωνικό όσο και σε μονοκλωνικό επίπεδο μπορούν να παρέμβουν ευεργετικά ή ακόμη και να καταστείλουν την αυτοάνοση νόσο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση της ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης (intravenous immunoglobulin, IVIG) στη θεραπεία ασθενών με αυτοάνοσα και άλλα νοσήματα. Η IVIG είναι πλούσια σε NAb της τάξης IgG και τα θεραπευτικά αποτελέσματα από τη χορήγησή της αντανάκλουν τις βιολογικές δράσεις αυτών των αντισωμάτων. Σε πειραματικά μοντέλα *in vivo*, τα πολυδραστικά NAb, που απομονώθηκαν από IVIG, φαίνεται να προστατεύουν τον οργανισμό από την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων (1).

## **2. ΚΥΤΤΑΡΟΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ (CELL-PENETRATING ANTIBODIES CPAbs)**

### **2.1 Συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα**

#### **2.1.1 Ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ)**

Ο ΣΕΛ αποτελεί ένα πρότυπο συστηματικό αυτοάνοσο νόσημα. Οφείλεται στην παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι πρωτεϊνικών συστατικών του πυρήνα και στον επακόλουθο σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων τα οποία εναποτίθενται σε συγκεκριμένους ιστούς του οργανισμού προκαλώντας βλάβη. Ο σχηματισμός αυτοαντισωμάτων έναντι πρωτεϊνικών συστατικών του πυρήνα θεωρείται το πρωταρχικό αίτιο παθογένεσης στον ΣΕΛ. Τα αυτοαντισώματα αυτά ανευρίσκονται στον ορό των ασθενών, αποτελούν διαγνωστικό κριτήριο και σε ορισμένες περιπτώσεις είναι ενδεικτικά εγκατεστημένης ή επικείμενης προσβολής μείζονος οργάνου, όπως συμβαίνει για παράδειγμα με τα αντισώματα έναντι του δίκλωνου DNA (anti-dsDNA antibodies) η παρουσία των οποίων σηματοδοτεί την ύπαρξη νεφρικής προσβολής.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός που οδηγεί στη νόσο στοιχειοθετείται από την αναγνώριση των αυτοαντιγόνων από αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα, την ενεργοποίηση και διαφοροποίησή τους προς δραστικά κύτταρα (B-κύτταρα που παράγουν αυτοαντισώματα, αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα που παρέχουν σήματα διέγερσης στα B-κύτταρα και κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα) και τέλος την εναπόθεση στους ιστούς ανοσοσυμπλεγμάτων με κινητοποίηση μηχανισμών φλεγμονής που τελικά επιφέρουν ιστική βλάβη ή καταστροφή.

Η υπερδραστικότητα των B λεμφοκυττάρων αλλά και η B-λεμφοπενία αποτελούν τις πιο καλά μελετημένες εκδηλώσεις της ανοσολογικής απορρυθμίσεως στον ΣΕΛ. Στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΣΕΛ υπάρχει αυξημένος αριθμός αυτόματα ενεργοποιημένων B-κυττάρων τα οποία εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες όλων των υποτύπων. Τα κύτταρα αυτά παράγουν αυτοαντισώματα έναντι πληθώρας διαλυτών και κυτταρικών αυτοαντιγόνων. Τα πιο χαρακτηριστικά αλλά και πιο κοινά αυτοαντισώματα κατευθύνονται έναντι μακρομοριακών στοιχείων του κυτταρικού πυρήνα και είναι τα αντιπυρηνικά αντισώματα (antinuclear antibodies, ANA). Και ενώ το φάσμα των αυτοαντισωμάτων στον ΣΕΛ φαίνεται να είναι ανεξάντλητο, μόνο ένα μικρό ποσοστό αυτών συνεισφέρει αποδεδειγμένα στην πρόκληση ιστικής βλάβης. Ανάμεσα σε αυτά, τα αντισώματα έναντι DNA διπλής έλικας ενοχοποιούνται για την πρόκληση νεφρίτιδας ενώ τα αντισώματα έναντι των ερυθροκυττάρων ευθύνονται για τις κυτταροπενίες που ενίοτε εκδηλώνουν οι ασθενείς. Ανάλυση των υποπληθυσμών των B-κυττάρων σε ασθενείς με νεανικό ΣΕΛ κατέδειξε ότι τα αυτοδραστικά B- κύτταρα εμφανίζονται νωρίς κατά την οντογένεση της B-σειράς και ότι τα συνήθη σημεία ελέγχου της ανοσολογικής ανοχής παραβιάζονται (46).

Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν υπερενεργοποιημένο φαινότυπο και λειτουργία των μονοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων (DCs) στον ΣΕΛ (47). Παράγοντες που είναι παρόντες στον ορό ασθενών με ΣΕΛ όπως η IFN- $\alpha$ , CD40L, ελεύθερα νουκλεοσώματα και συμπλέγματα αυτοαντισωμάτων-DNA, επάγουν διαφοροποίηση και ενεργοποίηση φυσιολογικών DCs και διεγείρουν την παραγωγή κυτταροκινών από αυτά, συμπεριλαμβανομένης της IFN- $\alpha$  (48-50).

Διαταραχές στην απόπτωση ή/και στην κάθαρση αποπτωτικών σωματιδίων, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του ΣΕΛ (51). Τα μακροφάγα από ασθενείς με ΣΕΛ παρουσιάζουν ελαττώματα στην πρόσληψη αποπτωτικών σωματιδίων *in vitro* (52). Η ελαττωματική κάθαρση αποπτωτικών σωματιδίων τα οδηγεί σε δευτεροπαθή νέκρωση και τα νουκλεοσώματα που απελευθερώνονται επάγουν την παραγωγή κυτταροκινών από τα μακροφάγα και την ωρίμανση των DCs (53). Τα δενδριτικά κύτταρα

στο ΣΕΛ έχουν επίσης εμπλακεί στη διαταραγμένη, εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα, κάθαρση των αποπτωτικών σωματιδίων. Η διαφοροποίηση για παράδειγμα των DCs παρουσία χαμηλού του συστατικού C1q του συμπληρώματος οδηγεί στη δημιουργία κυττάρων που παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, εκφράζουν συνδιεγερτικά μόρια και υψηλή διεγερτική ικανότητα των T-λεμφοκυττάρων (54, 55).

## 2.2 Εισαγωγή στα CPAbs

Το καθιερωμένο δόγμα που υποστήριζε ότι τα αντισώματα μπορούν να αντιδρούν με τα αντιγόνα τους αποκλειστικά στον εξωκυττάριο χώρο καταρρίφθηκε μόλις έγινε γνωστό το 1978 ότι ένα αντίσωμα τάξης G ειδικό για τις ριβονουκλεοπρωτεΐνες (RNP) από ορό ασθενούς με μικτή νόσο του συνδετικού ιστού (ΜΝΣΙ) μπορεί να διεισδύσει *in vitro* στον πυρήνα ζωντανών ανθρώπινων περιφερικών μονοκύτταρων (56). Μερικά χρόνια αργότερα δείχθηκε διείσδυση αντι-RNP αντισωμάτων σε ζωντανά κερατινοκύτταρα ποντικού (57). Επιπλέον, αντιπυρηνικά αντισώματα, τα οποία περιέχονται σε ορούς ασθενών με ΣΕΛ, έχουν την ικανότητα να διεισδύουν σε ζωντανά επιθηλιακά κύτταρα *in vitro*. Η διείσδυση ανθρώπινων αντισωμάτων σε διαφορετικά ζώντα κύτταρα δεν είναι ένα φαινόμενο το οποίο περιορίζεται μόνο σε *in vitro* πειράματα. Αντι-Ro αντισώματα μπορούν να διεισδύουν σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα σε μοντέλο ξενομοσχεύματος σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια SCID. Ακόμα, στις βιοψίες δέρματος ενός μέρους ασθενών με ΣΕΛ ανιχνεύονται ενδοκυττάρια αντισώματα (58), ενώ αντι-νευρικά αντισώματα (anti-Hu) από ασθενείς με νευροπάθεια διεισδύουν σε κύτταρα νευρικού ιστού *in vivo* (59).

Μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για το dsDNA προερχόμενα από ποντίκια ((NZBxNZW)F1 και MRL/lpr) που εκδηλώνουν αυθόρμητα σύνδρομο λύκου που μοιάζει με την ανθρώπινη νόσο, έχουν παρόμοιες ιδιότητες (60, 61). Αυτά τα αντισώματα μπορούν και διεισδύουν τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ανθρώπου, ποντικού, πιθήκου και αρουραίου. Αντι-πυρηνισκικά αντισώματα επαγόμενα με υδράργυρο σε ποντίκια που εκδηλώνουν μια αυτοάνοση διαταραχή μπορούν να διεισδύουν *in vivo* σε κύτταρα του νεφρού και του ήπατος και *in vitro* σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες ποντικού. Anti-La και αντι-Sm μονοκλωνικά αντισώματα από ποντίκια MRL/lpr μπορούν να διεισδύουν σε ηπατοκύτταρα αρουραίου, νεφρικά κύτταρα χοίρου και επιδερμικά καρκινικά ανθρώπινα κύτταρα (62).

Αυτοαντισώματα έναντι ενδοκυτταρικών αντιγόνων είχαν ανιχνευτεί σε ορούς ασθενών που έπασχαν από διάφορες αυτοάνοσες νόσους και χρησίμευαν ως διαγνωστικοί δείκτες. Το 1978, παρατηρήθηκε από τον Alarcon-Segovia και συν. για πρώτη φορά πως ένα

αυτοαντίσωμα IgG έναντι πυρηνικής ριβονουκλεοπρωτεΐνης είχε την ικανότητα να εισέρχεται σε ζώντα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα και να αντιδρά με αντιγόνα του πυρήνα (56). Το γεγονός αυτό κατέρριπτε την τότε επικρατούσα θεωρία ότι τα αντισώματα αντιδρούσαν με αντιγόνα του εξωκυττάριου χώρου και κατόπιν εισέρχονταν ως σύμπλοκα εντός του κύτταρου, κυρίως μέσω του Fcγ-υποδοχέα. Έκτοτε, ένας μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων κατέδειξε την ικανότητα αρκετών αντισωμάτων να διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα.

*In vivo*, η χορήγηση μονοκλωνικών αντι-dsDNA αντισωμάτων σε φυσιολογικά μη αυτοάνοσα ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα τη διείσδυσή τους στον πυρήνα των κυττάρων διαφόρων οργάνων. Κάτι ανάλογο παρατηρήθηκε, και *in vitro* σε κυτταρικές σειρές που επώαστηκαν με αυτά τα αντισώματα, και δείχθηκε πως η διείσδυση ήταν συνδεδεμένη με τον παράτοπο (χρήση F(ab)<sub>2</sub>) αυτών των αντισωμάτων (23, 63).

### **2.2.1 Κύρια χαρακτηριστικά των CPAbs**

Τα CPAbs φαίνεται να έχουν κοινά χαρακτηριστικά με τα φυσικά αυτοαντισώματα. Αντιδρούν με ένα ευρύ φάσμα αυτοαντιγόνων όπως πρωτεΐνες του ορού, αντιγόνα της κυτταρικής μεμβράνης, του κυτταρικού σκελετού (μυοσίνη, ακτίνη) και του πυρήνα (DNA, ιστόνες), αλλά και με εξωγενή αντιγόνα όπως παθογόνους παράγοντες και απτένια (8, 64). Αναγνωρίζουν δηλαδή πολλούς διαφορετικούς αντιγονικούς επιτόπους κι επομένως χαρακτηρίζονται ως πολυδραστικά, ενώ έχουν συνήθως χαμηλή συγγένεια για κάθε ένα από αυτά τα αντιγόνα. Τα CPAbs έχουν ανιχνευθεί στον ορό ασθενών με ΣΕΛ και ποντικών που εμφανίζουν σύνδρομο αυθόρμητου λύκου (**Πίνακας 2.2.1.1**). Οι περισσότερες μελέτες έχουν γίνει με μονοκλωνικά αντισώματα που απομονώθηκαν από σπλήνες ποντικών MRL-lpr/lpr και (NZBxNZW) F1 που εμφανίζουν αυθόρμητο λύκο σε ηλικία 7-9 μηνών, και παράγουν αντισώματα που αντιδρούν ισχυρά με το dsDNA και σε μικρότερο βαθμό με άλλα αυτοαντιγόνα (**Πίνακας 2.2.1.2**). Όταν τα πολυδραστικά αυτά αντισώματα προστέθηκαν σε καλλιέργεια κυττάρων, παρατηρήθηκε ότι έχουν ικανότητα διείσδυσης στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα (23, 64, 65).

Τα διεισδυτικά αυτοαντισώματα, εκτός από το DNA, αναγνωρίζουν και άλλα πυρηνικά αυτοαντιγόνα (anti-nuclear antibodies, ANA), όπως, τα Sm (Smith antigen), Ro/SS-A, La/SS-B (62), DNA τοποϊσομεράση I (66), κεντρομερή, ριβονουκλεοπρωτεΐνη (56), ιστόνες καθώς και αντιγόνα του κυτταροσκελετού (ακτίνη, μυοσίνη, και τουμπουλίνη) (64). Πολλές αυτοάνοσες ασθένειες συνδέονται με την παρουσία αντισωμάτων εναντίον

των παραπάνω αντιγόνων, όπως η ΣΕΛ (αντι-dsDNA και αντι-Sm αντισώματα), το σκληρόδερμα (αντι-DNA-τοποϊσομεράση I και αντι-κεντρομερικά αντισώματα) και το σύνδρομο Sjogren (αντι-Ro/SS-A και αντι-La/SS-B αντισώματα). Μελέτες υποστηρίζουν ότι μόνο ANAs με διασταυρούμενη δραστηριότητα με dsDNA (και όχι μονοδραστικά) έχουν την ικανότητα διείσδυσης στον πυρήνα ζωντανών κυττάρων, καθιστώντας την πολυδραστικότητα ένα ουσιώδες στοιχείο της δράσης των διεισδυτικών αυτοαντισωμάτων (62).

Η ικανότητα διείσδυσης εξαρτάται από το είδος των κυττάρων π.χ. επιθηλιακά, νευρικά, μυϊκά κ.α., καθώς και από το στάδιο διαφοροποίησης και ενεργοποίησής τους. Πράγματι, έχει δοκιμαστεί η διεισδυτική ικανότητα αντισωμάτων σε μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών σειρών, τόσο επιθηλιακών προσκολλητικών σειρών (HeLa, 3T3, Hep2, πρωτογενείς επιθηλιακές κυτταρικές καλλιέργειες), (64) όσο και μη (θυμοκύτταρα ποντικού, ανθρώπινα T-κύτταρα και περιφερειακά μονοκύτταρα (60), μακροφάγα (67), με τα ποσοστά διείσδυσης να διαφέρουν μεταξύ των κυτταρικών σειρών. Επίσης, έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση των κυττάρων ή η έκθεσή τους σε λεμφοκίνες ή αυξητικούς παράγοντες μπορεί να αυξήσει την επιφανειακή έκφραση ενός αντιγόνου προάγοντας τη διείσδυση αντισωμάτων με ειδικότητα γι' αυτό (68) (βλ. Μηχανισμοί Διείσδυσης). Παράλληλα, κύτταρα που βρίσκονται σε φάση διαίρεσης είναι περισσότερο ευάλωτα στη διείσδυση, αφού έχει δειχθεί να επηρεάζεται από το στάδιο ανάπτυξης των κυττάρων (69).

Από την άλλη πλευρά, η διείσδυση των αντισωμάτων δεν παρατηρείται μόνο σε κυτταρικές σειρές, αλλά και *in vivo*, σε ασθενείς και πειραματόζωα. Για παράδειγμα, έχουν βρεθεί αντισώματα στον πυρήνα ασθενών με μικτή νόσο του συνδετικού ιστού, που χαρακτηρίζονται από υψηλούς τίτλους αντι-RNP AAbs, καθώς και αντιπυρηνικά αντισώματα στον πυρηνίσκο ηπατικών και νεφρικών κυττάρων ποντικών με συστηματική νόσο επαγόμενη από υδράργυρο (**Πίνακας 2.2.1.1**) (24).

**Πίνακας 2.2.1.1** Τα πρώτα διεισδυτικά αντισώματα που ανιχνεύθηκαν στον ορό (πολυκλωνικά) είτε ασθενών με αυτοάνοση νόσο είτε στο πειραματικό μοντέλο της νόσου.

Έτος	Συγγραφείς	Ισότυπος	Πειραματικό Μοντέλο	Ανθρώπινη Νόσος	Ειδικότητα
1978	Alarcon-Segovia	IgG	-	ΜΝΣΙ	Αντι-RNP
1982	Okudaira	IgG	-	-	Αντι-λεμφοκυτταρικά (ALA)
1988	Fabian	IgG	Κινητικοί νευρώνες αρουραίων	-	Αντι-συναπτοσωματικά
1991	Ma	IgG	-	Ρευματικά Νοσήματα	Αντι-RNP, Ro(SS-A)& La(SS-B)
1993	Golan	IgG	-	ΣΕΛ	ANA
1993	Csernok	IgG	-	νόσο Wegener, αγγειίτιδα και σήψη	cANCA αντι-προτεϊνάσης 3 (PR3)
1996	Herrera	IgG	BALB/c mice	-	Αντι-Ro
1996	Deng	IgG	-	ΜΝΣΙ και ΣΕΛ	αντι-νουκλεολίνης (nucleolin)
1997	Adamus	IgG	Χορήγηση ρικοβερίνης σε ποντικούς	Καρκίνο που σχετίζεται με αμφιβληστροειδοπάθεια	Αντι-ρικοβερίνης (Anti-recoverin)
1997	Morris Reichlin	IgG	-	ΣΕΛ & Σύνδρομο Sjörgen's	Αντι-P
1998	Malmborg	IgA	-	Πρωτογενείς χολική κίρρωση	Αντι-μιτοχονδριακά
1999	Ritz	IgM	-	Απομυελίνωση από αντι-MAG	Αντι-MAG γλυκοπρωτεΐνη μυελίνη
1999	Manuchehr Abedi-Valugardi	IgG1	Χορήγηση υδραργύρου σε ποντικούς A.SW(H-2s)	ΣΕΛ	Αντι-πυρηνισικά (ANoIA)

**Πίνακας 2.2.1.2** Μονοκλωνικά CPAbs που απομονώθηκαν από πειραματικά μοντέλα του ΣΕΑ

Έτος	Συγγραφείς	Μονοκλωνικά Αντισώματα	Ισότυπος	Φυλή Ποντικού	Ειδικότητα
1992	Vlahakos	H7, H72, H9	IgG2a	MRL-lpr/lpr	Αντι-DNA
1996	Weisbart	3E10, 5C6, 4H2	IgG2a	MRL-lpr/lpr	Αντι-dsDNA
1998	Avrameas	F4.1	IgG2a	BW	Αντι-DNA
1998	Madaio	H7, H72, H9	IgG1&IgG2a	MRL-lpr-lpr	Αντι-DNA
1998	Weisbart	μεταλλαγμένο 3E10 VH31Asn, τμήμα Fab του 3E10 VH31Asn	IgG2a	MRL-lpr/lpr	Αντι-dsDNA
2000	Deng	mAb 21(IgG2a), 5B5(IgA)	IgG2a,IgA	MRL-lpr/lpr	Αντι-La, Αντι-Sm & dsDNA
2001	Avrameas	F4.1,J20.8,F14.6	IgG2a	BW	Αντι-DNA
2001	Seddiki	F4.1,J20.8,F14.6, H9.3	IgG2a	BW	Αντι-DNA
2003	Weisbart	3E10	IgG2a	MRL-lpr/lpr	Αντι-dsDNA
2005	Madaio	H7	IgG2a	MRL-lpr/lpr	Αντι-DNA
2006	Ruiz-Arguelles	F4.1	IgG2a	BW	Αντι-DNA
2007	Eun-Jung Lee	G1-5	IgG	MRL-lpr/lpr	Αντι-dsDNA
2008	Song	9D7	IgG2b	MRL-lpr/lpr	Αντι-dsDNA
2009	Jang	3D8 scFv	IgG2a/k	MRL-lpr/lpr	Αντι-DNA

Η μοριακή ανάλυση των CPAbs έδειξε ότι οι υπερμεταβλητές περιοχές CDR2 και CDR3 των βαριών αλυσίδων τους έχουν υψηλή αμινοξική ομολογία και φέρουν σε μεγάλο ποσοστό θετικά φορτισμένα αμινοξέα, όπως αργινίνες (R) και λυσίνες (K), με χαρακτηριστικά μοτίβα που προσομοιάζουν εκείνο του σήματος πυρηνικού εντοπισμού RKK (NLS, Nuclear localization Signal) (Εικόνα 2.2.1.3) (23, 64). Επιπλέον, η ανάλυση των V<sub>H</sub> γονιδίων έδειξε ότι τα CPAbs κωδικοποιούνται από γονίδια της βλαστικής σειράς, με ελάχιστες, ή καθόλου, μεταλλάξεις (germ-line encoded) ή ανασυνδυασμούς, που οδηγούν στην ωρίμανση της ειδικότητάς τους (62). Τέλος, φαίνεται ότι τα CPAbs έχουν συγκεκριμένη τριτοταγή δομή, η οποία δεν συναντάται στα μη διεισδυτικά αντισώματα. Τα θετικά φορτία των αμινοξέων που βρίσκονται στις υπερμεταβλητές περιοχές αντιδρώντας με τα αρνητικά φορτία που υπάρχουν σε όλες τις κυτταρικές επιφάνειες φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διείσδυση των αντισωμάτων (70).

VAYYISRGGVST SDTVKGRFTRQKYNKRA **F4.1**

AYISRGGGIF QDISKGRFTREKYGKRGMDY **J20.8**

AISRGGVYS LDVKRTARATWDWFAY **F14.6**

**Εικόνα 2.2.1.3** Οι περιοχές CDR2 και CDR3 τριών CPAbs, προερχόμενων από τη βιβλιογραφία.

### 2.3 Μηχανισμοί διείσδυσης των CPAbs

Η πρώτη αναφορά σχετικά με μηχανισμό διείσδυσης αυτοαντισωμάτων αφορούσε αντι-RNP αντισώματα της τάξης IgG τα οποία μπορούσαν να διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα με υποδοχείς που αναγνωρίζουν το Fc τμήμα των IgG (FcγR) και στη συνέχεια να εισέρχονται στον πυρήνα. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι αυτά τα αντισώματα μπορούν να εισέρχονται και σε T-κύτταρα που φέρουν τον FcγR (Tγ-κύτταρα) υποδοχέα και να προκαλούν την εξάλειψή τους και την κατάργηση της κατασταλτικής τους λειτουργίας (71).

Οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούν τα CPAbs για να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα και τελικά να καταλήξουν στον πυρήνα δεν έχουν πλήρως διερευνηθεί. Η μεσολάβηση των Fc-υποδοχέων είναι ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς διείσδυσης, όμως οι περισσότερες μελέτες δείχνουν την εμπλοκή κυρίως του τμήματος Fab των αντισωμάτων (24, 65). Αυτό που χαρακτηρίζει τα τμήματα Fab των CPAbs όπως και των φυσικών αντισωμάτων, είναι ότι αναγνωρίζουν πολλά διαφορετικά αντιγόνα, είναι δηλαδή πολυδραστικά. Αυτή η ιδιότητα τους επιτρέπει ίσως να αναγνωρίζουν περισσότερες από μία δομές στην επιφάνεια των κυττάρων και να διευκολύνεται έτσι η κυτταρική τους διείσδυση. Πράγματι, διάφορες πρωτεΐνες έχουν περιγραφεί ως μεμβρανικοί στόχοι-υποδοχείς των διεισδυτικών αντισωμάτων. Οι ριβοσωμικές Ρ-πρωτεΐνες (72, 73), η μυοσίνη Ι σε ηπατικά και η α-ακτινίνη σε μεσαγγειακά κύτταρα (74), η θειική ηπαράνη (75, 76), το κολλαγόνο τύπου IV (77), η ινονεκτίνη (78), οι ιστόνες και τα νουκλεοσώματα (79) είναι κάποιες από αυτές. Πιθανή είναι επίσης η πρόσδεση των αντισωμάτων σε αντιγονικές δομές της μεμβράνης που μοιάζουν με αυτές του DNA, με αποτέλεσμα τη διευκόλυνση εισόδου τους στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον (80).

Εναλλακτικά, σε ορισμένες περιπτώσεις, η γλυκοζυλίωση των μεταβλητών περιοχών των βαριών και ελαφριών αλυσίδων του αντισώματος, θα μπορούσε να συμβάλλει στη μεταφορά του στον πυρήνα, με τα μόρια της γλυκόζης να λειτουργούν ως σήματα



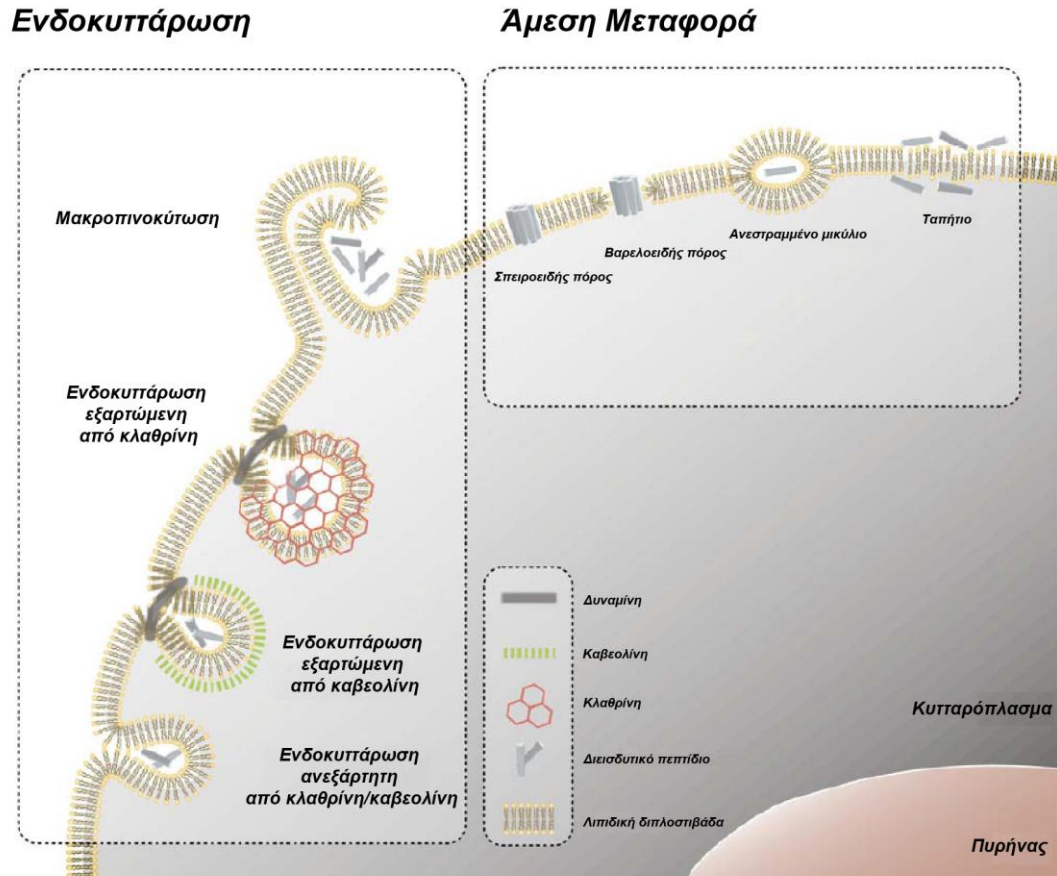
πυρηνικής μεταφοράς (65). Σ' αυτή την περίπτωση επειδή ούτε η πρωτοτοταγής δομή ούτε και η διαμόρφωση των βασικών αμινοξέων μπορεί να επάγει από μόνη της τη μεταφορά στον πυρήνα προτάθηκε ένας άλλος μηχανισμός. Σύμφωνα με αυτόν, η μεταφορά στον πυρήνα ξεκινά με την δέσμευση στην κυτταρική μεμβράνη ή με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που προστίθενται στο αντίσωμα καθώς αυτό διασχίζει το σύστημα Golgi για έκκριση (65).

Βιβλιογραφικά, αναφέρεται επίσης η ελεύθερη μεταφορά των αντισωμάτων διαμέσου του κυτταροπλάσματος με τη βοήθεια συνοδών πρωτεϊνών, όπως η κλαθρίνη (81, 82) και η ασβεστιοδικτίνη (calreticulin: calcium binding protein of endoplasmic reticulum) (83). Αντισώματα έναντι ασβεστιοδικτίνης εμποδίζουν τα αντι-dsDNA αντισώματα να προσδεθούν στην κυτταρική μεμβράνη και συνεπώς, να μεταφερθούν στο εσωτερικό του κυττάρου (83).

Πρόσφατες μελέτες πάνω στους μηχανισμούς διείσδυσης των αυτοαντισωμάτων έγιναν και για μονοκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν τα ενδοκυτταρικά αντιγόνα Sm και La. Αρκετοί παράγοντες που σχετίζονται με την ειδικότητα αυτών των αντισωμάτων, βρέθηκε, ότι μπορεί να επηρεάζουν την ενδοκυτταρική τους διείσδυση. Ένας άλλος πιθανός στόχος των CPAbs είναι η λαμινίνη, που αποτελεί κύριο συστατικό των βασικών μεμβρανών και η οποία έχει δειχθεί ότι αναγνωρίζεται από ορισμένα παθογονικά αντι-La αντισώματα που φαίνεται να αναγνωρίζουν τόσο το La όσο και snRNP-αντιγόνα που μετατίθενται στην κυτταρική επιφάνεια, όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε ορισμένους παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία. Παρατηρήθηκε ένας πολύ γρήγορος ρυθμός εισόδου στα κύτταρα αυτών των αντισωμάτων ανεξάρτητος από τη θερμοκρασία, που υποδηλώνει ότι ο χρησιμοποιούμενος μηχανισμός δεν ακολουθεί τους κλασσικούς κανόνες της ενδοκυττάρωσης μέσω υποδοχέων. Σε αντιστοιχία με το τελευταίο είναι και η απουσία συνεντοπισμού αντισωμάτων με κυστίδια. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει και η ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας των CDR3 περιοχών, από την οποία προκύπτει ότι αυτά τα μονοκλωνικά αντισώματα φέρουν στην CDR3 περιοχή της βαριάς αλυσίδας τους δύο κατάλοιπα αργινίνης και επίσης μερικά από αυτά και ιστιδίνη, ένα ακόμη θετικά φορτισμένο αμινοξύ, που όλα αυτά συνεισφέρουν στη δημιουργία ενός αρκετά μεγάλου θετικού φορτίου. Αντίθετα, τα μη διεισδυτικά αντισώματα δεν έφεραν αυτά τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα, με αποτέλεσμα το συνολικό φορτίο της H-CDR3 να είναι λιγότερο θετικό (62).

Μελέτες σε πεπτίδια, καταδεικνύουν την ύπαρξη πολλών πιθανών μηχανισμών διείσδυσης, οι οποίοι υπάγονται σε δυο κατηγορίες: την εξαρτώμενη από ενέργεια

μεταφορά μέσω ενδοκυττάρωσης και την ανεξάρτητη από ενέργεια, άμεση μεταφορά διαμέσου της λιπιδικής διπλοστιβάδας (**Εικόνα 2.3**). Όσον αφορά στην ενδοκυττάρωση, έχουν περιγραφεί μηχανισμοί μακροπinoκύττωσης, ενδοκυττάρωσης μέσω κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη και μέσω μικροκυστιδίων (caveoli) (84). Οι μελέτες με ολόκληρα αντισώματα δείχνουν επίσης ποικιλία εμπλεκόμενων μηχανισμών, όπως παραπάνω. Ωστόσο, φαίνεται ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η διείσδυση επηρεάζεται και από τη θερμοκρασία (η μείωση της θερμοκρασίας συνεπάγεται και μείωση της διείσδυσης). Γεγονός που συμβαίνει εξαιτίας της μείωσης του κυτταρικού μεταβολισμού, διαπίστωση που υπογραμμίζει την πιθανή εξάρτηση ορισμένων μηχανισμών διείσδυσης με το μεταβολισμό του κυττάρου, δηλαδή απαίτηση δαπάνης ATP (85). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως η μυοσίνη βοηθά στη μεταφορά των αντισωμάτων μέσω μικροκυστιδίων (**Πίνακας 2.3**) (**Εικόνα 2.3**), κατόπιν τα αντισώματα διερχόμενα του κυτταροπλάσματος καταλήγουν στον πυρήνα (μέσω πυρηνικών πόρων), στον οποίο καθοδηγούνται μέσω των θετικά φορτισμένων αμινοξέων στη CDR3 περιοχή, τα οποία λειτουργούν σαν σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) (86). Κάποιες μελέτες δείχνουν πως τα αντισώματα μεταφέρονται μέσω κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη και έπειτα απελευθερώνονται, είτε μέσω του pH, είτε μέσω λύσης του πinoσώματος. Δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί εάν αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι υπάρχουν διαφορετικά στάδια κατά την διακυτταροπλασματική μεταφορά των αντι-dsDNA αντισωμάτων στον πυρήνα ή ότι υπάρχουν διαφορετικά μονοπάτια, που μπορούν να ακολουθήσουν τα αντισώματα αυτά για την μεταφορά τους διαμέσου του κυτταροπλάσματος. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν πως η είσοδος και η μεταφορά γίνεται με τη βοήθεια κάποιων μορίων που λειτουργούν ως συνοδοί, όπως η μυοσίνη 1, τα αντι-Ro/La αυτοαντισώματα, που μεταφέρουν άλλα αυτοαντισώματα στον πυρήνα, ή μεταφορείς της οικογένειας διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ABC (24). Μελέτες υποδεικνύουν ότι μέλη της οικογένειας αντλιών ABC, ή άλλοι παρόμοιοι μεταφορείς, είναι πιθανό να εμπλέκονται στην είσοδο του αντισώματος και στη μεταφορά του, δεδομένου ότι πολλοί ανταγωνιστές καναλιών  $Ca^{++}$  προκαλούν την ενδοκυτταρική συσσώρευση των αντι-dsDNA αντισωμάτων (24).



**Εικόνα 2.3** Μηχανισμοί μεταφοράς πεπτιδίων CPPs δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης: A) ενδοκυττάρωση, B) άμεση μεταφορά.

**Πίνακας 2.3** Προτεινόμενοι βιβλιογραφικά μηχανισμοί διείσδυσης των CPABs.

Έτος	Συγγραφείς	Αντισώματα	Εξαρτώμενη Ενδοκυττάρωσης	Ανεξάρτητη Ενδοκυττάρωσης
1978	Alarcon-Segovia	<b>Πολυκλωνικά</b>	Μέσω υποδοχέων- FcT	-
1982	Okudaira	<b>Πολυκλωνικά</b>	Εγκόλπωση της κυτταρικής μεμβράνης και επακόλουθη ενδοκυττάρωση	-
1988	Fabian	<b>Πολυκλωνικά</b>	‘προσρόφησης’ ενδοκυττάρωση	-
1998	Avrameas	F4.1(μονοκλωνικό)	Ενεργειακά εξαρτώμενη	-
2001	Avrameas	F4.1,J20.8,F14.6 (μονοκλωνικά)	Μέσω υποδοχέων-DNA	-
2001	Seddiki	F4.1,J20.8,F14.6,H9.3 (μονοκλωνικά)	Μέσω υποδοχέα- Καλρετικουλίνη	-
1991	Ma	<b>Πολυκλωνικά</b>	μέσω υποδοχέων-Fc	-
1992	Vlahakos	H7, H72, and H9 (μονοκλωνικά)	Ενεργειακά εξαρτώμενη	-
1993	Golan	<b>Πολυκλωνικά</b>	Μέσω υποδοχέων	-
1996	Weisbart	3E10, 5C6, 4H2 (μονοκλωνικά)	Μέσω πρωτεΐνης HP8/HEVIN του ενδοκυττάρου πλέγματος και μέσω μηχανισμού που εμπλέκει το DNA.	-
1997	Morris Reichlin	<b>Πολυκλωνικά</b>	Μέσω μηχανισμού που εμπλέκει το DNA	-
1998	Madaio	H7, H72, H9 (μονοκλωνικά)	Μέσω υποδοχέα μυοσίνης-1	-
1998	Weisbart	mAb 3E10 VH31Asn mutant, Fab fragments of mutant	Μέσω μηχανισμού που εμπλέκει το DNA	-
1999	Manuchehr Abedi-Valugerdi	<b>Πολυκλωνικά</b>	Ενεργειακά εξαρτώμενη	-
2000	Deng S.	mAb 21(IgG2a),5B5(IgA)	-	Ενεργειακά ανεξάρτητη
2003	Weisbart	3E10 (μονοκλωνικό)	Μυοσίνη-IIb βοηθά τη μεταφορά των αντισωμάτων	-
2005	Madaio	H7 (μονοκλωνικό)	Μυοσίνη-1 βοηθά τη μεταφορά των αντισωμάτων μέσω μικροκυστιδίων	-
2006	Ruiz-Arguelles	F4.1 (μονοκλωνικό)	Ενεργειακά εξαρτώμενη	-
2007	Eun-Jung Lee	G1-5 (μονοκλωνικό)	Ενεργειακά εξαρτώμενη	-
2008	Song YC	9D7 (μονοκλωνικό)	-	Ενεργειακά ανεξάρτητη
2009	Jang	3D8 scFv (μονοκλωνικό)	μέσω μικροκυστιδίων	

## 2.4 Επίδραση των CPAbs στη λειτουργία του κυττάρου

Μελέτες έδειξαν τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* ότι τα διεισδυτικά αντισώματα μπορούν να επηρεάσουν διάφορες ενδοκυττάριας λειτουργίες (**Πίνακας 2.3**) και να συμμετέχουν στην ανάπτυξη αυτοάνοσων ασθενειών, όπως ο ΣΕΛ (87). Τα αυτοαντισώματα αυτά κατευθύνονται συνήθως έναντι πρωτεϊνών που παίζουν σημαντικό ρόλο σε μια σειρά από κυτταρικές λειτουργίες, όπως η μεταγραφή, η μετάφραση και το μάτισμα (**Εικόνα 2.4**) (67, 68).

### 2.4.1 CPAbs και επαγωγή απόπτωσης

Βιβλιογραφικά, η διείσδυση αυτοαντισωμάτων σε ζώντα κύτταρα προκαλεί σε αρκετές περιπτώσεις βλάβη στα κύτταρα και στους ιστούς. Ο παθογενετικός ρόλος των διεισδυτικών αυτοαντισωμάτων έχει επιβεβαιωθεί *in vivo* από την παρουσία ανοσοσφαιρινών στον πυρήνα ζώντων επιδερμικών κυττάρων σε βιοψίες δέρματος ατόμων με ασθένειες του συνδετικού ιστού, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από υψηλό ποσοστό IgG αντισωμάτων έναντι ριβονουκλεοπρωτεΐνης στον ορό τους (68, 88). Έχει παρατηρηθεί ότι διείσδυση αντι-dsDNA αντισωμάτων σε ποδοκύτταρα του νεφρικού σπειράματος σε ποντικούς προκαλεί πρωτεϊνουρία (85). Επίσης, η διείσδυση αυτοαντισωμάτων, έναντι του φορέα ADP/ATP, σε κύτταρα του μυοκαρδίου έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της διαδικασίας της φωσφορυλίωσης στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια, (89). Παρομοίως συσσώρευση αντι-πυρηνισκικών αυτοαντισωμάτων στους πυρηνίσκους νεφρικών και ηπατικών κυττάρων έχει παρατηρηθεί στην επαγόμενη από υδράργυρο συστηματική ασθένεια ποντικών γενοτύπου H-2s (90). Τέλος, η ενδοφλέβια χορήγηση διάφορων αντι-πυρηνικών αντισωμάτων σε εγκυμονούντα ποντίκια έχει δειχθεί ότι οδηγεί σε εμβρυϊκή υπανάπτυξη ή ενδομητριάκο θάνατο [Garza-Elizondo και συν, μη δημοσιευμένες παρατηρήσεις].

Παράλληλα, έχει δειχθεί, ότι η διείσδυση των αυτοαντισωμάτων *in vitro*, σε διάφορες κυτταρικές σειρές προκαλεί συχνά, πρόωρη έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας. Αυτοαντισώματα αντι-dsDNA που διεισδύουν σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα ή πρωτογενείς φλοιικούς νευρώνες προκαλούν σε μεγάλο ποσοστό απόπτωση των κυττάρων αυτών (85, 91). Αντισώματα έναντι του πυρηνικού αντιγόνου Hu, που βρίσκονται συνήθως στον ορό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, διεισδύουν σε νευρώνες και πιθανόν έχουν ως αποτέλεσμα την παρανεοπλαστική νευροπάθεια των ασθενών αυτών (59). Επιπλέον, αντισώματα είναι ικανά να διεισδύουν στα διπολικά κύτταρα και στους φωτοϋποδοχείς

του αμφιβληστροειδούς χιτώνα προκαλώντας απόπτωση και επακόλουθη βλάβη του αμφιβληστροειδούς χωρίς να παρατηρείται τοπική φλεγμονή (92). Γενικότερα, αυτοαντισώματα έναντι διαφόρων αυτοαντιγόνων του νευρικού συστήματος, φαίνεται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, μέσω της διείσδυσης και πρόκλησης απόπτωσης (93). Με βάση τα παραπάνω διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η απόπτωση μπορεί να αποτελεί ένα μηχανισμό παρουσίασης αυτοαντιγόνων, δεδομένου ότι τα αποπτωτικά σωμάτια, ως υπολείμματα του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, περιλαμβάνουν ομάδες αντιγόνων, που έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση αυτοάνοσων φαινομένων. Επιπλέον η ελαττωματική φαγοκύτωση των αποπτωτικών κυττάρων, έχει προταθεί ως ένας επιπρόσθετος μηχανισμός, ο οποίος καλείται να εξηγήσει την επαγωγή αυτοαντισωμάτων σε συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα (24).

Η ενεργοποίηση της αποπτωτικής διαδικασίας γίνεται μέσω διαφόρων μηχανισμών, εξαρτώμενων κυρίως από την αντιγονική εξειδίκευση των αντισωμάτων αλλά και από το στάδιο ενεργοποίησης των κυττάρων-στόχων. Συγκεκριμένα, αντισώματα εναντίον της συνοδού πρωτεΐνης hsp27 (heat shock protein 27), που βρίσκονται στον ορό ασθενών με γλαύκωμα, διεισδύουν σε νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς και προκαλούν τον αποπτωτικό θάνατό τους μέσω της παρεμπόδισης της hsp27 η οποία σταθεροποιεί την ακτίνη του κυτταροσκελετού (94). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι τα αυτοαντισώματα από την στιγμή που εισέρχονται στα κύτταρα μπορούν να επάγουν διακριτά προ-αποπτωτικά μονοπάτια, ανάλογα με την ειδικότητά τους ως προς το αντιγόνο. Άλλες μελέτες επίσης υποστηρίζουν ότι αντι-dsDNA αντισώματα με ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα μπορεί να επάγουν απόπτωση μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με το DNA, δεδομένου ότι αναγνωρίζουν συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (24).

Όσον αφορά στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, έχουν ταυτοποιηθεί αντισώματα τάξεως IgG έναντι U1snRNP που εισέρχονται σε λεμφοκύτταρα και εμποδίζουν την πρόοδο του κύκλου στη φάση G0/G1 οδηγώντας σε απόπτωση (69, 88, 91). Άλλα αντισώματα που αναγνωρίζουν την κασπάση-3 προκαλούν ενεργοποίηση του σηματοδοτικού της μονοπατιού, που καταλήγει στη θραυσματοποίηση του DNA στον πυρήνα και κατ' επέκταση σε κυτταρικό θάνατο (95). Αξίζει να σημειωθεί πως λεμφοκύτταρα διεγερμένα από μιτογόνα εκφράζουν μεγάλα ποσά του δείκτη CD95/Fas στην κυτταρική επιφάνεια έπειτα από διείσδυση ορισμένων αντι-DNA αυτοαντισωμάτων, υποδηλώνοντας ότι η επαγόμενη απόπτωση λαμβάνει χώρα μέσω της αλληλεπίδρασης Fas/Fas-Ligand μορίων με τα αντι-DNA αυτοαντισώματα (69, 96). Όταν τα ίδια

αντισώματα διεισδύουν σε μη διεγερμένα λεμφοκύτταρα, τα τελευταία οδηγούνται, επίσης, σε απόπτωση χωρίς, όμως, να εκφράσουν μόρια CD95 στην κυτταρική επιφάνειά τους (97).

Πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί προκειμένου να διαλευκανθούν οι μηχανισμοί με τους οποίους τα CPAbs επάγουν την απόπτωση καρκινικών κυττάρων. Οι περισσότερες εστίασαν στη χρήση πολυκλωνικών αντι-DNA αντισωμάτων, τα οποία παρουσιάζουν ετερογένεια τόσο στις ιδιότητες δέσμευσης όσο και στη λειτουργία τους. Για το λόγο αυτό απομονώθηκαν μονοκλωνικά αυτοαντισώματα έναντι του dsDNA, και δείχθηκε ότι είχαν την ικανότητα να διεισδύουν στα κύτταρα, να υδρολύουν το DNA και να επάγουν - διαμεσολαβούμενη από κασπάση- απόπτωση. Η περαιτέρω μελέτη της κυτταροτοξικής αλλά και της ικανότητας υδρόλυσης του DNA των αντι-DNA αντισωμάτων πιθανά να διαλευκάνει σε μεγαλύτερο βαθμό το ρόλο τους. Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο τα αντι-DNA αντισώματα ενδέχεται να επάγουν απόπτωση προκύπτει από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε αντι-DNA αντισώματα προερχόμενα από ποντίκια MRL-lpr/lpr. Τα αντισώματα αυτά βρέθηκε να αντιδρούν με το ένζυμο DNase 1 και μεταβάλλουν την ενεργότητά του, *in vivo*. Μέσα στο κυτταρόπλασμα η μυοσίνη 1 δημιουργεί σύμπλοκο με τη DNase 1 και την καλμοντουλίνη. Επομένως, η είσοδος των αντι-DNA αντισωμάτων μέσω της μυοσίνης 1 -η οποία, όπως προαναφέρθηκε, εμπλέκεται στο μηχανισμό διείσδυσής τους- πιθανά να τα φέρνει σε επαφή με την DNase 1 και με τον τρόπο αυτό να τους δίνει τη δυνατότητα να μεταβάλλουν τη δραστηριότητα του ενζύμου μέσα στο κύτταρο. Με βάση τα παραπάνω, μπορεί να υποθέσει κανείς ότι η διαμεσολαβούμενη από τα αντισώματα ρύθμιση της δραστηριότητας της DNase 1 μπορεί να παρεμβαίνει σε φυσιολογικούς μηχανισμούς απόπτωσης *in vivo* (85).

Όπως προαναφέρθηκε, ο θάνατος των κυττάρων του νευρικού συστήματος, που προκαλείται μετά από τη διείσδυση αντισωμάτων έναντι του Hu αντιγόνου, της recoverin, της hsp27, του MAG, του SGGLs συμβάλλει στην παθογένεια και στα κλινικά χαρακτηριστικά των νόσων στις οποίες τα αντισώματα αυτά ανευρίσκονται. Από την άλλη πλευρά, έχει διατυπωθεί η άποψη πως η απόπτωση, που επάγεται μετά από τη διείσδυση αντι-dsDNA αντισωμάτων, μπορεί να έχει φυσιολογικό ρόλο στην επιλογή και τον καθορισμό του φυσιολογικού ρεπερτορίου, μέσω μείωσης των αυτοδραστικών B-κυττάρων. Η πιθανότητα αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι τα ενεργοποιούμενα από μιτογόνους παράγοντες λεμφοειδή κύτταρα, όπως θα αναφερθεί και παρακάτω, είναι πιο επιρρεπή στη διείσδυση αντισωμάτων και στην επακόλουθη απόπτωση από ότι τα αντίστοιχα ώριμα κύτταρα. Επίσης μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση προέκυψε από τη

χορήγηση σε ακτινοβολημένα ποντίκια BALB/c διεισδυτικών αντι-dsDNA αντισωμάτων. Βρέθηκε ότι τα εν λόγω ποντίκια δεν μπορούσαν πλέον να αποκριθούν σε μεταγενέστερη χορήγηση των αντισωμάτων. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι όταν ανώριμα κύτταρα ενεργοποιούνται, είτε από αντιγόνα είτε από μη ειδικά μιτογόνα, καθίστανται επιρρεπή στη διείσδυση από αντι-dsDNA αντισώματα και εν συνεχεία αποπίπτουν (24).

Φυσιολογικά, είναι πιθανόν όταν εμβρυικά αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα εκτίθενται και ενεργοποιούνται από αυτοαντιγόνα, να οδηγηθούν σε κυτταρικό θάνατο με τη μεσολάβηση διεισδυτικών αντι-dsDNA αντισωμάτων. Ένας τέτοιος μηχανισμός μπορεί κάλλιστα να συμβάλλει στη διατήρηση της αυτοανοχής, χωρίς φυσικά να αποκλείονται οι άλλοι μηχανισμοί που έχουν ήδη προταθεί (24). Φαίνεται λοιπόν ότι, η απομάκρυνση των αυτοδραστικών κυττάρων που παράγονται κατά τη διάρκεια μιας ανοσιακής απόκρισης μπορεί επίσης να προστατεύει από την πρόκληση αυτοάνοσου νοσήματος. Επιπροσθέτως η παρουσία αντι-ιδιοτυπικών αντισωμάτων έναντι των ιδιοτύπων που φέρουν αντισώματα αντι-RNP, τα οποία μπλοκάρουν τη διείσδυση των αντι-RNP υποδεικνύει την εμπλοκή του ιδιοτυπικού-αντι-ιδιοτυπικού δικτύου στη ρυθμιστική αυτή διαδικασία. Η επέκταση των δικτύων αυτών εντός των κυττάρων προκειμένου για τη ρύθμιση της ανοχής μέσω επαγόμενης απόπτωσης επιλεγμένων κυτταρικών κλώνων μπορεί, παραδόξως, αρχικά να προστατεύει και αργότερα να προκαλεί αυτοάνοση νόσο. Από μια άλλη άποψη όμως, ενδέχεται να συμβάλλει στη δημιουργία ενός δικτύου 3<sup>ης</sup> γενιάς μέσα στα κύτταρα (91).

Η ακριβής διαφοροποίηση μεταξύ του φυσιολογικού και του παθολογικού ρόλου της επαγόμενης από τα CPAbs απόπτωσης δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί. Μάλιστα το φαινόμενο της επαγωγής της απόπτωσης από τα CPAbs φαίνεται να έχει διττό ρόλο, φυσιολογικό και παθολογικό. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα CPAbs επάγουν την απόπτωση δεν έχει εκτενώς μελετηθεί και οι περισσότερες αναφορές περιγράφουν την παρουσία των θραυσμάτων στο DNA ως την ένδειξη της ενεργοποίησης του κυτταρικού θανάτου.

Ένα άλλο ερώτημα που προκύπτει, αφορά το μονοπάτι της απόπτωσης (μιτοχονδριακό ή εξωγενές) που ενεργοποιείται. Από πειράματα με αντισώματα αντι-dsDNA (F4.1) με ικανότητα διείσδυσης σε λεμφοκύτταρα της περιφερικού αίματος προέκυψε ότι το Fas/FasL μονοπάτι δεν ήταν υπεύθυνο για την επαγόμενη από τα αντισώματα απόπτωση, καθώς απουσίαζε το αντιγόνο CD95 (Apo1, Fas) από τη μεμβράνη των αποπτωτικών σωματίων. Το αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται περισσότερο στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν το μιτοχονδριακό. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι το μη διεισδυτικό αντίσωμα 31.F1 μπορούσαν να επάγουν την έκφραση του υποδοχέα TNF



(TNFR) σε μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε απόπτωση αυτών των κυττάρων *in vitro*. Είναι πιθανό ότι εάν τα μη διεισδυτικά αντι-dsDNA αντισώματα επάγουν την έκφραση του TNFR *in vivo*, τότε παρουσία του συνδέτη του (TNF) μπορεί να έχουν την δυνατότητα να επάγουν την αποπτωτική διαδικασία. Είναι λογικό, το εκάστοτε αποπτωτικό μονοπάτι να επάγεται από τα CPAbs με διαφορετικούς και ανεξάρτητους μηχανισμούς. Ακόμη, το ποιο θα είναι το κυρίαρχο αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται σε ένα κύτταρο πιθανά να εξαρτάται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου και τη δραστηριότητα του συγκεκριμένου κυττάρου (98).

Σχετική με τα προαναφερθέντα είναι και η παρατήρηση ότι τα λεμφοειδή κύτταρα είναι περισσότερο επιρρεπή στη διείσδυση από αντι-DNA αυτοαντισώματα και στην επαγόμενη από αυτά απόπτωση σε σχέση με τα αντίστοιχα ώριμα κύτταρα. Από τα αποτελέσματα αυτών των μελετών φάνηκε ότι ορισμένα αντι-DNA αντισώματα :

1. Διεισδύουν στα κύτταρα και αλληλεπιδρούν άμεσα με συγκεκριμένες αλληλουχίες του πυρηνικού DNA προκειμένου να επάγουν απόπτωση. Αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι πεπτίδια που προήλθαν από τις περιοχές CDR των CPAbs χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία ως φορείς για την επιμόλυνση κυττάρων. Ακόμη υποστηρικτική της εν λόγω υπόθεσης είναι και η παρατήρηση ότι ορισμένα αντι-DNA αντισώματα είναι ειδικά για μικρές ακολουθίες του DNA (της τάξης των 6bp) (69)

2. Αλληλεπιδρούν με DNA συνδεδεμένο με άλλα οργανίδια ή πρωτεΐνες και επάγουν γνωστά ή νέα μονοπάτια απόπτωσης (69)

3. Επάγουν σηματοδοτικά μονοπάτια (όπως αυτό του Fas/FasL) που ενεργοποιούν ένα ή περισσότερα γνωστά αποπτωτικά μονοπάτια, χωρίς να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη (69)

Από την προαναφερθείσα σειρά πειραμάτων προκύπτει ακόμη ότι το επίπεδο δραστηριότητας/ενεργοποίησης των κυττάρων μπορεί επίσης να εμπλέκεται στην επιλογή του αποπτωτικού μονοπατιού. Τα αντισώματα εκείνα που και διεισδύουν και προκαλούν απόπτωση σε ένα μεγάλο αριθμό ανώριμων κυττάρων είναι πολυδραστικά αντισώματα με χαμηλή συγγένεια ως προς το dsDNA, ενώ εκείνα που διεισδύουν και προκαλούν απόπτωση σε ένα μικρό αριθμό ώριμων κυττάρων είναι μονοδραστικά αντι-dsDNA αντισώματα που χαρακτηρίζονται από υψηλότερη συγγένεια ως προς το δίκλωνο DNA. Είναι, επομένως πιθανό ότι τα πολυδραστικά φυσικά αυτοαντισώματα αναπαριστούν τους φυσιολογικούς ρυθμιστές που συμμετέχουν στην επιλογή του ρεπερτορίου, ενώ εκείνα που υπόκεινται σε ωρίμανση συγγένειας και εισέρχονται σε ώριμα κύτταρα αντιπροσωπεύουν τα παθολόγνα αντισώματα (69).

Μια ενδιαφέρουσα πρόσφατη παρατήρηση σχετικά με τον ρόλο των αυτοαντισωμάτων στην απόπτωση προέκυψε από μελέτες σχετικά με τη συμμετοχή του ΑΣ στην παθογένεια τόσο των αυτοάνοσων νοσημάτων όσο και του καρκίνου. Είναι γνωστό ότι ασθενείς με καρκίνο μπορεί να παράγουν αυτοαντισώματα και ότι πάσχοντες από αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ΣΕΛ, μπορεί να αναπτύξουν καρκίνο. Θεωρήθηκε, επομένως ότι η δράση των αυτοαντισωμάτων γενικά και των αντι-dsDNA ειδικά μπορεί να παρέχει στοιχεία σχετικά με την παθογένεια κακοήθων όγκων. Οι πάσχοντες που έχουν αναπτύξει όγκους παρουσιάζουν διαφορετικά μοτίβα αυτοαντισωμάτων από αυτά των πασχόντων από ΣΕΛ, οι οποίοι όμως δεν έχουν αναπτύξει όγκους. Οι κακοήθειες φάνηκε να συνδέονται με αυξημένα αντιπυρηνικά αντι-Ro/SSA και αντι-La/SSB αντισώματα αλλά μικρή συχνότητα αντι-dsDNA αντισωμάτων. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι όσο μικρότερα είναι τα επίπεδα των αντι-dsDNA αντισωμάτων τόσο πιο αυξημένος είναι ο κίνδυνος ανάπτυξης κακοήθειας. Πολλοί παράγοντες μπορεί να συμβάλλουν σε αυτό το φαινόμενο. Μια από τις υποθέσεις βασίστηκε στην ικανότητα των αντι-dsDNA αντισωμάτων να διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα και υποστηρίζει ότι τα επίπεδα των αντισωμάτων αυτών στον ορό είναι μειωμένα εξ' αιτίας της εισόδου τους στα κύτταρα και στη συνέχεια στον πυρήνα. Εάν συνδυαστεί με τα παραπάνω ευρήματα και το γεγονός ότι τα αντι-dsDNA αντισώματα έχουν την ικανότητα να επάγουν απόπτωση και να σκοτώνουν έως και κύτταρα όγκων, εξηγείται γιατί η ύπαρξη αντι-dsDNA αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με καρκίνο αποτελεί έναν καλό προγνωστικό δείκτη. Από την άλλη πλευρά, ΣΕΛ ασθενείς με κακοήθειες παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα τόσο Ro/SSA όσο και La/SSB αντισωμάτων. Επιπλέον τα αντίστοιχα αντιγόνα έχει δείχθει ότι αυξάνονται σε κύτταρα που υπόκεινται σε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Η πρωτεΐνη La χάνει μέσω πρωτεόλυσης το σήμα μεταφοράς της στον πυρήνα (NLS), το οποίο βρίσκεται στο καρβοξυτελικό της άκρο και αναδιανέμεται στο κυτταρόπλασμα. Έτσι, είναι πιθανό, η επαγόμενη από τα αντι-dsDNA αντισώματα απόπτωση να είναι υπεύθυνη για την επαγωγή των αντι-Ro/SSA και -La/SSB αντισωμάτων, η οποία εμφανίζεται στην μικρή ομάδα ασθενών με ΣΕΛ και κακοήθειες (58).

Συμπερασματικά, μετά την είσοδο των αυτοαντισωμάτων μέσα στα κύτταρα, ίσως να ενεργοποιείται η αποπτωτική κυτταρική διαδικασία μέσω αλληλεπίδρασης με μεγάλη ποικιλία μορίων τα οποία δύνανται, είτε να εμπλέκονται στα αποπτωτικά μονοπάτια, ή να ενεργοποιούν έμμεσα άλλους προ-αποπτωτικούς μηχανισμούς (99, 100).

#### 2.4.2 CPABs και ρύθμιση κυτταροκινών

Ο ρόλος των αντι-dsDNA αντισωμάτων αναφορικά με την έκφραση κυτταροκινών αποτελεί επίσης ένα ενδιαφέρον πεδίο μελέτης. Η υπερέκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-1, IL-6 και TNF- $\alpha$  έχει διαπιστωθεί τόσο σε ασθενείς με ΣΕΛ όσο και σε ποντίκια επιρρεπή σε λύκο και φαίνεται να σχετίζεται με έντονη φλεγμονώδη αντίδραση (67). Οι Finck και συν. (101) διαπίστωσαν ότι η IL-6 επιτάχυνε την πορεία της ασθένειας αυτοάνοσων ποντικών (NZBxNZW) F1. Η χορήγηση αντι-IL-6 ανέστειλε σημαντικά την παραγωγή των αντι-dsDNA, μείωσε την πρωτεϊνουρία, και παρέτεινε τη διάρκεια ζωής στα αυτοάνοσα ποντίκια (102). Επιπρόσθετα οι Lai και συν. (103, 104) απέδειξαν ότι πολυκλωνικά αντι-dsDNA αντισώματα διεγείρουν την απελευθέρωση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1 και IL-6 από ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω κυτταροτοξικής ενδοθηλιακής βλάβης και προκάλεσαν τραυματισμό αγγειακού ενδοθηλίου. Η αιτία της μη φυσιολογικής τροποποίησης αυτών των κυτταροκινών από αντι-dsDNA τόσο σε ασθενείς με ΣΕΛ όσο και σε ποντίκια επιρρεπή σε λύκο δεν έχει μέχρι σήμερα αποσαφηνιστεί. Ωστόσο, οι Okudaiya και συν. (60) βρήκαν αντι-dsDNA ικανά να διεισδύουν στους πυρήνες μονοπύρηνων κυττάρων και να επηρεάζουν τις λειτουργίες τους.

Σε προηγούμενη μελέτη, βρέθηκε ότι πολυκλωνικά αντι-dsDNA απομονωμένα από ορούς ασθενών με ενεργό ΣΕΛ, τροποποιούσαν τον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών ανθρώπινων μονοπύρηνων κυττάρων (MNC), έπειτα από επαγωγή τους με μιτογόνο (56, 105). Έχει δειχθεί, επίσης, ότι αντι-dsDNA αντισώματα με ικανότητα διείσδυσης σε μακροφάγα ποντικών, επάγουν την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως του TNF- $\alpha$ . Συγκεκριμένα, κύτταρα που εκτέθηκαν στα εν λόγω αντισώματα (H241, G6-7), εμφάνισαν σημαντική μείωση των επιπέδων του I $\kappa$ B- $\alpha$  αναστολέα του NF- $\kappa$ B, υποδεικνύοντας ότι τα αντισώματα αυτά εμπλέκονται στην επαγόμενη από τον NF- $\kappa$ B έκφραση του TNF- $\alpha$ . Πιθανά λοιπόν τα διεισδυτικά αντι-dsDNA αντισώματα να προκαλούν την ενεργοποίηση και μεταφορά στον πυρήνα του μεταγραφικού παράγοντα NF- $\kappa$ B με αποτέλεσμα την επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου του TNF- $\alpha$ . Δεδομένου του ρόλου του TNF- $\alpha$  στην επαγωγή της διαδικασίας της φλεγμονής αναδεικνύεται μια εμπλοκή των διεισδυτικών αντισωμάτων σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο ΣΕΛ (67).

Έχει βρεθεί ότι δυο μονοκλωνικά αντι-dsDNA αντισώματα, που απομονώθηκαν από ποντίκια MRL-lpr/lpr, μπορούσαν να επάγουν την έκφραση και την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1b, IL-6, IL-8 και TNF- $\alpha$ ) καθώς και την Th2

κυτταροκίνη IL-10, από μονοπύρηννα κύτταρα. Είναι επίσης γνωστό ότι σε ασθενείς με ΣΕΛ παρατηρείται υπερέκφραση των κυτταροκινών IL-1, IL-6 και TNF- $\alpha$ . Αν και στην προκειμένη περίπτωση δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός με τον οποίο τα αντι-dsDNA αντισώματα απορρυθμίζουν την έκφραση των κυτταροκινών, θεωρήθηκε ότι ο μηχανισμός αυτός περιλάμβανε τη διείσδυση και μεταφορά των αντισωμάτων στον πυρήνα των κυττάρων. Εκτός από την προαναφερθείσα επίπτωση η δράση των αντισωμάτων αυτών είχε σαν αποτέλεσμα την πόλωση της ανοσολογικής απόκρισης έτσι ώστε να ευνοηθεί το μονοπάτι των Th2 κυττάρων, υποδεικνύοντας έναν ακόμη ρόλο των αντι-DNA αντισωμάτων στην παθογένεια του ΣΕΛ. Αυτά τα ευρήματα παρέχουν μια πιθανή εξήγηση για τον παθολογικό ρόλο των αντι-dsDNA στους ιστούς των ασθενών με ΣΕΛ (106).

### 2.4.3 CPAbs και άλλες δράσεις

Στα CPAbs έχουν αποδοθεί και άλλες δράσεις. Με βάση τα μέχρι σήμερα δεδομένα, έχει αναφερθεί ότι η επώαση με αντι-nDNA αντισώματα σε ενεργοποιημένα κύτταρα εμποδίζει τη σύνθεση του DNA (88), φαινόμενο που παρατηρείται και με διεισδυτικά αντι-DNA αντισώματα, από ασθενείς με ΣΕΛ. Τα τελευταία, εμπόδισαν την πρόοδο του κύκλου στην φάση G1, σε αντίθεση με τα διεισδυτικά αντι-RNP αντισώματα, από ασθενείς με ΜΝΣΙ, τα οποία τον διακόπτουν στη φάση G0 (71, 88). Σε κάθε περίπτωση, η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου οδηγεί σε απόπτωση των κυττάρων (69, 96). Αντίθετα, το διεισδυτικό αντι-DNA αντίσωμα F4-1, προερχόμενο από ποντίκια NZBxNZW, φάνηκε να αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση S, χωρίς να προκαλεί απόπτωση (69) Αξίζει να σημειωθεί πως τα επίπεδα έκφρασης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικά ως προς την πορεία του κυττάρου προς απόπτωση ή προς αναστολή του κυτταρικού κύκλου. (107).

Από την άλλη πλευρά, μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα αυτοαντισώματα είναι ικανά να διεισδύουν σε ζωντανά κύτταρα, φαινόμενο με ποικίλες λειτουργικές επιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης. Ειδικότερα, διερευνήθηκε η επίδραση των αντι-DNA αντισωμάτων για την *in vitro* ενεργοποίηση των μονοπύρηννων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMNC) και βρέθηκε ότι ένα ανθρώπινο πολυκλωνικό αντι-DNA, IgG διεισδυτικό αντίσωμα, ήταν σε θέση να επάγει *in vitro* την έκφραση διαφορετικών αντιγόνων κυτταρικής ενεργοποίησης, όπως CD69, CD71 ή CD98 από PBMNC υγιών ατόμων. Εντούτοις, ο φαινότυπος κυτταρικής ενεργοποίησης που επάγεται από το αντι-DNA αντίσωμα δεν θεωρήθηκε φυσιολογικός, δεδομένου ότι η έκφραση ορισμένων αντιγόνων ενεργοποίησης (π.χ. ICAM-1) δεν παρουσιαζόταν αυξημένη, όπως θα ήταν

αναμενόμενο. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν χρησιμοποιώντας διαφορετικά μονοκλωνικά αντι-DNA mAbs ποντικού, που εμφανίζουν αυθόρμητα σύνδρομο λύκου. Επιπλέον, τα διεισδυτικά αντισώματα έτειναν να έχουν μεγαλύτερη επίδραση επί της ενεργοποίησης PBMNC. Αντι-DNA αντισώματα ήταν επίσης σε θέση να προκαλέσουν μια αυξημένη έκφραση του CD95 / Fas. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η διείσδυση αντι-DNA αντίσωμα είναι ικανή να επάγει μη φυσιολογική ενεργοποίηση *in vitro* σε ένα σημαντικό κλάσμα του PBMNC. Το γεγονός αυτό δύναται να λαμβάνει χώρα και *in vivo* και θα μπορούσε ενδεχομένως να σχετίζεται με την παθογένεση του ΣΕΛ (96).

Σε προηγούμενη μελέτη, βρέθηκε ότι πολυκλωνικά αντι-dsDNA απομονωμένα από ορούς ασθενών με ενεργό ΣΕΛ, τροποποιούσαν τον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών ανθρώπινων μονοπύρηνων κυττάρων (MNC), έπειτα από επαγωγή τους με μιτογόνο παράγοντα (56, 105). Επίσης, η διείσδυση αυτοαντισωμάτων, έναντι του φορέα ADP/ATP (anti-ADP-ATP carrier), σε κύτταρα του μυοκαρδίου έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της διαδικασίας της φωσφορυλίωσης του ATP στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια (89). Οι κακοήθεις νεοπλασίες φάνηκε να συνδέονται με αυξημένα επίπεδα αντιπυρηνικών αντι-Ro/SSA και αντι-La/SSB αντισωμάτων και συγχρόνως ελαττωμένα επίπεδα αντι-dsDNA αντισωμάτων. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι όσο μικρότερα είναι τα επίπεδα των αντι-dsDNA αντισωμάτων τόσο πιο αυξημένος είναι ο κίνδυνος ανάπτυξης κακοήθειας. Πολλοί παράγοντες μπορεί να συμβάλλουν σε αυτό το φαινόμενο (58).

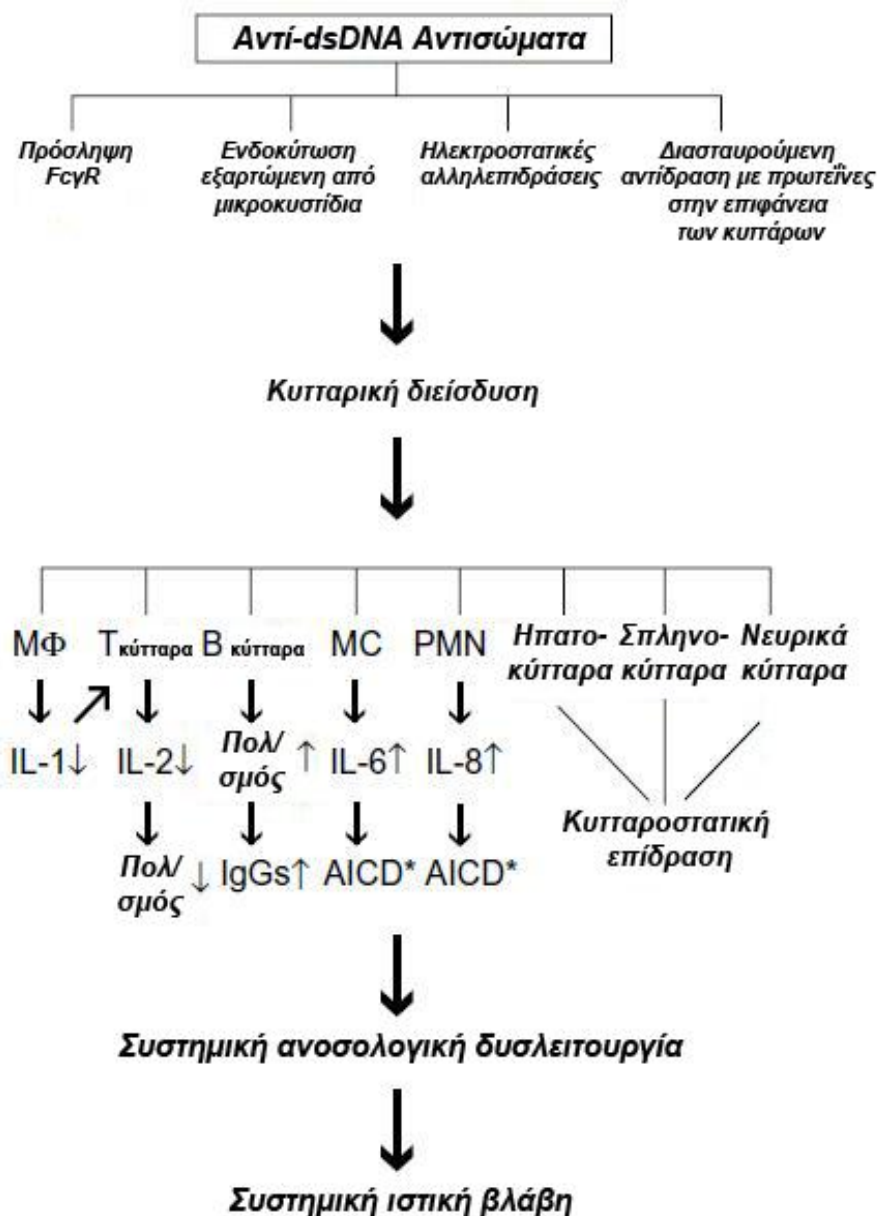
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως (**κεφάλαιο 2.4.1**), ο θάνατος των κυττάρων του νευρικού συστήματος, που προκαλείται μετά από τη διείσδυση αντισωμάτων έναντι μιας σειράς αντιγόνων (Hu, recoverin, hsp27, MAG, SGGLs) συμβάλλει στην παθογένεια και τα κλινικά χαρακτηριστικά συγκεκριμένων νόσων. Αυτοαντισώματα εναντί διαφόρων αυτοαντιγόνων του νευρικού συστήματος, φαίνεται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, μέσω της διείσδυσης και επαγωγής απόπτωσης (93). Με βάση τα παραπάνω διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η απόπτωση μπορεί να αποτελεί ένα μηχανισμό παρουσίασης αυτοαντιγόνων, δεδομένου ότι τα αποπτωτικά σωμάτια, ως υπολείμματα του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, περιλαμβάνουν ομάδες αντιγόνων, που έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση αυτοάνοσων φαινομένων (24). Αντισώματα ειδικά για τη ριβοσωμική πρωτεΐνη P από ορούς ασθενών με ΣΕΛ φάνηκε να εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα ηπατοκυττάρων και να αναστέλλουν την έκκριση της απολιποπρωτεΐνης B, τη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους και την πρωτεϊνοσύνθεση (72). Έχουν επίσης βρεθεί αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (aPL) πολυκλωνικά ανθρώπου

και μονοκλωνικά ποντικού, να διεισδύουν γρήγορα σε συγκυτιοτροφοβλάστες (syncytiotrophoblast), μέσω ενδοκύτταρωσης και να προκαλούν προεκλαμψια. Μετά τη διείσδυση τους προκαλούσαν απελευθέρωση νεκρωτικών υπολειμάτων τροφοβλάστη (με την απελευθέρωση κυτοχρώματος), τα οποία στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονταν από ενδοθηλιακά κύτταρα του μητρικού αγγειακού συστήματος, προκαλώντας ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμβάλλοντας έτσι στην παθογένεια της προεκλαμψίας (108).

Η ενεργοποίηση της απόπτωσης πραγματοποιείται μέσω διαφόρων μηχανισμών, εξαρτώμενων κυρίως από την αντιγονική εξειδίκευση των αντισωμάτων αλλά και από το στάδιο ενεργοποίησης των κυττάρων-στόχων. Για παράδειγμα, αντισώματα εναντίον της συνοδού πρωτεΐνης hsp27 (heat shock protein 27), που βρίσκονται στον ορό ασθενών με γλαύκωμα, διεισδύουν σε νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς και προκαλούν τον αποπτωτικό θάνατό τους μέσω της παρεμπόδισης της hsp27 η οποία σταθεροποιεί την ακτίνη του κυτταροσκελετού (94).

**Πίνακας 2.3** Αντισώματα που διεισδύουν στο εσωτερικό των κυττάρων και επεμβαίνουν σε κυτταρικές λειτουργίες σε ασθενείς με ΣΕΛ.

Αντισώματα	Κύτταρα-Στόχος	Λειτουργική Επίδραση
Αντι-dsDNA	Σπειραματικά μεσαγγειακά	AICD, κυτταρικός πολλαπλασιασμός ↓
	Μακροφάγα, T-κύτταρα	Λειτουργική βλάβη
	Αστροκύτταρα, νευρωνικά κύτταρα	GFAP ↓
	PMNs	IL-8 ↑, φαγοκυττάρωση ↓, AICD ↑
	B-κύτταρα	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός, Σύνθεση ανοσοσφαιρινών ↑
Αντι-ριβοσωμικά P	T-κύτταρα	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός ↓
	Μακροφάγα	Απόπτωση ↑
	Εγκεφάλου	Ψύχωση
	Κύτταρα σπειράματος	Νεφρίτιδα
Αντι-RNP	Μονοπύρηννα κύτταρα	Ενδοκυττάρια GSH ↓
Αντι-Sm	Μονοπύρηννα κύτταρα	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός ↓
Αντι-SSB/La	Καρδιακού όζου AV	Διαφορετικού βαθμού AV φραγμός
	Μονοπύρηννα κύτταρα	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός ↓
	PMNs	φαγοκυττάρωση ↓, IL-8 ↑ AICD ↑
	Λεμφοκύτταρα	AICD ↑



**Εικόνα 2.4** Δράσεις των αντι-dsDNA διεισδυτικών αντισωμάτων. Απεικόνιση των ανοσοπαθογόνων ρόλων των αντι-dsDNA αντισωμάτων στην παθογένεια του ΣΕΛ. **ΜΦ**: Μακροφάγα, **PMN**: Πολυμορφοπύρρηνα Ουδετερόφιλα, **AICD**: Επαγόμενος από ενεργοποίηση κυτταρικός θάνατος (απόπτωση), **ΜC**: Μονοκύτταρα.

## 2.5 Τα CPAs ως θεραπευτικά εργαλεία

Η ικανότητα διείσδυσης ορισμένων αυτοαντισωμάτων σε ζώντα κύτταρα προκειμένου αυτά να δεσμευθούν σε αντιγόνα-στόχους, έχει οδηγήσει στην *in vitro* πειραματική τους μελέτη ως εργαλεία μεταφοράς διαφόρων μορίων για θεραπευτικούς σκοπούς (**Εικόνα 2.5**).



Μέχρι σήμερα, έχει επιτευχθεί η *in vitro* μεταφορά μακρομορίων στον πυρήνα κυττάρων μέσω σύζευξής τους με διεισδυτικά αντι-dsDNA αντισώματα, τα Fab τμήματά τους ή και τεχνητά πεπτίδια που αντιστοιχούν στις υπερμεταβλητές περιοχές/ακολουθίες CDR2 και CDR3 της βαριάς αλυσίδας τους (85, 109). Οι βαριές και ελαφριές αλυσίδες των αντι-dsDNA αντισωμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την μεταφορά στον πυρήνα απτενίων όπως η φλουορεσκεΐνη, και η βιοτίνη, ολιγονουκλεοτιδίων ή μακρομορίων όπως η υπεροξειδάση (64, 65, 110). Η σύζευξη CPAbs με ένζυμο θέτει ως στόχο τη διερεύνηση θεραπευτικών προσεγγίσεων για κληρονομικές ασθένειες ενζυμικής ανεπάρκειας (24). Για παράδειγμα, έχει επιτευχθεί η μεταφορά καταλάσης στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα πρωτοπαγών, φλοιικών νευρώνων όπου το ένζυμο διατηρεί την ενεργότητά του. Η καταλάση καταλύει την διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και η έλλειψή της προκαλεί οξειδωτικές βλάβες που συναντάμε σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος Alzheimer. Η σύζευξη ενός μονοκλωνικού αντι-dsDNA CPAb με την καταλάση και η διείσδυσή του στους νευρώνες προστάτεψε τα κύτταρα από την παρουσία του  $H_2O_2$  (111).

Εν συγκρίσει με τα αντισώματα, τα πεπτίδια-φορείς εμφανίζουν αρκετά μειονεκτήματα, όπως η μικρή ανθεκτικότητά τους απέναντι στις πρωτεάσες του ορού αλλά και των διαφόρων ιστών, με αποτέλεσμα να απομακρύνονται πολύ γρήγορα από την κυκλοφορία. Επιπλέον έχουν μειωμένη ικανότητα να κατευθύνονται έναντι ενδοκυτταρικών στόχων σε αντίθεση με τα CPAbs. Τέλος, τα αντισώματα λόγω των διαφορετικών τους φυσικοχημικών ιδιοτήτων αλλά και της προέλευσής τους δεν θεωρούνται τόσο κυτταροτοξικά όσο τα πεπτίδια (112).



**Εικόνα 2.5** Αυτοαντισώματα με ικανότητα διείσδυσης στον πυρήνα ζώντων κυττάρων και η χρήση τους ως φορέων βιολογικά δραστικών μορίων.

Άλλες θεραπευτικές εφαρμογές των CPAbs αφορούν: α) τη χρήση γενετικά τροποποιημένων αντι-CEA (anti-carcinoembryonic antigen) αντισωμάτων στη ραδιοανοσοκαθοδηγούμενη χειρουργική (113) και β) τη σύνδεση με CPAbs υδροφιλικών μορίων, που φυσιολογικά δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, που έχει αποδειχθεί χρήσιμη εφαρμογή στη φωτοδυναμική θεραπεία συγκεκριμένων μορφών καρκίνου (114).

### 2.5.1 CPAbs ως φορείς γονιδίων

Η μεταφορά γονιδίων στον πυρήνα ζώντων κυττάρων είναι εφικτή μέσω των CPAbs ή πεπτιδίων που προέρχονται από αυτά. Η γονιδιακή θεραπεία βασίζεται στην ικανότητα του κυττάρου να συνθέτει μια πρωτεΐνη από εξωγενές DNA. Για το σκοπό αυτό, πολλοί ιικοί και μη-ιικοί φορείς έχουν εξεταστεί ως μέσα στόχευσης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Οι σημαντικότεροι περιοριστικοί παράγοντες του συγκεκριμένου εγχειρήματος είναι μεταξύ άλλων η τοξικότητα των χρησιμοποιούμενων φορέων και η ικανότητά τους να δρουν ως ανοσογόνα. Άλλα σημαντικά προβλήματα είναι η αναποτελεσματική μεταφορά των γονιδίων στα κύτταρα καθώς και η μειωμένη σταθερότητα του «ξένου» γονιδίου που οδηγεί στη μειωμένη έκφρασή του (115). Τα αντισώματα ως φορείς γονιδίων, φαίνεται να υπερβαίνουν κάποια από τα προαναφερθέντα εμπόδια.—Μονοκλωνικά αντι-dsDNA αντισώματα, όπως και πεπτίδια που αντιστοιχούν στις αλληλουχίες των CDR2 και CDR3, έχουν χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά ως μεταφορείς του γονιδίου της λουσιφεράσης σε διάφορες κυτταρικές σειρές (23, 64, 116). Ομοίως, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το G250, κατευθυνόμενο έναντι ενός ογκοειδικού αντιγόνου, εκφραζόμενου στις περισσότερες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, έχει χρησιμοποιηθεί για την εισαγωγή πλασμιδιακού cDNA που κωδικοποιεί την ιντερλευκίνη-2 του ποντικού. Τα καρκινικά κύτταρα στα οποία διείσδυσε αυτό το σύμπλεγμα, άρχισαν να παράγουν συστηματικά ιντερλευκίνη-2, με συνέπεια την εντατικότερη μελέτη μιας τέτοιας προσέγγισης για τη θεραπεία των νεφρικών καρκινωμάτων.

Σε ότι αφορά τη μεταφορά γονιδίων σε ζώντα κύτταρα με τη χρήση CPAbs, δείχθηκε αρχικά ότι δύο μονοκλωνικά αντι-dsDNA αντισώματα, F4.1 και J20.8, που προέρχονται από ποντίκια (NZBxNZW)F1, όταν συνδέονται με “ουρές” από κατάλοιπα λυσίνης μπορούν να χρησιμεύσουν ως φορείς γονιδίων. Ένα πεπτίδιο 30 αμινοξέων που αντιστοιχεί στις συνδεδεμένες περιοχές CDR2 και CDR3 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 σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές σειρές.

Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν ότι η προσθήκη των καταλοίπων λυσίνης σε ένα διεισδυτικό πεπτίδιο μπορεί να το μετατρέψει αυτομάτως σε φορέα πλασμιδιακού DNA (24).

#### 2.5.1.1 Το παράδειγμα του mAb G250 ως προτεινόμενη αντι-καρκινική θεραπευτική προσέγγιση

Στην αντικαρκινική θεραπεία, τα συστήματα μεταφοράς γονιδίων που έχουν χρησιμοποιηθεί βασίζονται είτε σε ικούς είτε σε μη ικούς φορείς που συνδέονται μέσω ενός συνδέτη με το προς μεταφορά μόριο. Καθώς ο συνδέτης έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει συγκεκριμένα μόρια στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, θεωρήθηκε ότι για το ρόλο αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντισώματα, τα οποία αφ' ενός δεσμεύουν πλασμιδιακό DNA, αφ' ετέρου κατευθύνονται έναντι ιστοειδικών υποδοχέων. Τέτοια αντισώματα είναι και εκείνα που αναγνωρίζουν αντιγόνα σχετιζόμενα με όγκους (Tumor Associated Antigens, TAA)(117).

Το μονοκλωνικό αντίσωμα G250 αναγνωρίζει αντιγόνα ειδικά για τα νεφρικά καρκινικά κύτταρα RCC (Renal Cellular Carcinoma) και πιο συγκεκριμένα το αντιγόνο TAA, το οποίο εμφανίζεται στο 95% των πρωτοπαθών RCC και στο 60% των καρκινωμάτων αυτών από μετάσταση. Το κυριότερο αποτέλεσμα της διαμεσολαβούμενης από το TAA ενδοκυττάρωσης του G250 ήταν η δυνατότητά του να συμμετέχει στην παραγωγή εξωγενούς κυτταροκίνης. Εντούτοις, παρά την ιδιαίτερα επιτυχημένη είσοδο του συμπλόκου στα κύτταρα, πιθανότατα λόγω και της επακόλουθης αποικοδόμησής του, η γονιδιακή μεταφορά δεν κατέστη εξίσου αποτελεσματική.

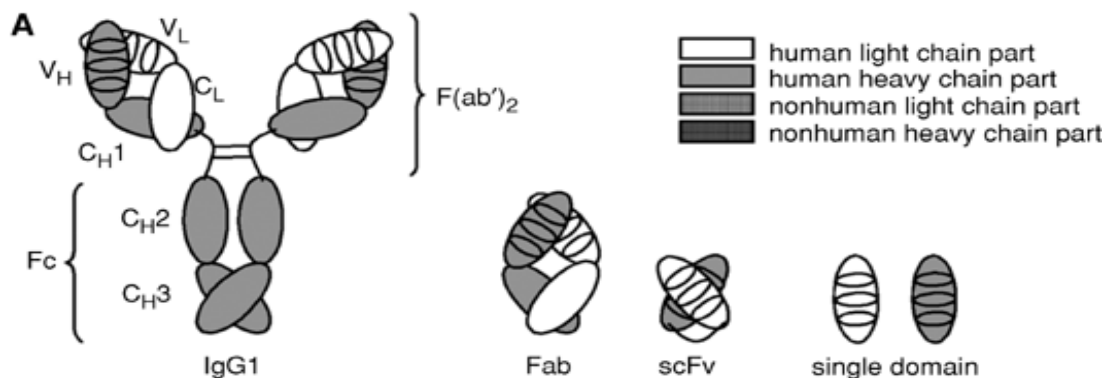
#### 2.5.2 CPAbs ως φορείς πρωτεϊνών

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, διεισδυτικά αντισώματα όπως το mAb 3E10 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά πρωτεϊνών σε ζώντα κύτταρα, οι οποίες διατηρούν τη λειτουργικότητά τους μετά τη διείσδυση. Εάν στην ικανότητα διείσδυσης των αντισωμάτων αυτών προστεθεί και η ικανότητά τους να επάγουν ανοσολογική ανοχή στα ίδια και στην εκάστοτε πρωτεΐνη που μεταφέρουν, αντιλαμβάνεται κανείς γιατί τα CPAbs αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την ενδοκυτταρική μεταφορά πρωτεϊνών (115).

Η βελτίωση της ικανότητας διείσδυσης και μεταφοράς του mAb 3E10, καθώς και ο προσδιορισμός των μικρότερων δυνατών τμημάτων του αντισώματος που απαιτούνται για αποτελεσματική διείσδυση, αποτέλεσαν αντικείμενο περαιτέρω έρευνας. Δείχθηκε πως μία μόνο αλλαγή αμινοξέος στη θέση 31 της CDR1 περιοχής της V<sub>H</sub> (αντικατάσταση

ασπαρτικού οξέος από κατάλοιπο ασπαραγίνης) ήταν ικανή να αυξήσει σε σημαντικό βαθμό τη διεισδυτική ικανότητα των αντισωμάτων στα κύτταρα, ακόμη και όταν τα πρώτα βρίσκονταν σε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με τα φυσιολογικά αυτοαντισώματα (115). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι τα μικρότερα τμήματα (Fab) του τροποποιημένου αντισώματος είχαν την ικανότητα να διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα εξίσου αποτελεσματικά όπως το mAb 3E10, μεταφέροντας το ενζυμο αλκαλική φωσφατάση (σύμπλοκο Fab-ενζύμου) στον πυρήνα ζώντων κυττάρων. Εντούτοις, παρά το γεγονός ότι το mAb 3E10 και τα Fab τμήματα αυτού αποδείχτηκαν ως αποτελεσματικά συστήματα μεταφοράς, το scFv (single chain fragment) τμήμα του αντισώματος είναι εκείνο που έχει μελετηθεί περισσότερο τα τελευταία χρόνια (115). Το scFv τμήμα του mAb 3E10 αποτελείται από τις μεταβλητές περιοχές της ελαφριάς και της βαριάς αλυσίδας του αντισώματος, που συνδέονται μεταξύ τους με μια μικρού μήκους αλληλουχία συνδέτη (GGGG)<sub>3</sub>. Το τμήμα Fv διεισδύει σε ζώντα κύτταρα εξίσου αποτελεσματικά με το ακέραιο mAb 3E10 και το τμήμα Fab αυτού, ενώ εμφανίζει επίσης την ικανότητα να μεταφέρεται στον πυρήνα των κυττάρων (**Εικόνα 2.5.2**). Το σύμπλοκο Fv-GFP (green fluorescent protein), που προκύπτει μετά από σύντηξη του Fv με την εν λόγω πρωτεΐνη, ήταν το πρώτο που μελετήθηκε και βρέθηκε ότι εισέρχεται στα κύτταρα και εντοπίζεται στον πυρήνα τους (115). Μία χαρακτηριστική θεραπευτική προσέγγιση με τη χρήση του τμήματος Fv, αφορούσε και τη μεταφορά καρβοξυ-τελικών πεπτιδίων ή αντισωμάτων στα καρκινικά κύτταρα με σκοπό την ενεργοποίηση της ελαττωματικής ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 (κι επομένως την επαναφορά της μεταγραφικής της ικανότητας), ώστε να ανασταλεί ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων (115).

Επιπρόσθετα, το τμήμα Fv εξετάστηκε ως ένα μέσο άμεσης μεταφοράς της πρωτεΐνης δυστροφίνης στα μυϊκά κύτταρα, σε μία απόπειρα θεραπευτικής αντιμετώπισης της μυϊκής δυστροφίας Duchenne, μιας νευρομυϊκής ασθένειας που κληρονομείται με φυλοσύνδετο υπολειπόμενο τρόπο και οφείλεται σε έλλειψη της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.



**Εικόνα 2.5.2** Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς. Το τμήμα scFv αποτελείται από τη μεταβλητή περιοχή της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας, οι οποίες ενώνονται με μια αλληλουχία συνδέτη

### 2.5.2.1 CPAbs ως φορείς ενζύμων

Το μονοκλωνικό αντι-dsDNA mAb 3E10, το οποίο όπως έχει δειχθεί διεισδύει σε ζώντα κύτταρα και εισέρχεται στον πυρήνα τους χωρίς να προκαλεί βλάβες στα κύτταρα-στόχους, μελετήθηκε ως φορέας ενζύμων. Δεδομένου του ρόλου του οξειδωτικού στρες στην παθοφυσιολογία νευροεκφυλιστικών νόσων, όπως η νόσος του Alzheimer, εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς του ενζύμου καταλάση σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων φλοιού αρουραίων μετά από ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου στο mAb 3E10. Ακόμη αξιολογήθηκε η προστατευτική δράση του συμπλόκου καταλάσης-mAb, αφού το ακέραιο mAb 3E10 μετέφερε σε πρωτογενείς νευρώνες του φλοιού το ένζυμο της καταλάσης, με αποτέλεσμα την προστασία των νευρώνων από τον επαγόμενο, με υπεροξειδίου, κυτταρικό θάνατο (111). Πράγματι το σύμπλοκο αυτό μπορούσε να διεισδύσει εντός των κυττάρων και στη συνέχεια να εντοπιστεί τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Η διαφορετική υποκυτταρική κατανομή του συμπλόκου αυτού συγκριτικά με την κατανομή που παρουσιάζει το αντίσωμα μόνο του μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες όπως το μέγεθος, το φορτίο, η δομή και η δέσμευση σε ενδοκυτταρικές θέσεις. Το αντίσωμα μόνο του δεν κατόρθωσε να προστατεύσει τους νευρώνες από τις οξειδωτικές βλάβες, ενώ το ένζυμο καταλάση όταν χορηγούνταν μόνο του δεν προστάτευε τους νευρώνες παρά μόνο σε μικρό βαθμό. Αντίθετα, το σύμπλοκο Ab-καταλάσης παρείχε υψηλότερη προστασία (κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο) στους νευρώνες συγκριτικά με το μάρτυρα της καταλάσης, υποδηλώνοντας ότι το ένζυμο διατηρεί την ενεργότητά του μετά τη διείσδυση στα κύτταρα σε σύμπλοκο με το αντίσωμα

(111). Ωστόσο, η απαίτηση για σχετικά μεγάλες ποσότητες συμπλόκου αντισώματος-καταλάσης μπορεί να περιορίζει τη χρήση του *in vivo*. Για το λόγο αυτό φάνηκε να προτιμάται η χρήση ενός του mAb 3E10 με μια μόνο αλυσίδα, το οποίο έχει δειχθεί ότι μπορεί να διεισδύει σε ζώντα κύτταρα.

### 3. ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (CATALYTIC ANTIBODIES, Cat-Abs)

#### 3.1 Εισαγωγή

Η καταλυτική δράση ορισμένων αντισωμάτων αναφέρθηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας 1940 από τον Pauling (118) κι έκτοτε το ερευνητικό ενδιαφέρον πολλών ομάδων στράφηκε στη μελέτη του παθοφυσιολογικού τους ρόλου (**Εικόνα 3.1**)

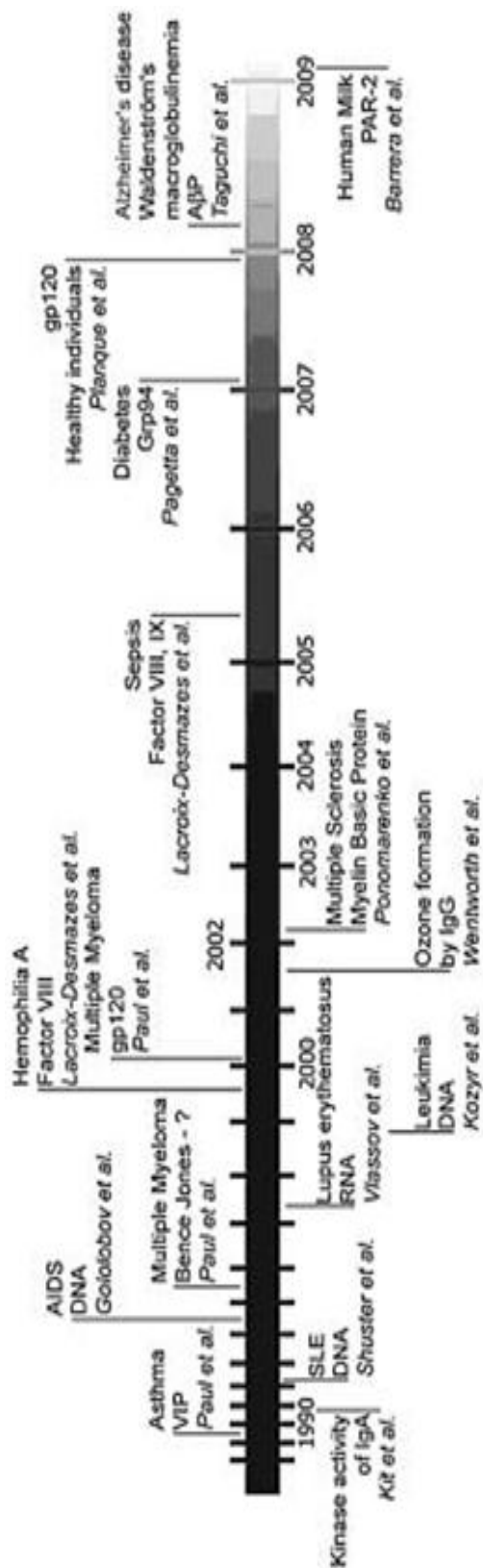
Σύμφωνα με τον Pauling, εάν η δομή της θέσης πρόσδεσης αντιγόνου στα αντισώματα δημιουργείται με τυχαίο τρόπο, τότε ορισμένα αντισώματα μπορεί να φέρουν ένα ενεργό κέντρο που να προσομοιάζει με αυτό των ενζύμων και τα αντισώματα αυτά με τη σειρά τους, ίσως, να εκφράσουν ενζυματική δράση. Με την μέθοδο παραγωγής υβριδωμάτων (Kohler –Milstein, 1975), η οποία χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικών για συγκεκριμένα αντιγόνα, επιβεβαιώθηκε η υπόθεση του Pauling (1986) και απομονώθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα με καταλυτικές ιδιότητες τόσο από φυσιολογικά άτομα, όσο και από ασθενείς. Αρκετές προσεγγίσεις έχουν αναπτυχθεί ώστε να παραχθούν καταλυτικά αντισώματα, μετά από ανοσοποίηση. Άξιζει να σημειωθεί ότι με τη χρήση χημικών ενώσεων, όπως τα απτενια σε μεταβατική κατάσταση (transition state analog) δημιουργήθηκαν αντισώματα τα οποία καταλύουν θερμοδυναμικά ή κινητικά αντιδράσεις που δεν μπορούν να καταλυθούν από τα φυσικά ένζυμα ή από τις μέχρι σήμερα διαθέσιμες χημικές μεθόδους (119).

#### 3.2 Cat-Abs στη φυσιολογία και στην παθολογία

Αυτοαντισώματα από υγιή άτομα και από ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα παρουσιάζουν συχνά ενζυμική δράση έναντι αυτοαντιγόνων. Στην περίπτωση των NAb, η ενζυμική δράση είναι πολυειδική και ως υπόστρωμα χρησιμοποιούνται διάφορα πεπτίδια μικρού μοριακού βάρους. Καταλυτικά αντισώματα διαφορετικών ισότυπων -IgG, IgA και IgM- είναι μέρος του φυσιολογικού ρεπερτορίου των φυσικών αντισωμάτων που ανιχνεύονται στην κυκλοφορία υγιών ατόμων (120, 121) (**Πίνακας 3.2**). Πολυκλωνικά αντισώματα τάξης IgM από υγιείς ανθρώπους και φυσιολογικά ποντίκια, και σε μικρότερο βαθμό IgG, δείχνουν καταλυτική δράση έναντι τόσο νουκλεϊκών οξέων, όσο και

πρωτεϊνών (121, 122). Η πρωτεολυτική δράση περιορίζεται μόνο από την ανάγκη μη ομοιοπολικής αναγνώρισης ενός θετικού φορτίου με ένα ηλεκτρόφιλο υπόστρωμα. Πρωτεολυτικά Cat-Abs που προσδιορίστηκαν σε υγιή άτομα φαίνεται να έχουν προστατευτικό ρόλο, όπως προκύπτει από παρατηρήσεις ότι η δράση αυτή είναι μειωμένη σε άτομα με αυτοάνοσα νοσήματα (123), αλλά και σε ασθενείς με σηπτικό σοκ που καταλήγουν σε σχέση με εκείνους που επιβιώνουν (124).

Σε υγιείς ανθρώπους και μη ανοσοποιημένα ποντίκια, ανιχνεύονται αντισώματα που υδρολύουν IgMs, τον πρώτο ισότυπο που παράγεται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των B- κυττάρων (125, 126). Επιπλέον τα φυσικά Cat-Abs χαρακτηρίζονται από ενεργότητα κινάσης και DNάσης ενώ έχουν εντοπισθεί και στο ανθρώπινο γάλα (IgAs) (127-129). Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν ανιχνευθεί στο γάλα από υγιείς μητέρες καταλυτικά αντισώματα με δράση κινάσης έναντι ενός αριθμού πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των κύριων συστατικών του γάλακτος α-καζεΐνης και β-καζεΐνης, συνιστώντας έτσι ένα πρώτο παράδειγμα σύνθετης δράσης Cat-Abs, που υδρολύουν δύο υποστρώματα. Επιπρόσθετα σημειώνεται ότι όλα τα αντισώματα χαρακτηρίζονται δυναμικά με βακτηριοκτόνο δράση (130). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι οι καταλυτικές δραστηριότητες μπορεί να προκύψουν σε αντισώματα με πλήρως φυσικές διαδικασίες.



**Εικόνα 3.1** Ιστορική αναδρομή της μελέτης των φυσικών Cat-Abs.



**Πίνακας 3.2** *Cat-Abs στην κυκλοφορία υγιών ατόμων.*

<b>Υπόταξη Cat-Abs</b>	<b>Δραστικότητα</b>
<b>IgG</b>	Πρωτεάσης, Φωσφατάσης, DNase, Αμυλάσης, Οξειδωση Νερού
<b>IgM</b>	Πρωτεάσης, DNase
<b>IgA (από ανθρώπινο γάλα)</b>	DNase, Αμυλάσης, Φωσφορυλίωσης (πρωτείνες, λιπίδια)

Η συγκέντρωση των φυσικών Cat-Abs αυξάνεται ή μειώνεται στα πλαίσια κυρίως των αυτοάνοσων και φλεγμονώδων παθήσεων. Σε αυτοάνοσα νοσήματα (129, 131, 132), λεμφώματα (133, 134) και άλλες παθολογικές καταστάσεις (135) έχουν εντοπιστεί, τόσο αυτούσια τα αντισώματα, όσο και μεμονωμένες ελαφριές αλυσίδες τους, με δράσεις πρωτεάσης και νουκλεάσης (**Πίνακας 3.3**). Τα πρώτα Cat-Abs που έχουν περιγραφεί, είχαν απομονωθεί από ασθενείς με βρογχικό άσθμα και ήταν ικανά να καταλύουν το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (VIP) (136). Έκτοτε, πρωτεολυτικά αντισώματα ειδικά για θυρεοσφαιρίνη, προθρομβίνη και τον παράγοντα VIII (FVIII) έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT), πολλαπλό μυέλωμα και με αιμοφιλία (ή αιμορροφιλία) A, αντίστοιχα (135, 137, 138). Αντισώματα IgM ή/και IgG που υδρολύουν το DNA και το RNA έχουν απομονωθεί από τον ορό ασθενών με ιογενείς ασθένειες (ιογενή Ηπατίτιδα και AIDS), λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα (λεμφώματα Β-κυττάρου (139), αλλά και από διαφορα συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα, όπως: ο ΣΕΛ, η Σκληροδερμία, η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα ή η Σκλήρυνση κατά πλάκας (131, 140, 141). Μερικά τέτοια Cat-Abs φαίνεται να εμφανίζουν επιλεκτικότητα ως προς τη στόχευσή τους καθώς δεν ανιχνεύθηκαν σε ορούς από υγιείς μάρτυρες ή σε ασθενείς με άλλες ιογενείς ή βακτηριογενείς διαταραχές (γρίπη, πνευμονία, φυματίωση, αμυγδαλίτιδα, δωδεκαδακτυλικό έλκος), όπως και σε ορισμένους τύπους καρκίνου (142).

**Πίνακας 3.3** *Cat-Abs σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα.*

<b>Cat-Abs σχετιζόμενα με ασθένειες</b>	
<b>Ασθένεια</b>	<b>Δραστικότητα</b>
<b>Άσθμα</b>	Πρωτεάσης (VIP)
<b>ΣΕΛ</b>	Πρωτεάσης (Θυρεοσφαιρίνη, VIP), DNase, RNase
<b>Θυροειδίτιδα Hashimoto</b>	Πρωτεάσης (Θυρεοσφαιρίνη), DNase
<b>Πολλαπλό Μυέλωμα</b>	Πρωτεάσης (Προθρομβίνη), DNase
<b>Λεμφώματα Β-κυττάρου</b>	DNase
<b>Ρευματοειδής Αρθρίτις</b>	Πρωτεάσης (σχετιζόμενη με αλληλουχίες HLA-DR )
<b>Σκλήρυνση κατά πλάκας</b>	Πρωτεάσης, Αμυλάσης, DNase, RNase
<b>Αιμοφιλία Α</b>	Πρωτεάσης (Παράγοντας VIII)
<b>Ιογενή Ηπατίτιδα</b>	RNase

### 3.3 Cat-Abs με δραστικότητα αντι-DNA

Ανάμεσα στα Cat-Abs, τα αντι-DNA αντισώματα με δράση DNase συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Η παραγωγή των Cat-Abs σε ανθρώπινο ορό έχειδειχθεί ότι αυξάνεται, όταν η ομοιότητα του ΑΣ διαταράσσεται, όπως συμβαίνει σε περιπτώσεις φλεγμονωδών διαταραχών ή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Αξίζει να σημειωθεί, πως ο αριθμός των ανθρώπινων αντι-DNA αντισωμάτων που έχουν αναφερθεί να υδρολύουν το DNA-κυρίως σε πολυκλωνικό επίπεδο-(pAbs) (141, 143) είναι μικρός, ενώ και ο μηχανισμός της υδρόλυσης δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος. Η βιοχημική και δομική βάση της υδρόλυσης του DNA ή/και του RNA δεν είναι αποσαφηνισμένη. Αυτό που είναι γνωστό, ωστόσο, είναι πως τα συγκεκριμένα Cat-Abs διαθέτουν πολλά κατιονικά αμινοξέα, όπως Arg και Lys, σε περιοχές καθορισμού συμπληρωματικότητας (CDR) στη βαριά (V<sub>H</sub>) ή/και ελαφριά αλυσίδα (V<sub>L</sub>), ιδιαίτερα στην V<sub>H</sub>-CDR3 περιοχή (144-147). Ομοίως με τον άνθρωπο, παρατηρήθηκε ότι η συχνότητα των Β-κυττάρων που παράγουν Cat-Abs ήταν αυξημένη σε ποντικούς, κλασικά ζωικά μοντέλα αυτοάνοσων νοσημάτων, (NZBxNZW)F1, MRL-lpr/lpr και SJL/J, ανοσοποιημένους με απτένια (148). Η δράση των DNA-CatAbs (149) δείχθηκε σε περαιτέρω μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με

μονοκλωνικά αντισώματα, όπως τα BV04-01, scFv 3D8, και G1-5, τα οποία απομονώθηκαν από ποντικούς (NZBxNZW)F1 και MRL lpr/lpr (150-153). Εντούτοις, δεν ήταν εφικτή η πλήρης διαλεύκανση της εξειδίκευσής τους ως προς την αλληλουχία της θέσης διάσπασης, αφού κάθε φορά παρατηρούνταν διαφοροποιήσεις ως προς την επιλογή του υποστρώματος (150-152). Στη βιβλιογραφία είναι γνωστό ένα τουλάχιστον μονοκλωνικό αντι-ssDNA αντίσωμα, το BV04-01, που έχει υδρολυτική δράση παρουσία ιόντων  $Mg^{2+}$  και  $Ca^{2+}$ , τα οποία λειτουργούν ως συμπράγοντες. Το scFv 3D8 χαρακτηρίζεται από εξαρτώμενη από  $Mg^{2+}$  υδρολυτική δράση, την οποία χάνει παρουσία EDTA. Το mAb G1-5 παρουσίασε δράσεις γλυκοσιδάσης και φωσφατάσης έναντι τόσο dsDNA, όσο και ssDNA, παρουσία ιόντων  $Mg^{2+}$ , με προτίμηση για ακολουθίες πλούσιες σε θυμίνη (T) του DNA. Τόσο το BV04-01 όσο και το scFv 3D8 δεν εμφανίζουν αυστηρή εξειδίκευση αλληλουχίας, αν και το BV04-01 δείχνει να προτιμά να υδρολύει ακολουθίες πλούσιες σε C-και CG- του DNA, ενώ το 3D8 ήταν πιο αποτελεσματικό έναντι περιοχών πλούσιων σε T- του DNA (150, 154). Μάλιστα, παρατηρήθηκε ότι το scFv 3D8 διεισδύει στο κυτοσόλιο κυττάρων μέσω ενδοκυττάρωσης διαμεσολαβούμενης από μικροκυστίδια (caveoli) και το G1-5 στον πυρήνα μέσω ενεργειακά εξαρτώμενων μηχανισμών, προκαλώντας κυτταροτοξικότητα εξαιτίας της υδρολυτικής τους δράσης. Είναι πιθανό ότι οι δύο μηχανισμοί (διείσδυση, υδρόλυση) μπορούν να συνεργαστούν και έτσι να προκαλούν κυτταρικό θάνατο, το οποίο χρήζει περαιτέρω ανάλυσης με σκοπό την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της ιστικής βλάβης και της παθογένειας αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως ο SLE.

#### **4. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΥΤΗΣ**

##### **4.1 Η φυσιολογική αγγειογένεση**

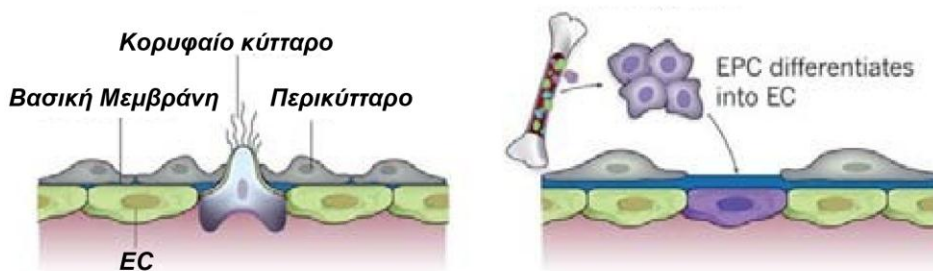
Ως αγγειογένεση ορίζεται η ανάπτυξη νέων αγγείων από προϋπάρχουσες αγγειακές δομές και είναι μία αυστηρά ελεγχόμενη, πολλαπλών σταδίων διαδικασία. Η αγγειογένεση συνήθως δημιουργείται με εκβλάστηση από προϋπάρχοντα αγγεία (**Εικόνα 4.1Α**), όπου η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός και η δομική αναδιαμόρφωση των συστατικών των αγγείων αποτελούν ουσιαστικής σημασίας γεγονότα (155-157). Τα αιμοφόρα αγγεία αναπτύσσονται για να επιτρέψουν στα αιμοποιητικά κύτταρα να κυκλοφορούν στον οργανισμό να επιτηρούν ανοσολογικά, να παρέχουν οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά και να αποβάλλουν τα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού. Όμως τα αγγεία παρέχουν και

σήματα καθοδήγησης για την οργανογένεση με ένα μηχανισμό ανεξάρτητο από την αιμάτωση (158). Ποικίλες μορφές σχηματισμού αγγείων έχουν αναγνωριστεί (**Εικόνα 4.1**). Στο αναπτυσσόμενο έμβρυο θηλαστικών, ο αγγειοβλάστης διαφοροποιείται σε ενδοθηλιακό κύτταρο που στη συνέχεια οργανώνεται σε ένα αγγειακό λαβύρινθο-μία διαδικασία γνωστή ως αγγειοποίηση (**4.1B**). Διακριτά σήματα καθορίζουν την αρτηριακή ή τη φλεβική διαφοροποίηση (159). Στην αρτηριογένεση, τα αγγεία και τα ενδοθηλιακά κυτταρικά κανάλια καλύπτονται από περικύτταρα ή λεία μυϊκά κύτταρα που παρέχουν σταθερότητα και έλεγχο της αιμάτωσης.

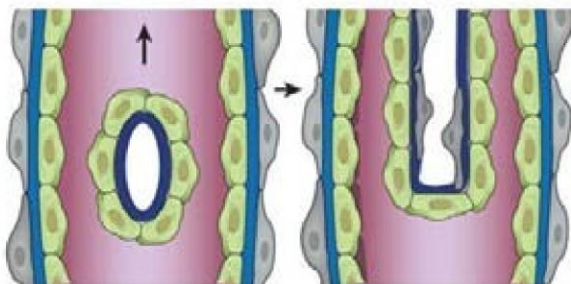
Αν και αμέσως μετά τη γέννηση, η αγγειογένεση εξακολουθεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη των οργάνων, τα περισσότερα αιμοφόρα αγγεία κατά την ενηλικίωση παραμένουν σε κατάσταση ηρεμίας και η φυσιολογική αγγειογένεση λαμβάνει χώρα μόνο σε καταστάσεις όπως η αναγέννηση του ενδομητρίου στον καταμήνιο κύκλο και η εγκυμοσύνη. Ωστόσο, τα ECs διατηρούν την ικανότητα τους να διαιρούνται ταχέως ως απόκριση σε φυσιολογικά ερεθίσματα όπως η υποξία (155) με αποτέλεσμα η αγγειογένεση να επανενεργοποιείται κατά την επούλωση πληγών και την επιδιόρθωση τραυμάτων. Στο φυσιολογικό ενήλικα, τα ήρεμα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν μακρούς χρόνους ημίσειας ζωής.

Όταν τα ήρεμα ECs ανιχνεύσουν ένα αγγειογενετικό σήμα όπως τον VEGF, ή τους FGFs ή άλλες χυμοκίνες που απελευθερώνονται από ένα υποξικό, φλεγμονώδες ή καρκινικό κύτταρο, τα περικύτταρα αρχικά αποκολλώνται από το αγγειακό τοίχωμα (σε απόκριση στην ANG-2) και ελευθερώνονται από τη βασική μεμβράνη με πρωτεολυτική διάσπαση που μεσολαβείται από τις μεταλλοπρωτεϊνάσες του στρώματος (MMPs) (**Εικόνα 4.1.1A**). Τα ECs και τα τοιχωματικά κύτταρα χαλαρώνουν τις συνδέσεις τους και ο VEGF αποκτά καλύτερη πρόσβαση στους υποδοχείς του με αποτέλεσμα να αυξάνει τη διαπερατότητα των ECs αλλάζοντας την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία ποιοτικά και ποσοτικά. Στα πλαίσια αυτά ο VEGF επιτρέπει την εξαγγείωση πρωτεϊνών και τη δημιουργία ενός προσωρινού εξωκυττάριου στρωματικού ικριώματος, αλλά επίσης απελευθερώνει πρωτεάσες που αναδιαμορφώνουν την υπάρχουσα ECM.

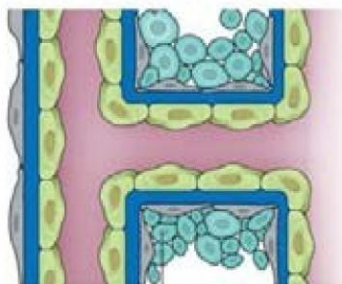
**A. Αγγειογένεση μέσω εκβλάστησης B. Αγγειακή μορφογένεση**



**Γ. Εγκολεασμός**

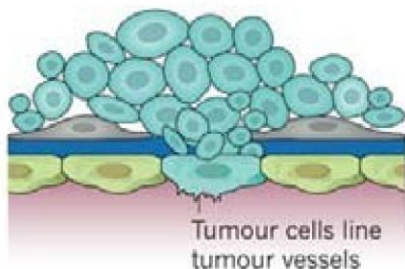


**Δ. Συνεπιλογή από προϋπάρχοντα αγγεία**



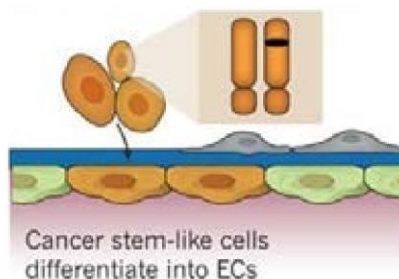
Tumour cells co-opt pre-existing vessels

**Ε. Αγγειακή μίμηση**



Tumour cells line tumour vessels

**ΣΤ. Διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων σε EC**



Cancer stem-like cells differentiate into ECs

Carmeliet P. and Rakesh JK. Nature 2011;473:298-307

**Εικόνα 4.1** Μηχανισμοί διαμόρφωσης αγγείων σε φυσιολογικούς ιστούς και σε όγκους.

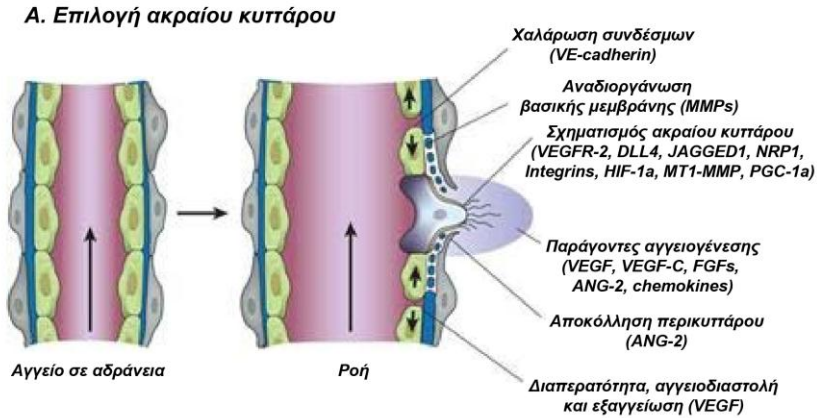
**A–Γ:** Σχηματισμός αγγείων μπορεί να συμβεί με αγγειογένεση μέσω εκβλάστησης (A) με τη προσέλκυση ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων (EPCs) από το μυελό των οστών ή/και από τα ευρισκόμενα στο αγγειακό τοίχωμα που διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs) (αγγειακή μορφογένεση) (B) ή με μία διαδικασία διαχωρισμού του αγγείου γνωστή ως εγκολεασμός (Γ).

**Δ–ΣΤ:** Τα κύτταρα του όγκου μπορούν να συνεπιλεγούν από προϋπάρχοντα αγγεία (Δ) ή τα αγγεία του όγκου μπορούν να επενδυθούν με καρκινικά κύτταρα (αγγειακή μίμηση)(Ε) ή από ενδοθηλιακά κύτταρα με κυτταρογενετικές ανωμαλίες στα χρωμοσώματά τους, προερχόμενα από καρκινικά βλαστικά κύτταρα (ΣΤ). Σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ιστούς που χρησιμοποιούν την αγγειογένεση μέσω εκβλάστησης ή εγκολεασμού και αγγειοποίησης (A–Γ), οι όγκοι μπορούν να χρησιμοποιήσουν και τους έξι τρόπους σχηματισμών αγγείων (A–ΣΤ)(158).

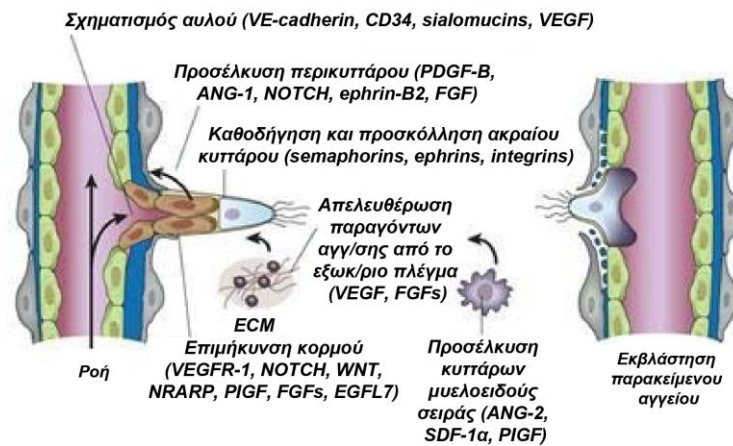
Σημαντικό στοιχείο της εκβλάστησης είναι η επιλογή από τον VEGF ενός «ακραίου» κυττάρου (tip cell) για να την καθοδηγήσει και να αποτραπεί μαζική μετακίνηση των ECs προς τον αγγειογενετικό παράγοντα (**Εικόνα 4.1.1A**). Τα γειτονικά κύτταρα του ακραίου κυττάρου αποτελούν τα κύτταρα του κορμού (stalk cells) τα οποία διαιρούμενα δημιουργούν έναν κορμό ο οποίος επιμηκύνεται προκειμένου σε δεύτερο στάδιο να αλλοποιηθεί (**Εικόνα 4.1.1B**). Τα ακραία κύτταρα είναι εφοδιασμένα με φιλλοπόδια για να αντιλαμβάνονται τα περιβαλλοντικά σήματα κατεύθυνσης όπως τις εφρίνες (eprhins) και τις σεμαφορίνες (semaphorins). ενώ τα κύτταρα κορμού απελευθερώνουν μόρια, όπως η EGFL7 πρωτεΐνη, στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία για να μεταφέρουν χωρικές πληροφορίες σχετικά με τη θέση γειτονικών κυττάρων. Κύτταρα-γέφυρες της μυελοειδούς προσελκύονται και ενεργοποιούν τη σύντηξη με άλλες εκβλαστήσεις επιτρέποντας την έναρξη της αιματικής ροής. Τα ECs ανακτούν την ήρεμη κατάσταση φάλαγγας (**Εικόνα 4.1.1Γ**) και σήματα όπως ο PDGF-β, ANG-1, TGF-β, εφρίνη-β2 και NOTCH επάγουν την κάλυψη των ενδοθηλιακών κυττάρων με περικύτταρα. Αναστολείς των πρωτεασών, γνωστοί ως ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs) και ο αναστολέας 1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) προκαλούν την εναπόθεση της βασικής μεμβράνης και επανεγκαθίστανται οι κυτταρικές συνδέσεις για να επιτρέψουν την ιδανική κατανομή της ροής του αίματος (**Εικόνα 4.1.1Γ**).

Η ιστική υποξία αποτελεί ένα σημαντικό ερέθισμα για την ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου. Αρχικά τα κύτταρα οξυγονώνονται με απλή διάχυση του οξυγόνου αλλά όταν οι ιστοί αναπτύσσονται πέρα του ορίου διάχυσης, η υποξία κινητοποιεί την αγγειακή ανάπτυξη μέσω σηματοδότησης των HIFs (160). Οι HIFs επάγουν πολλαπλά αγγειογενή γονίδια αλλά η επαγωγή του VEGF είναι ίσως η πλέον αξιοσημείωτη-έως και 30 φορές αύξηση εντός λεπτών. Ο VEGF διεγείρει ακολούθως την αγγειογένεση με ένα αυστηρά δοσοεξαρτώμενο τρόπο και για το λόγο αυτό αξιολογείται σήμερα ως υποψήφιο για προ- ή αντιαγγειογενετική θεραπεία (161).

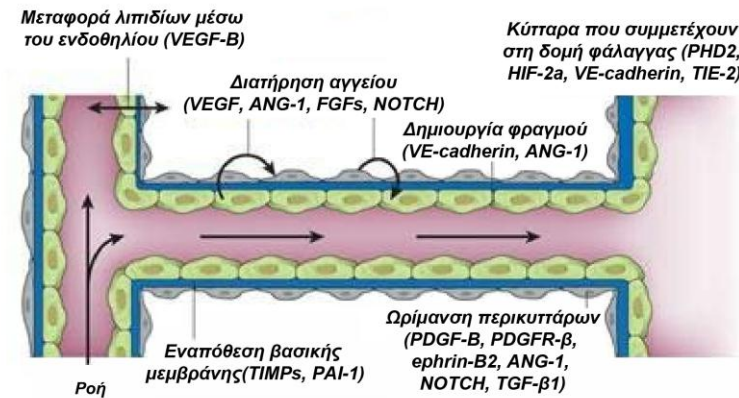




**B. Επιμήκυνση κορμού και καθοδήγηση από το ακραίο κύτταρο**



**Γ. Δημιουργία δομής φάλαγγας**



**Εικόνα 4.1.1** Η μοριακή βάση του σχηματισμού των αγγειακών διακλαδώσεων.

A) Μετά από ενεργοποίηση με αγγειογενετικούς παράγοντες, τα ήρεμα αγγεία διαστέλλονται και επιλέγεται ένα ενδοθηλιακό κύτταρο ως άκραιο [tip cell] (DLL4 και JAGGED1) για να εξασφαλιστεί ο σχηματισμός της εκβλάστησης. Ο σχηματισμός του ακραίου κυττάρου απαιτεί την αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης, την αποκόλληση των περικυττάρων και τη χαλάρωση των ενδοθηλιακών κυτταρικών συνδέσεων. Η αυξημένη διαπερατότητα επιτρέπει την εξαγγείωση πρωτεϊνών του πλάσματος (όπως ινωδογόνο και ινωνεκτίνη) για το σχηματισμό ενός υποστηρικτικού στρώματος και οι πρωτεάσες διασπών το προϋπάρχον στρώμα με σκοπό την ενίσχυση της μετανάστευσης. Για

λόγους απλοποίησης, απεικονίζεται μόνο η βασική μεμβράνη μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και των περικυττάρων αλλά στην πραγματικότητα τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα περικύτταρα βρίσκονται πάνω στη βασική μεμβράνη.

**Β)** Τα ακραία κύτταρα προσανατολίζονται ως απόκριση σε σήματα καθοδήγησης (όπως οι σεμαφορίνες και οι εφρίνες) και προσκολλώνται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (που διαμεσολαβείται από τις ιντεγκρίνες) για να μεταναστεύσουν. Τα κύτταρα του κορμού (stalk) πίσω από τα ακραία πολλαπλασιάζονται, επιμηκύνονται και σχηματίζουν έναν αυλό. Τέλος, οι εκβλαστήσεις συντήκονται για να σχηματίσουν ένα αιματούμενο νεοαγγείο. Τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα κορμού προσελκύουν περικύτταρα και επιτρέπουν στη βασική μεμβράνη να σταθεροποιηθεί. Τα προελκόμενα μυελικά κύτταρα της μυελοειδούς σειράς, όπως τα μακροφάγα των όγκων (TAMs) και τα μονοκύτταρα που εκφράζουν TIE-2 (TEMs), μπορούν να παράγουν προ-αγγειογενετικούς παράγοντες ή πρωτεολυτικά απελευθερωμένους αγγειογενετικούς αυξητικούς παράγοντες από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία.

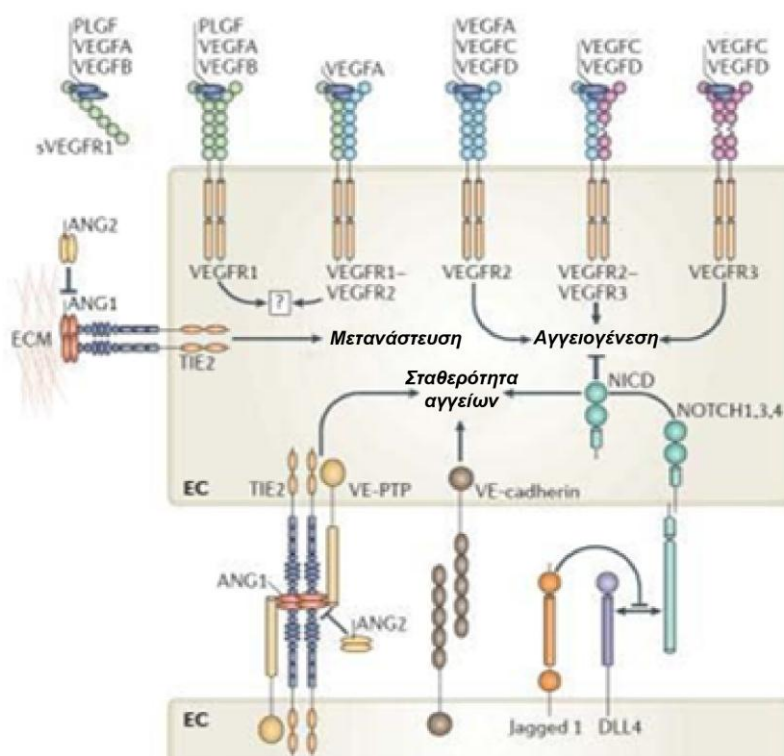
**Γ)** Μετά τη σύντηξη γειτονικών διακλαδώσεων, ο σχηματισμός αυλού επιτρέπει την αιμάτωση του νεοαγγείου που επιστρέφει στην ήρεμη κατάσταση επάγοντας ένα φαινότυπο φάλαγγας, επανεγκαθίδρυση των συνδέσεων, εναπόθεση της βασικής μεμβράνης, ωρίμανση των περικυττάρων και παραγωγή σημάτων συντήρησης. Άλλοι παράγοντες επάγουν διενδοθηλιακή μεταφορά λιπιδίων (158).

Δοθείσης της πολυπλοκότητας μίας διαδικασίας όπως η αγγειογένεση, είναι εντυπωσιακό πως ένας μόνο αυξητικός παράγοντας, ο VEGF, κατέχει κυρίαρχο ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία αυτή. Ο VEGF (γνωστός και ως VEGF-A) διεγείρει την αγγειογένεση τόσο φυσιολογικά όσο και παθολογικά μέσω της σηματοδότησης του VEGFR-2 (162, 163). Οι νευροπιλίνες (NRP-1 και NRP-2) αποτελούν συνυποδοχείς του VEGF που ενισχύουν τη δραστηριότητα του VEGFR-2 αλλά σηματοδοτούν και ανεξάρτητα (164). Σε απόκριση σε ένα πρηνές του VEGF, που δημιουργείται από διαλυτές μορφές αλλά και από τον προσδεδεμένο στην ECM, τα ακραία κύτταρα αυξάνουν την έκφραση του Dll-4 και ενεργοποιούν το Notch στα γειτονικά κύτταρα κορμού. Η ενεργοποίηση αυτή καταστέλλει την έκφραση του VEGFR-2, καθιστώντας τα κύτταρα κορμού μη ανταποκρινόμενα στο VEGF, βεβαιώνοντας έτσι ότι το ακραίο κύτταρο θα ηγηθεί της διαδικασίας (165). Συρρέουσες μαρτυρίες δείχνουν ότι η βιολογική δράση της σηματοδότησης του VEGFR-2 εξαρτάται από την υποκυτταρική εντόπιση του- για παράδειγμα η σηματοδότηση πρέπει να γίνει από ενδοκυτταρικά διαμερίσματα για να επαχθεί η αρτηριακή αναδιαμόρφωση (166).

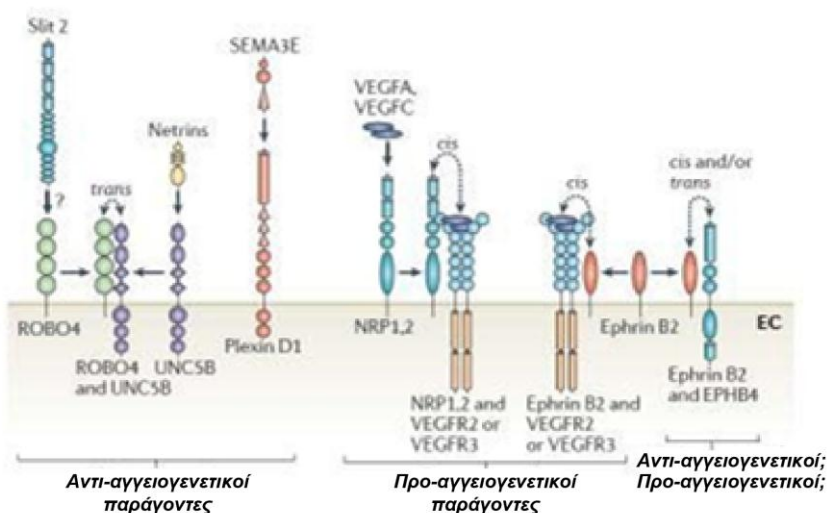
Διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια εκτός του VEGFR-2 έχουν περιγραφεί στην αγγειογένεση και παρουσιάζονται συνοπτικά στην **Εικόνα 4.1.2**.



A.



B.



**Εικόνα 4.1.2** Σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την αγγειογένεση.

A) Γενικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τη συμπεριφορά των ECs. Οι VEGFs των θηλαστικών προσδέονται σε ομοδιμερή και ετεροδιμερή συμπλέγματα τριών VEGFRs. Η σηματοδότηση μέσω του VEGFR2, VEGFR3 ή VEGFR2– VEGFR3 ετεροδιμερούς, είναι προ-αγγειογενετική. Η πρωτεολυτική επεξεργασία των VEGF-C και VEGF-D είναι προαπαιτούμενη για να αλληλεπιδράσουν με τον VEGFR2. Η πρόσδεση του VEGFA στον VEGFR1 αλλά και στην εκκρινόμενη εξωκυττάρια περιοχή του VEGFR1 (διαλυτός VEGFR1 (sVEGFR1) δρα σαν «παγίδα» για τον VEGFA που περιορίζει τη διαθεσιμότητά του για την ενεργοποίηση του VEGFR2. Η αλληλεπίδραση του υποδοχέα TIE2 με την προσδεσμένη στο εξωκυττάριο στρώμα αγγειοποιητίνη-1 (ANG1) στις περιοχές σύνδεσης των EC–ECM επάγει τη μετανάστευση (167). Αντιθέτως, στις περιοχές σύνδεσης μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων οι αλληλεπιδράσεις ANG1–TIE2 επάγουν τον

εφουσχασμό μετά από την δημιουργία *trans*-συμπλεγμάτων με γειτονικά κύτταρα. Τα συμπλέγματα αυτά περιλαμβάνουν την πρωτεϊνική τυροσινική φωσφατάση του αγγειακού ενδοθηλίου (*vascular endothelial protein Tyr phosphatase*, *VE-PTP*, επίσης γνωστή και ως *PTPRB*) και ενεργοποιούν διακριτά σηματοδοτικά μονοπάτια από αυτά που ξεκινάνε στα σημεία επαφής κυττάρων-στρώματος (167). Η *ANG2* ανταγωνίζεται τη δράση της *ANG1* στον *TIE2* στην αποσταθεροποίηση των αγγείων και βοηθά την αγγειακή αναδιαμόρφωση. Οι ομοειδείς αλληλεπιδράσεις της *VE-cadherin* διατηρούν τις συνδέσεις μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων. Η διαμεσολαβούμενη από το *Delta-like 4 (DLL4)* ενεργοποίηση των υποδοχέων *Notch* καταστέλλει την αγγειογενετική συμπεριφορά των αγγειογενετικών κυττάρων και επάγει την αγγειακή σταθερότητα μετά την πρωτεολυτική απελευθέρωση του ενδοκυττάρου τμήματος του (*NICD*). Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, η *Jagged 1* ανταγωνίζεται τη *DLL4* για πρόσδεση στη *Notch* προκειμένου να ελαττώσει τη σηματοδότηση *DLL4-Notch*. Β) Γνωστοί υποδοχείς καθοδήγησης των νευραξόνων που εκφράζονται στα *ECs*. Οι αλληλεπιδράσεις των *Roundabout homologue 4 (ROBO4)*–*uncoordinated 5 homologue B (UNC5B)* επάγουν την *UNC5B*-διαμεσολαβούμενη καταστολή της σηματοδότησης των *VEGFR*, εμποδίζουν την αγγειογένεση και διατηρούν την αγγειακή ακεραιότητα. Η ενεργοποίηση του *ROBO4* από το *Slit 2* μπορεί επίσης να μπλοκάρει τη σηματοδότηση των *VEGFR* αλλά αυτό είναι αμφισβητούμενο. Η ενεργοποίηση του *UNC5B* από τις νετρίνες μπορεί επίσης να διακόψει την αγγειογένεση. Οι εκκρινόμενες τάξης III σεμαφορίνες (όπως η σεμαφορίνη 3E (*SEMA3E*)) επάγουν την υποστρόφη των *EC* για να διαταράξουν την αγγειογένεση μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα τους, την πλεξίνη *D1*. Σε αντίθεση, η νευροπλίνη 1 (*NRP1*) ή *NRP2* ενισχύουν την αγγειογενή συμπεριφορά των *EC* μετά την πρόσδεση του *VEGFA* ή *VEGFC* και/ή την αλληλεπίδραση με τους *VEGFR2* ή *VEGFR3*. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα *B4* της εφρίνης (*EPHB4*) μετά από την αλληλεπίδραση με το μεμβρανοσύνδετο συνδέτη του, *erhrin B2*, μπορεί να επάγει την μεταξύ *ECs* αποστρόφη ή προσέλκυση κάτω από συγκεκριμένες κυτταρικές συνθήκες και είναι ουσιώδης για την αγγειογένεση. Η ανάστροφη σηματοδότηση *EPHB4-erhrin B2* μπορεί να παίζει καθοριστικούς ρόλους στην αγγειακή ανάπτυξη. Η αλληλεπίδραση της *erhrin B2* με τους *VEGFR2* ή *VEGFR3* επάγει την εσωτερικήευση στη μεμβράνη των *VEGFR* και ενισχύει την αγγειογενή σηματοδότηση.

## 4.2 Η παθολογική αγγειογένεση

Η αγγειογένεση, αν και ωφέλιμη για την ανάπτυξη των ιστών και την αναγέννηση, δεν αποτελεί πάντοτε ευεργετική διαδικασία. Τα αγγεία μπορούν να τροφοδοτήσουν φλεγμονώδεις και κακοήθεις νόσους και να αξιοποιηθούν από καρκινικά κύτταρα για τη μετάσταση των τελευταίων. Οι αποκλίσεις από τη φυσιολογική αγγειογένεση όταν είναι κατασταλτικές οδηγούν σε ανεπάρκεια της (π.χ. αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, έμφραγμα μυοκαρδίου, ελκώδεις διαταραχές και νευροεκφυλιστικές νόσοι) ενώ η μη φυσιολογική ανάπτυξη και αναδιαμόρφωση των αγγείων παρατηρείται σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις συμπεριλαμβανομένων οξέων και χρόνιων φλεγμονωδών διαδικασιών όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και οι κακοήθειες (156), αλλά και σε πολλές επιπρόσθετες διαδικασίες όπως η παχυσαρκία, το άσθμα, ο σακχαρώδης διαβήτης, η ενδομητρίωση, οι βακτηριακές λοιμώξεις και τα αυτοάνοσα νοσήματα.

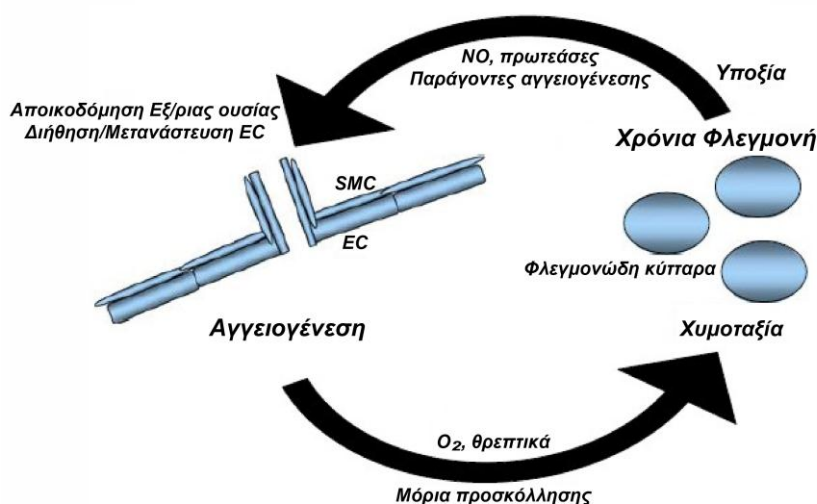
Οι σχηματισμός αγγειακών εκβλασήσεων είναι ο καλύτερα χαρακτηρισμένος τρόπος νέο-αγγειογένεσης που περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των *ECs*

σε περιοχές δίχως αγγεία, αν και διάφοροι άλλοι αγγειογενείς μηχανισμοί έχουν επίσης προταθεί (168). Ο συχνότερος παθοφυσιολογικός μηχανισμός θεωρείται η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ προ- και αντιαγγειογενών παραγόντων που παρατείνεται για μεγάλες περιόδους και συνήθως συνοδεύει τη φλεγμονή (169).

Ο συντονισμός της αγγειογένεσης επιτυγχάνεται από ένα ευρύ φάσμα ενεργοποιητών και αναστολέων που συγχρονίζουν διαδοχικά μία πολύπλοκη αλληλουχία γεγονότων. Η διαδικασία αυτή απαιτεί ενεργοποίηση πολλαπλών υποδοχέων από πολυάριθμους συνδέτες, που περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τους PlGF, aFGF και bFGF, Ang-1 και Ang-2, PDGF και του HGF (170-173). Από τους πολυάριθμους αγγειογενετικούς παράγοντες ο VEGF θεωρείται ως ο κυρίαρχος της επαγόμενης από την ανοσία αγγειογένεσης (174, 175) και εκφράζεται σε πολλές φλεγμονώδεις νόσους όπως η αρθρίτιδα (176), η αθηροσκλήρυνση (126) καθώς και σε περιπτώσεις απουσίας ιστοσυμβατότητας (π.χ. κατά την απόρριψη μοσχεύματος) (177) και. Ο VEGF δρα μέσω πρόσδεσης στους δύο υποδοχείς κινάσης τυροσινικής, VEGFR1 και VEGFR2 αν και οι περισσότερες από τις βιολογικές δράσεις του διαμεσολαβούνται από τη σηματοδότηση του VEGFR2 (178-180). Ο VEGF παράγεται τόσο από ECs όσο και από μονοκύτταρα και ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα (174, 181) που μπορούν να διεγείρουν την αγγειογένεση στα πλαίσια φλεγμονωδών αποκρίσεων (182-184). Η ρύθμιση του VEGF από την υποξία έχει δειχθεί σε πολλούς τύπους καρκίνων αλλά και επούλωση πληγών που είναι γενικά ισχαιμικές περιοχές. Ωστόσο η οξέωση, σταθερό σημείο φλεγμονωδών και ισχαιμικών περιοχών επίσης αυξάνει την έκφραση του VEGF-A και μάλιστα ανεξάρτητα από την υποξία (185).

Η χρόνια φλεγμονή και η αγγειογένεση αποτελούν δύο διαδικασίες που συγκλίνουν. Η υποξία αποτελεί το κύριο ερέθισμα και για τις δύο αυτές διαδικασίες οδηγώντας σε συσσώρευση μακροφάγων και άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού (186) καθώς και σε υπερπαραγωγή αυξητικών παραγόντων (169, 170, 187, 188). Πολλά από τα κύτταρα που λαμβάνουν μέρος στις φλεγμονώδεις διαδικασίες, απελευθερώνουν διάφορους παράγοντες που δρουν άμεσα ή έμμεσα στα ECs. Εναλλακτικά, η αγγειογένεση συντηρεί τη φλεγμονή παρέχοντας οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά για τις μεταβολικές ανάγκες των κυττάρων που βρίσκονται στις φλεγμονώδεις εστίες (**Εικόνα 4.2**). Αρχικό γεγονός αποτελεί η παραγωγή NO, ενός καλά αναγνωρισμένου φλεγμονώδους μεσολαβητή, από την iNOS των φλεγμονωδών κυττάρων. Το NO επάγει τη διατασιμότητα των αγγείων και αυξάνει τη διαπερατότητα τους, γεγονός που ευνοεί την εξαγγείωση των ανοσοποιητικών κυττάρων (189).

Πολλές άλλες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χυμοκίνες που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους απόκρισης, αποτελούν ισχυρούς ενεργοποιητές των γειτονικών ECs στην προσέλκυση φλεγμονωδών κυττάρων. Το πλέον κρίσιμο στάδιο ολόκληρης της διαδικασίας αποτελεί η προσκόλληση των ανοσοποιητικών κυττάρων στο ενδοθήλιο, η οποία ενεργοποιεί την ολίσθησή τους και την είσοδό τους στον έσω χιτώνα του αγγείου. Οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές που παράγονται από τα ανοσοποιητικά κύτταρα, στοχεύουν τους ινοβλάστες και τα ECs ώστε να παράγουν αγγειογενείς παράγοντες (190), παρέχοντας έμμεση ενεργοποίηση της αγγειογένεσης. Τα προφλεγμονώδη κύτταρα μπορούν και άμεσα να διεγείρουν την αγγειογένεση καθώς τα ίδια παράγουν αγγειογενείς παράγοντες όπως VEGF, Ang, bFGF, HGF, PDGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  μεταξύ άλλων, οι οποίοι μεταβιβάζουν μιτογόνα και μεταναστευτικά σήματα στο ενδοθήλιο (191-193).



**Εικόνα 4.2** Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ χρόνιας φλεγμονής και αγγειογένεσης. Τα φλεγμονώδη κύτταρα εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες, πρωτεάσες και κυτταροκίνες που επάγουν την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, την ανάπτυξη, μετανάστευση και τη διηθητική ικανότητα των ECs, δηλαδή την αγγειογένεση. Αντίστροφα, τα αγγειακά τοιχώματα ενισχύουν τη χρόνια φλεγμονή παρέχοντας κυτταροκίνες, οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά και επιτρέποντας τη χυμοταξία των φλεγμονωδών κυττάρων. Η αγκύλη αυτή ενισχύει περαιτέρω τη φλεγμονή και την αγγειογένεση (194).

Η υποξία που αποτελεί χαρακτηριστικό σημείο της φλεγμονής, επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HIF ο οποίος με τη σειρά του ρυθμίζει τη μεταγραφική ενεργοποίηση ποικίλων αγγειογενών γονιδίων (190), ενώ σημαντικό ρόλο κατέχει και η

ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB από προφλεγμονώδεις παράγοντες και ο οποίος εμπλέκεται τόσο στη φλεγμονή όσο και στην αγγειογένεση (195, 196). Πρόσφατα δεδομένα συνηγορούν ότι φλεγμονή και αγγειογένεση βασίζονται στη διασταυρούμενη αλληλεπίδραση μεταξύ NF-κB και Ang-Tie-2 σηματοδοτικού μονοπατιού (195, 197).

Η παθολογική αγγειογένεση συναντάται εκτός από τις χρόνιες φλεγμονές και στην αθηροσκλήρυνση στην οποία η νεοαγγείωση της αθηρωματικής πλάκας θεωρείται ότι συμμετέχει στην εξέλιξή της. Στον αθηροσκληρωτικό έσω χιτώνα των αγγείων, τα νεοσχηματισθέντα αγγεία κατανέμονται ατάκτως αλλά σε πολύ πυκνή διάταξη στα σημεία διάσπασης του μέσου χιτώνα, ενώ ο έσω και ο μέσος χιτώνας σε επιπεπλεγμένες πλάκες διηθούνται από μάζες μικροαγγείων όμοια με αυτά των όγκων (198, 199). Τα περισσότερα από τα αγγεία αυτά είναι ανώριμα και με διαρροή επιτρέποντας διηθήσεις από φλεγμονώδη κύτταρα και είσοδο συστατικών του αίματος (198).

Το ενδοθήλιο στα τριχοειδή του έσω χιτώνα εμφανίζει αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως της E-σελεκτίνης, ICAM-1 και VCAM-1 (200) που υποδηλώνει ένα θετικό επανατροφοδοτικό μηχανισμό μεταξύ αθηροσκλήρυνσης και χρόνιας φλεγμονής. Η αγγειογένεση και η φλεγμονή είναι δύο ανεξάρτητες βιολογικές διεργασίες που συνδέονται ως απόκριση σε βλάβη. Στην οξεία φλεγμονή τα τριχοειδή διατείνονται και αυξάνουν τη διαπερατότητα τους ενώ στη χρόνια φλεγμονή των μεγάλων αγγείων, η παρατηρούμενη αθηροσκλήρυνση σχετίζεται με πολλαπλασιασμό των *vasa vassorum* (αγγεία του έξω χιτώνα των αγγείων που αιματώνουν το αγγειακό τοίχωμα) (201). Σχηματισμός νέων *vasa vassorum* έχει εμπλακεί σε αναπτυσσόμενες αλλοιώσεις ως αποτέλεσμα υποξίας, ένα από τα πλέον ισχυρά ερεθίσματα για αγγειογένεση, που συμβαίνει όσο αυξάνεται το πάχος του έσω χιτώνα (201). Επιπρόσθετα, το φλεγμονώδες διήθημα από μονοκύτταρα/μακροφάγα και T-λεμφοκύτταρα παράγει ένα αριθμό διαλυτών παραγόντων (κυτταροκίνες, χυμοκίνες και αυξητικούς παράγοντες) που επηρεάζουν την συμπεριφορά των ECs και υποστηρίζουν το επαγόμενο από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες αγγειογενές πρόγραμμα. Η αγγειογένεση στην αθηροσκλήρυνση θα περιγραφεί αναλυτικότερα στο σχετικό κεφάλαιο παρακάτω. Σε ορισμένες καταστάσεις όπως η ισχαιμική καρδιακή νόσος και η προεκλαμψία, η αγγειογένεση είναι ανεπαρκής και προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, αγγειακές διαμαρτίες ή και υποστροφή των αγγείων, εμποδίζοντας την επανααγγείωση, την επούλωση και την αναγέννηση.

### 4.3 Αγγειοπάθεια στον ΣΕΛ

Εδώ και τουλάχιστον 30 χρόνια, ένα δικόρυφο πρότυπο θνησιμότητας έχει περιγραφεί στο ΣΕΛ, με το δεύτερο σκέλος να οφείλεται σε θανάτους οφειλόμενους σε πρώιμη καρδιαγγειακή νόσο (202). Κύρια αιτιολογία του φαινομένου αυτού είναι ότι ο ΣΕΛ όπως και τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα χαρακτηρίζονται από εκσεσημασμένη, πρώιμη και επιταχυνόμενη αθηροσκλήρυνση (203-206) που δεν μπορεί να αιτιολογηθεί μόνο από τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου κατά Framingham (207-209). Αυτός ο αυξημένος κίνδυνος αθηροσκλήρυνσης αυξάνει με κάθε έτος στη διάρκεια της νόσου και αποκτά ιδιαίτερη σημασία στην περίπτωση νέων γυναικών με ΣΕΛ στις οποίες ο καρδιαγγειακός κίνδυνος μπορεί να είναι έως και 50 φορές υψηλότερος σε σχέση με ανάλογης ηλικίας υγιείς μάρτυρες (210, 211). Αν και οι διαταραχές στη ανοσορύθμιση διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο (212), οι ακριβείς μηχανισμοί που οδηγούν σε εκσεσημασμένο καρδιαγγειακό κίνδυνο παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Ενώ η συστηματική φλεγμονή έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης τόσο στο γενικό πληθυσμό όσο και σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις, τυπικά ο ΣΕΛ χαρακτηρίζεται από χαμηλότερο «κλασσικό φλεγμονώδες φορτίο» σε σχέση με αυτό που εμφανίζεται στη ρευματοειδή αρθρίτιδα ή στις σπονδυλαθροπάθειες. Παρόλα αυτά ο λύκος σχετίζεται με υψηλότερο καρδιαγγειακό κίνδυνο σε σχέση με αυτές τις νόσους. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι οι παράγοντες που κινητοποιούν την επιταχυνόμενη αθηροσκλήρυνση στο λύκο, διαφέρουν από τους κλασσικούς προφλεγμονώδεις παράγοντες (π.χ. η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη) που έχουν συσχετιστεί με την ιδιοπαθή αθηροσκλήρυνση. Η αθηροσκλήρυνση στο ΣΕΛ εμφανίζεται ή εξελίσσεται στο 10% των ασθενών ανά έτος και μεταξύ των άλλων παραγόντων η εξέλιξη αυτή σχετίζεται με τη μεγαλύτερη ηλικία και τη μακρύτερη διάρκεια νόσου υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι η χρόνια έκθεση στις επαγόμενες από το λύκο διαταραχές της ανοσορρύθμισης ευνοεί την ανάπτυξη της καρδιαγγειακής νόσου (213).

Συνολικά οι ασθενείς με ΣΕΛ εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα των παραδοσιακών παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με πρώιμη αγγειακή βλάβη. Συσχέτιση έχει καταγραφεί μεταξύ καπνίσματος και αρτηριακών θρομβωτικών γεγονότων (214), η αρτηριακή υπέρταση σχετίζεται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο τόσο στο ΣΕΛ όσο και στην Ρ.Α. και δυσλιποπρωτεϊναιμία που χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα VLDL, υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων, υψηλή ή φυσιολογική LDL και χαμηλή HDL σε συνδυασμό με διαταραχές στο σχηματισμό των χυλομικρών (215, 216). Μεταβολές στη

λειτουργία των λιποπρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων της υψηλής λιποπρωτεΐνης α και της οξειδωμένης LDL, έχουν επίσης περιγραφεί σε ασθενείς με ΣΕΛ (215, 217). Η HDL έχει επίσης αναφερθεί ότι εμφανίζει προφλεγμονώδεις ιδιότητες και συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα οξειδωμένης LDL (218). Αρκετές επίσης μεταβολικές διαταραχές που προδιαθέτουν σε αθηροσκλήρυνση στο γενικό πληθυσμό είναι επίσης παρούσες σε ασθενείς με ΣΕΛ, όπως η υπερομοκυστεϊναιμία (219) και η αντίσταση στην ινσουλίνη (220).

Αν και οι απόψεις δίστανται αναφορικά με την υπεραντιπροσώπευση ή μη των παραδοσιακών παραγόντων κινδύνου στο ΣΕΛ (221, 222), είναι προφανές ότι και άλλοι παράγοντες συμβάλλουν στα αυξημένα ποσοστά καρδιαγγειακής νόσου. Ακόμα και μετά από ρύθμιση των παραμέτρων αυτών, ο ΣΕΛ παραμένει ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για καρδιαγγειακά γεγονότα, υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι οι κλασσικοί παράγοντες κινδύνου κατά Framingham δεν μπορούν να αιτιολογήσουν την αυξημένη και πρόωμη αθηροσκλήρυνση που παρατηρείται σε αυτούς τους ασθενείς (208).

Ως ένας πιθανός μηχανισμός που προτείνεται στο ΣΕΛ είναι η ανισορροπία μεταξύ ενδοθηλιακής βλάβης και επιδιόρθωσης. Η αυξημένη ενδοθηλιακή βλάβη καταγράφεται ως αύξηση στα κυκλοφορούντα αποπτωτικά ενδοθηλιακά κύτταρα, τα υψηλά επίπεδα των οποίων συσχετίζονται ισχυρά με ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, παραγωγή προθρομβωτικού ιστικού παράγοντα (223) και αποτελούν έναν αντιπροσωπευτικό δείκτη μελλοντικής ανάπτυξης αθηροσκλήρυνσης (224). Διάφορα διαλυτά μόρια προσκόλλησης όπως VCAM-1, ICAM και E-σελεκτίνη που απελευθερώνονται μετά από ενδοθηλιακή βλάβη, βρίσκονται αυξημένα στο ΣΕΛ και συσχετίζονται με αυξημένα επίπεδα ασβεστώσεων στις στεφανιαίες αρτηρίες και επιπρόσθετα η φλεγμονώδης ενεργοποίηση μεταλλοπρωτεϊνών σχετίζεται με την παρουσία καρωτιδικών πλακών (225). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η χρόνια ενεργοποίηση του ενδοθηλίου και η φλεγμονή αποτελούν σημαντικούς παράγοντες της αθηροσκληρωτικής παθολογίας (226). Παρά τον εκτεταμένο ενδοθηλιακό κυτταρικό θάνατο που καταγράφεται στον ΣΕΛ, ένα φαινόμενο που κανονικά θα έπρεπε να κινητοποιήσει μία ενισχυμένη αγγειακή επιδιόρθωση, αυτή βρίσκεται σημαντικά διαταραγμένη στη νόσο. Οι ασθενείς εμφανίζουν μειωμένο αριθμό των προερχομένων από το μυελό των οστών κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών προγονικών και αγγειογενών κυττάρων της μυελικής σειράς. Ακόμα και τα λιγοστά κύτταρα που καταγράφονται χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη απόπτωση ακόμα και κατά τη διάρκεια ανενεργού νόσου, ελαττωμένη σύνθεση προαγγειογενετικών μορίων και ελαττωματική ικανότητα για ενσωμάτωση σε προσχηματισμένες αγγειακές δομές και διαφοροποίηση σε

ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα (223, 227, 228). Έτσι οι ασθενείς με ΣΕΛ εμφανίζουν ελαττωματική επιδιόρθωση του κατεστραμμένου ενδοθηλίου, που οδηγεί στην εγκαθίδρυση ενός περιβάλλοντος που επάγει την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας.

Ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς διαταραχών στην αγγειακή επιδιόρθωση θεωρείται η αυξημένη συγκέντρωση και οι ενισχυμένες δράσεις των τύπου I ιντερφερονών. Οι τύπου I ιντερφερόνες (Type I IFNs) και κυρίως η IFN $\alpha$ , διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο την παθογένεια του ΣΕΛ (48, 229). Ως μέρος της παθογένειας αυτής έχει προταθεί και η ανάπτυξη της καρδιαγγειακής νόσου η οποία, τουλάχιστον κατά ένα μέρος, αποδίδεται στην IFN $\alpha$  και δυνητικά και σε άλλες τύπου I ιντερφερόνες. Η IFN $\alpha$  επάγει απόπτωση στα EPCs/CACs και απομακρύνει τα μυελικά κύτταρα προς μη αγγειογενείς φαινοτύπους όπως τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα (228). Ανάλογα ευρήματα έχουν καταγραφεί και σε ζωικά μοντέλα λύκου ενώ φυσιολογικά EPCs από ποντίκια αδυνατούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσία IFN $\alpha$  (230, 231). Τα μονοπάτια μέσω των οποίων η IFN $\alpha$  επάγει την ελαττωματική επιδιόρθωση περιλαμβάνουν την καταστολή προαγγειογενετικών παραγόντων όπως η IL-1 $\beta$  και ο VEGF και αύξηση του αντιαγγειογενούς παράγοντα αναστολέα του υποδοχέα της IL-1. Η προσθήκη ανασυνδυασμένης IL-1 $\beta$  σε καλλιέργειες EPC/CAC από ΣΕΛ επαναφέρει τη φυσιολογική ενδοθηλιακή διαφοροποίηση (230). Αν και είναι πιθανό η ελάττωση της IL-1 και η αύξηση του αναστολέα του υποδοχέα της να αντιστοιχεί σε φαινότυπο που προστατεύει το αγγειακό σύστημα, ένα προφίλ κυτταροκινών που ενισχύει τις αντιαγγειογενείς αποκρίσεις μπορεί να θεωρηθεί ως αγγειοπαθογενετικό και να επιταχύνει την αθηροσκλήρυνση στον ΣΕΛ. Πράγματι, η αγγειακή ενεργοποίηση σε συνδυασμό με αυξημένα επίπεδα των τύπου I ιντερφερονών μπορεί να οδηγήσει σε περιόδους ενδοθηλιακής βλάβης ακολουθούμενη από ελαττωματική επιδιόρθωση. Τέτοια κυκλική εναλλαγή βλάβης και αποτυχημένης αγγειακής επιδιόρθωσης θα μπορούσε να οδηγήσει σε έναρξη και επέκταση αγγειακών αλλοιώσεων κατά τη διάρκεια τέτοιων εξάρσεων (232).

Περαιτέρω επιβεβαίωση του ρόλου των τύπου I ιντερφερονών στην πρόιμη αγγειακή βλάβη στον ΣΕΛ προκύπτει από μελέτη σε ασθενείς με υψηλή «υπογραφή» των τύπου I ιντερφερονών (type I interferon signature) οι οποίοι εμφανίζουν ελαττωματική ενδοθηλιακή λειτουργία όπως αυτή εκτιμήθηκε από τον αγγειακό τόνο των περιφερικών αρτηριών (233). Προκαταρκτικές μελέτες δείχνουν ότι η «υπογραφή» των τύπου I ιντερφερονών σχετίζεται με το πάχος του έσω-μέσου χιτώνα (IMT) των καρωτίδων ασθενών με ΣΕΛ. Επιπρόσθετα ευρήματα συνηγορούν για την παρουσία ενός αντιαγγειογενούς φαινοτύπου που εκδηλώνεται με ελαττωμένη αγγειακή πυκνότητα και



αυξημένη αγγειακή αραίωση στα νεφρικά αιμοφόρα αγγεία (230). Πρόσφατα μελετήθηκε και η κυτταρική προέλευση των τύπου I ιντερφερονών που οδηγούν σε διαταραχές στη αγγειακή επιδιόρθωση. Αν και τα pDCs αποτελούν τους κύριους παραγωγούς IFN-α, η απαλοιφή τους δε διορθώνει τη διαταραχή στη διαφοροποίηση των EPCs/CACs στο λύκο (234). Τα χαμηλής πυκνότητας κοκκιοκύτταρα (LDGs) που ανευρίσκονται στο κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων εμφανίζουν μεταξύ άλλων σοβαρή τοξικότητα για τα ECs και έχουν ισχυρή ικανότητα για έκκριση επαρκούς ποσότητας IFN-α ικανής να παρεμβαίνει στην αγγειακή επιδιόρθωση. Η απαλοιφή τους από το περιφερικό αίμα ασθενών με ΣΕΛ επαναφέρει την ικανότητα διαφοροποίησης των EPCs/CACs σε ενδοθηλιακή μονοστιβάδα (234).

Συνολικά, τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν τον καταστροφικό ρόλο των τύπου I ιντερφερονών στην ενδοθηλιακή βιολογία του ΣΕΛ και εγείρουν το ενδεχόμενο ότι η καταστολή των δράσεων τους μπορεί όχι μόνο να βελτιώσει τη δραστηριότητα της νόσου αλλά να μειώσει και τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Εκτός όμως από τις τύπου I ιντερφερόνες και άλλες κυτταροκίνες φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεια της αγγειοπάθειας του ΣΕΛ. Η προφλεγμονώδης κυτταροκίνη TNF-α φαίνεται να κατέχει σημαντικό ρόλο στην έναρξη και επέκταση των αθηροσκληρωτικών βλαβών. Αυξάνει την έκφραση μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια των ECs και αυξάνει την έκφραση χυμοτακτικών πρωτεϊνών που επάγουν την προσέλκυση μονοκυττάρων και T-λεμφοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα (235). Στο ΣΕΛ, τα επίπεδα TNF-α στον ορό βρίσκονται αυξημένα και συσχετίζονται θετικά με την κλιμακα ασβεστώσεων στις στεφανιαίες αρτηρίες (226). Επίσης βρίσκονται σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στον ορό σε ασθενείς με ΣΕΛ και καρδιαγγειακή νόσο σε σχέση με αυτούς χωρίς καρδιαγγειακή νόσο και συσχετίζονται θετικά με τροποποιημένο λιπιδαιμικό πρότυπο (236) ενώ αυξάνουν τα επίπεδα του διαλυτού VCAM-1 (237). Ωστόσο ο ακριβής ρόλος της κυτταροκίνης αυτής στην αγγειοπάθεια του ΣΕΛ παραμένει ασαφής.

Η IFN-γ που εκκρίνεται από T-λεμφοκύτταρα φυσικούς φονείς μπορεί επίσης να συμβάλλει στην παθογένεια της αθηροσκλήρυνσης στο ΣΕΛ (238). Η αντιαθηρογόνος κυτταροκίνη TGF-β βρίσκεται ελαττωμένη στο ΣΕΛ (239) ενώ υψηλά επίπεδα της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-17 και έκπτωση των Th17 κυττάρων έχει καταγραφεί στο ΣΕΛ και οδηγούν σε αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης (240, 241).

Τα **Th1 CD4+ κύτταρα** παίζουν ένα παθογενετικό ρόλο στην καρδιαγγειακή νόσο και η διαφοροποίησή τους στις αθηροσκληρωτικές πλάκες επάγεται από τις υψηλές εκφράσεις IFN-γ και IL-12 (235). Τα κύτταρα αυτά μπορεί επίσης να έχουν ρόλο και στην

καρδιαγγειακή νόσο στο ΣΕΛ καθώς ποντίκια επιρρεπή σε αθηροσκλήρυνση εμφανίζουν υψηλή αγγειακή φλεγμονή και διηθήσεις από CD4<sup>+</sup> T κύτταρα στις αθηροσκληρωτικές πλάκες μετά από μεταμόσχευση μυελού οστών με κύτταρα από ΣΕΛ (242) ενώ η έκθεση τους στην IFN-α αυξάνει την έκφραση του TRAIL που οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας (243). Επίσης προτείνεται ένας υποθετικός ρόλος για τα αυτοδραστικά T-κύτταρα στην ενδοθηλιακή βλάβη στο ΣΕΛ. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να σκοτώσουν τα APCs (244). Τα ECs μετά την ενεργοποίησή τους έχουν την ικανότητα να δρουν ως APCs και μελέτες σε απορρίψεις μοσχευμάτων υποδηλώνουν ότι τα ECs του μοσχεύματος μπορούν να ενεργοποιηθούν αποκτώντας ένα προ-φλεγμονώδη φαινότυπο και ακολούθως να θανατωθούν από T-κύτταρα του ξενιστή κατά τη διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης (245). Περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού στο ΣΕΛ απαιτείται ώστε να επιβεβαιωθεί εάν ισχύει και για τα ECs του λύκου.

Ο ρόλος άλλων υποτύπων T λεμφοκυττάρων στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης βρίσκεται υπό διερεύνηση. Για παράδειγμα, παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστο αν οι διαταραχές που έχουν αναφερθεί στα ρυθμιστικά T-κύτταρα (Treg) του ΣΕΛ συμβάλλουν στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης (246). Προτείνεται ένας υποθετικός ρόλος που προκύπτει από την παρατήρηση σε ζωικά μοντέλα αθηροσκλήρυνσης ότι αν η λειτουργία των Treg διαταραχθεί, τότε ενισχύεται σημαντικά η εξέλιξη της καρδιαγγειακής νόσου (247).

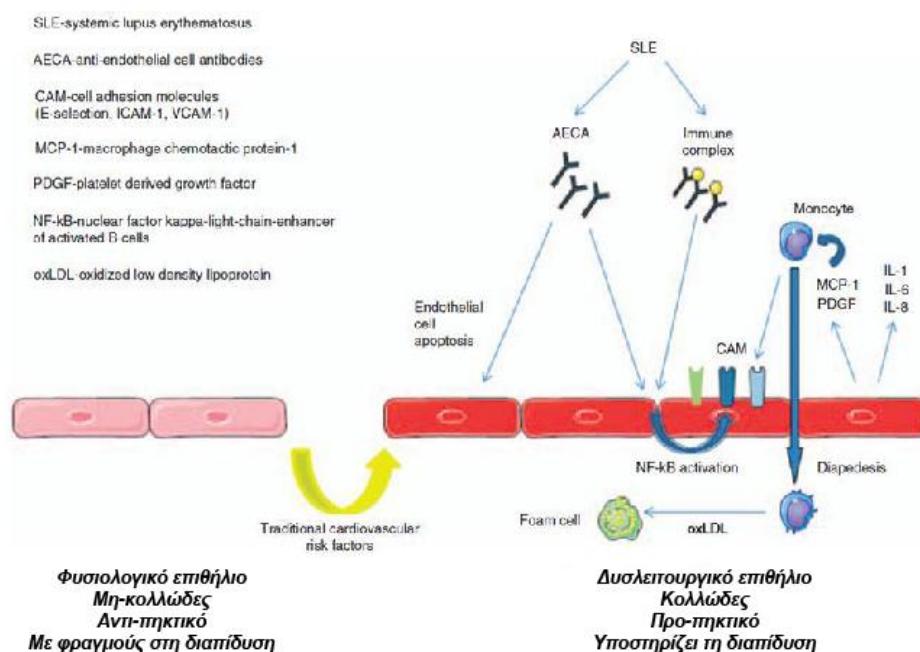
Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος από φλεγμονώδες ερέθισμα μπορεί να αλληλεπιδράσει με ανοσοσυμπλέγματα (ICs) που ανιχνεύονται στο ΣΕΛ και να επάγει την έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ECs όπως του VCAM-1 και της E-σελεκτίνης. Τα μόρια αυτά μπορεί να ενισχύσουν την προσέλκυση ουδετεροφίλων και την ενδοθηλιακή βλάβη. Υψηλά επίπεδα ICs μεταξύ oxLDL/β2GPI και IgG/IgM έχουν αναφερθεί στο ΣΕΛ παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με διάφορους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου (248). Η ελαττωμένη έκφραση του αντι-αθηροσκληρωτικού συστατικού C1q του συμπληρώματος στο ΣΕΛ (249), η ενεργοποίηση του συμπληρώματος που έχει εμπλακεί ως μηχανισμός στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης (250) και η παρουσία των ICs ή διαταραχές των υποδοχέων τους σε ζωικά μοντέλα αθηροσκλήρυνσης (251) υποδηλώνουν την πιθανή συμμετοχή τους και στο ΣΕΛ, που απαιτεί όμως επιβεβαίωση.

Η οξειδωτική επιβάρυνση, που αποτελεί ένα καλά επιβεβαιωμένο παράγοντα ενδοθηλιακής βλάβης, εμφανίζεται σε υψηλά επίπεδα στον ΣΕΛ. Οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα ενεργών ριζών οξυγόνου και νιτρωδών που τροποποιούν τις πρωτεΐνες και σε συνδυασμό με τα αντισώματα που παράγονται έναντι

των τροποποιημένων αυτών πρωτεϊνών δημιουργείται ένα περιβάλλον που προδιαθέτει στην ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης (252). Η ομοκυστεΐνη, ένα μόριο με ικανότητα να αυξάνει τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στην κυκλοφορία, βρίσκεται αυξημένο στο ΣΕΛ και σχετίζεται με αυξημένο IMT στις καρωτίδες και ασβεστώσεις στις στεφανιαίες αρτηρίες (253, 254). Ελαττωματικοί μηχανισμοί άμυνας έναντι του διαταραγμένου οξειδοαναγωγικού περιβάλλοντος έχουν επίσης περιγραφεί στο ΣΕΛ όπως η μειωμένη δραστηριότητα παραοξανάσης, ενός αντιοξειδωτικού ενζύμου, που βρίσκεται συζευγμένο με την HDL και αποτρέπει την οξείδωση της LDL. Το εύρημα αυτό συσχετίζεται με την παρουσία αυξημένων τίτλων αντισωμάτων έναντι της HDL και της β2GPI και με αυξημένο κίνδυνο αθηροσκλήρυνσης (255).

Η παρουσία **AECA** έχει επίσης αναφερθεί ως κοινό εύρημα τόσο στο ΣΕΛ όσο και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (256). Τα AECA αντιπροσωπεύουν μία ετερογενή ομάδα αυτοαντισωμάτων στρεφόμενα κατά δομικών ενδοθηλιακών πρωτεϊνών και η παρουσία τους στον ΣΕΛ κυμαίνεται μεταξύ 15%-88% με το πλατύ αυτό εύρος να οφείλεται εν μέρει και σε τεχνικά θέματα (257). Η παρουσία των AECA στον ΣΕΛ έχει συσχετιστεί τόσο με την ενεργότητα της νόσου όσο και με τη φλεγμονή του αγγειακού τοιχώματος. Η συσχέτιση αυτή και η απουσία των AECA σε καταστάσεις στις οποίες η βλάβη του αγγειακού τοιχώματος επάγεται ξεκάθαρα από άλλους εκτελεστικούς μηχανισμούς (όπως κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα στην ιδιοπαθή μικτή κρυσφαιριναιμία (258)) υποδηλώνει ένα πιθανό παθογενετικό ρόλο των AECA. *In-vitro* μελέτες έχουν δείξει στο ΣΕΛ την ικανότητα των AECA να σταθεροποιούν το συμπλήρωμα (259), να διαμεσολαβούν την εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταροτοξικότητα των κυττάρων φυσικών φονέων (NK cells) (258) και να ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα με αύξηση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης και έκκρισης προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και χυμοκινών στην πρωτογενή αυτοάνοση αγγειίτιδα (260, 261), και στο σκληρόδερμα (262). Η συγκρίσιμη δραστηριότητα που παρουσιάζουν τα AECA από ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ και θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα στην ενεργοποίηση των ECs υποδηλώνει ότι μάλλον πρόκειται για ένα κοινό χαρακτηριστικό αυτών των αντισωμάτων (263, 264). Αν και τα ευρήματα αυτά εμπλέκουν τα AECA στην οξεία ενδοθηλιακή βλάβη, ο πιθανός ρόλος τους (**Εικόνα 4.3.1**) στη χρόνια ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης παραμένει υπό διερεύνηση. AECA και αντι-DNA αντισώματα συχνά συνυπάρχουν στην ίδια ορό και έχει προταθεί ότι οι δύο αντισωματικοί πληθυσμοί μερικώς επικαλύπτονται. Στην πραγματικότητα, μονοκλωνικά αντι-DNA αντισώματα προερχόμενα από στελέχη ποντικών επιρρεπή στο λύκο (265) και πολυκλωνικά αντι-DNA

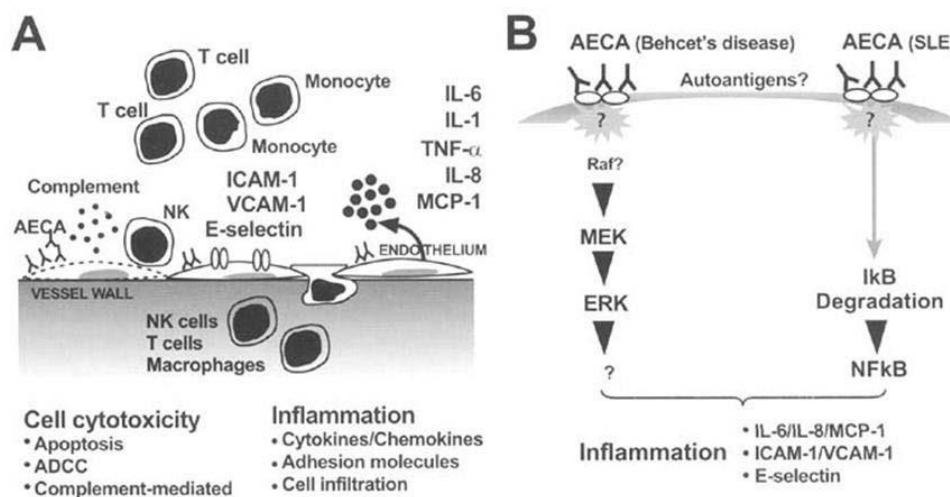
μονής έλικας (ssDNA) ή αντι-dsDNA αντισώματα απομονωμένα από ορούς ασθενών με ΣΕΛ (158) εμφανίζουν δράση ΑΕCA. Τα αντι-DNA αντισώματα μπορούν να συνδεθούν στην ενδοθηλιακή κυτταρική μεμβράνη είτε άμεσα είτε ως προ-σχηματισμένα DNA-αντι-DNA σύμπλοκα. Δεσμευτικές πρωτεΐνες DNA που δεσμεύουν το τμήμα DNA αυτών των συμπλοκών έχουν ταυτοποιηθεί στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, επιπλέον/πρόσθετα αντιγόνα δεσμεύονται άμεσα από τα αντισώματα, χωρίς γέφυρα DNA (266). Αυτές οι μελέτες έρχονται να ρίξουν φως στην αλληλοεπικάλυψη μεταξύ ΑΕCA και αντι-DNA αντισωμάτων, ιδίως όσον αφορά την ικανότητα των τελευταίων να δεσμεύουν αντιγόνα που βρίσκονται στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων.



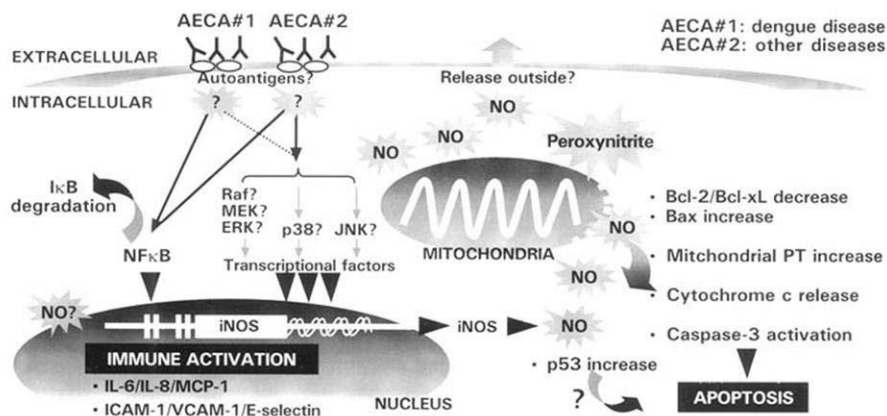
**Εικόνα 4.3.1** Υποθετικός ρόλος των αντι-ενδοθηλιακών αυτοαντισωμάτων στην πρόκληση άμεσης ενδοθηλιακής βλάβης στον ΣΕΛ.

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για τη διαμεσολαβούμενη από τα ΑΕCA ενδοθηλιακή βλάβη (**Εικόνα 4.3.1.1A**) και περιλαμβάνουν τόσο την κυτταροτοξικότητα όσο και τη φλεγμονή. Οι μοριακοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται παραμένουν υποθετικοί αλλά φαίνεται ότι στο ΣΕΛ τα ΑΕCA προσδένονται και ενεργοποιούν το ενδοθήλιο μέσω παραγωγής IL-6 και έκφραση ICAM-1 και E-σελεκτίνης και πιθανά αυτό γίνεται μέσω ενεργοποίησης του NF-κB (**Εικόνα 4.3.1.1B**). (Ο διττός ρόλος του (NO)

έχει περιγραφεί τόσο στην κυτταρική απόπτωση όσο και στην επιβίωση. Η ενδοθηλιακή απόπτωση μπορεί να προκληθεί από τα AECA μέσω μηχανισμού διαμεσολαβούμενου από το NO που εμπλέκει τα μιτοχόνδρια (Εικόνα 4.3.1.2). Η περισσότερη ωστόσο διερεύνηση αφορά και άλλα αυτοαντισώματα έναντι κυρίως στοιχείων των λιποπρωτεϊνών και στην ικανότητα τους να επιταχύνουν την ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης. Έχουν περιγραφεί αντισώματα έναντι οξειδωμένων μορφών της LDL, έναντι της HDL και ApoAI, της Lp(α) και για τα οποία έχουν περιγραφεί ποικίλοι ρόλοι στην ενδοθηλιακή βλάβη του ΣΕΛ (267). Οι ασθενείς με ΣΕΛ έχουν επίσης αντισώματα έναντι της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, τα οποία αυξάνονται με τη δραστηριότητα της νόσου και μπορεί να συμβάλλουν σε υπερτριγλυκαυριδαμία (268). Αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών θερμικού στρες 60 και 65 (HSP60/65) ενισχύουν την ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης σε διάφορα πειραματικά μοντέλα και βρίσκονται αυξημένα στο ΣΕΛ (269). Αν και τα αντισώματα έναντι των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι αρκετά συχνά στο ΣΕΛ, και έχει προταθεί ότι εμπλέκονται σε ενδοθηλιακή βλάβη (270), διάφορες ερευνητικές ομάδες υποστηρίζουν ότι τα αντισώματα αυτά μπορεί να μη συσχετίζονται με άλλους δείκτες ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας (271).

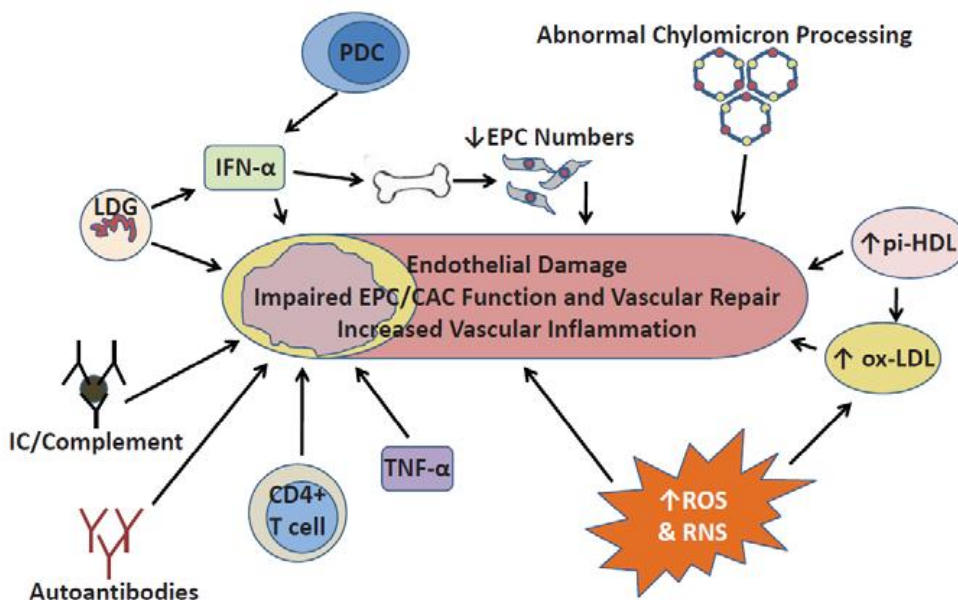


**Εικόνα 4.3.1.1** Υποθετικός ρόλος των αντι-ενδοθηλιακών αυτοαντισωμάτων στην πρόκληση ενδοθηλιακής φλεγμονής στον ΣΕΛ (A). Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τα AECA στον ΣΕΛ και στη νόσο Behcet's (B)



**Εικόνα 4.3.1.2** Το σηματοδοτικό μονοπάτι της διαμεσολαβούμενης από AECA- ενδοθηλιακής απόπτωσης και ενεργοποίησης μέσω του NO-ρυθμιζόμενου μονοπατιού.

Η έρευνα πάνω στους πιθανούς μηχανισμούς της αγγειοπάθειας του ΣΕΛ συνεχώς επεκτείνεται προκειμένου να ανιχνευθούν οι ακριβείς μηχανισμοί και τα μονοπάτια που εμπλέκονται. Τα έως τώρα σημαντικά ευρήματα συνοψίζονται στην **εικόνα 4.3.1.3**.



**Εικόνα 4.3.1.3** Σχηματική απεικόνιση των πιθανών μηχανισμών αγγειοπάθειας στον ΣΕΛ. Η αλληλεπίδραση διαφόρων φλεγμονωδών μεσολαβητών αυξάνει την ενδοθηλιακή βλάβη και το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας στο ΣΕΛ.

*Σκοπός*

## II. ΣΚΟΠΟΣ

Τα διεισδυτικά Abs είναι αυτοαντισώματα τα οποία έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να εντοπίζονται στο εσωτερικό ζώντων κυττάρων με αδιευκρίνιστους ακόμη μηχανισμούς. Τα περισσότερο μελετημένα διεισδυτικά αντισώματα είναι αυτά που αναγνωρίζουν το DNA διπλής έλικας (dsDNA), τα οποία χαρακτηρίζονται από πολυδραστικότητα, δηλαδή είναι ικανά να αναγνωρίζουν και άλλα αντιγόνα, όπως η ακτίνη και απτένια, όπως η τρινιτροφαινόλη. Η διείσδυση αυτοαντισωμάτων σε ζώντα κύτταρα φαίνεται να συμμετέχει στην παθογένεια διαφόρων αυτοάνοσων νόσων, αλλά ενδέχεται να έχει και φυσιολογικό ρόλο σε υγιή άτομα. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι αντι-DNA αντισώματα μπορούν να διεγείρουν την έκφραση/απελευθέρωση των κυτταροκινών από υγιή ανθρώπινα μονοκύτταρα, με αποτέλεσμα να ενισχύουν τη φλεγμονώδη αντίδραση και να πολώνουν την ανοσιακή απάντηση, γεγονός που συνεπάγεται συμμετοχή στην παθογένεση διάφορων ασθενειών. Έπισης, έχει αναφερθεί ότι στον ορό ασθενών με ΣΕΛ με υψηλό τίτλο αντι-dsDNA αντισωμάτων, η αγγειογενετική δραστηριότητα να είναι αυξημένη σε σύγκριση με εκείνη των υγιών μαρτύρων.

Έτσι, βασικός σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της διεισδυτικής ικανότητας των αντι-DNA μονοκλωνικών CPAbs και η μελέτη της ενδοκυτταρικής βιολογικής δράσης τους.

Συγκεκριμένα, για την απάντηση του βασικού σκοπού τέθηκαν οι παρακάτω επιμέρους στόχοι

1. Η απομόνωση διεισδυτικών CPAbs και τα αντίστοιχα μονοκλωνικά μάρτυρες σε ικανές ποσότητες και να χαρακτηριστούν οι ανοσοχημικές τους ιδιότητες
2. Η μελέτη των παραμέτρων διείσδυσης των CPAbs στα κύτταρα
3. Η διερεύνηση του ρόλου της φυσικής σύνδεσης των CPAbs με το DNA και άλλα συστατικά του πυρήνα στη διεισδυτικότητα και τη βιολογική δραστηριότητά τους, και
4. Η διαλεύκανση πιθανής επίδρασης στον αγγειογενετικό φαινότυπο των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Μακροπρόθεσμος στόχος και φιλοδοξία της διατριβής είναι η δημιουργία παρακαταθήκης βασικής γνώσης στο πεδίο των κυτταρο-διεισδυτικών αντισωμάτων που θα συμβάλει στη μετάφραση της γνώσης αυτής σε i) κατανόηση της παθογένεσης αυτοάνοσων νοσήμάτων, όπως ο ΣΕΛ, και ii) θεραπευτικές εφαρμογές, είτε μόνα τους,



είτε ως μεταφορείς φαρμάκων στο εσωτερικό των κυττάρων αξιοποιώντας το διεισδυτικό δυναμικό τους.

## *Υλικά και Μέθοδοι*

### III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 1 ΥΛΙΚΑ

##### 1.1 Αναλώσιμα

- Σωληνάρια τύπου falcon 50 και 15 ml (Greiner bio one, Switzerland)
- Σωληνάρια τύπου erpendorf 1,5 ml (Sarstedt, France)
- Σωληνάρια για απομόνωση αντισωμάτων 5 ml (Sarstedt)
- Στήλες χρωματογραφίας econocolumn Ø2,5 x 20 cm (Bio-Rad, USA)
- Μεμβράνες για διαπίδυση - Dialysis tubing (Sigma, Germany)
- Φίλτρα 0,45 µm (Sarstedt)
- Φίλτρα 0,8 µm (Millipore, USA)
- Μεμβράνη συμύκνωσης PM 30 (Millipore)
- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας 75 και 25 ml (Nunc<sup>TM</sup>, Denmark)
- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 24 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα (Corning, USA)
- Πλάκες πολυστυρενίου μικροτιτλοποίησης 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα για ELISA (Nunc)
- Τρυβλία Petri (BIBE, Ελλάδα)
- Πλαστικές πιπέτες κυτταροκαλλιέργειας 10 ml, 5 ml και 2 ml (Sarstedt)
- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (Sigma)
- Σωληνάρια κατάψυξης κυττάρων 1 ml (CryoTube Vials, Nunc<sup>TM</sup>)
- Σύριγγες 20 ml, 10 ml και 5 ml (Πινόη, Ελλάδα)
- Καλυπτρίδες στρογγυλές Ø 13 mm (Πινόη)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες (VWR International, UK)
- Πιπέτες Pasteur κλειστές (CEB, France)
- Μικροπλάκες 96 φρεατίων (Orange Scientific, Belgium)

## 1.2 Διαλύματα–Χημικά

<b>• Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (KP) 1 M pH 7,4:</b>	
<u>Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1M σε 1L (με dH<sub>2</sub>O):</u>	
K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub> ·3 H <sub>2</sub> O M.B. 228,23 g/mol (Merck)	228gr
<u>Διάλυμα μονόξινου φωσφορικού καλίου (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 1M σε 1L (με dH<sub>2</sub>O):</u>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> M.B. 136,08 g/mol (Merck)	136gr
Στο διάλυμα K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M ώστε το pH του τελικού διαλύματος να γίνει 7,4.	
<b>• Διάλυμα γλυκίνης 0,1M σε 1L (με dH<sub>2</sub>O):</b>	
Γλυκίνη M.B. 75,1 g/mol (Serva)	7,51gr
<b>• Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (NaP) 0,1M, pH 8:</b>	
<u>Διάλυμα μονόξινου φωσφορικού νατρίου (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0.1M σε 1L (με dH<sub>2</sub>O):</u>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> M.B. 141,96 g/mol	14,196 gr
<u>Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού νατρίου (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0.1M σε 1L (με dH<sub>2</sub>O) :</u>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O M.B. 137,99 g/mol	13,8 gr
Στο διάλυμα Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.1M προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1M ώστε το pH του τελικού διαλύματος να γίνει 8,0.	
<b>• Διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH 0,1N/NaCl 0.15M, pH 3 σε 1 L (με dH<sub>2</sub>O):</b>	
<u>Δ/μα CH<sub>3</sub>COOH 1N σε 100 ml (με dH<sub>2</sub>O)</u>	
CH <sub>3</sub> COOH 100% (18,9N)	5,3 ml
NaCl M.B. 58,4 g/mol	8.76 gr
<b>• Διάλυμα κιτρικών 0,1M, pH 6 ή pH 4.5 σε 1 L (με dH<sub>2</sub>O):</b>	
<u>Διάλυμα κιτρικού νατρίου 0.1M</u> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O M.B. 294.10 g/mol	29.41 gr
Συμπληρώνεται ο όγκος με 800 ml dH <sub>2</sub> O	
Ρύθμιση σε pH 6 ή pH 4.5 με <u>διάλυμα κιτρικού οξέος 1M</u> (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> H <sub>2</sub> O, 210.14 g/mol) και συμπληρώνεται ο όγκος με dH <sub>2</sub> O στο 1 L	

<b>• Tris-Phosphate pH 8,3 σε 4L dH<sub>2</sub>O :</b>	
Tris M.B. 121,14 g/mol	19,4 gr
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O M.B. 137.99 g/mol	13.8 gr
<b>• Tris-Phosphate 50 mM NaCl pH 8,3 σε 0.5L dH<sub>2</sub>O:</b>	
Tris-Phosphate pH8,3	400ml
NaCl M.B 58.44 g/mol	1.46 gr
Ρύθμιση pH 8.3 με διάλυμα HCL 25 %	
<b>• Tris-Phosphate 70mM NaCl pH 8,3 σε 0.5L dH<sub>2</sub>O :</b>	
Tris-Phosphate pH8,3	400ml
NaCl M.B 58.44 g/mol	2.045 gr
Ρύθμιση pH 8.3 με διάλυμα HCL 25 %	
<b>• Tris-Phosphate 100mM NaCl pH 8,3 σε 0.5L dH<sub>2</sub>O :</b>	
Tris-Phosphate pH8,3	400ml
NaCl M.B 58.44 g/mol	2.922 gr
Ρύθμιση pH 8.3 με διάλυμα HCL 25 %	
<b>Tris-Phosphate 1M NaCl pH 8,3 σε 0.5L dH<sub>2</sub>O:</b>	
Tris-Phosphate pH8,3	400ml
NaCl M.B 58.44 g/mol	29.22 gr
Ρύθμιση pH 8.3 με διάλυμα HCL 25 %	
<b>• Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών / χλωριούχου νατρίου (Phosphate Buffered Saline, PBS) σε 1L (με dH<sub>2</sub>O):</b>	
Χλωριούχο νάτριο (NaCl) M.B. 58,4 g/mol (Merck)	9 gr
Ρυθμιστικό διάλυμα KP 1M, pH 7,4	10 ml
<b>• PBS – Tween 0,1%:</b>	
Tween 20 (Merck)	1 ml
PBS	1 L
<b>• Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl / χλωριούχου νατρίου (Tris Buffered Saline, TBS):</b>	
NaCl (Merck)	9 gr
Tris M.B. 121,1 g/mol (Merck)	3 gr
Ρύθμιση του pH στο 7,4 με προσθήκη διαλύματος HCl 25% (Merck)	
<b>• TBS – Tween 0,1%:</b>	

Tween 20 (Merck)	1 ml
TBS	1 L
<b>• Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού-διττανθρακικού νατρίου [Carbonate BiCarbonate (CBC)] 1M, pH 9,6 σε 1L dH<sub>2</sub>O:</b>	
Ανθρακικό νάτριο (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) (Merck, Germany)	35 gr
Οξινό ανθρακικό νάτριο (NaHCO <sub>3</sub> ) (Merck)	56 gr
<b>• Διάλυμα αλβουμίνης βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) (Sigma) σε PBS:</b>	
Για τον κορεσμό των μη ειδικών θέσεων (blocking buffer) στο πολυστυρένιο στην πλάκα για ELISA	1% w/v
Για την δέσμευση των μη ειδικών θέσεων (blocking buffer) στη δοκιμασία ανοσοφθορισμού	0,1% w/v
<b>• Ζελατίνη (Merck) σε TBS:</b>	
Διάλυμα για τον κορεσμό των μη ειδικών θέσεων (blocking buffer) στην πλάκα για ELISA	0,5% w/v
<b>• Υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης:</b>	
π-νιτροφαινόλη (PNPP) (Sigma)	20 mg
Διαλύματος αλκαλικής φωσφατάσης	20 ml
Διάλυμα γλυκίνης – καυστικού νατρίου (NaOH) pH 10,4	0,1 M
MgCl <sub>2</sub> (Merck)	1 mM
ZnCl <sub>2</sub> (Merck)	1 mM
<b>• Διάλυμα Tris-HCl 1,5M pH 8,8:</b>	
Tris (Merck)	182 g/L
SDS 10%	40 ml
Ρύθμιση του pH στο 8,8 με HCl 25%	
<b>• Διάλυμα Tris-HCl 0,5M pH 6,8:</b>	
Tris (Merck)	60,6g/L
SDS 10%	40 ml
Ρύθμιση του pH στο 6,8 με HCl 25%	
<b>• Ακρυλαμίδιο-δισακρυλαμίδιο (Acr/Bis):</b>	
Ακρυλαμίδιο	300 gr

Δισακρυλαμίδιο	8 gr
<b>• Υπερθεικό αμμώνιο [Ammonium Persulfate (AP) ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)] σε 0.5 L dH<sub>2</sub>O:</b>	
AP (Sigma)	0,05 gr
<b>• Πήκτωμα διαχωρισμού (Seperating gel) 10%:</b>	
dH <sub>2</sub> O	1,7 ml
Tris pH 8,8	1,25 ml
AcT/Bis	2 ml
AP	50 μl
TEMED	5 μl
<b>• Πήκτωμα πακεταρίσματος (Stacking gel) 3%:</b>	
dH <sub>2</sub> O	1,55 ml
Tris pH 6,8	625 μl
AcT/Bis	0,3 ml
<b>• Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) (4x):</b>	
Tris (Merck)	12 gr
Γλυκίνη (Serva)	56 gr
SDS (Sigma)	4 gr
Συμπληρώνεται με dH <sub>2</sub> O και το pH ρυθμίζεται στο 8,3	1 L
<b>• Διάλυμα δειγμάτων (Sample Buffer):</b>	
Tris-HCl pH 6,8	0.0625M
SDS (Sigma)	10%
Γλυκερόλη (Serva)	30%
β-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma)	25%
Μπλε της βρωμοφαινόλης (Sigma)	0,01%
Συμπληρώνεται με dH <sub>2</sub> O μέχρι τελικό όγκο	10 ml
<b>• Διάλυμα χρώσης για ηλεκτροφόρηση (Stain solution):</b>	
Αιθανόλη (Sigma)	225 ml
Coomasie Blue (Sigma)	1,25 gr
Οξικό οξύ (VWR International, UK)	40 ml
dH <sub>2</sub> O	230 ml
<b>• Διάλυμα αποχρωματισμού για ηλεκτροφόρηση (Destain solution):</b>	
Οξικό οξύ (VWR International)	10%
Αιθανόλη (Sigma Aldrich)	20%

dH <sub>2</sub> O	70%
<b>• Διάλυμα κατάψυξης κυττάρων στους -80°C:</b>	
FBS DMSO 10% του συνολικού όγκου	
<b>• Παραφορμαλδεΰδη 2% (PFA) (Sigma):</b>	
Για την παρασκευή διαλύματος 4% w/v PFA:	
PFA	8 gr
PBS	200 ml
<b>• Διάλυμα διαπερατότητας κυττάρων και κορεσμού (Permeabilization Blocking Buffer):</b>	
Διάλυμα BSA 1 mg/ml σε Triton X-100 0,1% v/v	
<b>• Mowiol 488 Reagent (Calbiochem):</b>	
Γλυκερόλη	6 gr
Mowiol	2,4 gr
dH <sub>2</sub> O	6 ml
Προσθήκη διαλύματος Tris-HCl 0,2 M pH 8,5	10 ml

- Αντιδραστήριο Bradford (5x) (BioRad)
- Trypan Blue Solution 0,4% (Fluka)
- Διάλυμα Θρυψίνης 0,5% (10x) με EDTA 4Na 0,2% (Gibco)
- Αιθανόλη 100% (Riedel-de Haen)
- Triton X-100 (Fluka): Μη ιοντικό απορρυπαντικό σε αναλογία 0,1% v/v σε PBS
- DMSO [Dimethyl sulfoxide (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS)] (Serva)
- Βακτηριοστατικό αζίδιο [Azide (NaN<sub>3</sub>)] 2% w/v (Merck)
- Μάρτυρες Μοριακών Βαρών για ηλεκτροφόρηση (Pharmacia)
- TEMED (N,N,N,N-Tetramethyl-ethylenediamine) (Sigma)
- Υπόστρωμα υπεροξειδάσης TMB (Seramun, Germany)
- Διάλυμα Δωδεκυλοθειϊκού νατρίου [Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)] 10% (Sigma)

### 1.2.1 Υλικά Κυτταροκαλλιέργειας

- Ορός εμβρύου βοός [Fetal Bovine Serum (FBS)] (Gibco):

Θερμικά αδρανοποιημένος στους 56°C για 30 min



- Θρεπτικό Υλικό DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Minimal essential medium):

50 ml DMEM (10X) (Biochrom, Germany)

420 ml H<sub>2</sub>O (απεσταγμένο, αποστειρωμένο)

5 ml L-glutamine 2 mM (Gibco, Paisley, UK)

5 ml ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 1M (Biochrom)

18 ml Sodium Bicarbonate 7,5% (Gibco)

5 ml Sodium pyruvate 100 mM (Gibco)

5x10<sup>5</sup> IU Πενικιλίνη (Κόπερ Α.Ε., Ελλάδα)

5x10<sup>5</sup> IU Στρεπτομυκίνη (Κόπερ Α.Ε.)

5x10<sup>-5</sup> M 2-μερκαπτοαιθανόλη (2-ME) (Sigma, USA)

500 µl μη απαραίτητα αμινοξέα Για την καλλιέργεια κύτταρων το θρεπτικό υλικό

Το DMEM εμπλουτίζεται με 10% του συνολικού όγκου FBS

- Θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (10X) (Biochrom, Germany) το οποίο παρασκευάζεται όπως το DMEM.

Για την καλλιέργεια κυττάρων τα θρεπτικά υλικά εμπλουτίστηκαν με 10% του συνολικού όγκου Fetal Bovine Serum (FBS).

- Θρεπτικό υλικό M199 εμπλουτισμένο 20% με εμβρυικό ορό βοός (Fetal Calf Serum, FCS, Invitrogen), 0,05 mg/ml ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement), 0,05 IU ηπαρίνης/ml και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

### 1.3. Αντισώματα και φθορίζουσες χρωστικές

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]

Στα πειράματα ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν:

- Αντίσωμα κατσίκας έναντι IgG (H+L) ανθρώπου συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική ALEXA<sup>®</sup> fluor 488 2 mg/ml (A-11013, 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.

Τα πολυκλωνικά αντισώματα των anti-pAkt (Ser473), anti-Akt, anti-pERK, anti-ERK, είναι όλα από την Cell Signaling Technology. Τα αντισώματα anti-actin της εταιρίας Chemicon, χρησιμοποιήθηκαν για ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε δοκιμασίες ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Το μονοκλωνικό αντισώμα έναντι της βρωμο-δεόξυουριδίνης (anti-BRDU) αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma-Aldrich (MO, USA).

Τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με το ένζυμο της υπεροξειδάσης (Horse Raddish Peroxidase, HRP) που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες ανοσοαποτύπωσης.

#### 1.4 Αντιγόνα

Οι έλεγχοι ειδικότητας των mAbs έγιναν με ELISA έναντι των εξής αντιγόνων:

- ολική ιστόνη (from calf thymus) (Sigma)
- DNA (native DNA from calf thymus) (Sigma)
- Πλασμιδιακό DNA pBlueScript II KS (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)

#### 1.5 Κυτταρικές σειρές

SK-BR-3: Ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά, επιθηλιακού ιστού του μαστικού αδένου.

MDA-MB-453: Ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά, επιθηλιακού ιστού του μαστικού αδένου.

SK-OV-3: Ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά, επιθηλιακού ιστού ωοθήκης.

T24: Ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά, επιθηλιακού ιστού ουροδόχου κύστεως.

NCI-N87: Ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά, επιθηλιακού ιστού του στομάχου.

DU 145: Ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά, επιθηλιακού ιστού του προστάτη.

HT-29: Ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά, επιθηλιακού ιστού του παχέος εντέρου.

Οι παραπάνω κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό RPMI παρουσία 10% FBS.

HeLa: Ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά, επιθηλιακού ιστού του τραχήλου της μήτρας.

NIH-3T3: Αθανατοποιημένα ινοβλαστικά κύτταρα επίμυος. Οι ινοβλάστες προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του αρχέγονου στηρικτικού ιστού.

Neuro-2a (N-2a): Νευροβλάστες που έχουν απομονωθεί από εγκέφαλο επίμυος με νευροβλάστωμα. Το νευροβλάστωμα είναι συμπαγής όγκος που προέρχεται από τα αρχέγονα κύτταρα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος.

COS-7: Ινοβλάστες που έχουν απομονωθεί από νεφρό αφρικανικού πιθήκου (*Cercopithecus aethiops*).

Οι παραπάνω κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM παρουσία 10% FBS. Τα κύτταρα αναπτύσσονται προσκολλημένα σε πλαστικές επιφάνειες (adherent cells). Η καλλιέργειά τους έγινε σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C, σε ατμόσφαιρα με 5% CO<sub>2</sub>, σε περιβάλλον υγρασίας.

## 1.6 Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα προέρχονται από τη μονάδα αναπαραγωγής πειραματοζώων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι (4-6 εβδομάδων), θηλυκοί ποντικοί της σειράς SCID NOD, Balb/c, C3H & NUDE για παραγωγή ασκιδών.

## 1.7 Εργαστηριακός εξοπλισμός

### 1.7.1 Όργανα και συσκευές

- Κλίβανος κυττάρων (Thermo Electron Corporation).
- Θάλαμος νηματικής ροής (Thermo Electron Corporation).
- Φυγόκεντρος για eppendorf (202 MK Sigma, USA).
- Φυγόκεντρος (4K10 Sigma, USA).
- Φυγόκεντρος εξάχνωσης υπό κενό Hetovac VR-I, Heto.
- Συσκευές οριζόντιας ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης, της

εταιρίας BRL.

- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου πρωτεϊνών της εταιρίας Biorad (Mini Protean II).
- Συσκευή για τη μεταφορά πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη της εταιρίας Biorad (Mini Trans-Blot).
- Τροφοδοτικά LKB, Biorad, Pharmacia.
- Λάμπα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας μήκους κύματος 302 nm, για την οπτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτώματα αγαρόζης κατόπιν ιχνηθέτησης με βρωμιούχο αιθίδιο.
- Αυτόματη φωτογραφική μηχανή Polaroid, για τη φωτογράφιση ηλεκτροφορήσεων νουκλεϊκών οξέων σε πηκτώματα αγαρόζης.
- Φωτόμετρο ορατής και υπεριώδους ακτινοβολίας LKB Biochrom Ultrospec II, UK.
- Φασματοφωτόμετρο πλακών ELISA Dynatech Laboratories MRX, UK
- Καταψύκτες  $-20^{\circ}\text{C}$  και  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Θερμαινόμενη πλάκα με εύρος θερμοκρασίας  $20^{\circ}\text{C}$ - $100^{\circ}\text{C}$ , με υποδοχείς για σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml και για σωληνάρια τύπου falcon της εταιρίας Thermoblock Scientific.
- Περισταλτική αντλία από την εταιρία LKB.
- Μηχανικές πιπέττες Gilson.
- Ηλεκτρονικό pHμετρο Thermo Electron Corporation, USA.
- Υδατόλουτρο JULABO.
- Μαγνητικός αναδευτήρας STUART.
- Ηλεκτρονικός ζυγός από την εταιρία Mettler.
- Ηλεκτρονικός μικροζυγός από την εταιρία Adam Equipment.
- Βιντεοκάμερα Sony DCR SR32E.

### 1.7.2 Γυαλικά και πλαστικά

- Πλαστικά ακρορύγχια (tips) των εταιριών Greiner Bio-one.
- Πλαστικά ακρορύγχια με φίλτρο (filter tips) της εταιρίας Sarstedt.
- Πλαστικοί σωλήνες (τύπου erpendorf) χωρητικότητας 1,5 ml των εταιριών Greiner

Bio-one.

- Προαποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου με βιδωτό πώμα, όγκου 15 και 50 ml (Falcon tubes) των εταιριών Greiner Bio-one.
- Αποστειρωμένες πλαστικές πιπέττες των 2, 5 και 10 ml των εταιριών Sarstedt.
- Αποστειρωμένες πλαστικές φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας, εμβαδού 25, 75 και 175 cm<sup>2</sup>, της εταιρίας Costar.
- Αποστειρωμένα πλαστικά τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας, διαμέτρου 35 και 65 mm, της εταιρίας Corning.
- Αποστειρωμένες πλαστικές πλάκες κυτταροκαλλιέργειας, 6, 96 και 24 πηγαδιών από τις εταιρίες Costar και Nunc.
- Αποστειρωμένα πλαστικά τρυβλία για καλλιέργειες βακτηρίων, διαμέτρου 10 cm, bacterial grade, της εταιρίας VIVE.
- Αντικειμενοφόρες πλάκες και καλυπτρίδες της εταιρίας Knittel-Glässer.
- Φίλτρα αποστείρωσης με διάμετρο πόρων 0,45/0,2 μm (από την εταιρία PALL) και 0,45 μm (από την εταιρία Schleicher schuell).
- Συσκευή συμπύκνωσης 50 ml (Amicon)
- Πλαστικές κυψελίδες μίας χρήσης, για φωτομέτρηση από την εταιρία Sarstedt.
- Κυψελίδες μίας χρήσης από την εταιρία Sarstedt.
- Για τη μεταφορά πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Hybond C της εταιρίας Amersham.

### **1.7.3 Μικροσκόπια και λογισμικά επεξεργασίας εικόνας**

- Ανάστροφο μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου και αντίθεσης φάσης της εταιρίας Zeiss, μοντέλο ID02 για την παρατήρηση ζωντανών κυττάρων.
- Ανάστροφο μικροσκόπιο (Bausch & Lomb, Germany) για παρατήρηση ζωντανών κυττάρων.
- Ανάστροφο μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου, αντίθεσης φάσης και φθορισμού της εταιρίας Leica.
- Ορθό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου, αντίθεσης φάσης και φθορισμού Zeiss-Axiophot.

- Ψηφιακή κάμερα Leica DC-300 που προσαρμόζεται στα δύο προηγούμενα μικροσκόπια για τη λήψη μικροφωτογραφιών με τη βοήθεια του λογισμικού Leica IM50.
- Συνεστιακό ορθό μικροσκόπιο σάρωσης laser (Confocal Laser Scanning Microscope) της εταιρίας Leica, μοντέλο TCP-SP, εξοπλισμένο με λογισμικό τρισδιάστατης ανάλυσης (Leica 3D analysis software).
- Σύστημα επεξεργασίας και ποσοτικής ανάλυσης εικόνας Image Pro Plus.

## 2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

#### 2.1.1 Ανάπτυξη των μονοκλωνικών αντισωμάτων σε μεγάλη ποσότητα

Πραγματοποιήθηκαν υβριδοποιήσεις σπληνικών κυττάρων από μη ανοσοποιημένα ποντίκια της φυλής NZBxNZW (F1) τα οποία εμφανίζουν αυθόρμητο λύκο (μοντέλο που μιμείται την ανθρώπινη νόσο ΣΕΛ), με τη μυελωματική, μη εκκριτική σειρά NSO. Τα ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν για υβριδοποίηση σε ηλικία 9 μηνών περίπου ηλικία στην οποία εκδηλώνεται αυθόρμητα η ασθένεια και έχουν συντεθεί αντι-DNA αντισώματα. Συστηματικοί ελέγχοι των επιπέδων των αντι-DNA αντισωμάτων με ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA στον ορό των ζώων από τον 4<sup>ο</sup> έως τον 9<sup>ο</sup> μήνα, υπέδειξαν την κατάλληλη ηλικία των ποντικών για την υβριδοποίηση των σπληνικών κυττάρων με τη μυελωματική σειρά. Τέτοια αντισώματα, προερχόμενα από αυτοάνοσους ποντικούς, είναι ήδη γνωστά ως προς τη διεσδυτική τους ικανότητα στη διεθνή βιβλιογραφία.

Οι πηγές των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη είναι:

- 1) Υπερκείμενα καλλιιεργειών υβριδωμάτων Β-λεμφοκυττάρων που παράγουν τα μονοκλωνικά αντισώματα.
- 2) Ασκιτικό υγρό που παράγεται σε ποντίκια SCID (Severe Combined Immunodeficient mice) μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση των υβριδωμάτων- τα οποία χαρακτηρίζονται από ανεπαρκές ανοσοποιητικό σύστημα διασφαλίζοντας έτσι την απουσία αντισωμάτων του ζώου.
- 3) Καθαρά διαλύματα αντισωμάτων, απαλλαγμένα από τις προσμίξεις που υπάρχουν στα ασκιτικά υγρά (για τον καθαρισμό ακολουθήθηκαν διάφορες βιοχημικές και

ανοσοχημικές μέθοδοι όπως κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο, ιοντοανταλλαγή σε στήλη DEAE-Sepharose και χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη πρωτεΐνης A-Sepharose).

#### 2.1.1.1 Καλλιέργεια υβριδωμάτων με μέσο απαλλαγμένο από ορό (SFM)

Με στόχο τις λιγότερες δυνατές προσμίξεις από άλλες ανοσοσφαιρίνες και τη μεγαλύτερη δυνατή παραγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων (10D2) χρησιμοποιήθηκε καλλιέργεια υβριδωμάτων σε μεγάλο αριθμό απο απλές φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας, με θρεπτικό μέσο απαλλαγμένο από συστατικά του ορού (Serum Free Medium-SFM). Όταν τα κύτταρα/υβριδώματα φτάσουν σε ικανοποιητική φάση ανάπτυξης στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (DMEM/10% FBS), μεταφέρονται σε θρεπτικό υλικό SFM και μετά από 4-5 ημέρες ώρες συλλέγεται το υπερκείμενο όπου έχει εκκριθεί το αντίσωμα. Μετά από διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (1000 και 3000 rpm) το παρασκεύασμα συμπυκνώνεται με συσκευή Amicon και αφήνεται προς εκτεταμένη διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-Phosphate pH 8,3 ή φωσφορικών NaP 0,1M pH 8,0.

#### 2.1.1.2 Καλλιέργεια υβριδωμάτων σε ειδικές φλάσκες

Πριν περιγραφεί η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των αντισωμάτων θα πρέπει να αναφερθούν οι συνθήκες καλλιέργειας. Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια υβριδωμάτων (5D3) σε ειδικές φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας δυο διαμερισμάτων (Celline), όπου γίνεται παραγωγή αντισωμάτων σε υψηλή συγκέντρωση. Η ειδική αυτή φλάσκα στο εσωτερικό της αποτελείται από δύο θαλάμους. Έναν μεγάλο και έναν μικρό – ο οποίος διαχωρίζεται από το μεγάλο με μια ημιπερατή μεμβράνη. Στο μικρό θάλαμο τοποθετείται το επιθυμητό υβρίδωμα με 6ml καλλιεργητικό υλικό DMEM με 1/100 αντιβιοτικό (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη) και ειδικά επεξεργασμένου ορού εμβρύου βοός χαμηλής περιεκτικότητας σε ανοσοσφαιρίνες του ζώου (FBS low IgG \*) από τον οποίο απουσιάζουν τα IgG (που κανονικά περιέχονται σε αυτόν). Στο μεγάλο θάλαμο τοποθετούνται περίπου 300ml υλικού DMEM με την ίδια ποσότητα αντιβιοτικού και 3% low IgG FBS.

Σε κάθε φλάσκα καλλιεργείται για 4-5 μέρες το υβρίδωμα κάθε μονοκλωνικού και στη συνέχεια λαμβάνεται το περιεχόμενο του μικρού θαλάμου της φλάσκας όπου βρίσκονται τα κύτταρα. Το εκκρινόμενο μονοκλωνικό αντίσωμα συγκρατείται λόγω της μεμβράνης στο μικρό θάλαμο και δεν περνά στο μεγάλο.

Το περιεχόμενο του μικρού θαλάμου φυγοκεντρείται για 7 λεπτά σε 1000rpm σε θερμοκρασία δωματίου, λαμβάνεται το υπερκείμενο και τοποθετείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Στο υπερκείμενο περιέχεται το επιθυμητό αντίσωμα και αλβουμίνη του ορού αλλά απουσιάζουν τα άλλα IgG του ορού – κάτι που διευκολύνει τον μετέπειτα καθαρισμό του εκάστοτε μονοκλωνικού αντισώματος.

### 2.1.1.3 Χορήγηση υβριδωμάτων σε πειραματόζωα

Ασκιτικό υγρό που παράγεται σε ποντίκια SCID (Severe Combined Immunodeficient mice) -μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση των υβριδωμάτων- τα οποία χαρακτηρίζονται από ανεπαρκές ανοσοποιητικό σύστημα διασφαλίζοντας έτσι την απουσία αντισωμάτων του ζώου.

- Αρχικά γίνεται δυο μέρες πριν, ανοσοποίηση SCID ποντικών με 0,5 ml IFA
- Μέρος των μονοκλωνικών κυττάρων χορηγείται στη συνέχεια στην περιτοναϊκή κοιλότητα των πειραματόζωων για την δημιουργία ασκίτη.
- Πραγματοποιείται εμβολιασμός με 0.5 ml εναιωρήματος κυττάρων ( $4 \times 10^6$  cells/mouse) σε κάθε ποντίκι ενδοπριτοναϊκά.
- Μετά από 2 εβδομάδες έχει αναπτυχθεί αρκετή ποσότητα ασκίτη, τον οποίο λαμβάνουμε με την βοήθεια σύριγγας από την κοιλιά του ποντικού. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 10 min και συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος

### 2.1.2 Κυτταρικές σειρές

Η καλλιέργεια όλων των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν γίνεται σε θρεπτικό υλικό DMEM με 10% κ.ό ορό και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά), σε αποστειρωμένες πλαστικές φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας  $75\text{ cm}^2$ , μέσα σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας  $37^{\circ}\text{C}$ , υγρασίας και συγκέντρωσης  $\text{CO}_2$  5% κ.ό. Όταν τα κύτταρα σχηματίζουν πλήρες ταπήτιο, χρησιμοποιείται διάλυμα τρυψίνης/EDTA για 1-2 λεπτά, για την αποκόλληση τους από τον πυθμένα της φλάσκας καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα κύτταρα επαναιωρούνται σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και επιστρώνονται σε καινούργια φλάσκα. Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι απαραίτητο τα κύτταρα να επιστρωθούν σε συγκεκριμένο αριθμό ανά μονάδα επιφάνειας οπότε, μετά την επαναραίωσή τους, ο αριθμός τους ανά μονάδα όγκου



του υλικού προσδιορίζεται με τη βοήθεια του αιματοκυτταρομέτρου, τύπου Neubauer και καθορίζεται έτσι ο νέος όγκος στον οποίο θα επαναιωρηθούν για να επιστρωθούν.

Σε περίπτωση που η απαιτούμενη πυκνότητα των κυττάρων είναι μικρότερη από την πυκνότητα που αποκτάται με την επαναδιάλυσή τους, τότε τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται σε φυγόκεντρο Beckman για 10 λεπτά στις 1200 rpm. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται στον κατάλληλο όγκο.

Όταν τα κύτταρα πρόκειται να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα, μετά την αποκόλλησή τους επαναιωρούνται σε υλικό καλλιέργειας στο οποίο προστίθεται 20% κ.ό FBS και 10% κ.ό DMSO (dimethylsulfoxide) και φυλάσσονται σε βαθιά κατάψυξη  $-80^{\circ}\text{C}$  ή σε δεξαμενή υγρού αζώτου μέσα σε ειδικά φιαλίδια κρυοπροστασίας όγκου 1,8 ml.

### **2.1.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων με χρήση θρυψίνης**

Για την συντήρηση της κυτταροκαλλιέργειας, όταν τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και καταλαμβάνουν πλήρως την επιφάνεια του δοχείου όπου αναπτύσσονται (culture flask), γίνεται ανακαλλιέργεια με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης.

Η διαδικασία θρυψινοποίησης για φλάσκα πολυστυρενίου των  $75\text{ cm}^2$  έχει ως εξής: Αρχικά γίνεται απομάκρυνση του υπάρχοντος θρεπτικού υλικού και ακολουθούν 2 πλύσεις των κυττάρων με διάλυμα φωσφορικών PBS ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του ορού. Στη συνέχεια αφαιρείται το PBS και προστίθεται 1 ml από το διάλυμα θρυψίνης. Τα κύτταρα επωάζονται για περίπου 3 min στους  $37^{\circ}\text{C}$  και έπειτα, με ελαφρά χτυπήματα γίνεται η αποκόλλησή τους από το υπόστρωμα. Στο επόμενο στάδιο, προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό (εμπλουτισμένο με 10% FBS) σε τετραπλάσιο όγκο. Ο ορός απενεργοποιεί το ένζυμο πριν η δράση του καταστεί τοξική για τα κύτταρα. Ακολουθούν μερικές αναδεύσεις του διαλύματος με πιπέτα μιας χρήσεως ώστε να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα κυττάρων. Τέλος αφαιρείται το επιθυμητό ποσοστό κυττάρων (ή μεταφέρεται σε άλλη φλάσκα) και το υπόλοιπο παραμένει εντός της φλάσκας. Εναλλακτικά, το κυτταρικό εναιώρημα μπορεί να παγωθεί και να αποθηκευτεί (βλ. επόμενη παράγραφο). Στη φλάσκα προστίθεται ποσότητα πλήρους θρεπτικού υλικού που δίνει τελικό όγκο 30 ml και τα κύτταρα επωάζονται στους  $37^{\circ}\text{C}$ , όπου προσκολλώνται ξανά στο υπόστρωμα.

### **2.1.4 Αποθήκευση κυτταρικών σειρών**

- Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 1000 rpm για 5 min.

- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα αποθήκευσης, σε τελική συγκέντρωση  $10^6$  κύτ/ml.
- Μεταφέρουμε από 1 ml σε ειδικές αμπούλες παγώματος και τις αποθηκεύουμε σε βαθιά κατάψυξη  $-80^{\circ}\text{C}$  για λίγες εβδομάδες και έπειτα σε υγρό άζωτο  $-170^{\circ}\text{C}$ , όπου διατηρούνται για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα. Το διάλυμα αποθήκευσης είναι τοξικό για τα κύτταρα, γι' αυτό οι αμπούλες πρέπει να ψύχονται αμέσως μετά την προσθήκη του στο κυτταρικό ίζημα.

### 2.1.5 Τεχνική μέτρησης 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:  $\text{Κύτταρα/ml} = N \times T \times A / 10^{-4} \times 25$ , 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

### ***Ειδικές τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου***

Μία αρχική εκτίμηση της επίδρασης των mAbs στη ζωτικότητα των κυττάρων έγινε με χρήση της χρωστικής Trypan Blue. Έπειτα από επώαση της κυτταρικής σειράς HeLa σε θρεπτικό υλικό που περιέχει το υπό εξέταση αντίσωμα σε συγκέντρωση  $100\mu\text{g/ml}$  για 2 ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$ , τα κύτταρα επωάζονται παρουσία της χρωστικής και ακολουθεί παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Τα νεκρά κύτταρα δίνουν μπλε χρώμα. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές αραιώσεις διαλύματος Trypan Blue, για τη λήψη ασφαλούς αποτελέσματος: μετά την επώαση, το θρεπτικό υλικό που περιέχει το αντίσωμα αφαιρείται και προστίθεται διάλυμα Trypan Blue σε θρεπτικό υλικό DMEM σε αναλογία Trypan Blue: DMEM 1:1, 2:1 και 5:1. Τα κύτταρα επωάζονται για 2 λεπτά, το διάλυμα αφαιρείται και προστίθεται νέο θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα παρατηρούνται σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Σε όλες τις

περιπτώσεις, πριν την επώαση με το αντίσωμα, γίνονται πλύσεις με DMEM για να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα που δεν σχετίζονται με την επίδραση των αντισωμάτων.

### **2.1.6 Φθορισμο-ανοσοκυτταροχημική τεχνική για τον έλεγχο της διείσδυσης**

#### **2.1.6.1 Αρχές Συνεστιακής Μικροσκοπίας (Confocal Microscopy)**

Κατά την εξέλιξη της παρούσας εργασίας κρίθηκε απαραίτητη η χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου (confocal microscope). Η συνεστιακή μικροσκοπία, σε αντίθεση με την κλασική μικροσκοπία φθορισμού, δίνει το μεγάλο πλεονέκτημα της λήψης εικόνων από διαφορετικά εστιακά επίπεδά του προς απεικόνιση αντικειμένου, δημιουργώντας πολλαπλές αξονικές τομές.

Η αρχή λειτουργίας του συνεστιακού μικροσκοπίου στηρίζεται στο γεγονός ότι ο φωτισμός και η παρατήρηση είναι περιορισμένα σε ένα σημείο του παρασκευάσματος. Αυτό επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση ενός πολύ μικρού διαφράγματος (pinhole) στους οπτικούς άξονες του αντικειμενικού και του συγκεντρωτή φακού. Η μεγέθυνση που επιτυγχάνεται στο δείγμα είναι όμοια με του απλού μικροσκοπίου φθορισμού (10x, 20x, 40x, 63x). Η εικόνα σχηματίζεται με σάρωση όλων των σημείων του πεδίου του μικροσκοπίου. Αρχικά το παρασκεύασμα παρατηρείται με φως ορατού μήκους κύματος ή με υπεριώδες και στη συνέχεια επιλέγεται η ακτίνα Laser αργού ή ηλίου-νέου ή και με τα δυο συγχρόνως. Οι εικόνες δεν είναι άμεσα ορατές (real time), αλλά η παρατήρηση γίνεται στην οθόνη του μικροϋπολογιστή του μικροσκοπίου.

Το σημαντικότερο πλεονεκτήματα του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι ότι σε αυτό ελαττώνονται κατά πολύ τα μηνύματα από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος με αποτέλεσμα να ενισχύεται η αντίθεση (contrast) του παρασκευάσματος. Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει τη σάρωση του παρασκευάσματος όχι μόνο ως προς τους άξονες x και y αλλά και ως προς τον z (βάθος) με αποτέλεσμα να παίρνουμε καλά εστιασμένες τρισδιάστατες εικόνες που όμως δεν παρατηρούνται άμεσα, αλλά μέσω μικροϋπολογιστή με ειδικά προγράμματα (software) που κάνουν ψηφιοποίηση και ανακατασκευή της εικόνας.

#### **Βασικό πρωτόκολλο**

Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού επιτρέπει την ανίχνευση ενός αντιγόνου και τον εντοπισμό της θέσης του σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο αλλά και σε επίπεδο

ιστών. Στηρίζεται στη χρήση ιχνηθετημένων με φθορίζουσες ουσίες δευτερογενών αντισωμάτων τα οποία αναγνωρίζουν και προσδέονται στη σταθερή περιοχή των πρωτογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται για τη δέσμευση του επιθυμητού αντιγόνου. Σε συνδυασμό με την τεχνολογία της συνεστιακής μικροσκοπίας και ανάλυσης εικόνας, ο ανοσοφθορισμός επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση δύο ή περισσότερων αντιγόνων, καθώς και την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασής τους. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα αποκολλώνται είτε μηχανικά είτε ενζυμικά από το τρυβλίο καλλιέργειάς τους και επιστρώνονται σε συγκεκριμένη πυκνότητα, π.χ. 20.000 κύτταρα ανά καλυπτρίδα διαμέτρου 13 mm, μέσα σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 24-θέσεων. Όταν τα κύτταρα προσκολληθούν στο υπόστρωμα, προστίθεται θρεπτικό υλικό μέχρις όγκου 500 μl και ακολουθεί επώαση για 24-48 ώρες. Μετά από το χρονικό αυτό διάστημα, το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται πλύση με θρεπτικό υλικό που απομακρύνει τα νεκρά κύτταρα, και προστίθεται νέο πλήρες θρεπτικό υλικό στο οποίο είναι διαλυμένο το υπό εξέταση αντίσωμα.

Η συγκέντρωση του αντισώματος είναι, στα περισσότερα πειράματα, 100 μg/ml αλλά πραγματοποιήθηκαν και πειράματα σε ορισμένες κυτταρικές σειρές με ποικίλες συγκεντρώσεις (από 2,5 μg/ml έως 200 μg/ml) για να προσδιοριστεί η άριστη συγκέντρωση αντισώματος για την εκδήλωση του φαινομένου της διείσδυσης. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C ή στους 4°C για διάφορα χρονικά διαστήματα, από 3 λεπτά έως 72 ώρες. Έτσι, εξετάστηκε η εξάρτηση της διείσδυσης από τη θερμοκρασία και αναλύθηκε η ανάπτυξη του φαινομένου ως προς το χρόνο. Ακολουθεί η μονιμοποίηση των κυττάρων για 20 λεπτά με διάλυμα με την προσθήκη παγωμένης αιθανόλης και παραμονή στους -20°C για 20 λεπτά ή 2% κ.ό παραφορμαλδεΐδη σε PBS και παραμονή στους 37°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται η κάλυψη των μη-ειδικών αντιγονικών θέσεων με επώαση των κυττάρων για μία ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα το οποίο περιέχει βόδια αλβουμίνη.

Ακολουθεί η επώαση των κυττάρων με το διάλυμα των πρωτογενών υπο εξέταση αντισωμάτων. Η αραίωση των αντισωμάτων γίνεται στο ίδιο διάλυμα με το οποίο έγινε η κάλυψη των μη-ειδικών θέσεων, προκειμένου να περιοριστεί ο «θόρυβος». Τα πρωτογενή αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμούς ανά δύο ή ακόμα και ανά τρία αρκεί να έχουν παραχθεί σε διαφορετικό ξενιστή και να αντιδρούν κατόπιν κοινής επεξεργασίας των δειγμάτων. Ο διαφορετικός ξενιστής εξασφαλίζει ότι στο επόμενο στάδιο που είναι η αντίδραση της σταθερής περιοχής του πρωτογενούς αντισώματος με το δευτερογενές, συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική, αντίσωμα θα υπάρξει εξειδίκευση

των δύο δευτερογενών αντισωμάτων [π.χ. goat anti-mouse IgG-AlexaFluor 488 (πράσινο) και goat anti-rabbit IgG-AlexaFluor 546 (κόκκινο)]. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται παραπάνω, όπου αναφέρεται και η αραίωση για το καθένα από αυτά και οι συνδυασμοί τους για το κάθε πείραμα αναφέρονται στα αντίστοιχα πεδία της ενότητας των αποτελεσμάτων. Η επώαση με τα πρωτογενή υπο εξέταση αντισώματα γίνεται για 2 ώρες στους 37°C ή στους 4°C, σε ειδικό δοχείο με υγρασία.

Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα, οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα ξεπλένονται 3 φορές με PBS και ακολουθεί η επώαση με τον κατάλληλο συνδυασμό δευτερογενών αντισωμάτων, συζευγμένων με φθορίζουσες χρωστικές, ώστε να επιτευχθεί διπλός ανοσοφθορισμός. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται παραπάνω και οι συνδυασμοί τους για κάθε πείραμα αναφέρονται στα αντίστοιχα πεδία της ενότητας των αποτελεσμάτων. Η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα γίνεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, σε ειδικό φωτοστεγές δοχείο με υγρασία. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που επώαστηκαν μόνο με δεύτερο αντίσωμα ή μη διεισδυτικά αντισώματα. Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα ξεπλένονται 3 φορές με PBS και μία φορά με dH<sub>2</sub>O και ακολουθεί η τοποθέτησή τους σε αντικειμενοφόρες πλάκες με τη μεσολάβηση του υλικού Mowiol. Όταν τα παρασκευάσματα στεγνώσουν, είναι έτοιμα για παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

#### ***Ειδικές τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου***

Το MTS είναι μια χρωμογόνης μέθοδος για τον προσδιορισμό του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων σε πολλαπλασιασμό, κυττάρων. 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 σχηματίσει ένα σταθερό διάλυμα. Η δοκιμασία χρησιμοποιεί φαιναζίνη (phenazine methosulfat, PMS) ως αντιδραστήριο σύζευξης ηλεκτρονίων. Για την ακρίβεια, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν ανά φρεάτιο πλάκας 96 φρεατίων, για 24 ώρες, στη συνέχεια επώαστηκαν με 100λ από τα δείγματα για 6, 24 και 48 ώρες και ακολούθως, στα κύτταρα προστέθηκαν 20 λ ανά φρεάτιο MTS για 4 ώρες και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 492nm.

Για την ανίχνευση του BrdU που έχει ενσωματωθεί στο DNA των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, μετά τη μονιμοποίηση, τα κύτταρα επώάζονται με 2N HCl, 0,1% κ.ό Triton X-100 για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί επώαση με ρυθμιστικό διάλυμα

εξισορρόπησης βορικού οξέος 0,1 M για 20 λεπτά και 3 πλύσιμα με PBS, πριν από την επώαση κάλυψης των μη-ειδικών θέσεων.

Για τη μελέτη του βαθμού συμπύκνωσης της χρωματίνης χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Hoechst [2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1H-bezimidazole] μια φθορίζουσα ουσία η οποία συνδέεται εξωτερικά με τρεις ή περισσότερες διαδοχικές βάσεις αδενίνης-θυμίνης 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 υπό το υπεριώδες φως. Έτσι, μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων, προστέθηκε σε αυτά διάλυμα χρώσης πυρήνων με Hoechst (1:500) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα επώαστηκαν με αντίσωμα έναντι της IgG (H+L αλυσίδα) ποντικού συζευγμένο με πράσινη ουσία Alexa 488.

#### Άλλα πρωτόκολλα ανοσοφθορισμού που δοκιμάστηκαν

##### Μονιμοποίηση με PFA και γλουταραλδεΐδη και πρόκληση διαπερατότητας με μεθανόλη.

Μετά την επώαση με τα αντισώματα και τις πλύσεις με θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με PFA 4% και γλουταραλδεΐδη 1% σε PBS για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 πλύσεις με PBS και επώαση με μεθανόλη για 15 λεπτά στους -20°C. Τα κύτταρα πλένονται 2 φορές με PBS και επωάζονται με 5% FBS σε PBS (δέσμευση μη ειδικών θέσεων στο πολυστυρένιο) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 2 πλύσεις με PBS, προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα (anti-mouse IgG – FITC) και τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C. Οι καλυπτρίδες πλένονται με PBS και dH<sub>2</sub>O και τοποθετούνται σε Mowiol όπως και στο προηγούμενο πρωτόκολλο.

##### Μονιμοποίηση με PFA 4% ή PFA 3% και πρόκληση διαπερατότητας με Triton X-100 0,25% ή Triton X-100 0,5%.

Μετά την επώαση με τα αντισώματα και τις πλύσεις με θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με παγωμένη PFA 4% ή 3% σε PBS για 20 λεπτά στους 4°C. Ακολουθούν 2 πλύσεις με παγωμένο PBS και επώαση με Triton 0,25% (όταν PFA 4%) και Triton X-100 0,5% (όταν PFA 3%) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Δύο πλύσεις με PBS απομακρύνουν το διάλυμα και η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων στο πολυστυρένιο γίνεται με προσθήκη 5% FBS σε PBS και επώαση 30 λεπτά στους 37°C. Μετά από 2 πλύσεις με PBS, προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα (anti-mouse IgG – FITC)

και τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C. Οι καλυπτρίδες πλένονται με PBS και dH<sub>2</sub>O και τοποθετούνται σε Mowiol κατά τον ίδιο τρόπο.

#### Μονιμοποίηση και πρόκληση διαπερατότητας με αιθανόλη 100%.

Μετά την επώαση με τα αντισώματα και τις πλύσεις με θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με παγωμένη αιθανόλη για 20 λεπτά στους -20°C. Ακολουθούν 2 πλύσεις με PBS και η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων στο πολυστυρένιο γίνεται με προσθήκη 5% FBS σε PBS και επώαση 30 λεπτά στους 37°C. Μετά από 2 πλύσεις με PBS, προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα (anti-mouse IgG-FITC) και τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C. Οι καλυπτρίδες πλένονται με PBS και dH<sub>2</sub>O και τοποθετούνται σε Mowiol κατά τον ίδιο τρόπο.

#### 2.1.7 Απομόνωση πυρηνικού και κυτταροπλασματικού κλάσματος από κύτταρα HeLa

Προκειμένου ν' απομονωθεί ξεχωριστά το πρωτεϊνικό εκχύλισμα του κυτταροπλάσματος κι εκείνο του πυρήνα, ακολουθείται το πρωτόκολλο των Sutherland H.G. και συν. (2004). Εν συντομία, τα κύτταρα πλένονται αρχικά με κρύο PBS και στη συνέχεια με πενταπλάσιο όγκο (σε σχέση με το ίζημα που σχηματίζουν) υποτονικού διαλύματος (10 mM HEPES [pH 7.9], 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 1X μίγμα αναστολέων πρωτεασών). Στο ίδιο υποτονικό διάλυμα και σε τριπλάσιο όγκο, τα κύτταρα παραμένουν στον πάγο για 10 λεπτά και ακολουθεί λύση αυτών με έντονο «πιπετάρισμα» και φυγοκέντρηση στα 3300 × g για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο, φυλάσσεται ως το κυτταροπλασματικό κλάσμα ενώ το ίζημα που συνίσταται από τους πυρήνες επαναδιαλύεται σε ίσο όγκο διαλύματος χαμηλής αλατότητας (20 mM HEPES [pH 7.9], 25% glycerol, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02 M KCl, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 1X μίγμα αναστολέων πρωτεασών). Κατόπιν, προστίθεται στάγδην διάλυμα υψηλής αλατότητας, ίσου όγκου με το ίζημα (σ.σ. ως προς τη σύσταση είναι ίδιο με εκείνο της χαμηλής αλατότητας και έχει επιπρόσθετα και 0,4 M KCl), και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 4°C για μισή ώρα. Το πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα συλλέγεται μετά από φυγοκέντρηση στα 25,000×g στο υπερκείμενο.

### 2.1.8 Πρωτογενείς καλλιέργειες

#### 2.1.8.1 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβα ομφάλιου λώρου

Η απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων (HUVEC, Human umbilical vein endothelial cells) πραγματοποιήθηκε από φλέβα ομφάλιου λώρου νεογνών σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Jaffe et al.. Συνοπτικά, μετά από ψηλάφηση εντοπίστηκε η φλέβα του λώρου και πλύθηκε με 50 ml διαλύματος φωσφορικών PBS. Τα άκρα της φλέβας του λώρου κλείστηκαν ερμητικά με τη βοήθεια βαλβίδων τριών σημείων (three way stop cocks) και ακολούθησε διαποτισμός της φλέβας με 0.1% διαλύματος κολλαγενάσης (Collagenase type IA, Sigma) σε PBS και επώαση του λώρου στους 37°C, για 12 λεπτά. Έπειτα από συλλογή του παραπάνω διαλύματος και των αποκολλημένων κυττάρων, ακολούθησε απενεργοποίηση της κολλαγενάσης με θρεπτικό υλικό M199 εμπλουτισμένο με 5% ορό βοός (FCS, Fetal calf serum, Invitrogen). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στις 1000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 10 ml θρεπτικού υλικού M199, εμπλουτισμένο με 20% FCS (Fetal calf serum), 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 0,05 mg/ml ECGS (Endothelial cell growth supplement) και 0,05 U/ml ηπαρίνης.

#### 2.1.8.2 Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων

Ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου HUVEC, καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία, τα οποία είχαν προηγουμένως επωαστεί με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I και στη συνέχεια πλυθεί με PBS. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό M199 εμπλουτισμένο 20% με εμβρυικό ορό βοός, 0,05 mg/ml ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement), 0,05 IU ηπαρίνης/ml και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στη διάρκεια των πειραμάτων ήταν μικρής γενιάς (από 2-5).

#### 2.1.8.3 Δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυττάρων HUVEC με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης

Ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο των 24 φρεατίων με καλυπτρίδες των 11 mm που είχαν προ-επωαστεί με κολλαγόνο σε συγκέντρωση 30.000 κύτταρα/φρεάτιο. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα επώαστηκαν με τα αντισώματα σε συγκέντρωση 200μg/ml. Μετά το πέρας 24 ωρών υπέστησαν στέρηση ορού για 18h και



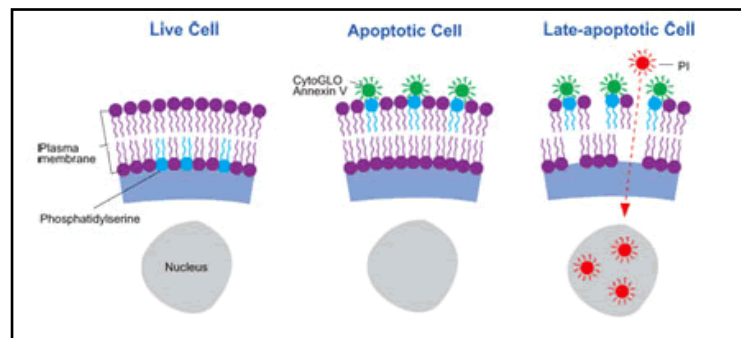
ακολούθησε επαγωγή με VEGF (50ng/ml) για 24 ώρες. Τις τελευταίες 6 ώρες προστέθηκε βρωμοδεόξυ ουριδίνη (BrdU) σε τελική συγκέντρωση 100μM. Στο τέλος της 6ωρης επώασης τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 3,7% και η εξουδετέρωση της περίσσειας παραφορμαλδεΐδης πραγματοποιήθηκε με 50mM χλωριούχο αμμώνιο (NH<sub>4</sub>Cl). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά με 1.5M υδροχλωρικό οξύ (HCl) με σκοπό την αποδιάταξη του DNA και ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις των 10 λεπτών, με PBS. Έπειτα, τοποθετήθηκαν σε διάλυμα Triton X-100 0.1% για 4 λεπτά προκειμένου η κυτταρική μεμβράνη να καταστεί διαπερατή. Η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων έγινε με ορό 10% (10% FCS) για 30 λεπτά και ακολούθησε μια ώρα επώαση με το αντίσωμα α-BRDU (βρωμοδεόξυ ουριδίνη) σε αραιώση 1:200. Έπειτα από πλύση με PBS, έγινε επώαση με δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με ισοθειοκυανική φλουερεσκεΐνη (FITC) σε αραιώση 1:200 και για μια ώρα. Τέλος, οι πυρήνες των κυττάρων σημάνθηκαν με τη χρωστική Hoechst. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) και οι παρατηρήσεις των δειγμάτων έγιναν σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP1 (Βιολογική Χημεία, Ιατρική Σχολή, Ιωάννινα), εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/SS-561/HeNe και λογισμικό Leica TCS, ή Leica SP5 (Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών/IBE-ITE, Ιωάννινα), εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/SS-561/HeNe και λογισμικό Las AF Lite.

#### **2.1.8.4 Δοκιμασία μετανάστευσης κυττάρων HUVEC**

Κύτταρα HUVE τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 35mm σε συγκέντρωση 15.000/τριβλίο. Την επόμενη ημέρα, τα κύτταρα επώαστηκαν με τα αντισώματα σε συγκέντρωση 200 μg/ml. Μετά το πέρας 24 ωρών, η μονοστιβάδα των κυττάρων τραυματίστηκε με τη χρήση ενός πλαστικού και αποστειρωμένου ακροφυσίου, πλύθηκε δύο φορές με PBS και καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 5% ορό και 1% πενικιλίνη και 1% στρεπτομυκίνη απουσία ή παρουσία VEGF (50ng/ml) σε θάλαμο 5% CO<sub>2</sub> και 37<sup>0</sup>C. Εικόνες της τραυματισμένης περιοχής ελήφθησαν κάθε 10 λεπτά και για 16h με τη χρήση του μικροσκοπίου Leica DM IBRE, εξοπλισμένο με την κάμερα HRD060-NIK CCD (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) και το λογισμικό Metamorph. Τα κύτταρα που μετακινήθηκαν προς την τραυματισμένη περιοχή μετρήθηκαν και εκφράστηκαν ως αριθμός κυττάρων ανά cm τραυματισμένης περιοχής.

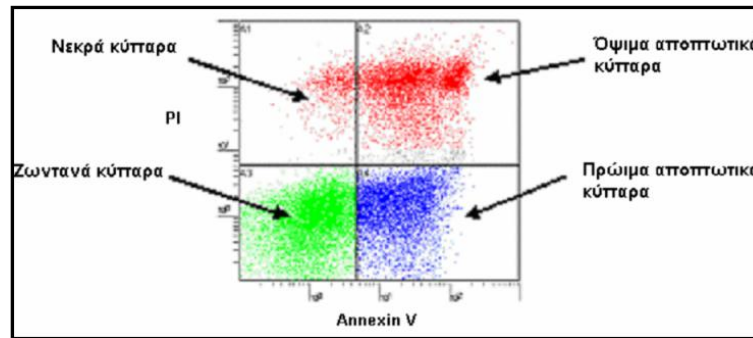
**2.1.8.5 Δοκιμασία επιβίωσης των κυττάρων HUVEC με κυτταρομετρία ροής, (Flow cytometry, FACS): Σήμανση με αννεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο**

Η απώλεια της ασυμμετρίας των φωσφολιπιδίων και η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης (phosphatidylserine, PS) στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, αντί της εσωτερικής που βρίσκεται σε φυσιολογικές συνθήκες, αποτελεί ένα βασικό δείκτη αναγνώρισης των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (272). Η αννεξίνη, η οποία είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 35-36 kDa, μπορεί και συνδέεται πάνω στην φωσφατιδυλοσερίνη με ιδιαίτερα υψηλή εξειδίκευση όταν η φωσφατιδυλοσερίνη εκτίθεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης (Εικόνα 2.1.8.5 α). Η σύνδεση αυτή εξαρτάται από την παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$ .



**Εικόνα 2.1.8.5 α)** Σήμανση με αννεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο.

Κατά συνέπεια, η σήμανση των κυττάρων με αννεξίνη συνδεδεμένη με φλουορεσκεΐνη (Annexin-FITC) αποτελεί ένα δείκτη πρώιμου αποπτωτικού θανάτου. Λόγω του γεγονότος ότι η φωσφατιδυλοσερίνη γίνεται προσβάσιμη και στην περίπτωση της νέκρωσης, χρησιμοποιήθηκε και ένας δεύτερος δείκτης, το ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI), το οποίο δένεται πάνω σε νουκλεϊνικά οξέα μόνο όταν η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης έχει χαθεί. Με αυτόν τον τρόπο, είναι εφικτός ο διαχωρισμός των κυττάρων σε 4 κατηγορίες. Ζωντανά κύτταρα, πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα, όψιμα αποπτωτικά κύτταρα και νεκρά κύτταρα (Εικόνα 3.8.5.4.1β).



**Εικόνα 2.1.8.5 β)** Διαχωρισμός των κυττάρων σε 4 κατηγορίες με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής.

Κύτταρα HUVEC τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων σε συγκέντρωση 300.000/φρεάτιο Την επόμενη ημέρα, τα κύτταρα επώαστηκαν με τα αντισώματα σε συγκέντρωση 200μg/ml. Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε M199 εμπλουτισμένο με 5% ρό και 1% πενικιλίνη και 1% στρεπτομυκίνη για 6 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκε VEGF (50ng/ml) για 24 ώρες. Τα κύτταρα τρυψινοποιήθηκαν, συλλέχθηκαν και καταμετρήθηκαν. Σε κάθε δείγμα  $1 \times 10^5$  κύτταρα επανεωρήθηκαν σε 0,1ml ρυθμιστικού διαλύματος ασβεστίου (0,1M HEPES / NaOH pH=7.4, 140mM NaCl, 25mM CaCl<sub>2</sub>) και επώαστηκαν με 1.0μg/ml Annexin-V-FITC και 5μg/ml ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide) για 20 λεπτά, στους 4°C, στο σκοτάδι (273). Ακολούθησε προσθήκη 0,9ml ρυθμιστικού διαλύματος ασβεστίου και ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής (CyFlow ML, Partec).

## 2.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.2.1 Μέθοδοι καθαρισμού αντισωμάτων

#### 2.2.1.1 Κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο (Ammonium Sulfate Precipitation)

##### *Αρχή μεθόδου*

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών να καθιζάνουν όταν αυξάνεται η ιοντική ισχύς του μέσου στο οποίο βρίσκονται με την προσθήκη ορισμένων αλάτων (εξαλάτωση). Η εξαλάτωση οφείλεται σε αφυδάτωση των υδρόφιλων ομάδων της πρωτεΐνης και συνεπώς σε μείωση της διαλυτότητάς της. Για την απομόνωση των αντισωμάτων στη δική μας περίπτωση χρησιμοποιήθηκε για κατακρήμνιση το θειικό αμμώνιο. Τα αντισώματα γνωρίζουμε ότι κατακρημνίζονται όταν βρεθούν σε διάλυμα 33%-40% κορεσμένου θειικού αμμωνίου ενώ η αλβουμίνη κατακρημνίζεται σε διάλυμα σε τελική συγκέντρωση 70% κορεσμένου θειικού αμμωνίου.

**Πορεία διεξαγωγής**

Σε υπερκείμενο καλλιέργειας (από ειδικού τύπου φλάσκα) ή σε ασκитικό υγρό που περιέχεται ένα από τα αντισώματα προστίθεται σταδιακά –σταγόνα-σταγόνα– κορεσμένο διάλυμα θειικού αμμωνίου ώστε το τελικό διάλυμα να περιέχει 45% v/v θειικό αμμώνιο. Στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται στους 4° C για όλη τη νύχτα. Έπειτα, φυγοκεντρείται για 17 λεπτά σε 3000g στους 4° C. Μετά τη φυγοκέντρηση παρατηρούμε το ίζημα του αντισώματος και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 45% v/v θειικό αμμώνιο και επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρηση. Απομακρύνουμε ξανά το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το αντίσωμα σε τόσο όγκο dH<sub>2</sub>O μέχρι το διάλυμα να μην είναι θολό και να περιέχει κατά προσέγγιση 3mg/ml αντισώματος. Με τον τρόπο αυτό έχουμε ένα διάλυμα στο οποίο υπάρχει το επιθυμητό μονοκλωνικό με μικρή μόνο ποσότητα αλβουμίνης (Wang et al., 2009; Layer et al., 2000).

**Συμπύκνωση και αλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος μονοκλωνικών αντισωμάτων**

Για τη διέλευση μεγάλου όγκου υπερκειμένων καλλιεργείων υβριδωμάτων που παράγουν τα μονοκλωνικά αντισώματα από στήλες χρωματογραφίας καθώς και για τις εκλούσεις που λαμβάνονται από τις στήλες (περιγράφεται παρακάτω) χρειάστηκε να συμπυκνωθούν ή να αλλάξουν ρυθμιστικό διάλυμα.

Τυπικά, η συγκέντρωση των αντισωμάτων τόσο από τα υπερκείμενα καλλιεργείων ή των διαλυμάτων των απομονωμένων αντισωμάτων μετά από χρωματογραφία συγγένειας ή ιοντοανταλλαγής, ήταν της τάξης των 0.1mg/ml. Τα δείγματα συμπυκνώθηκαν 40 έως 60 φορές, στους 4° C, κάτω από πίεση αερίου αζώτου με τη χρήση της συσκευής συμπύκνωσης amicon (MILLIPORE) και ηθμών ορίου αποκλεισμού 3 ή 10kDa.

Η αλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος πραγματοποιείται με διαπίδυση με τη χρήση σάκοι διαπίδυσης μέσα στις οποίες τοποθετείται και κλείνεται από τις δύο πλευρές το διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες (SIGMA) με όρια αποκλεισμού από 3 έως 12kDa ανάλογα με το μέγεθος του α. Έπειτα οι μεμβράνες αυτές τοποθετούνται σε δοχείο με το επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα και αφήνονται υπό ανάδευση για όλη τη νύχτα στους 4° C.

**2.2.1.2 Χρωματογραφικές μέθοδοι**

Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει του μοριακού τους βάρους ή του φορτίου τους. Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάσει του μοριακού βάρους τους χρησιμοποιούνται στήλες χρωματογραφίας οι οποίες περιέχουν υλικό με συγκεκριμένη διάμετρο πόρων. Τα πρωτεϊνικά μόρια μεγάλου μοριακού βάρους καθώς δεν περνούν από το εσωτερικό αυτού

του υλικού και για το λόγο αυτό εκλούνται πρώτα. Μόρια με μικρότερο μέγεθος διέρχονται μέσα από το υλικό και καθυστερούν να εξέλθουν από αυτό. Ο χρόνος έκλυσης κάθε πρωτεΐνης είναι αντιστρόφως ανάλογος του μεγέθους της και εξαρτάται από το σχήμα της. (Layer et al., 2000).

#### **2.2.1.2.1 Χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη πρωτεΐνης A**

##### **Αρχή της μεθόδου**

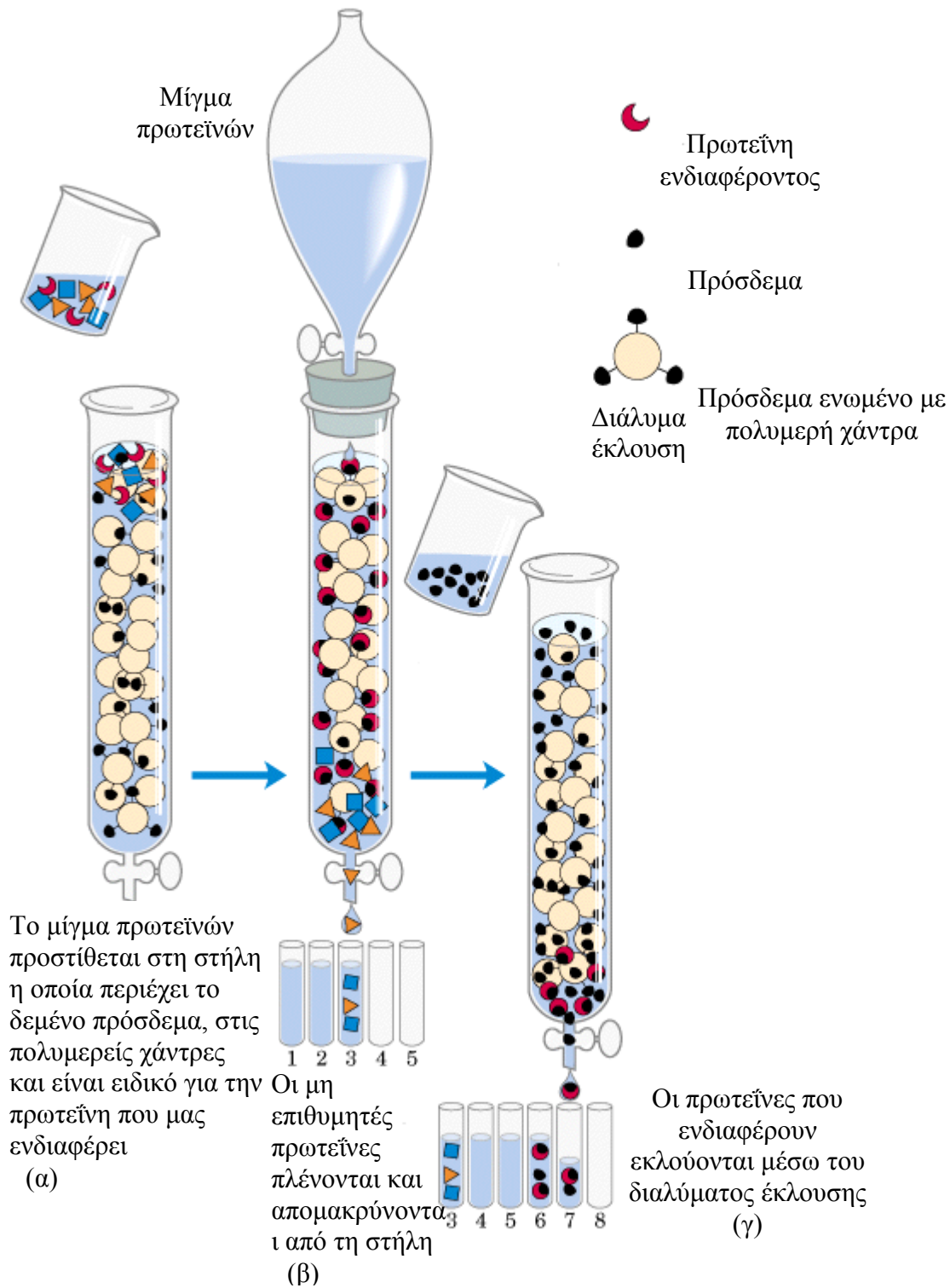
Αυτή η τεχνική εκμεταλλεύεται την ειδική σύνδεση της IgG σε έναν υποδοχέα όπως είναι η πρωτεΐνη A, οι οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη στις χάντρες χρωματογραφίας (Garper et al., 2007). Η πρωτεΐνη αυτή επειδή συνδέεται με το σταθερό τμήμα Fc των ανοσοσφαιρινών, χαρακτηρίζεται ως Fc υποδοχέας. Η πρωτεΐνη A βρίσκεται μέσα στα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα του *Staphylococcus aureus*. Συνδέεται με το ίδιο τμήμα των σταθερών περιοχών της IgG, υποδεικνύοντας μια συγκλίνουσα εξέλιξη των εν λόγω πρωτεϊνών. η χρωματογραφία συγγένειας με την πρωτεΐνη A αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο για τον καθαρισμό αντισωμάτων (Layer et al., 2000; Huse et al., 2002). Έτοιμη προς χρήση μήτρα (σφαιρίδια) με ακινητοποιημένη πρωτεΐνη A είναι εμπορικά διαθέσιμη και λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τις ιδιότητες δέσμευσης αυτών των δύο πρωτεϊνών, μπορούν να βρεθούν στη βιβλιογραφία ή παρέχονται από τους κατασκευαστές (Layer et al., 2000). Στην χρωματογραφία συγγένειας, τα δείγματα που περιέχουν ανοσοσφαιρίνες επωάζονται σε μήτρα, η οποία αποτελείται από ένα συνδετικό μόριο της ανοσοσφαιρίνης, ομοιοπολικά συνδεδεμένο σε χάντρες χρωματογραφίας. Τα μη συνδεδεμένα μόρια απομακρύνονται με πλύσιμο και οι ειδικά συνδεδεμένες ανοσοσφαιρίνες εκλούνται με τη χρήση ενός κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (**Εικόνα 3.8.6.1.3A**).

Μετά την έκλυση, στα κλάσματα που λαμβάνονται είναι καλύτερα να ακολουθεί απευθείας έλεγχος ύπαρξης ανοσοσφαιρινών με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) στα 280 nm. Εναλλακτικά, κλάσματα μπορούν να συλλέγονται και να ελέγχονται χωριστά χρησιμοποιώντας είτε απορρόφηση UV (Layer et al., 2000).

##### **Πορεία διεξαγωγής**

Η τεχνική καθαρισμού στήλης πρωτεΐνης A- Sepharose χρησιμοποιήθηκε για τα μονοκλωνικά αντισώματα τάξης IgG από υπερκείμενα καλλιιεργειών ή ασκτικό υγρό ποντικού με την χρησιμοποίηση.

Τοποθετούνται 1,5 gr πρωτεΐνης A-Sepharose μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 8 για 30 min, ώστε τα σφαιρίδια Sepharose να ενυδατωθούν και να διογκωθούν (1,5 gr σφαιριδίων δίνουν τελικά 5 ml πηκτώματος). Στη συνέχεια το πήκτωμα τοποθετείται στη χρωματογραφική στήλη στην οποία χορηγείται ρυθμιστικό διάλυμα pH 8 (εξισορρόπηση της στήλης). Στη στήλη τοποθετείται ασκητικό υγρό ή υπερκείμενο που έχει προηγουμένως υποστεί διαπίδυση έναντι του ρυθμιστικού διαλύματος pH 8 και στην οποία διεισδύει με αργό ρυθμό. Αφού το ασκητικό υγρό διεισδύσει πλήρως στη στήλη, χορηγείται το διάλυμα pH 8 μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα των κλασμάτων της έκλουσης στα 280 nm να ελαττωθεί και να γίνει μικρότερη από 0.050. Διαβιβάζεται το διάλυμα 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 έκλουση των άλλων ανοσοσφαιρινών διαβιβάζοντας διαδοχικά, το διάλυμα κιτρικού οξέος 0,1 M pH 3. Η στήλη εξουδετερώνεται με το ρυθμιστικό διάλυμα pH 8. Οι ανοσοσφαιρίνες που εκλούνται, εξουδετερώνονται με μερικές σταγόνες διαλύματος Tris 2M. Τα κλάσματα συλλέγονται, συμπυκνώνονται, υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι φυσιολογικού ορού /PBS και φυλάσσονται σε μικρές ποσότητες στην κατάψυξη (-80 °C).



**Εικόνα 3.8.6.1.3Α** Διαδικασία παραλαβής αντισωμάτων μέσω της χρωματογραφίας συγγένειας.

**Πηγή:** [http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/Protein\\_Properties/protein\\_purification.htm](http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/Protein_Properties/protein_purification.htm)

### 2.2.1.2.2 Χρωματογραφία ιοντοαλλαγής (Ion Exchange Chromatography)

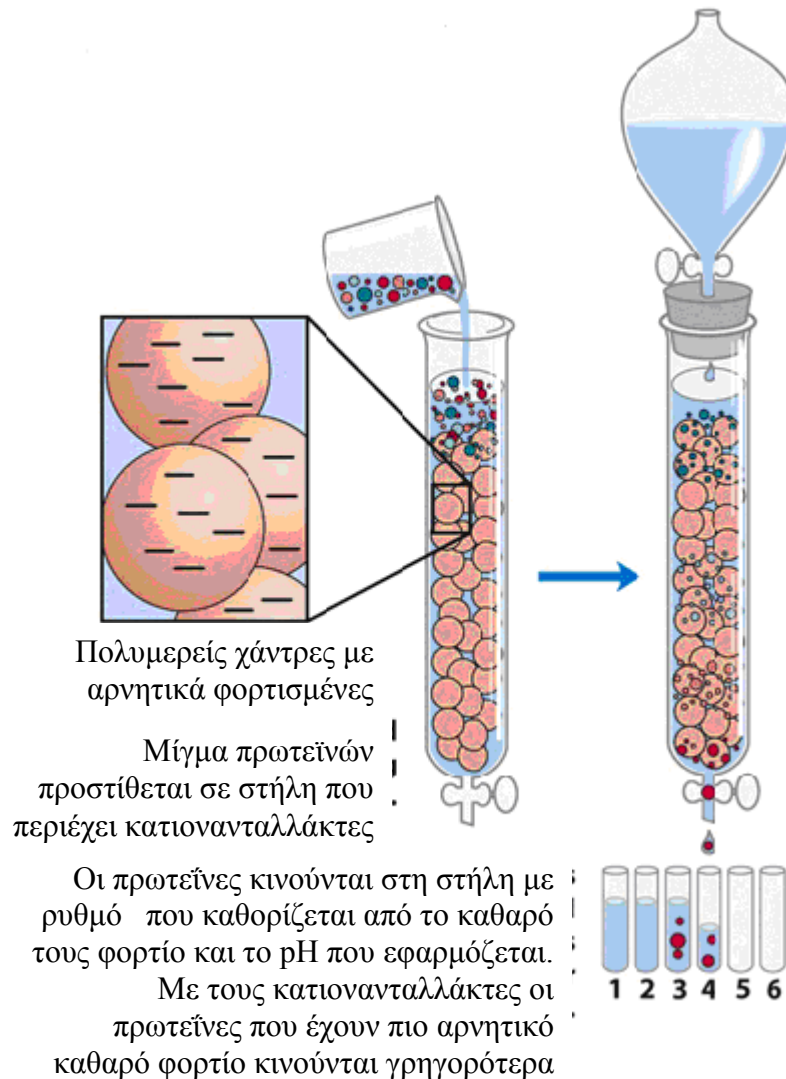
#### *Αρχή της μεθόδου*

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται με εκλεκτικές δεσμεύσεις και αποδεσμεύσεις μεταξύ των ιονισμένων συστατικών ενός υγρού και μιας στερεάς στατικής φάσης (ρητίνης) που φέρει δραστικές ομάδες στις οποίες συνδέονται ευκίνητα ιόντα που μπορούν να ανταλλάγουν με τα ιόντα του υγρού. Τα προς διαχωρισμό συστατικά του μίγματος βρίσκονται σε ιοντική μορφή με αντίθετο φορτίο ως προς τη στατική φάση και έλκονται σ' αυτήν με ηλεκτροστατικές δυνάμεις (**Εικόνα 3.8.6.1.3B**). Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με σταδιακή προσθήκη ενός ρυθμιστικού διαλύματος NaCl (Gapper et al., 2007; Layer et al., 2000). Αφού η δύναμη της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεΐνης-μέσου εξαρτάται από το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης, μια διαδοχική έκλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί με σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση άλατος (Layer et al., 2000). Επειδή οι ανοσοσφαιρίνες έχουν ένα πιο βασικό ισοηλεκτρικό σημείο από ότι οι περισσότερες άλλες πρωτεΐνες του ορού, η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό τους. Η μέθοδος αυτή μπορεί να δώσει καθαρά αντισώματα σε ικανοποιητική μορφή αν η αρχική πηγή είναι υπερκείμενο κυτταρικής καλλιέργειας ή ασκητικό υγρό, αλλά πρέπει να συνδυαστεί με μια επιπλέον μέθοδο καθαρισμού όταν πρόκειται για δείγματα ορού. Η μέθοδος αυτή είναι επίσης οικονομική και ενδείκνυται για μεγάλες αρχικές ποσότητες (Layer et al., 2000).

#### *Πορεία διεξαγωγής*

Ο ανταλλάκτης ιόντων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν Q-Sepharose CL-6B. Χρησιμοποιήθηκε 1 ml από τον ιοντοαντάλλακτη αυτόν σε στήλη 10 ml στους 4°C. Αρχικά η κολώνα εξισορροπήθηκε με 10 ml διαλύματος φωσφορικών 40mM Tris-25mM phosphate pH 8.3 (TB). Στη συνέχεια το «ακάθαρτο» αντίσωμα φορτώνεται στη στήλη και αφήνεται να περάσει μέσα από αυτήν. Ακολουθεί πλύσιμο της κολώνας με το διάλυμα εξισορρόπησης και στη συνέχεια οι εκλούσεις με διάλυμα TB με διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος (50 mM-1M NaCl). Τέλος ο χρησιμοποιούμενος ανταλλάκτης αναγεννάται με διάλυμα 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1M NaCl pH 7,5 με σκοπό την αποδέσμευση όλων των αδέσμευτων πρωτεϊνών. Τα κλάσματα συλλέγονται, συμπυκνώνονται, υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι PBS και φυλάσσονται σε μικρές ποσότητες στην κατάψυξη (-80°C).





- Μεγάλο καθαρό θετικό φορτίο, ● Καθαρό θετικό φορτίο, ● Καθαρό αρνητικό φορτίο,
- Μεγάλο καθαρό αρνητικό φορτίο

**Εικόνα 3.8.6.1.3B:** Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.

**Πηγή:** [http://dolly.biochem.arizona.edu/Bioc462b\\_Honors\\_Spring\\_2009/ighare/techniques.html](http://dolly.biochem.arizona.edu/Bioc462b_Honors_Spring_2009/ighare/techniques.html)

### 2.2.1.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE)

#### *Αρχή της μεθόδου*

Η μέθοδος αυτή ηλεκτροφόρησης στηρίζεται στο διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Η παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS) προκαλεί σε όλες τις πρωτεΐνες αποδιάταξη της τρισδιάστατης δομής τους διασπώντας τους δεσμούς

υδρογόνου και εξαλείφοντας τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το μόριο του οποίου αποτελείται από μία αρνητικά φορτισμένη θειική ομάδα (υδροφιλική) και από μια δωδεκακαυλική ομάδα (υδροφοβική). Οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται όταν η υδρόφοβη ομάδα των μορίων SDS συνδεθεί με τα υδροφοβικά τμήματα των πεπτιδικών αλυσίδων τους. Ο αριθμός των συνδεδεμένων μορίων SDS ανά μόριο πρωτεϊνικής αλυσίδας διαφέρει για κάθε πρωτεΐνη αλλά είναι αρκετά μεγάλος για να τη φορτίσει αρνητικά. Υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου οι πρωτεΐνες λόγω του φορτίου τους θα κινηθούν προς την άνοδο. Η ταχύτητα με την οποία θα κινηθεί καθεμιά τους στο κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου – συγκεκριμένης συγκέντρωσης – εξαρτάται κυρίως από το σχήμα τους, το μέγεθός τους και την επίδραση που θα έχει σε αυτά η σύνδεση των μορίων SDS.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με βινυλ-πολυμερισμό του μονομερούς ακρυλαμιδίου που οδηγεί στο σχηματισμό αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός γίνεται με μια βάση, την NNN'N'-τετραμεθυλενοδιαμίνη (TEMED) παρουσία ελεύθερων ριζών οξυγόνου που δημιουργούνται χημικώς με υπερθειικά ιόντα.

### ***Πορεία διεξαγωγής***

#### **Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου**

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου περιλαμβάνει πήκτωμα διαχωρισμού και πήκτωμα συμπύκνωσης. Το πήκτωμα διαχωρισμού περιέχει 0,375M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS και 12,5% (w/v) ακρυλαμίδιο. Ο πολυμερισμός του γίνεται με 1% (w/v) APS και 0,1% (v/v) TEMED. Το πήκτωμα συμπύκνωσης περιέχει 0,125M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS και 4% (w/v) ακρυλαμίδιο. Ο πολυμερισμός του πηκτώματος γίνεται με 1% (w/v) APS και 0,04% (v/v) TEMED. Οι πολυμερισμοί ολοκληρώνονται μετά από ~30 λεπτά.

#### **Προετοιμασία δειγμάτων πρωτεϊνών**

Στα διαλύματα των προς ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών προστίθεται διάλυμα που περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη. Στη συνέχεια τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά. Η προσθήκη SDS και ο βρασμός βοηθούν στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών καταστρέφοντας ασθενείς δεσμούς. Η β-μερκαπτοαιθανόλη είναι αναγωγικό μέσο και προκαλεί αναγωγή των ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών.

### **Ηλεκτροφόρηση**

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου τοποθετείται σε ειδική συσκευή. Στα πηγάδια του τοποθετούνται τα δείγματα με τις αποδιαταγμένες πρωτεΐνες καθώς και μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους το οποίο λειτουργεί ως δείκτης. Για τη διεξαγωγή της ηλεκτροφόρησης απαιτείται επίσης ρυθμιστικό διάλυμα (διάλυμα ηλεκτροφόρησης) Tris-Glycine pH 8.65 που περιέχει 0,1% (w/v) SDS και ιόντα. Η συσκευή με το πήκτωμα και το ρυθμιστικό διάλυμα τροφοδοτείται με ηλεκτρικό ρεύμα 120V για περίπου 40 λεπτά.

### **Χρώση για εντοπισμό των πρωτεϊνών στο πήκτωμα**

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται για χρώση σε διάλυμα χρωματισμού που περιέχει τη χρωστική Coomassie R-250 (Κεφάλαιο 'Υλικά') για 30-40 λεπτά στους 37° C ή σε όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Για τον αποχρωματισμό του πηκτώματος χρησιμοποιείται διάλυμα αποχρωματισμού (Κεφάλαιο 'Υλικά'). Το διάλυμα αυτό αφήνεται για περίπου 1 ώρα (μέχρι να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής) στους 37° C ή όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου.

#### **2.2.1.4 Ισοηλεκτρική εστίαση (Isoelectric focusing, IEF)**

##### ***Αρχή της μεθόδου***

Η ηλεκτροφόρηση αυτή διαχωρίζει τις πρωτεΐνες βάσει του ηλεκτρικού τους φορτίου. Στηρίζεται στο γεγονός ότι το φορτίο μιας πρωτεΐνης αλλάζει ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος. Οι πρωτεΐνες τοποθετούνται σε πήκτωμα στο οποίο υπάρχει σταθερή διαβάθμιση pH και κινούνται βάσει του φορτίου τους είτε προς την άνοδο είτε προς την κάθοδο. Η άνοδος έχει pH χαμηλότερο από της καθόδου και το εύρος του pH έχει επιλεχθεί έτσι ώστε οι πρωτεΐνες που πρόκειται να διαχωριστούν να έχουν το ισοηλεκτρικό τους σημείο εντός αυτού του εύρους. Για παράδειγμα, μια πρωτεΐνη που βρίσκεται σε pH μικρότερο του ισοηλεκτρικού της σημείου θα φορτιστεί θετικά και θα μετακινηθεί προς την κάθοδο. Κατά τη μετακίνησή της αυτή το pH ελαττώνεται ώσπου η πρωτεΐνη να φτάσει σε ένα pH που αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό της σημείο. Η πρωτεΐνη ακινητοποιείται στο σημείο του πηκτώματος όπου βρέθηκε σε pH ίσο με το ισοηλεκτρικό της σημείο καθώς πλέον δεν έχει φορτίο. Αφού κάθε πρωτεΐνη διαθέτει διαφορετικό ισοηλεκτρικό σημείο, αυτή θα πρέπει να περιοριστεί σε διαφορετικό σημείο στο πήκτωμα και έτσι θα ξεχωρίσει από τις υπόλοιπες όταν πραγματοποιηθεί χρώση για τον εντοπισμό

τους στο πήκτωμα. Η τεχνική αυτή επιτρέπει να διαχωρίζονται σε ένα δείγμα οι πρωτεΐνες που διαθέτουν διαφορετικό ισοηλεκτρικό σημείο.

### **Πορεία διεξαγωγής**

#### **Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης**

Σε ειδικό φύλλο πλαστικού (gelbond) που έχει κοπεί στις επιθυμητές διαστάσεις απλώνεται διάλυμα αγαρόζης 1% w/v (που είχε προηγουμένως θερμανθεί) και 6% v/v αμφολύτες. Το πλαστικό φύλλο πάνω στο οποίο θα δημιουργηθεί το πήκτωμα είναι τοποθετημένο σε ειδική γυάλινη επιφάνεια. Μετά την τοποθέτηση του διαλύματος αγαρόζης – αμφολυτών στο πλαστικό φύλλο αφήνεται να στερεοποιηθεί για περίπου μία ώρα στους 4°C.

#### **Ηλεκτροφόρηση**

Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται οριζόντια πάνω στην πλάκα της ειδικής συσκευής για την ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης. Η συσκευή αυτή διαθέτει σύστημα ψύξης με τη βοήθεια ρέοντος νερού. Στην μία πλευρά του πηκτώματος τοποθετείται λεπτή λωρίδα ειδικού χαρτιού εμβαπτισμένη σε 0,05M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και στην άλλη λωρίδα χαρτιού εμβαπτισμένη σε 1N NaOH. Τα διαλύματα των πρωτεϊνών (ποσότητα πρωτεΐνης ανά δείγμα: 20μg) τοποθετούνται σε ειδικά χαρτάκια επιφάνειας 1cm<sup>2</sup>. Στη συνέχεια τα χαρτάκια αυτά τοποθετούνται στη μέση περίπου του πηκτώματος.

Έπειτα η συσκευή ηλεκτροφόρησης κλείνει ώστε κατά τη διάρκεια τροφοδοσίας με ρεύμα το πήκτωμα με τα δείγματα να μην έρχεται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα. Αφού συνδεθούν τα ηλεκτρόδια με το τροφοδοτικό εφαρμόζεται τάση ως εξής: 150V για 1h, 30min 200V, 30min 300V, 30min 400V, 30min 500V. Η ισχύς που χρησιμοποιείται είναι 15W.

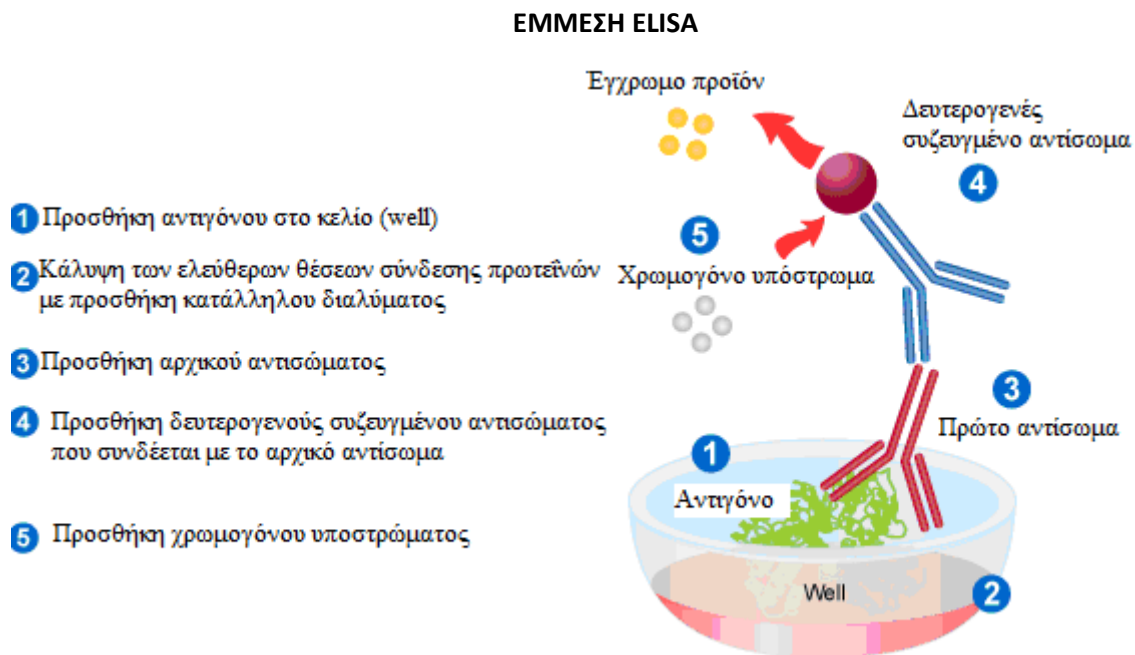
#### **Μονιμοποίηση και χρώση του πηκτώματος**

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα πλένεται με νερό και στη συνέχεια τοποθετείται σε διάλυμα TCA (Trichloroacetic acid) 20% για μία ώρα. Έπειτα αφήνεται όλη τη νύχτα να πλένεται με νερό. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται χρώση του πηκτώματος με χρήση Coomassie Brilliant Blue για μία ώρα στους 37° C. Ακολουθεί αποχρωματισμός του πηκτώματος με καταλληλό διάλυμα αποχρωματισμού.

### 2.2.1.5 Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA)

#### *Αρχή της μεθόδου*

Η ανοσοενζυμική μέθοδος (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) στηρίζεται στη δημιουργία συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος όταν ένα από τα δύο είναι ακινητοποιημένο. Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος ανιχνεύεται καθώς το αντίσωμα του συμπλόκου ή ένα άλλο αντίσωμα που προσδένει στο αντίσωμα του συμπλόκου είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο. Το ένζυμο αυτό θα οδηγήσει στη δημιουργία έγχρωμου διαλυτού προϊόντος όταν γίνει η προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος. Επομένως, για να υπάρξει έγχρωμο διαλυτό προϊόν μετά την προσθήκη του υποστρώματος θα πρέπει να έχει προηγηθεί σύνδεση αντιγόνου αντισώματος. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατό να ανιχνευθεί σε ένα δείγμα ένα συγκεκριμένο αντιγόνο ή αντίσωμα (Εικόνα 3.8.6.1.6). Για τις ανάγκες αυτής της τεχνικής χρησιμοποιούνται ειδικές μικροπλάκες των 96 θέσεων από ειδικό υλικό, συνήθως πολυστυρενίου.



**Εικόνα 3.8.6.1.6** Σχηματική απεικόνιση έμμεσης ELISA

#### *Πορεία διεξαγωγής*

Για τις ανάγκες αυτής της εργασίας ήταν απαραίτητος ο καθορισμός της συγκέντρωσης και της υπόταξης των αντισωμάτων της μελέτης, για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μη ανταγωνιστική ELISA, σύμφωνα με γνωστή μέθοδο (274). Αρχικά οι πλάκες

επιστρώθηκαν με 1 µg/ml of goat anti-mouse IgG1 ( $\gamma$ 1-chain specific), IgG2a ( $\gamma$ 2a), or IgG2b ( $\gamma$ 2b) antibody (Sigma) σε PBS 0.1 M, pH 7.4.. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση των πλακών όλη τη νύχτα στους 4° C. Μετά το τέλος της επώασης πραγματοποιούνται πλύσεις των φρεατίων με PBS ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα της πρωτεΐνης που δεν προσδέθηκε στα τοιχώματα. Έπειτα η πλάκα στεγνώνεται και ακολουθεί η επώαση με PBS 1% BSA για να καλυφθούν τα κενά χωρίς πρωτεΐνη στην κάθε θέση. Η επώαση αυτή πραγματοποιείται στους 37° C για μία ώρα. Τα φρεάτια αδειάζονται και ξεπλένονται 4 φορές με PBS. Στη συνέχεια ακολουθούν τέσσερις πλύσεις με PBS-Tween. Αφού η πλάκα στεγνώσει ακολουθεί η επώαση με τα δείγματα (υπερκείμενο ή απομονωμένο αντίσωμα και κυτταρικά εκχυλίσματα) σε κατάλληλες συγκεντρώσεις σε PBS-BSA με 0.1 % Tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany) (PBS-T-BSA) για 1h στους 37°C σε ξηρό κλίβανο. Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις μονοκλωνικών αντισωμάτων IgG1, IgG2a ή IgG2b ποντικού (Immunology Consultants Laboratory, Όρεγκον, ΗΠΑ) (500 - 3,9 ng / ml). Μετά το τέλος της επώασης πραγματοποιούνται πλύσεις τρεις φορές με PBS-Tween και μια με PBS. Αφού η πλάκα στεγνώσει επωάζεται με δεύτερο αντίσωμα το οποίο προσδένει το πρώτο αντίσωμα και είναι διαλυμένο σε PBS-Tween 1% BSA. Το δεύτερο αντίσωμα ειδικό για αντισώματα ποντικού καθώς το πρώτο αντίσωμα προέρχεται από ποντικό [goat anti-mouse IgG (Fab-specific) είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση των αγριοραφανίδων (horseradish peroxidase, HRP) (80µg/ml) (Sigma)], χρησιμοποιείται σε διάλυμα PBS-Tween 1% BSA. Η επώαση με αυτό πραγματοποιείται για 1 ώρα στους 37° C. Έπειτα ακολουθούν πλύσεις της πλάκας όπως προηγουμένως. Η πλάκα στεγνώνεται και σε κάθε φρεάτιο προστίθεται ποσότητα 100µl από το υπόστρωμα του ενζύμου TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) και γίνεται φωτομέτρηση στα 620 nm (reference). Αφού αναπτυχθεί η αντίδραση, διακόπτεται με την προσθήκη 50 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M και γίνεται νέα φωτομέτρηση στα 450 nm .

#### ***Εξαιρέσεις-ειδικές τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου***

- Έλεγχος της ειδικότητας των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων της μελέτης πραγματοποιήθηκε με έμμεση μη ανταγωνιστική ELISA, σύμφωνα με γνωστή μέθοδο. Τα αντισώματα ελέγχθηκαν σε συγκεντρώσεις 100 ως 0.78 µg/ml. Αρχικά οι πλάκες επιστρώθηκαν με ολική ιστόνη (10 µg/ml), θυρεοσφαιρίνη (10 µg/ml), F ακτίνη (5 µg/ml), τουμπουλίνη (5 µg/ml), καρβονική ανυδράση (5 µg/ml), TNP-BSA (10 µg/ml) και F(ab)'<sub>2</sub> (1 µg/ml) σε CBC 0,1M pH (9,6) και με ολικό DNA (10 µg/ml) σε PBS 0.01 M pH 6,8 και κερατίνη (5µg/ml) σε Tris-HCl 0.05M, pH 7.4 που περιέχει 8M ουρία . Για το DNA

επώαζουμε όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και για τα υπόλοιπα αντιγόνα 1h στους 37°C σε ξηρό κλίβανο. Στη συνέχεια ακολουθεί η επώαση με το επιθυμητό αντιγόνο όλη τη νύχτα στους 4°C. Μετά το τέλος της επώασης πραγματοποιούνται πλύσεις των θέσεων με PBS ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα της πρωτεΐνης που δεν προσδέθηκε στα τοιχώματα του κάθε φρεατίου. Έπειτα η πλάκα στεγνώνεται και ακολουθεί η επώαση με PBS 1% BSA για την κάλυψη των μη-ειδικών θέσεων. Τα αντισώματα (100-0.78 µg/ml) επώαστηκαν στους 37° C για δύο ώρες. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση, για 1,5 ώρα στους 37°C, με το δεύτερο αντίσωμα [goat anti-mouse IgG (γ-chain specific)] συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση των αγριοραφανίδων (horseradish peroxidase, HRP) (80ng/ml) σε διάλυμα PBS-Tween 1% BSA. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω .

#### **2.2.1.6 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford**

##### ***Αρχή της μεθόδου***

Υπό κατάλληλες συνθήκες οι όξινες και οι βασικές ομάδες των πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν με αποχωρούσες ομάδες οργανικών χρωστικών και σχηματίζουν έγχρωμα ιζήματα. Στο φαινόμενο αυτό στηρίζεται και η χρωματομετρική μέθοδος Bradford κατά την οποία χρησιμοποιείται η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 που σχηματίζει σύμπλοκα πρωτεΐνης – χρωστικής με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm και έχουν χρώμα γαλάζιο. (η ελεύθερη χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465 nm). Η κόκκινη (κατιονική) μορφή δρα ως δότης ηλεκτρονίων στις ιονιζόμενες ομάδες των πρωτεϊνών και η δέσμευσή της σταθεροποιείται με δυνάμεις van der Waals. Η δέσμευση στην πρωτεΐνη σταθεροποιεί τη μπλε (ανιονική) μορφή της χρωστικής, με φάσμα απορρόφησης στα 595 nm. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης γίνεται συγκρίνοντας την απορρόφηση του δείγματος στα 595 nm με μια πρότυπη καμπύλη που σχηματίζεται με βάση τη συγκέντρωση γνωστών διαλυμάτων της πρωτεϊνών συνήθως αλβουμίνης ή ανοσοσφαιρίνης IgG (ανάλογα το μοριακό βάρος) με την απορρόφηση τους στα 595 nm. Η αξιοπιστία της μεθόδου περιορίζεται σε πρωτεϊνικά δείγματα που η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται μεταξύ των 0,04 mg/ml και 0,20 mg/ml. Χρησιμοποιείται ευρέως γιατί είναι ευαίσθητη, γρήγορη και σχετικά ακριβής.

##### ***Πορεία διεξαγωγής***

Χρησιμοποιούμε αυτή τη μέθοδο για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των αντισωμάτων που απομονώνουμε. Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις 0,120-2 mg/ml ανθρώπινης IgG (Sigma). Αν είναι απαραίτητο, τα προς

μέτρηση δείγματα αραιώνονται σε κατάλληλη συγκέντρωση (μέσα στο εύρος της πρότυπης καμπύλης). Το αντιδραστήριο Bradford σε σκοτεινό δοχείο, σε θερμοκρασία δωματίου, αραιώνεται 1:5 με απεσταγμένο νερό. Προστίθεται 10,2 μl δείγματος και 509,8 μl αντιδραστηρίου Bradford σε σωληνάρια erpendorf. Το μίγμα επωάζεται θερμοκρασία 25°C για 15 λεπτά και ακολούθως λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595 nm, χρησιμοποιώντας ένα διάλυμα αναφοράς ως μάρτυρα ο οποίος περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από πρωτεΐνη. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό άγνωστου δείγματος αναμιγνύουμε 950 μl του αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford με 50μl πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης ώστε στην κυψελίδα να υπάρχουν 2-10 μg πρωτεΐνης. Ακολουθεί προσδιορισμός της συγκέντρωσης των αντισωμάτων με βάση την πρότυπη καμπύλη.

### **2.2.1.7 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting)**

#### ***Αρχή μεθόδου***

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα πρόσδεσης αντισωμάτων σε πρωτεΐνες ακινητοποιημένες σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται σύμπλοκο αντιγόνου – αντισώματος. Ο εντοπισμός αυτού του συμπλόκου πραγματοποιείται με τη χρήση δεύτερου αντισώματος που προσδένει στο πρώτο αντίσωμα και είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με ένζυμο. Μετά την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος για το ένζυμο πραγματοποιείται αντίδραση που δημιουργεί έγχρωμο προϊόν το οποίο βοηθάει να εντοπιστεί η πρωτεΐνη. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η ανίχνευση ακόμα και ελάχιστων ποσοτήτων πρωτεϊνών.

#### ***Πορεία διεξαγωγής***

#### ***Μεταφορά πρωτεϊνών από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης***

Αφού πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση SDS-Page το πήκτωμα τοποθετείται σε άμεση επαφή με μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και εκατέρωθεν αυτών τοποθετούνται κομμάτια απορροφητικού χαρτιού Whatman καθώς και ειδικά σφουγγαράκια. Η μεμβράνη και το πήκτωμα (μαζί με τα ειδικά χαρτιά και σφουγγαράκια) τοποθετούνται σε ειδικές πλάκες. Αυτές τοποθετούνται στην ειδική συσκευή που θα τροφοδοτηθεί με ηλεκτρικό ρεύμα για να γίνει η μεταφορά. Στο δοχείο της συσκευής τοποθετείται κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, διάλυμα μεταφοράς, το οποίο θα οδηγήσει στη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Στην πλευρά της συσκευής όπου είναι η κάθοδος πρέπει να βρίσκεται με σειρά: το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και όχι το αντίστροφο. Πάγος που τοποθετείται σε επαφή με τις πλάκες βοηθά στη μείωση της



θερμοκρασίας η οποία τείνει να αυξηθεί αρκετά στο εσωτερικό του δοχείου λόγω του ηλεκτρικού ρεύματος. Η μεταφορά πραγματοποιείται με ηλεκτρικό ρεύμα έντασης 300mA για περίπου μία ώρα (για πρωτεΐνες μάζας ~30 kD).

Αφού ολοκληρωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η τελευταία τοποθετείται σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS 1X με 5% (w/v) λυοφιλιωμένο γάλα και παραμένει για τουλάχιστον 30 λεπτά στους 37°C, ώστε να πληρωθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος στη μεμβράνη.

Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαζεται με το πρώτο αντίσωμα το οποίο έχει αραιωθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα με 2,5% (w/v) λυοφιλιωμένο γάλα και στη συνέχεια πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις με TBS 1X -0,1% Tween διάρκειας 10 λεπτών η καθεμιά. Ακολουθεί η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα που προσδένει στο πρώτο και ταυτόχρονα φέρει το ένζυμο HRP. Η επώαση διαρκεί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση και ακολουθούν ξανά τρεις πλύσεις με TBS 1X -0,1% Tween διάρκειας 10 λεπτών η καθεμιά.

#### ***Ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών: Μέθοδος ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemo-Luminescence).***

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, λαμβάνει χώρα σε σκοτεινό θάλαμο και απαιτεί τη χρήση συγκεκριμένων αντιδραστηρίων για την ολοκλήρωση της βιοχημικής αντίδρασης (λουμινόλη, κουμαρικό οξύ, υπεροξειδίο του υδρογόνου) καθώς επίσης φιλμ αυτοραδιογραφίας και διαλύματα για την ανάπτυξη και μονιμοποίηση του σήματος της χημειοφωταύγειας επάνω στο φιλμ.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ της λουμινόλης και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, που καταλύεται από το συζευγμένο στο δεύτερο αντίσωμα ένζυμο της υπεροξειδάσης. Το διεγερμένο χημικό ενδιάμεσο που παράγεται από την παραπάνω αντίδραση, μεταπίπτει στη συνέχεια σε μία κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας εκπέμποντας φως. Η παρουσία ενισχυτικών υποστρωμάτων όπως είναι το κουμαρικό οξύ, αυξάνει έως και 1000 φορές την ένταση του εκπεμπόμενου φωτός το οποίο και αποτυπώνεται στο φιλμ. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που φέρει τις αποδιαταγμένες πρωτεΐνες, εμβαπτίζεται στο διάλυμα των αντιδραστηρίων και παραμένει για ένα με δύο λεπτά. Κατόπιν, τυλίγεται σε πλαστική μεμβράνη και από πάνω τοποθετείται το φιλμ υπό πίεση προκειμένου ν' αποτυπωθεί το σήμα της χημειοφωταύγειας. Ο χρόνος έκθεσης της μεμβράνης στο φιλμ ποικίλλει ανάλογα με την

ένταση του σήματος και κυμαίνεται από ένα έως και είκοσι λεπτά. Πέραν αυτού του χρονικού διαστήματος το σήμα έχει αποδυναμωθεί πλήρως και δεν δύναται να μας προσφέρει κάποια επιπρόσθετη πληροφορία για το πείραμά μας. Η εμφάνιση των σεσημασμένων από τη φωταύγεια πρωτεϊνικών ζωνών, πραγματοποιείται με την εμφάνιση του φιλμ σε διάλυμα ανάπτυξης (GDX Developer, Kodak) και στη συνέχεια σε διάλυμα μονιμοποίησης (GBX Fixer, Kodak), ούτως ώστε να διατηρηθεί η εικόνα που λαμβάνουμε.

## 2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

### 2.3.1 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των μορίων DNA πραγματοποιείται με βάση το μοριακό τους βάρος, με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (ηλεκτροφόρηση) σε οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης (φυτικός πολυσακχαρίτης). Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα μόρια DNA τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω του ιονισμού των φωσφορικών ομάδων τους μετακινούνται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους. Ανάλογα με το μέγεθος των προς ανάλυση μορίων DNA, χρησιμοποιούνται πήκτωμα διαφορετικής συγκέντρωσης σε αγαρόζη. Μεγάλου μεγέθους μόρια DNA απαιτούν χαμηλή συγκέντρωση αγαρόζης, 0,8% κ.β. ώστε να μπορούν να μετακινηθούν μέσω των πόρων του πηκτώματος. Αντίθετα, μικρού μεγέθους μόρια, της τάξεως λίγων εκατοντάδων bp, χρειάζονται αρκετά πυκνό πήκτωμα, 2% κ.β. σε αγαρόζη, το οποίο θα τα συγκρατήσει και δε θα τ' αφήσει να διαφύγουν στο ρυθμιστικό διάλυμα κατά την ηλεκτροφόρηση. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι TBE 1X με βρωμιούχο αιθίδιο 0,5 μg/ml.

Τα δείγματα DNA μετά από προσθήκη διαλύματος φόρτωσης δείγματος (loading buffer) ( $V_{\text{loading buffer}}/V_{\text{ολικό}} = 1/10$ ) ηλεκτροφορούνται υπό σταθερή τάση 150 Volts, σε θερμοκρασία δωματίου. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα, στο πήκτωμα ηλεκτροφορείται κι ένας μάρτυρας (marker) γνωστών μοριακών μεγεθών. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) μήκους κύματος 302 nm, όπου λόγω της φθορίζουσας χρωστικής του βρωμιούχου αιθιδίου που ενσωματώνεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA, τα μόρια DNA σχηματίζουν ορατές ζώνες στις θέσεις που έχουν μεταναστεύσει με βάση το μοριακό τους βάρος. Τέλος το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφίζεται σε φιλμ «Polaroid Type 57». Η

μέθοδος της ηλεκτροφόρησης, εφαρμόζεται επίσης και κατά τη διαδικασία της απομόνωσης και καθαρισμού των μορίων DNA. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιούνται παρασκευαστικά πηκτώματα αγαρόζης, από τα οποία αποκόβονται τα τμήματα εκείνα που περιέχουν τις επιθυμητές ζώνες του DNA και κατόπιν εφαρμόζονται μέθοδοι καθαρισμού DNA.

### **2.3.2 Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες**

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που προέρχονται από μικροοργανισμούς, τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες και κόβουν το DNA σπάζοντας ένα φωσφοδιεστερικό δεσμό σε συγκεκριμένη θέση, σε κάθε αλυσίδα. Το πρότυπο πέψης ενός μορίου DNA με μία ειδική ενδονουκλεάση χρησιμοποιείται ευρέως, τόσο για την ταυτοποίηση όσο και για την απομόνωση συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Οι πέψεις πραγματοποιούνται σε περιβάλλον (ιοντική ισχύς, θερμοκρασία, pH, παρουσία ή απουσία απορρυπαντικού, κλπ.) που ευνοεί την δράση του εκάστοτε ενζύμου. Οι συνθήκες αυτές καθορίζονται από την εταιρεία παρασκευής του εκάστοτε ενζύμου. Σε μία τυπική αντίδραση πέψης 1 μg DNA επάγεται στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με 3-5 μονάδες ενζύμου, στην κατάλληλη θερμοκρασία για 2 ώρες. Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης.

### **2.3.3 Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού σοκ.**

Για την παραγωγή και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα, ακολουθείται ο μετασχηματισμός βακτηρίων υψηλά δεκτικών στην εξωγενή πρόσληψη γενετικού υλικού, με τη μέθοδο του θερμικού σοκ. Η αρχή της μεθόδου, βασίζεται στην αύξηση της διαπερατότητας της βακτηριακής μεμβράνης για το DNA, παρουσία κατιόντων (π.χ. ασβέστιο, μαγνήσιο), κατά την απότομη αύξηση της θερμοκρασίας (για σύντομο χρονικό διάστημα) από τους 4°C (πάγος) στους 42°C. Πιο συγκεκριμένα, επιλέγεται το στέλεχος της *E.coli* XL10 (XL10-Gold Ultracompetent cells-Stratagene) που διαθέτει ιδιαίτερα υψηλή δεκτικότητα ( $\geq 5 \times 10^9$  cfu.μg pUC18 DNA). Τα βακτήρια επάγονται μαζί με το DNA (πλασμιδιακό ή το προϊόν της αντίδρασης σύνδεσης /ligation) για 30 λεπτά στους 4°C παρουσία  $\text{CaCl}_2$  και αναδεύονται ήπια ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιείται κυμαίνεται από 0,1 έως 50 ng και εξαρτάται από το εάν θέλουμε να μετασχηματίσουμε τα βακτήρια μ' ένα απλό υπερελκωμένο πλασμίδιο (οπότε μία μικρή ποσότητα είναι αρκετή) ή με το προϊόν της αντίδρασης σύνδεσης. Κατόπιν, το μίγμα μεταφέρεται στους 42°C για 30 sec και αμέσως

μετά πάλι στον πάγο. Ακολουθεί εμβολιασμός των μετασηματισμένων βακτηρίων σε 1 ml θρεπτικού υλικού LB χωρίς αντιβιοτικό και επώαση στους 37°C για 1 ώρα υπό ανάδευση. Το υλικό στη συνέχεια επιστρώνεται σε βακτηριακά πιάτα που περιέχουν LB-άγαρ με το κατάλληλο αντιβιοτικό, ώστε να γίνει η επιλογή των βακτηρίων (θα επιβιώσουν στην καλλιέργεια τα βακτήρια που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο, το οποίο φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας έναντι του συγκεκριμένου αντιβιοτικού). Τα πιάτα αφήνονται για επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες και όταν αναπτυχθούν οι επιθυμητές αποικίες, ανακαλλιεργούνται με σκοπό να απομονωθεί σε μεγάλη ποσότητα το πλασμιδιακό DNA (ανασυνδυασμένο ή μη) που μας ενδιαφέρει.

#### **2.3.4 Παρασκευή και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα**

Με τη συστηματοποιημένη μέθοδο της QIAGEN Inc., απομονώνεται γρήγορα μικρή ποσότητα μερικώς μόνο καθαρισμένου πλασμιδιακού DNA από υγρές καλλιέργειες εμβολιασμένες με αποικίες μετασηματισμένων βακτηρίων. Το πλασμιδιακό DNA ελέγχεται στη συνέχεια με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και εντοπίζονται έτσι οι κλώνοι που φέρουν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

- Αρχικά εμβολιάζονται 3 ml διαλύματος θρεπτικού υλικού που περιέχει αμπικιλίνη (Στελική = 100 µg/ml) με μία αποικία μετασηματισμένων βακτηρίων. Ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37°C για 12-16 ώρες.
- Μεταφορά 1,5 ml από τη βακτηριακή καλλιέργεια σε σωλήνα erpendorf και φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 30 sec. σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπόλοιπο της βακτηριακής καλλιέργειας φυλάσσεται στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων επαναδιαλύεται με προσθήκη 100 µl κατάλληλου διαλύματος (resuspension buffer P1) και έντονη ανάδευση. Κατόπιν, προστίθενται 200 µl διαλύματος λύσης (lysis buffer P2) και τέλος 150 µl διαλύματος εξουδετέρωσης του όξινου pH (neutralization buffer P3). Ακολουθεί ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 rpm.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθεται 1 ml αιθανόλης 100%. Η ανάμιξη πραγματοποιείται με αναστροφή των σωλήνων erpendorf και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στο φούρνο στους 55°C.
- Η επαναδιάλυση του DNA γίνεται σε 50 µl ddH<sub>2</sub>O.

Όπως αναφέρθηκε και στην αρχή, μία ποσότητα του απομονωμένου DNA (10 µl) θα υποστεί πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, προκειμένου να εντοπιστούν στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης οι κλώνοι που φέρουν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

### **2.3.5 Παρασκευή και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxi prep)**

Με τη μέθοδο αυτή, απομονώνεται μεγάλη ποσότητα υψηλής καθαρότητας πλασμιδιακού DNA.

- Έχοντας προσδιορίσει από πριν -με απομόνωση σε μικρή κλίμακα- ποια αποικία-κλώνος φέρει το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, μεταφέρουμε μέρος της αρχικής μικρής υγρής καλλιέργειας των 3 ml σε 500 ml θρεπτικού διαλύματος LB που έχει εμβολιαστεί με αμπικιλίνη (Cτελική = 100 µg/ml). Ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37°C για 12-16 ώρες.

- Την επόμενη μέρα, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα (βακτηριακά κύτταρα) επαναδιαλύεται σε 10 ml κατάλληλου διαλύματος (resuspension buffer P1).

- Προστίθενται 10 ml διαλύματος λύσης (lysis buffer P2) και μετά από ήπια ανάδευση επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

- Προστίθενται 10 ml διαλύματος εξουδετέρωσης του όξινου pH (neutralization buffer P3) και μετά από ήπια ανάδευση επωάζουμε στον πάγο για 20 λεπτά.

- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C, σε φυγόκεντρο Sorvall SS-34. Το ίζημα απορρίπτεται και το υπερκείμενο που περιέχει το πλασμιδιακό DNA επαναφυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις ίδιες συνθήκες.

- Σε κολώνα QIAGEN-tip 500 προστίθενται 10 ml διαλύματος εξισορρόπησης (equilibration buffer QBT) το οποίο διαμορφώνει τις κατάλληλες συνθήκες αλατότητας και pH προκειμένου στη συνέχεια, κατά το «πέρασμα» του δείγματος να συγκρατηθεί από το φίλτρο μόνο το πλασμιδιακό DNA, ενώ άλλες προσμίξεις όπως κυτταρικές πρωτεΐνες ή μεταβολίτες ν' απομακρυνθούν. Αφήνουμε το διάλυμα QBT να περάσει από την κολώνα με τη δύναμη της βαρύτητας.

- Στη συνέχεια, προστίθεται στην κολώνα το υπερκείμενο της τελευταίας φυγοκέντρησης το οποίο και πάλι περνά την διαπερνά.

- Η κολώνα ξεπλένεται δύο φορές με 30 ml, κάθε φορά, διαλύματος πλύσης (wash buffer QC) το οποίο απομακρύνει οποιαδήποτε πρόσμιξη χωρίς να επηρεάζει τη δέσμευση του

πλασμιδιακού DNA. Επιπρόσθετα, εμποδίζει τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις και απομακρύνει τις πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA, χωρίς τη χρήση φαινόλης.

- Η έκλουση του DNA λαμβάνει χώρα με 15 ml κατάλληλου διαλύματος (elution buffer QF). Κατόπιν, το DNA κατακρημνίζεται με 10,5 ml ισοπροπανόλης και φυγοκέντρωση στις 10.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C.

- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και ο γυάλινος σωλήνας φυγοκέντρωσης (correx), αφήνεται να στεγνώσει στο φούρνο στους 65°C.

Το DNA που βρίσκεται στα τοιχώματα του σωλήνα, επαναδιαλύεται σε διάλυμα Tris-EDTA 1:0,1, δηλ. Tris 1mM pH 7,5:EDTA 0,1 mM pH 8. Η χαμηλή συγκέντρωση σε EDTA εξυπηρετεί στο ν' αποφευχθούν προβλήματα στις πέψεις με ένζυμα (το EDTA προστατεύει το DNA από τη δράση DNAασών όπως οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, δεσμεύοντας ιόντα-συμπαράγοντες).

### **2.3.6 Έλεγχος υδρόλυσης**

Το πλασμίδιο pBluescript KS II, χρησιμοποιήθηκε ως υποστρώμα για τις δοκιμή της υδρολυτικής ικανότητας του DNA από τα αντισώματα. Το πλασμίδιο επώαστηκε με τα αντισώματα για 30 λεπτά, 4, 16 και 24 ώρες στους 37°C και σε αναλογίες αντισώματος (μg): πλασμίδιο (μg), 2:1, 10:1 και 30:1 με TBS που περιέχει 2 mM MgCl<sub>2</sub>. Οι αντιδράσεις τερματίστηκαν με θρυψίνη (20 μg / ml) στους 37°C για 1 ώρα και τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

### ***Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης***

Τα δείγματα DNA αναμιγνύονται 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 δίκλωνο DNA και καθιστά δυνατή την παρατήρηση αυτού υπό το υπεριώδες φως λυχνίας UV. Τα δείγματα του DNA φωτογραφήθηκαν με την κάμερα KODAK Digital Science 1D και το λογισμικό EDAS 1201D. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA TBE 10x : Tris Base (108gr), Boric acid (55gr) και EDTA (7,44gr). Το pH προσαρμόζεται στο 8,3 με HCl και ογκομετρείται στο 1 l.

### **2.3.7 Έλεγχος κατακερματισμού του DNA**

Για τον έλεγχο κατακερματισμού του DNA, κύτταρα HeLa επώαστηκαν με τα αντισώματα (100μg/ml) για 48 ώρες στους 37°C (2x10<sup>5</sup> κύτταρα HeLa/ζώνη) και στη

συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα 3000 g για 5 λεπτά για τη λύση των κυττάρων, με ένα υποτονικό ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mg/ml διαλύματος πρωτεΐνης K επί 2 ώρες στους 50°C). Για την απομάκρυνση προσμίξεων RNA, χρησιμοποιήθηκε ένζυμο RNase (0,1 mg/ml) για 1 ώρα στους 37°C. Το DNA απομονώθηκε με μίγμα φαινόλης/χλωροφορμίου, κατακρημνίστηκε με ίσο όγκο ισοπροπυλικής αλκοόλης και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 12000 g για 15 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα που προέκυψε επαναδιαλύθηκε σε 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος (Tris-EDTA) και αφού προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος (2 μl) διαλύματος φόρτωσης (loading buffer: 0.25% bromphenol blue, 30% glyceric acid), ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% που περιέχει 1 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο.

## *Αποτελέσματα*



## IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. Επιλογή, ανάπτυξη και απομόνωση μονοκλωνικών CPAbs από υβριδώματα

Στο εργαστήριο Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ είχε ήδη παραχθεί μια σειρά από μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) από υβριδώματα ποντικών (NZBxNZW) F1 (αρσενικά) τα οποία εμφανίζουν αυθόρμητο λύκο (σε ηλικία εννέα μηνών). Τα υβριδώματα προήλθαν από τη σύντηξη σπληνοκυττάρων των ποντικών αυτών (αφού πρώτα είχαν ελεγχθεί για υψηλό τίτλο κυκλοφορούντων αντι-DNA αντισωμάτων), με μη εκκριτικά μυελωματικά κύτταρα NSO, σύμφωνα με την κλασική μέθοδο των Köhler και Milstein. Τα υβριδώματα επιλέχθηκαν σε μέσο με υποξανθίνη-αμινοπτερίνη-θυμιδίνη και τα εκκριτικά, υποκλωνίστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις. Κατόπιν ελέγχθηκαν ως προς αντι-DNA δραστηριότητα και διεισδυτική ικανότητα σε κύτταρα Hela με ELISA και φθορισμο-ανοσοκυτταροχημική τεχνική και παρατήρηση στο φωτονικό μικροσκόπιο, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους.

Για την παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν τρία από τα μονοκλωνικά CPAbs (10D2, 2C6 και 5D3A8) βάσει του διαφορετικού προφίλ διείσδυσης και των διαφορετικών ανοσοχημικών τους ιδιοτήτων (Πίνακας 1). Επίσης, δύο mAbs (H9.3 και 1C5), τα οποία δεν διείσδυαν, χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Τα 10D2, 2C6, H9.3 ανήκαν στην υπόταξη IgG2a και τα 5D3A8, 1C5 στην IgG2b.

Για την ανάπτυξη σε μεγάλη ποσότητα και απομόνωση των πέντε αυτών mAbs, ήταν αναγκαίο να γίνει βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας του κάθε υβριδωματικού κλώνου σύμφωνα με τις απαιτήσεις του, αφού οι κλώνοι που παράγουν πολυδραστικά αντισώματα εμφανίστηκαν ασταθείς στην καλλιέργεια, γεγονός που απαιτούσε συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης για τον καθένα (αυξημένη ή μειωμένη ποσότητα κυττάρων στο ταπήτιο καλλιέργειας, κτλ). Καθώς ο κάθε κλώνος εμφάνιζε ξεχωριστή εικόνα ως προς τον πολλαπλασιασμό του και βασικός στόχος ήταν οι λιγότερες δυνατές προσμίξεις από άλλες ζωικές ανοσοσφαιρίνες, λόγω της ύπαρξης φυσικών αυτοαντισωμάτων που θα μπορούσαν να διαστρεβλώνουν την εικόνα, όπως και τη μεγαλύτερη δυνατή παραγωγή, γι' αυτό δοκιμάστηκαν σαν πιθανές πηγές: 1) υπερκείμενα καλλιεργείων υβριδωμάτων σε απλές φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας με θρεπτικό μέσο απαλλαγμένο από συστατικά του ορού (Serum Free Medium - SFM), 2) υπερκείμενα καλλιεργείων υβριδωμάτων παρουσία ορού με χαμηλή συγκέντρωση ανοσοσφαιρινών σε ειδικές φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας δύο διαμερισμάτων και 3) ασκτικό υγρό από

ποντίκια SCID [ποντίκια με κατεσταλμένο ανοσοποιητικό σύστημα (Severe Combined Immunodeficient mice)].

Για τον καθαρισμό των αντισωμάτων από τα υπερκείμενα καλλιέργειών ή από τα ασκίτικα υγρά πραγματοποιήθηκε πρώτα κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο και στη συνέχεια, είτε χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη πρωτεΐνης A-Sepharose (για μονοκλωνικά αντισώματα τάξεως IgG2a και IgG1 που εκλύονται σε pH 5 και 6 αντίστοιχα), είτε ιοντοανταλλαγή σε στήλη DEAE-Sepharose (για μονοκλωνικά αντισώματα τάξεως IgG2b των οποίων η απομόνωση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8,3), για να μην εκτεθούν στην πρωτεΐνη A σε πολύ όξινο pH (3.0). Ο καθαρισμός των μονοκλωνικών αντισωμάτων τάξεως IgG2b προτιμήθηκε να γίνει με DEAE-Sepharose γιατί έτσι αποφεύγεται η παραμονή τους σε όξινο διάλυμα (pH 3), το οποίο δύναται να μεταβάλει τη δομή του ενεργού τους κέντρου. Μετά τον καθαρισμό, τα mAbs ελέγχθηκαν ως προς: α) την ολική τους συγκέντρωση σε πρωτεΐνη με μέθοδο Bradford, β) τη συγκέντρωσή τους σε ανοσοσφαιρίνες IgG2a, IgG1 και IgG2b με ELISA και γ) την καθαρότητά τους με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ισοηλεκτρική εστίαση (IEF) για τον προσδιορισμό ταυτόχρονα του ισοηλεκτρικού τους σημείου.

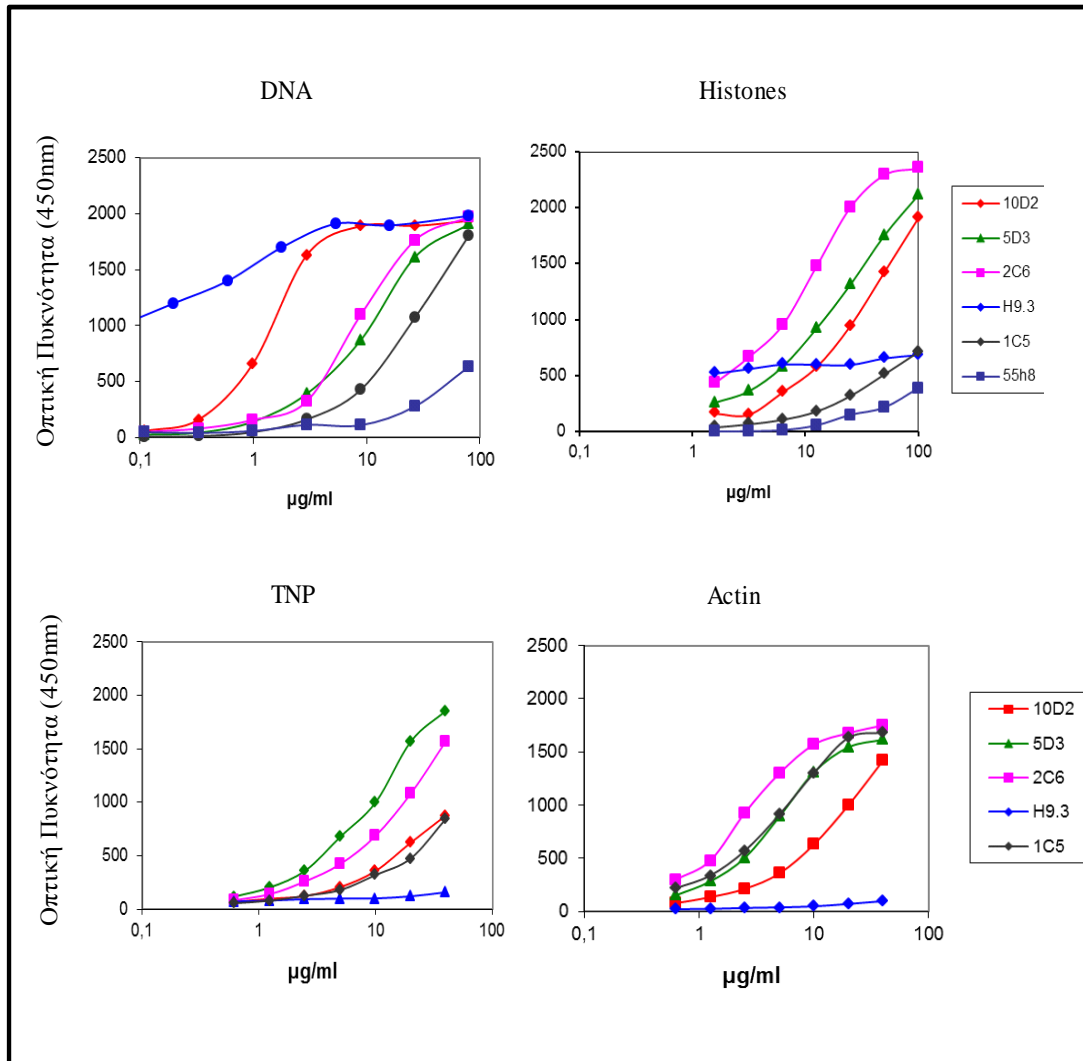
**Πίνακας 1. Ανοσοχημικές ιδιότητες των mAbs της μελέτης**

<i>mAbs/CPAbs</i>	<i>Υπόταξη<sup>a</sup></i>	<i>Ισοηλεκτρικό σημείο</i>	<i>Απομόνωση</i>
<b>10D2</b>	IgG2a	8.4	Protein A Sepharose από υπερκείμενα καλλιέργειας (SFM)
<b>2C6</b>	IgG2a	8.3	Protein A από ασκίτες ποντικών SCID
<b>5D3</b>	IgG2b	6.9	DEAE Sepharose από υπερκείμενα καλλιέργειας (φλάσκες δυο διαμερισμάτων)
<b>Μάρτυρες</b>			
<b>H9.3</b>	IgG2a	8	Protein A από ασκίτες ποντικών SCID
<b>1C5</b>	IgG2b	7.2	DEAE Sepharose από ασκίτες ποντικών SCID

<sup>a</sup> Η υπόταξη των mAbs καθορίστηκε με ELISA χρησιμοποιώντας anti-mouse IgG1, IgG2a ή IgG2b ως αντίσωμα δέσμευσης και ανιχνεύθηκε με αντίσωμα αντι-F(ab')<sub>2</sub> ποντικού συζευγμένο με HRP.

## 1.1 Χαρακτηρισμός της αντισωματικής δράσης των CPAbs

Ακολούθησε ο προσδιορισμός της αντισωματικής δράσης των CPAbs με δοκιμασία Farr και ELISA έναντι επτά αντιγόνων και πιο συγκεκριμένα nDNA, ιστονών, καρβονικής ανυδράσης (CA), τρινιτροφαινόλης συζευγμένης με βόεια αλβουμίνη ορού (TNP-BSA), ακτίνης, τουμπουλίνης και κερατίνης. Για να χαρακτηριστεί η πολυδραστικότητα επιλέχθησαν τα επτά αυτά -δομικά άσχετα μεταξύ τους- αντιγόνα: είτε επειδή είναι κλασσικά για τον έλεγχο φυσικών αυτοαντισωμάτων (π.χ. DNA, πρωτεΐνες κυτταροσκελετού, TNP), είτε γνωστά «εαυτά» (π.χ. DNA, πρωτεΐνες), ή εξωγενή (π.χ. απτένια-TNP) αντιγόνα, ή λόγω αρνητικού φορτίου (π.χ. καρβονική ανυδράση). Εκτός του αρνητικού μάρτυρα mAb H9.3, όλα τα υπόλοιπα αντισώματα βρέθηκαν να εκφράζουν ένα ξεχωριστό διακριτό πρότυπο πολυδραστικότητας έναντι όλων των αντιγόνων της μελέτης. (**Εικόνα 1.1.1** και **Πίνακας 1.1**). Τα 10D2, 5D3A8, 2C6 και H9.3 αναγνωρίζουν κυρίως το nDNA και τις ιστόνες, σε διαφορετικό ωστόσο βαθμό, όπως φάνηκε από την ELISA, ενώ το 1C5 αναγνωρίζει κυρίως την ακτίνη (**Πίνακας 1.1**). Μάλιστα με τη ραδιοανοσοδοκιμασία Farr η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αντισωμάτων υψηλής συγγένειας για το nDNA, φάνηκαν τα 10D2 και H9.3 να παρουσιάζουν την υψηλότερη συγγενεία για το nDNA σε σχέση με τα υπόλοιπα mAbs, που ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Όλα τα αντισώματα εξετάστηκαν με δοκιμασία έμμεσου ανοσοφθορισμού σε κύτταρα HeLa ώστε να εκτιμηθούν οι κυτταρικοί στόχοι τους και διαπιστώθηκε πως τα 10D2, 5D3A8 και 2C6 καθώς και το H9.3 παρουσίαζαν έντονη ομοιογενή πυρηνική χρώση (**Εικόνα 1.1.2**). Επιπλέον το 5D3 και το 1C5 εμφάνισαν μια έντονη κυτταροπλασματική κατανομή (**Εικόνα 1.1.2**). Το πρότυπο ανοσοφθορισμού των mAbs υποδεικνύει πως αυτά δεν αναγνωρίζουν μόνο τα αυτόλογα αντιγόνα, αλλά και ετερόλογα κυτταρικά συστατικά.



**Εικόνα 1.1.1** Δραστικότητα των mAbs (100 – 1,56 µg/ml) έναντι των αντιγόνων DNA, Ιστονών, TNP και Ακτίνης με ELISA.

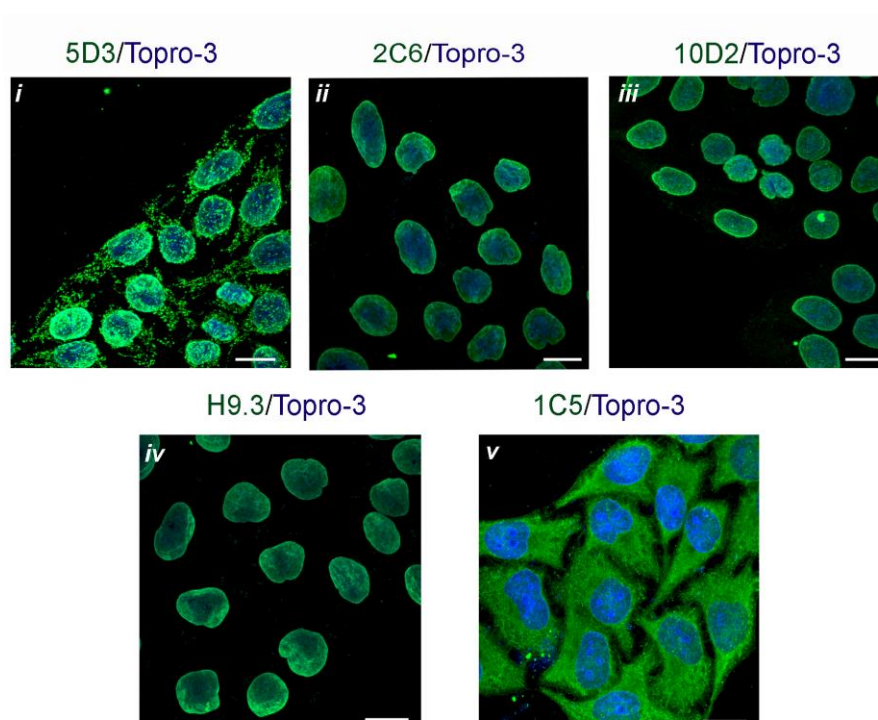
Πίνακας 1.1 Δραστικότητα των mAbs έναντι ενός πάνελ αντιγόνων

mAbs	Farr (RIA) <sup>a</sup>	ELISA <sup>b</sup>						
	dsDNA	nDNA	Histones	Actin	Tubulin	Keratin	C.A.	TNP
10D2	31	2	35	10	40	20	30	12
2C6	3	10	10	2	9	3	10	7
5D3	2	9	25	0.4	2	0.7	1	0.7
Controls								
H9.3	29	0.5	1	-	-	-	-	-
1C5	-	-	-	3	30	-	-	-

C.A.: Καρβονική Ανυδράση;

<sup>a</sup> Δραστικότητα mAbs (120μg/ml) έναντι dsDNA με δοκιμασία Farr (RIA) εκφράστηκε σε IU/ml, με cut-off τιμή 7 IU/ml.

<sup>b</sup> Το 50% της πρόσδεσης των mAb στα διαφορετικά αντιγόνα σε μg/ml έπειτα από τιτλοποίηση (200-0.01μg/ml) με ELISA, ανιχνεύθηκε με αντίσωμα αντι- IgG (γ-chain specific) ποντικού συζευγμένο με HRP.



**Εικόνα 1.1.2** Αντισωματική δράση των CPABs με εμμεσό ανοσοφθορισμό- Μέγιστη ένταση των τομών κυττάρων NIH-3T3 στον έμμεσο ανοσοφθορισμό. Τα 5D3, 2C6 και 10D2 (50 μg/ml) σε κύτταρα μονιμοποιημένα με αιθανόλη ανιχνεύονται με αντίσωμα Alexa-488 (πράσινη χρώση) και TOPRO-3 (μπλε χρώση). Αρνητικός μάρτυρας: κύτταρα επωασμένα με 1C5.

## **2. Μελέτη των παραμέτρων και του τρόπου διείσδυσης των CPAbs σε κύτταρα HeLa**

Η κυτταρική διείσδυση και ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των CPAbs, μελετήθηκε τόσο με ανοσοενζυμικές δοκιμασίες (χρώση με 3,3'-τετραϋδροχλωρική-διαμινο-βενζιδίνη, DAB) και παρατήρηση στο φωτονικό μικροσκόπιο, όσο και με ανοσοκυτταροχημεία/ανοσοφθορισμό και χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου.

### **2.1 Εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης των CPAbs και του χρόνου επώασής τους με τα κύτταρα**

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες για τη δοκιμασία διείσδυσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων, ελέγχθηκαν διάφορες παράμετροι όπως: 1) ο χρόνος επώασης των κυττάρων με το αντίσωμα, 2) η συγκέντρωση του αντισώματος, 3) η πυκνότητα των κυττάρων και ο χρόνος καλλιέργειάς τους και 4) άλλες τεχνικές παράμετροι σχετιζόμενες με την ανίχνευση των αντισωμάτων (ρυθμιστικά διαλύματα, συνθήκες μονιμοποίησης των κυττάρων, κλπ).

Ως ιδανικός χρόνος καλλιέργειας των κυτταρικών σειρών κρίθηκαν οι 48 ώρες πριν τη δοκιμασία διείσδυσης των αντισωμάτων, καθώς τα κύτταρα έχουν το χρονικό περιθώριο να αναπτυχθούν επαρκώς μετά την ανακαλλιέργεια και να εκφράσουν υποδοχείς και άλλες κρίσιμες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Επιπλέον, διαπιστώθηκε πως η πυκνότητα των κυττάρων πρέπει να είναι τέτοια ώστε εκείνα να καλύπτουν το 50% της επιφάνειας των φρεατίων καλλιέργειας. Με τον τρόπο αυτό, απομακρύνεται το ενδεχόμενο στενής επαφής μεταξύ τους, που θα εμπόδιζε την προσέγγιση και διείσδυση των αντισωμάτων. Επιπλέον, κατά τη μονιμοποίηση των κυττάρων χρησιμοποιείται, είτε 100% αιθανόλη, είτε 2% παραφορμαλδεΰδη, με τη δεύτερη να διατηρεί σε καλύτερη κατάσταση την τρισδιάστατη δομή του κυττάρου. Αντίθετα, η μονιμοποίηση με αιθανόλη 100%, λόγω της υψηλότερης αφυδάτωσης που προκαλεί στα κύτταρα, ευνοεί τη μελέτη δομών σε ένα επίπεδο.

Ως βέλτιστη συγκέντρωση των αντισωμάτων για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, προσδιορίστηκε εκείνη των 100 µg/ml καθώς είναι επαρκής για τη διείσδυσή τους και ταυτόχρονα αρκετά χαμηλή ώστε να μην ανιχνεύεται μη ειδικός φθορισμός (background) κατά την ανοσοκυτταροχημεία. Σημειώνεται πως ειδικός φθορισμός ανιχνεύθηκε από την ελάχιστη συγκέντρωση των 3 µg/ml, ενώ τα mAbs H9.3 και 1C5 δεν εμφάνισαν ικανότητα διείσδυσης (**Εικόνα 3.3.3.2 Α**).

Παράλληλα, μελετήθηκαν διάφοροι χρόνοι επώασης των κυττάρων HeLa με τα mAbs, από 3 λεπτά έως 72 ώρες, προκειμένου να προσδιοριστεί ο ιδανικός για τη διείσδυση των αντισωμάτων. Σε κάθε περίπτωση, η συγκέντρωσή τους διατηρήθηκε σταθερή στα 100 µg/ml και η θερμοκρασία στους 37°C (**Εικόνα 2.1A**). Κατόπιν ανοσοφθορισμού και ανάλυσης των εικόνων στο συνεστιακό μικροσκόπιο με το λογισμικό Image-Pro Plus, διαπιστώθηκε πως η ενδοκυτταρική ποσότητα των 10D2, 2C6 και 5D3 αυξανόταν με αύξηση της διάρκειας επώασης. Ειδικότερα, χρησιμοποιώντας αυθαίρετες μονάδες του λογισμικού επεξεργασίας (arbitrary units, a.u.), προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα (ενδεικτικά για τρεις χρόνους): α) για το **10D2**, 41 a.u. (3 λεπτά επώασης), 68 a.u. (2 ώρες επώασης), 75 a.u. (72 ώρες επώασης), β) για το **2C6**, 23 a.u. (3 λεπτά), 38 a.u. (2 ώρες), 45 a.u. (72 ώρες) γ) για το **5D3**, 14 a.u. (3 λεπτά), 25 a.u. (2 ώρες), 35 a.u. (72 ώρες) (**Εικόνα 2.1B**). Αξίζει να σημειωθεί πως το 10D2, εμφανίστηκε ως το πλέον αποτελεσματικό στη διείσδυση, καθώς από τα 3 λεπτά επώασης εντοπίστηκε σε υψηλότερη συγκέντρωση στο εσωτερικό των κυττάρων και πιο συγκεκριμένα εντός των πυρήνων, συγκριτικά με τα υπόλοιπα δύο. Βάσει των παραπάνω μετρήσεων, συμπεραίνεται πως από τις 2 ώρες και μετά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στην ποσότητα των αντισωμάτων που διεισδύουν στα κύτταρα, γι' αυτό και σε συνδυασμό με την καλή εικόνα των κυττάρων, αποφασίστηκε για τη δοκιμασία της διείσδυσης τα αντισώματα να επωάζονται για δύο ώρες με τα κύτταρα HeLa.

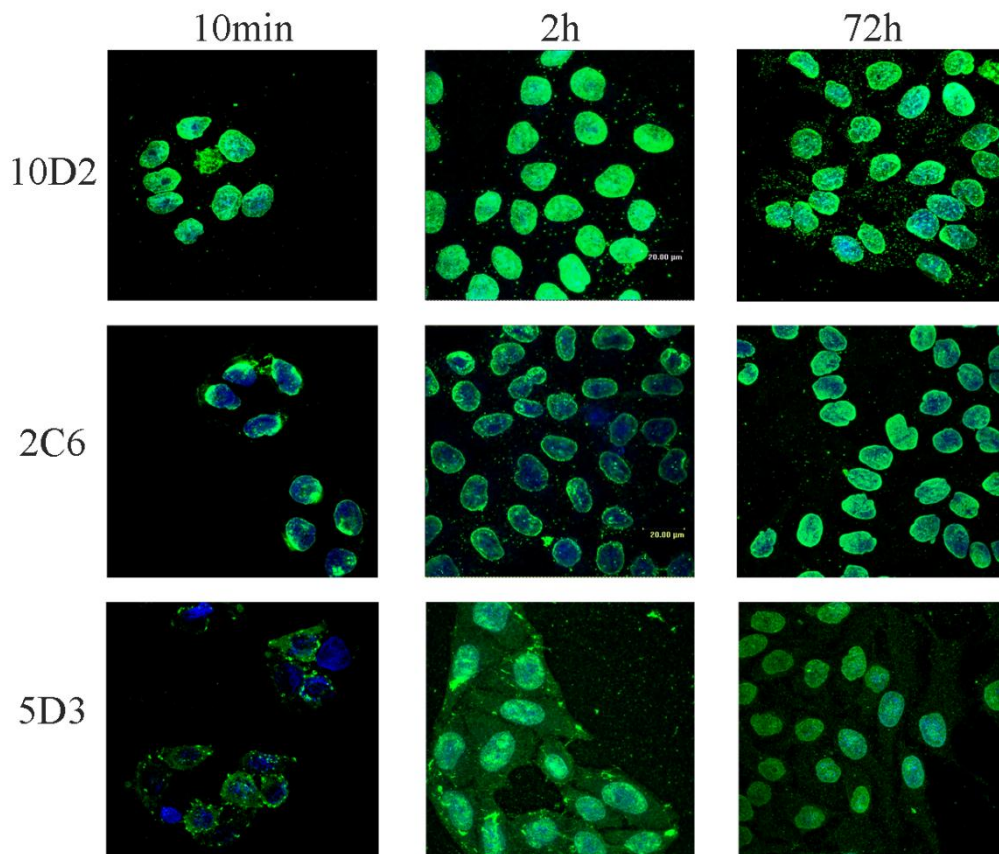
Αφού καθορίστηκαν οι άριστες συνθήκες της πειραματικής διαδικασίας της διείσδυσης των CPAbs, η διεισδυτική τους ικανότητα επιβεβαιώθηκε και με μέτρηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσής τους στα πυρηνικά εκχυλίσματα των κυττάρων με ELISA. Στα εκχυλίσματα αυτά ανιχνεύθηκαν 650 pg 10D2, 450 pg 5D3 και 24 pg 2C6 ανά 10<sup>4</sup> κύτταρα, συγκριτικά με τα σχεδόν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (χαμηλότερα των 23 pg), των αρνητικών μαρτύρων H9.3 και 1C5, τα οποία δεν διεισδύουν (**Εικόνα 3.3.3.2 A**).

Συμπερασματικά, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των αντισωμάτων και ο χρόνος επώασής τους με τα κύτταρα, τόσο αυξάνεται και η ένταση του φθορισμού, με ιδανική συγκέντρωση τα 100 µg/ml και χρόνο επώασης τις 2 ώρες, συνθήκες που ισχύουν για όλα τα CPAbs (**Εικόνα 2.1A**). Οι φωτογραφίες που παρατίθενται είναι αντιπροσωπευτικές του συνόλου των κυττάρων του κάθε φρεατίου. Το φαινόμενο της διείσδυσης των CPAbs, παρατηρείται στο σύνολο ή στο μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων με τα οποία επωάζονται κάθε φορά. Οι ανθρώπινες, επιθηλιακές κυτταρικές σειρές, καρκινικές (SKOV-3, SK-BR-3, HCT-116, A-431, DU-145) και μη (HUVVEC), καθώς και ινοβλάστες ποντικού (NIH-3T3, SWISS-3T3), δοκιμάστηκαν επίσης για τον έλεγχο διείσδυσης στις

ίδιες συνθήκες, και τα αντισώματα παρουσίασαν τα ίδια πρότυπα που περιγράφηκαν παραπάνω (δεν παρουσιάζονται αποτελέσματα).

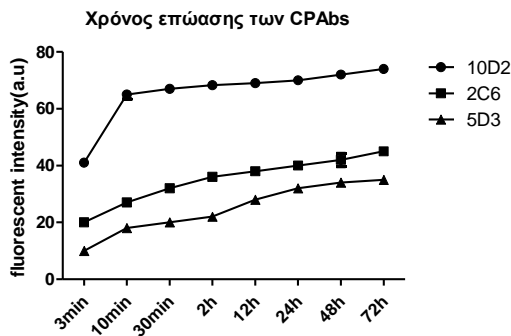
Τα τρία πολυδραστικά mAbs της μελέτης εντοπίζονται στον πυρήνα (10D2 και 2C6) ή και στο κυτταρόπλασμα (5D3) και εμφανίζουν χαρακτηριστικά φυσικών αντισωμάτων, δηλαδή πολυδραστικότητα και η κωδικοποίηση από γονίδια της βλαστικής σειράς (δείχθηκε σε παράλληλη μελέτη του εργαστηρίου μετά από ανάλυση της γονιδιακής αλληλουχίας των μεταβλητών περιοχών των βαριών και ελαφριών αλυσίδων).

A)





B)



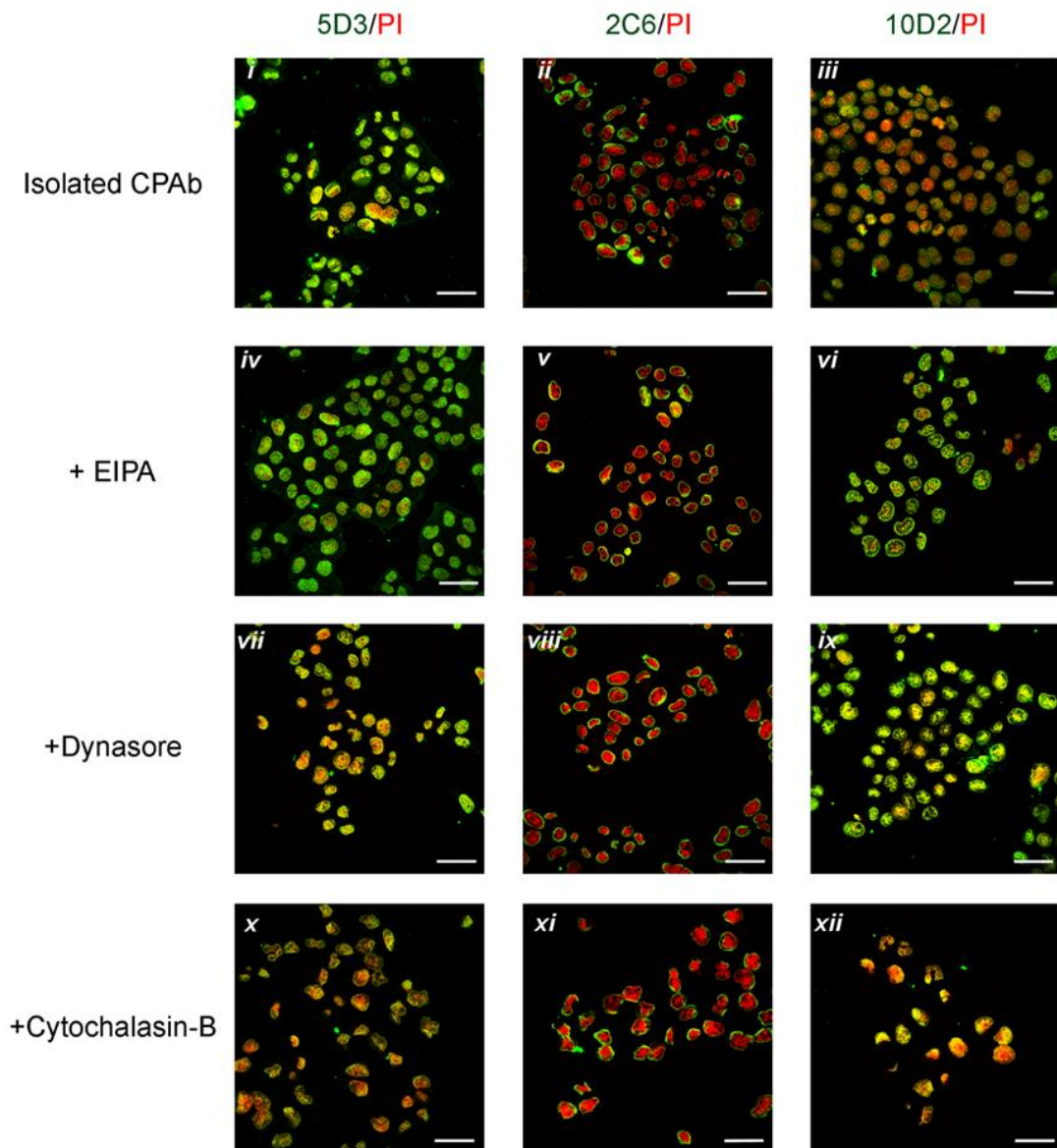
Γ)

CPAb/mAb	Ενδοπυρηνική συγκέντρωση (pg/ml)(ELISA)
10D2	650
5D3	450
2C6	24
H9.3 (μάρτυρας)	Κάτω από τα όρια ανίχνευσης
1C5 (μάρτυρας)	Κάτω από τα όρια ανίχνευσης

**Εικόνα 2.1** Κινητική διείσδυσης των CPAbs σε διαφορετικούς χρόνους επώασης με κύτταρα HeLa. Επώαση με κύτταρα HeLa των mAbs σε συγκέντρωση 100  $\mu\text{g/ml}$  και σε διαφορετικούς χρόνους επώασης, στους 37°C. Α) Ενδοκυττάρια εντοπισμός των CPAbs έπειτα από επώασή τους με τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με αιθανόλη, ακολούθησε ανίχνευση των CPAbs με αντίσωμα Alexa-488 (πράσινη χρώση) και των πυρήνων των κυττάρων με TOPRO-3 (μπλε χρώση) με συνεστιακή μικροσκοπία από μέγιστη ένταση και κεντρικές τομές κυττάρων, σε κλίμακα 20 $\mu\text{m}$  και Β) ποσοτικοποίηση της ενδοκυττάριας ποσότητας κυττάρων, στα οποία έχουν διεισδύσει τα CPAbs με λογισμικό Image-Pro Plus και Γ) Μέτρηση της ενδοκυττάριας ποσότητας των CPAbs ( $\text{pg}/10^4$  κύτταρα), με ELISA, στα πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa μετά από συνεπώασή τους (2h) με τα απομονωμένα CPAbs (100  $\mu\text{g/ml}$ ).

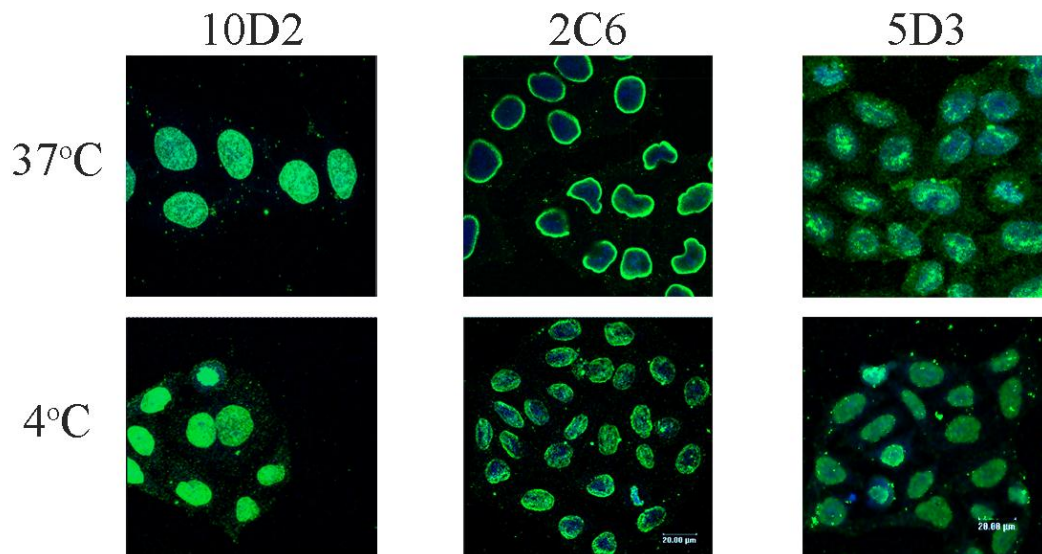
## 2.2 Τρόπος εισόδου

Προκειμένου να διερευνηθεί ο τρόπος εισόδου των CPAbs στα κύτταρα, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες κυτταρικής διείσδυσης στους 37°C, παρουσία συγκεκριμένων αναστολέων ενδοκυττάρωσης (εξαρτώμενης από κλαθρίνη ή καβεολίνη και μακροπινικότωση), όπως dynasore, EIPA ή κυτοχλασίνη D. Δείχθηκε πως η παρουσία των αναστολέων δεν επηρεάζει τη διεισδυτική ικανότητα των αντισωμάτων, με τον ενδοκυττάρια εντοπισμό τους και τα ποσοστά διείσδυσης να παραμένουν αμετάβλητα (**Εικόνα 2.2.1**). Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο ανεξάρτητος από την ενδοκυττάρωση τρόπος διείσδυσης των αντισωμάτων, η δοκιμασία έλαβε χώρα και στους 4°C, όπου είναι γνωστό πως αναστέλλονται τα ενεργειακά εξαρτώμενα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης. Και στην περίπτωση αυτή, φάνηκε πως η χαμηλή θερμοκρασία δεν επηρέασε τη διεισδυτική ικανότητα των υπό εξέταση CPAbs, τα οποία εμφάνισαν μικρές, ασήμαντες διαφορές ως προς τους χρόνους εισόδου εντός των κυττάρων (το 10D2 εντοπίζεται στον πυρήνα έπειτα από 10 λεπτά επώασης, ενώ τα 2C6 και 5D3 έπειτα από 15 λεπτά επώασης) (**Εικόνα 2.2.2A,B**).

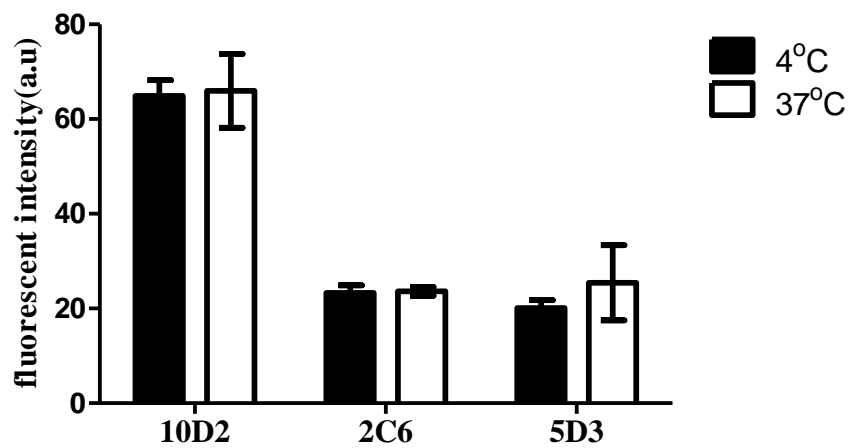


**Εικόνα 2.2.1** Διευσδυτική ικανότητα των CPAbs (100  $\mu\text{g/ml}$ ) απουσία ή παρουσία συγκεκριμένων αναστολέων ενδοκυττάρωσης (dynasore, EIPA ή κυτοχλασίνη D (2 $\mu\text{g/ml}$ )) μετά από 2 ώρες επώαση στους 37°C. Ενδοκυττάριος εντοπισμός των CPAbs με συνεστιακή μικροσκοπία από μέγιστης έντασης κεντρικές τομές μονιμοποιημένων με αιθανόλη κυττάρων HeLa, έπειτα από ανίχνευση με αντίσωμα Alexa-488 (πράσινη χρώση) και PI (κόκκινη χρώση) σε κλίμακα 20 $\mu\text{m}$ .

A)



B)



**Εικόνα 2.2.2** Διεσδυτική ικανότητα των CPAbs (100 μg/ml) μετά από 2 ώρες επώαση στους 37°C και στους 4°C. A) Ενδοκυττάριος εντοπισμός των CPAbs με συνεστιακή μικροσκοπία από μέγιστης έντασης κεντρικές τομές μονιμοποιημένων με αιθανόλη κυττάρων HeLa, έπειτα από ανίχνευση με αντίσωμα Alexa-488 (πράσινη χρώση) και TOPRO-3 (μπλε χρώση) σε κλίμακα 20μm και B) ποσοτικοποίηση της ενδοκυττάριας ποσότητας των CPAbs με λογισμικό Image-Pro Plus.

### 3. Επίδραση κυτταρικών συστατικών στη διεισδυτική ικανότητα των CPAbs

#### 3.1 Συγκριτική μελέτη της διεισδυτικής ικανότητας των CPAbs πριν και μετά την απομόνωσή τους από υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειας

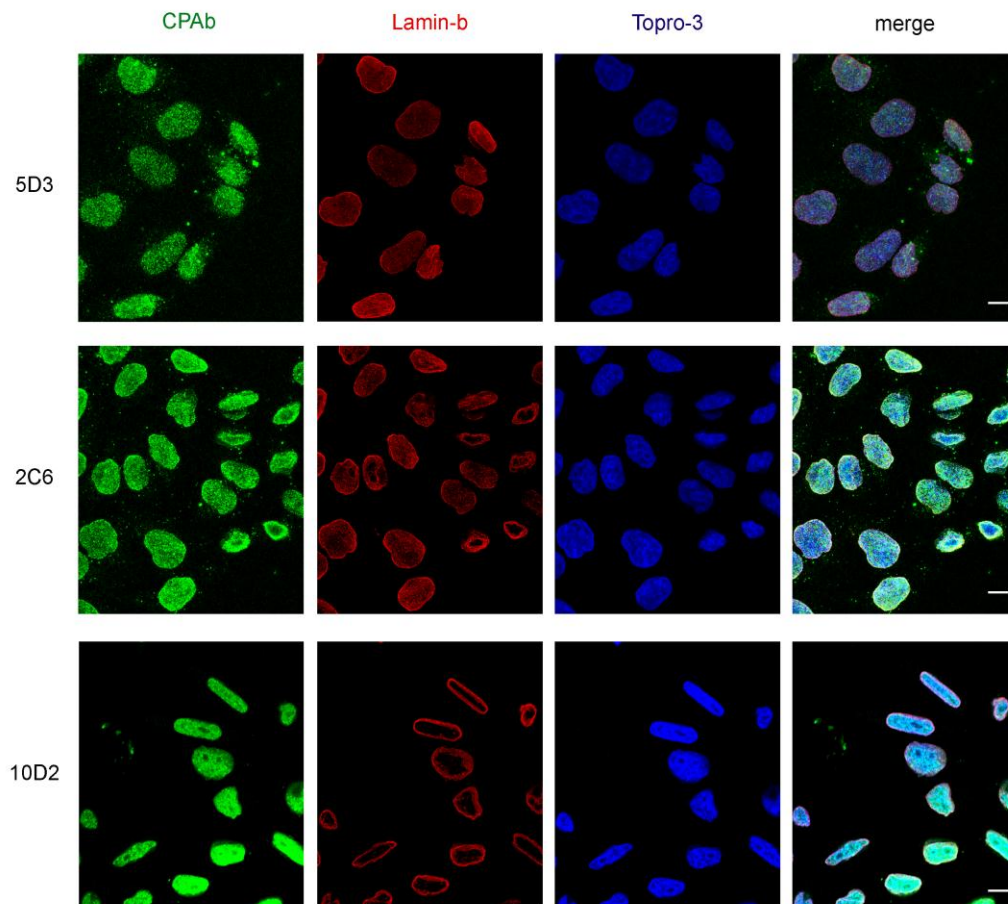
Κατά τον καθαρισμό των CPAbs και μετά από σύγκριση της κυτταρο-διεισδυτικής τους ικανότητας πριν και μετά την απομόνωσή τους, διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στη διεισδυτική ικανότητα των CPAbs 5D3 και 2C6 (με συνεστιακό μικροσκόπιο), ανάλογα με το αν αυτά βρίσκονται σε υπερκείμενα καλλιέργειας των υβριδωμάτων (υπ/να) ή ήταν απομονωμένα. Επομένως μελετήθηκαν ενδελεχώς οι διαφορές ως προς τη διεισδυτική ικανότητα μεταξύ υπ/νων και απομονωμένων CPAbs (100μg/ml) σε κύτταρα HeLa (2 ώρες επώαση), έπειτα από ανάλυση (ενδοκυτταρικό εντοπισμό, ενδοκυτταρική ποσότητα και αριθμό των κυττάρων που τα περιέχουν), των εικόνων του συνεστιακού μικροσκοπίου, με το λογισμικό Image-Pro Plus.

Πράγματι, όταν το 5D3 και το 2C6, δοκιμάστηκαν ως υπ/να εκτός από την πυρηνική χρώση, εντοπίστηκαν στην επιφάνεια των κυττάρων και στο κυτταρόπλασμα παρουσιάζοντας μια στικτή χρώση (μεγάλα στίγματα στο κυτταρόπλασμα) (**Εικόνα 3.1.1A**). Αντιθέτως, το απομονωμένο 5D3 παρουσίασε τόσο στικτή κυτταροπλασματική, όσο και ομοιογενή πυρηνική χρώση, ενώ το απομονωμένο 2C6 παρουσίασε αποκλειστικά περιπυρηνική χρώση, δεδομένου ότι συν-εντοπίζεται με την πρωτεΐνη πυρηνικού φακέλου λαμίνη-B (**Εικόνα 3.1A**). Τέλος, 10D2 -είτε ως υπ/νο ή απομονωμένο- εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα και στους πυρηνίσκους των κυττάρων εμφανίζοντας ομοιογενής πυρηνική χρώση (**Εικόνα 3.1.1A**), όπου συν-εντοπίζεται με τη νουκλεολίνη B23 (**Εικόνα 3.1.B**).

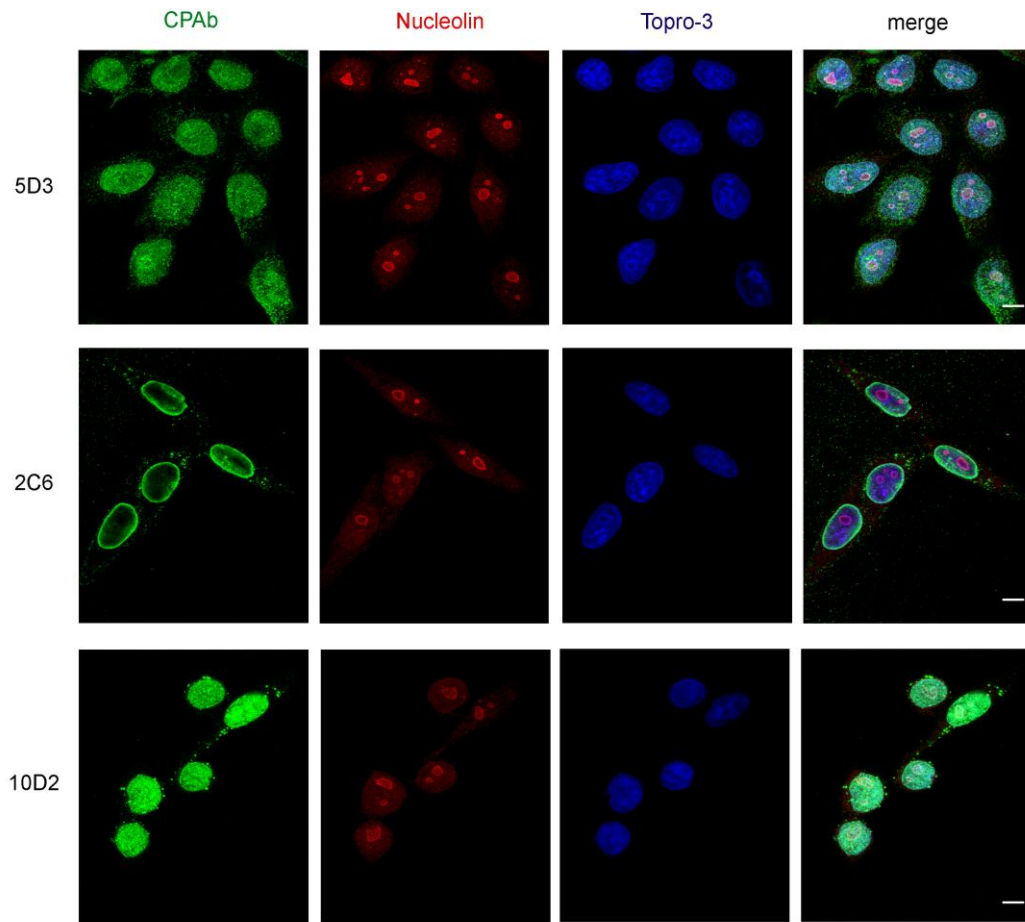
Σε όλες τις περιπτώσεις η ένταση φθορισμού τους (a.u.) καθώς και ο αριθμός των θετικών κυττάρων (%) που περιέχουν CPAbs ήταν σημαντικά υψηλότερα όταν δοκιμάστηκαν ως υπ/να σε σχέση με τα απομονωμένα CPAbs. Πιο συγκεκριμένα, 68 a.u. και 89 % θετικά κύτταρα μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας το 5D3 ως υπ/νο έναντι 20 au και 41% ( $p < 0.001$ ), με το απομονωμένο, 40 a.u. και 90% θετικά κύτταρα μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας το 2C6 ως υπ/νο έναντι 23 a.u. ( $p < 0,001$ ) και 74% ( $p < 0,01$ ) με το απομονωμένο, και 79 au και 98 % μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας ακατέργαστη μορφή του 10D2 έναντι 65 a.u. και 84% με την καθαρισμένη μορφή της ( $p < 0,001$ ) (**Εικόνα 3.1.1B**). Ανάλογα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τα μη διεισδυτικά mAbs H9.3 και 1C5, είτε ως υπ/να ή απομονωμένα, δεν έδειξαν θετική αντίδραση φθορισμού (**Εικόνα 3.3.3.2**).

A). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν και τα τρία CPAbs ως υπ/να παρουσιάζουν εμφανώς ενισχυμένη διεισδυτική ικανότητα σε σχέση με τα απομονωμένα, με δύο απο αυτά να εμφανίζουν διαφορετικό ενδοκυτταρικό εντοπισμό.

A)

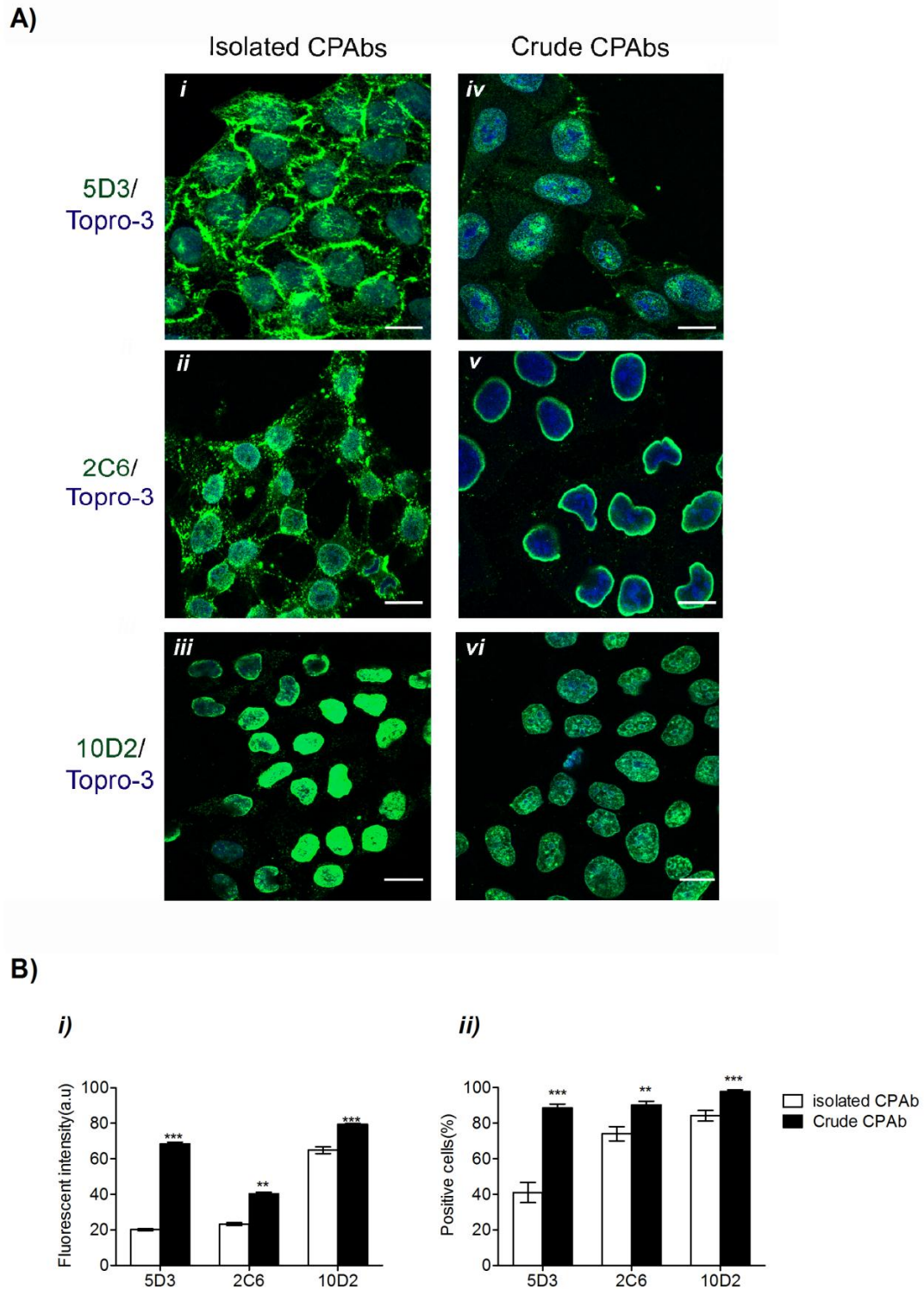


B)



**Εικόνα 3.1** Διεσδυτική ικανότητα των απομονωμένων CPAbs (100μg/ml) παρουσία ή απουσία αντισώματων είτε έναντι lamin-B (A) ή nucleolin (B) μετά από 2 ώρες επώαση στους 37°C. Ενδοκυττάριος εντοπισμός των CPAbs με συνεστιακή μικροσκοπία από μέγιστη ένταση και διάταξη σταυρωνύμου τομών μονιμοποιημένων με αιθανόλη κυττάρων HeLa, σε κλίμακα 20μm.





**Εικόνα 3.1.1** Διευσδυτική ικανότητα μεταξύ απομονωμένων CPAbs (100μg/ml) και υπ/να (αραιωμένα 1/2 σε πλήρες θρεπτικό υλικό) μετά από 2 ώρες επώαση στους 37°C. *A)* Ενδοκυττάρια εντοπισμός των CPAbs με συνεστιακή μικροσκοπία από μέγιστη ένταση και διάταξη σταυρωνόμου τομών μονιμοποιημένων με αιθανόλη κυττάρων HeLa, σε κλίμακα 20μm και *B)* ποσοτικοποίηση της ενδοκυττάριας ποσότητας και του ποσοστού κυττάρων, στα οποία έχουν διευσδύσει τα CPAbs με λογισμικό Image-Pro Plus.

### 3.2 Επίδραση πυρηνικών μορίων στη διεισδυτική ικανότητα των CPAbs

#### 3.2.1 Επίδραση nDNA στη διεισδυτική ικανότητα των CPAbs

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, τα τρία CPAbs ως υπ/να παρουσιάζουν εμφανώς ενισχυμένη διεισδυτική ικανότητα σε σχέση με τα απομονωμένα, με δύο από αυτά (5D3, 2C6) να εμφανίζουν διαφορετικό ενδοκυτταρικό εντοπισμό. Επιπρόσθετα και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα CPAbs αναγνωρίζουν πυρηνικά μόρια, εξετάστηκε το ενδεχόμενο οι διαφορές μεταξύ υπ/νων και απομονωμένων CPAbs να οφείλονται στην αλληλεπίδραση των CPAbs με πυρηνικά συστατικά όπως DNA, ιστόνες και νουκλεοϊστόνες. Τα προαναφερθέντα, περιέχονται στα υπ/να λόγω παρουσίας της χρωματίνης κατά την κυτταρική απόπτωση και νέκρωση. Ένα μόριο το οποίο μπορεί να ευθύνεται για την ενίσχυση της διεισδυτικής ικανότητας των CPAbs ως υπ/να θα μπορούσε να είναι το DNA, καθώς στο παρελθόν έχει αναφερθεί αυξημένη διεισδυτική ικανότητα CPAbs παρουσία 2μg/ml DNA [18]. Για να εξετασθεί η επίδρασή του, έπρεπε να αποκλειστεί η ενδεχόμενη πρόσμιξη των απομονωμένων CPAbs από DNA, γι' αυτό πραγματοποιήθηκε επεξεργασία τους με DNase I, η οποία έδειξε να μην επηρεάζει τη διεισδυτική ικανότητά τους (**Εικόνα 3.2.1A**).

Δοκιμαστικά πειράματα επαλήθευσαν τη συγκέντρωση 2 μg/ml nDNA ως την ιδανική, για τη διεξαγωγή των μετέπειτα πειραμάτων. Οι παράμετροι της κυτταρικής διεισδυσης: ο ενδοκυττάριος εντοπισμός, η ενδοκυτταρική ποσότητα και ο αριθμός των κυττάρων που τα περιέχουν προσδιορίστηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Η παρουσία του nDNA στο υπερκείμενο κυτταρικής καλλιέργειας φάνηκε να επηρεάζει την ενδοκυτταρικό εντοπισμό των δύο CPAbs, αφού η ένταση της κυτταροπλασματικής χρώσης του 5D3 ελαττώθηκε και η πυρηνική έγινε πιο έντονη και ομοιογενής, ενώ η περιπυρηνική χρώση του 2C6 έγινε αποκλειστικά πυρηνική (**Εικόνα 3.2.2A**). Επιπλέον, με την παρουσία του nDNA σημειώθηκε σημαντική ενίσχυση της ενδοκυτταρικής ποσότητας των CPAbs [20 a.u. απομονωμένου 5D3 έναντι 26 a.u. παρουσία nDNA ( $p < 0,01$ ), 23 a.u. απομονωμένου 2C6 έναντι 34 a.u. παρουσία nDNA ( $p < 0,001$ ) και 65 a.u. απομονωμένου 10D2 έναντι 71 a.u. παρουσία nDNA ( $p < 0,05$ )] (**Εικόνα 3.2.2Bi**). Όσον αφορά τον αριθμό των θετικών κυττάρων, παρουσία του nDNA αυξήθηκε μόνο ο αριθμός των κυττάρων που περιέχουν το 5D3 (40% των κυττάρων απουσία του nDNA έναντι 68% των κυττάρων παρουσία αυτού,  $p < 0,01$ ) (**Εικόνα 3.2.2Bii**). Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω, με μέτρηση της ενδοκυττάριας ποσότητας των CPAbs στα κυτταρικά εκχυλίσματα, με ELISA, παρουσία ή απουσία nDNA στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Σε όλες τις



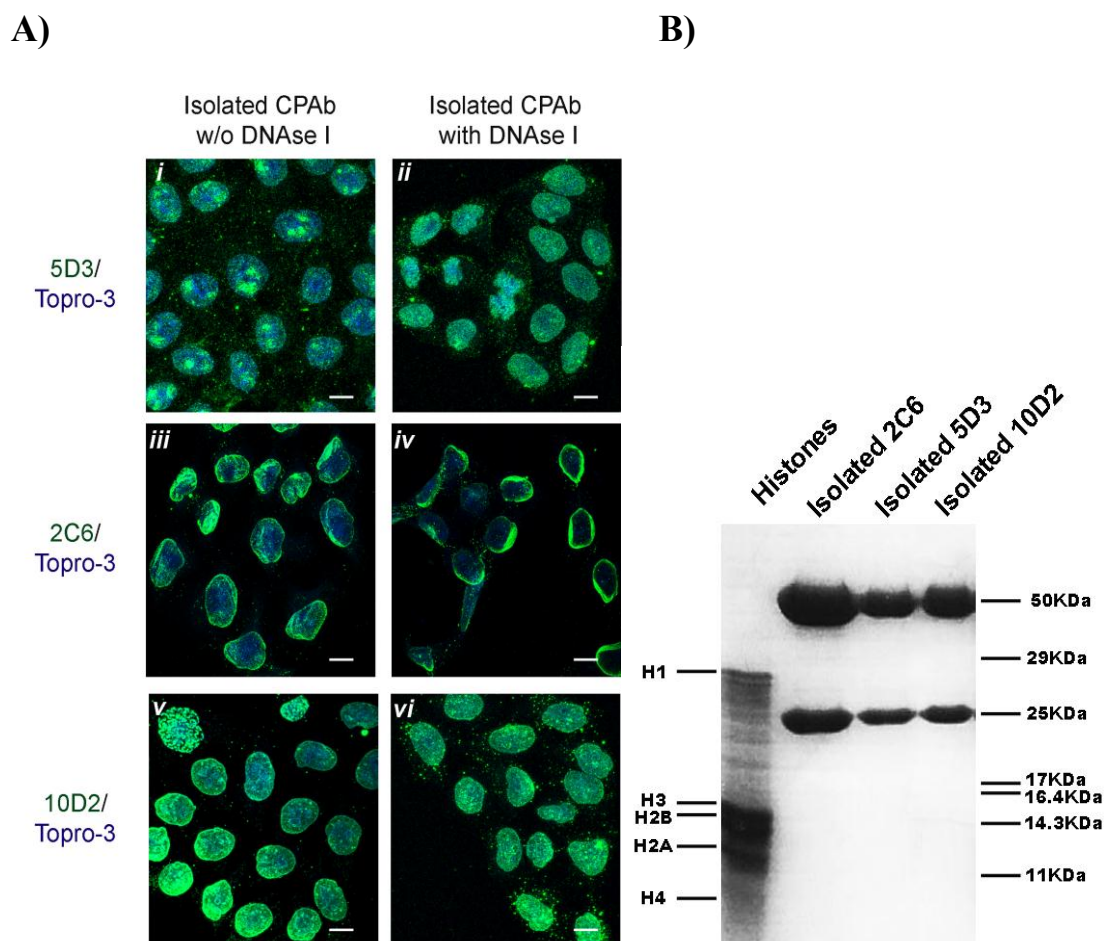
περιπτώσεις, οι συγκεντρώσεις των CPAbs στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της δοκιμασίας (<20pg). Στα πυρηνικά εκχυλίσματα 57 pg του 2C6 και 1324 pg του 10D2 ανά  $10^4$  κύτταρα ανιχνεύθηκαν παρουσία του nDNA, σε σύγκριση με τα σχεδόν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα χαμηλότερα από 23pg για το 2C6 και 647pg για 10D2 απουσία του nDNA (Πίνακας 1.4.1). Η ποσοτικοποίηση του ενδοκυτταρικού 5D3, παρουσία ή απουσία nDNA στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, δεν επιτεύχθηκε, αφού δεν ελήφθησαν επαναλήψιμα αποτελέσματα. Για να επιβεβαιωθεί ότι το nDNA εισέρχεται στα κύτταρα ως σύμπλοκο με τα CPAbs, χρησιμοποιήθηκε nDNA συζευγμένο με τη φθορίζουσα χρωστική DRAQ5(Εικόνα 3.2.3). Διαπιστώθηκε ότι το nDNA συνεντοπίζεται και με τα τρία CPAbs εντός του πυρήνα, σε αντίθεση με τα H9.3 και 1C5 (Εικόνα 3.3.3.2 Biv). Συνεπώς, το nDNA δρα συνεργιστικά με αντισώματα όχι μόνο δραστικά έναντι του nDNA, αλλά και ικανά να διεισδύουν στα κύτταρα.

### 3.2.2 Επίδραση ιστονών στη διεισδυτική ικανότητα των CPAbs

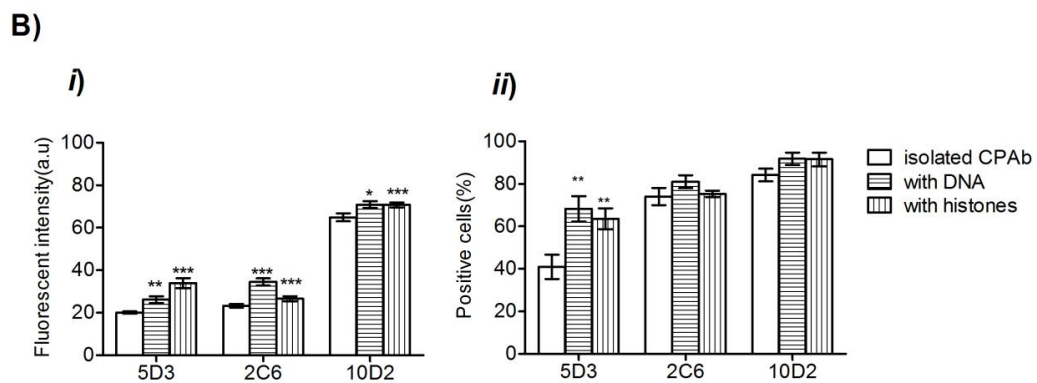
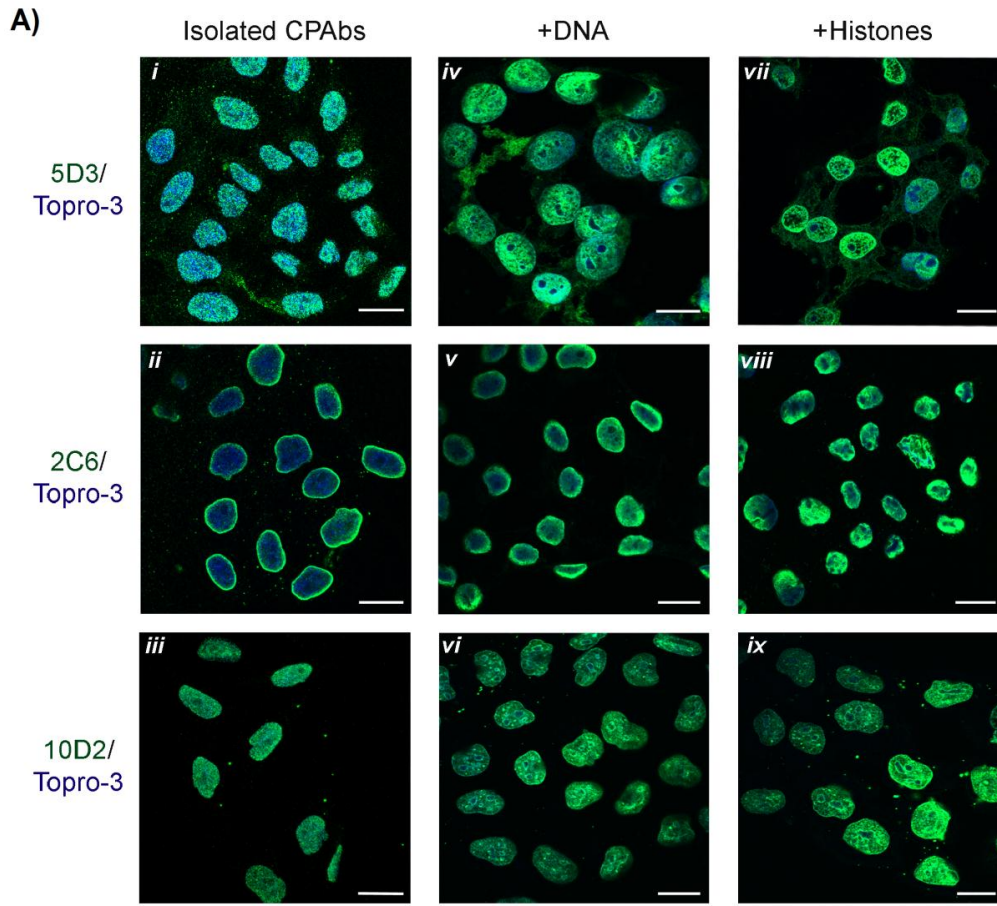
Η επίδραση των ιστονών στη διείσδυση των αντισωμάτων αξιολογήθηκε ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία, όπως παραπάνω. Ενδεχομένη πρόσμιξη των απομονωμένων CPAbs με ιστόνες αποκλείστηκε με ανάλυση SDS-PAGE (Εικόνα 3.2.1B). Η παρουσία των ιστονών στην κυτταρική καλλιέργεια φάνηκε να επηρεάζει τον ενδοκυττάριο εντοπισμό των δύο CPAbs, αφού το 5D3 παρουσίασε έντονη ομοιογενή πυρηνική χρώση με τη στικτή κυτταροπλασματική να παραμένει ανεπηρέαστη, ενώ στην περίπτωση του 2C6 εκτός από την περιπυρηνική χρώση, παρατηρήθηκε επίσης μια πιο διάχυτη πυρηνική χρώση (Εικόνα 3.2.2A). Επιπλέον, παρουσία των ιστονών αυξήθηκε σημαντικά η ενδοκυττάρια ποσότητα και των τριών CPAbs [20 a.u. απομονωμένου 5D3 έναντι 52 a.u. CPAb παρουσία των ιστονών ( $p < 0,0001$ ), 23 a.u. απομονωμένου 2C6 έναντι 27 a.u. CPAb παρουσία των ιστονών ( $p < 0,05$ ) και 65 a.u. απομονωμένου 10D2 έναντι 71 CPAb παρουσία των ιστονών ( $p < 0,05$ )] (Εικόνα 3.2.2Bi). Σημαντική αύξηση του ποσοστού των θετικών κυττάρων παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση του 5D3 (40% έναντι 64%,  $p < 0,01$ ) (Εικόνα 3.2.2Bii). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με ποσοτικοποίηση- με ELISA -των CPAbs στα κυτταρικά εκχυλίσματα, παρουσία ή απουσία των ιστονών στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι συγκεντρώσεις των CPAbs στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της δοκιμασίας. Στα πυρηνικά εκχυλίσματα, οι συγκεντρώσεις των CPAbs όταν αναμιγνύονται με ιστόνες ήταν 38 pg και 1226 pg/ $10^4$  κύτταρα για το 2C6 και το 10D2, αντίστοιχα, σε σύγκριση με 23pg και 647pg/ $10^4$  κύτταρα για τα CPAbs απουσία ιστονών (Πίνακας 3.3.1). Η

ποσοτικοποίηση του ενδοκυτταρίου 5D3, παρουσία ή απουσία των ιστονών στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, δεν επιτεύχθηκε αφού ελήφθησαν μη επαναλήψιμα αποτελέσματα.

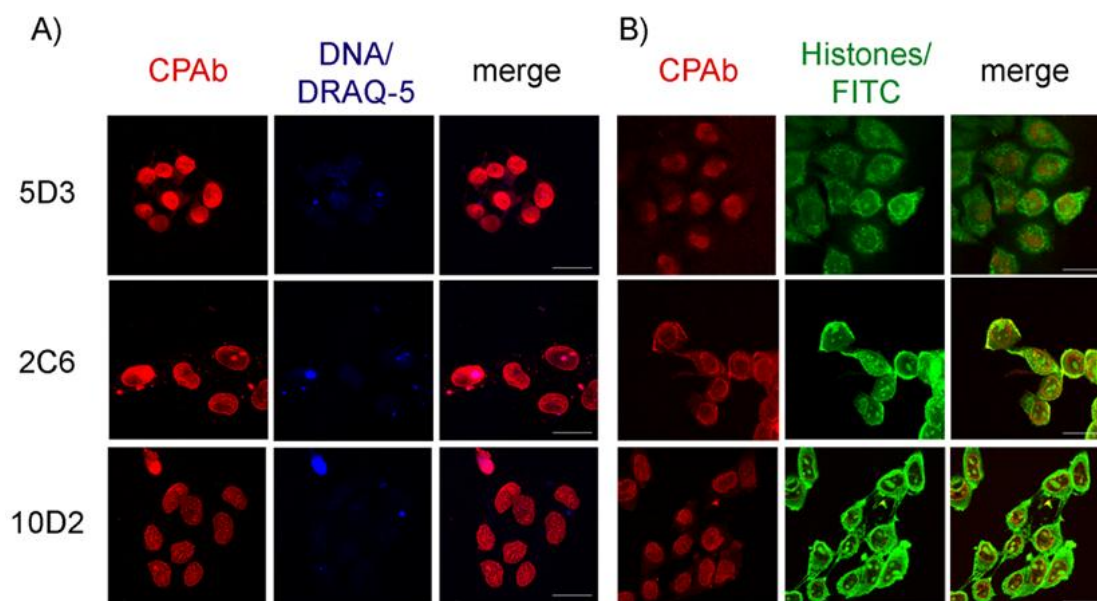
Προκειμένου να αποδειχθεί ότι οι ιστόνες εισέρχονται στα κύτταρα ως σύμπλοκο με τα CPABs, χρησιμοποιήθηκαν ιστόνες συζευγμένες με FITC και μελετήθηκε ο συνεντοπισμός της και με τα τρία CPABs εντός του πυρήνα (**Εικόνα 3.2.3B**). Τα H9.3 και 1C5 (αρνητικοί μάρτυρες της δοκιμασίας) παρέμειναν ανεπηρέαστοι από την παρουσία των ιστονών (**Εικόνα 3.3.3.2 Bv**). Συνολικά, η συνεπάωση των ιστονών με τα CPABs αυξάνει τη διεισδυτική τους ικανότητα και μεταβάλλει επιλεκτικά τον ενδοκυττάριο εντοπισμό δύο εξ' αυτών (5D3 και 2C6).



**Εικόνα 3.2.1** Έλεγχος ενδεχόμενης πρόσμιξης των απομονωμένων CPABs. **A)** Διεισδυτική ικανότητα των CPABs (100  $\mu\text{g/ml}$ ) έπειτα από επεξεργασία (30 λεπτά) τους (*ii, iv, vi*) ή όχι με DNase (*i, iii, v*) (2 $\mu\text{g/ml}$ ) μετά από 2 ώρες επώαση στους 37°C. Ενδοκυττάριος εντοπισμός των CPABs με συνεστιακή μικροσκόπια από μέγιστη ένταση τομών μονιμοποιημένων με αιθανόλη κυττάρων HeLa, σε κλίμακα 20 $\mu\text{m}$ . **B)** Χαρακτηρισμός της καθαρότητας των απομονωμένων CPABs με SDS-PAGE. Απομονωμένα CPABs (15  $\mu\text{g/ml}$ ) σε 12,5% (αναγωγικές συνθήκες) πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS. Ιστόνες θύμου αδένου μόσχου χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός μάρτυρας. Χρώση με Coomassie Blue.



**Εικόνα 3.2.2** Διεσδυτική ικανότητα των CPAbs (100 µg/ml) απουσία ή παρουσία DNA ή ιστονών (2µg/ml) μετά από 2 ώρες επώαση στους 37°C. **A)** Ενδοκυττάριος εντοπισμός των CPAbs σε κύτταρα HeLa, ακολούθησε μονιμοποίηση με αιθανόλη των κυττάρων και παρατήρηση με συνεστιακή μικροσκοπία από μέγιστη ένταση και διάταξη σταυρωνύμων τομών HeLa, σε κλίμακα 20µm και **B)** ποσοτικοποίηση της ενδοκυττάριας ποσότητας και του ποσοστού κυττάρων, στα οποία έχουν διεσδώσει τα CPAbs με λογισμικό Image-Pro Plus.



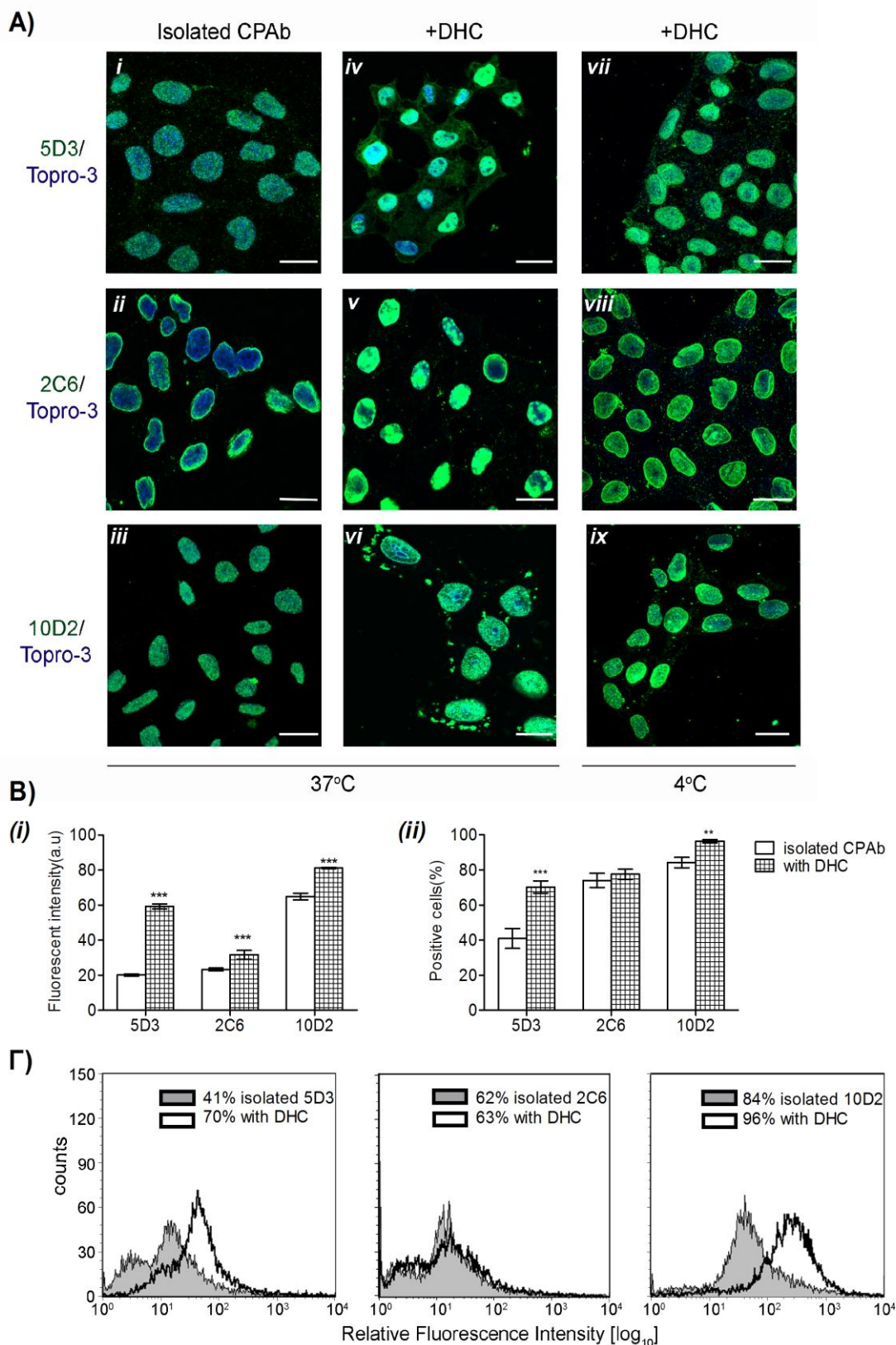
**Εικόνα 3.2.3** Συνεντοπισμός των τριών CPAbs με πυρηνικά μόρια συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες. Διεισδυτική ικανότητα των CPAbs (100  $\mu\text{g/ml}$ ) απουσία ή παρουσία nDNA-DRAQ5 και ιστονών-FITC (2 $\mu\text{g/ml}$ ) στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, μετά από 2 ώρες επώαση στους 37°C. Ενδοκυττάριος εντοπισμός των CPAbs με συνεστιακή μικροσκοπία από μέγιστη ένταση και κεντρικές τομές κυττάρων HeLa, σε κλίμακα 20 $\mu\text{m}$ .

### 3.3.3 Επίδραση nDNA, ιστονών και νουκλεοϊστονών στη διεισδυτική ικανότητα των CPAbs

Τέλος, ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία όπως παραπάνω, αξιολογήθηκε η επίδραση των νουκλεοϊστονών (μίγμα DNA και ιστονών) (DHC) στη διείσδυση των αντισωμάτων. Η συνεπώαση του DHC με τα CPAbs τροποποίησε τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό τους και ειδικότερα: 1) το 5D3 παρουσίασε έντονη ομοιογενή πυρηνική χρώση, εκτός από την συνηθισμένη στικτή κυτταροπλασματική, 2) το 2C6 εμφάνισε πιο έντονη ομοιογενή πυρηνική χρώση έκτος από την περιπυρηνική (**Εικόνα 3.3.3A**), και 3) το 10D2 παρουσίασε σημαντικά πιο έντονη πυρηνική χρώση (**Εικόνα 3.3.3A**). Επιπλέον, το DHC σε συνδυασμό με τα απομονωμένα CPAbs ενίσχυσε σημαντικά την ενδοκυτταρική ποσότητα του 5D3 (20a.u. έναντι 59a.u.,  $p < 0.001$ ), του 2C6 (23a.u. έναντι 32a.u.,  $p < 0.01$ ), και του 10D2 (65a.u. έναντι 81a.u.,  $p < 0,001$ ) (**Εικόνα 3.3.3Bi**). Η παρουσία DHC στην κυτταρική καλλιέργεια αύξησε σημαντικά τα ποσοστά των θετικών κυττάρων δυο εξ' αυτών (41% για το 5D3 έναντι 70% για 5D3 + DHC,  $p < 0.001$  και 84% για 10D2 έναντι 96% για 10D2 + DHC,  $p < 0,01$ ) (**Εικόνα 3.3.3Bii**). Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με αξιολόγηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των CPAbs, με ELISA (**Πίνακας 1.1**), και των ποσοστών των θετικών κυττάρων, με FACS (**Εικόνα 3.3.3C**), με

την παρουσία ή απουσία DHC στο θρεπτικό υλικό. Στα πυρηνικά εκχυλίσματα, οι συγκεντρώσεις των CPAbs όταν αναμιγνύονταν με το DHC ήταν 57pg και 2307pg/10<sup>4</sup> κύτταρα για τα 2C6 και 10D2, αντίστοιχα, σε σύγκριση με 23pg και 657pg/10<sup>4</sup> κύτταρα των CPAbs απουσία του (**Πίνακας 3.3.1**). Τα επίπεδα των CPAbs στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα ήταν μη ανιχνεύσιμα. Η ποσοτικοποίηση του ενδοκυττάριου 5D3, παρουσία ή απουσία των DHC στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, δεν επιτεύχθηκε αφού ελήφθησαν μη επαναλήψιμα αποτελέσματα. Τα ποσοστά των θετικών κυττάρων αυξήθηκαν σημαντικά σε δύο από τα τρία CPAbs όταν αυτά συνεπώαστηκαν με το DHC (60% και 89% για το 5D3 και 10D2, αντιστοίχως, έναντι 90% και 96% για την 5D3 + DHC και 10D2 + DHC) (**Εικόνα 3.3.3C**). Για να αποδειχθεί ότι το DHC εισέρχεται στα κύτταρα σαν σύμπλοκο με τα CPAbs, παρασκευάστηκε DHC με σημασμένα DNA και ιστόνες (nDNA-DRAQ5 και ιστόνες-FITC) και παρατηρήθηκε ότι και τα δύο πυρηνικά μόρια συνεντοπίζονται στο εσωτερικό των κυττάρων, έπειτα από δοκιμασία διείσδυσης (**Εικόνα 3.3.3.1**). Επιπλέον, η διεισδυτική ικανότητα των CPAbs συνδυασμένα με DHC, όταν δοκιμάστηκε στους 4°C δεν είχε τροποποιηθεί συγκριτικά με εκείνη στους 37°C, όσον αφορά στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό, στην ενδοκυττάρια ποσότητα και στο ποσοστό θετικών κυττάρων (**Εικόνα 3.3.3A**). Συμπερασματικά, τα CPAbs, είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό με το DHC, εισέρχονται στα κύτταρα με ενεργειακά ανεξάρτητο(υς) μηχανισμό(ύς). Σε όλες τις περιπτώσεις τα μονοκλωνικά H9.3 και 1C5 (αρνητικοί μάρτυρες) παρέμειναν ανεπηρέαστα από την παρουσία του DHC (**Εικόνα 3.3.3.2 Cvii-iii**). Επομένως, η συνεπώαση του DHC με τα CPAbs αύξησε σημαντικά τη διεισδυτική ικανότητα και των τριών.



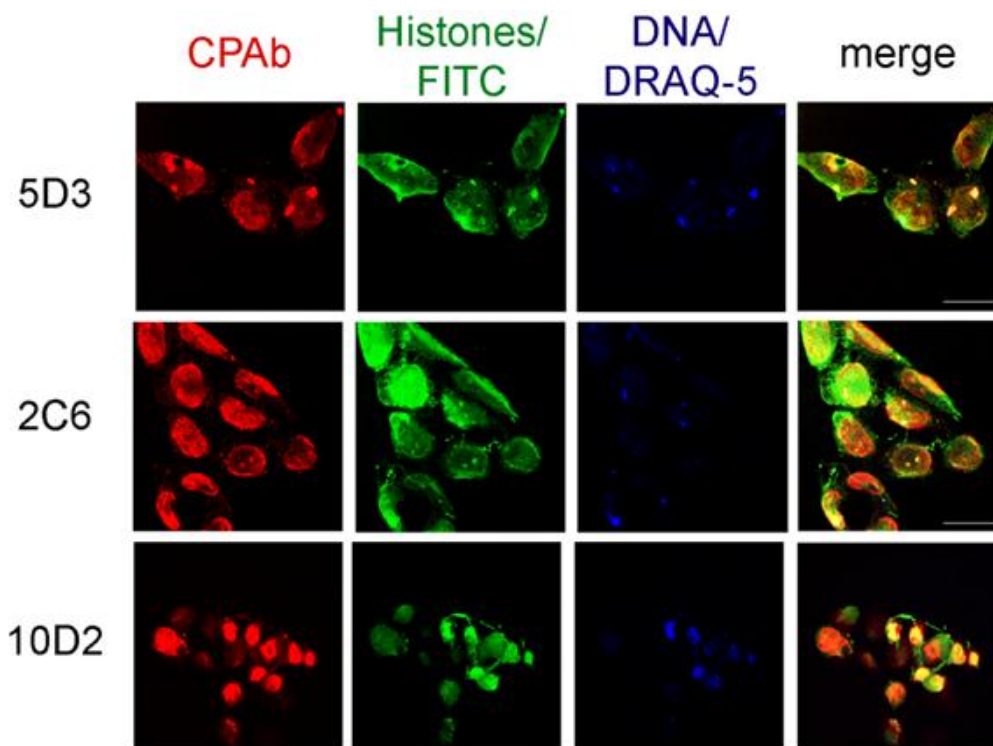


**Εικόνα 3.3.3** Διεσδυτική ικανότητα των CPAbs παρουσία ή απουσία του DHC. CPAbs (100  $\mu\text{g/ml}$ ) παρουσία ή απουσία του DHC (2 $\mu\text{g/ml}$ ) στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, μετά από επώαση 2 ώρες στους 37°C και στους 4°C. **A)** ενδοκυττάριος εντοπισμός των CPAbs με συνεστιακή μικροσκοπία από μέγιστη ένταση και διάταξη σταυρωνύμιου τομών μονιμοποιημένων με αιθανόλη

κυττάρων, HeLa, σε κλίμακα 20μm, **B)** ποσοτικοποίηση της ενδοκυττάριας ποσότητας και του ποσοστού κυττάρων, στα οποία έχουν διεισδύσει τα CPAbs με λογισμικό Image-Pro Plus και **C)** Ποσοτικοποίηση/Ανάλυση του ποσοστού κυττάρων, στα οποία έχουν διεισδύσει τα CPAbs με κυτταρομετρία ροής (FACS).

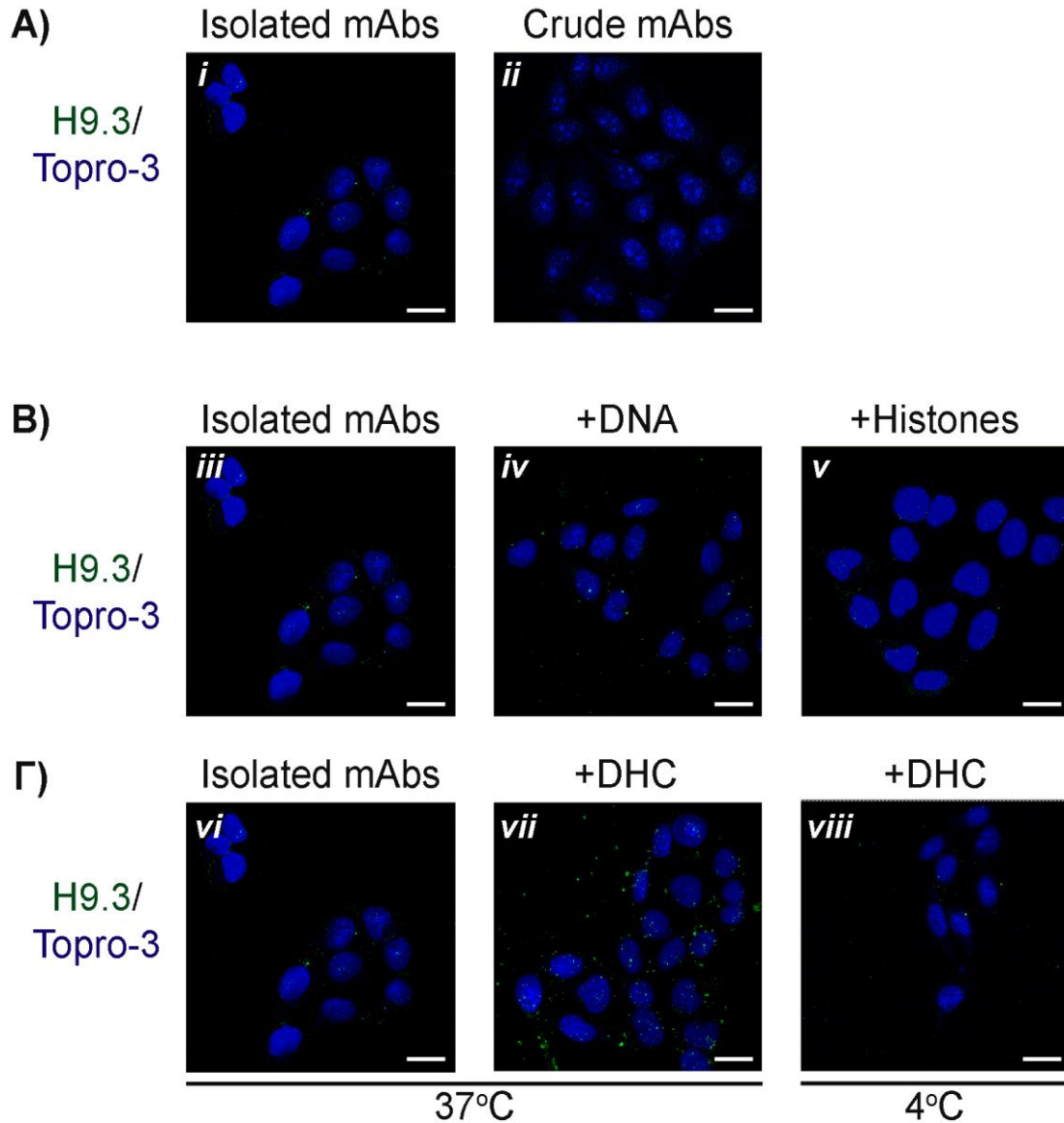
Πυρηνικά Μόρια	CPAbs		
	10D2	2C6	5D3
-	657 ± 0.04	23 ± 0.002	38±0.005
nDNA	1324 ± 0.05	30 ± 0.003	49±0.001
Ιστόνες	1226 ± 0.03	38 ± 0.001	65±0.003
DHC (nDNA+ιστόνες)	2307 ± 0.06	57 ± 0.002	74±0.006

**Πίνακας 3.3.1** Μέτρηση της ενδοκυττάριας ποσότητας των CPAbs (pg/10<sup>4</sup> κύτταρα) με ELISA στα πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa μετά από συνεπώασή τους με απομονωμένα CPAbs (100 μg/ml) και DNA ή ιστόνες, ή νουκλεοϊστόνες (μίγμα DNA και ιστονών).



**Εικόνα 3.3.3.1** Συνεντοπισμός των τριών CPAbs με DHC συζευγμένο με φθορίζουσες ουσίες. Διεισδυτική ικανότητα των CPAbs (100 μg/ml) έπειτα από συνεπώαση με DHC παρασκευασμένου με

σημασμένα DNA και ιστόνες (nDNA-DRAQ5 και ιστόνες-FITC) (2μg/ml), ακολούθησε επώαση με τα κύτταρα, 2 ώρες στους 37°C και μονιμοποίηση με αιθανόλη. Ενδοκυττάριος εντοπισμός των CPABs με συνεστιακή μικροσκοπία από μέγιστη ένταση και κεντρικές τομές κυττάρων HeLa, σε κλίμακα 20μm.



**Εικόνα 3.3.3.2** Το μη διεισδυτικό mAb H9.3, που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας σε όλες τις δοκιμασίες σε σύγκριση με τα CPABs στις ίδιες συνθήκες (2 ώρες στους 37°C). Διεισδυτική ικανότητα του mAb (100 μg/ml) ελέγχθηκε **A** σε σύγκριση με το υπέρκειμενο κυτταροκαλλιέργειας υβριδώματος **B** παρουσία ή απουσία 2μg/ml nDNA (iv) or 2μg/ml histones (v), και **Γ** παρουσία or απουσία 2μg/ml DHC, είτε στους 37°C (vii) ή στους 4°C (viii). Ενδοκυττάριος εντοπισμός των CPABs με συνεστιακή μικροσκοπία από μέγιστη ένταση και κεντρικές τομές κυττάρων HeLa, σε κλίμακα 20μm.



#### 4. Μελέτη του βιολογικού ρόλου των CPAbs

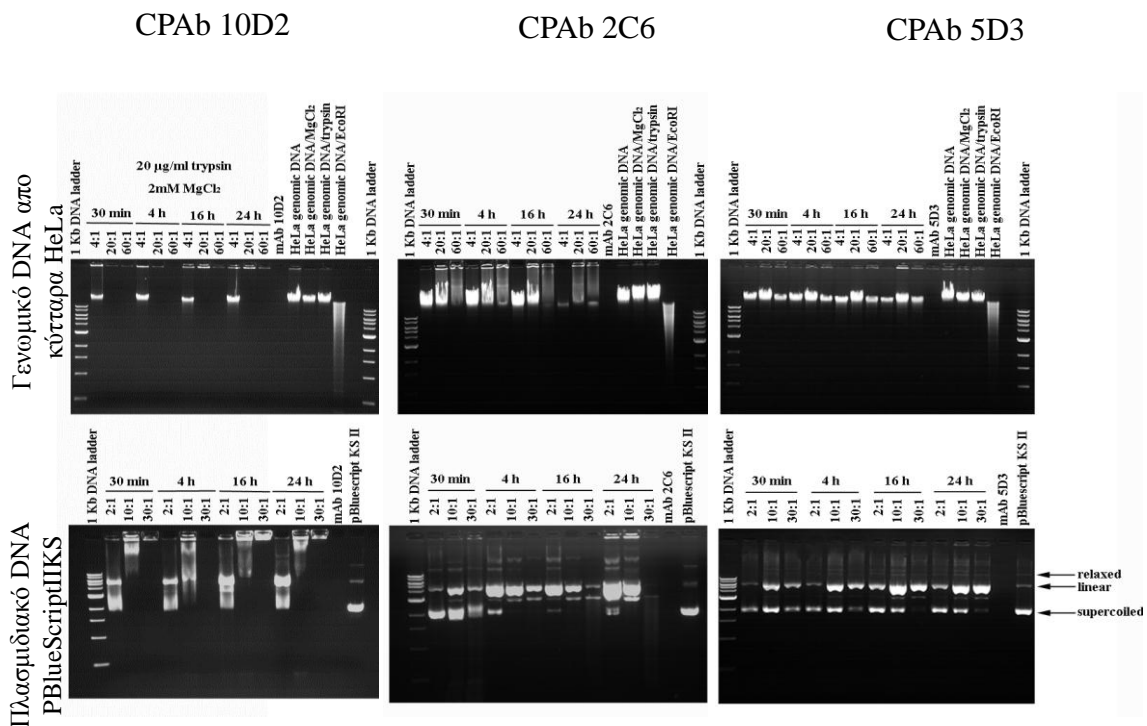
Μέχρι σήμερα είναι γνωστό από *in vivo* μελέτες ότι αντι-DNA διεισδυτικά αντισώματα παρεμβαίνουν σε κυτταρικές λειτουργίες, όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Επιπλέον, έχει αναφερθεί να εμφανίζουν δράση πρωτεάσης και νουκλεάσης (DNAσης ή RNAσης). Τα καταλυτικά αντισώματα (catAbs), όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, έχουν απομονωθεί τόσο από τους ορούς υγιών ατόμων, καθώς και από τους ορούς α-σθενών με αυτοάνοσα νοσήματα (ΣΕΛ, σκληροδερμία, ρευματοειδής αρθρίτιδα, πολλαπλό μυέλωμα, κ.λπ.). Από την άλλη πλευρά, μικρός είναι ο αριθμός των βιβλιογραφικών δεδομένων που υποστηρίζουν ότι τα catAbs εμφανίζονται πιο συχνά σε ποντίκια-πειραματικά πρότυπα αυτοάνοσων νοσημάτων συγκριτικά με φυσιολογικά. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η καταλυτική δράση των αντισωμάτων ίσως να εμπλέκεται στην παθογένεια των αυτοαντισωμάτων. Από τα παραπάνω δεδομένα τέθηκε το ερώτημα αν τα CPAbs είναι σε θέση να υδρολύουν το DNA, δεδομένου ότι το αναγνωρίζουν και εισέρχονται στον πυρήνα ζώντων κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, σε αντίθεση με την πλειοψηφία προηγούμενων μελετών με catAbs, που πραγματοποιήθηκαν κυρίως σε πολυκλωνικό επίπεδο, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν τα τρία μονοκλωνικά CPAbs (10D2, 5D3, 2C6) ως προς την ικανότητά τους να υδρολύουν το DNA, να επάγουν απόπτωση σε κύτταρα HeLa και να επιδρούν στον κυτταρικό τους πολλαπλασιασμό.

##### 4.1 Υδρόλυση πλασμιδιακού και γενωμικού DNA

Ο έλεγχος της ενδεχόμενης υδρολυτικής ικανότητας των CPAbs του εργαστηρίου μας πραγματοποιήθηκε αρχικά σε πλασμιδιακό DNA (pBluescript II KS), το οποίο απομονώθηκε σε μεγάλη κλίμακα από βακτηριακή καλλιέργεια του στελέχους XL1, ( βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Το παρασκεύασμα επώαστηκε με τα αντισώματα σε διαφορετικές αναλογίες  $\mu\text{g}$  αντισώματος/  $\mu\text{g}$  πλασμιδίου (2:1, 10:1 και 30:1) για 0.5, 4, 16, 24 ώρες, στους 37°C, σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Οι αντιδράσεις τερματίστηκαν με προσθήκη θρυψίνης και τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Από την ανάλυση βρέθηκε ότι το 10D2 υδρολύει και τις δύο αλυσίδες της διπλής έλικας του DNA αλλάζοντας το βαθμό υπερελίκωσης του πλασμιδίου, ενώ τα 2C6 και 5D3 αλλάζουν το βαθμό υπερελίκωσης του πλασμιδίου, προκαλώντας θραυσματοποίηση στη μια μόνο αλυσίδα. Πιο συγκεκριμένα, το 10D2 προκαλεί αλλαγή του βαθμού υπερελίκωσης του πλασμιδίου με αποτέλεσμα την αύξηση της γραμμικής μορφής του, κυρίως στην αναλογία 2:1, ενώ στην 30:1 εμφανίζει δράση DNase I, ανεξαρτήτως τους χρόνους επώασης (Εικόνα 4.1). Το 2C6 φάνηκε να θραυσματοποιεί στο πλασμιδιακό DNA, μετά από 4, 16

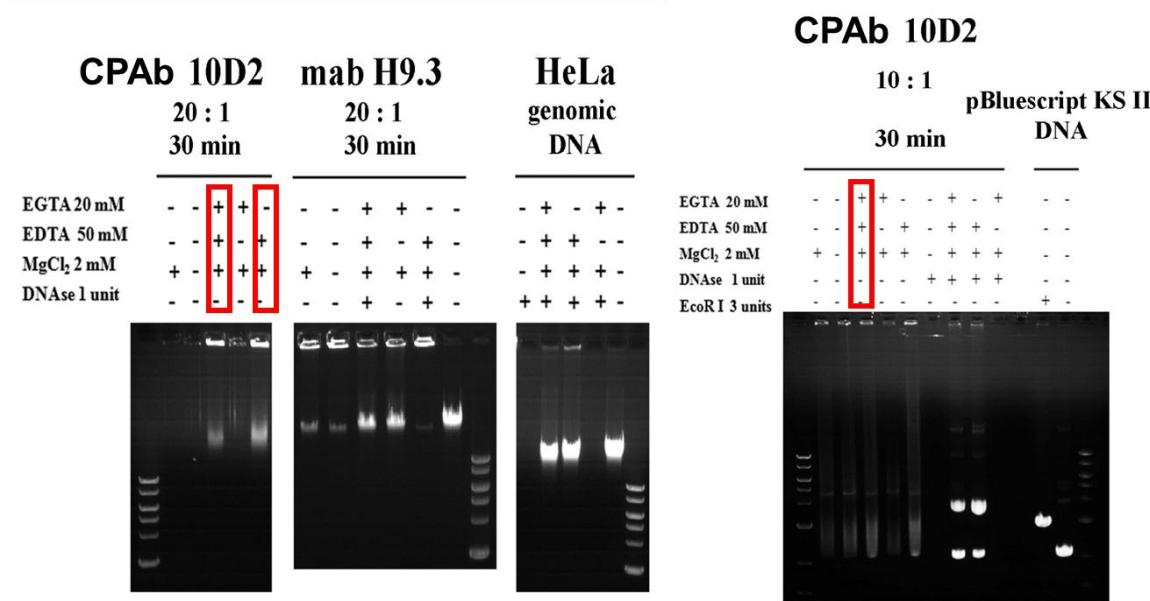
και 24 ώρες επώασης στις αναλογίες 10:1 και 30:1, με αποτέλεσμα την αλλαγή του βαθμού υπερελίκωσής του και επακόλουθα της γραμμικής του μορφής (**Εικόνα 4.1**). Επίσης, και το 5D3 προκάλεσε διάσπαση της υπερελικωμένης μορφής του πλαμιδιακού DNA, αυξάνοντας την ποσότητα της γραμμικής μορφής του, έπειτα από 24 ώρες επώασης και στην αναλογία 30:1 (**Εικόνα 4.1**).

Με σκοπό να μελετηθεί περαιτέρω η ικανότητα των CPAbs να υδρολύουν το DNA, απομονώθηκε γενωμικό DNA, από κύτταρα HeLa και ακολουθήθηκε η ίδια μεθοδολογία, όπως παραπάνω. Το 10D2, εμφανίζει δράση DNase I, καθώς το γενωμικό DNA αποικοδομείται πλήρως, όπως φαίνεται κατά την ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης. Από την άλλη πλευρά, τα 2C6 και 5D3 προκαλούν καθυστέρηση στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα του γενωμικού DNA, ως συνέπεια της υδρολυτικής τους δράσης. Πιο συγκεκριμένα, το 10D2 προκαλεί κατακερματισμό του γενωμικού DNA μετά από επώαση μισής ώρας εμφανίζοντας δράση τύπου DNase I, στις αναλογίες 20:1 και 60:1, σε όλους τους χρόνους επώασης. Το 2C6 με τη σειρά του μετά από 24 ώρες προκαλεί ηλεκτροφορητική καθυστέρηση του γενωμικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης σε συνδυασμό με μειωμένη ποσότητά του σε όλες τις αναλογίες, στις οποίες δοκιμάστηκε. Τέλος, το 5D3 μειώνει την ποσότητα του γενωμικού DNA, σε αναλογία 60:1 σε όλους τους χρόνους επώασης (**Εικόνα 4.1.1**).



**Εικόνα 4.1** Έλεγχος ικανότητας των CPAbs να υδρολύουν τόσο το πλασμιδιακό (pBlueScript II KS) όσο και το γενωμικό (από κύτταρα HeLa) DNA. Τα CPAbs επώστηκαν με το DNA στους 37°C σε αναλογία γραμμαρίων αντισώματος/γενωμικού DNA 4:1, 20:1 και 60:1 ή αντισώματος/πλασμιδίου 2:1, 10:1 και 30:1 για 0.5, 4, 16, 24h σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS (Tris Buffer Saline) που περιέχει 2mM MgCl<sub>2</sub>. Οι αντιδράσεις διακόπηκαν με προσθήκη θρυψίνης και τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (1%).

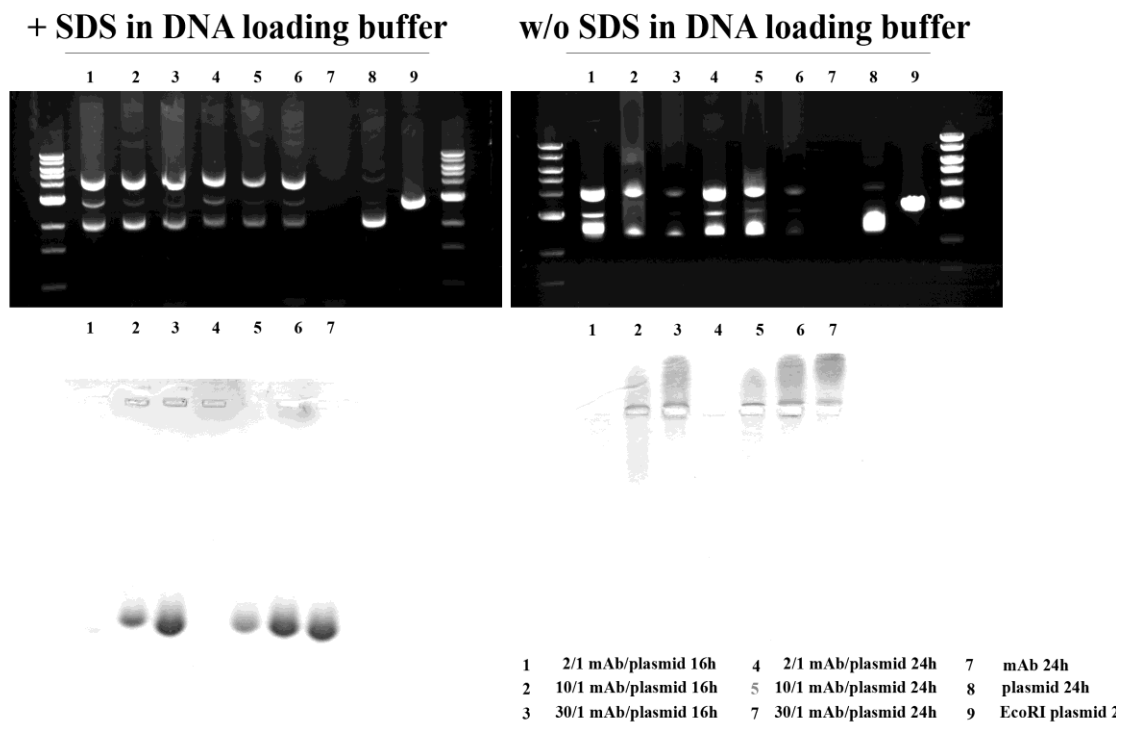
Επιπλέον, για να αποκλειστεί η πιθανότητα η υδρολυτική ικανότητα των mAbs να οφείλεται σε πρόσμιξη με DNase I, επαναλήφθηκαν οι παραπάνω αντιδράσεις (τόσο σε πλασμιδιακό όσο και σε γενωμικό DNA) παρουσία και απουσία αναστολέων (20mM EGTA και 50mM EDTA) για το ένζυμο, όπου και επιβεβαιώθηκαν τα παραπάνω αποτελέσματα (Εικόνα 4.1.1). Ανακεφαλαιώνοντας, το κάθε αντίσωμα υδρολύει σε/με διαφορετικό βαθμό/τρόπο το γενωμικό και το πλασμιδιακό DNA (δράση DNase I ή παρέμβαση στο βαθμό υπερελίκωσης) και η υδρολυτική ικανότητά τους, δεν φανηκέ να οφείλεται σε πρόσμιξή τους με DNase, υποδεικνύοντας ότι αποτελεί εγγενή ιδιότητα του εκάστου αντισώματος.



**Εικόνα 4.1.1** Έλεγχος ικανότητας των CPAbs να υδρολύουν τόσο το πλασμιδιακό όσο και το γενωμικό DNA παρουσία και απουσία αναστολέων για το ένζυμο DNase. Το 10D2 επώαστηκε με το DNA στους 37°C σε αναλογία γραμμαρίων αντισώματος/γενωμικού DNA 20:1 ή αντισώματος/πλασμιδίου 10:1 για 30' σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS (Tris Buffer Saline) παρουσία και απουσία αναστολέων για το ένζυμο (20mM EGTA, 50mM EDTA) ή/και 2mM MgCl<sub>2</sub>. Οι αντιδράσεις διακόπηκαν με προσθήκη θρυψίνης και τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (1%).

Ακολούθησε έλεγχος ικανότητας των CPAbs να υδρολύουν το πλασμιδιακό DNA παρουσία και απουσία SDS στη χρωστική (loading buffer), ώστε να ελεγχθεί, εάν η καθυστέρηση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας τόσο του πλασμιδιακού όσο και του γενωμικού DNA, οφειλόταν στην επίδραση των mAbs. Μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι η κατεργασία του δείγματος με το SDS και τη μερκαπτοαιθανόλη μετουσιώνει τις ανώτερες διαμορφώσεις των μορίων (τριτοταγή δομή). Ειδικότερα, οι δισουλφιδικοί δεσμοί (θειογέφυρες -S-S-) των πρωτεϊνών ανάγονται από τη μερκαπτοαιθανόλη και το SDS συμπλοκοποιείται με τις πρωτεΐνες. Για κάθε ζεύγος αμινοξέων συνδέεται ένα μόριο SDS με αποτέλεσμα το τελικό φορτίο του συμπλόκου να είναι αρνητικό και έτσι αυτό να μετακινείται κατά την ηλεκτροφόρηση προς την άνοδο. Το τελευταίο εξαλείφει την επιρροή τού φορτίου στην κινητικότητα και οι πρωτεΐνες κινούνται μόνο με βάση το M.B. τους. Για το σκοπό αυτό το 2C6 επώαστηκε με το DNA σε διαφορετικές αναλογίες γραμμαρίων αντισώματος/ πλασμιδίου για 16h και 24h παρουσία και απουσία SDS και β-μερκαπτοαιθανόλης στη χρωστική. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο, στο τέλος της οποίας και αφού ανιχνεύθηκε η παρουσία των νουκλεϊκών οξέων, το πήκτωμα εμβαπτίστηκε σε χρώση Coomassie blue ώστε να

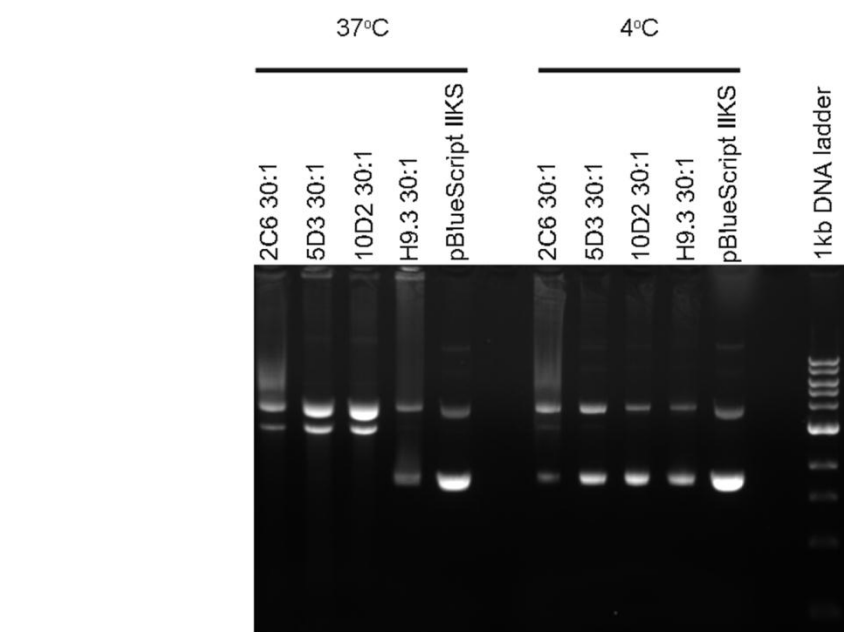
ανιχνεύσουμε το mAb. (Εικόνα 4.1.2). Πράγματι, παρουσία SDS και έπειτα από έκθεση της υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στο βαθμό υπερελίκωσης ή καθυστέρηση στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα του πλασμιδίου. Παράλληλα, με χρώση του πηκτώματος με Coomassie Blue φάνηκε πως παρουσία αποδιατακτικών συνθηκών, το 2C6 αδυνατεί να υδρολύσει το DNA και μετακινείται προς την άνοδο, φορτισμένο αρνητικά όπως και το DNA. Αντίθετα, απουσία SDS και β-μερκαπτοαιθανόλης, το αντίσωμα διατηρεί την υδρολυτική του ικανότητα και μάλιστα μετακινείται αυτή τη φορά προς την κάθοδο (την αντίθετη κατεύθυνση με το DNA), δηλώνοντας επιπρόσθετα πως οι μεταβολές στην κινητικότητα του DNA δεν οφείλονται στην συμπλοκοποίηση με το CPAb.



**Εικόνα 4.1.2** Έλεγχος ικανότητας των CPAbs να υδρολύουν το πλασμιδιακό DNA παρουσία και απουσία SDS στη χρωστική (loading buffer). Το 2C6 επώαστηκε με το DNA στους 37°C σε αναλογία γραμμαρίων αντισώματος/ πλασμιδίου 2:1,10:1 και 30:1 για 16h και 24h σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS (Tris Buffer Saline) παρουσία ή/και 2mM MgCl<sub>2</sub>. Οι αντιδράσεις διακόπηκαν με προσθήκη θρυψίνης και τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης (1%).

Όπως συμβαίνει στις περισσότερες χημικές αντιδράσεις, έτσι και σ' αυτές που καταλύονται από ένζυμα (ενζυμικές), η ταχύτητά τους είναι ανάλογη της θερμοκρασίας. Για κάθε ένζυμο υπάρχει μια ορισμένη θερμοκρασία, στην οποία η ταχύτητα της αντίδρασης γίνεται μέγιστη. Τα περισσότερα ένζυμα δρουν άριστα σε θερμοκρασίες

μεταξύ 36°- 38°C που είναι και η θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος. Θέλοντας να μελετήσουμε την επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστηριότητα των CPAbs να υδρολύουν το πλασμιδιακό DNA στους 37°C και στους 4°C, τα CPAbs 2C6, 5D3, 10D2 και το mAb H9.3 (μάρτυρας) επωάστηκαν με το DNA σε διαφορετικές αναλογίες γραμμαρίων αντισώματος/πλασμιδίου για 24 ώρες. Παρατηρήθηκε αναστολή της υδρολυτικής τους δράσης στους 4°C και αύξηση στους 37°C (Εικόνα 4.1.3), γεγονός που ενισχύει την ενζυμική δράση τους, αυτή της DNAσης.

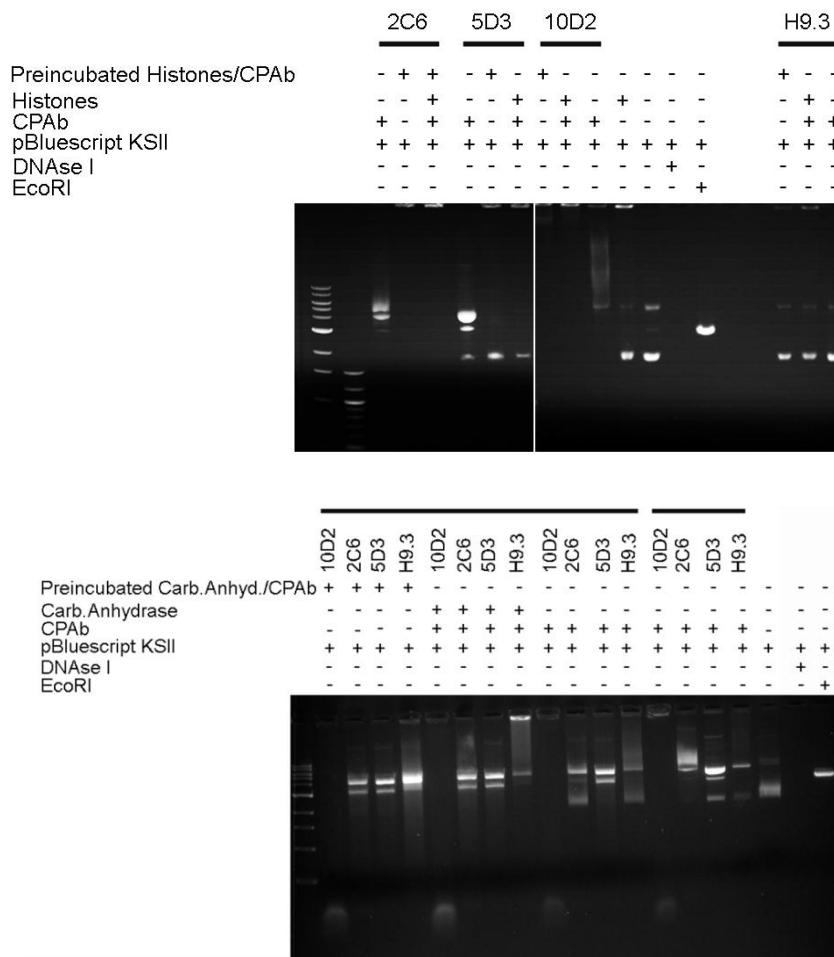


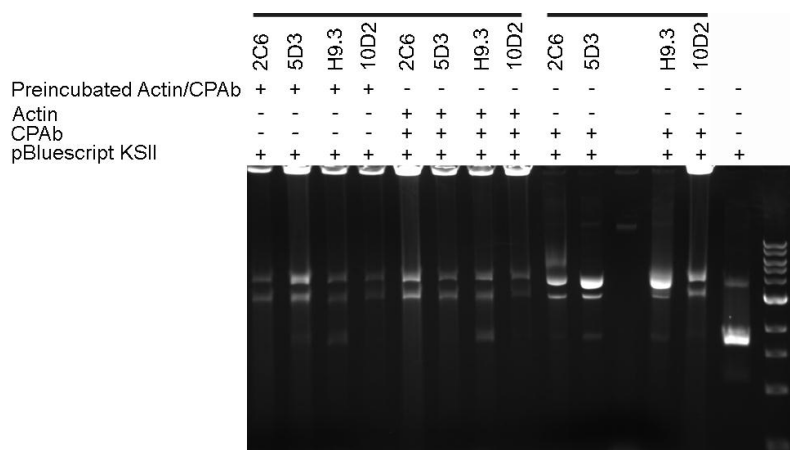
**Εικόνα 4.4.1.3** Έλεγχος ικανότητας των CPAbs να υδρολύουν το πλασμιδιακό DNA στους 37°C και στους 4°C. Τα CPAbs 2C6, 5D3, 10D2 και το mAb H9.3 (μάρτυρας) επωάστηκαν με το DNA σε αναλογία γραμμαρίων αντισώματος/ πλασμιδίου 30:1 για 24h σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS παρουσία και 2mM MgCl<sub>2</sub>. Οι αντιδράσεις διακόπηκαν με προσθήκη θρυψίνης και τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης (1%).

Στη συνέχεια, θελήσαμε να αποσαφηνίσουμε περαιτέρω την δράση των CPAbs, αναφορικά με την πολυδραστικότητά τους έναντι διαφόρων αντιγόνων, η οποία ενδεχομένως και να τροποποιεί την υδρολυτική τους ικανότητα. Έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά πως η δραστηριότητα των αντισωμάτων έναντι DNA ή χρωματίνης *per se* να μην είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη νεφρίτιδας, αλλά μάλλον η ικανότητα των αυτοαντισωμάτων να δεσμεύονται σε διαφορετικά αντιγόνα (275, 276).

Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η υδρολυτική δράση των CPAbs παρουσία πλασμιδιακού DNA και τριών αντιγόνων (ιστόνες, καρβονική ανυδράση και ακτίνη), σε υψηλή

συγκέντρωση. Όπως φαίνεται από τον **Πίνακα 1.1** πρόκειται για αντιγόνα που τα αναγνωρίζουν σε διαφορετικό βαθμό το καθένα. Τα CPAbs 2C6, 5D3,10D2 και το mAb H9.3 (μάρτυρας), με ή χωρίς προεπόαση με τα αντιγόνα, επώαστηκαν με το DNA στους 37°C. Φάνηκε ότι παρουσία των αντιγόνων σε υψηλές συγκεντρώσεις ενισχύεται η σημαντικά η υδρολυτική δράση τους, το 10D2 και το 2C6 εμφανίζουν δράση DNase παρουσία, ενώ με το 5D3 παρατηρείται αλλαγή του βαθμού υπερελίκωσης του πλασμιδίου (**Εικόνα 4.1.4**). Τα παραπάνω αποτελέσματα δύνανται να χρησιμεύσουν στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στον ΣΕΛ, δεδομένης της παρουσίας CPAbs στον ορό ασθενών με λύκο, σε ένα περιβάλλον που χαρακτηρίζεται από έντονη αποπτωτική δραστηριότητα, όπως φαίνεται από την παρουσία υψηλών επιπέδων πυρηνικών και μη αντιγόνων.





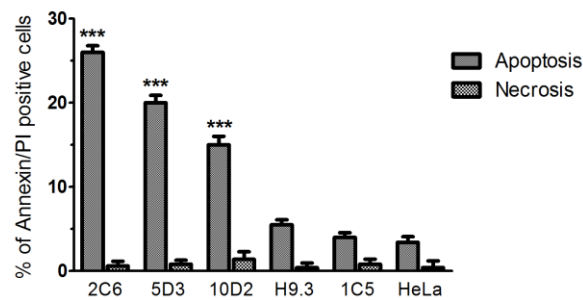
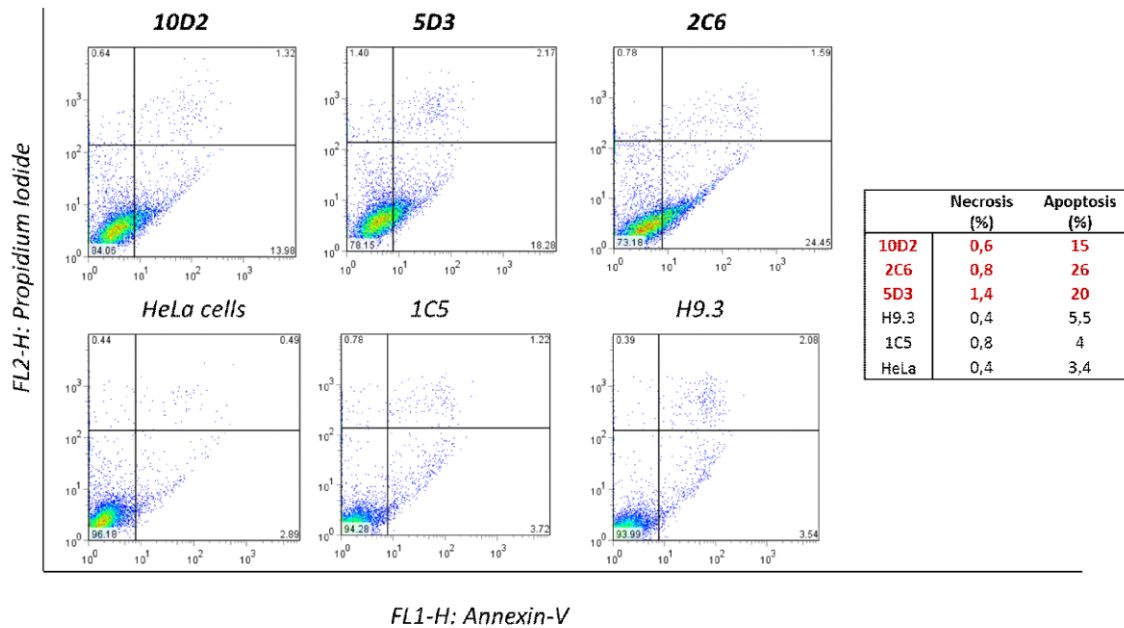
**Εικόνα 4.1.4** Έλεγχος ικανότητας των CPAbs να υδρολύουν το πλασμιδιακό DNA παρουσία ιστονών, καρβονικής ανυδράσης και ακτίνης. Τα CPAbs 2C6, 5D3, 10D2 και το mAb H9.3 (μάρτυρας), είτε με ή χωρίς προεπώαση με τα αντιγόνα, επώαστηκαν με το DNA στους 37°C σε αναλογία γραμμαρίων αντισώματος/αντιγόνου/ πλασμιδίου 30:60:1 για 24h σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS (Tris Buffer Saline) παρουσία και 2mM MgCl<sub>2</sub>. Οι αντιδράσεις διακόπηκαν με προσθήκη θρυψίνης και τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (1%).

## 4.2 Επαγωγή απόπτωσης

Τα διεισδυτικά αντι-DNA αντισώματα με υδρολυτική δράση έναντι DNA έχουν αναφερθεί να προκαλούν απόπτωση σε διάφορες καρκινικές σειρές (98) και οδήγησαν τους συγγραφείς στην υπόθεση ότι η απόπτωση πυροδοτήθηκε από κατακερματισμό του πυρηνικού DNA, έπειτα από τη διείσδυση των αντι-DNA αντισωμάτων στον πυρήνα (70, 277). Επομένως, από τη στιγμή που τα CPAbs υδρολύουν το DNA το επόμενο βήμα ήταν να μελετηθεί η ικανότητά τους να επάγουν απόπτωση σε κύτταρα HeLa. Έπειτα από επώαση των κύτταρων με τα υπό εξέταση αντισώματα, ακολούθησε χρώση τους με αννεξίνη V (Αννεξίνη-V-FITC), για την ανίχνευση πρώιμων σταδίων απόπτωσης και με ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI), για την ανίχνευση τελικών σταδίων απόπτωσης, και εξετάστηκαν με τη βοήθεια του κυτταρομετρητή ροής (FACS). Δοκιμάστηκαν διάφορες παράμετροι, όπως: 1) ο χρόνος επώασης των κυττάρων με το αντίσωμα (12, 24, 48h), και 2) η συγκέντρωση του αντισώματος (50, 100, 200 μg/ml), ώστε να βρεθούν οι άριστες συνθήκες για την ανίχνευση της απόπτωσης. Διαπιστώθηκε ότι στα 100 μg/ml το 2C6, το 5D3 και το 10D2 προκαλούν απόπτωση ήταν 27%, 22% και 16% αντίστοιχα, αντίστοιχα έπειτα από 48h επώασης τους με τα κύτταρα (**Εικόνα 4.2**). Πιο συγκεκριμένα, τα mAbs H9.3 και 1C5, δεν επάγουν απόπτωση σε καμιά από τις παραπάνω συνθήκες (5%) σε σχέση με τη σταυροσπορίνη-ST5 (10 μM) που χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας (58% απόπτωση και 23% νέκρωση) (**Εικόνα 4.2**).



Αξίζει να σημειωθεί ότι τα CRABs προκαλούν κυρίως απόπτωση πρώιμων σταδίων, ενώ τα ποσοστά τελικών σταδίων απόπτωσης, είναι χαμηλά ανάλογα με εκείνα των θετικών μαρτύρων της μεθόδου. Αντιθέτως, ακόμη και στην υψηλή συγκέντρωση (200 µg/ml) του αντισώματος τα ποσοστά απόπτωσης των κυττάρων δεν διέφεραν, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν πρόκειται για δοσοεξαρτώμενο φαινόμενο. Κατά συνέπεια τα CRABs προκαλούν απόπτωση σε σημαντικό ποσοστό καρκινικών κυττάρων.

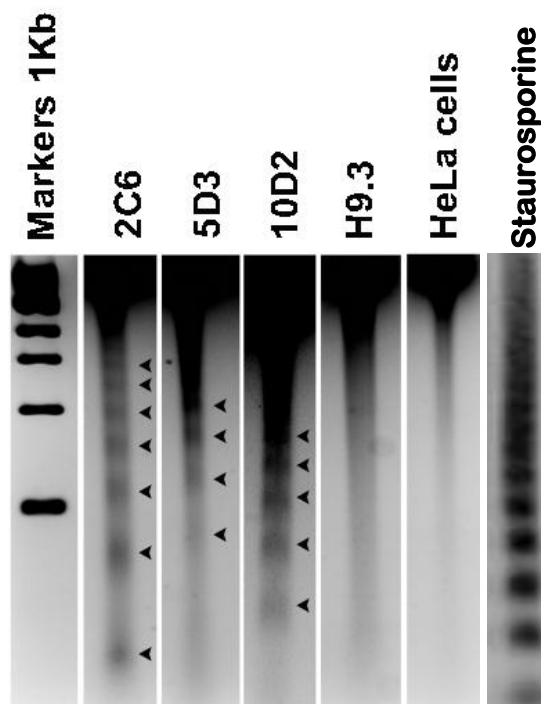


**Εικόνα 4.2** Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης και η κυτταρική διαπερατότητα των κυττάρων HeLa μετρήθηκε με διπλή σήμανση με Ανεξίνη V-FITC και PI. Επώση με 10D2, 5D3, 2C6, μάρτυρας (κύτταρα HeLa), 1C5 και H9.3 για 48 ώρες. Κάθε τεταρτημόριο αντιπροσωπεύει: κάτω αριστερά: μη σημασμένα. Πάνω αριστερά: PI θετικά, κάτω δεξιά: Ανεξίνη V-FITC V θετικά, πάνω δεξιά Ανεξίνη V-FITC και PI θετικά. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών διαφορετικών πειραμάτων με παρόμοια αποτελέσματα.

### 4.3 Κατακερματισμός του DNA

Ένα άλλο χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι η διάσπαση του DNA σε πολλαπλά διανουκλεοσωματικά κλάσματα εξαιτίας της μεσολαβούμενης από ενδονουκλεάσες κατάτμισης του γενωμικού DNA. Για την ανίχνευση της διάσπασης του DNA χρησιμοποιήθηκε μια ποιοτική μέθοδος η οποία επιτρέπει την απελευθέρωση διασπασμένης χρωματίνης από τον πυρήνα μετά τη λύση του κυττάρου και την αποδιοργάνωση της πυρηνικής δομής. Το διασπασμένο, χαμηλού μοριακού βάρους DNA αναλύεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Στα κύτταρα HeLa που επώαστηκαν με σταυροσπορίνη ανιχνεύτηκε διάσπαση του DNA (**Εικόνα 4.3**). Στα κύτταρα HeLa που επώαστηκαν με τα CPABs 2C6 και 10D2 για 48 ώρες παρατηρήθηκε επίσης διάσπαση του DNA σε πολλαπλά διανουκλεοσωματικά κλάσματα μικρού μοριακού βάρους (**Εικόνα 4.3**). Στα κύτταρα που επώαστηκαν για 48 ώρες με το 5D3 παρατηρήθηκε επίσης κατακερματισμός του DNA σε πολλαπλά διανουκλεοσωματικά κλάσματα μικρού μοριακού βάρους, αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν με τα άλλα δύο CPABs (**Εικόνα 4.4.3**). Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε το μοτίβο DNA- ladder, γεγονός που επιβεβαιώνει την επαγωγή απόπτωσης που προκαλεί η παρουσία των CPABs στα κύτταρα, όπως έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες με διεισδυτικά αντισώματα που επάγουν αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.

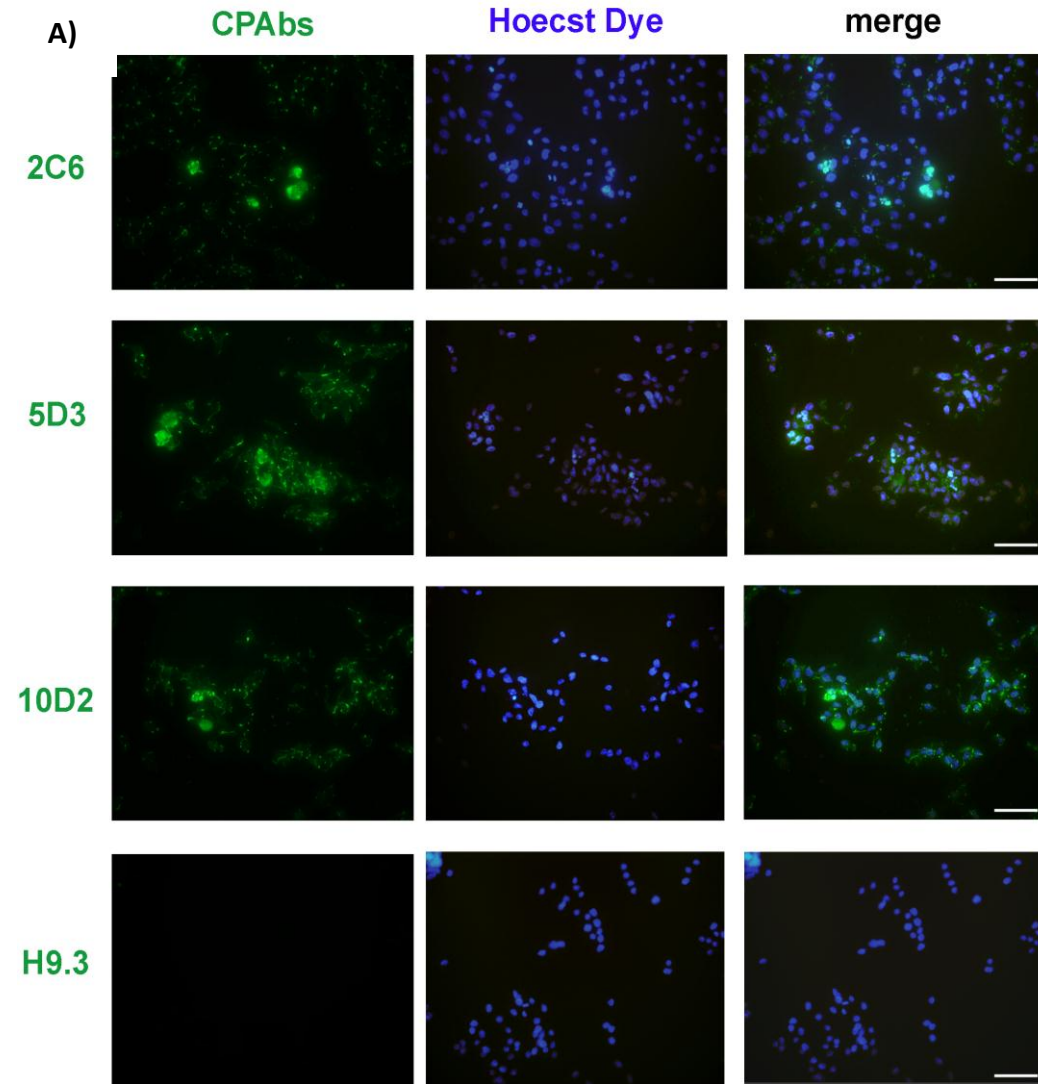


**Εικόνα 4.3** Διάσπαση του DNA σε πολλαπλά διανουκλεοσωματικά κλάσματα. Το χαμηλού μοριακού βάρους DNA, που απομονώθηκε από κύτταρα HeLa, έπειτα από επώαση 48 ώρες με CPABs

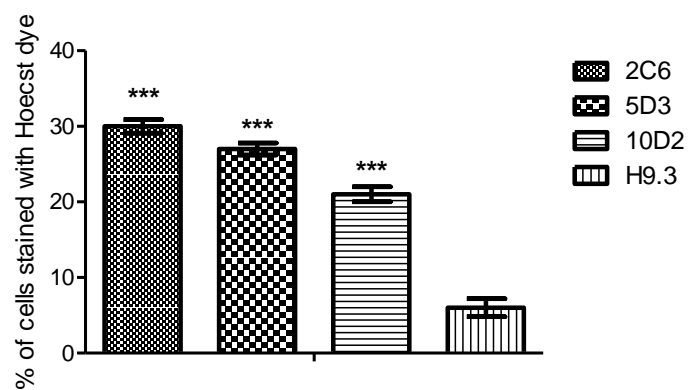
(100μg/ml), ανιχνεύτηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων.

#### 4.4 Επαγωγή μορφολογικών και πυρηνικών αλλαγών σε κύτταρα HeLa

Εφόσον τα CPAbs επάγουν απόπτωση, μελετήσαμε εάν η επίδραση αυτή οφείλεται σε αποπτωτικό θάνατο ή/και σε σχηματισμό ‘μη φυσιολογικών’ κυτταρικών τύπων χωρίς πυρήνα. Οι μορφολογικές και πυρηνικές αλλαγές κυττάρων HeLa που επώαστηκαν με τα CPAbs, παρατηρήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού μετά από σήμανση με τη χρωστική Hoechst. Τα κύτταρα συνεπώαστηκαν τόσο με διεισδυτικά, όσο και με μη διεισδυτικά αντισώματα (100μg/ml), για 16, 24 και 48 ώρες. Η οπτική μικροσκοπία αντίθεσης φάσεων έδειξε ότι η μορφολογία τους επηρεάζεται στην πλειοψηφία των κυττάρων από την παρουσία των CPAbs σε σχέση με την φυσιολογική μορφολογία των κυττάρων-μαρτύρων (**Εικόνα 4.4Α-Γ**). Τα κύτταρα που εκτίθενται στα τρία CPAbs, εμφανίζουν στρογγυλό κυτταρικό σχήμα, ελάττωση του όγκου τους, καθώς και πυρηνικές αλλαγές χαρακτηριστικές του αποπτωτικού θανάτου. Πιο συγκεκριμένα, οι αποπτωτικοί πυρήνες αναγνωρίστηκαν από τον έντονο μπλε φθορισμό, ο οποίος συμπεριλαμβάνει ένα ποσοστό συμπύκνωσης της πυρηνικής χρωματίνης των κυττάρων και διάσπασης του πυρηνικού DNA. Στα κύτταρα που επώαστηκαν για 48 ώρες με τα 2C6, 5D3 και 10D2, τα ποσοστά των θετικών για Hoechst κύτταρα ήταν αντίστοιχα  $30\pm 2\%$ ,  $27\pm 1\%$  και  $19\pm 0.8\%$  (**Εικόνα 4.4Β**). Τα κύτταρα-μάρτυρες, που επώαστηκαν με το H9.3 έχουν κανονική κυτταρική μορφολογία, σε όλους τους χρόνους. Με τη χρώση Hoechst φάνηκε ότι στην πλειοψηφία των κυττάρων παρουσιάστηκαν πυκνωτικοί πυρήνες με ένα έντονο φθορισμό που είναι χαρακτηριστικός των αποπτωτικών κυττάρων, σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες, τα οποία διατηρούν τους ομοιόμορφους και στρογγυλού σχήματος πυρήνες με χαμηλό φθορισμό. Συμπερασματικά, η στρογγυλή κυτταρική μορφολογία, η ελάττωση του όγκου και οι πυρηνικές αλλαγές των κυττάρων, δηλαδή η συμπύκνωση του πυρήνα αρχικά και η μετέπειτα η διάσπασή/θραυσματοποίησή του, αποδεικνύουν ότι τα CPAbs επάγουν απόπτωση στα κύτταρα HeLa.



B)



**Εικόνα 4.4** Κυτταρική και πυρηνική μορφολογία των κυττάρων HeLa παρουσία CPAbs μετά από σήμανση με χρωστική Hoechst. A) κύτταρα που επωάστηκαν με 2C6 για 48 ώρες, κύτταρα που επωάστηκαν με 5D3 για 48 ώρες, κύτταρα που επωάστηκαν με 10D2 για 48 ώρες, κύτταρα που επωάστηκαν με H9.3 για 48 ώρες (μάρτυρες). Παρατηρείται διάσπαση πυρήνα και συμπύκνωση χρωματινής. Οι μικρογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας είναι αντιπροσωπευτικές τριών

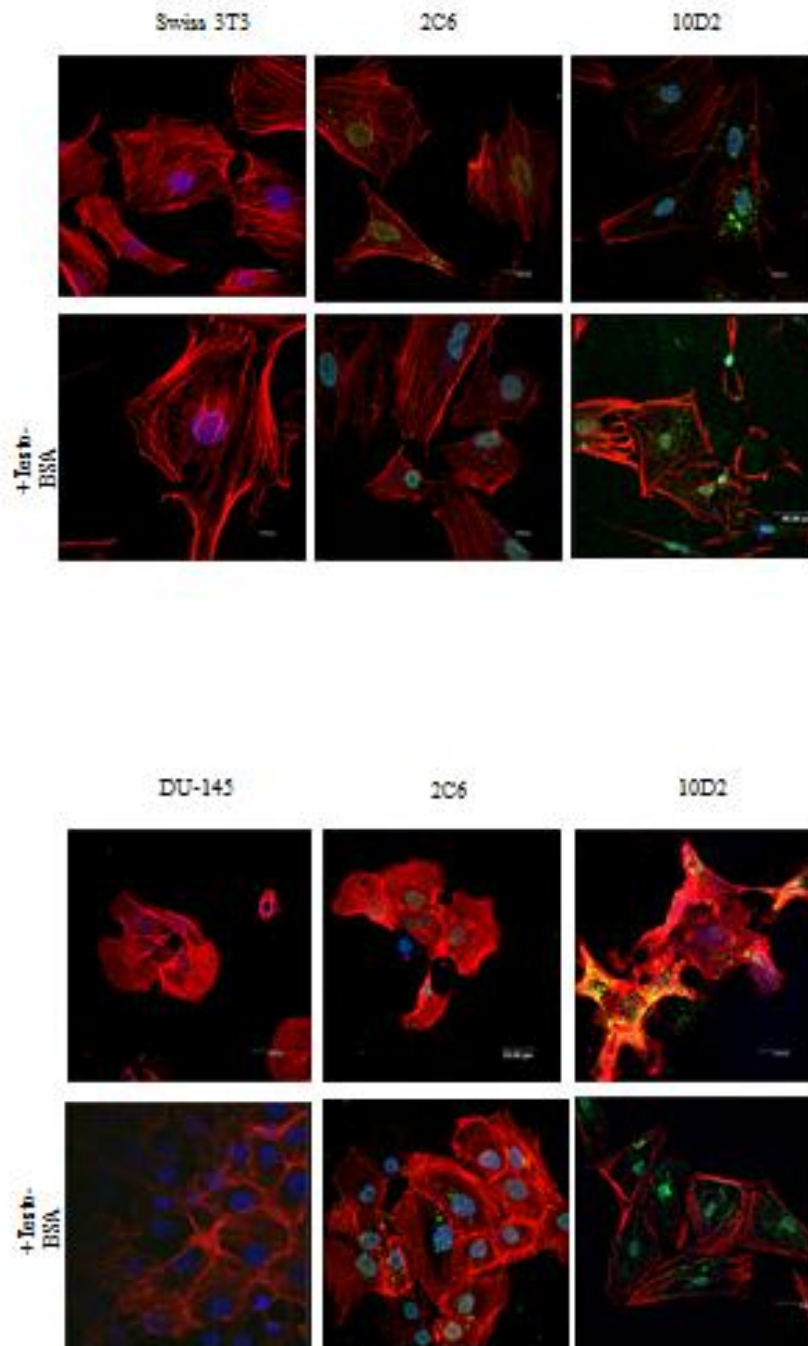
ανεξάρτητων πειραμάτων σε κλίμακα 40μm. **B)** Το γράφημα αποικονίζει το ποσοστό των κυττάρων που παρουσιάζουν πυκνωτικούς πυρήνες.

#### 4.5 Αναδιοργάνωση *in vitro* του πλέγματος της ακτίνης σε καρκινικά κύτταρα

Είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια του αποπτωτικού θανάτου παρατηρείται αποδιοργάνωση του κυτταρικού σκελετού, έτσι διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση των CPABs στη δυναμική ισορροπία του πλέγματος της ακτίνης. Από πρόσφατες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι ραγδαίες αλλαγές στη δυναμική ισορροπία του πλέγματος της ακτίνης στον κυτταροσκελετό πυροδοτήθηκαν από διάφορα σήματα που επάγουν ισχυρή αναδιοργάνωση του πλέγματος, το οποίο μπορεί να ελέγχει πολλές πτυχές της φυσιολογίας του κυττάρου (278). Έχει αναφερθεί ότι η αναδιαμορφωση της ακτίνης εμπλέκεται επίσης στη ρύθμιση της απόπτωσης και ειδικά σηματοδοτικά μονοπάτια ρυθμίζουν τόσο, την αναδιοργάνωση της ακτίνης, όσο και την απόπτωση (279, 280). Από πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα φάνηκε ότι η αναδιοργάνωση της ακτίνης που προκαλείται από την ενεργοποίηση των μεμβρανικών ανδρογονικών υποδοχέων (mAR) έλεγχε την απόπτωση των ανθρώπινων κυττάρων καρκίνου του προστάτη (DU-145) (281) αποδεικνύοντας τον καθοριστικό ρόλο της σηματοδότησης ακτίνης που συνδέεται με την ενεργοποίηση των mAR και τη ρύθμιση των προ-αποπτωτικών μηχανισμών σε διάφορα καρκινικά κύτταρα. Όσον αφορά τα ανδρογόνα, αυτά έχουν αναφερθεί στην ενεργοποίηση μεμβρανικών και πυρηνικών ανδρογονικών υποδοχέων προκαλώντας έτσι διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, μέσω της τεστοστερόνης, όπως είναι η μετανάστευση και η απόπτωση (281, 282). Είναι ενδιαφέρον ότι, η μη καρκινική κυτταρική σειρά Swiss-3T3 εκφράζει ενεργούς ανδρογονικούς υποδοχείς και ανταποκρίνεται στη δράση των ανδρογόνων, ενώ αντίθετα η κυτταρική σειρά DU145 δεν φέρει ανδρογονικούς υποδοχείς με αποτέλεσμα να καθίσταται ανθεκτικότερη στη δράση των ανδρογόνων (283). Σε αυτό το μοντέλο των κυττάρων, η διέγερση με τεστοστερόνη είτε συζευγμένη, είτε όχι με BSA προκαλεί ισχυρή αναδιοργάνωση της ακτίνης, αναστέλλοντας την κυτταρική κινητικότητα και την απόπτωση (281). Η BSA καθιστά ανίκανη την τεστοστερόνη να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη.

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το εργαστήριο Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, που διευθύνει ο καθηγητής Χ. Στουρνάρας. Με βάση τα παραπάνω στην παρούσα μελέτη τα CPABs δοκιμάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναδιοργανώνουν τα μικροϊνίδια της ακτίνης στα κύτταρα Swiss-3T3 και DU-145, όπως η Testo-BSA, ή να καταστείλλουν τη δράση του παράγοντα στα κύτταρα. Ειδικότερα τα

κύτταρα επώαστηκαν με τα CPAbs παρουσία ή όχι της Testo-BSA, ακολούθησε εφαρμογή έμμεσου ανοσοφθορισμού με τη χρήση ροδαμίνης-φαλλοιδίνης για παρατήρηση των κυττάρων στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Η μέθοδος επιτρέπει την παρατήρηση μόνο της πολυμερούς ακτίνης γιατί βασίζεται στην ειδική σύνδεση της φαλλοιδίνης με τα μικροϊνίδια της πολυμερούς ακτίνης (284) με ταυτόχρονο φθορισμό της ροδαμίνης. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.5**, η επίδραση με τα CPAbs έχει ως αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση των ινιδίων ακτίνης κάτω από την κυτταρική μεμβράνη. Φάνηκε ότι το 2C6 και το 10D2 παρουσία της Testo-BSA προκαλούν ήπιο αποπολυμερισμό, με την πολυμερισμένη ακτίνη να περιορίζεται στην περιφέρεια, ενώ στο κύριο σώμα του κυττάρου απουσιάζουν τα ινίδια του στρες (stress fibers). Φάνηκε επομένως να αναστέλλουν τη δράση της Testo-BSA στο πλέγμα της ακτίνης. Αντιθέτως απουσία της Testo-BSA, επάγουν περιορισμένου βαθμού αναδιοργάνωση της σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου, τα κύτταρα εμφανίστηκαν επιμήκη, με παράλληλη κατανομή των μικροϊνιδίων της ακτίνης, χαρακτηριστικό της εμφάνισης των ινιδίων του στρες. Η μεταβολή στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που παρατηρήθηκε από τα CPAbs βρίσκεται σε συμφωνία με το φαινόμενο της απόπτωσης.



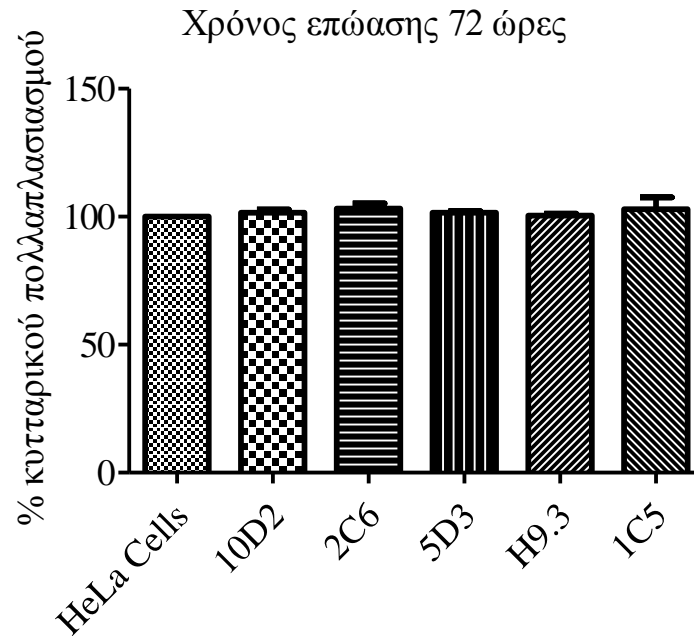
**Εικόνα 4.5** Έλεγχος των CPAbs ως προς την αναδιοργάνωση *in vitro* του πλέγματος της ακτίνης σε κύτταρα Swiss-3T3 και DU-145. Τα κύτταρα προ-επωάστηκαν 24 ώρες απουσία ορού και επωάστηκαν στη συνέχεια με τα CPAbs για 2 ώρες παρουσία ή όχι της Testo-BSA. Ακολούθως μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε επισήμανση με αντίσωμα Alexa-488 (πράσινο), ροδαμίνη-φαλοϊδίνη (κόκκινο) και DAPI (μπλε).

#### 4.6 Επίδραση των CPAbs στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Σε αυτή τη φάση ελέγχθηκε επιπλέον η ικανότητα των CPAbs να επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa με δοκιμασία MTS. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα HeLa (απουσία ή παρουσία ορού στην καλλιέργεια) επώαστηκαν με τα CPAbs (100μg/ml) για διαφορετικούς χρόνους (12, 24, 48 και 72 ώρες), ακολούθησε προσθήκη MTS για 4 ώρες και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 490 nm. Διαπιστώθηκε ότι τα CPAbs, είτε απουσία είτε παρουσία ορού στην καλλιέργεια των HeLa, δεν επηρεάζουν σημαντικά τον πολλαπλασιασμό τους (**Εικόνα 4.6**).

Προκειμένου να αξιολογηθεί σφαιρικά η διεισδυτική ικανότητα των τριών αντισωμάτων, κρίθηκε απαραίτητο, παράλληλα με την παραπάνω δοκιμασία MTS, να ελεγχθεί η πιθανή αρνητική επίδρασή τους στην κυτταρική λειτουργία. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HeLa επώαστηκαν με τα διεισδυτικά mAbs 10D2, 5D3A8, 2C6 καθώς και με τους αρνητικούς μάρτυρες H9.3 και 1C5 σε συγκέντρωση 100 μg/ml και σε ίδιους χρόνους με τις προηγούμενες δοκιμασίες (12, 24, 48 και 72 ώρες). Η συγκέντρωση που επιλέχθηκε είναι εκείνη που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα διείσδυσης, ώστε να αποδειχθεί με βεβαιότητα η επίδραση ή όχι των αντισωμάτων στην επιβίωση των κυττάρων. Μετά την επώαση έγινε εκτίμηση του ποσοστού νεκρών κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επώαση κυττάρων με τα CPAbs δεν προκαλεί αυξημένο ποσοστό νέκρωσης στις συνθήκες της *in vitro* κυτταροκαλλιέργειας, συγκριτικά με αυτό που παρατηρείται όταν τα κύτταρα επώάζονται με τους αρνητικούς μάρτυρες. Έτσι, επιβεβαιώνεται ότι το φαινόμενο της διείσδυσης που περιγράφεται εδώ, συμβαίνει αποκλειστικά σε ζώντα κύτταρα.





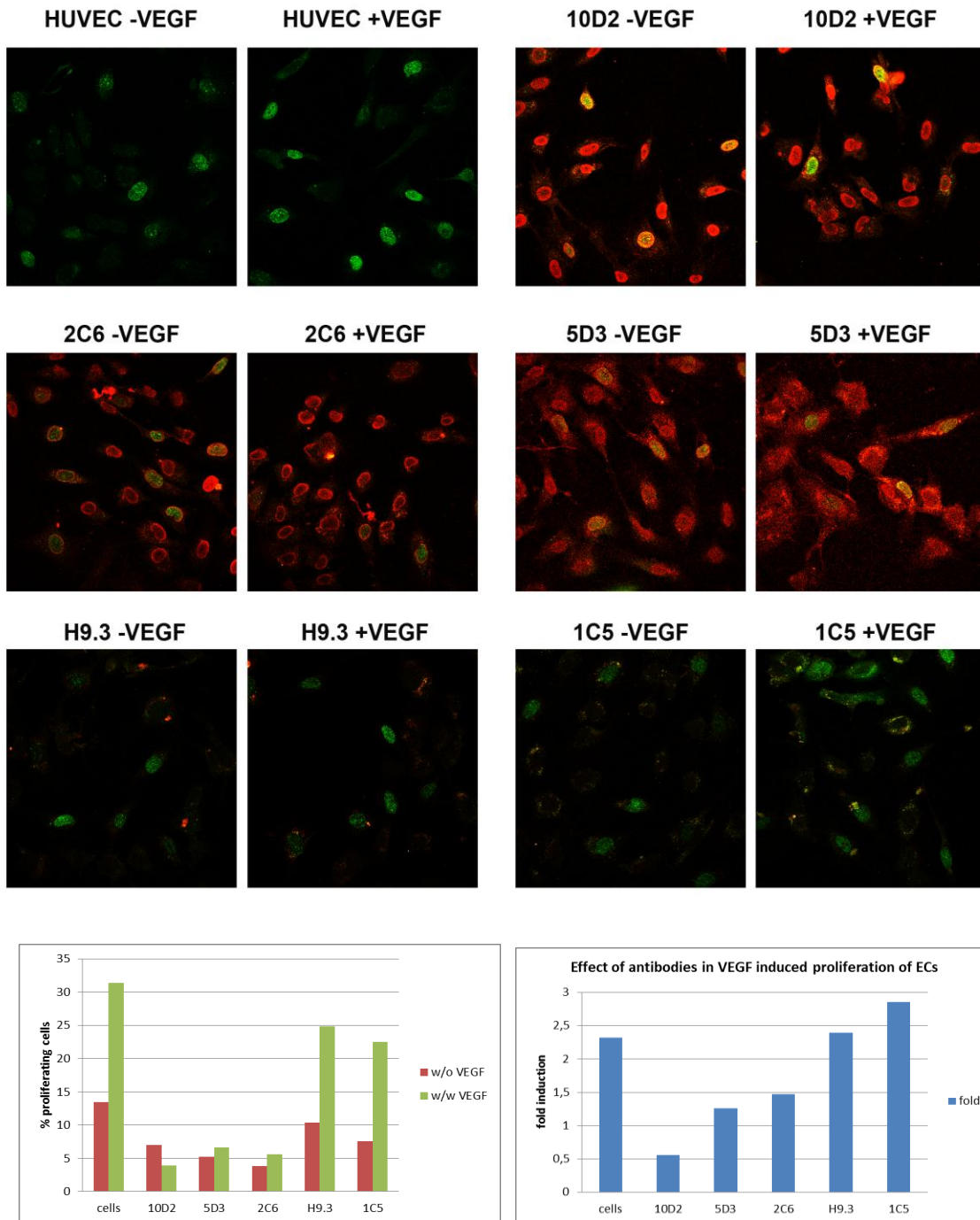
**Εικόνα 4.6** Ποσοστά κυτταρικού πολλαπλασιασμού των HeLa μετά από επώαση με τα mAbs. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τα αντισώματα (100μg/ml) για 24, 48 και 72 ώρες. Τα ποσοστά καθορίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του MTS. Οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τυπικές αποκλίσεις από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

## 5. Επίδραση των CPAbs στην αγγειογένεση

Στην τελευταία φάση της διατριβής μελετήθηκε ο ρόλος των (επαγωγικός ή κατασταλτικός) στην αγγειογένεση σε σύγκριση με τον αγγειακό ενδοθηλιακό παράγοντα ανάπτυξης VEGF. Έχει διαπιστωθεί ότι στον ορό ασθενών με ΣΕΛ, η αγγειογενετική δραστηριότητα είναι αυξημένη σε σύγκριση με εκείνη των υγιών μαρτύρων. Αυτή η υψηλή αγγειογενετική δραστηριότητα συνδέεται με νεφρικές επιπλοκές και με την παρουσία αντι-dsDNA αντισωμάτων, ευρήματα τα οποία υποδηλώνουν την εμπλοκή της διαταραχής της αγγειογένεσης στην παθογένεια του ΣΕΛ. Όλα τα αντι-dsDNA αντισώματα λόγω του υψηλού αριθμού βασικών αμινοξέων που περιέχουν στη μεταβλητή περιοχή, έχουν την ικανότητα να αντιδρούν εκτός από το dsDNA και με θεϊκές αμινογλυκάνες, όπως διάφορα παράγωγα της ηπαρίνης που βρίσκονται στις μεμβράνες όλων των κυττάρων των θηλαστικών. Αυτή η ιδιότητα χαρακτηρίζει επίσης τον VEGF, ο οποίος έχει θεμελιώδη ρόλο στη θετική ρύθμιση της φυσιολογικής και της παθολογικής αγγειογένεσης. Ο VEGF επάγει τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και τελικά τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων για την δημιουργία ενός καινούριου αγγείου.

### 5.1 Στον πολλαπλασιασμό κυττάρων HUVEC, είτε παρουσία, είτε απουσία VEGF

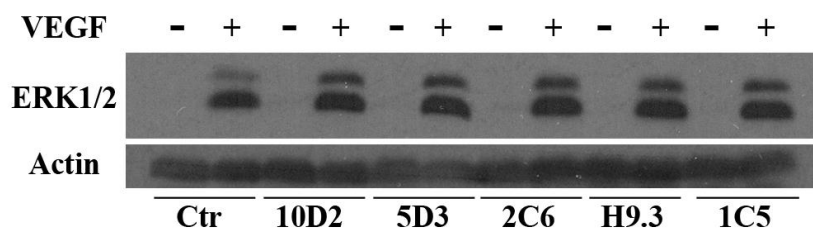
Πιο συγκεκριμένα τα αντισώματα δοκιμάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC, όπως ο VEGF, ή να καταστείλουν τη δράση του παράγοντα σε αυτή την κυτταρική σειρά. Για να μελετήσουμε την δράση τους στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία βρωμοδεόξυ-ουριδίνης (BrdU) σε δυο διαφορετικές συγκέντρωσεις του αντισώματος (100, 200μg/ml), ώστε να βρεθούν οι άριστες συνθήκες, είτε παρουσία, είτε απουσία VEGF. Τα CPAbs ανέστειλαν σημαντικά την ενσωμάτωση BrdU στα κύτταρα HUVECs επαγόμενα από VEGF (2,5 ng/ml) για 24 ώρες: 4 φορές το 10D2 , 2 φορές το 5D3 και 2 φορές το 2C6 σε σχέση με τα κύτταρα HUVECs επαγόμενα από VEGF. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση της ενσωμάτωσης BrdU και απουσία του VEGF. Φαίνεται λοιπόν ότι τα CPAbs δεν αναστέλλουν μόνο τον επαγόμενο πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά και τα βασικά επίπεδα πολλαπλασιασμού (**Εικόνα 5.1**). Πιο συγκεκριμένα, στη συγκέντρωση των 200μg/ml των CPAbs παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αναστολή στον αριθμό των BrdU-θετικών κυττάρων: το 10D2 (4 % παρουσία VEGF έναντι 9% απουσία του), το 2C6 (6,5 % παρουσία VEGF έναντι 6,8% απουσία του) και το 5D3 (7,9 % παρουσία VEGF έναντι 7,8 % απουσία του) κατά 0,5, 0,9 και 1 φορά αντίστοιχα σε σχέση με τα κύτταρα (18% παρουσία VEGF έναντι 36% απουσία του) (**Εικόνα 5.1**). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα CPAbs αναστέλλουν σημαντικά την ενσωμάτωση της BrdU σε σύγκριση με τα κύτταρα που είχαν συνεπωαστεί με μη διεισδυτικά αντισώματα, τα οποία έδειξαν παρόμοια ποσοστά πολλαπλασιασμού με αυτά των κυττάρων-μάρτυρες.



**Εικόνα 5.1** Τα CPABs αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Μετά το πέρας 48 ωρών, τα κύτταρα HUVEC υπέστησαν στέρηση ορού για 18 ώρες (παρουσία ή απουσία CPABs) και ακολούθησε επαγωγή με VEGF για 24 ώρες. Οι καλλιέργειες εκτέθηκαν είτε μόνο σε θρεπτικό υλικό είτε μόνο στον VEGF (2,5 ng/ml), είτε μόνο σε CPABs (100 µg/ml) είτε σε VEGF και CPABs για 24 ώρες. Μετά από 24 ώρες, χορηγήθηκε BrdU (100µM) για 6 ώρες και τα κύτταρα αφού επεξεργάστηκαν με ανοσοφθορισμό με αντίσωμα Alexa-488 (κοκκίνη χρώση) για τον εντοπισμό των CPABs και αντι-BrdU (πράσινη χρώση) για τον εντοπισμό των κυττάρων που πολλαπλασιάζονται, μελετήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Η επικάλυψη των εικόνων φαίνεται σε κλίμακα 20µm. Στα γραφήματα παρουσιάζονται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων (κάτω πλαίσιο) που εκφράστηκε ως % ποσοστό θετικών κυττάρων για την ενσωμάτωση της BrdU σε σχέση με τον ολικό αριθμό κυττάρων τα οποία εκφράζουν CPABs.

## 5.2 Στο σηματοδοτικό μονοπάτι των κινασών Erk1/2

Από τη διεθνή βιβλιογραφία είναι γνωστή η συμμετοχή των MAP-κινασών σε διαδικασίες που αφορούν στη μετανάστευση και στη διαφοροποίηση πολλών τύπων κυττάρων. Παράλληλα, τα CPAbs, ανέστειλαν την δραστικότητα του VEGF και έτσι δημιουργείται το ερώτημα εάν τα μιτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια του και ειδικότερα αυτό των Erk1/2 MAPK κινασών είναι σημαντικά για την αντιπολλαπλασιαστική δράση των CPAbs. Έτσι, η ενότητα αυτή στοχεύει να απαντήσει στο ερώτημα εάν εξαρτάται η αναστολή του πολλαπλασιασμού από την μεταγωγική οδό CPAbs/Erk1/2. Για τους λόγους αυτούς, θελήσαμε να ελέγξουμε το εάν τα CPAbs επηρεάζουν την ενεργοποίηση των κινάσων Erk1/2. Προσδιορίστηκε η επίδραση των CPAbs στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των Erk1/2 έπειτα από ανάλυση κατά Western με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των φωσφορυλιωμένων Erk1/2 στη θέση Thr202/Tyr204, Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.5.2, στα κύτταρα HUVEC, τα CPAbs δεν επηρεάζουν την ενεργοποίηση των κινάσων Erk1/2. Επιπλέον έχουν αναφερθεί, ο TGF- $\beta$ , και κατ' επέκταση η ακτιβίνη A, να ενεργοποιούν και άλλους διαμεσολαβητές, οι οποίοι θα μπορούσαν να συμμετέχουν στην αντιπολλαπλασιαστική δράση. Έτσι, το άλλο ερώτημα της ενότητας αυτής στοχεύει στην διαλεύκανση της συμμετοχής άλλων ανεξάρτητων μονοπατιών στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων από τα CPAbs.



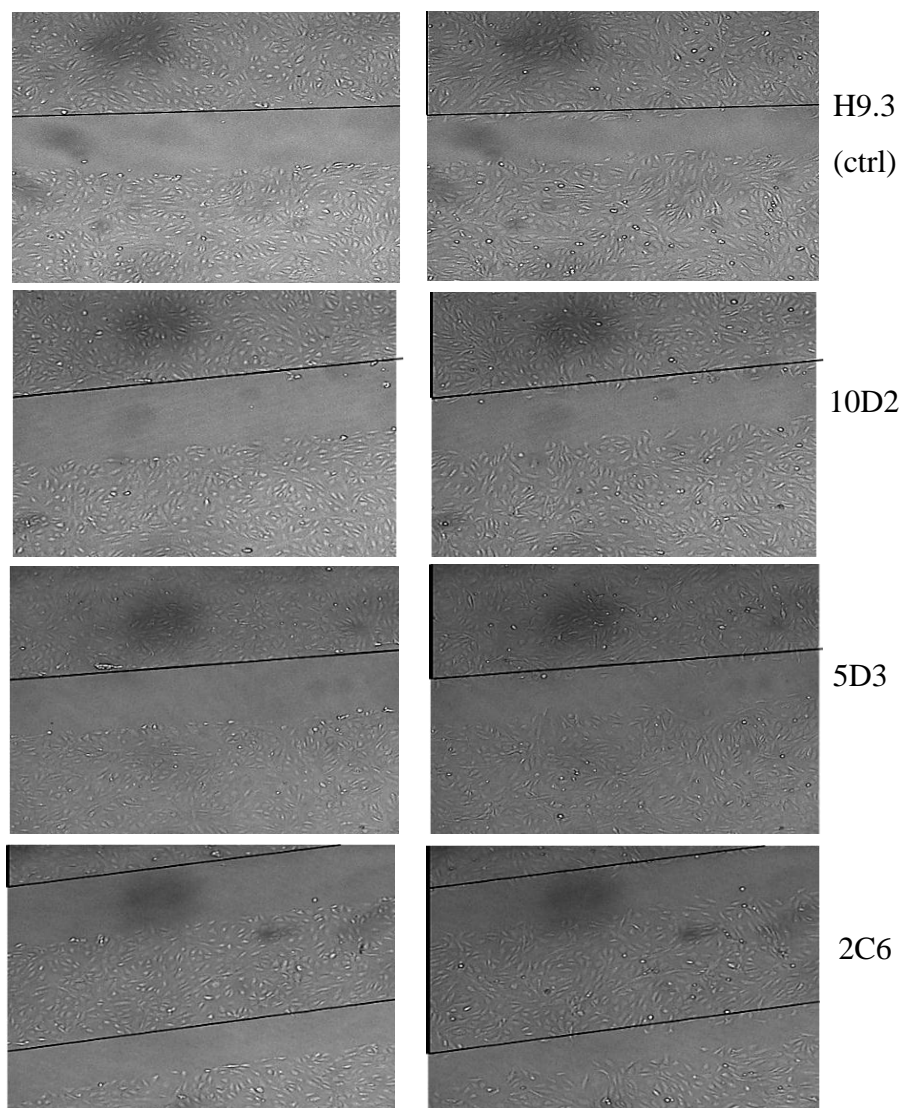
**Εικόνα 5.2** Τα πεπτίδιο CPAbs δεν καταστέλλουν την ενεργοποίηση των κινασών Erk1/2 στα κύτταρα HUVEC. Κύτταρα επώαστηκαν για 15 min με CPAbs (100μg/ml). Μετά τη λύση των κυττάρων, την απομόνωση του ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών και την ανάλυση με ανοσοαποτύπωση, προσδιορίστηκε η ενεργοποίηση των κινασών Erk1/2 με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης Thr202/Tyr204. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Η ανίχνευση της έκφρασης των φωσφορυλιωμένων μορφών ERK1/2 (p-p44/42) έγινε με ειδικό αντίσωμα φωσφο-p44/p42.

## 5.3 Στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων

Με δεδομένη τη δράση των CPAbs στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, θελήσαμε να διερευνήσουμε την δράση τους στην μετανάστευσή τους. Τα ενδοθηλιακά

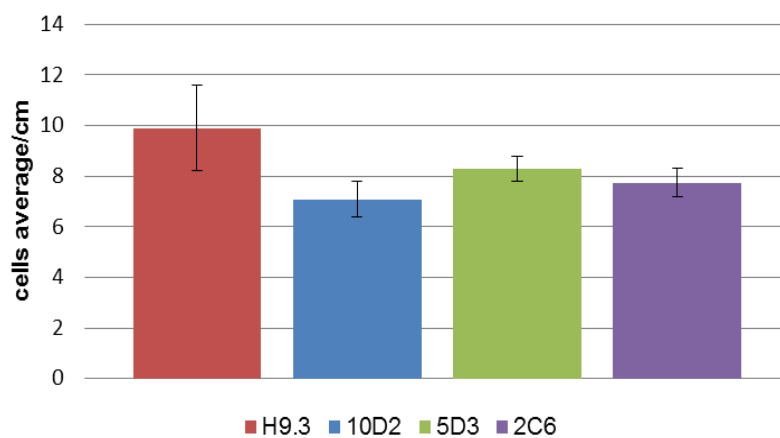
κύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλή κινητική ενεργότητα, και αυτή τους η λειτουργία είναι πολύ σημαντική για τη διατήρηση της αγγειακής πλαστικότητας. Η μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε καλλιέργεια μπορεί να ρυθμιστεί με τον αυξητικό παράγοντα VEGF. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα όπου η επιφάνεια κυττάρων HUVEC σε καλλιέργεια είχε τραυματιστεί. Η παρουσία του μονοκλωνικού μάρτυρα H9.3 (100  $\mu\text{g/ml}$ ) ώθησε τα κύτταρα να μετακινηθούν προς την κατεύθυνση της τραυματισμένης περιοχής. Τα αποτελέσματα στην **εικόνα 5.3** δείχνουν ότι την παρουσία CPAbs προκαλείται μείωση του αριθμού κυττάρων που μετακινούνται στην τραυματισμένη περιοχή με πιο ισχυρό το 10D2, ακολουθεί το 2C6 και τέλος το 5D3. Όπως φαίνεται τα μονοκλωνικά 10D2, 2C6 και 5D3 μειώνουν τη μετανάστευση των κυττάρων HUVEC κατά 30%, 23% και 18%, αντίστοιχα σε σχέση με το μάρτυρα. Επιπλέον, είναι φανερό ότι τα CPAbs μείωσαν και τη βασική μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων που παρατηρείται απουσία VEGF.

A)



B)

## migration assay



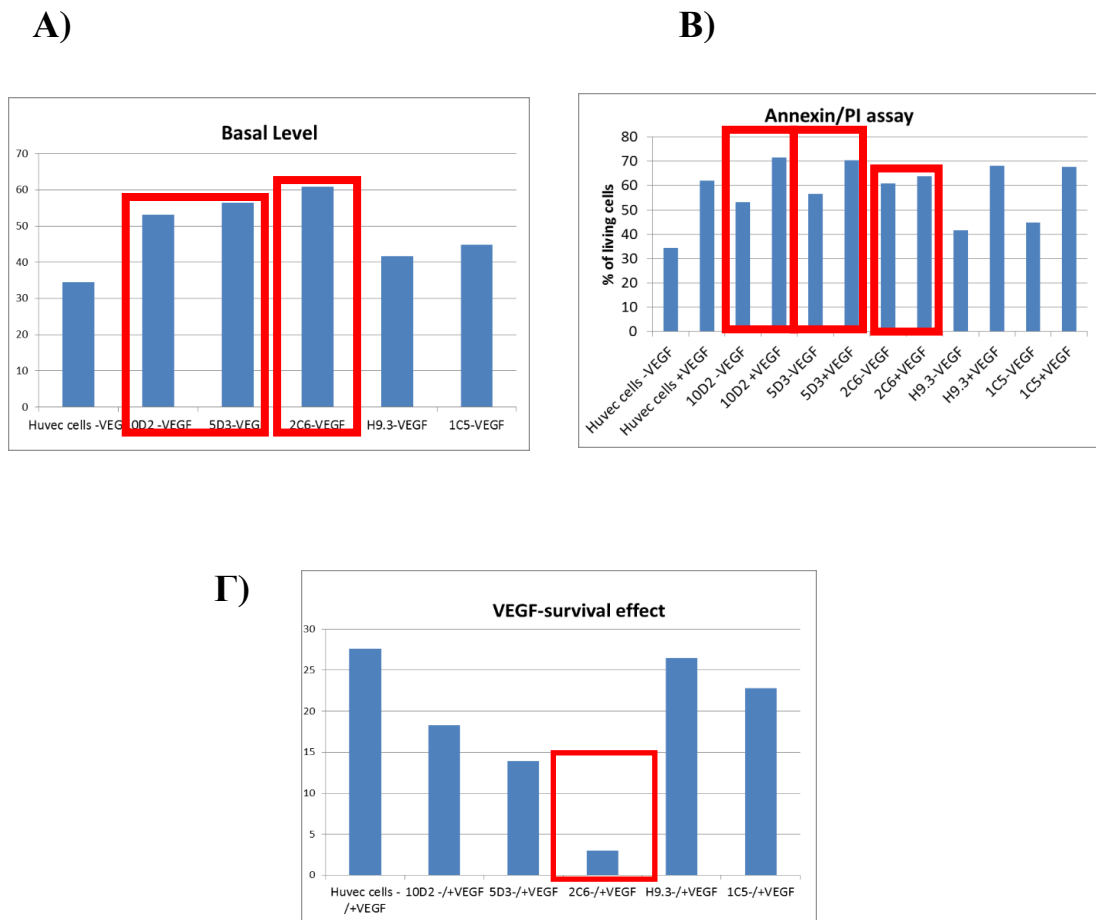
**Εικόνα 5.3** Τα CPAbs αναστέλλουν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πλήρες ταπήτιο HUVEC κυττάρων χαράχτηκε ελαφρά με το πλαστικό ρύγχος πιπέττας. Οι τραυματισμένες καλλιέργειες εκτέθηκαν στο H9.3 (μάρτυρας) και στα τρία CPAbs (10D2, 5D3, 2C6) (100 µg/ml) για 8 ώρες. Τα κύτταρα τα οποία πέρασαν στην τραυματισμένη περιοχή μετρήθηκαν και εκφράστηκαν ως

αριθμός κυττάρων/ cm τραυματισμένης περιοχής. Τέσσερα πεδία μετρήθηκαν για κάθε πειραματική διαδικασία (περίπου 300 κύτταρα σε κάθε πείραμα).

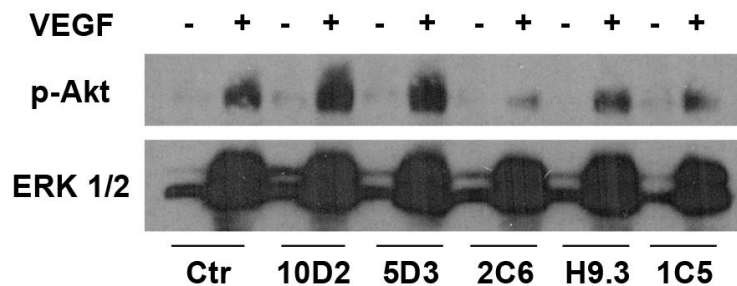
#### 5.4 Στην απόπτωση σε κύτταρα HUVEC *in vitro*

Για να πιστοποιήσουμε ότι τα CPAbs ασκούν τη βιολογική τους δράση άμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση, χωρίς να επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων, πραγματοποιήσαμε πειράματα ελέγχου της κυτταροτοξικότητας. Στη συνέχεια, ποσοτικοποιήσαμε την ικανότητα τους σε σχέση με τον VEGF, ο οποίος δρα ως παράγοντας επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (Flow cytometry Assay, FACS), μετά από σήμανση με αννεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο. Οι αρχές της δοκιμασίας περιγράφονται στο κεφ. *Υλικά και Μέθοδοι*. Για να διερευνήσουμε την επίδραση των CPAbs στην επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, είτε παρουσία, είτε απουσία του VEGF, εξετάσαμε την επίδραση τους σε δυο διαφορετικές συγκέντρωσεις του αντισώματος (100, 200μg/ml), μετά από στέρηση ορού. Απόσυρση του ορού είναι γνωστό ότι επάγει απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία είναι αναστρέψιμη με την προσθήκη του VEGF. Πράγματι, ενώ το 34% των HUVECs ήταν αποπτωτικά, όντας υποδιπλοειδείς σε FACS ανάλυση, μετά από στέρηση ορού (σε 5% FCS), η συνεπώαση/θεραπεία με VEGF για 18 ώρες διασωθεί σχεδόν το 62% (6% αποπτωτικά κύτταρα) των κυττάρων από απόπτωση. Τα 10D2 (53% απουσία VEGF έναντι 72% παρουσία του) και 5D3 (57% απουσία VEGF έναντι 70% παρουσία του) φάνηκε να δρουν συνεργιστικά με το VEGF και να αυξάνουν την επιβίωση των κυττάρων (**Εικόνα 5.4 Β**), ενώ το 2C6 όχι γιατί αυξάνει τόσο από μόνο του το βασικό επίπεδο επιβίωσης των κυττάρων (61% απουσία VEGF έναντι 64% παρουσία του) (**Εικόνα 5.4 Γ**). Αξίζει να σημειωθεί ότι το βασικό επίπεδο επιβίωσης των κυττάρων HUVEC απουσία VEGF αυξάνεται σημαντικά και με τα τρία CPAbs (**Εικόνα 5.4 Α**). Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα, το μονοπάτι του VEGF υπεύθυνο για την επαγωγή της επιβίωσης των ενδοθηλιακών είναι αυτό της PI3K/ Akt (285). Ενεργοποίηση της PI3K έχει ως αποτέλεσμα σε πολλές περιπτώσεις την επαγωγή του μονοπατιού PI3K/Akt που αποτελεί σημαντικό αντι-αποπτωτικό μονοπάτι των κυττάρων. Προκειμένου να ελέγξουμε αν τα CPAbs επηρεάζουν το μονοπάτι αυτό, ελέγξαμε την επίδραση τους στη φωσφορυλίωση της Akt με ανοσοαποτύπωση κατά Western σε κύτταρα HUVEC. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5.5**, στα κύτταρα HUVEC, τα 10D2 και 5D3 δρουν συνεργιστικά με το VEGF αυξάνοντας σημαντικά την φωσφορυλίωση της Akt. Τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν συνάδουν με αυτά από τον έλεγχο της επιβίωσης των

ενδοθηλιακών κυττάρων, επιβεβαιώνοντας τη συνεργιστική δράση των CPABs με τον παράγοντα VEGF.



**Εικόνα 5.4** Τα CPABs δεν προκαλούν απόπτωση στα κύτταρα HUVEC. Ενδοθηλιακά κύτταρα καλλιεργήθηκαν τα αντισώματα παρουσία (B) ή απουσία (A,B) VEGF και 18 h μετά προσδιορίστηκε ο αριθμός των απαντητικών κυττάρων με χρήση FACS ανάλυσης. Στο γράφημα (Γ) αντιπροσωπεύεται το % ποσοστό της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από επαγωγή με VEGF (-/+VEGF). Τα αποτελέσματα είναι η μέση τιμή ± το τυπικό σφάλμα από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα.



**Εικόνα 5.5** Τα CPABs επάγουν την φωσφορυλίωση της Akt σε κύτταρα HUVEC, δρώντας συνεργιστικά με τον VEGF. Κύτταρα επώαστηκαν για 15 min με CPABs (10D2,5D3,2C6) mAbs



(H9.3,1C5) παρουσία (+) ή απουσία (-) VEGF. Μετά τη λύση των κυττάρων, την απομόνωση του ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών και, ανάλυση κατά Western, προσδιορίστηκε η ενεργοποίηση της Akt με ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης Akt. Οι ολικές Erk1/2 χρησιμοποιήθηκαν ως πρωτεΐνη μάρτυρας. Τα αποτελέσματα είναι η μέση τιμή  $\pm$  το τυπικό σφάλμα από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$

## *Συζήτηση-Συμπεράσματα*

## V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αντισώματα με ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα (CPAbs) που ανευρίσκονται στον ορό ασθενών με ΣΕΛ και σε ποντικούς με πειραματική νόσο, είναι γνωστά από το 1978. Τα αντισώματα αυτά συσσωρεύονται κυρίως στον πυρήνα του κυττάρου και είναι πολυδραστικά αναγνωρίζουν δηλαδή εντελώς διαφορετικά -από άποψη δομής- αντιγόνα όπως νουκλεϊνικά οξέα, πρωτεΐνες και απτένια. (64, 88). Αρχικά, το ερευνητικό ενδιαφέρον είχε στραφεί τόσο στον μηχανισμό εισόδου τους στα κύτταρα (μέσω ενδοκυττάρωσης), όσο και στη συμμετοχή τους σε βιολογικές διαδικασίες (κυτταρικός πολλαπλασιασμός, απόπτωση, υδρόλυση του DNA), χωρίς όμως μέχρι σήμερα αυτά να έχουν αποσαφηνιστεί. Η γρήγορη διείσδυση και συσσώρευση στον πυρήνα οδήγησε στη χρήση πεπτιδίων των μονοκλωνικών CPAbs που προέρχονταν από συνδυασμό των υπερμεταβλητών τους περιοχών CDR2 και CDR3, ως φορέων ποικίλων δραστικών βιομορίων. Όμως, η *in vivo* χρήση τους εμφανίζει αρκετά μειονεκτήματα, αφού έχουν μικρό χρόνο ημιζωής, παρουσιάζουν συχνά τοξικότητα, και διαχέονται τοπικά στο σημείο της χορήγησης στο ανθρώπινο σώμα, τα οποία δεν συμβαίνουν με τη χρήση ολόκληρων αυτοαντισωμάτων, τα οποία αποτελούν συστατικά του εαυτού.

Με βάση τα παραπάνω, η παρούσα διατριβή προσανατολίστηκε στην εκ νέου δημιουργία μονοκλωνικών CPAbs για την καταρχήν ενδεδεχθή μελέτη τους, σε ότι αφορά την βαθύτερη κατανόηση του τρόπου εισόδου και δράσης τους μετά την κυτταροδιείσδυση. Απώτερος στόχος ήταν η αξιοποίησή τους ως θεραπευτικών εργαλείων στη βιοϊατρική. Για το λόγο αυτό παρήχθησαν τα συγκεκριμένα mAbs στο εργαστήριο Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, από μη ανοσοποιημένα ποντίκια (NZBxNZW) F1, τα οποία εμφανίζουν αυθόρμητα λύκο.

### 1. Απομόνωση και χαρακτηρισμός CPAbs

Σ' ένα πρώτο στάδιο της διατριβής βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες παραγωγής και απομόνωσης των mAbs, τα οποία κατόπιν χαρακτηρίστηκαν ως προς τις βιοχημικές και ανοσολογικές τους ιδιότητες. Επιλέχθηκαν συνολικά, πέντε υβριδώματα από ποντίκια με αυθόρμητο λύκο, τρία από τα οποία εκκρίνουν CPAbs (δύο IgG2a: **10D2**, **2C6** και ένα IgG2b: **5D3A8**) και δύο εκκρίνουν μη διεισδυτικά mAbs (ένα IgG2a: H9.3 και ένα IgG2b: 1C5). Τα υβριδώματα αυτά έτυχαν μεγάλης προσοχής σε ότι αφορά την ανάπτυξη τους προκειμένου να μην παρευρίσκονται στο μεσο τυχόν προσμίξεις από ανοσοσφαιρίνες ζώου που επίσης περιεχει πολυδραστικές ανοσοσφαιρίνες που θα μπορούσαν να

διαστρεβλώνουν την εικόνα, όπως και τη μεγαλύτερη δυνατή παραγωγή. Το καθένα από τα τρία CPAbs (10D2, 2C6 και 5D3A8) χαρακτηρίζεται από διαφορετικό προφίλ διείσδυσης και διαφορετικές ανοσοχημικές ιδιότητες. Εκτός του αρνητικού μάρτυρα mAb H9.3, όλα τα υπόλοιπα αντισώματα βρέθηκαν να εκφράζουν ένα διακριτό πρότυπο πολυδραστικότητας έναντι όλων των αντιγόνων της μελέτης. Τα 10D2, 5D3A8, 2C6 και H9.3 αναγνωρίζουν κυρίως το pDNA και τις ιστόνες, σε διαφορετικό ωστόσο βαθμό (ELISA), ενώ το 1C5 αναγνωρίζει κυρίως την ακτίνη. Βιβλιογραφικά, η πολυδραστικότητα αποτελεί βασική προϋπόθεση της δράσης των διεισδυτικών αυτοαντισωμάτων και μάλιστα, όπως και στην περίπτωση μας, η συγγένεια των CPAbs έναντι των αντιγονικών επιτόπων ποικίλλει (8, 64), (62). Αξίζει να σημειωθεί πως από την ELISA η συγγένεια των mAbs είναι ενδεικτική με βάση το 50% της πρόσδεσης μόνο για να επιβεβαιώσουμε σίγουρα την υψηλή συγγένεια τους για το dsDNA χρησιμοποιήσαμε τη δοκιμασία Farr, από όπου τα 10D2 και H9.3 χαρακτηρίστηκαν από υψηλότερη συγγένεια για το dsDNA σε σχέση με τα υπόλοιπα.

Τα διεισδυτικά αυτά mAbs εμφανίζουν τα κύρια χαρακτηριστικά των φυσιολογικών αντισωμάτων, αναγνωρίζουν δηλαδή μόρια διαφορετικής δομής και κωδικοποιούνται από γονίδια της βλαστικής σειράς (με λίγες ή καθόλου μεταλλάξεις), όπως έδειξε ανάλυση της γονιδιακής αλληλουχίας των μεταβλητών περιοχών των βαριών και ελαφριών αλυσίδων, σε παράλληλη μελέτη του εργαστηρίου. Μάλιστα, οι υπερμεταβλητές ακολουθίες CDR2 και CDR3 των αντισωμάτων φάνηκαν να περιλαμβάνουν υψηλό ποσοστό τυροσινών και θετικά φορτισμένων αμινοξέων όπως λυσίνες (K) και αργινίνες (R), τα οποία με βάση τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετίζονται με την ικανότητα διείσδυσης πολυδραστικών CPAbs (23, 65). Εντούτοις, στην αμινοξική αλληλουχία δεν εντοπίζονται χαρακτηριστικά μοτίβα RKK που αποτελούν σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS, Nuclear localization Signal) (23, 64)

## 2. Μηχανισμός διείσδυσης των CPAbs

Με ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία, επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών διείσδυσης των CPAbs σε μία σειρά από καρκινικές κυτταρικές σειρές. Διαπιστώθηκε πως για το σύνολο των αντισωμάτων της μελέτης, η επώασή τους με τα κύτταρα για 2 ώρες στους 37°C και σε συγκέντρωση 100 μg/ml, ήταν επαρκής για τη διείσδυσή τους στον πυρήνα. Ειδικότερα, το CPAb 10D2 που διαθέτει ισχυρή αντι-DNA δραστηριότητα, εντοπίστηκε στον πυρήνα των κυττάρων HeLa σε ιδιαίτερα σύντομο

χρονικό διάστημα (3 λεπτά) από την προσθήκη του στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Από την άλλη πλευρά, το γεγονός ότι τα CPAbs διεισδύουν σε όλες τις υπό εξέταση κυτταρικές σειρές, υποδηλώνει πως αυτά δεν χαρακτηρίζονται από «εκλεκτικότητα» ως προς το είδος του κυττάρου στο οποίο δύνανται να εισχωρήσουν πολύ πιθανά λόγω απουσίας εξειδικευμένων υποδοχέων πρόσδεσης. Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα μονοκλωνικά αντισώματα δεν έχασαν την ικανότητα διείσδυσής τους ακόμη και παρουσία αναστολέων της ενδοκυττάρωσης ή σε θερμοκρασία 4°C, όπου ο μεταβολισμός των κυττάρων βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα. Αποκλείεται συνεπώς η ύπαρξη μη ειδικού μηχανισμού εισόδου των αντισωμάτων στο κύτταρο όπως είναι η ενδοκυττάρωση. Αντιθέτως, τα μέχρι σήμερα δεδομένα στη βιβλιογραφία, υποστηρίζουν ότι η διείσδυση επιτυγχάνεται μέσω ειδικού μηχανισμού που προϋποθέτει ενδεχομένως συγκεκριμένους υποδοχείς ή αντιγονικούς καθοριστές στην κυτταρική μεμβράνη (62, 65, 286). Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί τα αντι-dsDNA Abs να εισέρχονται σε ανθρώπινα κύτταρα είτε μέσω ενδοκυττάρωσης, μιας είτε μέσω μορίων κλαθρίνης (clathrin mediated endocytosis, CME) είτε μέσω καβεολίνης και λιπιδίων (caveolae/lipid-raft-mediated endocytosis) (63, 85, 89-91, 287). Σε ελάχιστες όμως μελέτες αναφέρονται CPAbs να εισέρχονται στα κύτταρα χωρίς να απαιτείται ενέργεια, όπως το αντι-dsDNA 9D7, mAb21 and 5B5, που προέκυψαν από ποντικούς MRL-lpr/lpr (62, 288). Φαίνεται, επομένως, ότι σε ασθενείς με ΣΕΛ δύνανται να υπάρχουν στην κυκλοφορία CPAbs που διεισδύουν στα κύτταρα, μέσω ενεργειακά-εξαρτώμενων και -ανεξάρτητων μηχανισμών, γεγονός που ενισχύει τη διαγνωστική για τη νόσο αξία τους. Η ενεργειακά ανεξάρτητη εσωτερίκευση μορίων σε ζώντα κύτταρα είναι μια καλά τεκμηριωμένη διαδικασία (289, 290) και χαρακτηρίζει πεπτίδια που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη (CPPs) και δομικές αλληλουχίες μεταγωγής πρωτεϊνών (PTDs), τα οποία παρέχουν τη βάση για την ανάπτυξη νέων μεθόδων εισαγωγής δραστικών μορίων στα κύτταρα (291-296). Ο μεγαλύτερος όγκος μελετών αφορά ως τώρα διεισδυτικά πεπτίδια, τα οποία προέρχονται, είτε από τις CDR2/CDR3 περιοχές των βαρέων αλυσίδων διεισδυτικών αντισωμάτων, είτε από τμήματα άλλων πρωτεϊνών όπως η Tat του ιού HIV (297), η VP-22 του HSV (298) ή απλά πολυπεπτίδια αργινίνης (289).

Οι διαφορές στη δομή μεταξύ των διαφορετικών CPAbs φαίνεται να καθορίζουν τη διεισδυτική τους συμπεριφορά στα ανθρώπινα κύτταρα και κατά συνέπεια τον παθολογικό τους ρόλο (288). Στην ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης, τα κυστίδια ωριμάζουν μέσα από μια σειρά γεγονότων, είναι μια διαδικασία που απαιτεί ενέργεια, καθώς προϋποθέτει τη δράση συμπλόκων πρωτεϊνών και κυτταροσκελετικές αναδιατάξεις για το σχηματισμό

κοιλότητας, την εγκόλπωση και την απόσχιση των κυστιδίων που μεταφέρουν τα μόρια εντός του κυττάρου (299). Ορισμένα CPAbs πιθανόν να μην διαθέτουν την κατάλληλη δομή ώστε να υλοποιούν αυτές τις μεμβρανικές ανακατατάξεις και κατά συνέπεια να απαιτούν ενεργειακά-εξαρτώμενη ενδοκύττωση για να εισέρχονται στα ανθρώπινα κύτταρα. Άλλα CPAbs, όπως τα 5D3, 2C6, και 10D2, είναι ικανά να σχηματίζουν κοιλότητες στη μεμβράνη, χωρίς να απαιτείται ενέργεια, όπως τα CPPs και PTDs (290), πιθανώς επειδή μοιράζονται περιοχές με παρόμοια λειτουργία. Πράγματι, έχει προταθεί ότι στη "φυσική ενδοκύττωση" μπορεί να σχηματίζονται κοιλότητες στη μεμβράνη επειδή τα φωσφολιπίδια αναγκάζονται να συμπυκνώθουν όταν τα κατάλοιπα αργινίνης συνδέονται με τις φωσφολιπιδικές κεφαλές επί της εξωτερικής πτυχής των κυστιδίων (300). Είναι ενδιαφέρον ότι το αντι-dsDNA Ab 9D7, είναι από τα ελάχιστα CPAbs που αναφέρθηκαν να διεισδύουν με ενεργειακά-ανεξάρτητο τρόπο, αποδίδοντας σημαντικό μέρος της διεισδυτικής του ικανότητας σε μετάλλαξη καταλοίπων αργινίνης στις CDR2 και CDR3 περιοχές της βαριάς αλυσίδας (288).

### **3. Ο ρόλος των πυρηνικών μορίων στη διεισδυτική ικανότητα των CPAbs**

Τα μονοκλωνικά CPAbs που απομονώνονται σε υπερκείμενα υβριδώματος εμφανίζουν συχνά ένα διαφορετικό προφίλ διείσδυσης σε σύγκριση με τα καθαρισμένα CPAbs. Η διαφορά αυτή θα μπορούσε να οφείλεται στην απουσία κυτταρικών συστατικών, πιθανά απαραίτητων για τη διείσδυση, τα οποία βρίσκονται στο υπερκείμενο της κυτταροκαλλιέργειας. Κυτταρικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες του κυτταρικού σκελετού ή συστατικά του πυρήνα (π.χ. DNA και ιστόνες) που υπάρχουν στο υπερκείμενο καλλιέργειας ως προϊόντα απόπτωσης ή νέκρωσης των υβριδωμάτων, ενδέχεται να υποβοηθούν αυτή τη διαδικασία συνδεδεμένα με το αντίσωμα. Μία χαρακτηριστική περίπτωση έχει αναφερθεί από τον L. Jacob και συνεργάτες, όπου παρατηρήθηκε πως η ικανότητα πρόσδεσης ενός αντι-DNA αντισώματος στην κυτταρική μεμβράνη επιτυγχάνεται μόνο όταν εκείνο είναι συνδεδεμένο με νουκλεοσώματα και όχι σε καθαρή μορφή (79). Επίσης, ο K. Kramers και συνεργάτες το 1996 περιέγραψαν τρία μονοκλωνικά αντισώματα που απομονώθηκαν από ποντίκια με σύνδρομο λύκου και αναγνώριζαν ισχυρά τα νουκλεοσώματα και πολύ λιγότερο τα συστατικά τους μόρια μεμονωμένα (DNA και ιστόνες). Η ικανότητα διείσδυσης των αντισωμάτων αυτών σε κύτταρα εξαρτιώταν αποκλειστικά από την παρουσία των νουκλεοσωμάτων, η δε εισχώρησή τους γινόταν μέσω κυστιδίων (301).

Σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στη διεισδυτική ικανότητα των mAbs 5D3 και 2C6 όταν αυτά εξετάζονταν στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών των υβριδωμάτων ή μετά την απομόνωσή τους με βιοχημικές ή ανοσοενζυμικές μεθόδους. Δεδομένου ότι τα νουκλεοσώματα και τα συστατικά τους (DNA και ιστόνες), βρίσκονται σε αφθονία στην κυκλοφορία στον ΣΕΛ, μελετήθηκε κατόπιν η επίδραση των συγκεκριμένων παραγόντων στη διεισδυτική ικανότητα των μονοκλωνικών CPAbs. Παρουσία των DHC, nDNA ή ιστονών, τα τρία CPAbs εμφάνισαν αυξημένη διεισδυτική ικανότητα και ιδιαίτερα το 5D3, που εμφανίζει χαμηλότερη συγγένεια για το nDNA και τις ιστόνες. Θα υποστηρίξουμε συνεπώς, ότι τα συγκεκριμένα μόρια βοηθούν τη διείσδυση των CPAbs και ειδικότερα εκείνων με χαμηλή δραστηριότητα έναντι των πυρηνικών στόχων. Μεταξύ αυτών των συστατικών, το DHC προκάλεσε την υψηλότερη αύξηση της διεισδυτικής ικανότητας και των τριών απομονωμένων CPAbs. Αυτό, ίσως, να οφείλεται στην παρουσία τόσο αρνητικών (DNA), όσο και θετικών (ιστόνες) φορτίων στο DHC, τα οποία ενισχύουν πιθανά την πρόσδεση των CPAbs στις κυτταρικές μεμβράνες ευνοώντας κατόπιν και τη διείσδυσή τους στα κύτταρα (302-304). Τα παραπάνω ευρήματα συνάδουν με τα αντίστοιχα μιας προηγούμενης ανεξάρτητης μελέτης στην οποία παρατηρήθηκε ότι το πλασμιδιακό DNA ενίσχυσε τη διεισδυτική ικανότητα των CPAbs (305).

Αν και τα απομονωμένα 5D3 και 2C6 εμφανίζουν διεισδυτική ικανότητα σημαντικά χαμηλότερη συγκριτικά με την αντίστοιχη των υπερκειμένων τους, αυτή αυξάνεται παρουσία DHC. Σημειώνεται ωστόσο πως η συνεπώαση με το DHC δεν δύναται να επαναφέρει πλήρως την εικόνα διείσδυσης του υπερκειμένου των CPAbs καθώς και άλλα μόρια πέραν των νουκλεοσωμάτων που εμπεριέχονται στα υπερκείμενα, όπως η HMGB1, τα εξωσώματα κ.α., ενδέχεται να έχουν ανάλογο βοηθητικό ρόλο (306, 307). Μόνο το 10D2 φαίνεται να διατηρεί την υψηλή διεισδυτική ικανότητά του ακόμη και μετά την απομόνωσή του, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτά τα συστατικά που περιέχονται στα υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειας αντιπροσωπεύουν τροποποιητικά μόρια της διείσδυσης, ιδιαίτερα αντισωμάτων με χαμηλή δραστηριότητα έναντι των πυρηνικών αντιγόνων-στόχων.

Αναφορικά με τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό των CPAbs, διαπιστώθηκε πως η παρουσία των πυρηνικών συστατικών στο υπερκείμενο μεταβάλλει τον εντοπισμό του 2C6 από περιπυρηνικό σε αποκλειστικά πυρηνικό. Ομοίως, ο κυτταροπλασματικός και πυρηνικός εντοπισμός του 5D3 μετατρέπεται σε έναν έντονα πυρηνικό. Αντίθετα, ο αποκλειστικά πυρηνικός εντοπισμός του 10D2 παρέμεινε αμετάβλητος παρουσία των πυρηνικών

μορίων. Με τη χρήση σημασμένων DNA και ιστονών (πειράματα συνεντοπισμού) φάνηκε ότι τα ανοσοσύμπλοκα που σχηματίζονται μεταξύ CPAbs και πυρηνικών συστατικών διαπερνούν ως έχουν την κυτταρική μεμβράνη και καταλήγουν στον πυρήνα. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι τα CPAbs σε συνδυασμό με τα πυρηνικά συστατικά μπορεί να εισέλθουν στα κύτταρα ως συμπλέγματα και ότι η παρουσία του DNA και των ιστόνων θα μπορούσε να εξηγήσει τις αλλαγές στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό των δύο από τα τρία CPAbs. Το 10D2 σε σύγκριση με τα άλλα δύο CPAbs, χαρακτηρίζεται από την υψηλότερη συγγένεια για το nDNA, όπως φαίνεται από τις δοκιμασίες ELISA και FARR (αναγνώριση dsDNA). Αξίζει να αναφερθεί ότι από τα αποτελέσματα είναι εμφανές ότι τα μόρια αυτά (nDNA, ιστόνες, ή DHC), δεν ενεργούν ως φορείς για τη μετακίνηση των ανοσοσφαιρινών εντός των κυττάρων, δεδομένου ότι τα μονοκλωνικά-μάρτυρες (μη-διδυμικά αντισώματα, ένα εκ των οποίων με ισχυρή δραστηριότητα έναντι DNA και ιστονών) δεν εισέρχονται στα κύτταρα παρουσία αυτών των συστατικών.

Η ενεργειακά-ανεξάρτητη διείσδυση των CPAbs, δεν αποκλείει τη συνεργιστική μεταφορά τους εντός των κυττάρων μέσω συμπλόκων με πυρηνικά συστατικά. Ειδικότερα, οι ιστόνες όχι μόνο εισέρχονται στα κύτταρα από ανεστραμμένα μικύλλια, κατά ανεξάρτητο ενεργειακό τρόπο (308, 309), αλλά επιπλέον διαθέτουν και σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) (309) γεγονός που δικαιολογεί την αυξημένη πυρηνική μεταφορά των CPAbs παρουσία των ιστονών και DHC. Στην περίπτωση πάλι του DNA, μόνο κατιονικά λιπίδια και κατιονικά πολυμερή που δημιουργούν συμπλέγματα με αυτό έχουν δειχθεί να ευνοούν τη μεταφορά του στον πυρήνα (310). Επιπλέον, ο αδενοϊός τύπου 2 και τύπου 5 εισέρχεται στον πυρήνα μέσω μικροσωληνίσκων (311), ενώ ο ιός του πιθήκου SV40 μεταφέρεται στον πυρήνα μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) (312). Συνεπώς, τα CPAbs διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη και καταλήγουν στον πυρήνα με τη βοήθεια μιας περιοχής NLS συνδεδεμένης με το πυρηνικό μόριο ή μέσω μηχανισμών που χρησιμοποιούν οι ιοί. Εναλλακτικά, δομές όπως οι αλληλουχίες μεταγωγής πρωτεϊνών (PTDs) ή απλά πολυπεπίδια αργίνινης, ενδέχεται να συνεισφέρουν προς την ίδια κατεύθυνση.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η *in vitro*, και πιθανότατα η *in vivo*, διεισδυτική ικανότητα των CPAbs φαίνεται να εξαρτάται από το περιβάλλον τους και να απαιτεί μια συγκεκριμένη αναγνώριση και ανοσολογική αλληλεπίδραση με πυρηνικά ή άλλα κυτταρικά συστατικά. Τα ευρήματα αυτά ίσως αιτιολογούν παθογενετικούς μηχανισμούς, όπως εκείνον του ΣΕΛ. Αυξημένα επίπεδα νουκλεοσωμάτων που προκύπτουν από έντονη απόπτωση στον ΣΕΛ μπορεί να αυξήσουν την πυρηνική



διείσδυση των CPAbs οδηγώντας σε τροποποίηση ποικίλων κυτταρικών διαδικασιών, όπως η λειτουργία των μεσαγγειακών κυττάρων (313), η πολυκλωνική ενεργοποίηση B-κυττάρων (314), η έκκριση ιντερλευκίνης-6 από σπληνοκύτταρα (315), η λύση μέσω φυσικών φονικών κυττάρων (316) και η απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων από μακροφάγα (317).

Σημειώνεται, πως για πρώτη φορά, καταδεικνύεται η ενίσχυση της διεισδυτικής ικανότητας των CPAbs παρουσία των πυρηνικών αντιγόνων. Τα τρία διαφορετικά μονοκλωνικά CPAbs που χρησιμοποιήθηκαν, χαρακτηρίζονται από διαφορετική ανοσοδραστικότητα που σχετίζεται επίσης με την ξεχωριστή διεισδυτική ικανότητά τους απουσία ή παρουσία των πυρηνικών συστατικών. Ο μηχανισμός διείσδυσης των CPAbs φάνηκε εδώ πως δεν απαιτεί ενέργεια και είναι ανεξάρτητος της ενδοκυττάρωσης, ενώ υψηλότερη ενίσχυση παρατηρήθηκε με την παρουσία του DHC. Τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη σημασία του εξωκυττάρου περιβάλλοντος στη κυτταρική διείσδυση των CPAbs και μπορεί να βοηθήσουν στο μέλλον στην καλύτερη κατανόηση του παθολογικού μηχανισμού στον ΣΕΛ.

#### 4. Βιολογικός ρόλος των CPAbs (I): Επαγωγή Απόπτωσης

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες ολοένα και αυξάνεται το ενδιαφέρον για τη μελέτη φυσικών αντισωμάτων με ενζυμικές δράσεις (πρωτεάση ή DNase / RNase) έναντι διαφόρων αντιγόνων. Τα καταλυτικά αντισώματα (γνωστά και ως abzymes) έχουν περιγραφεί σε υγιή άτομα, καθώς και σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα, κυρίως στον ΣΕΛ (318). Καταλυτικές δράσεις έχουν επίσης ανιχνευθεί σε επίπεδο ορού σε ποντίκια επιρρεπή σε λύκο, και αποδοθεί σε αντι-DNA αυτοαντισώματα (149). Από την άλλη πλευρά, είναι γνωστό, από *in vitro* και *in vivo* μελέτες, ότι αντι-DNA CPAbs παρεμβαίνουν σε κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση (24, 99). Ήταν λοιπόν ένα από τα ερωτήματα που θέσαμε σε αυτή τη διατριβή αν τα αντι-DNA CPAbs υδρολύουν το DNA και αν κατ'επέκταση επάγουν απόπτωση.

Ένα από τα σημαντικότερα ευρήματα της παρούσας διατριβής ήταν πως τα CPAbs διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα, μέσω ενεργειακά ανεξάρτητων μηχανισμών και υδρολύουν τόσο το πλασμιδιακό όσο και το γενωμικό DNA σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και σε μικρότερους χρόνους συγκριτικά με τα αντισώματα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (70, 150, 151, 319). Συγκεκριμένα, για πρώτη φορά, αναφέρεται CPAb (10D2) που εμφανίζει δράση DNase I μετά από επώαση μισής ώρας ακόμα και στη πιο χαμηλή

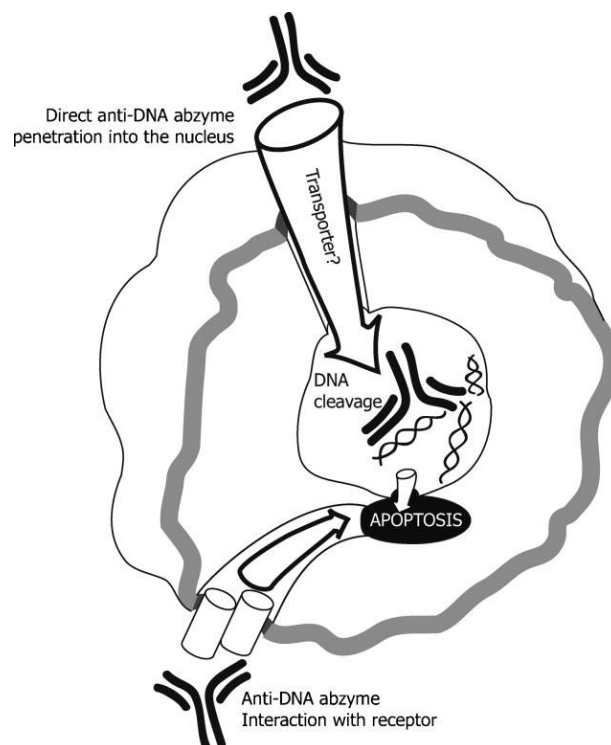
συγκέντρωση (10 µg/ml). Παράλληλα, τα άλλα δυο CPAbs (2C6 και 5D3) έδειξαν να αλλάζουν την υπερελίκωμενη μορφή του πλασμιδίου σε γραμμική στις χαμηλές συγκεντρώσεις μετά από 4 ώρες επώασης, ενώ στη μισή ώρα μειώθηκε σημαντικά η ποσότητα του γενωμικού DNA σε όλες τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν. Το καθένα παρουσίασε ξεχωριστό προφίλ υδρόλυσης το οποίο ήταν ανεξάρτητο της παρουσίας ιοντων  $Mg^{2+}$ . Επιπλέον η υδρολυτική τους ικανότητα παρέμεινε αμετάβλητη παρουσία αναστολέων DNase (EDTA και EGTA), υποστηρίζοντας έτσι ότι η υδρολυτική τους ικανότητα δεν είναι αποτέλεσμα ενδεχόμενης πρόσμιξής τους με DNase, αλλά είναι εγγενής ιδιότητα του κάθε αντισώματος. Η ταυτοποίηση των ειδικών αλληλουχιών δέσμευσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων στο DNA και υδρόλυσης αυτού, είναι ιδιαίτερο ενδιαφέρον θέμα και θα πρέπει να αποτελέσει αντικείμενο περαιτέρω μελέτης.

Καθώς τα CPAbs διεισδύουν στα κύτταρα και υδρολύουν το DNA, το ενδιαφέρον εστιάστηκε στην πιθανή εμπλοκή τους σε κυτταρικές λειτουργίες, όπως η απόπτωση και ο πολλαπλασιασμός. Παρατηρήθηκε ότι και τα τρία CPAbs επάγουν απόπτωση σε σημαντικό ποσοστό κυττάρων HeLa και σε διαφορετική έκταση μεταξύ τους. Ειδικότερα, τα ποσοστά απόπτωσης για τα 2C6, 5D3 και 10D2 ήταν 27%, 22% και 16% αντίστοιχα, έπειτα από 48 ώρες επώασης με τα κύτταρα. Τα διαφορετικά αυτά ποσοστά απόπτωσης αλλά και η παρατηρούμενη χρονική ετερογένεια στη δράση των CPAbs, θα μπορούσαν να δικαιολογηθούν από το γεγονός ότι τα CPAbs αναγνωρίζουν διαφορετικά αντιγόνα και με διαφορετική συγγένεια, πυροδοτώντας κατ' επέκταση και διαφορετικούς μηχανισμούς απόπτωσης (277, 320-322), (96, 139, 277). Δεδομένου ακόμη πως η έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας εξαρτάται και από τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται το κύτταρο (Kozyr και συν.) (277), μία ακόμη ερμηνεία της παρατηρούμενης ετερογένειας στη δράση των αντισωμάτων, θα μπορούσε να βασίζεται στο γεγονός πως οι κυτταρικές σειρές της μελέτης δεν ήταν συγχρονισμένες. Από την άλλη πλευρά, γνωρίζοντας πως η αναδιαμόρφωση της ακτίνης σχετίζεται και με τη διαδικασία της απόπτωσης, εξετάστηκε σε προκαταρκτικά πειράματα η πιθανή επίδραση των CPAbs στη δυναμική ισορροπία του πλέγματος της ακτίνης, η οποία και επιβεβαιώθηκε σε καρκινικά κύτταρα Swiss-3T3 και DU-145. Πράγματι, το 2C6 προκαλεί ήπιο αποπολυμερισμό και το 10D2 περιορισμένου βαθμού αναδιοργάνωση του πλέγματος της ακτίνης.

Τέλος, με δοκιμασία MTS και με ενσωμάτωση BrdU, δείχθηκε πως τα CPAbs δεν επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων HeLa, ενώ δεν παρατηρήθηκαν νεκρωτικά φαινόμενα κατόπιν χρώσης με Trypan Blue, ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις των CPAbs. Το γεγονός ότι τα CPAbs δεν επηρεάζουν τον

κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά προκαλούν πρόωμη απόπτωση, όπως δείχθηκε με κυτταρομετρία ροής, οφείλεται ενδεχομένως στην έκφραση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών αρκετά νωρίς κατά την έκθεση των κυττάρων στα διεισδυτικά αντι-dsDNA αντισώματα.

Η διαλεύκανση των μηχανισμών με τους οποίους τα διεισδυτικά αντισώματα εισέρχονται στον πυρήνα των κυττάρων και επάγουν την απόπτωση και εν συνεχεία υδρολύουν το DNA θα μπορούσε να συνεισφέρει στην αποσαφήνιση του φυσιολογικού και παθογενετικού τους ρόλου. Δύο τουλάχιστον μηχανισμοί δράσης των DNA-catAbs έχουν περιγραφεί *in vitro* (Εικ. 19). Ο πρώτος μηχανισμός που ενδεχομένως βρίσκει εφαρμογή και στα αντισώματα της παρούσας μελέτης, βασίζεται στην ανεξάρτητη από άλλα μόρια είσοδό τους μέσα στα κύτταρα και την επαγωγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, λόγω κατακερματισμού του DNA. Η παραπάνω υπόθεση υποστηρίζεται από ορισμένα αντι-DNA αντισώματα τα οποία φέρουν αλληλουχίες που προσομοιάζουν στη δομή σημάτων πυρηνικού εντοπισμού (NLS) (109). Ο δεύτερος μηχανισμός βασίζεται την αλληλεπίδραση του catAb με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίοι ενεργοποιούν την απόπτωση, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και μετέπειτα ενδοκυτταρική διείσδυση του DNA-catAb (151, 277, 323).



**Εικ.5.4** Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών επαγωγής κυτταρικού θανάτου οφειλόμενου στην παρουσία των DNA-catAbs. Στην πρώτη περίπτωση, το αντίσωμα εισέρχεται απ'ευθείας στο κύτταρο προκαλώντας κυτταρικό θάνατο, ενώ στη δεύτερη το φαινόμενο επάγεται από την αλληλεπίδραση του αντισώματος με τον κατάλληλο υποδοχέα (42).

## 5. Βιολογικός ρόλος των CPAbs (II): Αναστολή Αγγειογένεσης

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, διερευνήθηκε η δράση των CPAbs σε συγκεκριμένες αγγειογενετικές αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων. Βρέθηκε ότι και τα τρία CPAbs ανέστειλαν σημαντικά τόσο τον βασικό (οροεξαρτώμενο), όσο και τον επαγόμενο από τον VEGF πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, με το 10D2 να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής σε σχέση με τα 5D3 και 2C6. Κάτι αντίστοιχο έχει παρατηρηθεί βιβλιογραφικά τόσο με την εξωγενώς χορηγούμενη ακτιβίνη A, όσο και με τους αδενοϊούς, οι οποίοι εξέφραζαν την ακτιβίνη A ή τον υποδοχέα της. Πράγματι, η ακτιβίνη A, επάγει την έκφραση των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p15, p21 και p27 αναστέλλοντας την είσοδο των ενδοθηλιακών κυττάρων στη φάση S (324, 325). Παράλληλα, η ακτιβίνη A, αλλά και ο μόνιμα ενεργός υποδοχέας της, μείωσαν δραστικά την έκφραση του υποδοχέα VEGFR-2 αναστέλλοντας την δραστηριότητα του VEGF μέσω του μονοπατιού ERK1/2 MAPK κινασών. Παρόμοια αντιπολλαπλασιαστική δράση έχει δειχθεί και για τον TGF-β (326).

Με βάση τα μέχρι σήμερα δεδομένα, έχει αναφερθεί ότι η επώαση με αντι-nDNA αντισώματα σε ενεργοποιημένα κύτταρα εμποδίζει τη σύνθεση του DNA [95], φαινόμενο που παρατηρείται και με διεισδυτικά αντι-DNA αντισώματα, από ασθενείς με ΣΕΛ. Τα τελευταία, εμπόδισαν την πρόοδο του κύκλου στην φάση G1, σε αντίθεση με τα διεισδυτικά αντι-RNP αντισώματα, από ασθενείς με ΜΝΣΙ, τα οποία τον διακόπτουν στη φάση G0 (71, 88). Σε κάθε περίπτωση, η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου οδηγεί σε απόπτωση των κυττάρων (69, 96). Αντίθετα, το διεισδυτικό αντι-DNA αντίσωμα F4-1, προερχόμενο από NZB/NZW ποντίκια, φάνηκε να αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση S, χωρίς να προκαλεί απόπτωση [95]. Αξίζει να σημειωθεί πως τα επίπεδα έκφρασης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικά ως προς την πορεία του κυττάρου προς απόπτωση ή προς αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης της p53 προκαλείται μόνο αναστολή του κυτταρικού κύκλου, ενώ σε υψηλά επίπεδα έκφρασης επάγεται απόπτωση, διαδικασία στην οποία συμμετέχει – εν μέρει τουλάχιστον- και η πρωτεΐνη Bax (107).

Από την άλλη πλευρά, είναι γνωστό ότι ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων ρυθμίζεται μέσω της αυτοκρινούς παραγωγής των αυξητικών παραγόντων και την έκφραση των αντίστοιχων υποδοχέων. Μάλιστα έχει αναφερθεί από τους Yung, και συνεργάτες (327) ότι η δέσμευση αντι-DNA αντισωμάτων, από ασθενείς με λύκο, σε

νεφρικά εγγύς σωληνοειδή επιθηλιακά κύτταρα οδήγησε στη διαδοχική αύξηση της έκκρισης IL-1β. Σε προηγούμενη μελέτη, παρατηρήθηκε ότι η ιντερλευκίνη 1 (IL-1) αναστέλλει την ενδοθηλιακή ανάπτυξη *in vitro* και *in vivo* παρεμποδίζοντας την πρόοδο του κύκλου στη φάση G1, ενδεχομένως λόγω μειωμένης έκφρασης των υποδοχέων FGF. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για την IL-1β (103). Συνεπώς, βάσει όλων των παραπάνω, τα CPAbs της μελέτης δύνανται να αναστέλλουν τόσο τον βασικό όσο και τον επαγόμενο από τον VEGF πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, παρεμβαίνοντας ίσως σε κάποιο σηματοδοτικό μονοπάτι των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνη D, κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες).

Δείχθηκε τέλος πως τα CPAbs της μελέτης όχι μόνο δεν προκαλούν απόπτωση στα κύτταρα HUVEC, αλλά αυξάνουν το βασικό επίπεδο επιβίωσής τους απουσία του VEGF (2C6>>5D3 >10D2). Από την άλλη πλευρά, παρουσία του VEGF, μόνο τα 10D2 και 5D3 επιφέρουν αύξηση στο επίπεδο επιβίωσης, υποδηλώνοντας μία συνεργιστική δράση. Είναι γνωστό ότι η αυξημένη έκφραση της μεταλλοπρωτεάσης 9 της εξωκυττάριας ουσίας (MMP9) οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα του VEGF, οπότε και επάγεται ο αγγειογενετικός φαινότυπος (328). Μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί ότι η πρόσδεση των CPAbs στο mRNA της MMP-9 οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του ενζύμου, το οποίο με το να αποικοδομεί μόρια της εξωκυττάριας ουσίας έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του VEGF, οπότε επάγεται ο αγγειογενετικός φαινότυπος, συμβάλλοντας στην μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, ενώ τα CPAbs συνδέονται άμεσα με την αυξημένη έκφραση του ογκογονιδίου bcl-2 που αποτρέπει την κυτταρική απόπτωση (329, 330). Πρόσφατα, δείχθηκε ότι τα αντι-DNA αντισώματα, η νεφρική DNaseI, τα επίπεδα mRNA των μεταλλοπρωτεασών 2 και 9 (MMP2, MMP9) και άλλα ένζυμα δρουν συνεργιστικά διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο τόσο στα πρώιμα όσο και στα τελικά στάδια στη νεφρίτιδα λύκου στα (NZBxNZW) F1 ποντίκια (331). Τα πρώιμα στάδια της νεφρίτιδας σχετίζονται με το σύμπλοκο χρωματίνης- IgG που εναποτίθεται στην μεσαγγειακή ούσια, και το οποίο σχετίζεται με την εμφάνιση των αντι-dsDNA αντισωμάτων (332). Μετά από αυτό το γεγονός, παρατηρείται μια δραματική καταστολή των επιπέδων mRNA της νεφρικής DNase I και δράσης του ενζύμου, ενώ τα επίπεδα mRNA των MMP2 και MMP9 και τις δρασεις των ενζύμων αυξάνονται. Επιπλέον, η ομάδα του Madaio παρατήρησε αναστολή της επαγωγής του p53 από το διεισδυτικό αντίσωμα H7 εξαιτίας της αύξησης των επιπέδων της πρωτεΐνης καβεολίνης μέσω του H7, γεγονός που συνεπάγεται αναστολή της απόπτωσης. Μάλιστα, ο ενδοκυττάριος εντοπισμός του H7, στα caveolae αποτελεί ισχυρή απόδειξη, δεδομένου ότι η διαφοροποίηση των επιπέδων καβεολίνης έχουν συσχετισθεί με την

κυτταρική μεταφορά, τον κακοήθη κυτταρικό μετασχηματισμό καθώς συναφείς κυτταρικές διεργασίες, και μεταβολές στη δραστικότητα p53 (86). Βιβλιογραφικά, έχουν αναφερθεί CPAbs που επάγουν απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα *in vitro* και *in vivo* χωρίς να προκαλούν τοξικότητα στους φυσιολογικούς ιστούς (111, 333-335)

Τέλος, και τα τρία CPAbs φάνηκε να καθυστερούν σημαντικά τη μετανάστευση των κυττάρων HUVEC *in vitro*. Σε μελέτη των Portales-Perez και συνεργατών, δείχθηκε πως τα διεισδυτικά αντισώματα προκαλούν μείωση της έκφρασης της ICAM-1, με επακόλουθη μειωμένη μετανάστευση των HUVECs, γεγονός που ενδέχεται να λαμβάνει χώρα και στη περίπτωση των CPAbs της μελέτης (96). Επίσης, η αναστολή στη μετανάστευση θα μπορούσε να οφείλεται στην αυξημένη έκφραση της αγγειογενετικής κυτταροκίνης TGF-β1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αφού έχει ήδη αναφερθεί από τους Lai και συνεργάτες, ότι η έκφραση της αυξάνεται σε HUVECs όταν καλλιεργούνται παρουσία των αντι-dsDNA αντισωμάτων (336). Μία τρίτη εκδοχή θα μπορούσε να βασίζεται στην αλληλεπίδραση των αντι-dsDNA Abs με άλλες πρωτεΐνες (λαμινίνη, φμπρονεκτίνη, α-ακτινίνη), φωσφολιπίδια, και θειική ηπαρίνη (74, 337-340). Ευρήματα από προγενέστερη μελέτη έχουν τεκμηριώσει περαιτέρω την πιθανή εμπλοκή των αυτοαντισωμάτων έναντι της λαμινίνης στο σχηματισμό ανοσοσυμπλόκων στην περίπτωση της σπειραματονεφρίτιδας. Επιπλέον, τα αποτελέσματα μας δείχνουν εντυπωσιακές μεταβολές στην έκφραση λαμινίνης στη βασική σπειραματική μεμβράνη (GBM) κατά την ανάπτυξη σπειραματονεφρίτιδας. Τα ευρήματα αυτά αυξάνουν την πιθανότητα τα αυτοαντισώματα να αντιδρούν με νεοαντιγόνα που εκφράζονται στην GBM κατά τη διάρκεια σπειραματικής φλεγμονής (341). Οι επίτοποι λαμινίνης, εντοπίζονται σε θραύσματα λαμινίνης-1, μεσολαβούν στην κυτταρική προσκόλληση και σύνδεση προς άλλα συστατικά μήτρας/πλέγματος (342). Έτσι, αυτές οι ποιοτικές αλλαγές στην έκφραση και την κατανομή λαμινίνης μπορεί καλά αποτελούν τη βάση μη φυσιολογικό κυττάρου-μήτρας και αλληλεπιδράσεις πλέγματος-πλεγματος στο πειραματικό μοντέλο της νεφρίτιδας λύκου. Έχει φανεί ότι η λαμινίνη-1 επάγει πρόωμη διαφοροποίηση των κυττάρων ταυτόχρονα με μια μείωση στην πυρηνική νουκλεολίνη και στον εντοπισμο της στην κυτταρικής (343). Η λαμινίνη-1 οποία ως γνωστό προσδένεται στη νουκλεολίνη (NCL), και με αυτόν τον τρόπο ίσως να μειώνουν την έκφραση της NCL στα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγώντας σε καταστολή της μετανάστευσής τους και παρεμπόδιση του σχηματισμού τριχοειδών σωλήνων (344).

Η ενεργοποίηση των μεταλλο-πρωτεϊνών (MMPs) οι οποίες εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ύλης, η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση

αγγειογενετικών παραγόντων, όπως οι VEGF, bFGF και TGFβ και συμβάλλουν στην κυτταρική μετανάστευση, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση. Η MMP-2 συγκεκριμένα που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και στους περισσότερους τύπους κυττάρων, είναι σημαντική για την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αναδιαμόρφωση των αγγείων κατά την αγγειογένεση (345) και διευκολύνει την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων (346). Η κατασταλτική δράση των CPAbs στην αγγειογένεση, αλλά και στην μετανάστευση και κινητικότητα των κυττάρων HUVEC μπορεί να συσχετίζεται με την ρύθμιση της έκφρασης της MMP-2. Η συσχέτιση μεταξύ τέτοιας ρύθμισης και της δραστηριότητας/ενεργότητας της νόσου, η δέσμευση του DNA που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων από τα αντι-DNA αντισώματα, καθώς και οι πιθανές λειτουργικές μεταβολές των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά τη δέσμευση των αντισωμάτων, φαίνονται ως ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένεια του ΣΕΛ.

Συμπερασματικά, στην εργασία αυτή μελετήθηκε για πρώτη φορά η επίδραση μονοκλωνικών CPAbs σε σημαντικές αγγειογενετικές αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων, και η διεισδυτική τους ικανότητα σ' αυτά με τρόπο ανεξάρτητο της ενδοκύττωσης. Ανάλογα αποτελέσματα με τη δική μας μελέτη έχουν παρατηρηθεί με τα πεπτίδια Nucants, HB-19 και N6L τα οποία φάνηκαν *in vitro* να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των HUVEC, δίχως να επάγουν απόπτωση (347). Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκε η νουκλεολίνη της κυτταρικής επιφάνειας ως το κύριο μόριο μέσω του οποίου τα πεπτίδια αυτά ασκούν τις βιολογικές τους δράσεις, αφού σχηματίζουν σταθερό σύμπλοκο και έτσι ενδοκυτταρώνονται με ενεργό τρόπο, χωρίς όμως να διαπερνούν την πυρηνική μεμβράνη (348). Μέχρι σήμερα μόνο η ομάδα των Fujii και συνεργατών έχει αναφερθεί στην εναπόθεση των αντισωμάτων στο ενδοθήλιο και το σχηματισμό αλλοιώσεων σπειράματος, παρόμοιων με εκείνες που παρατηρούνται σε ποντίκια επιρρεπή σε λύκο έπειτα από τη χορήγηση ενός IgG3 μονοκλωνικού αντισώματος, προερχόμενο από MRL/gld ποντίκια με λύκο, σε SCID ποντίκια (349). Επομένως, ένας από τους μηχανισμούς της σπειραματικής νεφρίτιδας του λύκου, ίσως να οφείλεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ συγκεκριμένων αντισωμάτων και ιντεγκρινών κυτταρικής επιφάνειας μέσω της φιμπρονεκτίνης, η οποία εμπλέκεται στην διείσδυση των αντισωμάτων στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα CPAbs μπορούν να αποτελέσουν ένα σημαντικό εργαλείο για αντι-αγγειογενετική δράση. Η δυνατότητα αυτή, ενισχύεται από το γεγονός ότι τα αντισώματα αυτά παρουσιάζουν αντι-καρκινική δράση, είναι εύκολο να

παραχθούν σε μεγάλη κλίμακα, είναι σταθερά στον ορό και δεν προκαλούν τοξικότητα σε φυσιολογικούς ιστούς, παρέχοντας νέες θεραπευτικές δυνατότητες για πληθώρα ασθενειών. Η έρευνα που διεξάγεται εργαστήριο Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ κινείται προς την κατεύθυνση του πλήρους χαρακτηρισμού των πολυδραστικών, μονοκλωνικών αυτοαντισωμάτων καθώς και της βιολογικής τους δράσης σε πολλά διαφορετικά συστήματα ιικά κτλ. Στους μελλοντικούς στόχους συμπεριλαμβάνεται μελέτη της επίδρασής τους σε διάφορα πειραματικά μοντέλα ασθενειών *in vivo*. Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η πιθανή τους χρήση ως μόρια μεταφοράς δραστικών ουσιών (π.χ. φάρμακα, ένζυμα κ.α.) στο εσωτερικό των κυττάρων για θεραπευτικούς σκοπούς. Η ανάγκη για ουσίες με βιολογική δράση ικανές να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη έχει μέχρι σήμερα καλυφθεί από σύμπλοκα των ουσιών αυτών με μικρού μοριακού βάρους πεπτιδία (ικής κυρίως προέλευσης) με ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα (350, 351). Αυτά τα σύμπλοκα όμως παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα: είναι τοξικά, ανοσογονικά και με μικρό χρόνο ημιζωής μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό (350). Τα μειονεκτήματα αυτά μπορούν να ξεπεραστούν με τη χρήση των διεισδυτικών αντισωμάτων, τα οποία φέρουν κοινά χαρακτηριστικά με εκείνα των φυσικών αντισωμάτων (NAbs) που παράγονται εγγενώς, έχοντας την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα (352). Τα διεισδυτικά αυτά αντισώματα είναι πολυδραστικά, ανήκουν σε όλες τις υποτάξεις, κωδικοποιούνται από γονίδια της βλαστικής σειράς και διαθέτουν διάφορες βιολογικές δράσεις όπως η επαγωγή απόπτωσης σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους που διεισδύουν (64, 98, 151). Επιπρόσθετα, δεν παρουσιάζουν κανένα από τα μειονεκτήματα των ιικών πεπτιδίων και έχουν την ικανότητα να κυκλοφορούν για πολλές ημέρες (διάρκεια ημιζωής 8 ημέρες) σε όλο τον οργανισμό. Άλλωστε ακέραια αντισώματα [που περιέχονται στις ενδοφλέβιες ανοσοσφαιρίνες (IVIg)], πολυδραστικά χρησιμοποιούνται ήδη εδώ και τριάντα χρόνια, χωρίς σημαντικές παρενέργειες για τη θεραπεία πολλών αυτοάνοσων και φλεγμονωδών νοσημάτων. Συνεπώς, τα διεισδυτικά αντισώματα αποτελούν μια φυσιολογική πηγή αντισωμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία ασθενειών που οφείλονται σε ελαττωματική απόπτωση. Τα κυτταροτοξικά, διεισδυτικά αντισώματα προσφέρουν νέα προοπτική στη θεραπεία του καρκίνου, απαλλαγμένη από τα μειονεκτήματα των γνωστών μέχρι σήμερα θεραπειών, ενώ τα διεισδυτικά μη κυτταροτοξικά αντισώματα θα αξιοποιηθούν ως φορείς για την καλύτερη μεταφορά εντός των κυττάρων γνωστών κυτταροτοξικών ουσιών.



## *Περίληψη/Summary*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντισώματα με ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα (CPAbs) ανευρίσκονται στον ορό ασθενών με Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο (ΣΕΛ) και σε ποντικούς με πειραματική νόσο. Τα αντισώματα αυτά συσσωρεύονται κυρίως στον πυρήνα του κυττάρου, αναγνωρίζουν συχνά το DNA, αλλά και άλλα δομικά άσχετα αντιγόνα όπως πρωτεΐνες και απτένια. Ενώ δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί ο τρόπος εισόδου των CPAbs στα κύτταρα και οι κυτταρικές λειτουργίες που επηρεάζονται από την είσοδό τους στο κύτταρο, υπήρξε διεθνώς πολύ μεγάλη ενδιαφέρον για τη χρήση πεπτιδίων, που έφεραν την αλληλουχία των υπερμεταβλητών περιοχών CDR2 και CDR3 των CPAbs, ως φορέων βιοδραστικών μορίων, αξιοποιώντας τη γρήγορη διείσδυση και τη συσσώρευσή τους στον πυρήνα. Τα διεισδυτικά πεπτίδια έχουν όμως συνδεθεί με αρκετά μειονεκτήματα στην *in vivo* χρήση τους (μικρό χρόνο ημιζωής, τοπική διάχυση, τοξικότητα, κá), σε αντίθεση με τα ακέραια αυτοαντισώματα. Έτσι, παρά τη διεθνή τάση για χρήση διεισδυτικών πεπτιδίων για ενδοκυτταρική μεταφορά βιομορίων, θελήσαμε να μελετήσουμε ακέραια CPAbs ως προς νέες βιολογικές δράσεις, όπως η υδρόλυση γενωμικού DNA, κατακερματισμού του DNA των κυττάρων στα οποία έχουν διεισδύσει και επίδραση στην αγγειογένεση με απώτερο στόχο τη χρήση τους ως θεραπευτικών εργαλείων.

Για το σκοπό αυτό στο Εργαστήριο Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ παράχθηκε μια σειρά από μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) έπειτα από σύντηξη μη εκκριτικών μυελωματικών κυττάρων NSO με σπληνοκύτταρα από μη ανοσοποιημένα αρσενικά ποντίκια (NZBxNZW) F1, τα οποία εμφανίζουν αυθόρμητο σύνδρομο λύκου σε ηλικία εννέα μηνών. Αφού προσδιορίστηκαν τα υβριδώματα που εκκρίνουν αντι-DNA mAbs με ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα (CPAbs), αυτά απομονώθηκαν και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ενδελεχής έλεγχος ως προς τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά τους, τα χαρακτηριστικά διείσδυσης και την επακόλουθη βιολογική δράση τους και ειδικότερα

1. Διερεύνηση του ρόλου της φυσικής σύνδεσης των CPAbs με το DNA και άλλα συστατικά του πυρήνα στη διεισδυτικότητα και τη βιολογική δραστηριότητά τους, και
2. Διαλεύκανση πιθανής επίδρασης στον αγγειογενετικό φαινότυπο των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έχουν ως εξής:

Συνολικά, επιλέξαμε πέντε mAbs, τρία CPAbs (2 IgG2a: **10D2**, **2C6** και ένα IgG2b: **5D3A8**) και δύο μη διεισδυτικά mAbs (ένα IgG2a: H9.3 και ένα IgG2b: 1C5) ως

αρνητικούς μάρτυρες. Τα 10D2, 5D3A8, 2C6 και H9.3 αναγνώριζαν κυρίως το pDNA και τις ιστόνες, σε διαφορετικό βαθμό, όπως φάνηκε από την ELISA και τη δοκιμασία Farr, ενώ το 1C5 αναγνωρίζει κυρίως την ακτίνη. Τα τρία CPAbs αναγνώριζαν ωστόσο και διάφορα άλλα αντιγόνα όπως ακτίνη και καρβονική ανυδράση, εκφράζοντας ένα διακριτό πρότυπο πολυδραστικότητας.

Τα αντισώματα που απομονώθηκαν από τα υπερκείμενα καλλιέργειας των υβριδωμάτων βρέθηκαν να διεισδύουν σε όλες τις κυτταρικές σειρές (καρκινικές και μη), εμφανίζοντας όμως διαφορετικό πρότυπο διείσδυσης. Συγκεκριμένα τα CPAbs διεισδύουν κυρίως στον πυρήνα (10D2, 5D3, 2C6) ή/και στο κυτταρόπλασμα (5D3), σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Από τη μελέτη των παραμέτρων της διείσδυσης φάνηκε ότι το φαινόμενο λαμβάνει χώρα από τα πρώτα 3 λεπτά της επώασης σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν και ότι πρόκειται για έναν ειδικό μηχανισμό εισόδου των αντισωμάτων που δεν απαιτεί ενέργεια, αφού λαμβάνει χώρα τόσο στους 4° C, όσο και στους 37°C και με την παρουσία αναστολέων ενδοκύττωσης.

Σημαντικές διαφορές στα χαρακτηριστικά διείσδυσης των υπερκειμένων κυτταροκαλλιέργειας συγκριτικά με τα απομονωμένα CPAbs διαπιστώθηκαν στην προσπάθειά μας να τα απομονώσουμε σε μεγάλη ποσότητα. Φάνηκε ότι η διείσδυση των τριών πολυδραστικών CPAbs, ενισχύθηκε σημαντικά από την παρουσία των πυρηνικών μορίων DNA και ιστονών και ιδιαίτερα των νουκλεοϊστονών, ευνοώντας τον πυρηνικό εντοπισμό τους. Σημειώνεται ωστόσο πως η συνεπώαση με το DHC δεν δύναται να επαναφέρει πλήρως την εικόνα διείσδυσης του υπερκειμένου των CPAbs καθώς και άλλα μόρια πέραν των νουκλεοσωμάτων που εμπεριέχονται στα υπερκείμενα, όπως η HMGB1, τα εξωσώματα κ.α., ενδέχεται να έχουν ανάλογο βοηθητικό ρόλο.

Ως προς τη βιολογική δράση των CPAbs διαπιστώθηκε ότι:

α) υδρολύουν τόσο το πλασμιδιακό όσο και το γενωμικό DNA σε διαφορετικό βαθμό το καθένα. Πιο συγκεκριμένα, τα 2C6 και 5D3 αλλάζουν το βαθμό υπερελίκωσης του πλασμιδίου και μειώνουν την ποσότητα του γενωμικού DNA, ενώ το 10D2 προκαλεί κατακερματισμό τόσο του πλασμιδιακού, όσο και του γενωμικού DNA εμφανίζοντας δράση DNase I. Σημειώνεται ότι η υδρολυτική ικανότητά τους δεν οφείλεται σε πρόσμιξή τους με DNase όπως φάνηκε και πειραματικά με τη χρήση αναστολέων του ενζύμου. Επιπλέον, προέκυψε ότι τα τρία CPAbs (2C6, 5D3 και 10D2) δεν επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά προκαλούν απόπτωση σε σημαντικό ποσοστό κυττάρων HeLa.

β) επεμβαίνουν σε σημαντικές αγγειογενετικές αποκρίσεις και σε διαφορετικό βαθμό το καθένα, στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC, παρουσία ή απουσία του VEGF, στη μετανάστευση των κυττάρων καθώς και στην επιβίωσή τους παρουσία ή απουσία του VEGF. Συγκεκριμένα, τα CPAbs όχι μόνο ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά μείωσαν σημαντικά και τη μετανάστευσή τους, ενώ, αύξησαν την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, δρώντας συνεργιστικά με τον VEGF.

Συμπερασματικά, μελετήσαμε τρία μονοκλωνικά CPAbs προερχόμενα από ποντικούς με αυθόρμητη νόσο που προσομοιάζει τον ΣΕΛ, τα οποία διαθέτουν ένα διαφορετικό προφίλ πολυδραστικότητας, διείσδυσης/εντοπισμού και βιολογικής δράσης. Ειδικότερα:

- ✓ διεισδύουν στον πυρήνα διαφόρων κυτταρικών σειρών (καρκινικών και μη), με ενεργειακά ανεξάρτητο μηχανισμό ενδοκύτωσης, παρουσιάζοντας αποκλειστικά πυρηνικό ή/και κυτταροπλασματικό πρότυπο ενδοκυττάριου εντοπισμού
- ✓ υδρολύουν το γενωμικό και το πλασμιδιακό DNA (δράση DNase I ή παρέμβαση στο βαθμό υπερελίκωσης)
- ✓ προκαλούν απόπτωση σε σημαντικό ποσοστό καρκινικών κυττάρων,
- ✓ κατακερματίζουν το γενωμικό DNA των κυττάρων στα οποία έχουν διεισδύσει,
- ✓ αναστέλλουν *in vitro* τον -επαγόμενο ή μη- πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων,
- ✓ μειώνουν σημαντικά τη βασική μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, και
- ✓ αυξάνουν σημαντικά την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ παρουσία αγγειογενετικού παράγοντα δρουν συνεργιστικά.

Οι παραπάνω διακριτές ιδιότητες των τριών CPAbs προσθέτουν νέα γνώση ως προς i) την κατανόηση της παθογένεσης αυτοάνοσων νοσήμάτων, όπως ο ΣΕΛ, και ii) την αξιοποίησή τους *per se* για θεραπευτικούς σκοπούς.

## SUMMARY

Antibodies with penetrating capacity into living cells (Cell-Penetrating Antibodies, CPAbs) were found in the serum of patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and in mouse models of the disease. These antibodies accumulate mainly in the cell nucleus, recognize frequently dsDNA but also other structurally unrelated antigens such as proteins and haptens. Although the cell entry mechanism and the cellular functions affected by CPAbs entry have not yet clarified, the use of peptides from the CDR2 and CDR3 of CPAbs as carriers of active biomolecules attracted the interest of researchers exploiting their fast penetration and accumulation in the nucleus. However, the cell-penetrating peptides present several disadvantages mainly associated with the *in vivo* use (short half-life, local diffusion, toxicity, etc), unlike intact autoantibodies. Thus, despite the international trend towards the use of peptides for intracellular delivery of biomolecules, we chose to study intact CPAbs searching for new biological activities, such as hydrolysis of genomic DNA, DNA fragmentation of living cells in which they penetrate, and impact in angiogenesis, in order to evaluate them as potential therapeutic tools.

For this purpose, a series of monoclonal antibodies (mAbs) was produced at the Immunology Laboratory of the Hellenic Pasteur Institute, after fusion of non-secreting NSO myeloma cell line with splenocytes from non-immunized nine-month old male (NZBxNZW) F1 mice, which spontaneously present a lupus-like syndrome. Anti-DNA mAbs with penetrating ability into living cells were isolated from hybridomas and characterized in terms of their immunological properties, cell-penetrating capacity and subsequent biological activity, emphasizing in:

1. The effect of their physical binding to DNA or other nuclear components in the cell-penetration and the subsequent biological activity, and
2. The elucidation of their potential effect on the angiogenic phenotype of endothelial cells.

We thus selected five mAbs, among which three CPAbs (2 IgG2a: 10D2, 2C6 and an IgG2b: 5D3A8) and two non-penetrating mAbs (an IgG2a: H9.3 and one IgG2b: 1C5) to be used as negative controls. The 10D2, 5D3A8, 2C6 and H9.3 recognized nDNA with different avidity, as evidenced by ELISA and Farr assay, as well as histones, while the 1C5 recognized mainly actin. All three CPAbs also recognized other antigens, such as actin and carbonic anhydrase, thus expressing a distinct polyreactivity pattern.

Antibodies isolated from hybridoma culture supernatants were found to penetrate in all cell lines (cancerous or not), showing a different pattern of penetration. Specifically, all three CPAbs penetrated mainly in the nucleus, while 5D3 in both the nucleus and the cytoplasm, compared with control antibodies. The study of specific parameters of cell-penetration, such as the concentration of antibodies or the required incubation time, demonstrated that penetration takes place during the first 3 minutes of incubation at all concentrations tested. Moreover, we verified that the cell-penetration mechanism does not require energy, since it occurs at both 4°C and at 37°C in the presence or absence of endocytosis inhibitors.

In our effort to isolate a large quantity of CPAbs, we initially observed significant differences in the penetrating capacity between hybridoma culture supernatants and isolated CPAbs. It appeared that the penetration of the three polyreactive CPAbs, was significantly enhanced in the presence of: histones, DNA and particularly DNA-histones complex (DHC) favoring their accumulation in the nucleus. It should be noted that in the presence of DHC, the penetrating pattern of the isolated CPAbs was not fully reconstituted (as the profile of crude CPAbs), implying that apart from nucleosomes, other molecules in supernatants, such as high-mobility group box 1 (HMGB1) protein and exosomes etc, which may have a similar auxiliary role in cell penetration..

Regarding their biological activity we found that CPAbs:

a) hydrolyze both plasmid and genomic DNA, in different degrees. More specifically, 2C6 and 5D3 alter the degree of supercoiling plasmid and reduce the amount of genomic DNA, while 10D2 causes fragmentation of both plasmid and genomic DNA exhibiting DNase I activity. It should be noted that the hydrolytic ability is not due to contamination with DNase as demonstrated by the use of enzyme inhibitors. Furthermore, the three CPAbs (2C6, 5D3 and 10D2) did not affect cell proliferation but induced apoptosis in a significant % of HeLa cells.

b) affect -in a distinct way- several angiogenic responses, such as proliferation of endothelial cells HUVEC (in the presence or absence of VEGF), cell migration and their survival (in the presence or absence of VEGF). Specifically, CPAbs not only inhibited the proliferation of endothelial cells, but also reduced significantly their migration, while increased the survival of endothelial cells co-operating with VEGF.

To conclude, we studied three monoclonal CPAbs from lupus prone mice, each of them exhibiting a distinct polyreactivity, cell-penetration /localization and biological activity profile. Specifically these antibodies:

- ✓ penetrate the nucleus of various cell lines (cancerous or not), with energy-independent endocytosis mechanism, showing exclusively nuclear and/or cytoplasmic pattern of intracellular localization,
- ✓ hydrolyze genomic and plasmid DNA (exhibit DNase I activity or influence the extent of supercoiling),
- ✓ induce apoptosis in a significant proportion of cancer cells (HeLa)
- ✓ cause fragmentation to genomic DNA of living cells after penetration,
- ✓ inhibit *in vitro* the endothelial cell proliferation,
- ✓ significantly reduce the basic migration of endothelial cells, and
- ✓ significantly increase the survival of endothelial cells, acting synergistically with VEGF.

The above distinct properties of the three CPAbs add new knowledge regarding i) the understanding of the pathogenesis of autoimmune diseases, such as SLE, and ii) their exploitation *per se* for therapeutic purposes.

## *Βιβλιογραφία*



**VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Avrameas S, Ternynck T, Tsonis IA, Lymberi P. Naturally occurring B-cell autoreactivity: a critical overview. *Journal of autoimmunity*. 2007 Dec;29(4):213-8.
2. Boyden SV. Natural antibodies and the immune response. *Advances in immunology*. 1966;5:1-28.
3. Avrameas S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunology today*. 1991 May;12(5):154-9.
4. 31st Annual Psychopharmacology Meeting. Jesenik Spa, January 1989. *Act Nerv Super (Praha)*. 1989 Dec;31(4):265-306.
5. Owen RD. Immunogenetic Consequences of Vascular Anastomoses between Bovine Twins. *Science*. 1945 Oct 19;102(2651):400-1.
6. Landsteiner K, van der Scheer J. On the Specificity of Serological Reactions with Simple Chemical Compounds (Inhibition Reactions). *J Exp Med*. 1931 Jul 31;54(3):295-305.
7. Avrameas S, Guilbert B, Dighiero G. 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. *Annales d'immunologie*. 1981 Mar-Apr;132C(2):231-6.
8. Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural autoantibodies. *Current opinion in immunology*. 1995 Dec;7(6):812-8.
9. Avrameas S, Ternynck T. The natural autoantibodies system: between hypotheses and facts. *Molecular immunology*. 1993 Aug;30(12):1133-42.
10. Avrameas S, Ternynck T. Natural autoantibodies: the other side of the immune system. *Research in immunology*. 1995 May-Jun;146(4-5):235-48.
11. Bouvet JP, Dighiero G. From natural polyreactive autoantibodies to a la carte monoreactive antibodies to infectious agents: is it a small world after all? *Infection and immunity*. 1998 Jan;66(1):1-4.
12. Sigounas G, Kolaitis N, Monell-Torrens E, Notkins AL. Polyreactive IgM antibodies in the circulation are masked by antigen binding. *Journal of clinical immunology*. 1994 Nov;14(6):375-81.
13. Grandien A, Modigliani Y, Freitas A, Andersson J, Coutinho A. Positive and negative selection of antibody repertoires during B-cell differentiation. *Immunol Rev*. 1994 Feb;137:53-89.
14. Haury M, Sundblad A, Grandien A, Barreau C, Coutinho A, Nobrega A. The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *European journal of immunology*. 1997 Jun;27(6):1557-63.
15. Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer seminars in immunopathology*. 2005 Mar;26(4):347-62.
16. Schwartz-Albiez R, Monteiro RC, Rodriguez M, Binder CJ, Shoenfeld Y. Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation. *Clinical and experimental immunology*. 2009 Dec;158 Suppl 1:43-50.
17. Nossal GJ, Pike BL. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980 Mar;77(3):1602-6.

18. Nossal GJ. Cellular mechanisms of immunologic tolerance. *Annu Rev Immunol.* 1983;1:33-62.
19. Goodnow CC. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1996 Mar 19;93(6):2264-71.
20. Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med.* 1993 Apr 1;177(4):999-1008.
21. Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *The Journal of Experimental Medicine.* 1993. 177: 1009-1020. *Journal of immunology.* 2011 Feb 1;186(3):1313-24.
22. Hartley SB, Crosbie J, Brink R, Kantor AB, Basten A, Goodnow CC. Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature.* 1991 Oct 24;353(6346):765-9.
23. Avrameas A, Ternynck T, Nato F, Buttin G, Avrameas S. Polyreactive anti-DNA monoclonal antibodies and a derived peptide as vectors for the intracytoplasmic and intranuclear translocation of macromolecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998 May 12;95(10):5601-6.
24. Ruiz-Arguelles A, Alarcon-Segovia D. Penetration of autoantibodies into living cells, 2000. *Isr Med Assoc J.* 2001 Feb;3(2):121-6.
25. Nevinsky GA, Kanyshkova TG, Buneva VN. Natural catalytic antibodies (abzymes) in normalcy and pathology. *Biochemistry (Mosc).* 2000 Nov;65(11):1245-55.
26. Clatworthy MR. Targeting B cells and antibody in transplantation. *Am J Transplant.* 2011 Jul;11(7):1359-67.
27. Zhou ZH, Tzioufas AG, Notkins AL. Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. *Journal of autoimmunity.* 2007 Dec;29(4):219-28.
28. Matsiota P, Saron MF, Guillon JC, Avrameas S. Mouse natural autoantibodies can interfere with murine alpha and beta interferons. *J Virol.* 1989 Feb;63(2):955-6.
29. Gonzalez R, Matsiota P, Torchy C, De Kinkelin P, Avrameas S. Natural anti-TNP antibodies from rainbow trout interfere with viral infection in vitro. *Research in immunology.* 1989 Sep;140(7):675-84.
30. Lewis MJ, Malik TH, Ehrenstein MR, Boyle JJ, Botto M, Haskard DO. Immunoglobulin M is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* 2009 Aug 4;120(5):417-26.
31. Arese P, Turrini F, Schwarzer E. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem.* 2005;16(4-6):133-46.
32. Peng Y, Kowalewski R, Kim S, Elkon KB. The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells. *Molecular immunology.* 2005 May;42(7):781-7.
33. Wigzell H. Regulation of immunity by anti-idiotypic antibodies. *Vet Immunol Immunopathol.* 1987 Dec;17(1-4):161-72.
34. Guilbert B, Dighiero G, Avrameas S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization. *Journal of immunology.* 1982 Jun;128(6):2779-87.

35. Bakhiet M, Diab A, Mahamustafa, Jiezh, Lindqvist L, Link H. Potential role of autoantibodies in the regulation of cytokine responses during bacterial infections. *Infection and immunity*. 1997 Aug;65(8):3300-3.
36. Sundblad A, Marcos M, Huetz F, Freitas A, Heusser C, Portnoi D, et al. Normal serum immunoglobulins influence the numbers of bone marrow pre-B and B cells. *European journal of immunology*. 1991 May;21(5):1155-61.
37. MacMillan HF, Lee T, Issekutz AC. Intravenous immunoglobulin G-mediated inhibition of T-cell proliferation reflects an endogenous mechanism by which IgG modulates T-cell activation. *Clin Immunol*. 2009 Aug;132(2):222-33.
38. Kieber-Emmons T, Monzavi-Karbassi B, Pashov A, Saha S, Murali R, Kohler H. The promise of the anti-idiotypic concept. *Front Oncol*. 2012;2:196.
39. Bordenave G. [Antibody idiotypes--contribution of the network of interactions between idiotypes and anti-idiotypes to the regulation of antibody production]. *Transfus Clin Biol*. 1995;2(1):51-6.
40. Bobrzynski T, Fux M, Vogel M, Stadler MB, Stadler BM, Miescher SM. A high-affinity natural autoantibody from human cord blood defines a physiologically relevant epitope on the FcεpsilonR1α. *Journal of immunology*. 2005 Nov 15;175(10):6589-96.
41. Mace G, Blanpied C, Emorine LJ, Druet P, Dietrich G. Isolation and characterization of natural human IgG with a morphine-like activity. *European journal of immunology*. 1999 Mar;29(3):997-1003.
42. Belogurov A, Jr., Kozyr A, Ponomarenko N, Gabibov A. Catalytic antibodies: balancing between Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Bioessays*. 2009 Nov;31(11):1161-71.
43. Cabral AR, Alarcon-Segovia D. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 1998 Sep;10(5):409-16.
44. Eibl MM. History of immunoglobulin replacement. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2008 Nov;28(4):737-64, viii.
45. Casadevall A, Dadachova E, Pirofski LA. Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Sep;2(9):695-703.
46. Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V, et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*. 2005 Mar 7;201(5):703-11.
47. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 2003 Feb 17;197(4):403-11.
48. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-α in systemic lupus erythematosus. *Science*. 2001 Nov 16;294(5546):1540-3.
49. Decker P, Singh-Jasuja H, Haager S, Kotter I, Rammensee HG. Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. *Journal of immunology*. 2005 Mar 15;174(6):3326-34.
50. Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest*. 2005 Feb;115(2):407-17.
51. Kaplan MJ. Apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2004 Sep;112(3):210-8.

52. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998 Jul;41(7):1241-50.
53. Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Meister S, Munoz L, Heyder P, De Marchis F, et al. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med.* 2008 Dec 22;205(13):3007-18.
54. Manderson AP, Botto M, Walport MJ. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:431-56.
55. Castellano G, Woltman AM, Schlagwein N, Xu W, Schena FP, Daha MR, et al. Immune modulation of human dendritic cells by complement. *European journal of immunology.* 2007 Oct;37(10):2803-11.
56. Alarcon-Segovia D, Ruiz-Arguelles A, Fishbein E. Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature.* 1978 Jan 5;271(5640):67-9.
57. Galoppin L, Saurat JH. In vitro study of the binding of antiribonucleoprotein antibodies to the nucleus of isolated living keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1981 Apr;76(4):264-7.
58. Bohm I. IgG deposits can be detected in cell nuclei of patients with both lupus erythematosus and malignancy. *Clin Rheumatol.* 2007 Nov;26(11):1877-82.
59. Hormigo A, Lieberman F. Nuclear localization of anti-Hu antibody is not associated with in vitro cytotoxicity. *J Neuroimmunol.* 1994 Dec;55(2):205-12.
60. Okudaira K, Yoshizawa H, Williams RC, Jr. Monoclonal murine anti-DNA antibody interacts with living mononuclear cells. *Arthritis Rheum.* 1987 Jun;30(6):669-78.
61. Yanase K, Smith RM, Cizman B, Foster MH, Peachey LD, Jarett L, et al. 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 Jul;71(1):52-60.
62. Deng SX, Hanson E, Sanz I. In vivo cell penetration and intracellular transport of anti-Sm and anti-La autoantibodies. *International immunology.* 2000 Apr;12(4):415-23.
63. Putterman C. New approaches to the renal pathogenicity of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2004 Feb;3(2):7-11.
64. Ternynck T, Avrameas A, Ragimbeau J, Buttin G, Avrameas S. Immunochemical, structural and translocating properties of anti-DNA antibodies from (NZBxNZW)F1 mice. *Journal of autoimmunity.* 1998 Oct;11(5):511-21.
65. Zack DJ, Stempniak M, Wong AL, Taylor C, Weisbart RH. Mechanisms of cellular penetration and nuclear localization of an anti-double strand DNA autoantibody. *Journal of immunology.* 1996 Sep 1;157(5):2082-8.
66. Shero JH, Bordwell B, Rothfield NF, Earnshaw WC. High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science.* 1986 Feb 14;231(4739):737-40.
67. Jang EJ, Nahm DH, Jang YJ. Mouse monoclonal autoantibodies penetrate mouse macrophage cells and stimulate NF-kappaB activation and TNF-alpha release. *Immunol Lett.* 2009 Jun 4;124(2):70-6.
68. Golan TD, Sigal D, Sabo E, Shemuel Z, Guedj D, Weinberger A. The penetrating potential of autoantibodies into live cells in vitro coincides with the in vivo staining of epidermal nuclei. *Lupus.* 1997;6(1):18-26.

69. Ruiz-Arguelles A, Perez-romano B, Llorente L, Alarcon-Segovia D, Castellanos JM. Penetration of anti-DNA antibodies into immature live cells. *Journal of autoimmunity*. 1998 Oct;11(5):547-56.
70. Jang JY, Jeong JG, Jun HR, Lee SC, Kim JS, Kim YS, et al. A nucleic acid-hydrolyzing antibody penetrates into cells via caveolae-mediated endocytosis, localizes in the cytosol and exhibits cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Jun;66(11-12):1985-97.
71. Alarcon-Segovia D, Llorente L, Ruiz-Arguelles A. Antibody penetration into living cells. III. Effect of antiribonucleoprotein IgG on the cell cycle of human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Immunol Immunopathol*. 1982 Apr;23(1):22-33.
72. Koscec M, Koren E, Wolfson-Reichlin M, Fugate RD, Trieu E, Targoff IN, et al. Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture. *Journal of immunology*. 1997 Aug 15;159(4):2033-41.
73. Sun KH, Liu WT, Tang SJ, Tsai CY, Hsieh SC, Wu TH, et al. The expression of acidic ribosomal phosphoproteins on the surface membrane of different tissues in autoimmune and normal mice which are the target molecules for anti-double-stranded DNA antibodies. *Immunology*. 1996 Mar;87(3):362-71.
74. Deocharan B, Qing X, Lichauco J, Putterman C. Alpha-actinin is a cross-reactive renal target for pathogenic anti-DNA antibodies. *Journal of immunology*. 2002 Mar 15;168(6):3072-8.
75. Faaber P, Rijke TP, van de Putte LB, Capel PJ, Berden JH. Cross-reactivity of human and murine anti-DNA antibodies with heparan sulfate. The major glycosaminoglycan in glomerular basement membranes. *J Clin Invest*. 1986 Jun;77(6):1824-30.
76. Termaat RM, Brinkman K, van Gompel F, van den Heuvel LP, Veerkamp JH, Smeenk RJ, et al. Cross-reactivity of monoclonal anti-DNA antibodies with heparan sulfate is mediated via bound DNA/histone complexes. *Journal of autoimmunity*. 1990 Oct;3(5):531-45.
77. Di Valerio R, Bernstein KA, Varghese E, Lefkowitz JB. Murine lupus glomerulotropic monoclonal antibodies exhibit differing specificities but bind via a common mechanism. *Journal of immunology*. 1995 Aug 15;155(4):2258-68.
78. Lake RA, Morgan A, Henderson B, Staines NA. A key role for fibronectin in the sequential binding of native dsDNA and monoclonal anti-DNA antibodies to components of the extracellular matrix: its possible significance in glomerulonephritis. *Immunology*. 1985 Feb;54(2):389-95.
79. Jacob L, Viard JP, Allenet B, Anin MF, Slama FB, Vandekerckhove J, et al. A monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody binds to a 94-kDa cell-surface protein on various cell types via nucleosomes or a DNA-histone complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989 Jun;86(12):4669-73.
80. Duverger E, Carpentier V, Roche AC, Monsigny M. Sugar-dependent nuclear import of glycoconjugates from the cytosol. *Exp Cell Res*. 1993 Jul;207(1):197-201.
81. Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature*. 1979 Jun 21;279(5715):679-85.
82. Okada CY, Rechsteiner M. Introduction of macromolecules into cultured mammalian cells by osmotic lysis of pinocytotic vesicles. *Cell*. 1982 May;29(1):33-41.
83. Seddiki N, Nato F, Lafaye P, Amoura Z, Piette JC, Mazie JC. Calreticulin, a potential cell surface receptor involved in cell penetration of anti-DNA antibodies. *Journal of immunology*. 2001 May 15;166(10):6423-9.

84. Fonseca SB, Pereira MP, Kelley SO. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Sep 30;61(11):953-64.
85. Madaio MP, Yanase K. Cellular penetration and nuclear localization of anti-DNA antibodies: mechanisms, consequences, implications and applications. *Journal of autoimmunity.* 1998 Oct;11(5):535-8.
86. Yanase K, Madaio MP. Nuclear localizing anti-DNA antibodies enter cells via caveoli and modulate expression of caveolin and p53. *Journal of autoimmunity.* 2005 Mar;24(2):145-51.
87. Koutouzov S, Cabrespines A, Amoura Z, Chabre H, Lotton C, Bach JF. Binding of nucleosomes to a cell surface receptor: redistribution and endocytosis in the presence of lupus antibodies. *European journal of immunology.* 1996 Feb;26(2):472-86.
88. Alarcon-Segovia D, Ruiz-Arguelles A, Fishbein E. Antibody penetration into living cells. I. Intranuclear immunoglobulin in peripheral blood mononuclear cells in mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology.* 1979 Mar;35(3):364-75.
89. Schulze K, Becker BF, Schultheiss HP. 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 Feb;64(2):179-92.
90. Abedi-Valugerdi M, Hu H, Moller G. Mercury-induced anti-nucleolar autoantibodies can transgress the membrane of living cells in vivo and in vitro. *International immunology.* 1999 Apr;11(4):605-15.
91. Alarcon-Segovia D, Llorente L, Ruiz-Arguelles A. 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 Apr;9(2):295-300.
92. Adamus G, Machnicki M, Elerding H, Sugden B, Blocker YS, Fox DA. Antibodies to recoverin induce apoptosis of photoreceptor and bipolar cells in vivo. *Journal of autoimmunity.* 1998 Oct;11(5):523-33.
93. El-Fawal HA, Waterman SJ, De Feo A, Shamy MY. Neuroimmunotoxicology: humoral assessment of neurotoxicity and autoimmune mechanisms. *Environ Health Perspect.* 1999 Oct;107 Suppl 5:767-75.
94. Tezel G, Wax MB. The mechanisms of hsp27 antibody-mediated apoptosis in retinal neuronal cells. *J Neurosci.* 2000 May 15;20(10):3552-62.
95. Tse E, Rabbitts TH. Intracellular antibody-caspase-mediated cell killing: an approach for application in cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000 Oct 24;97(22):12266-71.
96. Portales-Perez D, Alarcon-Segovia D, Llorente L, Ruiz-Arguelles A, Abud-Mendoza C, Baranda L, et al. Penetrating anti-DNA monoclonal antibodies induce activation of human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of autoimmunity.* 1998 Oct;11(5):563-71.
97. Schmidt-Acevedo S, Perez-Romano B, Ruiz-Arguelles A. 'LE cells' result from phagocytosis of apoptotic bodies induced by antinuclear antibodies. *Journal of autoimmunity.* 2000 Aug;15(1):15-20.
98. Rivadeneyra-Espinoza L, Ruiz-Arguelles A. Cell-penetrating anti-native DNA antibodies trigger apoptosis through both the neglect and programmed pathways. *Journal of autoimmunity.* 2006 Feb;26(1):52-6.

99. Sun KH, Tang SJ, Lin ML, Wang YS, Sun GH, Liu WT. Monoclonal antibodies against human ribosomal P proteins penetrate into living cells and cause apoptosis of Jurkat T cells in culture. *Rheumatology (Oxford)*. 2001 Jul;40(7):750-6.
100. Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, Irvine AE, Kennedy RJ, Bell AL. Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia. *Ann Rheum Dis*. 1999 May;58(5):309-14.
101. Finck BN, Dantzer R, Kelley KW, Woods JA, Johnson RW. Central lipopolysaccharide elevates plasma IL-6 concentration by an alpha-adrenoreceptor-mediated mechanism. *Am J Physiol*. 1997 Jun;272(6 Pt 2):R1880-7.
102. Lambert PH, Dixon FJ. Pathogenesis of the glomerulonephritis of NZB/W mice. *J Exp Med*. 1968 Mar 1;127(3):507-22.
103. Neng Lai K, Leung JC, Bik Lai K, Li PK, Lai CK. Anti-DNA autoantibodies stimulate the release of interleukin-1 and interleukin-6 from endothelial cells. *J Pathol*. 1996 Apr;178(4):451-7.
104. Lai KN, Leung JC, Lai KB, Lai FM, Wong KC. Increased release of von Willebrand factor antigen from endothelial cells by anti-DNA autoantibodies. *Ann Rheum Dis*. 1996 Jan;55(1):57-62.
105. Yu CL, Chang KL, Chiu CC, Chiang BN, Han SH, Wang SR. Alteration of mitogenic responses of mononuclear cells by anti-ds DNA antibodies resembling immune disorders in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol*. 1989;18(5):265-76.
106. Sun KH, Yu CL, Tang SJ, Sun GH. 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 Mar;99(3):352-60.
107. Lai PB, Chi TY, Chen GG. Different levels of p53 induced either apoptosis or cell cycle arrest in a doxycycline-regulated hepatocellular carcinoma cell line in vitro. *Apoptosis*. 2007 Feb;12(2):387-93.
108. Viall CA, Chen Q, Liu B, Hickey A, Snowise S, Salmon JE, et al. Antiphospholipid antibodies internalised by human syncytiotrophoblast cause aberrant cell death and the release of necrotic trophoblast debris. *Journal of autoimmunity*. 2013 Dec;47:45-57.
109. Foster MH, Kieber-Emmons T, Ohliger M, Madaio MP. Molecular and structural analysis of nuclear localizing anti-DNA lupus antibodies. *Immunol Res*. 1994;13(2-3):186-206.
110. Weisbart RH, Stempniak M, Harris S, Zack DJ, Ferreri K. An autoantibody is modified for use as a delivery system to target the cell nucleus: therapeutic implications. *Journal of autoimmunity*. 1998 Oct;11(5):539-46.
111. Weisbart RH, Baldwin R, Huh B, Zack DJ, Nishimura R. Novel protein transfection of primary rat cortical neurons using an antibody that penetrates living cells. *Journal of immunology*. 2000 Jun 1;164(11):6020-6.
112. McGregor DP. Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 2008 Oct;8(5):616-9.
113. Mayer A, Tsiompanou E, O'Malley D, Boxer GM, Bhatia J, Flynn AA, et al. Radioimmunoguided surgery in colorectal cancer using a genetically engineered anti-CEA single-chain Fv antibody. *Clin Cancer Res*. 2000 May;6(5):1711-9.

114. Vrouenraets MB, Visser GW, Loup C, Meunier B, Stigter M, Oppelaar H, et al. Targeting of a hydrophilic photosensitizer by use of internalizing monoclonal antibodies: A new possibility for use in photodynamic therapy. *Int J Cancer*. 2000 Oct 1;88(1):108-14.
115. Hansen JE, Weisbart RH, Nishimura RN. Antibody mediated transduction of therapeutic proteins into living cells. *ScientificWorldJournal*. 2005 Sep 16;5:782-8.
116. Avrameas A, Ternynck T, Gasmi L, Buttin G. Efficient gene delivery by a peptide derived from a monoclonal anti-DNA antibody. *Bioconjug Chem*. 1999 Jan-Feb;10(1):87-93.
117. Durrbach A, Angevin E, Poncet P, Rouleau M, Chavanel G, Chapel A, 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 Nov-Dec;6(6):564-71.
118. Pauling L. Nature of forces between large molecules of biological interest. *Nature*. 1948 May 8;161(4097):707-9.
119. Hilvert D. Critical analysis of antibody catalysis. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:751-93.
120. Nevinsky GA, Kanyshkova TG, Semenov DV, Vlassov AV, Gal'vita AV, Buneva VN. Secretory immunoglobulin A from healthy human mothers' milk catalyzes nucleic acid hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol*. 2000 Jan-Mar;83(1-3):115-29; discussion 29-30, 45-53.
121. Planque S, Bangale Y, Song XT, Karle S, Taguchi H, Poindexter B, et al. Ontogeny of proteolytic immunity: IgM serine proteases. *J Biol Chem*. 2004 Apr 2;279(14):14024-32.
122. Planque S, Taguchi H, Burr G, Bhatia G, Karle S, Zhou YX, et al. Broadly distributed chemical reactivity of natural antibodies expressed in coordination with specific antigen binding activity. *J Biol Chem*. 2003 May 30;278(22):20436-43.
123. Kalaga R, Li L, O'Dell JR, Paul S. Unexpected presence of polyreactive catalytic antibodies in IgG from unimmunized donors and decreased levels in rheumatoid arthritis. *Journal of immunology*. 1995 Sep 1;155(5):2695-702.
124. Lacroix-Desmazes S, Bayry J, Kaveri SV, Hayon-Sonsino D, Thorenoor N, Charpentier J, et al. High levels of catalytic antibodies correlate with favorable outcome in sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Mar 15;102(11):4109-13.
125. Lucey MD, Newkirk MM, Neville C, Lepage K, Fortin PR. Association between IgM response to IgG damaged by glyoxidation and disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2000 Feb;27(2):319-23.
126. Deng SX, de Prada P, Landry DW. Anticocaine catalytic antibodies. *Journal of immunological methods*. 2002 Nov 1;269(1-2):299-310.
127. Hu R, Xie GY, Zhang X, Guo ZQ, Jin S. Production and characterization of monoclonal anti-idiotypic antibody exhibiting a catalytic activity similar to carboxypeptidase A. *J Biotechnol*. 1998 Apr 15;61(2):109-15.
128. Du M, Guo Z, Jin S. A new monoclonal anti-idiotypic catalytic antibody with a CPA-like activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 1999 Jun 7;9(11):1487-92.
129. Bangale Y, Karle S, Planque S, Zhou YX, Taguchi H, Nishiyama Y, et al. VIPase autoantibodies in Fas-defective mice and patients with autoimmune disease. *FASEB J*. 2003 Apr;17(6):628-35.



130. Wentworth P, Jr., McDunn JE, Wentworth AD, Takeuchi C, Nieva J, Jones T, et al. Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science*. 2002 Dec 13;298(5601):2195-9.
131. Shuster AM, Gololobov GV, Kvashuk OA, Bogomolova AE, Smirnov IV, Gabibov AG. DNA hydrolyzing autoantibodies. *Science*. 1992 May 1;256(5057):665-7.
132. Saveliev AN, Ivanen DR, Kulminskaya AA, Ershova NA, Kanyshkova TG, Buneva VN, et al. Amyolytic activity of IgM and IgG antibodies from patients with multiple sclerosis. *Immunol Lett*. 2003 May 1;86(3):291-7.
133. Matsuura K, Yamamoto K, Sinohara H. Amidase activity of human Bence Jones proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Oct 14;204(1):57-62.
134. Paul S, Li L, Kalaga R, Wilkins-Stevens P, Stevens FJ, Solomon A. Natural catalytic antibodies: peptide-hydrolyzing activities of Bence Jones proteins and VL fragment. *J Biol Chem*. 1995 Jun 23;270(25):15257-61.
135. Lacroix-Desmazes S, Moreau A, Sooryanarayana, Bonnemain C, Stieltjes N, Pashov A, et al. Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. *Nat Med*. 1999 Sep;5(9):1044-7.
136. Paul S, Volle DJ, Beach CM, Johnson DR, Powell MJ, Massey RJ. Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody. *Science*. 1989 Jun 9;244(4909):1158-62.
137. Li L, Paul S, Tyutyulkova S, Kazatchkine MD, Kaveri S. Catalytic activity of anti-thyroglobulin antibodies. *Journal of immunology*. 1995 Apr 1;154(7):3328-32.
138. Thiagarajan P, Dannenbring R, Matsuura K, Tramontano A, Gololobov G, Paul S. Monoclonal antibody light chain with prothrombinase activity. *Biochemistry*. 2000 May 30;39(21):6459-65.
139. Kozyr AV, Kolesnikov AV, Aleksandrova ES, Sashchenko LP, Gnuchev NV, Favorov PV, et al. Novel functional activities of anti-DNA autoantibodies from sera of patients with lymphoproliferative and autoimmune diseases. *Appl Biochem Biotechnol*. 1998 Oct;75(1):45-61.
140. Vlassov A, Florentz C, Helm M, Naumov V, Buneva V, Nevinsky G, et al. Characterization and selectivity of catalytic antibodies from human serum with RNase activity. *Nucleic Acids Res*. 1998 Dec 1;26(23):5243-50.
141. Baranovskii AG, Ershova NA, Buneva VN, Kanyshkova TG, Mogelnitskii AS, Doronin BM, et al. Catalytic heterogeneity of polyclonal DNA-hydrolyzing antibodies from the sera of patients with multiple sclerosis. *Immunol Lett*. 2001 Apr 2;76(3):163-7.
142. Baranovsky AG, Matushin VG, Vlassov AV, Zabara VG, Naumov VA, Giege R, et al. DNA- and RNA-hydrolyzing antibodies from the blood of patients with various forms of viral hepatitis. *Biochemistry (Mosc)*. 1997 Dec;62(12):1358-66.
143. Krasnorutskii MA, Buneva VN, Nevinsky GA. Antibodies against RNA hydrolyze RNA and DNA. *J Mol Recognit*. 2008 Sep-Oct;21(5):338-47.
144. Jang YJ, Stollar BD. Anti-DNA antibodies: aspects of structure and pathogenicity. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Feb;60(2):309-20.
145. Nevinsky GA, Buneva VN. Human catalytic RNA- and DNA-hydrolyzing antibodies. *Journal of immunological methods*. 2002 Nov 1;269(1-2):235-49.
146. Marion TN, Krishnan MR, Desai DD, Jou NT, Tillman DM. Monoclonal anti-DNA antibodies: structure, specificity, and biology. *Methods*. 1997 Jan;11(1):3-11.

147. Kim DS, Lee SH, Kim JS, Lee SC, Kwon MH, Kim YS. Generation of humanized anti-DNA hydrolyzing catalytic antibodies by complementarity determining region grafting. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Feb 6;379(2):314-8.
148. Tawfik DS, Chap R, Green BS, Sela M, Eshhar Z. Unexpectedly high occurrence of catalytic antibodies in MRL/lpr and SJL mice immunized with a transition-state analog: is there a linkage to autoimmunity? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995 Mar 14;92(6):2145-9.
149. Ponomarenko NA, Durova OM, Vorobiev, II, Aleksandrova ES, Telegin GB, Chamborant OG, et al. Catalytic antibodies in clinical and experimental pathology: human and mouse models. *J Immunol Methods*. 2002 Nov 1;269(1-2):197-211.
150. Kim YR, Kim JS, Lee SH, Lee WR, Sohn JN, Chung YC, et al. Heavy and light chain variable single domains of an anti-DNA binding antibody hydrolyze both double- and single-stranded DNAs without sequence specificity. *J Biol Chem*. 2006 Jun 2;281(22):15287-95.
151. Lee EJ, Jang EJ, Lee E, Yu J, Chung HY, Jang YJ. Cell-penetrating autoantibody induces caspase-mediated apoptosis through catalytic hydrolysis of DNA. *Bioorg Med Chem*. 2007 Mar 1;15(5):2016-23.
152. Gololobov GV, Rumbley CA, Rumbley JN, Schourov DV, Makarevich OI, Gabibov AG, et al. DNA hydrolysis by monoclonal anti-ssDNA autoantibody BV 04-01: origins of catalytic activity. *Molecular immunology*. 1997 Oct;34(15):1083-93.
153. Gololobov GV, Mikhalap SV, Starov AV, Kolesnikov AF, Gabibov AG. DNA-protein complexes. Natural targets for DNA-hydrolyzing antibodies. *Appl Biochem Biotechnol*. 1994 May-Jun;47(2-3):305-14; discussion 14-5.
154. Gololobov G, Sun M, Paul S. Innate antibody catalysis. *Molecular immunology*. 1999 Dec;36(18):1215-22.
155. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):653-60.
156. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):932-6.
157. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):967-74.
158. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):298-307.
159. Swift MR, Weinstein BM. Arterial-venous specification during development. *Circ Res*. 2009 Mar 13;104(5):576-88.
160. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):677-84.
161. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):669-76.
162. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw*. 2009 Dec;20(4):158-63.
163. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2007;2:251-75.
164. Neufeld G, Kessler O. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008 Aug;8(8):632-45.
165. Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell*. 2009 Feb;16(2):196-208.

166. Buysschaert I, Schmidt T, Roncal C, Carmeliet P, Lambrechts D. Genetics, epigenetics and pharmaco-(epi)genomics in angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2008 Dec;12(6B):2533-51.
167. Saharinen P, Eklund L, Miettinen J, Wirkkala R, Anisimov A, Winderlich M, et al. Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat Cell Biol.* 2008 May;10(5):527-37.
168. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996 Aug 9;86(3):353-64.
169. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995 Jan;1(1):27-31.
170. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000 Sep 14;407(6801):242-8.
171. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Apr;16(2):159-78.
172. Ohnishi T, Daikuhara Y. Hepatocyte growth factor/scatter factor in development, inflammation and carcinogenesis: its expression and role in oral tissues. *Arch Oral Biol.* 2003 Dec;48(12):797-804.
173. Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Dec;979:80-93.
174. Polverini PJ. Role of the macrophage in angiogenesis-dependent diseases. *EXS.* 1997;79:11-28.
175. Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol.* 2000 Dec;11(6):617-24.
176. Lu J, Kasama T, Kobayashi K, Yoda Y, Shiozawa F, Hanyuda M, et al. Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. *Journal of immunology.* 2000 Jun 1;164(11):5922-7.
177. Reinders ME, Fang JC, Wong W, Ganz P, Briscoe DM. Expression patterns of vascular endothelial growth factor in human cardiac allografts: association with rejection. *Transplantation.* 2003 Jul 15;76(1):224-30.
178. Wheeler-Jones C, Abu-Ghazaleh R, Cospedal R, Houliston RA, Martin J, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A2 in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *FEBS Lett.* 1997 Dec 22;420(1):28-32.
179. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998 May 22;273(21):13313-6.
180. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* 1998 Nov 13;273(46):30336-43.
181. Bottomley MJ, Webb NJ, Watson CJ, Holt PJ, Freemont AJ, Brenchley PE. Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis spontaneously secrete vascular endothelial growth factor (VEGF): specific up-regulation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in synovial fluid. *Clinical and experimental immunology.* 1999 Jul;117(1):171-6.

182. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature*. 1987 Oct 15-21;329(6140):630-2.
183. Koch AE, Polverini PJ, Leibovich SJ. Induction of neovascularization by activated human monocytes. *J Leukoc Biol*. 1986 Feb;39(2):233-8.
184. Leibovich SJ, Polverini PJ, Fong TW, Harlow LA, Koch AE. Production of angiogenic activity by human monocytes requires an L-arginine/nitric oxide-synthase-dependent effector mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994 May 10;91(10):4190-4.
185. Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed B, Jain RK. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res*. 2001 Aug 15;61(16):6020-4.
186. Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *Journal of immunology*. 2005 Nov 15;175(10):6257-63.
187. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):249-57.
188. Semenza GL, Shimoda LA, Prabhakar NR. Regulation of gene expression by HIF-1. *Novartis Found Symp*. 2006;272:2-8; discussion -14, 33-6.
189. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*. 2004 Oct 29;95(9):858-66.
190. Naldini A, Carraro F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005 Feb;4(1):3-8.
191. Gong R, Rifai A, Dworkin LD. Anti-inflammatory effect of hepatocyte growth factor in chronic kidney disease: targeting the inflamed vascular endothelium. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Sep;17(9):2464-73.
192. Funa K, Uramoto H. Regulatory mechanisms for the expression and activity of platelet-derived growth factor receptor. *Acta Biochim Pol*. 2003;50(3):647-58.
193. Lee YC. The involvement of VEGF in endothelial permeability: a target for anti-inflammatory therapy. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005 Nov;6(11):1124-30.
194. Costa C, Incio J, Soares R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis*. 2007;10(3):149-66.
195. Pacifico F, Leonardi A. NF-kappaB in solid tumors. *Biochem Pharmacol*. 2006 Oct 30;72(9):1142-52.
196. Nam NH. Naturally occurring NF-kappaB inhibitors. *Mini Rev Med Chem*. 2006 Aug;6(8):945-51.
197. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med*. 2006 Feb;12(2):235-9.
198. Moulton KS. Angiogenesis in atherosclerosis: gathering evidence beyond speculation. *Curr Opin Lipidol*. 2006 Oct;17(5):548-55.
199. Slevin M, Krupinski J, Badimon L. Controlling the angiogenic switch in developing atherosclerotic plaques: possible targets for therapeutic intervention. *J Angiogenes Res*. 2009;1:4.
200. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*. 1996 Feb 15;93(4):672-82.

201. Barger AC, Beeuwkes R, 3rd, Lainey LL, Silverman KJ. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N Engl J Med*. 1984 Jan 19;310(3):175-7.
202. Urowitz MB, Bookman AA, Koehler BE, Gordon DA, Smythe HA, Ogryzlo MA. The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. *Am J Med*. 1976 Feb;60(2):221-5.
203. Kao AH, Sabatine JM, Manzi S. Update on vascular disease in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2003 Sep;15(5):519-27.
204. Ward MM. Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1999 Feb;42(2):338-46.
205. Haider YS, Roberts WC. Coronary arterial disease in systemic lupus erythematosus; quantification of degrees of narrowing in 22 necropsy patients (21 women) aged 16 to 37 years. *Am J Med*. 1981 Apr;70(4):775-81.
206. Hosenpud JD, Montanaro A, Hart MV, Haines JE, Specht HD, Bennett RM, et al. Myocardial perfusion abnormalities in asymptomatic patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med*. 1984 Aug;77(2):286-92.
207. Rahman P, Urowitz MB, Gladman DD, Bruce IN, Genest J, Jr. Contribution of traditional risk factors to coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1999 Nov;26(11):2363-8.
208. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T, Li Y, Panaritis C, du Berger R, et al. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2001 Oct;44(10):2331-7.
209. Nikpour M, Urowitz MB, Gladman DD. Epidemiology of atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep*. 2009 Aug;11(4):248-54.
210. Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE, Conte CG, Medsger TA, Jr., Jansen-McWilliams L, et al. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol*. 1997 Mar 1;145(5):408-15.
211. Hak AE, Karlson EW, Feskanich D, Stampfer MJ, Costenbader KH. Systemic lupus erythematosus and the risk of cardiovascular disease: results from the nurses' health study. *Arthritis Rheum*. 2009 Oct 15;61(10):1396-402.
212. Baraczka K, Nekam K, Pozsonyi T, Jakab L, Szongoth M, Sesztak M. Concentration of soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sICAM-1 and sL-selectin) in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus with central nervous involvement. *Neuroimmunomodulation*. 2001;9(1):49-54.
213. Roman MJ, Crow MK, Lockshin MD, Devereux RB, Paget SA, Sammaritano L, et al. Rate and determinants of progression of atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2007 Oct;56(10):3412-9.
214. Calvo-Alen J, Alarcon GS, Tew MB, Tan FK, McGwin G, Jr., Fessler BJ, et al. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort: XXXIV. Deficient mannose-binding lectin exon 1 polymorphisms are associated with cerebrovascular but not with other arterial thrombotic events. *Arthritis Rheum*. 2006 Jun;54(6):1940-5.
215. Svenungsson E, Jensen-Urstad K, Heimburger M, Silveira A, Hamsten A, de Faire U, et al. Risk factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Circulation*. 2001 Oct 16;104(16):1887-93.
216. de Carvalho JF, Bonfa E, Borba EF. Systemic lupus erythematosus and "lupus dyslipoproteinemia". *Autoimmun Rev*. 2008 Jan;7(3):246-50.

217. Sari RA, Polat MF, Taysi S, Bakan E, Capoglu I. Serum lipoprotein(a) level and its clinical significance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2002 Nov;21(6):520-4.
218. McMahan M, Grossman J, FitzGerald J, Dahlin-Lee E, Wallace DJ, Thong BY, et al. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006 Aug;54(8):2541-9.
219. Von Feldt JM, Scalzi LV, Cucchiara AJ, Morthala S, Kealey C, Flagg SD, et al. Homocysteine levels and disease duration independently correlate with coronary artery calcification in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006 Jul;54(7):2220-7.
220. Chung CP, Oeser A, Solus JF, Gebretsadik T, Shintani A, Avalos I, et al. Inflammation-associated insulin resistance: differential effects in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus define potential mechanisms. *Arthritis Rheum*. 2008 Jul;58(7):2105-12.
221. Chung CP, Avalos I, Oeser A, Gebretsadik T, Shintani A, Raggi P, et al. High prevalence of the metabolic syndrome in patients with systemic lupus erythematosus: association with disease characteristics and cardiovascular risk factors. *Ann Rheum Dis*. 2007 Feb;66(2):208-14.
222. Colombo BM, Cacciapaglia F, Puntoni M, Murdaca G, Rossi E, Rodriguez G, et al. Traditional and non traditional risk factors in accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of vascular endothelial growth factor (VEGATS Study). *Autoimmun Rev*. 2009 Feb;8(4):309-15.
223. Rajagopalan S, Somers EC, Brook RD, Kehrer C, Pfenninger D, Lewis E, et al. Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity. *Blood*. 2004 May 15;103(10):3677-83.
224. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992 Nov 7;340(8828):1111-5.
225. Reynolds HR, Buyon J, Kim M, Rivera TL, Izmirly P, Tunick P, et al. Association of plasma soluble E-selectin and adiponectin with carotid plaque in patients with systemic lupus erythematosus. *Atherosclerosis*. 2010 Jun;210(2):569-74.
226. Rho YH, Chung CP, Oeser A, Solus J, Raggi P, Gebretsadik T, et al. Novel cardiovascular risk factors in premature coronary atherosclerosis associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2008 Sep;35(9):1789-94.
227. Westerweel PE, Luijten RK, Hofer IE, Koomans HA, Derksen RH, Verhaar MC. Haematopoietic and endothelial progenitor cells are deficient in quiescent systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2007 Jul;66(7):865-70.
228. Denny MF, Thacker S, Mehta H, Somers EC, Dodick T, Barrat FJ, et al. Interferon-alpha promotes abnormal vasculogenesis in lupus: a potential pathway for premature atherosclerosis. *Blood*. 2007 Oct 15;110(8):2907-15.
229. Crow MK, Kirou KA. Interferon-alpha in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2004 Sep;16(5):541-7.
230. Thacker SG, Berthier CC, Mattinzoli D, Rastaldi MP, Kretzler M, Kaplan MJ. The detrimental effects of IFN-alpha on vasculogenesis in lupus are mediated by repression of

IL-1 pathways: potential role in atherogenesis and renal vascular rarefaction. *Journal of immunology*. 2010 Oct 1;185(7):4457-69.

231. Thacker SG, Duquaine D, Park J, Kaplan MJ. Lupus-prone New Zealand Black/New Zealand White F1 mice display endothelial dysfunction and abnormal phenotype and function of endothelial progenitor cells. *Lupus*. 2010 Mar;19(3):288-99.

232. Kaplan MJ, Salmon JE. How does interferon-alpha insult the vasculature? Let me count the ways. *Arthritis Rheum*. 2011 Feb;63(2):334-6.

233. Lee PY, Li Y, Richards HB, Chan FS, Zhuang H, Narain S, et al. Type I interferon as a novel risk factor for endothelial progenitor cell depletion and endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2007 Nov;56(11):3759-69.

234. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *Journal of immunology*. 2010 Mar 15;184(6):3284-97.

235. McMahan M, Hahn BH. Atherosclerosis and systemic lupus erythematosus: mechanistic basis of the association. *Current opinion in immunology*. 2007 Dec;19(6):633-9.

236. Svenungsson E, Fei GZ, Jensen-Urstad K, de Faire U, Hamsten A, Frostegard J. TNF-alpha: a link between hypertriglyceridaemia and inflammation in SLE patients with cardiovascular disease. *Lupus*. 2003;12(6):454-61.

237. Svenungsson E, Cederholm A, Jensen-Urstad K, Fei GZ, de Faire U, Frostegard J. Endothelial function and markers of endothelial activation in relation to cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol*. 2008 Sep-Oct;37(5):352-9.

238. Major AS, Singh RR, Joyce S, Van Kaer L. The role of invariant natural killer T cells in lupus and atherogenesis. *Immunol Res*. 2006;34(1):49-66.

239. Becker-Merok A, Eilertsen GO, Nossent JC. Levels of transforming growth factor-beta are low in systemic lupus erythematosus patients with active disease. *J Rheumatol*. 2010 Oct;37(10):2039-45.

240. Mok MY, Wu HJ, Lo Y, Lau CS. The relation of interleukin 17 (IL-17) and IL-23 to Th1/Th2 cytokines and disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2010 Oct;37(10):2046-52.

241. Yang J, Chu Y, Yang X, Gao D, Zhu L, Wan L, et al. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2009 May;60(5):1472-83.

242. Braun N, Wade NS, Wakeland EK, Major AS. Accelerated atherosclerosis is independent of feeding high fat diet in systemic lupus erythematosus-susceptible LDLr(-/-) mice. *Lupus*. 2008 Dec;17(12):1070-8.

243. Niessner A, Weyand CM. Dendritic cells in atherosclerotic disease. *Clin Immunol*. 2010 Jan;134(1):25-32.

244. Kaplan MJ, Lewis EE, Sheldon EA, Somers E, Pavlic R, McCune WJ, et al. The apoptotic ligands TRAIL, TWEAK, and Fas ligand mediate monocyte death induced by autologous lupus T cells. *Journal of immunology*. 2002 Nov 15;169(10):6020-9.

245. Al-Lamki RS, Bradley JR, Pober JS. Endothelial cells in allograft rejection. *Transplantation*. 2008 Nov 27;86(10):1340-8.

246. Bonelli M, Smolen JS, Scheinecker C. Treg and lupus. *Ann Rheum Dis*. 2010 Jan;69 Suppl 1:i65-6.

247. Nilsson J, Wigren M, Shah PK. Regulatory T cells and the control of modified lipoprotein autoimmunity-driven atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2009 Nov;19(8):272-6.
248. Bassi N, Zampieri S, Ghirardello A, Tonon M, Zen M, Beggio S, et al. oxLDL/beta2GPI complex and anti-oxLDL/beta2GPI in SLE: prevalence and correlates. *Autoimmunity*. 2009 May;42(4):289-91.
249. Fraser DA, Tenner AJ. Innate immune proteins C1q and mannan-binding lectin enhance clearance of atherogenic lipoproteins by human monocytes and macrophages. *Journal of immunology*. 2010 Oct 1;185(7):3932-9.
250. Haskard DO, Boyle JJ, Mason JC. The role of complement in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2008 Oct;19(5):478-82.
251. Mayadas TN, Tsokos GC, Tsuboi N. Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. *Circulation*. 2009 Nov 17;120(20):2012-24.
252. Wang G, Pierangeli SS, Papalardo E, Ansari GA, Khan MF. Markers of oxidative and nitrosative stress in systemic lupus erythematosus: correlation with disease activity. *Arthritis Rheum*. 2010 Jul;62(7):2064-72.
253. Ames PR, Margarita A, Delgado Alves J, Tommasino C, Iannaccone L, Brancaccio V. Anticardiolipin antibody titre and plasma homocysteine level independently predict intima media thickness of carotid arteries in subjects with idiopathic antiphospholipid antibodies. *Lupus*. 2002;11(4):208-14.
254. Kiani AN, Magder L, Petri M. Coronary calcium in systemic lupus erythematosus is associated with traditional cardiovascular risk factors, but not with disease activity. *J Rheumatol*. 2008 Jul;35(7):1300-6.
255. Delgado Alves J, Ames PR, Donohue S, Stanyer L, Nourooz-Zadeh J, Ravirajan C, et al. Antibodies to high-density lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum*. 2002 Oct;46(10):2686-94.
256. Meroni PL, D'Cruz D, Khamashta M, Youinou P, Hughes GR. Anti-endothelial cell antibodies: only for scientists or for clinicians too? *Clinical and experimental immunology*. 1996 May;104(2):199-202.
257. Renaudineau Y, Dugue C, Dueymes M, Youinou P. Antiendothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2002 Dec;1(6):365-72.
258. del Papa N, Meroni PL, Barcellini W, Sinico A, Radice A, Tincani A, et al. Antibodies to endothelial cells in primary vasculitides mediate in vitro endothelial cytotoxicity in the presence of normal peripheral blood mononuclear cells. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992 Jun;63(3):267-74.
259. Cines DB, Lyss AP, Reeber M, Bina M, DeHoratius RJ. Presence of complement-fixing anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 1984 Mar;73(3):611-25.
260. Del Papa N, Guidali L, Sironi M, Shoenfeld Y, Mantovani A, Tincani A, et al. Anti-endothelial cell IgG antibodies from patients with Wegener's granulomatosis bind to human endothelial cells in vitro and induce adhesion molecule expression and cytokine secretion. *Arthritis Rheum*. 1996 May;39(5):758-66.
261. Blank M, Krause I, Goldkorn T, Praprotnik S, Livneh A, Langevitz P, et al. Monoclonal anti-endothelial cell antibodies from a patient with Takayasu arteritis activate endothelial cells from large vessels. *Arthritis Rheum*. 1999 Jul;42(7):1421-32.



262. Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J Clin Invest.* 1996 Jan 1;97(1):111-9.
263. Carvalho D, Savage CO, Isenberg D, Pearson JD. IgG anti-endothelial cell autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus or systemic vasculitis stimulate the release of two endothelial cell-derived mediators, which enhance adhesion molecule expression and leukocyte adhesion in an autocrine manner. *Arthritis Rheum.* 1999 Apr;42(4):631-40.
264. Praprotnik S, Blank M, Levy Y, Tavor S, Boffa MC, Weksler B, et al. Anti-endothelial cell antibodies from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura specifically activate small vessel endothelial cells. *International immunology.* 2001 Feb;13(2):203-10.
265. Red-Horse K, Ueno H, Weissman IL, Krasnow MA. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature.* 2010 Mar 25;464(7288):549-53.
266. Gimbrone MA, Jr., Nagel T, Topper JN. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest.* 1997 Dec 1;100(11 Suppl):S61-5.
267. Narshi CB, Giles IP, Rahman A. The endothelium: an interface between autoimmunity and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus? *Lupus.* 2011 Jan;20(1):5-13.
268. Rodrigues CE, Bonfa E, Carvalho JF. Review on anti-lipoprotein lipase antibodies. *Clin Chim Acta.* 2010 Nov 11;411(21-22):1603-5.
269. Mandal K, Foteinos G, Jahangiri M, Xu Q. Role of antiheat shock protein 60 autoantibodies in atherosclerosis. *Lupus.* 2005;14(9):742-6.
270. Domiciano DS, Carvalho JF, Shoenfeld Y. Pathogenic role of anti-endothelial cell antibodies in autoimmune rheumatic diseases. *Lupus.* 2009 Nov;18(13):1233-8.
271. Duval A, Helley D, Capron L, Youinou P, Renaudineau Y, Dubucquoi S, et al. Endothelial dysfunction in systemic lupus patients with low disease activity: evaluation by quantification and characterization of circulating endothelial microparticles, role of anti-endothelial cell antibodies. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Jun;49(6):1049-55.
272. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.* 1998 Jan 1;31(1):1-9.
273. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995 Jul 17;184(1):39-51.
274. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971 Sep;8(9):871-4.
275. Waldman M, Madaio MP. Pathogenic autoantibodies in lupus nephritis. *Lupus.* 2005;14(1):19-24.
276. Raz E, Brezis M, Rosenmann E, Eilat D. Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney. *Journal of immunology.* 1989 May 1;142(9):3076-82.
277. Kozyr AV, Sashchenko LP, Kolesnikov AV, Zelenova NA, Khaidukov SV, Ignatova AN, et al. Anti-DNA autoantibodies reveal toxicity to tumor cell lines. *Immunol Lett.* 2002 Jan 1;80(1):41-7.
278. Papakonstanti EA, Stournaras C. Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 2008 Jun 18;582(14):2120-7.

279. Flusberg DA, Numaguchi Y, Ingber DE. Cooperative control of Akt phosphorylation, bcl-2 expression, and apoptosis by cytoskeletal microfilaments and microtubules in capillary endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 2001 Oct;12(10):3087-94.
280. Franklin-Tong VE, Gourlay CW. A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. *Biochem J*. 2008 Aug 1;413(3):389-404.
281. Papadopoulou N, Charalampopoulos I, Alevizopoulos K, Gravanis A, Stournaras C. Rho/ROCK/actin signaling regulates membrane androgen receptor induced apoptosis in prostate cancer cells. *Exp Cell Res*. 2008 Oct 15;314(17):3162-74.
282. Ting HJ, Chang C. Actin associated proteins function as androgen receptor coregulators: an implication of androgen receptor's roles in skeletal muscle. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008 Sep;111(3-5):157-63.
283. Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H, Choubey D. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Lett*. 2006 Apr 17;580(9):2294-300.
284. Faulstich H, Trischmann H, Mayer D. Preparation of tetramethylrhodaminyl-phalloidin and uptake of the toxin into short-term cultured hepatocytes by endocytosis. *Exp Cell Res*. 1983 Mar;144(1):73-82.
285. Bagli E, Stefanidou M, Morbidelli L, Ziche M, Psillas K, Murphy C, et al. Luteolin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis; inhibition of endothelial cell survival and proliferation by targeting phosphatidylinositol 3'-kinase activity. *Cancer Res*. 2004 Nov 1;64(21):7936-46.
286. Madaio MP, Carlson J, Cataldo J, Ucci A, Migliorini P, Pankewycz O. Murine monoclonal anti-DNA antibodies bind directly to glomerular antigens and form immune deposits. *Journal of immunology*. 1987 May 1;138(9):2883-9.
287. Linton PL, Decker DJ, Klinman NR. Primary antibody-forming cells and secondary B cells are generated from separate precursor cell subpopulations. *Cell*. 1989 Dec 22;59(6):1049-59.
288. Song YC, Sun GH, Lee TP, Huang JC, Yu CL, Chen CH, et al. Arginines in the CDR of anti-dsDNA autoantibodies facilitate cell internalization via electrostatic interactions. *European journal of immunology*. 2008 Nov;38(11):3178-90.
289. Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*. 1994 Apr 8;269(14):10444-50.
290. Maniti O, Blanchard E, Trugnan G, Lamaziere A, Ayala-Sanmartin J. Metabolic energy-independent mechanism of internalization for the cell penetrating peptide penetratin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 Jun;44(6):869-75.
291. Pooga M, Soomets U, Hallbrink M, Valkna A, Saar K, Rezaei K, et al. Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat Biotechnol*. 1998 Sep;16(9):857-61.
292. Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994 Jan 18;91(2):664-8.
293. Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L, Rothbard JB. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000 Nov 21;97(24):13003-8.

294. Deshayes S, Morris MC, Divita G, Heitz F. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Aug;62(16):1839-49.
295. Meade BR, Dowdy SF. Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 Mar 30;59(2-3):134-40.
296. Morris MC, Deshayes S, Heitz F, Divita G. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol Cell.* 2008 Apr;100(4):201-17.
297. Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem.* 1997 Jun 20;272(25):16010-7.
298. Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell.* 1997 Jan 24;88(2):223-33.
299. Traub LM. Clathrin couture: fashioning distinctive membrane coats at the cell surface. *PLoS Biol.* 2009 Sep;7(9):e1000192.
300. Lamaziere A, Burlina F, Wolf C, Chassaing G, Trugnan G, Ayala-Sanmartin J. Non-metabolic membrane tubulation and permeability induced by bioactive peptides. *PLoS One.* 2007;2(2):e201.
301. Kramers K, van Bruggen MC, Rijke-Schilder TP, Dijkman HB, Hylkema MN, Croes HJ, et al. In vivo ANA is a fixation artifact: nucleosome-complexed antinucleosome autoantibodies bind to the cell surface and are internalized. *J Am Soc Nephrol.* 1996 Jun;7(6):946-54.
302. Guo H, Leung JC, Chan LY, Chan TM, Lai KN. The pathogenetic role of immunoglobulin G from patients with systemic lupus erythematosus in the development of lupus pleuritis. *Rheumatology (Oxford).* 2004 Mar;43(3):286-93.
303. Kramers C, Hylkema MN, van Bruggen MC, van de Lagemaat R, Dijkman HB, Assmann KJ, et al. Anti-nucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement membrane in vivo. *J Clin Invest.* 1994 Aug;94(2):568-77.
304. Chan TM, Frampton G, Staines NA, Hobby P, Perry GJ, Cameron JS. Different mechanisms by which anti-DNA MoAbs bind to human endothelial cells and glomerular mesangial cells. *Clinical and experimental immunology.* 1992 Apr;88(1):68-74.
305. Avrameas A, Gasmi L, Buttin G. DNA and heparin alter the internalization process of anti-DNA monoclonal antibodies according to patterns typical of both the charged molecule and the antibody. *Journal of autoimmunity.* 2001 Jun;16(4):383-91.
306. Bell CW, Jiang W, Reich CF, 3rd, Pisetsky DS. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Dec;291(6):C1318-25.
307. Waldenstrom A, Genneback N, Hellman U, Ronquist G. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One.* 2012;7(4):e34653.
308. Hariton-Gazal E, Rosenbluh J, Graessmann A, Gilon C, Loyter A. Direct translocation of histone molecules across cell membranes. *J Cell Sci.* 2003 Nov 15;116(Pt 22):4577-86.
309. Kaouass M, Beaulieu R, Balicki D. Histonefection: Novel and potent non-viral gene delivery. *J Control Release.* 2006 Jul 20;113(3):245-54.
310. Li S, Huang L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther.* 2000 Jan;7(1):31-4.
311. Strunze S, Trotman LC, Boucke K, Greber UF. Nuclear targeting of adenovirus type 2 requires CRM1-mediated nuclear export. *Mol Biol Cell.* 2005 Jun;16(6):2999-3009.

312. Nabi IR, Le PU. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol.* 2003 May 26;161(4):673-7.
313. Coritsidis GN, Beers PC, Rumore PM. Glomerular uptake of nucleosomes: evidence for receptor-mediated mesangial cell binding. *Kidney Int.* 1995 May;47(5):1258-65.
314. Bell DA, Morrison B. The spontaneous apoptotic cell death of normal human lymphocytes in vitro: the release of, and immunoproliferative response to, nucleosomes in vitro. *Clin Immunol Immunopathol.* 1991 Jul;60(1):13-26.
315. Hefeneider SH, Cornell KA, Brown LE, Bakke AC, McCoy SL, Bennett RM. Nucleosomes and DNA bind to specific cell-surface molecules on murine cells and induce cytokine production. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992 Jun;63(3):245-51.
316. Le Lann AD, Fournie GJ, Boissier L, Toutain PL, Benoist H. In vitro inhibition of natural-killer-mediated lysis by chromatin fragments. *Cancer Immunol Immunother.* 1994 Sep;39(3):185-92.
317. Laderach D, Bach JF, Koutouzov S. Nucleosomes inhibit phagocytosis of apoptotic thymocytes by peritoneal macrophages from MRL+/+ lupus-prone mice. *J Leukoc Biol.* 1998 Dec;64(6):774-80.
318. Nevinsky GA, Buneva VN. Natural catalytic antibodies in norm, autoimmune, viral, and bacterial diseases. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:1203-33.
319. Rodkey LS, Gololobov G, Rumbley CA, Rumbley J, Schourov DV, Makarevich OI, et al. DNA hydrolysis by monoclonal autoantibody BV 04-01. *Appl Biochem Biotechnol.* 2000 Jan-Mar;83(1-3):95-103; discussion -5, 45-53.
320. Suchkov SV, Gabibov AG, Gnuchev NV, Alekberova ZS. The Distribution of DNA-Abzymes in Patients with Different Types of Systemic and Organ-Specific Autoimmune Disorders. *Russ J Immunol.* 2001 Oct;6(3):309-12.
321. Shoenfeld Y, Mozes E. Pathogenic anti-DNA idiotype (16/6 Id) in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 1991;11(3):91-3.
322. Sashchenko LP, Khaidukov SV, Kozyr AV, Luk'yanova TI, Gabibov AG, Suchkov SV, et al. Caspase-dependent cytotoxicity of anti-DNA autoantibodies. *Dokl Biochem Biophys.* 2001 Sep-Oct;380:313-5.
323. Parkhomenko TA, Odintsova ES, Buneva VN, Kunder EV, Zhylytsov IV, Senkovich SA, et al. DNA-hydrolysing activity of IgG antibodies from the sera of patients with diseases caused by different bacterial infections. *J Cell Mol Med.* 2009 Sep;13(9A):2875-87.
324. Panopoulou E, Murphy C, Rasmussen H, Bagli E, Rofstad EK, Fotsis T. Activin A suppresses neuroblastoma xenograft tumor growth via antimitotic and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res.* 2005 Mar 1;65(5):1877-86.
325. Burdette JE, Jeruss JS, Kurley SJ, Lee EJ, Woodruff TK. Activin A mediates growth inhibition and cell cycle arrest through Smads in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2005 Sep 1;65(17):7968-75.
326. Kivinen L, Laiho M. Ras- and mitogen-activated protein kinase kinase-dependent and -independent pathways in p21Cip1/Waf1 induction by fibroblast growth factor-2, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor-beta1. *Cell Growth Differ.* 1999 Sep;10(9):621-8.
327. Yung S, Chan TM. Anti-DNA antibodies in the pathogenesis of lupus nephritis--the emerging mechanisms. *Autoimmun Rev.* 2008 Feb;7(4):317-21.
328. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004 Dec;56(4):549-80.

329. Gatenby PA, Irvine M. The bcl-2 proto-oncogene is overexpressed in systemic lupus erythematosus. *Journal of autoimmunity*. 1994 Oct;7(5):623-31.
330. Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA. Bcl-2 expression is unaltered in unfractionated peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol*. 1995 Apr;34(4):316-20.
331. Fenton K, Fisman S, Hedberg A, Sereckina N, Fenton C, Mortensen ES, et al. Anti-dsDNA antibodies promote initiation, and acquired loss of renal Dnase1 promotes progression of lupus nephritis in autoimmune (NZBxNZW)F1 mice. *PLoS One*. 2009;4(12):e8474.
332. Emlen W, Mannik M. Clearance of circulating DNA-anti-DNA immune complexes in mice. *J Exp Med*. 1982 Apr 1;155(4):1210-5.
333. Hansen JE, Fischer LK, Chan G, Chang SS, Baldwin SW, Aragon RJ, et al. Antibody-mediated p53 protein therapy prevents liver metastasis in vivo. *Cancer Res*. 2007 Feb 15;67(4):1769-74.
334. Weisbart RH, Gera JF, Chan G, Hansen JE, Li E, Cloninger C, et al. A cell-penetrating bispecific antibody for therapeutic regulation of intracellular targets. *Mol Cancer Ther*. 2012 Oct;11(10):2169-73.
335. Vlahakos D, Foster MH, Ucci AA, Barrett KJ, Datta SK, Madaio MP. Murine monoclonal anti-DNA antibodies penetrate cells, bind to nuclei, and induce glomerular proliferation and proteinuria in vivo. *J Am Soc Nephrol*. 1992 Feb;2(8):1345-54.
336. Lai KN, Leung JC, Lai KB, Lai CK. Effect of anti-DNA autoantibodies on the gene expression of interleukin 8, transforming growth factor-beta, and nitric oxide synthase in cultured endothelial cells. *Scand J Rheumatol*. 1997;26(6):461-7.
337. Yung S, Cheung KF, Zhang Q, Chan TM. Anti-dsDNA antibodies bind to mesangial annexin II in lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Nov;21(11):1912-27.
338. Mostoslavsky G, Fischel R, Yachimovich N, Yarkoni Y, Rosenmann E, Monestier M, et al. Lupus anti-DNA autoantibodies cross-react with a glomerular structural protein: a case for tissue injury by molecular mimicry. *European journal of immunology*. 2001 Apr;31(4):1221-7.
339. Termaat RM, Assmann KJ, van Son JP, Dijkman HB, Koene RA, Berden JH. Antigen-specificity of antibodies bound to glomeruli of mice with systemic lupus erythematosus-like syndromes. *Lab Invest*. 1993 Feb;68(2):164-73.
340. Haramoto T, Makino H, Ikeda S, Wieslander J, Ota Z. Ultrastructural localization of the three major basement membrane components--type IV collagen, heparan sulfate proteoglycan and laminin--in human membranous glomerulonephritis. *Am J Nephrol*. 1994;14(1):30-6.
341. Krishnan MR, Wang C, Marion TN. Anti-DNA autoantibodies initiate experimental lupus nephritis by binding directly to the glomerular basement membrane in mice. *Kidney Int*. 2012 Jul;82(2):184-92.
342. Kootstra CJ, Bergijk EC, Veninga A, Prins FA, de Heer E, Abrahamson DR, et al. Qualitative alterations in laminin expression in experimental lupus nephritis. *Am J Pathol*. 1995 Aug;147(2):476-88.
343. Turck N, Lefebvre O, Gross I, Gendry P, Kedinger M, Simon-Assmann P, et al. Effect of laminin-1 on intestinal cell differentiation involves inhibition of nuclear nucleolin. *J Cell Physiol*. 2006 Feb;206(2):545-55.

344. Huang Y, Shi H, Zhou H, Song X, Yuan S, Luo Y. The angiogenic function of nucleolin is mediated by vascular endothelial growth factor and nonmuscle myosin. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3564-71.
345. Haas TL. Endothelial cell regulation of matrix metalloproteinases. *Can J Physiol Pharmacol*. 2005 Jan;83(1):1-7.
346. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Mar;25(1):9-34.
347. Birmpas C, Briand JP, Courty J, Katsoris P. Nucleolin mediates the antiangiogenesis effect of the pseudopeptide N6L. *BMC Cell Biol*. 2012;13:32.
348. Destouches D, El Khoury D, Hamma-Kourbali Y, Krust B, Albanese P, Katsoris P, et al. Suppression of tumor growth and angiogenesis by a specific antagonist of the cell-surface expressed nucleolin. *PLoS One*. 2008;3(6):e2518.
349. Fujii H, Nakatani K, Arita N, Ito MR, Terada M, Miyazaki T, et al. Internalization of antibodies by endothelial cells via fibronectin implicating a novel mechanism in lupus nephritis. *Kidney Int*. 2003 Nov;64(5):1662-70.
350. Trehin R, Merkle HP. Chances and pitfalls of cell penetrating peptides for cellular drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004 Sep;58(2):209-23.
351. Wadia JS, Dowdy SF. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005 Feb 28;57(4):579-96.
352. Ruiz-Arguelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Alarcon-Segovia D. Antibody penetration into living cells: pathogenic, preventive and immuno-therapeutic implications. *Curr Pharm Des*. 2003;9(23):1881-7.