



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
<<ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ>>

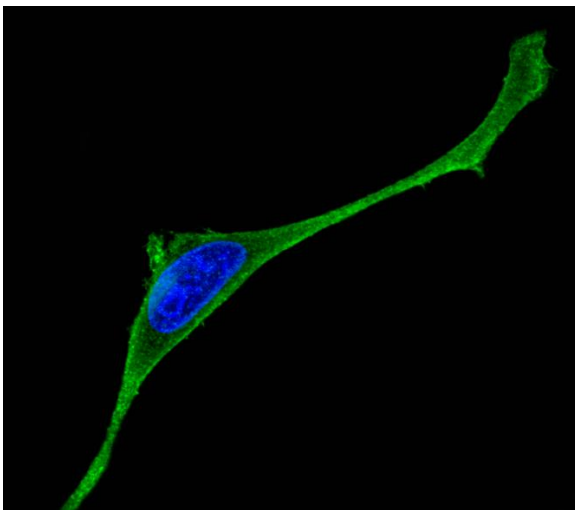


ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
INSTITUT PASTEUR HELLENIQUE
Εργαστήριο Ανοσολογίας
Laboratory of Immunology

Διπλωματική Εργασία:

**<<Ανθρώπινες μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες με
ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα-
Βιολογική ενδοκυττάρια δράση>>**

**<<Human monoclonal immunoglobulins with the
capacity of penetration into living cells- biological
intracellular function>>**



Φεβρουάριος 2018

**ΣΑΡΡΗΓΕΩΡΓΙΟΥ
ΙΩΑΝΝΗΣ**
(225604)



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
<<ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ>>

Διπλωματική Εργασία

**<<Ανθρώπινες μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες με
ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα-
Βιολογική ενδοκυττάρια δράση>>**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Δρ. Γαϊτανάκη Αικατερίνη, Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων (Μέλος ΔΕΠ)

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Υπευθύνουσα καθηγήτρια:

Δρ. Λυμπέρη Πηνή, Ερευνήτρια Α', Διευθύντρια Ερευνών

Εργαστήριο Ανοσολογίας, Τμήμα Ανοσολογίας, Ε.Ι.Π.

Δρ. Παπαζαφείρη Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Φεβρουάριος 2018

Ευχαριστίες

Ίσως το σημαντικότερο απόκτημα από την εμπειρία μου κατά την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας στο Παστέρ, είναι η διαμόρφωση ενός μέρους του χαρακτήρα μου, ως απόρροια των διαπροσωπικών σχέσεων που ανέπτυξα με τους συναδέλφους του Ιδρύματος. Η παρατήρηση και η αποκωδικοποίηση της σύστασης του συστήματος που καλούμαστε οι νέοι να ενταχθούμε και να παράγουμε έργο, αποτελεί μία πρωταρχική βάση για την κατανόηση και την τοποθέτηση του καθενός μέσα στο χώρο και στο χρόνο. Οι απαραίτητες προϋποθέσεις για την προαγωγή αυτών των διεργασιών ζύμωσης του χαρακτήρα κάθε νέου, αποτελούν η ανταλλαγή ιδεών, η συνδιαμόρφωση, η αλληλοστήριξη και ο σεβασμός μεταξύ των συναδέλφων του χώρου. Τα ιδεώδη αυτά, ενσωματώνονται σε κάθε επίπεδο της καθημερινότητας, τόσο σε θέματα που αφορούν αμιγώς την ερευνητική μας εργασία όσο και σε θέματα προσωπικής φύσεως που αναμφίβολα επηρεάζουν και όλα τα υπόλοιπα. Η ανιδιοτέλεια που εισέπραξα, κυρίως από τους νεότερους συναδέλφους στο χώρο και η δίψα για την ανταλλαγή ιδεών στα ερευνητικά μας ενδιαφέροντα καθώς και της ερευνητικής μας πορείας στο χώρο, συντέλεσαν στην απομυθοποίηση πολλών κατεστημένων σκέψεων που λανθασμένα είχαν επιβληθεί ως ‘καθώς πρέπει’ παραδοχές. Ως νεότεροι στο χώρο, καλούμαστε να ενσωματωθούμε σε ένα σύστημα που συχνά έρχεται σε αντίθεση με τα ιδεώδη και την ανιδιοτέλεια, ενώ παράλληλα, φαίνεται πως σε αρκετές περιπτώσεις, η ίδια η ενσωμάτωση οδηγεί σε έναν αποκλίνων φαινότυπο από αυτά. Όλοι μιλάνε για αυτό ως ωμή πραγματικότητα ή ως ο ανταγωνιστικός κόσμος που ζούμε ή πιο απλοϊκά, έτσι είναι τα πράγματα. Όταν όμως συναντάς ανθρώπους, σκεπτόμενους, με γνώσεις και εμπειρίες στο χώρο, οι οποίοι αγωνίζονται να διαμορφώσουν μία διαφορετική πραγματικότητα και μία προηγμένη αντίληψη για ένα πιο γόνιμο σύστημα έρευνας, παιδείας και κοινωνίας γενικότερα, το πιο εύλογο πράγμα που έχεις να κάνεις είναι να αναθεωρήσεις όσα έχουν τεθεί ως δεδομένα και κανόνες από το ήδη υπάρχον σύστημα. Η μεγαλύτερη παραδοχή και το απόλυτο γεγονός, είναι πως κάθε σύστημα και κάθε δομή ως υποσύνολό του, βασίζεται εξ ολοκλήρου στις μονάδες οι οποίες το απαρτίζουν και καθώς η μία γενεά διαδέχεται την άλλη, σε κάποιο χρόνο εμείς που τώρα είμαστε νέοι, θα έχουμε στα χέρια μας τις δυνατότητες και τις ευκαιρίες να συμβάλουμε καθοριστικά στην αναδιαμόρφωσή του. Ωστόσο, ο τρόπος και ο σκοπός του καθενός βασίζεται στην τοποθέτησή του μέσα στο χώρο και στο χρόνο ως μία αέναη διαδικασία την οποία ορίζει σε καθημερινή βάση. Με αυτό το σκεπτικό, θέλω να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν για ακόμα μία φορά στη ζωή μου να τοποθετηθώ εκεί που πιστεύω πως βρίσκεται η ουσία, παραμένοντας ανιδιοτελής και ανοιχτός σε θέματα συνδιαμόρφωσης και αποδοχής του διαφορετικού. Είναι αυτό που θεωρώ σημαντικότερο, πως η κατάκτηση των αξιών και της μεγάλης ιδέας δεν έρχεται ως επιφώιση στο μυαλό του καθενός, αλλά αντιθέτως έρχεται μέσω της συνύπαρξης και της καθημερινής τριβής, της κοινής ερμηνείας και της αποδοχής αυτής καθώς και της ανεύρεσης λύσεων επί των θεμάτων που προκύπτουν. Ως επιτακτική ανάγκη θα ήθελα να ευχαριστήσω επ’ ονομαστικά τους ανθρώπους που συνεισέφεραν στις σκέψεις μου αυτές. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα. Γαϊτανάκη η οποία, στάθηκε δίπλα μου σε μία δύσκολη φάση κατά την διάρκεια της διατριβής μου και ως εκπαιδευτικός, ήταν εκείνη που μου υπέδειξε ορθά και με ρεαλισμό τις διεξόδους και τις λύσεις καθώς και τις ευθύνες που μου αναλογούσαν σε κάθε περίπτωση. Την υπεύθυνη καθηγήτριά μου κα. Λυμπέρη η οποία, με δέχθηκε στο εργαστήριό της, μετά από μεγάλη μου επιμονή, παρ’ όλες τις δυσκολίες των καιρών και με την οποία είχαμε μια αντάξια των συνθηκών συνεργασία. Στιγμές γεμάτες, καλές και δύσκολες, ευχάριστες και δυσάρεστες, όμως όλες κατέληγαν στην ανεύρεση των λύσεων για κάθε ένα από τα θέματα που προκύπταν. Η κατάρτηση της γνώσης επί του αντικειμένου της φυσικής αυτοανοσίας που μου προσέφερε, υπήρξε ανεκτίμητης αξίας για μένα.

Επίσης, η επαφή που υπήρξε με τον κ. Αβραμέα, έναν διακεκριμένο άνθρωπο στο χώρο, αποτέλεσε ένα ξεχωριστό γεγονός για το οποίο νιώθω τυχερός και ευγνώμον. Τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, την κα. Στιβαρού στη θέση της post-doc, η οποία μου μεταλαμπάδευσε τις γνώσεις της στην κυτταροκαλιέργεια, σε πολλά πειραματικά πρωτόκολλα, καθώς και στους βασικούς εργαστηριακούς χειρισμούς, την κα. Σοπάκη (PhD) η οποία ήταν πάντα έτοιμη και πρόθυμη να προσφέρει τόσο τις γνώσεις της όσο και την βοήθειά της και τον κ. Χαλά του οποίου η παρουσία και η βοήθεια στο εργαστήριο, ξεπέρασε τις προσδοκίες μου. Η παραπάνω ομάδα που δημιουργήσαμε κατά την διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο ήταν ένας σπάνιος, κατά κοινή παραδοχή, συνδυασμός ανθρώπων που οδήγησε σε μία ουσιαστική και εποικοδομητική συνεργασία. Παράλληλα, οι φιλίες που αναπτύχθηκαν μεταξύ μας και τα κοινά βιώματα που μας ενώσανε, είναι αυτά που σηματοδοτούν μία υγιή συμβίωση και εύχομαι να παραμείνουν άφθαρτα με το πέρασ του χρόνου. Τέλος, από τα μέλη του εργαστηρίου, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μπαλάφα ο οποίος, υπήρξε μια εξαιρετική παρέα τα πρωινά της εργασιακής μας πραγματικότητας, με ατελείωτες συζητήσεις και παραθέσεις απόψεων επί των καιρίων θεμάτων τόσο του εργασιακού όσο και του ευρύτερου κοινωνικού και προσωπικού περιβάλλοντος. Εκτός εργαστηρίου, θέλω να ευχαριστήσω την κα. Μπολέτη της οποίας η παρουσία με κέρδισε από την πρώτη στιγμή και η ίδια με βοήθησε τόσο σε πρακτικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Την κα. Αθανασίου της οποίας η προθυμία της να με βοηθήσει αποτελεί υπόδειγμα επιστήμονα για μένα, προσφέροντας μου τόσο τις γνώσεις της στην κυτταρομετρία ροής όσο και τις απαραίτητες υποδείξεις για τα πειράματά μου. Την αξιαγάπητη Παρή Κουτσουδάκη, η οποία με βοήθησε σε όποια δυσκολία είχα στο συνεσιακό μικροσκόπιο καθώς και μου πρόσφερε απαραίτητες γνώσεις πάνω σε αυτό. Τον Λευτέρη από την μοριακή που περάσαμε μαζί, μόνοι, όλο το καλοκαίρι στο Παστέρ, όταν οι άλλοι ήταν διακοπές εμείς είμασταν εκεί να διεκδικούμε τα όνειρά μας δουλεύοντας από το πρωί μέχρι το βράδυ με πολύ καφέ, τσιγάρο και συζητήσεις στα ενδιαμέσα διαλείμματά μας. Την Αθηνά από το γεωπονικό που έρχεται ως εξωτερική συνεργάτιδα στο τμήμα της μοριακής στο Παστέρ, η οποία με πλήρη ανιδιοτέλεια με βοήθησε ξανά και ξανά στα πειράματά μου και η ίδια βίωσε το δικό μου άγχος ως δικό της ενώ παράλληλα είχαμε πολλές στιγμές γέλιου και συζητήσεων. Τον Πέτρο, τον Μάριο και τον Κώστα από το ίδιο εργαστήριο που υπήρξαν μία ευχάριστη νότα στη καθημερινότητα, οι οποίοι και με βοήθησαν σε πρακτικά θέματα, αλλά και οι συζητήσεις μας πάνω στα ερευνητικά μας ενδιαφέροντα πολλές φορές ήταν υψηλού επιπέδου προσφέροντάς μου άφθονη τροφή για σκέψη. Τον Νίκο Κοκκοράκη που και αυτός κάθε φορά που του ζήτησα το στιδήποτε υπήρξε πρόθυμος να βοηθήσει και να συζητήσει μαζί μου. Τον Αλέξη και τον Πέτρο που παρόλης της κατεξοχήν τυπικής σχέσης που είχαμε φάνηκαν αξιόλογοι άνθρωποι και πρόθυμοι να με συμβουλέψουν όταν τους το ζήτησα. Τα υπόλοιπα κορίτσια από την νευροβιολογία που με το χαμόγελο και την ευχάριστη παρουσία τους υπήρξαν καθημερινά μία όαση θετικής διάθεσης. Τις κυρίες στην κουζίνα των οποίων η παρουσία και η σχέση μας εξελίχθηκε σε μία όμορφη καθημερινή συναναστροφή. Τα παιδιά από το τμήμα της βιοπληροφορικής που συχνά συναντούσα και συζητάγαμε για την επιστημονική επικαιρότητα καθώς και τα παιδιά από την τεχνική στήριξη που πάντα ήταν άψογοι στο να διορθώνουν όποια βλάβη χρειαζόταν. Την συμφοιτήτριά μου Μαρία και τον συμφοιτητή μου Νίκο που μαζί καταφέραμε να διεκπεραιώσουμε την διατριβή μας στο Παστέρ, βοηθώντας ο ένας τον άλλο και νοιάζοντας τα προβλήματα και τις δυσκολίες του. Τέλος θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένειά μου και όλους τους υπόλοιπους ανθρώπους που ήρθα σε επαφή στον εργασιακό χώρο και που τελικά, ο καθένας από αυτούς προσέφερε ένα λιθαράκι ακόμα στην ομαλή διεκπεραίωση των καθημερινών στόχων. Ένα πιο ιδιαίτερο ευχαριστώ θέλω να αποδώσω σε όλους τους ανθρώπους που γνώρισα και αποτελούν παράδειγμα προς αποφυγή για μένα. Πιθανά, οι σκέψεις και η ανάγκη που συχνά δημιουργείται για ένα καλύτερο αύριο να ήταν πιο στείρα με την απουσία τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	3
Περιεχόμενα.....	5
Συντομογραφίες.....	8
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1. Φυσική Αυτοανοσία (Natural Immunity) – Φυσικά Αντισώματα (Naturally occurring Antibodies- NAbs).....	14
1.1. Φυσική Αυτοανοσία και η ανακάλυψη της ύπαρξης των Φυσικών Αντισωμάτων (NAbs).....	14
1.2. Τα Φυσικά Αντισώματα (NAbs).....	17
1.3. Τα χαρακτηριστικά των NAbs.....	18
➤ Κύτταρα που παράγουν NAbs.....	18
○ Τα B-1 λεμφοκύτταρα του ποντικού.....	18
○ Τα B-1 λεμφοκύτταρα του ανθρώπου.....	22
➤ Τα NAbs κωδικοποιούνται από γονίδιο της βλαστικής σειράς.....	22
➤ Πολυδραστικότητα ή πολυειδικότητα των NAbs.....	23
○ Αλληλουχία μεταβλητής περιοχής.....	24
○ Η τρισδιάστατη δομή της μεταβλητής περιοχής.....	26
○ Αντιγόνα- στόχοι.....	27
1.4. Βιολογικός ρόλος των NAbs.....	28
1.5. NAbs και παθολογικές καταστάσεις.....	34
1.6. Εφαρμογές στην βιοϊατρική.....	35
➤ Ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη.....	35
2. Κυτταροδιεισδυτικά Αντισώματα (Cell Penetrating Antibodies- CPAbs).....	38
2.1. Χαρακτηριστικά των CPAbs.....	39
➤ Ενδοκυττάριος εντοπισμός και μηχανισμοί διείσδυσης των CPAbs.....	40
➤ Μηχανισμοί διείσδυσης των CPAbs.....	40
○ Ενεργοεξαρτώμενη κυτταρική διείσδυση.....	41
○ Ενεργο- ανεξάρτητη κυτταρική διείσδυση.....	42

2.2. Βιολογικές δράσεις των CPAbs.....	43
➤ Επαγωγή απόπτωσης από τα CPAbs.....	43
➤ Ρύθμιση της έκφρασης κυτταροκινών από τα CPAbs.....	45
2.3. Εφαρμογές των CPAbs στην βιοϊατρική.....	45
3. Τα φυσικά Αντισώματα στον καρκίνο.....	46
3.1. Οι αντιγονικοί στόχοι των NAbs στα καρκινικά κύτταρα.....	47
3.2. Η αντικαρκινική δράση των NAbs.....	50
3.3. Τα NAbs στην θεραπεία του καρκίνου.....	52
II. ΣΚΟΠΟΣ.....	53
III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	54
1. Κυτταροκαλλιέργεια.....	55
1.1. Κυτταρικές σειρές.....	55
1.2. Βασικοί χειρισμοί.....	55
➤ Παρασκευή διαλύματος πλήρους θρεπτικού υλικού.....	55
➤ Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1x pH7.4.....	56
➤ Διαδικασία Ανακαλλιέργειας κυτταρων από stock φυλασσόμενων κυττάρων σε υγρό άζωτο (-170 °C).....	56
➤ Αλλαγή θρεπτικού υλικού.....	57
➤ Ανακαλλιέργεια (SPLIT) κυττάρων καλλιέργειας.....	58
➤ Υπολογισμός αριθμού (συγκέντρωσης) κυττάρων καλλιέργειας.....	59
➤ Αποθήκευση κυττάρων.....	60
2. Απομόνωση Μονοκλωνικών Αντισωμάτων.....	62
2.1. Απομόνωση mIgG Αντισωμάτων με χρωματογραφία συγγένειας.....	62
➤ Συμπύκνωση των δειγμάτων.....	64
➤ Διαπύδηση.....	64
➤ Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των καθαρισμένων IgG.....	65
2.2. Απομόνωση Μονοκλωνικών IgM Αντισωμάτων.....	66
3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμύδης – SDS-PAGE.....	67
4. Ισοηλεκτρική εστίαση (IF) σε πήκτωμα αγαρόζης.....	70

5. Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA).....	72
6. Τεχνικές ανοσοφθορισμού.....	73
6.1. Ανοσοκυτταροχημική Τεχνική - Έμμεσος Ανοσοφθορισμός in vitro.....	74
6.2. Δοκιμασία διείσδυσης των Abs σε ζώντα κύτταρα.....	77
7. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων (DNA) από κύτταρα καλλιέργειας...81	
8. Δοκιμασία Υδρόλυσης νουκλεϊκών οξέων.....	82
9. Έλεγχος επαγωγής της απόπτωσης και κυτταροτοξικότητας με κυτταρομετρία ροής (FACS).....	82
10. Στατιστική ανάλυση.....	84
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	85
1. Μελέτη Ανθρώπινων Μονοκλωνικών IgG με χαρακτηριστικά των NAb.....	86
1.1. Απομόνωση ανθρώπινων mIgGs.....	86
➤ Προσδιορισμός της καθαρότητας των mIgGs.....	87
➤ Προσδιορισμός της μονοκλωνικότητας των mIgGs.....	88
1.2. Έμμεσος Ανοσοφθορισμός.....	91
1.3. Έλεγχος κυτταρικής διείσδυσης των mIgGs.....	92
1.4. Έλεγχος της διείσδυσης των mIgGs στους 4 ⁰ C.....	95
1.5. Έλεγχος της υδρολυτικής ικανότητας των mIgGs.....	98
➤ Δοκιμασία υδρόλυσης γονιδιωματικού DNA.....	98
➤ Δοκιμασία υδρόλυσης πλασμιδιακού DNA.....	99
1.6. Έλεγχος επαγωγής της απόπτωσης και κυτταροτοξικότητας από τα mIgGs.....	99
2. Μελέτη Ανθρώπινων Μονοκλωνικών IgM (mIgMs) με χαρακτηριστικά των NAb.....	102
2.1. Απομόνωση ανθρώπινων mIgMs.....	102
➤ Προσδιορισμός της καθαρότητας των mIgMs.....	103
2.2. Έλεγχος κυτταρικής διείσδυσης των mIgMs.....	103
2.3. Έλεγχος υδρολυτικής ικανότητας των mIgMs.....	106

2.4. Έλεγχος επαγωγής της απόπτωσης και κυτταροτοξικότητας από τα mIgMs.....	106
3. Συνοψίζοντας τις ιδιότητες των mAbs της μελέτης.....	109
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	110
➤ Απομόνωση των mAbs.....	112
➤ Κυτταροδιεισδυτική ικανότητα.....	113
➤ Επαγωγή απόπτωσης και κυτταροτοξικότητας.....	114
➤ Υδρολυτική δραστικότητα.....	115
➤ Μελλοντικές κατευθύνσεις.....	116
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	118
VII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ABSTRACT.....	135

Συντομογραφίες

aAbs: Αυτοαντισώματα (autoantibodies)

Ab: Αντίσωμα (Antibody)

Abzs: Καταλυτικά Αντισώματα (Abzymes)

Acr/Bis: Ακρυλαμίδη/ δις- ακρυλαμίδη

APS: Υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium persulfate)

ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine triphosphate)

BAFF: Παράγοντας ενεργοποίησης Β κυττάρων (B cell Activation Factor)

BCR: Υποδοχέας Β κυττάρων (B cell Receptor)

Bregs: Β- ρυθιστικά κύτταρα (B regulatory cells)

BSA: Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin)

C: Παράγοντας C του συμπληρώματος

CD: Σύμπλεγμα διαφοροποίησης (Cluster of differentiation)

CDR: Συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές (Complementary Determining Regions)

CLP: Κοινός Λεμφοειδής πρόγονοι (Common Lymphoid Progenitors)

CPAbs: Κυτταρο- διεισδυτικά αντισώματα (Cell Penetrating Antibodies)

CPPs: Κυτταροδιεισδυτικά πεπτίδια (Cell Penetrating Peptides)

CXCL: Χημειοτακτικός συνδέτης

D: Τμήματα ποικιλίας (Diversity segments)

DC: Δενδριτικό κύτταρο (Dendritic cell)

DMEM: Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ζωικών κυττάρων

DMSO: Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide)

DNA: Δεσοξυ- ριβονουκλεϊκό οξύ (Deoxyribo-Nucleic Acid)

dsDNA: Διπλής έλικας DNA (Double stranded DNA)

ECM: Εξωκυττάρια μήτρα (Extra Cellular Matrix)

EDTA: Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EthyleneDiamine Tetraacetic Acid)

ELISA: Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (Enzyme-linked Immunosorbent assay)

F(ab)': Αντιγονοδεσμευτική περιοχή

FACS: Διαλογή κυττάρων με ενεργοποίηση φθορισμού (Fluorescence-activated cell sorting)

Fas: Μεμβρανικός υποδοχέας θανάτου (Fas cell surface death receptor)

FBS: Ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum)

Fc: Σταθερή περιοχή ανοσοσφαιρινών

Fca/mR: Υποδοχέας Fc των IgA και IgM (Fc fragment of IgA and IgM, receptor)

FcγR: Υποδοχέας των ανοσοσφαιρινών τάξης G (Fc fragment of IgG, receptor)

FITCH: Φθορίζουσα ισοθειοκυανίνη (Fluorescein isothiocyanate)

FO: Λεμφαδένες (Follicular)

FR: Περιοχές πλαισίου (Framework)

GALT: Λεμφικοί ιστοί που σχετίζονται με το έντερο (GUT-associated lymphoid tissues)

GTP: Τριφωσφορική γουανιδίνη (Guanosine triphosphate)

HIV: Ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (human immunodeficiency virus)

HRP: Υπεροξειδάση (Horseradish peroxidase)

HSCs: Αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (Hemopoietic Stem Cells)

Hsp: Πρωτείνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins)

IEF: Ισοηλεκτρική εστίαση (Isoelectric Focusing)

Ig: Ανοσοσφαιρίνη (Immunoglobulin)

IL: Ιντερλευκίνη (interleukin)

INF: Ιντερφερόνη (Interferon)

IVIG: Ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη (Intravenous immunoglobulin)

J: Τμήματα σύνδεσης (Joining segments)

Kd: Σταθερά διάστασης

LC: Ελαφριά αλυσίδα ανοσοσφαιρινών (Light chain)

LDL: Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoprotein)

M.W.: Μοριακό Βάρος (Molecular Weight)

mAb: Μονοκλωνικό Αντίσωμα (monoclonal antibody)

MBA: N-N μεθυλενο- δις- ακρυλαμίδη

MBL: Λεκτίνη συνδεόμενη με μανόζη (Mannose-Binding Lectin)

MGUS: Μονοκλωνική γαμμαπάθεια απροσδιόριστης σημασίας

MHC: Μείζον σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex)

MMPs: Μεταλλοπρωτεϊνάσες της μήτρας (Matrix Metalloproteinases)

MZ: Οριακή ζώνη του σπλήνα (marginal zone)

MΦ: Μακροφάγο (Macrophage)

NAbs: Φυσικά Αντισώματα (Naturally occurring Antibodies)

NF-κB: Πυρηνικός παράγοντας κB (nuclear factor- κB)

NK: Κύτταρα Φυσικοί φονιάδες (Natural Killer cells)

NLS: Σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal)

OD: Οπτική Πυκνότητα (Optimal Density)

P21/WAF: Πρωτεΐνη του κυτταρικού κύκλου εξαρτώμενη από κυκλίνη (cell cycle arrest protein)

PBS: Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών (Phosphatate Buffered Saline)

PC: Φωσφατυδιλοχολίνη (Phosfatidilocholine)

PCDs: Πλασματοκυτταρικές Δυσκρασίες (Plasma Cell Dyscrasias)

PE/ST: Πενικιλίνη/ στρεπταβιδίνη (Penicillin/ Streptavidin)

PI: Ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide)

PRRs: Υποδοχείς αναγνώρισης παθογόνων (Pathogen Recognition Receptors)

PS: Φωσφατιδυλοσερίνη (Phosphatidyl serine)

RNA: Ριβονουκλεϊκό οξύ (RiboNucleic Acid)

RNP: Ριβονουκλεοπρωτεΐνη (RiboNucleoProtein)

ROS: Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species)

RT: Θερμοκρασία δωματίου (Room Temperature)

SDS: Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο (Sodium dodecyl sulfate)

SEL: Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (Systemic Lupus Erythematosus)

slgA: Εκκρινόμενη Ανοσοσφαιρίνη Α (Secreted Immunoglobulin A)

ssDNA: Μονής έλικας DNA (single stranded DNA)

TAAs: Όγκο- Αντιγόνα (Tumor Associated Antigens)

TACAs: Όγκο- υδατανθρακικά αντιγόνα (Tumor Associated Carbohydrate Antigens)

TBE: Tris/Βορικό οξύ/EDTA

TCR: Υποδοχέας Τα λεμφοκυττάρων (T cell Receptor)

TEMED: N,N,N,N- τετραμεθυλο- 1,2- διαμινο- αιθάνιο

TNF: Παράγοντας νέκρωσης όγκων (Tumour Necrosis Factor)

TNP: Τρινιτροφαινόλη (Trinitrophenol)

Tris: 2-άμινο-2-(υδροξυμεθυλ)-1,3-προπανιδιόλη

TSLP: Λιποπρωτεΐνη του στρώματος του θύμου (Thymic Stromal Lipoprotein)

V: Μεταβλητά τμήματα (Variable segments)

VC: Βαριά αλυσίδα ανοσοσφαιρινών (Heavy chain)

VEGF: Αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας ανάπτυξης (Vascular endothelial growth factor)

VSV: Ο ιός της φυσαλιδώδους στοματίτιδας (Vesicular stomatitis virus)

MW: Μακροσφαιριναμία Waldenström's (Waldenström's macroglobulinemia)

MNΣΙ: Μικτή Νόσος Συνδετικού Ιστού (Mixed Connective Tissue Disease)

ΠΜ: Πολλαπλό Μυέλωμα (Multiple Myeloma)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

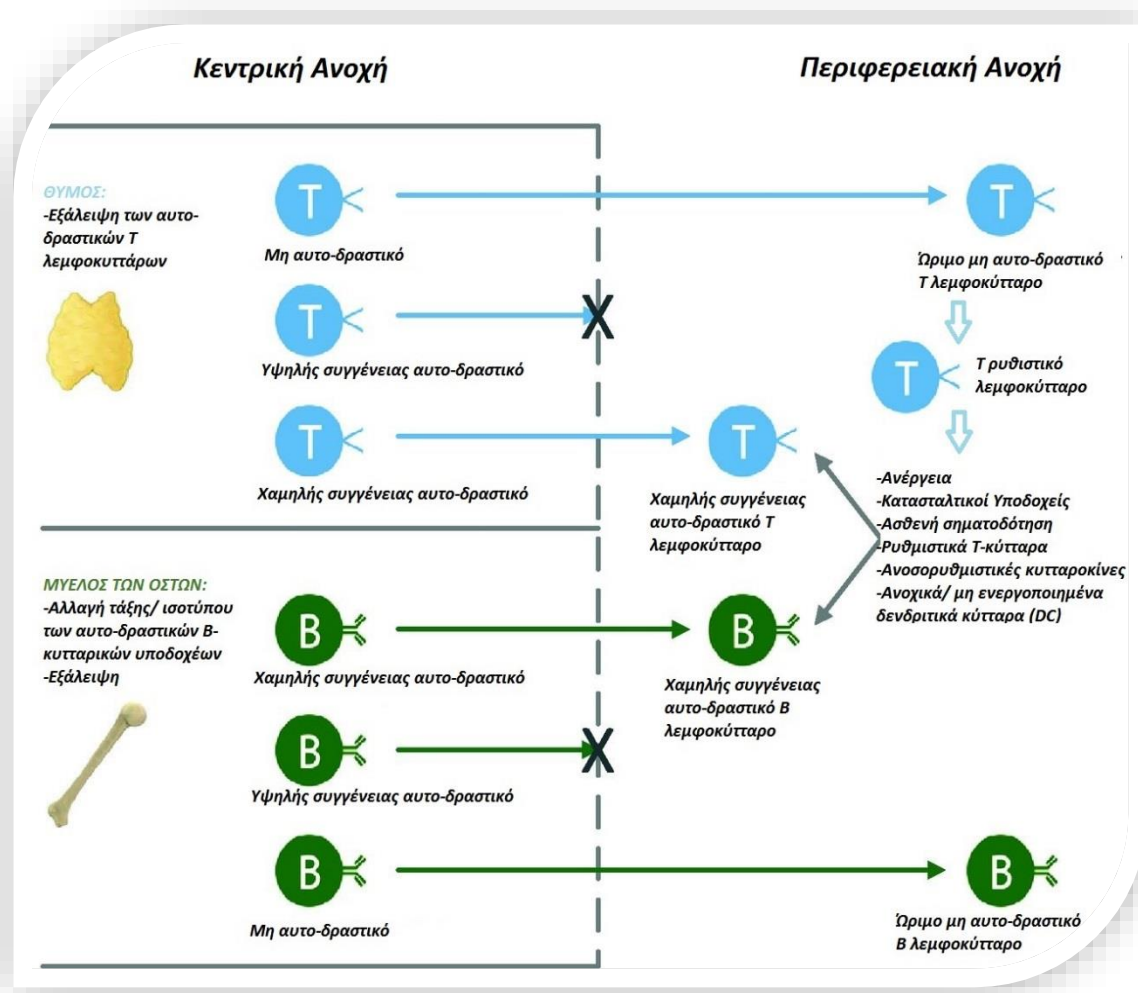
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Φυσική Αυτοανοσία (Natural Immunity) – Φυσικά Αντισώματα (Naturally occurring Antibodies- NABs)

1.1. Φυσική Αυτοανοσία και η ανακάλυψη της ύπαρξης των Φυσικών Αντισωμάτων (NABs)

Η αναγνώριση των συστατικών του οργανισμού από τον ίδιο τον οργανισμό, δηλαδή η αναγνώριση του εαυτού, χωρίς την επαγωγή ή ύπαρξη παθολογικής κατάστασης, αποτελεί ένα φυσιολογικό φαινόμενο, αυτό της φυσικής αυτοανοσίας (Natural Immunity). Ο όρος αυτός καθιερώθηκε τις τελευταίες δεκαετίες ύστερα από πολυάριθμες μελέτες που ανέδειξαν το θεμέλιο ρόλο της αυτό-αναγνώρισης από εξειδικευμένα κύτταρα και μόρια του οργανισμού συμπεριλαμβανομένων των Φυσικών Αντισωμάτων (NABs) προερχόμενα από αυτό-δραστικά Β λεμφοκύτταρα, καθώς και της ύπαρξης αυτό-δραστικών Τ λεμφοκυττάρων με πολυδραστικούς υποδοχείς TCR (T-cell Receptor) [1, 2, 3]. Η ύπαρξη αυτών περιγράφεται σε φυσιολογικές συνθήκες, υγιείς οργανισμούς, γεγονός που διαχωρίζει το φαινόμενο της φυσικής αυτοανοσίας από την παθολογική αυτοανοσία. Εύλογα όμως γεννιέται το ερώτημα για το ποιοι είναι οι μηχανισμοί και τα μόρια τελεστές της ρύθμισης και διατήρησης της ισορροπίας μεταξύ των δύο καταστάσεων, αυτής της φυσιολογικής αυτοανοσίας από την εκτενώς χαρακτηρισμένη, παθολογική αυτοανοσία.

Οι μέχρι πρότινος αποδεκτές θεωρίες της Ανοσολογίας, όπως είναι η εκπαίδευση του οργανισμού να μην αναγνωρίζει εαυτά συστατικά και αν αυτό συμβεί θεωρείτο παθολογία (Burnet, 1974), ήρθαν σε σύγκρουση με τον νεότερο όρο της φυσικής αυτοανοσίας η οποία, τέθηκε αρχικά υπό έντονες αμφισβητήσεις. Οι θεωρίες αυτές, επέβαλαν την απομάκρυνση και τη καταστροφή αυτο-δραστικών λεμφοκυττάρων μέσω διαφόρων μηχανισμών ανοχής του ανοσοποιητικού συστήματος (self-tolerance). Οι μηχανισμοί αυτοί περιλάμβαναν α) τους κεντρικούς μηχανισμούς της αρνητικής επιλογής μέσω αποπτωτικού θανάτου των αυτο-δραστικών Β και Τ λεμφοκυττάρων στον θύμο αδένα ή στο μυελό των οστών [4, 5] και β) τους περιφερειακούς μηχανισμούς της κλωνικής ανέργειας, άγνοιας και καταστολής των αυτο-δραστικών λεμφοκυττάρων της κυκλοφορίας μέσω εξάλειψής τους στους λεμφαδένες της περιφέρειας [6]. Η ανέργεια των περιφερικών αυτο-δραστικών Β λεμφοκυττάρων εξασφαλίζεται μέσω της απουσίας του συνδιεγερτικού σήματος από τα CD4+ Τ λεμφοκύτταρα. Τα ανεργικά Β-κύτταρα αναγνωρίζουν και δεσμεύουν αντιγόνα αλλά, δεν είναι σε θέση να μεταβιβάσουν το σήμα ενδοκυττάρια. Μερικά αυτο-δραστικά προ-Β κύτταρα είναι ικανά να διαφύγουν από τους μηχανισμούς της ανοχής αυξάνοντας την πιθανότητα εμφάνισης αυτοάνοσου νοσήματος. Η **Εικόνα 1** παρουσιάζει σχηματικά τους μηχανισμούς ανοχής του ανοσοποιητικού συστήματος που λαμβάνουν χώρα κατά την ανάπτυξη (κεντρικοί) και κατά τη διάρκεια ζωής (περιφερειακοί) των λεμφοκυττάρων.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των κεντρικών και των περιφερειακών μηχανισμών Ανοχής έναντι των αυτο-δραστικών κλώνων των B- και T- κυττάρων που προτάθηκε το 1957 από τον Frank MacFarlane Burnet.

Σήμερα, μετά από μια πληθώρα δημοσιεύσεων σχετικά με την ύπαρξη και το ρόλο των φυσιολογικών αυτοδραστικών κλώνων, πολλές μελέτες εστιάζονται στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που επιτρέπουν και προάγουν την ύπαρξη των κλώνων αυτών στην κυκλοφορία. Φαίνεται πλέον, πως αυτοί οι κλώνοι έχουν κυρίως ανοσορρυθμιστικό ρόλο, επιβλέποντας ανοσολογικά τον οργανισμό (ανοσο-επιτήρηση) συμμετέχοντας στις διαδικασίες διατήρησης της ομοιόστασης του συστήματος. Ωστόσο, οι πολύπλοκοι μηχανισμοί που υποκρύπτονται της δράσης τους, συχνά παρεκκλίνουν και η συμμετοχή αυτών στην εξέλιξη παθολογιών, όπως σε κάποια αυτοάνοσα νοσήματα, υποδεικνύει την υψίστη σημασία τους και τη φύση του ρυθμιστικού τους ρόλου.

Η ανακάλυψη των Φυσικών Αντισωμάτων χρονολογείται περίπου την ίδια περίοδο που αναδύθηκε ο κλάδος της επιστήμης της Ανοσολογίας (Landsteiner 1945, Boyden 1965, Michael 1969), τότε που ανακαλύφθηκαν αντισώματα έναντι τοξινών, βακτηρίων και ερυθροκυττάρων σε ορούς ανοσοποιημένων αλλά και υγιών ατόμων [7, 8, 9, 10].

Η ιστορική αναδρομή και τα γεγονότα που οδήγησαν την επιστημονική κοινότητα στην ανακάλυψη των φυσικών αντισωμάτων συνοψίζονται εν τάχει στις επόμενες γραμμές.

- Το **1890** ο Kitasato Shibasaburo και ο Emil von Behring άνοιξαν το δρόμο για τη διερεύνηση του χημικού σκέλους της ανοσίας.
- Το **1894** ο Richard Pfeiffer, μελετώντας το φαινόμενο της βακτηριολύσης, συμπέρανε ότι κάποιο συστατικό του αίματος είχε βακτηριοκτόνο δράση [11].
- Το **1897** ο Paul Ehrlich διατύπωσε τη θεωρία των πλευρικών αλυσίδων (side-chain-theory) [10].
- Το **1900** ο Ehrlich διατύπωσε τη θεωρία του «Horror Autotoxicus» σύμφωνα με την οποία ήταν επικίνδυνο και τοξικό ένας υγιής οργανισμός να αναγνωρίζει τον εαυτό του.
- Το **1901** ο Landsteiner χρησιμοποίησε τον όρο «αντισώματα» για πρώτη φορά.
- Το **1926** οι Lloyd D. Felton και G.H Bailey κατάφεραν να προσδιορίσουν ότι τα αντισώματα ανήκουν στις πρωτεΐνες.
- Το **1934** ο John R. Marrack διατύπωσε τη θεωρία του δικτύου (lattice theory) [12].
- Το **1955** ο Niels Jerne δημοσίευσε τη θεωρία «της φυσικής επιλογής» (natural selection theory) διατυπώνοντας την άποψη ότι όλα τα αντισώματα σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής και είναι παρόντα στο σώμα κατά τη γέννηση [13]. Το **1974** ο Jerne πρότεινε την θεωρία του «Ιδιοτυπικού Δικτύου» (Βραβείο Nobel, 1984) [14]. Με αυτή τη θεωρία αναδείχτηκε η Φυσική Αυτοανοσία ως μια συνεχής διαδικασία επιτήρησης και όχι ως μια “ανώμαλη” καταστροφική διαδικασία.
- Το **1959-1961** διευκρινίστηκε η δομή των αντισωμάτων από τον Rodney R. Porter και Gerald Edelman [15, 16].
- Το **1964** ο Frank MacFarlane Burnet διατύπωσε τη θεωρία της «Επιλογής των κλώνων» (clonal selection theory) ή αλλιώς το μηχανισμό ανοχής του ανοσιακού συστήματος [10].
- Το **1977-1982** η ομάδα του καθηγητή Stratis Avrameas μελέτησε συστηματικά την ύπαρξη των φυσικών αντισωμάτων διαπιστώνοντας ότι τέτοια αντισώματα υπήρχαν ήδη στον ορό διαφόρων ζώων, χωρίς να έχει προηγηθεί κάποια πειραματική ανοσοποίηση [17] και τα οποία αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα αντιγόνων του εαυτού [18]. Πρότεινε ότι τα αντισώματα αυτά, δημιουργούν ένα εκτεταμένο δυναμικό δίκτυο/πλέγμα που συμβάλλει στη γενική ομοίωση του οργανισμού [19, 20].
- Παράλληλα, το **1982** ο H.U. Lutz προσδιόρισε φυσικά αντισώματα έναντι των ζωνών 1 και 2 της σπεκτρίνης στον ορό υγιών ατόμων [21].
- Το **1988-1989** η ομάδα του A.L. Notkins προσπάθησε να χαρακτηρίσει τα Β λεμφοκύτταρα που εκκρίνουν φυσικά αντισώματα στον ποντικό (Leu-1+, CD5+ Β λεμφοκύτταρα) [22, 23].
- Το **1989** ο Charles Janeway μια γενική θεωρία της φυσικής ανοσίας (pattern recognition theory) και σύστησε τις αρχές της φυσικής ανοσίας και τη συσχέτισή της με την επίκτητη.
- Το **1991** ο S. Avrameas πρότεινε τη θεωρία του «γνώθι σ' εαυτόν» (Natural autoantibodies: from horror autotoxicus to gnothi seauton), θεώρησε ότι η γνώση του «εαυτού» αποτελεί πρωταρχική ιδιότητα του ανοσιακού συστήματος του οργανισμού απαραίτητη πριν αναγνωρίσει το «ξένο» [8]. Τα φυσικά αντισώματα, αναγνωρίζοντας τον «εαυτό» και τον «ξένο» δημιουργούν ένα εκτενές και πολύπλοκο πλέγμα, εξαιτίας της τεράστιας ποικιλίας των αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται και έτσι η ανοσιακή ομοίωση του οργανισμού εγκαθιδρύεται. Εδραιώθηκε έτσι η παρουσία των NAbS στον ορό υγιών οργανισμών και προσδιορίστηκε το βασικό χαρακτηριστικό τους, η πολυδραστικότητα, δηλαδή η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με μια μεγάλη ποικιλία μορίων, δομών και αλληλουχιών. Επίσης, έγινε προφανές η παρουσία των φυσικών αντισωμάτων και στο ορό ασθενών όπως και οι μεταβολές στα επίπεδα μεταξύ φυσιολογικού και παθολογίας.

Στις μέρες μας, η παρουσία αυτοδραστικών Β λεμφοκυττάρων στον ορό υγιών ανθρώπων και ζώων έχει χαρακτηριστεί και μελετηθεί διεξοδικά. Για πολλά χρόνια οι επιστήμονες πίστευαν ότι η παραγωγή των φυσικών αντισωμάτων ήταν κυρίως αποτέλεσμα διασταυρούμενων αντιδράσεων με εξωγενή, περιβαλλοντικά αντιγόνα, ή, απόρροια μη ειδικών μηχανισμών που συνοδεύουν τις ανοσοαποκρίσεις. Πλέον, υπάρχουν αποδείξεις ότι η αναγνώριση των αυτοαντιγόνων και η παραγωγή αντισωμάτων έναντι αυτών τοποθετείται μέσα στα πλαίσια της φυσιολογικής λειτουργίας του ανοσιακού συστήματος, κατέχοντας βασικούς βιολογικούς ρόλους για την λειτουργία του οργανισμού και της ισορροπίας μεταξύ παθολογίας και φυσιολογικών διεργασιών [15].

1.2. Τα Φυσικά Αντισώματα (Naturally occurring Antibodies-NABs)

Φυσικά Αντισώματα (Naturally occurring Antibodies- NABs), είναι τα αντισώματα που ανευρίσκονται σε υγιείς οργανισμούς και παράγονται χωρίς προηγούμενη εξωγενή διέγερση (επιμόλυνση, εμβολιασμό, ανοσοποίηση ή άλλη εξωγενή έκθεση αντιγόνου) [24]. Τα Φυσικά Αντισώματα ανήκουν στο σκέλος της φυσικής ανοσίας και λαμβάνουν μέρος στις καίριες λειτουργίες της πρώτης γραμμής άμυνας του οργανισμού ενώ παράλληλα επιτελούν και ρυθμιστικό ρόλο των δραστηριοτήτων της ειδικής ανοσίας και της δεύτερης γραμμής άμυνας του οργανισμού. Σε αντίθεση με τα επαγόμενα αντισώματα, τα οποία αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια μιας επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης και αποτελούν μέρος αποκλειστικά της δεύτερης γραμμής της άμυνας [25], τα φυσικά αντισώματα δεν αποτελούν προϊόν ανοσοποίησης και ανευρίσκονται στον οργανισμό από τα πρώιμα στάδια της οντογένεσης. Παράλληλα σε ολοένα και αυξανόμενες έρευνες διαπιστώνεται η διαφορά των επιπέδων των NABs, μεταξύ ατόμων, σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες και μεταξύ φυσιολογίας και διάφορων παθολογιών [26].

Το ρεπερτόριο των NABs είναι παρόμοιο σε κάθε ζωικό είδος αλλά, φαίνεται να διαφέρει από το ένα άτομο στο άλλο. Τα NABs στον ορό υγιών ατόμων έχει βρεθεί πως ανήκουν στις τάξεις των ανοσοσφαιρινών M, G, A και E [27]. Ωστόσο, το ρεπερτόριο των IgM-NABs φαίνεται να παραμένει σταθερό ενώ, των υπόλοιπων τάξεων να εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και το ιστορικό του κάθε ατόμου [25]. Τα NABs ανευρίσκονται στη μήτρα, στο αίμα των νεογνών και στο μητρικό γάλα ενώ στους ενήλικες ανευρίσκονται στο αίμα και σε άλλα βιολογικά υγρά, όπως το σάλιο και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό [8, 28-32].

Σκοπός πολλών μελετών είναι η αποσαφήνιση της σημασίας των NABs, των χαρακτηριστικών τους και των βιολογικών λειτουργιών τους. Η δράση τους επικεντρώνεται στην ανοσο-επιτήρηση του οργανισμού και στη διατήρηση της ομοιόστασης, ενώ παράλληλα μεγάλο μέρος αυτών εμφανίζουν πολυδιάστατες ιδιότητες. Η εμπλοκή τους σε μηχανισμούς ρύθμισης του συστήματος υποδηλώνει πως τα NABs είναι ικανά να αλληλεπιδρούν με πληθώρα συστατικών του οργανισμού, γεγονός που διαφοροποιεί την φύση τους από αυτή των εξειδικευμένων επαγόμενων αντισωμάτων [18, 19]. Ο πλήρης προσδιορισμός της δημιουργίας και του τρόπου δράσης των NABs, αποτελεί ένα καίριο πεδίο μελέτης σε επίπεδο βασικής έρευνας. Παράλληλα, φαίνεται πως οι ιδιότητες που παρουσιάζουν, σε συνδυασμό με την έλλειψη της τοξικότητας, ως φυσικά παραγόμενα προϊόντα από τον οργανισμό, υποδεικνύουν την ωφέλιμη χρήση τους ως θεραπευτικά, διαγνωστικά και μοριακά εργαλεία σε επίπεδο εφαρμοσμένης έρευνας. Παρόλες τις μελέτες που έχουν επικεντρωθεί στον χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων των NABs, τα στοιχεία για τον πλήρη προσδιορισμό του βιολογικού και λειτουργικού τους ρόλου παραμένουν ελλιπή, προμηνύοντας την ανάγκη για την περεταίρω διερεύνησή τους.

1.3. Χαρακτηριστικά των NAbS

Από αναλύσεις B-κυτταρικών κλώνων της περιφέρειας φάνηκε πως έως και το 33% των μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs) που εκκρίνονται αναγνωρίζουν περισσότερα του ενός αντιγόνα. Τα αντισώματα αυτά χαρακτηρίζονται ως πολυδραστικά, δηλαδή αναγνωρίζουν τουλάχιστον δύο ή περισσότερα αντιγόνα και αποτελούν μέρος του ρεπερτορίου των NAbS [31]. Η επιβεβαίωση της ύπαρξης αυτών των αντισωμάτων μετά από την απομόνωσή τους από διάφορα φυσιολογικά (υγιή) είδη ζώων επέτρεψε την περαιτέρω μελέτη τους ως προς τον προσδιορισμό των βασικών χαρακτηριστικών τους [33].

Κυρίως λόγω της τεχνικής των υβριδωμάτων που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των NAbS, υπήρξε η εσφαλμένη εντύπωση πως αυτά ανήκουν αποκλειστικά στη τάξη IgM. Αυτό οφειλόταν στο γεγονός πως πολλές μελέτες σε ποντίκια βασίζονταν σε πειράματα υβριδοποίησης με τη σύντηξη μη εκκριτικών μυελωματικών σειρών σπληνοκυττάρων από μη ανοσοποιημένα ζώα, που δίνουν σχεδόν αποκλειστικά υβριδώματα IgM. Επίσης, οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στα IgM-NAbS, λόγω του πολυδιάστατου ρόλου τους και της συχνότερης ανεύρεσής τους στη κυκλοφορία. Το ποσοστό των άλλων τάξεων φαίνεται πως διαφοροποιείται μετά από έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και στη παθολογία [31].

Τα βασικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν τα NAbS αποτελούν, α) οι υποπληθυσμοί των B λεμφοκυττάρων από τους οποίους παράγονται, β) η κωδικοποίησή τους, κυρίως, από γονίδια της βλαστικής σειράς και γ) το φαινόμενο της πολυδραστικότητας που παρουσιάζουν, το οποίο συνολικά φαίνεται να εξαρτάται και να καθορίζεται από μια σειρά παραγόντων, οι βασικότεροι από τους οποίους είναι η αλληλουχία της μεταβλητής περιοχής, η τρισδιάστατη δομή της και τα αντιγόνα-στόχοι.

➤ Κύτταρα που παράγουν NAbS

Τα διαφορετικά υποσύνολα των B λεμφοκυττάρων ποικίλλουν ως προς την περιοχή προέλευσής τους, τις διαδικασίες ωρίμανσής τους, του εντοπισμού τους, της ικανότητας μετανάστευσης, και την εξάρτησή τους από τα T λεμφοκύτταρα για την ενεργοποίησή τους. Στις μέρες μας, είναι γνωστό πλέον, πως υπάρχουν διάφοροι τύποι B λεμφοκυττάρων που φέρουν χαρακτηριστικούς δείκτες στην επιφάνειά τους [34]. Ο υποπληθυσμός των B-2 λεμφοκυττάρων είναι αυτός από τον οποίο παράγονται τα ειδικά αντισώματα ως προϊόν αντιγονικής διέγερσης κατά την ειδική ανοσοαπάντηση. Τα B-2 κύτταρα, παράγονται στον μυελό των οστών από τον οποίο μεταναστεύουν και εγκαθίστανται στους λεμφαδένες και στην οριακή ζώνη του σπλήνα [35]. Τα φυσικά αντισώματα στο ποντίκι και τον άνθρωπο, παράγονται από έναν διακριτό υποπληθυσμό B λεμφοκυττάρων, τα B-1 λεμφοκύτταρα [25].

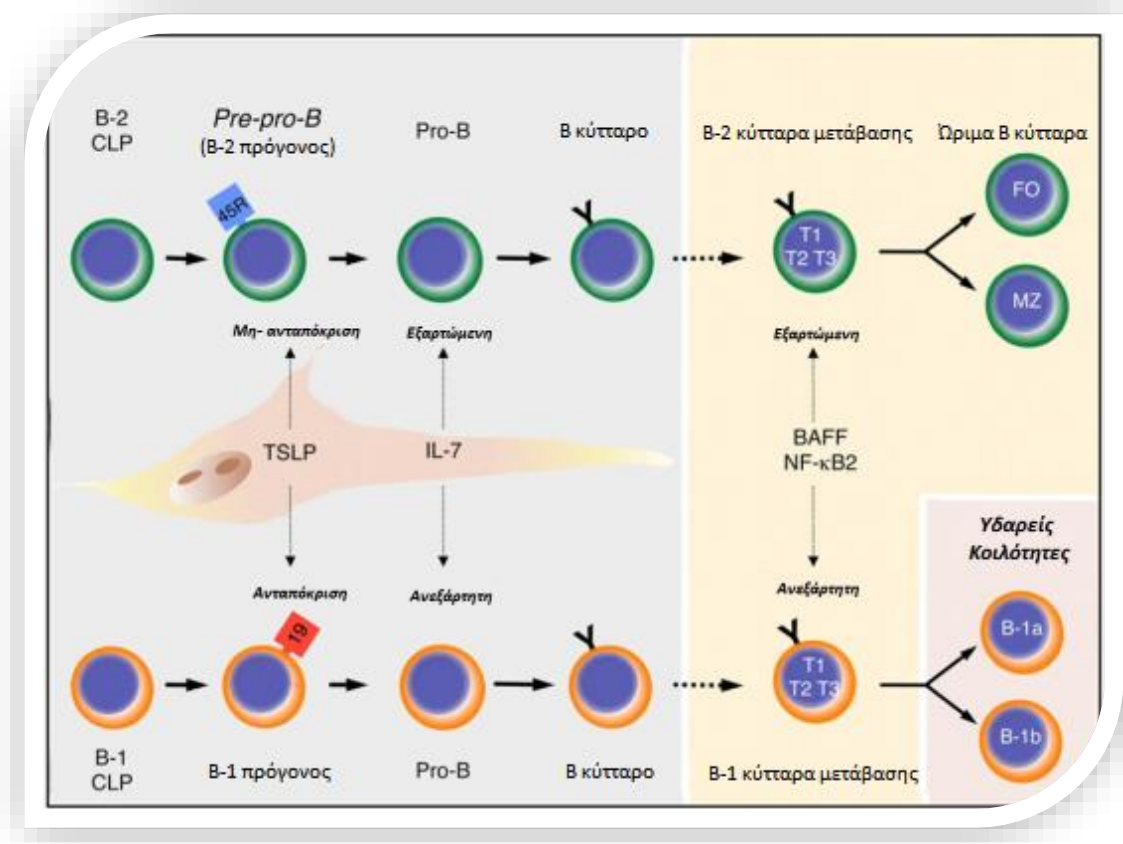
○ Τα B-1 λεμφοκύτταρα του ποντικού

Πληθώρα πειραματικών δεδομένων υποδεικνύει πως τα B-1 και B-2 λεμφοκύτταρα προέρχονται από διαφορετικούς κλώνους προγονικών κυττάρων με τον πρόγονο των B-1 κυττάρων να φέρει τον δείκτη CD19 ενώ των B-2 τον δείκτη CD45R(B220) (**Εικόνα 2**). Ο υποπληθυσμός των B-1 λεμφοκυττάρων υποδιαιρείται σε δύο υποομάδες: τα B1-a που εκφράζουν τον δείκτη επιφανείας CD5 (CD5⁺) και τα B1-b που δεν εκφράζουν το CD5 (CD5⁻). Το υποσύνολο των B1-a είναι υπεύθυνο για την παραγωγή των φυσικών αντισωμάτων ως απάντηση σε T-ανεξάρτητες διαδικασίες. Αυτά ανευρίσκονται κυρίως στη περιτοναϊκή και πλευρική κοιλότητα, αντιπροσωπεύοντας την πρώτη γραμμή άμυνας κατά των μικροβίων [36].

Συνολικά φαίνεται πως οι πρόδρομοι των B-1 και B-2 κυττάρων ανταποκρίνονται σε διαφορετικό προφίλ κυτταροκινών στις οποίες εκτίθενται και πως αυτό το γεγονός διαφοροποιεί την επακόλουθη παραγωγή των διακριτών κλώνων των B-κυττάρων. Έχει δειχθεί πως η ανταπόκριση των προδρομικών B-κυττάρων στην κυτταροκίνη TSLP (Thymic Stromal Lipoprotein) στο εμβρυικό ήπαρ οδηγεί στην ανάπτυξη κλώνων CD19⁺ CD45R^{low/-} [37]. Το εύρημα αυτό συνηγορεί στο γεγονός πως τα B-1 λεμφοκύτταρα επικρατούν έναντι των B-2 κατά την εμβρυική περίοδο. Στα επόμενα στάδια ωρίμανσης η IL7 η οποία έχει χαρακτηριστεί ως ρυθμιστής της προαγωγής των B-2 κλώνων φάνηκε πως δεν επηρεάζει την παραγωγή των B-1 κυττάρων [38]. Τέλος, κατά τα στάδια μετάβασης T1, T2 και T3 των B-κυττάρων διαφορετικοί μεσολαβητές διακρίνονται μεταξύ των B-1 και B-2 κυττάρων οι οποίοι σηματοδοτούν την επιβίωση και την ωρίμανση τους. Η πρόσδεση του υποδοχέα BCR των B-2 κυττάρων στον παράγοντα ενεργοποίησης των B-κυττάρων (B Cell Activation Factor-BAFF) σε συνδυασμό με συνδιεγερτικά σήματα από τον Nf-κB2 αποτελεί απαραίτητο γεγονός για την περαιτέρω επιβίωση και ωρίμανσή τους, ενώ φαίνεται πως αυτές οι διαδικασίες στα B-1 κύτταρα είναι ανεξάρτητες αυτών των σηματοδοτήσεων [39].

Επιπρόσθετα, τα B1-a λεμφοκύτταρα έχουν την ικανότητα εσωτερίκευσης (internalization) και της εξάλειψης βακτηριακών παθογόνων και φέρουν στην πλασματική τους μεμβράνη τον δείκτη CD11b [40] ο οποίος τους προσδίδει ένα φαινότυπο μακροφάγου. Βιβλιογραφικά, κάποιοι συγγραφείς έχουν προτείνει πως τα B1-a λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά και για το λόγο αυτό, αυτά τα δι-φαινοτυπικά B/μακροφάγα ίσως προέρχονται από έναν αρχαίο εξελικτικά κοινό πρόγονο ικανό να προσαρμόζεται έναντι βακτηριακών μόλυνσεων λαμβάνοντας μέρος στην άμυνα της φυσικής ανοσίας [41]. Τα B-1 λεμφοκύτταρα των θηλαστικών μπορούν να συσχετισθούν εξελικτικά με τα B-κύτταρα των ψαριών και κυρίως, με ψάρια της ταξινομικής ομάδας των τελεόστεων, όπως η ιριδίζουσα πέστροφα, τα γατόψαρα κ.α.. Τα κυκλοφορούντα B-κύτταρα των τελεόστεων ομοιάζουν μορφολογικά με τα B1-a λεμφοκύτταρα των θηλαστικών, εκφράζουν ανοσοσφαιρινικούς μεμβρανικούς υποδοχείς IgM, IgD ή IgT/Z και έχουν ικανότητα φαγοκυττάρωσης [41]. Αυτή η εξελικτική θεωρία των B-κυττάρων υποστηρίζει την ιδέα ενός κοινού υπόβαθρου της φυσικής ανοσίας και της εξέλιξης των B-κυττάρων. Στο πλαίσιο αυτό φαίνεται πως τα φυσικά αντισώματα και τα B-1 λεμφοκύτταρα γεφυρώνουν το σκέλος της φυσικής ανοσίας με την επίκτητη [42].

Ο πληθυσμός των B-1 λεμφοκυττάρων ανευρίσκεται κυρίως σε κοιλότητες όπως η πλευρική και η περιτοναϊκή (35-70%) και τα κύτταρα αυτά συχνά μετακινούνται μεταξύ των δύο περιοχών, μια διαδικασία που απαιτεί την έκφραση του χημιοτακτικού συνδέτη CXCL13. Σε περιπτώσεις απάντησης σε παθογόνα, τα B-1 κύτταρα μετακινούνται από την αρχική τους τοποθεσία σε δευτερογενή λεμφικά όργανα όπως ο σπλήνας και οι λεμφαδένες απ' όπου και εκκρίνουν τα αντισώματα IgM. B-1 κύτταρα έχουν αναφερθεί να ανευρίσκονται στο σπλήνα (1-2%), σε λεμφαδένες (0.1-0.3%), στον μυελό των οστών (0.1-0.2%), στο παρέγχυμα των πνευμόνων (0.4-0.6%), στο χόριο του βλενογόνου του εντέρου (έως και 50% IgA + B-κύτταρα) και στο αίμα (0.3-0.5%). Στην περιτοναϊκή κοιλότητα ένας υποπληθυσμός των B-1 κυττάρων φαίνεται πως χάνει τον επιφανειακό δείκτη CD43 αλλά τα περισσότερα από αυτά τα κύτταρα τον διατηρούν σε άλλους ιστούς. Ωστόσο κατά γενικότητα όταν τα B1-κύτταρα ενεργοποιούνται, υπερεκφράζουν το CD43. Στην περιτοναϊκή και πλευρική κοιλότητα τα περισσότερα από τα B1-a και B1-b λεμφοκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους το μόριο της ιντεγκρίνης CD11b αλλά όταν αυτά μεταναστεύουν σε άλλα όργανα όπως στο σπλήνα, μειώνουν την έκφρασή του. Τα B-1 λεμφοκύτταρα και τα B-κύτταρα της οριακής ζώνης (MZ-B) παρουσιάζουν κοινές λειτουργικές ιδιότητες και για το λόγο αυτό, ένα υποσύνολο των B-κυττάρων της οριακής ζώνης (MZ) εντάσσεται στο υποσύνολο των φυσικών B-κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα θεωρούνται και ως ρυθμιστικά B-κύτταρα καθώς μετά από ενεργοποίησή τους παράγουν μεγάλες ποσότητες IL-10 [43].



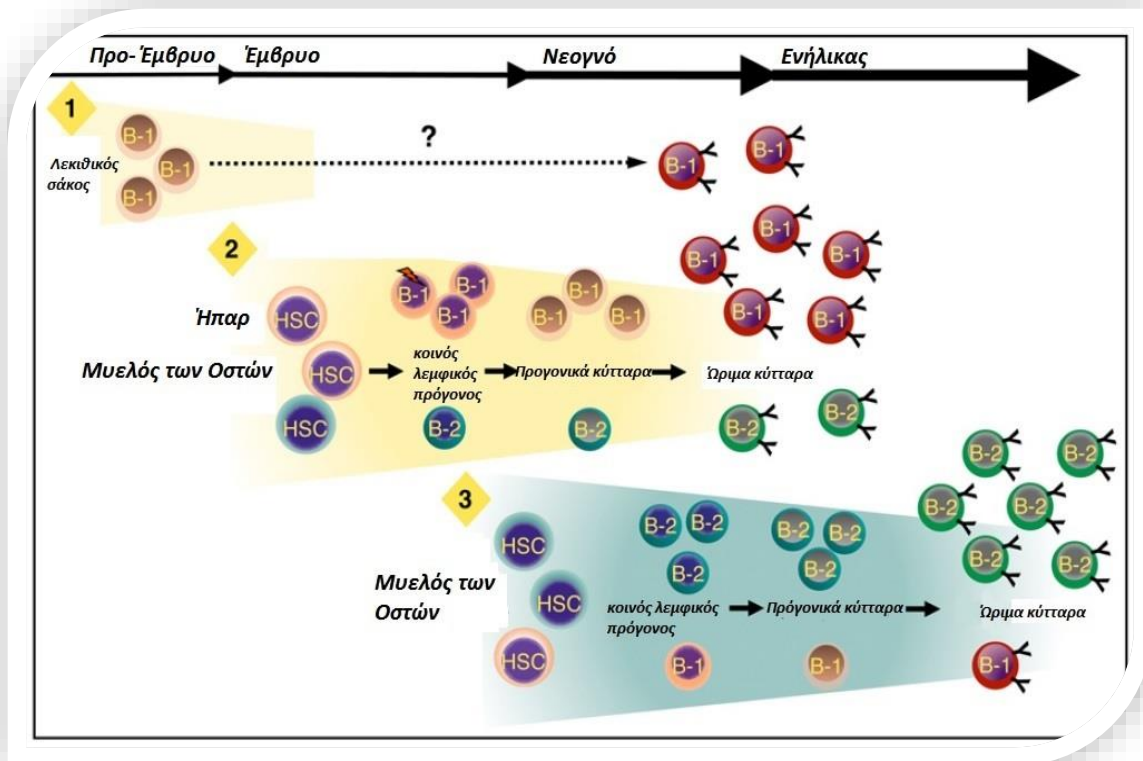
Εικόνα 2: Τα B2-κύτταρα (στο πάνω μέρος της εικόνας) παράγονται στον μυελό των οστών μετά την γέννηση. Οι κοινοί λεμφικοί πρόγονοι (Common Lymphoid Progenitors-CLPs) ωριμάζουν μέσω των σταδίων *pre-pro-B*, *pro-B* και *pre-B* (δεν εμφανίζεται) κυττάρων σε ανώριμα *slgM+* B-κύτταρα. Τα *pre-pro-B*-κύτταρα αποτελούν τους πρόγονους των B2-κυττάρων. Τα ανώριμα *slgM+* κύτταρα μεταναστεύουν και ωριμάζουν μέσω μεταβατικών σταδίων (B κύτταρα μετάβασης T1, T2, T3) σε B-κύτταρα των λεμφαδένων (FO) ή της οριακής ζώνης (MZ). Σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο παραγωγής των B-1 κυττάρων (κάτω μέρος της εικόνας) τα ώριμα B-1 κύτταρα προέρχονται από έναν εξειδικευμένο B-1 κοινό λεμφικό πρόγονο (CLP) από τον οποίο διαφοροποιούνται διαδοχικά σε *pro-B*, *pre-B* (δεν εμφανίζεται) και σε ανώριμα *slgM+* B-1 κύτταρα τα οποία ωριμάζουν στο σπλήνα (T1, T2, T3). Στη συνέχεια τα B-1 κύτταρα μεταναστεύουν σε υδαρείς κοιλότητες αποκτώντας τον B1-a ή B-2b φαινότυπο. Στην εικόνα υποδεικνύεται επίσης πως: 1) τα προγονικά B-1 αλλά όχι τα προγονικά B-2 κύτταρα ανταποκρίνονται στην κυτταροκίνη TSLP (Thymic Stromal Lipoprotein), 2) η παραγωγή των B2 αλλά όχι των B1-κυττάρων εξαρτάται από την IL-7 και 3) η επιβίωση και η ωρίμανση των β κυττάρων μετάβασης (T1, T2, T3) είναι ανεξάρτητη των BAFF (B cell- Activation Factor) και Nf-Kb. Προσαρμοσμένο- Hardy et al. (1991) [43].

Η κύρια λειτουργία των B-1 λεμφοκυττάρων είναι η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων φυσικών αντισωμάτων της τάξης IgM η οποία απαντά σε βακτηριακές μολύνσεις και η παραγωγή IgA-NAbs τα οποία συμβάλουν στην άμυνα κατά των παρασίτων του εντέρου. Ωστόσο, τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να παράγουν αυθόρμητα, φυσικά αντισώματα των τάξεων IgG2 και IgG3 και κάτω από κάποιες συνθήκες και IgE. Η παραγωγή αντισωμάτων από τα B-1 κύτταρα είναι αυθόρμητη ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να προαχθεί μέσω συγκεκριμένων κυτταροκινών ή αναγνώρισης αντιγόνων ανεξάρτητα από T-κύτταρα [44].

Όπως αναφέρθηκε, το ποσοστό των B-1 κυττάρων κυριαρχεί στην εμβρυική περίοδο, όμως αυτό φαίνεται πως μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας ενώ αναφορές έχουν υπάρξει πως το ποσοστό αυτών αυξάνεται ξανά σε προχωρημένες ηλικίες τόσο στον ποντικό όσο και στον άνθρωπο. Παρ' όλο όμως αυτής της αύξησής τους στους γηραιότερους οργανισμούς, τα κύτταρα αυτά φαίνεται πως δεν είναι λειτουργικά οδηγώντας σε αυξημένες εμφανίσεις μολύνσεων του πνεύμονα και συσχετισμό με διάφορες πνευμονίες [45].

Πολλές μελέτες υποδεικνύουν την ετερογένεια των B-1 λεμφοκυττάρων όμως το φαινόμενο δεν έχει διερευνηθεί σε βάθος. Ωστόσο, ο Baumgarth, θεώρησε πως τρεις είναι οι παράγοντες που συμβάλουν στην ετερογένεια των B-1 κυττάρων και στις λειτουργίες τους: 1) η ετερογένεια της προέλευσής τους, 2) οι διαφορές των ιστο-ειδικών σημάτων που τα ενεργοποιούν και 3) οι διαφορές στην έκθεση, στην αναγνώριση και στην απάντηση των B-1 κλώνων έναντι σε ξένα και εαυτά αντιγόνα [46].

Το μεγαλύτερο ποσοστό των B-1 κυττάρων, πιθανά να προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του εμβρυικού ήπατος και του μυελού των οστών και να μετακινούνται για περαιτέρω επεξεργασία στο σπλήνα. Τα κύτταρα B1 είναι παρόντα νωρίς στην οντογένεση, στην προ-εμβρυική περίοδο, στην εμβρυική και στα νεογένητα και βρίσκονται πρωτίστως στο περιτόναιο, ενώ τα κύτταρα MZ-B ανιχνεύονται στην οριακή ζώνη του σπλήνα. Τα B-1 κύτταρα των ενηλίκων παρουσιάζονται αργότερα στην οντογένεση, γύρω στους εννέα μήνες περίπου για τον άνθρωπο και ανευρίσκονται στην κυκλοφορία, στα θυλάκια των λεμφαδένων και στην οριακή ζώνη του σπλήνα [25]. Συνθέτουν πολυδραστικά IgM-NAbs και μπορούν να μεταβούν (switch) στην παραγωγή IgG- και IgA-NAbs, τα οποία φέρουν ένα αριθμό μεταλλάξεων που ποικίλλει [47]. Ένα προτεινόμενο μοντέλο της δημιουργίας των B-κυττάρων, σε τρία διακριτά 'κύματα' εμφάνισης κατά την ανάπτυξη του ποντικού παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3**.



Εικόνα 3: Το προτεινόμενο μοντέλο για τα τρία κύματα εμφάνισης των B-1 κυττάρων. Το πρώτο κύμα ("1") λαμβάνει χώρα στον εμβρυικό σάκο και στην παρα-αορτικά σπλαχνόπλευρα πριν την εμφάνιση των οριστικών αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (HSCs). Δεν είναι ξεκάθαρο, όπως ορίζει και η διακεκομμένη γραμμή, αν τα προγονικά B-1 κύτταρα που παράγονται σε αυτή τη φάση ωριμάζουν σε B-1 κύτταρα που ανευρίσκονται στον ενήλικα. Εάν αυτό συμβαίνει, πιθανά η ωρίμανσή τους να λαμβάνει χώρα στον αμνιακό σάκο ή στα παρα-αορτικά σπλαχνόπλευρα ή να μεταναστεύουν στο εμβρυικό ήπαρ και μυελό των οστών ολοκληρώνοντας εκεί την ωρίμανση τους. Κατά το δεύτερο κύμα ("2"), το οποίο λαμβάνει χώρα στο εμβρυικό ήπαρ και στον μυελό των οστών, τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (HSCs) παράγουν B-1 προγονικά κύτταρα από τα οποία θα προκύψουν τα ώριμα B-1 κύτταρα. Παρόλο που στο δεύτερο κύμα παράγονται και B-2 κύτταρα, τα B-1 κυριαρχούν. Η παραγωγή των B-1 κυττάρων κορυφώνεται στα τελευταία στάδια της εμβρυογένεσης και αρχίζει να φθίνει ακριβώς πριν την γέννηση. Το τρίτο κύμα ("3") ανάπτυξης των B-κυττάρων λαμβάνει χώρα στον μυελό των οστών και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυρίως B-2 κυττάρων. B-1 κύτταρα παράγονται και στο τρίτο κύμα αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό συγκριτικά με το δεύτερο. Προσαρμοσμένο- Encarnacion Montecino-Rodriguez, Kenneth Dorshkind, 2011 [43].

ο Τα B-1 λεμφοκύτταρα του ανθρώπου

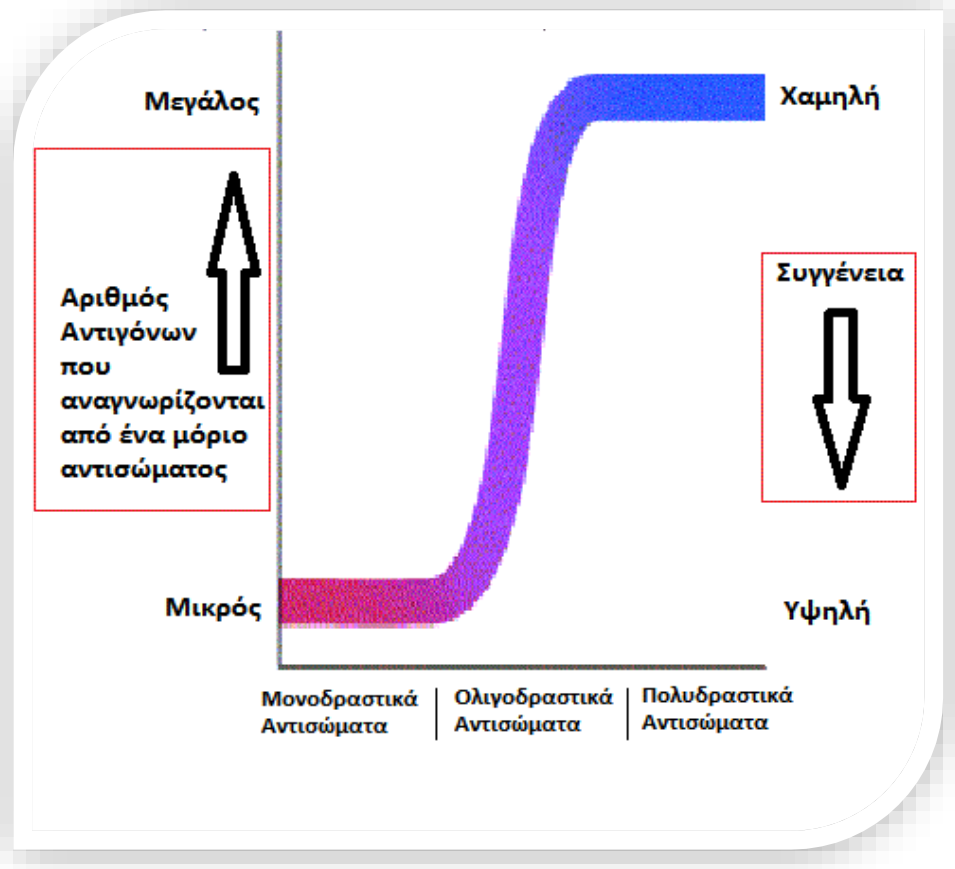
Η ύπαρξη των B-1 κυττάρων, όμοιων με του ποντικού, στον άνθρωπο δεν είναι ξεκάθαρη. Ο χαρακτηριστικός δείκτης CD5 που διακρίνει τα B-1 κύτταρα του ποντικού δεν μπορεί να αποτελέσει χαρακτηριστικό των B-1 κυττάρων του ανθρώπου καθώς ο δείκτης αυτός εκφράζεται και σε άλλους κυτταρικούς τύπους του ανθρώπου [48-53]. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες περιγράφουν την ύπαρξη ενός υποπληθυσμού ανθρώπινων B-κυττάρων που ομοιάζουν με τα B-1 κύτταρα του ποντικού [54]. Τα κύτταρα αυτά φέρουν τους δείκτες CD20⁺ CD27⁺ CD43⁺ CD70⁻ και CD11b προσδιορίζοντας αυτόν τον υποπληθυσμό ως B-1 κύτταρα [55]. Όμοια με τα B-1 κύτταρα του ποντικού, τα ανθρώπινα B-1 κύτταρα εκκρίνουν αυθόρμητα αντισώματα της τάξης IgM, με ελάχιστες σωματικές μεταλλάξεις, τα οποία φαίνεται πως αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα αυτοαντιγόνων, όπως η φωσφατιδυλοχολίνη και το DNA. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως τα ανθρώπινα B-κύτταρα που παράγονται κατά την εμβρυοποίηση φέρουν ανοσοσφαιρινικούς υποδοχείς που εμφανίζουν πολυδραστικότητα [56]. Τέλος σε μια πρόσφατη μελέτη προσδιορίστηκε ο φαινότυπος Lin⁻ CD34^{high} CD10⁻ CD19⁻ ως ο αιμοποιητικός πρόγονος των B-1 κυττάρων του ανθρώπου, τα οποία φάνηκε πως παράγονται σε δυο χρονικώς διακριτά κύματα παρόμοια με αυτά του ποντικού [57].

➤ Τα NAbS κωδικοποιούνται από γονίδια της βλαστικής σειράς

Τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας χρησιμοποιούν εξειδικευμένους υποδοχείς που κωδικοποιούνται από γονίδια της βλαστικής σειράς από διακριτές οικογένειες πρωτεϊνών [58,59]. Η απαιτούμενη ποικιλία των ανοσοσφαιρινικών υποδοχέων της φυσικής ανοσίας επιτυγχάνεται μέσω της συνδυαστικής σύνδεσης των ανοσοσφαιρινικών γονιδίων της βλαστικής σειράς. Οι επιπρόσθετες διαγραφές, προσθήκες και λάθη που συμβαίνουν κατά τον ανασυνδυασμό των γονιδίων εξασφαλίζουν την γενετική και φαινοτυπική ποικιλία των υποδοχέων αυτών προσδίδοντάς τους την ικανότητα να αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα αντιγονικών στόχων χωρίς επιπρόσθετα γεγονότα μεταλλάξεων προς αύξηση της συγγένειας [60-66]. Τα φυσικά αντισώματα ως μέρος του φυσικού σκέλους της ανοσίας, κωδικοποιούνται συχνά από γονίδια της βλαστικής σειράς φέροντας συνήθως λίγες ή καθόλου μεταλλάξεις. Στον ορό των υγιών ατόμων έχουν ανευρεθεί και φυσικά μονοειδικά αντισώματα, τα γονίδια των οποίων επίσης εντάσσονται σε αυτά της βλαστικής σειράς, ο αριθμός τους όμως είναι σημαντικά περιορισμένος σε σχέση με αυτόν των φυσικών πολυδραστικών αντισωμάτων. Πιθανολογείται πως τα πολυδραστικά NAbS αποτελούν πρόδρομους κάποιων ειδικών αντισωμάτων υψηλής συγγένειας που προκύπτουν έναντι εαυτών ή ξένων αντιγόνων [67].

➤ Πολυδραστικότητα ή πολυειδικότητα των NAbs

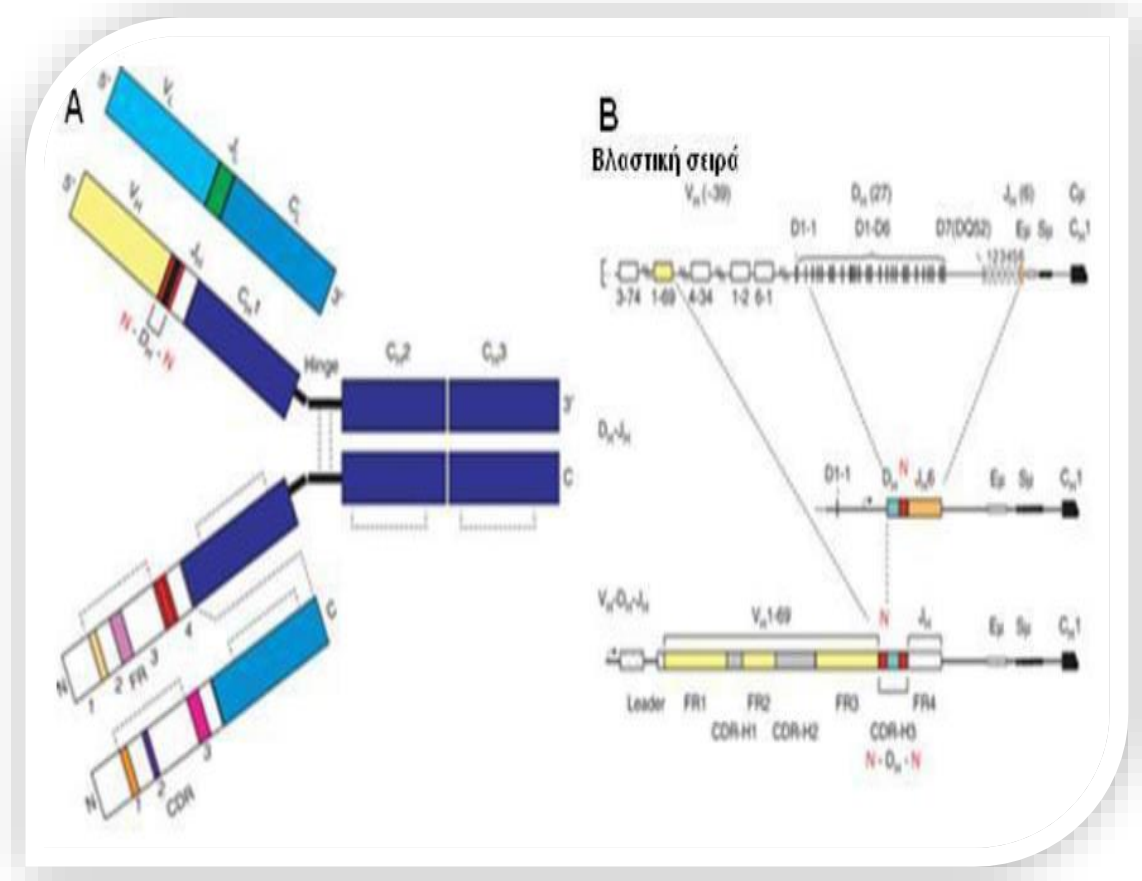
Ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά των NAbs είναι η πολυδραστικότητα (πολυειδικότητα) η οποία προσδίδει την ικανότητα αναγνώρισης πολλών και διαφορετικών δομικά αντιγόνων. Η πολυδραστικότητα των NAbs αποτελεί ιδιότητα της μεταβλητής περιοχής των αντισωμάτων και δεν οφείλεται σε μη ειδική πρόσδεση μεταξύ μοριακών δομών, αφού τα NAbs παρουσιάζουν ξεχωριστό προφίλ αντίδρασης με διαφορετικά αντιγόνα και έχουν διαφορετικές σταθερές συγγένειας για κάθε αντιγόνο. Αυτό που χαρακτηρίζει την ισχύ ενός συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος είναι η πολλαπλή συγγένεια σύνδεσης (avidity) του αντισώματος, η οποία εξαρτάται από τρεις παραμέτρους: 1) τη συγγένεια (affinity) του παράτοπου του αντισώματος (θέση δέσμευσης του αντιγόνου σε ένα αντίσωμα) για έναν επίτοπο, 2) το σθένος του αντισώματος και του αντιγόνου και 3) τη δομική διάταξη των τμημάτων που αλληλεπιδρούν. Η συγγένεια των πολυδραστικών NAbs είναι χαμηλότερη από αυτή των επαγόμενων μονοειδικών αντισωμάτων και μπορεί να διαφέρει για τα διάφορα αντιγόνα έως και χίλιες φορές, με τη σταθερά διάστασης K_d να κυμαίνεται μεταξύ 10^4 - 10^7 mol/l, σε σύγκριση με την αντίστοιχη των μονοειδικών αντισωμάτων για τα συγγενικά τους αντιγόνα, όπου η K_d κυμαίνεται μεταξύ 10^7 - 10^{11} mol/l (**Εικόνα 4**) [68].



Εικόνα 4: Καμπύλη διαγράμματος του αριθμού των αντιγονικών στόχων των αντισωμάτων σε σχέση με την συγγένεια σύνδεσης των δύο μορίων. Υποδεικνύεται πως όσο αυξάνεται η πολυδραστικότητα, ενός αντισώματος, δηλαδή όσο αυξάνονται τα μόρια τα οποία αυτό αναγνωρίζει, μειώνεται η συγγένεια σύνδεσης αυτού με τα αντιγόνα στόχους.

ο Αλληλουχία μεταβλητής περιοχής

Το πρώτο βασικό χαρακτηριστικό των NABs που συμβάλλει στην πολυδραστικότητα τους είναι η νουκλεοτιδική και κατά συνέπεια η αμινοξική αλληλουχία τους. Γενικά, η μεταβλητή περιοχή (V, Variable region) της βαριάς αλυσίδας (HC, Heavy chain) προκύπτει από το συνδυασμό των γονιδιακών τμημάτων V, D και J (πρώτα γίνεται ο συνδυασμός D-J και μετά ο συνδυασμός V-DJ), ενώ της ελαφριάς (LC, Light chain) από το συνδυασμό των γονιδιακών τμημάτων V και J (ή VL και JL). Σωματικές μεταλλάξεις, που μεταβάλλουν τις βάσεις στη μεταβλητή περιοχή των αντισωμάτων, παρέχουν περαιτέρω ποικιλομορφία και οδηγούν σε αυξημένη συγγένεια (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Σχηματική δομή IgG. Ο συνδυασμός των τμημάτων της βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας. (A) Οι βαριές αλυσίδες κωδικοποιούνται για τη μεταβλητή περιοχή τους από τα γονίδια V, D, J (VH, DH, JH) και για τη σταθερή περιοχή C (Cμ, δ, γ3, γ1, γ2β, γ2α, ε, α), ενώ οι ελαφριές από τα γονίδια V και J (VL και JL). Στις κάτω αλυσίδες υποδεικνύονται οι περιοχές πλαισίου (FR) και οι συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές (CDR). Οι διακεκομμένες γραμμές δηλώνουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς. (B) Ο ανασυνδυασμός των γονιδιακών τμημάτων. Τα γονίδια της βαριάς αλυσίδας αποτελούνται από πολλαπλά (~200) τμήματα V (variable segments), μια σειρά από τα τμήματα D (diversity segments), τμήματα J (joining segments) (~6) και μια σειρά τμημάτων σταθερής περιοχής (C). Οι ελαφριές αλυσίδες φέρουν τη CDR-H1 (10αα από το 24 έως το 34), CDR-H2 (6αα από το 50 έως το 56) και CDR-H3 (8αα από το 89 έως το 97) και οι βαριές αλυσίδες φέρουν τη CDR-L1 (4αα από το 31 έως το 35), CDR-L2 (15αα από το 50 έως το 65) και CDR-L3 (6αα από το 96 έως το 102).

Η πολυδραστικότητα των αντισωμάτων ορίζεται κυρίως από τη περιοχή CDR3 της H3, μια περιοχή η οποία είναι επίσης γνωστή για τον κεντρικό ρόλο στην αναγνώριση των αντιγόνων από την πλειονότητα των αντισωμάτων. Μερικές μόνο αντικαταστάσεις αμινοξέων στη περιοχή CDR-H3, αρκούν για να καταστήσουν ένα πολυδραστικό αντίσωμα, μονοειδικό [71-73]. Ορισμένες μεταλλάξεις στην περιοχή CDR-H3 δεν επηρεάζουν την πολυδραστικότητα, ενώ άλλες την αυξάνουν ακόμη περισσότερο. Επίσης το απομονωμένο Fab θραύσμα των πολυδραστικών αντισωμάτων διατηρεί την πολυδραστικότητα του [70, 71, 75, 76] ενώ, μια και μόνο αντικατάσταση αμινοξέος της CDR-H3 περιοχής θα μπορούσε να καταργήσει εντελώς την πολυδραστικότητα [20, 68].

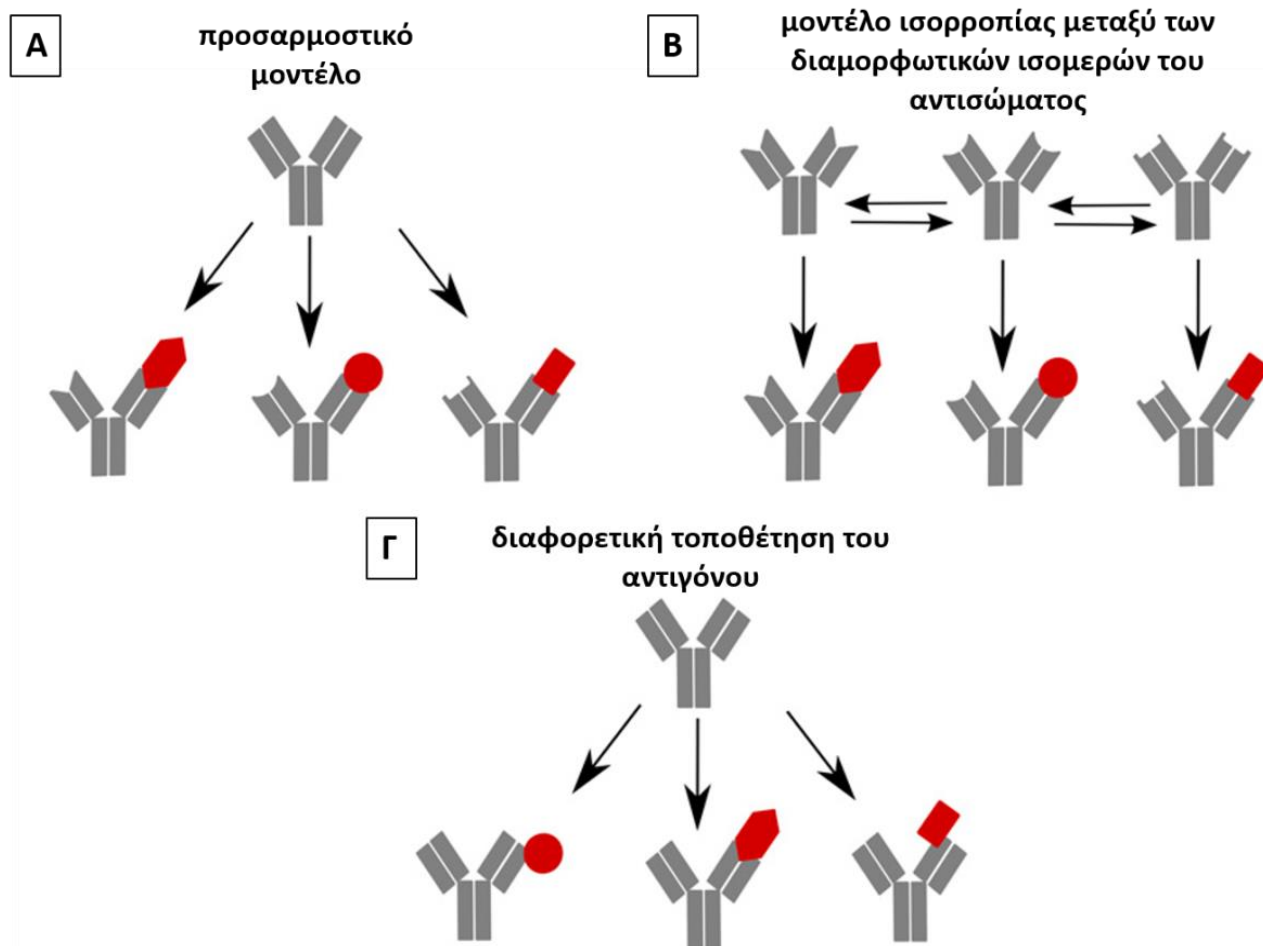
Η υποτάξη της βαριάς αλυσίδας μπορεί να επηρεάσει την ειδικότητα και τη συγγένεια καθώς και την τάση ανάμεσα στα πολυδραστικά αντισώματα που φέρουν πανομοιότυπο παράτοπο. Συνολικά, έχει αναφερθεί ότι τα πολυδραστικά NAbS τάξης M κωδικοποιούνται συνήθως από γονίδια χωρίς ή με ελάχιστες μεταλλάξεις, ενώ τα NAbS τάξης IgG και IgA κωδικοποιούνται από γονίδια που συνήθως φέρουν 7-11 μεταλλάξεις. Δεν είναι σπάνια όμως και NAbS τάξης G και A που κωδικοποιούνται από γονίδια με πολλές μεταλλάξεις (πάνω από 20) προσδίδοντάς τους την ικανότητα μιας πιο εξειδικευμένης αναγνώρισης στόχων. Τα αντισώματα αυτά συνήθως αναφέρονται ως «εξουδετερωτικά» (neutralizing antibodies) όπως τα αντισώματα εναντίον του ιού HIV που τον αδρανοποιούν [77]. Φαίνεται πως ορισμένα αντισώματα είτε διατηρούν είτε αυξάνουν τη δομική ευελιξία των θέσεων πρόσδεσης των αντιγόνων τους ως αποτέλεσμα της ωρίμανσης συγγένειας. Συνολικά, τα τελευταία βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι η πολυδραστικότητα δεν περιορίζεται μόνο στα αντισώματα που κωδικοποιούνται από γονίδια βλαστικής σειράς, αλλά μπορεί επίσης να χαρακτηρίζει αντισώματα που έχουν υποστεί ωρίμανση συγγένειας, ενώ δεν έχει βρεθεί κάποια συγκεκριμένη αλληλουχία που να μπορεί κανείς να προβλέψει εάν θα προκύψει ένα πολυδραστικό ή ένα μονοειδικό αντίσωμα. Τέλος, έχουν βρεθεί αντισώματα των οποίων ο πολυδραστικός χαρακτήρας εμφανίζεται ύστερα από επαφή με άλλα μόρια της κυκλοφορίας όπως η αίμη. Τα αντισώματα αυτά ονομάζονται επαγόμενα πολυδραστικά αντισώματα (scripted Abs) [78].

Στη μεταβλητή περιοχή των αντισωμάτων, οι συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές CDR (Complementarity determining regions) είναι σημαντικές για την πολυειδικότητα ή μονοειδικότητά τους. Η βαριά και η ελαφριά αλυσίδα φέρουν τρεις περιοχές CDR τις CDR -1, -2 και -3 και τέσσερις σταθερές περιοχές πλαισίου FR (framework). Η δομική βάση της πολυδραστικότητας σχετίζεται με τις ιδιότητες της μεταβλητής περιοχής και κυρίως της βαριάς αλυσίδας. Στη βαριά αλυσίδα η θέση δέσμευσης αντιγόνου σχηματίζεται από την παράθεση των CDR -H1, -H2 και -H3 και την περιοχή πλαισίου 3 (FR3) (Εικόνα 5) [69, 70]. Οι περισσότερες αναφορές υποστηρίζουν πως μέρος των πολυδραστικών NAbS παρουσιάζει μεγαλύτερη σε μήκος περιοχή VH και ιδιαίτερα της CDR-H3 από εκείνη των μονοειδικών αντισωμάτων και συνήθως, στις CDR περιοχές τους φέρουν συχνά υδρόφιλα και θετικά φορτισμένα αμινοξέα, όπως κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης, βοηθώντας στην αλληλεπίδραση με διάφορα αρνητικά φορτισμένα αντιγόνα. Επίσης σε ορισμένες περιπτώσεις, τα κατάλοιπα από την ελαφριά αλυσίδα των αντισωμάτων παίζουν βοηθητικούς ρόλους στον καθορισμό της πολυδραστικότητας των αντισωμάτων.

Συνολικά, φαίνεται πιο πιθανό ότι η εγγενής ικανότητα της αντιγονο-δεσμευτικής περιοχής να λαμβάνει διάφορες διαμορφώσεις είναι αυτό που καθορίζει την πολυδραστικότητα και αυτή μπορεί να παρέχεται από πολλές πιθανές ακολουθίες CDR-H3 ενώ, μοναδικές αλληλουχίες ή δομικά χαρακτηριστικά της CDR-H3 που εμφανίζονται κατά αποκλειστικότητα στα πολυδραστικά αντισώματα δεν έχουν χαρακτηριστεί [79].

ο Η τρισδιάστατη δομή της μεταβλητής περιοχής

Η υψηλή προσαρμοστικότητα της εύκαμπτης επιφάνειας δέσμευσης των αντισωμάτων μπορεί να προσδώσει στα αντισώματα τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με πολλά και δομικά διαφορετικά αντιγόνα (80, 81). Μια πληθώρα μελετών υποδεικνύει πως τα πολυδραστικά αντισώματα μπορεί να χρησιμοποιήσουν διάφορους μοριακούς μηχανισμούς για την αλληλεπίδραση με τα διάφορα αντιγόνα στόχους. Τρία πιθανά μοντέλα προσπαθούν να προσεγγίσουν το φαινόμενο της πολυδραστικότητας και της τριτοταγούς δομής της αντιγονικής θέσης σύνδεσης των φυσικών αντισωμάτων. (Εικόνα 6)

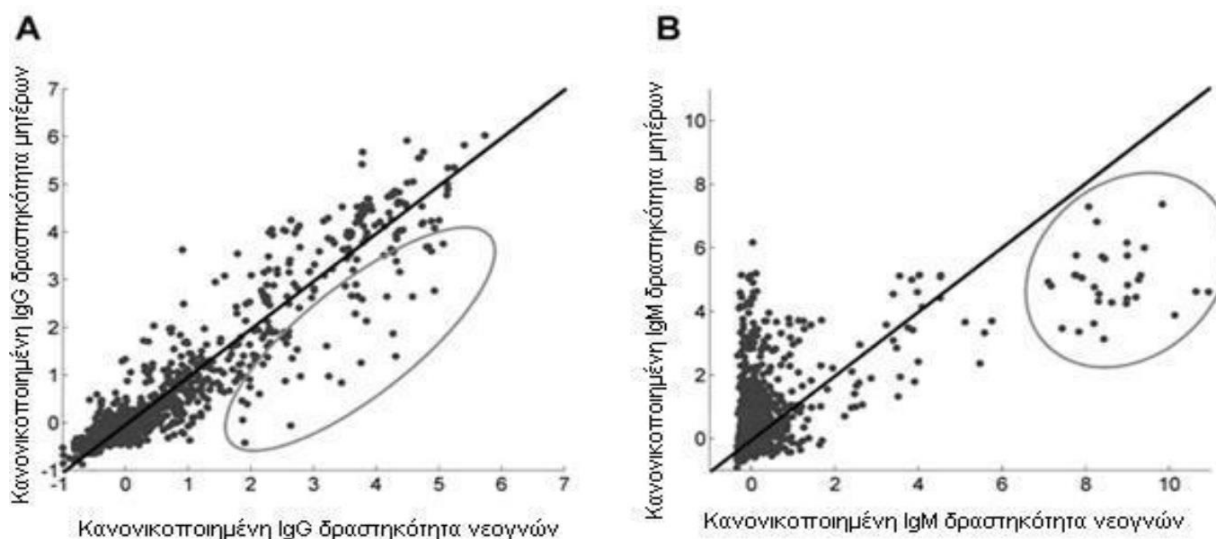


Εικόνα 6: Μοριακοί μηχανισμοί της πολυδραστικότητας των αντισωμάτων. Το μοντέλο της επαγόμενης προσαρμοστικής αλληλεπίδρασης (A) προτείνει ότι ένα μόριο Ab (γκρι χρώμα) με εύκαμπτη περιοχή δέσμευσης αντιγόνου μπορεί να προσαρμοστεί σε διαφορετικά αντιγόνα (κόκκινο χρώμα) μέσω δομικών αλλαγών που πραγματοποιούνται κατά τη στιγμή της αλληλεπίδρασης [77, 82]. Αντίθετα, το μοντέλο της διαμορφωτικής ισομέρειας (B) προτείνει την ύπαρξη διαμορφωτικών ισομερών ενός μόνο αντισώματος Ab. Κάθε ισομερές έχει διαφορετική διαμόρφωση της θέσης σύνδεσης του αντιγόνου και μπορεί να δεσμεύσει δομικά διαφορετικά αντιγόνα. Τα πολυδραστικά Abs μπορούν επίσης να χρησιμοποιήσουν ταυτόχρονα τα δύο μοντέλα για σύνδεση με διάφορα αντιγόνα [82, 83]. Μερικά αντισώματα μπορούν επίσης να χρησιμοποιούν διαφορετικές περιοχές από τις θέσεις δέσμευσης του αντιγόνου για σύνδεση με διάφορα αντιγόνα (Γ) [84]. Προσαρμοσμένο- Dimitrov, D.J., et al. 2013, [78].

ο Αντιγόνα – στόχοι

Τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας δεν αναγνωρίζουν εξειδικευμένους μονοδιάστατους αντιγονικούς επίτοπους αλλά αντιγονικά μοτίβα συντηρημένα κατά την εξέλιξη, των οποίων η έκφραση είναι ανεξάρτητη από γεγονότα μεταλλάξεων [58]. Αυτό το σύστημα αναγνώρισης εξασφαλίζει μία γρήγορη ανοσιακή απάντηση παρακάμπτοντας τους μηχανισμούς μεταλλάξεων προς ωρίμανση της συγγένειας προσδίδοντας στην φυσική ανοσία τον ρυθμιστικό χαρακτήρα της ανοσο-επιτήρησης και ομοιόστασης του οργανισμού.

Τα NAb, εφόσον αποτελούν μέρος της φυσικής ανοσίας, αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα δομικά διάφορων αντιγόνων και συντηρημένων δομών του εαυτού και του ξένου. Αναγνωρίζουν μια ποικιλία αντιγονικών επιτόπων, που βρίσκονται σε ενδοκυττάρια διαμερίσματα όσο και στην κυτταρική επιφάνεια, ενώ φαίνεται να αναγνωρίζουν και κυκλοφορούντα μακρομόρια και απτένια, που χαρακτηρίζονται από μεγάλη συντηρητικότητα κατά την διάρκεια της εξέλιξης. Σε αυτά περιλαμβάνονται κάποιες πρωτεΐνες (πχ. του κυτταρικού σκελετού), τα νουκλεϊνικά οξέα (DNA, RNA), υδατανθρακικοί επίτοποι, φωσφολιπίδια, γλυκοπρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, καθώς και απτένια (πχ. TNP, τρινιτροφαινόλη). Οι επίτοποι που αναγνωρίζουν τα NAb φαίνεται να σχετίζονται με τρισδιάστατες δομές ή φορτία και όχι με κοινούς επιτόπους εξειδικευμένης αλληλουχίας. Έχει προσδιοριστεί πως NAb με μεταβλητές περιοχές πλούσιες σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα μπορούν να αναγνωρίσουν και να αλληλεπιδράσουν καλύτερα με αρνητικά φορτισμένα μόρια, όπως το DNA. Συνολικά, τα πολυδραστικά NAb δεσμεύονται σε ένα ευρύ φάσμα μορίων, εαυτών και ξένων, αλληλεπιδρώντας είτε με τη σύσταση, είτε με τη δομή τους, είτε με το φορτίο τους. Από μελέτες έχει φανεί πως το ρεπερτόριο των NAb εμφανίζει επιλεκτικότητα έναντι των αντιγόνων-στόχων και πως ανάμεσα στο ρεπερτόριο της δραστηρότητάς τους υπάρχουν δραστηρότητες που κυριαρχούν έναντι των άλλων (**Εικόνα 7**) [85].



Εικόνα 7: Κανονικοποιημένες δραστηρότητες αντισωμάτων τάξης G (A) και M (B) των νεογνών (άξονας x) και των μητέρων τους (άξονας y). (A) Για τα περισσότερα από τα αντιγόνα παρουσίαζαν παρόμοιες δραστηρότητες οι IgG των νεογνών και των μητέρων, ενώ μόνο ένα μικρό κλάσμα των αντιγόνων δείχνει σημαντικές αποκλίσεις από αυτή την τάση, παρουσιάζοντας υψηλότερες δραστηρότητες μόνο από τις IgG των νεογνών (κυκλωμένο). (B) Δυο τύποι αντιγονικών πληθυσμών μπορούν να ανιχνευτούν. Ο πρώτος πληθυσμός είναι η συντριπτική πλειοψηφία των αντιγόνων που χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλή δραστηρότητα από τις IgM των νεογνών σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των μητέρων τους. Η δεύτερη ομάδα χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα της δραστηρότητας των IgM των νεογέννητων και έλλειψη δραστηρότητας από τις μητέρες [85].

1.4. Βιολογικός ρόλος των NAbS

Τα NAbS διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στις φυσιολογικές λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος και του οργανισμού γενικότερα. Το συμπέρασμα αυτό απορρέει από την πλέον επιβεβαιωμένη παρουσία τους σε όλους τους οργανισμούς που έχουν μελετηθεί (κουνέλια, μύες, επιμύες, διάφορα είδη ψαριών και στον άνθρωπο) καθώς και στο γεγονός πως τα NAbS αναγνωρίζουν φυλογενετικά συντηρημένα, ξένα και ενδογενή, αντιγόνα κατά την εξέλιξη των ειδών.

Το πλήθος των ρόλων που φαίνεται να έχουν τα NAbS δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, άλλα σύμφωνα με τα ως τώρα δεδομένα, φαίνεται πως κατά κύριο λόγο δρουν: α) στον περιορισμό της ιστικής βλάβης, β) στην αντιμετώπιση οξειδωμένων επιτόπων, γ) στην ανοσορύθμιση, δ) στη διαδικασία του οψονισμού, ε) στην ενεργοποίηση του συστήματος συμπληρώματος, ζ) στην εξουδετέρωση ιών και τοξινών, η) στη φαγοκύτωση, θ) στην ενδοκύτωση μέσω υποδοχέων, ι) στην αλληλεπίδραση με επιφανειακούς υποδοχείς, κ) στην κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από αντισώματα και λ) στην απευθείας αντιμικροβιακή δράση (**Εικόνα 8**) [86].

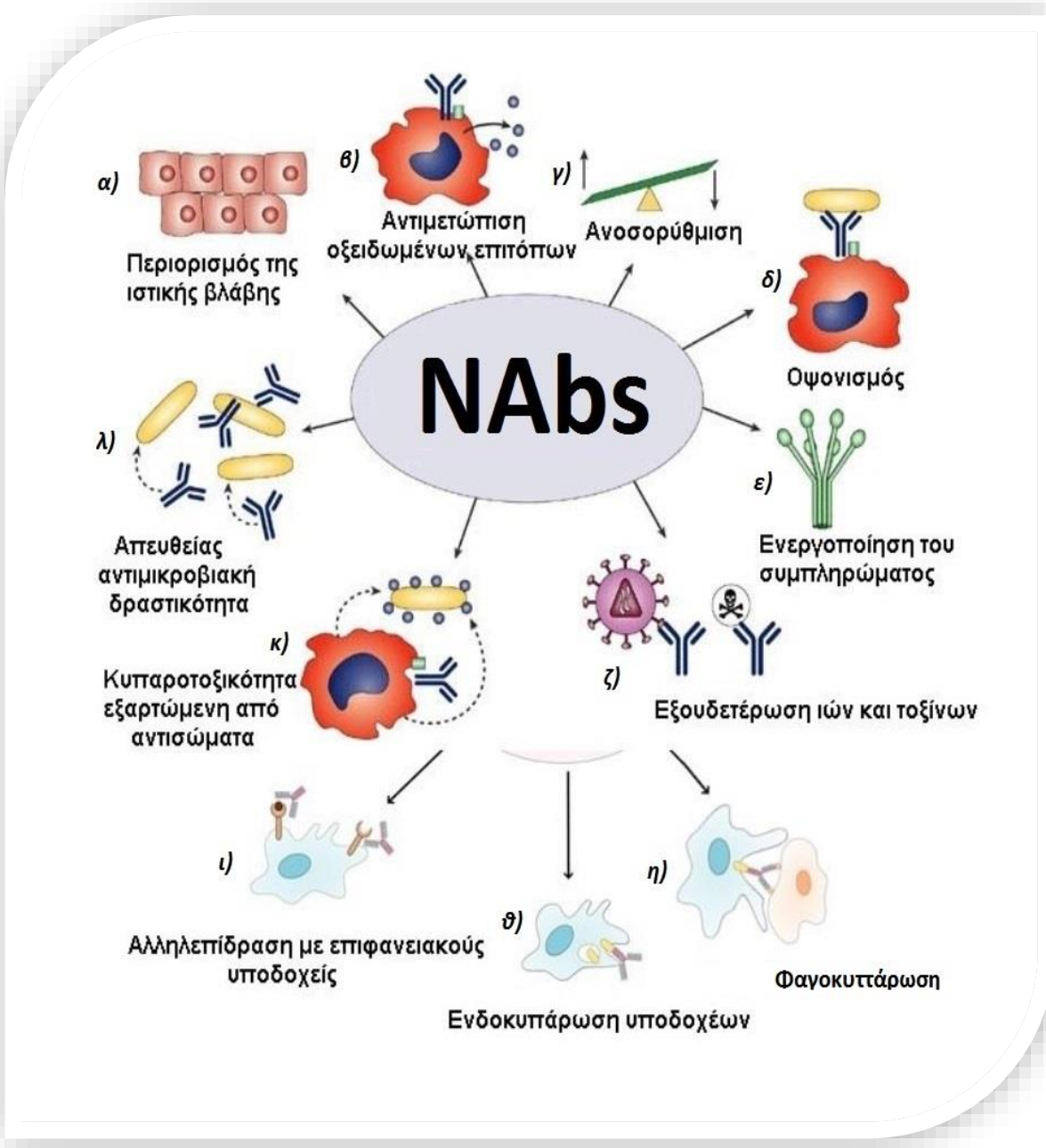
Ο ρόλος των NAbS στην απομάκρυνση των προϊόντων του μεταβολισμού προτάθηκε από τον P. Grabar το 1975 ο οποίος παρατήρησε μια αυξανόμενη παρουσία αυτοαντισωμάτων όταν υπήρχε καταστροφή ιστού ή αλλοίωση του από εξωγενείς παράγοντες [87]. Τα NAbS θεωρείται πως συμμετέχουν στην απομάκρυνση μιας πληθώρας προϊόντων του μεταβολισμού καθώς επίσης, χρίζει ιδιαίτερης σημασίας ο ρόλος τους στην απομάκρυνση των αποπτωτικών και γηρασμένων κυττάρων.

Η άμυνα έναντι βακτηρίων, ιών και άλλων παθογόνων παραγόντων είναι καθοριστικής σημασίας με τα πολυδραστικά NAbS να αποτελούν μέρος του σκέλους της φυσικής ανοσίας και να συμβάλλουν στην πρόσληψη, επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνων στα μακροφάγα [88]. Ο σημαντικότερος μηχανισμός δράσης των φυσικών αυτοαντισωμάτων είναι μέσω ενεργοποίησης του συμπληρώματος.

Τα NAbS μπορούν να θεωρηθούν ως αυτό-υποδοχείς, που είτε ελεύθεροι στη κυκλοφορία είτε δεσμευμένοι πάνω σε κυτταρικές μεμβράνες διαδραματίζουν ανοσορυθμιστικό ρόλο, μέσω της αλληλοαναγνώρισής τους καθώς και μέσω αναγνώρισης αντιγόνων του εαυτού και του ξένου [19]. Ένας άλλος ανοσορυθμιστικός ρόλος των NAbS είναι μέσω της ρύθμισης της δράσης των κυτταροκινών. Υπάρχουν αντισώματα που αντιδρούν με διάφορες κυτταροκίνες και εμποδίζουν την πρόσδεσή τους στους υποδοχείς τους. Μέσω αυτού του μηχανισμού περιορίζεται η ένταση της ανοσιακής απόκρισης που μπορεί να προκληθεί λόγω της περίσσειας κυτταροκινών. Τα NAbS μπορούν επίσης να λειτουργούν και ως μεταφορείς των κυτταροκινών και να αυξάνουν το χρόνο ημιζωής τους στην κυκλοφορία, ενώ τα σύμπλοκα κυτταροκινών-αντισωμάτων μπορεί να συνεισφέρουν σημαντικά στην ενεργοποίηση κυττάρων του ανοσιακού συστήματος [88].

Τα NAbS συμμετέχουν στη ρύθμιση των B- και T-κυττάρων καθώς και στις διαδικασίες αντιγονοπαρουσίασης στα T-κύτταρα. Αναλυτικότερα, IgG-NAbS επηρεάζουν τον αριθμό των προγονικών B-κυττάρων και των προ-B-κυττάρων στο μυελό των οστών, υποδηλώνοντας έτσι έναν πιθανό αναδραστικό μηχανισμό με τον οποίο τα NAbS ρυθμίζουν την παραγωγή των κυτταρικών σειρών των B λεμφοκυττάρων, μέρος του γενικού μηχανισμού διατήρησης της ομοιόστασης του ανοσιακού συστήματος [89]. Ακόμη, τα NAbS αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων T-κυττάρων (CD8+ και CD4+) μέσω της πρόσδεσής τους με το τμήμα F(ab')₂ στον υποδοχέα των T-κυττάρων (TCR) ή σε άλλα μόρια, χωρίς να απαιτούν τη βοήθεια κάποιων ρυθμιστικών κυττάρων [90].

Τέλος, υπάρχουν NAbS που εκφράζουν ενεργότητα έναντι των υποδοχέων IgE που βρίσκονται σε βασεόφιλα και προκαλούν αποκοκκίωση και απελευθέρωση ισταμίνης ανταγωνιζόμενα *in vitro* τις IgE, ενώ *in vivo* θεωρείται πως εμπλέκονται στην ρύθμιση των αντιδράσεων αναφυλαξίας [91].



Εικόνα 8: Οι διαφορετικοί βιολογικοί ρόλοι των NAb's. Η εξουδετέρωση των τοξινών και των ιών, η ενεργοποίηση του συμπληρώματος και η απευθείας αντιμικροβιακή δραστηριότητα, είναι γεγονότα ανεξάρτητα από άλλα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος. Εν' αντιθέση, η εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταροτοξικότητα, και ο οψονισμός απαιτούν και άλλους μεσολαβητές του συστήματος. Προσαρμοσμένο- (Casadevall et al. 2004) [86].

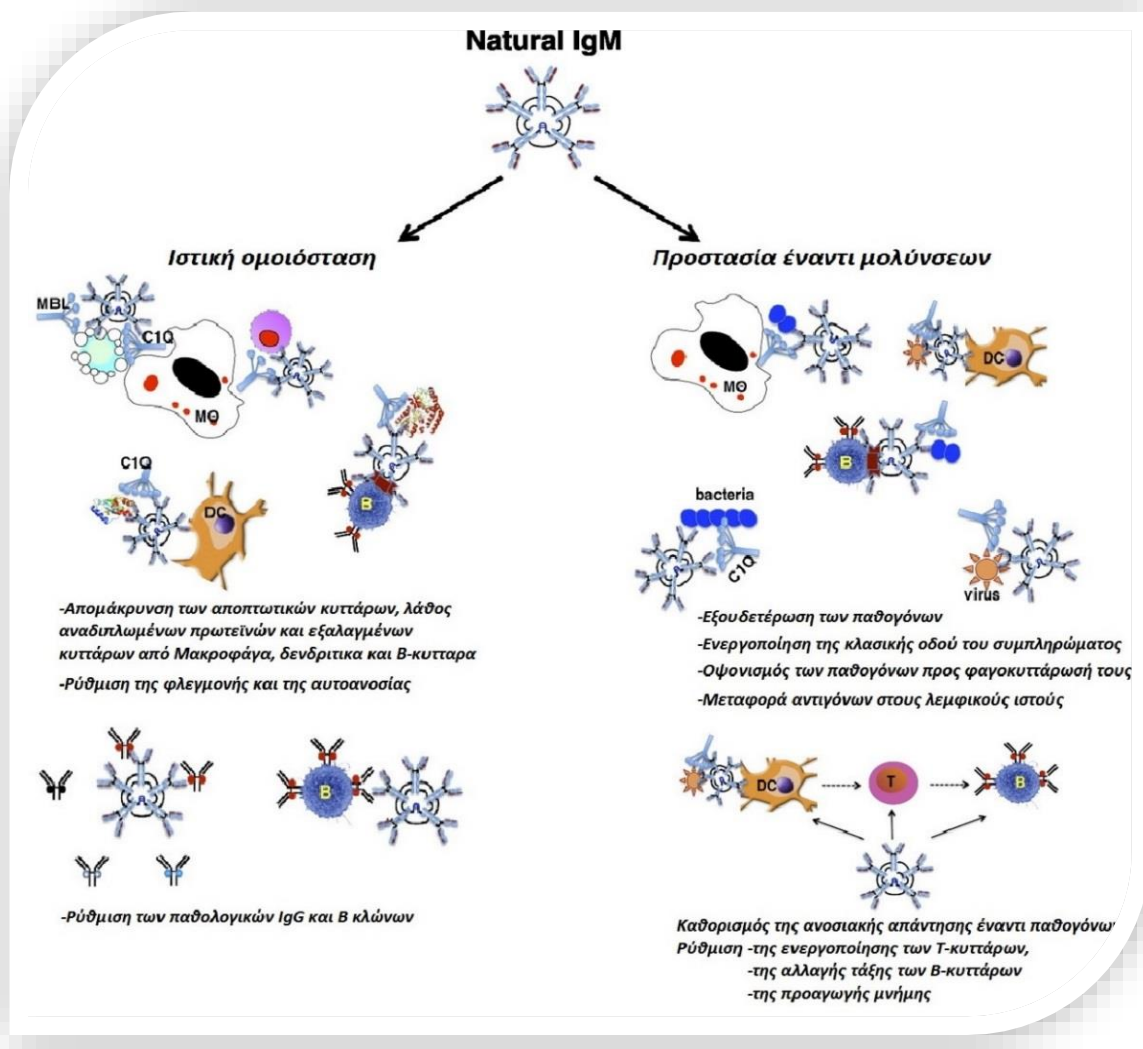
IgM-NAbs: Τα φυσικά αντισώματα της τάξης M αναγνωρίζουν με χαμηλή συγγένεια, ένα ευρύ φάσμα μικροβιακών στόχων και αυτόλογων συστατικών (αυτοαντιγόνων). Η σημαντικότητα των IgM-NAbs γίνεται ολοένα και εμφανέστερη καθώς αυξάνονται τα δεδομένα για τον λειτουργικό τους ρόλο και την εμπλοκή τους σε μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών [92]. Η πενταμερής δομή των φυσικών IgM με δέκα αντιγονικές θέσεις σύνδεσης [93] αναγνωρίζει φυλογενετικά συντηρημένες δομές όπως νουκλεϊκά οξέα, φωσφολιπίδια και υδατανθρακικούς επίτοπους [92]. Φυσικά IgM έχουν βρεθεί και ως μονομερή σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα [94] και χρόνια ασθένεια του ήπατος [95]. Ο προστατευτικός ρόλος των IgM-NAbs έχει αναδειχθεί σε ποικίλες ιικές, βακτηριακές, μυκητιακές, και παρασιτικές μολύνσεις [96]. Παραδειγματικά, έχει βρεθεί πως οι ιοί *vesicular stomatitis*, *lymphocytic choriomeningitis*, *influenza*, *Streptococcus pneumoniae*, και *Cryptococcus neoformans* [97, 98] δεσμεύονται και εξουδετερώνονται από IgM-NAbs [99-102]. Ποντίκια που δεν παράγουν IgM-NAbs είναι ευάλωτα σε μολύνσεις, λόγω της ανικανότητας απομάκρυνσης των παθογόνων, της μειωμένης επιστράτευσης ουδετερόφυλων και των ανεπαρκών επιπέδων προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών [103]. Τα επίπεδα των IgM-NAbs δεν επηρεάζονται από ξένα αντιγόνα υποδεικνύοντας τον χαρακτήρα της φυσικής ανοσίας των IgM-NAbs [104].

Υπο το πρίσμα λοιπόν της φυσικής ανοσίας, τα IgM-NAbs περιορίζουν την εξάπλωση των μολύνσεων μέσω διαδικασιών όπως η άμεση εξουδετέρωση (neutralization) [99,100,102], μέσω της δημιουργίας ανοσοσυμπλεγμάτων με μόρια του συμπληρώματος και της εξάλειψης των παθογόνων μέσω ενεργοποίησης αυτού [102,105] και της άμεσης παρουσίασης αντιγόνων στα δευτερογενή λεμφικά όργανα καθοδηγώντας και ρυθμίζοντας την ειδική ανοσοαπάντηση. Τα IgM-NAbs συνδέονται ισχυρά με τον παράγοντα C1q του συμπληρώματος ενεργοποιώντας τον καταρράκτη του συμπληρώματος [105,106]. Τα NAbs τάξης M παρουσιάζουν προστατευτικό ρόλο από τις μολύνσεις και με έμμεσο τρόπο, ανεξάρτητα του συμπληρώματος. Πιο συγκεκριμένα, ύστερα από μελέτες σε ποντίκια, βρέθηκε πως μονοκλωνικά πολυδραστικά NAbs ρυθμίζουν τη δράση της ιντερφερόνης και κατά συνέπεια την ιική μόλυνση από τον ιό VSV μέσω της πρόσδεσης τους στην επιφάνεια των μολυσμένων κυττάρων του ζώου. Θεωρείται πως τα αντισώματα αυτά αλληλεπιδρούν με νέους επίτοπους που δημιουργούνται στην επιφάνεια των κυττάρων μετά τη μόλυνση τους από τους ιούς [99].

Τα IgM-NAbs επίσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των αποπτωτικών και γηρασμένων κυττάρων [107]. Παραδειγματικά, η πρόσδεση αυτοαντισωμάτων IgM σε εξωκυττάρια ινίδια κερατίνης αυξάνει την απομάκρυνση των αδιάλυτων ινιδίων κερατίνης μετά το θάνατο των κερατινοκυττάρων [8]. Επίσης η πρόσδεση των IgM-NAbs στην οξειδωμένη LDL (Low-Density Lipoprotein) εμποδίζει την εναπόθεσή της στις αθηρωματικές πλάκες και συνεπώς προστατεύει από την ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης [108]. Επιπλέον, η πρόσδεση των NAbs έναντι της ζώνης 3, μιας διαμεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης των ερυθροκυττάρων με ρόλο ανιοντοανταλλάκτη, σε γηρασμένα ερυθροκύτταρα και σε συνδυασμό με τα συστατικά του συμπληρώματος, διευκολύνει την φαγοκυττάρωση των ερυθροκυττάρων από τα μονοκύτταρα [109].

Κατά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, το αποτέλεσμα των ενδοκυττάρων αποπτωτικών μηχανισμών είναι η παραγωγή φωσφατυδιλοχολίνης (PC) στο εξωκυττάριο τμήμα της πλασματικής μεμβράνης. Η PC αναγνωρίζεται από τα NAbs, κυρίως της τάξης M (αλλά και G), των οποίων η δέσμευση οδηγεί στην ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος και την προσέλκυση μακροφάγων, τα οποία φαγοκυτταρώνουν τα αποπτωτικά κύτταρα [110]. Τα IgM-NAbs επίσης, συνδέονται με την MBL (mannose-binding lectin), η οποία είναι συνδεδεμένη με τα αποπτωτικά κύτταρα [111, 112] και οδηγούν στην απομάκρυνση των ανοσοσυμπλεγμάτων μέσω της σύνδεσής με τον υποδοχέα Fcα/mR στα φαγοκύτταρα. Εναλλακτικά, η σύνδεση των IgM-NAbs στα αποπτωτικά κύτταρα μπορεί να επιστρατεύσει την MBL και τα ανοσοσυμπλέγματα μπορεί να απομακρυνθούν μέσω του υποδοχέων φαγοκυττάρωσης της καλρεκουλίνης [113].

Στην **Εικόνα 9** συνοψίζονται οι διάφοροι ρόλοι των IgM-NAbs που έχουν χαρακτηριστεί σε μελέτες σε ποντίκια [114]. Τέλος τα IgM-NAbs διαδραματίζουν καίριους ρόλους στην διατήρηση της ομοιόστασης των B-κυττάρων [115] στις διεργασίες της φλεγμονής [11, 116], στον περιορισμό της εμφάνισης αυτοανοσίας [117] και στην εξάλειψη των εξαλλαγμένων κυττάρων [114].

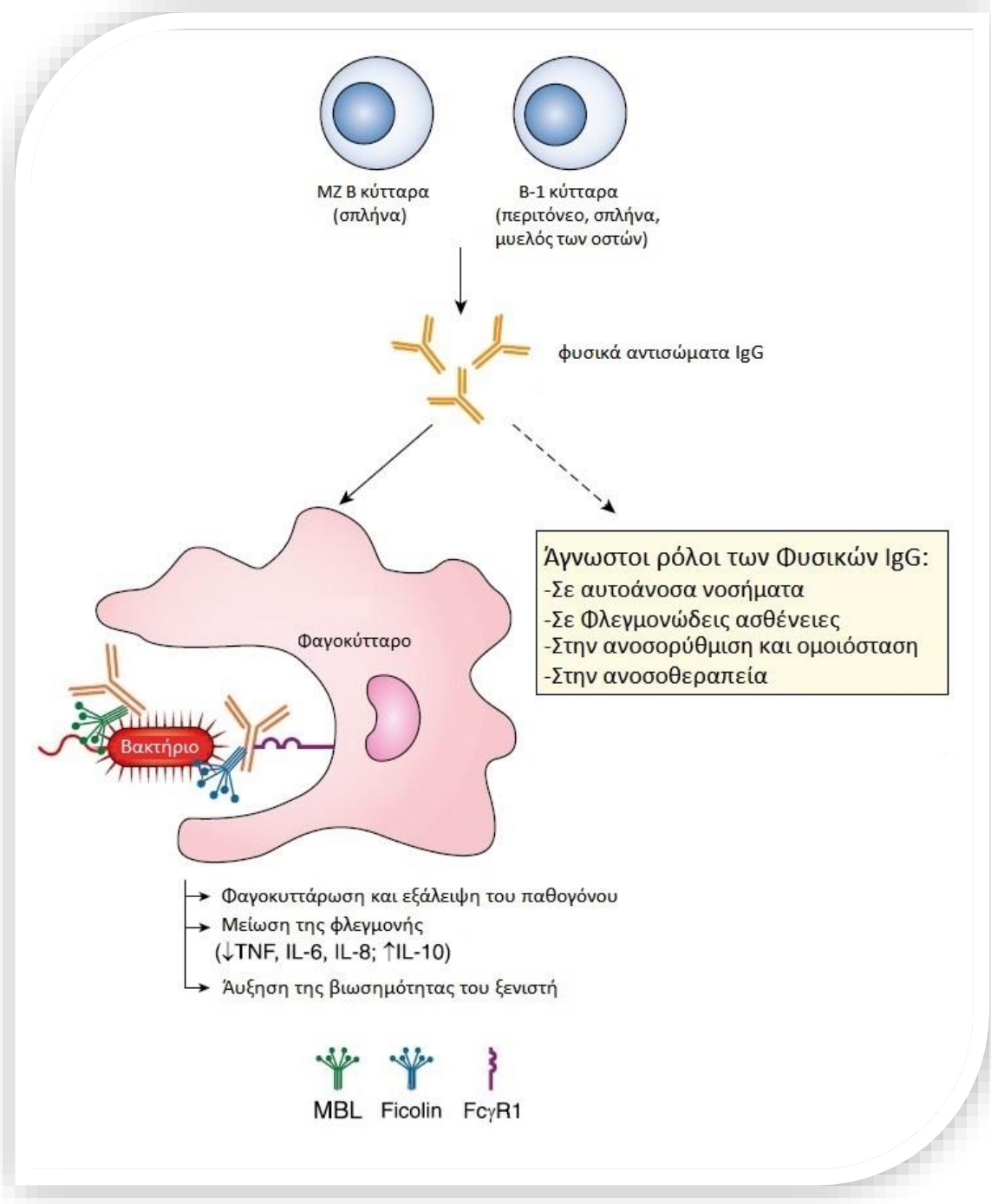


Εικόνα 9: Τα φυσικά IgM αντισώματα και οι μηχανισμοί διατήρησης της ισορροπίας του συστήματος. Τα φυσικά αντισώματα IgM μπορούν και διατηρούν την ισορροπία του οργανισμού μέσω ρύθμισης της ιστικής ομοιόστασης, δρώντας παράλληλα στην πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι μικροβίων και διαμορφώνοντας της ανοσολογική απάντηση. Ο ρόλος των IgM-NAbs συμπεριλαμβάνει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και βοηθά συνεργιστικά, περιορίζοντας την φλεγμονή και την εμφάνιση αυτοανοσίας και καρκινικής εξάλειψης. Αυτές οι δράσεις περιέχουν την αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων και την απομάκρυνση αυτών μέσω φαγοκυττάρωσης από τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα, την απομάκρυνση των εξαλλαγμένων κυττάρων και τον ανώμαλα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, καθώς και της ρύθμισης των παθολογικών IgG και B κλώνων. Επιπλέον, τα IgM-NAbs προστατεύουν τον οργανισμό από παθογόνους εισβολείς μέσω της άμεσης εξουδετέρωσής τους, μέσω της ενεργοποίησης του συμπληρώματος και της οψονοποίησης. Μεταφέρουν αντιγόνα στους λεμφικούς ιστούς και ρυθμίζουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων καθώς και την αλλαγή τάξης/ισότυπου των B-κυττάρων. Προσαρμοσμένο- Sriniv V. Kaveri, Gregg J. Silverman and Jagadeesh Bayry, 2012 [114].

IgG-NAbs: Τα φυσικά αντισώματα της τάξης G παρουσιάζουν χαμηλή συγγένεια και ειδικότητα έναντι των αντιγόνων στόχων τους σε σχέση με τα επαγόμενα IgG αντισώματα και η συγκέντρωσή τους στη κυκλοφορία κυμαίνεται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με αυτή των IgM-NAbs. Ενώ αρχικά θεωρούνταν πως τα αντισώματα αυτά δεν εμπλέκονταν στις διαδικασίες εξάλειψης των παθογόνων, εντούτοις, φαίνεται πως έχουν έναν προστατευτικό και θεμελιώδη ρόλο στη συστηματική φυσική ανοσιακή απάντηση [118].

Σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα με τη χρήση μονοκλωνικών φυσικών IgG αντισωμάτων απομονωμένων από υγιείς δότες, αποκαλύφθηκε ο πρώτος προστατευτικός ρόλος των IgG-NAbs κατά της βακτηριακής μόλυνσης [118]. Τα IgG-NAbs συνδεδεμένα σε υποδοχείς λεκτινών οι οποίοι έχουν συνδεθεί προηγουμένως στην επιφάνεια των βακτηρίων (οι υποδοχείς αυτοί γνωστοί ως PRRs π.χ. ficolin, MBL αναγνωρίζουν σακχαρικά μόρια στην επιφάνεια των μικροοργανισμών) οδηγούσαν σε απομάκρυνση των βακτηρίων μέσω του υποδοχέα FcγR1 σε φαγοκυττάρωσή τους από τα ανθρώπινα μονοκύτταρα. Η δράση των IgG-NAbs στις διαδικασίες απομάκρυνσης των παθογόνων βακτηρίων μέσω της σύνδεσής τους στους ορολογικούς υποδοχείς των λεκτινών συνοψίζεται στην **Εικόνα 10** [119]. Περεταίρω πειράματα έδειξαν πως κατά την βακτηριακή μόλυνση, στις φλεγμένους περιοχές παρατηρείται μία μείωση στη τιμή του pH [120-122] και στα επίπεδα του ασβεστίου [123-125] η οποία οδηγεί σε αύξηση της συγγένειας μεταξύ των φυσικών IgG και του υποδοχέα ficolin της οικογένειας των λεκτινών, αυξάνοντας έτσι τον βαθμό φαγοκυττάρωσης των παθογόνων [106, 126]. Φάνηκε πως το μικροπεριβάλλον της φλεγμένους περιοχής και η πτώση του PH οδηγούσε σε αύξηση των διαμοριακών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με αποτέλεσμα την αύξηση της συγγένειας μεταξύ των δύο μορίων [126]. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν πως το ανοσοποιητικό σύστημα εκμεταλλεύεται της φυσιο-χημικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της μόλυνση-φλεγμονής και πως η ύπαρξη των φυσικών IgG προάγει μια ισχυρότερη ανοσιακή απάντηση έναντι των παθογόνων της περιοχής.

Ο δυνητικός ρόλος των φυσικών IgG στην ρύθμιση της φλεγμονής αναδύθηκε με τα νεότερα δεδομένα όπου, συμπλέγματα μεταξύ των φυσικών IgG με το μόριο της αιμοσφαιρίνης ανευρέθηκαν κάτω από αιμολυτικές συνθήκες. Τα IgG-NAbs φάνηκε πως υποβοηθούν την απομάκρυνση της οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού οδηγώντας στην μείωση της φλεγμονής και στην επαναφορά της ομοιόστασης [128]. Η ερευνητική ομάδα του Hens ανακάλυψε πως οι αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες των IgG αντισωμάτων οφείλονται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του τμήματος Fc των αντισωμάτων αυτών [129]. Τα ευρήματά τους υπέδειξαν πως ανάλογα με το βαθμό της γλυκοζυλίωσης της Fc περιοχής των IgG αντισωμάτων αυτά αποκτούν διαφορετικό ρόλο στην φλεγμονή επάγοντας ενίοτε την ανάλογη ανοσο-απάντηση. Πιο συγκεκριμένα, η σιαλυλίωση των περιοχών αυτών οδηγεί σε αντι-φλεγμονώδη χαρακτήρα των αντισωμάτων ενώ οι αγαλακτοσυλιωμένες περιοχές αυτών οδηγούν σε ένα φλεγμονώδη χαρακτήρα.



Εικόνα 10: Ο ρόλος των IgG-NAbs στην άμυνα του ανοσοποιητικού συστήματος: Τα IgG-NAbs διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού. Αναγνωρίζουν έμμεσα τα παθογόνα και οδηγούν στην εξάλειψή τους (αριστερά) μέσω της αλληλοαναγνώρισης με την λεκτίνη συνδεόμενη με μαννόζη (MBL) και το μόριο Ficolin οδηγώντας την φαγοκυττάρωσή τους μέσω του υποδοχέα FcγR1. Επιπλέον ελέγχουν την φλεγμονή μέσω ρύθμισης της παραγωγής κυτταροκινών (μειώνοντας τις προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF, IL-6 και IL-8 και αυξάνοντας την αντ-φλεγμονώδη IL-10). Προσαρμοσμένο- Saswati Panda and Jeak L. Ding, 2015 [119].

IgA-NAbs: Οι λεμφικοί ιστοί που σχετίζονται με το έντερο (Gut-associated lymphoid tissues- GALT) και αποτελούνται από της πλάκες του Peyer, τους μεσεντέριους λεμφαδένες, τα λεμφοκύτταρα του χόριου του βλεννογόνου και τα ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα, έχουν διακριτές λειτουργίες και εξειδικευμένες ιδιότητες που τα ξεχωρίζουν από το συστηματικό ανοσοποιητικό σύστημα [130]. Τα B-κύτταρα του GALT εξειδικεύονται στην παραγωγή και στη μεταφορά IgA αντισωμάτων στον αυλό του εντέρου.

Οι ανοσοσφαιρίνες της τάξης A (IgA) επικρατούν στις ενδοθηλιακές επιφάνειες του οργανισμού παρέχοντας μια πρώτη γραμμή άμυνας έναντι της εισβολής των παθογόνων διαμέσου αυτών των επιφανειών. Τα IgA αντισώματα ανήκουν σε δύο υποτάξεις A1 και A2. Στον άνθρωπο η υπόταξη A1 ανευρίσκεται στην κυκλοφορία κυρίως ως μονομερές ενώ η εκκρινόμενη μορφή της (sIgA) ανευρίσκεται στην εντερική κυρίως κοιλότητα (αλλά και σε άλλα εκκρινόμενα υγρά των βλεννογόνων) ως διμερές, όπου δύο μονομερή μόρια IgA συνδέονται ομοιοπολικά με μια αλυσίδα j (j-chain) [131, 132]. Μέσω της αλυσίδας j παρέχεται η δυνατότητα μεταφοράς των διμερών IgA τα οποία εισέρχονται διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου στον εντερικό αυλό. Η εκκρινόμενη μορφή των IgA αντισωμάτων αποτελεί τον κύριο φραγμό έναντι της εισβολής των μικροβίων στις επιθηλιακές κοιλότητες και έχει έναν θεμέλιο ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης του μικροβιώματος καθώς και της ρύθμισης της ανοσοαπάντησης έναντι μικροβίων που ανευρίσκονται στις τροφές και στο έντερο [133, 134]. Πολλοί βιολογικοί ρόλοι έχουν αποδοθεί στις ιδιότητες της sIgA με κυριότερο αυτόν του ανοσιακού αποκλεισμού [135]. τα αντισώματα IgA συνδέονται σε συστατικά των μικροβιακών επιφανειών μειώνοντας την δυνατότητα εισβολής τους παρεμποδίζοντας τις αλληλεπιδράσεις τους με τα επιθηλιακά κύτταρα ενώ παράλληλα μειώνουν την έκθεση του συστήματος σε φλεγμονώδεις επίτοπους που φέρουν διάφορα μικρόβια στην επιφάνειά τους μειώνοντας με τον τρόπο αυτό τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Παράλληλα τα IgA επιτρέπουν κάποια επωφελή βακτήρια να συνδεθούν με διάφορα συστατικά της βλέννας τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας. Με αυτές τις δράσεις τα αντισώματα IgA ρυθμίζουν την σύσταση του μικροβιώματος του εντέρου.

Φυσικά αντισώματα της τάξης A έχουν βρεθεί τόσο στον ποντικό όσο και στον άνθρωπο [136, 137]. Τα αντισώματα αυτά ανευρίσκονται σε φυσιολογικούς/ υγιείς οργανισμούς και φαίνεται πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των παθογόνων στις επιθηλιακές κοιλότητες. Τα αντισώματα αυτά φαίνεται πως παράγονται από B-1 κύτταρα που ανευρίσκονται στα ανατομικά σημεία του GALT και αναγνωρίζουν μία μεγάλη γκάμα αντιγόνων της επιφανείας διαφόρων βακτηρίων καθώς και του εαυτού [138, 139]. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως σε αρκετές μελέτες έχουν περιγραφεί φυσικά IgA τα οποία φέρουν ένα σημαντικό αριθμό μεταλλάξεων. Ωστόσο οι μεταλλάξεις αυτές φάνηκε πως δεν αποτελούν προϊόν αντιγονικής προαγωγής και πως η πολυδραστικότητά τους δεν επηρεάζονταν από αυτές. Συνολικά φαίνεται πως ο ρόλος των φυσικών IgA του GALT είναι ρυθμιστικός ως προς τη σύσταση του μικροβιώματος μέσω της άμεσης και ευρύ φάσματος αντιβακτηριακής τους δραστηριότητας καθώς και της απομάκρυνσης πιθανά επιζήμιων συστατικών του εαυτού και των παραπροϊόντων του μεταβολισμού. Τέλος έχει φανεί πως B-1 κλώνοι του GALT είναι πιθανό μετά από επαγωγικά σήματα από T βοηθητικά κύτταρα να μεταβούν σε ωρίμανση συγγένειας τόσο έναντι παθογόνων μικροβίων προς την εξάλειψή τους αλλά και έναντι αυτοαντιγόνων παράγοντας εξειδικευμένα αντισώματα και προάγοντας αυτοάνοσες εκδηλώσεις [140].

➤ **NAbs και παθολογικές καταστάσεις**

Όπως έχει γίνει κατανοητό, τα NAb είναι μία συνιστώσα της φυσικής αυτοανοσίας. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις οι τίτλοι συγκεκριμένων αυτοαντισωμάτων σχετίζονται με την παρουσία και τη σοβαρότητα ενός αυτοάνοσου νοσήματος, ενώ σε άλλες περιπτώσεις δεν υπάρχει καθαρός συσχετισμός μεταξύ NAb και αυτοάνοσου νοσήματος. Επιπλέον, οι τίτλοι και το πρότυπο της δραστηριότητας των NAb μεταβάλλεται σε ασθένειες των οποίων η παθογένεια δεν σχετίζεται με το ανοσιακό σύστημα [28].

Άτομα που χαρακτηρίζονται από προδιάθεση σε αυτοάνοσα νοσήματα μπορεί να αναπτύξουν κάποιας μορφής ανοσοπαθολογία, συνήθως μετά από έντονη διέγερση και ενεργοποίηση των κυττάρων που παράγουν NAb. Τέτοια ερεθίσματα, συνήθως, διαταράσσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ B και T λεμφοκυττάρων, διευκολύνοντας έτσι την επαγωγή κάποιας ανοσοπαθολογικής κατάστασης [141]. Σημαντικές μεταβολές του φυσιολογικού ρεπερτορίου και των ιστύπων των NAb έχουν αναφερθεί σε πολλά συστηματικά αλλά και οργανοειδικά αυτοάνοσα νοσήματα (π.χ. ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης, η αιμολυτική αναιμία και η ηπατίτιδα αυτοάνοσης αιτιολογίας) ενώ σε άλλα νοσήματα (π.χ. Ρευματοειδή αρθρίτιδα, Συστηματικός ερυθηματώδεις λύκος, Χρόνια λεμφογενής λευχαιμία) δεν παρατηρείται χαρακτηριστική μεταβολή του φυσιολογικού ρεπερτορίου των NAb, παρόλο που αυτά αλλά και τα κύτταρα που τα παράγουν φαίνεται να συμμετέχουν ενεργά στην παθογένεια των νοσημάτων [141]. Τόσο ο εντοπισμός NAb στους ιστούς, που αποτελούν στόχους της αυτοάνοσης προσβολής, όσο και η παρουσία κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων με NAb, συνηγορούν για τη συμμετοχή τους στην παθογένεια, αν και ο ακριβής ρόλος τους παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστος.

Επίσης, τα NAb παίζουν ρόλο και στις νόσους του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Εφόσον στην παθολογική κατάσταση τα επίπεδα τους διαταράσσονται, μπορούν να λειτουργήσουν ως ορολογικοί δείκτες για διαγνωστικούς σκοπούς, χωρίς να συμβάλλουν στην παθολογική διαδικασία ή/και στην εξέλιξη της νόσου.

1.5. Εφαρμογές στη βιοϊατρική

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, υπάρχουν δεδομένα που υποδηλώνουν ότι τα NAb μπορούν να παρέμβουν ευεργετικά ή ακόμη και να καταστείλουν την αυτοάνοση νόσο. Έτσι το ενδιαφέρον έχει στραφεί και προς τη χρήση τους σε θεραπευτικές εφαρμογές. Η χορήγηση των NAb ως θεραπευτικά σκευάσματα έχει ως κύριο τρόπο δράσης την ανασορύθμιση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση της ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης (intravenous immunoglobulin, IVIg) στη θεραπεία ασθενών με αυτοάνοσα και άλλα νοσήματα [28, 141, 142]. Η IVIg είναι πλούσια σε NAb της τάξης G και τα θεραπευτικά αποτελέσματα από τη χορήγησή της αντανάκλουν τις βιολογικές δράσεις αυτών των αντισωμάτων. Σε πειραματικά μοντέλα *in vivo*, τα πολυδραστικά NAb, που απομονώθηκαν από IVIg, φαίνεται να προστατεύουν τον οργανισμό από την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων [141]. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί NAb που στοχεύουν σε συσσωματώματα πρωτεϊνών εντός του εγκεφάλου. Αυτό θα μπορούσε να είναι ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις στις νευροεκφυλιστικές ή νευροαυτοάνοσες διαταραχές. Ακόμη, περαιτέρω στοιχεία απέδειξαν την ύπαρξη NAb που στοχεύουν σε αντιγόνα επάνω στους νευρώνες και στα ολιγοδενδροκύτταρα, προωθώντας έτσι την ανάπτυξη νευραξόνων και την επαναμυελίνωσή τους [143].

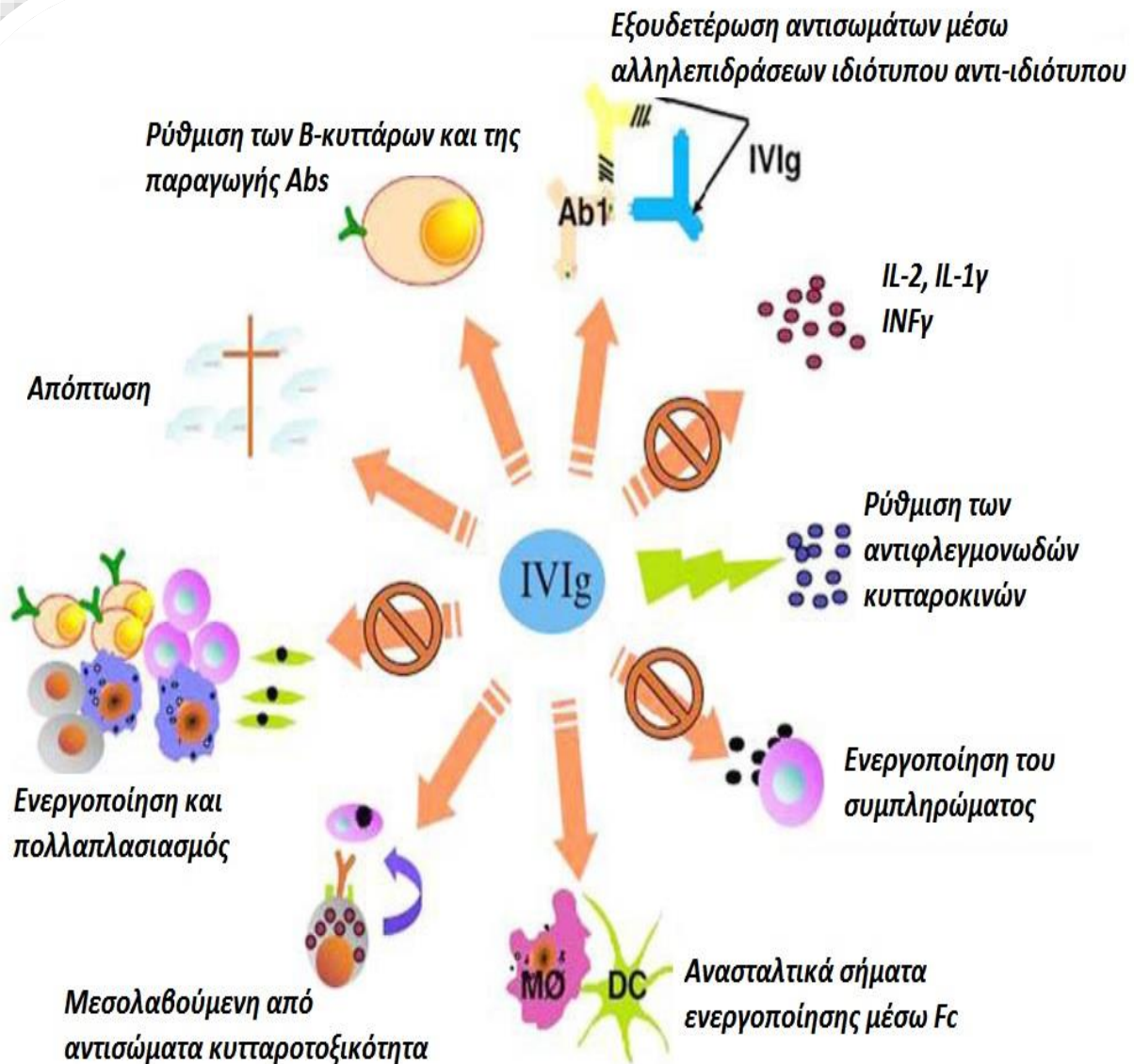
➤ Ενδοφλέβια Ανοσοσφαιρίνη (IVIg)

Ένα από τα σημαντικότερα παραδείγματα θεραπευτικής εφαρμογής των NAb είναι η χορήγηση της ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης (Intravenous Immunoglobulin-IVIg). Η IVIg είναι ένα θεραπευτικό παράγωγο του αίματος ενδοφλέβιας χορήγησης, που αποτελείται από ένα μείγμα ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών, οι οποίες προέρχονται από μεγάλο αριθμό υγιών δοτών (πάνω από 50.000). Χορηγείται κυρίως σε περιπτώσεις ανοσοανεπάρκειας, αλλά και αυτοάνοσων και φλεγμονωδών νοσημάτων. Σήμερα κυκλοφορούν πολλά θεραπευτικά παρασκευάσματα της IVIg, που διαφέρουν μεταξύ τους γενικά ως προς τα στάδια παραγωγής τους, τη σύστασή τους ως προς τις Ig και τα σακχαρικά σταθεροποιητικά έκδοχα, τη μορφή τους (διαλυτοποιημένη ή σε σκόνη) και τον αριθμό δοτών [144, 145].

Το φάσμα των ασθενειών στις οποίες χρησιμοποιείται η IVIg συνεχώς διευρύνεται. Χορηγείται σε χαμηλές δόσεις ως θεραπεία υποκατάστασης αλλά και σε περιπτώσεις δευτερογενών ανοσοανεπαρκειών όπου η παραγωγή αντισωμάτων είναι μειωμένη [146]. Παράλληλα, η IVIg, χορηγούμενη σε υψηλές δόσεις (μέχρι 2g/kg/μήνα), διαθέτει και έναν ανοσορρυθμιστικό ρόλο, αποτελώντας έτσι ένα χρήσιμο θεραπευτικό εργαλείο για φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες διαταραχές. Κλινικές μελέτες έχουν επίσης δείξει πως η ανοσορρυθμιστική θεραπεία με IVIg έχει θετικά αποτελέσματα σε πάρα πολλές νόσους, όπως χρόνια φλεγμονώδης απομυελινωτική πολυνευροπάθεια, δερματομυοσίτιδα, πέμφιγα, αγγειίτιδα, βαριά μυασθένεια, σκλήρυνση κατά πλάκας, και ΣΕΛ. Επίσης χορηγείται και σε γυναίκες με ιστορικό αυτόματων αποβολών [147].

Οι μηχανισμοί δράσης της IVIg φαίνεται πως εξαρτώνται τόσο από την παθογένεια της εκάστοτε νόσου, όσο και από τη χορηγούμενη δόση. Σε περιπτώσεις ανοσοανεπάρκειας ο μηχανισμός δράσης είναι αυτός της υποκατάστασης. Η έλλειψη αντισωμάτων ειδικών για ξένα αντιγόνα και παθογόνους μικροοργανισμούς υποκαθίσταται από την δεξαμενή αντισωμάτων της IVIg που περιέχει ένα ευρύ φάσμα ειδικοτήτων, ικανών να αναγνωρίσουν και να αδρανοποιήσουν ένα πλήθος ξένων αντιγόνων [148]. Η ανοσορρυθμιστική δράση της IVIg είναι πιο περίπλοκη και οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως. Οι IgG προάγουν τόσο προφλεγμονώδεις όσο και αντιφλεγμονώδεις αποκρίσεις, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους. Σε χαμηλές δόσεις (500mg/kg σωματικού βάρους) προκαλείται ενεργοποίηση του συμπληρώματος τόσο μέσω της κλασικής όσο και μέσω της εναλλακτικής οδού, κυρίως με την ενεργοποίηση του θραύσματος C3b [149]. Αντίθετα, χορηγούμενη σε υψηλές δόσεις, η IVIg έχει αντιφλεγμονώδη δράση, για την οποία έχουν προταθεί διάφοροι πιθανοί και ίσως αλληλεπικαλυπτόμενοι μηχανισμοί [150].

Ως σήμερα οι κύριοι γνωστοί μηχανισμοί δράσης της IVIg είναι μέσω: 1) των Fc τμημάτων και της σύνδεσής τους με τους υποδοχείς FcγR, 2) της αλληλεπίδρασης με το σύστημα του συμπληρώματος, 3) της ρύθμισης της έκφρασης και της λειτουργίας των κυτταροκινών, 4) της εξουδετέρωσης αυτοαντισωμάτων (αAbs) και 5) της ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης (**Εικόνα 11**)



Εικόνα 11: Προτεινόμενοι μηχανισμοί της δράσης της IVIG σε μολυσματικές ασθένειες και ανοσοανεπάρκειες. Ο ρόλος των δράσεων της IVIG περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις με μια πληθώρα κυτταρικών και διαλυτών συστατικών του ανοσοποιητικού συστήματος. Προσαρμοσμένο- VS Negi et. al. 2007 [150].

2. Κυτταροδισιδυτικά Αντισώματα (Cell-Penetrating Antibodies—CPAbs)

Τα κυτταροδισιδυτικά αντισώματα (CPAbs) αποτελούν έναν διακριτό υποπληθυσμό αντισωμάτων με την ικανότητα να εισέρχεται σε ζώντα κύτταρα. Η ανακάλυψή τους είναι μεταγενέστερη από αυτή των φυσικών αντισωμάτων ενώ, αρχικά, η κυτταροδισιδυτική τους ικανότητα αντιμετώπισε αρκετή κριτική. Η πρώτη ξεκάθαρη περιγραφή έγινε το 1978 από τον Alarçon-Segonia και τους συνεργάτες του, αναφερόμενοι σε αυτοαντισώματα τάξης IgG που αναγνώριζαν πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (RNPs). Τα αντισώματα αυτά ανευρέθηκαν στον ορό ασθενούς με μικτή νόσο του συνδετικού ιστού (ΜΝΣΙ) και είχαν την ικανότητα να εισέρχονται στον πυρήνα ζώντων λεμφοκυττάρων ανθρώπινης προέλευσης [151, 152]. Η ανακάλυψη αυτή ήρθε να αντικρούσει την μέχρι τότε δογματική άποψη, ότι η χυμική απόκριση περιορίζεται αποκλειστικά στον εξωκυττάριο χώρο.

Τα μετέπειτα χρόνια που ακολούθησαν, διάφορες μελέτες επιβεβαίωσαν την ύπαρξη των CPAbs [153] τα οποία αρχικά συσχετίστηκαν με παθολογικά χαρακτηριστικά αυτοάνοσων ασθενειών [84, 154]. Παραδειγματικά, πολλές μελέτες αναφέρονται στην υψηλή συχνότητα εμφάνισης κυτταροδισιδυτικών αντισωμάτων σε ασθενείς με ΣΕΛ, των οποίων ο εντοπισμός είναι κυρίως πυρηνικός και σχετίζεται με τα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της νόσου [155, 156]. CPAbs έχουν βρεθεί επίσης και στον ορό ή σε βιοψίες ασθενών με σκληρόδερμα, ρευματοειδή αρθρίτιδα και αντι-φωσφολιπιδικό σύνδρομο. Επίσης, διείσδυση αυτοαντισωμάτων έχει παρατηρηθεί σε ηπατοκύτταρα οδηγώντας σε μειωμένη σύνθεση της απολιποπρωτεΐνης Β [157], σε νεφρικά πειραματικά κύτταρα έναντι δίκλωνου DNA επάγοντας σύντηξη των ποδοκυττάρων [158], καθώς και σε ασθενείς με γλαύκωμα [159] και νευροεκφυλιστικές ασθένειες [160].

Οι αρχικές μελέτες των CPAbs επικεντρώθηκαν στον προσδιορισμό αυτών των αντισωμάτων σε πολυκλωνικό επίπεδο, όμως με μεταγενέστερα πειράματα σε μοντέλα ποντικών που εμφανίζουν αυθόρμητο λύκο [(NZBxNZW)F1 και MRL/lpr], κατέστη δυνατή η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός CPAbs και σε μονοκλωνικό επίπεδο [161, 162]. Από μελέτες σε τέτοια ποντίκια δείχθηκε πως τα CPAbs αφού διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα, εμπλέκονται στην παθογένεση του ΣΕΛ και παρεμβαίνουν σε κυτταρικές λειτουργίες, προκαλώντας απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση.

Σήμερα, πέρα των παθολογικών καταστάσεων, σε μια πληθώρα μελετών έχουν ταυτοποιηθεί CPAbs τα οποία ανευρίσκονται στον ορό υγιών ατόμων τόσο σε πολυκλωνικό όσο και σε μονοκλωνικό επίπεδο. Στο εργαστήριο Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστερ (ΕΙΠ) έχει διαπιστωθεί η παρουσία φυσικών πολυκλωνικών CPAbs στην IVIg (Intravenous Immunoglobulin-IVIg-ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη). Επίσης, απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά και μονοκλωνικά φυσικά CPAbs σε ποντίκια BALB/c. Στη συνέχεια των ερευνών του εργαστηρίου απομονώθηκαν και φυσικά μονοκλωνικά CPAbs ανθρώπινης προελεύσεως. Μονοκλωνικές IgG απομονώθηκαν από τον ορό ασθενών με Πολλαπλό Μυέλωμα (Π.Μ.) λόγω παλαιότερων ισχυρών ενδείξεων πως οι κλώνοι που παράγουν παραπρωτεΐνες (μονοκλωνικές IgG) στους ασθενείς με Π.Μ. προέρχονται από λεμφοκύτταρα τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες παράγουν NAb [18]. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν πως οι οροί αυτοί αποτελούν μια καλή πηγή ανθρώπινων φυσικών, μονοκλωνικών CPAbs.

Παρά το γεγονός πως οι ακριβείς μηχανισμοί του τρόπου εισόδου δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί, τα τελευταία χρόνια τα CPAbs και τα παράγωγά τους (π.χ. F(ab')₂) θεωρούνται πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλείο για τη μεταφορά ενζύμων, φαρμακευτικών ουσιών, ισότοπων και γονιδίων σε ενδοκυττάρια διαμερίσματα [84].

2.1. Χαρακτηριστικά των CPAbs

Τα φυσικά CPAbs αποτελούν έναν υποπληθυσμό των Φυσικών Αντισωμάτων γεγονός που προμηνύει πως αυτά μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά. Όμως και τα παθολογικά CPAbs φαίνεται να έχουν κοινά χαρακτηριστικά με τα Φυσικά Αυτοαντισώματα. Τόσο τα Φυσικά όσο και τα παθολογικά CPAbs αντιδρούν με ένα ευρύ φάσμα αυτοαντιγόνων όπως πρωτεΐνες του ορού, αντιγόνα της κυτταρικής μεμβράνης, του κυτταρικού σκελετού (π.χ. μυοσίνη, ακτίνη) και του πυρήνα (DNA, ιστόνες), αλλά και με εξωγενή αντιγόνα όπως παθογόνοι παράγοντες και απτένια [28, 84]. Το γεγονός αυτό τους προσδίδει τον χαρακτήρα της πολυδραστικότητας, ενώ εν' συναινέσει αυτού, παρουσιάζουν συνήθως χαμηλή συγγένεια για κάθε ένα από αυτά τα αντιγόνα. Μελέτες σε αντι-DNA mAbs τα οποία προέρχονταν από ποντικούς (NZBxNZW)F1, έδειξαν ότι η πολυδραστικότητα αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ικανότητα διείσδυσης [163]. Τα αντισώματα αυτά αναγνώριζαν ισχυρά το dsDNA, με χαμηλότερη συγγένεια το μονόκλωνο DNA (ssDNA) και διάφορα εαυτά (ακτίνη, μυοσίνη, μυοσφαιρίνη, ιστόνες, τουμπουλίνη) και ξένα αντιγόνα (TNP) [153, 164]. Αν και οι μηχανισμοί διείσδυσης δεν είναι εμφανείς, φαίνεται ότι η ικανότητα διείσδυσης συνδέεται με την πολυδραστικότητα του αντισώματος αφού, μονοδραστικά αντι-DNA αντισώματα δεν φέρουν την ικανότητα αυτή [164]. Δομές που υπάρχουν στις κυτταρικές μεμβράνες και προσομοιάζουν τη δομή του DNA μπορεί επίσης να αναγνωρίζονται από τα CPAbs (Μοριακός μιμητισμός) και να συμβάλλουν στην κυτταροδιεισδυτική τους ικανότητα.

Τα πολυκλωνικά και μονοκλωνικά CPAbs του ποντικού και του ανθρώπου που έχουν μελετηθεί φαίνεται να διεισδύουν *in vitro* σε ζώντα κύτταρα διαφόρων κυτταρικών σειρών τόσο του ανθρώπου όσο και του ποντικού. Η διείσδυση ωστόσο, δεν πραγματοποιείται στο ίδιο ποσοστό σε όλα τα είδη κυττάρων ενώ φαίνεται πως αυτή επηρεάζεται από το στάδιο διαφοροποίησης και ενεργοποίησης των κυττάρων. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση του κυττάρου ή η έκθεση σε λεμφοκίνες ή αυξητικούς παράγοντες μπορεί να αυξήσει την έκφραση επιφανειακών αντιγόνων προάγοντας την διείσδυση αντισωμάτων με ειδικότητα έναντι του αντιγόνου αυτού [165]. Επιπλέον, η διείσδυση των αντισωμάτων δεν παρατηρείται μόνο σε κυτταρικές σειρές, αλλά και *in vivo*, σε ασθενείς και πειραματόζωα. Για παράδειγμα, έχουν βρεθεί αντισώματα στον πυρήνα ασθενών με μικτή νόσο του συνδετικού ιστού, που χαρακτηρίζονται από υψηλούς τίτλους αντι-RNP αντισωμάτων, καθώς και αντιπυρηνικά αντισώματα στον πυρηνίσκο ηπατικών και νεφρικών κυττάρων ποντικών με συστηματική νόσο επαγόμενη από υδράργυρο [84].

Η μοριακή ανάλυση των CPAbs έδειξε ότι οι υπερμεταβλητές περιοχές CDR2 και CDR3 των βαριών αλυσίδων τους έχουν υψηλή αμινοξική ομολογία και φέρουν σε μεγάλο ποσοστό θετικά φορτισμένα αμινοξέα, όπως αργινίνες (R) και λυσίνες (K), με χαρακτηριστικά μοτίβα που προσομοιάζουν εκείνο του σήματος πυρηνικού εντοπισμού RKK (NLS, Nuclear localization Signal) [28, 164]. Επιπλέον, η ανάλυση των VH γονιδίων έδειξε ότι τα CPAbs κωδικοποιούνται από γονίδια της βλαστικής σειράς, με ελάχιστες, ή καθόλου, μεταλλάξεις (*germ-line encoded*) ή μικρής κλίμακας ανασυνδυασμών, που οδηγούν στην ωρίμανση της ειδικότητάς τους [163]. Τέλος, φαίνεται ότι τα CPAbs έχουν συγκεκριμένη τριτοταγή δομή, η οποία δεν συναντάται στα μη διεισδυτικά αντισώματα. Τα θετικά φορτία των αμινοξέων στις υπερμεταβλητές περιοχές φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διείσδυση των αντισωμάτων [166].

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως από έναν μεγάλο αριθμό μονοκλωνικών φυσικών αυτοαντισωμάτων που απομονώθηκαν στο εργαστήριο Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστερ (ΕΙΠ), όλα τα μονοκλωνικά φυσικά CPAbs ανήκαν στις υποτάξεις IgG1 και IgG2 ενώ δεν εντοπίστηκε κανένα που να ανήκει στην υπόταξη IgG2a, η οποία συναντάται μαζί με την υπόταξη IgG2b, κατά πλειοψηφία στα παθολογικά CPAbs του λύκου. Ένα άλλο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των μονοκλωνικών φυσικών CPAbs είναι ο ενδοκυττάριος εντοπισμός τους μετά τη διείσδυση, ο οποίος είναι κατά βάση κυτταροπλασματικός.

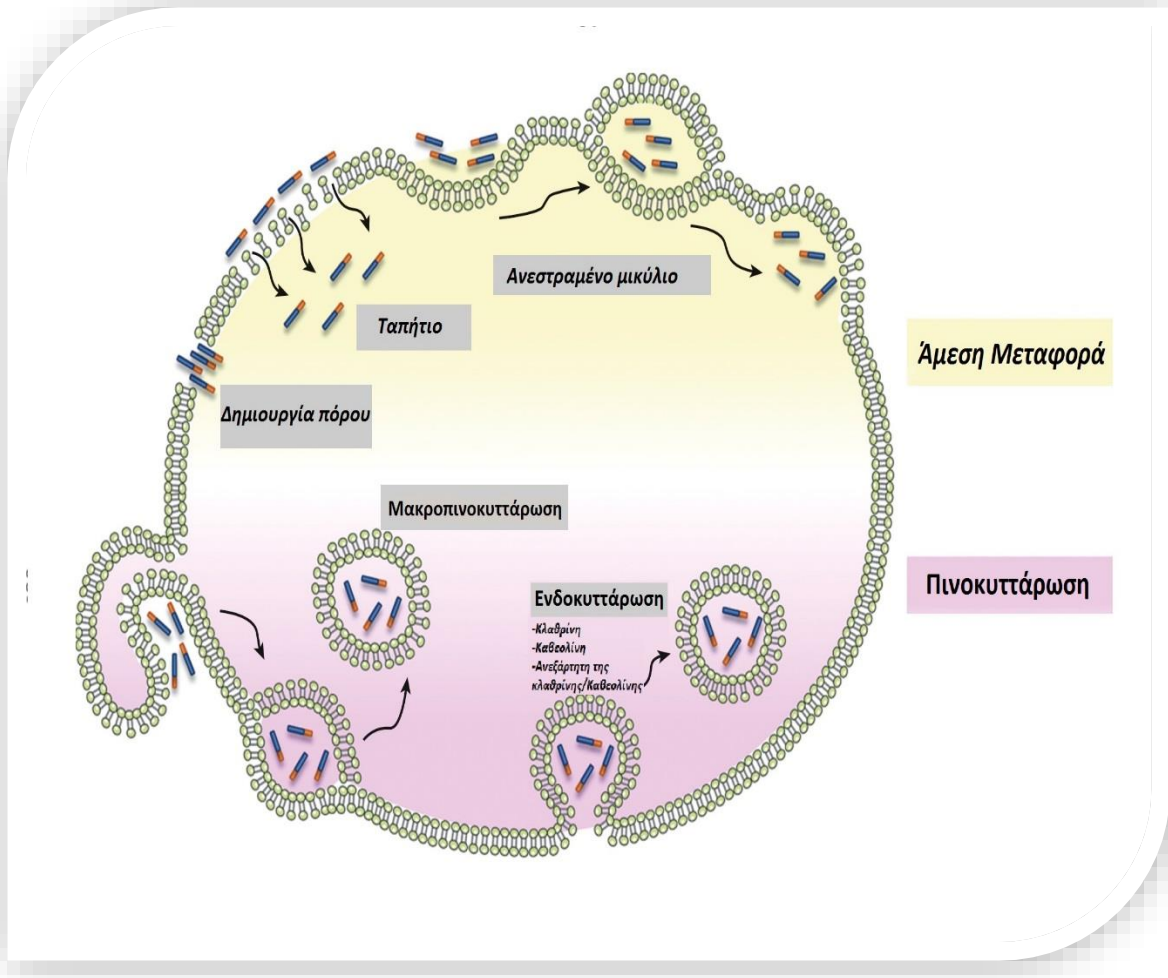
Καθώς τα CPAbs φέρουν πολυδραστικούς επίτοπους που αναγνωρίζουν τόσο εξωκυττάρια όσο και ενδοκυττάρια αυτό-αντιγόνα, εύλογα γεννιέται το ερώτημα αν κατά την είσοδό τους στο κύτταρο ασκούν βιολογική δράση έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων στόχων και αν αυτές οι εξειδικευμένες δραστηριότητες που εμφανίζουν εμπλέκονται με την κυτταροδιείσδυτική τους ικανότητα. Ωστόσο, φαίνεται πως το φαινόμενο της κυτταροδιείσδυσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες στους οποίους λαμβάνει μέρος τόσο η φύση των CPAbs όσο και η φύση των κυττάρων καθώς και του εξωκυττάριου μικροπεριβάλλοντος.

➤ **Ενδοκυτταρικός εντοπισμός και μηχανισμοί διείσδυσης των CPAbs**

Μια ειδοποιός διαφορά των παθολογικών και των φυσιολογικών CPAbs φαίνεται να είναι ο ενδοκυττάριος εντοπισμός τους που ακολουθεί της κυτταροδιείσδυσης. Τα φυσικά CPAbs εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα ή/και στον πυρηνίσκο σε αντίθεση με τα παθολογικά CPAbs που εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως τα παθολογικά αντισώματα έναντι dsDNA, εντοπίζονται στη μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και σε δομές όπως των μιτοχονδρίων, αλλά κυρίως στον πυρήνα [157, 167]. Ο διαφορετικός ενδοκυττάριος εντοπισμός τους, πολύ πιθανά, υποδηλώνει διαφοροποίηση και στο ρόλο τους, αφού τα παθολογικά CPAbs του ΣΕΛ που εντοπίζονται στον πυρήνα εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου [168-174], ενώ από την άλλη, τα φυσικά αντισώματα είναι γνωστά για τον προστατευτικό τους ρόλο και τη συμβολή τους στην ανοσορύθμιση [28]. Τα διαμερίσματα του πυρηνίσκου και του κυτταροπλάσματος είναι συνεχή και ο εντοπισμός των φυσιολογικών CPAbs στα σημεία αυτά σε ταυτόσημο χρόνο, πιθανά να οφείλεται στην μεταφορά των αντισωμάτων κατά την επικοινωνία αυτών των διαμερισμάτων. Είναι πιθανό επίσης, ο διακριτός ενδοκυττάριος εντοπισμός να υποδεικνύει και δομικές διαφορές στη μεταβλητή περιοχή σύνδεσης κάθε αντισώματος, είτε αναγνωρίζοντας με μεγάλη συγγένεια συγκεκριμένα κυτταρικά συστατικά-στόχους, είτε τρισδιάστατες δομές, είτε διαφορές στην πλαστικότητα της περιοχής σύνδεσης.

➤ **Μηχανισμοί διείσδυσης των CPAbs**

Κατά την διαδικασία της διείσδυσης στο κύτταρο, είναι εμφανές πως το πρώτο βήμα αποτελεί η επαφή και η αλληλεπίδραση των CPAbs με την μεμβράνη του κυττάρου. Η πλασματική μεμβράνη αποτελείται από μια λιπιδιακή διπλοστιβάδα της οποίας η συνοχή και η δομή διατηρείται μέσω της δημιουργίας δυναμικού εντός και εκτός του κυττάρου, που ως αποτέλεσμα έχει την δημιουργία αρνητικού φορτίου στην εξωτερική πλευρά αυτής. Η μεσολάβηση υποδοχέων Fc είναι ένας πιθανός μηχανισμός εσωτερικοποίησης (internalization) των αντισωμάτων, ωστόσο το γεγονός πως το Fab τμήμα των περισσότερων CPAbs είναι θετικά φορτισμένο πιθανά να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην αλληλεπίδραση και στη διαδικασία αυτή [84, 175]. Οι μηχανισμοί όμως της κυτταρικής διείσδυσης των CPAbs δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί. Αρκετές ενδείξεις υποδεικνύουν ως πιθανούς τρόπους εισόδου των CPAbs αυτόν της ενδοκυττάρωσης ή της απευθείας κυτταρικής διείσδυσης (translocation), ενώ είναι πολύ πιθανό ο ένας να μην αποκλείει τον άλλο (**Εικόνα 12**). Ο μηχανισμός της κυτταροδιείσδυσης μπορεί να διακριθεί σε δύο πιθανές εκδοχές με βάση την ενέργεια που απαιτείται για την διαδικασία: 1) την ενεργειακά-εξαρτώμενη μεταφορά, που περιλαμβάνει τη φαγοκυττάρωση και την πινοκύτωση (μακροπινοκύτωση και ενδοκυττάρωση) και 2) την ενεργειακά-ανεξάρτητη ή απ' ευθείας μεταφορά διαμέσου της λιπιδιακής διπλοστιβάδας [176].



Εικόνα 12: Μονοπάτια διείσδυσης των CRABs σε ζώντα κύτταρα. Τα CRABs διεισδύουν σε ζώντα κύτταρα, είτε μέσω ενδοκυττάρωσης, είτε με απ' ευθείας διείσδυση χωρίς την κατανάλωση ενέργειας. Αφού εισέλθουν μπορούν να εντοπιστούν σε διάφορα οργανίδια του κυττάρου αλλά κυρίως στον πυρήνα. Προσαρμοσμένο- Casadevall, et. al. 2004 [177].

ο Ενεργο-εξαρτώμενη κυτταρική διείσδυση

Μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει πως η κυτταρική διείσδυση των αντισωμάτων είναι μια μεταβολική διαδικασία, η οποία απαιτεί ενέργεια με τη μορφή ATP/GTP [158], και εξαρτάται από το χρόνο και τη θερμοκρασία [178]. Μείωση της θερμοκρασίας προκαλεί, κατά κανόνα, περιορισμό της κυτταρικής διείσδυσης. Ακόμη, από μελέτες φάνηκε πως τα αντισώματα διεισδύουν καλύτερα σε ορισμένους τύπους κυττάρων, πιθανά λόγω του ότι αυτά έφεραν συγκεκριμένα επιφανειακά μόρια, καθώς επίσης και σε κύτταρα τα οποία βρίσκονται στη φάση της μίτωσης κατά τον κυτταρικό τους κύκλο [165, 175].

Οι ενεργο-εξαρτώμενοι μηχανισμοί διείσδυσης συμπεριλαμβάνουν τη φαγοκυττάρωση για την πρόσληψη μεγάλων μορίων (διάμετρος $\geq 250\text{nm}$) με τη δημιουργία φαγοσωμάτων και τη σύντηξη τους με λυσοσώματα, και την πινοκυττάρωση για την πρόσληψη διαλυτών ουσιών-μορίων (διάμετρος $\leq 150\text{nm}$) μέσω κυστιδίων. Η πινοκυττάρωση διακρίνεται στη μακροπινοκυττάρωση και την ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχέων, όπου εμπλέκονται κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη ή καβεολίνη, είτε μη-καλυμμένα κυστίδια.

Η μεσολάβηση των Fc-υποδοχέων είναι ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς διείσδυσης, όμως οι περισσότερες μελέτες δείχνουν την εμπλοκή κυρίως του τμήματος Fab των αντισωμάτων [84, 175]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το αυξημένο θετικό φορτίο που έχει παρατηρηθεί στην CDR3 περιοχή του Fab τμήματος των CPAbs. Εν' αντιθέση, τα μη διεισδυτικά αντισώματα παρουσιάζουν συνολικά ένα λιγότερο θετικό φορτίο της περιοχής αυτής [163].

Τα αντιγόνα-στόχοι των πολυδραστικών –εξ' ορισμού- CPAbs φαίνεται πως επηρεάζουν την διαδικασία της κυτταρικής διείσδυσης. Πράγματι, διάφορες πρωτεΐνες έχουν περιγραφεί ως μεμβρανικοί στόχοι-υποδοχείς των διεισδυτικών αντισωμάτων. Οι ριβοσωμικές Ρ-πρωτεΐνες [179, 180], η μυοσίνη Ι σε ηπατικά και η α -ακτινίνη σε μεσαγγειακά κύτταρα [181], η θειική ηπαράνη [182, 183], το κολλαγόνο τύπου IV [184], η ινονεκτίνη [185], οι ιστόνες και τα νουκλεοσώματα [186] είναι κάποιες από αυτές.

Η ικανότητα διείσδυσης ορισμένων μονοκλωνικών αντι-DNA CPAbs έχει αποδοθεί και στην παρουσία ενδοκυττάρων αντιγόνων που εκτίθενται στις κυτταρικές μεμβράνες, όπως είναι το DNA ή δομές που το προσομοιάζουν [187]. Πράγματι, έχει δείχθει ότι μετά το θάνατο γειτονικών κυττάρων, νουκλεοσώματα από εξωγενές DNA εναποτίθενται στις κυτταρικές μεμβράνες ουδετερόφιλων και μονοπύρηνων γεγονός που επιτρέπει σε ορισμένα αντι-DNA αντισώματα να εισέρχονται στα κύτταρα [188]. Η καλρετικουλίνη, είναι ένα ενδοκυττάριο μόριο (ενδοκυτταροπλασματική πηγή ασβεστίου), το οποίο μεσολαβεί στη διείσδυση των αντισωμάτων στα κύτταρα. Δείχθηκε πως αντι-DNA CPAbs από (NZBxNZW)F1 ποντικού προσδένονταν πάνω στην καλρετικουλίνη, στην κυτταρική μεμβράνη και με αυτόν τον τρόπο διείσδυναν στο εσωτερικό του κυττάρου [189].

ο **Ενεργο-ανεξάρτητη κυτταρική διείσδυση**

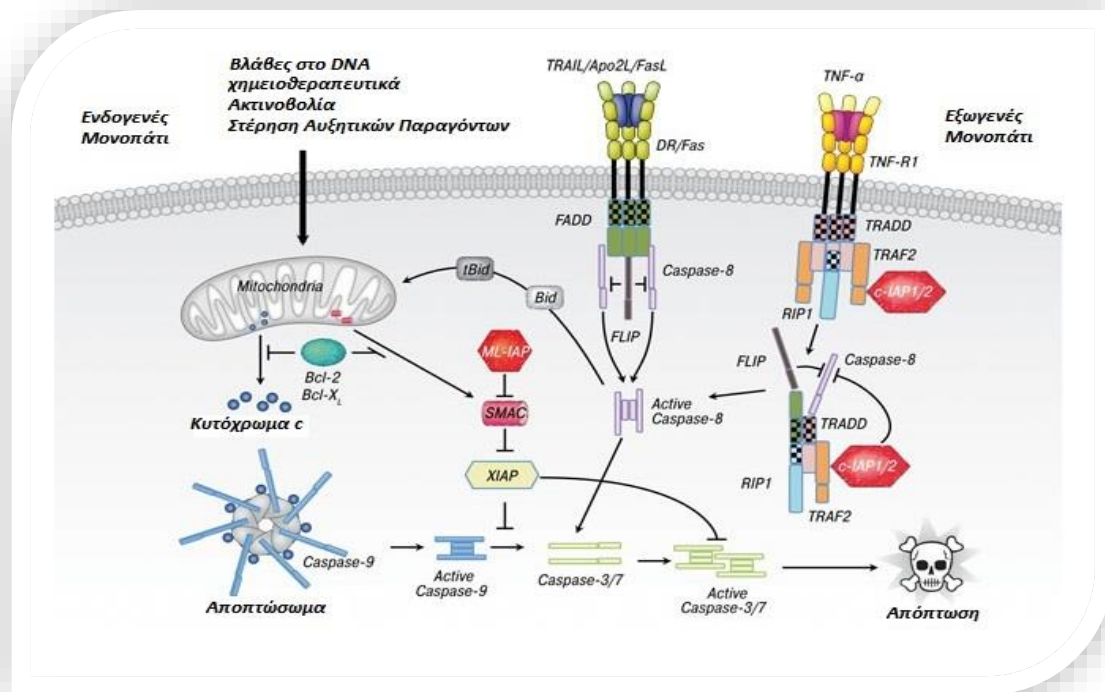
Εκτός των γνωστών μηχανισμών ενδοκυττάρωσης, που αναφέρθηκαν προηγουμένως, μετά από πρόσφατες μελέτες έχει φανεί πως η κυτταρική διείσδυση των CPAbs μπορεί να είναι άμεση και ο μηχανισμός εισόδου ενεργειακά ανεξάρτητος. Αυτό αποδείχθηκε με την κυτταρική διείσδυση των CPAbs στους 4°C , όπου δεν πραγματοποιείται κατανάλωση ενέργειας καθώς, και με την παρουσία μορίων αναστολής της ενδοκυττάρωσης (π.χ. κυτοχλασίνη).

Η απ' ευθείας κυτταρική διείσδυση μέσω ενεργειακά ανεξάρτητων οδών μπορεί να περιλαμβάνει διάφορους μηχανισμούς. Για παράδειγμα το σχηματισμό ανεστραμμένου μικκυλίου (inverted micelle formation), το σχηματισμό πόρων (pore formation), το μοντέλο χαλιού (carpet like model) ή το μοντέλο λέπτυνσης της κυτταρικής μεμβράνης (membrane thinning model) [190]. Το πρώτο βήμα σε όλους αυτούς τους μηχανισμούς είναι η αλληλεπίδραση της θετικά φορτισμένης πρωτεΐνης-μορίου με αρνητικά φορτισμένα συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης, όπως είναι η θειική ηπαράνη. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως συνέπεια μια μόνιμη ή παροδική αποσταθεροποίηση της μεμβράνης, που σχετίζεται με τη φόρτωση του μορίου επάνω της. Ο επακόλουθος μηχανισμός της εσωτερίκευσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση του μεταφερόμενου μορίου, την πεπτιδική του αλληλουχία και τη σύνθεση των λιπιδίων της μεμβράνης.

2.2. Βιολογικές δράσεις των CPABs

➤ Επαγωγή απόπτωσης από τα CPABs

Η απόπτωση αποτελεί μια φυσιολογική και προγραμματισμένη λειτουργία κυτταρικού θανάτου η οποία εμπλέκεται στην διατήρηση της ομοιόστασης των πολυκύτταρων οργανισμών. Οι οδοί ενεργοποίησης των αποπτωτικών μηχανισμών αποτελούνται από το εξωγενές και το ενδογενές μονοπάτι. Το εξωγενές μονοπάτι περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ειδικών υποδοχέων του συστήματος (Receptors System π.χ. Fas) οι οποίοι μεταβιβάζουν το μήνυμα ενδοκυττάρια ή μέσω της σύνδεσης τοξικών για το κύτταρο μορίων στην επιφάνεια της μεμβράνης προκαλώντας κυτταροτοξικό στρες. Το ενδογενές μονοπάτι ενεργοποιείται μετά από βλάβες εντός του κυττάρου ή όταν προκύπτει εσωτερικό στρες (π.χ. βλάβη του DNA, υποξία, στέρηση αυξητικού παράγοντα, ROS κ.α.) (**Εικόνα 13**).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση των αποπτωτικών οδών. Υπάρχουν τουλάχιστον δύο βασικά μονοπάτια που οδηγούν στην απόπτωση, ένα «εξωγενές» και ένα «ενδογενές». Στα δύο μονοπάτια, η σηματοδότηση οδηγεί στην ενεργοποίηση κασπασών μιας οικογένειας πρωτεασών κυστεΐνης (Cysteine Proteases), που δρουν σε ένα πρωτεολυτικό καταρράκτη. Προσαρμοσμένο: M.C. de Almagro, D. Vucic* Department of Early Discovery Biochemistry, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, 94080, USA, 2012.

Η πιο χαρακτηριστική δράση των CPABs είναι η επαγωγή του κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης. Η ακριβής διαφοροποίηση μεταξύ του φυσιολογικού και του παθολογικού ρόλου της επαγόμενης από τα CPABs απόπτωσης δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί, ωστόσο φαίνεται να έχει διπτό ρόλο και να εμπλέκεται τόσο στις φυσιολογικές λειτουργίες όσο και στην παθολογία. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα CPABs επάγουν την απόπτωση δεν έχει εκτενώς μελετηθεί και οι περισσότερες αναφορές περιγράφουν την παρουσία των θραυσμάτων στο DNA ως την ένδειξη της ενεργοποίησης του κυτταρικού θανάτου.

Ο παθογενετικός ρόλος των διεισδυτικών αυτοαντισωμάτων έχει επιβεβαιωθεί *in vivo* από την παρουσία ανοσοσφαιρινών στον πυρήνα ζώντων επιδερμικών κυττάρων σε βιοψίες δέρματος ατόμων με ασθένειες του συνδετικού ιστού, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από υψηλό ποσοστό IgG αντισωμάτων έναντι ριβονουκλεοπρωτεϊνών στον ορό τους [191, 192]. Παράλληλα, μελέτες έχουν δείξει, πως η διείσδυση των αυτοαντισωμάτων *in vitro*, σε διάφορες κυτταρικές σειρές προκαλεί συχνά, πρόωρη έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας. Αυτοαντισώματα αντι-dsDNA που διεισδύουν σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα ή πρωτογενείς φλοιικούς νευρώνες προκαλούν σε μεγάλο ποσοστό απόπτωση των κυττάρων αυτών [158, 193]. Σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα μετά τη διείσδυση των αντι-dsDNA αντισωμάτων και ταυτόχρονη ενεργοποίηση με μιτογόνα βρέθηκε να υπερεκφράζεται ο CD95/Fas, υποδεικνύοντας ότι η αλληλεπίδραση Fas με τον συνδέτη του (Fas ligand) εμπλέκεται στην επαγωγή απόπτωσης από CPABs. Όταν τα λεμφοκύτταρα δεν είναι ενεργοποιημένα (resting) και εκτεθούν με τον ίδιο τρόπο στα αντι-dsDNA CPABs, τα κύτταρα υφίστανται απόπτωση χωρίς όμως την εμπλοκή του δείκτη CD95/Fas [168, 169, 170].

Επίσης, αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης hsp27 (heat shock protein 27) επάγουν απόπτωση αφού διεισδύσουν στα κύτταρα εμποδίζοντας τη σταθεροποίηση της δομής του κυτταροσκελετού. Αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης hsp27, που έχουν ανευρεθεί σε ασθενείς με γλαύκωμα εισέρχονται σε νευρικά κύτταρα του ανθρώπινου αμφιβληστροειδούς προκαλώντας κυτταρικό θάνατο, πιθανότατα μέσω της δέσμευσης της hsp27 με αποτέλεσμα να μην παρουσιάζει πια την ικανότητα να σταθεροποιεί την ακτίνη του κυτταροσκελετού, υποδηλώνοντας έτσι ένα παθογενετικό ρόλο αυτών των αντισωμάτων [159]. Γενικότερα, αυτοαντισώματα έναντι διαφόρων αυτοαντιγόνων του νευρικού συστήματος, φαίνεται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, μέσω της διείσδυσης και πρόκλησης απόπτωσης [160]. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι τα αυτοαντισώματα από την στιγμή που εισέρχονται στα κύτταρα μπορούν να επάγουν διακριτά προ-αποπτωτικά μονοπάτια, ανάλογα με την ειδικότητά τους ως προς το αντιγόνο.

Έχει φανεί επίσης πως αντι-dsDNA αντισώματα με ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα μπορεί να επάγουν απόπτωση μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με το DNA, δεδομένου ότι αναγνωρίζουν συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες [84]. Επιπλέον, είναι πιθανό πως το κυρίαρχο αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται σε ένα κύτταρο πιθανά να εξαρτάται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου και τη δραστηριότητα του συγκεκριμένου κυττάρου [194].

Επιπλέον, αντισώματα έναντι της κασπάσης 3 (caspase-3, cistein aspartate protease-3), εκτελεστή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, έχουν δειχθεί να επάγουν αυτο-ενεργοποίηση επικρατειών της κασπάσης 3, που οδηγεί σε μη αναστρέψιμο θάνατο του κυττάρου [195]. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με την ιδέα ότι όταν τα αντισώματα βρεθούν μέσα στα κύτταρα, μπορούν να διεγείρουν άλλα προ-αποπτωτικά μονοπάτια, ανάλογα με την αντιγονική τους ειδικότητα. Επαγωγή απόπτωσης προκαλείται επίσης από μονοκλωνικά, αντι-DNA CPABs ποντικού σε ανθρώπινα κύτταρα του περιφερικού αίματος και στην καρκινική κυτταρική σειρά HL60 μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών 2, 3 και 8, της Bax και Bcl-2 [194, 196]. Μερικά από αυτά τα αντισώματα βρέθηκαν ικανά να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, να μετατοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου και να αντιδρούν με τα αντιγόνα τους. Φαίνεται λοιπόν ότι μετά τη διείσδυση στα κύτταρα ακολουθεί σηματοδότηση της ενεργοποίησης της κυτταρικής απόπτωσης. Αναλυτική μελέτη στα αποπτωτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται, έδειξε ότι εκτός από το μιτοχονδριακό μονοπάτι, εμπλέκεται και το μονοπάτι μέσω της μεμβράνης -κασπάσες 2 και 8- σε μικρότερο όμως ποσοστό κυττάρων. Διεισδυτικά αντι-dsDNA αντισώματα δείχνουν εκτός από την ενεργοποίηση της απόπτωσης να προκαλούν και προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο δρώντας πάνω στην κυτταρική μεμβράνη [194].

➤ Ρύθμιση της έκφρασης κυτταροκινών από τα CPAbs

Τα αντι-dsDNA αντισώματα φαίνεται πως έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης κυτταροκινών. Η υπερέκφραση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-1, IL-6 και ο TNF-α έχει διαπιστωθεί τόσο σε ασθενείς με ΣΕΛ όσο και σε ποντίκια επιρρεπή σε λύκο και φαίνεται να σχετίζεται με την έντονη φλεγμονώδη αντίδραση που παρατηρείται [197]. Οι Finck et al., διαπίστωσαν ότι η χορήγηση IL-6 επιτάχυνε την πορεία της ασθένειας αυτοάνοσων ποντικών (NZBxNZW) F1 [198] ενώ η χορήγηση αντι-IL-6 ανέστειλε σημαντικά την παραγωγή αντι-dsDNA, μείωσε την πρωτεϊνουρία και παράτεινε την διάρκεια ζωής στα αυτοάνοσα ποντίκια [199]. Επιπρόσθετα, οι Lai et al., [200, 201] απέδειξαν ότι πολυκλωνικά αντι-dsDNA αντισώματα διεγείρουν την απελευθέρωση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1 και IL-6 από ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω κυτταροτοξικής ενδοθηλιακής βλάβης προκαλώντας τραυματισμό του αγγειακού ενδοθηλίου. Σε προηγούμενη μελέτη, βρέθηκε ότι πολυκλωνικά αντι-dsDNA απομονωμένα από ορούς ασθενών με ενεργό ΣΕΛ, τροποποιούσαν τον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών ανθρώπινων μονοκυττάρων, έπειτα από επαγωγή τους με μιτογόνο [151, 202]. Δύο μονοκλωνικά αντι-dsDNA αντισώματα, που απομονώθηκαν από ποντίκια MRL-lpr/lpr, βρέθηκε ότι μπορούν να επάγουν την έκφραση και την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1b, IL-6, IL-8) μετά τη διεσόδωση τους σε T λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα [203]. Επίσης, έχει δειχθεί ότι τα αντισώματα αυτά διεσόδουν σε μακροφάγα κύτταρα RAW264.7, ενεργοποιούν τον NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) και διεγείρουν την παραγωγή του TNF-α (tumor necrosis factor alpha). Δεδομένου του ρόλου του TNF-α στην επαγωγή της διαδικασίας της φλεγμονής αναδεικνύεται μια εμπλοκή των διεσδυτικών αντισωμάτων σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο ΣΕΛ [197].

2.3. Εφαρμογές των CPAbs στην βιοϊατρική

Τα αντισώματα έχουν αναδειχθεί ως το μεγαλύτερο τμήμα της αγοράς των θεραπευτικών συσκευασιών ανοσορύθμισης [204]. Ωστόσο, για την ενδοκυττάρια στόχευση και μεταφορά ουσιών έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες που έχουν οδηγήσει στη δημιουργία πεπτιδίων με την ικανότητα διεσόδωσης σε κύτταρα (Cell Penetrating Peptides-CPPs). Εν' προκειμένου, τα CPPs εμφανίζουν αρκετά μειονεκτήματα σε σχέση με τη χρήση των αντισωμάτων, ένα από τα βασικότερα ίσως είναι η τοξικότητα που παρουσιάζουν [205].

Τα CPAbs έχουν κατά γενικότητα μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής στην κυκλοφορία και παρουσιάζουν αυξημένη ανθεκτικότητα απέναντι σε πρωτεάσες του ορού και διαφόρων ιστών. Η αναγνώριση των μοριακών στόχων των CPAbs χαρακτηρίζεται από την ειδικότητα και την εξειδίκευση της αντιγονικής τους περιοχής. Επίσης τα CPAbs λόγω των διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους καθώς και της 'φυσικής' τους προέλευσης θεωρείται πως δεν εμφανίζουν τοξικότητα. Τέλος, το σημαντικότερο πλεονέκτημα των CPAbs είναι πως, ως πρωτεϊνικά μόρια, έχουν περισσότερες από μία επικράτειες για αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες/μόρια και έτσι είναι δυνατόν να αναπτυχθεί ένα αντιδραστήριο το οποίο αποτρέπει συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις αλλά και επιτρέπει άλλες εναλλακτικά. Αυτές οι ποικίλες μορφές δράσης των αντισωμάτων αυτών έχουν μεγάλες προοπτικές στον τομέα της ιατρικής.

Η μελέτη των CPAbs σε θεραπευτικές προσεγγίσεις οδηγείται από την ικανότητα διεσόδωσης σε ζώντα κύτταρα και της αναγνώριση ενδοκυττάρων αντιγόνων-στόχων. Τα CPAbs αποτελούν δελεαστικά εργαλεία μεταφοράς διαφόρων μορίων για θεραπευτικούς σκοπούς καθώς και της χρήσης αυτών, ως αυτούσιων αντισωμάτων, ως θεραπευτικοί παράγοντες. Επίσης, τα αντισώματα έναντι ενδοκυττάρων αντιγόνων που ανευρίσκονται στον ορό ασθενών με διάφορες αυτόνοσες ασθένειες, χρησιμοποιούνται ευρέως στην διάγνωση.

Μέχρι σήμερα, έχει επιτευχθεί η *in vitro* μεταφορά μακρομορίων στον πυρήνα κυττάρων μέσω σύζευξής τους με διεισδυτικά αντι-dsDNA αντισώματα, τα Fab τμήματά τους ή και τεχνητά πεπτίδια που αντιστοιχούν στις υπερμεταβλητές περιοχές/ακολουθίες CDR2 και CDR3 της βαριάς αλυσίδας τους [158, 205]. Πληθώρα μελετών υποδεικνύουν την δυνατότητα της χρήση των CPAbs ως θεραπευτικούς παράγοντες [206] καθώς και ως ενδοκυττάρων μεταφορέων μορίων όπως πρωτεϊνών [207], φαρμάκων [208] και γονιδίων [209, 210].

3. Τα φυσικά αντισώματα στον καρκίνο

Το νεοπλαστικό φαινόμενο αποτελεί μια κακοήγη εξαλλαγή ενός υποπληθυσμού κυττάρων του οργανισμού, των οποίων ο φαινότυπος οδηγείται σταδιακά σε ατυπία αποκτώντας παράλληλα ολοένα και μεγαλύτερο δυναμικό μεταστατικότητας. Τα φαινόμενα αυτά οδηγούνται μέσω της έλλειψης ανασταλτικών μηνυμάτων σηματοδότησης, λόγω των διαταραγμένων και μη φυσιολογικά τροποποιημένων βιολογικών και μεταβολικών διαδικασιών των εξαλλαγμένων κυττάρων, καθώς επίσης και από την αδυναμία, σε πολλές περιπτώσεις, του ανοσοποιητικού συστήματος να καταστείλει αποτελεσματικά την νεοπλασία. Η δυσλειτουργική αυτή κυτταρική σηματοδότηση έχει σαν αποτέλεσμα την απορρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων [211-213].

Κατά τη διάρκεια της ζωής του, κάθε πολυκύτταρος οργανισμός έρχεται σε συνεχή επαφή με εξαλλαγμένα – μη φυσιολογικά- κύτταρα τα οποία εμφανίζονται στον οργανισμό είτε με τυχαίο τρόπο είτε μέσω προαγωγής τους από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Στον άνθρωπο, το φαινόμενο της καρκινικής εξαλλαγής μπορεί να θεωρηθεί ως μία χρόνια ασθένεια. Παρόλο που κάθε καρκινικό κύτταρο δεν έχει το ίδιο δυναμικό και ικανότητα εξαλλαγής προς ανάπτυξη καρκίνου, το βασικό ερώτημα δεν αποτελεί το πώς εμφανίζεται η νεοπλασία, αλλά, το πώς το φαινόμενο αυτό διατηρείται σε τόσο χαμηλές συχνότητες [214]. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως το ανοσοποιητικό σύστημα κατέχει αποτελεσματικούς μηχανισμούς ανοσο-επιτήρησης για τον περιορισμό του φαινομένου και διατήρησής του σε χαμηλές συχνότητες.

Για πολλές δεκαετίες οι ερευνητές θεωρούσαν πως τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (λεμφοκύτταρα και μακροφάγα) είχαν την ικανότητα να αναγνωρίζουν ειδικά τα καρκινικά κύτταρα οδηγώντας το σύστημα σε μία ειδική χυμική ανοσιακή απάντηση προς την εξάλειψή τους. Εν προκειμένου, η απάντηση του ανοσοποιητικού σε αυτά τα μεταλλαγμένα εαυτά αντιγόνα είναι ορισμένες φορές αδύναμη και ανίκανη να καταστείλει αποτελεσματικά την ανάπτυξη του όγκου [215]. Οι προσπάθειες ωστόσο, για τον χαρακτηρισμό τέτοιων αντιγόνων οδήγησαν στη έρευνα και στην ανάπτυξη αντικαρκινικών εμβολίων και στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου.

Τα τελευταία χρόνια φάνηκε πως οι μηχανισμοί του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι των καρκινικών κυττάρων και της νεοπλασίας βασίζονται στην ανοσο-επιτήρηση του συστήματος σε ένα πιο πρώιμο στάδιο, με τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας να είναι οι κύριοι τελεστές και ρυθμιστές της ομοιόστασης του οργανισμού. Έτσι αναδύεται ένας ακόμη σημαντικός ρόλος της φυσικής ανοσίας και της συμβολής της στην εξάλειψη του καρκινικού φαινομένου. Παρόλο που η σημασία των φυσικών κυττάρων-φονιάδων (NK) και των φυσικών αντισωμάτων έχει μελετηθεί σχετικά με τις βακτηριακές λοιμώξεις, οι δημοσιεύσεις σχετικά με τον ρόλο τους έναντι εξαλλαγμένων κυττάρων και του καρκινικού φαινομένου παραμένουν ελάχιστες [216, 217].

3.1. Οι αντιγονικοί στόχοι των NAb στα καρκινικά κύτταρα

Η φυσική ανοσία είναι η βάση και το κλειδί για όλες τις ανοσολογικές διαδικασίες. Εξειδικευμένοι υποδοχείς στην επιφάνεια μακροφάγων, δενδριτικών κυττάρων, NK-κυττάρων και σε Β λεμφοκύτταρα που παράγουν φυσικά αντισώματα, δρουν στην πρώτη γραμμή άμυνας απομακρύνοντας τα πιθανά επιζήμια και ξένα προς τον εαυτό συστατικά όπως τα βακτήρια, οι ιοί, τα προϊόντα του μεταβολισμού, τα μη φυσιολογικά-τροποποιημένα μόρια και πρωτίστως, τα καρκινικά κύτταρα. Η απομάκρυνση των εξελαγγμένων κυττάρων είναι μια αέναη διαδικασία και μέρος της επιτήρησης του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα φυσικά αντισώματα φαίνεται πως αποτελούν τους κύριους παράγοντες αυτής της αντικαρκινικής δραστηριότητας του συστήματος [218].

Η αναγνώριση του εαυτού από το ξένο αποτελεί κομβικό σημείο για κάθε σηματοδότηση μεταξύ των κυττάρων του ανοσοποιητικού, το οποίο έχει εκπαιδευτεί να αναγνωρίζει τον εαυτό με χαμηλή συγγένεια και να μην αντιδράει έναντι αυτού ειδικά. Η πρωτοποριακή μελέτη των Jan Klein και Barju Benacerraf στις αρχές του 1970 θεμελίωσε το σύστημα της διπλής αναγνώρισης ως απαραίτητη προϋπόθεση για την κινητοποίηση της προσαρμοστικής ανοσίας και της χυμικής ανοσο-απάντησης [219, 220]. Σύμφωνα με το σύστημα αυτό, τα μη εαυτά πρωτεϊνικά μόρια επεξεργάζονται, μετά από φαγοκυττάρωση από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα οποία με τη δράση προτεασών διασπούν τις πρωτεΐνες και τις παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους, ως πρωτεϊνικά θραύσματα ή μικρά πεπτίδια, στα εξειδικευμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού [221]. Το σύμπλεγμα H-2 στο ποντικό και το MHC στον άνθρωπο δρουν ως συνυποδοχείς αυτής της επεξεργασίας και παρουσιάζονται μαζί με τα ξένα πεπτίδια [219, 222]. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση των T-κυττάρων, στην ωρίμανση συγγένειας των κυττάρων τελεστών και κυττάρων μνήμης και στην παραγωγή ειδικών αντισωμάτων και υποδοχέων υψηλής συγγένειας στα B- και T- κύτταρα. Μόνο ο συνδυασμός του ξένου πεπτιδίου, πρωτεϊνικής φύσεως, που παρουσιάζεται παράλληλα με το σύμπλεγμα MHC έχει την ικανότητα να διεγείρει την ωρίμανση συγγένειας και την προαγωγή μνήμης των κυττάρων της επίκτητης ανοσίας.

Εκτός της αναγνώρισης των ξένων παθογόνων και την κινητοποίηση της ειδικής ανοσίας, εξίσου αναγκαία κρίνεται και η αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού μέσω ειδικών μορίων-στόχων, τα οποία θα πρέπει να εκφράζονται επιλεκτικά από τα καρκινικά κύτταρα αλλά να εκλείπουν από τα φυσιολογικά κύτταρα και τους φυσιολογικούς ιστούς [218].

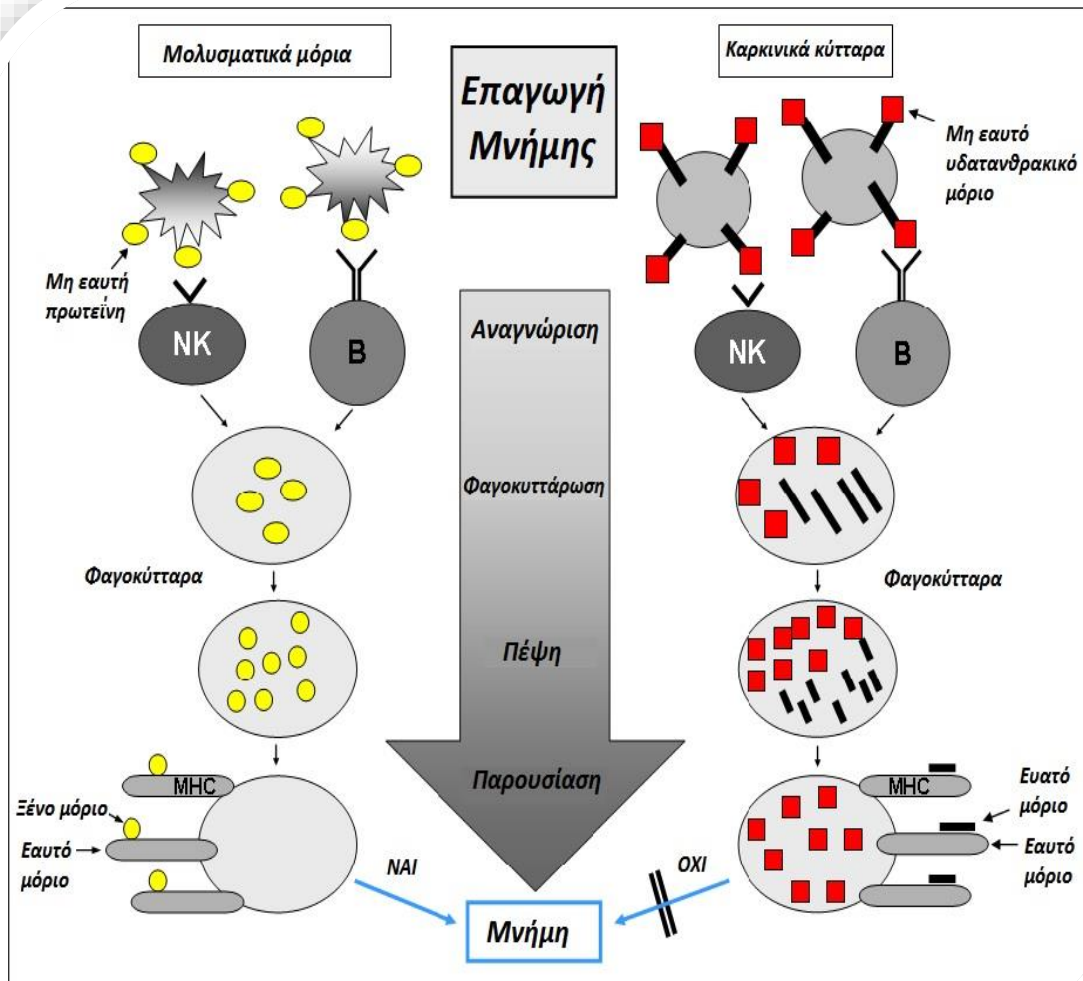
Ο Robert W. Baldwin ήταν ο πρώτος επιστήμονας που ανέδειξε την ύπαρξη της ανοσιακής απάντησης έναντι συμπαγών όγκων [223]. Οι μηχανισμοί ανοσο-επιτήρησης της φυσικής ανοσίας μπορούν να αναγνωρίσουν τα καρκινικά κύτταρα και να προβούν στην εξάλειψη και στον περιορισμό τους, τόσο σε προ-καρκινικά στάδια όσο και κατά την εξέλιξη του φαινομένου, καθώς και να προάγουν την κινητοποίηση της ειδικής ανοσίας μέσω αναγνώρισης ειδικών αντιγόνων στόχων στα κύτταρα αυτά [224]. Οι αυτόλογες πρωτεΐνες των καρκινικών κυττάρων που αποτελούν τα ογκο-σχετιζόμενα αντιγόνα στόχους (Tumor associate antigens-TAAs) θεωρείται πως είναι ικανές να προάγουν ανοσολογική απάντηση [225, 226]. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν εαυτά μόρια που μπορεί είτε να υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα, είτε να είναι μεταλλαγμένες ή να αποκλίνουν από τη φυσιολογική τους τρισδιάστατη δομή (miss folding). Ο εντοπισμός τους μπορεί να είναι είτε εντός των καρκινικών κυττάρων, στην επιφάνεια αυτών, είτε στην κυκλοφορία μετά από έκκρισή τους από τα καρκινικά κύτταρα, ενώ φαίνεται πως σχετίζονται με τον παθολογικό φαινότυπο και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες προόδου της καρκινικής δραστηριότητας και εξαλλαγής [227].

Όστόσο η ειδική απάντηση της επίκτητης ανοσίας φαίνεται πως έχει ένα υποδεέστερο ρόλο έναντι των καρκινικών κυττάρων και συχνά η δράση της δεν είναι ικανή να καταστείλει την ανάπτυξη της νεοπλασίας. Φαίνεται πως πρωταρχικό ρόλο έχει το σύστημα ανοσο-επιτήρησης της φυσικής ανοσίας το

οποίο έχει ως δράση την αναγνώριση των εξαλλαγμένων κυττάρων σε ένα πιο πρώιμο στάδιο και την εξάλειψη αυτών πριν την προαγωγή τους σε όγκους [215].

Όπως έχει ξανά αναφερθεί, τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας δεν αναγνωρίζουν εξειδικευμένους μονοδιάστατους αντιγονικούς επίτοπους αλλά αντιγονικά μοτίβα συντηρημένα κατά την εξέλιξη, των οποίων η έκφραση είναι ανεξάρτητη από γεγονότα μεταλλάξεων [58]. Κατά τη διάρκεια της πρώιμης εξαλλαγής των καρκινικών κυττάρων οι διαταραγμένοι βιολογικοί μηχανισμοί των κυττάρων αυτών οδηγούν στην προαγωγή μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων σε αυτόλογα εαυτά μόρια (γλυκολιπίδια, γλυκοπρωτεΐνες κ.α). Οι τροποποιήσεις αυτές είναι κυρίως υδατανθρακικής φύσεως οι οποίες αναγνωρίζονται από τους εξειδικευμένους υποδοχείς της φυσικής ανοσίας και από τα φυσικά αντισώματα προκαλώντας ανοσογονικότητα και διέγερση του συστήματος. Αυτοί οι νέο-επίτοποι δεν ανευρίσκονται στα φυσιολογικά κύτταρα ενώ η παρουσία τους φαίνεται να είναι αναπόσπαστο κομμάτι των διεργασιών της καρκινογένεσης, γεγονός που τους εντάσσει σε εξειδικευμένους ογκο-ειδικούς αντιγονικούς στόχους (Tumor associated carbohydrate antigens-TACAs). Καθώς τα TACAs δεν αποτελούν αντιγονικούς επίτοπους πρωτεϊνικής φύσεως τα κύτταρα του ανοσοποιητικού αδυνατούν να παρουσιάσουν τα αντιγόνα αυτά μέσω του συμπλέγματος MHC και να προάγουν την κινητοποίηση της ειδικής ανοσίας καθώς και της ανοσολογικής μνήμης έναντι αυτών (**Εικόνα 15**) [228].

Σε αντίθεση με τα B1-a κύτταρα, που όπως έχει αναφερθεί, είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της πλειοψηφίας των NAb, η παραγωγή φυσικών αντισωμάτων που εξειδικεύονται στην αναγνώριση υδατανθρακικών επίτοπων και ως εκ τούτου, έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν τέτοιες δομές στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, φαίνεται πως διεξάγεται από τα B2-b κύτταρα και τα MZ-B κύτταρα της οριακής ζώνης που παράγουν NAb. Σε αντίθεση με τα B2- κύτταρα της οριακής ζώνης τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή πλασματοκυττάρων, τα B1-b κύτταρα έχουν την ικανότητα τόσο να αυτό-αναπαράγονται όσο και να παράγουν πλασματοκύτταρα, ενώ πιθανά να αποτελούν την πηγή των κυττάρων 'μνήμης' που εξασφαλίζουν την μακροχρόνια παραγωγή των αντισωμάτων με εξειδίκευση έναντι των υδατανθρακικών επίτοπων [229].

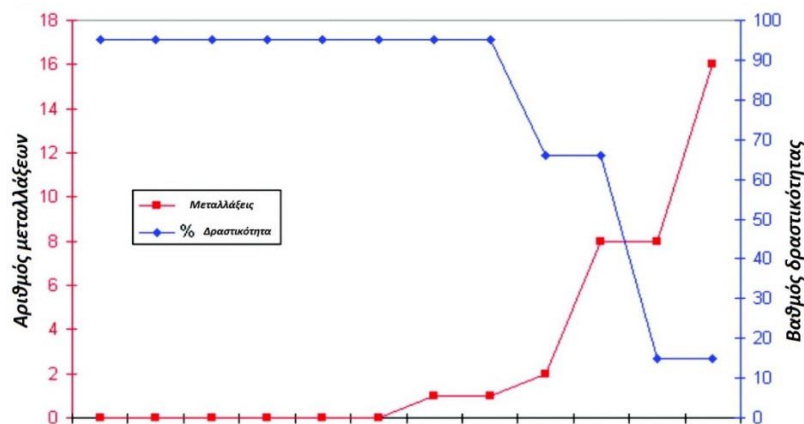


Εικόνα 15: Μηχανισμοί επαγωγής της μνήμης. Η φυσικά ανοσία κατέχει τον ρόλο της ανοσο-επιτήρησης του οργανισμού. Μέσω μιας ομάδας κληρονομούμενων υποδοχέων που αναγνωρίζουν μοτίβα (PRRs) στην επιφάνεια των φυσικών φονιάδων (NK) και με τα φυσικά αντισώματα που παράγονται από τα B-1 κύτταρα, η φυσική ανοσία αναγνωρίζει και εξαλείφει τους εισβολείς και τα τροποποιημένα μόρια εντός του οργανισμού. Οι στόχοι τους είναι συντηρημένες κατά την εξέλιξη δομές, κυρίως υδατανθρακες. Τα ξένα προς τον εαυτό μόρια φαγοκυτταρώνονται και οδηγούνται στα λεμφικά όργανα. Εδώ συζητείται αν τα διαφορετικά μόρια που φαγοκυτταρώνονται μπορούν να προάγουν την μνήμη του ανοσιακού. Στην περίπτωση των μολυσματικών παραγόντων, τα T- βοηθητικά κ'ύτταρα ενεργοποιούνται μέσω της αναγνώρισης ξένων πρωτεϊνικών μορίων τα οποία παρουσιάζονται μέσω του συμπλέγματος MHC του εαυτού. Ως συνέπεια αυτού, παράγονται εξειδικευμένα T-κυτταροτοξικά και B2-κύτταρα έναντι του παθογόνου. Στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων, αυτή η αναγνώριση αποτυγχάνει διότι τα φαγοκύτταρα αδυνατούν να παρουσιάσουν υδατανθρακικά μόρια σε συνδυασμό με το σύμπλεγμα MHC. Τα πεπτίδια τα οποία σχετίζονται με τους υδατανθρακικούς επίτοπους αποτελούν εαυτά μόρια και για τον λόγο αυτό δεν είναι ικανά να προάγουν την μνήμη. Προσαρμοσμένο- Peter Vollmers, 2007 [228].

Φυσικά αντισώματα και NK-κύτταρα που αναγνωρίζουν TACAs και στρέφονται έναντι των καρκινικών κυττάρων έχουν βρεθεί στην κυκλοφορία ασθενών με καρκίνο και σε ασθενείς στους οποίους έχει προηγηθεί χορήγηση αντικαρκινικών εμβολίων και έχουν συσχετιστεί με ευνοϊκή πρόγνωση. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως τέτοια αντισώματα έναντι των TACAs ανευρίσκονται και σε υγιείς δότες [230].

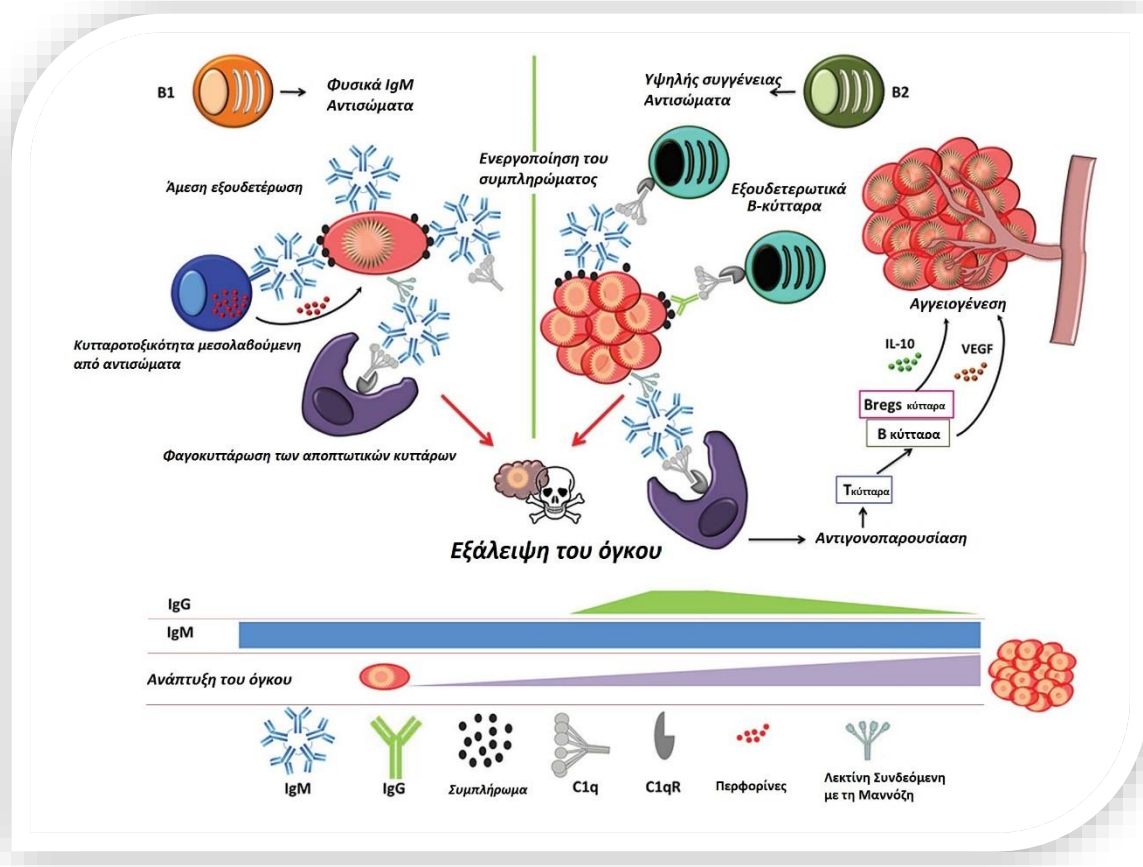
3.2. Η αντικαρκινική δράση των NABs

Σε μία εκτεταμένη έρευνα που διεξήχθη τα τελευταία χρόνια με σκοπό την μελέτη της άμυνας του ανοσοποιητικού έναντι του καρκίνου σε ανθρώπους, χιλιάδες μονοκλωνικά αντισώματα απομονώθηκαν από ασθενείς με καρκίνο και υγιείς δότες με τη χρήση της συμβατικής τεχνικής παραγωγής ανθρώπινων υβριδωμάτων (Trioma technique) [216, 218]. Όλα τα ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των όγκων που απομονώθηκαν και έχουν αναλυθεί μέχρι στιγμής, φέρουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά, αυτά των φυσικών αντισωμάτων. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως τα περισσότερα από αυτά είναι πενταμερείς IgM τα οποία παράγονται από τα CD5+ B-κύτταρα και κωδικοποιούνται από συγκεκριμένες οικογένειες γονιδίων της βλαστικής σειράς με καθόλου ή ελάχιστες μεταλλάξεις. Επιπλέον ο τύπος της ελαφριάς αλυσίδας που επικρατεί είναι η λ (λ-chain) γεγονός που τα διαφοροποιεί από τα συνήθη αντισώματα της κυκλοφορίας που φέρουν ως επί το πλείστο κ ελαφριά αλυσίδα (κ-chain) [218]. Τα φυσικά αυτά IgM αντισώματα φάνηκε ότι συνδέονταν επιλεκτικά στα TACAs αναγνωρίζοντας δομές κυρίως υδατανθρακικής φύσεως [218, 231]. Ενδιαφέρον επίσης αποτελεί το γεγονός πως η πολυδραστικότητα των αντισωμάτων αυτών συνδέεται με ισχυρότερη αναγνώριση των καρκινικών επίτοπων, ενώ όσο αυτή μειώνονταν με την παράλληλη αύξηση των μεταλλαξιακών γεγονότων και της ωρίμανσης της συγγένειας η αναγνώριση των καρκινικών στόχων υπολείπονταν της αρχικής [218] (**Εικόνα 16**). Τέλος, κοινό χαρακτηριστικό αυτών των NABs είναι η επαγωγή της απόπτωσης στα εξαλλαγμένα κύτταρα *in vitro* και *in vivo* [231]. Η επαγωγή της απόπτωσης φαίνεται να προκύπτει με τρόπο ανεξάρτητο της σηματοδότησης μέσω επικρατειών θανάτου (Death Domain) αλλά, δια μέσου της δέσμησης των αντισωμάτων σε μεμβρανικούς υποδοχείς, που έχουν υποστεί μετα-μεταφραστικές, αναγνωρίζοντας υδατανθρακικούς επίτοπους και προκαλώντας ενδοκυττάριο στρες [216, 232].



Εικόνα 16: Αμοιβαία συσχέτιση της δραστηριότητας των αντισωμάτων σε σχέση με την γενετική τους απόκλιση από τη βλαστική σειρά. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων της βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας των αντισωμάτων συσχετίζονται με τον βαθμό της δραστηριότητάς τους έναντι διάφορων καρκινικών ιστών. Αντισώματα χωρίς καθόλου μεταλλαγές έδειξαν μια ευρύτερη δραστηριότητα έναντι περισσότερων καρκινικών ιστών, ενώ όσο οι μεταλλάξεις αυξάνονταν το φάσμα της δραστηριότητας των αντισωμάτων μειωνόταν. Προσαρμοσμένο- Brändlein et al. 2003 [218].

Συνολικά φαίνεται πως τα φυσικά αντισώματα έναντι των καρκινικών κυττάρων ανευρίσκονται φυσιολογικά στην κυκλοφορία των υγιών οργανισμών, ενώ αυτά είναι υπεύθυνα για την αντικαρκινική δραστηριότητα του συστήματος στα προ-καρκινικά στάδια, κατά την εξέλιξη της ασθένειας, καθώς και αφ' ότου εδραιωθεί ο καρκίνος [233]. Επιπλέον, η καρκινική περιοχή χαρακτηρίζεται από έντονα νεκρωτικά συμβάντα καθώς και φλεγμονωδών στοιχείων, γεγονός που προάγει την ενεργοποίηση της ειδικής ανοσίας, στην ρύθμιση της οποίας συμβάλλουν και τα NAb. Ωστόσο, τα επαγόμενα αντισώματα έναντι του όγκου εμφανίζονται στα αρχικά στάδια του καρκίνου, ενώ η παραγωγή τους φθίνει με τον χρόνο. Τα επίπεδα των φυσικών αντισωμάτων, όπως έχει αναφερθεί, δεν μεταβάλλονται με την παρουσία νέο-αντιγόνων και για τον λόγο αυτό είναι παρόντα σε όλα τα στάδια της καρκινικής εξαλλαγής (**Εικόνα 17**) [234].



Εικόνα 17: Η δράση των αντισωμάτων της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας έναντι του καρκίνου.

Τα αντισώματα της τάξης IgM τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας επιτελούν εξειδικευμένες λειτουργίες κατά την ανοσο-απάντηση στον καρκίνο, περιορίζοντας τα καρκινικά κύτταρα στα πρώιμα στάδια της εξαλλαγής (IgM-NAbs) και κατά την εξέλιξή του (επαγόμενα IgM). Όμως, όταν ο καρκίνος εδραιωθεί, συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα B-κύτταρα και τα B ρυθμιστικά κύτταρα της επίκτητης ανοσίας, εκκρίνουν τον αγγειακό ενδοθηλιακό παράγοντα ανάπτυξης (VEGF) και την IL-10, προάγοντας την αγγειογένεση και μειώνοντας την απάντηση των T-κυττάρων με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της εξέλιξης του καρκίνου και την διασπορά των νεοπλαστικών κυττάρων. Τα αντισώματα IgG είναι παρόντα στα αρχικά στάδια του καρκίνου, ενώ η παραγωγή τους καταστέλλεται με το χρόνο, σε αντίθεση με τα αντισώματα IgM των οποίων τα επίπεδα παραμένουν σταθερά. Προσαρμοσμένο- DÍAZ-ZARAGOZA M, HERNÁNDEZ-ÁVILA R et al. 2015 [234].

Τα δεδομένα αυτά, υποδεικνύουν την ύψιστη σημασία των φυσικών αντισωμάτων και τον καίριο ρόλο τους στον περιορισμό και στην ρύθμιση του καρκινικού φαινομένου ενώ παράλληλα ανοίγουν ένα νέο παράθυρο με πρωτοποριακές εξελίξεις στην θεραπεία και στη διάγνωση της νεοπλασίας [235].

3.3. Τα NAbS στην θεραπεία του καρκίνου

Ο συσχετισμός του ρόλου των NAbS με το καρκινικό φαινόμενο, υποδεικνύει την πιθανή χρήση τους ως θεραπευτικά αλλά και προγνωστικά εργαλεία για την καταπολέμηση της νεοπλασίας, τόσο σε πολυκλωνικό όσο και σε μονοκλωνικό επίπεδο. Σε πολυκλωνικό επίπεδο, η χρήση της IVIg φαίνεται πως μπορεί να προσφέρει ευεργετικά αποτελέσματα έναντι της ασθένειας του καρκίνου. Η αυτοανοσία και η καρκινική εξαλλαγή συχνά συνυπάρχουν και πιθανό είναι πως τα δύο αυτά φαινόμενα μοιράζονται κοινούς αιτιολογικούς και παθολογικούς μηχανισμούς [215]. Εκτός από τα αυτοάνοσα νοσήματα, μελέτες της χρήσης της IVIg έχουν διεκπεραιωθεί και για την θεραπεία του καρκίνου. Η χορήγηση της έχει φανεί πως αυξάνει την ενεργοποίηση των κυττάρων φυσικών φονιάδων (NK) και την παραγωγή της IL-2 η οποία αποτελεί ένα αντικαρκινικό και αντι-αγγειογενετικό παράγοντα [236]. Η αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας (Extracellular matrix-ECM) είναι σημαντικός παράγοντας για την εξέλιξη και την διασπορά των καρκινικών κυττάρων. Τα ένζυμα που διασπούν το ECM και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της μήτρας (MMPs) παράγονται κυρίως από τα μονοκύτταρα που βρίσκονται εντός των καρκινικών εστιών. Από μελέτες έχει φανεί πως η IVIg μειώνει την έκκριση των MMPs περιορίζοντας την ανάπτυξη του όγκου. Η λειτουργία αυτή επιτυγχάνεται μέσω του F(ab)2 τμήμα των αντισωμάτων και όχι από την Fc περιοχή αυτών [215]. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί πυρηνικός και κυτταροπλασματικός εντοπισμός των διεισδυτικών υποπληθυσμών της IVIg σε καρκινικά κύτταρα που ως αποτέλεσμα είχε τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων, την προαγωγή ανοσογονικότητας έναντι αυτών και ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της μετάστασης [237]. Τέλος οι αντικαρκινικές ιδιότητες της IVIg φαίνεται πως προκύπτουν και μέσω της ικανότητάς της να αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στην G1 φάση ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των αντισωμάτων με κομβικά μόρια της καρκινογένεσης όπως το p21/WAF-1, η p53 και του παράγοντα BAFF [238].

Σε μονοκλωνικό επίπεδο, όλα τα αντισώματα που έχουν απομονωθεί έναντι των καρκινικών κυττάρων φέρουν τα χαρακτηριστικά των NAbS. Χαρακτηρίζονται από πολυδραστικότητα και η κύρια δράση τους είναι η επαγωγή της απόπτωσης αυτών και η πρόκληση κυτταροτοξικότητας [231]. Ενδο-περιτοναϊκή χορήγηση μονοκλωνικών IgM-NAbS έναντι καρκινικών κυττάρων σε μοντέλα ποντικών, όπου είχαν μεταμοσχευθεί καρκινικοί όγκοι, έδειξαν πως το πενταμερές της IgM είχε την ικανότητα να διηθήσει στους ιστούς και να εντοπιστεί στην καρκινική περιοχή ασκώντας την κυτταροτοξική της δράση [233]. Παράλληλα, αντι-DNA NAbS με ποικίλες δραστηριότητες, που ανευρίσκονται στην κυκλοφορία ασθενών με καρκίνο, συνδέονται με καλή πρόγνωση [239]. Ενώ πλέον έχουν απομονωθεί αρκετά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των καρκινικών κυττάρων, περαιτέρω μελέτες και *in vivo* πειράματα είναι αναγκαία για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών και εξειδικευμένων φαρμακευτικών σκευασμάτων. Οι σημερινές τεχνικές επιτρέπουν την διάγνωση του καρκίνου στα πρώιμα στάδια της εξαλλαγής, όταν δηλαδή πρωτοεμφανιστούν τα κλινικά συμπτώματα της νόσου. Ωστόσο η χρήση των φυσικών αντισωμάτων στην διάγνωση αποτελεί μια πρωτοπορία στην εποχή μας, αφού τα αντισώματα αυτά ανευρίσκονται στην κυκλοφορία σε στάδια πολύ νωρίτερα της εκδήλωσης της νόσου και μπορούν να αποτελέσουν σημαντικούς για την επιβίωση, διαγνωστικούς και προγνωστικούς δείκτες της νεοπλασίας [240].

II. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση ανθρώπινων μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών από ορούς ασθενών με Πολλαπλούν Μυέλωμα (ΠΜ) και Μακροσφαιριναμία Waldenström (MW) ως προς την ανεύρεση αντισωμάτων τάξης G και τάξης M αντίστοιχα, που φέρουν χαρακτηριστικά όμοια με τα NAbS και έχουν την ικανότητα να διεισδύουν σε ζώντα καρκινικά κύτταρα. Οι ασθένειες ΠΜ και η MW εντάσσονται στις πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες (PCDs) και χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών στον ορό των ασθενών. Καθώς το κυρίως γνώρισμα των NAbS είναι η πολυδραστικότητα, καθίσταται δυνατή η επιλογή αντισωμάτων από τους ορούς, με βάση την αντιγονική τους δραστικότητα έναντι ενός πάνελ αντιγόνων του ευατού και του ξένου. Στόχος, είναι η απομόνωση μονοκλωνικών αντισωμάτων και η επιβεβαίωση της πολυδραστικότητάς τους με τη χρήση της τεχνικής ELISA, ο έλεγχος της κυτταροδιεισδυτικής τους ικανότητας σε ζώντα καρκινικά κύτταρα (MDA-MB-231, HeLa) και ο έλεγχος της βιολογικής τους δράσης έναντι αυτών, μέσω του ελέγχου της απόπτωσης *in vitro*. Τέλος, πραγματοποιείται έλεγχος για πιθανές καταλυτικές δράσεις των υποψήφιων μονοκλωνικών αντισωμάτων της μελέτης χρησιμοποιώντας νουκλεϊκά οξέα ως υποστρώματα.

Το εργαστήριο Ανοσολογίας του Ινστιτούτου Παστέρ, εστιάζει το ερευνητικό του ενδιαφέρον στην αξιοποίηση των NAbS στη θεραπεία. Μονοκλωνικά φυσικά κυτταροδιεισδυτικά αντισώματα έχουν απομονωθεί στο εργαστήριό, αρχικά από μοντέλα ποντικού που εμφανίζουν αυθόρμητο λύκο (NZBxNZW)F1, αλλά και στη συνέχεια, από υγιή ποντίκια BALB/c. Παράλληλα στον άνθρωπο, οι μελέτες του εργαστηρίου στράφηκαν στην ανεύρεση πολυκλωνικών φυσικών αντισωμάτων με κυτταροδιεισδυτική ικανότητα στο φαρμακευτικό σκεύασμα της ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης (IVIg). Ως συνέχεια των ενδιαφερόντων του εργαστηρίου ήταν η μελέτη φυσικών μονοκλωνικών αντισωμάτων ανθρώπινης προελεύσεως, με κυτταροδιεισδυτική ικανότητα. Αναφορές, έχουν επισημάνει την υψηλή συχνότητα ανεύρεσης ανοσοσφαιρινών που φέρουν χαρακτηριστικά όμοια με αυτά των NAbS σε ορούς ασθενών με πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες (PCDs). Επιπλέον, στοιχεία από προηγούμενες μελέτες υποδεικνύουν πως στις PCDs, κάποιοι από τους κλώνους των Β-κυττάρων που παράγουν μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες, πιθανά να προέρχονται από κλώνους, που κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, παράγουν NAbS [18-20].

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις πιο συνήθεις ασθένειες του δυτικού κόσμου και τα φυσικά αντισώματα φαίνεται πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του φαινομένου σε χαμηλές συχνότητες εμφάνισης. Ωστόσο, η βιολογική δράση μονοκλωνικών CPAbs έναντι καρκινικών κυττάρων παραμένει αδιευρεύνητη, ενώ συνολικά φαίνεται πως ο περιορισμός της εξάπλωσής του καρκίνου *in vivo* προάγεται μέσω της κυτταροτοξικής δράσης, κυρίως των IgM-NAbS, στα καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, η κυτταροδιεισδυτική ικανότητα και η βιολογική ενδοκυττάρια δράση μονοκλωνικών CPAbs ανθρώπινης προελεύσεως αποτελεί ένα καινοτόμο πεδίο μελέτης με δυνατότητες αξιοποίησής τους στη θεραπεία. Η κυτταροδιεισδυτική ικανότητά των CPAbs σχετίζεται άμεσα με την πολυδραστικότητα που εμφανίζουν, ως μέρος του συνόλου των NAbS, ενώ αυτά μπορούν να αξιοποιηθούν είτε ως μεταφορείς δραστικών ουσιών, είτε ως αυτούσια θεραπευτικά μόρια (ενδογενής βιολογικός ρόλος).

Υλικά και Μέθοδοι

III. Υλικά και Μέθοδοι

1. Κυτταροκαλλιέργεια

1.1. Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο προσκολλητικές σειρές καρκίνου του ανθρώπου:

HeLa: Καρκινική σειρά ανθρώπου, που προέρχεται από επιθηλιακό ιστό του τραχήλου της μήτρας.

MDA-MB-231: Καρκινική σειρά (τριπλά αρνητική) καρκίνου του μαστού.

1.2. Βασικοί χειρισμοί

➤ Παρασκευή διαλύματος πλήρους θρεπτικού υλικού

Θρεπτικό υλικό: DMEM Culture Medium 1x (gibco)

DMEM Θρεπτικό μέσο (Dulbeco's Modified Eagle's Minimal essential medium), 500 mL
<ul style="list-style-type: none">• DMEM (10x): 50 mL• Αποστειρωμένο dH₂O: 420 mL• L-γλουταμίνη 2mM: 5mL• Hepar 1M ρυθμιστικό διάλυμα: 1mL• Διττανθρακικό νάτριο 7.5%: 18mL• Πυρουβικό νάτριο 100mM: 5 mL

Για την παρασκευή πλήρους θρεπτικού υλικού είναι αναγκαία η προσθήκη ορού εμβρύου βοοειδούς (FBS), στο θρεπτικό μέσο. Το FBS προστίθεται στο θρεπτικό μέσο με αναλογία 9:1 (DMEM 1x / FBS) ύστερα από θερμική αδρανοποίησή του στους 56°C για 30 λεπτά. Στο θρεπτικό μέσο προστίθενται επίσης τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε αναλογία 1% του τελικού όγκου.

Πλήρες θρεπτικό υλικό		
ΥΛΙΚΑ	Θερμοκρασία φύλαξης	Τελική αναλογία % v/v
DMEM 1x	4 °C	
5 x 10 ⁵ IU πενικιλίνη	-20 °C	1%
5 x 10 ⁵ IU στρεπτομυκίνη	-20 °C	1%
Ορός εμβρύου βοοειδούς (FBS)	-20 °C	10%

➤ **Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1x pH7.4**

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (KP) 1 M και 0,1M, pH 7,4:

Διάλυμα Φωσφορικών (KP) 1M pH 7.6
-Διάλυμα KH_2PO_4 1M (Merck) <ul style="list-style-type: none"> • KH_2PO_4, MW 136.08g/mol: 136gr • dH_2O: 1L - Διάλυμα K_2HPO_4 1M (Merck) <ul style="list-style-type: none"> • K_2HPO_4, MW 228.23g/mol: 228gr • dH_2O: 1L σε διάλυμα K_2HPO_4 1M προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα διαλύματος K_2HPO_4 1M, υπό συνεχή ανάδευση, έως την ένδειξη pH 7.6

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών παρουσία χλωριούχου νατρίου:

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών παρουσία χλωριούχου νατρίου (PBS), 1L
<ul style="list-style-type: none"> • NaCl (M.W. 58,44 g/mol): 9 gr • Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (KP) 1M, pH 7.4: 10mL Προστίθεται dH_2O έως τελικού όγκου 1L

➤ **Διαδικασία Ανακαλλιέργειας κυττάρων από το στοκ φυλασσομένων κυττάρων σε υγρό άζωτο (-170 °C)**

Τα κυτταρικά εναιωρήματα φυλάσσονται για περιόδους μακράς διάρκειας σε υγρό άζωτο (-170 °C). Τα κύτταρα είναι αποθηκευμένα σε σωληνάρια κατάψυξης όπου έχουν καταψυχθεί σε διάλυμα 90% ορού εμβρύου βοοειδούς (FBS) και 10% Διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO).

<u>Υλικά:</u>	
Διαλύματα - χημικά	<ul style="list-style-type: none"> • Πλήρες Θρεπτικό υλικό
Αναλώσιμα	<ul style="list-style-type: none"> • Πλαστικά σωληνάρια 15ml • Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 6 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα (Corning, USA) • Αναλώσιμες πιπέτες 5ml & 10ml
Συσκευές	<ul style="list-style-type: none"> • Υδατόλουτρο (Julabo, Germany) • Φυγόκεντρος (4K10 Sigma, USA) • Θάλαμος νηματικής ροής (Thermo Electron Corporation) • Κλίβανος κυττάρων (Thermo Electron Corporation)

Διαδικασία:

- Ανάκτηση των δειγμάτων από το δοχείο υγρού αζώτου.
- Καταγραφή των στοιχείων που αναγράφονται στην ετικέτα του δείγματος και διαγραφή αυτών από τους καταλόγους και τα αρχεία excel του εργαστηρίου.
- Θέρμανση του δείγματος σε υδατόλουτρο στους 37 °C για την επαναφορά του περιεχομένου σε υγρή μορφή.
- Προσθήκη θρεπτικού υλικού σε πλαστικό σωληνάριο των 15ml και εν συνεχεία προσθήκη του κυτταρικού εναιωρήματος σε αυτό.

Σημείωση: η ποσότητα θρεπτικού υλικού που προστίθεται σε κάθε σωληνάριο εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων.

- Φυγοκέντρηση του δείγματος για 5 λεπτά, σε 1100 rpm στους 20 °C.
- Ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος που θα προκύψει επιλέγεται και η επιφάνεια καλλιέργειας (μέγεθος φλάσκας) που θα χρησιμοποιηθεί.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού.
- Προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού στην επιφάνεια καλλιέργειας (φλάσκα).
- Προσθήκη του κυτταρικού εναιωρήματος στην επιφάνεια καλλιέργειας και ανάδευση της φλάσκας.

Σημείωση: η ανάδευση της φλάσκας γίνεται εκτελώντας κυκλικές σταυρωτές ή ελλειψοειδής κινήσεις.

- Επάωση της καλλιέργειας σε κλίβανο (37 °C, 5% CO₂).

➤ Αλλαγή θρεπτικού υλικού

Σε κάποιες περιπτώσεις είναι αναγκαία η συχνή αλλαγή θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας (~ ανα 2 μέρες) ώστε να υπάρχει επάρκεια των αναγκαίων θρεπτικών συστατικών για την φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων. Ταυτόχρονα απομακρύνονται από την καλλιέργεια άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων και νεκρωτικό υλικό.

<u>Υλικά:</u>	
Διαλύματα - χημικά	<ul style="list-style-type: none">• Πλήρες Θρεπτικό υλικό• Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών (PBS) 1x
Αναλώσιμα	<ul style="list-style-type: none">• Πλαστικά σωληνάρια 15ml• Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 6 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα (Corning, USA)• Αναλώσιμες πιπέτες 5ml & 10ml
Συσκευές	<ul style="list-style-type: none">• Υδατόλουτρο (Julabo, Germany)• Θάλαμος νηματικής ροής (Thermo Electron Corporation)• Κλίβανος κυττάρων (Thermo Electron Corporation)

Διαδικασία:

- Απομάκρυνση του παλιού θρεπτικού υλικού.
- Ξεπλένεται η επιφάνεια καλλιέργειας με PBS 1x (προαιρετικά).
- Προσθήκη νέας ποσότητας θρεπτικού υλικού στη φλάσκα.
- Καλή ανάδευση ώστε το θρεπτικό να καταλάβει όλα τα σημεία της επιφάνειας της φλάσκας.
- Επώαση της καλλιέργειας σε κλίβανο (37 °C, 5% CO₂).

➤ **Ανακαλλιέργεια κυττάρων**

Καθώς τα κύτταρα επωάζονται και μεγαλώνουν σε μια συγκεκριμένη επιφάνεια καλλιέργειας (μέγεθος φλάσκας) και με μια συγκεκριμένη ποσότητα θρεπτικού υλικού, κρίνεται αναγκαία η ανακαλλιέργειά τους όταν πλέον αυτά δεν είναι επαρκή. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται όταν η πυκνότητά τους στην αρχική επιφάνεια καλλιέργειας ξεπεράσει περίπου το 80%. Σε εκείνη την φάση παρατηρείται και αλλαγή του χρώματος του θρεπτικού υλικού καλλιέργειας (χρώμα προς το κίτρινο) και αυτό συμβαίνει λόγω της κατανάλωσής του από τα κύτταρα καθώς και λόγω της ύπαρξης των βιολογικών απόβλητων των κυττάρων.

<u>Υλικά:</u>	
Διαλύματα – χημικά	<ul style="list-style-type: none">• Πλήρες Θρεπτικό υλικό• Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών (PBS) 1x• Θρυψίνη-EDTA (0.5%) (<i>Thermo-Fisher Scientific</i>)
Αναλώσιμα	<ul style="list-style-type: none">• Φλάσκα καλλιέργειας 15ml ή 75ml• Αναλώσιμες πιπέτες 5ml, 10ml & 25ml
Συσκευές	<ul style="list-style-type: none">• Υδατόλουτρο (Julabo, Germany)• Θάλαμος νηματικής ροής (Thermo Electron Corporation)• Κλίβανος κυττάρων (Thermo Electron Corporation)

Διαδικασία:

- Αναρρόφηση θρεπτικού υλικού.
- Ξέπλυμα της επιφάνειας καλλιέργειας με PBS 1x και επαναρρόφηση αυτού.

Σημείωση: είναι απαραίτητη για τους επόμενους χειρισμούς η απομάκρυνση από την επιφάνεια της καλλιέργειας των υπολειμμάτων ορού.

- Προσθήκη Θρυψίνης 1x και ανάδευση της φλάσκας ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνεια καλλιέργειας (~3ml).

Σημείωση: η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο που χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των κυττάρων (προσκολλητικές σειρές) από την επιφάνεια της καλλιέργειας.

- Επώαση των κυττάρων για 3-5 λεπτά στον κλίβανο (37 °C, 5% CO₂).

Σημείωση: το ένζυμο θρυψίνη ενεργοποιείται στους 37 °C.

- Προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού.

Σημείωση: Η δράση του ενζύμου αναστέλλεται από τον ορό. Η ποσότητα του θρεπτικού υλικού που θα προστεθεί εξαρτάται από την αναλογία που χρειάζεται να ανακαλλιεργηθούν τα κύτταρα σε κάθε φλάσκα. Κατά την προσθήκη του θρεπτικού υλικού εκτελείται καλό πιπετάρισμα ώστε να 'σπάσουν' τα συσσωματώματα των κυττάρων που δημιουργήθηκαν από τη δράση του ενζύμου.

- Προστίθεται θρεπτικό υλικό σε όλες τις φλάσκες.

Σημείωση: η ποσότητα θρεπτικού υλικού καλλιέργειας εξαρτάται από το μέγεθος της φλάσκας.

- Μοιράζεται βάση αναλογίας το εναιώρημα των κυττάρων σε φλάσκες.

Σημείωση: σε κάθε ανακαλλιέργεια κρατάμε πάντα την παλιά επιφάνεια καλλιέργειας και με βάση την αναλογία μοιράζονται τα υπόλοιπα κύτταρα σε νέες φλάσκες.

- Εκτελείται καλή ανάδευση της κάθε φλάσκας (κυκλικές, ελλειπτικές ή σταυρωτές κινήσεις) ώστε το θρεπτικό υλικό να καταλάβει όλη την επιφάνεια καλλιέργειας.
- Επώαση της καλλιέργειας σε κλίβανο (37 °C, 5% CO₂).

➤ Υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων καλλιέργειας

Στις περισσότερες των περιπτώσεων ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων στη καλλιέργεια είναι αναγκαίος για μελλοντικούς υπολογισμούς και πειραματικούς χειρισμούς σε διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα.

Υλικά:	
Διαλύματα - χημικά	<ul style="list-style-type: none"> • Πλήρες Θρεπτικό υλικό • Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών (PBS) 1x • Θρυψίνη-EDTA (0.5%) (<i>Thermo-Fisher Scientific</i>) • Διάλυμα Trypan Blue 0.4% (<i>Honeywell-Fluka, USA</i>)
Αναλώσιμα	<ul style="list-style-type: none"> • Πλαστικά σωληνάκια 1,5ml • Αναλώσιμες πιπέτες 5ml & 10ml
Συσκευές	<ul style="list-style-type: none"> • Υδατόλουτρο (<i>Julabo, Germany</i>) • Φυγόκεντρος (4K10 <i>Sigma, USA</i>) • Θάλαμος νηματικής ροής (<i>Thermo Electron Corporation</i>) • Αιμοκυτταρόμετρο <i>Neubauer (Sigma-Aldrich)</i> • Ανάστροφο μικροσκόπιο (<i>Bausch & Lomb, Germany</i>)

Διαδικασία:

Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων καλλιέργειας γίνεται με αιμοδυναμόμετρο *Neubauer* και την χρήση της χρωστικής *Trypan Blue*. Η χρωστική *Trypan Blue* χρωματίζει (μπλέ) τα νεκρά κύτταρα ώστε να καθίσταται εφικτός ο διαχωρισμός τους από τα ζωντανά. Η μέτρηση στο αιμοκυτταρόμετρο γίνεται μετρώντας τα ζωντανά κύτταρα όλων των τεταρτημόριων της πλάκας *Neubauer* στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Υπολογίζεται ο μέσος όρος των τιμών και στη συνέχεια υπολογίζεται η συγκέντρωση των κυττάρων με βάση τον τύπο: [(Μ.Ο. x συντελεστή αραιώσης x 10⁴) κύτταρα/ml].

Η συνηθέστερη αναλογία κυττάρων έναντι του τελικού όγκου της χρωστικής Trypan Blue που χρησιμοποιείται για την κάθε μέτρηση είναι 1:5 και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων δίνεται από την παρακάτω μαθηματική σχέση:

$$\frac{\text{κύτταρα}}{\text{ml}} = \frac{N \times T \times A}{10^{-4} \times 25}$$

- N, ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν
- T, ο αριθμός των τετραγώνων που έγινε η καταμέτρηση
- A, η αναλογία αραιώσης των κυττάρων ως προς το τελικό όγκο
- 10^{-4} , ποσότητα (mL) του κάθε τετραγώνου
- 25, ο συνολικός αριθμός των τετραγώνων της πλάκας

➤ **Αποθήκευση κυττάρων**

Για την παραγωγή σποκ των κυττάρων και την αποθήκευσή τους για μακροχρόνιες περιόδους πραγματοποιείται η διαδικασία κατάψυξής τους. Οι σωστοί και προσεκτικοί χειρισμοί είναι απαραίτητοι για τη βιωσιμότητα των κυττάρων καλλιέργειας σε μελλοντική απόψυξη.

<u>Υλικά:</u>	
Διαλύματα - χημικά	<ul style="list-style-type: none"> • Πλήρες Θρεπτικό υλικό • Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών (PBS) 1x • Θρυψίνη-EDTA (0.5%) (<i>Thermo-Fisher Scientific</i>) • Διάλυμα Trypan Blue 0.4% (<i>Honeywell-Fluka, USA</i>) • Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (<i>Sigma-Aldrich</i>) • Ορός εμβρύου βοοειδούς (FBS) 1x
Αναλώσιμα	<ul style="list-style-type: none"> • Πλαστικά σωληνάρια 1,5ml & 15ml • Σωληνάρια κατάψυξης κυττάρων 1ml (Nunc) • Αναλώσιμες πιπέτες 5ml & 10ml
Συσκευές	<ul style="list-style-type: none"> • Υδατόλουτρο (<i>Julabo, Germany</i>) • Φυγόκεντρος (4K10 <i>Sigma, USA</i>) • Θάλαμος νηματικής ροής (<i>Thermo Electron Corporation</i>) • αιμοκυτταρόμετρο <i>Neubauer</i> • Ανάστροφο μικροσκόπιο (<i>Bausch & Lomb, Germany</i>)

Διαδικασία:

- Αρχικά ακολουθούνται όλα τα βήματα της ανακαλλιέργειας μέχρι και την προσθήκη του θρεπτικού υλικού με τον ορό για την απενεργοποίηση του ενζύμου Θρυψίνη.
- Πραγματοποιείται αναρόφηση του κυτταρικού εναιωρήματος από την επιφάνεια καλλιέργειας (φλάσκα) και μεταφορά του σε ένα πλαστικό σωληνάριο των 15ml.
- Πραγματοποιείται καλή ανάδευση και στη συνέχεια μεταφορά ~50λ κυτταρικού εναιωρήματος σε πλαστικό σωληνάριο 1,5ml.

Σημείωση: σε αυτό το σημείο θέλουμε να μετρήσουμε την συνολική ποσότητα των κυττάρων στο εναιώρημα. Έτσι ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα για τις μετρήσεις.

- (έξω από τον θάλαμο νηματικής ροής) Σε ένα νέο πλαστικό σωληνάριο 1,5ml φτιάχνουμε ένα μίγμα: 20λ κυτταρικό εναιώρημα + 30λ PBS (1x) + 50λ Trypan Blue (αραίωση 1/5, συντελεστής αραίωσης 5).
- Σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer προσθέτουμε 12λ από το μίγμα.

Σημείωση: έχουμε εκ το προτέρων καθαρίσει καλά με ddH₂O την πλάκα και την καλυπτρίδα του αιμοκυτταρόμετρου ώστε να μην υπάρχουν οποιαδήποτε υπολείμματα.

- Η μέτρηση στο αιμοκυτταρόμετρο γίνεται μετρώντας τα ζωντανά κύτταρα στα τεταρτημόρια της πλάκας Neubauer.

Σημείωση: υπολογίζουμε των μέσω όρο των τιμών από τις μετρήσεις των ζωντανών κυττάρων των τεταρτημορίων. Από τον μέσο όρο μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση των κυττάρων [(M.O.x συντελεστής αραίωσης x 10⁴) κύτταρα/ml]. Από τη συγκέντρωση των κυττάρων υπολογίζουμε των αριθμό των κυττάρων του αρχικού δείγματος (συγκέντρωση x ml της ποσότητας στο σωληνάριο). Τέλος, από την ποσότητα των κυττάρων που θέλουμε να καταψύξουμε σε κάθε σωληνάριο κατάψυξης κυττάρων (1ml), συνήθως 2-2,5 x 10⁶ κύτταρα/ σωληνάριο, υπολογίζουμε πόσα σωληνάρια κατάψυξης κυττάρων θα χρειαστούμε (Z).

- Φτιάχνουμε ένα μίγμα για όσα σωληνάρια θα χρειαστούμε +1 (Z+1).

Σημείωση: τα κύτταρα καταψύχονται σε διάλυμα 90% FBS + 10% DMSO και ο όγκος κάθε σωληναρίου κατάψυξης κυττάρων είναι πάντα 1ml.

- Φυγοκέντρηση των κυττάρων σε 1100 rpm, στους 20 °C, για 5 λεπτά.

Σημείωση: τα κύτταρα στο σωληνάριο βρίσκονται σε διάλυμα θρεπτικού υλικού με ορό από το οποίο πρέπει να διαχωριστούν. Με την φυγοκέντρηση τα κύτταρα καθιζάνουν και το υπερκείμενο (θρεπτικό) απομακρύνεται.

- Επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων σε Z+1ml από το μίγμα και καλό πιπετάρισμα.
- Σημειώνονται τα σωληνάρια κατάψυξης των κυττάρων.

Σημείωση: αναγράφονται: η κυτταρική σειρά, ο αριθμός ανακαλλιέργειας, ημερομηνία και το όνομα του χρήστη.

- Προσθήκη 1ml σε κάθε σωληνάριο κατάψυξης.
- Πακετάρισμα των σωληναρίων και τοποθέτηση στους -20 °C για 30 λεπτά.
- Μεταφορά στους -80 °C για 2-3 ημέρες.
- Μεταφορά στο υγρό άζωτο (-170 °C) για περιόδους μακράς διάρκειας.

2. Απομόνωση Μονοκλωνικών Αντισωμάτων

Για την απομόνωση μονοκλωνικών φυσικών αντισωμάτων στραφήκαμε στην αναζήτησή αυτών σε ορούς ασθενών με Πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες (PCDs- Πολλαπλούν Μυέλωμα, Μακροσφαιριναιμία Waldenström). Οι οροί συλλέχθηκαν από κλινικά δείγματα περιστατικών του γενικού νοσοκομείου Αλεξάνδρας υπό τα πλαίσια συνεργασίας με τον καθηγητή αιματολογίας Δρ. Ευάγγελο Τέρο.

1.2. Απομόνωση mIgG Αντισωμάτων με χρωματογραφία συγγένειας

Η βασική αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αντιστρεπτή αλληλεπίδραση- σύνδεση μορίων με υψηλή συγγένεια σύνδεσης μεταξύ τους. Στη περίπτωση απομόνωσης ανοσοσφαιρινών τάξης G χρησιμοποιείται ευρέως ως παράγοντας σύνδεσης η πρωτεΐνη G, συνδεδεμένη σε σφαιρίδια σεφαρόζης (CL-Sepharose) ως στερεά φάση του ανοσοπροσροφητή. Η πρωτεΐνη G εκκρίνεται και απομονώνεται από τα βακτηριακά στελέχη C και G του στρεπτόκοκου και έχει την ιδιότητα να δεσμεύει ισχυρά τη σταθερή περιοχή των ανοσοσφαιρινών τάξης G. Χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση IgG από ανθρωπινους ορούς. Καθώς το δείγμα σε πρώτη φάση (έκπλυση) εισέρχεται στον ανοσοπροσροφητή οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης G και του τμήματος της σταθερής περιοχής των αντισωμάτων συγκρατούν τα αντισώματα στόχους (IgG) και τα υπόλοιπα μέρη του δείγματος απομακρύνονται. Σε δεύτερη φάση (έκλυση) η αλλαγή του pH οδηγεί στην εξασθένηση των ειδικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων και στην απελευθέρωση των μορίων στόχων (αντισώματα IgG) των οποίων γίνεται η περισυλλογή.

<u>Υλικά:</u>	
Διαλύματα - χημικά	<ul style="list-style-type: none">• Πρωτεΐνη G συνδεδεμένη σε σφαιρίδια σεφαρόζης (Pharmacia, USA)• Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών (PBS) 1x• Διάλυμα υδροχλωριο-γλυκίνη 0.2N pH 2.8• 2-άμινο-2-(υδροξυμεθυλ)-1,3-προπανιδιόλη (Tris) 2M (Merck)• Βακτηριοστατικό αζίδιο (NaN₃) 2% w/v (Merck)
Αναλώσιμα	<ul style="list-style-type: none">• Σωληνάρια 50ml• Σωληνάρια για απομόνωση αντισωμάτων 5 ml (Sarstedt)• Πιπέτες Παστέρ κλειστές (CEB, France)• Κιβέτα χαλαζία 1,5ml• Αναλώσιμες πιπέτες 5ml
Συσκευές	<ul style="list-style-type: none">• Φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους (LKB Biochrom Ultrospec II, UK)• Πεχάμετρο (Thermo Electron Corporation, USA)• Στήλη χρωματογραφίας 2,5 x 20 cm (Bio-Rad, USA)

Διαλύματα:

Διάλυμα HCl-Γλυκίνη 0.2N pH 2.8, 1L

-Διάλυμα υδροχλωρίου 0.2N (Merck)

- HCl 37% 11N: 17.54 mL

dH₂O προστίθεται έως τελικού όγκου 100mL

-Διάλυμα γλυκίνης 2M (Serva)

- Γλυκίνη (M.W. 75.1 g/mol): 150.2 gr

dH₂O προστίθεται έως τελικού όγκου 1L

προσθέτουμε διάλυμα γλυκίνης σε 100 mL διαλύματος HCl έως την τιμή του pH 2.8. Συμπληρώνεται ο όγκος με dH₂O έως 1L.

Διαδικασία:

Η διαδικασία της απομόνωσης αντισωμάτων με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας διεξάγεται εξ ολοκλήρου στους 4 °C και αποτελείται από τρία στάδια:

- **Στο πρώτο στάδιο** γίνεται η **επώαση** του ανοσοπροσροφητή με το δείγμα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το δείγμα μας είναι ορός με υψηλή συγκέντρωση μονοκλωνικής IgG και για το λόγο αυτό πριν την επώαση αραιώνουμε τον ορό σε αναλογία 1/1 με PBS. Η επώαση του δείγματος διαρκεί δύο ώρες με συχνές, ήπιες αναδεύσεις με τη χρήση γυάλινης, κλειστής πιπέτας παστέρ.
- **Το δεύτερο στάδιο** είναι αυτό της **έκπλυσης** του ανοσοπροσροφητή, στο οποίο γίνεται η απομάκρυνση των συστατικών του δείγματος πλην των μορίων στόχων προς απομόνωση τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα σε αυτόν. Η έκπλυση γίνεται με την συνεχή ροή διαλύματος PBS 1x (pH 7.4) μέσα από τον ανοσοπροσροφητή ενώ παράλληλα γίνεται φωτομέτρηση των προϊόντων που εξέρχονται από αυτόν στα 280nm και τυφλό το PBS. Η διαδικασία της έκπλυσης ολοκληρώνεται όταν η μέτρηση των προϊόντων εξόδου μηδενιστεί.
- **Το τρίτο στάδιο** είναι αυτό της **έκλουσης** των μορίων στόχων προς απομόνωση από τον ανοσοπροσροφητή και η περισυλλογή τους. Η αποδέσμευση των αντισωμάτων από τα σφαιρίδια της σεφαρόζης γίνεται με τη δημιουργία ενός χαμηλού PH εντός του ανοσοπροσροφητή. Αυτό επιτυγχάνεται με τη συνεχή ροή διαλύματος **υδροχλωριο-γλυκίνης pH2.8** δια μέσου του ανοσοπροσροφητή ενώ παράλληλα πραγματοποιείται φωτομέτρηση των προϊόντων που εξέρχονται από αυτόν, στα 280nm με τυφλό το νερό. Το περιβάλλον ενός χαμηλού PH είναι αναγκαίο για την αποδέσμευση των αντισωμάτων από την πρωτεΐνη G και έχει ως τελικό αποτέλεσμα τα αντισώματα στόχοι προς απομόνωση να εξέρχονται αυτής από την έξοδο Του ανοσοπροσροφητή σε διάλυμα **υδροχλωριο-γλυκίνη pH2.8**. Το χαμηλό pH του διαλύματος εξόδου όμως μπορεί να επιφέρει τροποποιήσεις στη δραστικότητα των αντισωμάτων και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η ταχεία εξουδετέρωσή του και η επαναφορά του pH στο 7,4. Για το λόγο αυτό καθώς το προϊόν της έκλουσης εξέρχεται η περισυλλογή του γίνεται σε γυάλινα σωληνάκια τα οποία περιέχουν κατάλληλη ποσότητα διαλύματος Tris 2M για την άμεση εξουδετέρωση του διαλύματος (20λ Tris 2M / 1ml διαλύματος έκλουσης **υδροχλωριο-γλυκίνη pH2.8**). Οι μετρήσεις στο φωτόμετρο καταγράφονται και η διαδικασία της έκλουσης ολοκληρώνεται όταν η ένδειξη του φωτόμετρου πέσει κάτω από το 0,05.

Τα δείγματα συγκεντρώνονται σε κοινό δοχείο και στη συνέχεια οδηγούνται προς συμπύκνωση του όγκου τους.

➤ **Συμπύκνωση των δειγμάτων**

<u>Υλικά:</u>	
Αναλώσιμα	<ul style="list-style-type: none">• Μembrάνη συμπύκνωσης PM 30 (Millipore)
Συσκευές	<ul style="list-style-type: none">• Συσκευή συμπύκνωσης (Amicon)• Φιάλη αζώτου

Διαδικασία:

Η συμπύκνωση των δειγμάτων βασίζεται στην διαφορά μεγέθους των μορίων του διαλύματος τα οποία ωθούνται μέσω δημιουργίας πίεσης εντός της συσκευής συμπύκνωσης, να διέλθουν διαμέσου μιας ημιδιαπερατής μεμβράνης. Η συσκευή του πυκνωτή συνδέεται με φιάλη αζώτου για τη δημιουργία πίεσης και πριν την έξοδο του πυκνωτή, τοποθετείται η μεμβράνη συμπύκνωσης (0,45μm) η οποία συγκρατεί μόρια μεγαλύτερα των 100KD ενώ είναι διαπερατή σε μόρια μικρότερου μοριακού βάρους τα οποία απομακρύνονται. Ο τελικός όγκος που επιλέχθηκε για τη συμπύκνωση των δειγμάτων είναι ~5ml.

➤ **Διαπίδυση**

Η διαδικασία της διαπίδυσης έχει ως στόχο την αλλαγή του διαλύτη ενός διαλύματος και η βασική αρχή της διαδικασίας βασίζεται στο φαινόμενο της όσμωσης μεταξύ δύο διαφορετικών διαλυμάτων (συγκέντρωση και pH) μέσω μιας ημιδιαπερατής επιφάνειας. Ο επιθυμητός διαλύτης των δειγμάτων των καθαρών αντισωμάτων IgG για τους περεταίρω χειρισμούς, την αποθήκευση τους και τη χρήση τους σε πειραματικές διαδικασίες σε ζώντα κύτταρα είναι το PBS 1x (pH7,4).

<u>Υλικά:</u>	
Αναλώσιμα	<ul style="list-style-type: none">• Ταινία διαπίδυσης (<i>Sigma-Aldrich, USA</i>)
Συσκευές	<ul style="list-style-type: none">• Μαγνητικός αναδευτήρας

Διαδικασία:

Χρησιμοποιούμε κομμάτι από την ταινία διαπίδυσης στο επιθυμητό μέγεθος για την ποσότητα του δείγματός (~5ml). Τοποθετούμε το κομμάτι της ταινίας σε δοχείο ζέσεως (500ml) με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά ώστε να ανοίξουν τα τοιχώματα. Εφόσον τα τοιχώματα ανοίξουν δημιουργούμε μια θήκη κλείνοντας το ένα άκρο της ταινίας αεροστεγώς. Το δείγμα τοποθετείται εντός των τοιχωμάτων της ταινίας και στη συνέχεια σφραγίζεται και το άλλο άκρο. Σε δοχείο 5L προστίθεται ο επιθυμητός διαλύτης (PBS 1x) και το δείγμα τοποθετείται εντός του δοχείου και υπό ήπια ανάδευση παραμένει για τουλάχιστον δώδεκα ώρες στους 4°C. Με το πέρας του χρόνου περισυλλέγεται το δείγμα με τη χρήση πιπέτας από το εσωτερικό της ταινίας.

➤ Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των απομονωμένων IgG

Ένας από τους τρόπους υπολογισμού της συγκέντρωσης καθαρισμένων αντισωμάτων τάξης G είναι μέσω της τιμής της απορρόφησης του πρωτεϊικού δείγματος στα 280nm (A280) και ως τυφλό τον διαλύτη στον οποίο βρίσκονται το δείγμα (στην παρούσα περίπτωση PBS 1x). Η φωτομέτρηση γίνεται από UV φασματοφωτόμετρο με ικανότητα απορρόφησης του φωτός στο υπεριώδες φάσμα. Οι πρωτεΐνες περιέχουν τα αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα Τρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη και τυροσίνη τα οποία απορροφούν το φως σε μήκος κύματος ~280nm. Κάθε πρωτεΐνη έχει τον δικό της συντελεστή απόσβεσης ανάλογα με τον αριθμό των τριών αυτών αμινοξέων που περιέχονται σε αυτή. Στη περίπτωση των ανοσοσφαιρινών οι διαφορές στον αριθμό αυτών των αμινοξέων δεν χρίζουν υψηλής σημασίας. Όσο ισχυρότερη είναι η απορρόφηση τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα. Για την βέλτιστη απόδοση της διαδικασίας είναι αναγκαία η υψηλή καθαρότητα του δείγματος (>95%). Στη περίπτωση που το δείγμα είναι πολύ πυκνό (υψηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης- OD>3,000) η μέτρηση του φωτόμετρου δεν είναι αξιόπιστη. Για τον λόγο αυτό προετοιμάζονται τουλάχιστον τρεις διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος ώστε να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη αξιοπιστία των μετρήσεων και του τελικού προσδιορισμού της συγκέντρωσης της IgG στο δείγμα.

<u>Υλικά:</u>	
Διαλύματα - χημικά	<ul style="list-style-type: none">• Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών (PBS) 1x
Αναλώσιμα	<ul style="list-style-type: none">• Σωληνάρια 1,5ml• Κιβέτα χαλαζία 1,5ml
Συσκευές	<ul style="list-style-type: none">• Φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους (LKB Biochrom Ultrospec II, UK)

Διαδικασία:

- Εκκίνηση φωτόμετρου και ρύθμιση στα 280nm.
- Προετοιμασία τριών διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος.
- Μηδενισμός του φωτόμετρου με το τυφλό (στη συγκεκριμένη περίπτωση PBS 1x).
- Μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων σε κιβέτα χαλαζία 1ml.
- Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του δείγματος (IgG):

Η θεωρητική απορρόφηση της IgG σε συγκέντρωση 1.0 mg/ml είναι 1.36 (OD=1360).

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης διαιρούμε των μέσο όρο των τιμών της απορρόφησης των αραιώσεων με το 1.36.

1.3. Απομόνωση Μονοκλωνικών IgM Αντισωμάτων

Οι οροί ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης Μ. Ωστόσο είναι πιθανό στο διάλυμα του ορού να περιέχονται και άλλα μόρια ανοσοσφαιρινών. Για να αποφευχθεί αυτό το πιθανό γεγονός, επιλέχθηκαν με βάση τα κλινικά εργαστηριακά στοιχεία των δειγμάτων, πυκνοί οροί, με υψηλή μονοκλωνικότητα.

Μια από τις διάφορες μεθόδους διαχωρισμού των πρωτεϊνών είναι με βάση την διαλυτότητά τους. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα είναι: α) η οξύτητα του διαλύματος (σε pH κοντά στο ισοηλεκτρικό της σημείο, κάθε πρωτεΐνη έχει τη μικρότερη διαλυτότητα), β) η ιονική ισχύς του διαλύματος (η χαμηλή ιονική ισχύς συνήθως αυξάνει την διαλυτότητα ενώ η υψηλή ιονική ισχύ την ελαττώνει), γ) ουδέτεροι υδατοδιαλυτοί παράγοντες συνήθως ελαττώνουν τη διαλυτότητα, δ) αλκαλοειδείς παράγοντες συνήθως ελαττώνουν τη διαλυτότητα και ε) η θερμοκρασία έως και 50 °C συνήθως αυξάνει την διαλυτότητα, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται.

Το πενταμερές μόριο της IgM είναι μια πρωτεΐνη 900KD η οποία είναι σύνηθες να δημιουργεί συσσωματώματα, όταν βρεθεί σε διάλυμα χαμηλής ιονικής ισχύς. Στις συνθήκες αυτές, δημιουργείται ίζημα και τα συσσωματώματα καθιζάνουν. Για τον λόγο αυτό, επιλέχθηκε η απομόνωση των IgM από πυκνούς ορούς να πραγματοποιηθεί με βάση τη διαλυτότητά της σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris- HCl, 5mM και τιμή pH=8,2.

Η διαδικασία της απομόνωσης έχει δύο διακριτά στάδια. Στο πρώτο στάδιο, γίνεται αλλαγή διαλύτη στο διάλυμα του ορού με την διαδικασία της διαπύδησης. Ο ορός τοποθετείται μέσα σε ταινία διαπύδησης και παραμένει για τουλάχιστον δώδεκα ώρες σε δοχείο υπό συνεχόμενη ανάδευση στο οποίο έχει τοποθετηθεί το επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα που θα αποτελέσει τον νέο διαλύτη του δείγματος. Στην παρούσα περίπτωση επιλέχθηκε το διάλυμα Tris- HCl 5mM και pH 8,2. Με το πέρας της διαδικασίας της διαπύδησης η πρωτεΐνη (IgM) έχει καθιζάνει και παρατηρείται ως ίζημα εντός της ταινίας διαπύδησης.

Το δεύτερο στάδιο της διαδικασίας είναι η επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος στο επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα. Εφ' όσον το ίζημα που παρατηρείται θεωρητικά αποτελεί την επιθυμητή πρωτεΐνη που θέλουμε να απομονώσουμε, θα χρειαστεί να το επαναδιαλυτοποιήσουμε σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα που θα μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε στη συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών με την απομονωμένη πρωτεΐνη. Στην συγκεκριμένη περίπτωση οι πειραματικές διαδικασίες που θα ακολουθήσουν αφορούν πειράματα σε ζώντα κύτταρα και για το λόγο αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα επαναδιαλυτοποίησης που επιλέχθηκε είναι το PBS 1M και pH 7,4. Διαδικαστικά, σταδιακή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος PBS χρησιμοποιείται υπό συνεχή ανάδευση του ιζήματος με γυάλινη, κλειστή πιπέτα παστέρ έως τελικού όγκου όπου η πρωτεΐνη παραμένει διαλυτή και δεν καθιζάνει. Τέλος αν πρωτεΐνη παραμένει αδιάλυτη, μια μικρή ποσότητα άλατος (π.χ. NaCl 1M) προστίθεται για να σταθεροποιήσει το μόριο και να παραμείνει διαλυτό.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των απομονωμένων αντισωμάτων γίνεται με την ίδια διαδικασία που πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αντισωμάτων IgG που απομονώθηκαν. Ωστόσο, η θεωρητική απορρόφηση του μορίου της IgM σε συγκέντρωση 1.0mg/ml είναι 1.18 (OD=1180). Έτσι για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του δείγματος διαιρούμε τον μέσο όρο των τιμών της απορρόφησης των αραιώσεων με το 1.18.

3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης – SDS-PAGE

Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού, κατά την οποία φορτισμένα μόρια (πρωτεΐνες) μετακινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου στο εσωτερικό πηκτής ακρυλαμίδης. Μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο τα φορτισμένα μόρια κινούνται προς τον ένα ή τον άλλο πόλο με ταχύτητες διαφορετικές, ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθός τους. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) της πρωτεΐνης σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και το συντελεστή τριβής (f):

$$u = Ez / f$$

Η σταθερά τριβής f εξαρτάται από τη **μάζα** και το **σχήμα** του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την **πυκνότητα του μέσου**.

Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο- δις-ακρυλαμίδης (MBA). Το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμίδης και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες. Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειικού αμμωνίου (APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο- 1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Γενικά, πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο.

Σε μία τυπική (επίπεδη) ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους σε συνθήκες είτε αναγωγικές είτε μη αναγωγικές. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Στις αναγωγικές συνθήκες προστίθεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη, που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων και η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης καθίσταται πλέον αμελητέο καθώς το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο σε μία ευρεία κλίμακα pH. Έτσι, τα σύμπλοκα SDS- αποδιαταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται με κατεύθυνση από την κάθοδο προς την άνοδο. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής διαδρομής (που κρίνεται από το μέτωπο του διαλύτη) οι πρωτεΐνες στο πήκτωμα εμφανίζονται με χρώση κυανού του Coomassie. Η επίπεδη ηλεκτροφόρηση έχει το πλεονέκτημα ότι όλα τα δείγματα διαχωρίζονται στο ίδιο πήκτωμα, συνεπώς στις ίδιες συνθήκες συγκέντρωσης ακρυλαμίδης, θερμοκρασίας κλπ κι έτσι είναι περισσότερο αξιόπιστη η ποιοτική και ποσοτική σύγκριση των ζωνών μεταξύ τους.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής (discontinuous) επιτελείται δηλαδή σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το πήκτωμα πακεταρίσματος.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με SDS είναι γρήγορη, ευαίσθητη και έχει μεγάλη διαχωριστική (αναλυτική) ικανότητα. Οι απαιτούμενες ποσότητες των πρωτεϊνών είναι μικρές (περίπου 0,1 μg για χρώση με Coomassie). Πρωτεΐνες που διαφέρουν στη μάζα τους ~ 2 % μπορούν εύκολα να διαχωριστούν σε κατάλληλο ηλεκτροφορητικό σύστημα.

Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών σε σύστημα SDS-PAGE χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του Μοριακού Βάρους και της σχετικής ποσότητας (ημι-ποσοτική μέθοδος) πρωτεϊνικών μορίων σε ένα δείγμα, αλλά και για τον καθορισμό της κατανομής πρωτεϊνών σε διάφορα βιοχημικά εκχυλίσματα ιστών και κυττάρων.

<u>Υλικά:</u>	
Διαλύματα - χημικά	<ul style="list-style-type: none"> • 2-άμινο-2-(υδροξυμεθυλ)-1,3-προπανιδιόλη (Tris Base) (M.W. 121.14 g/mol) (Merck) • Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο (SDS) 10% (Sigma-Aldrich) • Γλυκίνη (Serva), • Αιθανόλη 100% (Honeywell-Riedel-de Haen) • TEMED [N,N,N,N, -Tetramethyl-ethylenediamine] (Sigma-Aldrich) • Υπερθειϊκό αμμώνιο [(NH₄)₂S₂O₈] (AP) (Sigma) • β-μερκαπτεθανόλη (Sigma) • μπλε της βρωμοφαινόλης (Sigma) • κυανό του Coomassie (Coomassie Blue) (Sigma) • Οξικό οξύ (VWR International, UK) • Μάρτυρες Μοριακών Βαρών (Pharmacia, Sweden)
Αναλώσιμα	<ul style="list-style-type: none"> • Πλαστικά σωληνάρια 50ml και 15ml (Greiner bio one, Switzerland) • Αναλώσιμες πιπετες 5ml
Συσκευές	<ul style="list-style-type: none"> • Συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad) • Θερμοσυσσκευή (Bioblock Scientific) • Επιτραπέζιος αναδευτήρας • Αναδευτήρας δειγμάτων (μηχανή vortex)

Διαλύματα:

Διάλυμα Tris-HCl 1.5M pH 8.8, 1L
<ul style="list-style-type: none"> • 2-άμινο-2-(υδροξυμεθυλ)-1,3-προπανιδιόλη (Tris Base) (M.W. 121.14 g/mol): 181.15g • Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο (SDS) 10%: 40mL <p>Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με διάλυμα HCl 37% και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το 1L με dH₂O.</p>

Διάλυμα Tris-HCl 1.5M pH 6.8, 1L
<ul style="list-style-type: none"> • 2-άμινο-2-(υδροξυμεθυλ)-1,3-προπανιδιόλη (Tris Base) (M.W. 121.14 g/mol): 60.6g • Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο (SDS) 10%: 40mL <p>Το pH ρυθμίζεται στο 6.8 με διάλυμα HCl 37% και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το 1L με dH₂O.</p>

Διάλυμα Υπερθειϊκού αμμωνίου [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈] (AP), 1mL
<ul style="list-style-type: none"> • Υπερθειϊκό αμμώνιο (M.W. 228.18 g/mol): 0.0001 gr <p>Προσθήκη 1mL dH₂O και φύλαξη στους 4°C.</p>

Διάλυμα Ακρυλαμίδη/ δισ- ακρυλαμίδη (Acr/Bis), 1L

- Ακρυλαμίδη (M.W. 71.08 g/mol): 300 gr
- δισ-ακρυλαμίδη (M.W. 154.17 g/mol): 8 gr

700 mL dH₂O προστίθενται στο διάλυμα και αυτό αναδεύεται υπό θέρμανση. Προστίθεται dH₂O έως τελικού όγκου 1L. το pH ελέγχεται (<7). Φύλαξη στους 4°C σε σκοτεινή φιάλη.

Πηκτή διαχωρισμού 10%, 5 mL

- dH₂O: 1.7 mL
- 2-άμινο-2-(υδροξυμεθυλ)-1,3-προπανιδιόλη (Tris Base) pH 8.8 1.5M: 1.25 mL
- Διάλυμα Ακρυλαμίδη/ δισ- ακρυλαμίδη (Acr/Bis): 2 mL
- Υπερθειικό αμμώνιο: 50μl
- TEMED: 5 μl

Πηκτή πακεταρίσματος 3%, 5 mL

- dH₂O: 1.7 mL
- 2-άμινο-2-(υδροξυμεθυλ)-1,3-προπανιδιόλη (Tris Base) pH 8.8 1.5M: 1.25 mL
- Διάλυμα Ακρυλαμίδη/ δισ- ακρυλαμίδη (Acr/Bis): 2 mL
- Υπερθειικό αμμώνιο: 50μl
- TEMED: 5 μl

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης – SDS-PAGE, 1L

- 2-άμινο-2-(υδροξυμεθυλ)-1,3-προπανιδιόλη (Tris Base) (M.W. 121.14 g/mol): 12 gr
- Γλυκίνη (M.W. 75.07 g/mol): 56 gr
- Δωδεκακυλοθειικό νάτριο (SDS) (288.372 g/mol): 4 gr

Προστίθεται dH₂O έως τελικού όγκου 1L και το pH ρυθμίζεται στο 8.3 με διάλυμα HCl 37%.

Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων ηλεκτροφόρησης - SDS-PAGE, 10 mL

- Tris-HCl 0.5M pH 6.8: 1.25 mL
- Δωδεκακυλοθειικό νάτριο (SDS) (288.372 g/mol): 1 gr
- Γλυκερόλη: 3 mL
- β-μερκαπτεθανόλη: 2.5 mL
- Μπλε της βρωμοφαινόλης: 0.001 gr

Προστίθεται dH₂O έως τελικού όγκου 10mL.

Διάλυμα χρώσης της πηκτής - SDS-PAGE, 495 mL

- Αιθανόλη 100%: 225 mL
- κυανού του Coomassie (Coomassie Blue) (M.W. 825.97 g/mol): 1.25 gr
- Οξικό οξύ: 40 mL
- dH₂O: 230 mL

Διάλυμα απόχρωσης της πηκτής - SDS-PAGE, 140 mL

- Αιθανόλη 100%: 100 mL
- Οξικό οξύ: 50 mL
- dH₂O: 350 mL

Διαδικασία:

- Στήσιμο συστήματος γυάλινων πλακών έτσι ώστε να μην υπάρχει διαρροή.
- Κατασκευή πηκτώματος διαχωρισμού 10%. (vortex)
- Το μίγμα τοποθετείται στο σύστημα των γυάλινων πλακών και στην επιφάνειά του προστίθεται απεσταγμένο νερό για να ευθυγραμμιστεί η στάθμη.
- Το πήκτωμα αφήνεται 1 ώρα για να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του.
- Κατασκευή πηκτώματος πακεταρίσματος 3%. (vortex)
- Απομάκρυνση του νερού και προσθήκη του διαλύματος του πηκτώματος πακεταρίσματος στο σύστημα των γυάλινων πλακών. Έπειτα τοποθετείται το ειδικό «χτενάκι» για τη δημιουργία των θέσεων φόρτωσης των δειγμάτων.
- Το πήκτωμα αφήνεται 1 ώρα για να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του.
- Γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις των δειγμάτων.
- Σε 20μl δείγματος προστίθονται 4μl ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος. Στις αναγωγικές συνθήκες το ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος περιέχει μερκαπτοαιθανόλη που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ κυστεϊνών. Τα δείγματα των αναγωγικών συνθηκών θερμαίνονται στους 100°C για 10 λεπτά.
- Αφαιρείται το ειδικό «χτενάκι» και το σύστημα των γυάλινων πλακών που περιέχει το πήκτωμα τοποθετείται κατακόρυφα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Προστίθεται διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
- Οι μάρτυρες μοριακών βαρών (Markers) και τα δείγματα τοποθετούνται στις θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων.
- Διαβιβάζεται στη συσκευή ρεύμα τάσης 120V.
- Όταν το μέτωπο της χρωστικής φτάσει σχεδόν στο κάτω άκρο του πηκτώματος, διακόπτεται η παροχή ρεύματος και το πήκτωμα αφαιρείται από της γυάλινες πλάκες και τοποθετείται στο διάλυμα χρώσης που περιέχει κυανό του coomasie, υπό ανάδευση για μια νύχτα.
- Το διάλυμα χρώσης απομακρύνεται και προστίθεται διάλυμα αποχρωματισμού.

Μετά τον αποχρωματισμό το πήκτωμα πλένεται και διατηρείται σε νερό μέχρι να φωτογραφηθεί.

4. Ισοηλεκτρική εστίαση (IEF) σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ισοηλεκτρική εστίαση αποτελεί μια ηλεκτροφοριστική μέθοδο διαχωρισμού πρωτεϊνών σύμφωνα με το ηλεκτρικό τους φορτίο, σε πηκτή αγαρόζης με μεταβλητή σύσταση pH, διαβαθμιζόμενη ως προς την κατεύθυνση μετακίνησης. Σε ουδέτερο pH, στις πρωτεΐνες, αμινοξικά κατάλοιπα αργινίνης, ιστιδίνης και λυσίνης είναι γενικά θετικά φορτισμένα, ενώ κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος και γλουταμινικού οξέος είναι γενικά αρνητικά φορτισμένα. Η ισορροπία μεταξύ αρνητικών και θετικών φορτίων σε ένα πρωτεϊνικό μόριο εξαρτάται από το pH του περιβάλλοντος. Έτσι, σε ένα δεδομένο pH, το μόριο κάθε πρωτεΐνης έχει ορισμένο συνολικό φορτίο, που εξαρτάται από τη συμπεριφορά των καταλοίπων της στη συγκεκριμένη τιμή pH. Η τιμή pH στην οποία το συνολικό θετικό φορτίο μιας πρωτεΐνης είναι ίσο με το συνολικό αρνητικό φορτίο της ισούται με το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) της πρωτεΐνης. Κατά τη διάρκεια της ισοηλεκτρικής εστίασης, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με τη μετακίνηση των πρωτεϊνών, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, σε πηκτή με διαβαθμιζόμενη τιμή pH. Η βαθμίδωση του PH επιτυγχάνεται με την χρήση αμφολύτων, επαμφοτερίζουσες ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την ανάμειξη με πρωτεϊνικά μόρια με παραπλήσια ισοηλεκτρικά σημεία, κατά τη παρασκευή του πηκτώματος.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η πρωτεΐνη μετακινείται μέχρι να φτάσει σε μια θέση στην πηκτή, όπου η τιμή pH, γίνεται ίση με το σημείο pI της πρωτεΐνης. Εκεί το μόριο λόγω μηδενικού φορτίου παύει να κινείται επί του ηλεκτρικού πεδίου. Με δεδομένο ότι η ισοηλεκτρική εστίαση βασίζεται ουσιαστικά στις διαφορές του φυσικού φορτίου των πρωτεϊνικών μορίων, η αξιοπιστία, αλλά και η επαναληψιμότητα της μεθόδου προϋποθέτουν τον προσεκτικό χειρισμό των δειγμάτων, ώστε να αποτραπεί η οποιαδήποτε τροποποίηση της χημικής σύνθεσης ή της δομής των μορίων κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας. Επιπλέον, αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών με λιπίδια ή με άλλες πρωτεΐνες μπορεί να προκαλέσουν τροποποιήσεις φορτίων που θα οδηγήσουν σε τροποποιημένες ισοηλεκτρικές κινητικότητες.

<u>Υλικά:</u>	
Διαλύματα - χημικά	<ul style="list-style-type: none"> • Αγαρόζη (IEF/ Pharmacia) • H₂SO₄ • NaOH • Αμφολύτες 3-10 (Pharmacia) • Κυανό του Coomasie (Coomasie Blue) (Sigma) • Οξικό οξύ (VWR International, UK) • Αιθανόλη 100% (Honeywell-Riedel-de Haen)
Αναλώσιμα	<ul style="list-style-type: none"> • Πλαστικά σωληνάρια 50ml και 15ml (Greiner bio one, Switzerland) • Αναλώσιμες πιπέτες 5ml • Ταινία πολυεστέρα (GelBond Film®)
Συσκευές	<ul style="list-style-type: none"> • Συσκευή ισοηλεκτρικής εστίασης • Υδατόλουτρο (Julabo, Germany) • Μαγνητικός θερμαινόμενος αναδευτήρας • Επιτραπέζιος αναδευτήρας

Διαδικασία:

- Ρύθμιση του υδατόλουτρου στους 65⁰C.
- Θέρμανση της ταινίας πολυεστέρα με σεσουάρ.
- Δημιουργία πηκτής αγαρόζης βαθμίδωσης pH:
 - a. 111mg αγαρόζης (IEF/ Pharmacia) σε 10,340ml dH₂O.
 - b. Θέρμανση στους 100⁰C υπό ανάδευση σε μαγνητικό θερμαινόμενο αναδευτήρα.
 - c. Όταν το μίγμα ομογενοποιηθεί μπαίνει στους 65⁰C στο υδατόλουτρο για 5 λεπτά.
 - d. Με το πέρας των 5 λεπτών προστίθενται 600ml από τους αμφολύτες χωρίς ανάδευση για 1-2 λεπτά και στη συνέχεια το μίγμα αναδεύεται εντός του υδατόλουτρου.
- Σε ειδική επίπεδη πλάκα η οποία έχει προθερμανθεί με σεσουάρ τοποθετείται η ταινία πολυεστέρα (13x9,5 cm) με την υδρόφιλη μεριά προς τα πάνω και την υδρόφοβη σε επαφή με τη πλάκα.
- Σε σύντομο χρόνο τοποθετείται το μίγμα της αγαρόζης πάνω στην υδρόφιλη μεριά της ταινίας πολυεστέρα ώστε αυτή να καλυφθεί ομοιόμορφα.
- Το πήκτωμα μαζί με την ταινία πολυεστέρα τοποθετείται στο ψυγείο μέσα σε δοχείο με υγρασία για ~12 ώρες.

- Ετοιμασία των διαλυμάτων των ηλεκτροδίων:
 - a. (+) H_2SO_4 0,05M [245μl H_2SO_4 σε 100ml dH_2O]
 - b. (-) NaOH 1N [10N: 4gr NaOH σε 100ml dH_2O]
- Τοποθετείται το πήκτωμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Σε ειδικά απορροφητικά χαρτιά φορτώνονται 20μl του κάθε δείγματος και αυτά τοποθετούνται προσεκτικά στη μέση του πηκτώματος. Μαζί με τα δείγματα φορτώνονται δίπλα και αναραίωτη αιμοσφαιρίνη (pH 7,0) και οι ειδικοί δείκτες (markers: STANDARDS pl 3-10 Pharmacia).

Σημείωση: μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων πάνω στη πηκτή, τα δείγματα δεν πρέπει να ξανά μετακινηθούν.

- Τα ηλεκτρόδια διαποτίζονται με τα διαλύματά τους και τοποθετούνται παράλληλα εφαπτόμενα στις δύο πλευρές του πηκτώματος.
- Η ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης κλείνει αεροστεγώς ώστε να μην επέλθει ξήρανση της πηκτής.
- Η συσκευή τροφοδοτείται με νερό.
- Η τάση του ρεύματος ρυθμίζεται ως εξής:
 - a. 150V για 1 ώρα.

Σημείωση: στο βήμα αυτό αντικαθίστανται τα παλιά ηλεκτρόδια με καινούρια και τα απορροφητικά χαρτιά στα οποία είχαν φορτωθεί τα δείγματα αφαιρούνται.

- b. 200 V για 30'
- c. 300V για 30'
- d. 400 V για 30'
- e. 500V για 30'

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί η χρώση και ο αποχρωματισμός της πηκτής:

- Η πηκτή ξεπλένεται 2 φορές με dH_2O .
- Ο χρωματισμός της πηκτής γίνεται σε διάλυμα Coomassie Blue για 1 ώρα σε ήπια ανάδευση.
- Ακολουθούν 2 πλύσεις με dH_2O .
- Αφήνουμε για ~12 ώρες τη πηκτή μέσα στο διάλυμα αποχρωματισμού υπο ήπια ανάδευση.
- Την επόμενη μέρα η πηκτή ξεπλένεται με dH_2O και ξηρένεται με τη χρήση σεσουάρ έως ότου περάσει εξολοκλήρου στη ταινία πολυεστέρα.

5. Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA)

Η ELISA είναι μέθοδος υψηλής ευαισθησίας, η οποία επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, χημικών ουσιών κ.α. σε βιολογικά υγρά με τη χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων και χρωμογόνου υποστρώματος. Η κλασική δοκιμασία ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) στηρίζεται στη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος και στην οπτική απορρόφηση του χρωμογόνου υποστρώματος. Τα αντισώματα που βρίσκονται στο δείγμα αντιδρούν με αντιγόνα που είναι ακινητοποιημένα σε φρεάτια πλακών μικροτιτλοδότησης. Μετά την απομάκρυνση των ελεύθερων αντισωμάτων με πλύσεις, η παρουσία και η ποσότητα του προσδεδεμένου αντισώματος ανιχνεύεται με την προσθήκη αντι-ισοτυπικού αντισώματος, το οποίο είναι συζευγμένο με κάποιο ένζυμο. Η περίσσεια του δευτερογενούς αντισώματος απομακρύνεται με πλύσεις και προστίθεται το άχρωμο υπόστρωμα του ενζύμου, το οποίο με τη βοήθεια του ενζύμου μετατρέπεται σε έγχρωμο προϊόν. Στα ένζυμα που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνονται η αλκαλική φωσφατάση, η υπεροξειδάση και η β-γαλακτοσιδάση. Η ποσότητα του έγχρωμου προϊόντος μετριέται σε ειδικό φασματοφωτομετρικό μετρητή πλακών.

Διαδικασία:

Ο έλεγχος της ειδικότητας των υποπληθυσμών αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων της μελέτης πραγματοποιήθηκε με απλή μη ανταγωνιστική ELISA. Οι πλάκες επιστρώθηκαν με DNA (10 µg/ml), θυρεοσφαιρίνη (10 µg/ml), F ακτίνη (5 µg/ml), τουμπουλίνη (5 µg/ml), καρβονική ανυδράση (5 µg/ml), ηπαρίνη (2 µg/ml), και TNP-BSA (10 µg/ml).

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

- Τα φρεάτια αδειάζονται και ξεπλένονται 4 φορές με PBS 1x
- Προστίθενται σε όλα τα φρεάτια 200µl PBS 1% BSA και ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 37°C σε ξηρό κλίβανο
- Τα φρεάτια αδειάζονται και ξεπλένονται 4 φορές με PBS-Tween
- Προστίθενται 100µl δείγματος και γίνεται επώαση για 2h στους 37°C σε ξηρό κλίβανο
- Τα φρεάτια αδειάζονται και ξεπλένονται 4 φορές με PBS-Tween
- Προστίθενται 100µl του συζευγμένου αντισώματος. χρησιμοποιείται αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση σε αραιώση 1:2500 σε διάλυμα PBS-Tween 1% BSA. Επώαση για 1,5 ώρες στους 37°C σε ξηρό κλίβανο
- Τα φρεάτια αδειάζονται και ξεπλένονται 3 φορές με PBS-Tween και 1 με PBS

Για το αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση (HRP) προστίθενται 100µl TMB και γίνεται φωτομέτρηση στα 620nm. Αφού αναπτυχθεί η αντίδραση, διακόπτεται με προσθήκη 50µl H₂SO₄ 2M και γίνεται φωτομέτρηση στα 450nm.

6. Τεχνικές ανοσοφθορισμού

Φθορισμός είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ορισμένα σώματα εκπέμπουν φως όταν διεγείρονται από κάποια ακτινοβολία. Η εκπομπή φωτός σταματάει αμέσως μετά την παύση της διεγείρουσας ακτινοβολίας και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που παράγεται (φθορισμός) είναι μεγαλύτερο από εκείνο της διεγείρουσας ακτινοβολίας (νόμος του Stokes). Το φαινόμενο αυτό αξιοποιείται στη μικροσκοπία φθορισμού για την παρατήρηση ουσιών ή κυτταρικών δομών που είτε φθορίζουν από τη φύση τους είτε γίνονται φθορίζουσες με τη χρήση χημικών ουσιών, όπου ο εξειδικευμένος αυτός φθορισμός μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση φθοριοχρωμάτων. Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται όπως ακριβώς και οι συνηθισμένες ιστολογικές χρωστικές. Ο φθορισμός που παρατηρείται στα παρασκευάσματα που έχουν χρωσθεί με **φθοριοχρώματα** αναφέρεται ως "**δευτερογενής φθορισμός**".

Όταν το φθοριόχρωμα έχει συνδεθεί με κάποιο αντίσωμα που στη συνέχεια συνδέεται με το αντιγόνο και έτσι κάνει το τελευταίο ορατό, τότε η τεχνική αναφέρεται ως **ανοσοφθορισμός**. Τα φθοριοχρώματα αυτά είναι συνδεδεμένα με την Fc περιοχή αντισωμάτων χωρίς να επηρεάζουν την ειδικότητά τους. Μερικά από τα πιο γνωστά φθοριοχρώματα είναι η φλουορεσκεΐνη, η ροδαμίνη και η φυκοερυθρίνη, αλλά και τα πιο ανθεκτικά παράγωγά τους, όπως το ALEXA® fluor. Η τεχνική αυτή επινοήθηκε το 1950 από τους Coons και Kaplan και τα τελευταία χρόνια εφαρμόζεται για ερευνητικούς σκοπούς στις βιοϊατρικές επιστήμες αλλά και για διαγνωστικούς σκοπούς, λόγω της δημιουργίας μεγάλης καθαρότητας μονοκλωνικών αντισωμάτων.

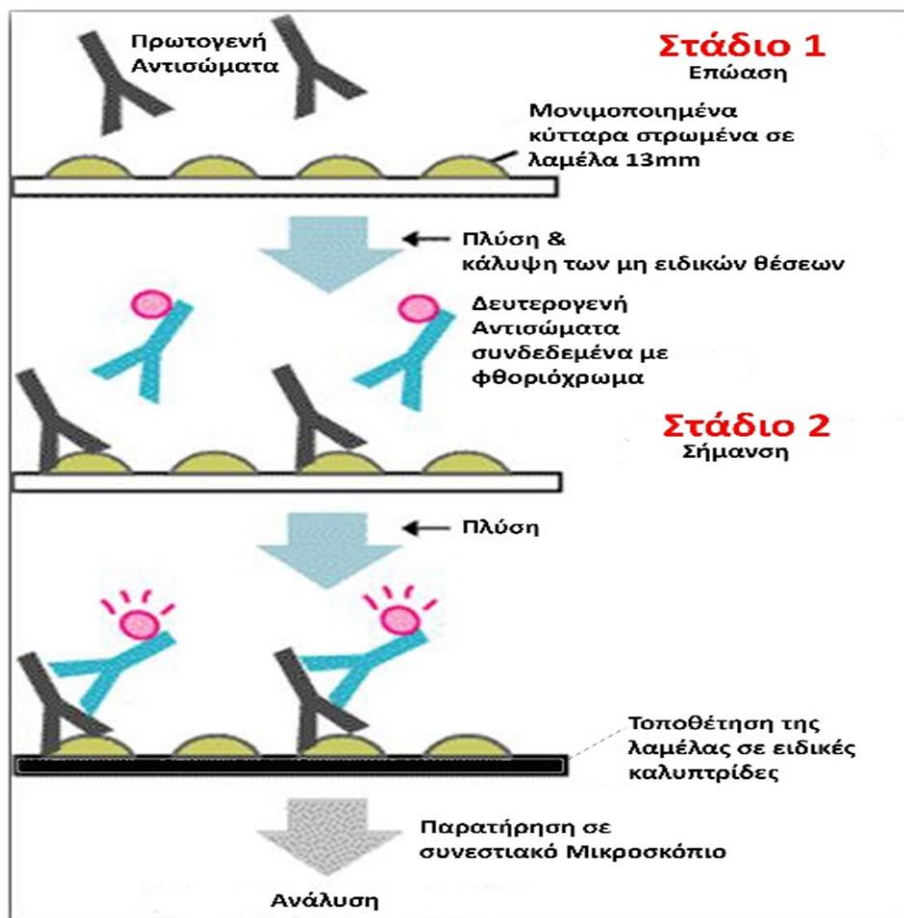
Το 1957 ο Marvin Lee Minsky εισήγαγε την αρχική ιδέα της συνεστιακής μικροσκοπίας με σκοπό να ξεπεραστούν οι μέχρι τότε περιορισμοί. Το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser (CONFOCAL) έρχεται να λύσει ένα από τα βασικότερα προβλήματα της συμβατικής μικροσκοπίας φθορισμού, τον «οπτικό θόρυβο». Αντίθετα με τον κλασικό τρόπο φωτισμού και παρατήρησης που γίνεται στο κοινό μικροσκόπιο, η συνεστιακή μικροσκοπία στηρίζεται στο γεγονός ότι και ο φωτισμός και η παρατήρηση

περιορίζονται σε ένα σημείο του παρασκευάσματος. Αυτό επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση ενός πολύ μικρού διαφράγματος (ίριδα, <math><10\mu\text{m}</math>) στους οπτικούς άξονες του αντικειμενικού και του συγκεντρωτικού φακού. Προσθέτοντας την ίριδα το πρόβλημα του «οπτικού θορύβου» επιλύεται. Επειδή το εστιακό σημείο του αντικειμενικού φακού του μικροσκοπίου δημιουργεί την εικόνα εκεί όπου είναι η ίριδα τα δύο αυτά σημεία ονομάζονται συζευγμένα. Το εστιακό επίπεδο επιλέγεται μέσω ενός κινητήρα υψηλής ακρίβειας, ελεγχόμενο από υπολογιστή, μετακινώντας την αντικειμενοφόρο πλάκα. Κατά αυτόν τον τρόπο, μπορούμε να πάρουμε μια ακολουθία από δισδιάστατες εικόνες σε διαφορετικό βάθος στο δείγμα, οι οποίες μας δίνουν μια τρισδιάστατη απεικόνιση του αντικειμένου.

Στα σύγχρονα μικροσκόπια σάρωσης με laser η ευθυγράμμιση των οπτικών, η επιλογή του μήκους κύματος και της ισχύος του laser, η τοποθέτηση των φίλτρων, οι κινήσεις της αντικειμενοφόρου πλάκας και των γαλβανομετρικών κατόπτρων ελέγχονται όλα από υπολογιστή.

6.1. Ανοσοκυτταροχημική Τεχνική - Έμμεσος Ανοσοφθορισμός *in vitro*

Η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού είναι μια τεχνική δύο σταδίων όπου στο πρώτο στάδιο γίνεται επώαση των υπό εξέταση αντισωμάτων (πρωτογενή αντισώματα) σε μονιμοποιημένα κύτταρα. Η πλασματική και η πυρηνική μεμβράνη των μονιμοποιημένων κυττάρων είναι διάτρητες με αποτέλεσμα να δίνεται η δυνατότητα στα υπό εξέταση αντισώματα να αναγνωρίσουν αντιγόνα στόχους (αυτοαντιγόνα) εντός των κυττάρων. **(Εικόνα 19)**



Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της τεχνικής του έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Στο δεύτερο στάδιο ακολουθεί η σήμανση των πρωτογενών αντισωμάτων με δευτερογενή αντισώματα τα οποία είναι συνδεδεμένα στη σταθερή τους περιοχή με φθοριοχρώματα ενώ τα ίδια αναγνωρίζουν το σταθερό τμήμα των πρωτογενών αντισωμάτων. Με την χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου γίνεται η ανίχνευση της θέσης των πρωτογενών αντισωμάτων εντός των μονιμοποιημένων κυττάρων.

<u>Υλικά:</u>	
Διαλύματα - χημικά	<ul style="list-style-type: none"> • Πλήρες θρεπτικό υλικό • Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών (PBS) 1x • Αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA) • Διάλυμα Trypan Blue 0.4% (Honeywell-Fluka, USA) • Αιθανόλη 100% (Honeywell-Riedel-de Haen) • Ζελατίνη (Merck) • Mowiol 4-88 (Calbiochem) • Alexa Fluor 488 anti-human IgG (H+L) • Topro 3
Αναλώσιμα	<ul style="list-style-type: none"> • Πλαστικά σωληνάρια 50 και 15 ml (Greiner bio one, Switzerland) • Αναλώσιμες 5ml • Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 24 και 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα (Corning, USA) • Τρυβλία Petri (BIBE, Ελλάδα) • Καλυπτρίδες στρογγυλές Ø 13 mm (Πνοή) • Αντικειμενοφόροι πλάκες (VWR International, UK) • Βελόνες 0,90 x 25 mm, 20G x 1' (PiC indolor, Italy)
Συσκευές	<ul style="list-style-type: none"> • Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (Sigma) • Επιτραπέζιος αναδευτήρας • Συνεστιακό μικροσκόπιο (TCS-SP Leica, Germany).

Διαλύματα:

Αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA)/PBS ρυθμιστικό διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων

- 0.1% w/v Αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA) σε Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών (PBS) 1x

Διάλυμα Mowiol, 16 mL

- Γλυκερόλη (M.W. 92.09 g/mol): 6 gr
- Mowiol 4-88 (M.W. 31 g/mol): 2.4 gr
- dH₂O: 6 mL
- Tris-HCl 0.2 M pH 8.5: 10 mL

Ανάδευση υπό θέρμανση για 4'-5'. Το διάλυμα φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο συλλέγεται. Φύλαξη στους -20 °C

Διαδικασία:

Μέρα 1^η : στρώσιμο των κυττάρων (seeding)

Το πείραμα πραγματοποιείται σε λαμέλες διαμέτρου 13mm.

- Σε πλάκα καλλιέργειας 24 φρεατίων τοποθετούμε με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας τις λαμέλες στα φρεάτια.

Σημείωση: σε κάθε φρεάτιο τοποθετείται μία λαμέλα.

- Σε κάθε φρεάτιο με λαμέλα προστίθεται 150μl ζελατίνης πάνω στη λαμέλα.
- Επώαση της πλάκας στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 30 λεπτά.
- Παράλληλα ακολουθείται η διαδικασία μετρήματος των κυττάρων και γίνονται οι υπολογισμοί για το στρώσιμο των κυττάρων. Υπολογίζουμε 25000-30000 κύτταρα για κάθε λαμέλα 13mm.
- Σε νέο πλαστικό σωληνάριο 15ml προστίθεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που θα χρειαστεί για το στρώσιμο και συμπληρώνεται ο όγκος με πλήρες θρεπτικό υλικό.

Σημείωση: ο συνολικός όγκος θρεπτικού υλικού και κυττάρων υπολογίζεται από τον αριθμό των δειγμάτων. Σε κάθε λαμέλα εναποτίθεται σταγόνα 60μl, συνεπώς ο συνολικός όγκος ισούται με τον αριθμό των δειγμάτων x 60μl.

- Μετά τα 30 λεπτά αφαιρείται η ζελατίνη και εναποτίθεται σταγόνα 60μl από το υλικό των κυττάρων στο κέντρο της κάθε λαμέλας.
- Η πλάκα εισέρχεται για 2 ώρες στον κλίβανο ώστε τα κύτταρα να προσκολληθούν στην επιφάνεια της λαμέλας.
- Μετά τις 2 ώρες προστίθενται 690μl πλήρες θρεπτικού υλικού σε κάθε φρεάτιο με λαμέλα (συνολικός όγκος κάθε φρεατίου με λαμέλα = 750μl).
- Τα κύτταρα παραμένουν στον κλίβανο για 2 μέρες ώστε να αναπτυχθούν και να αποκτήσουν την φυσιολογική χαρακτηριστική τους μορφολογία.

Μέρα 2^η : – Ελέγχουμε την μορφολογία και την πυκνότητα των κυττάρων.

Μέρα 3^η : πειραματική διαδικασία

- Στο οπτικό μικροσκόπιο ελέγχεται η πυκνότητα και ο αριθμός των κυττάρων κάθε λαμέλας της πλάκας και επιλέγονται οι κατάλληλες λαμέλες που θα χρησιμοποιηθούν για τη πειραματική διαδικασία.
- Σε τριβλίο petri 100cm² καλύπτουμε την επιφάνεια του πάτου με διηθητικό χαρτί το οποίο και ενυδατώνουμε με dH₂O (για να διατηρείται η υγρασία εντός του τριβλίου). Πάνω από το διηθητικό χαρτί τοποθετείται κομμάτι ταινίας πάραφιλμ και σε αυτή αναγράφονται ο αριθμός των δειγμάτων και οι προκείμενες πειραματικές συνθήκες
- Ακολουθεί μονιμοποίηση των κυττάρων σε 100% αιθανόλη. Στο τριβλίο petri που έχουν τοποθετηθεί το διηθητικό χαρτί και η ταινία πάραφιλμ εναποθέτουμε σταγόνα 60μl 100% αιθανόλης για κάθε δείγμα. Στη συνέχεια η κάθε λαμέλα μεταφέρεται στην αντίστοιχη σταγόνα αιθανόλης με την επιφάνεια των κυττάρων να έρχεται σε επαφή με αυτή και τα δείγματα τοποθετούνται στους -20°C για 15 λεπτά.

- Ακολουθούν 3x10 πλύσεις με πλήρες θρεπτικό υλικό (3x50ml πλαστικά σωληνάρια και εμβάπτιση της κάθε λαμέλας 10 φορές σε κάθε σωληνάριο).
- Αποψύχονται τα αντισώματα και φυγοκεντρώνονται για 7 λεπτά σε 11000rpm και στους 4°C.
- Γίνονται οι αραιώσεις των αντισωμάτων σε πλήρες θρεπτικό υλικό ώστε να έχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση αυτών.
- Τοποθετούνται 60μl αντισώματος κάθε δείγματος στην ανάλογη θέση πάνω στη ταινία πάραφιλμ που έχει τοποθετηθεί στο τριβλίο.
- Γίνεται επώαση των δειγμάτων στους 37°C για 2 ώρες.
- Με το πέρας της επώασης πραγματοποιούνται 3x10 πλύσεις τις κάθε λαμέλας με PBS 1x.

Σημείωση: οι πλύσεις γίνονται με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας εμβαπτίζοντας κάθε λαμέλα μέσα σε θρεπτικό υλικό που έχει τοποθετηθεί σε πλαστικά σωληνάρια 50ml (3x50ml).

- Ακολουθεί η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων (blocking). Σε νέο τριβλίο petri έχοντας τοποθετήσει με τον ίδιο τρόπο το διηθητικό χαρτί και την ταινία πάραφιλμ εναποθέτουμε σταγόνα 60μl PBS1x-BSA 1% για κάθε δείγμα. Στη συνέχεια η κάθε λαμέλα μεταφέρεται στην αντίστοιχη σταγόνα PBS1x-BSA 1% με την επιφάνεια των κυττάρων να έρχεται σε επαφή με αυτή και τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 1 ώρα.
- Χωρίς να μεσολαβήσουν πλύσεις ακολουθεί η επώαση των δειγμάτων με τα δευτερογενή αντισώματα. Σε νέο τριβλίο petri έχοντας τοποθετήσει με τον ίδιο τρόπο το διηθητικό χαρτί και την ταινία πάραφιλμ εναποθέτουμε σταγόνα 60μl από το δεύτερο αντίσωμα για κάθε δείγμα. Στη συνέχεια η κάθε λαμέλα μεταφέρεται στην αντίστοιχη σταγόνα κάθε δείγματος με την επιφάνεια των κυττάρων να έρχεται σε επαφή με αυτή και τα δείγματα παραμένουν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 2 ώρες.

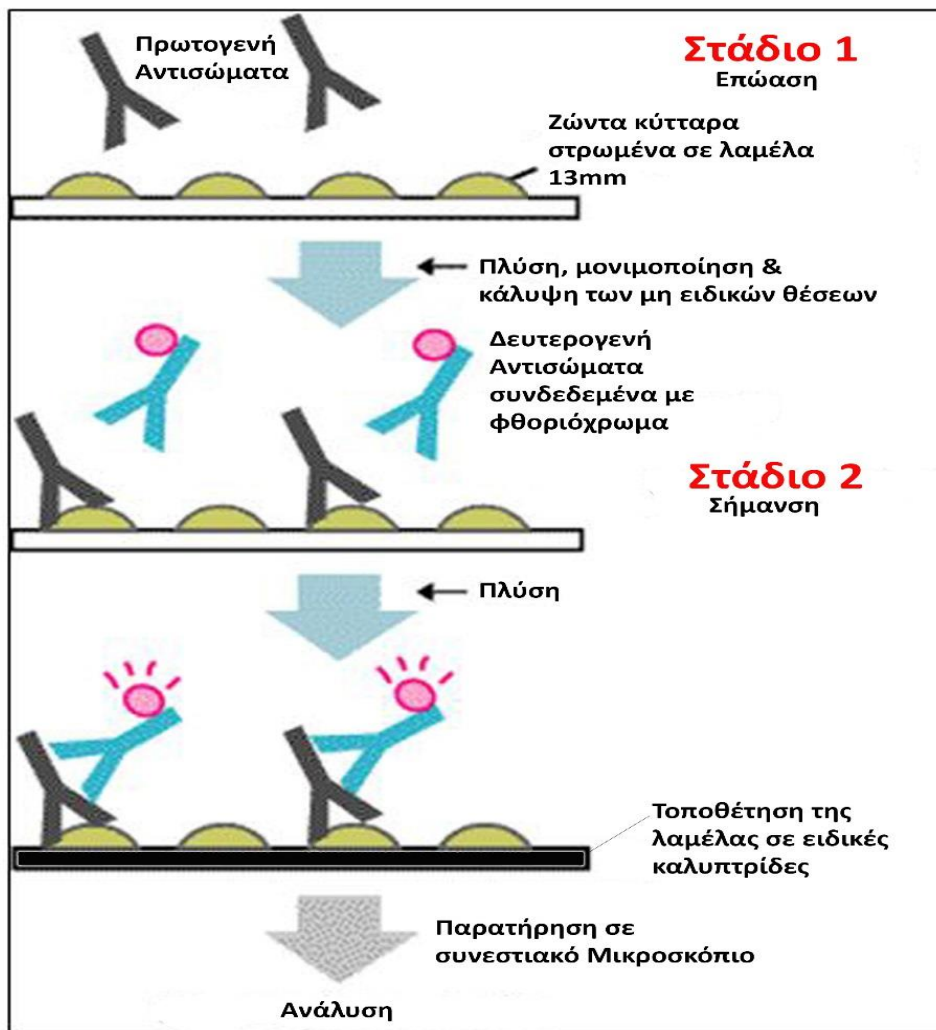
Σημείωση: τα δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι το ALEXA Fluor για την ανίχνευση των πρωτογενών αντισωμάτων και η χρωστική torro 3 για τη χρώση των πυρήνων (φωτοευαίσθητα). Το ALEXA Fluor έχει τελική συγκέντρωση 1:2000 σε κάθε δείγμα ενώ το torro 3, 1:1000. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του ALEXA Fluor για 7 λεπτά σε 11000rpm και στους 4°C και η τελική συγκέντρωση γίνεται με αραιώση αυτών σε διάλυμα PBS1x-BSA 1%. Ο τελικός όγκος υπολογίζεται με βάση των αριθμό των δειγμάτων (60μl σε κάθε σταγόνα).

- Ακολουθούν 2x10 πλύσεις σε PBS 1x-BSA 1%, 2x10 πλύσεις σε PBS 1x και 1x10 πλύσεις σε dH₂O.
- Σε αντικειμενοφόρους πλάκες στις οποίες έχουν σημειωθεί τα στοιχεία του κάθε δείγματος προστίθεται μια σταγόνα Mowiol για κάθε δείγμα και η κάθε λαμέλα μεταφέρεται σε αυτή με την επιφάνεια των κυττάρων να έρχεται σε επαφή μαζί της. Τα δείγματα παραμένουν για περίπου δώδεκα ώρες στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσουν.

Μέρα 4^η : παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

6.2. Δοκιμασία διείσδυσης των mAbs σε ζώντα κύτταρα

Αποτελεί μια τροποποιημένη εκδοχή του έμμεσου ανοσοφθορισμού που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας. Η βασική διαφορά είναι πως ζωντανά κι όχι μονιμοποιημένα κύτταρα επάζονται με το πρώτο αντίσωμα, το οποίο είναι το δείγμα. Η μονιμοποίηση πραγματοποιείται μετά την επώαση των κυττάρων με το δείγμα. Με την εφαρμογή αυτής της τεχνικής και τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου εξετάζεται η κυτταροδιεισδυτική ικανότητα των αντισωμάτων στο εσωτερικό των κυττάρων (**Εικόνα 20**).



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της τεχνικής έμμεσου ανοσοφθορισμού σε ζώντα κύτταρα.

Υλικά:	
Διαλύματα - χημικά	<ul style="list-style-type: none"> • Πλήρες θρεπτικό υλικό • Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών (PBS) 1x • Αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA) • Διάλυμα Trypan Blue 0.4% (<i>Honeywell-Fluka, USA</i>) • Αιθανόλη 100% (<i>Honeywell-Riedel-de Haen</i>) • Ζελατίνη (Merck) • Mowiol 4-88 (Calbiochem) • Alexa Fluor [488 anti-human IgG (H+L)/ 633 anti-human IgM] • Topro 3/ Dapi

Αναλώσιμα	<ul style="list-style-type: none"> • Πλαστικά σωληνάρια 50 και 15 ml (Greiner bio one, Switzerland) • Αναλώσιμες πιπέτες 5ml • Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 24 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα (Corning, USA) • Τρυβλία Petri (BIBE, Ελλάδα) • Καλυπτρίδες στρογγυλές Ø 13 mm (Πνοή) • Αντικειμενοφόροι πλάκες (VWR International, UK) • Βελόνες 0,90 x 25 mm, 20G x 1' (PiC indolor, Italy)
Συσκευές	<ul style="list-style-type: none"> • Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (Sigma) • Επιτραπέζιος αναδευτήρας • Συνεστιακό μικροσκόπιο (TCS-SP Leica, Germany).

Διαλύματα:

Αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA)/PBS ρυθμιστικό διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων
<ul style="list-style-type: none"> • 0.1% w/v Αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA) σε Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών (PBS) 1x

Διάλυμα Mowiol, 16 mL
<ul style="list-style-type: none"> • Γλυκερόλη (M.W. 92.09 g/mol): 6 gr • Mowiol 4-88 (M.W. 31 g/mol): 2.4 gr • dH₂O: 6 mL • Tris-HCl 0.2 M pH 8.5: 10 mL <p>Ανάδευση υπό θέρμανση για 4'-5'. Το διάλυμα φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο συλλέγεται. Φύλαξη στους -20 °C</p>

Διαδικασία:

Μέρα 1^η: στρώσιμο των κυττάρων (seeding)

Το πείραμα πραγματοποιείται σε λαμέλες διαμέτρου 13mm.

- Σε πλάκα 24 φρεατίων τοποθετούμε με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας τις λαμέλες στα φρεάτια.

Σημείωση: σε κάθε φρεάτιο τοποθετείται μία λαμέλα. Κάθε δείγμα εξετάζεται σε τριπλέτα ώστε τα αποτελέσματα να είναι αντιπροσωπευτικά και επαναλήψιμα.

- Σε κάθε κελίο με λαμέλα προσθέτω 150μl ζελατίνης πάνω στη λαμέλα. Επώαση της πλάκας στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 30 λεπτά.
- Παράλληλα ακολουθείται η διαδικασία μετρήματος των κυττάρων και γίνονται οι υπολογισμοί για το στρώσιμο των κυττάρων. Υπολογίζουμε 25000-30000 κύτταρα για κάθε λαμέλα 13mm.
- Σε νέο πλαστικό σωληνάριο 15ml προστίθεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που θα χρειαστεί για το στρώσιμο και συμπληρώνεται ο όγκος με πλήρες θρεπτικό υλικό.

Σημείωση: ο συνολικός όγκος θρεπτικού υλικού και κυττάρων υπολογίζεται από τον αριθμό των δειγμάτων. Σε κάθε λαμέλα εναποτίθεται σταγόνα 60μL, συνεπώς ο συνολικός όγκος ισούται με τον αριθμό των δειγμάτων x 60μl.

- Μετά τα 30 λεπτά αφαιρείται η ζελατίνη και εναποτίθεται σταγόνα 60μl κυτταρικού εναιωρήματος στο κέντρο της κάθε λαμέλας.
- Η πλάκα εισέρχεται για 2 ώρες στον κλίβανο ώστε τα κύτταρα να προσκολληθούν στην επιφάνεια της λαμέλας.
- Μετά τις 2 ώρες προστίθενται 690μl πλήρες θρεπτικού υλικού σε κάθε κελίο με λαμέλα (συνολικός όγκος κάθε κελίου με λαμέλα = 750μl).
- Τα κύτταρα παραμένουν στον κλίβανο για 2 μέρες ώστε να αναπτυχθούν και να αποκτήσουν την φυσιολογική χαρακτηριστική τους μορφολογία.

Μέρα 2^η : - Ελέγχουμε την μορφολογία και την πυκνότητα των κυττάρων.

Μέρα 3^η : πειραματική διαδικασία

- Αποψύχονται τα αντισώματα και φυγοκεντρούνται για 7 λεπτά σε 11000rpm και στους 4^oC.
- Γίνονται οι αραιώσεις των αντισωμάτων σε πλήρες θρεπτικό υλικό ώστε να έχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση αυτών.
- Σε τριβλίο petri 100cm² καλύπτουμε την επιφάνεια του πάτου με διηθητικό χαρτί το οποίο και ενυδατώνουμε με dH₂O (για να διατηρείται η υγρασία εντός του τριβλίου). Πάνω από το διηθητικό χαρτί τοποθετείται κομμάτι ταινίας πάραφιλμ και σε αυτή αναγράφονται ο αριθμός των δειγμάτων και οι προκείμενες πειραματικές συνθήκες.
Στο οπτικό μικροσκόπιο ελέγχεται η πυκνότητα και ο αριθμός των κυττάρων κάθε λαμέλας της 24αρας πλάκας και επιλέγονται οι κατάλληλες λαμέλες που θα χρησιμοποιηθούν για τη πειραματική διαδικασία
- Τοποθετούνται 60μl αντισώματος κάθε δείγματος στην ανάλογη θέση πάνω στη ταινία πάραφιλμ που έχει τοποθετηθεί στο τριβλίο.
- Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από κάθε κελίο με λαμέλα.
- Με τη βοήθεια βελόνας και τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας η κάθε λαμέλα μεταφέρεται από τα φρεάτια της πλάκας πάνω στη σταγόνα του κάθε δείγματος.

Σημείωση: τα κύτταρα στις λαμέλες εντός των κελίων βρίσκονται στην πάνω επιφάνεια της κάθε λαμέλας. Όταν αυτά μεταφέρονται στο τριβλίο θα πρέπει η επιφάνεια των κυττάρων να έρχεται σε επαφή με τη σταγόνα του δείγματος, συνεπώς τα κύτταρα θα βρίσκονται στη κάτω επιφάνεια της λαμέλας καθώς αυτή παρατηρείται από τον χειριστή.

- Γίνεται επώαση των δειγμάτων στον κλίβανο για το ανάλογο χρονικό διάστημα που απαιτεί το κάθε πειραματικό πρωτόκολλο.
- Με το πέρας της επώασης πραγματοποιούνται 3x10 πλύσεις τις κάθε λαμέλας σε θρεπτικό υλικό.

Σημείωση: οι πλύσεις γίνονται με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας εμβαπτίζοντας κάθε λαμέλα μέσα σε θρεπτικό υλικό που έχει τοποθετηθεί σε πλαστικά σωληνάκια 50ml (3x50ml).

- Ακολουθεί μονιμοποίηση των κυττάρων σε 100% αιθανόλη. Σε νέο τριβλίο petri έχοντας τοποθετήσει με τον ίδιο τρόπο το διηθητικό χαρτί και την ταινία πάραφιλμ εναποθέτουμε σταγόνα 60μl 100%

αιθανόλης για κάθε δείγμα. Στη συνέχεια η κάθε λαμέλα μεταφέρεται στην αντίστοιχη σταγόνα αιθανόλης με την επιφάνεια των κυττάρων να έρχεται σε επαφή με αυτή και τα δείγματα τοποθετούνται στους -20°C για 15 λεπτά.

- Ακολουθούν 3x10 πλύσεις με PBS 1x (3x50ml πλαστικά σωληνάρια και εμβάπτιση της κάθε λαμέλας 10 φορές σε κάθε σωληνάριο).
- Ακολουθεί η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων (blocking). Σε νέο τριβλίο petri έχοντας τοποθετήσει με τον ίδιο τρόπο το διηθητικό χαρτί και την ταινία πάραφιλμ εναποθέτουμε σταγόνα 60μl PBS1x-BSA 1% για κάθε δείγμα. Στη συνέχεια η κάθε λαμέλα μεταφέρεται στην αντίστοιχη σταγόνα PBS1x-BSA 1% με την επιφάνεια των κυττάρων να έρχεται σε επαφή με αυτή και τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 1 ώρα.
- Χωρίς να μεσολαβήσουν πλύσεις ακολουθεί η επώαση των δειγμάτων με τα δευτερογενή αντισώματα. Σε νέο τριβλίο petri έχοντας τοποθετήσει με τον ίδιο τρόπο το διηθητικό χαρτί και την ταινία πάραφιλμ εναποθέτουμε σταγόνα 60μl από το δεύτερο αντίσωμα για κάθε δείγμα. Στη συνέχεια η κάθε λαμέλα μεταφέρεται στην αντίστοιχη σταγόνα κάθε δείγματος με την επιφάνεια των κυττάρων να έρχεται σε επαφή με αυτή και τα δείγματα παραμένουν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 2 ώρες.

Σημείωση: τα δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι το ALEXA Fluor για την ανίχνευση των πρωτογενών αντισωμάτων και η χρωστική torro 3 για τη χρώση των πυρήνων (φωτοευαίσθητα). Το ALEXA Fluor έχει τελική συγκέντρωση 1:2000 σε κάθε δείγμα ενώ το torro 3 1:1000. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του ALEXA Fluor για 7 λεπτά σε 11000rpm, στους 4°C και η τελική συγκέντρωση γίνεται με αραιώση αυτών σε διάλυμα PBS1x-BSA 1%. Ο τελικός όγκος υπολογίζεται με βάση των αριθμό των δειγμάτων (60μl σε κάθε σταγόνα).

- Ακολουθούν διαδοχικά 2x10 πλύσεις σε PBS 1x-BSA 1%, 2x10 πλύσεις σε PBS 1x και 1x10 πλύσεις σε dH_2O .
- Σε αντικειμενοφόρους πλάκες στις οποίες έχουν σημειωθεί τα στοιχεία του κάθε δείγματος προστίθεται μια σταγόνα Mowiol για κάθε δείγμα και η κάθε λαμέλα μεταφέρεται σε αυτή με την επιφάνεια των κυττάρων να έρχεται σε επαφή μαζί της. Τα δείγματα παραμένουν περίπου δώδεκα ώρες στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσουν.

Μέρα 4^η : παρατήρηση στο μικροσκόπιο

7. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων (DNA) από κύτταρα καλλιέργειας

Η απομόνωση του DNA από τα κύτταρα της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε με την χρήση του KIT NucleoSpin DNA RapidLyse της εταιρίας Macherey-Nagel. Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την συλλογή των κυττάρων από την επιφάνεια καλλιέργειας. Στην συνέχεια ακολουθεί λύση των μεμβρανών των κυττάρων με την χρήση πρωτεϊνάσης και θέρμανσης στους 56°C για μία ώρα. Στα επόμενα βήματα πραγματοποιείται η δέσμευση του DNA σε ειδική μεμβράνη και επαναλαμβανόμενες φυγοκεντρήσεις για την απομάκρυνση των υπόλοιπων συστατικών του δείγματος (RNA, πρωτεΐνες και κυτταρικά κατάλοιπα). Τέλος με την χρήση ενός ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης αποδεσμεύεται το DNA από την μεμβράνη συγκράτησης και συλλέγεται σε πλαστικό σωληνάριο 1,5ml. Τέλος ελέγχεται το δείγμα που συλλέχθηκε για την ποσοτικοποίηση και την καθαρότητά του με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1%) και μέτρηση στη συσκευή nanodrop.

8. Δοκιμασία Υδρόλυσης νουκλεικών οξέων

Το γονιδιωματικό DNA που απομονώθηκε από τα κύτταρα καλλιέργειας (HeLA) και τα πλασμίδια pBluescript KS II και pTrix3,1, χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώμα για τη δοκιμή της υδρολυτικής ικανότητας των αντισωμάτων έναντι νουκλεικών οξέων. Τα δείγματα DNA (γονιδιωματικό/ πλασμιδιακό) επωάστηκαν με τα αντισώματα για 24 ώρες στους 37°C και σε αναλογία αντισώματος (μg): DNA (μg), 12:1 για τα mIgGs και σε αναλογία 1:1 για τα mIgMs, σε αποστειρωμένο νερό που περιέχει 2 mM MgCl₂. Οι αντιδράσεις τερματίστηκαν με θρυψίνη (20 μg / ml) για 1 ώρα στους 37°C και τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 1% με ηλεκτροφόρηση.

➤ Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης

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

Για την παρασκευή 1 l διαλύματος TBE 10x σε 800 ml ddH₂O αναμιγνύονται τα εξής:

	ποσότητα ανά 1 l διαλύματος
Tris Base	108 g
boric acid	55 g
EDTA	7,44 g

Το pH προσαρμόζεται στο 8,3 με HCl και ογκομετρείται στο 1l.

9. Έλεγχος επαγωγής της απόπτωσης και της κυτταροτοξικότητας με κυτταρομετρία ροής (FACS)

Η απόπτωση και η νέκρωση είναι οι δύο κύριες μορφές κυτταρικού θανάτου. Η απόπτωση σε μη παθολογικές καταστάσεις είναι μια φυσιολογική διαδικασία και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη και στην ομοιοστάση όλων των πολυκύτταρων οργανισμών. Σε αντίθεση με την απόπτωση, η νέκρωση αποτελεί έναν μη φυσιολογικό θάνατο, επαγόμενο από παράγοντες που προκαλούν κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα και προάγουν την λύση τους και τοπική φλεγμονή.

Η απόπτωση μπορεί να προκληθεί από διάφορα ερεθίσματα, όπως είναι η UV ακτινοβολία ή διάφορες ουσίες που προκαλούν βλάβες στο DNA. Κατά τις διεργασίες της απόπτωσης διακρίνεται μία αναδιάταξη της πλασματικής μεμβράνης των αποπτωτικών κυττάρων και βασικό χαρακτηριστικό αποτελεί η εξωτερικοποίηση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS). Η απώλεια της ασυμμετρίας των φωσφολιπιδίων και η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης, ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται στην εσωτερική-ενδοκυττάρια πλευρά, αποτελεί ένα βασικό δείκτη αναγνώρισης των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων. Η ανεξίνη, η οποία είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 35-36 KDa, μπορεί και συνδέεται πάνω στην φωσφατιδυλοσερίνη με ιδιαίτερα υψηλή συγγένεια, όταν αυτή εκτίθεται στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Η σύνδεσή αυτή εξαρτάται από την παρουσία ιόντων Ca²⁺. Κατά συνέπεια, η σήμανση των κυττάρων με ανεξίνη συνδεδεμένη με την χρωστική FITC αποτελεί ένα δείκτη πρώιμου αποπτωτικού θανάτου.

Καθώς η φωσφατιδυλοσερίνη γίνεται προσβάσιμη και στην περίπτωση της νέκρωσης, για τον κατάλληλο διαχωρισμό των αποπτωτικών και των νεκρωτικών κυττάρων αναγκαία είναι η χρήση ενός ακόμη δείκτη, του ιωδιούχου προπίδιου (Propidium Iodide, PI). Το ιωδιούχο προπίδιο προσδένεται πάνω σε νουκλεϊκά οξέα μόνο όταν η ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης έχει χαθεί. Με τον τρόπο αυτό, είναι εφικτός ο διαχωρισμός των κυττάρων σε 4 κατηγορίες: 1) ζωντανά, 2) πρώιμα αποπτωτικά (βαμμένα κυρίως με ανεξίνη), 3) όψιμα αποπτωτικά (βαμμένα με ανεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο και 4) νεκρά κύτταρα (βαμμένα κυρίως με ιωδιούχο προπίδιο).

Για τον έλεγχο επαγωγής απόπτωσης και κυτταροτοξικότητας των υπό μελέτη δειγμάτων στα κύτταρα καλλιέργειας, χρησιμοποιήθηκε το KIT FITC Annexin V + PI της εταιρίας BioLegend.

<u>Υλικά:</u>	
Διαλύματα - χημικά	<ul style="list-style-type: none"> • Πλήρες θρεπτικό υλικό • Θρεπτικό υλικό (DMEM)/ 1% PE/ST • Θρουψίνη-EDTA (0.5%) (<i>Thermo-Fisher Scientific</i>) • Διάλυμα Trypan Blue 0.4% (<i>Honeywell-Fluka, USA</i>) • Ρυθμιστικό διάλυμα για FACS - PBS 1x (αποστειρωμένο) • Ρυθμιστικό διάλυμα για δείγματα FACS – PBS 1x/4% FBS • Ανεξίνη/FITC (KIT-BioLegend) • Ιωδιούχο προπίδιο (PI) (KIT-BioLegend) • Ρυθμιστικό διάλυμα ανεξίνης (KIT-BioLegend)
Αναλώσιμα	<ul style="list-style-type: none"> • Σωληνάρια για FACS • Αναλώσιμες πιπέτες 5ml • Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 6 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα (<i>Corning, USA</i>) • Πλαστικά σωληνάρια 1,5ml
Συσκευές	<ul style="list-style-type: none"> • Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (Sigma) • Κυτταρόμετρο- FACS

Διαδικασία:

Μέρα 1^η στρώσιμο των κυττάρων:

- Σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 6 φρεατίων στρώνουμε $0,1 \times 10^7$ κύτταρα σε κάθε κελίο. Ο τελικός όγκος θρεπτικού υλικού σε κάθε κελίο είναι 1,5 ml.

Σημείωση: Εκτός από τον αριθμό των δειγμάτων συμπεριλαμβάνονται και οι μάρτυρες που είναι: 1) αρνητικός μάρτυρας που δεν θα βαφτεί, 2) θετικός μάρτυρας όπου τα κύτταρα θα επωαστούν με H_2O_2 , 3) μάρτυρας που θα γίνει χρώση μόνο με Ανεξίνη και 4) μάρτυρας που θα γίνει χρώση μόνο με ιωδιούχο προπίδιο.

- Τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο ($37^\circ C$, 5% CO_2) για δύο μέρες.

Μέρα 3^η : προσθήκη θρεπτικού υλικού χωρίς FBS (starvation)

- Αφαιρείται το πλήρες θρεπτικό υλικό από τα κελία των δειγμάτων (και των controls) και προστίθεται ίσος όγκος (1,5ml) θρεπτικού υλικού χωρίς FBS (DMEM / 1% PE/ST).
- Τα δείγματα επωάζονται στον κλίβανο (37 °C, 5% CO₂) για 24 ώρες.

Μέρα 4^η : προσθήκη των υπό μελέτη Αντισωμάτων

- Σε πλαστικά σωληνάρια 1,5ml αραιώνουμε το αντίσωμα του κάθε δείγματος, στην επιθυμητή συγκέντρωση, σε θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει FBS (DMEM/ 1% PE/ST), (300μg/ml) / (Vτελ=1,5ml).
- Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από κάθε κελίο και προσθέτουμε το διάλυμα με το αντίσωμα κάθε δείγματος.
- Τα δείγματα επωάζονται στον κλίβανο (37 °C, 5% CO₂) για 48 ώρες.

Μέρα 5^η : χρώση των δειγμάτων και ανάλυση στο κυτταρόμετρο-FACS.

10. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα των ελέγχων της επίδρασης των mAbs στα κύτταρα καλλιέργειας και της ικανότητάς τους να επάγουν την απόπτωση ή/ και κυτταροτοξικότητα με τη χρήση της τεχνικής της κυτταρομετρίας ροής, αναλύθηκαν στο πρόγραμμα flowjo V10. Οι τιμές για κάθε δείγμα είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται $\alpha=5$ ($p<0.05$). Η στατιστική ανάλυση έγινε στο πρόγραμμα Microsoft excel με την χρήση των συναρτήσεων «AVERAGE» για τον μέσο όρο κάθε τριπλέτας δειγμάτων, «STDEV» για την τυπική απόκλιση των τιμών του μέσου όρου των ανεξάρτητων πειραμάτων και «TTEST» για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των τιμών σε σχέση με τους μάρτυρες της πειραματικής διαδικασίας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μελέτη ανθρώπινων μονοκλωνικών IgG (mIgGs) με χαρακτηριστικά των NAb's

1.1. Απομόνωση ανθρώπινων mIgGs

Η απομόνωση των μονοκλωνικών IgG (mIgGs) έγινε από ορούς ασθενών με Πολλαπλούν Μυέλωμα (ΠΜ). Είναι γνωστό πως μονοκλωνικά αυτοαντισώματα IgG (mIgGs) ανευρίσκονται, σε μεγάλες συγκεντρώσεις, στον ορό ασθενών με ΠΜ και υπάρχουν ενδείξεις πως, κάποιιοι από τους διαταραγμένους κλώνους Β-κυττάρων των ασθενών αυτών, παράγουν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες φυσικά αντισώματα. Η συγκέντρωση των μονοκλωνικών αντισωμάτων στον ορό ασθενών με ΠΜ-IgG κυμαίνεται από 2 g/L έως και 83 g/L και αυτή φαίνεται να εξαρτάται από το στάδιο της εξαλλαγής των Β κλώνων που τα παράγουν. Για το λόγο αυτό, στις μελέτες του εργαστηρίου αναλύθηκε ένας μεγάλος αριθμός (100) ορών ασθενών με ΠΜ ως προς τις δραστηριότητες των μονοκλωνικών αντισωμάτων που φέρουν.

Στο πρώτο βήμα της μελέτης του εργαστηρίου, οι οροί που συλλέχθηκαν υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ELISA έναντι ενός πάνελ αυτοαντιγόνων, για την διαλογή αυτών που εμφάνιζαν πολυδραστηκότητα. Το πάνελ περιείχε μια ποικιλία δομικά διαφορετικών εαυτών αντιγόνων (DNA, ακτίνη, καρβονική ανυδράση, μυοσίνη, τουμπουλίνη, θυρεοσφαιρίνη) καθώς και του εξωγενούς αντιγόνου τρινιτροφαινόλη (TNP). Οι οροί που υπέδειξαν πολυδραστικό προφίλ έναντι των αντιγόνων του πάνελ επιλέχθηκαν ως υποψήφια δείγματα για την περαιτέρω ανάλυσή τους. Επιπλέον οι πολυδραστικοί οροί υποβλήθηκαν σε δοκιμασίες κυτταροδιείσδυσης σε ζώντα κύτταρα (τα αποτελέσματα δεν παρατίθενται) ως μία πρώτη ένδειξη της κυτταροδιεισδυτικής ικανότητας των μονοκλωνικών αντισωμάτων που ανευρίσκονται σε αυτούς. Από αυτήν τη μέθοδο διαλογής, στη παρούσα εργασία, επιλέχθηκαν πέντε (5) οροί με υψηλές συγκεντρώσεις μονοκλωνικών IgG. Επιπρόσθετα, οι οροί οι οποίοι δεν υπέδειξαν πολυδραστικό προφίλ αποτέλεσαν τα υποψήφια δείγματα που θα χρησίμευαν ως αρνητικοί μάρτυρες των πειραματικών μας διαδικασιών. Για την παρούσα μελέτη, ο ορός MM72 δεν φάνηκε να αντιδράει με κανένα από τα αντιγόνα του πάνελ και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε ως αρνητικός μάρτυρας των πειραμάτων. Τα αποτελέσματα της διαλογής παρατίθενται στην **Εικόνα 21**. Όπως διακρίνεται στην εικόνα, τα αντισώματα των ορών που επιλέχθηκαν αναγνώριζαν έναν διαφορετικό συνδυασμό των αντιγόνων του πάνελ. Ο ορός MM167 φάνηκε εξαιρετικά πολυδραστικός και ο μοναδικός που αναγνώριζε το DNA. Παράλληλα, για τη μελέτη μας επιλέχθηκε και ο ορός MM175 ο οποίος υπέδειξε ισχυρή αναγνώριση της ακτίνης ενώ δεν αντιδρούσε με κανένα άλλο αντιγόνο του πάνελ.

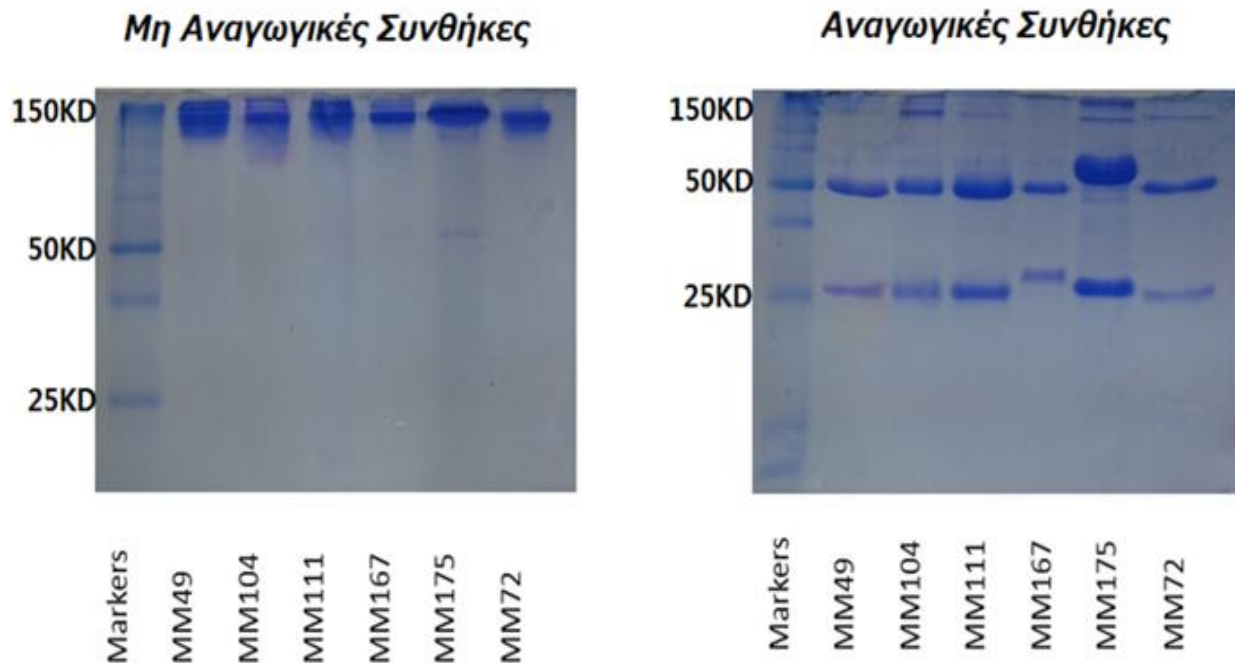
Μετά από την διαλογή των ορών της μελέτης, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση των IgGs με την χρήση χρωματογραφίας συγγένειας με πρωτεΐνη G (protein G chromatography). Καθώς, οι οροί που επιλέχθηκαν παρουσίαζαν υψηλές συγκεντρώσεις μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών, η χρήση της τεχνικής της πρωτεΐνης G μας εξασφαλίζει την επιλεκτική απομόνωση των IgGs από τα διαλύματα των δειγμάτων. Ωστόσο, στα επόμενα βήματα ακολούθησε ο προσδιορισμός της καθαρότητας και η επιβεβαίωση της μονοκλωνικότητας των IgGs που απομονώθηκαν.

mAbs	DNA	Ακτίνη	TNP	Καρβονική ανυδράση	Μυοσίνη	Θυρεο- σφαιρίνη	Τουμπουλίνη	Πολύ- δραστικότητα	Ολική IgG (g/L)
MM49								+	16,8
MM104								+	35,1
MM111								+	9,97
MM167								+	52
MM175								Μονοδραστικό	23,5
MM72								Αρνητικό	10,5

Εικόνα 21: Πολυδραστικότητα ανθρώπινων ορών ΠΜ έναντι του αντιγονικού πάνελ της μεθόδου διαλογής. Στον πίνακα παρατίθενται επίσης (δεξιά), οι τιμές των συγκεντρώσεων των μονοκλωνικών αντισωμάτων στον ορό, όπως αυτές υποδείχθηκαν από τα κλινικά νοσοκομειακά δεδομένα.

➤ Προσδιορισμός της καθαρότητας των mIgGs

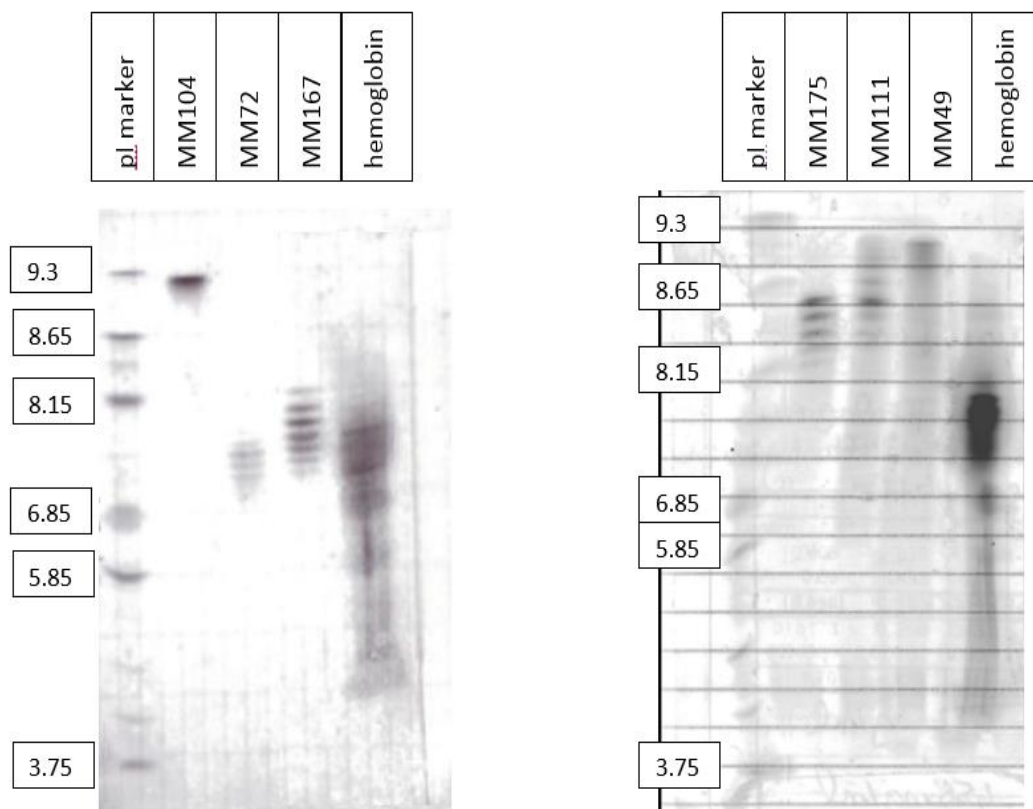
Τα απομονωμένα αντισώματα ελέγχθηκαν με SDS-PAGE για την καθαρότητά τους. Τα αντισώματα IgG αποτελούνται από δύο βαριές αλυσίδες, 50KD η κάθε μία και από δύο ελαφριές αλυσίδες, 25KD η κάθε μία. Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE πραγματοποιήθηκε σε αναγωγικές και μη αναγωγικές συνθήκες. Στις μη αναγωγικές συνθήκες αναμένουμε να παρατηρήσουμε μία μπάντα στα 150KD που αντιπροσωπεύει το φυσιολογικό πλήρες μόριο των ανοσοσφαιρινών τάξης G. Στις αναγωγικές συνθήκες πριν την ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται θέρμανση των δειγμάτων υπό την παρουσία μερκαπτεθανόλης (αποδιατακτικός παράγοντας) στους 100°C για 10 λεπτά, ώστε το μόριο της πρωτεΐνης να αποδιαταχθεί. Έτσι στο πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης των αναγωγικών συνθηκών αναμένουμε δύο μπάντες, μία στα 25KD που αντιπροσωπεύει τα μόρια των ελαφριών αλυσίδων και μία στα 50KD που αντιπροσωπεύει τα μόρια των βαριών αλυσίδων. Η χρώση του πηκτώματος έγινε με κυανό του Coomassie. Εκτός από τις αναμενόμενες μπάντες των αντισωμάτων, οι επιπρόσθετες μπάντες που εμφανίζονται στις αναγωγικές συνθήκες με μοριακά βάρη μεγαλύτερα των 50KD, είναι πιθανό να οφείλονται στην μερική αποδιάταξη των μορίων των αντισωμάτων. Επιπλέον, για το MM175 φαίνεται στις Μη Αναγωγικές συνθήκες πως υπάρχει μία ελάχιστη πρόσμιξη με αλβουμίνη (χαρακτηριστικό μοριακό βάρος 50KD). Ωστόσο, αυτό δεν επηρεάζει τις περαιτέρω πειραματικές μας προσεγγίσεις. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρατίθενται στην **Εικόνα 22**.



Εικόνα 22: SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (10%) των καθαρισμένων mIgG σε μη αναγωγικές και αναγωγικές συνθήκες.

➤ Προσδιορισμός της μονοκλωνικότητας των mIgGs

Για τον προσδιορισμό της μονοκλωνικότητας των καθαρισμένων αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF) σε πήκτωμα αγαρόζης. Κατά την ισοηλεκτρική εστίαση η κάθε πρωτεΐνη κινείται διαφορετικά σε πηκτή βαθμίδωσης του pH με βάση το ισοηλεκτρικό της σημείο. Όταν τα πρωτεϊνικά μόρια φτάσουν στο σημείο του πηκτώματος που αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό τους σημείο, σταματούν να κινούνται περαιτέρω, λόγω του ότι στο σημείο αυτό τα ηλεκτρικά φορτία του μορίου εξουδετερώνονται. Η μονοκλωνικότητα των αντισωμάτων ορίζεται από την ένδειξη στενών μπαντών σε ένα περιορισμένο εύρος της πηκτής που αντανακλούν στο βαθμό γλυκοζηλίωσης των εκάστοτε πρωτεϊνικών μορίων (ισομορφών) που αποτελούν το διάλυμα της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα της IEF φαίνονται στην **Εικόνα 23**.

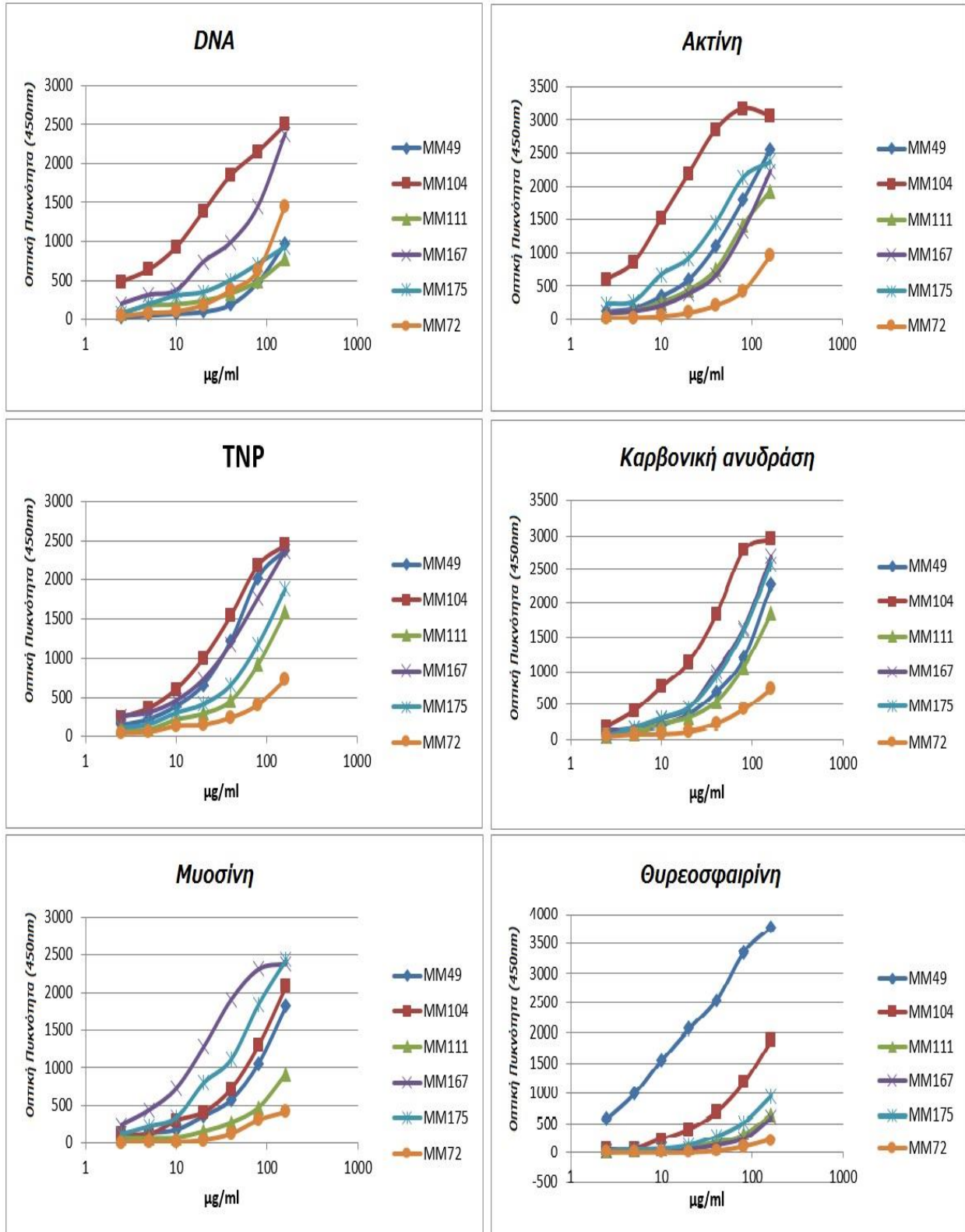


Εικόνα 23: Ισοηλεκτρική εστίαση σε πήκτωμα αγαρόζης των απομονωμένων IgG.

Συνολικά τα χαρακτηριστικά των απομονωμένων IgGs (mAbs) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

mAbs	ισότυπος	Ελαφριά αλυσίδα	Ισοηλεκτρικό σημείο (pI)
MM49	IgG	κ	9.5
MM104		λ	9.0
MM111		κ	8.5
MM167		κ	7.3
MM175		λ	8.45
MM72		λ	7.0

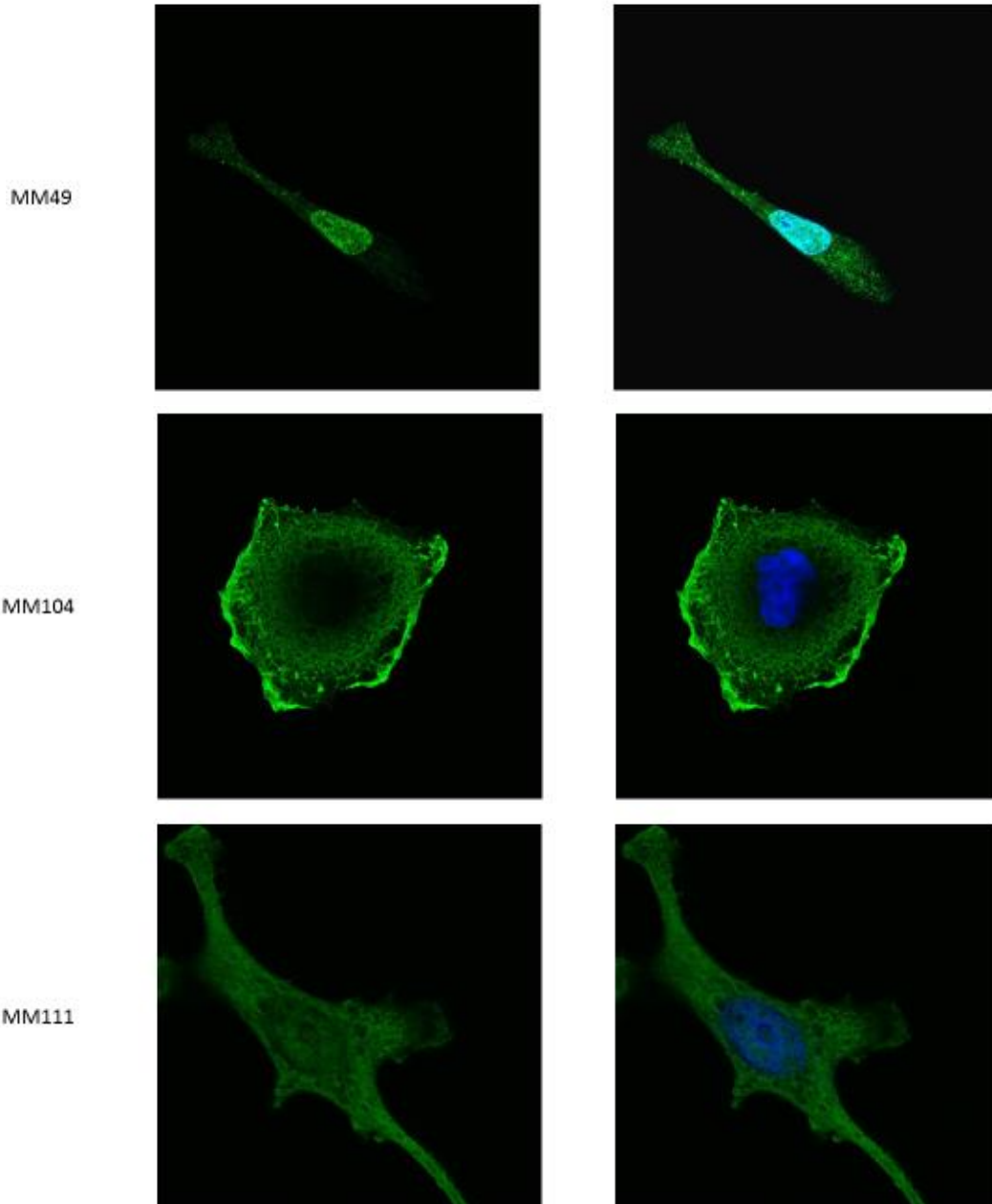
Οι έλεγχοι των ηλεκτροφορήσεων των mIgGs επιβεβαίωσαν τον αποτελεσματικό καθαρισμό και την μονοκλωνικότητα τους. Παρόλο που τα mIgGs της μελέτης επιλέχθηκαν με κυριότερο χαρακτηριστικό την πολυδραστικότητα έναντι αντιγόνων του πάνελ, η πολυδραστικότητα τους επιβεβαιώθηκε και μετά τον καθαρισμό τους με δοκιμασία ELISA έναντι των αντιγόνων του πάνελ. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας παρατίθενται στην **Εικόνα 24**. Στην εικόνα αυτή, διακρίνεται μια μικρή διαφοροποίηση της αντιγονικής δραστικότητας των καθαρισμένων mIgGs με τα αντιγόνα του πάνελ. Είναι πολύ πιθανό πως οι λοιπές πρωτεΐνες του ορού αλληλεπιδρούν με τα πρωτεϊνικά μόρια των mIgGs στο διάλυμα υποκρύπτοντας μέρος της αντισωματικής δραστικότητας τους.

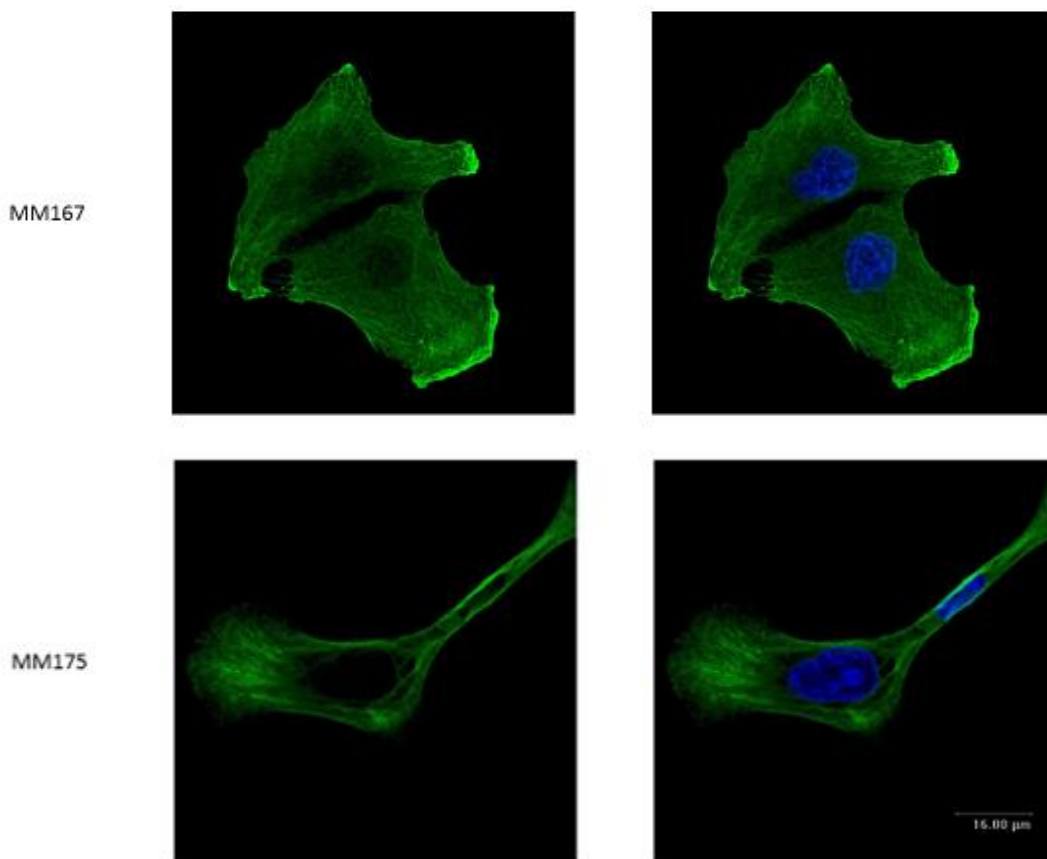


Εικόνα 24: Οι δραστηριότητες των καθαρισμένων mIgGs έναντι των αντιγόνων του πάνελ.

1.2. Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Μία άλλη προσέγγιση για τον προσδιορισμό της δραστικότητας των απομονωμένων mIgGs έναντι εαυτών αντιγόνων, είναι η οπτικοποίηση της πρόσδεσής τους στα αντιγόνα αυτά χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μονιμοποιημένα κύτταρα. Με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού και τη χρήση συνεστιακού μικροσκόπιου, επιβεβαιώθηκε η αυτοδραστικότητα των mIgGs έναντι ενδοκυττάρων αντιγονικών στόχων. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στην **Εικόνα 25**.

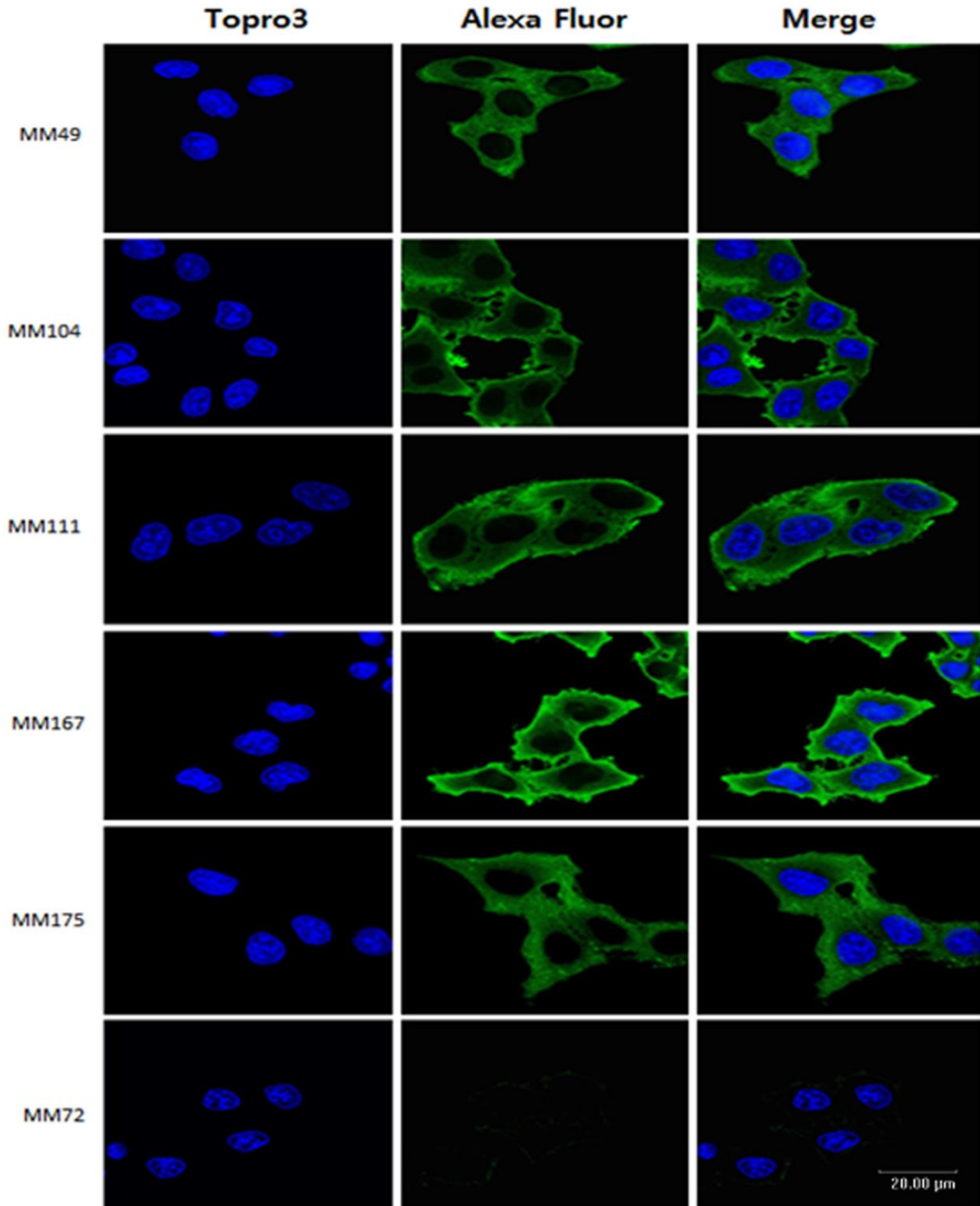




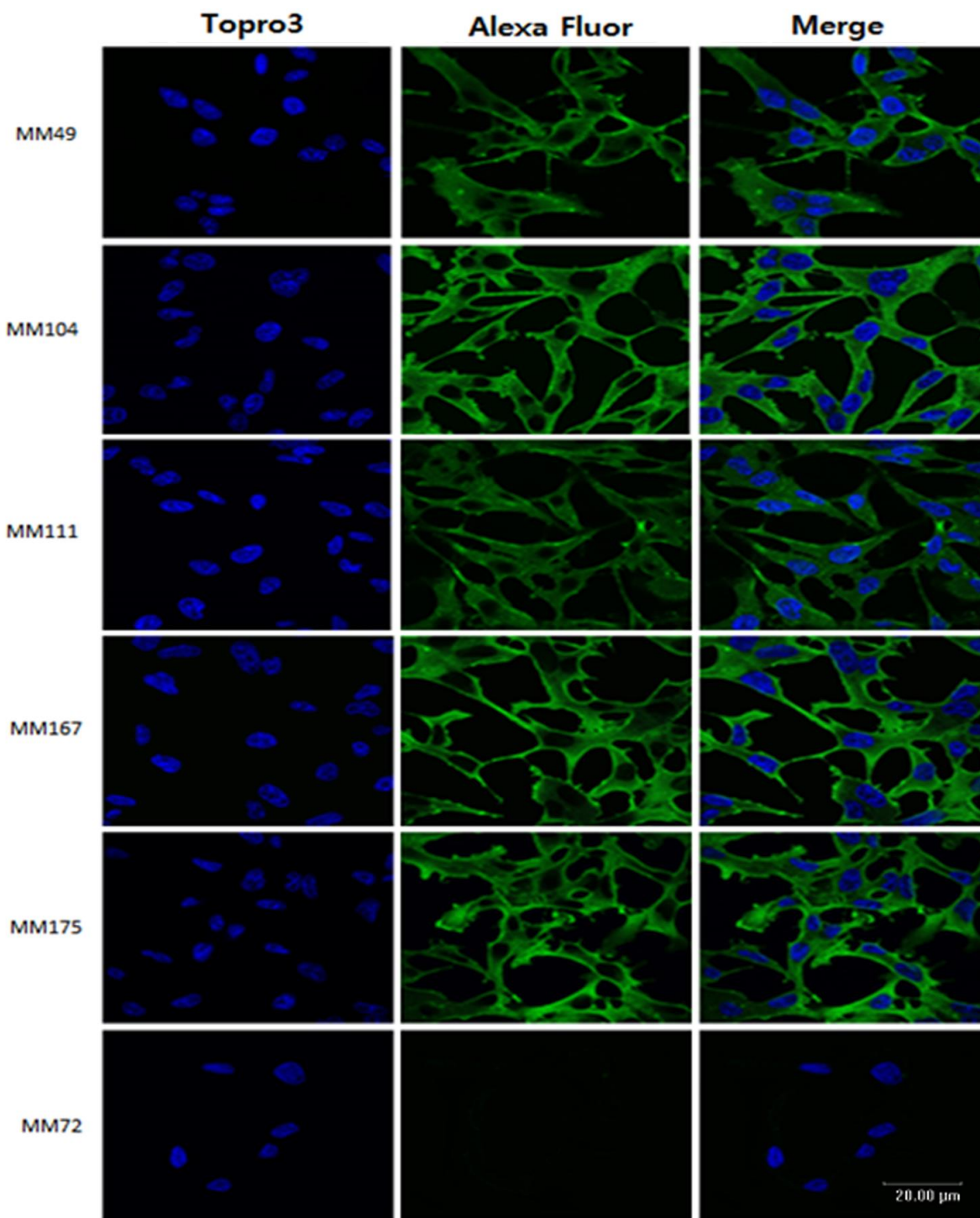
Εικόνα 25: Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένα κύτταρα MDA-MB-231. Πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση των κυττάρων με 100% αιθανόλη και ακολούθως, δύο ώρες επώαση με τα υπό εξέταση mIgGs σε τελική συγκέντρωση 300μg/ml. Η σήμανση των πρωτογενών αντισωμάτων (mIgGs) έγινε με το δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα Alexa Fluor 488/ human anti- IgG (H+L) (πράσινο χρώμα). Η πυρηνική χρώση έγινε με topro3 (μπλέ χρώμα). Παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TSC. Φακός x63, κλίμακα 16μm. Οι μικρογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

1.3. Έλεγχος κυτταρικής διείσδυσης των mIgGs

Ο έλεγχος για την διεισδυτική ικανότητα των mIgGs πραγματοποιήθηκε με την χρήση τεχνικών ανοσοφθορισμού και με βάση ενός πειραματικού πρωτόκολλου που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο μας. Το πρωτόκολλο αυτό αποτελεί μια παραλλαγή της τεχνικής του έμμεσου ανοσοφθορισμού κατά το οποίο πριν την μονιμοποίηση των κυττάρων, προηγείται επώαση των κυττάρων με τα φυσικά αντισώματα στο καλλιεργητικό μέσο. Σε μελέτες που διεξήχθησαν στο εργαστήριο, μελετήθηκαν οι παράγοντες του χρόνου και της τελικής συγκέντρωσης των αντισωμάτων για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών επώασης των κυττάρων καλλιέργειας με τα mAbs. Οι παρατηρήσεις από τις μελέτες αυτές μας οδήγησαν στον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών που ακολουθήθηκαν σε όλες τις περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες των τεχνικών ανοσοφθορισμού, υποδεικνύοντας πως δύο ώρες επώασης με τελική συγκέντρωση του εκάστοτε αντισώματος στα 300μg/ml έδιναν ικανοποιητικά αποτελέσματα διείσδυσης αλλά και οπτικοποίησης του σήματος κατά την ανάλυση στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρατίθενται στην **Εικόνα 26** για την κυτταρική σειρά HeLa και στην **Εικόνα 27** για την κυτταρική σειρά MDA-MB-231.



Εικόνα 26: Δοκιμασία διεισδυσης των mIgGs σε κύτταρα HeLa. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν για δύο ώρες, στους 37°C με τα mIgGs σε τελική συγκέντρωση 300μg/ml στο μέσο καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 100% αιθανόλη και έγινε σήμανση των mIgGs με δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα (Alexa Fluor 488/ human anti-IgG (H+L), πράσινο χρώμα). Η πυρηνική χρώση έγινε με topro3 (μπλέ χρώμα). Παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TSC. Φακός x63, κλίμακα 20μm. Οι μικρογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



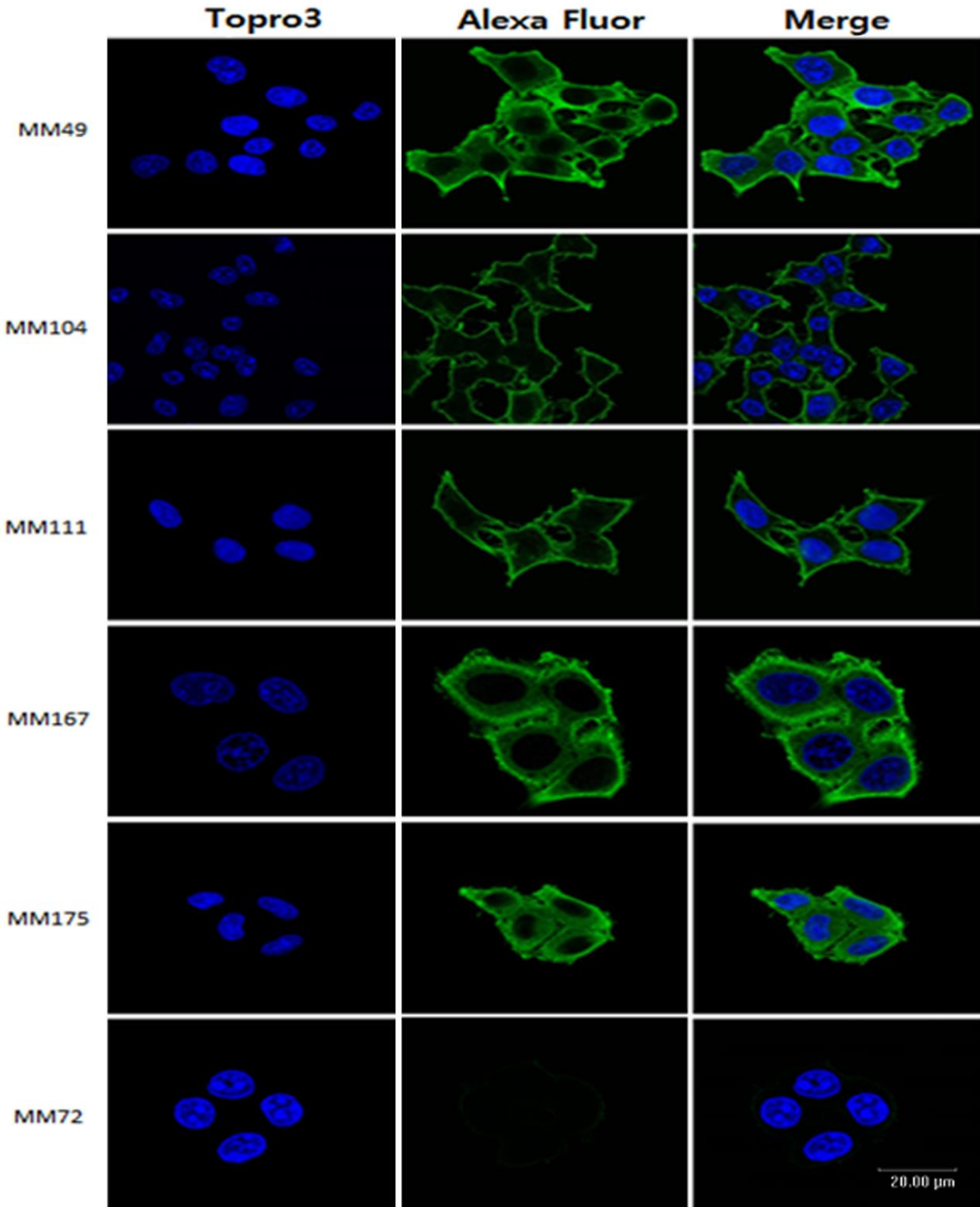
Εικόνα 27: Δοκιμασία διεισδυσης των mIgGs σε κύτταρα MDA-MB-231. Κύτταρα MDA-MB-231 επώαστηκαν για δύο ώρες, στους 37⁰C, με τα mIgGs σε τελική συγκέντρωση 300μg/ml στο μέσο καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 100% αιθανόλη και έγινε σήμανση των mIgGs με δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα (Alexa Fluor 488/ human anti-IgG (H+L), πράσινο χρώμα). Η πυρηνική χρώση έγινε με topro3 (μπλέ χρώμα). Παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TSC. Φακός x63, κλίμακα 20μm. Οι μικρογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ο υποδοχέας των ανοσοσφαιρινών G (FcγR), εμπλέκεται σε κάποιες περιπτώσεις, στις διαδικασίες ενδοκυττάρωσης των αντισωμάτων. Για το λόγο αυτό, ο έλεγχος της διείσδυσης πραγματοποιήθηκε σε καρκινικές κυτταρικές σειρές που ο υποδοχέας εκφράζεται στην επιφάνεια των κυττάρων (MDA-MB-231/FcγR+) είτε εκλείπει (δεν εκφράζεται) από την επιφάνειά τους (HeLa/ FcγR-). Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνεται η κυτταροδιεισδυτική ικανότητα των mIgGs και στις δύο κυτταρικές σειρές ανεξαρτήτως της παρουσίας του υποδοχέα FcγR. Τα mIgGs μετά την κυτταροδιείσδυση εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, ενώ δεν παρατηρήθηκε πυρηνική χρώση. Τέλος, ο αρνητικός μάρτυρας MM72 δεν υπέδειξε καμία κυτταροδιεισδυτική ικανότητα σε καμία από τις δυο κυτταρικές σειρές.

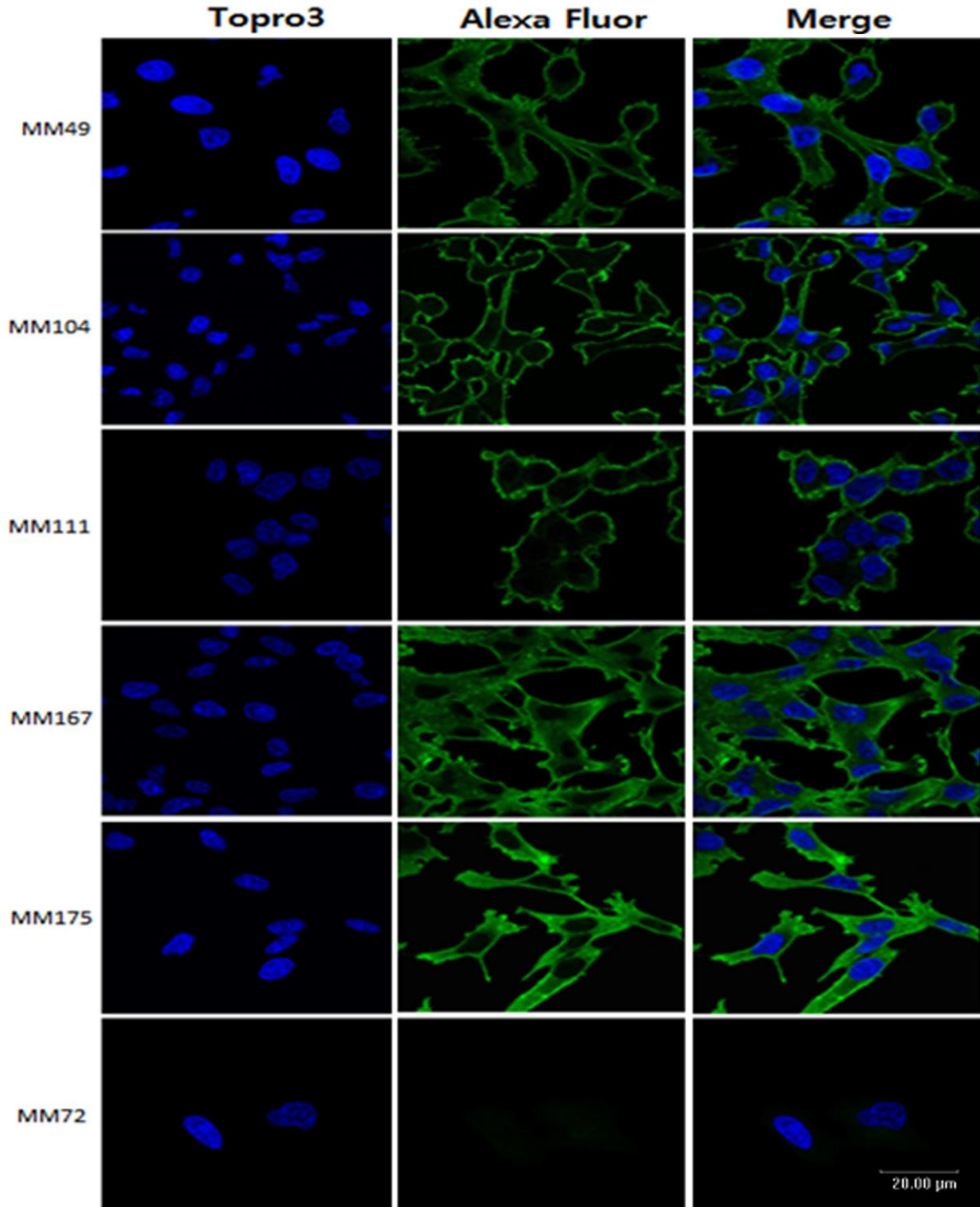
1.4. Έλεγχος της διείσδυσης των mIgGs στους 4°C

Η κυτταροδιείσδυση των αντισωμάτων, έχει συσχετισθεί με μηχανισμούς ενδοκυττάρωσης με την δαπάνη ενέργειας καθώς και με μηχανισμούς ανεξάρτητους από ενεργειακές μεταβολές. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκαν οι προκείμενοι μηχανισμοί της κυτταρικής διείσδυσης με τον έλεγχο της διεισδυτικής ικανότητας των mIgGs στους 37°C, όπου οι συνθήκες ευνοούν τις ενεργειακά εξαρτώμενες μεταβολικές διεργασίες, και στους 4°C, όπου λόγω μειωμένης θερμοκρασίας δεν πραγματοποιείται κατανάλωση της ενέργειας.

Για τον έλεγχο του μηχανισμού της κυτταρικής διείσδυσης η επώαση των κυτταρικών σειρών με τα mIgGs πραγματοποιήθηκε για δύο ώρες, στους 4°C, με σκοπό την ελαχιστοποίηση των δαπανών ενέργειας. Στόχος αυτού του ελέγχου αποτελεί η διερεύνηση και ο διαχωρισμός των οδών διείσδυσης των mIgGs σε ενεργο-εξαρτώμενες και ενεργο-ανεξάρτητες διεργασίες. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης στο συνεστιακό μικροσκόπιο παρατίθενται στην **Εικόνα 28** για την κυτταρική σειρά HeLa και στην **Εικόνα 29** για την κυτταρική σειρά MDA-MB-231. Στις εικόνες αυτές παρατηρείται μια διαφοροποίηση της κυτταροδιεισδυτικής ικανότητας των mIgGs τόσο στην κυτταρική σειρά HeLa όσο και στην κυτταρική σειρά MDA-MB-231. Τα mAbs MM104 και MM111 φάνηκαν ανίκανα να διεισδύουν στους 4°C ενώ το MM49 υπέδειξε μια χαμηλού βαθμού διείσδυση και ένα ασθενές, μερικό κυτταροπλασματικό σήμα κατά την ανάλυση στο μικροσκόπιο. Τα MM167 και MM175 φάνηκαν ικανά να κυτταροδιεισδύουν και στις δύο κυτταρικές σειρές στους 4°C και να εντοπίζονται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα. Τέλος, ο αρνητικός μάρτυρας MM72 δεν υπέδειξε καμία κυτταροδιεισδυτική ικανότητα σε καμία από τις δυο κυτταρικές σειρές κατά τον έλεγχο της κυτταροδιείσδυσης στους 4°C.



Εικόνα 28: Έλεγχος μηχανισμού διεισδυσης των mIgGs σε κύτταρα HeLa. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν για δύο ώρες, στους 4°C, με τα mIgGs σε τελική συγκέντρωση 300μg/ml στο μέσο καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 100% αιθανόλη και έγινε σήμανση των mIgGs με δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα (Alexa Fluor 488/ human anti-IgG (H+L), πράσινο χρώμα). Η πυρηνική χρώση έγινε με topro3 (μπλέ χρώμα). Παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TSC. Φακός x63, κλίμακα 20μm. Οι μικρογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



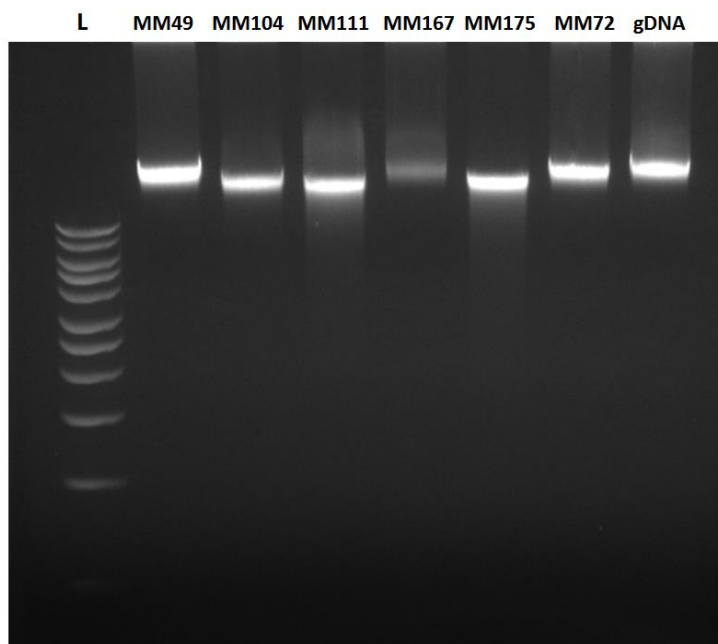
Εικόνα 29: Έλεγχος μηχανισμού διεισδυσης των mlgGs σε κύτταρα MDA-MB-231. Κύτταρα MDA-MB-231 επώαστηκαν για δύο ώρες, στους 4°C, με τα mlgGs σε τελική συγκέντρωση 300μg/ml στο μέσο καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 100% αιθανόλη και έγινε σήμανση των mlgGs με δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα (Alexa Fluor 488/ human anti-IgG (H+L), πράσινο χρώμα). Η πυρηνική χρώση έγινε με topro3 (μπλέ χρώμα). Παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TSC. Φακός x63, κλίμακα 20μm. Οι μικρογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

1.5. Έλεγχος υδρολυτικής ικανότητας των mIgGs

Τα αντισώματα που φέρουν στις μεταβλητές τους περιοχές, δομές που προσομοιάζουν το ενεργό κέντρο των ενζύμων, ονομάζονται Abzymes (Abzs). Οι πρώτες ανακαλύψεις των φυσικών Abzs, αφορούσαν αντισώματα τάξης G με ικανότητα υδρόλυσης μικρών πεπτιδίων καθώς και νουκλεϊκών οξέων. Για το λόγο αυτό, προβήκαμε στον έλεγχο της υδρολυτικής ικανότητας των αντισωμάτων που μελετήθηκαν στην εργασία αυτή. Για τον έλεγχο της υδρολυτικής ικανότητας των αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως φυσικά υποστρώματα, γονιδιωματικό DNA απομονωμένο από κύτταρα HeLa, καθώς και πλασμιδιακό DNA (pBluescript II KS) προερχόμενο από βακτηριακά στελέχη (XL1). Η αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε διάλυμα αποστειρωμένου, διπλά απειονισμένου νερού που περιείχε επιπρόσθετα $MgCl_2$ τελικής συγκέντρωσης 5mM στο διάλυμα και τερματίστηκαν με τη προσθήκη θρυψίνης.

➤ Δοκιμασία υδρόλυσης γονιδιωματικού DNA

Τα mIgGs επώασηκαν με το γονιδιωματικό DNA για 24 ώρες στους 37°C, σε αναλογία 12:1 αντισώματος/ υποστρώματος. Τα αποτελέσματα για τον έλεγχο της υδρόλυσης του γονιδιωματικού DNA από τα mIgGs παρατίθενται στην **Εικόνα 30**. Η ανάλυση του ελέγχου πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

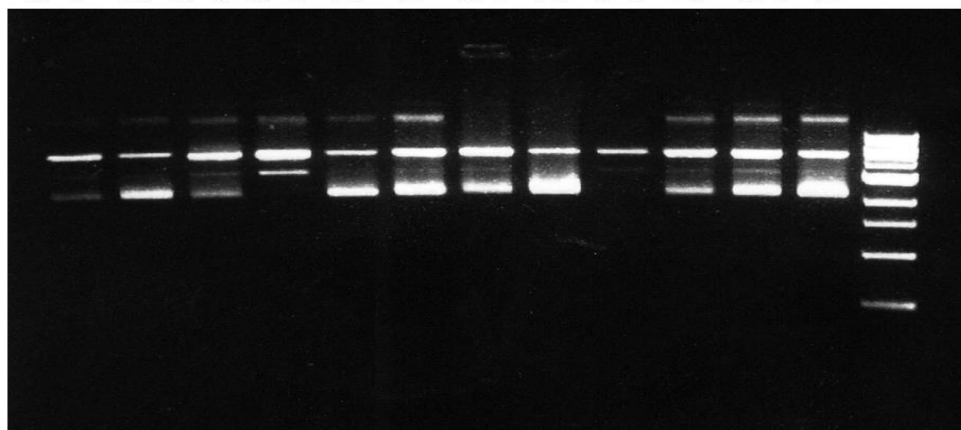


Εικόνα 30: Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA από κύτταρα HeLa μετά από 24 ώρες επώασης με τα mIgGs. Ως διαλύτης της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο, διπλά απειονισμένο νερό με προσθήκη $MgCl_2$ τελικής συγκέντρωσης 5mM στο διάλυμα. Η αντίδραση τερματίστηκε με προσθήκη θρυψίνης και η ανάλυση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

➤ Δοκιμασία υδρόλυσης πλασμιδιακού DNA

Το πλασμίδιο pBluescript II KS χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της υδρολυτικής ικανότητας των mIgGs. Τα mIgGs επώαστηκαν με το πλασμιδιακό DNA για 24 ώρες στους 37°C και στους 4°C, σε αναλογία 12:1 αντισώματος/ υποστρώματος. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρατίθενται στην **Εικόνα 31**. Η ανάλυση του ελέγχου πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

MMs: 49 49 104 111 104 111 167 167 175 175 72 72 L
37°C 4°C 37°C 37°C 4°C 4°C 37°C 4°C 37°C 4°C 37°C 4°C

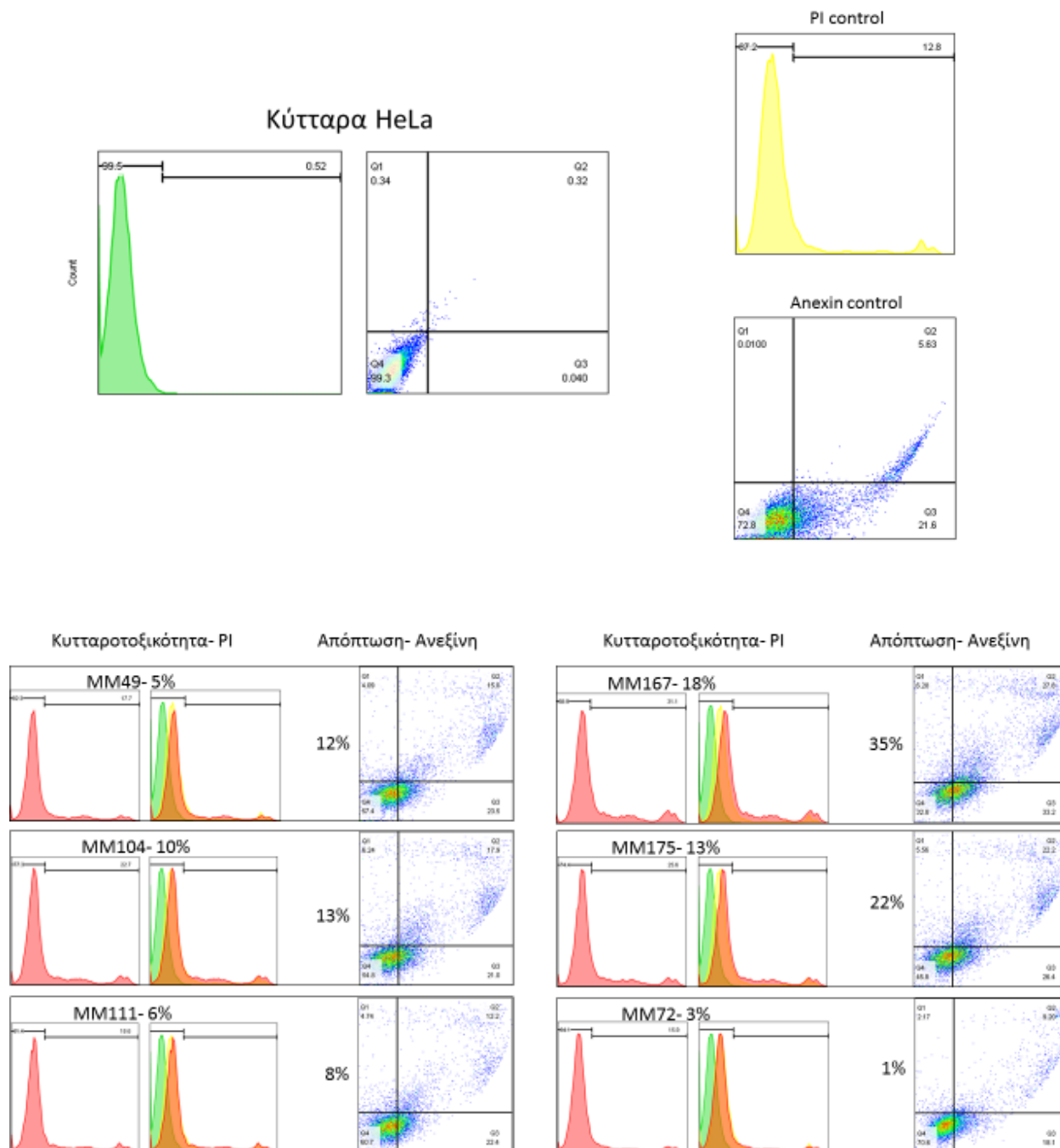


Εικόνα 31: Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA pBluescript II KS μετά από 24 ώρες επώασης με τα mIgGs. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C και στους 4°C, σε διάλυμα αποστειρωμένου, διπλά απειονισμένου νερού που περιείχε MgCl₂ τελικής συγκέντρωσης 5mM. Η αντίδραση τερματίστηκε με θρυψίνη και τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

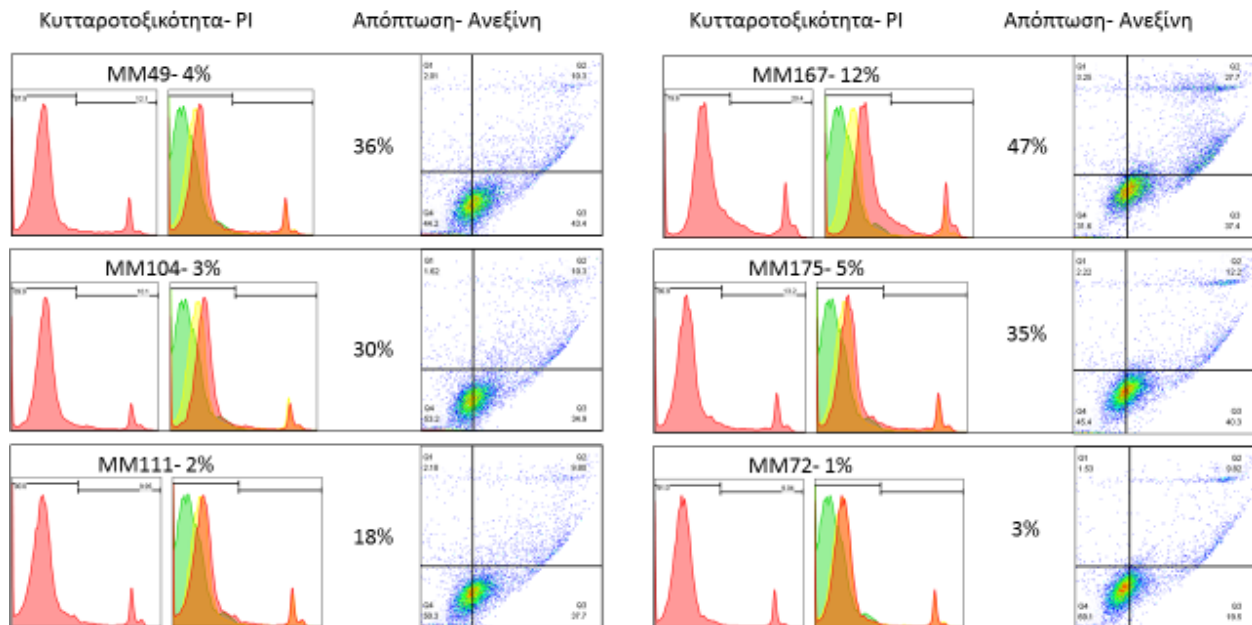
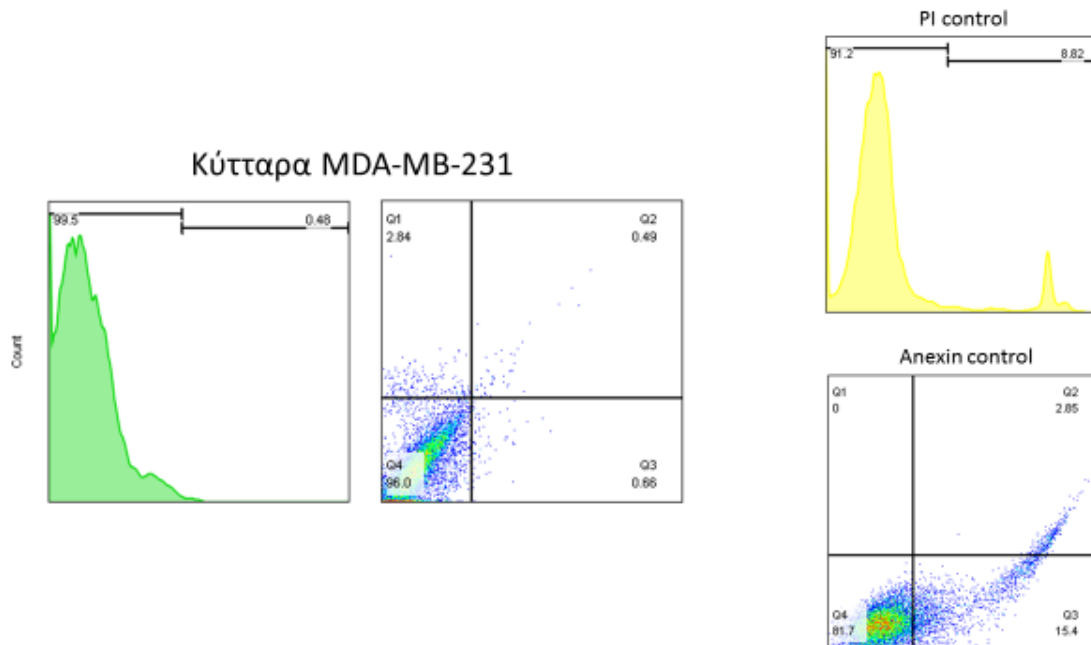
1.6. Έλεγχος επαγωγής της απόπτωσης και κυτταροτοξικότητας από τα mIgGs

Ο έλεγχος της ικανότητας των mIgGs να επάγουν τους αποπτωτικούς μηχανισμούς ή κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα της καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκε με την επώαση των κυττάρων για 48 ώρες με τα υπό μελέτη mAbs σε τελική συγκέντρωση 300μg/ml στο θρεπτικό μέσο. Με το πέρας της επώασης, έγινε χρώση των κυττάρων με ανεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο και η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα των τιμών για κάθε δείγμα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα flowjo V10. Οι τιμές για κάθε δείγμα είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε $\alpha=5$ ($p<0.05$).

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας για την επαγωγή της απόπτωσης και κυτταροτοξικότητας των mIgGs έναντι των καρκινικών σειρών καλλιέργειας παρατίθενται στην **Εικόνα 32** για την κυτταρική σειρά HeLa και στην **Εικόνα 33** για την κυτταρική σειρά MDA-MB-231.



Εικόνα 32: Αποτελέσματα της ανάλυσης για την επίδραση των mIgGs στα κύτταρα HeLa. Στο επάνω αριστερά μέρος της εικόνας διακρίνεται ο φυσικός πληθυσμός των κυττάρων HeLa, όπως αυτά απεικονίζονται στο ιστογράμμο (PI) και στο σταυρόνημα (Ανεξίνη), ενώ στο επάνω δεξιά μέρος της εικόνας απεικονίζονται οι αρνητικοί μάρτυρες των χρώσεων της πειραματικής διαδικασίας (PI control και Annexin control). Τα ποσοστά κυτταροτοξικότητας και της απόπτωσης προκύπτουν μετά από αφαίρεση της αντίστοιχης χρώσης-control από την τιμή της μέτρησης για κάθε δείγμα. Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα flowjo V10. Οι τιμές για κάθε δείγμα είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων ($p < 0.05$).



Εικόνα 33: Αποτελέσματα της ανάλυσης για την επίδραση των miGs στα κύτταρα MDA-MB-231.

Στο επάνω αριστερά μέρος της εικόνας διακρίνεται ο φυσικός πληθυσμός των κυττάρων MDA-MB-231, όπως αυτά απεικονίζονται στο ιστόγραμμα (PI) και στο σταυρόνημα (Ανεξίνη), ενώ στο επάνω δεξιά μέρος της εικόνας απεικονίζονται οι αρνητικοί μάρτυρες των χρώσεων της πειραματικής διαδικασίας (PI control και Annexin control). Τα ποσοστά κυτταροτοξικότητας και της απόπτωσης προκύπτουν μετά από αφαίρεση της αντίστοιχης χρώσης-control από την τιμή της μέτρησης για κάθε δείγμα. Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα flowjo V10. Οι τιμές για κάθε δείγμα είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων ($p < 0.05$).

2. Μελέτη ανθρώπινων μονοκλωνικών IgM (mIgMs) με χαρακτηριστικά των NAb

2.1. Απομόνωση ανθρώπινων mIgMs

Ένα μέρος της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση μονοκλωνικών αντισωμάτων τάξης IgM. Είναι γνωστό πως στον ορό ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström (MW) βρίσκονται υψηλές συγκεντρώσεις μονοκλωνικής IgM και οι κλώνοι που παράγουν τα αντισώματα αυτά, είναι πιθανό, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, να αποτελούν κλώνους που παράγουν φυσικά IgM αντισώματα. Για το λόγο αυτό με την ίδια λογική που προβήκαμε παραπάνω, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος διαλογής ορών ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström που εμφάνιζαν συνδυαστικές δραστηριότητες έναντι του πάνελ αντιγόνων του εργαστηρίου, με τη χρήση της τεχνικής ELISA. Τα αποτελέσματα της ELISA παρατίθενται στην **Εικόνα 34**.

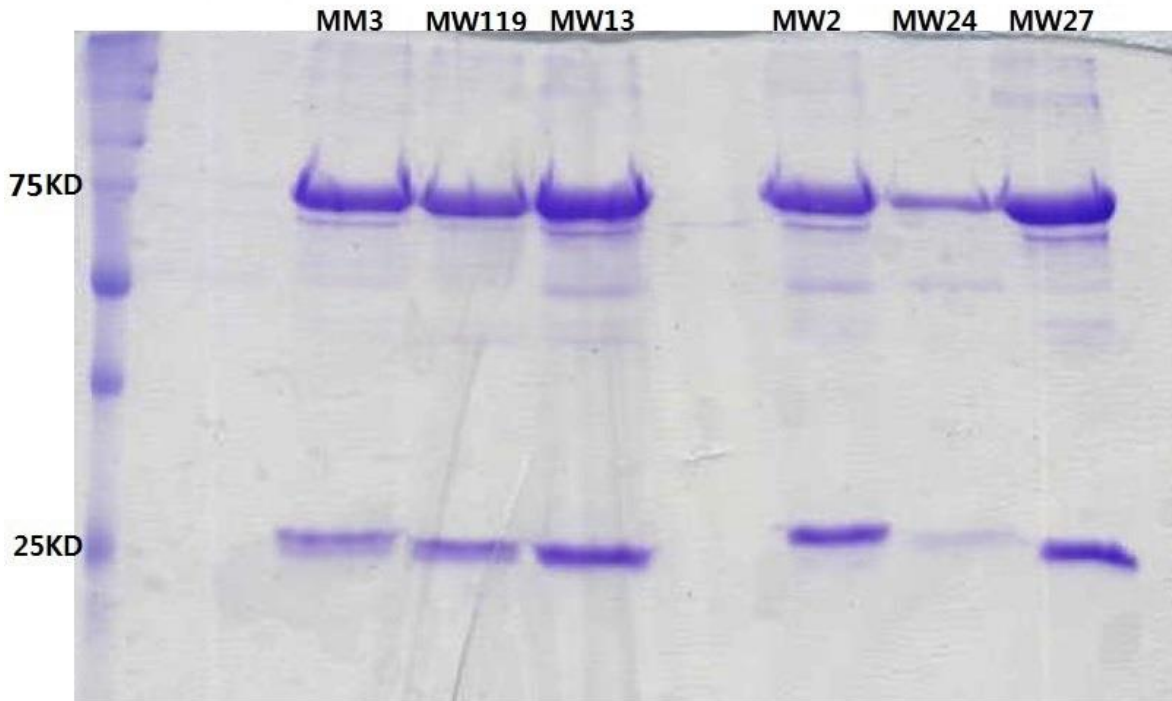
mAbs	DNA	Ακτίνη	TNP	Καρβονική ανυδράση	Μυοσίνη	Θυρεο-σφαιρίνη	Τουμπουλίνη	Πολύ-δραστικότητα	Ολική IgM (g/L)
MW2								+	31,2
MW13								+	54,8
MW24								Μονοδραστικό	45
MW27								+	52,8
MW119								+	9,04
MW3								Αρνητικό	33,2

Εικόνα 34: Πολυδραστικότητα ανθρώπινων ορών MW έναντι του αντιγονικού πάνελ της μεθόδου διαλογής. Στον πίνακα παρατίθενται επίσης (δεξιά) οι τιμές των συγκεντρώσεων των μονοκλωνικών αντισωμάτων στον ορό, όπως αυτές υποδείχθηκαν από τα κλινικά νοσοκομειακά δεδομένα.

Για τον καθαρισμό των mIgMs από τα δείγματα των ορών που επιλέχθηκαν, πραγματοποιήθηκε καθίζηση του μορίου της IgM μετά από αλλαγή του διαλύτη στο διάλυμα του κάθε ορού/ δείγματος. Οι υψηλές συγκεντρώσεις των μονοκλωνικών IgM στους επιλεγμένους ορούς, καθιστά ευκολότερη την παρατήρηση του ιζήματος που δημιουργείται. Η καθίζηση πραγματοποιήθηκε με διάλυμα χαμηλής ιονικής ισχύς (Tris- HCl pH 8,2) και το ίζημα της πρωτεΐνης επαναδιαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1x pH 7,4. Μικρή ποσότητα άλατος προστέθηκε στα δείγματα τα οποία εμφάνιζαν μερική διαλυτότητα και η οποία καθιστά το μόριο της IgM πιο σταθερό.

➤ Προσδιορισμός της καθαρότητας των mIgMs

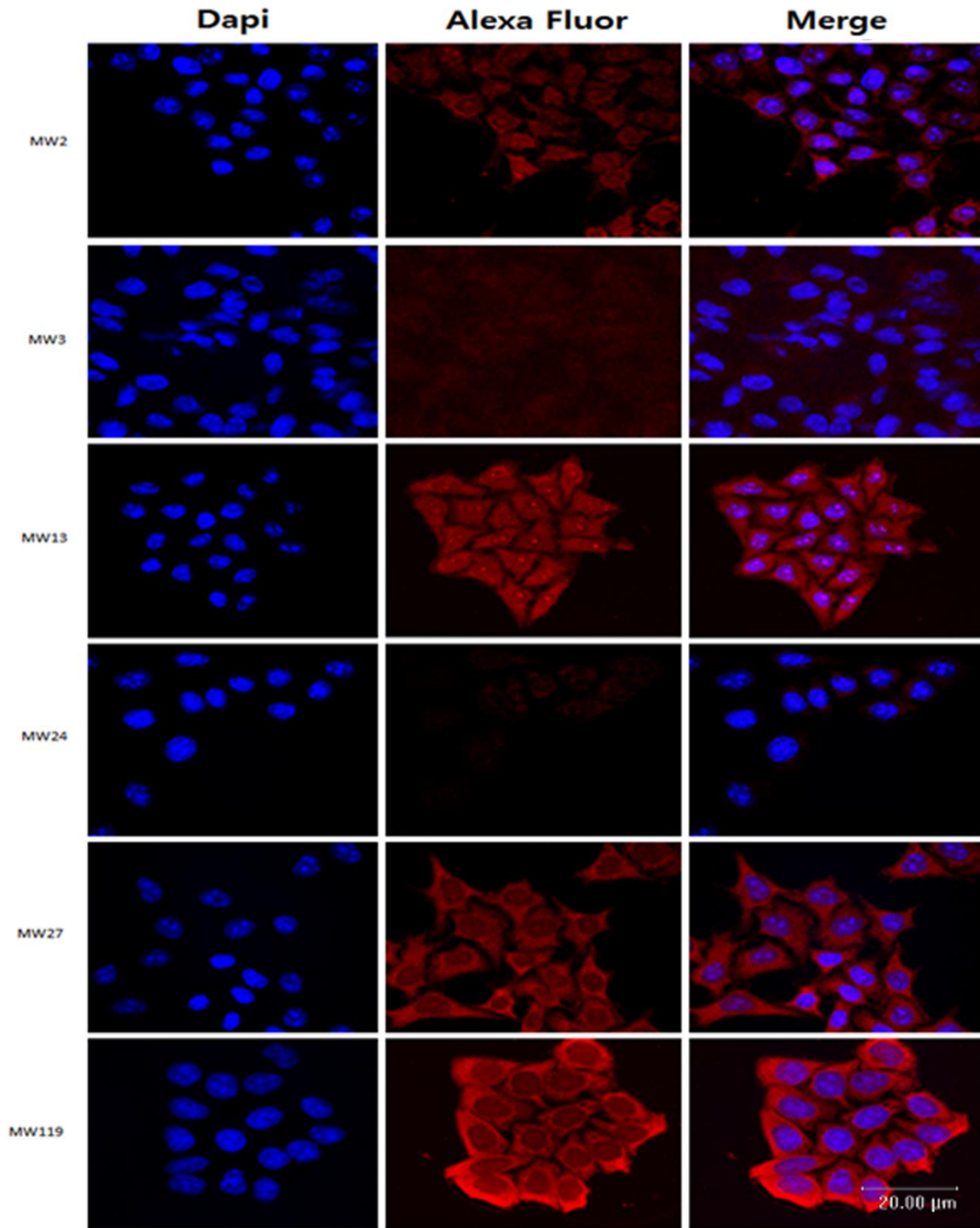
Ο έλεγχος της καθαρότητας των απομονωμένων mIgMs πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε αναγωγικές συνθήκες. Τα μονομερή του μορίου της IgM αποτελούνται από δυο βαριές αλυσίδες μοριακού βάρους 65KD η κάθε μία και δύο ελαφριές αλυσίδες 25KD η κάθε μία. Έτσι στο πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης αναμένουμε μία μπάντα στα 65KD που αντιπροσωπεύει τα μόρια των βαριών αλυσίδων του μορίου και μία μπάντα στα 25KD που αντιπροσωπεύει τα μόρια των ελαφριών αλυσίδων. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρατίθενται στην Εικόνα 35.



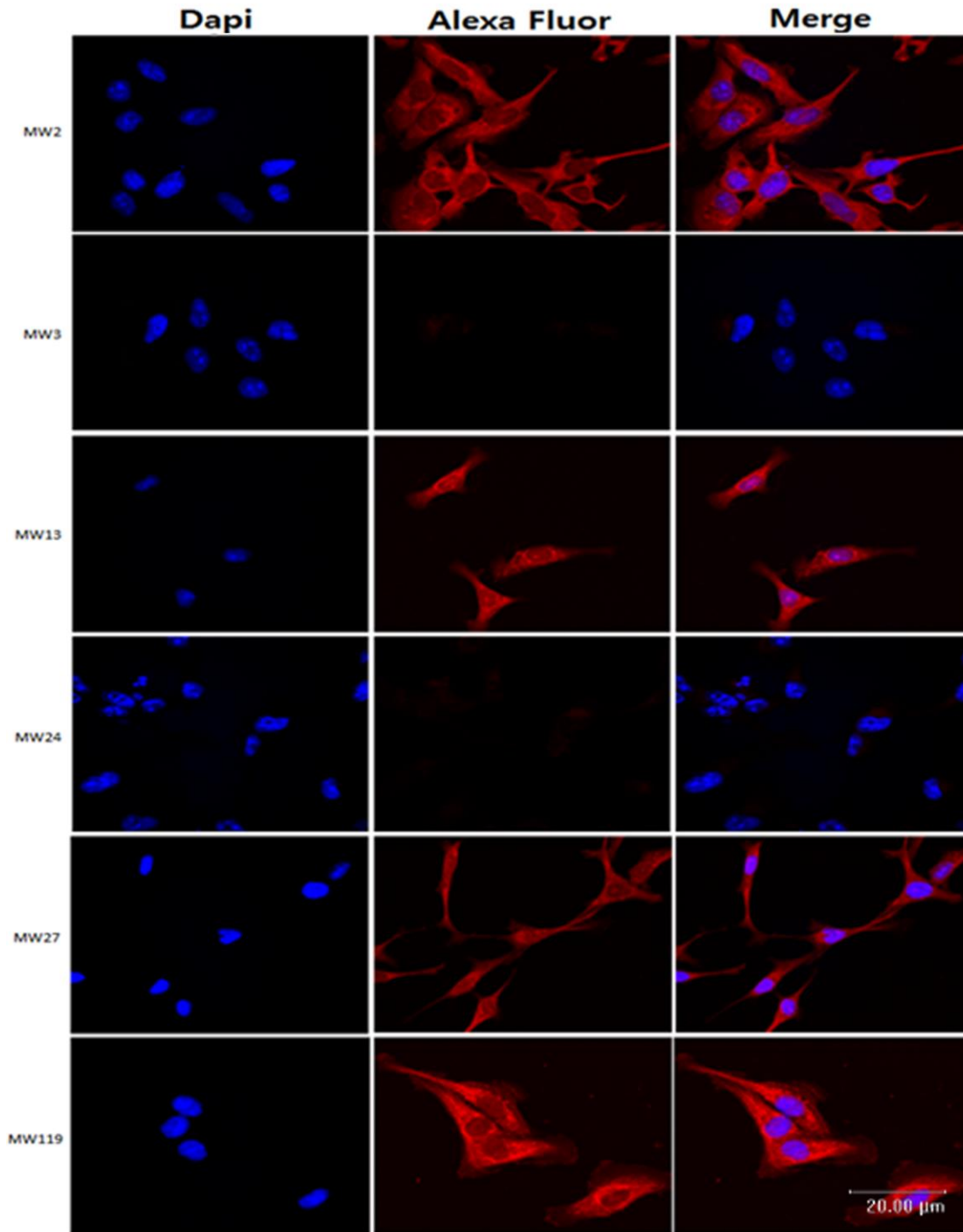
Εικόνα 35: SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (10%) για τα mIgMs.

2.2. Έλεγχος κυτταρικής διείσδυσης των mIgMs

Μετά τον καθαρισμό των mIgMs ελέγχθηκε η κυτταροδιεισδυτική τους ικανότητα. Τα κύτταρα της καλλιέργειας επωάσθηκαν με τα mIgMs για 2 ώρες στους 37°C με τελική συγκέντρωση 300μg/ml. Τα αποτελέσματα της κυτταροδιείσδυσης των mIgMs στις κυτταρικές σειρές HeLa και MDA-MB-231 παρατίθενται στην Εικόνα 36 και στην Εικόνα 37 αντίστοιχα. Στις εικόνες παρατηρείται έλλειψη διεισδυτικής ικανότητας των MW3 (μη πολυδραστικό) και MW24 (μονοδραστικό) και στις δύο κυτταρικές σειρές καθώς επίσης το MW2 υπέδειξε μειωμένη διεισδυτικότητα στην κυτταρική σειρά HeLa σε αντίθεση με την κυτταρική σειρά MDA-MB-231. Αντίθετα, τα MW13, MW27 και MW119 φάνηκε πως ήταν ικανά να διεισδύουν και στις δυο κυτταρικές σειρές και να εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, αλλά και στην περιπυρηνική περιοχή για τα MW13 και MW27.



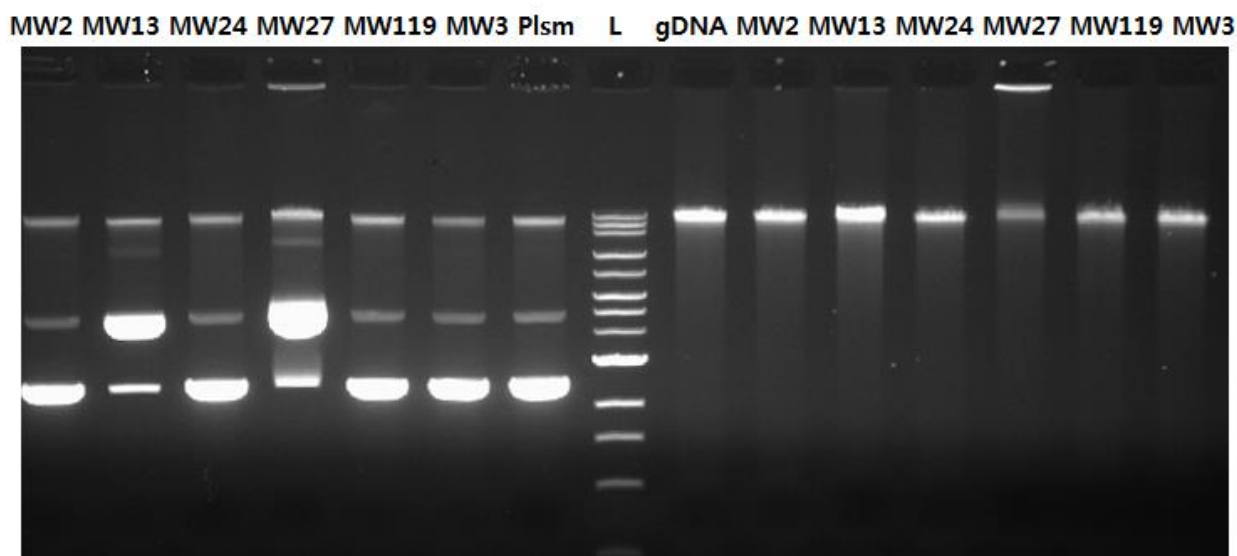
Εικόνα 36 : Δοκιμασία διεισδυσης των mIgMs σε κύτταρα HeLa. Κύτταρα HeLa επωάστηκαν για δύο ώρες, στους 37°C με τα mIgMs σε τελική συγκέντρωση 300μg/ml στο μέσο καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 100% αιθανόλη και έγινε σήμανση των mIgMs με δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα (Alexa Fluor 633/ human anti-IgM, κόκκινο χρώμα). Η πυρηνική χρώση έγινε με Dapi (μπλέ χρώμα). Παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP5. Φακός x63, κλίμακα 20μm. Οι μικρογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



Εικόνα 37: Δοκιμασία διεισδυσης των mIgMs σε κύτταρα MDA-MB-231. Κύτταρα MDA-MB-231 επώαστηκαν για δύο ώρες, στους 37⁰C, με τα mIgMs σε τελική συγκέντρωση 300μg/ml στο μέσο καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 100% αιθανόλη και έγινε σήμανση των mIgMs με δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα (Alexa Fluor 633/ human anti-IgM, κόκκινο χρώμα). Η πυρηνική χρώση έγινε με Dapi (μπλέ χρώμα). Παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP5. Φακός x63, κλίμακα 20μm. Οι μικρογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

2.3. Έλεγχος της υδρολυτικής ικανότητας των mIgMs

Εκτός των φυσικών IgG αντισωμάτων που πρωτοαναφέρθηκαν με καταλυτική ικανότητα (Abzs), έχει φανεί πως τα φυσικά Abzs ανήκουν σε όλες τις τάξεις των ανοσοσφαιρινών. Για το λόγο αυτό προβήκαμε στον έλεγχο της υδρολυτικής ικανότητας των mIgMs της μελέτης. Για τον έλεγχο αυτό, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pTriX 3,1 προερχόμενο από βακτηριακά στελέχη (TX3,1) και γονιδιωματικό DNA που απομονώθηκε από κύτταρα HeLa ως φυσικά υποστρώματα. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε αναλογία αντισώματος/ DNA 1:1 για 24 ώρες στους 37°C, σε διάλυμα αποστειρωμένου, διπλά απειοσιμένου νερού που περιείχε MgCl₂ τελικής συγκέντρωσης 5mM. Η αντίδραση διακόπηκε με τη προσθήκη θρυψίνης και τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Τα αποτελέσματα για τον έλεγχο της υδρόλυσης του πλασμιδιακού και του γονιδιωματικού DNA από τα mIgMs παρατίθενται στην **Εικόνα 38**.

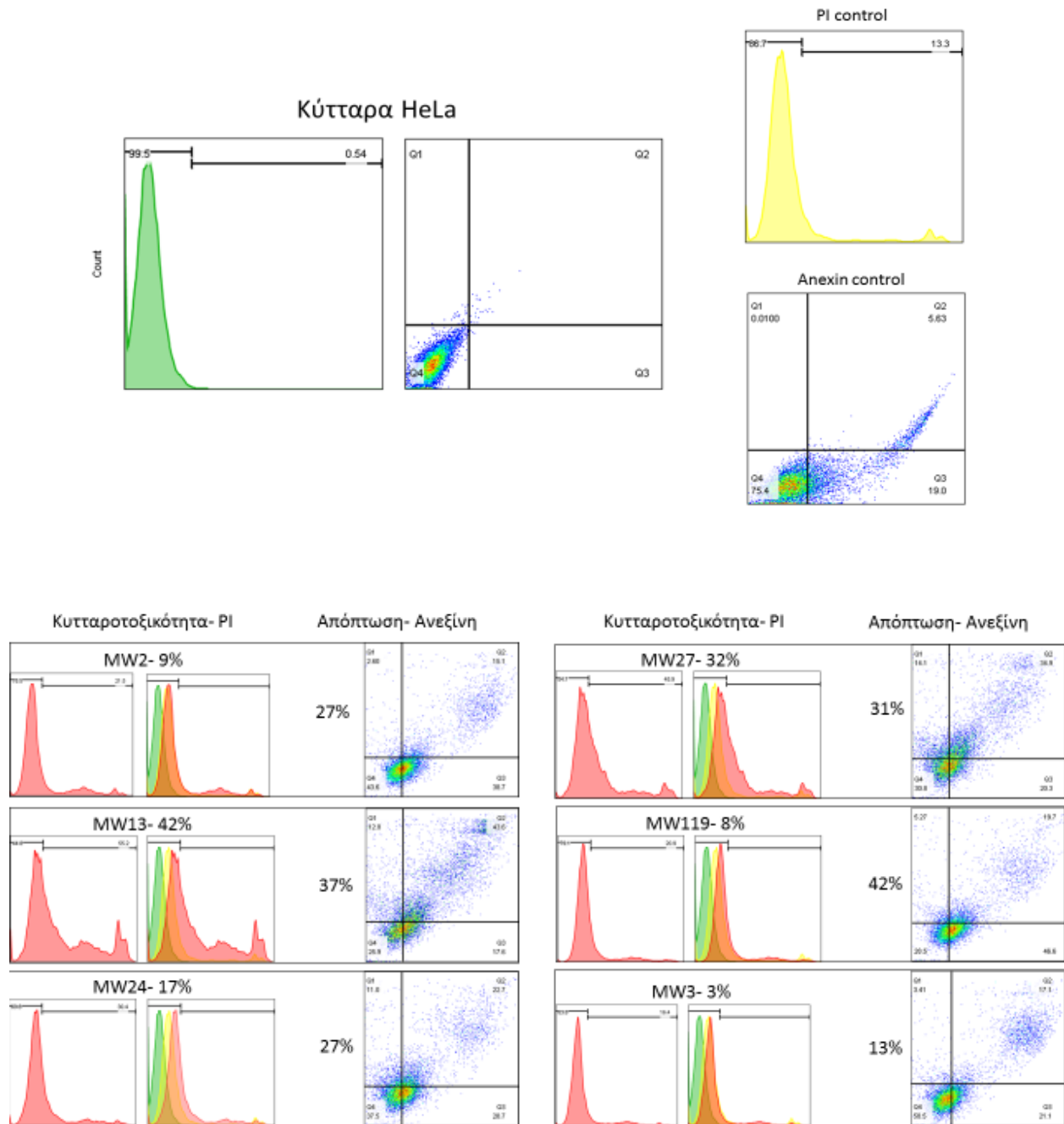


Εικόνα 38: Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού και γονιδιωματικού DNA μετά από 24 ώρες επώασης με τα mIgMs. Ως διαλύτης της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο, διπλά απειοσιμένο νερό με προσθήκη MgCl₂ τελικής συγκέντρωσης 5mM στο διάλυμα. Οι αντιδράσεις τερματίστηκαν με προσθήκη θρυψίνης και η ανάλυση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

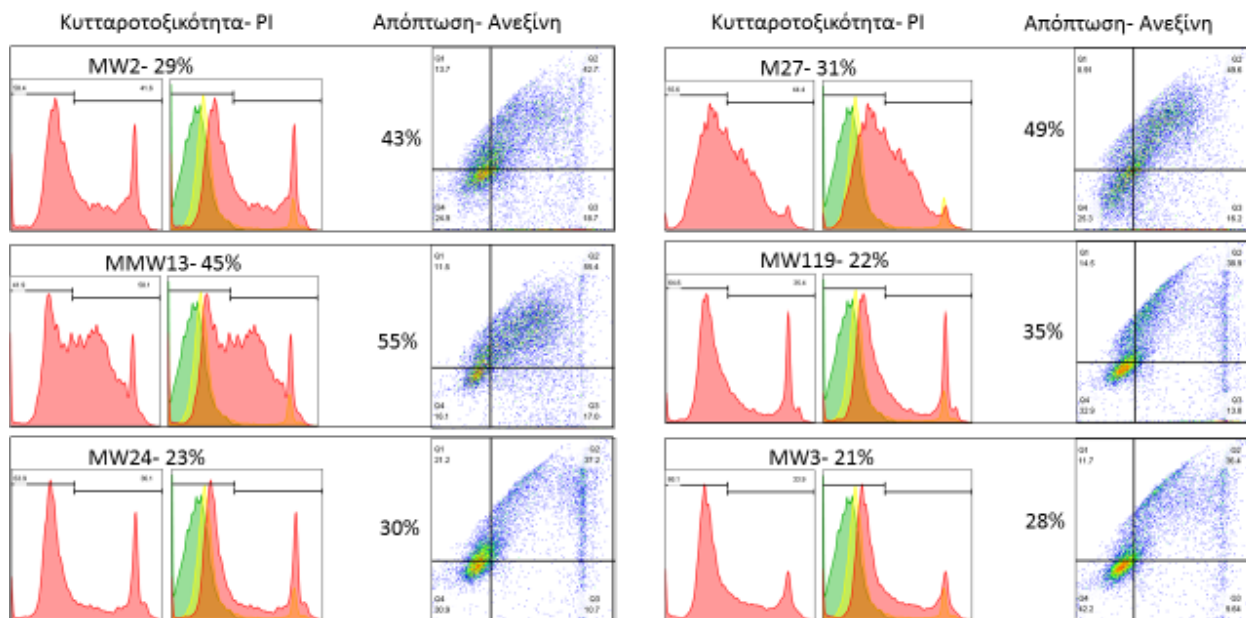
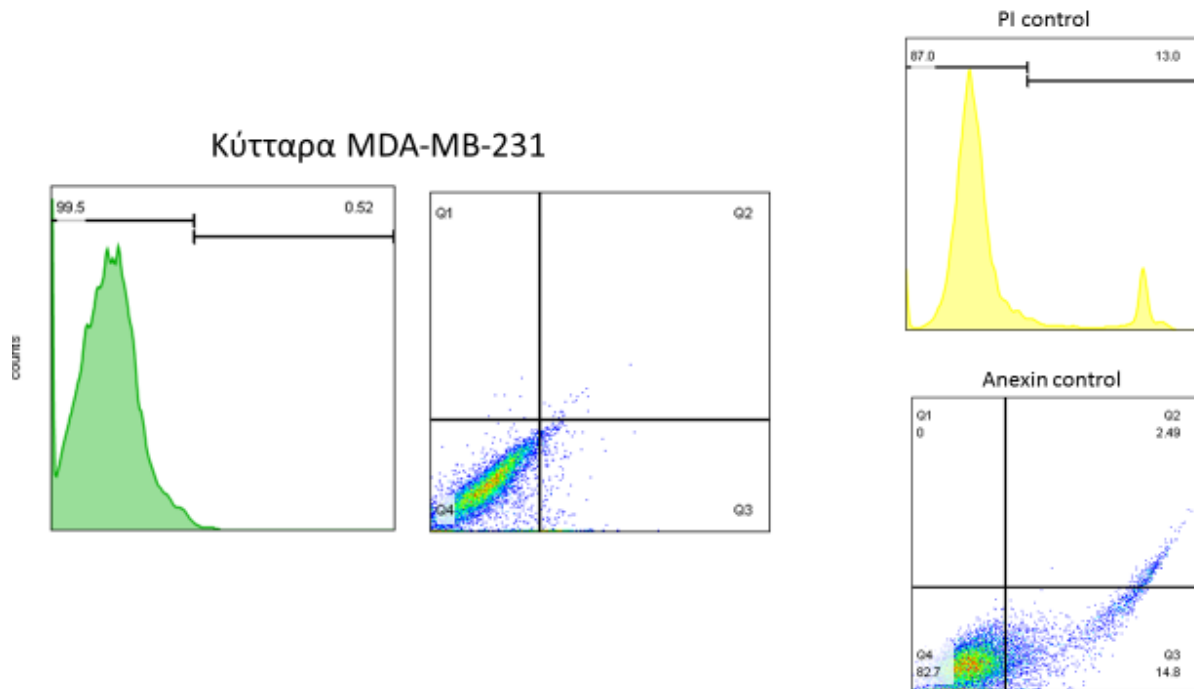
2.4. Έλεγχος επαγωγής της απόπτωσης και κυτταροτοξικότητας από τα mIgMs

Ο έλεγχος της ικανότητας των mIgMs να επάγουν τους αποπτωτικούς μηχανισμούς ή την κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα της καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκε με την επώαση των κυττάρων για 48 ώρες με τα υπό μελέτη mAbs σε τελική συγκέντρωση 300μg/ml στο θρεπτικό μέσο. Με το πέρας της επώασης, έγινε χρώση των κυττάρων με ανεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο και η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα των τιμών για κάθε δείγμα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα flowjo V10. Οι τιμές για κάθε δείγμα είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε $\alpha=5$ ($p<0.05$).

Τα αποτελέσματα του ελέγχου για την επαγωγή της απόπτωσης και κυτταροτοξικότητας των miGMs έναντι των καρκινικών σειρών καλλιέργειας παρατίθενται στην **Εικόνα 39** για την κυτταρική σειρά HeLa και στην **Εικόνα 40** για την κυτταρική σειρά MDA-MB-231.



Εικόνα 39: Αποτελέσματα της ανάλυσης για την επίδραση των miGMs στα κύτταρα HeLa. Στο επάνω αριστερά μέρος της εικόνας διακρίνεται ο φυσικός πληθυσμός των κυττάρων HeLa, όπως αυτά απεικονίζονται στο ιστογράμμο (PI) και στο σταυρόνημα (Ανεξίνη), ενώ στο επάνω δεξιά μέρος της εικόνας απεικονίζονται οι αρνητικοί μάρτυρες των χρώσεων της πειραματικής διαδικασίας (PI control και Anexin control). Τα ποσοστά κυτταροτοξικότητας και της απόπτωσης προκύπτουν μετά από αφαίρεση της αντίστοιχης χρώσης-control από την τιμή της μέτρησης για κάθε δείγμα. Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα flowjo V10. Οι τιμές για κάθε δείγμα είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων ($p < 0.05$).



Εικόνα 40: Αποτελέσματα της ανάλυσης για την επίδραση των miGMs στα κύτταρα MDA-MB-231.

Στο επάνω αριστερά μέρος της εικόνας διακρίνεται ο φυσικός πληθυσμός των κυττάρων MDA-MB-231, όπως αυτά απεικονίζονται στο ιστόγραμμα (PI) και στο σταυρόνημα (Ανεξίνη), ενώ στο επάνω δεξιά μέρος της εικόνας απεικονίζονται οι αρνητικοί μάρτυρες των χρώσεων της πειραματικής διαδικασίας (PI control και Anexin control). Τα ποσοστά κυτταροτοξικότητας και της απόπτωσης προκύπτουν μετά από αφαίρεση της αντίστοιχης χρώσης-control από την τιμή της μέτρησης για κάθε δείγμα. Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα flowjo V10. Οι τιμές για κάθε δείγμα είναι αντιπροσωπευτικές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων ($p < 0.05$).

3. Συνοψίζοντας τις ιδιότητες των mAbs της μελέτης

➤ mIgGs

mIgG	Τύπος ελαφριάς αλυσίδας	Ισοηλεκτρικό σημείο	Πολυδραστικότητα	Ενεργο-εξαρτώμενοι μηχανισμοί	Ενεργο-ανεξάρτητοι μηχανισμοί
MM49	κ	9.5	Ναι	Ναι	Ναι
MM104	λ	9.0	Ναι	Ναι	Όχι
MM111	κ	8.5	Ναι	Ναι	Όχι
MM167	κ	7.3	Ναι	Ναι	Ναι
MM175	λ	8.45	Ναι	Ναι	Ναι
MM72 (control)	λ	7.0	Όχι	Δεν διεισδύει	Δεν διεισδύει

mIgG	Επίδραση στο πλασμιδιακό DNA (37 °C)	Επίδραση στο γονιδιωματικό DNA (37 °C)	Επαγωγή Κυτταροτοξικότητας		Επαγωγή απόπτωσης	
			HeLa	MDA-MB-231	HeLa	MDA-MB-231
MM49	Εμφανή	Καμία	5%	4%	12%	36%
MM104	Εμφανή	Καμία	10%	3%	13%	30%
MM111	Μέτρια	Καμία	6%	2%	8%	18%
MM167	Μέτρια	Μέτρια	18%	12%	35%	47%
MM175	Εμφανή	Καμία	13%	5%	22%	35%
MM72 (control)	Καμία	Καμία	3%	1%	1%	3%

➤ mIgMs

mIgM	Τύπος ελαφριάς αλυσίδας	Πολύ-δραστικότητα	Επίδραση στο πλασμιδιακό DNA (37 °C)	Επίδραση στο γονιδιωματικό DNA (37 °C)	Επαγωγή Κυτταροτοξικότητας		Επαγωγή απόπτωσης	
					HeLa	MDA-MB-231	HeLa	MDA-MB-231
MW2	λ	Ναι	Καμία	Καμία	9%	29%	27%	43%
MW13	κ	Ναι	Εμφανή	Καμία	42%	45%	37%	55%
MW24	κ	Όχι	Καμία	Καμία	17%	23%	27%	30%
MW27	κ	Ναι	Εμφανή	Μέτρια	32%	31%	31%	49%
MW119	λ	Ναι	Καμία	Καμία	8%	22%	42%	35%
MW3 (control)	κ	Όχι	Καμία	Καμία	3%	21%	13%	28%

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως έγινε αντιληπτό και από τη θεωρία στην ΕΙΣΑΓΩΓΗ της παρούσας εργασίας, τα φυσικά αντισώματα (NAbs) επιτελούν έναν πολυδιάστατο βιολογικό ρόλο *in vivo*, με κύρια λειτουργία την ανοσορύθμιση και τη διατήρηση της ομοιόστασης [42]. Η γνώση για τις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των NAbs προήλθε κυρίως από τη μελέτη τους σε μονοκλωνικό επίπεδο, η οποία και ανέδειξε την ιδιαιτερότητα αυτών των αντισωμάτων. Καθώς προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου είχαν εστιαστεί στον χαρακτηρισμό μονοκλωνικών NAbs που παρασκευάστηκαν στον ποντικό αλλά και πολυκλωνικών NAbs από τον άνθρωπο (εμπορικό παρασκεύασμα ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης/IVIg), ως προς την ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα, η μελέτη των ανθρώπινων μονοκλωνικών NAbs στην παρούσα εργασία αποτελεί ένα καινούριο και πολύ σημαντικό ερευνητικό κεφάλαιο του εργαστηρίου, αφού έχει ως απώτερο στόχο την αξιοποίησή τους στη θεραπεία.

Στην παρούσα μελέτη, στραφήκαμε στην απομόνωση και στον χαρακτηρισμό πέντε ανθρώπινων μονοκλωνικών IgG (mIgGs) και πέντε ανθρώπινων μονοκλωνικών IgM (mIgMs) αντισωμάτων που φέρουν χαρακτηριστικά όμοια με αυτά των NAbs και προήλθαν από ορούς ασθενών με πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες (PCDs). Το κύριο κοινό χαρακτηριστικό των μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών (mIgs) που απομονώθηκαν είναι η πολυδραστικότητα, η οποία, αποτελεί και ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία διαφοροποίησης των NAbs σε σχέση με τα επαγόμενα μονοκλωνικά αντισώματα. Μέρος των μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών που απομονώθηκαν, φάνηκε πως έχουν την ικανότητα να διεισδύουν σε ζώντα καρκινικά κύτταρα ασκώντας ενδοκυττάρια βιολογική δράση, γεγονός που διεγείρει το ερευνητικό μας ενδιαφέρον για την περαιτέρω μελέτη και αξιοποίησή τους στη θεραπεία ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Επιπλέον, ως αρνητικοί μάρτυρες των πειραμάτων απομονώθηκαν μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες από τους ορούς των ασθενών οι οποίες δεν υπέδειξαν πολυδραστικότητα στις δοκιμασίες ELISA κατά την διαλογή τους.

Οι χαμηλοί τίτλοι των συγκεντρώσεων των NAbs στην κυκλοφορία, είναι ένα γεγονός το οποίο δυσχεραίνει την έρευνα σε μονοκλωνικό επίπεδο. Καθώς οι τεχνικές υβριδοποίησης ανθρώπινων B κυττάρων ύστερα από αθανάτοποίηση μέσω του ιού Epstein bar όπως και η αναζήτηση αντισωμάτων από βιβλιοθήκες φάγων απαιτούν υψηλό κόστος αλλά και χρόνο για την υλοποίηση και τη διεξαγωγή των ερευνητικών ενδιαφερόντων της διατριβής αυτής, θελήσαμε αρχικά να απομονώσουμε και να εξετάσουμε φυσικά μονοκλωνικά αντισώματα από ορούς ασθενών με PCDs. Βιβλιογραφικές μελέτες, καθώς και προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, έχουν τεκμηριώσει την υψηλή συχνότητα mIgs που φέρουν χαρακτηριστικά όμοια με τα NAbs στους ορούς ασθενών με PCDs [18-20, 241-254]. Οι PCDs αποτελούν ένα ευρύ φάσμα αιματολογικών παθήσεων που χαρακτηρίζονται από τον κλωνικό πολλαπλασιασμό και τη συσσώρευση κυττάρων που παράγουν mIgs (ολόκληρες ή τμήματα αυτών). Οι μηχανισμοί παθογένεσης των PCDs παραμένουν ως επί το πλείστο αδιευκρίνιστοι, ωστόσο φαίνεται πως σε πολλές περιπτώσεις, οι mIgs που παράγονται από τους υπερπλαστικούς B κλώνους, είναι φυσιολογικές κατέχοντας αντισωματικές ειδικότητες, υποδεικνύοντας έναν πολύπλοκο μηχανισμό παθογένεσης, κατά τον οποίο δεν διαταράσσεται αναγκαία η λειτουργικότητά τους [255, 256]. Το γεγονός πως η επιλογή του B κλώνου που επικρατεί κατά την εξέλιξη των PCDs, είναι τυχαία, αποτελεί ισχυρή ένδειξη, πως κάποιος από αυτούς τους κλώνους πιθανά να αποτελούν κλώνους που παράγουν NAbs. Η απομόνωση των mAbs της μελέτης έγινε από ορούς ασθενών με Πολλαπλούν Μυέλωμα (ΠΜ), για την διερεύνηση φυσικών μονοκλωνικών αντισωμάτων τάξης G, και ασθενών με Μακροσφαιριναιμία Waldenström (MW), για τη διερεύνηση φυσικών μονοκλωνικών αντισωμάτων τάξης M [18].

Στις PCDs, συχνά οι mIgs, γνωστές και ως παραπρωτεΐνες, είναι ειδικές έναντι συγκεκριμένων ικών, ή βακτηριδιακών αντιγόνων, ή αποτελούν αυτό-αντισώματα ή πολυδραστικά αυτοαντισώματα [241-245]. Σε μία πληθώρα μελετών, αντισώματα των τάξεων G και M έχουν ανευρεθεί στον ορό ασθενών με

ΠΜ και MW, αντίστοιχα και εμφάνιζαν πολυδραστικότητα με διακριτές δραστηριότητες έναντι ξένων και αυτόλογων αντιγόνων. Για παράδειγμα, μονοκλωνικά αντισώματα τάξης G έχουν βρεθεί έναντι ενδογενών αντιγόνων, όπως αυτά του κυτταροσκελετού [18-20], πυρηνικών αντιγόνων όπως το ssDNA [247], των ιστονών [248] αντιγόνων της κυκλοφορίας όπως η μακροσφαιρίνη α2 [249] και η γλυκοπρωτεΐνη IIIa (GPIIIa) [250], οργανοειδικών αντιγόνων όπως η θυροσφαιρίνη [251] και ο υποδοχέας της ακετυλοχολίνης [252], καθώς και έναντι εξωγενών αντιγόνων [248]. Τέλος, μελέτες έχουν αναφέρει πως απομονωμένες μονοκλωνικές IgM από ορούς ασθενών με MW αναγνωρίζουν με μεγάλη συχνότητα συντηρημένα αυτοαντιγόνα [18-20, 253, 254]. Μια ενδιαφέρουσα μελέτη μεγάλης κλίμακας για την ανεύρεση μονοκλωνικών αντισωμάτων ικανών να προάγουν επαναμυελίνωση εξετάστηκαν 140.000 οροί ασθενών με PCDs, από την βιβλιοθήκη περιστατικών της Mayo Clinic, όπου βρέθηκαν δύο φυσικά IgM αντισώματα ικανά να προάγουν επαναμυελίνωση [257]. Οι παραπάνω μελέτες τεκμηριώνουν την αντίληψη πως οι οροί των ασθενών με PCDs αποτελούν μια αξιόλογη πηγή φυσικών αντισωμάτων και προσφέρουν τη δυνατότητα της ανεύρεσης μεταξύ αυτών, mAbs με διακριτές ειδικότητες.

➤ Απομόνωση των mAbs

Οι μελέτες του εργαστηρίου στηρίζονται στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που εμφανίζουν τα NAbs και κυρίως στην πολυδραστικότητα, η οποία αποτελεί και το μέσο διαφοροποίησης και διαλογής των υποψήφιων προς μελέτη μονοκλωνικών αντισωμάτων. Με τη χρήση της τεχνικής ELISA στήθηκε μια μέθοδος διαλογής, για την επιλογή των ορών που εμφάνιζαν πολυδραστικό χαρακτήρα, με βάση τη βιβλιογραφική γνώση καθώς και δημοσιεύσεις του εργαστηρίου [258]. Η μέθοδος στηρίζεται στην δραστηριότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων των ορών, έναντι μιας σειράς από αντιγόνα που αποτελείται από συντηρημένα αυτοαντιγόνα, καθώς και από το εξωγενές αντιγόνο Τρινιτροφαινόλη (TNP), ένα μόριο που ανήκει στην ομάδα των απτενίων τα οποία βιβλιογραφικά χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των NAbs [259]. Τα mAbs που επιλέχθηκαν, εμφανίζουν ένα διακριτό προφίλ αντιγονικής εξειδίκευσης και οι μεταξύ τους αποκλίσεις ως προς αυτήν, προσδίδει μια ποικιλομορφία των χαρακτηριστικών τους, υπό το κοινό πρίσμα της πολυδραστικότητας που τα χαρακτηρίζει.

Η απομόνωση των mIgGs έγινε με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας με την πρωτεΐνη G, μια βακτηριακή πρωτεΐνη με υψηλή συγγένεια σύνδεσης για τις ανθρώπινες υποτάξεις των ανοσοσφαιρινών G, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τον καθαρισμό ανθρώπινων IgG αντισωμάτων από διαλύματα [260, 261]. Ο έλεγχος για την καθαρότητα των απομονωμένων mIgGs έγινε με την τεχνική SDS-PAGE όπου επιβεβαιώθηκε η αρτιότητα του μεγέθους των πρωτεϊνικών μορίων, η οποία συνάδει με αυτή των ανοσοσφαιρινών τάξης G [262]. Τέλος, με την τεχνική της ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF) επιβεβαιώθηκε η μονοκλωνικότητα των καθαρισμένων mAbs [263]. Με αυτά τα δεδομένα, φαίνεται πως τα πρωτεϊνικά μόρια που απομονώθηκαν από τους ορούς των ασθενών με ΠΜ αποτελούν ανοσοσφαιρινικά μονοκλωνικά μόρια τάξης G.

Εκτός από την ταυτοποίηση της αρτιότητας των mIgGs και την επιβεβαίωση της μονοκλωνικότητάς τους, αναγκαίος υπήρξε και ο έλεγχος της αντισωματικής τους ενεργότητας για την επιβεβαίωση της λειτουργικότητάς τους ύστερα από τον καθαρισμό τους από τα διαλύματα των ορών. Έτσι με τη χρήση της τεχνικής ELISA εξετάστηκε η αντισωματική ενεργότητα των καθαρισμένων mIgGs, τα οποία υπέδειξαν αντισωματικές δραστηριότητες έναντι των αντιγόνων της μελέτης. Επιπλέον, με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού και τη χρήση συνεστιακού μικροσκόπιου, φάνηκε η αυτοδραστικότητα των mIgGs έναντι ενδοκυττάρων αντιγονικών στόχων σε μονιμοποιημένα κύτταρα MDA-MB-231.

Όπως έχει αναφερθεί και στη θεωρία, οι οροί των ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων μονοκλωνικής IgM και η μονοκλωνικότητα των δειγμάτων είχε προσδιοριστεί από τις κλινικές αναλύσεις του νοσοκομείου. Ο καθαρισμός των mIgMs από τα δείγματα των ορών που επιλέχθηκαν, πραγματοποιήθηκε με κατακρήμνιση του μορίου της IgM σε διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος [264]. Ο έλεγχος της καθαρότητας των απομονωμένων mIgMs πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE η οποία επιβεβαίωσε την αριότητα του μεγέθους των πρωτεϊνικών μορίων, η οποία συνάδει με το μέγεθος των ανοσοσφαιρινών τάξης M [262, 263].

Συμπερασματικά, φαίνεται πως όλα τα mAbs της μελέτης είναι πολυδραστικά, σε αντίθεση με τους αρνητικούς μάρτυρες, υποδεικνύοντας ένα διακριτό προφίλ ανοσοχημικών χαρακτηριστικών. Θεωρείται πως η ποικιλομορφία των χαρακτηριστικών των NAbS αντανακλά και την ποικιλομορφία της βιολογικής τους δράσης, γεγονός το οποίο συμβάλλει στις πολυδιάστατες ιδιότητές τους στον οργανισμό [10]. Επιπλέον, φαίνεται πως οι εξειδικευμένες βιολογικές δράσεις των NAbS σχετίζονται άμεσα με την πολυδραστικότητα που εμφανίζουν [88]. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η επίδραση της βιολογικής δράσης των mAbs, έναντι δύο γνωστώνκαρκινικών σειρών (HeLa, MDA-MB-231), αρχικά ως προς την ικανότητα της κυτταρικής τους διείσδυσης και στη συνέχεια μέσω του ελέγχου της επαγωγής της απόπτωσης και κυτταροτοξικότητας σε αυτά.

➤ **Κυτταροδιεισδυτική ικανότητα**

Μέχρι στιγμής, CPAbs που έχουν μελετηθεί στο εργαστήριο, ανήκουν στην τάξη G των ανοσοσφαιρινών, ενώ η ύπαρξη κυτταροδιεισδυτικών ανοσοσφαιρινών τάξης M δεν έχει ποτέ μελετηθεί σε διεθνές επίπεδο. Ο έλεγχος για την διεισδυτική ικανότητα των mAbs της μελέτης πραγματοποιήθηκε με την χρήση της τεχνικής του ανοσοφθορισμού και με βάση ένα πειραματικό πρωτόκολλο που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο. Το πρωτόκολλο αυτό αποτελεί μια παραλλαγή της τεχνικής του έμμεσου ανοσοφθορισμού κατά το οποίο πριν την μονιμοποίηση των κυττάρων, προηγείται επώαση των κυττάρων με τα mAbs στο καλλιεργητικό μέσο.

Βιβλιογραφικά, η μεταφορά των αντισωμάτων στο εσωτερικό ζώντων κυττάρων έχει επιτευχθεί μέσω διαφόρων προσεγγίσεων όπως με μικροέγχυση, με ηλεκτροδιάτρηση, μέσω της ομοιοπολικής σύνδεσης των αντισωμάτων με πεπτίδια που φέρουν ικανότητα διείσδυσης (Cell Penetrating Peptides-CPPs) ή μέσω μοριακής τροποποίησης μη διεισδυτικών αντισωμάτων [265]. Μελέτες που εξετάζουν τον τρόπο διείσδυσης κυτταροδιεισδυτικών μορίων όπως τα CPPs, και της ενδοκυττάριας στόχευσης μοριακών στόχων, έχουν αναφερθεί σε πολλαπλούς μηχανισμούς διείσδυσης, οι οποίοι είναι είτε ανεξάρτητοι είτε εξαρτώμενοι της ενέργειας. Για τον διαχωρισμό των δύο μηχανισμών πραγματοποιείται η μελέτη της διείσδυσης στους 4°C, όπου οι ενεργοβόρες διεργασίες των κυττάρων μειώνονται στο ελάχιστο [266]. Στη παρούσα μελέτη με βάση τη βιβλιογραφική γνώση αλλά και την ήδη τεκμηριωμένη γνώση του εργαστηρίου προχωρήσαμε στον έλεγχο της κυτταρικής διείσδυσης των mIgGs στους 37°C και 4°C. Από τα αποτελέσματά μας, φάνηκε πως δύο από τα πέντε mIgGs της μελέτης έχουν την ικανότητα να διεισδύουν σε ζώντα καρκινικά κύτταρα στους 4°C, υποδεικνύοντας έναν ενεργο- ανεξάρτητο μηχανισμό διείσδυσης. Επιπλέον και τα πέντε mIgGs είχαν την ικανότητα να διεισδύουν σε ζώντα καρκινικά κύτταρα στους 37°C, υποδεικνύοντας ένα διακριτό προφίλ κυτταροδιείσδυσης. Η έκφραση του υποδοχέα FcγR της πλασματικής μεμβράνης, είναι γνωστό βιβλιογραφικά ότι εμπλέκεται στις διαδικασίες ενδοκυττάρωσης των IgGs [151]. Για το λόγο αυτό, οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο του μηχανισμού της κυτταροδιείσδυσης των mIgGs είτε εξέφραζαν τον υποδοχέα FcγR στην επιφάνειά τους (MDA-MB-231/ FcγR+) είτε αυτός δεν εκφραζόταν (HeLa/ FcγR-). Τα αποτελέσματα των ελέγχων έδειξαν πως οι mIgGs είχαν την δυνατότητα να εισέρχονται σε ζώντα

καρκινικά κύτταρα ανεξάρτητα της έκφρασης του υποδοχέα FcγR και να εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Η διείσδυση των αντισωμάτων φάνηκε να πραγματοποιείται σε μεγάλο ποσοστό των κυττάρων που επώαστηκαν με κάθε δείγμα (~80%). Το γεγονός πως τα mIgG-CPAbs που απομονώσαμε εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, συνάδει με τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό αντίστοιχων φυσικών μονοκλωνικών αντισωμάτων από υγιή ποντίκια BALB/c, αλλά και με ανθρώπινα πολυκλωνικά αντισώματα στην ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη (IVIg) που έχουν μελετηθεί στο εργαστήριο [267]. Είναι πολύ πιθανό, πως ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των CPAbs, αντανακλά και τη βιολογική τους δραστηριότητα. Παράλληλα τα αντισώματα που διεισδύουν μέσω ενεργο- εξαρτώμενων μηχανισμών, στους οποίους εμπλέκονται οι διαδικασίες κλασικής ενδοκυττάρωσης, πρέπει να φέρουν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά για να εξέλθουν από τα ενδοσώματα πριν την σύντηξή τους με τα λυσοσώματα και την αποικοδόμησή τους. Ωστόσο, η μελέτη για τον τρόπο διαφυγής από τα ενδοσώματα αυτών των CPAbs αποτελεί ένα ξεχωριστό και ολοένα αναδυόμενο πεδίο μελέτης για την ενδοκυττάρια στόχευση [268].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην παρούσα μελέτη, αποτελεί το προκαταρκτικό εύρημα της κυτταροδιεισδυτικής ικανότητας των mIgMs στους 37°C. Τρία από τα πέντε mIgMs της μελέτης υπέδειξαν ένα διακριτό προφίλ κυτταροδιείσδυσης στα καρκινικά κύτταρα HeLa και MDA-MB-231. Τα mIgMs αυτά, εντοπίζονταν κυρίως στο κυτταρόπλασμα μετά την διείσδυση ενώ, δύο από αυτά, τα οποία αναγνώριζαν το DNA στην ELISA διαλογής, εντοπίζονταν κοντά στην πυρηνική περιοχή (πυρηνίσκος). Η εξακρίβωση και η μελέτη των μηχανισμών της διείσδυσης των mIgMs, καθώς και του περιπυρηνικού τους εντοπισμού, αποτελεί μια δελεαστική συνέχεια της μελέτης αυτής.

➤ Επαγωγή της απόπτωσης και κυτταροτοξικότητας

Από τη βιβλιογραφία αλλά και από μελέτες του εργαστηρίου, έχει φανεί πως η κυτταροδιείσδυση των CPAbs οδηγεί συχνά στην επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων στα οποία αυτά διεισδύουν [195]. Επιπλέον, *in vivo*, η πολυδραστικότητα των NAbS φαίνεται να διασφαλίζει και να οδηγεί στην επιλεκτική εξάλειψη των εξαλλαγμένων κυττάρων κυρίως μέσω κυτταροτοξικότητας μεσολαβούμενης από IgM-NAbS αλλά και μέσω της επαγωγής των αποπτωτικών μηχανισμών [228]. Η διπλή χρώση των κυττάρων με ανεξίτη και ιωδιούχο προπίδιο είναι μία μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τον έλεγχο της επίδρασης τοξικών παραγόντων *in vitro* σε ζώντα κύτταρα [269, 270]. Η ανεξίτη αποτελεί έναν δείκτη για την επαγωγή της απόπτωσης ενώ το ιωδιούχο προπίδιο χρησιμοποιείται ως δείκτης κυτταροτοξικότητας [271, 272]. Η ανάλυση των πειραματικών μας δεδομένων, υπέδειξε έναν σαφή διαχωρισμό της δράσης των mIgGs σε σχέση με τα mIgMs. Πιο συγκεκριμένα, φάνηκε πως η βιολογική δράση των mIgGs αντανακλά κυρίως στην ενεργοποίηση των αποπτωτικών μηχανισμών των καρκινικών κυττάρων, ενώ η δράση των mIgMs υπέδειξε υψηλά ποσοστά πρόκλησης κυτταροτοξικότητας στα καρκινικά κύτταρα. Διαφορές επίσης, υπήρξαν μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών της μελέτης. Τα κύτταρα MDA-MB-231 φάνηκαν, συνολικά, πιο ευαίσθητα στη δράση των αντισωμάτων τόσο στα επίπεδα κυτταροτοξικότητας όσο και της απόπτωσης. Η διαφορά της ιστικής προέλευσης των δύο καρκινικών σειρών σε συνδυασμό με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κάθε κυτταρικού τύπου, φαίνεται πως επηρεάζουν τον βιολογικό αντίκτυπο της δράσης των αντισωμάτων. Φαίνεται δηλαδή πως η βιολογική δράση των αντισωμάτων διαμορφώνεται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο γεγονός το οποίο έχει τεκμηριωθεί σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου [267].

➤ Υδρολυτική ικανότητα

Η ενζυμική δράση των αντισωμάτων πρωτοαναφέρθηκε από τον Pauling το 1940 και η θεωρία του επιβεβαιώθηκε μετά από κάποια χρόνια (1986), ύστερα από την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό αντισωμάτων που φέραν στις μεταβλητές τους περιοχές δομές που προσομοίαζαν το ενεργό κέντρο των ενζύμων [273]. Τα αντισώματα αυτά ονομάστηκαν Abzymes (Abzs) και ήταν ικανά να καταλύουν θερμοδυναμικά ή κινητικά αντιδράσεις τις οποίες αδυνατούν να καταλύσουν φυσικά ένζυμα ή οι μέχρι σήμερα διαθέσιμες χημικές μέθοδοι [274-279]. Έκτοτε και μέχρι σήμερα, υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην παραγωγή Abzs με καινοτόμες ιδιότητες [280]. Τα Abzs που ανήκουν στον υποπληθισμό των NAbS εμφανίζουν συχνά μία πολυειδική ενζυματική δράση και ως υποστρώματα χρησιμοποιούνται διάφορα πεπτίδια μικρού μοριακού βάρους καθώς και νουκλεϊκά οξέα. Το πρώτο παράδειγμα φυσικού Abz, ήταν της τάξης G, το οποίο ανευρέθηκε σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα και παρουσίαζε δραστικότητα υδρολάσης, υδρολύοντας το αγγειοενεργό εντερικό πεπτίδιο (VIP) [281]. Ακολούθως, αναφέρθηκαν φυσικά IgG Abzs με ενεργότητα DNάσης και με δράση RNάσης σε ασθενείς με ΣΕΛ [282, 283]. Έκτοτε, έχουν χαρακτηριστεί και αντισώματα σε ορούς ασθενών με PCDs που φέρουν ενζυμικές δραστικότητες έναντι της προθρομβίνης, των ιστονών κ.α [284-286]. Πρωτεολυτικά αντισώματα ειδικά για θυρεοσφαιρίνη και τον παράγοντα VIII (FVIII) έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto (HT) και αιμοφιλία A, αντίστοιχα [287, 288]. Επίσης, αντισώματα IgM ή/και IgG που υδρολύουν το DNA και το RNA έχουν απομονωθεί από τον ορό ασθενών με ιογενείς ασθένειες (ιογενή Ηπατίτιδα και AIDS), λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα [289] αλλά και από διάφορα συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο ΣΕΛ, η Σκληροδερμία, η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα και η Σκλήρυνση κατά Πλάκας [290, 291].

Πλέον είναι γνωστό πως καταλυτικά αντισώματα διαφορετικών ισotypών (IgM, IgG & IgA), ανιχνεύονται στην κυκλοφορία υγιών ατόμων [292]. Πολυκλωνικά αντισώματα τάξης M από υγιείς ανθρώπους και φυσιολογικά ποντίκια και σε μικρότερο βαθμό G, δείχνουν καταλυτική δράση έναντι τόσο νουκλεϊκών οξέων, όσο και πρωτεϊνών [293]. Τα φυσικά αντι-DNA Abzs δεν διαθέτουν, γενικώς, ειδικότητα ως προς την αλληλουχίας δέσμευσης τους στο μόριο του DNA [294-296]. Φαίνεται επίσης, πως υπάρχουν διαφορές στις κινητικές των αντιδράσεων ανάμεσα σε αυτά τα Abzs [296], ενώ, η βιοχημική και δομική βάση της υδρόλυσης του DNA ή/και του RNA δεν είναι ξεκάθαρη. Ωστόσο, έχει αναφερθεί πως τα περισσότερα Abzs με δράση DNάσης διαθέτουν πολλά κατιονικά αμινοξέα, όπως Arg και Lys, στις περιοχές CDR της βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας τους και ιδιαίτερα στην V_H-CDR3 [297].

Στην παρούσα μελέτη προβήκαμε στον έλεγχο της υδρολυτικής δράσης των απομονωμένων αντισωμάτων της μελέτης μας. Ως υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν γονιδιωματικό DNA απομονωμένο από κύτταρα HeLa και πλασμιδιακό DNA προερχόμενο από βακτηριακά στελέχη. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας υποδεικνύουν την έλλειψη υδρολυτικής ικανότητας των εν προκειμένω αντισωμάτων έναντι των νουκλεϊκών υποστρωμάτων DNA. Ωστόσο, κάποια από τα αντισώματα της μελέτης μας, υπέδειξαν μια επίδραση μεταξύ των ισομορφών του πλασμιδιακού DNA. Φυσιολογικά, το πλασμιδιακό DNA συνυπάρχει σε τρεις ισομορφές, της υπερελικωμένης, της χαλαρής και της γραμμικής ισομορφής. Από τα αποτελέσματά φάνηκε μια σαφή επίδραση των mAbs στην υπερελικωμένη και στη χαλαρή ισομορφή του πλασμιδιακού DNA ενώ η γραμμική ισομορφή φάνηκε πως δεν επηρεάζεται, γεγονός που υποδεικνύει την αλληλεπίδρασή τους με την τρισδιάστατη δομή των νουκλεϊκών μορίων στο χώρο. Έτσι, μπορεί να γίνει κατανοητό πως τα θετικά φορτία που βρίσκονται στις αντιγονικές θέσεις των πολυδραστικών αντισωμάτων, φαίνεται πως, πιθανά, αλληλεπιδρούν με το αρνητικά φορτισμένο πλασμιδιακό DNA επηρεάζοντας την τρισδιάστατη διαμόρφωσή του στο χώρο. Πιο συγκεκριμένα, τα mAbs τα οποία κατά τη δοκιμασία της ELISA είχαν φανεί πως αντιδρούσαν με το DNA, φάνηκε πως είχαν μια ιδιαίτερη αλληλεπίδραση με τα νουκλεϊκά μόρια, κατά τον έλεγχο της υδρόλυσης. Πιθανολογούμε την ισχυρή δέσμευση των μορίων του DNA από τα αντισώματα αυτά, ενώ συχνά, στις δοκιμασίες ελέγχου της υδρόλυσης, δημιουργούσαν συσωματώματα τα οποία εμπόδιζαν τα δείγματα να τρέξουν

φυσιολογικά κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Διακρίνεται λοιπόν μία σαφής δέσμευση του DNA, ιδιαίτερα από τα αντι-DNA mAbs, ωστόσο αυτά, δεν υπέδειξαν κάποια εμφανή υδρολυτική ικανότητα.

Ο περαιτέρω έλεγχος για την ανεύρεση μονοκλωνικών CPABs με καταλυτικές ιδιότητες, κρίνεται αναγκαίος και απαραίτητος από το εργαστήριο, καθώς αυτές οι εξειδικευμένες δραστηριότητες, μπορούν να φανούν ιδιαίτερα χρήσιμες στην χρήση και στην εφαρμογή των mAbs που τις φέρουν.

➤ **Μελλοντικές κατευθύνσεις**

Τα ανθρώπινα NAbS εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον τόσο σε επίπεδο βασικής έρευνας, για τα οποία παρέχονται λιγοστές πληροφορίες στην διεθνή βιβλιογραφία, όσο και σε επίπεδο εφαρμοσμένης έρευνας, στο οποίο τα NAbS μπορούν να υπάρξουν ως καινοτόμα εργαλεία για θεραπευτικούς σκοπούς. Στις μέρες μας, έχει γίνει πλέον φανερό στην επιστημονική κοινότητα, πως τα NAbS εμπλέκονται σε μια πληθώρα φυσιολογικών διεργασιών, ενώ παράλληλα ο βιολογικός τους ρόλος σε διάφορα αυτοάνοσα φλεγμονώδη νοσήματα και στο καρκίνο συνεχώς αναδεικνύει την πολυδιάστατη φύση τους. Μία από τις πιο δελεαστικές προοπτικές της χρήσης των NAbS σε θεραπευτικό επίπεδο αποτελεί η στόχευση και η αντιμετώπιση του καρκίνου. Όπως έχει αναφερθεί στα εισαγωγικά, φαίνεται πως τα NAbS κατέχουν έναν αξιοσημείωτο αντικαρκινικό βιολογικό ρόλο. Ωστόσο, με βάση τις γνώσεις μας, η κυτταροδιεισδυτική ικανότητα των IgM-NAbS δεν έχει ποτέ αναφερθεί, συνεπώς ούτε συσχετισθεί με την καταπολέμηση του καρκίνου. Η κύρια αντικαρκινική δράση των IgM-NAbS *in vivo* φαίνεται πως επιτελείται μέσω της πρόκλησης κυτταροτοξικότητας στα καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, η αναδυόμενη κυτταροδιεισδυτική ικανότητα των φυσικών mIgMs που προέκυψε από την μελέτη αυτή, μας προτρέπει για περαιτέρω σκέψεις για τις δυνατότητες και τις προοπτικές ενός τέτοιου θεραπευτικού εργαλείου με πολυδύναμες βιολογικές δραστηριότητες σε συνδυασμό με την ενδοκυττάρια ικανότητα στόχευσης. Η κυτταροδιείσδυση έχει παρατηρηθεί σε IgG-NAbS τα οποία φαίνεται πως μπορούν να αποτελέσουν σημαντικούς θεραπευτικούς παράγοντες και μοριακά εργαλεία για την εξειδικευμένη ενδοκυττάρια στόχευση ως αυτούσια θεραπευτικά μόρια σε ζώντα κύτταρα, όπως π.χ. τα καρκινικά κύτταρα, καθώς και για την ενδοκυττάρια μεταφορά βιοδραστικών ουσιών, όπως έχουν επιτευχθεί σε άλλες μελέτες [163, 164]. Έτσι λοιπόν, κρίνεται αναγκαία και απαραίτητη η συνεχής μελέτη, η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ολοένα και περισσότερων μονοκλωνικών κυτταροδιεισδυτικών IgG με απότερω σκοπό την κατανόηση του τρόπου δράσης τους, μέσω της σύγκρισης και της ανάλυσης των δεδομένων που προκύπτουν από τις μελέτες, καθώς και της ανεύρεσης καινοτόμων ιδιοτήτων ώστε αυτά να εφαρμοστούν και στη θεραπεία. Οι μελέτες στη βασική έρευνα που απαιτούνται για την κατανόηση της δράσης των μονοκλωνικών NAbS είναι αυτές που θα μας οδηγήσουν στην ανεύρεση πρωτοποριακών θεραπειών στο πεδίο της εφαρμοσμένης έρευνας.

Συμπερασματικά, οι οροί των ασθενών με PCDs φαίνεται πως αποτελούν μια αξιόλογη πηγή μονοκλωνικών φυσικών CPABs με διακριτές δραστηριότητες. Το γεγονός αυτό, διευκολύνει κατά πολύ τη μελέτη μονοκλωνικών CPABs στον άνθρωπο, ενώ παράλληλα αποτελεί μια ικανή εναλλακτική μεθοδολογία για την ανεύρεση φυσικών mAbs με νέες βιολογικές δράσεις (αντι-ική δράση, αντι-παρασιτική δράση, κλπ) και της εφαρμογής τους ως θεραπευτικούς παράγοντες και εργαλεία. Οι μελλοντικές κατευθύνσεις του εργαστηρίου αποσκοπούν στην σε βάθος μελέτη της εισόδου των IgM-NAbS στα ζώντα κύτταρα, ως ένα πρωτοποριακό και ανεξερεύνητο πεδίο των ιδιοτήτων των φυσικών mIgMs. Έλεγχοι για τον ενδοκυττάρια συνεντοπισμό των CPABs στα διάφορα υποκυτταρικά οργανίδια, αποτελούν προτεραιότητα του εργαστηρίου, καθώς μέσω αυτών θα συνεχιστεί η ευρύτερη μελέτη του τρόπου εισόδου των CPABs, και των ιδιοτήτων που τους επιτρέπουν να αναγνωρίζουν τους ενδοκυττάριους στόχους τους. Η διαλεύκανση του τρόπου εισόδου των CPABs αποτελεί μια προκλητική

και εστιασμένη έρευνα επί του φαινομένου, ενώ παράλληλα απαιτείται ο προσδιορισμός ενός μεγάλου αριθμού παραγόντων (π.χ. μεμβρανικές πρωτεΐνες, εξωκυττάριο και ενδοκυττάριο περιβάλλον, κυτταρικός κύκλος κ.α) που εμπλέκονται στις διαδικασίες αυτές. Τέλος, η εξειδικευμένη στόχευση ενδοκυττάρων μορίων που εμπλέκονται στις διεργασίες καρκινογένεσης αποτελεί μία ενδιαφέρουσα μελέτη για την ανακάλυψη εκλεπτυσμένων αντικαρκινικών θεραπειών, καθώς στον παρόντα χρόνο, πολλές από τις αντικαρκινικές θεραπείες βασίζονται σε μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν και προσδένονται σε εξωκυττάρους μοριακούς στόχους. Λαμβάνοντας υπ' όψη το γεγονός πως οι μέχρι τώρα θεραπευτικές αγωγές, εμφανίζουν ακόμα μειωμένα ποσοστά επιτυχίας για τη θεραπεία της νόσου, η ενδοκυττάρια στόχευση στην αντικαρκινική θεραπεία, αποτελεί μια πρωτοποριακή προσέγγιση η οποία καθίσταται τόσο επίκαιρη όσο και επιτακτική στη θεραπεία του καρκίνου [298].

Βιβλιογραφία

1. Φυσική Αυτοανοσία (Natural Immunity) – Φυσικά Αντισώματα (Naturally occurring Antibodies-NAbs).

1. NA Danke, DM Koelle, C Yee, S Beheray, WW Kwok: Autoreactive T cells in healthy individuals. *Journal of Immunology* 2004, 172:5967-72.
2. MC Filion, AJ Bradley, DV Devine, F Decary, P Chartrand: Autoreactive T cells in healthy individuals show tolerance in vitro with characteristics similar to but distinct from clonal anergy. *European Journal of Immunology* 1995, 25:3123-7.
3. M Cohn: A stepwise model of polyreactivity of the T cell antigen-receptor (TCR): its impact on the self-nonself discrimination and on related observations (receptor editing, anergy, dual receptor cells). *Cell Mol Life Sci* 2013.
4. PG Ashton-Rickardt, A Bandeira, JR Delaney, L Van Kaer, HP Pircher, RM Zinkernagel, S Tonegawa: Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* 1994, 76:651-63.
5. PG Ashton-Rickardt, S Tonegawa: A differential-avidity model for T-cell selection. *Immunol Today* 1994, 15:362-6.
6. AA Freitas, B Rocha: Peripheral T cell survival. *Curr Opin Immunol* 1999, 11:152-6.
7. Landsteiner K, van der Scheer J. On the Specificity of Serological Reactions with Simple Chemical Compounds (Inhibition Reactions). *J Exp Med*, 1931 Jul 31;54(3):295-305.
8. S Avrameas: Natural Autoantibodies - from Horror Autotoxicus to Gnothi Seauton. *Immunology Today* 1991, 12:154-159.
9. P Keating, A Ousman: The Problem of Natural Antibodies, 1894-1905. *Journal of the History of Biology* 1991, 24:245-263.
10. HP Vollmers, S Brandlein: The "early birds": natural IgM antibodies and immune surveillance. *Histology and Histopathology* 2005, 20:927-937.
11. DJ Bibel: Milestones in immunology. Madison, WI Berlin ; New York: Science Tech ; Springer-Verlag; 1988.
12. JR Marrack: The chemistry of antigens and antibodies. Oxford,: Printed by J. Johnson at the University press; 1934.
13. NK Jerne: The Natural-Selection Theory of Antibody Formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1955, 41:849-57.
14. NK Jerne: Towards a Network Theory of Immune System. *Annales D Immunologie* 1974, C125:373-389.
15. RR Porter: The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J* 1959, 73:119-26.
16. GM Edelman, MD Poulik: Studies on structural units of the gamma-globulins. *Journal of Experimental Medicine* 1961, 113:861-84.
17. E Karsenti, B Guilbert, M Bornens, S Avrameas: Antibodies to tubulin in normal nonimmunized animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, 74:3997-4001.
18. S Avrameas, B Guilbert, G Dighiero: Natural antibodies against tubulin, actin myoglobin, thyroglobulin, fetuin, albumin and transferrin are present in normal human sera, and monoclonal

- immunoglobulins from multiple myeloma and Waldenstrom's macroglobulinemia may express similar antibody specificities. *Ann Immunol (Paris)* 1981, 132C:231-6.
19. B Guilbert, G Dighiero, S Avrameas: Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization. *Journal of Immunology* 1982, 128:2779-87.
 20. G Dighiero, B Guilbert, S Avrameas: Naturally occurring antibodies against nine common antigens in humans sera. II. High incidence of monoclonal Ig exhibiting antibody activity against actin and tubulin and sharing antibody specificities with natural antibodies. *Journal of Immunology* 1982, 128:2788-92.
 21. HU Lutz, G Wipf: Naturally occurring autoantibodies to skeletal proteins from human red blood cells. *Journal of Immunology* 1982, 128:1695-9.
 22. P Casali, BS Prabhakar, AL Notkins: Characterization of multireactive autoantibodies and identification of Leu-1+ B lymphocytes as cells making antibodies binding multiple self and exogenous molecules. *Int Rev Immunol* 1988, 3:17-45.
 23. P Casali, AL Notkins: Probing the human B-cell repertoire with EBV: polyreactive antibodies and CD5+ B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1989, 7:513-35.
 24. Dighiero, D., Lymberi, P., Holmberg, D., Lundquist, I., Coutinho, A. and Avrameas, S., 1985, High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice. *J Immunol*, 134:765-71.
 25. Baumgarth, N., Tung, J.W. and Herzenberg, L.A., 2005, Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol*, 26:347-62.
 26. Guilbert, B., Mahana. W., Gilbert, M., Mazie, J.C., and Avrameas, S., 1985, Presence of natural autoantibodies in hyperimmunized mice. *Immunology*, 56:401-8.
 27. Baldo, B.A., 2012, Cross-reactive antigens for natural IgE antibodies: allergens with the potential to transform a dormant to an active allergic response? *Clin Exp Allergy*, 42:810-13.
 28. Coutinho, A., Kazatchkine, M.D. and Avrameas, S., 1995, Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol*, 7:812-18.
 29. Avrameas, S. and Ternynck, T., 1993, The natural autoantibodies system: between hypotheses and facts. *Mol immunol*, 12:1133-42.
 30. Avrameas, S. and Ternynck, T., 1995, Natural autoantibodies: the other side of the immune system. *Research in immunology*, 146:235-48.
 31. Bouvet, J.P. and Dighiero, G., 1998, From natural polyreactive autoantibodies to a la carte monoreactive antibodies to infectious agents: is it a small world after all? *Infect Immun*, 66:1-4.
 32. Sigounas, G., Kolaitis, N., Monell-Torrens, E. and Notkins, A.L., 1994, Polyreactive IgM antibodies in the circulation are masked by antigen binding. *J Clin Immunol*, 6:375-81.
 33. Grandien, A., Modigliani, Y., Freitas, A., Andersson, J. and Coutinho, A., 1994, Positive and negative selection of antibody repertoires during B-cell differentiation. *Immunol Rev*, 137:53-89.
 34. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: How they develop and function. *Blood*. 2008;112:1570-1580. DOI: 10.1182/blood-2008-02-078071.
 35. Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown L, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:2250-2255.
 36. Lopes JD, Mariano M. B-1 cell: The precursor of a novel mononuclear phagocyte with immunoregulatory properties. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2009;81:489-496. DOI: <https://dx.Doi.org/10.1590/S0001-37652009000300013>.

37. Jensen, C.T., Kharazi, S., Boers, C., Liuba, K., and Jacobsen, S.E. (2007). TSLP-mediated fetal B lymphopoiesis? *Nat. Immunol.* 8, 897–898, author reply 898.
38. Carvalho, T.L., Mota-Santos, T., Cumano, A., Demengeot, J., and Vieira, P. (2001). Arrested B lymphopoiesis and persistence of activated B cells in adult interleukin 7(-/-) mice. *J. Exp. Med.* 194, 1141–1150.
39. Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2011). Formation of B-1 B cells from neonatal B-1 transitional cells exhibits NF- κ B redundancy. *J. Immunol.* 187, 5712–5719.
40. Gao J, Ma X, Gu W, Fu M, An J, Xing Y, et al. Novel functions of murine B1 cells: Active phagocytic and microbicidal abilities. *European Journal of Immunology.* 2012;42:982-992. DOI: 10.1002/eji.201141519.
41. Sunyer JO. Evolutionary and functional relationships of B cells from fish and mammals: insights into their novel roles in phagocytosis and presentation of particulate antigen. *Infectious Disorders Drug Targets.* 2012;12:200-212.
42. Panda S, Ding JL. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *Journal of Immunology.* 2015;194:13-20. DOI: 10.4049/jimmunol.1400844.
43. Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. B-1 B Cell Development in the Fetus and Adult. *Immunity.* 2012;36(1):13-21. doi:10.1016/j.immuni.2011.11.017.
44. Duan B, Morel L. Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews.* 2006;5:403-408. DOI: 10.1016/j.autrev.2005.10.007.
45. Grupp SA, Mitchell RN, Schreiber KL, McKean DJ, Abbas AK. Molecular mechanisms that control expression of the B lymphocyte antigen receptor complex. *Journal of Experimental Medicine.* 1995 Jan 1;181:161-168.
46. Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. B-1 B Cell Development in the Fetus and Adult. *Immunity.* 2012;36(1):13-21. doi:10.1016/j.immuni.2011.11.017. Baumgarth N. B-1 cell heterogeneity and the regulation of natural and antigen-induced IgM production. *Frontiers in Immunology.* 2016;9:324. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00324.
47. Q Tian, M Beardall, Y Xu, J Li, DC Parker, N Casanova, AC Bakke, C Chen: B cells expressing a natural polyreactive autoantibody have a distinct phenotype and are overrepresented in immunoglobulin heavy chain transgenic mice. *Journal of Immunology* 2006, 177:2412-22.
48. Antin, J.H., Emerson, S.G., Martin, P., Gadol, N., and Ault, K.A. (1986). Leu-1+ (CD5+) B cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: phenotypic and functional studies. *J. Immunol.* 136, 505–510.
49. Bhat, N.M., Kantor, A.B., Bieber, M.M., Stall, A.M., Herzenberg, L.A., and Teng, N.N.H. (1992). The ontogeny and functional characteristics of human B-1 (CD5+ B) cells. *Int. Immunol.* 4, 243–252.
50. Bofill, M., Janossy, G., Janossa, M., Burford, G.D., Seymour, G.J., Wernet, P., and Kelemen, E. (1985). Human B cell development. II. Subpopulations in the human fetus. *J. Immunol.* 134, 1531–1538.
51. Solvason, N., and Kearney, J.F. (1992). The human fetal omentum: a site of B cell generation. *J. Exp. Med.* 175, 397–404.
52. Dauphine´ e, M., Tovar, Z., and Talal, N. (1988). B cells expressing CD5 are increased in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 31, 642–647.
53. Donze, H.H., Lue, C., Julian, B.A., Kutteh, W.H., Kantele, A., and Mestecky, J. (1997). Human peritoneal B-1 cells and the influence of continuous ambulatory peritoneal dialysis on peritoneal and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) composition and immunoglobulin levels. *Clin. Exp. Immunol.* 109, 356–361.

54. Griffin, D.O., Holodick, N.E., and Rothstein, T.L. (2011). Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20⁺ CD27⁺ CD43⁺ CD70⁻. *J. Exp. Med.* 208, 67–80.
55. Griffin, D.O., and Rothstein, T.L. (2011). A small CD11b⁺ human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus. *J. Exp. Med.* 208, 2591–2598.
56. Merbl, Y., Zucker-Toledano, M., Quintana, F.J., and Cohen, I.R. (2007). Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J. Clin. Invest.* 117, 712–718.
57. Sanz, E., Muñoz-A, N., Monserrat, J., Van-Den-Rym, A., Escoll, P., Ranz, I., Alvarez-Mon, M., and de-la-Hera, A. (2010). Ordering human CD34⁺CD10⁺CD19⁺ pre/pro-B-cell and CD19⁻ common lymphoid progenitor stages in two pro-B-cell development pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 5925–5930.
58. Janeway, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *old Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 54: 1–13, 1989.
59. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Rev. Immunol.*, 1:135–145, 2001.
60. Cedar, H., and Bergman, Y. Developmental regulation of immune system gene rearrangement. *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 64–69, 1999.
61. Lewis, S. M. The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv. Immunol.*, 56: 27–150, 1994.
62. Gellert, M. Recent advances in understanding V(D)J recombination. *Adv. Immunol.*, 64: 39–64, 1997.
63. Schatz, D. G., Oettinger, M. A., and Schlissel, M. S. V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu. Rev. Immunol.*, 10: 359–383, 1992.
64. Constantinescu, A., and Schlissel, M. S. Changes in locus-specific V(D)J recombinase activity induced by immunoglobulin gene products during B cell development. *J. Exp. Med.* 185, 609–620, 1997.
65. Papavasiliou, F., Jankovic, M., Gong, S., and Nussenzweig, M. C. Control of immunoglobulin gene rearrangements in developing B cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 9:233–238, 1997.
66. Rothenberg, E. V. Stepwise specification of lymphocyte developmental lineages. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10: 370–379, 2000.
67. N Harindranath, H Ikematsu, AL Notkins, P Casali: Structure of the VH and VL segments of polyreactive and monoreactive human natural antibodies to HIV-1 and Escherichia coli beta-galactosidase. *Int Immunol* 1993, 5:1523-33.
68. AL Notkins: Polyreactivity of antibody molecules. *Trends Immunol* 2004, 25:174-9.
69. HJ Ditzel, K Itoh, DR Burton: Determinants of polyreactivity in a large panel of recombinant human antibodies from HIV-1 infection. *Journal of Immunology* 1996, 157:739-49.
70. R Crouzier, T Martin, JL Pasquali: Heavy chain variable region, light chain variable region, and heavy chain CDR3 influences on the mono- and polyreactivity and on the affinity of human monoclonal rheumatoid factors. *Journal of Immunology* 1995, 154:4526-35.
71. Y Ichiyoshi, P Casali: Analysis of the structural correlates for antibody polyreactivity by multiple reassortments of chimeric human immunoglobulin heavy and light chain V segments. *Journal of Experimental Medicine* 1994, 180:885-95.
72. T Martin, R Crouzier, JC Weber, TJ Kipps, JL Pasquali: Structure-function studies on a polyreactive (natural) autoantibody. Polyreactivity is dependent on somatically generated sequences in the third complementarity-determining region of the antibody heavy chain. *Journal of Immunology* 1994, 152:5988-96.

73. M Polymenis, BD Stollar: Critical binding site amino acids of anti-Z-DNA single chain Fv molecules. Role of heavy and light chain CDR3 and relationship to autoantibody activity. *Journal of Immunology* 1994, 152:5318-29.
74. SC Cheung, S Takeda, AL Notkins: Both V-H and V-L Chains of Polyreactive Igm Antibody Are Required for Polyreactivity - Expression of Fab in Escherichia-Coli. *Clinical and Experimental Immunology* 1995, 101:383-386.
75. SC Cheung, S Takeda, AL Notkins: Both V-H and V-L Chains of Polyreactive Igm Antibody Are Required for Polyreactivity - Expression of Fab in Escherichia-Coli. *Clinical and Experimental Immunology* 1995, 101:383-386.
76. C Chen, MP Stenzel-Poore, MB Rittenberg: Natural auto- and polyreactive antibodies differing from antigen-induced antibodies in the H chain CDR3. *Journal of Immunology* 1991, 147:2359-67.
77. HX Liao, X Chen, S Munshaw, R Zhang, DJ Marshall, N Vandergrift, JF Whitesides, X Lu, JS Yu, KK Hwang, et al: Initial antibodies binding to HIV-1 gp41 in acutely infected subjects are polyreactive and highly mutated. *Journal of Experimental Medicine* 2011, 208:2237-49.
78. Maya Hadzhieva, Tchavdar Vassilev, Jagadeesh Bayry, Srinivas Kaveri, Sébastien Lacroix-Desmazes, Jordan D. Dimitrov, Relationship between natural and heme-mediated antibody polyreactivity, In *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 472, Issue 1, 2016, Pages 281-286.
79. K Mannoor, Y Xu, C Chen: Natural autoantibodies and associated B cells in immunity and autoimmunity. *Autoimmunity* 2013, 46:138-47.
80. Manivel, V., Bayiroglu, F., Siddiqui, Z., Salunke, D.M. and Rao, K.V., 2002, The primary antibody repertoire represents a linked network of degenerate antigen specificities. *J Immunol*, 169:888–97.
81. Eisen, H.N., and Chakraborty, A.K., 2010, Evolving concepts of specificity in immune reactions. *Proc Natl Acad Sci*, 107:22373–80.
82. James, L.C., and Tawfik, D.S., 2003, Conformational diversity and protein evolution: a 60-year-old hypothesis revisited. *Trends Biochem Sci*, 28:361–68.
83. James, L.C., Roversi, P. and Tawfik, D.S., 2002, Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science*, 299:62–67.
84. Ruiz-Arguelles, A. and Alarcon-Segovia, D., 2001, Penetration of autoantibodies into living cells, 2000. *Isr Med Assoc J*, 3:121-26.
85. A Madi, S Bransburg-Zabary, DY Kenett, E Ben-Jacob, IR Cohen: The natural autoantibody repertoire in newborns and adults: a current overview. *Adv Exp Med Biol* 2012, 750:198-212.
86. Casadevall, Ekaterina Dadachova, Liise-anne Pirofski: Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Sep; 2(9): 695–703. doi: 10.1038/nrmicro974.
87. Grabar, P., 1975, Hypothesis. Auto-antibodies and immunological theories: an analytical review. *Clin Immunol Immunopathol*, 4:453-66.
88. Zhou, Z.H., Tzioufas, A.G. and Notkins, A.L., 2007, Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. *J Autoimmun*, 4:219-28.
89. MacMillan, H.F., Lee, T. and Issekutz, A.C., 2009, Intravenous immunoglobulin G-mediated inhibition of T-cell proliferation reflects an endogenous mechanism by which IgG modulates T-cell activation. *Clin Immunol*, 2:222-33.
90. Kieber-Emmons, T., Monzavi-Karbassi, B., Pashov, A., Saha, S., Murali, R. and Kohler, H., 2012, The promise of the anti-idiotypic concept. *Front Oncol*, 2:196.

91. Bobrzynski T, Fux M, Vogel M, Stadler MB, Stadler BM, Miescher SM. A high-affinity natural autoantibody from human cord blood defines a physiologically relevant epitope on the FcεR1α. *Journal of immunology*. 2005 Nov 15;175(10):6589-96.
92. Ehrenstein, M. R., and C. A. Notley. 2010. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 778–786.
93. Czajkowsky, D. M., and Z. Shao. 2009. The human IgM pentamer is a mushroom-shaped molecule with a flexural bias. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 14960–14965.
94. Bonagura, V. R., L. Mendez, N. Agostino, and B. Pernis. 1987. Monomeric (7S) IgM found in the serum of rheumatoid arthritis patients share idiotypes with pentameric (19S) monoclonal rheumatoid factors. *J. Clin. Invest.* 79: 813–818.
95. Fakunle, Y. M., F. Aranguibel, D. de Villiers, H. C. Thomas, and S. Sherlock. 1979. Monomeric (7S) IgM in chronic liver disease. *Clin. Exp. Immunol.* 38: 204–210.
96. Zhou, Z. H., Y. Zhang, Y. F. Hu, L. M. Wahl, J. O. Cisar, and A. L. Notkins. 2007. The broad antibacterial activity of the natural antibody repertoire is due to polyreactive antibodies. *Cell Host Microbe* 1: 51–61.
97. Briles, D. E., M. Nahm, K. Schroer, J. Davie, P. Baker, J. Kearney, and R. Barletta. 1981. Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *J. Exp. Med.* 153: 694–705.
98. Subramaniam, K. S., K. Datta, E. Quintero, C. Manix, M. S. Marks, and L. A. Pirofski. 2010. The absence of serum IgM enhances the susceptibility of mice to pulmonary challenge with *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 184: 5755–5767.
99. Ochsenbein, A. F., T. Fehr, C. Lutz, M. Suter, F. Brombacher, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286: 2156–2159.
100. Baumgarth, N., O. C. Herman, G. C. Jager, L. E. Brown, L. A. Herzenberg, and J. Chen. 2000. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J. Exp. Med.* 192: 271–280.
101. Choi, Y. S., and N. Baumgarth. 2008. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *J. Exp. Med.* 205: 3053–3064.
102. Jayasekera, J. P., E. A. Moseman, and M. C. Carroll. 2007. Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity. *J. Virol.* 81: 3487–3494.
103. Boes, M., A. P. Prodeus, T. Schmidt, M. C. Carroll, and J. Chen. 1998. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J. Exp. Med.* 188: 2381–2386.
104. Haury, M., A. Sundblad, A. Grandien, C. Barreau, A. Coutinho, and A. Nobrega. 1997. The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *Eur. J. Immunol.* 27: 1557–1563.
105. Ogden, C. A., R. Kowalewski, Y. Peng, V. Montenegro, and K. B. Elkon. 2005. IGM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo. *Autoimmunity* 38: 259–264.
106. Quartier, P., P. K. Potter, M. R. Ehrenstein, M. J. Walport, and M. Botto. 2005. Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro. *Eur. J. Immunol.* 35: 252–260.

- 107.** Chen, Y., Y. B. Park, E. Patel, and G. J. Silverman. 2009. IgM antibodies to apoptosis-associated determinants recruit C1q and enhance dendritic cell phagocytosis of apoptotic cells. *J. Immunol.* 182: 6031–6043.
- 108.** Lewis, M.J., Malik, T.H., Ehrenstein, M.R., Boyle, J.J., Botto, M. and Haskard, D.O., 2009, Immunoglobulin M is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*, 5:417-26.
- 109.** Arese, P., Turrini, F. and Schwarzer, E., 2005, Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, 4-6:133-46.
- 110.** Peng, Y., Kowalewski, R., Kim, S. and Elkon, K.B., 2005, The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells. *Mol Immunol*, 7:781-87.
- 111.** Nauta, A. J., N. Raaschou-Jensen, A. Roos, M. R. Daha, H. O. Madsen, M. C. Borrias-Essers, L. P. Ryder, C. Koch, and P. Garred. 2003. Mannosebinding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur. J. Immunol.* 33: 2853–2863.
- 112.** Arnold, J. N., M. R. Wormald, D. M. Suter, C. M. Radcliffe, D. J. Harvey, R. A. Dwek, P. M. Rudd, and R. B. Sim. 2005. Human serum IgM glycosylation: identification of glycoforms that can bind to mannan-binding lectin. *J. Biol. Chem.* 280: 29080–29087.
- 113.** Chen, Y., S. Khanna, C. S. Goodyear, Y. B. Park, E. Raz, S. Thiel, C. Groenwall, J. Vas, D. L. Boyle, M. Corr, et al. 2009. Regulation of dendritic cells and macrophages by an anti-apoptotic cell natural antibody that suppresses TLR responses and inhibits inflammatory arthritis. *J. Immunol.* 183: 1346–1359.
- 114.** Srinivasa Kaveri, Gregg J. Silverman, Jagadeesh Bayry: Natural IgM in Immune Equilibrium and Harnessing Their Therapeutic Potential. *The Journal of Immunology* February 1, 2012, 188 (3) 939-945; DOI: 10.4049/jimmunol.1102107.
- 115.** Notley, C. A., N. Baker, and M. R. Ehrenstein. 2010. Secreted IgM enhances B cell receptor signaling and promotes splenic but impairs peritoneal B cell survival. *J. Immunol.* 184: 3386–3393.
- 116.** Fabrizio, K., A. Groner, M. Boes, and L. A. Pirofski. 2007. A human monoclonal immunoglobulin M reduces bacteremia and inflammation in a mouse model of systemic pneumococcal infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 382–390.
- 117.** Boes, M., T. Schmidt, K. Linkemann, B. C. Beaudette, A. Marshak-Rothstein, and J. Chen. 2000. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1184–1189.
- 118.** Panda, S., J. Zhang, N. S. Tan, B. Ho, and J. L. Ding. 2013. Natural IgG antibodies provide innate protection against ficolin-opsonized bacteria. *EMBO J.* 32: 2905–2919.
- 119.** Saswati Panda and Jeak L. Ding: Natural Antibodies Bridge Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol* 2015; 194:13-20; doi: 10.4049/jimmunol.1400844.
- 120.** Baranov, D., and P. Neligan. 2007. Trauma and aggressive homeostasis management. *Anesthesiol. Clin.* 25: 49–63, viii.
- 121.** Simmen, H. P., H. Battaglia, P. Giovanoli, and J. Blaser. 1994. Analysis of pH, pO₂ and pCO₂ in drainage fluid allows for rapid detection of infectious complications during the follow-up period after abdominal surgery. *Infection* 22: 386–389.
- 122.** Bessman, A. N., J. Page, and L. J. Thomas. 1989. In vivo pH of induced soft-tissue abscesses in diabetic and nondiabetic mice. *Diabetes* 38: 659–662.
- 123.** TranVan Nhieu, G., C. Clair, G. Grompone, and P. Sansonetti. 2004. Calcium signalling during cell interactions with bacterial pathogens. *Biol. Cell* 96: 93–101.

124. Prince, A. S., J. P. Mizgerd, J. Wiener-Kronish, and J. Bhattacharya. 2006. Cell signaling underlying the pathophysiology of pneumonia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 291: L297–L300.
125. Eichstaedt, S., K. Gäbler, S. Below, C. Muller, C. Kohler, S. Engelmann, P. Hildebrandt, U. Volker, M. Hecker, and J. P. Hildebrandt. 2009. Effects of *Staphylococcus aureus*-hemolysin A on calcium signalling in immortalized human airway epithelial cells. *Cell Calcium* 45: 165–176.
126. Puga, I., and A. Cerutti. 2013. Protection by natural IgG: a sweet partnership with soluble lectins does the trick! *EMBO J.* 32: 2897–2899.
127. Panda, S., J. Zhang, L. Yang, G. S. Anand, and J. L. Ding. 2014. Molecular interaction between natural IgG and ficolin—mechanistic insights on adaptive-innate immune crosstalk. *Sci. Rep.* 4: 3675.
128. Subramanian, K., R. Du, N. S. Tan, B. Ho, and J. L. Ding. 2013. CD163 and IgG codefend against cytotoxic hemoglobin via autocrine and paracrine mechanisms. *J. Immunol.* 190: 5267–5278.
129. Hess, C., A. Winkler, A. K. Lorenz, V. Holecska, V. Blanchard, S. Eiglmeier, A. L. Schoen, J. Bitterling, A. D. Stoehr, D. Petzold, et al. 2013. T cell-independent B cell activation induces immunosuppressive sialylated IgG antibodies. *J. Clin. Invest.* 123: 3788–3796.
130. Ottaway, C.A. (1990) in *Immunology and Immunopathology of the Liver and Gastrointestinal Track* (Targan, S.R. and Shanahan, F., eds), pp. 49-70, Igaku-shoin.
131. Johansen FE, Braathen R, Brandtzaeg P. Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. *Scand J Immunol* 2000; 52:240-8.
132. Woof JM, Mestecky J. Mucosal immunoglobulins. *Immunol Rev* 2005; 206:64-82.
133. Cerutti, A., and Rescigno, M. (2008). The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28, 740–750.
134. Corthe'sy, B. (2013). Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front. Immunol.* 4, 185.
135. Mestecky, J., Russell, M.W., and Elson, C.O. (1999). Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut* 44, 2–5.
136. Fransen et al.. BALB/c and C57BL/6 Mice Differ in Polyreactive IgA Abundance, which Impacts the Generation of Antigen-Specific IgA and Microbiota Diversity. 2015, *Immunity* 43, 527–540.
137. Quan CP, Berneman A, Pires R, Avrameas S, Bouvet JP. Natural polyreactive secretory immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infection in humans. *Infection and Immunity.* 1997;65(10):3997-4004.
138. Shimoda M, Inoue Y, Azuma N, Kanno C. Natural polyreactive immunoglobulin A antibodies produced in mouse Peyer's patches. *Immunology.* 1999;97(1):9-17. doi:10.1046/j.1365-2567.1999.00755.x.
139. Bos NA, Bun JC, Popma SH, et al. Monoclonal immunoglobulin A derived from peritoneal B cells is encoded by both germ line and somatically mutated VH genes and is reactive with commensal bacteria. *Infection and Immunity.* 1996;64(2):616-623.
140. Masao Murakami, Tasuku Honjo. Involvement of B-1 cells in mucosal immunity and autoimmunity. *Immunology Today*; Volume 16, Issue 11, p534–539, Nov. 1995.
141. Avrameas, S., Ternynck, T., Tsonis, I.A. and Lymberi, P., 2007, Naturally occurring B-cell autoreactivity: a critical overview. *J Autoimmun*, 4:213-18.
142. JO Sunyer, IK Zarkadis, JD Lambris: Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? *Immunol Today* 1998, 19:519-23.
143. Gold, M., Pul, R., Bach, J.P., Stangel, M. and Dodel, R., 2012, Pathogenic and physiological autoantibodies in the central nervous system. *Immunol Rev*, 248:68-86.

144. MM Eibl: History of immunoglobulin replacement. *Immunol Allergy Clin North Am* 2008, 28:737-64, viii.
145. JS Orange, EM Hossny, CR Weiler, M Ballow, M Berger, FA Bonilla, R Buckley, J Chinen, Y El-Gamal, BD Mazer, et al: Use of intravenous immunoglobulin in human disease: a review of evidence by members of the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2006, 117:S525-53.
146. ER Stiehm: Human intravenous immunoglobulin in primary and secondary antibody deficiencies. *Pediatr Infect Dis J* 1997, 16:696-707.
147. S Jolles, WA Sewell, SA Misbah: Clinical uses of intravenous immunoglobulin. *Clinical and Experimental Immunology* 2005, 142:1-11.
148. A Durandy, SV Kaveri, TW Kuijpers, M Basta, S Miescher, JV Ravetch, R Rieben: Intravenous immunoglobulins--understanding properties and mechanisms. *Clinical and Experimental Immunology* 2009, 158 Suppl 1:2-13.
149. TE Mollnes, K Hogasen, C De Carolis, E Vaquero, EW Nielsen, L Fontana, R Perricone: High-dose intravenous immunoglobulin treatment activates complement in vivo. *Scand J Immunol* 1998, 48:312-7.
150. VS Negi, S Elluru, S Siberil, S Graff-Dubois, L Mouthon, MD Kazatchkine, S Lacroix-Desmazes, J Bayry, SV Kaveri: Intravenous immunoglobulin: An update on the clinical use and mechanisms of action. *Journal of Clinical Immunology* 2007, 27:233-245.

2. Κυτταροδεισδυτικά Αντισώματα (Cell-Penetrating Antibodies– CPAbs).

151. D Alarcon-Segovia, A Ruiz-Arguelles, E Fishbein: Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature* 1978, 271:67-9.
152. JA Ma, GV Chapman, SL Chen, R Penny, SN Breit: Flow cytometry with crystal violet to detect intracytoplasmic fluorescence in viable human lymphocytes. Demonstration of antibody entering living cells. *J Immunol Methods* 1987, 104:195-200.
153. T Ternynck, A Avrameas, J Ragimbeau, G Buttin, S Avrameas: Immunochemical, structural and translocating properties of anti-DNA antibodies from (NZBxNZW)F1 mice. *J Autoimmun* 1998, 11:511-21.
154. K Conrad, EM Tan, RL Humbel, Y Shoenfeld: Autoantibodies--diagnostic, pathogenic and prognostic relevance. *Clin Exp Rheumatol* 1997, 15:457-65.
155. A Ruiz-Arguelles, GJ Brito, P Reyes-Izquierdo, B Perez-Romano, S Sanchez-Sosa: Apoptosis of melanocytes in vitiligo results from antibody penetration. *J Autoimmun* 2007, 29:281-6.
156. AR Cabral, D Alarcon-Segovia: Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 1997, 9:387-92.
157. Reichlin M. Cellular dysfunction induced by penetration of autoantibodies into living cells: cellular damage and dysfunction mediated by antibodies to dsDNA and ribosomal P proteins. *J. Autoimmun.* 1998;11:557-61.
158. Madaio MP, Yanase K. Cellular penetration and nuclear localization of anti-DNA antibodies: mechanisms, consequences, implications and applications. *J. Autoimmun.* 1998;11:535-8.
159. Tezel G, Wax MB. 2000. The mechanism of hsp antibody-mediated apoptosis in retinal neuronal cells. *J. Neurosci.*;20:3552-62.

- 160.** EL-Fawal HA, Waterman SJ, DeFeo A, Shamy MY. 1999. Neuroimmunotoxicology: humoral assessment of neurotoxicity and autoimmune mechanisms. *Environ. Health Perspect*;107(Suppl 7):767-75
- 161.** K Okudaira, H Yoshizawa, RC Williams, Jr.: Monoclonal murine anti-DNA antibody interacts with living mononuclear cells. *Arthritis Rheum* 1987, 30:669-78.
- 162.** K Yanase, RM Smith, B Cizman, MH Foster, LD Peachey, L Jarett, MP Madaio: A subgroup of murine monoclonal anti-deoxyribonucleic acid antibodies traverse the cytoplasm and enter the nucleus in a time-and temperature- dependent manner. *Lab Invest* 1994, 71:52-60.
- 163.** Deng SX, Hanson E, Sanz I. In vivo cell penetration and intracellular transport of anti-Sm and anti-La autoantibodies. *Int Immunol Vol. 12, No. 4*, pp 415-423.
- 164.** Avrameas, A., Ternynck, T., Nato, F., Buttin, G., and Avrameas, S., 1998, Polyreactive anti-DNA monoclonal antibodies and a derived peptide as vectors for the intracytoplasmic and intranuclear translocation of macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:5601-06.
- 165.** Golan Td, Gharavi AE, Elkon KB. Penetration of autoantibodies into living epithelial cells. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 316-322.
- 166.** Jang, J.Y., Jeong, J.G., Jun, H.R., Lee, S.C., Kim, J.S., Kim, Y.S., and Kwon, M.H., 2009, A nucleic acid-hydrolyzing antibody penetrates into cells via caveolae-mediated endocytosis, localizes in the cytosol and exhibits cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci*, 11-12:1985-97.
- 167.** KH Sun, WT Liu, CY Tsai, SJ Tang, SH Han, CL Yu: Anti-dsDNA antibodies cross-react with ribosomal P proteins expressed on the surface of glomerular mesangial cells to exert a cytostatic effect. *Immunology* 1995, 85:262-9.
- 168.** Ruiz-Arguelles, A., Perez-Romano, B., Llorente, L., Alarcon-Segovia, D. and Castellanos, J.M., 1998, Penetration of anti-DNA antibodies into immature live cells. *J Autoimmun*,11:547-556.
- 169.** Portales-Perez, D., Alarcon-Segovia, D., Llorente, L., Ruiz-Arguelles, A., Abud-Mendoza, C., Baranda, L., de la Fuente, H., Ternynck, T. and Gonzales-Amaro, R., 1998, Penetrating anti-DNA monoclonal antibodies induce activation of human peripheral blood mononuclear cells. *J Autoimmun*, 11:563-71.
- 170.** Schmidt-Acevedo, S., Perez-Romano, B. and Ruiz-Arguelles, A., 2000, 'LE cells' result from phagocytosis of apoptotic bodies induced by antinuclear antibodies. *J Autoimmun*, 15:15-20.
- 171.** Kawada, K., Terasaki, P.I., 1987, Evidence for immunosuppression by high-dose gammaglobulin. *Exp Hematol*, 15:133-36.
- 172.** Vanschaik, I.N., Vermeulen, M. and Brand, A., 1994, In-Vitro Effects of Polyvalent Immunoglobulin for Intravenous Use. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 57:15-17.
- 173.** Sapir, T. and Shoenfeld, Y., 2005, Facing the enigma of immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulin. *Clin Rev Allergy Immunol*, 29:185-99.
- 174.** Koren, E., Koscec, M., Wolfson-Reichlin, M., Ebling, F.M., Tsao, B., Hahn, B.H. and Reichlin, M., 1995, Murine and human antibodies to native DNA that cross-react with the A and D SnRNP polypeptides cause direct injury of cultured kidney cells. *J Immunol*, 154:4857-64.
- 175.** Zack DJ, Stempniak M, Wong AL, Taylor C, Weisbart RH, Mechanisms of cellular penetration and nuclear localization of an anti-double strand DNA autoantibody. *Journal of immunology*. 1996 Sep 1;157(5):2082-8.
- 176.** Madani, F., Lindberg, S., Langel, U., Futaki, S. and Graslund, A., 2011, Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys*, 2011:414729.

177. Casadevall, A., Dadachova, E. and Pirofski, L.A., 2004, Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2:695-703.
178. Fonesca SB, Pereira MP, Kelley SO. Recent advances in the use of self-penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009 Sep 30;61(11):953-64.
179. Koscec, M., Koren, E., Wolfson-Reichlin, M., Fugate, R.D., Trieu, E., Targoff, I.N. and Reichlin, M., 1997, Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture. *J Immunol*, 159:2033-41.
180. Sun, K.H., Liu, W.T., Tang, S.J., Tsai, C.Y., Hsieh, S.C., Wu, T.H., Han, S.H. and Yu, C.L., 1996, The expression of acidic ribosomal phosphoproteins on the surface membrane of different tissues in autoimmune and normal mice which are the target molecules for anti-double-stranded DNA antibodies. *Immunol*, 3:362-71.
181. Deocharan, B., Qing, X., Lichauco, J. and Putterman, C., 2002, Alpha-actinin is a cross-reactive renal target for pathogenic anti-DNA antibodies. *J Immunol*, 6:3072-78.
182. Faaber, P., Rijke, T.P., van de Putte, L.B., Capel, P.J. and Berden, J.H., 1986, Cross-reactivity of human and murine anti-DNA antibodies with heparan sulfate. The major glycosaminoglycan in glomerular basement membranes. *J Clin Invest*, 6:1824-30.
183. Termaat, R.M., Brinkman, K., van Gompel, F., van den Heuvel, L.P., Veerkamp, J.H., Smeenk, R.J. and Berden, J.H., 1990, Cross-reactivity of monoclonal anti-DNA antibodies with heparan sulfate is mediated via bound DNA/histone complexes. *J Autoimmun*, 5:531-45.
184. Di Valerio, R., Bernstein, K.A., Varghese, E. and Lefkowitz, J.B., 1995, Murine lupus glomerulotropic monoclonal antibodies exhibit differing specificities but bind via a common mechanism. *J Immunol*, 4:2258-68.
185. Lake, R.A., Morgan, A., Henderson, B. and Staines, N.A., 1985, A key role for fibronectin in the sequential binding of native dsDNA and monoclonal anti-DNA antibodies to components of the extracellular matrix: its possible significance in glomerulonephritis. *Immunology*, 2:389-95.
186. Jacob, L., Viard, J.P., Allenet, B., Anin, M.F., Slama, F.B., Vandekerckhove, J., Primo, J., Markovits, J., Jacob, F., Bach J.F., et al., 1989, A monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody binds to a 94-kDa cell-surface protein on various cell types via nucleosomes or a DNA-histone complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 12:4669-73.
187. Duverger, E., Carpentier, V., Roche, A.C. and Monsigny, M., 1993, Sugar-dependent nuclear import of glycoconjugates from the cytosol. *Exp Cell Res*, 1:197-201.
188. JE Hansen, G Chan, Y Liu, DC Hegan, S Dalal, E Dray, Y Kwon, Y Xu, X Xu, E Peterson-Roth, et al: Targeting cancer with a lupus autoantibody. *Sci Transl Med* 2012, 4:157ra142.
189. Seddiki, N., Nato, F., Lafaye, P., Amoura, Z., Piette, J.C. and Mazie, J.C., 2001, Calreticulin, a potential cell surface receptor involved in cell penetration of anti-DNA antibodies. *J Immunol*, 166:6423-29.
190. Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G. and Prochiantz, A., 1996, Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor independent. *J Biol Chem*, 271:18188-93.
191. Golan, T.D., Sigal, D., Sabo, E., Shemuel, Z., Guedj, D. and Weinberger, A., 1997, The penetrating potential of autoantibodies into live cells in vitro coincides with the in vivo staining of epidermal nuclei. *Lupus*, 1:18-26.
192. Alarcon-Segovia, D., Ruiz-Arguelles, A. and Fishbein, E., 1979, Antibody penetration into living cells. I. Intranuclear immunoglobulin in peripheral blood mononuclear cells in mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*, 3:364-75.

- 193.** Alarcon-Segovia, D., Llorente, L. and Ruiz-Arguelles, A., 1996, The penetration of autoantibodies into cells may induce tolerance to self by apoptosis of autoreactive lymphocytes and cause autoimmune disease by dysregulation and/or cell damage. *J Autoimmun*, 2:295-300.
- 194.** Rivadeneyra-Espinoza, L. and Ruiz-Arguelles, A., 2006, Cell-penetrating anti-native DNA antibodies trigger apoptosis through both the neglect and programmed pathways. *J Autoimmun*, 1:52-56.
- 195.** E Tse, TH Rabbitts: Intracellular antibody-caspase-mediated cell killing: an approach for application in cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:12266-71.
- 196.** EJ Lee, EJ Jang, E Lee, J Yu, HY Chung, YJ Jang: Cell-penetrating autoantibody induces caspase-mediated apoptosis through catalytic hydrolysis of DNA. *Bioorg Med Chem* 2007, 15:2016-23.
- 197.** Jang, E.J., Nahm, D.H. and Jang, Y.J., 2009, Mouse monoclonal autoantibodies penetrate mouse macrophage cells and stimulate NF-kappaB activation and TNF-alpha release. *Immunol Lett*, 2:70-76.
- 198.** Finck BN, Dantzer R, Kelley KW, Woods JA, Johnson RW, Central lipopolysaccharide elevates plasma IL-6 concentration by an alpha-adrenoreceptor-mediated mechanism. *Am J Physiol*. 1997 Jun;272(6 Pt 2):R1880-7.
- 199.** Lambert PH, Dixon FJ. Pathogenesis of the glomerulonephritis of NZB/W mice. *J Exp Med*. 1968 Mar 1;127(3):507-22.
- 200.** Neng Lai K, Leung JC, Bik Lai K, Li PK, Lai CK . Anti-DNA autoantibodies stimulate the release of interleukin-1 and interleukin-6 from endothelial cells. *J. Pathol*. 1996 Apr;178(4):451-7.
- 201.** Lai KN, Leung JC, Lai KB, Lai FM, Wong KC. Increased release of von Willebrand factor antigen from endothelial cells by anti-DNA autoantibodies, *Ann Rheum Dis*. 1996 Jan;55(1):57-62.
- 202.** Yu CL, Chang KL, Chiu CC, Chiang BN, Han SH, Wang SR, Alteration of mitogenic responses of mononuclear cells by anti-ds DNA antibodies resembling immune disorders in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol*. 1989;18(5):265-76.
- 203.** Sun, K.H., Yu, C.L., Tang, S.J. and Sun, G.H., 2000, Monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody stimulates the expression and release of IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha from normal human mononuclear cells involving in the lupus pathogenesis. *Immunology*, 3:352-60.
- 204.** S Muller, Y Zhao, TL Brown, AC Morgan, H Kohler: TransMabs: cell-penetrating antibodies, the next generation. *Expert Opin Biol Ther* 2005, 5:237-41.
- 205.** Foster, M.H., Kieber-Emmons, T., Ohliger, M. and Madaio, M.P., 1994, Molecular and structural analysis of nuclear localizing anti-DNA lupus antibodies. *Immunol Res*, 13:186-206.
- 206.** RE Kontermann: Intrabodies as therapeutic agents. *Methods* 2004, 34:163-170.
- 207.** Hansen, J.E., Fischer, L.K., Chan, G., Chang, S.S., Baldwin, S.W., Aragon, R.J., Carter, J.J., Lilly, M., Nishimura, R.N., Weisbart, R.H. and Reeves, M.E., 2007, Antibody-mediated p53 protein therapy prevents liver metastasis in vivo. *Cancer Res*, 67:1769-74.
- 208.** Hansen, J.E., Weisbart, R.H. and Nishimura, R.N., 2005, Antibody mediated transduction of therapeutic proteins into living cells. *Sci World J*, 5:782-88.
- 209.** Avrameas, A., Ternynck, T., Gasmi, L. and Buttin, G., 1999, Efficient gene delivery by a peptide derived from a monoclonal anti-DNA antibody. *Bioconjug Chem*, 1:87-93.
- 210.** Dürrbach, A., Angevin, E., Poncet, P., Rouleau, M., Chavanel, G., Chapel, A., Thierry, D., Gorter, A., Hirsch, R., Charpentier, B., Senik, A. and Hirsch, F., 1999, Antibody-mediated endocytosis of G250 tumor-associated antigen allows targeted gene transfer to human renal cell carcinoma in vitro. *Cancer Gene Ther*, 6:564-71.

3. Τα φυσικά αντισώματα στον καρκίνο.

- 211.** Vogelstein B, Kinzler KW., The multistep nature of cancer. *Trends Genet: TIG* 1993; 9:138-41.
- 212.** Hanahan D, Weinberg RA., The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
- 213.** Evan GI, Vousden KH., Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411:342-8.
- 214.** Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. Cancer. In: M. Robertson, R. Adams, S. M. Cobert, D. Goertzen, (eds.). *Molecular Biology of the Cell*. Ed. 3 ed., pp. 1255–1291. New York: Garland Publishing, Inc., 1994.
- 215.** Toubi, E., & Toubi, E. (2007). Protective autoimmunity in cancer (Review). *Oncology Reports*, 17, 245-251.
- 216.** Vollmers, H. P., and Brändlein, S. Nature's best weapons to fight cancer: reloading human monoclonal IgM antibodies. *Hum. Antibodies*, 11: 131–142, 2002.
- 217.** Brändlein, S., Lorenz, J., Ruoff, N., Hensel, F., Beyer, I., Muller, J., Neukam, K., Eck, M., Illert, B., Müller-Hermelink, H. K., and Vollmers, H. P. Human monoclonal IgM antibodies with apoptotic activity isolated from cancer patients. *Hum. Antibodies*, 11: 107–119, 2002.
- 218.** Brandlein S, Pohle T, Ruoff N, Wozniak E, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP: Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res* 2003, 63(22):7995-8005.
- 219.** Klein J: Private and public antigens of the mouse H-2 system. *Nature* 1971, 229(5287):635-637.
- 220.** Benacerraf B, McDevitt HO: Histocompatibility-linked immune response genes. *Science* 1972, 175(19):273-279.
- 221.** Zinkernagel RM, Doherty PC: The discovery of MHC restriction. *Immunol Today* 1997, 18(1):14-17.
- 222.** Snell GD: The immunogenetics of tumor transplantation. *Cancer Res* 1952, 12(8):543-546.
- 223.** Baldwin RW (1955) Immunity to transplanted tumour: the effect of tumour extracts on the growth of homologous tumours in rats. *Br J Cancer* 9, 646–651.
- 224.** Baldwin RW (1971) Tumour-associated antigens and tumour-host interactions. *Proc R Soc Med* 64, 1039–1042.
- 225.** Anderson KS & LaBaer J (2005) The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers. *J Proteome Res* 4, 1123–1133.
- 226.** Caron M, Choquet-Kastylevsky G & Joubert-Caron R (2007) Cancer immunomics: using autoantibody signatures for biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics* 6, 1115–1122.
- 227.** Tan EM (2001) Autoantibodies as reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis. *J Clin Invest* 108, 1411–1415.
- 228.** Vollmers HP, Brändlein S. Tumors: Too sweet to remember? *Molecular Cancer*. 2007;6:78. doi:10.1186/1476-4598-6-78.
- 229.** Schwartz-Albiez R. Naturally occurring antibodies directed against carbohydrate tumor antigens. *Adv Exp Med Biol*. 2012;750:27-43.
- 230.** Slovin SF, Keding SJ, Ragupathi G: Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. *Immunol Cell Biol* 2005, 83(4):418-428.
- 231.** H. Peter Vollmers, Stephanie Brändlein, Natural antibodies and cancer, In *New Biotechnology*, Volume 25, Issue 5, 2009, Pages 294-298, ISSN 1871-6784.
- 232.** Vollmers, H.P. and Brandlein, S. (2005) Death by stress: natural IgM-induced apoptosis. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 27, 185–191.
- 233.** Vollmers HP, Brändlein S. Natural IgM antibodies: from parias to parvenus. *Histol Histopathol*. 2006 Dec;21(12):1355-66. doi: 10.14670/HH-21.1355.

- 234.** Diaz-Zaragoza M, Hernandez-Ávila R, Viedma-Rodriguez R, Arenas-Aranda D, Ostoa-Saloma P. Natural and adaptive IgM antibodies in the recognition of tumor-associated antigens of breast cancer (Review). *Oncology Reports*. 2015;34(3):1106-1114. doi:10.3892/or.2015.4095.
- 235.** H. Peter Vollmers, Stephanie Brändlein, Natural IgM antibodies: The orphaned molecules in immune surveillance. In *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 58, Issues 5–6, 2006, Pages 755-765.
- 236.** Krause I and Shoenfeld Y: Intravenous immunoglobulin treatment for fibrosis, atherosclerosis, and malignant conditions. *Methods Mol Med* 109: 403-408, 2005.
- 237.** Fishman P, Bar-Yehuda S and Shoenfeld Y: IVIG to prevent tumor metastases. *Int J Oncol* 21: 875-880, 2002.
- 238.** Schwartz-Albiez, R., Monteiro, R.C., Rodriguez, M., Binder, C.J. and Shoenfeld, Y., 2009, Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation. *Clin exp immunol*, 1:43-50.
- 239.** Shun Lv, Jinping Zhang, Jin Wu, Xiujuan Zheng, Yiwei Chu, Sidong Xiong, Origin and anti-tumor effects of anti-dsDNA autoantibodies in cancer patients and tumor-bearing mice, In *Immunology Letters*, Volume 99, Issue 2, 2005, Pages 217-227.
- 240.** Tan, H. T., Low, J., Lim, S. G. and Chung, M. C. M. (2009), Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection. *FEBS J*. 2009 Dec;276(23):6880-904.

4. Συζήτηση

- 241.** Abu-Shakra M, Buskila D, Shoenfeld Y., Idiotypes of Natural Autoantibodies and Monoclonal Gammopathies, In *Idiotypes in Medicine: Autoimmunity, Infection and Cancer*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1997, Pages 193-203, ISBN 9780444828071
- 242.** Danon F, Seligmann M: Transient human monoclonal immunoglobulins. *Scand J Immunol* 1972; 1:323-8
- 243.** Benign K.J: paraproteinemias. *J Clin Path* 1975; 28:77- 82
- 244.** Metzger H: Myeloma proteins and antibodies. *Am J Med* 1969; 47:837-44
- 245.** Potter M: Myeloma proteins (M-components) with antibody-like activity. *N Engl J Med* 1971; 284:831-8
- 246.** Veillon DM, Cotelingam JD: Pathologic studies useful for the diagnosis and monitoring of plasma cell dyscrasias. *Contrib Nephrol* 2007; 153: 25-43
- 247.** Zouali M, Stollar BD: Thymine and guanine base specificity of human myeloma proteins with anti-DNA activity. *J. Clin. Invest.* 1986;78(5):1173–1178
- 248.** Buskila D, Abu-Shakra M, Amital-Teplizki H, et al.: Serum monoclonal antibodies derived from patients with multiple myeloma react with mycobacterial phosphoinositides and nuclear antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 1989;76(3):378–383
- 249.** Seligmann M, Sassy C, A Chevalier: A Human IgG Myeloma Protein with Anti- α 2 Macroglobulin Antibody Activity. *J. Immunol.* 1973;110(1):85 LP-90
- 250.** DiMinno G, Coraggio F, Cerbone AM, et al.: A myeloma paraprotein with specificity for platelet glycoprotein IIIa in a patient with a fatal bleeding disorder. *J. Clin. Invest.* 1986;77(1):157–164
- 251.** Yativ N, Buskila D, Blank M, et al.: The detection of antithyroglobulin activity in human serum monoclonal immunoglobulins (monoclonal gammopathies). *Immunol. Res.* 1993;12(4):330
- 252.** Ahlberg RE, Lefvert AK: Monoclonal gammopathy and antibody activity against the acetylcholine receptor. *Am. J. Hematol.* 1988;29(1):49–51
- 253.** Melistedt H, Holm G, Björkholm M. Multiple Myeloma, Waldenström’s Macroglobulinemia, and Benign Monoclonal Gammopathy: Characteristics of The B Cell Clone, Immunoregulatory Cell Populations and Clinical Implications. *Adv. Cancer Res.* 1984;41:257–289

- 254.** Barbouche MR, Guilbert B, Makni S, Gorgi Y, Ayed K, Avrameas S: Common idiotypes expressed on human, monoclonal, abnormal immunoglobulins and cryoglobulins with polyreactive autoantibody activities. *Clinical and Experimental Immunology*. 1993;91(2):196-201
- 255.** RF Ritchie and R Smith :Immunofixation. III. Application to the study of monoclonal proteins. *Clin Chem* 1976; 22:1982-5
- 256.** Kyle RA: The monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 1994; 40:2154-61
- 257.** Warrington, A. E., Asakura, K., Bieber, A. J., Ciric, B., Van Keulen, V., Kaveri, S. V., Rodriguez, M. (2000). Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6820–6825
- 258.** Lacroix-Desmazes S, Kaveri S V, Mouthon L, Ayoub A, Malanchère E, Coutinho A, Kazatchkine M D., Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J. Immunol. Methods*, Volume 216, Issues 1–2, 1998, Pages 117-137, ISSN 0022-1759
- 259.** Gunti S, Notkins AL. Polyreactive Antibodies: Function and Quantification. *The Journal of Infectious Diseases*. 2015;212(Suppl 1):S42-S46. doi:10.1093/infdis/jiu512
- 260.** Björck L, Kronvall G: Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol* August 1, 1984, 133 (2) 969-974;
- 261.** Grodzki A.C., Berenstein E. (2010) Antibody Purification: Affinity Chromatography – Protein A and Protein G Sepharose. In: Oliver C., Jamur M. (eds) *Immunocytochemical Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 588. Humana Press
- 262.** Sites, D.P., et al. (1976). *Basic & Clinical Immunology*. Lange Medical Publication, Los Altos, CA
- 263.** Hames, B. David, ed. Rickwood, David, ed. *Gel electrophoresis of proteins : a practical approach*. New York :. Oxford University Press,. c1990. xviii, 383 p. : 24 cm. Edición ; 1. Ed
- 264.** Sharma, L., Baker, J., Brooks, A., et al. (2005). Study of IgM Aggregation in Serum of Patients with Macroglobulinemia. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38(8), pp. 759-764
- 265.** Min, S. E., Lee, K.-H., Park, S.-W., Yoo, T. H., Oh, C. H., Park, J.-H., Yang, S. Y., Kim, Y.-S. and Kim, D.-M. (2016), Cell-free production and streamlined assay of cytosol-penetrating antibodies. *Biotechnol. Bioeng.*, 113: 2107–2112. doi:10.1002/bit.25985
- 266.** Takeuchi, Toshihide & Futaki, Shiroh. (2016). Current Understanding of Direct Translocation of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides and Its Internalization Mechanisms. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*. 64. 1431-1437. 10.1248/cpb.c16-00505
- 267.** Sali AD, Karakasiliotis I, Evangelidou M, Avrameas S, Lymberi P. Immunological evidence and regulatory potential for cell-penetrating antibodies in intravenous immunoglobulin. *Clin Trans Immunol*. 2015;4:e42
- 268.** Ji-Sun Kim, Dong-Ki Choi, Ju-Yeon Shin, Seung-Min Shin, Seong-Wook Park, Hyun-Soo Cho, Yong-Sung Kim, Endosomal acidic pH-induced conformational changes of a cytosol-penetrating antibody mediate endosomal escape, In *Journal of Controlled Release*, Volume 235, 2016, Pages 165-175, ISSN 0168-3659
- 269.** Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (50), 2597
- 270.** Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P. and Traganos, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*. 1992; 13: 795–808. doi:10.1002/cyto.990130802
- 271.** Demchenko A.P. The change of cellular membranes on apoptosis: fluorescence detection. *Experimental Oncology*. 2012; Vol. 34, No. 3

- 272.** Schwartz-Albiez R., Dill O. (2017) Assessment of Anti-Tumor Cytotoxic Activity of Naturally Occurring Antibodies in Human Serum or Plasma. In: Kaveri S., Bayry J. (eds) *Natural Antibodies. Methods in Molecular Biology*, vol 1643. Humana Press, New York, NY
- 273.** L Pauling: Nature of forces between large molecules of biological interest. *Nature*. 1948 May 8;161(4097):707-9
- 274.** Lerner RA, Tramontano A, 1987: Antibodies as enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 12, 427–438
- 275.** Stewart JD, Benkovic SJ, 1993: Recent developments in catalytic antibodies. *Int. Rev. Immunol.* 10, 229–240
- 276.** Martin AB, Schultz PG, 1999: Opportunities at the interface of chemistry and biology. *Trends Cell Biol.* 9, 24–28
- 277.** Nevinsky GA, Semenov DV, Buneva VN, 2000: Catalytic antibodies (abzymes) induced by stable transition-state analogs. *Biochem (Mosc.)* 65, 1233–1244
- 278.** Tanaka F, 2002: Catalytic antibodies as designer proteases and esterases. *Chem. Rev.* 102, 4885–4906
- 279.** Hilvert D: Critical analysis of antibody catalysis. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:751-93
- 280.** Nevinsky GA, Buneva VN: Natural Catalytic Antibodies in Norm, Autoimmune, Viral, and Bacterial Diseases. *The Scientific World J.* Vol. 10 (2010), P. 1203-1233
- 281.** Paul S, Volle DJ, Beach CM, Johnson DR, Powell MJ, Massey RJ, 1989: Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody. *Science* 244, 1158–1162
- 282.** Shuster AM, Gololobov GV, Kvashuk OA, Bogomolova AE, Smirnov IV, Gabibov AG, 1992: DNA hydrolyzing autoantibodies. *Science* 256, 665–667
- 283.** Buneva VN, Andrievskaia OA, Romannikova IV, Gololobov GV, Iadav RP, Iamkovo VI, Nevinskii GA, 1994: Interaction of catalytically active antibodies with oligoribonucleotides. *Mol. Biol. (Mosk.)* 28, 738–743
- 284.** Li L, Paul S, Tyutyulkova S, Kazatchkine MD, Kaveri S: Catalytic activity of anti-thyroglobulin antibodies. *J. Immunol.* 1995 Apr 1;154(7):3328-32
- 285.** Magorivska I, Bilyy R, Shalay O, et al.: Blood serum immunoglobulins of patients with multiple myeloma are capable of hydrolysing histone H1. *TL - 31. Exp. Oncol.* 2009;31 VN-r(2):97–101
- 286.** Bilyy R, Tomin A, Mahorivska I, et al.: Antibody-mediated sialidase activity in blood serum of patients with multiple myeloma. *J. Mol. Recognit.* 2011;24(4):576–584
- 287.** Lacroix-Desmazes S, Moreau A, Sooryanarayana, Bonnemain C, Stieltjes N, Pashov A, et al.: Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. *Nat Med.* 1999 Sep;5(9):1044-7
- 288.** Paul S, Volle DJ, Beach CM, Johnson DR, Powell MJ, Massey RJ: Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody. *Science.* 1989 Jun 9;244(4909):1158-62
- 289.** Kozyr AV, Kolesnikov AV, Aleksandrova ES, Sashchenko LP, Gnuchev NV, Favorov PV, et al.: Novel functional activities of anti-DNA autoantibodies from sera of patients with lymphoproliferative and autoimmune diseases. *Appl Biochem Biotechnol.* 1998 Oct;75(1):45-61
- 290.** Vlassov A, Florentz C, Helm M, Naumov V, Buena V, Nevinsky G, et al.: Characterization and selectivity of catalytic antibodies from human sera with RNase activity. *Nucleic Acids Res.* 1998 Dec 1;26(23):5243-50
- 291.** Baranovskii AG, Ershova NA, Buena VN, Kanyshkova TG, Mogelnitskii AS, Doromin BM, et al.: Catalytic heterogeneity of polyclonal DNA-hydrolyzing antibodies from the sera of patients with multiple sclerosis. *Immunol Lett.* 2001 Apr 2;76(3):163-7
- 292.** Nevinsky GA, Kanyshkova TG, Buneva VN, 2000: Natural catalytic antibodies (abzymes) in normalcy and pathology. *Biochem (Mosc.)* 65, 1245–1255

- 293.** Planque S, Taguchi H, Burr G, Bhatia G, Karle S, Zhou YX, et al.: Broadly distributed chemical reactivity of natural antibodies expressed in coordination with specific antigen binding activity. *J. Biol Chem.* 2003 May 30;278(22):20436-43
- 294.** Pavlovic M, Kats A, Cavallo M, Shoenfeld Y, 2010: 'Clinical and molecular evidence for association of SLE with parvovirus B19', *Lupus*, Vol. 19, No. 7, pp.783–792
- 295.** Spatz L, Iliev A, Sashenko V, Jones L, Irigoyen M, Manheimer-Lory A, Gaynor B, Putterman C, Bynoe M, Kowal C, Kuo P, Newman J, Diamond B, 1997: 'Studies on the structure, regulation, and pathogenic potential of anti-dsDNA antibodies', *Methods*, Vol. 11, pp.70–78
- 296.** Tanner JJ, Komissarov AA, Deutcher SL, 2001: 'Crystal structure of an antigen-binding fragment bound to single-stranded DNA', *J.Mol. Biol.*, Vol. 314, pp.807–822
- 297.** Pavlovic M, 2009: 'The role of anti-DNA antibodies in Systemic Lupus Erythematosus: ranges and perspectives', *Med. Data Rev.*, Vol. 1, No. 1, pp.7–11
- 298.** Dissanayake S, Denny W A, Gamage S, Sarojini V, Recent developments in anticancer drug delivery using cell penetrating and tumor targeting peptides, In *Journal of Controlled Release*, Volume 250, 2017, Pages 62-76, ISSN 0168-3659

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυσικά αντισώματα (NAbs), ανευρίσκονται στον ορό υγιών ατόμων χωρίς προηγούμενη εξωγενή αντιγονική διέγερση. Το κύριο χαρακτηριστικό των NAbs είναι η πολυδραστικότητα, δηλαδή η ικανότητα να αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα δομικά διαφορετικών αντιγόνων του 'εαυτού' και του 'ξένου'. Η ιδιότητα της πολυδραστικότητας προσδίδει στα NAbs έναν πολυδιάστατο βιολογικό ρόλο με κύριες λειτουργίες την ανοσορύθμιση και την διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Ένας διακριτός υποπληθυσμός των NAbs, τα φυσικά κυτταροδιεισδυτικά αντισώματα (CPAbs), κατέχει την ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα και ενδοκυττάρια εντοπισμού στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα. Η ιδιότητα αυτή φαίνεται να συνδέεται αμεσα με την πολυδραστικότητα που φέρουν τα CPABs ως μέρος του συνόλου των φυσικών αντισωμάτων. Ο χαρακτηρισμός και ο προσδιορισμός του βιολογικού ρόλου μονοκλωνικών φυσικών CPABs αποτελεί ένα ενδιαφέρον πεδίο για καινοτόμες θεραπευτικές προσεγγίσεις με κύριο πλεονέκτημα την έλλειψη τοξικότητας. Η μελέτη των NAbs, θα μπορούσε να παρέχει καινοτόμες εφαρμογές στην θεραπεία του καρκίνου ενώ παράλληλα μελέτες υποδεικνύουν έναν διακριτό και ύψιστης σημασίας ρόλο στην ανοσολογική επιτήρηση του οργανισμού ως μία από τις βασικότερες βιολογικές τους λειτουργίες. Η εξειδικευμένη ικανότητα αναγνώρισης, ογκοειδικών αντιγονικών στόχων (TACAs) στα εξαλλαγμένα κύτταρα από τα NAbs, φαίνεται πως είναι απόρροια της πολυδραστικής τους φύσης, αναγνωρίζοντας συντηρημένα αντιγονικά μοτίβα τα οποία εμφανίζονται κατά τις διεργασίες της εξαλλαγής των κυττάρων στην επιφάνειά τους. Το εργαστήριο Ανοσολογίας του Ινστιτούτου Παστέρ ασχολείται τα τελευταία χρόνια με την μελέτη των NAbs. Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν μονοκλωνικά CPABs προερχόμενα από υγιή BALBc ποντίκια καθώς και για πρώτη φορά, πολυκλωνικά IgG- CPABs ανθρώπινης προέλευσης που ανευρίσκονται στο σκεύασμα της ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης (IVIG). Στις τελευταίες μελέτες του εργαστηρίου, συμπεριλαμβανομένης και της παρούσας εργασίας, έγιναν προσπάθειες χαρακτηρισμού μονοκλωνικών CPABs ανθρώπινης προελεύσεως. Σε συνδυασμό με τις παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου και των βιβλιογραφικών δεδομένων, έχει φανεί πως σε ορούς ασθενών με πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες (PCDs) ανευρίσκονται με υψηλή συχνότητα μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες που φέρουν χαρακτηριστικά όμοια με αυτά των NAbs. Πληθώρα μελετών υποδεικνύει, πως σε πολλές περιπτώσεις οι παραγόμενες μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες είναι πλήρως λειτουργικά μόρια, ενώ έχουν υπάρξει πολυάριθμες αναφορές πως αυτά συχνά στοχεύουν εαυτά και ξένα αντιγόνα εμφανίζοντας παράλληλα τον πολυδραστικό χαρακτήρα των NAbs. Υπάρχουν επομένως, ισχυρες ενδείξεις ότι κάποιοι από τους B κλώνους που προσβάλλονται και πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αποτελούν B κλώνους που παράγουν NAbs. Με βάση αυτό το δεδομένο, το εργαστήριο στράφηκε στην απομόνωση ανθρώπινων μονοκλωνικών φυσικών αντισωμάτων από ορούς ασθενών με PCDs με σκοπό τον χαρακτηρισμό τους και της μελέτης της βιολογικής τους δράσης. Στην παρούσα εργασία, απομονώθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα τάξης IgG από έξι (6) ορούς ασθενών με Πολλαπλούν Μυέλωμα και έξι (6) αντισώματα τάξης IgM από ορούς ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström. Με την χρήση της τεχνικής ELISA προσδιορίστηκε η πολυδραστικότητά τους, ενώ παράλληλα, μελετήθηκε η ικανότητα αυτών να διεισδύουν σε ζώντα καρκινικά κύτταρα ανθρώπινης προελεύσεως [MDA-MB-231 (FcRγ+), HeLa (FcRγ-)]. Τέλος μελετήθηκε η επίδραση της βιολογικής τους δράσης έναντι των παραπάνω καρκινικών σειρών, ως προς την ικανότητά τους να επάγουν απόπτωση ή/και κυτταροτοξικότητα. Τα συμπεράσματα της μελέτης συννεύουν στο γεγονός πως τα απομονωθέντα αντισώματα φέρουν χαρακτηριστικά όμοια με αυτά των NAbs, ενώ παράλληλα κάποια από αυτά φάνηκε πως ανήκουν στον υποπληθυσμό των CPABs εμφανίζοντας ικανότητα διείσδυσης σε ζώντα κύτταρα μέσω είτε ενεργο- εξαρτώμενων είτε ενεργο- ανεξάρτητων μηχανισμών. Στη μελέτη μας, φάνηκε πως μετά από επώαση των κυτταρικών σειρών με τα mIgGs, αυτά είχαν την ικανότητα να επάγουν τους αποπτωτικούς μηχανισμούς στα καρκινικά κύτταρα, ενώ παράλληλα τα mIgMs οδήγησαν σε αυξημένα ποσοστά κυτταροτοξικότητας. Συμπερασματικά, φάνηκε πως οι οροί ασθενών με PCDs, αποτελούν μια

αξιοποιήσιμη πηγή φυσικών μονοκλωνικών αντισωμάτων, παρέχοντας την δυνατότητα τής περαιτέρω μελέτης των χαρακτηριστικών και των βιολογικών ιδιοτήτων των αντισωμάτων αυτών. Τα NAb, λόγω των ξεχωριστών ιδιοτήτων τους, αποτελούν ένα δελεαστικό πεδίο μελέτης σε επίπεδο βασικής έρευνας, ενώ στο πεδίο της εφαρμοσμένης έρευνας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αυτούσια θεραπευτικά μόρια ή ως φορείς βιοδραστικών ουσιών. Τέλος, μία πρωτοποριακή ιδέα, είναι και η συνδυαστική χρήση τους ως μεταφορείς ουσιών οι οποίοι παράλληλα φέρουν και ενδογενή δραστικότητα. Η ικανότητα της εξειδικευμένης, πολλαπλής στόχευσης με τη χρήση των φυσικών CPAb αποτελεί λοιπόν, ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα της μελέτης και της εφαρμογής τους στη θεραπεία.

Abstract

Natural antibodies (Naturally occurring Antibodies- NAbs) are antibodies present in the serum of healthy subjects without previous antigenic stimulation. NAbs have the ability to recognize self-and non self- antigens providing a surveillance system of the organism's molecular state and confers to homeostasis, acting as a humoral element of innate immunity. Cell penetrating antibodies- CPABs, a distinct subpopulation of NAbs, have the ability to penetrate living cells and accumulating in the cytoplasm or the nucleus. Polyreactivity seems to be directly related to the penetration ability of CPABs and therefore they represent a potential pharmaceutical weapon against various diseases. More specifically the use of NAbs in cancer therapy has gained a lot of interest. Particularly, IgM- NAbs recognize specifically antigens on the surface of tumor cells called tumor-associated-carbohydrate-antigens (TACAs) and the polyreactive nature of these NAbs seems to play a major role in this recognition. The Immunology Laboratory of the Hellenic Pasteur Institute has been working on the characterization of natural antibodies, mostly on CPABs subpopulation. In more detail, monoclonal natural CPABs from BALB/c mice were isolated and the sub group of IgG- CPABs was detected in the commercial preparation of intravenous immunoglobulin (IVIG). Latest studies, including the present one, were focused on the isolation of human monoclonal CPABs from the sera of patients with plasma cell dyscrasias (PCDs). In PCDs pathogenesis, a B cell clone starts randomly to over multiple itself, suppressing the others and resulting in the production of high levels of monoclonal Igs in the serum. In most cases, these mIgs are functional. Literature provides evidence that mIgs producing B-cell clones that have undergone malignancy may under physiological conditions produce NAbs. With this in mind, our laboratory focused in the research of human monoclonal "natural" CPABs derived from the sera of patients with PCDs. In this study, six (6) mIgGs from sera of patients with Multiple Myeloma and six (6) mIgMs from sera of patients with Waldenström's macroglobulinemia were selected and isolated based on their ability to act as polyreactive antibodies. With the use of ELISA we identified their polyreactivity and examined their ability to penetrate into cancer cells (HeLa and MDA-MB-231) *in vitro*. Subsequently, we examined their biological function on the above human cancer cells, their ability to induce apoptosis and/ or cytotoxicity, and lastly their possible catalytic activities, by hydrolyzing nucleic acids. Our results validate that the isolated mIgs share common features with NAbs and indicate that some of them have the ability to penetrate living cells through energy-dependent and/ or energy- independent manner. Our study on the biological effect of our isolated mAbs indicates that mIgGs induce mainly apoptosis on the cancer cells studied, whereas mIgMs showed a distinct cytotoxic effect. In conclusion, we demonstrate that sera of patients with PCDs represent an excellent source of natural antibodies, which can be exploited in a wide range of applications. Indeed, the multiple biological functions of NAbs make them a potential therapeutic tool in therapy and diagnosis of many disorders such as cancer. Natural CPABs can be used for drug delivery, to deliver intracellular compounds with the desired biological activity, or they can be used in therapy *per se* as they express their own biological activities. Finally an innovative use of natural CPABs could be their combinational use as carriers of biologically effective drugs, having together a desirable endogenous biological activity.