

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ
HER2/neu**



Monoclonal antibodies targeting
a HER2 protein overexpressing cell

ΠΑΠΑΧΡΗΣΤΟΥ ΜΑΡΙΑ

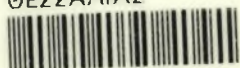
ΛΑΡΙΣΑ 2005



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4844/1
Ημερ. Εισ.: 15-11-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΠΑΠ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087747

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΚΟΝΤΟΥ ΜΑΡΙΑ

Λεκτορας
Τμήματος Βιοχημείας βιοτεχνολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΜΑΜΑΛΑΚΗ ΑΥΓΗ

Κύρια Ερευνήτρια
Τμήμα Βιοχημείας
Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας
Τμήματος Βιοχημείας βιοτεχνολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ErbBs	6
1.1.2. ΕΝΑ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΜΕΝΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΔΙΚΤΥΟ	14
1.1.2.α. Επίπεδο έναρξης	15
1.1.2.β. Επίπεδο επεξεργασίας σήματος	17
1.1.2.γ. Επίπεδο απόκρισης	17
1.1.3. Η ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ErbBs ΜΕ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	17
1.1.3.α. Προσδέτες	18
1.1.3.β. ErbB1	19
1.1.3.γ. ErbB2	19
1.1.3.δ. Υποδοχείς νευρογουλινών	20
1.2. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ErbB2 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	20
1.2.1. Καρκίνος του μαστού	20
1.2.2. Γυναικολογικοί καρκίνοι	20
1.2.3. Καρκίνος του προστάτη	21
1.2.4. Γαστρεντερικοί καρκίνοι	21
1.2.5. Καρκίνος της κεφαλής	21
1.2.6. Καρκίνος του νεφρού	21
1.2.7. Καρκίνος της ουροδόχου κύστης	21
1.3.1. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	22
1.3.1.α. Δομή αντισωμάτων	22
1.3.1.β. Μηχανισμός δράσης των αντισωμάτων <i>in vivo</i>	24
1.3.1.γ. Ανάπτυξη θεραπευτικών αντισωμάτων	25
1.3.1.δ. Αντισώματα που στοχεύουν τον καρκίνο	26
1.3.1.ε. Αντισώματα χωρίς Fc	26
1.3.2. Αντισώματα που χρησιμοποιούνται εναντίον του καρκίνου	27
1.3.3. Μελλοντικές εφαρμογές	29
1.3.4. Fab63	29
1.4. ΣΚΟΠΟΣ	30
2. ΥΛΙΚΑ	31
3. ΜΕΘΟΔΟΙ	36
3.1. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΑΣΗΣ	36
3.1.1. Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων XL1-Blue για ηλεκτροδιάταση	36
3.1.2. Έλεγχος μόλυνσεων	37
3.1.3. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων XL1-Blue με ηλεκτροδιάταση	37
3.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ Fab63	38
3.2.1. Έκφραση Fab63 σε μεγάλη κλίμακα	38
3.2.2. Ανοσοενζυμική δοκιμασία (ELISA) με διαλυτά Fab63 κλάσματα	38

3.2.3.ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ Fab63	39
3.2.3.α. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	39
3.2.3.β. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών υπό κενό	40
3.2.3.γ. Χρωματογραφία συγγένειας	41
3.2.4. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης φωτομετρικά	42
3.2.5. Ηλεκτροφόρηση	42
3.2.6. Ανοσοαποτύπωση κατά Western του κλάσματος Fab63	44
3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ Fab63 ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΜΕ ΤΟ ΦΥΣΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ Her2/neu	45
3.3.1. Παρασκευή μεμβρανικού εκχυλίσματος και διαλυτού υποδοχέα Her2/neu από την κυτταρική σειρά SKBR3	45
3.3.2. Sandwich ELISA	47
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
4.1. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ	48
4.1.1. Έλεγχος μολύνσεων	48
4.1.2. Έλεγχος διαπερατότητας	48
4.1.3. Μετασχηματισμός με το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο του Fab63	48
4.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ Fab63	49
4.2.1. Έκφραση του Fab63 σε μεγάλη κλίμακα	49
4.2.2. Έλεγχος της ειδικότητας του Fab63 ως προς την συγγένεια με το Her2/neu-ECD	49
4.2.3. Καθαρισμός του Fab63	50
4.2.3.α. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	50
4.2.3.β. Ανοσοαποτύπωση υπό κενό	51
4.2.3.γ. Χρωματογραφία συγγένειας	53
4.2.4. Ποσοτικός προσδιορισμός του Fab63	54
4.2.5. Ηλεκτροφόρηση Fab63	55
4.2.6. Ανοσοαποτύπωση κατά Western του Fab63	56
4.3. Έλεγχος της ειδικότητας του Fab63 ως προς τη συγγένεια με το φυσικό υποδοχέα Her2/neu	57
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	59
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60
7. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	65

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

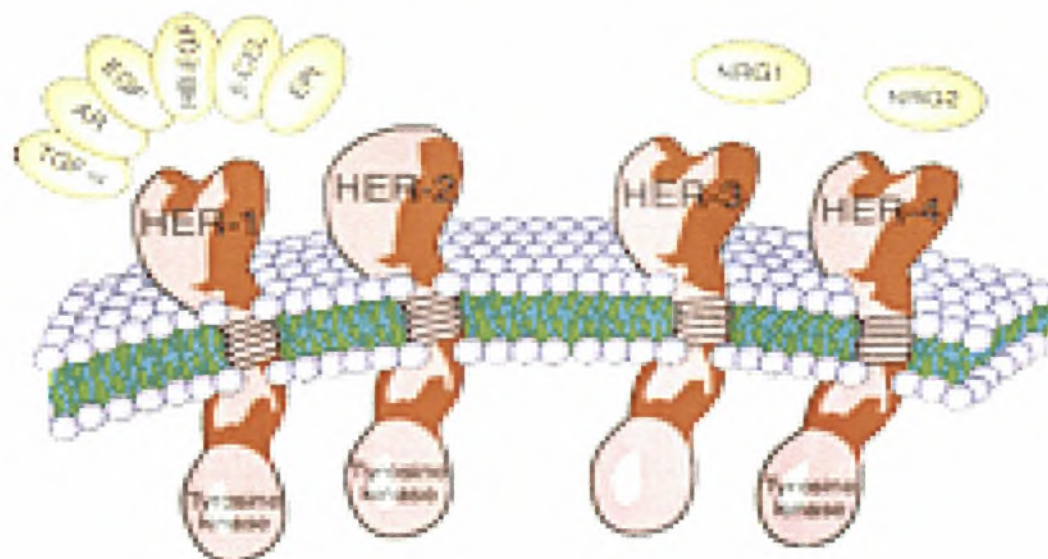
Η οικογένεια των ErbBs υποδοχέων είναι μια τυπική οικογένεια υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (RTK), και αποτελείται από τέσσερα μέλη: τον ErbB1, τον ErbB2, τον ErbB3 και τον ErbB4 υποδοχέα. Η φυσιολογική λειτουργία των υποδοχέων ErbBs καθώς και των προσδετών τους είναι η διακυτταρική επικοινωνία κατά την οργανογένεση και την ανάπτυξη. Με μερικές εξαιρέσεις (για παράδειγμα τα αιματοποιητικά κύτταρα), οι ErbB πρωτεΐνες εκφράζονται σε κύτταρα που προέρχονται απ' το εξώδερμα και το μεσόδερμα [Yosef Yarden et al, 2001].

Στα επιθήλια, οι ErbBs μεταδίδουν σήματα ανάμεσα στο μεσέγχυμα και στο επιθήλιο για την κυτταρική αύξηση. Το μεσέγχυμα προσφέρεται σαν αποθήκη για πολλούς προσδέτες (ligands), όπως οι νευρογουλίνες (NRGs), οι οποίες συνδέονται στον ErbB3 και τον ErbB4 [Monilola A.O. et al, 2000]. Τα μονοπάτια που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος συμπεριλαμβάνουν τα: Ras/ MAPK (mitogen-activated protein kinase), PI3K/Akt, Janus kinase και PLC-γ και επηρεάζουν τελικά τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την απόπτωση και την προσκόλληση του κυττάρου [Jeffrey S. Ross, 2004].

Ο ErbB2, ο οποίος είναι γνωστός και ως HER2/neu, αποτελεί τον συνυποδοχέα για τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας. Δεν έχει προσδιοριστεί μέχρι σήμερα κανένας προσδέτης ο οποίος προσδένεται σ' αυτόν. Είναι η πιο δυναμική ογκοπρωτεΐνη σε σχέση με τους υπόλοιπους ErbBs. Παρεμποδίζοντας τη δράση του ErbB2 αναστέλλεται μια πληθώρα μιτογόνων μονοπατιών επηρεάζοντας τα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν τον ErbB [Monilola A.O. et al, 2000]. Το γονίδιο του ανθρώπινου HER-2/*neu* (*c-erbB-2*) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17q και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη διαμεμβρανικού υποδοχέα τυροσινικής κινάσης, 185,000 kDa (Εικόνα 1) [Jeffrey S. Ross et al, 2004].

Πολλοί τύποι καρκίνου προάγονται από την ενεργοποίηση των ErbBs, η οποία μπορεί να προέρχεται από μεταλλάξεις του υποδοχέα, από υπερέκφρασή του είτε από διέγερση του [Antony W. Burgess et al, 2003].

The HER (erbB) family



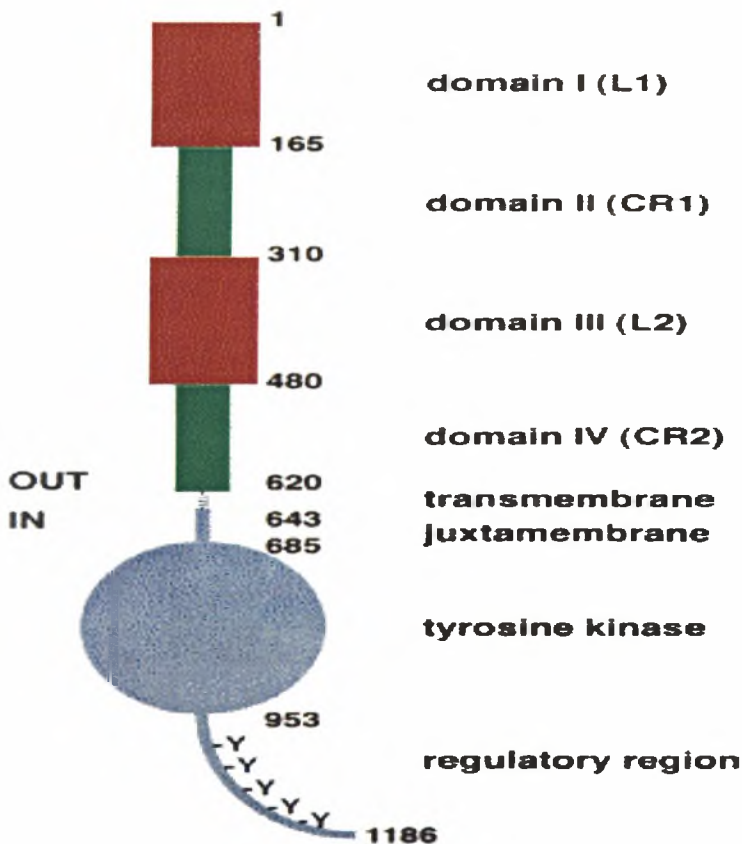
Εικόνα 1. Η οικογένεια HER (erb). Σημειώνεται ότι ο υποδοχέας HER2/neu δεν έχει κάποιο γνωστό προσδέτη και ότι ο HER3 δεν έχει εγγενή δραστικότητα κινάσης τυροσίνης. Οι συντομογραφίες: TGF- α = μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας άλφα, AR = αμφιρεγουλίνη, EGF = επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, HB-EGF = heparin συνδεδεμένη σε επιδερμικό αυξητικό παράγοντα, β -CEL = βήτα cellulin, EPI = επινεφρίνη, NRG1 = νευρογουλίνη 1, NRG2 = νευρογουλίνη 2.

1.1.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ErbBs

Η πρόσδεση των αυξητικών παραγόντων στο εξωκυττάριο τμήμα του ErbB προάγει το διμερισμό του μονομερούς υποδοχέα ομοδιμερισμό, αν οι ErbBs είναι ίδιοι, ή ετεροδιμερισμό, αν πρόκειται για διαφορετικούς ErbBs και αυξάνει τη δραστικότητα της κινάσης τυροσίνης του ενδοκυττάριου τμήματος. Το διμερές που προκύπτει στη συνέχεια αυτοφωσφορυλιώνεται σε τυροσινικά κατάλοιπα και έτσι στρατολογούνται μόρια τα οποία διεγείρουν μια σειρά από ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια [Schessinger J. et al, 2000]. Δεν είναι ακόμη εξακριβωμένος ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησης της κινάσης του EGFR από την εξωκυττάρια σύνδεση του προσδέτη. Η διαθεσιμότητα του προσδέτη είναι κυρίαρχη στον έλεγχο της βιολογικής δραστικότητας των μελών της EGFR οικογένειας. Ωστόσο, ρυθμιστικό ρόλο επίσης παίζει η έκθεση, η συγγένεια και η επάρκεια του υποδοχέα. Ο EGFR φαίνεται να υπάρχει σε δύο διαφορετικές τάξεις συγγένειας στην κυτταρική επιφάνεια, το 2 με 5% παρουσιάζει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης του EGF στον υποδοχέα και το 92 με 95% χαμηλή συγγένεια πρόσδεσης. Οι τάξεις συγγένειας πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύουν διαφορετικές διαμορφώσεις του υποδοχέα και/ή των ολιγομερών [Antony W. Burgess et al, 2003].

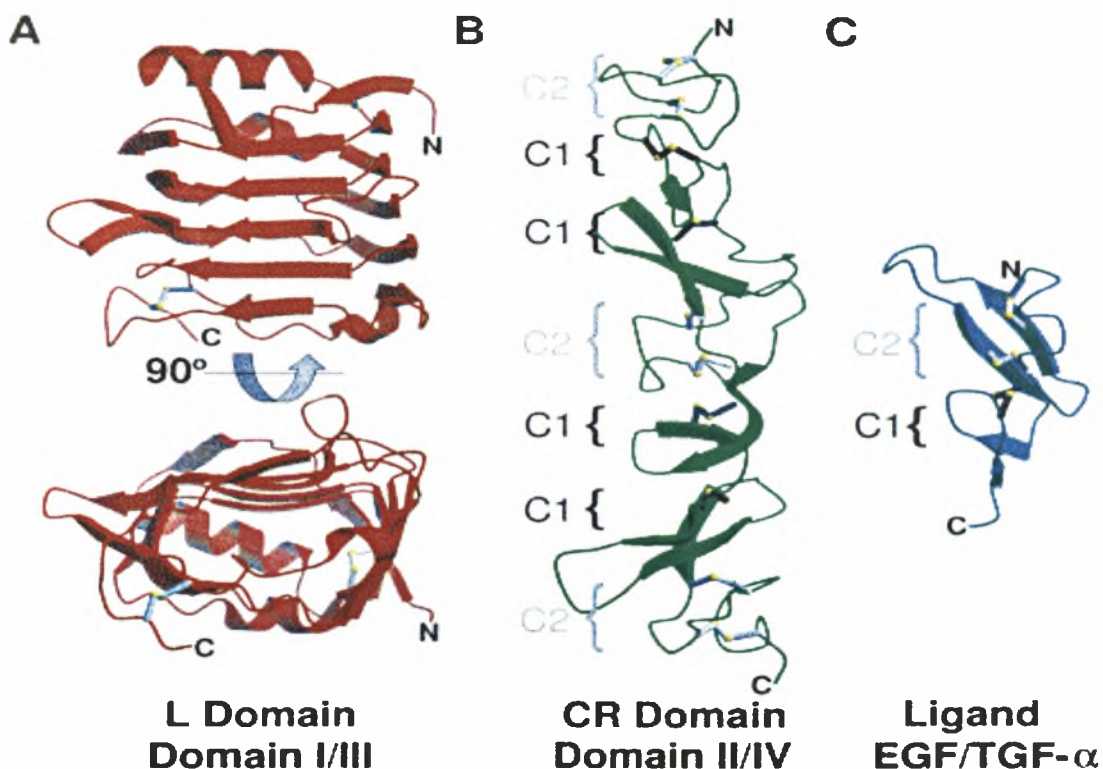
Ο EGFR ρυθμίζεται από μία οικογένεια προσδετών, το λιγότερο επτά διακριτών πεπτιδίων, που περιλαμβάνει τους: EGF, αυξητικός μεταμορφωτικός παράγοντας-α (transforming growth factor-α (TGF-α)), αμφιρεγουλίνη (amphiregulin), βήτα cellulin (betacellulin), (epigen), επιρεγουλίνη (epiregulin), heparin συνδεδεμένη σε επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (heparin binding EGF-like growth factor (HB-EGF)). Ο ErbB2 δεν έχει κανένα γνωστό προσδέτη άμεσης ενεργοποίησης [Cirti A., 2003], ενώ ο ErbB3 και ο ErbB4 λειτουργούν ως υποδοχείς των νευρογουλινών (neuregulin (NRGs)) [Falls D. L., 2003].

Και τα τέσσερα μέλη των ErbBs είναι συγγενικές γλυκοπρωτεΐνες που παρουσιάζουν την ακόλουθη δομή: 1) μία εξωκυττάρια περιοχή πρόσδεσης (~620 αμινοξέα), 2) ένα διαμεμβανικό τμήμα (~23 αμινοξέα), 3) ένα τμήμα κοντά στη μεμβράνη (~260 αμινοξέα), 4) ένα ενδοκυττάριο τμήμα κινάσης τυροσίνης (40 αμινοξέα) και 5) μία καρβοξυτελική ρυθμιστική περιοχή (232 αμινοξέα) (Εικόνα 2). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως παρόλο που ο ErbB2 είναι ορφανός υποδοχέας έχει ισχυρή δραστικότητα κινάσης τυροσίνης, ενώ ο ErbB3 που είναι υποδοχέας των NRGs δεν παρουσιάζει δραστικότητα κινάσης τυροσίνης [Antony W. Burgess et al, 2003]. Κάθε υποδοχέας ErbB έχει ένα ξεχωριστό φυσιολογικό ρόλο, ο οποίος εξαρτάται από μία επαγομένη από τον προσδέτη δομή των ετεροδιμερών του υποδοχέα που είναι ικανά να προάγουν μοναδικά σηματοδοτικά μονοπάτια [Lax I. et al, 1990]



Εικόνα 2. Οργάνωση της δομής των ErbB υποδοχέων. Οι περιοχές του υποδοχέα αναφέρονται χρησιμοποιώντας την ονοματολογία I, II, III, IV. Εναλλακτικά, η ονοματολογία είναι L1, CR1, L2, CR2.

Η εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα αποτελείται από τέσσερα τμήματα, τα I, II, III, IV. Τα τμήματα I και III είναι δύο ομόλογα μεγάλα τμήματα, τα οποία έχουν δομή β δεξιόστροφης έλικας και είναι μέλη της πλούσια σε επαναλαμβανόμενη λευκίνη (leucine rich repeat (LRR)) οικογένειας. Κάθε β έλικα ακολουθείται από μία α έλικα και ένα δισουλφιδικό δεσμό. Τα τμήματα II και IV είναι δύο πλούσια σε κυστεΐνη τμήματα, που περιέχουν συνδεδεμένες δισουλφιδικές υπομονάδες (8 στο τμήμα II και 7 στο IV) παρόμοιες με τη λαμινίνη (Εικόνα 3) [Antony W. Burgess et al, 2003].



Εικόνα 3. Δομικά χαρακτηριστικά των περιοχών.

A) Περιοχή I του υποδοχέα φαίνεται σε δύο ορθογώνιους προσανατολισμούς σαν μία β έλικα ή σωληνοειδή περιοχή.

B) Περιοχή IV, φαίνεται σε μία πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή. Η κλίμακα των δισουλφιδικών δεσμών φαίνεται καθαρά. Η σειρά των υπομονάδων που είναι δεσμευμένα σ' αυτήν την περιοχή είναι C2-C1-C1-C2-C1-C1-C2. Τα δισουλφίδια στις C2 υπομονάδες είναι χρώματος γκρι ενώ αυτά στις C1 υπομονάδες είναι μαύρα.

C) Ο EGF από το σύμπλοκο EGFR·EGF φαίνεται σαν ένα μόριο πρόσδεσης. Ο EGF περιέχει δύο μικρά β φύλλα. Όπως σημειώνεται εδώ, φαίνεται να περιέχει δύο υπομονάδες: τη C1 και τη C2.

Σχεδόν σε όλες τις επαφές υποδοχέα - υποδοχέα διαμεσολαβεί το τμήμα II. Στο κέντρο της αλληλεπίδρασης του διμερούς προεκτείνεται ένας βρόγχος από το ένα τμήμα στο αντίστοιχο τμήμα του διμερούς. Αυτή η θηλιά είναι ειδική στους υποδοχείς ErbB και ονομάζεται «βραχίονας διμερισμού» [Oligoso H. et al, 2002], ελλείψεις ή μεταλλάξεις σ' αυτήν την περιοχή αποτρέπει απόλυτα την ενεργοποίηση του επαγόμενου από τον προσδέτη ErbB [Garrett T.P.J. et al,2002] [Oligoso H. et al, 2002]. Εκτός από το βραχίονα διμερισμού υπάρχουν δύο μικρότερες περιοχές αλληλεπίδρασης του τμήματος II που συμμετέχουν στο διμερισμό. Επίσης, πιθανολογείται ότι η αλληλεπίδραση του διμερούς εκτείνεται και στην περιοχή IV. Έχει αναφερθεί, μετά από μελέτες, ότι μεταλλάξεις του τμήματος IV μπορεί να επηρεάσουν την ικανότητα του προσδέτη για σύνδεση και την επαγωγή φωσφορυλίωσης της τυροσίνης του EGFR [Antony W. Burgess et al, 2003].

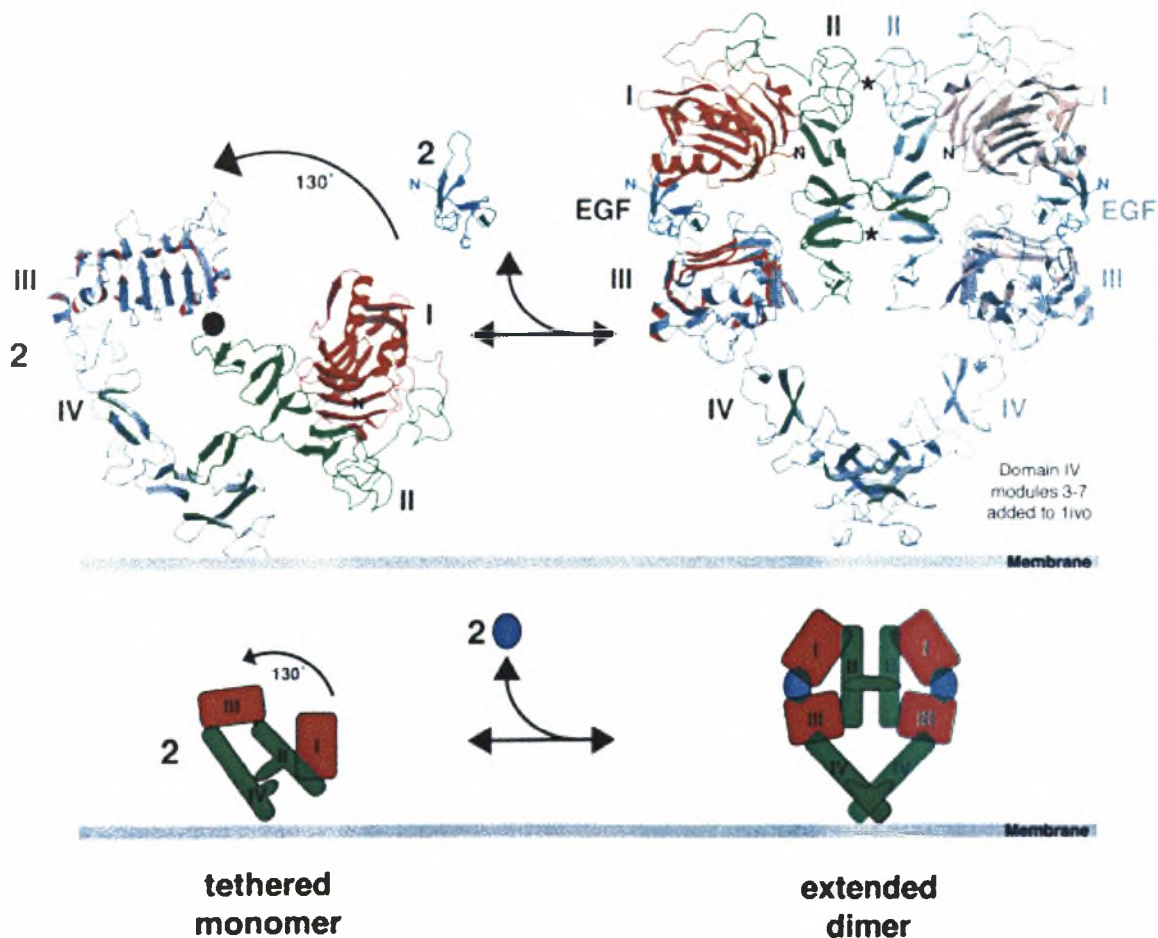
Κάθε προσδέτης ταυτόχρονα συνδέεται σε δύο ξεχωριστές θέσεις πρόσδεσης στο ίδιο μόριο EGFR, στα τμήματα I και III [Garrett T.P.J. et al; 2002, Oligoso H. et al; 2002]. Ενώ οι επαφές του προσδέτη στο τμήμα I παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια, η σύνδεση του προσδέτη στο τμήμα III είναι ασθενής. Έχει δειχθεί ότι μία υψηλά συντηρημένη αργινίνη στον προσδέτη αλληλεπιδρά με ένα συντηρημένο ασπαραγινικό στον ErbB [Antony W. Burgess et al, 2003]. Η ταυτόχρονη σύνδεση του προσδέτη στα τμήματα I και III μπορεί να επιφέρει μεταβολή στη σχετική θέση αυτών των τμημάτων, γεγονός που διαδοχικά μπορεί να αλλάζει τη δομή του τμήματος II και έτσι να ενισχυθεί η ικανότητα του για διμερισμό [Garrett T.P.J. et al,2002]. Η σύνδεση του προσδέτη δεν επηρεάζει καθόλου τη σχετική θέση των τμημάτων I και III, είτε ο διμερισμένος υποδοχέας είναι ενεργοποιημένος είτε όχι, ενώ η σχετική θέση των τμημάτων II και III αλλάζει δραματικά. Η άμεση αλληλεπίδραση των τμημάτων II και IV μειώνει τη συγγένεια των τμημάτων II και III που χαρακτηρίζει την ανενεργή διαμόρφωση. Οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των τμημάτων δημιουργούνται στα τέσσερα απ' τα πέντε κατάλοιπα που είναι καλά συντηρημένα στους ErbBs, ErbB3 και ErbB4, αλλά όχι στον ErbB2. Μερικά απ' αυτά τα κατάλοιπα βρίσκονται στο τμήμα II του βραχίονα διμερισμού και φαίνεται να έχουν διπλό ρόλο συμβάλλοντας εναλλακτικά στο ενδομοριακό τμήμα II/IV στον ανενεργό υποδοχέα ή στο διμερισμό του ενεργοποιημένου υποδοχέα. Η ανενεργή διαμόρφωση οφείλεται στο γεγονός ότι ο βραχίονας διμερισμού του τμήματος II «εισχωρεί» στο τμήμα IV και έτσι δεν μπορεί να επιτευχθεί ο διμερισμός (Εικόνα 4) [Cho H. S. et al,2002] [Ferguson K. M. et al,2003]. Επιπλέον, οι περιοχές I και III στις οποίες συνδέεται ο προσδέτης βρίσκονται μακριά στην ανενεργή διαμόρφωση και ο προσδέτης δεν μπορεί να προσδεθεί ταυτόχρονα και στις δύο. Συνεπώς, η ανενεργή διαμόρφωση του υποδοχέα μπορεί να αποκτήσει μόνο χαμηλής

συγγένειας αλληλεπιδράσεις με τον προσδέτη, χρησιμοποιώντας μόνο μία από τις περιοχές πρόσδεσης κάθε φορά [Antony W. Burgess et al, 2003].

Για να έρθει σε επαφή ο προσδέτης με τα τμήματα I και III ταυτόχρονα πρέπει ο υποδοχέας να βρίσκεται σε εκτεταμένη διαμόρφωση, η οποία προκύπτει από μία περιστροφή 130° των άκαμπτων I και II τμημάτων (Εικόνα 4), «σπάζοντας» έτσι το ενδομοριακό τμήμα II/IV με συνέπεια την έκθεση του βραχίονα διμερισμού. Έτσι μόνο η εκτεταμένη διαμόρφωση του ErbB είναι ικανή για σύνδεση και των δύο υψηλής συγγένειας προσδετών και διμερισμό. Μόνο το 5% των ErbBs βρίσκεται κάθε στιγμή σε εκτεταμένη διαμόρφωση στα κύτταρα.

Ενώ η έκθεση του βραχίονα διμερισμού είναι απολύτως απαραίτητη δεν είναι αρκετή για να οδηγήσει στον διμερισμό, απαιτείται και η συνεργασία επιπρόσθετων περιοχών πρόσδεσης.

Στους περισσότερους RTKs (receptor tyrosine kinases), όπως είναι και ο ErbB, τα τμήματα κινάσης είναι ανενεργά έως ότου ο διμερισμός που επάγεται μετά την σύνδεση του προσδέτη τους προκαλέσει την αυτοφωσφορλίωσή τους [Antony W. Burgess et al, 2003] [Stamos J. et al, 2002].



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση των διαμορφωτικών αλλαγών του EGFR που επάγονται από προσδέτη και διμερισμός. Μετάβαση ανάμεσα στις δύο EGFR δομές φαίνεται και στις δύο αναπαραστάσεις. Η ανενεργή δομή του EGFR φαίνεται στα αριστερά. Ένα μοντέλο διμερούς φαίνεται στα δεξιά. Αυτό το μοντέλο παρουσιάζει έλλειψη στις πέντε από τις επτά υπομονάδες δισουλφιδικών δεσμών της περιοχής IV. Έχουν προστεθεί οι απύσες υπομονάδες της δομής IV χρησιμοποιώντας τη δομή ανενεργού EGFR, και υποθέτοντας ότι η σχέση ανάμεσα στην περιοχή III/IV στον EGFR παραμένει αμετάβλητη με την δέσμευση του προσδέτη.

Οι περιοχές I και III στον υποδοχέα είναι χρώματος κόκκινου, και οι II και IV πράσινες. Ο προσδέτης είναι μπλε.

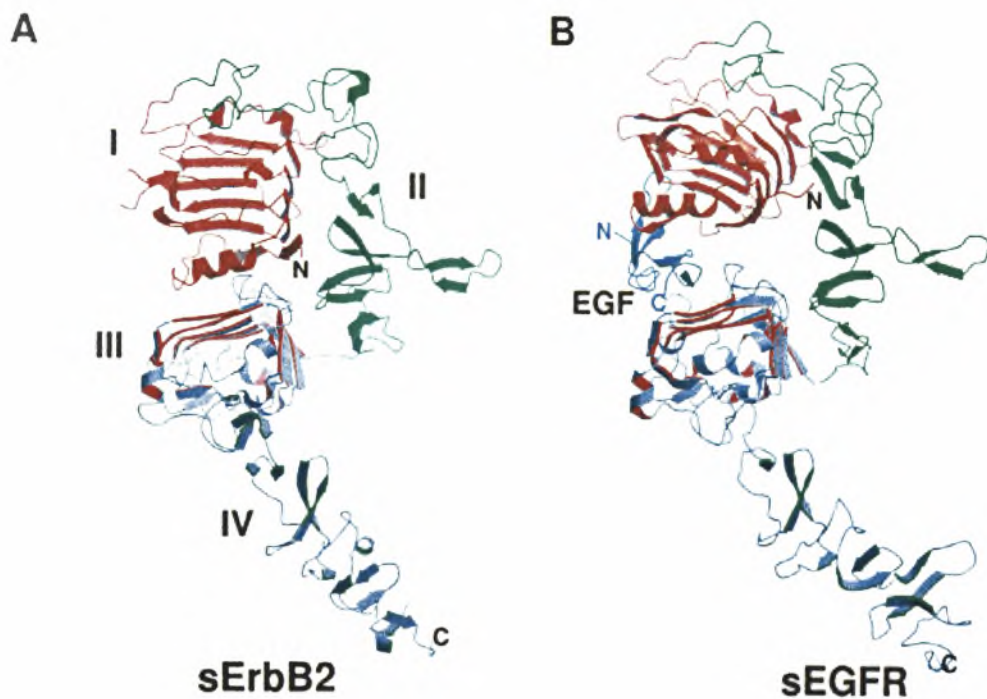
Η πρόσδεση του EGF έχει προταθεί ότι επάγει μία περιστροφή 130° μιας άκαμπτης περιοχής που περιέχει τις περιοχές I και II, ο μαύρος κύκλος αναπαριστά τον άξονα περιστροφής (στην ένωση των περιοχών II/III). Αυτό εκθέτει τον βραχίονα διμερισμού και επιτρέπει το διμερισμό του EGFR, όπως απεικονίζεται δεξιά.

Το δεύτερο μέλος της ErbB οικογένειας, ο **ErbB2**, έχει πολλές μοναδικές ιδιότητες. Πρώτον, ο ErbB2 δεν έχει κανένα γνωστό άμεσο προσδέτη, υποδηλώνοντας έτσι ότι μπορεί να λειτουργεί κυρίως ως συνυποδοχέας για άλλους υποδοχείς που έχουν προσδέτες [Cirti A. et al, 2003] [Yarden Y. and Sliwkowski M.X., 2001]. Δεύτερον, σε αντίθεση με άλλους υποδοχείς, η υπερέκφραση του ErbB2 μπορεί να προκαλέσει τον κυτταρικό μετασχηματισμό ακόμη και απουσία προσδέτη [Yarden Y. and Sliwkowski M.X., 2001]. Το ορθόλογο του ErbB2 στα τρωκτικά που ονομάζεται Neu, αναγνωρίστηκε πριν από είκοσι χρόνια ως ένα δυναμικό προϊόν ογκογονιδίου μετασχηματισμού (με ένα μεταλλαγμένο διαμεμβρανικό τμήμα) σε αρουραίους που χορηγούνταν αιθυλονιτροζουρία. Το μη μεταβλητό, άγριου τύπου, ανθρώπινο ErbB2 γονίδιο ενισχύεται ή υπερέκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνων του μαστού. Αυτή η υπερέκφραση σχετίζεται με ένα φαινότυπο επιθετικού όγκου, όπως το μέγεθος του όγκου, την εμπλοκή των λεμφαδένων, το υψηλό ποσοστό των κυττάρων στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, την ανευπλοειδία. Η ενίσχυση ή υπερέκφραση του ErbB2 παρατηρείται επίσης σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως πνεύμονα, ωθηκών, στομάχου κλπ. Σύμφωνα με την ικανότητά του υποδοχέα για μετασχηματισμό των κυττάρων όταν υπερέκφράζεται, συνεπάγεται ότι ο ErbB2 έχει υψηλά επίπεδα δραστηριότητας και ότι η έκφρασή του πάνω από το καθορισμένο όριο μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου [Yarden Y. and Sliwkowski M.X., 2001]. Αυτές οι ιδιότητες του ErbB2 τον έχουν θέσει ως ένα στόχο-κλειδί για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Μια τέτοια εφαρμογή έχει το ανθρωποποιημένο αντίσωμα έναντι του ErbB2, το Herceptin.

Ο ErbB2 έχει ομόλογα τμήματα με τον EGFR και τον ErbB3 με εξαίρεση τον προσανατολισμό του τμήματος II (Εικόνα 5). Η δομή του ErbB2 ακόμη και χωρίς την σύνδεση ενός προσδέτη μοιάζει με την εκτεταμένη διαμόρφωση του EGFR, ιδιότητα που υποδηλώνει ότι μπορεί να αυτο-ενεργοποιείται. Στον ErbB2 δεν υπάρχει ο δεσμός II/IV, ενώ τρία από τα επτά συντηρημένα κατάλοιπα σημαντικά για

το δεσμό που σχηματίζεται στην ανενεργή διαμόρφωση του EGFR και του ErbB3 είναι διαφορετικά στον ErbB2. Η διαμόρφωση του ErbB2 βρίσκεται κάτω από την επιρροή της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στα τμήματα I και III, οι οποίες συνδέονται με ένα προσδέτη άμεσα με όμοιο τρόπο με τον EGFR.

Το γεγονός ότι ο ErbB2 ουσιαστικά υιοθετεί μία εκτεταμένη διαμόρφωση, με εκτεθειμένο το βραχίονα διμερισμού, υποδηλώνει ότι ο ErbB2 είναι πάντα ικανός να ομοδιμερίζεται και να σχηματίζει ετεροδιμερή με άλλους υποδοχείς ErbBs. Καταρχήν, αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει τη μοναδική ικανότητα του ErbB2 να μετασχηματίζει τα κύτταρα όταν υπερεκφράζεται. Το γεγονός ότι ο ErbB2 δεν επιδεικνύει τη μέγιστη δραστηριότητα όταν εκφράζεται στα κύτταρα και ότι πρέπει να εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα για να προκαλέσει κυτταρικό μετασχηματισμό δείχνει πως ο ομοδιμερισμός του ErbB2 είναι μάλλον αδύναμος [Antony W. Burgess et al, 2003].



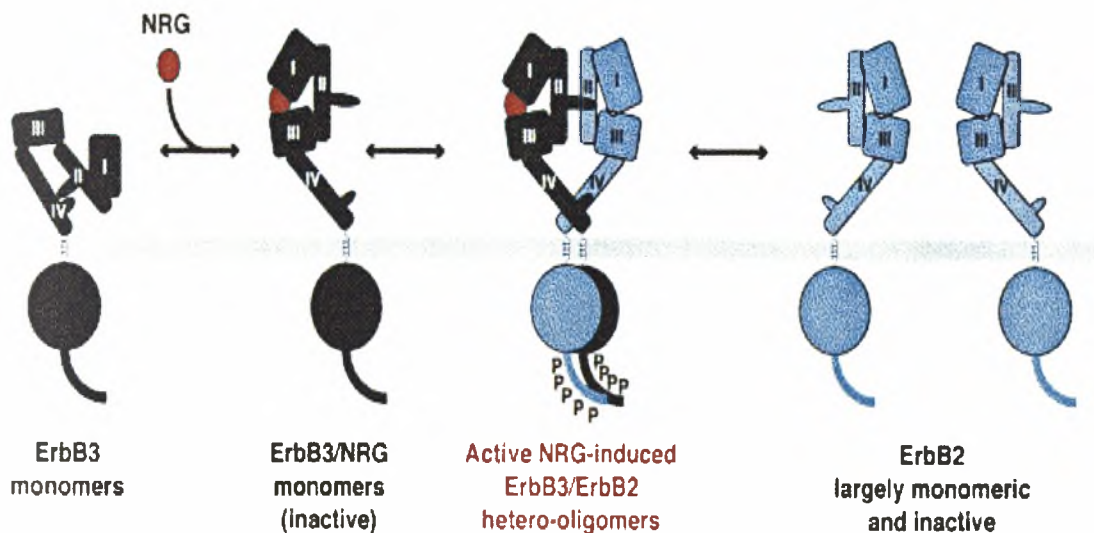
Εικόνα 5. Η εξωκυττάρια περιοχή του ErbB2 υιοθετεί μία εκτεταμένη διαμόρφωση που μοιάζει τον ενεργοποιημένο από τη δέσμευση του προσδέτη EGFR.

A) Αναπαρίστανται ο υποδοχέας ErbB2 από τον οποίο το δεσμευμένο trastuzumab (Herceptin) έχει αφαιρεθεί. Οι ξεχωριστές περιοχές φαίνονται σαν άλλες δομές (κόκκινο για τις περιοχές I και III, πράσινο για τις II και IV). Σημειώνεται η εγγύτητα των περιοχών I και III. Ο βραχίονας διμερισμού του ErbB2 είναι φανερά εκτεθειμένος.

B) Το ένα μισό του διμερούς του EGFR παρουσία του προσδέτη EGF από την εικόνα 4 παρατίθεται για σύγκριση, παραπέμποντας στον προσανατολισμό της περιοχής II στον ErbB2.

Για να επιτευχθεί η μέγιστη αυτοφωσφορυλίωση του ErbB2 σε φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης, άλλοι υποδοχείς ErbBs στο ίδιο κύτταρο πρέπει να ενεργοποιηθούν [Yarden Y., 2001]. Επιπλέον, υπάρχουν αποδείξεις ότι ο ErbB2 ετεροδιμερίζεται με τον ErbB3 ή τον ErbB4 επαγόμενος από τις NRGs (Εικόνα 6). Το ετεροδιμερές ErbB2/ ErbB3 θεωρείται ότι είναι το πιο επικρατές και δυναμικά μιτογόνο σύμπλοκο [Agus D. B. et al,2002] [Cirti A. et al, 2003].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω για τους EGFRs, η έκθεση του βραχίονα διμερισμού δεν είναι αρκετή για τον ομοδιμερισμό του ErbB2 ή του ErbB3. Οι επιφάνειες του ErbB2 και του εκτεταμένου ErbB3 στερούνται διαμόρφωσης αυτό- συμπληρωματικότητας και αυτό εξηγεί την αποτυχία τους να ομοδιμερίζονται [Antony W. Burgess et al, 2003].



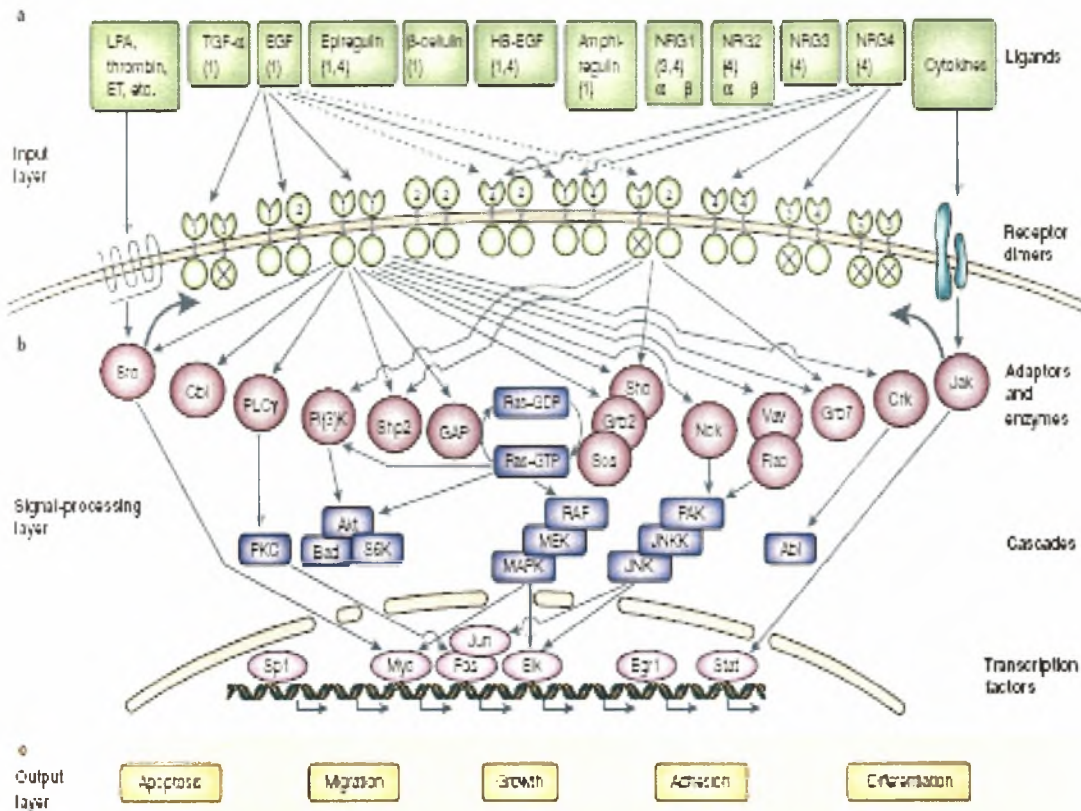
Εικόνα 6. Το μοντέλο του ετεροδιμερισμού του ErbB2 και του ErbB3 επαγόμενο από NRG. Στα αριστερά αποτυπώνεται το μονομερές ErbB3. Η πρόσδεση της NRG (κόκκινο) επάγει την εκτεταμένη διαμόρφωση του ErbB3, με εκτεθειμένο το βραχίονα διμερισμού. Ο εκτεταμένος ErbB3 πιστεύεται ότι σχηματίζει ομοδιμερή μόνο ανεπαρκώς. Στα δεξιά φαίνονται τα μόρια ErbB2, σε εκτεταμένη διαμόρφωση, που πιστεύεται ότι αρχικά είναι μονομερή (ωστόσο ο ομοδιμερισμός μπορεί πιθανόν να οδηγηθεί από σημαντική υπερέκφραση). Όταν η πρόσδεση της NRG στα μόρια ErbB3 παρουσιάζεται στην κυτταρική μεμβράνη, ο ErbB2 προνομιακά σχηματίζει ετεροολιγομερή με τον ErbB3, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του υποδοχέα και σε μιτογόνο σηματοδότηση. Επιπρόσθετες αλληλεπιδράσεις συμπεριλαμβανομένων των διαμεμβρανικών περιοχών και των περιοχών κινάσης μπορούν επίσης να συμβάλλουν στον ολιγομερισμό του υποδοχέα.

Σε ένα ανενεργό κύτταρο, τα μόρια του ErbB2 είναι εκτεταμένα αλλά κυρίως μονομερή. Τα μόρια του ErbB3 είναι κυρίως συσπειρωμένα και μονομερή. Οι NRGs όταν προσδεθούν στον ErbB3

επάγουν την υιοθέτηση της εκτεταμένης διαμόρφωσης. Τα εκτεταμένα μόρια του ErbB3 προτιμούν να ετεροδιμερίζονται με τον ErbB2 και να επάγουν μια δυναμικά μιτογόνο απάντηση, παρά να ομοδιμερίζονται [Cirti A. et al, 2003]. Σύμφωνα μ' αυτήν την υπόθεση, οι εκτεταμένες διαμορφώσεις των EGFR και ErbB4, οι οποίες μπορούν να ομοδιμερίζονται αποτελεσματικά και να ετεροδιμερίζονται με τον ErbB2, θα πρέπει να θέτουν το τμήμα II στις επιφάνειες αλληλεπίδρασης που είναι ικανές είτε να αλληλεπιδράσουν με τον εαυτό τους είτε με τον ErbB2 [Antony W. Burgess, et al].

1.1.2. ΕΝΑ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΜΕΝΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΔΙΚΤΥΟ

Τα συστατικά του ErbB σηματοδοτικού μονοπατιού είναι εξελικτικά παλιά. Με την πρώτη ματιά φαίνεται ένα απλό σηματοδοτικό μονοπάτι αυξητικού παράγοντα: ένας προσδέτης προσδένεται σε ένα μονομερή υποδοχέα κινάσης τυροσίνης και ακολούθως ενεργοποιεί την κυτταροπλασματική καταλυτική λειτουργία προάγοντας το διμερισμό του υποδοχέα και την αυτοφωσφορυλίωση του σε τυροσινικά κατάλοιπα. Παρέχει περιοχές "αγκυροβόλησης" για διάφορες πρωτεΐνες προσαρμοστές ή ένζυμα, τα οποία ταυτόχρονα ξεκινούν πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια για να παραχθεί ένα φυσιολογικό αποτέλεσμα (Εικόνα 7). Στα ανώτερα ευκαρυωτικά, το απλό μονοδιάστατο σηματοδοτικό μονοπάτι αντικαθίσταται από ένα πολύπλοκο δίκτυο, στο οποίο η συνδυαστική έκφραση και ενεργοποίηση συστατικών του επιτρέπει ειδικές βιολογικές αποκρίσεις κατά την ανάπτυξη.

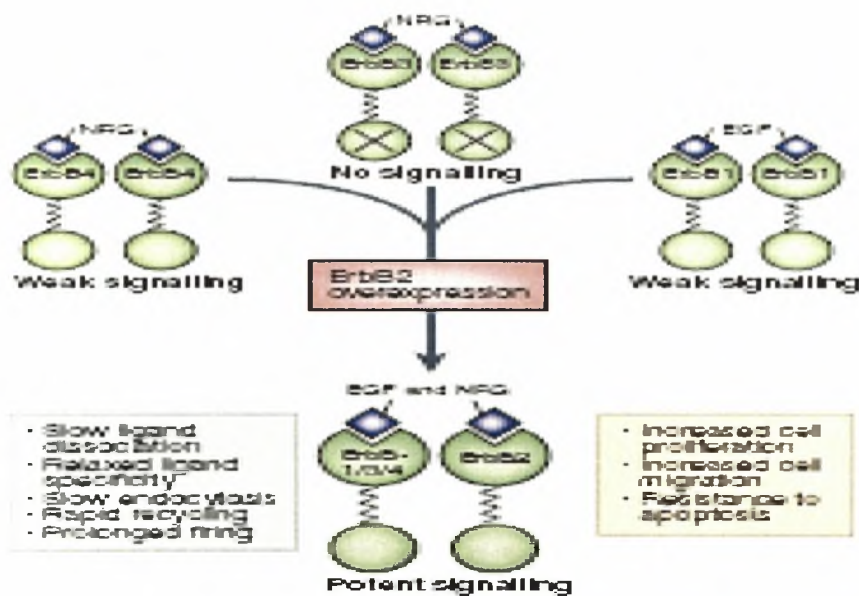


Εικόνα 7. Το σηματοδοτικό δίκτυο των ErbBs. **a)** Ο συνδυασμός των προσδέτων και των δέκα διμερισμένων υποδοχέων αποτελούν το input layer. Τα νούμερα σε κάθε προσδέτη υποδεικνύουν την ιδιαίτερη υψηλή συγγένεια των ErbB υποδοχέων. Για απλότητα, η ιδιαιτερότητα του υποδοχέα για πρόσδεση παρατίθεται μόνο για τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) και τη νευρογουλίνη 4 (NRG4). Ο ErbB2 δεν προσδένει με υψηλή συγγένεια κανένα υποδοχέα, και τα ομοδιμερή του ErbB3 είναι καταλυτικά ανενεργά. Η *trans*-ρύθμιση από GPCRs (με προσδέτες όπως το λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA), η θρομβίνη και η ενδοθηλίνη (ET)) και υποδοχείς κυτοκίνης παρουσιάζεται με μακριά βέλη. **b)** Η σηματοδότηση σε επίπεδο adaptor/ενζύμου παρατίθεται μόνο για δύο διμερισμένους υποδοχείς: το ασθενές ομοδιμερές του ErbB1 και το σχετικά ισχυρό ετεροδιμερές ErbB2-ErbB3. Μόνο μερικά από τα μονοπάτια και μερικοί μεταγραφικοί παράγοντες παρίστανται σ' αυτό το επίπεδο. **c)** Το κατά πόσο μεταγράφονται σε ειδικούς τύπους του output είναι ελάχιστα κατανοητό προς το παρόν. (Abl, μια πρωτο-ογκογονική κινάση τυροσίνης όπου οι στόχοι της είναι ελάχιστα κατανοητοί. Akt, μία κινάση σερίνης/θρεονίνης η οποία φωσφορυλιώνει την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bad και τη ριβοσωμική κινάση S6 (S6K). GAP, GTPάση δραστική πρωτεΐνη. HB-EGF, ηπαρίνη συνδεδεμένη στον EGF. Jak, janus kinase. PKC, πρωτεϊνική κινάση C. PLCγ, φωσφολιπάση Cγ. Shp2, Src ομόλογη περιοχή-2-που περιέχει πρωτεϊνική τυροσινική φωσφατάση. Stat, μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής. RAF-MEK-MAPK και PAK-JNKK-JNK, δύο μονοπάτια κινάσης σερίνης/θρεονίνης που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση πολλών μεταγραφικών παραγόντων.

1.1.2.α. Επίπεδο έναρξης. Αυτό το επίπεδο περιλαμβάνει τους προσδέτες (οικογένεια EGF) και τους υποδοχείς τους ErbBs (Εικόνα 7). Μετά από μελέτες σε κυτταρικές σειρές και αρχικές δοκιμές

διαπιστώθηκε ότι οι προσδέτες του ErbB δεν έχουν επικαλυπτική λειτουργία. Για παράδειγμα, προσδέτες όπως οι NRG4 και EGF, οι οποίοι προσδένονται στους ErbB4 και ErbB1, αντίστοιχα, έχουν περιορισμένη εξειδίκευση, ενώ η επιρεγουλίνη, η NRG1β, η betacellulin προσδένονται σε δύο διαφορετικούς υποδοχείς άμεσα [Jones J. T. et al, 1999].

Η εξέταση των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων τμημάτων των ErbBs παρέχει μία ικανοποιητική εξήγηση για ποιο λόγο ένα οριζόντιο δίκτυο αλληλεπιδράσεων είναι κρίσιμο στο σηματοδοτικό μονοπάτι του ErbB: ο ErbB3 δεν έχει εγγενή δραστικότητα κινάσης τυροσίνης, ενώ ο ErbB2 δεν έχει άμεσο προσδέτη [Klapper L. N. et al. 1999]. Συνεπώς, ούτε ο ErbB2 ούτε ο ErbB3 μπορεί να επιφέρει μια μονοδιάστατη σηματοδότηση (Εικόνα 8). Στις περισσότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποδοχέων εμπλέκονται οι προσδέτες και σχηματίζονται κατά προτίμηση ετεροδιμερή που περιέχουν τον ErbB2 [Tzahar E. et al. 1996] [Grauss Porta D. et al, 1997]. Ωστόσο, υπερέκφραση ενός ειδικού υποδοχέα μπορεί να προδιαθέτει τη διαμόρφωση του διμερούς, ειδικά στην περίπτωση του ErbB2, του οποίου τα ομοδιμερή μπορούν αυτόματα να σχηματιστούν σε κύτταρα που υπερεκφράζεται ο ErbB2. Πολλοί καρκίνοι του επιθηλίου παρουσιάζουν ενίσχυση του γονιδίου ErbB2, με αποτέλεσμα τον ομοδιμερισμό του ErbB2 [Yosef Yarden, 2001].



Εικόνα 8. Σηματοδότηση από ομοδιμερή ErbB σε σύγκριση με ετεροδιμερή που περιέχουν τον ErbB2. Οι υποδοχείς φαίνονται σε δύο λοβούς συνδεδεμένοι με μία διαμεμβρανική επέκταση. Σύνδεση ενός προσδέτη (EGF-like ή NRG) στον εξωκυττάριο λοβό του ErbB1, του ErbB3 ή του ErbB4 επάγει την ομοδιμερή διαμόρφωση. Όταν ο ErbB2 υπερεκφράζεται, προνομαϊκά σχηματίζονται ετεροδιμερή. Αντίθετα με τα ομοδιμερή που είναι είτε ανενεργά (ομοδιμερή ErbB3) είτε σηματοδοτικά αδύναμα, τα ετεροδιμερή που περιέχουν τον ErbB2 φέρουν χαρακτηριστικά που επιμηκύνουν και ενισχύουν την downstream σηματοδότηση (πράσινο κουτί) και τις αποκρίσεις τους (κίτρινο κουτί). Προφανώς, τα ομοδιμερή

του ErbB2 είναι πιο αδύναμα σηματοδοτικά σύμπλοκα από ότι τα ετεροδιμερή που περιέχουν τον ErbB2. (EGF, epidermal growth factor; NRG, neuregulin)

1.1.2.β. Επίπεδο επεξεργασίας σήματος. Η εξειδίκευση και η δυναμική των ενδοκυττάρων σημάτων καθορίζεται μέσω θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων των ErbB πρωτεϊνών, επιπρόσθετα μέσω της ομοιότητας του προσδέτη, τη σύνθεση των ολιγομερών και των συγκεκριμένων δομικών καθοριστικών παραγόντων των υποδοχέων. Ο κύριος καθοριστικός παράγοντας, ωστόσο, είναι ο μεγάλος αριθμός των πρωτεϊνών που προσδέονται στη φωσφοτυροσίνη που συνδέεται με το άκρο κάθε μορίου ErbB μετά το διμερισμό (Εικόνα 7). Ποιες περιοχές αυτοφωσφορυλιώνονται και στο εξής ποιες πρωτεΐνες σηματοδότησης συμμετέχουν, ορίζεται από την ομοιότητα του προσδέτη και από τον παρτενέρ διμερισμού [Soltoff S. P. & Cantley L. C., 1996].

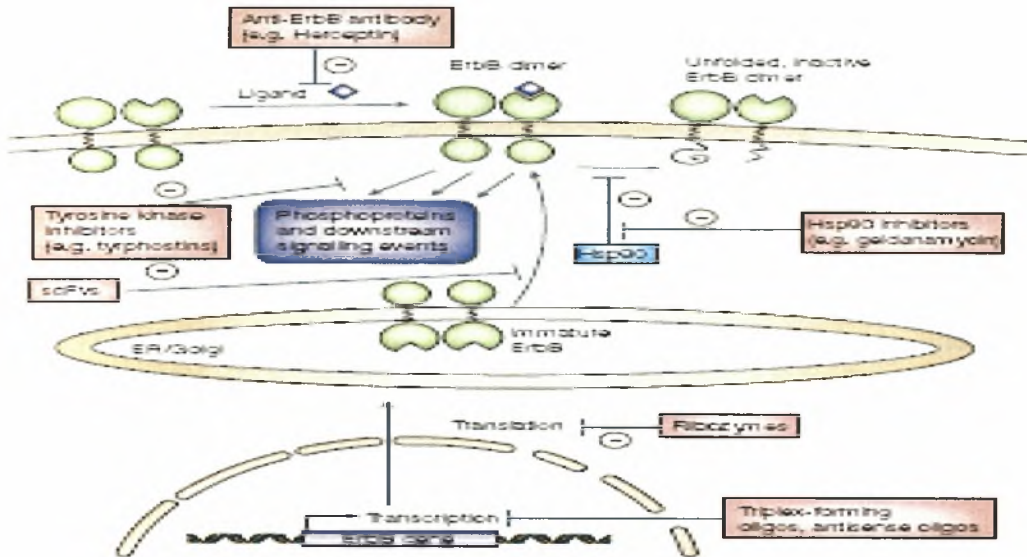
1.1.2.γ. Επίπεδο απόκρισης. Η απόδοση του δικτύου ErbB εκτείνεται απ' την κυτταρική διαίρεση και μετανάστευση στη συγκόλληση, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση (Εικόνα 7). Η απόδοση βασίζεται στο κυτταρικό περιβάλλον, τον ειδικό προσδέτη και το διμερές ErbB. Αυτό έχει αποδειχθεί καλύτερα σε περιόδους μιτογόνων και μετασχηματιστικών απαντήσεων: ομοδιμερή υποδοχέα είναι λιγότερο μιτογόνα και μετασχηματιστικά απ' ότι τα αντίστοιχα ετεροδιμερή, ενώ τα ετεροδιμερή που περιέχουν τον ErbB2 είναι τα πιο δυναμικά σύμπλοκα (Εικόνα 8) [Yosef Yarden, 2001].

Ίσως το καλύτερο παράδειγμα της ικανότητας του ErbB να συντονίζει τη μιτογόνο σηματοδότηση αποδεικνύεται απ' το ετεροδιμερές ErbB2/ ErbB3: αν και ούτε ο ErbB2 ούτε ο ErbB3 μόνος του μπορεί να ενεργοποιηθεί από προσδέτη, το ετεροδιμερές είναι το πιο μιτογόνο και μετασχηματιστικό σύμπλοκο [Alimandi M. *et al.*, 1995] [Wallasch C. *et al.*, 1995]. Το ετεροδιμερές ErbB2/ ErbB3 αυξάνει την κινητικότητα του κυττάρου μετά τη διέγερση από έναν προσδέτη, αλλά ο άλλος υποδοχέας NRG, ο ErbB4, που υπάρχει σε πολλές ισομορφές, έχει συνδεθεί με διεργασίες απ' την κυτταρική χημειοταξία ως τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση.

1.1.3. Η ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ErbBs ΜΕ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Τα δυναμικά σήματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού δημιουργούνται μέσω του ErbB δικτύου και χρησιμοποιούνται από τα καρκινικά κύτταρα για να ορίσουν ογκογονικές μεταλλάξεις με κλωνική επέκταση. Επίσης, πολλοί τύποι ογκογόνων ιών εκμεταλλεύονται το δίκτυο ErbB με τη χρησιμοποίηση των συστατικών του. Οι καρκίνοι στον άνθρωπο χρησιμοποιούν πολλούς μηχανισμούς για να ενεργοποιήσουν το δίκτυο σε διάφορα επίπεδα. Σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων, το μονοπάτι ErbB

υπερενεργοποιείται μέσω ποικίλων μηχανισμών, όπως υπερπαραγωγή προσδετών, υποδοχέων ή ενεργοποίηση των υποδοχέων. Είναι χρήσιμο να γνωρίζουμε αν ένας καρκίνος έχει ένα υπερενεργό ErbB μονοπάτι λόγω μετάλλαξης, υπερέκφρασης ή ενίσχυσης ενός συστατικού του μονοπατιού γιατί μας παρέχει ένδειξη για την πιθανότητα επιβίωσης του ασθενούς καθώς και ποιο φάρμακο θα ήταν ωφέλιμο να του χορηγηθεί (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Θεραπευτικές στρατηγικές για το μπλοκάρισμα του δικτύου σηματοδότησης του ErbB.

Αντισώματα έναντι του ErbB (όπως το Herceptin, που προσδένεται στον ErbB2) μπλοκάρουν τη σύνδεση του προσδέτη και διεγείρουν την ενδοκύττωση του υποδοχέα. Αναστολείς της κινάσης τυροσίνης (όπως οι typhostins) μπλοκάρουν την προς τα κάτω σηματοδότηση του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέτη, και οι αναστολείς Hsp90 αποτρέπουν τη σταθεροποίηση των ErbBs στη μεμβράνη. Η ενεργή διαμόρφωση του ErbB2 διατηρείται μέσω αλληλεπιδράσεων με ένα μόριο συνοδό (chaperone) (Hsp90), και επομένως οι ανταγωνιστές των μορίων συνοδών απενεργοποιούν την ογκοπρωτεΐνη. Αυτό επίσης θα ήταν δυνατό να αποτρέψει τους ErbBs να φτάσουν στην κυτταρική επιφάνεια, μπλοκάροντας τη μεταγραφή τους με τριπλέτα ολιγονουκλεοτιδίων, τη μετάφραση με ολιγονουκλεοτίδια χωρίς νόημα ή ριβοένζυμα, ή τη μεταφορά τους από την κυτταρική επιφάνεια με ενδοκυττάρια μονόκλωνα τμήματα Fv των αντισωμάτων (scFvs). (ER, endoplasmic reticulum)

1.1.3.α. Προσδέτες. Η σχέση μεταξύ της έκφρασης του προσδέτη ErbB και της καρκινογένεσης είναι πολύπλοκη: αυξητικοί παράγοντες μπορούν να επαχθούν δευτερευόντως από ένα πρωταρχικό ογκογονίδιο. Είτε ο συνδετικός ιστός είτε ο όγκος μπορούν να δρουν σαν πηγή προσδετών. Ο προσδέτης μπορεί να εκφραστεί μη επεξεργασμένος ή απομονωμένος σε μία ανενεργή μορφή.

Ο ErbB1 και ο TGF-α συνεκφράζονται σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος των πνευμόνων, των ωθηκών και του παχέος εντέρου. Στον καρκίνο του προστάτη, το μοτίβο της

έκφρασης του TGF-α μοιάζει να αλλάζει καθώς προχωρεί η ασθένεια. Στον καρκίνο του προστάτη που εξαρτάται από τα ανδρογόνα, ο TGF-α εκφράζεται αρχικά στο συνδετικό ιστό του όγκου, το οποίο προκαλεί παρακρινή σηματοδότηση. Προοδευτικά, στην εξαρτώμενη από τα ανδρογόνα ασθένεια, ο TGF-α εκφράζεται από τα καρκινικά κύτταρα υποδεικνύοντας αυτοκρινή σηματοδότηση. Για άλλους προσδέτες λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες.

1.1.3.β. ErbB1. Υπερέκφραση και δομικές μεταβολές του ErbB1 είναι συχνές σε κακοήθειες στον άνθρωπο. Ωστόσο *in vitro* μελέτες προτείνουν ότι υπερέκφραση του φυσιολογικού υποδοχέα οδηγεί σε μετασχηματισμό μόνο παρουσία προσδέτη. Ανάλογα, έκφραση παρόμοιων με το EGF προσδετών συχνά συνοδεύεται από υπερέκφραση του ErbB1 σε πρωτογενείς όγκους. Υπερέκφραση του ErbB1 είναι μία πολύ συχνή γενετική μεταβολή σε καρκίνους του εγκεφάλου. Η υπερέκφραση σχετίζεται με τον υψηλότερο βαθμό επικινδυνότητας της ασθένειας, τον υψηλότερο πολλαπλασιασμό και τη μειωμένη βιωσιμότητα. Σε ένα σημαντικό ποσοστό των όγκων, η γονιδιακή ενίσχυση συνοδεύεται από αναδιοργανώσεις. Η πιο κοινή μετάλλαξη διαγράφει μέρος του εξωκυττάριου τμήματος, αποδίδοντας ένα δομικά ενεργό υποδοχέα. Πρόσφατες μελέτες ταυτοποίησαν μία πανομοιότυπη μεταβολή σε καρκινώματα του πνεύμονα, των ωοθηκών και του στήθους, υποδηλώνοντας ευρύτερες επιπτώσεις στον ανθρώπινο καρκίνο [Yosef Yarden, 2001].

1.1.3.γ. ErbB2. Πολλοί τύποι καρκίνου υπερεκφράζουν τον ErbB2. Η συσχέτιση της υπερέκφρασης του ErbB2 με τον καρκίνο είναι εκτενώς μελετημένη στον καρκίνο του μαστού, όπου υπερεκφράζεται λόγω της ενίσχυσης του γονιδίου στο 15-30% των επιθετικών μορφών καρκίνου του μαστού [Slamon D. J. *et al.*, 1987]. Η υπερέκφραση σχετίζεται με το μέγεθος του όγκου, την εξάπλωση του όγκου στους λεμφαδένες, τον ανώτερο βαθμό σοβαρότητας της ασθένειας, το ανώτερο ποσοστό των κύτταρων στην S φάση, την ανευπλοειδία και την έλλειψη υποδοχέων στεροειδών ορμονών, υποδηλώνοντας ότι ο ErbB2 προσδίδει ένα ισχυρό πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού στα καρκινικά κύτταρα.

Η πιστοποίηση της ενίσχυσης του ErbB2 μέσω της τεχνικής FISH (fluorescence in situ hybridization) έχει εγκριθεί από το FDA (Food and Drug Administration) για να επισημανθούν οι ασθενείς με υψηλό κίνδυνο για την επανεμφάνιση της ασθένειας καθώς και τη θνησιμότητα που σχετίζεται με αυτή. Πολλές έρευνες δείχνουν ότι οι ασθενείς στους οποίους υπερεκφράζεται ο ErbB2 παρουσιάζουν αντίσταση στη θεραπεία με αντι-οιστρογόνα. Οι περισσότεροι όγκοι που υπερεκφράζουν τον ErbB2 δεν εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης, υποδηλώνοντας αντίστροφες σχέσεις μεταξύ του άξονα στεροειδικών ορμονών και του δικτύου

ErbB. Έτσι, λειτουργικά εναλλάσσονται τα μονοπάτια του ErbB και των στεροειδών για την ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

1.1.3.δ. Υποδοχείς νευροουλινών. Το καταλυτικά ανενεργό μέλος της οικογένειας ErbB, ο ErbB3, εκφράζεται σε πολλούς καρκίνους αλλά δεν υπάρχουν αποδείξεις για γονιδιακή ενίσχυση και η υπερέκφραση του είναι περιορισμένη. Ωστόσο, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι έκφραση του ErbB2 μαζί με τον ErbB1 ή τον ErbB3 σε καρκινικά κύτταρα του στόματος ήταν σημαντική και αυτό αποδεικνύει το μη αυτόνομο ρόλο του ErbB3. Όμοια, αναλύσεις στον καρκίνο του προστάτη προτείνουν την παρουσία μιας παρακρινούς θηλιάς, εμπλέκοντας την NRG1 με το ετεροδιμερές ErbB2/ErbB3. Κάποιες έρευνες παρουσιάζουν μικρότερη έκφραση του ErbB4 σε καρκίνους του μαστού και του προστάτη σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς. Σε αντίθεση με τους επιθηλιακούς όγκους, ο πρώιμος καρκίνος του εγκεφάλου συχνά εκφράζει τον ErbB4, του οποίου η συνέκφραση με τον ErbB2 έχει προγνωστική αξία, σύμφωνα με τη σπουδαιότητα του υποδοχέα ετεροδιμερισμού [Yosef Yarden, 2001].

1.2. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ErbB2 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

1.2.1. Καρκίνος του μαστού. Στα καρκινώματα των γαλακτοφόρων πόρων του μαστού *in situ* (DCIS) ο ErbB2 υπερεκφράζεται σε ποσοστό 90%. Αντίθετα με το DCIS, ο διεισδυτικός καρκίνος των γαλακτοφόρων πόρων (IDC) σε καλοήγη κατάσταση δεν υπερεκφράζει τον ErbB2. Ωστόσο, μεταστάσεις που προέρχονται από όγκους που υπερεκφράζουν τον ErbB2 διατηρούν την υπερέκφραση, προτείνοντας ότι ο ErbB2 δεν εμπλέκεται σε προκαρκινικά στάδια, αλλά ο ρόλος του μπορεί να είναι σημαντικός για την πρόοδο και τη μετάσταση του καρκίνου [Barnes D. M. et al, 1992] [Barsky S. H. et al, 1997] [Iglehart J. D. et al, 1995] [Niehans G. A. et al, 1993] [Leah N. Klapper et al].

Μελέτες έδειξαν ότι στο 30% των μεταστατικών καρκινωμάτων των γαλακτοφόρων πόρων του μαστού παρουσιάζεται ενίσχυση του ErbB2. Φαίνεται πολύ πιθανό πως η μετατροπή του DCIS σε IDC επιτυγχάνεται μέσω της εισβολής από τη βάση του επιθηλιακού ιστού όπου επιλέγονται καρκινικά κύτταρα τα οποία δεν υπερεκφράζουν τον ErbB2, αλλά στη συνέχεια όταν μεταφερθούν στους όγκους που τον υπερεκφράζουν χρησιμεύουν στην πρόοδο του πολλαπλασιασμού. [Lipponen H. J. et al, 1993] [Barsky S. H. et al, 1997] [Leah N. Klapper et al].

1.2.2. Γυναικολογικοί καρκίνοι. Γυναίκες με καρκίνο του μαστού είναι πιθανόν στη συνέχεια να εμφανίσουν και καρκίνο των ωοθηκών, και το αντίστροφο. Αυτό συμβαίνει γιατί και στους δύο

τύπους εμπλέκονται οι στερεοειδείς ορμόνες και οι όγκοι εμφανίζονται σε επιθηλιακά κύτταρα. Ενώ στο φυσιολογικό ιστό των ωοθηκών δεν υπερεκφράζεται ο ErbB2, το 20-35% των borderline όγκων και το 30-50% του καρκίνου των ωοθηκών τον υπερεκφράζουν [Eltabach G. H. et al, 1997] [Leah N. Klapper et al].

Όσων αφορά τον αιδοιονικό καρκίνο, ασθενείς στα στάδια I και II είναι πιθανότερο να εμφανίζουν κομβικές μεταστάσεις εάν υπερεκφράζουν τον ErbB2. Επίσης, στον καρκίνο του ενδομήτριου παρουσιάζεται υπερέκφραση του ErbB2 στο 48% των ασθενών [Gordinier M. E. et al, 1997] [Backe J. et al, 1997].

Σε κολπικούς καρκίνους ενίσχυση του ErbB2 πιστοποιείται στο 12-22% στα στάδια II και III (που πολλές φορές μπορεί να σχετίζεται με τον HPV (human papilloma virus) [Roland P. Y. et al, 1997] [Leah N. Klapper et al].

1.2.3. Καρκίνος του προστάτη. Το 30% περίπου των ασθενών με καρκίνο του προστάτη εμφανίζουν υπερέκφραση του ErbB2. Ωστόσο, ο ρόλος του ErbB2 στην καλοήγη υπερτροφία του προστάτη δεν είναι ακόμη σαφής [Kuhn E. J. et al, 1993].

1.2.4. Γαστρεντερικοί καρκίνοι. Στον καρκίνο του κόλου υπερέκφραση του ErbB2 παρουσιάζεται στο 50% των πρώιμων σταδίων του, ιδιαίτερος σε ασθενείς χωρίς αδενωμάτωδη συστατικά. Επιπλέον, ασθενείς με καρκίνο του κόλου με μεταστάσεις στο ήπαρ ή στους λεμφαδένες έχουν υψηλά επίπεδα ErbB2 [Caruso M. L., 1996] [Leah N. Klapper et al].

Στο 43% του καρκίνου του οισοφάγου ο ErbB2 υπερεκφράζεται.

Στο γαστρικό καρκίνο η υπερέκφραση του ErbB2 είναι κοινή ιδιαίτερα σε προχωρημένο στάδιο και σε εντερικούς υπότυπους.

Στο παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα ο ErbB2 συχνά υπερεκφράζεται ειδικά στις καλά ή μέτρια διαφοροποιημένες αδενικές περιοχές του όγκου και μειώνεται στις ελάχιστα διαφοροποιημένες περιοχές.

1.2.5. Καρκίνος της κεφαλής. Η ενίσχυση του ErbB2 σχετίζεται με μειωμένη βιωσιμότητα σε αδενοκαρκίνωμα εντερικού τύπου των παραρινικών κόλπων και νεοπλάσματα των σιελογόνων αδένων του ουρανίσκου.

1.2.6. Καρκίνος του νεφρού. Ενίσχυση του ErbB2 φαίνεται να αυξάνεται συχνά σε πολλές νεφρικές κυστικές διαταραχές όπως στα νεοπλάσματα.

1.2.7. Καρκίνος της ουροδόχου κύστης. Στα καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης ο ErbB2 υπερεκφράζεται στο 70% των όγκων

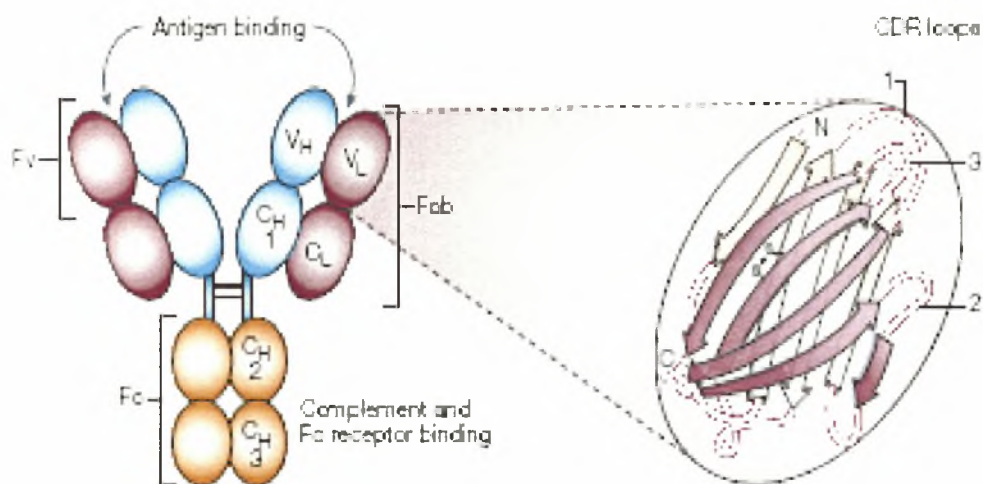
αυτών, ενώ στα φυσιολογικά κύτταρα υπάρχει σε φυσιολογικά επίπεδα [Leah N. Klapper et al].

1.3.1. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Πολλές προσπάθειες έχουν δρομολογηθεί για την καταπολέμηση του καρκίνου μέχρι σήμερα. Η φαινομενική συσχέτιση της έκφρασης του ErbB2 με τους καρκίνους στον άνθρωπο έχει προσελκύσει την προσοχή σε αυτά τα μόρια ως πιθανούς στόχους για την ανάπτυξη θεραπευτικών μορίων. Επειδή ο ErbB2 είναι συσχετισμένος με την επιθετικότητα και την κακή πρόγνωση των καρκίνων σε επιθηλιακούς ιστούς, οι στρατηγικές που δοκιμάζονται κατευθύνονται ώστε να εμποδίζουν την ενεργοποίησή του καθώς επίσης και να προωθήσουν μια εξειδικευμένη ανοσία. Ασθενείς με καρκίνο στον οποίο υπερεκφράζεται ο ErbB2 φαίνεται να αναπτύσσουν ανοσολογική απάντηση έναντι στην πρωτεΐνη αποδεικνύοντας ότι εμπόδια έναντι του υποδοχέα θα μπορούσαν επιτυχώς να προκαλέσουν μια αντικαρκινική απάντηση. Η υψηλή έκφραση του ErbB2 στα καρκινικά κύτταρα υποδηλώνει ότι μια τέτοια απάντηση μπορεί να κατευθύνεται άμεσα έναντι στην κακοήθεια χωρίς αυτοάνοση τοξικότητα. Έτσι η πιο αποτελεσματική θεραπεία για τον καρκίνο φαίνεται να είναι η ανοσοθεραπεία.

1.3.1.α. Δομή αντισωμάτων. Ένα τυπικό αντίσωμα (ανοσοσφαιρίνη, Ig) αποτελείται από δύο περιοχές πρόσδεσης αντιγόνου (Fab), οι οποίες είναι συνδεδεμένες μέσω μιας εύκαμπτης περιοχής με μια σταθερή περιοχή (Fc) (Εικόνα 10). Αυτή η δομή περιλαμβάνει δύο ζευγάρια πολυπεπτιδικών αλυσίδων, κάθε ζευγάρι αποτελείται από μια βαριά (H) και μια ελαφριά αλυσίδα (κ ή λ) διαφορετικού μεγέθους [Ole Henrik Brekke et al, 2002].

Κάθε ελαφριά αλυσίδα συνδέεται με μια βαριά και οι δύο βαριές συνδέονται μεταξύ τους όλες με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η κάθε ελαφριά αλυσίδα αποτελείται από μια μεταβλητή και μια σταθερή περιοχή, ενώ η κάθε βαριά αλυσίδα έχει μία μεταβλητή και τρία τμήματα σταθερής περιοχής. Και οι βαριές και οι ελαφριές αλυσίδες αναδιπλώνονται παίρνοντας μια χαρακτηριστική τρισδιάστατη μορφή που ονομάζεται περιοχή ανοσοσφαιρίνης. Κάθε μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας (που ονομάζεται V_H) ή της ελαφριάς αλυσίδας (που ονομάζεται V_L) περιέχει τρεις υπερμεταβλητές περιοχές ή CDRs.



Εικόνα 10. Μοριακή δομή της ανοσοσφαιρίνης. Η εικόνα δείχνει ένα μόνο μόριο ανοσοσφαιρίνης (Ig). Όλα τα μονομερή ανοσοσφαιρίνης αποτελούνται από δύο ίδιες ελαφριές (L) αλυσίδες και δύο ίδιες βαριές (H) αλυσίδες. Οι ελαφριές αλυσίδες αποτελούνται από μία σταθερή (C_L) και μια μεταβλητή περιοχή (V_L), ενώ οι βαριές αλυσίδες αποτελούνται από τρεις σταθερές περιοχές (C_{H1}, C_{H2} και C_{H3}) και μία μεταβλητή περιοχή (V_H). Οι βαριές αλυσίδες είναι ομοιοπολικά δεσμευμένες στην εύκαμπτη περιοχή και οι ελαφριές αλυσίδες είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες στη βαριά αλυσίδα. Οι μεταβλητές περιοχές και των ελαφριών και των βαριών αλυσίδων αποτελούν το τμήμα του μορίου όπου δεσμεύεται το αντιγόνο (F_V). Στις μεταβλητές περιοχές υπάρχουν τρεις θηλιές χαρακτηριζόμενες από καθορισμένη-συμπληρωματικότητα περιοχές (CDRs, complementary- determining regions) 1,2 και 3, οι οποίες απονέμουν τη μέγιστη ποικιλία και καθορίζουν την εξειδίκευση της πρόσδεσης του αντισώματος. Η θέση Fc είναι γλυκοσυλιωμένη και περιέχει τμήματα για την αλληλεπίδραση με δραστικά μόρια, όπως το σύμπλοκο C1 του συστήματος συμπληρώματος και μια ποικιλία υποδοχέων Fc που περιλαμβάνουν το νεογνικό υποδοχέα Fc (FcRn).

Υπάρχουν δύο τύποι ελαφριών αλυσίδων, (κ και λ), οι οποίες διαφέρουν στις σταθερές τους περιοχές αλλά όχι στις λειτουργίες τους. Υπάρχουν πέντε τύποι βαριών αλυσίδων που ονομάζονται μ, γ, δ, ε και α που διαφέρουν επίσης στις σταθερές τους περιοχές. Κάθε τύπος ελαφριάς αλυσίδας μπορεί να ενώνεται με οποιοδήποτε τύπο βαριάς για να σχηματιστεί ένα μόριο αντισώματος. Τα αντισώματα που περιέχουν διαφορετικές βαριές αλυσίδες ανήκουν σε διαφορετικούς ισότυπους ή τάξεις και ονομάζονται ανάλογα με τη βαριά τους αλυσίδα, δηλαδή IgM, IgG, IgD, IgE και IgA ανεξάρτητα από το είδος της ελαφριάς αλυσίδας. Οι διάφοροι ισότυποι διαφέρουν ως προς τις φυσικές και βιολογικές τους ιδιότητες και ως προς τις δραστικές τους λειτουργίες. Τα χαρακτηριστικά των κύριων ισότυπων των αντισωμάτων παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα [Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman].

Ισότυπος αντισώματος	Υπότυποι	Βαριά αλυσίδα	Λειτουργίες
IgA	IgA1,2	α(1 ή 2)	Βλεννονεογνική ανοσία, νεογνική παθητική ανοσία
IgD	-	δ	Αντιγονικός υποδοχέας παρθένων Β κυττάρων
IgE	-	ε	Άμεση υπερευαισθησία
IgG	IgG1-4	γ(1,2,3 ή 4)	Οψωνινοποίηση, ενεργοποίηση συμπληρώματος, ADCC, νεογνική ανοσία, αναστολή Β κυττάρων με ανάδραση
IgM	-	μ	Αντιγονικός υποδοχέας παρθένων Β κυττάρων, ενεργοποίηση του συμπληρώματος

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των κύριων ισότυπων (τάξεων) των αντισωμάτων. Ο πίνακας συνοψίζει ορισμένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των κύριων ισότυπων των αντισωμάτων στον άνθρωπο. Οι ισότυποι ταξινομούνται με βάση τις βαριές αλυσίδες, κάθε ισότυπος μπορεί να περιέχει την κ ή τη λ ελαφριά αλυσίδα. Σημειώστε ότι η IgA αποτελείται από δύο υποτάξεις, την IgA1 και την IgA2, ενώ η IgG αποτελείται από τέσσερις υποτάξεις, τις IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4.

1.3.1.β. Μηχανισμός δράσης των αντισωμάτων *in vivo*. Οι θεραπείες που βασίζονται στα αντισώματα ως στόχο έχουν την εξουδετέρωση μιας παθογόνου μόλυνσης ή τη στόχευση μιας ασθένειας, για παράδειγμα, έχουν βακτηριακούς, ιικούς ή καρκινικούς στόχους. Θεραπευτικά αντισώματα μπορούν να λειτουργήσουν με τρεις κύριους τρόπους δράσης: 1) με παρεμπόδιση της δράσης ειδικών μορίων, 2) με στόχευση συγκεκριμένων κυττάρων ή 3) λειτουργώντας σαν σηματοδοτικά μόρια.

Η δράση των θεραπευτικών αντισωμάτων επιτυγχάνεται παρεμποδίζοντας τους αυξητικούς παράγοντες, τις κυττοκίνες ή άλλους διαλυτούς μεσολαβητές να φτάσουν τους υποδοχείς στόχους τους. Η δράση αυτή επιτυγχάνεται με την πρόσδεση του αντισώματος είτε στον παράγοντά του είτε στον υποδοχέα του.

Η στόχευση περιλαμβάνει αντισώματα που κατευθύνονται άμεσα σε συγκεκριμένο πληθυσμό κυττάρων και επίσης αντισώματα μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να φέρουν δραστικά μόρια, όπως ένζυμα, τοξίνες, ραδιο-άτομα, κυττοκίνες ή και μόρια DNA, στα κύτταρα στόχους (για παράδειγμα, τοξίνες ή ραδιενεργά άτομα μπορούν να εξουδετερώσουν τα καρκινικά κύτταρα στόχους).

Οι φυσιολογικές δραστικές λειτουργίες του αντισώματος σχετίζονται με την πρόσδεση στους Fc υποδοχείς ή την πρόσδεση σε συμπληρωματικές πρωτεΐνες και επάγουν κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από τη συμπληρωματικότητα (CDC). Το σηματοδοτικό

αποτέλεσμα των αντισωμάτων στηρίζεται είτε στη διασύνδεση των υπαρχόντων υποδοχέων, διαδοχικά, συνδεδεμένων σε μεσολαβητές της κυτταρικής διαίρεσης ή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ή κατευθύνοντας τα άμεσα σε εξειδικευμένους υποδοχείς που δρουν ως αγωνιστές για την ενεργοποίηση συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών. Μια άλλη προσέγγιση είναι η χρησιμοποίηση αντισωμάτων σε φορείς DNA ή αντιγόνων σε πολλά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα για την ενεργοποίηση μιας εξειδικευμένης κυτταρικής απάντησης έναντι αυτού του αντιγόνου [Ole Henrik Brekke et al, 2002].

1.3.1.γ. Ανάπτυξη θεραπευτικών αντισωμάτων. Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για την ανάπτυξη εξειδικευμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων που θα χρησιμεύσουν στη θεραπεία αλλά και στη πρόληψη μολύνσεων, καρκίνου και αυτοάνοσων διαταραχών. Η τεχνολογία των υβριδωμάτων ήταν ένα σημαντικό βήμα για την ανάπτυξη της τεχνολογίας των μονοκλωνικών αντισωμάτων [Kohler G., 1975]. Η αξιολόγηση της *in vivo* χρησιμοποίησης μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικών σε ανθρώπους αποσκοπούσε στην απεικόνιση και τη θεραπεία [Larrick J. W., 1991]. Τα μονοκλωνικά αντισώματα φάνηκε να έχουν περιορισμένη χρησιμότητα ως θεραπευτικοί παράγοντες εξαιτίας του μικρού χρόνου ημιζώης τους, της ανικανότητάς τους να ενεργοποιήσουν δραστικές λειτουργίες στον άνθρωπο και, τέλος, της ανοσογονικότητάς τους [Khazaeli M. B. et al, 1994]. Για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής παρήχθησαν χιμαιρικά αντισώματα, δηλαδή αντισώματα με ανθρώπινες σταθερές περιοχές και μεταβλητές περιοχές ποντικού. Ωστόσο, ενώ τα χιμαιρικά αντισώματα φαινόταν λιγότερο ξένα και έτσι λιγότερο ανοσογονικά απ' τα μονοκλωνικά αντισώματα του ποντικού, παρ' όλα αυτά παρατηρήθηκαν ανθρώπινα αντισώματα έναντι των χιμαιρικών. Περαιτέρω ελαχιστοποίηση των συστατικών από ποντικούς στα αντισώματα επιτεύχθηκε με την κατασκευή ανθρωποποιημένων αντισωμάτων. Σ' αυτά τα «ανθρωποποιημένα» αντισώματα, οι θηλιές CDR (complementarity-determining region), που είναι υπεύθυνες για στην πρόσδεση του αντιγόνου, ενός μονοκλωνικού αντισώματος που προέρχεται από ποντίκι εισάγονται σε ανθρώπινη μεταβλητή περιοχή. Η ικανότητα για διαχειρισμό αντισωμάτων με περισσότερες ανθρώπινες μεταβλητές περιοχές τελικά κάνει εφικτή την παραγωγή αντισωμάτων χρήσιμα για κλινική χρήση. Με την απομόνωση γονιδίων που κωδικοποιούν ανθρώπινες μεταβλητές περιοχές, την επιτυχή έκφρασή τους στην *Escherichia coli* και την εισαγωγή της τεχνολογίας έκφρασης σε φάγους (phage-display), η επιλογή ολόκληρων ανθρώπινων μεταβλητών περιοχών έχει απλοποιηθεί πολύ.

Η επιλογή τμημάτων ανθρώπινων αντισωμάτων από τις βιβλιοθήκες έκφρασης σε φάγους σήμερα χρησιμοποιείται για την

ανάπτυξη νέων ανθρώπινων αντισωμάτων. Μια άλλη προσέγγιση είναι η χρησιμοποίηση διαγονιδιακών ποντικών που παράγουν ανθρώπινες Ig. Ανοσοποίηση ενός τέτοιου διαγονιδιακού ποντικού επιφέρει μια ανοσολογική απάντηση με ανθρώπινα αντισώματα, και μπορούν να παραχθούν από τα Β λεμφοκύτταρα του ποντικού υβριδώματα που εκκρίνουν ανθρώπινα αντισώματα

Σήμερα υπάρχουν περίπου 200 αντισώματα σε κλινικές δοκιμές. Το FDA έχει εγκρίνει πολλά αντισώματα έναντι του καρκίνου, της απόρριψης μοσχεύματος, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της ασθένειας Crohn και για την αντιιική προφύλαξη. Μέχρι τώρα, το 20% των βιοφαρμακευτικών προϊόντων σε κλινικές δοκιμές είναι μονοκλωνικά αντισώματα, κάνοντας τα το δεύτερο μεγαλύτερο βιοφαρμακευτικό προϊόν μετά τα εμβόλια. Καθώς η ανάπτυξη των πιθανών νέων θεραπευτικών παραγόντων στα εμπορικά προϊόντα διαρκεί περίπου 10 έτη, τα εγκεκριμένα από το FDA αντισώματα, και μερικά που βρίσκονται στα τελευταία στάδια ανάπτυξης, είναι χιμαιρικά ή «ανθρωποποιημένα» αντισώματα [Ole Henrik Brekke et al, 2002].

1.3.1.δ. Αντισώματα που στοχεύουν τον καρκίνο. Στη θεραπεία του καρκίνου, ο σκοπός της χρήσης του αντισώματος είναι να επάγει άμεσα ή έμμεσα την καταστροφή του καρκινικού κυττάρου, είτε με ειδική στόχευση του όγκου ή της αγγείωσης που «τρέφει» τον όγκο. Πράγματι, νέες τεχνολογίες βιβλιοθηκών αντισωμάτων μετά από επιλογή (panning) σε άθικτα κύτταρα έχουν κάνει δυνατή την απομόνωση αντισωμάτων έναντι αντιγόνων που σχετίζονται με τον καρκίνο [Roovers R. C. et al, 2001]. Ωστόσο, οι πιο κοινοί στόχοι για τον καρκίνο είναι το καρκινοεμβρυονικό αντιγόνο (CEA), που σχετίζεται με τον ορθοκολικό καρκίνο, ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και ErbB2 (οι οποίοι σχετίζονται με το καρκίνο του πνεύμονα και του μαστού), και το CD20 των Β κυττάρων, που είναι ένας μάρτυρας για το λέμφωμα non-Hodgkin's (NHL). Παραδείγματα εγκεκριμένων θεραπευτικών αντισωμάτων κατευθυνόμενα άμεσα στον ErbB2 και το CD20 περιλαμβάνουν το ανθρωποποιημένο IgG1 αντίσωμα trastuzumab (Herceptin) για τον καρκίνο του μαστού και το χιμαιρικό IgG1 αντίσωμα rituximab (Rituxan) για το NHL.

Σήμερα, εξειδικευμένα θεραπευτικά αντισώματα χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με την κλασική χημειοθεραπεία, αλλά το ζητούμενο είναι η ανάπτυξη ειδικών και υψηλά κυτταροτοξικών φαρμάκων έναντι των καρκινικών κυττάρων [Ole Henrik Brekke et al, 2003].

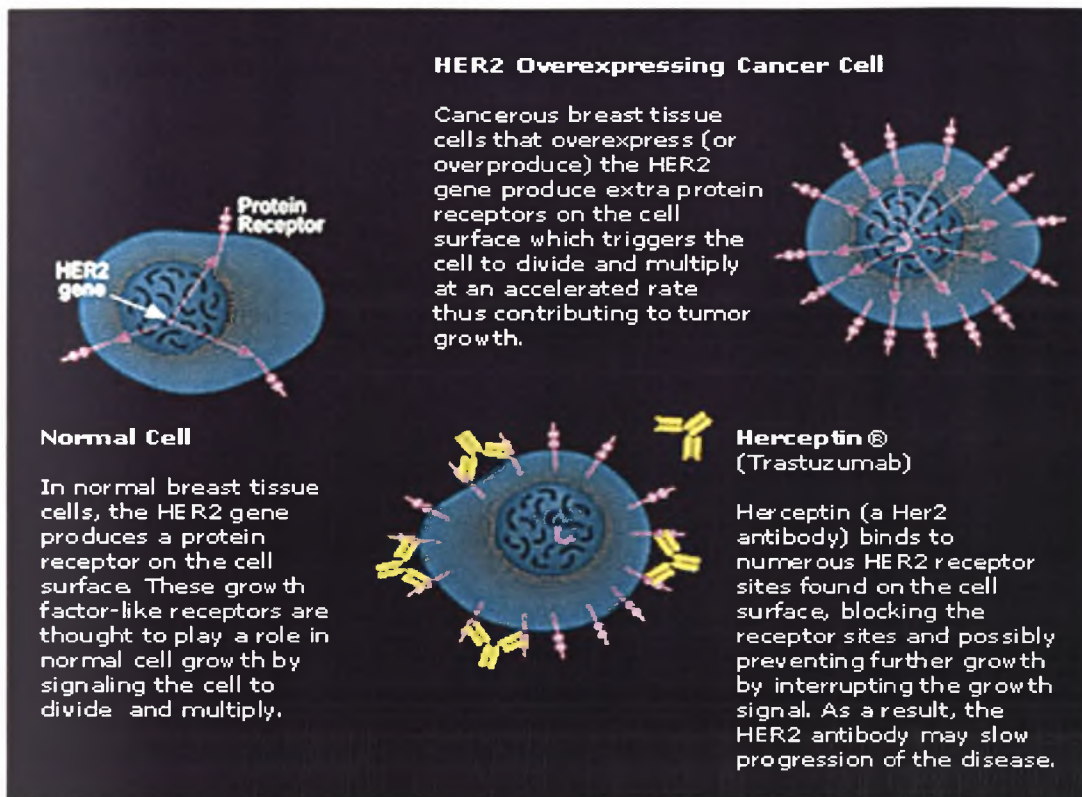
1.3.1.ε. Αντισώματα χωρίς Fc. Μικρά κλάσματα αντισωμάτων μπορούν να επιτελέσουν εργασίες που φυσιολογικά θα διεξάγονταν από ολόκληρα αντισώματα, όπως η παρεμπόδιση της δράσης μιας τοξίνης ή η παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε μία κυττοκίνη και στον υποδοχέα της [Weir A. N. C. et al, 2002] [Choy

E. H. *et al*, 2002]. Αυτά τα κλάσματα αντισωμάτων μπορούν επίσης να μεταφέρουν δραστικά μόρια στους στόχους τους. Το παρεμποδιστικό αποτέλεσμα των αντισωμάτων απλώς απαιτεί την αναστολή του επόμενου προσδέτη ή την πρόσδεση στον υποδοχέα, και δεν χρειάζεται απαραίτητα δραστικές λειτουργίες. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις πως ακόμη και κλάσματα με δραστικές λειτουργίες φυσιολογικά σχετίζονται με «γυμνά» αντισώματα. Αυτά τα κλάσματα αποτελούνται είτε από το Fv ή το Fab τμήμα του αντισώματος, το οποίο και στις δύο περιπτώσεις είναι το τμήμα το οποίο προσδένεται στο αντιγόνο. Τέτοια κλάσματα αντισωμάτων μπορούν λειτουργικά να εκφραστούν στο *E.coli* με μια εύκολη διαδικασία [Ole Henrik Brekke *et al*, 2003].

Η πρόοδος στη γενετική μηχανική των αντισωμάτων έκανε εφικτή την απομόνωση ολόκληρων ανθρώπινων κλασμάτων Fab και scFv (single chain Fv) από ανθρώπινες βιβλιοθήκες αντισωμάτων που εκφράζονται στην επιφάνεια βακτηριοφάγων (phage display) [Carter P., 2001]. Η ικανότητα της παραγωγής ολόκληρων κλασμάτων ανθρώπινων αντισωμάτων είναι πολύ σημαντική γιατί ξεπεράστηκε το πρόβλημα της ανοσολογικής απάντησης που επάγεται από χιμαιρικά ή «ανθρωποποιημένα» αντισώματα. Το μικρό μέγεθος των κλασμάτων Fab και scFv είναι ωφέλιμο για τη διεισδυτικότητα τους σε στερεούς καρκίνους και τη στόχευση τους σε κύτταρα με κακοήθεια. Ενδοκυτταρωμένα Fabs και scFvs έχουν επίσης απομονωθεί σε δυναμικά εργαλεία για την διανομή κυτταροτοξικού και κυτταροστατικού φορτίου στο κυτταρόπλασμα [Park J. W. *et al*, 2002] [Wang L. *et al*, 2001]. Πρόσφατα, ένα ανθρώπινο scFv που εκφράζεται σε φάγο (Erbicin) βρέθηκε να παρουσιάζει κυτοστατική/κυτταροτοξική επίδραση σε κύτταρα θετικά στον ErbB2 [De Lorenzo C. *et al*, 2002].

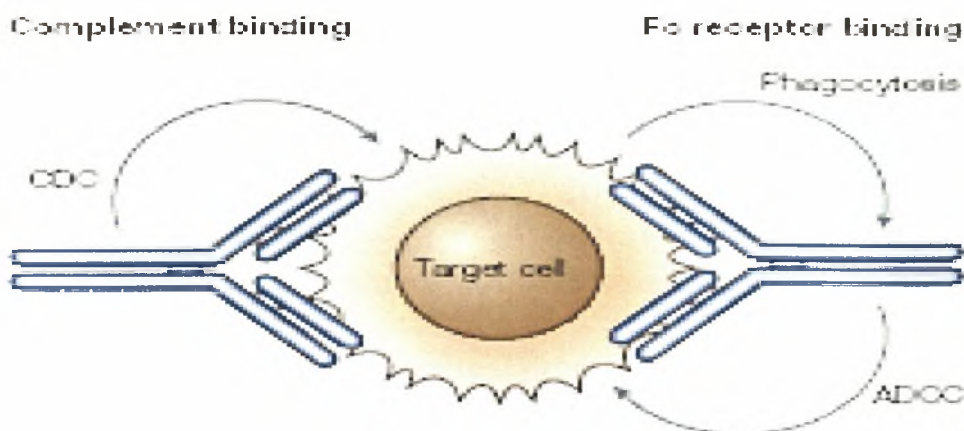
1.3.2. Αντισώματα που χρησιμοποιούνται εναντίον του καρκίνου. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, μέχρι τώρα, όλες οι ελπιδοφόρες θεραπείες που στοχεύουν στα εξωκυττάρια τμήματα του ErbB βασίζονται στα αντισώματα. «Ανθρωποποιημένα» ή χιμαιρικά αντισώματα αναπτύσσονται ενάντια στις εξωκυττάρια περιοχές των EGFR και ErbB2. Πολλά αντισώματα έναντι του EGFR βρίσκονται υπό κλινική δοκιμή. Μερικά απ' αυτά αναστέλλουν την πρόσδεση του EGF και δρουν ως ανταγωνιστές, αλλά οι ακριβείς τους επίτοποι και ο τρόπος δράσης τους δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος.

Το πιο γνωστό αντίσωμα έναντι του ErbB2 είναι το trastuzumab (Herceptin), που αναπτύχθηκε σε μία θεραπευτική επιλογή για γυναίκες με καρκίνο του μαστού στον οποίο υπερεκφράζεται ο ErbB2. Το Herceptin εγκρίθηκε από το FDA το 1998. Το Herceptin χαρακτηρίζεται ως «γυμνό αντίσωμα», γιατί δε φέρει κάποιο ραδιοϊσότοπο ή κάποια τοξίνη. Το Herceptin απαιτεί την παρουσία μιας άθικτης Fc περιοχής, υποδηλώνοντας ένα ρόλο της δράσης του, την αντισωματοεξαρτώμενη κυτταρική κυτταροτοξικότητα (ADCC).



Εικόνα 11. Απεικόνιση του τρόπου δράσης του Herceptin. Αριστερά απεικονίζεται ένα φυσιολογικό κύτταρο στο οποίο η έκφραση του υποδοχέα ErbB2 γίνεται σε κανονικά επίπεδα. Ο υποδοχέας αποτυπώνεται με το ροζ χρώμα. Στη συνέχεια φαίνεται ένα κύτταρο από καρκινικό ιστό μαστού. Εδώ παρατηρείται ο αυξημένος αριθμός των υποδοχέων στην επιφάνεια του καρκινικού κυττάρου, ο οποίος διεγείρει το κύτταρο για διαίρεση και πολλαπλασιασμό σε επιταχυνόμενο ρυθμό και έτσι συμβάλλει στην αύξηση του όγκου. Τέλος, παρατηρείται η πρόσδεση του Herceptin σε πολυάριθμες περιοχές του υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια, μπλοκάροντας τις περιοχές του υποδοχέα και πιθανόν έτσι εμποδίζεται η περαιτέρω αύξηση της σηματοδότησης. Το αποτέλεσμα είναι η επιβράδυνση της πρόοδου της ασθένειας.

Ο επίτοπος του ErbB2 που προσδέεται το Fab του Herceptin είναι κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο του τμήματος IV. Το Herceptin δεν παρεμποδίζει την ικανότητα του ErbB2 να σχηματίσει ετεροδιμερή με τον ErbB3. Το τμήμα IV περιλαμβάνει την περιοχή αποκοπής που χρησιμοποιείται όταν η εξωκυττάρια περιοχή του ErbB2 απελευθερώνεται από τη μεμβράνη μέσω των μεταλλοπρωτεϊνών. Μόλις η εξωκυττάρια περιοχή απομακρυνθεί, τα διαμεμβρανικά και ενδοκυττάρια τμήματα του ErbB2 πιστεύεται ότι αυτοσυνδέονται, επιφέροντας την ενεργοποίηση της κινάσης. Το Herceptin μπλοκάρει αυτήν την πρωτεολυτική αποκοπή, σημαντικό στοιχείο της αντικαρκινικής του δραστηριότητας. Η επερχόμενη μείωση της σηματοδότησης του ErbB2 μαζί με την αλληλεπίδραση Fc-Fcγ είναι αρκετά να εξηγήσουν τη δράση του Herceptin [Ole Henrik Brekke, et al, 2003].



Εικόνα 12. Δραστικές λειτουργίες της φυσικής ανοσοσφαιρίνης.

Το κλασικό μονοπάτι του συμπληρώματος ξεκινά με την πρόσδεση του C1 στα ανοσοσύνπλοκα (που είναι επικαλυμμένα κύτταρα ή αντιγόνα) και τελικά οδηγούν στην κυτταρική λύση και προκαλούν φλεγμονώδεις απαντήσεις για την τελική εξάλειψη του κυττάρου στόχου. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από τη συμπληρωματικότητα (CDC). Οι δραστικές λειτουργίες που διαμεσολαβούν τον υποδοχέα Fc σχετίζονται με τη στρατολόγηση των δραστικών κυτταρικών μορίων οδηγώντας είτε σε φαγοκυττάρωση είτε σε αντισωματοεξαρτώμενη κυτταρική κυτταροτοξικότητα (ADCC). Αυτοί οι μηχανισμοί είναι οι διαδικασίες που λειτουργούν όταν γυμνά αντισώματα χρησιμοποιούνται σε θεραπευτικοί παράγοντες.

1.3.3. Μελλοντικές εφαρμογές. Η δομή του ErbB ξεκάθαρα προτείνει επίτοπους που θα πρέπει να στοχευθούν από τα μελλοντικά θεραπευτικά αντισώματα. Το πιο προφανές είναι ο βραχίονας διμερισμού του τμήματος II, καθώς και άλλα μέλη του τμήματος II. Ένα τέτοιο παράδειγμα φαίνεται πως αντιπροσωπεύεται από το αντίσωμα pertuzumab έναντι του ErbB2 που παρεμποδίζει αποτελεσματικά την αλληλεπίδραση ErbB2/ErbB3. Το pertuzumab προσδένεται στο τμήμα II του ErbB2, αρχικά μέσω επαφών ανάμεσα στο τμήμα V_H του αντισώματος και των καταλοίπων του καρβοξυτελικού άκρου του βραχίονα διμερισμού του ErbB2. Επίσης, η ικανότητα του pertuzumab να αναστέλλει τον ετεροδιμερισμό ErbB2/ErbB3 ίσως να επέρχεται και από τον αποκλεισμό των καταλοίπων των καρβοξυτελικών άκρων που εμπλέκονται άμεσα στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στους υποδοχείς. Το pertuzumab πρόσφατα χρησιμοποιήθηκε και σε κλινικές δοκιμές για καρκίνους στους οποίους ο ErbB2 εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα.

1.3.4. Fab63. Στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσοβιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ απομονώθηκε ένα **ανθρώπινο** Fab κλάσμα (Fab63) έναντι του ανασυνδυασμένου εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα ErbB2. Αυτό επιτεύχθηκε με την χρήση μιας συνδυαστικής

Fab με έκφραση στην επιφάνεια βακτηριοφάγων (phage-display) βιβλιοθήκης η οποία φτιάχτηκε από Β λεμφοκύτταρα απομονωμένα από διηθημένους λεμφαδένες ασθενή με καρκίνο του μαστού θετικό στον ErbB2. Το Fab63 ανταγωνίζεται το Herceptin για πρόσδεση στον διαλυτό υποδοχέα ErbB2 και μπορεί να προσδεθεί στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ErbB2 υποδοχέα. Αντίθετα με το Herceptin, το Fab63 ενδοκυτταρώνεται σε υψηλό ρυθμό. Το Fab63 έχει κυτταροστατικά αποτελέσματα στις καρκινικές σειρές SKBR3 και MDA-MB453, οι οποίες υπερεκφράζουν τον ErbB2, όπου μηχανισμοί ανεξάρτητοι προσδέτη κυριαρχούν στην επαγωγή σήματος. Επίσης, παρουσία του προσδέτη heregulin (HRG-β1), ο οποίος έχει υψηλή συγγένεια για τον ErbB3, παρατηρήθηκε αύξηση της αναστολής πολλαπλασιασμού στα MDA-MB-453 κύτταρα. Αυτές οι μοναδικές ιδιότητες του Fab63 το καθιστούν ένα πολλά υποσχόμενο υποψήφιο μόριο ως αντικαρκινικό παράγοντα για διάγνωση και θεραπεία, καθώς επίσης ένα πολύτιμο εργαλείο για την έρευνα της δομής του ErbB2 υποδοχέα και των βιοχημικών ιδιοτήτων του [Maria M. Belimezi, et al, 2005].

1.4. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η παραγωγή του Fab63 σε μεγάλη κλίμακα με σκοπό την ανίχνευση του μηχανισμού λειτουργίας του Fab63..

Η σειρά των πειραμάτων που ακολουθήθηκε για την διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εισαγωγή ενός πλασμιδίου το οποίο κωδικοποιεί το Fab63, το οποίο έχει αναφερθεί παραπάνω, σε κύτταρα E.coli, ο έλεγχος της ειδικότητας του Fab63 ως προς τη συγγένειά του με το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα HER2/neu, η απομόνωση στη συνέχεια του Fab63 από τα βακτηριακά κύτταρα με τη χρησιμοποίηση χρωματογραφικών τεχνικών και τέλος ο έλεγχος της ειδικότητας του Fab63 ως προς τη συγγένεια του με το φυσικό υποδοχέα HER2/neu.

2. ΥΛΙΚΑ

Υλικό	Εταιρία
Yeast Extract	BD
Bacto Trypton	BD
MOPS	SIGMA
NaCl	BD
MgCl ₂	Applichem
Φίλτρα με διάμετρο πόρου 0.22μm	Millipore
Φίλτρα με διάμετρο πόρου 0.45μm	Millipore
Σύστημα FPLC	Amersham Pharmacia Biotech
Στήλη Sephantex G-25	Amersham Biosciences
Στήλη G-protein	Amersham Biosciences
Συσκευή Dot Blot	Bio Rad
Αντίσωμα Anti-Fab	PIERCE
Anti-goat HRP	DAKO
BSA	Applichem
Γλυκίνη	BDH
Ακρυλαμίδιο	Applichem
APS	SIGMA
TEMED	SIGMA
Καρμπενικιλίνη	Applichem
Γλυκόζη	SIGMA
KCl	SIGMA
MgSO ₄	SIGMA
Μηχάνημα ηλεκτροδιάτασης	Bio-Rad
Μεμβράνη διαπήδυσης	Spectrum
DMSO	SIGMA
Κυτταρική σειρά SKBR3	ATCC
Κυτταρική σειρά MDA-MB-453	ATCC
RPMI-1640	Gibco
FBS	Gibco
Πενικιλίνη	Gibco
Στρεπτομικίνη	Gibco
L-γλουταμίνη	Gibco
Triton	Fluka
HEPES	Gibco
EDTA	SIGMA
Na ₃ VO ₄	SIGMA
Protease inhibitor cocktail	Roche
Μάρτυρας LMW	Amersham Pharmacia
Μάρτυρας Page ruler	Fermentas
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	Amersham Pharmacia
Μεθανόλη	BDH
IPTG	Promega

PMSF	SIGMA
Τετρακυκλίνη	SIGMA
Καρμπενικιλίνη	SIGMA
Πλασμίδιο PUC19	New England Biolabs
Αλκαλική φωσφατάση	SIGMA

Οι **κυτταρικές σειρές** που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

- Τα βακτηριακά κύτταρα XL-1 blue, τα οποία είναι στελέχη των *E.coli*. Αυτά τα κύτταρα φέρουν γονίδια με ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη και επιπλέον είναι ιδανικά για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA γιατί δε διαθέτουν μηχανισμό αναγνώρισης και καταστροφής ξένων τμημάτων DNA.
- Η κυτταρική σειρά SKBR3 είναι ανθρώπινα κύτταρα μαστικού αδενοκαρκινώματος, τα οποία προέρχονται από πλευρική έκχυση επιθηλιακών κακοηθών κυττάρων του μαστού.

Τα **θρεπτικά μέσα για καλλιέργειες *E. Coli*** που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Υγρό θρεπτικό μέσο SB (Super Broth) (1L).
30g Bacto Trypton
20g Yeast Extract
10g MOPS
απιονισμένο νερό
- Στερεό θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani) (1L) Agar.
10g Bacto Trypton
10g NaCl
5g Yeast Extract
5g Agar
απιονισμένο νερό
- Υγρό θρεπτικό μέσο SOB (100ml).
0,5g Yeast Extract
2g Bacto Trypton
200μl NaCl 5M
250μl KCl 1M
- Υγρό θρεπτικό μέσο SOC.
Σε 5ml SOB προστίθενται: 50λ MgCl₂ 1M
50λ MgSO₄ 1M
90λ 20% γλυκόζη

Όλα τα θρεπτικά μέσα πριν την αποστείρωσή τους σε κλίβανο ρυθμίστηκαν σε pH 7 με 10N NaOH.

Υγρό **θρεπτικό μέσο ευκαρυωτικών κυττάρων** RPMI-1640 complete medium.

- Για 50ml RPMI-1640 complete medium:
44ml RPMI-1640

5ml 10%FSB
0.5ml 1%Pen/Strep
0.5ml 1%L-gloutamine

Για την **ηλεκτροφόρηση** των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12%.

- Για την πηκτή διαχωρισμού χρησιμοποιούνται:
1.7ml H₂O
2ml ακρυλαμίδιο 20%
1.25ml Tris pH 8.8
25λ SDS 20%
25λ APS 10%
2.5λ TEMED
- Για την πηκτή συγκέντρωσης χρησιμοποιούνται:
3.025ml H₂O
0.65ml ακρυλαμίδιο 20%
1.25ml Tris pH 6.8
25λ SDS 20%
25λ APS 10%
5λ TEMED
- Διάλυμα "φόρτωσης" δείγματος πρωτεϊνών 4x (loading buffer) (8 ml):
4 ml ddH₂O
1 ml Tris-HCl, (pH 6,8), 0,5 M
0,8 ml γλυκερόλη
1,6 ml SDS 10%
0,4 ml β-μερκαπτοαιθανόλη
0,2 ml χρωστική κυανούν της βρωμοφαινόλης 0,05%
- Διάλυμα χρωματισμού του SDS-PAGE (500ml).
125ml ισοπροπανόλη
0.3g Coomasie brilliant blue R-250
325ml dH₂O
- Διάλυμα αποχρωματισμού του SDS-PAGE (500ml).
100ml οξικό οξύ
50ml ισοπροπανόλη
850ml dH₂O

Τα **διαλύματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western** που απαιτήθηκαν ήταν τα εξής:

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς 10x (transfer buffer) (1 lt)
30 g Tris-base
144 g γλυκίνη
20% κ.ο.μεθανόλη
- Διάλυμα χρώσης Ponceau S
0,2% κ.β.Ponceau
0,5% κ.ο.TCA

Τα **διαλύματα υποστρώματος** που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:

- Διάλυμα υποστρώματος της αλκαλικής φωσφατάσης:
10% Διαιθανολαμίνη
0,01 %MgCl₂
3mM NaN₃
Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με 12NΗCl στο 9,8.
- Διάλυμα εμφάνισης με υπόστρωμα DAB:
100 ml PBS 1X
0,03 g DAB
0,03 g NiCl
0,03 ml Διάλυμα H₂O₂ 30%

Ανασύσταση αντιβιοτικών

- Αμπικιλλίνη (100 mg/ml)
10 g Αμπικιλλίνη
100 ml ddH₂O
- Καρμπενικιλλίνη (100 mg/ml)
10 g Καρμπενικιλλίνη
100 ml ddH₂O
- Τετρακυκλίνη (5 mg/ml)
0,5 g Τετρακυκλίνη
100 ml Αιθανόλη 100%

Τα **διαλύματα ομογενοποίησης του υποδοχέα HER2/neu** είναι τα ακόλουθα:

- Διάλυμα ομογενοποίησης Α (pH 7,5)
10mM Na₃PO₄
100mM NaCl
5mM EDTA
5mM EGTA
5mM ιωδοακεταμίδιο
- Διάλυμα ομογενοποίησης Β (pH 7,5)
10mM Na₃PO₄
100mM NaCl
5mM EDTA
5mM EGTA
5mM ιωδοακεταμίδιο
0,5mM PMSF
5 units/ml απροτινίνη (αναστολέας της τρυψίνης)
5μg/ml πεπστατίνη (αναστολέας της πεψίνης)
2% κ.ο. Triton X-100

Το **ρυθμιστικό διάλυμα** που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής:

- PBS 10x pH 7,4 (1 lt)
80 g NaCl
11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
2 g KCl
2 g KH_2PO_4

Για τα διάφορα στάδια καθαρισμού του μορίου Fab63 χρησιμοποιήθηκε η συσκευή FPLC και χρωματογραφικά υλικά Sephadex G-25, για τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, και κολώνα με G πρωτεΐνη, για τη χρωματογραφία συγγένειας. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στο FPLC είναι απαερωμένα και φιλτραρισμένα. Για την αλλαγή του ρυθμιστικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες διαπίδωσης.

Οι καλλιέργειες των ευκαρυωτικών κυττάρων έγιναν σε υλικό RPMI complete medium. Οι χειρισμοί της καλλιέργειας των κυττάρων έγιναν σε αυστηρά στείρες συνθήκες σε ειδική καμπίνα σε δωμάτιο κυτταροκαλλιεργειών κοντά σε φλόγα. Τα σκεύη, τα θρεπτικά υλικά και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις κυτταροκαλλιέργειες αποστειρώθηκαν με υψηλή θερμοκρασία σε κλίβανο. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε επωαστήρες ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας, στους 37°C, με ατμόσφαιρα 5% CO_2 και 95% αέρα.

Οι χειρισμοί των καλλιεργειών των βακτηριακών κυττάρων κατά την ανάπτυξη των κυττάρων καθώς επίσης και κατά τη διαδικασία του μετασχηματισμού τους έγιναν σε στείρες συνθήκες κοντά σε φλόγα. Τα σκεύη, τα θρεπτικά υλικά και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις καλλιέργειες αποστειρώθηκαν με υψηλή θερμοκρασία σε κλίβανο.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΑΣΗΣ (electroporation)

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροδιάτασης (Dower et al., 1988). Η ικανότητα μετασχηματισμού των βακτηρίων με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτασης είναι 10^9 - 10^{10} βακτήρια/μg υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA. Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το ειδικό σύστημα συσκευών για μετασχηματισμό βακτηρίων με ηλεκτροδιάταση της BIO-RAD (GENE PULSER, PULSE CONTROLLER και ο ειδικός θάλαμος ηλεκτροδιάτασης). Μετασχηματίστηκαν *E.coli* XL-1 Blue, στελέχη τα οποία φέρουν πλασμίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη.

3.1.1. Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων XL1-Blue για ηλεκτροδιάταση (electrocompetent cells)

Κατά την παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων απαιτούνται ταχείς και κατά το δυνατόν ήπιοι χειρισμοί, σε χαμηλή θερμοκρασία. Για το λόγο αυτό τα διαλύματα, τα σκεύη και οι φυγόκεντροι ψύχονται πριν τη χρήση. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια.

1. Εμβολιασμός 10 ml υλικού SB- 40 μg/ml τετρακυκλίνη με βακτηριακή αποικία από φρέσκο τριβλίο Petri και επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για περίπου 16 h.
2. Εμβολιασμός 0,5 l SB στο οποίο έχουν προστεθεί 10 ml 20 % γλυκόζης και 5 ml 1M MgCl₂ με 2,5 ml της παραπάνω καλλιέργειας.
3. Επώαση υπό ανάδευση στους 37°C μέχρι OD_{600nm} = 0,7-0,8 (3-4 h).
4. Τοποθέτηση της καλλιέργειας στον πάγο για 30 min.
5. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στις 4.000 rpm (κεφαλή Sorvall GS-3) για 20 min στους 4°C.
6. Απόχυση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των βακτηρίων σε 250 ml στείρου παγωμένου διαλύματος 10 % γλυκερόλης.
7. Φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 20 min στους 4°C.
8. Απόχυση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 250 ml στείρου παγωμένου διαλύματος 10 % γλυκερόλης.
9. Φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 20 min στους 4°C.
10. Απόχυση του υπερκείμενου, επαναδιάλυση του ιζήματος σε 12,5 ml στείρου παγωμένου διαλύματος 10% γλυκερόλης και μεταφορά σε παγωμένο στείρο σωληνάριο 50 ml.
11. Φυγοκέντρηση στις 3.500 rpm για 15 min στους 4°C.
12. Προσεκτική απόχυση του υπερκείμενου, προσθήκη 1 ml στείρου παγωμένου διαλύματος 10% γλυκερόλης και γρήγορη επαναδιάλυση του ιζήματος.

13. Μοίρασμα με επαναληπτική πιπέτα του εναιωρήματος των βακτηρίων ανά 100 μl σε σωληνάρια erpendorf που βρίσκονται τοποθετημένα σε λουτρό αιθανόλης-ξηρού πάγου και άμεση ψύξη.

Τα επιδεκτικά βακτήρια διατηρούνται στους -80°C για διάστημα 6 και πλέον μηνών.

3.1.2. Έλεγχος μολύνσεων.

Μέρος του δείγματος, που προέκυψε από την παραπάνω διεργασία, επιστρέφεται σε τριβλία LB/agar με τετρακυκλίνη σε τελική συγκέντρωση του αντιβιοτικού 40μg/ml και με αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Αποικίες εμφανίζονται μόνο στο τριβλίο με την τετρακυκλίνη, επειδή το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε φέρει πλασμιδίο που του προσδίδει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη. Στο τριβλίο με την αμπικιλίνη που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για τον έλεγχο πιθανών μολύνσεων δεν αναμένεται εμφάνιση αποικιών εφόσον το δείγμα δεν έχει μολυνθεί.

3.1.3. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων XL1-Blue με ηλεκτροδιάταση (electroporation)

1. Ρύθμιση της συσκευής GENE PULSER στα 25 μF και 1,8 KV και της συσκευής PULSE CONTROLLER στα 200 Ohms.
2. Αργό ξεπάγωμα των επιδεκτικών βακτηρίων σε πάγο.
3. Μεταφορά 50 μl βακτηριακού εναιωρήματος και 1 μl από το πλασμιδιακό DNA που φέρει το γονίδιο για το Fab63 σε κυψελίδα 0,1 cm, η οποία βρίσκεται σε πάγο. Επώαση της κυψελίδας με τα βακτήρια και το πλασμιδίο στον πάγο για 1 min.
4. Τοποθέτηση της κυψελίδας, αφού σκουπιστεί εξωτερικά και είναι εντελώς στεγνή, στο θάλαμο ηλεκτροδιάτασης και εφαρμογή τάσης στα άκρα της με την ενεργοποίηση της συσκευής που παράγει τον ηλεκτρικό παλμό. Για να γίνει ο μετασχηματισμός των βακτηρίων ο ηλεκτρικός παλμός πρέπει να έχει διάρκεια > 4,0 msec.
5. Προσθήκη, αμέσως μετά τον παλμό, 1 ml θρεπτικού υλικού SOC στην κυψελίδα και μεταφορά των βακτηρίων σε στείρο σωληνάριο Falcon των 15 ml. Προαιρετικά η κυψελίδα ξεπλένεται με την προσθήκη ενός επιπλέον όγκου SOC.
6. Επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 1 h.
7. Επίστρωση κατάλληλου όγκου της υγρής καλλιέργειας σε τρυβλίο Petri με στερεό θρεπτικό μέσο παρουσία καρμπενικιλίνης.

Τα μετασχηματισμένα βακτήρια που παραλήφθηκαν μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο Falcon 50 ml. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 h και περαιτέρω πολλαπλασιασμός των βακτηριακών κυττάρων όπως περιγράφεται παρακάτω.

3.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ Fab63

3.2.1. Έκφραση Fab63 σε μεγάλη κλίμακα

Η παραγωγή διαλυτού Fab63 τμήματος σε μεγάλη κλίμακα πραγματοποιείται ως εξής:

1. Εμβολιασμός 10 ml SB-50 $\mu\text{g/ml}$ καρμπενικιλίνη με μία αποικία του προς παραγωγή Fab κλώνου ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση στους 37°C .
2. Εμβολιασμός 250 ml SB-50 $\mu\text{g/ml}$ καρμπενικιλίνη-20 mM MgCl_2 με 2,5 ml της παραπάνω καλλιέργειας και επώαση υπό ανάδευση στους 37°C μέχρι $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,8-1,2$ (~ 5 h).
3. Επαγωγή της έκφρασης των διαλυτών Fab τμημάτων με προσθήκη IPTG τελικής συγκέντρωσης 1 mM και ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση στους 30°C .
4. Φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 15 min στους 4°C .
5. Απόχυση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του βακτηριακού ιζήματος σε 10 ml παγωμένου διαλύματος PBS- 0,2 mM PMSF.
6. Διάσπαση της εξωτερικής βακτηριακής μεμβράνης και απελευθέρωση του Fab τμήματος από τον περιπλασμικό χώρο είτε με υπερήχους είτε με διαδοχικούς κύκλους απότομης ψύξης/θέρμανσης.
7. Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm (κεφαλή Sorvall SS34), για 30 min στους 4°C .
Μεταφορά του υπερκείμενου σε φρέσκο σωληνάριο και φύλαξη στους 4°C ή στους -20°C .

Το υπερκείμενο της βακτηριακής λύσης ελέγχθηκε για την παρουσία Fab63 τμήματος του αντισώματος και την πιστοποίηση της επιτυχούς έκφρασης της πρωτεΐνης με δοκιμασία ELISA.

3.2.2. Ανοσοενζυμική δοκιμασία (ELISA) με διαλυτά Fab63 κλάσματα

Ο έλεγχος της ειδικότητας του Fab63 ως προς το αντιγόνο Her2/neu-ECD πραγματοποιήθηκε με δοκιμασία ELISA. Στην ELISA χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα: Her2/neu-ECD, ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (HSA) και $\alpha 1$ -ECD του ανθρώπινου υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (AChR), όλα εκφρασμένα στη *P.pastoris* και αλβουμίνη από ορό βοδιού (BSA) ακινητοποιημένα στην πλάκα μικροτιτλοδότησης. Ο ανοσοενζυμικός προσδιορισμός περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Επίστρωση των φρεατίων μικροτιτλοδότησης με 2 $\mu\text{g/ml}$ $\alpha 1$ -ECD ή με 120 fmoles AChR/φρεάτιο ο οποίος ακινητοποιείται μέσω του mAb 124 (15 $\mu\text{g/ml}$) και κορεσμός των ελεύθερων για πρόσδεση θέσεων (blocking).

2. Προσθήκη κατάλληλης αραιώσης παρασκευάσματος διαλυτού Fab τμήματος (σε PBS-1% BSA) στο φρεάτιο μικροτιτλοδότησης και επώαση υπό ήπια ανάδευση για 1 h στους 37°C.
3. Πλύσεις 10 φορές με PBS-0,05% Tween 20.
4. Προσθήκη αντί-Fab αντισώματος συζευγμένου με αλκαλική φωσφατάση σε αραιώση 1:1000 σε PBS-1% BSA και επώαση υπό ήπια ανάδευση για 1 h στους 37°C.
5. Πλύσεις 10 φορές με PBS-0,05% Tween 20.
6. Εμφάνιση με προσθήκη 50μl διαλύματος εμφάνισης (σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος διαιθανολαμίνης, pH 9,8 διαλύεται μία ταμπλέτα υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης 5 mg, Sigma) και επώαση για 5-30 min σε θερμοκρασία δωματίου (εμφάνιση κίτρινου χρώματος).
7. Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 405 nm.

3.2.3.ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ Fab63

Για την απομόνωση του Fab63 από το υπερκείμενο ακολουθείται χρωματογραφία μοριακής διήθησης για αφαλάτωση του δείγματος και χρωματογραφία συγγένειας, από την οποία τελικά θα απομονωθεί το Fab63. Σημειώνεται ότι όλα τα διαλύματα που θα χρησιμοποιηθούν στο σύστημα του FPLC πρέπει να είναι φιλτραρισμένα και απαερωμένα.

3.2.3.α. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Στηρίζεται στο γεγονός ότι μόρια διαφορετικού μεγέθους περνούν με διαφορετική ταχύτητα διαμέσου μιας μήτρας που περιέχει ομοιόμορφους πόρους. Το δείγμα εισέρχεται στη κορυφή μιας στήλης που αποτελείται από πορώδεις κόκκους από αδιάλυτα πολυμερή, όπως δεξτράνια, αγαρόζη, πολυακρυλαμίδιο, τα οποία μπορούν και συγκρατούν μεγάλες ποσότητες νερού. Τα μικρά μόρια έχουν την ικανότητα να περνούν μέσω των κόκκων, ενώ τα μεγάλα μόρια δεν μπορούν. Έτσι τα μικρά μόρια κατανέμονται στο υδάτινο περιβάλλον μέσα στους κόκκους και μεταξύ τους, ενώ τα μεγάλα μόρια βρίσκονται μόνο μεταξύ των κόκκων. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω είναι τα μεγάλα μόρια να περνούν ευκολότερα μέσα από τη στήλη και να εμφανίζονται πρώτα γιατί βρίσκονται σε μικρότερο όγκο υγρού. [Lubert Stryer, 1997]

Χρησιμοποιείται στήλη Sephadex G-25 η οποία συνδέεται στο σύστημα FPLC.

1. Η στήλη ξεπλένεται με δύο έως τρεις όγκους νερό και 50mM Na₄PO₃.
2. Εισαγωγή στο σύστημα του προϊόντος της λύσης των κυττάρων.

3. Έκλουση των πρωτεϊνών από τη στήλη με 50mM Na₄PO₃.
4. Η στήλη ξεπλένεται με δύο έως τρεις όγκους 50mM Na₄PO₃, νερό και 20% αιθανόλη και φυλάσσεται καλά κλεισμένη στους 4⁰C.

Ακολουθεί Dot Blot των κλασμάτων που προκύπτουν από την χρωματογραφία μοριακής διήθησης για να πιστοποιηθεί σε ποια κλάσματα υπάρχει το Fab63.

3.2.3.β. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών υπό κενό (Dot blotting)

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών υπό κενό πραγματοποιείται για τον ταχύ έλεγχο μεγάλου αριθμού δειγμάτων ως προς την ύπαρξη της επιθυμητής πρωτεΐνης. Σε αντίθεση με την ανοσοαποτύπωση κατά Western, η μέθοδος αυτή δεν παρέχει τη δυνατότητα εκτίμησης του μεγέθους της ανιχνευόμενης πρωτεΐνης, αλλά προσφέρει μόνο μία ένδειξη για την ύπαρξη πρωτεΐνης που μπορεί να ανιχνευθεί από το ειδικό αντίσωμα. Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε για τον έλεγχο της παραγωγής διαλυτών Fab τμημάτων σε μεγάλο αριθμό καλλιεργειών μικρής κλίμακας. Χρησιμοποιήθηκε συσκευή κενού η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη διήθηση 96 δειγμάτων μέσα σε ισάριθμα φρεάτια (Easy-titer, ELIFA system, PIERCE). Τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Προετοιμασία της συσκευής διήθησης με την τοποθέτηση τμήματος απορροφητικού χαρτιού Whatmann 3MM και κατόπιν κατάλληλου μεγέθους μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (Hybond-C) επάνω στο κατώτερο τμήμα της συσκευής, τοποθέτηση του ανώτερου τμήματος της συσκευής που φέρει τα 96 φρεάτια και καλή ακινητοποίηση.
2. Μεταφορά των προς ανάλυση δειγμάτων (5μl δείγματος που προέκυψε από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης αραιωμένο με 95μl αποστειρωμένο νερό) στα αντίστοιχα φρεάτια απουσία κενού.
3. Δημιουργία κενού και διήθηση των δειγμάτων μέχρι η μεμβράνη να είναι εντελώς στεγνή. Καθώς τα δείγματα διέρχονται μέσα από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, οι πρωτεΐνες αποτίθενται σε αυτή.
4. Αφαίρεση της μεμβράνης από τη συσκευή και ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών. Το έγχρωμο προϊόν που υποδηλώνει την ύπαρξη της ανιχνευόμενης πρωτεΐνης εμφανίζεται στην επιφάνεια της μεμβράνης με τη μορφή στρογγυλής κηλίδας. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:
 - a. Η μεμβράνη επωάζεται με 5% γάλα σε 1xPBS για 30min στους 37⁰C για να συνδεθούν οι πρωτεΐνες του γάλακτος στις θέσεις που δεν υπάρχουν πρωτεΐνες του δείγματος που φορτώθηκε.
 - b. Ξέπλυμα με 1xPBS.

- c. Προσθήκη αντισώματος anti-Fab (unconjugated) σε αραιώση 1/1000 με 1% PBS/BSA
- d. Επώαση στους 4°C όλη νύχτα.
- e. Πλύση της μεμβράνης με 1xPBS.
- f. Επώασή της με αντίσωμα anti-goat HRP αραιωμένο 1/1000 με 1% PBS/BSA στους 37°C για μία ώρα.
- g. Η μεμβράνη ξεπλένεται με 1xPBS και επωάζεται μ' αυτό σε θερμοκρασία δωματίου για 30min.
- h. Προσθήκη διαλύματος (DAB) που θα χρωματίσει τις περιοχές όπου υπάρχει το Fab63, το οποίο περιέχει 50ml 1xPBS, 0.015g νικέλιο, 15ml H₂O₂ και 100ml DAB.
- i. Όταν χρωματιστούν οι περιοχές με το Fab63 η μεμβράνη ξεπλένεται με 1xPBS και τοποθετείται σε χαρτί Whatman στους 37°C για να στεγνώσει.

Τα δείγματα που συλλέγονται για να χρησιμοποιηθούν στη χρωματογραφία συγγένειας είναι αυτά που εμφανίζουν στη μεμβράνη έντονο σκούρο χρώμα.

3.2.3.γ. Χρωματογραφία συγγένειας.

Αυτή η τεχνική απομόνωσης πρωτεΐνης εκμεταλλεύεται την υψηλή συγγένεια μιας πρωτεΐνης για μία ειδική χημική ομάδα. Η χρωματογραφία συγγένειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για την απομόνωση πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν μια ομάδα X, ως εξής: η ομοιοπολική δέσμευση του X ή παραγώγου του σε στήλη, έπειτα, προσθήκη του μείγματος της πρωτεΐνης στη στήλη, που στη συνέχεια ξεπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δε δεσμεύτηκαν, και τέλος, έκλυση της πρωτεΐνης που επιλέγεται με προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης διαλυτής μορφής του X. [Lubert Stryer, 1997]

Χρησιμοποιούνται σφαιρίδια αγαρόζης στα οποία έχει ακινητοποιηθεί πρωτεΐνη G (Protein G Immobilized on highly cross-linked agarose, Sigma). Η πρωτεΐνη G (M.B.:30 kDa) αποτελεί συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος ορισμένων στελεχών των β-αιμολυτικών *Streptococci* και εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τις ανοσοσφαιρίνες IgG, τις οποίες δεσμεύει μέσω του Fc τμήματός τους (Akerstrom and Bjorck, 1986; Akerstrom et al., 1985). Η ακινητοποιημένη πρωτεΐνη G στα σφαιρίδια αγαρόζης είναι γενετικά τροποποιημένη ώστε να παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για τις IgGs, αλλά και για Fab τμήματα.

Χρησιμοποιείται στήλη με πρωτεΐνη G και η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Συνδέεται (η στήλη) στο σύστημα FPLC.
2. Ξεπλένεται με δύο έως τρεις όγκους νερό και 50mM Na₄PO₃.
3. Εισαγωγή του δείγματος φιλτραρισμένο με φίλτρα διάμετρου πόρων 0.45μm και 0.22μm.

4. Αφού περάσει όλο το δείγμα από τη στήλη το Fab εκλύεται με 0.1M γλυκίνη με pH 2.7.
5. Όταν παρατηρηθεί αύξηση της απορρόφησης στα 280nm τότε το Fab63 απομακρύνεται απ' τη στήλη.
6. Τα κλάσματα συλλέγονται προσθέτοντας 1M Tris pH 9 σε τελικό όγκο 10%, για να εξουδετερωθεί το όξινο pH της γλυκίνης και να μη προκληθεί αποικοδόμηση της πρωτεΐνης.
7. Η στήλη ξεπλένεται με δύο έως τρεις όγκους 0.1M Tris pH 8, νερό και 20% αιθανόλη. Φυλάσσεται καλά κλεισμένη στους 4°C.
8. Το δείγμα επωάζεται όλη νύχτα σε μεμβράνη διαπίδυσης σε 2l 1xPBS, στους 4°C με ταυτόχρονη ανάδευση, για την αλλαγή του διαλύματος Tris και γλυκίνης σε PBS.
9. Έλεγχος pH του δείγματος, το οποίο πρέπει να είναι 7.

3.2.4. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης φωτομετρικά.

Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών να απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή με μέγιστο στα 280 nm, λόγω της παρουσίας των αρωματικών αμινοξέων τυροσίνης και κυρίως τρυπτοφάνης. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι πως κατά τη μέτρηση το πρωτεϊνικό παρασκεύασμα δεν καταστρέφεται ενώ το μειονέκτημα της είναι η χαμηλή εξειδίκευση και ακρίβεια καθώς στα 280 nm απορροφούν και άλλες ουσίες εκτός από τις πρωτεΐνες. [Δ.Α. Κυριακίδης, 2000]

Μετά τη συλλογή του Fab63 από τη μεμβράνη διαπίδυσης μετράται η απορρόφηση του στα 280nm για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του Fab σύμφωνα με το νόμο απορρόφησης των Lambert - Beer $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ (όπου A η απορρόφηση, ϵ η μοριακή απορροφητικότητα της ουσίας, b το μήκος της διαδρομής της ακτινοβολίας στο διάλυμα και c η συγκέντρωση της ουσίας που αναλύεται) [Στυλιανός Λιοδάκης, 2001]. Είναι γνωστό ότι ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του Fab είναι 1.526ml/cm·mg, ο οποίος έχει υπολογιστεί με βάση την αλληλουχία του Fab.

Η επιτυχία του καθαρισμού ελέγχεται με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση.

3.2.5. Ηλεκτροφόρηση.

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε SDS-PAGE χρησιμοποιείται για τον έλεγχο καθαρότητας διάφορων παρασκευασμάτων, τον χαρακτηρισμό υπομονάδων μιας πρωτεΐνης και την εύρεση μοριακών βαρών πρωτεϊνικών αλυσίδων. Οι πρωτεΐνες σε SDS-PAGE διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό βάρος και το φορτίο τους. Οι πρωτεΐνες σε μια τέτοια πηκτή αποδιατάσσονται υιοθετώντας την πρωτοταγή δομή τους, ενώ παράλληλα η αρνητικά φορτισμένη ομάδα του SDS δεσμεύεται στις κύριες αλυσίδες σε αναλογία ενός

μορίου SDS ανά δύο αμινοξέα, που δίνει στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιαταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο αρνητικό φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης. Έτσι όλες οι πρωτεΐνες υπό την επίδραση του SDS μετακινούνται προς το θετικό πόλο όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο, με τον ίδιο ρυθμό ανεξάρτητα από το μέγεθός τους. Επομένως, πρέπει να επιλεγθεί ένα περιβάλλον που θα επιτρέψει σε πρωτεΐνες διαφορετικού μεγέθους να κινηθούν με διαφορετικό τρόπο. Το μέσο που επιλέγεται είναι το πολυακρυλαμίδιο. Στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο για να μετακινηθούν οι πρωτεΐνες, αντιστρόφως ανάλογα με τη μάζα τους. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος γρήγορη, ευαίσθητη και έχει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα. [Δ.Α. Κυριακίδης, 2000]

Η προετοιμασία των προς ανάλυση δειγμάτων περιλαμβάνει την αραιώσή τους σε διάλυμα "φόρτωσης" δείγματος (loading buffer), που περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη και το βρασμό τους σε υδατόλουτρο στους 100°C για 3 min. Οι συνθήκες αυτές είναι αποδιατακτικές για τις πρωτεΐνες καθώς, ο βρασμός και η παρουσία του SDS καταστρέφουν τους ασθενείς δεσμούς (δεσμούς υδρογόνου, ιοντικούς, υδρόφοβους, van der Waals) ενώ η παρουσία της β-μερκαπτοαιθανόλης (αναγωγικό μέσο) έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή των ισχυρών ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα, γίνεται ανάλυση μείγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (electrode buffer) με ρεύμα σταθερής τάσης 200 V σε θερμοκρασία δωματίου. Οι ζώνες των πρωτεϊνών εμφανίζονται μετά από κατάλληλη χρώση (Coomassie) του πηκτώματος και στη συνέχεια αποχρωματισμό του.

Χρώση Coomassie.

- Επώαση του διαλύματος στο διάλυμα χρώσης (stain solution) για 30 min στους 37°C.
- Αποχρωματισμός του πηκτώματος με επανειλημμένες πλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού (destain solution) έως ότου να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής.

Το δείγμα ηλεκτροφορείται σε 12% SDS page, για την πιστοποίηση της καθαρότητας του προϊόντος καθώς και την εκτίμηση της συγκέντρωσης, ανάλογα με την ένταση των ζωνών, και της δομής του Fab63, με βάση την εμφάνιση δύο ζωνών στο SDS page οι οποίες αντιστοιχούν στις δύο αλυσίδες του Fab.

3.2.6. Ανοσοαποτύπωση κατά Western του κλάσματος Fab63 (Western blotting)

Οι πρωτεΐνες, μετά το διαχωρισμό τους στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρονται σε σταθερή επιφάνεια (μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή νάυλον), όπου είναι δυνατή η επεξεργασία για το χαρακτηρισμό τους. Για να πραγματοποιηθεί η μεταφορά, το πήκτωμα έρχεται σε επαφή με τη μεμβράνη και κάθετα προς την επιφάνειά τους διαβιβάζεται ηλεκτρικό ρεύμα (Burnette, 1981). Ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών στη συνέχεια γίνεται με τη βοήθεια αντισωμάτων εξαιτίας της μεγάλης τους ειδικότητας. Το πρώτο αντίσωμα που χρησιμοποιείται είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που εξετάζεται. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης αντισώματος ανιχνεύεται από ένα δεύτερο αντίσωμα, ειδικό για το πρώτο, που φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένο ένα ένζυμο. Μετά την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος το ένζυμο καταλύει μια αντίδραση που δίνει ένα έγχρωμο προϊόν, με αποτέλεσμα να γίνεται ορατή η ζώνη της πρωτεΐνης.

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

α. Μεταφορά των πρωτεϊνών

Η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη πραγματοποιείται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (transfer buffer) με $pH \geq 8,3$. Σε αυτή την τιμή pH οι πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό φορτίο και μετακινούνται μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο προς το θετικό πόλο. Η μεταφορά πραγματοποιείται ως εξής:

- 1.** Εμβάπτιση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (Hybond-C, Amersham) και δύο τμημάτων απορροφητικού χαρτιού Whatmann 3MM, που έχουν κοπεί σε μέγεθος λίγο μεγαλύτερο του πηκτώματος, στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς.
- 2.** Τοποθέτηση στην πλευρά της συσκευής όπου θα εφαρμοσθεί ο αρνητικός πόλος των ακόλουθων κατά σειρά: απορροφητικό χαρτί Whatmann 3MM, πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, απορροφητικό χαρτί Whatmann 3MM και τέλος, η πλευρά της συσκευής, όπου θα εφαρμοσθεί ο θετικός πόλος. Η τοποθέτηση γίνεται προσεκτικά, ώστε να μην εγκλωβιστούν φυσαλίδες αέρα που θα εμποδίσουν τη μεταφορά.
- 3.** Μεταφορά των πρωτεϊνών με ρεύμα σταθερής έντασης 300 mA για 1 h στους 4°C (ο χρόνος μεταφοράς ισχύει για μικρό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου).
- 4.** Χρώση της μεμβράνης, μετά τη μεταφορά, με διάλυμα Ponceau (βάφει μη ειδικά όλες τις πρωτεΐνες) για περίπου 1 min και κατόπιν πλύση με ddH₂O προς απομάκρυνση της περίσσειας της χρωστικής. Οι ζώνες των πρωτεϊνών καθίστανται ορατές και

ελέγχεται έτσι η επιτυχία της μεταφοράς. Παράλληλα, αριθμούνται επάνω στην νιτροκυτταρίνη οι διαδρομές των δειγμάτων και απομακρύνεται με νυστέρι η διαδρομή του μείγματος πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες. Ας σημειωθεί ότι αν οι μάρτυρες είναι ήδη χρωματισμένοι (pre-stained markers), η απομάκρυνση της αντίστοιχης διαδρομής από τη μεμβράνη πρέπει να πραγματοποιηθεί πριν τη χρώση με Ponceau. Ο αποχρωματισμός της μεμβράνης γίνεται με επανειλημμένες πλύσεις σε διάλυμα PBS.

β. Ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών

Για την ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών, χρησιμοποιείται αντίσωμα συζευγμένο με ένζυμο (ραφανιδική υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση) το οποίο καταλύει την αντίδραση κατάλληλου υποστρώματος οδηγώντας στην παραγωγή έγχρωμου προϊόντος. Τα στάδια που ακολουθούνται μετά τον αποχρωματισμό της μεμβράνης είναι τα εξής:

1. Κορεσμός (blocking) των ελεύθερων για πρόσδεση θέσεων της μεμβράνης με επώαση υπό ανάδευση σε διάλυμα PBS-3% κ.β. λυοφιλιωμένο γάλα για 30 min στους 37⁰C.
2. Επώαση της νιτροκυτταρίνης με το πρώτο αντίσωμα, αραιωμένο σε διάλυμα PBS-3% κ.β. λυοφιλιωμένο γάλα, για περίπου 16 h στους 4⁰C ή για 1 h στους 37⁰C υπό συνεχή ανάδευση. Η συγκέντρωση του πρώτου αντισώματος και ο χρόνος επώασης εξαρτώνται από το σύστημα ανιχνευόμενης πρωτεΐνης-ειδικού αντισώματος.
3. Πλύσεις με PBS-3% κ.β. λυοφιλιωμένο γάλα τρεις φορές, διάρκειας περίπου 10 min η καθεμία.
4. Επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα, σε αραιώση 1:1000 ή 1:500 σε διάλυμα PBS-3% κ.β. λυοφιλιωμένο γάλα, για 1 h στους 37⁰C υπό συνεχή ανάδευση. Το δεύτερο αντίσωμα είναι ειδικό για το πρώτο αντίσωμα.
5. Πλύσεις με PBS-3% κ.β. λυοφιλιωμένο γάλα τρεις φορές, διάρκειας περίπου 10 min η καθεμία.
6. Εμφάνιση.

3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ Fab63 ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΜΕ ΤΟ ΦΥΣΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ Her2/neu.

3.3.1. Παρασκευή μεμβρανικού εκχυλίσματος και διαλυτού υποδοχέα Her2/neu από την κυτταρική σειρά SKBR3.

Η εκχύλιση μεμβρανικών υποδοχέων από διάφορες πηγές (κύτταρα ή ιστούς), επιτυγχάνεται με την επίδραση μη ιοντικών απορρυπαντικών, όπως είναι το Triton X-100 (Porot and Changeux, 1984).

ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Η καρκινική κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε είναι η SKBR3. Τα SKBR3 κύτταρα προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος μαστού και υπερεκφράζουν τον ErbB2 υποδοχέα.

Τα κύτταρα φυλάσσονται σε υγρό N₂ με θρεπτικό υλικό RPMI-1640-complete medium και 5% DMSO (το θρεπτικό υλικό RPMI-1640-complete medium στα 50ml περιέχει: 44ml RPMI-1640, 5ml FSB, 0.5ml 1% πενικιλίνη/ στρεπτομυκίνη, 0.5ml 1% L-γλουταμίνη).

- Για να χρησιμοποιηθούν ξεπαγώνονται σε υδατόλουτρο στους 37⁰C.
- Πλύση για να αφαιρεθεί το DMSO προσθέτοντας 4-5ml RPMI-1640-complete medium.
- Φυγοκέντρηση στις 1200rpm, στους 4⁰C για 15min.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Στο ίζημα προστίθεται 1ml RPMI-complete medium επαναδιαλύοντας τα κύτταρα.
- Εισαγωγή σε φιάλη T25 μαζί με 5ml RPMI-complete medium. Οι συνθήκες επώασής τους είναι στους 37⁰C, σε 5% CO₂ και 95% ατμοσφαιρικού αέρα.

Το θρεπτικό υλικό αλλάζεται απομακρύνοντας το υπάρχον και προσθέτοντας άλλα 5ml RPMI-complete medium κάθε μέρα έως ότου τα κύτταρα μεγαλώσουν τόσο ώστε να καλύπτουν την επιφάνεια του πάτου της φιάλης. Τότε μεταφέρονται σε μία φιάλη T75 ή σε δύο T25. Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

- Απ' τη φιάλη με την καλλιέργεια απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό
- Προσθήκη 5ml 1xPBS αν η φιάλη με την καλλιέργεια είναι T25 και 15ml 1xPBS αν είναι T75.
- Ανάδευση φιάλης για να πλυθούν τα κύτταρα
- Απομάκρυνση PBS.
- Προσθήκη τρυψίνης, για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα από τη φλάσκα, 1ml και 3ml σε φιάλες T25 και T75 αντίστοιχα. Τα κύτταρα επώάζονται στους 37⁰C 3-4min.
- Η φιάλη αναταράσσεται δυνατά για να ξεκολλήσουν καλά τα κύτταρα.
- Άμεση προσθήκη RPMI-complete medium για να σταματήσει η δράση της τρυψίνης.
- Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 1200rpm, στους 4⁰C για 5min.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Προσθήκη 1ml RPMI-complete medium επαναδιαλύοντας το ίζημα.

- Το διάλυμα εισάγεται σε καινούρια φιάλη μαζί με θρεπτικό υλικό.

Για την ψύξη των κυττάρων αραιώνεται το διάλυμα (κύτταρα συν θρεπτικό υλικό) με θρεπτικό υλικό τόσο ώστε η συγκέντρωση του να είναι 10^6 κύτταρα/ml. Στη συνέχεια, προστίθεται freezing agent (10% FSB, 10% DMSO) 5% για κύτταρα SKBR3 και 10% για MDA-MB-453. Τοποθετούνται για μία ημέρα στους -80°C και τέλος στο υγρό N_2 .

Για να γίνει η εκχύλιση του ανθρώπινου υποδοχέα ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Αφαιρείται το υλικό καλλιέργειας και το στρώμα των κυττάρων στα τρυβλία πλένεται με 10 mM Na_3PO_4 100 mM NaCl pH 7,5 και τα κύτταρα συλλέγονται σε διάλυμα **ομογενοποίησης A**.
2. Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται σε 6.000xg για 10' και το ίζημα αναδιαλύεται σε 2-4 ml ρυθμιστικού διαλύματος **ομογενοποίησης B**.
3. Για την ομογενοποίηση των κυττάρων χρησιμοποιείται ομογενοποιητής χειρός Kontes.
4. Ακολουθεί επώαση υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C για 1 h.
5. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται σε 100.000xg για 30 λεπτά. Στο υπερκείμενο, στο οποίο περιέχονται οι διαλυτοποιημένοι υποδοχείς, γίνεται προσθήκη γλυκερόλης 10% κ.ο. και φυλάσσεται στους -80°C .

Ο βιοχημικός και λειτουργικός έλεγχος του φυσικού Her2/neu υποδοχέα, πραγματοποιείται με δοκιμασία Sandwich ELISA που περιγράφονται παρακάτω.

3.3.2. Sandwich ELISA

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της πρόσδεσης του ανθρώπινου Fab τμημάτων στον υποδοχέα Her2/neu. Αρχικά στις πλάκες μικροτιτλοδότησης προσροφήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα **TAB250** σε συγκέντρωση 0.5μg/ml για να ακινητοποιηθεί ο ανέπαφος υποδοχέας στην πλάκα. Ακολούθησε πλύση των φρεατίων 3 φορές με διάλυμα PBS και προσθήκη σε κάθε φρεάτιο ισομοριακής ποσότητας υποδοχέα και επώαση στους 4°C για ~16h. Ακολουθούν τα στάδια της κλασικής τεχνικής ELISA όπως αυτά περιγράφονται παραπάνω στην παράγραφο 3.2.2.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ

4.1.1. Έλεγχος μολύνσεων.

Όπως αναφέρθηκε μέρος του δείγματος των βακτηριακών κυττάρων, που έχουν υποστεί επεξεργασία για τη μετατροπή τους σε επιδεκτικά κύτταρα, επιστρώθηκε σε τριβλία LB/agar με τετρακυκλίνη και αμπικιλίνη. Επειδή τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη αποικίες θα πρέπει να εμφανιστούν μόνο στο τριβλίο με την τετρακυκλίνη. Πράγματι, παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών μόνο στο τριβλίο με την τετρακυκλίνη, ενώ στο τριβλίο με την αμπικιλίνη δεν υπήρχαν αποικίες, γεγονός που επιβεβαιώνει πως δεν υπάρχουν μολύνσεις στο δείγμα μας.

4.1.2. Έλεγχος διαπερατότητας.

Τα βακτηριακά κύτταρα με απόδοση μετασχηματισμού της τάξης 10^9 αποικίες/μg DNA, θεωρείται ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μετασχηματισμό με πλασμιδικό DNA. Μετά την διαδικασία της ηλεκτροδιάτασης των βακτηριακών κυττάρων με το πλασμίδιο PBR322 ή pBluescript και την επώαση των μετασχηματισμένων κυττάρων γίνεται καταμέτρηση των αποικιών που εμφανίζονται σε τριβλίο LB/agar με αμπικιλίνη στις διάφορες συγκεντρώσεις του προϊόντος μετασχηματισμού. Η καταμέτρηση των αποικιών γίνεται στο τριβλίο όπου έχει επιστρωθεί το προϊόν του μετασχηματισμού με συγκέντρωση 0.1ng/μl. Έτσι, ο αριθμός των αποικιών που μετρήθηκε σ' αυτήν την αραιώση ήταν 110, οπότε η συγκέντρωση των αποικιών ανά ml ήταν 1.1×10^7 , οι οποίες αντιστοιχούν σε 0.01μg DNA. Η τελική συγκέντρωση υπολογίζεται ίση με 1.1×10^9 αποικίες/μg DNA. Ο έλεγχος αυτός έδειξε ότι τα βακτήρια είναι αρκετά επιδεκτικά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εισαγωγή του πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί το Fab63.

4.1.3. Μετασχηματισμός με το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο του Fab63.

Τα κύτταρα με την απαιτούμενη διαπερατότητα χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή του πλασμιδίου που φέρει το cDNA που κωδικοποιεί το Fab63 καθώς και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καρμπενικιλίνη. Μετά την ηλεκτροδιάταση (electroporation) των βακτηριακών κυττάρων, την εισαγωγή του πλασμιδίου και την

επώαση των μετασχηματισμένων κυττάρων τα κύτταρα επιστρώνονται σε τριβλία LB/agar με καρμπενικιλίνη. Οι αποικίες που εμφανίζονται στο τριβλίο με την καρμπενικιλίνη, πιστοποιούν ότι τα βακτηριακά κύτταρα εμπεριέχουν το πλασμίδιο που προσδίδει την ανθεκτικότητα στην καρμπενικιλίνη με το οποίο μετασχηματίστηκαν.

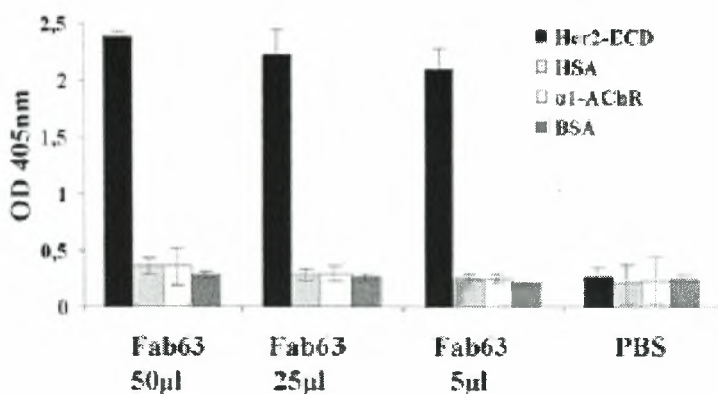
4.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ Fab63

4.2.1. Έκφραση του Fab63 σε μεγάλη κλίμακα.

Ο κλώνος των μετασχηματισμένων βακτηρίων που έφερε το πλασμίδιο που κωδικοποιεί για το Fab63, καλλιεργήθηκε σε 500ml θρεπτικού υλικού, όπως περιγράφεται στις μεθόδους. Μετά την επαγωγή της έκφρασης του Fab63 με IPTG στη βακτηριακή καλλιέργεια για 16 h στους 30°C, έγινε η λύση των βακτηριακών κυττάρων και η απελευθέρωση του διαλυτού Fab63 τμήματος από τον περιπλασμικό χώρο, χρησιμοποιώντας απότομες εναλλαγές θερμοκρασίας, όπως περιγράφεται στις μεθόδους. Το υπερκείμενο της βακτηριακής λύσης κάθε παραγωγής, ελέγχθηκε για την παρουσία Fab63 τμήματος του αντισώματος και την πιστοποίηση της επιτυχούς έκφρασης της πρωτεΐνης με δοκιμασία ELISA.

4.2.2. Έλεγχος της ειδικότητας του Fab63 ως προς την συγγένεια με το Her2/neu-ECD.

Ο έλεγχος της ειδικότητας του Fab63 ως προς το αντιγόνο Her2/neu-ECD πραγματοποιήθηκε με δοκιμασία ELISA όπως περιγράφηκε στις μεθόδους. Χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε φρεάτιο της πλάκας ELISA 0.1μg από τα παρακάτω αντιγόνα: Her2/neu-ECD, ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (HSA), α1-ECD του ανθρώπινου υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (AChR) (Psaridi-Linardaki et al., 2002), όλα εκφρασμένα στη *P.pastoris* και αλβουμίνη από ορό βοδιού (BSA). Η ειδικότητα του Fab63 που εκφράστηκε στα βακτήρια ελέγχθηκε σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις χρησιμοποιώντας 50, 25 και 5μl από το περιπλασμικό εκχύλισμα των βακτηρίων. Η ανίχνευση των Fab έγινε χρησιμοποιώντας αντίσωμα κατσίκας έναντι ανθρώπινης IgG(F(ab')₂ συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση και προσθέτοντας το ανάλογο υπόστρωμα του ενζύμου. Όπως βλέπουμε στο διάγραμμα της Εικόνας 1, το Fab63 εμφάνισε υψηλή πρόσδεση, σε όλες τις συγκεντρώσεις, μόνο για το Her2/neu-ECD αντιγόνο αποδεικνύοντας την ειδικότητά του ως προς το αντιγόνο αυτό.



Εικόνα 1. Η ειδικότητα του Fab63 στο HER2/neu-ECD. Διαφορετικές ποσότητες του προϊόντος της λύσης των βακτηριακών κυττάρων που περιέχει Fab63 ελέγχεται με τη δοκιμασία της ELISA για την πρόσδεσή του σε διάφορα αντιγόνα. Το Fab63 αναγνωρίζει ειδικά το ανασυνδυασμένο αντιγόνο HER2/neu-ECD.

4.2.3. Καθαρισμός του Fab63

Η πρωτεΐνη G χρησιμοποιείται ευρέως για τον καθαρισμό των διάφορων ανοσοσφαιρινών. Παράλληλα έχει δειχθεί ότι μπορεί να δεσμεύσει και Fab τμήματα ανοσοσφαιρινών. Για την πρόσδεση του Fab στην πρωτεΐνη G το δείγμα πρέπει προηγουμένως να αφαλατωθεί.

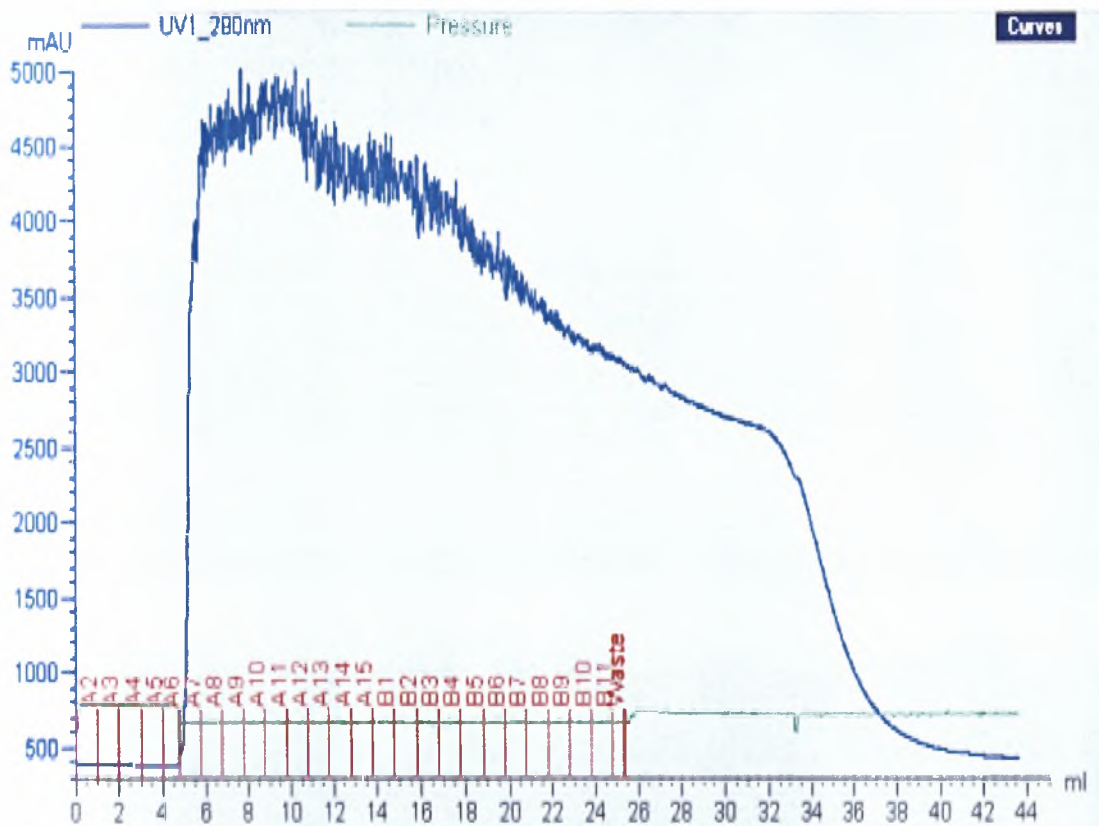
Για τον καθαρισμό του Fab63 η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Α) χρωματογραφία μοριακής διήθησης για αφαλάτωση του δείγματος, Β) ανάλυση των κλασμάτων με σημειακή ανοσοαποτύπωση για να διαπιστωθεί σε ποια κλάσματα εκλύεται το Fab63 και Γ) χρωματογραφία συγγένειας.

4.2.3.α. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης για αφαλάτωση του δείγματος.

Μετά τη βακτηριακή λύση κάθε παραγωγής χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη Sephadex G-25 (HiTrap Desalting, Amersham), για την αφαλάτωση του δείγματος. Η Sephadex G-25 χρησιμοποιείται επίσης για διαχωρισμό πρωτεϊνών πολύ μικρού μοριακού βάρους (<5 KDa).

Κατά τη διέλευση του δείγματος από το σύστημα FPLC (AKTA) μετράται η απορρόφηση του δείγματος που εξέρχεται από τη στήλη σε συνάρτηση με τον χρόνο διέλευσης. Κατά την έκλυση των πρωτεϊνών από τη στήλη Sephadex G-25 αρχικά εκλύονται όλες οι πρωτεΐνες άνω των 5 KDa και στη συνέχεια, εκλύονται πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους και τέλος, ακολουθεί η έκλυση διάφορων αλάτων (όπου η απορρόφηση πέφτει κατακόρυφα). Η έκλυση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με ρυθμιστικό διάλυμα

φωσφορικού νατρίου (αναφέρεται στις μεθόδους). Το χρωματογράφημα της έκλουσης των πρωτεϊνών από την κολώνα Sephadex G-25 φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 2. Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης. Παρατίθενται αριθμημένα τα δείγματα, ενός ml το καθένα, που συλλέγονται, δηλαδή A1, A2, A3, ..., A15, B1, ..., B11, σε συνάρτηση με την απορρόφηση των πρωτεϊνών κατά την εκλούσή τους από τη στήλη Sephadex G-25.

Κλάσματα 1ml συλλέγονται από την έκλουση των πρωτεϊνών κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης τα οποία παρατίθενται στο χρωματογράφημα αριθμημένα, δηλαδή A1, A2, A3, ..., A15, B1, ..., B11. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση των κλασμάτων με σημειακή ανοσοαποτύπωση για να διαπιστωθεί σε ποια κλάσματα εκλούεται το Fab63.

4.2.3.β. Ανοσοαποτύπωση υπό κενό (Dot blotting).

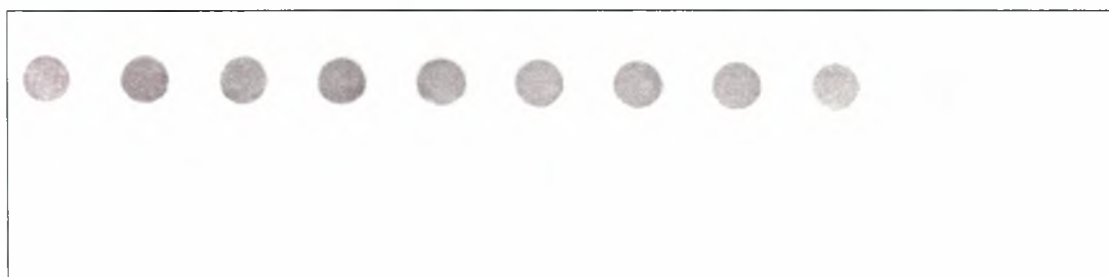
Η μέθοδος της σημειακής ανοσοαποτύπωσης διεξάχθηκε για τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από την χρωματογραφία μοριακής διήθησης, δηλαδή τα A6, A7, ..., A15, B1, ... και B11, για να πιστοποιήσουμε σε ποια από αυτά εκλούεται το Fab63. Δείγματα πρωτεΐνης από τα διάφορα κλάσματα δεσμεύονται υπό κενό σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιώντας την ειδική συσκευή. Για

την ανίχνευση του Fab63 χρησιμοποιήθηκαν α) το αντίσωμα κατσίκας έναντι ανθρώπινης IgG(F(ab')₂), το οποίο αναγνωρίζει την ελαφριά αλυσίδα των ανθρώπινων Ig, β) ένα πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι ανοσοσφαιρίνης κατσίκας συζευγμένο με υπεροξειδάση και γ) DAB ως υπόστρωμα του ενζύμου της υπεροξειδάσης. Η σειρά των δειγμάτων που φορτώθηκαν στη συσκευή που χρησιμοποιείται για τη σημειακή ανοσοαποτύπωση φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα:

A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
B11									

Πίνακας 1. Παρατίθεται η σειρά με την οποία φορτώθηκαν τα δείγματα στη συσκευή που χρησιμοποιείται για τη σημειακή ανοσοαποτύπωση.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



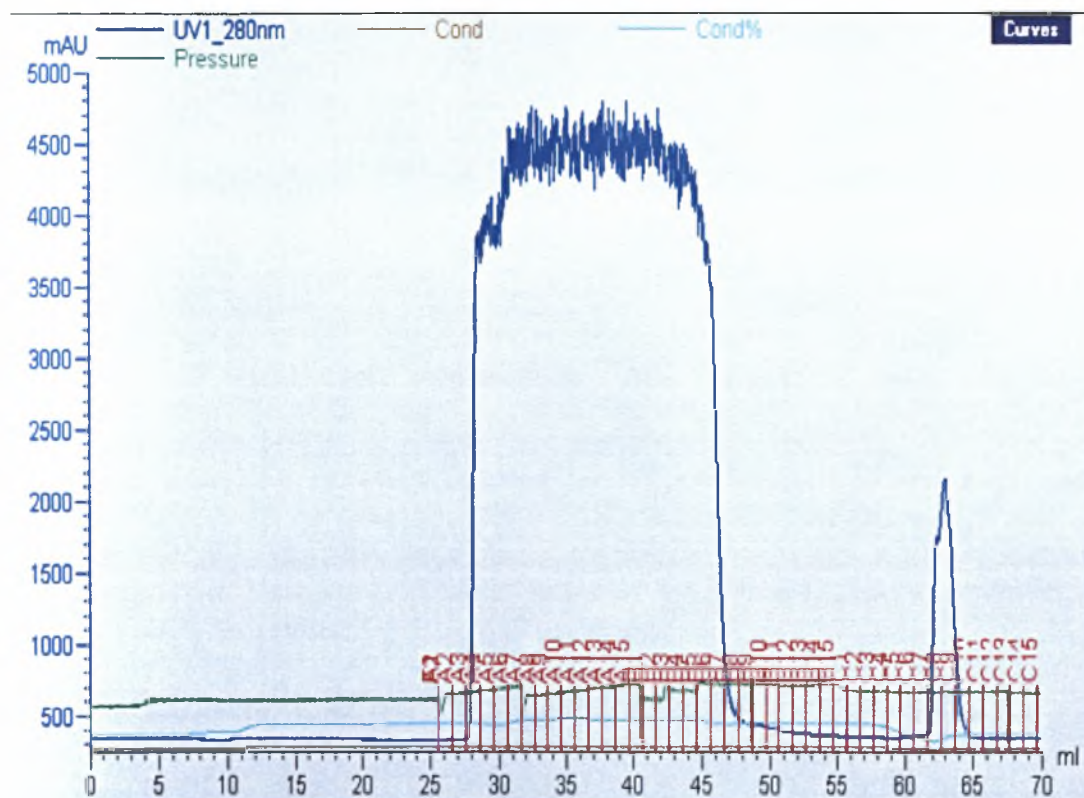
Εικόνα 3. Αποτελέσματα σημειακής ανοσοαποτύπωσης κλασμάτων χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Τα δείγματα φορτώθηκαν με τη σειρά που παρουσιάστηκε στον πίνακα 2, άρα η πρώτη κουκίδα αντιστοιχεί στο A6, η δεύτερη στο A7 κ.ο.κ. Σημειώνεται ότι στα πρώτα δείγματα η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι πολύ υψηλή (A6, A7, A8, A9) και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά ώσπου να μηδενιστεί (από το B1 και μετά).

Διαπιστώθηκε η παρουσία του Fab63 στα δέκα πρώτα δείγματα, όπου εμφανίζεται το σκούρο χρώμα. Στα τέσσερα πρώτα, δηλαδή τα δείγματα A6, A7, A8 και A9, η ένταση της σήμανσης είναι πολύ μεγάλη γεγονός που υποδηλώνει την υψηλή συγκέντρωση του Fab63 σ' αυτά. Στα επόμενα τέσσερα, τα A10, A11, A12, A13, η σήμανση είναι ελαφρώς μειωμένη, πράγμα που σημαίνει ότι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης αρχίζει να μειώνεται. Στο δείγμα A14 υπάρχει ακόμη μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης, ενώ στο A15 η εξασθένηση της σήμανσης είναι φανερή. Μετά το δείγμα B1 δεν παρατηρείται κανένα ίχνος σήμανσης οπότε στα δείγματα που έπονται του B1 δεν ανιχνεύεται Fab63.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι τα δείγματα όπου υπάρχει αρκετή συγκέντρωση Fab63 είναι αυτά που υπάρχουν στο πρώτο τμήμα της καμπύλης απορρόφησης.

4.2.3.γ. Χρωματογραφία συγγένειας.

Για την απομόνωση του Fab63 από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του δείγματος χρησιμοποιείται η χρωματογραφία συγγένειας με HiTrap Protein G (Amersham). Το δείγμα που εισάγεται στη στήλη είναι 10ml και έχει προκύψει από συλλογή των κλασμάτων που παρουσίασαν σήμανση κατά την ανάλυση της σημειακής ανοσοαποτύπωσης. Κατά τη διέλευση του δείγματος από τη στήλη το Fab63 προσδένεται ισχυρά στη στήλη γιατί έχει υψηλή συγγένεια με την πρωτεΐνη G. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες του δείγματος επειδή δεν παρουσιάζουν συγγένεια με την πρωτεΐνη G εκκλύονται από τη στήλη με ρυθμιστικό διάλυμα 20mM φωσφορικού νατρίου, pH 7.0. Αφού ολοκληρωθεί η έκλυση των μη προσδεμένων πρωτεϊνών, γεγονός που αντιστοιχεί σε μείωση της απορρόφησης στο χρωματογράφημα, ακολουθεί η έκλυση του Fab63 η οποία επιτυγχάνεται με την προσθήκη γλυκίνης (pH 2.7), οποία βοηθά στη διάρρηξη του δεσμού Fab-G πρωτεΐνης. Η έκλυση του Fab στο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στη δεύτερη κορυφή. Το χρωματογράφημα συγγένειας ακολουθεί.



Εικόνα 4. Διάγραμμα απορρόφησης χρωματογραφίας συγγένειας. Η χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε σε στήλη με πρωτεΐνη G. Κατά την

απομάκρυνση του δείγματος από τη στήλη το σύστημα του FPLC μετρά την απορρόφηση του δείγματος (μπλε γραμμή) σε συνάρτηση με την ποσότητα, δηλαδή τα ml που περνούν. Επίσης, παρατίθενται αριθμημένα τα δείγματα, ενός ml το καθένα, που συλλέγονται. Στο πρώτο τμήμα της καμπύλης παρατηρείται κατακόρυφη αύξηση της απορρόφησης και η διατήρησή της σε ένα πλατό. Στο δεύτερο τμήμα της καμπύλης η απορρόφηση πέφτει κατακόρυφα, λόγω της απομάκρυνσης απ' την κολώνα των πρωτεϊνών που δεν παρουσιάζουν χημική συγγένεια με την πρωτεΐνη G. Στο τελευταίο τμήμα της καμπύλης εμφανίζεται μια νέα κορυφή η οποία αντιστοιχεί στην απορρόφηση του Fab63 μετά την έκλυση του από τη στήλη.

Στο παραπάνω χρωματογράφημα φαίνεται στο πρώτο τμήμα αύξηση της απορρόφησης που αντιστοιχεί σε κλάσματα όπου περιέχονται οι πρωτεΐνες οι οποίες δεν παρουσιάζουν χημική συγγένεια με την πρωτεΐνη G της στήλης. Το δεύτερο τμήμα είναι αυτό κατά το οποίο οι πρωτεΐνες του δείγματος που δεν έχουν προσδεθεί στην πρωτεΐνη G έχουν ήδη απομακρυνθεί από τη στήλη και η απορρόφηση έχει μειωθεί κατακόρυφα. Σ' αυτό το σημείο γίνεται η προσθήκη της γλυκίνης pH 2.7 για την έκλυση του Fab63 από τη στήλη. Το τρίτο τμήμα είναι το διάστημα όπου πραγματοποιείται η έκλυση της κολώνας μετά τη δράση του χαμηλού pH της γλυκίνης οπότε και αποδεσμεύεται το Fab63 από την πρωτεΐνη G και απομακρύνεται από την κολώνα προκαλώντας αύξηση της απορρόφησης η οποία εμφανίζεται σε δεύτερη κορυφή.

Περιοχή διαγράμματος	Αρίθμηση δειγμάτων	Περιεκτικότητα δειγμάτων
1 ^ο τμήμα	A3-B7	Πρωτεΐνες χωρίς χημική συγγένεια στην πρωτεΐνη G
2 ^ο τμήμα	B8-C6	Μόνο διαλύματα που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια του FPLC
3 ^ο τμήμα	C7-C10	Fab63

Πίνακας 2. Αναλυτική παρουσίαση των τμημάτων της καμπύλης απορρόφησης. Σε κάθε τμήμα της καμπύλης αναφέρεται η αντίστοιχη περιοχή των αριθμημένων δειγμάτων καθώς και η περιεκτικότητά τους.

Τα κλάσματα με το εκλουόμενο Fab63 εξουδετερώθηκαν αμέσως με 1M Tris pH 9.0 και στη συνέχεια ελέγχθησαν όπως και προηγουμένως με σημειακή ανοσοαποτύπωση και στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE και ανάλυση κατά Western.

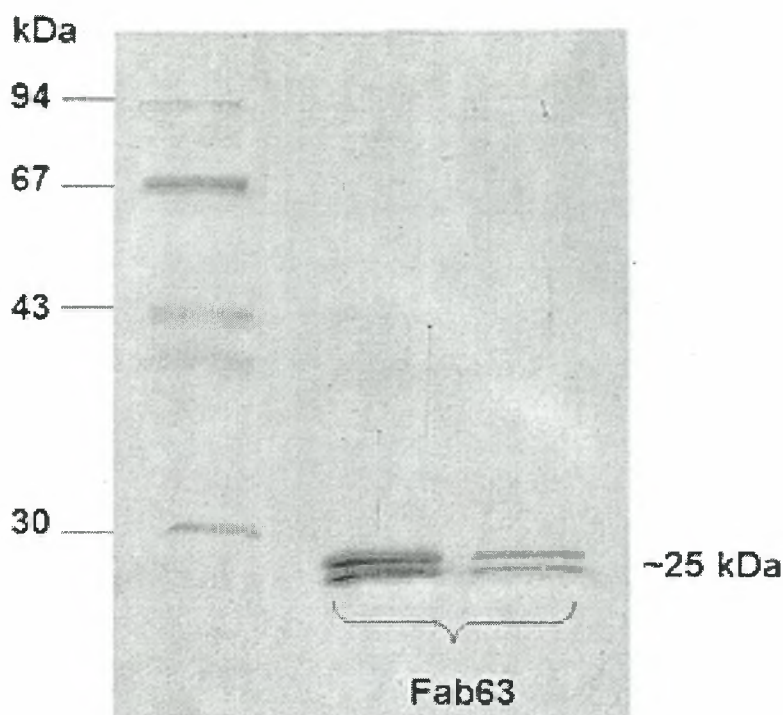
4.2.4. Ποσοτικός προσδιορισμός του Fab63.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του Fab63 έγινε με φασματοφωτομετρία. Η απορρόφηση στα 280 nm βρέθηκε να είναι ίση με 0.815. Γνωρίζοντας πως ο συντελεστής μοριακής

απορροφητικότητας του Fab63 είναι 1.526ml/cm·mg υπολογίστηκε η συγκέντρωση του Fab63 ίση με 0.534 mg/ml.

4.2.5. Ηλεκτροφόρηση Fab63.

Η ηλεκτροφόρηση του Fab63 σε SDS-PAGE 12% πραγματοποιείται για την πιστοποίηση της καθαρότητας του δείγματος. Από την ηλεκτροφόρηση παρατηρείται η παρουσία δύο ζωνών μοριακού βάρους ~25 kDa η καθεμία, στις διαδρομές που φορτώθηκε το Fab63. Οι ζώνες αυτές αντιστοιχούν στις δύο αλυσίδες του Fab, η υψηλότερη ζώνη αντιστοιχεί στο VHCH1 της βαριάς αλυσίδας, ενώ η χαμηλότερη στην L αλυσίδα του Fab63, η οποία είναι μικρότερου μεγέθους (Εικόνα 5). Το δείγμα που προέκυψε είναι απόλυτα καθαρό, αφού δεν εμφανίζεται άλλη ζώνη εκτός από τις αναμενόμενες, οπότε η απομόνωση του Fab63 έγινε επιτυχώς και δεν υπάρχει καμία άλλη πρωτεΐνη στο δείγμα. Τέλος, με την ηλεκτροφόρηση του Fab63 γίνεται δυνατή η εκτίμηση της συγκέντρωσής του. Είναι γνωστό ότι σε 1μl μάρτυρα μοριακού βάρους η ζώνη που αντιστοιχεί στα 30kDa είναι 0.1μg. Έτσι, μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση του Fab63, αντιστοιχίζοντας ανάλογα με την ποσότητα που φορτώνεται και την ένταση της ζώνης του μάρτυρα με αυτή του δείγματος. Όπως φαίνεται και στην ακόλουθη ηλεκτροφόρηση στο πρώτο πηγάδι φορτώθηκε 1μl μάρτυρα LMW (ο οποίος περιέχει πρωτεΐνες 30, 43, 67 και 94 kDa), στο δεύτερο 2μl δείγματος Fab63 και στο τρίτο 1μl δείγματος Fab63. Σύμφωνα με τα παραπάνω, στο 0.1μg της ζώνης των 30kDa του μάρτυρα του αντιστοιχούν 0.5μg δείγματος, δηλαδή ο υπολογισμός της συγκέντρωσης με το πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης επαληθεύει το αποτέλεσμα του φασματοφωτομετρικού υπολογισμού.

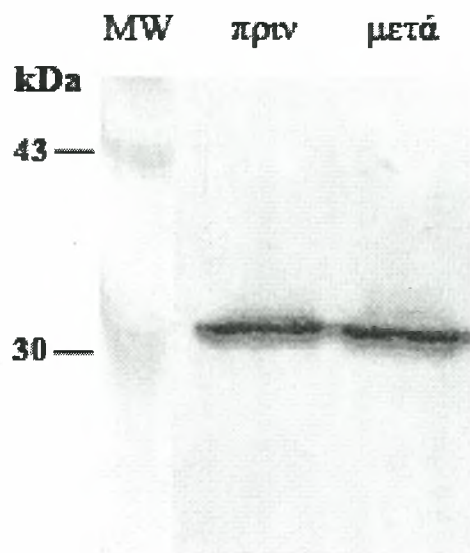


Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση Fab63 σε 12% SDS-PAGE. Η ηλεκτροφόρηση του Fab63 έγινε σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις 1μl και 2μl. Στο πρώτο πηγάδι φορτώθηκε 1μl μάρτυρα LMW, στο δεύτερο 2μl δείγματος Fab63 και στο τρίτο 1μl δείγματος Fab63. Εμφανίζονται δύο ζώνες περίπου 25 kDa η καθεμιά που αντιστοιχούν στις δύο αλυσίδες του Fab63. Επίσης, σημειώνεται ότι το δείγμα που φορτώθηκε δεν έχει προσμίξεις, αφού δεν εμφανίζονται άλλες ζώνες. Επίσης, υπολογίζεται η συγκέντρωση του Fab63, αντιστοιχίζοντας ανάλογα με την ποσότητα που φορτώνεται και την ένταση της ζώνης του μάρτυρα με αυτή του δείγματος. Υπολογίζεται ότι η ζώνη των 30 kDa του μάρτυρα είναι 0.1μg και η συγκέντρωση του δείγματος από το πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης υπολογίζεται στα 0.5μg/μl, γεγονός που επαληθεύει το αποτέλεσμα του φασματοφωτομετρικού υπολογισμού.

4.2.6. Ανοσοαποτύπωση κατά Western του Fab63.

Για τον έλεγχο του Fab63 στα εκλούσματα, πραγματοποιήθηκε επίσης ανοσοαποτύπωση κατά Western. Μετά την ηλεκτροφόρηση του Fab63 σε SDS-PAGE 12% οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε σταθερή επιφάνεια (μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή νάυλον), όπου είναι δυνατή η επεξεργασία για το χαρακτηρισμό τους.

Για την ανίχνευση του Fab63 χρησιμοποιήθηκαν α) το αντίσωμα κατσίκας έναντι ανθρώπινης IgG(F(ab')₂), το οποίο αναγνωρίζει την ελαφριά αλυσίδα των ανθρώπινων Ig, β) ένα πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι ανοσοσφαιρίνης κατσίκας συζευγμένο με υπεροξειδάση και γ) DAB ως υπόστρωμα του ενζύμου της υπεροξειδάσης. Στην εικόνα 6 παρατηρείται η ζώνη της ελαφριάς αλυσίδας του Fab, σε ύψος 25kDa, όπως αυτή ανιχνεύεται από το πρώτο αντίσωμα anti-IgG(F(ab')₂), το οποίο έχει παραχθεί κατά της ελαφριάς αλυσίδας του Fab τμήματος.



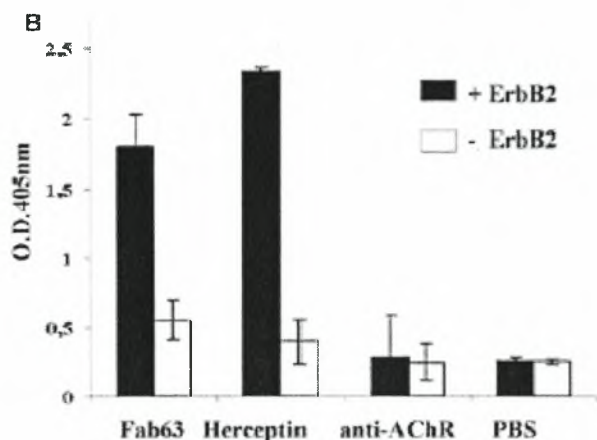
Εικόνα 6. Ανοσοαποτύπωση κατά Western. Στην πρώτη διαδρομή αποτυπώνεται ο μάρτυρας. Στη δεύτερη διαδρομή το Fab63 μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων. Τέλος, στην τρίτη διαδρομή το Fab63 μετά τον καθαρισμό του με τις μεθόδους της χρωματογραφίας. Αποτυπώνεται η ελαφριά αλυσίδα του Fab, σε ύψος 25kDa, όπως αυτή ανιχνεύεται από το πρώτο αντίσωμα anti-IgG(F(ab')₂), κατά της ελαφριάς αλυσίδας.

4.3. Έλεγχος της ειδικότητας του Fab63 ως προς τη συγγένεια με το φυσικό υποδοχέα Her2/neu.

Η ειδικότητα του Fab63 ως προς το Her2/neu-ECD δεν εξασφαλίζει την ειδικότητα του μορίου προς τον φυσικό υποδοχέα, καθώς το πρώτο είναι μία ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, εκφρασμένη σε ετερόλογο σύστημα με πιθανό διαφορετική γλυκοζυλίωση και δομή. Για τον έλεγχο της ειδικότητας του Fab63 ως προς το φυσικό υποδοχέα πραγματοποιήθηκε δοκιμασία Sandwich ELISA με καθαρισμένο Fab63.

Η δοκιμασία Sandwich ELISA πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στις μεθόδους, χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα TAB250, το οποίο αναγνωρίζει την εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα, για την ακινητοποίηση του σε πλάκες μικροτιτλοδότησης. Η παρασκευή μεμβρανικού εκχυλίσματος του διαλυτού υποδοχέα έγινε από την κυτταρική σειρά SKBR3, που υπερεκφάζει τη Her2/neu πρωτεΐνη, με τη διαδικασία που περιγράφεται στις μεθόδους. Το Fab63 προστέθηκε σε συγκέντρωση 250nM, ενώ το Herceptin ή το anti-AChR Fab χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί ή αρνητικοί μάρτυρες στα 10 ή 250nM, αντίστοιχα. Η ανίχνευση των Fab έγινε χρησιμοποιώντας αντίσωμα κατσίκας έναντι ανθρώπινης IgG(F(ab')₂) συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση και προσθέτοντας το ανάλογο υπόστρωμα του ενζύμου.

Η ανίχνευση του Fab63 και του Herceptin με ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει ανθρώπινο Fab παράγει ένα δυνατό σήμα μόνο στα φρεάτια της πλάκας ELISA όπου ο υποδοχέας HER2/neu έχει επιστρωθεί. Στα φρεάτια που επιστρώθηκαν μόνο με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα HER2/neu παράγεται χαμηλό σήμα σε επίπεδο αρνητικού μάρτυρα (εικόνα 7).



Εικόνα 7. Η ειδικότητα του Fab63 στο φυσικό υποδοχέα HER2/neu. Δοκιμασία Sandwich ELISA με διαλυτό υποδοχέα HER2/neu ακινητοποιημένο με το mAb TAB250. Το Fab63 καθώς και το Herceptin έχουν υψηλή συγγένεια στον υποδοχέα και παρουσιάζουν υψηλή πρόσδεση, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο 30% του μεταστατικού καρκίνου του μαστού το ErbB2 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα. Έχει διαπιστωθεί επίσης η παρουσία αντισωμάτων έναντι του Her2/neu σε ασθενείς με καρκίνο θετικό στο Her2. Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του μαστού μέσω της παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του ErbB2 τα οποία έχουν κυτταροστατικά αποτελέσματα στα καρκινικά κύτταρα. Όμως, εξαιτίας της μη ανθρωπινής προέλευσής τους η χρήση τους έχει περιοριστεί επειδή προκαλεί ανοσολογική απάντηση έναντι των αντισωμάτων του ποντικού. Η δυνατότητα του μετασχηματισμού αντισωμάτων τρωκτικών σε αντισώματα με περισσότερα ανθρώπινα τμήματα έχει επιτρέψει την παραγωγή θεραπευτικών παραγόντων με μειωμένη ανοσοαπάντηση.. Το Herceptin και το Pertuzumab, δύο «ανθρωποποιημένα» αντισώματα, έχουν χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικοί παράγοντες για τη στόχευση καρκίνων με υψηλή ή μειωμένη έκφραση του ErbB2, αντιστοίχως. Πρόσφατα, με την χρησιμοποίηση της τεχνολογίας έκφρασης στην επιφάνεια βακτηριοφάγων (phage display), μπορούν να επιλεγθούν ολόκληρα ανθρώπινα scFvs ή Fabs από ανασυνδυασμένες βιβλιοθήκες ανθρώπινων τμημάτων αντισωμάτων.

Ένα τέτοιο τμήμα είναι το Fab63 το οποίο προσδένεται ειδικά στα καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ErbB2. Επίσης, το Fab63 συνδυάζει τα κυτταροστατικά του αποτελέσματα με την ικανότητά του να ενδοκυτταρώνεται στα κύτταρα στόχους γρήγορα.

Το Fab63 έχει την ικανότητα να αναστέλλει την κυτταρική αύξηση στα SKBR3 κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν τον ErbB2. Μια πιθανή εξήγηση γι' αυτό το αποτέλεσμα είναι ότι το Fab63 μπορεί να εμποδίσει τη σηματοδότηση του ErbB2 περιορίζοντας τον αριθμό των μεμβρανικών υποδοχέων μετά την ενδοκυττάρωση του συμπλόκου υποδοχέα-Fab, ανεξάρτητα με το εάν ο υποδοχέας βρίσκεται σε ομοδιμερισμένη είτε σε ετεροδιμερισμένη μορφή. Ο μηχανισμός της δράσης του Fab63 στην αναστολή της κυτταρικής αύξησης είναι υπό έρευνα.

Σε αυτή την εργασία απομονώθηκε το Fab63 σε μεγάλη κλίμακα για τη μελέτη του μηχανισμού δράσης του και της χρήσης του σε θεραπευτικό εργαλείο.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Yosef Yarden, Mark X. Sliwkowski. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Molecular Cell Biology* 2:127-137.
2. Jeffrey S. Ross, Jonathan A. Fletcher, Kenneth J. Bloom, Gerald P. Linette, James Stec, W. Fraser Symmans, Lajos Pusztai and Gabriel N. Hortobagyi. 2004. Targeted Therapy in Breast Cancer. The HER2/neu Gene and Protein. *Molecular & Cellular Proteomics* 3:379-398.
3. Monilola A.O., Neve R.M., Lane H.A. & Hynes N.E. 2000. The ErbB signalling network: receptor heterodimerization in development of cancer. *EMBO J.* 19:3159-3167.
4. Antony W. Burgess, Hyun-Soo Cho, Charles Eigenbrot, Kathryn M. Ferguson, Thomas P.J. Garrett, Daniel J. Leahy, Mark A. Lemmon, Mark X. Sliwkowski, Colin W. Ward, and Shigeyuki Yokoyama. 2003. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Molecular Cell* 12:541-552.
5. Arteaga C.L. 2002. Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin. Oncol.* 29:3-9.
6. Cho H. S., Mason K., Ramyar K.X., Stanley A.M., Gabelli S. B., Danney D.W., Leahy D.J. 2003. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature.* 421, 756-760.
7. Cirti A., Skaria K. B. and Yarden Y. 2003. The deaf and the dumb: the biology of ErbB2 and ErbB3. *Exp. Cell Res.* 284:54-65.
8. Falls D. L. 2003. Neuregulins: functions, forms, and signalling strategies. *Exp. Cell Res.* 284:14-30.
9. Ferguson K. M., Berger M. B., Mendrola J.M., Cho H. S., Leahy D.J. and Lemmon M. A. 2003. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol. Cell.* 11:507-517.
10. Garrett T.P.J., McKern N.M., Lou M., Elleman T. C., Adams T. E., Lovrecz G. O., Zhu H. J., Walker F., Frenkel M. J., Hoyne P. A., et al. 2002. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor- α . *Cell.* 110:763-773.
11. Lax I., Bellot F., Honegger A. M., Schmidt A., Ullrich A., Givol D., and Schlessinger J. 1990. Domain deletion in the extracellular portion of the EGF-receptor reduces ligand binding and impairs cell surface expression. *Cell Regul.* 1:173-188.
12. Oligoso H., Ishitani R., Nureki O., Fukai S., Yamanaka M., Kim J. H., Saito k., Sakamoto A., Inoue M., Shirouzu M.

- and Ykoyama S. 2002. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110:775-787.
13. Schessinger J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-225.
 14. Schessinger J. 2002. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 110:669-672.
 15. Stamos J., Sliwkowski M. X. and Eigenbrot C. 2002. Structure of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J. Biol. Chem.* 277:46265-46272.
 16. Yarden Y. 2001. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 61 (Suppl 2), 1-13.
 17. Yarden Y., and Sliwkowski M.X. 2001. Untangling the erbB signaling network. *Nature Reviews* 2:127-137.
 18. Agus D. B., Akita R. W., Fox W. d., Lewis G. D., Higgins B., Pisacane P. I., Lofgren J. A., Tindell C., Evans D. P., Maiese K., et al. 2002. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell* 2:127-137.
 19. Jones J. T., Akita R. W. & Sliwkowski M. X. 1999. Binding specificities and affinities of EGF domains for ErbB receptors. *FEBS Lett.* 447:227-231.
 20. Tzahar E. *et al.* 1997. Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signalling network. *EMBO J.* 16:4938-4950.
 21. Ferguson K. M., Darling P. J., Mohan M. J., Macatee T. L. & Lemmon M.A. 2000. Extracellular domains drive homo- but not heterodimerization of erbB receptors. *EMBO J.* 19:4632-4643.
 22. Klapper L. N. *et al.* 1999. The ErbB2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96:4995-5000.
 23. Tzahar E. *et al.* 1996. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 16:5276-5287.
 24. Grauss Porta D., Beerli R. R., Daly J. M. & Hynes N. E. 1997. ErbB2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signalling. *EMBO J.* 16:1647-1655.
 25. Soltoff S. P. & Cantley L. C. 1996. p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J. Biol. Chem.* 271:563-567.

26. Alimandi M. *et al.* 1995. Cooperative signalling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation of human mammary carcinoma cells. *Oncogene* 15:1813-1821.
27. Wallasch C. *et al.* 1995. Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signalling by heterodimerization with HER3. *EMBO J.* 14:4267-4275.
28. Slamon D. J. *et al.* 1987. Human breast cancer : correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science* 235:177-182.
29. Leah N. Klapper, Mark H. Kirschbaum, Michael Sela and Yosef Yarden. 2000. Biochemical and Clinical Implications of the ErbB/HER Signaling Network of Growth Factor Receptors. *Academic Press* :26-62.
30. Backe J., Gassel A. M., Krebs S., Muller T. and Caffier H. 1997. *Arch. Gynecol. Obstet.* 259:189-195.
31. Barnes D. M., Bartkova J., Camplejohn R. S., Gullick W. J., Smith P. J. and Millis R. R. 1992. *Eur. J. Cancer* 28:644-648.
32. Barsky S. H., Doberneck S. A., Sterlicht M. D., Grossman D. A. and Love S. M. 1997. *J. Pathol.* 183:188-194.
33. Caruso M. L. and Valentini A. M. 1996. *Anticancer Res.* 16:3813-3818.
34. Eltabalch G. H., Belinson J. L., Kennedy A. W., Biscotti C. V., Casey G. and Tubbs R. R. 1997. *Gynecol. Oncol.* 65:218-224.
35. Gordinier M. E., Steinhoff M. M., Hogan J. W., Peipert J. F., Gajewski W. H., Falkenberry S. S. and Granai C. O.. 1997. *Gynecol.Oncol.* 67:200-202.
36. Iglehart J. D., Kerns B. J., Huper G. and Marks J. R. 1995. *Breast Cancer Res. Treat.* 34:253-263.
37. Kuhn E. J., Kurnot R. A., Sesterhenn I A., Chang E. H. and Moul J. W. 1993. *J. Urol.* 150: 1427-1433.
38. Lipponen H. J., Aaltomaa S., Syrjanen S. and Syrjanen K. 1993. *Anticancer Res.* 13:1147-1152.
39. Niehans G. A., Singleton T. P., Dykoski D. and Kiang D. T. 1993. *J. Natl. Cancer Inst.* 85:1230-1235.
40. Roland P. Y., Stoler M. H., Broker T. R. and Chow L. T. 1997. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 177:133-138.
41. Ole Henrik Brekke and Inger Sandlie. 2003. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nature* 2:52-62.
42. Kohler G. & Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 258:495-497.
43. Larrick J. W. & Fry K. E. 1991. Recombinant antibodies. *Hum. Antibodies Hybridomas* 2:172-189.

44. Khazaeli M. B., Conry R. M. & LoBuglio A. F. 1994. Human response to monoclonal antibodies. *J. Immunother.* 15:42-52.
45. Roovers R. C., Van der Linden E., De Bruine A. P., Arends J. W. & Hoogenboom H. R. 2001. Identification of colon tumour associated antigens by phage antibody selection on primary colorectal carcinoma. *Eur. J. Cancer* 37:542-549.
46. Weir A. N. C. *et al.* 2002. Formatting antibody fragments to mediate specific therapeutic functions. *Biochem. Soc. Transactions* 30:512-516.
47. Choy E. H. *et al.* 2002. Efficacy of a novel PEGylated humanized anti-TNF fragment (CDP870) in patients with rheumatoid arthritis: a phase II double-blinded, randomized, dose-escalating trial. *Rheumatology* 41:1133-1137.
48. Belimezi M. M., Papanastassiou D., Merkouri E., Baxevanis C. N., Mamalaki A. 2005. Growth inhibition of breast cancer cell lines overexpressing Her2/neu by a novel internalized fully human Fab antibody fragment. *Cancer Immunol Immunother.*
49. Carter P. 2001. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* 1:118-1129.
50. De Lorenzo C., Palmer D. B., Piccoli R., Ritter M. A., D' Alessio G. 2002. A new human antitumor immunoreagent specific for ErbB2. *Clin. Cancer Res.* 8:1710-1719.
51. Park J. W., Hong K., Kirpotin D. B., Colbern G., Shalaby R., Baselga J., Shao Y., Nielsen U. B., Marks J. D., Moore D., Papahadjopoulos D., Benz C. C. 2002. Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin. Cancer Res.* 8:1172-1181.
52. Slamon D. J., Leyland-Jones B., Shak S., Fuchs H., Paton V., Bajamonde A., Fleming T., Eiermann W., Wolter J., Pergam M., Baselga J., Norton L. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl J. Med.* 344:783-792.
53. Wang L., Lui B., Schmidt M., Lu Y., Wels W., Fan Z. 2001. Antitumor effect of an HER2-specific antibody-toxin fusion protein on human prostate cancer cells. *Prostate* 47:21-28.
54. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. 2004. Βασική ανοσολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης 4:83-89.
55. Roitt I., Brostoff J., Male D. 2000. Ανοσολογία. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου. 6:72-77.
56. Τριανταφυλλίδης Κωνσταντίνος. 2001. Κλασική και Μοριακή Γενετική. Εκδόσεις Αδελφών Κυριακίδη α.ε. 17:393-395.

57. Lubert Stryer. 1997. Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 3:46,47, 49-51, 66.
58. Ι.Γ. Γεωργάτσος, Τ.Α. Γιουψάνης, Δ.Α. Κυριακίδης. 2001. Ενζυμολογία. Εκδόσεις Ζητη 5:59, 61.
59. Δ.Α. Κυριακίδης. 2000. Ασκήσεις Ενζυμολογίας. Εκδόσεις Ζητη :11-13, 25.
60. Στέφανος Κολαής. 1996. Πρακτική μικροβιολογία. University Studio Press 7:145, 146.
61. Στυλιανός Λιοδάκης. 2001. Αναλυτική Χημεία. Εκδόσεις Παπασωτηρίου 12:234-244.
62. Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acid Research* 16:6127-6136.

7. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ADCC:	Antibody –Dependent Cellular Cytotoxicity Αντισωματοεξαρτώμενη κυτταρική κυτταροτοξικότητα
AR:	Amphiregulin Αμφιρεγουλίνη
β-CEL:	beta Cellulin βήτα Cellulin
CDC:	Complement-Dependent Cytotoxicity Κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα
CDR:	Complementarity-Determining Region Περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας
CEA:	Carcinoembryonic Antigen Καρκινοεμβρυονικό αντιγόνο
DCIS:	Ductal Carcinoma In Situ In Situ καρκίνωμα γαλακτοφόρου πόρου
EGF:	Epidermal Growth Factor Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EGFR:	Epidermal Growth Factor Receptor Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
EPI:	Epinephrine Επινεφρίνη
ET:	Endothelin Ενδοθηλίνη
Fab:	Fragment antigen binding Κλάσμα πρόσδεσης αντιγόνου
FcRn:	neonatal Fc Receptor Νεογνικός Fc υποδοχέας
FDA:	Food and Drug Administration Οργάνωση τροφίμων και φαρμάκων
FPLC:	Fast Protein Liquid Chromatography Γρήγορη υγρή χρωματογραφία
GAP:	GTPase Activating Protein Πρωτεΐνη ενεργοποιημένη από GTPάση
GPCRs:	G- Protein Coupled Receptors Υποδοχείς συνδεδεμένοι με G πρωτεΐνη
HB-EGF:	Heparin Binding EGF Ηπαρίνη συνδεδεμένη με EGF
HPV:	Human Papilloma Virus Ανθρώπινος ιός Papilloma
IDC:	Infiltrating Ductal Cancer Διεισδυτικός καρκίνος των γαλακτοφόρων πόρων
Ig:	Immunoglobulin Ανοσοσφαιρίνη

Jak:	Janus kinase Κινάση Janus
LPA:	Lysophosphatidic Acid Λυσοφωσφατιδικό οξύ
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinase Πρωτεϊνική κινάση επαγόμενη από μιτογόνο
MMP:	Metalloproteinase Μεταλλοπρωτεϊνάση
NHL:	non-Hodgkin's Lymphoma Λέμφωμα non-Hodgkin's
NRGs:	Neuregulins Νευρογουλίνες
PI3K:	Phosphatidylinositol-3-OH Kinase Φωσφατιδιλοϊνοσιτολ-3-OH κινάση
PKC:	Protein Kinase C Πρωτεϊνική κινάση C
PLCγ:	Phospholipase Cγ Φωσφολιπάση Cγ
RTK:	Receptor Tyrosine Kinase Υποδοχέας τυροσινικής κινάσης
scFvs:	single-chain Fv fragments of antibodies Μονόκλιωνα Fv κλάσματα αντισωμάτων
TGF- α :	Transforming Growth Factor alpha Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας άλφα