



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
«ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» (ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»)

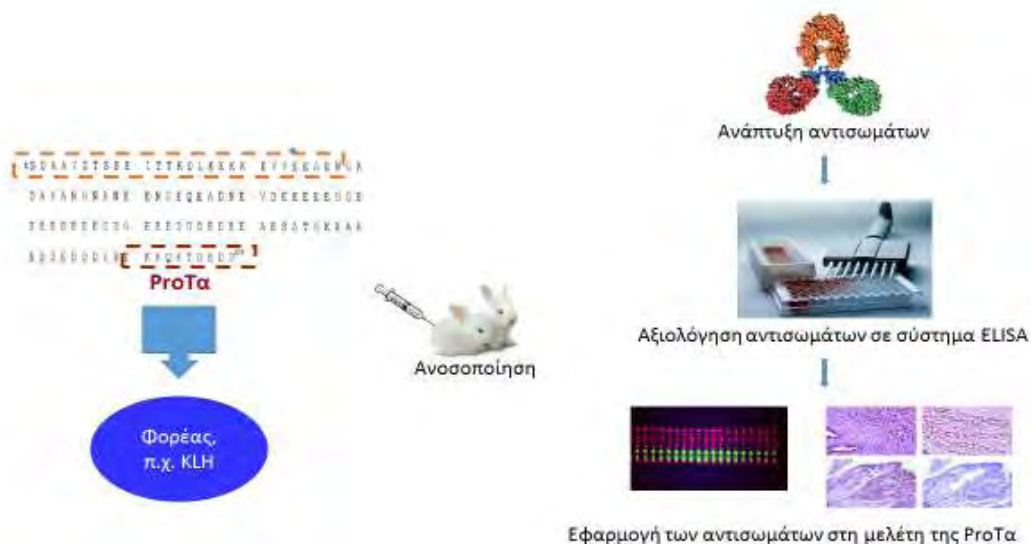
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ & ΡΑΔΙΟΛΟΓΙΚΩΝ  
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ &  
ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ (ΙΠΡΕΤΕΑ)

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΒΑΣΙΛΕΙΑΔΟΥ ΜΑΡΙΑΣ ΕΛΙΣΣΑΒΕΤ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥ -ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΥ

*Αξιολόγηση εργαστηριακών εργαλείων για την μελέτη του  
πολυπεπτιδίου προθυμοσίνη α (ProTa)*

*Evaluation of laboratory tools for studying the endogenous  
polypeptide prothymosin alpha (ProTa)*



Επιβλέπων καθηγητής: Δημήτρης Κουρέτας

Λάρισα 2017

***Evaluation of laboratory tools for studying the endogenous polypeptide prothymosin alpha (ProTα)***

***Αξιολόγηση εργαστηριακών εργαλείων για την μελέτη του πολυπεπτιδίου προθυμοσίνη α (ProTα)***

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΒΑΣΙΛΕΙΑΔΟΥ ΜΑΡΙΑ ΕΛΙΣΣΑΒΕΤ**

Επιβλέπων καθηγητής:

**Δημήτρης Κουρέτας**, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Δημήτρης Κουρέτας, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας

Δημήτρης Στάγκος, Επικ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας

Ευαγγελία Λιβανίου, Ερευνήτρια Α', ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Λιβανίου για την εμπιστοσύνη, την υποστήριξη, για τις πολύτιμες συμβουλές και την κατανόηση που μου έδειξε, καθώς επίσης και για την χαρά και τιμή να συμμετάσχω στην εργαστηριακή της ομάδα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Κουρέτα, επιβλέποντα Καθηγητή, για την εμπιστοσύνη και τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετέχω στην παρούσα μελέτη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον κύριο Στάγκο που με βοήθησε με τις συμβουλές του στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου, τον Νίκο, την Στεφανία και την Μελίνα για την βοήθειά τους κατά τη διάρκεια του πειραματικού τμήματος και για την εμπύχωση που μου παρείχαν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά την μεταδιδάκτορα Χρυσούλα Καραχάλιου, που με ανέλαβε και μαζί φέραμε εις πέρας την παρούσα εργασία και που ήταν πάντα δίπλα μου στο εργαστήριο και έλυne κάθε μου απορία.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, που μου δίνει τη δυνατότητα να σπουδάζω για ένα καλύτερο μέλλον αλλά και για την ψυχολογική στήριξη.

*Αξιολόγηση εργαστηριακών εργαλείων για την  
μελέτη του πολυπεπτιδίου προθυμοσίνη α*

2017

Μαρία Ελισσάβητ Βασιλειάδου

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>SUMMARY</b> .....	σελ. 8
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	σελ. 9

<b>ΜΕΡΟΣ Α: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	σελ. 10
---------------------------------------	---------

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΟ ΕΝΔΟΓΕΝΕΣ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΟ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗ ΑΛΦΑ

1.1. ΘΥΜΟΣ ΑΔΕΝΑΣ.....	σελ. 11
1.2. ΘΥΜΟΣΙΝΕΣ.....	σελ. 12
1.3. ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗ ΑΛΦΑ (ProTα).....	σελ. 13
1.3.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ProTα.....	σελ. 13
1.3.2. ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ProTα.....	σελ. 15
1.3.3. Ο ΔΙΤΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ProTα.....	σελ. 15
1.3.3.1. Ενδοκυτταρικός ρόλος της ProTα.....	σελ. 16
1.3.3.1α. ProTα και απόπτωση.....	σελ. 16
1.3.3.1β. ProTα και οξειδωτικό stress.....	σελ. 17
1.3.3.2. Εξωκυτταρικός ρόλος της ProTα.....	σελ. 18
1.3.3.2α. Εξωκυτταρική δράση της ProTα: Το C-τελικό δεκαπεπτίδιο ProTα[100-109] ως ανοσοδραστικό κέντρο του μορίου.....	σελ. 19
1.3.3.2β. Εξωκυτταρική δράση της ProTα: Πιθανοί υποδοχείς του μορίου.....	σελ. 20
1.3.4. ProTα ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	σελ. 21
1.3.5. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ProTα.....	σελ. 22

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ - ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

2.1. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	σελ. 23
2.1.1. ΦΥΣΙΚΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ.....	σελ. 23
2.2. ΑΝΤΙΓΟΝΑ – ΑΝΟΣΟΓΟΝΑ.....	σελ. 25
2.3. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	σελ. 25

2.3.1. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....σελ.	26
2.3.2. ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....σελ.	27
2.3.3. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....σελ.	27
2.4. Η ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA.....σελ.	27

<b>ΣΚΟΠΟΣ.....σελ.</b>	<b>31</b>
------------------------	-----------

<b>ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....σελ.</b>	<b>32</b>
--	-----------

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Ανάλυση της ProTa και των συνθετικών πεπτιδικών τμημάτων ProTa[1-28] (Ta1) & ProTa[100-109] με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC).....σελ.	33
3.1.1. Θεωρητικό υπόβαθρο.....σελ.	33
3.1.2. Πειραματικές συνθήκες.....σελ.	34
3.2. Πειράματα τιτλοδότησης ELISA.....σελ.	35
3.2.1. Υλικά και όργανα.....σελ.	35
3.2.2. Αντισώματα – Αντιοροί.....σελ.	36
3.2.3. Πρωτόκολλο μεθόδου.....σελ.	37
3.2.3.1. Πρωτόκολλο I.....σελ.	37
3.2.3.2. Πρωτόκολλο II.....σελ.	38
3.3. Πειράματα εκτόπισης ELISA.....σελ.	39
3.3.1. Υλικά και όργανα.....σελ.	39
3.3.2. Αντισώματα – Αντιοροί.....σελ.	40
3.3.3. Πεπτίδια.....σελ.	40
3.3.4. Πρωτόκολλο μεθόδου.....σελ.	40

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Χρωματογραφήματα αναλυτικής RP-HPLC.....	σελ. 42
4.1.1. Ανάλυση ProTa.....	σελ. 42
4.1.2. Ανάλυση ProTa[1-28] (Ta1).....	σελ. 43
4.1.3. Ανάλυση ProTa[100-109].....	σελ. 43
4.2. Καμπύλες τιτλοδότησης ELISA.....	σελ. 44
4.2.1. Αντίσωμα εναντίον ProTa/KLH (Ab-ProTa/KLH).....	σελ. 44
4.2.2. Αντίσωμα εναντίον ProTa[1-28]/KLH ή Ta1/KLH (Ab-ProTa[1-28]/KLH ή Ab-Ta1/KLH).....	σελ. 45
4.2.3. Αντίσωμα εναντίον ProTa[1-14]/KLH (Ab-ProTa[1-14]/KLH).....	σελ. 46
4.2.4. Αντίσωμα εναντίον ProTa[1-11]/PLD (Ab-ProTa[1-11]/PLD).....	σελ. 47
4.2.5. Αντίσωμα εναντίον ProTa[87-109]/KLH (Ab-ProTa[87-109]/KLH).....	σελ. 48
4.2.6. Αντίσωμα εναντίον ProTa[100-109]/KLH (Ab-ProTa[100-109]/KLH).....	σελ. 49
4.2.7. Αντίσωμα εναντίον ProTa[100-109]/RVH (Ab-ProTa[100-109]/RVH).....	σελ. 50
4.2.8. Αρνητικός μάρτυρας Α: Ορός αίματος φυσιολογικού κουνελιού (Normal Rabbit Serum, NRS).....	σελ. 51
4.2.9. Αρνητικός μάρτυρας Β: Αντίσωμα εναντίον πεπτιδικού τμήματος της θυμοσίνης βήτα 4 συζευγμένου σε KLH (Ab-AcSDKP/KLH).....	σελ. 52
4.2.10. Αρνητικός μάρτυρας Γ: Αντίσωμα εναντίον KLH (Ab-KLH).....	σελ. 53
4.3. Καμπύλες εκτόπισης ELISA.....	σελ. 54
4.3.1. Αντίσωμα εναντίον ProTa[1-28]/KLH ή Ta1/KLH (Ab-ProTa[1-28]/KLH ή Ab-Ta1/KLH).....	σελ. 54
4.3.2. Αντίσωμα εναντίον ProTa[100-109]/RVH (Ab-ProTa[100-109]/RVH).....	σελ. 55
<b>ΜΕΡΟΣ Γ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	σελ. 56
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	σελ. 60

## SUMMARY

Prothymosin alpha (ProT $\alpha$ ) is a polypeptide (human sequence: 109 amino acids, MW: ~ 12 kDa) that has originally been isolated from the thymus gland, and has a double biological role, both intracellular and extracellular. The intracellular role of ProT $\alpha$  is primarily associated with cell proliferation, cell cycle regulation and chromatin remodeling. Its extracellular role is associated with the strengthening of cell mediated immunity. Several bioactive peptide fragments of ProT $\alpha$ , such as the N-terminal 28 peptide (ProT $\alpha$  [1-28], also known as thymosin alpha1 T $\alpha$ 1) and the C-terminal decapeptide (ProT $\alpha$  [100-109]), are likely to be produced in the body by proteolysis and they are of particular biological interest.

The purpose of this thesis was to evaluate laboratory tools that can be used for the study of ProT $\alpha$  – specifically polyclonal antibodies raised against the polypeptide. Polyclonal antibodies have been developed in the past in the laboratories of NCSR "Demokritos", because, until now, there are no broadly commercially available antibodies against the polypeptide. These antibodies were developed in New Zealand white rabbits against the ProT $\alpha$  or synthetic peptide fragments of the polypeptide, after their coupling to a specific carrier protein. The synthetic peptides used to develop antibodies against the ProT $\alpha$  were: ProT $\alpha$  [1-28] (or T $\alpha$ 1), ProT $\alpha$  [1-14], ProT $\alpha$  [1-11], ProT $\alpha$  [87-109] and ProT $\alpha$  [100-109]. The carriers proteins used for the coupling of ProT $\alpha$  or its synthetic peptides were: *keyhole limpet haemocyanin* or KLH, *Rapana venosa haemocyanin* (RVH) and a synthetic polylysine dendrimer (PLD). Overall, the following antibodies were evaluated: Ab-ProT $\alpha$ /KLH, Ab-ProT $\alpha$ [1-28]/KLH (or Ab-T $\alpha$ 1/KLH), Ab-ProT $\alpha$ [1-14]/KLH, Ab-ProT $\alpha$ [1-11]/PLD, Ab-ProT $\alpha$ [87-109]/KLH, Ab-ProT $\alpha$ [100-109]/KLH and Ab-ProT $\alpha$ [100-109]/RVH. Initially, these antibodies were evaluated for their titre by the ELISA method (ELISA titration experiments) and the findings demonstrated that the Ab-T $\alpha$ 1/KLH, Ab-ProT $\alpha$ [100-109]/KLH and Ab-ProT $\alpha$ [100-109]/RVH antibodies gave the highest titre values (up to 1: 10,000). These findings encouraged us to continue the evaluation, as to the ability of antibodies (specifically, the Ab-T $\alpha$ 1/KLH and Ab-ProT $\alpha$ [100-109]/RVH) to recognize both ProT $\alpha$  and the T $\alpha$ 1 and ProT $\alpha$  [100-109] bioactive peptides, in solution form, using the ELISA method (displacement experiments or cross reaction ELISA experiments). According to our experimental results, the Ab-T $\alpha$ 1/KLH is capable of recognizing both ProT $\alpha$  and the N-terminal ProT $\alpha$  peptide [1-28] (T $\alpha$ 1), in solution form and does not cross-react with the C-terminal ProT $\alpha$  peptide [100-109]. On the contrary, the Ab-ProT $\alpha$ [100-109]/RVH is capable of recognizing both ProT $\alpha$  and the C-terminal ProT $\alpha$  [100-109] peptide, in solution form, while it does not cross-react with the N-terminal ProT $\alpha$  [1-28] peptide (T $\alpha$ 1). The above mentioned antibodies could be used in the future as laboratory tools (in immunochemical techniques, e.g., immunohistochemistry, immunocytology, immunoanalyses, Western-blot techniques, etc.) for the study of ProT $\alpha$  and/or its possible fragments in specific biological samples.



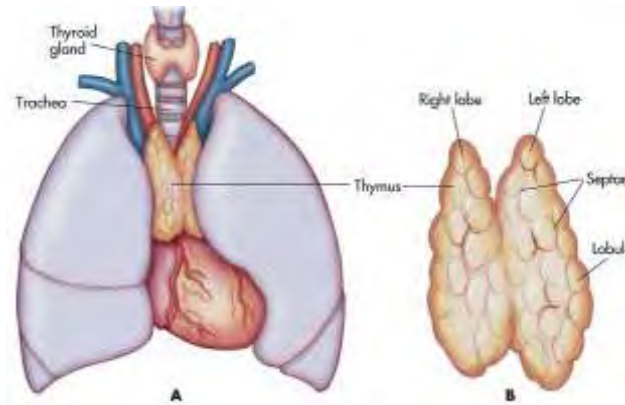
## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προθυμοσίνη άλφα (ProTa) είναι ένα πολυπεπτίδιο (ανθρώπινη αλληλουχία: 109 αμινοξέα, MB: ~12 kDa) που απομονώθηκε αρχικά από τον θύμο αδένα και έχει διττό βιολογικό ρόλο, τόσο ενδοκυτταρικό όσο και εξωκυτταρικό. Ο ενδοκυτταρικός ρόλος της ProTa σχετίζεται κυρίως με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης. Ο εξωκυτταρικός ρόλος συνδέεται με την ενίσχυση της κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας. Ορισμένα βιοδραστικά πεπτιδικά θραύσματα της ProTa, όπως το N-τελικό 28-πεπτίδιο (ProTa[1-28], γνωστό και ως θυμοσίνη άλφα1 ή Ta1) καθώς και το C-τελικό δεκαπεπτίδιο (ProTa[100-109]), είναι πιθανόν να παράγονται μέσα στον οργανισμό μέσω πρωτεόλυσης και παρουσιάζουν ιδιαίτερο βιολογικό ενδιαφέρον.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση εργαστηριακών εργαλείων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη της ProTa -συγκεκριμένα πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι του πολυπεπτιδίου. Τα πολυκλωνικά αντισώματα είχαν αναπτυχθεί κατά το παρελθόν στα εργαστήρια του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», επειδή, έως και σήμερα, δεν υπάρχουν ευρέως διαθέσιμα στο εμπόριο αντισώματα έναντι του πολυπεπτιδίου. Τα αντισώματα αυτά αναπτύχθηκαν σε λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας εναντίον της ProTa ή συνθετικών πεπτιδικών τμημάτων του πολυπεπτιδίου, μετά από σύζευξή τους σε ειδικό φορέα. Τα συνθετικά πεπτίδια που είχαν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι της ProTa ήταν τα: ProTa[1-28] (ή Ta1), ProTa[1-14], ProTa[1-11], ProTa[87-109] και ProTa[100-109]. Οι φορείς που είχαν χρησιμοποιηθεί για τη σύζευξη της ProTa ή των συνθετικών πεπτιδίων της ήταν οι: αιμοκυανίνη του οργανισμού *Keyhole limpet* (keyhole limpet haemocyanin ή KLH), αιμοκυανίνη του οργανισμού *Rapana venosa* (RVH) και ένα συνθετικό πολυλυσινικό δενδριμερές (PLD). Συνολικά, αξιολογήθηκαν τα ακόλουθα αντισώματα: Ab-ProTa/KLH, Ab-ProTa[1-28]/KLH (ή Ab-Ta1/KLH), Ab-ProTa[1-14]/KLH, Ab-ProTa[1-11]/PLD, Ab-ProTa[87-109]/KLH, Ab-ProTa[100-109]/KLH και Ab-ProTa[100-109]/RVH. Αρχικά, τα παραπάνω αντισώματα αξιολογήθηκαν ως προς τον τίτλο τους με μέθοδο ELISA (πειράματα τιτλοδότησης ELISA) και τα ευρήματα έδειξαν πως τα αντισώματα Ab-Ta1/KLH, Ab-ProTa[100-109]/KLH και Ab-ProTa[100-109]/RVH έδωσαν τις πιο υψηλές τιμές τίτλου (έως >1:10.000). Τα ευρήματα αυτά μας παρότρυναν να συνεχίσουμε την αξιολόγηση, ως προς την ικανότητα των αντισωμάτων (συγκεκριμένα, των Ab-Ta1/KLH και Ab-ProTa[100-109]/RVH) να αναγνωρίζουν τόσο την ProTa όσο και τα βιοδραστικά πεπτίδια Ta1 και ProTa[100-109], σε μορφή διαλύματος, με μέθοδο ELISA (πειράματα εκτόπισης ή πειράματα διασταυρούμενης αντίδρασης ELISA). Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, το Ab-Ta1/KLH είναι ικανό να αναγνωρίζει τόσο την ProTa όσο και το N-τελικό πεπτίδιο ProTa[1-28] (Ta1), υπό μορφή διαλύματος, ενώ δεν έχει διασταυρούμενη αντίδραση με το C-τελικό πεπτίδιο ProTa[100-109]. Αντίθετα, το Ab-ProTa[100-109]/RVH είναι ικανό να αναγνωρίζει τόσο την ProTa όσο και το C-τελικό πεπτίδιο ProTa[100-109], υπό μορφή διαλύματος, ενώ δεν έχει διασταυρούμενη αντίδραση με το N-τελικό πεπτίδιο ProTa[1-28] (Ta1). Τα παραπάνω αντισώματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά ως εργαστηριακά εργαλεία (σε ανοσοχημικές τεχνικές, π.χ. ανοσοϊστοχημεία, ανοσοκυτταρολογία, ανοσοανάλυσεις, τεχνικές Western-blot, κ.λπ.) για τη μελέτη της ProTa ή/και πιθανών θραυσμάτων της σε ειδικά βιολογικά παρασκευάσματα.

## **ΜΕΡΟΣ Α: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### 1.1.Θύμος Αδένας



**Σχήμα 1.** Θέση του θύμου αδένος στο πρόσθιο-άνω μεσοθωράκιο (A), λοβοί του θύμου αδένος (B)

Ο θύμος αδένος βρίσκεται στο πρόσθιο-άνω μεσοθωράκιο, ανάμεσα στο στέρνο και το περικάρδιο. Προσθίως βρίσκεται το στέρνο, τα παρακείμενα τμήματα των ανώτερων τεσσάρων πλευρικών χόνδρων και οι στερνοθυροειδείς μύες. Οπισθίως βρίσκονται το περικάρδιο και το αορτικό τόξο με τους κλάδους του, την αριστερή ανώνυμη φλέβα, το πρόσθιο και τα πλάγια της τραχείας (1) (πίσω από την κορυφή και στο κέντρο του στέρνου). Ο θύμος μεγαλώνει κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και ατροφεί κατά την εφηβεία, ενώ φτάνει στο μέγιστο βάρος του (20 έως 37 g) κατά το χρονικό διάστημα της εφηβείας. Οι δύο λοβοί διαφέρουν ελαφρώς ως προς το μέγεθος και μπορεί να ενωθούν ή να διαχωριστούν. Ο θύμος αδένος θεωρήθηκε για αρκετό χρονικό διάστημα όργανο χωρίς ιδιαίτερη σημασία, ενώ μετά το 1960 αναγνωρίστηκε η κεντρική σημασία που κατέχει στην διαδικασία της ανοσίας και την ανάπτυξη των T-λεμφοκυττάρων (2). Ο θύμος αδένος είναι εξειδικευμένο πρωτογενές λεμφικό όργανο του ανοσοποιητικού συστήματος. Έχει ιδιαίτερη λειτουργία γιατί στο θύμο ωριμάζουν τα T-λεμφοκύτταρα (T-κύτταρα). Συγκεκριμένα ο θύμος αδένος παρέχει τον τόπο όπου τα T-λεμφοκύτταρα αποκτούν μια συγκεκριμένη αντιγονική εξειδίκευση. Οι πρώτες έρευνες γύρω από τη σημασία του θύμου αδένος έγιναν την δεκαετία του 1960, οπότε, ύστερα από θυμοεκτομή, παρατηρήθηκαν μειωμένοι πληθυσμοί B -και T-λεμφοκυττάρων, μειωμένη παραγωγή αντιγόνων καθώς και αδυναμία απόρριψης μη συμβατών μοσχευμάτων. Ο θύμος αδένος κέρδισε το ενδιαφέρον των ερευνητών όσον αφορά στον εντοπισμό και την ταυτοποίηση εκκρινόμενων από το θύμο πολυπεπτιδίων με ορμονική δράση. Στο θύμο συντίθεται μεγάλη ποικιλία βιολογικά ενεργών παραγόντων με διαφορετική χημική δομή. Πρόκειται για βιολογικά ενεργούς θυμικούς παράγοντες που οι ερευνητές θεώρησαν ότι θα μπορούσαν να υποκαταστήσουν τη λειτουργία του θύμου αδένος σε άτομα τα οποία παρουσιάζουν ανεπάρκειες του θύμου ή εναλλακτικά να ενισχύσουν την ανοσολογική απόκριση σε φυσιολογικά άτομα.

## 1.2.Θυμοσίνες

---

Τη δεκαετία του 1960 ο Goldstein και οι συνεργάτες του προχώρησαν στην απομόνωση και εν συνεχεία στη μελέτη ενός βιοδραστικού εκχυλίσματος από θύμο αδένα μοσχαριού (3), το οποίο ονόμασαν θυμοσινικό κλάσμα 5 (Thymosin Fraction 5, TF5). Αρχικά, το TF5 θεωρήθηκε ότι περιείχε ένα και μόνο πολυπεπτιδίο (4). Ύστερα από *in vitro* μελέτες, βρέθηκε ότι το TF5 είναι ικανό να διεγείρει τα λεμφοκύτταρα που προέρχονται από ανοσοκατεσταλμένους ανθρώπους και να αποκαθιστά τις λειτουργίες των λεμφοκυττάρων σε φυσιολογικά επίπεδα (5).

Λίγο αργότερα, με περαιτέρω ανάλυση, αποδείχθηκε ότι το TF5 περιέχει ένα μίγμα μικρών πεπτιδίων, με MB που κυμαίνεται από 1.000 μέχρι 15.000 Da (5). Συγκεκριμένα, η ανάλυση αποκάλυψε ότι το TF5 αποτελείται από 30 - 40 διακριτά πεπτιδία. Τα πεπτιδία ταξινομήθηκαν σε τρεις διαφορετικές ομάδες, σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) τους, οι οποίες κωδικοποιήθηκαν ως θυμοσίνες άλφα ή α (pI: < 5), βήτα ή β (pI: 5 -7) και γάμμα ή γ (pI: > 7) (6). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε ένας αριθμός ως δείκτης για την ταυτοποίηση των πεπτιδίων κάθε ομάδας, ενδεικτικός της σειράς με την οποία απομονώθηκαν από το TF5. Ο πρώτος εκπρόσωπος των α-θυμοσινών, που απομονώθηκε το 1977 από το TF5, ήταν η θυμοσίνη α1 ή Τα1 (7). Η Τα1 αλληλουχήθηκε και βρέθηκε ότι αποτελείται από 28 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 3.108 Da. Το αμινοτελικό της αμινοξύ (σερίνη) είναι ακετυλιωμένο και από την πρωτοταγή της δομή απουσιάζουν αρωματικά αμινοξέα. Σε διάφορες μελέτες η Τα1 βρέθηκε να είναι 10-1.000 φορές πιο δραστική από το TF5.

Το 1983 απομονώθηκαν δύο ακόμη πεπτιδία από το TF5 που σχετίζονται δομικά με την Τα1, τα θυμοσίνη άλφα 11 (Τα11) και des-[25-28]Τα1 (8). Το πεπτιδίο des-(25-28)-Τα1 είχε τέσσερα αμινοξέα λιγότερα στο καρβοξυτελικό του άκρο, ενώ αντίθετα η Τα11 είχε επτά παραπάνω αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο. Οι Τα1 και Τα11 βρέθηκαν εξίσου ενεργές έναντι των διαφορετικών λοιμώξεων σε *Candida albicans* (8).

Παρακάτω αναφέρονται οι αλληλουχίες των θυμοσινών des-[25-28]Τα1, Τα1, Τα11:

***AcSDAAVDTSSSE ITTKDLKEKK EVVE*** (des-[25-28]Τα1)

***AcSDAAVDTSSSE ITTKDLKEKK EVVEEAEN*** (Τα1)

***Ac-SDAAVDTSSSE ITTKDLKEKK EVVEEAENGRDAPAN*** (Τα11)

Το ότι βρέθηκαν και άλλα πεπτιδία δομικώς όμοια με την Τα1 οδήγησε τους ερευνητές να αναζητήσουν ένα μεγαλύτερο, πιθανόν πρόδρομο μόριο. Πράγματι, στα μέσα της δεκαετίας του 1980, οι Haritos και συνεργάτες απομόνωσαν και ταυτοποίησαν (9, 10) από θύμο αδένα αρουραίου, ένα πολυπεπτιδίο περίπου 110 αμινοξέων και το ονόμασαν προθυμοσίνη άλφα (ProΤα). Το πολυπεπτιδίο αυτό θεωρήθηκε ως πρόδρομο μόριο των Τα1 και Τα11, διότι στο αμινοτελικό του άκρο υπήρχε η αλληλουχία των πεπτιδίων αυτών. Σύμφωνα με μεταγενέστερες μελέτες, η Τα1 προέρχεται από πρωτεολυτική διάσπαση της ProΤα, που γίνεται ενδοκυτταρικά από το ένζυμο asparaginyl endopeptidase (11). Άλλοι, ωστόσο,

ερευνητές πιστεύουν ότι η Τα1, όπως και η Τα11, δεν παράγεται μέσα στον οργανισμό, αλλά προκύπτει κατά την *in vitro* κατεργασία του TF5.

Η πρώτη αλληλουχία της ProTa, που αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία, ήταν της ProTa που απομονώθηκε από τον θύμο αδένα αρουραίου (10). Ακολούθησε η ταυτοποίηση της ProTa του ανθρώπου (12).

Με μετέπειτα μελέτες βρέθηκε ότι η ProTa δεν μπορεί να θεωρηθεί ως ορμόνη του θύμου αδένα, καθώς εντοπίστηκε σε πολλούς άλλους ιστούς και όργανα, όπως στη σπλήνα, στο ήπαρ, τους πνεύμονες, κ.λπ., όλων των θηλαστικών. Η βιολογική της δράση σχετίζεται με την ενίσχυση των λειτουργιών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, αλλά δεν περιορίζεται εκεί, όπως θα αναφέρουμε στη συνέχεια.

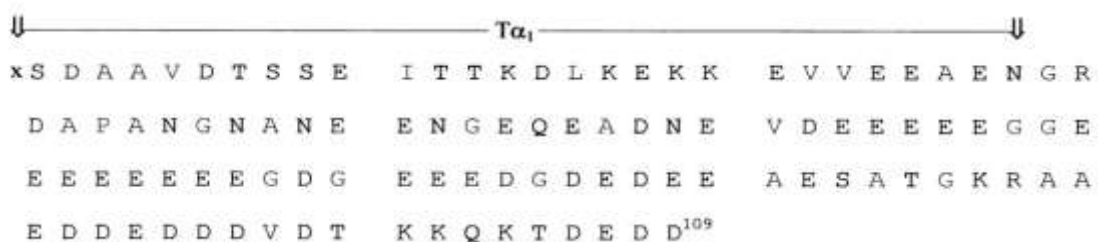
## 1.3. Προθυμοσίνη άλφα (Pro Τα)

### 1.3.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ProTa

Η ανθρώπινη ProTa έχει μήκος 109 αμινοξέων και μοριακό βάρος 12,6 kDa, κωδικοποιείται δε από το γονίδιο *PTMA* που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2, στο μεγάλο βραχίονα (2q 37.1) (13).

Η αμινοξική αλληλουχία της ProTa στο κεντρικό τμήμα του μορίου είναι πλούσια σε γλουταμινικό και ασπαρτικό οξύ, με αποτέλεσμα το μόριο να αποκτά έναν ιδιαίτερα όξινο χαρακτήρα και να έχει χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο (pI 3,55) (9). Επειδή τα περισσότερα όξινα κατάλοιπα που περιέχει η ProTa βρίσκονται στο κεντρικό τμήμα της αλληλουχίας της, το πολυπεπτίδιο δεν έχει συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή και αποκτά μία τυχαία, ακανόνιστη δομή στο χώρο. Είναι πιθανό, ωστόσο, να αποκτά δευτεροταγή δομή μετά από αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες – πιθανούς υποδοχείς (14).

Η ProTa αρχικά χαρακτηρίστηκε ως «θυμική ορμόνη» αφού απομονώθηκε για πρώτη φορά από θύμο αδένα, ωστόσο η ίδια εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς, όπως ήδη αναφέρθηκε (15). Επίσης, εμφανίζει υψηλή εξελικτική συντηρητικότητα και η πρωτοταγής δομή του πολυπεπτιδίου παρουσιάζει μεγάλη ομολογία μεταξύ των διαφόρων ειδών θηλαστικών, όπως φαίνεται και στα Σχήματα 2 και 3, που ακολουθούν (16). Στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται η αμινοξική αλληλουχία της ανθρώπινης ProTa, ενώ στο Σχήμα 3 παρουσιάζεται η αμινοξική αλληλουχία της ProTa από διάφορα θηλαστικά.



**Σχήμα 2.** Αμινοξική αλληλουχία της ανθρώπινης ProTa.

Στο Σχήμα φαίνεται επίσης η αλληλουχία της Τα1 (ταυτόσημη με το N-τελικό 28-πεπτίδιο της ProTa). Η N-τελική σερίνη της φυσικής ProTa είναι ακετυλιωμένη.

	1Q	2Q	3Q	4Q
<i>B. taurus</i>	QDAAYDTSEI	ITTEILKRF	EVNVEAEHQ	EAFARQRL-N
<i>H. sapiens</i>	QDAAYDTAPE	ITTEILKRF	EVNVEAEHQ	EAFARQRL-N
<i>M. musculus</i>	QDAAYDTSEI	ITTEILKRF	EVNVEAEHQ	EAFARQRL-N
<i>R. norvegicus</i>	QDAAYDTSEI	ITTEILKRF	EVNVEAEHQ	EAFARQRL-N
<i>S. scrofa</i>	QDAAYDTSEI	ITTEILKRF	EVNVEAEHQ	EAFARQRL-N
	*****	*****	*****	*****
	5Q	6Q	7Q	8Q
<i>B. taurus</i>	EEHQEQEAD	EVDEEEEDG	EEDEEEEDG	GEEDGDEID
<i>H. sapiens</i>	EEHQEQEAD	EVDEEEEDG	EEDEEEEDG	GEEDGDEID
<i>M. musculus</i>	EEHQEQEAD	EVDEEEEDG	EEDEEEEDG	GEEDGDEID
<i>R. norvegicus</i>	EEHQEQEAD	EVDEEEEDG	EEDEEEEDG	GEEDGDEID
<i>S. scrofa</i>	EEHQEQEAD	EVDEEEEDG	EEDEEEEDG	GEEDGDEID
	*****	*****	*****	*****
	9Q	10Q	11Q	
<i>B. taurus</i>	EAEARTEEA	AEDDEEDVD	TEEQE-TIED D	
<i>H. sapiens</i>	EAEARTEEA	AEDDEEDVD	TEEQE-TIED D	
<i>M. musculus</i>	EAEARTEEA	AEDDEEDVD	TEEQE-TIED D	
<i>R. norvegicus</i>	EAEARTEEA	AEDDEEDVD	TEEQE-TIED D	
<i>S. scrofa</i>	EAEARTEEA	AEDDEEDVD	TEEQE-TIED D	
	***,****	*****	*****,**	*

\* Ταυτόσημο αμινοξύ κατάλοιπο, : Αμινοξύ κατάλοιπο με ταυτόσημο χημικό ιδιότητα, . Αμινοξύ κατάλοιπο με παρόμοιο χημικό ιδιότητα

**Σχήμα 3.** Αμινοξική αλληλουχία της ProTa από διάφορα είδη θηλαστικών.

Το μόριο της ProTa περιέχει δύο αλληλουχίες που λειτουργούν ως σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), τις αλληλουχίες  $K^{87}R^{88}$  και  $K^{101}KQK^{104}$  (ή  $K^{87}R-X_{12}-KKQK^{104}$ ), και που υποδεικνύουν τον εντοπισμό του πολυπεπτιδίου στον πυρήνα. Πράγματι, μεταλλάξεις και στα δύο τμήματα του διμερούς NLS οδήγησαν σε σημαντικό (αλλά όχι ) εντοπισμό της ProTa στο κυτταρόπλασμα (17, 18).

### 1.3.2.ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ProTa

Το 1988 αναφέρθηκε για πρώτη φορά ότι η ProTa εντοπίζεται στον πυρήνα, όπου μάλιστα συμμετέχει στην οργάνωση κάποιων πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων (19). Το μόριο της ProTa στερείται κάποιου σήματος έκκρισης (14). Από την άλλη πλευρά, όπως ήδη αναφέρθηκε, το μόριο διαθέτει διμερές NLS ( $^{87}\text{KR-X}_{12}\text{-KKQK}^{104}$ ), το οποίο φαίνεται ότι ευθύνεται για τον εντοπισμό του πολυπεπτιδίου στον πυρήνα, αφού ύστερα από μεταλλάξεις και τροποποίηση της αλληλουχίας του διμερούς NLS παρατηρήθηκε σημαντική κατανομή της ProTa στο κυτταρόπλασμα (18). Επίσης, η ProTa έχει όξινη φύση, όπως και οι περισσότερες πρωτεΐνες του πυρήνα. Για τους παραπάνω λόγους, η ProTa θεωρήθηκε για ένα μεγάλο διάστημα ως αποκλειστικά πυρηνικό πολυπεπίδιο (20). Ωστόσο, πολλοί ερευνητές υποστήριζαν ότι η ProTa είναι πιθανόν να μετακινείται ανάμεσα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα (21). Πράγματι, η ProTa έχει μικρό μέγεθος, οπότε μπορεί να κινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, πιθανόν δε να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην εισαγωγή μορίων στον πυρήνα, όπως η καρυοφερίνη-β, η Rch-1, η Ran και η RCC1 (22). Επίσης, σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, η ProTa είναι πιθανόν να εμπλέκεται στη διαδικασία της μίτωσης (23).

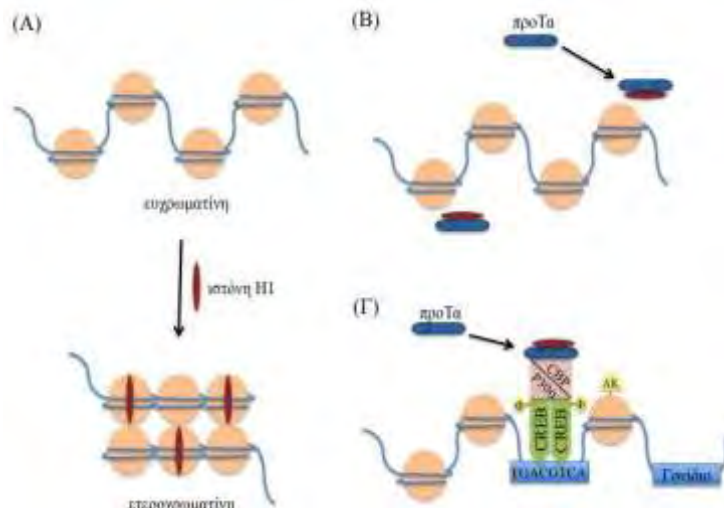
### 1.3.3.0 ΔΙΤΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ProTa

#### 1.3.3.1.Ενδοκυτταρικός ρόλος της ProTa

Ενδοκυτταρικά, η ProTa συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθώς και στην αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης. Η ProTa είναι απαραίτητη για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών κυττάρων (14), ενώ σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται έντονα έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του *PTMA* (24).

Στον κυτταρικό πυρήνα η ProTa έχει αναφερθεί ότι είναι ικανή να απομακρύνει την ιστόνη H1 από τα νουκλεοσώματα, με αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση της ίνας της χρωματίνης (25). Μετά από λεπτομερή ανάλυση της αλληλεπίδρασης της H1 με την ProTa έχει προταθεί ότι η ProTa μπορεί να προκαλεί από-ελίκωση της ίνας της χρωματίνης μέσω αλληλεπίδρασης της όξινης κεντρικής περιοχής της ProTa με την H1.

Μέσω της αναδιαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης, η ProTa έχει αναφερθεί ότι ενισχύει τη μεταγραφή (26). Συγκεκριμένα, το μόριο πιθανόν να εμπλέκεται στη μεταγραφή μέσω αλληλεπίδρασης με μεταγραφικούς παράγοντες, π.χ. με την CREB-προσδένουσα πρωτεΐνη που είναι μεταγραφικός συνενεργοποιητής (27, 28, 29), όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.



**Σχήμα 4.** Η ProTa αλληλεπιδρά με την ιστόνη H1 βοηθώντας τη διαδικασία της μεταγραφής γονιδίων.

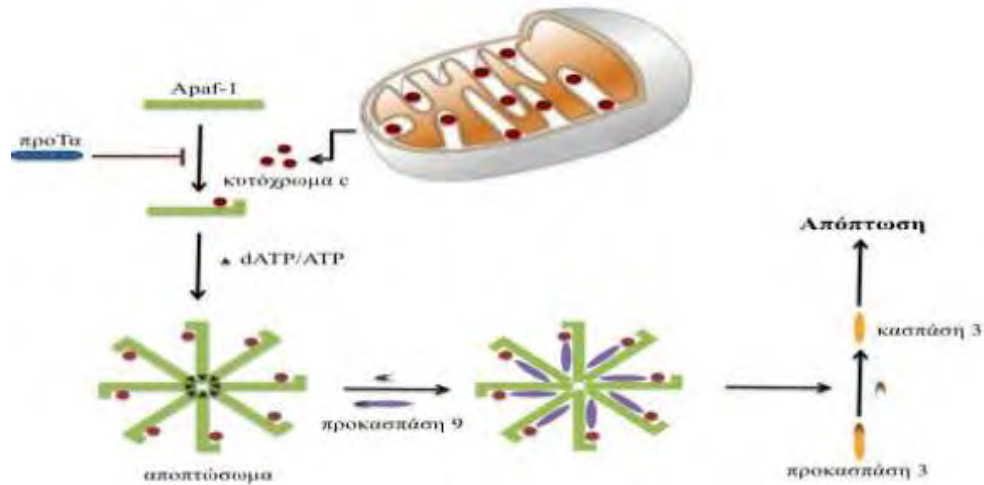
A) Απουσία ProTa, η H1 προσδέεται στα νουκλεοσώματα και προκαλεί τη συμπύκνωση της ευχρωματίνης σε ετεροχρωματίνη. B) Παρουσία ProTa, το πολυπεπτιδίο αλληλεπιδρά με την H1 βοηθώντας τη μεταφορά της από και προς τη χρωματίνη. Γ) Κατά τη μεταγραφή αποκαλύπτεται η αλληλουχία CRE (TGACGTCA) στο γενετικό υλικό, όπου προσδέεται το ομοδιμερές CREB. Το CREB φωσφορυλιώνεται (Φ) από κινάσες και το σύμπλεγμα CBP-p300 στρατολογείται από την ProTa. Το σύμπλεγμα CREB-CBP-p300 σταθεροποιείται, οδηγώντας σε ακετυλίωση (AK) ιστονών από την p300, με αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και τη μεταγραφή γονιδίων (ανατύπωση από Καππά και συν., 2013 (29)).

### 1.3.3.1α. ProTa και απόπτωση

Στο κυτταρόπλασμα η ProTa αποτρέπει την απόπτωση αναστέλλοντας το σχηματισμό του αποπτωσώματος.

Το αποπτώσωμα συγκροτείται μετά τη σύνδεση του ενεργοποιητικού παράγοντα των πρωτεασών της απόπτωσης (apoptotic protease activating factor, Araf)-1 και του κυτοχρώματος c που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια (30). Ο σχηματισμός του αποπτωσώματος έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας σειράς κασπασών (καταρράκτης των κασπασών). Ο καταρράκτης αυτός είναι ιδιαίτερα σημαντικός γιατί καταλήγει στην κασπάση 3, η οποία είναι και η κασπάση - τελεστής που οδηγεί τελικά στον κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο η ενεργοποίηση της κασπάσης 3, ως τελικής κασπάσης, προϋποθέτει την ενεργοποίηση μιας σειράς άλλων κασπασών, ξεκινώντας αρχικά από την ενεργοποίηση της κασπάσης-9, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί την προ-κασπάση-3 σε κασπάση-3, οδηγώντας τελικά στον κυτταρικό θάνατο. Παρουσία της ProTa παρεμποδίζεται η πρόσδεση του κυτοχρώματος c στον Araf-1. Τα επίπεδα έκφρασης του πολυπεπτιδίου θεωρούνται ως ένας μοριακός «διακόπτης» μεταξύ απόπτωσης και αυτοφαγικού τύπου κυτταρικού θανάτου σε τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα (31).



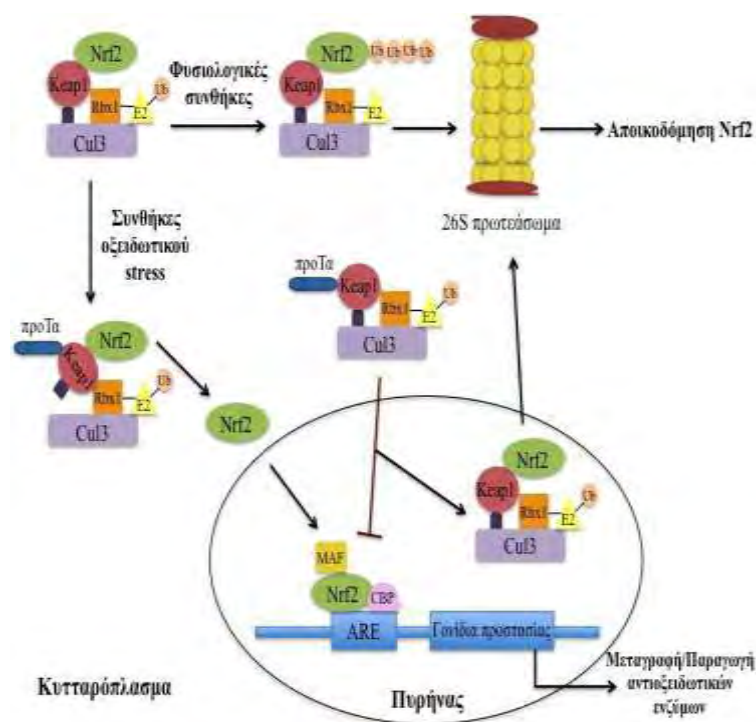


**Σχήμα 5.** ProTa και απόπτωση.

Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται από το μεσομεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου στο κυτταρόπλασμα και συνδέεται με τον Araf-1, ενεργοποιώντας τον και σχηματίζοντας το αποπτώσωμα. Ακολουθεί η ενεργοποίηση της κασπάσης 9, που με τη σειρά της ενεργοποιεί την προκασπάση 3 προς κασπάση 3, η οποία επάγει την απόπτωση του κυττάρου. Παρουσία ProTa, παρεμποδίζεται η πρόσδεση του κυτοχρώματος c στον Araf-1 και συνεπώς αναστέλλεται το αποπτωτικό μονοπάτι (ανατύπωση από Καππά και συν., 2013 (29))

### 1.3.3.1β. ProTa και οξειδωτικό stress

Ενδοκυτταρικά, η ProTa αλληλεπιδρά με την Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) (32), η οποία καταστέλλει το μεταγραφικό παράγοντα Nrf2. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο παράγοντας Nrf2 αλληλεπιδρά με την Keap1 και το σύμπλοκο Nrf2-Keap1 ουβικιτινυλιώνεται από τη Cul3/Rbx1-εξαρτώμενη E3 λιγάση της ουβικιτίνης και στη συνέχεια οδηγείται στο πρωτεάσωμα, όπου αποικοδομείται (33). Σε συνθήκες οξειδωτικού stress, η ProTa αλληλεπιδρά με την Keap1, μέσω του όξινου κεντρικού της τμήματος (33), απελευθερώνοντας τον Nrf2, ο οποίος στη συνέχεια επάγει την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων, συμβάλλοντας, έτσι, στην επιβίωση των κυττάρων (32). Αξίζει να αναφερθεί ότι η ProTa μεσολαβεί επίσης και στη μεταφορά του συμπλέγματος Keap1/Cul3/Rbx1 στον πυρήνα για την αποικοδόμηση του Nrf2, λειτουργώντας και εδώ ως «διακόπτης» της επαγωγής κύτταρο-προστατευτικών μηχανισμών (34).



**Σχήμα 6.** Η ProTa προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό stress.

Υπό συνθήκες οξειδωτικού stress, η ProTa προσδένεται στο σύμπλοκο μέσω του Keap1, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του Nrf2, τη μετανάστευσή του στον πυρήνα και την ενεργοποίηση του μηχανισμού μεταγραφής γονιδίων και παραγωγής αντιοξειδωτικών ενζύμων. Απενεργοποίηση του μηχανισμού προκαλείται από το σύμπλεγμα ProTa-Keap1-Cul3-Rbx1, το οποίο προσδένει τον Nrf2 και τον οδηγεί στο πρωτεάσωμα, όπου και αποικοδομείται. Σε φυσιολογικές συνθήκες, το σύμπλεγμα Nrf2-Keap1-Cul3-Rbx1 ουβικιτινιλιώνεται (Ub) στο κυτταρόπλασμα και οδηγείται στο πρωτεάσωμα όπου αποικοδομείται. (Ανατύπωση από Καππά και συν., 2013 (29).

### 1.3.3.2. Εξωκυτταρικός ρόλος της ProTa

Εξωκυτταρικά, η ProTa έχει δείξει ότι συμμετέχει στην ενίσχυση της κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*. Η εξωκυτταρική δράση της ProTa μελετήθηκε με *in vivo* πειράματα, που έδειξαν ότι χορήγηση ProTa προστάτευσε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια από ευκαιριακές λοιμώξεις με *Candida albicans*, αλλά και διέγειρε την έκκριση του παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης μακροφάγων (35). Επιπλέον, με πειράματα σε ποντικούς φάνηκε ότι δίαιτα πλούσια σε ψευδάργυρο και παράλληλα καθημερινή χορήγηση ProTa οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής αντισωμάτων από τα σπληνοκύτταρα έναντι συγκεκριμένου, T-εξαρτώμενου αντιγόνου (36). Σε παρόμοια πειράματα, η χορήγηση συγκεκριμένης δόσης ProTa σε νεαρούς ποντικούς είχε ως αποτέλεσμα το διπλασιασμό του λόγου των βοηθητικών CD4+ T-λεμφοκυττάρων προς τα κατασταλτικά CD8+ T-λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος, ενώ επίσης παρατηρήθηκαν διαφορές στο θύμο αδένα όπως αύξηση του μεγέθους του φλοιού, του μυελού και γενικά ολόκληρου του οργάνου (37).

Στα πλαίσια της μελέτης της επίδρασης της ProTa σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς, το πολυπεπίτιδιο φάνηκε ότι είναι ικανό να διεγείρει την κυτταροτοξικότητα

των φυσικών φονικών (natural killer, NK) κυττάρων (38), ενώ, συνεργιστικά με την IL-2, να ενισχύει τη δράση των ενεργοποιημένων από λεμφοκίνες φονικών (lymphokine-activated killer, LAK) κυττάρων (39). Επίσης η ProTa δείχθηκε να επάγει την ωρίμανση ανώριμων προς ώριμα δενδριτικά κύτταρα *in vitro* (40), μέσω της αύξησης της επιφανειακής έκφρασης συγκεκριμένων μορίων-δεικτών στην επιφάνειά τους (HLA-DR, CD11b, CD80, CD83, CD40 και CD86). Έπειτα από μελέτες με πειραματόζωα τα οποία είχαν εμβολιαστεί με τον ιό της ηπατίτιδας Β και με το DNA που κωδικοποιεί την ProTa παρατηρήθηκε πως το πεπτίδιο διεγείρει την ανοσολογική απόκριση τύπου I στα ζώα (41). Επιπλέον, η ProTa ενισχύει τη φαγοκυτταρική ικανότητα, καθώς και την ενδοκυτταρική παραγωγή και εξωκυτταρική απελευθέρωση ριζών οξυγόνου από ουδετερόφιλα περιφερικού αίματος ασθενών με καρκίνο (42). Ακόμη, η ProTa επάγει την έκφραση των γονιδίων *MHC II* τάξης σε ανθρώπινα μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα, αλλά και σε καρκινικά κύτταρα, τα οποία δεν εξέφραζαν τα συγκεκριμένα μόρια (43). Η ProTa φαίνεται να έχει επίσης ανοσορρυθμιστική δράση, η οποία έχει καταδειχθεί και σε περιπτώσεις αυτοάνοσων νοσημάτων. Παραδείγματα αποτελούν η περίπτωση του ερυθματώδη λύκου, όπου η ProTa αυξάνει την έκφραση μορίων *MHC* τάξης II (44) και η περίπτωση της σκλήρυνσης κατά πλάκα, όπου η ProTa επαναφέρει σε φυσιολογικά επίπεδα την μεικτή (αυτόλογη και ετερόλογη) λεμφοκυτταρική απόκριση και αποκαθιστά την λειτουργικότητα των μονοπύρηνων (45).

#### **1.3.3.2α. Εξωκυτταρική δράση της ProTa: Το C-τελικό δεκαπεπτίδιο ProTa[100-109] ως το ανοσοδραστικό κέντρο του μορίου**

Ερευνητικές προσπάθειες των Skopeliti και συνεργατών, στο Εργαστήριο της Δρ. Τσιτσιλώνη, ταυτοποίησαν το C-τελικό δεκαπεπτίδιο ProTa[100-109] ως το τμήμα του μορίου όπου εδράζεται το ανοσοδραστικό κέντρο της ProTa. Οι ερευνητές, για να ελέγξουν την ακριβή δομή της ανοσοδραστικής περιοχής της ProTa, συνέθεσαν πεπτίδια με διαδοχικές, αμινοτελικά επεκτεινόμενες κατά ένα αμινοξύ αλληλουχίες, στην περιοχή 89-109. Τα πεπτίδια τα οποία συνέθεσαν ελέγχθηκαν παράλληλα με το ακέραιο μόριο της ProTa ως προς την ικανότητά τους να ενισχύουν την αυτόλογη μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση και την κυτταροτοξικότητα των PBMCs (μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το δεκαπεπτίδιο ProTa[100-109], με αμινοξική αλληλουχία TKKQKTDEDD, είναι υπεύθυνο για την ανοσορρυθμιστική δράση της ProTa, καθώς παρουσία αυτού παρατηρήθηκε ενίσχυση του πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικής δράσης των λεμφοκυττάρων σε επίπεδα αντίστοιχα με αυτά του ακέραιου πολυπεπτιδίου. Επιπλέον, δείχθηκε ότι το δεκαπεπτίδιο αυτό επάγει *in vitro* την ωρίμανση ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων (46).

Σε έρευνα των Samara και συνεργατών, που έγινε επίσης στο Εργαστήριο της Δρ. Τσιτσιλώνη, μελετήθηκε η επίδραση του ProTa[100-109] στην ενεργοποίηση ουδετερόφιλων από υγιείς δότες και ασθενείς με καρκίνο του μαστού (47). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, διέγερση με ProTa[100-109] ενίσχυσε τη φαγοκυτταρική ικανότητα και την παραγωγή και απελευθέρωση ενεργών ριζών οξυγόνου των ουδετερόφιλων από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, ενώ ιδιαίτερης σημασίας ήταν η ικανότητα του ProTa[100-109] να αυξάνει και την κυτταροτοξική ικανότητα των φυσικών φονικών κυττάρων έναντι καρκινικών κυττάρων. Η δράση του ProTa[100-109] αποδείχθηκε ότι ήταν αντίστοιχη με αυτή της ProTa.

Σε πρόσφατη έρευνα των Voutsas και συνεργατών μελετήθηκε η επίδραση της ProTa και του πεπτιδίου ProTa[100-109] σε λεμφοκύτταρα απομονωμένα από ασκίτικο υγρό ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών (tumor-associated lymphocytes, TALs) (48). Τα κύτταρα TALs εμφανίζουν μειωμένη δραστηριότητα εξαιτίας της ενδογενούς ανοσοκαταστολής που υφίστανται στο περιβάλλον του ασκίτη και για το λόγο αυτό η ενίσχυση της κυτταροτοξικής τους ικανότητας είναι ιδιαίτερης κλινικής σημασίας. Η *in vitro* καλλιέργεια των TALs παρουσία ProTa ή Pro Ta[100-109] οδήγησε στη βελτίωση της κυτταροτοξικής τους δράσης έναντι και των αυτόλογων καρκινικών κυττάρων. Τα *ex-vivo* ενεργοποιημένα με ProTa ή ProTa[100-109] TALs χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά σε ποντίκια SCID, τα οποία είχαν ενοφθαλμιστεί με καρκινικά κύτταρα απομονωμένα από το ασκίτικο υγρό των ίδιων ασθενών. Τα ζώα, που έλαβαν θεραπευτικά τα αυτόλογα με τον όγκο και ενεργοποιημένα με τα πεπτίδια TALs, παρουσίασαν μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης των όγκων και παρατεταμένη επιβίωση συγκριτικά με ζώα-μάρτυρες, υποδεικνύοντας την ικανότητα της ProTa και του ProTa[100-109] να επάγουν δράση των ανοσοενισχυτικών μηχανισμών.

### **1.3.3.2β. Εξωκυτταρική δράση της ProTa: Πιθανοί υποδοχείς του μορίου**

Στα μέσα της δεκαετίας του 1990 εμφανίστηκαν οι πρώτες μελέτες για την εύρεση ειδικών υποδοχέων για την ProTa. Αρχικά, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν ProTa μοσχαριού επισημασμένη με ραδιενεργό Ιώδιο, οπότε εντοπίστηκαν σε ανθρώπινα μονοκύτταρα αίματος δύο πιθανές θέσεις πρόσδεσης σχετιζόμενες με την ProTa. Η πρώτη ήταν υψηλής (250 pM) και η δεύτερη χαμηλής συγγένειας (15 pM) (14). Οι δύο πιθανές θέσεις δέσμευσης φάνηκαν να αφορούν μόνο την ProTa, όχι συγγενή μόρια όπως η Ta1 (14). Σε επόμενη μελέτη, εντοπίστηκαν τρεις πιθανές θέσεις πρόσδεσης της ProTa, με υψηλή, μέση και χαμηλή συγγένεια (49), ενώ αργότερα αναφέρθηκε ότι οι θέσεις πρόσδεσης της ProTa εντοπίζονται σε περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης που είναι πλούσιες σε χοληστερόλη και γλυκοσφιγγολιπίδια (50).

Στα τέλη της δεκαετίας του 2000 εμφανίστηκαν μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες η ProTa πιθανόν να λειτουργεί ως προσδέτης του υποδοχέα TLR-4. Συγκεκριμένα, οι ερευνητές μελέτησαν το προφίλ των κυτταροκινών που εκκρίνονται από μακροφάγα ποντικού ύστερα από επώασή τους με την ProTa. Αναλυτικότερα, επίδραση της ProTa σε μακροφάγα απομονωμένα από φυσιολογικούς (αγρίου τύπου) ποντικούς οδήγησε στην παραγωγή IFN- $\gamma$ , μέσω ενεργοποίησης του TRIF-εξαρτώμενου μονοπατιού, αλλά και στην παραγωγή TNF- $\alpha$ , μέσω ενεργοποίησης του MyD88-εξαρτώμενου μονοπατιού (51, 52)

Το 2013 ακολούθησε μια νέα μελέτη, σε δενδριτικά κύτταρα, από τους Ιοαννου και συνεργάτες (53). Συγκεκριμένα οι ερευνητές συνέκριναν το προφίλ κυττάρων τα οποία είχαν επώασει με την ProTa με εκείνα τα οποία είχαν επώασει με τον «πρότυπο» προσδέτη του υποδοχέα TLR-4, δηλαδή τον LPS.

Πρόσφατα αποτελέσματα ερευνητικών ομάδων του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» έδειξαν με *in vitro* πειράματα ότι ραδιοεπισημασμένη μορφή του ProTa[100-109] ( $[^{99m}\text{Tc}]$ ProTa[100-109]) αναγνωρίζει και δεσμεύεται εξειδικευμένα στην επιφάνεια ανθρώπινων ουδετερόφιλων. Η δέσμευση της ραδιενέργειας αναστέλλεται παρουσία του πρότυπου προσδέτη του υποδοχέα TLR-4, LPS (54).

Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα δεν επαρκούν για να μιλήσουμε με ακρίβεια για συγκεκριμένο υποδοχέα της ProTa. Μπορούμε όμως να μιλήσουμε για πιθανό υποδοχέα του πολυπεπτιδίου σε πιθανούς κυτταρικούς πληθυσμούς.

### 1.3.4.ProTa ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Επειδή η ProTa βρέθηκε να εμπλέκεται στην διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επειδή ο καρκίνος συχνά χαρακτηρίζεται από υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, μελετήθηκε εάν τα επίπεδα της ProTa θα μπορούσαν να συσχετισθούν με διάφορους τύπους καρκίνου. Πράγματι, σε διάφορες περιπτώσεις καρκίνου παρατηρήθηκε ιδιαίτερα αυξημένη ενδοκυτταρική έκφραση της ProTa καθώς και του αντίστοιχου mRNA (55). Μάλιστα, σε ορισμένες περιπτώσεις βρέθηκε συσχέτιση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης του πρωτο-ογκογονιδίου *c-MYC* (55). Με βάση τα παραπάνω στοιχεία της βιβλιογραφίας, η ProTa πιθανόν να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ανίχνευσης όγκων (55).

Παρακάτω παρουσιάζονται τύποι καρκίνων, που έχουν συνδεθεί με την παρουσία της ProTa σε αυξημένα επίπεδα.

**Πίνακας 1.** Τύποι καρκίνου με αυξημένα επίπεδα ProTa

Τύπος καρκίνου	Βιβλιογραφική παραπομπή
Μαστού	Tsitsiloni <i>et al.</i> , 1993 (56)
Ανώτερου ουροποιητικού συστήματος	Jou <i>et al.</i> , 2009 (57)
Ήπατος	Wu <i>et al.</i> , 1997 (58) Fraga <i>et al.</i> , 1993 (59)
Θυρεοειδούς	Letsas <i>et al.</i> , 2007 (60) Kashat <i>et al.</i> , 2010 (61)
Νευροβλάστωμα	Sasaki <i>et al.</i> , 2001 (62)
Ορθού	Ojima <i>et al.</i> , 2007 (63)
Παχέος εντέρου	Mori <i>et al.</i> , 1993 (64)
Εντέρου	Tsitsiloni <i>et al.</i> , 1993 (56)

### 1.3.5.ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ProTa

Η ProTa είναι ένα πολυπεπίδιο με χαμηλή ανοσογονικότητα (65), πιθανόν λόγω της υψηλής συντήρησης που παρουσιάζει η δομή του μεταξύ των ειδών. Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας του μορίου, είναι δύσκολη η ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι ProTa με υψηλό τίτλο και υψηλή χημική συγγένεια. Ωστόσο, κατά το παρελθόν διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν επιχειρήσει να αναπτύξουν αντισώματα που να αναγνωρίζουν την ProTa. Τα αντισώματα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες για την ποιοτική ανίχνευση ή τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων του πολυπεπτιδίου σε διαφορετικά βιολογικά δείγματα, με τη χρήση διαφορετικών τεχνικών, όπως ενδεικτικά φαίνεται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2.** Ενδεικτική παράθεση μελετών για την ProTa, με χρήση αντισωμάτων έναντι της ProTa

Βιβλιογραφική παραπομπή	Ανοσοχημική Τεχνική (Τεχνική που χρησιμοποιεί αντισώματα για την ProTa)	Δείγματα
Samara <i>et al.</i> , 2013 (66)	ELISA	Οροί ποντικών που έχουν μολυνθεί με το βακτήριο <i>Streptococcus pyogenes</i>
Zou <i>et al.</i> , 2013 (67)	ELISA	Πλάσμα από ασθενείς με καρκίνωμα ουροθηλιακών και νεφρικών κυττάρων
Klimetzou <i>et al.</i> , 2008 (68)	Ανοσοκυτταρολογία Ανοσοϊστοχημεία	Καρκινικές κυτταρικές σειρές Τομές ιστού από καρκίνο του προστάτη
Tzai <i>et al.</i> , 2006 (69)	ELISA	Ούρα από υγιείς εθελοντές, ασθενείς με λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος, ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο κύστης ή μη-μεταστατικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης
Costopoulou <i>et al.</i> , 1998 (70)	ELISA	Οροί από υγιή άτομα και ασθενείς με καρκίνο του μαστού και εκχυλίσματα ιστού από ασθενείς με καρκίνο του μαστού
Tsitsilonis <i>et al.</i> , 1994 (71)	RIA	Εκχυλίσματα μαστικού ιστού από ασθενείς με καρκίνο του μαστού

### **2.1.Ανοσοποιητικό σύστημα**

---

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί σύστημα με πολύ σημαντικό ρόλο για την διατήρηση της υγείας του οργανισμού. Είναι υπεύθυνο να αναγνωρίζει κάθε ξένη ουσία και να αντιδρά μέσω μοριακών και κυτταρικών διεργασιών προκειμένου να αποφθεχθεί η εκδήλωση νόσου. Το ανοσοποιητικό σύστημα αναπτύχθηκε προκειμένου να δρα ως ένα πολύπλοκο δίκτυο ασφαλείας το οποίο προστατεύει όχι μόνο από παθογόνους οργανισμούς αλλά και από τον καρκίνο. Αποτελεί ένα πολύπλοκο σύστημα μορίων και κυττάρων το οποίο ανταγωνίζεται σε πολυπλοκότητα το Νευρικό σύστημα. Η δράση του έγκειται στο να διακρίνει εξειδικευμένα τα δικά του συστατικά σε σχέση με τα ξένα και να αποκρίνεται μέσω της ενεργοποίησης λεμφοκυττάρων με σκοπό την εξάλειψη του αντιγόνου, την εξασθένησή του και την ανάπτυξη ανοσολογικής μνήμης.

#### **2.1.1.ΦΥΣΙΚΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ**

Η ανοσία του οργανισμού χωρίζεται στην φυσική ή έμφυτη και την επίκτητη ανοσία. Η φυσική ανοσία είναι η πρώτη γραμμή άμυνας και δεν χαρακτηρίζεται από εξειδίκευση και μνήμη έναντι του παθογόνου. Η φυσική ανοσία αποτελείται από προστατευτικούς μηχανισμούς που υπάρχουν καθ' όλη την διάρκεια ζωής του οργανισμού. Τα υγιή άτομα εξουδετερώνουν την πλειοψηφία των μικροοργανισμών πριν ενεργοποιηθεί η επίκτητη ανοσία. Η φυσική ανοσία ενεργοποιεί το συμπλήρωμα, που αποτελείται από διαλυτούς παράγοντες, τους επιθηλιακούς φραγμούς (π.χ. το δέρμα, τους βλεννογόνους κ.λπ.), τα φαγοκύτταρα και τα NK κύτταρα καθώς και διάφορους διαβιβαστές, όπως οι κυτταροκίνες των μακροφάγων. Οι κυτταροκίνες αποτελούν πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα μολυσμένα κύτταρα και επάγουν έναν «συναγερμό» του ανοσοποιητικού συστήματος. Στις κυτταροκίνες ανήκουν οι ιντερφερόνες (IFNs), που εκκρίνονται ως απόκριση στην εισβολή ιών, αναστέλλουν την αντιγραφή τους μέσα στο κύτταρο και ενεργοποιούν την απόπτωση του μολυσμένου κυττάρου, και που διακρίνονται σε IFNs-α, IFNs-β, IFNs-γ. Στις κυτταροκίνες ανήκουν επίσης οι ιντερλευκίνες (ILs). Όσον αφορά την φυσική ανοσία, οι ILs εκκρίνονται κυρίως από τα μακροφάγα, ενώ όπως θα αναφέρουμε αργότερα εκκρίνονται επίσης και από τα βοηθητικά CD4+ T<sub>H</sub> κύτταρα (κύτταρα της επίκτητης ανοσίας). Τέλος στις κυτταροκίνες υπάγονται και οι παράγοντες νέκρωσης όγκων (TNFs), οι οποίοι παράγονται από τα σιτευτικά, τα καρδιομυοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά, τους ινοβλάστες και τα νευρικά κύτταρα. Εκτός από τις κυτταροκίνες, στους παράγοντες της φυσικής ανοσίας κατατάσσονται και οι κολλεκτίνες. Τέλος, στο σκέλος της φυσικής ανοσίας ανήκουν επίσης τα φαγοκύτταρα, τα οποία και χωρίζονται σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα, με τα μονοκύτταρα να διαφοροποιούνται σε μακροφάγα τα οποία εγκλωβίζουν τον

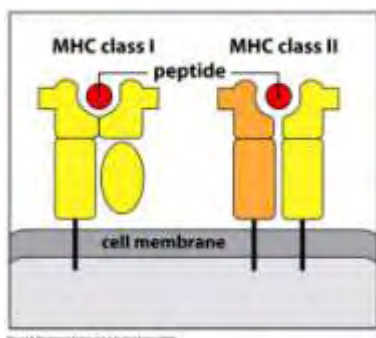
μικροοργανισμό και εκθέτουν στην επιφάνειά τους τμήματά του βοηθώντας στην περαιτέρω αναγνώρισή του. Η φυσική ανοσία «καθοδηγεί» την επίκτητη ανοσία και η επίκτητη ανοσία χρησιμοποιεί μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας για την εξάλειψη της λοίμωξης.

Σε περίπτωση αποτυχίας της φυσικής ανοσίας ενεργοποιείται η επίκτητη ανοσία. Στην περίπτωση της επίκτητης ανοσίας ενεργοποιούνται τα Β-λεμφοκύτταρα, από τα οποία και θα παραχθούν αντισώματα εναντίον ειδικών αντιγόνων (κυρίως εναντίον πρωτεϊνών του μικροοργανισμού - εισβολέα, τις οποίες ο οργανισμός-ξενιστής αναγνωρίζει ως «ξένες») και τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα οποία συμβάλλουν με πολλούς τρόπους στην ανοσολογική απόκριση. Η επίκτητη ανοσία χαρακτηρίζεται από δύο κύρια χαρακτηριστικά: την εξειδίκευση και την μνήμη. Η μνήμη αναφέρεται στην ικανότητα του οργανισμού να θυμάται με ποια αντιγόνα έχει έρθει σε επαφή με σκοπό μια πιο γρήγορη απόκριση σε περίπτωση δεύτερης επαφής με το ίδιο αντιγόνο. Η εξειδίκευση ορίζεται ως η ιδιότητα των αντισωμάτων να αναγνωρίζουν πρωτεΐνες που διαφέρουν ελάχιστα. Έτσι οι υποδοχείς των Τ και Β λεμφοκυττάρων να διακρίνουν τις μικρές και λεπτές διαφορές των διάφορων επιτόπων (δηλαδή, των δομικών περιοχών ενός αντιγόνου, που αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς των λεμφοκυττάρων). Επιπλέον χαρακτηριστικό της επίκτητης ανοσίας είναι η τεράστια ποικιλία ειδικών λεμφοκυττάρων, τα οποία θεωρείται ότι έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν έως και 1.000.000.000 διαφορετικούς επιτόπους.

Τα Β-λεμφοκύτταρα έχουν ως τόπο ωρίμανσης το μυελό των οστών. Όταν ωριμάσουν και εγκαταλείψουν τον μυελό των οστών, τα Β-λεμφοκύτταρα φέρουν στην επιφάνειά τους έναν υποδοχέα, ειδικό για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο (πιο σωστά, για ένα συγκεκριμένο επίτοπο). Το αντίσωμα, που εκκρίνεται από τα Β λεμφοκύτταρα, και ο υποδοχέας που τα Β λεμφοκύτταρα φέρουν στην επιφάνειά τους, είναι πανομοιότυποι. Επαφή ενός Β-λεμφοκυττάρου με το αντίστοιχο αντιγόνο θα προκαλέσει την δέσμευση του αντιγόνου με τον υποδοχέα με αποτέλεσμα τον γρήγορο πολλαπλασιασμό των Β κυττάρων και την μετέπειτα διαφοροποίησή τους σε Β κύτταρα μνήμης και πλασματοκύτταρα. Τα τελευταία εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες αντισώματος στην κυκλοφορία του αίματος, ενώ τα Β κύτταρα μνήμης «θυμούνται» την έκθεση στο συγκεκριμένο αντιγόνο, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται άμεσα μετά από επόμενη έκθεσή τους στο ίδιο αντιγόνο.

Τα Τ-λεμφοκύτταρα αν και προέρχονται από τον μυελό των οστών ωριμάζουν στον θύμο αδένα, από το όνομα του οποίου πήραν και την ονομασία τους (thymus). Τα Τ-λεμφοκύτταρα, κατά τη διαδικασία της ωρίμανσής τους, εκφράζουν στην επιφάνειά τους συγκεκριμένους υποδοχείς, οι οποίοι αναγνωρίζουν αντιγόνα τα οποία είναι συνδεδεμένα με τις πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC). Δηλαδή, οι πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικά μόρια του αντιγόνου στα Τ-λεμφοκύτταρα. Οι πρωτεΐνες MHC διακρίνονται σε πρωτεΐνες τάξης I, οι οποίες και εμφανίζονται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα και αλληλεπιδρούν με τα κυτταροτοξικά Τ-κύτταρα (T<sub>c</sub>), και στις MHC τάξης II, που εμφανίζονται σε όλα τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρούν με τα βοηθητικά Τ-κύτταρα (T<sub>H</sub>). Η αλληλεπίδραση των T<sub>H</sub> με τις MHC τάξης II έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση κυτταροκινών, όπως προαναφέρθηκε. Οι κυτταροκίνες θα ενεργοποιήσουν τα Β -κύτταρα, τα T<sub>c</sub> καθώς και άλλους κυτταρικούς τύπους, που συμβάλλουν στην ανοσολογική απόκριση.





**Σχήμα 7.** Σχηματική παράσταση των συμπλεγμάτων πρωτεϊνών του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου I και τύπου II (MHC I και MHC II) με τμήματα του μορίου του αντιγόνου.

## 2.2.Αντιγόνα - Ανοσογόνα

---

Τα αντιγόνα είναι μόρια ή συστατικά, τα οποία μπορεί να αναγνωριστούν από υποδοχείς των T και B-λεμφοκυττάρων. Τα ανοσογόνα, ή διαφορετικά όπως ονομάζονται τα πλήρη αντιγόνα, είναι μόρια που μπορεί να προκαλέσουν κυτταρομεσολαβητική ή χυμική ανοσολογική απόκριση και να αντιδράσουν ειδικά με τα προϊόντα της χυμικής απόκρισης, που είναι τα αντισώματα. Υπάρχουν επίσης τα απένια ή ατελή αντιγόνα, που έχουν την ικανότητα να συνδέονται με τα αντισώματα, χωρίς όμως να έχουν την ικανότητα να επάγουν ανοσολογική απόκριση. Τα απένια είναι συνήθως μόρια μικρού μοριακού βάρους και μπορούν να καταστούν ανοσογονικά μετά από ομοιοπολική πρόσδεση (σύζευξη) σε κατάλληλο φορέα –συνήθως σε μία πρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους.

## 2.3.Αντισώματα

---

Τα αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulins, Igs) είναι τα εκτελεστικά όργανα του αμυντικού συστήματος του οργανισμού. Παράγονται από τα B-λεμφοκύτταρα με μοναδικό στόχο να αναγνωρίζουν συγκεκριμένους εισβολείς όπως βακτήρια ή ιούς και να συμβάλουν στην καταστροφή τους. Το αντίσωμα αναγνωρίζει ένα μοναδικό κομμάτι του εισβολέα, το αντιγόνο. Η δομή κάθε ανοσοσφαιρίνης μοιάζει με το γράμμα Y και συνδέεται όπως ένα κλειδί με μια κλειδαριά με το αντιγόνο, το οποίο αναγνωρίζει. Συγκεκριμένα κάθε ανοσοσφαιρίνη έχει ένα και μοναδικό είδος παρατόπου, δομής που μοιάζει με κλειδαριά και αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο επίτοπο, μια δομή στο μόριο του αντιγόνου που μοιάζει με κλειδί, ώστε να γίνεται η σύνδεση παρατόπου – επιτόπου με ακρίβεια. Κάθε αντίσωμα αποτελείται από δύο μεγάλες (βαριές, H) πεπτιδικές αλυσίδες, μοριακού βάρους 50 kDa, και δύο μικρές (ελαφρές, L) αλυσίδες, μοριακού βάρους 25 kDa. Κάθε ελαφριά αλυσίδα συνδέεται με την βαριά με δισουλφιδικούς δεσμούς καθώς και με μη ομοιοπολικούς

δεσμούς. Οι δύο βαριές και οι δύο ελαφριές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους επίσης με μη ομοιοπολικούς και δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα αντισώματα χαρακτηρίζονται από δύο περιοχές, την μεταβλητή περιοχή που συμβολίζεται με το γράμμα V (variable) και τη σταθερή περιοχή η οποία συμβολίζεται με το γράμμα C (constant). Η μεταβλητή περιοχή είναι εκείνη στην οποία οφείλεται η διαφορετική εξειδίκευση κάθε αντισώματος. Αυτή η περιοχή αποτελείται από την αμινοτελική περιοχή μιας βαριάς αλυσίδας και μιας ελαφριάς αλυσίδας, και είναι και η περιοχή η οποία μεταβάλλεται ανάλογα με την αλληλουχία των αμινοξέων της. Στο ανθρώπινο σώμα υπάρχουν πέντε κατηγορίες αντισωμάτων (τάξεις), που χαρακτηρίζονται με ένα γράμμα του λατινικού αλφαβήτου, IgG, IgA, IgM, IgD και IgE, ανάλογα με το είδος των βαριών αλυσίδων που περιέχουν. Όλα τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες (συγκεκριμένα γλυκοπρωτεΐνες), αλλά η κάθε κατηγορία έχει διαφορετική επί μέρους σύσταση καθώς και διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες και λειτουργίες.

Η τάξη των IgG αφθονεί στον ορό του αίματος (ποσοστό περίπου 80%) και για το λόγο αυτό τα περισσότερα πολυκλωνικά αντισώματα, που χρησιμοποιούνται σε ερευνητικά εργαστήρια, προέρχονται από αντιορούς (δηλαδή από τον ορό αίματος ανοσοποιημένων ζώων) και ανήκουν στην κατηγορία των IgG. Δεύτερη στον ορό του αίματος έρχεται η τάξη IgM με ποσοστό 5-10%. Οι IgAs εντοπίζονται κυρίως στο σάλιο, τα δάκρυα καθώς και στη βρογχική και εντερική βλέννα και για το λόγο αυτό λειτουργούν ως πρώτη γραμμή άμυνας έναντι βακτηριακών και ιικών αντιγόνων. Οι IgDs βρίσκονται στον ορό του αίματος σε ποσοστό μικρότερο από 10%, ωστόσο απαντώνται σε μεγάλο ποσοστό στην κυτταρική μεμβράνη πολλών B-λεμφοκυττάρων. Τέλος, οι IgEs βρίσκονται σε πολύ μικρό ποσοστό στον ορό του αίματος, ενώ απαντώνται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης βασεόφιλων και μονοκυττάρων και συνδέονται με την αλλεργική αντίδραση.

### **2.3.1. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ**

Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι αντισώματα με πλήρως πανομοιότυπη ειδικότητα, με άλλα λόγια εμφανίζουν ειδικότητα για ένα μόνο επίτοπο. Τα μονοκλωνικά αντισώματα παράγονται στο εργαστήριο με σύντηξη σπληνικών κυττάρων ποντικού, ο οποίος είχε προηγουμένως ανοσοποιηθεί με συγκεκριμένο αντιγόνο, και μυελωματικών κυττάρων (καρκινικών B-λεμφοκυττάρων). Η σύντηξη αυτή έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή υβριδικών κυττάρων, που μπορούν να παράγουν ειδικά αντισώματα (λόγω των αρχικών B-λεμφοκυττάρων του ανοσοποιημένου ζώου) και επιπλέον έχουν την ιδιότητα να πολλαπλασιάζονται και να διατηρούνται σε κυτταρική σειρά, δηλαδή να είναι αθάνατα (λόγω των αρχικών μυελωματικών κυττάρων). Τα μονοκλωνικά αντισώματα παράγονται επίσης με μεθόδους μοριακής γενετικής, κατά τις οποίες γίνεται εισαγωγή των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ειδικές ανοσοσφαιρίνες σε κύτταρα *Escherichia coli* με τη βοήθεια βακτηριοφάγου. Το βασικό πλεονέκτημα των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι η πλήρης ομοιογένεια των χαρακτηριστικών τους και η δυνατότητα μαζικής παραγωγής τους για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.

### 2.3.2.ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα πολυκλωνικά αντισώματα είναι μίγμα αντισωμάτων που εκκρίνονται από διαφορετικούς κλώνους Β-λεμφοκυττάρων. Αναπτύσσονται σε κουνέλια ή μεγαλύτερα θηλαστικά και παραλαμβάνονται αρχικά υπό την μορφή αντιορού. Η παραγωγή τους είναι πιο εύκολη και λιγότερο δαπανηρή από αυτή των μονοκλωνικών αντισωμάτων και συνήθως παρουσιάζουν υψηλότερη τάση για σύνδεση (βλ. 2.3.3) για το αντίστοιχο αντιγόνο σε σχέση με τα μονοκλωνικά. Επίσης, τα πολυκλωνικά αντισώματα είναι περισσότερο ανθεκτικά στις συνθήκες του περιβάλλοντος φύλαξής τους σε σχέση με τα μονοκλωνικά.

### 2.3.3.ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Χημική συγγένεια (Affinity): Πρόκειται για την ισχύ, με την οποία συνδέεται ο παράτοπος του αντισώματος με τον επίτοπο του αντιγόνου.

Τάση προς σύνδεση (Avidity): Πρόκειται για τη συνολική ισχύ με την οποία συνδέεται ένα αντίσωμα με ένα αντιγόνο. Συνδέεται τόσο με το πλήθος των αντισωμάτων όσο και με τη χημική τους συγγένεια.

Τίτλος (Titer): Πρόκειται για τη σχετική συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων, που είναι παρόντα σε ένα δείγμα αντιορού. Ο τίτλος προσδιορίζεται με ένα συγκεκριμένο τύπο εργαστηριακού πειράματος, συνήθως με πειράματα τιτλοδότησης ELISA. Στην περίπτωση αυτή, ο τίτλος εκφράζεται ως η αραίωση του αντιορού που αντιστοιχεί σε τιμή οπτικής απορρόφησης  $\approx 1$ .

Εξειδίκευση (Specificity): Πρόκειται για την ικανότητα του αντισώματος να αναγνωρίζει αποκλειστικά το αντίστοιχο αντιγόνο, παρουσία πλήθους άλλων μορίων.

Διασταυρούμενη αντίδραση (Cross-reaction): Περιγράφει το φαινόμενο κατά το οποίο το αντίσωμα αναγνωρίζει, πέρα από το αντίστοιχο αντιγόνο, άλλες ουσίες οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη δομική ομοιότητα με το αντιγόνο.

## 2.4.Η μέθοδος ELISA

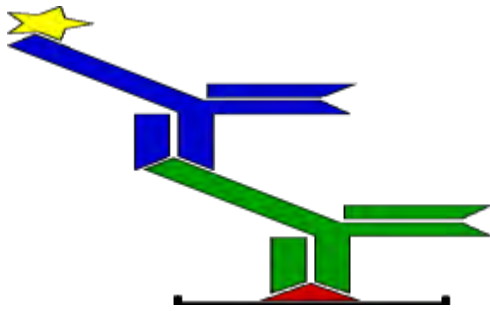
---

Το 1971, οι Peter Perlmann και Eva Engvall από το Πανεπιστήμιο της Στοκχόλμης στη Σουηδία, και οι Anton Schuurs και Bauke van Weemen από την Ολλανδία δημοσίευσαν ανεξάρτητα επιστημονικές εργασίες, οι οποίες ανέφεραν την αρχή της μεθόδου ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (72, 73).

Όπως φανερώνει και ο τίτλος της, η ELISA είναι μια ενζυμική ανοσοανάλυση, η οποία ως προς την αρχή της μοιάζει με τον ανοσοφθορισμό. Η μέθοδος ELISA βασίζεται στη χρήση αντιγόνου ή αντισώματος που έχει συνδεδεμένο στο μόριό του ένα ένζυμο. Το ένζυμο καταλύει μια χημική αντίδραση, η οποία συνοδεύεται από μεταβολή των ιδιοτήτων του αρχικού ενζυμικού υποστρώματος, π.χ. μεταβολή του χρώματος. Η μέθοδος ELISA χρησιμοποιείται στην ανοσολογία για την ανίχνευση ενός αντιγόνου ή ενός αντισώματος σε

ένα δείγμα, εφ' όσον υπάρχει διαθέσιμο το αντίστοιχο αντίσωμα ή, αντίστροφα, το αντίστοιχο αντιγόνο. Η μέθοδος ELISA χρησιμοποιείται πολύ συχνά για την ανίχνευση ή/και τον προσδιορισμό της σχετικής συγκέντρωσης (προσδιορισμός τίτλου) ενός ειδικού αντισώματος σε έναν αντιορό, ως εξής:

Αρχικά, το αντιγόνο ακινητοποιείται επάνω στα φρεάτια πλακιδίου ELISA (πλακίδια προεπεξεργασμένου πολυστυρολίου, 96 θέσεων), μέσω μη ειδικής προσρόφησης. Η ποσότητα του αντιγόνου, η οποία δεν έχει ακινητοποιηθεί στο φρεάτιο, απομακρύνεται μετά από έκπλυση με ειδικό διάλυμα και συνήθως ακολουθεί «κορεσμός» των τυχόν ακάλυπτων θέσεων προσρόφησης στα φρεάτια. Στην συνέχεια γίνεται επώαση με το υπό αξιολόγηση αντίσωμα, υπό τη μορφή διαδοχικών αραιώσεων του αντίστοιχου αντιορού. Έπειτα ακολουθεί απόχυση του πρώτου αντισώματος, έκπλυση των φρεατίων και επώαση με ένα δεύτερο αντίσωμα (αντι-αντίσωμα), που αναγνωρίζει το πρώτο και που είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο (ενζυμικώς επισημασμένο δεύτερο αντίσωμα). Η ανίχνευση του ενζυμικού ιχνηθέτη απαιτεί την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος και τη μέτρηση της καταλυτικής δράσης του ενζύμου. Για το λόγο αυτό, στο τέλος προστίθεται κατάλληλο, χρωμογόνο ενζυμικό υπόστρωμα, το οποίο παρουσία του ενζύμου μετατρέπεται σε έγχρωμο προϊόν. Μια μικρή σχετικά ποσότητα ενζύμου μπορεί να προκαλέσει την ταχεία μετατροπή μεγάλης ποσότητας υποστρώματος σε έγχρωμο προϊόν. Η παραγωγή αυτού του προϊόντος συνήθως διακόπτεται με την προσθήκη συγκεκριμένου αντιδραστηρίου (π.χ. ενός οξέος) και στη συνέχεια μετράται η οπτική απορρόφηση, (A) (ή οπτική πυκνότητα, OD) με τη χρήση ειδικού φασματοφωτόμετρου τύπου ELISA (ELISA reader). Ο τίτλος του αντισώματος προσδιορίζεται μέσω της καμπύλης τιτλοδότησης και αντιστοιχεί στην αραιώση του αντιορού που οδηγεί σε προκαθορισμένη τιμή του τελικού σήματος οπτικής απορρόφησης (συνήθως  $\sim 1$ ). Να σημειωθεί ότι προσθήκη διαλυμάτων του αντιγόνου, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, κατά το στάδιο της επώασης με το πρώτο αντίσωμα έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή «εκτόπιση» του πρώτου αντισώματος από τα φρεάτια. Ποιοτικά ανάλογο αποτέλεσμα έχει, πολλές φορές, και η προσθήκη διαλυμάτων άλλων ουσιών, δομικά όμοιων με το αντιγόνο, εάν αυτές αναγνωρίζονται από το αντίσωμα.



**Σχήμα 8.** Σχηματική παράσταση της βασικής αρχής μεθόδου ELISA, που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του τίτλου ενός ειδικού αντισώματος.

Το οπτικό σήμα (οπτική απορρόφηση) προκύπτει από την έμμεση πρόσδεση ενζυμικώς επισημασμένου (κίτρινο) δεύτερου αντισώματος (μπλε) σε αντιγόνο ακινητοποιημένο σε φρεάτια πλακιδίου ELISA (κόκκινο), μέσω ειδικού πρώτου αντισώματος (πράσινο), που χρησιμοποιείται σε διαφορετικές αραιώσεις. Οι διαφορετικές αραιώσεις πρώτου αντισώματος οδηγούν σε διαφορετική τιμή οπτικής απορρόφησης. Ο τίτλος του αντισώματος αντιστοιχεί στην αραιώση που οδηγεί σε τιμή οπτικής απορρόφησης  $\sim 1$ .

Πέρα από την εφαρμογή της προαναφερθείσας μορφής ELISA στην αξιολόγηση αντισωμάτων, διάφορες μορφές της μεθόδου έχουν αναπτυχθεί (π.χ. ανταγωνιστική ή μη ανταγωνιστική –sandwich ELISA) και χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την ποιοτική ανίχνευση ή/και τον ποσοτικό προσδιορισμό πλήθους αντιγόνων σε ειδικά δείγματα. Για παράδειγμα, σε μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μορφή ανταγωνιστικής ELISA χρησιμοποιείται ενζυμικώς επισημασμένο αντιγόνο. Στην περίπτωση αυτή το προς μέτρηση και το επισημασμένο αντιγόνο ανταγωνίζονται για την κατοχή των θέσεων σύνδεσης ειδικού αντισώματος, σε περιορισμένη συγκέντρωση, που έχει ακινητοποιηθεί σε φρεάτια ELISA και το τελικώς μετρούμενο οπτικό σήμα είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης του προς μέτρηση αντιγόνου.

Διάφορες μορφές ανταγωνιστικής ή μη ανταγωνιστικής μεθόδου ELISA χρησιμοποιούνται ευρύτατα, π.χ. στο κλινικό εργαστήριο για τον προσδιορισμό ειδικών βιοδεικτών ή για τον προσδιορισμό των επιπέδων φαρμάκων, στη βιομηχανία τροφίμων για την ανίχνευση αλλεργιογόνων σε τρόφιμα, στην τοξικολογία για την ανίχνευση ναρκωτικών ουσιών, κ.λπ.



**Σχήμα 9.** Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων σε συσκευή αυτόματης έκπλυσης.

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση εργαστηριακών εργαλείων για τη μελέτη της ProTa –συγκεκριμένα πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της ProTa. Τα πολυκλωνικά αντισώματα είχαν αναπτυχθεί κατά το παρελθόν στα εργαστήρια του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι το μόριο της ProTa είναι γνωστό για τη χαμηλή του ανοσογονικότητα, ενώ, έως και σήμερα, δεν υπάρχουν ευρέως διαθέσιμα στο εμπόριο αντισώματα έναντι του πολυπεπτιδίου.

Τα υπό αξιολόγηση αντισώματα είχαν αναπτυχθεί σε λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας εναντίον της ProTa (απομονωμένης από βόειους ιστούς, εμπορικά διαθέσιμης) ή συνθετικών πεπτιδικών τμημάτων του πολυπεπτιδίου, μετά από σύζευξή τους σε ειδικό φορέα. Τα συνθετικά πεπτίδια που είχαν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι της ProTa ήταν τα: ProTa[1-28] (ή Ta1), ProTa[1-14], ProTa[1-11], ProTa[87-109] και ProTa[100-109]. Τα παραπάνω συνθετικά πεπτίδια είχαν παρασκευασθεί στα εργαστήρια του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» σύμφωνα με παλαιότερα δημοσιευμένη μέθοδο. Οι φορείς που είχαν χρησιμοποιηθεί για τη σύζευξη της ProTa ή των συνθετικών πεπτιδίων της ήταν οι: αιμοκυανίνη του οργανισμού *Keyhole limpet* (keyhole limpet haemocyanin ή KLH), αιμοκυανίνη του οργανισμού *Rapana venosa* (RVH) και ένα συνθετικό πολυλυσινικό δένδριμερές (PLD). Συνολικά, αξιολογήθηκαν τα ακόλουθα αντισώματα:

- Ab-ProTa/KLH,
- Ab-ProTa[1-28]/KLH (ή Ab-Ta1/KLH),
- Ab-ProTa[1-14]/KLH,
- Ab-ProTa[1-11]/PLD,
- Ab-ProTa[87-109]/KLH,
- Ab-ProTa[100-109]/KLH,
- Ab-ProTa[100-109]/RVH

Η αξιολόγηση των αντισωμάτων έγινε με πειράματα τιτλοδότησης ELISA και με πειράματα εκτόπισης ELISA. Με βάση τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των διαφορετικών πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της ProTa μπορούμε να συμπεράνουμε εάν ορισμένα από αυτά διαθέτουν ικανοποιητικά υψηλό τίτλο και επιθυμητή εξειδίκευση. Τα αντισώματα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε ειδικές ανοσοχημικές μεθόδους (π.χ. σε μεθόδους ανοσοϊστοχημείας, ανοσοκυτταρολογίας, σε ανοσοανάλυσεις, αναλύσεις Western blot, κ.λπ.), με αρχικό στόχο την ανίχνευση της ProTa ή/και βιοδραστικών θραυσμάτων της σε επιλεγμένα βιολογικά παρασκευάσματα και με απώτερο στόχο την περαιτέρω αποσαφήνιση του βιολογικού ρόλου της ProTa.

## **ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3.1.ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ProTα ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ProTα[1-28] (Tα1) & ProTα[100-109] ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ (RP-HPLC)**

#### **3.1.1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ**

Ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) αποτελείται γενικά από τα εξής μέρη:

1. Δυο δοχεία αποθήκευσης διαλυτών (Α και Β). Τα δοχεία αυτά τις πιο πολλές φορές είναι συνδεδεμένα με απαερωτή, για την απομάκρυνση του διαλυμένου αέρα, ο οποίος μπορεί να επηρεάσει την ανάλυση.
2. Βαλβίδα ανάμιξης διαλυτών: Συντελεί στην ανάμιξη των διαλυτών πριν αυτοί εισέλθουν στο θάλαμο διαχωρισμού και περάσουν από τη στήλη.
3. Αντλίες: Η υψηλή πίεση πρέπει να εφαρμοστεί στην υγρή κινητή φάση για να διέλθει από τη στήλη διαχωρισμού με ικανοποιητική ταχύτητα, κάτι το οποίο τείνουν να επιτύχουν οι αντλίες. Οι αντλίες παρασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα υψηλής ποιότητας ή από αδρανή πολυμερή, όπως τα πολυτετραφθοροαιθυλένιο, ώστε να αντιστέκονται στην προσβολή από οποιαδήποτε κινητή φάση.
4. Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος: Αποτελείται από ένα βαθμονομημένο βρόγχο, ώστε να εισάγεται σταθερός και επιλήψιμος όγκος δείγματος κάθε φορά ή περιέχει βρόγχο μεγάλης περιεκτικότητας και ο όγκος δείγματος υπολογίζεται με σύριγγα. Έπειτα και συνήθως χειροκίνητα γίνεται έγχυση του δείγματος στην κινητή φάση
5. Προστήλη: Η προστήλη τις πιο πολλές φορές περιέχει τα ίδια υλικά με την στήλη διαχωρισμού και η χρησιμότητά της είναι να δρα ως φίλτρο το οποίο απομακρύνει τις ισχυρά κρατούμενες ενώσεις που είναι δυνατό να κορέσουν την αναλυτική στήλη και να ελαττώσουν την διάρκεια ζωής της.
6. Στήλη: Ως υλικά πλήρωσης των στηλών έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά συστατικά (άνθρακας, οργανικά, πολυμερή, κ.ά.) ενώ η επιλογή τους καθορίζει και το φυσικοχημικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα στους διαχωρισμούς και συνεπώς το είδος της χρωματογραφίας. Το οξείδιο του πυριτίου είναι το πιο διαδεδομένο υλικό πλήρωσης.

7. Ανιχνευτές :Χρησιμοποιείται πληθώρα ανιχνευτών και όλοι παράγουν ένα ενισχυμένο σήμα το οποίο είναι ανάλογο της ποσότητας της ουσίας που εκλύεται κάθε στιγμή. Στην HPLC οι σημαντικότεροι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται είναι :
- 1) φασματοφωτομετρικοί (UV ή IR),
  - 2) φθορισμομετρικοί,
  - 3) ανιχνευτές δείκτη διάθλασης
  - 4) ιονισμού φλόγας,
  - 5) φάσματος μαζών,
  - 6) ραδιενέργειας ,
  - 7) χημικοί ανιχνευτές,
  - 8) ηλεκτρικοί ανιχνευτές

Οι μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) είναι οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενοι μέθοδοι HPLC, διότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλές εφαρμογές (74). Η στατική φάση που χρησιμοποιείται στις στήλες διαχωρισμού των μεθόδων HPLC είναι το οξείδιο του πυριτίου. Η στατική φάση, μετά από την κατάλληλη χημική επεξεργασία, φέρει στην επιφάνεια της άλκυλο-πυριτικές ομάδες συνήθως δεκαόκτυλο-πυριτικές (C18), που προσδίδουν στη στήλη υδρόφοβο χαρακτήρα. Η κατακράτηση στη στήλη των προς διαχωρισμό / ταυτοποίηση ουσιών οφείλεται στην ανάπτυξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών και της επιφάνειας στατικής φάσης. Συγκεκριμένα, για την έκλυση πεπτιδικών μορίων από τη στήλη χρησιμοποιείται σύστημα έκλυσης, γραμμικής βαθμίδωσης, δύο διαλυτών Α και Β. Ο διαλύτης Α είναι συνήθως 0,05 – 0,1 % τριφθορο-οξικό οξύ (TFA) σε H<sub>2</sub>O, ενώ ο διαλύτης Β περιέχει συνήθως ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη. Οι διάφορες ουσίες εκλύονται κατά σειρά αύξουσας υδροφοβικότητας.

### **3.1.2.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ**

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάλυση της ProTα και των συνθετικών πεπτιδίων ProTα[1-28] (Tα1) και ProTα[100-109] με RP-HPLC.

**Πίνακας 3.** Συνθήκες αναλυτικής μεθόδου RP-HPLC

Πεπτίδιο	Στήλη	Διαλύτες έκλυσης	Μεταβολή σύστασης μέσου έκλυσης	UV ανίχνευση (nm)
ProTa	<u>Symmetry 300 C4</u> 4,6 x 250 mm ID Waters	<u>Διαλύτης A:</u> 0,05% TFA σε H <sub>2</sub> O <u>Διαλύτης B:</u> ακετονιτρίλιο : διαλύτης A, 90 : 10	1 – 20 min: 100% A – 40% A	220
ProTa[1-28] (Ta1)	<u>Symmetry 300 C4</u> 4,6 x 250 mm ID Waters	<u>Διαλύτης A:</u> 0,05% TFA σε H <sub>2</sub> O <u>Διαλύτης B:</u> ακετονιτρίλιο : διαλύτης A, 90 : 10	1 – 20 min: 100% A – 40% A	220
ProTa[100-109]	<u>LiChrospher RP C18</u> 4,6 x 250 mm ID Merck	<u>Διαλύτης A:</u> 0,05% TFA σε H <sub>2</sub> O <u>Διαλύτης B:</u> ακετονιτρίλιο : διαλύτης A, 90 : 10	1 – 23 min: 100% A – 85% A	220

## 3.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ ELISA

### 3.2.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

1. Ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-χλωριούχων (PBS) 0,01 M pH 7,4

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,204 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,424 g
KCl	0,201g
NaCl	8,766 g

Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε 500 mL H<sub>2</sub>O και στην συνέχεια συμπληρώνεται όγκος έως 1 L H<sub>2</sub>O, το pH ρυθμίζεται στο 7,4.

2. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 0,01 M, pH 7,4 (PB)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,204 g
---------------------------------	---------

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,424 g

Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε 500 mL H<sub>2</sub>O και στην συνέχεια συμπληρώνεται όγκος έως 1 L H<sub>2</sub>O, το pH ρυθμίζεται στο 7,4.

3. Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών (CB), 0,1 M, pH 5,0
4. Διάλυμα έκπλυσης: 0,05 % v/v Tween-20 σε PBS 0,01 M, pH 7,4
5. Διάλυμα κορεσμού: διάλυμα έκπλυσης που περιέχει 2 % w/v BSA
6. Διάλυμα αραιώσης: διάλυμα έκπλυσης που περιέχει 0,2 % w/v BSA
7. Διάλυμα ενζυμικώς επισημασμένου δεύτερου αντισώματος: εμπορικά διαθέσιμο goat anti-rabbit IgG/HRP (Sigma), αραιωμένο 1:1000 σε διάλυμα αραιώσης
8. Διάλυμα ενζυμικού υποστρώματος:  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 8,900g  
Κιτρικό οξύ 10,537 g  
Υπερβορικό νάτριο 0,241g

Τα συστατικά διαλύονται σε 400 mL H<sub>2</sub>O, το pH ρυθμίζεται σε 4,4 με NaOH 1 N και συμπληρώνεται ο όγκος έως 500 mL με H<sub>2</sub>O. Στην συνέχεια προστίθενται 0,5 g ABTS και το διάλυμα αναδεύεται μέχρι να διαλυθεί πλήρως.

9. Πλακίδια μικροτιτλοδότησης ELISA: Costar 3590
10. Συσκευή αυτόματης έκπλυσης πλακών ELISA, Model Multiwash II (Tricontinent)
11. Επωαστικός κλίβανος Precision, 4EG
12. Φωτόμετρο πλακών ELISA, Model Sirio S (Seac)

### 3.2.2. ANTIΟΡΟΙ - ANΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αντισώματα που αξιολογήθηκαν με τα πειράματα τιτλοδότησης ELISA ήταν τα ακόλουθα:

- Αντίσωμα εναντίον του συνθετικού πεπτιδικού τμήματος ProTa[1-14], συζευγμένου στην πρωτεΐνη KLH (Ab-ProTa[1-14]/KLH),
- Αντίσωμα εναντίον του συνθετικού πεπτιδικού τμήματος ProTa[1-11], συζευγμένου σε συνθετικό πολυλυσινικό δενδριμερές (Ab-ProTa[1-11]/PLD),

- Αντίσωμα εναντίον του συνθετικού πεπτιδικού τμήματος ProTa[1-28] (Ta1), συζευγμένου στην πρωτεΐνη KLH (Ab-ProTa[1-28]/KLH ή Ab-Ta1/KLH),
- Αντίσωμα εναντίον ολόκληρου του μορίου της ProTa, συζευγμένου στην πρωτεΐνη KLH (Ab-ProTa/KLH),
- Αντίσωμα εναντίον του συνθετικού πεπτιδικού τμήματος ProTa[87-109], συζευγμένου στην πρωτεΐνη KLH (Ab-ProTa[87-109]/KLH),
- Αντίσωμα εναντίον του συνθετικού πεπτιδικού τμήματος ProTa[100-109], συζευγμένου στην πρωτεΐνη KLH (Ab-ProTa[100-109]/KLH),
- Αντίσωμα εναντίον του συνθετικού πεπτιδικού τμήματος ProTa[100-109], συζευγμένου στην πρωτεΐνη RVH (Ab-ProTa[100-109]/RVH)

Ως πηγή των διαφορετικών πολυκλωνικών αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι αντιοροί (αντιορός: ο ορός αίματος του ανοσοποιημένου ζώου). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα: Α: ορός αίματος φυσιολογικού κουνελιού (normal rabbit serum, NRS), Β: αντίσωμα εναντίον του Ν-τελικού τετραπεπτιδίου της θυμοσίνης βήτα 4 συζευγμένου σε KLH (Ab-AcSDKP/KLH), Γ: αντίσωμα εναντίον της KLH (Ab-KLH).

### 3.2.3.ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΘΟΔΟΥ

#### 3.2.3.1.Πρωτόκολλο Ι

Φρεάτια πλακιδίων ELISA επικαλύπτονται (100 μL/φρεάτιο) με διάλυμα ProTa σε CB (1 μg/mL, 0,2 μg/mL ή 0,1 μg/mL) και έπειτα παραμένουν όλη την νύχτα σε επωαστικό κλίβανο (37 °C). Την επόμενη ημέρα το υγρό αποχύνεται από τα φρεάτια και ακολουθεί έκπλυση του πλακιδίου με PB. Στην συνέχεια ακολουθεί επώαση 1 h με διάλυμα κορεσμού (200 μL/φρεάτιο, θερμοκρασία δωματίου), με σκοπό να καλυφθούν οι τυχόν απομείνισες ελεύθερες θέσεις στην στερεή επιφάνεια. Ακολουθεί απόχυση και έκπλυση των φρεατίων (τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης). Στην συνέχεια στα φρεάτια προστίθενται οι αντιοροί, που πρόκειται να αξιολογηθούν, αραιωμένοι (1:1.000 –1:60.000) σε διάλυμα αραιώσης (100 μL/φρεάτιο), παράλληλα με αρνητικούς μάρτυρες, και τα φρεάτια επωάζονται για 2 h (37 °C). Ακολουθεί απόχυση του υγρού των φρεατίων, έκλυση (τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης), προσθήκη στα φρεάτια του διαλύματος του ενζυμικώς επισημασμένου δεύτερου αντισώματος (100 μL/φρεάτιο) και επώαση για 2 h (37 °C). Στη συνέχεια, ακολουθεί και πάλι απόχυση του υγρού των φρεατίων, έκπλυση (τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης), προσθήκη διαλύματος του ενζυμικού υποστρώματος (100 μL/φρεάτιο) και επώαση για 30 min (37 °C). Τέλος, γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (405 nm). Ο προσδιορισμός του τίτλου των υπό αξιολόγηση αντιορών / αντισωμάτων γίνεται με τη βοήθεια της αντίστοιχης καμπύλης τίτλου.

Τα στάδια του πειραματικού πρωτοκόλλου Ι παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 4.

**Πίνακας 4.** Στάδια πρωτοκόλλου πειραμάτων τιτλοδότησης ELISA (πρωτόκολλο I)

ΣΤΑΔΙΑ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ
Επίστρωση φρεατίων με διάλυμα ProTa (0,1 µg/mL, 0,2 µg/mL ή 1 µg/mL, σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 0,01 M, pH 5,0)	Όλη τη νύκτα, 37 °C
1 <sup>η</sup> έκπλυση	PB x 1
Επώαση με διάλυμα κορεσμού	1 h, θερμοκρασία δωματίου
2 <sup>η</sup> έκπλυση	Διάλυμα έκπλυσης x 3
Επώαση με το υπό αξιολόγηση αντίσωμα (πρώτο αντίσωμα) σε διαδοχικές αραιώσεις (1:1.000 – 1:60.000)	2 h, 37 °C
3 <sup>η</sup> έκπλυση	Διάλυμα έκπλυσης x 3
Επώαση με ενζυμικώς επισημασμένο δεύτερο αντίσωμα	2 h, 37 °C
4 <sup>η</sup> έκπλυση	Διάλυμα έκπλυσης x 3
Επώαση με διάλυμα ενζυμικού υποστρώματος	30 min, 37 °C

### 3.2.3.2. Πρωτόκολλο II

Φρεάτια πλακιδίων ELISA επικαλύπτονται (100 µL/φρεάτιο) με διάλυμα ProTa σε διασπεσταγμένο H<sub>2</sub>O (1 µg/mL, 0,2 µg/mL ή 0,1 µg/mL) και έπειτα παραμένουν όλη την νύκτα σε επωαστικό κλίβανο (50 °C). Την επόμενη ημέρα το υγρό αποχύνεται και στα φρεάτια προστίθενται οι αντιοροί, που πρόκειται να αξιολογηθούν, αραιωμένοι (1:1.000 - 1:10.000) σε διάλυμα αραιώσης (100 µL/φρεάτιο), παράλληλα με τον αρνητικό μάρτυρα (NRS), και τα φρεάτια επωάζονται για 2 h (37 °C). Ακολουθεί απόχυση του υγρού των φρεατίων, έκπλυση (τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης), προσθήκη στα φρεάτια του διαλύματος του ενζυμικώς επισημασμένου δευτέρου αντισώματος (100 µL/φρεάτιο) και επώαση για 2 h (37 °C). Στη συνέχεια, ακολουθεί και πάλι απόχυση του υγρού των φρεατίων,

έκπλυση (τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης), προσθήκη διαλύματος του ενζυμικού υποστρώματος (100  $\mu\text{L}$ /φρεάτιο) και επώαση για 30 min (37 °C). Τέλος, γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (405 nm).

Τα στάδια του πειραματικού πρωτοκόλλου II παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 5.

**Πίνακας 5.** Στάδια πρωτοκόλλου πειραμάτων τιτλοδότησης ELISA (πρωτόκολλο II)

ΣΤΑΔΙΑ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ
Επίστρωση φρεατίων με διάλυμα ProTa (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ή 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , σε δισαπεσταγμένο $\text{H}_2\text{O}$ )	Όλη τη νύκτα, 50 °C
Επώαση με το υπό αξιολόγηση αντίσωμα (πρώτο αντίσωμα) σε διαδοχικές αραιώσεις (1:1.000 – 1:10.000)	2 h, 37 °C
3 <sup>η</sup> έκπλυση	Διάλυμα έκπλυσης x 3
Επώαση με ενζυμικός επισημασμένο δεύτερο αντίσωμα	2 h, 37 °C
4 <sup>η</sup> έκπλυση	Διάλυμα έκπλυσης x 3
Επώαση με διάλυμα ενζυμικού υποστρώματος	30 min, 37 °C

### 3.3.ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΚΤΟΠΙΣΗΣ ELISA

#### 3.3.1.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Χρησιμοποιήθηκαν τα Υλικά και Όργανα που περιγράφονται στην παράγραφο 3.2.1.

### 3.3.2.ΑΝΤΙΟΡΟΙ – ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αντισώματα που επελέγησαν για να αξιολογηθούν περαιτέρω, με πειράματα εκτόπισης (ή πειράματα διασταυρούμενης αντίδρασης) ELISA, ήταν τα ακόλουθα:

- Αντίσωμα εναντίον του συνθετικού πεπτιδικού τμήματος ProTa[1-28] (Ta1), συζευγμένου στην πρωτεΐνη KLH (Ab-ProTa[1-28]/KLH ή Ab-Ta1/KLH),
- Αντίσωμα εναντίον του συνθετικού πεπτιδικού τμήματος ProTa[100-109], συζευγμένου στην πρωτεΐνη RVH (Ab-ProTa[100-109]/RVH)

Ως πηγή των παραπάνω πολυκλωνικών αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι αντιοροί (αντιορός: ο ορός αίματος του ανοσοποιημένου ζώου). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ορός αίματος φυσιολογικού κουνελιού (normal rabbit serum, NRS).

### 3.3.3.ΠΕΠΤΙΔΙΑ

Τα πειράματα εκτόπισης έγιναν παρουσία διαλυμάτων των ακόλουθων πεπτιδικών μορίων:

- ProTa,
- ProTa[1-28] (Ta1) και
- ProTa[100-109]

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα των ProTa, ProTa[1-28] (Ta1) και ProTa[100-109] σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0,005 – 5  $\mu$ M).

### 3.3.4.ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΘΟΔΟΥ

Φρεάτια πλακιδίων ELISA επικαλύπτονται (100  $\mu$ L/φρεάτιο) με διάλυμα ProTa σε CB (1  $\mu$ g/mL) και έπειτα παραμένουν όλη την νύχτα σε επωαστικό κλίβανο (37 °C). Την επόμενη ημέρα το υγρό αποχύνεται από τα φρεάτια και ακολουθεί έκπλυση του πλακιδίου με PB. Στην συνέχεια ακολουθεί επώαση 1 h με διάλυμα κορεσμού (200  $\mu$ L/φρεάτιο, θερμοκρασία δωματίου), με σκοπό να καλυφθούν οι τυχόν απομείνασες ελεύθερες θέσεις στην στερεή επιφάνεια. Ακολουθεί απόχυση και έκπλυση των φρεατίων (τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης). Στην συνέχεια, στα φρεάτια προστίθενται: α) ο υπό αξιολόγηση αντιορός, αραιωμένος σύμφωνα με τον τίτλο του (50  $\mu$ l/φρεάτιο) και β) είτε διάλυμα αραιώσης (50  $\mu$ L/φρεάτιο) ή πεπτίδιο σε διάλυμα αραιώσης, συγκέντρωσης 0,005 – 5  $\mu$ M (50  $\mu$ L/φρεάτιο). Τα φρεάτια επωάζονται για 2 h (37 °C) και ακολουθεί απόχυση του υγρού των φρεατίων και έκπλυση (τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης). Στη συνέχεια, στα φρεάτια προστίθεται το διάλυμα του ενζυμικώς επισημασμένου δεύτερου αντισώματος (100  $\mu$ L/φρεάτιο) και ακολουθεί επώαση για 2 h (37 °C), απόχυση του υγρού των φρεατίων και έκπλυση (τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης). Ακολουθεί προσθήκη του διαλύματος του ενζυμικού



υποστρώματος (100  $\mu$ L/φρεάτιο) και επώαση για 30 min (37 °C). Τέλος, γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (405 nm) και ο σχεδιασμός των αντίστοιχων καμπυλών εκτόπισης.

Τα στάδια του πειραματικού πρωτοκόλλου παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 6.

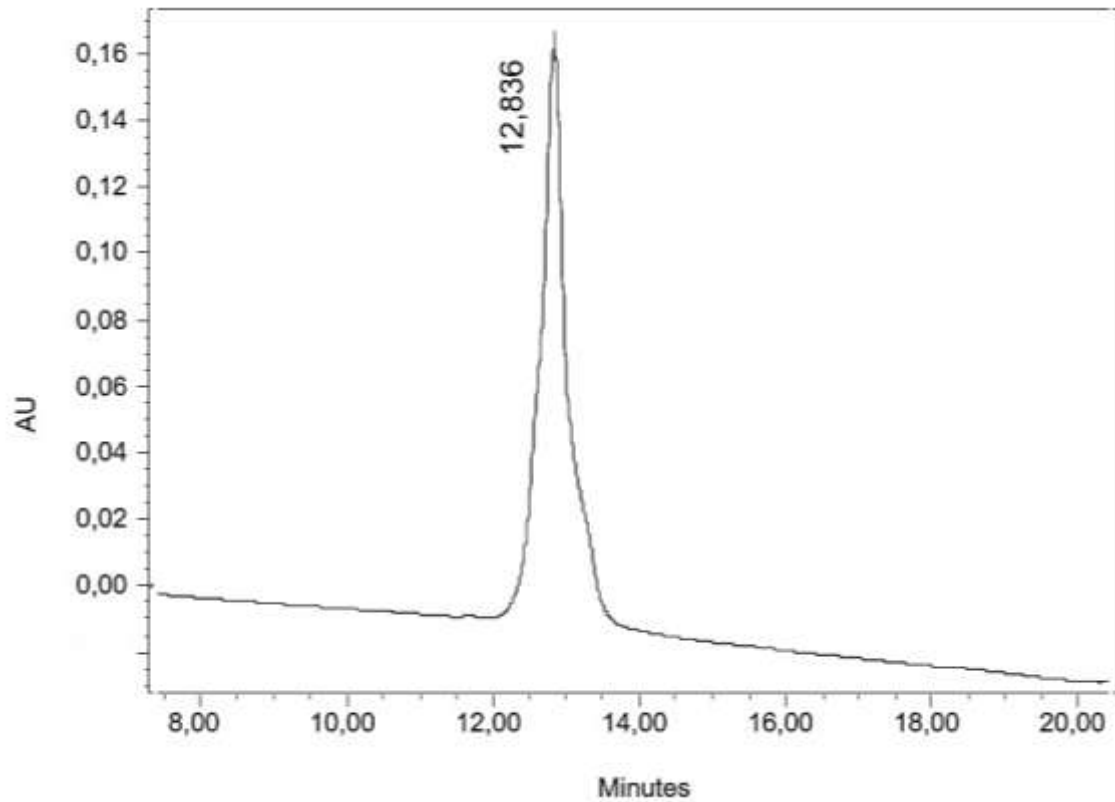
**Πίνακας 6.** Στάδια πρωτοκόλλου πειραμάτων εκτόπισης ELISA

ΣΤΑΔΙΑ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ
Επίστρωση φρεατίων με διάλυμα ProTa (1 $\mu$ g/mL, σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 0,01 M, pH 5,0)	Όλη τη νύκτα, 37 °C
1 <sup>η</sup> έκπλυση	PB x 1
Επώαση με διάλυμα κορεσμού	1 h, θερμοκρασία δωματίου
2 <sup>η</sup> έκπλυση	Διάλυμα έκπλυσης x 3
Συνεπώαση με: <ul style="list-style-type: none"> <li>το υπό αξιολόγηση αντίσωμα σε αραιώση ανάλογη του τίτλου του,</li> <li>ProTa, Ta1 ή ProTa[100-109] (0,005 – 5 <math>\mu</math>M)</li> </ul>	2 h, 37 °C
3 <sup>η</sup> έκπλυση	Διάλυμα έκπλυσης x 3
Επώαση με ενζυμικώς επισημασμένο δεύτερο αντίσωμα	2 h, 37 °C
4 <sup>η</sup> έκπλυση	Διάλυμα έκπλυσης x 3
Επώαση με διάλυμα ενζυμικού υποστρώματος	30 min, 37 °C

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

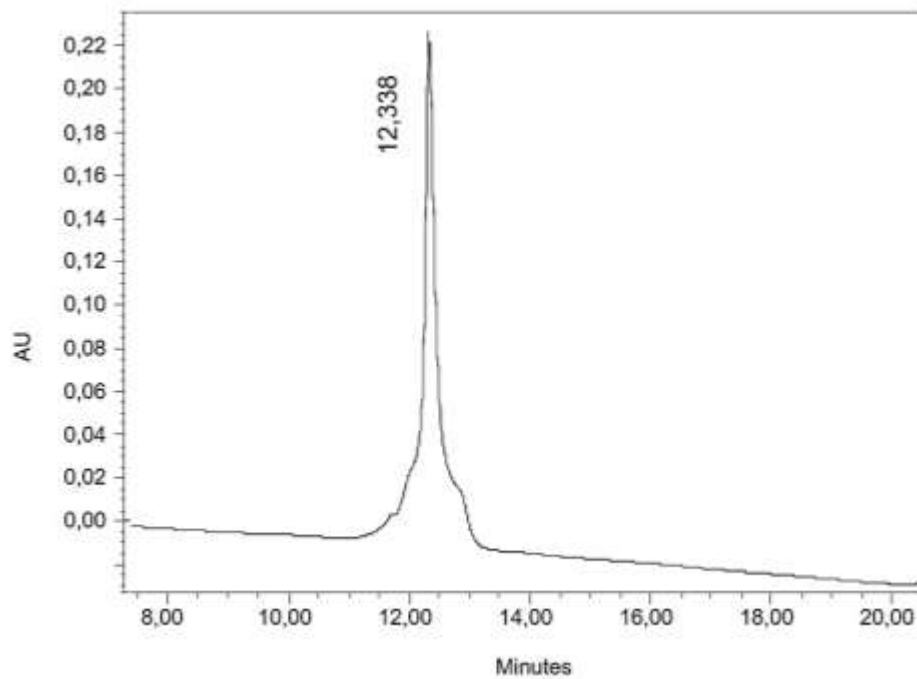
### 4.1.ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ RP-HPLC

#### 4.1.1.ΑΝΑΛΥΣΗ ProTa



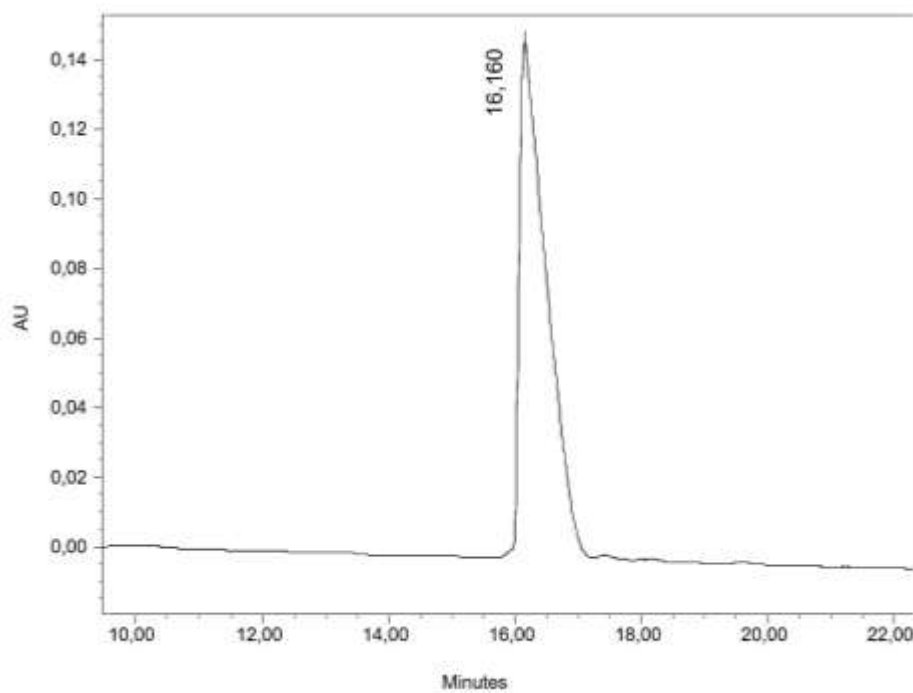
**Σχήμα 10.** Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC για την ProTa

#### 4.1.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ProTα[1-28] (Tα1)



Σχήμα 11. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC για το συνθετικό πεπτίδιο ProTα[1-28] (Tα1)

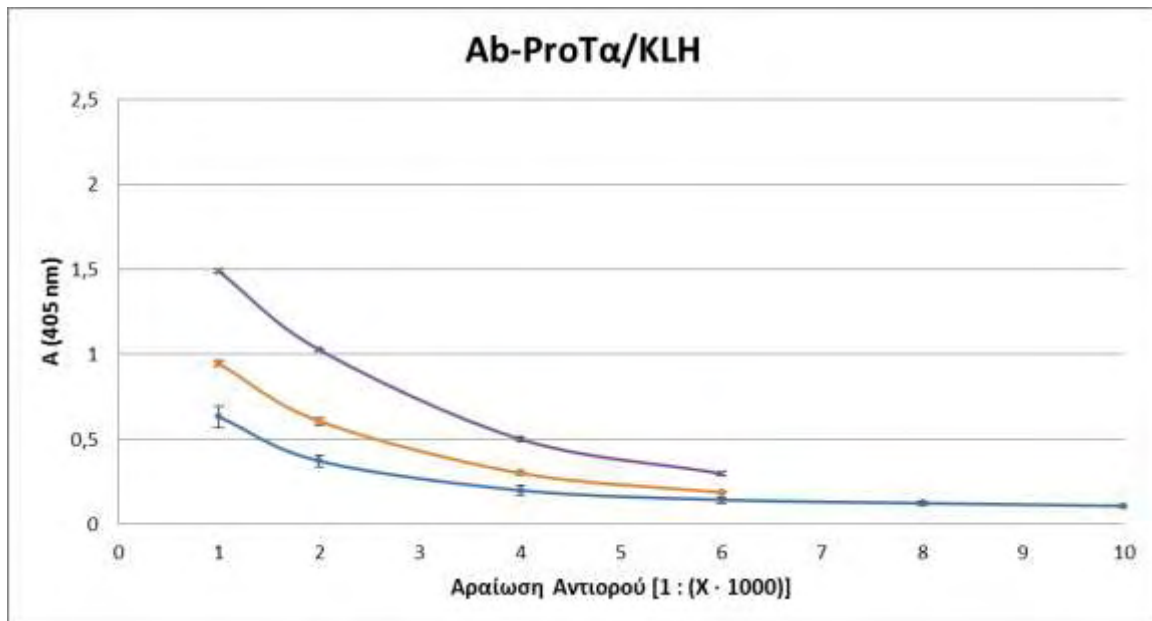
#### 4.1.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ProTα[100-109]



Σχήμα 12. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC για το συνθετικό πεπτίδιο ProTα[100-109]

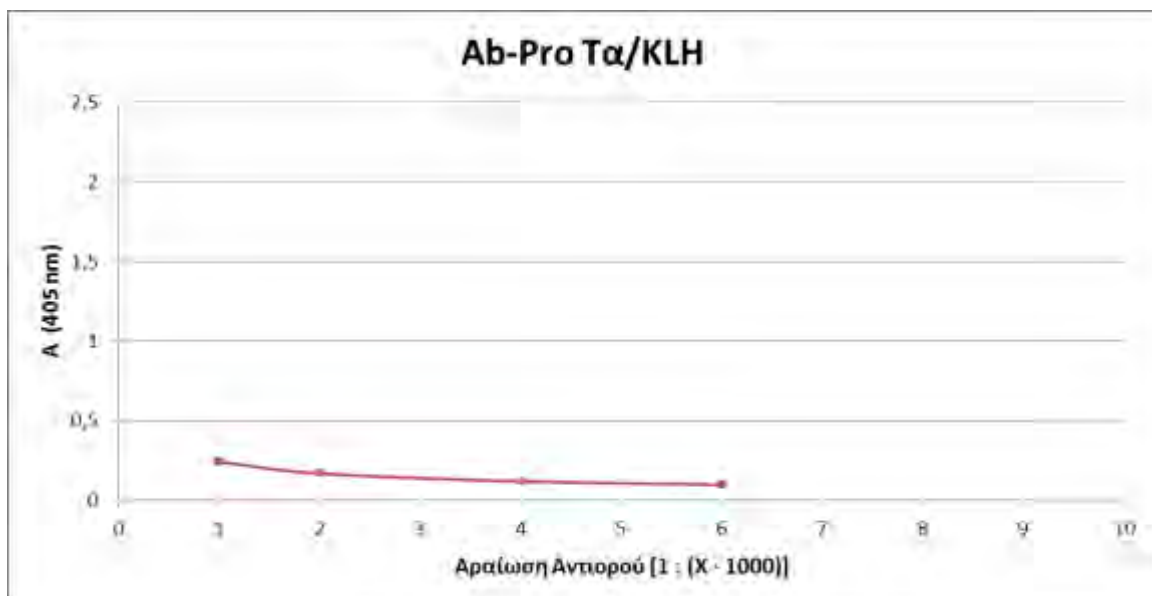
## 4.2.ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ ELISA

### 4.2.1. ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ProΤα/KLH (Ab-ProΤα/KLH)



**Σχήμα 13.** Ενδεικτικές καμπύλες τίτλου του Ab-ProΤα/KLH (Πρωτόκολλο I).

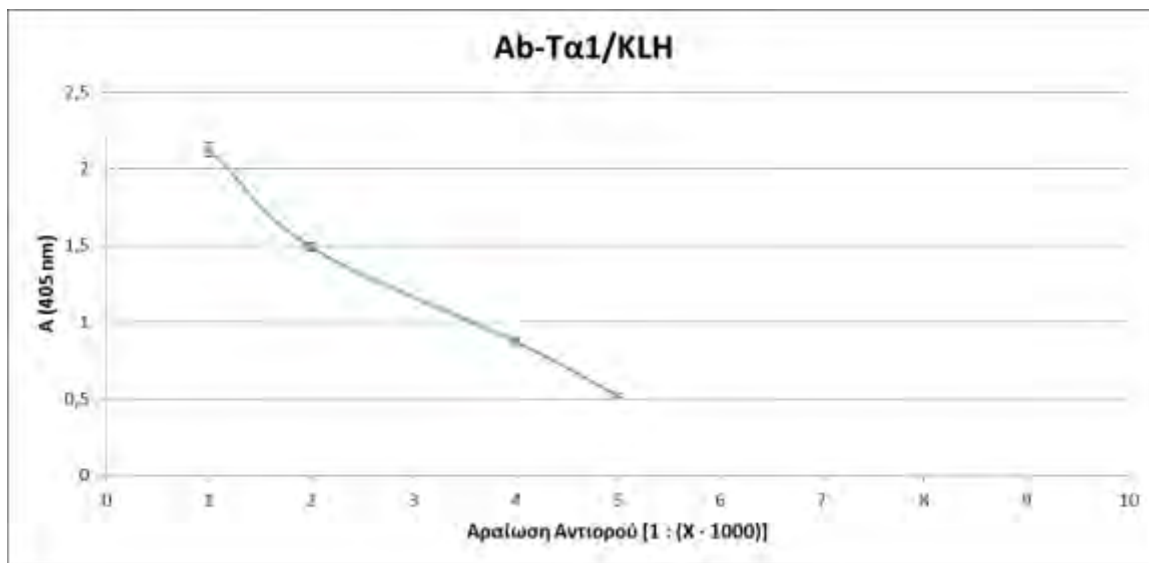
Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με ProΤα, σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,1 µg/mL, 0,2 µg/mL, 1 µg/mL). Οι χαμηλότερες τιμές οπτικής απορρόφησης ελήφθησαν με διάλυμα ProΤα συγκέντρωσης 0,1 µg/mL. Οι υψηλότερες τιμές οπτικής απορρόφησης ελήφθησαν με διάλυμα ProΤα συγκέντρωσης 1 µg/mL και αντιστοιχούν σε τίτλο ~ 1:2.000.



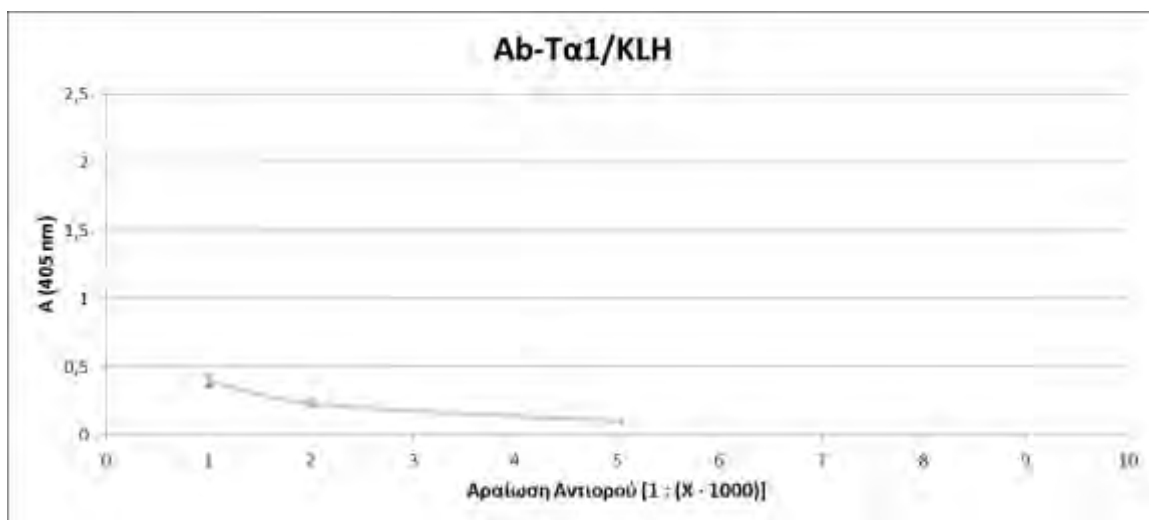
**Σχήμα 14.** Ενδεικτική καμπύλη τίτλου του Ab-ProΤα/KLH (Πρωτόκολλο II).

Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με διάλυμα ProΤα συγκέντρωσης 0,2 µg/mL. Οι τιμές οπτικής απορρόφησης ήταν πολύ χαμηλές (< 0.5).

#### 4.2.2. ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ProTα[1-28]/KLH ή Tα1/KLH (Ab-ProTα/KLH ή Ab-Tα1/KLH)

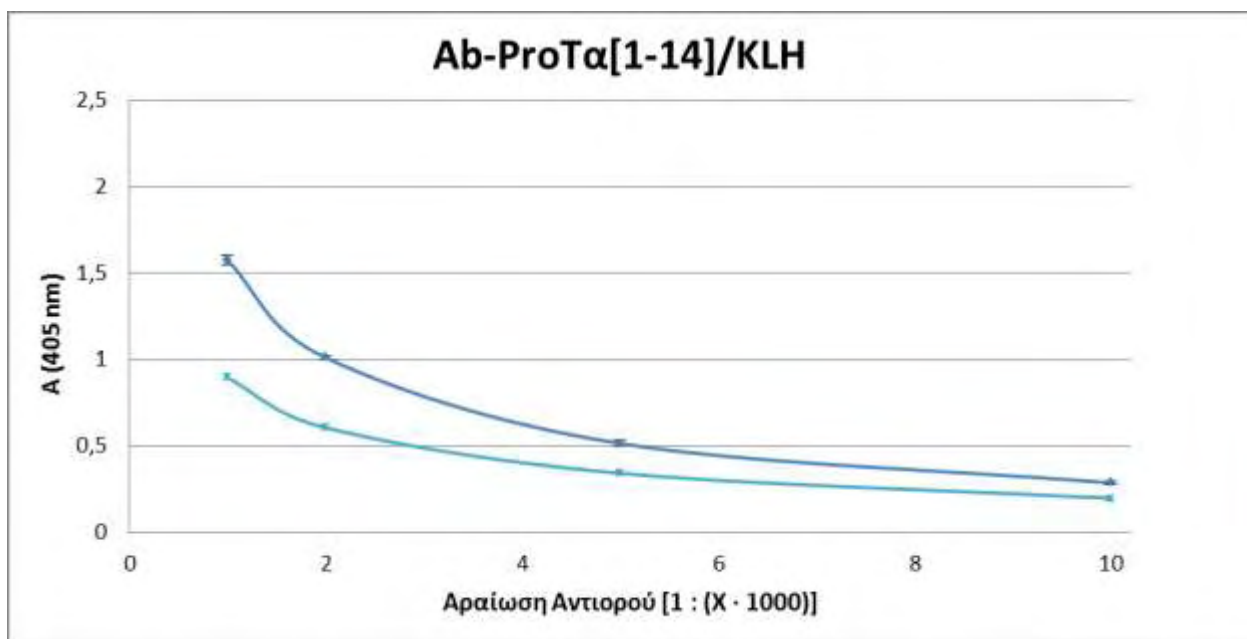


**Σχήμα 15.** Ενδεικτική καμπύλη τίτλου του Ab-ProTα[1-28]/KLH ή Ab-Tα1/KLH (Πρωτόκολλο I). Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με διάλυμα ProTα 1 μg/mL. Με βάση τις τιμές οπτικής απορρόφησης ο τίτλος υπολογίζεται σε ~ 1:3.500.



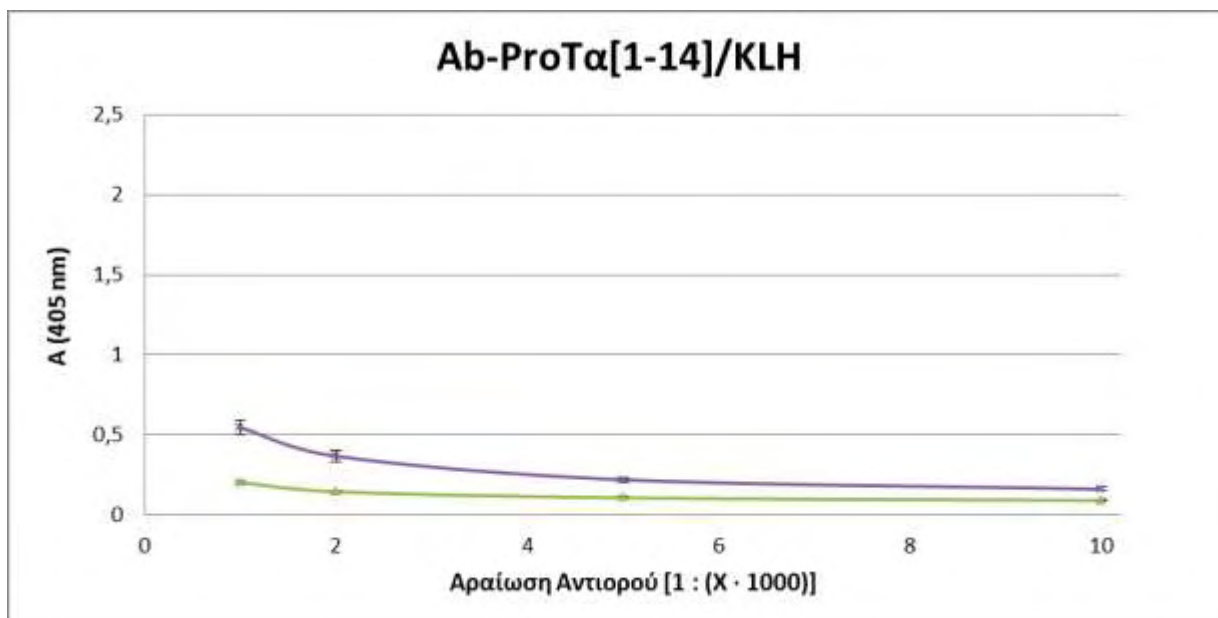
**Σχήμα 16.** Ενδεικτική καμπύλη τίτλου του Ab-ProTα[1-28]/KLH ή Ab-Tα1/KLH (Πρωτόκολλο II). Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με διάλυμα ProTα συγκέντρωσης 1 μg/mL. Οι τιμές οπτικής απορρόφησης ήταν πολύ χαμηλές (< 0.5).

#### 4.2.3. ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ProΤα[1-14]/KLH (Ab-ProΤα[1-14]/KLH)



**Σχήμα 17.** Ενδεικτικές καμπύλες τίτλου του Ab-ProΤα[1-14]/KLH (Πρωτόκολλο I).

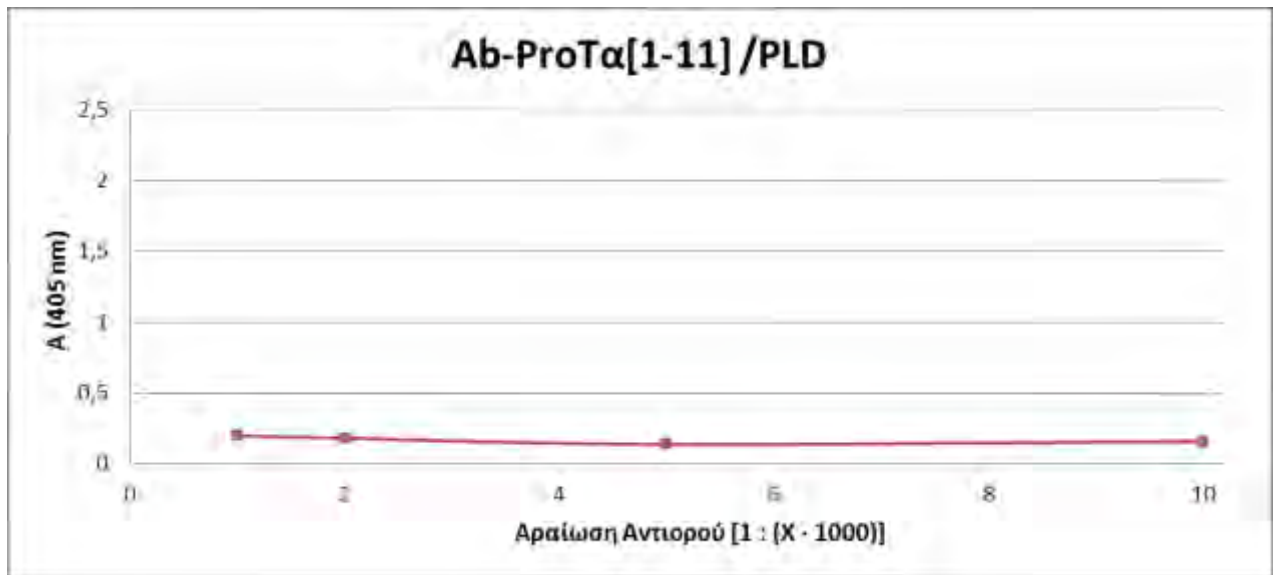
Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με ProΤα σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,2 μg/mL και 1 μg/mL). Οι χαμηλότερες τιμές οπτικής απορρόφησης ελήφθησαν με διάλυμα ProΤα συγκέντρωσης 0,2 μg/mL. Οι υψηλότερες τιμές οπτικής απορρόφησης ελήφθησαν με διάλυμα ProΤα συγκέντρωσης 1 μg/mL και αντιστοιχούν σε τίτλο ~ 1:2.000.



**Σχήμα 18.** Ενδεικτικές καμπύλες τίτλου του Ab-ProΤα[1-14]/KLH (Πρωτόκολλο II).

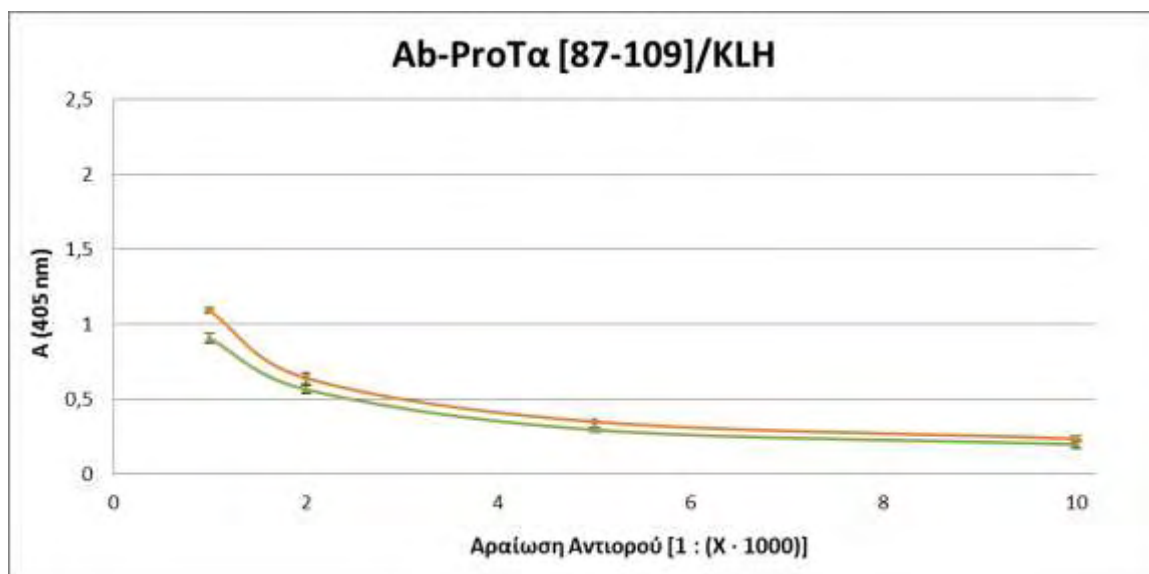
Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με ProΤα σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,2 μg/mL, 1 μg/mL και 1 μg/mL). Σε κάθε περίπτωση, οι τιμές οπτικής απορρόφησης ήταν χαμηλές ( $\leq 0.5$ ).

#### 4.2.4. ΑΝΤΙΣΩΜΑ ENANTIION ProΤα[1-11]/PLD (Ab-ProΤα[1-11]/PLD)



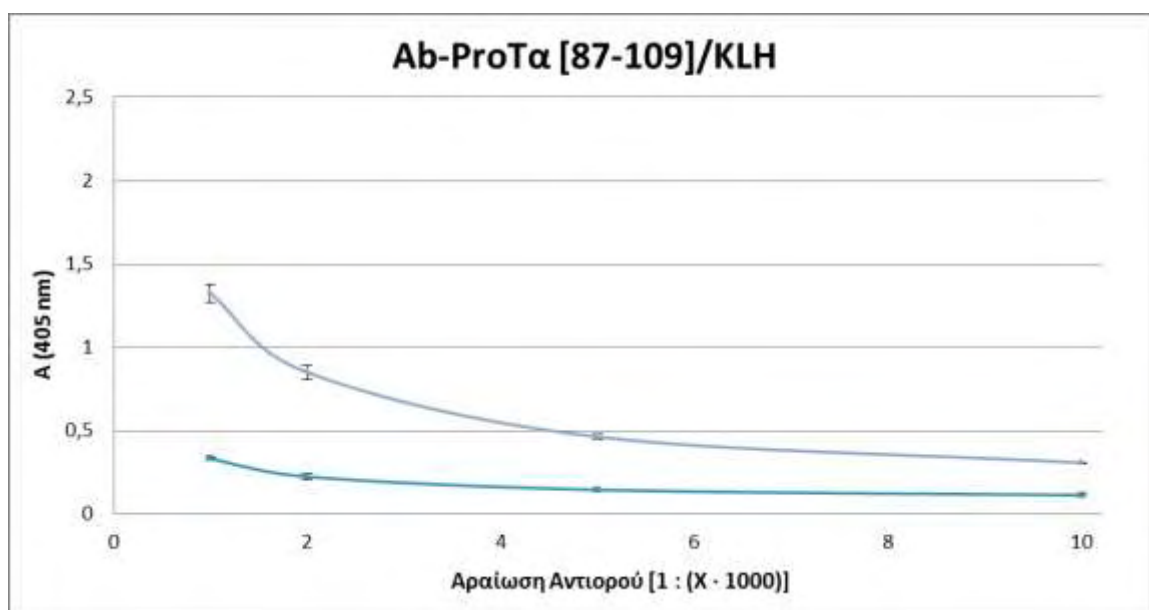
**Σχήμα 19.** Ενδεικτική καμπύλη τίτλου του Ab-ProΤα[1-11]/PLD (Πρωτόκολλο Ι). Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με διάλυμα ProΤα συγκέντρωσης 1 μg/mL. Οι τιμές οπτικής απορρόφησης ήταν πολύ χαμηλές (< 0.5).

#### 4.2.5. ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ProΤα[87-109]/KLH (Ab-ProΤα[87-109]/KLH)



**Σχήμα 20.** Ενδεικτικές καμπύλες τίτλου του Ab-ProΤα[87-109]/KLH (Πρωτόκολλο I).

Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με ProΤα σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,2 μg/mL και 1 μg/mL). Οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν με διάλυμα ProΤα συγκέντρωσης 1 μg/mL ήταν ελαφρώς υψηλότερες και αντιστοιχούν σε τίτλο ~ 1:1.000.

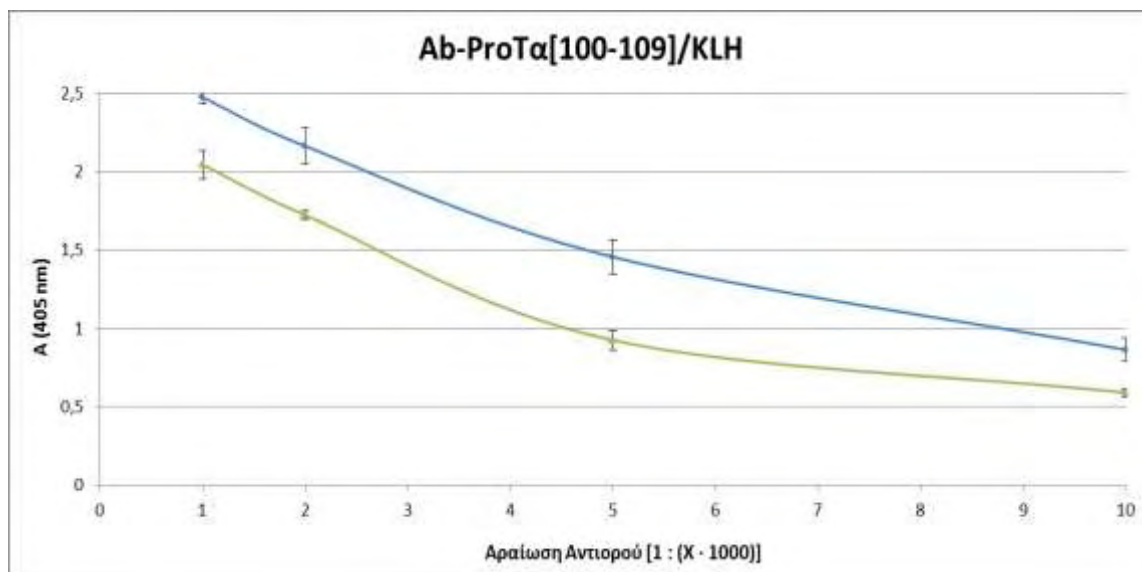


**Σχήμα 21.** Ενδεικτικές καμπύλες τίτλου του Ab-ProΤα[87-109]/KLH (Πρωτόκολλο II).

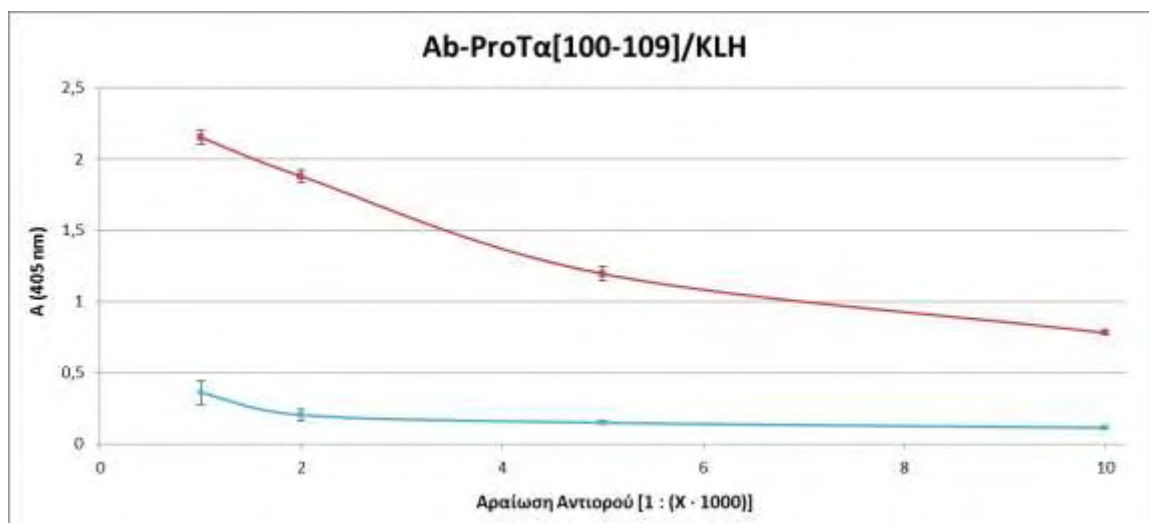
Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με ProΤα σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,2 μg/mL και 1 μg/mL). Οι υψηλότερες τιμές οπτικής απορρόφησης ελήφθησαν με διάλυμα ProΤα συγκέντρωσης 1 μg/mL και αντιστοιχούν σε τίτλο ~ 1:1.500.



#### 4.2.6. ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ProΤα[100-109]/KLH (Ab-ProΤα[100-109]/KLH)

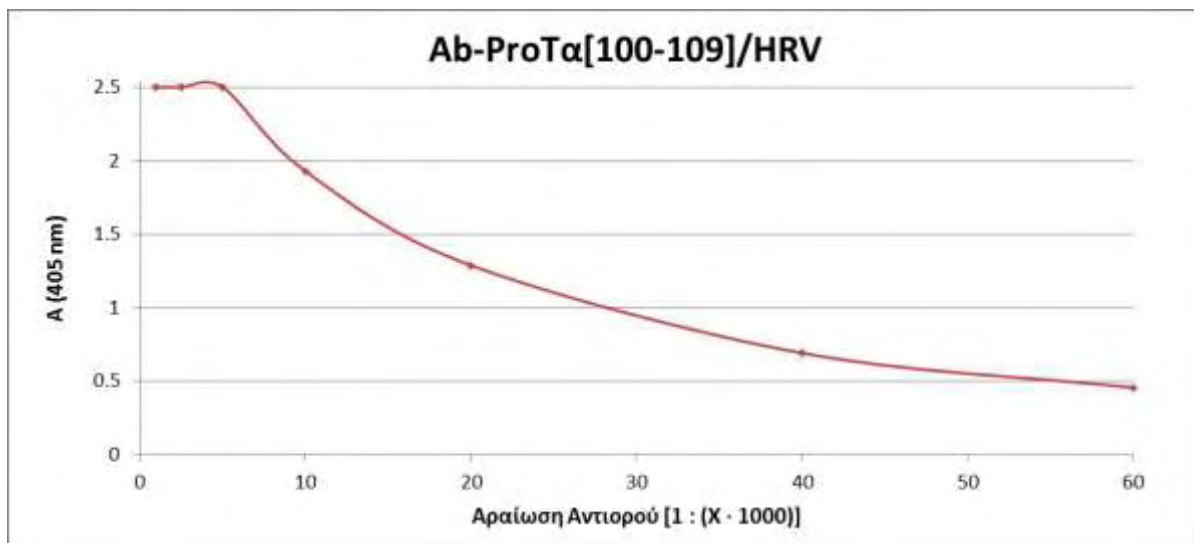


**Σχήμα 22.** Ενδεικτικές καμπύλες τίτλου του Ab-ProΤα[100-109]/KLH (Πρωτόκολλο I). Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με ProΤα σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,2 μg/mL και 1 μg/mL). Οι υψηλότερες τιμές οπτικής απορρόφησης ελήφθησαν με διάλυμα ProΤα συγκέντρωσης 1 μg/mL και αντιστοιχούν σε τίτλο ~ 1:8.000.

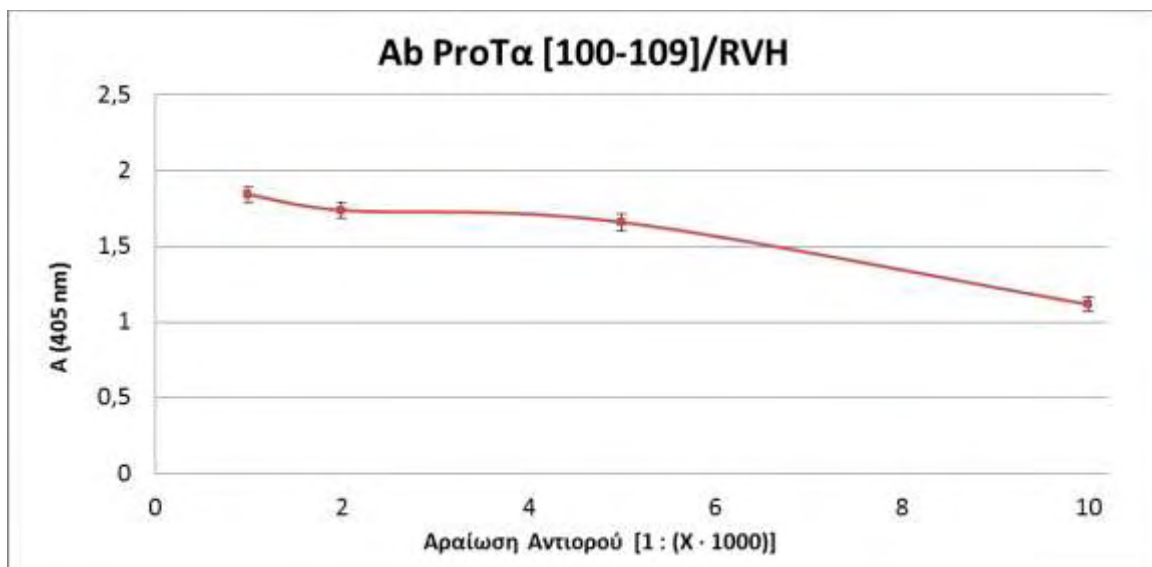


**Σχήμα 23.** Ενδεικτικές καμπύλες τίτλου του Ab-ProΤα[100-109]/KLH (Πρωτόκολλο II). Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με ProΤα σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,2 μg/mL και 1 μg/mL). Οι υψηλότερες τιμές οπτικής απορρόφησης ελήφθησαν με διάλυμα ProΤα συγκέντρωσης 1 μg/mL και αντιστοιχούν σε τίτλο ~ 1:7.000.

#### 4.2.7. ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ProΤα[100-109]/RVH (Ab-ProΤα[100-109]/RVH)

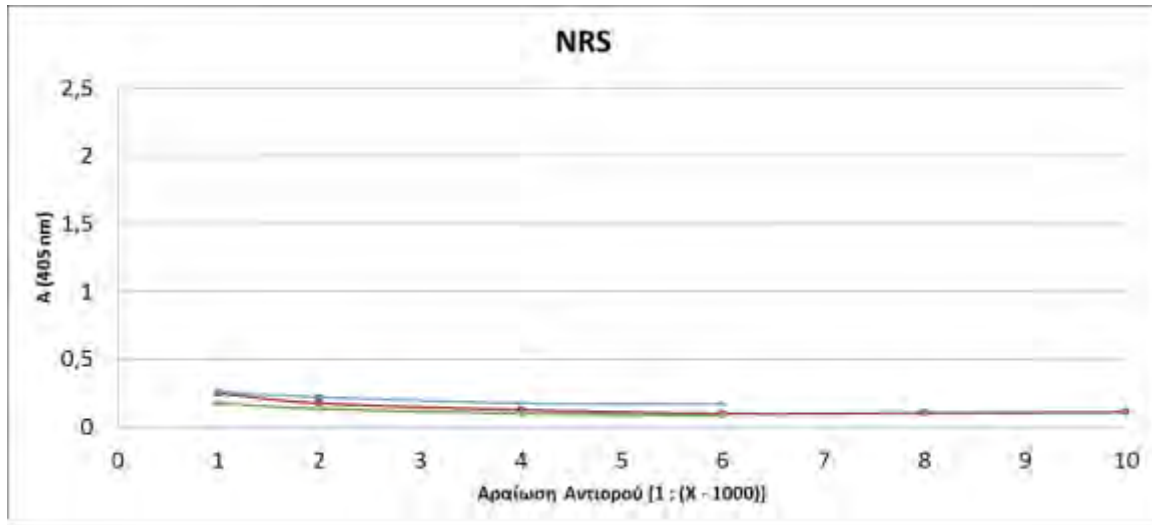


**Σχήμα 24.** Ενδεικτική καμπύλη τίτλου του Ab-ProΤα[100-109]/RVH (Πρωτόκολλο I). Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με ProΤα σε διάλυμα συγκέντρωσης 1 μg/mL. Με βάση τις τιμές οπτικής απορρόφησης ο τίτλος υπολογίζεται σε ~ 1:25.000.

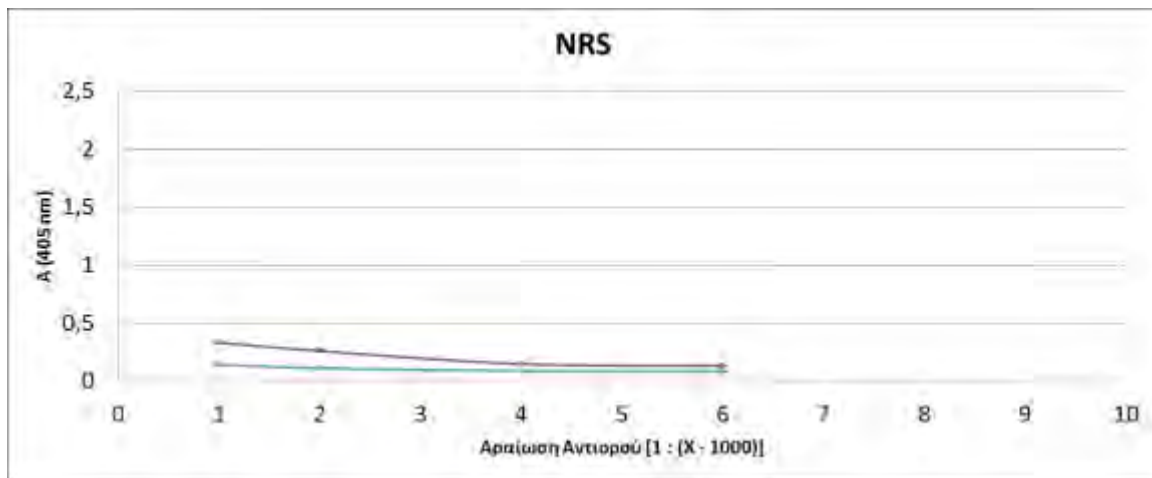


**Σχήμα 25.** Ενδεικτική καμπύλη τίτλου του Ab-ProΤα[100-109]/RVH (Πρωτόκολλο II). Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με ProΤα σε διάλυμα συγκέντρωσης 1 μg/mL. Με βάση τις τιμές οπτικής απορρόφησης ο τίτλος υπολογίζεται σε ~ 1:10.000.

#### 4.2.8. ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ Α: ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ (Normal Rabbit Serum, NRS)

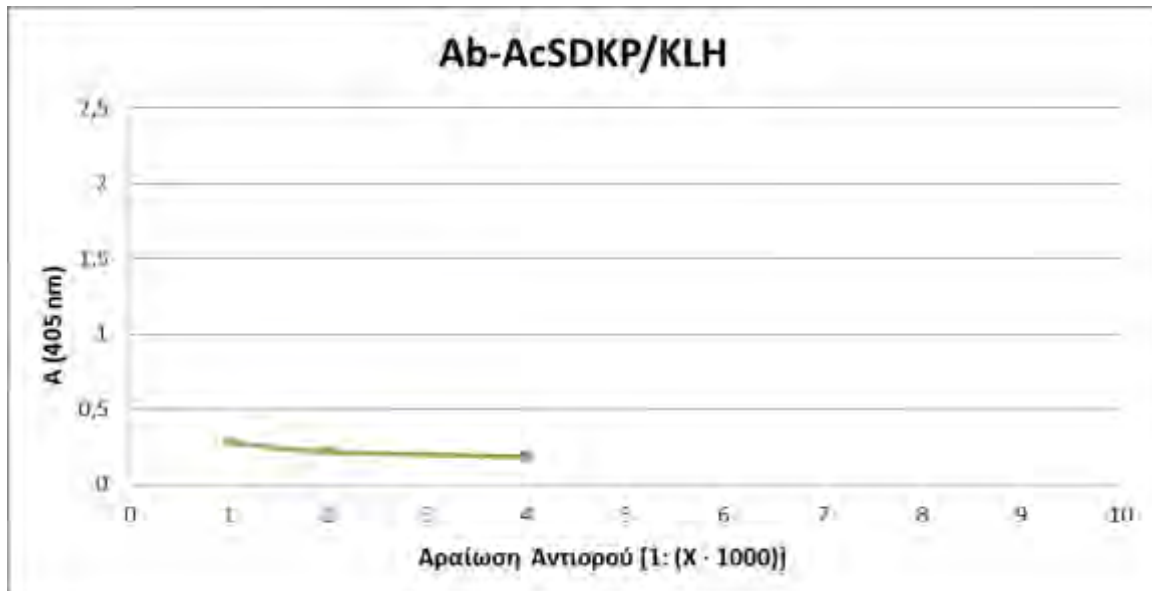


**Σχήμα 26.** Ενδεικτικές καμπύλες τίτλου του αρνητικού μάρτυρα NRS (Πρωτόκολλο I). Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με ProTa, σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,1 μg/mL, 0,2 μg/mL, 1 μg/mL). Σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές οπτικής απορρόφησης ήταν πολύ χαμηλές (< 0.5).



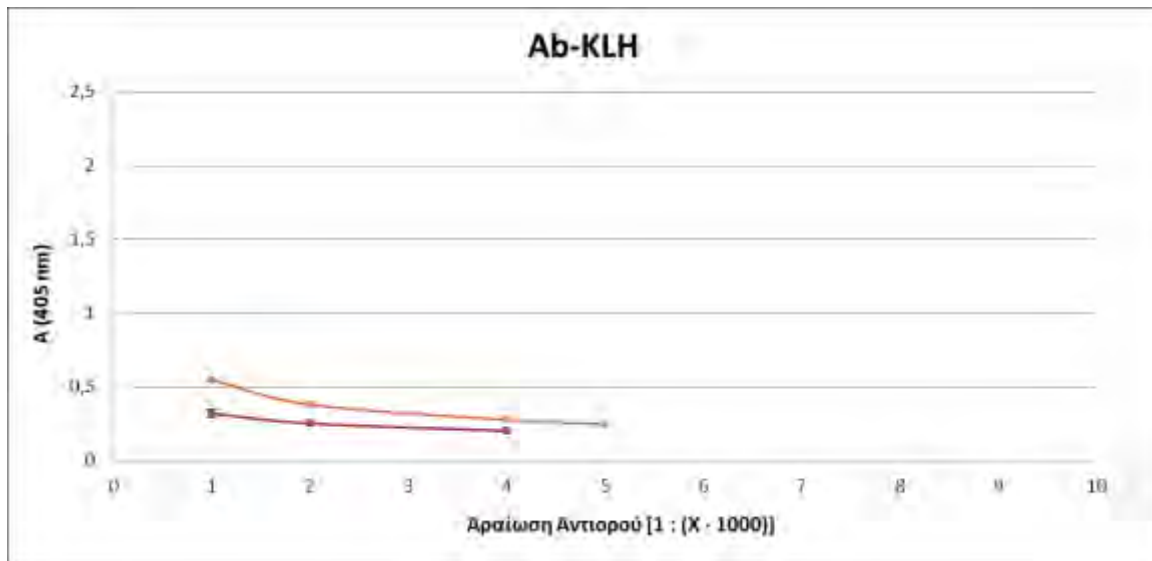
**Σχήμα 27.** Ενδεικτικές καμπύλες τίτλου του αρνητικού μάρτυρα NRS (Πρωτόκολλο II). Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με ProTa, σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,2 μg/mL και 1 μg/mL). Σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές οπτικής απορρόφησης ήταν πολύ χαμηλές (< 0.5).

#### 4.2.9. ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ Β: ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΘΥΜΟΣΙΝΗΣ ΒΗΤΑ 4 ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΟΥ ΣΕ ΚΛΗ (Ab-AcSDKP/KLH)

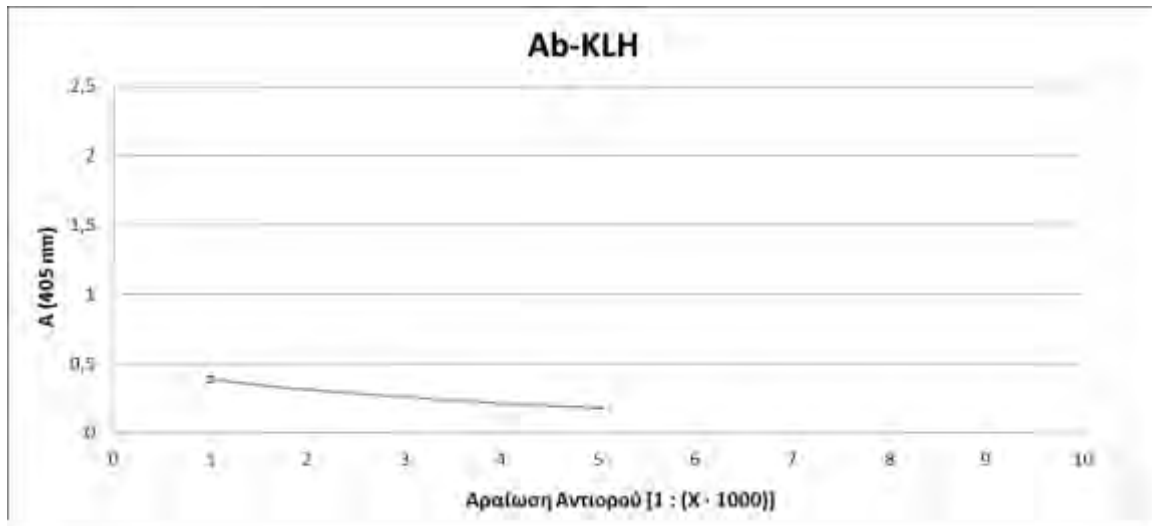


**Σχήμα 28.** Ενδεικτικές καμπύλες τίτλου του αρνητικού μάρτυρα Ab-AcSDKP/KLH (Πρωτόκολλο I). Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με ProTa, σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,2 μg/mL και 1 μg/mL). Σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές οπτικής απορρόφησης ήταν πολύ χαμηλές (< 0.5).

#### 4.2.10. ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ Γ: ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ΤΗΣ ΚΛΗ (Ab-KLH)



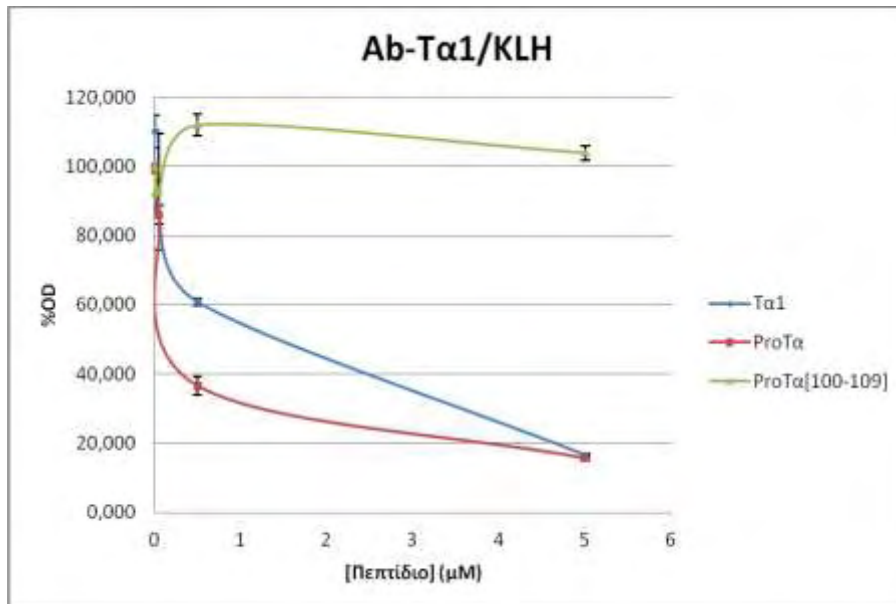
**Σχήμα 29.** Ενδεικτικές καμπύλες τίτλου του αρνητικού μάρτυρα Ab-KLH (Πρωτόκολλο I). Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με ProTa, σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,2 μg/mL και 1 μg/mL). Σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές οπτικής απορρόφησης ήταν χαμηλές ( $\leq 0.5$ ).



**Σχήμα 30.** Ενδεικτικές καμπύλες τίτλου του αρνητικού μάρτυρα Ab-KLH (Πρωτόκολλο II). Η επικάλυψη των φρεατίων έγινε με ProTa, σε διάλυμα συγκέντρωσης 1 μg/mL. Οι τιμές οπτικής απορρόφησης ήταν πολύ χαμηλές ( $\leq 0.5$ ).

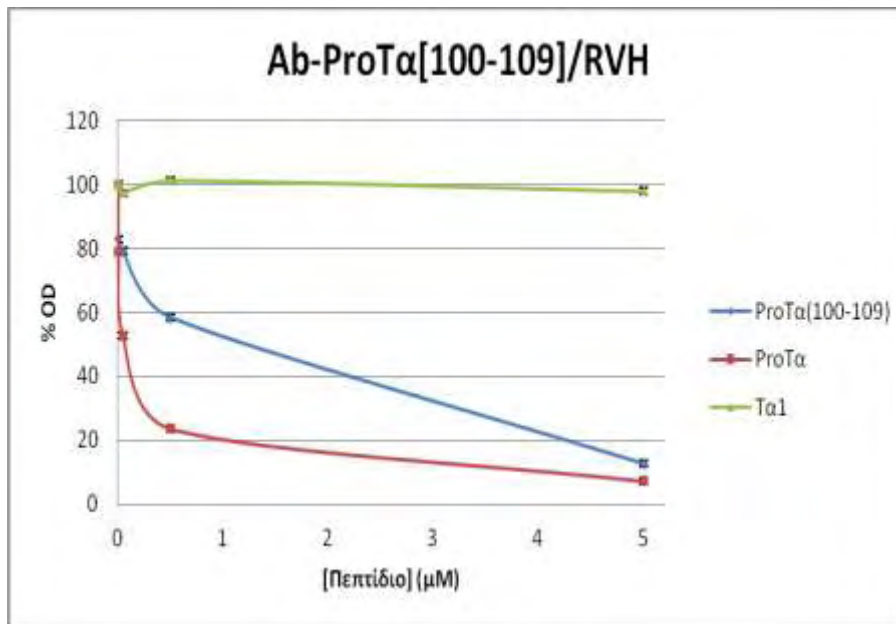
### 4.3.ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΕΚΤΟΠΙΣΗΣ ELISA

#### 4.3.1.ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΕΝΑΝΤΙΟΝ ProΤα[1-28]/KLH ή Τα1/KLH (Ab- ProΤα[1-28]/KLH ή Ab-Τα1/KLH)



**Σχήμα 31.** Ενδεικτικές καμπύλες εκτόπισης για το Ab-ProΤα[1-28]/KLH (Ab-Τα1/KLH), παρουσία διαλυμάτων ProΤα, ProΤα[1-28] (Τα1) ή ProΤα[100-109] σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Το Ab-ProΤα[1-28]/KLH αναγνωρίζει τόσο το πεπτίδιο ProΤα[1-28] (Τα1) όσο και την ProΤα, υπό μορφή διαλύματος, με αποτέλεσμα να «εκτοπίζεται» από τα φρεάτια ELISA παρουσία διαλυμάτων της Τα1 (σχετικά υψηλότερων συγκεντρώσεων) και της ProΤα (σχετικά χαμηλότερων συγκεντρώσεων), όπως φαίνεται από τη μείωση των τιμών του οπτικού σήματος. Αντίθετα, το Ab-ProΤα[1-28]/KLH δεν αναγνωρίζει το πεπτίδιο ProΤα[100-109].

#### 4.3.2. ANTISΩΜΑ ENANTION ProTα[100-109]/RVH (Ab-ProTα[100-109]/RVH)



**Σχήμα 32.** Ενδεικτικές καμπύλες εκτόπισης για το Ab-ProTα[100-109]/RVH, παρουσία διαλυμάτων ProTα, ProTα[1-28] (Tα1) ή ProTα[100-109] σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Το Ab-ProTα[100-109]/RVH αναγνωρίζει τόσο το πεπτίδιο ProTα[100-109] όσο και την ProTα, υπό μορφή διαλύματος, με αποτέλεσμα να «εκτοπίζεται» από τα φρέατια ELISA παρουσία διαλυμάτων του πεπτιδίου ProTα[100-109] (σχετικά υψηλότερων συγκεντρώσεων) και της ProTα (σχετικά χαμηλότερων συγκεντρώσεων), όπως φαίνεται από τη μείωση των τιμών του οπτικού σήματος. Αντίθετα, το Ab-ProTα[100-109]/KLH δεν αναγνωρίζει το πεπτίδιο ProTα[1-28] (Tα1).

## **ΜΕΡΟΣ Γ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ξεκινώντας από τον θύμο αδένα ξετυλίγεται και η ιστορία της προθυμοσίνης άλφα (ProTa). Ο θύμος αδένας αποτελούσε και αποτελεί τον κύριο όργανο του λεμφικού συστήματος, το οποίο παίζει ουσιώδη ρόλο στην σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο λόγος για τον οποίο μας απασχολεί ο θύμος αδένας σε σχέση με την ProTa είναι η προέλευση της ProTa, η οποία απομονώθηκε για πρώτη φορά από θύμο αδένα αρουραίου, το 1984. Νωρίτερα, κατά την δεκαετία του 1960, είχε απομονωθεί με βιοχημική διαδικασία πέντε σταδίων ένα εκχύλισμα βόειου θύμου αδένας με ανοσοενισχυτική δράση, γνωστό ως θυμοσινικό κλάσμα 5 (TF5). Το TF5 «έκρυβε» 30-40 πεπτίδια, που ονομάστηκαν θυμοσίνες, μεταξύ των οποίων ένα όξινο ανοσοενισχυτικό πεπτίδιο 28 αμινοξέων που ονομάστηκε θυμοσίνη άλφα 1 (Ta1). Η ερευνητική ομάδα των Haritos και συνεργατών, που ανακάλυψαν αργότερα την ProTa, της έδωσαν το όνομα «προθυμοσίνη άλφα» επειδή θεώρησαν ότι αποτελούσε το πρόδρομο μόριο της ήδη γνωστής Ta1, επειδή η αμινοξική αλληλουχία της Ta1 ήταν ταυτόσημη με τα πρώτα 28 N-τελικά αμινοξέα της ProTa. Έως σήμερα, δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί εάν η Ta1, που διαθέτει ανοσοενισχυτική δράση, παράγεται ενδογενώς, ως αποτέλεσμα πρωτεόλυσης της ProTa μέσα στο κύτταρο, ή εάν προκύπτει κατά την *in vitro* διαδικασία απομόνωσης της ProTa.

Η ProTa είναι ένα εξαιρετικά όξινο μόριο, με ισοηλεκτρικό σημείο 3,55, κάτι το οποίο προϋποθέτει για το ότι πιθανόν να αποτελεί ένα πολυπεπτίδιο του πυρήνα. Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγεί και η δομή του μορίου, στην οποία υπάρχει αμινοξική αλληλουχία που είναι σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localisation Signal, NLS). Πράγματι, σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα, η ProTa φαίνεται να εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων, όπου φαίνεται να ελέγχει την έκφραση διαφόρων γονιδίων και κυρίως γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Όπως βρέθηκε, η ProTa είναι απαραίτητη για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών κυττάρων, κάτι το οποίο εξηγεί την συντηρητικότητα που εμφανίζει η δομή της μεταξύ των θηλαστικών. Επίσης, η ProTa φαίνεται να παίζει ρόλο στην αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης και άρα στην μεταγραφή. Τέλος, η ProTa έχει συνδεθεί με την αναστολή της απόπτωσης.

Εκτός από τον ενδοκυτταρικό της ρόλο η ProTa έχει και εξωκυτταρικό ρόλο, ο οποίος φαίνεται να συνδέεται με την ενίσχυση των μηχανισμών ανοσίας. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι η ProTa ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων, μέσω της αύξησης της παραγωγής IL-2 και της έκφρασης του αντίστοιχου υποδοχέα. Επιπλέον, χορήγηση ProTa προστάτευσε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια από ευκαιριακές λοιμώξεις με *Candida albicans*, ενώ επίσης διέγειρε την έκκριση του παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης μικροφάγων. Σύμφωνα με μελέτες της τελευταίας δεκαετίας, το ανοσοδραστικό κέντρο της ProTa εδράζεται στο C-τελικό άκρο του μορίου και συγκεκριμένα στο C-τελικό δεκαπεπτίδιο ProTa[100-109].

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση εργαστηριακών εργαλείων για την μελέτη της ProTa – συγκεκριμένα πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της ProTa. Τα πολυκλωνικά αντισώματα είχαν αναπτυχθεί κατά το παρελθόν στα εργαστήρια του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι το μόριο της ProTa είναι γνωστό για τη χαμηλή του ανοσογονικότητα, ενώ, έως και σήμερα, δεν υπάρχουν ευρέως διαθέσιμα στο

εμπόριο αντισώματα έναντι του πολυπεπτιδίου. Τα υπό αξιολόγηση αντισώματα είχαν αναπτυχθεί σε λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας εναντίον της ProTa (απομονωμένης από βόειους ιστούς, εμπορικά διαθέσιμη) ή συνθετικών πεπτιδικών τμημάτων του πολυπεπτιδίου, μετά από σύζευξή τους σε ειδικό φορέα. Τα συνθετικά πεπτίδια που είχαν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι της ProTa ήταν τα: ProTa[1-14], ProTa[1-11], ProTa[1-28] (ή Ta1), ProTa[87-109] και ProTa[100-109]. Τα παραπάνω συνθετικά πεπτίδια είχαν παρασκευασθεί στα εργαστήρια του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» σύμφωνα με τη μέθοδο της Fmoc/tBu σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση (75). Οι φορείς που είχαν χρησιμοποιηθεί για τη σύζευξη της ProTa ή των συνθετικών πεπτιδίων της ήταν οι: αιμοκυανίνη του οργανισμού *Keyhole limpet* (keyhole limpet haemocyanin ή KLH), αιμοκυανίνη του οργανισμού *Rapana venosa* (RVH) και ένα συνθετικό πολυλυσινικό δενδριμερές (PLD). Η KLH ήταν εμπορικά διαθέσιμη, η RVH είχε απομονωθεί σύμφωνα με πρωτόκολλο Ερευνητών από την Ακαδημία Επιστημών της Σόφιας, Βουλγαρία (76), ενώ το PLD είχε παρασκευασθεί στα εργαστήρια του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» σύμφωνα με πρωτόκολλο βασισμένο στη μέθοδο της Fmoc/tBu σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση. Συνολικά, αξιολογήθηκαν τα ακόλουθα αντισώματα:

- Ab-ProTa/KLH,
- Ab-ProTa[1-28]/KLH (ή Ab-Ta1/KLH),
- Ab-ProTa[1-14]/KLH,
- Ab-ProTa[1-11]/PLD,
- Ab-ProTa[87-109]/KLH,
- Ab-ProTa[100-109]/KLH,
- Ab-ProTa[100-109]/RVH

Η αξιολόγηση των αντισωμάτων έγινε αρχικά με πειράματα τιτλοδότησης ELISA. Ως πηγή των διαφορετικών πολυκλωνικών αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι αντιοροί (αντιορός: ο ορός αίματος του ανοσοποιημένου ζώου). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα: Α: ορός αίματος φυσιολογικού κουνελιού (normal rabbit serum, NRS), Β: αντίσωμα εναντίον του Ν-τελικού τετραπεπτιδίου της θυμοσίνης βήτα 4 συζευγμένου σε KLH (Ab-AcSDKP/KLH), Γ: αντίσωμα εναντίον της KLH (Ab-KLH). Κατά την πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα (πρωτόκολλο Ι, πρωτόκολλο ΙΙ), τα οποία διέφεραν ως προς τις συνθήκες επίστρωσης της ProTa στα φρεάτια των πλακιδίων ELISA. Κατά την εφαρμογή τόσο του πρωτοκόλλου Ι όσο και του πρωτοκόλλου ΙΙ δοκιμάστηκαν, στο στάδιο της επίστρωσης των φρεατίων, διαλύματα ProTa διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,1 μg/mL, 0,2 μg/mL, 1 μg/mL). Καλύτερα αποτελέσματα, στις περισσότερες περιπτώσεις, είχαμε με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου Ι και με τη χρήση διαλύματος ProTa συγκέντρωσης 1 μg/mL κατά την επίστρωση των φρεατίων. Τους υψηλότερους τίτλους έδωσαν τα ακόλουθα αντισώματα: Ab-Ta1/KLH (~ 1:3.500), Ab-ProTa[100-109]/KLH (~ 1:8.000), Ab-ProTa[100-109]/RVH (~ 1:25.000).

Στο πλαίσιο της αξιολόγησης των αντισωμάτων, έγιναν επίσης πειράματα εκτόπισης ELISA (πειράματα διασταυρούμενης αντίδρασης ELISA). Συγκεκριμένα, με πειράματα εκτόπισης αξιολογήθηκαν τα Ab-Ta1/KLH και Ab-ProTa[100-109]/RVH, οι τίτλοι των οποίων ήταν από τους υψηλότερους (~ 1:3.500 και ~ 1:25.000, αντίστοιχα) σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων τιτλοδότησης. Τα πειράματα εκτόπισης έγιναν παρουσία διαλυμάτων ProTa, ProTa[1-28] (Ta1) και ProTa[100-109] σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0,005 – 5  $\mu$ M). Στα πειράματα εκτόπισης χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμη ProTa, απομονωμένη από βόειους ιστούς, και τα πεπτιδικά τμήματα ProTa[1-28] (Ta1) και ProTa[100-109], που είχαν παρασκευασθεί στα εργαστήρια του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» σύμφωνα με τη μέθοδο της Fmoc/tBu σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση και είχαν ταυτοποιηθεί με μέθοδο φασματομετρίας μαζών με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS). Πριν τη χρησιμοποίησή τους στα πειράματα εκτόπισης, η καθαρότητα τόσο της ProTa, όσο και των συνθετικών πεπτιδίων ProTa[1-28] (Ta1) και ProTa[100-109] ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC και βρέθηκε πολύ υψηλή (~ 95%).

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκτόπισης ELISA προκύπτουν τα ακόλουθα:

- Το αντίσωμα εναντίον ProTa[100-109]/RVH (Ab-ProTa[100-109]/RVH) φαίνεται να αναγνωρίζει τόσο ολόκληρο το μόριο της ProTa, όσο και το βιοδραστικό C-τελικό δεκαπεπτίδιο του μορίου, ProTa[100-109]. Αντίθετα, δεν παρατηρείται εκτόπιση του Ab-ProTa[100-109]/RVH από τα επιστρωμένα με ProTa φρεάτια ELISA παρουσία του, επίσης βιοδραστικού N-τελικού τμήματος του μορίου, Ta1, κάτι το οποίο επιβεβαιώνει πως το συγκεκριμένο αντίσωμα δεν αναγνωρίζει το N-τελικό άκρο, ενώ μπορεί να θεωρηθεί εξειδικευμένο για το C-τελικό άκρο του μορίου της ProTa.

- Το αντίσωμα εναντίον Ta1/KLH (Ab-Ta1/KLH) φαίνεται να αναγνωρίζει τόσο ολόκληρο το μόριο της ProTa, όσο και το βιοδραστικό N-τελικό 28-πεπτίδιο του μορίου, ProTa[1-28] ή Ta1. Αντίθετα, δεν παρατηρείται εκτόπιση του Ab-Ta1/KLH από τα επιστρωμένα με ProTa φρεάτια ELISA παρουσία του, επίσης βιοδραστικού C-τελικού τμήματος του μορίου, ProTa[100-109], κάτι το οποίο επιβεβαιώνει πως το συγκεκριμένο αντίσωμα δεν αναγνωρίζει το C-τελικό άκρο, ενώ μπορεί να θεωρηθεί εξειδικευμένο για το N-τελικό άκρο του μορίου της ProTa.

Με βάση τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των διαφορετικών πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της ProTa, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ορισμένα από αυτά διαθέτουν ικανοποιητικά υψηλό τίτλο και επιθυμητή εξειδίκευση. Τα αντισώματα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε ανοσοχημικές μεθόδους (π.χ. σε μεθόδους ανοσοϊστοχημείας, ανοσοκυτταρολογίας, σε ανοσοανάλυσεις, αναλύσεις Western blot, κ.λπ.), με αρχικό στόχο την ανίχνευση της ProTa ή/και βιοδραστικών θραυσμάτων της σε επιλεγμένα βιολογικά παρασκευάσματα και με απώτερο στόχο την περαιτέρω αποσαφήνιση του βιολογικού ρόλου της ProTa.

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### Γενική Βιβλιογραφία

- I. Καραχάλιου Χρυσούλα –Ευαγγελία, Ερευνητική εργασία Διπλώματος εξειδίκευσης: Ανάπτυξη και βιολογική αξιολόγηση ειδικών παραγώγων της Προθυμοσίνης α, Αθήνα 2011, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ.
- II. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. Ανοσολογία (Πέμπτη έκδοση), Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ, Πασχαλίδης, Αθήνα 2007
- III. Desphante SS. Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development. Chapman & Hall, NY USA, 1996.

### Ειδική Βιβλιογραφία

1. Gray's Anatomy. 38th edition. p. 1423-1431. Churchill Livingstone, 1999
2. Cooper MD, Peterson RDA, Good RA. Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken. Nature 1966; 205: 143-146
3. Goldstein AL, Slate FDr, White A. Preparation, assay and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin), Proc Natl Acad Sci USA 1966; 56: 1010-1017
4. Goldstein AL, Guha A, Zatz MM, Hardy MA, White A. Purification and biological activity of thymosin, a hormone of the thymous gland. Proc Natl Acad Sci USA 1972; 69: 1800-1803
5. Wara, DW, Goldstein AL, Doyce NE, Amman AJ. Thymosin activity in patients with cellular immunodeficiency. N Engl J Med 1975; 292: 70-74
6. Low TL, Goldstein AL. Thymic hormones: An overview. Methods Enzymol 1985; 116: 213-219
7. Goldstein AL, Low TL, McAdoo M, McClure J, Thurman GB, Rossio J, Lai CY, Chang D, Wang SS, Harvey C, Ramel AH, Meienhofer J. Thymosin alpha1: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 725-729
8. Caldarella J, Goodall GJ, Felix AM, Heimer EP, Salvin SB, Horecker BL. Thymosin alpha 11: A peptide related to thymosin alpha 1 isolated from calf thymosin fraction 5. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 7424-7427
9. Haritos AA, Goodall GJ, Horecker BL. Prothymosin alpha: Isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin alpha 1 in rat thymus. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 1008-1011
10. Haritos AA, Blacher R, Stein S, Caldarella J, Horecker BL. Primary structure of rat thymus prothymosin alpha. Proc Natl Acad Sci USA. 1985; 82: 343-346

11. Sarandeses CS, Covelo G, Diaz-Jullien C, Freire M. Prothymosin  $\alpha$  is processed to thymosin  $\alpha 1$  and thymosin  $\alpha 11$  by a lysosomal asparaginyl endopeptidase. *J Biol Chem* 2003; 278: 13286–13293
12. Pan LX, Haritos AA, Wideman J, Komiyama T, Chang M, Stein S, Salvin SB, Horecker BL. Human prothymosin alpha: amino acid sequence and immunologic properties. *Arch Biochem Biophys* 1986; 250: 197-201
13. Szabo P, Panneerselvam C, Clinton M, Frangou-Lazaridis M, Weksler D, Whittington E, Macera MJ, Grzeschik KH, Selvakumar A, Horecker BL. Prothymosin alpha gene in humans: Organization of its promoter region and localization to chromosome 2. *Hum Genet* 1993; 90: 629-634.
14. Piñeiro A, Cordero OJ, Nogueira M. Fifteen years of prothymosin alpha: Contradictory past and new horizons. *Peptides* 2000; 21: 1433-46
15. Haritos AA, Tsolas O, Horecker BL. Distribution of prothymosin alpha in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1391-1393.
16. Hannappel E, Huff T. The thymosins. Prothymosin alpha, parathymosin, and beta thymosins: Structure and function. *Vitam Horm* 2003; 66: 257-296.
17. Manrow RE, Sburlati AR, Hanover JA, Berger SL. (1991). Nuclear targeting of prothymosin alpha. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266: 3916–3924
18. Rubtsov Y, Vartapetian A. Lysine –87 is a functional important residue in human prothymosin alpha. *FEBS Lett* 1996; 397: 215-218
19. Gómez-Márquez J, Segade F. Prothymosin alpha is a nuclear protein. *FEBS Lett.* 1988; 226: 217–219
20. Manrow RE, Sburlati AR, Hanover JA, Berger SL. Nuclear targeting of prothymosin alpha. *J Biol Chem* 1991; 266: 3916-24
21. Enkemann SA, Ward RD, Berger SL. Mobility within the nucleus and neighboring cytosol is a key feature of prothymosin-alpha. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 1341-1355.
22. Freire J, Covelo G, Sarandeses C, Díaz-Jullien C, Freire M. Identification of nuclear-import and cell-cycle regulatory proteins that bind to prothymosin alpha. *Biochem Cell Biol.* 2001; 79: 123-131
23. Vareli K, Frangou-Lazaridis M. Prothymosin alpha is localized in mitotic spindle during mitosis. *Biol Cell* 2004; 96: 421-428
24. Eilers M, Schirm S, Bishop JM. The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J* 1991; 10: 133-141
25. Papamarcaki T, Tsolas O. Prothymosin alpha binds to histone H1 in vitro. *FEBS Lett* 1994; 345: 71-75
26. Segade F, Gomez-Marquez J. Prothymosin alpha, *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 1243-1248

27. Karetsova Z, Kretsovali A, Murphy C, Tsolas O, Papamarcaki T. Prothymosin alpha interacts with the CREB-binding protein and potentiates transcription. *EMBO Rep* 2002; 3: 361-366.
28. Subramanian C, Hasan S, Rowe M, Hottiger M, Orre R, Robertson ES. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. *J Virol* 2002; 76: 4699-4708
29. Καππά Ν, Williams E, Ιωάννου Κ, Σαμαρά Π, Τσιτσιλώνη Ο. Η προθυμοσίνη α ως καρκινικός βιοδείκτης και ανοσοθεραπευτικό μόριο. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2013; 30: 406-419
30. Qi X, Wang L, Du F. Novel small molecules relieve prothymosin alpha-mediated inhibition of apoptosome formation by blocking its interaction with Apaf-1. *Biochemistry* 2010; 49: 1923-1930
31. Piacentini M, Evangelisti C, Mastroberardino PG, Nardacci R, Kroemer G. Does prothymosin-alpha act as molecular switch between apoptosis and autophagy? *Cell Death Differ* 2003; 10: 937-939
32. Karapetian RN, Evstafieva AG, Abaeva IS, Chichkova NV, Filonov GS, Rubtsov YP, Sukhacheva EA, Melnikov SV, Schneider U, Wanker EE, Vartapetian AB. Nuclear oncoprotein prothymosin alpha is a partner of Keap1: implications for expression of oxidative stress-protecting genes. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1089-1099
33. Khan H, Cino EA, Brickenden A, Fan J, Yang D, Choy WY. Fuzzy complex formation between the intrinsically disordered prothymosin  $\alpha$  and the Kelch domain of Keap1 involved in the oxidative stress response. *J Mol Biol* 2013; 425: 1011-1027
34. Niture SK, Jaiswal AK. Prothymosin-alpha mediates nuclear import of the INrf2/Cul3 Rbx1 complex to degrade nuclear Nrf2. *J Biol Chem* 2009; 284: 13856-13868
35. Pan LX, Haritos AA, Wideman J, Komiyama T, Chang M, Stein S, Salvin SB, Horecker BL. Human prothymosin alpha: amino acid sequence and immunologic properties. *Arch Biochem Biophys* 1986; 250: 197-201
36. Salvin SB, Horecker BL, Pan LX, Rabin BS. The effect of dietary zinc and prothymosin alpha on cellular immune responses of RF/J mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; 43: 281-288
37. Maric D, Veljic J, Ranin J, Jankovic BD. In vivo effect of prothymosin-alpha 1 on humoral and cell-mediated immune responses in the young rat. *Int J Neurosci* 1991; 59: 135-142
38. Cordero OJ, Sarandeses CS, López JL, Nogueira M. Prothymosin alpha enhances human natural killer cell cytotoxicity: Role in mediating signals for NK activity. *Lymphokine Cytokine Res* 1992; 11: 277-285
39. López-Rodríguez JL, Cordero OJ, Sarandeses C, Viñuela J, Nogueira M. Interleukin-2 killer cells: In vitro evaluation of combination with prothymosin alpha. *Lymphokine Cytokine Res* 1994; 13: 175-182
40. Skopeliti M, Iconomidou VA, Derhovanessian E, Pawelec G, Voelter W, Kalbacher H, Hamodrakas SJ, Tsitsilonis OE. Prothymosin alpha immunoactive carboxyl-terminal peptide TKKQKTDEDD stimulates lymphocyte reactions, induces dendritic cell maturation and adopts a beta-sheet conformation in a sequence-specific manner. *Mol Immunol* 2009; 46: 784-792

41. Jin Y, Cao C, Li P, Liu X, Huang W, Li C, Ma Q. Boosting immune response to hepatitis B DNA vaccine by coadministration of Prothymosin alpha-expressing plasmid. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 1364-1369
42. Heidecke H, Eckert K, Schulze-Forster K, Maurer HR. Prothymosin alpha 1 effects in vitro on chemotaxis, cytotoxicity and oxidative response of neutrophils from melanoma, colorectal and breast tumor patients. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19: 413-420
43. Baxevanis CN, Thanos D, Reclos GJ, Anastasopoulos E, Tsokos GC, Papamatheakis J, Papamichail M. Prothymosin alpha enhances human and murine MHC class II surface antigen expression and messenger RNA accumulation. *J Immunol* 1992; 148: 1979-1984
44. Baxevanis CN, Reclos GJ, Papamichail M, Tsokos GC. Prothymosin alpha restores the depressed autologous and allogeneic mixed lymphocyte responses in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1987; 9: 429-440
45. Reclos GJ, Baxevanis CN, Sfagos C, Papageorgiou C, Tsokos GC, Papamichail M. Multiple sclerosis: Effects of prothymosin alpha on the autologous and allogeneic MLR in patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1987; 70: 336-344
46. Skopeliti M, Voutsas I, Klimentzou P, Tsiatas ML, Beck A, Bamias A, Moraki M, Livaniou E, Neagu M, Voelter W, Tsitsilonis OE. The immunologically active site of prothymosin  $\alpha$  is located at the carboxy-terminus of the polypeptide. Evaluation of its in vitro effects in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1247-1257
47. Samara P, Ioannou K, Neagu M, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Voelter W, Tsitsilonis O. The C-terminal decapeptide of prothymosin  $\alpha$  is responsible for its stimulatory effect on the functions of human neutrophils in vitro. *Int Immunopharmacol* 2013; 15: 50-57
48. Voutsas IF, Pistamaltzian N, Tsiatas ML, Skopeliti M, Katsila T, Mavrothalassiti I, Spyrou S, Dimopoulos MA, Tsitsilonis OE, Bamias A. Ovarian malignant ascites-derived lymphocytes stimulated with prothymosin  $\alpha$  or its immunoactive decapeptide lyse autologous tumour cells in vitro and retard tumour growth in SCID mice. *Eur J Cancer* 2013; 49: 1706-1714
49. Piñeiro A, Begoña Bugia M, Pilar Arias M, Cordero OJ, Nogueira M. Identification of receptors for prothymosin alpha on human lymphocytes. *Biol Chem* 2001; 382: 1473-1482
50. Salgado FJ, Piñeiro A, Canda-Sánchez A, Lojo J, Nogueira M. Prothymosin alpha-receptor associates with lipid rafts in PHA-stimulated lymphocytes. *Mol Membr Biol* 2005; 22: 163-176
51. Skopeliti M, Kratzer U, Altenberend F, Panayotou G, Kalbacher H, Stevanovic S, Voelter W, Tsitsilonis OE. Proteomic exploitation on prothymosin  $\alpha$  – induced mononuclear cell activation. *Proteomics* 2007; 7: 1814-1824
52. Mosoian A, Teixeira A, Burns CS, Sander LE, Gusella GL, He C, Blander JM, Klotman P, Klotman ME. Prothymosin-alpha inhibits HIV-1 via Toll-like receptor 4-mediated type I interferon induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 10178-10183.
53. Ioannou K, Derhovanessian E, Tsakiri E, Samara P, Kalbacher H, Voelter W, Trougakos IP, Pawelec G, Tsitsilonis OE. Prothymosin alpha and a prothymosin alpha-derived peptide enhance T(H) 1-type immune responses against defined HER-2/neu epitopes. *BMC Immunol* 2013; 14: 43

54. Karachaliou C.-E., Liolios C, Triantis C, Zikos C, Samara P, Tsitsilonis OE, Kalbacher H, Voelter W, Papadopoulos M, Pirmettis I, Livaniou E. Specific in vitro binding of a new <sup>99m</sup>Tc-radiolabeled derivative of the C-terminal decapeptide of prothymosin alpha on human neutrophils. *Int J Pharm* 2015; 486: 1-12
55. Ioannou K, Samara P, Livaniou E, Derhovanessian E, Tsitsilonis OE. Prothymosin alpha: A ubiquitous polypeptide with potential use in cancer diagnosis and therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61: 599-614
56. Tsitsiloni OE, Stiakakis J, Koutselinis A, Gogas J, Markopoulos C, Yialouris P, Bekris S, Panoussopoulos D, Kiortsis V, Voelter W, Haritos AA. Expression of alpha-thymosins in human tissues in normal and abnormal growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9504-9507
57. Jou YC, Tung CL, Tsai YS, Shen CH, Syue-Yi C, Shiau AL, Tsai HT, Wu CL, Tzai TS. Prognostic relevance of prothymosin-alpha expression in human upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology* 2009; 74: 951-957
58. Wu CG, Habib NA, Mitry RR, Reitsma PH, van Deventer SJ, Chamuleau RA. Overexpression of hepatic prothymosin alpha, a novel marker for human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1997; 6: 1199-1204
59. Fraga M, García-Caballero T, Domínguez F, Pérez-Becerra E, Beiras A, Forteza J. Immunohistochemical location of prothymosin alpha in regenerating human hepatocytes and hepatocellular carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993; 423: 449-452
60. Letsas KP, Vartholomatos G, Tsepi C, Tsatsoulis A, Frangou-Lazaridis M. Fine-needle aspiration biopsy-RT-PCR expression analysis of prothymosin alpha and parathymosin in thyroid: Novel proliferation markers? *Neoplasma* 2007; 54: 57-62
61. Kashat L, So AK, Masui O, Wang XS, Cao J, Meng X, Macmillan C, Ailles LE, Siu KW, Ralhan R, Walfish PG. Secretome-based identification and characterization of potential biomarkers in thyroid cancer. *J Proteome Res* 2010; 9: 5757-5769
62. Sasaki H, Sato Y, Kondo S, Fukai I, Kiriya M, Yamakawa Y, Fujii Y. Expression of the prothymosin alpha mRNA correlated with that of N-myc in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2001; 168: 191-195
63. Ojima E, Inoue Y, Miki C, Mori M, Kusunoki M. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal cancer to preoperative radiotherapy. *J Gastroenterol* 2007; 42: 730-736
64. Mori M, Barnard GF, Staniunas RJ, Jessup JM, Steele GD Jr, Chen LB. Prothymosin-alpha mRNA expression correlates with that of c-myc in human colon cancer. *Oncogene* 1993; 8: 2821-2826
65. Freire M, Díaz-Jullien C, Covelo G. Developments in prothymosin  $\alpha$  research. In: *Recent Res Devel Proteins*, Transworld Research Network, Kerala, India, pp 257-276, 2002
66. Samara P, Kalbacher H, Ioannou K, Radu DL, Livaniou E, Promponas VJ, Voelter W, Tsitsilonis O. Development of an ELISA for the quantification of the C-terminal decapeptide prothymosin  $\alpha$ (100-109) in sera of mice infected with bacteria. *J Immunol Methods* 2013; 395: 54-62
67. Jou YC, Tsai YS, Hsieh HY, Chen SY, Tsai HT, Chen KJ, Wang ST, Shiau AL, Wu CL, Tzai TS. Plasma thymosin- $\alpha$ 1 level as a potential biomarker in urothelial and renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2013; 31: 1806-1811



68. Klimentzou P, Drougou A, Fehrenbacher B, Schaller M, Voelter W, Barbatis C, Paravatou-Petsotas M, Livaniou E. Immunocytological and preliminary immunohistochemical studies of Prothymosin  $\alpha$ , a human cancer-associated polypeptide, with a well-characterized polyclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 1023-1031
69. Tzai TS, Tsai YS, Shiau AL, Wu CL, Shieh GS, Tsai HT. Urine prothymosin-alpha as novel tumor marker for detection and follow-up of bladder cancer. *Urology* 2006; 67: 294-299
70. Costopoulou D, Leondiadis L, Czarnecki J, Ferderigos N, Ithakissios DS, Livaniou E, Evangelatos GP. Direct ELISA method for the specific determination of prothymosin alpha in human specimens. *J Immunoassay* 1998; 19: 295-316
71. Tsitsiloni OE, Heimer E, Felix A, Yialouris PP, Vamvoukakis J, Voelter W, Haritos AA. Radioimmunoassays for the C-terminus of prothymosin  $\alpha$  and the N-terminus of parathymosin  $\alpha$  for the measurement of the levels of  $\alpha$ -thymosins in human cancer. *J Immunol Methods* 1994; 169: 163-171
72. Engvall, E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8 : 871-874
73. Van Weemen BK, Schuurs AHWM. Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. *FEBS Lett* 1971; 15: 232-236
74. Prathap B, Dey A, Srinivasa GH, Johnson P, Arthanariswaran. A Review – Importance of RP-HPLC in analytical method development. *Int J Novel Trends Pharm Sci* 2013; 3: 15-23
75. Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res* 1990; 35: 161-214
76. Dolashka-Angelova P, Stefanova T, Livaniou E, Velkova L, Klimentzou P, Stevanovic S, Salvato B, Neychev H, Voelter W. Immunological potential of *Helix vulgaris* and *Rapana venosa* hemocyanins. *Immunol Investigations* 2008; 37: 822-840

# **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
CBP	CREB – binding protein
CD	Cluster of differentiation
CREB	cAMP response element – binding protein
Cul3	Cullin 3
E3	E3 ubiquitin ligase
HLA-DR	Human leukocyte antigen – antigen D related
IR	Infrared
LPS	Lipopolysaccharide
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
Nrf2	Nuclear factor – like 2
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
p300	Adenovirus early region 1A binding protein
Ran	RAs-related nuclear protein
Rbx1	RING-box protein 1
RCC1	Regulator of chromosome condensation 1
Rch-1	LRR (Leucine-rich repeat) receptor – like serine/threonine protein kinase
SCID	Severe combined immunodeficiency
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
UV	Ultra Violet