



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

*Μελέτη Βιοδεικτών Στα Αυτοάνοσα
Νευρολογικά Νοσήματα*

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΟΓΙΩΝΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

*Μελέτη Βιοδεικτών Στα Αυτοάνοσα Νευρολογικά
Νοσήματα*

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΟΓΙΩΝΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

*Μελέτη Βιοδεικτών Στα Αυτοάνοσα
Νευρολογικά Νοσήματα*

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΟΓΙΩΝΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Δαλάκας Μαρίνος, Ομότιμος Καθηγητής Νευρολογίας

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ευθυμιάπουλος Σπυρίδων

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου
– Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας

Σταματάκης Αντώνης

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας-Βιολογίας
Συμπεριφοράς, Τμήμα Νοσηλευτικής

Ρούτσιας Ιωάννης

Επίκουρος καθηγητής
Μικροβιολογίας/Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής

ΑΘΗΝΑ 2018

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε στον Τομέα Παθολογικής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.), στο πλαίσιο του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Κλινική Βιοχημεία – Μοριακή Διαγνωστική», με επιστημονικό υπεύθυνο τον κύριο Δαλάκα Μαρίνο, Ομότιμο Καθηγητή Νευρολογίας.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων κύριο Ευθυμίοπουλο Σπυρίδων, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την παρούσα διπλωματική εργασία στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, σε εξωτερική συνεργασία με τον Καθηγητή Δαλάκα Μαρίνο, Διευθυντή της Μονάδας Νευροανοσολογίας του τμήματος.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Δαλάκα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με τον τομέα της Νευροανοσολογίας, ένα πεδίο που πάντα με γοήτευε αλλά ποτέ μέχρι τώρα δεν είχα τη δυνατότητα να ασχοληθώ. Τα μέλη του εργαστηρίου, ο επιστημονικός υπεύθυνος Χάρης Αλεξόπουλος και η Σοφία Ακρίβου, από την πρώτη στιγμή με βοήθησαν στην επίλυση οποιουδήποτε προβλήματος, βοηθώντας με με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στη μεταδιδακτορικό Γιώτα Καραγιάννη και στους διδακτορικούς του τμήματος Τσιορτού Ποπιάννα και Πατσούρα Μάρκο, για το συνεχές ενδιαφέρον τους για την πρόοδο της δουλειάς μου. Η ηθική τους υποστήριξη σε ζητήματα τόσο επιστημονικά όσο και προσωπικά υπήρξε για μένα ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που αγάπησα ιδιαίτερα την ενασχόληση με το συγκεκριμένο πεδίο. Ο Νίκος, ο Λουκάς και ο Ανδριανός, ήταν οι άνθρωποι που πάντα ήταν πρόθυμοι να με βοηθήσουν με το οποιοδήποτε πρόβλημα τεχνικό, προέκυπτε στο χώρο, φροντίζοντας για την άμεση επίλυσή του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, η οποία με στήριξε υλικά και ψυχολογικά όχι μόνο κατά τη διάρκεια του Προγράμματος Σπουδών μου, αλλά και σε οποιαδήποτε δυσκολία αντιμετώπισα, αλλά κυρίως για την αμέριστη ενθάρρυνση, συμπαράσταση και κατανόηση που επιδεικνύουν σε κάθε μου βήμα. Αναμφίβολα, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου που πάντα ήταν πρόθυμοι να μοιραστούν μαζί μου σκέψεις και προβληματισμούς μου, στηρίζοντας με καθ'όλη τη διάρκεια της προσπάθειας αυτής. Βραβείο υπομονής κερδίζουν η Κλεοπάτρα και η Άνι, για τις αμέτρητες φορές που με άκουσαν να γκρινιάζω, αλλά και για την ηθική και τεχνική υποστήριξη σε οποιοδήποτε πρόβλημα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αυτοάνοσα νοσήματα προσβάλλουν όλο και αυξανόμενα ποσοστά του πληθυσμού και αυτό κάνει επιτακτική την ανάγκη για βελτιστοποίηση των θεραπευτικών αλγορίθμων αλλά και την αναζήτηση νέων βιοδεικτών που να οδηγούν στην καλύτερη διάγνωση αλλά και στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας τους. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αναζητήσει γενετικούς βιοδείκτες απόκρισης στην θεραπεία στο σύνδρομο του Δύσκαμπτου Ανθρώπου και ανασολογικούς βιοδείκτες που συσχετίζονται με την απομυελίνωση στα πλαίσια των συστηματικών αυτοάνοσων νοσημάτων.

Το Σύνδρομο του Δύσκαμπτου Ανθρώπου (Stiff Person Syndrome-SPS) είναι μία σποραδική, σπάνια νευρολογική διαταραχή, που συσχετίζεται με έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών αυτοαντισωμάτων, που στοχεύουν αντιγόνα που εκφράζονται αποκλειστικά στις ανασταλτικές συνάψεις του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Με βάση την αιτιοπαθογένεια του SPS έχουν αναπτυχθεί δύο κύριες θεραπευτικές προσεγγίσεις: α) Η χρήση φαρμάκων που ενισχύουν την παραγωγή του GABA και β) Η χρήση ανοσοτροποποιητικών ή ανοσοκατασταλτικών θεραπειών. Πιο συγκεκριμένα, θεραπείες που στοχεύουν τα CD20+ αντιγόνα επιφανείας των B κυττάρων, χρησιμοποιώντας εξανθρωποποιημένα μονοκλωνικά αντισώματα, έχουν προταθεί ως προσέγγιση για τη ρύθμιση της αυτοδραστικότητας και της κλωνικής έκπτυξης των B κυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα στο SPS, ενώ κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι το μονοκλωνικό αντίσωμα rituximab, φάνηκε να οδηγεί στην κλινική βελτίωση του συνδρόμου. Άλλες μελέτες έδειξαν το rituximab φάνηκε αναποτελεσματικό.

Ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο το rituximab καταστρέφει τα CD20+ B κύτταρα, είναι η κυτταροτοξικότητα που εξαρτάται από αντισώματα, που διαμεσολαβείται από τους υποδοχείς των IgG (FcγR). Νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στα γονίδια FCGR3A και FCGR2A, που κωδικοποιούν τους υποδοχείς FcγRIIIa και FcγRIIa αντίστοιχα, μεταβάλλουν τη συγγένεια των υποδοχέων και έχουν συσχετιστεί με απόκριση στο rituximab σε διάφορες αυτοάνοσες και αιματολογικές ασθένειες. Ασθενείς που έχουν υποδοχείς υψηλής συγγένειας αποκρίνονται καλύτερα στη θεραπεία συγκριτικά με αυτούς που έχουν υποδοχείς χαμηλής συγγένειας.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας εξετάσαμε τους γονοτύπους μίας κοόρτης ασθενών με SPS, όπου μία υποομάδα είχε συμμετάσχει σε μία κλινική μελέτη, με χρήση και εικονικού φαρμάκου (placebo), απόκρισης ή μη στο rituximab. Η υπόθεσή μας ήταν ότι οι ασθενείς της μελέτης που ανταποκρίθηκαν στο συγκεκριμένο φάρμακο διαθέτουν τους υποδοχείς Fcγ υψηλής συγγένειας, σε σχέση με αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν.

Οι ασθενείς με SPS που εξετάστηκαν ως προς τους πολυμορφισμούς για τα γονίδια FCGR2A και FCGR3A παρουσίασαν τόσο ομοζυγωτία για τον πολυμορφισμό όσο και ετεροζυγωτία.

Για τον πολυμορφισμό στο γονίδιο FCGR3A, βρέθηκε ότι οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία, είχαν γονότυπο V/V, F/V, F/F, γεγονός που υποδηλώνει ότι η απόκριση στο φάρμακο δεν συσχετίζεται με το γονότυπο των ασθενών για το συγκεκριμένο γονίδιο. Για τον πολυμορφισμό στο γονίδιο FCGR2A, βρέθηκε ότι οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία με rituximab είχαν γονότυπο H/R, ο οποίος όμως ήταν ο συχνότερος πολυμορφισμός και στις υπόλοιπες ομάδες, δηλαδή και σε αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν, πήραν placebo ή εξετάστηκαν ως υγιείς. Αυτό δεν αποκλείει το ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός που σχετίζεται με τον υποδοχέα υψηλής συγγένειας, ενδεχομένως έχει ρόλο στην απόκριση στο φάρμακο.

Η γλυκοπρωτεΐνη των ολιγοδενδροκυττάρων και της μυελίνης (MOG) έχει μελετηθεί ως αυτοαντιγόνο-στόχος σε απομυελινωτικά νοσήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως η Παιδιατρική Πολλαπλή Σκλήρυνση. Αντίστοιχα, τα αντισώματα έναντι του αστροκυτταρικού διαύλου νερού, ακουαπορίνης-4 (AQP4) είναι παθογενετικά σε πολλές αυτοάνοσες απομυελινωτικές διαταραχές, όπως η νόσος Devic (οπτική νευρομυελίτιδα). Ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (ΣΕΛ) και το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (ΑΦ) είναι δύο αυτοάνοσες διαταραχές, που χαρακτηρίζονται από υπερδιέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, με υπερπαραγωγή αντισωμάτων έναντι ποικίλων αντιγονικών στόχων. Σε προηγούμενες μελέτες άλλων ομάδων αλλά και του εργαστηρίου, έχει βρεθεί ότι ασθενείς με ΣΕΛ και απομυελίνωση, είχαν αντισώματα έναντι της AQP-4.

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε ασθενείς με ΣΕΛ, για να ελέγξουμε αν παρουσιάζουν αντισώματα έναντι της MOG και σε ασθενείς με ΑΦ για την παρουσία αντισωμάτων έναντι MOG και AQP4. Στους ασθενείς με ΣΕΛ, χρησιμοποιώντας την μέθοδο cell-based assay για την ανεύρεση αντι-MOG αντισωμάτων, αυτά εντοπίστηκαν σε 1/40 ασθενείς ο οποίος όμως δεν παρουσίαζε συμπτώματα απομυελίνωσης. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου, είχαν επίσης βρεθεί και αντισώματα έναντι της AQP4 σε ασθενείς με ΣΕΛ χωρίς όμως να έχουν εμφανίσει νευρολογικά συμπτώματα και απομυελίνωση.

Στους ορούς των ασθενών με ΑΦ εντοπίστηκαν αυτοαντισώματα έναντι της MOG σε 2 από τους 8, ενώ αντισώματα έναντι της AQP4 σε 1 από τους 8. Αντίστοιχα, κανείς από αυτούς τους ασθενείς δεν παρουσίαζε απομυελίνωση ή κάποια άλλη διαταραχή του νευρικού συστήματος.

Η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων έναντι της MOG και της AQP4 σε ασθενείς με λύκο και αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, ίσως να αποτελεί προγνωστικό βιοδείκτη για την εμφάνιση νευρολογικής συμπτωματολογίας και το εύρημα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης σε μεγαλύτερους αριθμούς ασθενών και από τα δύο νοσήματα.

ABSTRACT

Stiff Person Syndrome (SPS) is a rare, disabling autoimmune CNS disorder, associated with a variety of autoantibodies that target antigens expressed in neurons of the brain and spinal cord, at synapses using the neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA).

Based on the presumed pathogenesis of SPS, the two main therapeutic approaches are: 1) GABA-enhancing drugs and 2) immunomodulating or immunosuppressant agents. Anti-B cell therapies using humanized monoclonal antibodies directed against CD20+ cells, have been proposed as a rational approach to modulating autoreactive and clonally expanded B cells in the CNS in SPS. Several case reports have indicated that rituximab, a B-cell depleting monoclonal antibody, was well-tolerated and appeared to exert long-lasting clinical remissions, although circulating antibody titers did not decline, although in other studies rituximab was found to be ineffective overall.

Rituximab is a mouse/human chimeric antibody that mediates complement-dependent cell lysis (CDCC) in the presence of human complement, and mainly antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), with human effector cells through Fcγ receptors of IgG. SNPs in the coding region of a gene, often result in amino acid changes that may alter the functioning of the affected proteins. Certain SNPs in the coding regions of the *FCGR2A* and *FCGR3A* genes appear to have clinical significance as they have been reported to correlate with responses to therapeutic mAbs. An important role for the FcγR phenotype, is indicated by the observation that effector cells from donors homozygous for *FCGR3A* 158 V (V/V) and *FCGR2A* 131 H(H/H) bound more IgG compared with cells from donors who were homozygous for *FCGR3A* 158 F (F/F) and *FCGR2A* 131 R(R/R).

In our study, we tested the genotype of SPS patients, who were treated with rituximab and placebo and our aim was to identify whether they had response to rituximab are homozygous for *FCGR3A* 158 V and *FCGR2A* 131 H. They were homozygous V/V, homozygous F/F for *FCGR3A* gene and heterozygous F/V for *FCGR2A* gene accordingly. There is no correlation of *FCGR3A* and *FCGR2A* receptor with highest affinity and response to rituximab.

Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) has been identified as a target of demyelinating autoantibodies in inflammatory demyelinating diseases of the CNS, such as paediatric multiple sclerosis. Anti-AQP4 antibodies are specific markers and pathogenetic factors for neuromyelitis optica (NMO) and NMO spectrum of disorders. Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic, relapsing–remitting systemic autoimmune disease. Antiphospholipid syndrome (APS), is an autoimmune, hypercoagulable state caused by antiphospholipid antibodies. Pathogenic anti-AQP4 autoantibodies were found in SLE patients, without the development of any clinical or radiological signs of NMOSD.

Cell-based immunoassays using MOG expressed in mammalian cells have demonstrated the presence of MOG and AQP-4 antibodies in SLE and APS patients with any sign of demyelination and neurological symptoms. 40 SLE patients were screened and 1 was seropositive for MOG autoantibodies. Also, 8 APS patients were screened and they were 2 seropositive for MOG and 1 seropositive for AQP-4 autoantibodies.

Anti-AQP4 and anti-MOG antibodies from non neurological SLE and APS patients can persist and although they induce complement-mediated astrocytic cytotoxicity, they do not cause disease.

Περιεχόμενα

1)ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1)ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΤΟΥ ΔΥΣΚΑΜΠΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (STIFF PERSON SYNDROME)	10
1.1.1)ΚΥΡΙΑ ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ	10
1.1.2)ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ SPS.....	11
1.1.3)ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	11
1.1.3.1)ΑΝΤΙ-GAD ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ: ΕΝΑΣ ΚΑΛΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΣΘΕΝΕΙΑ	11
1.1.3.2)ΆΛΛΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	13
1.1.4)ΘΕΡΑΠΕΙΑ	14
1.2) ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ ΚΑΙ Β ΚΥΤΤΑΡΑ	15
1.2.1)ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ	15
1.2.2)ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	16
1.2.3)ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΩΡΙΜΩΝ Β ΚΥΤΤΑΡΩΝ	17
1.2.4)ΜΝΗΜΟΝΙΚΑ Β ΚΥΤΤΑΡΑ	18
1.2.6)Β ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΣΚΕΠΤΙΚΟ ΓΙΑ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ ΤΑ Β ΚΥΤΤΑΡΑ	18
1.3)ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ Β ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ: ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ..	19
1.3.1)RITUXIMAB.....	20
1.4)ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ.....	22
1.5)Η ΜΟG ΠΡΩΤΕΪΝΗ	25
1.6)Η ΑΚΟΥΑΠΟΡΙΝΗ-4 ΠΡΩΤΕΪΝΗ	25
1.7)ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗΣ ΛΥΚΟΣ (ΣΕΛ)	26
1.7.1)ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ.....	26
1.7.2)ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΒΑΣΗ.....	27
1.7.3)ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	27
1.7.3.1)ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΟΥ ΛΥΚΟΥ	28
1.8)ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ.....	30
2)ΣΚΟΠΟΣ.....	31
3) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
3.1)ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA	33
3.2)ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΟΛΙΚΟΥ DNA.....	34
3.3) ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)	35
3.3.1)ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	35

3.3.2)ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΤΗΣ PCR.....	37
3.4)ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ FCGR3A ΚΑΙ FCGR2A.....	41
3.4.1) ΓΟΝΙΔΙΟ FCGR3A.....	41
3.4.2)ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ FCGR2A	45
3.5) RFLP ΑΝΑΛΥΣΗ (Restriction Fragment Length Polymorphism)-ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ.....	47
3.6)ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ.....	50
3.6.1) ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ FCGR3A	51
3.6.2) ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ FCGR2A	52
3.7) ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR), ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	53
3.8) ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΠΕΨΗΣ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ, ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	54
3.8)ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK293T.....	55
3.8.1)CELL BASED ASSAY ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ MOG ΚΑΙ AQP4 ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	55
3.8.2)CELL BASED ASSAY(EUROIMMUN) ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ AQP-4	57
4)ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	59
4.1)ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ.....	59
4.1.1)ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR), ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	59
4.1.2)ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΕΨΗΣ,ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ 60	
4.2)ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ MOG ΚΑΙ ΑΚΟΥΑΠΟΡΙΝΗΣ 4 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK293 ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΡΟΥ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗ ΛΥΚΟ ΚΑΙ ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ	68
5)ΣΥΖΗΤΗΣΗ	70
5.1)ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΟ RITUXIMAB.....	70
5.2) ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK293T ΓΙΑ ΑΝΕΥΡΕΣΗ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗ ΛΥΚΟ ΚΑΙ ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ	72
6)ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74

1)ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1)ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΤΟΥ ΔΥΣΚΑΜΠΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (STIFF PERSON SYNDROME)

Το Σύνδρομο του Δύσκαμπτου Ανθρώπου (Stiff Person Syndrome-SPS) είναι μία σποραδική, σπάνια νευρολογική διαταραχή, που προσβάλλει κυρίως γυναίκες. Αρχικά μελετήθηκε το 1956 από τους Moersch και Woltman σε μία σειρά 14 ασθενών (Moersch and Woltman 1956). Είναι μία διαταραχή που συσχετίζεται με έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών αυτοαντισωμάτων (GAD, GABARAP, αμφυφυσίνη και γεφυρίνη), τα οποία στοχεύουν αντιγόνα που εκφράζονται κυρίως στις ανασταλτικές συνάψεις του κεντρικού νευρικού συστήματος. Στο SPS, ένας αριθμός από άνοσο-τροποποιητικές θεραπείες όπως η χορήγηση ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης (IVIg) και η πλασμαφαίρεση βελτιώνουν σημαντικά τα συμπτώματα (Dalakas, Fujii et al. 2001), (Dalakas 2006), γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι μία ασθένεια, που διαμεσολαβείται από αυτοαντισώματα. Έχει επίσης βρεθεί μία ισχυρή συσχέτιση με αλληλόμορφα γονίδια όπως τα DQβ1 και DRβ1 της τάξης II του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Dalakas, Fujii et al. 2000), παρόλο που κανένα αλληλόμορφο δεν έχει βρεθεί να σχετίζεται αποκλειστικά με την εκδήλωση της ασθένειας. Παρόλο που η πρόσφατη έρευνα για την κατανόηση της αυτοάνοσης βάσης του νοσήματος είναι εντατική, δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο πώς και αν τα παρατηρούμενα αυτο-αντισώματα επάγουν την ασθένεια.

1.1.1)ΚΥΡΙΑ ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ

Το Σύνδρομο του Δύσκαμπτου Ανθρώπου χαρακτηρίζεται από μυϊκή δυσκαμψία στην οσφυϊκή μοίρα, στον κορμό του σώματος και αδυναμίας στους μύες, αλλαγές στη στάση του σώματος, μυϊκούς σπασμούς που συνοδεύονται από πόνο και συναισθηματική διαταραχή. Η μυϊκή δυσκαμψία προκαλείται από συνεχείς μυϊκές συσπάσεις, των παρασπονδυλικών και κοιλιακών μυών, ταυτόχρονα σε αγωνιστές και ανταγωνιστές μύες, επηρεάζοντας τη στάση του σώματος και οδηγώντας στην παρατηρούμενη υπερλόρδωση της οσφυϊκής μοίρας. Οι σπασμοί που συνοδεύονται από πόνο και πτώσεις μπορεί να πυροδοτηθούν από απροσδόκητους θορύβους όπως το χτύπημα του τηλεφώνου ή μία σειρήνα. Αυτές οι πτώσεις προσομοιάζουν την πτώση ενός κορμού ή ενός αγάλματος, επειδή οι ασθενείς δεν έχουν τον έλεγχο του σώματός τους που υφίσταται πτώση (Murinson 2004). Φόβος, ανησυχία, άγχος είναι επίσης συχνά συμπτώματα στους ασθενείς με SPS, δίνοντας συχνά την εντύπωση ότι επρόκειτο για ψυχιατρική διαταραχή. Αυτά τα συμπτώματα μπορεί να εξηγηθούν, είτε λόγω των πτώσεων, είτε λόγω δυσλειτουργίας ορισμένων περιοχών του εγκεφάλου όπως η αμυγδαλή και ο υπόκαμπος (Rakocvic, Raju et al. 2004), (Ameli, Snow et al. 2005). Η συνήθης ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων είναι τα 35 έτη, με καθυστέρηση μέχρι και τα 62 έτη μέχρι να γίνει η διάγνωση (Dalakas, Fujii et al. 2000).

Η διάγνωση πραγματοποιείται με ηλεκτροφυσιολογία, στην οποία αναδεικνύεται συνεχής δραστηριότητα εκούσιων συσπάσεων αγωνιστών και ανταγωνιστών μυών, παρόλη την προσπάθεια του ασθενούς να χαλαρώσει (Meinck, Ricker et al. 1984), εξαιτίας της συνεχούς πυροδότησης των εκπολωμένων κινητικών νευρώνων. Ένας μεγάλος αριθμός ασθενών με SPS,

τουλάχιστον 35%, πάσχει από διαβήτη τύπου 1, που είτε προηγείται της εμφάνισης του SPS, είτε αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου (Dalakas, Fujii et al. 2000), (Solimena, Butler et al. 1994). Άλλα αυτοάνοσα νοσήματα που μπορεί να σχετίζονται με το SPS είναι η νόσος του Hashimoto, η νόσος του Grave's, η κακοήθης αναιμία, η κοιλιοκάκη και η λεύκη (Dalakas, Fujii et al. 2000), (Burns 2005). Αντισώματα εναντίον πρωτεϊνών που σχετίζονται με την GABAεργική σύναψη, και συγκεκριμένα της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμικού οξέος (Glutamic acid decarboxylase-GAD), της πρωτεΐνης που σχετίζεται με τον υποδοχέα του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-GABARAP), αμφυφυσίνης και γεφυρίνης, ανευρίσκονται στο SPS (βλέπε Εικόνα 1).

1.1.2) ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ SPS

Η επικρατούσα υπόθεση για την παθογένεση του SPS είναι ότι τα αντί-GAD αντισώματα επηρεάζουν τη φυσιολογική λειτουργία των ανασταλτικών GABAεργικών κυκλωμάτων. Η παρατηρούμενη ταυτόχρονη σύσπαση αγωνιστών και ανταγωνιστών μυών και η συνεχής πυροδότηση της κινητικής μονάδας, παρόλη την προσπάθεια του ασθενούς να χαλαρώσει υποδεικνύει την έλλειψη αμοιβαίας αναστολής (Levy, Dalakas et al. 1999). Παρόλο που υποδεικνύεται μία σημαντική συσχέτιση του SPS, με δυσλειτουργία GABAεργικών κυκλωμάτων, δεν έχει ακόμη διασαφηνιστεί επακριβώς ποια κυκλώματα στον εγκέφαλο ή στο νωτιαίο μυελό εμπλέκονται. Όπως έχει δειχθεί από μελέτες αμφοτερόπλευρης διακρανιακής μαγνητικής διέγερσης σε ένα δείγμα από επτά ασθενείς SPS, η αναστολή αφορά κυρίως τον νωτιαίο μυελό και περιλαμβάνει «διάχυτη» υπερδιεγερσιμότητα του κινητικού φλοιού (Sandbrink, Syed et al. 2000). Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε σε μία μελέτη δεκαπέντε ασθενών στη συνέχεια (Koerner, Wieland et al. 2004). Ωστόσο πώς ακριβώς η υπερδιεγερσιμότητα του κινητικού φλοιού επηρεάζει τη μυϊκή δυσκαμψία δεν είναι ακόμη γνωστό. Έχει επίσης προταθεί ότι η μυϊκή δυσκαμψία θα μπορούσε εν μέρει να προκαλείται από τοπική απώλεια της αναστολής σε ανασταλτικά κυκλώματα στο νωτιαίο μυελό, όπως φάνηκε από τη μελέτη της αντανακλαστικής κίνησης των μυών (H-reflex), έπειτα από χρήση αναστολής επαγόμενης από δονήσεις (Floeter, Valls-Sole et al. 1998). Σε άλλες μελέτες που έγιναν για τα επίπεδα νευροδιαβιβαστών, βρέθηκε ότι τα επίπεδα του GABA είναι μειωμένα τόσο στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό των ασθενών (Dalakas, Li et al. 2001), όσο και στην εγκέφαλο με βάση μελέτες φασματοσκοπίας μαγνητικού συντονισμού (Levy, Levy-Reis et al. 2005).

1.1.3) ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

1.1.3.1) ANTI-GAD ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ: ΕΝΑΣ ΚΑΛΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΣΘΕΝΕΙΑ

Το πιο κοινό αυτοαντίσωμα που έχει βρεθεί στο 80% των ασθενών με SPS τόσο στον ορό όσο και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, είναι όπως αναφέραμε εναντίον του ενζύμου αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέος (GAD) (Dalakas, Fujii et al. 2000), (Meinck 2001). Η αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέος καταλύει την αποκαρβοξυλίωση του L-γλουταμικού σε γ-αμινοβουτυρικού οξύ (GABA), τον κύριο ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Η αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέος συνήθως συντίθεται στους GABAεργικούς νευρώνες στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Το

ένζυμο έχει δύο ισομορφές, τη GAD65 (ισομορφή που σχετίζεται με την κυτταρική μεμβράνη) και τη GAD67 (μία διαλυτή ισομορφή) που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, τα GAD2 και GAD1 αντίστοιχα. Η GAD67 συναντάται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ η GAD65 κυρίως στις νευρικές απολήξεις. Οι δύο αυτές ισομορφές είναι ταυτόσημες σε ποσοστό 65% και κυρίως διαφέρουν στην περιοχή του αμινοτελικού άκρου (ταυτόσημες μόνο κατά 23%), εκεί όπου υπάρχουν τα σήματα που βοηθούν στην αγκυροβόληση του GAD65 στα συναπτικά κυστίδια (Fenalti and Buckle 2010). Αυτό εξηγεί και τη διαφορετική κατανομή τους στα κύτταρα (Butler, Solimena et al. 1993). Και οι δύο ισομορφές συντίθενται στο κυτταρόπλασμα, όπου το GAD65 στη συνέχεια τροποποιείται και προσκολλάται στην εσωτερική επιφάνεια των συναπτικών κυστιδίων στους GABAεργικούς νευρώνες ή σε μικροκυστίδια στα β-κύτταρα του παγκρέατος (Reetz, Solimena et al. 1991). Η διαφορά των δύο ισομορφών υποδηλώνει και λειτουργικές διαφορές. Το GABA που συντίθεται από την ισομορφή GAD67, εμπλέκεται σε λειτουργίες όπως η συναπτογένεση και η προστασία από τραυματισμούς, αλλά όχι στη νευροδιαβίβαση. Αντίθετα το GABA που συντίθεται από την ισομορφή GAD65 κυρίως συμμετέχει στη νευροδιαβίβαση και υπό συνθήκες όταν απαιτείται γρήγορη σύνθεση GABA (Roth and Draguhn 2012). Το GAD65 έχει 3 λειτουργικές περιοχές α)μία που αποτελεί το αμινοτελικό άκρο (1-188 αμινοξέα), β)μία ενδιάμεση που αποτελεί την καταλυτική περιοχή του ενζύμου(198-473 αμινοξέα) και γ)το καρβοξυτελικό άκρο (465-585 αμινοξέα) (Fenalti and Buckle 2010). Τα αντι-GAD65 αντισώματα έχουν βρεθεί μόνο στο 1% του υγιούς πληθυσμού και στο 5% ασθενών με άλλες νευρολογικές διαταραχές. Στην κλινική πράξη τα αντισώματα αυτά μετρώνται στον ορό με μεθόδους που έχουν υψηλή ευαισθησία όπως η RIA και η ELISA.

Η υπόθεση περί αυτοανοσίας στο SPS προτάθηκε από τον Solimena και τους συνεργάτες του, που ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν τα αυτοαντισώματα αντι-GAD65, αποδεικνύοντας σύνδεση του ορού των ασθενών με GABAεργικούς νευρώνες σε τομές εγκεφάλου ανθρώπου και αρουραίου (Solimena, Folli et al. 1988). Τα αντι-GAD65 αυτοαντισώματα έχουν ανιχνευθεί σε ποσοστό 80% των ασθενών SPS, ενώ αυτοαντισώματα για το GAD67 μόνο σε ποσοστό κάτω από 50% των ασθενών και σε πολύ χαμηλότερους τίτλους (Meinck 2001), (Dinkel, Meinck et al. 1998), (Solimena and De Camilli 1991). Στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, αυτοαντισώματα έναντι του GAD65 ανιχνεύονται στο 75% των ασθενών (Dinkel, Meinck et al. 1998). Έχει προταθεί ότι αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ενδοθηκικής σύνθεσης των αντι-GAD65 IgG (Dalakas, Li et al. 2001). Οι τίτλοι των αντισωμάτων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι 50 φορές χαμηλότεροι συγκριτικά με τον ορό αλλά ο ρυθμός σύνθεσής τους δεκαπλάσιος (Rakocevic, Raju et al. 2004), υποδεικνύοντας το ρόλο των ώριμων κλώνων των B-κυττάρων που περιορίζονται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Αυτό επιβεβαιώθηκε σε μία μελέτη, που φάνηκε ότι η συγγένεια πρόσδεσης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό των IgG ήταν δέκα φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τις IgG στον ορό (Skorstad, Hestvik et al. 2008). Τελικά η ειδικότητα για τους διαφορετικούς επιτόπους που παρατηρείται στον ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό υποδηλώνει τοπική ενεργοποίηση των B κυττάρων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Raju, Foote et al. 2005).

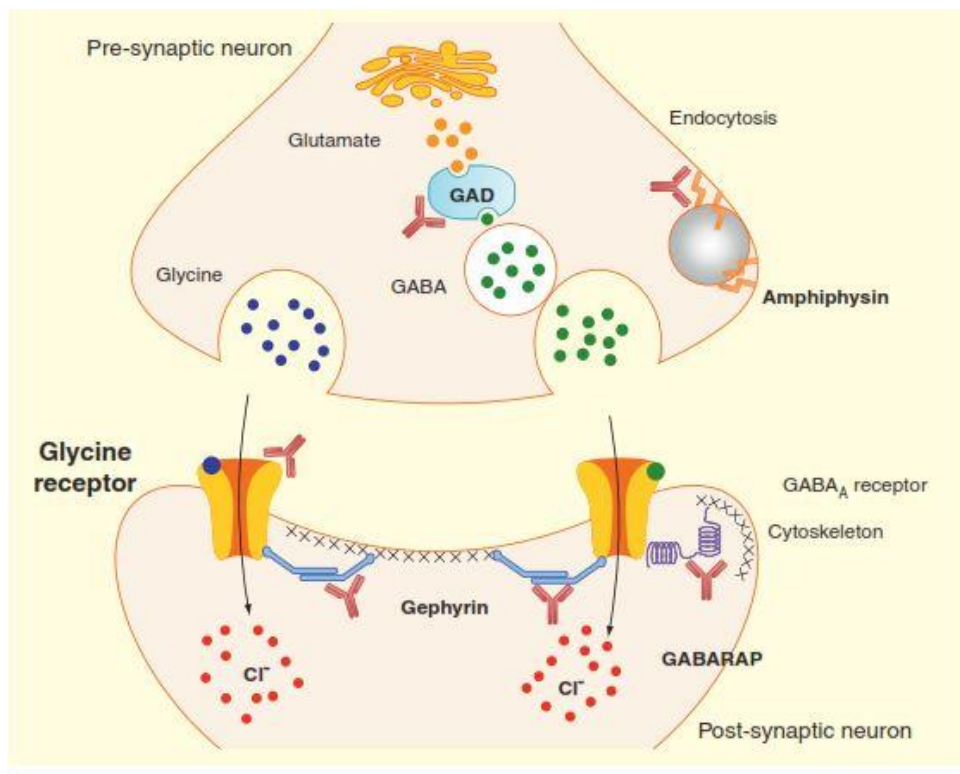
1.1.3.2) ΆΛΛΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Ένα άλλο αυτοαντίσωμα που έχει πρόσφατα ταυτοποιηθεί σε ποσοστό 10-12% των ασθενών με SPS είναι αυτό που στοχεύει τον υποδοχέα γλυκίνης (GlyRα1) (McKeon, Martinez-Hernandez et al. 2013), (Alexopoulos, Akrivou et al. 2013). Η γλυκίνη είναι ένας κύριος νευροδιαβιβαστής στους νωτιαίους ανασταλτικούς ενδονευρώνες και οι υποδοχείς τύπου GlyRα1 κυρίως εκφράζονται στο νωτιαίο μυελό, στο στέλεχος του εγκεφάλου και στην παρεγκεφαλίδα. Τα αντι-GlyR αντισώματα, αρχικά περιγράφηκαν στην προοδευτική εγκεφαλομυελίτιδα με δυσκαμψία και μυοκλονία (PERM), ένα νόσημα με παρόμοια συμπτωματολογία με αυτή του SPS (Mas, Saiz et al. 2011), (Iizuka, Leite et al. 2012).

Επειδή μεταλλάξεις στον υποδοχέα γλυκίνης μπορεί να δημιουργήσουν κληρονομική υπερεκπληξία στα βρέφη (Davies, Chung et al. 2010), έχει υποτεθεί ότι κάποια κύρια συμπτώματα του συνδρόμου όπως η υπερδιεγερσιμότητα και οι σπασμοί μπορεί να οφείλονται στα αντισώματα έναντι υποδοχέων γλυκίνης. Έχει βρεθεί ότι περίπου το 25% των ασθενών που πάσχουν από SPS και είναι αρνητικοί για τα GAD αντισώματα έχουν αντισώματα έναντι των υποδοχέων γλυκίνης (McKeon, Martinez-Hernandez et al. 2013).

Σε περίπου 5% των περιπτώσεων, το SPS μπορεί να έχει παρανεοπλασματική εκδήλωση, συνοδευόμενο από αυτοαντισώματα εναντίον της αμφυφυσίνης (De Camilli, Thomas et al. 1993), (Folli, Solimena et al. 1993) και της γεφυρίνης (Butler, Hayashi et al. 2000). Τα παρανεοπλασματικά νευρολογικά σύνδρομα μπορούν να χαρακτηριστούν σαν έμμεσες επιπτώσεις του καρκίνου, που δεν προκαλούνται από τον όγκο και τη μετάστασή του, ή από λοίμωξη, ισχαιμία ή μεταβολικές διαταραχές (Posner and Furneaux 1990), (Darnell and Posner 2003). Η αμφιφυσίνη είναι μία πρωτεΐνη, παρούσα στο κεντρικό νευρικό σύστημα, κυρίως στα προσυναπτικά άκρα και εμπλέκεται στην ενδοκύττωση των συναπτικών κυστιδίων. Η συσχετιζόμενη κακοήθεια είναι κυρίως καρκίνος του μαστού.

Είναι αξιοσημείωτο ότι όλα τα παραπάνω αυτοαντισώματα που εμπλέκονται στο SPS, (όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 1), στοχεύουν αντιγόνα που κυρίως εκφράζονται στις ανασταλτικές συνάψεις (τόσο στο προ- όσο και στο μετασυναπτικό άκρο) του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ορισμένα από αυτά τα αντιγόνα είναι κυρίως κυτταροπλασματικά και παραμένει υπό διερεύνηση το αν αυτά παροδικά εκθέτουν μία εξωκυττάρια περιοχή κατά τη διάρκεια της νευροδιαβίβασης και της εξωκύττωσης (Dalakas 2013). Αυτό είναι πολύ σημαντικό γιατί σε πολλές άλλες αυτοάνοσες νευρολογικές διαταραχές, αυτοαντισώματα που έχουν έναν παθογενετικό ρόλο, κυρίως στοχεύουν εξωκυττάρια περιοχές όπως ο ακετυλοχολινικός υποδοχέας στη μυασθένεια Gravis ή ένας από τους υποδοχείς γλουταμικού (NMDA) στην μεταιχμιακή εγκεφαλίτιδα (Vincent, Bien et al. 2011).



Εικόνα 1: Αυτοαντιγόνα και σχετικές διαδικασίες που εμπλέκονται με την GABAεργική συναπτική μεταβίβαση σε ασθενείς με σύνδρομο SPS. Στον προσυναπτικό νευρώνα το κυρίαρχο αντιγόνο είναι το GAD, το ένζυμο που μετατρέπει το γλουταμικό σε GABA και η αμφιφυσίνη, μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με τα συναπτικά κυστίδια και είναι υπεύθυνη για την ενδοκύτωση των μεμβρανών των κυστιδίων, που ακολουθείται από απελευθέρωση του GABA. Στον μετασυναπτικό νευρώνα, τα κύρια αντιγόνα είναι ο υποδοχέας γλυκίνης και η γεφυρίνη. Οι υποδοχείς γλυκίνης είναι ιοντοτροπικοί υποδοχείς που επιτρέπουν τη διέλευση των ιόντων χλωρίου. Η γεφυρίνη είναι μία πρωτεΐνη που προσδένεται στον κυτταροσκελετό και απαιτείται για την ομαδοποίηση (clustering) των υποδοχέων τόσο της γλυκίνης όσο και GABA_A. Το κύριο αυτοαντιγόνο στο σύνδρομο SPS είναι το GAD, που συναντάται στο 85% των ασθενών και οι υποδοχείς γλυκίνης στο 10-12% των ασθενών. Η αμφιφυσίνη, που σχετίζεται με την παρανεοπλασματική εκδήλωση της νόσου στο SPS συναντάται σε ένα ποσοστό του 5% των ασθενών και η γεφυρίνη έχει αναφερθεί σε μία μόνο περίπτωση. (Alexoroulos and Dalakas 2013).

1.1.4)ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Με βάση την αιτιοπαθογένεια του SPS υπάρχουν δύο κύριες θεραπευτικές προσεγγίσεις: α)φάρμακα που ενισχύουν την παραγωγή του GABA και β)ανοσοτροποποιητικές ή ανοσοκατασταλτικές θεραπείες. Επειδή φαίνεται ότι η μείωση του GABA είναι υπεύθυνη για την μυϊκή δυσκαμψία, φάρμακα που ενισχύουν τη δραστηριότητα του GABA μετριάζουν τα συμπτώματα του SPS. Ο Howard αρχικά παρατήρησε ότι οι σπασμοί μειώνονται σημαντικά με τη χρήση της διαζεπάμης (Howard 1963). Κατά την έναρξη των συμπτωμάτων και το χρονικό διάστημα που γίνεται η διάγνωση, η διαζεπάμη ή άλλες βενζοδιαζεπίνες (GABA_A αγωνιστές) είναι συνήθως η πρώτη επιλογή και η κύρια θεραπεία (Cohen 1966), (Howard 1963), (Westblom

1977). Οι περισσότεροι ασθενείς αποκρίνονται επιτυχώς στη διαζεπάμη, τη βακλοφαίνη και άλλα παρόμοια φάρμακα (Miller and Korsvik 1981), (Olafson, Mulder et al. 1964), (Vermeij, van Doorn et al. 1996) για μία περίοδο.

Πολλές αναφορές έχουν περιγράψει τα πλεονεκτήματα της ανοσοθεραπείας όπως η πρενδιζόνη, η πλασμαφαίρεση (Brashear and Phillips 1991), (Harding, Thompson et al. 1989), (Vicari, Folli et al. 1989) και μεγαλύτερες δόσεις χορήγησης IVIg (Dalakas 2005), (Gerschlagel and Brown 2002), (Karlson, Sudarsky et al. 1994), (Khanlou and Eiger 1999) στη θεραπεία του SPS. Η χορήγηση ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης απεδείχθη ότι είναι μία αποτελεσματική θεραπεία σύμφωνα με κλινικές δοκιμές (Dalakas, Fujii et al. 2001), παρόλο που δεν είχε για όλους τους ασθενείς συνεχώς θετικά αποτελέσματα.

Οι θεραπείες έναντι των CD20+ κυττάρων χρησιμοποιώντας εξανθρωποποιημένα μονοκλωνικά αντισώματα, έχει επίσης προταθεί ως προσέγγιση για ρύθμιση της αυτοδραστικότητας και της κλωνικής έκπτυξης των B κυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα στο SPS (Dalakas 2008). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το rituximab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των B κυττάρων, φάνηκε να οδηγεί στη μείωση των κλινικών συμπτωμάτων, παρόλο που οι τίτλοι των κυκλοφορούντων αντισωμάτων παραμένουν υψηλοί (Bacorro and Tehrani 2010), (Baker, Das et al. 2005), (Dupond, Essalmi et al. 2010), (Katoh, Matsuda et al. 2010). Σε μία μελέτη με εικονικό φάρμακο, παρόλο που η μυϊκή δυσκαμψία και οι σπασμοί βελτιώθηκαν σημαντικά σε αρκετούς ασθενείς, το rituximab φάνηκε αναποτελεσματικό (Dalakas, Rakocovic et al. 2017). Έχει προταθεί ότι η ανοσοαπόκριση έχει ευαίσθητα και ανθεκτικά συστατικά στο rituximab, με συνεχή έκκριση αντισωμάτων, πιθανά από τα πλασματοκύτταρα που έχουν παραμείνει στην κυκλοφορία και από τα μνημονικά B κύτταρα (Rizzi, Knoth et al. 2010).

1.2) ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ ΚΑΙ Β ΚΥΤΤΑΡΑ

1.2.1) ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ

Αυτοανοσία είναι μία μη φυσιολογική κατάσταση στην οποία το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού όχι μόνο αναγνωρίζει τα δικά του συστατικά αλλά αποκρίνεται έναντι αυτών. Ορισμένες φορές οι βλάβες στα κύτταρα του εαυτού ή στα όργανα, προκαλούνται από αντισώματα, ενώ σε άλλες περιπτώσεις είναι υπεύθυνα τα T ή τα B κύτταρα. Ένα πολύ γνωστό παράδειγμα κυτταροεξαρτώμενης ανοσίας είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα, στην οποία αυτοδραστικά T κύτταρα επιτίθενται σε ιστούς των αρθρώσεων, προκαλώντας μία φλεγμονώδη απόκριση που έχει σαν αποτέλεσμα το οίδημα και την καταστροφή του ιστού. Το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αντισωμοεξαρτώμενης αυτοανοσίας είναι η βαριά μυασθένεια, με αντισώματα έναντι πρωτεϊνών της νευρομυϊκής σύναψης.

Τα αυτοάνοσα νοσήματα διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: α) στα οργανοειδικά και β) στα συστηματικά αυτοάνοσα. Σε ένα οργανοειδικό αυτοάνοσο νόσημα, η ανοσολογική απόκριση κατευθύνεται σε ένα αντιγόνο-στόχο, που εκφράζεται σε συγκεκριμένα όργανα ή ιστούς, ώστε οι εκδηλώσεις να περιορίζονται στο όργανο αυτό. Τα κύτταρα των οργάνων-στόχων μπορούν να καταστραφούν άμεσα από χυμικούς ή κυτταρομεσολαβητικούς μηχανισμούς. Εναλλακτικά, αντισώματα μπορούν να υπερευαισθητοποιήσουν ή να αναστείλουν τη φυσιολογική λειτουργία του οργάνου-στόχου. Παραδείγματα οργανοειδικών

αυτοάνοσων νοσημάτων αποτελούν ο ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης, η μυασθένεια Gravis, η θυρεοειδίτιδα Hashimoto και αναιμίες όπως η αυτοάνοση αιμολυτική και η κακοήθης.

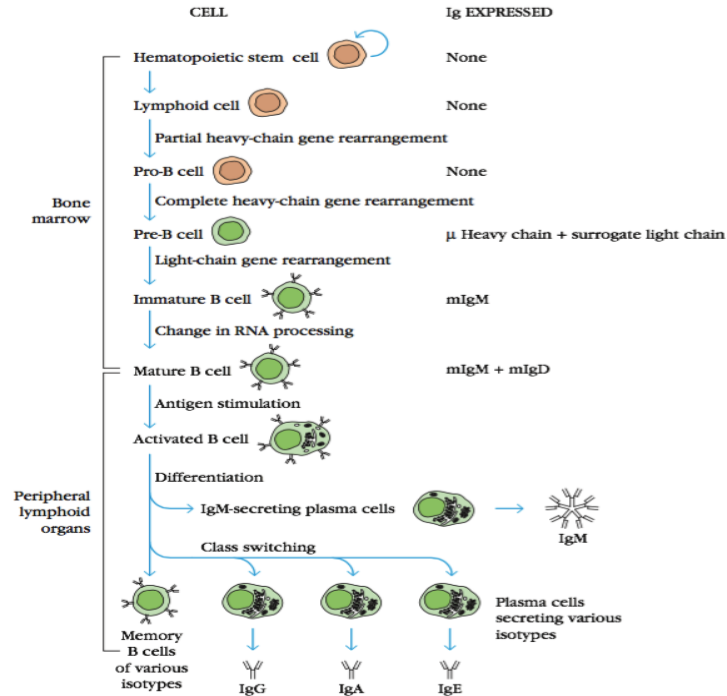
Στα συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα, η αντίδραση κατευθύνεται έναντι ευρέος φάσματος αντιγόνων-στόχων και περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό οργάνων και ιστών. Τα νοσήματα αυτά αντιπροσωπεύουν μία γενική ανεπάρκεια στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία έχει ως αποτέλεσμα υπερενεργοποιημένα T και B κύτταρα. Η καταστροφή του ιστού είναι εκτεταμένη, τόσο από κυτταρομεσολαβητικές ανοσολογικές αποκρίσεις, όσο και από άμεση κυτταρική καταστροφή, που προκαλείται από τα αυτοαντισώματα ή από συσσώρευση ανοσοσυμπλεγμάτων. Παράδειγμα αποτελεί ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, όπου προσβάλλονται πολλά όργανα, όπως το δέρμα και τα νεφρά.

Όπως συμβαίνει στα συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα, έτσι και στις αυτοάνοσες διαταραχές του νευρικού συστήματος παρατηρείται συμμετοχή των συστατικών του ανοσοποιητικού συστήματος συμπεριλαμβανομένων και των B κυττάρων.

Ο ρόλος των B κυττάρων, όχι μόνο σαν κύτταρα που παράγουν αντισώματα, αλλά και σαν αισθητήρες, συντονιστές και ρυθμιστές της ανοσολογικής απόκρισης έχει προκαλέσει μεγάλο κλινικό και ερευνητικό ενδιαφέρον. Τα B κύτταρα φαίνεται να διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση όχι μόνο στις απομυελινωτικές νόσους, αλλά και στις αυτοάνοσες διαταραχές του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος όπως οι εγκεφαλοπάθειες, οι περιφερικές νευροπάθειες, οι νευρομυϊκές και μυϊκές διαταραχές. Η έρευνα σε αυτό το πεδίο έχει ωθήσει την παραγωγή βιολογικών συστατικών που στοχεύουν τα B κύτταρα ή τα μονοπάτια των B κυττάρων, επισημαίνοντας το ρόλο των B κυττάρων στην παθοφυσιολογία των νευρολογικών διαταραχών, βρίσκοντας νέους θεραπευτικούς στόχους (Alexopoulos, Biba et al. 2016).

1.2.2) ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Στους ανθρώπους, μετά τη γέννηση, η πλειοψηφία των B λεμφοκυττάρων αναπτύσσεται από αρχέγονα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα στο μυελό των οστών. Εκεί κατά τη διάρκεια των πρώτων δύο σταδίων ανάπτυξης των B κυττάρων, αυτά αποκτούν την ειδικότητα έναντι του αντιγόνου με αναδιάταξη των βαριών και ελαφριών αλυσίδων, διαδικασία που δεν απαιτεί έκθεση των B κυττάρων σε κάποιο αντιγόνο (Eibel, Kraus et al. 2014). Στο τέλος του πρώτου σταδίου τα προγονικά-B κύτταρα, έπειτα από την αναδιάταξη των γονιδίων των αλυσίδων και την έκφραση στην επιφάνεια τους της βαριάς αλυσίδας μ των ανοσοσφαιρινών, γίνονται πρόδρομα ή προ-B κύτταρα και στη συνέχεια ολοκληρώνεται και η αναδιάταξη των γονιδίων της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών, οπότε μετατρέπονται σε ανώριμα. Όταν λειτουργικά μόρια ανοσφαιρίνης τύπου IgM θα εκφραστούν στα ανώριμα B κύτταρα, αυτά εγκαταλείπουν τον μυελό των οστών και μεταναστεύουν στο σπλήνα ή σε άλλα δευτερογενή λεμφικά όργανα, όπου ολοκληρώνεται η ανάπτυξή τους γιατί διαφοροποιούνται από ανώριμα B κύτταρα σε παρθένα ώριμα, έτοιμα να δεχθούν την αντιγονική διέγερση και να μετατραπούν σε ενεργοποιημένα B κύτταρα (Pieper, Grimbacher et al. 2013).



Εικόνα 2: Περίληψη των σταδίων ανάπτυξης των B κυττάρων. Τα γεγονότα που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης στο μυελό των οστών δεν απαιτούν αντιγόνο, ενώ η ενεργοποίηση και η διαφοροποίηση των ώριμων B κυττάρων στα περιφερικά λεμφικά όργανα (π.χ. σπλήνας) απαιτεί αντιγόνο. (Kuby 6th edition)

1.2.3) ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΩΡΙΜΩΝ B ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα ώριμα αλλά ακόμα παρθένα κύτταρα (που επίσης ονομάζονται επανακυκλοφορούντα) εκφράζουν τους ισοτύπους IgM και IgD, έχουν την ικανότητα να επανακυκλοφορούν μέσα στα πρωτογενή θυλάκια των δευτερογενών λεμφικών οργάνων αναζητώντας το συγγενικό τους αντιγόνο. Μόλις συναντήσουν το αντιγόνο αυτό, εκείνο ενδοκυτταρώνεται προκειμένου να κοπεί σε μικρά πεπτίδια και στη συνέχεια να παρουσιαστεί στην επιφάνεια των B λεμφοκυττάρων από τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας II (Weinstein, Peena et al. 2004). Σε αυτό το στάδιο, τα B κύτταρα μεταναστεύουν στο χώρο έξω από τα θυλάκια των δευτερογενών λεμφικών οργάνων και αλληλεπιδρούν με βοηθητικά T κύτταρα (Th cells) που έχουν προηγουμένως ενεργοποιηθεί από αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα. Εκεί τα βοηθητικά T κύτταρα, ενεργοποιούν περισσότερο τα B κύτταρα παρουσιάζοντας μεγαλύτερη συγγένεια για το αντιγόνο, μέσω του μορίου CD40L, ώστε να παραχθούν κεντροβλάστες και πλασματοκύτταρα (Kitano, Moriyama et al. 2011), (O'Connor, Vogel et al. 2006). Τα κύτταρα αυτά παράγουν αντισώματα που συνεισφέρουν στο σχηματισμό των ανοσοσυμπλεγμάτων.

1.2.4) ΜΝΗΜΟΝΙΚΑ Β ΚΥΤΤΑΡΑ

Ένας αριθμός γεγονότων, συχνά σχετιζόμενων με την αυτοανοσία, συμπεριλαμβανομένων της ωρίμανσης συγγένειας, την αλλαγής των ισοτύπων των ανοσοσφαιρινών και της δημιουργίας μνημονικών Β κυττάρων και πλασματοκυττάρων με μεγάλη διάρκεια ζωής, λαμβάνουν χώρα έπειτα από μία ταχύτατη κλωνική εξάπλωση των ενεργοποιημένων Β κυττάρων και τη δημιουργία βλαστικών κέντρων στα θυλάκια των λεμφικών οργάνων. Στα βλαστικά κέντρα, η ωρίμανση συγγένειας των Β κυττάρων μέσω των σωματικών υπερμεταλλάξεων των γονιδίων IgV έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη των Β κυττάρων με αυξημένη συγγένεια για το αντιγόνο. Κάποια από τα Β κύτταρα αυτά που έχουν υποστεί ωρίμανση συγγένειας στα βλαστικά κέντρα, τελικά διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα με μικρή διάρκεια ζωής ή πλασματοκύτταρα με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής που μεταναστεύουν πίσω στο μυελό των οστών και επιτυγχάνουν μακροπρόθεσμη παραγωγή αντισωμάτων (Nutt, Hodgkin et al. 2015). Β κύτταρα που έχουν επίσης υποστεί την ωρίμανση συγγένειας εγκαταλείπουν τα βλαστικά κέντρα ως Β κύτταρα μνήμης (Kurosaki, Kometani et al. 2015). Αυτά τα Β κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε αντιγόνα, εκφράζουν υψηλής συγγένειας αντισώματα για αυτά τα αντιγόνα και έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν πολύ γρήγορα σε πλασματοκύτταρα σε μελλοντική επαφή με αντιγόνα. Αυτά τα κύτταρα μνήμης μπορούν να παράγουν πολύ γρήγορα μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων, έπειτα από επαναλαμβανόμενη έκθεση με το «σχετικό» αντιγόνο τους (Kurosaki, Kometani et al. 2015).

1.2.6) Β ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΣΚΕΠΤΙΚΟ ΓΙΑ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ ΤΑ Β ΚΥΤΤΑΡΑ

Ο ρόλος των Β κυττάρων στην ανοσολογική απόκριση σχετίζεται με την αντιγονοπαρουσίαση, την έκκριση αντισωμάτων και τη ρύθμιση της ενεργοποίησης των Τ κυττάρων (Miyagaki, Fujimoto et al. 2015). Στην αυτοανοσία, πιθανά ο πιο σημαντικός ρόλος των Β κυττάρων είναι η παραγωγή αυτοαντισωμάτων από πλασματοκύτταρα, που έχουν διαφύγει από τα σημεία ελέγχου που αφορούν την αυτό-ανοχή (Tussiwand, Bosco et al. 2009). Σε κάποιες νευρολογικές διαταραχές, τα αυτοαντισώματα είναι άμεσα παθογενετικά, όπως για παράδειγμα αντισώματα έναντι του ακετυλοχολινικού υποδοχέα στη μυασθένεια gravis (MG), αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης MAG σε ασθενείς με απομυελινωτικού τύπου πολυνευροπάθεια με IgM-παραπρωτεΐναιμία, αντισώματα έναντι του υποδοχέα NMDAR στη λιμβική εγκεφαλίτιδα, αντισώματα έναντι της ακουαπορίνης 4 στην οπτική νευρομυελίτιδα. Σε άλλες διαταραχές αυτοαντισώματα, όπως αυτά που εμφανίζονται στις παρανεοπλασματικού τύπου νευροπάθειες, στην πολυεστιακή κινητική νευροπάθεια ή στο σύνδρομο του δύσκαμπτου ανθρώπου δε φαίνεται να έχουν άμεση δράση σε αυτοαντιγόνα και ίσως μπορεί να χρησιμοποιηθούν μόνο ως δείκτες για την ασθένεια. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι αντιγονοεξαρτώμενες λειτουργίες των Β κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της αντιγονοπαρουσίασης, της συν-διέγερσης, της παραγωγής κυτταροκινών και της ενεργοποίησης με τα Τ κύτταρα εμπλέκουν στα Β κύτταρα στην παθογένεση των διαταραχών αυτών (Dalakas 2008).

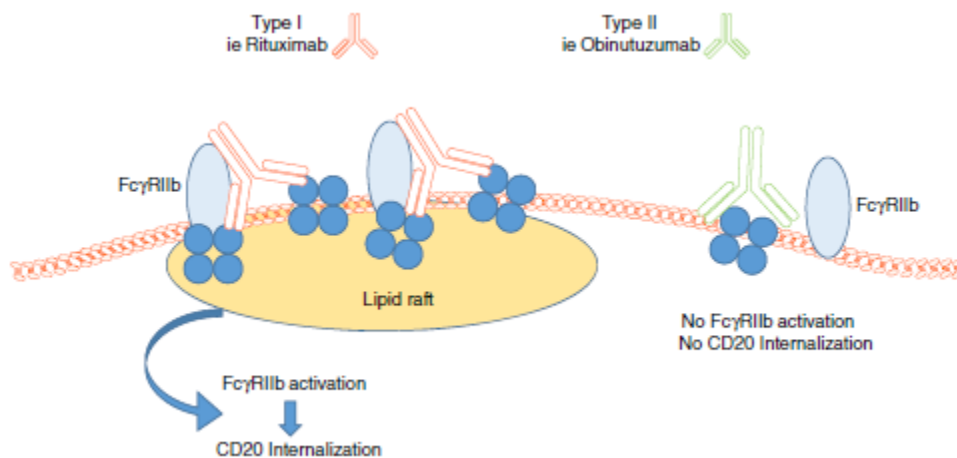
1.3)ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ Β ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ: ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

Ένας μεγάλος αριθμός φαρμάκων, μονοκλωνικών αντισωμάτων ή χιμερικών πρωτεϊνών που στοχεύουν τα Β κύτταρα, επηρεάζοντας την επιβίωση τους ή προκαλώντας επιλεκτικά μείωση τους, έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτοάνοσες διαταραχές και κακοήθειες. Αυτά περιλαμβάνουν φάρμακα για χρόνια λεμφογενή λευχαιμία (ofatumumab, alemtuzumab, rituximab), για μη-Hodgkin λέμφωμα(rituximab), για λύκο (belimumab), φάρμακα για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα (rituximab, etanercept, tocilizumab), πολυαγγειίτιδα (rituximab), και παιδιατρική αρθρίτιδα (etanercept, tocilizumab). Πλήθος κλινικών μελετών έχουν ολοκληρωθεί υποδεικνύοντας αυτές τις θεραπείες για αυτοάνοσες νευρολογικές διαταραχές.

Τα φάρμακα που μπορούν κατευθείαν να στοχεύσουν στη μείωση του αριθμού των Β κυττάρων, στοχεύουν στα αντιγόνα CD19, CD20, και CD22 που βρίσκονται στην επιφάνεια των Β κυττάρων. Το CD19 είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που συνδέεται με τον υποδοχέα των Β κυττάρων (BCR), παίζοντας καταλυτικό ρόλο στη σηματοδότηση μέσω του BCR (Fujimoto, Poe et al. 2000). Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μονοκλωνικά αντισώματα στοχεύουν το CD20, μία γλυκοπρωτεΐνη στην επιφάνεια των κυττάρων (αποτελείται από 297 αμινοξέα, με μοριακό βάρος 33–37 kD), της οποίας τη λειτουργία δε γνωρίζουμε ακόμη. Το CD20 εκφράζεται σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης των Β κυττάρων εκτός από τα πρόδρομα Β κύτταρα και τα τελικά διαφοροποιημένα πλασματοκύτταρα. Τα Β κύτταρα στοχεύονται μέσω του CD20 μέσω τριών κύριων κυτταροτοξικών μηχανισμών: α) κυτταροτοξικότητα διαμεσολαβούμενη από αντισώματα, στην οποία εμπλέκονται οι υποδοχείς που αναγνωρίζουν το σταθερό τμήμα Fc των αντισωμάτων (FcγRs) (ADCC), β) κυτταροτοξικότητα που εξαρτάται από το συμπλήρωμα (CDC) και γ)άμεσα επαγόμενη κυτταρική απόπτωση. Τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του CD20 μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο τύπους ανάλογα με την ικανότητα πρόσδεσης και το μηχανισμό δράσης τους.

Τα αντισώματα τύπου I περιλαμβάνουν τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα rituximab, ofatumumab, and ocrelizumab. Τα τύπου II αντισώματα περιλαμβάνουν τα tositumomab and obinutuzumab. Τα τύπου I μονοκλωνικά προκαλούν τη συσσώρευση των CD20 σε λιπιδικές σχεδίες, παρουσιάζοντας εξαιρετική ικανότητα πρόσδεσης και επάγοντας την κυτταροτοξικότητα που διαμεσολαβείται από το συμπλήρωμα. Τα τύπου II μονοκλωνικά αντισώματα δεν επιτρέπουν τη συσσώρευση των CD20, παρουσιάζουν χαμηλή ικανότητα πρόσδεσης, συγκρινόμενα με τα τύπου I και δεν επάγουν κυτταροτοξικότητα που διαμεσολαβείται από το συμπλήρωμα. Εξαιτίας της διαφορετικής σύνδεσης των τύπου I αντισωμάτων συγκριτικά με τα τύπου II, τα συμπλέγματα με το τύπου I αντίσωμα έναντι του CD20 εσωτερικεύονται και αποικοδομούνται ταχύτατα, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ανατροφοδότηση των δραστικών κυττάρων και χρόνο ημιζωής των αντισωμάτων (Εικόνα 3). Επειδή τα τύπου II μονοκλωνικά εσωτερικεύονται λιγότερο γρήγορα μέσα στα Β κύτταρα στόχους, η δράση τους μέσω των FcγRIIb παρατείνεται και για αυτό επάγουν μία μεγαλύτερη χρονικά κυτταροτοξικότητα που εξαρτάται από το αντίσωμα, όντας ικανά να στρατολογήσουν

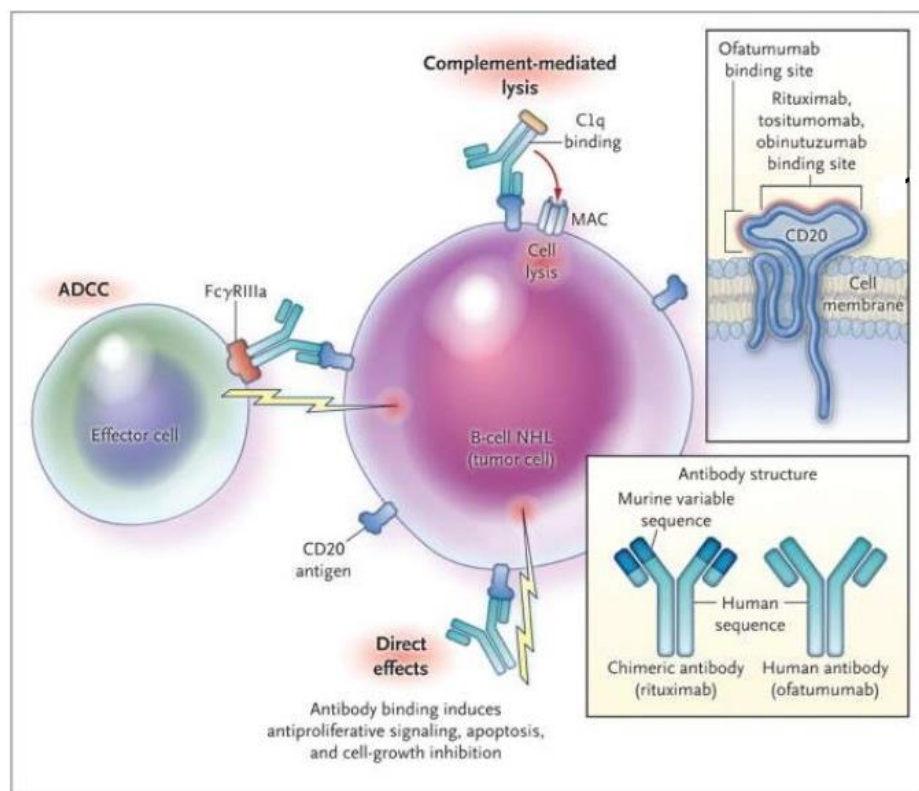
μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα και δενδριτικά κύτταρα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Goede, Klein et al. 2015).



Εικόνα 3: Προτεινόμενο μοντέλο για τις ικανότητες πρόσδεσης των τύπου I και τύπου II μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του CD20. Αντισώματα όπως το rituximab (τύπου I) μπορεί να προσδένονται ταυτόχρονα στο CD20 και FcγRIIb, προωθώντας την εσωτερίκευση των CD20 σε λιπιδικές σχεδίες. Αντισώματα όπως το obinutuzumab προσδένονται αποκλειστικά στο τετραμερές CD20, το οποίο δεν οδηγεί στην εσωτερίκευση παρατείνοντας τη δράση του αντισώματος (Goede, Klein et al. 2015).

1.3.1) RITUXIMAB

Το rituximab είναι ένα χημειοθεραπευτικό αντίσωμα ποντικού/ανθρώπου έναντι των CD20, που αποτελεσματικά στοχεύει στη μείωση του αριθμού των B κυττάρων, χωρίς να στοχεύει πρόδρομα/προγονικά B κύτταρα και πλασματοκύτταρα. Η μείωση του αριθμού ενός υποκυτταρικού πληθυσμού B κυττάρων CD20+ σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση έχει αναφερθεί εκτεταμένα στη βιβλιογραφία (Palanichamy, Jahn et al. 2014). Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με rituximab εξαρτάται από την αποτελεσματική μείωση του αριθμού των μη κυκλοφορούντων B κυττάρων. Σχετίζεται με ποιοτικές ανοσολογικές αλλαγές, που υποδεικνύουν επαναδιαμόρφωση της μνήμης των B κυττάρων, μέσω της συνεχούς μείωσης των αυτοδραστικών κυττάρων που δημιουργούν κλώνους και του πληθυσμού των B ρυθμιστικών κυττάρων που χαρακτηρίζεται από παραγωγή της ιντερλευκίνης 10 (IL10) (Quan, Zhang Bao et al. 2015), (Maurer, Rakocovic et al. 2012). Το rituximab ανιχνεύεται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό έπειτα από ενδοφλέβια χορήγηση μέχρι και 24 εβδομάδες. Τα επίπεδα του rituximab στο εγκεφαλονωτιαίο σχετίζονται σημαντικά με την ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Petereit and Rubbert-Roth 2009).



Εικόνα 4: Μηχανισμός της δράσης του Rituximab. Τα B κύτταρα στοχεύονται μέσω του CD20 μέσω τριών κύριων κυτταροτοξικών μηχανισμών: α) κυτταροτοξικότητα διαμεσολαβούμενη από αντισώματα, στην οποία εμπλέκονται οι υποδοχείς που αναγνωρίζουν το σταθερό τμήμα Fc των αντισωμάτων (FcγRs) (ADCC), β) κυτταροτοξικότητα που εξαρτάται από το συμπλήρωμα (CDC) και γ) άμεσα επαγόμενη κυτταρική απόπτωση (Maloney 2012).

Ο κύριος μηχανισμός δράσης του rituximab είναι η κυτταροτοξικότητα που εξαρτάται από αντισώματα (antibody-dependent cellular cytotoxicity - ADCC). Πιο συγκεκριμένα, η μεταβλητή περιοχή (Fab) του rituximab προσδένεται στο CD20 αντιγόνο των B κυττάρων και η σταθερή περιοχή του (Fc) ενεργοποιεί τα κύτταρα τελεστές του ανοσοποιητικού συστήματος για να προκαλέσουν λύση των B κυττάρων (Reff, Carner et al. 1994).

Το rituximab, έχει υψηλή αποτελεσματικότητα στη θεραπεία της πολλαπλής σκλήρυνσης, κυρίως στην υποτροπιάζουσα μορφή της νόσου, αυτής με υφέσεις και εξάρσεις, που δεν παρουσιάζει βελτίωση με τις θεραπείες που ήδη χρησιμοποιούνται. Κλινική μελέτη φάσης II για το rituximab έδειξε μείωση του αριθμού των B κυττάρων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, που επίσης συσχετίστηκε με μείωση των T κυττάρων (Cross, Stark et al. 2006). Υπάρχουν επίσης στοιχεία ότι το rituximab είναι αποτελεσματικό στη θεραπεία της οπτικής νευρομυελίτιδας, αλλά δεν έχουν αναφερθεί κλινικές μελέτες. Μελέτες αναφέρουν μία σημαντική μείωση στην υποτροπή της νόσου και επακόλουθη σταθεροποίηση και βελτίωση στην αναπηρία, όπως μετρήθηκε από διάφορα τεστ που εξετάζουν το βαθμό της αναπηρίας (Radaelli, Moiola et al. 2016), (Bedi, Brown et al. 2011), (Cree, Lamb et al. 2005), (Ip, Lau et al. 2013), (Jacob, Weinshenker et al. 2008), (Mahmood, Silver et al. 2011). Παρόλο που σημειώθηκε

βελτίωση ως προς την υποτροπή της νόσου, η μείωση της δραστηριότητας των αντισωμάτων IgG έναντι της ακουαπορίνης 4 (AQP4-IgG) δε φάνηκε να σχετίζεται σταθερά με κλινική βελτίωση, ακόμα και μετά από μείωση των B κύτταρων για μεγάλο χρονικό διάστημα (Gredler, Mader et al. 2013).

Σε μία μεγάλη κοόρτη με 100 ασθενείς με οπτική νευρομυελίτιδα που έπαιρναν θεραπεία με rituximab, παρατηρήθηκε μία μείωση της τάξης του 96% των ετήσιων υποτροπών της νόσου, συγκριτικά με τη θεραπεία πριν το rituximab (Kim, Jeong et al. 2015). Σε αυτή τη μελέτη επίσης αναφέρθηκε η συσχέτιση του πολυμορφισμού του αλληλομόρφου γονιδίου FCGR3A, (του F αλληλίου, που χαρακτηρίζει υποδοχείς χαμηλής συγγένειας για την IgG), με τον κίνδυνο της υποτροπής και της αναποτελεσματικής μείωσης των B κυττάρων κατά τη διάρκεια της θεραπείας rituximab (Kim, Jeong et al. 2015).

Πιλοτικές μελέτες έχουν δείξει ότι το rituximab θα μπορούσε να φανεί χρήσιμο σε ασθενείς με SPS (Bacorro and Tehrani 2010), (Lobo, Araujo et al. 2010). Το rituximab ήταν αποτελεσματικό στη θεραπεία του SPS, ακόμα και σε περιπτώσεις με επιπλοκές όπως δυσθυρεοειδική οφθαλμοπάθεια και αναπνευστικά προβλήματα (Dupond, Essalmi et al. 2010), (Katoh, Matsuda et al. 2010), (Qureshi and Hennessy 2012). Παρόλα αυτά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, το rituximab δεν είχε τα αναμενόμενα αποτελέσματα σε μία καλά σχεδιασμένη μελέτη (Dalakas, Rakocovic et al. 2017).

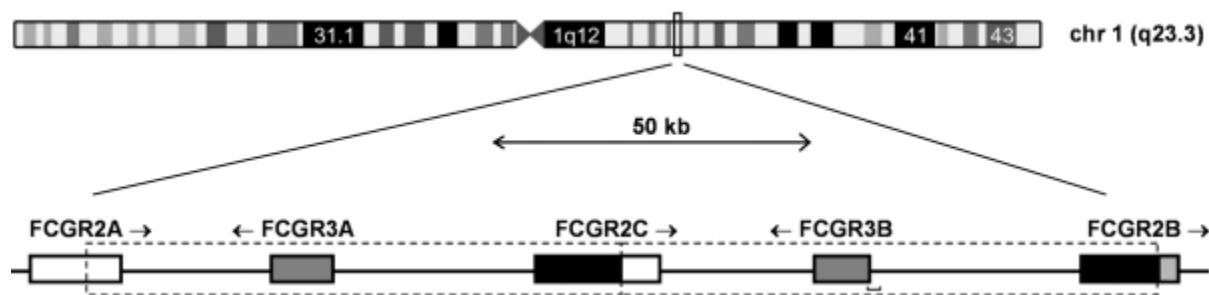
1.4)ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ

Η κυτταροτοξικότητα που εξαρτάται από αντισώματα διαμεσολαβείται από τους υποδοχείς των IgG (FcγR) που εκφράζονται σε ειδικά λευκοκύτταρα, όπως είναι τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK κύτταρα) (van Sorge, van der Pol et al. 2003). Οι FcγR ταξινομούνται σε 3 κύριους τύπους (FcγRI, FcγRII και FcγRIII) και σε περισσότερους υπότυπους, συμπεριλαμβανομένων των FcγRI, FcγRIIa/IIb/IIc, and FcγRIIIa/IIIb. (van Sorge, van der Pol et al. 2003), (Nimmerjahn and Ravetch 2010), (Cartron, Watier et al. 2004). Ο FcγRIIa ανευρίσκεται σε 2 αλληλικούς τύπους, είτε με χαμηλή (IIa-R131), είτε με υψηλή (IIa-H131) συγγένεια για τα συμπλέγματα IgG2 και IgG3. Ο FcγRIIIa ανευρίσκεται σε 2 αλληλικούς τύπους, ο (IIIa-V158) με μεγάλη συγγένεια σύνδεσης με την IgG, ενώ ο (IIIa-F158) με χαμηλότερη συγγένεια πρόσδεσης.

Ο FcγRIIIa εκφράζεται στα μακροφάγα, στα NK κύτταρα και σε κάποια δενδριτικά κύτταρα, ενώ ο FcγRIIa εκφράζεται στα μακροφάγα, στα ουδετερόφιλα, τα δενδριτικά και σε κάποια μαστοκύτταρα (Kim, Jung et al. 2006). Όπως και στον FcγRIIa, η ικανότητα σύνδεσης του FcγRIIIa με την IgG ποικίλλει στα διάφορα αλληλίου. Οι ομοζυγώτες FcγRIIIa-V158/V158 έχουν μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης με την IgG, ενώ οι ομοζυγώτες FcγRIIIa-F158/F158 δεν συνδέονται επαρκώς με την IgG.

Η χαμηλή συγγένεια του FcγRIIIa-R131 για τα ανοσοσυμπλέγματα που περιέχουν IgG2, και του FcγRIIIa-F176 γι' αυτά που περιέχουν IgG1 και IgG3 οδηγεί σε μείωση της σύνδεσης και σε καθυστέρηση της απομάκρυνσης των κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων, αυξημένη εναπόθεσή τους στους ιστούς και επιταχυνόμενη βλάβη των οργάνων.

Οι υποδοχείς αυτοί κωδικοποιούνται στον άνθρωπο από οκτώ γονίδια, που όλα βρίσκονται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 1.



Εικόνα 5: Ο γενετικός τόπος των γονιδίων FCGR στο χρωμόσωμα 1 του ανθρώπου. Τα γονίδια FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCGR3A και FCGR3B απεικονίζονται με διαφορετικές αποχρώσεις, παρουσιάζοντας την ομολογία των περιοχών στα γονίδια. Η κατεύθυνση του βέλους υποδεικνύει την κατεύθυνση της μεταγραφής (Marques, Thabet et al. 2010).

Δύο από τους τύπους των υποδοχέων, οι FcγRIIA και FcγRIIIA παρουσιάζουν πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου και έχει βρεθεί συσχέτιση με την αποτελεσματικότητα των λειτουργιών των εξαρτώμενων από αντισώματα λευκοκυττάρων, όπως η κυτταρομεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα που εξαρτάται από αντισώματα. Επίσης σχετίζονται με την απόκριση στη θεραπεία με το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των CD20, σε ασθενείς με λέμφωμα και αυτοάνοσες διαταραχές (Rascu, Repp et al. 1997), (van Sorge, van der Pol et al. 2003), (Mellor, Brown et al. 2013), (Quartuccio, Fabris et al. 2014).

Human IgG receptors						
Name	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIB	FcγRIIC ¹	FcγRIIIA	FcγRIIIB
CD	CD64	CD32A	CD32B	CD32C	CD16A	CD16B
B cell	-	-	+	-	-	-
T cell	-	-	-	-	-	-
NK cell	-	-	±	± ²	+	-
Mono/Macro	+	+	+/-	± ²	+	-
Neutrophil	(+)	+	+/-	± ²	-	+
Dendritic Cell ⁶	+	+	+	-	-	-
Basophil	-	+	+	-	-	+/-
Mast cell	(+)	+	-	-	-	-
Eosinophil	-	+	-	-	-	-
Platelet	-	+	-	-	-	-
Endothelium	-	-	-	-	-	-

Εικόνα 6: Οικογένεια των υποδοχέων των IgG στον άνθρωπο. Στον παραπάνω πίνακα φαίνεται σε ποιους κυτταρικούς τύπους εκφράζονται οι διάφοροι τύποι υποδοχέων FcγR (ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif, γ₂: dimer of Fcγ subunits, ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, GPI:glycosyl-phosphatidylinositol) (Gillis, Gouel-Chéron et al. 2014).

Το γονίδιο FCGR3A κωδικοποιεί τον υποδοχέα τύπου FcγRIIIa, που εκφράζεται στα NK κύτταρα και στα μονοκύτταρα/μακροφάγα και παρουσιάζει έναν πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου, που προκαλείται από μία υποκατάσταση μίας αζωτούχας βάσης, δηλαδή η γουανίνη (G) αντικαθίσταται από μία θυμίνη (T), στο νουκλεοτίδιο 559 στο cDNA (Koene, Kleijer et al. 1997), (Wu, Edberg et al. 1997). Αυτός ο πολυμορφισμός οδηγεί στη δημιουργία δύο αλλοτύπων FcγRIIIa, εκ των οποίων ο ένας έχει μία βαλίνη (Val) και ο άλλος μία φαινυλαλανίνη (Phe) στη θέση 158 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, στην περιοχή που μοιάζει με την επικράτεια της Ig κοντά στη μεμβράνη (Sondermann, Huber et al. 2000), (Radaev, Motyka et al. 2001). Ο γονότυπος FcγRIIIa-V/V σχετίζεται με πιο αποτελεσματική σύνδεση των IgG1 ή IgG3 στα NK κύτταρα και με πιο αυξημένη ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών (ως απόκριση στο σύνολο των IgG) συγκριτικά με το γονότυπο F/F (Koene, Kleijer et al. 1997), (Wu, Edberg et al. 1997). Στους Καυκάσιους και στους Αφροαμερικάνους, το 8–17% είναι ομόζυγοι για το γονότυπο V/V, 32–50% ομόζυγοι για τον F/F και 39–51% ετερόζυγοι για τον γονότυπο V/F (Wu, Edberg et al. 1997), (Koene, Kleijer et al. 1997), (Lehrnbecher, Foster et al. 1999), (Leppers-van de Straat, van der Pol et al. 2000).

Τα τελευταία χρόνια, πολλές μελέτες έχουν αναφέρει συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό 158V/F του FCGR3A και στο συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (Wu, Edberg et al. 1997), (Koene, Kleijer et al. 1998), (Song, Han et al. 1998), (Salmon, Ng et al. 1999), στην κοκκιωμάτωση κατά Wegener (Dijstelbloem, Scheepers et al. 1999), στην περιοδοντίτιδα ενηλίκων (Sugita, Yamamoto et al. 1999) και στο σάρκωμα Kaposi σε άνδρες που έχουν προσβληθεί από τον ιό HIV (Lehrnbecher, Foster et al. 2000). Έχει βρεθεί επίσης ότι υπάρχει μία συσχέτιση ανάμεσα στο γονότυπο του FCGR3A και στην απόκριση στο rituximab (MabtheraR and RituxanR), ένα χημειοαντί-CD20 IgG1 μονοκλωνικό αντίσωμα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Cartron, Dacheux et al. 2002). Σε μελέτες in vitro, βρέθηκε ότι η κυτταροτοξικότητα που εξαρτάται από αντισώματα αλλά και άλλες λειτουργίες των λευκοκυττάρων που εξαρτώνται από αντισώματα, πυροδοτούνται πιο αποτελεσματικά όταν υπάρχει τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο που κωδικοποιεί για βαλίνη στη θέση 158 του υποδοχέα FcγRIIIA. Η σύνδεση των γονοτύπων με τη θεραπεία ίσως αντικατοπτρίζει διαφορές στην αποτελεσματικότητα της ανατροφοδότησης των NK κυττάρων από το rituximab, όταν αυτό προσδένεται στα κυκλοφορούντα B κύτταρα. Οι γονότυποι λοιπόν του FcγRIIIA υποδοχέα ίσως αναπαριστούν νέους βιοδείκτες για την πρόγνωση της απόκρισης στη θεραπεία με rituximab σε ασθενείς με πολυνευροπάθεια που σχετίζεται με IgM μονοκλωνική γαμμοπάθεια (IgM –PNP) (Stork, Notermans et al. 2014).

Ο υποδοχέας FcγRIIa συνδέεται καλύτερα στις ανοσοσφαιρίνες τύπου IgG₂ (van der Pol and van de Winkel 1998). Μία σημειακή μετάλλαξη (πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου) και

συγκεκριμένα μία υποκατάσταση της αζωτούχας βάσης γουανίνης (G) σε αδενίνη (A), οδηγεί σε μία υποκατάσταση της ιστιδίνης (H) από αργινίνη (R) στη θέση 131 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός επηρεάζει σημαντικά την πρόσδεση στην IgG₂, καθώς ο υποδοχέας που φέρει ιστιδίνη παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για τις IgG₂ and IgG₃ συγκριτικά με αυτόν που φέρει αργινίνη (Clatworthy 2014). Ο υποδοχέας FCγRIIa που φέρει ιστιδίνη (H allele) προσδένεται καλύτερα στην ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη IgG₂ συγκριτικά με αυτόν που φέρει αργινίνη (R allele) (Parren, Warmerdam et al. 1992), (Warmerdam, van de Winkel et al. 1991). Περίπου το 24% των Καυκάσιων είναι ομόζυγοι (H/H) για τον υψηλής συγγένειας υποδοχέα που φέρει ιστιδίνη στη θέση 131, 42% είναι ετερόζυγοι (H/R) για ιστιδίνη/αργινίνη και 34% είναι ομόζυγοι (R/R) για το αλληλόμορφο που κωδικοποιεί την αργινίνη (2012).

1.5)Η MOG ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Η γλυκοπρωτεΐνη μυελίνης ολιγοδενδροκυττάρων (Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)), αποτελεί μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών και δομικό συστατικό της μυελίνης (Brunner, Lassmann et al. 1989), (Schluesener, Sobel et al. 1987), (Pham-Dinh, Mattei et al. 1993), (Gardinier, Amiguet et al. 1992). Η MOG που εκφράζεται στον άνθρωπο αποτελείται από 218 αμινοξέα και εκφράζεται αποκλειστικά στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η σχετικά καθυστερημένη έκφρασή της στη νευρωνική ανάπτυξη, υποδεικνύει ότι ίσως αποτελεί έναν σημαντικό δείκτη (επιφανείας) της ωρίμανσης των ολιγοδενδροκυττάρων, παίζοντας επίσης έναν σημαντικό ρόλο στην «ακεραιότητα» της μυελίνης, στην προσκόλληση και στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα κύτταρα (Pham-Dinh, Mattei et al. 1993), (Pham-Dinh, Allinquant et al. 1994). Η πρωτεΐνη MOG έχει μελετηθεί ως αυτοαντιγόνο-στόχος για το κεντρικό νευρικό σύστημα, για τις αποκρίσεις τόσο της χυμικής όσο και της κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας. Η πρωτεΐνη MOG συναντάται στην εξωτερική επιφάνεια της μυελίνης και στην πλασματική μεμβράνη των ολιγοδενδροκυττάρων (Brunner, Lassmann et al. 1989). Επειδή συναντάται κυρίως στις έλυτρα μυελίνης, είναι βιολογικά προσβάσιμος αντιγονικός στόχος για τη δράση των αυτοαντισωμάτων (Brunner, Lassmann et al. 1989), (Lington, Bradl et al. 1988).

Αντισώματα έναντι επιτόπων της πρωτεΐνης MOG έχουν βρεθεί σε πολλές φλεγμονώδεις απομυελινωτικές ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως στην αμφοτερόπλευρη περιοδική οπτική νευρίτιδα (rON), στην οπτική νευρομυελίτιδα με αντισώματα αρνητικά για ακουαπορίνη-4 (NMOs), στην παιδική πολλαπλή σκλήρυνση και σπανιότερα στην εγκεφαλίτιδα με αντισώματα έναντι του υποδοχέα NMDA (Hohlfeld, Dornmair et al. 2016).

1.6)Η ΑΚΟΥΑΠΟΡΙΝΗ-4 ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Η ακουαπορίνη-4, γνωστή επίσης ως AQP4, είναι μία πρωτεΐνη που συμπεριφέρεται ως δίαυλος νερού και κωδικοποιείται από το γονίδιο AQP4 στους ανθρώπους (Jung, Bhat et al. 1994). Ανήκει στην οικογένεια των ακουαπορινών που είναι ζωτικής σημασίας, μεμβρανικές πρωτεΐνες που μεταφέρουν νερό μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Στο ΚΝΣ, η AQP4 είναι η πιο

διαδεδομένη, που εκφράζεται συνήθως στις απολήξεις των αστροκυττάρων (Saadoun and Papadopoulos 2010).

Κάθε μονομερές της ακουαπορίνης-4 αποτελείται από 6 ελικοειδείς, μεμβρανικές επικράτειες και δύο ελικοειδή τμήματα που περικλείουν ένα στενό υδατικό πόρο (Verkman, Phuan et al. 2013). Όπως συμβαίνει και με άλλους διαύλους ακουαπορινών, τα μονομερή δημιουργούν τετραμερή (Chu, Huang et al. 2016). Η ακουαπορίνη-4 έχει δυο ισομορφές, τις M1 και M23. Τόσο τα ομοτετραμερή, όσο και τα ετεροτετραμερή είναι διαπερατά σε νερό (Okłinski, Skowronski et al. 2016).

Η ακουαπορίνη-4 εκφράζεται κυρίως στον άνθρωπο στις απολήξεις των αστροκυττάρων (Verkman, Phuan et al. 2013). Επίσης μπορεί να εκφραστεί στα επιθηλιακά κύτταρα πολλών οργάνων στο ανθρώπινο σώμα, όπως οι νεφροί, το έντερο, οι σιελογόνοι αδένες, αισθητήρια όργανα και σκελετικούς μύες (Gleiser, Wagner et al. 2016). Ειδικότερα στο ΚΝΣ, η ακουαπορίνη-4 μπορεί να βρεθεί κατά μήκος του νωτιαίου μυελού, καθώς αποτελεί τον κεντρικό δίαυλο νερού (Okłinski, Skowronski et al. 2016). Οι δίαυλοι της ακουαπορίνης -4, βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Hubbard, Szu et al. 2018).

Η κύρια λειτουργία της είναι η μεταφορά νερού μέσα και έξω από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό, οπότε μέσω αυτής εξασφαλίζεται η ομοιοστατική ισορροπία στο ΚΝΣ (Okłinski, Skowronski et al. 2016). Εμπλέκεται επίσης σε μία ποικιλία φυσιολογικών διαδικασιών, όπως η απομάκρυνση τοξικών παραπροϊόντων του μεταβολισμού των κυττάρων (Hubbard, Szu et al. 2018), η μετανάστευση των κυττάρων, το εγκεφαλικό οίδημα και η ομοιόσταση των κυττάρων (Desai, Hsu et al. 2016).

Τα αντισώματα έναντι της ακουαπορίνης-4 αποτελούν ειδικούς δείκτες και παθογενετικούς παράγοντες για την οπτική νευρομυελίτιδα (NMO) και το φάσμα των NMO διαταραχών (NMOD) (Lennon, Wingerchuk et al. 2004). Στο συστηματικό ερυθηματώδη λύκο και στο σύνδρομο Sjögren αντισώματα έναντι της ακουαπορίνης-4 έχουν βρεθεί σε ασθενείς με εγκεφαλικές κακώσεις, υποτροπιάζουσα οπτική νευρίτιδα και εγκάρσια μυελίτιδα (Wandinger, Stangel et al. 2010), (Wingerchuk, Lennon et al. 2007).

1.7)ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΣ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗΣ ΛΥΚΟΣ (ΣΕΛ)

Ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ) είναι μία χρόνια, με εξάρσεις και υφέσεις συστηματική αυτοάνοση ασθένεια που κυρίως προσβάλλει γυναίκες σε ποσοστό 52,2% στις ΗΠΑ (D'Cruz, Khamashta et al. 2007). Οι νευρολογικές διαταραχές αποτελούν ένα σημαντικό πεδίο μελέτης για την ασθένεια, καθώς παρουσιάζεται μία μεγάλη ποικιλία νευρολογικών συμπτωμάτων που αφορούν το κεντρικό και το περιφερικό νευρικό σύστημα (Hanly 2014).

1.7.1)ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

Οι νευρολογικές διαταραχές στο συστηματικό ερυθηματώδη λύκο αποτελούν ένα σημαντικό εύρημα για την ασθένεια. Η παρουσία ψυχώσεων ή σπασμών αποτελεί κριτήριο για

τη διάγνωση του συστηματικού ερυθματώδους λύκου με βάσει την Αμερικάνικη Ένωση Ρευματολογίας. Ένα μεγάλο φάσμα από νευρολογικές διαταραχές που επηρεάζει το κεντρικό και το περιφερικό νευρικό σύστημα, συναντάται σε ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο. Δεν είναι πάντα ξεκάθαρό εάν όλα τα συμπτώματα σχετίζονται άμεσα με την ασθένεια ή δευτερογενώς λόγω του ότι προσβάλλονται πολλοί διαφορετικοί ιστοί στον οργανισμό.

Στους ασθενείς με ΣΕΛ έχει περιγραφεί ιδιαίτερα μεγάλος αριθμός εκδηλώσεων από το ΚΝΣ, το νωτιαίο μυελό και τα περιφερικά νεύρα, όπως:

1. Κεφαλαλγία ημικρανιακού τύπου
2. Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ) που σχετίζεται με την ύπαρξη αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων και απόφραξη των εγκεφαλικών αγγείων.
3. Επιληπτικοί σπασμοί.
4. Χορεία, που συσχετίζεται με την παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων.
5. Προσβολή κρανιακών νεύρων που εκδηλώνεται με ποικιλία σημείων όπως πάρεση του προσωπικού νεύρου, ιλίγγου κ.ά.
6. Προσβολή περιφερικών νεύρων με τη μορφή κινητικοαισθητικής πολυνευροπάθειας ή πολλαπλής μονονευρίτιδας.
7. Κλινική εικόνα παρόμοια με αυτή του Guillain-Barre.
8. Μυελοπάθεια
9. Γνωστική Δυσλειτουργία
10. Οπτική Νευρίτιδα

1.7.2)ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΒΑΣΗ

Οι μηχανισμοί παθογένεσης του ΣΕΛ παραμένουν αδιευκρίνιστοι, ωστόσο ευρήματα υποδεικνύουν υπολειτουργία σε διάφορους ανοσολογικούς μηχανισμούς, όπως η αντιγονοπαρουσίαση, μη φυσιολογικές αποκρίσεις των Β κυττάρων, παραγωγή αυτοαντισωμάτων και καταστροφή οργάνων που διαμεσολαβείται από ανοσοσυμπλέγματα, υπερλειτουργία των βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων, μη φυσιολογική παραγωγή κυτταροκινών και απώλεια της αυτορρύθμισης των Τ και Β κυττάρων (Azevedo, Murphy et al. 2014).

1.7.3)ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Έχει προταθεί ότι η πυροδότηση της ασθένειας προέρχεται από ένα εξωγενές ανοσογόνο που επάγει την παραγωγή αυτοαντισωμάτων μέσω ενός μηχανισμού μοριακής μίμησης. Παρόλες τις σημαντικές προσπάθειες, κανένας λοιμογόνος παράγοντας δεν έχει πειστικά συσχετιστεί με την ασθένεια. Άλλη επικρατής θεωρία είναι ότι ανεπαρκής απομάκρυνση των

αποπτωτικών ή νεκρωτικών συστατικών των κυττάρων μπορεί να σχετίζεται με ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος με αυτοαντιγόνα (Dieker, Fransen et al. 2007), (Kirou and Gkrouzman 2013). Έλλειμμα στην κάθαρση αποπτωτικών κυττάρων στο συστηματικό ερυθματώδη λύκο, μπορεί να οδηγήσει σε ασυνήθιστη πρόσληψη του υλικού αυτού από τα μακροφάγα, που στη συνέχεια θα παρουσιάσουν αντιγόνα στα Τ και Β κύτταρα, πυροδοτώντας την αυτοάνοση διαδικασία (Munoz, Gairl et al. 2005). Αυτός ο μηχανισμός επίσης σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή ιντερφερόνης τύπου Ι, μέσω της ενδοκύτωσης των ανοσοσυμπλεγμάτων από δενδριτικά κύτταρα, οδηγώντας με τη σειρά της στην παραγωγή μεγάλων ποσών ιντερφερόνης άλφα και επάγοντας προφλεγμονώδεις αποκρίσεις (D'Cruz, Khamashta et al. 2007).

1.7.3.1) ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΟΥ ΛΥΚΟΥ

Η αιτιοπαθογένεια για κάθε μία νευρολογική εκδήλωση μπορεί να περιλαμβάνει τόσο φλεγμονώδεις όσο και θρομβωτικές διαδικασίες, όπως η παραγωγή αυτοαντισωμάτων, η ενδοθηλική παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, η μικροαγγειοπάθεια και η αθηροσκλήρυνση. Γενικά, οι κεντρικές νευρολογικές διαταραχές και η απουσία ταυτόχρονης υψηλής δραστηριότητας της νόσου σχετίζεται με μία θρομβωτική διαδικασία, ενώ σποραδικά περιστατικά και γενικευμένη δραστηριότητα της νόσου σχετίζεται μάλλον με φλεγμονώδη διαδικασία (Bertsias and Boumpas 2010). Πειραματικά, ιστοπαθολογικές και νευροαπεικονιστικές μελέτες προτείνουν ότι η μη-φλεγμονώδης μικροαγγειοπάθεια σχετίζεται με κατάσταση θρομβοφιλίας εξαιτίας των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων και της ενεργοποίησης του συμπληρώματος, που οδηγεί σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου (Bertsias and Boumpas 2010), (Hanly, Urowitz et al. 2007). Σε αντίθεση με την κοινή γνώμη, η πραγματική εγκεφαλική αγγειίτιδα σπάνια ανευρίσκεται στο λύκο (Moore and Richardson 1998), (Jennekens and Kater 2002). Οι συχνότερες εγκεφαλικές κακώσεις στον νευροψυχιατρικό λύκο είναι ισχαιμικές και αφορούν πολυεστιακά μικροεπεισόδια ή καθολικές ισχαιμικές αλλαγές ή και τα δύο. Ατροφία στο φλοιό, μικρο- και μακροαιμοραγίες, απομυελίνωση, ήπια αγγειοπάθεια, θρομβωτική αγγειοπάθεια με αιμοπετάλια και θρόμβους ινώδους, νευρωνική νέκρωση και απώλεια αξόνων και νευρώνων, όπως επίσης και παρεγχυματικό οίδημα έχουν παρατηρηθεί ιστολογικά. Ταύτιση ανάμεσα στα κλινικά και στα ιστοπαθολογικά ευρήματα συμβαίνει σε λιγότερο από 50% μέχρι 70% στις περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες (Devinsky, Petito et al. 1988), (Hanly, Walsh et al. 1992), (Brooks, Sibbitt et al. 2010), (Sibbitt, Brooks et al. 2010).

Πιθανά, η καλύτερη συσχέτιση του νευροψυχιατρικού λύκου φαίνεται να είναι με διάφορα αυτοαντισώματα που σχετίζονται με κύρια νευρολογικά συμπτώματα. Τα αυτοαντισώματα αυτά περιλαμβάνουν:

Αντιφωσφολιπιδιά αντισώματα: Αντιφωσφολιπιδιά αντισώματα (aPL) εμπλέκονται σε μικροαγγειακά θρομβωτικά, εμβολικά επεισόδια ή με την καταστροφή του ενδοθηλίου (Padovan, Castellino et al. 2012) σε περιπτώσεις εγκεφαλικών επεισοδίων, επιληπτικών κρίσεων, χορείας, μυελοπάθειας, κρανιακής νευροπάθειας, ημικρανιών και γνωστικής

δυσλειτουργίας (Hanly, Hong et al. 1999), (Sanna, Bertolaccini et al. 2003), (Appenzeller, Cendes et al. 2004), (Birnbbaum, Petri et al. 2009), (Zandman-Goddard, Chapman et al. 2007). Ο στόχος τους είναι φωσφολιπίδια και συμπλέγματα με πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια. Τα aPL περιλαμβάνουν αντι-καρδιολιπίνη (aCL), αντιπηκτικό του λύκου και αντισώματα έναντι της β2 γλυκοπρωτεΐνης. Αυτά οδηγούν στην αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης (όπως για παράδειγμα η E σελεκτίνη, ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1), που οδηγούν σε αυξημένη φλεγμονώδη απόκριση και θρομβοεμβολικά επεισόδια (Zaccagni, Fried et al. 2004).

Αντι-ριβοσωμικά Ρ αντισώματα: Έχουν βρεθεί σε πάνω από 36% των ασθενών με λύκο. Έχουν συσχετιστεί με κατάθλιψη και ψύχωση (Tzioufas, Tzortzakis et al. 2000), (Abdel-Nasser, Ghaleb et al. 2008). Αυτή η συσχέτιση δεν έχει ωστόσο επιβεβαιωθεί (Haddouk, Marzouk et al. 2009).

Αντισώματα έναντι της ακουαπορίνης 4: Αυτά ανευρίσκονται σε ασθενείς με διαταραχές του φάσματος της οπτικής νευρομυελίτιδας, που κυρίως εκδηλώνονται με μυελοπάθεια και οπτική νευρίτιδα (Lennon, Wingerchuk et al. 2004), (Pittock, Lennon et al. 2008), (Birnbbaum, Petri et al. 2009). Τα αντισώματα επίσης βρίσκονται σε περιπτώσεις απομυελίνωσης που συνοδεύουν άλλες συστηματικές αυτοάνοσες διαταραχές. Στο συστηματικό ερυθρεματώδη λύκο και στο σύνδρομο Sjögren αντισώματα NMO-IgG/anti-AQP4 έχουν βρεθεί σε ασθενείς με εγκάρσια μυελίτιδα ή περιοδική οπτική νευρίτιδα (Wingerchuk, Lennon et al. 2007), (Wandinger, Stangel et al. 2010). Δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί εάν το να είναι κάποιος ασθενής θετικός για NMO-IgG στον ορό στον νευροψυχιατρικό λύκο είναι συνύπαρξη δύο διαφορετικών ασθενειών ή αντιπροσωπεύει μία διακριτή νευροψυχιατρική διαταραχή του λύκου (Pittock, Lennon et al. 2008).

Αντισώματα έναντι της NR2 υπομονάδας του υποδοχέα γλουταμικού: Έχουν βρεθεί στον ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ορισμένων ασθενών με λύκο (DeGiorgio, Konstantinov et al. 2001). Μία συσχέτιση έχει βρεθεί ανάμεσα σε αυτά τα αντισώματα και σε ποικίλες νευροψυχιατρικές διαταραχές, όπως το γνωστικό έλλειμμα και η κατάθλιψη όπως έχουν δείξει πολλές μελέτες (Appenzeller, Carnevalle et al. 2006), (Lapteva, Nowak et al. 2006), (Yoshio, Onda et al. 2006), (Kozora, West et al. 2010).

Αντινευρωνικά αντισώματα: Έχει υποτεθεί ότι ποικίλα συμπτώματα στο νευροψυχιατρικό λύκο, όπως για παράδειγμα η επιληψία, θα μπορούσαν να συσχετισθούν με την παρουσία αντισωμάτων έναντι της μεμβράνης των νευρικών κυττάρων, όπως στην μεταιχμιακή εγκεφαλίτιδα. Μία μελέτη σε μία κοόρτη ασθενών με νευροψυχιατρικό λύκο, έδειξε ότι οι επιληπτικές κρίσεις δεν σχετίζονταν με τέτοιου τύπου αντισώματα

Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο μεγαλύτερες κοόρτες ασθενών να ερευνηθούν για καινούργια αυτοαντισώματα (Kampylafka, Alexopoulos et al. 2016).

1.8)ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ

Το Σύνδρομο Αντιφωσφολιπιδίων (AntiPhospholipid Syndrome (APS)) είναι μία αυτοάνοση επίκτητη θρομβοφιλία που χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζουσες αρτηριακές και φλεβικές θρομβώσεις καθώς και από νοσηρότητα εγκυμοσύνης, παρουσία αυτοαντισωμάτων στον ορό, τα οποία στρέφονται εναντίον πρωτεϊνών που προσδένουν φωσφολιπίδια όπως η Βήτα-2 γλυκοπρωτεΐνη-I (β 2GPI) (McNeil, Chesterman et al. 1991) και η προθρομβίνη (Bever, Galli et al. 1991). Τα αντισώματα αυτά επιδρούν στους φυσιολογικούς μηχανισμούς πήξης και ινωδόλυσης, οδηγώντας την αιμοστατική ισορροπία προς την κατεύθυνση της πήξης, με αποτέλεσμα το κύριο χαρακτηριστικό του συνδρόμου να είναι η θρόμβωση και δυνητικά μπορεί να προσβληθούν όλα τα όργανα του σώματος. Η νόσος είναι χρόνια και πολυσυστηματική με υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα ιδιαίτερα σε νέους ασθενείς (Griks, Ziakas et al. 2012).

Η κλινική εικόνα του συνδρόμου περιλαμβάνει εκδηλώσεις από διάφορα όργανα και συστήματα, όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα, το δέρμα, τους νεφρούς, τη γαστρεντερική οδό, την καρδιά και τον πλακούντα και δυνητικά μπορεί να προσβάλει οποιοδήποτε όργανο δημιουργώντας θρομβώσεις (Cervera, Piette et al. 2002). Η υποτροπή και η εμφάνιση νέων θρομβώσεων εμποδίζεται από τη χορήγηση κουμαρινικών αντιπηκτικών, ενώ η νοσηρότητα εγκυμοσύνης προλαμβάνεται με τη συγχορήγηση ηπαρίνης και ασπιρίνης καθ'όλη η διάρκεια της κύησης.

Διάφοροι μηχανισμοί δράσης των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων έχουν προταθεί έως τώρα στην προσπάθεια να διευκρινιστεί πλήρως η παθογένεια του συνδρόμου (Mehdi, Uthman et al. 2010). Σύντομα αναφέρουμε ότι οι επικρατούσες θεωρίες περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση κυτταρικών συστατικών, την αναστολή του ινωδολυτικού συστήματος, καθώς και την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης και του συμπληρώματος.

Η ανάμιξη του κεντρικού νευρικού συστήματος είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά στο APS και έχει χαρακτηριστεί αρκετά καλά. Τόσο οι θρομβωτικές νευρολογικές διαταραχές όσο και μη θρομβωτικές σχετίζονται με το APS. Σε μία μελέτη 1000 ασθενών με APS, οι νευρολογικές διαταραχές όπως τα εγκεφαλικά επεισόδια και οι ημικρανίες, ήταν από τα πιο συχνά κλινικά χαρακτηριστικά, συμβαίνοντας σε ποσοστό πάνω από 20% των ασθενών (Cervera, Piette et al. 2002). Άλλες νευρολογικές διαταραχές όπως επιληψία, γνωστική δυσλειτουργία, άνοια, χορεία, σύνδρομο που μοιάζουν με πολλαπλή σκλήρυνση και Guillain-Barre, καθώς επίσης και απώλεια νευροαισθητήρια απώλεια ακοής έχουν αναφερθεί (Levine and Welch 1987), (Brey and Escalante 1998), (Hughes 2003), (Sanna, Bertolaccini et al. 2003), (Chapman, Rand et al. 2003).

2)ΣΚΟΠΟΣ

Το Σύνδρομο του Δύσκαμπτου Ανθρώπου (Stiff Person Syndrome-SPS) είναι μία σποραδική, σπάνια νευρολογική διαταραχή, που συσχετίζεται με έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών αυτοαντισωμάτων που στοχεύουν αντιγόνα που εκφράζονται αποκλειστικά στις ανασταλτικές συνάψεις του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Με βάση την αιτιοπαθογένεια του SPS έχουν αναπτυχθεί δύο κύριες θεραπευτικές προσεγγίσεις: α) Η χρήση φαρμάκων που ενισχύουν την παραγωγή του GABA και β) Η χρήση ανοσοτροποποιητικών ή ανοσοκατασταλτικών θεραπειών. Πιο συγκεκριμένα, θεραπείες που στοχεύουν τα CD20+ αντιγόνα επιφανείας των B κυττάρων, χρησιμοποιώντας εξανθρωποποιημένα μονοκλωνικά αντισώματα, έχουν προταθεί ως προσέγγιση για την ρύθμιση της αυτοδραστικότητας και της κλωνικής έκπτυξης των B κυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα στο SPS. Ενώ κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι το μονοκλωνικό αντίσωμα rituximab, φάνηκε να οδηγεί στην κλινική βελτίωση του συνδρόμου, άλλες μελέτες, έδειξαν ότι το rituximab φάνηκε αναποτελεσματικό.

Ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο το rituximab καταστρέφει τα CD20+ B-κύτταρα, είναι η κυτταροτοξικότητα που εξαρτάται από αντισώματα, που διαμεσολαβείται από τους υποδοχείς των IgG (FcγR). Νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στα γονίδια FCGR3A και FCGR2A, που κωδικοποιούν τους υποδοχείς FcγRIIIa και FcγRIIa αντίστοιχα, μεταβάλλουν τη συγγένεια των υποδοχέων και έχουν συσχετιστεί με απόκριση στο rituximab σε διάφορες αυτοάνοσες και αιματολογικές ασθένειες. Ασθενείς που έχουν υποδοχείς υψηλής συγγένειας αποκρίνονται καλύτερα στη θεραπεία συγκριτικά με αυτούς που έχουν υποδοχείς χαμηλής συγγένειας.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας εξετάσαμε τους γονοτύπους μίας κοόρτης ασθενών με SPS, όπου μία υποομάδα είχε συμμετάσχει σε μία κλινική μελέτη, με χρήση και εικονικού φαρμάκου (placebo), απόκρισης ή μη στο rituximab. Η υπόθεσή μας ήταν ότι οι ασθενείς της μελέτης που ανταποκρίθηκαν στο συγκεκριμένο φάρμακο διαθέτουν τους υποδοχείς Fcγ υψηλής συγγένειας, σε σχέση με αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν.

Η γλυκοπρωτεΐνη των ολιγοδενροκυττάρων και της μυελίνης (MOG) έχει μελετηθεί ως αυτοαντιγόνο-στόχος σε απομυελινωτικά νοσήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως η παιδιατρική Πολλαπλή Σκλήρυνση. Αντίστοιχα, τα αντισώματα έναντι του αστροκυτταρικού διαύλου νερού, ακουαπορίνης-4 (AQP4) είναι παθογενετικά σε πολλές αυτοάνοσες απομυελινωτικές διαταραχές όπως η νόσος Devic (οπτική νευρομυελίτιδα). Ο συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος (ΣΕΛ) και το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (ΑΦ) είναι δύο αυτοάνοσες διαταραχές, που χαρακτηρίζονται από υπερδιέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, με υπερπαραγωγή αντισωμάτων έναντι ποικίλων αντιγονικών στόχων. Σε προηγούμενες μελέτες άλλων ομάδων, αλλά και του εργαστηρίου, έχει βρεθεί ότι ασθενείς με ΣΕΛ και απομυελίνωση, είχαν αντισώματα έναντι της AQP4.

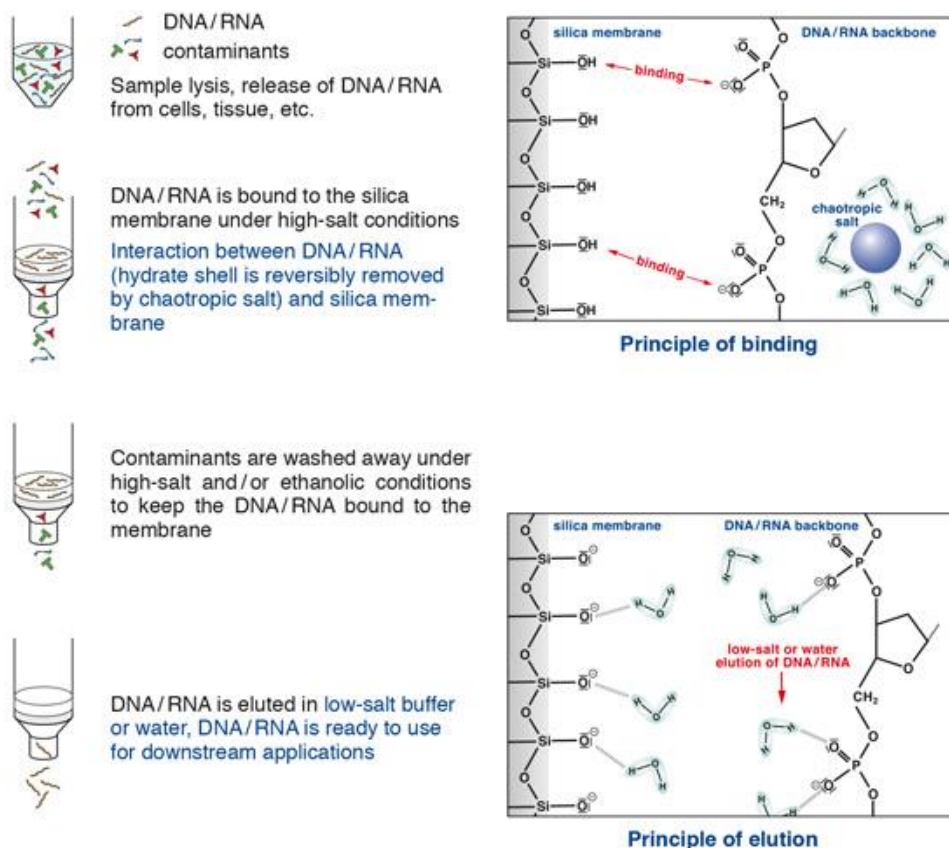
Έτσι, στόχος ήταν να ελέγξουμε εάν ασθενείς με ΣΕΛ, παρουσιάζουν και αντισώματα έναντι της MOG, χωρίς να όμως να έχουν εμφανίσει συμπτώματα νευρολογικά και

απομυελίνωση. Επιλέξαμε να εξετάσουμε αν υπάρχουν αυτοαντισώματα έναντι των δυο προαναφερθέντων πρωτεϊνών-στόχων και στο αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, καθώς τα δύο σύνδρομα σχετίζονται κλινικά, αφού οι ασθενείς παρουσιάζουν κοινά κλινικά συμπτώματα. Η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων έναντι της MOG και της ακουαπορίνης-4 σε ασθενείς με λύκο και αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο μπορεί να αποτελεί προγνωστικό βιοδείκτη για την εμφάνιση νευρολογικής συμπτωματολογίας στο μέλλον.

3) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1) ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA

Για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης μελέτης πραγματοποιήθηκε συλλογή περιφερικών κυττάρων, Τ και Β λεμφοκυττάρων (PBLs=Peripheral blood lymphocytes), από 31 ασθενείς με SPS και 13 υγιείς. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωμικού DNA, το οποίο στη συνέχεια ενισχύθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), προκειμένου να ενισχύσουμε τα γονίδια FCGR3A και FCGR2A που μας ενδιαφέρουν. Γενωμικό DNA απομονώθηκε από 200 μl εναίωρημα PBLs, τα οποία αραιώθηκαν αρχικά σε 1ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS) 1X. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη φυγοκέντρηση απομακρύνεται το υπερκείμενο, επαναδιαλυτοποιούνται τα κύτταρα σε 200μl PBS 1X. Η απομόνωση DNA πραγματοποιήθηκε με χρήση κολώνων πυριτίου, ακολουθώντας το πρωτόκολλο για απομόνωση γενωμικού DNA από αίμα της εταιρείας Macherey-Nagel (Nucleospin Blood). Το DNA φυλάσσεται στους -20°C προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για μελλοντική χρήση.



Εικόνα 7: Βασική αρχή απομόνωσης DNA μέσω μεμβράνης πυριτίου (silica membrane),

MACHEREY-NAGEL Protocols

Αρχικά πραγματοποιείται λύση των κυττάρων προκειμένου να απελευθερωθεί το DNA, το RNA και οι πρωτεΐνες από αυτά. Στη συνέχεια το DNA προσδένεται στη μεμβράνη πυριτίου κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας. Πραγματοποιούνται ξεπλύματα με αιθανόλη και ρυθμιστικά διαλύματα υψηλής αλατότητας, προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα υπόλοιπα συστατικά και να παραμείνει κολλημένο στη μεμβράνη το DNA. Τελικά πραγματοποιείται έκλουση του DNA με διαλύματα χαμηλής αλατότητας ή νερό, προκειμένου να ξεκολλήσει από τη μεμβράνη και να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά.

3.2)ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΟΛΙΚΟΥ DNA

Το DNA που απομονώθηκε με την διαδικασία που αναλύθηκε στην προηγούμενη ενότητα (DNA extraction), μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά και ποιοτικά με φωτομέτρηση. Το φωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την διαδικασία είναι το BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer, της Shimadzu Scientific Instruments.

Για να προσδιορίσουμε την ποιότητα του DNA υπολογίζουμε το λόγο A260/A280, ο οποίος είναι ενδεικτικός της καθαρότητας του DNA που απομονώθηκε. Η απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm οφείλεται κυρίως στην απορρόφηση των αζωτούχων βάσεων των νουκλεϊκών οξέων. Πιο συγκεκριμένα, οι πυριμιδίνες (κυτοσίνη και ουρακίλη στο RNA, κυτοσίνη και θυμίνη στο DNA) απορροφούν λίγο πιο κάτω από τα 260 nm, ενώ οι πουρίνες (αδενίνη και γουανίνη) λίγο πιο πάνω από τα 260 nm). Η απορρόφηση στα 280 nm οφείλεται κυρίως στην απορρόφηση τριών αμινοξέων των πρωτεϊνών της φαινυλαλανίνης, της τυροσίνης και τρυπτοφάνης (Hilario, Stern et al. 2017).

Το φασματοφωτόμετρο BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer, της Shimadzu Scientific Instruments που χρησιμοποιήθηκε επιτρέπει τον ακριβή και γρήγορο προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας κάθε δείγματος υπολογίζοντας αυτόματα τη συγκέντρωση του DNA σε $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Σε φασματοφωτόμετρα που υπολογίζουν μόνο οπτική απορρόφηση στα 260 nm, η συγκέντρωση του DNA σε $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ προσδιορίζεται πολλαπλασιάζοντας την τιμή της απορρόφησης αυτής με τον παράγοντα της αραίωσης και με την τιμή της συγκέντρωσης του DNA που αντιστοιχεί σε μια μονάδα απορρόφησης. Για να θεωρείται καθαρό το DNA που απομονώθηκε, δηλαδή απαλλαγμένο από προσμίξεις RNA και πρωτεϊνών, θα πρέπει σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Ambion για το TRI Reagent®, ο λόγος A260/A280 να κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2,0. Στην περίπτωση που ο λόγος A260/A280, λαμβάνει τιμές μικρότερες του 1,8, το εκχύλισμα DNA έχει υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 2,0 υποδηλώνουν την παρουσία ποσότητας RNA στο υπό μελέτη δείγμα. Αυτό συμβαίνει γιατί ο λόγος A260/A280 στο RNA ίσως είναι λίγο μεγαλύτερος, καθώς η ουρακίλη απορροφά περισσότερο συγκριτικά με τη θυμίνη (Desjardins and Conklin 2010).

3.3) ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)

3.3.1) ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι μια επαναλαμβανόμενη ενζυμική διαδικασία, όπου μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA - στόχος αντιγράφεται *in vitro*, προκειμένου να παραχθεί μεγάλος αριθμός αντιγράφων της εν λόγω αλληλουχίας. Κάθε κύκλος αυτής της επαναλαμβανόμενης διαδικασίας, η οποία περιλαμβάνει συνήθως 25 – 40 κύκλους, αποτελείται από τα στάδια της αποδιάταξης του δίκλωνου DNA υποστρώματος, του υβριδισμού των εκκινητών και της σύνθεσης του DNA, τα οποία θα αναλυθούν στη συνέχεια.

Σε κάθε κύκλο, κάθε μόριο που περιέχει την επιθυμητή προς ενίσχυση αλληλουχία DNA - στόχο, παράγει ένα αντίγραφο αυτής της αλληλουχίας. Στο τέλος μιας αντίδρασης PCR, μετά από *n* κύκλους θα παραχθούν, θεωρητικά, 2^n δίκλωνα μόρια DNA, που αποτελούν αντίγραφα της αλληλουχίας - στόχου του DNA. Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητο να απομονωθεί μόνο η προς ενίσχυση αλληλουχία, διότι αυτή μπορεί να καθοριστεί – οριοθετηθεί μέσω των εκκινητών που θα χρησιμοποιηθούν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Η δράση της DNA πολυμεράσης κατευθύνεται μέσω κατάλληλων εκκινητών και πραγματοποιείται η σύνθεση συγκεκριμένης περιοχής του DNA με εκθετικό τρόπο.

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που επιτυγχάνονται για την αποδιάταξη του DNA υποστρώματος, οι κοινές DNA πολυμεράσες αποδιατάσσονται, με αποτέλεσμα να απαιτείται σε κάθε κύκλο προσθήκη ενζύμου. Όμως, με την απομόνωση των θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών (π.χ. Taq πολυμεράση) από μικροοργανισμούς που ζουν σε θερμές πηγές (Chien, Edgar et al. 1976), δεν απαιτείται πλέον προσθήκη ενζύμου σε κάθε κύκλο. Η αντίδραση PCR σχεδιάστηκε και παρουσιάστηκε από τον Dr Kary Mullis το 1983 (Shampo and Kyle 2002). Πλέον, για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR χρησιμοποιούνται ειδικά όργανα, οι αυτόματοι θερμικοί κυκλοποιητές (thermal cyclers), που σε κάθε κύκλο μεταβαίνουν αυτόματα στις θερμοκρασίες που έχουμε επιλέξει, παρέχοντας τη δυνατότητα παραγωγής εκατομμυρίων αντιγράφων συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA σε ελάχιστο χρονικό διάστημα.

Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης διαφέρουν ανάλογα με τις απαιτήσεις του ενζύμου που χρησιμοποιείται, τη δομή και το μέγεθος του DNA υποστρώματος, καθώς και τις βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας πρόσδεσης των εκκινητών.

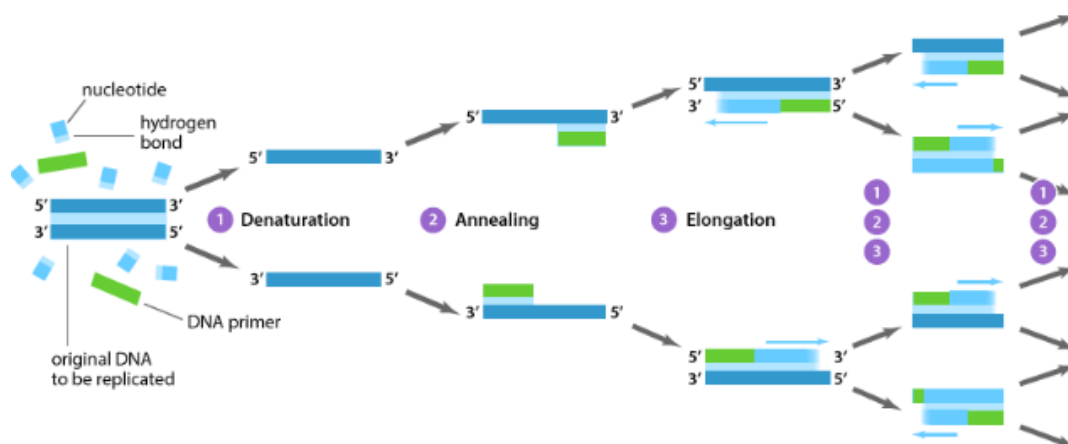
Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει πολλούς κύκλους (25-40), ο καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες (αποδιάταξη του δίκλωνου DNA υποστρώματος, υβριδισμός εκκινητών, σύνθεση DNA), βάσει των παρακάτω βημάτων (Εικόνα 9):

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA υποστρώματος (denaturation). Το μίγμα θερμαίνεται αρχικά στους 95°C για περίπου 15 λεπτά. Λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που

αναπτύσσεται στο διάλυμα, οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA διασπώνται. Ως εκ τούτου, καταστρέφονται οι δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές, τα δίκλινα μόρια DNA αποχωρίζονται τελείως και έτσι παράγονται οι μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμεύσουν ως εκμαγεία για τους εκκινητές και την DNA πολυμεράση.

2. Υβριδοποίηση των εκκινητών (annealing). Στη συνέχεια το διάλυμα ψύχεται απότομα και η θερμοκρασία μειώνεται μεταξύ 40-72°C (ανάλογα με το σχεδιασμό των εκκινητών, τη συγκέντρωση των αλάτων και τη συγκέντρωση των συστατικών του διαλύματος), ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στις μονόκλωνες, πλέον, αλυσίδες του DNA. Ο ένας εκκινητής προσδένεται στο 3' άκρο της μιας αλυσίδας, ενώ ο άλλος στο 3' άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εξειδίκευση της αντίδρασης PCR.
3. Επέκταση (extension) ή επιμήκυνση (elongation) του DNA. Στο επόμενο βήμα, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, ώστε να εκτελεστεί η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Αυτή είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (συνήθως Taq πολυμεράση). Η DNA πολυμεράση επιμηκώνει και τους δύο εκκινητές προς την 3' κατεύθυνση και έτσι επιτυγχάνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA, καταναλώνοντας τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) του διαλύματος. Ο χρόνος επώασης στους 72°C ποικίλει από 1 έως 3 λεπτά, ανάλογα με το μήκος του στόχου που θέλουμε να ενισχύσουμε.
4. Αποδιάταξη των προϊόντων. Η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι στους 95°C, ώστε τα δίκλινα μόρια που μόλις συντέθηκαν, να αποχωριστούν στις επιμέρους αλυσίδες. Αυτές οι μονόκλωνες αλυσίδες αποτελούν υποστρώματα για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA.
5. Επανάληψη των σταδίων 2 έως 4 για 25-40 φορές (25-40 κύκλοι).
6. Μετά το πέρας του τελευταίου κύκλου, ακολουθεί ένα στάδιο επιμήκυνσης διάρκειας περίπου 10 λεπτών, χρόνος απαραίτητος για την επέκταση όλων των προϊόντων από την θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση.

Κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου, το προϊόν που παράγεται είναι μικρότερο σε μέγεθος από το αρχικό δείγμα DNA (υπόστρωμα), αλλά μεγαλύτερο από την επιθυμητή προς ενίσχυση αλληλουχία. Στον δεύτερο κύκλο, έχουμε επίσης προϊόντα ενδιάμεσου μεγέθους και έπειτα εμφανίζονται αλυσίδες που αντιστοιχούν στην αλληλουχία - στόχο και περιλαμβάνουν στα άκρα τους εκκινητές. Πλέον, η ενίσχυση των προϊόντων επιθυμητού μεγέθους (που περιέχουν την αλληλουχία-στόχο) αυξάνεται εκθετικά, σε σύγκριση με την γραμμική συσσώρευση των προϊόντων ενδιάμεσου μεγέθους, που συνεπάγεται την ανίχνευση κυρίως των επιθυμητών προϊόντων στο τέλος της αντίδρασης (Schultze 2001).



Εικόνα 8: Σχηματική παρουσίαση των βημάτων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), AbmGood Protocols

3.3.2)ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΤΗΣ PCR

Τα απαιτούμενα αντιδραστήρια και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ήταν τα εξής:

- I. H_2O ελεύθερο από (δεοξυ)ριβονουκλεάσες (RNase/DNase-free H_2O)
- II. 10X KAPA Taq buffer A (Kapa Biosystems Inc.), που περιέχει $MgCl_2$ τελικής συγκέντρωσης 1,5mM
- III. Μείγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)
- IV. DNA Πολυμεράση-Taq Πολυμεράση (Kapa Biosystems)
- V. Εκκινητές (ολιγονουκλεοτίδια)
- VI. Θερμικός κυκλοποιητής (Veriti 96-Well Fast Thermal Cyclers Applied Biosystems™)

Ρυθμιστικό διάλυμα

Τα συστατικά που περιέχονται κατά κύριο λόγο είναι 100 mM Tris-HCl (pH 8,3 στους 25°C), 500 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$ και 0,1% Tween-20. Η χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος γίνεται για να βελτιστοποιηθεί η δράση της DNA πολυμεράσης, καθώς και για την βέλτιστη υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA εκμαγείο. Το Tris-HCl φέρει σε θερμοκρασία δωματίου pH 8,3, ενώ στους 72°C το pH του πέφτει στο 7,4 που αποτελεί το βέλτιστο pH για τις περισσότερες DNA πολυμεράσες. Τα μονοσθενή κατιόντα, όπως το K^+ , μειώνουν τις ηλεκτροαπωθητικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των εκκινητών και του DNA

υποστρώματος, εξαιτίας των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του σκελετού του DNA (Schultze 2001).

Μείγμα τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs)

Τα dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ανήκουν στα απαραίτητα συστατικά για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA στην αντίδραση PCR. Οι συγκεντρώσεις των dNTPs κυμαίνονται μεταξύ 50-200mM. Το μείγμα των τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων πρέπει να περιέχει ίσες συγκεντρώσεις των dATP, dTTP, dCTP και dGTP, εκτός και αν η αλληλουχία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί περιέχει κυρίως A/T ή G/C, οπότε και η αναλογία των dNTPs αλλάζει. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, η πιστότητα της αντιγραφής από την Taq πολυμεράση μειώνεται και ο ρυθμός εισαγωγής λάθος νουκλεοτιδίων αυξάνει προκαλώντας έτσι, την παραγωγή παραπροϊόντων από την πολυμεράση. Αντίθετα, αν η συγκέντρωση είναι χαμηλότερη μπορεί να επηρεάσει την αποδοτικότητα της αντίδρασης.

Η βέλτιστη συγκέντρωση των dNTPs εξαρτάται κάθε φορά από διάφορους παράγοντες, όπως τη συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου, τη συγκέντρωση των εκκινητών, το μήκος των αντιγράφων του DNA και τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Επειδή, τα dNTPs δεσμεύουν τα ιόντα Mg^{2+} , σημαντική αλλαγή στη συγκέντρωση των dNTPs θα προκαλέσει αλλαγή στη συγκέντρωση του ελεύθερου ποσού του διαθέσιμου Mg^{2+} (Schultze 2001).

Χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$)

Ένα από τα σημαντικότερα συστατικά της PCR, αποτελούν τα ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}), καθώς η συγκέντρωση αυτών επηρεάζει τόσο την ειδικότητα όσο και την αποδοτικότητα της αντίδρασης. Τα ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) προστίθενται στο μείγμα της αντίδρασης με την μορφή $MgCl_2$ και αποτελούν συμπράγοντα της DNA πολυμεράσης.

Σε συγκέντρωση ελεύθερου Mg^{2+} 1,2-1,3 mM, η DNA πολυμεράση παρουσιάζει τη μέγιστη ενεργότητά της. Η συγκέντρωση του ελεύθερου μαγνησίου επηρεάζεται από την συγκέντρωση των dNTPs όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, καθώς τα ιόντα Mg^{2+} προσδένονται στοιχειομετρικά με τα dNTPs και σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα που διευκολύνουν την ενσωμάτωσή τους στην αλυσίδα του DNA. Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου κυμαίνεται από 0,5 ως 5 mM. Συγκεντρώσεις περίπου 1,5mM είναι συνηθέστερες, αλλά σε μερικές περιπτώσεις διαφορετικές συγκεντρώσεις Mg^{2+} μπορεί να αποδειχτούν απαραίτητες (Schultze 2001).

Χαμηλές συγκεντρώσεις των ιόντων μαγνησίου οδηγούν σε χαμηλή απόδοση της αντίδρασης. Αντίθετα, πολύ αυξημένες συγκεντρώσεις τους οδηγούν σε αναστολή της ενίσχυσης λόγω της σταθεροποίησης της διπλής έλικας, καθώς και σε παραγωγή μη ειδικών προϊόντων εξαιτίας της σταθεροποίησης και πρόσδεσης των εκκινητών σε μη συμπληρωματικές αλληλουχίες. Επίσης, σε υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων Mg^{2+} αυξάνεται η συχνότητα των λαθών

από την DNA πολυμεράση κατά την αντιγραφή, με αποτέλεσμα να μειώνεται η πιστότητα της αντίδρασης (Schultze 2001).

DNA Πολυμεράση - Taq Πολυμεράση

Η DNA πολυμεράση κατά την σύνθεση του DNA επιλέγει το σωστό νουκλεοτίδιο για την επιμήκυνση της ολιγονουκλεοτιδικής αλυσίδας σε συμφωνία με τους κανόνες συμπληρωματικότητας των βάσεων και ανάλογα με τη βάση που βρίσκεται στην αλυσίδα εκμαγείο. Συναντούμε δύο κατηγορίες DNA πολυμερασών: τις DNA εξαρτώμενες DNA πολυμεράσες και τις RNA εξαρτώμενες DNA πολυμεράσες ή αντίστροφες μεταγραφάσες.

Η DNA πολυμεράση καταλύει τη σύνθεση του DNA προς την 5'→3' κατεύθυνση. Ορισμένες πολυμεράσες διαθέτουν και μια 3'→5' εξωνουκλεολυτική ενεργότητα (επιδιορθωτική), η οποία ελέγχει την τοποθέτηση του σωστού νουκλεοτιδίου στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα DNA. Αν η τοποθέτηση δεν έχει πραγματοποιηθεί σωστά, τότε μέσω της 3'→5' εξωνουκλεολυτικής ενεργότητας απομακρύνεται το νουκλεοτίδιο και εισάγεται το σωστό νουκλεοτίδιο λόγω της 5'→3' πολυμεριστικής ενεργότητας. Έτσι αυξάνεται η ακρίβεια, δηλαδή η πιστότητα, με την οποία η πολυμεράση αντιγράφει την αλυσίδα εκμαγείο.

Μετά την ανακάλυψη των θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών που διαθέτουν βακτήρια που ζουν σε υψηλές θερμοκρασίες σημειώθηκε μεγάλη πρόοδος στην αντίδραση PCR. Το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, απομονώθηκε και περιεγράφηκε πριν από σχεδόν 50 χρόνια (Brock and Freeze 1969). Το συγκεκριμένο βακτήριο ζει στο νερό σε θερμοκρασία 75°C. Πλέον, η Taq πολυμεράση, με μοριακό βάρος 94 kDa, αποτελεί το πιο κοινό ένζυμο για χρήση σε αντιδράσεις PCR και διαθέτει δύο ενζυμικές ενεργότητες:

- μία 5'→3' πολυμεριστική ενεργότητα με ρυθμό επιμήκυνσης 50-60 νουκλεοτίδια/δευτερόλεπτο,
- μία 5'→3' ενεργότητα εξωνουκλεάσης.

Το ένζυμο αυτό με χρόνο ημιζωής περίπου 130 λεπτά στους 92,5°C (40 λεπτά στους 95°C), παρουσιάζει γύρω στους 72-75°C τη βέλτιστη θερμοκρασία για την σύνθεση DNA. Στη θερμοκρασία αυτή αποτρέπονται διάφορες δευτεροταγείς ή τριτοταγείς δομές του υποστρώματος και εμποδίζεται η πρόσδεση των εκκινητών σε μη συμπληρωματικές θέσεις.

Η διαδικασία αντιγραφής του DNA, δεν είναι ιδανική και κάποιες φορές μπορεί να προστεθεί στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα ένα λάθος νουκλεοτίδιο από την DNA πολυμεράση. Επειδή όμως όπως αναφέρθηκε, η Taq πολυμεράση δε διαθέτει την 3' → 5' επιδιορθωτική ενεργότητα, τα λανθασμένα νουκλεοτίδια που τοποθετούνται στην αλυσίδα δεν απομακρύνονται. Η Taq πολυμεράση χαρακτηρίζεται από την προσθήκη μιας A στο 3' άκρο της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA (Hu 1993). Με την αντοχή της Taq πολυμεράσης σε υψηλές θερμοκρασίες είναι δυνατή η αυτοματοποίηση της PCR με τη χρήση των θερμικών κυκλοποιητών (thermal cyclers), καθώς είναι δυνατή η προσθήκη της πολυμεράσης μια φορά

στην αρχή της αντίδρασης αφού έχει την ικανότητα να παραμένει ενεργή σε όλη την διάρκεια των κύκλων.

Εκτός από τη δυνατότητα αυτοματοποίησης, με τη χρήση της Taq πολυμεράσης βελτιώθηκε η ευαισθησία της αντίδρασης PCR. Με τη Taq πολυμεράση χρησιμοποιούνται υψηλές θερμοκρασίες και όχι χαμηλές που απαιτούνται για την δράση της E. Coli DNA πολυμεράσης. Στις χαμηλές θερμοκρασίες οι εκκινητές θα μπορούσαν να υβριδοποιηθούν και σε διαφορετικές περιοχές από την περιοχή που βρίσκεται η αλληλουχία στόχος ενισχύοντας έτσι μη επιθυμητές περιοχές. Χρησιμοποιώντας λοιπόν υψηλές θερμοκρασίες εξαιτίας της θερμοανθεκτικότητας της Taq πολυμεράσης αποφεύγουμε την εμφάνιση των φαινομένων αυτών (Schultze 2001).

Σχεδιασμός και επιλογή του εκκινητή

Σημαντικό παράγοντα για την επιτυχή έκβαση μιας αντίδρασης PCR αποτελεί ο ακριβής σχεδιασμός και η επιλογή του κατάλληλου εκκινητή. Στις τυπικές αντιδράσεις PCR απαιτούνται δύο εκκινητές με διαφορετική αλληλουχία και τέλεια συμπληρωματικότητα με τις αλληλουχίες που βρίσκονται στα άκρα του τμήματος του DNA στόχου που επιθυμούμε να ενισχυθεί. Για να πολλαπλασιαστεί όμως μόνο ο επιθυμητός στόχος DNA, οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν σχεδιαστεί σωστά ώστε να παρέχουν υψηλή εξειδίκευση. Όταν η αλληλουχία του DNA που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα είναι γνωστή, τότε είναι εύκολη η σχεδίαση κατάλληλων εκκινητών, με τη χρήση λογισμικού, προκειμένου να ενισχυθεί το τμήμα στόχος. Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών πρέπει να εξετάζονται κάποια κριτήρια, τα πιο σημαντικά από τα οποία ακολουθούν στη συνέχεια.

Το μήκος των εκκινητών πρέπει να κυμαίνεται από 18 έως 30 νουκλεοτίδια (συνήθως 20 νουκλεοτίδια), παρέχοντας αρκετά ικανή ειδικότητα για την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου και μόνο. Μικρού μήκους εκκινητές ενδέχεται να συνδεθούν και με άλλα τμήματα του DNA δίνοντας μη ειδικά προϊόντα, ενώ μεγαλύτερου μήκους εκκινητές μειώνουν την απόδοση της αντίδρασης.

Κατά το σχεδιασμό των εκκινητών πρέπει να αποφεύγονται όσο είναι εφικτό επαναληπτικές ακολουθίες του ίδιου νουκλεοτιδίου, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε «γλίστρημα» του εκκινητή στην αλληλουχία - στόχο. Επαναλαμβανόμενες δομές με υψηλό ποσοστό G+C είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε αναδιπλώσεις φουρκέτας δημιουργώντας προβλήματα στην πρόσδεση γι' αυτό και το ποσοστό G+C πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 45% και 55% (συνήθως 50%). Το 3' άκρο του ενός εκκινητή δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικό με το 3' άκρο του άλλου εκκινητή του ζεύγους, γιατί προκαλεί το σχηματισμό διμερών των εκκινητών.

Η αλληλουχία του εκκινητή μπορεί να μην είναι πάντα απόλυτα συμπληρωματική με την αλληλουχία DNA του υποστρώματος. Θα πρέπει όμως η αλληλουχία του εκκινητή που βρίσκεται στο 3' άκρο του, να διαθέτει τέλεια συμπληρωματικότητα (και ειδικότερα τα τρία πρώτα νουκλεοτίδια του), διότι η DNA πολυμεράση επιμηκύνει τον εκκινητή από το ελεύθερο 3'-OH του. Η ύπαρξη τριών δεσμών υδρογόνου στα ζευγάρια GC, τα καθιστά πιο σταθερά από τα AT,

για το λόγο αυτό είναι προτιμότερο να μην υπάρχουν G's ή C's στο 3' άκρο του εκκινητή. Επίσης, επειδή η T εμφανίζει μεγαλύτερη ανοχή σε μη ειδικές δεσμεύσεις, πρέπει να αποφεύγεται ως τελευταία βάση, καθώς επίσης δε θα πρέπει να εμφανίζονται σε αυτή την περιοχή δευτεροταγείς δομές.

Σοβαρά υπόψιν πρέπει να ληφθεί η θερμοκρασία τήξεως των εκκινητών (melting temperature, T_m), δηλαδή η θερμοκρασία στην οποία το 50% των εκκινητών έχει υβριδοποιηθεί στην αλληλουχία-στόχο. Οι θερμοκρασίες τήξεως των εκκινητών που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να είναι παραπλήσιες (διαφορά της τάξης 1-2°C), ώστε και οι δύο εκκινητές να δεσμεύονται ειδικά στην ίδια θερμοκρασία αναδιάταξης και να κυμαίνονται από 55-80°C. Ένας απλός τρόπος για να υπολογιστεί η T_m ενός εκκινητή μήκους έως 20 νουκλεοτιδίων, είναι μέσω του τύπου που ακολουθεί:

$$T_m = (\text{αριθμός G+C}) \times 4^\circ\text{C} + (\text{αριθμός A+T}) \times 2^\circ\text{C}$$

Γενικά, οι δύο εκκινητές πρέπει να χρησιμοποιούνται στην ίδια συγκέντρωση (συνήθως 0,05 - 0,5 μM). Υψηλότερες συγκεντρώσεις θα αυξήσουν την πιθανότητα σχηματισμού διμερών - εκκινητών και μη ειδικών προϊόντων (Schultze 2001).

3.4) ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ FCGR3A ΚΑΙ FCGR2A

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων FCGR3A και FCGR2A χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) στα DNA που απομονώθηκαν τόσο από ασθενείς με SPS όσο και από τους υγιείς.

Συγκεκριμένα για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου FCGR3A υπήρξε απαραίτητη η διεξαγωγή μιας εσωτερικής PCR αντίδρασης (nested PCR) στα προϊόντα που προέκυψαν αφού αυτά είχαν πρώτα αραιωθεί.

3.4.1) ΓΟΝΙΔΙΟ FCGR3A

Για την αρχική αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε ένας πρόσθιος εκκινητής (forward primer) με αλληλουχία 5'- ATA TTT ACA GAA TGG CAC AGG-3' και ένας ανάστροφος εκκινητής (reverse primer) με αλληλουχία 5'- GAC TTG GTA CCC AGG TTG AA-3'. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση ενός τμήματος του γονιδίου με μέγεθος 1,2 kb, στο οποίο περιλαμβάνεται η θέση πολυμορφισμού.

Έπειτα, στα προϊόντα της παραπάνω αντίδρασης πραγματοποιήθηκε αραιώση με νερό ελεύθερο από νουκλεάσες (nuclease-free water) και στη συνέχεια τα αραιωμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για την διεξαγωγή μιας εσωτερικής PCR αντίδρασης (nested PCR) προκειμένου να αυξηθεί η ειδικότητα της αντίδρασης, για το τμήμα του γονιδίου στο οποίο

περιλαμβάνεται η θέση πολυμορφισμού, δηλαδή να ελαχιστοποιηθεί η ύπαρξη μη ειδικών προϊόντων.

Έτσι, σχεδιάστηκε ένας δεύτερος ειδικός για το FGCR3A πρόσθιος εκκινητής με αλληλουχία

5'-ATC AGA TTC GAT CCT ACT TCT GCA GGG GGC AT -3'. Παράλληλα σχεδιάστηκε και ένας δεύτερος, λίγο πιο εσωτερικός ανάστροφος εκκινητής με αλληλουχία 5'-ACG TGC TGA GCT TGA GTG ATG GTG ATG TTC AC -3'. Αυτό το ζευγάρι εκκινητών οδήγησε στην ενίσχυση ενός τμήματος μεγέθους 94 bp, δημιουργώντας μία θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NlaIII μόνο στο αλληλίο 158 V.

Ως υπόστρωμα για την πρώτη αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 200ng DNA των διαλυμάτων που φωτομετρήσαμε προηγουμένως (31 από ασθενείς SPS και 13 υγιείς, με σκοπό την ενίσχυση του τμήματος μεγέθους 1,2 kb.

Ο όγκος του διαλύματος DNA που προστίθεται στο μείγμα της πρώτης αντίδρασης PCR υπολογίζεται με βάση τη συγκέντρωση του DNA του συγκεκριμένου δείγματος. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται με βάση την απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm (A260). Η σχέση που μας δίνει τον όγκο του διαλύματος DNA, ο οποίος αντιστοιχεί σε 200 ng είναι:

$$V_{DNA}(\mu l) = 200 / C_{DNA} \text{ δείγματος,}$$

όπου C_{DNA} δείγματος η συγκέντρωση που μετρήθηκε στο nanodrop (ng/μl)

Αρχικά σε ένα erppendorf των 0,2 ml απαλλαγμένο από DNάσες, προσθέτουμε:

1. 20 μl 2X KAPA Taq Readymix
2. 2 μl από κάθε εκκινητή
3. Όγκο διαλύματος DNA (για κάθε δείγμα εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του)
4. Συμπληρώνουμε με RNase/DNase-free H₂O μέχρι ο συνολικός όγκος του διαλύματος να είναι 40 μl

Το Πρωτόκολλο και οι Συνθήκες αντιδράσεων PCR για τη κλωνοποίηση του τμήματος 1,2 kb για το γονίδιο FCGR3A παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1):

Πίνακας 1: Το Πρωτόκολλο και οι Συνθήκες αντιδράσεων PCR για τη κλωνοποίηση του τμήματος 1,2 kb για το γονίδιο FCGR3A

Πρωτόκολλο			Συνθήκες αντίδρασης			
Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Όγκος (μl)	Στάδιο	Θερμ/σία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
PCR- H ₂ O	-	Μέχρι τα 40μl	Αρχική αποδιάταξη	95	2 min	1
2X KAPA Taq Readymix	2X	20				
dNTPs	-	Περιείχε το Buffer	Αποδιάταξη	95	60 sec	x35
MgCl ₂	-	Περιείχε το Buffer	Υβριδ/ση	59	90 sec	
Πρόσθιος εκκινητής	10pM	2	Επέκταση	72	90 sec	
Ανάστροφος εκκινητής	10pM	2				
KAPA Taq πολυμεράση	-	Περιείχε το Buffer	Τελική επέκταση	72	8min	1
Σύνολο		40 μL				

Ως εκμαγείο για την διεξαγωγή μιας εσωτερικής PCR αντίδρασης (nested PCR) χρησιμοποιήθηκε το τμήμα μεγέθους 1,2 kb του γονιδίου FCGR3A, προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR, για να προκύψει το τμήμα 94bp που περιγράφηκε παραπάνω.

Σε ένα eppendorf των 0,2 ml απαλλαγμένο από DNάσες, προσθέτουμε:

1. 20 μl KAPA Taq Readymix
2. 2 μl από κάθε εκκινητή
3. 4μl διαλύματος DNA, προϊόν της πρώτης PCR
4. Συμπληρώνουμε με RNase/DNase-free H₂O μέχρι ο συνολικός όγκος του διαλύματος να είναι 40 μl

Το Πρωτόκολλο και οι Συνθήκες αντιδράσεων PCR για τη κλωνοποίηση του τμήματος 94bp για το γονίδιο FCGR3A παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2):

Πίνακας 2: Πρωτόκολλο και οι Συνθήκες αντιδράσεων PCR για τη κλωνοποίηση του τμήματος 94bp για το γονίδιο FCGR3A

Πρωτόκολλο			Συνθήκες αντίδρασης			
Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Όγκος (μl)	Στάδιο	Θερμ/σία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
PCR- H ₂ O	-	Μέχρι τα 40μl	Αρχική αποδιάταξη	95	2 min	1
2X KAPA Taq mastermix	2X	20				
dNTPs	-	Περιείχε το Buffer	Αποδιάταξη	95	60 sec	x35
MgCl ₂	-	Περιείχε το Buffer	Υβριδ/ση	66	60 sec	
Πρόσθιος εκκινητής	10pM	2	Επέκταση	72	60 sec	
Ανάστροφος εκκινητής	10pM	2				
KAPA Taq πολυμεράση	-	Περιείχε το Buffer	Τελική επέκταση	72	9,5min	1
Σύνολο		40 μL				

3.4.2) ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ FCGR2A

Για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου FCGR2A στην αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε ένας πρόσθιος εκκινητής (forward primer) με αλληλουχία 5'- GGA AAA TCC CAG AAA TTC TCG C-3' και ένας ανάστροφος εκκινητής (reverse primer) με αλληλουχία

5'- CAA CAG CCT GAC TAC CTA TTA CGC GGG-3'.

Ως υπόστρωμα για την πρώτη αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 200ng DNA των διαλυμάτων που φωτομετρήσαμε προηγουμένως (31 από ασθενείς SPS και 13 υγιείς, με σκοπό την ενίσχυση ενός τμήματος μεγέθους 337 bp.

Ο όγκος του διαλύματος DNA που προστίθεται στο μείγμα της πρώτης αντίδρασης PCR υπολογίζεται με βάση τη συγκέντρωση του DNA του συγκεκριμένου δείγματος. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται με βάση την απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm (A260). Η σχέση που μας δίνει τον όγκο του διαλύματος DNA, ο οποίος αντιστοιχεί σε 200 ng είναι:

$$V_{DNA}(\mu l) = 200 / C_{DNA} \text{ δείγματος},$$

όπου C_{DNA} δείγματος η συγκέντρωση που μετρήθηκε στο nanodrop (ng/μl)

Αρχικά σε ένα erppendorf των 0,2 ml απαλλαγμένο από DNάσες, προσθέτουμε:

1. 20 μl 2X KAPA Taq Readymix
2. 2 μl από κάθε εκκινητή
3. Όγκο διαλύματος DNA (για κάθε δείγμα εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του)
4. Συμπληρώνουμε με RNase/DNase-free H₂O μέχρι ο συνολικός όγκος του διαλύματος να είναι 40 μl

Το Πρωτόκολλο και οι Συνθήκες αντιδράσεων PCR για τη κλωνοποίηση του τμήματος που μας ενδιαφέρει για το γονίδιο FCGR2A παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3):

Πίνακας 3: Πρωτόκολλο και οι Συνθήκες αντιδράσεων PCR για τη κλωνοποίηση του τμήματος που μας ενδιαφέρει για το γονίδιο FCGR2A

Πρωτόκολλο			Συνθήκες αντίδρασης			
Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Όγκος (μl)	Στάδιο	Θερμ/σία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
PCR- H ₂ O	-	Μέχρι τα 40μl	Αρχική αποδιάταξη	95	2 min	1
2X KAPA Taq Readymix	2X	20				
dNTPs	-	Περιείχε το Buffer	Αποδιάταξη	95	15 sec	x35
MgCl ₂	-	Περιείχε το Buffer	Υβριδ/ση	55	30 sec	
Πρόσθιος εκκινητής	10pM	2	Επέκταση	72	40 sec	
Ανάστροφος εκκινητής	10pM	2				
KAPA Taq πολυμεράση	-	Περιείχε το Buffer	Τελική επέκταση	72	7min	1
Σύνολο		40 μL				

Πίνακας 4: Καταγραφή των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των γονιδίων FCGR3A και FCGR2A. Οι θερμοκρασίες τήξεως των εκκινητών (T_m) υπολογίστηκαν μέσω Primer-BLAST.

		Εκκινητές			
		Κατεύθυνση	Αλληλουχία (5'→3')	Μήκος (nt)	T _m (°C)
Κλωνοποίηση	PCR FCGR3A	Πρόσθιος	ATA TTT ACA GAA TGG CAC AGG	21	54.0
		Ανάστροφος	GAC TTG GTA CCC AGG TTG AA	20	57.3
	Nested PCR FCGR3A	Πρόσθιος	ATC AGA TTC GAT CCT ACT TCT GCA GGG GGC AT	32	69.5
		Ανάστροφος	ACG TGC TGA GCT TGA GTG ATG GTG ATG TTC AC	32	69.5
	PCR FCGR2A	Πρόσθιος	GGA AAA TCC CAG AAA TTC TCG C	22	58.4
		Ανάστροφος	CAA CAG CCT GAC TAC CTA TTA CGC GGG	27	68.0

3.5) RFLP ANALΥΣΗ (Restriction Fragment Length Polymorphism)- ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ

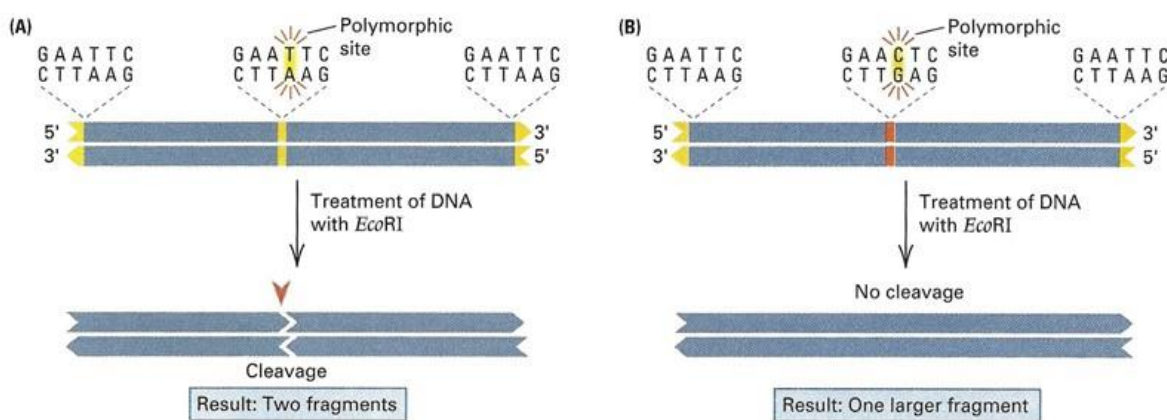
Πολυμορφισμός είναι η ύπαρξη δύο ή περισσότερων γενετικά καθοριζόμενων εναλλακτικών φαινοτύπων σ'έναν πληθυσμό με τέτοιες συχνότητες που ο σπανιότερος δεν θα μπορούσε να διατηρηθεί μόνο με επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις.

Οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism: SNP), είναι πολυμορφισμοί που έχουν προκύψει από αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου σε μία συγκεκριμένη γενετική θέση. Οι πολυμορφισμοί που εξετάζουμε για τα γονίδια FCGR3A και FCGR2A αποτελούν τέτοιους πολυμορφισμούς και η ανίχνευσή τους θα πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια της μεθόδου RFLP, που περιγράφεται αμέσως μετά.

Ο πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLP) είναι μία διαφορά σε ομόλογες DNA αλληλουχίες που μπορεί να ανιχνευθεί μέσω της παρουσίας τμημάτων διαφορετικού μεγέθους, έπειτα από πέψη του δείγματος DNA, με τη βοήθεια ειδικών περιοριστικών ενδονουκλεασών. Ο RFLP, ως μοριακός δείκτης είναι ειδικός για το συνδυασμό ειδικού κλώνου (DNA) - περιοριστικού ενζύμου.

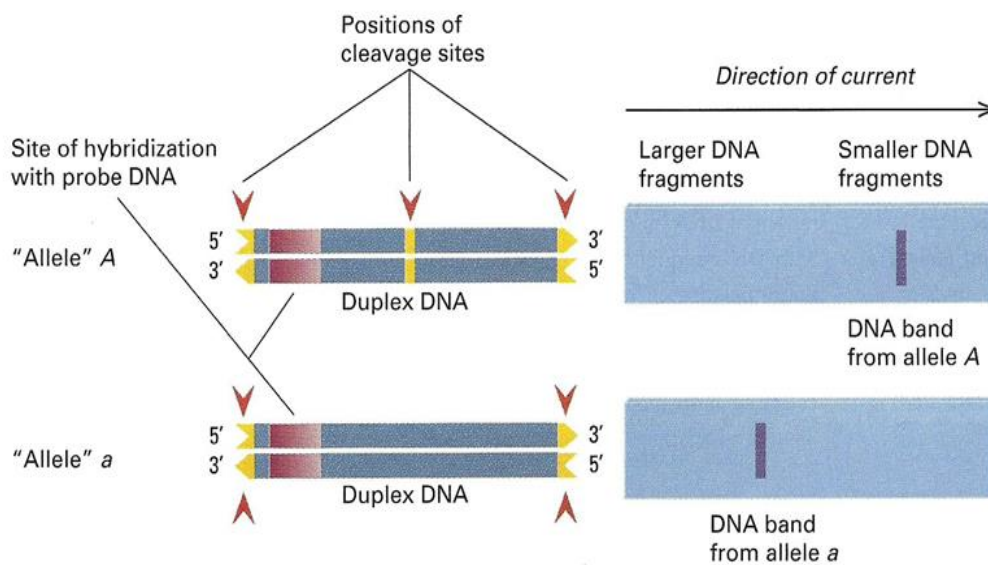
Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση πολυμορφισμών με βάση το πρότυπο ηλεκτροφόρησης θραυσμάτων μετά από πέψη (βλέπε Εικόνες 10,11).

Στο γονιδίωμα υπάρχουν πάρα πολλές θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών. Είναι δυνατόν λοιπόν, εάν σε μία θέση που είναι πολυμορφική υπάρξει αντικατάσταση για παράδειγμα ενός νουκλεοτιδίου, η θέση αυτή να μην αποτελεί πια θέση αναγνώρισης για τη συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, χρησιμοποιώντας το ένζυμο αυτό να πάρουμε διαφορετικό πρότυπο ηλεκτροφόρησης ανάλογα με τα κομμάτια που υπάρχουν.



Εικόνα 9: Στην εικόνα παρατηρούμε ότι τόσο στο (A) όσο και στο (B) υπάρχουν 3 θέσεις αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης ECORI. Εάν σε μία θέση πολυμορφισμού (στη συγκεκριμένη περίπτωση αυτή ανευρίσκεται στη δεύτερη θέση αναγνώρισης της ECORI, πάνω στην αλληλουχία του DNA), υπάρχει διαφορετικό νουκλεοτίδιο, που αντί για θυμίνη (T) φέρει κυτοσίνη (C), παύει πλέον η θέση αυτή να αποτελεί θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση ECORI. Επομένως, στην (A) περίπτωση που υπάρχει θέση αναγνώρισης του συγκεκριμένου ενζύμου, έπειτα από πέψη θα προκύψουν 2 κομμάτια μικρότερου μεγέθους, ενώ στην περίπτωση (B) η θέση αναγνώρισης «χάνεται» οπότε το ένζυμο αυτό δε θα πραγματοποιήσει πέψη, με αποτέλεσμα να υπάρχει 1 κομμάτι μεγαλύτερου μεγέθους (Szauter, et al. 2013)

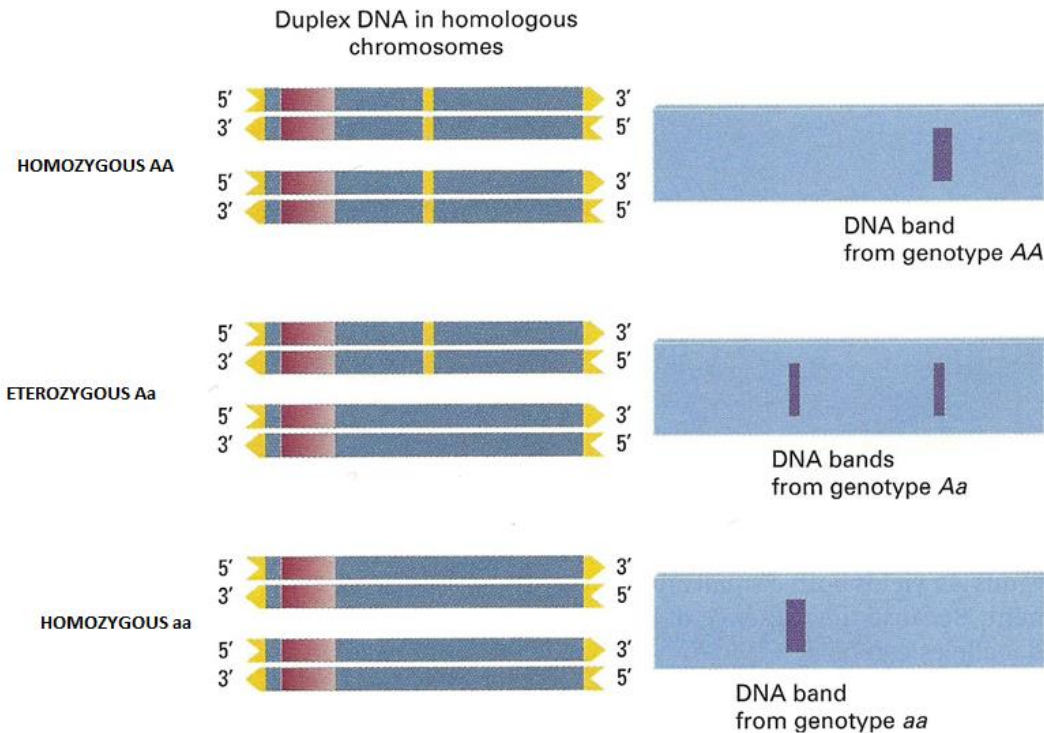
Η παρουσία ή μη της θέσης αναγνώρισης ανάλογα με την αλληλουχία οδηγεί στη δημιουργία διαφορετικού αλληλομόρφου στο γονότυπο του ατόμου (βλέπε Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Η παρουσία θέσης αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης οδηγεί στο αλληλόμορφο A, ενώ η απουσία της στο a. Εάν γίνει πέψη γενωμικού DNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση ECORI, για τα δύο αλληλόμορφα θα παρατηρήσουμε τμήματα διαφορετικού μεγέθους σε ηλεκτροφόρηση, ανάλογα με το αν το ένζυμο θα κόψει ή όχι την αλληλουχία DNA σε κάθε αλληλόμορφο.

(Szauter, et al. 2013)

Έτσι το πρότυπο ηλεκτροφόρησης θα βοηθήσει στον καθορισμό του γονοτύπου και στην εξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν το εάν το άτομο φέρει ή όχι τον πολυμορφισμό (βλέπε Εικόνα 11). Ο άνθρωπος είναι διπλοειδής οργανισμός οπότε φέρει 2 αλληλόμορφα γονίδια. Υπάρχει λοιπόν περίπτωση τα 2 αυτά γονίδια να είναι ακριβώς ίδια μεταξύ τους, καταλήγοντας στην περίπτωση της ομοζυγωτίας (AA ή aa) ή να είναι διαφορετικά μεταξύ τους καθιστώντας τον οργανισμό αυτό ετερόζυγο (Aa) για τη συγκεκριμένη θέση (βλέπε Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Στην περίπτωση ομοζυγωτίας, είτε για το αλληλόμορφο τύπου A (που φέρει θέση αναγνώρισης περιοριστικής ενδονουκλεάσης), είτε για το αλληλόμορφο τύπου a (που δε φέρει τη θέση αναγνώρισης περιοριστικής ενδονουκλεάσης) παρατηρείται μία μόνο ζώνη στην ηλεκτροφόρηση. Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας παρατηρούνται δύο διαφορετικές ζώνες στην ηλεκτροφόρηση.

(Szauter, et al. 2013)

3.6) ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Ένα περιοριστικό ένζυμο ή μία περιοριστική ενδονουκλεάση, είναι ένα ένζυμο που κόβει το DNA σε κομμάτια, αναγνωρίζοντας ειδικές θέσεις πάνω στο μόριο, γνωστές ως θέσεις περιορισμού (Roberts and Murray 1976), (Kessler and Manta 1990). Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες ταξινομούνται τυπικά σε 4 διαφορετικούς τύπους, που διαφέρουν δομικά και εάν κόβουν το υπόστρωμα τους DNA, στη θέση αναγνώρισης ή εάν η θέση αναγνώρισης και κοπής βρίσκονται ξεχωριστά. Για να κόψουν το DNA, δημιουργούν τομές σε 2 σημεία, σπάζοντας 1 φωσφοδιεστερικό δεσμό σε κάθε αλυσίδα της διπλής έλικας του DNA.

Τα ένζυμα αυτά παράγονται στα βακτήρια και τα αρχαία και αποτελούν μηχανισμό προστασίας του οργανισμού από την εισβολή ξένου DNA, συνήθως ιού (W Arber and Linn 1969), (Krüger and Bickle 1983). Μέσα στο βακτήριο, τα περιοριστικά ένζυμα κόβουν επιλεκτικά το ξένο DNA, ενώ το DNA τους προστατεύεται από ένα τροποποιητικό ένζυμο, που ονομάζεται μεθυλοτρανσφεράση, που τροποποιεί το προκαρυωτικό DNA και εμποδίζει την πέψη του.

Τα περιοριστικά ένζυμα αναγνωρίζουν μία ειδική αλληλουχία νουκλεοτιδίων και προκαλούν τομή στη διπλή έλικα του DNA. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης μπορούν επίσης να ταξινομηθούν ανάλογα με τον αριθμό των νουκλεοτιδίων στη θέση αναγνώρισης, που συνήθως είναι 4-8 νουκλεοτίδια. Ο αριθμός των νουκλεοτιδίων στην αλληλουχία αναγνώρισης καθορίζει το πόσο συχνά αυτή η αλληλουχία θα εμφανίζεται στο υπό μελέτη γονιδίωμα, για παράδειγμα μία αλληλουχία 4 νουκλεοτιδίων θα μπορούσε θεωρητικά να συναντάται κάθε $4^4 = 256$ ζεύγη βάσεων (bp), 6 νουκλεοτίδια ανά $4^6 = 4,096$ bp, and 8 νουκλεοτίδια ανά $4^8 = 65,536$ bp.

3.6.1) ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ FCGR3A

Προκειμένου να διακρίνουμε τον πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου στο γονίδιο FCGR3A, χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο NlaIII (New England Biolabs-NEB), για τον γενετικό τόπο 158 όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει την αλληλουχία

5'... CATG^v ...3'

3'...[^]GTAC ...5'

Πραγματοποιήθηκε πέψη λοιπόν των προϊόντων που προέκυψαν από τη nested PCR στο τμήμα DNA που ενισχύθηκε, μεγέθους 94bp. Στο αλληλόμορφο γονίδιο FCGR3A που φέρει βαλίνη (V) υπάρχει θέση αναγνώρισης του ενζύμου NlaIII, οπότε έπειτα από πέψη προκύπτουν δύο τμήματα μεγέθους 61bp και 33bp. Το αλληλόμορφο γονίδιο FCGR3A που φέρει φαινυλαλανίνη (F) δεν έχει θέση αναγνώρισης για το ένζυμο. Έτσι δεν είναι δυνατόν να γίνει πέψη, οπότε στην ηλεκτροφόρηση αναμένεται να παρατηρηθεί μία ζώνη μεγέθους 94bp, όσο δηλαδή το προϊόν της PCR.

Το υπόστρωμα DNA που χρησιμοποιήθηκε για την πέψη με το ένζυμο NlaIII, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της NEB ήταν ποσοτικά 1 μg από το προϊόν της nested PCR για το γονίδιο FCGR3A, χρησιμοποιώντας αντίστοιχα 10 units περιοριστικού ενζύμου.

Το πρωτόκολλο και οι συνθήκες της αντίδρασης πέψης με το ένζυμο NlaIII, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5):

Πίνακας 5: Πρωτόκολλο και οι συνθήκες της αντίδρασης πέψης με το ένζυμο NlaIII

Πρωτόκολλο		Συνθήκες Αντίδρασης
10 units ένζυμο	1μl	- Επώαση με το ένζυμο overnight στους 37° C - Απενεργοποίηση ενζύμου στους 60° C για 20 λεπτά
5x cutsmart buffer	5μl	
DNA υπόστρωμα	1μg	
H ₂ O(Dnase/Rnase free)	Μέχρι V=50μl	
Σύνολο	V=50μl	

Στη συνέχεια τα προϊόντα της πέψης υπέστησαν ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, ώστε να διακρίνουμε το πρότυπο ζώνωσης για κάθε δείγμα.

3.6.2) ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ FCGR2A

Προκειμένου να διακρίνουμε τον πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου στο γονίδιο FCGR2A, χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο BstUI (New England Biolabs-NEB), για τον γενετικό τόπο 131 όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει την αλληλουχία

5'... CG^ΥCG ...3'

3'...GC^ΛGC ...5'

Πραγματοποιήθηκε πέψη λοιπόν των προϊόντων που προέκυψαν από την PCR στο τμήμα DNA που ενισχύθηκε, μεγέθους 337bp. Στο αλληλόμορφο γονίδιο FCGR2A που φέρει αργινίνη (R) υπάρχει θέση αναγνώρισης του ενζύμου BstUI, οπότε έπειτα από πέψη προκύπτουν δύο τμήματα μεγέθους 316bp και 21bp. Το αλληλόμορφο γονίδιο FCGR2A που φέρει ιστιδίνη (H) δεν έχει θέση αναγνώρισης για το ένζυμο. Έτσι δεν είναι δυνατόν να γίνει πέψη, οπότε στην ηλεκτροφόρηση αναμένεται να παρατηρηθεί μία ζώνη μεγέθους 337bp, όσο δηλαδή το προϊόν της PCR.

Το υπόστρωμα DNA που χρησιμοποιήθηκε για την πέψη με το ένζυμο BstUI, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της NEB ήταν ποσοτικά 1 μg από το προϊόν της PCR για το γονίδιο FCGR2A, χρησιμοποιώντας αντίστοιχα 10 units περιοριστικού ενζύμου.

Το πρωτόκολλο και οι συνθήκες της αντίδρασης πέψης με το ένζυμο BstUI, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6):

Πίνακας 6: Πρωτόκολλο και οι συνθήκες της αντίδρασης πέψης με το ένζυμο BstUI

Πρωτόκολλο		Συνθήκες Αντίδρασης
10 units ένζυμο	1μl	Επώαση με το ένζυμο overnight στους 60° C
5x cutsmart buffer	5μl	
DNA υπόστρωμα	1μg	
H ₂ O(Dnase/Rnase free)	Μέχρι V=50μl	
Σύνολο	V=50μl	

Στη συνέχεια τα προϊόντα της πέψης υπέστησαν ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, ώστε να διακρίνουμε το πρότυπο ζώνωσης για κάθε δείγμα.

3.7) ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR), ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Τα απαιτούμενα υλικά και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης μεθόδου, προκειμένου να ελέγξουμε εάν τα προϊόντα των PCR που πραγματοποιήσαμε, πριν πραγματοποιηθεί η πέψη αυτών με περιοριστικά ένζυμα, ήταν τα ακόλουθα:

- Αγαρόζη (Invitrogen)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (1X) που περιέχει:
 - ✓ 0,089M Tris (Applichem),
 - ✓ 0,089M βορικό οξύ (Merck),
 - ✓ 0,002M EDTA (Applichem).
- Βρωμιούχο αιθίδιο - ethidium bromide (EtBr)
- DNA loading dye solution 6X (διάλυμα χρώσης του DNA)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης έχουμε τη δυνατότητα διαχωρισμού τμημάτων DNA που το μέγεθός τους κυμαίνεται περίπου από 75 ζεύγη βάσεων έως 30.000 ζεύγη βάσεων (Sambrook and Russell 2001, Brody and Kern 2004). Για να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, ακολουθείται η παρακάτω πειραματική διαδικασία:

Σε κωνική φιάλη προσθέτουμε τα κατάλληλα g σκόνης αγαρόζης και τα ανάλογα ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X, ώστε να παραχθεί πήκτωμα αγαρόζης 1,5% - 2% w/v. (Για παράδειγμα, για την παραγωγή 2% w/v πηκτώματος αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν 1gr σκόνης αγαρόζης και 50ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X). Το επόμενο βήμα είναι να θερμάνουμε με συνεχή ανάδευση έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη. Ακολουθεί η προσεκτική προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου με τελική συγκέντρωση 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Γίνεται η συναρμολόγηση της συσκευής, στην οποία θα πήξει η αγαρόζη και τοποθετείται “χτένα”, η οποία δημιουργεί θέσεις φόρτωσης του δείγματος όταν ολοκληρωθεί η πήξη. Έπειτα, χύνουμε το διάλυμα της αγαρόζης στην συσκευή που φέρει τη “χτένα” και όταν πήξει η αγαρόζη, αφαιρούμε με προσοχή τη “χτένα” δημιουργώντας τις θέσεις φόρτωσης του δείγματος. Μετά, εισάγουμε το πήκτωμα αγαρόζης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X.

Τέλος, προσθέτουμε κατάλληλο όγκο διαλύματος χρώσης (DNA loading dye solution 6X) στα δείγματα που θα φορτώσουμε στο πήκτωμα. Εκτός από τη φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα, απαραίτητη είναι και η φόρτωση του κατάλληλου ladder. Η ηλεκτροφόρηση ξεκινά έχοντας ρυθμίσει στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, τα κατάλληλα Volt (συνήθως 80 - 120V) και

το απαιτούμενο χρονικό διάστημα (συνήθως 35 - 120 λεπτά) που θα χρειαστούν για το διαχωρισμό. Κάθε πήκτωμα φωτογραφήθηκε μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας, εκμεταλλευόμενοι το φαινόμενο του φθορισμού, εξαιτίας της προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου κατά την κατασκευή του πηκτώματος αγαρόζης.

3.8) ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΠΕΨΗΣ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ, ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Τα απαιτούμενα υλικά και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης μεθόδου ήταν τα ακόλουθα:

- Πολυακρυλαμίδα (Invitrogen)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (1X) που περιέχει:
 - ✓ 0,089M Tris (Applichem),
 - ✓ 0,089M βορικό οξύ (Merck),
 - ✓ 0,002M EDTA (Applichem).
- Βρωμιούχο αιθίδιο - ethidium bromide (EtBr)
- DNA loading dye solution 6X (διάλυμα χρώσης του DNA)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης έχουμε τη δυνατότητα διαχωρισμού τμημάτων DNA που το μέγεθός τους κυμαίνεται περίπου από 10 ζεύγη βάσεων έως 3000 ζεύγη βάσεων. Το DNA είναι ένα μόριο φορτισμένο αρνητικά, ως εκ τούτου όταν βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο κινείται προς τη θετικά φορτισμένη άνοδο (Lee, Costumbrado et al. 2012). Η απόσταση που διανύουν τα μόρια DNA μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους (Helling, Goodman et al. 1974). Ο ρυθμός της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας των μορίων του DNA μέσω του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης καθορίζεται από: α) το μέγεθος του DNA, β) τη συγκέντρωση της πολυακρυλαμίδης, γ) τη στερεοδιάταξη του DNA, δ) την ένταση του ρεύματος, ε) την παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου, στ) τον τύπο της πολυακρυλαμίδης και ζ) το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (Sigmon and Larcom 1996, Lee, Costumbrado et al. 2012).

Παρασκευάζεται το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12% με βάσει το πρωτόκολλο του παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7):

Πίνακας 7: Πρωτόκολλο παρασκευής πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 12%

Πολυακρυλαμίδα	TBE 10X	H ₂ O	APS	TEMED
4,8 ml	1,2 ml	6 ml	200 μl	10μl

Γίνεται η συναρμολόγηση της συσκευής, στην οποία θα πήξει η αγαρόζη και τοποθετείται “χτένα”, η οποία δημιουργεί θέσεις φόρτωσης του δείγματος όταν ολοκληρωθεί η πήξη. Έπειτα, χύνουμε το διάλυμα της πολυακρυλαμίδης στην συσκευή που φέρει τη “χτένα” και όταν πήξει η πολυακρυλαμίδα, αφαιρούμε με προσοχή τη “χτένα” δημιουργώντας τις θέσεις φόρτωσης του δείγματος. Μετά, εισάγουμε το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X.

Τέλος, προσθέτουμε κατάλληλο όγκο διαλύματος χρώσης (DNA loading dye solution 6X) στα δείγματα που θα φορτώσουμε στο πήκτωμα. Εκτός από τη φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα, απαραίτητη είναι και η φόρτωση του κατάλληλου ladder. Η ηλεκτροφόρηση ξεκινά έχοντας ρυθμίσει στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, τα κατάλληλα Volt (συνήθως 90-95V) και το απαιτούμενο χρονικό διάστημα (συνήθως 120 λεπτά) που θα χρειαστούν για το διαχωρισμό.

Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση ακολουθεί χρώση του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με βρωμιούχο αιθίδιο με τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml, για περίπου 20 λεπτά. Ακολουθούν 2 ξεπλύματα χρονικής διάρκειας 20 λεπτών με H₂O και τελικά κάθε πήκτωμα φωτογραφήθηκε μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας, εκμεταλλευόμενοι το φαινόμενο του φθορισμού, εξαιτίας της προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου.

3.8) ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK293T

3.8.1) CELL BASED ASSAY ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ MOG ΚΑΙ AQP4 ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Προκειμένου να διαπιστώσουμε την ύπαρξη αυτοαντισωμάτων έναντι της MOG πρωτεΐνης και της ακουαπορίνης-4, σε δείγματα ορού ασθενών με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο και αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός σε κύτταρα HEK293T. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε ορούς 40 ασθενών με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, που εμφάνιζαν νευρολογικά συμπτώματα και σε 8 ορούς ασθενών με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, με cell based assay τόσο εμπορικά όσο και βάσει πρωτοκόλλου που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο.

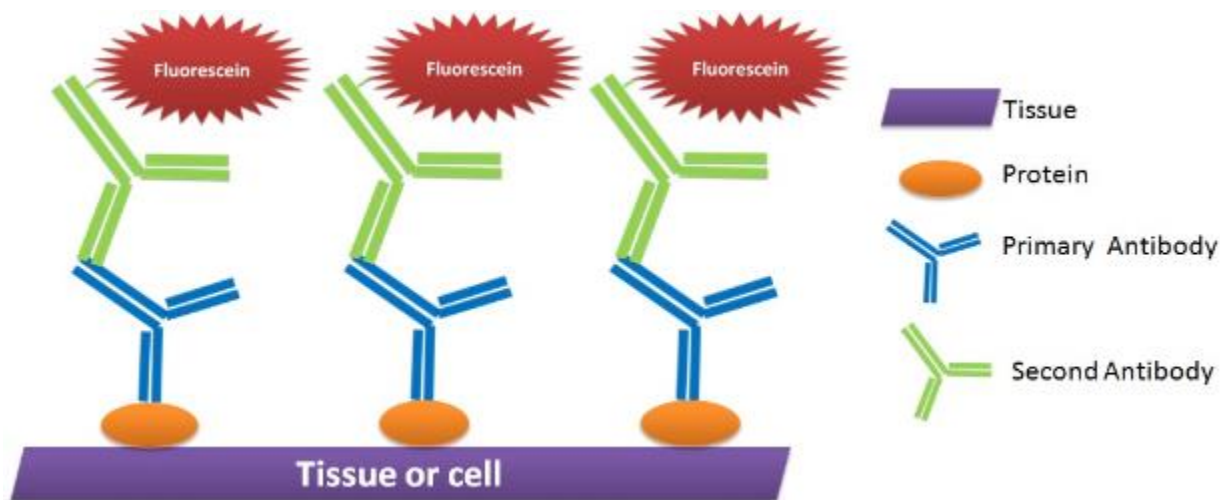
Για την διαμόλυνση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το kit διαμόλυνσης κυττάρων της Clontech). Κατά κανόνα, 5μg πλασμιδίου αραιώθηκαν σε Xfect ρυθμιστικό διάλυμα, σε τελικό όγκο 100 μl. Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε, έχοντας ενσωματωμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί την MOG πρωτεΐνη, ήταν ένας pcDNA 3,2-Venus κλώνος, EGFP tagged. Ως αρνητικό

δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HEK 293T, που διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο, που εκφράζει μόνο EGFP. Έπειτα από καλή ανάδευση, προσθέσαμε 0,3 μl Xfect πολυμερές για κάθε μg πλασμιδίου. Τα δείγματα επωάστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να σχηματιστούν τα νανοσωματίδια. Τέλος, προσθέσαμε το διάλυμα στάγδην σε κύτταρα HEK293T που είχαν στρωθεί σε πηγάδι πιάτου 6-well την προηγούμενη ημέρα (σε θρεπτικό υλικό DMEM υψηλής γλυκόζης με 1% γλουταμίνη, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 10% fetal bovine serum). Την επόμενη ημέρα συλλέχθηκαν τα διαμολυσμένα κύτταρα και στρώθηκαν σε στρογγυλές καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm επιστρωμένες με poly-L-lysine στο ίδιο θρεπτικό υλικό σε 24-well πιάτο. Την μεθεπόμενη ημέρα τα διαμολυσμένα κύτταρα είναι έτοιμα για τον ανοσοφθορισμό.

Ο ανοσοφθορισμός είναι η μέθοδος, κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα, για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα.

Αρχή Μεθόδου

Τα κύτταρα HEK293T, έπειτα από διαμόλυνση με το πλασμίδιο, που έχει ενσωματωμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί την MOG πρωτεΐνη, εκφράζουν την πρωτεΐνη MOG στην επιφάνειά τους. Εάν γίνει επώαση με ορό ασθενούς που έχει αυτοαντισώματα έναντι της MOG, τα αυτοαντισώματα (πρωτογενή), θα αναγνωρίσουν την πρωτεΐνη που θα εκφράζεται στα κύτταρα και θα προσδεθούν σε αυτή. Στη συνέχεια, γίνεται επώαση με δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με φθορίζουσα ουσία, που αναγνωρίζει ανθρώπινο αντίσωμα πρωτογενές και ακολουθεί μικροσκόπηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Στην περίπτωση που δεν υπάρχει πρωτογενές αντίσωμα στον ορό του ασθενούς, το δευτερογενές δε φθορίζει.



Εικόνα 12: Απεικόνιση του πρωτοκόλλου έμμεσου ανοσοφθορισμού (Sino Biological Protocols)

Το πρωτόκολλο του εργαστηρίου που ακολουθήθηκε για την ανίχνευση των MOG αυτοαντισωμάτων είναι το εξής:

Τα κύτταρα έπειτα από 3 πλυσίματα με ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X επώαστηκαν με ορούς ασθενών (με αραιώση 1/25). Οι οροί αραιώθηκαν με 1% BSA 1XPBS και η επώαση έγινε για μιάμιση ώρα. Αμέσως μετά την επώαση αυτή ακολούθησαν 3 πλυσίματα με PBS 1X, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια των αντισωμάτων και οποιαδήποτε άλλη ουσία, μη ειδική, περιέχεται στον ορό του ασθενούς. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων για 10 λεπτά με παραφορμαλδεΰδη (4% PFA), 3 ξεπλύματα με PBS 1X για απομάκρυνση της περίσσειας PFA, 10 λεπτά επώαση με TRITON-X 0,1% (απορρυπαντικό που χρησιμοποιείται για τη διάνοιξη τρυπών στην κυτταρική μεμβράνη, ώστε να διευκολυνθεί η ανίχνευση με το δευτερογενές αντίσωμα), 3 ξεπλύματα με PBS 1X, για να απομακρυνθεί η περίσσεια του απορρυπαντικού και επώαση για 1 ώρα με 10% Normal Goat Serum (NGS). Αμέσως μετά τα κύτταρα επώαστηκαν με δευτερογενές αντίσωμα Alexa Fluor 568 αντι-human σε αραιώση (1/750) για μιάμιση ώρα. Τέλος, έπειτα από ξεπλύματα με PBS 1X, τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss.

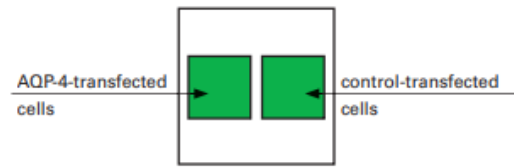
Στην περίπτωση που η διαμόλυνση έχει γίνει με το πλασμίδιο που εκφράζει την EGFP πρωτεΐνη, που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό δείγμα ελέγχου, τα κύτταρα δεν εκφράζουν τη MOG πρωτεΐνη στην επιφάνειά τους, οπότε το πρωτογενές αντίσωμα (στον ορό του ασθενούς), δε θα προσδεθεί σε αντιγόνο-στόχο, με αποτέλεσμα το δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα να μην προσδεθεί στο πρωτογενές. Έτσι δε θα παρατηρηθεί φθορισμός στη συγκεκριμένη περίπτωση.

Τα δύο πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τη MOG και την EGFP, φθορίζουν στο πράσινο, ενώ το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε φθορίζει στο κόκκινο.

3.8.2) CELL BASED ASSAY (EUROIMMUN) ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ AQP-4

Η αρχή μεθόδου του ανοσοφθορισμού είναι ακριβώς ίδια με αυτή που αναφέρθηκε παραπάνω.

Στην περίπτωση αυτή, κύτταρα HEK293T, ήδη διαμολυσμένα με το πλασμίδιο που εκφράζει την AQP-4, επωάζονται με τον ορό του ασθενούς. Η αραιώση του ορού είναι 1:10, σε διάλυμα PBS Tween, για 30 λεπτά. Εάν υπάρχουν αντισώματα στον ορό έναντι της AQP-4, θα αναγνωρίσουν το αντιγόνο-στόχο. Στη συνέχεια, ακολουθούν 3 ξεπλύματα με PBS Tween για να απομακρυνθεί η περίσσεια των αντισωμάτων και οποιαδήποτε άλλη ουσία περιέχεται στον ορό του ασθενούς. Ακολουθεί επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα που αναγνωρίζει ανθρώπινα αντισώματα, και είναι σημασμένο με τη φθορίζουσα ουσία FITC, για 30 λεπτά. Οι επώσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου. Η φθορίζουσα ουσία FITC, όταν διεγείρεται φθορίζει δίνοντας πράσινο χρώμα. Το ίδιο ακριβώς πρωτόκολλο ακολουθείται για επώαση των ορών των ασθενών σε κύτταρα μη διαμολυσμένα, που χρησιμοποιούνται ως αρνητικό δείγμα ελέγχου. Σε αυτή την περίπτωση, εφόσον τα κύτταρα HEK293T, δεν εκφράζουν το αντιγόνο AQP-4, έναντι του οποίου ανιχνεύονται τα αντισώματα στον ορό του ασθενούς, δε θα παρατηρηθεί φθορισμός.



Εικόνα 13: Πλακάκι της Euroimmun. Σε κάθε μία από τις 10 θέσεις, υπάρχουν δύο επιμέρους πεδία. Στο ένα υπάρχουν HEK293 κύτταρα που είναι επιμολυσμένα με την AQP-4, ενώ στο άλλο υπάρχουν κύτταρα που δεν είναι διαμολυσμένα και χρησιμοποιούνται ως αρνητικό δείγμα ελέγχου. (Euroimmun Protocols).

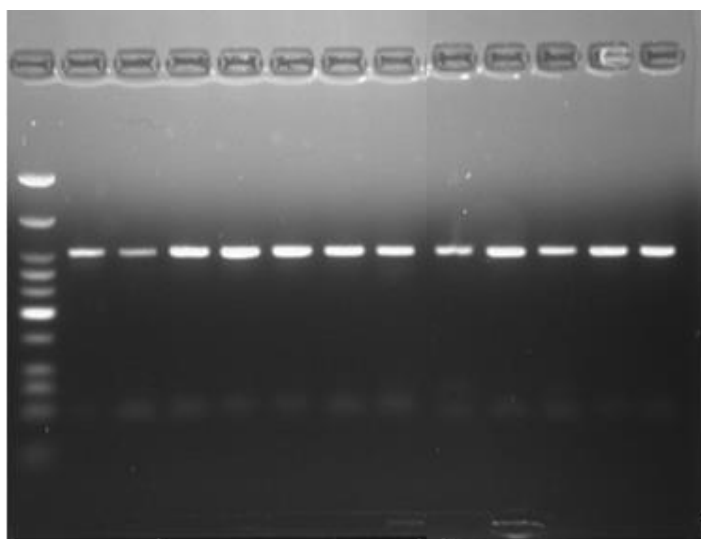
4)ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1)ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ

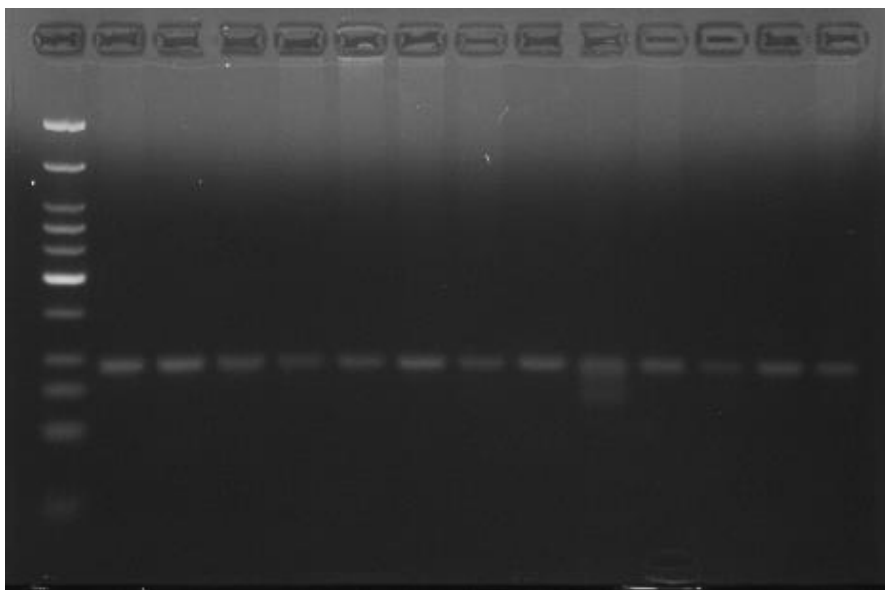
4.1.1)ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR), ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι τα προϊόντα της PCR που αφορούσαν τα γονίδια FCGR2A και FCGR3A ήταν τα αναμενόμενα, όσον αφορά στο μέγεθος και την καθαρότητά τους αμέσως μετά την PCR πραγματοποιήσαμε ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη για να ανιχνεύσουμε τα προϊόντα. Το επιθυμητό προϊόν για το γονίδιο FCGR2A ήταν μεγέθους 337 ζευγών βάσεων (base pairs=bp), ενώ αυτό για το γονίδιο FCGR3A ήταν μεγέθους 94 bp. Η ανίχνευση του επιθυμητού προϊόντος ήταν ζωτικής σημασίας για να συνεχιστεί η πειραματική διαδικασία και η πέψη των προϊόντων με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που έχει αναφερθεί παραπάνω για το κάθε προϊόν.

Η ταυτοποίηση του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη 2% για όλα τα δείγματα ασθενών και υγιών και πράγματι όσον αφορά την PCR για το γονίδιο FCGR2A υπήρχε η επιθυμητή ζώνη μεγέθους 337 bp (βλέπε Εικόνα 12). Αντίστοιχα, η ταυτοποίηση του προϊόντος για το γονίδιο FCGR3A πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη 3% για όλα τα δείγματα ασθενών και υγιών και σε όλα τα δείγματα υπήρχε η επιθυμητή ζώνη μεγέθους 94bp (βλέπε Εικόνα 13). Ο ladder που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση ήταν ο Low Molecular Weight DNA Ladder (προϊόν της εταιρείας NEB), με εύρος 25-766 ζεύγη βάσεων (bp).



Εικόνα 12: Ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη 2% των προϊόντων της PCR για το FCGR2A. Η εικονιζόμενη ζώνη είναι μεγέθους 337bp, το αναμενόμενο προϊόν. Η παρούσα εικόνα αποτελεί ενδεικτική φωτογραφία των δειγμάτων.



Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη 3% των προϊόντων της PCR για το FCGR3A. Η εικονιζόμενη ζώνη είναι μεγέθους 94bp, το αναμενόμενο προϊόν. Η παρούσα εικόνα αποτελεί ενδεικτική φωτογραφία των δειγμάτων.

4.1.2) ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΕΨΗΣ, ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

Οι ασθενείς με SPS που εξετάστηκαν ως προς τους πολυμορφισμούς για τα γονίδια FCGR2A και FCGR3A παρουσίασαν τόσο ομοζυγωτία για τον πολυμορφισμό όσο και ετεροζυγωτία.

Για τον FCGR3A

Όσον αφορά στους ασθενείς με SPS για τον πολυμορφισμό στο γονίδιο FCGR3A από το σύνολο των 31 που εξετάστηκαν, ποσοστό της τάξεως του 29% παρουσίασε γονότυπο F/F, το 25,8% παρουσίασε γονότυπο F/V ενώ το 45,2% γονότυπο V/V.

Οι 22 από τους 31 ασθενείς με SPS με βάση προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου (Dalakas, Rakocovic et al. 2017) συμμετείχαν σε μία κλινική δοκιμή για απόκριση στο rituximab. Ορισμένοι από αυτούς έλαβαν το φάρμακο και άλλοι placebo, προκειμένου να μελετηθεί εάν υπάρχει σημαντική βελτίωση θεραπευτικά όσον αφορά στο φάρμακο. Οι υπόλοιποι 9 εξετάστηκαν ως προς την ύπαρξη ή όχι του πολυμορφισμού ως ομάδα ελέγχου για το νόσημα SPS.

Από τους 22 ασθενείς οι 11 έλαβαν το φάρμακο, εκ των οποίων μόνο οι 4 ανταποκρίθηκαν με επιτυχία στη θεραπεία, και οι υπόλοιποι 11 placebo. Επιθυμώντας να αξιολογήσουμε εάν οι πολυμορφισμοί για τους γενετικούς τόπους FCGR3A και FCGR2A σχετίζονται ως προς την απόκριση στο φάρμακο υπολογίσαμε τα ποσοστά των διαφόρων γονοτύπων σε αυτούς που έλαβαν το φάρμακο και σε αυτούς που έλαβαν placebo.

Από τους ασθενείς με SPS που έλαβαν placebo, το 27,2% ήταν ετερόζυγο με γονότυπο F/V, 36,4% ομόζυγο με V/V, ενώ το 36,4% παρουσίασε γονότυπο F/F.

Από τους ασθενείς της μελέτης που έλαβαν το φάρμακο το 63,6% παρουσίασε γονότυπο V/V, 18,2% F/V και 18,2% F/F.

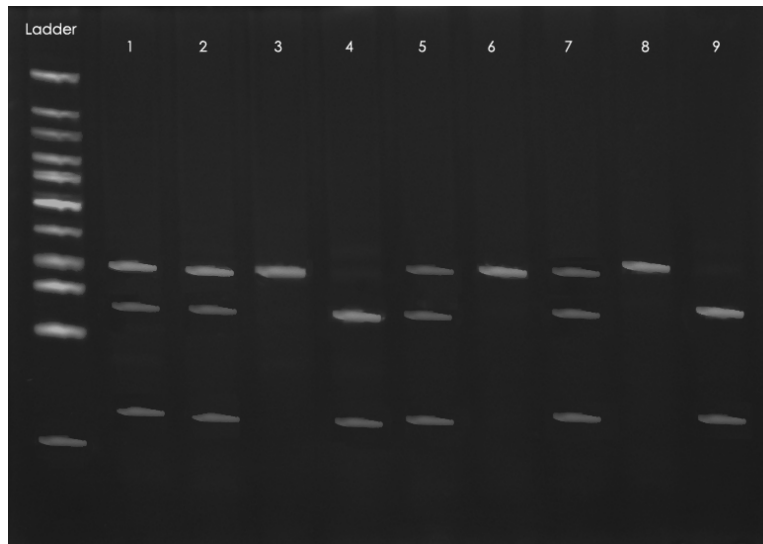
Όσον αφορά στους ασθενείς που έλαβαν το φάρμακο σύμφωνα με τη μελέτη που προηγήθηκε (Dalakas, Rakocenic et al. 2017) από τους 11 ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία οι 4, εκ των οποίων 2 είχαν γονότυπο V/V, 1 είχε F/V και 1 επίσης F/F.

Οι υγιείς που εξετάστηκαν για τους πολυμορφισμούς στην παρούσα μελέτη ήταν 13 εκ των οποίων 23% είχαν γονότυπο F/F, 54% ήταν ετερόζυγοι με γονότυπο F/V και το 23% παρουσίασε γονότυπο V/V. Συνοπτικά τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

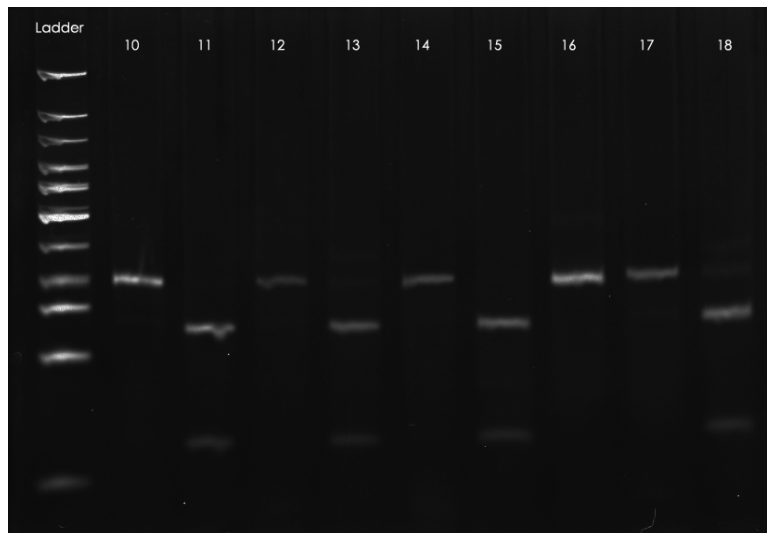
Απόκριση στο φάρμακο Σύνολο: 4 στους 11			Μη απόκριση στο φάρμακο Σύνολο: 7 στους 11			Placebo Σύνολο: 11			Ομάδα ελέγχου νοσήματος Σύνολο: 9			Υγιείς Σύνολο:13		
F/V	F/F	V/V	F/V	F/F	V/V	F/V	F/F	V/V	F/V	F/F	V/V	F/V	F/F	V/V
1	1	2	1	1	5	3	4	4	3	3	3	7	3	3

Πίνακας 8: Παρουσίαση γονοτύπων ασθενών και υγιών για τον πολυμορφισμό που αφορά τον FCGR3A

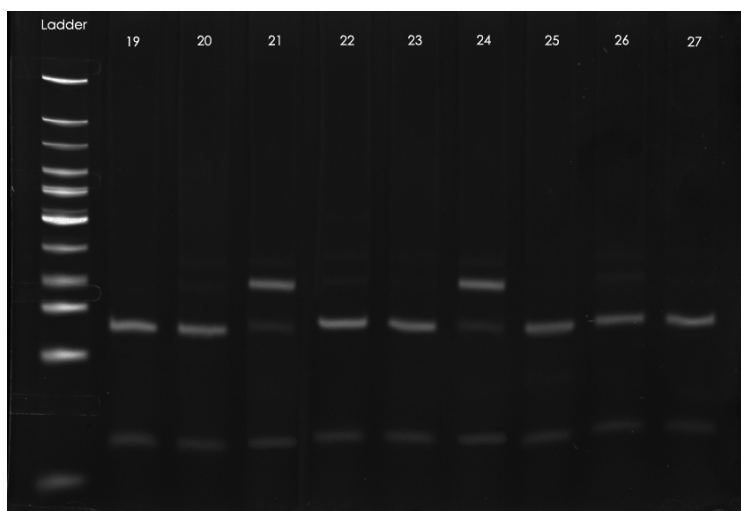
Λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι ομοζυγώτες FcγRIIIa-V158/V158 έχουν μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης με την IgG, ενώ οι ομοζυγώτες FcγRIIIa-F158/F158 δεν συνδέονται επαρκώς με την IgG, θα αναμενόταν όλοι οι ασθενείς με ομοζυγωτία V/V να είχαν ανταπόκριση στη θεραπεία. Παρόλα αυτά μόνο 2 στους 6 με γονότυπο V/V παρουσίασαν απόκριση στη θεραπεία, γεγονός που δεν υποδηλώνει ενδεχομένως κάποια συσχέτιση του πολυμορφισμού για το γενετικό τόπο FCGR3A και την απόκριση στη θεραπεία στο συγκεκριμένο νόσημα που μελετήσαμε.



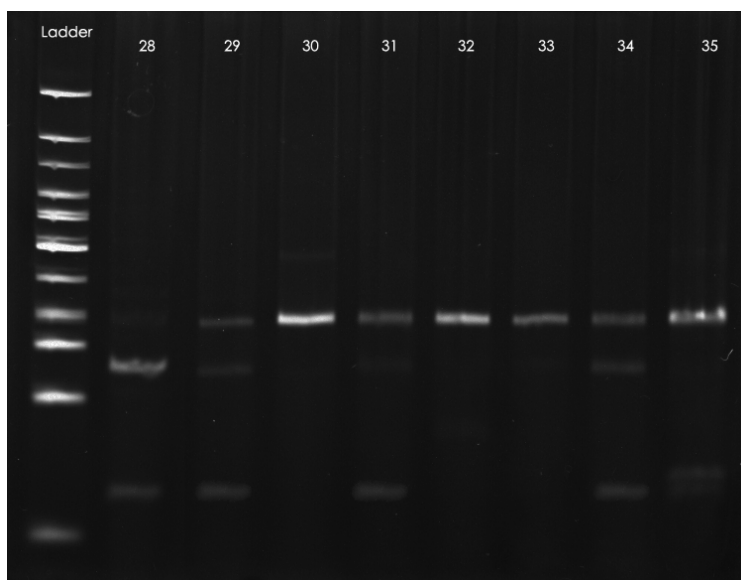
Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης 12%. Οι ασθενείς 1,2,5,7 είναι ετερόζυγοι με γονότυπο F/V, αφού διαθέτουν τρεις ζώνες με μεγέθη 94bp,61bp και 33bp. Οι ασθενείς 3,6 και 8 είναι ομόζυγοι με γονότυπο F/F, με ζώνη μεγέθους 94bp. Οι ασθενείς 4 και 9 είναι ομόζυγοι με γονότυπο V/V, αφού διαθέτουν ζώνες μεγέθους 61bp και 33bp.



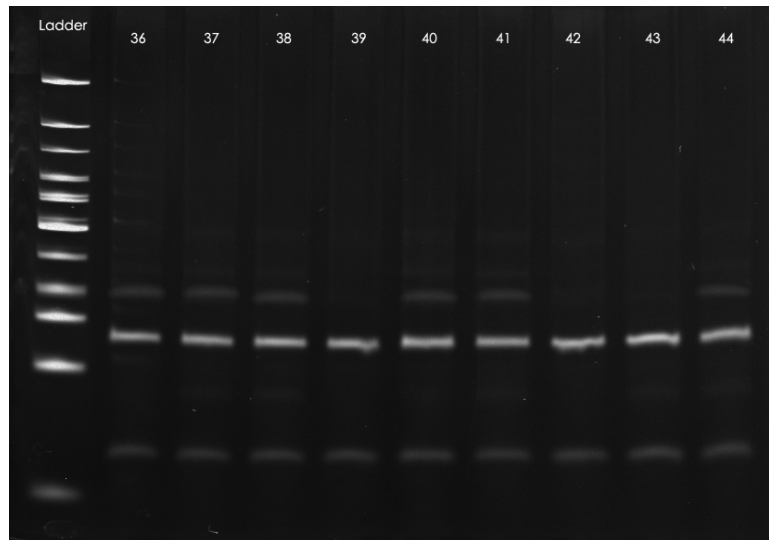
Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης 12%. Οι ασθενείς 10,12 14,16 και 17 είναι ομόζυγοι με γονότυπο F/F, με ζώνη μεγέθους 94bp. Οι ασθενείς 11,13,15 και 18 είναι ομόζυγοι με γονότυπο V/V, αφού διαθέτουν ζώνες μεγέθους 61bp και 33bp.



Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης 12%. Οι ασθενείς 21 και 24 είναι ετερόζυγοι με γονότυπο F/V, με τρεις ζώνες μεγέθους 94bp, 61 bp και 33bp. Οι ασθενείς 19, 20, 22, 23, 25-27 είναι ομόζυγοι με γονότυπο V/V, αφού διαθέτουν δύο ζώνες μεγέθους 61bp και 33bp.



Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης 12%. Οι ασθενείς 29, 31 και ο υγιής 34 είναι ετερόζυγοι με γονότυπο F/V, αφού διαθέτουν τρεις ζώνες με μεγέθη 94bp, 61bp και 33bp. Ο ασθενής 30 και οι υγιείς 32, 33, 35 είναι ομόζυγοι με γονότυπο F/F, με ζώνη μεγέθους 94bp. Ο ασθενής 28 είναι ομόζυγος με γονότυπο V/V, αφού διαθέτει ζώνες μεγέθους 61bp και 33bp.



Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης 12%. Οι υγιείς 36,37,38,40,41,44 είναι ετερόζυγοι με γονότυπο F/V, αφού διαθέτουν τρεις ζώνες με μεγέθη 94bp,61bp και 33bp. Οι υγιείς 39,42,43 είναι ομόζυγοι με γονότυπο V/V, αφού διαθέτουν ζώνες μεγέθους 61bp και 33bp.

Πίνακας 10: Ασθενείς που αποκρίθηκαν ή όχι, που έλαβαν Placebo και ανήκουν στην ομάδα ελέγχου του νοσήματος, Υγιείς (Πολυμορφισμός για FCGR3A)

Ασθενείς				Υγιείς
Απόκριση	Μη απόκριση	Placebo	Ομάδα Ελέγχου	32-44
2,8,11,19	5,9,10,13,22,27,28	1,4,6,12,14,17,18,21,25,26,29	3,7,15,16,20,23,24,30,31	

Για τον FCGR2A

Όσον αφορά στους ασθενείς με SPS για τον πολυμορφισμό στο γονίδιο FCGR2A από το σύνολο των 31 που εξετάστηκαν, ποσοστό της τάξεως του 25,8% παρουσίασε γονότυπο H/H, το 58% παρουσίασε γονότυπο H/R ενώ το 16,2% γονότυπο R/R.

Από τους 22 ασθενείς που συμμετείχαν στην προηγούμενη μελέτη (Dalakas, Rakocvic et al. 2017), οι 4 που αποκρίθηκαν είχαν γονότυπο H/R.

Όσον αφορά τους υγιείς 46,2% είχε γονότυπο H/H και το 53,8% παρουσίασε γονότυπο H/R. Ο γονότυπος R/R δε βρέθηκε στους υγιείς.

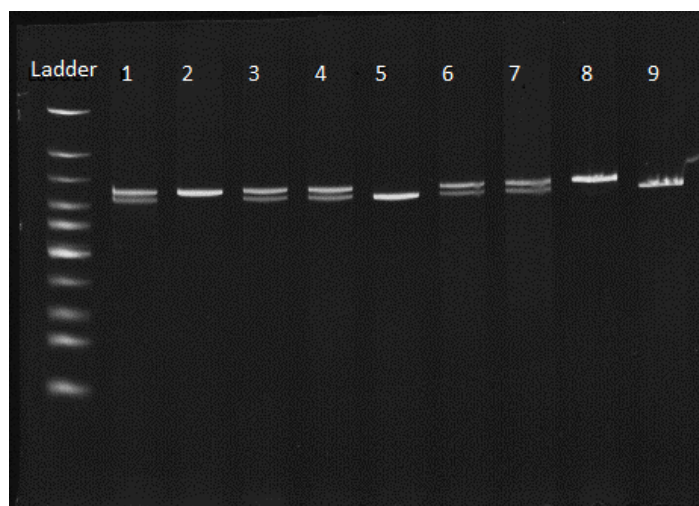
Από τους ασθενείς με SPS που έλαβαν placebo, το 54,5% ήταν ετερόζυγο με γονότυπο H/R, 18,2% ομόζυγο με H/H, ενώ το 27,3% παρουσίασε γονότυπο R/R.

Από τους ασθενείς της μελέτης που έλαβαν το φάρμακο το 18,2% παρουσίασε γονότυπο H/H, 81,8% H/R ενώ κανείς δεν παρουσίασε γονότυπο R/R. Τα αποτελέσματα φαίνονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα:

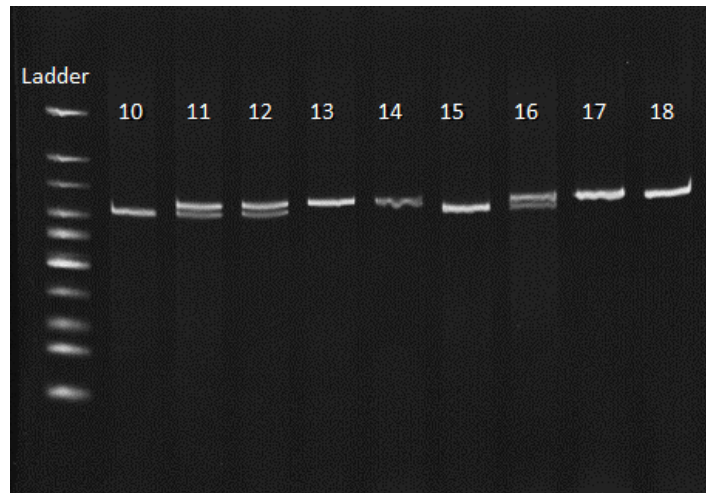
Απόκριση στο φάρμακο Σύνολο: 4 στους 11			Μη απόκριση στο φάρμακο Σύνολο: 7 στους 11			Placebo Σύνολο: 11			Ομάδα ελέγχου νοσήματος Σύνολο: 9			Υγιείς Σύνολο:13		
H/R	H/H	R/R	H/R	H/H	R/R	H/R	H/H	R/R	H/R	H/H	R/R	H/R	H/H	R/R
4	-	-	4	3	-	6	2	3	4	3	2	7	6	-

Πίνακας 9: Παρουσίαση γονοτύπων ασθενών και υγιών για τον πολυμορφισμό που αφορά τον FCGR2A. Όπου: H/R ετερόζυγοι, H/H ομόζυγοι και R/R ομόζυγοι για τον πολυμορφισμό στο FCGR2A.

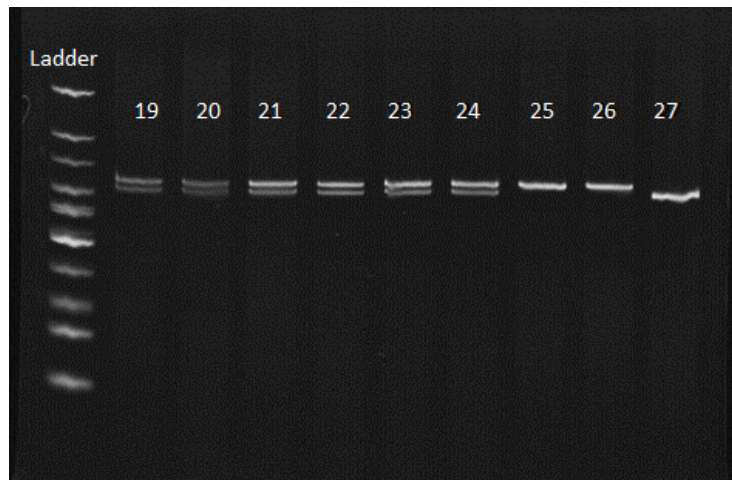
Ο FcγRIIIa ανευρίσκεται σε 2 αλληλικούς τύπους, είτε με χαμηλή (IIa-R131), είτε με υψηλή (IIa-H131) συγγένεια για τα συμπλέγματα IgG2 και IgG3. Έτσι λοιπόν παρατηρούμε ότι όλοι οι ασθενείς που πήραν το φάρμακο και ανταποκρίθηκαν περιείχαν στο γονότυπό τους το αλληλόμορφο H, εφόσον ήταν είτε ομόζυγοι H/H είτε ετερόζυγοι H/R.



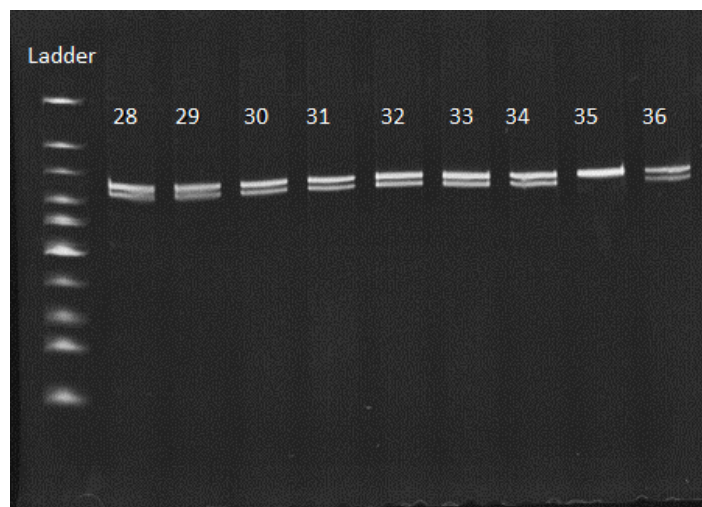
Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης 12%. Οι ασθενείς 1,3,4,6,7 είναι ετερόζυγοι με γονότυπο H/R, αφού διαθέτουν δύο ζώνες με μεγέθη 337bp και 316bp. Οι ασθενείς 2 και 8 είναι ομόζυγοι με γονότυπο H/H, με ζώνη μεγέθους 337bp. Ο ασθενής 9 είναι ομόζυγος με γονότυπο R/R, αφού διαθέτει ζώνη μεγέθους 316bp.



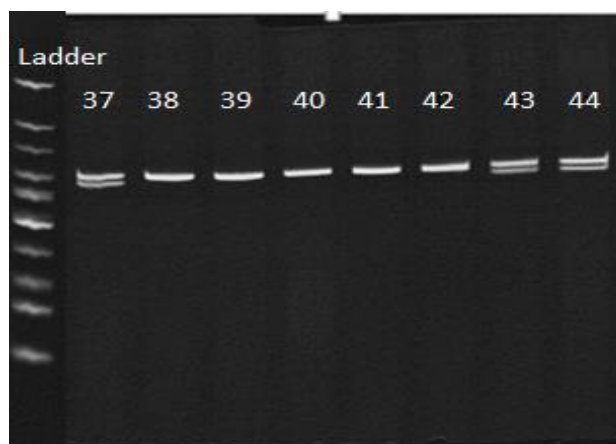
Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης 12%. Οι ασθενείς 11, 12,16 είναι ετερόζυγοι με γονότυπο H/R, αφού διαθέτουν δύο ζώνες με μεγέθη 337bp και 316bp. Οι ασθενείς 13,14,17 και 18 είναι ομόζυγοι με γονότυπο H/H, με ζώνη μεγέθους 337bp. Οι ασθενείς 10 και 15 είναι ομόζυγος με γονότυπο R/R, αφού διαθέτει ζώνη μεγέθους 316bp.



Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης 12%. Οι ασθενείς 19-24 είναι ετερόζυγοι με γονότυπο H/R, αφού διαθέτουν δύο ζώνες με μεγέθη 337bp και 316bp. Οι ασθενείς 25 και 26 είναι ομόζυγοι με γονότυπο H/H, με ζώνη μεγέθους 337bp. Ο ασθενής 27 είναι ομόζυγος με γονότυπο R/R, αφού διαθέτει ζώνη μεγέθους 316bp.



Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης 12%. Οι ασθενείς 28-31 και οι υγιείς 32-34, 36 είναι ετερόζυγοι με γονότυπο H/R, αφού διαθέτουν δύο ζώνες με μεγέθη 337bp και 316bp. Ο υγιής 35 είναι ομόζυγος με γονότυπο H/H, με ζώνη μεγέθους 337bp.



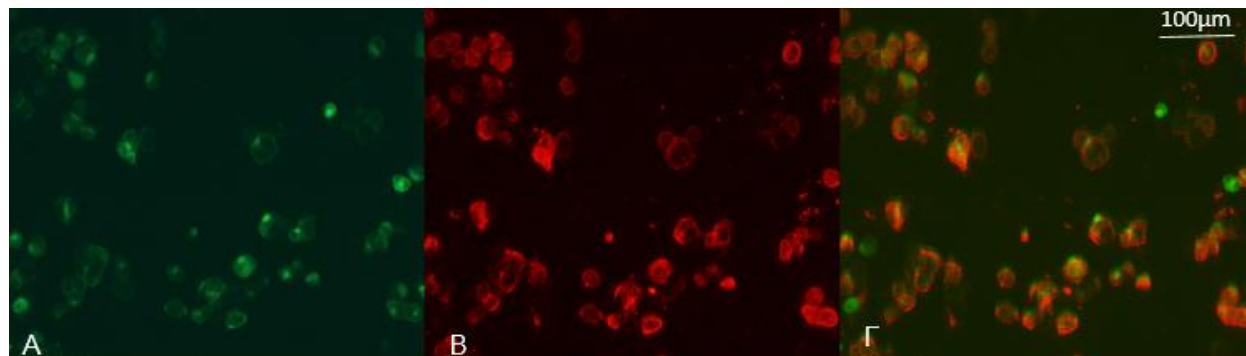
Εικόνα 23: Ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης 12%. Οι υγιείς 37, 43, 44 είναι ετερόζυγοι με γονότυπο H/R, αφού διαθέτουν δύο ζώνες με μεγέθη 337bp και 316bp. Οι υγιείς 38-42 είναι ομόζυγοι με γονότυπο H/H, με ζώνη μεγέθους 337bp.

Πίνακας 11: Ασθενείς που αποκρίθηκαν ή όχι, που έλαβαν Placebo και ανήκουν στην ομάδα ελέγχου του νοσήματος, Υγιείς (Πολυμορφισμός για το γονίδιο FCGR2A)

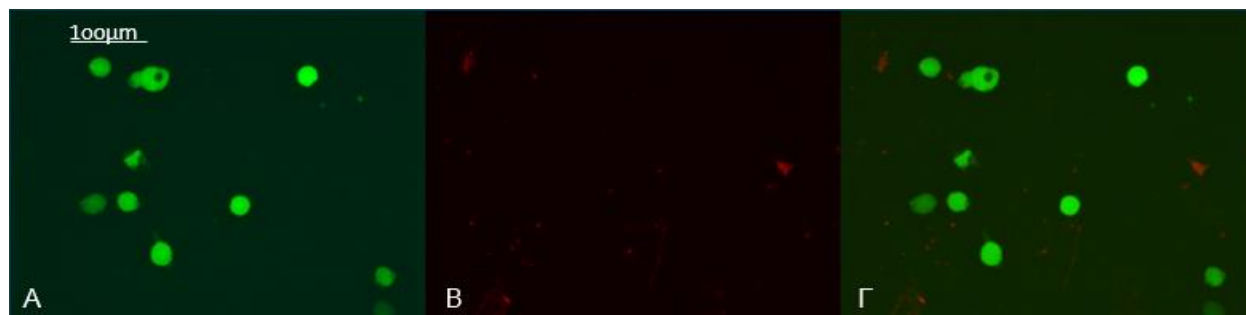
Ασθενείς				Υγιείς
Απόκριση	Μη απόκριση	Placebo	Ομάδα Ελέγχου	32-44
12, 16, 20, 30	7,13,14,19,21 23,26	3,4,8,10,11,15, 22,24,25,27,31	1,2,5,6,9,17,18,28,2 9	

4.2) ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ MOG ΚΑΙ ΑΚΟΥΑΠΟΡΙΝΗΣ 4 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK293 ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΡΟΥ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗ ΛΥΚΟ ΚΑΙ ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

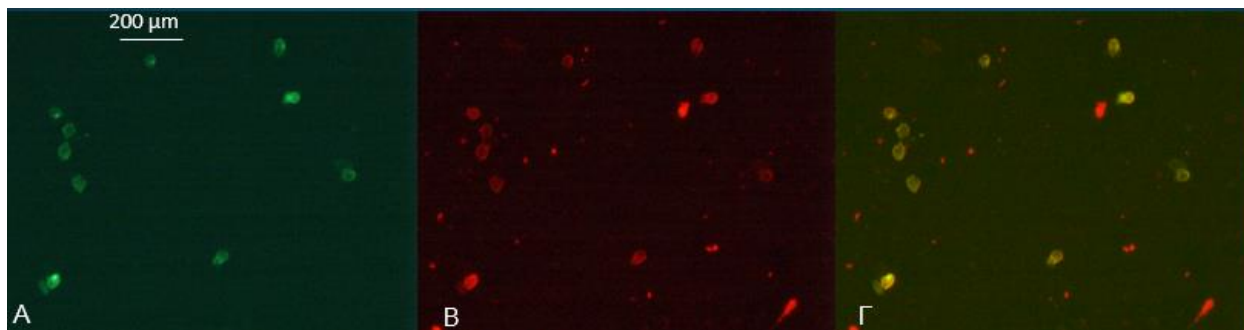
Κατά τον ανοσοφθορισμό κυττάρων HEK293T, έπειτα από επώαση με ορούς ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο για ανεύρεση αυτοαντισωμάτων έναντι της MOG πρωτεΐνης έγινε εντοπισμός αυτοαντισωμάτων σε έναν ορό ασθενούς, χωρίς αυτός να παρουσιάζει συμπτώματα απομυελίνωσης.



Εικόνα 24: MOG Θετικός Ορός Ασθενούς (positive control): A: Anti-MOG (πράσινο), B: Anti-human IgG (κόκκινο), Γ: Συνεντοπισμός



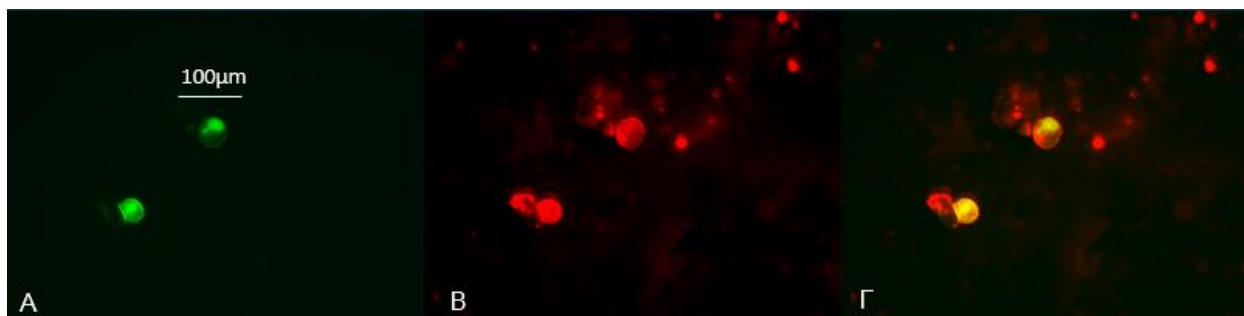
Εικόνα 25: EGFP διαμολυσμένα κύτταρα (negative control): A: EGFP έκφραση(πράσινο), B: Anti-human IgG (κόκκινο), Γ: Συνεντοπισμός



Εικόνα 25: MOG Θετικός Ορός Ασθενούς με ΣΕΛ: Α: Anti-MOG (πράσινο), Β: Anti-human IgG (κόκκινο), Γ: Συνεντοπισμός

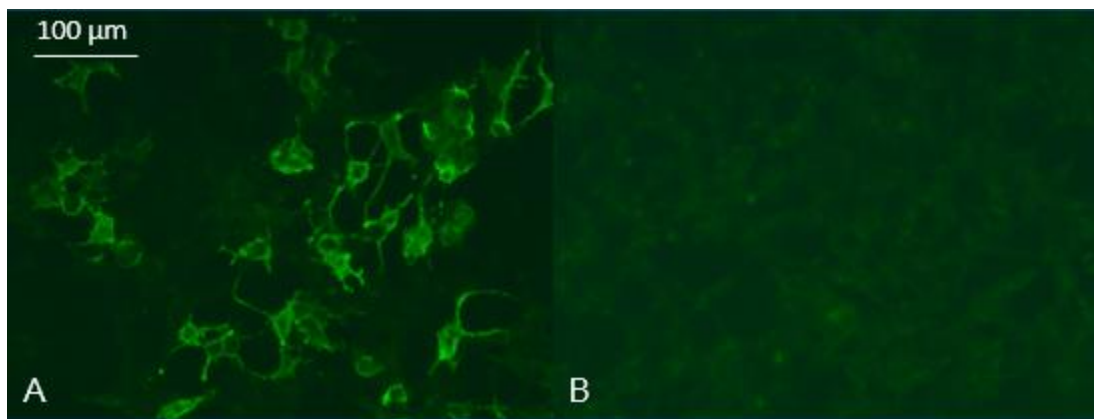
Α: Κύτταρα που εκφράζουν MOG-GFP, Β: επώαση ορού και οπτικοποίηση με ένα δευτεροταγές αντίσωμα που αναγνωρίζει ανθρώπινα αντισώματα, Γ: επικάλυψη των δύο εικόνων απεικονίζοντας την πρόσδεση των αντισωμάτων που βρίσκονται στον ορό στα κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη MOG

Όσον αφορά τους ορούς των ασθενών με αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο εντοπίστηκαν αυτοαντισώματα έναντι της MOG σε 2 από τους 8, ενώ αντισώματα έναντι της ακουαπορίνης 4 σε 1 από τους 8.



Εικόνα 26: MOG Θετικός Ορός Ασθενούς με APS: Α: Anti-MOG (πράσινο), Β: Anti-human IgG (κόκκινο), Γ: Συνεντοπισμός

Α: Κύτταρα που εκφράζουν MOG-GFP, Β: επώαση ορού και οπτικοποίηση με ένα δευτεροταγές αντίσωμα που αναγνωρίζει ανθρώπινα αντισώματα, Γ: επικάλυψη των δύο εικόνων απεικονίζοντας την πρόσδεση των αντισωμάτων που βρίσκονται στον ορό στα κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη MOG



Εικόνα 27: A: Ορός ασθενούς με αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο που είναι θετικός για αντισώματα έναντι της ακουαπορίνης-4, B: Ορός ασθενούς με αντιφωσfolιπιδικό που είναι αρνητικός για αντισώματα έναντι της ακουαπορίνης-4

5)ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1)ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΟ RITUXIMAB

Δύο από τους υποδοχείς, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι FcγRIIA και FcγRIIIA παρουσιάζουν μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς. Έχει βρεθεί συσχέτιση αυτών με την αποτελεσματικότητα συγκεκριμένων κυτταρικών λειτουργιών, όπως η κυτταρομεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα που εξαρτάται από αντισώματα. Στα πλαίσια αυτά, συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί, έχουν συσχετιστεί με την απόκριση στη θεραπεία, με το μονοκλωνικό αντίσωμα rituximab, έναντι των CD20+ B κυττάρων, σε ασθενείς με λέμφωμα και αυτοάνοσες διαταραχές (Rascu, Repp et al. 1997), (van Sorge, van der Pol et al. 2003), (Mellor, Brown et al. 2013), (Quartuccio, Fabris et al. 2014). Σε μελέτη με ασθενείς με οπτική νευρομυελίτιδα, έπειτα από χορήγηση rituximab, αναφέρθηκε η συσχέτιση του πολυμορφισμού του αλληλομόρφου γονιδίου FCGR3A με τον κίνδυνο της υποτροπής και της αναποτελεσματικής μείωσης των B κυττάρων κατά τη διάρκεια της θεραπείας με το φάρμακο (Kim, Jeong et al. 2015), ενώ σε άλλη μελέτη υποδεικνύεται η χρησιμότητα των FcγR3A πολυμορφισμών, ως εν δυνάμει βιοδεικτών για την απόκριση στο rituximab, όπως δείχθηκε στη νευροπάθεια με αντι-MAG αντισώματα (Stork, Notermans et al. 2014).

Ο γονότυπος FcγRIIIa-V/V σχετίζεται με πιο αποτελεσματική σύνδεση των IgG1 ή IgG3 στα κύτταρα φυσικούς φονείς και με πιο αυξημένη ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών (ως απόκριση στο σύνολο των IgG) συγκριτικά με το γονότυπο F/F (Koene, Kleijer et al. 1997), (Wu, Edberg et al. 1997).

Είναι λοιπόν αναμενόμενο ότι τα άτομα με γονότυπο V/V θα έχουν καλύτερη απόκριση στο φάρμακο, αφού παρουσιάζουν υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης με τις IgG σε σχέση με αυτούς με γονότυπο F/V και F/F.

Από τους 11 ασθενείς της μελέτης στο SPS που έλαβαν το φάρμακο, (Dalakas, Rakocenic et al. 2017), 4 ανταποκρίθηκαν στο rituximab, παρουσιάζοντας καλύτερη κλινική εικόνα. Για τον πολυμορφισμό του FCGR3A, δύο από αυτούς είχαν γονότυπο V/V, ένας είχε F/F και ένας ακόμη είχε γονότυπο F/V. Με βάση τη βιβλιογραφία η αρχική μας υπόθεση ότι και οι 4 που ανταποκρίθηκαν στο φάρμακο θα είχαν τον γονότυπο V/V, τελικά δεν επιβεβαιώνεται. Τόσο οι γονότυποι των ασθενών που έλαβαν το φάρμακο όσο και οι γονότυποι αυτών που έλαβαν το placebo ήταν ποικίλοι. Εάν, και οι 4 ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στο rituximab, παρουσίαζαν τον γονότυπο V/V, και παρότι λόγω του μικρού δείγματος, το αποτέλεσμα δεν θα είχε στατιστική σημαντικότητα, θα ήταν άξιο μελέτης, εάν σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός παίζει ρόλο στην απόκριση του rituximab στο SPS.

Εξαρχής το εύρημα ότι 4 ασθενείς με SPS, (Dalakas, Rakocenic et al. 2017) ανταποκρίθηκαν στο φάρμακο δεν ήταν στατιστικά σημαντικό, είτε επειδή ο αριθμός των ασθενών που πήραν το φάρμακο και όσων πήραν placebo ήταν μικρός, είτε λόγω του ότι οι κλίμακες αξιολόγησης των κλινικών συμπτωμάτων δεν ήταν πολύ ευαίσθητες. Οι (Dalakas, Rakocenic et al. 2017) πρότειναν ότι θα έπρεπε να εξεταστεί μεγαλύτερη κοόρτη ασθενών, δίνοντας έτσι ισχυρότερο στατιστικό αποτέλεσμα. Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι το κλινικό εύρημα είναι πιθανά τυχαίο, αφού οι γονότυποι των ατόμων αυτών δεν συσχετίζονται με τον υποδοχέα FcγIIIa που είναι υψηλής συγγένειας για το φάρμακο (γονότυπος V/V).

Ο υποδοχέας FcγRIIa που φέρει ιστιδίνη (H allele) προσδένεται καλύτερα στην ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη IgG₂ συγκριτικά με αυτόν που φέρει αργινίνη (R allele) (Parren, Warmerdam et al. 1992), (Warmerdam, van de Winkel et al. 1991). Οι 4 ασθενείς της μελέτης (Dalakas, Rakocenic et al. 2017) παρουσίασαν γονότυπο H/R. Από το σύνολο των ασθενών και των υγιών που εξετάστηκαν ο γονότυπος H/R επικράτησε σε σχέση με τους H/H και H/R, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανόν συνολικά στον πληθυσμό ο γονότυπος H/R επικρατεί συγκριτικά με τους H/H και H/R.

Συμπερασματικά λοιπόν καταλήγουμε ότι ο γονότυπος που αφορά τον πολυμορφισμό του γονιδίου FCGR3A, που κωδικοποιεί τον υποδοχέα FcγIIIa, δε σχετίζεται με απόκριση στη θεραπεία με το rituximab του νοσήματος τους δύσκαμπτου ανθρώπου. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό του γονιδίου FCGR2A, που κωδικοποιεί τον υποδοχέα FcγIIa, το εύρημα μας δεν υποδηλώνει κάποια συσχέτιση με την απόκριση στο rituximab, καθώς ο γονότυπος H/R, είναι ο συχνότερος σε όλες τις ομάδες, τόσο σε αυτούς που αποκρίθηκαν στο φάρμακο, όσο και σε αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν, πήραν placebo ή εξετάστηκαν ως υγιείς. Επομένως η γενετική ανάλυση των δύο πολυμορφισμών που αφορούν αυτούς τους 2 τύπους υποδοχέων δε μπορεί να αποτελέσει βιοδείκτη για να γνωρίζουμε εάν κάποιος ασθενής με SPS θα ανταποκριθεί ή όχι στη θεραπεία με rituximab.

5.2) ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK293T ΓΙΑ ΑΝΕΥΡΕΣΗ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗ ΛΥΚΟ ΚΑΙ ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (Alexopoulos, Kampylafka et al. 2015) έδειξαν ότι παθογενετικά αντισώματα έναντι της ακουαπορίνης-4, που είναι παθογενετικά για το φάσμα των διαταραχών της οπτικής νευρομυελίτιδας βρέθηκαν και σε ποσοστό 2,2% ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο, χωρίς την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων που να ανήκουν στο φάσμα της οπτικής νευρομυελίτιδας. Αυτό πιθανά σημαίνει ότι οι ασθενείς με λύκο που είναι θετικοί για αυτοαντισώματα έναντι της ακουαπορίνης 4, έχουν την πιθανότητα να αναπτύξουν νευρολογική διαταραχή στο μέλλον. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι είναι αβέβαιο το γιατί οι ασθενείς δεν έχουν αναπτύξει κάποιο νευρολογικό νόσημα, παρόλο που τα αντισώματα αυτά σχετίζονται με παθογένεια, εφόσον επάγουν την κυτταροτοξικότητα που μεσολαβείται από το συμπλήρωμα. Τόσο τα αντισώματα έναντι της ακουαπορίνης-4 όσο και αυτά έναντι της MOG αποτελούν βιοδείκτες απομυελίνωσης. Η πρωτεΐνη MOG συναντάται στην εξωτερική επιφάνεια της μυελίνης και στην πλασματική μεμβράνη των ολιγοδενδροκυττάρων και επειδή συναντάται κυρίως στα έλυτρα μυελίνης, είναι βιολογικά προσβάσιμος αντιγονικός στόχος για τη δράση των αυτοαντισωμάτων.

Η ασθενής με Συστηματικό Ερυθματώδη λύκο που εμφάνισε αντισώματα έναντι της MOG, αλλά και οι ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο με βάσει το κλινικό τους ιστορικό και την τρέχουσα κλινική αξιολόγηση δεν παρουσίαζαν και δεν παρουσίασαν στο παρελθόν απομυελινωτική διαταραχή.

Μία πιθανή εξήγηση για τη μη ανάπτυξη νευρολογικής σημειολογίας είναι το ότι τα αντισώματα έναντι της ακουαπορίνης-4 και της πρωτεΐνης MOG δεν έχουν περάσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Επίσης είναι πιθανό τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα που λαμβάνουν τόσο οι ασθενείς, με συστηματικό ερυθματώδη λύκο όσο και με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, να απέτρεψαν την ανάπτυξη νευρολογικής διαταραχής.

Στα αυτοάνοσα νοσήματα παρατηρείται μία υπερδιέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος με αποτέλεσμα να υπερπαράγονται αυτοαντισώματα, στοχεύοντας διάφορα μόρια στον οργανισμό. Έτσι μπορεί ενδεχομένως να εξηγηθεί και η περίπτωση των ασθενών με συστηματικό ερυθματώδη λύκο και αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, στους οποίους ανιχνεύθηκαν αυτοαντισώματα έναντι της ακουαπορίνης-4 και της πρωτεΐνης MOG, χωρίς την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων του φάσματος των διαταραχών της οπτικής νευρομυελίτιδας και απομυελίνωσης.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε ότι είναι δυνατόν σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος και το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, να παράγονται στον οργανισμό του ασθενούς αυτοαντισώματα έναντι της ακουαπορίνης-4 και της MOG, χωρίς εμφάνιση απομυελίνωσης. Αυτό υποδηλώνει ότι πρέπει να εξετάσουμε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών από τις δυο αυτοάνοσες διαταραχές και να παρατηρήσουμε πότε

και για πόσο μεγάλο χρονικό διάστημα αναπτύσσουν ή όχι αυτοαντισώματα έναντι των δύο πρωτεϊνών. Η ανεύρεση αυτοαντισωμάτων έναντι της ακουαπορίνης-4 και της MOG ίσως αποτελεί προγνωστικό βιοδείκτη για την πορεία και εξέλιξη της νόσου για την πιθανή εμφάνιση κλινικών νευρολογικών συμπτωμάτων και απομυελίνωσης.

6)ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (2012). 7 - Antibody interactions with the immune system A2 - Strohl, William R. Therapeutic Antibody Engineering. L. M. Strohl, Woodhead Publishing: 131-595.
- Abdel-Nasser, A. M., R. M. Ghaleb, J. A. Mahmoud, W. Khairy and R. M. Mahmoud (2008). "Association of anti-ribosomal P protein antibodies with neuropsychiatric and other manifestations of systemic lupus erythematosus." Clin Rheumatol **27**(11): 1377-1385.
- Alexopoulos, H., S. Akrivou and M. C. Dalakas (2013). "Glycine receptor antibodies in stiff-person syndrome and other GAD-positive CNS disorders." Neurology **81**(22): 1962-1964.
- Alexopoulos, H., A. Biba and M. C. Dalakas (2016). "Anti-B-Cell Therapies in Autoimmune Neurological Diseases: Rationale and Efficacy Trials." Neurotherapeutics **13**(1): 20-33.
- Alexopoulos, H. and M. C. Dalakas (2013). "Immunology of stiff person syndrome and other GAD-associated neurological disorders." Expert Rev Clin Immunol **9**(11): 1043-1053.
- Alexopoulos, H., E. I. Kampylafka, P. Fouka, I. Tatouli, S. Akrivou, P. K. Politis, H. M. Moutsopoulos, A. G. Tzioufas and M. C. Dalakas (2015). "Anti-aquaporin-4 autoantibodies in systemic lupus erythematosus persist for years and induce astrocytic cytotoxicity but not CNS disease." J Neuroimmunol **289**: 8-11.
- Ameli, R., J. Snow, G. Rakocovic and M. C. Dalakas (2005). "A neuropsychological assessment of phobias in patients with stiff person syndrome." Neurology **64**(11): 1961-1963.
- Appenzeller, S., A. D. Carnevale, L. M. Li, L. T. Costallat and F. Cendes (2006). "Hippocampal atrophy in systemic lupus erythematosus." Ann Rheum Dis **65**(12): 1585-1589.
- Appenzeller, S., F. Cendes and L. T. Costallat (2004). "Epileptic seizures in systemic lupus erythematosus." Neurology **63**(10): 1808-1812.
- Azevedo, P. C., G. Murphy and D. A. Isenberg (2014). "Pathology of systemic lupus erythematosus: the challenges ahead." Methods Mol Biol **1134**: 1-16.
- Bacorro, E. A. and R. Tehrani (2010). "Stiff-person syndrome: persistent elevation of glutamic acid decarboxylase antibodies despite successful treatment with rituximab." J Clin Rheumatol **16**(5): 237-239.
- Baker, M. R., M. Das, J. Isaacs, P. R. Fawcett and D. Bates (2005). "Treatment of stiff person syndrome with rituximab." J Neurol Neurosurg Psychiatry **76**(7): 999-1001.
- Bedi, G. S., A. D. Brown, S. R. Delgado, N. Usmani, B. L. Lam and W. A. Sheremata (2011). "Impact of rituximab on relapse rate and disability in neuromyelitis optica." Mult Scler **17**(10): 1225-1230.
- Bertsias, G. K. and D. T. Boumpas (2010). "Pathogenesis, diagnosis and management of neuropsychiatric SLE manifestations." Nat Rev Rheumatol **6**(6): 358-367.
- Bevers, E. M., M. Galli, T. Barbui, P. Comfurius and R. F. Zwaal (1991). "Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin." Thromb Haemost **66**(6): 629-632.
- Birnbaum, J., M. Petri, R. Thompson, I. Izbudak and D. Kerr (2009). "Distinct subtypes of myelitis in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **60**(11): 3378-3387.
- Brashear, H. R. and L. H. Phillips, 2nd (1991). "Autoantibodies to GABAergic neurons and response to plasmapheresis in stiff-man syndrome." Neurology **41**(10): 1588-1592.
- Brey, R. L. and A. Escalante (1998). "Neurological manifestations of antiphospholipid antibody syndrome." Lupus **7 Suppl 2**: S67-74.
- Brock, T. D. and H. Freeze (1969). "Thermus aquaticus gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile." J Bacteriol **98**(1): 289-297.
- Brody, J. R. and S. E. Kern (2004). "History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis." Anal Biochem **333**(1): 1-13.
- Brooks, W. M., W. L. Sibbitt, Jr., M. Kornfeld, R. E. Jung, A. D. Bankhurst and C. A. Roldan (2010). "The histopathologic associates of neurometabolite abnormalities in fatal neuropsychiatric systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **62**(7): 2055-2063.

Brunner, C., H. Lassmann, T. V. Waehneltd, J. M. Matthieu and C. Linington (1989). "Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats." *J Neurochem* **52**(1): 296-304.

Burns, T. M. (2005). "A step forward for stiff-person syndrome." *Lancet* **365**(9468): 1365-1367.

Butler, M. H., A. Hayashi, N. Ohkoshi, C. Villmann, C. M. Becker, G. Feng, P. De Camilli and M. Solimena (2000). "Autoimmunity to gephyrin in Stiff-Man syndrome." *Neuron* **26**(2): 307-312.

Butler, M. H., M. Solimena, R. Dirx, Jr., A. Hayday and P. De Camilli (1993). "Identification of a dominant epitope of glutamic acid decarboxylase (GAD-65) recognized by autoantibodies in stiff-man syndrome." *J Exp Med* **178**(6): 2097-2106.

Cartron, G., L. Dacheux, G. Salles, P. Solal-Celigny, P. Bardos, P. Colombat and H. Watier (2002). "Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene." *Blood* **99**(3): 754-758.

Cartron, G., H. Watier, J. Golay and P. Solal-Celigny (2004). "From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy." *Blood* **104**(9): 2635-2642.

Cervera, R., J. C. Piette, J. Font, M. A. Khamashta, Y. Shoenfeld, M. T. Camps, S. Jacobsen, G. Lakos, A. Tincani, I. Kontopoulou-Griva, M. Galeazzi, P. L. Meroni, R. H. Derksen, P. G. de Groot, E. Gromnica-Ihle, M. Baleva, M. Mosca, S. Bombardieri, F. Houssiau, J. C. Gris, I. Quere, E. Hachulla, C. Vasconcelos, B. Roch, A. Fernandez-Nebro, M. C. Boffa, G. R. Hughes, M. Ingelmo and G. Euro-Phospholipid Project (2002). "Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients." *Arthritis Rheum* **46**(4): 1019-1027.

Chapman, J., J. H. Rand, R. L. Brey, S. R. Levine, I. Blatt, M. A. Khamashta and Y. Shoenfeld (2003). "Non-stroke neurological syndromes associated with antiphospholipid antibodies: evaluation of clinical and experimental studies." *Lupus* **12**(7): 514-517.

Chien, A., D. B. Edgar and J. M. Trela (1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*." *J Bacteriol* **127**(3): 1550-1557.

Chu, H., C. Huang, H. Ding, J. Dong, Z. Gao, X. Yang, Y. Tang and Q. Dong (2016). "Aquaporin-4 and Cerebrovascular Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* **17**(8): 1249.

Clatworthy, M. R. (2014). Chapter 12 - Fcγ Receptor Polymorphisms and Susceptibility to Infection A2 - Ackerman, Margaret E. *Antibody Fc*. F. Nimmerjahn. Boston, Academic Press: 217-237.

Cohen, L. (1966). "Stiff-man syndrome. Two patients treated with diazepam." *Jama* **195**(3): 222-224.

Cree, B. A., S. Lamb, K. Morgan, A. Chen, E. Waubant and C. Genain (2005). "An open label study of the effects of rituximab in neuromyelitis optica." *Neurology* **64**(7): 1270-1272.

Cross, A. H., J. L. Stark, J. Lauber, M. J. Ramsbottom and J. A. Lyons (2006). "Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients." *J Neuroimmunol* **180**(1-2): 63-70.

D'Cruz, D. P., M. A. Khamashta and G. R. Hughes (2007). "Systemic lupus erythematosus." *Lancet* **369**(9561): 587-596.

Dalakas, M. C. (2005). "The role of IVIg in the treatment of patients with stiff person syndrome and other neurological diseases associated with anti-GAD antibodies." *J Neurol* **252** Suppl 1: 119-25.

Dalakas, M. C. (2006). "Role of IVIg in autoimmune, neuroinflammatory and neurodegenerative disorders of the central nervous system: present and future prospects." *J Neurol* **253** Suppl 5: V25-32.

Dalakas, M. C. (2008). "B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders." *Nat Clin Pract Neurol* **4**(10): 557-567.

Dalakas, M. C. (2008). "Invited article: inhibition of B cell functions: implications for neurology." *Neurology* **70**(23): 2252-2260.

Dalakas, M. C. (2013). "Progress and stiff challenges in understanding the role of GAD-antibodies in stiff-person syndrome." *Exp Neurol* **247**: 303-307.

Dalakas, M. C., M. Fujii, M. Li, B. Lutfi, J. Kyhos and B. McElroy (2001). "High-Dose Intravenous Immune Globulin for Stiff-Person Syndrome." *New England Journal of Medicine* **345**(26): 1870-1876.

Dalakas, M. C., M. Fujii, M. Li and B. McElroy (2000). "The clinical spectrum of anti-GAD antibody-positive patients with stiff-person syndrome." Neurology **55**(10): 1531-1535.

Dalakas, M. C., M. Li, M. Fujii and D. M. Jacobowitz (2001). "Stiff person syndrome: quantification, specificity, and intrathecal synthesis of GAD65 antibodies." Neurology **57**(5): 780-784.

Dalakas, M. C., G. Rakocevic, J. M. Dambrosia, H. Alexopoulos and B. McElroy (2017). "A double-blind, placebo-controlled study of rituximab in patients with stiff person syndrome." Ann Neurol **82**(2): 271-277.

Darnell, R. B. and J. B. Posner (2003). "Paraneoplastic syndromes involving the nervous system." N Engl J Med **349**(16): 1543-1554.

Davies, J. S., S. K. Chung, R. H. Thomas, A. Robinson, C. L. Hammond, J. G. Mullins, E. Carta, B. R. Pearce, K. Harvey, R. J. Harvey and M. I. Rees (2010). "The glycinergic system in human startle disease: a genetic screening approach." Front Mol Neurosci **3**: 8.

De Camilli, P., A. Thomas, R. Cofield, F. Folli, B. Lichte, G. Piccolo, H. M. Meinck, M. Austoni, G. Fassetta, G. Bottazzo, D. Bates, N. Cartledge, M. Solimena, M. W. Kilimann and et al. (1993). "The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of Stiff-Man syndrome with breast cancer." J Exp Med **178**(6): 2219-2223.

DeGiorgio, L. A., K. N. Konstantinov, S. C. Lee, J. A. Hardin, B. T. Volpe and B. Diamond (2001). "A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus." Nat Med **7**(11): 1189-1193.

Desai, B., Y. Hsu, B. Schneller, J. G. Hobbs, A. I. Mehta and A. Linninger (2016). "Hydrocephalus: the role of cerebral aquaporin-4 channels and computational modeling considerations of cerebrospinal fluid." Neurosurg Focus **41**(3): E8.

Desjardins, P. and D. Conklin (2010). "NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids." Journal of Visualized Experiments : JoVE(45): 2565.

Devinsky, O., C. K. Petito and D. R. Alonso (1988). "Clinical and neuropathological findings in systemic lupus erythematosus: the role of vasculitis, heart emboli, and thrombotic thrombocytopenic purpura." Ann Neurol **23**(4): 380-384.

Dieker, J. W., J. H. Fransen, C. C. van Bavel, J. P. Briand, C. W. Jacobs, S. Muller, J. H. Berden and J. van der Vlag (2007). "Apoptosis-induced acetylation of histones is pathogenic in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **56**(6): 1921-1933.

Dijstelbloem, H. M., R. H. Scheepers, W. W. Oost, C. A. Stegeman, W. L. van der Pol, W. J. Sluiter, C. G. Kallenberg, J. G. van de Winkel and J. W. Tervaert (1999). "Fcγ receptor polymorphisms in Wegener's granulomatosis: risk factors for disease relapse." Arthritis Rheum **42**(9): 1823-1827.

Dinkel, K., H. M. Meinck, K. M. Jury, W. Karges and W. Richter (1998). "Inhibition of gamma-aminobutyric acid synthesis by glutamic acid decarboxylase autoantibodies in stiff-man syndrome." Ann Neurol **44**(2): 194-201.

Dupond, J. L., L. Essalmi, H. Gil, N. Meaux-Ruault and C. Hafsaoui (2010). "Rituximab treatment of stiff-person syndrome in a patient with thymoma, diabetes mellitus and autoimmune thyroiditis." J Clin Neurosci **17**(3): 389-391.

Eibel, H., H. Kraus, H. Sic, A.-K. Kienzler and M. Rizzi (2014). B cell Biology: An Overview.

Fenalti, G. and A. M. Buckle (2010). "Structural biology of the GAD autoantigen." Autoimmun Rev **9**(3): 148-152.

Floeter, M. K., J. Valls-Sole, C. Toro, D. Jacobowitz and M. Hallett (1998). "Physiologic studies of spinal inhibitory circuits in patients with stiff-person syndrome." Neurology **51**(1): 85-93.

Folli, F., M. Solimena, R. Cofield, M. Austoni, G. Tallini, G. Fassetta, D. Bates, N. Cartledge, G. F. Bottazzo, G. Piccolo, P. De Camilli and et al. (1993). "Autoantibodies to a 128-kd synaptic protein in three women with the stiff-man syndrome and breast cancer." N Engl J Med **328**(8): 546-551.

Fujimoto, M., J. C. Poe, M. Hasegawa and T. F. Tedder (2000). "CD19 regulates intrinsic B lymphocyte signal transduction and activation through a novel mechanism of processive amplification." Immunol Res **22**(2-3): 281-298.

Gardinier, M. V., P. Amiguet, C. Linington and J. M. Matthieu (1992). "Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily." J Neurosci Res **33**(1): 177-187.

Gerschlagler, W. and P. Brown (2002). "Effect of treatment with intravenous immunoglobulin on quality of life in patients with stiff-person syndrome." Mov Disord **17**(3): 590-593.

Gillis, C., A. Gouel-Chéron, F. Jönsson and P. Bruhns (2014). "Contribution of Human FcγRs to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies." Frontiers in Immunology **5**(254).

Gleiser, C., A. Wagner, P. Fallier-Becker, H. Wolburg, B. Hirt and A. F. Mack (2016). "Aquaporin-4 in Astroglial Cells in the CNS and Supporting Cells of Sensory Organs—A Comparative Perspective." International Journal of Molecular Sciences **17**(9): 1411.

Goede, V., C. Klein and S. Stilgenbauer (2015). "Obinutuzumab (GA101) for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and other B-cell non-hodgkin's lymphomas: a glycoengineered type II CD20 antibody." Oncol Res Treat **38**(4): 185-192.

Gredler, V., S. Mader, K. Schanda, H. Hegen, F. Di Pauli, B. Kuenz, F. Deisenhammer, T. Berger, M. Reindl and A. Lutterotti (2013). "Clinical and immunological follow-up of B-cell depleting therapy in CNS demyelinating diseases." J Neurol Sci **328**(1-2): 77-82.

Grika, E. P., P. D. Ziakas, E. Zintzaras, H. M. Moutsopoulos and P. G. Vlachoyiannopoulos (2012). "Morbidity, mortality, and organ damage in patients with antiphospholipid syndrome." J Rheumatol **39**(3): 516-523.

Haddouk, S., S. Marzouk, M. Jallouli, H. Fourati, M. Frigui, Y. B. Hmida, F. Koubaa, W. Sellami, S. Baklouti, J. Hachicha, Z. Bahloul and H. Masmoudi (2009). "Clinical and diagnostic value of ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus." Rheumatology (Oxford) **48**(8): 953-957.

Hanly, J. G. (2014). "Diagnosis and management of neuropsychiatric SLE." Nat Rev Rheumatol **10**(6): 338-347.

Hanly, J. G., C. Hong, S. Smith and J. D. Fisk (1999). "A prospective analysis of cognitive function and anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **42**(4): 728-734.

Hanly, J. G., M. B. Urowitz, J. Sanchez-Guerrero, S. C. Bae, C. Gordon, D. J. Wallace, D. Isenberg, G. S. Alarcon, A. Clarke, S. Bernatsky, J. T. Merrill, M. Petri, M. A. Dooley, D. Gladman, P. R. Fortin, K. Steinsson, I. Bruce, S. Manzi, M. Khamashta, A. Zoma, C. Aranow, E. Ginzler, R. Van Vollenhoven, J. Font, G. Sturfelt, O. Nived, R. Ramsey-Goldman, K. Kalunian, J. Douglas, K. Thompson and V. Farewell (2007). "Neuropsychiatric events at the time of diagnosis of systemic lupus erythematosus: an international inception cohort study." Arthritis Rheum **56**(1): 265-273.

Hanly, J. G., N. M. Walsh and V. Sangalang (1992). "Brain pathology in systemic lupus erythematosus." J Rheumatol **19**(5): 732-741.

Harding, A. E., P. D. Thompson, R. S. Kocen, J. R. Batchelor, N. Davey and C. D. Marsden (1989). "Plasma exchange and immunosuppression in the stiff man syndrome." Lancet **2**(8668): 915.

Helling, R. B., H. M. Goodman and H. W. Boyer (1974). "Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis." J Virol **14**(5): 1235-1244.

Hilario, E. C., A. Stern, C. H. Wang, Y. W. Vargas, C. J. Morgan, T. E. Swartz and T. W. Patapoff (2017). "An Improved Method of Predicting Extinction Coefficients for the Determination of Protein Concentration." PDA J Pharm Sci Technol **71**(2): 127-135.

Hohlfeld, R., K. Dornmair, E. Meinl and H. Wekerle (2016). "The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 2: CD8+ T cells, B cells, and antibodies in the focus of reverse-translational research." Lancet Neurol **15**(3): 317-331.

Howard, F. M., Jr. (1963). "A new and effective drug in the treatment of the stiff-man syndrome: preliminary report." Proc Staff Meet Mayo Clin **38**: 203-212.

Hu, G. (1993). "DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment." DNA Cell Biol **12**(8): 763-770.

Hubbard, J. A., J. I. Szu and D. K. Binder (2018). "The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease." Brain Research Bulletin **136**: 118-129.

Hughes, G. (2003). "Migraine, memory loss, and "multiple sclerosis ". Neurological features of the antiphospholipid (Hughes') syndrome." Postgraduate Medical Journal **79**(928): 81-83.

Iizuka, T., M. I. Leite, B. Lang, P. Waters, Y. Urano, S. Miyakawa, J. Hamada, F. Sakai, H. Mochizuki and A. Vincent (2012). "Glycine receptor antibodies are detected in progressive encephalomyelitis with rigidity and myoclonus (PERM) but not in saccadic oscillations." J Neurol **259**(8): 1566-1573.

Ip, V. H., A. Y. Lau, L. W. Au, F. S. Fan, A. Y. Chan, V. C. Mok and K. S. Wong (2013). "Rituximab reduces attacks in Chinese patients with neuromyelitis optica spectrum disorders." J Neurol Sci **324**(1-2): 38-39.

Jacob, A., B. G. Weinshenker, I. Violich, N. McLinskey, L. Krupp, R. J. Fox, D. M. Wingerchuk, M. Boggild, C. S. Constantinescu, A. Miller, T. De Angelis, M. Matiello and B. A. Cree (2008). "Treatment of neuromyelitis optica with rituximab: retrospective analysis of 25 patients." Arch Neurol **65**(11): 1443-1448.

Jennekens, F. G. and L. Kater (2002). "The central nervous system in systemic lupus erythematosus. Part 2. Pathogenetic mechanisms of clinical syndromes: a literature investigation." Rheumatology (Oxford) **41**(6): 619-630.

Jung, J. S., R. V. Bhat, G. M. Preston, W. B. Guggino, J. M. Baraban and P. Agre (1994). "Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(26): 13052-13056.

Kampylafka, E. I., H. Alexopoulos, P. Fouka, H. M. Moutsopoulos, M. C. Dalakas and A. G. Tzioufas (2016). "Epileptic syndrome in systemic lupus erythematosus and neuronal autoantibody associations." Lupus **25**(11): 1260-1265.

Karlson, E. W., L. Sudarsky, E. Ruderman, S. Pierson, M. Scott and S. M. Helfgott (1994). "Treatment of stiff-man syndrome with intravenous immune globulin." Arthritis Rheum **37**(6): 915-918.

Katoh, N., M. Matsuda, W. Ishii, H. Morita and S. Ikeda (2010). "Successful treatment with rituximab in a patient with stiff-person syndrome complicated by dysthyroid ophthalmopathy." Intern Med **49**(3): 237-241.

Kessler, C. and V. Manta (1990). "Specificity of restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases — a review (edition 3)." Gene **92**(1): 1-240.

Khanlou, H. and G. Eiger (1999). "Long-term remission of refractory stiff-man syndrome after treatment with intravenous immunoglobulin." Mayo Clin Proc **74**(12): 1231-1232.

Kim, D. H., H. D. Jung, J. G. Kim, J. J. Lee, D. H. Yang, Y. H. Park, Y. R. Do, H. J. Shin, M. K. Kim, M. S. Hyun and S. K. Sohn (2006). "FCGR3A gene polymorphisms may correlate with response to frontline R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma." Blood **108**(8): 2720-2725.

Kim, S. H., I. H. Jeong, J. W. Hyun, A. Joung, H. J. Jo, S. H. Hwang, S. Yun, J. Joo and H. J. Kim (2015). "Treatment Outcomes With Rituximab in 100 Patients With Neuromyelitis Optica: Influence of FCGR3A Polymorphisms on the Therapeutic Response to Rituximab." JAMA Neurol **72**(9): 989-995.

Kirou, K. A. and E. Gkrouzman (2013). "Anti-interferon alpha treatment in SLE." Clin Immunol **148**(3): 303-312.

Kitano, M., S. Moriyama, Y. Ando, M. Hikida, Y. Mori, T. Kurosaki and T. Okada (2011). "Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity." Immunity **34**(6): 961-972.

Koene, H. R., M. Kleijer, J. Algra, D. Roos, A. E. von dem Borne and M. de Haas (1997). "Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype." *Blood* **90**(3): 1109-1114.

Koene, H. R., M. Kleijer, A. J. Swaak, K. E. Sullivan, M. Bijl, M. A. Petri, C. G. Kallenberg, D. Roos, A. E. von dem Borne and M. de Haas (1998). "The Fc gammaRIIIA-158F allele is a risk factor for systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* **41**(10): 1813-1818.

Koerner, C., B. Wieland, W. Richter and H. M. Meinck (2004). "Stiff-person syndromes: motor cortex hyperexcitability correlates with anti-GAD autoimmunity." *Neurology* **62**(8): 1357-1362.

Kozora, E., S. G. West, S. F. Maier, C. M. Filley, D. B. Arciniegas, M. Brown, D. Miller, A. Grimm and L. Zhang (2010). "Antibodies against N-methyl-D-aspartate receptors in patients with systemic lupus erythematosus without major neuropsychiatric syndromes." *J Neurol Sci* **295**(1-2): 87-91.

Krüger, D. H. and T. A. Bickle (1983). "Bacteriophage survival: multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts." *Microbiological Reviews* **47**(3): 345-360.

Kurosaki, T., K. Kometani and W. Ise (2015). "Memory B cells." *Nat Rev Immunol* **15**(3): 149-159.

Lapteva, L., M. Nowak, C. H. Yarboro, K. Takada, T. Roebuck-Spencer, T. Weickert, J. Bleiberg, D. Rosenstein, M. Pao, N. Patronas, S. Steele, M. Manzano, J. W. van der Veen, P. E. Lipsky, S. Marengo, R. Wesley, B. Volpe, B. Diamond and G. G. Illei (2006). "Anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies, cognitive dysfunction, and depression in systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* **54**(8): 2505-2514.

Lee, P. Y., J. Costumbrado, C. Y. Hsu and Y. H. Kim (2012). "Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments." *J Vis Exp*(62).

Lehrnbecher, T., C. B. Foster, S. Zhu, S. F. Leitman, L. R. Goldin, K. Huppi and S. J. Chanock (1999). "Variant genotypes of the low-affinity Fc gamma receptors in two control populations and a review of low-affinity Fc gamma receptor polymorphisms in control and disease populations." *Blood* **94**(12): 4220-4232.

Lehrnbecher, T. L., C. B. Foster, S. Zhu, D. Venzon, S. M. Steinberg, K. Wyvill, J. A. Metcalf, S. S. Cohen, J. Kovacs, R. Yarchoan, A. Blauvelt and S. J. Chanock (2000). "Variant genotypes of Fc gammaRIIIA influence the development of Kaposi's sarcoma in HIV-infected men." *Blood* **95**(7): 2386-2390.

Lennon, V. A., D. M. Wingerchuk, T. J. Kryzer, S. J. Pittock, C. F. Lucchinetti, K. Fujihara, I. Nakashima and B. G. Weinshenker (2004). "A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis." *Lancet* **364**(9451): 2106-2112.

Leppers-van de Straat, F. G., W. L. van der Pol, M. D. Jansen, N. Sugita, H. Yoshie, T. Kobayashi and J. G. van de Winkel (2000). "A novel PCR-based method for direct Fc gamma receptor IIIa (CD16) allotyping." *J Immunol Methods* **242**(1-2): 127-132.

Levine, S. R. and K. A. Welch (1987). "The spectrum of neurologic disease associated with antiphospholipid antibodies: Lupus anticoagulants and anticardiolipin antibodies." *Archives of Neurology* **44**(8): 876-883.

Levy, L. M., M. C. Dalakas and M. Floeter (1999). "The stiff-person syndrome: An autoimmune disorder affecting neurotransmission of γ -aminobutyric acid." *Annals of Internal Medicine* **131**(7): 522-530.

Levy, L. M., I. Levy-Reis, M. Fujii and M. C. Dalakas (2005). "Brain gamma-aminobutyric acid changes in stiff-person syndrome." *Arch Neurol* **62**(6): 970-974.

Linnington, C., M. Bradl, H. Lassmann, C. Brunner and K. Vass (1988). "Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein." *The American Journal of Pathology* **130**(3): 443-454.

Lobo, M. E., M. L. Araujo, C. A. Tomaz and N. Allam (2010). "Stiff-person syndrome treated with rituximab." *BMJ Case Rep* **2010**.

Mahmood, N. A., K. Silver, K. Onel, M. Ko and A. Javed (2011). "Efficacy and safety of rituximab in pediatric neuromyelitis optica." *J Child Neurol* **26**(2): 244-247.

Maloney, D. G. (2012). "Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas." N Engl J Med **366**(21): 2008-2016.

Marques, R. B., M. M. Thabet, S. J. White, J. J. Houwing-Duistermaat, A. M. Bakker, G. J. Hendriks, A. Zhernakova, T. W. Huizinga, A. H. van der Helm-van Mil and R. E. Toes (2010). "Genetic variation of the Fc gamma receptor 3B gene and association with rheumatoid arthritis." PLoS One **5**(10).

Mas, N., A. Saiz, M. I. Leite, P. Waters, M. Baron, D. Castano, L. Sabater, A. Vincent and F. Graus (2011). "Antiglycine-receptor encephalomyelitis with rigidity." J Neurol Neurosurg Psychiatry **82**(12): 1399-1401.

Maurer, M. A., G. Rakocevic, C. S. Leung, I. Quast, M. Lukacisin, N. Goebels, C. Munz, H. Wardemann, M. Dalakas and J. D. Lunemann (2012). "Rituximab induces sustained reduction of pathogenic B cells in patients with peripheral nervous system autoimmunity." J Clin Invest **122**(4): 1393-1402.

McKeon, A., E. Martinez-Hernandez, E. Lancaster, J. Y. Matsumoto, R. J. Harvey, K. M. McEvoy, S. J. Pittock, V. A. Lennon and J. Dalmau (2013). "Glycine receptor autoimmune spectrum with stiff-man syndrome phenotype." JAMA Neurol **70**(1): 44-50.

McNeil, H. P., C. N. Chesterman and S. A. Krilis (1991). "Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies." Adv Immunol **49**: 193-280.

Mehdi, A. A., I. Uthman and M. Khamashta (2010). "Antiphospholipid syndrome: pathogenesis and a window of treatment opportunities in the future." Eur J Clin Invest **40**(5): 451-464.

Meinck, H. M. (2001). "Stiff man syndrome." CNS Drugs **15**(7): 515-526.

Meinck, H. M., K. Ricker and B. Conrad (1984). "The stiff-man syndrome: new pathophysiological aspects from abnormal exteroceptive reflexes and the response to clomipramine, clonidine, and tizanidine." Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry **47**(3): 280-287.

Mellor, J. D., M. P. Brown, H. R. Irving, J. R. Zalcberg and A. Dobrovic (2013). "A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer." J Hematol Oncol **6**: 1.

Miller, F. and H. Korsvik (1981). "Baclofen in the treatment of stiff-man syndrome." Ann Neurol **9**(5): 511-512.

Miyagaki, T., M. Fujimoto and S. Sato (2015). "Regulatory B cells in human inflammatory and autoimmune diseases: from mouse models to clinical research." Int Immunol **27**(10): 495-504.

Moersch, F. P. and H. W. Woltman (1956). "Progressive fluctuating muscular rigidity and spasm ("stiff-man" syndrome); report of a case and some observations in 13 other cases." Proc Staff Meet Mayo Clin **31**(15): 421-427.

Moore, P. M. and B. Richardson (1998). "Neurology of the vasculitides and connective tissue diseases." J Neurol Neurosurg Psychiatry **65**(1): 10-22.

Munoz, L. E., U. S. Gaip, S. Franz, A. Sheriff, R. E. Voll, J. R. Kalden and M. Herrmann (2005). "SLE--a disease of clearance deficiency?" Rheumatology (Oxford) **44**(9): 1101-1107.

Murinson, B. B. (2004). "Stiff-person syndrome." Neurologist **10**(3): 131-137.

Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch (2010). "Antibody-mediated modulation of immune responses." Immunol Rev **236**: 265-275.

Nutt, S. L., P. D. Hodgkin, D. M. Tarlinton and L. M. Corcoran (2015). "The generation of antibody-secreting plasma cells." Nat Rev Immunol **15**(3): 160-171.

O'Connor, B. P., L. A. Vogel, W. Zhang, W. Loo, D. Shnider, E. F. Lind, M. Ratliff, R. J. Noelle and L. D. Erickson (2006). "Imprinting the Fate of Antigen-Reactive B Cells through the Affinity of the B Cell Receptor." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **177**(11): 7723.

Oklinski, M. K., M. T. Skowronski, A. Skowronska, M. Rützler, K. Nørgaard, J. D. Nieland, T.-H. Kwon and S. Nielsen (2016). "Aquaporins in the Spinal Cord." International Journal of Molecular Sciences **17**(12): 2050.

Olafson, R. A., D. W. Mulder and F. M. Howard (1964). ""STIFF-MAN" SYNDROME: A REVIEW OF THE LITERATURE, REPORT OF THREE ADDITIONAL CASES AND DISCUSSION OF PATHOPHYSIOLOGY AND THERAPY." Mayo Clin Proc **39**: 131-144.

Padovan, M., G. Castellino, A. Bortoluzzi, L. Caniatti, F. Trotta and M. Govoni (2012). "Factors and comorbidities associated with central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus: a retrospective cross-sectional case-control study from a single center." Rheumatol Int **32**(1): 129-135.

Palanichamy, A., S. Jahn, D. Nickles, M. Derstine, A. Abounasr, S. L. Hauser, S. E. Baranzini, D. Leppert and H. C. von Budingen (2014). "Rituximab efficiently depletes increased CD20-expressing T cells in multiple sclerosis patients." J Immunol **193**(2): 580-586.

Parren, P. W., P. A. Warmerdam, L. C. Boeijs, J. Arts, N. A. Westerdaal, A. Vlug, P. J. Capel, L. A. Aarden and J. G. van de Winkel (1992). "On the interaction of IgG subclasses with the low affinity Fc gamma RIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2." J Clin Invest **90**(4): 1537-1546.

Petereit, H. F. and A. Rubbert-Roth (2009). "Rituximab levels in cerebrospinal fluid of patients with neurological autoimmune disorders." Mult Scler **15**(2): 189-192.

Pham-Dinh, D., B. Allinquant, M. Ruberg, B. Della Gaspera, J. L. Nussbaum and A. Dautigny (1994). "Characterization and expression of the cDNA coding for the human myelin/oligodendrocyte glycoprotein." J Neurochem **63**(6): 2353-2356.

Pham-Dinh, D., M. G. Mattei, J. L. Nussbaum, G. Roussel, P. Pontarotti, N. Roeckel, I. H. Mather, K. Artzt, K. F. Lindahl and A. Dautigny (1993). "Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 7990-7994.

Pieper, K., B. Grimbacher and H. Eibel (2013). "B-cell biology and development." J Allergy Clin Immunol **131**(4): 959-971.

Pittock, S. J., V. A. Lennon, J. de Seze, P. Vermersch, H. A. Homburger, D. M. Wingerchuk, C. F. Lucchinetti, H. Zephir, K. Moder and B. G. Weinshenker (2008). "Neuromyelitis optica and non organ-specific autoimmunity." Arch Neurol **65**(1): 78-83.

Posner, J. B. and H. M. Furneaux (1990). "Paraneoplastic syndromes." Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis **68**: 187-219.

Quan, C., J. Zhang, Bao, J. Lu, C. Zhao, T. Cai, B. Wang, H. Yu, J. Qiao and C. Lu (2015). "The immune balance between memory and regulatory B cells in NMO and the changes of the balance after methylprednisolone or rituximab therapy." J Neuroimmunol **282**: 45-53.

Quartuccio, L., M. Fabris, E. Pontarini, S. Salvin, A. Zabotti, M. Benucci, M. Manfredi, D. Biasi, V. Ravagnani, F. Atzeni, P. Sarzi-Puttini, P. Morassi, F. Fischetti, P. Tomietto, L. Bazzichi, M. Saracco, R. Pellerito, M. Cimmino, F. Schiavon, V. Carraro, A. Semeraro, R. Caporali, L. Cavagna, R. Bortolotti, G. Paolazzi, M. Govoni, S. Bombardieri and S. De Vita (2014). "The 158VV Fc gamma receptor 3A genotype is associated with response to rituximab in rheumatoid arthritis: results of an Italian multicentre study." Ann Rheum Dis **73**(4): 716-721.

Qureshi, A. and M. Hennessy (2012). "Stiff person syndrome (SPS) complicated by respiratory failure: successful treatment with rituximab." J Neurol **259**(1): 180-181.

Radaelli, M., L. Moiola, F. Sangalli, F. Esposito, V. Barcella, L. Ferre, M. Rodegher, B. Colombo, R. Fazio, V. Martinelli and G. Comi (2016). "Neuromyelitis optica spectrum disorders: long-term safety and efficacy of rituximab in Caucasian patients." Mult Scler **22**(4): 511-519.

Radaev, S., S. Motyka, W. H. Fridman, C. Sautes-Fridman and P. D. Sun (2001). "The structure of a human type III Fc gamma receptor in complex with Fc." J Biol Chem **276**(19): 16469-16477.

Raju, R., J. Foote, J. P. Banga, T. R. Hall, C. J. Padoa, M. C. Dalakas, E. Ortqvist and C. S. Hampe (2005). "Analysis of GAD65 autoantibodies in Stiff-Person syndrome patients." J Immunol **175**(11): 7755-7762.

Rakocevic, G., R. Raju and M. C. Dalakas (2004). "Anti-glutamic acid decarboxylase antibodies in the serum and cerebrospinal fluid of patients with stiff-person syndrome: Correlation with clinical severity." Archives of Neurology **61**(6): 902-904.

Rascu, A., R. Repp, N. A. Westerdaal, J. R. Kalden and J. G. van de Winkel (1997). "Clinical relevance of Fc gamma receptor polymorphisms." Ann N Y Acad Sci **815**: 282-295.

Reetz, A., M. Solimena, M. Matteoli, F. Folli, K. Takei and P. De Camilli (1991). "GABA and pancreatic beta-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion." Embo j **10**(5): 1275-1284.

Reff, M. E., K. Carner, K. S. Chambers, P. C. Chinn, J. E. Leonard, R. Raab, R. A. Newman, N. Hanna and D. R. Anderson (1994). "Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20." Blood **83**(2): 435-445.

Rizzi, M., R. Knoth, C. S. Hampe, P. Lorenz, M. L. Gougeon, B. Lemercier, N. Venhoff, F. Ferrera, U. Salzer, H. J. Thiesen, H. H. Peter, U. A. Walker and H. Eibel (2010). "Long-lived plasma cells and memory B cells produce pathogenic anti-GAD65 autoantibodies in Stiff Person Syndrome." PLoS One **5**(5): e10838.

Roberts, R. J. and K. Murray (1976). "Restriction Endonuclease." CRC Critical Reviews in Biochemistry **4**(2): 123-164.

Roth, F. C. and A. Draguhn (2012). "GABA metabolism and transport: effects on synaptic efficacy." Neural Plast **2012**: 805830.

Saadoun, S. and M. C. Papadopoulos (2010). "Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema." Neuroscience **168**(4): 1036-1046.

Salmon, J. E., S. Ng, D. H. Yoo, T. H. Kim, S. Y. Kim and G. G. Song (1999). "Altered distribution of Fc gamma receptor IIIA alleles in a cohort of Korean patients with lupus nephritis." Arthritis Rheum **42**(4): 818-819.

Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandbrink, F., N. A. Syed, M. D. Fujii, M. C. Dalakas and M. K. Floeter (2000). "Motor cortex excitability in stiff-person syndrome." Brain **123 (Pt 11)**: 2231-2239.

Sanna, G., M. L. Bertolaccini, M. J. Cuadrado, M. A. Khamashta and G. R. V. Hughes (2003). "Central nervous system involvement in the antiphospholipid (Hughes) syndrome." Rheumatology **42**(2): 200-213.

Sanna, G., M. L. Bertolaccini and A. Mathieu (2003). "Central nervous system lupus: a clinical approach to therapy." Lupus **12**(12): 935-942.

Schluesener, H. J., R. A. Sobel, C. Linington and H. L. Weiner (1987). "A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease." J Immunol **139**(12): 4016-4021.

Schultze, M. (2001). "PCR. M. J. McPherson and S. G. Møller. BIOS Scientific Publishers, Oxford. 2000. pp. 288. Price £22.95, paperback. ISBN 1 85996 017 0." Heredity **86**(4): 513-514.

Shampo, M. A. and R. A. Kyle (2002). "Kary B. Mullis--Nobel Laureate for procedure to replicate DNA." Mayo Clin Proc **77**(7): 606.

Sibbitt, W. L., Jr., W. M. Brooks, M. Kornfeld, B. L. Hart, A. D. Bankhurst and C. A. Roldan (2010). "Magnetic resonance imaging and brain histopathology in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus." Semin Arthritis Rheum **40**(1): 32-52.

Sigmon, J. and L. L. Larcom (1996). "The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis." Electrophoresis **17**(10): 1524-1527.

Skorstad, G., A. L. Hestvik, P. Torjesen, K. Alvik, F. Vartdal, B. Vandvik and T. Holmoy (2008). "GAD65 IgG autoantibodies in stiff person syndrome: clonality, avidity and persistence." Eur J Neurol **15**(9): 973-980.

Solimena, M., M. H. Butler and P. De Camilli (1994). "GAD, diabetes, and Stiff-Man syndrome: some progress and more questions." J Endocrinol Invest **17**(7): 509-520.

Solimena, M. and P. De Camilli (1991). "Autoimmunity to glutamic acid decarboxylase (GAD) in Stiff-Man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus." Trends Neurosci **14**(10): 452-457.

Solimena, M., F. Folli, S. Denis-Donini, G. C. Comi, G. Pozza, P. De Camilli and A. M. Vicari (1988). "Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy, and type I diabetes mellitus." N Engl J Med **318**(16): 1012-1020.

Sondermann, P., R. Huber, V. Oosthuizen and U. Jacob (2000). "The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex." Nature **406**(6793): 267-273.

Song, Y. W., C. W. Han, S. W. Kang, H. J. Baek, E. B. Lee, C. H. Shin, B. H. Hahn and B. P. Tsao (1998). "Abnormal distribution of Fc gamma receptor type IIa polymorphisms in Korean patients with systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **41**(3): 421-426.

Stork, A. C., N. C. Notermans, L. H. van den Berg, R. D. Schellevis, J. M. Niermeijer, M. Nederend, J. H. Leusen and W. L. van der Pol (2014). "Fc gamma receptor IIIA genotype is associated with rituximab response in antimyelin-associated glycoprotein neuropathy." J Neurol Neurosurg Psychiatry **85**(8): 918-920.

Sugita, N., K. Yamamoto, T. Kobayashi, W. Van Der Pol, T. Horigome, H. Yoshie, J. G. Van De Winkel and K. Hara (1999). "Relevance of Fc gamma RIIIA-158V-F polymorphism to recurrence of adult periodontitis in Japanese patients." Clin Exp Immunol **117**(2): 350-354.

Tussiwand, R., N. Bosco, R. Ceredig and A. G. Rolink (2009). "Tolerance checkpoints in B-cell development: Johnny B good." Eur J Immunol **39**(9): 2317-2324.

Tzioufas, A. G., N. G. Tzortzakis, E. Panou-Pomonis, K. A. Boki, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos and H. M. Moutsopoulos (2000). "The clinical relevance of antibodies to ribosomal-P common epitope in two targeted systemic lupus erythematosus populations: a large cohort of consecutive patients and patients with active central nervous system disease." Ann Rheum Dis **59**(2): 99-104.

van der Pol, W. and J. G. van de Winkel (1998). "IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease." Immunogenetics **48**(3): 222-232.

van Sorge, N. M., W. L. van der Pol and J. G. van de Winkel (2003). "Fc gamma R polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy." Tissue Antigens **61**(3): 189-202.

Verkman, A. S., P.-W. Phuan, N. Asavapanumas and L. Tradtrantip (2013). "Biology of AQP4 and anti-AQP4 antibody: therapeutic implications." Brain pathology (Zurich, Switzerland) **23**(6): 684-695.

Vermeij, F. H., P. A. van Doorn and H. F. Busch (1996). "Improvement of stiff-man syndrome with vigabatrin." Lancet **348**(9027): 612.

Vicari, A. M., F. Folli, G. Pozza, G. C. Comi, M. Comola, N. Canal, C. Besana, A. Borri, M. Tresoldi, M. Solimena, P. DeCamilli and et al. (1989). "Plasmapheresis in the treatment of stiff-man syndrome." N Engl J Med **320**(22): 1499.

Vincent, A., C. G. Bien, S. R. Irani and P. Waters (2011). "Autoantibodies associated with diseases of the CNS: new developments and future challenges." Lancet Neurol **10**(8): 759-772.

W Arber, a. and S. Linn (1969). "DNA Modification and Restriction." Annual Review of Biochemistry **38**(1): 467-500.

Wandinger, K. P., M. Stangel, T. Witte, P. Venables, P. Charles, S. Jarius, B. Wildemann, C. Probst, C. Iking-Konert and M. Schneider (2010). "Autoantibodies against aquaporin-4 in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum **62**(4): 1198-1200.

Warmerdam, P. A., J. G. van de Winkel, A. Vlug, N. A. Westerdaal and P. J. Capel (1991). "A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding." The Journal of Immunology **147**(4): 1338-1343.

Weinstein, E., E. Peeva, C. Putterman and B. Diamond (2004). "B-cell biology." Rheum Dis Clin North Am **30**(1): 159-174.

Westblom, U. (1977). "Stiff-man syndrome and clonazepam." Jama **237**(18): 1930.

Wingerchuk, D. M., V. A. Lennon, C. F. Lucchinetti, S. J. Pittock and B. G. Weinshenker (2007). "The spectrum of neuromyelitis optica." Lancet Neurol **6**(9): 805-815.

Wu, J., J. C. Edberg, P. B. Redecha, V. Bansal, P. M. Guyre, K. Coleman, J. E. Salmon and R. P. Kimberly (1997). "A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease." J Clin Invest **100**(5): 1059-1070.

Yoshio, T., K. Onda, H. Nara and S. Minota (2006). "Association of IgG anti-NR2 glutamate receptor antibodies in cerebrospinal fluid with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **54**(2): 675-678.

Zaccagni, H., J. Fried, J. Cornell, P. Padilla and R. L. Brey (2004). "Soluble adhesion molecule levels, neuropsychiatric lupus and lupus-related damage." Front Biosci **9**: 1654-1659.

Zandman-Goddard, G., J. Chapman and Y. Shoenfeld (2007). "Autoantibodies involved in neuropsychiatric SLE and antiphospholipid syndrome." Semin Arthritis Rheum **36**(5): 297-315.