



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα Ιατρικής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία:
«Μελέτης της φωσφορυλίωσης της κινάσης Syk σε ενεργοποιημένα Β
λεμφοκύτταρα ασθενών με Συστηματική Σκλήρυνση»

Χριστοφορίδη Ευαγγελία

Τριμελής Επιτροπή:
Μπόγδανος Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων
Γερμενής Αναστάσιος, Ομότιμος Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας
Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη μοριακή
ιατρική

Λάρισα, Απρίλιος 2020



UNIVERSITY OF THESSALY



SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
Faculty of Medicine

MASTER PROGRAMME IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS
“Investigating the phosphorylation of Syk kinase in B cells of patients
with Systemic Sclerosis”

Christoforidi Evangelia

Master Thesis committee:

Bogdanos Dimitrios, Associate Professor of Medicine and Autoimmune diseases
Germentis Anastasios, Professor (Emeritus) of Laboratory Immunology
Speletas Matthaios, Professor of Medical Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine, School of Health Sciences of the University of Thessaly in
partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Molecular Medicine

Larissa, April 2020

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες

Συντομογραφίες

Περίληψη

Abstract

1. Εισαγωγή

1.1 Ανοσιακή Απόκριση

1.1.1. Τα κύτταρα της ανοσιακή απόκρισης

1.1.2. Εκκρίσεις της ανοσιακή απόκρισης

1.2. Μεταγωγή σήματος

1.3. Κινάσες Τυροσίνης (PTKs)

1.3.1. Η κινάση Spleen Tyrosine Kinase, Syk

1.3.2. Μοριακός μηχανισμός της Syk

1.4. Ανοχή

1.5. Απόπτωση

1.6. Αυτοανοσία

1.6.1. Αυτοάνοσα Ρευματικά νοσήματα

A. Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (Systemic Lupus Erythymatosous, SLE)

B. Νόσος μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (Graft Versus Host Disease, GVHD)

Γ. Συστηματική Σκλήρυνση ή Σκληρόδερμα (Systemic Sclerosis, SSc)

1.7. Κυτταρική Ανοσία και Αυτοάνοσα Ρευματικά νοσήματα

2. Σκοπός

2.1. Μέρος Α

2.2. Μέρος Β

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Υλικά

3.1.1. Βιολογικά Δείγματα

3.2. Μέθοδοι

3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση με Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry)

3.2.2. Διαχωρισμός κυττάρων (δειγμα ολικού αίματος 20 ml)

3.2.3. Καλλιέργεια λευκών αιμοσφαιρίων

3.2.4. Κυτταρομετρική Ανάλυση

3.2.5. Στατιστική Ανάλυση

3.3. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

4. Αποτελέσματα

4.1. Συμπεράσματα από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση

4.1.1. Μελέτες Syk στον SLE

4.1.2. Μελέτες Syk σε GVHD και SSc

A.GVHD και Syk

B.SSc και Syk

4.2. Αποτελέσματα της κυτταρομετρικής ανάλυσης CD20-pSyk

4.2.α. Σύγκριση διαφορετικών υποστρωμάτων για ανίχνευση pSyk

4.2.β. Απενεργοποίηση φωσφατασών, PTPs

4.2.γ. Υπολογισμός πληθυσμού κυττάρων CD20+Syk+

5. Συζήτηση

6. Βιβλιογραφία

Ευχαριστίες

Σε κάθε μεταβολικό μονοπάτι εντός του κυττάρου, μια αλλαγή διεγείρει μια επόμενη. Η παρουσίαση της διπλωματικής μου εργασίας σηματοδοτεί τη λήξη της φοίτησής μου στο Τμήμα Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Φτάνοντας στο τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου, κύριο Μπόγδανο Δημήτρη, ο οποίος με εμπιστεύτηκε όταν του ζήτησα να πραγματοποιήσω τα πειράματα της διπλωματικής μου εργασίας στο εργαστήριό του, δίνοντάς μου την ευκαιρία να ασχοληθώ με την παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων, που ήταν ο λόγος για τον οποίο αιτήθηκα στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα. Με την καθοδήγησή του πήραν μορφή τα πειράματα που παρουσιάζονται στη συνέχεια, και μου ανοίχθηκε ένας νέος κλάδος γεμάτος καινούριες γνώσεις.

Ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου για τη συνεργασία, και ειδικά το Μαυρόπουλο Θάνο, ο οποίος επιτηρούσε και καθοδηγούσε τα πειράματα μου με τον καλύτερο δυνατό τρόπο. Χάρη σε εκείνον βελτίωσα τις γνώσεις μου στην κυτταρομετρία ροής, τεχνική που πλέον αποτελεί βασικό προσόν στο βιογραφικό μου. Ευχαριστώ τη Χουτεσιώτη Σοφία, για το χρόνο που αφιέρωσε στην επικοινωνία μας και την ανεκτίμητη εξυπηρέτηση, καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου.

Ευχαριστώ τους Καθηγητές κυρίους Γερμενή Αναστάσιο και Σπελέτα Ματθαίο για την επίβλεψη της διπλωματικής εργασίας, ως μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Ευχαριστώ την οικογένειά μου για την ουσιαστική στήριξή τους σε κάθε μου βήμα. Πνευματική, σωματική και υλική, αποτελεί πάντα το στήριγμά μου για τη διεκπεραίωση των στόχων μου.

Συντομογραφίες

- Κινάσες τυροσίνης, Protein Tyrosine Kinases, PTKs
- Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας, major histocompatibility complex, MHC
- Νόσος Μοσχεύματος έναντι του Ξενιστή, Graft Versus Host Disease, GVHD
- Σύμπλεγμα διαφοροποίησης, Cluster of Differentiation, CD
- Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος, Systemic Lupus Erythymatosous, SLE
- Συστηματική Σκλήρυνση, Σκληρόδερμα, Systemic Sclerosis, SSc
- Υποδοχέας Β κυττάρων, B cell receptor, BCR
- Υποδοχέας Τ κυττάρων, T cell receptor, TCR
- Φωσφορυλιωμένη μορφή της Syk, phosphor-Syk, p-Syk
- Immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM
- monoclonal Antibody, mAb
- polyclonal Antibody, pAb
- Peripheral Blood Nuclear Cells, PBMCs
- P-selectin Glycoprotein Ligand-1, PSGL-1
- Spleen Tyrosine Kinase, Syk
- Transformation Growth Factor β 1, TGF- β 1

Περίληψη

Τα Β λεμφοκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως η Νόσος Μοσχεύματος έναντι του Ξενιστή και ο Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος. Η κινάση Syk εμπλέκεται στη σηματοδότηση των Β λεμφοκυττάρων μέσω του υποδοχέα τους BCR. Ακόμη η καταστολή της κινάσης Syk, έχει προταθεί ως θεραπευτικό μέσο στα νοσήματα αυτά. Η παρούσα εργασία περιλαμβάνει θεωρητικό και πειραματικό παραδοτέο. Πρώτον, πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση με σκοπό τη συλλογή πληροφοριών και πειραματικών πρωτοκόλλων που αφορούν στο ρόλο της κινάσης Syk σε Β λεμφοκύτταρα ασθενών με Νόσο Μοσχεύματος έναντι του Ξενιστή, Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο ή Συστηματική Σκλήρυνση. Οι πληροφορίες αφορούν σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, και σε μικρότερο ποσοστό σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα από ασθενείς, στοχεύοντας στην ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων και στα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής της κινάσης Syk. Συμπέρασμα της ανασκόπησης είναι πως, παρά τα περιορισμένα δεδομένα που έχουν δημοσιευθεί, το μονοπάτι της Syk υποδεικνύεται ως πιθανός μοριακός στόχος για τη θεραπευτική παρέμβαση του Συστηματικού Ερυθματώδους Λύκου, της Νόσου Μοσχεύματος Έναντι του Ξενιστή και της Συστηματικής Σκλήρυνσης, καθώς και ότι η Syk κατέχει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία πνευμονικής ίνωσης σε ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση. Δεύτερον, σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυτταρομετρίας ροής σε απομονωμένα λεμφοκύτταρα ασθενών με Συστηματική Σκλήρυνση και υγιών δότην. Αρχικός στόχος ήταν η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου, ώστε να εδραιωθούν οι συνθήκες ταυτόχρονης προσμέτρησης ενεργοποίησης των Β κυττάρων και φωσφορυλίωσης της Syk. Έπειτα από τη δοκιμή διαφορετικών συνθηκών ενεργοποίησης και επώασης, εφαρμόστηκε το τελικό πρωτόκολλο σε ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση, και υγιείς δότες. Η κινάση Syk και ο πρωτεϊνικός υποδοχέας CD20 των Β κυττάρων, σημάνθηκαν ώστε να υπολογιστεί το ποσοστό της phospho-Syk στο κυτταρόπλασμα των Β κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα φωσφορυλίωσης της Syk, σε ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση και υγιείς δότες, με τη φωσφορυλίωση να είναι χαμηλότερη σε ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση, χωρίς όμως η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από μικρό αριθμό δότην και, για το λόγο αυτό η παρούσα ερευνητική εργασία χρήζει επιπλέον πειραμάτων για να οδηγήσει σε πιο ασφαλή συμπεράσματα.

Abstract

B lymphocytes play an important role in the pathogenesis of autoimmune diseases such as Graft versus Host Disease and Systemic Lupus Erythematosus. Syk kinase is involved in B cell signaling through their BCR receptor. In addition, suppression of Syk kinase has been suggested as a therapeutic agent in these diseases. The present work includes theoretical and experimental deliverables. First, a literature review was conducted to collect information and experimental protocols regarding the role of Syk kinase in B lymphocytes from patients with Systemic Lupus Erythematosus, Graft Versus Host Disease, or Systemic Sclerosis. The information relates to studies performed on experimental mouse models, and to a lesser extent on human lymphocytes from patients, aimed at B lymphocyte activation and levels of the phosphorylated form of Syk kinase. The conclusion of the review is that, despite the limited data that have been published, the Syk pathway is indicated as a potential molecular target for therapeutic intervention for Systemic Lupus Erythematosus, Graft Versus Host Disease, and Systemic Sclerosis, as well as Syk plays a crucial role in the development of pulmonary fibrosis in patients with Systemic Sclerosis. Second, in a subsequent step, experiments with flow cytometry were performed on isolated lymphocytes of patients with Systemic Sclerosis and healthy donors. The initial aim was to optimize the protocol in order to establish the conditions for simultaneous B cell activation and Syk phosphorylation. After testing different conditions of activation and incubation, the final protocol was applied to B lymphocytes from patients with Systemic Sclerosis and healthy donors. Syk kinase and the B lymphocyte receptor CD20 were labeled to calculate the percentage of phosphor-Syk in the B cell cytoplasm. The results show different levels of phosphorylation of Syk in patients with Systemic Sclerosis and healthy donors, with the phosphorylation being lower in patients with Systemic Sclerosis, though the difference is not statistically significant. This conclusion is drawn from a small number of donors therefore, the present research needs further experiments to lead to safer conclusions.

Εισαγωγή

1.1 Ανοσιακή Απόκριση

Ανοσία είναι η κατάσταση που προκύπτει από μηχανισμούς προστασίας από ξένα παθογόνα ή ουσίες (αντιγόνα), τα οποία δεν βρίσκονται στον ξενιστή και εκλαμβάνονται ως «ξένα». Ως αντιγόνα, αναγνωρίζονται ιοί, βακτήρια, μύκητες και τμήματα αυτών, κα.

Η ανοσιακή απόκριση των σπονδυλωτών μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες: την έμφυτη και την προσαρμοστική [1].

Έμφυτη ανοσιακή απόκριση

Η έμφυτη, αλλιώς μη ειδική, απόκριση είναι η πρώτη γραμμή άμυνας. Αποκρίνεται είτε με κατά μέτωπο επίθεση, χρησιμοποιώντας κωδικοποιημένα μόρια αναγνώρισης και φαγοκύτταρα, είτε μέσω σύνθεσης κυτοκινών, χημειοκινών και άλλων μεσολαβητών με αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονής [2].

Προσαρμοστική ανοσιακή απόκριση

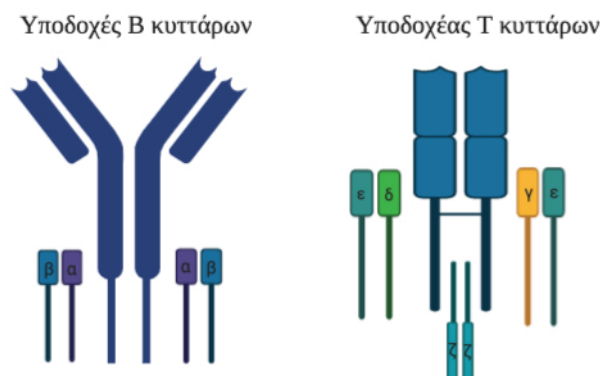
Η προσαρμοστική, αλλιώς ειδική, ανοσιακή απόκριση είναι η δεύτερη γραμμή άμυνας. Στηρίζεται στους επιφανειακούς υποδοχείς που διαθέτουν τα λεμφοκύτταρα, οι οποίοι ονομάζονται υποδοχείς B και T λεμφοκυττάρων (B, T cell receptors, BCR, TCR). Οι υποδοχείς, αυτοί, προκύπτουν από τυχαίες αναδιατάξεις του DNA κατά την ανάπτυξη των B και T λεμφοκυττάρων [1].

Η ειδική ανοσιακή απόκριση, διαιρείται σε δύο επιμέρους είδη απάντησης: τη χυμική και την κυτταρική.

Η χυμική ανοσία περιλαμβάνει την καταπολέμηση παθογόνων παραγόντων μέσω αντισωμάτων, τα οποία παράγονται από τα πλασματοκύτταρα (διαφοροποιημένα B λεμφοκύτταρα) και ανιχνεύονται στο αίμα και σε άλλα βιολογικά υγρά.

Η κυτταρική ανοσία περιλαμβάνει κυρίως (αλλά όχι αποκλειστικά) αντιγονοειδικά T λεμφοκύτταρα, τα οποία σκοπεύουν στον έλεγχο ή στην εξάλειψη των παθογόνων και αλληλεπιδρούν με άλλα κύτταρα για την πρόκληση αποτελεσματικής ανοσιακής απόκρισης [1]. Για παράδειγμα, η αλλαγή κλάσης και η διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων αποτελούν διαδικασίες οι οποίες ρυθμίζονται από τα T-λεμφοκύτταρα [3].

Με τη διαδικασία της κλωνικής επιλογής, δημιουργούνται κλώνοι T και B λεμφοκυττάρων λόγω διαφορετικών TCR και BCR, αντίστοιχα. Κάθε ένας από τους κλώνους ενεργοποιείται ειδικά, έναντι συγκεκριμένου αντιγόνου. Παρά την μοριακή ποικιλότητα των T και B κυττάρων, η δομή των TCR και BCR, που αγκυροβολεί διαμεμβρανικά στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων, είναι όμοια σε όλους τους κλώνους (Εικ:1). Χάρη στην ειδικότητα των αντιγονικών υποδοχέων, και δεδομένου ότι σε κάθε λεμφοκυτταρικό κλώνο εκφράζεται ένας συγκεκριμένος τύπος υποδοχέα, τα λεμφοκύτταρα στοχεύουν ειδικά αντιγόνα [4].



Εικ.1: Απεικόνιση δομής BCR και TCR. Δημιουργήθηκε με bio render
<<https://app.biorender.com/illustrations/edit/5d82313bc8e5be008292f1e1>>

1.1.1. Τα κύτταρα της ανοσιακή απόκρισης

Η ανοσιακή απόκριση προκύπτει από τις συντονισμένες δράσεις πολλών τύπων κυττάρων και οργάνων. Τα ώριμα κύτταρα του ανοδικού συστήματος περιλαμβάνουν: αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα διαφόρων τύπων (δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, Β λεμφοκύτταρα), φαγοκύτταρα (μακροφάγα, ουδετερόφιλα, εωσινόφιλα, βασεόφιλα) και λεμφοκύτταρα (Τ, Β και φυσικά κύτταρα φονείς) [2].

Τα περισσότερα αντιγόνα φέρουν χημικές δομές οι οποίες δεν ανιχνεύονται στα θηλαστικά, και χαρακτηρίζονται ως μοριακές δομές αναγνώρισης παθογόνου (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Αυτές οι δομές αναγνωρίζονται από υποδοχείς που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, τόσο της ειδικής όσο και της φυσικής ανοσίας. Πρόκειται για τους πρωτεϊνικούς υποδοχείς αναγνώρισης παθογόνου (pattern recognition receptors, PRRs), οι οποίοι αναγνωρίζουν ειδικές πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, νουκλεϊκά οξέα, ως συστατικές δομές των αντιγόνων [5].

Τα λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε τρεις τύπους: τα Β λεμφοκύτταρα (Β κύτταρα), τα Τ λεμφοκύτταρα (Τ κύτταρα) και τα φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer, NK). Εκτός από τους υποδοχείς των Τ και Β λεμφοκυττάρων, υπάρχουν επιφανειακές πρωτεΐνες που εκφράζονται για να διαφοροποιηθούν οι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται “σύμπλεγμα διαφοροποίησης” (cluster of differentiation, CD) [5].

Στη φυσική/μη ειδική ανοσία συμβάλλουν τα φαγοκύτταρα, ορισμένα από τα αντιγονοπαρουσιαστικά και τα NK [2].

Στην προσαρμοστική/ ειδική ανοσία κυρίαρχο ρόλο παίζουν τα Τ και Β λεμφοκύτταρα. Τα Β λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν διαλυτά ή σωματιδιακά αντιγόνα και τα δεσμεύουν στο μόριο ανοσοσφαιρίνης (αντίσωμα), του BCR, το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται ειδικά με το αντιγόνο. Μέσω αυτής της δέσμευσης τα Β λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα, τα οποία χάνουν την έκφραση της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης και εξειδικεύονται στην έκκριση αντισώματος. Τα αντισώματα που παράγονται, ανήκουν σε διαφορετικούς ισότυπους, οι οποίοι προκύπτουν μέσω της διαδικασίας ανασυνδυασμού αλλαγής κλάσης. Ο ανασυνδυασμός πραγματοποιείται στα γονίδια ανοσοσφαιρίνης των σωματικών κυττάρων, και αποτελεί ένα μέσω αύξησης της συγγένειας των αντισωμάτων [6].

Οι υποδοχείς των Τ λεμφοκυττάρων αναγνωρίζουν μόνο τα επεξεργασμένα τμήματα του αντιγόνου, που έχει δεσμευθεί σε πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης, τα μόρια μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC). Τα τμήματα του αντιγόνου που αναγνωρίζουν οι TCR, έχουν προηγούμενα δεσμευθεί και παρουσιαστεί από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen presenting cells- APCs)[1][2].

Ως APCs δρουν κυρίως τα δενδριτικά κύτταρα, αλλά και τα Β λεμφοκύτταρα (ως non professional APCs) και τα μακροφάγα. Δεδομένου ότι, τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα, αποτελούν κατηγορίες κυττάρων της φυσικής άμυνας, η αναγνώριση του αντιγόνου και η αντιγονοπαρουσίασή του, επιτελείται μέσω συνεργασίας των δυο γραμμών άμυνας και των αντίστοιχων κυτταρικών πληθυσμών [1] [7].

1.1.2. Εκκρίσεις της ανοσιακή απόκρισης

Την αναγνώριση και τη σύνδεση του αντιγόνου, τόσο με τα κύτταρα στη φυσικής όσο και με αυτά της προσαρμοστικής ανοσίας, ακολουθεί έκκριση μορίων που επικοινωνούν μεταξύ κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, και αναφέρονται ως κυτοκίνες. Γενικά, οι κυτοκίνες είναι διαλυτά πρωτεϊνικά μόρια, αν και μερικά υπάρχουν και σε δεσμευμένη

μορφή στην κυτταρική μεμβράνη. Υπάρχουν 6 κύριες οικογένειες κυτοκινών με τους αντίστοιχους υποδοχείς, και η διάκριση γίνεται ανάλογα με τη δομή και τη δράση τους [5]:

1. Ιντερλευκίνη 1, (Interleukin, IL-1)
2. Αιμοποιητίνες (κλάση I)
3. Ιντερφερόνες (κλάση II)
4. Παράγοντας Νέκρωσης Ογκού, (Tumor Necrosis Factor, TNF)
5. Ιντερλευκίνη 17, IL-17
6. Χυμοκίνες

Η αλληλεπίδραση μιας κυτοκίνης με τον υποδοχέα της σε ένα κύτταρο στόχο, μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη μεμβράνη του κυττάρου στόχου, επιτρέποντάς της έτσι να μετακινηθεί από τη μια θέση στην άλλη. Οι κυτοκίνες μπορούν, επίσης, να σηματοδοτούν ένα ανοσοκύτταρο για να αυξάνουν ή να μειώνουν τη δραστηριότητα συγκεκριμένων ενζύμων ή να αλλάζουν το μεταγραφικό του πρόγραμμα, τροποποιώντας έτσι και ενισχύοντας τις λειτουργίες του τελεστή του [1]. Για παράδειγμα, τα κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, ηωσινόφιλα) της φυσικής ανοσίας εκκρίνουν κυτοκίνες που ρυθμίζουν την διαφοροποίηση των T και B λεμφοκυττάρων, επικοινωνώντας έτσι με την προσαρμοστική ανοσία. Τέλος, οι κυτοκίνες ρυθμίζουν την ένταση και τη διάρκεια της ανοσοαπόκρισης με διέγερση ή αναστολή της ενεργοποίησης, πολλαπλασιασμού και / ή διαφοροποίησης διαφόρων κυττάρων, ρυθμίζοντας την έκκριση άλλων κυτοκινών ή αντισωμάτων ή σε μερικές περιπτώσεις προκαλώντας προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο στο κύτταρο στόχο [1].

1.2. Μεταγωγή σήματος

Ο βασικός τρόπος επικοινωνίας των κυττάρων στους πολυκύτταρους οργανισμούς είναι η μεταγωγή σήματος από το εξωτερικό στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω ειδικής ομάδας ενζύμων, τις κινάσες τυροσίνης (Protein Tyrosine Kinases, PTKs). Τα πρώτα μόρια που λαμβάνουν σήμα ενεργοποίησης στο εσωτερικό του κυττάρου είναι οι κινάσες (π.χ. κινάσες τυροσίνης, κινάσες σερίνης / θρεονίνης). Η μετάδοση σήματος ξεκινά με τη μεταφορά μορίων ATP στην καταλυτική υπομονάδα του πρωτεϊνικού μορίου, φωσφορυλιώνοντάς το [8]. Το σήμα που λαμβάνεται από τη δράση των κυτοκινών σε συνδυασμό με το σήμα από το σύμπλοκο αντιγόνο-υποδοχέα, μεταφράζεται σε μια σειρά σηματοδοτήσεων και ενεργοποίησης διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών, στο ίδιο ή σε γειτονικά κύτταρα [8].

Οι κινάσες αποτελούν ένζυμα τα οποία φωσφορυλιώνονται και φωσφορυλιώνουν, προκειμένου να μεταδώσουν μοριακά σήματα σε έναν αριθμό διαφορετικών οδών. Τα σήματα αυτά αφορούν στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση, την επικοινωνία, τη μετανάστευση και τις μεταβολικές αλλαγές των κυττάρων. Η σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα προκαλεί σύνδεση παρόμοιων υποδοχέων σε διαφορετικά σημεία, προκαλώντας έτσι την ενεργοποίηση υποδοχέων ειδικών για PTKs [1]. Η δυσλειτουργία των PTKs προκαλεί διαταραχή των λειτουργιών μεταγωγής σήματος που ελέγχονται από αυτές και τροποποιούν την ανοσιακή απόκριση.

1.3. Κινάσες Τυροσίνης (PTKs)

Πολλά μονοπάτια σηματοδότησης, ιδιαίτερα εκείνα που σηματοδοτούν την κυτταρική ανάπτυξη ή τον πολλαπλασιασμό, αρχίζουν με ένα γεγονός φωσφορυλίωσης τυροσίνης. Οι PTKs μεταφέρουν σήμα από διαφορετικούς υποδοχείς όπως αντιγονικούς υποδοχείς των λευκοκυττάρων (BCR, TCR) και υποδοχείς κυτοκινών, γι' αυτό το λόγο αποτελούν διαμεσολαβητές της στρατολόγησης και της ενεργοποίησης πολλών λευκοκυτταρικών πληθυσμών [9].

Διακρίνονται δύο κατηγορίες τυροσινικών κινασών: οι υποδοχείς (Receptor PTKs) και οι κυτταροπλασματικές (Non-Receptor PTKs) [10]. Οι υποδοχείς τυροσινικές κινάσες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με ένα εξωτερικό κομμάτι που δεσμεύει προσδεδεμένα μόρια, μια διαμεμβρανική έλικα και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα που περιλαμβάνει την περιοχή κινάσης και τις ρυθμιστικές περιοχές. Οι κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης, αποτελούμενες από τις ρυθμιστικές περιοχές, βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, χωρίς να συνδέονται με κάποιο διαμεμβρανικό μόριο [11].

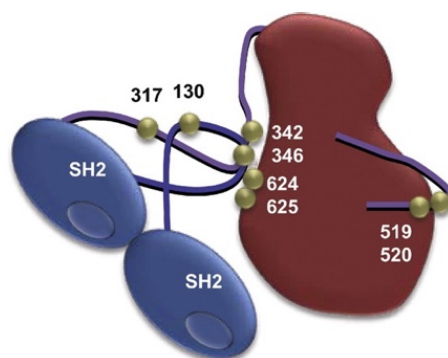
Κάθε PTK διαθέτει δύο θέσεις τυροσίνης στις οποίες μπορούν να φωσφορυλιωθούν: μία ανασταλτική και μία ενεργοποιητική θέση. Σε κατάσταση ηρεμίας, η ανασταλτική θέση φωσφορυλιώνεται και η κινάση αναδιπλώνεται από μόνη της, σχηματίζοντας δεσμό μεταξύ μιας εσωτερικής ομάδας-SH2 και του ανασταλτικού φωσφορικού, προστατεύοντας την ενεργό θέση του ενζύμου. Η διάσπαση της φωσφορικής ομάδας από την ανασταλτική τυροσίνη επιτρέπει στο ένζυμο να αναδιπλώσει τη δομή του και να αποκαλύψει την ενεργό θέση. Περαιτέρω ενεργοποίηση του ενζύμου λαμβάνει χώρα όταν μια δεύτερη τυροσίνη φωσφορυλιώνεται, σταθεροποιώντας την ενεργοποιημένη κατάσταση [12].

Υπάρχουν δέκα διαφορετικές οικογένειες κυτταροπλασματικών κινασών τυροσίνης, μεταξύ των οποίων οι Src, Jak και Syk.

1.3.1. Η κινάση Spleen Tyrosine Kinase, Syk

Η Syk (Spleen Tyrosine Kinase) αποτελεί μια κυτταροπλασματική PTK, μέλος της οικογένειας των μη συνδεδεμένων με υποδοχείς κινασών. Το γονίδιο *SYK*, που την κωδικοποιεί βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 και, εκφράζεται τόσο στα αιμοποιητικά όσο και στα επιθηλιακά κύτταρα [13]. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε βιολογικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής προσκόλλησης, της ανοσιακή αναγνώρισης, της ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και της αγγειακής ανάπτυξης [14].

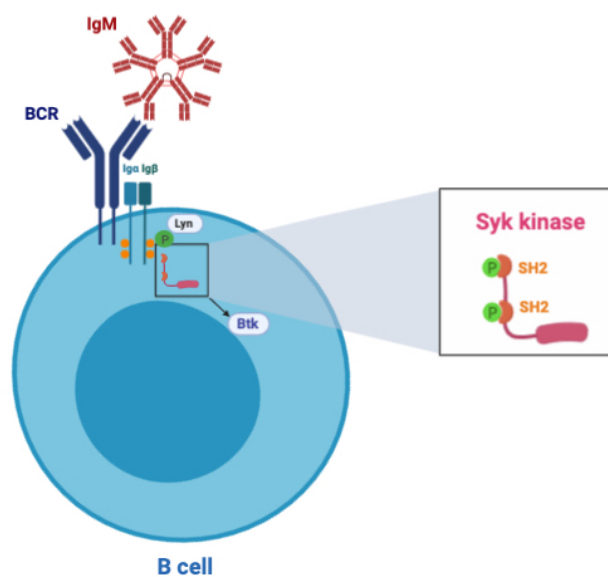
Το μήκος του μορίου είναι 72 kDa, και χαρακτηρίζεται από δυο SH2 υπομονάδες στο αμινοτελικό άκρο (Εικ.2). Η κυτταροπλασματική κινάση Syk, ενεργοποιείται μέσω υποδοχέων όπως ο BCR, ο TCR και ο Fc receptor (FcR) [15]. Οι υποδοχείς αυτοί, αν και ετερογενείς στο εξωκυττάριο τμήμα, διαθέτουν τη συντηρημένη περιοχή φωσφορυλίωσης ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) στο εσωτερικό τους, με δύο τυροσίνες που φωσφορυλιώνονται αμέσως μετά την ενεργοποίησή τους, όπως οι ανοσοσφαιρίνες Iga και Igb του BCR [16]. Αμέσως μετά τη δημιουργία συμπλόκου, αντιγόνο-υποδοχέα, ακολουθεί η φωσφορυλίωση των τυροσινών στις κυτταροπλασματικές ουρές του υποδοχέα Iga και Igb (CD79a-CD79b), όπως στην περίπτωση του BCR. Κάθε Iga, Igb αλυσίδα διαθέτει δυο μόρια ITAM. Οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες των μορίων ITAM, αναγνωρίζονται από τις υπομονάδες SH2 της Syk, με σκοπό την ενεργοποίηση επιπλέον μορίων προσκόλλησης και την ενεργοποίηση καθοδικών μονοπατιών με αποτέλεσμα την κυτταρική απόκριση (Εικ.3) [14]. Το καρβοξυτελικό άκρο της SH2 υπομονάδας είναι αυτό που μεσολαβεί στη στρατολόγηση της Syk στον υποδοχέα, έπειτα από τη φωσφορυλίωση των Iga, Igb (Εικ.3). Αντίστοιχα, απενεργοποίηση του καρβοξυτελικού άκρου οδηγεί στη ανικανότητα της Syk να σηματοδοτεί επιπλέον μόρια [17].



Εικ.2: Πρότυπη δομή της κινάσης Syk. Οι αριθμοί υποδεικνύουν τα κύρια σημεία φωσφορυλίωσης των τυροσινών. (Robert L. Geahlen, / Biochimica et Biophysica Acta 1793 (2009) 1115–1127)

Η Syk, είναι από τις πρώτες κινάσες που προσδένεται μέσω των περιοχών της στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες των ανοσο-υποδοχέων. Λόγω της θέσης της, ψηλά στα μονοπάτια μετάδοσης σήματος, ο ρόλος της στα κύτταρα του ανοσοποιητικού και αιμοποιητικού συστήματος είναι πολύπλευρος και εξαιρετικά απαραίτητος. Για παράδειγμα, επάγει τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των Β κυττάρων, την κλωνική τους επέκταση και την επάνοδό τους στο κυκλοφορικό σύστημα[16]. Στα Τ λεμφοκύτταρα η Syk προάγει τη θετική επιλογή και τη διαφοροποίησή τους. Επίσης, θεωρείται απαραίτητη για την ενεργοποίηση των NK κυττάρων, των ουδετερόφιλων, των μακροφάγων και των αιμοπεταλίων.

Ανεπάρκεια της Syk, οδηγεί σε περιεμβρυϊκή θνησιμότητα εξαιτίας του ελλειπούς διαχωρισμού αιματικών και λεμφαγγείων [9]. Ο συσχετισμός της Syk με διαφορετικού τύπου ασθένειες έχει οδηγήσει στην εκτενή μελέτη του μορίου και στην ανάπτυξη ειδικών μορίων αναστολέα, με σημαντικά αποτελέσματα σε *in vitro* πειράματα. Για το λόγο αυτό έχει υποδειχθεί ως πιθανός θεραπευτικός στόχος σε ορισμένες αυτοάνοσες ασθένειες που σχετίζονται με ίνωση, συμπεριλαμβανομένου της συστηματικής σκλήρυνσης και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας [18].



Εικ.3: Ενεργοποίηση της Syk έπειτα από τη σύνδεση IgM στον BCR. Δημιουργήθηκε με bio render <<https://app.biorender.com/illustrations/edit/5d82313bc8e5be008292f1e1>>

1.3.2. Μοριακός μηχανισμός της Syk

Η Syk, αλληλεπιδρά με τον BCR, με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωσή της και την ενεργοποίησή της ενζυμικής της δραστηριότητας [19]. Η σύνδεση του BCR με το αντιγόνο, προκαλεί διαφοροποίηση στην ενεργότητα ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών, μέσω της ικανότητας του BCR να ενεργοποιεί τη Syk. Μετά την ενεργοποίηση του BCR η Syk φωσφορυλιώνεται σε πολλαπλές θέσεις τυροσινών, μερικές από τις οποίες αποτελούν σημείο αγκυροβολίας για μόρια καθοδικά της Syk τα οποία διαθέτουν επίσης την υπομονάδα SH2, η οποία τα καθιστά ικανή την αλληλεπίδρασή τους. Το περισσότερο ταυτοποιημένο μόριο που αλληλεπιδρά με τη Syk, μέσω της καταλυτικής της υπομονάδας, είναι η PI3K. Η PI3K αποτελείται από υπομονάδες, μεταξύ των οποίων η p85. Η p85 με τη σειρά της διαθέτει την

υπομονάδα SH2 της οποίας το καρβοξυτελικό άκρο είναι ικανό να αλληλεπιδράσει με την pSyk (pTyr 317) [20]. Η παραμονή του συμπλόκου Syk-BCR στην πλασματική μεμβράνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο χρονικό διάστημα που θα παραμείνει ενεργή η Syk, από τη στιγμή που το αντιγόνο προσδέεται στον BCR. [17]. Υπάρχει ευρύ φάσμα μορίων/υποστρωμάτων κάτωθεν της Syk, με τα οποία αυτή συνδέεται και προκαλείται η ενεργοποίησή τους, είτε απευθείας είτε μέσω προσαρμοστών, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τη λειτουργία που πρέπει να εκτελεστεί.

Έπειτα από τη σύνδεση με τον υποδοχέα και τη φωσφορυλίωση, η Syk συνδέεται με ανοσο-υποδοχείς και φωσφορυλιώνει καθοδικά μόρια τα οποία οδηγούν στη μετακίνηση Ca^{2+} , στην έναρξη λειτουργίας εξωκυττάρων κινασών και κινασών με μιτογόνο δράση, καθώς και στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων.

Δομικά η Syk, όπως αναφέρθηκε, αποτελείται από δυο υπομονάδες SH2, με αμινο-τελικό άκρο οι οποίες διαχωρίζονται από έναν εσωτερικό προσδέτη-SH2, μια περιοχή σύνδεσης της κινάσης και, το καρβοξυτελικό άκρο της κινάσης. Προκειμένου να συνδεθεί η Syk στους ανοσο-υποδοχείς, απαιτείται πρόσδεση της υπομονάδας SH2 της Syk στις ενδοκυττάριας περιοχές του υποδοχέα που διαθέτουν τα μόρια ενεργοποίησης τυροσίνης, τα ITAMs. Η ενεργοποίηση της Syk και οι μετέπειτα αλληλεπιδράσεις με μόρια καθοδικά του μονοπατιού, ρυθμίζονται από τη φωσφορυλίωσή της στο μόριο τυροσίνης [17]. Υπάρχουν δέκα θέσεις αυτοφωσφορυλίωσης της τυροσίνης στη Syk, η κάθεμία αλληλεπιδρά με διαφορετικά μόρια και είναι υπεύθυνη για διαφορετική λειτουργία της κινάσης (Πίνακας 1). Στον πίνακα 1 αναγράφονται μερικές από τις τυροσινικές θέσεις φωσφορυλίωσης της Syk.

Sites of phosphorylation	Region on Syk kinase
Tyr-348	SH2-linker region
Tyr-352	SH2-linker region
Tyr-525	Activation loop
Tyr-526	Activation loop
Tyr-630	C-terminus

Πίνακας 1: 5 από τις διαφορετικές θέσεις φωσφορυλίωσης της κινάσης Syk

Πειράματα έχουν δείξει πως μεταλλάξεις στο γονίδιο SYK που αφορούν στις περιοχές φωσφορυλίωσης 340-356 της SH2 υπομονάδας, επηρεάζουν τη ρύθμιση του μορίου μέσω φωσφορυλίωσης [12].

1.4. Ανοχή

Ο όρος ανοχή αναφέρεται σε διαφορετικά επίπεδα προστασίας που επιβάλλει το ανοσοποιητικό σύστημα, για την πρόληψη της αντίδρασης των κυττάρων και των αντισωμάτων του έναντι του ξενιστή. Η διατήρηση της ανοχής στον εαυτό αποτελεί κρίσιμο μηχανισμό για την αποφυγή των μη επιθυμητών ανοσιακών απαντήσεων και της αυτοανοσίας [21].

Υπάρχουν δυο μηχανισμοί οι οποίοι ρυθμίζουν την ανοχή στον εαυτό, η κεντρική και η περιφερειακή. Αρχικά, η κεντρική ανοχή διαγράφει κλώνους λεμφοκυττάρων T ή B, πριν ωριμάσουν τα κύτταρα που διαθέτουν υποδοχείς οι οποίοι αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα με υψηλή συγγένεια [22]. Η κεντρική ανοχή στα πρωτογενή λεμφικά όργανα, στο μυελό των οστών για τα B λεμφοκύτταρα και στο θύμο αδένια για τα T λεμφοκύτταρα. Ωστόσο, κάποια αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα εισέρχονται στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, οπότε οι μηχανισμοί περιφερειακής ανοχής οδηγεί στην εξάλειψή τους. Ορισμένα αυτοδραστικά

λεμφοκύτταρα καθίστανται ανενεργά και δημιουργούνται νέα κύτταρα, υπεύθυνα να αναστέλλουν ενεργά τις ανοσιακές αποκρίσεις κατά του εαυτού. Τα αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα μπορούν να γίνουν ανεκτικά με την διαγραφή ολόκληρου κλώνου, την ανέργια. Οι απαντήσεις τους ελέγχονται από τα ρυθμιστικά T και B λεμφοκύτταρα, ή άλλα ρυθμιστικά κύτταρα[22]. Η πιθανότητα διατραχίς και βλάβης από αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα περιορίζεται περαιτέρω από τη διάρκεια ζωής των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων, η οποία ρυθμίζεται από προγράμματα που προκαλούν κυτταρικό θάνατο και απόπτωση μετά από λήψη συγκεκριμένων σημάτων.

1.5. Απόπτωση

Η διαδικασία της απόπτωσης, αλλιώς προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, παρουσιάζει ξεχωριστά μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά. Η απόπτωση συμβαίνει κανονικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της γήρανσης, και λειτουργεί ως ομοιοστατικός μηχανισμός για τη διατήρηση των κυτταρικών πληθυσμών στους ιστούς. Η απόπτωση εμφανίζεται επίσης ως αμυντικός μηχανισμός, όπως σε ανοσολογικές αντιδράσεις ή όταν τα κύτταρα έχουν υποστεί βλάβη σε παθολογικές καταστάσεις [23].

Η απόπτωση μπορεί να προκληθεί από ποικίλα ερεθίσματα (μέσω κυτοκινών) και συνθήκες, τόσο φυσιολογικές όσο και παθολογικές.

Τα αποπτωτικά κύτταρα:

- δεν απελευθερώνουν τα κυτταρικά συστατικά τους στον περιβάλλοντα ενδιάμεσο ιστό,
- φαγοκυτταρώνονται άμεσα από τα περιβάλλοντα κύτταρα και,
- αφότου εγκολληθούν, δεν παράγουν ούτε εκκρίνουν αντιφλεγμονώδη μόρια στο εσωτερικό των φαγοκυττάρων.

Υπάρχουν τρεις κύριες αποπτωτικές οδοί :

1. εξωγενής οδός του υποδοχέα του θανάτου
2. η ενδογενής ή μιτοχονδριακή οδός
3. η κυτταροτοξική με τη μεσολάβηση T λεμφοκυττάρων

Η εξωγενής οδός σηματοδότησης περιλαμβάνει διαμεμβρανικές αλληλεπιδράσεις μεσολαβούμενες από υποδοχέα, όπως για παράδειγμα υποδοχείς κυτοκινών της οικέγενειας TNF.

Η ενδογενής οδός σηματοδότησης εμπλέκει ερεθίσματα προερχόμενα από τα μιτοχόνδρια, χωρίς τη μεσολάβηση υποδοχέων, παράγοντας ενδοκυτταρικά σήματα που δρουν άμεσα στο στόχο, εντός του κυττάρου.

Τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (Cytotoxic T lymphocytes, CTLs) είναι ικανά να θανατώνουν κύτταρα-στόχους μέσω της εξωγενούς οδού [24].

Η απόπτωση είναι σημαντική για διάφορες αναπτυξιακές διεργασίες, τόσο του νευρικού όσο και του ανοσοποιητικού συστήματος, που προκύπτουν από την ενεργοποίηση των κυττάρων. Επίσης, είναι απαραίτητη για την εξάλειψη ενεργοποιημένων ή αυτοδραστικών λεμφοκυτταρικών πληθυσμών κατά την ωρίμανσή τους στα κεντρικά λεμφικά όργανα [25]. Επομένως, ανωμαλίες στη ρύθμιση κυτταρικού θανάτου μπορεί να αποτελούν σημαντικό αίτιο πρόκλησης χρόνιων νοσημάτων, όπως τα αυτοάνοσα νοσήματα και οι κακοήθειες [23]. Πιο συγκεκριμένα με τη διαδικασία της απόπτωσης ελέγχονται οι πληθυσμοί των T και B λεμφοκυττάρων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους και τη διαδικασία ανγνώρισης μεταξύ «εαυτού» και «μη-εαυτού». Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η διαδικασία της αρνητικής επιλογής, κατά την οποία τα κύτταρα πεθαίνουν με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο [25].

1.6. Αυτοανοσία

Τα θυμοκύτταρα, των οποίων οι υποδοχείς T λεμφοκυττάρων συνδέονται με σύμπλοκα ΜHC-πεπτιδίου με πολλή υψηλή συγγένεια προκαλούνται να πεθάνουν, με τη διαδικασία της αρνητικής επιλογής. Τα θυμοκύτταρα που δεσμεύουν ΜHC-πεπτίδια με ενδιάμεση συγγένεια υποβάλλονται σε θετική επιλογή, με αποτέλεσμα την επιβίωση, την ωρίμανση και τη μετανάστευσή τους [1]. Αντίστοιχα, αντιγονικοί υποδοχείς των Β λεμφοκυττάρων οι οποίοι συνδέονται με πολλή μεγάλη συγγένεια με κάποιο διαλυτό αντιγόνο, οδηγούνται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο [26]. Ωστόσο, ορισμένα Τ και Β λεμφοκύτταρα, ξεφεύγουν από την ανοχή και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και μετατρέπονται σε αυτοδραστικά. Δύο παράγοντες συμβάλλουν σε αυτό:

1. δεν εκφράζονται όλα τα αυτοαντιγόνα στα κεντρικά λεμφικά όργανα, όπου συμβαίνει αρνητική επιλογή και,
2. υπάρχει όριο συγγένειας για τα αυτοαντιγόνα πρώτου ενεργοποιηθεί η κλωνική εξάλειψη, επιτρέποντας σε μερικούς ασθενώς αυτοδραστικούς κλώνους να επιβιώσουν στη διαδικασία της εξάλειψης.

Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν πως η ανοχή διαταράσσεται από την απάντηση του οργανισμού σε ιικά αντιγόνα, μέσω της παραγωγής αντιϊκών αντισωμάτων και Τ λεμφοκυττάρων που πιθανά ενισχύουν την παραγωγή αυτοαντισωμάτων και αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων με διάφορους μηχανισμούς, όπως τη μοριακή μίμηση και διασταυρούμενη αντιδραστικότητα κ.α [4].

Η ανικανότητα της αυτοανοχής να προστατέψει τον ξενιστή, εκφράζεται ως δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, οι οποίες περιλαμβάνουν ασθένειες όπως αυτοάνοσα νοσήματα, αλλεργίες κ.α.

1.6.1. Αυτοάνοσα Ρευματικά νοσήματα

Όσον αφορά στα αυτοάνοσα νοσήματα, στην παθογένεια τους μπορεί να διαδραματίζουν ρόλο ποικίλοι παραγόντες, όπως:

- περιβαλλοντικοί (βακτήρια)
- γενετικοί (γονιδιακές μεταλλάξεις) και επιγενετικοί
- ενδογενείς (φλεγμονή) [5]

Οι αυτοάνοσες ασθένειες χαρακτηρίζονται από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων και αυτοδραστικών CD4 και CD8 T λεμφοκυττάρων έναντι μορίων του εαυτού, τα γνωστά και ως αυτοαντιγόνα. Η αυτοάνοση αντίδραση οδηγεί στην καταστροφή πρωτεϊνών, την κυτταρική λύση ακόμη και τη φλεγμονώδη απόκριση στο προσβεβλημένο όργανο ή όργανα και η προσβολή μπορεί να είναι οργανοειδική (πχ πολλαπλή σκλήρυνση) ή συστηματική (πχ συστηματικός ερυθματώδης λύκος, ΣΕΛ).

Ως αυτοαντιγόνα δρουν, πρωτεΐνες, αλλά και νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA), λειτουργικά ένζυμα που παράγονται φυσιολογικά στα κύτταρα (DNA-polymerase), κυτοκίνες, και διάφορα άλλα συστατικά που ελευθερώνονται στην κυκλοφορία, έπειτα από λύση των κυττάρων. Ορισμένα βακτήρια και ιοί παρουσιάζουν αντιγονικές δομές, παρόμοιες ή πανομοιότυπες με συστατικά των υγιών κυττάρων του ξενιστή, φαινόμενο που οδηγεί στην ενεργοποίηση του μηχανισμού του μοριακού μιμιτισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, αντισώματα ή Τ λεμφοκύτταρα που παράγονται έναντι παθογόνων, να στοχεύουν αυτοαντιγόνα, μέσω μιας διασταυρούμενης αντίδρασης, η οποία οδηγεί σε αυτοανοσία [1].

Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν πως ανοσιακές απαντήσεις έναντι ιών, όπως ο κυτταρομεγαλοϊός (Cytomegalovirus, CMV), καταλήγουν στην έκκριση αντισωμάτων έναντι του ιού τα οποία όμως βλάπτουν και ενδοθηλιακούς ιστούς [27].

Ανάλογα με το εύρος των οργάνων τα οποία πλήττουν, διακρίνονται σε οργανοειδικά, αν προσβάλλουν ένα συγκεκριμένο όργανο, ή συστηματικά αν προσβάλλουν διάφορα όργανα και ιστούς του οργανισμού. Στα συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα παρατηρείται γενικευμένη απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την υπερδιέγερση των T και B λεμφοκυττάρων αλλά και κυττάρων της φυσικής ανοσίας. Η καταστροφή των οργάνων προκαλείται είτε από την παθολογική ενεργοποίηση την κυτταρικής ανοσιακή απόκρισης, είτε από την τοπική δράση των αυτοαντισωμάτων και την δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων αυτοαντιγόνων/αυτοαντισωμάτων (πιο σπάνια). Παραδείγματα συστηματικών αυτοάνοσων νοσημάτων είναι:

- Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος
- Νόσος μοσχεύματος έναντι του ξενιστή και η
- Συστηματική Σκλήρυνση ή Σκληρόδερμα

A. Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος (Systemic Lupus Erythematous, SLE)

Ο SLE αποτελεί χρόνιο, πολυσυστημικό αυτοάνοσο νόσημα με μεγάλη ετερογένεια. Οι περισσότεροι μηχανισμοί της ασθένειας οδηγούν σε έλλειψη ανοχής έναντι εαυτού και σε δυσλειτουργία των οργάνων. Κυρίως προσβάλλονται ζωτικά όργανα όπως τα νεφρά, ο εγκέφαλος, το ήπαρ και το αιμοποιητικό σύστημα. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών είναι γυναίκες ηλικίας 20-40 ετών [28].

Οι παράγοντες που οδηγούν στην εμφάνιση του SLE μπορεί να είναι κληρονομικοί, γενετικοί, συμπεριλαμβανομένου του φύλου, επιγενετικοί, περιβαλλοντικοί, ορμονικοί κ.α. Η ενεργοποίηση των κυττάρων μέσω αναγνώρισης από τους υποδοχείς είναι τροποποιημένη στα T και B λεμφοκύτταρα των ασθενών με SLE, με αποτέλεσμα την πρόωρη σηματοδότηση [28]. Η διαφοροποίηση και η ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με SLE, εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή τους με τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα, και τα επίπεδα κινασών όπως η Syk, Btk και JAK [3].

B. Νόσος μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (Graft Versus Host Disease, GVHD)

Η GVHD αποτελεί αυτοάνοση πάθηση που προκαλείται έπειτα από τη μεταμόσχευση αλλογενών αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, και τα λεμφοκύτταρα του δότη εκκινούν ανοσολογική αντίδραση έναντι αντιγόνων του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, τα T λεμφοκύτταρα ($CD4^+$, $CD8^+$) του δότη αναγνωρίζουν μόρια του κεντρικού συμπλόκου ιστοσυμβατότητας του ξενιστή ως ξένα. Η ασθένεια προσβάλλει κυρίως το δέρμα, το γαστρεντερικό σύστημα και το συκώτι, και πιθανά τους πνεύμονες, τον οισοφάγο και το βλεννογόνο του στόματος και του οφθαλμού. Ανάλογα με την κλινική εικόνα της νόσου, διακρίνονται δύο κατηγορίες, η οξεία και η χρόνια. Στο διαχωρισμό δε λαμβάνονται υπόψη τα συμπτώματα της δεδομένης χρονικής περιόδου, αλλά ο φαινότυπος της ασθένειας. Η οξεία εκδοχή της ασθένειας μπορεί να οδηγήσει αργότερα στην ανάπτυξη χρόνιας νόσου, καθώς οι παράγοντες επικινδυνότητας και των δύο είναι παρόμοιοι. Τέτοιοι παράγοντες αποτελούν η ηλικία του δέκτη, τα περιφερικά κύτταρα του αίματος, εάν η μεταμόσχευση γίνεται από γυναίκα δότη σε άντρα δέκτη, εάν δεν υπάρχει ομολογία με τον δότη. Υπάρχουν συσχετισμοί του μηχανισμού δράσης της νόσου με άλλες αυτοάνοσες διαταραχές, όπως η Συστηματική Σκλήρυνση, το σύνδρομο Sjögren και η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα [29].

Γ. Συστηματική Σκλήρυνση ή Σκληρόδερμα (Systemic Sclerosis, SSc)

Η SSc είναι μια αυτοάνοση ρευματική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από αγγειοπάθεια και ίνωση στο δέρμα και στα εσωτερικά όργανα (όπως οι πνεύμονες και ο οισοφάγος), με παράλληλη παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι πυρηνικών και άλλων αυτοαντιγόνων [30].

Παρ'όλο που η συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι μικρή, η νοσηρότητα και η θνησιμότητά της είναι φαίνεται να είναι η υψηλότερη από κάθε άλλη αυτοάνοση ρευματική ασθένεια [31]. Υπολογίζεται πως 2,5 εκατομμύρια άνθρωποι νοσούν παγκοσμίως, με μέσο όρο επιβίωσης 11 χρόνια από την έγκαιρη διάγνωση της διάχυτης μορφής της νόσου.

Ορισμένοι τύποι SSc είναι λιγότερο επιθετικοί και δυνητικά βελτιώνονται μόνοι τους, ενώ άλλοι οδηγούν σε σοβαρά προβλήματα τα οποία απειλούν την υγεία του ασθενή [32].

Η SSc χωρίζεται σε δυο επιμέρους κατηγορίες:

1. την περιορισμένη ή τοπικό σκληρόδερμα (limited cutaneous, lcSSc), και
2. τη διάχυτη ή συστηματικό σκληρόδερμα (diffuse cutaneous, dcSSc)

1. Περιορισμένη μορφή:

Αποτελεί την πιο ήπια και κοινή μορφή της ασθένειας. Συχνά εμφανίζεται σε παιδιά, όμως μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία. Προσβάλλει σχεδόν αποκλειστικά το δέρμα. Ανάλογα με το φαινότυπό τους διακρίνονται δυο τύποι ο μορφέας και η γραμμική [33]. Εμφανίζεται κυρίως στο κάτω άκρο του χεριού, κάτω άκρο του ποδιού και το πρόσωπο, ωστόσο μπορεί να προσβάλλει τους πνεύμονες και το πεπτικό σύστημα. Στα πρώτα διαγνωστικά στάδια εμφανίζεται συχνά ως σύνδρομο Raynaud's [33].

2. Διάχυτη μορφή:

Προσβάλλει τα εσωτερικά όργανα και οι αλλαγές στο δέρμα μπορεί να επηρεάσουν όλο το σώμα. Τυπικά συμπτώματα αποτελούν η απώλεια βάρους, η κόπωση, οι αρθραλγίες και η δυσκολία στην κίνηση, τα οποία μπορούν να επιδεινωθούν με ταχείς ρυθμούς τα πρώτα χρόνια. Έπειτα η κατάσταση μπορεί να σταθεροποιηθεί και οι αλλαγές στο δέρματος να αναστραφούν ή να εξελιχθεί σε βαθμό που ποικίλει ανάλογα με τον ασθενή [31]. Δυστυχώς μέχρι σήμερα, δεν γνωρίζουμε επακριβώς τους λόγους που οδηγούν σε ταχεία ή μη επιδείνωση [33]. Χαρακτηριστικό της νόσου αποτελεί η έντονη δραστηριότητα των ινοβλαστών, η οποία οδηγεί στη μη φυσιολογική αύξηση του συνδετικού ιστού και την εναπόθεση κολλαγόνου, με αποτέλεσμα τη βλάβη αγγείων και την ίνωση. Η διεργασία της ίνωσης εντοπίζεται στο δέρμα, το γαστρεντερικό σύστημα, την καρδιά, τους πνεύμονες και άλλα όργανα [30]. Παράλληλα ενεργοποιείται το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω παραγωγής αυτοαντισωμάτων έναντι πυρηνικών και άλλων αντιγόνων και της κυτταρικής αυτοανοσίας. Αυτός ο τύπος προσβάλλει κυρίως το γυναικείο φύλο, με εύρος ηλικίας 30-50 χρονών, ενώ παιδιά νοσούν σπάνια. Η παραγωγή αυτοαντισωμάτων και ο χαρακτηρισμός τους αποτελεί βασικό διαγνωστικό δείγμα της SSc. Ορισμένα από τα πλέον χαρακτηρισμένα αυτοαντισώματα είναι τα Anti-Scl-70, Anti-Ro52, Anti-Ro60 Anti-CENPA, Anti-CENPB. Ο χαρακτηρισμός των επιτόπων των αυτοαντισωμάτων και ο τρόπος με τον οποίο διαταράσσεται η ανοχή του οργανισμού λόγω της παραγωγής τους, θα οδηγήσει στην κατανόηση της παθογένεσης της SSc [34]. Σε ορισμένες περιπτώσεις η SSc επηρεάζει όργανα όπως η καρδιά, οι πνεύμονες και τα νεφρά, συνθήκες που οδηγούν σε συνοσηρότητες όπως πνευμονική ίνωση και πνευμονική υπέρταση [31].

Έως σήμερα δεν υπάρχει θεραπεία για τη SSc, καθώς δεν έχουν αποσαφηνιστεί τα κύρια αίτια που την προκαλούν, με πιθανούς παράγοντες έκλυσής της να είναι γενετικοί, περιβαλλοντικοί (πχ λοιμώξεις) κ.α. . Ωστόσο, τα συμπτώματα της ασθένειας μπορεί να περιοριστούν μέσω ποικίλων θεραπειών που στοχεύουν στην ανακούφιση των συμπτωμάτων, την αποφυγή επιδείνωσης και τον περιορισμό επιπλοκών [35], ενώ προσπάθειες γίνονται και μέσω της χρήσης αντι-ινωτικών θεραπειών και θεραπειών αναστροφής ή περιορισμού της επιδείνωσης της πνευμονικής υπέρτασης που αποτελούν και τα πιο σοβαρά προβλήματα της νόσου. Η διάγνωση της ασθένειας εξαρτάται από την εξέταση των επιπλοκών.

Η ACR/EULAR, στην πιο πρόσφατη ταξινόμηση που προτάθηκε το 2013 περιλαμβάνει βασικά κριτήρια, επαρκή για τη διάγνωση της SSc, και επτά κριτήρια βαθμονόμησης, τα οποία χρησιμοποιούνται όταν δεν πληρούνται τα βασικά κριτήρια [30]. Με βάση τα κριτήρια

αυτά, υπολογίζεται η βαθμολογία διάγνωσης (score) η οποία πρέπει να είναι μεγαλύτερη των 9 μονάδων, ώστε να αντιστοιχεί στη SSc [36]. Παρ'ότι τα διαγνωστικά κριτήρια είναι ελλιπή, τα κριτήρια κατάταξης τα οποία προτείνονται βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα της διάγνωσης, σε περιστατικά με αλληλοκαλυπτόμενες παθήσεις και οροαρνητικές περιπτώσεις με κλινική υποψία [37].

Τα συμπτώματα της SSc επηρεάζουν την ποιότητα ζωής των ασθενών. Οι πιο συχνές επιπλοκές είναι η οστεοπόρωση και η κατάθλιψη. Υψηλά ποσοστά κατάθλιψης υπολογίζονται σε ασθενείς με χρόνιες ρευματικές νόσους, σε σύγκριση με τον υπόλοιπο πληθυσμό. Τα συμπτώματα κατάθλιψης σχετίζονται με ψυχική αστάθεια, μειωμένη ικανοποίηση και αυτοπεποίθηση, καθώς και λειτουργικότητας του ασθενή. Περίπου το 65% των ασθενών με SSc εμφανίζουν συμπτώματα κατάθλιψης, το οποίο οφείλεται στο χρόνιο πόνο, την κούραση, την απογοήτευση από την εμφάνιση και τη μειωμένη ικανότητα ολοκλήρωσης δραστηριοτήτων. Εξαιτίας των εμφανών παραμορφώσεων του δέρματος στα άκρα, το στόμα, το πρόσωπο, οι ασθενείς αντιμετωπίζουν προβλήματα αυτοπεποίθησης, γεγονός που επηρεάζει την κοινωνική ζωή και μετέπειτα την ποιότητα ζωής τους [38]. Η κατάθλιψη στους SSc ασθενείς θα πρέπει να υπολογίζεται μεμονωμένα και να λαμβάνεται υπόψη στη θεραπεία. Έχει υπολογισθεί πως οι ασθενείς με έντονο πόνο και μειωμένη λειτουργικότητα, εμφανίζουν περισσότερες πιθανότητες κατάθλιψης, χωρίς όμως συμπτώματα όπως έλλειψη όρεξης, διαταραχές στον ύπνο και μειωμένη ενέργεια να συνεπάγονται απαραίτητα την εμφάνιση κατάθλιψης. Πιθανά, η διάγνωση της κατάθλιψης και η χορήγηση αντικαταθλιπτικών, να βελτιώνει τη λειτουργικότητα και την ποιότητα ζωής των ασθενών, και μετέπειτα την απόδοση της θεραπείας για τα συμπτώματα της SSc [39].

1.7. Κυτταρική Ανοσία και Αυτοάνοσα Ρευματικά νοσήματα

Τα Β λεμφοκύτταρα είναι πολυλειτουργικά λεμφοκύτταρα που συμβάλλουν στην παθογένεση των αυτοάνοσων νοσημάτων μέσω ενδογενών μηχανισμών, παραγωγής αντισωμάτων και αλληλεπίδρασης με Τ λεμφοκύτταρα. Τα Β λεμφοκύτταρα αντιπροσωπεύουν πολλά υποσχόμενους θεραπευτικούς στόχους για τις αυτοάνοσες ρευματικές παθήσεις. Μια κατηγορία Β λεμφοκυττάρων που έχουν μελετηθεί πρόσφατα είναι τα Β ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Bregs). Τα Bregs έχουν δρουν ως ρυθμιστές του ανοδικού συστήματος περιορίζοντας τη φλεγμονώδη αντίδραση ενεργοποιώντας στα Τ ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Tregs) και, αποτρέποντας τη αυτοανοσία [40]. Η έκκριση αυτοαντισωμάτων από τα Β λεμφοκύτταρα αποτελεί κύριο διαγνωστικό χαρακτηριστικό των αυτοάνοσων νοσημάτων, γι' αυτό η δράση τους έχει μελετηθεί αρκετά. Υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί με τους οποίους τα αυτοαντισώματα συμβάλλουν στην παθογένεση της αυτοάνοσης ασθένειας.

1. ανοσοσύμπλέγματα που περιέχουν αυτοαντισώματα μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν τα ανοσοκύτταρα
2. ανοσοσύμπλοκα μπορούν να σχηματιστούν σε ιστούς όπου μπορούν να ενεργοποιήσουν το συμπλήρωμα, και να προκαλέσουν ιστική βλάβη.
3. Τα αυτοαντισώματα μπορούν να επάγουν τη βλάβη του ιστού μέσω της ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) με δέσμευση αντιγόνων στον ιστό στόχο και τους υποδοχείς Fc (FcRs) σε μακροφάγα, ουδετερόφιλα, φυσικούς φονικούς φορείς.
4. ανοσοσύμπλοκα διευκολύνουν τη σύνδεση αντιγόνου σε δενδριτικά κύτταρα, ενεργοποιώντας αποτελεσματικά τα Τ κύτταρα.

Επιπλέον, τα αυτοαντισώματα υφίστανται σωματικές μεταλλάξεις, με αποτέλεσμα να αποκτούν υψηλή συγγένεια με τους BCR, και ως εκ τούτου είναι εξαιρετικά παθογόνα.

Οι παθολογικές επιδράσεις των Β λεμφοκυττάρων στα Τ λεμφοκύτταρα εντείνουν την αυτοανοσία. Η δράση των Β λεμφοκυττάρων ως APCs, οδηγεί στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων (πχ ρυθμιστικά Τ). Αντίστοιχα, τα Τ λεμφοκύτταρα μεταφέρουν συνδιεγερτικά σήματα για τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων και των πλασματοκυττάρων.

Επομένως, στην παθογένεια αλλά και στην εξέλιξη ενός αυτοάνοσου νοσήματος εμπλέκονται τα Β και Τ λεμφοκύτταρα αλλά και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις [41]. Τα Β λεμφοκύτταρα αποτελούν στόχο κυτταροθεραπειών σε αυτοάνοσα ρευματικά και άλλα νοσήματα, λόγω του ότι είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αυτοαντισωμάτων αλλά και διότι συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου με διάφορους μηχανισμούς που αναπτύχθηκαν προηγουμένως (πχ δράση τους ως non professional APCs ή την σχέση αυτοδραστικών και ρυθμιστικών Β λεμφοκυττάρων). Η μείωση των Β-λεμφοκυττάρων μειώνει τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων, εφόσον δεν προλαβαίνουν να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα. Ωστόσο, η μείωση των αυτοαντισωμάτων και η εξάλειψή τους δεν αποτελεί πάντα αποτελεσματική θεραπεία για την εξάλειψη αυτοάνοσων νοσημάτων, υποδηλώνοντας ότι άλλες λειτουργίες Β λεμφοκυττάρων είναι επίσης κρίσιμες στην παθογένεση της αυτοανοσίας [42].

Σκοπός

2.1. Μέρος Α

Ως πρωταρχικός σκοπός της παρούσας εργασίας, τέθηκε η βιβλιογραφική ανασκόπηση μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί αναφορικά με την εμπλοκή της Syk στον SLE, στην SSc και στη GVHD.

Μελέτες Syk σε αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα με έμφαση στο SSc

Πληθώρα κινασών έχουν γίνει στόχος μελέτης στα αυτοάνοσα νοσήματα, με τη Syk να έχει μελετηθεί εκτενέστερα στα αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα. Επιπλέον, τα T και B λεμφοκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων [43]. Επομένως, έχουν προηγηθεί αρκετές μελέτες του μονοπατιού σηματοδότησης της Syk στα B λεμφοκύτταρα, και αρκετές θεραπείες στοχεύουν στην αποσιώπηση του γονιδίου SYK με τους κατάλληλους αναστολείς. Η χορήγηση του αναστολέα της Syk, έχει προταθεί ως πιθανό θεραπευτικό μέσο σε μοντέλα ποντικών με SLE. Η συστηματική χορήγησή του φαίνεται να αποτρέπει ή να θεραπεύει βλάβες του δέρματος και των νεφρών.

Καθώς ασθένειες όπως η SSc και η GVHD παρουσιάζουν παρόμοιο μηχανισμό με αυτόν του SLE, πρωταρχικό σκοπό της παρούσας εργασίας, αποτελεί η ανασκόπηση εργασιών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία αναφορικά με την εμπλοκή της Syk στην εξέλιξη των νοσημάτων αυτών.

2.2. Μέρος Β

Κυτταρομετρική μελέτη της Syk σε Β κύτταρα SSc ασθενών

Σε δεύτερο στάδιο, σκοπός της μεταπτυχιακής μελέτης, τέθηκε η διεξαγωγή πειραμάτων ώστε να υπολογιστεί η δράση της κινάσης Syk σε ενεργοποιημένα Β λεμφοκύτταρα SSc ασθενών.

Τα Β λεμφοκύτταρα έχουν μελετηθεί αρκετά για το ρόλο που διαδραματίζουν στην παθογένεια αυτοάνοσων νοσημάτων. Υπάρχουν αρκετά πειραματικά δεδομένα, που υποδεικνύουν την εμπλοκή τους στη δημιουργία ίνωσης σε SSc ασθενείς αλλά, τα πειραματικά δεδομένα που υπάρχουν στο βαθμό ενεργοποίησης της Syk σε SSc ασθενείς είναι περιορισμένα και χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης [44].

Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Υλικά

3.1.1. Βιολογικά Δείγματα

Επιλέχθηκαν επτά SSc ασθενείς, ανεξαρτήτου φύλου και ηλικίας (εύρος ηλικίας 40-75 ετών). Οι ασθενείς βρίσκονταν σε διαφορετικό στάδιο εξέλιξης της ασθένειας, περιορισμένη ή διάχυτη μορφή, καθώς και ορισμένοι δεν είχαν λάβει θεραπεία μέχρι την ημέρα της δειγματοληψίας. Σε κανέναν ασθενή δε χορηγούνταν θεραπεία με Rituximab. Αυτό το φάρμακο αποτελεί χμαιοκικό αντίσωμα ποντικού/ανθρώπου έναντι της πρωτεΐνης προσκόλλησης CD20, της επιφάνειας των B λεμφοκυττάρων, το οποίο έπειτα από τη σύνδεση με το CD20 ενεργοποιεί τον κυτταρικό θάνατο των B λεμφοκυττάρων [45], [46].

Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια του American College of Rheumatology για την κατηγοριοποίηση της SSc, και όλοι οι ασθενείς της μελέτης παρακολουθούνται από το εξωτερικό ιατρείο SSc της Κλινικής Ρευματολογίας και κλινικής Ανοσολογίας του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, Σχολή Επιστημών Υγείας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε μετά από έγκριση του πρωτοκόλλου από το Επιστημονικού Συμβουλίου του Νοσοκομείου και τηρώντας τις αρχές και τους κανόνες του Ελσίνκι για πραγματοποίηση Βιοϊατρικής έρευνας. Όλοι οι ασθενείς και δότες έδωσαν προφορική και γραπτή συγκατάθεση για να συμπεριληφθούν στη Μελέτη.

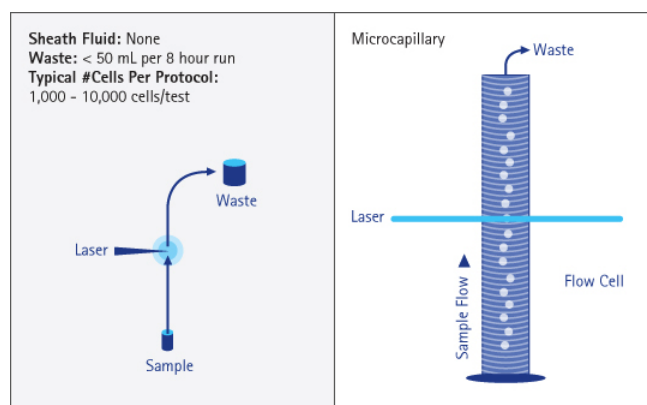
3.2. Μέθοδοι

3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση με Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry)

Η χρήση της κυτταρομετρίας ροής στην συγκεκριμένη μελέτη αποσκοπεί στην εκτίμηση του ποσοστού της φωσφορυλιωμένης μορφής της κινάσης Syk, έπειτα από την ενεργοποίησή της, στο κυτταρόπλασμα των Β λεμφοκυττάρων SSc ασθενών, συγκρίνοντάς το με το ποσοστό αυτής στα Β λεμφοκύτταρα υγιών δοτών.

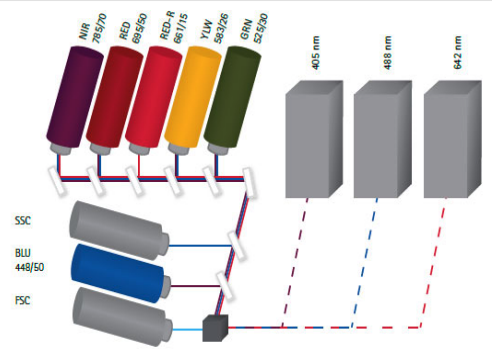
Το πλεονέκτημα της κυτταρομετρίας ροής είναι ότι η πλειοψηφία των μορίων που εκφράζονται στα Β λεμφοκύτταρα μπορεί να μετρηθεί χρησιμοποιώντας ένα μικρό όγκο ολικού αίματος, ενώ περιορίζονται και οι τεχνητές αλλαγές στη λειτουργικότητά του, οι οποίες προκαλούνται από τις διαδικασίες απομόνωσης και καθαρισμού.

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια πολύ σημαντική τεχνική στην κυτταρική βιολογία η οποία συμβάλλει στον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων σε ένα εναιώρημα, καθώς και στη διαλογή τους σε υποπληθυσμούς. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην καταμέτρηση των κυττάρων, τα οποία διέρχονται από ένα σημείο κατά 2.000-3.000/sec με την χρήση μιας δέσμης ακτίνων laser [47].



Εικ.4: Παρουσίαση αυτόματης απαρίθμησης κυττάρων μέσω μικροτριχειδίων κυτταρομετρητή.

Το σύστημα κυτταρομετρητή ροής αποτελείται από τρία τμήματα. Το πρώτο περιλαμβάνει το σύστημα ροής, όπου τα κύτταρα ευθυγραμμίζονται το ένα πίσω από το άλλο ώστε να περνούν σε σειρά από το σημείο ανίχνευσης, όπου το κάθε κύτταρο έρχεται σε επαφή με την ακτίνα που εκπέμπεται από το laser (Εικ.4). Το δεύτερο τμήμα αποτελεί ένα οπτικό σύστημα καταγραφής και το τρίτο ένα ηλεκτρονικό σύστημα απεικόνισης (Εικ.5). Τα δείγματα που προορίζονται για ανάλυση είναι σημασμένα με μια φθορίζουσα χρωστική, όπως για παράδειγμα η phycoerythrin-PE του anti-Syk που χρησιμοποιείται στα πειράματα, εκπέμποντας κόκκινο χρώμα. Καθώς η ακτίνα προσπίπτει στο κύτταρο διεγείρει την φθορίζουσα χρωστική. Η προσπίπτουσα ακτίνα διαχέεται στην συνέχεια σε όλες τις κατευθύνσεις, όπου ειδικοί ανιχνευτές καταγράφουν το σήμα και παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος του κυττάρου και την κοκκίωση του.



Εικ.5: αριστερά: Benchtop Flow Cytometer, δεξιά: Το σύστημα laser του κυτταρομετρητή.

3.2.2. Διαχωρισμός κυττάρων (δειγμα ολικού αίματος 20 ml)

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (ml)
Φικόλη (Lympho Prep gradient)	10
Ολικό αίμα	20
RPMI 1640 medium	~15
1% FBS	~2
FBS, fetal bovine serum	7
DMSO	1

- προσθήκη 10ml φικόλης, σε falcon 50ml
- εναπόθεση 20ml ολικού αίματος
- φυγοκέντρηση 20', 1800 rpm
- στιβάδες που δημιουργήθηκαν μετά τη φυγοκέντρηση:
 1. ορός αίματος
 2. λευκά αιμοσφαίρια
 3. διάλυμα φικόλης
 4. ερυθρά αιμοσφαίρια
- κατανομή στιβάδων σε αντίστοιχα φιαλίδια

Απομόνωση λευκών αιμοσφαιρίων

- μεταφορά στιβάδας λευκών αιμοσφαιρίων σε falcon 15ml
- προσθήκη RPMI για πλύση (πλήρωση falcon)
- φυγοκέντρηση 5', 2.500 rpm
- απόρριψη υπερκείμενου
- επαναίωση ιζήματος λευκών αιμοσφαιρίων με ~1ml 1%FBS

Σημείωση: για φύλαξη των λευκών αιμοσφαιρίων σε υγρό άζωτο (-80°C), η επαναίωση γίνεται με 3ml freezing buffer/δείγμα και διαχωρισμό εναιωρήματος σε 3 ειδικά φιαλίδια, 1ml/φιαλίδιο.

Παρασκευή 10ml freezing buffer:

1. 7ml FBS
2. 2ml RPMI
3. 1ml DMSO

Απόψυξη κυττάρων από το υγρό άζωτο

- μεταφορά διαλύματος λευκά αιμοσφαίρια-freezing buffer σε falcon
- προσθήκη 5ml RPMI
- φυγοκέντρηση 5', 2.500 rpm
- απόρριψη υπερκείμενου, επαναίωση 300 μl 1% FBS/ φιαλίδιο
- επώαση 30', στους 37 °C

Σημείωση: 1% FBS= 9,9 RPMI + 0,1 FBS

3.2.3. Καλλιέργεια λευκών αιμοσφαιρίων

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
IgM (10mg/ml)	3 µl
Pervanadate (10µM)	3 µl
PFA	300 µl
PBS	~ 250 ml
BD perm buffer III (cat: 558050)	800 µl
2% FBS	~ 1 ml
FITC Mouse Anti-Human CD20 (clone 2H7), BD	8 µl
PE mouse anti- Syk (pY348), BD	8 µl

1. Προετοιμασία δειγμάτων
 - προσθήκη 3 µl IgM (10 µg/ml), όπου χρειάζεται, 8'
 - προσθήκη 3 µl pervanadate (0,1mM, 0,5mM) όπου χρειάζεται
 - προσθήκη 300 µl 4% PFA, 10'
 - φυγοκέντρηση 2', 4.000 rpm
 - απόρριψη υπερκείμενου, επαναιώρηση σε 1 ml PBS
2. Διάνοιξη πόρων κυτταρικής μεμβράνης
 - φυγοκέντρηση 2', 4.000 rpm
 - απόρριψη υπερκείμενου, επαναιώρηση αργού ρυθμού με vortex σε 800 µl BD perm buffer III
 - επώαση 30', σε πάγο
3. Ενυδάτωση κυττάρων
 - ήπια ανάδευση με vortex
 - φυγοκέντρηση 2', 4.000 rpm
 - απόρριψη υπερκείμενου, επαναιώρηση σε 1 ml PBS
 - επανάληψη βήματος, ενυδάτωση κυττάρων για 45'
 - φυγοκέντρηση 2', 4.000 rpm
 - προσθήκη 100 µl 2% FBS

Σημείωση: 2% FBS= 9,8 PBS + 0,2 FBS
4. Σηματοδότηση
 - προσθήκη 8 µl CD20 Ab
 - προσθήκη 8 µl pSyk Ab
 - επώαση σε σκοτάδι, 1 ώρα, θερμοκρασία δωματίου
 - προσθήκη 700 µl 2% FBS
 - φυγοκέντρηση 2', 4.000 rpm
 - απόρριψη υπερκείμενου, επαναιώρηση σε 500 µl PBS

3.2.4. Κυτταρομετρική Ανάλυση

Η επεξεργασία και η ανάλυση των αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης εργασίας έγινε χρησιμοποιώντας το λογισμικό FlowJo 10. Με την κυτταρομετρία ροής, μετρήθηκαν τουλάχιστον 3×10^5 λεμφοκύτταρα για κάθε δείγμα. Από αυτό τον πληθυσμό, μέσω του λογισμικού FlowJo 10, επιλέχθηκε ο ολικός πληθυσμός των B λεμφοκυττάρων, σύμφωνα με τη σήμανση που είχε προηγηθεί με CD20. Έπειτα ο ίδιος πληθυσμός διαχωρίστηκε σε 4 επιμέρους υποπληθυσμούς με βάση το ποσοστό φωσφορυλίωσης της κινάσης Syk. Για κάθε υποπληθυσμό υπολογίστηκε το ποσοστό των κυττάρων και το MFI (mean fluorescence intensity). Εφόσον οι υποπληθυσμοί ακολουθούν λογαριθμική κατανομή, η στατιστική ανάλυση έγινε με βάση την τιμή MFI (Εικ.12). Οι υποπληθυσμοί αναλύονται λεπτομερώς στην ενότητα 4.2. Αποτελέσματα της κυτταρομετρικής ανάλυσης CD20-pSyk.

3.2.5. Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Prism 8.2.1. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από την κατανομή των κυττάρων σε υποπληθυσμούς, ως ποσοστά και τιμές MFI, παρουσιάζονται ως mean±SEM (standard error for mean), για κάθε κατηγορία υποπληθυσμού κυττάρων (υγιών και SSc ασθενών). Η σύγκριση των αποτελεσμάτων έγινε με t-test. Τα αποτελέσματα και οι παράμετροι σχολιάζονται αναλυτικότερα στην ενότητα 4.2.γ. Υπολογισμός πληθυσμού κυττάρων CD20+Syk+.

3.3. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Η εύρεση της σχετικής βιβλιογραφίας έγινε μέσω αναζήτησης στο Pubmed χρησιμοποιώντας τις εξής λέξεις κλειδιά: SSc, GVHD, SLE, Bcells, Syk. Ανασκοπήθηκαν μόνο πρωτότυπα άρθρα, δημοσιευμένα στα Αγγλικά και προτιμήθηκαν τα πιο πρόσφατα. Ακόμη, κριτήριο για την επιλογή ήταν το πρωτόκολλο που είχε εφαρμοστεί στις μελέτες. Το πρωτόκολλο με τη χρήση του BD Perm Buffer, χρησιμοποιήθηκε σε τρεις μελέτες, δυο εξ'αυτών σε πειράματα που αφορούσαν στη μελέτη της Syk στη GVHD και ένα στη μελέτη της Syk στον SLE.

Αποτελέσματα

4.1. Συμπεράσματα από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση

Η βιβλιογραφική αναζήτηση ανέδειξε μόνο 5 πρωτότυπες εργασίες στην SSc και στην GVHD. Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν τόσο σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, όσο και σε ανθρώπινα κύτταρα νοσούντων με SSc ή GVHD.

Στην βιβλιογραφία επίσης έχουν δημοσιευτεί μελέτες στον SLE, δύο εκ των οποίων, σε πειραματικό μοντέλο και δυο σε ασθενείς με SLE. Στη συγκεκριμένη εργασία επιλέχθηκαν δυο μελέτες σε SLE ασθενείς, οι οποίες συζητούνται εκτενέστερα.

4.1.1. Μελέτες Syk στον SLE

Αρχικά, αναλύθηκε η μελέτη της ερευνητικής ομάδας Iwata S. et.al. Η συγκεκριμένη δημοσίευση επιλέχθηκε καθώς ο σκοπός και η πειραματική προσέγγιση αποτέλεσε τη βάση τη παρούσας διπλωματικής εργασίας όσον αφορά στο πειραματικό στάδιο και το σκοπό του. Σύμφωνα με τους Iwata S. et.al, η φωσφορυλίωση της Syk είναι σημαντικά αυξημένη στα B λεμφοκύτταρα SLE ασθενών[15].

Χαρακτηριστικό της παθογένειας του SLE αποτελεί η ασυνήθιστα αυξημένη ενεργοποίηση των αυτορρυθμιζόμενων T λεμφοκυττάρων και η αυξημένη παραγωγή αυτοαντισωμάτων από τα B λεμφοκύτταρα.

Ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο ο BCR επάγει την ενεργοποίηση της Syk, έχει μελετηθεί κυρίως σε B λεμφοκύτταρα ποντικών. Η σύνδεση αντιγόνου στον BCR, οδηγεί στην ενεργοποίηση κινάσων πρωτεΐνων-τυροσίνης, όπως Lyn και Syk. Η Syk, έπειτα, μεταφέρει το σήμα φωσφορυλιώνοντας μεγάλο εύρος σηματοδοτικών μορίων καθοδικά αυτής.

Για τα πειράματα της προαναφερόμενης μελέτης απομονώθηκαν μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) από 25 υγιείς δότες και 58 SLE ασθενείς και καλλιεργήθηκαν για τις ανάγκες του πειράματος. Οι ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια του American College of Rheumatology για SLE.

Πιο αναλυτικά, η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Τα PBMCs καλλιεργήθηκαν με 10% FCS-RMPI, στους 37°C και 5% CO₂, για 2 ώρες, με και χωρίς την προσθήκη του ανασταλέα της Syk (BAY61-3606).

Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής:

Για την ενδοκυττάρια χρώση της ολικής και φωσφορυλιωμένης Syk, σε CD19⁺ B κύτταρα υγιών και ασθενών, τα κύτταρα περιφερικού αίματος πλύθηκαν με PBS, μονιμοποιήθηκαν με 1% formaldehyde- PBS και η κυτταροπλασματική μεμβράνη τους έγινε διαπερατή με 0,1% saponin-PBS. Μετά από μια πλύση, τα κύτταρα επαναωρήθηκαν σε saponin-PBS και, πραγματοποιήθηκε χρώση με mouse anti-human Syk mAb, mouse anti-human p-Syk (pY348) mAb. Ως δευτερογενές αντιγόνο χρησιμοποιήθηκε το PE-labeled goat anti-mouse IgG pAb. Έπειτα από πλύση με saponin-PBS, έγινε χρώση των κυττάρων με αντισώμα FITC-labeled mouse anti-human CD19.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση Western Blot για τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του μορίου PLCγ, καθοδικά της Syk, το οποίο ρυθμίζει τη ροή μορίων Ca²⁺ στα B λεμφοκύτταρα.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων συνοψίζονται στα εξής συμπεράσματα:

Η έκφραση της Syk στα CD19⁺CD27⁺ B λεμφοκύτταρα μνήμης ήταν σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με τα CD19⁺CD27⁻ “αθώα” B λεμφοκύτταρα, των υγιών δοτών. Επιπλέον, η έκφραση της Syk, ήταν σε υψηλά επίπεδα τόσο στα “αθώα” όσο και στα κύτταρα μνήμης των SLE ασθενών.

Ακόμη και απουσία διεγερτικού σήματος, η φωσφορυλίωση της Syk ήταν σημαντικά στατιστικά αυξημένη στους ασθενείς, ιδιαίτερα σε αυτούς με ενεργότητα νόσου, συγκριτικά με τους υγιείς.

Κατά αντιστοιχία, από την Western Blot ανάλυση, τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των PLCγ και Btk, ήταν σημαντικά αυξημένα στους CD19⁺ SLE ασθενείς συγκριτικά με τους υγιείς.

Σε επόμενο στάδιο, εξετάστηκε το ενδεχόμενο η αναστολή τη Syk να αποφέρει εξίσου ανασταλτικά αποτελέσματα στο B λεμφοκύτταρα SLE ασθενών. Για το λόγο αυτό, B λεμφοκύτταρα επώαστηκαν με *in vitro*, με και χωρίς την παρουσία ειδικού αναστολέα BAY613606, για 2 ώρες. Τα επίπεδα p-Syk, παρουσία αναστολέα, ήταν σημαντικά ελαττωμένα, αποτέλεσμα που υποδεικνύει το καθοριστικό ρόλο της Syk στη σηματοδότηση B λεμφοκυττάρων SLE ασθενών και τη σημασία του αναστολέα της, ώστε να ρυθμίζει τα επίπεδα φωσφορυλίωσής της στα κύτταρα αυτά, με πιθανό μηχανισμό την παρεμπόδιση της αυτοφωσφορυλίωσης της Syk από τη p-Syk [15].

Ωστόσο, παραμένει άγνωστος ο τρόπος με τον οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά σε ανθρώπους SLE ασθενείς, καθότι οι πειραματικές διαδικασίες περιορίστηκαν σε μοντέλα ποντικών [48].

Αυτοί οι περιορισμοί δεν εμπόδισαν τους Iwata et.al. να προτείνουν πως τα επίπεδα έκφρασης της Syk στα B λεμφοκύτταρα SLE ασθενών, ρυθμίζονται μέσω μιας διαδικασίας άρρηκτα συνδεδεμένης με την ασθένεια.

Η κινητική του Ca²⁺ και η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών τυροσίνης, διαδικασίες που επάγονται από τον BCR, είναι αισθητές στα B λεμφοκύτταρα από SLE ασθενείς, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως αλλαγές στη σηματοδότηση των B λεμφοκυττάρων, συμβαίνουν κοντά στο επίπεδο του BCR.

Επιπλέον μελέτες, όπως αυτή της ερευνητικής ομάδας του Nicholas M. et.al., δείχνουν πως τα CD19^{hi} B λεμφοκύτταρα, παρουσιάζουν αυξημένη φωσφορυλίωση της Syk, σε σύγκριση με αυτή των CD19^{lo}, στους SLE ασθενείς [49]. Η πρωτεΐνη διαφοροποίησης CD19 είναι θετικός ρυθμιστής του σηματοδοτικού μονοπατιού BCR, ωστόσο, έλλειψή της δεν επηρεάζει τη φωσφορυλίωση και την ενεργότητα της Syk.

Πιο αναλυτικά η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Απομονώθηκαν PBMCs από δείγματα ολικού αίματος 10 SLE ασθενών και 10 υγιών δοτών. Τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν κατάλληλα και σημάνθηκαν με φθορίζοντα αντισώματα έναντι των CD19 APC, CD20-PE, pSyk-PE μεταξύ άλλων. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με βάση το BD Phosphoflow πρωτόκολλο, με βάση το οποίο τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε διάλυμα RPMI + 2%FBS και επώαστηκαν στους 37°C για 20'. Τα B λεμφοκύτταρα ενεργοποιήθηκαν μέσω σύνδεσης του BCR με goat F(ab')₂ α-human IgG και επώαστηκαν στους 37°C για επιπλέον 10' μέχρι να προστεθεί το Phosphoflow Fix Buffer 1. Έπειτα οι κυτταροπλασματικοί πόροι των κυττάρων διανοίχθηκαν ώστε να ακολουθήσει η χρώση με τα φθορίζοντα αντισώματα.

Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής:

Τα CD19 B λεμφοκύτταρα διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες: CD19^{hi} CD19^{lo}, και υπολογίστηκε ξεχωριστά το ποσοστό φωσφορυλίωσης της Syk στις δύο ομάδες. Τα επίπεδα της pSyk στα κύτταρα SLE ασθενούς, ήταν σημαντικά αυξημένα στον πληθυσμό CD19^{hi}, σε αντίθεση με τον πληθυσμό CD19^{lo} αλλά και σε αντίθεση με B λεμφοκύτταρα υγιούς δότη.

4.1.2. Μελέτες Syk σε GVHD και SSc

A.GVHD και Syk

Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τη μελέτη της Syk στη GVHD, τόσο in vitro όσο και in vivo.

Σύμφωνα με μελέτες των Le Huu et al, έπειτα από μεταμόσχευση μυελού των οστών σε μοντέλα ποντικών, η φωσφορυλίωση της Syk στα T και B λεμφοκύτταρα και στα CD11b⁺ κύτταρα, παρουσίασε αυξημένα ποσοστά. Η χορήγηση του αναστολέα της Syk, R788*, μείωσε την ίνωση στα μοντέλα ποντικών με Scl-GVHD και ελάττωσε τους παράγοντες μετανάστευσης, του ανοσοποιητικού συστήματος.

Ως παράγοντες μετανάστευσης στην συγκεκριμένη μελέτη αναφέρονται οι χυμοκίνες Chemokine stromal-derived factor 1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4. Οι παράγοντες αυτοί είναι υπεύθυνοι για τη σηματοδότηση της μετανάστευσης των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων στον ιστό στόχο. Εκεί τα κύτταρα αυτά θα δράσουν με αποτέλεσμα την έκκριση επιπλέον κυτοκινών και χυμοκινών (πχ. IL-6, IL-17, TGF-β, INF-γ). Στην περίπτωση της GVHD, τέτοιοι παράγοντες οδηγούν στη δημιουργία ίνωσης. Άρα, η αποφυγή της μετανάστευσης αποτελεί σημαντικό σημείο στον περιορισμό της GVHD.

Ακόμη, η χρήση του αναστολέα της Syk, R406*², μείωσε τη διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση των CD4⁺ T και των CD11b⁺ κυττάρων.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δυο στάδια, με τη χρήση R788 σε μοντέλα ποντικών Scl-GVHD, και τη χρήση R406, in vitro, σε πειράματα με T και B λεμφοκύτταρα.

Συγκεντρωτικά, οι αναστολείς της Syk, μείωσαν σημαντικά την ίνωση σε μοντέλα cGVHD. Η Syk, ήταν ενεργοποιημένη στα T και B λεμφοκύτταρα, και στα μακροφάγα στα μοντέλα Scl-cGVHD, και η απενεργοποίηση της βελτίωσε τα επίπεδα ίνωσης [50].

Ακόμη, η ερευνητική ομάδα των Flynn et al, πραγματοποίησε μελέτες τόσο σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, όσο και σε μοντέλα ποντικών. Αρχικά, ελέγχθηκε αν η ενεργοποίηση της Syk είναι σημαντική στην εξέλιξη της ασθένειας σε cGVHD ποντίκια. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυτταρομετρίας ροής όπου απομονωμένα κύτταρα ποντικών με cGVHD ενεργοποιήθηκαν με μέσω του BCR με anti-IgM και ακολούθησε σήμανση με φθορίζον αντίσωμα anti-pSyk (Y348). Για την προετοιμασία των κυττάρων για κυτταρομετρική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρείας BD (Cytotfix Fixation Buffer και Perm Buffer III) όπως περιγράφηκε στη μελέτη των Nicholas M. et.al.. Η φωσφορυλίωση της Syk ήταν αυξημένη, τόσο στα ενεργοποιημένα όσο και στα μη ενεργοποιημένα B λεμφοκύτταρα των cGVHD ποντικών.

Για να εξετασθεί εάν η Syk είναι απαραίτητη στην εξέλιξη της ασθένειας ακολούθησε αποσιώπηση του γονιδίου, και νοσοούντα ποντίκια δεν εμφάνισαν πνευμονικές διαταραχές, σε σύγκριση με υγιή μοντέλα. Ωστόσο, η χρήση του αναστολέα R788, fostamatinib, σε τρία διαφορετικά μοντέλα ποντικών, δεν εμφάνισε κάποια θεραπευτικά αποτελέσματα στην εξέλιξη της ασθένειας.

Η χρήση του αναστολέα R406, σε κύτταρα περιφερικού αίματος από ασθενείς με GVHD, αύξησε τα αποπτωτικά κύτταρα και τον κυτταρικό θάνατο των B λεμφοκυττάρων, συγκριτικά με τους υγιείς όπου παρατηρήθηκε απόπτωση και σε υπόλοιπες λεμφοκυτταρικές σειρές εκτός της B. Ως αποτέλεσμα, τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με cGVHD, μπορούν σε θεωρητικό επίπεδο να αποτελέσουν στόχο σε θεραπείες με τη χορήγηση του αναστολέα της Syk, αυξάνοντας τον κυτταρικό θάνατο. Επίσης, B λεμφοκύτταρα τα οποία ενεργοποιούνται μετά από ενεργοποίηση μέσω του BCR, εμφάνισαν μεγαλύτερα ποσοστά απόπτωσης, γεγονός που υποδεικνύει πως η χορήγηση του R406 ως θεραπευτικό μέσο, αυξάνει την απόπτωση των B λεμφοκυττάρων μέσω του μονοπατιού που ενεργοποιείται από τον BCR. Η στοχοποίηση των B κυττάρων, γίνεται λόγω της παραγωγής αυτοαντιγόνων από τα κύτταρα αυτά [51].

*R788: Αναστολέας της κινάσης Syk. Χρησιμοποιείται ως φάρμακο για την θρομβοπενεία, και ονομάζεται fostamatinib. Απορροφάται και μεταβολίζεται στην ενεργό μορφή, R406.

*²R406: Αναστολέας της κινάσης Syk. Προσδένεται στις θέσεις σύνδεσης των μορίων ATP.

B.SSc και Syk

Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την αποκωδικοποίηση του μηχανισμού της SSc, στοχεύοντας ενδοκυτταρικά μόρια τα οποία πιθανά συμβάλλουν στην παθογένεση της ασθένειας. Ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης έχουν μελετηθεί, και έχουν στοχοποιηθεί διαφορετικά μόρια κινασών και μεταγραφικών παραγόντων ως υπεύθυνα για την εξέλιξη της ασθένειας.

Η κινάση τυροσίνης Syk, μελετήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Le Huu et al., σε μοντέλα ποντικών με Scl-cGVHD, όπως αναφέρθηκε προηγούμενα. Τα πειραματικά μοντέλα αυτής της μελέτης εμφάνισαν αυξημένα ποσοστά της φωσφορυλιωμένης Syk, στα T και B λεμφοκύτταρα, και η αποσιώπηση του γονιδίου της, με τον αντίστοιχο αναστολέα, μείωσε τα επίπεδα πνευμονικής ίνωσης [50].

Επιπλέον μελέτες από την ερευνητική ομάδα Pamuk et al, στόχευσαν τη Syk μέσω του υποδοχέα Fc σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, σε μοντέλα ποντικών με Συστηματική Σκλήρυνση. Διαφορετική πειραματική προσέγγιση παρουσιάζεται στη μελέτη των Pamuk et al., όπου χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα SSc ποντικών, πιο συγκεκριμένα BALB/c ποντίκια στα οποία προκλήθηκε Συστηματική Σκλήρυνση με τη χρήση bleomycin. Στόχος ήταν να ελέγξουν τα αποτελέσματα της αναστολής της Syk χρησιμοποιώντας τον αναστολέα fostamatinib (R788). Δημιουργήθηκαν τέσσερις ομάδες των πέντε ποντικών: control, bleomycin, bleomycin+fostamatinib, fostamatinib. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση και επεξεργασία του επιδερμικού και του πνευμονικού ιστού. Από την επεξεργασία των προέκυψαν μονιμοποιημένοι χρωματισμένοι (haematoxylin, eosin) ιστοί σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες. Ακολούθησε ιστολογική εξέταση με μικροσκόπιο των τεσσάρων διαφορετικών κατηγοριών. Στόχος ήταν να παρατηρηθούν παθολογικές αλλαγές (βαθμονόμηση και υπολογισμός score 0-3) και τα επίπεδο φλεγμονής, με βάση την προσέλευση λευκοκυτάρων στους ιστούς. Όσον αφορά στο δερματικό ιστό για τον υπολογισμό του δερματικού πάχους χρειάστηκε μικροσκοπική μεγέθυνση x400 και μικρόμετρο και για τον υπολογισμό της ίνωσης χρησιμοποιήθηκε διαφορετική χρώση, Mallory's trichrome stain.

Σε επόμενο στάδιο οι ιστοί επεξεργάστηκαν ώστε να επωασθούν και να χρωματιστούν για τον υπολογισμό των Syk, p-Syk και TGF-β. με τα αντίστοιχα φθορίζοντα αντισώματα rabbit anti-mouse Syk (N-19), rabbit anti-mouse p-Syk (phospho Y323), rabbit anti-mouse TGF-β. Ακόμη εξετάστηκαν και καταμετρήθηκαν τα σιτευτικά κύτταρα και στα δυο είδη ιστών (πνευμονικός και δερματικός).

Τα αποτελέσματα από τις παραπάνω επεξεργασίες και παρατηρήσεις των ιστών είναι:

1. Αναφορικά με τη φλεγμονή και την ίνωση στον πνευμονικό ιστό, το οίδημα, η καταστροφή του ιστού και το score βαθμονόμησης των λευκοκυττάρων ήταν σημαντικά αυξημένο στην ομάδα bleomycin συγκριτικά με την ομάδα fostamatinib και control και, της ομάδας bleomycin+fostamatinib ήταν μειωμένο συγκριτικά με αυτό της bleomycin.
2. Αναφορικά με το πάχος του δερματικού ιστού, η ομάδα ποντικών bleomycin είχε αισθητά πιο παχύ δέρμα συγκριτικά με την ομάδα fostamatinib και control, και η ομάδα bleomycin+fostamatinib είχε λιγότερο παχύ από την ομάδα bleomycin αλλά περισσότερο από της άλλες δυο.
3. Αναφορικά με τον υπολογισμό της ίνωσης στο δερματικό ιστό (χρώση Mallory's) η ίνωση ήταν αισθητά μειωμένη στην ομάδα που έλαβαν fostamatinib.
4. Αναφορικά με την έκφραση των Syk, p-Syk, TGF-β: Η έκφραση της Syk ήταν αυξημένη στην ομάδα bleomycin, η οποία μειώθηκε και στους δυο ιστούς έπειτα από τη χορήγηση fostamatinib. Αντίστοιχο αποτέλεσμα είχε η έκφραση της p-Syk, καθώς

η p-Syk αποτελεί την ενεργή μορφή της Syk. Η πυκνότητα της χρώσης για την έκφραση του TGF- β ήταν έντονη στην ομάδα bleomycin αλλά ανύπαρκτη στην ομάδα bleomycin+ fostamatinib.

5. Τα σιτευτικά κύτταρα είναι ενεργά και αυξημένα στην SSc, και αποτελούν βασικά κύτταρα έκκρισης του TGF- β . Χορήγηση της fostamatinib μείωσε τον αριθμό σιτευτικών κυττάρων στα bleomycin-induced SSc ποντίκια.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν πως η αναστολή της Syk με fostamatinib(R788), μειώνει την ίνωση και τη φλεγμονή στο δερματικό και πνευμονικό ιστό. Ακόμη, έπειτα από θεραπεία με τον ίδιο αναστολέα, τα επίπεδα τόσο της Syk, της p-Syk και του TGF- β εμφανίζονται μειωμένα και στους δυο ιστούς, υποδεικνύοντας έτσι την αντι-ινωτική δράση της fostamatinib. Τέλος, η αναστολή της Syk μειώνει τον αριθμό των σιτευτικών κυττάρων, που αποτελεί ακόμη ένα μέσο μείωσης του TGF- β [52].

Η μελέτη της ερευνητικής ομάδας Silvan et al, πραγματοποίησε πειράματα σε 47 SSc ασθενείς και 35 υγιείς δότες και παρουσίασε διαφορετική προσέγγιση ενεργοποίησης του μονοπατιού της Syk, μέσω υποδοχέα ενεργοποίησης του PSGL-1 στα λευκοκύτταρα, μέσω πρόσδεσης της P-selectin σε αυτόν. Βασικό ενδιαφέρον της μελέτης αποτέλεσε ο υποδοχέας PSGL-1 των λευκοκυττάρων και η αλληλεπίδρασή του με τη μεταλλοπρωτεάση ADAM8. Η ανεπάρκεια του PSGL-1 ή της P-selectin, οδηγεί σε φλεγμονώδη νοσήματα και ίνωση. Έπειτα από σήμανση των πρωτεϊνών διαφοροποίησης για τους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, μεταξύ αυτών και της CD19 των B λεμφοκυττάρων, ο PSGL-1 υπολογίστηκε αυξημένος στα μονοκύτταρα, τα T λεμφοκύτταρα και τα δενδριτικά και, μειωμένος στα B λεμφοκύτταρα SSc ασθενών. Επίσης, υπολογίστηκε το ποσοστό της ADAM8 το οποίο ήταν μειωμένο στα B λεμφοκύτταρα, αυξημένο στα πλασματοκύτταρα και τα T λεμφοκύτταρα, και σταθερό στα μονοκύτταρα SSc ασθενών, σε σύγκριση με των υγιών δοτών. Πραγματοποιήθηκαν rolling-assays*³ για τον υπολογισμό της pSyk (μεταξύ άλλων) έπειτα από ενεργοποίηση του PSGL-1 των μονοκυττάρων με P-selectin. Ως αποτέλεσμα ήταν η αύξηση της φωσφορυλίωση της Syk στους υγιείς δότες αλλά, όχι στους SSc ασθενείς. Συμπερασματικά, τα πειράματα των Silvan et al. δεν να αποδεικνύουν την επίδραση της Syk στα μονοκύτταρα των ασθενών σε σχέση με το μονοπάτι ενεργοποίησης μέσω του PSGL-1, ωστόσο η pSyk είναι μειωμένη στα μονοκύτταρα SSc ασθενών, συγκριτικά με τους υγιείς [53].

*³Rolling-like assays: Σε αυτά τα πειράματα τα λευκοκύτταρα διηθούνται σε μια επιφάνεια επικαλυμμένη είτε με πρωτεΐνη είτε με κύτταρα. Τα κύτταρα «ρέουν» στην επιφάνεια και μέχρι να δημιουργηθούν δεσμοί ανάμεσα στον κυτταρικό υποδοχέα (PSGL-1) με το μόριο συνδέτη (πρωτεΐνη) ή τους υποδοχείς των επιστρωμένων κυττάρων(P-selectin). Οι δεσμοί που δημιουργούνται είναι μη ομοιοπολικοί, ασθενείς και αντιστρεπτοί [54].

Τέλος, σε πρόσφατα πειράματα των Melissaropoulos et al., εξετάστηκε η πρωτεϊνική έκφραση κινασών, όπως η Syk αλλά και η φωσφορυλιωμένη της μορφή, pSyk (p Y348) σε B λεμφοκύτταρα SSc ασθενών και σε υγιείς δότες. Βασικό ενδιαφέρον της μελέτης αποτέλεσαν τα B λεμφοκύτταρα των SSc ασθενών. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυτταρομετρίας ροής, σε 23 ασθενείς και 7 υγιείς, για τον υπολογισμό του ποσοστού έκφρασης των CD19 και CD22. Για τα συγκεκριμένα πειράματα, απομονωμένα B λεμφοκύτταρα ενεργοποιήθηκαν μέσω του BCR με IgM Fc γ και, σημάνθηκαν με τα φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα anti-CD19-FITC and anti-CD22-PE/Cy5. Η επώαση των κυττάρων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας BD και τη χρήση των υποστρωμάτων (Lyse/Fix Buffer Perm Buffer III), όπως περιγράφεται στα πειράματα της ερευνητικής ομάδας Nicholas M. et.al.. Οι CD19 και CD22 εξετάστηκαν ξεχωριστά σε δυο κατηγορίες ασθενών: dcSSc και lcSSc. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν μειωμένη έκφραση της CD22 στους dcSSc ασθενείς, αλλά αυξημένη στους lcSSc, συγκριτικά με τους υγιείς. Η έκφραση της CD19, δε διέφερε μεταξύ των τριών κατηγοριών. Ακολούθησαν πειράματα Western Blott σε CD22 B λεμφοκύτταρα για τον υπολογισμό των Syk, pSyk (Y348), σε 3 dcSSc και 2 lcSSc και 2

υγιείς δότες. Τα αποτελέσματα αυτής τα μελέτης δεν εμφανίζουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά [44].

Παρότι τα δεδομένα που διατίθενται είναι περιορισμένα, όσα υπάρχουν έως τώρα, προτείνουν πως το μονοπάτι της Syk εμπλέκεται στη δημιουργία πνευμονικής ίνωσης του Συστηματικής Σκλήρυνσης ή της Νόσου Μοσχεύματος έναντι του Ξενιστή. Για το λόγο αυτό, κρίνεται σκόπιμο να μελετηθεί διεξοδικά σε πειραματικό επίπεδο ο βαθμός ενεργοποίησης της Syk στη SSc μέχρι να προταθεί ως πιθανός θεραπευτικό στόχος.

4.2. Αποτελέσματα της κυτταρομετρικής ανάλυσης CD20-pSyk

4.2.α. Σύγκριση διαφορετικών υποστρωμάτων για ανίχνευση pSyk

Αρχικά, απομονώθηκαν λεμφοκύτταρα περιφερειακού αίματος από υγιείς δότες, και έγινε φαινοτυπική ανάλυση, με κυτταρομετρία ροής, για την έκφραση της επιφανειακής πρωτεΐνης CD20 και της κυτταροπλασματικής φωσφορυλιωμένης κινάσης Syk. Η CD20 εκφράζεται σε ώριμα προ-B λεμφοκύτταρα, σε αδρανή και ενεργοποιημένα B λεμφοκύτταρα και, σε δενδριτικά κύτταρα.

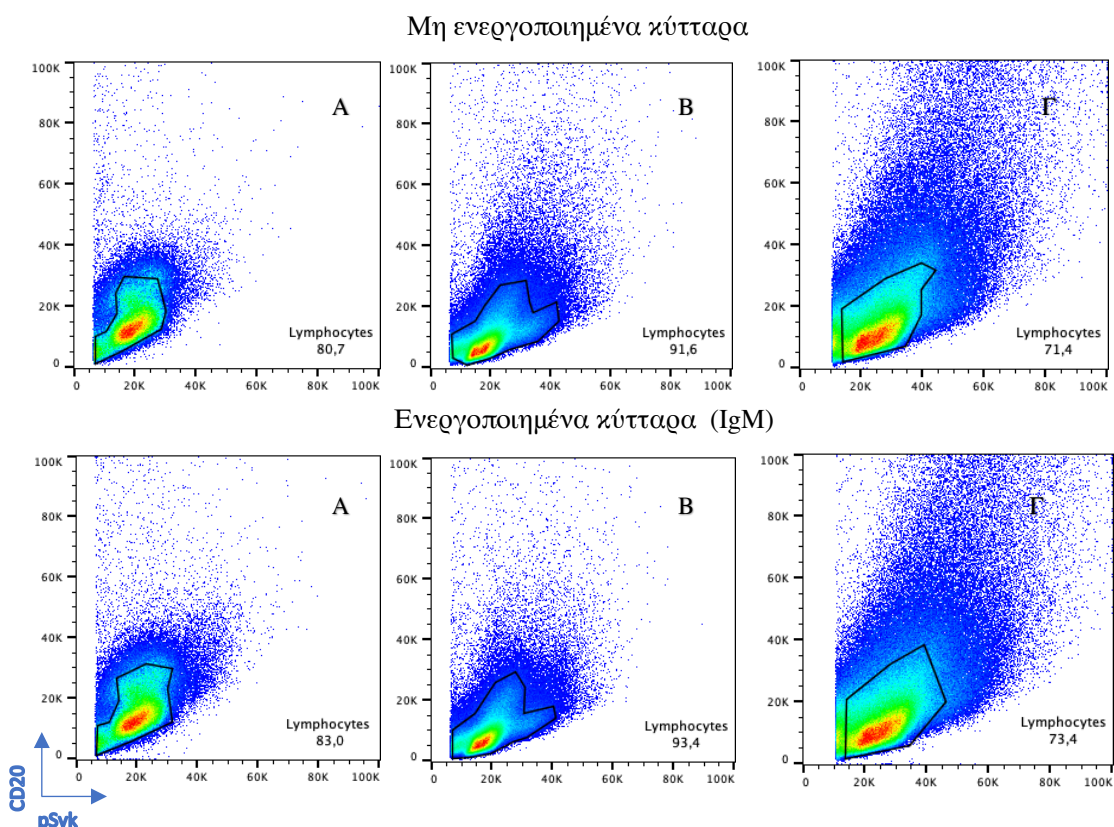
Η ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκε επώάζοντάς τα με πολυκλωνικό αντίσωμα IgM. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η κινάση Syk, ενεργοποιείται άμεσα (εντός 4-16') έπειτα από την ενεργοποίηση του κυτταρικού πληθυσμού με ισότυπο IgM, σε αντίθεση με τον πληθυσμό κυττάρων με τον ισότυπο IgG [55].

Η κινάση Syk βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, επομένως για την ανίχνευσή της χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα το οποίο προκαλεί διάνοιξη των πόρων της κυτταρικής μεμβράνης. Η διάνοιξη των πόρων εξυπηρετεί την είσοδο των φοριζόντων αντισωμάτων pSyk στο εσωτερικό των κυττάρων.

Με βάση τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικά υποστρώματα επώασης των κυττάρων. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε δοκιμή τριών διαφορετικών υποστρωμάτων, στις ίδιες συνθήκες ενεργοποίησης. Τα διαφορετικά υποστρώματα είναι τα εξής:

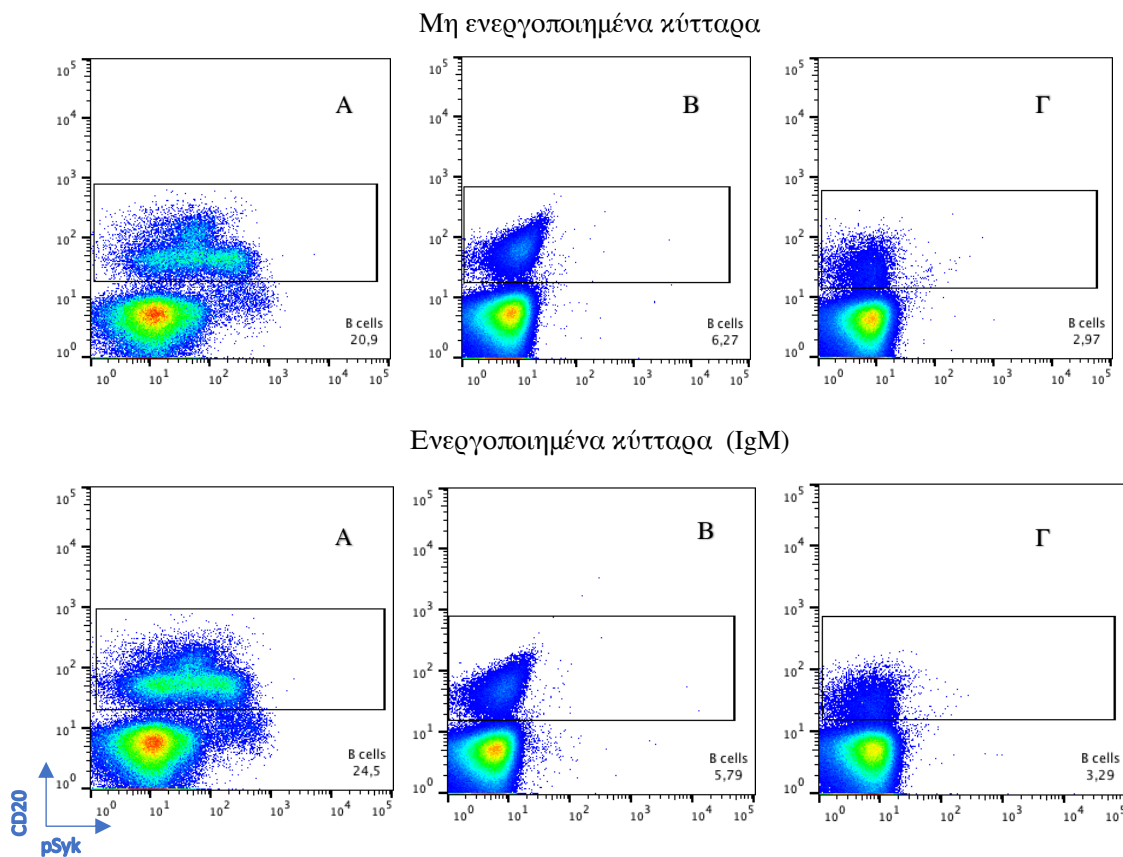
- A. True Nuclear perm buffer, BD
- B. 100% methanol
- Γ. Perm Buffer III, BD

Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής για κάθε ένα από τα τρία διαφορετικά υποστρώματα παρουσιάζονται παρακάτω:



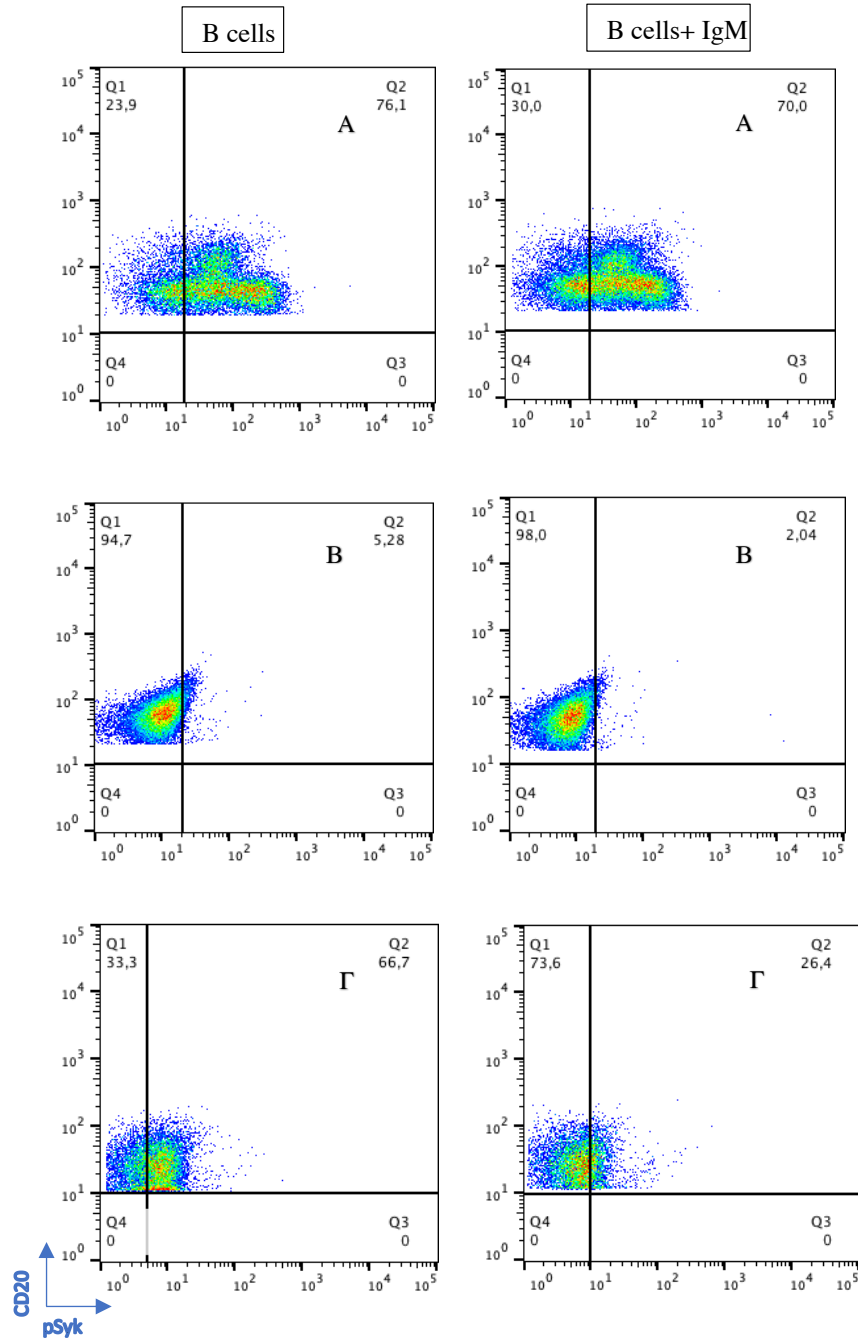
Εικ.6: Γραμμική απεικόνιση πληθυσμού ολικών κυττάρων από δείγματα υγιούς δότη. Επάνω: χωρίς ενεργοποίηση. Κατω: ενεργοποίηση με IgM. Τα επιλεγμένα πλαίσια παρουσιάζουν το ποσοστό λεμφοκυττάρων. Α. επώαση με True Nuclear Buffer, Β. επώαση με 100% methanol, Γ. Επώαση με Perm Buffer III.

Στα γραφήματα ολικού πληθυσμού, εμφανίζεται ο συνολικός πληθυσμός των λεμφοκυττάρων που καταμετράται κατά την πρόσθια και πλάγια σκέδαση. Σε αυτά τα γραφήματα πυκνότητας καταμετρήθηκαν τα λεμφοκύτταρα υγιών δοτών, παρουσία ή απουσία IgM. Δεν εμφανίζεται αποπτωτικός πληθυσμός, επομένως οι συνθήκες επώασης και ενεργοποίησης των κυττάρων, και στις τρεις περιπτώσεις, δεν επηρεάζουν την επιβίωση των κυττάρων κατά την καλλιέργεια.



Εικ.7: Επιλεγμένοι πληθυσμοί Β λεμφοκυττάρων υγιούς δότη, απουσία (επάνω) και παρουσία (κάτω) IgM. Α. επώαση με True Nuclear Buffer, Β. επώαση με 100% methanol, Γ. Επώαση με Perm Buffer III.

Από το συνολικό πληθυσμό λεμφοκυττάρων, επιλέχθηκαν τα Β λεμφοκύτταρα. Εφόσον πραγματοποιήθηκε σήμανση των κυττάρων με φοριζόν αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης διαφοροποίησης CD20, ο πληθυσμός των Β λεμφοκυττάρων εμφανίζεται στο επάνω μέρος του γραφήματος πυκνότητας.



Εικ.8: Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής B λεμφοκυττάρων υγιούς δότη. Τα κύτταρα έχουν επωασθεί με φθορίζοντα αντισώματα έναντι των CD20 και Syk. Αριστερά: απουσία IgM, Δεξιά: παρουσία IgM. Α. B κύτταρα επώαση με True Nuclear buffer, Β. B κύτταρα επώαση με 100% methanol, Γ. B κύτταρα επώαση με Perm Buffer III.

Τιμές mean p-Syk PE

	B cells unstimulated	B cells + IgM
A.	82,30	71,10
B.	10,5	9,76
Γ.	8,13	8,69

Παρατηρώντας τα τεταρτημόρια του γραφήματος, υπάρχει μετακίνηση των κυττάρων στα τεταρτημόρια Q1, Q2. Το τεταρτημόριο Q2 αντιπροσωπεύει τα κύτταρα CD20⁺phosphoSyk⁺. Έπειτα από τη διέγερση των κυττάρων με IgM, αναμένεται αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού CD20⁺phosphoSyk⁺, καθώς η Syk λαμβάνει σήματα ενεργοποίησης μέσω του BCR, ο οποίος ενεργοποιείται από τα μόρια IgM.

Τα ποσοστά ενεργοποίησης της Syk στους κυτταρικούς πληθυσμούς με τη χρήση πρωτοκόλλου True Nuclear perm buffer και 100% methanol, μετά από επώαση με αντίσωμα IgM είναι χαμηλότερα, σε σύγκριση με τα ποσοστά ενεργοποίησης χωρίς ενεργοποίηση με IgM, γεγονός διαφορετικό από το αναμενόμενο. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με το υπόστρωμα Perm Buffer III, παρατηρείται αύξηση της τιμής mean, έπειτα από επώαση με IgM, για το λόγο αυτό τα πειράματα που ακολούθησαν πραγματοποιήθηκαν με το υπόστρωμα Perm Buffer III, της εταιρείας BD.

Επιπλέον, στην περίπτωση A (True Nuclear buffer), το ποσοστό βασικής φωσφορυλίωσης της Syk 76%, είναι περισσότερο αυξημένο από το φυσιολογικό. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει πως το συγκεκριμένο υπόστρωμα δεν είναι κατάλληλο για τη συγκεκριμένη κινάση. Ανάλογα αποτελέσματα είχαν τα πειράματα σε άλλα δυο δείγματα υγιών δοτών.

4.2.β. Απενεργοποίηση φωσφατασών, PTPs

Για την απενεργοποίηση των φωσφατασών ελήφθησαν υπόψιν τα παρακάτω. Η φωσφορυλίωση τυροσινών μιας πρωτεΐνης στο εσωτερικό του κυττάρου αντιστοιχεί στην ισορροπία μεταξύ των ανταγωνιστικών λειτουργιών κινασών τυροσίνης (PTKs) και φωσφατασών (PTPs). Για την απενεργοποίηση των φωσφατασών, PTPs, και με απώτερο σκοπό τη διατήρηση της φωσφορυλίωσης της Syk, χρησιμοποιήθηκαν σε ξεχωριστά πειράματα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂), και το pervanadate. Το pervanadate παρασκευάζεται με την ανάμειξη 0.1 mM sodium orthovanadate και 0.5 mM H₂O₂ [20]. Το sodium orthovanadate ως ανταγωνιστικός αναστολέας, απενεργοποιεί τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες και συντηρεί τη φωσφορυλίωση τυροσινικών κινασών, όπως η Syk. Έκθεση των B κυττάρων σε pervanadate (s.orthovanadate/H₂O₂) απενεργοποιεί τις φωσφατάσες PTPs παρατείνοντας τη διάρκεια που παραμένουν φωσφορυλιωμένες οι τυροσίνες της Syk [56].

Η εξαρτώμενη από τον BCR ενεργοποίηση της Syk, και η μετάδοση του σήματος εξισορροπείται από τη λειτουργία των φωσφατασών [56]. Ιδιότητα των PTPs, είναι να αποφωσφορυλιώνουν τις ήδη φωσφορυλιωμένες τυροσίνες, ώστε να ρυθμίζουν τη μετάδοση σήματος και να τη σταματούν, διατηρώντας την ισορροπία στο εσωτερικό των κυττάρων. Αντίστοιχα, ελέγχεται η ενεργότητα των φωσφατασών, ώστε να σταματά η δράση τους εφόσον έχει ολοκληρωθεί η μετάδοση σήματος από τις κατάλληλες κινάσες. Αυτή τη λειτουργία επιτελεί το H₂O₂, όταν οξειδώνει το καταλυτικό κέντρο μιας φωσφατάσης αναστέλλοντας έτσι τη λειτουργία της [57].

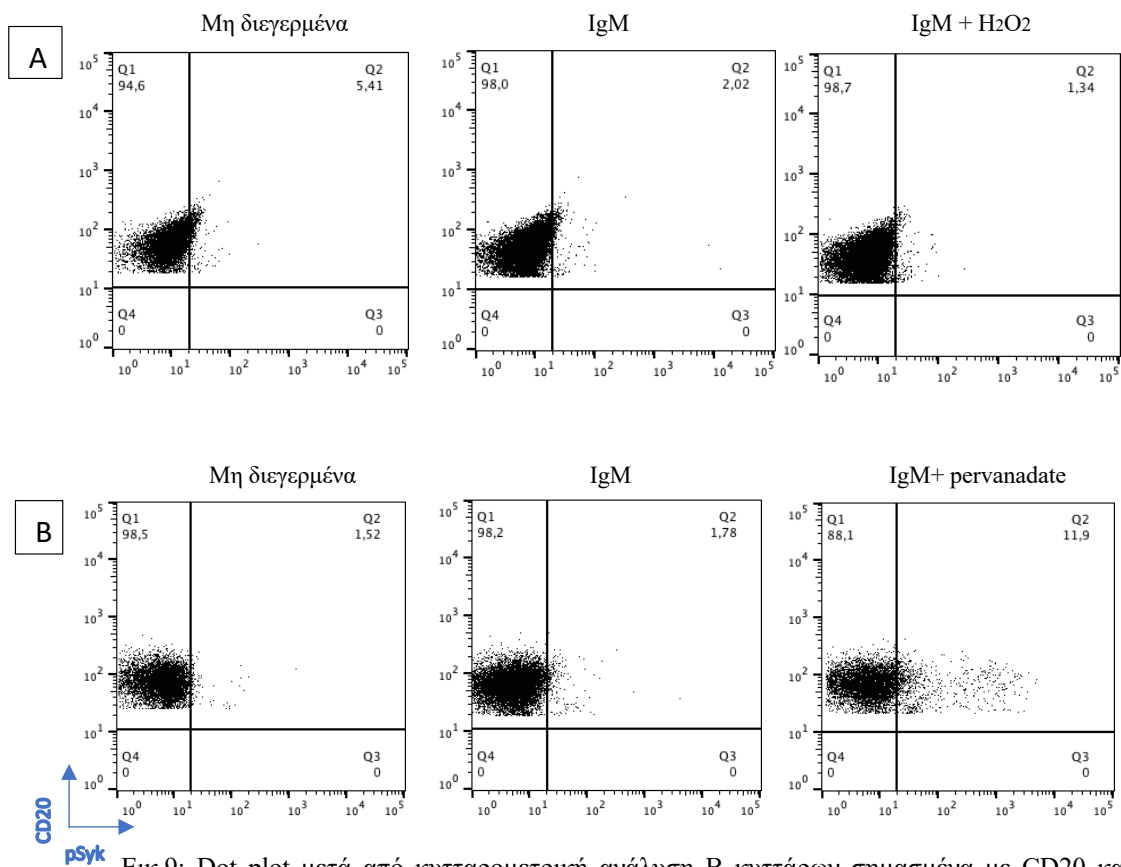
Ως αναστολέας των φωσφατασών, εκτός από το H₂O₂, χρησιμοποιείται το pervanadate [58]. Το pervanadate οξειδώνει το καταλυτικό κέντρο της φωσφατάσης, προκαλώντας με τον ίδιο τρόπο με το H₂O₂, την αναστολή των φωσφατασών. Ωστόσο, για τη χρήση του θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν η τοξικότητα του, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο, καθώς και το γεγονός πως μπορεί να αλλάξει τις συνθήκες pH του υποστρώματος, εάν η ποσότητα που χρησιμοποιείται υπερβεί την επιτρεπόμενη [59].

Επιπρόσθετα, η χρήση του IgM, εκτός από το ότι εξυπηρετεί την ενεργοποίηση του BCR, σηματοδοτεί φωσφατάσες, ως μηχανισμό αρνητικού ανατροφοδοτισμού [55].

Επομένως η απενεργοποίηση PTPs, είναι αναγκαία στα συγκεκριμένα πειράματα για αυτούς τους δυο λόγους.

Εφόσον εδραιώθηκε το πρωτόκολλο καλλιέργειας των κυττάρων με το υπόστρωμα Perm Buffer III, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την απενεργοποίηση των φωσφατασών, με αποτέλεσμα την ενίσχυση σήματος της pSyk.

Τα αποτελέσματα κυτταρομετρίας από τα δυο πειράματα είναι τα ακόλουθα:



Εικ.9: Dot plot μετά από κυτταρομετρική ανάλυση B κυττάρων σημασμένα με CD20 και phosphor-Syk αντίσωμα και επώαση με αναστολείς φωσφατασών. A: αναστολέας φωσφατασών H₂O₂, B: αναστολέας φωσφατασών pernanadate.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της κυτταρομετρίας, είναι εμφανής η διαφορά στη δράση του H₂O₂ συγκριτικά με το pernanadate. Στην περίπτωση B, η αύξηση του ποσοστού φωσφορυλίωσης της Syk είναι αρκετά μεγάλη, σε αντίθεση με την περίπτωση του H₂O₂, όπου παρατηρείται μείωση (αντιπροσωπευτικό από τρία πειράματα). Για το λόγο αυτό, ως αναστολέας των PTPs στα υπόλοιπα πειράματα χρησιμοποιείται το pernanadate.

4.2.γ. Υπολογισμός πληθυσμού κυττάρων CD20⁺Syk⁺

Για να υπολογιστεί το ποσοστό φωσφορυλίωσης της κινάσης Syk, στα Β λεμφοκύτταρα, τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα επώαστηκαν με φθορίζοντα αντισώματα έναντι της Syk και της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης CD20, που αποτελεί μόριο διάκρισης των Β κυττάρων.

Κάθε δείγμα αναλύθηκε με το ίδιο πρωτόκολλο (υπόστρωμα Perm Buff III, BD), σε τρεις διαφορετικές συνθήκες. Οι διαφορετικές συνθήκες εξυπηρετούν στον έλεγχο της βασικής φωσφορυλίωσης που πραγματοποιείται στα κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες, και στη φωσφορυλίωση έπειτα από ενεργοποίηση του κυττάρου με αντίσωμα IgM. Ως επιπλέον συνθήκη, ορίστηκε η ενεργοποίηση του κυττάρου με IgM και χορήγηση s. orthovanadate, το οποίο ως αναγωνιστικός αναστολέας, απενεργοποιεί τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες και συντηρεί τη φωσφορυλίωση τυροσινικών κινασών, όπως η Syk. Η Syk, αποτελεί κυτταροπλασματική κινάση που ενεργοποιείται εντός 8' έπειτα από την ενεργοποίηση του BCR.

Πιο αναλυτικά οι συνθήκες είναι οι εξής:

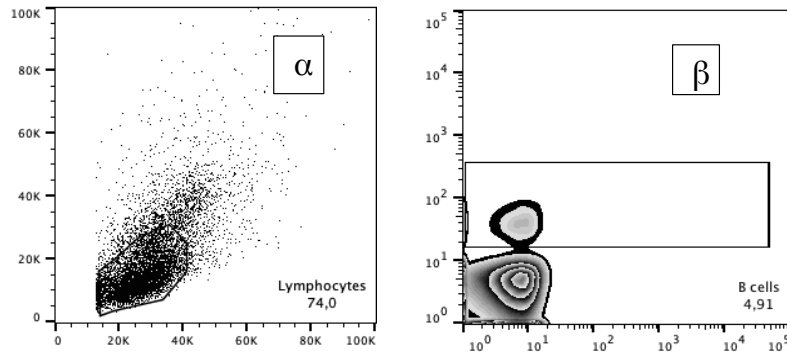
1. Επώαση των λεμφοκυττάρων
2. Επώαση των λεμφοκυττάρων με προσθήκη αντισώματος IgM
3. Επώαση των λεμφοκυττάρων με προσθήκη αντισώματος IgM και s. orthovanadate

Σε όλες τις συνθήκες ακολουθήθηκε η ίδια επεξεργασία της κυτταρομετρικής ανάλυσης. Η ενεργοποίηση της Syk έγινε στα 8' μετά την προσθήκη IgM. Με το πέρας των 8' σταμάτησε η επιπλέον φωσφορυλίωση με την προσθήκη παραφορμαλδεΐδης στα κύτταρα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στα 8' επώασης, η φωσφορυλίωση της Syk εμφανίζεται στο μεγαλύτερο ποσοστό[55]. Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων με τα φθορίζοντα αντισώματα FITC CD20 και PE mouse anti-Syk (pY348) BD phosphoflow.

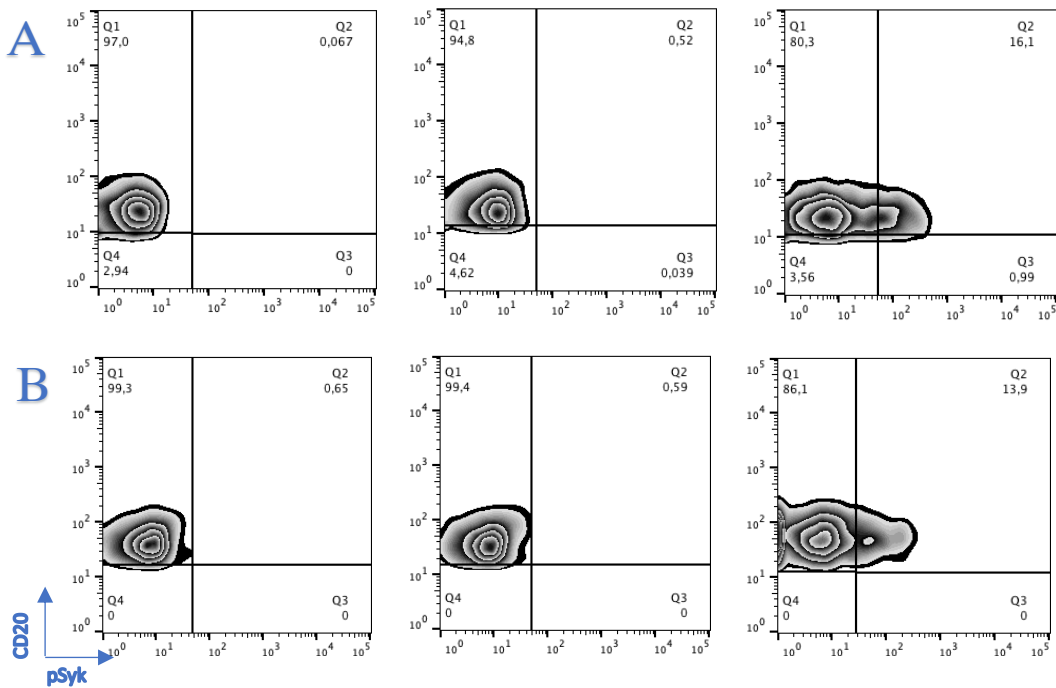
Αρχικά, επιλέχθηκαν τα ολικά λεμφοκύτταρα, αποκλείοντας τον πληθυσμό νεκρών κυττάρων (<5%) και υπολειμμάτων τους (Εικ.10α). Έπειτα, από την ανάλυση του πληθυσμού λεμφοκυττάρων, επιλέχθηκαν τα Β λεμφοκύτταρα, με βάση την έκφραση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης CD20 (Εικ.10β). Τέλος, αναλύθηκαν μεμονωμένα τα CD20 Β λεμφοκύτταρα ως προς τη φωσφορυλίωση της Syk (Εικ.11). Τα τεταρτημόρια που εμφανίζονται στους πίνακες κυτταρομετρίας είναι:

Q1	CD20 ⁺ Syk ⁻
Q2	CD20 ⁺ Syk ⁺
Q3	CD20 ⁻ Syk ⁺
Q4	CD20 ⁻ Syk ⁻

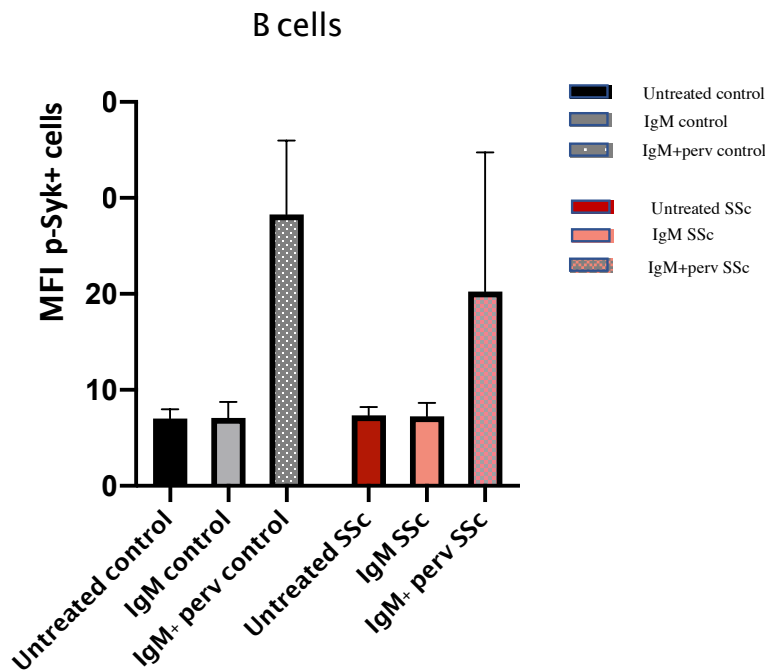
Ο πληθυσμός κυττάρων που μας ενδιαφέρει, βρίσκεται στο τεταρτημόριο Q2, καθώς αυτός ο πληθυσμός εκφράζει τόσο τη CD20 όσο και τη Syk (CD20⁺Syk⁺).



Εικ.10: Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, δείγμα ασθενούς. α. πληθυσμός λεμφοκυττάρων, επώαση χωρίς μόριο ενεργοποίησης, με φθορίζοντα αντισώματα έναντι Syk, CD20, β. πληθυσμός λεμφοκυττάρων και επιλεγμένα CD20⁺B λεμφοκύτταρα εντός πλαισίου.



Εικ.11: **A.** B λεμφοκύτταρα υγιούς δότη, **B.** B λεμφοκύτταρα SSc ασθενούς. Η φωσφορυλίωση της Syk υπολογίστηκε με κυτταρομετρία ροής με ειδικό φθορίζον αντίσωμα σε B λεμφοκύτταρα υγιών δοτών και SSc ασθενών, **1.** B λεμφοκύτταρα χωρίς επώαση με μόριο ενεργοποίησης, **2.** B λεμφοκύτταρα, επώαση με pAb IgM (8'). **3.** B λεμφοκύτταρα, επώαση με pAbIgM και pervanadate (8').



Εικ.12: Αθροιστικά δεδομένα από 14 πειράματα (δείγματα 7 υγιών, 7 ασθενών δοτών). Οι μπάρες του γραφήματος υποδεικνύουν την τιμή $\text{mean} \pm \text{SEM}$.

Συγκρίνοντας τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Syk, με και χωρίς ενεργοποίηση του BCR με pAb αντίσωμα IgM, παρατηρείται μικρή αύξησή της στους υγιείς δότες σε σχέση με χωρίς ωστόσο στατιστικά σημαντική διαφορά ($p_{\text{value}} > 0,05$), και μικρή μείωσή της στους SSc ασθενείς ($p_{\text{value}} > 0,05$). Οι τιμές p_{value} είναι στατιστικά μη σημαντικές, επομένως το αποτέλεσμα των πειραμάτων πιθανά διαφέρει εάν το μέγεθος του δείγματος είναι μεγαλύτερο.

Αντίστοιχα, η αύξηση της φωσφορυλιωμένης Syk στα δείγματα υγιών, στη συνθήκη ενεργοποίησης με IgM και ταυτόχρονη χορήγηση s.orthovanadate, είναι εμφανής συγκριτικά με τη συνθήκη untreated. Η αύξηση φωσφορυλίωσης στη συνθήκη IgM και pervanadate, στους ασθενείς με SSc, είναι μικρότερη από αυτή που παρατηρείται στους υγιείς δότες. Ωστόσο, συγκρίνοντας τις αυξημένες τιμές φωσφορυλιωμένης Syk, υγιών δοτών και SSc ασθενών, στη συνθήκη όπου χορηγήθηκε IgM και pervanadate, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p_{\text{value}} = 0,14$).

Συζήτηση

Από την βιβλιογραφική αναζήτηση προέκυψαν δεδομένα που υποδηλώνουν α) έλλειψη σημαντικών πειραματικών δεδομένων μελέτης της ενεργοποίησης της Syk στην SSc και άμεση ανάγκη περαιτέρω πειραματικής προσέγγισης σε επίπεδο μεταφραστικής έρευνας σε ασθενείς με τη νόσο και β) βιβλιογραφικές αναφορές που ενθαρρύνουν την πιθανή εστίαση θεραπευτικών επιλογών που να στηρίζονται στη στοχοποίηση του Syk.

Το SSc είναι μια χρόνια νόσος η οποία χαρακτηρίζεται από αυτοδραστική κυτταρική και χυμική απόκριση (πχ παραγωγή αυτοαντισωμάτων), τη δημιουργία ίνωσης και την αγγειοπάθεια [60]. Η εξάπλωσή της στα όργανα του οργανισμού, καθιστά δύσκολη την αποτελεσματική θεραπευτική αντιμετώπιση των νοσούντων, λόγω της μεγάλης ετερογένειας που παρουσιάζει η πάθηση και των πολύπλοκων μηχανισμών που συμμετέχουν στην εγκατάσταση και πρόοδο της νόσου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση νοσηρότητας και θνησιμότητας των ασθενών με SSc. Μια διαφορετική προσέγγιση έχει προταθεί από τον EULAR το 2016, η οποία προτείνει την ανάπτυξη διαφορετικής θεραπείας της SSc εξειδικευμένη για το σύστημα του οργανισμού που προσβάλλει [61]. Τόσο τα T όσο και τα B λεμφοκύτταρα έχουν μελετηθεί, και μελέτες που στηρίζονται σε άμεση ή έμμεση στοχοποίηση τους έχουν δοκιμαστεί με ενθαρρυντικά αποτελέσματα [60].

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έχουν δείξει ότι η λειτουργική ανεπάρκεια των ρυθμιστικών B λεμφοκυττάρων σχετίζεται με τη νόσο και ειδικότερα με ασθενείς με πνευμονική ίνωση. . Επιπρόσθετα, υπάρχει ενδεδειγμένη θεραπεία η οποία στοχεύει στα B λεμφοκύτταρα. Πρόκειται για το mAb αντίσωμα Rituximab (RTX, anti-CD20), το οποίο στοχεύει τις πρωτεΐνες διαφοροποίησης CD20 των κύτταρων[62] και χρησιμοποιείται σε SSc ασθενείς ένδειξη (πχ ασθενείς με πνευμονική ίνωση), με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τέλος αυτοαντισώματα και T λεμφοκύτταρα που στοχεύουν αυτοαντιγόνα που όπως τις endothelin 1 type A receptor, angiotensin II type 1 receptor, muscarinic receptor 3, platelet-derived growth factor receptor, έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη της νόσου.

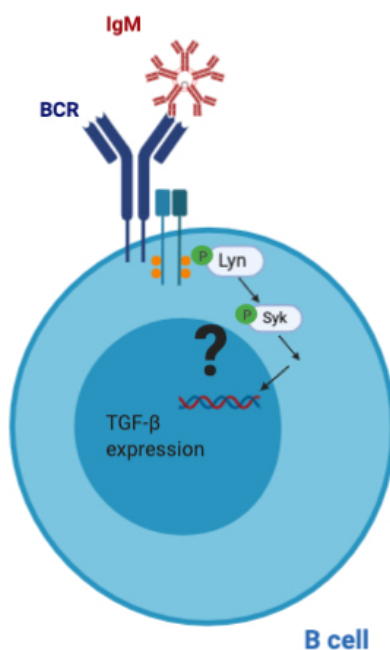
Η χορήγηση αντι-ινωτικών θεραπειών, όπως αυτές που χρησιμοποιούνται σε ασθενείς με ιδιοπαθή ίνωση, χρησιμοποιούνται εκτός ένδειξης σε μεμονωμένα περιστατικά. Αφορμώμενοι από τις θεραπείες που στοχεύουν τα B κύτταρα, θελήσαμε να διερευνήσουμε ποιοι είναι οι πιθανοί παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία των B λεμφοκυττάρων και κατά πόσο εμπλέκονται στην εξέλιξη της ασθένειας. Διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης έχουν στοχοποιηθεί, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικές επιλογές σε ασθενείς ή υποομάδες ασθενών με SSc. Αρκετά από αυτά αφορούν στην έκφραση κυτοκινών που σηματοδοτούν την ενεργοποίηση ινοβλαστών, εναπόθεσης κολλαγόνου και δημιουργία ίνωσης, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας TGF-β1 [62]. Έχει αποδειχθεί πως τα B λεμφοκύτταρα ενεργοποιούν τους ινοβλάστες των SSc ασθενών με αποτέλεσμα την υπερέκκριση κολλαγόνου και τη δημιουργία ίνωσης. Επιπλέον, έχει συσχετισθεί η παραγωγή κολλαγόνου από τους ινοβλάστες, οι οποίοι ενεργοποιούνται από τα B λεμφοκύτταρα, με την έκφραση του TGF-β1, ο οποίος εκκρίνεται από τα B λεμφοκύτταρα [63]. Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα, μπλοκάροντας τον TGF-β1, διακόπτεται η ικανότητα των B λεμφοκυττάρων να ενεργοποιούν του την έκκριση κολλαγόνου από τους ινοβλάστες [64]. Επομένως ο TGF-β1 αποτελεί σημαντικό στόχο έρευνας για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα B λεμφοκύτταρα συμβάλλουν στην ίνωση.

Ένα άλλο μονοπάτι σηματοδότησης περιλαμβάνει την κινάση Lyn, η οποία φωσφορυλιώνεται αμέσως μετά την ενεργοποίηση του BCR. Μελέτη της ερευνητικής ομάδας Melissaropoulos et al. που πραγματοποιήθηκε για τη φωσφορυλίωση της Lyn έπειτα από ενεργοποίηση του BCR σε CD22 λεμφοκύτταρα SSc ασθενών, δηλώνει μείωσή της, χωρίς όμως το αποτέλεσμα να είναι στατιστικά σημαντικό, αν και αυτό το εύρημα μπορεί να οφείλεται στο σχετικά μικρό αριθμό δειγμάτων που αναλύθηκαν. Καθοδικά της Lyn, βρίσκεται η κινάση Syk, για την οποία η ίδια ερευνητική ομάδα πραγματοποίησε περιορισμένα πειράματα σε CD22 B λεμφοκύτταρα SSc ασθενών, χωρίς όμως να καταλήγει σε στατιστικά σημαντικό συμπέρασμα (αναλυτική περιγραφή Melissaropoulos et al.) [44].

Παρά το γεγονός ότι αποτελεί τη μοναδική μελέτη που πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά σε ανθρώπινα B λεμφοκύτταρα υγιών και SSc ασθενών, το γεγονός ότι η μελέτη πραγματοποιήθηκε στα CD22 B λεμφοκύτταρα και όχι στο συνολικό πληθυσμό, θέτει επιπλέον περιορισμό για την εκτίμηση της συμμετοχής της Syk στην SSc.

Παράλληλα, μέσω της βιβλιογραφικής ανασκόπησης που πραγματοποιήθηκε, συλλέχθηκαν αρκετές μελέτες που αφορούν στη διερεύνηση της κινάσης Syk στην SSc. Συγκεντρωτικά, οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν κατά βάση σε λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από πειραματικά μοντέλα ποντικών. Τα λεμφοκύτταρα που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα είναι τα T, και λιγότερο τα B. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα B λεμφοκύτταρα είναι επικεντρωμένες στις CD19, CD20, CD22, χωρίς όμως την άμεση σύνδεση με το μονοπάτι ενεργοποίησης BCR-Syk. Οι υποδοχείς που έχουν μελετηθεί έως τώρα ποικίλουν, γι' αυτό και η παρούσα ερευνητική μελέτη επικεντρώθηκε στον BCR, ο οποίος σύμφωνα με τη βιβλιογραφία συνδέεται άμεσα με την ενεργοποίηση της Syk. Ταυτόχρονα η CD20 αποτελεί σημαντική πρωτεΐνη διαφοροποίησης στα B λεμφοκύτταρα SSc ασθενών, γι' αυτό και έχει δημιουργηθεί θεραπεία απόπλυσης των CD20 B λεμφοκυττάρων.

Τα δεδομένα αυτά δηλώνουν πως υπάρχει επιστημονική βάση που να δικαιολογεί το σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ο υπολογισμός της φωσφορυλίωσης της Syk, έπειτα από ενεργοποίηση των κυττάρων μέσω του BCR, μπορεί να διερευνηθεί στο μεταβολικό μονοπάτι που προτείνεται, με βάση τα έως τώρα δεδομένα (Εικ.13).



Εικ.13: Υποθετική στήξέτιση της κινάσης Syk με την έκφραση του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα TGF-β.

Βασιζόμενοι στη βιβλιογραφική ανασκόπηση και τα δεδομένα που συλλέχθηκαν για τη διερεύνηση της φωσφορυλίωσης της κινάσης Syk στη SSc αποφασίσαμε να πραγματοποιήσουμε πειράματα κυτταρομετρίας ροής σε δείγματα ασθενών με SSc, επικεντρωμένα στα CD20 B λεμφοκύτταρα.

Το Εργαστήριό μας συλλέγει δείγματα περιφερικού αίματος, από τους ασθενείς οι οποίοι νοσηλεύονται στη Ρευματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας ή παρακολουθούνται στα Εξωτερικά Ιατρεία της Κλινικής, με σκοπό το διαχωρισμό των κυττάρων και τη συντήρησή τους σε επιμέρους κατηγορίες, στο υγρό άζωτο (-80°C) για

περαιτέρω διερεύνηση και εκπόνηση ερευνητικών πρωτοκόλλων. Τα δεδομένα τις βιβλιογραφικής ανασκόπησης αφορούν στα:

1. πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, και,
2. πειράματα που έγιναν σε λεμφοκύτταρα ασθενών, τα οποία όμως δεν εδραιώνουν πειστικά το ρόλο της Syk στο SSc.

Για το λόγο ότι δεν υπάρχουν δημοσιευμένα πειράματα σε B κύτταρα ασθενών SSc, σε συνδυασμό με την ύπαρξη δειγμάτων stock στο υγρό άζωτο και , σχεδιάστηκαν τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής.

Τα πειράματα ξεκίνησαν με την δοκιμή διαφορετικών πρωτοκόλλων που αφορούν στο υπόστρωμα επώασης του κυτταρικού πληθυσμού και την απενεργοποίηση φωσφατάσων, ώστε να ανευρεθεί η ιδανική συνθήκη. Συνθήκες όπως η ενεργοποίηση του BCR με χρήση IgM, η χρονική διάρκεια επώασης για την ενεργοποίηση της Syk, ακολουθήθηκαν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

Αναλυτικότερα η συλλογιστική πορεία ώστε να δημιουργηθεί το κατάλληλο πειραματικό πρωτόκολλο είναι η ακόλουθη. Προκειμένου να διεγερθούν τα κύτταρα σε *in vitro* πειράματα, χρειάζεται ένα διεγερτικό μόριο. Στα πειράματα αυτής της διπλωματικής εργασίας, χρειάστηκε ένα μόριο το οποίο διεγείρει τον BCR, γι' αυτό ως μόριο διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα IgM (10mg/ml). Η επιλογή αυτού έγινε σύμφωνα με δεδομένα της βιβλιογραφίας[55].

Παράλληλα με τη διέγερση του BCR, χρειάστηκε να απενεργοποιηθούν οι φωσφατάσες. Η απενεργοποίηση αυτή εξυπηρετεί στην παράταση της φωσφορυλίωσης των τυροσινών, επομένως αναμένεται αύξηση του ποσοστού της. Για την απενεργοποίηση των φωσφατάσων χρησιμοποιήθηκαν δυο μόρια τα οποία σταματούν τη δράση των φωσφατάσων, και αυτά είναι το H₂O₂ και το s.orthovanadate ώστε να επιλεγεί το ένα από τα δύο. Έπειτα από προκαταρκτικά πειράματα κυτταρομετρίας ροής για να ελεγχθεί η επίδραση των δυο μορίων στη φωσφορυλίωση της Syk (Εικ.9), ως αναστολέας των PTPs επιλέχθηκε το s.orthovanadate (10μM, 50μM). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το συγκεκριμένο απενεργοποιεί φωσφατάσες που αποφωσφορυλιώνουν της τυροσίνες της κινάσης Syk[12].

Δεδομένου ότι η Syk, φωσφορυλιώνεται στα πρώτα 4-16 λεπτά έπειτα από την ενεργοποίηση του BCR, με μέγιστο ποσοστό φωσφορυλίωσης τα 8', χρησιμοποιήθηκε η παραφορμαλδεΐδη, PFA, ώστε να σταματήσει η διαδικασία της φωσφορυλίωσης [55].

Εφόσον τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν, ακολούθησε η καλλιέργεια των κυττάρων με σκοπό τη χρώση με τα κατάλληλα φθορίζοντα αντισώματα. Σκοπός ήταν να υπολογιστεί το ποσοστό φωσφορυλιωμένης Syk στον πληθυσμό B λεμφοκυττάρων. Επομένως χρησιμοποιήθηκαν τα μονοκλωνικά αντισώματα CD20 και pSyk. Ο φθορισμός των δύο μορίων εξυπηρετεί στην ανίχνευση συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Για να εισέλθουν τα φθορίζοντα αντισώματα στο εσωτερικό των κυττάρων, απαιτείται διάνοιξη των πόρων της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με διαφορετικά υποστρώματα, όπως περιγράφηκε στα αποτελέσματα (Εικ.8). Η επιλογή του υποστρώματος έγινε με βάση τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, οπότε επιλέχθηκε τελικά το perm buffer III. Τέλος, ακολούθησε επαναφορά των κυτταρικών πόρων, ώστε να διεξαχθεί η κυτταρομετρία ροής στις φυσιολογικές συνθήκες.

Περιορισμοί μελέτης

Οι δοκιμαστικές συνθήκες που αναφέρθηκαν εξετάστηκαν αρχικά σε δείγματα υγιών δοτών. Λόγω περιορισμένων αντιδραστηρίων και χρηματοδότησης δε μπορούσαν να γίνουν αρκετές δοκιμαστικές επαναλήψεις, ούτε να θέσουμε απερίοριστες συνθήκες στα πειράματα. Καταλήγοντας στις συνθήκες που θεωρήθηκαν ευνοϊκότερες για τα πειράματα, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο στα δείγματα SSc ασθενών. Μια από τις συνθήκες που θελήσαμε να εξετάσουμε, ήταν ο χρόνος ενεργοποίησης της Syk, στα 4, 8 και 12 λεπτά. Ο ίδιος

περιορισμός διαθεσιμότητας αντιδραστηρίων ισχύει και σε αυτή την περίπτωση, οπότε δεν προστέθηκαν περισσότερες συνθήκες στα πειράματα. Επίσης υπήρχαν περιορισμοί στην επιλογή των δειγμάτων, ασθενών με SSc. Οι περιορισμοί αφορούσαν στην ύπαρξη ασθένειας, εκτός από SSc, στη θεραπεία η οποία χορηγείται στους ασθενείς, και αν τα κύτταρα ήταν σε φυσιολογική κατάσταση έπειτα από την επαναφορά τους από το υγρό άζωτο. Όσον αφορά στη θεραπεία, ασθενείς με Συστηματική Σκλήρυνση, λαμβάνουν Rituximab, το οποίο απαλλάσσει τον οργανισμό από Β λεμφοκύτταρα, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η διεξαγωγή πειραμάτων σε αυτά. Επίσης, έχει παρατηρηθεί αυξημένος πληθυσμός αποπτωτικών κυττάρων σε δείγματα που παρέμειναν αρκετά χρόνια στο υγρό άζωτο, οπότε προσπαθήσαμε να χρησιμοποιήσουμε κύτταρα που απομονώθηκαν πρόσφατα.

Βιβλιογραφία

- [1] K. J. Owen J., Punt J., Stanford A. S., Jones P. P., *Kuby Immunology*, 7th ed., vol. 111, no. 479. New York: W. H. Freeman and Company , ©2013., 1965.
- [2] R. R. Rich, T. A. Fleisher, W. T. Shearer, H. W. Schroeder, A. J. Frew, and C. Weyand, *Clinical immunology: Principles and practice: Fourth edition*. 2012.
- [3] Y. Tanaka, S. Kubo, S. Iwata, M. Yoshikawa, and S. Nakayamada, “B cell phenotypes, signaling and their roles in secretion of antibodies in systemic lupus erythematosus,” *Clin. Immunol.*, vol. 186, pp. 21–25, 2018.
- [4] M. D. Hajime Kono, M.D. Ph.D and Kenneth L. Rock, “How dying cells alert the immune system to danger.” *Nat Rev Immunol*. 2008 April ; 8(4): 279–289. doi:10.1038/nri2215., 2008.
- [5] L. A. Abbas A.K., *Basic Immunology, Functions and disorders of the immune system*, 2nd ed. Philadelphia: Broken Hill Publications, 2004.
- [6] M. D. Diaz-Muñoz *et al.*, “The RNA-binding protein HuR is essential for the B cell antibody response,” *Nat. Immunol.*, vol. 16, no. 4, pp. 415–425, 2015.
- [7] K. M. Yatim and F. G. Lakkis, “A brief journey through the immune system,” *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 10, no. 7, pp. 1274–1281, 2015.
- [8] Q. Jiao, L. Bi, Y. Ren, S. Song, Q. Wang, and Y. shan Wang, “Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance,” *Mol. Cancer*, vol. 17, no. 1, pp. 1–12, 2018.
- [9] K. P. Szilveszter, T. Németh, and A. Mócsai, “Tyrosine kinases in autoimmune and inflammatory skin diseases,” *Front. Immunol.*, vol. 10, no. AUG, pp. 1–21, 2019.
- [10] T. U. Dy, “and F Uction of,” 2004.
- [11] D. R. Robinson, Y. M. Wu, and S. F. Lin, “The protein tyrosine kinase family of the human genome,” *Oncogene*, vol. 19, no. 49, pp. 5548–5557, 2000.
- [12] E. Tsang *et al.*, “Molecular mechanism of the Syk activation switch,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 47, pp. 32650–32659, 2008.
- [13] B. T. Kurosaki *et al.*, “Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling,” vol. 179, no. May, 1994.
- [14] A. Mócsai, J. Ruland, and V. L. J. Tybulewicz, “Europe PMC Funders Group The SYK tyrosine kinase : a crucial player in diverse biological functions,” vol. 10, no. 6, pp. 387–402, 2016.
- [15] S. Iwata *et al.*, “Increased Syk phosphorylation leads to overexpression of TRAF6 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus,” *Lupus*, vol. 24, no. 7, pp. 695–704, 2015.
- [16] A. M. Cheng, B. Rowley, W. Paot, A. Hayday, J. B. Bolent, and T. Pawson, “B-cell development,” vol. 378, no. November, pp. 303–306, 1995.
- [17] R. L. Geahlen, “Syk and pTyr’d: Signaling through the B cell antigen receptor,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1793, no. 7, pp. 1115–1127, 2009.
- [18] C. Qu *et al.*, “Tyrosine kinase SYK is a potential therapeutic target for liver fibrosis,” *Hepatology*, vol. 68, no. 3. pp. 1125–1139, 2018.
- [19] S. P. Sidorenko, C. L. Law, K. A. Chandran, and E. A. Clark, “Human spleen tyrosine kinase p72Syk associates with the Src-family kinase p53/56Lyn and a 120-kDa phosphoprotein,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 92, no. 2, pp. 359–363, 2006.
- [20] K. D. Moon *et al.*, “Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 2, pp. 1543–1551, 2005.
- [21] M. A. S. and M. S. Anderson, “Aire expands: new roles in immune tolerance

- and beyond.” .
- [22] J. A. Bluestone, “Mechanisms of Tolerance,” vol. 24(: 5–19, 2011.
 - [23] S. Elmore, “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death,” Carolina, USA, 2007.
 - [24] K. Kurosaka, M. Takahashi, N. Watanabe, and Y. Kobayashi, “Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages,” *J. Immunol.*, vol. 171, no. 9, pp. 4672–4679, 2003.
 - [25] B. A. Osborne, “Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 8, no. 2, pp. 245–254, 1996.
 - [26] K. M. Shokat and C. C. Goodnow, “Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses,” *Nature*, vol. 375, no. 6529, pp. 334–338, 1995.
 - [27] G. Efthymiou *et al.*, “A comprehensive analysis of antigen-specific antibody responses against human cytomegalovirus in patients with systemic sclerosis,” *Clin. Immunol.*, vol. 207, no. March, pp. 87–96, 2019.
 - [28] G. C. Tsokos, “Mechanisms of Disease Systemic Lupus Erythematosus,” *N. Engl. J. Med.*, pp. 2110–2121, 2011.
 - [29] S. Z. Munir and J. Aylward, “A review of ocular graft-versus-host disease,” *Optom. Vis. Sci.*, vol. 94, no. 5, pp. 545–555, 2017.
 - [30] P. Bains, “Classification criteria of systemic sclerosis: Journey so far,” *Our Dermatology Online*, vol. 8, no. 2, pp. 220–223, 2017.
 - [31] F. A. Wollheim, “Systemic sclerosis,” *Comorbidity Rheum. Dis.*, vol. 390, no. 10103, pp. 165–178, 2017.
 - [32] D. Khanna and C. P. Denton, “Evidence-based management of rapidly progressing systemic sclerosis,” *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 24, no. 3, pp. 387–400, Jun. 2010.
 - [33] M. Hinchcliff and J. Varga, “Systemic sclerosis/scleroderma: A treatable multisystem disease,” *Am. Fam. Physician*, vol. 78, no. 8, 2008.
 - [34] A. Gkoutzourelas *et al.*, “Anti-Ro60 Seropositivity Determines Anti-Ro52 Epitope Mapping in Patients With Systemic Sclerosis,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. December, p. 2835, 2018.
 - [35] A. D. Seftel, “Re: Erectile dysfunction is frequent in systemic sclerosis and associated with severe disease: A study of the EULAR scleroderma trial and research group,” *J. Urol.*, vol. 188, no. 2, pp. 549–550, 2012.
 - [36] F. van den Hoogen *et al.*, “2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 72, no. 11, pp. 1747 LP – 1755, Nov. 2013.
 - [37] M. C. Vonk, F. H. J. Van Den Hoogen, P. L. C. M. Van Riel, and G. Valentini, “What does the clinician need to improve patient care in systemic sclerosis?,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 66, no. 9, pp. 1129–1131, 2007.
 - [38] B. D. Thombs, S. S. Taillefer, M. Hudson, and M. Baron, “Depression in patients with systemic sclerosis: A systematic review of the evidence,” *Arthritis Care Res.*, vol. 57, no. 6, pp. 1089–1097, 2007.
 - [39] R. P. Roca, F. M. Wigley, and B. White, “Depressive symptoms associated with scleroderma,” *Arthritis Rheum.*, vol. 39, no. 6, pp. 1035–1040, 1996.
 - [40] L. I. Sakkas, D. Daoussis, A. Mavropoulos, S. N. Liosis, and D. P. Bogdanos, “Regulatory B cells: New players in inflammatory and autoimmune rheumatic diseases,” *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 48, no. 6, pp. 1133–1141, 2019.
 - [41] S. J. S. Rubin, M. S. Bloom, and W. H. Robinson, “B cell checkpoints in

- autoimmune rheumatic diseases,” *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 15, no. 5, pp. 303–315, 2019.
- [42] G. Cambridge *et al.*, “Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis,” *Arthritis Rheum.*, vol. 48, no. 8, pp. 2146–2154, 2003.
- [43] G. C. T. Deng, Guo-Min, Vasileios C. Kytтарыs, “Targetting-syk-in-autoimmune-rheumatic-diseases.pdf.” .
- [44] K. Melissaropoulos and S. N. Liossis, “Decreased CD22 expression and intracellular signaling aberrations in B cells of patients with systemic sclerosis,” *Rheumatol. Int.*, vol. 38, no. 7, pp. 1225–1234, 2018.
- [45] C. G. Katsiari, T. Simopoulou, I. Alexiou, and L. I. Sakkas, “Immunotherapy of systemic sclerosis,” *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 14, no. 11, pp. 2559–2567, 2018.
- [46] G. Salles *et al.*, “Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience,” *Adv. Ther.*, vol. 34, no. 10, pp. 2232–2273, Oct. 2017.
- [47] S. F. Van Eeden, M. E. Klut, B. A. M. Walker, and J. C. Hogg, “The use of flow cytometry to measure neutrophil function,” *J. Immunol. Methods*, vol. 232, no. 1–2, pp. 23–43, 1999.
- [48] G. M. Deng, L. Liu, F. R. Bahjat, P. R. Pine, and G. C. Tsokos, “Suppression of skin and kidney disease by inhibition of spleen tyrosine kinase in lupus-prone mice,” *Arthritis Rheum.*, vol. 62, no. 7, pp. 2086–2092, 2010.
- [49] M. W. Nicholas *et al.*, “A novel subset of memory B cells is enriched in autoreactivity and correlates with adverse outcomes in SLE,” *Clin. Immunol.*, vol. 126, no. 2, pp. 189–201, 2008.
- [50] T. M. Doanh Le Huu, Hiroshi Kimura, Mutsumi Date, Yasuhito Hamaguchi, Minoru Hasegawa, Khang Tran Hau, Manabu Fujimoto, Kazuhiko Takehara, “Blockade of Syk ameliorates murine GVHD.” .
- [51] F. R. *et al.*, “Targeting Syk-activated B cells in murine and human chronic graft-versus-host disease,” *Blood*, vol. 125, no. 26, pp. 4085–4094, 2015.
- [52] T. G. Pamuk ON1, Can G2, Ayvaz S3, Karaca T4, Pamuk GE5, Demirtas S4, “Spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor fostamatinib limits tissue damage and fibrosis in a bleomycin-induced scleroderma mouse model,” 2015.
- [53] J. Silván *et al.*, “Deregulated PSGL-1 Expression in B Cells and Dendritic Cells May Be Implicated in Human Systemic Sclerosis Development,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 138, no. 10, pp. 2123–2132, 2018.
- [54] Perrine Susan, “基因的改变NIH Public Access,” *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2005.
- [55] J. M. Irish, D. K. Czerwinski, G. P. Nolan, and R. Levy, “Kinetics of B Cell Receptor Signaling in Human B Cell Subsets Mapped by Phosphospecific Flow Cytometry,” *J. Immunol.*, vol. 177, no. 3, pp. 1581–1589, 2006.
- [56] V. Rolli *et al.*, “Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop,” *Mol. Cell*, vol. 10, no. 5, pp. 1057–1069, 2002.
- [57] N. K. Tonks, “Redox redux: Revisiting PTPs and the control of cell signaling,” *Cell*, vol. 121, no. 5, pp. 667–670, 2005.
- [58] G. Huyer *et al.*, “Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 2, pp. 843–851, 1997.
- [59] S. J. Enna and D. B. Bylund, “Vanadate,” *xPharm Compr. Pharmacol. Ref.*, vol. 20, no. 1982, pp. 1–1, 2011.

- [60] L. I. Sakkas and C. D. Platsoucas, "Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease?" *Arthritis Rheum.*, vol. 50, no. 6, pp. 1721–1733, 2004.
- [61] O. Kowal-Bielecka *et al.*, "Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 76, no. 8, pp. 1327–1339, 2017.
- [62] K. Melissaropoulos, P. Kraniotis, D. Bogdanos, T. Dimitroulas, L. Sakkas, and D. Daoussis, "Targeting very early systemic sclerosis: a case-based review," *Rheumatol. Int.*, vol. 39, no. 11, pp. 1961–1970, 2019.
- [63] D. Daoussis and S. N. C. Liossis, "B cells tell scleroderma fibroblasts to produce collagen," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 15, no. 6, 2013.
- [64] A. François *et al.*, "B lymphocytes and B-cell activating factor promote collagen and profibrotic markers expression by dermal fibroblasts in systemic sclerosis," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 15, no. 5, 2013.