



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Κατασκευή, απομόνωση και παραγωγή ανασυνδυασμένων τμημάτων
ανθρώπινων αντισωμάτων έναντι καρκινικών αντιγόνων»**

Της Ανδριάνας Παπαδημητροπούλου

Βιολόγου, MSc.

ΑΘΗΝΑ 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Εμμανουήλ Φραγκούλης	Καθηγητής (Επιβλέπων), Τομέας Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
Διδώ Βασιλακοπούλου	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
Ανδρέας Σκορίλας	Καθηγητής, Τομέας Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Εμμανουήλ Φραγκούλης	Καθηγητής (Επιβλέπων), Τομέας Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
Διδώ Βασιλακοπούλου	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
Ανδρέας Σκορίλας	Καθηγητής, Τομέας Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
Διαμάντης Σίδερης	Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σπύρος Ευθυμιόπουλος	Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σοφία Τσιτήλου	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
Αυγή Μαμαλάκη	Ερευνήτρια Α, Τομέας Βιοχημείας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

N. 5343/1932 άρθρο 202

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσοβιοτεχνολογίας του τομέα Βιοχημείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Θα ήθελα ολόψυχα να ευχαριστήσω το ΕΙΠ και ιδιαίτερα την επιβλέπουσα ερευνήτρια Αυγή Μαμαλάκη για τις επιστημονικές γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσε και τη συνεχή καθοδήγησή της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον επιβλέποντα καθηγητή Εμμανουήλ Φραγκούλη, την αναπλ.καθηγήτρια Διδώ Βασιλακοπούλου και τον καθηγητή Ανδρέα Σκορίλα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν στην ανάθεση του θέματος.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στους συναδέρφους που μοιραστήκαμε τον ίδιο χώρο και τις ίδιες αγωνίες όλα αυτά τα χρόνια, για όλες τις χαρούμενες αλλά και δύσκολες στιγμές που ζήσαμε μαζί και κυρίως για την αλληλεγγύη και τη βοήθεια που παρείχε ο ένας στον άλλο κάθε φορά που ήταν αναγκαίο. Έτσι λοιπόν, ευχαριστώ τους: Αλέξη Δημητριάδη, Δημήτρη Στέλλα, Αβραάμ Ελ Χαμιντιέ, Παναγιώτη Πολίτη, Κατερίνα Σιδερά, Διονύση Γιαννημάρα, Λένα Κυρατζοπούλου, Πέτρο Ηλιάδη, Βαγγέλη Ντούγκο, Σύλβια Μπίστη, Δήμητρα Μακατσώρη, Δάφνη Παπαπέτρου, Μαρία Σαμοΐλη, Αλκέτα Στέφα, Ουρανία Μπενιάτα, Πέτρο Γκιάστα, Κώστα Λαζαρίδη, Ράνια Γεωργοπούλου, Πέλλη Φωκά, Αγγελική Αραπάκη, Τάσο Μαΐδη και Μυρσίνη Αζαραφλού. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στον οικογενειακό μας φίλο, καθηγητή Αναστάσιο Μαλάκη για την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωση της διατριβής.

Πέρα από τους φίλους που απέκτησα εντός του εργαστηρίου, θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω όλους τους αγαπημένους μου ανθρώπους, που μου συμπαράσταθηκαν και με εμπύχωναν αγόγγυστα σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Κατερίνα Ξεκαρδάκη, Ευαγγελία Κουρεπίνη, Αριστόδημο Ρουσάκη, Δημήτριο Καλαφατά, Εμμανουέλα Μοδάτσου, Μανώλη Πολάκη, Δέσποινα Αποστολοπούλου, Γιώργο Πορετσάνο, Γιάννη Κρασάκη, Κωνσταντίνα Σκρέκα, Κατερίνα Μπίτου, Χρήστο Μπίτο, Γιώργο Φράγκο, Χρήστο Παππά, Βασιλική Πλατή, Ορέστη Σιώπη, Αγγελική Κοσματοπούλου, Άλκηστη Ζαλοκώστα, Σταυρούλα Σκαρμούτσου, Βασίλη Μπουντουβή, Τζίνα Ιατρίδου, Ασπασία Βλάχου, Δήμητρα Δελλή, Μαρία Παπαδημητροπούλου και Έλενα Παπαδημητροπούλου.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ απευθύνεται στους γονείς μου Δημήτριο και Ελένη, για την αμέριστη συμπαράστασή τους, την οικονομική ενίσχυση, την κατανόηση και την αγάπη τους. Χωρίς εκείνους, θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της διατριβής αυτής και θα τους είμαι ευγνώμων για μια ζωή.

...στους γονείς μου, τους ήρωές μου, Δημήτριο και Ελένη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1. Καρκίνος	13
1.1 Καρκινικά αντιγόνα	13
2. Μεταλλοπρωτεϊνάσες και καρκίνος.....	15
2.1. Γενικά χαρακτηριστικά μεταλλοπρωτεϊνών	15
2.2. Κατηγορίες μεταλλοπρωτεϊνών.	15
2.3 Δομή μεταλλοπρωτεϊνών	18
2.4. Ρύθμιση της δραστηριότητας των μεταλλοπρωτεϊνών	20
2.5. Μεταλλοπρωτεϊνάσες και μετάσταση.....	22
3. Επαγωγέας των Μεταλλοπρωτεϊνών EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer)	24
3.1. Εισαγωγή	24
3.2. Η δομή της EMMPRIN	25
3.3. Το γονίδιο της EMMPRIN (CD147/basigin).....	27
3.4. Ισομορφές της EMMPRIN.....	28
3.5. Κυτταρική έκφραση της EMMPRIN	30
3.6. Λειτουργίες της EMMPRIN στους φυσιολογικούς ιστούς.....	30
3.6.1. EMMPRIN και αναδόμηση/αποκατάσταση των ιστών	31
3.6.2. EMMPRIN και αναπαραγωγή	31
3.6.3. EMMPRIN και όραση.....	32
3.6.4. EMMPRIN και ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων	32
3.6.5. EMMPRIN και κεντρικό νευρικό σύστημα	33
3.6.6. EMMPRIN και κυτταρική διαφοροποίηση.....	33
3.6.7. Επιπλέον λειτουργίες της EMMPRIN	34
3.7. Στόχευση της EMMPRIN στην κυτταρική μεμβράνη και μηχανισμός δράσης	35
3.7.1. Στόχευση στην κυτταρική μεμβράνη	35
3.7.2. Μηχανισμός δράσης της EMMPRIN.....	36
3.8. EMMPRIN ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	37
3.8.1. Έκφραση της EMMPRIN στον καρκίνο	37
3.8.2. EMMPRIN και μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs).....	37
3.8.3. EMMPRIN και VEGF	40
3.8.4. EMMPRIN και επαγωγέας της ουροκινάσης πλασμινογόνου.....	41
3.8.5. EMMPRIN και κυκλοφιλίνες	43
3.8.6. EMMPRIN και Μεταφορείς Μονοκαρβοξυλικών οξέων (Monocarboxylate transporters, MCTs)	44
3.8.7. EMMPRIN και ιντεγκρίνες.....	45
3.8.8. EMMPRIN και καβεολίνη-1	46

3.8.9.	EMMPRIN και αντίσταση στη χημειοθεραπεία	49
4.	Αντισώματα έναντι της EMMPRIN	52
	ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	55
	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	57
A.	ΥΛΙΚΑ	58
A.1.	Εργαστηριακός εξοπλισμός	58
A.2.	Γενικά Αναλώσιμα, Πλαστικά	59
A.3.	Αντιδραστήρια	60
A.4.	Αντισώματα.....	62
A.5.	Διαλύματα	63
A.5.1.	Ρυθμιστικά διαλύματα:	63
A.5.2.	Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE).....	64
A.5.3.	Διαλύματα ανάλυσης και επεξεργασίας DNA.	66
A.5.4.	Διαλύματα παρασκευής πλασμιδιακού DNA σε μικρή και μεγάλη κλίμακα	67
A.5.5.	Διαλύματα για τη διαδικασία επιλογής φάγων (panning).....	67
A.5.6.	Ανασύσταση αντιβιοτικών	68
A.5.7.	Διάλυμα ομογενοποίησης του υποδοχέα EMMPRIN.....	68
A.6.	Κυτταρικές σειρές	68
A.7.	Εναρκτήρια μόρια	69
A.8.	Θρεπτικά Υλικά για καλλιέργειες <i>E. coli</i> και βακτηριοφάγων.....	70
A.9.	Θρεπτικά Υλικά για καλλιέργειες μυκήτων <i>Pichia pastoris</i>	71
B.	Στελέχη βακτηρίων <i>E.coli</i> και ζυμομύκητα <i>P.pastoris</i>, πλασμίδια, βακτηριοφάγοι.....	72
B.1.	Βακτηριακά στελέχη, πλασμίδια και βακτηριοφάγοι.	72
B.2.	Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης και κυτταρικά στελέχη <i>Pichia pastoris</i>	78
Γ.	Μέθοδοι.....	80
Γ.1.	Μέθοδοι Απομόνωσης Πλασμιδιακού DNA από Καλλιέργειες Βακτηρίων.....	80
Γ.1.1.	Απομόνωση μικρής ποσότητας πλασμιδιακού DNA.....	80
Γ.1.2.	Απομόνωση μεγάλης ποσότητας DNA.....	80
Γ.2.	Ανάλυση Μορίων DNA με Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης	81
Γ.3.	Καθαρισμός τμήματος DNA.....	82
Γ.3.1.	Με εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες (φαινόλη-χλωροφόρμιο).....	82
Γ.3.2.	Από πήκτωμα αγαρόζης	82
Γ.3.3.	Προϊόντα Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης ή/και Ενζυμικών Αντιδράσεων	83
Γ.4.	Πέψη μορίων DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	84
Γ.5.	Σύνδεση του πλασμιδιακού φορέα και του υπό κλωνοποίηση DNA μορίου με T4 DNA λιγάση.....	84
Γ.6.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)/Ποσοτική αντίδραση Q-PCR	85
Γ.7.	Κατακρήμνιση του DNA	86
Γ.8.	Μετασχηματισμός βακτηρίων.....	87
Γ.8.1.	Μετασχηματισμός <i>E.coli</i> με τη Μέθοδο της Ηλεκτροδιάτασης.....	87
Γ.8.2.	Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη Μέθοδο του Θερμικού Σοκ	89

Γ.9.	Έκφραση συνδυαστικής Fab βιβλιοθήκης στην επιφάνεια βακτηριοφάγων. Διαδικασία επιλογής (Bioanning), Fab τμήματος από τη βιβλιοθήκη βακτηριοφάγων έναντι ειδικού αντιγόνου	90
Γ.9.1.	Παρασκευή βοηθητικού βακτηριοφάγου VCSM13.....	90
Γ.9.2.	Πολλαπλασιασμός Fab βιβλιοθήκης βακτηριοφάγων	91
Γ.9.3.	Διαδικασία επιλογής Fab (Panning).....	93
Γ.9.4.	Παραγωγή διαλυτών Fab σε μικρή κλίμακα για τον έλεγχο και τη διάσωση θετικών κλώνων ως προς την αναγνώριση του αντιγόνου.....	95
Γ.9.5.	Παραγωγή διαλυτών Fab ή άλλων διαλυτών πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα, από θετικούς ως προς την αναγνώριση του αντιγόνου κλώνων	96
Γ.9.6.	Χρωματογραφία συγγένειας με στήλη αντισώματος-protein G	97
Γ.10.	Μετασχηματισμός κυττάρων <i>P. pastoris</i> με ηλεκτροδιάταξη.....	97
Γ.10.1.	Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>P. pastoris</i>	98
Γ.10.2.	Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>P. pastoris</i>	99
Γ.11.	Έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στην <i>P. pastoris</i>	99
Γ.11.1.	Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας <i>P. pastoris</i>	100
Γ.11.2.	Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας <i>P. pastoris</i>	100
Γ.12.	Απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από υπερκείμενο καλλιέργειας <i>P. pastoris</i>	101
Γ.12.1.	Συμπύκνωση υπερκείμενου καλλιέργειας <i>P. pastoris</i>	101
Γ.12.2.	Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας με στήλη Ni ²⁺ -NTA.....	102
Γ.13.	In vitro απογλυκοζυλίωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών	103
Γ.14.	Ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου παρουσία SDS (SDS-PAGE).....	104
Γ.15.	Μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοενζυμικός χαρακτηρισμός τους	105
Γ.16.	Φασματοσκοπικές μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών.	107
Γ.16.1.	Μέτρηση οπτικής πυκνότητας	107
Γ.16.2.	Μέθοδος Bradford.....	107
Γ.17.	Χρώση πρωτεϊνών.....	107
Γ.17.1.	Χρώση Coomassie Brilliant Blue.....	107
Γ.17.2.	Χρώση αργύρου (silver).....	108
Γ.18.	Παραγωγή ολόκληρου ανθρώπινου αντισώματος με επιμόλυνση CHO κυττάρων	108
Γ.19.	Παρασκευή μεμβρανικού εκχυλίσματος και διαλυτού μεμβρανικού υποδοχέα από κυτταρική σειρά θηλαστικών.....	110
Γ.20.	Ανοσοδιαγνωστικές τεχνικές	111
Γ.20.1.	Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός ELISA.....	111
Γ.20.2.	Ανοσοκαθίζηση.....	112
Γ.21.	Μελέτη της μετάστασης σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων με τη μέθοδο επούλωσης του χάσματος.....	113

Γ.22.	Μελέτη της μετάστασης σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων με τη μέθοδο διήθησης της εξωκυττάριας ουσίας.....	114
Γ.23.	Ζυμογραφία.....	115
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....		117
A.	Ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης ECD-EMMPRIN στο ζυμομύκητα <i>Pichia pastoris</i> και απομόνωση ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs) έναντι αυτής.....	118
A.1.	Κλωνοποίηση του μορίου ECD-EMMPRIN στο φορέα έκφρασης pPICZαB	118
A.2.	Έκφραση του ανασυνδυασμένου μορίου ECD-EMMPRIN από μετασχηματισμένα στελέχη <i>P.pastoris</i> σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας	123
A.3.	Έκφραση μεγάλης κλίμακας ανασυνδυασμένου μορίου ECD-EMMPRIN στην <i>P.pastoris</i>	124
A.4.	Βιοχημικός χαρακτηρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ECD-EMMPRIN	125
A.4.1.	Απογλυκοζυλίωση του μορίου.....	125
A.4.2.	Ανάλυση κατά Western.....	126
A.5.	Λειτουργικότητα της πρωτεΐνης ECD-EMMPRIN	127
A.6.	Απομόνωση ανθρώπινου αντισώματος έναντι της ECD-EMMPRIN.....	129
A.6.1.	Ενίσχυση της βιβλιοθήκης των φάγων-αντισωμάτων	130
A.6.2.	Επιλογή φάγων-αντισωμάτων έναντι της ECD-EMMPRIN	130
A.6.3.	Απομόνωση μεμονωμένων κλώνων φάγων-αντισωμάτων και ανάλυση με τη μέθοδο ELISA.....	133
A.6.4.	Απομόνωση μεμονωμένων κλώνων φάγων-αντισωμάτων και fingerprinting ανάλυση	134
A.6.5.	Νουκλεοτιδική και αμινοξική ανάλυση του Fab7	135
A.6.6.	Διαλυτή έκφραση των Fab τμημάτων των αντισωμάτων	136
A.7.	Κατασκευή ολόκληρου του ανθρώπινου μονοκλωνικού αντισώματος mAb7	139
A.8.	Βιοχημικός χαρακτηρισμός των μορίων Fab7 και mAb7.....	140
A.8.1.	Ανάλυση με τη μέθοδο ELISA	140
A.8.2.	Αναγνώριση του φυσικού μορίου EMMPRIN με ανοσοκαθίζηση	141
A.8.3.	Αναγνώριση του φυσικού μορίου EMMPRIN σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές με ανάλυση κατά Western.....	142
A.8.4.	Έλεγχος της αναστολής της διηθητικής ικανότητας καρκινικών κυττάρων παρουσία των Fab7 και mAb7	144
A.8.4.1.	Έλεγχος της αναστολής της μεταναστευτικής ικανότητας καρκινικών κυττάρων παρουσία των Fab7 ή mAb7 με τη δοκιμασία «επούλωσης πληγής»	144
A.8.4.2.	Έλεγχος της αναστολής της διηθητικής ικανότητας καρκινικών κυττάρων παρουσία των Fab7 ή mAb7 αντισωμάτων.....	146
A.9.	Έλεγχος της λειτουργικότητας του αντισώματος mAb7 ως προς την επαγωγή της MMP-2 με τη μέθοδο της ζυμογραφίας.....	147

B.	Ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN στο ζυμομύκητα <i>P.pastoris</i>	149
B.1.	Κλωνοποίηση των μορίων IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN στο φορέα έκφρασης pPICZαB	150
B.2.	Ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών ECD-EMMPRIN, IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN στο βακτηριακό στέλεχος της <i>E.coli</i>	154
B.3.	Βιοχημικός χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών ECD-EMMPRIN, IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN που παρήχθησαν στην <i>P.pastoris</i> και στην <i>E.coli</i>	157
B.4.	Λειτουργικότητα των πρωτεϊνών ECD, IgI, IgII-EMMPRIN ως προς την επαγωγή της MMP-2.....	158
B.5.	Σάρωση της ανθρώπινης βιβλιοθήκης φάγων-αντισωμάτων έναντι της IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN	162
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	167
A.	Το ανθρώπινο αντίσωμα έναντι της EMMPRIN επάγει την παραγωγή της MMP-2 και δεν παρεμποδίζει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων	168
B.	Η γλυκοζυλιωμένη εξωκυτταρική περιοχή IgII-EMMPRIN εμπλέκεται στην επαγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών.....	174
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	179
	SUMMARY.....	185
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	190

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

APS	Ammonium PerSulfate	Υπερθειϊκό αμμώνιο
ATP	Adenosine TriPhosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
BSA	Bovise Serum Albumin	Αλβουμίνη από ορό βοός
cDNA	complementary DNA	Συμπληρωματικό DNA
dd H₂O	double distilled water	Δις-απεσταγμένο και απιονισμένο H₂O
DAB	3,3-Diaminobenzidine	3,3- διϋδροχλωρική διαμινοβενζιδίνη
DMEM	(Dulbeco's Modified Eagle's Medium)	Θρεπτικό υλικό Dulbeco's
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
ECD	Extracellular domain	Εξωκυτταρική περιοχή
ECM	Extracellular Matrix	Εξωκυτταρικό στρώμα
EDTA	Ethylenediamino tetraacetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραονικό οξύ
EGF	Epidermal Growth Factor	Επιδερμικός παράγοντας αύξησης
FBS	Fetal Bovine Serum	Ορός εμβρύου βοός
KDa	Kilodalton	
MCT	Monocarboxylate transporter	Μεταφορέας του μονοκαρβοξυλικού οξέος
MMPs	Matrix metallo proteinases	Μεταλλοπρωτεϊνάσες
PBS	Phosphate-buffered saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
SDS	Sodium dodecyl sulphate	Δωδεκυλοθειϊκό νάτριο
TCSF	Tumor cell-derived collagenase stimulatory	Παραγόμενος από όγκο ενεργοποιητής κολλαγενάσης
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl ethylene diamine	Τετραμεθυλ-αιθυλ-διαμίνη
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας αύξησης
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία ιοντοανταλλακτικής στήλης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας των αναπτυγμένων χωρών. Είναι μια πολυσταδιακή και πολυπαραγοντική ασθένεια, η οποία χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων. Τα αίτια που προκαλούν τον καρκίνο οφείλονται σε συσσώρευση μεταλλαγών που προκύπτουν από την παρουσία μολυσματικών παραγόντων (πχ. ιοί), περιβαλλοντικών παραγόντων (πχ. ακτινοβολίες, χημικές ενώσεις), τρόπου διαβίωσης (πχ. διατροφική, κάπνισμα), κλπ. Όλοι αυτοί οι παράγοντες δρουν συσσωρευτικά και μακροπρόθεσμα μέχρι την εμφάνιση της νόσου.

Υπάρχει μία κατηγορία μορίων που αποτελούν τα καρκινικά αντιγόνα. Τα αντιγόνα αυτά ή υπερεκφράζονται ή είναι μεταλλαγμένα ή εκφράζονται επιλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Τα καρκινικά αντιγόνα αποτελούν σήμερα στόχους για διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις, μεταξύ των οποίων είναι και η στόχευση με μονοκλωνικά αντισώματα.

1.1 Καρκινικά αντιγόνα

Ο μοριακός χαρακτηρισμός των καρκινικών αντιγόνων έχει επιτρέψει την καλύτερη κατανόηση των γενετικών μηχανισμών που μπορούν να οδηγήσουν στην δημιουργία των όγκων καθώς και στην αναγνώριση των ιστοειδικών καρκινικών αντιγόνων. Πιο συγκεκριμένα, τα καρκινικά αντιγόνα μπορεί να αποτελούν το κύριο προϊόν της μετάφρασης του mRNA γονιδίων που εκφράζονται διαφοροποιημένα από τους φυσιολογικούς ιστούς στα καρκινικά κύτταρα. Μπορούν επίσης να κωδικοποιούνται από μεταλλαγμένα γονίδια, αλληλουχίες ιντρονίων, αλληλουχίες εναλλακτικής συρραφής, ψευδογονίδια ή να αποτελούν πρωτεϊνικά προϊόντα γενετικής μετατόπισης χρωμοσωμικού υλικού. Από την εποχή του MAGE-1, του πρώτου γονιδίου που αναφέρθηκε πως κωδικοποιεί ένα καρκινικό αντιγόνο που αναγνωρίζεται από τα T λεμφοκύτταρα (van der Bruggen et al. 1991), έχει περιγραφεί ένας τεράστιος αριθμός καρκινικών αντιγόνων.

Αναφορικά με την αντιγονικότητα των όγκων, τα αντιγόνα διακρίνονται σε ογκοειδικά ή ειδικά αντιγόνα όγκων (tumour specific antigens TSAs) και σε ογκοσχετιζόμενα ή αντιγόνα σχετιζόμενα/συνδεδεμένα με τους όγκους (tumour associated antigens, TAAs). Η κατάταξη των TAAs διαχωρίζεται περαιτέρω σε

υποκατηγορίες ανάλογα με την αλληλουχία του επίτοπου των T κυττάρων και τον HLA περιορισμό, που παρουσιάζει ενδιαφέρον στο πεδίο της ανοσολογίας του όγκου και στην ανοσοθεραπεία (Novellino et al. 2005).

Τα καρκινικά αντιγόνα μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με το που εντοπίζονται ή από πού προέρχονται σε όσα:

- εκφράζονται σε εμβρυϊκούς ιστούς και στα καρκινικά σωματικά κύτταρα (CEA, TAG-72 κ.α.),
- προκαλούνται από τη δράση ιών (HPV E6, E7 κ.α.),
- εκφράζονται στους φυσιολογικούς ιστούς αλλά υπερεκφράζονται/συσσωρεύονται στα καρκινικά κύτταρα (Her2/neu Ep-CAM, EphA3 κ.α.),
- εκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα και στους αναπαραγωγικούς ιστούς από κοινού (BAGE, CAGE κ.α.)
- είναι προϊόντα μεταλλάξεων (p53, BRCA1/2, Ras)
- προέρχονται από υπερέκφραση ενός μοναδικού καρκινικού ιστοτύπου (MC1R, Melan-A/MART-1) και που προκύπτουν από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (MUC1) (Hassane M. Zarour).

Η κατάταξη των αντιγόνων δεν είναι καθορισμένη με αυστηρά κριτήρια και πολλά αντιγόνα εμπίπτουν σε παραπάνω από μια κατηγορίες. Για παράδειγμα, το γονίδιο που κωδικοποιεί την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 είναι συχνά μεταλλαγμένο στα καρκινικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται και να μη γίνεται σωστά η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Με βάση τις παραμέτρους αυτές, η p53 μπορεί να υπαχθεί και στην κατηγορία των υπερεκφρασμένων/συσσωρευμένων καρκινικών αντιγόνων, αλλά και στην κατηγορία των μεταλλαγμένων (Wang 1999; Wang et al. 1999; Thompson et al. 2000; Renkvist et al. 2001).

Μια πρωτεΐνη που κατατάσσεται στην κατηγορία των καρκινικών αντιγόνων που υπερεκφράζονται και παράλληλα υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (αυξημένη γλυκοζυλίωση) είναι η EMMPRIN, η οποία θεωρείται ο βασικός επαγωγέας των μεταλλοπρωτεϊνών, απ' όπου πήρε και το όνομα της (Extracellular Matrix MetalloPRoteinase Inducer). Η EMMPRIN βρίσκεται στις μεμβράνες των κυττάρων έχοντας σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών δραστηριοτήτων, όπως είναι η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, η επιβίωση, η προσκόλληση, η μετανάστευση, η πρόσληψη και η έκκριση.

2. Μεταλλοπρωτεϊνάσες και καρκίνος

2.1. Γενικά χαρακτηριστικά μεταλλοπρωτεϊνών

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (metalloproteinases, **MMPs**) παράγονται από πολλά είδη κυττάρων, όπως μακροφάγα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και κερατινοκύτταρα και επιτελούν ποικιλία φυσιολογικών λειτουργιών, όπως η εμφύτευση της βλαστοκύστης, η ανάπτυξη του εμβρύου, η αναμόρφωση των οστών, η αγγειογένεση στην επούλωση των πληγών, η ανάπτυξη των νεύρων, η απόπτωση κλπ. Εκτός όμως από τις φυσιολογικές διεργασίες, συμμετέχουν και σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων επάγοντας την καταστροφή του ιστού, όπως στη καρδιομυοπάθεια, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, το ανεύρυσμα της αορτής, το έλκος στομάχου, στη διήθηση και μετάσταση του καρκίνου (Turpeenniemi-Hujanen et al. 1992; Mecham 1998). Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι μια οικογένεια ενδοπεπτιδασών που μπορούν να διασπάσουν σχεδόν οποιοδήποτε συστατικό του εξωκυττάριου χώρου. Σήμερα αριθμούνται 24 μέλη (Woessner 1991; Woessner 1999), τα οποία παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες στην πρωτεϊνική τους δομή καθώς όλες χρειάζονται ένα άτομο ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο προκειμένου να επιτευχθεί η καταλυτική τους δράση. Ιστορικά, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες χωρίζονταν στις κολλαγενάσες, ζελατινάσες, στρωμελυσίνες και ματρυλυσίνες ανάλογα με τις πρωτεΐνες του εξωκυτταρικού χώρου τις οποίες αποικοδομούσαν. Λόγω του αυξανόμενου αριθμού των υποστρωμάτων των μεταλλοπρωτεϊνών, οι MMPs πλέον χωρίζονται σε κατηγορίες με βάση τη δομή τους. Έτσι, υπάρχουν 6 διακριτές ομάδες μεταλλοπρωτεϊνών, 4 εκκρινόμενες (κολλαγενάσες, ζελατινάσες, στρωμαλυσίνες, ματρυλυσίνες), 1 ομάδα προσδεδεμένων στην μεμβράνη και 1 ομάδα που απαρτίζεται από επτά MMP που δεν κατατάσσονται στις παραπάνω κατηγορίες.

2.2. Κατηγορίες μεταλλοπρωτεϊνών.

Με βάση την ειδικότητά τους ως προς το υπόστρωμα, τις κοινές αλληλουχίες και την οργάνωση των υποπεριοχών που τις απαρτίζουν, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες διαχωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

1. Κολλαγενάσες

Το βασικό χαρακτηριστικό αυτών των ενζύμων αυτών είναι η ικανότητά τους να διασπούν τα ενδιάμεσα κολλαγόνα I, II και III σε μία ειδική θέση που βρίσκεται τρία τέταρτα από το αμινοτελικό άκρο. Οι κολλαγενάσες μπορούν επίσης να διασπάσουν και άλλα μόρια του εξωκυτταρικού χώρου (ECM) καθώς και έναν αριθμό μη-ECM μορίων. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει τις MMP-1, MMP-8, MMP-13 και MMP-18 (Visse et al. 2003).

2. Ζελατινάσες

Στην ομάδα αυτή ανήκουν η ζελατινάση A (MMP-2) και η ζελατινάση B (MMP-9). Διασπούν τα μετουσιωμένα κολλαγόνα, τις ζελατίνες. Αυτά τα ένζυμα έχουν τρεις επαναλήψεις μιας περιοχής ινοσυνδετίνης τύπου II μέσα στην καταλυτική περιοχή, στην οποία και δεσμεύονται ζελατίνη, κολλαγόνα και η λαμινίνη-12. Η MMP-2, αλλά όχι η MMP-9, διασπά τα κολλαγόνα τύπου I, II, και III ενώ και οι δύο διασπούν το κολλαγόνο τύπου IV, V, VII και X. Οι ζελατινάσες διασπούν, επίσης, τη φιμπρονεκτίνη, την αδιάλυτη ελαστίνη και τις πρωτεογλυκάνες (Aimes et al. 1995; Allan et al. 1995).

3. Στρομαλυσίνες

Η αρχική τους ονομασία ήταν πρωτεογλυκανάσες. Στην ομάδα αυτή ανήκουν η στρομαλυσίνη-1 (MMP-3) και η στρομαλυσίνη-2 (MMP-10) που έχουν παρόμοιες ειδικότητες υποστρώματος, αλλά η MMP-3 διαθέτει υψηλότερη πρωτεολυτική ικανότητα από την MMP-10. Οι στρομαλυσίνες 1 και 2 διασπούν σε σημαντικό βαθμό τις πρωτεογλυκάνες και διάφορα συστατικά της βασικής μεμβράνης (λαμινίνη, φιμπρονεκτίνη), καθώς επίσης και το κολλαγόνο τύπου IV και τη ζελατίνη. Εκτός από την πέψη των συστατικών του ECM, η MMP-3 ενεργοποιεί και έναν αριθμό προ-MMP όπως στην περίπτωση της προ-MMP-1 που είναι ζωτικής σημασίας για την παραγωγή πλήρως δραστικού μορίου MMP-1 (Suzuki et al. 1990).

4. Ματριλυσίνες

Οι ματριλυσίνες χαρακτηρίζονται από την έλλειψη της περιοχής αιμοπηξίνης και σε αυτή την ομάδα ανήκουν η ματριλυσίνη 1 (MMP-7) (Wielockx et al. 2004) και η ματριλυσίνη 2 (MMP-26) (Uria et al. 2000). Σημαντικότερη πρωτεΐνη είναι η MMP-7 που, εκτός από τα συστατικά του ECM, κατεργάζεται και μόρια της

κυτταρικής επιφάνειας, όπως ως η προ-ντιφενσίνη (a-defensing), ο Fas-συνδέτης, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF), η καντερίνη E κλπ. Είναι δραστική έναντι των πρωτεογλυκανών, της αδιάλυτης ελαστίνης και συστατικών της βασικής μεμβράνης (λαμινίνη, φιμπρονεκτίνη, εντακτίνη). Η ικανότητά της να διασπά τις πρωτεογλυκάνες είναι 5 φορές μεγαλύτερη από αυτήν των στρωμαλυσινών και η ικανότητά της να διασπά την αδιάλυτη ελαστίνη είναι 2 φορές μεγαλύτερη από αυτήν της MMP-9.

5. Μεταλλοπρωτεϊνάσες των μεμβρανών

Η παρουσία μιας διαμεμβρανικής περιοχής στο ακραίο τμήμα της C υποδηλώνει ότι αυτές οι μεταλλοπρωτεϊνάσες δεν εκκρίνονται, αλλά παραμένουν συνδεδεμένες στην επιφάνεια των κυττάρων και ονομάστηκαν μεταλλοπρωτεϊνάσες τύπου μεμβράνης (MT-MMP, Membrane-Type Metalloproteinases).

Υπάρχουν έξι μεταλλοπρωτεϊνάσες τύπου μεμβράνης (MT-MMP): τέσσερις είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I (MMP-14, MMP-15, MMP-16, και MMP-24), και δύο πρωτεΐνες είναι συνδεδεμένες με το φωσφολιπίδιο γλυκοζυλοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (GPI-anchored), οι MMP-17 και MMP-25. Όλες έχουν μια αλληλουχία αναγνώρισης φουρίνης RX [R / K] R στο C-τελικό άκρο του προπεπτιδίου. Με εξαίρεση την MMP-17 (MT4-MMP), είναι όλες ικανές να ενεργοποιούν την προ-MMP-2 να λάβει την ενεργή μορφή της (English et al. 2000). Είναι ένζυμα που μπορούν να διασπάσουν μια σειρά μορίων του ECM και η MT1-MMP έχει κολλαγονολυτική δραστικότητα επί των κολλαγόνων τύπου I, II, και III.

6. Άλλες MMPs

Υπάρχουν και επτά MMP που δεν κατατάσσονται στις παραπάνω κατηγορίες. Η MMP-12 (Μεταλλοελαστάση) διασπά την ελαστίνη και εκφράζεται κυρίως στα μακροφάγα και είναι απαραίτητη για την μετανάστευση των μακροφάγων (Shapiro et al. 1993; Shipley et al. 1996). Η MMP-19 ταυτοποιήθηκε με cDNA κλωνοποίηση από το ήπαρ και σαν αυτοαντιγόνο προερχόμενο από T-κύτταρα σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (RASI) (Kolb et al. 1997; Pendas et al. 1997). Επίσης, υπάρχει η MMP-20, η οποία διασπά την αμελογενίνη (Ryu et al. 1999) και η MMP-22 με άγνωστη ακόμα λειτουργία. Η MMP-23, στερείται της περιοχής αιμοπηξίνης καθώς και της κυστεΐνης του προπεπτιδίου αλλά διαθέτει μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη, ακολουθούμενη από μια περιοχή παρόμοια με τη δομή της ανοσοσφαιρίνης (Velasco

et al. 1999). Επειδή έχει ένα μοτίβο αναγνώρισης φουρίνης στο προπεπτίδιο, αυτή διασπάται στο Golgi και απελευθερώνεται ως ένα ενεργό ένζυμο στον εξωκυτταρικό χώρο (Pei et al. 2000). Τέλος, η MMP-28 είναι η τελευταία προσθήκη στην οικογένεια αυτή, εκφράζεται κυρίως σε κερατινοκύτταρα και η έκφραση της σε κατεστραμμένο δέρμα υποδηλώνει ότι η MMP-28 θα μπορούσε να λειτουργήσει στην αιμόσταση και επιδιόρθωση ιστών σε περίπτωση τραύματος (Lohi et al. 2001; Marchenko et al. 2001; Saarialho-Kere et al. 2002).

2.3 Δομή μεταλλοπρωτεϊνών

Η οικογένεια των MMPs χαρακτηρίζεται από μόρια που παρουσιάζουν ομοιότητες ως προς τη χημική τους δομή και χαρακτηρίζονται από την παρουσία 5 βασικών περιοχών. Έχουν μια κοινή πολυτμηματική δομή, αλλά παρουσιάζουν και διαφορές που φαίνεται να έχουν άμεση σχέση με την ειδικότητά τους ως προς το υπόστρωμα, τη δράση τους και την ενεργότητά τους. Οι κύριες ομόλογες περιοχές αναφέρονται στη συνέχεια με βάση το αμινοτελικό άκρο του πρωτεϊνικού μορίου:

A) Σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide): αποτελείται από 17-29 αμινοξέα και ευθύνεται για τη μεταφορά του προϊόντος της μετάφρασης στο ενδοπλασματικό δίκτυο για να καταλήξει να εκκριθεί σαν ένζυμο (Birkedal-Hansen et al. 1993)(Birkedal-Hansen et al. 1993).

B) Προπεπτίδιο (propeptide) – αμινοτελικό άκρο: Το τμήμα αυτό έχει ωοειδές σχήμα, περιέχει 3 α- έλικες, και ένα τμήμα που συνδέεται με τη καταλυτική περιοχή. Εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο του μορίου, αποτελείται από 77-87 αμινοξέα και επικαλύπτει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, μέσω ενός δεσμού που αναπτύσσεται μεταξύ μιας Cys του προπεπτιδίου και του Zn^{2+} της καταλυτικής περιοχής. Όταν αφαιρεθεί το προπεπτίδιο από το μόριο τότε προκύπτει η ενεργός μορφή του ενζύμου.

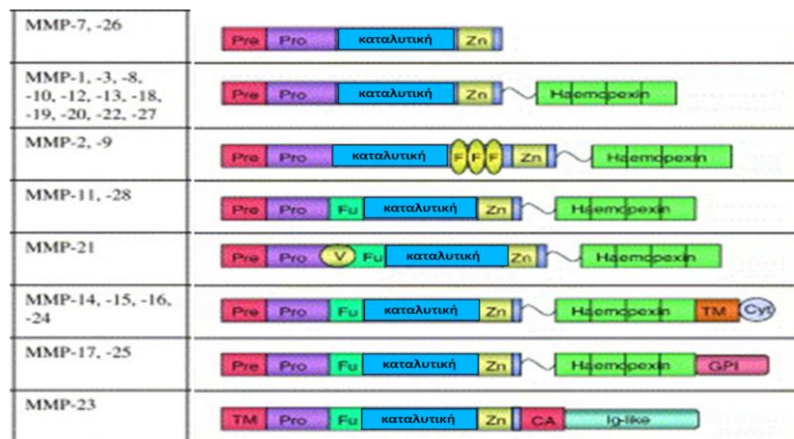
Γ) Καταλυτική περιοχή: Έχει ελλειψοειδές σχήμα και περιέχει 5 β-πτυχωτές επιφάνειες και 3 α-έλικες. Αποτελείται από 165 αμινοξέα περίπου. Περιέχει ένα ιόν Zn^{2+} και περιοχές δέσμευσης των απαραίτητων για τη δράση δισθενών μετάλλων (Zn^{2+} ή Ca^{2+}), όπως 3 κατάλοιπα ιστιδίνης. Είναι υπεύθυνη για την υδρολυτική δράση του ενζύμου έναντι των υποστρωμάτων του καθώς και για την αυτολυτική δράση αυτού (Murphy et al. 1997).

Δ) Περιοχή άρθρωσης (ή γέφυρα πλούσια σε Pro): Το μέγεθός της μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το ένζυμο. Έτσι στην περίπτωση των κολλαγενασών αποτελείται από 16 αμινοξέα, ενώ στη ζελατινάση B (MMP-9) είναι κατά πολύ μεγαλύτερη. Στην περίπτωση των κολλαγενασών φαίνεται ότι η περιοχή αυτή, σε συνδυασμό με το C-τελικό πεπτίδιο, παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδιάταξη της τριπλής έλικας του υποστρώματος (κολλαγόνου) με αποτέλεσμα την αποδοτικότερη δράση του ενζύμου. Κατά τους Murphy και Knauper, οι δύο παραπάνω περιοχές διατάσσονται αντικριστά εγκλωβίζοντας κατά κάποιον τρόπο το υπόστρωμα το οποίο αποδιατάσσεται και στη συνέχεια υδρολύεται από την καταλυτική περιοχή του ενζύμου (Murphy et al. 1997).

Ε) Καρβοξυτελικό άκρο: Έχει ελλειψοειδές δισκοειδές σχήμα με 4 λεπιδωτές β δομές, η κάθε μια από τις οποίες φέρει 4 αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες και μια α-έλικα. Αποτελείται από 200 περίπου αμινοξέα, εμφανίζει ομολογία ως προς την αιμοπηξίνη και υπάρχει σε όλες τις MMPs εκτός από την MMP-7. Διαθέτει ένα δομικό Zn^{2+} και 2-3 ιόντα ασβεστίου που θεωρούνται απαραίτητα για τη σταθερότητα και την έκφραση της ενζυμικής δραστηριότητας. Στην περίπτωση των κολλαγενασών (MMP-1, MMP-8 και MMP-13) υποστηρίζεται ότι - σε συνδυασμό με την καταλυτική περιοχή και την περιοχή της άρθρωσης - καθορίζουν τη δέσμευση του υποστρώματος με το ένζυμο (Murphy et al. 1997). Με αυτόν τον τρόπο επηρεάζεται η εξειδίκευση του ενζύμου έναντι του υποστρώματος. Τέλος, είναι η περιοχή η οποία συνδέεται με την C-περιοχή των ιστικών αναστολέων τους (TIMPs).

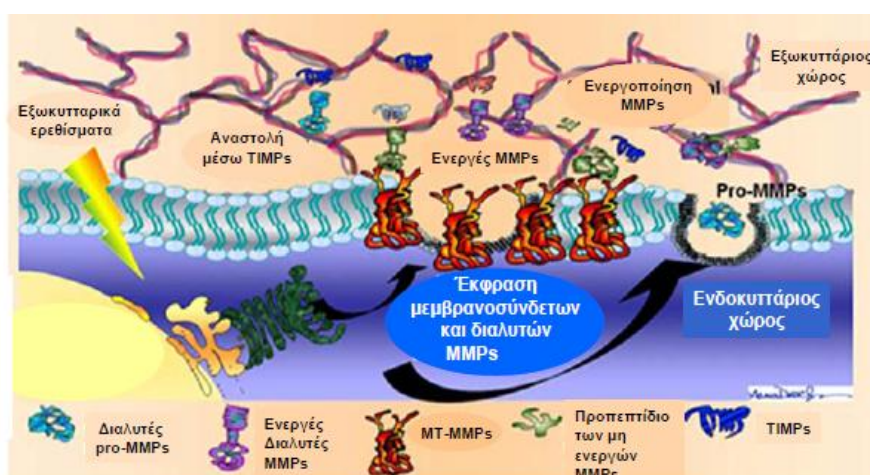
ΣΤ) Περιοχή ομόλογη με ινoσυνδετίνη: Συναντάται μόνο στις ζελατινάσες Α και Β. Παρεμβάλλεται στην καταλυτική περιοχή, αποτελείται από 3 επαναλήψεις μιας αλληλουχίας αμινοξέων (που μοιάζει με την ινoσυνδετίνη) και είναι υπεύθυνη για την δυνατότητα δέσμευσης της ζελατίνης από τα μόρια των ζελατινασών.

Ζ) Διαμεμβρανική περιοχή: απαντάται στις μεμβρανικού τύπου MMPs (MT-MMPs). Εμφανίζεται μετά το καρβοξυτελικό άκρο και ευθύνεται για την πρόσδεση των μορίων αυτών στην κυτταρική μεμβράνη.



ενεργοποιητή (Nagase 1997). Οι περισσότερες MMPs ενεργοποιούνται εκτός κυττάρου από άλλες ήδη ενεργοποιημένες MMPs ή από πρωτεΐνες σερίνης. Η δραστηριότητά τους ελέγχεται αυστηρά από την παρουσία αναστολέων που είναι:

- η α2-μακρογλοβουλίνη (α2-macroglobulin) (Sottrup-Jensen et al. 1989),
- οι θρομβοσπονδίνες -1 και -2 (Bein et al. 2000; Tarabozetti et al. 2000; Rodriguez-Manzanique et al. 2001),
- οι ιστο-ειδικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, **TIMPs**) (Wang et al. 2000; Edwards 2001) με πιο μελετημένα τα μόρια TIMP -1, -2, -3 και -4
- μικρά μόρια με υποπεριοχές δομικά παρόμοιες με εκείνες των TIMPs (Netzer et al. 1998; Mott et al. 2000),
- το μοναδικό προσδεμένο στην μεμβράνη αναστολέα RECK (reversion-inducing cysteine rich protein with kazak motifs) (Oh et al. 2001).



Εικόνα 2: Ρύθμιση της δραστηριότητας των MMPs. Μεγάλος αριθμός ερεθισμάτων (μηχανικών και βιοχημικών) μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των MMPs και των TIMPs. Αν και δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένο ακόμα, ένας μεγάλος αριθμός μετα-μεταγραφικών βημάτων απαιτούνται για την εγκατάσταση των MT-MMPs στην κυτταρική μεμβράνη, όπως επίσης και για την αποδέσμευση των διαλυτών MMPs στο κυτταρόπλασμα. Η ενεργοποίηση των διαλυτών MMPs γίνεται μέσω απομάκρυνσης μέρους του αμινοτελικού άκρου του προπεπτιδίου, παρουσία πρωτεασών ή των MT-MMPs. Η δράση της ενεργής μορφής των MMPs (διαλυτή και μεμβρανοσύνδετη) αναστέλλεται από τους TIMPs.

2.5. Μεταλλοπρωτεΐνάσες και μετάσταση

Η έκφραση και η δραστηριότητα των MMPs είναι σε υψηλά επίπεδα σχεδόν σε όλους τους τύπους του ανθρώπινου καρκίνου και αυτό σχετίζεται με προχωρημένα στάδια της ασθένειας, όπου υπάρχει αυξημένη διήθηση και μετάσταση. Αντίθετα με ότι συμβαίνει με τα περισσότερα κλασσικά ογκογονίδια, οι MMPs δεν αυξάνονται λόγω πολλαπλασιασμού του γονιδίου ή ενεργών μεταλλάξεων. Οι μόνες καταγεγραμμένες γενετικές αλλαγές σε καρκινικά κύτταρα είναι μια μετατόπιση στο γονίδιο της MMP-23 (Gururajan et al. 1998) και ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου της MMP-24 (Llano et al. 1999). Η αυξημένη έκφραση των MMPs οφείλεται κυρίως σε αλλαγές σε μεταγραφικό επίπεδο. Αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης ογκογονιδίων ή της αναστολής της δράσης των ογκογονιδίων, όπως για παράδειγμα της MMP-7, η οποία υπερεκφράζεται λόγω συνδυασμένης δράσης των μεταγραφικών παραγόντων PEA3, c-JUN, β -catenin, LEF-1 (Crawford et al. 2001), ενώ η μεταγραφή των MMP-1, MMP-13 αναστέλλεται από τη δράση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 (Sun et al. 1999; Sun et al. 2000). Στους ανθρώπινους καρκίνους, τα καρκινικά κύτταρα δεν είναι η μοναδική πηγή παραγωγής MMPs. Παρόλο που κάποιες MMPs παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα, όπως η MMP-7, οι περισσότερες MMPs προέρχονται από τα κύτταρα του στρώματος. Στην προκειμένη περίπτωση τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες, όπως ιντερλευκίνες, ιντερφερόνες, αλλά και την EMMPRIN, προκειμένου να ενεργοποιήσουν παρακρινικά τους παρακείμενους ινοβλάστες ή τα επιθηλιακά κύτταρα να εκκρίνουν MMPs (Sternlicht et al. 2001). Χαρακτηριστικό παράδειγμα η MMP-2, της οποίας το mRNA στον καρκίνο του μαστού εκφράζεται από τους ινοβλάστες, ενώ η πρωτεΐνη MMP-2 εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και των 2 τύπων κυττάρων (Polette et al. 1994).

Αν και αρχικά ήταν γνωστό ότι οι μεταλλοπρωτεΐνάσες έπαιζαν ρόλο μόνο στη μετάσταση του καρκίνου, τα τελευταία χρόνια έχουν συνδεθεί με όλα τα βήματα της εμφάνισης και ανάπτυξης του όγκου.

Πολυάριθμα στοιχεία και για τον ρόλο των MMPs στη μετάσταση έχουν δοθεί από *in vitro* πειράματα όσο και από *in vivo* αλλομοσχεύματα. Οι MMP-2, -3, -13 και -14 επάγουν τη μετανάστευση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές εν μέρει μέσω κολλαγόνου τύπου I (Deryugina et al. 1997; Lochter et al. 1997; Belien et al. 1999; Ala-Aho et al. 2002), ενώ ο αριθμός των καρκινικών εστιών μειώνεται με την

αναστολή της έκφρασης της MMP-9 (Hua et al. 1996), καθώς και με πλήρη απενεργοποίηση των γονιδίων των MMP-2 και MMP-9 (Itoh et al. 1998; Itoh et al. 1999). Η αποκοπή της λαμινίνης-5 από τις MMP-2 και MMP-14 συνεπάγεται την εμφάνιση «κρυμμένων» σημείων της πρωτεΐνης, τα οποία πυροδοτούν την κυτταρική κινητικότητα (Giannelli et al. 1997; Koshikawa et al. 2000). Αυτές οι μορφές της λαμινίνης με τα αποκομμένα τμήματα εντοπίζονται σε πολλά πειραματικά μοντέλα όγκων (Giannelli et al. 1997), ενώ η MMP-14 παρατηρείται συνεντοπισμένη με τη λαμινίνη-5 σε πολλούς καρκίνους (Koshikawa et al. 2000). Η απορρύθμιση της καντερίνης-E, ενός μορίου που συμμετέχει στην κυτταρική πρόσδεση, είναι επίσης συνδεδεμένη με την ανάπτυξη καρκίνου (Birchmeier et al. 1996). Η καντερίνη-E αποκόβεται από την MMP-3 και την MMP-7 (Noe et al. 2001) και το τμήμα που απελευθερώνεται επάγει την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων με παρακρινή τρόπο *in vitro*, πιθανόν μεσολαβώντας στη λειτουργία των άλλων μη αποκομμένων μορίων της καντερίνης E. Ακόμα, η αποκοπή αυτή σηματοδοτεί τη μετάβαση από την επιθηλιακή μορφή του κυττάρου στην μεσεγχυματική, φαινοτυπική αλλαγή η οποία συνδέεται με πιο επιθετική συμπεριφορά (Birchmeier et al. 1996).

Κατά τη διάρκεια της μεταναστευτικής διαδικασίας, οι MMPs εντοπίζονται στις προεκβολές του κυτταροπλάσματος, όπως τα ψευδοπόδια, προκειμένου να προάγουν την κυτταρική μετακίνηση και τη διήθηση του όγκου (Nakahara et al. 1997). Οι MMP-2, MMP-9 και MMP-14 φτάνουν στα ψευδοπόδια με διαφορετικούς μηχανισμούς. Η MMP-9 φτάνει μέσω πρόσδεσης στην πρωτεΐνη CD44 (Nakahara et al. 1997), ενώ η MMP-2 πιθανόν μεταφέρεται μέσω πρόσδεσης στην ιντεγκρίνη ανβ3 (Brooks et al. 1996). Τέλος, οι MMPs συμμετέχουν και στα τελικά στάδια της μετάστασης του όγκου, εκεί όπου τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να εισέλθουν, να επιβιώσουν και να εξέλθουν από τα αγγεία στους ιστούς που θα προσβάλλουν. Η MMP-9 είναι απαραίτητη για την ενδοαγγείωση (intravasation) (Kim et al. 1998), ενώ η υπερέκφραση της MMP-14 αυξάνει τον αριθμό των καρκινικών κυττάρων που επιβιώνουν κατόπιν ενδοφλέβιας ένεσης σε πειραματικά μοντέλα μετάστασης (Tsunezuka et al. 1996). Τέλος, οι MMPs επάγουν τη μετάσταση με την επίδραση στα μόρια των χημειοκινών μέσω της ρύθμισης της διαθεσιμότητάς τους.

3. Επαγωγέας των Μεταλλοπρωτεϊνών EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer)

3.1. Εισαγωγή

Ο επαγωγέας των μεταλλοπρωτεϊνών του εξωκυτταρικού χώρου EMMPRIN αποτελεί μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία ανήκει στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών και συμμετέχει σε ποικίλες σημαντικές δραστηριότητες όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, αναγνώριση και επικοινωνία. Η EMMPRIN ανιχνεύθηκε ανεξάρτητα από διάφορα εργαστήρια σε διαφορετικούς ιστούς ή οργανισμούς με αποτέλεσμα να υπάρχουν ποικίλες ονομασίες για αυτήν, όπως gp42 που ανιχνεύθηκε στο ποντίκι (fibronectin-receptor-associated antigen) (Altruda et al. 1989), LeX μεταφορέας του αναπτυξιακά ρυθμισμένου αντιγόνου (carrier of a developmentally regulated antigen) (Miyauchi et al. 1990; Miyauchi et al. 1991), HT7 αντιγόνο εμπλεκόμενο στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (blood brain barrier-associated antigen) (Seulberger et al. 1990), neurothelin (neural cell-associated antigen) (Schlosshauer et al. 1990), OX-47 αντιγόνο ενεργοποίησης λεμφοκυττάρων (lymphocyte activation antigen) (Fossum et al. 1991), 5A11 μόριο που συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ νευρικών και νευρογλοιακών κυττάρων (antigen involved in neural-glial interaction) (Fadool et al. 1993), M6 αντιγόνο σχετιζόμενο με την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων (leukocyte activation-associated antigen) (Kasinrerk et al. 1992), TCSF επαγωγικός παράγοντας προερχόμενος από καρκινικά κύτταρα (tumor-cell derived stimulatory factor) και EMMPRIN επαγωγέας των εξωκυτταρικών μεταλλοπρωτεϊνών (extracellular matrix metalloprotease inducer) (Biswas et al. 1995). Το όνομα του γονιδίου της EMMPRIN σήμερα στα προγράμματα του γονιδιώματος του ποντικού (Mouse Genome Informatics) και του ανθρώπου (LocusLink) είναι basigin. Το σύμβολο του γονιδίου στον άνθρωπο είναι BSG (Kaname et al. 1993) και στο ποντίκι είναι Bsg (Simon-Chazottes et al. 1992). Στην BSG έχει επίσης δοθεί ένα όνομα CD, το CD147.

Η EMMPRIN (Basigin) κλωνοποιήθηκε αρχικά σαν μεταφορέας ενός αναπτυξιακά εκφραζόμενου μάρτυρα σε καρκινικά βλαστοκύτταρα τερατοκαρκινώματος και έχει βρεθεί πως εκφράζεται ευρέως σε έμβρυα και σε ενήλικες (Miyauchi et al. 1990; Miyauchi et al. 1991). Βιοχημικές μέθοδοι και

αναλύσεις μικροπεπτιδικής αλληλούχισης (Spring et al. 1997) έδειξαν πως το αντιγόνο OK του αίματος είναι πανομοιότυπο με το M6 αντιγόνο ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων καθώς και την BSG. Η κυτταρομετρία ροής φανέρωσε την καθολική έκφραση στα λευκοκύτταρα, ενώ ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι έδειξαν πως η πρωτεΐνη αυτή υπάρχει σε πληθώρα φυσιολογικών ιστών αλλά και σε πολλά καρκινικά κύτταρα. Ανάλυση ανοσοσύτωσης έδειξε έκφραση μιας παρόμοιας πρωτεΐνης στα ερυθροκύτταρα και τελικά η ανάλυση με RACE- PCR (Rapid analysis of cDNA ends),(Biswas et al. 1995) έδειξε πως η πρωτεΐνη αυτή είναι η EMMPRIN.

3.2. Η δομή της EMMPRIN

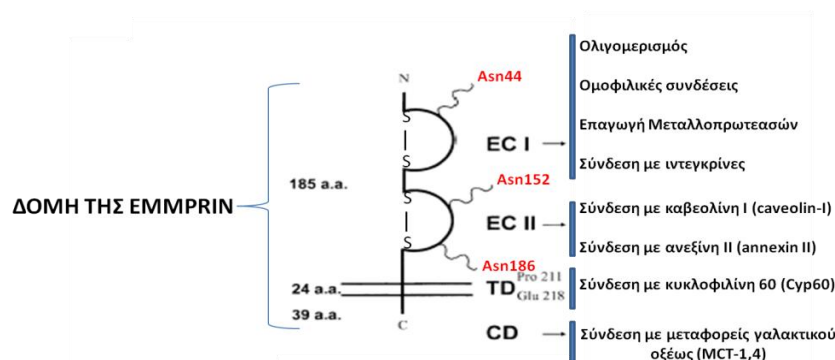
Η EMMPRIN αποτελείται από μια εξωκυτταρική περιοχή 185 αμινοξέων, που περιέχει 2 περιοχές τύπου ανοσοσφαιρίνης (Ig), μια διαμεμβρανική περιοχή 24 αμινοξέων και μια κυτταροπλασματική περιοχή 39 αμινοξέων (Biswas et al. 1995). Το εξωκυτταρικό τμήμα περιέχει 3 συντηρημένες περιοχές N-γλυκοζυλίωσης, οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία στη γλυκοζυλίωσή τους (Tang et al. 2004). Εκεί οφείλεται και η ποικιλομορφία στο μοριακό βάρος της EMMPRIN, το οποίο κυμαίνεται από 30-66 kDa (Fadool et al. 1993). Από τις 2 Ig περιοχές της EMMPRIN, η IgI (46 αα) περιέχει μία θέση γλυκοζυλίωσης (Asn 44), ενώ η IgII (59 αα) περιέχει δύο θέσεις γλυκοζυλίωσης (Asn 152, Asn 186). Πρόσφατα ανακαλύφθηκε στον οφθαλμό μια ισοφορμή της EMMPRIN, η οποία έχει και ένα τρίτο εξωκυτταρικό τμήμα (Hanna et al. 2003). Μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη μορίων της EMMPRIN με υψηλά ποσοστά γλυκοζυλίωσης (HG-CD147), ενώ άλλα μόρια εμφανίζουν πολύ λιγότερη γλυκοζυλίωση (LG-CD147), γεγονός που επηρεάζει τη δράση του μορίου (Sun et al. 2001; Tang et al. 2004). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η υψηλή γλυκοζυλίωση (λόγω γαλακτοζαμινών) ενέχεται στην επαγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών (Sun et al. 2001).

Η μελέτη των διαφορετικών περιοχών της EMMPRIN έδειξε ότι:

- η εξωκυτταρική περιοχή EMMPRIN/IgI ή ECI συμμετέχει σε διαδικασίες, όπως ο ολιγομερισμός των μορίων της EMMPRIN (Yoshida et al. 2000), οι ομοφιλικές συνδέσεις (Sun et al. 2001), οι συνδέσεις με διάφορα άλλα μόρια, όπως οι ιντεγκρίνες (Berditchevski et al. 1997), καθώς και η επαγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών (Li et al. 2001).

- η εξωκυτταρική περιοχή EMMPRIN/IgII ή ECII συνδέεται με την καβεολίνη-1 (Yan et al. 2005). Η σύνδεση της EMMPRIN με την καβεολίνη-1, έχει διττό ρόλο ανάλογα με τα κύτταρα στα οποία μελετάται. Σε ορισμένες περιπτώσεις η παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία μετατροπής των LG-EMMPRIN σε HG-EMPPRIN και τελικά την αναχαίτιση της επαγωγής των MMPs, ενώ σε άλλες παρατηρείται το αντίθετο φαινόμενο (Tang et al. 2004).
- η διαμεμβρανική περιοχή της EMMPRIN είναι πλήρως συντηρημένη ανάμεσα στα είδη και περιέχει σχηματισμούς «φερμουάρ λευκίνης» (3 λευκίνες κάθε έβδομο αμινοξύ). Στο μέσο της περιοχής βρίσκεται ένα θετικά φορτισμένο αμινοξύ, το γλουταμινικό οξύ, το οποίο υποδηλώνει αλληλεπίδραση της EMMPRIN με διάφορες πρωτεΐνες (Kasinrerker et al. 1992).
- η κυτταροπλασματική περιοχή της EMMPRIN φαίνεται πως συμμετέχει σε ποικίλες ενδοκυτταρικές αλληλεπιδράσεις με ιδιαίτερα μελετημένη τη δράση της EMMPRIN ως μεταφορέα των μονοκαρβοξυλικών οξέων MCT1 και MCT4 (Kirk et al. 2000).

Η EMMPRIN εμφανίζει μεγάλη ομολογία στην αμινοξική της αλληλουχία στους οργανισμούς που έχει εντοπιστεί και μελετηθεί. Η ομολογία αυτή αγγίζει το 94% μεταξύ ποντικού και αρουραίου, το 58% μεταξύ ανθρώπου και ποντικού και το 45% μεταξύ ποντικού και κοτόπουλου. Οι περισσότερες διαφορές παρατηρούνται στην εξωκυτταρική περιοχή, καθώς η διαμεμβρανική είναι απόλυτα συντηρημένη και η κυτταροπλασματική παρουσιάζει υψηλό βαθμό συντήρησης.

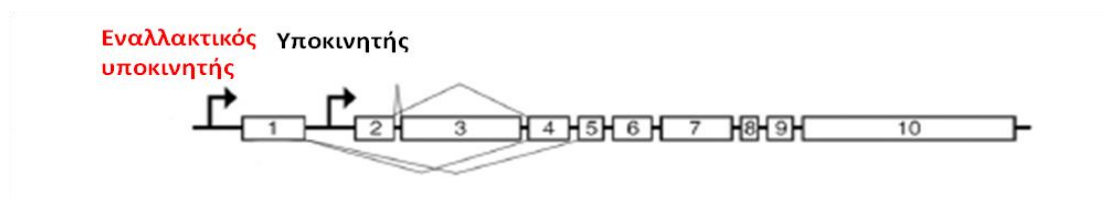


Εικόνα 3: Η δομή του μορίου της EMMPRIN - EC I: εξωκυτταρική περιοχή I, EC II: εξωκυτταρική περιοχή II, TD: διαμεμβρανική περιοχή, CD:

κυτταροπλασματική περιοχή, Asn: AA με N-γλυκοζυλίωση στην Ασπαραγίνη

3.3. Το γονίδιο της EMMPRIN (CD147/basigin)

In situ υβριδοποίηση φθορισμού φανέρωσε πως το γονίδιο της EMMPRIN βρίσκεται τοποθετημένο στο χρωμόσωμα 19p13.3 (Kaname et al. 1993). Αν και αρχικά το γονίδιο της EMMPRIN θεωρούνταν πως περιέχει 8 εξώνια, 7 εσώνια και έχει μέγεθος 10.8 Kb (Guo et al. 1998), πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως αποτελείται από 10 εξώνια και περιέχει 15.000 νουκλεοτίδια (Liao et al. 2011). Τα πρώτα 4 εξώνια, συμπεριλαμβανομένων των πρώτων 2 εναλλακτικών εξωνίων, υπόκεινται σε εναλλακτική συρραφή (alternative splicing) καθώς υπάρχει εναλλακτικός υποκινητής (Εικόνα 4) μεταξύ των νουκλεοτιδίων στις θέσεις -656 bp και -473 bp πριν το εξώνιο 1. Το εξώνιο 1 περιέχει το 5'-UTR και τη θέση έναρξης της μετάφρασης, η οποία βρίσκεται σε μία περιοχή που διαθέτει νησίδα πλούσια σε βάσεις GC (CpG island). Στην αριστερή περιοχή του 5'-άκρου δεν υπάρχει αλληλουχία TATA ή CAAT, αλλά εμπεριέχονται 3 συντηρημένες αλληλουχίες πρόσδεσης για την Sp1 και δύο θέσεις για την AP2. Έχειδειχτεί πως το τμήμα -471 bp μέχρι την κωδική περιοχή του γονιδίου είναι υπεύθυνο για την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου, ενώ η περιοχή -1413 bp έως -1024 bp την αναστέλλει. Επίσης, προσδιορίστηκε σε μακροφάγα κύτταρα THP-1 και Raw 264.7, μία περιοχή 30 bp που βρίσκεται στις θέσεις -142 bp έως -112 bp της αλληλουχίας, η οποία περιέχει θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων Sp1, AP1, TFII και EGR-2 και επάγει τη μεταγραφή της EMMPRIN (Liang et al. 2002). Μεταλλάξεις στην περιοχή -122 bp έως -116 bp του γονιδίου της EMMPRIN δείχτηκε ότι προκαλούν μείωση της λειτουργίας του υποκινητή. Επίσης, παροδική έκφραση των Sp1 και Sp3 σε κύτταρα που δεν τους εκφράζουν, προκάλεσε αύξηση της δραστηριότητας του υποκινητή της EMMPRIN.



Εικόνα 4: Η οργάνωση του γονιδίου της EMMPRIN, όπου περιλαμβάνονται τα εσώνια, τα εξώνια και οι δυο εναλλακτικοί υποκινητές.

3.4. Ισομορφές της EMMPRIN

Η EMMPRIN παρατηρείται σε 4 ισομορφές.

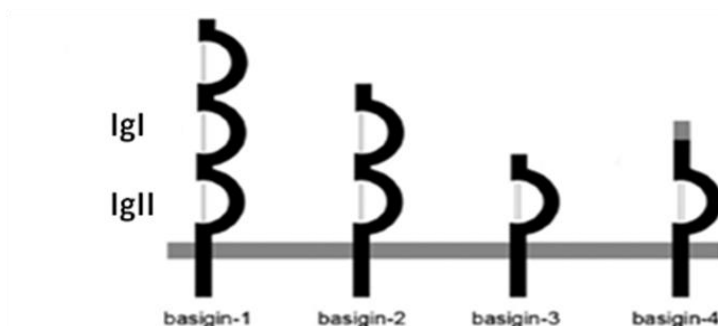
- Η ισομορφή-1 αντιστοιχεί στη μεγαλύτερη πολυπεπτιδική αλυσίδα και είναι γνωστή με την ονομασία basigin-1. Παρατηρείται μόνο σε κύτταρα του αμφιβληστροειδούς και είναι η μοναδική που φέρει 3 τμήματα Ig (IgI, IgII, IgIII) στην εξωκυτταρική περιοχή.
- Η ισομορφή-2 ονομάζεται basigin-2 και έχει επιλεγεί να θεωρείται ως η «κανονική» αλληλουχία. Παρουσιάζει έλλειψη της περιοχής 24-139 που αντιστοιχεί στο εξώνιο-3 και περιέχει 2 εξωκυτταρικές περιοχές IgI και IgII.
- Η ισομορφή-3, γνωστή και ως basigin-3, δε φέρει την αμινοξική αλληλουχία 1-209. Η μετάφραση της πρωτεΐνης ξεκινάει από το κωδικόνιο έναρξης του εξωνίου 5 και για αυτό περιέχει μόνο την περιοχή IgII στο εξωκυτταρικό της τμήμα.
- Η τελευταία ισομορφή, η basigin-4, παρουσιάζει διαφορές σε σχέση με την ισομορφή-3 στη σύσταση των αμινοξέων στην περιοχή 1-11 (MAAALFVLLGF → MKQSDASPQER), δεν έχει τα αμινοξέα 12-191, και φέρει μόνο την IgII περιοχή (εικόνες 4-5).

Και οι 4 ισομορφές της EMMPRIN διαφέρουν μόνο στο αμινοτελικό τμήμα της εξωκυτταρικής περιοχής και έχουν κοινή και συντηρημένη αλληλουχία μεταξύ των εξωνίων 5 και 10 που περιλαμβάνει την IgII περιοχή, τη διαμεμβρανική και την ενδοκυτταρική περιοχή.

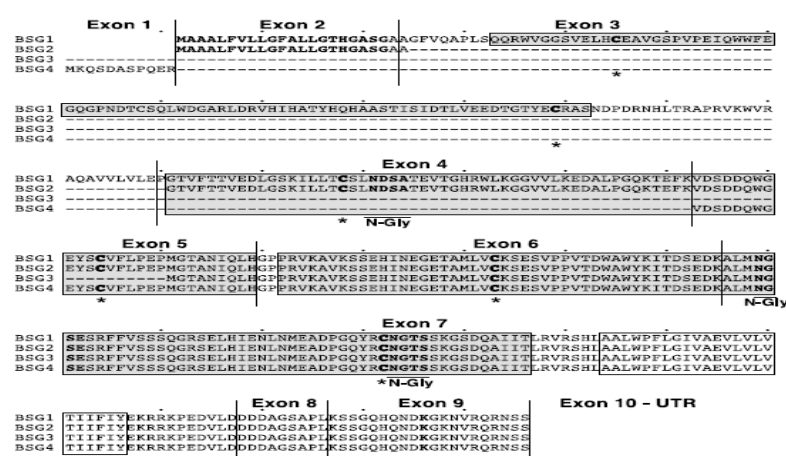
A.



B.



Γ.



Εικόνα 5: Α. Η αλληλουχία των ισομορφών της EMMPRIN. Τα εξόνια είναι με μαύρο χρώμα Β. Σχεδιάγραμμα των ισομορφών όπου φαίνονται οι διαφορές στα εξωκυτταρικά τμήματα Γ. Η αμινοξική αλληλουχία των ισομορφών της EMMPRIN (basigin) με βάση το πρόγραμμα CrustalW. Το οδηγό πεπτιδίο βρίσκεται στο εξόνιο 2 και φαίνεται με έντονα μαύρα γράμματα, οι Ig εξωκυτταρικές περιοχές εντοπίζονται στα γκρι πλαίσια, ενώ η διαμεμβρανική περιοχή στο εξόνιο 7 είναι σε λευκό πλαίσιο. Οι περιοχές γλυκοζυλίωσης στις ασπαραγίνες είναι με έντονα μαύρα γράμματα και ονομάζονται N-Gly. Οι συντηρημένες κυστεΐνες που είναι απαραίτητες για την σταθερότητα των αναδιπλώσεων επισημαίνονται με αστερίσκο.

3.5. Κυτταρική έκφραση της EMMPRIN

Η συγκέντρωση της EMMPRIN στους φυσιολογικούς ιστούς είναι σχετικά χαμηλή, ενώ υπερέκφραση της παρατηρείται σπάνια σε φυσιολογικές καταστάσεις και συχνότερα σε παθολογικές (Zhou et al. 2005; Iacono et al. 2007). Η EMMPRIN εκφράζεται ευρέως σε αιματοποιητικά κύτταρα του κυκλοφορικού συστήματος, όπως τα μονοκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα, αλλά και σε μη αιμοποιητικά κύτταρα, όπως τα ενδοθηλιακά και οι ινοβλάστες. Χαμηλή έκφραση έχει παρατηρηθεί στα μη ενεργά T λεμφοκύτταρα, η οποία αυξάνεται όταν αυτά ενεργοποιούνται (Altruda et al. 1989; Miyauchi et al. 1990; Seulberger et al. 1990; Fossum et al. 1991; Kasinrerck et al. 1992). Η EMMPRIN εντοπίζεται σε υψηλά ποσοστά στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, όπου επάγει την παρακρινή έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών από τα κύτταρα του στρώματος (ινοβλάστες και ενδοθηλιακά), αλλά και από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα σε μικρότερο βαθμό (Suzuki et al. 2004). Η αυξημένη έκφραση της EMMPRIN σε πολυάριθμους καρκίνους, όπως της ουροδόχου κύστης, μαστού, πνεύμονα, οισοφάγου, δέρματος, λεμφώματα κλπ. προσδίδει κακή πρόγνωση στην εξέλιξη της νόσου (Muraoka et al. 1993; Polette et al. 1997; Marionnet et al. 2003; Ishibashi et al. 2004; Nabeshima et al. 2004). Πρόσφατες αναφορές κάνουν λόγο για την ικανότητα της EMMPRIN να αυτορρυθμίζει την έκφρασή της μέσω ενός μηχανισμού θετικής ανάδρασης (positive feedback). Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με την επίδραση είτε εξωγενούς EMMPRIN σε ινοβλάστες, είτε μορίων EMMPRIN που απελευθερώνονταν σε συγκαλλιέργειες καρκινικών κυττάρων με ινοβλάστες, έδειξαν αύξηση της έκφρασης της EMMPRIN και στα δύο είδη κυττάρων, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνών (Tang et al. 2004). Αυτή η αύξηση της έκφρασης, μειώθηκε σε μεγάλο βαθμό κατόπιν προσθήκης EMMPRIN συμπληρωματικών (antisense) μορίων στα καρκινικά κύτταρα.

3.6. Λειτουργίες της EMMPRIN στους φυσιολογικούς ιστούς

Η EMMPRIN ανιχνεύεται σε πολλούς ιστούς και συμμετέχει σε διάφορες λειτουργίες του οργανισμού, προφανώς λόγω της ποικιλίας των αλληλεπιδράσεων που έχει με άλλες πρωτεΐνες. Παρακάτω παραθέτονται οι κυριότερες από αυτές, με έμφαση στην ικανότητα της EMMPRIN να επάγει την παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών (Matrix Metalloproteinases-MMPs) για τη διάσπαση του εξωκυτταρικού χώρου.

3.6.1. EMMPRIN και αναδόμηση/αποκατάσταση των ιστών

Υπάρχει μια εύθραυστη ισορροπία μεταξύ της MMP-επαγόμενης ομοιοστάσης και της καταστροφής των κυττάρων του στρώματος, οπότε και γίνεται κατανοητό πως η επαγωγή των ίδιων των MMPs είναι μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία. Η EMMPRIN αποτελεί έναν βασικό ρυθμιστή της έκφρασης των MMPs και καθορίζει αυτήν την ομοιοστατική διαδικασία μέσω ενός μηχανισμού που συνδέει τα «προσβεβλημένα» επιθηλιακά κύτταρα με τους παρακείμενους ινοβλάστες (Gabison et al. 2005). Για παράδειγμα, το έλκος του κερατοειδούς αποτελεί μια ασθένεια στην οποία παρατηρείται καταστροφή του επιθηλιακού φραγμού του οφθαλμού, με αποτέλεσμα να είναι επιρρεπής σε εξωτερικές μολύνσεις. Στην παθολογική αυτή κατάσταση έχει παρατηρηθεί υπέκφραση της EMMPRIN, εντοπιζόμενη στα σημεία όπου υπάρχει υπερέκφραση MMPs (Gabison et al. 2005). Άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα της δυναμικής αυτής κατάστασης, αποτελεί το κυκλοφορικό σύστημα, όπου η έκφραση των MMPs είναι απαραίτητη για την πρόληψη της υπέρτασης και ταυτόχρονα ενοχοποιείται και για την καρδιακή ανεπάρκεια (Spinale et al. 2000). Η διατήρηση εύκαμπτων αγγείων προκύπτει από τη συνεχή καταστροφή και αναγέννηση του εξωκυτταρικού χώρου. Αναλύσεις σε υπερτασικούς ασθενείς έδειξαν μείωση στην παραγωγή των MMPs, με ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης της EMMPRIN και αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου, η οποία μπορεί να συμβάλλει στην καταστροφή οργάνων, σε εγκεφαλικό επεισόδιο, σε υπερτροφία της αριστεράς κοιλίας και σε στεφανιαία νόσο (Ergul et al. 2004). Αξιοσημείωτη είναι η μεγάλη ελάττωση της EMMPRIN και των MMPs σε αρτηρίες διαβητικών, υποδεικνύοντας την ύπαρξη απορρυθμισμένης EMMPRIN σε παθολογικές αγγειακές καταστάσεις όπου υπάρχει συσσώρευση κολλαγόνου (Portik-Dobos et al. 2002).

3.6.2. EMMPRIN και αναπαραγωγή

Πολλές πληροφορίες έχουν αντληθεί για το ρόλο της EMMPRIN στην αναπαραγωγική διαδικασία από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια με ολική έλλειψη του γονιδίου της EMMPRIN (EMMPRIN ^{-/-}). Μία από τις πρώτες παρατηρήσεις στα ποντίκια αυτά ήταν η αδυναμία τελικής εμφύτευσης του εμβρύου στη μήτρα (Igakura et al. 1996; Igakura et al. 1998). Παρόλο που τα έμβρυα αναπτύσσονταν σωστά στα προεμφυτευτικά στάδια, τελικά λιγότερο από το 8%

κατάφερναν να εμφυτευτούν με επιτυχία στη μήτρα ετερόζυγων για την EMMPRIN θηλυκών (Igakura et al. 1998). Εντυπωσιακή, επίσης, είναι η παρατήρηση πως τα ομόζυγα θηλυκά με έλλειψη του γονιδίου της EMMPRIN μπορούσαν να κυοφορήσουν αγρίου τύπου έμβρυα (EMMPRIN $+/+$), αλλά σε εξαιρετικά χαμηλά ποσοστά. Σε ανθρώπινο πλακούντα, η EMMPRIN θεωρείται πως, μέσω της επαγωγής των MMPs, προκαλεί τη ρήξη της μεμβράνης του εμβρύου και την αποκόλληση από τη μήτρα τη στιγμή του τοκετού (Li et al. 2004).

3.6.3. EMMPRIN και όραση

Η αλληλεπίδραση της EMMPRIN με τους υποδοχείς των μονοκαρβοξυλικών οξέων (Monocarboxylate transporters-MCTs) είναι σημαντική για πληθώρα λειτουργιών, όπως στο μεταβολισμό της ενέργειας στα νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς χιτώνα. Η ανάπτυξη του αμφιβληστροειδούς απαιτεί την συντονισμένη επικοινωνία μεταξύ των φωτοϋποδοχέων και των κυττάρων Muller. Τα κύτταρα Muller μεταβολίζουν τη γλυκόζη και το τελικό προϊόν, το γαλακτικό οξύ, χρησιμοποιείται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση για την παροχή ενέργειας των γειτονικών φωτοϋποδοχέων. Η περίσσια του γαλακτικού οξέως πρέπει να απομακρυνθεί από τα κύτταρα προτού γίνει τοξική, διαδικασία που πραγματοποιούν οι υποδοχείς των μονοκαρβοξυλικών οξέων. Έχειδειχτεί πως η EMMPRIN δημιουργεί σύμπλοκα με τους MCT1 και MCT4 και τους οδηγεί στη μεμβράνη, συμβάλλοντας στη διατήρηση του κυτταρικού μεταβολισμού. Ποντίκια ομόζυγα για την έλλειψη της EMMPRIN παρουσίασαν έλλειψη των πρωτεϊνών MCT1, MCT3 και MCT4 στα επιθηλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η απομάκρυνση της περίσσειας του γαλακτικού οξέος, να προκαλείται καταστροφή των κυττάρων και τελικά να επέρχεται τύφλωση λόγω δυσλειτουργίας των φωτοϋποδοχέων (Philp et al. 2003).

3.6.4. EMMPRIN και ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων

Έχειδειχτεί πως στο θύμο αδένα παρατηρείται υψηλή έκφραση της EMMPRIN, η οποία σχετίζεται με τη μετάβαση των ανώριμων T λεμφοκυττάρων στο επόμενο επίπεδο ωρίμανσης. Η αναγκαιότητα αυτή φάνηκε από πειράματα που έγιναν σε πρώιμα λεμφοκύτταρα με τη χρήση ενός αντισώματος έναντι της EMMPRIN, η

προσθήκη του οποίου σταμάτησε την περαιτέρω ωρίμανση. Η ανάλυση της ποσότητας του mRNA στα πρώιμα, αλλά και στα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα έδειξε μια αύξηση της τάξεως του 3,75 στη μεταγραφή του γονιδίου της EMMPRIN στον πληθυσμό των ενεργοποιημένων κυττάρων (Zhang et al. 2002).

3.6.5. EMMPRIN και κεντρικό νευρικό σύστημα

Η EMMPRIN συμβάλλει στη διαφοροποίηση του νευρικού συστήματος και στη διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Papoutsis et al. 2000). Ο εντοπισμός της όμως και σε άλλα σημεία του κεντρικού νευρικού συστήματος υποδεικνύει την εμπλοκή της και σε άλλες λειτουργίες. Η EMMPRIN συμμετέχει στην αλληλεπίδραση μεταξύ ενδοθηλιακών και νευρικών κυττάρων, η οποία θεωρείται πως γίνεται για τη δημιουργία ακόμα πιο σταθερών συνδέσεων (Fadool et al. 1993; Curtin et al. 2007). Επίσης, έχει αναφερθεί πως συμμετέχει στη λειτουργία της όσφρησης, στο σχηματισμό του ιππόκαμπου, βρίσκεται στην αμυγδαλή, στον υποθάλαμο, στο μεσεγκέφαλο, στα κύτταρα Purkinje της παρεγκεφαλίδας και στη φαιά ουσία του νωτιαίου μυελού (Fan et al. 1998).

3.6.6. EMMPRIN και κυτταρική διαφοροποίηση

Εκτενής αναφορά έχει γίνει για το ρόλο της EMMPRIN στην κυτταρική διαφοροποίηση. Αυτό έγινε αντιληπτό από τις αναπτυξιακές ανωμαλίες που είχαν παρατηρηθεί σε ποντίκια που δεν έφεραν το γονίδιο της EMMPRIN, καθώς και από μελέτες σε ποικίλα βιολογικά συστήματα. Στην επιδερμίδα και σε άλλα επιθηλιακά κύτταρα, έχει παρατηρηθεί υψηλή και συνεχής έκφραση στα κύτταρα που βρίσκονται στη διαδικασία της διαφοροποίησης και όχι σε εκείνα που την ολοκληρώνουν (Gabison et al. 2005). Η διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα σχετίζεται με την υπερέκφραση της EMMPRIN παράλληλα με την παραγωγή MMPs (Major et al. 2002). Πρόσφατα έγιναν γνωστά παραπάνω στοιχεία για τη συμμετοχή της EMMPRIN στη διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυο-ινοβλάστες, ένα σημαντικό γεγονός στη διαδικασία επούλωσης πληγής, που οδηγεί στην αναδιάταξη του εξωκυτταρικού χώρου και τη συρρίκνωση του τραύματος (Huet et al. 2008). Επιδράσεις εξωγενούς EMMPRIN είχαν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης της αSMA, μιας ισομορφής της ακτίνης χαρακτηριστικής για τους μυο-ινοβλάστες.

Επιπρόσθετα, η EMMPRIN αύξανε τις συσταλτικές ιδιότητες των ινοβλαστών, όπως φάνηκε από πειράματα ανοσοϊστοχημείας και συνεντοπισμού με κύτταρα του στρώματος (Huet et al. 2008).

3.6.7. Επιπλέον λειτουργίες της EMMPRIN

Ο Pushkarsky και η ομάδα του (Pushkarsky et al., 2001) αναγνώρισαν την EMMPRIN σαν υποδοχέα της εξωκυτταρικής κυκλοφιλίνης A (CypA), μόριο με το οποίο αλληλεπιδρά ο ιός HIV προκειμένου να εισέλθει στα κύτταρα. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης έδειξαν την αλληλεπίδραση της EMMPRIN με το σύμπλοκο κυκλοφιλίνης A / ιού και παρεμπόδιση της εισόδου του ιού στα κύτταρα κατόπιν χρήσης αντισώματος έναντι της EMMPRIN.

Ο Yurchenko (Yurchenko et al., 2001) έδειξε πως η EMMPRIN λειτουργεί σαν υποδοχέας της κυκλοφιλίνης B (CypB), καθώς η CypB ενεργοποιούσε τη ροή ιόντων ασβεστίου, τη φωσφορυλίωση του μονοπατιού ERK και το χημειοτακτισμό σε κύτταρα με υπερέκφραση της EMMPRIN, σε αντίθεση με τα κύτταρα ελέγχου. Αντισώματα έναντι της EMMPRIN παρεμπόδισαν το χημειοτακτισμό των ουδετερόφιλων, υποδεικνύοντας τη χρησιμότητα της EMMPRIN στις δράσεις του μορίου CYPB.

Ο Zhou (Zhou et al., 2005) αναγνώρισε την EMMPRIN σαν υπομονάδα του συμπλόκου της γ-σεκρετάσης και η απουσία έκφρασης της EMMPRIN μέσω τεχνολογίας RNAi, προκάλεσε την αύξηση στα επίπεδα των πλακών αμυλοειδούς, χωρίς να αλλάζουν τα επίπεδα των άλλων συστατικών μορίων του συμπλόκου.

Η EMMPRIN αλληλεπιδρά επίσης με την SHREW1, μια πρωτεΐνη που συνδέεται με την κυτταρική μετανάστευση και η μείωση της έκφρασης της μιας εκ των 2 μέσω RNAi, παρεμπόδισε τη μετανάστευση των HeLa κυττάρων χωρίς να έχει καμία επίδραση στον πολλαπλασιασμό τους (Schreiner et al. 2007).

Ακόμα, συστηματική διαλογή βιβλιοθηκών ερυθροκυττάρων έδειξε την EMMPRIN σαν υποδοχέα της PfRh5, μιας πρωτεΐνης απαραίτητης για την ανάπτυξη του πλασμοδίου (*Plasmodium falciparum*) στο αίμα, ενός παρασίτου που ευθύνεται για την ελονοσία. Η έλλειψη της EMMPRIN ανέστειλε την προσβολή των ερυθροκυττάρων από όλα τα στελέχη του πλασμοδίου, ενώ πλήρης καταστολή της ικανότητας εισόδου στα ερυθροκύτταρα επετεύχθη με τη χρήση αντισωμάτων έναντι της EMMPRIN. Περαιτέρω μελέτες με μόρια της EMMPRIN που είχαν υποστεί

μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα σημεία, φανέρωσαν τη μερική ή την ολοκληρωτική αδυναμία (glu9 σε lys ή leu90 σε pro) πρόσδεσης με το μόριο της PfRh5 (Muramatsu 2012).

3.7. Στόχευση της EMMPRIN στην κυτταρική μεμβράνη και μηχανισμός δράσης

3.7.1. Στόχευση στην κυτταρική μεμβράνη

Ο εντοπισμός της EMMPRIN στην κυτταρική μεμβράνη είναι απαραίτητος προκειμένου να επιτελέσει πολλές από τις λειτουργίες στις οποίες συμμετέχει. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο κατευθύνεται στην πλασματική μεμβράνη παραμένει ακόμα άγνωστος, αλλά πρόσφατες μελέτες έχουν προτείνει τρεις πιθανούς μηχανισμούς:

A. Το γλουταμινικό οξύ, το οποίο βρίσκεται στη διαμεμβρανική περιοχή της EMMPRIN και είναι πολύ συντηρημένο ανάμεσα στα είδη, συνδέεται άμεσα με την μεταφορά της EMMPRIN στην κυτταρική μεμβράνη και τη σύνδεση της με το μεταφορέα των μονοκαρβοξυλικών οξέων MCT1. Η μετάλλαξη του γλουταμινικού σε αργινίνη παρεμπόδισε την μεταφορά της EMMPRIN στην μεμβράνη και τη σύνδεσή της με τον MCT1, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να παραμένει «εγκλωβισμένη» στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Wilson et al. 2002).

B. Η λευκίνη στη θέση 252 στην κυτταροπλασματική ουρά της EMMPRIN αναγνωρίστηκε ως το έναυσμα για τη βασοπλευρική στόχευση της στα κύτταρα νεφρού MDCK (Madine-Darby canine kidney), ενώ το σήμα αυτό δεν αναγνωρίζονταν από τα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, όπου η EMMPRIN παρουσίαζε διαφορετική (**apical**) κατανομή (Deora et al. 2004). Το γεγονός αυτό αποτέλεσε μια ένδειξη πως το συγκεκριμένο σήμα λειτουργεί σε ορισμένους τύπους κυττάρων, ενώ παράλληλα χρειάζονται ορισμένοι ιστοειδικοί ρυθμιστές για την μεταφορά της EMMPRIN στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων (Pushkarsky et al. 2005).

Γ. Ένα μέλος της οικογένειας των κυκλοφιλινών, η πρωτεΐνη Cyp60, έχει δείχτεί πως ενέχεται στη μεταφορά και τον εντοπισμό της EMMPRIN στην κυτταρική μεμβράνη. Η αλληλεπίδραση της EMMPRIN με την πρωτεΐνη Cyp60 απαιτεί την

προλίνη 211 που βρίσκεται στο τέλος της διαμεμβρανικής περιοχής, δίπλα στην εξωκυτταρική περιοχή. Οι κυκλοφιλίνες είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών οι οποίες δρουν σαν πρωτεΐνες-μεταφορείς ή αλλιώς «σαπερόνες» και μεταφέρουν τα πρωτεϊνικά τους υποστρώματα μέσω του δικτύου του κυττάρου. Τα πρωτεϊνικά υποστρώματα περιλαμβάνουν μόρια, όπως η EMMPRIN, ο συνδέτης Flt3, καθώς και ο υποδοχέας της ινσουλίνης (Pushkarsky et al. 2005).

3.7.2. Μηχανισμός δράσης της EMMPRIN

Η EMMPRIN απαντάται σε 2 μορφές, ως διαμεμβρανική πρωτεΐνη και ως διαλυτό μόριο και μπορεί να δράσει και με τις 2 μορφές (Ellis et al. 1989; Nabeshima et al. 1991; Bordador et al. 2000; Ko et al. 2000; Sidhu et al. 2004; Tang et al. 2004). Οι ινοβλάστες που βρίσκονται σε απόσταση από τα κύτταρα που εκφράζουν την EMMPRIN, δέχονται την επίδραση του μορίου, είτε ολόκληρου (Sidhu et al. 2004), είτε του διαλυτού αμινοτελικού άκρου της κατόπιν πρωτεόλυσης και απομάκρυνσης του καρβοξυτελικού τμήματος (Tang et al. 2004). Η συμμετοχή της EMMPRIN σε πλήθος λειτουργιών προϋποθέτει για την εμπλοκή της σε πολλά από τα γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια. Για παράδειγμα, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν πως η EMMPRIN επάγει την παραγωγή της MMP-1 μέσω του p38 MAPK μονοπατιού (Lim et al. 1998) και της MMP-2 μέσω της φωσφολιπάσης A_2 και της 5-λιποξυγενάσης (Taylor et al. 2002). Επίσης, εντοπίζεται να συμμετέχει σε αντι-αποπτωτικά μονοπάτια που συνδέονται με την - επαγόμενη από υαλουρονικό οξύ - ενεργοποίηση του μονοπατιού ErBb2 (Zucker et al. 2001).

Στην καρκινική σειρά NCI-H460, η ουσία PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) ενεργοποίησε την παραγωγή της EMMPRIN μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης C, ασβεστίου και των πρωτεϊνών MEK $\frac{1}{2}$ (Menashi et al. 2003; Sidhu et al. 2004). Στην καρκινική σειρά μαστού NS2T2A1, η επαγωγή της EMMPRIN έγινε μέσω της επίδρασης του επιθηλιακού παράγοντα αύξησης (Epithelial Growth Factor-EGF) και της αμφιρεγκουλίνης (amphiregulin), μέσω φωσφορυλίωσης της κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα EGFR, η οποία μειώθηκε δραστικά με τη χρήση συμπληρωματικών cDNAs (Menashi et al. 2003). Αντίθετα, η πυρηνική πρωτεΐνη πιπίνη (pipin) είναι πιθανό να εμπλέκεται στην αρνητική ρύθμιση της έκφρασης της EMMPRIN (Shi et al. 2001) και να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες περιπτώσεις καρκίνου,

καθώς η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει μειωμένη έκφραση σε πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων (Shi et al. 2000).

3.8. EMMPRIN ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

3.8.1. Έκφραση της EMMPRIN στον καρκίνο

Η EMMPRIN βρέθηκε πως υπερεκφράζεται σε μικρομεταστατικά κύτταρα που είχαν απομονωθεί από το μυελό των οστών ασθενών με διάφορους τύπους καρκίνου (Klein et al. 2002), δείχνοντας με σαφήνεια τη συμμετοχή της σε διαδικασίες ογκογένεσης και μετάστασης. Αυξημένη έκφραση της EMMPRIN ανιχνεύεται σε καρκίνους της ουροδόχου κύστης (Muraoka et al. 1993), μαστού (Taylor et al. 2002), πνεύμονα (Polette et al. 1997; Caudroy et al. 1999), στοματικής κοιλότητας (Bordador et al. 2000), οισοφάγου (Ishibashi et al. 2004), δέρματος (Marionnet et al. 2003), του περιφερικού νευρικού συστήματος (Nabeshima et al. 2006) καθώς και σε λεμφώματα (Thorns et al. 2002). Επίσης, υπερέκφραση της EMMPRIN σχετίζεται με την ανάπτυξη και εξάπλωση καρκίνων, όπως των γλοιωμάτων (Sameshima et al. 2000), οστών (Nabeshima et al. 2006), λάρυγγα (Rosenthal et al. 2003), ωοθηκών (Davidson et al. 2003) και του μελανώματος (van den Oord et al. 1997).

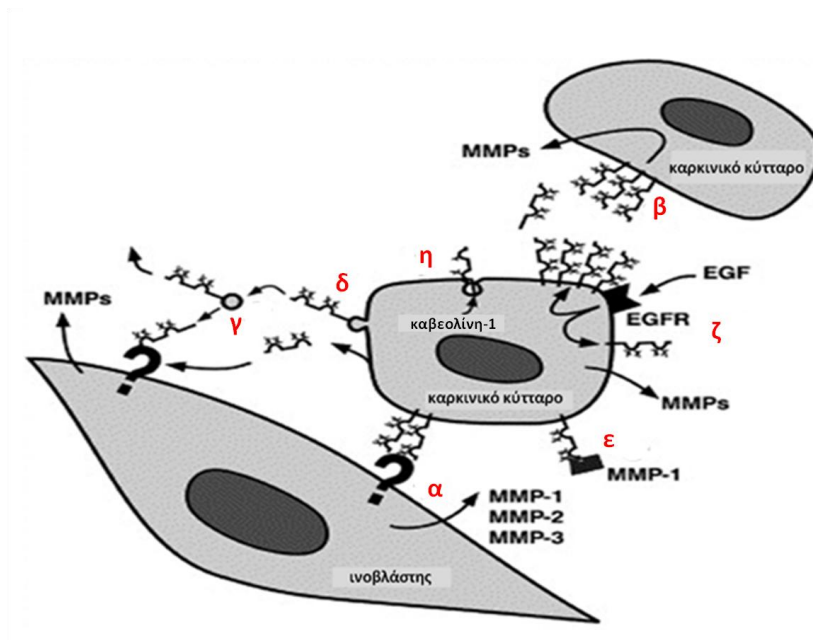
Η υψηλή συχνότητα της EMMPRIN σε πολλά είδη καρκίνων έγινε γνωστή μετά από εκτεταμένες μελέτες και πειράματα που έγιναν με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και δειγμάτων ιστών σε ιστικές μικροσυστοιχίες (tissue microarrays). Υπερέκφραση της EMMPRIN εντοπίστηκε σε 112 από τα 119 δείγματα καρκίνων και παρουσίαζε τις παρακάτω συχνότητες στα διάφορα είδη καρκίνου: ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα 60-100%, καρκίνος παγκρέατος 87%, ηπατοκυτταρικός 83%, μυελοειδής καρκίνος μαστού 83%, γλοιοβλάστωμα 79%, στομάχου 66%, πνεύμονα 62%, ήπατος 80%, εντέρου 58%, ορθού 59%, μαστού 64%, εγκεφάλου 90%, οισοφάγου 87%, ωοθηκών 75% και ουροδόχου κύστεως 85% (Riethdorf et al. 2006).

3.8.2. EMMPRIN και μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs)

Η επαγωγή μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) από αλληλεπιδράσεις μεταξύ καρκινικών κυττάρων και ινοβλαστών, έχει μελετηθεί από πληθώρα ερευνητών και έχει διαπιστωθεί η συμβολή τους στην ανάπτυξη και μετανάστευση του όγκου (Pyke

et al. 1992; Heppner et al. 1996). Η EMMPRIN που αποτελεί τον κυριότερο επαγωγέα των MMPs, αρχικά απομονώθηκε ως μια 58 kDa πρωτεΐνη από την επιφάνεια κυττάρων καρκίνου του πνεύμονα, η οποία μπορούσε να επάγει την παραγωγή της MMP-1 (Kataoka et al. 1993). Αργότερα, παρατηρήθηκε πως η μεγάλη αύξηση των επιπέδων των MMPs από παρακείμενους σε καρκινικά κύτταρα ινοβλάστες, συνδεόταν με μεγάλη αύξηση στα επίπεδα της EMMPRIN (Caudroy et al. 1999; Dalberg et al. 2000). Υπερκείμενα καρκινικών κυττάρων, τα οποία υπερέκφραζαν την EMMPRIN στην επιφάνεια τους, μπορούσαν να επάγουν την παραγωγή των MMP-2, MMP-3, MMP-9 και MMP-11 από κύτταρα ινοβλαστών (Kataoka et al. 1993; Guo et al. 1997).

Η επαγωγή των MMPs γίνεται μέσω ολόκληρου του μορίου της EMMPRIN, είτε αυτό είναι διαλυτό είτε μέσω μιας μορφής που περιλαμβάνει μόνο την εξωκυτταρική περιοχή της και προέρχεται από τη δράση των MMPs (MMP-induced shedding) (Li et al. 2001; Taylor et al. 2002; Egawa et al. 2006). Αν και ο μηχανισμός με τον οποίο προκαλείται η επαγωγή των MMPs μέσω της EMMPRIN δεν έχει διασαφηνιστεί επακριβώς, οι ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις της EMMPRIN φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο. Έχει παρατηρηθεί επαγωγή MMPs από ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που έφεραν τμήματα της EMMPRIN (EMMPRIN-fusion proteins) και δημιουργούσαν τέτοιες συνδέσεις (Sun et al. 2001). Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες που συνδέουν την υπερέκφραση της EMMPRIN με την αύξηση στα επίπεδα των MMPs και χωρίς την παρουσία ινοβλαστών. Επιμόλυνση με EMMPRIN ή εξωγενής προσθήκη ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε καρκινικά κύτταρα είχε σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα (Sun et al. 2001). Αξιοσημείωτο είναι πως παρατηρείται και το αντίστροφο, καθώς επιμόλυνση ινοβλαστών με αδενοϊό που έφερε το cDNA της EMMPRIN, προκαλούσε αύξηση στα επίπεδα των MMPs (Li et al. 2001). Επιπρόσθετα, η παρουσία της EMMPRIN στην επιφάνεια ενδοθηλιακών κυττάρων σε καρκίνους μαστού και πνεύμονα, αποτελεί ένδειξη για τη συμμετοχή της στην παραγωγή MMPs και από τα ίδια τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Caudroy et al. 1999).



Εικόνα 6: Πιθανοί μηχανισμοί ρύθμισης της επαγωγής των μεταλλοπρωτεϊνών μέσω EMMPRIN σε αλληλεπιδράσεις καρκινικών κυττάρων-ινοβλαστών. Παρόλο που δεν είναι ακόμα γνωστός ο υποδοχέας της EMMPRIN στους ινοβλάστες (α), θεωρείται ότι δρα σαν υποδοχέας το ίδιο το μόριο στα παρακείμενα κύτταρα (β), η διαλυτή EMMPRIN, είτε απελευθερώνεται σαν ολόκληρο μόριο είτε πρωτεολυτικά κομμένη σε υποπεριοχές, φαίνεται να διατηρεί την επαγωγική της δράση (γ), και μπορεί να ενεργεί σε απομακρυσμένα σημεία. Η απελευθέρωσή της σαν ολόκληρο μόριο πραγματοποιείται με κυστίδια που αποχωρίζονται από την κυτταρική μεμβράνη (microvesicular membrane shedding) (δ). Επίσης, η EMMPRIN μπορεί να αυξήσει τη αποικοδόμηση του κολλαγόνου της περιοχής μέσω πρόσδεσης στην MMP-1 (ε). Η σύνθεση της EMMPRIN και η επαγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών αυξάνονται μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού του EGFR (ζ), ενώ η γλυκοζυλίωση της EMMPRIN αναστέλλεται από τη σύνδεση με την καβεολίνη-1 (η).

Η πιο σαφής ένδειξη της εμπλοκής της EMMPRIN στη μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων και την εξάπλωση του όγκου φάνηκε χαρακτηριστικά από ένα *in vivo* πείραμα, όπου η επιμόλυνση της καρκινικής σειράς μαστού MDA-MB-436 με

το cDNA της EMMPRIN, είχε σαν αποτέλεσμα την γρήγορη ανάπτυξη του όγκου σε «γυμνά» (nude) ποντίκια (Zucker et al. 2001), η οποία συνοδευόταν από υψηλή έκφραση των MMP-2 και MMP-9. Επιπρόσθετα, η χρήση ενός αντισώματος έναντι της EMMPRIN ανέστειλε την έκφραση των MMPs, στοιχείο που δείχνει την άμεση εξάρτηση των πρωτεϊνών αυτών από την EMMPRIN (Menashi et al. 2003). Οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους γίνεται η επαγωγή των MMPs παραμένουν σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστοι, αλλά η υψηλή γλυκοζυλίωση της EMMPRIN φαίνεται πως συμβάλλει σημαντικά στο φαινόμενο αυτό (Guo et al. 1997; Sun et al. 2001). Η συμμετοχή της γλυκοζυλίωσης διαφαίνεται και από πειράματα που έγιναν με τη χρήση συνθετικής εξωκυτταρικής περιοχής IgI (ECI) που έφερε GlcNAc (n=0-2), η οποία μπορούσε να επάγει MMPs σε σχέση με την ECI που δεν ήταν γλυκοζυλιωμένη και δεν είχε καμία δραστηριότητα (Hironobu Hojo et al. 2003). Τα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά δίκτυα που ρυθμίζουν τη λειτουργία και τη δράση της EMMPRIN βρίσκονται υπό συνεχή διερεύνηση, αλλά κάποια είναι ήδη γνωστά όπως το μονοπάτι των MAPKs στην παραγωγή της MMP-1 από τους ινοβλάστες (Lim et al. 1998) και η συμβολή της φωσφολιπάσης A2 και της 5-λιποξυγενάσης στην παραγωγή της MMP-2 από κύτταρα ινοβλαστών (Taylor et al. 2002). Σε μεταστατικά καρκινώματα των ωοθηκών παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας από εξωκυτταρικά σήματα των κινασών πρωτεϊνών (ERK), της p38 και των c-Jun κινασών παράλληλα με την υψηλή έκφραση της MMP-2 (Davidson et al. 2003). Η επαγωγή της MMP-9 σχετίζεται θετικά με την ενεργοποίηση των μονοπατιών της p38 κινάσης, αλλά έχει αρνητικό συσχετισμό με την έκφραση και δράση της κινάσης ERK (Davidson et al. 2003). Συνολικά, διαφαίνεται ότι διαφορετικά σηματοδοτικά δίκτυα δύναται να ενεργοποιούνται ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου.

3.8.3. EMMPRIN και VEGF

Πέρα από την ικανότητα της EMMPRIN να ρυθμίζει την επαγωγή των MMPs, εκτεταμένες μελέτες δείχνουν πως η EMMPRIN ενεργοποιεί την ίδια της την έκφραση μέσω ενός «μηχανισμού επανατροφοδότησης» παράλληλα με την υπερέκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα αύξησης (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). Ο αυξητικός παράγοντας VEGF είναι απαραίτητος για τη φυσιολογική αγγειογένεση κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, τον

αναπαραγωγικό κύκλο και τη διαδικασία επούλωσης των πληγών στους ενήλικους (Carmeliet et al. 1996; Ferrara et al. 1996; Goede et al. 1998; Kronenberg 2003; Li et al. 2003). Επιπλέον, κατά την ογκογένεση, το μεταστατικό δυναμικό των κυττάρων που υπερεκφράζουν την EMMPRIN συνδέεται άμεσα με την ικανότητα τους να σχηματίζουν νέα αγγεία μέσω αυξημένης παραγωγής VEGF (Tang et al. 2005).

Αναλύσεις *in vitro* και *in vivo* δείχνουν έναν σχεδόν άρρηκτο δεσμό μεταξύ της υπερέκφρασης της EMMPRIN και της ταυτόχρονης παραγωγής VEGF. Σε καρκινικές σειρές μαστού, καθώς και σε ανθρώπινα γλοιοβλαστώματα, η αναστολή της έκφρασης της EMMPRIN με συμπληρωματικό RNA ελάττωσε όχι μόνο τις μεταλλοπρωτεΐνες MMP-2 και MMP-9, αλλά και την έκκριση του VEGF (Liang et al. 2005; Tang et al. 2005). Στην κυτταρική σειρά μαστού MDA-MB-231 η EMMPRIN ενεργοποιούσε την παραγωγή VEGF, τόσο στα καρκινικά όσο και κύτταρα του στρώματος (Tang et al. 2005).

Επιπρόσθετα, η απενεργοποίηση της EMMPRIN μέσω RNAi σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος ποντικού (Hca-F) προκάλεσε σημαντική μείωση και στα επίπεδα του VEGF και τελικά σε αναχαίτιση της μετάστασης (Jia et al. 2006). Επιπλέον, χρήση siRNA έναντι της EMMPRIN στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά μελανώματος A375, είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία κλώνων με μειωμένη έκφραση της EMMPRIN και ελαττωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης *in vitro*. Οι siRNA κλώνοι είχαν επίσης χαμηλά επίπεδα έκφρασης του VEGF και συνεπώς χαμηλότερα ποσοστά μετανάστευσης των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (Chen et al. 2006). Συναφείς παρατηρήσεις υπήρχαν και στην καρκινική σειρά μελανώματος B16, όπου η έλλειψη του γονιδίου της EMMPRIN (B16-CD147 knock down) οδήγησε σε αξιοσημείωτη μείωση της έκφρασης του VEGF τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Voigt et al. 2009). Στα *in vivo* πειράματα, οι όγκοι που είχαν δημιουργηθεί από τη χορήγηση κυττάρων με siRNA παρουσίασαν μικρότερο μέγεθος όγκου στα «γυμνά» nude ποντίκια, ελαττωμένη πυκνότητα στα αιμοφόρα αγγεία που τροφοδοτούσαν τον όγκο καθώς και σε μειωμένη μεταστατικότητα (Chen et al. 2006).

3.8.4. EMMPRIN και επαγωγέας της ουροκινάσης πλασμινογόνου

Μεταξύ των άλλων πρωτεϊνών που συμβάλλουν στη διάσπαση του εξωκυττάριου χώρου και στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, ο επαγωγέας

της ουροκινάσης του πλασμινογόνου (urokinase plasminogen activator, uPA) έχει δείχτει πως διαδραματίζει ενεργό ρόλο (Dano et al. 2005). Ο uPA καταλύει τη μετατροπή του ζυμογόνου πλασμινογόνου σε πλασμίνη, η οποία και αποικοδομεί μια πληθώρα εξωκυτταρικών πρωτεϊνών και ενεργοποιεί και άλλες πρωτεΐνάσες, μεταξύ αυτών και τις MMPs. Η πεποίθηση πως το σύστημα uPA συμμετέχει ενεργά στη μετανάστευση του όγκου ενισχύεται και από πειράματα *in vitro* σε καλλιέργειες κυττάρων και *in vivo* σε ζωικά μοντέλα όγκων (Dano et al. 2005). Αυτό επιβεβαιώθηκε και από τη μελέτη ασθενών με καρκίνο μαστού, όπου τα αυξημένα επίπεδα uPA σε εκχυλίσματα από τους πρωταρχικούς όγκους σχετίζεται με κακή πρόγνωση (Look et al. 2002).

Η παρουσία του uPA και του υποδοχέα αυτού uPAR σε καρκινικά κύτταρα αλλά και σε κύτταρα του στρώματος που περιβάλλουν τον όγκο (Frandsen et al. 2001), γέννησε το ερώτημα κατά πόσο το σύστημα αυτό μπορεί, όπως οι MMPs, να ρυθμίζεται από την EMMPRIN. Με τη χρήση μιας καρκινικής σειράς μαστού (NS2T2A), παρατηρήθηκε πως η αυξημένη συγκέντρωση της EMMPRIN, είτε ενδογενώς μέσω επιμόλυνσης, είτε προστιθέμενη εξωγενώς, αύξανε και τα επίπεδα των uPA και του υποδοχέα uPAR (Quemener et al. 2007). Το φαινόμενο της αύξησης των uPA και uPAR αντιστράφηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν siRNA έναντι της EMMPRIN και ειδικό αντίσωμα που αναχαιτίζει τη λειτουργία της. Επιπρόσθετα, η χορήγηση καρκινικών κυττάρων μαστού που υπερέκφραζαν EMMPRIN σε ποντίκια, παρήγαγαν υπερμεγέθεις όγκους που περιείχαν υψηλά επίπεδα MMPs και uPA, υποδεικνύοντας πως η EMMPRIN αποτελεί παράγοντα κλειδί και για τα 2 συστήματα. Ακόμα, η υπερέκφραση της EMMPRIN στα NS2T2A, αύξησε τα επίπεδα του uPA σε ενδοθηλιακά κύτταρα σε συγκαλλιέργειες με τα NS2T2A, δείχνοντας έτσι πως υπάρχει και παρακρινής δράση της EMMPRIN μεταξύ καρκινικών κυττάρων και κυττάρων του στρώματος. Τα NS2T2A παρουσίαζαν επίσης ενισχυμένη μεταναστευτικότητα *in vitro* και η χρήση αναστολέων, όπως το amiloride (αναστολέας του uPA) και του marimastat (αναστολέας των MMP), ελάττωσε σημαντικά την EMMPRIN-επαγόμενη ικανότητα μετανάστευσης, είτε με χορήγηση του κάθε αναστολέα χωριστά, είτε σε συνδυασμό. Αυτά τα στοιχεία δείχνουν την εμπλοκή της EMMPRIN στην ενεργότητα του uPA και τη σχετίζουν άμεσα με την απορρύθμιση του σε καρκινικές καταστάσεις (Quemener et al. 2007).

3.8.5. EMMPRIN και κυκλοφιλίνες

Οι κυκλοφιλίνες (Cyps) είναι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των πεπτιδυλ-προλυλ *cis-trans* ισομερασών και δρουν σα μεταφορείς (σαπερόνες) και σα μεσολαβητές της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Πολλές μελέτες εμπλέκουν τις κυκλοφιλίνες με την επιφανειακή έκφραση της EMMPRIN, καθώς η κυκλοσπορίνη A (CsA), που προσδένει την CyP, επηρέασε αρνητικά την έκφρασή της στην κυτταρική μεμβράνη (Yurchenko et al. 2001; Pushkarsky et al. 2005; Yurchenko et al. 2005). Μελέτες που έγιναν με πειράματα πρόσδεσης πεπτιδίων αναγνώρισαν την προλίνη 211 (P211) στη διαμεμβρανική περιοχή της EMMPRIN ως το απαραίτητο αμινοξύ για την -υποβοηθούμενη από την CyP- μεταφορά της EMMPRIN στην κυτταρική μεμβράνη (Yurchenko et al. 2005). Μεταγενέστερες μελέτες από την ίδια ομάδα, εντόπισαν την λιγότερο χαρακτηρισμένη Cyp60 ως σαπερόνη της EMMPRIN. Πρόσφατες έρευνες αναγνώρισαν την χρησιμότητα της EMMPRIN στην κυτταρική σηματοδότηση μέσω κυκλοφιλινών (Yurchenko et al. 2002; Arora et al. 2005). Η πρόσδεση εξωκυτταρικής CyPA στην EMMPRIN είχε σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ERK μονοπατιού και τον χημειοτακτισμό (Yurchenko et al. 2001). Στη συνέχεια, πειράματα ανταγωνισμού έδειξαν πως οι κυκλοφιλίνες A και B (CypA και CypB) έχουν την EMMPRIN ως κοινό υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη (Yurchenko et al. 2002).

Παρ' όλη την αλληλεπίδραση των κυκλοφιλινών με την EMMPRIN, λίγα είναι γνωστά για την συμμετοχή τους σε καρκινικές περιπτώσεις. Η έκφραση της EMMPRIN και της CypA σε παγκρεατικά αδενοκαρκινώματα είναι σαφώς υψηλότερη από τους γειτονικούς ιστούς. Η εξωγενής προσθήκη CypA ενίσχυσε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο και το φαινόμενο αυτό παρεμποδίστηκε από την προεπώαση με αντίσωμα έναντι της EMMPRIN. Επιπλέον, η CypA έχει δείχτει πως μαζί με τον παράγοντα αναστολής των μακροφάγων (macrophage inhibitory factor, MIF) είναι οι πιο διαδεδομένες πρωτεΐνες στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Campa et al. 2003).

3.8.6. EMMPRIN και Μεταφορείς Μονοκαρβοξυλικών οξέων (Monocarboxylate transporters, MCTs)

Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από μειωμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση και από υψηλά ποσοστά γλυκόλυσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων γαλακτικού οξέος, γνωστό σαν φαινόμενο Warburg (Warburg 1956). Η αυξημένη γλυκόλυση στον καρκίνο συνδέεται με διάφορες συνθήκες, όπως η υποξία, η οξέωση και η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, φαινόμενα τα οποία συνδέονται με την αντίσταση στη χημειοθεραπεία και την ανάπτυξη του όγκου (Gatenby et al. 2004; Gatenby et al. 2006; Pelicano et al. 2006; Pelicano et al. 2006; Tredan et al. 2007). Ο μεταβολισμός της γλυκόζης μέσω της γλυκόλυσης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων γαλακτικού οξέος, το οποίο μεταφέρεται άμεσα εκτός καρκινικού κυττάρου προκειμένου να διατηρηθούν οι υψηλοί ρυθμοί γλυκόλυσης και να αποφευχθεί μια πιθανή τοξικότητα στο εσωτερικό του κυττάρου.

Οι μεταφορείς των μονοκαρβοξυλικών οξέων (monocarboxylate transporters, MCTs) είναι τα μόρια που αναλαμβάνουν τη διαδικασία μεταφοράς των οξέων στο εξωτερικό του κυττάρου. Η μεταφορά στο εξωτερικό του κυττάρου έχει σαν αποτέλεσμα την τοπική μείωση του pH και την παρεμπόδιση της δράσης των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων, ευνοώντας με αυτόν τον τρόπο την ανεξέλεγκτη αύξηση του όγκου, τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων (Martinez-Zaguilan et al. 1996; Gatenby 2006; Gatenby et al. 2006) καθώς και τη μετάσταση (Schlappack et al. 1991).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η EMMPRIN αποτελεί την απαραίτητη σαπερόνη για τη μεταφορά των μεταφορέων του μονοκαρβοξυλικού οξέως MCT1, MCT3 και MCT4 στην πλασματική μεμβράνη (Kirk et al. 2000; Philp et al. 2003; Gallagher et al. 2007). Η έκφραση του MCT3 περιορίζεται στον οφθαλμό, ενώ τα μόρια MCT1 και MCT4 παρουσιάζουν πιο ευρεία κατανομή στους ιστούς. Τα σύμπλοκα μεταξύ EMMPRIN, MCT1 και MCT4 μεταφέρουν το γαλακτικό οξύ έξω από το κύτταρο. Μελέτες βασισμένες σε πειράματα με τεχνολογία RNAi έδειξαν πως απενεργοποιώντας την EMMPRIN, το μόριο MCT4 δεν κατευθύνεται στην πλασματική μεμβράνη και συσσωρεύεται στα λυσοσώματα. Παρομοίως, απενεργοποιώντας το MCT4, η EMMPRIN παραμένει στο ενδοπλασματικό δίκτυο αδυνατώντας να φτάσει στην κυτταρική μεμβράνη (Gallagher et al. 2007).

Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν δείξει, επίσης, την επίδραση της EMMPRIN στο μόρια MCT1 με πειράματα που βασίζονταν στη χρήση της τεχνολογίας siRNA ή τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων που παρεμπόδιζαν τη λειτουργία της EMMPRIN. Η χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού MEM-M6/1 έναντι της EMMPRIN (Baba et al. 2008), προκάλεσε τον κυτταρικό θάνατο σε καρκινικές σειρές του παχέως εντέρου (LoVo, HT-29, WiDr, SW620) και σε κύτταρα μελανώματος A2058. Το MEM-M6/1 αναχαίτισε την απελευθέρωση του γαλακτικού οξέος στο μικροπεριβάλλον του όγκου, με αποτέλεσμα να συσσωρευτεί στο κυτταρόπλασμα, να μειωθεί το ενδοκυτταρικό pH και να δημιουργηθούν συνθήκες οξέωσης που μείωσαν τους γλυκολυτικούς ρυθμούς παραγωγής ATP. Στα κύτταρα μελανώματος A375 και στα κύτταρα καρκίνου του παγκρέατος MiaPaCa2 και Panc, το siRNA έναντι της EMMPRIN σταμάτησε τον πολλαπλασιασμό, τη διηθητικότητα, την παραγωγή VEGF και τους ρυθμούς γλυκόλυσης, ενώ ταυτόχρονα μείωσε την ογκογονικότητα σε αλλομοσχεύματα σε «γυμνά» ποντίκια (Chen et al. 2009; Schneiderhan et al. 2009). Παρόμοια αποτελέσματα είχε και στην κυτταρική σειρά T λεμφώματος Jurkat, όπου εκτός από τη μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης, επηρέασε αρνητικά και την ικανότητα πρόσδεσης στην εξωκυτταρική φιβρονεκτίνη, *in vitro*.

3.8.7. EMMPRIN και ιντεγκρίνες

Οι ιντεγκρίνες είναι υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας που αποτελούνται από ετεροδιμερή αλυσίδων α και β και ευθύνονται για τις φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κυττάρου και του περιβάλλοντα εξωκυτταρικού χώρου. Η σύγκριση μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων του προστάτη φανέρωσε μια τάση για σύνδεση μεταξύ των μορίων α6 και β4, η οποία στα καρκινικά κύτταρα αντικαθίσταται από τη σύνδεση α6β1, προφανώς για να εξυπηρετήσει μετέπειτα σηματοδοτικά γεγονότα (Demetriou et al. 2004). Οι συνδέσεις EMMPRIN/α3β1 και EMMPRIN/α6β1 είναι υπεύθυνες για το μεταναστευτικό δυναμικό που παρουσιάζουν τα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (Berdichevski et al. 1997; Dai et al. 2009). Η επαγωγική δράση της EMMPRIN στην ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων αυτών, καθώς και στην έκκριση MMPs, παρεμποδίστηκε μερικώς από την χρήση αντισωμάτων έναντι της ιντεγκρίνης α6β1. Η ουσία Wortmannin, ένας αναστολέας της κινάσης PI3K, ανέστειλε την επίδραση της EMMPRIN στην κινητικότητα του

ενδοκυτταρικού ασβεστίου, μείωσε σημαντικά το μεταναστευτικό δυναμικό των ηπατοκυττάρων και την παραγωγή των MMPs.

Με βάση τα δεδομένα αυτά, φαίνεται πως η αββ1 ιντεγκρίνη αλληλεπιδρά με την EMMPRIN και το σύμπλοκο επάγει την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K. Επιπρόσθετα, παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν με την υπερέκφραση της EMMPRIN στα ηπατοκύτταρα 7721, όπου αυξήθηκε η διάσπαση του εξωκυττάρου χώρου μέσω αυξημένων MMPs και η μεταστατικότητα μέσω των μονοπατιών FAK-paxillin and FAK-PI3K-Ca²⁺, φαινόμενα τα οποία αναχαιτίστηκαν με τη χρήση αντισωμάτων έναντι της ιντεγκρίνης αββ1 (Tang et al. 2012). Η υψηλή έκφραση των αββ1 και αββ1 σε πολλά είδη καρκίνων σε συνδυασμό με τη σύνδεσή τους με την επίσης υπερεκφρασμένη σε καρκίνους EMMPRIN, φανερώνει πιθανούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν ενδοκυτταρική συνεργασία μεταξύ των μορίων αυτών προκειμένου να επιτευχθεί η διάσπαση του εξωκυτταρικού χώρου και η μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων.

3.8.8. EMMPRIN και καβεολίνη-1

Πέρα από τις καρκινικές δράσεις που έχει η EMMPRIN, μελέτες έχουν δείξει πως μπορεί να δράσει και σε μόριο που παρεμποδίζει την ανάπτυξη του καρκίνου, γεγονός το οποίο οφείλεται στην αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη καβεολίνη-1 (caveolin-1). Οι καβεολίνες αποτελούν τα βασικά συστατικά των καβεολίων, τα οποία είναι σχηματισμοί από χοληστερόλη και φωσφωσφιγγολιπίδια και ευθύνονται για τη μεταφορά μακρομορίων με τρόπο εξαρτώμενο από κυστίδια κλαθρίνης (Williams et al. 2004; Williams et al. 2005; Williams et al. 2005). Αποτελούν μόρια που τους έχουν αποδοθεί πολλές λειτουργίες, όπως η ομοιόσταση της χοληστερόλης, η κυτταρική σηματοδότηση, η μεταφορά λιπιδίων (Cohen et al. 2004), η οργάνωση και συντήρηση των κυτταρικών και - αρκετά πρόσφατα - η σύνδεσή τους με το μετασχηματισμό και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (Williams et al. 2004; Williams et al. 2004; Williams et al. 2005; Williams et al. 2005). Η καβεολίνη-1 παρουσιάζει διττό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως ρυθμίζει την ανάπτυξη, τη διήθηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων όπως στον καρκίνο του προστάτη (Corn et al. 2010), της ουροδόχου κύστης (Fong et al. 2003) και του οισοφάγου (Ando et al. 2007). Αντίθετα, εμφανίζει ογκοκατασταλτική δράση στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Bender et al. 2000), του

πνεύμονα (Ho et al. 2002), των ωοθηκών (Wiechen et al. 2001) και στο σάρκωμα (Wiechen et al. 2001).

Από τα 3 μέλη της οικογένειας των καβεολινών (1, 2, 3) μόνο η καβεολίνη-1 (Caveolin-1) έχει δείχτει πως συνδέεται άμεσα με την EMMPRIN. Η καβεολίνη-1 είναι γνωστή σαν μια πρωτεΐνη που λειτουργεί σα μεταφορέας λιπιδίων και έχει βρεθεί πως αλληλεπιδρά με σηματοδοτικά μόρια, όπως οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων, οι G πρωτεΐνες, οι Src κινάσες κλπ (Liu et al. 2002).

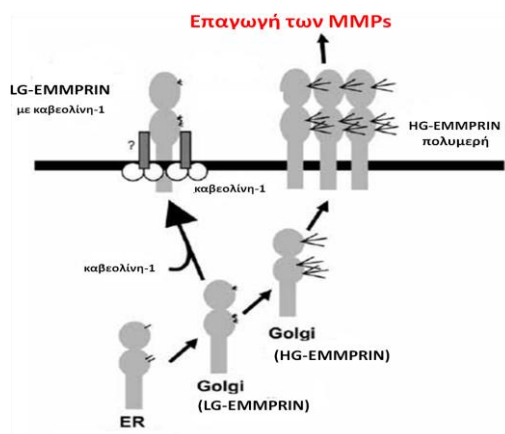
Μια μελέτη με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης αποκάλυψε την αλληλεπίδραση μεταξύ καβεολίνης/EMMPRIN σε πολλούς τύπους κυττάρων (Tang et al. 2004). Το σύμπλοκο EMMPRIN/καβεολίνης-1 εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια και συμπεριλαμβάνει την εξωκυτταρική περιοχή 2 (IgII/EMMPRIN). Η εξάλειψη της έκφρασης της καβεολίνης-1, μέσω RNAi, οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων των υψηλά γλυκοζυλιωμένων μορίων της EMMPRIN, των οποίων η συσσώρευση στην πλασματική μεμβράνη πυροδότησε την παραγωγή των MMPs. Αυτό αποτελεί και μια αρχική εξήγηση για το πώς η καβεολίνη-1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, τη διηθητικότητα, την ανάπτυξη αποικιών σε ρευστό άγαρ και την παραγωγή των MMPs στα καρκινικά κύτταρα (Razani et al. 2001; Fiucci et al. 2002). Η καβεολίνη-1 συνδέεται επιλεκτικά με τις χαμηλής γλυκοζυλίωσης μορφές της EMMPRIN στο δίκτυο Golgi (LG-EMMPRIN), παρεμποδίζοντας τη μετατροπή τους στα υψηλής γλυκοζυλίωσης μόρια (HG-EMMPRIN) που απαιτούνται για την επαγωγή των MMPs (Tang et al. 2004). Θεωρείται γενικά πως η καβεολίνη-1 είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της συσσώρευσης των HG-EMMPRIN στη μεμβράνη (εικόνα 7). Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται και από πειράματα με τη δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών, όπου η έλλειψη της περιοχής IgII-EMMPRIN, δεν επέτρεψε την αλληλεπίδραση μαζί της (Tang et al. 2004).

Αντίθετα, πιο πρόσφατες μελέτες που έγιναν σε καρκινικές σειρές ηπατικού καρκίνου με διαφορετικό μεταστατικό δυναμικό (HcaF- υψηλό, HcaP-χαμηλό και Hepa1-6-μηδαμινό) έδειξαν πως όταν εφαρμόστηκε η τεχνολογία RNAi, η μείωση της έκφρασης της καβεολίνης-1 στην πιο μεταστατική σειρά (Hca-F), οδήγησε ταυτόχρονα σε μείωση της HG-EMMPRIN, αύξηση της LG-EMMPRIN, ελάττωση της MMP-11 και παρεμπόδιση της κυτταρικής διήθησης. Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση της καβεολίνης-1 στη μη μεταστατική κυτταρική σειρά Hepa1-6, προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της HG-EMMPRIN, της MMP-11 καθώς και του μεταστατικού δυναμικού.

Συνεπώς, φαίνεται πως η καβεολίνη-1 επάγει τη γλυκοζυλίωση της EMMPRIN και ρυθμίζει θετικά τη μετατροπή της από χαμηλής σε υψηλής γλυκοζυλίωσης μόρια (Jia et al. 2006). Η θετική αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων της EMMPRIN και της καβεολίνης-1, φάνηκε και από τα συμπεράσματα στα οποία κατέληξαν πειράματα όπου μελετήθηκε η σχέση της καβεολίνης-1 με την EMMPRIN στον ρινοφαρυγγικό καρκίνο. Αναλύσεις Q-PCR και Western σε δείγματα από ιστούς ασθενών και στις κυτταρικές σειρές CNE1, CNE2, C666-1 έδειξε υψηλή έκφραση και στα 2 μόρια, η οποία σχετιζόταν και με κακή πρόγνωση της νόσου. Επιπρόσθετα, η αναστολή της έκφρασής τους, οδήγησε σε ελάττωση των επιπέδων των MMP-3 και MMP-11, ενώ η υπερέκφρασή τους είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των MMP-3 και MMP-11. Επίσης, η υπερέκφραση της καβεολίνης-1 συνδέεται με την αύξηση των επιπέδων της EMMPRIN (Du et al. 2009).

Αντίθετα, ο Barth και οι συνεργάτες του σε πειράματα συνεντοπισμού σε κυτταρικές σειρές πνεύμονα δεν έδειξαν κανένα συνεντοπισμό της EMMPRIN και της καβεολίνης (Barth et al. 2006), σύμφωνα με τα οποία δεν υπάρχει λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ της καβεολίνης και της EMMPRIN.

Όλα αυτά τα δεδομένα, δείχνουν πως στα περισσότερα καρκινικά κύτταρα υπάρχει ζωτικής σημασίας σύνδεση μεταξύ της EMMPRIN και της καβεολίνης-1, η οποία όμως έχει διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με τον τύπο των καρκινικών κυττάρων στα οποία μελετάται.



Εικόνα 7: Ρύθμιση της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) μέσω της EMMPRIN. Το «γυμνό» μόριο της EMMPRIN βγαίνει από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και εισέρχεται στο δίκτυο Golgi, όπου

γλυκοζυλιώνεται σε υψηλής και χαμηλής γλυκοζυλίωσης μόρια. Τα υψηλής γλυκοζυλίωσης φτάνουν στη μεμβράνη όπου ομοδιμερίζονται και επάγουν τις MMPs, ενώ τα χαμηλής γλυκοζυλίωσης μόρια είναι ενωμένα με την καβεολίνη-1 και το σύμπλοκο αυτό ενώ φτάνει στη μεμβράνη, δεν ομοδιμερίζεται και δεν επάγει τις μεταλλοπρωτεϊνάσες.

3.8.9. EMMPRIN και αντίσταση στη χημειοθεραπεία

Η αντίσταση που αναπτύσσουν τα καρκινικά κύτταρα σε χημειοθεραπευτικά σκευάσματα αποτελεί το σημαντικότερο πρόβλημα στην καταπολέμηση του καρκίνου. Η αντίσταση αυτή προκύπτει με πολλούς μηχανισμούς, όπως (Weidle et al. 2010):

- μειωμένη πρόσληψη του φαρμάκου λόγω κυτταρικών και ιστικών φραγμών
- ενεργοποίηση μηχανισμών επιδιόρθωσης και αποτοξίνωσης
- διαφορετικός κυτταρικός μεταβολισμός
- ενεργοποίηση επιβίωσης/αντι-αποπτωτικών μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης ,
- αυξημένη έξοδος των φαρμάκων από το κύτταρο μέσω των μεμβρανικών μεταφορέων ABC (ATP Binding cassette) (Gottesman 2002; Assaraf 2006; Landis-Piwowar et al. 2006; Li et al. 2006; Broxterman et al. 2007; Dai et al. 2007; Tredan et al. 2007).

Σε πολλούς τύπους καρκίνου έχει παρατηρηθεί πως η EMMPRIN εμφανίζει αντιαποπτωτικές ιδιότητες και έχει συνδεθεί άμεσα με την αντίσταση σε χημειοθεραπευτικά σκευάσματα. Στην καρκινική σειρά των ωοθηκών HO-8910, το RNAi έναντι της EMMPRIN μείωνε σημαντικά την ογκογονικότητα, τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων και την ευαισθησία στην ταξόλη, ένα χημειοθεραπευτικό σκεύασμα που παρεμβαίνει στην οργάνωση των νηματίων της ακτίνης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Zou et al. 2007). Αύξηση της έκφρασης της EMMPRIN έχει βρεθεί σε πληθώρα καρκινικών σειρών που είναι ανθεκτικές σε χημειοθεραπείες (Toole et al. 2008; Li et al. 2009). Πειράματα που έγιναν στην καρκινική σειρά του μαστού MCF7 και την ομόλογη σειρά που είναι ανθεκτική σε χημειοθεραπευτικές ουσίες, όπως η αδριαμυκίνη (Adriamycin) (MCF7/Adr), έδειξαν

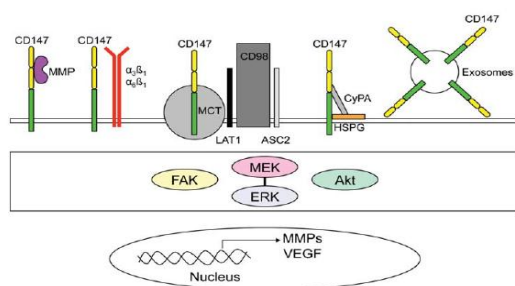
πως η ανθεκτικότητα στα κύτταρα MCF7/Adr οφειλόταν εν μέρει στην γλυκοπρωτεΐνη P (P-gp), η οποία υπερκφράζεται σε πολλούς μεταστατικούς καρκίνους που απαιτούν την παραγωγή MMPs. Η EMMPRIN υπερεκφραζόταν σε αυτά τα κύτταρα σε σχέση με τη μητρική σειρά MCF7 και η επιμόλυνση των MCF7 με το cDNA EMMPRIN, αύξανε τα επίπεδα της P-gp και την έκφραση των MMP-2 and MMP-9. Με αυτόν τον τρόπο, υπήρξε ώθηση στην ανάπτυξη μεγαλύτερης αντίστασης των κυττάρων αυτών σε ουσίες που έχουν σαν υπόστρωμα την P-gp, όπως η αδριαμυκίνη, η βινκριστίνη και η ταξόλη (taxol). Παρεμπόδιση της έκφρασης της EMMPRIN στα MCF7/Adr είχε σαν αποτέλεσμα τη αναστολή της έκφρασης της P-gp και των MMPs και την ανάπτυξη ενός κυτταρικού φαινοτύπου ευαίσθητου στη χημειοθεραπεία (Yang et al. 2003; Li et al. 2007).

Παρόμοια αποτελέσματα υπήρξαν και από πειραματικές αναλύσεις σε καρκινικές σειρές πλακώδους καρκινώματος KB και του ανθεκτικού στη χημειοθεραπεία παραγώγου KB/V (human oral squamous cell carcinoma cell line KB and its MDR derivative KB/V). Τα επίπεδα της EMMPRIN ήταν πιο υψηλά στην ανθεκτική σειρά KB/V και η απενεργοποίηση του γονιδίου της EMMPRIN, αποκατέστησε την ευαισθησία στα σκευάσματα vincristine (VCR), ταξόλη και 5-fluorouracil (5-Fu) (Kuang et al. 2008). Για αυτό η EMMPRIN θεωρείται πως συμβάλλει σημαντικά στην απόκτηση ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων μέσω έκφρασης της P-gp και της αυξημένης δραστηριότητας των MMPs. Τα δεδομένα αυτά δημιούργησαν και την επιθυμία διερεύνησης των μηχανισμών με τους οποίους συμβάλλει η υπερέκφραση της EMMPRIN στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων. Πρωτεϊνική ανάλυση των KB, KB/V και KB/V siRNA-EMMPRIN φανέρωσε 21 υπερεκφραζόμενες πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων και η κυκλοφιλίνη A (cyclophilinA-CyPA) που έχει ήδη αναφερθεί πως αλληλεπιδρά με την EMMPRIN. Η προσθήκη της κυκλοσπορίνης A, του αναστολέα της κυκλοφιλίνης A (CyPA), αποκατέστησε την ευαισθησία στα VCR and 5-fluorouracil, γεγονός που υποδεικνύει την λειτουργική σύνδεση της CyPA με την EMMPRIN στην ανάπτυξη του ανθεκτικού φαινοτύπου (Kuang et al. 2008).

Η EMMPRIN έχει αναγνωριστεί επίσης, σαν υποδοχέας που προάγει την ανάπτυξη των όγκων ανεξάρτητα από την παρουσία ανδρογόνων, μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από το υαλουρονικό οξύ. Έχει δειχτεί πως η EMMPRIN επάγει την παραγωγή του υαλουρονικού οξέως και η αλληλεπίδραση μεταξύ υαλουρονικού και καρκινικού κυττάρου, ενεργοποιεί το αντι-αποπτωτικό μονοπάτι

επιβίωσης PI3K/Akt (Marieb et al. 2004). Η EMMPRIN-επαγόμενη παραγωγή υαλουρονικού σχετίζεται και με την αυξημένη δραστηριότητα πολλών μονοπατιών κυτταρικής επιβίωσης, όπως του μονοπατιού ERBB2 (Ghatak et al. 2005) καθώς και με την - ανεξάρτητη από σημεία πρόσδεσης - ανάπτυξη του όγκου (anchorage-independent manner) (Yang et al. 2003; Marieb et al. 2004). Στα πλακώδη καρκινώματα του στόματος (oral squamous cell carcinomas-SCC) η απενεργοποίηση της EMMPRIN είχε σαν συνέπεια τη μείωση της έκφρασης του συνδεδεμένου με το X χρωμόσωμα αναστολέα της απόπτωσης (X-chromosome linked inhibitor of apoptosis-XIAP) και τελικά τη μεγαλύτερη αύξηση της ευαισθησίας στην αντικαρκινική χημική ουσία 5-fluorouracil (Kuang et al. 2009).

Σε άλλη μελέτη προσδιορίστηκε η συμβολή της υπερέκφρασης της EMMPRIN στον κακοήγη φαινότυπο του καρκίνου του μαστού, η οποία οφείλεται στην αναστολή της anoikis, μια μορφής απόπτωσης που οφείλεται στις ατελείς συνδέσεις των κυττάρων με τον εξωκυτταρικό χώρο. Τα κύτταρα αυτά, μετά από παρεμπόδιση της έκφρασης της EMMPRIN, μείωναν τη βιωσιμότητα τους με ενεργοποίηση της αντιαποπτωτικής κασπάσης-3 και την αύξηση του κατακερματισμού του DNA, χαρακτηριστικά της anoikis. Επιπλέον, παρατηρήθηκε συσσώρευση του προ-αποπτωτικού παράγοντα Bim. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η EMMPRIN ευθύνεται για τη φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση της κινάσης ERK, η οποία φωσφορυλιώνει την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bim, η οποία τελικά καταλήγει για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης της Bim συνεπάγεται και την αναστολή της λειτουργίας του μηχανισμού anoikis και προάγει την επιβίωση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Yang et al. 2006).



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση των συνδέσεων της EMMPRIN με τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά, τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιεί και τα γονίδια που επάγει

4. Αντισώματα έναντι της EMMPRIN

Έχουν απομονωθεί πολλά μονοκλωνικά αντισώματα που ανιχνεύουν διαφορετικούς επιτόπους της EMMPRIN και παρεμποδίζουν τη δράση της σε διάφορους τύπους κυττάρων. Παρατηρήθηκε ότι χαμηλής συγγένειας αντισώματα μπορούσαν να προσδεθούν μόνο σε ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, λόγω δισθενούς πρόσδεσης στα συσσωρευμένα μόρια της EMMPRIN στην επιφάνεια των κυττάρων. Αντίθετα, τα αντισώματα που είχαν υψηλή συγγένεια προσδένονταν σε “ήρεμα” T λεμφοκύτταρα, τα οποία είναι χαμηλοί εκφραστές της EMMPRIN. Η διαφοροποίηση αυτή θεωρήθηκε πως οφείλεται στη δισθενή πρόσδεση των χαμηλής συγγένειας αντισωμάτων όπου υπάρχει υπερέκφραση των μορίων της EMMPRIN, ενώ τα υψηλής συγγένειας αντισώματα προσδένονται στην EMMPRIN που εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα (Koch et al. 1999).

Το υψηλής συγγένειας μονοκλωνικό αντίσωμα MEM-M6/1 έναντι της ανθρώπινης EMMPRIN, ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (LoVo, HT-29, WiDr, and SW620 κύτταρα) και του μελανώματος (A2058 κύτταρα) (Baba et al. 2008), αλλά όχι των WI-38 and TIG-113 φυσιολογικών ινοβλαστών. Η EMMPRIN είναι γνωστό ότι σχηματίζει σύμπλοκο με τους MCTs, οι οποίοι είναι κρίσιμοι για τη μεταφορά του γαλακτικού οξέος και την ομοιοστάση του ενδοκυτταρικού pH. Σε κύτταρα LoVo, το μονοκλωνικό MEM-M6/1 αντίσωμα έναντι της EMMPRIN, ανέστειλε την διασύνδεση των μορίων EMMPRIN και MCTs, αναχαιτίζοντας την λειτουργία των MCTs με την παρατηρούμενη μείωση στην πρόσληψη και απελευθέρωση του γαλακτικού οξέος και του pH των κυττάρων. Περαιτέρω, η επαγωγή της οξύτητας ήταν παράλληλη με τη μείωση της γλυκολυτικής ροής και τα επίπεδα ενδοκυτταρικού ATP. Αυτές οι επιδράσεις δεν εντοπίστηκαν στους φυσιολογικούς ινοβλάστες. Καθώς τα καρκινικά κύτταρα εξαρτώνται από τη γλυκόλυση για την παραγωγή ενέργειας, η αναστολή της δράσης της EMMPRIN προκαλεί το θάνατο των καρκινικών κυττάρων.

Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η διαμερισματοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης σε μικροπεριοχές (microdomains) είναι μια από τις αρχές που διέπουν τη σηματοδότηση μέσω των κυτταρικών υποδοχέων. Η αλληλεπίδραση της EMMPRIN με το αντίσωμα MEM-M6/6 έχει δειχτεί πως προκαλεί την μετατόπιση των υποδοχέων CD48 και CD59 από τις μικροπεριοχές, γεγονός που προκαλεί την

παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων. Τα αντισώματα αυτά, ενώ εκκρίνουν κανονικά επίπεδα IL-2, έχουν μειωμένες τις α -αλυσίδες CD25 του υποδοχέα IL-2 (Staffler et al. 2003).

Πειράματα με COS-7 (ινοβλάστες νεφρού πιθήκου) κατόπιν χορήγησης μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι διαφόρων επιτόπων της EMMPRIN, έδειξαν πως η EMMPRIN περιέχει τουλάχιστον δύο περιοχές που ενέχονται σε διαφορετικές λειτουργίες. Η μία εμπλέκεται στη ρύθμιση της κυτταρικής πρόσδεσης (ομοτυπική κυτταρική συσσωμάτωση) και η άλλη ρυθμίζει την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων (Chiampanichayakul et al. 2006). Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες με μία σειρά αντισωμάτων όπου εξετάστηκε η ικανότητά τους να αναστέλλουν την εξέλιξη του ηπατοκυτταρικού καρκίνου (HCC) (Xu et al. 2007). Το mAb Hb18G και ένα ιωδινιλωμένο F(ab')₂ τμήμα του Hb18G (Licartin) έναντι της EMMPRIN, ήταν υπεύθυνα για την αναστολή της έκφρασης πολλών πρωτεϊνών του στρώματος, όπως των μεταλλοπρωτεϊνών, του VEGF κ.α. σε συγκαλλιέργειες καρκινικών κυττάρων με ινοβλάστες. Ακόμα, η δράση των αντισωμάτων αυτών είχε σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της διήθησης και μετάστασης των ηπατοκαρκινικών κυττάρων. Επειδή το mAb Hb18G και το F(ab')₂ τμήμα του μπορούσαν να μειώνουν σημαντικά την επιβίωση και αύξηση των καρκινικών κυττάρων, το Licartin χρησιμοποιήθηκε σε κλινικές μελέτες για στοχευμένη ραδιοθεραπεία ασθενών με ηπατικό καρκίνο και συνέβαλε στην αποτροπή της επανεμφάνισης της νόσου καθώς και στην αύξηση του προσδόκιμου ζωής σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση ήπατος (Xu et al. 2007). Ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση ήπατος και έλαβαν Licartin είχαν αυξημένο ποσοστό επιβίωσης κατά 20.6% και χαμηλότερα ποσοστά επανεμφάνισης του όγκου κατά 30.4% (Xu et al. 2007) .

Το χημαιρικό αντίσωμα έναντι της EMMPRIN με την ονομασία CNTO3899 αξιολογήθηκε για τη χρησιμότητά του στον καρκίνο της κεφαλής και του τραχήλου (Dean et al. 2009). Πειραματόζωα που τους χορηγήθηκε το αντίσωμα είχαν καθυστερημένη ανάπτυξη του όγκου σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου, ενώ σε συνδυασμό με τη ακτινοθεραπεία, παρουσιάστηκε μεγαλύτερη μείωση του όγκου. Η χρήση του αντισώματος παρεμπόδισε την μετάσταση των SSC-1 και FaDu καρκινικών κυττάρων σε ποσοστό 57%, ενώ επέφερε και μείωση της αποικοδόμησης του κολλαγόνου και άλλων προφλεγμονωδών και προαγγειογενετικών πρωτεϊνών όπως η IL-1 β , η IL-6, η IL-8, ο VEGF τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Επίσης, η παρουσία του αντισώματος ενίσχυσε τη δράση της ακτινοθεραπείας.

Επιπρόσθετα, σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την πολλαπλή σκλήρυνση (multiple sclerosis-MS) και την αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE), απομονώθηκε ένα αντίσωμα από ποντίκι, έναντι των αμινοξέων 40-55 της εξωκυτταρικής περιοχής IgI της EMMPRIN, το οποίο αναγνώριζε την ανθρώπινη και την ποντικίσια EMMPRIN και λειτουργούσε παρεμποδιστικά στη δράση της EMMPRIN που σχετίζονταν με τη δράση των T λεμφοκυττάρων. Η παρουσία του αντισώματος ελάττωνε τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων, μείωνε την ικανότητα τους να εκκρίνουν MMP-9 και αναχαίτιζε την κυτταροτοξικότητα που προκαλούσαν τα T λεμφοκύτταρα στους νευρώνες. Επιπρόσθετα, προκειμένου να ελεγχθεί η θεραπευτική δράση του αντισώματος αυτού *in vivo*, χορηγήθηκε σε ποντίκια λίγο πριν την έναρξη της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας, κατά την έναρξη αλλά και αμέσως μετά. Τα ζώα που είχαν λάβει το αντίσωμα σε σύγκριση με εκείνα που είχαν λάβει άλλο αντίσωμα σαν δείγμα ελέγχου, παρουσίασαν εξασθένιση της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας. Η ιστολογική ανάλυση διαμήκων τμημάτων του νωτιαίου μυελού αποκάλυψε περισσότερη ανέπαφη μυελίνη και την παρουσία λιγότερων φλεγμονωδών κυττάρων (Agrawal et al. 2011; Agrawal et al. 2012).

Τέλος, σε μια μελέτη όπου χορηγήθηκε αντίσωμα έναντι της EMMPRIN παρουσία ή απουσία χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων της EMMPRIN (gemcitabine, β -lapachone), σε πειραματικά μοντέλα όγκου από κύτταρα παγκρεατικού καρκίνου MIA PaCa-2, παρατηρήθηκε ότι το αντίσωμα από μόνο του προκαλούσε αναστολή της αύξησης του όγκου, ενώ σε συνδυασμό με τα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα είχε ανταγωνιστική δράση σε όγκους που δεν αιματώνονταν αρκετά (Kim et al. 2014). Το φαινόμενο δεν παρατηρούνταν σε όγκους με καλή αιμάτωση (υψηλή συγκέντρωση αγγείων), διότι η παρουσία πολλών αγγείων συνέβαλε στη μεταφορά μεγαλύτερης συγκέντρωσης φαρμάκου στον όγκο, προκαλώντας αναχαίτιση της ανάπτυξης του όγκου και τελικά καλύτερη κλινική εικόνα (Shah et al. 2012).

ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σημαντικός ρόλος της EMMPRIN στην επαγωγή των MMPs που ευθύνονται για την αποικοδόμηση του εξωκυτταρικού χώρου και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, κατέστησε σαφές πως η αναστολή της δράσης του μορίου αυτού θα μπορούσε να αποτελέσει έναν καίριο θεραπευτικό στόχο. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση ανθρώπινων αντισωμάτων έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής της EMMPRIN προκειμένου να μελετηθεί διεξοδικά ο τρόπος δράσης της και κατ' επέκταση να παρεμποδιστεί η επαγωγική της δραστηριότητα σχετικά με την έκφραση των MMPs.

Επιπρόσθετα, καθώς δεν έχει ακριβώς διασαφηνιστεί εάν μόνο το IgI εξωκυτταρικό τμήμα της EMMRPIN ευθύνεται για την παραγωγή των MMPs και επειδή υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με το ρόλο της γλυκοζυλίωσης στη διαδικασία αυτή, κατέστη αναγκαία μια αναλυτική διερεύνηση των υποπεριοχών της εξωκυτταρικής περιοχής της EMMPRIN και του ρόλου της γλυκοζυλίωσης στην επαγωγή των MMPs. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία τέθηκε ως στόχος να απομονωθούν ξεχωριστά ολόκληρη η εξωκυτταρική περιοχή και τα τμήματα αυτής, IgI και IgII, στη γλυκοζυλιωμένη και μη μορφή τους για να διαπιστωθεί τελικά: 1) ποιο είναι ακριβώς το τμήμα της εξωκυτταρικής περιοχής που ενέχεται στην επαγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών και 2) αν πράγματι ο βαθμός γλυκοζυλίωσης είναι απαραίτητος για την επαγωγή αυτή. Η εύρεση ενός πιθανού νέου επιτόπου που συνδράμει σημαντικά στην επαγωγική αυτή ικανότητα της EMMPRIN, θα μπορούσε να αποτελέσει ένα επιπρόσθετο και ίσως πιο ειδικό υπόστρωμα στη διαδικασία επίλογής ενός εξειδικευμένου παρεμποδιστικού αντισώματος έναντι της EMMPRIN.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. ΥΛΙΚΑ

A.1. Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Φυγόκεντρος, Kubota 7780 (κεφαλές AG-5006A και AG-6512C)
- Φυγόκεντρος, Eppendorf 581012
- Μικροφυγόκεντροι Eppendorf 5410
- Υπερφυγόκεντρος Beckman L8-80M (κεφαλή Vti-80)
- Φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους, Bio-Rad Smartspec plus
- Υδατόλουτρο, Julabo
- Σύστημα υπερδιήθησης διαλυμάτων, Millipore Minitan system
- Περισταλτική αντλία, Millipore
- Elisa reader, Bio-Rad model 680
- Συσκευή FPLC, AKTA purifier Box 900
- Πεχάμετρο, HANNA
- Λουτρό υπερήχων, BRANSON 2200
- Αναδευτήρες, Vortex-GENIE 2
- Μαγνητικοί αναδευτήρες, Stuart, Snijders 34532 και Heidolph unimax 1010
- Συσκευές κάθετης ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών, Mini-Protean II και Mini-Protean III Bio-Rad
- Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη, Mini-Trans-Blot Bio-Rad
- Συσκευή ανοσοαποτύπωσης υπό κενό, Easy-titer ELIFA system PIERCE
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων της B.R.L.
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας για μέτρηση μικρών ποσοτήτων, Sartorius CP1245-OCE
- Ηλεκτρονικός ζυγός, Sartorius CP2201
- Θάλαμος Νηματικής Ροής Heraeus B5060 EK/CO₂
- Επωαστήρας HeraCell ¹⁵⁰ 150m (Thermoelectron)
- Κλίβανος καλλιέργειας βακτηρίων υπό ανάδευση, GALLENKAMP
- Κλίβανος καλλιέργειας βακτηριοφάγων σε στερεό υπόστρωμα, GALLENKAMP
- Επωαστήρας για καλλιέργειες μυκήτων, MRC ORBITAL SHAKER INCUBATOR

- Σύστημα για μετασχηματισμό βακτηρίων με ηλεκτροδιάταξη GENE PULSER, PULSE CONTROLLER και GENE TRANSFORMER, BIORAD.
- Σύστημα υπερδιήθησης διαλυμάτων Millipore Minitan system
- Συσκευή PCR DNA-Engine
- Οπτικό μικροσκόπιο Olympus CK
- Ανάστροφο μικροσκόπιο Leica DMIL

A.2. Γενικά Αναλώσιμα, Πλαστικά

- Πλαστικά ακρορύγχια (tips): από Costar, για επαναληπτική πιπέτα Eppendorf,
- Αποστειρωμένα (filter tips), 1-30 μ l, 10-200 μ l και 100-1000 μ l από Corning.
- Γυάλινες πιπέτες παστέρ από Brand.
- Πλαστικές πιπέτες των 1, 2, 5, 10, 25 ml από SARSTEDT.
- Τρυβλία για στερεές καλλιέργειες βακτηρίων από Vive.
- Πλαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου ή πολυστυρενίου των 15 και 50 ml (Falcon) από SARSTEDT
- Πλαστικοί σωλήνες 1.5 ml (eppendorf) από SARSTEDT
- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (5 ml quick- seal ultracentrifuge tubes) από Beckman.
- Πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων από πολυστυρένιο με επίπεδο πυθμένα (MaxiSorp F96) από Nunc.
- Κυψελίδες 0.1 cm για ηλεκτροδιάταξη από BIORAD.
- Πλαστικές κυψελίδες μιας χρήσης από SARSTEDT.
- Φίλτρα με διάμετρο πόρου 0.2 και 0.45 μ m από Gelman.
- Φίλτρα συμπίκνωσης Amicon.
- Μembrάνες νιτροκυτταρίνης hybond C από Amersham International P.L.C.
- Στήλη νικελίου (Ni^{2+} -NTA-agarose) από QIAGEN Inc.
- Στήλη πρωτεΐνης G (Protein G Immobilized on highly cross-linked agarose) από Sigma.
- Μembrάνες διαπίδυσης από Spectrum και φίλτρα υπερδιήθησης από Amicon.
- Χαρτί διήθησης 3MM από Whatmann.
- Φίλμ Hyperfilm ECL/high performance chemil.film από Amersham

- Τζάμια για συσκευές ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών από BIORAD.
- Σύριγγες ινσουλίνης από BD Plastipak.
- Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου από Knittel GLASER
- Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειών από Corning.
- Φλάσκες κυττάρων 25, 75, 125 cm² από Corning.
- Πλάκες 6, 12, 24, 48 και 96 φρεατίων για κυτταροκαλλιέργειες από Costar
- Αιματοκυτταρόμετρο Neubauer για την καταμέτρηση κυττάρων θηλαστικών
- Cryotubes, Nunc

A.3. Αντιδραστήρια

Για όλα τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκε δις-απεσταγμένο νερό ειδικής αγωγιμότητας 18.2 MΩ*cm.

Όπου χρειαζόταν πραγματοποιούνταν υγρή αποστείρωση σε κλίβανο για 20 min υπό πίεση 15 lb/in² ή φιλτράρισμα μέσα από φίλτρα με διάμετρο πόρου 0.2 μm (Sterile Acrodisc, Gelman).

Τα χημικά ήταν αναλυτικού βαθμού (BDH, Sigma, Biorad, Merck, Promega), καθώς και υψηλού βαθμού καθαρότητας 99% για τις τεχνικές Μοριακής Βιολογίας.

Υλικά καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων

RPMI-1640 από Gibco

DMEM από Gibco

GMEM από Gibco

ορός εμβρύου βοός (FBS) απενεργοποιημένος στους 56⁰ C για 20min, από Gibco

Lipofectamin Plus Reagent από Invitrogen

Διμεθυλο-σουλφοξίδιο (DMSO) από Sigma

Για την παραγωγή μονοκλωνικού αντισώματος

100x μη-απαραίτητα αμινοξέα από Sigma

100x πυροσταφυλικό νάτριο από Sigma

100x γλουταμικό + ασπαρτικό οξύ από Sigma

50x νουκλεοσίδια από Sigma

Υλικά καλλιέργειας βακτηρίων και φάγων

Τρυπτόνη (Bacto-tryptone) από Difco Laboratories

Πεπτόνη (Bacto peptone) από Difco Laboratories

Εκχύλισμα ζύμης (Bacto yeast extract) από Difco Laboratories

Άγαρ (bacto agar) από Difco Laboratories

MOPS από Sigma

Αντιβιοτικά

Αμπικιλίνη από Bristol Mayers Squib

Καρμπενικιλίνη από Applichem

Καναμυκίνη από Gibco

Τετρακυκλίνη από Sigma

Υλικά Μοριακής Βιολογίας

HEPES από Sigma

Εναρκτήρια μόρια από Minotech Molecular Biology Products (IMBB).

dNTPs από Promega.

Rnasin από Promega.

MMLV αντίστροφη μεταγραφή από Promega.

Taq πολυμεράση από Gibco και Minotech Molecular Biology Products (IMBB).

T4 DNA λιγάση από Boehringer Mannheim /Roche και Fermentas.

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες από New England Biolabs και Promega

Rneasy kit από QIAGEN Inc.

QIAquick από QIAGEN Inc.

Gel Extraction Kit από QIAGEN Inc.

QIAquick PCR Purification kit από QIAGEN Inc.

Αγαρόζη από Sigma

Λυσοζύμη από Sigma

RNase A από Sigma

Μάρτυρες μοριακών μεγεθών DNA: pGEM /Gene Ruler 1Kb/

100 bp DNA Ladder της Fermentas

Υλικά Βιοχημείας

Triton-X-100 (FLUKA)

Μάρτυρες μοριακών μεγεθών πρωτεϊνών (Low Molecular Weight markers) από Pharmacia

Prestained Protein Molecular Weight Marker από Fermentas

IPTG από Promega.

TEMED από Sigma

APS από Sigma

DTT από Sigma

ζελατίνη από Sigma

Ιμιδαζόλιο από Sigma

Διαλύματα silver stain από BIO-RAD.

Αλβουμίνη από ορό βοδιού (BSA) από Sigma.

Coomassie brilliant blue από Sigma.

Σφαιρίδια αγαρόζης συνδεδεμένα με πρωτεΐνη A ή G από AMERSHAM

Εμφανιστικά υγρά Developer-Fixer (Kodak)

Υποστρώματα ανοσοενζυμικού προσδιορισμού

Υπεροξειδάσης: DAB από Sigma

TMB από Fermentas

Ταμπλέτες αλκαλικής φωσφατάσης pNPP από Sigma

A.4. Αντισώματα

- Αντίσωμα κουνελιού έναντι ανοσοσφαιρίνης ποντικού, συζευγμένο με υπεροξειδάση (DakoCytomation F0434, ^{σε} αραίωση 1/5000)
- Αντίσωμα κατσίκας έναντι ανθρώπινης IgG (F(ab')₂ συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση (Pierce 3131, σε αραίωση 1/500)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι ανοσοσφαιρίνης κατσίκας συζευγμένο με υπεροξειδάση (DakoCytomation, P 0449, σε αραίωση 1/5000)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κατσίκας έναντι ανοσοσφαιρίνης κουνελιού συζευγμένο με υπεροξειδάση (DakoCytomation, P 0448, σε αραίωση 1/5000)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της ανθρώπινης ακτίνης (MAB1501 Chemicon, σε αραίωση 1/5000)

- Herceptin (Trastuzumab) Ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της εξωτερικής περιοχής του υποδοχέα HER-2 (Roche, 0.1 μ g/50 μ l PBS/BSA 3%)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι του πεπτιδίου myc προερχόμενο από την υβριδωματική σειρά ποντικού ATCC CRL 1729, (απομονώθηκε από ασκίτη στο εργαστήριο, σε αραίωση 1/1000)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι ενός επιτόπου που εντοπίζεται στην εξωκυτταρική πλευρά της EMMPRIN (A-12, sc25273/Santa Cruz, σε αραιώσεις 1/1000 σε Western Blot και 1/500 για IP)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι ενός επιτόπου που εντοπίζεται στην εξωκυτταρική πλευρά της EMMPRIN (N-19, sc9752/Santa Cruz, σε αραίωση - 1/1000)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της MMP-2 (4022S/Cell Signaling, σε αραίωση 1/750)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της κυτταροπλασματικής περιοχής του υποδοχέα HER2/neu (C-18, sc-284/Santa Cruz, σε αραίωση 1/1000)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα HER2/neu (9G6, sc08/Santa Cruz, σε αραίωση 1/1000)

A.5 Διαλύματα

A.5.1. Ρυθμιστικά διαλύματα:

1X PBS pH 7.4

NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KCl	2.7 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM

1X TBS pH 7.4

Tris-HCl (pH 7.4)	50 mM
NaCl	150 mM

Το pH στα διαλύματα PBS και TBS ρυθμίζεται σε τιμή 7.4 με προσθήκη HCl

A.5.2. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

Διάλυμα ακρυλαμίδιου 30%

ακρυλαμίδιο 29.2% κ.β.

N,N-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο 0.8% κ.β.

Ανάλογα με την υπό μελέτη πρωτεΐνη αλλάζει και η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στα πηκτώματα διαχωρισμού (8%, 10%, 12%)

Πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel)

Tris-HCl (pH 8.8) 0.375 M

SDS 0.1 % (κ.β.)

Υπερθειικό αμμώνιο APS 0.1 % (κ.β.)

TEMED 0.04 % (κ.ο.)

Πήκτωμα επιστοιβαξης (stacking gel)

Tris-HCl (pH 6.8) 0.125 M

SDS 0.1 % (κ.β.)

Υπερθειικό αμμώνιο (APS) 0.1 % (κ.β.)

TEMED 0.1 % (κ.ο.)

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Electrode Buffer)

Tris- HCl pH (8.4) 0.025 M

Γλυκίνη 0.192 M

SDS 0.1% κ.β.

Διάλυμα φόρτωσης δείγματος (loading buffer)

SDS 10% κ.β.

Tris- HCl (pH 6.8) 0.12 M

μερκαπτοαιθανόλη 10% κ.ο.

Γλυκερόλη 20% κ.ο.

Μπλε της βρωμοφαινόλης 0.05% κ.β.

Διάλυμα χρώσης πηκτώματος (Stain gel)

Ισοπροπανόλη 25%

Οξικό οξύ	10% κ.ο
Coomassie brilliant blue R-250	0,06% κ.β.

Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτώματος (Destain gel)

Ισοπροπανόλη	5% κ.ο.
Οξικό οξύ	10% κ.ο.

Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (Western blot)

Γλυκίνη	192 mM
Tris HCl (pH 8.4)	25 mM
Μεθανόλη	20% κ.ο.

Διάλυμα χρώσης Ponceau S

Ponceau S	0,2% κ.β.
TCA (τριχλωροοξικό οξύ)	3% κ.β.

Διάλυμα 3',3',Διαμινοβενζιδίνης (3',3', Diaminobenzidine: DAB)

DAB	0.03%
NiCl ₂	0.03%
H ₂ O ₂ σε TBS 1X	0.03%

Διάλυμα λύσης κυττάρων (lysis buffer) για απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από κύτταρα θηλαστικών

Tris-HCl (pH 7.4)	20 mM
NaCl	137 mM
HEPES	50 mM
PMSF	0.5 mM
Glycerol	10%
Triton X-100	1%
EDTA	10 mM

Αναστολείς πρωτεασών (10X)

Λευπεπτίνη (leupeptin)	50 µg/ml
Πεπστατίνη (pepstatin)	50 µg/ml

Απροτινίνη (aprotinin)	50 µg/ml
------------------------	----------

A.5.3. Διαλύματα ανάλυσης και επεξεργασίας DNA.

TE (1:0.1)

Tris-HCl (pH 8.0)	1 mM
EDTA	0.1 mM

10X TBE διάλυμα ηλεκτροφόρησης δείγματος DNA-RNA

Tris	45 mM
Boric acid	45 mM
EDTA (pH 8.0)	10 mM

6X Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης δείγματος ηλεκτροφόρησης DNA

χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης	0,25% κ.β.
σακχαρόζη	40% κ.β

10X Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης

Tris-HCl (pH 7.8)	300 mM
MgCl ₂	100 mM
ATP	10 mM
DTT	100 mM

10X Ρυθμιστικό διάλυμα RT-PCR.

KCl	1.4 M
Tris-HCl (pH 8.1)	500 mM
MgCl ₂	80 mM

10X Ρυθμιστικό διάλυμα Taq DNA πολυμεράσης

KCl	500 mM
Tris-HCl (pH 8.3)	100 mM
MgCl ₂	15 mM

A.5.4. Διαλύματα παρασκευής πλασμιδιακού DNA σε μικρή και μεγάλη κλίμακα

STET

NaCl	0,1 M
Triton X-100	5% κ.ο.
EDTA (pH 8.0)	1 mM
Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM

Διάλυμα I

γλυκόζη	50 mM
Tris-HCl (pH 8.0)	25 mM
EDTA (pH 8.0)	10 mM

Διάλυμα II

NaOH	0,2 N
SDS	1% κ.β

Διάλυμα III

οξικό κάλιο 5 M	60 ml
κρυσταλλικό (glacial) οξικό οξύ	11.5 ml
H ₂ O	28.5 ml

A.5.5. Διαλύματα για τη διαδικασία επιλογής φάγων (biopanning)

Όλα τα διαλύματα φιλτράρονται από φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.2 μm

Διάλυμα έκλουσης φάγων

0.1M HCl – 0.1% BSA, pH 2.2

Διάλυμα εξουδετέρωσης

2M Tris Base (pH 9)

Διάλυμα κατακρήμνισης φάγων (1 lt)

PEG-8000	200 g
NaCl	145 g

Διαλύματα κορεσμού

PBS 1X/ 3% BSA

A.5.6. Ανασύσταση αντιβιοτικών

Όλα τα διαλύματα φιλτράρονται από φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.2 μm

Αμπικιλλίνη	100 mg/ml σε ddH ₂ O
Καρμπενικιλλίνη	100 mg/ml σε ddH ₂ O
Τετρακυκλίνη	5 mg/ml σε 100% αιθανόλη
Καναμυκίνη	20 mg/ml σε ddH ₂ O

A.5.7. Διάλυμα ομογενοποίησης του υποδοχέα EMMPRIN

Διάλυμα ομογενοποίησης B (pH 7.5)

Na ₃ PO ₄	10 mM
NaCl	100 mM
EDTA	5 mM
EGTA	5 mM
Ιωδοακεταμίδιο	5 mM
PMSF	0.5 mM
απροτινίνη (αναστολέας τρυψίνης)	5 units/ml
πεπστατίνη (αναστολέας πεψίνης)	5 $\mu\text{g/ml}$
Triton X-100	2% κ.ο.

A.6. Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω κυτταρικές σειρές:

- Η υβριδωματική σειρά ATCC CRL 1729, η οποία εκκρίνει το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-myc 9E10.2
- Ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν την EMMPRIN όπως HeLa (καρκίνος τραχήλου της μήτρας), SkBR3, MDA-MB-435, MDA-453 (καρκινικές σειρές μαστού), MDA-435-eb1 (μαστού, τα οποία έχουν μετασηματιστεί ώστε να υπερεκφράζουν το HER2/neu), Mia Capa2 (καρκίνος παγκρέατος), Du145 (καρκίνος προστάτη), T24 (καρκίνος

ουροδόχου κύστης) SkOV3 (καρκίνος ωοθηκών), Calu3 (καρκίνος πνεύμονα), N87 (καρκίνος στομάχου), HT29 (καρκίνος παχέος εντέρου), προήλθαν από την ATCC.

- Η κυτταρική σειρά των ανθρώπινων ινοβλαστών ήταν μια ευγενική προσφορά του Δρ. Δημητρίου Κλέτσα από το Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος και προήλθε από έναν εθελοντή
- Η κυτταρική σειρά CHO (Chinese Hamster Ovary) που απομονώθηκε από την ωοθήκη ποντικού Hamster και προήλθε από την ATCC

A.7. Εναρκτήρια μόρια

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εναρκτήριων μορίων (ή εκκινήτων) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του cDNA των μορίων υπό εξέταση περιγράφονται παρακάτω:

- i) Εναρκτήρια μόρια για την ταυτοποίηση της πρωτοταγής δομής των Fab τμημάτων στο φορέα **pComb3HSS**:

Βαριά αλυσίδα

PelB	5'-ACC TAT TGC CTA CGG CAG CCG-3'
SEQG2	5'-GAA GTA GTC CTT GAC CAG-3'

Ελαφριά αλυσίδα

OmpA	5'-AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA G-3'
SEQkb	5'-ATA GAA ATT GTT CAG CAG GCA-3'

- ii) Για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τμημάτων DNA υποκλωνοποιημένων στους πλασμιδιακούς φορείς pPICZαB και pBluescript, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής εναρκτήρια μόρια:

α factor:	5'-TAC TAT TGC CAG CAT TGC TGC -3'
3' AOX1:	5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC -3'

- iii) Εναρκτήρια μόρια για την ενίσχυση των περιοχών ECD-IgI- EMMPRIN:

For-ECD-ext	5'-GATACGCTACCGTGGCCCAGGCGGC-3'
REV-ECD/IgI-ext	5'-GTGATGGTGCTGGCCATTAAGGCC
For-ECD	5'-TGGCCCAGGCGGCCGGCTCCAAGATACT-3'
REV-ECD	5'-TGGCCATTAAGGCCGGAGCTGGTGCCGT-3'
REV-IgI	5'-GGCCATTAAGGCCCATGGGCTCGGGGA-3'
For-IgII	5'-TGGCCCAGGCGGCCTGCAAGTCAGAGTC-3'

iv) Εναρκτήρια μόρια για την ενίσχυση της MMP-2 και GAPDH:

MMP-2F	5'- TGATCTTGACCAGAATACCATCGA-3'
MMP-2R	5'-GGCTTGCGAGGGAAGAAGTT-3'
GAPDHF	5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
GAPDHR	5'- GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'

A.8. Θρεπτικά Υλικά για καλλιέργειες *E. Coli* και βακτηριοφάγων

Όλα τα θρεπτικά υλικά και τα διαλύματα, εκτός εάν αναγράφεται διαφορετικά, αποστειρώνονται σε υγρό κλίβανο για 20' υπό πίεση 15 lb/in².

LB (Luria-Bertani) (1 lt)

NaCl	1% κ.β.
πεπτόνη	1% κ.β.
εκχύλισμα ζύμης	0,5% κ.β.

Το pH ρυθμίζεται σε τιμή 7.0 με προσθήκη NaOH

LB- άγαρ + ampicillin

LB που περιέχει 1,5% κ.β. άγαρ + 100 µg/mL αμπικιλίνη

SB (Super Broth) (1 lt)

Τρυπτόνη	30 g
Εκχύλισμα ζύμης	20 g
MOPS	10 g

Το pH ρυθμίζεται σε τιμή 7.0 με προσθήκη NaOH

SOC (1 lt)

Τρυπτόνη	20 g
Εκχύλισμα ζύμης	5 g
NaCl	0,5 g
KCl 250mM	10 ml

Το pH του υλικού ρυθμίζεται σε τιμή 7.0 με προσθήκη NaOH. Ακολουθεί αποστείρωση και προσθήκη 10 ml MgCl₂ 1 M και 7,2 ml γλυκόζης 50% κ.β

A.9. Θρεπτικά Υλικά για καλλιέργειες μυκήτων *Pichia pastoris***BMGY**

εκχύλισμα ζύμης	1% κ.β.
πεπτόνη	2% κ.β.
ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 6.0)	100 mM
YNB	1,34% κ.β.
βιοτίνη	0.4μg/mL
γλυκερόλη	1% κ.ο.

BMMY

εκχύλισμα ζύμης	1% κ.β.
πεπτόνη	2% κ.β.
ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 6.0)	100 mM
YNB	1,34% κ.β.
βιοτίνη	0.4μg/mL
μεθανόλη	0,5% κ.ο.

YPD ± zeocin

εκχύλισμα ζύμης	1% κ.β.
πεπτόνη	2% κ.β.
γλυκόζη	2% κ.β.
ζεοσίνη	25 μg/mL

YPD-άγαρ ± zeocin Y

PD που περιέχει 1,5% κ.β. άγαρ + 25 μg/mL ζεοσίνη

B. Στελέχη βακτηρίων *E.coli* και ζυμομύκητα *P.pastoris*, πλασμίδια, βακτηριοφάγοι.

B.1. Βακτηριακά στελέχη, πλασμίδια και βακτηριοφάγοι.

Βακτηριακά στελέχη

Τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα TOP10F' και XL-1Blue.)

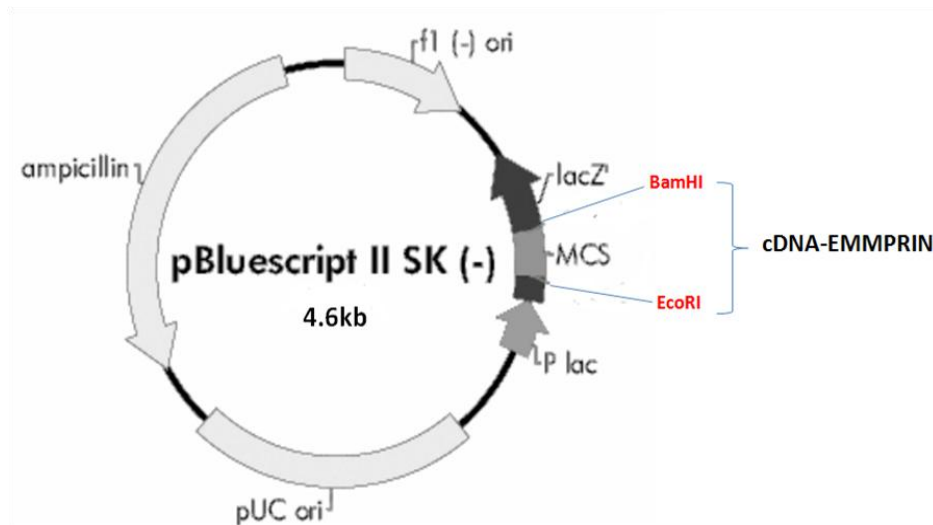
- **TOP10F'**: με γονότυπο F'[lacI^q Tn10(tet^R)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 λ⁻
- ***E.coli* XL-1Blue (Stratagene)**: με γονότυπο recA1 endA1 gyrA96 thi-1hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^R)]

Ο έλεγχος της μεταγραφής και μετάφρασης στο βακτήριο βασίστηκε στη λειτουργία του οπερονίου της λακτόζης. Το στέλεχος XL1-Blue φέρει το μεταλλαγμένο γονίδιο *lacI^q* στο επισωμικό στοιχείο F, το οποίο υπερεκφράζει τον καταστολέα lac. Στο επίσωμα F έχει επίσης ενσωματωθεί το μεταθετό στοιχείο Tn10, καθιστώντας τα βακτήρια ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη (Tet^R). Το στέλεχος είναι ανεπαρκές ως προς την ικανότητα ανασυνδυασμού λόγω της παρουσίας του γονιδίου *recA1*, με αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας των πλασμιδίων κατά τον πολλαπλασιασμό τους στα βακτήρια. Το στέλεχος XL1-Blue παρουσιάζει υψηλή απόδοση μετασχηματισμού, ιδιαίτερα με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάστασης (10⁹-10¹⁰ colonies/μg pUC18 DNA).

Πλασμίδιο pBluescript - EMMPRIN

Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης των cDNA μορίων της ανθρώπινης EMMPRIN (1.6 Kb) ήταν ο pBluescript II SK (-). Η ένθεση είχε γίνει μεταξύ των θέσεων περιορισμού *Bam*HI-*Eco*RI και ήταν ευγενική προσφορά του B.Toole (Tufts Medical Center).

Χάρτης του πλασμιδίου pBluescript-EMMPRIN

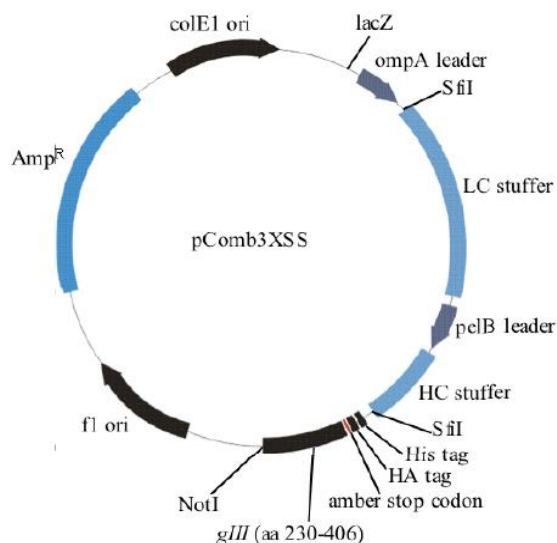


- (i) ο υποκινητής του οπερονίου λακτόζης (P_{lac}),
- (ii) η περιοχή πολλαπλών σημείων κλωνοποίησης (MCS),
- (iii) το οπερόνιο λακτόζης ($lacZ'$),
- (iv) το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (ampicillin),
- (v) το σημείο έναρξης της αντιγραφής ($pUC\ ori$) του πλασμιδιακού DNA.

Βιβλιοθήκη ανθρώπινων αντισωμάτων στο φαγεμίδιο pComb3HSS

Για την κατασκευή της χρησιμοποιήθηκαν Β λεμφοκύτταρα διηθημένων λεμφαδένων ασθενούς με καρκίνο μαστού HER-2/neu+, όπου έγινε ενίσχυση των cDNAs των Fab τμημάτων των ανθρώπινων αντισωμάτων (VH-CH1 και VL-CL) με τη μέθοδο PCR και στη συνέχεια κλωνοποίησή τους στο φορέα έκφρασης pComb3H. Η βιβλιοθήκη αυτή αποτελείται από 2 υπο-βιβλιοθήκες, τις libr1 και libr2, όπου η διαφορά τους εστιάζεται στη χρονική σειρά με την οποία έγινε η κλωνοποίηση στον φορέα pComb3H. Στη μια περίπτωση κλωνοποιήθηκε πρώτα το VH-CH1 τμήμα, ενώ στην άλλη πρώτα το VL-CL. Η libr1 παρουσιάζει τίτλο της τάξης 10^7 , ενώ η libr2 έχει χαμηλότερο τίτλο της τάξης 10^6 .

Χάρτης του φορέα κλωνοποίησης pComb3XSS



- (i) ο υποκινητής του οπερονίου λακτόζης (*P lac*),
- (ii) η περιοχή πολλαπλών σημείων κλωνοποίησης κάτω από τον έλεγχο του οπερονίου της λακτόζης, που επιτρέπει την υποκλωνοποίηση scFvs και Fabs,
- (iii) το οπερόνιο λακτόζης (*lacZ'*),
- (iv) το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (ampicillin),
- (v) ο σημείο έναρξης της αντιγραφής (*colE1*) του πλασμιδιακού DNA, και το (*fl*) για την αντιγραφή του φάγου

Το φαγεμίδιο pComb3HSS χρησιμοποιείται για την κατασκευή βιβλιοθηκών ανθρώπινων τμημάτων ανοσοφαιρινών Fab στη διαλυτή έκφρασή τους σε βακτήρια και είναι προσφορά των C.F. Barbas και D.R. Burton, (The Scripps Research Institute, LaJolla, California). Το pComb3HSS αποτελεί παραλλαγή του φαγεμιδίου pComb3 (Barbas et al. 1991). Εμπεριέχει συνεπώς μόνο την περιοχή IR του βακτηριοφάγου fl, υπεύθυνη για την έναρξη της αντιγραφής του DNA και απαιτεί την παρουσία βοηθητικού φάγου για τον σχηματισμό νέων λειτουργικών φαγικών σωματιδίων. Επίσης διαθέτει τη θέση έναρξης της αντιγραφής του πλασμιδίου ColE1, το οποίο εκφράζεται σε πολλαπλά αντίτυπα και το γονίδιο της β-λακταμάσης που καθιστά τα μετασχηματισμένα με το φαγεμίδιο βακτήρια, ανθεκτικά στη καρμπενικιλίνη (Cb^r). Το pComb3HSS σχεδιάστηκε για να κωδικοποιεί την

ανθρώπινη ακολουθία αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο της VH περιοχής και περιέχει την ακολουθία QVKLLE στο καρβοξυτελικό άκρο του PelB πεπτιδίου και όχι την ακολουθία EVQLLE που υπήρχε στο pComb3. Στο pComb3HSS διακρίνουμε την παρουσία δύο επιπλέον τμημάτων DNA, μήκους 1200 και 300bp (stuffer sequences), ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις *SacI/XbaI* και *XhoI/SpeI*, αντίστοιχα. Τα παραπάνω τμήματα αποτελούν μάρτυρες για τον έλεγχο της επιτυχούς διπλής πέψης με τους παραπάνω συνδυασμούς ενζύμων. Επίσης, όλες οι ομόλογες ακολουθίες του pComb3H έχουν απομακρυνθεί στο pComb3HSS για να αυξηθεί η σταθερότητα του φαγεμιδίου.

Το pComb3HSS έχει σχεδιαστεί για την έκφραση τμημάτων της βαριάς (Fd) αλυσίδας και της ελαφριάς αλυσίδας σε ίσες αναλογίες, για την αποφυγή σχηματισμού ανεπιθύμητων ομοδιμερών, γνωστών και ως Bence-Jones πρωτεϊνών στην περίπτωση των ομοδιμερών που σχηματίζονται από ελαφριές αλυσίδες. Κατά συνέπεια, εμπεριέχει δύο υποκινητές *lac*, ένα για το Fd τμήμα και ένα για την ελαφριά αλυσίδα. Το φαγεμίδιο εμπεριέχει επίσης τον χειριστή του *lac* αλλά δε διαθέτει τον καταστολέα του *lac* και συνεπώς η επαγωγή της έκφρασης με IPTG, επιτυγχάνεται μερικώς. Η σύνθεση του pComb3HSS περιέχει έναν ικανό αριθμό, εύχρηστων και μοναδικών περιοριστικών θέσεων οι οποίες χρησιμοποιούνται ως «κασέτες» για την κλωνοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων:

α. Το Fd τμήμα των βαριών αλυσίδων ανοσοσφαιρινών εισάγεται ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις *XhoI-SpeI*.

β. Τα cDNAs των ελαφριών αλυσίδων κλωνοποιούνται ανάμεσα στις περιοριστικές θέσεις *SacI-XbaI*. Τέλος ένα τμήμα *XbaI-NotI* εμπερικλείει ένα κωδικόνιο λήξης.

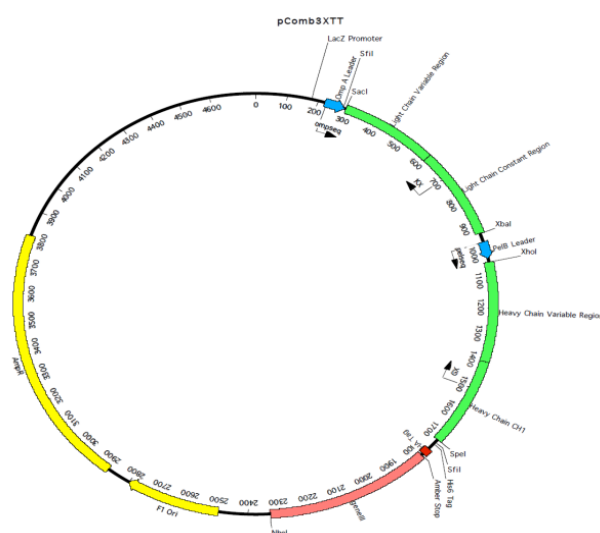
Για την παραγωγή διαλυτού Fab αποκόπτουμε με πέψη *SpeI-NheI* το γονίδιο pIII με αποτέλεσμα τη διαλυτή έκφραση του Fab τμήματος στο περίπλασμα.

Ο βοηθητικός βακτηριοφάγος VCSM13 (Stratagene) εμπεριέχει το γονίδιο επιλογής που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη (Km^r). Ο VCSM13 είναι ανεπαρκής ως προς την ικανότητα να σχηματίζει λειτουργικά καψίδια. Συνεπώς, κατά την επιμόλυνση των βακτηρίων με φάγους και των δύο στελεχών και τον πολλαπλασιασμό τους, παράγεται ένας μεικτός πληθυσμός στον οποίο κυριαρχούν οι pComb3H φάγοι.

pComb3X-TT

Παρόμοια με το σύστημα έκφρασης pComb3HSS, χρησιμοποιείται και ο πλασμιδιακός φορέας pComb3X-TT. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε για τη βακτηριακή έκφραση των εξωκυτταρικών τμημάτων της EMMPRIN. Το πλασμίδιο pComb3X και το παράγωγο αυτού pComb3X-TT πλεονεκτούν έναντι του pComb3HSS, επειδή έχουν αυξημένη σταθερότητα και έχουν την *SfiI* κασέτα για την εύκολη κλωνοποίηση των Fab, scFv και άλλων πρωτεϊνών. Η αλληλουχία των 6 ιστιδινών και του επιτόπου HA (Human influenza hemagglutinin) βοηθά στον εύκολο καθαρισμό. Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το pComb3X-TT και ο προσδιορισμός –TT αναφέρεται στο ανθρώπινο Fab έναντι της τοξίνης του τετάνου.

Χάρτης του φορέα κλωνοποίησης pComb3X-TT

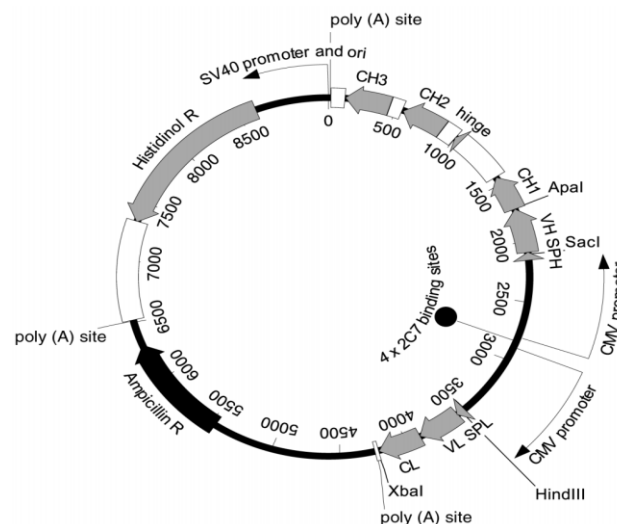


- (i) ο υποκινητής του οπερονίου λακτόζης (*P lac*),
- (ii) η περιοχή πολλαπλών σημείων κλωνοποίησης κάτω από τον έλεγχο του οπερονίου της λακτόζης, που επιτρέπει την υποκλωνοποίηση scFvs, Fabs, και άλλων πρωτεϊνών
- (iii) το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (ampicillin),
- (iv) το σημείο έναρξης της αντιγραφής (*colE1*) του πλασμιδιακού DNA, και το (*f1*) για την αντιγραφή του φάγου

- **pIgG1**

Για την κατασκευή ολόκληρου του ανθρώπινου αντισώματος, πραγματοποιείται υποκλωνοποίηση των cDNA VHCH1 και VLCL στον φορέα έκφρασης pIgGI (Barbas Lab, Scripps Research Institute). Η βαριά αλυσίδα υποκλωνοποιείται με τη βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων *BstEII* και *XhoI* ενώ η ελαφριά αλυσίδα με τις ενδονουκλεάσες *SacI* και *XbaI*. Η υποκλωνοποίηση του τμήματος VH-CH1 γίνεται μπροστά από το υπόλοιπο τμήμα της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (CH2-CH3) ώστε να προκύπτει ολόκληρη η βαριά αλυσίδα του αντισώματος.

Χάρτης του φορέα κλωνοποίησης pIgG1 στα CHO-K1 κύτταρα



- (i) ο υποκινητής CMV (κυτταρομεγαλοϊού)
- (ii) οι περιοχές κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή, CMV που επιτρέπουν την υποκλωνοποίηση της ελαφριάς (*SacI*-*XbaI*) και της βαριάς αλυσίδας (*XhoI*-*BstEII*) του αντισώματος
- (iii) το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (ampicillin),
- (iv) το γονίδιο που κωδικοποιεί τη συνθάση της γλουταμίνης (GS- glutathione-S transferase)

B.2. Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης και κυτταρικά στελέχη *Pichia pastoris*

Κύτταρα ζυμομύκητα *Pichia pastoris*

Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για την ετερόλογη έκφραση των εξωκυτταρικών τμημάτων ήταν η ζύμη *Pichia pastoris*. Πρόκειται για ένα μονοκύτταρο μεθυλοτροφικό ζυμομύκητα, ο οποίος ως ευκαρυωτικός οργανισμός διαθέτει την ικανότητα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που οδηγούν σε επεξεργασία και αναδίπλωση των παραγόμενων πρωτεϊνικών μορίων. Σε σύγκριση με άλλα ευκαρυωτικά συστήματα ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών, η *P. pastoris* είναι ένα σύστημα πιο γρήγορο, χαμηλότερου κόστους και υψηλότερου επιπέδου έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών. Επίσης, η *P. pastoris* παρουσιάζει 10-100 φορές υψηλότερα επίπεδα έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών σε σχέση με το *S. cerevisiae*, ενώ διατηρεί το κοινό τους χαρακτηριστικό, όσον αφορά στη σχετικά εύκολη χρήση τους σε τεχνικές γενετικής και μοριακής βιολογίας.

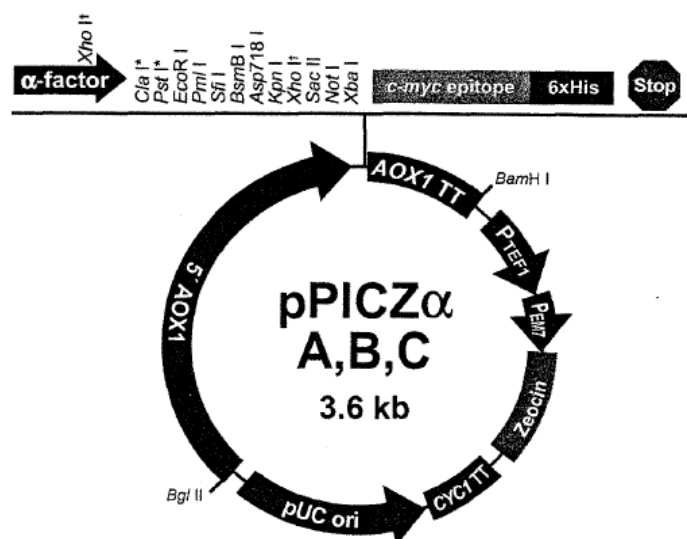
Η *P. pastoris* μπορεί να αναπτύσσεται σε υλικό που περιέχει μεθανόλη ως μόνη πηγή άνθρακα. Το πρώτο βήμα στο μεταβολισμό της μεθανόλης είναι η οξείδωσή της από μοριακό οξυγόνο σε φορμαλδεΐδη και υπεροξείδιο του υδρογόνου, η οποία καταλύεται από το ένζυμο της αλκοολικής οξειδάσης. Επειδή η αλκοολική οξειδάση έχει χαμηλή συγγένεια για το μοριακό οξυγόνο, το σύστημα της *P. pastoris* αναγκάζεται να παράγει μεγάλες ποσότητες αυτού του ενζύμου, όταν υπάρχει αυξημένη ποσότητα μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο. Υπάρχουν δύο γονίδια που κωδικοποιούν την αλκοολική οξειδάση: τα *AOX1* και *AOX2*, τα οποία παρουσιάζουν 97% ομολογία. Όμως, το *AOX1* είναι υπεύθυνο για το μεγαλύτερο μέρος της δράσης της αλκοολικής οξειδάσης στο κύτταρο. Ο υποκινητής που ρυθμίζει τη μεταγραφή του *AOX1* είναι και αυτός που χρησιμοποιείται για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών.

Για την έκφραση στην *P.pastoris* χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη X33. Το στέλεχος X33 είναι αγρίου τύπου (wild-type), (σε σύγκριση με το στέλεχος GS115, το οποίο φέρει μία μετάλλαξη στο γονίδιο της ιστιδινικής αφυδρογονάσης (*his4*), η οποία παρεμποδίζει την ικανότητα σύνθεσης ιστιδίνης.

Πλασμίδια pPICZα

Ως φορέας έκφρασης στην *P.pastoris*, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pPICZαB, το οποίο διαθέτει τον υποκινητή του γονιδίου *AOX1*, καθώς και το γονίδιο που κωδικοποιεί το πεπτιδιο-οδηγό (α -factor) του *S. cerevisiae*, προκειμένου να γίνεται έκκριση της ετερόλογης πρωτεΐνης.

Χάρτης του φορέα κλωνοποίησης pPICZα



- i) το σημείο έναρξης της αντιγραφής (pUCI ori)
- ii) ο υποκινητής του γονιδίου *AOX1*
- iii) το γονίδιο του οδηγού πεπτιδίου (α factor) για την έκκριση της ετερόλογης πρωτεΐνης
- iv) το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ζεοσίνη (Zeocin),
- v) η περιοχή πολλαπλών σημείων κλωνοποίησης
- vi) το γονίδιο που κωδικοποιεί 6 συνεχόμενα κατάλοιπα ιστιδίνης
- vii) το γονίδιο που κωδικοποιεί το c-myc επίτοπο

Γ. Μέθοδοι

Γ.1. Μέθοδοι Απομόνωσης Πλασμιδιακού DNA από Καλλιέργειες Βακτηρίων

Γ.1.1. Απομόνωση μικρής ποσότητας πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν οι συστηματοποιημένες μέθοδοι της QIAGEN.

- Εμβολιασμός μίας βακτηριακής αποικίας σε 3 ml υλικού LB και επώαση στους 37⁰C για 12-16 hrs . Πραγματοποιούνται πολλοί εμβολιασμοί ώστε να ελεγχθούν πολλές βακτηριακές αποικίες.
- Φυγοκέντρηση των καλλιεργειών σε 4.000g ώστε να κατακρημνιστούν τα βακτήρια.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl διαλύματος P1.
- Προσθήκη 200 μl διαλύματος P2 και απαλή ανάδευση.
- Προσθήκη 150 μl P3 και απαλή ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση στις 16.000g για 15 min.
- Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος κρύας ισοπροπανόλης.
- Φυγοκέντρηση στις 16.000g για 15 min.
- Στο υπερκείμενο προστίθεται κρύα αιθανόλη.
- Φυγοκέντρηση στις 16.000g για 15 min.
- Το ίζημα στεγνώνει στους 37⁰C.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50 μl dd H₂O.
- Το DNA είναι κατάλληλο για πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση.

Γ.1.2. Απομόνωση μεγάλης ποσότητας DNA

- Εμβολιασμός 20 ml θρεπτικού υλικού καλλιέργειας με αμπικιλίνη (100 μg/ml) με μία αποικία από μετασχηματισμένα βακτήρια και επώαση υπό ανάδευση στους 37⁰C, για περίπου 16 hrs.
- Εμβολιασμός 1 lt θρεπτικού υλικού καλλιέργειας με αμπικιλίνη με 10 ml της παραπάνω καλλιέργειας και επώαση υπό ανάδευση στους 37⁰C για περίπου 16 hrs.

- Φυγοκέντρωση της καλλιέργειας σε 6.000g για 15 min στους 4⁰C σε φυγόκεντρο.
- Αναδιάλυση του ιζήματος των βακτηριακών κυττάρων, υπό ισχυρή ανάδευση, σε 10 ml διαλύματος P1.
- Προσθήκη 10 ml διαλύματος P2, απαλή ανάδευση και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 10 ml διαλύματος P3, ανάδευση και επώαση του μίγματος στον πάγο για 20 min.
- Φυγοκέντρωση σε 20.000g για 30 min στους 4⁰C Το ίζημα των κυτταρικών υπολειμμάτων (μεμβρανικά θραύσματα, πρωτεΐνες, χρωμοσωμικό DNA και μεγαλομοριακό RNA) απομακρύνεται.
- Το υπερκείμενο διηθείται με υαλοβάμβακα και εφαρμόζεται σε στήλη QIAGEN-tip 500 η οποία έχει προηγουμένως πλυθεί με 10 ml διαλύματος QBT.
- Πλύσιμο της κολόνας 2 φορές με 30 ml διαλύματος QC, ώστε να απομακρυνθούν διάφορες προσμίξεις.
- Έκλουση του DNA με 15 ml διαλύματος QF.
- Προσθήκη 10.5 ml ισοπροπανόλης στο έκλουσμα.
- Φυγοκέντρωση σε 15.000g για 30 min στους 4⁰C.
- Προσθήκη 5 ml αιθανόλης στο έκλουσμα.
- Φυγοκέντρωση σε 15.000g για 30 min στους 4⁰C.
- Το ίζημα στεγνώνει στους 37⁰C.
- Επαναδιάλυση σε 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE (1:01).

Γ.2. Ανάλυση Μορίων DNA με Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης

Μόρια DNA μεγέθους 0.1 - 20 Kb μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σε 0.8-2% οριζόντια πηκτώματα αγαρόζης. Η περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αγαρόζη είναι αντιστρόφως ανάλογη των μοριακών βαρών των μορίων DNA που πρόκειται να διαχωριστούν. Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται 1X TBE, στο οποίο προστίθεται 0.5 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το EtBr ενσωματώνεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και το σύμπλοκο αυτό γίνεται ορατό όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Στα δείγματα DNA προστίθεται

ποσότητα ίση με το 1/10 του όγκου τους, από ειδικό διάλυμα δείγματος 10X το οποίο αποτελείται από 40 % κ.β. σακχαρόζη και 0.25 % κ.β. μπλε της βρωμοφαινόλης. Η υψηλή συγκέντρωση σακχαρόζης εξασφαλίζει την παραμονή του δείγματος στο φρεάτιο του πηκτώματος και η χρωστική χρησιμεύει σαν δείκτης μετανάστευσης. Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα θερμαίνονται για 10 λεπτά στους 65⁰C. Μετά την ηλεκτροφόρηση τα μόρια του DNA σχηματίζουν ζώνες οι οποίες γίνονται διακριτές με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 302 nm, οπότε και μπορούν να φωτογραφηθούν σε κατάλληλο φίλμ.

Γ.3. Καθαρισμός τμήματος DNA

Γ.3.1 Με εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες (φαινόλη-χλωροφόρμιο)

Κατά την εκχύλιση με βασικό διάλυμα φαινόλης, οι πρωτεΐνες απομακρύνονται στην οργανική φάση, ενώ το καθαρό DNA παραλαμβάνεται στην υδατική φάση. Επειδή τα προϊόντα οξείδωσης της φαινόλης μπορεί να καταστρέψουν τα νουκλεϊκά οξέα, επιβάλλεται η χρήση εξισσοροπημένης φαινόλης. Η διαδικασία αυτή έχει ως εξής:

Το υδατικό διάλυμα DNA εκχυλίζεται με διαδοχική προσθήκη ίσων όγκων διαλύματος φαινόλης-χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης 1:1 και χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης. Οι δύο φάσεις αναμιγνύονται κάθε φορά με έντονη ανάδευση και διαχωρίζονται μετά από σύντομη φυγοκέντρηση (15.000g, 5 min, θερμοκρασία δωματίου).

Γ.3.2. Από πήκτωμα αγαρόζης

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό μορίων DNA από παρασκευαστικά πηκτώματα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε η συστηματοποιημένη μέθοδος QIAquick Gel Extraction της QIAGEN. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η απομόνωση από πηκτώματα αγαρόζης, τμημάτων DNA από 70 bp έως 10 kb και ποσότητα μέχρι 10 µg dsDNA. Το DNA που απομονώνεται με τη μέθοδο αυτή είναι αρκετά καθαρό για να χρησιμοποιηθεί για πέψη με περιοριστικά ένζυμα ή για υποκλωνοποίηση.

- Η ζώνη του DNA αφαιρείται από το πήκτωμα αγαρόζης με καθαρό νυστέρι και τοποθετείται σε σωληνάριο Eppendorf.
- Το κομμάτι του πηκτώματος ζυγίζεται και προστίθενται 3 όγκοι διαλύματος QG (αναλογία 1:3).
- Επώαση στους 50⁰C μέχρι να διαλυτοποιηθεί εντελώς η αγαρόζη.
- Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης και ανάδευση.
- Εφαρμογή σε στήλη QIAquick και φυγοκέντρηση για 1 min στα 15.000g.
- Το έκλουσμα απομακρύνεται και στη στήλη προστίθενται 0.5 ml διαλύματος QG.
- Φυγοκέντρηση για 1 min στα 15.000g.
- Το έκλουσμα απομακρύνεται και η στήλη πλένεται με φυγοκέντρηση για 1 min στα 15.000g με 0.75 ml διαλύματος PE.
- Το έκλουσμα απομακρύνεται και η στήλη φυγοκεντρείται για 1 min στα 15.000g.
- Το DNA εκλούεται με προσθήκη 0.5 ml στείρου ddH₂O και γίνεται φυγοκέντρηση για 1 min στα 15.000g.

Γ.3.3. Προϊόντα Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης ή/και Ενζυμικών Αντιδράσεων

Για τον καθαρισμό προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ή/και ενζυμικών αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε η συστηματικοποιημένη μέθοδος QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Με τη συγκεκριμένη μέθοδο γίνεται δυνατός ο καθαρισμός κομματιών DNA μονής και διπλής έλικας που προέκυψαν μετά από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή ενζυμικών αντιδράσεων. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- Προσθήκη 5 όγκων διαλύματος PB σε 1 όγκο δείγματος.
- Εφαρμογή του DNA σε κολόνα QIAquick και φυγοκέντρηση στα 15.000g στα για 1 min.
- Απομάκρυνση του εκλούσματος και προσθήκη 0.7 ml διαλύματος PE στη στήλη.
- Φυγοκέντρηση στα 15.000g για 1 min.

- Το έκλουσμα απομακρύνεται και η κολόνα φυγοκεντρείται στα 15.000g για 1 min.
- Στη στήλη προστίθενται 100 μ l ddH₂O και το DNA εκλούεται με φυγοκέντρωση στα 15.000g για 1 min.

Γ.4. Πέψη μορίων DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα τα οποία προέρχονται από μικροοργανισμούς. Αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες και κόβουν το DNA διασπώντας το φωσφοδιεστερικό δεσμό σε συγκεκριμένη θέση σε κάθε αλυσίδα. Το πρότυπο πέψης του DNA με ειδικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιείται ευρέως, τόσο για την ταυτοποίηση όσο και για την απομόνωση συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Οι πέψεις γίνονται σε περιβάλλον (ιοντική ισχύς, θερμοκρασία, pH) που ευνοεί τη δράση του κάθε ενζύμου και καθορίζονται από τον προμηθευτή. Για την πέψη των DNA μορίων με περιοριστικά ένζυμα ακολουθήθηκαν οι οδηγίες που αναγράφονται στα συνοδευτικά φυλλάδια των ενζύμων και χρησιμοποιήθηκαν τα ειδικά ρυθμιστικά διαλύματα που συνοδεύουν κάθε ένζυμο. Κατά κανόνα γίνεται πέψη 1 μ g DNA με 3-5 units ενζύμου σε 10-20 μ l συνολικού όγκου αντίδρασης.

Γ.5. Σύνδεση του πλασμιδιακού φορέα και του υπό κλωνοποίηση DNA μορίου με T4 DNA λιγάση

Η συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση τμήματος DNA σε φορέα έκφρασης. Διακρίνονται δύο περιπτώσεις:

1) Το προς κλωνοποίηση DNA μόριο και το πλασμίδιο να έχουν συμπληρωματικά κολλώδη άκρα (*cohesive ends*). Η αναλογία του DNA-μορίου και του πλασμιδίου-φορέα μπορεί να είναι 3:1 ή 1:1 ή 1:3 ανάλογα με το μέγεθος των μορίων αυτών. Ο ακόλουθος τύπος υπολογίζει με ακρίβεια τα ng DNA που πρέπει να χρησιμοποιηθούν, σε συνάρτηση με το μέγεθός του, το μέγεθος του φορέα και της μοριακής τους αναλογίας.

$ng \text{ τμήματος DNA (προς κλωνοποίηση)} = ng \text{ φορέα } X (\text{μέγεθος τμήματος DNA} / \text{μέγεθος φορέα}) X \text{ μοριακή αναλογία τμήματος DNA} / \text{φορέα}.$

- Τα χ (συνήθως 100-200 ng) γραμμικού πλασμιδιακού DNA (*linearized vector*) αναμιγνύονται με τα ψ ng του προς κλωνοποίηση DNA (*insert DNA*).

- Διεξάγεται η αντίδραση της λιγάσης σε τελικό όγκο 10 μl προσθέτοντας το διάλυμα λιγάσης μαζί με 1 μl ενζύμου T4 DNA λιγάσης.
- Επίσης διεξάγονται δύο ακόμη παρόμοιες αντιδράσεις. Στην πρώτη δεν προστίθεται το DNA προς κλωνοποίηση και στη δεύτερη δεν προστίθεται λιγάση. Με την πρώτη ελέγχεται κατά πόσον έχει γίνει επανασύνδεση των άκρων του πλασμιδίου, και με τη δεύτερη εάν υπάρχει άκοπο πλασμίδιο.
- Επώαση για 16 hrs στους 16°C.
- Τμήμα της αντίδρασης χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό του κατάλληλου βακτηριακού στελέχους.

2) Το προς κλωνοποίηση DNA-μόριο και το πλασμίδιο-φορέας να έχουν κοπεί με διαφορετικά ένζυμα, με αποτέλεσμα να έχουν διαφορετικά άκρα. Για να γίνει σύνδεση των τμημάτων μεταξύ τους χρειάζεται τα κολλώδη άκρα να μετατραπούν σε ‘αδρά’ (*blunt ends*). Το γέμισμα των κολλώδων άκρων και η μετατροπή τους σε αδρά είναι δυνατό να γίνει εφόσον έχουν προκύψει από το περιοριστικό ένζυμο 3’-μονόκλωνες ουρές και με τη χρήση του ενζύμου Klenow-DNA πολυμεράση που γεμίζει με συμπληρωματικά νουκλεοτίδια στην κατεύθυνση 5’→3’.

Γ.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)/ Ποσοτική αντίδραση Q-PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιείται με σκοπό την ενίσχυση (πολλαπλασιασμό) *in vitro* μιας περιοχής DNA (μήτρα), με τη βοήθεια ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών, συμπληρωματικών προς τη κάθε μια από τις 2 αλυσίδες του προς ενίσχυση τμήματος DNA. Κατά την αντίδραση, πραγματοποιείται συγχρόνως επιμήκυνση και των 2 αλυσίδων με τη βοήθεια ειδικής θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης. Η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία dNTPs και ιόντων Mg^{2+} . Κάθε νεοσχηματισμένη αλυσίδα λειτουργεί με τη σειρά της ως μήτρα με αποτέλεσμα η αλληλουχία προς ενίσχυση να πολλαπλασιάζεται εκθετικά. Συνοπτικά, ο κάθε κύκλος περιλαμβάνει αποδιάταξη της μήτρας, αναδιάταξη των μονόκλωνων αλυσίδων του DNA με τα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές και επιμήκυνση της νέας αλυσίδας.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το cDNA ολόκληρης της εξωκυτταρικής περιοχής της EMMPRIN ως μήτρα για την παραγωγή των επιμέρους εξωκυτταρικών τμημάτων ECD/IgI/IgII τμημάτων του υποδοχέα της EMMPRIN. Ως

εκκινητές για την παραγωγή των αντίστοιχων εξωκυτταρικών περιοχών, χρησιμοποιήθηκαν τα κατάλληλα ολιγονοκλεοτίδια που έχουν περιγραφεί παραπάνω. Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των διάφορων περιοχών ήταν το εξής:

- 94⁰ C για 2 min για 1 κύκλο
- 94⁰ C για 15 sec / 55⁰ C για 15 sec / 72⁰ C για 45 sec για 25 κύκλους
- 72⁰ C για 5 min για 1 κύκλο
- 4⁰ C για 16 hrs

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της MMP-2 και της GAPDH (Q-PCR) πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές που περιγράφονται στην παράγραφο A7 στις παρακάτω συνθήκες:

- 95⁰ C για 10min
- 95⁰ C για 30 sec / 60°C for 30 sec / 72°C for 30 sec για 40 κύκλους
- 95°C για 1 min, 55°C for 30 sec και τελικά αργή αύξηση έως τους 95°C

Γ.7. Κατακρήμνιση του DNA

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την συμπύκνωση των νουκλεϊκών οξέων ή για την απομάκρυνση αλάτων, ενζύμων και άλλων προσμίξεων από το υδατικό διάλυμα των νουκλεϊκών οξέων. Για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιούνται παράγοντες οι οποίοι μειώνουν τη διαλυτότητα των μορίων των νουκλεϊκών οξέων, όπως α) η χαμηλή θερμοκρασία, β) τα κατιόντα, τα οποία αυξάνουν την ιοντική ισχύ του διαλύματος και γ) η αιθανόλη, η οποία απομακρύνει τα μόρια νερού από τα μόρια του νουκλεϊκού οξέος (αφυδατικό μέσο). Η πορεία αυτής της διαδικασίας είναι η ακόλουθη:

Γίνεται προσθήκη 1/10 του όγκου διαλύματος του απομονωμένου DNA με διάλυμα 3M οξικού νατρίου (pH 4.8) και διπλάσιου όγκου κρύας απόλυτης αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 15.000g για 5 min στους 4°C και έκλυση του ιζήματος με διάλυμα αιθανόλης 70% κ.ο. για την απομάκρυνση αλάτων. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη μέσω παραμονής στους 37°C, το ίζημα αναδιαλύεται στον επιθυμητό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος TE (10 :1)

Γ.8. Μετασχηματισμός βακτηρίων

Τα βακτηριακά στελέχη της *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή και τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδιακού DNA είναι τα XL-1 και τα TOP10F. Ως υλικό για την υγρή καλλιέργεια των παραπάνω στελεχών χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο υλικό καλλιέργειας Luria-Bertani Broth (LB) ή χαμηλής αλατότητας (Low Salt LB) ή το SB (Super Broth). Η υγρή καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών της *E. coli* πραγματοποιήθηκε σε σωλήνες των 15 και 50 ml και σε κωνικές φλάσκες των 500, 1000 και 2000 ml, σε επωαστήρες υπό συνεχή ανάδευση, κατάλληλης θερμοκρασίας και για κατάλληλο χρόνο επώασης.

Για τη στερεή καλλιέργεια τους σε τρυβλία Petri, συμπληρώθηκε το υλικό με Bacto-Agar το οποίο διαλύεται κατά την υγρή αποστείρωση. Κατόπιν, στο μίγμα, πριν κρυώσει και πολυμεριστεί στους 45-55⁰C, προστίθεται το κατάλληλο αντιβιοτικό ανάλογα με το πλασμίδιο και το βακτηριακό στέλεχος που καλλιεργείται. Το υγρό θρεπτικό υλικό καθώς και τα τρυβλία μπορούν να διατηρηθούν στους 4⁰C, για ένα διάστημα 30 ημερών, μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Τα βακτηριακά στελέχη αναπτύσσονται στους 37⁰C σε θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας. Για τις υγρές καλλιέργειες είναι απαραίτητη η συνεχής ανάδευση καθώς και ο καλός αερισμός. Για αποθήκευση για μεγαλύτερες περιόδους τα βακτήρια διατηρούνται στους -80⁰C στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο, παρουσία 50% γλυκερόλης.

Γ.8.1. Μετασχηματισμός *E.Coli* με τη Μέθοδο της Ηλεκτροδιάτασης

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι η GENE PUSLER της BIORAD η οποία συνοδεύεται από το PULSE CONTROLLER το οποίο χρησιμεύει για μετασχηματισμό βακτηρίων.

Προετοιμασία των κυττάρων

- Εμβολιάζονται 100 ml θρεπτικού υλικού LB με βακτήρια από μια μονή αποικία από τρυβλίο που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό και η καλλιέργεια επωάζεται υπό ανάδευση για 12-16 hrs στους 37⁰ C.
- Ακολουθεί εμβολιασμός 1 lt θρεπτικού υλικού LB με 100 ml της καλλιέργειας που αναφέρεται στο προηγούμενο στάδιο και τα βακτήρια αφήνονται να

μεγαλώσουν έως ότου η απορρόφηση στα 600 nm να είναι μεταξύ 0.5 και 0.7 (αυξητική φάση, περίπου σε 2-2.5 hrs).

- Η καλλιέργεια τοποθετείται σε πάγο επί 30 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε 4.000g επί 15 min.
- Το ιζήμα των βακτηρίων αναδιαλύεται σε 1 lt διαλύματος 10% παγωμένης και αποστειρωμένης γλυκερόλης.
- Φυγοκέντρωση σε 4.000 g επί 15 min.
- Αναδιάλυση του ιζήματος σε 0.5 lt διαλύματος 10% παγωμένης και αποστειρωμένης γλυκερόλης.
- Φυγοκέντρωση σε 4.000 g επί 15 min.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 20 ml διαλύματος 10% παγωμένης, αποστειρωμένης γλυκερόλης.
- Φυγοκέντρωση σε 4.000 g επί 15 min.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε τελικό όγκο 2-3 ml παγωμένης, αποστειρωμένης 10% γλυκερόλης. Η συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων θα πρέπει να είναι $1-3 \times 10^{10}$ κύτταρα/ ml.
- Το διάλυμα των βακτηρίων μοιράζεται σε ίσους όγκους των 100 μl σε στείρα σωληνάρια Eppendorf τα οποία και παγώνονται σε υγρό άζωτο ή λουτρό με ξηρό πάγο και αιθανόλη.
- Τα βακτηριακά κύτταρα διατηρούνται στους -80°C και η ικανότητα μετασχηματισμού τους πρέπει να είναι 10^9 αποικίες/μg DNA.

Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάταξη

- Βακτήρια τα οποία έχουν ετοιμαστεί κατάλληλα για μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάταξη ξεπαγώνονται αργά σε πάγο.
- Σε μια κυψελίδα 0.1 cm η οποία βρίσκεται σε πάγο, τοποθετούνται 40 μl διαλύματος βακτηρίων με 1 έως 2 μl διαλύματος DNA. Το DNA πρέπει να βρίσκεται διαλυμένο σε διάλυμα πολύ μικρής ιοντικής ισχύος.
- Η συσκευή GENE PULSER ρυθμίζεται στα 25 μF και η συσκευή PULSE CONTROLLER στα 200 Ω και στα 1.8 KV.
- Η κυψελίδα με τα βακτήρια και το DNA τοποθετείται στον πάγο για 1 min και στη συνέχεια τοποθετείται στον ειδικό υποδοχέα όπου εφαρμόζεται τάση στον θάλαμο της ηλεκτροδιάταξης.

- Αμέσως μετά τον παλμό τα βακτήρια αναδιαλύονται σε 1 ml SOC ή LB θρεπτικό υλικό και επωάζονται για 1h στους 37°C.
- Τέλος τα βακτήρια επιστρώνονται σε τρυβλίο με το κατάλληλο αντιβιοτικό ως επιλεκτικό μέσο των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Γ.8.2. Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη Μέθοδο του Θερμικού Σοκ

Προετοιμασία των κυττάρων

- Εμβολιάζονται 50 ml LB με βακτήρια από μια μονή αποικία από τρυβλίο που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος και καλλιεργούνται για 12-16 hrs υπό συνεχή ανάδευση μέσα σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 37°C .
- Εμβολιάζονται 500 ml LB με 50 ml της παραπάνω καλλιέργειας και η καλλιέργεια αφήνεται μέχρι η απορρόφηση στα 600 nm να γίνει μεταξύ 0.5-0.7 (αυξητική φάση).
- Η καλλιέργεια τοποθετείται σε πάγο ώστε να κρυώσει όσο πιο γρήγορα γίνεται. Από αυτό το στάδιο και μετά είναι απαραίτητο τα κύτταρα να διατηρούνται στους 4°C.
- Φυγοκέντρηση σε 4.000g επί 15 min στους 4°C.
- Επαναδιάλυση των βακτηρίων σε 250 ml κρύου στείρου διαλύματος 0.1 M CaCl_2 .
- Επώαση στον πάγο για 30 min.
- Φυγοκέντρηση σε 4.000 g επί 15 min στους 4°C.
- Επαναδιάλυση των βακτηρίων σε 43 ml κρύου στείρου διαλύματος 0.1 M CaCl_2 και επώαση σε πάγο για 30 min. Η επώαση σε πάγο σε αυτό το στάδιο είναι προαιρετική και ο χρόνος ποικίλει ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος.
- Προστίθενται 7 ml στείρας γλυκερόλης 100 % και ανακατεύονται ήπια.
- Τα βακτήρια μοιράζονται ανά 100 μl σε στείρους πλαστικούς σωλήνες του 1.5 ml οι οποίοι βρίσκονται τοποθετημένοι μέσα σε ξηρό πάγο και αιθανόλη, ώστε να εξασφαλιστεί το άμεσο πάγωμα των κυττάρων.
- Τα βακτήρια φυλάσσονται στους -80°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Με τη μέθοδο αυτή η ικανότητα των βακτηρίων για μετασχηματισμό κυμαίνεται από 5×10^6 - 2×10^7 αποικίες/μg DNA. Ο υπολογισμός της ικανότητας

μετασχηματισμού μπορεί να βρεθεί εάν ανταποκρίνεται στο παραπάνω εύρος με πειραματικό μετασχηματισμό των βακτηρίων με 1 ng υπερελικωμένου πλασμιδίου

Μετασχηματισμός με θερμικό σοκ

- Ξεπάγωμα των βακτηρίων από τους -80°C μέσα σε πάγο.
- Ανάμιξη όγκου 200 μl βακτηρίων με το DNA.
- Επώαση σε πάγο για 30 min.
- Επώαση στους 42°C για 1.30 min.
- Προσθήκη 2 ml υλικού LB.
- Επώαση στους 37°C για 1h.
- Εμβολιασμός τρυβλίων που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό με 100 μl από το παραπάνω υλικό.
- Επώαση για 12-16 hrs στους 37°C .

Γ.9. Έκφραση συνδυαστικής Fab βιβλιοθήκης στην επιφάνεια βακτηριοφάγων. Διαδικασία επιλογής (bioanning), Fab τμήματος από τη βιβλιοθήκη βακτηριοφάγων έναντι ειδικού αντιγόνου

Για την έκφραση των Fab βιβλιοθηκών στην επιφάνεια των βακτηριοφάγων απαιτείται η επιμόλυνση των μετασχηματισμένων κυττάρων με βοηθητικό φάγο M13. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος VCSM13 το οποίο, όπως προαναφέρθηκε, φέρει όλα τα γονίδια που είναι απαραίτητα για το σχηματισμό του ιικού καψιδίου του φαγεμιδίου pComb3H και τον σχηματισμό λειτουργικού φάγου. Ο χειρισμός των φάγων απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή μολύνσεων και πραγματοποιείται σε κλειστό δωμάτιο και σε ειδικό απαγωγό στείρων συνθηκών. Όλα τα διαλύματα αποστειρώνονται ή φιλτράρονται μέσω μεμβρανών διαμέτρου πόρων $0.2\mu\text{m}$.

Γ.9.1. Παρασκευή βοηθητικού βακτηριοφάγου VCSM13.

- Προετοιμάζεται υγρή καλλιέργεια 10 ml SB παρουσία (10 $\mu\text{g/ml}$) τετρακυκλίνης η οποία εμβολιάζεται με 15 μl βακτηρίων E. coli XL1-Blue.
- Επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 1h.

- Προσθήκη μίας πλάκας βοηθητικού φάγου VCSM13 από στερεή καλλιέργεια φάγων στην καλλιέργεια των 10 ml και επώαση υπό ισχυρή ανάδευση στους 37°C για 2 hrs.
- Μεταφορά σε 500 ml SB παρουσία (10 µg/ml) τετρακυκλίνης και (70 µg/ml) καναμυκίνης. Ακολουθεί επώαση υπό ισχυρή ανάδευση στους 37°C για 16 hrs.
- Φυγοκέντρωση στα 4000g για 15 min.
- Επώαση του υπερκειμένου που περιέχει τους φάγους για 20 min στους 70°C και φυγοκέντρωση στα 4000g για 15 min.
- Αποθήκευση του υπερκειμένου σε σωλήνες 50 ml στους 4°C.
- Τιτλοποίηση σε στερεές καλλιέργειες, που έχουν προθερμανθεί, απουσία αντιβιοτικού.

α) Τήξη υλικού Top Agar και διατήρηση της θερμοκρασίας σε υδατόλουτρο στους 42°C.

β) Προετοιμασία υγρής καλλιέργειας σε 10 ml SB παρουσία (10 µg/ml) τετρακυκλίνης εμβολιασμένη με E. coli XL1-Blue με $OD_{600nm} = 1$.

γ) Πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις του VCSM13 (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}). σε υλικό LB.

δ) Επιμόλυνση 100 µl XL1-Blue βακτηρίων με 1 µl VCSM13 από κάθε αραιώση και προσθήκη 3 ml Top Agar. Ακολουθεί ταχύτατη απόχυση σε προθερμασμένα τρυβλία LB χωρίς αντιβιοτικό και προσεχτική κάλυψη της επιφάνειάς τους.

ε) Επώαση στους 37°C για 16 hrs.

ζ) Οι βοηθητικοί φάγοι φυλάσσονται στους 4°C.

Η τιτλοποίηση του βοηθητικού βακτηριοφάγου πραγματοποιείται με τη μέτρηση πλακών (pfu) σε στερεές καλλιέργειες και λαμβάνοντας υπόψη το συντελεστή αραιώσης σε κάθε τρυβλίο. Ο αποδεκτός τίτλος του βοηθητικού βακτηριοφάγου πρέπει να είναι $\geq 10^{12}$.

Γ.9.2. Πολλαπλασιασμός Fab βιβλιοθήκης βακτηριοφάγων

Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων με τις βιβλιοθήκες Fab τμημάτων που ακολουθείται από την παρακάτω διαδικασία γίνεται για την έκφραση και τον πολλαπλασιασμό των αντισωμάτων της βιβλιοθήκης στη φαγική μορφή τους.

- Μετά το τέλος της 1^{ης} επώασης των μετασχηματισμένων βακτηρίων προστίθενται 10 ml προθερμασμένου (37⁰C) SB με 20 µg/ml καρμπενικιλίνη (Carb) και 10 µg/ml τετρακυκλίνη (Tet).
- Ακολουθεί άμεση τιτλοποίηση των βιβλιοθηκών για τον καθορισμό της ποικιλότητας τους. Προετοιμάζονται στερεές καλλιέργειες σε τρυβλία LB παρουσία καρμπενικιλίνης (100 µg/ml), με 10 µl, 1 µl και 0,1 µl βακτηρίων και επωάζονται στους 37⁰C για 16 hrs. Η ποικιλομορφία μία βιβλιοθήκης υπολογίζεται από τον αριθμό των αποικιών που έχουν αναπτυχθεί ανά µg DNA που χρησιμοποιήθηκε κατά τον μετασχηματισμό των βακτηρίων (cfu/µg), λαμβάνοντας υπόψη την αραιώση του βακτηριακού εναιωρήματος.
- Επώαση υπό ισχυρή ανάδευση στους 37⁰C για 1h. Ακολουθεί προσθήκη Carb για τελική συγκέντρωση 50 µg/ml και επώαση υπό ανάδευση στους 37⁰C για 1h.
- 4α. Αν πραγματοποιείται η κατασκευή και ενίσχυση της Fab βιβλιοθήκης, η προηγούμενη καλλιέργεια μεταφέρεται σε 100 ml SB παρουσία καρμπενικιλίνης (50 µg/ml) και τετρακυκλίνης (10 µg/ml), η οποία επωάζεται υπό ανάδευση στους 37⁰C για ~16hrs. Ακολουθεί απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα.
- 4β. Αν πρόκειται για τις βιβλιοθήκες ιϊκών Fab σωματιδίων ακολουθεί προσθήκη 1 ml βοηθητικού φάγου VCSM13 (10¹² pfu), μεταφορά της καλλιέργειας σε 100 ml παρουσία καρμπενικιλίνης (50 µg/ml) και τετρακυκλίνης (10µg/ml) και επώαση υπό ανάδευση στους 37⁰C για 2 hrs.
- Προσθήκη καναμυκίνης Kan (70 µg/ml) και επώαση υπό ανάδευση στους 37⁰C για 16 hrs.
- Φυγοκέντρηση της βακτηριακής καλλιέργειας στην οποία έχουν πολλαπλασιαστεί οι βακτηριοφάγοι στα 3000g για 15 min στους 4⁰C. Το υπερκείμενο, που περιέχει τους φάγους μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα, και προστίθεται 25 ml διαλύματος 20% PEG-8000/2.5M NaCl για την κατακρήμνιση των φάγων. Ακολουθεί ανάδευση για 5 min. Το βακτηριακό ίζημα φυλάσσεται στους -20⁰C για απομόνωση πλασμιδιακού DNA.
- Κατακρήμνιση των φάγων με επώαση στον πάγο για 30 min.
- Φυγοκέντρηση στα 21000g και αναστροφή του σωλήνα για 10 min, για την απομάκρυνση της μέγιστης δυνατής ποσότητας PEG.

- Επαναδιάλυση του ιζήματος των φάγων σε 2 ml διαλύματος PBS/1% BSA και φυγοκέντρωση για 5 min στα 17500g για την απομάκρυνση των βακτηριακών υπολειμμάτων.
- Το υπερκείμενο φάγων αποθηκεύεται στους 4°C με 0,02% NaN₃.
- Για την τιτλοποίηση των ενισχυμένων φάγων πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις 10⁻³, 10⁻⁶ και 10⁻⁹ και 10 μl από κάθε αραιώση επιμολύνει 50 μl φρέσκιας καλλιέργειας XL1-Blue βακτηρίων (OD_{600nm}=0,5) με επώαση 15 min. Τα βακτήρια καλλιεργούνται σε τρυβλία LB με 100 μg/ml Carb για 16 hrs. Με αυτή τη μέθοδο δεν υπολογίζεται ο απόλυτος αριθμός των φάγων αλλά ο αριθμός των αποικιών βακτηρίων που έχουν επιμολυνθεί από φάγους. Μόνο φρέσκα παρασκευάσματα βακτηριοφάγων μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία επιλογής (biopanning), καθώς οι πρωτεΐνες που ανιχνεύονται στο διάλυμα δρουν αποκόπτοντας το Fab τμήμα από τη pIII πρωτεΐνη του φάγου.

Γ.9.3. Διαδικασία επιλογής Fab (Biopanning).

Η χρήση των βιβλιοθηκών βακτηριοφάγων για επιλογή και απομόνωση κλώνων που φέρουν στην επιφάνεια τους αντισώματα ή πεπτίδια που προσδένουν ειδικά και με υψηλή συγγένεια ένα αντιγόνο, πραγματοποιείται με τη διαδικασία της “επιλογής” (biopanning). Η τεχνική της “επιλογής” περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους επιλογής με βάση τη συγγένεια προς το αντιγόνο, τον πολλαπλασιασμό και καθαρισμό των ειδικών ανασυνδυασμένων φάγων, έτσι ώστε σε κάθε κύκλο, οι φάγοι να εμπλουτίζονται ολοένα και περισσότερο σε ειδικούς και μεγαλύτερης συγγένειας κλώνους. Τελικώς, επικρατούν και επιλέγονται οι ανασυνδυασμένοι φάγοι που φέρουν το αντίσωμα ή το πεπτίδιο με τη μεγαλύτερη συγγένεια για το αντιγόνο.

Υπάρχουν ποικίλοι τρόποι να δοκιμαστεί μια βιβλιοθήκη έναντι ενός αντιγόνου. Ο πιο απλός τρόπος, ο οποίος έχει χρησιμοποιηθεί σε όλες τις δοκιμές, είναι η επίστρωση πλάκας πολυστυρενίου με το αντιγόνο και η επώαση της βιβλιοθήκης στο στερεό υπόστρωμα. Αναλυτικά:

Η διαδικασία της “επιλογής” περιλαμβάνει πέντε στάδια που είναι τα εξής:

- επώαση της βιβλιοθήκης με το αντιγόνο και πλύσεις για την απομάκρυνση των μη ειδικών φάγων,

- έκλουση των προσδεδεμένων φάγων στο αντιγόνο,
- τιτλοδότηση των εκλούμενων φάγων,
- επιμόλυνση βακτηρίων με τους εκλούμενους φάγους για τον πολλαπλασιασμό τους και
- καθαρισμός.

Όλα τα παραπάνω στάδια αποτελούν ένα γύρο επιλογής ο οποίος επαναλαμβάνεται τόσες φορές όσες απαιτείται για την τελική επιλογή ειδικών κλώνων (συνήθως 10 φορές). Κάθε νέος γύρος ξεκινάει από την αρχή, αλλά στο επιστρωμένο αντιγόνο προστίθενται 10^{11} - 10^{12} (ή τουλάχιστον 10^9) φάγοι από το ενισχυμένο έκλουσμα του προηγούμενου γύρου επιλογής. Σε κάθε γύρο επιλογής αυξάνεται σταδιακά η αυστηρότητα των πλύσεων, είτε αυξάνοντας τον αριθμό των πλύσεων, είτε αυξάνοντας την συγκέντρωση του απορρυπαντικού (από 0,1% σε 0,5% Tween-20).

Αναλυτικότερα ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

Κατά τον πρώτο γύρο επιλογής, κάθε κλώνος πρέπει να αντιπροσωπεύεται από επαρκή αριθμό αντιγράφων προκειμένου να μη χαθούν κάποιοι από τους κλώνους (όχι λιγότερο από 100 αντίγραφα ανά κλώνο). Έτσι, ανάλογα με την ποικιλότητα της βιβλιοθήκης, υπολογίζεται ο ελάχιστος αριθμός των φάγων που πρέπει να προστεθεί προκειμένου να αντιπροσωπεύεται επαρκώς το σύνολο της ποικιλότητας της βιβλιοθήκης. Επίσης, οι πλύσεις κατά τον πρώτο γύρο πρέπει να είναι ήπιες, ώστε να ενισχυθούν όλοι οι ειδικοί κλώνοι, ακόμη και αυτοί που είναι χαμηλής συγγένειας.

- 1 μ g αντιγόνου (ECD-IgI-IgII/EMMPRIN) αναμιγνύεται με διάλυμα 0.1 M NaHCO_3 , (pH 8.6) σε τελικό όγκο 50 μ l και προσροφάται σε ένα φρεατίο πλάκας μικροτιτλοδότησης από πολυστυρένιο 96 φρεατίων υψηλής πρόσδεσης (high binding ELISA plate), για 16 hrs στους 4°C υπό ήπια ανάδευση.
- 2 πλύσεις του φρεατίου της πλάκας με ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- Πλήρωση του φρεατίου με διάλυμα κορεσμού (blocking solution) PBS /3% BSA/0,02% NaN_3 και επώαση για 1h στους 37°C . Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται για την παρεμπόδιση της μη ειδικής πρόσδεσης των φάγων στην πλάκα.

- Προσθήκη 50 µl ενισχυμένων φάγων ($\sim 10^{12}$ cfu/ml) σε κάθε φρεάτιο, επώαση με το αντιγόνο για 2 hrs στους 37°C, υπό ήπια ανάδευση
- 1-10 πλύσεις (αυξανόμενες σε κάθε γύρο επιλογής) με διάλυμα PBS/0,5% Tween-20 με έντονη αναρρόφηση, κατά τις οποίες απομακρύνονται οι μη ειδικά προσδεδεμένοι φάγοι. Στον πρώτο γύρο επιλογής γίνεται συνήθως μόνο μία πλύση, ενώ στους επόμενους γύρους, οι πλύσεις σταδιακά αυξάνονται, έως ότου φτάσουν τις 10 στον 3^ο ή 4^ο γύρο. Μεταξύ των πλύσεων συνήθως πραγματοποιούνται επώσεις για διαστήματα 2-5 min.
- Όλοι οι φάγοι που έχουν προσδεθεί στο υπόστρωμα εκλούνται με ένα διάλυμα όξινου pH, το οποίο διασπά τους μη ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των μορίων. Προσθήκη στο φρεάτιο της πλάκας 50 µl διαλύματος 0.2 M HCl-glycine (pH 2.2) / 1 mg/ml BSA και επώαση για 10 min το μέγιστο, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά του εκλούσματος σε Eppendorf και άμεση εξουδετέρωση του όξινου pH με την προσθήκη 6 µl διαλύματος 2 M Tris-HCl (pH 9.1).
- Επιμόλυνση 2 ml φρέσκιας καλλιέργειας XL1-Blue βακτηρίων ($OD_{600nm}=1$) με το σύνολο των εκλούμενων φάγων από κάθε φρεάτιο με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
- Προσθήκη 10 ml προθερμασμένου SB παρουσία καρμπενικιλίνης (50 µg/ml) και τετρακυκλίνης (10 µg/ml) και άμεση τιτλοποίηση των εκλουόμενων φάγων με επίστρωση 10 µl, 1 µl και 0,1 µl σε τρυβλία *Petri* με LB παρουσία καρμπενικιλίνης (100 µg/ml). Επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 1h.

Ο πολλαπλασιασμός των βακτηριοφάγων και ο καθαρισμός τους, πραγματοποιείται με την ίδια διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί.

Γ.9.4. Παραγωγή διαλυτών Fab σε μικρή κλίμακα για τον έλεγχο και τη διάσωση θετικών κλώνων ως προς την αναγνώριση του αντιγόνου

- Απομόνωση του βακτηριακού ιζήματος του τελευταίου κύκλου επιλογής (biopanning), πέψη με *SpeI-NheI* και επανασύνδεση των άκρων του φαγεμιδίου με T4 λιγάση.
- 1 µl της αντίδρασης σύνδεσης χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό 50 µl *XL1-Blue* βακτηρίων. Πραγματοποιούνται διαφορετικές αραιώσεις σε

στερεές καλλιέργειες τρυβλίων Petri-LB παρουσία καρμπενικιλίνης (100 $\mu\text{g/ml}$) και επώαση στους 37°C για 16 hrs.

- Προετοιμάζονται υγρές καλλιέργειες των 10 ml SB παρουσία καρμπενικιλίνης (50 $\mu\text{g/ml}$) με 20 mM MgCl_2 οι οποίες εμβολιάζονται με μεμονωμένες αποικίες που προήλθαν από το προηγούμενο στάδιο. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37°C μέχρι $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.6-0.8$ (6 hrs) και επαγωγή με προσθήκη 1 mM IPTG στους 30°C για 16 hrs. Φυγοκέντρηση στα 3200g για 15min στους 4°C .
- Επαναδιάλυση του βακτηριακού ιζήματος σε 1 ml παγωμένου διαλύματος PBS/0.2 mM PMSF.
- Η λύση των βακτηρίων και απελευθέρωση του διαλυτού Fab τμήματος από τον περιπλασμικό χώρο πραγματοποιείται με τη μέθοδο ψύξης-απόψυξης σε λουτρό αιθανόλης-ξηρού πάγου και νερού 37°C αντίστοιχα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4-6 φορές.
- Φυγοκέντρηση στα 21000g για 5 min.
- Συλλογή του υπερκλειμένου που περιέχει το διαλυτό Fab.

Ακολουθεί δοκιμασία ELISA που θα περιγραφεί σε επόμενη ενότητα για τον έλεγχο της ικανότητας των Fab τμημάτων να αναγνωρίζουν το ειδικό αντιγόνο.

Γ.9.5. Παραγωγή διαλυτών Fab ή άλλων διαλυτών πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα, από θετικούς ως προς την αναγνώριση του αντιγόνου κλώνων

- Προετοιμάζεται υγρή καλλιέργεια 10 ml SB παρουσία καρμπενικιλίνης (50 $\mu\text{g/ml}$) με εμβολιασμό από μεμονωμένη αποικία θετικού Fab κλώνου και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 16 hrs.
- Εμβολιασμός 500 ml SB παρουσία (50 $\mu\text{g/ml}$) καρμπενικιλίνης και 20 mM MgCl_2 με 5 ml της παραπάνω καλλιέργειας και γίνεται επώαση υπό ανάδευση στους 37°C μέχρι $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.8-1$
- Επαγωγή της έκφρασης με προσθήκη IPTG 1 mM και επώαση υπό ανάδευση στους 30°C για 16 hrs.
- Φυγοκέντρηση στα 3200g για 15 min στους 4°C .
- Επαναδιάλυση του βακτηριακού ιζήματος σε 20 ml διαλύματος PBS/0.2 mM PMSF.

- Η λύση των βακτηρίων και απελευθέρωση του διαλυτού Fab τμήματος από τον περιπλαστικό χώρο πραγματοποιείται με τη μέθοδο ψύξης-απόψυξης σε λουτρό αιθανόλης-ξηρού πάγου και νερού 37⁰C, αντίστοιχα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4-6 φορές. Εναλλακτικά η λύση των βακτηρίων πραγματοποιείται με την εφαρμογή υπερήχων στο 50% της ισχύς τους για 2 min.
 - Φυγοκέντρωση στις 15.000g για 30 min στους 4⁰C και διαπίδυση σε διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) για 16 hrs στους 4⁰C.
 - Αποθήκευση στους 4⁰C παρουσία 0.01% NaN₃.
- Ακολουθεί καθαρισμός της πρωτεΐνης με τη μέθοδο που περιγράφεται στην επόμενη ενότητα

Γ.9.6. Χρωματογραφία συγγένειας με στήλη protein G

- Το βακτηριακό εκχύλισμα ή το υπερκείμενο κυττάρων που περιέχει το Fab ή mAb τμήμα φιλτράρεται από 0.2μm μεμβράνη.
- Το υπερκείμενο που συλλέγεται αραιώνεται σε ίσο όγκο με διάλυμα πρόσδεσης 1X PBS ή 20 mM φωσφορικού νατρίου (pH 8).
- Η στήλη protein G ξεπλένεται με ddH₂O για απομάκρυνση του μέσου αποθήκευσης (συνήθως 20% αιθανόλη).
- Η στήλη protein G εξισορροπείται με την προσθήκη διαλύματος πρόσδεσης ή με 0.1 M οξικού νατρίου (pH 5).
- Το διάλυμα με το αντίσωμα προστίθεται στη στήλη.
- Ακολουθούν εκπλύσεις της στήλης με διάλυμα πρόσδεσης.
- Το αντίσωμα εκλούεται με διάλυμα γλυκίνης 0.1 M-HCl (pH 2.7).
- Τα εκλούσματα εξουδετερώνονται αμέσως με διάλυμα 1 M Tris- HCl (pH 9).
- Ακολουθεί διαπίδυση των κλασμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X PBS.
- Η στήλη protein G ξεπλένεται με 1X PBS και αποθηκεύεται στους 4⁰C.

Γ.10. Μετασχηματισμός κυττάρων *P. pastoris* με ηλεκτροδιάταση

Χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη X-33 της *P. pastoris*. Το στέλεχος X33 μπορεί να αναπτύσσεται σε υγρό και στερεό θρεπτικό υλικό YPD με επώαση στους 30⁰C. Ο χρόνος διπλασιασμού του στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης είναι 2 hrs. Για τη

διατήρηση μετασχηματισμένων και μη στελεχών της *P. pastoris* για μεγάλα χρονικά διαστήματα, τα στελέχη αναπτύσσονται σε υλικό YPD στους 30°C για 16 hrs και φυλάσσονται στους -80°C, παρουσία 20% κ.ο. γλυκερόλης. Οι στερεές καλλιέργειες διατηρούνται στους 4°C για διάστημα αρκετών ημερών έως και δύο εβδομάδων. Το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των κυττάρων (BMGY), όταν επρόκειτο να ακολουθήσει επαγωγή της έκφρασης της ετερόλογης πρωτεΐνης, περιέχει γλυκερόλη αντί για γλυκόζη.

Με την εφαρμογή ρεύματος υψηλής τάσης, κατάλληλα επεξεργασμένα κύτταρα ζύμης γίνονται διαπερατά σε πλασμίδια, οπότε ακολουθεί η εισαγωγή των πλασμιδίων στο εσωτερικό του κυττάρου. Για μεγαλύτερη ικανότητα μετασχηματισμού, πραγματοποιείται η γραμμικοποίηση του πλασμιδίου (linearization) με πέψη σε μοναδική θέση αναγνώρισης στην αλληλουχία 5' *AOXI* των πλασμιδίων πριν τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης. Αυτό γίνεται, προκειμένου να ενισχυθεί η πιθανότητα δημιουργίας ομόλογου ανασυνδυασμού με την ομόλογη και συντηρημένη αλληλουχία *AOXI* του χρωμοσώματος της *P. pastoris* και η ενσωμάτωση των πλασμιδίων στο χρωμοσωμικό DNA της *P. pastoris*. Η μέθοδος έχει ικανότητα μετασχηματισμού 103-104 κύτταρα/μg γραμμικού DNA, χωρίς να καταστρέφει το κυτταρικό τοίχωμα της *P. pastoris* και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

Γ.10.1. Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris*

Γίνεται εμβολιασμός κυττάρων μιας αποικίας του στελεχους X33 από θρεπτικό υλικό YPD-άγαρ σε 10 mL θρεπτικού υλικού YPD και επώαση στους 30°C, υπό ανάδευση για περίπου 16 hrs. Στη συνέχεια χρησιμοποιούνται 50 μL από την παραπάνω καλλιέργεια για τον εμβολιασμό 500 mL YPD και γίνεται επώαση στους 30°C, μέχρις ότου O.D.600 = 1.3 (16 hrs). Ακολουθούν τέσσερις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (1500g, 5 min, 4 °C) και αναδιάλυση του πρώτου ιζήματος σε 500 ml αποστειρωμένου και προψυγμένου ddH₂O, του δεύτερου ιζήματος σε 250 mL αποστειρωμένου και προψυγμένου ddH₂O, του τρίτου ιζήματος σε 20 mL 1M σορβιτόλης και τέλος του τέταρτου ιζήματος σε 1 mL σορβιτόλης 1 M, οπότε προκύπτει ελαιώδη κυττάρων τελικού όγκου περίπου 1.5 mL. Το ελαιώδη αυτό των επιδεκτικών πλέον κυττάρων ζύμης χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό.

Γ.10.2. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris*

Ποσότητα 80 μL εναιωρήματος των επιδεκτικών κυττάρων X33 αναμειγνύεται με 20 μL γραμμικών pPICZaB πλασμιδίων, (κατάλληλης συγκέντρωσης ώστε τα 20 μL να αντιστοιχούν σε 10-12 μg πλασμιδιακού DNA), τα οποία έχουν υποστεί πέψη με ενδονουκλεάση σε μοναδική θέση αναγνώρισης μέσα στο 5' *AOXI* τόπο. Ακολουθεί μεταφορά του μείγματος σε προψυγμένη κυψελίδα 0.2 cm (ειδική για ηλεκτροδιάτρηση) και επώαση σε 4°C για 5 min. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση στη συσκευή GENE PULSER που έχει ρυθμιστεί σε 25 μF και 1.5 kV. Μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού διάρκειας 4.4–4.6 ms, προστίθεται αμέσως 1 mL διαλύματος 1 M σορβιτόλης και ακολουθεί η μεταφορά του μείγματος σε στείρο σωλήνα 1.5 mL και επώασή του χωρίς ανάδευση στους 30°C για 1h. Στη συνέχεια γίνεται επίστρωση των κυττάρων X33 σε στερεό θρεπτικό υλικό YPD που περιέχει 25 $\mu\text{g/mL}$ ζεοσίνη. Ακολουθεί επώαση σε 30°C, ώστε να γίνει η επιλογή των επιτυχώς μετασχηματισμένων κυττάρων X33 με τα πλασμίδια pPICZaB. Η επιλογή των επιτυχώς μετασχηματισμένων X33 κυττάρων με ανασυνδυασμένο και μη πλασμίδιο pPICZaB στηρίζεται στην ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε YPD παρουσία ζεοσίνης. Η ανάπτυξη αποικιών των επιτυχώς μετασχηματισμένων κυττάρων παρατηρείται συνήθως μέσα σε 48-72 hrs.

Γ.11. Έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στην *P. pastoris*

Η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, τα γονίδια των οποίων έχουν υποκλωνοποιηθεί σε pPICZaB πλασμίδιο, ώστε η μεταγραφή τους να βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της αλκοολικής οξειδάσης (*AOXI*), επάγεται κατά την προσθήκη μεθανόλης στην καλλιέργεια. Η μεθανόλη ενεργοποιεί τον υποκινητή *AOXI* και οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες οδηγούνται από το πεπτίδιο οδηγό («παράγοντας α» από *S. cerevisiae*) προς έκκριση στο θρεπτικό υλικό, από το οποίο συλλέγονται. Ο προκαταρκτικός έλεγχος της έκφρασης πραγματοποιείται σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας. Από τον έλεγχο αυτό επιλέγονται οι ισχυροί κλώνοι για έκφραση σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας.

Γ.11.1. Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας *P. pastoris*

- Μεμονωμένες αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων X33 της *P.pastoris* που φέρουν το γονίδιο της πρωτεΐνης για ετερόλογη έκφραση, χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 5 mL θρεπτικού υλικού BMGY σε στείρους δοκιμαστικούς σωλήνες μιας χρήσης των 50 mL. Ακολουθεί επώαση στους 30°C υπό έντονη ανάδευση για 16-20 hrs.
- Το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται με φυγοκέντρωση σε 2000g για 10 min στους 20°C. Ακολουθεί επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1 mL θρεπτικού υλικού BMMY και μεταφορά κατάλληλου όγκου εναιωρήματος σε 5 mL θρεπτικού υλικού BMMY, ώστε αρχική O.D.600 = 1.0, προς επαγωγή της έκφρασης. Πραγματοποιείται επώαση στους 30°C, υπό ανάδευση για 48 hrs και με την προσθήκη μεθανόλης ανά 24 hrs σε τελική συγκέντρωση 0.5% (κ.ο.).
- Μετά τη διακοπή της επώασης γίνεται συλλογή του υπερκείμενου των καλλιιεργειών με φυγοκέντρωση στα 6000g για 15 min στους 4°C.
- Γίνεται έλεγχος έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (Dot-Blot), χρησιμοποιώντας κατάλληλα αντισώματα. Η επιλογή των κλώνων για έκφραση σε μεγαλύτερη κλίμακα στηρίζεται στην ένταση του σήματος ανοσοαποτύπωσης.

Γ.11.2. Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας *P. pastoris*

- Μεμονωμένες αποικίες ισχυρά μετασχηματισμένων κλώνων X33 χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 5 mL θρεπτικού υλικού BMGY και επωάζονται σε 30°C για 16 hrs
- Ακολουθεί εμβολιασμός 0.5 mL της παραπάνω καλλιέργειας σε 500 mL BMGY και επώαση υπό ανάδευση σε 30°C έως ότου O.D.600 = 4.0.
- Γίνεται φυγοκέντρωση στα 2000g για 10 min στους 20°C και αναδιάλυση σε 4 x 500 mL (2lt) BMMY, ώστε αρχική O.D.600 = 1.0 κατά την επαγωγή της έκφρασης, η οποία διαρκεί 48-72 hrs με την καθημερινή προσθήκη μεθανόλης

0.5% κ.ο. Επειδή για την ανάπτυξη των κυττάρων του ζυμομύκητα *P. pastoris* απαιτείται καλός αερισμός της καλλιέργειας, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες των 500 mL σε κωνικές φιάλες χωρητικότητας 2lt και χρησιμοποιήθηκαν πώματα από διπλή γάζα.

- Μετά το πέρας της επαγωγής της έκφρασης έγινε συλλογή του υπερκειμένου της καλλιέργειας, μέσα στο οποίο περιέχονται οι εκκρινόμενες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, με φυγοκέντρωση στα 9000g για 15 min στους 4°C.

Γ.12. Απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από υπερκείμενο καλλιέργειας *P. pastoris*

Μετά τη συλλογή του υπερκειμένου των καλλιεργειών των μετασχηματισμένων κυττάρων X33, έγινε προσθήκη νατραζιδίου (Na_3N) και φαινυλ-μεθυλ-σουλφονυλ-φθοριδίου (PMSF) σε τελικές συγκεντρώσεις 0.05 % κ.β. και 0.1 mM, αντίστοιχα. Ακολουθεί συμπύκνωση, του υπερκειμένου, διαπίδυση και απομόνωση με χρωματογραφία συγγένειας.

Γ.12.1. Συμπύκνωση υπερκειμένου καλλιέργειας *P. pastoris*

Μετά το φιλτράρισμα του υπερκειμένου των καλλιεργειών, ακολουθεί η συμπύκνωσή του μέσω συσκευής εφapτόμενης συνεχούς ροής της Millipore, στο εσωτερικό της οποίας υπάρχει μεμβράνη με συγκεκριμένη διάμετρο, ώστε να αποκλείεται η διέλευση μορίων μεγέθους > 1 kDa. Η ροή του πρωτεϊνικού διαλύματος εφapτεται στην ειδική αυτή μεμβράνη, ενώ η συνεχής ροή εξασφαλίζεται μέσω περισταλτικής αντλίας. Η μεμβράνη συγκρατεί μόρια μεγαλύτερα από τη διάμετρο των πόρων της, ενώ τα μικρότερα μόρια διαφεύγουν της μεμβράνης μαζί με το διάλυμα. Πριν τη χρήση της, η συσκευή ξεπλένεται με 2lt ddH₂O, χωρίς ανακύκλωση, ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα 0.5 M NaOH αποθήκευσης της συσκευής. Ακολουθεί συμπύκνωση του πρωτεϊνικού διαλύματος και διαπίδυση με 50 mM διάλυμα φωσφορικού νατρίου (pH 8.0) και 150 mM NaCl. Η αναλογία συμπυκνωμένου υπερκειμένου πρωτεΐνης / διαλύματος διαπίδυσης είναι 1:20. Το διάλυμα που προκύπτει συμπυκνώνεται εκ νέου μέχρι τα 150 mL. Στο τέλος γίνεται

έκπλυση της συσκευής, πρώτα με 2lt ddH₂O και στη συνέχεια με 4lt 0.5M NaOH και αποθήκευσή της μέχρι την επόμενη χρήση στους 4°C.

Γ.12.2. Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας με στήλη Ni²⁺-NTA

Το στάδιο απομόνωσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που φέρουν τον επίτοπο 6x-His πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία μεταλλικής συγγένειας Ni²⁺-NTA στο σωληνάριο, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen, Valencia, CA). Το πρώτο στάδιο καθαρισμού της πρωτεΐνης στηρίζεται στην ύπαρξη έξι συνεχόμενων κατάλοιπων ιστιδίνης (6X His tag) στο καρβοξυ-τελικό άκρο της. Σε αλκαλικό περιβάλλον, η πρωτεΐνη προσδένεται με υψηλή συγγένεια σε στήλη ρητίνης, συζευγμένης με ιόντα νικελίου (Ni²⁺), λόγω των αρνητικά φορτισμένων δακτυλίων ιμιδαζολίου των ιστιδινών σε pH 8.0. Η έκλυση της προσδεμένης στη στήλη Ni²⁺-NTA πρωτεΐνης πραγματοποιείται με χρήση ιμιδαζολίου, το οποίο ανταγωνίζεται τα ιμιδαζόλια των ιστιδινών της πρωτεΐνης για πρόσδεση στα ιόντα Ni²⁺ της στήλης.

Πιο συγκεκριμένα, γίνεται:

- Εξισορρόπηση σφαιριδίων Ni²⁺-NTA αгарόξης (Qiagen) με 50 mM φωσφορικό διάλυμα νατρίου (pH 8.0) τρεις φορές, με παρεμβολή μίας φυγοκέντρωσης (1700g, 10min, 4°C) κάθε φορά.
- Μετά την τελευταία φυγοκέντρωση, γίνεται αναδιάλυση του ιζήματος σε κατάλληλο όγκο 50 mM PB (pH 8.0) και η αναλογία των σφαιριδίων που εξισορροπούνται είναι 1mL καθαρών σφαιριδίων/L αρχικής καλλιέργειας. Το συμπυκνωμένο υπερκείμενο που περιέχει την πρωτεΐνη, επωάζεται σε πλαστικό σωληνάριο τύπου falcon με τα αναδιαλυμένα σφαιρίδια Ni²⁺-NTA αгарόξης, για 16 hrs, υπό ανάδευση, στους 4°C, προκειμένου να επιτευχθεί η πρόσδεση της πρωτεΐνης στα σφαιρίδια.
- Την επόμενη μέρα το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 2000g για 5min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, ενώ το ίζημα των σφαιριδίων με τα προσδεμένα πλέον μόρια πρωτεΐνης αναδιαλύεται σε 10πλάσιο όγκο διαλύματος πλύσης (50 mM φωσφορικό διάλυμα νατρίου pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM ιμιδαζόλιο, προς αποφυγή όσο το δυνατόν περισσότερων μη

ειδικών ασθενών προσδέσεων) και στη συνέχεια μεταφέρεται σε πλαστική στήλη χρωματογραφίας.

- Με το διάλυμα πλύσης, αφ' ενός απομακρύνονται οι ασθενώς μη ειδικά προσδεμένες προσμίξεις και αφ' ετέρου επιτυγχάνεται το πακετάρισμα της στήλης σφαιριδίων.
- Η έκλουση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, με 50 mM φωσφορικό διάλυμα νατρίου pH 8.0, 500 mM NaCl και 100-250 mM Ιμιδαζόλιο.
- Συνολικά συλλέγονται 6 κλάσματα όγκου 500 μ l το κάθε ένα και 1 κλάσμα με χρήση φωσφορικού διαλύματος νατρίου pH 8.0, 500 mM NaCl, 1M ιμιδαζόλιο για την πλήρη αποδέσμευση της πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια.

Τα κλάσματα ηλεκτροφορούνται (10 μ L από κάθε κλάσμα) σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση για να προσδιοριστεί ο βαθμός καθαρότητας τους.

Γ.13. In vitro απογλυκοζυλίωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Προκειμένου να παραχθούν ανασυνδυασμένα μόρια που δε φέρουν αλυσίδες σακχάρων, γίνεται απογλυκοζυλίωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με τη χρήση της ενδογλυκοσιδάσης PNGase F (New England Biolabs). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απογλυκοζυλίωση των μορίων ήταν η εξής:

- Γίνεται προσθήκη κατάλληλης ποσότητας PNGase F (500.000 units/mL) στις γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες, συνήθως μετά το πρώτο στάδιο καθαρισμού με στήλη Ni^{2+} -NTA-αγαρόζης, σε τελικό όγκο αντίδρασης 500 μ L ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM PB (pH 7.5) και ακολουθεί επώαση κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C και υπό ανάδευση. Η ποσότητα του χρησιμοποιούμενου κάθε φορά ενζύμου καθορίζεται από την ποσότητα της προς απογλυκοζυλίωση πρωτεΐνης, αφού μία μονάδα ενζύμου (1 unit) απογλυκοζυλιώνει 10 μ g RNάσης B.
- Ο έλεγχος της επιτυχούς απογλυκοζυλίωσης γίνεται με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων και ανίχνευση με ανοσοαποτύπωση (Western Blot)

Γ.14. Ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με βάση το μοριακό τους βάρος με ηλεκτροφόρηση σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκακυλικού θειϊκού νατρίου (SDS). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, τα πρωτεϊνικά μόρια αποκτούν αρνητικό φορτίο, καθώς εκτείθονται στο αρνητικά φορτισμένο απορρυπαντικό SDS (ένα περίπου μόριο του SDS δεσμεύεται σε κάθε αμινοξύ μιας πρωτεΐνης καθιστώντας όλο το μόριο αρνητικά φορτισμένο) και μετακινούνται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθός τους.

Κατά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες τοποθετούνται αρχικά σε πήκτωμα χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (πήκτωμα επιστοιβαξης) και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε πήκτωμα υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (πήκτωμα διαχωρισμού). Ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών προς ανάλυση χρησιμοποιούνται πηκτώματα διαχωρισμού 10-15% κ.β. ακρυλαμιδίου, ενώ το πήκτωμα συμπύκνωσης έχει πάντοτε σταθερή συγκέντρωση 4% κ.β. ακρυλαμίδιο. Τα προς ανάλυση δείγματα αραιώνονται κατάλληλα σε διάλυμα “φόρτωσης” δείγματος (loading buffer), που περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη, και επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 100°C για 3min. Οι συνθήκες αυτές είναι αποδιατακτικές για τις πρωτεΐνες καθώς, ο βρασμός και η παρουσία του SDS καταστρέφουν τους ασθενείς δεσμούς (υδρογόνου, ιοντικούς, υδρόφοβους, van der Waals), ενώ η παρουσία της β-μερκαπτοαιθανόλης (αναγωγικό μέσο) έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή των ισχυρών ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα, γίνεται ανάλυση μείγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (electrophoresis buffer) με ρεύμα σταθερής τάσης 200 Volts σε θερμοκρασία δωματίου. Οι ζώνες των πρωτεϊνών εμφανίζονται μετά από χρώση του πηκτώματος και στη συνέχεια αποχρωματισμό του. Η χρώση του πηκτώματος πραγματοποιείται με ήπια ανάδευση σε διάλυμα χρωματισμού για 1h περίπου στους 37°C. Ο αποχρωματισμός του πηκτώματος γίνεται με επανειλημμένες πλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού έως ότου να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής.

Γ.15. Μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοενζυμικός χαρακτηρισμός τους

Οι πρωτεΐνες, μετά το διαχωρισμό τους στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου είναι δυνατή η επεξεργασία για το χαρακτηρισμό τους. Για να πραγματοποιηθεί η μεταφορά, το πήκτωμα έρχεται σε επαφή με τη μεμβράνη και κάθετα προς την επιφάνειά τους διαβιβάζεται ηλεκτρικό ρεύμα. Ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών στη συνέχεια γίνεται με τη βοήθεια αντισωμάτων εξαιτίας της μεγάλης τους ειδικότητας. Το πρώτο αντίσωμα που χρησιμοποιείται είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που εξετάζεται. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης αντισώματος ανιχνεύεται από ένα δεύτερο αντίσωμα, ειδικό για το πρώτο, που φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένο ένα ένζυμο (όπως η υπεροξειδάση που προσδίδει χημειοφωταύγεια). Μετά την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος το ένζυμο καταλύει μια αντίδραση που δίνει ένα έγχρωμο προϊόν, με αποτέλεσμα να γίνεται ορατή η ζώνη της πρωτεΐνης.

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση, ακόμη και σε πολύ μικρές ποσότητες, μιας πρωτεΐνης σε ένα μείγμα πρωτεϊνών, για τον προσδιορισμό της ταυτότητας ή του μεγέθους μιας πρωτεΐνης ή ακόμη και για τον χαρακτηρισμό αντισωμάτων με τη βοήθεια γνωστής πρωτεΐνης.

α. Μεταφορά των πρωτεϊνών

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη χρησιμοποιείται κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (transfer buffer) με $\text{pH} \geq 8.3$. Σ' αυτή τη τιμή pH οι πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό φορτίο και μετακινούνται μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο προς το θετικό πόλο. Ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης και δύο κομμάτια απορροφητικό χαρτί Whatmann 3MM κόβονται σε μέγεθος λίγο μεγαλύτερο του πηκτώματος και εμβαπτίζονται στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα. Στη μία πλευρά της συσκευής, που θα εφαρμοστεί ο αρνητικός πόλος, τοποθετούνται με τη σειρά: ένα απορροφητικό χαρτί Whatmann 3MM, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, η νιτροκυτταρίνη, ένα απορροφητικό χαρτί Whatmann 3MM και τέλος, η άλλη πλευρά της συσκευής, που θα εφαρμοσθεί ο θετικός πόλος. Η τοποθέτηση γίνεται προσεκτικά, ώστε να μην εγκλωβιστούν φυσαλίδες αέρα που θα εμποδίσουν τη μεταφορά. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με ρεύμα σταθερής έντασης 300 mA για 1-1.30 hrs στους 4°C . Μετά τη μεταφορά η

νιτροκυτταρίνη βάφεται για περίπου 1 min με διάλυμα χρωστικής Ponceau S (βάφει μη ειδικά όλες τις πρωτεΐνες) και κατόπιν ξεπλένεται με ddH₂O για να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής. Οι ζώνες των πρωτεϊνών γίνονται ορατές και ελέγχεται έτσι η επιτυχία της μεταφοράς. Παράλληλα, αριθμούνται επάνω στην νιτροκυτταρίνη οι διαδρομές των δειγμάτων και απομακρύνεται με νυστέρι η διαδρομή του μείγματος πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες. Ο αποχρωματισμός της νιτροκυτταρίνης από την Ponceau S γίνεται με επανειλημμένες πλύσεις σε διάλυμα PBST ή TBST.

β. Ανίχνευση με υπόστρωμα υπεροξειδάσης

Μετά τον αποχρωματισμό της από τη χρωστική Ponceau S η νιτροκυτταρίνη επώάζεται με συνεχή ανάδευση, με διάλυμα 3% κ.β. λυοφιλιωμένο γάλα σε PBS, για 1h στους 37°C. Με την επώαση αυτή παρεμποδίζεται στη συνέχεια η μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων (blocking). Ακολουθεί επώαση της νιτροκυτταρίνης με το πρώτο αντίσωμα, αραιωμένο σε διάλυμα 3% κ.β. λυοφιλιωμένο γάλα σε PBS, για περίπου 16 hrs στους 4°C με συνεχή ανάδευση. Πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές πλύσεις με PBS (ή TBS) με 0.1% Triton X-100 διάρκειας 10 min η καθεμία. Ακολουθεί επώαση της νιτροκυτταρίνης με το δεύτερο αντίσωμα, αραιωμένο κατάλληλα σε διάλυμα 3% κ.β. λυοφιλιωμένο γάλα σε PBS (ή TBS), για 1.5 hrs σε θερμοκρασία δωματίου (RT) με συνεχή ανάδευση. Το δεύτερο αντίσωμα φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης και είναι ειδικό για το πρώτο αντίσωμα. Πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές πλύσεις με PBS-0.1% Triton X-100 διάρκειας 10 min η καθεμία. Ακολουθεί επώαση της νιτροκυτταρίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα εμφάνισης. Η ενζυμική δράση της υπεροξειδάσης ανιχνεύεται είτε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα 0.003 % κ.β. διαμινοβενζιδίνη (DAB) παρουσία 0.003 % κ.β. NiCl₂ (ενίσχυση σήματος) και 0.003 % κ.ο. 30 % διαλύματος H₂O₂ που δρα ως καταλύτης της αντίδρασης, είτε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (για μεγαλύτερη ευαισθησία). Η νιτροκυτταρίνη στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε ddH₂O, για να σταματήσει η αντίδραση της υπεροξειδάσης και τοποθετείται πάνω σε χαρτί Whatmann 3MM για να στεγνώσει.

Γ.16. Φασματοσκοπικές μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών.

Γ.16.1. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας

Η συγκέντρωση μιας πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα προσδιορίζεται βάσει εμπειρικών τύπων από την απορρόφηση του πρωτεϊνικού διαλύματος, στην περιοχή του υπεριώδους του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, όπου απορροφούν τα αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών. Η μέθοδος απαιτεί μικρή ποσότητα δείγματος, είναι γρήγορη και μη καταστροφική για το δείγμα. Μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 280 nm (A280 nm) και η συγκέντρωση του προσδιορίζεται από τον τύπο:

$$Molarity = (A280 \times αραιωση) / (5500 Nw + 4910 NY + 125 Ns-s)$$
 που λαμβάνει υπόψη την περιεκτικότητα σε κατάλοιπα τρυπτοφάνης και τυροσίνης (Nw και NY οι αριθμοί των καταλοίπων τρυπτοφάνης και τυροσίνης αντίστοιχα) στη μετρούμενη πρωτεΐνη και Ns-s ο αριθμός των δισουλφιδικών δεσμών.

Γ.16.2. Μέθοδος Bradford

Η ποσότητα μιας πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα προσδιορίζεται από καμπύλη βαθμονόμησης που δημιουργείται με προσδιορισμό BSA σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η μέθοδος είναι γρήγορη και εύκολη και η γραμμική της περιοχή είναι μεταξύ 10 και 200 μg.

Για την καμπύλη βαθμονόμησης παρασκευάζονται 100 μl διαλυμάτων 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800 και 1000 μg BSA σε 0,15 M NaCl. Σ' αυτά προστίθεται διαδοχικά 1ml διαλύματος 0.1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue και μετράται η απορρόφηση των διαλυμάτων στα 595 nm μετά από παραμονή 2 min. Παράλληλα, ακολουθείται η ίδια διαδικασία και για το άγνωστο δείγμα. Από την καμπύλη αναφοράς, που σχεδιάζεται με βάση την απορρόφηση των διαλυμάτων της BSA, υπολογίζεται η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος.

Γ.17. Χρώση πρωτεϊνών

Γ.17.1. Χρώση Coomassie Brilliant Blue

Οι ζώνες των πρωτεϊνών εμφανίζονται μετά από χρώση του πηκτώματος με διάλυμα χρωματισμού για 30 min περίπου. Ο αποχρωματισμός του πηκτώματος γίνεται με επανειλημμένες πλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού έως ότου να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα,

γίνεται ανάλυση μείγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες.

Γ.17.2. Χρώση αργύρου (silver)

Η χρώση silver είναι μια πολύ ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου. Η χρώση αυτή είναι 10-50 φορές περισσότερο ευαίσθητη από τη χρώση Coomassie και 2-5 περισσότερο ευαίσθητη για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε σχέση με το βρωμιούχο αιθίδιο. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ακόλουθη:

- Επώαση του πηκτώματος με σταθεροποιητικό διάλυμα (Fixative) για τουλάχιστον 30 min.
- Ακόλουθη επώαση με οξειδωτικό διάλυμα (Oxidizer) για 5 min.
- 6-7 γρήγορες πλύσεις με ddH₂O για 5 min και νέα πλύση για 10 min επιπλέον (μέγιστος χρόνος επώασης 15 min).
- Εμβάπτιση του πηκτώματος στο αντιδραστήριο του αργύρου (silver) για 20 min.
- Γρήγορη πλύση με ddH₂O.
- Προσθήκη του εμφανιστικού διαλύματος (developer) και επώαση για όσο χρόνο χρειάζεται να βαφεί το πηκτωμα.
- Προσθήκη ddH₂O ή 5% οξικού οξέος για να σταματήσει η αντίδραση της χρώσης.

Γ.18. Παραγωγή ολόκληρου ανθρώπινου αντισώματος με επιμόλυνση CHO κυττάρων

Ειδικά σχεδιασμένα κατιονικά λιπίδια, όπως η λιποφεκταμίνη (lipofectamine), δεσμεύουν το φωσφορικό σκελετό του νουκλεϊνικού οξέος και με τη θετικά φορτισμένη τους επιφάνεια διευκολύνουν την αλληλεπίδραση του DNA με την κυτταρική μεμβράνη, οδηγώντας στη σύντηξη του λιποσώματος / DNA (σύμπλεγμα επιμόλυνσης) με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη. Στη συνέχεια το σύμπλεγμα επιμόλυνσης εισέρχεται στο κύτταρο με ενδοκύτωση.

- Τα κύτταρα στρώνονται σε συγκέντρωση 2×10^5 ανά φρεάτιο σε πιάτο 6-φρεατίων (6 well plate) σε πλήρες θρεπτικό από μια αρχική καλλιέργεια η οποία είχε φτάσει σε τελική πυκνότητα 60-70%.
- Την επόμενη μέρα, προετοιμάζονται τα υλικά. Σε στείρους πλαστικούς σωλήνες του 1.5 ml ετοιμάζονται τα εξής διαλύματα (για κάθε φρεάτιο):
 Διάλυμα A: 2 μ g ευθυγραμμισμένο DNA (ή κενό για το δείγμα ελέγχου) + 100 μ l υλικό OPTIMEM
 Διάλυμα B: 12 μ l lipofectamine + 100 μ l υλικό OPTIMEM
- Τα δύο διαλύματα αναμιγνύονται και επωάζονται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ξέπλυμα κυττάρων με 0.4 ml υλικού OPTIMEM σε κάθε φρεάτιο.
- Προσθήκη 200 μ l OPTIMEM σε κάθε μίγμα και προσθήκη στα κύτταρα.
- Επώση των κυττάρων με το μίγμα επιμόλυνσης για 6 hrs στον επωαστήρα κυττάρων.
- Απομάκρυνση του υλικού επιμόλυνσης, ξέπλυμα των κυττάρων και προσθήκη φρέσκου υλικού καλλιέργειας (RPMI / 10% dFBS χωρίς αντιβιοτικά και γλουταμίνη).
- Αντικατάσταση του υλικού καλλιέργειας με φρέσκο υλικό επιλογής το οποίο περιέχει τον αναστολέα παραγωγής της γλουταμίνης για την επιλογή των θετικών κλώνων. Το υλικό καλλιέργειας που απομακρύνεται, φυλάσσεται για την πραγματοποίηση ανοσοενζυμικού προσδιορισμού (ELISA)
 Αν η επιμόλυνση είναι επιτυχής με βάση τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό, υπάρχει κυτταρικός θάνατος λόγω παρουσίας του αναστολέα MSX στα φρεάτια για μια περίοδο 6-7 ημερών.
- Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής προστίθεται φρέσκο υλικό παρουσία του αναστολέα και το προηγούμενο υλικό ελέγχεται με ELISA προκειμένου να βρεθεί ο πιο δυνατός κλώνος.
- Για κάθε θετικό κλώνο που επιλέγεται γίνονται διαδοχικές αραιώσεις κυττάρων 10, 5 και 2.5 κύτταρα/ml σε τελικό όγκο 25 ml θρεπτικού.
- Κατόπιν, σε πλάκα 48 φρεατίων επιστρώνονται 200 μ l από τις αραιώσεις και τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο καλλιέργειας μέχρι να αρχίσουν να εμφανίζονται αποικίες (ένδειξη ύπαρξης ενός κλώνου).

- Τα φρεάτια όπου αρχίζουν να εμφανίζονται αποικίες σημαδεύονται σε μονόκλωνα και μόλις παρουσιάσουν πυκνότητα κυττάρων 50-70% γίνεται επανέλεγχος με ELISA για την ύπαρξη θετικού σήματος. Ο κλώνος με το υψηλότερο σήμα στην ELISA επιλέγεται ως το πιο ειδικό μονόκλωνο αντίσωμα και καλλιεργείται σε μεγάλη κλίμακα προκειμένου για να καταψυχθεί και να αποθηκευτεί για μελλοντική χρήση.

Γ.19. Παρασκευή μεμβρανικού εκχυλίσματος και διαλυτού μεμβρανικού υποδοχέα από κυτταρική σειρά θηλαστικών

Η εκχύλιση μεμβρανικών υποδοχέων από διάφορες πηγές (κύτταρα ή ιστούς), επιτυγχάνεται με την επίδραση μη ιοντικών απορρυπαντικών, όπως είναι το Triton X-100. Για τη λύση των κυττάρων και την εκχύλιση των υποδοχέων, ακολουθήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται παρακάτω:

- Τα κύτταρα (SkBR3 ή SkOV3) καλλιεργήθηκαν σε υλικό RPMI εμπλουτισμένο με 10% κ.ο. FBS.
- Για την επαγωγή της μέγιστης έκφρασης του υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για επιπλέον 3 έως 4 ημέρες.
- Το υλικό της κυτταροκαλλιέργειας αντικαθίσταται κάθε δύο μέρες μέχρι να συλλεχθούν τα κύτταρα και να γίνει η εκχύλιση του ανθρώπινου υποδοχέα.

Την ημέρα της εκχύλισης ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Αφαιρείται το υλικό καλλιέργειας και το στρώμα των κυττάρων στα τρυβλία ξεπλένεται με 10 mM Na_3PO_4 , 100 mM NaCl (pH 7.5) και τα κύτταρα συλλέγονται σε διάλυμα ομογενοποίησης A.
- Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται σε 6.000g για 10 min και το ίζημα αναδιαλύεται σε 2-4 ml ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης B.
- Για την ομογενοποίηση των κυττάρων χρησιμοποιείται ομογενοποιητής χειρός Kontes.
- Ακολουθεί επώαση υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C για 1h.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε 100.000g για 30 λεπτά.
- Στο υπερκείμενο, στο οποίο περιέχονται οι διαλυτοποιημένοι υποδοχείς, γίνεται προσθήκη γλυκερόλης 10-30% κ.ο. και φυλάσσεται στους -80°C.

Γ.20. Ανοσοδιαγνωστικές τεχνικές

Γ.20.1. Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός ELISA

α. Άμεση ELISA

- Η πρωτεΐνη αραιώνεται σε συγκέντρωση 1-10 µg/ml σε διάλυμα 50 mM όξινου ανθρακικού νατρίου (pH 9.6) ή σε PBS και 100 µl του πρωτεϊνικού διαλύματος επωάζονται σε κάθε φρεάτιο της πλάκας μικροτιτλοδότησης για την προσρόφηση της πρωτεΐνης στο υλικό της πλάκας. Ακολουθεί πλύση των φρεατίων της πλάκας 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- Προσθήκη στα φρεάτια 200 µl διαλύματος PBS-2.5% BSA ή PBS-5% γάλα και επώαση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση αυτή πραγματοποιείται για να παρεμποδιστεί η μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων που θα προστεθούν στην συνέχεια.
- Πλύση των φρεατίων της πλάκας 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- Προσθήκη στα φρεάτια 100 µl διαλύματος PBS-0.2% BSA, που περιέχουν διάφορες αραιώσεις από το περιπλαστικό υλικό των βακτηρίων που εκφράζουν Fab τμήματα των ανοσοσφαιρινών και επώαση για 2 hrs σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση των φρεατίων 3 φορές με διάλυμα PBS-0.05% Tween 20 και 3 φορές με διάλυμα PBS.
- Προσθήκη στα φρεάτια 100µl διαλύματος PBS-0.2% BSA, που περιέχουν το δεύτερο αντίσωμα το οποίο ποικίλει ώστε να είναι το κατάλληλο για να ανιχνεύσει και να προσδεθεί στο χρησιμοποιούμενο κάθε φορά πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα επωάζεται για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση των φρεατίων 3 φορές με διάλυμα PBS-0.05% Tween 20 και 3 φορές με διάλυμα PBS.
- Η ισχύς της σύνδεσης του πρώτου με το δεύτερο αντίσωμα όταν αυτό είναι συνδεδεμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση, προσδιορίζεται με το χρωμογόνο (TMB) από το οποίο προστίθενται 100 µl σε κάθε φρεάτιο.
- Το μπλε χρώμα που αναπτύσσεται, μετράται στα 450 nm σε φασματοφωτόμετρο που διαθέτει ειδική υποδοχή για πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων.

- Στην περίπτωση που το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση χρησιμοποιείται το κατάλληλο υπόστρωμα για το ένζυμο αυτό και το κίτρινο χρώμα που αναπτύσσεται μετράται στα 405 nm.

β. Sandwich ELISA

- Στις πλάκες μικροτιτλοδότησης προσροφάται ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για το υπό ανίχνευση αντιγόνο σε συγκέντρωση 0.1-0.5 µg/ml.
- Ακολουθεί πλύση των φρεατίων 3 φορές με διάλυμα PBS και προσθήκη σε κάθε φρεάτιο ισομοριακής ποσότητας αντιγόνου και επώαση στους 4°C για 16 hrs.
- Ακολουθούν τα στάδια της κλασικής τεχνικής ELISA όπως αυτά περιγράφονται στην προηγούμενη ενότητα.

Γ.20.2. Ανοσοκαθίζηση

Ανοσοκαθίζηση ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία πεπτίδια ή πρωτεΐνες που αντιδρούν ειδικά με κάποιο αντίσωμα, μπορούν να κατακρημνιστούν σε σύμπλοκο με το αντίσωμα αυτό και να απομονωθούν από ένα διάλυμα. Τα συμπλέγματα πρωτεΐνης-αντισώματος μπορούν να απομακρυνθούν από το διάλυμα με την προσθήκη ακινητοποιημένης πρωτεΐνης (σε σεφαρόζη ή αγαρόζη) A ή G οι οποίες είναι βακτηριακές πρωτεΐνες, ικανές να δεσμεύουν αντισώματα στην Fc περιοχή.

- Το υλικό στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η ανοσοκαθίζηση επωάζεται σε πρώτη φάση με σφαιρίδια ακινητοποιημένης πρωτεΐνης G, για 2-3 hrs με μη μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απομακρυνθούν από το διάλυμα πεπτίδια ή πρωτεΐνες οι οποίες δένονται μη ειδικά στα σφαιρίδια της πρωτεΐνης G.
- Αφού απομακρυνθούν τα σφαιρίδια πρωτεΐνης G με τους μη ειδικούς προσδέτες, το διάλυμα επωάζεται με αντίσωμα με μη μαγνητική ανάδευση για 16 hrs στους 4°C.
- Την επόμενη μέρα προστίθενται τα σφαιρίδια πρωτεΐνης G στο μίγμα και ακολουθεί επώαση για 2 hrs σε θερμοκρασία δωματίου.

- Ακολουθούν 3 πλυσίματα με διάλυμα πλυσίματος και προσθήκη ειδικού διαλύματος SDS.
- Η ανάλυση των ανοσοσυμπλεγμάτων γίνεται με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωμα.

Γ.21. Μελέτη της μετάστασης σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων με τη μέθοδο επούλωσης του χάσματος

Η μελέτη της μεταναστευτικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων γίνεται με τη μέθοδο «επούλωσης χάσματος»

- Αρχικά τα κύτταρα επιστρώνονται σε στρογγυλές καλυπτρίδες σε πυκνότητα 10^5 κύτταρα ανά φρεάτιο και παραμένουν στην καλλιέργεια για 24 hrs χωρίς καμία αλλαγή των συνθηκών ώστε να δημιουργηθεί μια ομοιογενής στοιβάδα κυττάρων.
- Στη συνέχεια το υλικό αντικαθίσταται με φρέσκο υλικό χωρίς ορό.
- Μετά από 16 hrs με τη βοήθεια ενός ακρορυγχίου δημιουργείται μια ευθύγραμμη περιοχή ελεύθερη κυττάρων και πλάτους περίπου ενός χιλιοστού.
- Αμέσως μετά (χρόνος μηδέν), το υλικό καλλιέργειας αντικαθίσταται με φρέσκο υλικό (υλικό μάρτυρας) ή υλικό στο οποίο συμπεριλαμβάνονται τα προς μελέτη μόρια. Τα κύτταρα που βρίσκονται εκατέρωθεν της κενής περιοχής αφήνονται να μεταναστεύσουν μέσα σ' αυτήν για ορισμένο χρόνο.
- Με τη βοήθεια ανάστροφου μικροσκοπίου Leica DM IL και ψηφιακής κάμερας Leica DC100 συνδεδεμένης με ηλεκτρονικό υπολογιστή, λαμβάνονται φωτογραφίες των καλλιιεργειών σε χρόνο μηδέν, σε ενδιάμεσους χρόνους και σε τελικό χρόνο (0 hrs-24 hrs-48 hrs-72 hrs).
- Η μέτρηση της διανυόμενης απόστασης από τα κύτταρα γίνεται με τη βοήθεια λογισμικού ανάλυσης Image Pro Plus και υπολογίζεται ως η διαφορά του μέσου πλάτους της κενής περιοχής στον τελικό χρόνο από το μέσο πλάτος της αντίστοιχης περιοχής στο χρόνο μηδέν.
- Μετά το τέλος της δοκιμασίας μετανάστευσης, ακολούθησε η χρώση των καλλιιεργειών με Trypan Blue για την παρατήρηση του ποσοστού των νεκρών κυττάρων.

Γ.22. Μελέτη της μετάστασης σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων με τη μέθοδο διήθησης της εξωκυττάριας ουσίας

Τα πειράματα διήθησης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των Biocoat Matrigel Invasion Chambers (θάλαμοι διήθησης) και των αντίστοιχων Control Inserts (θάλαμοι μετανάστευσης) (BD Biosciences). Οι θάλαμοι διήθησης αποτελούνται από PET μεμβράνες με πόρους διαμέτρου 8 μm που περιέχουν ένα λεπτό στρώμα matrigel. Το matrigel είναι ένα υλικό σε μορφή γέλης με σύσταση αντίστοιχη με αυτήν της εξωκυττάριας ύλης. Οι θάλαμοι μετανάστευσης αποτελούνται από τη μεμβράνη χωρίς το matrigel.

Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

- Οι θάλαμοι, που διατηρούνται στους -20°C , αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου και 0.5 ml υλικού DMEM προστίθενται στη βάση των πηγαδιών και στο εσωτερικό του matrigel.
- Στη συνέχεια οι θάλαμοι ενυδατώνονται για 2 hrs στους $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$.
- Σε αυτό το χρονικό διάστημα τα κύτταρα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία και βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης, ξεπλένονται δύο φορές με PBS, αποκολλώνται με τρυψίνη και μετρώνται. Ετοιμάζονται έτσι εναιωρήματα κυττάρων σε DMEM, συγκέντρωσης $5 \times 10^4/\text{ml}$.
- Το καλλιεργητικό μέσο απομακρύνεται από τους θαλάμους και 0.75 ml DMEM με 5% (v/v) ορό (FBS) προστίθεται σε φρεάτια. Ο ορός δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας.
- Με τη χρήση λαβίδων οι θάλαμοι μεταφέρονται στα φρεάτια με το υλικό, ενώ στο εσωτερικό τους προστίθενται τα κύτταρα για 24 hrs σε επωστήρα με θερμοκρασία $37^{\circ}\text{C} / 5\% \text{CO}_2$.
- Την επόμενη μέρα τα κύτταρα που δεν έχουν μεταναστεύσει και βρίσκονται στην πάνω επιφάνεια της μεμβράνης, απομακρύνονται.
- Τα κύτταρα που έχουν μεταναστεύσει και βρίσκονται στην κάτω επιφάνεια της μεμβράνης μονιμοποιούνται με μεθανόλη και βάφονται με χρώση Giemsa.
- Στη συνέχεια οι μεμβράνες αποκόπτονται και μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους έτσι ώστε τα κύτταρα σε κάθε μεμβράνη να μετρηθούν σε οπτικό μικροσκόπιο.

Γ.23. Ζυμογραφία

Πρόκειται ουσιαστικά για συνδυασμό ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού των πρωτεϊνών ενός δείγματος (όπως δηλαδή η SDS-PAGE) και ανίχνευσης ενζυμικής δραστηριότητας μεταξύ των διαχωριζόμενων πρωτεϊνών. Η ενζυμική δραστηριότητα που ανιχνεύεται οφείλεται στην ικανότητα αποικοδόμησης της ζελατίνης του πηκτώματος διαχωρισμού από τα ένζυμα του ηλεκτροφορούμενου δείγματος.

Ο υπολογισμός του MB των ζελατινολυτικών πρωτεϊνών, γίνεται όπως περιγράφεται στην SDS-PAGE.

- Το πηκτώμα διαχωρισμού είναι περιεκτικότητας 10% σε πολυακρυλαμίδιο με αναλογία ακρυλαμιδίου/δις-ακρυλαμίδιο 30:1 και περιείχε 1 mg/ml ζελατίνη.
- Τα δείγματα προεπωάζονται για 5 min στους 37C⁰ σε ρυθμιστικό διάλυμα επεξεργασίας δειγμάτων απουσίας β-μερκαπτοαιθανόλης
- Ηλεκτροφόρηση για 2-3 hrs στα 120V στους 4C⁰.
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης τα πηκτώματα ξεπλένονται 3 φορές στους 37C⁰ (από 15 min τη φορά) με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl (pH:7.5), 5 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂ και 0.02% NaN₃, το οποίο περιέχει 2.5% Triton X-100, ώστε να απομακρυνθεί το SDS.
- Ακολουθεί έκπλυση 30 min με 2.5% Triton.
- Ακολουθεί έκπλυση 1 min με το αρχικό διάλυμα απουσία Triton
- Τα πηκτώματα επωάζονται στο αρχικό διάλυμα απουσία Triton για 16 hrs στους 37°C.
- Τα πηκτώματα βάφονται σε διάλυμα 0.25% Coomassie Blue R-250 σε 45% μεθανόλη και 9% οξικό οξύ για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί αποχρωματισμός με διάλυμα 45% μεθανόλης και 7% οξικού οξέος.
- Ακολουθεί διατήρηση του πηκτώματος σε ddH₂O

Το πηκτώμα αποκτά ένα ομοιόμορφο μπλέ χρώμα λόγω δέσμευσης της χρωστικής με τη ζελατίνη που έχει ακινητοποιηθεί σε αυτό κατά τον συμπολυμερισμό των συστατικών του. Στις θέσεις όπου είχαν ηλεκτροφορηθεί ένζυμα τα οποία είχαν την δυνατότητα αποικοδόμησης της ζελατίνης (ζελατινάσες), λόγω τοπικής αποικοδόμησης του υποστρώματος, εμφανίζονταν

διάφανες ζώνες λύσεώς της. Η εκτίμηση της έντασης των ζωνών λύσεως γίνεται με την χρήση των προγραμμάτων Image J ή Quantity One.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. Ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης ECD-EMMPRIN στο ζυμομύκητα *Pichia pastoris* και απομόνωση ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs) έναντι αυτής

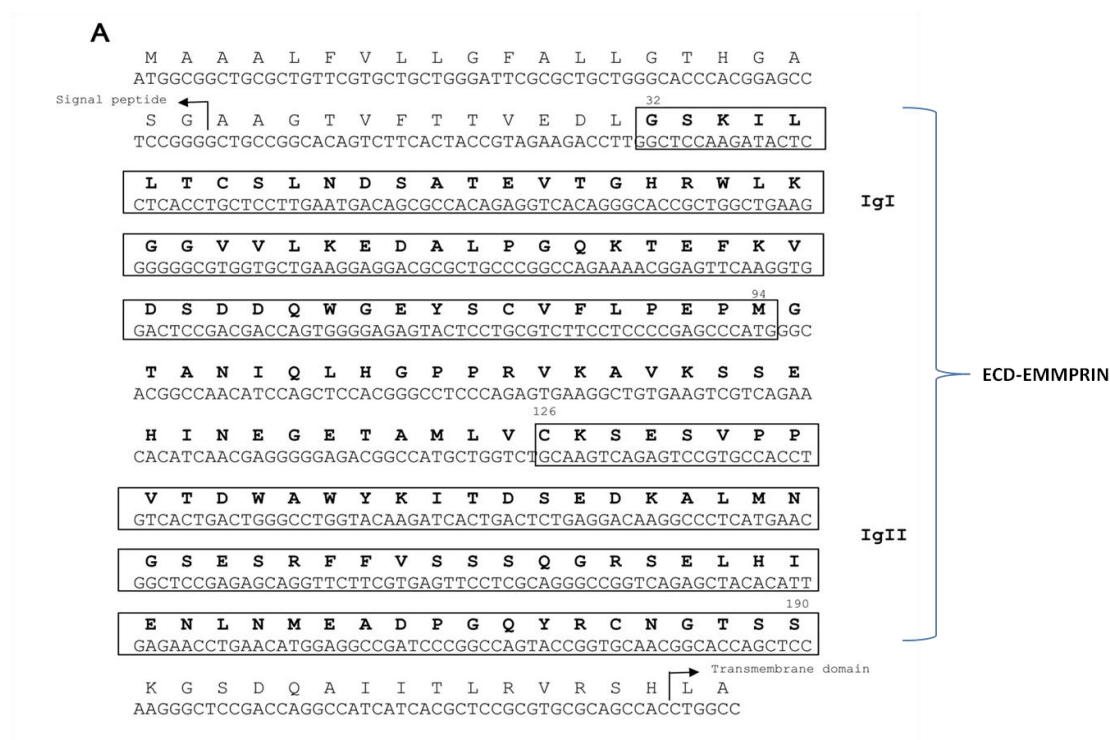
Για την απομόνωση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της EMMPRIN χρησιμοποιήθηκε η ανασυνδυασμένη μορφή του εξωκυτταρικού τμήματος της πρωτεΐνης, η οποία εκφράστηκε στο ζυμομύκητα *P.pastoris*. Η παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης είναι αναγκαία διότι απαιτείται αυξημένη ποσότητα αντιγόνου, η οποία χρησιμεύει σαν υπόστρωμα στις διαδικασίες επιλογής των αντισωμάτων κατά τη σάρωση της ανασυνδυασμένης βιβλιοθήκης «φάγων-αντισωμάτων». Επίσης, το συγκεκριμένο σύστημα έκφρασης επιλέχθηκε διότι η EMMPRIN στον καρκίνο είναι υπεργλυκοζυλιωμένη. Το σύστημα της *Pichia pastoris* προσφέρει έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε υψηλά ποσοστά, επιτρέπει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως αυξημένη γλυκοζυλίωση και διευκολύνει την απομόνωση και τον καθαρισμό της πρωτεΐνης, χάρη στους επιτόπους myc-His που εντοπίζονται στο 3' άκρο της. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες παράγονται σε διαλυτή μορφή στο υπερκείμενο της καλλιέργειας, με αποτέλεσμα να προσεγγίζουν σε μεγάλο βαθμό τη δομή του φυσικού μορίου. Η πρωτεΐνη που παρήχθηκε στο σύστημα έκφρασης της *P.pastoris*, αφού χαρακτηρίστηκε βιοχημικά και λειτουργικά, χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή ανθρώπινων αντισωμάτων που προέρχονται από μια βιβλιοθήκη αντισωμάτων ασθενούς με καρκίνο μαστού (§ Γ.9. Υλικά και Μέθοδοι). Τα αντισώματα που απομονώθηκαν, χαρακτηρίστηκαν ως προς την ειδικότητά τους και μελετήθηκε η λειτουργικότητά τους ως προς την επαγωγή της MMP-2 καθώς και η ικανότητά τους να παρεμποδίζουν τη δράση της EMMPRIN.

A.1. Κλωνοποίηση του μορίου ECD-EMMPRIN στο φορέα έκφρασης pPICZαB

Προκειμένου να εκφραστεί ολόκληρη η εξωκυτταρική περιοχή (ECD-EMMPRIN) και να εξασφαλιστεί η γλυκοζυλίωσή της, απομονώθηκε το cDNA τμήμα που κωδικοποιεί για την ECD-EMMPRIN, από το αρχικό πλασμίδιο που φέρει ολόκληρο το cDNA της EMMPRIN, το pBluescript-EMMPRIN (ευγενική προσφορά

του Dr.Toole, Tufts Medical Center), και το οποίο στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pPICZαB.

Στην εικόνα 1 απεικονίζεται το cDNA που κωδικοποιεί την εξωκυτταρική περιοχή της EMMPRIN (ECD-EMMPRIN) και περιλαμβάνει τα 2 επιμέρους τμήματα IgI και IgII, τα οποία εμφανίζονται στο πρώτο και δεύτερο πλαίσιο, αντίστοιχα.



Εικόνα 1: Το cDNA που κωδικοποιεί την εξωκυτταρική περιοχή της EMMPRIN (ECD-EMMPRIN) περιλαμβάνει τα δυο επιμέρους τμήματα IgI και IgII, τα οποία εμφανίζονται στο πρώτο και δεύτερο πλαίσιο, αντίστοιχα. Η ενδιάμεση περιοχή εκτός πλαισίου αντιστοιχεί σε μια αλληλουχία-συνδέτη μεταξύ των 2 υποπεριοχών IgI και IgII

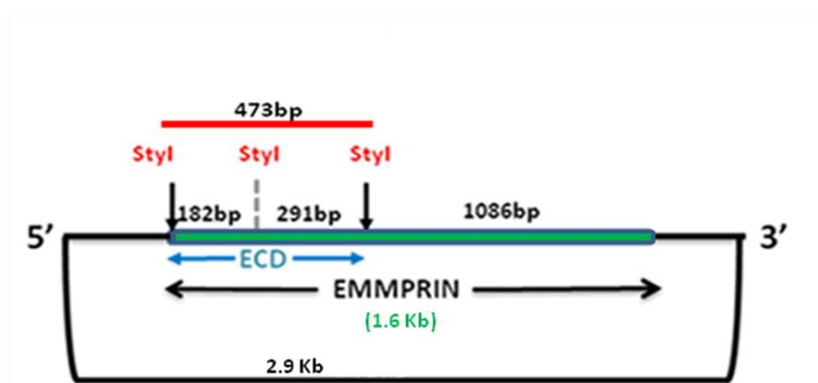
Το cDNA που κωδικοποιεί την ECD-EMMPRIN απομονώθηκε από το αρχικό πλασμίδιο pBluescript-EMMPRIN, μετά από μερική πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *StyI*. Η μερική πέψη έγινε διότι η περιοριστική ενδονουκλεάση *StyI* κόβει - εκτός από τα άκρα της περιοχής ECD - και μία φορά μέσα στην περιοχή ECD (εικόνα 2A). Μετά από μερική πέψη με το ένζυμο, ήταν δυνατή η απομόνωση ενός τμήματος 473 bp, το οποίο περιείχε ολόκληρη την cDNA περιοχή της ECD-

EMMPRIN. Κατόπιν, δημιουργήθηκαν «τυφλά άκρα» στο τμήμα αυτό, με τη δράση της πολυμεράσης Klenow, έτσι ώστε να γίνει προσθήκη νουκλεοτιδίων στο μονόκλωνο τμήμα του ενθέματος. Στη συνέχεια, το τμήμα αυτό υποκλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pPICZαB μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *EcoRI* και *XbaI*, στις οποίες επίσης είχαν δημιουργηθεί «τυφλά άκρα», ώστε μετά την ένθεση στο πλασμίδιο να υπάρχει το σωστό πλαίσιο ανάγνωσης και να γίνει δυνατή η έκφραση της ECD-EMMPRIN στην *Pichia pastoris* (εικόνες 2B, 3).

A. Η αλληλουχία της ECD-EMMPRIN στο πλασμίδιο pBluescript

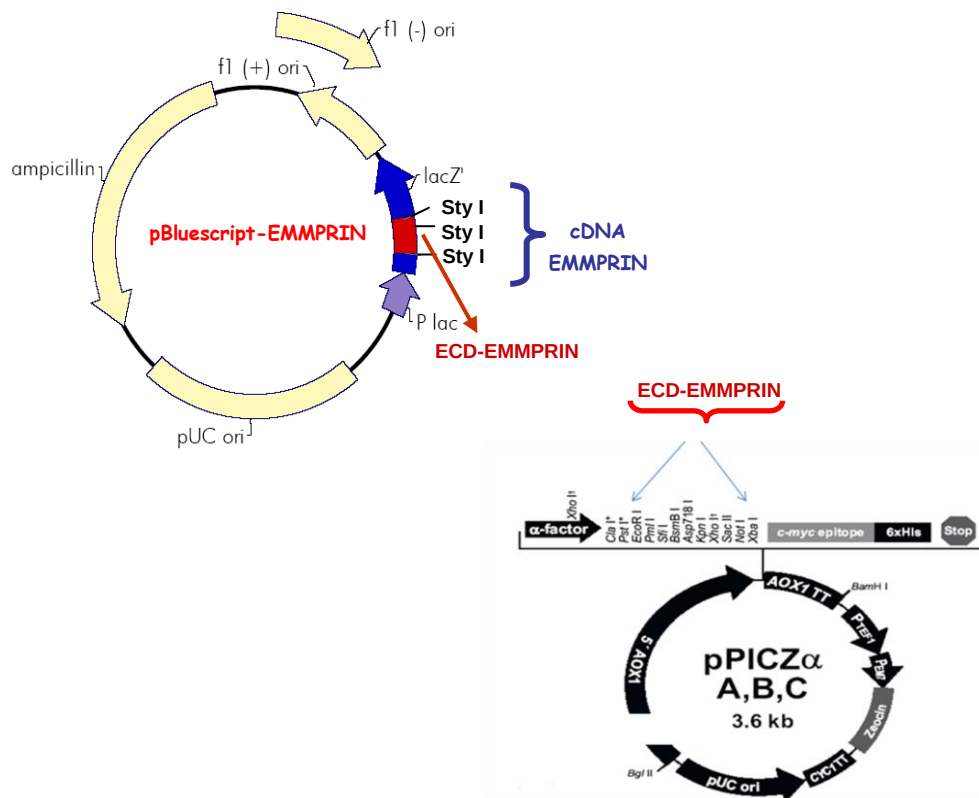


B. Θέσεις περιορισμού της *StyI* στο πλασμίδιο pBluescript-EMMPRIN



Εικόνα 2: ECD-EMMPRIN: A) Η νουκλεοτιδική αλληλουχία της ECD-EMMPRIN (με πράσινα γράμματα). B) Χάρτης του πλασμιδίου pBluescript-EMMPRIN. Διακρίνονται το 1.6 Kb cDNA της EMMPRIN (πράσινο χρώμα) και οι 3 θέσεις περιορισμού της *StyI*, οι οποίες

βρίσκονται στα άκρα και εντός της ECD της EMMPRIN και δίνουν μετά από πλήρη πέψη 3 τμήματα των 182, 291, και 4044 bp. Μετά από μερική πέψη με StyI, απομονώθηκε το τμήμα των 473 (182+291) που περιλαμβάνει όλη την ECD.

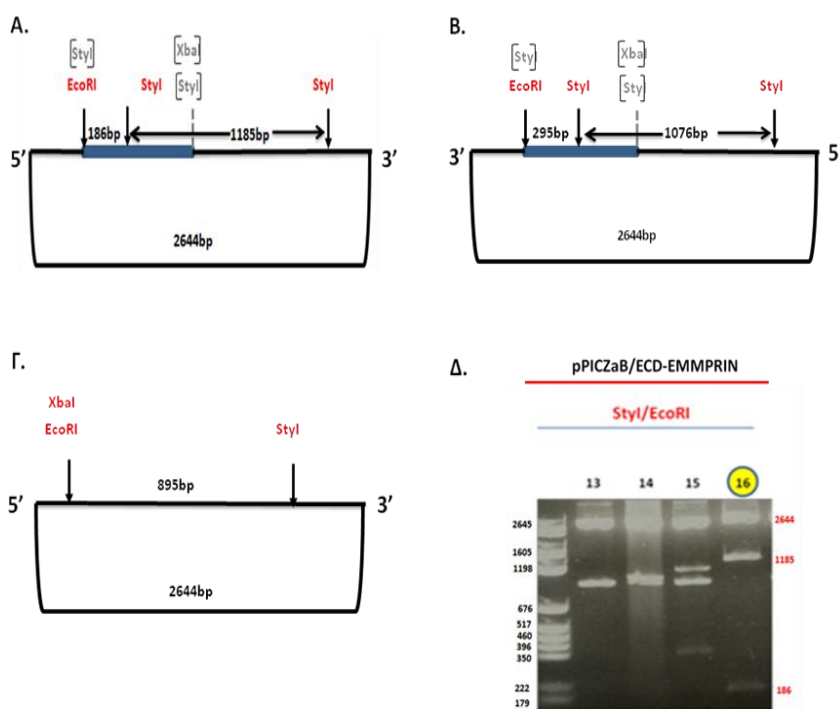


Εικόνα 3: Χάρτες των πλασμιδίων pBluescript-EMMPRIN και pPICZαB, καθώς και οι θέσεις περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την υποκλωνοποίηση της ECD-EMMPRIN .

Μετά το μετασχηματισμό των TOP10F' βακτηριακών κυττάρων *E.coli* με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, έγινε επιλογή των κλώνων σε θρεπτικό υλικό LB παρουσία ζεοσίνης και στη συνέχεια ανάπτυξη ορισμένων κλώνων σε υγρή καλλιέργεια μικρής κλίμακας για απομόνωση πλασμιδιακού DNA, με σκοπό να πιστοποιηθούν οι κλώνοι εκείνοι που φέρουν το ένθεμα στη σωστή κατεύθυνση 5'→3'. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις διπλής πέψης StyI-EcoRI του πλασμιδιακού DNA και οι πέψεις ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 2%. Στην περίπτωση της ECD-EMMPRIN (εικόνα 4A), όταν η ένθεση είναι με κατεύθυνση 5'→3',

αναμένονται 3 ζώνες, μια στα 186 bp μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *StyI*-*EcoRI*, μια στα 1185 bp μεταξύ των θέσεων *StyI*-*StyI* και μια ζώνη 2644 bp που αντιστοιχεί στο υπόλοιπο πλασμίδιο. Στην αντίθετη περίπτωση, με 3'→5' προσανατολισμό (εικόνα 4B), μεταξύ των θέσεων *EcoRI* και *StyI* αναμένεται ζώνη 295 bp, μεταξύ των θέσεων *StyI*-*StyI* μια ζώνη 1076 bp και μια ζώνη των 2644 bp. Εάν το ένθεμα δεν εισέλθει, προκύπτουν 2 ζώνες, μια στα 895 και μια στα 2644 bp (εικόνα 4Γ).

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων σε πήκτωμα αгарόζης επιβεβαίωσε την ύπαρξη του σωστά προσανατολισμένου ενθέματος στον κλώνο 16, καθώς υπήρχε η ένθεση στην επιθυμητή κατεύθυνση 5'→3' (Εικόνα 4Δ). Ο κλώνος 16 χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για παρασκευή ανασυνδυασμένων ζυμομυκήτων *P.pastoris* που θα εκφράζουν την ECD-EMMPRIN.



Εικόνα 4: Πλασμδιακοί χάρτες όπου το ένθεμα έχει μπει με κατεύθυνση:

A. 5'→3'

B. 3'→5'

Γ. Χωρίς ένθεμα

Δ. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης για πέψεις επιβεβαίωσης του προσανατολισμού ένθεσης του cDNA ECD-EMMPRIN στον πλασμδιακό φορέα pPICZaB. Με 13, 14, 15, 16 συμβολίζονται διαφορετικοί κλώνοι, όπου ο κλώνος 16 φέρει το σωστό προσανατολισμό.

A.2. Έκφραση του ανασυνδυασμένου μορίου ECD-EMMPRIN από μετασχηματισμένα στελέχη *P.pastoris* σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας

Ο πλασμδιακός κλώνος #16 (pPICZaB-ECD-EMMPRIN) έγινε γραμμικός με τη χρήση του ενζύμου *SacI* και στη συνέχεια έγινε μετασχηματισμός του στελέχους X33 της *P.pastoris* μέσω ηλεκτροδιάτασης, όπως αναφέρεται αναλυτικά (§ Γ.4, Γ.10 Υλικά και Μέθοδοι). Για την επιλογή του κλώνου που θα εκφράζει αυξημένες ποσότητες της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ECD-EMMPRIN πραγματοποιήθηκε αρχικά ανάλυση των κλώνων σε μικρή κλίμακα. Έτσι, μεμονωμένες αποικίες αναπτύχθηκαν σε τριβλία YPD-άγαρ με το κατάλληλο αντιβιοτικό (Zeocin) για 3 μέρες στους 30°C και κατόπιν αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια μικρής κλίμακας, στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό, για 16 hrs στους 30° C. Κατόπιν, έγινε επαγωγή με μεθανόλη για την έκκριση της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο της καλλιέργειας (§ Γ.11. Υλικά και Μέθοδοι). Μετά από 72 hrs επαγωγής της έκφρασης της πρωτεΐνης ECD-EMMPRIN, 200 μ L του υπερκειμένου της καλλιέργειας αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κουκκίδας (Dot blot) και τη χρήση ενός μονοκλωνικού αντι-myc αντισώματος (§ Γ.11.1. Υλικά και Μέθοδοι). Η ένταση των κουκκίδων συγκρίθηκε με την ένταση της κουκκίδας ίδιας ποσότητας υπερκειμένου ενός θετικού μάρτυρα που είχε κατασκευαστεί προηγουμένως στο εργαστήριο, της πρωτεΐνης ECD-HER2 σημασμένης με το myc επίτοπο.

Εντοπίστηκαν διάφοροι κλώνοι με περισσότερο ή λιγότερο αυξημένη έκφραση της ECD-EMMPRIN όπως φαίνεται στην εικόνα 5, όπου παρουσιάζεται ενδεικτικά η ανάλυση 4 κλώνων, εκ των οποίων ο ένας (#29) παρουσίαζε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης.



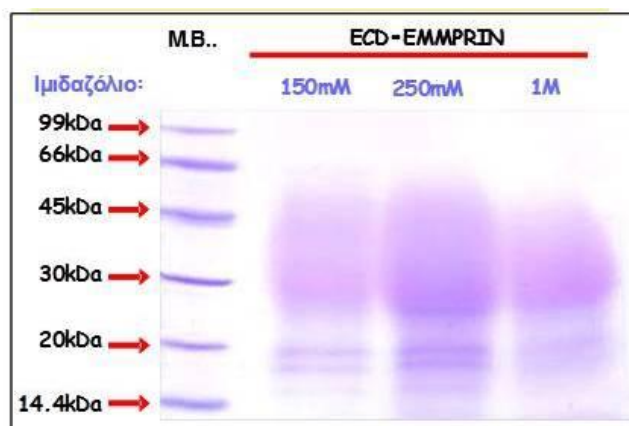
Εικόνα 5: *Ημιποσοτική ανάλυση των κλώνων έκφρασης pPICZaB-ECD-EMMPRIN με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κουκκίδας και τη χρήση αντι-myc αντισώματος*

A.3. Έκφραση μεγάλης κλίμακας του ανασυνδυασμένου μορίου ECD-EMMPRIN στην *P.pastoris*

Η καλλιέργεια της ECD-EMMPRIN σε μεγάλη κλίμακα πραγματοποιήθηκε με επαναλαμβανόμενη επιμόλυνση 4 λίτρων θρεπτικού υλικού BMGY με τον κλώνο #29 και επαγωγή επί 3 μέρες με 2.5 mL μεθανόλης, υπό ανάδευση στους 30°C (§ Γ.11.2. Υλικά και Μέθοδοι). Το υπερκείμενο της καλλιέργειας που περιείχε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ECD-EMMRPIN, διαχωρίστηκε από τα κύτταρα του ζυμομύκητα με φυγοκέντρηση, διηθήθηκε από 0.22 μm φίλτρο και συμπυκνώθηκε με ειδική συσκευή συμπύκνωσης εξοπλισμένη με μεμβράνη 1 kDa cut-off (Prep Scale-Tff Cartridges-millipore). Κατόπιν, έγινε διαπίδηση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (pH 8) και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μέσω χρωματογραφίας σε στήλη νικελίου (§ Γ.12.1. Γ.12.2 Υλικά και Μέθοδοι).

Συνοπτικά, το συμπυκνωμένο υπερκείμενο της καλλιέργειας που περιείχε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη προστέθηκε στα σφαιρίδια Ni²⁺-NTA-αγαρόζης, τα οποία επώαστηκαν υπό ανάδευση για 16 hrs στους 4°C, ώστε να προσδεθεί σε αυτά η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που φέρει τον επίτοπο 6-His. Για την αποφυγή μη ειδικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σφαιριδίων νικελίου και άλλων πρωτεϊνών με κατάλοιπα ιστιδινών, οι διαδικασίες πρόσδεσης της πρωτεΐνης και πλυσίματος της κολόνας έγιναν με διάλυμα φωσφορικού καλίου (pH 8), το οποίο περιείχε 20 mM ιμιδαζόλιο. Πραγματοποιήθηκαν 3 διαδοχικές εκλούσεις με 1 ml ρυθμιστικά διαλύματα αλάτων (50 mM KPB, 300 mM NaCl) τα οποία περιείχαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (150 mM, 250 mM και 1 M), το οποίο δρα ανταγωνιστικά στην πρόσδεση της πρωτεΐνης-6His στη στήλη νικελίου. Μετά την έκλυση, έγινε διαπίδηση της πρωτεΐνης-6His, σε ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (pH 7.4). Πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της απομονωμένης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (§ Γ.16.2 Υλικά και Μέθοδοι) και προσδιορίστηκε η απόδοση της καλλιέργειας.

Συνολικά, για κάθε 1lt καλλιέργειας μπορούσαν να απομονωθούν περίπου 0.5-0.8 mgr ανασυνδυασμένου μορίου ECD-EMMPRIN. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση της εκλούμενης πρωτεΐνης σε 12% SDS-PAGE και χρώση με Coomassie Brilliant Blue (εικόνα 6), όπου διαπιστώθηκε η μεγάλη ποικιλομορφία στη γλυκοζυλίωση του μορίου, καθώς και η ανάγκη χρήσης 250 mM ιμιδαζολίου ώστε να εκλύεται το μεγαλύτερο ποσό της πρωτεΐνης.



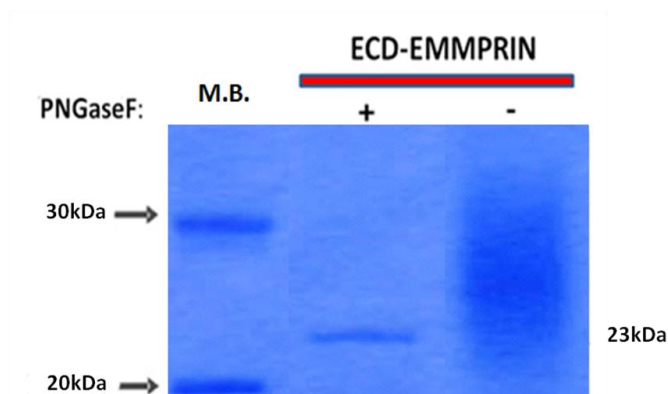
Εικόνα 6: Καθαρισμός του ανασυνδυασμένου μορίου ECD-EMMPRIN με στήλη χρωματογραφίας συγγενείας Ni^{2+} -NTA-αγαρόζης. Απεικονίζονται διαδοχικές εκλούσεις της πρωτεΐνης με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου.

A.4. Βιοχημικός χαρακτηρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ECD-EMMPRIN

A.4.1. Απογλυκοζυλίωση του μορίου

Προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο η παραγόμενη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη αντιστοιχούσε στην εξωκυτταρική περιοχή της EMMPRIN, έγινε απογλυκοζυλίωση με τη χρήση του ενζύμου PNGase F. Το ένζυμο PNGase F είναι μια αμιδάση που απομακρύνει τις αλυσίδες σακχάρων από τα κατάλοιπα ασπαραγίνης και το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που προκύπτει, είναι αυτό που αναμένεται από τις αμινοξικές αλληλουχίες. 1 μg της πρωτεΐνης απογλυκοζυλιώθηκε για 1h στους 37°C σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε αναλυτικά προηγουμένως (§ Γ.13. Υλικά και Μέθοδοι) και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε 12% SDS-PAGE και χρώση με Coomassie Brilliant Blue (§ Γ.14., Γ.17.1 Υλικά και Μέθοδοι) (εικόνα 7). Πράγματι, το μέγεθος του απογλυκοζυλιωμένου ανασυνδυασμένου μορίου ECD-EMMPRIN ήταν παρόμοιο με το αναμενόμενο από την αμινοξική αλληλουχία του, δηλαδή 23 kDa, ενώ τα

γλυκοζυλιωμένα μόρια κυμαίνονταν σε μοριακά βάρη από 20-40 kDa ανάλογα με τα μόρια σακχάρων που υπήρχαν.

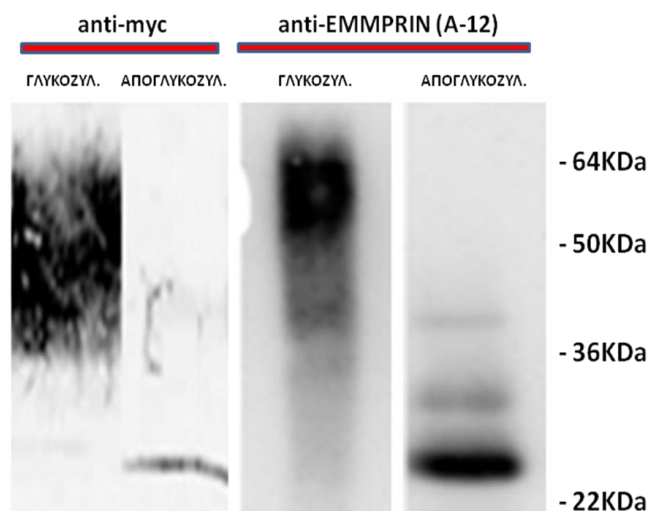


Εικόνα 7: Χρώση με Coomassie κατόπιν απογλυκοζυλίωσης της ECD-EMMPRIN με τη χρήση του ενζύμου PNGase F. Το μοριακό βάρος της απογλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης ECD-EMMPRIN εντοπίζεται γύρω στα 23 kDa σε σχέση με τη γλυκοζυλιωμένη μορφή που εμφανίζεται σαν μία φαρδιά ζώνη μεταξύ 20 και 40 kDa, λόγω διαφορετικού βαθμού γλυκοζυλίωσης του μορίου.

A.4.2. Ανάλυση κατά Western

Το ανασυνδυασμένο μόριο ECD-EMMPRIN αναλύθηκε με ανοσοστύπωμα (Western Blot) όπως περιγράφεται (§ Γ.14., Γ.15. Υλικά και Μέθοδοι). Για την ανίχνευση των μορίων χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι της ECD-EMMPRIN (anti-CD147 A-12, Santa Cruz) καθώς και του επιτόπου myc (anti-myc Ab, που είχε παραχθεί στο εργαστήριο). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε 1 µg πρωτεΐνης από την γλυκοζυλιωμένη και την απογλυκοζυλιωμένη μορφή της, ενώ τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1/1000.

Στην εικόνα 8 που ακολουθεί, απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατά Western, όπου και τα 2 τα αντισώματα αναγνώριζαν τις γλυκοζυλιωμένες και απογλυκοζυλιωμένες μορφές της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε παρόμοια μοριακά βάρη, επιβεβαιώνοντας πως η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη είναι η ECD-EMMPRIN.



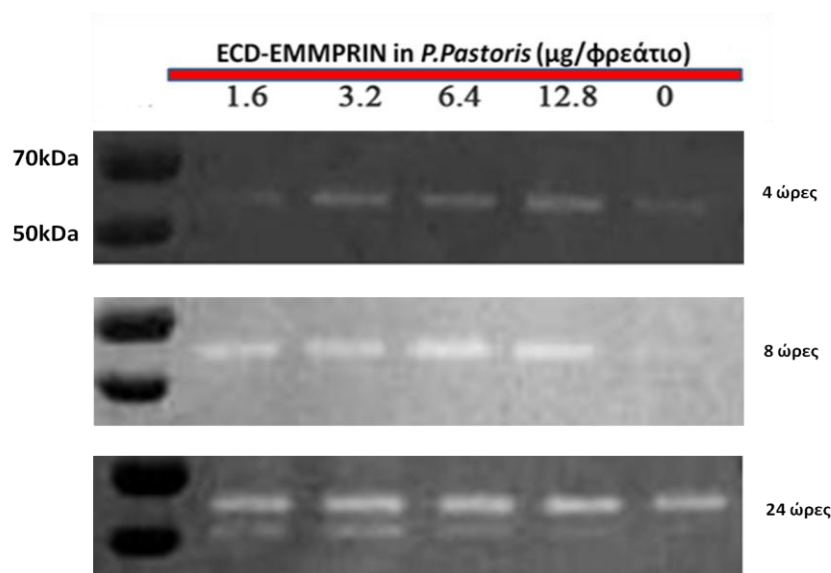
Εικόνα 8: Ποιοτική ανάλυση του γλυκοζυλιωμένου και απογλυκοζυλιωμένου μορίου ECD-EMMPRIN με ανάλυση Western και τη βοήθεια των αντισωμάτων anti-EMMPRIN (A-12) και anti-myc. Τα γλυκοζυλιωμένα μόρια εντοπίζονται σε ποικίλα μοριακά βάρη, ενώ το απογλυκοζυλιωμένο μόριο ECD-EMMPRIN εντοπίζεται περίπου στα 23 kDa.

A.5. Λειτουργικότητα της πρωτεΐνης ECD-EMMPRIN

Για να διαπιστωθεί αν το ανασυνδυασμένο μόριο ECD-EMMPRIN είναι λειτουργικό, ελέγχθηκε η ικανότητά του να επάγει τη μεταλλοπρωτεϊνάση-2 (MMP-2), με την τεχνική της ζυμογραφίας. Κατά τη διαδικασία αυτή οι μεταλλοπρωτεϊνάσες που παράγονται από το υπό εξέταση δείγμα αποικοδομούν τη ζελατίνη που υπάρχει στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης.

Ινοβλάστες δέρματος καλλιεργήθηκαν για 16 hrs σε θρεπτικό υλικό RPMI με 10% ορό και την επόμενη μέρα έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού χωρίς την παρουσία ορού (§ Γ.23. Υλικά και Μέθοδοι). Έγινε επίδραση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις της ECD-EMMPRIN (0 μg, 1.6 μg, 3.2 μg, 6.4 μg και 13.3 μg) για 4, 8 και 24 hrs στους 37°C. 10 μl από κάθε υπερκείμενο της καλλιέργειας ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS/PAGE που περιείχε 10 mg/ml ζελατίνη. Ακολούθησαν πλύσεις με το ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα ζυμογραφίας παρουσία Triton και στη συνέχεια επώαση για 16 hrs με το ίδιο διάλυμα στους 37°C απουσία Triton, προκειμένου να αρχίσουν να δρουν οι μεταλλοπρωτεϊνάσες. Στη συνέχεια, με

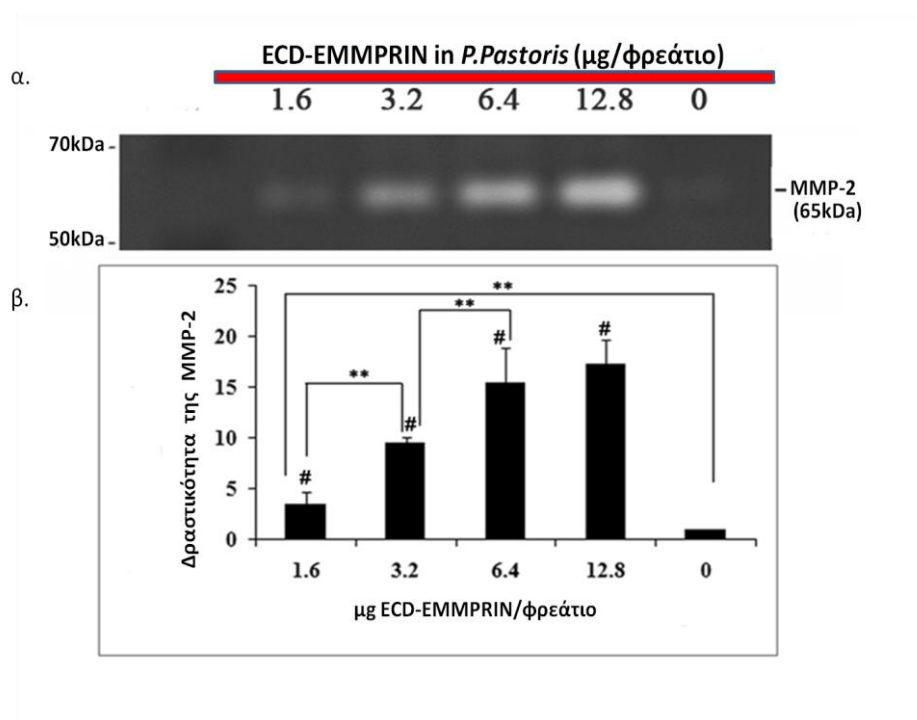
χρώση Coomassie Brilliant Blue, τα σημεία όπου οι μεταλλοπρωτεΐνάσες είχαν διασπάσει τη ζελατίνη εμφανίστηκαν σε λευκές ζώνες. Η επίδραση αυξανόμενων ποσοτήτων 1.6, 3.2, 6.4, και 12.8 $\mu\text{g}/\text{φρεάτιο}$ ECD-EMMPRIN για χρονικό διάστημα 4, 8 και 24 hrs, έδειξε μια αύξηση της έκφρασης της MMP-2 ξεκινώντας από τα 1.6 $\mu\text{g}/\text{φρεάτιο}$ (εικόνα 9).



Εικόνα 9: Ζυμογραφία ζελατίνης για τη μεταλλοπρωτεΐνάση-2 (MMP-2) κατόπιν επίδρασης της γλυκοζυλιωμένης ECD-EMMPRIN για 4, 8 και 24 hrs. Παρατηρείται αύξηση της έκφρασης της MMP-2 από τα 1.6 μg σε όλες τις ώρες επώασης.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε και αναλύθηκε η επίδραση των αυξανόμενων ποσοτήτων ECD-EMMPRIN για χρονικό διάστημα 6 hrs (εικόνα 10). Οι ζώνες ζυμογραφίας αναλύθηκαν με το πρόγραμμα ImageJ. Κάθε πείραμα έγινε τουλάχιστον 3 φορές και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά με τη χρήση των μεθόδων Kruskal–Wallis και Mann–Whitney. Η δραστηριότητα της ενεργούς μορφής της MMP-2 (65 kDa) αυξανόταν σε μεγάλο βαθμό ήδη από την προσθήκη της χαμηλότερης συγκέντρωσης ECD-EMMPRIN. Τα αποτελέσματα έδειξαν 3.53, 9.57, 15.5 και 17.36 φορές αύξηση της επαγωγής της MMP-2 κατόπιν προσθήκης 1.6, 3.2, 6.4, και 12.8 $\mu\text{g}/\text{φρεάτιο}$ ECD-EMMPRIN αντίστοιχα, σε σχέση με τους ινοβλάστες που δεν είχαν δεχτεί επίδραση της εξωγενούς ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (αρνητικό δείγμα ελέγχου). Η αύξηση της MMP-2 ήταν στατιστικά σημαντική μέχρι την προσθήκη 6.4

μg/φρεάτιο ECD-EMMPRIN, ενώ το φαινόμενο δεν ήταν στατιστικά σημαντικό όταν προστέθηκαν 12.8 μg/φρεάτιο ($p = 0.999$).



Εικόνα 10: α. Ζυμογραφική ανάλυση της επαγωγής της μεταλλοπρωτεϊνάσης 2 (MMP-2) κατόπιν επίδρασης της γλυκοζυλιωμένης ECD-EMMPRIN. Το μοριακό βάρος εντοπίζεται γύρω στα 65 kDa, ενώ παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης της MMP-2 ανάλογα με τη συγκέντρωση της προστιθέμενης εξωγενούς πρωτεΐνης (δοσοεξαρτώμενη αύξηση) έως τα 6.4 μg/φρεάτιο.

β. Στατιστική ανάλυση με τη χρήση των μεθόδων Kruskal–Wallis και Mann–Whitney. Τα σύμβολα # και ** δείχνουν την στατιστική διαφορά σε σχέση με τους ινοβλάστες που δεν είχαν προσθήκη εξωγενούς πρωτεΐνης (αρνητικό δείγμα ελέγχου 0.01).

A.6. Απομόνωση ανθρώπινου αντισώματος έναντι της ECD-EMMPRIN

Καθώς ο αρχικός σκοπός της μελέτης ήταν η απομόνωση ανθρώπινων αντισωμάτων έναντι της ECD-EMMPRIN, το ανασυνδυασμένο και λειτουργικό μόριο που παρήχθηκε στην *P. pastoris* χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα για την απομόνωση του αντισώματος. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η βιβλιοθήκη ανθρώπινων αντισωμάτων από λεμφοκύτταρα ασθενούς με καρκίνο μαστού που είχε

κατασκευαστεί στο εργαστήριο με την τεχνολογία των «φάγων-αντισωμάτων» (Belimezi et al). Η περιγραφή της βιβλιοθήκης «φάγων-αντισωμάτων» αναφέρεται αναλυτικά (§ B1. Υλικά και Μέθοδοι).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν αρχικά η ενίσχυση της βιβλιοθήκης, στη συνέχεια η διαδικασία επιλογής των ειδικών φάγων-αντισωμάτων έναντι της ECD-EMMPRIN και τέλος η ανάλυση των απομονωμένων κλώνων.

A.6.1. Ενίσχυση της βιβλιοθήκης των φάγων-αντισωμάτων

Για τη διαδικασία επιλογής, οι δύο βιβλιοθήκες (L+H) και (H+L) ενώθηκαν σε αναλογία 1:10 διότι διέφεραν μια τάξη μεγέθους στο βαθμό πικιλομορφίας τους. Οι ονομασίες (L+H) και (H+L) αντιπροσωπεύουν τη χρονική σειρά με την οποία έγινε η κλωνοποίηση στο φορέα pCOMB3H (§ Γ.9.2. Υλικά και Μέθοδοι). Κατόπιν, έγινε επιμόλυνση XL1-Blue βακτηρίων με ηλεκτροδιάταξη προκειμένου να ενισχυθεί η τελική βιβλιοθήκη. Μια ποσότητα (50 μ l) του θρεπτικού με τα βακτήρια χρησιμοποιήθηκε για τιτλοδότηση (input) και στην υπόλοιπη έγινε προσθήκη βοηθητικού φάγου M13 ώστε να απομονωθούν νέα φαγεμίδια, τα οποία θα εκφράζουν στην επιφάνεια της ουράς τους τα Fab τμήματα και θα ξεκινήσει ο κύκλος επιλογής των ειδικών φάγων-αντισωμάτων έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής της EMMPRIN. Υπολογίστηκε ο αριθμός των αποικιών των βακτηρίων που έχουν επιμολυνθεί από φάγους σε cfu/ μ g, η οποία ήταν 2.22×10^{11} cfu/ μ g. Ο τίτλος αυτός υποδεικνύει την πολυπλοκότητα (complexity) της βιβλιοθήκης από την οποία ξεκινά η επιλογή.

A.6.2. Επιλογή φάγων-αντισωμάτων έναντι της ECD-EMMPRIN

Μέσω μιας σειράς επαναλαμβανόμενων κύκλων επιλογής παρουσία του αντιγόνου επιλέγεται ο φάγος με το ειδικό αντίσωμα, το οποίο έχει θεωρητικά τη μεγαλύτερη συγγένεια για το αντιγόνο ECD-EMMPRIN. Καθένας από αυτούς τους κύκλους περιλαμβάνει τέσσερα στάδια: α) πρόσδεση των ειδικών φάγων στο αντιγόνο-στόχο, β) διαδοχικές πλύσεις αυξανόμενης αυστηρότητας για την απομάκρυνση των μη ειδικών φάγων, γ) έκλουση σε χαμηλό pH για την ανάκτηση των ειδικών φάγων για το αντιγόνο και δ) πολλαπλασιασμό τους με επιμόλυνση βακτηρίων για να εισέλθουν σε νέο κύκλο επιλογής.

Η επιλογή πραγματοποιήθηκε σε 4 φρεάτια πλάκας ELISA, που ήταν επικαλυμμένα με 1 μg από την καθαρή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ECD-EMMPRIN, εκφρασμένη στο ζυμομύκητα *P.pastoris*. Ο αριθμός των εκπλύσεων αυξανόταν διαδοχικά από μία έκπλυση στον 1^ο κύκλο επιλογής, σε 3 και 6 εκπλύσεις στους επόμενους 2 κύκλους επιλογής, ενώ διατηρήθηκε σταθερός στις 10 εκπλύσεις για τους υπόλοιπους κύκλους έως το τέλος της διαδικασίας επιλογής. Ο χρόνος επώασης των φάγων-αντισωμάτων με το αντιγόνο, ήταν 2 hrs για τους 4 πρώτους κύκλους και στη συνέχεια μειώθηκε στις 1.5 hrs μέχρι το τέλος της διαδικασίας της επιλογής.

Οι συνθήκες αυτές διαμορφώθηκαν με σκοπό την αύξηση των συνθηκών αυστηρότητας κατά την επιλογή, για την απομόνωση Fab τμημάτων με μεγάλη συγγένεια ως προς το αντιγόνο (§ Γ.9.3 Υλικά και Μέθοδοι). Σε κάθε κύκλο επιλογής γινόταν τιτλοποίηση τόσο των εκλουόμενων φάγων όσο και των φάγων που προστίθονταν σε κάθε νέο κύκλο επιλογής μετά την ενίσχυσή τους.

Η πορεία της επιλογής στα 4 φρεάτια συνοψίζεται στην εικόνα 11. Η τάξη της μείωσης του τίτλου των εκλουόμενων φάγων, μειώθηκε σταδιακά στους πρώτους κύκλους επιλογής και έφτασε έως και $\sim 10^3$ φορές στον 4 κύκλο επιλογής, ενώ στη συνέχεια παρατηρήθηκε αύξηση η οποία έφτανε έως και τις 1000 φορές στον τελευταίο κύκλο επιλογής.

Στην εικόνα 11B παρουσιάζεται η διαγραμματική απεικόνιση του τίτλου κατά την πορεία της επιλογής και για τα 4 φρεάτια. Η επιλογή ήταν επιτυχής διότι υπήρξε διατήρηση ενός σταθερά υψηλού τίτλου φάγων (input) της τάξεως του 10^{11} - 10^{12} που εισέρχονται σε κάθε κύκλο επιλογής. Ο τίτλος των εκλουόμενων φάγων ξεκίνησε από υψηλά επίπεδα, συνεχίστηκε σε χαμηλά και επανήλθε σε υψηλά επίπεδα στο τέλος της διαδικασίας.

Η αυξητική πορεία του τίτλου μετά τους 4 πρώτους κύκλους επιλογής υποδηλώνει τον επιτυχή εμπλουτισμό του πληθυσμού με φάγους που φέρουν ειδικά Fab τμήματα ειδικά για το αντιγόνο ECD-EMMPRIN.

A.

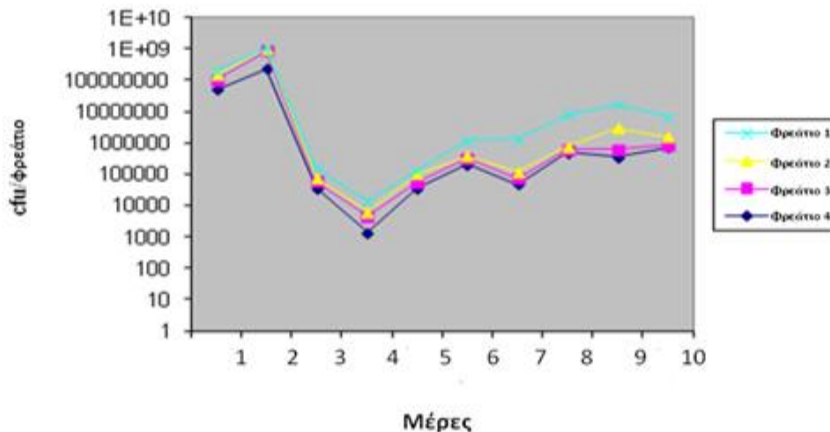
	1 ^η ημέρα	2 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	4 ^η ημέρα	5 ^η ημέρα	6 ^η ημέρα	7 ^η ημέρα	8 ^η ημέρα	9 ^η ημέρα	10 ^η ημέρα
Τίτλος φάγων μετά την έκλυση	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Τίτλος μετά τον πολλαπλασιασμό του φάγου	5*10 ⁷	2.34*10 ⁸	3.6*10 ⁴	1.4*10 ³	3.6*10 ⁴	2*10 ⁵	4.8*10 ⁴	5*10 ⁵	3.6*10 ⁵	7.2*10 ⁵
Φρεάτιο 1	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9

Τίτλος φάγων μετά την έκλυση	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Τίτλος μετά τον πολλαπλασιασμό του φάγου	5*10 ⁷	6*10 ⁸	2.4*10 ⁴	3.12*10 ³	1.9*10 ⁴	1.2*10 ⁵	2.4*10 ⁴	9.6*10 ⁴	2.4*10 ⁵	1.2*10 ⁵
Φρεάτιο 2	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9

Τίτλος φάγων μετά την έκλυση	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Τίτλος μετά τον πολλαπλασιασμό του φάγου	5*10 ⁷	1.38*10 ⁸	1.2*10 ⁴	1.8*10 ³	4.8*10 ⁴	5.6*10 ⁴	4.8*10 ⁴	1.44*10 ⁵	2.28*10 ⁶	7.2*10 ⁵
Φρεάτιο 3	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9

Τίτλος φάγων μετά την έκλυση	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Τίτλος μετά τον πολλαπλασιασμό του φάγου	5*10 ⁷	6.3*10 ⁷	8.4*10 ⁴	7.2*10 ³	3.24*10 ⁴	8*10 ⁵	1.2*10 ⁶	6.96*10 ⁶	1.38*10 ⁷	5*10 ⁶
Φρεάτιο 4	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9

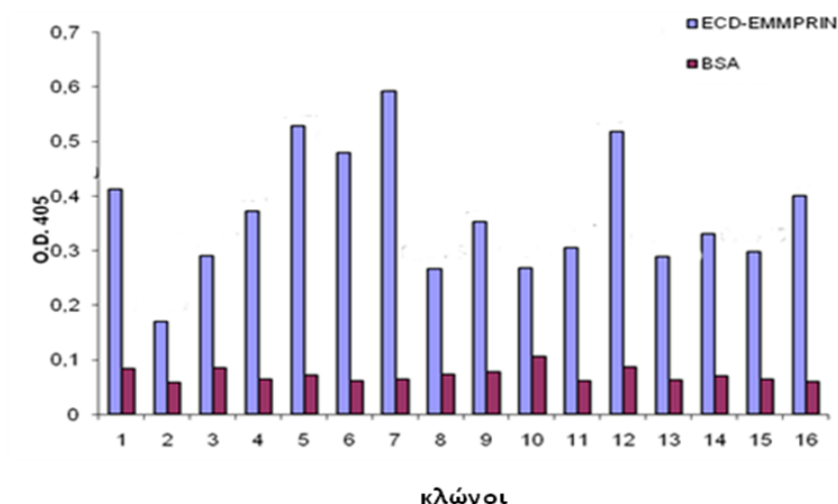
B.



Εικόνα 11: A. Τίτλος ειδικών εκλουόμενων φάγων και τίτλος πολλαπλασιασμού των φάγων που επιμόλυναν τα βακτήρια σε κάθε νέο κύκλο επιλογής.
 B. Διάγραμμα του τίτλου των εκλουόμενων φάγων από τα 4 φρεάτια, κατά τη διαδικασία επιλογής. Πραγματοποιήθηκαν 10 κύκλοι επιλογής, όπως φαίνεται στο άξονα X. Είναι εμφανής η σημαντική πτώση του τίτλου στον 4^ο κύκλο επιλογής και η σημαντική αύξησή του κατά την ολοκλήρωση των 10 κύκλων επιλογής, χαρακτηριστικό του εμπλουτισμού των ειδικών φάγων ως προς το αντιγόνο επιλογής.

Α.6.3. Απομόνωση μεμονωμένων κλώνων φάγων-αντισωμάτων και ανάλυση με τη μέθοδο ELISA

Στο τέλος της διαδικασίας επιλογής, ακολούθησε η ανάπτυξη μεμονωμένων αποικιών σε υγρή καλλιέργεια και η απομόνωση των ειδικών φάγων που θα ελεγχθούν σε δοκιμασία ELISA ως προς την ειδικότητά τους για την ECD-EMMPRIN (§ Γ.20.1. Υλικά και Μέθοδοι). 0.1 μg της ECD-EMMPRIN επώαστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) για 16 hrs στους 4°C. Την επόμενη μέρα, έγινε αρχικά επώαση με διάλυμα PBS/γάλα για 2 hrs στους 37°C για τον κορεσμό των μη ειδικών θέσεων και την αποφυγή πρόσδεσης των φάγων-αντισωμάτων σε αυτές και κατόπιν επώαση με 50 μl φάγων-αντισωμάτων για 1h στους 37°C. Ακολούθησαν εκπλύσεις με PBS/Tween 0.5% και προσθήκη αντισώματος αντι-M13 για 1.30 hrs σε RT. Ανάλογα με το 2^ο αντίσωμα (συζευγμένο με υπεροξειδάση ή φωσφατάση), η μέτρηση γινόταν στα 450 ή 405 nm αντίστοιχα. Αναλύθηκαν 16 κλώνοι από αποικίες που είχαν αναπτυχθεί από το 4^ο φρεάτιο, που είχε τη μεγαλύτερη μείωση στον τίτλο των φαγεμιδίων στην 4^η έκπλυση και στη συνέχεια παρουσίασε αρκετά ικανοποιητική αύξηση.



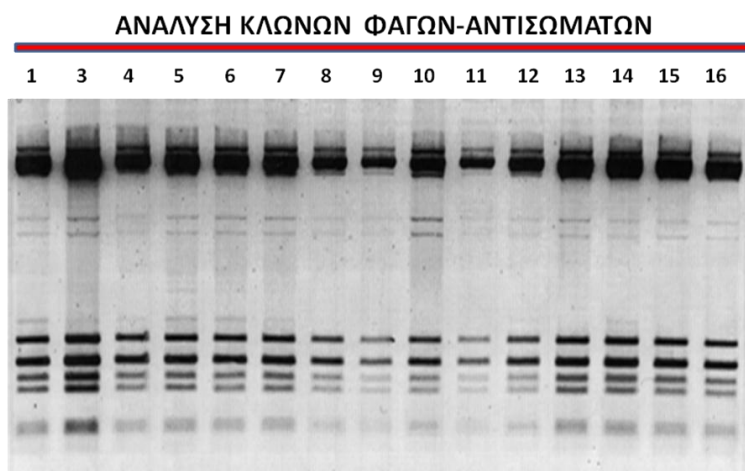
Εικόνα 12: Έλεγχος της ειδικότητας φάγων-αντισωμάτων με δοκιμασία ELISA από το φρεάτιο 4. Η φασματοφωτομετρική ανάλυση των κλώνων παρουσίασε υψηλές τιμές κατά την επώαση του μόνο με την ECD-EMMPRIN, ενώ οι τιμές του για το BSA, που αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα, ήταν σε χαμηλά επίπεδα.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 12, αρκετοί κλώνοι είχαν υψηλή ειδικότητα ως προς την ECD-EMMPRIN σε σχέση με το αντιγόνο BSA που είχε χρησιμοποιηθεί σαν αρνητικό δείγμα ελέγχου. Η σύγκριση αυτή είναι ποιοτική ως προς την ικανότητα των φαγεμιδίων να αναγνωρίζουν το συγκεκριμένο αντιγόνο και σε καμία περίπτωση δεν μπορεί να θεωρηθεί ποσοτική, αφού δεν λαμβάνεται υπόψη ο αριθμός των φαγεμιδίων που εμπεριέχεται στο υπερκείμενο της καλλιέργειας.

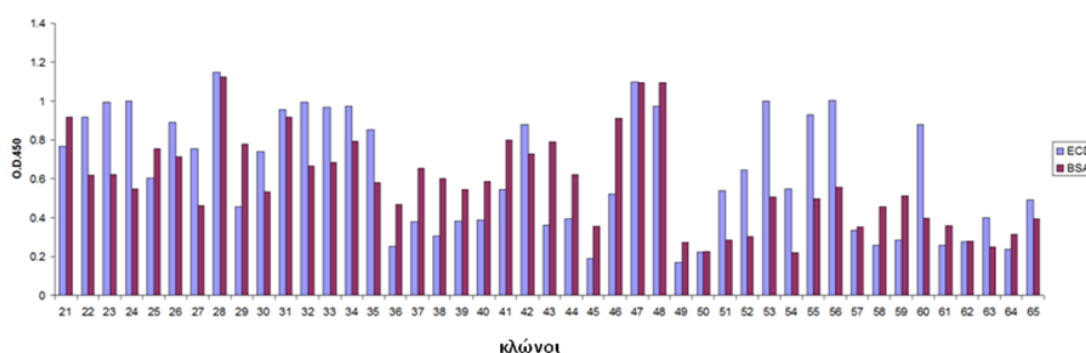
A.6.4. Απομόνωση μεμονωμένων κλώνων φάγων-αντισωμάτων και fingerprinting ανάλυση

Για τη διαφοροποίηση των κλώνων φάγων-αντισωμάτων μεταξύ τους έγινε ανάλυση “fingerprinting” του πλασμιδιακού DNA. Μεμονωμένες αποικίες αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό LB, απομονώθηκε DNA από τους κλώνους που ελέγχθηκαν στην ELISA και έγινε ανάλυση-fingerprinting μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *BstNI*. Η ποιοτική ανάλυση της πέψης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 2%, όπως εμφανίζεται στην εικόνα 13, έδειξε ότι σε όλους τους υπό εξέταση κλώνους, η κατανομή των ζωνών DNA μετά την πέψη ήταν πανομοιότυπη. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν στο ότι ενισχύθηκε ο ίδιος κλώνος, άρα έγινε πολύ καλή επιλογή φάγου-αντισώματος στο συγκεκριμένο φρεάτιο. Επιλέχθηκαν δυο κλώνοι, οι #5 και #7, για πλήρη ανάλυση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας και να πιστοποιηθεί αναλυτικότερα η ομοιότητά τους (Αποτελέσματα A.6.5.).

Παράλληλα, ελέγχθηκαν και τα υπόλοιπα 3 φρεάτια μήπως βρεθούν και άλλοι ειδικοί κλώνοι με διαφορετική αλληλουχία cDNA από αυτήν που είχαν οι κλώνοι από το φρεάτιο 4. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τη μέθοδο ELISA και DNA fingerprinting, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Στην εικόνα 14, η ELISA έδειξε ότι η πλειοψηφία των κλώνων ήταν θετικοί έναντι του αντιγόνου ECD-EMMPRIN, με αυξημένο θόρυβο έναντι της BSA. Οι θετικοί κλώνοι (π.χ. 53, 54, 55, 56 κλπ) ελέγχθηκαν με DNA fingerprinting ανάλυση, όπου και αυτοί οι κλώνοι είχαν το ίδιο μοτίβο ανάλυσης στο πήκτωμα αгарόζης, όπως οι κλώνοι από το φρεάτιο 4.



Εικόνα 13: DNA «fingerprinting» των κλώνων που απομονώθηκαν από τη διαδικασία επιλογής των φάγων-αντισωμάτων μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *BstNI* και ανάλυση σε 2% πήκτωμα αгарόζης



Εικόνα 14: Έλεγχος της ειδικότητας κλώνων φάγων-αντισωμάτων έναντι της ECD-EMMPRIN με δοκιμασία ELISA από τα φρεάτια 1, 2 και 3

Το συμπέρασμα που πρέκυψε από την επιλογή «φάγων-αντισωμάτων» της συγκεκριμένης βιβλιοθήκης είναι ότι ενισχύθηκε ένας μόνο κλώνος, όπου το Fab τμήμα που εκφράστηκε στο φαγεμίδιο είχε μεγάλη συγγένεια για το αντιγόνο ECD-EMMPRIN.

A.6.5. Νουκλεοτιδική και αμινοξική ανάλυση του Fab5 και Fab7

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τους 2 θετικούς κλώνους (#5, #7) για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των VH και VL τμημάτων των αντισωμάτων χρησιμοποιώντας τα εναρκτήρια μόρια *PelB*,

SEQG2 και OmpA, SEQkb, αντίστοιχα, τα οποία έχουν περιγραφεί αναλυτικά (§ A.7. Υλικά και Μέθοδοι).

Οι κλώνοι αποδείχτηκαν ταυτόσημοι. Εντοπίστηκαν στην αλληλουχία οι υπερμεταβλητές περιοχές CDR (Complementarity Determining Region) των μεταβλητών περιοχών των αντισωμάτων, με τη χρήση της βάσης δεδομένων Kabat και NCBI. Κατά την παραπάνω μελέτη βρέθηκε ότι το VH-cDNA τμήμα του Fab7, παρουσίαζε υψηλότερη ομολογία με τα γονίδια V4, D2 και J4 των βαριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών, ενώ το VL-cDNA τμήμα με τα γονίδια VK1 και J4. Στην εικόνα 15 παρατίθεται η στοίχιση των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών του Fab7 μορίου, με τις ακολουθίες των CDRs να βρίσκονται εντός πλαισίου.

A.

```

                                CDR-H1
E V Q L L E W G P G L V K P S G T L S L T C A V S G G S I R D S N W W G
GAGGTGCAGCTGCTCGAGTGGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGGGACCCCTGTCCCTCAACCTGCCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGGGATAGTAATTGGTGGGGT

                                CDR-H2
W V R Q P P G K G L E W I G E I Y H S G T T N Y N F S L K S R V T I S V
TGGGTCCGCCAGCCCCAGGGAGGGGCTGGAGTGGATTGGGTAATCTATCATATGTGGAGCCCACTACACCCGTCCTCAGAGGTGGAGTCAACCATATCAGTA

                                CDR-H3
D K S K N Q F S L N L S S V T A A D T A V Y Y C A R E D C S Y G S C Y F D Y
GACAAGTCCAAGAACAGTTCCTCCGTGAACCTGAGTTCTGTGACCGCGCGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAAGGATTGCAGTTATGGTAGCTGCTACTTTGACTAC

W G Q G T L V T V S S
TGGGGCCAGGGAAACCTTGGTCAACCGTCTCCTCA

```

B.

```

                                CDR-L1
E L T L T Q S P S S L S A S L G D R V T I R C R A S Q S I S A A L N W Y Q Q
GAGCTCACACTCAGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTTTAGGGGACAGAGTCACCATCAGGTGCAGGGCAAGTCAGAGCATTAGCGCCGCTTTAAATTTGGTATCAGCAG

                                CDR-L2
K P G K A P K L L I H D V S T L Q S G V P A R F S G G G S E T D F T L T I S
AAACAGGGGAAAGCCCTTAAGCTCCTGATTCTATGATGTGTCCACTTTGCAAGTTGGGTCCCTGCAAGGTTCAAGTGGCGGGGGTCTGAGACAGATTCTACTCTCACCATCAGC

                                CDR-L3
S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y R V F L T F F G G G T R L E I K
AGTCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACCGTGTTCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCCGGCTAGAGATCAAG

```

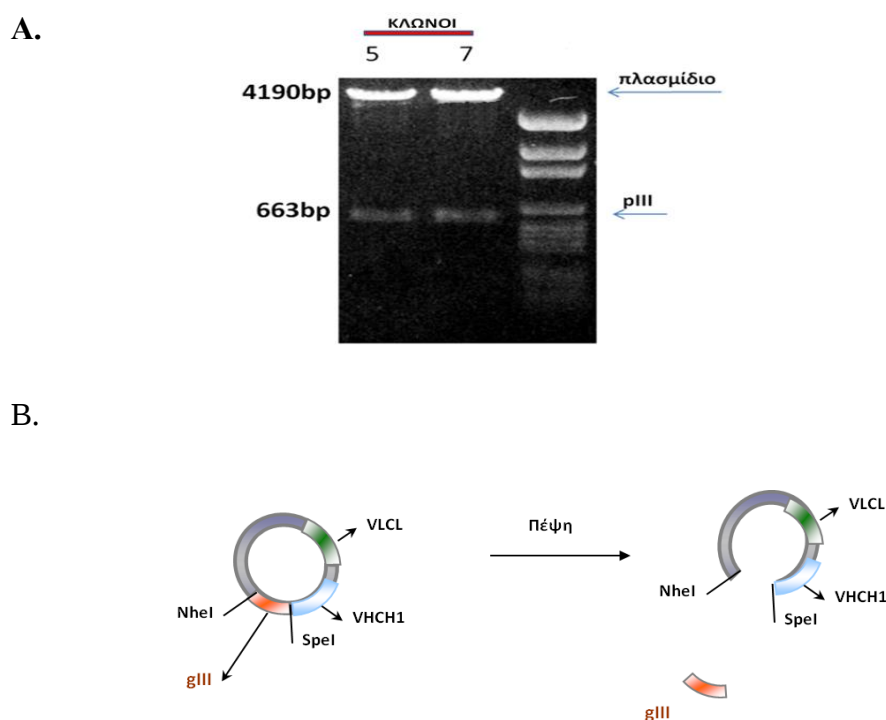
Εικόνα 15: Νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία των (A) VH και (B) VL περιοχών των Fab5 και Fab7. Οι CDR περιοχές εμφανίζονται με πράσινο χρώμα και είναι σε κόκκινο πλαίσιο.

A.6.6. Διαλυτή έκφραση των Fab τμημάτων των αντισωμάτων

Για τη διαλυτή έκφραση του Fab τμήματος του αντισώματος των κλώνων 5 και 7, έπρεπε πρώτα να απομακρυνθεί από το πλασμίδιο η περιοχή που κωδικοποιεί για την rIII πρωτεΐνη του φάγου. Η περιοχή αυτή απομακρύνθηκε από το DNA του φαγεμιδίου με τη χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών *NheI* και *SpeI*. Στην

εικόνα 16 παρουσιάζονται τα προϊόντα πέψης *SpeI-NheI* των κλώνων 5 και 7 σε πήκτωμα 1% αγαρόζης (§ Γ.4. Υλικά και Μέθοδοι).

Κατά την παραπάνω πέψη προκύπτει ένα τμήμα 663 bp που αντιστοιχεί στο γονίδιο *gIII* και μία ζώνη μεγέθους ~4190 bp που αντιστοιχεί στο υπόλοιπο πλασμίδιο *pComb3H* με τα *VHCH1* και *VLCL* τμήματα του αντισώματος. Το DNA των 4190 bp απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης, το οποίο στη συνέχεια επανακυκλοποιήθηκε με T4 λιγάση και έγινε μετασχηματισμός XL1 βακτηριακών κυττάρων (§ Γ.5., Γ.8. Υλικά και Μέθοδοι). Ορισμένοι κλώνοι αναπτύχθηκαν σε μικρή κλίμακα, για να ελεγχθεί η σωστή αποκοπή του τμήματος και στη συνέχεια μια αποικία αναπτύχθηκε σε μεγάλη κλίμακα (§ Γ.9.4., Γ.9.5. Υλικά και Μέθοδοι).

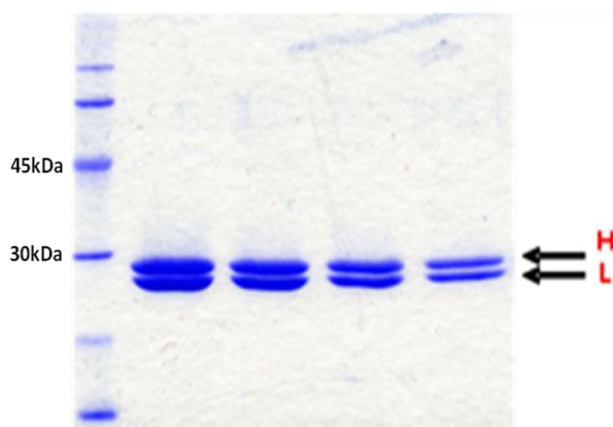


Εικόνα 16: *A. Έλεγχος αντίδρασης διπλής πέψης *NheI-SpeI* παρασκευασμάτων φαγικού DNA με ηλεκτροφόρηση σε 1% κ.β. πήκτωμα αγαρόζης*
*B. Σχηματική αναπαράσταση των διπλών πέψεων του DNA των φάγων. Σημειώνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων που περικλείουν την ακολουθία του *gIII* που αποκόπτεται.*

Η καλλιέργεια του Fab7 αναπτύχθηκε μέχρι μία οπτική πυκνότητα 0.6-0.8 και στη συνέχεια έγινε επαγωγή με 1% IPTG στους 30°C για 16 hrs. Το Fab7

καθαρίστηκε από το περίπλασμα των βακτηρίων με χρωματογραφία συγγένειας σε κολόνα protein G στο FPLC (AKTA, GE Healthcare). Η έκλουση έγινε με διαλύματα γλυκίνης (pH 2.7), το pH του οποίου εξουδετερώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα Tris (pH 9) και στη συνέχεια έγινε διαπίδση σε φωσφορικό διάλυμα PBS (§ Γ.9.6. Υλικά και Μέθοδοι).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 17, η ανάλυση διαδοχικών εκλουσμάτων από το FPLC σε 12% SDS/PAGE, έδειξε ότι η πρωτεΐνη Fab7 εμφανίζεται στο πήκτωμα ακρυλαμίδιου ως μία διπλή ζώνη ύψους ~25 kDa. Η υψηλότερη ζώνη αντιστοιχεί στο τμήμα της βαριάς αλυσίδας VHCH1, ενώ η χαμηλότερη στην VLCL αλυσίδα του Fab7, η οποία είναι μικρότερου μεγέθους. Η ποσοτικοποίηση του Fab7 πραγματοποιήθηκε με Bradford, όπως έχει περιγραφεί στα Υλικά και Μέθοδοι (§ Γ.16.2. Υλικά και Μέθοδοι). Η απόδοση της καλλιέργειας σε Fab7 προσδιορίστηκε περίπου σε 0.5 mg-1 mg/lit καλλιέργειας. Το Fab7 αποθηκεύτηκε στους -80°C για περαιτέρω χρήση.



Εικόνα 17: Ποιοτική ανάλυση του Fab7. Ηλεκτροφορήθηκαν 5 μ l από 4 διαφορετικά εκλούσματα και το αντίσωμα Fab7 εμφανίζεται στο πήκτωμα ακρυλαμίδιου μετά από χρώση με Coomassie ως μία διπλή ζώνη ύψους ~25 kDa. Η υψηλότερη ζώνη (H) αντιστοιχεί στο VHCH1 τμήμα της βαριάς αλυσίδας, ενώ η χαμηλότερη (L) στη VLCL αλυσίδα.

A.7. Κατασκευή ολόκληρου του ανθρώπινου μονοκλωνικού αντισώματος mAb7

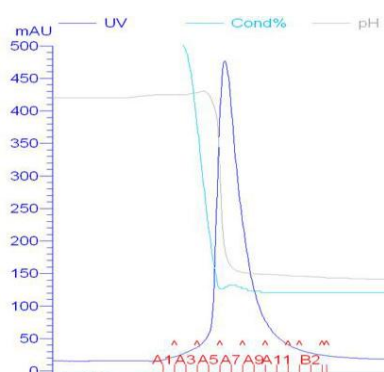
Για την κατασκευή ολόκληρου του ανθρώπινου αντισώματος, πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση των cDNA VHCH1 και VLCL του Fab7 στον φορέα έκφρασης pIgGI (Barbas Lab, Scripps Research Institute), με τη βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων *BstEII*, *XhoI* για τη βαριά αλυσίδα και *SacI*, *XbaI* για την ελαφριά αλυσίδα. Η υποκλωνοποίηση του τμήματος VH-CH1 γίνεται μπροστά από το υπόλοιπο τμήμα της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (CH2-CH3) (εικόνα 18A), ώστε να προκύπτει ολόκληρη η βαριά αλυσίδα του αντισώματος.

Με τη βοήθεια της λιποφεκταμίνης, έγινε σταθερός μετασχηματισμός των κυττάρων CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary), ώστε να εκφραστεί στο υπερκείμενο της καλλιέργειας ολόκληρο το αντίσωμα (§ Γ.18. Υλικά και Μέθοδοι). Μετά τον μετασχηματισμό των κυττάρων, έγινε επιλογή και ανάπτυξη των ανθεκτικών κλώνων με τη χρήση της ουσίας MSX, ενός αναστολέα παραγωγής της γλουταμίνης, καθώς ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει το γονίδιο του ενζύμου συνθάσης της γλουταμίνης (GS-glutamine synthetase).

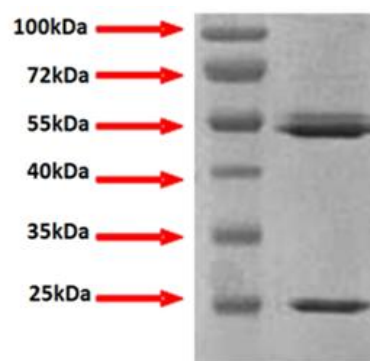
Ο έλεγχος της ειδικότητας των παραγόμενων αντισωμάτων έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής της EMMPRIN, από διαφορετικούς κλώνους που αναπτύχθηκαν, έγινε με ELISA. Επιλέχθηκε ένας θετικός κλώνος ο οποίος εξέφραζε σε υψηλή συγκέντρωση το αντίσωμα και παράχθηκε σε μεγάλη κλίμακα. Το αντίσωμα απομονώθηκε από το υπερκείμενο της καλλιέργειας των κυττάρων με FPLC σε στήλη protein G (§ Γ.9.6. Υλικά και Μέθοδοι) (εικόνα 18). Τα εκλούσματα που εμπεριείχαν αντίσωμα, συνενώθηκαν και έγινε διαπίδηση σε PBS.

Η απόδοση παραγωγής του mAb7 ήταν μεταξύ 1.5-3 mg/L. Η ποιοτική ανάλυση του αντισώματος mAb7 έγινε με ηλεκτροφόρηση σε 12% SDS-PAGE και χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Όπως φαίνεται στην εικόνα 18B, η βαριά αλυσίδα του αντισώματος mAb7 εντοπιζόταν στα 50 kDa και η ελαφριά αλυσίδα στα 25 kDa.

A.



B.



Εικόνα 18: *A. Διάγραμμα έκλουσης του αντισώματος mAb7 μετά από καθαρισμό με κολόνα ανοσοσυγγενείας protein G. Τα 7 κλάσματα A1-B2 αντιστοιχούν στην περιοχή έκλουσης του αντισώματος από τη στήλη.*

Γ. Ποιοτική ανάλυση του mAb7 μετά τον καθαρισμό. Η βαριά και η ελαφριά αλυσίδα του mAb7 εντοπίζονται στα 50 kDa και 25 kDa μετά από χρώση με Coomassie Brilliant Blue.

A.8. Βιοχημικός χαρακτηρισμός των μορίων Fab7 και mAb7

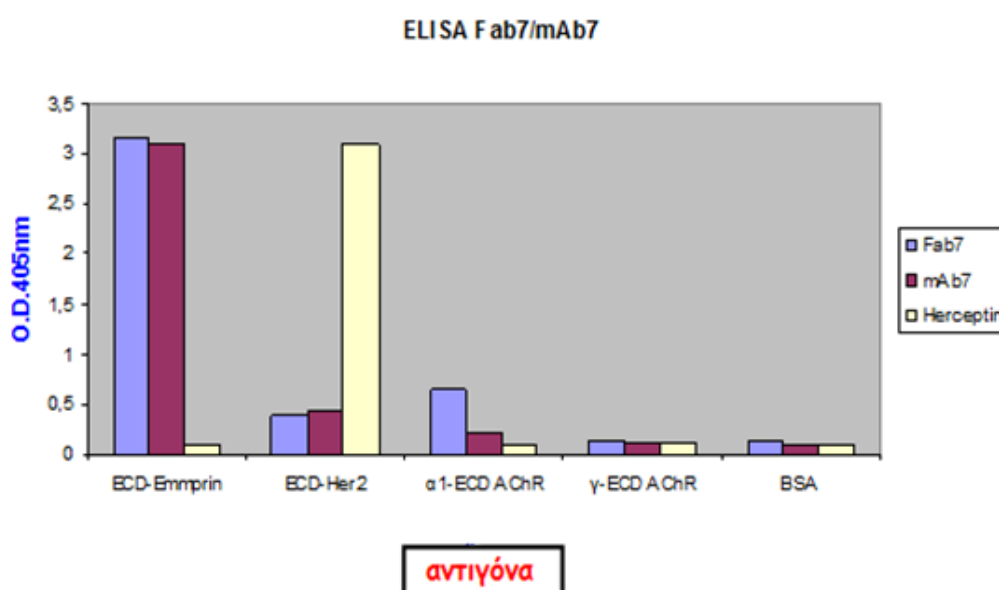
A.8.1. Ανάλυση με τη μέθοδο ELISA

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό των Fab7 και mAb7 ήταν απαραίτητο να εξετασθεί η ειδικότητα τους ως προς το ανασυνδυασμένο ECD-EMMPRIN με ανάλυση ELISA. Ως αρνητικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν άλλα αντιγόνα που είχαν εκφραστεί στην *P.pastoris*. Η ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων έγινε χρησιμοποιώντας αντίσωμα κατσίκας έναντι ανθρώπινης IgG(F(ab')₂ συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση ή με υπεροξειδάση.

0.1μg των ανασυνδυασμένων μορίων ECD-EMMPRIN και των αντιγόνων ECD-HER2, α1-ECD AChR, γ-ECD AChR και BSA επιστρώθηκαν εις διπλούν σε πλάκες ELISA για 16 hrs στους 4°C. Την επόμενη μέρα έγινε κορεσμός των ελεύθερων προς πρόσδεση θέσεων, για 1h στους 37°C με BSA 3%. Κατόπιν, έγινε επώαση με 1 μg από τα Fab7, mAb7 και Herceptin (ένα ανθρωποποιημένο αντίσωμα έναντι του Her2/neu) για 1h στους 37°C, εκπλύσεις με διάλυμα PBS-Tween, επίδραση δεύτερου αντισώματος έναντι του ανθρώπινου Fab τμήματος συνδεδεμένου

με μόρια αλκαλικής φωσφατάσης και φωτομέτρηση στα 405nm (§ Γ.20.1. Υλικά και Μέθοδοι).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 19, το Fab7 και το mAb7 αναγνώρισαν μόνο την εξωκυτταρική περιοχή της EMMPRIN και κανένα από τα άλλα αντιγόνα που χρησιμοποιήθηκαν σαν αρνητικά δείγματα ελέγχου. Το Herceptin που αποτελούσε το θετικό δείγμα ελέγχου της ανάλυσης, αναγνώρισε μόνο το αντίστοιχο αντιγόνο ECD-HER2. Τα αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα πως το Fab7 και mAb7 ήταν ειδικά για την ECD- EMMPRIN.



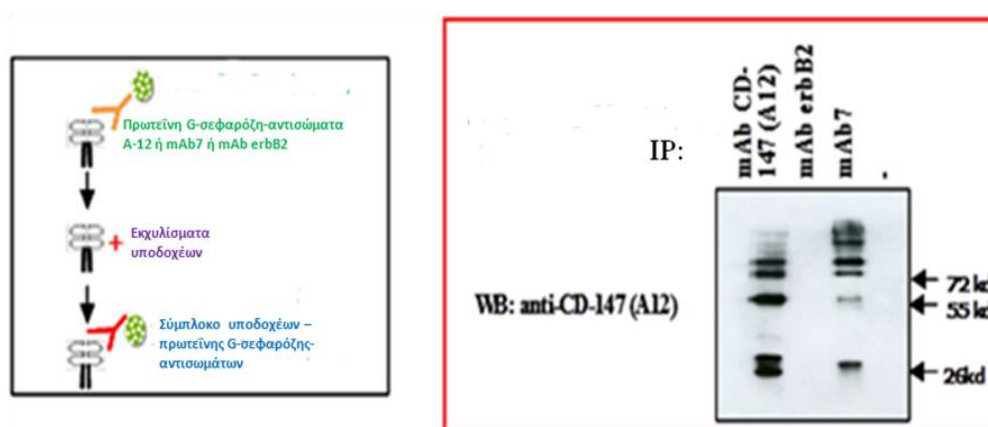
Εικόνα 19: Έλεγχος της ειδικότητας των Fab7 και mAb7 με δοκιμασία ELISA. Η φασματοφωτομετρική ανάλυση παρουσίασε υψηλές τιμές για τα Fab7 και mAb7 (άξονας ψ) κατά την επώαση του μόνο με την ECD-EMMPRIN. Το Herceptin αναγνώρισε την ECD-HER2 και χρησιμοποιήθηκε σαν δείγμα θετικού ελέγχου της αντίδρασης.

A.8.2. Αναγνώριση του φυσικού μορίου EMMPRIN με ανοσοκαθίζηση

Στη συνέχεια εξετάστηκε η ειδικότητα των Fab7 και mAb7 ως προς την ειδικότητά τους στο φυσικό υποδοχέα της EMMPRIN, σε πειράματα ανοσοκαθίζησης και ανάλυση κατά Western (§ Γ.14., Γ.20.2. Υλικά και Μέθοδοι). Χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα υποδοχέων από την καρκινική κυτταρική σειρά ωοθηκών, SkOV-3, που υπερεκφράζει την EMMPRIN. Το εκχύλισμα επώαστηκε για 16 hrs στους 4°C με το

σύμπλοκο protein G-Sepharose-Ab, όπου Ab ήταν εναλλακτικά το mAb7 ή το mAb A-12 του εμπορίου έναντι της EMMPRIN (anti-CD147, A-12, Santa Cruz) ή το αντίσωμα anti-erbB2 του εμπορίου έναντι του HER2/neu (anti-c-erbB2, 9G6, Santa Cruz) ως αρνητικό δείγμα ελέγχου. Στη συνέχεια, έγινε έκλουση από το σύμπλοκο των προσδεδεμένων πρωτεϊνών στα αντισώματα και πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Western με anti-EMMPRIN αντίσωμα του εμπορίου (A-12, Santa Cruz). Στην εικόνα 20, φαίνεται ξεκάθαρα η ειδικότητα του mAb7, το οποίο μπορούσε να καθιζάνει το φυσικό υποδοχέα της EMMPRIN, όπως και το αντίσωμα anti-EMMPRIN του εμπορίου, ενώ το anti-HER2 αντίσωμα, όπως αναμενόταν, δεν είχε καμία αλληλεπίδραση.

Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι mAb7 μπορούσε να καθιζάνει περισσότερο τα μόρια της EMMPRIN με μεγαλύτερη γλυκοζυλίωση (highly glycosylated- HG-EMMPRIN), σε σχέση με το αντίσωμα του εμπορίου anti-EMMPRIN (A-12, Santa-Cruz).



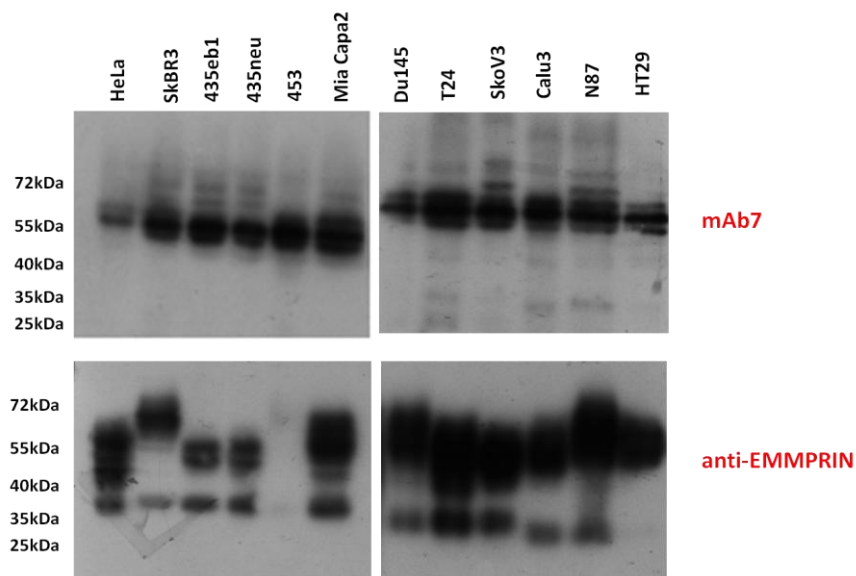
Εικόνα 20: Ανοσοκαθίζηση (IP) των αντισωμάτων anti-EMMPRIN (anti-CD147, A-12) και mAb7 με το φυσικό υποδοχέα EMMPRIN

A.8.3. Αναγνώριση του φυσικού μορίου EMMPRIN σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές με ανάλυση κατά Western

Η αλληλεπίδραση του mAb7 με το φυσικό υποδοχέα της EMMPRIN ελέγχθηκε σε καρκινικές κυτταρικές σειρές με ανάλυση κατά Western. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν από διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές όπως: HeLa (καρκίνος τραχήλου της μήτρας), SkBR3, MDA-MB-435, MDA-453 (καρκινικές

σειρές μαστού), MDA-435-eb1 (τα οποία έχουν μετασχηματιστεί ώστε να υπερεκφράζουν τον HER2/neu), Mia Capa2 (καρκίνος παγκρέατος), Du145 (καρκίνος προστάτη), T24 (καρκίνος ουροδόχου κύστης), SkOV3 (καρκίνος ωοθηκών), Calu3 (καρκίνος πνεύμονα), N87 (καρκίνος στομάχου), HT29 (καρκίνος παχέος εντέρου). Όπως περιγράφεται στις Μεθόδους (§ Γ.14. Υλικά και Μέθοδοι), 30 μg πρωτεϊνών διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα 12% SDS-PAGE και η EMMPRIN ανιχνεύτηκε με το anti-EMMPRIN αντίσωμα του εμπορίου mAb A-12 ή με το mAb7.

Στην εικόνα 21 παρατηρήθηκε ότι το mAb7 μπορούσε να ανιχνεύσει την EMMPRIN σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν. Σε σύγκριση με το αντίσωμα του εμπορίου υπήρχαν διαφοροποιήσεις στην ανίχνευση των διάφορων μορφών γλυκοζυλίωσης. Το mAb7 αναγνώριζε καλύτερα ορισμένες μορφές της EMMPRIN με υψηλά ποσοστά γλυκοζυλίωσης (HG-EMMPRIN), ενώ δεν ανίχνευε τα χαμηλής γλυκοζυλίωσης μόρια.



Εικόνα 21: Western Blot με κυτταρικά εκχυλίσματα από καρκινικές κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν την EMMPRIN, με το (A) mAb7 και (B) το mAb του εμπορίου A-12.

A.8.4. Έλεγχος της αναστολής της διηθητικής ικανότητας καρκινικών κυττάρων παρουσία των Fab7 και mAb7

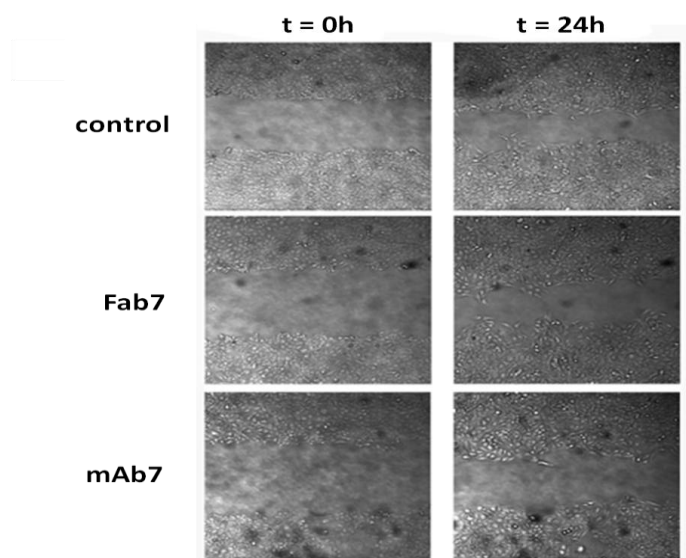
Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να διηθούνται αποτελεί το χαρακτηριστικό γνώρισμα του μεταστατικού φαινοτύπου. Για τη μελέτη της μετάστασης, έχουν αναπτυχθεί *in vitro* δοκιμασίες οι οποίες μιμούνται την *in vivo* πορεία. Αυτές είναι: α) η δοκιμασία «επούλωσης πληγής» (wound healing) και β) η μέθοδος διήθησης της εξωκυττάριας ουσίας Boyden chamber, η οποία χρησιμοποιεί ως φραγμό το Matrigel, που αποτελεί τη μεσοκυττάρια ουσία. Χρησιμοποιήθηκαν και οι 2 προσεγγίσεις για να ελεγχθεί η ικανότητα του Fab7 και του mAb7 στην αναστολή της διηθητικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων.

A.8.4.1. Έλεγχος της αναστολής της μεταναστευτικής ικανότητας καρκινικών κυττάρων παρουσία των Fab7 ή mAb7 με τη δοκιμασία «επούλωσης πληγής».

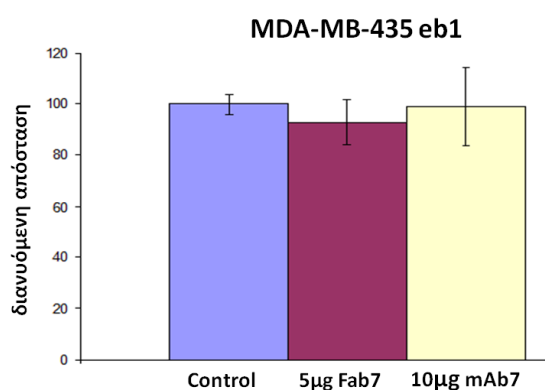
Η πιθανή δράση των ανασυνδυασμένων ανθρώπινων αντισωμάτων στην μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε *in vitro* με τη δοκιμασία «επούλωσης πληγής» (§ Γ.21. Υλικά και Μέθοδοι). Αρχικά τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πυκνότητα 10^5 κύτταρα ανά φρεάτιο σε πλάκα 48 φρεατίων για 24 hrs και στη συνέχεια το υλικό καλλιέργειας αντικαταστάθηκε από υλικό χωρίς ορό. Μετά από 16 hrs δημιουργήθηκε μια ευθύγραμμη περιοχή ελεύθερη κυττάρων (χρόνος μηδέν) και αμέσως μετά το υλικό καλλιέργειας αντικαταστάθηκε από φρέσκο υλικό με ή χωρίς την παρουσία αντισώματος. Χρησιμοποιήθηκαν δύο συγκεντρώσεις αντισώματος, 5 μg Fab7 ή 10 μg mAb7. Τα κύτταρα αφέθηκαν να μεταναστεύουν για 24 hrs ή 48 hrs και η μέτρηση της διανυόμενης από τα κύτταρα απόστασης, υπολογίστηκε με τη βοήθεια του μικροσκοπίου Leica DM IL και του προγράμματος Image Pro Plus Analysis. Η διαφορά του μέσου πλάτους της κενής περιοχής στον τελικό χρόνο από το μέσο πλάτος της αντίστοιχης περιοχής στο χρόνο μηδέν, υποδεικνύει την μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων. Η δοκιμασία «επούλωσης πληγής» παρουσία Fab7 και mAb7 πραγματοποιήθηκε σε καρκινικές σειρές κυττάρων MDA-MB-435-eb1 (μετασχηματισμένα με το cDNA του HER-2 και υπερεκφράζουν τον υποδοχέα HER-2) και SkOv3 (καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα HER-2). Τα πειράματα «επούλωσης πληγής» επαναλήφθηκαν τουλάχιστον 3 φορές.

Στην εικόνα 22, παραθέτονται ενδεικτικά οι 0 h και 24 hrs επώασης των κυττάρων MDA-MB-435 eb1 με το mAb7. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, παρουσία 5 μ g Fab7 ή 10 μ g mAb7 για 24 hrs στο υλικό καλλιέργειας δεν κατόρθωσε να αναστείλει το ρυθμό μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων στο μεταναστευτικό κενό σε σχέση με τις καλλιέργειες-μάρτυρες. Μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα υπήρξαν και για τις 48 hrs. Παρόμοιες παρατηρήσεις υπήρξαν και με την καρκινική σειρά των ωοθηκών SkOV3.

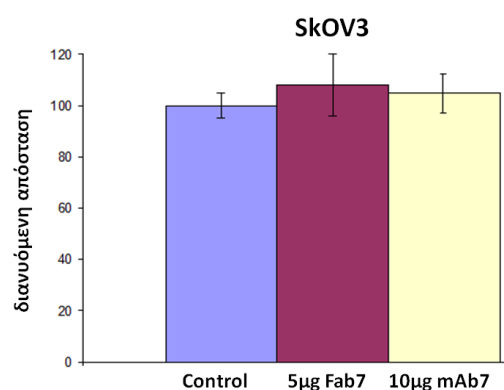
A.



B1.



B2.



Εικόνα 22: A. Μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων MDA-MB-435-eb1 (wound healing assay) απουσία ή παρουσία αντισώματος mAb7 και Fab7, στις 24 hrs επώασης.

B. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η μετανάστευση των κυττάρων που παρατηρήθηκε στο δείγμα ελέγχου θεωρήθηκε σαν 100% επούλωση. Τα διαγράμματα αντιστοιχούν σε πειράματα που έχουν επαναληφθεί τουλάχιστον 3 φορές, μετά από την επώαση των κυττάρων απουσία ή παρουσία αντισώματος mAb7 και Fab7 για 24hrs. B1. MDA-MB-435 eb1 B2. SKOV3

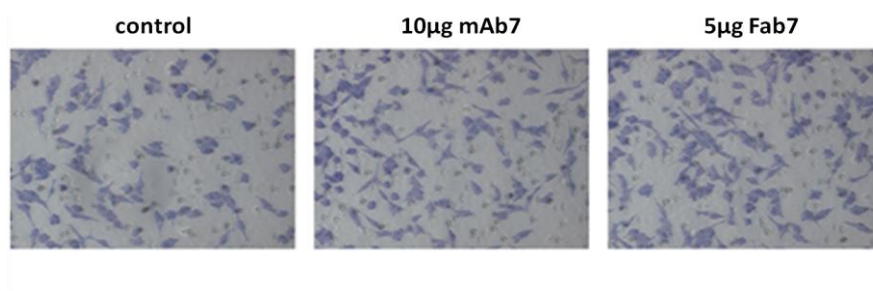
A.8.4.2. Έλεγχος της αναστολής της διηθητικής ικανότητας καρκινικών κυττάρων παρουσία των Fab7 ή mAb7 αντισωμάτων.

Η δράση των αντισωμάτων Fab7 ή mAb7 δοκιμάστηκε επίσης σε πειράματα αναστολής της διηθητικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων. Για τη μελέτη αυτού του φαινομένου τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στα ειδικά φρεάτια, τα οποία έφεραν ένα πορώδες φίλτρο στο κάτω μέρος τους, επιστρωμένο με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας. Η διηθητική ικανότητα των κυττάρων, διαπιστώνεται με την πέψη των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας και τη διέλευση των κυττάρων μέσω των πόρων στην κάτω πλευρά του φίλτρου (§ Γ.22. Υλικά και Μέθοδοι).

Για τη δοκιμασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι καρκινικές σειρές MDA-435-eb1 και SkOV3 όπως και στα προηγούμενα πειράματα. Είναι γνωστό ότι η καρκινική σειρά μαστού MDA-435-eb1 παρουσιάζει μεγάλη διηθητικότητα (Grothey et al). Τα κύτταρα αυτά επώαστηκαν για 24 hrs με 10μg mAb7 ή 5μg Fab7. Όσα κύτταρα είχαν μεταναστεύσει (διαπέρασαν το πορώδες υλικό) μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη, βάφτηκαν με χρώση Giemsa και κατόπιν μετρήθηκε ο αριθμός τους στο οπτικό μικροσκόπιο (§ Γ.22. Υλικά και Μέθοδοι). Όπως φαίνεται στην εικόνα 23, η επίδραση 10μg mAb7 ή 5μg Fab7 δεν ήταν ικανή να αναχαιτίσει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων.

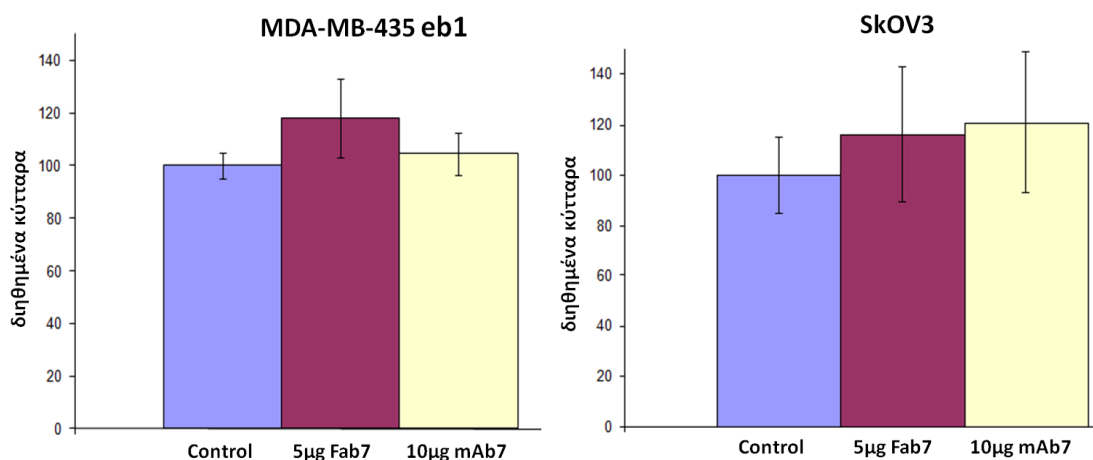
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τα δείγματα που επώαστηκαν παρουσία αντισωμάτων δεν παρουσίασαν μείωση στη διηθητική τους ικανότητα. Παρατηρήθηκε ότι τα αντισώματα ίσως μπορούσαν να επάγουν ακόμα περισσότερο τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων, αλλά ανάλυση κατά ANOVA έδειξε πως δεν ήταν στατιστικά σημαντική η διαφορά στη διήθηση των κυττάρων κατόπιν επίδρασης των αντισωμάτων. Αντίστοιχες παρατηρήσεις υπήρξαν και στις 48 hrs ή 72 hrs. Παρόμοια αποτελέσματα υπήρχαν και για την καρκινική σειρά SkOV3 (τα πειράματα επαναλήφθηκαν και στις δυο κυτταρικές σειρές τουλάχιστον 3 φορές).

A.



B1.

B2.



Εικόνα 23: *A. Μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων MDA-MB-435-eb1 στην in vitro μέθοδο κυτταρικής διήθησης (matrigel invasion assay) απουσία ή παρουσία αντισώματος 10µg mAb7 ή 5µg Fab7.*
B. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων στη διηθητική ικανότητα των κυττάρων απουσία ή παρουσία αντισώματος 10µg mAb7 ή 5µg Fab7 B1. MDA-435-eb1 και B2. SkOV3.

A.9. Έλεγχος της λειτουργικότητας του αντισώματος mAb7 ως προς την επαγωγή της MMP-2 με τη μέθοδο της ζυμογραφίας

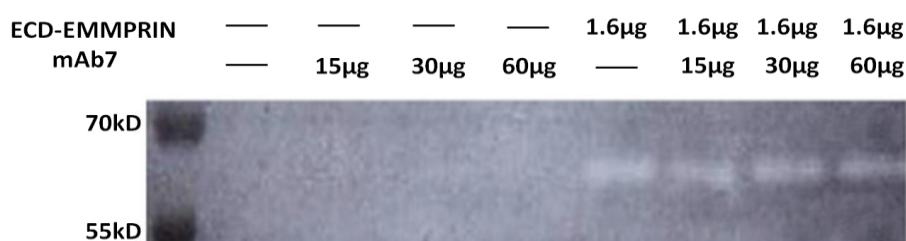
Καθώς τα αντισώματα δεν ήταν ικανά να αναχαιτίσουν την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, ελέγχθηκε η ικανότητα του mAb7 να επάγει την MMP-2, καθώς υπάρχουν αναφορές ότι ένα αντίσωμα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής της EMMPRIN μπορούσε να επάγει την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών (Toole et al). Ο

έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ζυμογραφίας (§ Γ.23. Υλικά και Μέθοδοι).

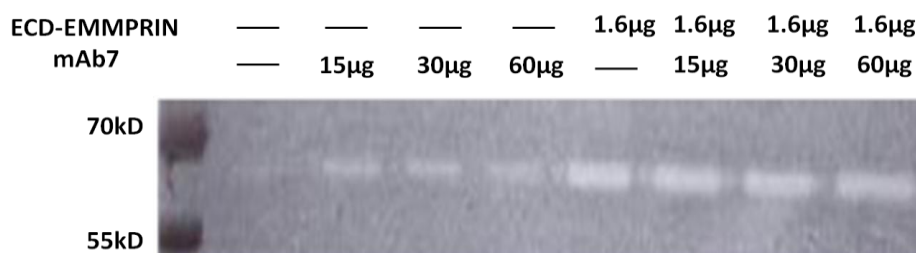
Πιο συγκεκριμένα, έγινε επίδραση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αντισώματος mAb7 σε ινοβλάστες, παρουσία ή απουσία ECD-EMMPRIN. Οι ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν για 16 hrs σε θρεπτικό υλικό RPMI με 10% ορό και την επόμενη έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού χωρίς την παρουσία ορού και επώαση με 1.6 µg ανασυνδυασμένης ECD-EMMPRIN απουσία mAb7 ή σε συνδυασμό με 15 µg, 30 µg, 60 µg mAb7. Τα δείγματα επώαστηκαν για 8 και 24 hrs στους 37°C και με τη μέθοδο της ζυμογραφίας ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν τη δράση της ECD-EMMPRIN στην επαγωγή της MMP-2. 10µl από κάθε υπερκείμενο της καλλιέργειας ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα 10% SDS-PAGE που περιείχε 10 mg/ml ζελατίνης, στα 120V στους 4°C. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολούθησαν 3 πλύσεις στους 37°C (από 15 min τη φορά) με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, μια πλύση με σκέτο 2.5% Triton X-100 (ώστε να απομακρυνθεί το SDS) και έγινε επώαση με το ίδιο ρυθμιστικό απουσία απορρυπαντικού για 16 hrs στους 37°C. Σε χρώση με Coomassie Brilliant Blue τα σημεία όπου οι MMPs είχαν διασπάσει τη ζελατίνη φάνηκαν σα λευκές ζώνες (§ Γ.23. Υλικά και Μέθοδοι).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 24, το mAb7 μπορούσε να επάγει αύξηση στα επίπεδά της MMP-2 στους ινοβλάστες σε σχέση με το δείγμα ελέγχου μόνο στις 24 hrs. Ο συνδυασμός με την ECD-EMMPRIN δε φάνηκε να έχει συνεργιστικό φαινόμενο καθώς οι ζώνες που αντιστοιχούσαν στα δείγματα παρουσία και ECD-EMMPRIN και mAb7 είχαν παρόμοια ένταση με εκείνη της επώασης με σκέτο ECD-EMMPRIN.

A.



B.



Εικόνα 24: Έλεγχος της λειτουργικότητας του αντισώματος mAb7 (A) στις 8 hrs και (B) 24 hrs με ζυμογραφία ζελατίνης. Στις 24 hrs, παρατηρείται έκφραση της MMP-2 παρουσία του αντισώματος mAb7 σε ποσότητες 15 μg, 30 μg και 60 μg.

Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε ότι το ανθρώπινο αντίσωμα έναντι της ECD-EMMPRIN που απομονώθηκε από τη βιβλιοθήκη των φάγων-αντισωμάτων ασθενούς με HER2+ καρκίνο, ήταν ικανό να ενεργοποιήσει την επαγωγή της MMP-2 σε καλλιέργειες ινοβλαστών.

B. Ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN στο ζυμομύκητα *P.pastoris*

Συνοπτικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το αντίσωμα που απομονώθηκε έναντι της ECD-EMMPRIN δεν παρεμποδίζει τη δράση της EMMPRIN σχετικά με την επαγωγή της MMP-2, αλλά αντίθετα φαίνεται να την ενισχύει. Έτσι, κρίθηκε αναγκαίο να χρησιμοποιηθούν μικρότερα τμήματα όπως οι υποπεριοχές IgI και IgII της εξωκυτταρικής περιοχής της EMMPRIN για την επιλογή παρεμποδιστικών ανασυνδυασμένων ανθρώπινων αντισωμάτων τα οποία θα ήταν ικανά να αναχαιτίσουν τη δράση της EMMPRIN στην επαγωγή των MMPs. Η χρησιμοποίηση μικρότερης περιοχής για την επιλογή των αντισωμάτων στους κύκλους του biopanning, ίσως βοηθούσε σε μια πιο στοχευμένη επιλογή. Η επιλογή - εκτός της IgI περιοχής που θεωρείται η υπεύθυνη για την επαγωγή των MMPs - και της IgII σαν αντιγόνο επιλογής, έγινε διότι υπάρχουν ορισμένες ενδείξεις που τις προσδίδουν και αυτή τη δράση (Guo et al. 1997; Sun et al. 2001).

Παράλληλα, κρίθηκε αναγκαίο να διερευνηθεί πιο στοχευμένα η συμβολή των υποπεριοχών IgI και IgII της εξωκυτταρικής περιοχής της EMMPRIN στην επαγωγή

των MMPs και να μελετηθεί κατά πόσο η γλυκοζυλίωση συμβάλλει στη δράση αυτή καθώς υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις (Guo et al. 1997; Zucker et al. 2001; Belton et al. 2008).

Για το λόγο αυτό, εκτός από την υποκλωνοποίηση και έκφραση των IgI και IgII τμημάτων της ECD-EMMPRIN στο ζυμομύκητα *P.pastoris*, πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση και έκφραση στο βακτήριο *E.coli*, προκειμένου να παραχθούν και σε μη γλυκοζυλιωμένη μορφή. Αυτό ήταν αναγκαίο διότι η απογλυκοζυλίωση του μορίου με το ένζυμο PNGase F δεν ήταν πλήρης. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η λειτουργικότητα των υποπεριοχών IgI και IgII της εξωκυτταρικής περιοχής της EMMPRIN στην επαγωγή των MMPs και στη συνέχεια έγινε σάρωση της βιβλιοθήκης ανθρώπινων αντισωμάτων, προκειμένου να απομονωθεί ένα παρεμποδιστικό αντίσωμα που θα μπορούσε να αναστείλει τη λειτουργία της EMMPRIN.

B.1. Κλωνοποίηση των μορίων IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN στο φορέα έκφρασης pPICZaB

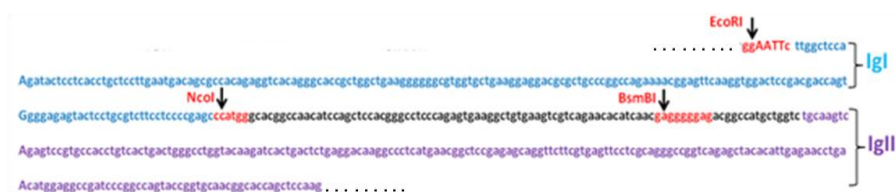
Για την υποκλωνοποίηση των τμημάτων IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pPICZaB-ECD-EMMPRIN, το οποίο περιέχει όλη την ECD περιοχή της EMMPRIN. Η υποκλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε σε 2 στάδια.

A) Για την IgI-EMMPRIN, στο cDNA του ενθέματος ECD-EMMPRIN έγινε πέψη με NcoI, προσθήκη νουκλεοτιδίων με την πολυμεράση *Klenow* και στη συνέχεια πέψη με το ένζυμο *EcoRI*. Το τμήμα αυτό κλωνοποιήθηκε στη συνέχεια στο πλασμίδιο pPICZaB μεταξύ των θέσεων *XbaI* και *EcoRI*, όπου αρχικά έγινε πέψη με *XbaI*, επεξεργασία με *Klenow* στα μονόκλωνα άκρα και στη συνέχεια πέψη με *EcoRI*.

B) Η εξωκυτταρική περιοχή IgII-EMMPRIN προέκυψε μετά από πέψεις με *EcoRI*-*BsmBI* για την απομάκρυνση του τμήματος IgI, επίδραση με *Mung Bean* για την αποκοπή των μονόκλωνων άκρων και επανακυκλοποίηση του πλασμιδίου με την λιγάση T4.

Στην εικόνα 25 φαίνεται αναλυτικά η αλληλουχία των ενθεμάτων και οι θέσεις περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τις παραπάνω κατασκευές πάνω στην αλληλουχία.

IgI και IgII EMMPRIN στο πλασμίδιο pPICZaB



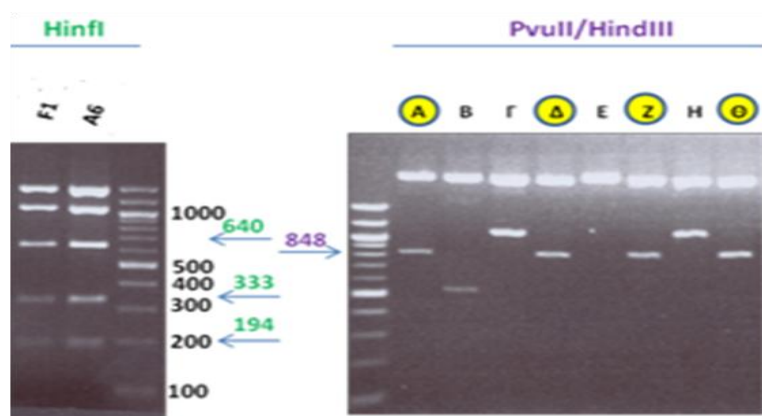
Εικόνα 25: Α. Αλληλουχία cDNA των *IgI*-EMMPRIN και *IgII*-EMMPRIN που περιλαμβάνεται στο πλασμίδιο *pPICZaB-ECD-EMMPRIN*. Με γαλάζιο χρώμα φαίνεται η αλληλουχία του *IgI* και με μωβ χρώμα η αλληλουχία *IgII*. Σημειώνονται επίσης οι θέσεις περιορισμού των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των επιμέρους πλασμιδίων έκφρασης *IgI* και *IgII*-EMMPRIN

TOP10F' βακτηριακά κυττάρια μετασχηματίστηκαν με τα αντίστοιχα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και ακολουούθησε παραγωγή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα και αντιδράσεις πέψης προς επιβεβαίωση της ορθής κατεύθυνσης 5'→3' των ενθεμάτων. Αναλύθηκαν διάφοροι κλώνοι για την *IgI*-EMMPRIN και *IgII*-EMMPRIN με διάφορα ένζυμα περιορισμού, για την επιβεβαίωση των κατασκευών. Στην εικόνα 26 φαίνονται μερικές ενδεικτικές πέψεις ελέγχου:

1) Για την ***IgI*-EMMPRIN** πραγματοποιήθηκε μονή πέψη με *HinfI*, όπου οι ζώνες των 1493, 934bp, 646bp, 333bp και 191bp υποδεικνύουν τη σωστή κατασκευή. Αυτές ανιχνεύθηκαν στους κλώνους F1 και A6.

2) Για την ***IgII*-EMMPRIN** πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη με *PvuII* και *HindIII* όπου αναμένεται μια ζώνη στα 848bp. Οι θετικοί κλώνοι που ανιχνεύθηκαν ήταν οι A,Δ,Z,Θ.

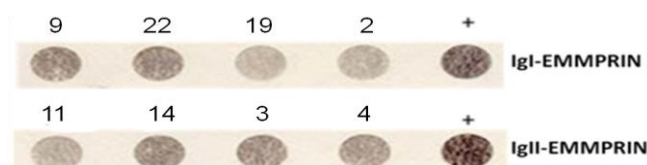
Από κάθε κατασκευή επιλέχτηκε ένας κλώνος, ο A6 για την *IgI*-EMMPRIN και ο Z για την *IgII*-EMMPRIN, για παραγωγή πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα, μετασχηματισμό κυττάρων και έκφραση στην *P. pastoris*.



Εικόνα 26: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των πλασμιδιακών πέψεων με αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού για επιβεβαίωση των σωστών κατασκευών για έκφραση στην *P.pastoris* των cDNAs IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN. Για την IgI βρέθηκαν 2 θετικοί κλώνοι, οι F1 και A6 και για την IgII 4 θετικοί κλώνοι, οι A, Δ, Ζ, Ο. Οι A6 και Ζ αναπτύχθηκαν περαιτέρω σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας.

Ο έλεγχος της έκφρασης πραγματοποιήθηκε και εδώ σε δείγματα υπερκειμένων των καλλιιεργειών με ανοσοαποτύπωση κουκκίδας (Dot Blot) με τη χρήση του αντι-myc αντισώματος. Όπως φαίνεται στην εικόνα 27, οι κλώνοι που παρουσίαζαν μεγαλύτερη έκφραση των πρωτεϊνών ήταν οι 22 και 9 για την IgI-EMMPRIN και οι 3, 14 για την IgII-EMMPRIN.

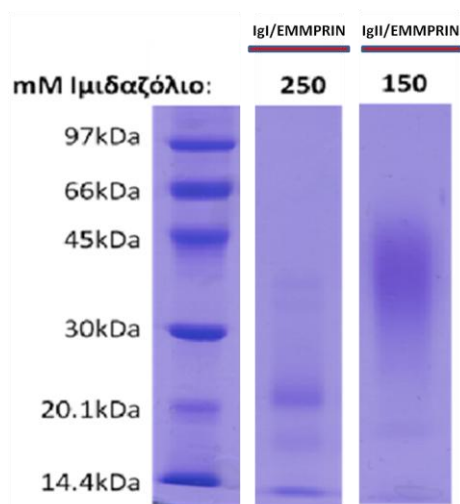
Από αυτούς ο κλώνος 22 για την IgI-EMMPRIN και ο κλώνος 14 για την IgII-EMMPRIN επιλέχθηκαν για παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα, όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά (§ Γ.11.2 Υλικά και Μέθοδοι).



Εικόνα 27: Ποιοτική ανάλυση της έκφρασης των κλώνων *pPICZaB-IgI-EMMPRIN* και *pPICZaB-IgII-EMMPRIN* με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κουκκίδας και τη χρήση αντι-myc αντισώματος

Στη συνέχεια ακολούθησε η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN από το υπερκείμενο της καλλιέργειας, με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη ρητίνης συζευγμένης με ιόντα νικελίου. Η έκλυση των πρωτεϊνών έγινε με διαλύματα που περιείχαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου, οι οποίες κυμαίνονταν από 75-500 mM (§ Γ.12. Υλικά και Μέθοδοι). Ο έλεγχος των δειγμάτων από τα κλάσματα έκλυσης πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα 12% SDS-PAGE και χρώση με Coomassie Brilliant Blue.

Όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στην εικόνα 28, το μεγαλύτερο ποσοστό έκλυσης των πρωτεϊνών IgI και IgII έγινε στα 250 mM και 150mM ιμιδαζολίου, αντίστοιχα. Επίσης, ήταν εμφανές ότι η IgII περιοχή είναι περισσότερο γλυκοζυλιωμένη από ότι η IgI, κάτι που ήταν αναμενόμενο λόγω της ύπαρξης δυο θέσεων γλυκοζυλίωσης στην IgII έναντι μιας στην IgI.



Εικόνα 28: Καθαρισμός των ανασυνδυασμένων μορίων IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN με στήλη χρωματογραφίας συγγενείας Ni^{2+} -NTA-αγαρόζης. Απεικονίζονται οι εκλούσεις της κάθε πρωτεΐνης με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου. Στα 250 mM ιμιδαζολίου απελευθερώνεται η μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης IgI-EMMPRIN και στα 150 mM η πρωτεΐνη IgII-EMMPRIN

B.2. Ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών ECD-EMMPRIN, IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN στο βακτηριακό στέλεχος της *E.coli*

Η υποκλωνοποίηση των εξωκυτταρικών τμημάτων ECD, IgI IgII της EMMPRIN στο πλασμίδιο pCOMB3X-TT για μετασχηματισμό του βακτηριακού στελέχους TOP10F της *E.coli*, πραγματοποιήθηκε μετά από ενίσχυση των αντίστοιχων τμημάτων cDNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να ενισχυθεί η επιθυμητή αλληλουχία παράλληλα με την εισαγωγή στα άκρα περιοριστικών θέσεων προκειμένου να υποκλωνοποιηθούν στο πλασμίδιο pCOMB3X-TT (§ Γ.6. Υλικά και Μέθοδοι).

Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν:

A. Για την ECD-EMMPRIN οι εκκινητές FOR-ECD, REV-ECD για την ενίσχυση του cDNA και στη συνέχεια οι FOR-ECD-ext και REV-ECD-ext για την εισαγωγή των θέσεων περιορισμού *SfiI* στα άκρα του cDNA, με σκοπό την υποκλωνοποίησή τους στη θέση *SfiI* του φορέα έκφρασης.

B. Για την IgI-EMMPRIN ο εκκινητής FOR-ECD, καθώς η αρχή του εξωκυτταρικού τμήματος IgI είναι η ίδια με αυτή της ECD και ο REV-IgI, ο οποίος ήταν συμπληρωματικός για τα 27 τελευταία νουκλεοτίδια της αλληλουχίας IgI-EMMPRIN της κωδικής αλυσίδας. Παρομοίως με την ECD-EMMPRIN, στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν οι FOR-ECD-ext και REV-ECD-ext για την εισαγωγή των θέσεων περιορισμού *SfiI* και την υποκλωνοποίησή τους.

Γ. Για την IgII-EMMPRIN χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής FOR-IgII και ο εκκινητής REV-ECD και στη συνέχεια οι FOR-ECD-ext και REV-ECD-ext για τη δημιουργία των θέσεων *SfiI* για την υποκλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα.

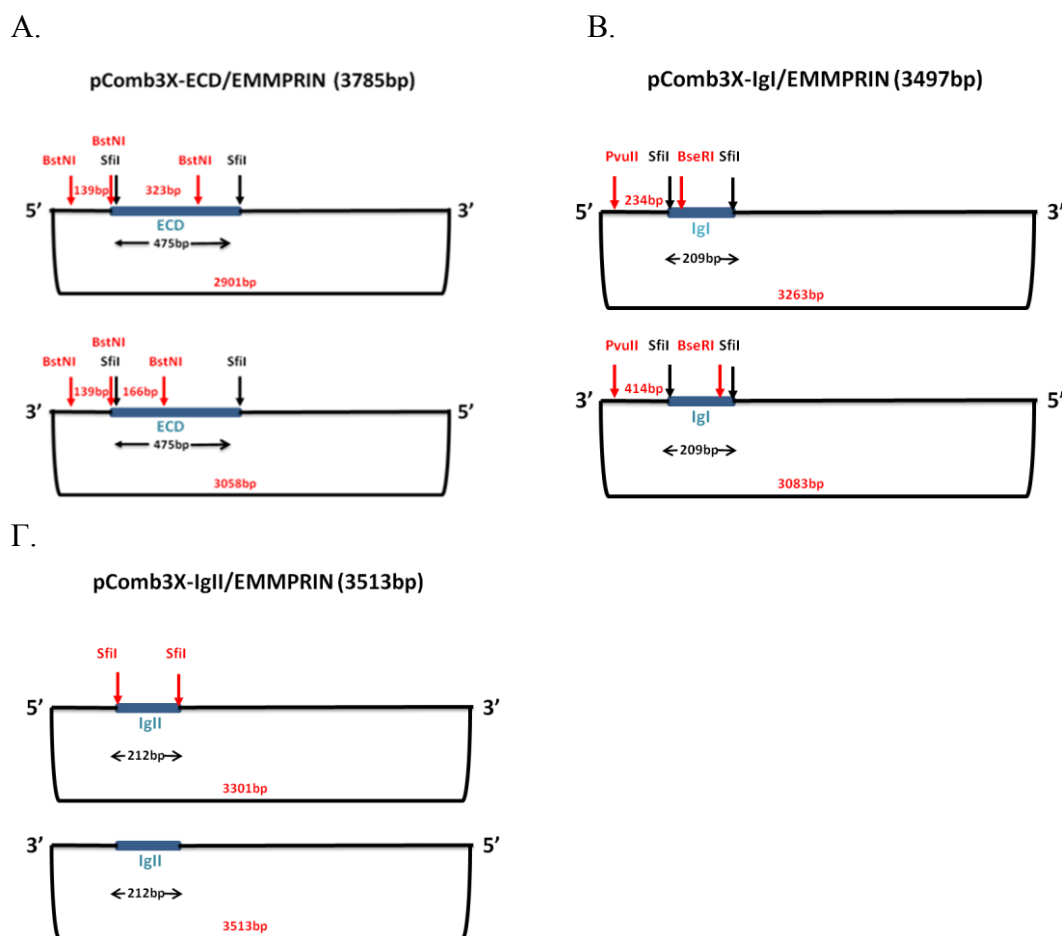
Στο τελικό προϊόν κάθε αντίδρασης καθώς και στο πλασμίδιο υποκλωνοποίησης pCOMB3X, έγιναν πέψεις με το ένζυμο *SfiI* (§ Γ.4., Υλικά και Μέθοδοι), αντίδραση σύνδεσης για την εισαγωγή του ενθέματος στο πλασμίδιο (§ Γ.5., Υλικά και Μέθοδοι). και στη συνέχεια μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων TOP10F (§ Γ.8., Υλικά και Μέθοδοι). Κατόπιν, έγινε ανάπτυξη μεμονωμένων αποικιών σε μικρή κλίμακα, απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες προκειμένου να εντοπιστούν οι κλώνοι οι οποίοι φέρουν ένθεμα με το σωστό προσανατολισμό. Πραγματοποιήθηκαν

πένψεις επιβεβαίωσης των κατασκευών και οι αλληλουχίες επαληθεύτηκαν στη συνέχεια με αλληλούχηση.

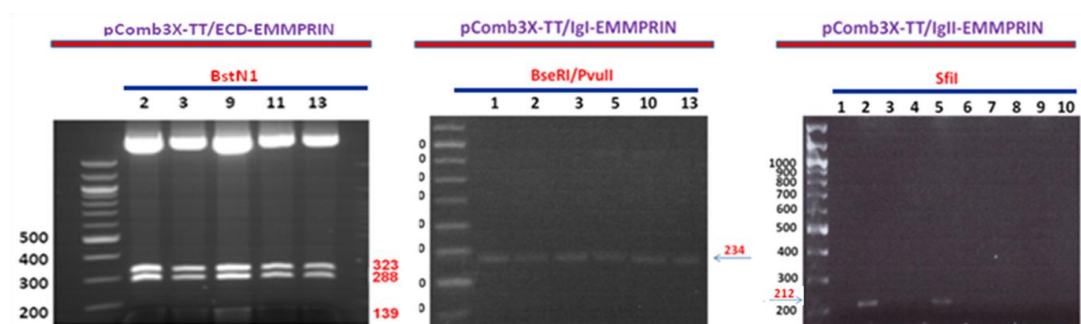
Για τον έλεγχο της κατασκευής ECD-EMMPRIN πραγματοποιήθηκαν πένψεις με *Bst*NI, όπου εάν το ένθεμα είχε εισαχθεί με το σωστό προσανατολισμό 5'→3', οι αναμενόμενες ζώνες θα ήταν στα 2901 bp, 323 bp, 288 bp, 139 bp, 121 bp και 13 bp, ενώ στην αντίθετη κατεύθυνση 3'→5' οι αναμενόμενες ζώνες θα ήταν 3058 bp, 288 bp, 166 bp, 139 bp, 121 bp και 13 bp (εικόνα 29Α).

Για τον έλεγχο της κατασκευής IgI-EMMPRIN πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη με *Bse*RI και *Pvu*II, όπου αναμενόταν μια ζώνη στα 234 bp μεταξύ των *Pvu*II και *Bse*RI και μια ζώνη 3263 bp όταν η ένθεση ήταν με κατεύθυνση 5'→3', ενώ στην αντίθετη κατεύθυνση η ζώνη μεταξύ των *Pvu*II και *Bse*RI θα ήταν στα 414 bp και το υπόλοιπο πλασμίδιο 3083 bp (εικόνα 29Β).

Για τον έλεγχο της IgII-EMMPRIN πραγματοποιήθηκε πέψη με *Sfi*I. Εάν εισαχθεί με σωστή κατεύθυνση 5'→3' τότε οι αναμενόμενες ζώνες εντοπίζονται στα 3301 και 212 bp, ενώ με 3'→5' χάνονται και οι δυο θέσεις *Sfi*I (εικόνα 29Γ).



Δ.



Εικόνα 29: Α.Β.Γ. Πλασμιδιακοί χάρτες των κατασκευών pComb3X-ECD/IgI/IgII-EMMPRIN όπου απεικονίζονται με μπλε χρώμα οι ενθέσεις με τη σωστή κατεύθυνση των 475 bp, 209 bp, 212 bp μεταξύ των περιοριστικών θέσεων Sfi αντίστοιχα. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι ζώνες που αναμένονται από τις πέψεις ελέγχου με Bstn1, BseRI/PvuII και SfiI για τα ECD, IgI και IgII, αντίστοιχα.

Δ. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των πέψεων επιβεβαίωσης του σωστού προσανατολισμού ένθεσης των cDNA ECD-EMMPRIN, IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN στον πλασμιδιακό φορέα pComb3X-TT. Τα μεγέθη που προσδιορίζουν το σωστό προσανατολισμό ένθεσης παρουσιάζονται με κόκκινο.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 29Δ εντοπίστηκαν κλώνοι και στις τρεις κατασκευές που έφεραν το ένθεμα με τη σωστή κατεύθυνση και για την παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας, επιλέχθηκαν για την ECD-EMMPRIN ο κλώνος 11, για την IgI-EMMPRIN ο κλώνος 3 και για την IgII-EMMPRIN ο κλώνος 2.

Οι θετικοί κλώνοι για κάθε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη αναπτύχθηκαν στο κατάλληλο θρεπτικό και όταν η OD_{600nm} των κυττάρων ήταν 0.8-1 και έγινε επαγωγή της έκφρασης με προσθήκη 1mM IPTG στους 30°C για 16 hrs. Η λύση των βακτηρίων και απελευθέρωση των διαλυτών πρωτεϊνών από τον περιπλασμικό χώρο πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ψύξης-απόψυξης σε λουτρό αιθανόλης-ξηρού πάγου στους 37°C, αντίστοιχα.

Κατόπιν, έγινε ο καθαρισμός τους από σφαιρίδια Ni^{2+} -NTA-αγαρόζης προκειμένου να προσδεθεί σε αυτά η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που φέρει τον

επίτοπο 6-His. Για την αποφυγή μη ειδικών αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν κατάλοιπα ιστιδίνης, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα έκπλυσης φωσφορικού καλίου (pH 8) που περιείχε 20 mM ιμιδαζόλιο. Η έκλυση των πρωτεϊνών έγινε με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος αλάτων (50 mM KPB, 300 mM NaCl) με διάφορες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου.

Συνολικά, για κάθε 1lt καλλιέργειας μπορούσαν να απομονωθούν περίπου 0.5-1 mgr/L ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

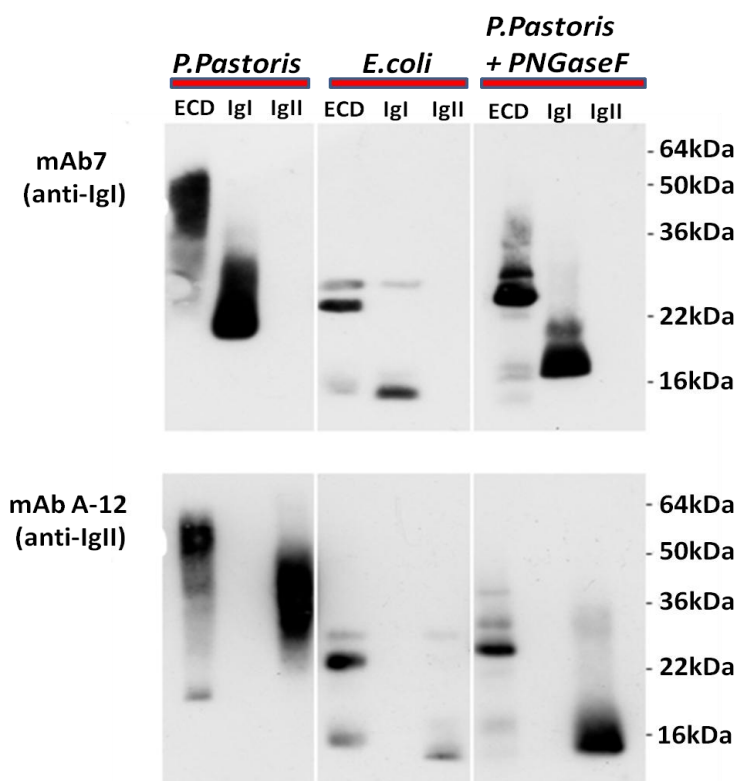
B.3. Βιοχημικός χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών ECD-EMMPRIN, IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN που παρήχθησαν στην *P.pastoris* και στην *E.coli*

Προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσον οι παραγόμενες ανασυνδυασμένες γλυκοζυλιωμένες και μη πρωτεΐνες, αντιστοιχούσαν στο εξωκυτταρικό τμήμα της EMMPRIN ή τις υποπεριοχές IgI και IgII, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάλυσης κατά Western με τη χρήση αντισωμάτων του εμπορίου έναντι της IgI (N-19, Santa Cruz) και IgII περιοχής της EMMPRIN (mAb A-12, Santa Cruz), καθώς και του ανθρώπινου αντισώματος mAb7, το οποίο απομονώθηκε από την βιβλιοθήκη των αντισωμάτων, όπως περιγράφηκε παραπάνω, ώστε να προσδιοριστεί η περιοχή προσδεσής του. Παράλληλα, έγινε απογλυκοζυλίωση στις γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες με το ένζυμο PNGase F (§ Γ.13. Υλικά και Μέθοδοι).

Η ανάλυση κατά Western έδειξε ότι το mAb7 προσδένεται σε έναν επίτοπο επάνω στην IgI εξωκυτταρικής περιοχή της EMMPRIN.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 30, η ανασυνδυασμένη ECD-EMMPRIN, με 3 θέσεις γλυκοζυλίωσης, ανιχνεύθηκε σε μοριακό βάρος μεταξύ 20 και 65 kDa, η IgI-EMMPRIN μεταξύ 10 και 20 kDa, ενώ η IgII-EMMPRIN μεταξύ 22 και 50 kDa, διαφορές που οφείλονται σε διαφορετικό βαθμό γλυκοζυλίωσης. Οι μη γλυκοζυλιωμένες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, ECD, IgI και IgII, ανιχνεύτηκαν στα 23 kDa, 9.7 kDa και 10.4 kDa αντίστοιχα, με τα αντισώματα mAb7 και A-12 που προσδένονται στην IgI και IgII περιοχή της EMMPRIN αντίστοιχα.

Τα απογλυκοζυλιωμένα μόρια που προέκυψαν από τη δράση της PNGase F στα μόρια που έχουν εκφραστεί στην *P.pastoris*, εντοπίστηκαν λίγο πιο ψηλά από τις αντίστοιχες μη γλυκοζυλιωμένες, λόγω του myc επιτόπου που υπάρχει στο 3' άκρο.

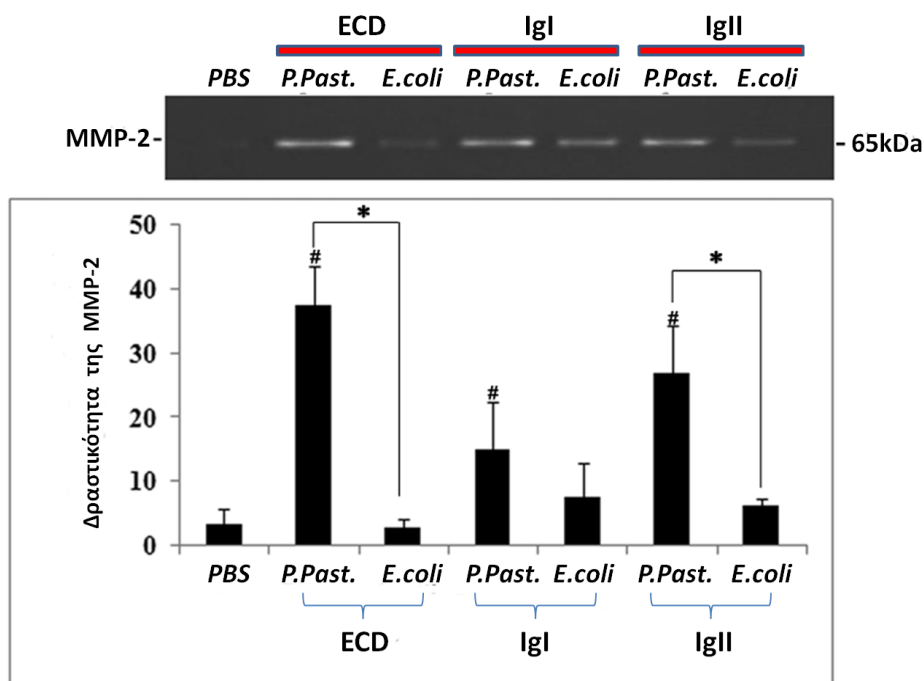


Εικόνα 30: Ανάλυση κατά Western των ανασυνδυασμένων γλυκοζυλιωμένων και μη- πρωτεϊνών ECD, IgI και IgII, που εκφράστηκαν στην *P.pastoris* και *E.coli* καθώς και των απογλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών με PNGase F. Η γλυκοζυλιωμένη ECD δρα και σα θετικός μάρτυρας

B.4. Λειτουργικότητα των πρωτεϊνών ECD, IgI, IgII-EMMPRIN ως προς την επαγωγή της MMP-2

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα ανασυνδυασμένα μόρια IgI και IgII-EMMPRIN που παρήχθησαν από την καλλιέργεια του μύκητα *P.pastoris*, καθώς και του βακτηρίου *E.coli*, είναι λειτουργικά, έπρεπε να ελεγχθεί η ικανότητά τους να επάγουν τις MMPs. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ζυμογραφίας, όπως περιγράφηκε και στην περίπτωση της ECD-EMMPRIN (§ Γ.23. Υλικά και Μέθοδοι). Ινοβλάστες δέρματος καλλιεργήθηκαν για 16 hrs σε θρεπτικό υλικό RPMI με 10% ορό και την επόμενη έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού χωρίς την παρουσία ορού. Έγινε επίδραση με 1.6 μg/φρεάτιο ECD-EMMPRIN για 6 hrs στους 37°C. 10 μl από κάθε υπερκείμενο της καλλιέργειας ηλεκτροφορήθηκε σε 10% SDS/PAGE που περιείχε 10 mg/ml ζελατίνη. Οι ζώνες ζυμογραφίας αναλύθηκαν με

το πρόγραμμα ImageJ. Κάθε πείραμα έγινε τουλάχιστον 3 φορές και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά με τη χρήση των μεθόδων Kruskal–Wallis και Mann–Whitney.



Εικόνα 31: Ζυμογραφική ανάλυση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ECD-/IgI-/IgII-EMMPRIN που απομονώθηκαν από την *P.pastoris* καθώς και την *E.coli* στις γλυκοζυλιωμένες και μη-γλυκοζυλιωμένες μορφές, αντίστοιχα. Τα εξωκυτταρικά τμήματα ECD-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN είναι εκείνα στα οποία παρατηρείται αυξημένη έκφραση της MMP-2. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά με τη χρήση των μεθόδων Kruskal–Wallis και Mann–Whitney

Όπως γίνεται εμφανές και στην εικόνα 31, οι ινοβλάστες που είχαν επωαστεί με τις γλυκοζυλιωμένες ECD, IgI και IgII περιοχές μπορούσαν να επάγουν σημαντικά την έκφραση της μεταλλοπρωτεΐνης-2 (MMP-2). Η επαγωγή αυτή ήταν υψηλότερη κατά 37.54, 15.07 και 27.06 φορές αντίστοιχα σε σχέση με τους ινοβλάστες που δεν είχαν υποστεί καμία επίδραση (αρνητικό δείγμα ελέγχου). Οι πρωτεΐνες που είχαν παραχθεί στα βακτήρια και δεν είχαν υποστεί μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (εν προκειμένω δεν έχουν γλυκοζυλιωθεί) δεν μπορούσαν να επάγουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό την MMP-2. Επιπρόσθετα, στατιστικές αναλύσεις (Mann–Whitney)

που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των γλυκοζυλιωμένων και μη μορφών, έδειξαν πως μόνο οι γλυκοζυλιωμένες μορφές των ECD-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN πρωτεϊνών μπορούσαν να επάγουν ικανοποιητικά την MMP-2. Η IgI-EMMPRIN δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της MMP-2 μεταξύ της γλυκοζυλιωμένης και μη μορφής.

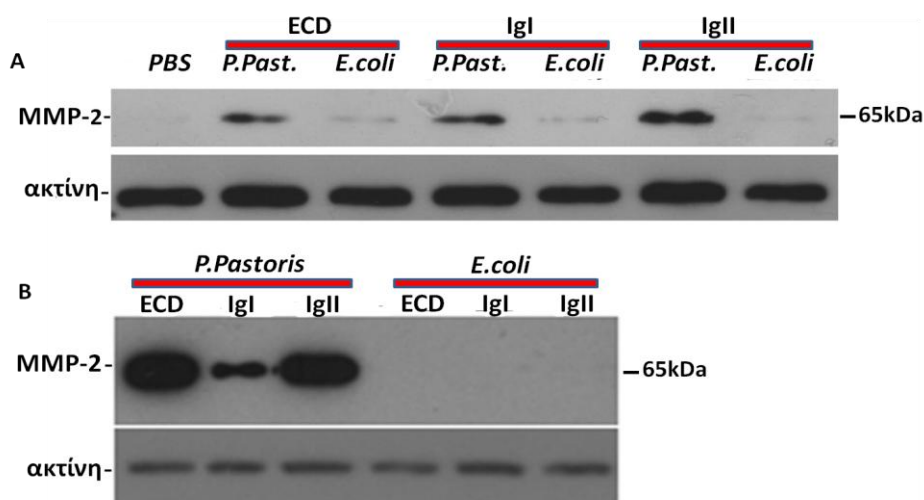
Η επαγωγική ικανότητα των τμημάτων ECD-EMMPRIN, IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN για την MMP-2 διερευνήθηκε επίσης με ανάλυση κατά Western. Πιο συγκεκριμένα, ίσες ποσότητες πρωτεϊνών από κυτταρικά εκχυλίσματα ή υπερκείμενα ινοβλαστών διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό τους βάρος σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12%. Η ανίχνευση της MMP-2 και της ακτίνης που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας, έγινε με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων για την MMP-2 (mAb 4022-Cell Signaling) και την ακτίνη (mAb1501-Chemicon).

Στην εικόνα 32A, η ανάλυση 20 μl πρωτεϊνών από κυτταρικά εκχυλίσματα έδειξε ότι η έκφραση της MMP-2 επάγεται μόνο στα κύτταρα στα οποία είχε γίνει επίδραση με τα γλυκοζυλιωμένα μόρια ECD-EMMPRIN, IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN, ενώ στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με τα αντίστοιχα ανασυνδυασμένα μόρια που είχαν παραχθεί στα βακτήρια, η έκφραση της MMP-2 δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Επιπλέον, όπως φαίνεται στην εικόνα 32B, όπου αναλύθηκαν συμπυκνωμένα υπερκείμενα κυττάρων (250 μl), μόνο οι γλυκοζυλιωμένες μορφές των ECD-EMMPRIN, IgII-EMMPRIN και πολύ λιγότερο της IgI-EMMPRIN ήταν ικανές να διεγείρουν την έκκριση της MMP-2 στο υπερκείμενο των κυττάρων.

Για να διασαφηνιστεί ο μηχανισμός που ενέχεται στην επαγωγή της MMP-2 από τις γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες ECD-EMMPRIN, IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN, πραγματοποιήθηκε ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR) σε πρωτογενείς καλλιέργειες ινοβλαστών. Ίσες ποσότητες ολικού RNA από κύτταρα που επωάστηκαν με τις γλυκοζυλιωμένες και μη πρωτεΐνες, μεταγράφηκαν με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης σε cDNA και κατόπιν πραγματοποιήθηκε ποσοτική αντίδραση PCR με εκκινητές ειδικούς για την MMP-2.

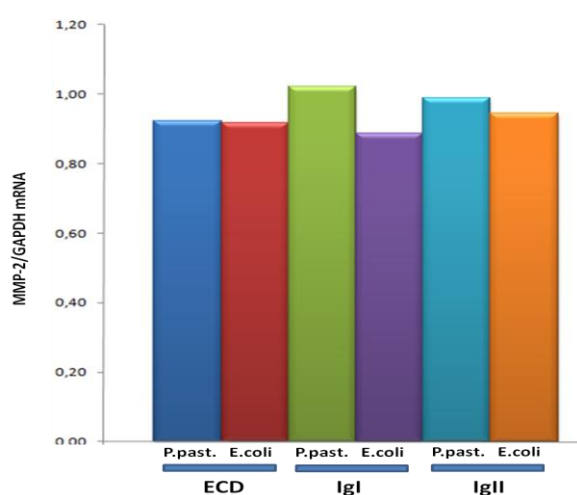
Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα του mRNA της MMP-2, μεταξύ των δειγμάτων που είχαν επωαστεί με τα γλυκοζυλιωμένα και μη γλυκοζυλιωμένα μόρια της EMMPRIN. Το αποτέλεσμα αυτό φανερώνει πως η ενεργοποίηση της έκφρασης της MMP-2 από τις γλυκοζυλιωμένες

μορφές των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, δεν οφείλεται σε μεταγραφικές αλλαγές αλλά πιθανόν σε μετα-μεταγραφικές / μεταφραστικές τροποποιήσεις (εικόνα 33).



Εικόνα 32: Ανάλυση κατά Western της έκφρασης της MMP-2 από τους ανθρώπινους ινοβλάστες μετά από επώαση με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που παρήχθησαν στην *P. pastoris* και στην *E. coli*.

- A. Κυτταρικά εκχυλίσματα ινοβλαστών μετά από την επίδραση των ECD, IgI, IgII περιοχών της EMMPRIN σε γλυκοζυλιωμένη και μη μορφή
- B. Υπερκείμενα κυττάρων ινοβλαστών μετά από την επίδραση των ECD, IgI, IgII περιοχών της EMMPRIN σε γλυκοζυλιωμένη και μη μορφή



Εικόνα 33: Ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της MMP-2 μετά από την επίδραση των ECD, IgI, IgII περιοχών της EMMPRIN σε γλυκοζυλιωμένη και μη μορφή

Συνοπτικά, παρατηρήθηκε ότι:

- 1) η γλυκοζυλίωση των εξωκυτταρικών περιοχών της EMMPRIN επάγει την έκφραση της MMP-2
- 2) η IgII περιοχή ενέχεται σε αυτήν την επαγωγή.

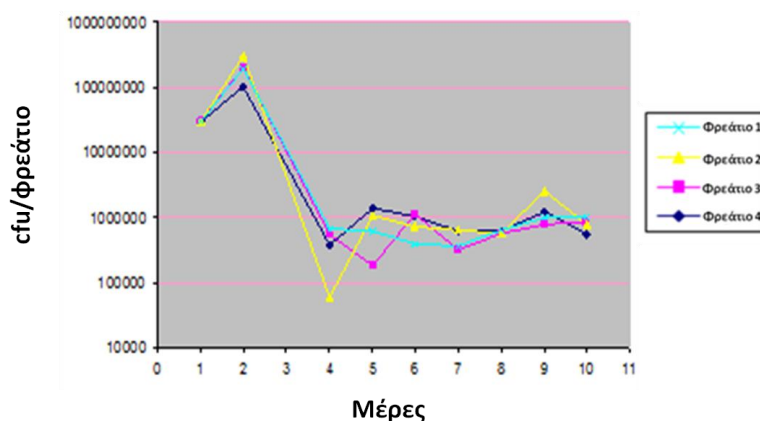
B.5. Σάρωση της ανθρώπινης βιβλιοθήκης φάγων-αντισωμάτων έναντι της IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN

Οι γλυκοζυλιωμένες μορφές IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN, οι οποίες εκφράστηκαν στην *P.pastoris*, χρησιμοποιήθηκαν σαν υποστρώματα για την σάρωση της ανθρώπινης βιβλιοθήκης “φάγων-αντισωμάτων”, που χρησιμοποιήθηκε και προηγουμένως, με σκοπό την απομόνωση λειτουργικών παρεμποδιστικών anti-EMMPRIN αντισωμάτων. Στην περίπτωση της IgI-EMMPRIN έγιναν 10 κύκλοι επιλογής, όπως φαίνεται στην εικόνα 34, όπου είναι εμφανής η σημαντική πτώση του τίτλου των αντισωμάτων στους κύκλους 3-4. Στους επόμενους κύκλους επιλογής όμως, δεν παρατηρήθηκε αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν υπήρξε επιλογή αντισωμάτων με μεγάλη συγγένεια.

A.

	1 ^η ημέρα	2 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	4 ^η ημέρα	5 ^η ημέρα	6 ^η ημέρα	7 ^η ημέρα	8 ^η ημέρα	9 ^η ημέρα	10 ^η ημέρα
Τίτλος φάγων μετά την έκλυση	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Τίτλος μετά τον πολλαπλασιασμό του φάγου	3*10 ⁷	1*10 ⁸	Δεν Μετρήθ.	3.8*10 ⁴	1.4*10 ⁶	1.4*10 ⁶	6.24*10 ⁵	6.24*10 ⁵	1.2*10 ⁶	5.5*10 ⁶
Φρεάτιο 1	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Τίτλος φάγων μετά την έκλυση	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Τίτλος μετά τον πολλαπλασιασμό του φάγου	3*10 ⁷	2*10 ⁸	Δεν Μετρήθ.	5.5*10 ⁵	1.8*10 ⁵	1.15*10 ⁶	3.2*10 ⁵	5.6*10 ⁵	8*10 ⁵	8.5*10 ⁵
Φρεάτιο 2	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Τίτλος φάγων μετά την έκλυση	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Τίτλος μετά τον πολλαπλασιασμό του φάγου	3*10 ⁷	3*10 ⁸	Δεν Μετρήθ.	6*10 ⁴	1.08*10 ⁶	7.2*10 ⁵	6.36*10 ⁵	5.64*10 ⁵	2.56*10 ⁶	8*10 ⁵
Φρεάτιο 3	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Τίτλος φάγων μετά την έκλυση	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Τίτλος μετά τον πολλαπλασιασμό του φάγου	3*10 ⁷	1.9*10 ⁸	Δεν Μετρήθ.	6.6*10 ⁵	6.1*10 ⁵	3.96*10 ⁵	3.6*10 ⁵	6.3*10 ⁵	9.9*10 ⁵	1.05*10 ⁶
Φρεάτιο 4	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9

B.



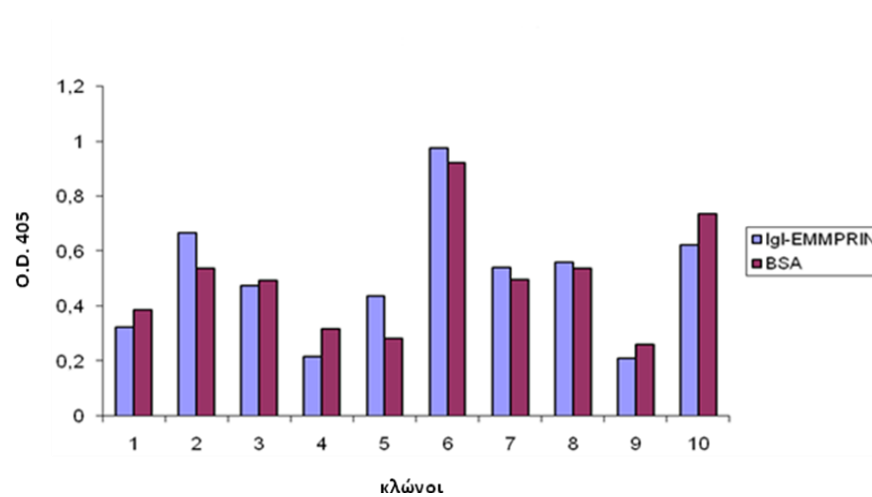
Εικόνα 34: *A. Τίτλος ειδικών εκλουόμενων φάγων και τίτλος πολλαπλασιασμού των φάγων που επιμόλυναν τα βακτήρια για ένα νέο κύκλο επιλογής, όταν χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο επιλογής η IgI-EMMPRIN.*
B. Διάγραμμα τίτλου των εκλουόμενων φάγων σε σχέση με τους κύκλους επιλογής.

Παρόλο που ο τίτλος μετά το πέρας του 10ου κύκλου επιλογής παρέμενε χαμηλός, έγινε περαιτέρω έλεγχος με τη μέθοδο ELISA σε μεμονωμένες αποικίες φάγων-αντισωμάτων και από τα τέσσερα φρεάτια, όπως περιγράφεται (§ Γ.20.1. Υλικά και Μέθοδοι).

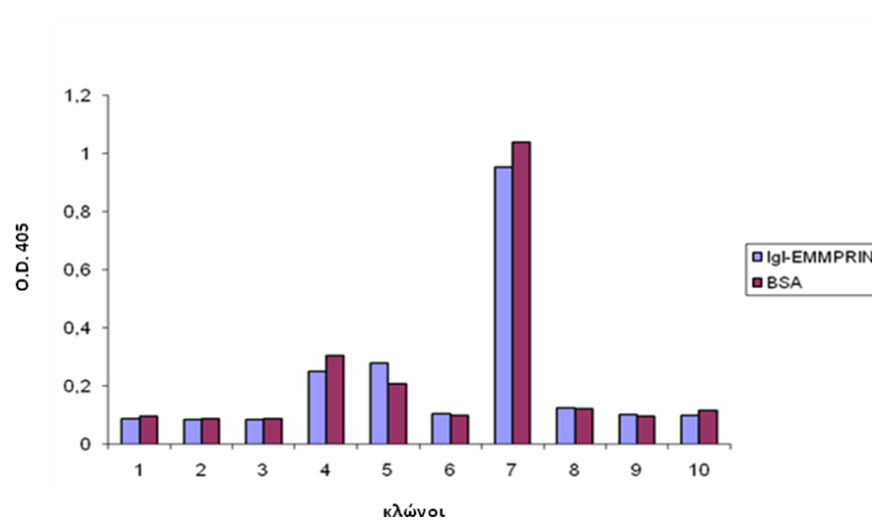
Αναλύθηκαν πάνω από 100 κλώνοι και από τα 4 φρεάτια, αλλά δεν ήταν εφικτή η απομόνωση κάποιου ειδικού φάγου-αντισώματος που να προσδένεται σε ικανοποιητικό βαθμό στην εξωκυττάρια περιοχή IgI-EMMPRIN.

Στην εικόνα 35α και 35β, παρατίθενται χαρακτηριστικά 10 τυχαίοι κλώνοι που αναλύθηκαν ELISA είτε ως φάγοι-αντισώματα είτε ως διαλυτό Fab. Και στις δύο περιπτώσεις, δεν κατέστη δυνατό να απομονωθεί ένας κλώνος που να προσδένει ειδικά το IgI-EMMPRIN, καθώς οι τιμές από την ELISA δεν διέφεραν μεταξύ του ειδικού αντιγόνου IgI-EMMPRIN και της BSA, που χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο αρνητικού ελέγχου.

A.

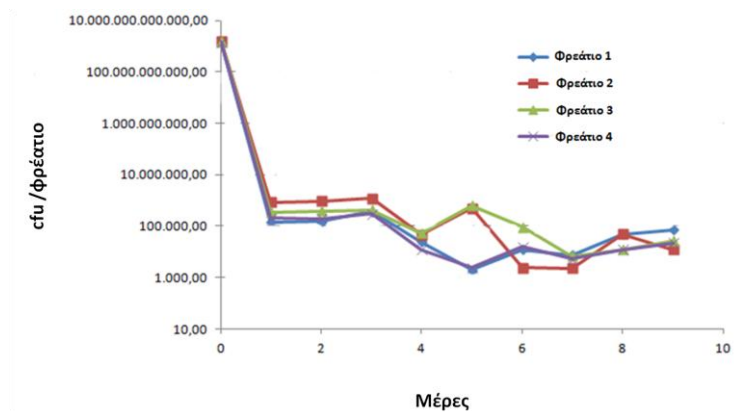


B.



Εικόνα 35: Έλεγχος της ειδικότητας κλώνων φάγων-αντισωμάτων έναντι της IgI-EMMPRIN, με δοκιμασία ELISA σε επίπεδο (A) φάγων-αντισωμάτων ή (B) διαλυτών Fab τμημάτων. Ως αντιγόνο αρνητικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η BSA.

Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε η περιοχή IgII-EMMPRIN σαν υπόστρωμα. Πραγματοποιήθηκαν 10 κύκλοι επιλογής αλλά και σε αυτήν την περίπτωση δεν υπήρξε σημαντική αύξηση του τίτλου των ειδικών φάγων-αντισωμάτων (εικόνα 36).



Εικόνα 36: Διάγραμμα τίτλου των εκλουόμενων φάγων σε σχέση με τους κύκλους επιλογής, όταν χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο επιλογής η IgII-EMMPRIN.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι χρησιμοποιώντας την IgI περιοχή δεν απομονώθηκε ούτε ο κλώνος εκείνος που είχε επιλεγεί με τη χρήση ολόκληρης της ECD-EMMPRIN σαν αντιγόνο επιλογής. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι για να υπάρξει απομόνωση ενός αντισώματος που θα έχει τη σωστή δομή, χρειάζεται ολόκληρη η εξωκυτταρική περιοχή ECD-EMMPRIN.

Συμπερασματικά:

Η αδυναμία απομόνωσης ενός αντισώματος που θα ανέστειλε τη δράση της EMMPRIN μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες:

- είναι πιθανό ο συνδυασμός βαριών και ελαφριών αλυσίδων κατά την κατασκευή της βιβλιοθήκης των φάγων-αντισωμάτων να μην αντικατοπτρίζει την *in vivo* κατάσταση στα Β λεμφοκύτταρα του ασθενούς, παρ' όλο που κατά την κατασκευή της βιβλιοθήκης ο τίτλος ποικιλομορφίας ήταν ικανοποιητικός (10^7 cfu/μg).
- η βιβλιοθήκη των φάγων-αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκε, είχε δημιουργηθεί από τα Β λεμφοκύτταρα ενός ασθενή με καρκίνο του μαστού ο οποίος ήταν θετικός στο HER2/neu. Είναι πιθανό ο ασθενής αυτός να μην είχε αντισώματα με παρεμποδιστική δράση έναντι της EMMPRIN και κατ' επέκταση ούτε η βιβλιοθήκη των φάγων-αντισωμάτων που κατασκευάστηκε.
- Είναι πιθανό το αντίσωμα που απομονώθηκε από τη βιβλιοθήκη να αλληλεπιδρά με την EMMPRIN και να σχηματίζει ετεροδιμερή, τα οποία στη συνέχεια ενεργοποιούν την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών, καθώς είναι

γνωστό ότι η EMMPRIN ανήκει στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών και μοιάζει δομικά με το αντίσωμα. Αυτό όμως είναι δύσκολο να ελεγχθεί καθώς δεν υπάρχει υλικό πλέον από αυτόν τον ασθενή.

Πάντως, αν και η ένδειξη αυτή είναι αποτρεπτική για τη χρήση του αντισώματος σε περιπτώσεις όγκων όπου υπερκφράζεται η EMMPRIN, θα μπορούσε να συμβάλλει ενεργά σε καταστάσεις όπου απαιτείται παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών, όπως η επούλωση τραύματος, η αναδόμηση ιστών και η αγγειογένεση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένα κρίσιμο σημείο στην πορεία διήθησης και μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων αποτελεί η αποικοδόμηση του εξωκυτταρικού χώρου. Κύριοι πρωταγωνιστές στη διαδικασία αυτή είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), των οποίων οι φυσιολογικοί ρυθμιστές είναι διάφοροι διαλυτοί παράγοντες όπως κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες και ορμόνες (Handsley et al. 2005). Ένας από τους σημαντικότερους ρυθμιστές της έκφρασης των MMPs αποτελεί η διαμεμβρανική πρωτεΐνη EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer), γνωστή και ως basigin ή CD147 που ανήκει στην υπερουκογένεια των ανοσοσφαιρινών (Fossum et al. 1991) (Biswas et al. 1995). Η EMMPRIN - είτε ως διαμεμβρανικό μόριο, είτε εκκρινόμενη - ενεργοποιεί την παραγωγή πολλών μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) από παρακείμενους ινοβλάστες όπως: MMP-1 (ενδιάμεση κολλαγενάση τύπου 1), MMP-2 (ζελατινάση A), MMP-3 (στρωμελυσίνη 1) και MMP-9 (ζελατινάση B). Η έκφρασή της και η επαγωγή των MMPs ενέχονται σε πολλές από τις φυσιολογικές διαδικασίες του οργανισμού (μορφογένεση, διαφοροποίηση, ιστική αποκατάσταση κλπ) αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος. Η EMMPRIN παρατηρείται σε πολύ υψηλά επίπεδα σε πολυάριθμους καρκίνους όπως της ουροδόχου κύστης, μαστού, πνεύμονα, οισοφάγου, δέρματος, λεμφώματα κλπ (Muraoka et al. 1993) (Polette et al. 1997; Sameshima et al. 2000; Marionnet et al. 2003; Ishibashi et al. 2004). Η υπερέκφραση της EMMPRIN και κατά συνέπεια η αύξηση των επιπέδων των MMPs, σχετίζονται συνήθως με κακή πρόγνωση. Ο σημαντικός ρόλος της EMMPRIN στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων κατέστησε σαφές πως η αναστολή της δράσης του μορίου με τη χρήση αντισωμάτων θα μπορούσε να αποτελέσει έναν καίριο θεραπευτικό στόχο.

A. Το ανθρώπινο αντίσωμα έναντι της EMMPRIN επάγει την παραγωγή της MMP-2 και δεν παρεμποδίζει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων

Ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει τη δράση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της EMMPRIN στον καρκίνο, τα οποία παρουσιάζουν σημαντικές ανοσοθεραπευτικές ιδιότητες. Το μονοκλωνικό αντίσωμα mAb Hb18G και το Licartin, ένα ιωδιονυλιωμένο F(ab)₂ τμήμα του mAb Hb18G, ανέστειλαν την

έκφραση των MMPs και του VEGF (Xu et al. 2007). Το Licartin χρησιμοποιήθηκε σε κλινικές μελέτες για στοχευμένη ραδιοθεραπεία και συνέβαλε στην αποτροπή της επανεμφάνισης της νόσου και σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση ήπατος (Xu et al. 2007). Παρόμοια δράση παρουσίασε και το χμαιοικό αντίσωμα CNTO 3899 που χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία του καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου (Dean et al. 2009). Το αντίσωμα κατόρθωσε να παρεμποδίσει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών σειρών UM-SCC-1 και FaDu σε ποσοστό 57%, να αναχαιτίσει την αποικοδόμηση του κολλαγόνου, την έκφραση προφλεγμονωδών πρωτεϊνών όπως MMPs και VEGF και τελικά την αύξηση του όγκου σε *in vivo* μοντέλα. Παρά τα θετικά αποτελέσματα που παρουσιάζει η χρήση αυτών των αντισωμάτων, υπάρχουν περιορισμοί στην κλινική εφαρμογή τους καθώς η προέλευσή τους δεν είναι ανθρώπινη και η επαναλαμβανόμενη χορήγηση προκαλεί ανοσοαπάντηση στα αντισώματα.

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην απομόνωση ενός ανθρώπινου αντισώματος έναντι της EMMPRIN – είτε σαν Fab τμήμα είτε ως ολόκληρο μονοκλωνικό – με σκοπό να παρεμποδιστεί η δράση του μορίου χωρίς τις ανεπιθύμητες παρενέργειες που προκύπτουν από την ύπαρξη των αντιγονικών επιτόπων που προέρχονται από το ποντίκι. Το αντίσωμα θα απομονώνονταν αρχικά σαν Fab τμήμα από μία βιβλιοθήκη ανθρώπινων αντισωμάτων και κατόπιν θα εκφράζονταν σαν ολόκληρο αντίσωμα σε κύτταρα θηλαστικού (CHO). Η βιβλιοθήκη ανθρώπινων αντισωμάτων είχε κατασκευαστεί με την τεχνολογία των «φάγων-αντισωμάτων» από B λεμφοκύτταρα διηθημένων λεμφαδένων ασθενούς με καρκίνο του μαστού HER2+, στο mRNA των οποίων είχε γίνει ενίσχυση των cDNA για το Fab τμήμα (VH-CH1 και VL-CL) με τη μέθοδο PCR και κλωνοποίησή τους στο φορέα έκφρασης του φαγεμιδίου pComb3H.

Για την επιλογή του Fab τμήματος από τη βιβλιοθήκη ανθρώπινων αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκε η εξωκυτταρική περιοχή της EMMPRIN (ExtraCellular Domain/ECD-EMMPRIN), λόγω της επαγωγικής της δράσης στην παραγωγή των MMPs (Guo et al. 1997; Sun et al. 2001). Η παραγωγή του γλυκοζυλιωμένου αντιγόνου πραγματοποιήθηκε στο ετερόλογο σύστημα του ζυμομύκητα *Pichia pastoris*, που προσέφερε υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης, έκκρισή της στο θρεπτικό υλικό για εύκολη απομόνωση καθώς και αυξημένη γλυκοζυλίωση του μορίου.

Αρχικά, υποκλωνοποιήθηκε το cDNA που κωδικοποιεί ολόκληρη την ECD-EMMPRIN στο πλασμίδιο pPICZαB για το μετασχηματισμό του στελέχους X33 της *P.pastoris*. Αφού επιλέχτηκε ο κλώνος με τη μεγαλύτερη έκφραση, πραγματοποιήθηκε η βιοχημική ανάλυση του ανασυνδυασμένου μορίου προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο αυτό αντιστοιχούσε στην EMMPRIN. Έτσι, έγινε απογλυκοζυλίωση με τη χρήση του ενζύμου PNGase F και το μέγεθος του απογλυκοζυλιωμένου ανασυνδυασμένου μορίου ECD-EMMPRIN ήταν αυτό που αναμενόταν, περίπου 23 kDa, παρόμοιο με εκείνο που καθορίζει η αμινοξική αλληλουχία του μετά την αφαίρεση των αλυσίδων σακχάρων. Κατόπιν, συγκριτικές αναλύσεις κατά Western με αντισώματα του εμπορίου έναντι της EMMPRIN και του myc επιτόπου (που υπάρχει στο ανασυνδυασμένο μόριο) έδειξαν πως οι γλυκοζυλιωμένες και απογλυκοζυλιωμένες μορφές της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης εντοπίζονταν σε παρόμοια μοριακά βάρη, είτε ανιχνεύονταν με το anti-EMMPRIN αντίσωμα είτε με το anti-myc αντίσωμα, επιβεβαιώνοντας έτσι πως η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη είναι πράγματι η ECD-EMMPRIN.

Προκειμένου όμως να χρησιμοποιηθεί σαν αντιγόνο στη διαδικασία απομόνωσης του ανθρώπινου αντισώματος, έπρεπε να ελεγχθεί και η λειτουργικότητά της. Με την τεχνική της ζυμογραφίας, φάνηκε πως η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ECD-EMMPRIN μπορούσε να επάγει την έκφραση της MMP-2 - και μάλιστα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο - μέχρι τα 12.6 μg/φρεάτιο 24άρας πλάκας επίστρωσης κυττάρων (Papadimitropoulou et al. 2013). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά ικανοποίησαν τα κριτήρια για τη χρησιμοποίηση της ECD-EMMPRIN σαν αντιγόνο επιλογής των Fab τμημάτων των ανθρώπινων αντισωμάτων έναντι της EMMPRIN.

Η βιβλιοθήκη φάγων-αντισωμάτων των Fab τμημάτων που προϋπήρχε στο εργαστήριο και χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας, παρουσίαζε ποικιλομορφία της τάξης του 10^7 (Belimezi et al. 2006), γεγονός που καταδείκνυε την επιτυχή κλωνοποίηση και ενίσχυση ενός μεγάλου εύρους αντισωμάτων. Η έκφραση σε φάγους αποτελεί ένα ευέλικτο σύστημα επιλογής που μπορεί να εφαρμοστεί και σε *in vitro* και σε *in vivo* συνθήκες (McCafferty et al. 1990; Johns 2000) (Johns 2000) και επιτρέπει μεταβολές στις συνθήκες και την αυστηρότητα επιλογής (Watters et al. 1997; Hoogenboom et al. 1998). Μετά την ενίσχυση της βιβλιοθήκης των φάγων-αντισωμάτων, πραγματοποιήθηκε μια σειρά επαναλαμβανόμενων κύκλων επιλογής, παρουσία του αντιγόνου, στο τέλος της οποίας επιλέχτηκε μία σειρά βακτηριοφάγων

με το ειδικό Fab τμήμα που παρουσίαζαν τη μεγαλύτερη συγγένεια για την ECD-EMMPRIN. Η ανάλυση των βακτηριοφάγων αυτών με DNA fingerprinting και αλληλούχιση έδειξε ότι όλοι ήταν όμοιοι, οπότε επιλέχτηκε ένας για ανάπτυξη σε μεγάλη κλίμακα. Το ειδικό τμήμα του αντισώματος που απομονώθηκε ονομάστηκε Fab7, από τον αρχικό κλώνο επιλογής που ήταν ο φάγος Νο7. Έπειτα, παρασκευάστηκε ολόκληρο το μονοκλωνικό αντίσωμα με την υποκλωνοποίηση και έκφραση των cDNA VHCH1 και VLCL του Fab τμήματος σε κύτταρα θηλαστικού (CHO) και ονομάστηκε αντίστοιχα mAb7. Μετά την παραγωγή (σε διαλυτή μορφή) και τον καθαρισμό των Fab7 και mAb7 εξετάστηκε η ειδικότητά τους ως προς το ανασυνδυασμένο μόριο ECD-EMMPRIN με ανάλυση ELISA. Χρησιμοποιώντας αντιγόνα, όπως αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA) και ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που είχαν επίσης παραχθεί στην *P.pastoris*, όπως η ECD-HER2 ή η ECD της α1 υπομονάδας του AChR, φάνηκε πως τα αντισώματα Fab7 και mAb7 παρουσίαζαν υψηλή συγγένεια μόνο για την ECD-EMMPRIN. Καθώς η διαδικασία επιλογής βασιζόταν στη χρήση ενός ανασυνδυασμένου μορίου, ήταν απαραίτητο να εξακριβωθεί κατά πόσο ήταν ικανά τα αντισώματα να αναγνωρίζουν το φυσικό υποδοχέα. Πειράματα ανοσοκαθίζησης και ανάλυση κατά Western έδειξαν πως το mAb7 (συνεπώς και το Fab7) μπορούσε να καθιζάνει το φυσικό υποδοχέα της EMMPRIN και περισσότερο τα μόρια της EMMPRIN με μεγαλύτερη γλυκοζυλίωση (HG-EMMPRIN). Παρόμοια, σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα με ανάλυση κατά Western, το mAb7 αναγνώριζε καλύτερα τις μορφές της EMMPRIN με υψηλά ποσοστά γλυκοζυλίωσης, ενώ δεν ανίχνευε τα χαμηλής γλυκοζυλίωσης μόρια (LG-EMMPRIN).

Με δεδομένη την ισχυρή αυτή σύνδεση των Fab7 και mAb7 με την ECD-EMMPRIN, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τη μελέτη της ικανότητάς τους να παρεμποδίζουν τη δράση της EMMPRIN και να αναστέλλουν την έκφραση της MMP-2. Πειράματα ζυμογραφίας έδειξαν πως τα αντισώματα όχι μόνο δεν μπορούσαν να παρεμποδίσουν την έκφραση της MMP-2, αλλά δρούσαν επαγωγικά στην παραγωγή της. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (Toole BP. *et al* 2001) όπου ένα αντίσωμα (#2881) έναντι της EMMPRIN (basigin) του ποντικού μπορούσε να επάγει τις MMPs. Μια πιθανή εξήγηση για το φαινόμενο αυτό, είναι ο σχηματισμός ολιγομερών της EMMPRIN στην πλασματική μεμβράνη (Fadool & Linser, 1996; Yoshida *et al.*, 2000) που ίσως επάγεται από την πρόσδεση του αντισώματος. Λόγω παρόμοιας δομής (δομή ανοσοσφαιρίνης) του μορίου της

EMMPRIN και του αντισώματος, είναι πολύ πιθανό να σχηματίζονται και ετεροδιμερή μεταξύ EMMPRIN και αντισώματος. Συνεπώς, τα σύμπλοκα αυτά μπορεί να ευθύνονται για την έκφραση των MMPs με τρόπο παρόμοιο με τα ολιγομερή της EMMPRIN.

Με σκοπό τη μελέτη της ανασταλτικής δράσης των αντισωμάτων στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα «επούλωσης χάσματος» και «διήθησης της εξωκυττάριας ουσίας». Τα πειράματα αυτά έδειξαν πως τα αντισώματα δεν ήταν ικανά να παρεμποδίσουν τη μετανάστευση των κυττάρων.

Αντίθετα, υπήρχαν ενδείξεις πως ίσως να την επιταχύνουν, καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις, φάνηκε πως υπήρχε μετακίνηση κυττάρων στα δείγματα που είχαν επωαστεί με τα αντισώματα σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με την παρατήρηση ότι το αντίσωμα επάγει την έκφραση της MMP-2, άρα συμβάλλει στην ταχύτερη αποικοδόμηση του εξωκυτταρικού χώρου και τελικά τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Η ένδειξη αυτή είναι αποτρεπτική για τη χρήση του αντισώματος σε περιπτώσεις όγκων όπου υπερκφράζεται η EMMPRIN, αλλά θα μπορούσε να συμβάλλει ενεργά σε καταστάσεις όπου απαιτείται παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών, όπως στην επούλωση τραύματος, την αναδόμηση ιστών και την αγγειογένεση.

Η αδυναμία απομόνωσης ενός λειτουργικού αντισώματος που θα αναστέλλει τη δράση της EMMPRIN, οδήγησε σε μια νέα προσπάθεια απομόνωσης ενός αντισώματος, αυτή τη φορά με αντιγόνο επιλογής την IgI-EMMPRIN που θεωρείται βιβλιογραφικά σαν ο κύριος επαγωγέας των MMPs (Guo et al. 1997; Sun et al. 2001). Η μικρότερη περιοχή επιλογής σε συνδυασμό με την παρουσία της δραστηρικής περιοχής στην IgI-EMMPRIN, θα αύξανε θεωρητικά τις πιθανότητες για απομόνωση ενός πιο ειδικού παρεμποδιστικού αντισώματος. Η IgI-EMMPRIN απομονώθηκε από το ζυμομύκητα και ελέγχθηκε η λειτουργικότητά της με παρόμοιες διαδικασίες όπως για την ECD-EMMPRIN. Πράγματι, η ανασυνδυασμένη IgI-EMMPRIN ήταν ικανή να επάγει την MMP-2, αλλά σε μικρότερο βαθμό από ότι ολόκληρο το μόριο ECD-EMMPRIN. Το γεγονός όμως ότι ήταν λειτουργική - έστω και λιγότερο από ότι ολόκληρη η εξωκυτταρική περιοχή - την καθιστούσε ικανή να χρησιμοποιηθεί σαν αντιγόνο επιλογής. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα σε ένα νέο γύρο επιλογής ειδικού παρεμποδιστικού αντισώματος αλλά δεν ήταν δυνατή η απομόνωση κάποιου ειδικού φάγου με μεγάλη συγγένεια ως προς το IgI-EMMPRIN.

Η δυσκολία απομόνωσης ενός αντισώματος που θα δρούσε ανασταλτικά στη δράση της EMMPRIN μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Καταρχάς, η βιβλιοθήκη H+L αλυσίδων αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκε είχε δημιουργηθεί από τα Β λεμφοκύτταρα ενός ασθενή με συγκεκριμένο τύπο καρκίνου του μαστού (HER-2 θετικός με διήθηση στους λεμφαδένες) και είναι πιθανό η βιβλιοθήκη να μην περιείχε κατασταλτικό αντίσωμα έναντι της EMMPRIN. Επιπρόσθετα, από κατασκευαστικούς καθαρά λόγους, μπορεί να μην ενισχύθηκε επαρκώς το συγκεκριμένο αντίσωμα ή ενώ υπήρχε η κατάλληλη βαριά και ελαφριά αλυσίδα, να μην πραγματοποιήθηκε ο σωστός συνδυασμός τους στο ίδιο φαγεμίδιο. Καθότι η τεχνική του biopanning βασίζεται στην απομόνωση των φάγων που φέρουν τα αντισώματα με τη μεγαλύτερη συγγένεια με τον υπό εξέταση αντιγόνο, είναι επίσης πιθανό – ενώ υπήρχε ανασταλτικό αντίσωμα έναντι της EMMPRIN - να μην ενισχύθηκε περαιτέρω λόγω χαμηλής συγγένειας.

Δυστυχώς δεν υπάρχουν νέα δεδομένα για την πορεία του ασθενούς αλλά η μεταστατικότητα του παρουσίαζε, μπορεί να οφειλόταν και στην παρουσία αντισωμάτων που δρούσαν προς όφελος της εξάπλωσης των καρκινικών κυττάρων, π.χ. μέσω της επαγωγής των MMPs και της αποικοδόμησης του εξωκυτταρικού χώρου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα που να ενισχύει την υπόθεση αυτή είναι και το mAb7 που απομονώθηκε και μελετήθηκε στην παρούσα εργασία και φάνηκε πως επάγει την έκφραση της MMP-2. Είναι πιθανό, το αντίσωμα λόγω της δομής του, να αλληλεπιδρά με την EMMPRIN και να σχηματίζει ετεροδιμερή που ενεργοποιούν την έκφραση των MMPs. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τέτοια επαγωγικά αντισώματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων που χρήζουν άμεσης παραγωγής μεταλλοπρωτεϊνών.

Προκειμένου να απομονωθούν ειδικά παρεμποδιστικά αντισώματα έναντι της EMMPRIN, θα μπορούσαν να προταθούν διαφορετικές προσεγγίσεις όπως η χρήση διαφορετικών βιβλιοθηκών αντισωμάτων που θα προέρχονταν από ασθενείς με διαφορετικούς τύπους καρκίνων ή διαφορετικά στάδια εξέλιξης της νόσου. Ακόμα, η μελέτη αντισωμάτων μικρότερης συγγένειας, οι λιγότεροι κύκλοι επιλογής, η ανάλυση περισσότερων κλώνων, η χρήση μιας πιο γενικής βιβλιοθήκης αντισωμάτων, η χρησιμοποίηση μικρότερης δραστηκής περιοχής της EMMPRIN, ίσως να συνέβαλαν καθοριστικά στην εύρεση του αντισώματος που θα είχε ανασταλτικό ρόλο στη δράση της EMMPRIN.

B. Η γλυκοζυλιωμένη εξωκυτταρική περιοχή IgII-EMMPRIN εμπλέκεται στην επαγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών

Το γεγονός ότι η ανασυνδυασμένη IgI-EMMPRIN δεν αρκεί για να αυξηθούν τα επίπεδα της MMP-2 όσο στην ECD-EMMPRIN οδήγησε στη διερεύνηση δυο υποθέσεων : α) ότι μπορεί να χρειάζεται ολόκληρη η εξωκυτταρική περιοχή για την επιτυχή επαγωγή των MMPs, με την περιοχή Ig-II EMMPRIN να συμβάλλει στην επαγωγή και β) να έχει καθοριστικό ρόλο στο φαινόμενο ο βαθμός γλυκοζυλίωσης του μορίου.

Η EMMPRIN εντοπίζεται σε 2 μορφές ανάλογα με το βαθμό γλυκοζυλίωσης, την υψηλής (HG-EMMPRIN) και τη χαμηλής (LG-EMMPRIN). Πληθώρα μελετών έχουν δείξει ότι η EMMPRIN είναι υπεργλυκοζυλιωμένη σε πολλούς τύπους καρκίνου και πως τα γλυκοζυλιωμένα ομοδιμερή επάγουν MMPs. Πρόσφατα, έγινε μια μελέτη στην οποία έδειξαν πως η απογλυκοζυλιωμένη εξωκυτταρική περιοχή της EMMPRIN είναι από μόνη της ικανή να επάγει την έκφραση των MMPs, πιθανόν μέσω της τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής της (Belton et al. 2008). Αυτό ήρθε σε αντίθεση με όσα υποστηρίζονταν μέχρι τότε, σύμφωνα με τα οποία η γλυκοζυλίωση του μορίου ήταν εκείνη που ευθύνεται για την παραγωγή των MMPs (Guo et al. 1997; Sun et al. 2001).

Με σκοπό τη μελέτη του ρόλου της γλυκοζυλίωσης και τη συμμετοχή της IgII εξωκυτταρικής περιοχής στην επαγωγή της MMP-2, κρίθηκε αναγκαίο να απομονωθεί γλυκοζυλιωμένο και το IgII εξωκυτταρικό τμήμα αλλά και όλες οι εξωκυτταρικές περιοχές ECD- IgI-, IgII χωρίς καμία αλυσίδα σακχάρων. Έτσι, πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση και έκφραση της περιοχής IgII-EMMPRIN στο σύστημα της *P. pastoris*, καθώς των τριών ECD-EMMPRIN, IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN σε βακτηριακά συστήματα. Ως γνωστόν, τα ανασυνδυασμένα μόρια που παράγονται σε βακτήρια δεν υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Με τον τρόπο αυτό παρήχθησαν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες χωρίς γλυκοζυλιώσεις και μελετήθηκαν σε συνδυασμό με τα γλυκοζυλιωμένα μόρια, προκειμένου να διασαφηνιστούν οι παραπάνω υποθέσεις.

Με τη χρήση ειδικών anti-EMMPRIN αντισωμάτων (το mAb7 που απομονώθηκε στην παρούσα εργασία και τα N-19, A-12 του εμπορίου) σε ανάλυση κατά Western και με απογλυκοζυλίωση με το ένζυμο PNGase F, διαπιστώθηκε ότι οι παραγόμενες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες αντιστοιχούσαν στο εξωκυτταρικό τμήμα

της EMMPRIN και τις υποπεριοχές IgI και IgII που το συνιστούν. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν το ανασυνδυασμένο μόριο IgII-EMMPRIN που απομονώθηκε από την καλλιέργεια του μύκητα *P.pastoris* καθώς και οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες από το βακτήριο *E.coli* είναι λειτουργικές, ελέγχθηκε η ικανότητά τους να επάγουν την έκφραση της MMP-2.

Τα αποτελέσματα από τα πειράματα Western Blot και ζυμογραφίας έδειξαν πως μόνο οι γλυκοζυλιωμένες μορφές των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μπορούσαν να επάγουν αύξηση των επιπέδων της MMP-2. Όλα τα γλυκοζυλιωμένα μόρια είχαν στατιστικά σημαντική αύξηση της MMP-2 ενώ οι πρωτεΐνες που προήλθαν από τα βακτήρια, δεν ενεργοποιούσαν καθόλου ή ενεργοποιούσαν σε πολύ μικρότερο βαθμό (στατιστικά μη σημαντικό) την παραγωγή της MMP-2.

Το πιο σημαντικό ίσως εύρημα της παρούσας εργασίας, ήταν η παρατήρηση πως η εξωκυτταρική περιοχή IgII-EMMPRIN ήταν ικανή να επάγει πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης της MMP-2, υψηλότερα και από την IgI-EMMPRIN που υποστηρίζεται βιβλιογραφικά ως η υπεύθυνη περιοχή για την παραγωγή των MMPs. Το μόριο ECD-EMMPRIN παρουσίασε τη μεγαλύτερη επαγωγή της MMP-2, με την IgII-EMMPRIN να ακολουθεί με μικρή διαφορά και την IgI-EMMPRIN να έχει τη μικρότερη επαγωγική δράση. Η ικανότητα της ECD-EMMPRIN να επάγει την υψηλότερη έκφραση της MMP-2, είναι πιθανό να προκύπτει σαν αποτέλεσμα της συνεργιστικής δράσης μεταξύ των IgI και IgII εξωκυτταρικών τμημάτων. Η στατιστική ανάλυση των πειραμάτων Western και των ζυμογραφιών, έδειξε πως τα επίπεδα της MMP-2 στην ECD-EMMPRIN ήταν παρόμοια με το άθροισμα των επιπέδων της MMP-2 των IgI- και IgII-EMMPRIN. Έτσι, είναι πολύ λογικό να ισχυριστεί κάποιος πως η επαγωγική ικανότητα του μορίου ECD απαιτεί αφενός την ύπαρξη και των 2 υποπεριοχών της και αφετέρου τη συντονισμένη δράση τους.

Η υψηλή έκφραση της MMP-2 στην περίπτωση της IgII-EMMPRIN σε σχέση με την IgI-EMMPRIN - αν ισχύει η πεποίθηση περί αναγκαιότητας της γλυκοζυλίωσης στην επαγωγή των MMPs - ίσως οφείλεται στις 2 θέσεις γλυκοζυλίωσης που υπάρχουν στην IgII περιοχή. Η IgI-EMMPRIN, αν και μπορούσε να επάγει - σε χαμηλό όμως βαθμό - την έκφραση της MMP-2, δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ της γλυκοζυλιωμένης και μη μορφής της. Η ανασυνδυασμένη IgI που απομονώθηκε από τα βακτηριακά στελέχη φάνηκε να είναι η μόνη που είχε την ικανότητα να δρα επαγωγικά στην έκφραση της

MMP-2 από ότι τα μη γλυκοζυλιωμένα ECD και IgII, αλλά σε στατιστικά μη σημαντικό βαθμό σε σχέση με το αντίστοιχο γλυκοζυλιωμένο μόριο.

Η ενεργοποίηση της παραγωγής της MMP-2 προέκυψε πιθανόν μέσω μετα-μεταγραφικών ή /και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων καθώς πειράματα Q-PCR δεν έδειξαν κάποια μεταβολή στα επίπεδα των mRNA μεταξύ των ανασυνδυασμένων μορίων. Ο ακριβής μηχανισμός της επαγωγής της MMP-2 από τα γλυκοζυλιωμένα μόρια παραμένει αδιευκρίνιστος. Είναι πιθανό η παρουσία των αλυσίδων σακχάρων να ενισχύει σε μεγάλο βαθμό τον ολιγομερισμό των μορίων της EMMPRIN, ο οποίος συμβαίνει σε χαμηλό ποσοστό απουσία γλυκανών (Yu et al. 2008).

Αυτή η θεωρία μοιάζει ακόμα πιο πιθανή μετά την πρόσφατη δημοσίευση του Huang που υποστήριξε πως η EMMPRIN σχηματίζει ομοδιμερή ανεξάρτητα από την παρουσία σακχάρων. Υποστήριξε πως η γλυκοζυλίωση σταθεροποιούσε περαιτέρω τις δομές των μορίων της EMMPRIN, βοηθώντας στη διατήρηση ενός ενεργού, δραστικού σχηματισμού. Εξίσου σημαντική παρατήρηση ήταν πως κατόπιν μεταλλάξεως της N-152 θέσης γλυκοζυλίωσης (ασπαραγίνης 152) της EMMPRIN, το μόριο αδυνατούσε να μεταφερθεί στην κυτταρική μεμβράνη και παρέμενε στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση μη αναδιπλωμένων μορίων της EMMPRIN στο εσωτερικό του κυττάρου, την αδυναμία μεταφοράς τους στην μεμβράνη και τελικά την ελαττωμένη έκφραση των MMPs. Αυτό αποδεικνύει έμπρακτα τη σπουδαιότητα της γλυκοζυλίωσης στη λειτουργία της EMMPRIN και δείχνει πως η γλυκοζυλίωση επηρεάζει την επαγωγή των MMPs μέσω της εξασφάλισης μιας σωστής δομής (Huang et al. 2013). Άλλωστε είναι γνωστό πως η γλυκοζυλίωση είναι απαραίτητη για τη σωστή διαμόρφωση και την έκφραση στην επιφάνεια του κυττάρου πολλών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων και μελών της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών Ig, όπως το CD4 και το MAG (Tiffet et al. 1992; Tropak et al. 1997).

Από την άλλη όμως, ο Berlton έδειξε πως μια ανασυνδυασμένη, μη γλυκοζυλιωμένη εξωκυτταρική περιοχή της EMMPRIN (rBSG) ενεργοποιούσε μέσω του ERK1/2 την παραγωγή των MMP-1, MMP-2 και MMP-3. Οι αντικρουόμενες αυτές απόψεις δεν αποκλείουν την ύπαρξη μιας λογικής εξήγησης που να ερμηνεύει ικανοποιητικά και τις δυο θεωρίες. Μια πιθανή εξήγηση που δόθηκε από την ομάδα του Berlton για τη βιολογική δραστηριότητα της rBSG ήταν η τριτοταγής και τεταρτοταγής δομή του μορίου, που δημιουργούσε σταθερά διμερή, τα οποία μετά την πρόσδεση στους υποδοχείς των ινοβλαστών προκαλούσαν τον ομοδιμερισμό των

υποδοχέων και πυροδοτούσαν το σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγούσε σε έκφραση των MMPs.

Επιπρόσθετα, η επαγωγική δράση της IgII-EMMPRIN στην έκφραση της MMP-2, είναι πιθανόν να οφείλεται στην αλληλεπίδραση που έχει με την καβεολίνη-1. Όπως αναφέρθηκε εκτενώς και στην εισαγωγή, η καβεολίνη-1 είναι ένα μόριο που παρουσιάζει διττό ρόλο, καθώς δρα άλλοτε σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο και άλλοτε σαν ογκογονίδιο. Εμφανίζεται μειωμένη σε καρκίνους του παχέος εντέρου (Bender et al. 2000), του πνεύμονα (Ho et al. 2002), των ωοθηκών (Wiechen et al. 2001) και στα σαρκώματα (Wiechen et al. 2001), φανερώνοντας μια ογκοκατασταλτική δράση ενώ είναι αυξημένη στον καρκίνο του προστάτη (Corn et al. 2010), της ουροδόχου κύστης (Fong et al. 2003) και του οισοφάγου (Ando et al. 2007), συμβάλλοντας ενεργά στην ανάπτυξη του όγκου. Μέχρι πρόσφατα, είχε δείχτει μόνο πως το σύμπλοκο αυτό οδηγεί σε μειωμένη συγκέντρωση των υψηλής γλυκοζυλίωσης μορίων της EMMPRIN (HG-EMMPRIN) στην επιφάνεια του κυττάρου και κατ'επέκταση μειωμένη επαγωγή των MMPs (Tang et al. 2004; Tang et al. 2004). Πρόσφατες μελέτες όμως έδειξαν πως η απενεργοποίηση του γονιδίου της καβεολίνης-1 μέσω RNAi, είχε σαν αποτέλεσμα την αδυναμία μετατροπής των LG-EMMPRIN σε HG-EMMPRIN και τη μείωση της έκφρασης των MMPs, MMP-3 και MMP-11 ενώ η υπερέκφραση της καβεολίνης-1 είχε το αντίθετο αποτέλεσμα (Jia et al. 2006; Du et al. 2009). Με βάση τα νέα αυτά δεδομένα και σε συνδυασμό με τα συμπεράσματα της παρούσας εργασίας σχετικά με τη γλυκοζυλίωση, μπορεί να υποτεθεί πως η εξωκυτταρική περιοχή Ig-II EMMPRIN αντιδρά ενδοκυτταρικά με την καβεολίνη-1, γλυκοζυλιώνεται επαρκώς και στις 2 θέσεις με αποτέλεσμα τα μόρια της EMMPRIN να φτάνουν γλυκοζυλιωμένα στην κυτταρική μεμβράνη και να λαμβάνουν μια σταθερή δομή που θα επάγει την έκφραση της MMP-2. Συνεπώς αύξηση των επιπέδων της καβεολίνης-1, συνεπάγεται και αύξηση των μορίων της EMMPRIN που - μέσω της IgII - αλληλεπιδρούν με την καβεολίνη-1, γλυκοζυλιώνονται σε μεγάλο βαθμό και τελικά φτάνουν στην κυτταρική μεμβράνη όπου προκαλούν υψηλότερη έκφραση της MMP-2.

Αυτό προσφέρει και μια ικανοποιητική εξήγηση για το γεγονός ότι μόνο η γλυκοζυλιωμένη ECD ολόκληρη και το IgII τμήμα - και όχι η IgI - μπορούσαν να αυξήσουν σημαντικά τα επίπεδα της MMP-2. Επιπλέον, η αύξηση της MMP-2 μετά την προσθήκη των γλυκοζυλιωμένων ECD και IgII-EMMPRIN στους ινοβλάστες εξωγενώς - όπως έγινε και στην παρούσα εργασία - πιθανόν και να οφείλεται και

σε μηχανισμό ανεξάρτητο της καβεολίνης (Barth et al. 2006). Ο σχηματισμός ομοδιμερών μεταξύ των μορίων της EMMPRIN στην κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός πιθανού επιτόπου της IgII περιοχής, μπορεί να οδηγεί στην επαγωγή της MMP-2, θεωρία που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Yoshida et al. 2000).

Η διαπίστωση πως η γλυκοζυλιωμένη IgII-EMMPRIN επάγει την έκφραση της MMP-2 κατέστησε απαραίτητη τη χρησιμοποίηση αυτού του μορίου σαν αντιγόνο επιλογής για την απομόνωση ειδικού λειτουργικού αντισώματος έναντι της EMMPRIN. Επαναλήφθηκε η διαδικασία επιλογής από τη βιβλιοθήκη ανθρώπων αντισωμάτων, όπως έχει ήδη περιγραφεί αναλυτικά για την κατασκευή του mAb7, προκειμένου να επιλεγεί ο βακτηριοφάγος με το ειδικό αντίσωμα με τη μεγαλύτερη θεωρητικά συγγένεια για το αντιγόνο. Μετά το τέλος όμως της διαδικασίας επιλογής, δεν υπήρξε σημαντική αύξηση του τίτλου των ειδικών φάγων-αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου IgII-EMMPRIN, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν κατέστη εφικτή η απομόνωση κάποιου ειδικού φάγου ή αντισώματος που να προσδένεται σε ικανοποιητικό βαθμό στην εξωκυττάρια περιοχή IgII-EMMPRIN από την συγκεκριμένη βιβλιοθήκη φάγων-αντισωμάτων. Παρόλα αυτά, οι προσπάθειες για την εύρεση ενός αντισώματος συνεχίζονται καθώς η ανοσοθεραπεία αποτελεί μια πολύ ελπιδοφόρα τακτική αντιμετώπισης των όγκων. Η EMMPRIN παρουσιάζεται αυξημένη σε πολλούς και διαφορετικούς καρκίνους και η επιτυχής αναστολή της δράσης της, θα μπορούσε να επιφέρει σημαντικά θεραπευτικά αποτελέσματα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα κρίσιμο σημείο στην πορεία διήθησης και μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων αποτελεί η αποικοδόμηση του εξωκυτταρικού χώρου. Κύριοι πρωταγωνιστές στη διαδικασία αυτή είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες, οι οποίες ρυθμίζονται από διάφορους παράγοντες, μεταξύ των οποίων και η **EMMPRIN** (**E**xtracellular **M**atrix **M**etallo**p**rotease **I**nducer), η οποία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους ρυθμιστές της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών. Η EMMPRIN είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία ανιχνεύεται σε αφθονία στη μεμβράνη πολλών τύπων καρκινικών κυττάρων, γνωστή και ως **basigin** ή **CD147**, και ανήκει στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών.

Η EMMPRIN αποτελείται από μια εξωκυτταρική περιοχή 185 αμινοξέων, που περιέχει 2 περιοχές τύπου ανοσοσφαιρίνης (IgI και IgII), μια διαμεμβρανική περιοχή 24 αμινοξέων και μια κυτταροπλασματική περιοχή 39 αμινοξέων. Το εξωκυτταρικό τμήμα περιέχει 3 συντηρημένες περιοχές N-γλυκοζυλίωσης (1 θέση στην IgI και 2 στην IgII), οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία στη γλυκοζυλίωσή τους. Υπάρχουν μόρια της EMMPRIN με υψηλά ποσοστά γλυκοζυλίωσης (HG-CD147), ενώ άλλα μόρια είναι λιγότερο γλυκοζυλιωμένα (LG-CD147). Η ύπαρξη αυξημένης γλυκοζυλίωσης της EMMPRIN στον καρκίνο συνηγορεί στο ότι η γλυκοζυλίωση ενέχεται στην επαγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs).

Ο σημαντικός ρόλος της EMMPRIN στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων αναδεικνύει το μόριο αυτό ως ένα καίριο θεραπευτικό στόχο, με την απομόνωση μορίων τα οποία θα μπορούσαν να αναστείλουν τη δράση της. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση ανθρώπινων αντισωμάτων έναντι της EMMPRIN και η χρήση αυτών ως θεραπευτικά μόρια προκειμένου να παρεμποδιστεί η δράση της και συνεπώς η μετάσταση του καρκίνου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μια βιβλιοθήκη ανθρώπινων αντισωμάτων ενός ασθενούς με καρκίνο μαστού HER2+, η οποία είχε κατασκευαστεί με την τεχνολογία των «φάγων-αντισωμάτων». Για την κατασκευή της, χρησιμοποιήθηκαν Β λεμφοκύτταρα διηθημένων λεμφαδένων στα οποία είχε γίνει ενίσχυση με PCR των cDNA για το Fab τμήμα (VH-CH1 και VL-CL) του αντισώματος και στη συνέχεια κλωνοποίησή τους στο φορέα έκφρασης του φαγεμιδίου pComb3H.

Για την διαδικασία της επιλογής των ειδικών φάγων-αντισωμάτων ήταν αναγκαία η ύπαρξη αντιγόνου σε μεγάλη ποσότητα και υψηλή καθαρότητα. Η παραγωγή του αντιγόνου, που στην προκειμένη περίπτωση ήταν η εξωκυτταρική περιοχή της EMMPRIN (**ECD-EMMPRIN**, **E**xtra**C**ellular **D**omain), έγινε στο

σύστημα του ζυμομύκητα *Pichia pastoris*, που προσφέρει υψηλή έκφραση διαλυτής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και σωστή διαμόρφωσή της. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη απομονώθηκε από το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας με χρωματογραφία συγγένειας (Ni^{2+} -NTA) και στη συνέχεια ελέγχθηκε η λειτουργικότητά της ως προς την επαγωγή της MMP-2 με τη μέθοδο της ζυμογραφίας. Μετά από επίδραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε ινοβλάστες δέρματος, παρατηρήθηκε μία δόσοεξαρτώμενη αύξηση στη δραστηριότητα της ενεργούς μορφής της MMP-2 (65 kDa). Τα αποτελέσματα έδειξαν 3.53, 9.57, 15.5 και 17.36 φορές αύξηση της επαγωγής της MMP-2 κατόπιν προσθήκης 1.6, 3.2, 6.4, και 12.8 $\mu\text{g}/\text{φρεάτιο}$ ECD-EMMPRIN αντίστοιχα, σε σχέση με τους ινοβλάστες που δεν είχαν δεχτεί επίδραση της εξωγενούς ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (αρνητικό δείγμα ελέγχου). Η αύξηση της MMP-2 ήταν στατιστικά σημαντική μέχρι την προσθήκη 6.4 $\mu\text{g}/\text{φρεάτιο}$ ECD-EMMPRIN, ενώ το φαινόμενο δεν ήταν στατιστικά σημαντικό όταν προστέθηκαν 12.8 $\mu\text{g}/\text{φρεάτιο}$ ($p = 0.999$).

Στη συνέχεια η ECD-EMMPRIN χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα για την απομόνωση ενός ανθρώπινου αντισώματος, το οποίο θα εκφραζόταν στην επιφάνεια νηματοειδών βακτηριοφάγων σαν Fab τμήμα, μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων επιλογής (biopanning). Από το σύνολο των κλώνων που απομονώθηκαν από τη βιβλιοθήκη, μετά από ανάλυση DNA με «fingerprinting» και αλληλουχίση, ενισχύθηκε τελικά ένας κλώνος (Fab7) με ειδικότητα έναντι της ECD-EMMPRIN, και με υψηλή συγγένεια για το αντιγόνο. Επίσης, έγινε κατασκευή ολόκληρου του αντισώματος (mAb7) για έκφρασή του στο υπερκείμενο της καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών CHO. Τα Fab7 και mAb7 καλλιεργήθηκαν και απομονώθηκαν σε μεγάλη κλίμακα. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, έδειξαν ότι τα αντισώματα ήταν ειδικά για το φυσικό μόριο της EMMPRIN, ενώ η ανάλυση κατά Western έδειξε πως αναγνώριζαν κυρίως τα υψηλής γλυκοζυλίωσης μόρια της EMMPRIN. Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η ικανότητα των Fab7 και mAb7 να αναστέλλουν τη μεταστατικότητα των κυττάρων καρκινικών σειρών μαστού και ωοθηκών με τις μεθόδους «επούλωσης πληγής» (wound healing) και «διήθησης της εξωκυττάριας ουσίας» (matrigel invasion assays). Το αντίσωμα που απομονώθηκε έναντι της ECD-EMMPRIN, είτε σαν Fab τμήμα είτε σαν ολόκληρο μονοκλωνικό αντίσωμα, δεν ήταν ικανό να αναστείλει τη μεταστατικότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών μαστού και ωοθηκών. Αντιθέτως, μπορούσε να επάγει υψηλά επίπεδα MMPs σε σχέση με το δείγμα ελέγχου σε πειράματα ζυμογραφίας.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το αντίσωμα που απομονώθηκε έναντι της ECD-EMMPRIN δεν παρεμποδίζει τη δράση της EMMPRIN σχετικά με την επαγωγή της MMP-2, αλλά αντίθετα φαίνεται να την ενισχύει. Για το λόγο αυτό κρίθηκε αναγκαίο να χρησιμοποιηθούν μικρότερα τμήματα, όπως οι υποπεριοχές IgI και IgII της εξωκυτταρικής περιοχής της EMMPRIN, για την επιλογή παρεμποδιστικών ανασυνδυασμένων ανθρώπινων αντισωμάτων τα οποία θα ήταν ικανά να αναχαιτίσουν την δράση της EMMPRIN στην επαγωγή των MMPs. Η χρησιμοποίηση μικρότερης περιοχής για την επιλογή των αντισωμάτων στους κύκλους του biopanning, ίσως βοηθούσε σε μια πιο στοχευμένη επιλογή. Η επιλογή - εκτός της IgI περιοχής που θεωρείται η υπεύθυνη για την επαγωγή των MMPs - και της IgII σαν αντιγόνο επιλογής, έγινε διότι υπάρχουν ορισμένες ενδείξεις που της προσδίδουν και αυτή τη δράση. Παράλληλα, κρίθηκε αναγκαίο να διερευνηθεί η συμβολή των υποπεριοχών IgI και IgII της εξωκυτταρικής περιοχής της EMMPRIN στην επαγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών και το ρόλο της γλυκοζυλίωσης στη διαδικασία αυτή.

Για το λόγο αυτό, εκτός από την υποκλωνοποίηση και έκφραση των IgI και IgII τμημάτων της ECD-EMMPRIN στο ζυμομύκητα *P.pastoris*, πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση και έκφραση στο βακτήριο *E.coli*, προκειμένου να παραχθούν σε γλυκοζυλιωμένη και μη μορφή, αντίστοιχα. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η λειτουργικότητα των υποπεριοχών IgI και IgII της εξωκυτταρικής περιοχής της EMMPRIN στην επαγωγή των MMPs και στη συνέχεια έγινε σάρωση της βιβλιοθήκης ανθρώπινων αντισωμάτων, προκειμένου να απομονωθεί ένα παρεμποδιστικό αντίσωμα που θα μπορούσε να αναστείλει τη λειτουργία της EMMPRIN.

Σε πειράματα ζυμογραφίας φάνηκε ότι οι ινοβλάστες που είχαν επωαστεί με τις γλυκοζυλιωμένες IgI και IgII περιοχές μπορούσαν να επάγουν σημαντικά την έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης-2 (MMP-2). Η επαγωγή αυτή ήταν υψηλότερη κατά 37.54, 15.07 και 27.06 φορές αντίστοιχα σε σχέση με τους ινοβλάστες που δεν είχαν υποστεί καμία επίδραση (αρνητικό δείγμα ελέγχου). Οι πρωτεΐνες που είχαν παραχθεί στα βακτήρια και δεν είχαν υποστεί μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, δεν μπορούσαν να επάγουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό την MMP-2. Οι στατιστικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των γλυκοζυλιωμένων και μη μορφών, έδειξαν πως μόνο οι γλυκοζυλιωμένες μορφές των ECD-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN πρωτεϊνών μπορούσαν να επάγουν ικανοποιητικά την MMP-2. Η

IgI-EMMPRIN δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της MMP-2 μεταξύ της γλυκοζυλιωμένης και μη μορφής.

Η επαγωγική ικανότητα των τμημάτων ECD-EMMPRIN, IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN για την MMP-2 διερευνήθηκε επίσης με ανάλυση κατά Western. Η ανάλυση πρωτεϊνών από κυτταρικά εκχυλίσματα έδειξε ότι η έκφραση της MMP-2 επάγεται μόνο στα κύτταρα στα οποία είχε γίνει επίδραση με τα γλυκοζυλιωμένα μόρια ECD-EMMPRIN, IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN, ενώ στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με τα αντίστοιχα ανασυνδυασμένα μόρια που είχαν παραχθεί στα βακτήρια, η έκφραση της MMP-2 δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Επιπλέον, αναλύθηκαν συμπυκνωμένα υπερκείμενα κυττάρων, όπου μόνο οι γλυκοζυλιωμένες μορφές των ECD-EMMPRIN, IgII-EMMPRIN και πολύ λιγότερο της IgI-EMMPRIN, ήταν ικανές να διεγείρουν την έκκριση της MMP-2 στο υπερκείμενο των ινοβλαστών.

Για να διασαφηνιστεί ο μηχανισμός που ενέχεται στην επαγωγή της MMP-2 από τις γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες ECD-EMMPRIN, IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN, πραγματοποιήθηκε ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (RT-PCR) σε πρωτογενείς καλλιέργειες ινοβλαστών. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα του mRNA της MMP-2, μεταξύ των δειγμάτων που είχαν επωαστεί με τα γλυκοζυλιωμένα και μη γλυκοζυλιωμένα μόρια της EMMPRIN. Το αποτέλεσμα αυτό φανερώνει πως η ενεργοποίηση της έκφρασης της MMP-2 από τις γλυκοζυλιωμένες μορφές των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, δεν οφείλεται σε μεταγραφικές αλλαγές αλλά πιθανόν σε μετα-μεταγραφικές / μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή έδειξε ότι:

- 1) η γλυκοζυλίωση των εξωκυτταρικών περιοχών της EMMPRIN επάγει την έκφραση της MMP-2 και
- 2) η IgII περιοχή ενέχεται σε αυτήν την επαγωγή.

Οι γλυκοζυλιωμένες μορφές IgI-EMMPRIN και IgII-EMMPRIN, οι οποίες εκφράστηκαν στην *P.pastoris*, χρησιμοποιήθηκαν σαν υποστρώματα για την σάρωση της ανθρώπινης βιβλιοθήκης “φάγων-αντισωμάτων”, που χρησιμοποιήθηκε και προηγουμένως, με σκοπό την απομόνωση λειτουργικών παρεμποδιστικών anti-EMMPRIN αντισωμάτων. Για το λόγο αυτό επαναλήφθηκε η διαδικασία επιλογής από τη βιβλιοθήκη, η οποία δεν οδήγησε στην απομόνωση κάποιου ειδικού

αντισώματος. Η αδυναμία απομόνωσης ενός αντισώματος που θα ανέστειλε τη δράση της EMMPRIN μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες:

α) είναι πιθανό ο συνδυασμός βαριών και ελαφριών αλυσίδων κατά την κατασκευή της βιβλιοθήκης των φάγων-αντισωμάτων να μην αντικατοπτρίζει την *in vivo* κατάσταση στα Β λεμφοκύτταρα διηθημένων λεμφαδένων του ασθενούς, παρ' όλο που κατά την κατασκευή της βιβλιοθήκης ο τίτλος ποικιλομορφίας ήταν ικανοποιητικός.

β) η βιβλιοθήκη των φάγων-αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκε είχε δημιουργηθεί από τα Β λεμφοκύτταρα διηθημένων λεμφαδένων ενός ασθενή με καρκίνο μαστού, ο οποίος ήταν θετικός στο HER-2/neu. Είναι πιθανό ο ασθενής αυτός να μην είχε αντισώματα με παρεμποδιστική δράση έναντι της EMMPRIN και κατ' επέκταση ούτε η βιβλιοθήκη των φάγων-αντισωμάτων που κατασκευάστηκε.

γ) Είναι πιθανό το αντίσωμα που απομονώθηκε από τη βιβλιοθήκη να αλληλεπιδρά με την EMMPRIN και να σχηματίζει ετεροδιμερή, τα οποία στη συνέχεια ενεργοποιούν την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών, καθώς είναι γνωστό ότι η EMMPRIN ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και μοιάζει δομικά με το αντίσωμα. Αυτό όμως είναι δύσκολο να ελεγχθεί καθώς δεν υπάρχει υλικό πλέον από αυτόν τον ασθενή.

Τα αποτελέσματα αυτά ενώ είναι αποτρεπτικά για τη χρήση του αντισώματος σε περιπτώσεις όγκων όπου υπερκφράζεται η EMMPRIN, θα μπορούσε όμως να συμβάλλει ενεργά σε καταστάσεις όπου απαιτείται παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών, όπως στην επούλωση τραύματος, την αναδόμηση ιστών και την αγγειογένεση.

SUMMARY

A critical point during the infiltration and migration of cancer cells is the degradation of the extracellular space. Major components of this process are metalloproteinases (MMPs), which are regulated by several factors, including EMMPRIN, which is a major regulator of the expression of MMPs. EMMPRIN is a transmembrane protein detected in abundance at the membrane of many types of cancer cells. It belongs to the immunoglobulin superfamily and is also known as basigin or CD147 or EMMPRIN. It consists of a 185 amino acid extracellular region containing two immunoglobulin-like domains (IgI and IgII), a 24 amino acid transmembrane region and a cytoplasmic domain of 39 amino acids. The extracellular domain contains three conserved N-glycosylation sites (one in IgI and two in IgII), which are very diverse in their glycosylation. There are molecules with high levels of glycosylation (HG-CD147), while others are less glycosylated (LG-CD147). The increased glycosylation of EMMPRIN in cancer suggests that glycosylation contributes to the induction of MMPs.

The important role of EMMPRIN during the migration of cancer cells makes this molecule a potential therapeutic target and the isolation of molecules that could inhibit its action, a promising strategy. The purpose of this study was to isolate human antibodies against EMMPRIN and use them as therapeutic molecules in order to inhibit the activity of EMMPRIN and consequently the metastasis of cancer. For this purpose, a library of human antibodies of a patient with breast cancer HER2⁺ was used, which was constructed with the technology of "phage-antibody". The library was constructed with the use of infiltrated lymph node B cells, with the cDNA coding the Fab portion of antibody (VH-CH1 and VL-CL) being amplified by PCR and then cloned in the phagemid expression vector pComb3H.

The selection of specific phage-antibody required the antigen in large amounts and high purity. The production of the antigen, which in this case was the extracellular domain of EMMPRIN (ECD-EMMPRIIN, ExtraCellular Domain), was performed to the yeast *Pichia pastoris*, a system that offers high expression of soluble recombinant protein, proper refolding and post-translational modifications. The recombinant protein was isolated from the culture medium by affinity chromatography (Ni²⁺-NTA) and then tested with gelatin zymography assay for its ability to induce MMP-2. After incubating skin fibroblasts with the recombinant protein, there was a dose dependent increase in activity of the active form of MMP-2 (65 kDa). The results showed 3.53, 9.57, 5.15 and 17.36 fold increase in induction of

MMP-2 by adding 1.6, 3.2, 6.4, and 12.8 µg/well ECD-EMMPRIN, respectively, compared with fibroblasts that had not received exogenous recombinant protein (negative control). The increase of MMP-2 was statistically significant with the addition of 6.4 µg/well ECD-EMMPRIN, while the effect was not significant when 12.8 µg/well was added ($p = 0.999$).

Then, ECD-EMMPRIN was used as substrate for the isolation of a human antibody, which was expressed on the surface of filamentous bacteriophage as a Fab portion through repeated cycles of selection (biopanning). Among all the clones isolated from the library and analysed by DNA «fingerprinting» and sequencing, only one (Fab7) with the higher specificity against ECD-EMMPRIN was ultimately strengthened and further amplified. Also, the whole antibody (mAb7) was constructed after subcloning of the cDNA regions coding for the heavy and light chains of Fab7 to pIgG1 vector for expression in the culture supernatant of mammalian cells CHO. Fab7 and mAb7 were isolated and cultured on a large scale for further analysis.

Immunoprecipitation experiments showed that Fab7 and mAb7 were specific for natural EMMPRIN, while Western analysis showed that they recognized molecules with high glycosylation (HG-EMMPRIN). Subsequently, the ability of Fab7 and mAb7 to inhibit metastatic cells of breast and ovarian cancer cell lines was investigated by "wound healing" and "matrigel invasion assays". The antibody isolated against ECD-EMMPRIN, either as Fab portion or as whole monoclonal antibody, was not able to inhibit the metastatic potential of breast and ovarian cancer cells. In contrast, both Fab7 and mAb7 were able to induce high levels of MMPs compared to control sample in zymography experiments.

The above results indicate that the antibody isolated against ECD-EMMPRIN does not inhibit the activity of EMMPRIN related to the induction of MMP-2, but instead it seems to reinforce it. For this reason, it was considered necessary to use smaller parts, such as the IgI and IgII extracellular subdomains of EMMPRIN, for the selection of recombinant human function blocking antibodies. The use of smaller area for the selection of antibodies cycles of biopanning, may assist to a more targeted selection. The choice of IgII as antigen selection – besides IgI domain which is considered bibliographically as the responsible domain for the induction of MMPs – was due to some evidence that imply this kind of action. At the same time, it was considered necessary to elucidate the contribution of subregions IgI and IgII to the induction of MMPs and the role of glycosylation in this process. For this reason,

except for the subcloning and expression of glycosylated IgI and IgII portions of ECD-EMMPRIN in yeast *P.pastoris*, these domains were subcloned and expressed in the bacterium *E.coli* in order to produce their non-glycosylated counterparts. In the present study, the ability of ECD-EMMPRIN subregions IgI and IgII to induce MMPs was initially tested. Then, they were used as substrates for the scanning of the human antibody library in order to isolate an antibody that could inhibit the activity of EMMPRIN.

Zymography experiments on fibroblasts incubated with the glycosylated IgI and IgII showed that they could significantly induce the expression of metalloproteinase-2 (MMP-2). This induction was higher at 37.54, 15.07 and 6.27 times respectively, compared to fibroblasts which had not undergone any exogenous effect (negative control). The proteins produced in bacteria and had no post-translational modifications could not induce significantly the production of MMP-2. The statistical analyses performed between glycosylated and non-glucosylated forms, showed that only the glycosylated forms of ECD-EMMPRIN and IgII-EMMPRIN proteins could satisfactory induce MMP-2. The IgI-EMMPRIN had no statistically significant difference in expression levels of MMP-2 between the glycosylated and the non glycosylated form.

The inductive capacity of ECD-EMMPRIN, IgI and IgII-EMMPRIN-EMMPRIN was also investigated by Western Blot analysis. The protein analysis of cell extracts revealed that the expression of MMP-2 was induced only in cells which were incubated with the glycosylated molecules ECD-EMMPRIN, IgI-EMMPRIN and IgII-EMMPRIN, while cells incubated with recombinant molecules produced in bacteria did not have any statistically significant expression of MMP-2. In addition, experiments with concentrated cell supernatants, showed that only the glycosylated forms of ECD-EMMPRIN, IgII-EMMPRIN and much less of IgI-EMMPRIN was sufficient to stimulate the secretion of MMP-2 in the supernatant of the fibroblasts.

To further elucidate the mechanism involved in the induction of MMP-2 from the glycosylated proteins ECD-EMMPRIN, IgI-EMMPRIN and IgII-EMMPRIN, Quantitative Polymerase Chain Reaction (Q-PCR) in primary fibroblast cultures was performed. The results showed that there was no statistically significant difference in the mRNA levels of MMP-2 between samples incubated with the glycosylated and unglycosylated extracellular domains of EMMPRIN. This result suggests that the activation of the expression of MMP-2 from the glycosylated forms of the

recombinant proteins is not due to transcriptional changes but possibly by post-transcriptional / translational modifications.

In conclusion, this study showed that:

- 1) The glycosylation of the extracellular domains of EMMPRIN induce expression of MMP-2
- 2) The IgII subdomain of ECD-EMMPRIN is involved in this process

The glycosylated forms of IgI-EMMPRIN and IgII-EMMPRIN were used as substrates for the screening of the human "phage-antibody" library, which was isolated in our lab and was mentioned earlier, in order to isolate inhibitory anti-EMMPRIN antibodies. For this reason, the selection process was repeated but in both cases (whether IgI or IgII was used as a substrate) but did not lead to the isolation of a specific antibody. The inability to find an antibody able to inhibit the activity of EMMPRIN may be due to several factors:

- a) it is likely that the combination of heavy and light chains during construction of the library does not reflect the in vivo situation of the infiltrated B lymphocytes of the patient, although diversity of the library was satisfactory.
- b) the phage-antibody library was created by the B lymphocytes infiltrated to the lymph node of a patient with breast cancer who was positive for HER-2/neu. It is likely that the patient does not have antibodies with inhibitory activity against EMMPRIN and thus neither does the library of phage-antibody constructed by these cells.
- c) It is possible that the antibody isolated from the library interacts with EMMPRIN and forms heterodimers, which then activate the expression of MMPs, as it is known that EMMPRIN belongs to the immunoglobulin superfamily and structurally resembles to the antibody. However, this is difficult to elucidate as there is no longer any biological material left from this patient.

These results are deterrent for the use of the antibody in cases where tumors overexpress EMMPRIN but it could contribute actively in situations where there is a vital need for production of MMPs such as wound healing, tissue remodeling and angiogenesis.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agrawal, S. M., C. Silva, et al. (2011). "EMMPRIN: a novel regulator of leukocyte transmigration into the CNS in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neurosci **31**(2): 669-677.
- Agrawal, S. M., C. Silva, et al. (2012). "A novel anti-EMMPRIN function-blocking antibody reduces T cell proliferation and neurotoxicity: relevance to multiple sclerosis." J Neuroinflammation **9**: 64.
- Aimes, R. T. and J. P. Quigley (1995). "Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments." J Biol Chem **270**(11): 5872-5876.
- Ala-Aho, R., N. Johansson, et al. (2002). "Expression of collagenase-3 (MMP-13) enhances invasion of human fibrosarcoma HT-1080 cells." Int J Cancer **97**(3): 283-289.
- Allan, J. A., A. J. Docherty, et al. (1995). "Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components." Biochem J **309** (Pt 1): 299-306.
- Altruda, F., P. Cervella, et al. (1989). "Cloning of cDNA for a novel mouse membrane glycoprotein (gp42): shared identity to histocompatibility antigens, immunoglobulins and neural-cell adhesion molecules." Gene **85**(2): 445-451.
- Ando, T., H. Ishiguro, et al. (2007). "The overexpression of caveolin-1 and caveolin-2 correlates with a poor prognosis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma." Oncol Rep **18**(3): 601-609.
- Arora, K., W. M. Gwinn, et al. (2005). "Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses." J Immunol **175**(1): 517-522.
- Assaraf, Y. G. (2006). "The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis." Drug Resist Updat **9**(4-5): 227-246.
- Baba, M., M. Inoue, et al. (2008). "Blocking CD147 induces cell death in cancer cells through impairment of glycolytic energy metabolism." Biochem Biophys Res Commun **374**(1): 111-116.
- Barbas, C. F., 3rd, A. S. Kang, et al. (1991). "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(18): 7978-7982.
- Barth, K., R. Blasche, et al. (2006). "Lack of evidence for caveolin-1 and CD147 interaction before and after bleomycin-induced lung injury." Histochem Cell Biol **126**(5): 563-573.
- Bein, K. and M. Simons (2000). "Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity." J Biol Chem **275**(41): 32167-32173.
- Belien, A. T., P. A. Paganetti, et al. (1999). "Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter." J Cell Biol **144**(2): 373-384.
- Belimezi, M. M., D. Papanastassiou, et al. (2006). "Growth inhibition of breast cancer cell lines overexpressing Her2/neu by a novel internalized fully human Fab antibody fragment." Cancer Immunol Immunother **55**(9): 1091-1099.

- Belton, R. J., Jr., L. Chen, et al. (2008). "Basigin-2 is a cell surface receptor for soluble basigin ligand." J Biol Chem **283**(26): 17805-17814.
- Bender, F. C., M. A. Reymond, et al. (2000). "Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity." Cancer Res **60**(20): 5870-5878.
- Berditchevski, F., S. Chang, et al. (1997). "Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6." J Biol Chem **272**(46): 29174-29180.
- Birchmeier, C., W. Birchmeier, et al. (1996). "Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression." Acta Anat (Basel) **156**(3): 217-226.
- Birkedal-Hansen, H., W. G. Moore, et al. (1993). "Matrix metalloproteinases: a review." Crit Rev Oral Biol Med **4**(2): 197-250.
- Biswas, C., Y. Zhang, et al. (1995). "The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily." Cancer Res **55**(2): 434-439.
- Bordador, L. C., X. Li, et al. (2000). "Expression of emmprin by oral squamous cell carcinoma." Int J Cancer **85**(3): 347-352.
- Brooks, P. C., S. Stromblad, et al. (1996). "Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3." Cell **85**(5): 683-693.
- Broxterman, H. J. and N. H. Georgopapadakou (2007). "Anticancer therapeutics: a surge of new developments increasingly target tumor and stroma." Drug Resist Updat **10**(4-5): 182-193.
- Campa, M. J., M. Z. Wang, et al. (2003). "Protein expression profiling identifies macrophage migration inhibitory factor and cyclophilin a as potential molecular targets in non-small cell lung cancer." Cancer Res **63**(7): 1652-1656.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, et al. (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." Nature **380**(6573): 435-439.
- Caudroy, S., M. Polette, et al. (1999). "Expression of the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and the matrix metalloproteinase-2 in bronchopulmonary and breast lesions." J Histochem Cytochem **47**(12): 1575-1580.
- Chen, X., J. Lin, et al. (2006). "A small interfering CD147-targeting RNA inhibited the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of malignant melanoma." Cancer Res **66**(23): 11323-11330.
- Chen, Y., H. Zhang, et al. (2009). "Upregulation of HAb18G/CD147 in activated human umbilical vein endothelial cells enhances the angiogenesis." Cancer Lett **278**(1): 113-121.
- Chiampanichayakul, S., P. Peng-in, et al. (2006). "CD147 contains different bioactive epitopes involving the regulation of cell adhesion and lymphocyte activation." Immunobiology **211**(3): 167-178.

- Cohen, A. W., B. Razani, et al. (2004). "Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation." Diabetes **53**(5): 1261-1270.
- Corn, P. G. and T. C. Thompson (2010). "Identification of a novel prostate cancer biomarker, caveolin-1: Implications and potential clinical benefit." Cancer Manag Res **2**: 111-122.
- Crawford, H. C., B. Fingleton, et al. (2001). "The PEA3 subfamily of Ets transcription factors synergizes with beta-catenin-LEF-1 to activate matrilysin transcription in intestinal tumors." Mol Cell Biol **21**(4): 1370-1383.
- Curtin, K. D., R. J. Wyman, et al. (2007). "Basigin/EMMPRIN/CD147 mediates neuron-glia interactions in the optic lamina of Drosophila." Glia **55**(15): 1542-1553.
- Dai, J. Y., K. F. Dou, et al. (2009). "The interaction of HAb18G/CD147 with integrin alpha6beta1 and its implications for the invasion potential of human hepatoma cells." BMC Cancer **9**: 337.
- Dai, Y. and S. Grant (2007). "Targeting multiple arms of the apoptotic regulatory machinery." Cancer Res **67**(7): 2908-2911.
- Dalberg, K., E. Eriksson, et al. (2000). "Gelatinase A, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and extracellular matrix metalloproteinase inducer mRNA expression: correlation with invasive growth of breast cancer." World J Surg **24**(3): 334-340.
- Dano, K., N. Behrendt, et al. (2005). "Plasminogen activation and cancer." Thromb Haemost **93**(4): 676-681.
- Davidson, B., V. Givant-Horwitz, et al. (2003). "Matrix metalloproteinases (MMP), EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) and mitogen-activated protein kinases (MAPK): co-expression in metastatic serous ovarian carcinoma." Clin Exp Metastasis **20**(7): 621-631.
- Davidson, B., I. Goldberg, et al. (2003). "EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) is a novel marker of poor outcome in serous ovarian carcinoma." Clin Exp Metastasis **20**(2): 161-169.
- Dean, N. R., J. R. Newman, et al. (2009). "Anti-EMMPRIN monoclonal antibody as a novel agent for therapy of head and neck cancer." Clin Cancer Res **15**(12): 4058-4065.
- Demetriou, M. C., M. E. Pennington, et al. (2004). "Extracellular alpha 6 integrin cleavage by urokinase-type plasminogen activator in human prostate cancer." Exp Cell Res **294**(2): 550-558.
- Deora, A. A., D. Gravotta, et al. (2004). "The basolateral targeting signal of CD147 (EMMPRIN) consists of a single leucine and is not recognized by retinal pigment epithelium." Mol Biol Cell **15**(9): 4148-4165.
- Deryugina, E. I., G. X. Luo, et al. (1997). "Tumor cell invasion through matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2." Anticancer Res **17**(5A): 3201-3210.
- Du, Z. M., C. F. Hu, et al. (2009). "Upregulation of caveolin-1 and CD147 expression in nasopharyngeal carcinoma enhanced tumor cell migration and correlated with poor prognosis of the patients." Int J Cancer **125**(8): 1832-1841.

- Edwards, D. R. (2001). Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy Totowa, New Jersey, Humana Press,.
- Egawa, N., N. Koshikawa, et al. (2006). "Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) cleaves and releases a 22-kDa extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) fragment from tumor cells." J Biol Chem **281**(49): 37576-37585.
- Ellis, S. M., K. Nabeshima, et al. (1989). "Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor." Cancer Res **49**(12): 3385-3391.
- English, W. R., X. S. Puente, et al. (2000). "Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2." J Biol Chem **275**(19): 14046-14055.
- Ergul, A., V. Portik-Dobos, et al. (2004). "Downregulation of vascular matrix metalloproteinase inducer and activator proteins in hypertensive patients." Am J Hypertens **17**(9): 775-782.
- Fadool, J. M. and P. J. Linser (1993). "5A11 antigen is a cell recognition molecule which is involved in neuronal-glial interactions in avian neural retina." Dev Dyn **196**(4): 252-262.
- Fadool, J. M. and P. J. Linser (1993). "Differential glycosylation of the 5A11/HT7 antigen by neural retina and epithelial tissues in the chicken." J Neurochem **60**(4): 1354-1364.
- Fan, Q. W., S. Yuasa, et al. (1998). "Expression of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in the mouse central nervous system." Neurosci Res **30**(1): 53-63.
- Ferrara, N., K. Carver-Moore, et al. (1996). "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene." Nature **380**(6573): 439-442.
- Fiucci, G., D. Ravid, et al. (2002). "Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells." Oncogene **21**(15): 2365-2375.
- Fong, A., E. Garcia, et al. (2003). "Expression of caveolin-1 and caveolin-2 in urothelial carcinoma of the urinary bladder correlates with tumor grade and squamous differentiation." Am J Clin Pathol **120**(1): 93-100.
- Fossum, S., S. Mallett, et al. (1991). "The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence." Eur J Immunol **21**(3): 671-679.
- Frandsen, T. L., C. Holst-Hansen, et al. (2001). "Direct evidence of the importance of stromal urokinase plasminogen activator (uPA) in the growth of an experimental human breast cancer using a combined uPA gene-disrupted and immunodeficient xenograft model." Cancer Res **61**(2): 532-537.
- Gabison, E. E., S. Mourah, et al. (2005). "Differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) in normal and ulcerated corneas:

- role in epithelio-stromal interactions and matrix metalloproteinase induction." Am J Pathol **166**(1): 209-219.
- Gallagher, S. M., J. J. Castorino, et al. (2007). "Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231." Cancer Res **67**(9): 4182-4189.
- Gatenby, R. A. (2006). "Commentary: carcinogenesis as Darwinian evolution? Do the math!" Int J Epidemiol **35**(5): 1165-1167.
- Gatenby, R. A. and B. R. Frieden (2004). "Information dynamics in carcinogenesis and tumor growth." Mutat Res **568**(2): 259-273.
- Gatenby, R. A., E. T. Gawlinski, et al. (2006). "Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study." Cancer Res **66**(10): 5216-5223.
- Ghatak, S., S. Misra, et al. (2005). "Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells." J Biol Chem **280**(10): 8875-8883.
- Giannelli, G., J. Falk-Marzillier, et al. (1997). "Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5." Science **277**(5323): 225-228.
- Goede, V., T. Schmidt, et al. (1998). "Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis." Lab Invest **78**(11): 1385-1394.
- Gottesman, M. M. (2002). "Mechanisms of cancer drug resistance." Annu Rev Med **53**: 615-627.
- Guo, H., G. Majumdar, et al. (1998). "Characterization of the gene for human EMMPRIN, a tumor cell surface inducer of matrix metalloproteinases." Gene **220**(1-2): 99-108.
- Guo, H., S. Zucker, et al. (1997). "Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells." J Biol Chem **272**(1): 24-27.
- Gururajan, R., J. M. Lahti, et al. (1998). "Duplication of a genomic region containing the Cdc2L1-2 and MMP21-22 genes on human chromosome 1p36.3 and their linkage to D1Z2." Genome Res **8**(9): 929-939.
- Handsley, M. M. and D. R. Edwards (2005). "Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis." Int J Cancer **115**(6): 849-860.
- Hanna, S. M., P. Kirk, et al. (2003). "A novel form of the membrane protein CD147 that contains an extra Ig-like domain and interacts homophilically." BMC Biochem **4**: 17.
- Hassane M. Zarour, M., Albert DeLeo, PhD, Olivera J. Finn, PhD, and Walter J. Storkus, PhD., Ed. Categories of Tumor Antigens, Holland-Frei Cancer Medicine.
- Heppner, K. J., L. M. Matrisian, et al. (1996). "Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response." Am J Pathol **149**(1): 273-282.
- Hironobu Hojo, E. H., Yoshiyuki Matsumoto, Yoshiaki Nakahara, and B. P. T. a. Y. W. Kazuki Nabeshima (2003). "The first synthesis of peptide thioester

- carrying N-linked core pentasaccharide through modified Fmoc thioester preparation: synthesis of an N-glycosylated Ig domain of emmprin." Tetrahedron Letters **Tetrahedron Letters**: 2961–2964.
- Ho, C. C., P. H. Huang, et al. (2002). "Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation." Am J Pathol **161**(5): 1647-1656.
- Hoogenboom, H. R., A. P. de Bruine, et al. (1998). "Antibody phage display technology and its applications." Immunotechnology **4**(1): 1-20.
- Hua, J. and R. J. Muschel (1996). "Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system." Cancer Res **56**(22): 5279-5284.
- Huang, W., W. J. Luo, et al. (2013). "Modulation of CD147-induced matrix metalloproteinase activity: role of CD147 N-glycosylation." Biochem J **449**(2): 437-448.
- Huet, E., B. Vallee, et al. (2008). "Extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 promotes myofibroblast differentiation by inducing alpha-smooth muscle actin expression and collagen gel contraction: implications in tissue remodeling." FASEB J **22**(4): 1144-1154.
- Iacono, K. T., A. L. Brown, et al. (2007). "CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology." Exp Mol Pathol **83**(3): 283-295.
- Igakura, T., K. Kadomatsu, et al. (1998). "A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis." Dev Biol **194**(2): 152-165.
- Igakura, T., K. Kadomatsu, et al. (1996). "Roles of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in behavior as to an irritating odor, lymphocyte response, and blood-brain barrier." Biochem Biophys Res Commun **224**(1): 33-36.
- Ishibashi, Y., T. Matsumoto, et al. (2004). "CD147 and matrix metalloproteinase-2 protein expression as significant prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma." Cancer **101**(9): 1994-2000.
- Itoh, T., M. Tanioka, et al. (1999). "Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice." Clin Exp Metastasis **17**(2): 177-181.
- Itoh, T., M. Tanioka, et al. (1998). "Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice." Cancer Res **58**(5): 1048-1051.
- Jia, L., S. Wang, et al. (2006). "Caveolin-1 up-regulates CD147 glycosylation and the invasive capability of murine hepatocarcinoma cell lines." Int J Biochem Cell Biol **38**(9): 1584-1593.
- Johns, M. (2000). "Phage display technology." Methods Mol Med **40**: 53-62.
- Kaname, T., T. Miyauchi, et al. (1993). "Mapping basigin (BSG), a member of the immunoglobulin superfamily, to 19p13.3." Cytogenet Cell Genet **64**(3-4): 195-197.
- Kasinrerk, W., E. Fiebigler, et al. (1992). "Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule." J Immunol **149**(3): 847-854.

- Kataoka, H., R. DeCastro, et al. (1993). "Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase." Cancer Res **53**(13): 3154-3158.
- Kim, H., C. J. Rigell, et al. (2014). "Antagonistic effects of anti-EMMPRIN antibody when combined with chemotherapy against hypovascular pancreatic cancers." Mol Imaging Biol **16**(1): 85-94.
- Kim, J., W. Yu, et al. (1998). "Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay." Cell **94**(3): 353-362.
- Kirk, P., M. C. Wilson, et al. (2000). "CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression." EMBO J **19**(15): 3896-3904.
- Klein, C. A., S. Seidl, et al. (2002). "Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells." Nat Biotechnol **20**(4): 387-392.
- Ko, K., S. Yazumi, et al. (2000). "Activation of fibroblast-derived matrix metalloproteinase-2 by colon-cancer cells in non-contact Co-cultures." Int J Cancer **87**(2): 165-171.
- Koch, C., G. Staffler, et al. (1999). "T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density." Int Immunol **11**(5): 777-786.
- Kolb, C., S. Mauch, et al. (1997). "The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient." Immunol Lett **57**(1-3): 83-88.
- Koshikawa, N., G. Giannelli, et al. (2000). "Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5." J Cell Biol **148**(3): 615-624.
- Kronenberg, H. M. (2003). "Developmental regulation of the growth plate." Nature **423**(6937): 332-336.
- Kuang, Y. H., X. Chen, et al. (2008). "Proteome analysis of multidrug resistance of human oral squamous carcinoma cells using CD147 silencing." J Proteome Res **7**(11): 4784-4791.
- Kuang, Y. H., X. Chen, et al. (2009). "RNA interference targeting the CD147 induces apoptosis of multi-drug resistant cancer cells related to XIAP depletion." Cancer Lett **276**(2): 189-195.
- Landis-Piwowar, K. R., V. Milacic, et al. (2006). "The proteasome as a potential target for novel anticancer drugs and chemosensitizers." Drug Resist Updat **9**(6): 263-273.
- Li, J., Y. P. Zhang, et al. (2003). "Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix." Microsc Res Tech **60**(1): 107-114.
- Li, Q. Q., X. X. Cao, et al. (2009). "The role of P-glycoprotein/cellular prion protein interaction in multidrug-resistant breast cancer cells treated with paclitaxel." Cell Mol Life Sci **66**(3): 504-515.

- Li, Q. Q., W. J. Wang, et al. (2007). "Involvement of CD147 in regulation of multidrug resistance to P-gp substrate drugs and in vitro invasion in breast cancer cells." Cancer Sci **98**(7): 1064-1069.
- Li, R., L. Huang, et al. (2001). "Basigin (murine EMMPRIN) stimulates matrix metalloproteinase production by fibroblasts." J Cell Physiol **186**(3): 371-379.
- Li, W., N. Alfaidy, et al. (2004). "Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human placenta and fetal membranes at term labor." J Clin Endocrinol Metab **89**(6): 2897-2904.
- Li, Z. W. and W. S. Dalton (2006). "Tumor microenvironment and drug resistance in hematologic malignancies." Blood Rev **20**(6): 333-342.
- Liang, A. B., L. Li, et al. (2005). "[Preliminary study of VEGF and its receptor expression on childhood acute lymphoblastic leukemia and its relativity to clinical manifestations]." Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi **26**(8): 489-492.
- Liang, L., T. Major, et al. (2002). "Characterization of the promoter of human extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)." Gene **282**(1-2): 75-86.
- Liao, C. G., L. M. Kong, et al. (2011). "Characterization of basigin isoforms and the inhibitory function of basigin-3 in human hepatocellular carcinoma proliferation and invasion." Mol Cell Biol **31**(13): 2591-2604.
- Lim, M., T. Martinez, et al. (1998). "Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38." FEBS Lett **441**(1): 88-92.
- Liu, P., M. Rudick, et al. (2002). "Multiple functions of caveolin-1." J Biol Chem **277**(44): 41295-41298.
- Llano, E., A. M. Pendas, et al. (1999). "Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors." Cancer Res **59**(11): 2570-2576.
- Lochter, A., S. Galosy, et al. (1997). "Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells." J Cell Biol **139**(7): 1861-1872.
- Lohi, J., C. L. Wilson, et al. (2001). "Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury." J Biol Chem **276**(13): 10134-10144.
- Look, M. P., W. L. van Putten, et al. (2002). "Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients." J Natl Cancer Inst **94**(2): 116-128.
- Major, T. C., L. Liang, et al. (2002). "Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is induced upon monocyte differentiation and is expressed in human atheroma." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(7): 1200-1207.
- Marchenko, G. N. and A. Y. Strongin (2001). "MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors." Gene **265**(1-2): 87-93.

- Marieb, E. A., A. Zoltan-Jones, et al. (2004). "Emmprin promotes anchorage-independent growth in human mammary carcinoma cells by stimulating hyaluronan production." Cancer Res **64**(4): 1229-1232.
- Marionnet, C., C. Lalou, et al. (2003). "Differential molecular profiling between skin carcinomas reveals four newly reported genes potentially implicated in squamous cell carcinoma development." Oncogene **22**(22): 3500-3505.
- Martinez-Zaguilan, R., E. A. Seftor, et al. (1996). "Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells." Clin Exp Metastasis **14**(2): 176-186.
- McCafferty, J., A. D. Griffiths, et al. (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." Nature **348**(6301): 552-554.
- Mecham, R. P. (1998). "Conference summary: biology & pathobiology of the lung circulation." Chest **114**(1 Suppl): 106S-111S.
- Menashi, S., M. Serova, et al. (2003). "Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells." Cancer Res **63**(22): 7575-7580.
- Miyauchi, T., T. Kanekura, et al. (1990). "Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class II antigen." J Biochem **107**(2): 316-323.
- Miyauchi, T., Y. Masuzawa, et al. (1991). "The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen." J Biochem **110**(5): 770-774.
- Mott, J. D., C. L. Thomas, et al. (2000). "Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor." J Biol Chem **275**(2): 1384-1390.
- Muramatsu, T. (2012). "Basigin: a multifunctional membrane protein with an emerging role in infections by malaria parasites." Expert Opin Ther Targets **16**(10): 999-1011.
- Muraoka, K., K. Nabeshima, et al. (1993). "Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma: its usefulness as a tumor marker for bladder cancers." Int J Cancer **55**(1): 19-26.
- Murphy, G. and V. Knauper (1997). "Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain?" Matrix Biol **15**(8-9): 511-518.
- Nabeshima, K., H. Iwasaki, et al. (2006). "Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression." Pathol Int **56**(7): 359-367.
- Nabeshima, K., H. Iwasaki, et al. (2006). "Expression of emmprin and matrix metalloproteinases (MMPs) in peripheral nerve sheath tumors: emmprin and membrane-type (MT)1-MMP expressions are associated with malignant potential." Anticancer Res **26**(2B): 1359-1367.

- Nabeshima, K., W. S. Lane, et al. (1991). "Partial sequencing and characterization of the tumor cell-derived collagenase stimulatory factor." Arch Biochem Biophys **285**(1): 90-96.
- Nabeshima, K., J. Suzumiya, et al. (2004). "Emmprin, a cell surface inducer of matrix metalloproteinases (MMPs), is expressed in T-cell lymphomas." J Pathol **202**(3): 341-351.
- Nagase, H. (1997). "Activation mechanisms of matrix metalloproteinases." Biol Chem **378**(3-4): 151-160.
- Nakahara, H., L. Howard, et al. (1997). "Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(15): 7959-7964.
- Netzer, K. O., K. Suzuki, et al. (1998). "Comparative analysis of the noncollagenous NC1 domain of type IV collagen: identification of structural features important for assembly, function, and pathogenesis." Protein Sci **7**(6): 1340-1351.
- Noe, V., B. Fingleton, et al. (2001). "Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1." J Cell Sci **114**(Pt 1): 111-118.
- Novellino, L., C. Castelli, et al. (2005). "A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update." Cancer Immunol Immunother **54**(3): 187-207.
- Oh, J., R. Takahashi, et al. (2001). "The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis." Cell **107**(6): 789-800.
- Papadimitropoulou, A. and A. Mamalaki (2013). "The glycosylated IgII extracellular domain of EMMPRIN is implicated in the induction of MMP-2." Mol Cell Biochem **379**(1-2): 107-113.
- Papoutsis, M., H. Kurz, et al. (2000). "Induction of the blood-brain barrier marker neurothelin/HT7 in endothelial cells by a variety of tumors in chick embryos." Histochem Cell Biol **113**(2): 105-113.
- Pei, D., T. Kang, et al. (2000). "Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation." J Biol Chem **275**(43): 33988-33997.
- Pelicano, H., D. S. Martin, et al. (2006). "Glycolysis inhibition for anticancer treatment." Oncogene **25**(34): 4633-4646.
- Pelicano, H., R. H. Xu, et al. (2006). "Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism." J Cell Biol **175**(6): 913-923.
- Pendas, A. M., V. Knauper, et al. (1997). "Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution." J Biol Chem **272**(7): 4281-4286.

- Philp, N. J., J. D. Ochrietor, et al. (2003). "Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(3): 1305-1311.
- Polette, M., N. Gilbert, et al. (1994). "Gelatinase A expression and localization in human breast cancers. An in situ hybridization study and immunohistochemical detection using confocal microscopy." Virchows Arch **424**(6): 641-645.
- Polette, M., C. Gilles, et al. (1997). "Tumor collagenase stimulatory factor (TCSF) expression and localization in human lung and breast cancers." J Histochem Cytochem **45**(5): 703-709.
- Portik-Dobos, V., M. P. Anstadt, et al. (2002). "Evidence for a matrix metalloproteinase induction/activation system in arterial vasculature and decreased synthesis and activity in diabetes." Diabetes **51**(10): 3063-3068.
- Pushkarsky, T., V. Yurchenko, et al. (2005). "Cell surface expression of CD147/EMMPRIN is regulated by cyclophilin 60." J Biol Chem **280**(30): 27866-27871.
- Pyke, C., E. Ralfkiaer, et al. (1992). "Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization." Cancer Res **52**(5): 1336-1341.
- Quemener, C., E. E. Gabison, et al. (2007). "Extracellular matrix metalloproteinase inducer up-regulates the urokinase-type plasminogen activator system promoting tumor cell invasion." Cancer Res **67**(1): 9-15.
- Razani, B. and M. P. Lisanti (2001). "Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease." J Clin Invest **108**(11): 1553-1561.
- Renkvist, N., C. Castelli, et al. (2001). "A listing of human tumor antigens recognized by T cells." Cancer Immunol Immunother **50**(1): 3-15.
- Riethdorf, S., N. Reimers, et al. (2006). "High incidence of EMMPRIN expression in human tumors." Int J Cancer **119**(8): 1800-1810.
- Rodriguez-Manzaneque, J. C., T. F. Lane, et al. (2001). "Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12485-12490.
- Rosenthal, E. L., S. Shreenivas, et al. (2003). "Expression of extracellular matrix metalloprotease inducer in laryngeal squamous cell carcinoma." Laryngoscope **113**(8): 1406-1410.
- Ryu, O. H., A. G. Fincham, et al. (1999). "Characterization of recombinant pig enamelysin activity and cleavage of recombinant pig and mouse amelogenins." J Dent Res **78**(3): 743-750.
- Saarialho-Kere, U., E. Kerkela, et al. (2002). "Epilysin (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair." J Invest Dermatol **119**(1): 14-21.
- Sameshima, T., K. Nabeshima, et al. (2000). "Expression of emmprin (CD147), a cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas." Int J Cancer **88**(1): 21-27.

- Schlappack, O. K., A. Zimmermann, et al. (1991). "Glucose starvation and acidosis: effect on experimental metastatic potential, DNA content and MTX resistance of murine tumour cells." Br J Cancer **64**(4): 663-670.
- Schlosshauer, B. and K. H. Herzog (1990). "Neurothelin: an inducible cell surface glycoprotein of blood-brain barrier-specific endothelial cells and distinct neurons." J Cell Biol **110**(4): 1261-1274.
- Schneiderhan, W., M. Scheler, et al. (2009). "CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models." Gut **58**(10): 1391-1398.
- Schreiner, A., M. Ruonala, et al. (2007). "Junction protein shrew-1 influences cell invasion and interacts with invasion-promoting protein CD147." Mol Biol Cell **18**(4): 1272-1281.
- Seulberger, H., F. Lottspeich, et al. (1990). "The inducible blood--brain barrier specific molecule HT7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glycoprotein." EMBO J **9**(7): 2151-2158.
- Shah, N., G. Zhai, et al. (2012). "(18)F-FDG PET/CT imaging detects therapy efficacy of anti-EMMPRIN antibody and gemcitabine in orthotopic pancreatic tumor xenografts." Mol Imaging Biol **14**(2): 237-244.
- Shapiro, S. D., D. K. Kobayashi, et al. (1993). "Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages." J Biol Chem **268**(32): 23824-23829.
- Shi, Y., P. Ouyang, et al. (2000). "Characterization of the gene encoding pinin/DRS/memA and evidence for its potential tumor suppressor function." Oncogene **19**(2): 289-297.
- Shi, Y., M. N. Simmons, et al. (2001). "Change in gene expression subsequent to induction of Pnn/DRS/memA: increase in p21(cip1/waf1)." Oncogene **20**(30): 4007-4018.
- Shipley, J. M., R. L. Wesselschmidt, et al. (1996). "Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 3942-3946.
- Sidhu, S. S., A. T. Mengistab, et al. (2004). "The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions." Oncogene **23**(4): 956-963.
- Simon-Chazottes, D., S. Matsubara, et al. (1992). "Chromosomal localization of two cell surface-associated molecules of potential importance in development: midkine (Mdk) and basigin (Bsg)." Mamm Genome **2**(4): 269-271.
- Sottrup-Jensen, L. and H. Birkedal-Hansen (1989). "Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian alpha-macroglobulins." J Biol Chem **264**(1): 393-401.
- Spinale, F. G., M. L. Coker, et al. (2000). "A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure." Circulation **102**(16): 1944-1949.

- Staffler, G., A. Szekeres, et al. (2003). "Selective inhibition of T cell activation via CD147 through novel modulation of lipid rafts." J Immunol **171**(4): 1707-1714.
- Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 463-516.
- Sun, J. and M. E. Hemler (2001). "Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions." Cancer Res **61**(5): 2276-2281.
- Sun, Y., J. M. Cheung, et al. (2000). "Wild type and mutant p53 differentially regulate the gene expression of human collagenase-3 (hMMP-13)." J Biol Chem **275**(15): 11327-11332.
- Sun, Y., L. Wenger, et al. (1999). "p53 down-regulates human matrix metalloproteinase-1 (Collagenase-1) gene expression." J Biol Chem **274**(17): 11535-11540.
- Suzuki, K., J. J. Enghild, et al. (1990). "Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin)." Biochemistry **29**(44): 10261-10270.
- Suzuki, S., M. Sato, et al. (2004). "Direct cell-cell interaction enhances pro-MMP-2 production and activation in co-culture of laryngeal cancer cells and fibroblasts: involvement of EMMPRIN and MT1-MMP." Exp Cell Res **293**(2): 259-266.
- Tang, W., S. B. Chang, et al. (2004). "Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1." Mol Biol Cell **15**(9): 4043-4050.
- Tang, W. and M. E. Hemler (2004). "Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering." J Biol Chem **279**(12): 11112-11118.
- Tang, X., N. Guo, et al. (2012). "CD147/EMMPRIN: an effective therapeutic target for hepatocellular carcinoma." J Drug Target.
- Tang, Y., P. Kesavan, et al. (2004). "Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN." Mol Cancer Res **2**(2): 73-80.
- Tang, Y., M. T. Nakada, et al. (2005). "Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases." Cancer Res **65**(8): 3193-3199.
- Taraboletti, G., L. Morbidelli, et al. (2000). "The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells." FASEB J **14**(12): 1674-1676.
- Taylor, P. M., R. J. Woodfield, et al. (2002). "Breast cancer cell-derived EMMPRIN stimulates fibroblast MMP2 release through a phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase catalyzed pathway." Oncogene **21**(37): 5765-5772.
- Thompson, L. W., L. Brinckerhoff, et al. (2000). "Vaccination for melanoma." Curr Oncol Rep **2**(4): 292-299.

- Thorns, C., A. C. Feller, et al. (2002). "EMMPRIN (CD 174) is expressed in Hodgkin's lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. An immunohistochemical study of 60 cases." Anticancer Res **22**(4): 1983-1986.
- Tifft, C. J., R. L. Proia, et al. (1992). "The folding and cell surface expression of CD4 requires glycosylation." J Biol Chem **267**(5): 3268-3273.
- Toole, B. P. and M. G. Slomiany (2008). "Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance." Drug Resist Updat **11**(3): 110-121.
- Tredan, O., C. M. Galmarini, et al. (2007). "Drug resistance and the solid tumor microenvironment." J Natl Cancer Inst **99**(19): 1441-1454.
- Tropak, M. B. and J. C. Roder (1997). "Regulation of myelin-associated glycoprotein binding by sialylated cis-ligands." J Neurochem **68**(4): 1753-1763.
- Tsunezuka, Y., H. Kinoh, et al. (1996). "Expression of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in tumor cells enhances pulmonary metastasis in an experimental metastasis assay." Cancer Res **56**(24): 5678-5683.
- Turpeenniemi-Hujanen, T., L. Ronnberg, et al. (1992). "Laminin in the human embryo implantation: analogy to the invasion by malignant cells." Fertil Steril **58**(1): 105-113.
- Uria, J. A. and C. Lopez-Otin (2000). "Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity." Cancer Res **60**(17): 4745-4751.
- van den Oord, J. J., L. Paemen, et al. (1997). "Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin." Am J Pathol **151**(3): 665-670.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, et al. (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." Science **254**(5038): 1643-1647.
- Velasco, G., A. M. Pendas, et al. (1999). "Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members." J Biol Chem **274**(8): 4570-4576.
- Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-839.
- Voigt, H., C. S. Vetter-Kauczok, et al. (2009). "CD147 impacts angiogenesis and metastasis formation." Cancer Invest **27**(3): 329-333.
- Wang, R. F. (1999). "Human tumor antigens: implications for cancer vaccine development." J Mol Med (Berl) **77**(9): 640-655.
- Wang, R. F. and S. A. Rosenberg (1999). "Human tumor antigens for cancer vaccine development." Immunol Rev **170**: 85-100.
- Wang, Z., R. Juttermann, et al. (2000). "TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo." J Biol Chem **275**(34): 26411-26415.
- Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." Science **123**(3191): 309-314.

- Watters, J. M., P. Telleman, et al. (1997). "An optimized method for cell-based phage display panning." Immunotechnology **3**(1): 21-29.
- Weidle, U. H., W. Scheuer, et al. (2010). "Cancer-related issues of CD147." Cancer Genomics Proteomics **7**(3): 157-169.
- Wiechen, K., L. Diatchenko, et al. (2001). "Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene." Am J Pathol **159**(5): 1635-1643.
- Wiechen, K., C. Sers, et al. (2001). "Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas." Am J Pathol **158**(3): 833-839.
- Wielockx, B., C. Libert, et al. (2004). "Matrilysin (matrix metalloproteinase-7): a new promising drug target in cancer and inflammation?" Cytokine Growth Factor Rev **15**(2-3): 111-115.
- Williams, T. M., G. S. Hassan, et al. (2005). "Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice." J Biol Chem **280**(26): 25134-25145.
- Williams, T. M. and M. P. Lisanti (2004). "The Caveolin genes: from cell biology to medicine." Ann Med **36**(8): 584-595.
- Williams, T. M. and M. P. Lisanti (2005). "Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis." Am J Physiol Cell Physiol **288**(3): C494-506.
- Williams, T. M., F. Medina, et al. (2004). "Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion." J Biol Chem **279**(49): 51630-51646.
- Wilson, M. C., D. Meredith, et al. (2002). "Fluorescence resonance energy transfer studies on the interaction between the lactate transporter MCT1 and CD147 provide information on the topology and stoichiometry of the complex in situ." J Biol Chem **277**(5): 3666-3672.
- Woessner, J. F., Jr. (1991). "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling." FASEB J **5**(8): 2145-2154.
- Woessner, J. F., Jr. (1999). "Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium." Ann N Y Acad Sci **878**: 388-403.
- Xu, J., Z. Y. Shen, et al. (2007). "A randomized controlled trial of Licartin for preventing hepatoma recurrence after liver transplantation." Hepatology **45**(2): 269-276.
- Xu, J., H. Y. Xu, et al. (2007). "HAb18G/CD147 functions in invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma." Mol Cancer Res **5**(6): 605-614.
- Yan, L., S. Zucker, et al. (2005). "Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression." Thromb Haemost **93**(2): 199-204.
- Yang, J. M., P. O'Neill, et al. (2006). "Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) confers resistance of breast cancer cells to Anoikis through inhibition of Bim." J Biol Chem **281**(14): 9719-9727.

- Yang, J. M., Z. Xu, et al. (2003). "Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells." Mol Cancer Res **1**(6): 420-427.
- Yoshida, S., M. Shibata, et al. (2000). "Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain." Eur J Biochem **267**(14): 4372-4380.
- Yu, X. L., T. Hu, et al. (2008). "Crystal structure of HAb18G/CD147: implications for immunoglobulin superfamily homophilic adhesion." J Biol Chem **283**(26): 18056-18065.
- Yurchenko, V., M. O'Connor, et al. (2001). "CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B." Biochem Biophys Res Commun **288**(4): 786-788.
- Yurchenko, V., T. Pushkarsky, et al. (2005). "Regulation of CD147 cell surface expression: involvement of the proline residue in the CD147 transmembrane domain." J Biol Chem **280**(17): 17013-17019.
- Yurchenko, V., G. Zybarth, et al. (2002). "Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147." J Biol Chem **277**(25): 22959-22965.
- Zhang, X., Z. Chen, et al. (2002). "DNA microarray analysis of the gene expression profiles of naive versus activated tumor-specific T cells." Life Sci **71**(25): 3005-3017.
- Zhou, S., H. Zhou, et al. (2005). "CD147 is a regulatory subunit of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease amyloid beta-peptide production." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(21): 7499-7504.
- Zou, W., H. Yang, et al. (2007). "Inhibition of CD147 gene expression via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumorigenicity and increases chemosensitivity to paclitaxel in HO-8910pm cells." Cancer Lett **248**(2): 211-218.
- Zucker, S., M. Hymowitz, et al. (2001). "Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer." Am J Pathol **158**(6): 1921-1928.