

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΩΝ
ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΣΑΓΓΑΡΙΔΟΥ ΕΛΕΝΑ

**Ηράκλειο
Μάρτιος 2010**

Επιβλέπων Καθηγητής: Π. Θεοδωρόπουλος

Τριμελής Επιτροπή: Π. Θεοδωρόπουλος

Η. Καστανάς

Η. Κουρούμαλης

Επταμελής Επιτροπή: Π. Θεοδωρόπουλος

Η. Καστανάς

Η. Κουρούμαλης

Α. Γραβάνης

Ε. Σταθόπουλος

Μ. Τζαρδή

Μ. Καμπά

Στην οικογένεια μου,
που με στήριξε καθόλη την διάρκεια
παρόλες τις αντιξοότητες
και ιδιαίτερα στον πατέρα μου,
που έφυγε νωρίς.....

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	1
1. Ο Πυρήνας	2
1.1. Σύσταση του πυρήνα	2
1.2. Περιοχές και σωματίδια του πυρήνα	6
2. Ο Πυρηνικός Φάκελος	11
2.1 Δομή, Σύσταση και Οργάνωση του πυρηνικού φακέλου	11
2.2. Διάσπαση και επανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου	24
2.3. Συστατικά του πυρηνικού φακέλου με αυτοαντιγονική δράση	30
3. Πρωτοπαθής Χολική Κίρρωση	34
3.1. Γενικά για την πρωτοπαθή χολική κίρρωση	34
3.2. Τα αντιμιτοχονδριακά αυτοαντισώματα στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση	40
3.3. Τα αντιπυρηνικά αυτοαντισώματα στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση	42
3.4. Τα αντιπεριπυρηνικά αυτοαντισώματα στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση	44
4. Σκοπός της διατριβής	51
<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	52
1. Υλικά	53
2. Μέθοδοι	55
2.1. Κυτταροκαλλιέργειες	55
2.2. Απομόνωση πυρήνων	55
2.2.1. Διαδικασία απομόνωσης πυρήνων από HepG2 κύτταρα	55
2.2.2. Διαδικασία απομόνωσης πυρήνων από ηπατοκύτταρα αρουραίων	56
2.3. Απομόνωση πυρηνικών φακέλων από πυρήνες ηπατοκυττάρων αρουραίων	57
2.4. Καθαρισμός πρωτεϊνών	58
2.4.1. Καθαρισμός λαμινών από πυρηνικούς φακέλους ηπατοκυττάρων αρουραίων	58
2.4.1.1. Προετοιμασία εκχυλίσματος πυρηνικών φακέλων ηπατοκυττάρων αρουραίων	59
2.4.1.2. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής DE52	59
2.4.2. Απομόνωση χιμαιρικών πρωτεϊνών από βακτήρια	60

2.5.	Ανοσοκατακρήμνιση	60
2.5.1.	Εκχύλιση πρωτεϊνών των πυρηνικών πόρων από πυρηνικούς φακέλου ηπατοκυττάρων αρουραίων.	61
2.5.2.	Ανοσοκατακρήμνιση αυτοαντιγόνων με τη χρήση αντισωμάτων.	61
2.5.3.	Ανοσοκατακρήμνιση αυτοαντιγόνων με τη χρήση αυτοαντισωμάτων.	62
2.6.	Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών.	62
2.7.	Κατακρήμνιση πρωτεϊνών.	63
2.8.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).	63
2.8.1.	Προετοιμασία δειγμάτων.	63
2.8.2.	Προετοιμασία πηκτής SDS- πολυακρυλαμιδίου.	63
2.8.3.	Ηλεκτροφόρηση.	64
2.8.4.	Χρώση πηκτής πολυακρυλαμιδίου.	64
2.9.	Ανοσοαποτύπωση-Western Blot.	64
2.9.1.	Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.	64
2.9.2.	Επαναφορά πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτική κατάσταση.	64
2.9.3.	Διαδικασία ανοσοανίχνευσης.	65
2.9.4.	Απομάκρυνση αντισωμάτων για την επανάληψη της ανοσοανίχνευσης.	65
2.10.	Έμμεσος ανοσοφθορισμός.	66
2.10.1.	Υπόστρωμα κυττάρων (HeLa, HepG2, Hep2, Ishikawa).	66
2.10.2.	Υπόστρωμα πυρήνων (ηπατοκυττάρων αρουραίων, HepG2 κυττάρων).	68
2.11.	Μέθοδος ενζυμοσύνδετης ανοσοαπορροφητικής μέτρησης (ELISA).	68
2.12.	Μέθοδος ταυτοποίησης αντι-μιτοχονδριακών αυτοαντισωμάτων.	69
<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>		70
1.	Ανίχνευση και συχνότητα αυτοαντισωμάτων με έμμεσο ανοσοφθορισμό	71
1.1.	Ρόλος του υποστρώματα και είδους μονιμοποίησης	71
1.2.	Συχνότητα εμφάνισης αυτοαντισωμάτων για πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου	76
1.3.	Συχνότητα αυτοαντισωμάτων για δομές του πυρηνοπλάσματος	80

1.4.	Συνύπαρξη αυτοαντισωμάτων για διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα	83
1.5.	Πρότυπα φθορισμού των αυτοαντισωμάτων στη μίτωση	85
2.	Ταυτοποίηση αυτοαντισωμάτων για συγκεκριμένες πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου	87
2.1	Καθαρότητα υποστρώματος πυρηνικών φακέλων	87
2.2.	Προσδιορισμός του αριθμού και του μοριακού βάρους των αυτοαντιγόνων της πυρηνικής μεμβράνης	90
2.3.	Διερεύνηση της ύπαρξης αντισωμάτων για την γλυκοπρωτεΐνη gp210	90
2.4.	Διερεύνηση της ύπαρξης αντισωμάτων για την πρωτεΐνη p62	95
2.5.	Διερεύνηση της ύπαρξης αντισωμάτων έναντι των λαμινών	95
2.6.	Διερεύνηση της ύπαρξης αυτοαντισωμάτων έναντι του LBR	96
2.7.	Ταυτοποίηση αυτοαντιγόνων με φασματοσκοπία μαζών	99
	<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	103
	<u>Βιβλιογραφία</u>	117

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων στον ορό ασθενών παίζει κεντρικό ρόλο για τη σωστή διάγνωση και κατάταξη των αυτοάνοσων νοσημάτων.

Τόσο σε ερευνητικά όσο και κλινικά εργαστήρια χρησιμοποιούνται οι τεχνικές του έμμεσου ανοσοφθορισμού, της ELISA και της ανοσοαποτύπωσης. Δεδομένης της μεγάλης απόκλισης που παρουσιάζουν δημοσιευμένες μελέτες όσον αφορά στη συχνότητα εμφάνισης αυτοαντισωμάτων του πυρήνα σε ορούς ασθενών με PBC, κύριος στόχος της μελέτης αυτής ήταν να εδραιώσουμε, να χρησιμοποιήσουμε και να συγκρίνουμε όλες τις διαθέσιμες τεχνικές για τον προσδιορισμό αυτοαντισωμάτων του πυρήνα.

Για τον σκοπό αυτό α) εδραιώσαμε αρχικά μια μεθοδολογία ανίχνευσης των αντισωμάτων με έμμεσο ανοσοφθορισμό και ταυτοποίησης αυτοαντισωμάτων για συγκεκριμένα αντιγόνα του πυρηνικού φακέλου με βιοχημικές και ανοσοχημικές προσεγγίσεις, χρησιμοποιώντας νέα υποστρώματα και υλικά και β) προσδιορίσαμε τη συχνότητα εμφάνισης αυτοαντισωμάτων για αντιγόνα του πυρήνα και του πυρηνικού φακέλου σε 103 ορούς ασθενών με PBC.

Τα σημαντικότερα συμπεράσματα της μελέτης μας είναι τα παρακάτω:

1. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική τεχνική για την ανίχνευση περιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων υπό την προϋπόθεση ότι χρησιμοποιούνται κατάλληλα υποστρώματα και αντιδραστήρια.

Η χρησιμοποίηση καθαρών πυρήνων χωρίς την παρουσία καταλοίπων του κυτταροπλάσματος, μεθοδολογία εξαιρετικά ευαίσθητη, ειδική και ευκόλως χρησιμοποιούμενη, έδειξε ότι η συχνότητα περιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων στη PBC είναι υψηλή και αντιστοιχεί περίπου στο 50% των ασθενών.

Επίσης, στη πλειοψηφία των ορών συνυπάρχουν περιπυρηνικά αυτοαντισώματα τάξης IgG και IgM, ενώ τα αντι-κεντρομεριδικά και τα αντι-sp100 είναι κατά κύριο λόγο ανοσοσφαιρίνες G τάξης.

2. Η ήδη υπάρχουσα και εμπορικά διαθέσιμη μεθοδολογία ELISA δεν επαρκεί για τον προσδιορισμό αντι-grp210 αυτοαντισωμάτων. Ως εκ τούτου,

θεωρούμε αναγκαία την ανάπτυξη μεθοδολογίας με νέα αντιγονικά υποστρώματα και δευτερογενή αντισώματα.

3. Η ανοσοαποτύπωση μόνη της ή σε συνδυασμό με την **ανοσοκατακρήμνιση** αποτελούν αποτελεσματικές μεθόδους για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων για συγκεκριμένες πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου.

Με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα πυρηνικών φακέλων βρήκαμε ότι η πρωτεϊνική ζώνη στα 210kDa που αναγνωρίζουν οι οροί οφείλεται σε αντι-gr210 και επομένως η συγκεκριμένη μεθοδολογία αποτελεί ένα απλό τρόπο προσδιορισμού τους, στην PBC.

Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα καθαρές λαμίνες και ανασυνδυασμένο αμινοτελικό τμήμα του LBR, βρήκαμε ότι η συχνότητα αυτοαντισωμάτων για τις πυρηνικές λαμίνες και τον LBR είναι χαμηλή και σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες.

Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την p62 και την gr210, διαπιστώσαμε ότι δεν υπάρχουν αντι-p62 αυτοαντισώματα εκτός αν υφίστανται σε εξαιρετικά χαμηλό τίτλο, ενώ τα αντι-gr210 αντισώματα είναι τα χαρακτηριστικά περιπυρηνικά αυτοαντισώματα στη PBC (1/3 συνόλου ορών και 2/3 ορών με περιπυρηνικά αυτοαντισώματα).

Εν κατακλείδι, η έρευνά μας έδειξε ότι η χρησιμοποίηση της σωστής τεχνικής απαιτεί μεταξύ άλλων γνώση των δυνατοτήτων και περιορισμών της. Δεδομένης της αναδυόμενης σημασίας των συγκεκριμένων αντισωμάτων στην διάγνωση και πρόγνωση της PBC και βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της μελέτης μας, προτείνουμε την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών πακέτων IIF και ELISA για τον προσδιορισμό του περιπυρηνικού φθορισμού και αντι-gr210 σε ορούς ασθενών με PBC.

Abstract

Detection of autoantibodies giving nuclear rim pattern by immunofluorescence (anti-nuclear envelope antibodies - ANEA) in sera from patients with primary biliary cirrhosis (PBC) is a useful tool for the diagnosis and prognosis of the disease. Differences in the prevalence of ANEA in PBC sera so far reported have been attributed to the methodology used for the detection as well as to ethnic/geographical variations. Therefore, we evaluated the prevalence of ANEA in sera of Greek patients with PBC by using methods widely used by clinical laboratories and a combination of techniques and materials.

We screened 103 sera by immunoblotting on nuclear envelopes and indirect immunofluorescence (IIF) using cells and purified nuclei. Reactivities against specific autoantigens were assessed using purified proteins, ELISA, immunoprecipitation and mass spectrometry.

We found higher prevalence of ANEA when sera were assayed by IIF on purified nuclei or cultured cells (50%) compared to Hep2 commercially available slides (15%). Anti-gp210 antibodies were identified in 22.3% and 33% of sera using ELISA for the C-terminal of gp210 or both ELISA and immunoprecipitation, respectively. Immunoblotting on nuclear envelopes revealed that immunoreactivity for the 210 kDa zone is related to anti-gp210 antibodies ($p < 0.0001$). Moreover, we found that sera had antibodies for lamins A (6.8%), B (1%) and C (1%) and LBR (8.7%), whereas none at all had detectable anti-p62 antibodies.

The prevalence of ANEA or anti-gp210 antibodies is under-estimated in PBC sera which are analyzed by conventional commercially available IIF or ELISA, respectively. Therefore, new substrates for IIF and ELISA should be included by clinical laboratories in the analysis of ANEA in autoimmune sera.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ο ΠΥΡΗΝΑΣ

1.1. Σύσταση του πυρήνα.

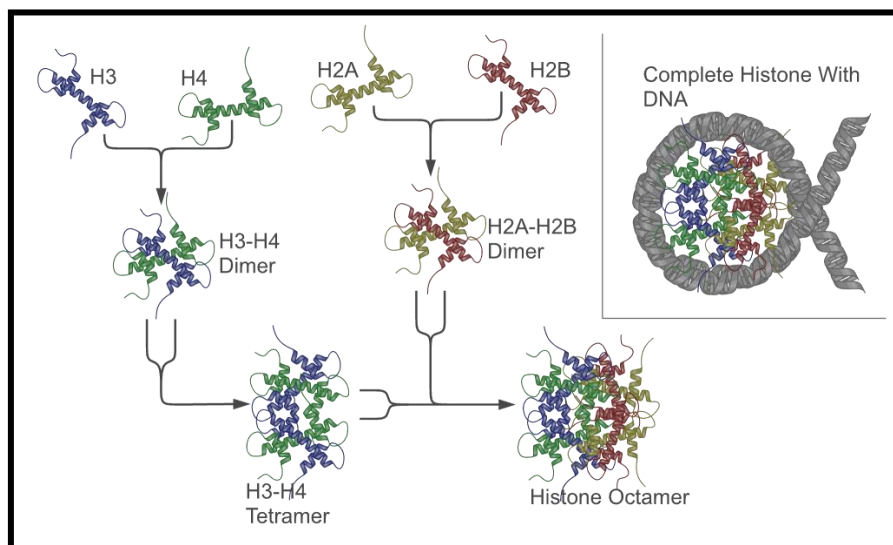
Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το γενετικό υλικό περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη και αποτελεί το οργανίδιο του πυρήνα, υπεύθυνο για την έκφραση των γονιδίων. Η λειτουργία του πυρήνα επιτυγχάνεται με τη συμβολή των διαφόρων πυρηνικών σωματιδίων. Η ύπαρξη σωματιδίων ή εξειδικευμένων περιοχών μέσα στον πυρήνα επιβεβαιώθηκε μετά από εκτεταμένες μελέτες (Lamond and Earnshaw 1998). Επιπλέον στο εσωτερικό του πυρήνα εκτός από τη χρωματίνη και τα πυρηνικά σωματίδια υπάρχουν και άλλα στοιχεία όπως ιόντα, πρωτεΐνες και νουκλεοτίδια (Lamond and Earnshaw 1998; Burke and Stewart 2002).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα εξαιρετικά επιμήκη, δίκλιωνα μόρια του DNA αλληλεπιδρούν με εξειδικευμένες πρωτεΐνες, οι οποίες διπλώνουν και συσκευάζουν τις λεπτές ίνες του DNA σε μια πιο συμπαγή δομή, τα χρωμοσώματα, τα οποία χωρούν μέσα στον πυρήνα και διαμοιράζονται στα δύο θυγατρικά κύτταρα σε κάθε κυτταρική διαίρεση. Η βασική υπομονάδα της χρωματίνης είναι τα νουκλεοσώματα τα οποία ακολουθούν ένα κοινό δομικό πρότυπο σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ο πυρήνας ενός νουκλεοσώματος αποτελείται από ένα σύμπλοκο αποτελούμενο από οκτώ μόρια ιστονών (δύο μόρια από κάθε ιστόνη) και ένα τμήμα δίκλωνου DNA μήκους περίπου 146 ζευγών νουκλεοτιδίων (Mosammarast, Ewart et al. 2002). Οι ιστόνες είναι μικρές πρωτεΐνες μοριακού βάρους 11-16 kDa (102-135 αμινοξέα), οι οποίες περιέχουν μεγάλο ποσοστό θετικά φορτισμένων αμινοξέων (λυσίνη και αργινίνη) και ανήκουν στις πλέον συντηρημένες από εξελικτική άποψη ευκαρυωτικές πρωτεΐνες (Bottomley 2004). Τα θετικά φορτία βοηθούν τις ιστόνες να συνδεθούν ισχυρά με τον αρνητικά φορτισμένο σακχαροφωσφορικό σκελετό του DNA, άσχετα από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του. Υπάρχουν πέντε τύποι ιστονών οι οποίες χωρίζονται σε δύο ομάδες, στις ιστόνες του νουκλεοσώματος (core histones) H3, H4, H2A, H2B και στη συνδετική (linker) ιστόνη H1. Οι νουκλεοσωματικές ιστόνες είναι υπεύθυνες για την περιέλιξη του DNA στο νουκλεόσωμα, το οποίο αποτελεί το πρώτο και πιο βασικό επίπεδο συσκευασίας της χρωματίνης. Σχηματίζουν διμερή H2A/H2B και τετραμερή H3/H4, τα οποία στη συνέχεια συνδέονται έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα οκταμερές ιστονών (Adams and Kamakaka 1999). Το κέντρο του νουκλεοσώματος καταλαμβάνεται από ένα τετραμερές ιστονών (H3-H4)₂, ενώ στις δύο άκρες εντοπίζονται αντίστοιχα δύο διμερή των ιστονών H2A-H2B. Το οκταμερές των ιστονών σχηματίζει ένα πρωτεϊνικό πυρήνα γύρω από τον οποίο περιελίσσεται η δίκλινη έλικα του DNA. **(Εικόνα**

1.1.2.) Τα νουκλεοσώματα συνδέονται μεταξύ τους με συνδετικό DNA (linker DNA) του οποίου το μήκος ποικίλλει από 8 bp έως και 114 bp ανά νουκλεόσωμα. Στο συνδετικό DNA συνδέεται ένα μόριο ιστόνης (H1) που βρίσκεται στο σημείο εισόδου και εξόδου του DNA στο νουκλεόσωμα.

Στα κεντρομερή, η ιστόνη H3 υποκαθίσταται από τη CenH3, ένα διαφοροποιημένο ανάλογο της H3 ιστόνης. Η CenH3 σε αντίθεση με την H3 δεν είναι εξελικτικά συντηρημένη πρωτεΐνη και αλληλεπιδρά μόνο με το κεντρομεριδιακό DNA, που επίσης δεν είναι εξελικτικά συντηρημένο (Malik and Henikoff 2001; Talbert, Masuelli et al. 2002). Η CenH3 είναι συντηρημένη στα ευκαρυωτικά κύτταρα (Sullivan, Santiago et al. 2001).

Τόσο το νουκλεόσωμα που συστατικό του αποτελεί η H3 όσο και το νουκλεόσωμα με τη CenH3 έχουν την ίδια δομή (οκταμερές) (Blower, Sullivan et al. 2002; Foltz, Jansen et al. 2006) αλλά διαφορετικές δομικές ιδιότητες. Τα $(CenH3CENP-A/H4)_2$ νουκλεοσώματα είναι πιο συμπαγή και πιο άκαμπτα (Black, Foltz et al. 2004) εξαιτίας της μεγάλης διαφοράς που παρουσιάζουν οι αλληλουχίες των δύο πρωτεϊνών (H3 και CenH3).



Εικόνα 1.1.2. Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης των ιστονών του πρωτεϊνικού πυρήνα (core) του νουκλεοσώματος (Molecular Biology of the Cell, 4th Edition, Alberts et al., Garland Science, 2001)

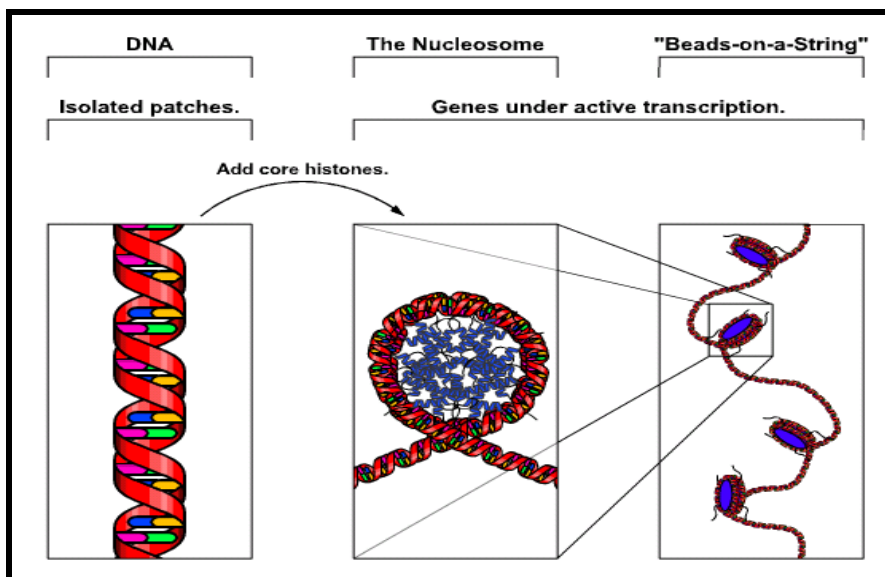
Η χρωματίνη αποτελεί μια δυναμική δομή η οποία συμπυκνώνεται και διπλώνεται (και αντίστροφα) με ρυθμιζόμενο τρόπο, έτσι ώστε να διευθετεί ποικίλες διεργασίες όπως είναι η μεταγραφή, η αντιγραφή και ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων (Verreault 2000;

Kruhlik, Hendzel et al. 2001). Από εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας προκύπτει ότι στο πρώτο επίπεδο συμπύκνωσης η χρωματίνη οργανώνεται σε δομές που περιγράφονται από τον όρο "χάντρες κομπολογιού" (beads-on-a-string) **(Εικόνα 1.1.3)**. Σε αυτές τις δομές νουκλεοσώματα που περιέχουν ιστόνη CenH3 αναμιγνύονται με νουκλεοσώματα που περιέχουν H3 ιστόνη (Blower, Sullivan et al. 2002) και σχηματίζουν εξειδικευμένες ανώτερες δομές, στα μιτωτικά χρωμοσώματα, όπου τα νουκλεοσώματα με την H3 να βρίσκονται μεταξύ των δύο χρωματίδων ενώ τα νουκλεοσώματα με τη CenH3 βρίσκονται στην πλευρά του κινητοχώρου. Έτσι διασφαλίζεται ο σχηματισμός των κινητοχώρων στις αντίθετες πλευρές των αδελφών χρωματίδων.**(Εικόνα 1.1.4)**

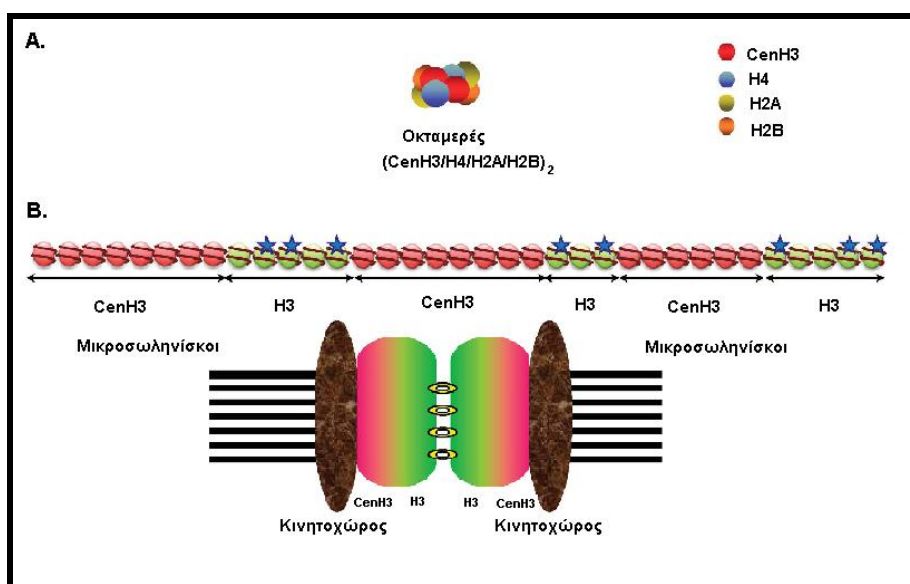
Στα κεντρομερή βρίσκεται συγκεκριμένος τύπος αλληλουχίας DNA, που ονομάζεται δορυφορικό DNA. Οι ακολουθίες αυτές δεσμεύουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες, που ονομάζονται CEN. Πολλά από τα πρωτεϊνικά συστατικά των κεντρομερών έχουν ταυτοποιηθεί. Στα ανθρώπινα χρωμοσώματα οι πρωτεΐνες των κεντρομερών/κινητοχώρου (CENPA, CENP-B, CENP-C) είναι οι πρώτες που ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ορούς με αντικεντρομεριδιακά αντισώματα από ασθενείς με αυτοάνοσο νόσημα (Earnshaw and Rothfield 1985). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι από τα απαραίτητα συστατικά των κεντρομερών που συμβάλλουν στη διατήρηση της δομής και της ταυτότητάς του, αφού συνεχίζουν να υπάρχουν καθόλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

Η CENP-A, είναι η κεντρομεριδιακή ιστόνη H3 (CenH3). Η CENP-A είναι απαραίτητη για την επιβίωση των οργανισμών και επιπλέον απαιτείται για το σχηματισμό άλλων συστατικών των κεντρομερών/κινητοχώρων όπως της CENP-C στα ποντίκια (Howman, Fowler et al. 2000), *C. elegans* και *Schizosacharomyces pombe*. Οι παρατηρήσεις αυτές όπως τα προαναφερθέντα (βλ.σελ.3-4) δείχνουν ότι η CENP-A είναι πρωταρχικής σημασίας συστατικό της ειδικής χρωματινικής δομής των κεντρομερών.

Η CENP-B είναι συντηρημένη στα θηλαστικά και υπάρχει εξειδικευμένα στα κεντρομερή των χρωμοσωμάτων του ανθρώπου και του ποντικού (Earnshaw, Machlin et al. 1987). Η CENP-B υπάρχει στα ενεργά και ανενεργά κεντρομερή και στα δικεντρικά χρωμοσώματα αλλά δεν υπάρχει στα Y χρωμοσώματα και στα και στα νεοκεντρομερή (Earnshaw, Ratrie et al. 1989; Sullivan, Santiago et al. 2001). Οργανισμοί στους οποίους λείπει η CENP-B επιβιώνουν (Hudson, Fowler et al. 1998) σε αντίθεση με οργανισμούς στους οποίους λείπει η CENP-A, γεγονός που σημαίνει ότι η ύπαρξη της CENP-B δεν είναι τόσο απαραίτητη για τη λειτουργία του κινητοχώρου.



Εικόνα 1.1.3. Οργάνωση της χρωματίνης. Σχηματική αναπαράσταση του πρώτου επιπέδου οργάνωσης και συσκευασίας της χρωματίνης ενός μεταφασικού χρωμοσώματος (The major chromatin structures, Richard Wheelers, 2005).



Εικόνα 1.1.4. Η δομή και η οργάνωση της CenH3 χρωματίνης. (A) Τα νουκλεοσώματα της CenH3 αποτελούνται από οκταμερή $(CenH3/H4/H2A/H2B)_2$. (B) Στην κεντρομεριδιακή χρωματίνη, τα νουκλεοσώματα με H3 ιστόνη βρίσκονται ανάμικτα με τα νουκλεοσώματα της CenH3 ιστόνης στις δομές πρώτου επιπέδου συμπύκνωσης της χρωματίνης. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης η κεντρομεριδιακή χρωματίνη συμπυκνώνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε τα νουκλεοσώματα με την H3 ιστόνη να βρίσκονται μεταξύ των δύο χρωματίδων ενώ τα νουκλεοσώματα με την CenH3 από την πλευρά του κινητοχώρου. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται ο σχηματισμός των κινητοχώρων στις αντίθετες πλευρές των αδερφών χρωματίδων (Torrás-Llort, Moreno-Moreno et al. 2009).

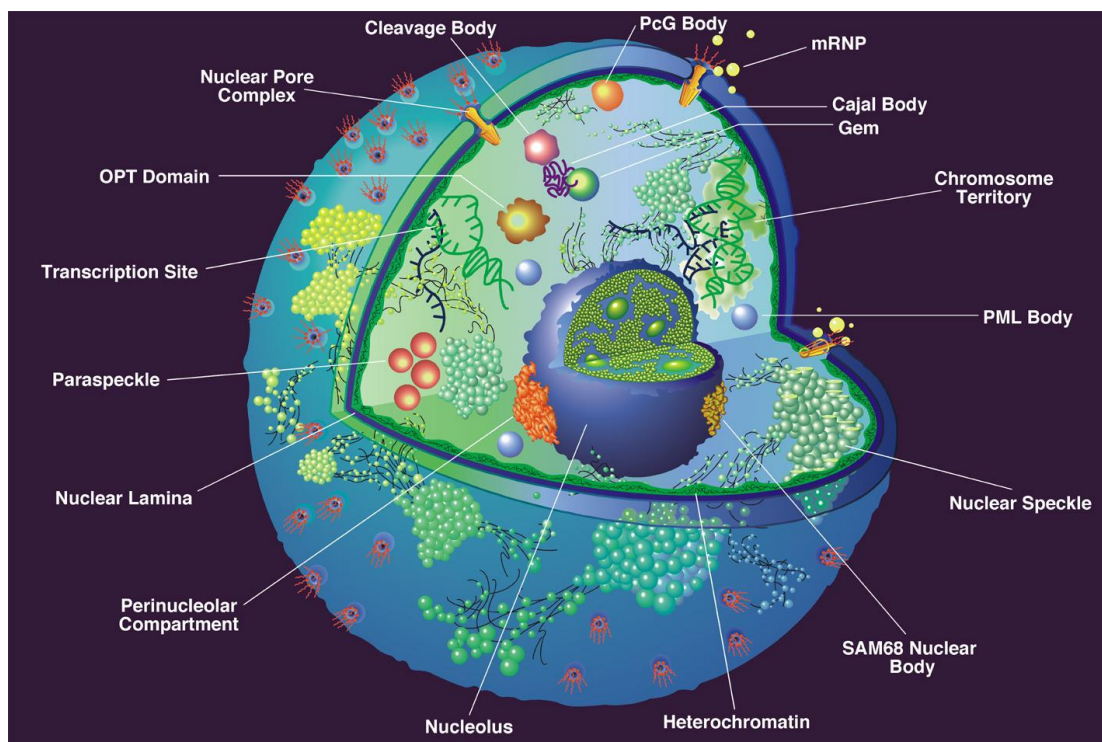
Η CENP-C βρίσκεται στα εσωτερικά στρώματα του κινητοχώρου στα μιτωτικά χρωμοσώματα. Είναι απαραίτητη για την λειτουργία των κεντρομεριδίων (Saitoh, Tomkiel et al. 1992) και είναι συντηρημένη μεταξύ του ανθρώπου, του ποντικού, των πτηνών και του *C.elegan*. Οργανισμοί στους οποίους λείπει η CENP-C δεν επιβιώνουν, γεγονός που είναι αποτέλεσμα του μη κανονικού διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων (Kalitsis, Fowler et al. 1998). Η CENP-C είναι απαραίτητη για την διαδικασία διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων.

Επιπλέον συστατικά των κεντρομερών αποτελούν οι πρωτεΐνες CENP-H (Sugata, Li et al. 2000), hMis6 (CENP-I) και hMis12 (Goshima, Kiyomitsu et al. 2003). Τόσο η CENP-H όσο και η Mis6 ομόλογο της CENP-I είναι απαραίτητες για την εντόπιση της CENP-C στα DT40, κύτταρα πτηνών (Fukagawa, Mikami et al. 2001; Nishihashi, Haraguchi et al. 2002). Η ύπαρξη της CENP-C στον κινητοχώρο δεν εξαρτάται από την ύπαρξη των ομολόγων της CENP-I (hMis6 και hMis12) και ο εντοπισμός της hMis12 είναι ανεξάρτητος από τον εντοπισμό της CENP-A (Goshima, Kiyomitsu et al. 2003).

1.2. Περιοχές και σωματίδια του πυρήνα.

Οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στην έκφραση των γονιδίων είναι καταμερισμένες σε συγκεκριμένες περιοχές του πυρηνοπλάσματος. Στις περιοχές αυτές μπορεί να υπάρχουν κοκκιώματα ή συσσωματώματα. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη σωματιδίων στο πυρηνόπλασμα, των οποίων η λειτουργία δεν έχει διευκρινιστεί. Τα σωματίδια του πυρήνα και η λειτουργία τους φαίνεται στην **εικόνα 1.2.1** κι αναγράφεται επιγραμματικά στον **πίνακα 1.2.1**.

Ο πυρηνίσκος είναι το πιο εμφανές σωματίδιο του πυρήνα. Είναι υπεύθυνος για τη σύνθεση και την κατεργασία του rRNA αλλά και τον σχηματισμό των ριβοσωμάτων (Spector 1993). Τα περισσότερα κύτταρα στα θηλαστικά περιέχουν 1-5 πυρηνίσκους, διαμέτρου 0,5-5,0 μm. Στον πυρηνίσκο διακρίνονται τρεις περιοχές. Τα ινιδιακά κέντρα είναι οι περιοχές του πυρηνίσκου, που θεωρούνται το μεσοφασικό ανάλογο των περιοχών των χρωμοσωμάτων που οργανώνονται από τους πυρηνίσκους (nucleolar-organising regions of chromosomes, NORs). Τα ανθρώπινα κύτταρα περιέχουν περίπου 250 αντίγραφα από rDNA το οποίο βρίσκεται στα NORs σε πέντε διαφορετικά ζεύγη χρωμοσωμάτων. Η μεταγραφή και η επεξεργασία του rRNA πιστεύεται ότι γίνεται μέσα σε συμπαγή ινιδιακά σωματίδια (**Εικόνα 1.2.1, μπλε δίκτυο, πυρηνίσκου**), μία περιοχή που περιβάλλει και κάποιες φορές εκτείνεται μεταξύ των ινιδιακών κέντρων. Τα κοκκώδη σωματίδια (που δίνονται ως πράσινοι



Εικόνα 1.2.1. Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης του πυρήνα. Cleavage body: σωματίδια διαχωρισμού, Nuclear speckles: κοκκιώδη σωματίδια, Paraspeckle: παρακοκκιώδη σωματίδια, Perinucleolar compartment: παρα-κοκκιώδη σωματίδια, SAM 68 nuclear body: πυρηνικό σωματίδιο στην επιφάνεια του πυρηνίσκου, PML Body: σωματίδια PML, Cajal body: σωματίδια Cajal, Gem: δυάδα σωματιδίων Cajal, PcG Body: σωματίδια PcG, Cleavage Body: σωματίδια διαχωρισμού, OPT domain: περιοχή OPT, Transcription site: περιοχή μεταγραφής, Nuclear lamina: Πυρηνική λάμινα, Nuclear pore complex: Σύμπλοκα πυρηνικών πόρων (Spector 2001).

Πυρηνικά Σωματίδια	Περιγραφή λειτουργίας
OPT	Ο ρόλος του είναι άγνωστος.
Πυρηνίσκοι	Η σύνθεση κι η κατεργασία του rRNA αλλά και ο σχηματισμός των ριβοσωμάτων
Σωματίδια Cajal	Λαμβάνουν μέρος στη βιογένεση και τη μεταφορά των snRNPs και των snoRNPs.
Πυρηνικά Κοκκιώματα (Nuclear Speckle)	Συσσωματώματα των παραγόντων συρραφής του προ-mRNA
PNC	Ο ρόλος του είναι άγνωστος
SAM68	Ο ρόλος του είναι άγνωστος
PML	Τα σωματίδια PML έχει προταθεί ότι συμβάλλουν στη ρύθμιση της μεταγραφής.
Gems	Ωρίμανση των snRNPs
Σωματίδια διαχωρισμού Cleavage bodies	Σχηματισμοί που δημιουργούνται κατά την συσσώρευση των παραγόντων που λαμβάνουν μέρος στην κοπή ή την πολυαδενυλίωση των προ-mRNA
ICGs	Εικάζεται ότι εμπλέκονται στην διάταξη και/ή διαφοροποίηση των συζευκτικών παραγόντων του προ-mRNA
PcG	Δεν έχει διευκρινιστεί αν τα σωματίδια αυτά είναι αποθηκευτικά ή αν συμβάλλουν στην αποσιώπηση των γονιδίων.
Παρα-κοκκιώδη Σωματίδια (Paraspeckles)	Μεταγραφή από την RNA Pol II.

Πίνακας 1.2.1. Τα σωματίδια του πυρήνα και η λειτουργία τους.

κόκκοι) αποτελείται από προ-ριβωσωμικά σωματίδια σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης και ριβωσωμικές υπομονάδες τόσο μεγάλες όσο και μικρές.

Τα σωματίδια που βρίσκονται περί τον πυρηνίσκο (PNC) και το πυρηνικό σωματίδιο SAM68 (Huang 2000) είναι ξεχωριστές δομές οι οποίες συσχετίζονται με την επιφάνεια το πυρηνίσκου και θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του RNA. Η διάμετρος τους κυμαίνεται μεταξύ 0,25-1,0 μm και κάθε πυρήνας περιέχει 1-10. Τα PNC περιέχουν μια σειρά από μικρά RNAs, που μεταγράφηκαν από την RNA πολυμεράση III, και πολλές άλλες πρωτεΐνες που δένουν στο RNA, περιλαμβανομένης και της πρωτεΐνης που δένει στην πολυπυριμιδική περιοχή (PTB). Τα πυρηνικά σωματίδια SAM68, περιέχουν μέλη από μία ομάδα RNA-συνδεόμενων πρωτεϊνών, που περιέχουν μία GSG περιοχή, η οποία ονομάζεται και περιοχή STAR (signal transduction and activation of RNA, μετάλλαξη σήματος και ενεργοποίηση του RNA). Η περιοχή STAR αποτελείται από αλληλουχία αμινοξέων και εμφανίζει μεγάλη ομολογία με την περιοχή KH, που βρίσκεται στα hnRNP K. Παρόλο που η λειτουργία των σωματιδίων PNC και SAM68 είναι άγνωστη και οι δύο δομές εντοπίζονται ως επί το πλείστον σε καρκινικές σειρές και σπάνια σε πρωτογενή κύτταρα.

Τα σωματίδια PML (Maul, Negorev et al. 2000), είναι διαμέτρου 0,3-1,0 και ονομάζονται επίσης ND10, PODs (PML oncogenic domains, PML ογκογονικές περιοχές) και σωματίδια Kr. Εκτός από την πρωτεΐνη PML στα σωματίδια αυτά έχουν βρεθεί οι πρωτεΐνες Sp100, SUMO1, HAUSP και η CBP, οι οποίες συναντιούνται επίσης και στο πυρηνόπλασμα. Τα σωματίδια αυτά εικάζεται ότι είναι πολυλειτουργικά και εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση αλλά κι ότι αποτελούν στόχους για ιική μόλυνση (Matera, Weiner et al. 1990).

Οι παράγοντες συρραφής του προ-mRNA βρίσκονται είτε σε σχηματισμό των 25-50 πυρηνικών κοκκιωμάτων είτε διάχυτοι στο πυρηνόπλασμα (Spector 1993). Πολλά από τα μεγάλα κοκκιώματα είναι συμπλέγματα κόκκων ευχρωματίνης (interchromatin granule clusters, ICGs), που πιστεύεται ότι εμπλέκονται στον σχηματισμό ή τη διαφοροποίηση των παραγόντων συρραφής του προ-mRNA. Τα πυρηνικά κοκκιώματα είναι δυναμικές δομές. Παράγοντες συρραφής του προ-mRNA μετατοπίζονται από αυτά στις μεταγραφικές περιοχές (περιχρωματινικά ινίδια). Μεταγραφικές περιοχές εντοπίζονται σε όλο το πυρηνόπλασμα συμπεριλαμβανομένης και της περιφέρειας των ICGs αλλά και συγκεντρωμένοι στην περιοχή OPT (Oct1/PTF/transcription). Οι περιοχές αυτές είναι διαμέτρου 1,0-1,5μm και περιέχουν νεοσυντιθέμενα μεταγραφήματα, μεταγραφικούς παράγοντες κι ελάχιστους παράγοντες που εμπλέκονται στη κατεργασία του RNA (Grande, van der Kraan et al. 1997; Pombo, Cuello et al. 1998). Οι OPT περιοχές εμφανίζονται κατά

την φάση G1, όπου συχνά μετατοπίζονται δίπλα στον πυρηνίσκο, κι εξαφανίζονται κατά την S φάση. Η λειτουργία τους είναι άγνωστη.

Η ύπαρξη των παρα-κοκκιώδων σωματιδίων διαπιστώθηκε από τους Fox et al. το 2002. Είναι δυναμικές δομές που εδράζονται στην ευχρωματινική περιοχή του πυρήνα και διαφοροποιούνται, ως αποτέλεσμα απόκρισης τους στις αλλαγές της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Απουσία της μεταγραφής από την RNA Pol II, η ύπαρξη των δομών αναιρείται και τα πρωτεϊνικά συστατικά τους (PSP1, p54nrb, PSP2, CFI(m)68 και PSF) μετατοπίζονται δημιουργώντας ένα σχηματισμό εξωτερικά από τον πυρηνίσκο (Spector 1993). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται στη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Τα παρακοκκιώδη σωματίδια είναι εμφανή κατά τη διάρκεια της μεσόφασης και όλων των σταδίων της μίτωσης εκτός από την τελόφαση, όπου δεν γίνεται μεταγραφή RNA και οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε σχηματισμό εξωτερικά του πυρηνίσκου (Fox, Bond et al. 2005).

Σε πολλά είδη κυττάρων οι παράγοντες συρραφής του προ-mRNA εντοπίζονται στα σωματίδια Cajal (Gall 2000). Τα σωματίδια Cajal πιστεύεται ότι λαμβάνουν μέρος στη βιογένεση και μεταφορά snRNPs και snoRNPs, όπου οι παράγοντες συρραφής U1, U2, U4/U6 και U5 snRNPs όπως και ο U7 snRNP λαμβάνουν μέρος στην ωρίμανση του 3'-άκρου των ιστονών ενώ οι U3 και U8 snoRNPs στην ωρίμανση του προ-RNA. Πιστεύεται ότι οι παράγοντες περνούν δια μέσου των σωματιδίων Cajal, στη διαδρομή τους για τα σωματίδια των πυρηνικών κοκκιωμάτων (snRNPs) ή τους πυρηνίσκους (snoRNPs). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι τα σωματίδια Cajal συνδέονται με τις ιστονικές περιοχές όπως επίσης και με τα συμπλέγματα των γονιδίων U1, U2 και U3 (Matera 1999).

Γειτονικά των σωματιδίων Cajal βρίσκονται τα σωματίδια Gems (δυάδα από σωματίδια Cajal, gemini of Cajal bodies) που αναλόγως του είδους της κυτταρικής σειράς, πολλές φορές συμπίπτουν με τα σωματίδια Cajal. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία του παραγώγου του γονιδίου επιβίωσης των κινητήριων νευρόνων (SMN) και ενός συσχετιζόμενου παράγοντα, του Gemin2 (Matera 1999). Η κυτταροπλασματική δεξαμενή των SMN και Gemin2 λαμβάνει μέρος στη σύζευξη των snRNPs ενώ η πυρηνική δεξαμενή στην ωρίμανση τους.

Στο στάδιο της κοπής και της πολυαδενυλίωσης των προ-mRNA λαμβάνουν μέρος διάφοροι παράγοντες (π.χ. CstF και CPSF), που βρίσκονται διάχυτοι στον πυρήνα ή συσσωρευμένοι σε σχηματισμούς που ονομάζονται σωματίδια διαχωρισμού (Schul, Groenhout et al. 1996). Οι δομές αυτές γειτονεύουν ή και επικαλύπτουν τα σωματίδια Cajal. Τα σωματίδια διαχωρισμού που δεν επικαλύπτουν τα σωματίδια Cajal, περιέχουν νεοσυντιθέμενο RNA.

Τα Pc G σωματίδια συνδέονται με την περικεντρομεριδιακή ετεροχρωματίνη και περιέχουν μία πολυσυμπυκνωμένη ομάδα πρωτεϊνών (π.χ. RING1, BMI1, hPc2) (Saurin, Shiels et al. 1998). Δεν έχει διευκρινιστεί αν ο ρόλος των σωματιδίων αυτών είναι αποθηκευτικός ή αν εμπλέκονται στην αποσιώπηση των γονιδίων. Εκτός από τα σωματίδια που έχουν αναφερθεί στους πυρήνες των θηλαστικών υπάρχουν και άλλα τα οποία σχετίζονται με το είδος του κυττάρου ή της φυσιολογικής του κατάστασης, όπως τα πυρηνικά σωματίδια GATA-1, περιέχουν μεταγραφικούς παράγοντες GATA, σε αιμοποιητικά κύτταρα ποντικού (Elefanty, Antoniou et al. 1996). Τα σωματίδια αυτά δεν είναι ενεργά κατά τη μεταγραφή. Τα σωματίδια HSF1, που περιέχουν τον μεταγραφικό παράγοντα, heat shock 1, έχουν βρεθεί σε πυρήνες κυττάρων τα οποία έχουν υποστεί υπερθερμία. Τα σωματίδια αυτά δεν συνεντοπίζονται με τις μεταγραφικές περιοχές των HSP70 και των HSP90 (Jolly, Morimoto et al. 1997).

2. Ο ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΦΑΚΕΛΟΣ

2.1. Δομή, Σύσταση και Οργάνωση του Πυρηνικού Φακέλου

Ο πυρήνας περιβάλλεται από τον πυρηνικό φάκελο. Στα σημεία όπου οι δύο μεμβράνες, του πυρηνικού φακέλου, ενώνονται σχηματίζονται οι πυρηνικοί πόροι, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η επικοινωνία μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (Stoffler, Fahrenkrog et al. 1999). Μία αξιοσημείωτη δομή του πυρηνικού πόρου (NPC) είναι το πυρηνικό καλάθι (nuclear basket), που εκτείνεται στο πυρηνόπλασμα. Η εξωτερική πυρηνική μεμβράνη αποτελεί συνέχεια του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου ενώ η εσωτερική υποστηρίζεται από το δίκτυο των λαμινών. Η θέση και η δυναμική του πυρήνα καθορίζεται από μεγαλομοριακά σύμπλοκα που σχηματίζονται μεταξύ του πυρηνοσκελετού και του κυτταροσκελετού, που ονομάζονται σύμπλοκα LINC. Συγκεκριμένα οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, Sun1 και Sun2, αλληλεπιδρούν μέσω του N-τελικού άκρου με τις λαμίνες τύπου A και B (Hodzic, Yeater et al. 2004; Crisp, Liu et al. 2006; Haque, Lloyd et al. 2006; Wang, Du et al. 2006; Razafsky and Hodzic 2009) ενώ μέσω του C-τελικού άκρου αλληλεπιδρούν με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες της έξω πυρηνικής μεμβράνης, τις Syne-1 και -2 ή Nesprin-1 και -2 (Apel, Lewis et al. 2000; Razafsky and Hodzic 2009). Το C-τελικό άκρο των SUN αλληλεπιδρά με το C-τελικό άκρο των Nesprin και συγκεκριμένα με τη συντηρημένη KASH περιοχή. Το μέρος των πρωτεϊνών Nesprin-1 και -2 που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό δημιουργώντας μία σύνδεση με τον πυρήνα. **(Εικόνα 1.1.1)**

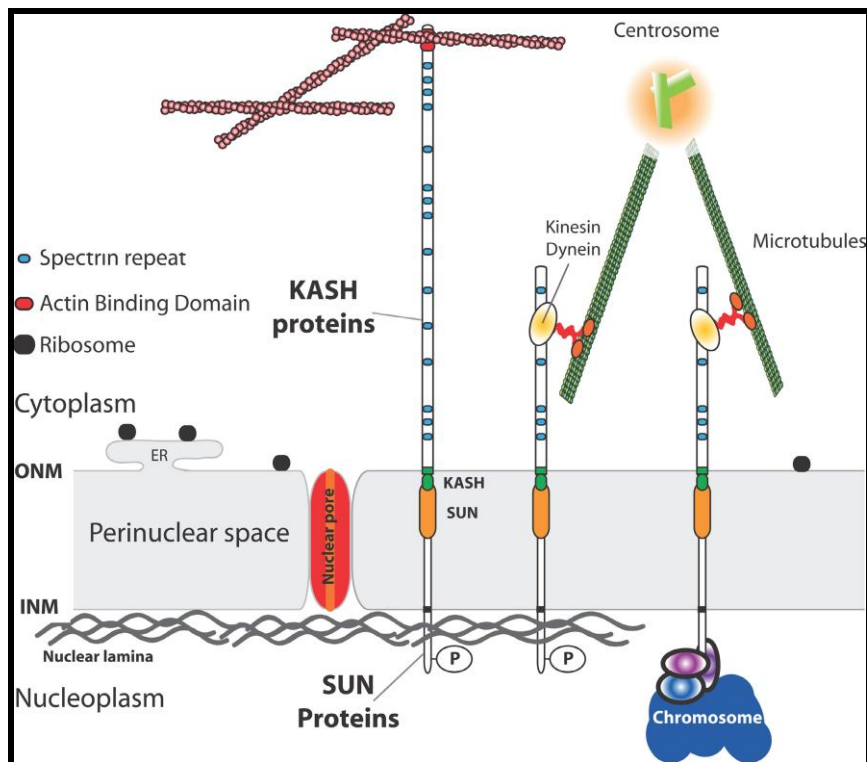
Στις **πρωτεΐνες της INM** που έχουν μελετηθεί εκτενώς, ανήκουν ο LBR (lamin B receptor), η LAP1 (Lamin associated polypeptide 1), η LAP2 (Lamin associated polypeptide 2), η εμερίνη και η MAN1. **(Εικόνα 2.1.1)**

Ο **LBR** είναι η πιο καλά μελετημένη πρωτεΐνη της INM και εκφράζεται σε όλα τα μετάζωα. Αρχικά απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε στα ερυθροκύτταρα των πτηνών. Αποτελείται από μια επιμήκη άμινο-τελική περιοχή, επτά ή οχτώ υδρόφοβα διαμεμβρανικά τμήματα και μια καρβόξυ-τελική ουρά (Worman, Yuan et al. 1988; Worman, Evans et al. 1990; Ye and Worman 1994). Το άμινο-τελικό τμήμα του μορίου εκτείνεται στο πυρηνόπλασμα και περιλαμβάνει εκτεταμένες περιοχές που αποτελούνται από εναλλασσόμενες σερίνες και αργινίνες (SR motifs) οι οποίες φωσφορυλιώνονται από τις κινάσες SRPK1 και cdc2 (Nikolakaki, Simos et al. 1996; Nikolakaki, Meier et al. 1997). Από *in vitro* μελέτες προκύπτει ότι ο LBR μπορεί να σχηματίσει ολιγομερή μέσω της άμινο-τελικής του περιοχής (Makatsori, Kourmouli et al. 2004) και αποτελεί μέρος ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου, το οποίο περιλαμβάνει τις λαμίνες A και B, μια ειδική κινάση (LBR κινάση), την διαμεμβρανική πρωτεΐνη p18 καθώς και την p32/p34 (Simos and Georgatos 1992; Simos and Georgatos 1994). Η κινάση του LBR είναι όμοια με την κινάση SRPK1 η οποία φωσφορυλιώνει αλληλουχίες SR. Η φωσφορυλίωση των SR έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση της p32/p34 από το σύμπλοκο, αλλά δεν επηρεάζει τη σύνδεση των λαμινών. Η p18 έχει δομική ομοιότητα με τους υποδοχείς των βενζοδιαζεπινών, εκφράζεται σε περιορισμένο αριθμό καλά διαφοροποιημένων κυττάρων και συνδέεται *in vitro* με τον LBR και τις λαμίνες τύπου B (Simos, Maison et al. 1996).

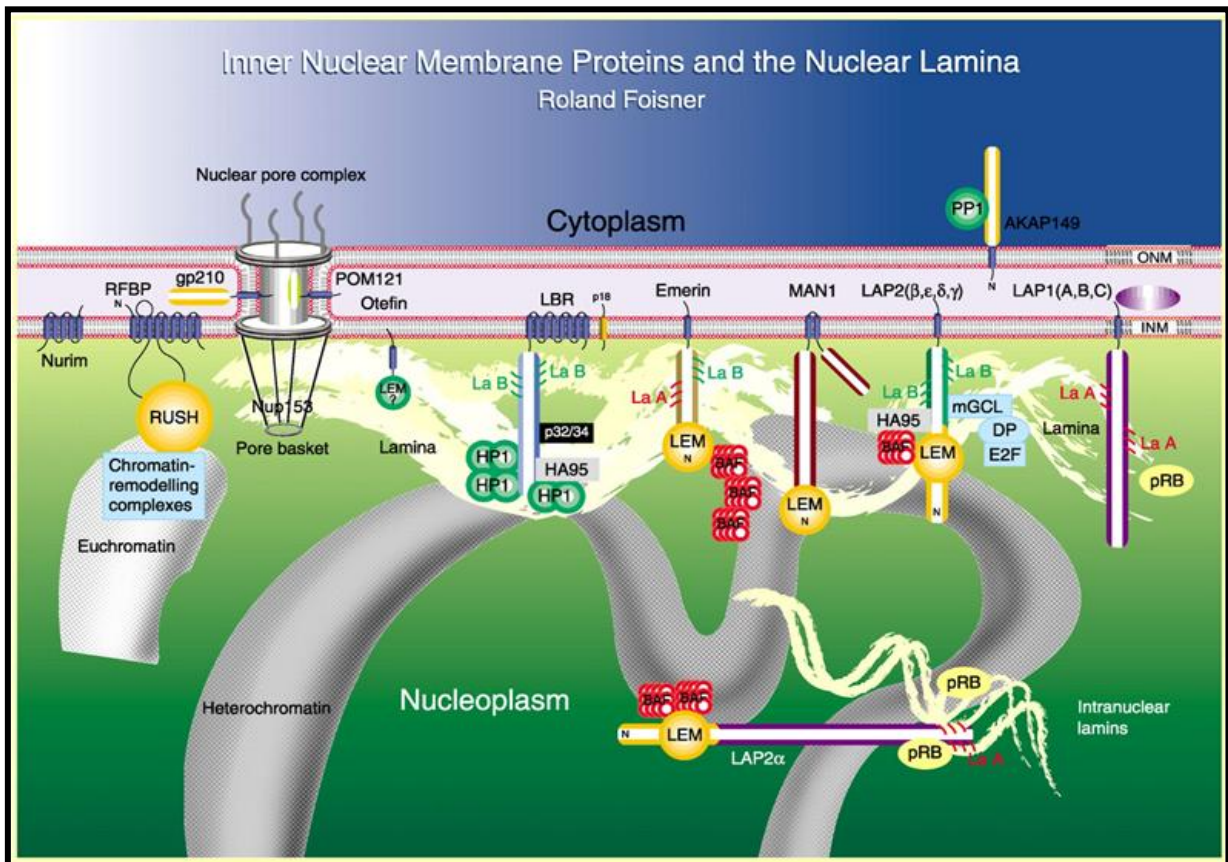
Η **LAP1** είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II. Αποτελείται από μια καρβόξυ-τελική περιοχή που εκτείνεται στον περιπυρηνικό χώρο, μια κεντρική διαμεμβρανική περιοχή και ένα αμινοτελικό τμήμα προς την πλευρά του πυρηνοπλάσματος. Έχει τρεις ισομορφές, τις LAP1A, B και C, οι οποίες προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα του μεταγραφήματος του γονιδίου της LAP1. Η LAP1C εκφράζεται σε όλους τους τύπους κυττάρων σε αντίθεση με τις άλλες δύο ισομορφές, οι οποίες εκφράζονται σε καλά διαφοροποιημένα κύτταρα (Foisner and Gerace 1993).

Όπως ο LBR έτσι και η LAP1 έχει προταθεί ότι αποτελεί συστατικό ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου, το οποίο περιλαμβάνει, όπως προκύπτει από πειράματα συγκατακρήμνισης, λαμίνες τύπου B, καθώς και μια κινάση, της οποίας η λειτουργία εξαρτάται από ιόντα ασβεστίου (Maison, Pyrasoroulou et al. 1997). Από την ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας προκύπτει ότι στο αμινοτελικό άκρο των LAP1A και LAP1B περιέχεται περιοχή coiled-coil μήκους 27 αμινοξέων, η οποία πιθανότατα εμπλέκεται στο σχηματισμό

ομοδιμερών (Martin, Toda et al. 1995). Μελέτες με ηλεκτρονική μικροσκοπία υποδεικνύουν το σχηματισμό συστάδων LAP1 οι οποίες κατανέμονται κατά μήκος του πυρηνικού φακέλου (Maison, Pyrgasopoulou et al. 1997).



Εικόνα 1.1.1. Ο εντοπισμός και η λειτουργία των συμπλόκων LINC. Στο διαμεμβρανικό χώρο η αλληλεπίδραση μεταξύ των περιοχών SUN(πορτοκαλί) και KASH(πράσινο), συνδέει την πυρηνική λάμινα με τα κύρια συστατικά του κυτταροσκελετού όπως η ακτίνη και το δίκτυο των μικροσωληνίσκων. Η σύνδεση αυτή επιτρέπει τη μετακίνηση-αγκυροβόληση του πυρήνα μέσα στο κύτταρο. Επιπλέον οι αλληλεπιδράσεις SUN-KASH συμβάλλουν σημαντικά στην δυναμική των χρωμοσωμάτων και την πρόσδεσή τους στον πυρηνικό φάκελο (Razafsky and Hodzic 2009)



Εικόνα 2.1.1. Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνών της έσω πυρηνικής μεμβράνης. Αναπαριστούνται δομικά και τοπολογικά χαρακτηριστικά γνωστών πρωτεϊνών της έσω πυρηνικής μεμβράνης και του πυρηνικού πόρου καθώς και η σύνδεσή τους με την πυρηνική λάμινα αλλά και τη χρωματίνη (Foisner 2001).

Η **LAP2** είναι επίσης μια πολυμορφική πρωτεΐνη. Εναλλακτικό μάτισμα του ίδιου γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία τριών ισομορφών στον άνθρωπο (LAP2α, β, γ) και επτά στον ποντικό (LAP2α, β, β', γ, δ, ε, ζ). Οι ισομορφές β, β', γ, δ, ε είναι πρωτεΐνες τύπου II οι οποίες διαθέτουν μια κεντρική διαμεμβρανική περιοχή, το αμινοτελικό τους άκρο εκτείνεται στο πυρηνόπλασμα, ενώ το καρβόξυ-τελικό τους άκρο εντοπίζεται στον περιπυρηνικό χώρο. Από τις LAP2α και ζ απουσιάζει η διαμεμβρανική περιοχή, επομένως οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται μόνο στο πυρηνόπλασμα. Το άμινο-τελικό άκρο της LAP2β έχει μήκος περίπου 400 αμινοξέων σε αντίθεση με εκείνο των ισομορφών γ, δ και ε το οποίο είναι κατά πολύ μικρότερο. Η LAP2α διαφέρει κατά πολύ από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, έχοντας διατηρήσει μόνο ένα μικρό τμήμα της άμινο-τελικής περιοχής της LAP2β (Dechat, Korbei et al. 2000). Όπως και στην περίπτωση του LBR και της LAP1, η LAP2β συνδέεται με λαμίνες τύπου B. Η μιτωτική φωσφορυλίωση της LAP2β έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση της από τις λαμίνες (Maison, Pyrgasopoulou et al. 1997). Η LAP2β συμμετέχει στο σχηματισμό ενός μεγάλου μεγέθους πρωτεϊνικού συμπλόκου, το οποίο περιλαμβάνει τις λαμίνες τύπου B, την εμερίνη, τον LBR και την HA95 (Martins, Eide et al. 2000).

Η **εμερίνη** έχει ένα άμινο-τελικό τμήμα πλούσιο σε σερίνες το οποίο εντοπίζεται στην περιοχή του πυρηνόπλάσματος, μια διαμεμβρανική περιοχή καθώς και ένα βραχύ καρβόξυ-τελικό άκρο το οποίο εκτείνεται στον περιπυρηνικό χώρο. Το σύμπλοκο της εμερίνης περιλαμβάνει τον LBR, την LAP2β καθώς και λαμίνες τύπου B. Επιπλέον η εμερίνη συνδέεται με λαμίνες τύπου A (Martin, Toda et al. 1995; Clements, Manilal et al. 2000).

Η **MAN1** αποτελείται από δύο διαμεμβρανικά τμήματα, καθώς και από μια μακριά άμινο-τελική περιοχή και ένα βραχύ καρβόξυ-τελικό άκρο τα οποία εκτείνονται στο πυρηνόπλασμα (Lin, Blake et al. 2000). Όπως προκύπτει από ανάλυση της ακολουθίας των αμινοξέων, η MAN1 μοιράζεται με την LAP2 και την εμερίνη ένα τμήμα 40 περίπου αμινοξέων με χαρακτηριστική δομή (LEM module).

Ο όρος **πυρηνική λάμινα** αναφέρεται σε ένα οργανωμένο δισδιάστατο δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων, τα οποία καλύπτουν και στηρίζουν την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Πρόκειται για ένα ορθοκανονικό πλέγμα, το οποίο αποτελείται από ενδιάμεσα ινίδια λαμινών. Αντίστοιχα με τις άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό ενδιάμεσων ινιδίων, το μόριο των λαμινών περιλαμβάνει μια μικρή άμινο-τελική κεφαλή, ένα μεσαίο τμήμα με χαρακτηριστική ελίκωση coiled-coil και μια καρβόξυ-τελική ουρά. Οι περιοχές coiled-coil δύο μορίων λαμίνης συνδέονται παράλληλα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό

πολικών διμερών, τα οποία στη συνέχεια διατάσσονται αντιπαράλληλα και δημιουργούν πολυμερή. Τα πολυμερή με τη σειρά τους διατάσσονται αντιπαράλληλα και συνδέονται εγκάρσια μεταξύ τους (Stuurman, Heins et al. 1998).

Οι **λαμίνες** διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις τύπου A και τύπου B ανάλογα με τη δομή και το πρότυπο έκφρασής τους. Οι λαμίνες τύπου B εκφράζονται από τα διαφορετικά γονίδια *LMNB1* και *LMNB2* τα οποία κωδικοποιούν τη λαμίνη B1 καθώς και τις λαμίνες B2 και B3 αντίστοιχα. Αντίθετα τέσσερις τουλάχιστον λαμίνες τύπου A (A, AΔ10, C, C2) λαμβάνονται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου *LMNA*. Οι λαμίνες τύπου B εκφράζονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα σε αντίθεση με τις τύπου A οι οποίες εντοπίζονται μόνο σε καλά διαφοροποιημένα κύτταρα (Broers and Ramaekers 2004).

Διαφορετικού τύπου λαμίνες φαίνεται να έχουν εξειδικευμένες λειτουργίες ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, τον βαθμό διαφοροποίησης, τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν και την τοπολογία τους. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι λαμίνες τύπου B είναι απαραίτητες για την επιβίωση ενός οργανισμού σε αντίθεση με τις λαμίνες A που πιθανόν εξυπηρετούν πιο εξειδικευμένες λειτουργίες (Pekovic, Harborth et al. 2007).

Όλες οι λαμίνες τύπου B καθώς και η λαμίνη A, μεταφράζονται ως προλαμίνες (pre-lamins) και περιέχουν στο καρβοξυτελικό άκρο μια χαρακτηριστική ακολουθία CaaX (cysteine-aliphatic-aliphatic-any amino acid) η οποία υφίσταται τρεις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Η διαδικασία περιλαμβάνει διαδοχικά ισοπρενυλίωση της κυστεΐνης, πρωτεολυτική απομάκρυνση των τριών καρβόξυ-τελικών αμινοξέων (aaX) και καρβοξυμεθυλίωση της ισοπρενυλιωμένης κυστεΐνης. Οι λαμίνες τύπου A υφίστανται μια επιπλέον μετα-μεταφραστική τροποποίηση που οδηγεί στην απομάκρυνση του ισοπρενυλιωμένου καρβόξυ-τελικού άκρου (Weber, Plessmann et al. 1989; Mattout, Dechat et al. 2006; Scaffidi and Misteli 2006).

Η λάμινα συνδέεται με τον πυρηνικό φάκελο μέσω των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών LBR, LAP1, LAP2, εμερίνη και MAN1 (Georgatos 2001). Η ενσωμάτωση των νεοσυντιθέμενων λαμινών υποβοηθείται από την παρουσία της ακολουθίας CaaX. Στη μεσόφαση η σύνδεση με το φάκελο, αλλά και η συγκρότηση ή η αναδιάταξη των ινιδίων ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης. Με την έναρξη της μίτωσης, η υπερφωσφορυλίωση των λαμινών προκαλεί εξασθένηση των αλληλεπιδράσεων λαμίνης-λαμίνης και σταδιακό αποπολυμερισμό της λάμινας (Stuurman, Heins et al. 1998).

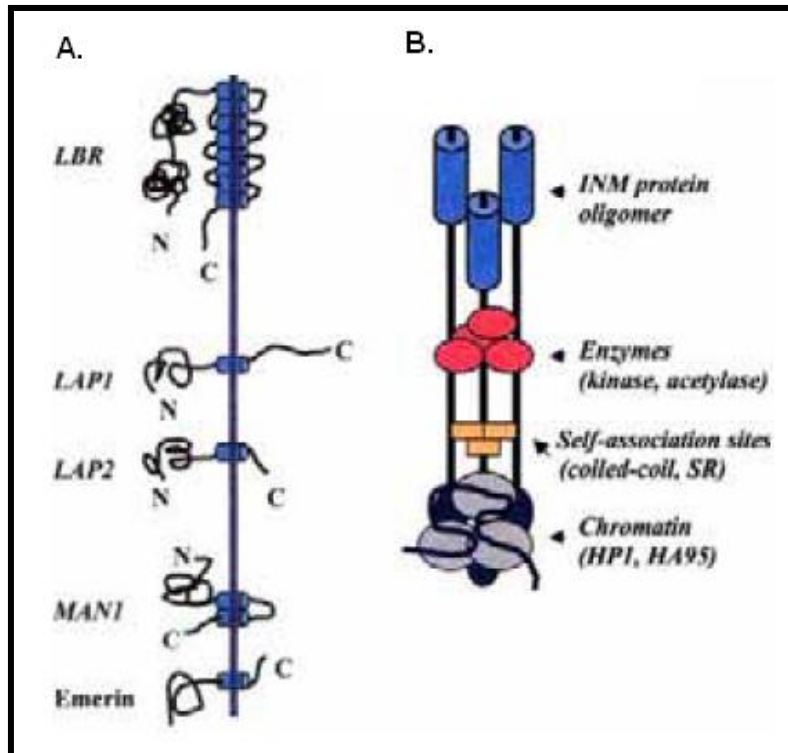
Επομένως, η πυρηνική λάμινα προσδίδει σχήμα και σταθερότητα στον πυρηνικό φάκελο στον οποίο συνδέεται μέσω των NPCs αλλά και της INM και παρέχει το δομικό

σύνδεσμο μεταξύ του DNA και της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης. Σε αντίθεση με τα κυτταροπλασματικά ενδιάμεσα ινίδια τα οποία είναι αρκετά σταθερά, τα ενδιάμεσα ινίδια της πυρηνικής λάμινας αποσυναρμολογούνται και ξανασχηματίζονται σε κάθε κυτταρική διαίρεση.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πρωτεϊνική σύσταση της εξωτερικής πυρηνικής μεμβράνης (ONM), είναι παρόμοια με εκείνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Από πρόσφατες μελέτες προκύπτει ότι η ONM περιέχει αρκετές μοναδικές πρωτεΐνες, οι οποίες μέσω αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης (INM), συνδέουν τον περιφερικό σκελετό του πυρήνα με τον κυτταροσκελετό (**Εικόνα 1.1.1**).

Κοινό χαρακτηριστικό όλων των πρωτεϊνών της INM, είναι οι μεγάλου μεγέθους πυρηνοπλασματικές περιοχές οι οποίες περιέχουν αλληλουχίες που τροποποιούνται από διάφορες κινάσες καθώς και coiled-coil μοτίβα (LAP1, LAP2, MAN1, εμερίνη) μέσω των οποίων μπορούν να σχηματίσουν ομο- και ετεροδιμερή *in vivo*. Οι περιοχές αυτές εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο και συνδέονται με την πυρηνική λάμινα και με πρωτεΐνες της χρωματίνης όπως είναι η HP1 (heterochromatin protein 1), ο παράγοντας BAF (barrier-to autointegration factor) και η HA95 (**Εικόνα 2.1.2**) (Martin, Toda et al. 1995; Georgatos 2001).

Οι μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης και της χρωματίνης έχουν διπλή σημασία. Πιο συγκεκριμένα, η πρόσδεση των πρωτεϊνών αυτών στη συμπυκνωμένη χρωματίνη παρέχει την κινητήρια δύναμη για την ανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου μετά το τέλος της μίτωσης (Georgatos and Theodoropoulos 1999). Επιπρόσθετα, η σύνδεση χρωματινικών περιοχών στον φάκελο έχει ως αποτέλεσμα την μεταγραφική τους αποσιώπηση (Andrulis, Neiman et al. 1998). Πιθανότατα στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη συγκεντρώνονται παράγοντες οι οποίοι προκαλούν αλλαγή στη δομή της χρωματίνης.



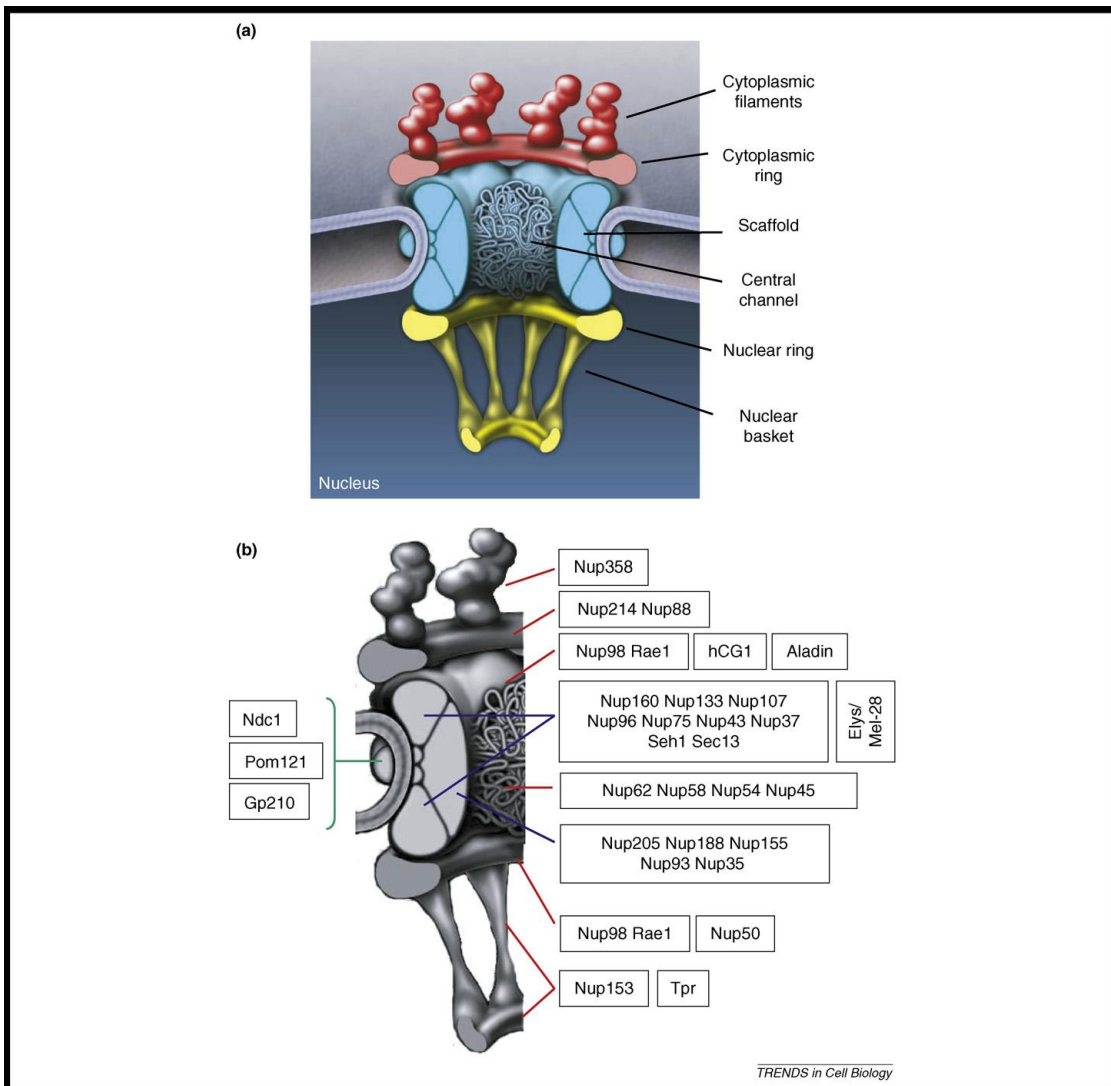
Εικόνα 2.1.2. Τοπολογία και οργάνωση πρωτεϊνών της έσω πυρηνικής μεμβράνης. (A) Σχηματικό διάγραμμα που αναπαριστά δομικά και τοπολογικά χαρακτηριστικά γνωστών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών της έσω πυρηνικής μεμβράνης. Τα υδρόφιλα άκρα (ακανόνιστες γραμμές) εκτείνονται στο πυρηνόπλασμα και την περιπυρηνική περιοχή, ενώ οι υδρόφοβες περιοχές (κύλινδροι) διασχίζουν την έσω πυρηνική μεμβράνη (B) Υποθετικό μοντέλο πρωτεϊνικών συμπλόκων της έσω πυρηνικής μεμβράνης τα οποία αποτελούνται από ολιγομερή μεμβρανικών πρωτεϊνών, ρυθμιστικά ένζυμα και στοιχεία συνδεδεμένα με την χρωματίνη (Georgatos 2001).

Τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων (Nuclear pore complexes, NPCs) αποτελούν τα κανάλια μεταφοράς των μακρομορίων μέσα ή έξω από τον πυρήνα. Τα NPCs αποτελούνται από πρωτεϊνικές δομές οι οποίες διαπερνούν την λιπιδική διπλοστοιβάδα του πυρηνικού φακέλου. Η συνολική τους μάζα είναι στα θηλαστικά περίπου 60-125MDa και στο σακχαρομύκητα περίπου 40-60MDa (D'Angelo and Hetzer 2008). Ο αριθμός των πυρηνικών πόρων ανά πυρήνα είναι για τα θηλαστικά 2000-5000 σε αντίθεση με τον μικρότερου μεγέθους πυρήνα του σακχαρομύκητα ο οποίος περιέχει περίπου 200 NPCs (Gerace and Burke 1988; Gorlich and Kutay 1999). Τα σύμπλοκα των πόρων (**Εικόνα 2.1.3**) συγκροτούνται από 30 τουλάχιστον διαφορετικές πρωτεΐνες, τις νουκλεοπορίνες (Nups), οι οποίες βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα και διευθετούνται έτσι ώστε να προκύψει ένα κανάλι με συμμετρία όγδοης τάξης ως προς τον κεντρικό άξονα του πόρου (Pante and Aebi 1996). Έτσι ο πυρηνικός πόρος αποτελείται από το βασικό κυλινδρικό κανάλι, τον κυτταροπλασματικό δακτύλιο με τα οκτώ εκφυόμενα κυτταροπλασματικά ινίδια, και τον πυρηνοπλασματικό δακτύλιο με οκτώ εκφυόμενα ινίδια τα οποία ενώνονται σε ένα πιο απομακρυσμένο δακτύλιο και σχηματίζουν το “πυρηνικό καλάθι” (Lim, Aebi et al. 2008).

Στα κυτταροπλασματικά ινίδια έχει βρεθεί η Nup358 (Wilken, Senecal et al. 1995; Cronshaw, Krutchinsky et al. 2002) και στον κυτταροπλασματικό δακτύλιο έχουν βρεθεί οι πρωτεΐνες CAN/Nup214 (Kraemer, Wozniak et al. 1994; Pante and Aebi 1994), Nup84/88 (Bastos, Ribas de Pouplana et al. 1997), hCG1/NLP1 (Cronshaw, Krutchinsky et al. 2002), η ALADIN (Cronshaw, Krutchinsky et al. 2002) αλλά και οι Nup98 και Rae1, οι οποίες βρίσκονται επίσης και στον πυρηνικό δακτύλιο μαζί με την Nup50 (D'Angelo and Hetzer 2008). Τα πυρηνικά ινίδια που δίνουν το πυρηνικό καλάθι αποτελούνται από την Nup153 και την Tpr (D'Angelo and Hetzer 2008).

Το σημείο στο οποίο συναντώνται η εσωτερική και εξωτερική πυρηνική μεμβράνη ονομάζεται μεμβράνη των πόρων και περιέχει ειδικές πρωτεΐνες όπως η gp210 και η POM121, οι οποίες συγκρατούν το πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα των πόρων στη λιπιδική διπλοστοιβάδα (Lyman and Gerace 2001). Τέλος στο κεντρικό κανάλι βρίσκονται τα σύμπλοκα των Nup107-160 και της p62 αλλά και η Nup 205 που αλληλεπιδρά με τις Nup155, Nup 188, Nup 35 και Nup 93.

Η κύρια λειτουργία των συμπλόκων των πυρηνικών πόρων είναι η ρύθμιση της επικοινωνίας μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Η διακίνηση μορίων διαμέσου των πόρων γίνεται και προς τις δύο κατευθύνσεις. Πρωτεϊνικά μόρια από το κυτταρόπλασμα εισέρχονται στον πυρήνα, ενώ μόρια RNA και ριβοσωμικές υπομονάδες που συντίθενται στον πυρήνα, εξέρχονται προς το κυτταρόπλασμα. Επομένως τα NPCs είναι εξειδικευμένα



Εικόνα 2.1.3. Δομή και σύνθεση του πυρηνικού πόρου. α) Σχηματική αναπαράσταση της δομής του συμπλόκου του πυρηνικού πόρου β) Προσδιορισμός της θέσης των συμπλόκων του πυρηνικού πόρου (D'Angelo and Hetzer 2008).

κανάλια μεταφοράς μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η μετακίνηση των μακρομορίων από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και αντίστροφα αλλά ταυτόχρονα παρέχουν ένα σημαντικό σημείο ελέγχου της έκφρασης των γονιδίων (Adam 2001).

Κάθε πόρος περιέχει έναν ή περισσότερους υδρόφιλους διαύλους μέσω των οποίων μικρά υδατοδιαλυτά μόρια διακινούνται, ελεύθερα και μη επιλεκτικά, μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Επίσης ιόντα, μεταβολίτες και πρωτεΐνες μεγέθους μικρότερου από 9nm σε διάμετρο ή 30-40kDa σε μάζα, μπορούν να διαπεράσουν τα NPCs με απλή διάχυση. Από μελέτες κρυοηλεκτρονικής μικροσκοπίας, προκύπτει ότι η δομή των NPCs μπορεί να διαστέλλεται περιστασιακά έτσι ώστε να διευκολυνθεί η μεταφορά μεγαλύτερων σωματιδίων. **(Εικόνα 2.1.4)**

Η μεταφορά των μακρομορίων μεσολαβείται από διαλυτούς παράγοντες (μεταφορείς) οι οποίοι αλληλεπιδρούν με συστατικά των NPCs (νουκλεοπορίνες) και μετακινούνται μέσω των καναλιών από και προς τον πυρήνα (Suntharalingam and Wentz 2003). Οι μεταφορείς στην πλειοψηφία τους ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών που αναφέρονται ως karyopherins (οικογένεια karyopherin-β). Η οικογένεια των karyopherins αριθμεί 20 μέλη στον άνθρωπο και 14 μέλη στον σακχαρομύκητα. Οι karyopherins που υποβοηθούν την είσοδο μορίων στον πυρήνα καλούνται importins ενώ εκείνες που μεσολαβούν στην έξοδο μορίων χαρακτηρίζονται ως exportins **(Πίνακας 2.1.1)**. Η importin-β, η οποία ανακαλύφθηκε πρώτη, είναι το πιο καλά χαρακτηρισμένο μέλος της οικογένειας και για το λόγο αυτό οι karyopherins αναφέρονται και ως importin-β like proteins (Kuersten, Ohno et al. 2001; Pemberton and Paschal 2005).

Στη διακίνηση των μορίων με τη βοήθεια διαλυτών παραγόντων συμβάλλουν οι νουκλεοπορίνες με FXFG αλληλουχίες, όπως το σύμπλοκο του κεντρικού καναλιού p62, η Nup358 των κυτταροπλασματικών ινιδίων και η Nup153 των πυρηνοπλασματικών ινιδίων που σχηματίζουν το πυρηνικό καλάθι.

Η νουκλεοπορίνη p62 έχει τροποποιήσεις από O-δεσμευόμενη N-ακετυλογλυκοσαμίνη (GlcNAc) (Davis and Blobel 1987; D'Onofrio, Starr et al. 1988; Wesierska-Gadek, Klima et al. 2007) και περιοχές με σάκχαρα ενωμένα με κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης, στην πλούσια από θρεονίνη περιοχή που ενώνει το άμινο-τελικό άκρο με το καρβόξυ-τελικό άκρο. Το N-τελικό άκρο περιέχει τουλάχιστον 11 FXFG αλληλουχίες (Buss, Kent et al. 1994; Wesierska-Gadek, Klima et al. 2007). Πιστεύεται ότι η γλυκοσυλίωση της πρωτεΐνης γίνεται στο κυτταρόπλασμα είτε κατά τη διάρκεια της μετάφρασης (D'Onofrio, Starr et al. 1988; Wesierska-Gadek, Klima et al. 2007) είτε μετά το

τέλος της σύνθεσης της (Starr and Hanover 1990; Wesierska-Gadek, Klima et al. 2007).

(Εικόνα 2.1.5)

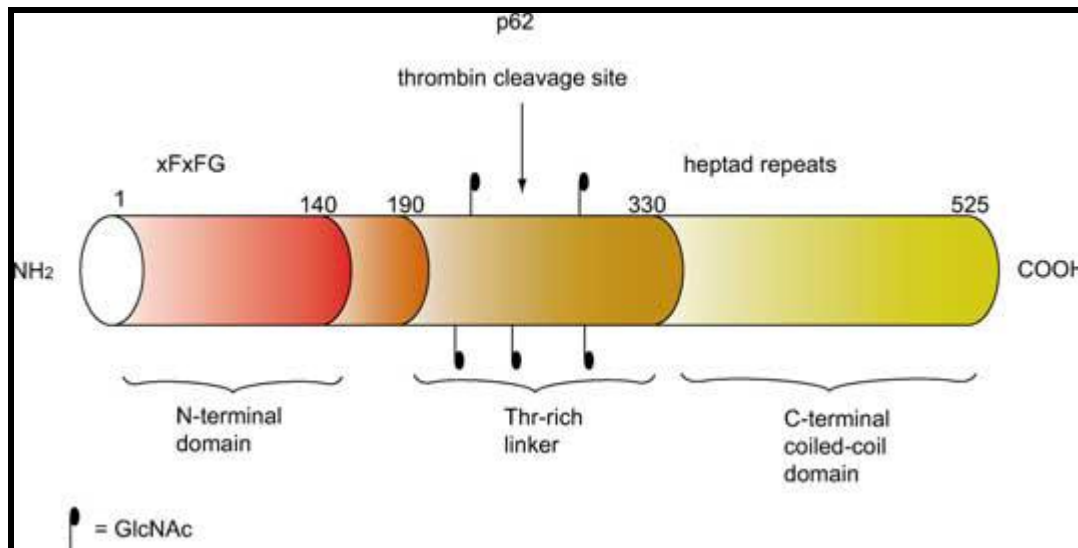
Human	Cargo	Yeast	Cargo	Essential gene
Import				
Importin-β1	Many cargoes, cargoes with basic NLSs via karyopherin α, UsnRNPs via snurportin	Kap95	Many cargoes including those with basic NLS via karyopherin α	Yes
Karyopherin-β2	hnRNPA1, histones, ribosomal proteins	Kap104	Nab2, Hrp1	ts
Transportin SR1	SR proteins	Mtr10/Kap111	Npl3, Hrb1	ts
Transportin SR2	HuR		
Importin 4	Histones, ribosomal proteins	Kap123	Ribosomal proteins, histones	No
Importin 5	Histones, ribosomal proteins	Kap121	Ribosomal proteins, histones, Pho4, others	Yes
Importin 9	Histones, ribosomal proteins	Kap114	TBP, histones, Nap1p	No
Importin 7	HIV RTC, Glucocorticoid receptor, ribosomal proteins	Nmd5/Kap119	TFIIS, Hog 1, others	No
Importin 8	SRP19	Sxm1/Kap108	Lhp1, ribosomal proteins	No
Importin 11	UbcM2, rpL12		No
.....		Kap122	TFIIA	
Export				
Crm1	Leucine rich NES cargoes	Crm1	Leucine rich NES cargoes	Yes
Exportin-t	tRNA	Los1	tRNA	No
CAS	Karyopherin α	Cse1	Karyopherin α	Yes
Exportin 4	eIF-5 A		
Exportin 5	microRNA precursors		
Exportin 6	Profilin, actin		
Exportin 7	p50Rho-GAP, 14-3-38		
Import/Export				
Importin 13	Rbm8, Ubc9, Pax6 (import) eIF-1 A (export)		
.....		Msn5	Pho4, others including phosphorylated proteins (import) Replication protein A complex (export)	No
Uncharacterized				
RanBP6	undefined		
RanBP17	undefined		
.....		Kap120	undefined	No

Πίνακας 2.1.1. Μέλη της οικογένειας Karyopherin-β στον άνθρωπο και στον σακχαρομύκητα (Pemberton and Paschal 2005).



Εικόνα 2.1.4.

Σχηματική αναπαράσταση του κεντρικού και των περιφερικών καναλιών του πόρου (Hinshaw, Carragher et al. 1992; Spector 1993; Lim, Aebi et al. 2008).



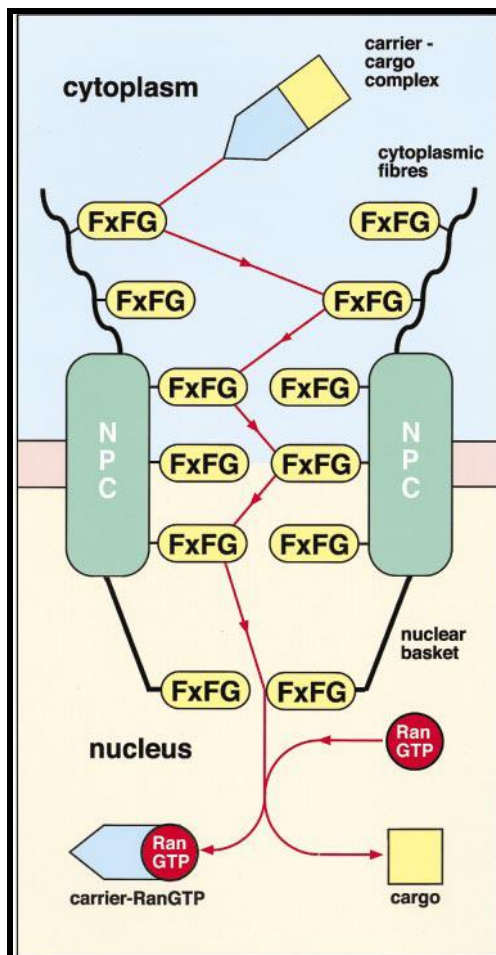
Εικόνα 2.1.5. Δομική οργάνωση της νοκλεοπορίνης p62 (Wesierska-Gadek, Klima et al. 2007).

Με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας FXFG αλληλουχίες έχουν εντοπιστεί στις νουκλεοπορίνες του κεντρικού καναλιού αλλά και της κυταροπλασματικής και πυρηνοπλασματικής πλευράς εισόδου του πυρηνικού πόρου (Grote, Kubitscheck et al. 1995; Stoffler, Fahrenkrog et al. 1999; Rout, Aitchison et al. 2000). Οι FXFG αλληλουχίες έχουν συσχετιστεί με την μεταφορά του συμπλόκου μεταφορέα-φορτίου δια μέσου του κεντρικού καναλιού του πυρηνικού πόρου (Rexach and Blobel 1995; Damelin and Silver 2000). Οι νουκλεοπορίνες περιέχουν 10-30 FXFG αλληλουχίες και λόγω της οκταπλής συμμετρίας του πυρηνικού πόρου η συγκέντρωση αλληλουχιών που προβλέπεται είναι μεγάλη (της τάξεως των 50mM) (Bayliss, Ribbeck et al. 1999). **(Εικόνα 2.1.6)**

2.2. Διάσπαση και επανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου

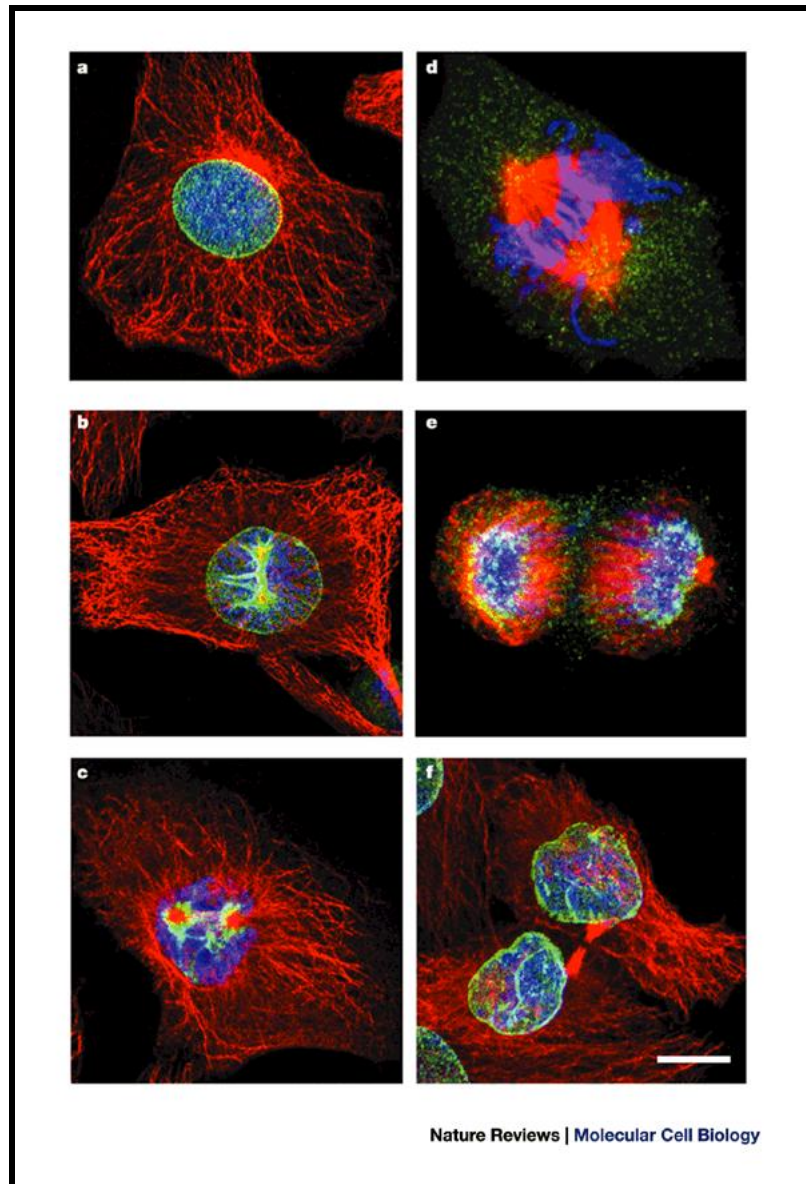
Ο πυρηνικός φάκελος των ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων αποδομείται στην αρχή της μίτωσης, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου με τα χρωμοσώματα, και επανασυγκροτείται γύρω από τις αδελφές χρωματίδες στα τελευταία στάδια της κυτταρικής διαίρεσης (Gonczy 2002). **(Εικόνα 2.2.1)** Η αποδόμηση του φακέλου αρχίζει στις πρώιμες φάσεις της πρόφασης και περιλαμβάνει τον αποπολυμερισμό της λάμινας, την θραυσματοποίηση και απομάκρυνση των πυρηνικών μεμβρανών από την χρωματίνη καθώς και την αποσυναρμολόγηση των συμπλόκων των πυρηνικών πόρων (Aitchison and Rout 2002). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου πραγματοποιείται η διάσπαση του πυρηνικού φακέλου αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών.

Από πειράματα κλασσικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας τα οποία πραγματοποιήθηκαν 43 χρόνια πριν είχε προταθεί ότι η διάσπαση του πυρηνικού φακέλου σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους, δεδομένης της στενής σύνδεσης της ατράκτου με τον φάκελο καθώς και της παρουσίας εγκολπώσεων κοντά στα κεντροσωμάτια (Robbins and Marcus 1964). Από μελέτες που έγιναν από το εργαστήριο μας, προτάθηκε ότι οι συγκεκριμένες εγκολπώσεις αποτελούν περιοχές στις οποίες οι μικροσωληνίσκοι που αναπτύσσονται από τα κεντροσωμάτια πιέζουν αντιδιαμετρικά τον πυρηνικό φάκελο δημιουργώντας εντομές (Georgatos, Pyrgasopoulou et al. 1997). Από πρόσφατες μελέτες σε ζωντανά κύτταρα προτάθηκε ότι οι παραπάνω εντομές σχηματίζονται όταν οι μικροσωληνίσκοι της μιτωτικής ατράκτου πιέζουν την πυρηνική μεμβράνη προς την κατεύθυνση των κεντροσωματίων. Η επακόλουθη διάτρηση του φακέλου λαμβάνει χώρα όχι στις περιοχές των εγκολπώσεων αλλά στην αντίθετη πλευρά του πυρήνα όπου η τάση είναι μεγαλύτερη. Επιπρόσθετα,



Εικόνα 2.1.6.

Σχηματική αναπαράσταση του συμπλόκου μεταφορέα-φορτίου δια μέσου του πυρηνικού πόρου, συνδεδεμένο στις FXFG αλληλουχίες των νουκλεοπορινών. Το σύμπλοκο μεταφορέα-φορτίου αρχικά αλληλεπιδρά με τις FXFG αλληλουχίες των νουκλεοπορινών της κυτταροπλασματικής πλευράς του NPC. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεταφορέα και FXFG αλληλουχιών των νουκλεοπορινών συνεχίζονται κατά μήκος του κεντρικού καναλιού του NPC. Στο πυρηνικό καλάθι η RanGTP δεσμεύει τον μεταφορέα, με αποτέλεσμα το φορτίο να ελευθερώνεται. (Bayliss, Corbett et al. 2000)



Εικόνα 2.2.1. Διάσπαση και επανασυνκρότηση του πυρηνικού φακέλου κατά τη μίτωση. Εικόνες ανοσοφθορισμού σε κύτταρα από νεφρά αρουραίου, όπου φαίνονται το DNA (μπλε), οι μικροσωληνίσκοι (κόκκινο) και ο πυρηνικός φάκελος (πράσινο, POM121) **(a)** Μεσόφαση, ο πυρηνικός φάκελος διαγράφεται ομαλά. **(b)** Πρόφαση, έντονη συσσώρευση σωματιδίων της πυρηνικής μεμβράνης γύρω από τα κεντροσώματα. **(c)** Προμετάφαση, ο πυρηνικός φάκελος βρίσκεται υπό μορφή θραυσμάτων. **(d)** Μετάφαση, ο πυρηνικός φάκελος είναι διάσπαρτος. **(e)** Τέλος ανάφασης, ο πυρηνικός φάκελος έχει εν μέρει ανασυνταχθεί. **(f)** Κυτοκίνηση, οι θυγατρικοί πυρήνες έχουν σχηματιστεί πλήρως. Scale bar in f, 10 μm . (Burke and Ellenberg 2002).

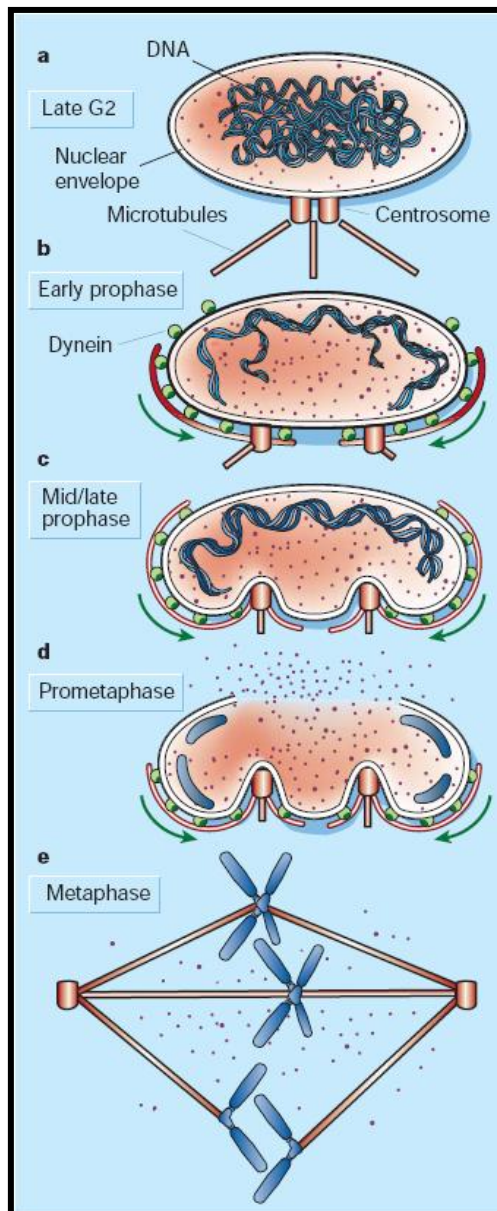
βρέθηκε ότι ο κινητήρας δυνεΐνη, εντοπίζεται στην εξωτερική πλευρά του πυρηνικού φακέλου πριν από τη διάσπαση του, όπου συνδεδεμένη με την πρωτεΐνη δυνακτίνη πιέζει τις πυρηνικές μεμβράνες καθώς και άλλα στοιχεία του πυρηνικού φακέλου κατά μήκος των μικροσωληνίσκων προς την πλευρά των κεντροσωματίων (Beaudouin, Gerlich et al. 2002; Salina, Bodoor et al. 2002). **(Εικόνα 2.2.2)**

Η πυρηνική λάμινα αποπολυμερίζεται με ρυθμιζόμενο τρόπο. Στην αρχή της πρόφασης αποπολυμερίζονται οι λαμίνες τύπου A και διαχέονται στο πυρηνόπλασμα ενώ ακολουθεί η διαλυτοποίηση των λαμινών τύπου B (Georgatos, Pyrgasopoulou et al. 1997). Τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων αποσυναρμολογούνται και τα συστατικά του πυρηνόπλάσματος και του κυτταροπλάσματος αναμειγνύονται, καθώς εξαφανίζεται η διαμερισματοποίηση του κυττάρου, προκειμένου να σχηματιστεί η μιτωτική άτρακτος (Hetzer, Walther et al. 2005). Ο αποπολυμερισμός της λάμινας αποτελεί προϋπόθεση για τη διάσπαση του πυρηνικού φακέλου σε μεμβρανικά κυστίδια, τα οποία μαζί με τα συστατικά του πυρήνα διασκορπίζονται σε ολόκληρο το κυτταρόπλασμα (Georgatos, Pyrgasopoulou et al. 1997). Η λαμίνη B συνεντοπίζεται με τον LBR σε μεμβρανικά κυστίδια (Meier and Georgatos 1994) ενώ ένας υποπληθυσμός κυστιδίων λαμίνης B- LAP1 αγκυροβολεί στη μιτωτική άτρακτο (Maison, Pyrgasopoulou et al. 1997).

Έχουν προταθεί διαφορετικά μοντέλα για την διάσπαση του πυρηνικού φακέλου. Σύμφωνα με το πρώτο, οι μεμβράνες αποσυντίθενται σε κυστίδια, τα οποία διακρίνονται από το ακέραιο μιτωτικό ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) (Vigers and Lohka 1991; Sasagawa, Yamamoto et al. 1999; Collas and Poccia 2000). Το δεύτερο μοντέλο υποστηρίζει ότι οι μεμβράνες καθώς και τα πρωτεϊνικά τους συστατικά απορροφούνται στο ER κατά τη διάρκεια της μίτωσης (Ellenberg, Siggia et al. 1997; Daigle, Beaudouin et al. 2001). Σε μια προσπάθεια να συνδυαστούν οι παραπάνω θεωρίες, προτάθηκε ένα τρίτο μοντέλο σύμφωνα με το οποίο οι πρωτεΐνες του φακέλου διανέμονται στο ER, αλλά παραμένουν διαχωρισμένες σε μικροπεριοχές του δικτύου (Mattaj 2004).

Η αποσυναρμολόγηση των μεμβρανών του πυρηνικού φακέλου και ο διασκορπισμός των νουκλεοπορινών, λαμινών και των πρωτεϊνών της INM αποτελούν καθοριστικό γεγονός για την εξέλιξη της μίτωσης. Αν και τα περισσότερα συστατικά διαχέονται στο ER, συγκεκριμένες νουκλεοπορίνες, όπως το σύμπλοκο Nup107-160, συνδέονται με τον κινητοχώρο κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης (Belgareh, Rabut et al. 2001; Enninga, Levay et al. 2003; Salina, Enarson et al. 2003; Loiodice, Alves et al. 2004). Επίσης η Nup358 συνδεδεμένη με την RanGAP εντοπίζεται στον κινητοχώρο και σε συγκεκριμένες περιοχές της ατράκτου (Joseph, Tan et al. 2002). Σε μιτωτικά κύτταρα τα οποία διαθέτουν

ανέπαφο σύστημα μικροσωληνίσκων, το μεγαλύτερο μέρος των κυστιδίων με λαμίνες τύπου B-LAP1C παραμένει συνδεδεμένο με την μιτωτική άτρακτο (Maison, Pyrgasopoulou et al. 1997).



Εικόνα 2.2.2 Μηχανισμός της διάσπασης του πυρηνικού φακέλου στην αρχή της μίτωσης (a) Τα χρωμοσώματα έχουν διπλασιαστεί και βρίσκονται σε μη-συμπυκνωμένη μορφή. Επίσης, έχουν διπλασιαστεί τα κεντροσώματα τα οποία βρίσκονται έξω από τον πυρήνα (b) Η πρωτεΐνη κινητήρας δυνεΐνη συγκεντρώνεται στην εξωτερική επιφάνεια του πυρηνικού φακέλου και αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους (c) Η δυνεΐνη τραβάει τα συστατικά του πυρηνικού φακέλου κατά μήκος των μικροσωληνίσκων προς τα κεντροσώματα (d) Η πίεση που ασκείται προς την αντίθετη από την περιοχή των κεντροσωματίων πλευρά του πυρήνα έχει ως αποτέλεσμα τη διάτρηση της πυρηνικής μεμβράνης (e) Μετά τη διάσπαση του πυρηνικού φακέλου τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα συνδέονται με τους μικροσωληνίσκους και διαχωρίζονται (Spector 1993; Salina, Bodoor et al. 2002).

Ο πυρηνικός φάκελος αποτελείται από δυναμικές δομές, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, όπου υποβάλλεται σε έναν πλήρη κύκλο αποσύνθεσης και επανασχηματισμού (Hetzer, Walther et al. 2005; Schirmer and Gerace 2005). Κατά τη διάρκεια της μίτωσης ο πυρηνικός φάκελος διασπάται και οι NPCs αποσυνδέονται από τις μεμβράνες και αποικοδομούνται εξολοκλήρου. Οι νουκλεοπορίνες Nup153, Nup358 και gr210 έχουν συσχετιστεί με τη διάσπαση του πυρηνικού φακέλου. Οι δύο πρώτες κατά τη μίτωση είναι υπερφωσφορυλιωμένες (Favreau, Worman et al. 1996) ενώ η gr210 φωσφορυλιώνεται πιθανόν από τη κυκλίνη B-p34^{cdc2}, στη σερίνη Ser¹⁸⁸⁰, η οποία βρίσκεται στο καρβόξυ-τελικό άκρο (Favreau, Worman et al. 1996).

Σε in vitro πειράματα με έμβρυα *C. Elegans* παρατηρήθηκε ότι η αδρανοποίηση της gr210 παρεμπόδιζε τον αποπολυμερισμό της λαμίνης και τον ανασυνδυασμό της χρωματίνης, πράγμα που οδηγούσε στο σχηματισμό δίδυμων πυρήνων και δομές που μοιάζουν με πυρηνοπλασματικές μεμβράνες στο κυτταρόπλασμα (Galy, Antonin et al. 2008). Στην ίδια δουλειά βρέθηκε, και πάλι με in vitro πειράματα, ότι αντισώματα έναντι επιτόπου στο C-τελικό άκρο της παρεμποδίζουν τη διάσπαση του πυρηνικού φακέλου στη μίτωση, ενώ στη μεσόφαση δεν επηρεάζουν καμία λειτουργία του πόρου. Ο λόγος που δεν διασπάται ο πυρηνικός φάκελος κατά τη μίτωση ήταν το γεγονός ότι η παρουσία των αντισωμάτων παρεμπόδισε τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης στο C-τελικό άκρο (Galy, Antonin et al. 2008).

Ο πυρηνικός φάκελος ανασυγκροτείται στο τελικό στάδιο της μίτωσης (τελόφαση), όπου τα συστατικά του πυρηνοπλάσματος και του κυτταροπλάσματος διαχωρίζονται και γύρω από κάθε ομάδα χρωμοσωμάτων δημιουργείται ένα πυρηνικό περίβλημα έτσι ώστε να σχηματιστούν δύο θυγατρικοί πυρήνες. Ο επανασχηματισμός των NPCs ξεκινάει στη χρωματίνη. Το σύμπλοκο Nup107-160, απαραίτητο για τον σχηματισμό NPC, επανασυντάσσεται και ακολουθούν οι Nup153 και Nup50. Η επανασύνταξη της gr210 γίνεται στο τέλος της μίτωσης (Bodoor, Shaikh et al. 1999).

Στη φάση αυτή, οι πρωτεϊνικές υπομονάδες των λαμινών που είχαν φωσφορυλιωθεί κατά την πρόφαση, αποφωσφορυλιώνονται και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για να σχηματίσουν την πυρηνική λάμινα. Στη συνέχεια γύρω από τα χρωμοσώματα συναθροίζονται κυστίδια της πυρηνικής μεμβράνης τα οποία αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες της χρωματίνης. Πολλές πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης (INM) συνδέονται με συστατικά της χρωματίνης όπως είναι η HP1 (heterochromatin protein 1), η BAF (barrier-to autointegration factor) και η HA95 (Georgatos 2001). Από μελέτες προκύπτει ότι η διαμεμβρανική πρωτεΐνη LBR, η οποία συνδέεται στην HP1 απαιτείται για την πρόσδεση

των μεμβρανικών κυστιδίων στην χρωματίνη *in vitro* (Collas, Courvalin et al. 1996; Pyrgasopoulou, Meier et al. 1996). Έχει προταθεί ότι οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην χρωματίνη και σε πρωτεΐνες της INM παρέχουν την κινητήριο δύναμη για τη συναρμολόγηση του πυρηνικού φακέλου μετά το τέλος της μίτωσης (Georgatos and Theodoropoulos 1999). Επίσης, ο συνεντοπισμός πολλών πρωτεϊνών του φακέλου με μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου και οι βλάβες του πυρηνικού φακέλου που προκύπτουν όταν μεταβάλλεται η δυναμική των μικροσωληνίσκων παρουσία αντιμιτωτικών φαρμάκων κατά τη διάρκεια της μίτωσης (Maison, Pyrgasopoulou et al. 1997; Theodoropoulos, Polioudaki et al. 1999) δείχνουν τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι μικροσωληνίσκοι στην συγκρότηση ενός λειτουργικού πυρηνικού φακέλου.

2.3. Συστατικά του πυρηνικού φακέλου με αυτοαντιγονική δράση

Από τα περισσότερο μελετημένα αυτοαντιγόνα του πυρηνικού φακέλου είναι οι λαμίνες (McKeon, Tuffanelli et al. 1983; Guilly, Danon et al. 1987; Reeves, Chaudhary et al. 1987; Lassoued, Guilly et al. 1988; Enarson, Rattner et al. 2004).

Τα αυτοαντισώματα έναντι λαμινών δεν παρουσιάζουν κάποια εξειδίκευση καθώς έχουν βρεθεί σε ορό από ασθενείς με σύνδρομο χρόνιας κοπώσεως (CFS), με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο (Systemic Erythematosus Lupus, SLE) και πρωτοπαθή χολική κίρρωση (Primary Billiary Cirrhosis, PBC) (Enarson, Rattner et al. 2004). Σε ασθενείς με SLE ανιχνεύθηκαν αντισώματα σε ποσοστό 21% κυρίως έναντι της λαμίνης B και λιγότερο έναντι των λαμινών A και C (Chou, Ali et al. 1991; Chou and Reeves 1992; Senecal, Rauch et al. 1999; Neshet, Margalit et al. 2001). Όσον αφορά το CFS οι ασθενείς παρουσιάζουν αντισώματα μόνο έναντι της λαμίνης B1, χωρίς να υπάρχουν καθόλου αντισώματα έναντι των λαμινών A και C, της gp210 και της Lap2 (Neshet, Margalit et al. 2001). Τα αυτοαντισώματα έναντι των λαμινών που έχουν βρεθεί σε ορό από ασθενείς με PBC, στοχεύουν κυρίως τις λαμίνες A και C. Τα ποσοστά των ορών με PBC που έχουν αναφερθεί με αντισώματα έναντι λαμινών είναι στο 8% (Wesierska-Gadek, Penner et al. 1988; Neshet, Margalit et al. 2001).

Αυτοαντισώματα έναντι του LBR έχουν βρεθεί σε ορό ασθενών οι οποίοι πάσχουν όλοι από PBC (Courvalin, Chaudhary et al. 1990; Nickowitz, Wozniak et al. 1994; Bandin, Courvalin et al. 1996; Lin, Noyer et al. 1996; Miyachi, Shibata et al. 1996; Neshet, Margalit et al. 2001), μολονότι το δείγμα ήταν περιορισμένο. Τα αντι-LBR αντισώματα ενώ δείχνουν ειδικότητα για την PBC, η ευαισθησία τους φτάνει μόνο μέχρι 1% με 3% (Nickowitz,

Wozniak et al. 1994; Miyachi, Shibata et al. 1996; Neshher, Margalit et al. 2001). Σε πιο πρόσφατες έρευνες βρέθηκαν αντι-LBR αυτοαντισώματα σε ποσοστά 9% και 6% των ορών ασθενών με PBC (Miyachi, Hankins et al. 2003; Muratori, Muratori et al. 2003; Bogdanos, Vergani et al. 2004).

Για τις πρωτεΐνες LAP έχουν βρεθεί αντισώματα σε πληθώρα αυτοάνοσων αλλά και μη αυτοάνοσων νοσημάτων. Σε μελέτες ορών ασθενών με PBC, αντι-LAP αντισώματα βρέθηκαν στο 16% και αντι-LAP2 στο 6% (Miyachi, Shibata et al. 1996; Miyachi, Hankins et al. 2003).

Οι πρωτεΐνες των πυρηνικών πόρων που έχουν αναφερθεί ως αυτοαντιγόνα είναι οι p62, gp210, Trp, Nup358 και Nup153. Όπως φαίνεται και στον **πίνακα 2.3.1** τα αυτοαντισώματα για τις p62 και nup153 δεν παρουσιάζουν ειδικότητα αλλά εμφανίζονται σε πολλά νοσήματα. Το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών με αυτοαντισώματα έναντι στην p62 (22%-32%) παρατηρείται στην PBC ενώ έναντι στη nup153 παρατηρούνται στην HBV και της νόσου Wilson's σε ποσοστά 41% και 40% αντίστοιχα (Enarson, Rattner et al. 2004). Το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών, που πάσχουν από PBC, με αντι-p62 αντισώματα (55%) βρέθηκε σε μελέτη που χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένη ανθρώπινη πρωτεΐνη p62, σημασμένη με S³⁵. (Wesierska-Gadek, Klima et al. 2007). Σε άλλη μελέτη βρέθηκαν αντι-p62 αυτοαντισώματα στο 13% ασθενών με PBC (Miyachi, Hankins et al. 2003) ενώ σε ορισμένες μελέτες δεν ανιχνεύθηκαν τα παραπάνω αυτοαντισώματα (Enarson, Rattner et al. 2004; Ou, Enarson et al. 2004).

Αυτοαντισώματα έναντι της Nup153 έχουν βρεθεί σε 29/65 ορούς από ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B (HBV), 1/24 με χρόνια ηπατίτιδα C (HCV), 4/10 με νόσο Wilson's, 1/11 με σύνδρομο Allagile, 2/11 έλλειψη α1 αντιτρυψίνης, και 1/12 με SLE και αυτοάνοση θυροειδίτιδα (Gregorio, Choudhuri et al. 1999) ενώ έναντι της Nup358 σε ορούς ασθενών με το σύνδρομο του συνδετικού ιστού (Wilken, Kossner et al. 1993).

Αντισώματα έναντι της Trp, πρωτεΐνης των πυρηνικών ινιδίων των NPCs, βρέθηκαν στο 16% ορών από ασθενείς με ρευματική νόσο. Συγκεκριμένα οι οροί αυτοί αναγνώρισαν πρωτεΐνη στα 175kDa, η οποία θεωρήθηκε ως πρωτεολυτικό κομμάτι της Trp (265kDa). Σε μεταγενέστερη μελέτη, η οποία συμπεριελάμβανε 75 ασθενείς που είχαν αντισώματα έναντι συστατικών των NE/NPC, βρέθηκε ότι η πλειοψηφία των αντισωμάτων αυτών ήταν αντι-Trp (Ou, Enarson et al. 2004).

Τα αυτοαντισώματα για την gp210 παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση και ευαισθησία σε ορό ασθενών με PBC και έχουν αναφερθεί ότι παρουσιάζουν προγνωστική σημασία. Σε μελέτες που έγιναν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ELISA η εξειδίκευση που

παρουσιάζουν τα αντι-gr210 αυτοαντισώματα ανέρχεται στο 99% ενώ ευαισθησία μεταξύ 10-41% (Nakamura, Shimizu-Yoshida et al. 2005; Nakamura, Takii et al. 2006; Gao, Tian et al. 2008). Τα αντι-gr210 αντισώματα εμφανίζονται και σε PBC ασθενείς χωρίς αντιμιτοχονδριακά αντισώματα σε ποσοστό 20%-47%. Λόγω της μεγάλης ειδικότητας αλλά και της μεγάλης ευαισθησίας που εμφανίζουν τα αντισώματα αντι-gr210 μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην διάγνωση PBC ασθενών χωρίς αντι-μιτοχονδριακά αντισώματα (Nesher, Margalit et al. 2001). Σε μελέτη που έγινε βρέθηκε ότι περισσότεροι ασθενείς με αντισώματα αντι-gr210 πεθαίνουν από ηπατική ανεπάρκεια συγκριτικά με ασθενείς που δεν έχουν αντισώματα αντι-gr210 και βρίσκονται στο ίδιο ιστολογικό στάδιο (Itoh, Ichida et al. 1998).

Συμπερασματικά τα αντι-περιπυρηνικά αυτοαντισώματα που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για την PBC είναι τα μεγάλης εξειδίκευσης gr210 και LBR αλλά και η p62.

Autoantigen	Disease	% prevalence, frequency
p62	PBC	22–32
	SjS	13
	RD	8
	MCTD	ND
	SLE	ND
gp210	PBC	10–41
Nup358	Overlap connective tissue disease	1
Nup153	HBV	41
	HCV	4
	Wilson's disease	40
	Alagille's syndrome	9
	AATD	17
	SLE	8
	Autoimmune thyroiditis	8
Tpr	RD	16
	ALD	41

Πίνακας 2.2.1. Αυτοαντισώματα έναντι συστατικών του πυρηνικού πόρου από διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα.

(AATD: α1 antitrypsin deficiency, ALD (autoimmune liver disease): αυτοάνοση ηπατίτιδα, CFS (chronic fatigue syndrome): σύνδρομο χρόνιας κοπώσεως, HBV (hepatitis B virus infection): ιός ηπατίτιδας Β, HCV (hepatitis C virus infection): ιός ηπατίτιδας C, MCTD: mixed connective tissue disease, NPC (nuclear pore complex) σύμπλοκο πυρηνικού πόρου, PBC (primary biliary cirrhosis): πρωτοπαθής ηπατική κίρρωση, RD (rheumatic disease): ρευματοειδής νόσος, SjS (Sjögren's syndrome): σύνδρομο Sjögren's, SLE (systemic lupus erythematosus): συστηματικό ερυθματώδη λύκο) (Enarson, Rattner et al. 2004).

3. Η ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ

3.1. Γενικά για την πρωτοπαθή χολική κίρρωση.

Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση είναι μια χρόνια χολοστατική νόσος του ήπατος, που χαρακτηρίζεται από την προοδευτική καταστροφή των ενδοηπατικών χοληφόρων, η οποία οδηγεί σε ίνωση και τελικά σε κίρρωση (Kaplan and Gershwin 2005; Muratori, Granito et al. 2008).

Η καταστροφή των μικρών χοληφόρων αγγείων στην PBC που οδηγεί στη βλάβη του ήπατος, θεωρείται δευτερογενής ανοσοαπόκριση. Σε αντίθεση με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, η PBC έχει πολύ μικρή απόκριση σε ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες και οι μεταβολές στον τίτλο των αυτοαντισωμάτων δεν φαίνεται να συσχετίζονται με την σοβαρότητα της νόσου (Benson, Kikuchi et al. 2004; Selmi and Gershwin 2009), παρά την ύπαρξη ορισμένων αντίθετων προς αυτή την άποψη δεδομένων (Muratori, Granito et al. 2008; Selmi and Gershwin 2009).

Στην πλειοψηφία τους οι ασθενείς δεν εμφανίζουν συμπτώματα κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Ορισμένοι όμως εμφανίζουν συμπτώματα κόπωσης ή/και κνηστού. Άλλα συμπτώματα είναι η εμφάνιση ασκίτη, ηπατικής εγκεφαλοπάθειας και/ή αιμορραγίες από κίρσους του οισοφάγου. Η PBC μπορεί να εμφανιστεί και παρουσία άλλων αυτοάνοσων ασθενειών όπως το σύνδρομο Sjogren's, σκληρόδερμα, το σύνδρομο Raynaud's και το σύνδρομο CREST (Kumagi and Heathcote 2008).

Η διάγνωση της PBC βασίζεται στα ακόλουθα κριτήρια: α) βιοχημικά στοιχεία που να αποδεικνύουν χολόσταση, όπως αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης β) παρουσία αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων γ) ιστολογικά ευρήματα απουσία χολαγειτιδός και παρουσία και παρουσία καταστροφής μικρού και μεσαίου μεγέθους χοληφόρων (Lindor, Gershwin et al. 2009). Για τους ασθενείς με χολοστατική ηπατική νόσο που δεν εμφανίζουν αντιμιτοχονδριακά αντισώματα, η εκτίμηση γίνεται με χολοαγγειογραφία και βιοψία ήπατος (Kumagi and Heathcote 2008).

Η εξέλιξη της νόσου είναι αργή. Ιστολογικά η νόσος χωρίζεται σε τέσσερα στάδια. Σε μια βιοψία ήπατος είναι δυνατόν να συνυπάρχουν ιστολογικά ευρήματα που καθορίζουν περισσότερα του ενός σταδίου, για το λόγο αυτό μία βιοψία για να είναι διαγνωστική θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει τουλάχιστον 10 πυλαία διαστήματα. (Kumagi and Heathcote 2008).

Το ουρσεοδεοξυχολικό οξύ (ursodeoxycholic acid, UDCA) είναι το μόνο γνωστό φάρμακο που μπορεί να επιβραδύνει την πορεία της νόσου (Kumagi and Heathcote 2008).

Χρησιμοποιείται ευρέως και έχει την ιδιότητα να αποτρέπει ή να καθυστερεί τη μεταμόσχευση (Lee, Belanger et al. 2007; Lindor, Gershwin et al. 2009) η οποία αποτελεί και την τελική θεραπευτική αντιμετώπιση. Το φάρμακο χορηγείται στους ασθενείς της PBC σε οποιοδήποτε στάδιο κι αν βρίσκονται, εφόσον η βιοχημική εικόνα του ήπατος δεν είναι η φυσιολογική. Γενικά οι ασθενείς, που βρίσκονται σε αρχικό στάδιο παρουσιάζουν βελτίωση και οι ασθενείς, που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο επιβιώνουν περισσότερο ή αποφεύγουν την μεταμόσχευση μετά από χορήγηση του φαρμάκου. (Poupon, Lindor et al. 1997; Lindor, Gershwin et al. 2009).

Η χρήση του UDCA έχει συσχετιστεί με την ελάττωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης, την μείωση της πιθανότητας σχηματισμού κισσών και της επιβράδυνσης της ιστολογικής προόδου της νόσου. Επίσης οι Nakamura et al. παρατήρησαν ότι ασθενείς θετικοί κατά τη διάγνωση τους σε αντι-gr210 αντισώματα, έπαυαν να εκφράζουν τα συγκεκριμένα αντισώματα μερικούς μήνες μετά την έναρξη της χορήγησης UDCA (Nakamura, Shimizu-Yoshida et al. 2005). Παρόλα αυτά το UDCA δεν βελτιώνει τα συμπτώματα κόπωσης, κνησμού, της συσχετιζόμενης οστικής βλάβης ή των αυτοάνοσων χαρακτηριστικών της PBC (Balan, Dickson et al. 1994; Lindor, Dickson et al. 1995; Lindor, Jorgensen et al. 1997; Degott, Zafrani et al. 1999; Lindor, Gershwin et al. 2009).

Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση εμφανίζεται κατά πλειοψηφία σε γυναίκες (αναλογία 9:1) μέσης ηλικίας και συνήθως με πρώτου βαθμού συγγένεια μεταξύ τους. Η αιτία πρόκλησης της αυτοάνοσου νόσου είναι άγνωστη. Εικάζεται ότι τα άτομα που νοσούν έχουν μια γενετική προδιάθεση. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (μολύνσεις, χημικά, κάπνισμα) μπορούν επίσης να είναι εν δυνάμει αιτίες ανάπτυξης της νόσου (Kumagi and Heathcote 2008).

Γενετικοί παράγοντες

Η οικογενειακή προδιάθεση στην PBC δεν είναι σπάνια. Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου σε άτομα με πρώτου βαθμού συγγένεια μεταξύ τους, είναι αυξημένη κατά 5% (Jones, Watt et al. 1999; Kumagi and Heathcote 2008). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η εμφάνιση της PBC σε άτομα της ίδιας οικογένειας σχετίζεται με παράγοντες που κληρονομούνται από τη μητέρα αλλά και το γεγονός ότι η εμφάνιση της νόσου στη δεύτερη γενιά τείνει να γίνεται συντομότερα (Brind, Bray et al. 1995; Kumagi and Heathcote 2008). Τέλος αναφέρεται ότι η νόσος εμφανίζεται συχνότερα σε δύο αδερφές ή μητέρα και κόρη (Bittencourt, Farias et al. 2004; Kumagi and Heathcote 2008).

Η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων αγγίζει το 63% ενώ δεν υπάρχει καμία τέτοια συχνότητα μεταξύ των διζυγωτικών. Στα μονοζυγωτικά δίδυμα η ηλικία εμφάνισης της ασθένειας είναι παρόμοια αλλά διαφέρουν ως προς την πορεία και τη σοβαρότητα της νόσου πράγμα που αποδεικνύει τη σημασία του ρόλου των επιγενετικών ή απλά των περιβαλλοντικών παραγόντων (Selmi, Ross et al. 2004; Kumagi and Heathcote 2008).

Παρόλο που η νόσος δεν παρουσιάζει διαφορές μεταξύ αντρών και γυναικών, πρόσφατα δεδομένα εισηγούνται ότι μεταξύ των γυναικών με PBC παρατηρείται ευρέως η X-χρωμοσωμική μονοσωμία στα λεμφοειδή κύτταρα (Invernizzi, Miozzo et al. 2004; Kumagi and Heathcote 2008). Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ανοσοανοχή βρίσκονται στο γονίδιο X και η PBC έχει παρουσιαστεί σε γυναίκες με σύνδρομο Turner (γυναίκες που έχουν ένα X χρωμόσωμα αντί δύο που είναι το φυσιολογικό) (Milkiewicz and Heathcote 2004; Kumagi and Heathcote 2008).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Η ύπαρξη όμοιων επιτόπων σε πρωτεΐνες διαφόρων ειδών, που δεν έχουν καμία σχέση μεταξύ τους, (molecular mimicry) έχει προταθεί ως ένας πιθανός μηχανισμός άρσης της ανοσοανοχής του ανοσοποιητικού συστήματος και πρόκλησης αυτοάνοσης νόσου (Van de Water, Ishibashi et al. 2001).

Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν προταθεί ως εν δυνάμει αιτίες πρόκλησης της νόσου αλλά ο κύριος παράγοντας είναι τα βακτήρια. Στους ασθενείς με PBC έχουν παρατηρηθεί συχνές λοιμώξεις του ουροποιητικού (Kumagi and Heathcote 2008) γεγονός που καθιστά το *Escherichia coli* τον πιθανότερο υποψήφιο, αφού είναι η πιο συχνή αιτία τέτοιων λοιμώξεων στην κλινική πράξη. Επίσης έχει παρατηρηθεί παρουσία βακτηριακών παραγώγων σε μονοκύτταρα που βρίσκονται γύρω από το κατεστραμμένο χοληφόρο (Tsuneyama, Harada et al. 2001; Selmi and Gershwin 2009). Άλλος ένας οργανισμός που έχει προταθεί ως πιθανή αιτία για την πρόκληση της νόσου είναι το *Novosphingobium aromaticivorans*. Το *N. aromaticivorans* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο βακτήριο, το οποίο δεν αναφέρεται ως παθογόνο για τον άνθρωπο, μεταβολίζει χημικά συστατικά και έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί τα οιστρογόνα (Long, Quan et al. 2001; Shi, Fredrickson et al. 2001; Fujii, Kikuchi et al. 2002; Selmi, Balkwill et al. 2003; Selmi and Gershwin 2009). Οι λόγοι για τους οποίους ο οργανισμός αυτός έχει προταθεί ως υποψήφιος για την πρόκληση της ασθένειας είναι: α) οι αμινοξικές αλληλουχίες δύο πρωτεϊνών του, που παρουσιάζουν μεγάλου βαθμού ομολογία με τον ανθρώπινο αυτοεπίτοπο της E2 υπομονάδας

του συμπλόκου της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης (PDC-E2, αμινοξέα 208-237) (Selmi, Balkwill et al. 2003; Selmi and Gershwin 2009) **β**) η ύπαρξη δύο λιποϋλιωμένων πρωτεϊνών μοριακού βάρους 47 και 50 kDa του *N. Aromaticivorans*, οι οποίες αναγνωρίζονται από ορούς PBC ασθενών, θετικούς έναντι του PDC-E2 αλλά ακόμα και AMA (Αντι Μιτοχονδριακών Αυτοαντισωμάτων) αρνητικών, ανεξαρτήτως του σταδίου (Padgett, Selmi et al. 2005; Selmi and Gershwin 2009) **γ**) το γεγονός ότι οι τίτλοι αντισωμάτων, σε ασθενείς με PBC, έναντι του οργανισμού αυτού είναι πολύ υψηλότεροι από αυτούς έναντι του *E.Coli*. Το ίδιο ισχύει κι όταν οι ασθενείς βρίσκονται σε αρχικά στάδια (Kumagi and Heathcote 2008) **δ**) ότι ο οργανισμός αυτός έχει προκαλέσει παραγωγή αυτοαντισωμάτων μέσω των T λεμφοκυττάρων στα χοληφόρα αγγεία μοντέλου για την PBC (ποντίκι) (Mattner, Savage et al. 2008; Selmi and Gershwin 2009). Τέλος έχει αναφερθεί ότι στο 75% περίπου των ασθενών με PBC ανιχνεύεται μόλυνση από ανθρώπινο β-ρετροϊό (ο οποίος έχει γονιδιακή ομολογία με τον ιό που είναι υπεύθυνος για την ογκογένεση στο μαστό ποντικών) (Xu, Shen et al. 2003; Kumagi and Heathcote 2008).

Η υπόθεση της ενεργοποίησης του ανοσολογικού συστήματος με μιμητισμό (molecular mimicry) βασίζεται στην αναγνώριση προκαρνωτικών αντιγόνων διαφόρων μικροβίων, συμπεριλαμβανομένου και του *E.Coli* (Shimoda, Nakamura et al. 2000; Selmi and Gershwin 2009), από αντισώματα ορών PBC ασθενών, οι οποίοι είναι AMA θετικοί και έχουν αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα. Τα προκαρνωτικά αντιγόνα παρουσιάζουν την ίδια αλληλουχία αμινοξέων (ExDK) στο μιμητικό επίτοπο με αυτόν των μιτοχονδριακών αυτοαντιγόνων και αναγνωρίζονται εξίσου από αντισώματα ορών PBC ασθενών, οι οποίοι είναι AMA θετικοί και έχουν αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα. Αφού η αλληλουχία του ενζύμου PDC είναι συντηρημένη στα είδη, η αναγνώριση επιτόπων άλλων ειδών είναι αναμενόμενη (Van de Water, Ishibashi et al. 2001; Selmi and Gershwin 2009).

Στο μοντέλο της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος με μιμητισμό, για την έναρξη της ασθένειας είναι απαραίτητη η ύπαρξη T λεμφοκυττάρων φυσικών φονέων (Natural killers T cells, NKT), τα οποία εξειδικευμένα αποκρίνονται στο α-γαλακτοσυλιωμένο κεραμίδιο του βακτηριακού τοιχώματος. Για τη διάδοση της νόσου υπεύθυνα είναι τα CD8+ T λεμφοκύτταρα. Επιπλέον στην έναρξη της ασθένειας εμπλέκεται και η ενδογενής ανοσοποίηση (Ehlers and Ravetch 2007; Selmi and Gershwin 2009). Η παρουσία βακτηριακού DNA ενεργοποιεί τον υποδοχέα φυσικής ανοσίας 9 (toll-like receptor, TLR) στα B λεμφοκύτταρα (Agrawal and Kandimalla 2003; Selmi and Gershwin 2009). Η ενεργοποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή M ανοσοσφαιρινών (IgM), που αποτελεί χαρακτηριστικό της νόσου. Επιπλέον τα μονοκύτταρα

του περιφερικού αίματος, στους ασθενείς με PBC, εκκρίνουν μεγαλύτερες ποσότητες από τις κυτοκίνες, που εκκρίνονται πριν τις φλεγμονές, συγκρινόμενες με τα ποσά των κυτοκινών που εκκρίνονται από τα ίδια κύτταρα όταν ενεργοποιηθούν από TLR με βακτηριακή ή ιική προέλευση (Mao, Lian et al. 2005; Selmi and Gershwin 2009).

Εκτός από τα βακτήρια και τους ιούς, υποψήφιοι για επαγωγή της αυτοάνοσης νόσου είναι και άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως ξενοβιοτικά ή χημικά στοιχεία που δεν βρίσκονται υπό κανονικές συνθήκες στους ζωντανούς οργανισμούς. Οι παράγοντες αυτοί ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα με μιμητισμό (Selmi and Gershwin 2009). Τέτοια παραδείγματα είναι οι ναρκωτικές ουσίες, τα μικροβιοκτόνα ή άλλα οργανικά μοντέλα τα οποία έχουν τη δυνατότητα να τροποποιήσουν τις πρωτεΐνες του οργανισμού στον οποίο βρίσκονται και να τις μετατρέψουν σε πιο αντιγονικές. Ένας μεγάλος αριθμός χημικών ξενοβιοτικών έχει συσχετισθεί με διάφορες αυτοάνοσες νόσους στον άνθρωπο. **(Πίνακας 3.1.1)**

Αλλα χημικά που έχουν σχέση με τα αυτοάνοσα νοσήματα είναι τα βαρέα μέταλλα όπως ο υδράργυρος (Havarinasab and Hultman 2005; Rowley and Monestier 2005; Rieger and Gershwin 2007), το ιώδιο (Rose, Bonita et al. 2002; Rieger and Gershwin 2007), η καναβανίνη (Montanaro and Bardana 1991; Rieger and Gershwin 2007) και το αλοθάνιο (Gut 1998; Liu, Nishida et al. 2002; Rieger and Gershwin 2007). Η ηπατίτιδα από αλοθάνιο είναι μια νόσος του ήπατος που επάγεται από ξενοβιοτικά όταν προκαλείται ανοσοαπόκριση έναντι των αντιγόνων των τριφθοροακετυλιωμένων (trifluoroacetylated, TFA) πρωτεϊνών. Τα αντι-TFA αντισώματα που δημιουργούνται αναγνωρίζουν την λιποϋλιωμένη έσω-λιποϋλική περιοχή του PDC-E2 στον άνθρωπο αλλά όχι την μη λιποϋλιωμένη μορφή (Christen, Quinn et al. 1994; Rieger and Gershwin 2007).

Τα ξενοβιοτικά έχουν την δυνατότητα να μεταβολιστούν και να μετατραπούν σε ενδιάμεσα τα οποία σχηματίζουν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες του οργανισμού. Πολλοί χημικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες μεταβολίζονται αρχικά στο ήπαρ, σχηματίζοντας ενεργούς μεταβολίτες οι οποίοι μπορούν να τροποποιήσουν κυτταρικές πρωτεΐνες έτσι ούτως ώστε να δημιουργήσουν νέα-αντιγόνα. Παρόλο που δεν είναι ξεκάθαρο το πώς τα ξενοβιοτικά ή οι τροποποιημένες κυτταρικές πρωτεΐνες επάγουν την PBC, διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί. Ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς είναι ο εξής: αρχικά η άμεση τοξική επίδραση των ξενοβιοτικών ή η επίδραση των νέο-αντιγόνων προκαλούν αφύσικο κυτταρικό θάνατο με απόπτωση ή νέκρωση, συνθήκες που ευνοούν την δημιουργία αυτοεπιτόπων. Στη συνέχεια, τα T και B λεμφοκύτταρα που έχουν δημιουργηθεί έναντι των νέο-αντιγόνων, πιθανόν αλληλεπιδρούν ευκολότερα με λιγότερο ανοσογόνα, γηγενή,

αυτοαντιγόνα. Τέλος οι χημικές τροποποιήσεις στις πρωτεΐνες των κυττάρων όπως η απομάκρυνση ή η αλλαγή του απτενίου σε πεπτιδία, μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την παρουσίαση κρυμμένων πεπτιδίων (Griem, Wulferink et al. 1998; Rieger and Gershwin 2007).

Ξενοβιοτικά	Ασθένειες	Αναφορές
Υδράργυρος	Σχηματισμός ανοσοσυμπλόκου, Νεφρίτιδα με φλεγμονή τριχοειδών	(Havarinasab and Hultman 2005; Rowley and Monestier 2005)
Ιώδιο	Αυτοάνοσος Θυρεοειδίτης	(Rose, Bonita et al. 2002)
Βινυλοχλωρίδιο	Ασθένειες τύπου σκληροδέρματος	(D'Cruz 2000)
Αρωματικές αμίνες	Συστημικός Ερυθματώδης Λύκος από φαρμακευτικές ουσίες	(Reidenberg 1983)
Υδραζίνες	Συστημικός Ερυθματώδης Λύκος (SLE)	(Yung and Richardson 1994)
Διοξειδίο του πυριτίου	Ρευματοειδής Αρθρίτιδα, SLE, Σκληρόδερμα	(Steenland and Goldsmith 1995)
Οργανικοί διαλυτές	Συστηματική Σκλήρυνση	(Silman and Newman 1996)
Αλοθένιο	Ηπατίτιδα	(Gut 1998; Liu, Nishida et al. 2002)
Καναβανίνη	σύνδρομα τύπου SLE	(Montanaro and Bardana 1991)
Τοξικά έλαια (ανιλίδια λιπαρών οξέων)	“Σύνδρομα τοξικών ελαίων” (ασθένειες συνδετικού ιστού τύπου σκληροδέρματος)	(Borda and Sterin-Borda 2001)

Πίνακας 3.1.1. Συσχέτιση χημικών ξενοβιοτικών με αυτοάνοσες νόσους στον άνθρωπο (Rieger and Gershwin 2007).

3.2. Τα αντιμιτοχονδριακά αυτοαντισώματα στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση

Από ανοσολογικής πλευράς η PBC χαρακτηρίζεται από την παρουσία αντισωμάτων έναντι μιτοχονδριακών αντιγόνων. Για την επιλεκτική καταστροφή των μικρών χοληφόρων αγγείων έχουν ενοχοποιηθεί πολλοί παράγοντες. Σε πρόσφατη μελέτη έχει αναφερθεί ότι μετά την απόπτωση τους τα κύτταρα των χοληφόρων αγγείων απελευθερώνουν άθικτους μιτοχονδριακούς αυτοεπιτόπους, πράγμα που δικαιολογεί την ειδικότητα που παρουσιάζουν τα αντισώματα αυτά ως προς τα μιτοχόνδρια των χοληφόρων αγγείων (Lleo, Selmi et al. 2009). Επίσης κατά την απόπτωση των κυττάρων των χοληφόρων αγγείων παρατηρείται υπερέκφραση Β λεμφοκυττάρων 2 που αναστέλλει τη γλουταθυλίωση του PDC-E2, με αποτέλεσμα να μην χάνει την αντιγονική του δράση (Charlotte, Wechsler et al. 1994; Odin, Huebert et al. 2001; Lleo, Selmi et al. 2009).

Τα AMA είναι τα πιο ειδικά αντισώματα στην ανοσοπαθολογία του ασθενούς. Εμφανίζονται στο 95% των περιπτώσεων PBC (Oertelt, Rieger et al. 2007; Selmi and Gershwin 2009). Οι επίτοποι για τα AMA είναι τα 2-OADC μέλη που βρίσκονται στην έσω-μιτοχονδριακή μεμβράνη αλλά απελευθερώνονται σε μια μη διαχωρισμένη μορφή ακολουθώντας την απόπτωση των χολαγγειοκυττάρων, ένα φαινόμενο που συμβαίνει μόνο σε αυτό το είδος κυττάρων (Odin, Huebert et al. 2001; Selmi and Gershwin 2009) και μπορεί να είναι και ο λόγος που τα κύτταρα αυτά είναι ο στόχος των αυτοαντισωμάτων (Lleo, Selmi et al. 2009; Selmi and Gershwin 2009). Από τα 2-OADC σύμπλοκα το πιο διαδεδομένο αυτοαντιγόνο είναι το PDC-E2 και οι επίτοποι βρίσκονται στην εσωτερική ή εξωτερική λιπούλική περιοχή (Gershwin and Mackay 2008; Selmi and Gershwin 2009).

Έχουν βρεθεί τουλάχιστον πέντε διαφορετικά αντιγόνα, συστατικά του συμπλόκου της οξοοξικής δεϋδρογονάσης (OADC) που βρίσκεται στην έσω-μιτοχονδριακή μεμβράνη. Τα πέντε αντιμιτοχονδριακά αυτοαντιγόνα είναι η E2 υπομονάδα της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης (PDC-E2) με μοριακό βάρος 74kDa (Gershwin, Mackay et al. 1987; Gershwin, Coppel et al. 1988; He, Ansari et al. 2006; Moritoki, Lian et al. 2007) και τα αντιγόνα της διϋδρολιποαμιδικής δεϋδρογονάσης: E3-συνδεδεμένη πρωτεΐνη (E3BP, E3-binding protein) με μοριακό βάρος 55kDa, η E2 υπομονάδα της διακλαδισμένης αλυσίδας του συμπλόκου της 2-οξοοξικής δεϋδρογονάσης (BCOADC-E2, branched chain 2-oxoacid dehydrogenase complex) με μοριακό βάρος 52kDa, η E2 υπομονάδα του συμπλόκου της οξογλουταρικής δεϋδρογονάσης (OGDC-E2, oxoglutarate dehydrogenase complex) με μοριακό βάρος 48kDa και η E1α υπομονάδα του συμπλόκου της πυροσταφυλικής

δεϋδρογονάσης (PDC-E1a, pyruvate dehydrogenase complex) με μοριακό βάρος 38kDa (Yeaman, Fussey et al. 1988; Mackay, Rowley et al. 1989).

Στους ασθενείς με PBC παρουσιάζονται υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης των αντι-PDC-E2 αντισωμάτων, πράγμα που υποδεικνύει την πλήρη καταστολή της ανοχής των Β λεμφοκυττάρων (Moritoki, Lian et al. 2007). Ωστόσο η συσχέτιση και ο βαθμός στον οποίο συσχετίζονται τα αντι-PDC-E2 με την παθογένεια της PBC παραμένουν άγνωστα. Η πλήρης καταστολή της ανοχής των Β λεμφοκυττάρων έναντι των μιτοχονδριακών αντιγόνων, αποτελεί δείκτη με μεγάλη ειδικότητα και υψηλό τίτλο για την PBC (Baum and Cunningham 1994; Berg and Klein 1995; Csepregi, Obermayer-Straub et al. 2003).

Ο κυρίαρχος επίτοπος της PDC-E2 για AMA στην PBC, βρίσκεται στη διϋδρολιπαμινική τρανσφεράση και είναι μια υδρόφιλη περιοχή 20 αμινοξέων (167–186) γύρω από τη λυσίνη που είναι συνδεδεμένη με λιποϊκό οξύ, του έσω λιποϋλικού τμήματος (Gershwin, Mackay et al. 1987; Coppel, McNeilage et al. 1988; Van de Water, Gershwin et al. 1988; Surh, Coppel et al. 1990; Csepregi, Obermayer-Straub et al. 2003). Το μικρό αυτό πεπτίδιο παρότι κατέχει κεντρική θέση στον κυρίαρχο επίτοπο, δεν παρουσιάζει ισχυρή αντιγονική δράση. Για να εμφανιστεί μέγιστη αντιγονική δράση, απαιτείται ολόκληρη η έσω περιοχή που δεσμεύει λιποϋλικές ομάδες (128–221) (Burrourghs, Butler et al. 1992; Csepregi, Obermayer-Straub et al. 2003).

Ένας μεγάλος αριθμός ασθενών με PBC έχουν αντισώματα για την διακλαδισμένη αλυσίδα της ακυλοτρανσφεράσης (BCKADC-E2) (Surh, Danner et al. 1989; Csepregi, Obermayer-Straub et al. 2003). Άνω του 71% των ορών των ασθενών με PBC έχουν βρεθεί να αναγνωρίζουν το BCKADC-E2. Σε ποσοστό ασθενών από 5-20% βρέθηκαν αντισώματα αποκλειστικά για το αντιγόνο αυτό χωρίς την παρουσία αυτοαντισωμάτων αντι-PDC-E2 (Fregeau, Davis et al. 1989; James, Yeaman et al. 1989; Iwayama, Leung et al. 1992; Leung, Chuang et al. 1995; Csepregi, Obermayer-Straub et al. 2003). Η παρουσία αντι-BCKADC-E2 αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων αναστέλλει τη δράση του ενζυμικού συμπλόκου της διακλαδισμένης αλυσίδας της α-κέτο-οξο-δεϋδρογονάσης (Fregeau, Davis et al. 1989; Csepregi, Obermayer-Straub et al. 2003).

Ωστόσο, αναφέρεται ένα ποσοστό 5%-10% ασθενών στους οποίους δεν ανιχνεύονται αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA-αρνητικοί), ενώ τα κλινικά, βιοχημικά και ιστολογικά στοιχεία δείχνουν ότι έχουν PBC, (Liu, Shi et al. 2008) αλλά αντισώματα για δομές και πρωτεΐνες του πυρήνα (ANA). Σε αντίθεση με τους AMA θετικούς, οι ANA θετικοί ασθενείς παρουσιάζουν μία πιο σοβαρή και πιο επιθετική μορφή της νόσου (Wesierska-Gadek, Penner et al. 2006; Nakamura, Kondo et al. 2007; Selmi and Gershwin

2009). Τα πιο εξειδικευμένα αντι-πυρηνικά αντισώματα που έχουν βρεθεί είναι τα αντι-sp100 και τα αντι-gr210. Η sp100 πρωτεΐνη είναι συστατικό των πυρηνικών σωματιδίων και η gr210 συστατικό του πυρηνικού πόρου. Τα αντισώματα ως προς τις πρωτεΐνες αυτές αν και παρουσιάζουν χαμηλή ευαισθησία έχουν μεγάλη ειδικότητα (>99%) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της νόσου απουσία αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων.

3.3. Τα αντιπυρηνικά αυτοαντισώματα στην πρωτοπαθή γολκική κίρρωση

Τα αντιπυρηνικά αντισώματα αναφέρθηκαν ως αυτοαντιγόνα για την PBC την δεκαετία του 50. Ανιχνεύθηκαν αρχικά με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε τομές ήπατος ή κύτταρα (Walker, Doniach et al. 1965; Gao, Tian et al. 2008). Στο πέρασμα των χρόνων διάφορες πρωτεΐνες έχουν αναγνωρισθεί ως εξειδικευμένα αντιγόνα για την PBC (Talwalkar and Lindor 2003).

Ένα από τα αντιπυρηνικά αυτοαντισώματα της PBC που παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση είναι η sp100 (Szosteck, Guldner et al. 1990; Evans, Suenaga et al. 1991; Fusconi, Cassani et al. 1991; Orth, Gerken et al. 1997; Zuchner, Sternsdorf et al. 1997; Gao, Tian et al. 2008), πρωτεΐνη των σωματιδίων PML. Επιπλέον έχουν βρεθεί αυτοαντισώματα έναντι των κεντρομεριδίων και της πρωτεΐνης PML, που καταστέλλει τον μετασχηματισμό και την ανάπτυξη των κυττάρων και η οποία υπερεκφράζεται στα προμυελωτικά λευχαιμικά κύτταρα. Η PML συνεντοπίζεται με την sp100. Τα αντικεντρομεριδιακά αντισώματα (ACA) έχουν συσχετιστεί με την πορεία της νόσου (Yang, Yu et al. 2004; Nakamura, Kondo et al. 2007; Gao, Tian et al. 2008).

Αυτοαντισώματα για την sp100

Σε κάθε πυρήνα αντιστοιχούν 10-30 σωματίδια PML τα οποία εικάζεται ότι είναι πολυλειτουργικά και εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση αλλά κι ότι αποτελούν στόχους για ιική μόλυνση (Matera, Weiner et al. 1990). Με έμμεσο ανοσοφθορισμό το αυτοαντιγόνο της sp100, εντοπίζεται ως διακριτός στικτός σχηματισμός σε μεταφασικά κύτταρα. Η πρωτεΐνη δεν επηρεάζεται από DNAασες και RNAασες, εξάγεται εύκολα και έχει μοριακό βάρος 100kDa (Szosteck, Guldner et al. 1990). Τα αντι-sp100 αντισώματα αναγνωρίζουν τουλάχιστο τρεις μη επικαλυπτόμενες περιοχές της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα δύο αλληλουχίες των 16-20 αμινοξέων, οι οποίες μπορεί να αποτελούν τους επιτόπους.

Η παρουσία αντι-sp100 αναφέρεται ότι κυμαίνεται μεταξύ 13% και 44% των ασθενών με PBC (Evans, Suenaga et al. 1991; Wichmann, Montes-Cano et al. 2003). Επίσης

σε τρεις διαφορετικές μελέτες, όπου ο αριθμός των ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν κυμαινόταν μεταξύ 33 και 170, βρέθηκαν αντι-sp100 αντισώματα σε ποσοστό 18% - 44% των ασθενών (Evans, Suenaga et al. 1991; Szostecki, Will et al. 1992; Bluthner, Schafer et al. 1999). Σε άλλες ακόμη μελέτες αντισώματα για την sp100 βρέθηκαν στο 11- 41% των ασθενών (Powell, Schroeter et al. 1984; Muratori, Muratori et al. 2002; Muratori, Muratori et al. 2003; Bogdanos, Vergani et al. 2004; Rigoroulou and Dalekos 2004).

Ορισμένοι ερευνητές έχουν προτείνει την sp100 ως διαγνωστικό δείκτη για την PBC, απουσία των AMA (Hansen, Eriksson et al. 1991; Wichmann, Montes-Cano et al. 2003) ενώ άλλοι έχουν παρατηρήσει αύξηση της συχνότητας εμφάνισης του φαινότυπου του διακριτού στικτού φθορισμού, όταν η PBC συνοδεύεται από σύνδρομο Sjogren (Bernstein 1984; Cassani, Bianchi et al. 1985; Wichmann, Montes-Cano et al. 2003). Τα εν λόγω αντισώματα έχουν βρεθεί επίσης σε νοσήματα του συνδετικού ιστού καθώς και στα άλλα νοσήματα του ήπατος, εκτός της PBC, (Pawlotsky, Andre et al. 1992; Wichmann, Montes-Cano et al. 2003) όπως η αυτοάνοση ηπατίτιδα.

Τα αντι-sp100 αντισώματα συνεχίζουν να υπάρχουν σε ορούς ασθενών ακόμα και μετά από μεταμόσχευση ήπατος, χωρίς να επηρεάζουν ιστολογικά το μόσχευμα (Dubel, Farges et al. 1998; Luettig, Boeker et al. 1998). Οι Zuchner et al. παρατήρησαν ότι η παρουσία αντισωμάτων έναντι των πυρηνικών σωματιδίων, συσχετίζεται με τη μεταβολή του σταδίου από I/II σε III/IV (Zuchner, Sternsdorf et al. 1997; Worman and Courvalin 2003) , μετά από 24 μήνες παρακολούθηση.

Αντι-κεντρομεριδιακά αυτοαντισώματα

Τα αντικεντρομεριδιακά αυτοαντισώματα αναγνωρίζουν τις κεντρομεριδιακές πρωτεΐνες A, B, C και D με μοριακά βάρη 17kDa, 80kDa, 140kDa και 47kDa αντίστοιχα, οι οποίες εντοπίζονται στα χρωμοσώματα (Shoji, Takagi et al. 1992). Η CENP-B, που αποτελεί το κύριο αυτοαντιγόνο (Earnshaw, Machlin et al. 1987; Shoji, Takagi et al. 1992), είναι πρωτεΐνη που δένει στο DNA και συμμετέχει στο σχηματισμό της κεντρομεριδιακής ετεροχρωματίνης (Earnshaw, Machlin et al. 1987; Masumoto, Nakano et al. 2004).

Αντικεντρομεριδιακά αντισώματα έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με διάφορες ρευματικές διαταραχές όπως το σύνδρομο του CREST, το σύνδρομο Sjogren, η ασθένεια του Reynaud, ρευματοειδής αρθρίτιδα και άλλες ασθένειες μη σχετιζόμενες με τον συνδετικό ιστό (Tan, Rodnan et al. 1980; Lee, Tsay et al. 1993; Miyawaki, Asanuma et al. 2005; Gao, Tian et al. 2008). Επίσης αντικεντρομεριδιακά αντισώματα έχουν αναφερθεί και στο 20-30%, περίπου, ασθενών με PBC (Bernstein, Callender et al. 1982; Makinen, Fritzler et al. 1983;

Parveen, Morshed et al. 1995; Gao, Tian et al. 2008). Τα αντισώματα ACA έχουν συσχετιστεί με τη συνύπαρξη νόσων. Ασθενείς που πάσχουν από PBC και σύνδρομο του CREST παρουσιάζουν αντισώματα ACA, όχι μόνο για την CENPB αλλά και για το CENPC με μοριακό βάρος 140kDa. Επιπλέον στην πλειοψηφία τους παρουσιάζουν αντισώματα έναντι του αντιγόνου PDC-E3 και λιγότερο ως προς το PDC-E1a (Shoji, Takagi et al. 1992).

Η συσχέτιση της παρουσίας των αντικετρομεριδιακών αντισωμάτων με την πορεία της νόσου, έδειξε ότι η παρουσία των συγκεκριμένων αντισωμάτων συσχετίζεται με την πυλαία υπέρταση (Nakamura, Kondo et al. 2007) και την ηπατική ανεπάρκεια (Yang, Yu et al. 2004). Σε μεταγενέστερη μελέτη βρέθηκε ότι το ποσοστό των ACA θετικών ασθενών που εμφανίζει πυλαία υπέρταση είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό των ACA αρνητικών, όμως δεν παρατηρήθηκε μεγάλη διαφοροποίηση των ποσοστών μεταξύ ACA θετικών και ACA αρνητικών όσον αφορά την εμφάνιση ηπατικής ανεπάρκειας (Gao, Tian et al. 2008). Η διαπίστωση αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η παρουσία ACA μπορεί να θεωρηθεί ως προγνωστικός δείκτης μόνο για την εμφάνιση πυλαίας υπέρτασης και όχι για την ηπατική ανεπάρκεια (Gao, Tian et al. 2008).

3.4. Τα αντιπεριπυρηνικά αυτοαντισώματα στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση

Οι πρωτεΐνες που έχουν αναφερθεί ως αυτοαντιγόνα της PBC είναι δύο του πυρηνικού πόρου, η γλυκοπρωτεΐνη gp210 (Wozniak, Bartnik et al. 1989) και η νουκλεοπορίνη p62 (Wesierska-Gadek, Hohenauer et al. 1996), δύο της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, ο LBR (Lassoued, Danon et al. 1991) και οι LAPs (Nesher, Margalit et al. 2001) και οι λαμίνες (Nesher, Margalit et al. 2001). Από αυτές εξειδίκευση στη νόσο παρουσιάζουν η gp210 και ο LBR.

Τα αντισώματα έναντι του πυρηνικού πόρου δίνουν στικτή περιπυρηνική χρώση σε μεσοφασικό κύτταρο, όταν εστιαστεί ο ισημερινός του κυττάρου. Επιπλέον, όταν εστιάζεται η κορυφή του σφαιρικού πυρήνα τότε η επιφάνεια του πυρήνα φαίνεται στικτή. **(Εικόνα 3.4.1.)**

Η συστηματική διερεύνηση των εξειδικευμένων αυτοαντισωμάτων για την PBC έδειξε συσχέτιση της παρουσίας αντιπυρηνικών αντισωμάτων με πιο σοβαρή μορφή της νόσου σε μεγάλο αριθμό ασθενών (Rigoroulou, Davies et al. 2005). Συγκεκριμένα τα αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών του πυρηνικού πόρου συσχετίστηκαν με σοβαρότερη

μορφή της νόσου (Itoh, Ichida et al. 1998; Invernizzi, Podda et al. 2001; Miyachi, Hankins et al. 2003; Muratori, Muratori et al. 2003; Wesierska-Gadek, Klima et al. 2007).

Σε πρόσφατη μελέτη, αναφέρεται ότι οι ασθενείς με αντισώματα, έναντι της πυρηνικής μεμβράνης, παρουσιάζουν δυσμενέστερα ιστολογικά χαρακτηριστικά και είναι συχνότερα κίρρωτικοί από αυτούς που είναι ANA αρνητικοί. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι χρησιμοποιώντας ως δευτερογενές αντίσωμα ολική IgG δεν φανερώθηκε το πραγματικό ποσοστό των ορών με ANA (15% ANA θετικοί με IgG και 65% ANA θετικοί με τη χρήση IgG δευτερογενών αντισωμάτων συγκεκριμένων ισοτύπων). Οι ασθενείς που είχαν αντιπυρηνικά αντισώματα με ανοσοσφαιρίνες ισοτύπου G3, παρουσίαζαν χειρότερη μορφή της νόσου συγκριτικά με ασθενείς που είχαν αντιπυρηνικά αντισώματα, άλλων IgG ισοτύπων (Rigoroulou, Davies et al. 2005). Από τα δεδομένα αυτά διαφαίνεται επίσης ότι τα IgG3 ANA πιθανόν να παίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεια της PBC.

Αντι-LBR

Σε ορούς από ασθενείς με PBC, έχουν βρεθεί αυτοαντισώματα έναντι της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης της πυρηνικής μεμβράνης, LBR (Courvalin, Chaudhary et al. 1990; Worman 2007). Όπως αποδείχτηκε αργότερα τα αντισώματα αυτά αναγνωρίζουν ένα ή περισσότερους επιτόπους στα πρώτα 60 αμινοξέα της πρωτεΐνης (Lin, Noyer et al. 1996; Worman 2007).

Τα αντισώματα αντι-LBR παρουσιάζουν μεγάλη ειδικότητα στην PBC αλλά πολύ μικρή ευαισθησία. Συγκεκριμένα εμφανίζονται στο 1% με 9% των ορών από ασθενείς με PBC και δεν έχουν βρεθεί σε καμία άλλη νόσο (Nickowitz, Wozniak et al. 1994; Bandin, Courvalin et al. 1996; Miyachi, Hankins et al. 2003; Worman 2007).

Αντι-Gp210

Το 1985 έγινε η πρώτη αναφορά για την ύπαρξη αντισωμάτων σε ορούς ασθενών με PBC, που έδιναν περιπυρηνικό φθορισμό (Ruffatti, Arslan et al. 1985; Worman and Courvalin 2003). Στη συνέχεια βρέθηκε ότι τα αυτοαντισώματα αυτά αναγνωρίζουν μία πρωτεΐνη του πυρηνικού πόρου με μοριακό βάρος γύρω στα 200kDa (Lassoued, Guilly et al. 1988; Lozano, Pares et al. 1988; Lassoued, Brenard et al. 1990; Worman and Courvalin 2003). Το 1990 το αντιγόνο ταυτοποιήθηκε και ήταν η gp210 (Courvalin, Chaudhary et al. 1990; Worman and Courvalin 2003).

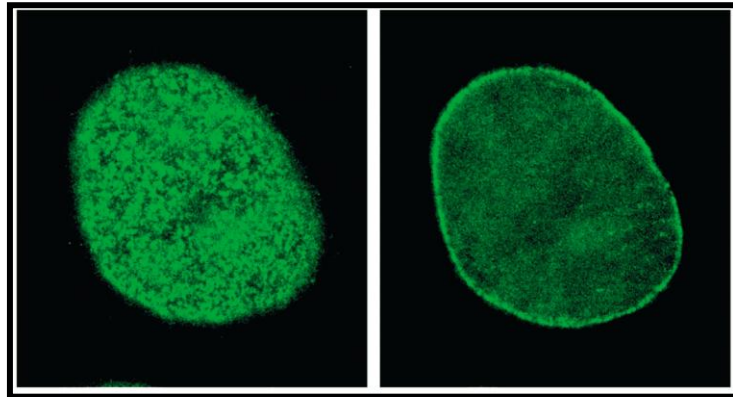
Η δομική πρωτεΐνη των πυρηνικών πόρων, gp210, στα θηλαστικά αποτελείται από το άμινο-τελικό της άκρο (1880 αμινοξέα) που βρίσκεται στο χώρο μεταξύ έξω και έσω

πυρηνικής μεμβράνης και ένα μικρό διαμεμβρανικό κομμάτι μήκους 20 αμινοξέων, που καταλήγει στο καρβόξυ-τελικό της άκρο, μήκους 58 αμινοξέων, το οποίο βρίσκεται στην περιοχή του πόρου (Wozniak, Bartnik et al. 1989; Greber, Senior et al. 1990; Wozniak and Blobel 1992; Worman and Courvalin 2003).

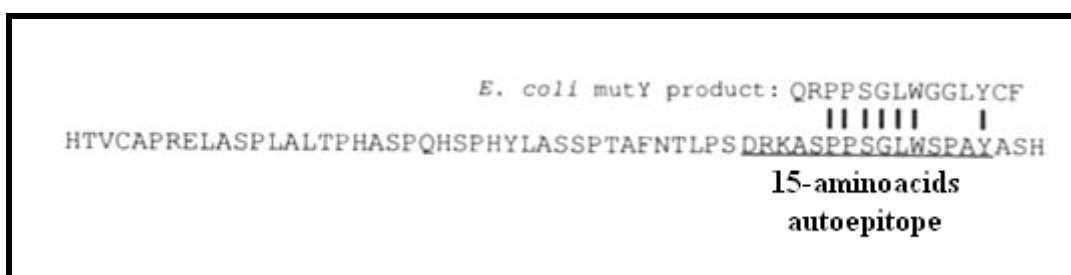
Το άμινο-τελικό άκρο έχει διάφορες τροποποιήσεις που οφείλονται σε γλυκοζυλιώσεις (Gerace, Ottaviano et al. 1982; Wozniak, Bartnik et al. 1989; Greber, Senior et al. 1990; Worman and Courvalin 2003). Το καρβόξυ-τελικό άκρο φωσφορυλιώνεται, πιθανότατα, από την κυκλίνη B- p34 cdc2 κινάση (Favreau, Worman et al. 1996; Worman and Courvalin 2003).

Το πλέον αντιγονικό μέρος της πρωτεΐνης είναι το C-τελικό άκρο (Lozano, Pares et al. 1988; Koizumi, Onozuka et al. 1999). Συγκεκριμένα ο επίτοπος στο καρβόξυ-τελικό άκρο είναι μία αλληλουχία δεκαπέντε αμινοξέων (DRKASPPSGLWSPAY) (Nickowitz and Worman 1993; Miyachi, Hankins et al. 2003; Worman and Courvalin 2003). Η ύπαρξη του επιτόπου αυτού έχει επιβεβαιωθεί με δύο μελέτες όπου χρησιμοποίησαν ELISA με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (Tartakovsky and Worman 1995; Worman and Courvalin 2003), ή πολυπεπτίδιο (Bandin, Courvalin et al. 1996; Worman and Courvalin 2003). Σε άλλη μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε μέρος της gp210, μετά από πέψη με πρωτεάση, βρέθηκε ότι υπάρχουν ασθενείς οι οποίοι έχουν αντισώματα και για το γλυκοζυλιωμένο κομμάτι της, στο άμινο-τελικό άκρο (Wesierska-Gadek, Hohenauer et al. 1995; Wesierska-Gadek, Hohenauer et al. 1996; Worman and Courvalin 2003).

Η αλληλουχία των 15 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο η οποία αποτελεί και τον κύριο αυτοεπίτοπο, έχει βρεθεί να έχει ομολογία με μέρος των πρωτεϊνικών παραγώγων του *E.Coli* (εικόνα 3.4.2) και της *Salmonella typhimurium*. Μία αλληλουχία έξι αμινοξέων ήταν πανομοιότυπη μεταξύ των τριών πρωτεϊνών.



Εικόνα 3.4.1. Χρώση πυρηνικών πόρων χρησιμοποιώντας ορό από ασθενείς με PBC, σε δύο διαφορετικά εστιακά επίπεδα. Στα αριστερά η εστίαση έγινε στην κορυφή του πυρήνα και είναι εμφανής η στικτή επιφάνεια του ενώ στα δεξιά στον ισημερινό του κυττάρου όπου φαίνεται η στικτή περιφέρεια του πυρήνα (Worman and Courvalin 2003).



Εικόνα 3.4.2. Ο κύριος αυτοεπίτοπος της gr210 παρουσιάζει ομολογία αμινοξέων με τα πρωτεϊνικά παράγωγα του *E. Coli*.

Όπως οι αυτοεπίτοποι στα αντιγόνα των μιτοχονδρίων έτσι και ο επίτοπος των 15 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο της gp210 παρουσιάζουν ομολογία με την πρωτεΐνη του *E.Coli*, γλυκοσυλάση της αδενίνης. Οι αλληλουχίες των αυτοεπιτόπων αυτών παρουσιάζουν ομολογία και με πρωτεΐνες του *S. Typhimurium* (Desiraju, Shanabruch et al. 1993; Nickowitz and Worman 1993). Τα πιο πάνω δεδομένα ενισχύουν την υπόθεση της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος με μιμιτισμό, στους ασθενείς με PBC.

Άλλος ένας πιθανός τρόπος με τον οποίο μπορεί να ενεργοποιηθεί η ανοσοαπόκριση είναι η εμφάνιση πολυπεπτιδίων, από το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αυτό συμβαίνει με πεπτίδια αποικοδομημένων πρωτεϊνών που παρουσιάζονται από το κύριο σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας, MHC, τάξεως I (Goldberg and Rock 1992; Nickowitz and Worman 1993).

Τέλος παρατηρήθηκε ότι τα αντιμιτοχονδριακά και αντι-περιπυρηνικά αντισώματα εμφανίζονται ταυτόχρονα σε ασθενείς της PBC. Περαιτέρω μελέτη έδειξε ότι οι επίτοποι των T-λεμφοκυττάρων στο PDC-E2 ένζυμο και την gp210, παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα, πράγμα που εισηγείται ότι τα αντισώματα έναντι των μιτοχονδρίων μπορούν να αναγνωρίσουν και πρωτεΐνες του πυρήνα. Κανένα πεπτίδιο από τις πρωτεΐνες p62, LBR, CENPC δεν παρουσιάζει ομολογία με το PDC-E2. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει την εμφάνιση ανοσοαπόκρισης ταυτόχρονα έναντι στο μιτοχονδριακό ένζυμο PDC-E2 και την γλυκοπρωτεΐνη των πυρηνικών πόρων gp210 (Shimoda, Nakamura et al. 2003).

Σε αντίθεση με αυτό που συμβαίνει με τα PDC-E2 αντιγόνα, οι επίτοποι των T και B λεμφοκυττάρων βρίσκονται σε διαφορετικές περιοχές, στην gp210. Ο κύριος αυτοεπίτοπος για τα B λεμφοκύτταρα είναι μία περιοχή περιορισμού μεταξύ των αμινοξέων 1869 και 1883, η οποία βρίσκεται στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (Nickowitz and Worman 1993; Shimoda, Nakamura et al. 2003). Ο επίτοπος των CD4 T λεμφοκυττάρων βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 188-201 γεγονός που δείχνει ότι οι επίτοποι των B και T λεμφοκυττάρων στην gp210 πρωτεΐνη βρίσκονται σε αντίθετες περιοχές. Δύο κλώνοι T λεμφοκυττάρων που επιλέχθηκαν από ανασυνδυασμένη gp210 δεν αναγνώριζαν το πεπτίδιο 188-201, που υποδεικνύει πιθανώς την ύπαρξη κι άλλων αυτοεπιτόπων για τα CD4 T-λεμφοκύτταρα (Nickowitz and Worman 1993; Shimoda, Nakamura et al. 2003).

Το ποσοστό των ασθενών, με διαγνωσμένη PBC, στο οποίο ανιχνεύθηκαν αντι-gp210 αντισώματα, κυμαινόταν μεταξύ 9,5%-41% (με μέσο όρο 25%) (Lozano, Pares et al. 1988; Lassoued, Brenard et al. 1990; Nickowitz, Wozniak et al. 1994; Wesierska-Gadek, Hohenauer et al. 1995; Bandin, Courvalin et al. 1996; Mattalia, Luttig et al. 1997; Worman and Courvalin 2003).

Αντι-gr210 αντισώματα, γενικά, συνεχίζουν να υπάρχουν και μετά από ορθοτοπική μεταμόσχευση ήπατος, παρόλο που δεν υπάρχουν ιστολογικά στοιχεία της ασθένειας (Mattalia, Luttig et al. 1997; Dubel, Farges et al. 1998; Luettig, Boeker et al. 1998; Worman and Courvalin 2003).

Η εξειδίκευση που παρουσιάζουν τα αντισώματα αντι-gr210 για την PBC, είναι μεγαλύτερη από 99% (Nesher, Margalit et al. 2001; Worman and Courvalin 2003; Bauer and Habior 2007; Muratori, Granito et al. 2008). Σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις αντι-gr210 αντισώματα έχουν βρεθεί στην αυτοάνοση ηπατίτιδα, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, τη πολυμυοσίτιδα και το σύνδρομο Sjogren (Dagenais, Bibor-Hardy et al. 1988; Konstantinov, Foisner et al. 1995; Bandin, Courvalin et al. 1996; Nesher, Margalit et al. 2001). Ως εκ τούτου, σε περιπτώσεις όπου τα AMA έχουν πολύ χαμηλό τίτλο ή δεν υπάρχουν καθόλου, τα αντι-gr210 αντισώματα χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση της διάγνωσης της ασθένειας.

Οι ασθενείς με αντισώματα έναντι της gr210 παρουσιάζουν παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο, έχουν υψηλότερα, αν και διαφορετικά, επίπεδα αντισωμάτων IgM. (Nakamura, Shimizu-Yoshida et al. 2005).

Η σημασία του τίτλου των αντισωμάτων αντι-gr210 διερευνήθηκε σε μελέτη, που έγινε από τους Nakamura et al., συγκρίνοντας την εξέλιξη της νόσου μεταξύ ασθενών με υψηλού τίτλου αντι-gr210 αντισώματα και ασθενών των οποίων ο τίτλος των αντίστοιχων αντισωμάτων ελαττώθηκε σε κανονικά ή χαμηλά επίπεδα μετά από έξι μήνες χρήσης του UDCA. Κατά τη διάρκεια των 10 χρόνων της παρακολούθησης των ασθενών, στο 78,9% και στο 6,8% των ασθενών με υψηλό τίτλο και χωρίς αντι-gr210 αντισώματα, αντίστοιχα, έγινε μεταμόσχευση ή επήλθε θάνατος, γεγονός που δεν συνέβη σε κανένα από τους ασθενείς των οποίων ο τίτλος των αντι-gr210 αντισωμάτων ελαττώθηκε. Τέλος το ποσοστό των ασθενών που κατέληξε σε ηπατική ανεπάρκεια ή θάνατο ήταν σημαντικά υψηλότερο στους αντι-gr210 θετικούς συγκριτικά με τους αντι-gr210 αρνητικούς ασθενείς (Nakamura, Shimizu-Yoshida et al. 2005). Τα αντισώματα των οποίων ο τίτλος ελαττώθηκε είχαν επίτοπο στο C-τελικό άκρο. Ο τίτλος έφτασε σε μεσαία ή χαμηλά επίπεδα 6 μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας (Nakamura, Shimizu-Yoshida et al. 2005). Οι ασθενείς αυτοί κατά τη στιγμή της διάγνωσης παρουσίαζαν πολύ χαμηλότερα επίπεδα χολερυθρίνης και AST ενζύμου συγκριτικά με τους ασθενείς των οποίων ο τίτλος των αντι-gr210 αντισωμάτων παρέμεινε υψηλός. Συμπερασματικά η μελέτη αυτή έδειξε ότι ασθενείς με υψηλού τίτλου αντι-gr210 αντισώματα κατά τη στιγμή της διάγνωσης έχουν χειρότερη πρόγνωση από αυτούς των οποίων ο τίτλος, για τα αντίστοιχα αντισώματα, είναι χαμηλός.

Σε γενικές γραμμές τα αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης gp210 απαντούνται στο 30% περίπου των ασθενών με PBC. Παρουσιάζουν μεγάλη, σχεδόν αποκλειστική, εξειδίκευση για την ασθένεια, γεγονός που τα καθιστά δείκτες στη διάγνωση της.

p62

Οι οροί από ασθενείς με PBC σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης αναγνώριζαν πρωτεΐνη στα 60kDa περίπου, η οποία εικάζόταν ότι ήταν η νουκλεοπορίνη p62 (Wesierska-Gadek, Hohenauer et al. 1996) Η πρωτεΐνη αυτή απομονώθηκε με χρωματογραφία αγκιστείας, WGA (wheat-germ- agglutinin) (D'Onofrio, Starr et al. 1988) και διαπιστώθηκε ότι οι οροί την αναγνώριζαν. Αντι-p62 αντισώματα έχουν αναφερθεί σε ποσοστό 23-32% των ασθενών με PBC (Miyachi, Shibata et al. 1996; Wesierska-Gadek, Hohenauer et al. 1996; Invernizzi, Podda et al. 2001; Miyachi, Hankins et al. 2003; Enarson, Rattner et al. 2004), και σε ποσοστό 13% ασθενών με σύνδρομο Sjogren (Miyachi, Shibata et al. 1996; Miyachi, Hankins et al. 2003; Enarson, Rattner et al. 2004). Σε μελέτη όπου η ταυτοποίηση της p62 βασίστηκε στην ιδιότητα της να συνδέεται σε λεκτίνη (η οποία ιδιότητα χρησιμοποιήθηκε και για την απομόνωσή της), βρέθηκε θετικό ποσοστό 13% των ασθενών (Miyachi, Hankins et al. 2003).

Με αυτόν όμως τον τρόπο απομόνωσης, διάφορες πρωτεΐνες του πυρηνικού πόρου που έχουν παρόμοια δομή μπορούν να συναπομονωθούν. Έτσι η ταυτότητα του αυτοαντιγόνου στα 60kDa έγινε γνωστή όταν χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένη p62 πρωτεΐνη από ανθρώπινο γενετικό υλικό σημασμένη με S³⁵ (Wesierska-Gadek, Penner et al. 2006; Wesierska-Gadek, Klima et al. 2007). Οι οροί ασθενών με PBC, αναγνώρισαν την ανασυνδυασμένη p62 τόσο σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης όσο και σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Το ποσοστό των ορών, που αναγνώρισαν την ανασυνδυασμένη p62, είναι 55%. Εκτός από την ανασυνδυασμένη p62 από ανθρώπινο γενετικό υλικό οι οροί από ασθενείς με PBC αναγνωρίζουν την ανασυνδυασμένη p62 και από γενετικό υλικό αρουραίου εκφρασμένη σε κύτταρα εντόμου Sf9 τα οποία παράγουν την τροποποιημένη από το GlcNAc πρωτεΐνη (Wesierska-Gadek, Klima et al. 2007). Η αναγνώριση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και των δύο ειδών σημαίνει ότι ο αυτοεπίτοπος/οι βρίσκονται στις συντηρημένες περιοχές της νουκλεοπορίνης. Μεγάλη ομολογία εμφανίζεται μεταξύ της ανθρώπινης DNA αλληλουχίας με την αντίστοιχη του αρουραίου (Wesierska-Gadek, Klima et al. 2007). Σε αντίθεση με τις πιο πάνω μελέτες οι Ou et al. δεν βρήκαν κανένα ορό που να έχει αντι-p62 αντισώματα. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ραδιενεργά σημασμένη p62, η

οποία παράχθηκε από ολόκληρο cDNA.(Enarson, Rattner et al. 2004; Ou, Enarson et al. 2004).

4. Σκοπός της Διατριβής

Όπως φαίνεται από το εισαγωγικό τμήμα, αρκετές πρωτεΐνες αποτελούν στόχο αντισωμάτων σε ορούς ασθενών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση. Εκτός των αντι-μιτοχονδριακών αντισωμάτων την ασθένεια χαρακτηρίζουν επίσης αντισώματα για πρωτεΐνες που βρίσκονται στον πυρήνα και κυρίως στον πυρηνικό φάκελο. Ορισμένα από τα αντιπυρηνικά αντισώματα που ανιχνεύονται στον ορό παρουσιάζουν μεγάλη ειδικότητα, όμως η συχνότητα εμφάνισής τους ποικίλει σημαντικά μεταξύ των δημοσιευμένων μελετών. Επίσης, δημοσιευμένα αποτελέσματα υποδεικνύουν την ύπαρξη αντισωμάτων για μη-χαρακτηρισμένα αυτοαντιγόνα. Σκοπός της διδακτορικής αυτής διατριβής ήταν α) να προσδιοριστεί με μεγάλη ακρίβεια η συχνότητα εμφάνισης αντιπυρηνικών αντισωμάτων και β) να ανιχνευθούν και να ταυτοποιηθούν, οι πρωτεΐνες κυρίως του πυρηνικού φακέλου, οι οποίες είναι στόχοι αυτοαντισωμάτων σε ορούς ασθενών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση. Για τον σκοπό αυτό α) εδραιώσαμε αρχικά μια μεθοδολογία ανίχνευσης των αντισωμάτων με έμμεσο ανοσοφθορισμό και ταυτοποίησης αυτοαντισωμάτων για συγκεκριμένα αντιγόνα του πυρηνικού φακέλου με βιοχημικές και ανοσοχημικές προσεγγίσεις, χρησιμοποιώντας νέα υποστρώματα και υλικά και β) προσδιόρισαμε τη συχνότητα εμφάνισης αυτοαντισωμάτων για αντιγόνα του πυρήνα και του πυρηνικού φακέλου σε 103 ορούς ασθενών με PBC, σε μία από τις μεγαλύτερες σειρές ασθενών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Υλικά

Όλα τα κοινά αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και δεν αναφέρονται ήταν αναλυτικής καθαρότητας και προέρχονται από τις εταιρείες Merck (Darmstadt, Germany), Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), Biorad (Palo Alto, CA, USA), Fluka (Switzerland) και Riedel del Haen (Switzerland).

Οι οροί που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από ασθενείς με διαγνωσμένη PBC και παρακολουθούνται στην Κλινική Γαστροεντερολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

Οι κυτταρικές σειρές HeLa και HepG2 προέρχονται από την ATCC (American Type Culture Collection), ενώ τα κύτταρα Ishikawa ήταν ευγενική προσφορά του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν. Κρήτης (Καθ. Α. Γραβάνης). Η προμήθεια των θρεπτικών υλικών, ορού εμβρύου βοός (FBS), πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης και θρυψίνης έγινε από την εταιρεία Gibco-BRL Co, MD, USA.

Για πειράματα ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιήθηκαν πυρήνες και πυρηνικοί φάκελοι από ηπατοκύτταρα αρουραίων, τα οποία απομονώθηκαν από ήπαρ υγιών αρουραίων του ζωοτροφείου του πανεπιστημίου Κρήτης.

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης και έμμεσου ανοσοφθορισμού είναι:

- Αυτοάνοσοι οροί ασθενών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση, Human (Κλινική Γαστροεντερολογίας, Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου)
- Anti-gp210, rabbit polyclonal, Abcam Inc., Cambridge
- Anti-p62, mouse monoclonal, BD Transduction
- Anti-nuclear pore complex proteins 414, mouse monoclonal, Covance, California
- Anti-lamin B, rabbit polyclonal, (Theodoropoulos, Polioudaki et al. 1999)
- Anti-LBR, rabbit polyclonal, (Makatsori, Kourmouli et al. 2004)

Στην ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα δευτερογενή αντισώματα:

- Anti-human IgG, Horseradish Peroxidase, GE Healthcare, UK
- Anti-human IgM, Horseradish Peroxidase, Southern Biotech, USA
- Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase GE Healthcare, UK
- Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase, GE Healthcare, UK

Στα πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα δευτερογενή αντισώματα:

- Anti-human FITC, IgG, INOVA Diagnostics, USA
- Anti-human FITC, IgM, DAKO, Denmark

Για πειράματα ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν και παρασκευάσματα κυττάρων Hep2 της INOVA Diagnostics (San Diego, CA).

Στα πειράματα ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσροφητικής μέτρησης (ELISA) χρησιμοποιήθηκαν τα QUANTA Lite™ gp210 kit για την γλυκοπρωτεΐνη gp210 και QUANTA Lite™ sp100 kit για την πρωτεΐνη sp100 των PML σωματιδίων των πόρων. Χρησιμοποιήθηκε επίσης το IMTEC-LIVER PROFILE S ELISA kit, το οποίο ανιχνεύει διάφορα αυτοαντισώματα παράλληλα (LKM1, AMA-M2, sp100, gp210, LBR και SLA).

Για τη διερεύνηση της ύπαρξης αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων στους ορούς χρησιμοποιήθηκε το Mitochondria Dot kit το οποίο ανιχνεύει τα αυτοαντισώματα τόσο G όσο και M τάξης των M2 αντιγόνων (OGDC-E2, BCOADC-2, PDC-E2).

2. Μέθοδοι

2.1. Κυτταροκαλλιέργειες

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές HeLa (ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα από αδενοκαρκίνωμα τραχήλου μήτρας) και HepG2 (ανθρώπινο ηπατοκυτταρό καρκίνωμα). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλαστικά τρυβλία Petri 100mm στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ανανεωνόταν κάθε 48 ή 72 ώρες.

Ως βασικό μέσο καλλιέργειας για τα HeLa χρησιμοποιήθηκε το Dulbecco's MEM (4500mg/L γλυκόζη, L-γλουταμίνη) που είναι εμπλουτισμένο με 10% v/v αδρανοποιημένο (56°C για 30 λεπτά) FBS (Fetal Bovine Serum), 1% v/v πυροσταφυλικό νάτριο, 1% v/v μείγμα πενικιλίνης/ στρεπτομυκίνης και τα HepG2 σε Dulbecco's MEM-Ham's F12 (1X medium, stable γλουταμίνη), το οποίο περιείχε 10% v/v αδρανοποιημένο (56°C για 30 λεπτά) FBS, 1% v/v πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Για τα Ishikawa το μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε είναι το MEM εμπλουτισμένο με 10% v/v αδρανοποιημένο (56°C για 30 λεπτά) FBS, 1% v/v πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη.

Όταν τα κύτταρα έφταναν σε πλήρη ανάπτυξη, προκειμένου να ανακαλλιεργηθούν, αποκολλούνταν από τα τρυβλία μετά από επώαση με διάλυμα θρυψίνης-EDTA για 3 λεπτά στους 37°C. Η θρυψίνη αδρανοποιείται προσθέτοντας ίσο όγκο θρεπτικού με ορό και απομακρύνεται με φυγοκέντρηση στις 1400 στροφές το λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (φυγόκεντρος Kubota 2100). Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού καλλιέργειας και μοιράζονται σε νέα τρυβλία για να επανακαλλιεργηθούν.

2.2. Απομόνωση πυρήνων

2.2.1. Διαδικασία απομόνωσης πυρήνων από HepG2 κύτταρα

Κύτταρα από 30 τρυβλία Petri διαμέτρου 100mm, συγκεντρώθηκαν σε 50mL θρεπτικού Dulbecco's MEM (4500mg/L γλυκόζη, L-γλουταμίνη) που περιείχε 10% v/v FBS (Fetal Bovine Serum), 1% v/v πυροσταφυλικό νάτριο, 1% v/v πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Στη συνέχεια προστεθήκαν 20mM κυτοχλασίνης και τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C για 45 λεπτά με ανάδευση κατά διαστήματα. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στα 300g για 5 λεπτά και το ίζημα πλύθηκε 3 φορές με PBS 1X, 1mM PMSF.

Μετά το τέλος των πλύσεων το ίζημα διαλύθηκε σε 30mL διαλύματος H (10mM Tris-HCl pH 7,5, 2mM MgCl₂, 0,1mM EGTA, 1mM PMSF, 1mM DTT, 1μL/mL αναστολείς

πρωτεασών) και παρέμεινε υπό ανάδευση στους 4°C για 30 λεπτά. Ακολούθησε επανάληψη της διαδικασίας της λύσης των κυττάρων με ενδιάμεση φυγοκέντρηση στα 1000g για 10 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 30mL διαλύματος H κι επώαστηκε στους 4°C για 30 λεπτά.

Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ομογενοποιητή Dounce. Η εξακρίβωση της κυτταρικής λύσης τους διαπιστώθηκε ελέγχοντας μικρή ποσότητα σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Το ομογενοποίημα πέρασε από σύριγγα, για να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα που σχηματίστηκαν και φυγοκεντρήθηκε στα 1000g για 10 λεπτά στους 4°C.

Το ίζημα διαλύθηκε σε 12mL διαλύματος B (1,2M σακχαρόζη, 25mM KCl, 50mM Tris-HCl pH 7,5, 5mM MgCl₂, 0,5mM PMSF, 0,5mM DTT, 1μL/mL αναστολείς πρωτεασών) και φυγοκεντρήθηκε πάνω από στρώμα διαλύματος σακχαρόζης (2M σακχαρόζη, 25mM KCl, 50mM Tris-HCl pH 7,5, 5mM MgCl₂, 0,5mM PMSF, 0,5mM DTT, 1μL/mL αναστολείς πρωτεασών) στις 30000 στροφές το λεπτό για 2 ώρες στους 4°C (φυγόκεντρος Sorval, κεφαλή TH-641).

Ακολούθησε διάλυση του ιζήματος σε μικρή ποσότητα διαλύματος B και φυγοκέντρηση στα 1500g για 10 λεπτά στους 4°C και καταψύχθηκαν σε 50% γλυκερόλη / PBS 1X στους -80°C.

Η ποσότητα των πυρήνων που απομονώθηκαν είναι ανάλογη της ποσότητας του DNA. Ο προσδιορισμός του DNA στηρίζεται στην ιδιότητα των βάσεων των νουκλεοτιδίων να απορροφούν στο υπεριώδες φως. Η οπτική πυκνότητα αραιωμένου διαλύματος (1:1000 εναιωρημένων πυρήνων) μετράται σε μήκος κύματος 260 nm (OD₂₆₀). Όταν η οπτική πυκνότητα (OD₂₆₀) είναι 1 τότε στο διάλυμα βρίσκονται 3×10^6 πυρήνες και αυτό ορίζεται ως μία μονάδα πυρήνων.

2.2.2. Διαδικασία απομόνωσης πυρήνων από ηπατοκύτταρα αρουραίων

Οι πυρήνες από ηπατοκύτταρα αρουραίων απομονώθηκαν ακολουθώντας την διαδικασία που περιγράφηκε από τους Blobel and Potter, κατά την οποία οι πυρήνες ιζηματοποιούνται περνώντας μέσα από στρώμα διαλύματος σουκρόζης. Η σύσταση του διαλύματος αυτού είναι τέτοια ούτως ώστε να επιτρέπει μόνο στους πυρήνες να το διαπεράσουν αφήνοντας το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια να επιπλέουν στο διάλυμα (Blobel and Potter 1966; Matunis 2006).

Κατά τη διαδικασία αυτή απομονώθηκε ήπαρ από δέκα νεαρούς αρουραίους και τοποθετήθηκε σε παγωμένο PBS. Στη συνέχεια, αφού ζυγίστηκε, ο ηπατικός ιστός

μεταφέρθηκε στο ψυχρό θάλαμο (cold room) όπου και τεμαχίστηκε. Ακολούθησε μηχανική ομογενοποίηση σε ίσο όγκο διαλύματος 0,25M steak (0,25M σακχαρόζη, 12,5mM KCl, 50mM Tris-HCl pH 7,5, 5mM MgCl₂, 0,5mM DTT, 1mM PMSF, αναστολείς πρωτεασών 1μL ανά mL). Το ομογενοποίημα πέρασε από φίλτρο για την απομάκρυνση τεμαχίων ιστού και φυγοκεντρήθηκε στις 2500 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Sorval, κεφαλή SS-34). Το σχηματιζόμενο ίζημα διαλύθηκε σε όγκο διαλύματος 2,3M steak (2,3M σακχαρόζη, 12,5mM KCl, 50mM Tris-HCl pH 7,5, 5mM MgCl₂, 0,5mM DTT, 1mM PMSF, αναστολείς πρωτεασών 1μL ανά mL) ίσο με τα 2/3 του αρχικού βάρους, κι αφού ομογενοποιήθηκε προστέθηκε διπλάσιος όγκος διαλύματος 2,3M steak. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε πάνω από στρώμα 5mL διαλύματος 2,3M steak στις 25000 στροφές το λεπτό για μία ώρα (φυγόκεντρος Sorval, κεφαλή AH 629).

Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε ενώ το ίζημα διαλύθηκε σε μικρή ποσότητα διαλύματος 0,25M steak, κι ακολούθησε προσδιορισμός της απόδοσης του σε πυρήνες, με βάση την ποσότητα του DNA. Τέλος οι πυρήνες φυγοκεντρήθηκαν στις 2500 στροφές ανά λεπτό κι αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο καταψύχθηκαν στους -80°C. Ο προσδιορισμός του DNA έγινε όπως περιγράφηκε και πιο πάνω.

2.3. Απομόνωση πυρηνικών φακέλων από πυρήνες ηπατοκυττάρων αρουραίων

Για την απομόνωση των πυρηνικών φακέλων ακολουθήθηκε διαδικασία που βασίζεται σε αυτήν που περιέγραψαν οι Dwyer και Blobel (Dwyer and Blobel 1976) Οι κατεψυγμένοι πυρήνες διαλύθηκαν σε διάλυμα A (0,1mM MgCl₂, 1mM DTT, 1μL/mL αναστολείς πρωτεασών) με όγκο αντίστοιχο των units (1mL /100units). Στη συνέχεια προστέθηκαν 4mL ανά 100units διαλύματος B (10%w/v σακχαρόζη, 20mM Tris-HCl pH8,5, 0,1mM MgCl₂, 1mM DTT, 1μL/mL αναστολείς πρωτεασών). Στο μείγμα προστέθηκαν 10μg /mL RNase και 10μg/mL DNase κι αφέθηκε υπό ανάδευση για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρωση πάνω από στρώμα διαλύματος σακχαρόζης (30% σακχαρόζη, 20mM Tris-HCl pH7,5, 0,1mM MgCl₂, 1mM DTT, 1μL/mL αναστολείς πρωτεασών) στις 10000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Sorval, κεφαλή SS-34).

Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1,2mL ανά 100units διαλύματος C (10%w/v σακχαρόζη, 20mM Tris-HCl pH7,5, 0,1mM MgCl₂, 1mM DTT, 1μL/mL αναστολείς πρωτεασών). Η πέψη επαναλήφθηκε με την προσθήκη 10μg /mL

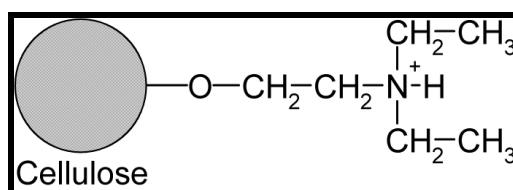
RNase και 10μg/mL DNase. Ακολούθησε φυγοκέντρωση πάνω από στρώμα διαλύματος σακχαρόζης (30% σακχαρόζη, 20mM Tris-HCl pH7,5, 0,1mM MgCl₂, 1mM DTT, 1μL/mL αναστολείς πρωτεασών) στις 10000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Sorval, κεφαλή SS-34).

Αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1mL ανά 100units διαλύματος C και προστέθηκε 0,1mg/mL ηπαρίνης, για την απομάκρυνση της χρωματίνης (Matunis 2006). Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στις 10000 στροφές ανά λεπτό στους 4°C πάνω από στρώμα διαλύματος σακχαρόζης (30% σακχαρόζη, 20mM Tris-HCl pH7,5, 0,1mM MgCl₂, 1mM DTT, 1μL/mL αναστολείς πρωτεασών). Το ίζημα διαλύθηκε σε διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης άλατος (2M KCl, 50mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM DTT, 1mM PMSF) και φυγοκεντρήθηκε στις 10000 στροφές ανά λεπτό για 30 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Sorval, κεφαλή SS-34). Τέλος το ίζημα διαλύθηκε σε παγωμένο νερό και φυγοκεντρήθηκε στις 15000 στροφές το λεπτό για 30 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Eppendorf). Οι πυρηνικοί φάκελοι (ίζημα) καταψύχθηκαν στους -80°C.

2.4. Καθαρισμός πρωτεϊνών

2.4.1. Καθαρισμός λαμινών από πυρηνικούς φακέλους ηπατοκυττάρων αρουραίων

Ο καθαρισμός των λαμινών έγινε από εκχύλισμα πυρηνικών φακέλων ηπατοκυττάρων αρουραίων με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Στην ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε η θετικά φορτισμένη ρητίνη δι-αιθυλ-αμινο-αιθυλοκυτταρίνη. Οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες δεσμεύθηκαν στη ρητίνη και εκλούστηκαν με διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης άλατος. Συγκεκριμένα για τον καθαρισμό των λαμινών χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη DE52 (Whatman), με την οποία επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός της λαμίνης B από τις λαμίνες A και C.



Εικόνα 2.4.1.1. Μόριο δι-αιθυλ-αμινο-αιθυλο κυτταρίνης.

2.4.1.1. Προετοιμασία εκχύλισματος πυρηνικών φακέλων ηπατοκυττάρων αρουραίων

Στο διάλυμα εκχύλισης το κύριο συστατικό ήταν η ουρία, που διασπά τους μη ομοιοπολικούς δεσμούς των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την διαλυτοποίησή τους. Μετά την υπερφυγοκέντρωση, που ακολούθησε, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες παρέμειναν στο ίζημα, ενώ οι λαμίνες, οι πυρηνικοί πόροι κι όσες πρωτεΐνες είναι συνδεδεμένες μαζί τους, βρέθηκαν στο υπερκείμενο.

Η εκχύλιση έγινε με διάλυμα ουρίας (8M Ουρία, 10mM Tris-HCl pH7,5, 0,5mM PMSF, 1mM EDTA, 1mM DTT) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια το εκχύλισμα υπερφυγοκεντρήθηκε στις 40000 στροφές το λεπτό για 30 λεπτά στους 18°C (φυγόκεντρος Beckman, κεφαλή 70.1 Ti). Τέλος το DTT απομακρύνθηκε με διαπίδυση σε διάλυμα ουρίας χωρίς DTT .

2.4.1.2. Χρωματογραφία ιοντικοανταλλαγής DE52

Αρχικά, στη ρητίνη, έγιναν 2 πλύσεις των 10 λεπτών με ίσο όγκο διαλύματος 1M Tris-HCl pH 7,5, υπό ανακίνηση, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν άλλες 2 πλύσεις των 10 λεπτών με ρυθμιστικό διάλυμα 100mM Tris-HCl pH7,5, στις ίδιες συνθήκες. Τέλος αφού έγινε άλλη μια πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Tris-HCl pH7,5, η ρητίνη αφέθηκε με το ρυθμιστικό διάλυμα για μία ώρα, υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου, για την εξισορρόπηση του pH.

Η εξισορροπημένη ρητίνη τοποθετήθηκε στη στήλη με μεγάλη προσοχή για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων. Αφού πέρασε το ρυθμιστικό διάλυμα, προστέθηκε το εκχύλισμα ουρίας, που πέρασε μέσα από τη ρητίνη με τη βοήθεια της βαρύτητας. Με αυτό τον τρόπο οι αρνητικά φορτισμένες λαμίνες δεσμεύθηκαν στην θετικά φορτισμένη ρητίνη. Το υπόλοιπο εκχύλισμα ουρίας καταψύχθηκε στους -80°C.

Στη συνέχεια ακολούθησαν πλύσεις της ρητίνης με το διάλυμα ουρίας (8M Ουρία, 10mM Tris-HCl pH7,5, 0,5mM PMSF, 1mM EDTA, 1mM DTT). Το πιο πάνω διάλυμα αποθηκεύθηκε επίσης στους -80°C.

Η έκλουση των λαμινών έγινε με διάλυμα ουρίας, διαβαθμισμένης συγκεντρώσεως άλατος (0-200mM NaCl, 8M Ουρία, 10mM Tris-HCl pH7,5, 0,5mM PMSF, 1mM EDTA, 1mM DTT). Το διάλυμα έκλουσης συλλέχθηκε σε κλάσματα. Τέλος για την αποδέσμευση όλων των πρωτεϊνών, η ρητίνη πλύθηκε με διάλυμα ουρίας που περιείχε 500 mM NaCl. Το διάλυμα αποθηκεύθηκε στους -80°C.

2.4.2. Απομόνωση χυμιαϊκών πρωτεϊνών από βακτήρια

Για την παραγωγή και την απομόνωση χυμιαϊκών GST-πρωτεϊνών ακολουθήθηκε η μέθοδος των Smith and Johnson (1988) (Smith and Johnson 1988). Βακτηριακή καλλιέργεια (100ml) του στελέχους των *E. Coli*, BL21(DE3) επώαστηκε στους 37 °C για 16 ώρες. Το θρεπτικό υγρό καλλιέργειας (LB) που χρησιμοποιήθηκε περιέχει 1% w/v τρυπτόνη, 0.5% w/v εκχύλισμα μαγιάς, 1% w/v NaCl και 50μg/ml αμπικιλίνη. Στη συνέχεια η καλλιέργεια αραιώθηκε σε όγκο 750ml και επώαστηκε στους 37 °C έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600nm φτάσει την τιμή 0,7. Η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης έγινε με 0,1mM IPTG (isopropyl β-D-Thiogalacto-pyranoside) στους 30 °C για 3 ώρες. Στη συνέχεια η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 5000 στροφές ανά λεπτό (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SLA-3000) για 10 λεπτά στους 4 °C. Τα βακτήρια λύθηκαν σε 5ml διαλύματος MTPBS (1X PBS, 1.3mM PMSF, 0.1mM μερκαπτοαιθανόλη) με χρήση υπερήχων (3 x 10sec). Ακολούθησε προσθήκη 1% Triton X-100 και φυγοκέντρωση στις 10000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4 °C (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34). Στη συνέχεια το υπερκείμενο επώαστηκε με σφαιρίδια γλουταθειόνης (GST-beads, Glutathione Sepharose 4B, Amersham) για 30 λεπτά στους 4 °C. Τα σφαιρίδια γλουταθειόνης προηγουμένως είχαν εξισορροπηθεί με διάλυμα MTPBS, 1% Triton X-100. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, τα σφαιρίδια, πλύθηκαν με το ίδιο διάλυμα (30ml) και ακολούθησε έκλυση της πρωτεΐνης με διάλυμα 10mM ανηγμένης γλουταθειόνης, 50mM Tris-HCl pH 8,0.

2.5. Ανοσοκατακρήμνιση

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ανοσοκατακρήμνιση των αυτοαντιγόνων διαφέρει ανάλογα με το είδος του αντισώματος. Τα μονοκλωνικά αντισώματα προεπώαστηκαν με το εκχύλισμα και μετά προστέθηκαν τα σφαιρίδια G πρωτεΐνης-σεφαρόζης. Σε αντίθεση, τα πολυκλωνικά αντισώματα πρώτα επώαστηκαν με τα σφαιρίδια G πρωτεΐνης-σεφαρόζης. Με τη βοήθεια του διμεθυλο-πιμελιμιδο-διχλωριδίου σχηματίστηκαν ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ αντισώματος και G πρωτεΐνης και στη συνέχεια τα δεσμευμένα με τη G πρωτεΐνη, των σφαιριδίων, αντισώματα, επώαστηκαν με το εκχύλισμα. Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι το αντίσωμα για την p62 και το αντίσωμα 414 που αναγνωρίζει την p62 και τις πρωτεΐνες του πυρηνικού πόρου με FXFG αλληλουχίες (nup358,nup214,nup153,nup54). Πολυκλωνικά είναι τα αντισώματα που περιέχονται στους ορούς των ασθενών με αυτοάνοση πρωτοπαθή χολική κίρρωση.

2.5.1. Εκχύλιση πρωτεϊνών των πυρηνικών πόρων από πυρηνικούς φακέλους ηπατοκυττάρων αρουραίων

Η εκχύλιση των πρωτεϊνών έγινε από πυρηνικούς φακέλους ηπατοκυττάρων, με διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης άλατος και απορρυπαντικού. Για την εκχύλιση της p62 χρησιμοποιήθηκε το απορρυπαντικό Empigen, ενώ για την εκχύλιση της gp210 καθώς και των άγνωστων αυτοαντιγόνων το μη ιονικό απορρυπαντικό Triton. Το Empigen έχει ιδιότητες τόσο ιονικών όσο και μη ιονικών απορρυπαντικών. Έτσι διασπά τους δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών, ιδιότητα των ιονικών απορρυπαντικών, χωρίς να προσδίδει αγωγιμότητα και ηλεκτροφορητική κινητικότητα, που είναι χαρακτηριστικό των μη ιονικών απορρυπαντικών.

Για την εκχύλιση της p62 οι πυρηνικοί φάκελοι ηπατοκυττάρων αρουραίου επώαστηκαν με διάλυμα S1 (0,3% Empigen (Fluka), 40mM Tris-HCl pH 7,5, 300mM NaCl, 10% σακχαρόζη, 1mM EGTA, 2mM MgCl₂, 1mM PMSF, αναστολείς πρωτεϊνών) για μία ώρα στον πάγο, αφού πρώτα ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση υπερήχων. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στα 15000g για 15 λεπτά στους 4°C, ούτως ώστε να απομακρυνθούν από το εκχύλισμα τα μη διαλυτά σωματίδια.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την εκχύλιση της gp210, χρησιμοποιώντας το διάλυμα S2 (2% Triton, 20mM Tris-HCl pH7,5, 300mM NaCl, 10% σακχαρόζη, 1mM EGTA, 2mM MgCl₂, 1mM PMSF, αναστολείς πρωτεϊνών).

2.5.2. Ανοσοκατακρήμνιση αυτοαντιγόνων με τη χρήση αντισωμάτων

Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ανοσοκατακρήμνιση με μονοκλωνικά αντισώματα είναι η εξής:

Το εκχύλισμα από πυρηνικούς φακέλους ηπατοκυττάρων αρουραίων για την p62 επώαστηκε με σφαιρίδια G πρωτεΐνης-σεφαρόζης, τα οποία προεπώαστηκαν με διάλυμα 1% φιλτραρισμένης ζελατίνης δέρματος ψαριού σε 1X PBS, για 1 ώρα στους 4°C. Με την επώαση αυτή αποτράπηκε η μη ειδική επικάθηση πρωτεϊνών στα σφαιρίδια. Στη συνέχεια το εκχύλισμα επώαστηκε με τον ορό, υπό ανακίνηση, για όλο το βράδυ στους 4°C. Την επόμενη μέρα προστέθηκαν σφαιρίδια G πρωτεΐνης-Σεφαρόζης, προεπωασμένα με διάλυμα 1% φιλτραρισμένης ζελατίνης δέρματος ψαριού σε 1X PBS, και επώαστηκαν υπό ανάδευση για μιάμιση ώρα στους 4°C. Μετά το τέλος της επώασης το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα σφαιρίδια με το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου πλύθηκαν με το διάλυμα S1. Τέλος τα

σύμπλοκα αντισώματος- αντιγόνου απομακρύνθηκαν από τα σφαιρίδια με τη βοήθεια αποδιατακτικού διαλύματος (Laemli Buffer) και θέρμανση στους 100°C.

2.5.3. Ανοσοκατακρήμνιση αυτοαντιγόνων με τη χρήση αυτοαντισωμάτων.

Αρχικά δημιουργήθηκαν ομοιοπολικά συνδεδεμένα αυτοαντισώματα σε σφαιρίδια G πρωτεΐνης. Η διαδικασία έχει ως εξής:

Ο ορός επώαστηκε με τα σφαιρίδια G πρωτεΐνης-Σεφαρόζης σε διάλυμα S3 (20mM Tris-HCl pH7,5, 10% σακχαρόζη, 1mM EGTA, 2mM MgCl₂, 1mM PMSF, αναστολείς πρωτεϊνών) για μία ώρα στους 4°C. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια πλύθηκαν 2 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M τετραβορικού νατρίου pH9 κι επώαστηκαν με 20mM διμεθυλοπιμελιμυδο-διϋδροχλωρίδιο (DMP, Dimethyl pimelimidate dihydrochloride, Sigma) σε διάλυμα 0,1M τετραβορικού νατρίου pH9 για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ούτως ώστε να σχηματιστούν ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ του αντισώματος και της G πρωτεΐνης των σφαιριδίων. Η επώαση με το διάλυμα DMP επαναλήφθηκε κι ακολούθησαν δύο πλύσεις με διάλυμα 50mM γλυκίνης pH 2,5 για την απομάκρυνση των μη ειδικά δεσμευμένων σωματιδίων. Το εκχύλισμα της gp210 προτού χρησιμοποιηθεί αραιώθηκε και προεπώαστηκε με σφαιρίδια G πρωτεΐνης-Σεφαρόζης για μία ώρα στους 4°C. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια με τα ομοιοπολικά δεσμευμένα αντισώματα αφού πλύθηκαν με PBS αρκετές φορές και επώαστηκαν με το εκχύλισμα όλο το βράδυ στους 4°C, υπό ανακίνηση. Την επόμενη μέρα τα σφαιρίδια με τα ομοιοπολικά δεμένα σύμπλοκα αντισώματος-αντιγόνου πλύθηκαν με το διάλυμα S3. Στη συνέχεια στα σφαιρίδια προστέθηκε αποδιατακτικό διάλυμα (Laemli Buffer) και θερμάνθηκαν στους 70°C για 15 λεπτά ούτως ώστε να αποδεσμευθούν τα αυτοαντιγόνα.

2.6. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος Bradford (Bradford, McRorie et al. 1976), η οποία στηρίζεται στο σχηματισμό έγχρωμων συμπλόκων μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων και μορίων χρωστικής Coomassie brilliant blue, τα οποία απορροφούν σε μήκος κύματος 595nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε δείγμα χρησιμοποιήθηκε μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε με μέτρηση της απορρόφησης δειγμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης BSA (αλβουμίνη ορού βοός).

2.7. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών

Η κατακρήμνιση πρωτεϊνών που βρίσκονται σε μεγάλο όγκο διαλύματος έγινε με την προσθήκη 25% τριχλωροξικού οξέος. Μετά την ομογενοποίηση των δύο στοιβάδων, που σχηματίζονται (υδατική, οργανική), το διάλυμα αφέθηκε σε πάγο στους 4°C όλο το βράδυ. Την επόμενη μέρα φυγοκεντρήθηκε στις 15000 στροφές το λεπτό (rpm) για 30 λεπτά στους 4°C. Στο ίζημα έγιναν δύο πεντάλεπτες πλύσεις με ακετόνη. Μετά από κάθε πλύση η ανάκτηση του ιζήματος γινόταν με φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές το λεπτό (rpm) για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά το τέλος των πλύσεων το ίζημα αφέθηκε για 5 λεπτά στους 100°C για την πλήρη απομάκρυνση της ακετόνης.

2.8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου

(SDS-PAGE)

2.8.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Τα πρωτεϊνικά δείγματα διαλύθηκαν σε αποδιατακτικό διάλυμα (4X Laemmli buffer: 250mM Tris-HCL pH 6,8, 9,2% w/v SDS, 40% v/v γλυκερόλη, 0,2% w/v Bromophenol blue, 100mM DTT) και θερμάνθηκαν στους 100 °C για 10 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών καθώς και η κάλυψή τους από μόρια SDS έχει σαν συνέπεια την εξάρτηση της ηλεκτροφορητικής τους ικανότητας μόνο από το μοριακό τους βάρος. Αυτό έχει σαν συνέπεια τον διαχωρισμό τους κατά μήκος του πηκτώματος αναλόγως του μοριακού τους βάρους.

2.8.2. Προετοιμασία πηκτής SDS- πολυακρυλαμιδίου

Η πηκτή SDS- πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο είδη πηκτωμάτων: το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel: 7,5-12,5% v/v διάλυμα πολυακρυλαμιδίου, 25% v/v ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού: 1,5M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% v/v APS, 0,05% v/v TEMED) και το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel: 4,5% v/v διάλυμα πολυακρυλαμιδίου, 25% v/v ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης: 0,5M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS, 0,1% v/v APS, 0,1% v/v TEMED). Τα APS και TEMED λειτουργούν ως καταλύτες για την έναρξη και τη διατήρηση του πολυμερισμού αντίστοιχα οπότεν προστίθενται στο τέλος.

Για την προετοιμασία της πηκτής αρχικά παρασκευάστηκε το πήκτωμα διαχωρισμού κι εκχύθηκε στον κενό χώρο μεταξύ δύο γυάλινων πλακών που διαχωρίζονται με γυάλινα τμήματα (spacers) πάχους 1,5mm. Αφέθηκε να πολυμεριστεί και προστέθηκε το πήκτωμα επιστοιβαξής, μέσα στο οποίο τοποθετήθηκε το χτένι για το σχηματισμό των θέσεων τοποθέτησης των δειγμάτων.

2.8.3. Ηλεκτροφόρηση

Αφού συναρμολογήθηκε η συσκευή και η πηκτή τοποθετήθηκε στη θέση της, απομακρύνθηκε το χτένι και προστέθηκε το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1X Electrophoresis buffer: 25mM Tris base, 192mM γλυκίνη, 0,1% w/v SDS). Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις θέσεις τους με σύριγγα Hamilton. Για πηκτώματα μικρού μεγέθους (mini gels) εφαρμόστηκε σταθερή τάση 400V κι ένταση 35mA.

2.8.4. Χρώση πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Η χρώση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε εμβαπίζοντας την πηκτή σε διάλυμα χρώσης (50% v/v μεθανόλη, 12% v/v οξικό οξύ, 0,1% w/v Coomassie Brilliant Blue R-250) για 15-30 λεπτά. Ακολούθως τοποθετήθηκε σε διάλυμα απόχρωσης (10% v/v μεθανόλη, 10% v/v οξικό οξύ) όπου παρέμεινε υπό συνεχή ανάδευση έως ότου γίνουν ορατές οι πρωτεϊνικές ζώνες.

2.9. Ανοσοαποτύπωση-Western Blot

2.9.1. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Οι πρωτεΐνες αφού αποδιατάκθηκαν και διαχωρίστηκαν στην πηκτή με ηλεκτροφόρηση μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (PROTRAN 0,2μm). Η μεταφορά επιτεύχθηκε εφαρμόζοντας ένταση ρεύματος 350mA για 1 ώρα. Το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 25mM Tris base, 192mM γλυκίνη, 0,1% w/v SDS και 20% v/v μεθανόλη.

2.9.2. Επαναφορά πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτική κατάσταση

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, αφού έγινε η μεταφορά των πρωτεϊνών, ξεπλύθηκε με διάλυμα ισοπροπανόλης (20% ισοπροπανόλη, 50mM Tris HCl pH8) ούτως ώστε να απομακρυνθεί η απορρυπαντική ουσία (SDS) του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε για μία ώρα στο διάλυμα επαναφοράς (7M γουανιδίνη,

50mM Tris HCl, 2mM EDTA, 5mM DTT). Με το πέρας της επώασης η μεμβράνη εμβαπτίστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris-HCl pH 7,4, 155mM NaCl και 0,1% v/v Tween-20, όπου και αφέθηκε υπό ανάδευση για 10 λεπτά. Τέλος τοποθετήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris-HCl pH 7,4, 155mM NaCl και 0,1% v/v Tween-20, 1% v/v ζελατίνη από δέρμα ψαριού (blocking buffer) για 16 ώρες στους 4°C.

2.9.3. Διαδικασία ανοσοανίχνευσης

Η μέθοδος της ανοσοανίχνευσης στηρίζεται στη σύνδεση ενός ειδικού αντισώματος με το αντίστοιχο αντιγόνο το οποίο βρίσκεται ακινητοποιημένο στη μεμβράνη. Αρχικά, η μεμβράνη στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες επώαστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris-HCl pH 7,4, 155mM NaCl και 0,1% v/v Tween-20, 1% v/v ζελατίνη από δέρμα ψαριού (blocking buffer) για 16 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έτσι ώστε να ελαττωθεί η πιθανότητα επικάλυψης των αντισωμάτων, μη ειδικά, στη μεμβράνη. Ακολούθησε επώαση για δύομιση ώρες με το πρωτογενές αντίσωμα, όταν αυτό ήταν αυτοάνοσος ορός και ανάλογα με τις οδηγίες της εταιρίας για τα υπόλοιπα (gp210, mAb414 και p62: 1h). Τα αντισώματα που κατασκευάστηκαν από το εργαστήριο μας επώαστηκαν για μία ώρα (Lm A/C, LBR). Τα αντισώματα αραιώθηκαν κατάλληλα σε διάλυμα blocking. Στη συνέχεια έγιναν τρεις εκπλύσεις διάρκειας 10 λεπτών η κάθε μια με σκοπό την απομάκρυνση του μη δεσμευμένου αντισώματος και η μεμβράνη επώαστηκε για μία ώρα με το δευτερογενές αντίσωμα, αραιωμένο σε διάλυμα blocking. Ακολούθως, η μεμβράνη πλύθηκε όπως αναφέρεται παραπάνω και επώαστηκε για 5 λεπτά με το αντιδραστήριο εμφάνισης. Τέλος εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ για χρόνο που εξαρτάται από την ένταση του σήματος της χημειοφωταύγειας. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα που αναφέρονται στους πίνακες 2.9.3.1. και 2.9.3.2. στις αντίστοιχες αραιώσεις.

2.9.4. Απομάκρυνση αντισωμάτων για την επανάληψη της ανοσοανίχνευσης

Για την απομάκρυνση των αντισωμάτων η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε διάλυμα 62,5mM Tris HCl pH 6,7, 2% w/v SDS, 100mM β-μερκαπτοαιθανόλη και θερμάνθηκε για 30 λεπτά στους 50°C. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις διάρκειας 10 λεπτών με 20mM Tris-HCl pH 7,4, 155mM NaCl και 0,1% v/v Tween-20 (washing buffer) και επανάληψη της διαδικασίας ανοσοανίχνευσης.

2.10 Έμμεσος ανοσοφθορισμός.

2.10.1. Υπόστρωμα κυττάρων HeLa, HepG2 και Hep2.

Κύτταρα HeLa, HepG2 και Hep2 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε καλυπτρίδες 18X18mm και αφού έγινε πλύση με 1X PBS, ακολούθησε μονιμοποίηση τους με διάλυμα φορμαλδεΰδης (4% ή 1% σε 1X PBS) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Για την απενεργοποίηση της φορμαλδεΰδης τα κύτταρα επώαστηκαν με διάλυμα 20mM γλυκίνη σε 1X PBS (Quench) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν με διάλυμα 1X PBS, 0,2% Triton X-100, 0,5% ζελατίνη δέρματος ψαριού και 2mM MgCl₂ (blocking buffer) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση με το blocking buffer είχε ως σκοπό την διάνοιξη οπών στις κυτταρικές μεμβράνες, ούτως ώστε να γίνει δυνατή η είσοδος του αντισώματος στα κύτταρα αλλά και να αποφευχθεί η επικάθηση του σε μη ειδικές θέσεις. Κατόπιν 50μl αραιωμένου ορού (1:80) σε blocking buffer τοποθετήθηκαν πάνω σε κάθε καλυπτρίδα. Το πρωτογενές αντίσωμα επώαστηκε με τα μονιμοποιημένα κύτταρα για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε πλύση των δειγμάτων με blocking buffer για 10 λεπτά ούτως ώστε να απομακρυνθεί το αντίσωμα που δεν είχε συνδεθεί ειδικά. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν με το δευτερογενές αντίσωμα για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού έγιναν δύο πεντάλεπτες πλύσεις, μία με blocking buffer και μία με PBS για την απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος πραγματοποιήθηκε χρώση των πυρήνων των κυττάρων με χρήση κατάλληλων χρωστικών ουσιών όπως είναι το DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindole) ή το TO-PRO-3 iodide. Το DAPI χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0.004mg/ml σε PBS και επώαστηκε με τα κύτταρα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η χρώση των πυρήνων με TO-PRO-3 έγινε μετά από αραιώση 1:1000 σε PBS και επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι παραπάνω χρωστικές διαφέρουν ως προς τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής στο φάσμα φθορισμού.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα παρασκευάσματα κυττάρων Hep2 από 3 διαφορετικές εταιρίες: INOVA Diagnostics (San Diego, CA), Zeus Scientific Inc. (Raritan, NJ), BMD (Marne La Vallée, France) ακολουθώντας τη διαδικασία που προτείνεται από την εταιρία.

Πρωτογενή αντισώματα	Αραιώσεις
103 Αυτοάνοσοι οροί Πρωτοπαθούς Χολικής Κίρρωσης	1:300
αντι- p62	1:1000
mAb414	1:1000
αντι-gr210	1:1000
αντι-LmA/C	1:1000
αντι-LBR	1:200

Πίνακας 2.9.3.1. Οι αραιώσεις των πρωτογενών αντισωμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοανίχνευση.

Δευτερογενή αντισώματα	Αραιώσεις
Anti-human IgG	1:10000
Anti-human IgM	1: 8000
Anti-mouse IgG	1:10000
Anti-rabbit IgG	1:10000

Πίνακας 2.9.3.2. Οι αραιώσεις των δευτερογενών αντισωμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοανίχνευση.

Τα δείγματα εκτιμήθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (TCS-NT Laser Scanning microscope, Leica) με χρήση ελαιοκαταδυτικού φακού HCX PL APO 40x/1.25. Τα αντισώματα (πρωτογενή και δευτερογενή) που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοφθορισμού είναι οι οροί με αυτοαντισώματα σε αραιώση 1:80 (πρωτογενή). Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα anti-human FITC IgM σε αραιώση 1:100 και anti-human FITC IgG (conjugate, INOVA Hep2 ANA kit).

2.10.2. Υπόστρωμα πυρήνων ηπατοκυττάρων αρουραίων και κυτταρικής σειράς HepG2.

Οι καλυπτρίδες, όπου τοποθετήθηκαν οι πυρήνες, καλύφθηκαν αρχικά με 0,1% Alcian Blue για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με αυτό τον τρόπο τα γυάλινα πλακάκια φορτίστηκαν θετικά, ούτως ώστε να σχηματίζουν ιονικούς δεσμούς με τις αρνητικά φορτισμένες μεμβράνες των πυρήνων. Στη συνέχεια, το Alcian Blue απομακρύνθηκε, τα πλακάκια ξεπλύθηκαν 3 φορές με απιονισμένο νερό και αφού στέγνωσαν καλά, καλύφθηκαν με εναιώρημα πυρήνων σε PBS, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 3 πλύσεις με PBS, για την απομάκρυνση όσων πυρήνων δεν δεσμεύθηκαν στις καλυπτρίδες, ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε για τον έμμεσο ανοσοφθορισμό των κυττάρων.

2.11 Μέθοδος ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσροφητικής μέτρησης (ELISA)

Για την ανίχνευση αντισωμάτων με τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά ELISA kits από 2 εταιρείες, την INOVA, Diagnostics Ink. και την IMTEC, Human GmbH.

Από την INOVA, Diagnostics Ink. χρησιμοποιήθηκαν το QUANTA Lite™gp210 kit για τον εντοπισμό gp210 αυτοαντισωμάτων και το QUANTA Lite™sp100 kit για τον εντοπισμό αυτοαντισωμάτων sp100 στους ορούς που μελετήθηκαν.

Στο gp210 kit η μικροπλάκα είναι επικαλυμμένη με το πεπτίδιο του επιτόπου στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης ενώ στο sp100 kit η μικροπλάκα είναι επικαλυμμένη με την πρωτεΐνη sp100. Τα αυτοαντισώματα τόσο για την gp210 όσο και για την sp100, που ανιχνεύονται με τα συγκεκριμένα ELISA kits έχουν ανοσοσφαιρίνες τάξεως G.

Από την IMTEC, Human GmbH χρησιμοποιήθηκε το IMTEC-LIVER PROFILE S ELISA kit, το οποίο ανιχνεύει πολλά αυτοαντισώματα παράλληλα. Τα αντισώματα αυτά έχουν ανοσοσφαιρίνες G τάξεως και αναγνωρίζουν τα αντιγόνα: LKM1, AMA-M2, sp100,

gp210, LBR και SLA. Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι θέσεις της μικροπλάκας που είναι επικαλυμμένες με τις πρωτεΐνες AMA-M2, sp100, gp210 και LBR, οι οποίες αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως αυτοαντιγόνα για στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση (PBC).

Όσον αφορά τη μεθοδολογία, ακολουθήθηκαν οι οδηγίες που δίνονται από τις κατασκευάστριες εταιρείες.

2.12 Μέθοδος ταυτοποίησης αντι-μιτοχονδριακών αυτοαντισωμάτων

Η ταυτοποίηση των αντι-μιτοχονδριακών αυτοαντισωμάτων των ορών από ασθενείς με PBC έγινε χρησιμοποιώντας το Mitochondria profile dot kit (ALPHADIA S.A./ N.V. Diagnostic Products. Το kit ανιχνεύει αντισώματα έναντι των M2 μιτοχονδριακών αντιγόνων OGDC-E2, BCOADC-E2 και PDC-E2. Όσον αφορά τη μεθοδολογία, ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ανίχνευση και συχνότητα αυτοαντισωμάτων με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Η ανίχνευση και ο προσδιορισμός της συχνότητας αυτοαντισωμάτων σε ορούς ασθενών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση έγινε με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Μελετήθηκαν τα διάφορα πρότυπα φθορισμού στη μεσόφαση και τη μίτωση.

1.1 Ρόλος του υποστρώματος και είδους μονιμοποίησης

Αρχικός στόχος μας ήταν η εδραίωση και χρησιμοποίηση μιας μεθόδου που επέτρεπε την αποτελεσματική ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων, κυρίως αυτών της περιφέρειας του πυρήνα. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν η επίδραση του μονιμοποιητικού μέσου και διαφορετικών υποστρωμάτων στον προσδιορισμό διαφόρων προτύπων φθορισμού, ιδιαίτερα του περιπυρηνικού φθορισμού.

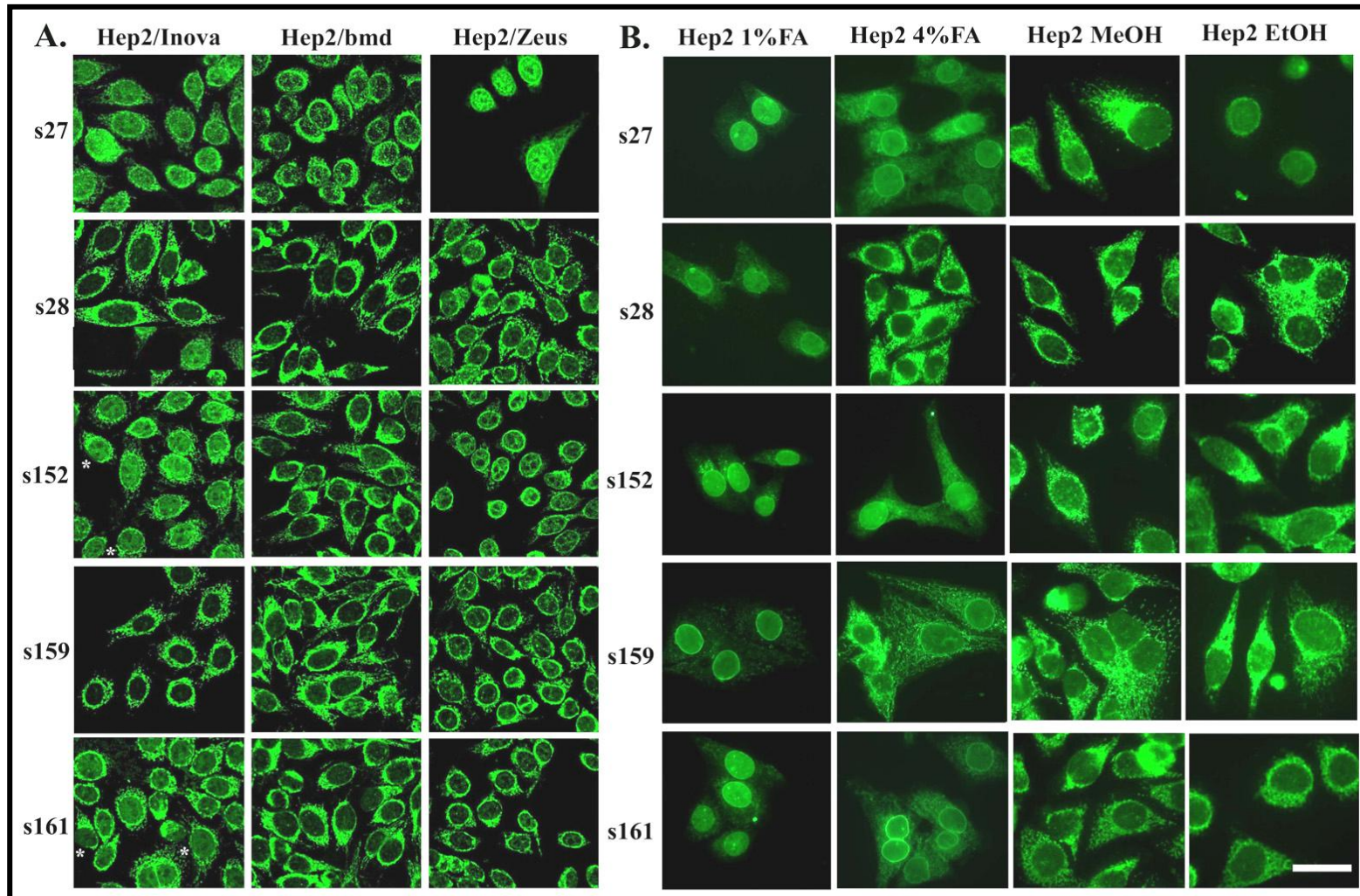
Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Hep2 και HeLa, μονιμοποιημένα με φορμαλδεΰδη σε δύο συγκεντρώσεις 1% και 4%, με EtOH και με MeOH αλλά και εμπορικά διαθέσιμα παρασκευάσματα, κυττάρων Hep2, από τρεις διαφορετικές εταιρίες. **(Εικόνα 1.1.1. και Εικόνα 1.1.2.)** Ο περιπυρηνικός φθορισμός ήταν σαφής μόνο όταν τα Hep2 κύτταρα ήταν μονιμοποιημένα με φορμαλδεΰδη, ιδιαίτερα όταν η μονιμοποίηση είχε γίνει με 1% φορμαλδεΰδη, όπου ο κυτταροπλασματικός φθορισμός είχε χαμηλότερη ένταση ή σε ορισμένες περιπτώσεις ήταν σχεδόν ανύπαρκτος. Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαμε και για τα κύτταρα HeLa όπου παρατηρήθηκαν ελαφρώς υψηλότερη ένταση και καλύτερη ευκρίνεια του περιπυρηνικού φθορισμού.

Επομένως, η μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδη ευνοεί την αναγνώριση των αυτοεπιτόπων των αντιγόνων του πυρηνικού φακέλου από τα αντισώματα των ορών. Επίσης κατά την ηπιότερη μονιμοποίηση των κυττάρων, με 1% φορμαλδεΰδη, δεν μονιμοποιείται καλά το κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα ο περιπυρηνικός φθορισμός να είναι σαφής, εφόσον υπάρχει. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι μειώνοντας την κυτταροπλασματική χρώση αναδεικνυόταν το πρότυπο του περιπυρηνικού φθορισμού και ως εκ τούτου υποθέσαμε ότι απουσία κυτταροπλάσματος θα ανιχνεύονταν και τα χαμηλού τίτλου αυτοαντισώματα έναντι της πυρηνικής μεμβράνης.

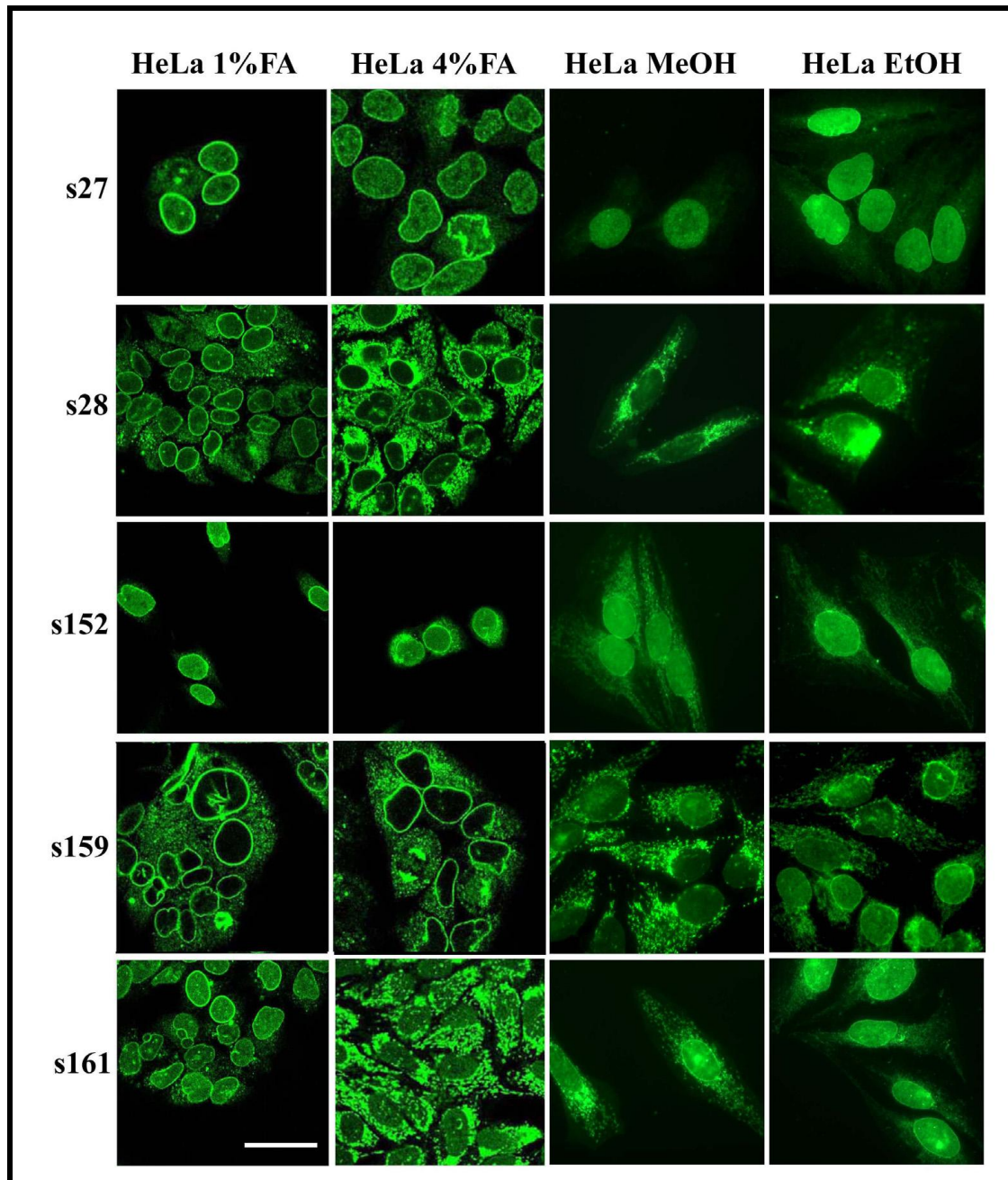
Για το λόγο αυτό η ανίχνευση των περιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων έγινε χρησιμοποιώντας πυρήνες που απομονώθηκαν από HepG2 κύτταρα και ηπατοκύτταρα αρουραίου, των οποίων η καθαρότητα από κυτταροπλασματικές προσμίξεις ελέγχθηκε με μορφολογικές και βιοχημικές προσεγγίσεις (βλέπε παράγραφο 2.1).

Στην **εικόνα 1.1.3** φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά προφίλ που έδωσαν τα αντισώματα G τάξης των ορών. Στην πρώτη κατηγορία (στήλη) κατατάσσονται οι οροί των οποίων ο περιπυρηνικός φθορισμός είναι εμφανής σε όλα τα υποστρώματα και με τους δύο τρόπους μονιμοποίησης. Στη δεύτερη και τρίτη κατηγορία (στήλες) κατατάσσονται οι οροί, που δεν είναι δυνατή η ανίχνευση του περιπυρηνικού φθορισμού με όλα τα είδη κυττάρων αλλά είναι με τους πυρήνες και στην τέταρτη κατηγορία (στήλη) κατατάσσονται οι οροί των οποίων ο περιπυρηνικός φθορισμός ανιχνεύεται μόνο σε υπόστρωμα πυρήνων. Τέλος στην πέμπτη στήλη κατατάσσονται οι οροί που δεν δίνουν καθόλου περιπυρηνικό φθορισμό σε κανένα είδος κυττάρου ή πυρήνα.

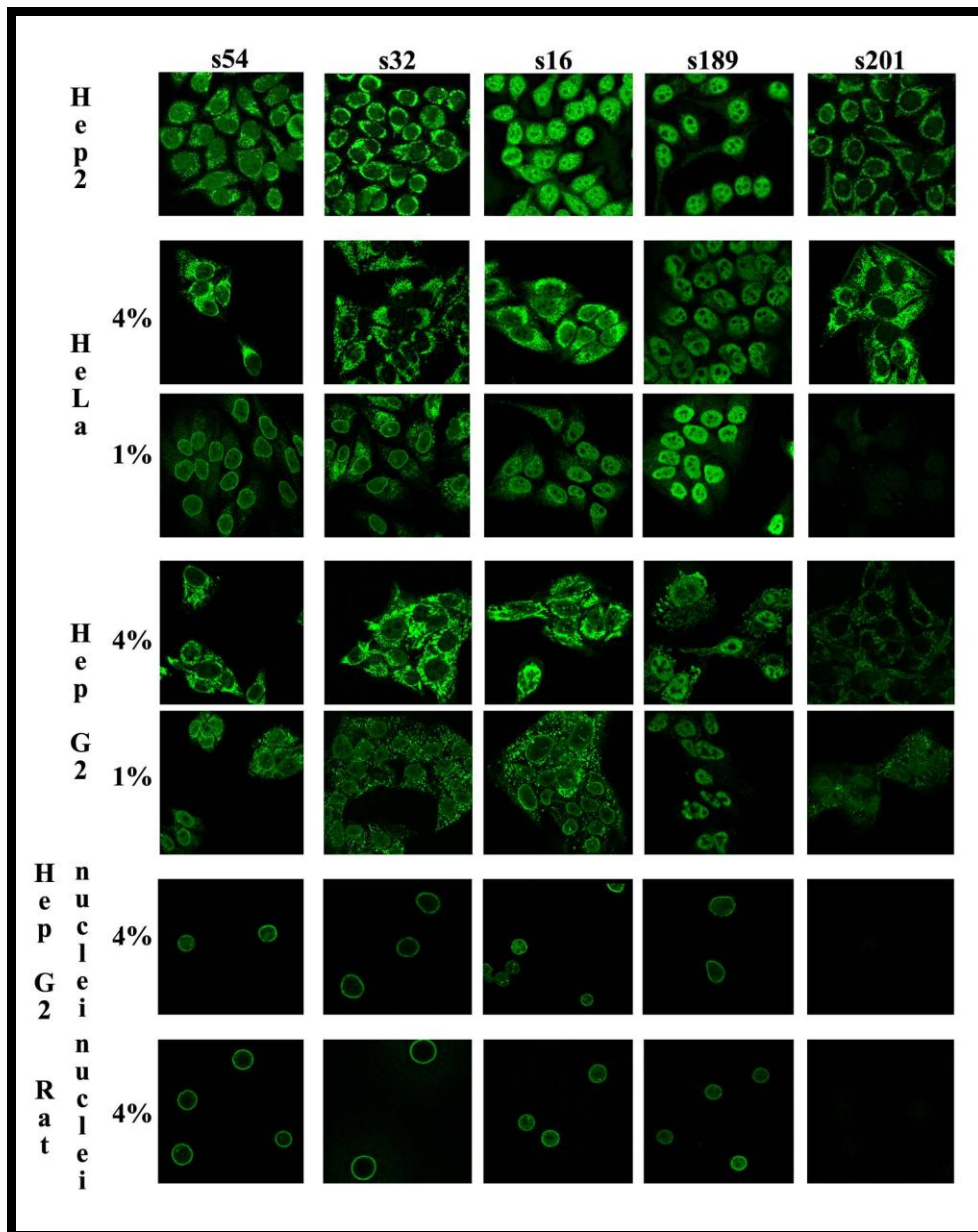
Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εμφανής η χρησιμότητα των απομονωθέντων πυρήνων για τον προσδιορισμό, με ανοσοφθορισμό, των συγκεκριμένων αυτοαντισωμάτων



Εικόνα 1.1.1. Ανοσοφθορισμός σε κύτταρα Hep2 με PBC ορούς. Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα (εταιρείες Inova, bmd και Zeus) παρασκευάσματα κυττάρων Hep2 (A) και Hep2 κύτταρα καλλιεργημένα σε καλυπτρίδες (B) μονιμοποιημένα με MeOH, EtOH, 1% ή 4% φορμαλδεΰδη ως υπόστρωμα για τους ορούς (s) 27, 28, 152, 159 και 161 σε αραιώση 1:80. Bar = 20μm.



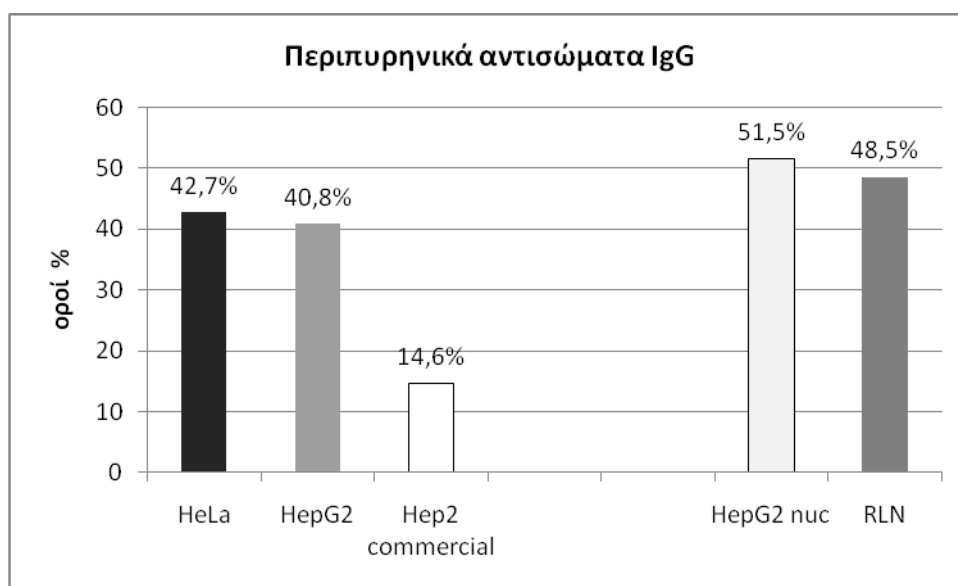
Εικόνα 1.1.2. Ανοσοφθορισμός σε κύτταρα HeLa μονιμοποιημένα με μεθανόλη (MeOH), αιθανόλη (EtOH), 1% ή 4% φορμαλδεΰδη (FA) με τους ορούς (s) 27, 28, 152, 159 και 161 σε αραιώση 1:80. Bar = 20μm.



Εικόνα 1.1.3. Προφίλ των αντισωμάτων τάξεως IgG στα διάφορα υποστρώματα. Ανοσοφθορισμός σε κύτταρα HeLa, HepG2 μονιμοποιημένα 1% ή 4% φορμαλδεύδη (FA), εμπορικά παρασκευάσματα κυττάρων Hep2 και πυρήνες από κύτταρα HepG2 και υπατοκύτταρα αρουραίων (Rat nuclei) με τους ορούς (s) 54, 32, 16, 189 και 201 σε αραιώση 1:80.

1.2. Συχνότητα εμφάνισης αυτοαντισωμάτων για πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου

Για την ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων έναντι του πυρηνικού φακέλου, ως υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν τόσο οι κυτταροσειρές HeLa και HepG2 αλλά και πυρήνες από HepG2 κύτταρα (HepG2nuc) και ηπατοκύτταρα αρουραίου (RLN), όπου η απουσία κυτταροπλάσματος αναδεικνύει το πρότυπο του περιπυρηνικού φθορισμού. (βλέπε παρ.1.1) Η μεγαλύτερη συχνότητα αντι-περιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων βρέθηκε με τη χρήση πυρήνων, ως υπόστρωμα (HepG2nuc: 51,5%, RLN: 48,5%). Χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα τις δύο κυτταροσειρές η συχνότητα των αντισωμάτων έναντι της πυρηνικής μεμβράνης είναι εμφανώς μικρότερη (HeLa: 42,7%, HepG2: 40,8%). Το πλέον ακατάλληλο υπόστρωμα για την ανίχνευση των εν λόγω αυτοαντισωμάτων μοιάζουν να είναι τα εμπορικά παρασκευάσματα κυττάρων Hep2, όπου η συχνότητα εμφάνισης που βρήκαν (14,6%) ήταν κατά πολύ μικρότερη από τις συχνότητες που βρέθηκαν με οποιαδήποτε άλλο υπόστρωμα. (Διάγραμμα 1.2.1.)



Διάγραμμα 1.2.1. Συχνότητα αντι-περιπυρηνικών αντισωμάτων στους ορούς. Χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα οι κυτταρικές σειρές HeLa και HepG2, τα παρασκευάσματα κυττάρων Hep2 και οι πυρήνες από κύτταρα HepG2 και ηπατοκύτταρα αρουραίων (RLN).

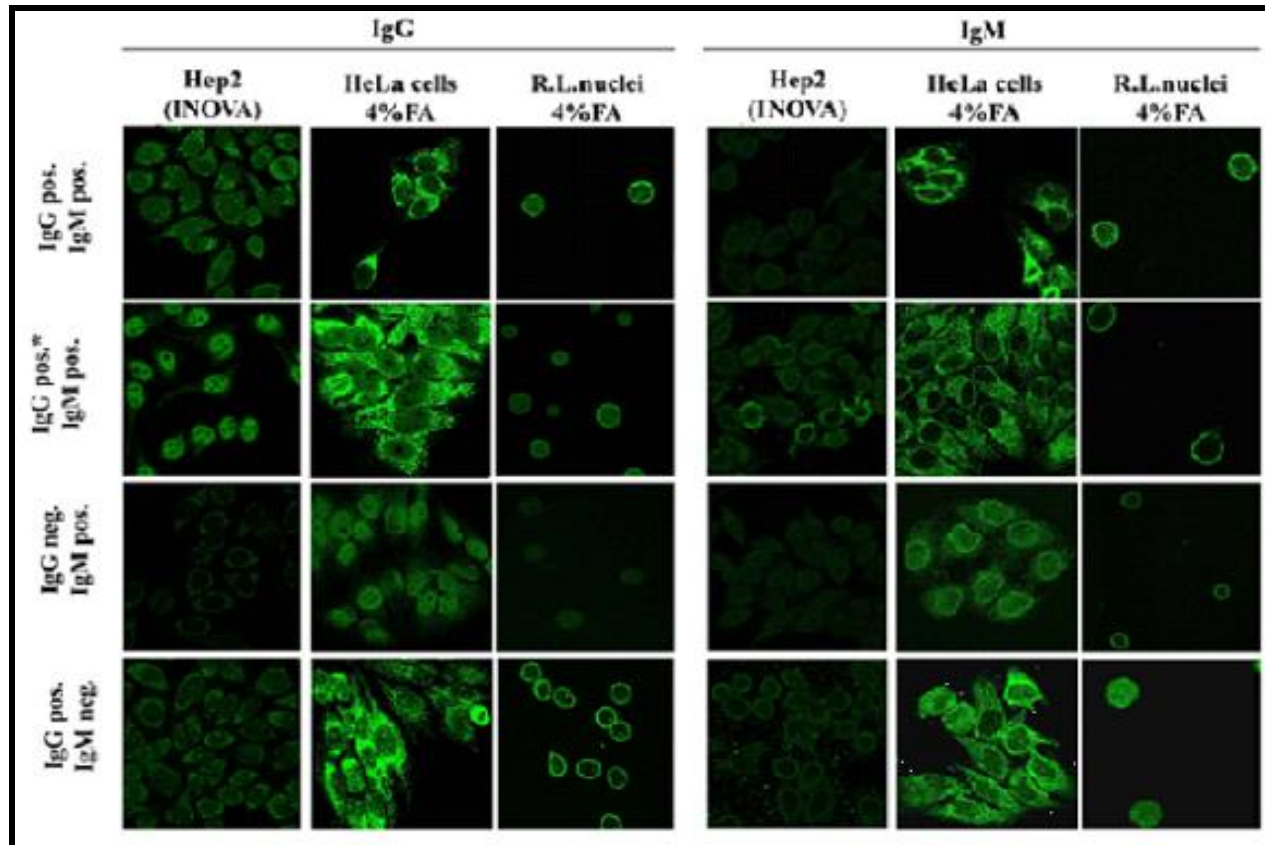
Εκτός από τα IgG αντι-περιπυρηνικά αντισώματα, στους ορούς των ασθενών με PBC ανιχνεύθηκαν και αντισώματα IgM τάξεως. Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα εμπορικά διαθέσιμα παρασκευάσματα κυττάρων Hep2, κύτταρα HeLa και πυρήνες από ήπαρ αρουραίου διαπιστώθηκε διαφορετική απόδοση των υποστρωμάτων στην ανίχνευση των IgM αυτοαντισωμάτων και διαφορετική σύσταση των ορών σε IgG ή/και IgM ανοσοσφαιρίνες. **(Εικόνα 1.2.1.)** Στην πλειοψηφία των ορών συνυπήρχαν αυτοαντισώματα και των δύο τάξεων ανοσοσφαιρινών, τόσο όταν χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa ως υπόστρωμα όσο κι όταν χρησιμοποιήθηκαν πυρήνες από ηπατοκύτταρα αρουραίου (RLN) (37,9% και 39,8% των ορών, αντίστοιχα). Σε αντίθεση όταν το υπόστρωμα ήταν τα εμπορικά διαθέσιμα παρασκευάσματα κυττάρων Hep2, συνύπαρξη IgG και IgM αντισωμάτων βρέθηκε μόνο στο 2,9% των ορών **(πίνακας 1.2.2)**

Το συνολικό ποσοστό των ορών με αντισώματα έναντι της πυρηνικής μεμβράνης αυξάνεται συνυπολογίζοντας τα ποσοστά των IgG και IgM αντι-περιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων. Συγκεκριμένα το ποσοστό των IgG αντι-περιπυρηνικών αντισωμάτων, που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τα εμπορικά διαθέσιμα παρασκευάσματα κυττάρων Hep2, είναι 14,6%. Αν στους ορούς με αντι-περιπυρηνικά αντισώματα συμπεριληφθούν και αυτοί με IgM αντισώματα, τότε το ποσοστό ανέρχεται στο 26,3%. Αντίστοιχες μεταβολές στα ποσοστά των ορών με αντι-περιπυρηνικά αντισώματα παρατηρούνται και όταν ως υποστρώματα χρησιμοποιηθούν κύτταρα HeLa και πυρήνες ηπατοκυττάρων αρουραίων (RLN) (από 37,9% σε 49,5% και από 39,8% σε 52,4%, αντίστοιχα). Συγκρίνοντας τα συνολικά ποσοστά των ορών στους οποίους ανιχνεύθηκαν αντι-περιπυρηνικά αντισώματα (IgG ή/και IgM) οι πυρήνες ηπατοκυττάρων αρουραίων (RLN) αποτελούν το καλύτερο από τα τρία υποστρώματα που μελετήθηκαν.

Συγκεντρωτικά αντι-περιπυρηνικά αυτοαντισώματα (IgG ή IgM) ανιχνεύθηκαν στο 53,4% των ορών. Το ποσοστό, είναι σχεδόν το ίδιο με εκείνο που βρέθηκε χρησιμοποιώντας αποκλειστικά πυρήνες ηπατοκυττάρων αρουραίων (RLN), πολύ κοντά σε αυτό που ανιχνεύθηκε με HeLa κύτταρα και πολύ μεγαλύτερο από το ποσοστό των ορών όπου ανιχνεύθηκαν αντι-περιπυρηνικά αντισώματα από τα παρασκευάσματα κυττάρων Hep2.

Κυτταρικές Σειρές Ανοσο- Σφαιρίνες	Hep2	HeLa	RLN	Οποιοδήποτε υπόστρωμα
IgG μόνο	11,7%	4,9%	8,7%	5,8%
IgG ολικά	14,6%	42,7%	48,5%	49,5%
IgM μόνο	9,7%	6,8%	3,9%	3,9%
IgM ολικά	12,6%	44,7%	43,7%	47,6%
IgG+IgM	2,9%	37,9%	39,8%	43,7%
IgG ή/και IgM	24,3%	49,5%	52,4%	53,4%

Πίνακας 1.2.2. Συχνότητα εμφάνισης αντιπεριπυρηνικών αντισωμάτων IgG και IgM τάξης σε διαφορετικά υποστρώματα. Στην πρώτη και τρίτη σειρά καταγράφονται τα ποσοστά των ορών στους οποίους βρέθηκαν μόνο IgG και μόνο IgM αυτοαντισώματα, αντίστοιχα. Στη δεύτερη σειρά (IgG ολικά) καταγράφονται τα ποσοστά των ορών με IgG αντισώματα ανεξαρτήτως συνύπαρξης IgM αυτοαντισωμάτων και στην τέταρτη σειρά (IgM ολικά) τα ποσοστά των ορών με IgM αντισώματα ανεξαρτήτως συνύπαρξης IgG αντισωμάτων. Στην πέμπτη σειρά παρουσιάζονται τα ποσοστά των ορών στους οποίους συνυπήρχαν αντισώματα και των δύο τάξεων. Τέλος στην έκτη σειρά (IgG ή/και IgM) καταγράφονται τα ποσοστά των ορών στους οποίους παρατηρήθηκε περιπυρηνικός φθορισμός, είτε αυτός οφειλόταν σε IgG είτε IgM αυτοαντισώματα. Στην πρώτη στήλη (Hep2) έχουν καταγραφεί τα ποσοστά των ορών που ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα εμπορικά παρασκευάσματα κυττάρων Hep2, στη δεύτερη στήλη (HeLa) τα αντίστοιχα ποσοστά των ορών που ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας υπόστρωμα κυττάρων HeLa και στην τρίτη στήλη (RLN) τα ποσοστά που για την ανίχνευσή τους χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα πυρήνων από ηπατοκύτταρα αρουραίων. Τέλος στην τελευταία στήλη παρουσιάζονται τα ποσοστά των ορών με περιπυρηνικό φθορισμό, που οφείλεται είτε σε IgG είτε σε ανοσοσφαιρίνες IgM κάθε είδους αντισωμάτων, ανεξαρτήτως του είδους του υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση τους.



Εικόνα 1.2.1 Κατηγορίες ορών με αντι-περιπυρηνικά αντισώματα. Οι οροί που αναλύθηκαν με ανοσοφθορισμό σε υποστρώματα πυρήνων από ηπατοκύτταρα αρουραίων (RL nuclei), κύτταρα HeLa (HeLa Cells) και παρασκευάσματα κυττάρων Hep2 (Hep2) και δευτερογενή αντισώματα IgG ή IgM. Στην πρώτη σειρά (IgG pos, IgM pos) βρίσκονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από ορούς, οι οποίοι έχουν τόσο IgG όσο και IgM αντιπεριπυρηνικά αντισώματα. Η δεύτερη σειρά εικόνων (IgG pos*, IgM pos) παρουσιάζει ορούς όπου έχουν βρεθεί τόσο IgG όσο και IgM αντιπεριπυρηνικά αντισώματα, τα οποία όμως δεν ανιχνεύονται με όλα τα υποστρώματα. Στην τρίτη σειρά (IgG pos, IgM neg) βρίσκονται αντιπροσωπευτικές εικόνες για τους ορούς που έχουν μόνο IgM αντισώματα (IgG neg, IgM pos) ενώ στην τέταρτη για αυτούς που έχουν μόνο IgG αντισώματα έναντι της πυρηνικής μεμβράνης.

1.3. Συχνότητα αυτοαντισωμάτων για δομές του πυρηνοπλάσματος.

Για την ανίχνευση του πυρηνικού φθορισμού, ως υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν κυρίως οι κυτταρικές σειρές HeLa, HepG2 και εναλλακτικά τα εμπορικά παρασκευάσματα κυττάρων Hep2. Παρατηρήθηκαν τέσσερις κυρίως φαινότυποι: ο στικτός πυρηνικός (nuclear dots, Multi Nuclear Dots - MND και Few Nuclear Dots - FNM), ο διάστικτος (speckled), ο κεντρομεριδιακός (centromere) και ο ομοιογενής πυρηνικός (homogeneous) φθορισμός. **(Εικόνα 1.3.1)** Σε κάποιους ορούς δεν κατέστη δυνατή η αναγνώριση του είδους του πυρηνικού φθορισμού λόγω του πολύ χαμηλού τίτλου των αντισωμάτων. Ο διαχωρισμός του στικτού πυρηνικού από τον κεντρομεριδιακό φθορισμό έγινε με παρατήρηση των μιτωτικών κυττάρων, όπου ο φθορισμός των κεντρομερών παραμένει στικτός κι εντοπίζεται στα χρωμοσώματα.

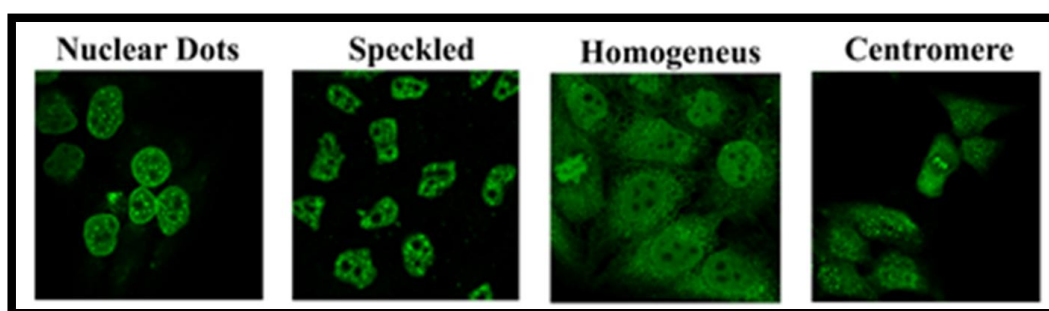
Το μεγαλύτερο ποσοστό ορών με αντι-πυρηνικά IgG αντισώματα ανιχνεύθηκε με τη χρήση των κυττάρων HeLa ως υπόστρωμα. **(Πίνακας 1.3.1)** Οι περισσότεροι από τους ορούς με αντισώματα έναντι του πυρήνα εμφάνισαν τον φαινότυπο του στικτού πυρηνικού φθορισμού. Συγκεκριμένα στικτό πυρηνικό φθορισμό παρουσιάζει ποσοστό 22,3% των ορών, διάστικτο πυρηνικό φθορισμό παρουσιάζει το 6,8% των ορών, κεντρομεριδιακό φθορισμό παρουσιάζει το 6,8% των ορών και ομοιογενή πυρηνικό φθορισμό παρουσιάζει το 4,9% των ορών. Επειδή τα δύο από τα πρότυπα πυρηνικού φθορισμού σχετίζονται ειδικότερα με τη διάγνωση και την πρόγνωση της PBC, οι οροί ελέγχθηκαν για την παρουσία των συγκεκριμένων αντισωμάτων χρησιμοποιώντας παρασκευάσματα κυττάρων Hep2. Βρέθηκε ότι τα ποσοστά των ορών με κεντρομεριδιακό ή στικτό φθορισμό ήταν παρόμοιοι και ανεξάρτητα του υποστρώματος.

Ο κεντρομεριδιακός και ο στικτός πυρηνικός φθορισμός εμφανίζονται και οι δύο με στίγματα στον πυρήνα αλλά τα αντισώματα στα οποία οφείλονται αναγνωρίζουν διαφορετικές πρωτεΐνες. Στον πρώτο τα αντιγόνα είναι πρωτεΐνες των κεντρομεριδίων ενώ στο δεύτερο φαινότυπο τα αντιγόνα είναι οι πρωτεΐνες sp100 των PML σωματιδίων του πυρήνα.

Όλοι οι οροί που παρουσίαζαν κεντρομεριδιακό ή στικτό πυρηνικό φθορισμό (29,1%) διερευνήθηκαν περαιτέρω με ELISA για την ύπαρξη αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης sp100. Αντι-sp100 αντισώματα βρέθηκαν στο 16,5% του συνόλου των ορών ενώ σε τρεις ορούς (2,9%) τα συγκεκριμένα αντισώματα συνυπάρχουν με αντισώματα έναντι των κεντρομεριδίων. **(Διάγραμμα 1.3.1)** Σε ορισμένους από τους ορούς με στικτό πυρηνικό

φθορισμό (5,9% του συνόλου) δεν βρέθηκαν αντι-sp100 αντισώματα, γεγονός που σημαίνει ότι ο στικτός πυρηνικός φθορισμός οφείλεται σε αντισώματα έναντι άλλου αυτοαντιγόνου.

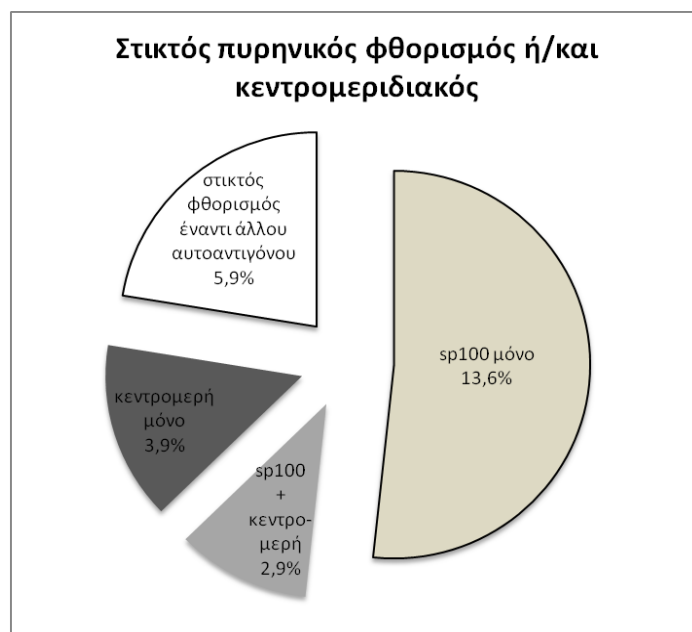
Στη συνέχεια διερευνήθηκε η ύπαρξη αντι-πυρηνικών αυτοαντισωμάτων IgM τάξης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα κύτταρα HeLa και εναλλακτικά παρασκευάσματα κυττάρων Hep2 για την ανίχνευση ειδικά του στικτού προτύπου. Βρέθηκε (**Πίνακας 1.3.2.**) ότι υπάρχουν αντισώματα IgM τάξης όμως το ποσοστό τους είναι σχετικά μικρό, ιδιαίτερα για τα αντισώματα που δίνουν στικτό και κεντρομεριδιακό φθορισμό και συγκρινόμενα με το ποσοστό των IgG αντισωμάτων είναι πολύ μικρότερο.



Εικόνα 1.3.1. Είδη πυρηνικού φθορισμού. Στικτός (nuclear dots), Διάστικτος (speckled), Ομογενής πυρηνικός φθορισμός (homogeneous) καθώς και κεντρομεριδιακός φθορισμός (centromere).

Είδη φθορισμού Κυτταρο- Σειρές	Είδη φθορισμού				
	Στικτός	Διάστικτος	Κεντρομεριδιακός	Ομοιογενής	Άλλο
HeLa	22,3%	6,8%	6,8%	4,9%	18,4%
HepG2	19,4%	0,97%	3,9%	1,9%	24,3%
Hep2 (INOVA)	18,4%	—	6,8%	—	—

Πίνακας 1.3.1. Συχνότητα διαφόρων προτύπων πυρηνικού φθορισμού στο σύνολο των ορών με IgG ανοσοσφαιρίνες.



Διάγραμμα 1.3.1. Συχνότητα υποτύπων στικτού πυρηνικού φθορισμού στο σύνολο των ορών με IgG ανοσοσφαιρίνες. Παρατηρείται ότι στην πλειοψηφία τους οι οροί έχουν αντι-sp100 αντισώματα (13,6%) ενώ σε ένα μικρό ποσοστό συνυπάρχουν αντι-sp100 και αντι-κεντρομεριδιακά αντισώματα (2,9%). Αντικεντρομεριδιακά αντισώματα βρέθηκαν στο 3,9% των ορών ενώ ποσοστό 5,9% των ορών παρουσίαζε πυρηνικά στίγματα που δεν ήταν ούτε αντικεντρομεριδιακά ούτε αντι-sp100 αντισώματα.

Είδη φθορισμού Κυτταρο-Σειρές	Είδη φθορισμού				
	Στικτός	Διάστικτος	Κεντρομεριδιακός	Ομοιογενής	Άλλο
HeLa IgG	22,3%	6,8%	6,8%	4,9%	18,4%
HeLa IgM	2,9%	2,9%	0,97%	0,97%	7,8%
Hep2 IgG (INOVA)	18,4%	—	6,8%	—	—
Hep2 IgM (INOVA)	1,9%	—	0%	—	—

Πίνακας 1.3.2. Συχνότητα διαφόρων προτύπων πυρηνικού φθορισμού στο σύνολο των ορών με IgG ή IgM ανοσοσφαιρίνες. Στις στήλες βρίσκονται τα ποσοστά των ορών που παρουσίασαν τον κάθε πυρηνικό φαινότυπο. Στις πρώτες δύο σειρές είναι τα ποσοστά των ορών όπου ανιχνεύθηκαν αντιπυρηνικά αντισώματα χρησιμοποιώντας κύτταρα HeLa (IgG στην πρώτη σειρά και IgM στη δεύτερη) ενώ στις δύο τελευταίες τα αντίστοιχα ποσοστά που ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα παρασκευάσματα κυττάρων Hep2 (IgG στην τρίτη σειρά και IgM στην τέταρτη σειρά).

1.4. Συνύπαρξη αυτοαντισωμάτων για διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα.

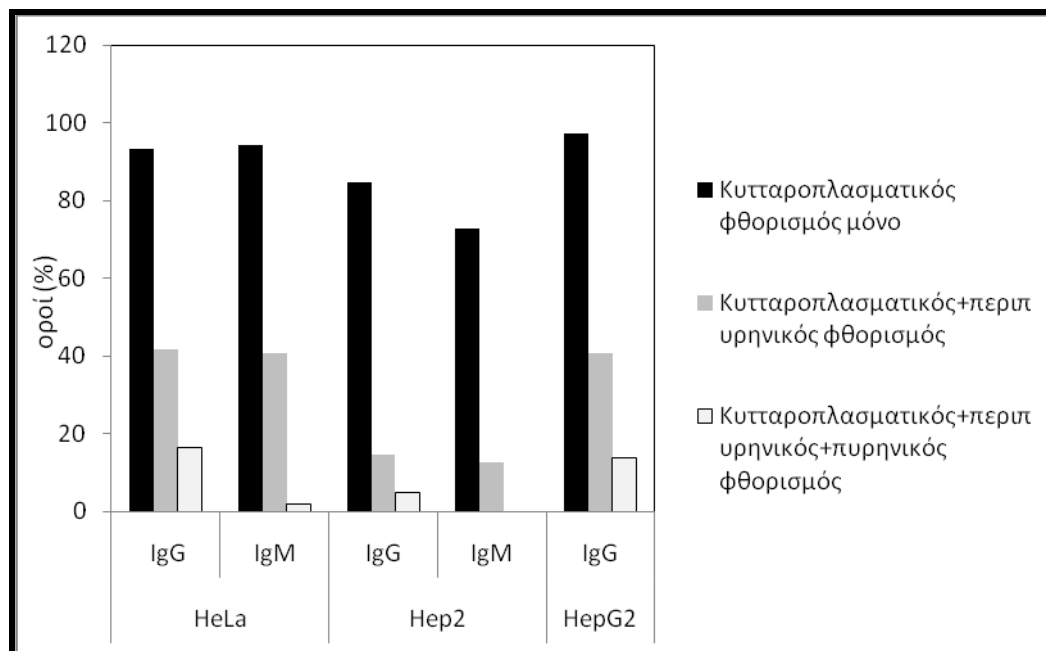
Στη μεγάλη πλειοψηφία των ορών που μελετήθηκαν σε κύτταρα HeLa και HepG2, παρατηρήθηκε συνύπαρξη αντισωμάτων και των δύο τάξεων (IgG και IgM) για διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα.

Αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος, και των δύο τάξεων (IgG και IgM), ανιχνεύθηκαν στην πλειοψηφία των ορών. **(Διάγραμμα 1.4.1.)** Συγκεκριμένα IgG αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος ανιχνεύθηκαν στο 93,2% των ορών, χρησιμοποιώντας κύτταρα HeLa, στο 97,1% των ορών, χρησιμοποιώντας κύτταρα HepG2 και στο 84,5% των ορών, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα εμπορικά παρασκευάσματα κυττάρων Hep2. Τα IgM αντισώματα έναντι του κυτταροπλάσματος βρέθηκαν στο 94,2% των ορών, χρησιμοποιώντας κύτταρα HeLa και στο 72,8% των ορών χρησιμοποιώντας κύτταρα Hep2. Φαίνεται επίσης ότι οι μισοί περίπου από τους ορούς με κυτταροπλασματικό φθορισμό έχουν και αυτοαντισώματα έναντι της πυρηνικής μεμβράνης, 44,8% σε υπόστρωμα κυττάρων HeLa και 42% σε κύτταρα HepG2. Στα εμπορικά παρασκευάσματα κυττάρων Hep2 το ποσοστό των ορών που παρουσιάζει κυτταροπλασματικό και πυρηνικό φθορισμό είναι πολύ μικρότερο (17,2%). Μικρό ποσοστό των ορών παρουσίασε φθορισμό και στα τρία κυτταρικά διαμερίσματα. Συγκεκριμένα κυτταροπλασματικό, πυρηνικό και περιπυρηνικό φθορισμό παρουσίασε συγχρόνως το 16,5% των ορών όταν χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa, το 13,6% όταν χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HepG2 και το 4,9% όταν ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά παρασκευάσματα κυττάρων Hep2.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η συνύπαρξη πυρηνικού και περιπυρηνικού φθορισμού. Όπως φαίνεται **στον πίνακα 1.4.1**, πάνω από το 50% των ορών με αντι-περιπυρηνικά αντισώματα παρουσιάζουν και στικτό πυρηνικό φθορισμό, ανεξαρτήτως υποστρώματος. Παρατηρείται ότι το ποσοστό των ορών στους οποίους συνυπάρχει περιπυρηνικός και στικτός πυρηνικός φθορισμός είναι μεγαλύτερο από τα ποσοστά συνύπαρξης των υπόλοιπων προτύπων πυρηνικού φθορισμού με τον περιπυρηνικό.

Το γεγονός αυτό παρουσιάζει ενδιαφέρον διότι ο στικτός πυρηνικός φθορισμός, που οφείλεται σε αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης sp100 των σωματιδίων PML του πυρήνα, έχει συσχετιστεί με την PBC (Szostecky, Guldner et al. 1990; Evans, Suenaga et al. 1991; Fusconi, Cassani et al. 1991; Orth, Gerken et al. 1997; Zuchner, Sternsdorf et al. 1997; Gao, Tian et al. 2008). Ακόμα ένα είδος πυρηνικού φθορισμού που έχει αναφερθεί ότι συσχετίζεται με τη νόσο είναι ο κεντρομεριδιακός (Bernstein, Callender et al. 1982; Makinen, Fritzler et al.

1983; Parveen, Morshed et al. 1995; Gao, Tian et al. 2008). Όπως φαίνεται το ποσοστό των ορών στους οποίους συνυπάρχουν περιπυρηνικός και κεντρομεριδιακός φθορισμός είναι αρκετά υψηλό σε όλα τα είδη κυττάρων.



Διάγραμμα 1.4.1. Συνύπαρξη και συχνότητα αντισωμάτων για διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα στο σύνολο των ορών.

Συνύπαρξη περιπυρηνικού με:	Κυτταρο-Σειρές				
	Στικτό	Διάστικτο	Κεντρομεριδιακό	Ομοιογενή	Άλλο
HeLa IgG	52,9%	5,8%	17,6%	23,5%	5,8%
HepG2 IgG	57,1%	0%	21,4%	14,3%	7,1%

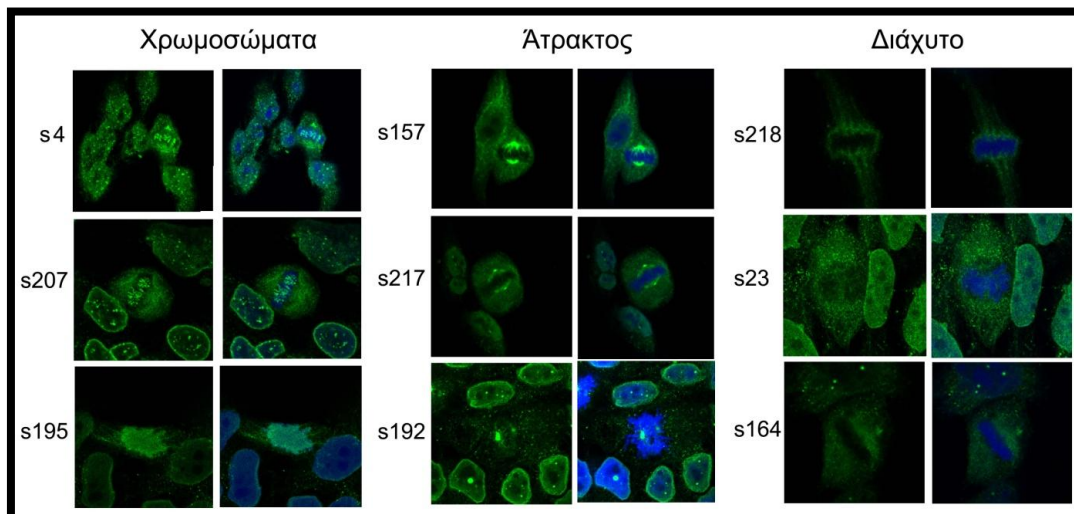
Πίνακας 1.4.1. Συχνότητα συνύπαρξης περιπυρηνικού και διαφόρων προτύπων πυρηνικού φθορισμού στους ορούς με αντιπεριπυρηνικά IgG αντισώματα.

1.5. Πρότυπα φθορισμού των αυτοαντισωμάτων στη μίτωση.

Για τη διερεύνηση της ύπαρξης αντι-κεντρομεριδιακών αυτοαντισωμάτων παρατηρήθηκαν τα πρότυπα φθορισμού των αυτοαντισωμάτων στη μίτωση. Έτσι εξακριβώθηκε ο αριθμός των ορών που είχαν αντισώματα έναντι των κεντρομερών, αφού παρατηρείται στικτός φθορισμός στα χρωμοσώματα. Επίσης εξακριβώθηκε η παρουσία και ο αριθμός των ορών που παρουσιάζουν ομοιογενή πυρηνικό φθορισμό. Οι οροί αυτοί σε υπόστρωμα μιτωτικών κυττάρων παρουσιάζουν ομοιογενή χρωμοσωμικό φθορισμό.

Μελετήθηκε επίσης η εντόπιση των αυτοαντιγόνων, κατά τη μίτωση, σε ορούς με περιπυρηνικό φθορισμό. Οι συγκεκριμένοι οροί παρουσίασαν διάχυτο φθορισμό που οφείλεται στην ύπαρξη αυτοαντισωμάτων IgG και IgM τάξης. Σε συνδυασμό με τον διάχυτο φθορισμό οι οροί εμφάνισαν και άλλα πρότυπα σε μιτωτικά κύτταρα, όπως φθορισμό στα ινίδια της μιτωτικής ατράκτου, των κεντροσωματίων, των κεντρομεριδίων και των χρωμοσωμάτων (**Εικόνα 1.5.1**). Η συνύπαρξη δύο ή και τριών προτύπων φθορισμού είχε παρατηρηθεί και σε μεσοφασικά κύτταρα και οφείλεται στην ύπαρξη περισσότερων του ενός αντισωμάτων, που στοχεύουν αντιγόνα στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα ή/και στην πυρηνική μεμβράνη.

Αναλυτικά στο 22,7% των ορών με περιπυρηνικό φθορισμό βρέθηκαν IgG αυτοαντισώματα που εντοπίζονται στα κεντροσωμάτια ενώ ποσοστό κάτω του 10% (6,8%) παρουσίασε φθορισμό στα ινίδια της ατράκτου. Το ποσοστό των ορών στους οποίους βρέθηκαν IgM αυτοαντισώματα που στοχεύουν στα κεντροσωμάτια (4,3%) και στα ινίδια της ατράκτου (4,3%) είναι μικρότερο. Τέλος στο 1% των ορών βρέθηκαν IgM αυτοαντισώματα που εντοπίζονται στα χρωμοσώματα ή στα κεντρομερή ποσοστό σημαντικά μικρότερο από εκείνα 11,4% και 6,8% IgG τάξης, που εντοπίζονται σε χρωμοσώματα και κεντρομερή, αντίστοιχα (**Πίνακας 1.5.1**). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν συνύπαρξη αυτοαντισωμάτων για πρωτεΐνες της περιφέρειας του πυρήνα και της χρωματίνης ή των κεντρομερών.



Εικόνα 1.5.1. Πρότυπα φθορισμού των αυτοαντισωμάτων στη μίτωση. Στην πρώτη στήλη δίνονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από ορούς με αντισώματα έναντι των κεντρομεριδίων (s4, s207) και έναντι των χρωμοσωμάτων (s195). Παρατηρείται ότι στις εικόνες του s4 υπάρχει και φθορισμός στα κεντροσώματα. Στη δεύτερη στήλη δίνονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από ορούς με αντισώματα έναντι των κεντροσωματίων (s192, s217) και της μιτωτικής ατράκτου (s157, s217). Τέλος στην τελευταία στήλη δίνονται αντιπροσωπευτικές εικόνες ορών που παρουσιάζουν διάχυτο φθορισμό κατά τη μίτωση. Διάχυτος φθορισμός παρατηρείται τόσο στις εικόνες της πρώτης όσο και της δεύτερης στήλης.

	Διάχυτο	Άτρακτος	Κεντροσώματα	Κεντρομερίδια	Χρωμοσώματα
IgG	100%	6,8%	22,7%	11,4%	6,8%
IgM	89%	4,3%	4,3%	1%	1%

Πίνακας 1.5.1. Κατανομή αυτοαντισωμάτων IgG και IgM τάξης στη μίτωση.

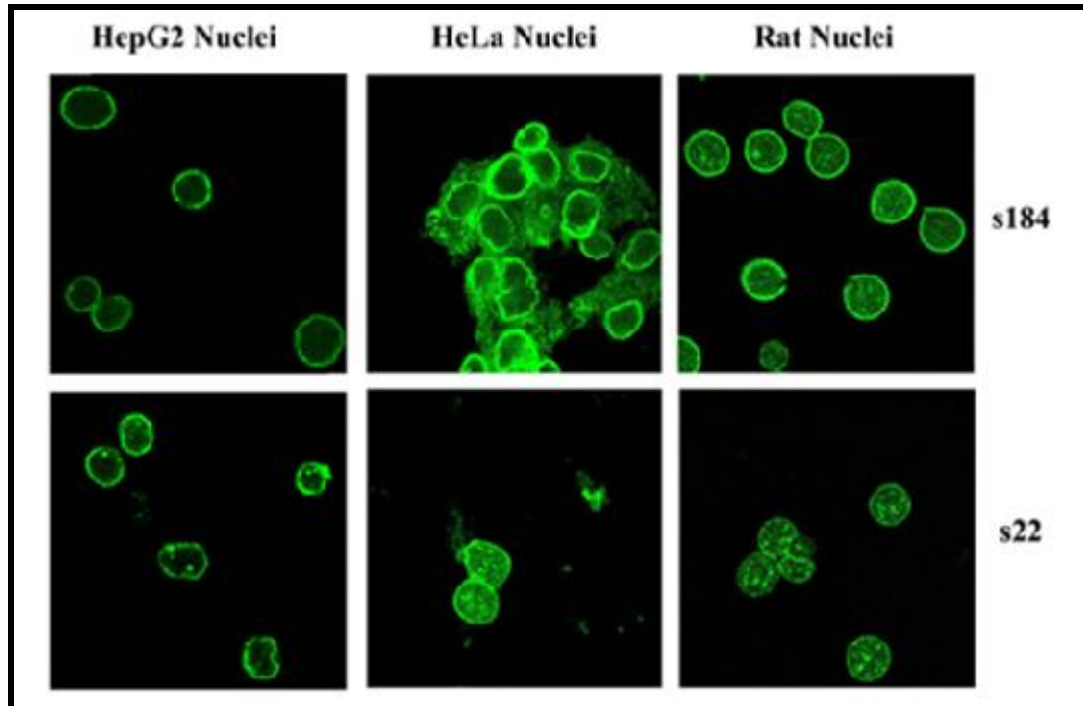
2. Ταυτοποίηση αυτοαντισωμάτων για συγκεκριμένες πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου.

Η διερεύνηση της ταυτότητας των αυτοαντισωμάτων του πυρηνικού φακέλου άρχισε με τον προσδιορισμό του αριθμού και του μοριακού βάρους των αυτοαντιγόνων που αναγνωρίζουν. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης, με υπόστρωμα πυρηνικούς φακέλους από ηπατοκύτταρα αρουραίου. Οι λόγοι για τους οποίους επιλέχθηκε υπόστρωμα από ήπαρ αρουραίου ήταν (α) η εξαιρετική καθαρότητα του υλικού και η καθιερωμένη μεθοδολογία απομόνωσής του, (β) η διαθεσιμότητα του αρχικού υλικού και η ικανοποιητική απόδοση σε ποσότητα και (γ) τα αποτελέσματα μας από την ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων με έμμεσο ανοσοφθορισμό (ενότητα 1) τα οποία έδειξαν την αποτελεσματικότητα των πυρήνων από ήπαρ αρουραίου.

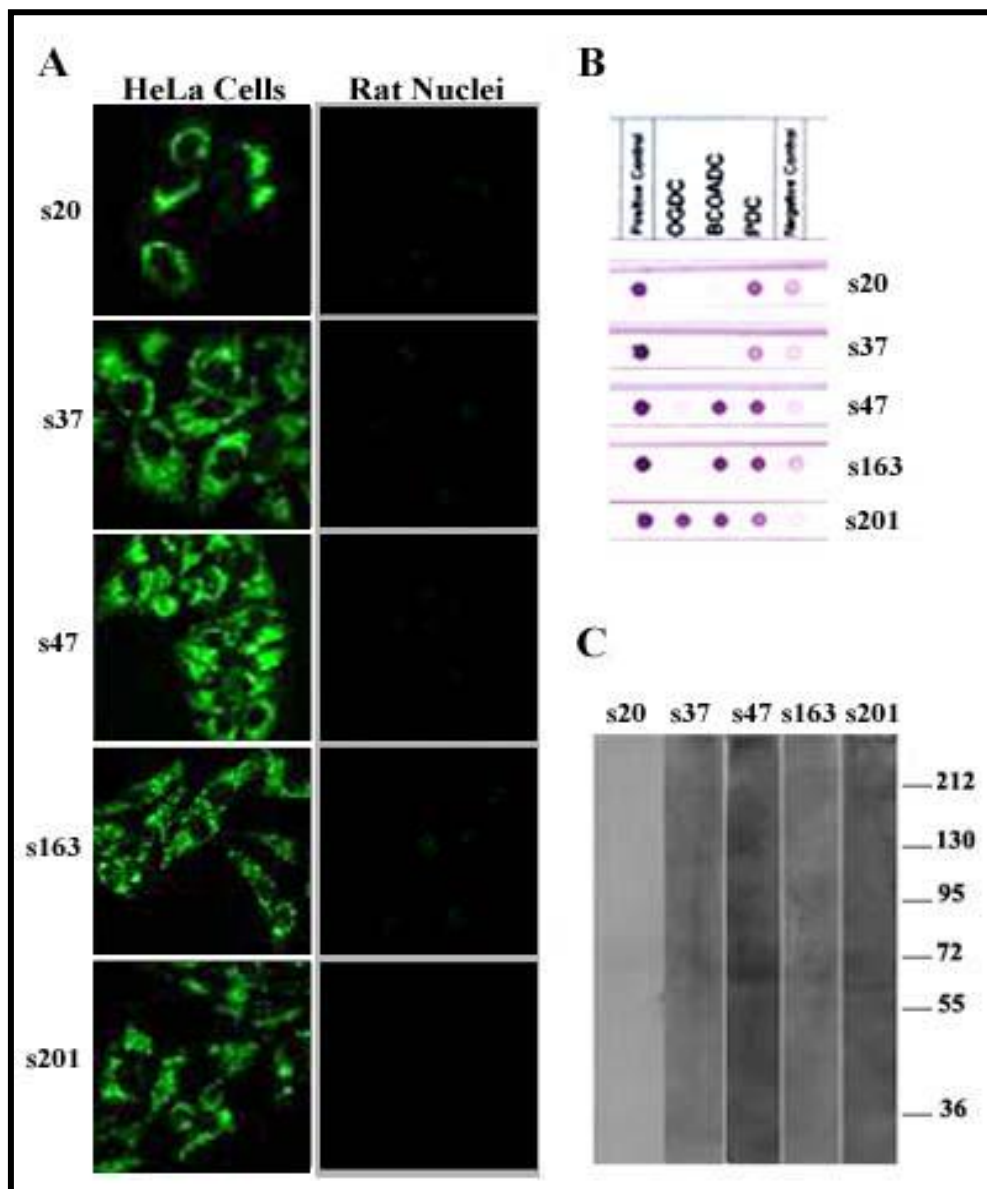
2.1. Καθαρότητα υποστρώματος πυρηνικών φακέλων

Η καθαρότητα του υλικού είναι ιδιαίτερα μεγάλης σημασίας επειδή η πλειονότητα των ορών, πλέον των αντι-περιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων, περιέχει αυτοαντισώματα για συστατικά του κυτταροπλάσματος. Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος των απομονωθέντων πυρήνων με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας ορούς οι οποίοι εκτός από περιπυρηνικό παρουσίασαν και κυτταροπλασματικό πρότυπο φθορισμού. Κατά τον έλεγχο παρατηρήθηκε ότι από τα τρία είδη πυρήνων που απομονώσαμε, δηλαδή κυττάρων HeLa (HeLa nuc), HepG2 (HepG2 nuc) και ήπατος αρουραίων (RLN), κυτταροπλασματικές προσμίξεις υπήρχαν μόνο στους πρώτους. **(Εικόνα 2.1.1.)** Έτσι τόσο οι πυρηνικοί φάκελοι από πυρήνες HepG2 όσο και οι πυρήνες ηπατοκυττάρων αρουραίου αποτελούν κατάλληλο υπόστρωμα για την περαιτέρω διερεύνηση των αντιπεριπυρηνικών αυτοαντιγόνων. Στην παρούσα μελέτη προτιμήθηκαν οι πυρηνικοί φάκελοι από ηπατοκύτταρα αρουραίου για το λόγο ότι μπορούσαν να απομονωθούν μεγάλες ποσότητες σε μικρότερο χρονικό διάστημα και με πολύ μικρότερο οικονομικό κόστος από ότι οι πυρηνικοί φάκελοι από πυρήνες HepG2.

Αφού απομονώθηκαν οι πυρηνικοί φάκελοι ελέγχθηκαν ξανά για κυτταροπλασματικές προσμίξεις. Ο έλεγχος έγινε με ανοσοανίχνευση χρησιμοποιώντας ορούς με αποκλειστικά φαινότυπο κυτταροπλασματικού φθορισμού **(εικόνα 2.1.2. Α)**, στους οποίους ανιχνεύθηκαν αντι-μιτοχονδριακά αντισώματα. Επιπλέον, ανοσοαποτύπωση σε υπόστρωμα πυρηνικών φακέλων από ηπατοκύτταρα αρουραίων έδειξε ότι το συγκεκριμένο υλικό δεν περιέχει προσμίξεις από μιτοχονδριακό υλικό **(εικόνα 2.1.2. Β)**.



Εικόνα 2.1.1. Έλεγχος καθαρότητας πυρήνων από κυτταροπλασματικές προσμίξεις. Στην εικόνα φαίνονται δύο αντιπροσωπευτικοί οροί, όπου συνυπάρχουν αντι-κυτταροπλασματικά αντισώματα μαζί με αντι-περιπυρηνικά. Παρατηρείται ότι στους πυρήνες από ηπατοκύτταρα αρουραίων και στους πυρήνες από κύτταρα HepG2 δεν ανιχνεύθηκαν κυτταροπλασματικές προσμίξεις.



Εικόνα 2.1.2. Έλεγχος καθαρότητας πυρήνων και πυρηνικών φακέλων από ήπαρ αρουραίων.

(A) Πρότυπα φθορισμού κυττάρων HeLa και πυρήνων από ήπαρ αρουραίων. Οι συγκεκριμένοι οροί δείχνουν αποκλειστικά κυτταροπλασματικό φθορισμό. (B) Ανάλυση dot blot συγκεκριμένων αντι-μιτοχονδριακών αντισωμάτων με εμπορικά διαθέσιμο kit. Οι οροί που χρησιμοποιήσαμε περιέχουν από 1 έως 3 διαφορετικά αντι-μιτοχονδριακά αυτοαντισώματα. (C) Ανοσοαποτύπωση σε υπόστρωμα πυρηνικών φακέλων από ήπαρ αρουραίων. Το υλικό φαίνεται ότι δεν περιέχει προσμίξεις από μιτοχόνδρια καθότι οι οροί δεν αναγνωρίζουν πρωτεΐνες του συγκεκριμένου υποστρώματος.

2.2. Προσδιορισμός του αριθμού και του μοριακού βάρους των αυτοαντιγόνων της πυρηνικής μεμβράνης.

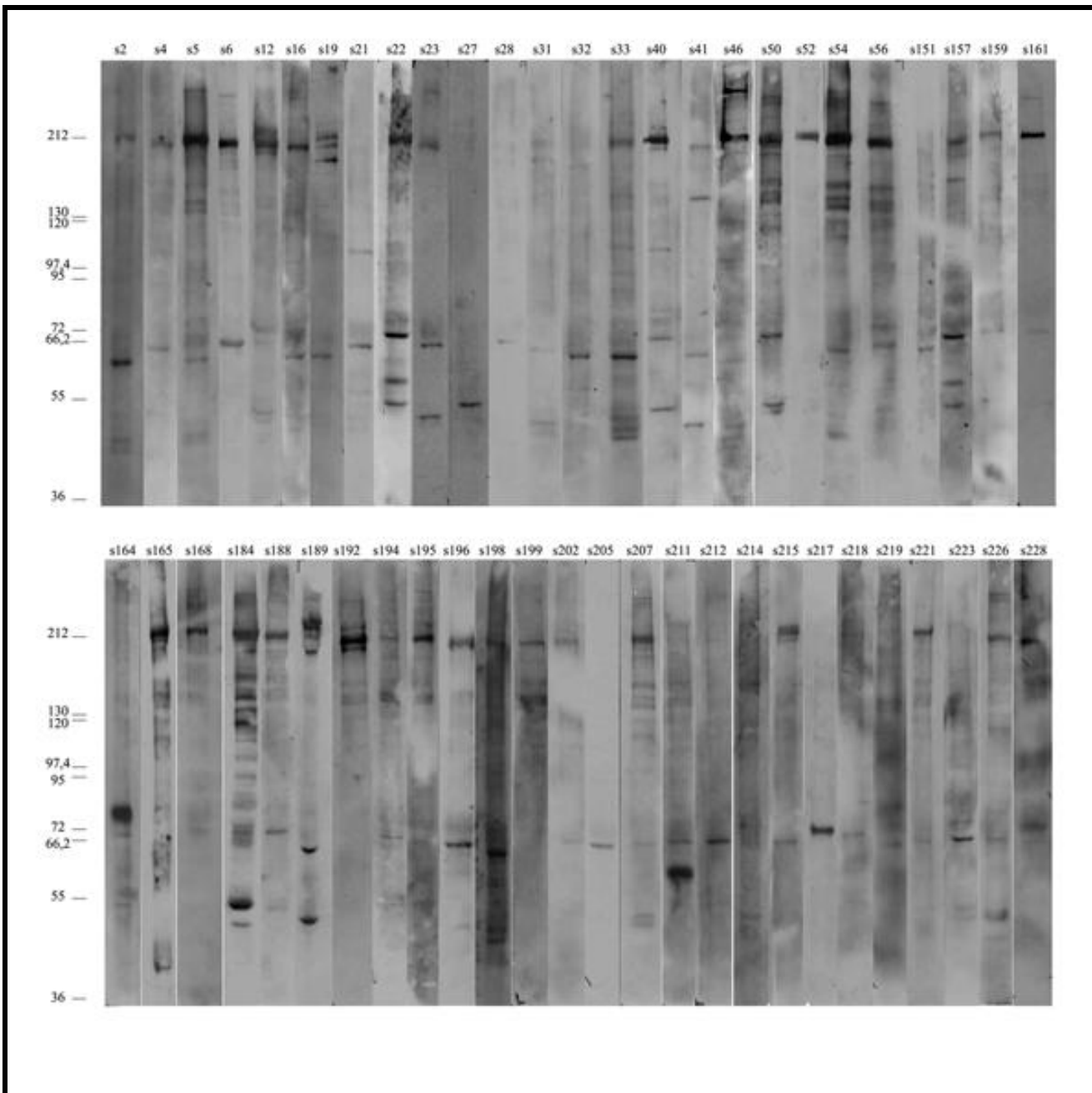
Με τη μέθοδο της ανοσοανίχνευσης προσδιορίστηκε ο αριθμός και το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου, οι οποίες είναι αυτοαντιγόνα για τους PBC ορούς. Ως αντιγονικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν οι καθαροί από προσμίξεις πυρηνικοί φάκελοι ηπατοκυττάρων αρουραίων. Στη διαδικασία αυτή συμπεριλήφθηκαν οι 52 οροί στους οποίους ανιχνεύθηκαν αντι-περιπυρηνικά αυτοαντισώματα με ανοσοφθορισμό. Τα αυτοαντιγόνα που αναγνώρισε ο κάθε ορός καθώς και τα μοριακά τους βάρη, φαίνονται στην **εικόνα 2.2.1**. Παρατηρείται ότι τα αυτοαντιγόνα που αναγνώρισε η πλειοψηφία των ορών ομαδοποιούνται σε δύο κυρίως κατηγορίες, τα υψηλού μοριακού βάρους (γύρω στα 210kDa) και τα μετρίου μοριακού βάρους (μεταξύ 55 και 75kDa). Το 83% των ορών με αυτοαντισώματα έναντι του πυρηνικού φακέλου έχουν αυτοαντισώματα έναντι αντιγόνων με μοριακό βάρος μεταξύ 55-75kDa και το 66% έχει αντισώματα έναντι αυτοαντιγόνου στα 210kDa. Πιθανά αυτοαντιγόνα για αντισώματα ορών σε ασθενείς με PBC αποτελούν η gp210 (210 kDa), ο LBR (58 kDa), οι πυρηνικές λαμίνες (64-72 kDa), οι Laps (LAP1 55-75kDa, LAP2 53kDa) και η p62 (62 kDa).

2.3. Διερεύνηση της ύπαρξης αντισωμάτων για την γλυκοπρωτεΐνη gp210.

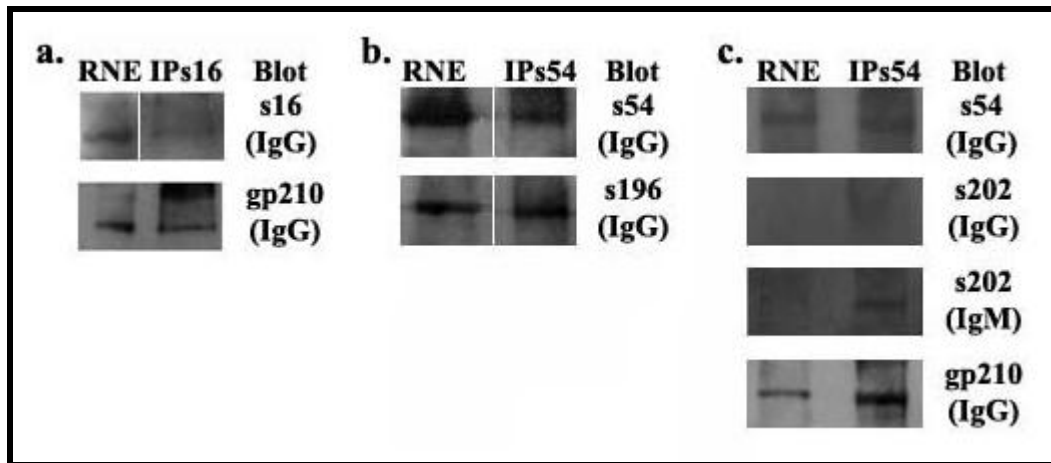
Η ύπαρξη αντι-gp210 αυτοαντισωμάτων διερευνήθηκε αρχικά χρησιμοποιώντας συγκεκριμένη εμπορικά διαθέσιμη και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο ELISA. Από το 34% των ορών με αντισώματα έναντι πρωτεΐνης μοριακού βάρους ~210kDa ταυτοποιήθηκε ότι το 22,3% των ορών είχαν αντισώματα G τάξης ανοσοσφαιρινών έναντι της gp210 γλυκοπρωτεΐνης και συγκεκριμένα έναντι του επιτόπου στο C-τελικό άκρο της. Στο υπόλοιπο 11,7% των ορών με αντισώματα έναντι του μη ταυτοποιημένου αυτοαντιγόνου των ~210kDa, θα μπορούσαν να υπάρχουν αντι-gp210 αντισώματα IgM τάξης ή αντισώματα έναντι του επιτόπου στο N-τελικό της άκρο καθώς και αντισώματα άλλης εξειδίκευσης για άγνωστο αυτοαντιγόνο.

Για τη διερεύνηση των πιο πάνω περιπτώσεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης και στη συνέχεια της ανοσοαποτύπωσης, χρησιμοποιώντας δευτερογενή αντισώματα IgG ή IgM τάξης. (**Εικόνα 2.3.1**) Για την απομόνωση με ανοσοκατακρήμνιση των αυτοαντιγόνων μοριακού βάρους 210kDa χρησιμοποιήθηκαν είτε οι ίδιοι οι οροί, είτε εναλλακτικά οροί για τους οποίους είχε εξακριβωθεί με τη μέθοδο ELISA και φασματοσκοπία μαζών ότι περιείχαν αυτοαντισώματα για την gp210.

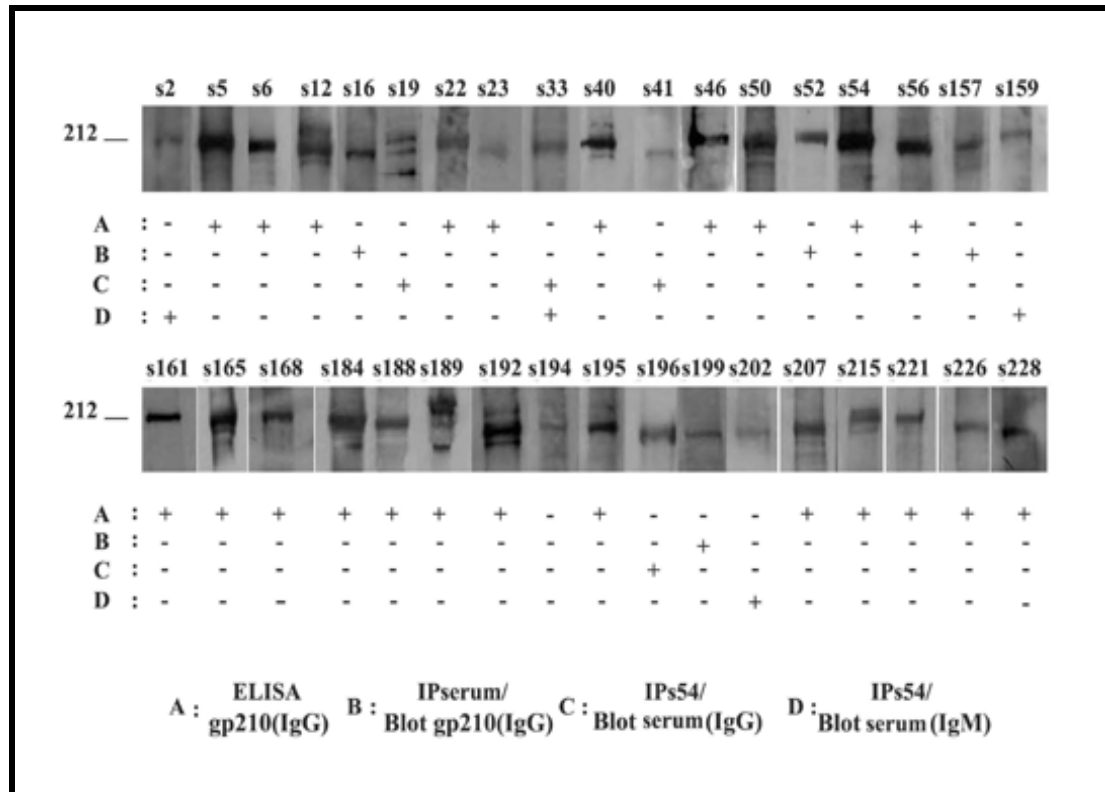
Χρησιμοποιώντας την παραπάνω μεθοδολογία βρέθηκε ότι όλοι οι οροί, πλην ενός (s194, **Εικόνα 2.3.2**) που αναγνωρίζουν τη ζώνη στα 210kDa είχαν αυτοαντισώματα για την gp210. Έτσι το τελικό ποσοστό των ορών με αντι-gp210 αντισώματα ανήλθε στο 32%, του συνόλου των ορών από το οποίο το 22,3% είχε ανοσοσφαιρίνες G τάξης ανιχνεύσιμες με ELISA για τον επίτοπο στο C-τελικό άκρο, το 2,9% είχε αντισώματα M τάξης ανοσοσφαιρινών για έναν από τους δύο επιτόπους και τέλος το 7,8% είχε αντισώματα G τάξης των οποίων ο τίτλος είναι ενδεχόμενα εκτός των ορίων ανίχνευσης αντισωμάτων με ELISA ή αφορά αντισώματα έναντι του επιτόπου στο N-τελικό άκρο. (**Εικόνα 2.3.2**)



Εικόνα 2.2.1. Τα μοριακά βάρη κι ο αριθμός των πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου για τις οποίες εμφανίζονται αυτοαντισώματα οι οροί ασθενών με PBC. Για την ανοσοανίχνευση χρησιμοποιήθηκαν πυρηνικοί φάκελοι από ηπατοκύτταρα αρουραίου, ως υπόστρωμα. Στα αριστερά αναγράφεται κλίμακα μοριακών βαρών. Πάνω από κάθε στήλη αναγράφεται ο ορός που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοανίχνευση.



Εικόνα 2.3.1. Μεθοδολογία για την ταυτοποίηση των αυτοαντισωμάτων αντι-gp210 με ανοσοκατακρήμνιση και ανοσοαποτύπωση. (a) Η ανοσοκατακρήμνιση έγινε με τον ορό s16. Η ανοσοαποτύπωση έγινε τόσο με τον ίδιο τον ορό για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη της πρωτεΐνης όσο και με το αντίσωμα αντι-gp210 για να αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη που κατακρημνίζεται από τον ορό s16, είναι η gp210. (b,c) Η ανοσοκατακρήμνιση έγινε με τον ορό s54, που αποδείχθηκε ότι έχει αντισώματα για την πρωτεΐνη gp210 τόσο με ELISA όσο και με φασματοσκοπία μαζών. Αρχικά πιστοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση ότι η πρωτεΐνη ανοσοκατακρημνίσθηκε, χρησιμοποιώντας τον ορό s54 και στη συνέχεια διερευνήθηκε αν άλλοι οροί περιέχουν (s196) ή όχι (s202) αυτοαντισώματα IgG ή IgM τάξης για την gp210.



Εικόνα 2.3.2. Ταυτοποίηση αντι-grp210 αντισωμάτων. Με τη μέθοδο ELISA ανιχνεύθηκαν IgG αντισώματα που αναγνωρίζουν τον επίτοπο στο C-τελικό άκρο (A). Με τη μέθοδο ανοσοκατακρήμνισης/ανοσοαποτύπωσης ανιχνεύθηκαν IgG αντι-grp210 αντισώματα (B, C) και τα IgM αντι-grp210 αντισώματα (D). Σύμφωνα με τη μέθοδο που ακολουθήθηκε (βλέπε εικόνα 2.3.1.) στο (B) η grp210 κατακρημνίστηκε από τον ορό και ταυτοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση από αντι-grp210 αντίσωμα. Στα (C) και (D) η grp210 πρωτεΐνη ανοσοκατακρημνίστηκε από τον ορό 54 και αναγνωρίστηκε με ανοσοαποτύπωση από τα αντισώματα των ορών χρησιμοποιώντας δευτερογενή αντίσωμα IgG ή IgM τάξης.

2.4. Διερεύνηση της ύπαρξης αντισωμάτων για την πρωτεΐνη p62.

Για τη διερεύνηση της ύπαρξης αντισωμάτων στους ορούς έναντι της πρωτεΐνης p62 χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι της ανοσοκατακρήμνισης και της ανοσοαποτύπωσης. Για την ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν δύο μονοκλωνικά αντισώματα το αντι-p62 που έχει ως επίτοπο το N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και το mAb414 που είναι αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει ως επίτοπο την FXFG αλληλουχία αμινοξέων, την οποία έχει και η πρωτεΐνη p62.

Στη συνέχεια το υλικό που κατακρημνίστηκε καθώς και δείγμα πυρηνικών φακέλων και εκχύλισμα αυτών πριν και μετά την ανοσοκατακρήμνιση ανοσοαποτυπώθηκαν χρησιμοποιώντας όλους τους ορούς εκείνους που αναγνώρισαν πρωτεϊνική ζώνη στα 55-75kDa. **(Εικόνα 2.2.1)** Χαρακτηριστικά παραδείγματα της συγκεκριμένης διαδικασίας παρουσιάζονται στην **εικόνα 2.4.1**.

Σε κανένα από τους ορούς δεν βρέθηκαν αντι-p62 αντισώματα. Το γεγονός αυτό δεν οφείλεται σε αποτυχία της μεθόδου, που ακολουθήθηκε, διότι όταν έγινε ανοσοανίχνευση με το αντι-p62 ή το mAb414 αντίσωμα φάνηκε ότι η πρωτεΐνη είχε κατακρημνιστεί και μάλιστα ποσοτικά. **(Εικόνα 2.4.1.)** Επίσης οι πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται από τους ορούς βρίσκονται στο εκχύλισμα μετά την ανοσοαφαίρεση της p62 από αυτό.

2.5. Διερεύνηση της ύπαρξης αντισωμάτων έναντι των λαμινών.

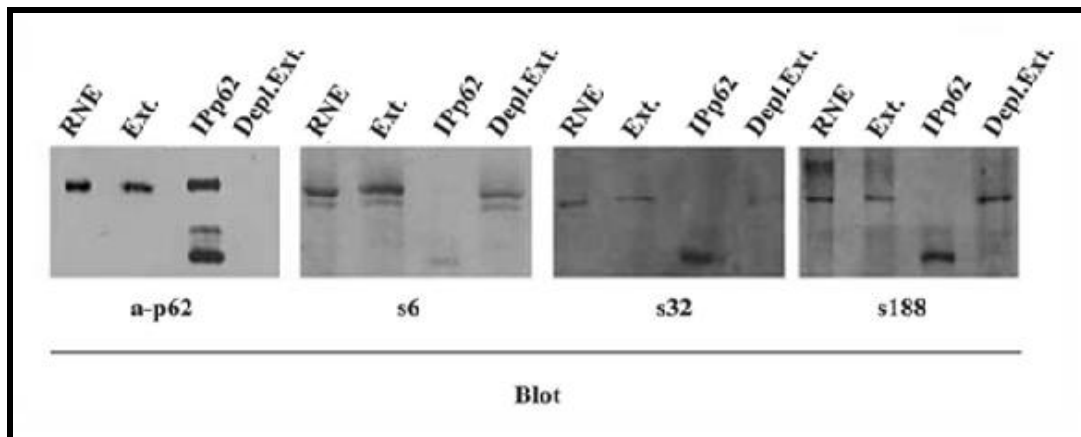
Η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων έναντι των λαμινών διερευνήθηκε με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας ως αντιγονικό υλικό κλάσματα λαμινών, που καθαρίστηκαν από πυρηνικούς φακέλους ηπατοκυττάρων αρουραίων με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Οι λαμίνες A και C εκλούνται στα ίδια κλάσματα ενώ η λαμίνη B εντοπίζεται σε ξεχωριστό κλάσμα. **(Εικόνα 2.5.1.)**

Αντισώματα για λαμίνες ανιχνεύθηκαν σε 10 ορούς (9,7%) **(Εικόνα 2.5.2)**. Από αυτούς οι 8 (s16, s19, s32, s50, s204, s205, s211, s219) περιείχαν αντισώματα έναντι της λαμίνης A ενώ ένας ορός περιείχε αντισώματα για κάθε μια εκ των λαμινών B (s6) και C (s211). Ο ορός s204 δεν παρουσιάζει περιπυρηνικό φθορισμό αλλά πυρηνικό, φαινότυπος που παρουσιάζει η LmnA εναλλακτικά του περιπυρηνικού φθορισμού, λόγω της παρουσίας της πρωτεΐνης στο πυρηνόπλασμα.

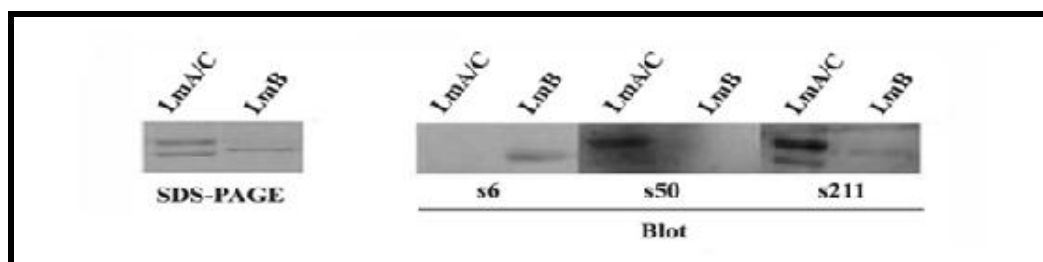
2.6. Διερεύνηση της ύπαρξης αυτοαντισωμάτων έναντι του LBR.

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των αντι-LBR αντισωμάτων ήταν η χιμαιρική πρωτεΐνη NT-LBR-GST που παράχθηκε από βακτήρια *E. Coli* και καθαρίστηκε με χρωματογραφία αγκιστείας. Η πρωτεΐνη αυτή πρωτεολύεται πολύ εύκολα από τη στιγμή της παραγωγής της, και ως εκ τούτου συνοδεύεται από τα πρωτεολυτικά της παράγωγα. Στην **εικόνα 2.6.1** φαίνεται ο LBR σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου με τα πρωτεολυτικά του παράγωγα (d.p.), στα δεξιά και το ανοσοαποτύπωμα του (a-LBR) καθώς και αυτό χαρακτηριστικών ορών αρνητικών (s33, s201) και θετικών σε a-LBR αυτοαντισώματα (s211, s21) και χαμηλού τίτλου (s196) στο αριστερό μέρος της εικόνας.

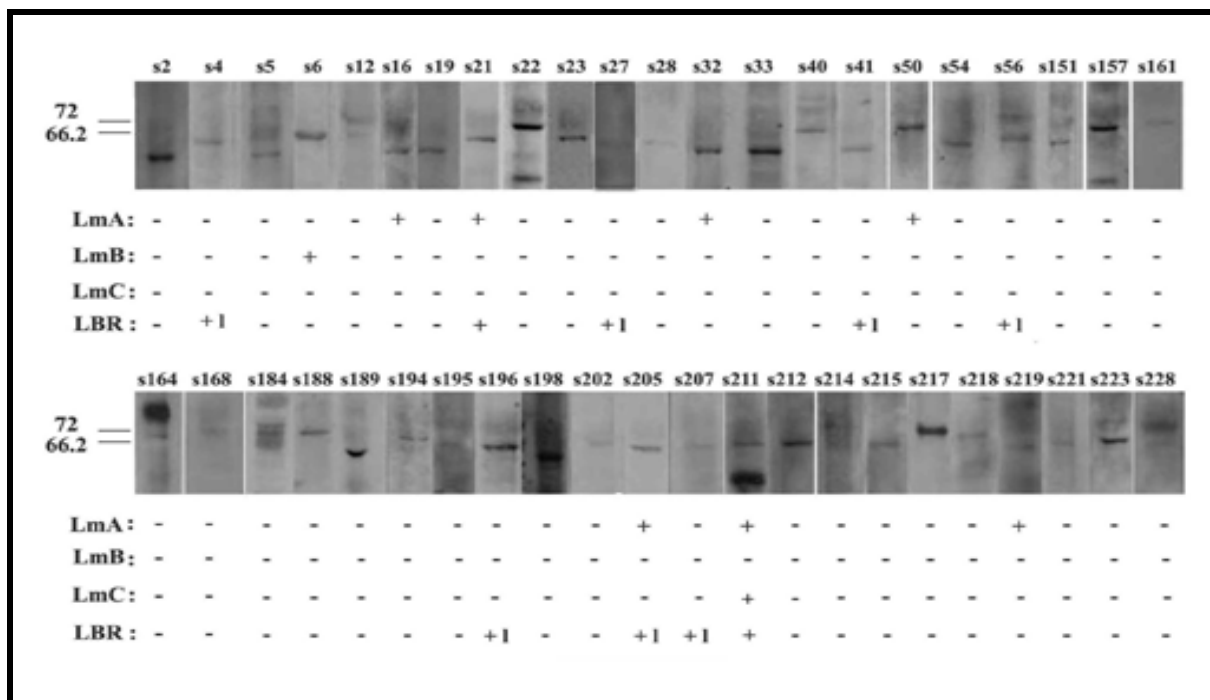
Αντι-LBR αντισώματα ανιχνεύθηκαν στο 8,7% των ορών (**Εικόνα 2.5.2**). Δυο οροί (s21, s211) περιείχαν υψηλού τίτλου αντισώματα ενώ οι υπόλοιποι 7 χαμηλού τίτλου (s4, s27, s41, s56, s196, s205, s207). Η ύπαρξη αντι-LBR αντισωμάτων επιβεβαιώθηκε και με τη μέθοδο ELISA, στους ορούς με υψηλού τίτλου αντισώματα. Οι οροί στους οποίους βρέθηκαν χαμηλού τίτλου αντι-LBR αντισώματα, η απορρόφηση που είχαν ήταν στα όρια θετικού και αρνητικού αποτελέσματος, γεγονός που επιβεβαιώνει τον χαμηλό τίτλο.



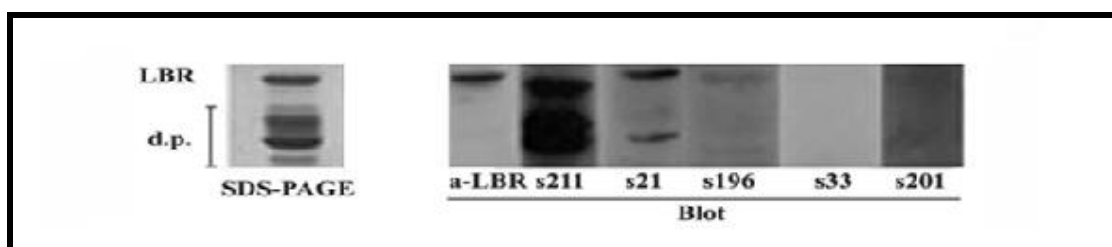
Εικόνα 2.4.1. Διερεύνηση της ύπαρξης αντι-p62 αντισωμάτων στους ορούς των ασθενών με PBC. Κάθε ορός επώαστηκε με μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην οποία καθηλώθηκαν πυρηνικοί φακέλοι από ηπατοκύτταρα αρουραίων (RNE), εκχύλισμα τους με απορρυπαντικό Triton (Ext.), η πρωτεΐνη p62 που ανοσοκατακρημνίστηκε χρησιμοποιώντας το αντι-p62 αντίσωμα (IP p62) και το εκχύλισμα πυρηνικών φακέλων ηπατοκυττάρων αρουραίων μετά την απομάκρυνση της πρωτεΐνης p62 (Depl.Ext.). Η πρώτη τετράδα υποστρωμάτων, ξεκινώντας από τα αριστερά, επώαστηκε με αντίσωμα αντι- p62 (a-p62), η δεύτερη με τον ορό s6, η τρίτη με τον ορό s32 και η τέταρτη με τον ορό s188.



Εικόνα 2.5.1. Διερεύνηση της ύπαρξης αντισωμάτων έναντι των λαμινών. SDS-PAGE λαμινών A/C και B. (αριστερά) Οι οροί που φαίνονται στην εικόνα είναι ο ορός όπου ανιχνεύθηκαν αντισώματα έναντι της λαμίνης B (s6), ο ορός με αντι- lamin A αντισώματα (s50) και ένας αντιπροσωπευτικός ορός με αντι-lamin A/C αντισώματα.



Εικόνα 2.5.2. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ταυτοποίησης αυτοαντισωμάτων για λαμίνες και LBR. Οι διάφοροι οροί που αναγνώριζαν ζώνη(ες) μεταξύ 55 και 75 kDa παρουσιάζονται στο επάνω μέρος ενώ από κάτω σημειώνεται η παρουσία (+) η απουσία (-) ή ο χαμηλός τίτλος (+1) αυτοαντισωμάτων για τις λαμίνες (LmA, LmB, LmC) και τον LBR.



Εικόνα 2.6.1. Διερεύνηση της ύπαρξης αυτοαντισωμάτων για τον LBR. Στο SDS-PAGE φαίνεται το άμινο τελικό άκρο του LBR και τα πρωτεολυτικά του παράγωγα (d.p.). Το αντι-LBR πολυκλωνικό αντίσωμα από κουνέλι, αναγνωρίζει την άθικτη πρωτεΐνη ενώ οι οροί αναγνωρίζουν και τα πρωτεολυτικά παράγωγα. Οι δύο πρώτοι οροί (s211, s21) έχουν υψηλού τίτλου αντι-LBR αντισώματα, ο τρίτος (s196) χαμηλού και οι δύο τελευταίοι (s33, s201) δεν έχουν αντι-LBR αυτοαντισώματα. Από τους ορούς που είναι αρνητικοί ο πρώτος (s33) έχει αντι-περιπυρηνικά αντισώματα ενώ ο δεύτερος (s201) έχει αντισώματα μόνο έναντι των μιτοχονδρίων.

2.7. Ταυτοποίηση αυτοαντιγόνων με φασματοσκοπία μαζών.

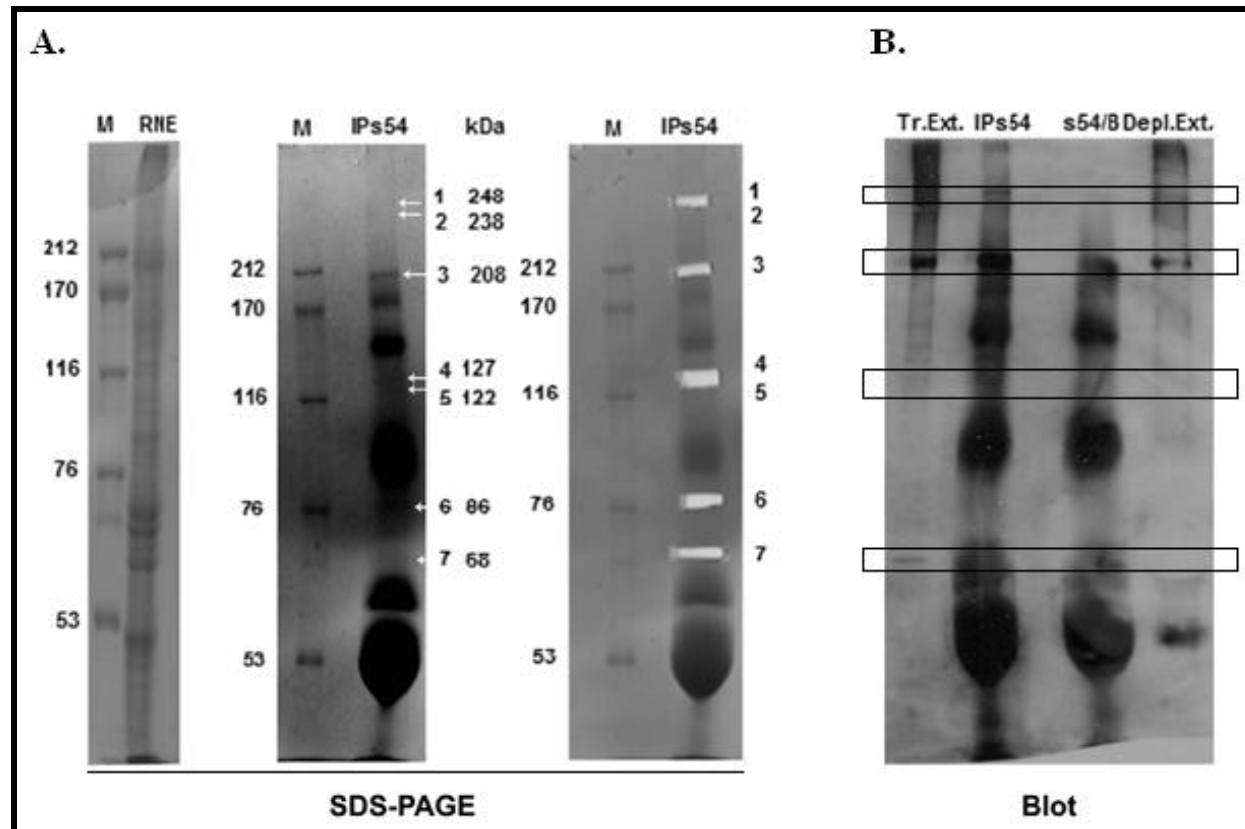
Με σκοπό την επιβεβαίωση της ταυτότητας ήδη χαρακτηρισμένων (παράγραφοι 2.3 έως 2.5) αντιγόνων καθώς και τη διερεύνηση της ταυτότητας πιθανών νέων αυτοαντιγόνων χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία μαζών. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει (Εικόνα 2.2.3) αρκετοί οροί αναγνωρίζουν περισσότερες της μιας πρωτεϊνικές ζώνες μετά από ανοσοαποτύπωση σε υπόστρωμα πυρηνικών φακέλων. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήσαμε τους ορούς 16, 50 και 54 που πιθανά περιέχουν περισσότερα του ενός αυτοαντισώματα για να απομονώσουμε με ανοσοκατακρήμιση τα αντίστοιχα αυτοαντιγόνα από εκχυλίσματα πυρηνικών φακέλων ηπατοκυττάρων αρουραίου.

Οι πρωτεΐνες που κατακρημνίστηκαν από τον ορό 54 διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτυπώθηκαν από τα αυτοαντισώματα του ορού 54 (**Εικόνα 2.7.1. Α και Β**). Οι πρωτεϊνικές ζώνες που εμφανίστηκαν μετά από χρώση της πηκτής απομονώθηκαν από αυτήν (**Εικόνα 2.7.1.Α**) και ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία μαζών από την ομάδα του Κου Παναγιώτου στο ερευνητικό κέντρο «Αλ. Φλέμιγκ».

Οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν είναι η gr210 (ζώνη 3, 208 kDa), η RanBP5 ή importin B (ζώνη 5, 122 kDa), ο μεταγραφικός παράγοντας Single minded homologue 1, SIM1 (ζώνη 6, 86 kDa) και η πρωτεΐνη των πυρηνίσκων U3 (small nucleolar RNA associated protein), που λαμβάνει μέρος κατά την pre-mRNA διαδικασία (ζώνη 7, 68 kDa) (**Εικόνα 2.7.1. και Πίνακας 2.7.1**). Η gr210 είναι πρωτεΐνη των πυρηνικών πόρων ενώ οι U3 και SIM1 είναι πρωτεΐνες των σωματιδίων του πυρήνα (μεταγραφικές περιοχές/OPT σωματίδια και πυρηνίσκο, αντίστοιχα) και η RanBP5 είναι πρωτεΐνη που μεταφέρει, μέσω των πόρων, πρωτεΐνες εντός και εκτός του πυρήνα. Η ύπαρξη αντισωμάτων αντι-gr210 σε ορούς ασθενών με PBC είναι γνωστή από τη βιβλιογραφία ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες δεν έχουν αναφερθεί ως αυτοαντιγόνα. Οι πρωτεΐνες U3 και RanBP5 ενώ δεν αποτελούν συστατικά του πυρηνικού πόρου έχουν εντοπιστεί σε μελέτες του πρωτεώματος του (Cronshaw, Krutchinsky et al. 2002) και φαίνεται να αναγνωρίζονται ασθενώς από αυτοαντισώματα του ορού 54 (**Εικόνα 2.7.1. Β**). Αντίθετα, ο μεταγραφικός παράγοντας SIM1 δεν φαίνεται να αποτελεί αυτοαντιγόνο και το πιθανότερο είναι να συγκατακρημνίζεται με μια εκ των 3 άλλων πρωτεϊνών.

Επιπλέον, χρησιμοποιώντας τους ορούς s16 και s50 επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών gr210 και λαμίνης A (LmnA). Στον ορό s50 βρέθηκε πλέον της LmnA, που είχε ταυτοποιηθεί προηγουμένα ως αυτοαντιγόνο, και η πρωτεΐνη LAP1. Αυτό είναι αναμενόμενο λόγω του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών και του

γεγονότος ότι οι 2 πρωτεΐνες είναι βιβλιογραφικά γνωστό (Foisner and Gerace 1993; Maison, Pyrgasopoulou et al. 1997) ότι αλληλεπιδρούν. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και με τον ορό s212, όπου η LAP1 συνεντοπίστηκε επίσης με λαμίνες. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ της ύπαρξης αυτοαντισωμάτων για τη LAP1 ιδιαίτερα όσον αφορά στον ορό 212 (Εικόνα 2.5.2) στον οποίο δεν ταυτοποιήθηκαν αυτοαντισώματα για τις λαμίνες, χρησιμοποιώντας απομονωμένες πρωτεΐνες. .



Εικόνα 2.7.1. Πρωτείνες που ανοσοκατακρημίστηκαν από αυτοαντισώματα του ορού 54. **(Α)** Ηλεκτροφορητικό προφίλ που εμφανίζει δείκτες μοριακών βαρών και ενδιαφέρουσες πρωτεϊνικές ζώνες (1-7) με τα πιθανά μοριακά τους βάρη (αριστερά) και το πήκτωμα μετά την αποκοπή των ζωνών (δεξιά). **(Β)** Ανοσοαποτύπωμα εκχυλίσματος πυρηνικών φακέλων (Tr.Ext.), πρωτεϊνών που ανοσοκατακρημίστηκαν από τον ορό 54 (IPs54), ανοσοσφαιρινών του ορού (ανοσοκατακρήμιση από τον ορό 54 απουσία εκχυλίσματος, s54/B) και εκχυλίσματος πυρηνικών φακέλων που απέμεινε μετά από την ανοσοκατακρήμιση (Depl.Ext.). Σημασμένες είναι οι περιοχές που αντιστοιχούν σε πρωτείνες που αναγνωρίζονται από αυτοαντισώματα του s54 στο εκχύλισμα και το υλικό της ανοσοκατακρήμισης (2 πρώτες γραμμές) και δεν αποτελούν ζώνες που οφείλονται σε ολιγομερισμό των ανοσοσφαιρινών (τρίτη γραμμή, s54/B).

Οροί	Μοριακό Βάρος (kDa)	Ταυτοποίηση
s16	210	gp210: δομική πρωτεΐνη NPC
	55-75	LmA: πρωτεΐνη της λάμινας
s50	210	gp210: δομική πρωτεΐνη NPC
	55-75	LAP1: πρωτεΐνη της INM Lamins: πρωτεΐνες της λάμινας
s54	210	gp210: πρωτεΐνη της λάμινας
	127	RanBP5: importin B
	86	SIM1: μεταγραφικός παράγοντας
	68	U3: πρωτεΐνη των sno RNP
s212	55-75	LAP1: πρωτεΐνη της INM LmB: πρωτεΐνη της λάμινας

Πίνακας 2.7.1. Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία μαζών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση είναι μια χρόνια χολοστατική νόσος του ήπατος, που οδηγεί τελικά σε κίρρωση (Kaplan and Gershwin 2005; Muratori, Granito et al. 2008). Εμφανίζεται, ως επί το πλείστον, σε γυναίκες (αναλογία 9:1) μέσης ηλικίας. Εικάζεται ότι τα άτομα που νοσούν έχουν γενετική προδιάθεση. Εν δυνάμει αιτίες της ανάπτυξης της νόσου μπορούν επίσης να είναι περιβαλλοντικοί παράγοντες (μολύνσεις, χημικά, κάπνισμα) (Kumagi and Heathcote 2008). Για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της PBC έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί από τους οποίους ο επικρατέστερος είναι η μοριακή μίμηση (molecular mimicry). Η υπόθεση της ενεργοποίησης του ανοσολογικού συστήματος με μιμητισμό (molecular mimicry) βασίζεται στην αναγνώριση αλληλουχίας αμινοξέων (ExDK) η οποία είναι ίδια (Van de Water, Ishibashi et al. 2001; Selmi and Gershwin 2009) με προκαρυωτικά αντιγόνα διαφόρων μικροβίων, συμπεριλαμβανομένου και του *E.Coli* (Shimoda, Nakamura et al. 2000; Selmi and Gershwin 2009).

Ειδικά αντισώματα στην ανοσοπαθολογία του ασθενούς με PBC είναι τα AMA που εμφανίζονται στο 95% περίπου των περιπτώσεων (Oertelt, Rieger et al. 2007; Selmi and Gershwin 2009). Διάφορα βακτήρια (*Novosphingobium aromaticivorans*, *Lactobacillus delbruekii*, *Escherichia coli*) αλλά και περιβαλλοντικά χημικά προϊόντα (βρωμοεξανοϊκός εστέρας) έχουν ομολογία με το κύριο αντι-μιτοχονδριακό αντιγόνο (PDC-E2) (Leung, Quan et al. 2003; Selmi, Balkwill et al. 2003; Bogdanos, Smith et al. 2005). Σε ένα ποσοστό 5%-10% των ασθενών δεν ανιχνεύονται αντι-μιτοχονδριακά αντισώματα (AMA-αρνητικοί) ενώ τα κλινικά, βιοχημικά και ιστολογικά ευρήματα δείχνουν ότι έχουν PBC (Liu, Shi et al. 2008). Έχει παρατηρηθεί ότι οι ασθενείς αρνητικοί σε AMA διαφέρουν από τους θετικούς ως προς τον τίτλο των αντι-πυρηνικών τους αντισωμάτων, που είναι υψηλότερος, και τα επίπεδα των IgM, που είναι χαμηλότερα (Lacerda, Ludwig et al. 1995; Liu, Shi et al. 2008). Σε αντίθεση με τους AMA θετικούς, οι ANA θετικοί ασθενείς παρουσιάζουν μία πιο σοβαρή και πιο επιθετική μορφή της νόσου (Wesierska-Gadek, Penner et al. 2006; Nakamura, Kondo et al. 2007; Selmi and Gershwin 2009).

Σκοπός της εκπόνησης της διδακτορικής αυτής διατριβής ήταν α) να προσδιοριστεί με μεγάλη ακρίβεια η συχνότητα εμφάνισης αντιπυρηνικών αντισωμάτων και β) να ανιχνευθούν και να ταυτοποιηθούν, οι πρωτεΐνες κυρίως του πυρηνικού φακέλου, οι οποίες είναι στόχοι αυτοαντισωμάτων σε ορούς ασθενών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση. Για τον σκοπό αυτό α) εδραιώσαμε αρχικά μια μεθοδολογία ανίχνευσης των αντισωμάτων με έμμεσο ανοσοφθορισμό και ταυτοποίησης αυτοαντισωμάτων για συγκεκριμένα αντιγόνα του πυρηνικού φακέλου με βιοχημικές και ανοσοχημικές προσεγγίσεις, χρησιμοποιώντας νέα

υποστρώματα και υλικά και β) προσδιορίσαμε τη συχνότητα εμφάνισης αυτοαντισωμάτων για αντιγόνα του πυρήνα και του πυρηνικού φακέλου σε 103 ορούς ασθενών με PBC.

Ανίχνευση αυτοαντισωμάτων με ΠΦ: Η ύπαρξη και η ένταση του κυτταροπλασματικού φθορισμού παρεμποδίζει την ανίχνευση περιπυρηνικού φθορισμού.

Στο 97% των ορών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση που μελετήθηκαν, ανιχνεύθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό κυτταροπλασματική χρώση, γεγονός που είναι αναμενόμενο εφόσον η ύπαρξη αντι-μιτοχονδριακών αντισωμάτων αποτελεί χαρακτηριστικό της νόσου. Εξίσου εξειδικευμένα αυτοαντισώματα για την ασθένεια είναι τα αντι-πυρηνικά αντισώματα (ANA) (Invernizzi, Selmi et al. 2005; Selmi and Gershwin 2009), που η ύπαρξη τους έχει συσχετισθεί με μία πιο σοβαρή και πιο επιθετική μορφή της νόσου (Wesierska-Gadek, Penner et al. 2006; Nakamura, Kondo et al. 2007; Selmi and Gershwin 2009). Μέχρι σήμερα, η ανίχνευση αντι-πυρηνικών αντισωμάτων με ανοσοφθορισμό γίνεται σε υπόστρωμα παρασκευασμάτων κυττάρων Hep2 (Chou, Lee et al. 1995; Konstantinov, Foisner et al. 1995; Bandin, Courvalin et al. 1996; Invernizzi, Podda et al. 2001; Miyachi, Hankins et al. 2003; Muratori, Muratori et al. 2003; Rigoroulou, Davies et al. 2005), το οποίο συχνά παρουσιάζει προβλήματα στην ανίχνευση των αντι-περιπυρηνικών αντισωμάτων. Συγκεκριμένα οι Bandin et al. είχαν παρατηρήσει ότι στο 20,5% των ορών, που μελέτησαν, παρουσιάστηκε περιπυρηνικός φθορισμός όταν η ένταση του κυτταροπλασματικού φθορισμού ελαττώθηκε (Bandin, Courvalin et al. 1996), ενώ πολλοί οροί ασθενών που περιείχαν αυτοαντισώματα έναντι του πυρηνικού φακέλου (18,8% του συνόλου των ορών, 15,6% αντι-gp210 και 6,3% αντι-LBR) δεν παρουσίαζαν περιπυρηνικό φθορισμό (9,4% του συνόλου των ορών) (Muratori, Muratori et al. 2003). Η ανάδειξη του προτύπου του περιπυρηνικού φθορισμού κατά την ελάττωση της κυτταροπλασματικής χρώσης παρατηρήθηκε και στη δική μας μελέτη και ως εκ τούτου υποθέσαμε ότι απουσία κυτταροπλάσματος θα ανιχνεύονταν καλύτερα τα χαμηλού τίτλου αυτοαντισώματα έναντι της πυρηνικής μεμβράνης. Έτσι, μελετώντας την επίδραση του μονιμοποιητικού μέσου και του υποστρώματος στον προσδιορισμό διαφόρων προτύπων φθορισμού, ιδιαίτερα του περιπυρηνικού φθορισμού, εδραιώσαμε και χρησιμοποιήσαμε μία μέθοδο που επιτρέπει την αποτελεσματική ανίχνευση των αντι-περιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων.

Σύμφωνα με τη νέα μέθοδο η ανίχνευση των περιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων γίνεται χρησιμοποιώντας πυρήνες που απομονώνονται από HepG2 κύτταρα και ηπατοκύτταρα αρουραίου, των οποίων η καθαρότητα από κυτταροπλασματικές προσμίξεις ελέγχεται με μορφολογικές και βιοχημικές προσεγγίσεις. Με τη νέα μέθοδο που εδραιώσαμε

ανιχνεύθηκαν αντι-περιπυρηνικά αυτοαντισώματα στο 53,4% των ορών, ποσοστό που είναι από τα υψηλότερα που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία με τη χρήση ανοσοχημικών ή βιοχημικών τεχνικών (Lozano, Pares et al. 1988; Lassoued, Brenard et al. 1990; Nickowitz, Wozniak et al. 1994; Wesierska-Gadek, Hohenauer et al. 1995; Bandin, Courvalin et al. 1996; Mattalia, Luttig et al. 1997; Muratori, Muratori et al. 2003; Worman and Courvalin 2003) ενώ με τα παρασκευάσματα κυττάρων Hep2 ανιχνεύθηκαν μόνο στο 24,3% των ορών.

Με τη χρησιμοποίηση πυρήνων απαλλαγμένων από κυτταροπλασματικά στοιχεία ως υπόστρωμα στον ανοσοφθορισμό ανιχνεύονται αντισώματα έναντι της πυρηνικής μεμβράνης στους ορούς ασθενών με PBC ανεξαρτήτως της ύπαρξης αντισωμάτων έναντι των μιτοχονδρίων, γεγονός που αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου και επιτρέπει την εύκολη και χωρίς υποκειμενικότητα καταγραφή του περιπυρηνικού φθορισμού από μη εξειδικευμένο επιστημονικό προσωπικό. Ως εκ τούτου, θεωρούμε πολύ χρήσιμη την χρησιμοποίηση της μεθοδολογίας που αναπτύξαμε σε ευρεία κλίμακα στα διαγνωστικά εργαστήρια. Η ανάπτυξη διαγνωστικού πακέτου προσδιορισμού των συγκεκριμένων αυτοαντισωμάτων αποτελεί αντικείμενο επαφών με εξειδικευμένες εταιρίες, καθώς προκαταρκτικά αποτελέσματά μας (δεν περιγράφονται στην διατριβή) δείχνουν ότι οι πυρήνες διατηρούν την εξειδίκευσή τους για επίτοπους έναντι αυτοαντισωμάτων του πυρηνικού φακέλου μετά από κρυοσυντήρηση για περίπου 3 μήνες.

Λαμβάνοντας υπ' όψη τη διαγνωστική σημασία των αντισωμάτων έναντι της πυρηνικής μεμβράνης, απουσία AMA από τον ορό και τη συσχέτισή τους με πιο σοβαρή ιστολογικά μορφή της νόσου (Rigoroulou, Davies et al. 2005), θεωρούμε ότι η χρήση της εν λόγω μεθόδου συνεισφέρει αποτελεσματικά τόσο στη διάγνωση όσο και στην πρόγνωση της PBC. Πράγματι, τα δεδομένα μας δείχνουν ότι 2 από τους 7 συνολικά ορούς που έχουν αντισώματα έναντι της πυρηνικής μεμβράνης αλλά όχι AMA, ανιχνεύονται αποκλειστικά με τη νέα μέθοδο.

Στην πλειοψηφία των ορών συνυπάρχουν αντι-περιπυρηνικά αυτοαντισώματα τάξης IgG και IgM ενώ τα αντι-πυρηνικά είναι κυρίως τάξης IgG.

Από τους φαινότυπους πυρηνικού φθορισμού που παρουσίασαν οι οροί, η ταυτότητα των ανοσοσφαιρινών διερευνήθηκε μόνο για το στικτό πυρηνικό (IgG: 22,3% vs IgM: 2,9%) και τον κεντρομεριδιακό (IgG: 6,8% vs IgM: 0,97%) φθορισμό, οι οποίοι οφείλονται σε αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης sp100, των PML σωματιδίων, και πρωτεϊνών των κεντρομεριδίων, που έχουν αναφερθεί ως αυτοαντιγόνα για την PBC (Szostecki, Guldner et al. 1990; Evans, Suenaga et al. 1991; Fusconi, Cassani et al. 1991; Orth, Gerken et al. 1997;

Zuchner, Sternsdorf et al. 1997; Gao, Tian et al. 2008) (Yang, Yu et al. 2004; Nakamura, Kondo et al. 2007; Gao, Tian et al. 2008). Σε αντίθεση με τα αντι-περιπυρηνικά αντισώματα που στην πλειοψηφία των ορών συνυπάρχουν τα IgG με τα IgM, τα αντι-πυρηνικά αντισώματα είναι κατά κύριο λόγο IgG. Συνύπαρξη IgG και IgM αντισωμάτων παρατηρήθηκε μόνο στο 2,9% των ορών που παρουσιάζουν στικτό πυρηνικό φθορισμό και μόνο στο 0,97% των ορών που παρουσιάζουν κεντρομεριδιακό φθορισμό. Η ύπαρξη χαμηλού ποσοστού ορών με IgM αντι-πυρηνικά αυτοαντισώματα παρατηρήθηκε και σε πρόσφατη μελέτη, σε αντίθεση με το υψηλό ποσοστό των ορών με αντισώματα των διαφόρων ισοτύπων του IgG (Rigoroulou, Davies et al. 2005).

Το συνολικό ποσοστό των ορών με αντι-περιπυρηνικά IgG αντισώματα που ανιχνεύθηκε σε κύτταρα HeLa (49,5%) ήταν παρεμφερές με το αντίστοιχο ποσοστό (46,7%) που βρέθηκε σε μελέτη όπου διερευνήθηκε ο ισότυπος των IgG αντι-περιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων σε ορούς από Έλληνες και Ισπανούς ασθενείς (Rigoroulou, Davies et al. 2005). Στο 37,9% των ορών βρήκαμε συνύπαρξη IgG και IgM αντι-περιπυρηνικών αντισωμάτων. Στη πλειοψηφία των ορών (31,1%) ο τίτλος των αντισωμάτων IgG και IgM ήταν παρόμοιος, ενώ σε 6,8% των ορών τα αντι-περιπυρηνικά IgM αντισώματα ήταν υψηλότερου τίτλου από τα IgG. Το ποσοστό των ορών όπου βρέθηκαν μόνο IgM αντιπεριπυρηνικά αντισώματα ήταν χαμηλό (3,9%) γεγονός που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Rigoroulou, Davies et al. 2005). Από τα πιο πάνω συμπεραίνεται (α) ότι στην πλειοψηφία των ορών ασθενών με PBC συνυπάρχουν IgG και IgM αντι-περιπυρηνικά αντισώματα και (β) ότι στο 10,7% των ορών δεν θα ανιχνευόταν τα αντι-περιπυρηνικά αντισώματα σε συνθήκες ανάλυσης που εφαρμόζονται σε κλινικά εργαστήρια ρουτίνας. Αυτό συμβαίνει διότι με το ANA kit που χρησιμοποιείται ανιχνεύονται μόνο τα IgG αντισώματα, ενώ τα χαμηλού τίτλου IgG αντι-περιπυρηνικά αντισώματα δεν θα παρουσίαζαν διακριτό περιπυρηνικό φθορισμό χρησιμοποιώντας συμβατικό μικροσκόπιο φθορισμού.

Η σημασία της ύπαρξης αντισωμάτων IgM δεν έχει διευκρινιστεί. Πειραματικά δεδομένα σε ποντίκια προτείνουν ότι τα αυτοαντισώματα IgG, σε αντίθεση με τα IgM, είναι συνήθως παθογόνα (Vaughan 1993; Korganow, Ji et al. 1999). Επίσης εκκρινόμενες ανοσοσφαιρίνες IgM φαίνεται ότι καταστέλλουν την ανάπτυξη αυτοανοσίας και αυτοαντισωμάτων IgG (Boes, Schmidt et al. 2000). Στα ποντίκια (Ogden, Kowalewski et al. 2005) και τα κύτταρα Jurkat (Zwart, Ciurana et al. 2004), τα IgM αντισώματα ενέχονται, με τη διαμεσολάβηση του συμπληρώματος, στην απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων. Έχει αναφερθεί ότι κατά τη διαδικασία της απόπτωσης, στοιχεία του πυρήνα μεταφέρονται σε μεμβρανικά κυστίδια (Casciola-Rosen, Anhalt et al. 1994) πιστεύεται δε ότι τα IgM

αυτοαντισώματα που παράγονται είτε φυσικά είτε κατά τη διάρκεια αυτοάνοσης απόκρισης, μπορεί να δεσμεύονται στα αυτοαντιγόνα και να προωθείται η απομάκρυνση τους δια της ενεργοποίησης του συμπληρώματος (Lutz, Binder et al. 2009). Τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν υπέρ ενός προστατευτικού ρόλου των αντισωμάτων IgM στην εξέλιξη της νόσου. Είναι επίσης γνωστό ότι η ενεργοποίηση του συμπληρώματος είναι ένας μηχανισμός κατά τον οποίο τα αντισώματα καταστρέφουν το κύτταρο. Έχει βρεθεί ότι το συμπλήρωμα ενεργοποιείται με μεγάλη αποτελεσματικότητα από τα IgG3 αντισώματα εξηγώντας το εύρημα ότι ασθενείς με αντι-περιπυρηνικά και αντι-πυρηνικά MND αντισώματα IgG3 ιστοτύπου παρουσιάζουν σοβαρότερη νόσο (Rigoroulou, Davies et al. 2005). Το γεγονός ότι τα IgM αυτοαντισώματα δρουν μέσω ενεργοποίησης του συμπληρώματος και δεδομένης της συνύπαρξής τους στο μεγαλύτερο μέρος των ορών με αντισώματα IgG δείχνει ότι πιθανότατα οι ανοσοσφαιρίνες IgM δεν έχουν προστατευτική δράση στην PBC. Το παραπάνω ενισχύεται από το γεγονός ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση στα ιστολογικά χαρακτηριστικά μεταξύ ασθενών με αντισώματα έναντι της πυρηνικής μεμβράνης IgG ή IgM τάξης. Τέλος, η σύγχρονη παρουσία αντισωμάτων IgG και IgM σε συγκεκριμένους ασθενείς θα μπορούσε να υποδεικνύει ότι τα αυτοαντιγόνα του πυρηνικού φακέλου είναι επαρκώς τροποποιημένα και πλήρως εκτεθημένα στο ανοσολογικό σύστημα.

Ταυτοποίηση αυτοαντισωμάτων υψηλής εξειδίκευσης

Μερικά από τα αντι-πυρηνικά αυτοαντισώματα παρουσιάζουν εξειδίκευση στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση (Invernizzi, Selmi et al. 2005; Selmi and Gershwin 2009) όπως είναι τα αντι-sp100, τα αντι-gr210 και τα αντι-LBR. Η sp100 πρωτεΐνη είναι συστατικό των πυρηνικών σωματιδίων PML, η gr210 συστατικό του συμπλόκου των πυρηνικών πόρων και ο LBR συστατικό της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης. Έχει βρεθεί ότι οι αλληλουχίες των επιτόπων τόσο της sp100 όσο και της gr210 παρουσιάζουν ομολογία με πρωτεϊνικά παράγωγα βακτηρίων. Συγκεκριμένα ο αυτοεπίτοπος της sp100 φαίνεται να έχει ομολογία με μέρος των πρωτεϊνικών παραγώγων του *E.Coli* και της *Salmonella typhimurium*. (Bogdanos, Baum et al. 2003) και ο κύριος επίτοπος 15 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο της gr210, παρουσιάζει ομολογία με την πρωτεΐνη του *E.Coli*, γλυκοσυλάση της αδενίνης, και με πρωτεΐνες του *S. Typhimurium* (Desiraju, Shanabruch et al. 1993; Nickowitz and Worman 1993). Τα πιο πάνω δεδομένα ενισχύουν την υπόθεση της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος με μιμητισμό στους ασθενείς με PBC.

Στη πλειοψηφία των ορών ο πυρηνικός φθορισμός παρουσιάζει στικτό πρότυπο.

Τα μοτίβα πυρηνικού φθορισμού που παρατηρήθηκαν είναι στικτός, διάστικτος, κεντρομεριδιακός και ομοιογενής πυρηνικός φθορισμός. Το μεγαλύτερο ποσοστό ορών με πυρηνικό φθορισμό έδωσε στικτό πυρηνικό φθορισμό ο οποίος είναι άμεσα συνυφασμένος με την ύπαρξη αντι-sp100 αντισωμάτων (Szosteckí, Guldner et al. 1990). Το γεγονός αυτό οφείλεται στην εξειδίκευση που έχουν τα αντι-sp100 αντισώματα ως προς την PBC. Άλλο ένα είδος πυρηνικού φθορισμού που έχει συσχετιστεί με τη νόσο είναι ο κεντρομεριδιακός φθορισμός (Bernstein, Callender et al. 1982; Makinen, Fritzler et al. 1983; Parveen, Morshed et al. 1995; Gao, Tian et al. 2008).

Ο στικτός πυρηνικός και ο κεντρομεριδιακός φθορισμός είναι δύσκολο να διαχωριστούν σε μεσοφασικά κύτταρα. Γι αυτό ο διαχωρισμός έγινε σε υπόστρωμα μιτωτικών κυττάρων. Επιπλέον σε ορούς που συνυπήρχαν οι δύο φαινότυποι ήταν αδύνατον να προσδιοριστούν με ανοσοφθορισμό. Έτσι η ύπαρξη αντι-sp100 αντισωμάτων επιβεβαιώθηκε με ELISA. Διαπιστώθηκε ότι το 16,5% των ορών είχε αντι-sp100 αντισώματα εκ των οποίων στο 2,9% συνυπήρχαν και αντι-κεντρομεριδιακά αντισώματα (ACA). Η σημασία της ανίχνευσης της πρωτεΐνης sp100 έγκειται στο γεγονός ότι παρουσιάζει ειδικότητα στη συγκεκριμένη ασθένεια. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν χαμηλό ποσοστό (6,8%) ACA, το οποίο συμφωνεί με αυτό που έχει δημοσιευθεί χρησιμοποιώντας ELISA (10,8%) στη μελέτη με Έλληνες και Ισπανούς ασθενείς με PBC (Bogdanos, Liaskos et al. 2007) αλλά διαφέρει από εκείνα που βρέθηκαν σε δύο μελέτες όπου ACA βρέθηκαν με ELISA στο 26,1% των ορών Ιαπώνων ασθενών και στο 29,2% των ορών Κινέζων ασθενών με IIF (Nakamura, Kondo et al. 2007; Gao, Tian et al. 2008). Η ύπαρξη αντισωμάτων που δίνουν στικτό MND φθορισμό (Rigoroulou, Davies et al. 2005) φαινότυπο αλλά δεν είναι ACA (Bogdanos, Liaskos et al. 2007) έχει συσχετιστεί με σοβαρότερη μορφή της νόσου, χαρακτηριζόμενη από τα ιστολογικά δεδομένα, ασθενών από Ισπανία και Ελλάδα, παρόλο που σε μελέτη με Ιάπωνες ασθενείς (Nakamura, Kondo et al. 2007) παρατηρήθηκε ότι μεταξύ των ACA θετικών ασθενών με PBC ήταν αυξημένο το ποσοστό αυτών που ανέπτυξαν πυλαία υπέρταση.

Τα αντι-gr210 είναι τα κύρια αντι-περιπυρηνικά αυτοαντισώματα στη PBC. Αναγκαιότητα βελτίωσης της υπάρχουσας μεθοδολογίας προσδιορισμού αντι-gr210 αυτοαντισωμάτων.

Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι οι οροί ασθενών της PBC έχουν αυτοαντισώματα έναντι της gr210 γλυκοπρωτεΐνης του πυρηνικού πόρου η οποία έχει μοριακό βάρος 210kDa (Lassoued, Guilly et al. 1988; Lozano, Pares et al. 1988; Courvalin,

Chaudhary et al. 1990; Lassoued, Brenard et al. 1990; Worman and Courvalin 2003). Για την πρωτεΐνη αυτή έχουν βρεθεί δύο αντιγονικές περιοχές: μία αποτελούμενη από τα δεκαπέντε αμινοξέα του καρβοξυ-τελικού άκρου (Nickowitz and Worman 1993; Miyachi, Hankins et al. 2003; Worman and Courvalin 2003) και μία δεύτερη στο άμινο-τελικό άκρο (Wesierska-Gadek, Hohenauer et al. 1995; Wesierska-Gadek, Hohenauer et al. 1996; Worman and Courvalin 2003). Αντι-gr210 αντισώματα στη βιβλιογραφία αναφέρονται για το 11- 41% των ασθενών με PBC (Nesher, Margalit et al. 2001; Worman and Courvalin 2003; Bauer and Habior 2007; Muratori, Granito et al. 2008). Στις παραπάνω μελέτες η ύπαρξη των αντισωμάτων προσδιορίστηκε με ELISA χρησιμοποιώντας το καρβοξυτελικό άκρο της gr210 ως αντιγονικό επίτοπο. Στη μελέτη μας τα συγκεκριμένα αυτοαντισώματα ανιχνεύθηκαν στο 32% των ορών. Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι περίπου το 1/3 των θετικών ορών σε αντι-gr210 αντισώματα (το 10,7 % του συνόλου των ορών) δεν ανιχνεύθηκε με ELISA αλλά χρησιμοποιώντας ανοσοκατακρήμνιση και ανοσοαποτύπωση. Στο 3% των ορών στους οποίους δεν ανιχνεύθηκαν αντι-gr210 αντισώματα με τη μέθοδο ELISA, βρέθηκαν IgM αντι-gr210 αντισώματα ενώ σε 8 ορούς (7,8%) βρέθηκαν IgG αντι-gr210 αντισώματα. Μια πιθανή εξήγηση για την αποτυχία της ELISA να εντοπίσει IgG αντι-gr210 αντισώματα είναι η μικρή συγκέντρωσή τους στον ορό (σε χαμηλότερο τίτλο από αυτόν που απαιτείται για την ανίχνευση με ELISA ή πιθανότερα να έχουν διαφορετικό επίτοπο, δηλαδή να αναγνωρίζουν τμήμα του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης.

Τα ευρήματα αυτά πιστεύουμε ότι έχουν ιδιαίτερη σημασία, δεδομένου του προγνωστικού ρόλου που έχουν τα αντι-gr210 αντισώματα για την PBC. Έχει αναφερθεί ότι μεγαλύτερο ποσοστό από τους ασθενείς με αντι-gr210 αντισώματα καταλήγει σε ηπατική ανεπάρκεια συγκριτικά με το αντίστοιχο ποσοστό ασθενών χωρίς αντι-gr210 αντισώματα (Itoh, Ichida et al. 1998; Nakamura, Shimizu-Yoshida et al. 2005; Wesierska-Gadek, Penner et al. 2006; Nakamura, Kondo et al. 2007). Ως εκ τούτου, προτείνουμε την ανάπτυξη νέου διαγνωστικού πακέτου ELISA, το οποίο θα περιλαμβάνει βελτιωμένους αντιγονικούς επιτόπους και περισσότερα δευτερογενή σημασμένα αντισώματα.

Αντι-LBR αντισώματα, ανιχνεύονται σε πολύ μικρό ποσοστό ορών με μεγάλη όμως εξειδίκευση στην PBC.

Τα αντι-LBR αντισώματα παρόλο που παρουσιάζουν πολύ μεγάλη εξειδίκευση, ανιχνεύονται σε πολύ μικρό ποσοστό ασθενών 1%- 9% (Nickowitz, Wozniak et al. 1994; Bandin, Courvalin et al. 1996; Miyachi, Hankins et al. 2003; Worman 2007). Στη μελέτη μας αντι-LBR αντισώματα βρέθηκαν σε 9 ασθενείς (8,7% των ορών). Το μεγαλύτερο μέρος των

ορών (7,1%) είχε χαμηλού τίτλου αντι-LBR αντισώματα. Τα αντισώματα αυτά ενώ εμφανίζονται αποκλειστικά σε ασθενείς με PBC δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί δείκτες λόγω της μικρής συχνότητας εμφάνισής τους. Οι δύο ασθενείς στους οποίους τα αντι-LBR αντισώματα είχαν υψηλό τίτλο, ήταν οι μόνοι που δεν άρχισαν θεραπεία με UDCA αμέσως μετά τη διάγνωση της ασθένειας και είναι και οι δύο νεκροί ανεξαρτήτως του σταδίου στο οποίο διαγνώστηκαν. Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι η ύπαρξη αντι-LBR αντισωμάτων υψηλού τίτλου πιθανόν να αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη για την πορεία της νόσου.

Μη ειδικά αυτοαντισώματα.

Εκτός από τα αυτοαντιγόνα με μεγάλη εξειδίκευση, έχουν βρεθεί και άλλα με μικρότερη ή και καθόλου εξειδίκευση όπως τα αντι-κεντρομεριδιακά αντισώματα (ACA), τα αντι-p62, τα αντι-LAP και τα αντισώματα έναντι πυρηνικών λαμινών.

Αντι-κεντρομεριδιακά αντισώματα

Το ποσοστό των ορών με αντι-κεντρομεριδιακά αντισώματα (ACA) που έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία ποικίλει. Αυτό που είναι σταθερό είναι η παρουσία συνοδών νοσημάτων στους ACA- θετικούς PBC ασθενείς (Bernstein, Callender et al. 1982; Makinen, Fritzler et al. 1983; Parveen, Morshed et al. 1995; Gao, Tian et al. 2008). Η παρουσία ACA έχει αναφερθεί ότι μπορεί να θεωρηθεί ως προγνωστικός δείκτης για την εμφάνιση πυλαίας υπέρτασης (Nakamura, Kondo et al. 2007; Gao, Tian et al. 2008). Στη μελέτη μας βρήκαμε ACA αντισώματα σε ποσοστό 6,8% των ασθενών και από αυτούς μόνο στο 1,9% συνυπήρχε άλλο αυτοάνοσο νόσημα.

Αντισώματα έναντι πυρηνικών λαμινών

Τα αντισώματα έναντι των λαμινών δεν παρουσιάζουν εξειδίκευση στη νόσο. Εμφανίζονται σε ποσοστό 8% σε ορούς ασθενών με PBC και στοχεύουν κυρίως τις λαμίνες A και C (Wesierska-Gadek, Penner et al. 1988; Neshet, Margalit et al. 2001). Το ποσοστό των ορών με αυτοαντισώματα έναντι των λαμινών που βρήκαμε ανέρχεται στο 9,7% και συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Στους ορούς βρέθηκαν κυρίως αντισώματα έναντι της λαμίνης A (8,7%) ενώ μια ασθενής εμφάνισε αντισώματα έναντι της λαμίνης B.

Αντι-LAPs

Αυτοαντισώματα για τις πρωτεΐνες LAP (Lamina Associated Polypeptide) έχουν βρεθεί σε αρκετές αυτοάνοσες νόσους όπως συστηματικός ερυθηματοειδής λύκος (SLE), οροαρνητική πολυαρθρίτιδα, πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren, ρευματική πολυμυαλγία, αντι-φωσφολιπιδικό σύνδρομο, οπτική νευρίτιδα, νεφρικό σύνδρομο και χρόνια ηπατίτιδα (Konstantinov, Foisner et al. 1995; Nesher, Margalit et al. 2001). Σε ορούς ασθενών με PBC πιθανή παρουσία αντι-LAP αντισωμάτων έχει αναφερθεί μόνο από τους Miyachi et al. σε ποσοστό 16% (Miyachi, Shibata et al. 1996; Miyachi, Hankins et al. 2003). Από προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι οι LAP1A και 1B συνδέονται σε όλες τις λαμίνες (Foisner and Gerace 1993), η LAP1C συγκατακρημνίζεται μόνο με τη λαμίνη B (Maison, Pyrgasopoulou et al. 1997) ενώ η LAP2 αλληλεπιδρά μόνο στη λαμίνη B1 (Foisner and Gerace 1993). Στη μελέτη μας ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία μαζών, πρωτεΐνες LAP που συν-κατακρημνίστηκαν με λαμίνες από τους ορούς 50 και 212. και ως εκ τούτου οι συγκεκριμένοι οροί περιέχουν πιθανότατα αυτοαντισώματα για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες.

Απουσία αντι-p62 αυτοαντισωμάτων

Η ταυτότητα του αυτοαντιγόνου στα 60kDa, το οποίο φέρει ομάδες N-ακέτυλο γλυκοζαμίνης (GlcNAc), έγινε γνωστή όταν χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένη p62 πρωτεΐνη από ανθρώπινο γενετικό υλικό σημασμένη με S³⁵ (D'Onofrio, Starr et al. 1988; Wesierska-Gadek, Penner et al. 2006; Wesierska-Gadek, Klima et al. 2007). Η έκφραση της p62 έγινε σε κύτταρα εντόμου Sf9, τα οποία παράγουν την τροποποιημένη με GlcNAc πρωτεΐνη. Οι οροί από ασθενείς με PBC αναγνωρίζουν επίσης την ανασυνδυασμένη p62 αρουραίου εκφρασμένη σε κύτταρα εντόμου Sf9 στα οποία γίνεται η μετα-μεταφραστική τροποποίηση (D'Onofrio, Starr et al. 1988; Wesierska-Gadek, Klima et al. 2007). Τα αντι-p62 αντισώματα έχουν αναφερθεί σε ποσοστό 23-32% των ασθενών με PBC (D'Onofrio, Starr et al. 1988; Miyachi, Shibata et al. 1996; Wesierska-Gadek, Hohenauer et al. 1996; Invernizzi, Podda et al. 2001; Miyachi, Hankins et al. 2003; Enarson, Rattner et al. 2004; Wesierska-Gadek, Klima et al. 2007) αλλά και σε ποσοστό 55% χρησιμοποιώντας, ραδιενεργά σημασμένη, ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, ως αντιγόνο. Σε άλλες μελέτες δεν βρέθηκαν οροί που περιείχαν αυτοαντισώματα για την πρωτεΐνη p62 (Enarson, Rattner et al. 2004; Ou, Enarson et al. 2004). Στους ορούς που μελετήσαμε χρησιμοποιώντας υλικό από πυρηνικούς φακέλους ηπατοκυττάρων αρουραίου και μεθοδολογία ανοσοκατακρήμνισης ακολουθούμενη από ανοσοαποτύπωση δεν βρέθηκαν αντισώματα για την p62. Το γεγονός ότι αρκετοί από τους ορούς που μελετήσαμε αναγνώριζαν με ανοσοαποτύπωση μια

πρωτεϊνική ζώνη στα 62kDa σε εκχύλισμα πυρηνικών φακέλων αρουραίου πριν και μετά την ανοσοαφαίρεση της p62 από το εκχύλισμα δείχνει ότι οι οροί περιέχουν αντισώματα για μια πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου με παρόμοιο μοριακό βάρος αλλά διαφορετική από την p62 ή εναλλακτικά για κάποιο πρωτεόλυμα πρωτεΐνης μεγαλύτερο μοριακού βάρους, πιθανά της gp210. Στη μελέτη των Wesierska-Gadek et al. η ανίχνευση των αντι-p62 αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη και σημασμένη με S^{35} πρωτεΐνη (Wesierska-Gadek, Klima et al. 2007) αυξάνοντας ως εκ τούτου την δυνατότητα ανίχνευσης όπως επίσης και την πιθανότητα πειραματικού λάθους. Η πιθανότητα να υπάρχουν αντι-p62 αντισώματα στους ορούς των ασθενών που μελετήθηκαν κατά την διάρκεια της διδακτορικής αυτής διατριβής είναι μηδαμινή εκτός και αν βρίσκονται σε εξαιρετικά χαμηλό τίτλο, μη ανιχνεύσιμο με τη μεθοδολογία που γενικά εφαρμόζεται.

Πιθανά νέα αυτοαντιγόνα

Κατά τη φασματοσκοπία μαζών πέραν της επιβεβαίωσης της ταυτότητας ήδη χαρακτηρισμένων αυτοαντιγόνων παρατηρήθηκε ότι ο ορός s54 κατακρήμνισε πρωτεΐνες για τις οποίες δεν έχει αναφερθεί αντιγονική δράση στην PBC. Συγκεκριμένα εκτός από την gp210, που είναι γνωστό αυτοαντιγόνο της PBC, κατακρήμνισε την RANBP5, την U3 και την SIM1. Οι πρωτεΐνες αυτές δεν είναι συστατικά του πυρηνικού φακέλου αλλά οι δύο τελευταίες αποτελούν μέρος πυρηνικών σωματιδίων ενώ η πρώτη είναι μεταφορέας πρωτεϊνών εντός κι εκτός του πυρήνα. Οι πρωτεΐνες U3 και RanBP5 ενώ δεν αποτελούν συστατικά του πυρηνικού φακέλου έχουν εντοπιστεί σε μελέτες του πρωτεώματος του πυρηνικού πόρου (Cronshaw, Krutchinsky et al. 2002) και φαίνεται να αναγνωρίζονται ασθενώς από αυτοαντισώματα του ορού 54. Αντίθετα, ο μεταγραφικός παράγοντας SIM1, ο οποίος λόγω της ιδιότητάς του κυκλοφορεί μέσα και έξω από τον πυρήνα, δεν φαίνεται να αποτελεί αυτοαντιγόνο και το πιθανότερο είναι να συγκατακρημνίζεται με μια εκ των 3 άλλων πρωτεϊνών. Λαμβάνοντας υπόψη τον χαμηλό τίτλο που παρουσιάζουν τα αντισώματα έναντι της U3 και της RANBP5 και τη χαμηλή συχνότητα τους ανάμεσα στους αντι-πυρηνικούς ορούς, δεν διερευνήθηκαν περαιτέρω τα συγκεκριμένα αυτοαντιγόνα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων στον ορό ασθενών παίζει κεντρικό ρόλο για τη σωστή διάγνωση και κατάταξη των αυτοάνοσων νοσημάτων.

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο σε ερευνητικά όσο και κλινικά εργαστήρια είναι αυτές του έμμεσου ανοσοφθορισμού, της ELISA και της ανοσοαποτύπωσης. Μολονότι παρουσιάζουν μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία, έχουν μειονεκτήματα και περιορισμούς, ορισμένες είναι χρονοβόρες, επίπονες, ημιποσοτικές και δύσκολα τυποποιήσιμες. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι τα διαφορετικά ποσοστά στη συχνότητα εμφάνισης συγκεκριμένων αυτοαντισωμάτων σε ορούς ασθενών που έχουν δημοσιευθεί σε μελέτες που χρησιμοποιούν είτε την ίδια είτε διαφορετικές τεχνικές.

Δεδομένης της μεγάλης απόκλισης που παρουσιάζουν δημοσιευμένες μελέτες όσον αφορά στη συχνότητα εμφάνισης αυτοαντισωμάτων του πυρήνα σε ορούς ασθενών με PBC, κύριος στόχος της μελέτης αυτής ήταν να εδραιώσουμε, να χρησιμοποιήσουμε και να συγκρίνουμε όλες τις διαθέσιμες τεχνικές για τον προσδιορισμό αυτοαντισωμάτων του πυρήνα.

Τα σημαντικότερα συμπεράσματα της μελέτης μας είναι τα παρακάτω:

1. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική τεχνική για την ανίχνευση περιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων υπό την προϋπόθεση ότι χρησιμοποιούνται κατάλληλα υποστρώματα και αντιδραστήρια.

Η μεθοδολογία του έμμεσου ανοσοφθορισμού (IF) που χρησιμοποιείται σήμερα για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων σε ορούς είναι πρακτικά η ίδια με εκείνη που εισήγαγαν οι Weller και Coons (Weller and Coons 1954) το 1954. Χρησιμοποιούνται καλλιέργειες κυττάρων ή τομές ιστών που επωάζονται αρχικά με τον ορό και στη συνέχεια με ένα σημασμένο με φθοριόχρωμα δευτερογενές αντίσωμα. Τα διαφορετικά πρότυπα φθορισμού αναλύονται χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο φθορισμού. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η καλή ευαισθησία της και το χαμηλό κόστος. Τα μειονεκτήματα είναι κυρίως η διαφορετική ποιότητα στα διαθέσιμα υποστρώματα και η αναγκαιότητα εξειδικευμένου επιστήμονα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Το τελευταίο γίνεται ακόμα δυσκολότερο όταν συνυπάρχουν στον ορό περισσότερα του ενός αυτοαντισώματα και ως εκ τούτου πολλαπλά πρότυπα φθορισμού.

Στη περίπτωση συνύπαρξης αυτοαντισωμάτων για δομές του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα ο κυτταροπλασματικός φθορισμός, που προέρχεται πολύ συχνά από την παρουσία AMA σε ορούς ασθενών με PBC, επικαλύπτει και εμποδίζει την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων για πρωτεΐνες της περιφέρειας του πυρήνα. Αυτό παρατηρήθηκε στη δική μας μελέτη και πιστεύουμε ότι είναι η κύρια αιτία για τα διαφορετικά ποσοστά στη

συχνότητα εμφάνισης των αυτοαντισωμάτων για πρωτεΐνες της περιφέρειας του πυρήνα που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα.

Η χρησιμοποίηση καθαρών πυρήνων χωρίς την παρουσία καταλοίπων του κυτταροπλάσματος, που αποτελεί μια μεθοδολογία εξαιρετικά ευαίσθητη, ειδική και ευκόλως χρησιμοποιούμενη από μη εξειδικευμένο προσωπικό, έδειξε ότι η συχνότητα περιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων στη PBC είναι υψηλή και αντιστοιχεί περίπου στο 50% των ασθενών.

Επίσης, η χρησιμοποίηση δευτερογενών αντισωμάτων IgG και IgM έδειξε ότι στη πλειοψηφία των ορών συνυπάρχουν περιπυρηνικά αυτοαντισώματα τάξης IgG και IgM, ενώ τα αντι-κεντρομεριδιακά και τα αντι-sp100 είναι κατά κύριο λόγο ανοσοσφαιρίνες G τάξης.

2. Η ήδη υπάρχουσα και εμπορικά διαθέσιμη **μεθοδολογία ELISA** δεν επαρκεί για τον προσδιορισμό αντι-gr210 αυτοαντισωμάτων.

Η μεθοδολογία της ELISA χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αυτοαντισωμάτων για συγκεκριμένα αυτοαντιγόνα. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ο ημιποσοτικός προσδιορισμός των αυτοαντισωμάτων με φασματομετρική ανάγνωση και η μη αναγκαιότητα εξειδικευμένου προσωπικού, δεδομένα που αυξάνουν την αντικειμενικότητα της μεθόδου. Το βασικότερο μειονέκτημα είναι η πιθανότητα ανεπαρκούς αναγνώρισης του επίτοπου από συγκεκριμένο αυτοαντίσωμα.

Χρησιμοποιώντας την μοναδική εμπορικά διαθέσιμη και ευρέως χρησιμοποιούμενη ELISA, που παρουσιάζει το καρβοξυτελικό τμήμα της gr210 ως αντιγόνο, βρήκαμε ότι ενώ υπάρχουν τα αντι-gr210 αυτοαντισώματα δεν ανιχνεύονται σ'ένα μεγάλο ποσοστό (10,7%) των ορών. Ως εκ τούτου, θεωρούμε αναγκαία την ανάπτυξη μεθοδολογίας με νέα αντιγονικά υποστρώματα και δευτερογενή αντισώματα.

3. Η **ανοσοαποτύπωση** μόνη της ή σε συνδυασμό με την **ανοσοκατακρήμνιση** αποτελούν αποτελεσματικές μεθόδους για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων για συγκεκριμένες πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου.

Στην ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιούνται πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου και μεταφερθεί σε ειδικές μεμβράνες. Η μεθοδολογία αυτή, αν και χρονοβόρα, δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων για πρωτεΐνες συγκεκριμένου μοριακού βάρους ή γνωστής ταυτότητας, με μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία.

Με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα πυρηνικών φακέλων βρήκαμε ότι η πρωτεϊνική ζώνη στα 210kDa που αναγνωρίζουν οι οροί οφείλεται σε αυτοαντισώματα για την gp210 και ως εκ τούτου η συγκεκριμένη μεθοδολογία μπορεί να αποτελέσει ένα απλό τρόπο προσδιορισμού αντι-gp210 αυτοαντισωμάτων στην PBC.

Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα καθαρές λαμίνες που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα πυρήνων καθώς και ανασυνδυασμένο αμινοτελικό τμήμα του LBR, βρήκαμε ότι η συχνότητα αυτοαντισωμάτων για τις πυρηνικές λαμίνες και τον LBR είναι χαμηλή και σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες.

Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την p62 και την gp210 που απομονώθηκαν με ανοσοκατακρήμιση από εκχυλίσματα πυρηνικών φακέλων, διαπιστώσαμε ότι δεν υπάρχουν αντι-p62 αυτοαντισώματα εκτός αν υφίστανται σε εξαιρετικά χαμηλό τίτλο, ενώ τα αντι-gp210 αντισώματα είναι τα χαρακτηριστικά περιπυρηνικά αυτοαντισώματα στη PBC. Περίπου το 1/3 του συνόλου των ορών και τα 2/3 των ορών με περιπυρηνικά αυτοαντισώματα περιέχουν αντι-gp210 αντισώματα.

Εν κατακλείδι, η έρευνά μας έδειξε ότι η χρησιμοποίηση της σωστής τεχνικής για την ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων απαιτεί μεταξύ άλλων γνώση των δυνατοτήτων και περιορισμών κάθε διαθέσιμης τεχνικής. Μέχρι σήμερα φαίνεται ότι, λόγω τεχνικών αδυναμιών, η συχνότητα των περιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων δεν έχει εκτιμηθεί σωστά. Δεδομένης της αναδυόμενης σημασίας των συγκεκριμένων αντισωμάτων στην διάγνωση και πρόγνωση της PBC και βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της μελέτης μας, προτείνουμε την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών πακέτων IIF και ELISA για τον προσδιορισμό του περιπυρηνικού φθορισμού και αυτοαντισωμάτων για την gp210 σε ορούς ασθενών με PBC.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adam, S. A. (2001). "The nuclear pore complex." Genome Biol **2**(9): REVIEWS0007.
- Adams, C. R. and R. T. Kamakaka (1999). "Chromatin assembly: biochemical identities and genetic redundancy." Curr Opin Genet Dev **9**(2): 185-90.
- Agrawal, S. and E. R. Kandimalla (2003). "Modulation of Toll-like Receptor 9 Responses through Synthetic Immunostimulatory Motifs of DNA." Ann N Y Acad Sci **1002**: 30-42.
- Aitchison, J. D. and M. P. Rout (2002). "A tense time for the nuclear envelope." Cell **108**(3): 301-4.
- Andrulis, E. D., A. M. Neiman, et al. (1998). "Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing." Nature **394**(6693): 592-5.
- Apel, E. D., R. M. Lewis, et al. (2000). "Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction." J Biol Chem **275**(41): 31986-95.
- Avouac, J., C. Sordet, et al. (2006). "Systemic sclerosis-associated Sjogren's syndrome and relationship to the limited cutaneous subtype: results of a prospective study of sicca syndrome in 133 consecutive patients." Arthritis Rheum **54**(7): 2243-9.
- Balan, V., E. R. Dickson, et al. (1994). "Effect of ursodeoxycholic acid on serum lipids of patients with primary biliary cirrhosis." Mayo Clin Proc **69**(10): 923-9.
- Bandin, O., J. C. Courvalin, et al. (1996). "Specificity and sensitivity of gp210 autoantibodies detected using an enzyme-linked immunosorbent assay and a synthetic polypeptide in the diagnosis of primary biliary cirrhosis." Hepatology **23**(5): 1020-4.
- Bastos, R., L. Ribas de Pouplana, et al. (1997). "Nup84, a novel nucleoporin that is associated with CAN/Nup214 on the cytoplasmic face of the nuclear pore complex." J Cell Biol **137**(5): 989-1000.
- Bauer, A. and A. Habor (2007). "Measurement of gp210 autoantibodies in sera of patients with primary biliary cirrhosis." J Clin Lab Anal **21**(4): 227-31.
- Baum, H. and P. Cunningham (1994). "Do MHC antigens generate pathogenetic peptides?" Immunol Today **15**(8): 388-9.
- Bayliss, R., A. H. Corbett, et al. (2000). "The molecular mechanism of transport of macromolecules through nuclear pore complexes." Traffic **1**(6): 448-56.
- Bayliss, R., K. Ribbeck, et al. (1999). "Interaction between NTF2 and xFxFG-containing nucleoporins is required to mediate nuclear import of RanGDP." J Mol Biol **293**(3): 579-93.
- Beaudouin, J., D. Gerlich, et al. (2002). "Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina." Cell **108**(1): 83-96.
- Belgareh, N., G. Rabut, et al. (2001). "An evolutionarily conserved NPC subcomplex, which redistributes in part to kinetochores in mammalian cells." J Cell Biol **154**(6): 1147-60.
- Benson, G. D., K. Kikuchi, et al. (2004). "Serial analysis of antimitochondrial antibody in patients with primary biliary cirrhosis." Clin Dev Immunol **11**(2): 129-33.
- Berg, P. A. and R. Klein (1995). "Mitochondrial antigen/antibody systems in primary biliary cirrhosis: revisited." Liver **15**(6): 281-92.
- Bernstein, R. M. (1984). "Antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis." Lancet **1**(8375): 508.
- Bernstein, R. M., M. E. Callender, et al. (1982). "Anticentromere antibody in primary biliary cirrhosis." Ann Rheum Dis **41**(6): 612-4.
- Bittencourt, P. L., A. Q. Farias, et al. (2004). "Prevalence of immune disturbances and chronic liver disease in family members of patients with primary biliary cirrhosis." J Gastroenterol Hepatol **19**(8): 873-8.

- Black, B. E., D. R. Foltz, et al. (2004). "Structural determinants for generating centromeric chromatin." *Nature* **430**(6999): 578-82.
- Blobel, G. and V. R. Potter (1966). "Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield." *Science* **154**(757): 1662-5.
- Blower, M. D., B. A. Sullivan, et al. (2002). "Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans." *Dev Cell* **2**(3): 319-30.
- Bluthner, M., C. Schafer, et al. (1999). "Identification of major linear epitopes on the sp100 nuclear PBC autoantigen by the gene-fragment phage-display technology." *Autoimmunity* **29**(1): 33-42.
- Bodoor, K., S. Shaikh, et al. (1999). "Function and assembly of nuclear pore complex proteins." *Biochem Cell Biol* **77**(4): 321-9.
- Boes, M., T. Schmidt, et al. (2000). "Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3): 1184-9.
- Bogdanos, D. P., H. Baum, et al. (2003). "Association between the primary biliary cirrhosis specific anti-sp100 antibodies and recurrent urinary tract infection." *Dig Liver Dis* **35**(11): 801-5.
- Bogdanos, D. P., C. Liaskos, et al. (2007). "Anti-gp210 antibody mirrors disease severity in primary biliary cirrhosis." *Hepatology* **45**(6): 1583; author reply 1583-4.
- Bogdanos, D. P., H. Smith, et al. (2005). "A study of molecular mimicry and immunological cross-reactivity between hepatitis B surface antigen and myelin mimics." *Clin Dev Immunol* **12**(3): 217-24.
- Bogdanos, D. P., D. Vergani, et al. (2004). "Specificity of anti-sp100 antibody for primary biliary cirrhosis." *Scand J Gastroenterol* **39**(4): 405-6; author reply 407.
- Borda, E. and L. Sterin-Borda (2001). "Autoantibodies against neonatal heart M1 muscarinic acetylcholine receptor in children with congenital heart block." *J Autoimmun* **16**(2): 143-50.
- Bottomley, M. J. (2004). "Structures of protein domains that create or recognize histone modifications." *EMBO Rep* **5**(5): 464-9.
- Bradford, M. M., R. A. McRorie, et al. (1976). "A role for esterases in the fertilization process." *J Exp Zool* **197**(2): 297-301.
- Brind, A. M., G. P. Bray, et al. (1995). "Prevalence and pattern of familial disease in primary biliary cirrhosis." *Gut* **36**(4): 615-7.
- Broers, J. L. and F. C. Ramaekers (2004). "Dynamics of nuclear lamina assembly and disassembly." *Symp Soc Exp Biol*(56): 177-92.
- Burke, B. and J. Ellenberg (2002). "Remodelling the walls of the nucleus." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(7): 487-97.
- Burke, B. and C. L. Stewart (2002). "Life at the edge: the nuclear envelope and human disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(8): 575-85.
- Burroughs, A. K., P. Butler, et al. (1992). "Molecular mimicry in liver disease." *Nature* **358**(6385): 377-8.
- Buss, F., H. Kent, et al. (1994). "Role of different domains in the self-association of rat nucleoporin p62." *J Cell Sci* **107** (Pt 2): 631-8.
- Casciola-Rosen, L. A., G. Anhalt, et al. (1994). "Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes." *J Exp Med* **179**(4): 1317-30.
- Cassani, F., F. B. Bianchi, et al. (1985). "Immunomorphological characterisation of antinuclear antibodies in chronic liver disease." *J Clin Pathol* **38**(7): 801-5.

- Charlotte, F., J. Wechsler, et al. (1994). "Nonepidermotropic cutaneous lymphomas. A histopathological and immunohistological study of 52 cases." Arch Pathol Lab Med **118**(1): 56-63.
- Chou, C. H., S. A. Ali, et al. (1991). "Onset and regulation of anti-lamin B autoantibody production is independent of the level of polyclonal activation." Autoimmunity **8**(4): 297-305.
- Chou, C. H. and W. H. Reeves (1992). "Recognition of multiple epitopes in the coiled-coil domain of lamin B by human autoantibodies." Mol Immunol **29**(9): 1055-64.
- Chou, M. J., S. L. Lee, et al. (1995). "Specificity of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis." Ann Rheum Dis **54**(2): 148-51.
- Christen, U., J. Quinn, et al. (1994). "Identification of the dihydrolipoamide acetyltransferase subunit of the human pyruvate dehydrogenase complex as an autoantigen in halothane hepatitis. Molecular mimicry of trifluoroacetyl-lysine by lipoic acid." Eur J Biochem **223**(3): 1035-47.
- Clements, L., S. Manilal, et al. (2000). "Direct interaction between emerin and lamin A." Biochem Biophys Res Commun **267**(3): 709-14.
- Collas, P., J. C. Courvalin, et al. (1996). "Targeting of membranes to sea urchin sperm chromatin is mediated by a lamin B receptor-like integral membrane protein." J Cell Biol **135**(6 Pt 2): 1715-25.
- Collas, P. and D. Poccia (2000). "Membrane fusion events during nuclear envelope assembly." Subcell Biochem **34**: 273-302.
- Coppel, R. L., L. J. McNeilage, et al. (1988). "Primary structure of the human M2 mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis: dihydrolipoamide acetyltransferase." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(19): 7317-21.
- Courvalin, J. C., N. Chaudhary, et al. (1990). "Characterization of human autoantibodies specific for lamin A." Biol Cell **69**(2): 93-7.
- Crisp, M., Q. Liu, et al. (2006). "Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex." J Cell Biol **172**(1): 41-53.
- Cronshaw, J. M., A. N. Krutchinsky, et al. (2002). "Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex." J Cell Biol **158**(5): 915-27.
- Csepregi, A., P. Obermayer-Straub, et al. (2003). "Characterization of a lipoyl domain-independent B-cell autoepitope on the human branched-chain acyltransferase in primary biliary cirrhosis and overlap syndrome with autoimmune hepatitis." Clin Dev Immunol **10**(2-4): 173-81.
- D'Angelo, M. A. and M. W. Hetzer (2008). "Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes." Trends Cell Biol **18**(10): 456-66.
- D'Cruz, D. (2000). "Autoimmune diseases associated with drugs, chemicals and environmental factors." Toxicol Lett **112-113**: 421-32.
- D'Onofrio, M., C. M. Starr, et al. (1988). "Partial cDNA sequence encoding a nuclear pore protein modified by O-linked N-acetylglucosamine." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9595-9.
- Dagenais, A., V. Bibor-Hardy, et al. (1988). "A novel autoantibody causing a peripheral fluorescent antinuclear antibody pattern is specific for nuclear pore complexes." Arthritis Rheum **31**(10): 1322-7.
- Daigle, N., J. Beaudouin, et al. (2001). "Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells." J Cell Biol **154**(1): 71-84.
- Damelin, M. and P. A. Silver (2000). "Mapping interactions between nuclear transport factors in living cells reveals pathways through the nuclear pore complex." Mol Cell **5**(1): 133-40.

- Davis, L. I. and G. Blobel (1987). "Nuclear pore complex contains a family of glycoproteins that includes p62: glycosylation through a previously unidentified cellular pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7552-6.
- Dechat, T., B. Korbei, et al. (2000). "Lamina-associated polypeptide 2alpha binds intranuclear A-type lamins." J Cell Sci **113 Pt 19**: 3473-84.
- Degott, C., E. S. Zafrani, et al. (1999). "Histopathological study of primary biliary cirrhosis and the effect of ursodeoxycholic acid treatment on histology progression." Hepatology **29**(4): 1007-12.
- Desiraju, V., W. G. Shanabruch, et al. (1993). "Nucleotide sequence of the Salmonella typhimurium mutB gene, the homolog of Escherichia coli mutY." J Bacteriol **175**(2): 541-3.
- Dubel, L., O. Farges, et al. (1998). "Persistence of gp210 and multiple nuclear dots antibodies does not correlate with recurrence of primary biliary cirrhosis 6 years after liver transplantation." J Hepatol **28**(1): 169-70.
- Dwyer, N. and G. Blobel (1976). "A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei." J Cell Biol **70**(3): 581-91.
- Earnshaw, W. C., P. S. Machlin, et al. (1987). "Analysis of anticentromere autoantibodies using cloned autoantigen CENP-B." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(14): 4979-83.
- Earnshaw, W. C., H. Ratrie, 3rd, et al. (1989). "Visualization of centromere proteins CENP-B and CENP-C on a stable dicentric chromosome in cytological spreads." Chromosoma **98**(1): 1-12.
- Earnshaw, W. C. and N. Rothfield (1985). "Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma." Chromosoma **91**(3-4): 313-21.
- Ehlers, M. and J. V. Ravetch (2007). "Opposing effects of Toll-like receptor stimulation induce autoimmunity or tolerance." Trends Immunol **28**(2): 74-9.
- Elefanty, A. G., M. Antoniou, et al. (1996). "GATA transcription factors associate with a novel class of nuclear bodies in erythroblasts and megakaryocytes." Embo J **15**(2): 319-33.
- Ellenberg, J., E. D. Siggia, et al. (1997). "Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis." J Cell Biol **138**(6): 1193-206.
- Enarson, P., J. B. Rattner, et al. (2004). "Autoantigens of the nuclear pore complex." J Mol Med **82**(7): 423-33.
- Enninga, J., A. Levay, et al. (2003). "Sec13 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and stably interacts with Nup96 at the nuclear pore complex." Mol Cell Biol **23**(20): 7271-84.
- Evans, M. J., R. Suenaga, et al. (1991). "Detection and purification of antiidiotypic antibody against anti-DNA in intravenous immune globulin." J Clin Immunol **11**(5): 291-5.
- Favreau, C., H. J. Worman, et al. (1996). "Cell cycle-dependent phosphorylation of nucleoporins and nuclear pore membrane protein Gp210." Biochemistry **35**(24): 8035-44.
- Foisner, R. (2001). "Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina." J Cell Sci **114**(Pt 21): 3791-2.
- Foisner, R. and L. Gerace (1993). "Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation." Cell **73**(7): 1267-79.
- Foltz, D. R., L. E. Jansen, et al. (2006). "The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex." Nat Cell Biol **8**(5): 458-69.

- Fox, A. H., C. S. Bond, et al. (2005). "P54nrb forms a heterodimer with PSP1 that localizes to paraspeckles in an RNA-dependent manner." *Mol Biol Cell* **16**(11): 5304-15.
- Fregeau, D. R., P. A. Davis, et al. (1989). "Antimitochondrial antibodies of primary biliary cirrhosis recognize dihydrolipoamide acyltransferase and inhibit enzyme function of the branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex." *J Immunol* **142**(11): 3815-20.
- Fujii, K., S. Kikuchi, et al. (2002). "Degradation of 17beta-estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan." *Appl Environ Microbiol* **68**(4): 2057-60.
- Fukagawa, T., Y. Mikami, et al. (2001). "CENP-H, a constitutive centromere component, is required for centromere targeting of CENP-C in vertebrate cells." *Embo J* **20**(16): 4603-17.
- Fusconi, M., F. Cassani, et al. (1991). "Anti-nuclear antibodies of primary biliary cirrhosis recognize 78-92-kD and 96-100-kD proteins of nuclear bodies." *Clin Exp Immunol* **83**(2): 291-7.
- Gall, J. G. (2000). "Cajal bodies: the first 100 years." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 273-300.
- Galy, V., W. Antonin, et al. (2008). "A role for gp210 in mitotic nuclear-envelope breakdown." *J Cell Sci* **121**(Pt 3): 317-28.
- Gao, L., X. Tian, et al. (2008). "The value of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis." *Clin Exp Med* **8**(1): 9-15.
- Georgatos, S. D. (2001). "The inner nuclear membrane: simple, or very complex?" *Embo J* **20**(12): 2989-94.
- Georgatos, S. D., A. Pырpasopoulou, et al. (1997). "Nuclear envelope breakdown in mammalian cells involves stepwise lamina disassembly and microtubule-drive deformation of the nuclear membrane." *J Cell Sci* **110** (Pt 17): 2129-40.
- Georgatos, S. D. and P. A. Theodoropoulos (1999). "Rules to remodel by: what drives nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis?" *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **9**(3-4): 373-81.
- Gerace, L. and B. Burke (1988). "Functional organization of the nuclear envelope." *Annu Rev Cell Biol* **4**: 335-74.
- Gerace, L., Y. Ottaviano, et al. (1982). "Identification of a major polypeptide of the nuclear pore complex." *J Cell Biol* **95**(3): 826-37.
- Gershwin, M. E., R. L. Coppel, et al. (1988). "Primary biliary cirrhosis and mitochondrial autoantigens--insights from molecular biology." *Hepatology* **8**(1): 147-51.
- Gershwin, M. E. and I. R. Mackay (2008). "The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths." *Hepatology* **47**(2): 737-45.
- Gershwin, M. E., I. R. Mackay, et al. (1987). "Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis." *J Immunol* **138**(10): 3525-31.
- Goldberg, A. L. and K. L. Rock (1992). "Proteolysis, proteasomes and antigen presentation." *Nature* **357**(6377): 375-9.
- Gonczy, P. (2002). "Nuclear envelope: torn apart at mitosis." *Curr Biol* **12**(7): R242-4.
- Gorlich, D. and U. Kutay (1999). "Transport between the cell nucleus and the cytoplasm." *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 607-60.
- Goshima, G., T. Kiyomitsu, et al. (2003). "Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway." *J Cell Biol* **160**(1): 25-39.
- Grande, M. A., I. van der Kraan, et al. (1997). "Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II." *J Cell Sci* **110** (Pt 15): 1781-91.

- Greber, U. F., A. Senior, et al. (1990). "A major glycoprotein of the nuclear pore complex is a membrane-spanning polypeptide with a large luminal domain and a small cytoplasmic tail." Embo J **9**(5): 1495-502.
- Gregorio, G. V., K. Choudhuri, et al. (1999). "Mimicry between the hepatitis B virus DNA polymerase and the antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis B virus infection." J Immunol **162**(3): 1802-10.
- Griem, P., M. Wulferink, et al. (1998). "Allergic and autoimmune reactions to xenobiotics: how do they arise?" Immunol Today **19**(3): 133-41.
- Grote, M., U. Kubitscheck, et al. (1995). "Mapping of nucleoporins to the center of the nuclear pore complex by post-embedding immunogold electron microscopy." J Cell Sci **108** (Pt 9): 2963-72.
- Guilly, M. N., F. Danon, et al. (1987). "Autoantibodies to nuclear lamin B in a patient with thrombopenia." Eur J Cell Biol **43**(2): 266-72.
- Gut, J. (1998). "Molecular basis of halothane hepatitis." Arch Toxicol Suppl **20**: 3-17.
- Hansen, B. U., S. Eriksson, et al. (1991). "High prevalence of autoimmune liver disease in patients with multiple nuclear dot, anti-centromere, and mitotic spindle antibodies." Scand J Gastroenterol **26**(7): 707-13.
- Haque, F., D. J. Lloyd, et al. (2006). "SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton." Mol Cell Biol **26**(10): 3738-51.
- Havarinasab, S. and P. Hultman (2005). "Organic mercury compounds and autoimmunity." Autoimmun Rev **4**(5): 270-5.
- He, X. S., A. A. Ansari, et al. (2006). "New insights to the immunopathology and autoimmune responses in primary biliary cirrhosis." Cell Immunol **239**(1): 1-13.
- Hetzer, M. W., T. C. Walther, et al. (2005). "Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 347-80.
- Hinshaw, J. E., B. O. Carragher, et al. (1992). "Architecture and design of the nuclear pore complex." Cell **69**(7): 1133-41.
- Hodzic, D. M., D. B. Yeater, et al. (2004). "Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein." J Biol Chem **279**(24): 25805-12.
- Howman, E. V., K. J. Fowler, et al. (2000). "Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(3): 1148-53.
- Huang, S. (2000). "Review: perinucleolar structures." J Struct Biol **129**(2-3): 233-40.
- Hudson, D. F., K. J. Fowler, et al. (1998). "Centromere protein B null mice are mitotically and meiotically normal but have lower body and testis weights." J Cell Biol **141**(2): 309-19.
- Invernizzi, P., M. Miozzo, et al. (2004). "Frequency of monosomy X in women with primary biliary cirrhosis." Lancet **363**(9408): 533-5.
- Invernizzi, P., M. Podda, et al. (2001). "Autoantibodies against nuclear pore complexes are associated with more active and severe liver disease in primary biliary cirrhosis." J Hepatol **34**(3): 366-72.
- Invernizzi, P., C. Selmi, et al. (2005). "Antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis." Semin Liver Dis **25**(3): 298-310.
- Itoh, S., T. Ichida, et al. (1998). "Autoantibodies against a 210 kDa glycoprotein of the nuclear pore complex as a prognostic marker in patients with primary biliary cirrhosis." J Gastroenterol Hepatol **13**(3): 257-65.
- Iwayama, T., P. S. Leung, et al. (1992). "Comparative immunoreactive profiles of Japanese and American patients with primary biliary cirrhosis against mitochondrial autoantigens." Int Arch Allergy Immunol **99**(1): 28-33.

- James, O. F., S. J. Yeaman, et al. (1989). "Molecular aspects of the M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis: what a difference a year makes." *Hepatology* **10**(2): 247-51.
- Jolly, C., R. Morimoto, et al. (1997). "HSF1 transcription factor concentrates in nuclear foci during heat shock: relationship with transcription sites." *J Cell Sci* **110** (Pt 23): 2935-41.
- Jones, D. E., F. E. Watt, et al. (1999). "Familial primary biliary cirrhosis reassessed: a geographically-based population study." *J Hepatol* **30**(3): 402-7.
- Joseph, J., S. H. Tan, et al. (2002). "SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles." *J Cell Biol* **156**(4): 595-602.
- Kalitsis, P., K. J. Fowler, et al. (1998). "Targeted disruption of mouse centromere protein C gene leads to mitotic disarray and early embryo death." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(3): 1136-41.
- Kaplan, M. M. and M. E. Gershwin (2005). "Primary biliary cirrhosis." *N Engl J Med* **353**(12): 1261-73.
- Koizumi, H., Y. Onozuka, et al. (1999). "[Detection of anti-nuclear antibodies in liver diseases by indirect immunofluorescence method and enzyme-linked immunosorbent assay]." *Rinsho Byori* **47**(8): 744-8.
- Konstantinov, K., R. Foisner, et al. (1995). "Integral membrane proteins associated with the nuclear lamina are novel autoimmune antigens of the nuclear envelope." *Clin Immunol Immunopathol* **74**(1): 89-99.
- Korganow, A. S., H. Ji, et al. (1999). "From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins." *Immunity* **10**(4): 451-61.
- Kraemer, D., R. W. Wozniak, et al. (1994). "The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis, is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4): 1519-23.
- Kruhlak, M. J., M. J. Hendzel, et al. (2001). "Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin." *J Biol Chem* **276**(41): 38307-19.
- Kuersten, S., M. Ohno, et al. (2001). "Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond." *Trends Cell Biol* **11**(12): 497-503.
- Kumagi, T. and E. J. Heathcote (2008). "Primary biliary cirrhosis." *Orphanet J Rare Dis* **3**: 1.
- Lacerda, M. A., J. Ludwig, et al. (1995). "Antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis." *Am J Gastroenterol* **90**(2): 247-9.
- Lamond, A. I. and W. C. Earnshaw (1998). "Structure and function in the nucleus." *Science* **280**(5363): 547-53.
- Lassoued, K., R. Brenard, et al. (1990). "Antinuclear antibodies directed to a 200-kilodalton polypeptide of the nuclear envelope in primary biliary cirrhosis. A clinical and immunological study of a series of 150 patients with primary biliary cirrhosis." *Gastroenterology* **99**(1): 181-6.
- Lassoued, K., F. Danon, et al. (1991). "Human autoantibodies to lamin B receptor are also anti-idiotypic to certain anti-lamin B antibodies." *Eur J Immunol* **21**(8): 1959-62.
- Lassoued, K., M. N. Guilly, et al. (1988). "Autoantibodies to 200 kD polypeptide(s) of the nuclear envelope: a new serologic marker of primary biliary cirrhosis." *Clin Exp Immunol* **74**(2): 283-8.
- Lee, J., A. Belanger, et al. (2007). "Transplantation trends in primary biliary cirrhosis." *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**(11): 1313-5.
- Lee, S. L., G. J. Tsay, et al. (1993). "Anticentromere antibodies in subjects with no apparent connective tissue disease." *Ann Rheum Dis* **52**(8): 586-9.

- Leung, P. S., D. T. Chuang, et al. (1995). "Autoantibodies to BCOADC-E2 in patients with primary biliary cirrhosis recognize a conformational epitope." *Hepatology* **22**(2): 505-13.
- Leung, P. S., C. Quan, et al. (2003). "Immunization with a xenobiotic 6-bromohexanoate bovine serum albumin conjugate induces antimitochondrial antibodies." *J Immunol* **170**(10): 5326-32.
- Lim, R. Y., U. Aebi, et al. (2008). "Towards reconciling structure and function in the nuclear pore complex." *Histochem Cell Biol* **129**(2): 105-16.
- Lin, F., D. L. Blake, et al. (2000). "MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin." *J Biol Chem* **275**(7): 4840-7.
- Lin, F., C. M. Noyer, et al. (1996). "Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a region within the nucleoplasmic domain of inner nuclear membrane protein LBR." *Hepatology* **23**(1): 57-61.
- Lindor, K. D., E. R. Dickson, et al. (1995). "The combination of ursodeoxycholic acid and methotrexate for patients with primary biliary cirrhosis: the results of a pilot study." *Hepatology* **22**(4 Pt 1): 1158-62.
- Lindor, K. D., M. E. Gershwin, et al. (2009). "Primary biliary cirrhosis." *Hepatology* **50**(1): 291-308.
- Lindor, K. D., R. A. Jorgensen, et al. (1997). "Ursodeoxycholic acid delays the onset of esophageal varices in primary biliary cirrhosis." *Mayo Clin Proc* **72**(12): 1137-40.
- Liu, B., X. H. Shi, et al. (2008). "Antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis: a subset of primary biliary cirrhosis." *Liver Int* **28**(2): 233-9.
- Liu, Z. X., H. Nishida, et al. (2002). "Hepatitis C virus genotype 1b core protein does not exert immunomodulatory effects on virus-induced cellular immunity." *J Virol* **76**(3): 990-7.
- Lleo, A., C. Selmi, et al. (2009). "Apoptosis and the biliary specificity of primary biliary cirrhosis." *Hepatology* **49**(3): 871-9.
- Loiodice, I., A. Alves, et al. (2004). "The entire Nup107-160 complex, including three new members, is targeted as one entity to kinetochores in mitosis." *Mol Biol Cell* **15**(7): 3333-44.
- Long, S. A., C. Quan, et al. (2001). "Immunoreactivity of organic mimeotopes of the E2 component of pyruvate dehydrogenase: connecting xenobiotics with primary biliary cirrhosis." *J Immunol* **167**(5): 2956-63.
- Lozano, F., A. Pares, et al. (1988). "Autoantibodies against nuclear envelope-associated proteins in primary biliary cirrhosis." *Hepatology* **8**(4): 930-8.
- Luettig, B., K. H. Boeker, et al. (1998). "The antinuclear autoantibodies Sp100 and gp210 persist after orthotopic liver transplantation in patients with primary biliary cirrhosis." *J Hepatol* **28**(5): 824-8.
- Lutz, H. U., C. J. Binder, et al. (2009). "Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease." *Trends Immunol* **30**(1): 43-51.
- Lyman, S. K. and L. Gerace (2001). "Nuclear pore complexes: dynamics in unexpected places." *J Cell Biol* **154**(1): 17-20.
- Mackay, I. R., M. J. Rowley, et al. (1989). "Identity of the M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis." *Hepatology* **10**(3): 389-90.
- Maison, C., A. Pырpasopoulou, et al. (1997). "The inner nuclear membrane protein LAP1 forms a native complex with B-type lamins and partitions with spindle-associated mitotic vesicles." *Embo J* **16**(16): 4839-50.

- Makatsori, D., N. Kourmouli, et al. (2004). "The inner nuclear membrane protein lamin B receptor forms distinct microdomains and links epigenetically marked chromatin to the nuclear envelope." *J Biol Chem* **279**(24): 25567-73.
- Makinen, D., M. Fritzler, et al. (1983). "Anticentromere antibodies in primary biliary cirrhosis." *Arthritis Rheum* **26**(7): 914-7.
- Malik, H. S. and S. Henikoff (2001). "Adaptive evolution of Cid, a centromere-specific histone in *Drosophila*." *Genetics* **157**(3): 1293-8.
- Mao, T. K., Z. X. Lian, et al. (2005). "Altered monocyte responses to defined TLR ligands in patients with primary biliary cirrhosis." *Hepatology* **42**(4): 802-8.
- Martin, A. C., K. Toda, et al. (1995). "Long loops in proteins." *Protein Eng* **8**(11): 1093-101.
- Martins, S. B., T. Eide, et al. (2000). "HA95 is a protein of the chromatin and nuclear matrix regulating nuclear envelope dynamics." *J Cell Sci* **113 Pt 21**: 3703-13.
- Masumoto, H., M. Nakano, et al. (2004). "The role of CENP-B and alpha-satellite DNA: de novo assembly and epigenetic maintenance of human centromeres." *Chromosome Res* **12**(6): 543-56.
- Matera, A. G. (1999). "Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space." *Trends Cell Biol* **9**(8): 302-9.
- Matera, A. G., A. M. Weiner, et al. (1990). "Structure and evolution of the U2 small nuclear RNA multigene family in primates: gene amplification under natural selection?" *Mol Cell Biol* **10**(11): 5876-82.
- Mattaj, I. W. (2004). "Sorting out the nuclear envelope from the endoplasmic reticulum." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(1): 65-9.
- Mattalia, A., B. Luttig, et al. (1997). "Persistence of autoantibodies against recombinant mitochondrial and nuclear pore proteins after orthotopic liver transplantation for primary biliary cirrhosis." *J Autoimmun* **10**(5): 491-7.
- Mattner, J., P. B. Savage, et al. (2008). "Liver autoimmunity triggered by microbial activation of natural killer T cells." *Cell Host Microbe* **3**(5): 304-15.
- Mattout, A., T. Dechat, et al. (2006). "Nuclear lamins, diseases and aging." *Curr Opin Cell Biol* **18**(3): 335-41.
- Matunis, M. J. (2006). "Isolation and fractionation of rat liver nuclear envelopes and nuclear pore complexes." *Methods* **39**(4): 277-83.
- Maul, G. G., D. Negorev, et al. (2000). "Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs." *J Struct Biol* **129**(2-3): 278-87.
- McKeon, F. D., D. L. Tuffanelli, et al. (1983). "Autoimmune response directed against conserved determinants of nuclear envelope proteins in a patient with linear scleroderma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(14): 4374-8.
- Meier, J. and S. D. Georgatos (1994). "Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly." *Embo J* **13**(8): 1888-98.
- Milkiewicz, P. and J. Heathcote (2004). "Can Turner syndrome teach us about the pathogenesis of chronic cholestasis?" *Hepatology* **40**(5): 1226-8.
- Miyachi, K., R. W. Hankins, et al. (2003). "Profile and clinical significance of anti-nuclear envelope antibodies found in patients with primary biliary cirrhosis: a multicenter study." *J Autoimmun* **20**(3): 247-54.
- Miyachi, K., M. Shibata, et al. (1996). "Primary biliary cirrhosis sera recognize not only gp210 but also proteins of the p62 complex bearing N-acetylglucosamine residues from rat liver nuclear envelope. Anti-p62 complex antibody in PBC." *Mol Biol Rep* **23**(3-4): 227-34.
- Miyawaki, S., H. Asanuma, et al. (2005). "Clinical and serological heterogeneity in patients with anticentromere antibodies." *J Rheumatol* **32**(8): 1488-94.

- Montanaro, A. and E. J. Bardana, Jr. (1991). "Dietary amino acid-induced systemic lupus erythematosus." Rheum Dis Clin North Am **17**(2): 323-32.
- Moritoki, Y., Z. X. Lian, et al. (2007). "AMA production in primary biliary cirrhosis is promoted by the TLR9 ligand CpG and suppressed by potassium channel blockers." Hepatology **45**(2): 314-22.
- Mosammaparast, N., C. S. Ewart, et al. (2002). "A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B." Embo J **21**(23): 6527-38.
- Muratori, L., A. Granito, et al. (2008). "Antimitochondrial antibodies and other antibodies in primary biliary cirrhosis: diagnostic and prognostic value." Clin Liver Dis **12**(2): 261-76; vii.
- Muratori, P., A. Granito, et al. (2008). "Autoimmune liver disease 2007." Mol Aspects Med **29**(1-2): 96-102.
- Muratori, P., L. Muratori, et al. (2002). "Anti-multiple nuclear dots (anti-MND) and anti-SP100 antibodies in hepatic and rheumatological disorders." Clin Exp Immunol **127**(1): 172-5.
- Muratori, P., L. Muratori, et al. (2003). "Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis." Am J Gastroenterol **98**(2): 431-7.
- Nakamura, M., H. Kondo, et al. (2007). "Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis." Hepatology **45**(1): 118-27.
- Nakamura, M., Y. Shimizu-Yoshida, et al. (2005). "Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis." J Hepatol **42**(3): 386-92.
- Nakamura, M., Y. Takii, et al. (2006). "Increased expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis." J Autoimmun **26**(2): 138-45.
- Nesher, G., R. Margalit, et al. (2001). "Anti-nuclear envelope antibodies: Clinical associations." Semin Arthritis Rheum **30**(5): 313-20.
- Nickowitz, R. E. and H. J. Worman (1993). "Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a restricted region within the cytoplasmic tail of nuclear pore membrane glycoprotein Gp210." J Exp Med **178**(6): 2237-42.
- Nickowitz, R. E., R. W. Wozniak, et al. (1994). "Autoantibodies against integral membrane proteins of the nuclear envelope in patients with primary biliary cirrhosis." Gastroenterology **106**(1): 193-9.
- Nikolakaki, E., J. Meier, et al. (1997). "Mitotic phosphorylation of the lamin B receptor by a serine/arginine kinase and p34(cdc2)." J Biol Chem **272**(10): 6208-13.
- Nikolakaki, E., G. Simos, et al. (1996). "A nuclear envelope-associated kinase phosphorylates arginine-serine motifs and modulates interactions between the lamin B receptor and other nuclear proteins." J Biol Chem **271**(14): 8365-72.
- Nishihashi, A., T. Haraguchi, et al. (2002). "CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells." Dev Cell **2**(4): 463-76.
- Odin, J. A., R. C. Huebert, et al. (2001). "Bcl-2-dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-E2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis." J Clin Invest **108**(2): 223-32.
- Oertelt, S., R. Rieger, et al. (2007). "A sensitive bead assay for antimitochondrial antibodies: Chipping away at AMA-negative primary biliary cirrhosis." Hepatology **45**(3): 659-65.
- Ogden, C. A., R. Kowalewski, et al. (2005). "IGM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo." Autoimmunity **38**(4): 259-64.

- Orth, T., G. Gerken, et al. (1997). "Antineutrophil nuclear antibodies (ANNA) in primary biliary cirrhosis: their prevalence and antigen specificity." Z Gastroenterol **35**(2): 113-21.
- Ou, Y., P. Enarson, et al. (2004). "The nuclear pore complex protein Tpr is a common autoantigen in sera that demonstrate nuclear envelope staining by indirect immunofluorescence." Clin Exp Immunol **136**(2): 379-87.
- Padgett, K. A., C. Selmi, et al. (2005). "Phylogenetic and immunological definition of four lipoylated proteins from *Novosphingobium aromaticivorans*, implications for primary biliary cirrhosis." J Autoimmun **24**(3): 209-19.
- Pante, N. and U. Aebi (1994). "Toward the molecular details of the nuclear pore complex." J Struct Biol **113**(3): 179-89.
- Pante, N. and U. Aebi (1996). "Molecular dissection of the nuclear pore complex." Crit Rev Biochem Mol Biol **31**(2): 153-99.
- Parveen, S., S. A. Morshed, et al. (1995). "High prevalence of antibodies to recombinant CENP-B in primary biliary cirrhosis: nuclear immunofluorescence patterns and ELISA reactivities." J Gastroenterol Hepatol **10**(4): 438-45.
- Pawlotsky, J. M., C. Andre, et al. (1992). "Multiple nuclear dots antinuclear antibodies are not specific for primary biliary cirrhosis." Hepatology **16**(1): 127-31.
- Pekovic, V., J. Harborth, et al. (2007). "Nucleoplasmic LAP2alpha-lamin A complexes are required to maintain a proliferative state in human fibroblasts." J Cell Biol **176**(2): 163-72.
- Pemberton, L. F. and B. M. Paschal (2005). "Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export." Traffic **6**(3): 187-98.
- Pombo, A., P. Cuello, et al. (1998). "Regional and temporal specialization in the nucleus: a transcriptionally-active nuclear domain rich in PTF, Oct1 and PIKA antigens associates with specific chromosomes early in the cell cycle." Embo J **17**(6): 1768-78.
- Poupon, R. E., K. D. Lindor, et al. (1997). "Combined analysis of randomized controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis." Gastroenterology **113**(3): 884-90.
- Powell, F., A. L. Schroeter, et al. (1984). "Antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis." Lancet **1**(8371): 288-9.
- Pyrpasopoulou, A., J. Meier, et al. (1996). "The lamin B receptor (LBR) provides essential chromatin docking sites at the nuclear envelope." Embo J **15**(24): 7108-19.
- Razafsky, D. and D. Hodzic (2009). "Bringing KASH under the SUN: the many faces of nucleo-cytoskeletal connections." J Cell Biol **186**(4): 461-72.
- Reeves, W. H., N. Chaudhary, et al. (1987). "Lamin B autoantibodies in sera of certain patients with systemic lupus erythematosus." J Exp Med **165**(3): 750-62.
- Reidenberg, M. M. (1983). "Aromatic amines and the pathogenesis of lupus erythematosus." Am J Med **75**(6): 1037-42.
- Rexach, M. and G. Blobel (1995). "Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins." Cell **83**(5): 683-92.
- Rieger, R. and M. E. Gershwin (2007). "The X and why of xenobiotics in primary biliary cirrhosis." J Autoimmun **28**(2-3): 76-84.
- Rigopoulou, E. I. and G. N. Dalekos (2004). "Anti-sp100 antibodies in primary biliary cirrhosis." Scand J Gastroenterol **39**(4): 406-7; author reply 407.
- Rigopoulou, E. I., E. T. Davies, et al. (2005). "Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis." Gut **54**(4): 528-32.
- Robbins, E. and P. I. Marcus (1964). "Mitotically Synchronized Mammalian Cells: a Simple Method for Obtaining Large Populations." Science **144**: 1152-3.

- Rose, N. R., R. Bonita, et al. (2002). "Iodine: an environmental trigger of thyroiditis." Autoimmun Rev **1**(1-2): 97-103.
- Rout, M. P., J. D. Aitchison, et al. (2000). "The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism." J Cell Biol **148**(4): 635-51.
- Rowley, B. and M. Monestier (2005). "Mechanisms of heavy metal-induced autoimmunity." Mol Immunol **42**(7): 833-8.
- Ruffatti, A., P. Arslan, et al. (1985). "Nuclear membrane-staining antinuclear antibody in patients with primary biliary cirrhosis." J Clin Immunol **5**(5): 357-61.
- Saitoh, H., J. Tomkiel, et al. (1992). "CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate." Cell **70**(1): 115-25.
- Salina, D., K. Bodoor, et al. (2002). "Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown." Cell **108**(1): 97-107.
- Salina, D., P. Enarson, et al. (2003). "Nup358 integrates nuclear envelope breakdown with kinetochore assembly." J Cell Biol **162**(6): 991-1001.
- Sasagawa, S., A. Yamamoto, et al. (1999). "In vitro nuclear assembly with affinity-purified nuclear envelope precursor vesicle fractions, PV1 and PV2." Eur J Cell Biol **78**(8): 593-600.
- Saurin, A. J., C. Shiels, et al. (1998). "The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain." J Cell Biol **142**(4): 887-98.
- Scaffidi, P. and T. Misteli (2006). "Lamin A-dependent nuclear defects in human aging." Science **312**(5776): 1059-63.
- Schirmer, E. C. and L. Gerace (2005). "The nuclear membrane proteome: extending the envelope." Trends Biochem Sci **30**(10): 551-8.
- Schul, W., B. Groenhout, et al. (1996). "The RNA 3' cleavage factors CstF 64 kDa and CPSF 100 kDa are concentrated in nuclear domains closely associated with coiled bodies and newly synthesized RNA." Embo J **15**(11): 2883-92.
- Selmi, C., D. L. Balkwill, et al. (2003). "Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium." Hepatology **38**(5): 1250-7.
- Selmi, C. and M. E. Gershwin (2009). "The role of environmental factors in primary biliary cirrhosis." Trends Immunol **30**(8): 415-20.
- Selmi, C., S. R. Ross, et al. (2004). "Lack of immunological or molecular evidence for a role of mouse mammary tumor retrovirus in primary biliary cirrhosis." Gastroenterology **127**(2): 493-501.
- Senecal, J. L., J. Rauch, et al. (1999). "Strong association of autoantibodies to human nuclear lamin B1 with lupus anticoagulant antibodies in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **42**(7): 1347-53.
- Shi, T., J. K. Fredrickson, et al. (2001). "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Sphingomonas strains isolated from the terrestrial subsurface." J Ind Microbiol Biotechnol **26**(5): 283-9.
- Shimoda, S., M. Nakamura, et al. (2003). "Molecular mimicry of mitochondrial and nuclear autoantigens in primary biliary cirrhosis." Gastroenterology **124**(7): 1915-25.
- Shimoda, S., M. Nakamura, et al. (2000). "Mimicry peptides of human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant T-cell epitope of primary biliary cirrhosis." Hepatology **31**(6): 1212-6.
- Shoji, I., T. Takagi, et al. (1992). "Anti-centromere antibody and CREST syndrome in patients with primary biliary cirrhosis." Intern Med **31**(12): 1348-55.
- Silman, A. J. and J. Newman (1996). "Epidemiology of systemic sclerosis." Curr Opin Rheumatol **8**(6): 585-9.

- Simos, G. and S. D. Georgatos (1992). "The inner nuclear membrane protein p58 associates in vivo with a p58 kinase and the nuclear lamins." *Embo J* **11**(11): 4027-36.
- Simos, G. and S. D. Georgatos (1994). "The lamin B receptor-associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32." *FEBS Lett* **346**(2-3): 225-8.
- Simos, G., C. Maison, et al. (1996). "Characterization of p18, a component of the lamin B receptor complex and a new integral membrane protein of the avian erythrocyte nuclear envelope." *J Biol Chem* **271**(21): 12617-25.
- Smith, D. B. and K. S. Johnson (1988). "Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase." *Gene* **67**(1): 31-40.
- Spector, D. L. (1993). "Macromolecular domains within the cell nucleus." *Annu Rev Cell Biol* **9**: 265-315.
- Spector, D. L. (2001). "Nuclear domains." *J Cell Sci* **114**(Pt 16): 2891-3.
- Starr, C. M. and J. A. Hanover (1990). "Glycosylation of nuclear pore protein p62. Reticulocyte lysate catalyzes O-linked N-acetylglucosamine addition in vitro." *J Biol Chem* **265**(12): 6868-73.
- Steenland, K. and D. F. Goldsmith (1995). "Silica exposure and autoimmune diseases." *Am J Ind Med* **28**(5): 603-8.
- Stoffler, D., B. Fahrenkrog, et al. (1999). "The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics." *Curr Opin Cell Biol* **11**(3): 391-401.
- Stuurman, N., S. Heins, et al. (1998). "Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions." *J Struct Biol* **122**(1-2): 42-66.
- Sugata, N., S. Li, et al. (2000). "Human CENP-H multimers colocalize with CENP-A and CENP-C at active centromere--kinetochore complexes." *Hum Mol Genet* **9**(19): 2919-26.
- Sullivan, E., C. Santiago, et al. (2001). "Drosophila stem loop binding protein coordinates accumulation of mature histone mRNA with cell cycle progression." *Genes Dev* **15**(2): 173-87.
- Suntharalingam, M. and S. R. Wenthe (2003). "Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function." *Dev Cell* **4**(6): 775-89.
- Surh, C. D., R. Coppel, et al. (1990). "Structural requirement for autoreactivity on human pyruvate dehydrogenase-E2, the major autoantigen of primary biliary cirrhosis. Implication for a conformational autoepitope." *J Immunol* **144**(9): 3367-74.
- Surh, C. D., D. J. Danner, et al. (1989). "Reactivity of primary biliary cirrhosis sera with a human fetal liver cDNA clone of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase dihydrolipoamide acyltransferase, the 52 kD mitochondrial autoantigen." *Hepatology* **9**(1): 63-8.
- Szostecki, C., H. H. Guldner, et al. (1990). "Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis." *J Immunol* **145**(12): 4338-47.
- Szostecki, C., H. Will, et al. (1992). "Autoantibodies to the nuclear Sp100 protein in primary biliary cirrhosis and associated diseases: epitope specificity and immunoglobulin class distribution." *Scand J Immunol* **36**(4): 555-64.
- Takada, K., K. Suzuki, et al. (2007). "Primary biliary cirrhosis in female subjects with sicca-associated antibodies." *Mod Rheumatol* **17**(6): 486-91.
- Talbert, P. B., R. Masuelli, et al. (2002). "Centromeric localization and adaptive evolution of an *Arabidopsis* histone H3 variant." *Plant Cell* **14**(5): 1053-66.
- Talwalkar, J. A. and K. D. Lindor (2003). "Primary biliary cirrhosis." *Lancet* **362**(9377): 53-61.

- Tan, E. M., G. P. Rodnan, et al. (1980). "Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome." *Arthritis Rheum* **23**(6): 617-25.
- Tartakovsky, F. and H. J. Worman (1995). "Detection of Gp210 autoantibodies in primary biliary cirrhosis using a recombinant protein containing the predominant autoepitope." *Hepatology* **21**(2): 495-500.
- Theodoropoulos, P. A., H. Polioudaki, et al. (1999). "Taxol affects nuclear lamina and pore complex organization and inhibits import of karyophilic proteins into the cell nucleus." *Cancer Res* **59**(18): 4625-33.
- Theodoropoulos, P. A., H. Polioudaki, et al. (1999). "PBC68: a nuclear pore complex protein that associates reversibly with the mitotic spindle." *J Cell Sci* **112 Pt 18**: 3049-59.
- Torras-Llort, M., O. Moreno-Moreno, et al. (2009). "Focus on the centre: the role of chromatin on the regulation of centromere identity and function." *Embo J* **28**(16): 2337-48.
- Tsuneyama, K., K. Harada, et al. (2001). "Scavenger cells with gram-positive bacterial lipoteichoic acid infiltrate around the damaged interlobular bile ducts of primary biliary cirrhosis." *J Hepatol* **35**(2): 156-63.
- Van de Water, J., M. E. Gershwin, et al. (1988). "The autoepitope of the 74-kD mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis corresponds to the functional site of dihydrolipoamide acetyltransferase." *J Exp Med* **167**(6): 1791-9.
- Van de Water, J., H. Ishibashi, et al. (2001). "Molecular mimicry and primary biliary cirrhosis: premises not promises." *Hepatology* **33**(4): 771-5.
- Vaughan, J. H. (1993). "1992 Joseph J. Bunim Lecture. Pathogenetic concepts and origins of rheumatoid factor in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **36**(1): 1-6.
- Verreault, A. (2000). "De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle." *Genes Dev* **14**(12): 1430-8.
- Vigers, G. P. and M. J. Lohka (1991). "A distinct vesicle population targets membranes and pore complexes to the nuclear envelope in *Xenopus* eggs." *J Cell Biol* **112**(4): 545-56.
- Walker, J. G., D. Doniach, et al. (1965). "Serological Tests in Diagnosis of Primary Biliary Cirrhosis." *Lancet* **1**(7390): 827-31.
- Wang, Q., X. Du, et al. (2006). "Characterization of the structures involved in localization of the SUN proteins to the nuclear envelope and the centrosome." *DNA Cell Biol* **25**(10): 554-62.
- Weber, K., U. Plessmann, et al. (1989). "Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina." *FEBS Lett* **257**(2): 411-4.
- Wesierska-Gadek, J., H. Hohenauer, et al. (1995). "Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis preferentially react with the amino-terminal domain of nuclear pore complex glycoprotein gp210." *J Exp Med* **182**(4): 1159-62.
- Wesierska-Gadek, J., H. Hohenauer, et al. (1996). "Anti-gp210 antibodies in sera of patients with primary biliary cirrhosis. Identification of a 64 kD fragment of gp210 as a major epitope." *Hum Antibodies Hybridomas* **7**(4): 167-74.
- Wesierska-Gadek, J., A. Klima, et al. (2007). "Characterization of autoantibodies against components of the nuclear pore complexes: high frequency of anti-p62 nucleoporin antibodies." *Ann N Y Acad Sci* **1109**: 519-30.
- Wesierska-Gadek, J., E. Penner, et al. (2006). "Correlation of initial autoantibody profile and clinical outcome in primary biliary cirrhosis." *Hepatology* **43**(5): 1135-44.
- Wesierska-Gadek, J., E. Penner, et al. (1988). "Antibodies to nuclear lamins in autoimmune liver disease." *Clin Immunol Immunopathol* **49**(1): 107-15.

- Wichmann, I., M. A. Montes-Cano, et al. (2003). "Clinical significance of anti-multiple nuclear dots/Sp100 autoantibodies." Scand J Gastroenterol **38**(9): 996-9.
- Wilken, N., U. Kossner, et al. (1993). "Nup180, a novel nuclear pore complex protein localizing to the cytoplasmic ring and associated fibrils." J Cell Biol **123**(6 Pt 1): 1345-54.
- Wilken, N., J. L. Senecal, et al. (1995). "Localization of the Ran-GTP binding protein RanBP2 at the cytoplasmic side of the nuclear pore complex." Eur J Cell Biol **68**(3): 211-9.
- Worman, H. J. (2007). "Nuclear envelope protein autoantigens in primary biliary cirrhosis." Hepatol Res **37 Suppl 3**: S406-11.
- Worman, H. J. and J. C. Courvalin (2003). "Antinuclear antibodies specific for primary biliary cirrhosis." Autoimmun Rev **2**(4): 211-7.
- Worman, H. J., C. D. Evans, et al. (1990). "The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains." J Cell Biol **111**(4): 1535-42.
- Worman, H. J., J. Yuan, et al. (1988). "A lamin B receptor in the nuclear envelope." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(22): 8531-4.
- Wozniak, R. W., E. Bartnik, et al. (1989). "Primary structure analysis of an integral membrane glycoprotein of the nuclear pore." J Cell Biol **108**(6): 2083-92.
- Wozniak, R. W. and G. Blobel (1992). "The single transmembrane segment of gp210 is sufficient for sorting to the pore membrane domain of the nuclear envelope." J Cell Biol **119**(6): 1441-9.
- Xu, L., Z. Shen, et al. (2003). "Does a betaretrovirus infection trigger primary biliary cirrhosis?" Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8454-9.
- Yang, W. H., J. H. Yu, et al. (2004). "Do antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis patients identify increased risk for liver failure?" Clin Gastroenterol Hepatol **2**(12): 1116-22.
- Ye, Q. and H. J. Worman (1994). "Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane." J Biol Chem **269**(15): 11306-11.
- Yeaman, S. J., S. P. Fussey, et al. (1988). "Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens." Lancet **1**(8594): 1067-70.
- Yung, R. L. and B. C. Richardson (1994). "Drug-induced lupus." Rheum Dis Clin North Am **20**(1): 61-86.
- Zuchner, D., T. Sternsdorf, et al. (1997). "Prevalence, kinetics, and therapeutic modulation of autoantibodies against Sp100 and promyelocytic leukemia protein in a large cohort of patients with primary biliary cirrhosis." Hepatology **26**(5): 1123-30.
- Zwart, B., C. Ciurana, et al. (2004). "Complement activation by apoptotic cells occurs predominantly via IgM and is limited to late apoptotic (secondary necrotic) cells." Autoimmunity **37**(2): 95-102.

Methodology article

Open Access

Optimized detection of circulating anti-nuclear envelope autoantibodies by immunofluorescence

Vagia Tsiakalou^{†1}, Elena Tsangaridou^{†1}, Hara Polioudaki¹, Artemissia-Phoebe Nifli², Meri Koulentaki³, Tonia Akoumianaki¹, Elias Kouroumalis³, Elias Castanas² and Panayiotis A Theodoropoulos^{*1}

Address: ¹Biochemistry, University of Crete, School of Medicine, P.O. Box 2208, Heraklion 71003, Greece, ²Experimental Endocrinology, University of Crete, School of Medicine, P.O. Box 2208, Heraklion 71003, Greece and ³Gastroenterology, University of Crete, School of Medicine, P.O. Box 2208, Heraklion 71003, Greece

Email: Vagia Tsiakalou - bio1020@edu.biology.uoc.gr; Elena Tsangaridou - elena79tsang@hotmail.com; Hara Polioudaki - polioud@imbb.forth.gr; Artemissia-Phoebe Nifli - nifli@med.uoc.gr; Meri Koulentaki - mkoulentaki@yahoo.gr; Tonia Akoumianaki - andy2003mel2003@yahoo.gr; Elias Kouroumalis - kouroum@med.uoc.gr; Elias Castanas - castanas@med.uoc.gr; Panayiotis A Theodoropoulos* - takis@med.uoc.gr

* Corresponding author †Equal contributors

Published: 06 September 2006

Received: 15 February 2006

BMC Immunology 2006, 7:20 doi:10.1186/1471-2172-7-20

Accepted: 06 September 2006

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/7/20>

© 2006 Tsiakalou et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Antinuclear antibodies are useful diagnostic tools in several autoimmune diseases. However, the routine detection of nuclear envelope autoantibodies using immunofluorescence (IF) is not always easy to perform in patients' sera because of the presence of autoantibodies to other nuclear and cytoplasmic components which could mask the characteristic rim-like pattern of nuclear envelope autoantibodies. This is particularly common in sera from patients with primary biliary cirrhosis (PBC), which generally have high titres of anti-mitochondrial antibodies. Therefore, we have assayed a number of commercial slides and alternative fixation conditions to optimize the detection of anti-nuclear envelope antibodies (ANEAs) in PBC sera.

Methods: We have explored the presence of ANEA in 33 sera from patients with established PBC using three different Hep2 commercial slides and home-made slides with HeLa and Hep2 cells fixed with methanol, ethanol, 1% or 4% formaldehyde.

Results: We observed that the IF pattern was related to the cell type used (Hep2 or HeLa), the manufacturer and the cell fixation scheme. When both cell lines were fixed with 1% formaldehyde, the intensity of the cytoplasmic staining was considerably decreased regardless to the serum sample, whereas the prevalence of cytoplasmic autoantibodies was significantly lowered, as compared to any of the Hep2 commercial slide and fixation used. In addition, the prevalence of ANEA was importantly increased in formaldehyde-fixed cells.

Conclusion: Immunofluorescence using appropriately fixed cells represent an easy, no time-consuming and low cost technique for the routine screening of sera for ANEA. Detection of ANEA is shown to be more efficient using formaldehyde-fixed cells instead of commercially available Hep2 cells.

Background

Circulating antinuclear antibodies (ANA) is a diverse group of autoantibodies found in patients with systemic or organ specific autoimmune diseases and a variety of infections, but also in asymptomatic normal individuals, although in low titres. ANA screening helps establishing diagnosis in patients with clinical features suggestive of an autoimmune or connective tissue disorders, while excluding (at least partially) the possibility of an autoimmune disorder in patients with few or uncertain clinical findings. In addition, they assist in monitoring disease progression and activity. Nuclear envelope is a complex structure consisting of outer and inner nuclear membranes, nuclear pore complexes (NPC) and the nuclear lamina [1]. Autoantibodies against nuclear envelope proteins exhibit a characteristic rim-like/peripheral pattern in IF. In a number of diseases, such as chronic fatigue syndrome, primary biliary cirrhosis and lupus or lupus-like syndrome the detection of anti-nuclear envelope antibodies may give an additional diagnostic clue [2-5]. In chronic fatigue syndrome, [6] appr. 52% of patients develop autoantibodies to components of the nuclear envelope, mainly nuclear lamins. In systemic lupus erythematosus [5] a strong association of autoantibodies to human nuclear lamin B1 with lupus anticoagulant antibodies (LAC) has been reported and suggested that the presence of LAC without anti-lamin B1 may define a subset of SLE patients at greater risk for thrombosis.

In PBC, a chronic destructive cholangitis, although ninety percent of patients show circulating antimitochondrial antibodies (AMA) [7], the presence of ANA is highly specific [8] and can be used as a "positive tool" in the diagnosis of AMA-negative PBC cases [9]. Indeed, 64% of sera from PBC patients were found positive for ANA [10]. Several proteins have been recognized as ANA targets in PBC, such as Sp100 [11] and promyelocytic leukemia proteins [12], the latter generating a multiple nuclear dot pattern in IF. Antibodies against proteins of the nuclear pore complex, such as gp210 and p62, have been reported [13,14], being associated with the activity and severity of the disease [3]. In addition, it was recently suggested that anti-p62 antibodies may be related to the progressive or advanced state of PBC [4]. In rare cases (1-2%) antibodies against lamin B receptor, an integral protein of the inner nuclear membrane may be found [8]. Using standard IF methods, the prevalence of ANEA in PBC, differs considerably amidst references, varying between 29% and 58% [4,13,15,16]. This discrepancy may be due to the use of different commercially available slides, or to the simultaneous presence of other autoantibodies in patient's sera, directed against different nucleoplasmic or cytoplasmic antigens, possibly masking perinuclear staining.

In the present work we propose an alternative protocol, using formaldehyde-fixed HeLa or Hep2 cells, to improve recognition of nuclear envelope proteins by circulating autoantibodies. The specificity of autoantibodies against nuclear envelope antigens was also confirmed by immunoblotting using purified HeLa nuclei and nuclear envelopes. Finally, the IF analysis of 33 sera from patients with established PBC, using formaldehyde-fixed cells and three commercially available slides showed that ANEA are more accurately detected in formaldehyde-fixed cells than in commercial slides.

Methods

Patients and sera

Frozen (-80°C) serum samples from thirty three patients (twenty nine women) with PBC were used. Median age at the time of venesection was 60 years (ranging from 32 to 75 years). All patients had histologically proven PBC, 16 were at stage I-II, 6 at stage III and 11 at stage IV. Patients were followed at the Department of Gastroenterology, University Hospital of Heraklion, Greece, were on ursodeoxycholic acid (15 mg/kg) since diagnosis, no one had ever been on steroids or other immunomodulatory treatment and no one had undergone liver transplantation. Oral informed consent from all patients participating in this study was taken, to use their blood samples for research purposes. Ethical approval was issued by the Scientific and Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion.

Cell lines and culture

Hep2 cells (ECACC 86030501) were found to have a HeLa profile by DNA fingerprinting and therefore recently re-designated as "HeLa derivative" cells. Hep2 (larynx and cervical carcinoma) cells were obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, Wiltshire) and cervical carcinoma HeLa cells (CCL-2), from the American Type Tissue Culture Collection (Manassas, VA). Both cell lines were maintained at 37°C, in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and cultured in Dulbecco's MEM or EMEM for HeLa and Hep2, respectively (Biochrom, Berlin, Germany), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin and streptomycin.

Indirect immunofluorescence microscopy

Indirect immunofluorescence was performed as described previously [17]. Briefly, Hep2 and HeLa cells grown on coverslips were washed with PBS, fixed in 4% or 1% formaldehyde for 5 minutes at room temperature or in cold (-20°C) methanol or ethanol for 5 minutes and permeabilized with Triton X-100. Fixed cells were incubated in blocking buffer (phosphate buffered saline, pH 7.4, 0.5% Triton X-100 and 1% fish skin gelatin) and then with sera at a dilution of 1/80 in blocking buffer for 1 hour. The

specimens were stained with fluorescein conjugated anti-human IgG, diluted and ready for use (Inova Diagnostics, San Diego, CA). The same sera (dilution 1/80) were examined for the presence of ANA using fixed Hep2 cells from 3 different suppliers: Inova Diagnostics (San Diego, CA), Zeus Scientific Inc. (Raritan, NJ) and bmd (Marne La Vallée, France). In all cases, detection was made by a supplied FITC-coupled anti-human Ig antibody. In all cases, we have followed the protocols suggested by the manufacturer. Fluorescence was routinely assayed in a Leica SP confocal microscope and a standard fluorescence microscope, with comparable results.

Isolation of cell nuclei and nuclear envelopes

To isolate nuclei and nuclear envelopes, HeLa cells were detached from the culture dishes, centrifuged at 300 g and washed three times with phosphate buffered saline pH 7.4, containing 1 mM PMSF. The pellet was resuspended in an equal volume of ice-cold buffer H (10 mM Hepes-KOH pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF and 2 µg/ml each of leupeptin, pepstatin and aprotinin) and Dounce-homogenized under careful phase monitoring. The homogenate was centrifuged at 1200 g for 10 minutes, yielding a pellet (nuclei) and a supernatant (cytoplasmic fraction). The nuclear fraction was washed in buffer H, containing 150 mM NaCl and was stored at -80°C until use.

Nuclear envelopes were prepared as described previously [18]. Briefly, nuclei were solubilised in 20 mM Tris buffer pH 8.5, containing 0.1 mM MgCl₂, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 10% sucrose and incubated with 2 mg/ml DNase I at room temperature for 15 minutes. DNase digestion was repeated in Tris buffer pH 7.5. The insoluble material representing nuclear envelopes was separated by centrifugation and solubilised sequentially in high salt (2 M KCl) buffer, secondly in 40 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF and finally in ice-cold distilled H₂O, in order to extract most of the peripherally attached material.

Immunoblotting

Thirty µg of HeLa nuclei or nuclear envelopes were electrophoresed on a 12.5% SDS polyacrylamide gel and transferred on nitrocellulose membrane. Immobilized autoantigens were subjected to a denaturation/renaturation process, in order to obtain correctly folded autoepitopes and therefore optimize autoantibody reactivity. Briefly, nitrocellulose membranes were first incubated for 5 minutes in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, containing 20% propanol-2 and washed 3 times with H₂O. Thereafter, proteins were initially denatured by incubating membrane in 7 M Guanidine-HCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA pH 8.0, 5 mM DTT and then renatured in washing buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 155

mM NaCl, 0.1% Tween) for 10 minutes. Free sites on the membrane were blocked in 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 155 mM NaCl, 0.1% Tween, 1% fish skin gelatin overnight at 4°C. Membranes were incubated with sera at 1/300 dilution in blocking buffer for 1 hour at room temperature and washed 3 times with the same buffer. Autoantibodies were recognized using anti-human secondary antibodies conjugated with HRP at a dilution of 1/10.000 in blocking buffer and detected using the ECL system (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK).

Statistical analysis

Comparison of two values was made by calculating the z-value and reporting to the normal distribution tables. Comparison of percentages (probabilities) was made by the calculation of χ^2 score.

Results

Anti-nuclear envelope antibodies are specifically detected using formaldehyde-fixed HeLa cells

PBC is among autoimmune diseases in which ANEA are usually detected. In the present study, we tested sera from patients with diagnosed PBC; representative cytoplasmic and nuclear envelope IF patterns are depicted in Figure 1. HeLa cells cultured on coverslips and fixed either with 4% or 1% formaldehyde were used. When cells were fixed with 4% FA a peripheral nuclear pattern indicative of nuclear envelope staining was observed, with the exception of sera 30 and 161, which presented an intense cytoplasmic staining and a non-conclusive nuclear envelope pattern. However, fixation with 1% FA allowed the detection of nuclear envelope autoantibodies in serum 161 (Figure 1A).

In order to confirm the results obtained with IF (Figure 1A), we assayed detection of autoantigens by immunoblotting using purified nuclei and nuclear envelopes from HeLa cells. Depending on their molecular weight, nuclear envelope autoantigens recognized by autoantibodies present in the sera examined could be grouped in two categories (Figure 1B): The first comprises autoantigens of high molecular mass, recognized by sera 176 and 184, while the second contains a protein of approximately 50 kDa recognized by all sera (27, 159, 161). Two additional proteins with a molecular mass of ~90 kDa and 40 kDa were recognized by serum 159, while serum 161 recognized only the former. No signal was detected upon blotting of the afore-mentioned nuclear extracts with a serum containing anti-mitochondrial antibodies but not ANEA as verified by IF (Figure 1, s30). Therefore, we concluded that HeLa cells, appropriately fixed with FA, are suitable substrates for the specific detection of ANEA in patients' sera.

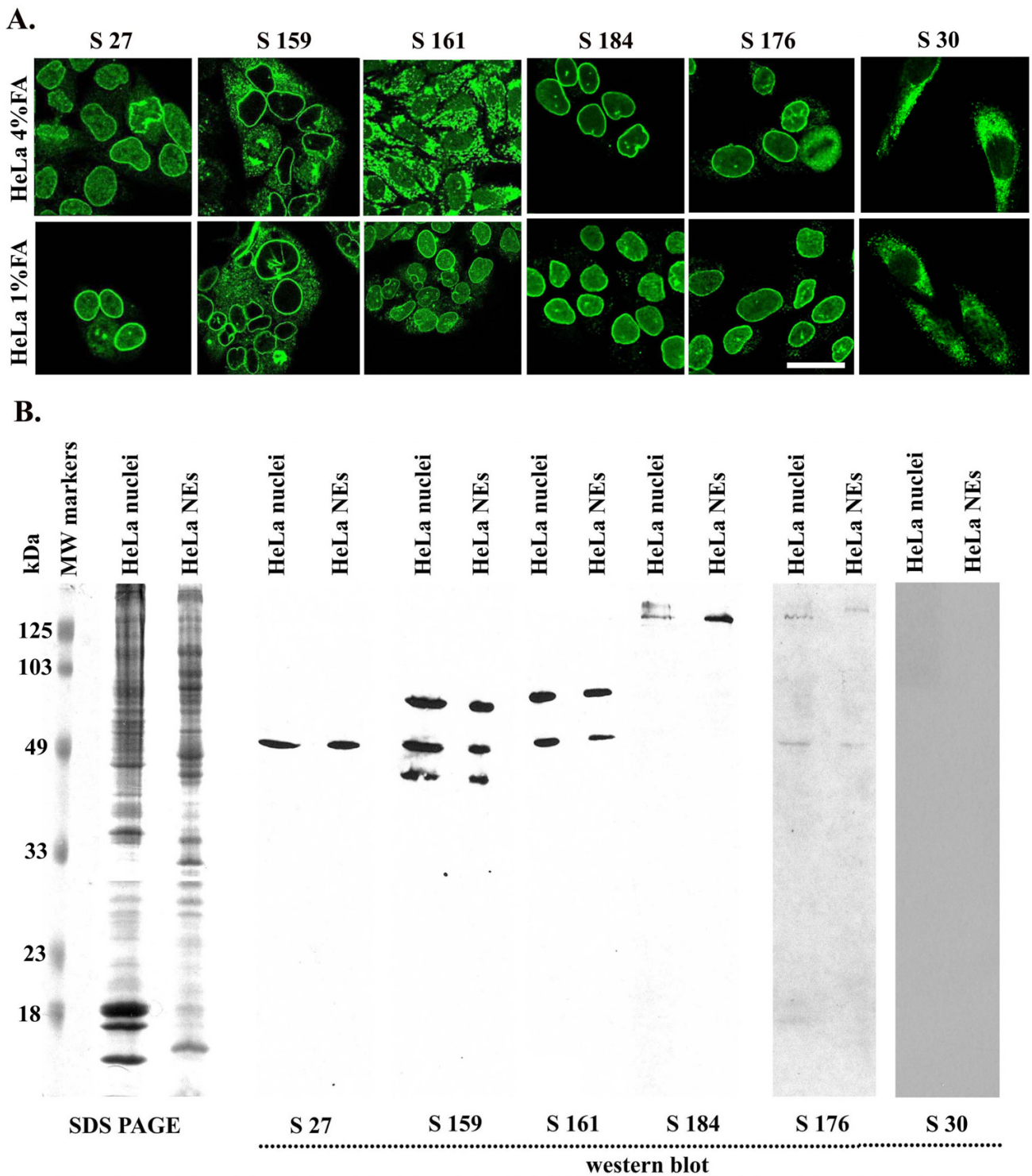


Figure 1
 (A) Immunostaining of HeLa cells fixed with 1% or 4% formaldehyde with PBC sera diluted 1/80, Bar = 20 μm. (B) Immunoblotting depicting electrophoretically fractionated nuclei and nuclear envelopes (NEs) from HeLa cells that have been probed with serum 27 (s27), serum 159 (s159), serum 161 (s161), serum 184 (s184), serum 176 (s176) or serum 30 (s30) at a dilution 1/300. At the left molecular mass markers at 125, 103, 49, 33, 23 and 18 kDa are indicated.

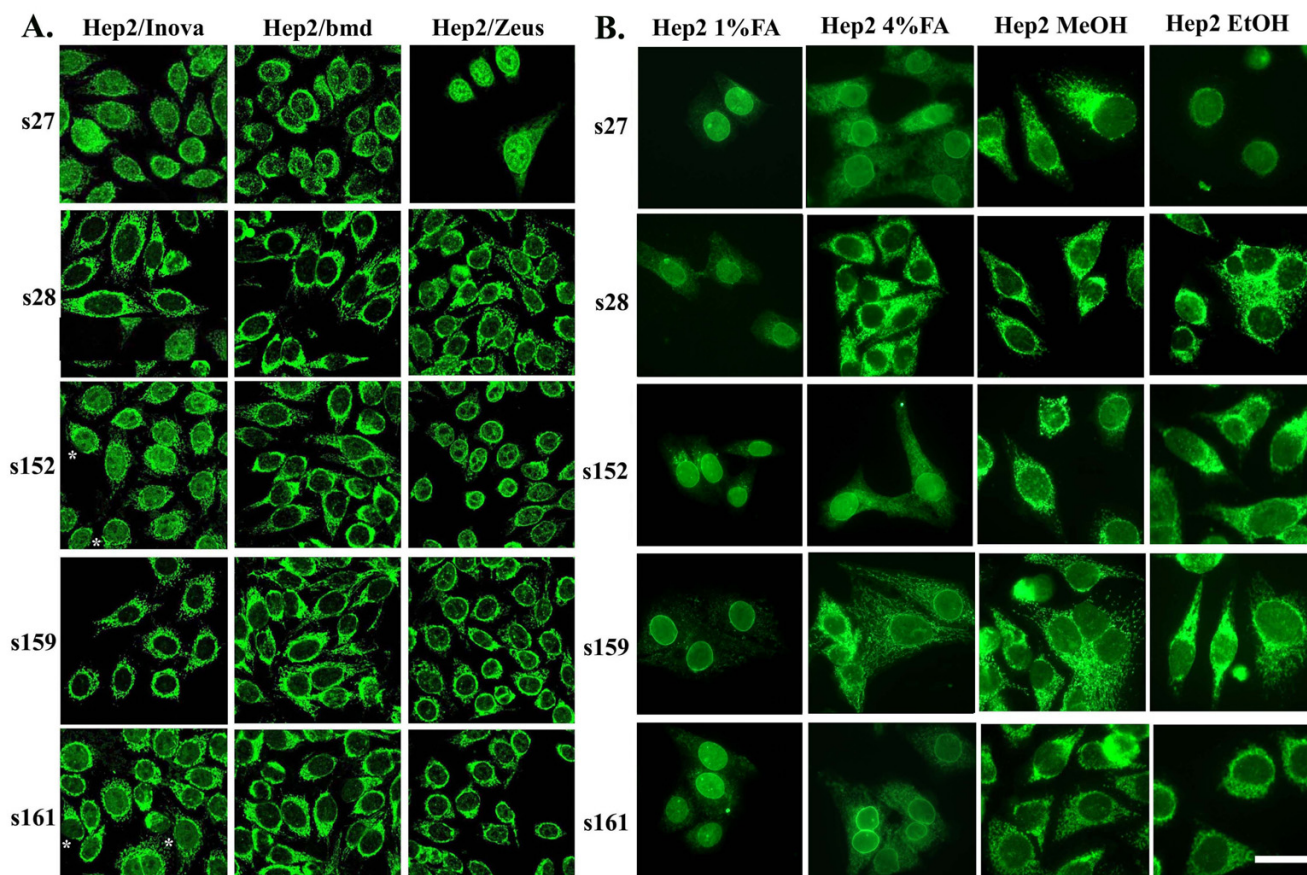


Figure 2
 Immunostaining of Hep2 cells with PBC sera. Commercially available slides with Hep2 cells (A) and normally growing Hep2 cells (B) fixed with methanol, ethanol, 1% or 4% formaldehyde were stained with sera (s) 27, 28, 152, 159 and 161 diluted 1/80, Bar = 20 μm.

Differential detection of anti-nuclear envelope antibodies by formaldehyde-fixed cells and commercially available Hep2 slides

Three different commercial slides/kits of Hep2 cells and home-made slides of Hep2 and HeLa cells were used for the detection of autoantibodies in patients' sera. The rationale behind the use of these two cell types is that they are both epithelial in origin (larynx and cervical carcinoma for Hep2 and cervical carcinoma for HeLa), and express the same genotype and a similar phenotype.

Characteristic immunofluorescence profiles of three commercially available Hep2 slides and home-made slides of Hep2 cells fixed with 1% or 4% formaldehyde, methanol or ethanol are shown in Figure 2. In Figure 2A, typical staining of sera using commercially available Hep2 slides, is depicted. Although all sera exhibited a cytoplasmic staining, its intensity varied depending on the substrate used. In general, weaker cytoplasmic staining was

observed when slides from Zeus company were used. In Hep2 slides from Inova, with the exception of serum 27, no conclusive staining of the nuclear envelope was found: the perinuclear pattern obtained with sera 152 and 161 was discontinuous in some cells (asterisks), indicating a rather cytoplasmic staining, while sera 28 and 159 did not show an accentuation of the peripheral staining, suggesting failure of nuclear envelope antigen recognition. A discontinuous perinuclear staining was observed using slides from bmd, whereas nuclear envelope pattern was revealed in 3 sera (27, 152 and 159) on Zeus slides.

Analysis of the same sera using home-made slides of Hep2 cells resulted in different IF patterns depending on the fixation conditions. Hep2 cells fixed with methanol or ethanol and to a lesser extent with 4% formaldehyde showed an IF profile very similar to those obtained with commercially available slides (compare Figure 2A and 2B). The IF pattern was quite different when sera were tested on Hep2

Table 1: Prevalence of cytoplasmic, nucleoplasmic and NE antibodies by immunofluorescence using various substrates and fixation schemes in 33 PBC patients' sera.

Cell type/fixation	autoantigen localization					
	Cytoplasmic		nucleoplasmic		NE	
	No.	%	No.	%	No.	%
HeLa/4%FA	19	57.5	10	30.3	11	33.3
HeLa/1%FA	9	27.2	12	36.4	13	39.4
Hep2/4%FA	25	75.7	13	39.4	11	33.3
Hep2/1%FA	10	30.3	15	45.4	15	45.4
Hep2 Inova	18	54.5	13	39.4	5	15.1
Hep2 bmd	19	57.5	12	36.4	4	12.1
Hep2 Zeus	17	51.5	18	54.5	7	21.2

cells fixed with 1% formaldehyde. As a rule, cytoplasmic staining was considerably lowered or eliminated thus revealing a nuclear envelope pattern (Figure 2).

We have further assayed the same sera using HeLa cells, a cell line widely used in experimental studies (Figure 3). As shown for Hep2 cells, when HeLa cells were fixed with 1% formaldehyde, cytoplasmic staining was considerably reduced and nuclear envelope was revealed as the predominant stained compartment (compare Figure 2B and Figure 3).

Extending our analysis in all 33 sera samples from patients with PBC, usually enriched in anti-mitochondrial antibodies, we showed that the detection of different groups of autoantibodies with IF varied considerably, depending on the provider, the fixation conditions and the cell type (Hep2, HeLa) used (Table 1). Moreover, many of the examined sera presented both cytoplasmic nuclear and/or nuclear envelope staining, while, a significant number of sera recognised solely nucleoplasmic or nuclear envelope antigens, depending on the substrate used. Concerning the detection of cytoplasmic autoantibodies, the three commercial tests and home-made slides with cells fixed with 4%FA revealed a number of positive cases, ranging from 51.5% to 75.7%. In contrast, when Hep2 or HeLa cells fixed with 1%FA were used, a significantly lower number of positive cases, 30.3% and 27.2%, respectively were detected ($p < 0.05$ at least by χ^2 analysis, as compared to the mean of the other tests). Although nucleoplasmic staining seemed favoured in Zeus test (positiveness was 54.5%) as compared to other substrates, (ranging from 30.3% to 45.4%) no statistically significant difference was found. Finally, HeLa and Hep2 cells, fixed with either 1% or 4% FA were more efficient in the detection of ANEA, as compared to Inova and bmd kits, while Zeus kit showed an equally higher number of ANEA positive cases (21.1%).

Discussion

The detection of ANA by IF is routinely used for the diagnosis of autoimmune diseases. In spite of a relative facility, parameters such as the IF substrates (tissue or cell lines), the fixation conditions, the absence of a common standard and the diagnostic ability of the examiner, hinder the comparison of results performed in different laboratories. In addition, the presence of a variety of autoantibodies, directed against diverse cytoplasmic or nuclear antigens may obscure the detection of a specific class of autoantibodies with potential diagnostic relevance in a given disease. Such cases are difficult to resolve and a number of alternative methods are subsequently applied, in order to identify the target of circulating autoantibodies.

Usually, the detection of ANEA is based on the characteristic perinuclear rim-like fluorescence. Nevertheless, as shown in Figures 2 and 3, in some cases, this pattern may be masked by the presence of autoantibodies directed against other cytoplasmic or nucleoplasmic elements. In the present study, we report that formaldehyde-fixed cells are more adequate to reveal the presence of ANEA, compared to commercially available Hep2 cell substrates (Table 1). It is known that antibody reactivity could be modulated by the type of fixation. Within this study, we showed that both normal (4%) and mild (1%) formaldehyde fixation are essential to detect the totality of ANEA, since specific autoantigens were recognized only under a particular fixation condition. In most cases, mild fixation of cells with 1% formaldehyde reduced their cytoplasmic staining. It is likely that 1% FA may not adequately fix mitochondrial antigens, thus unmasking nuclear envelope structures stained by nuclear envelope autoantibodies. In addition we showed that the NE pattern obtained in 1% FA fixed cells is specific and irrelevant to autoantigen mislocalisation. Indeed, immunoblot analysis of nuclear and nuclear envelope fraction with sera, exhibit-

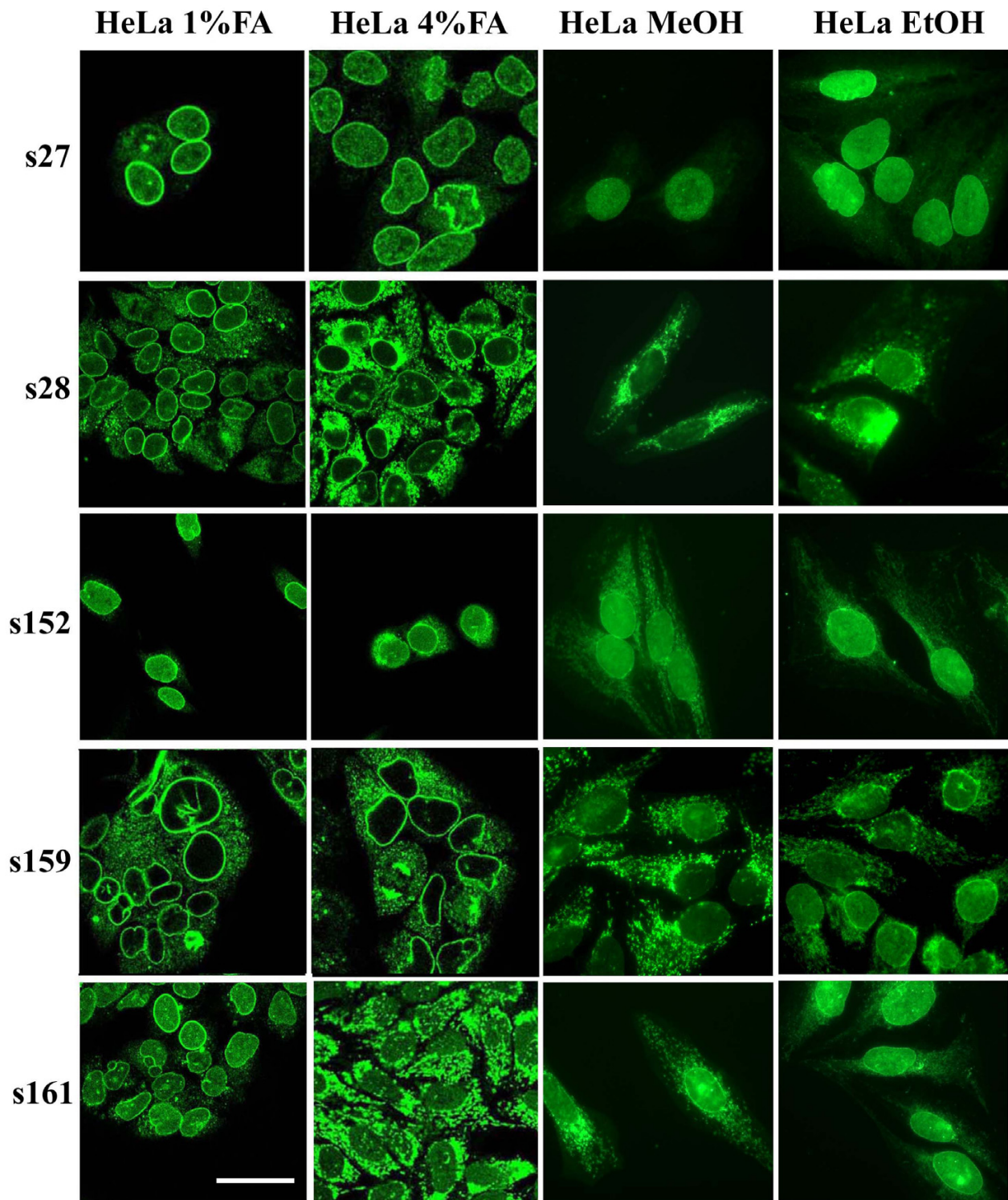


Figure 3
 Immunostaining of HeLa cells with PBC sera. Normally growing HeLa cells fixed with methanol, ethanol, 1% or 4% formaldehyde were stained with sera (s) 27, 28, 152, 159 and 161 diluted 1/80, Bar = 20 μ m.

ing perinuclear staining revealed the presence of specific nuclear envelope autoantigens. The proteins of high molecular mass recognized by autoantibodies of sera 176 and 184 correspond probably to gp210 antigen of the NPC. The rest of autoantigens detected by immunoblotting with an apparent molecular mass of 90 kDa, 50 kDa and 40 kDa could be components of the NPC, not yet characterized. Recently, anti-NPC antibodies against proteins with similar molecular mass (86 kDa, 54 kDa and 39 kDa) were identified in PBC sera using the same method, with frequencies of 29%, 30% and 18%, respectively [4].

Besides serum titration, IF guides further diagnostic procedures, eg ELISA for specific autoantibodies or dot blot assays, relying on the fluorescence pattern. However, in sera with a mixture of autoantibodies, the pattern for ANEA in IF is not always evident and easy to confirm, especially when AMA are detected in a high titre. In fact, results reported in various studies show an under- or an over-estimation of ANEA [4,13,15,16]. The same is also true for a number of other classes of autoantibodies. Indeed, analysis of PBC sera has shown that IF is less sensitive in detecting circulating autoantibodies than immunoblotting and enzymatic immunoassay [3,16]. More than 70% of the patients with PBC, who were AMA-negative by IF, were found AMA-positive using recombinant autoantigens in a newly developed ELISA [19]. In contrast, in another study, 21% of positive sera for ANEA by IF did not react with nuclear envelope components using immunoblotting [20]. Generally, immunoblotting analysis showed that antibodies against proteins of the nuclear pore complex are associated with a more active and severe liver disease in PBC [3] or with an advanced state of PBC [4].

Conclusion

Results of the present study indicate that efficient detection of ANEA may be obtained by indirect IF analysis of patients' sera using cells appropriately fixed with formaldehyde. In particular, mild fixation reduces considerably the staining of cytoplasmic or nucleoplasmic antigens in Hep2 and HeLa cells and permits a better resolution of nuclear membrane epitopes. In view of the potential diagnostic significance of ANEA in a number of rheumatic diseases, as well as in PBC, we consider that this method might be a valuable additional tool to the clinical laboratory practice.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

VT and ET: Acquisition and analysis of data

HP: Acquisition of data and technical supervision

APN and TA: Technical assistance and revising the manuscript

MK: Preparation of sera and follow-up of patients

EK: Interpretation of data and revising the manuscript

EC: Design of the study, interpretation of data and revising the manuscript

PAT: Conception and design of the study, analysis and interpretation of data, drafting and revising the manuscript

All of the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by PENED 2003 (03Δ66) from the Greek Secretariat of Research and Technology to PAT. APN holds a scholarship from the Public Benefit Foundation A.S.Onassis

References

- Georgatos SD, Theodoropoulos PA: **Rules to remodel by: what drives nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis?** *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999, **9(3-4)**:373-381.
- Coppo P, Clauvel JP, Bengoufa D, Fuentes V, Gouilleux-Gruart V, Courvalin JC, Lassoued K: **Autoimmune cytopenias associated with autoantibodies to nuclear envelope polypeptides.** *Am J Hematol* 2004, **77**:241-249.
- Invernizzi P, Podda M, Battezzati PM, Crosignani A, Zuin M, Hitchman E, Maggioni M, Meroni PL, Penner E, Wiesierska-Gadek J: **Autoantibodies against nuclear pore complexes are associated with more active and severe liver disease in primary biliary cirrhosis.** *J Hepatol* 2001, **34(3)**:366-372.
- Miyachi K, Hankins RW, Matsushima H, Kikuchi F, Inomata T, Horigome T, Shibata M, Onozuka Y, Ueno Y, Hashimoto E, Hayashi N, Shibuya A, Amaki S, Miyakawa H: **Profile and clinical significance of anti-nuclear envelope antibodies found in patients with primary biliary cirrhosis: a multicenter study.** *J Autoimmun* 2003, **20(3)**:247-254.
- Senecal JL, Grodzinsky RJ, Raynauld JP, Iuthman I, Nava A, Guimond M, Raymond Y: **Strong association of autoantibodies to human nuclear lamin B1 with lupus anticoagulant antibodies in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 2000, **42**:1347-1353.
- Konstantinov K, von Mikecz A, Buchwald D, Jones J, Gerace L, Tan EM: **Autoantibodies to nuclear envelope antigens in chronic fatigue syndrome.** *J Clin Invest* 1996, **98(8)**:1888-1896.
- Van de Water J, Cooper A, Surh CD, Coppel R, Danner D, Ansari A, Dickson R, Gershwin ME: **Detection of autoantibodies to recombinant mitochondrial proteins in patients with primary biliary cirrhosis.** *N Engl J Med* 1989, **320(21)**:1377-1380.
- Worman HJ, Courvalin JC: **Antinuclear antibodies specific for primary biliary cirrhosis.** *Autoimmun Rev* 2003, **2(4)**:211-217.
- Bogdanos DP, Baum H, Vergani D: **Antimitochondrial and other autoantibodies.** *Clin Liver Dis* 2003, **7(4)**:759-77, vi.
- Rigopoulou EI, Davies ET, Pares A, Zachou K, Liaskos C, Bogdanos DP, Rodes J, Dalekos GN, Vergani D: **Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis.** *Gut* 2005, **54(4)**:528-532.
- Szostecki C, Krippner H, Penner E, Bautz FA: **Autoimmune sera recognize a 100 kD nuclear protein antigen (sp-100).** *Clin Exp Immunol* 1987, **68(1)**:108-116.
- Sternsdorf T, Guldner HH, Szostecki C, Grotzinger T, Will H: **Two nuclear dot-associated proteins, PML and Sp100, are often co-autoimmunogenic in patients with primary biliary cirrhosis.** *Scand J Immunol* 1995, **42(2)**:257-268.

13. Wesierska-Gadek J, Hohenauer H, Hitchman E, Penner E: **Autoantibodies against nucleoporin p62 constitute a novel marker of primary biliary cirrhosis.** *Gastroenterology* 1996, **110(3)**:840-847.
14. Courvalin JC, Lassoued K, Bartnik E, Blobel G, Wozniak RW: **The 210-kD nuclear envelope polypeptide recognized by human autoantibodies in primary biliary cirrhosis is the major glycoprotein of the nuclear pore.** *J Clin Invest* 1990, **86(1)**:279-285.
15. Lassoued K, Brenard R, Degos F, Courvalin JC, Andre C, Danon F, Brouet JC, Zine-el-Abidine Y, Degott C, Zafrani S, et al.: **Antinuclear antibodies directed to a 200-kilodalton polypeptide of the nuclear envelope in primary biliary cirrhosis. A clinical and immunological study of a series of 150 patients with primary biliary cirrhosis.** *Gastroenterology* 1990, **99(1)**:181-186.
16. Miyachi K, Shibata M, Onozuka Y, Kikuchi F, Imai N, Horigome T: **Primary biliary cirrhosis sera recognize not only gp210 but also proteins of the p62 complex bearing N-acetylglucosamine residues from rat liver nuclear envelope. Anti-p62 complex antibody in PBC.** *Mol Biol Rep* 1996, **23(3-4)**:227-234.
17. Georgatos SD, Pyrasopoulou A, Theodoropoulos PA: **Nuclear envelope breakdown in mammalian cells involves stepwise lamina disassembly and microtubule-drive deformation of the nuclear membrane.** *J Cell Sci* 1997, **110 (Pt 17)**:2129-2140.
18. Dwyer N, Blobel G: **A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei.** *J Cell Biol* 1976, **70(3)**:581-591.
19. Miyakawa H, Tanaka A, Kikuchi K, Matsushita M, Kitazawa E, Kawaguchi N, Fujikawa H, Gershwin ME: **Detection of antimitochondrial autoantibodies in immunofluorescent AMA-negative patients with primary biliary cirrhosis using recombinant autoantigens.** *Hepatology* 2001, **34(2)**:243-248.
20. Ou Y, Enarson P, Rattner JB, Barr SG, Fritzler MJ: **The nuclear pore complex protein Tpr is a common autoantigen in sera that demonstrate nuclear envelope staining by indirect immunofluorescence.** *Clin Exp Immunol* 2004, **136(2)**:379-387.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Differential detection of nuclear envelope autoantibodies in primary biliary cirrhosis using routine and alternative methods

Elena Tsangaridou¹, Hara Polioudaki¹, Rania Sfakianaki², Martina Samiotaki³, Maria Tzardi⁴, Meri Koulentaki⁵, George Panayotou³, Elias Kouroumalis^{2,5}, Elias Castanas⁶, Panayiotis A Theodoropoulos^{1*}

Abstract

Background: Detection of autoantibodies giving nuclear rim pattern by immunofluorescence (anti-nuclear envelope antibodies - ANEA) in sera from patients with primary biliary cirrhosis (PBC) is a useful tool for the diagnosis and prognosis of the disease. Differences in the prevalence of ANEA in PBC sera so far reported have been attributed to the methodology used for the detection as well as to ethnic/geographical variations. Therefore, we evaluated the prevalence of ANEA in sera of Greek patients with PBC by using methods widely used by clinical laboratories and a combination of techniques and materials.

Methods: We screened 103 sera by immunoblotting on nuclear envelopes and indirect immunofluorescence (IIF) using cells and purified nuclei. Reactivities against specific autoantigens were assessed using purified proteins, ELISA, immunoprecipitation and mass spectrometry.

Results: We found higher prevalence of ANEA when sera were assayed by IIF on purified nuclei or cultured cells (50%) compared to Hep2 commercially available slides (15%). Anti-gp210 antibodies were identified in 22.3% and 33% of sera using ELISA for the C-terminal of gp210 or both ELISA and immunoprecipitation, respectively. Immunoblotting on nuclear envelopes revealed that immunoreactivity for the 210 kDa zone is related to anti-gp210 antibodies ($p < 0.0001$). Moreover, we found that sera had antibodies for lamins A (6.8%), B (1%) and C (1%) and LBR (8.7%), whereas none at all had detectable anti-p62 antibodies.

Conclusions: The prevalence of ANEA or anti-gp210 antibodies is under-estimated in PBC sera which are analyzed by conventional commercially available IIF or ELISA, respectively. Therefore, new substrates for IIF and ELISA should be included by clinical laboratories in the analysis of ANEA in autoimmune sera.

Background

Nuclear envelope is a complex structure consisting of outer and inner nuclear membranes, nuclear pore complexes (NPCs) and the nuclear lamina [1]. The outer nuclear membrane represents an extension of the endoplasmic reticulum, whereas the inner part constitutes a specialized environment that accommodates a unique set of proteins (LBR, emerin, LAP1s, and LAP2s). The nuclear lamina is composed of A- and B-type lamins. These proteins form a polymeric lining that supports the inner nuclear membrane and imparts elasticity to

the nuclear envelope. NPCs provide the sole means for regulated transport between the cytoplasm and the nucleoplasm and are conserved in all eukaryotic cells, from yeast to human. The mammalian NPCs are 125-MDa complexes containing 30 distinct polypeptides, called nucleoporins [2].

In a number of diseases, such as autoimmune liver and systemic rheumatic pathologies, a correlation with autoantibodies against nuclear envelope (ANEA) was reported [3]. Among them, primary biliary cirrhosis (PBC) is one of those in which ANEA have been considered as pathognomonic element [4,5]. However, a significant variation of their prevalence (between 10% and 48%) has been reported, when indirect immunofluorescence

* Correspondence: takis@med.uoc.gr

¹Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Crete, Crete, Greece

(IIF) is used for the screening of PBC sera [4,6-11]. This could be attributed to differences on the processing of IIF samples, namely substrates and reagents used for the detection and on the evaluation of the results, especially when antibodies of cytoplasmic specificities are present in the same serum [3,4,11].

PBC sera may contain a number of autoantibodies against specific constituents of the nuclear envelope. Antibodies against proteins of the nuclear pore complex, such as gp210, an integral glycoprotein of the nuclear pore membrane, and p62, a nucleoporin of the central channel, have been reported [10,12], being associated with the activity and severity of PBC [13]. In addition, it was recently suggested that anti-gp210 antibodies may be related to the hepatic failure-type of the disease [14]. The presence of anti-gp210 autoantibodies in PBC sera has been reported for the first time in 1990 [15] and shortly after, a 15-amino acid linear stretch within the carboxy-terminal domain of the protein, has been shown to be the predominant epitope [16]. Moreover, autoantibodies against gp210 have been demonstrated to recognize at least two different epitopes: one within the cytoplasmic tail and another located within the large glycosylated luminal domain [17]. However, thereafter and until today, anti-gp210 antibodies in sera of patients with PBC from USA [18], Europe [9,19-22] and Asia [14,23,24] were identified essentially by ELISA, using as an antigen the carboxy-terminal domain of the protein. These studies have shown different prevalence (10.4%-44%) for anti-gp210 autoantibodies, which have been essentially attributed to geographical and/or ethnic variations.

Autoantibodies against p62 have been reported for the first time in 1996 by two groups in Europe and Japan [8,10]. Using immunoblotting, they have shown that antibodies in PBC sera recognize a 62 kDa protein in a nuclear pore complex-enriched preparation with a prevalence of 32% in PBC patients [10]. An immunoreactive 62 kDa band was shown with a similar frequency (31%), after immunoblotting of PBC sera on a WGA-bound fraction of rat liver nuclear envelopes [7]. Using recombinant autoantigens, PBC sera was found to react more frequently with p62 (55%) than gp210 (10%) nucleoporin [25] and that more than 50% of PBC sera precipitated ³⁵S-radioactively labeled p62 recombinant rat or human nucleoporin, while 40% recognized this recombinant antigen by immunoblotting [26].

Antibodies against lamin B receptor (LBR), an integral protein of the inner nuclear membrane, are specific for PBC and when detected in sera, their positivity ranged from 1% to 9% [7,9,15]. It has been also shown that anti-LBR autoantibodies recognize intact or the N-terminal domain of human, rat and chicken LBR [15,27,28].

The aim of this study was to establish an IIF procedure, which allows the efficient and easy detection of

ANEA and to determine the prevalence of different ANEA autoantibody classes, specific for PBC. We report that ANEA and more specifically anti-gp210 are present with high frequency in PBC sera. Antibodies against other components of the nuclear envelope, such as LBR and lamins, are detected with low prevalence, whereas anti-p62 antibodies are absent.

Methods

Patients and sera

Serum samples from one hundred and three (103) patients (92 female and 11 male) with established PBC were used. All patients were followed at the Department of Gastroenterology, University Hospital of Heraklion, Greece. PBC was diagnosed according to established clinical, laboratory and histological findings [29] and 86% of sera contained anti-mitochondrial antibodies. In addition, we analyzed by IIF sera from 10 healthy controls, 25 individuals without autoimmune diseases registered with the university hospital, 5 patients with viral hepatitis B, 5 patients with viral hepatitis C and 10 patients with alcoholic cirrhosis. All patients consented to be included in the study which has been approved by the Ethics and Scientific Committees of the University Hospital of Heraklion.

Antibodies

Mouse monoclonal antibody p62 (BD Transduction Laboratories, Becton Drive, Franklin Lakes, New Jersey, USA) or mouse monoclonal antibody 414 which binds to FXFG-containing nup358, nup214, nup153, p62 and nup54 (Covance, Emeryville, California, USA) were used for immunoprecipitation and immunoblotting experiments. The characterization of affinity purified, rabbit polyclonal anti-chicken LBR has been described previously [30].

Cell lines and culture

HeLa cells (cervical adenocarcinoma) were cultured in Dulbecco's MEM (Biochrom, Berlin, Germany), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin and streptomycin. HepG2 cells (Human Hepatocellular liver carcinoma cell line) were maintained in DMEM/HAM'S F-12 (1:1) with N-Acetyl-L-Alanyl-L-glutamine (Biochrom, Berlin, Germany) containing 10% FBS, penicillin, and streptomycin. Both cell lines were obtained from the American Type Tissue Culture Collection (Manassas, VA) and were grown at 37°C in a humidified incubator with a 5% CO₂ atmosphere.

Isolation of nuclei from rat liver and HepG2 cells

Rat liver nuclei were prepared as described by Blobel and Potter [31]. To isolate nuclei from HepG2 cell cultures, single cells were incubated in ice-cold hypotonic

buffer and then Dounce-homogenized as described [11]. Purity of nuclei was examined by indirect immunofluorescence and immunoblotting.

Immunostaining and Confocal Microscopy

Sera (dilution 1/80) were tested on HeLa and HepG2 cells grown on coverslips and isolated nuclei from rat liver and HepG2 cells immobilized on coverslips using alcian blue by indirect immunofluorescence (IIF) performed as described previously [11]. Sera (dilution 1/80) were also analyzed using commercially available Hep2 cells (Inova Diagnostics, San Diego, CA) following the instructions of the supplier. In all cases, detection was made by a supplied FITC-coupled anti-human IgG antibody, diluted and ready for use (Inova Diagnostics, San Diego, CA) or FITC-coupled anti-human antibody IgM (DAKO, Carpinteria, CA) at a dilution of 1/100. Fluorescence was routinely assayed in a Leica SP confocal microscope (Leica microsystem Heidelberg GmbH, Germany)

Preparation of nuclear envelopes and proteins of the nuclear envelope

Nuclear envelopes were prepared from isolated rat liver nuclei following DNase and RNase digestion and washes with high salt buffer and ice-cold distilled water as previously reported [11].

Lamins A, C and lamin B were extracted from rat liver nuclear envelopes (RNE) with 8 M urea and further purified by ion exchange chromatography (DE52, Whatman International Ltd Maidstone, UK). The nucleoplasmic amino-terminal domain of chicken LBR fused to glutathione-S-transferase (GST) was expressed in BL21 (DE3) cells and purified from lysates according to standard procedures.

Immunoblotting

Purified proteins, RNE, or immunoprecipitated material were electrophoresed on a 7.5% SDS polyacrylamide gel, transferred on nitrocellulose membrane and immunoblotted as previously described [11]. PBC sera, anti-p62 and anti-LBR antibodies were used at 1/300, 1/1000 and 1/200 dilution, respectively. Autoantibodies were recognized using anti-human Ig, IgG (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), (1/10000) or IgM, (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA) (1/8000) secondary antibodies; monoclonal or polyclonal antibodies were detected using anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies, all conjugated with HRP (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) at a dilution of 1/10000 and detected using the ECL system (Thermo Scientific, Rockford, USA).

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation of nucleoporin p62 was accomplished using monoclonal antibodies and extracts from

RNE. Nuclear pore proteins were extracted from RNE with buffer S1 (10% sucrose, 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, protease inhibitors) containing 0.3% Empigen BB (Fluka, St Louis MO, USA) [32]. Extract was first clarified by centrifugation (15000 g for 15 min, at 4°C) and then cleared from proteins which bound to sepharose beads by incubating clarified supernatant for 1 hour, at 4°C with protein G-Sepharose beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), already treated with 1% filtered fish skin gelatine. Cleared extract was incubated with 4 µg of mouse monoclonal anti-p62 antibodies (BD Transduction Laboratories, Becton Drive, Franklin Lakes, New Jersey, USA) or mouse monoclonal antibodies 414 (Covance, Emeryville, California, USA), overnight at 4°C and then with gelatine treated protein G-Sepharose beads, for 1.5 hour at 4°C. The immune complexes were recovered by centrifugation, washed 7 times with buffer S1 and solubilized in loading buffer by heating at 100°C.

For the immunoprecipitation of nuclear envelope antigens, autoantibodies were either absorbed or covalently coupled to protein G-Sepharose beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). In both protocols RNE were extracted with buffer S2 (2% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% sucrose, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, protease inhibitors) for 1 hour on ice. Extract was clarified by centrifugation at 15000 g for 15 minutes at 4°C and mixed with an equal amount of buffer without NaCl and Triton X-100. Finally, extract was incubated with gelatine treated protein G-Sepharose beads, for 1 hour, at 4°C, in order to be cleared from proteins which they bound to sepharose beads.

In the first protocol, sera were incubated with extract overnight at 4°C. The immune complexes were then incubated with protein G-Sepharose beads for 1.5 hour at 4°C, washed 7 times with buffer (1% Triton, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10% sucrose, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, protease inhibitors) and eluted in loading buffer by heating at 100°C for 15 minutes.

Alternatively, autoantibodies were covalently coupled to protein G-Sepharose beads essentially as previously reported [33]. For this, sera were incubated with protein G-Sepharose beads for 1 hour at 4°C, washed twice with 0.1 M sodium tetraborate, pH 9 and then incubated twice with freshly prepared 20 mM DMP (Dimethyl pimelimidate dihydrochloride, Sigma, St Louis MO, USA) in 0.1 M sodium tetraborate, pH 9 for 30 minutes at room temperature. Beads were washed two times with ice-cold 50 mM glycine, pH 2.5 to remove uncoupled autoantibodies, and then 7 times with PBS. Beads bearing the covalently linked autoantibodies were incubated with extract overnight at 4°C. The immune

complexes were recovered by centrifugation and washed 7 times with buffer (1% Triton, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10% sucrose, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, protease inhibitors). The elution of bound autoantigens was performed by adding to beads an equal volume of loading buffer and heating at 70°C for 15 minutes.

Mass spectrometry

Stained protein bands were in-gel digested with trypsin. The extracted peptides were analysed by mass spectrometry using an LCQ-Deca mass-spectrometer as previously described [34] while protein identification was performed with TurboSEQUENT software.

Enzyme-linked immunosorbent assay

The antibody titers to gp210 were determined using ELISA kit (Inova Diagnostics, San Diego, CA) according to the manufacturer's protocol and instructions.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS V16 (SPSS, Chicago, IL) program. Comparison between values was accomplished using the χ^2 test.

Results

Routine histological slides do not detect ANEA in all positive sera of PBC patients. Alternative substrate-fixation methods

Commercial Hep2-based histology slides, coupled with an anti-IgG-FITC conjugate are routinely used for the

detection of circulating autoantibodies. Using this set of reagents, we were able to detect ANEA in 15% of sera. Use of anti-IgM or both anti-IgG and anti-IgM secondary antibodies revealed 13% and 23% of sera positive for ANEA, respectively (Figure 1). However, as we have reported previously [11] the origin and fixation method of cells, used as a substrate, may represent sources of variation of ANEA detection, in patients' sera. In this respect, here we tested HeLa and HepG2 cell lines and isolated nuclei from HepG2 cells and rat liver. The reason for using purified nuclei as substrate for the analysis of autoimmune sera was to eliminate staining from autoantibodies directed against cytoplasmic autoantigens and therefore to enhance sensitivity in the detection of ANEA (Figure 2). We used nuclei isolated from HepG2 cells instead of HeLa cells because unlike nuclei preparations from HeLa cells, those from HepG2 cells were free of cytoplasmic contaminations (Figure 3). We also analyzed sera using nuclei from rat liver because of their high purity after isolation, the convenience of tissue availability and the diversity of normal (no cancerous) cell types that constitute the whole tissue (liver) instead of a cell line. The latter would enhance identification of cell-type specific proteins, because liver contains hepatocytes, Kupffer cells, sinusoidal epithelia, perisinusoidal lipocytes, an endothelial vasculature, and muscle cells.

In Figure 2, we show characteristic patterns observed with a number of patients' sera, which, as will presented below, contain autoantibodies against specific nuclear envelope proteins (anti-gp210-s54, s16, s189-, or anti-lamin A-s32-). The use of different substrates resulted in

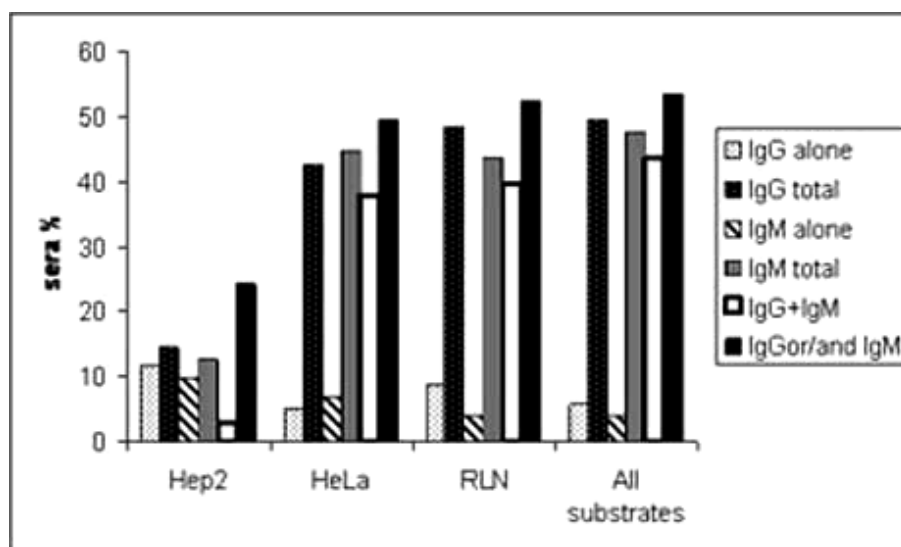
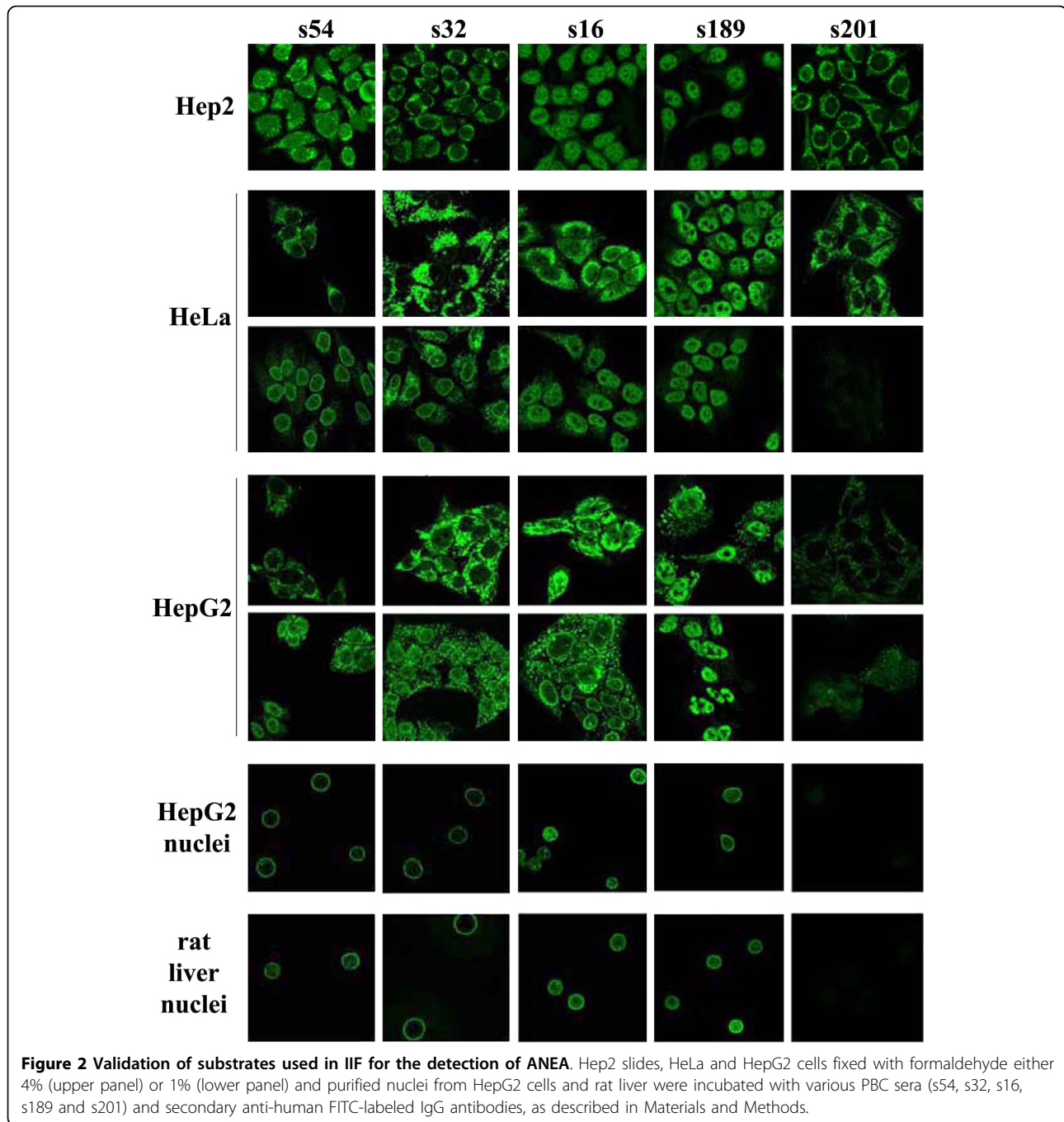


Figure 1 Prevalence of ANEA. Histograms showing the percentage of PBC sera containing ANEA of different Ig class as determined by IIF on Hep2 slides, HeLa cells, rat liver nuclei (RLN) and either substrate. "IgG Total" or "IgM Total" represent the sum of sera which had ANEA of both IgG and IgM antibodies (IgG+IgM) and those with either IgG class alone or IgM class alone, respectively.



pattern variability and we showed that, whenever sera contained low titer of ANEA and/or high titer of antibodies directed against cytoplasmic autoantigens, isolated nuclei revealed ANEA more efficiently and easily than whole cells (Figure 2, panels s32, s16 and s189). Interestingly enough, rat liver nuclei, in spite of the species difference, recognize human ANEA with the same efficacy as human liver (HepG2) nuclei. ANEA detection using purified nuclei was specific, as no staining of the nuclear periphery was shown when we used sera containing only cytoplasmic

autoantibodies (Figure 2, panel s201, and Figure 4). In addition, we did not detect any fluorescence of the nuclear periphery in both Hep2 commercial slides and purified nuclei when sera from 10 healthy controls, 25 individuals without autoimmune diseases registered with the university hospital, 5 patients with viral hepatitis B, 5 patients with viral hepatitis C and finally 10 patients with alcoholic cirrhosis were analyzed by IIF (not shown).

Staining on different substrates has been further repeated with an anti-IgM antiserum, to account for

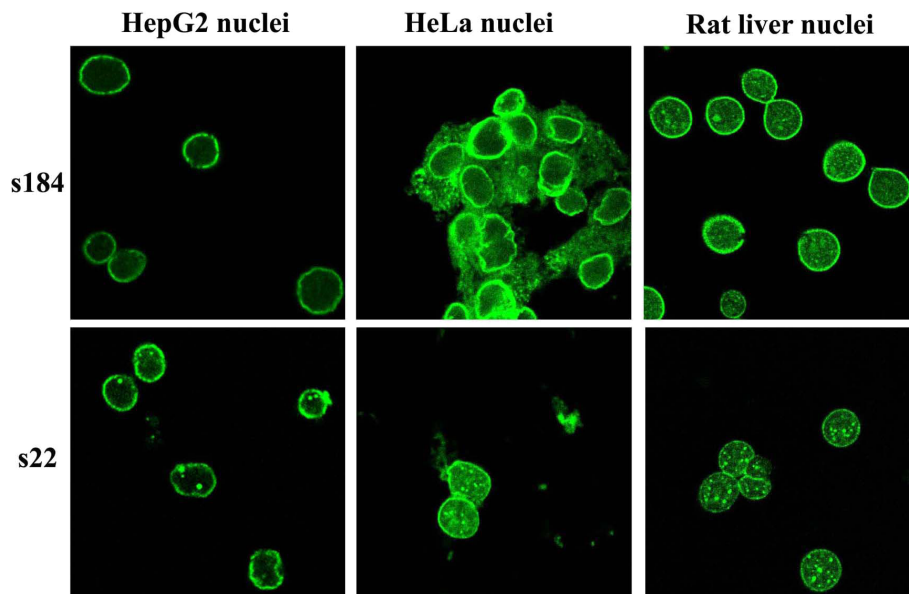


Figure 3 Purity of isolated nuclei from HEPG2 cells, HeLa cells and rat liver.

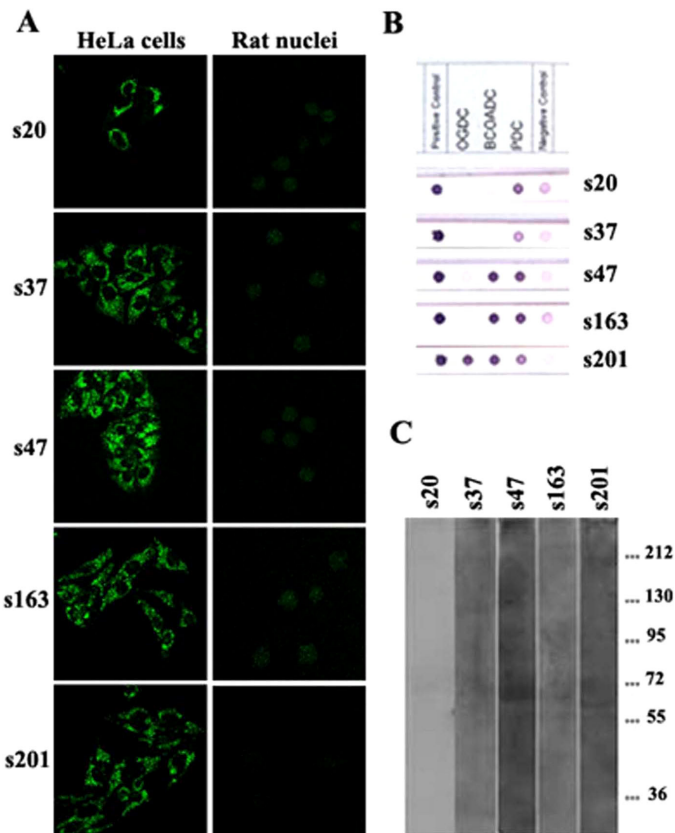


Figure 4 Purity of nuclear envelopes isolated from rat liver. (A) Reactivity of PBC sera (s) as detected by IIF on HeLa cells and nuclei isolated from rat liver. Note the cytoplasmic pattern of fluorescence and the absence of staining on nuclei. The same PBC sera were tested (B) for anti-mitochondrial autoantibodies by dot blotting (mitochondria profile blot, Alphasia Diagnostic Products, Wavre, Belgium) and (C) on nuclear envelopes from rat liver by immunoblotting. Note for all sera the presence of anti-mitochondrial autoantibodies and the absence of reactivity on nuclear envelopes.

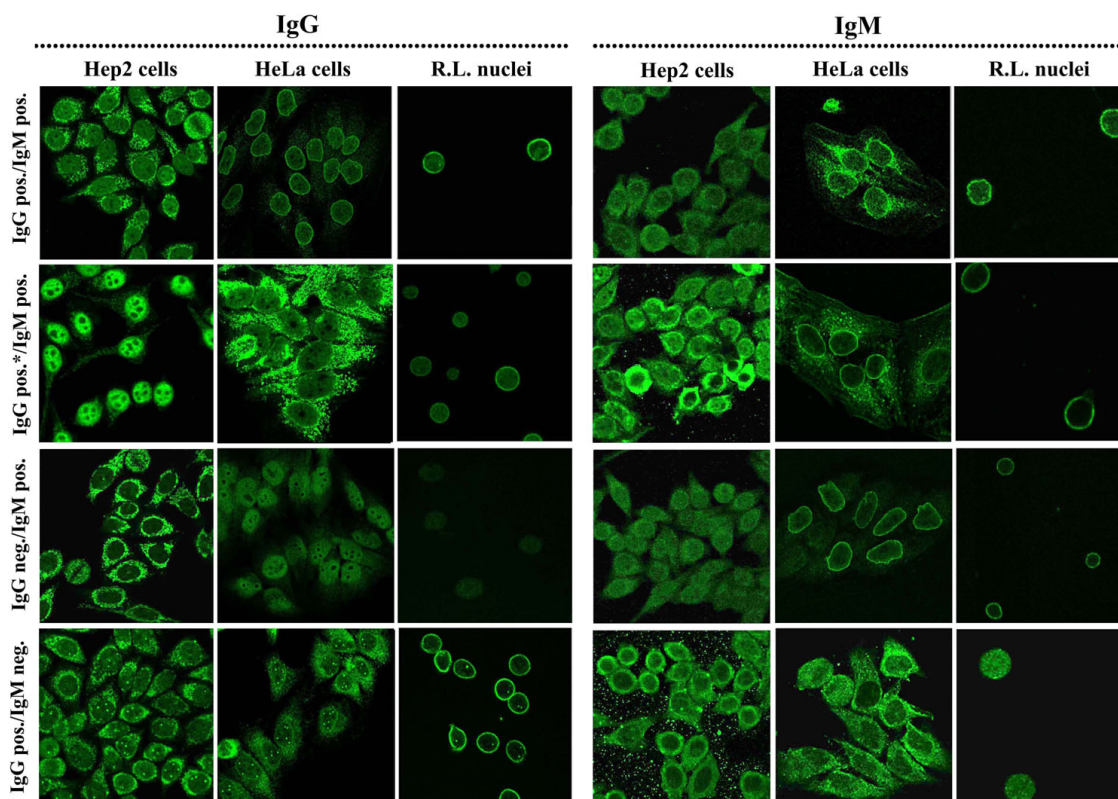


Figure 5 Detection of ANEA of IgG and IgM class by IIF. Commercially available slides with Hep2 cells (Hep2 cells), cultured HeLa cells (HeLa cells) and purified nuclei from rat liver (R.L. nuclei) were incubated with various PBC sera and secondary anti-human FITC-labeled IgG and IgM antibodies, as described in Materials and Methods.

isotype-specific ANEA in sera of PBC patients. Representative images are presented in Figure 5. We show that detection of IgG and/or IgM antibodies was depending on the patient's serum, as well as on the substrate used and that isolated nuclei could reveal ANEA more efficiently than whole cells (Figure 5, panel IgG pos.*/IgM pos.).

The prevalence of ANEA as determined in the different substrate/antiserum used varies within the different combinations (Figure 1). Alternative substrates (HeLa cells and isolated nuclei) identify a significantly higher number of sera, positive for ANEA. No significant difference was observed in the prevalence determined using either whole cells or isolated nuclei or when all methods were pooled for positivity in the totality of 103 sera examined. Most sera (44%) had both IgG and IgM antibodies, whereas we found low percentage (4%) of sera containing only IgM antibodies.

In conclusion, these data indicate that substrates and secondary reagents used in immunofluorescence assays are determinant factors for the detection of ANEA. Purified nuclei and appropriately fixed cells are better substrates than commercial Hep2-based histology slides and

should be used for the determination of ANEA by IIF when their presence is suspected in patients' sera.

Correlation of immunofluorescence and immunoblotting in the detection of ANEA

In order to confirm our IIF findings, we have tested all sera, by immunoblotting, using purified rat liver nuclear envelopes as substrate. With the exception of sera positive for anti-mitochondrial autoantibodies (Figure 4), all sera positive for ANEA by IIF were also positive by immunoblotting. A variety of reactive protein bands were revealed (Figure 6); most sera bound to proteins with an approximate mass of 210 kDa (35, 34% of sera) and/or 75-55 kDa (39, 37.9% of sera). In order to further characterize the major antigens targeted by circulating autoantibodies, we have analyzed them, using a variety of methods.

Anti-gp210 autoantibodies prevail in ANEA-positive cases of PBC

Anti-gp210 antibodies were most probable to be present as it is known that these antibodies are PBC-specific. As presented above, our PBC sera revealed autoantibodies

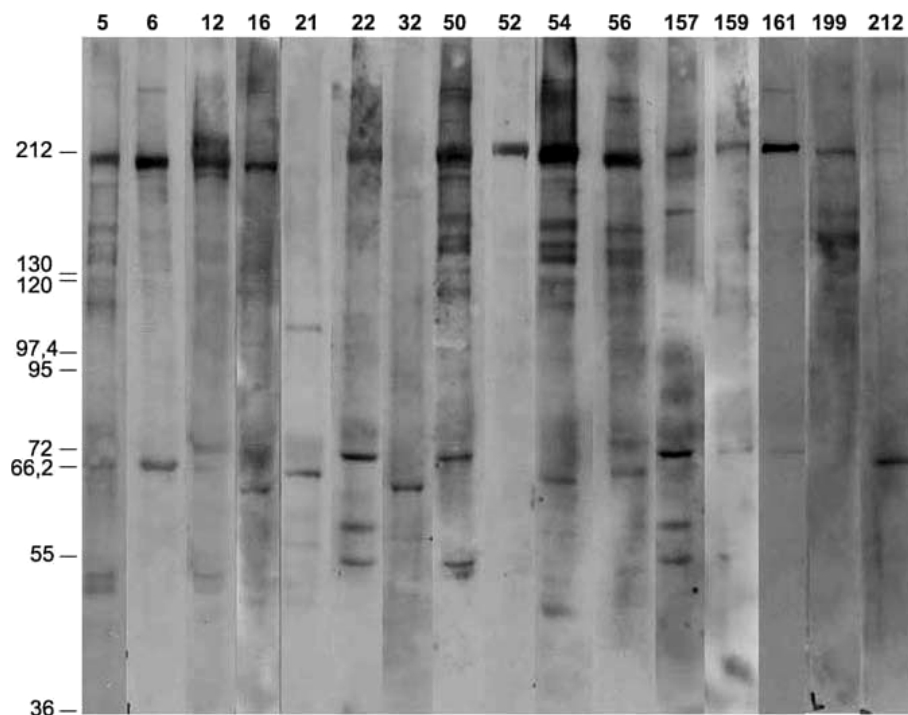


Figure 6 Detection of ANEA by immunoblotting. Apparent molecular mass of nuclear envelope proteins from rat liver which are recognized by autoantibodies comprised in selected PBC sera.

for proteins with an apparent molecular mass of ~210 kDa. Using a commercial ELISA kit for anti-gp210 antibody detection, we detected 43.4% of cases positivity, in ANEA IIF-positive sera. However, from the 35 sera, exhibiting autoantibodies against a protein substrate of ~210 kDa, only 23 were identified as anti-gp210 positive with ELISA (Figure 7). This discrepancy could indicate the existence of other, yet unidentified proteins with a similar apparent molecular mass, serving as targets of ANEA autoantibodies. Alternatively, it is also possible that anti-gp210 antibodies are not detected by ELISA because they are directed against epitopes other than the C-terminal of gp210 or belong predominantly to other classes than IgG.

To discriminate between these possibilities we performed immunoprecipitation experiments using Triton X-100 extracted material from purified rat liver nuclear envelopes. Material precipitated by immunoprecipitation-competent sera was further immunoblotted with anti-gp210 antibodies (Figure 8Ia). Alternatively, for those sera which were not suitable for immunoprecipitation (i.e. s196 and s202), we used serum 54, which was competent for immunoprecipitation and positive for anti-gp210 by ELISA. Immunoprecipitates were then immunoblotted with the different sera to be tested using as detection reagents anti-human IgG and, when necessary, IgM secondary antibodies (Figure 8Ib, c). We

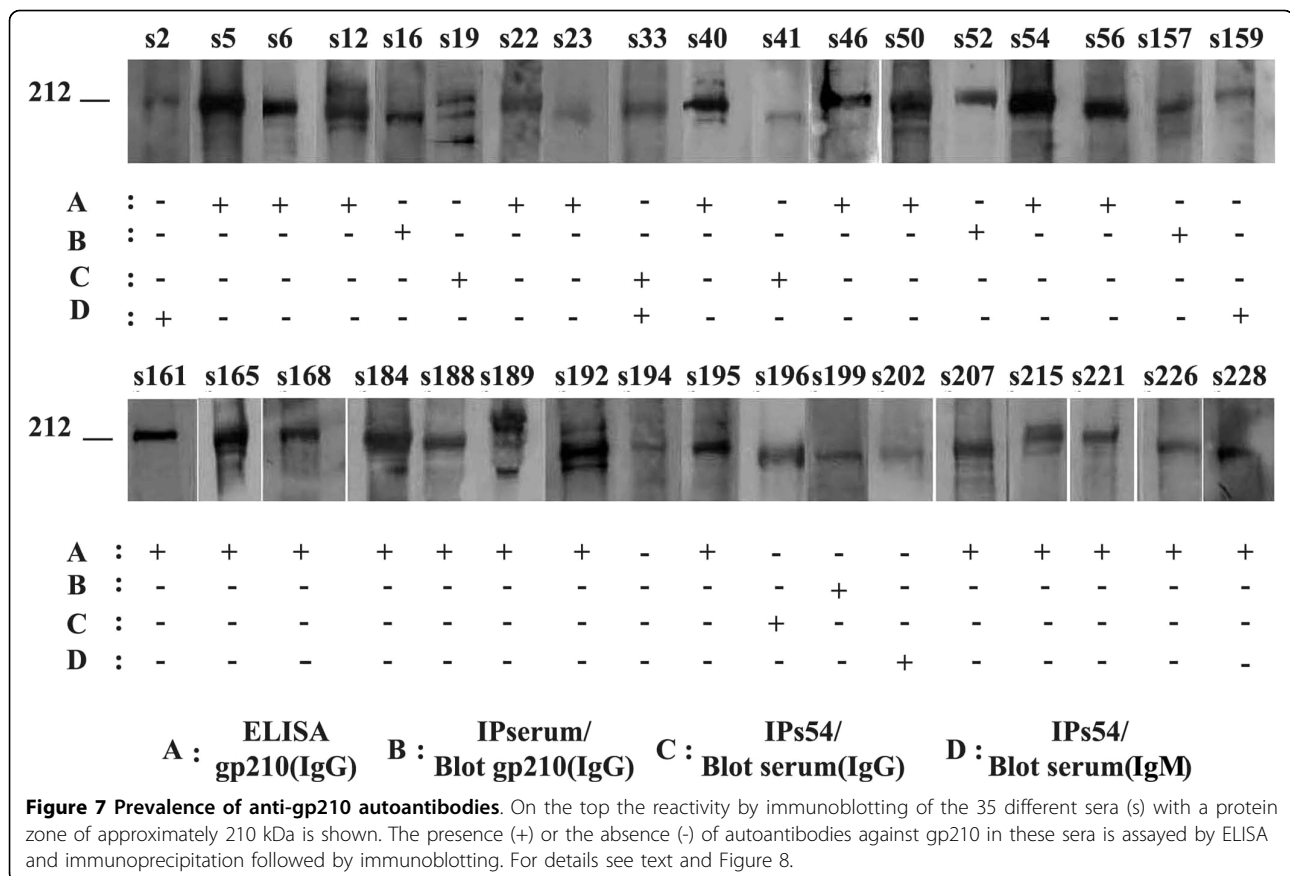
found 8/35 additional sera (22.9%) containing anti-gp210 IgG autoantibodies, not revealed by ELISA, whereas 3/35 sera (8.6%) contained anti-gp210 autoantibodies of IgM class alone (Figure 7). The identity of the gp210 substrate was further confirmed by mass spectrometry of the protein immunoprecipitated with sera 16 and 54.

Concluding, our results indicate that 34 of PBC sera (33%) contained anti-gp210 autoantibodies, while 11 of these sera could not be detected by ELISA, necessitating additional assays. Also, there is a statistically significant direct correlation ($p < 0.0001$) between the 210 kDa zone detected by immunoblotting (35 sera) and the identification of gp210 (34 sera) in the PBC sera tested.

Prevalence of anti-p62, anti-LBR and anti-lamin autoantibodies in PBC sera

The second major protein band identified in 38% of PBC patients' sera (39 sera), has an apparent molecular mass of 55-75 kDa. Therefore, we investigated the prevalence of anti-p62, anti-LBR and anti-lamin autoantibodies which have been previously reported to occur in autoimmune sera [3].

The presence of anti-p62 autoantibodies was studied by immunoblotting on material immunoprecipitated using specific monoclonal anti-p62 antibodies. As shown in Figure 8IV, monoclonal anti-p62 antibodies (a-p62)



recognized p62 nucleoporin in nuclear envelope preparations (RNE), on the material extracted (Ext.) and immunoprecipitated with anti-p62 antibodies (IPp62). Moreover, is shown that there was no detectable p62 in the extract after immunoprecipitation (Depl.Ext.) indicating that almost all of the extracted p62 was absorbed by anti-p62 antibodies. However, none of the patients sera, recognizing an autoantigen of similar molecular mass (55-75 kd) could react with the isolated p62, suggesting the absence of specific anti-p62 autoantibodies. Representative data from selected sera (s6, s32 and s188) are presented in Figure 8IV, where is shown an immunoreactivity for proteins of approximately 60 kDa in the nuclear envelope preparation (RNE) and the extracted material before (Ext.) and after (Depl.Ext.) immunodepletion but not for p62 nucleoporin (IPp62).

A similar method was used to investigate the presence of anti-lamin and anti-LBR autoantibodies. They were also detected by immunoblotting on the corresponding purified proteins. Anti-lamin and/or anti-LBR autoantibodies were present in 14 sera; specifically 4 contained anti-lamin A, 1 anti-lamin B, 6 sera contained a low titer anti-LBR antibody, 2 sera contained both anti-lamin A and anti-LBR and finally 1 serum was positive for anti-lamin A/C and anti-LBR antibodies (Figure 9).

Figure 8II shows characteristic immunoreactivities for lamin B (s6), lamin A (s50) and both lamins A and C (s211), whereas in Figure 8III are presented profiles from sera without (s33, s201) and with high (s211, s21) or low (s196) titer of anti-LBR autoantibodies. The existence of anti-lamin A autoantibodies was further confirmed by identifying lamin A with mass spectrometry in the immunoprecipitated material using serum 16.

In conclusion, our data indicate the complete absence of anti-p62 autoantibodies, while a small number of sera contained antibodies targeting LBR or nuclear lamins.

Discussion

Standard immunofluorescence has traditionally a lower sensitivity, as compared to immunoblotting or ELISA, for the detection of autoantibodies; however, molecular-based assays enable the detection of a limited number of selected targets, neglecting others of potential equal or even higher importance. A contribution of the present study is the finding that immunofluorescence may be a powerful technique for the detection of ANEA, which are often sub-optimally detected when autoantibodies of other reactivities are equally present in a specific serum [3,4,11]. In fact, we report high prevalence of autoantibodies against the nuclear periphery (in about half of

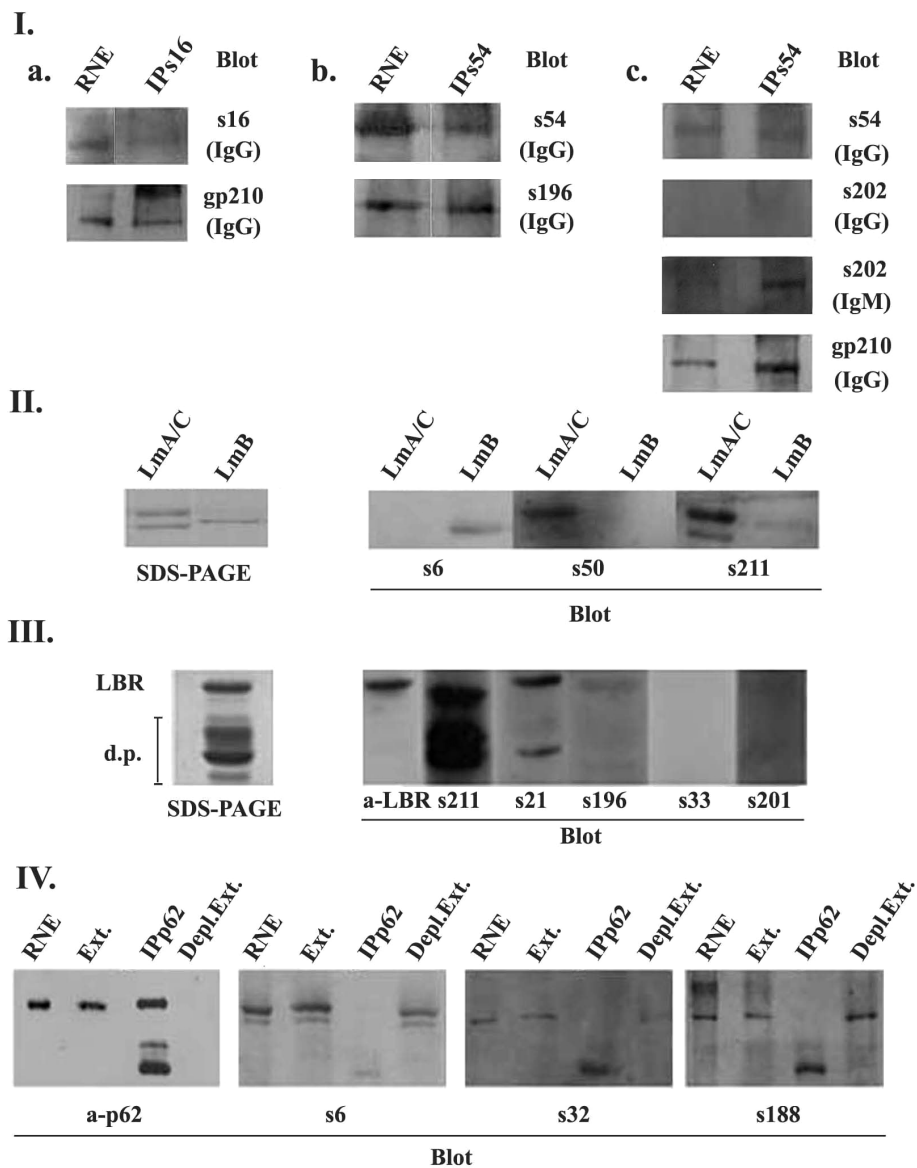
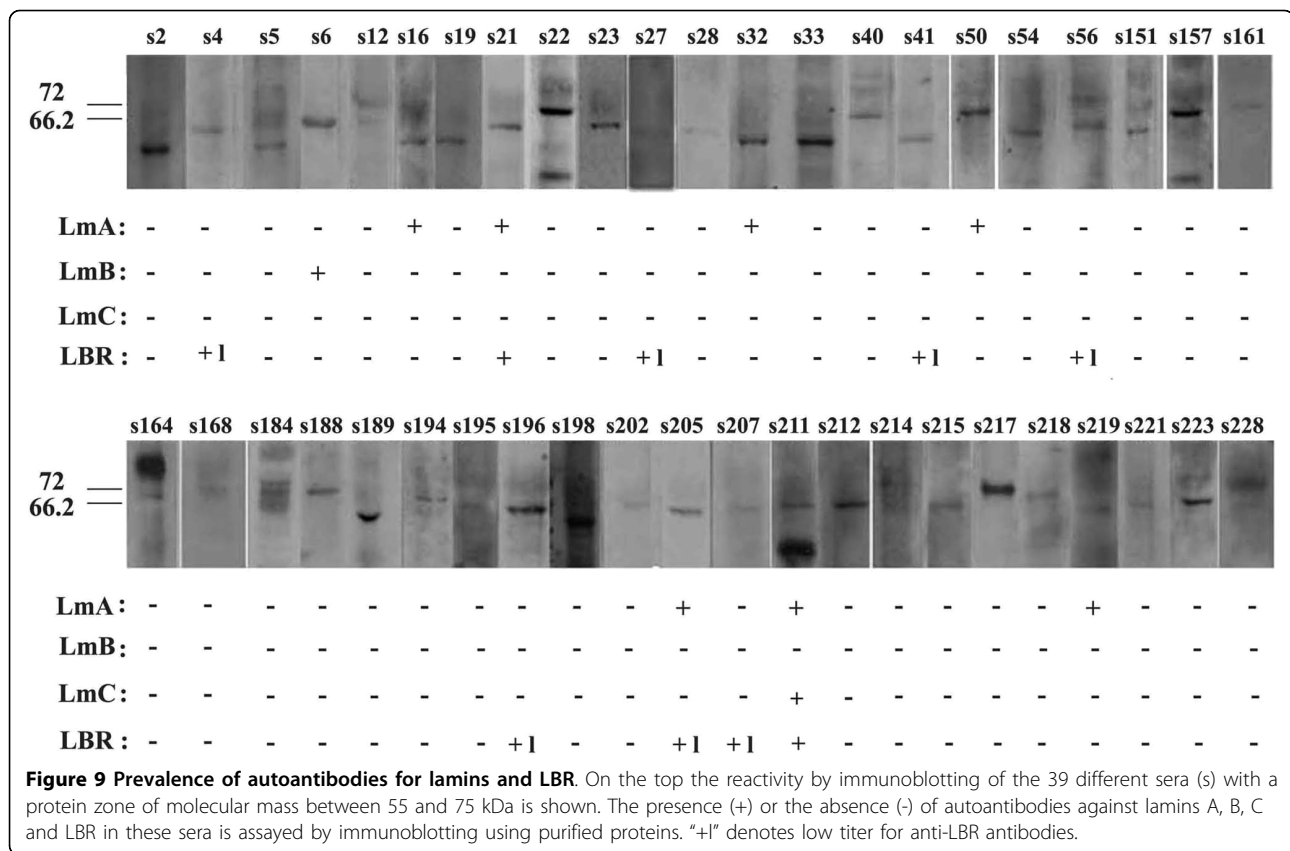


Figure 8 Identification of specific ANEA by biochemical approaches. (I) Identification of anti-gp210 autoantibodies. Immunoprecipitation (IP) of gp210 and immunoblotting (Blot) using IgG (IgG) and IgM (IgM) secondary antibodies. (II) Identification of autoantibodies directed against lamins A/C (LmA/C) and B (LmB) by immunoblotting (Blot) using purified proteins (SDS-PAGE). (III) Identification of anti-LBR autoantibodies by immunoblotting (Blot) using purified recombinant LBR (SDS-PAGE). "d.p." denotes characteristic proteolytic products of LBR that are produced after expression in bacteria. Sera negative (s33, s201) and highly (s211, s21) or moderately (s196) positive for LBR are shown. (IV) Identification of anti-p62 autoantibodies.

patients with PBC) when we used multiple substrates (cultured cells and purified nuclei) and antisera (IgG and IgM). In contrast, these antibody classes are underestimated, when standard IIF procedure (commercially available Hep2 cells and IgG antisera) was used for the detection. Interestingly enough, we further report that heterologous systems (rat liver nuclei/human sera) may also reveal, with a high specificity, ANEA autoantibodies, a technique which might be of potential clinical value.

Previously published studies shows a discrepancy in the results obtained by IIF and immunoblotting or ELISA. For example, in PBC sera, it has been shown that the prevalence of antibodies giving a rim-like membranous fluorescence (10%) by IIF on Hep2 cells was lower than the prevalence of antibodies assayed by ELISA against gp210 (16%), which represent one among other autoantigens of the nuclear envelope. Moreover, for specific sera which were negative for ANEA by IIF, antibodies against gp210 or LBR have been detected



using ELISA [9]. Similarly, in another study, anti-NPC antibodies, against at least one of the two major autoantigens at about 200 and 60 kDa, were detected by immunoblotting on purified human NPCs in as many as 22% of the ANA-negative by IIF PBC patients [13]. Our data indicate that an accurate detection of ANEA by IIF can be accomplished if appropriate substrates are used. Cytoplasmic staining, which is a major handicap for the detection of the peripheral nuclear staining very often shown in PBC sera, was considerably decreased or even eliminated when appropriately fixed cells or purified nuclei were used. Sera tested under such conditions showed high prevalence of ANEA by IIF. Of importance, all sera which were positive for anti-gp210 and anti-LBR autoantibodies showed also a peripheral nuclear staining by IIF, indicating that ANEA specific for PBC, are efficiently detected using our experimental protocol.

Another important finding was the identification of undetectable by conventional ELISA, anti-gp210 autoantibodies in more than 10% of PBC sera, representing 21% of sera with ANEA and 32% of anti-gp210 positive sera. Three of 11 sera contained anti-gp210 of only IgM class, whereas anti-gp210 autoantibodies in the last 8 sera did not reacted with the C-terminal epitope using an ELISA commercial kit which is widely used in clinical laboratories. Considering the importance of anti-

gp210 antibodies in diagnosis and prognosis of PBC, our results strongly suggest that additional ELISA kits should be developed including the N-terminal epitope as substrate and various secondary reagents for the identification of anti-gp210 autoantibodies of all specificities and Ig class.

Finally, we tried to identify the 60-70 kDa protein zones recognized by almost 40% (39 out of 103 sera) of our sera after immunoblotting on purified rat nuclear envelopes. We identified autoantibodies for LBR or lamins A, B and C, in 14 (36%) of those sera, whereas we have not detected anti-p62 autoantibodies in our PBC sera by immunoprecipitation, although p62 was effectively recognized in the material extracted from rat nuclear envelopes and precipitated using monoclonal anti-p62 antibodies. Moreover, the immunoreactivity of sera with a 60-70 kDa band in nuclear envelope extracts before and after immunoprecipitation clearly indicated that autoantibodies reacting with the 60-70 kDa proteins are not directed against p62 but reacted probably with degradation products of autoantigens of higher M.W. (20 of 25 sera had autoantibodies for gp210) or proteins of the nuclear envelope not yet reported as autoantigens. The only possible explanation for the lack of detection of anti-p62 autoantibodies could be their very low titer. This possibility is supported by the recent identification

of autoantibodies against p62 using recombinant rat or human protein in 50% of PBC sera by immunoprecipitation of ³⁵S-radioactively labeled p62 and in 40% by immunoblotting [26]. We believe that more studies are needed to confirm the presence and determine the prevalence of anti-p62 antibodies in PBC sera.

Conclusions

Results of the present study indicate high prevalence of autoantibodies giving rim/peripheral fluorescence in PBC sera when tested by IIF using multiple secondary reagents and adequate substrates for the analysis. We confirm that among many potential ANEA, anti-gp210 antibodies are very specific for PBC, although their sensitivity in PBC sera seems to be underestimated in previous studies. Giving the importance of ANEA and particularly anti-gp210 antibodies in diagnosis and prognosis of PBC, we suggest that modifications emerged by our study, concerning the screening of sera by IIF and the identification of gp210 antibodies, should be included for the identification of ANEA in future studies.

Acknowledgements

This work was supported by PENED 2003 (03ΕΔ66) from the Greek Secretariat of Research and Technology to PAT and an AKMONAS grant co-financed by the European Union - European Regional Development Fund to B.S.R.C. Al. Fleming.

Author details

¹Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Crete, Crete, Greece. ²Department of Gastroenterology, School of Medicine, University of Crete, Crete, Greece. ³Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming", Vari 16672, Greece. ⁴Department of Pathology, School of Medicine, University of Crete, Crete, Greece. ⁵Department of Gastroenterology, University Hospital of Heraklion, Heraklion, Crete, Greece. ⁶Department of Experimental Endocrinology, School of Medicine, University of Crete, Crete, Greece.

Authors' contributions

ET: Acquisition and analysis of data, revising the manuscript. HP: Acquisition of data, technical supervision and revising the manuscript. RS: Technical assistance, preparation of sera and revising the manuscript. MS: Acquisition and analysis of MS data, revising the manuscript. MT: Diagnosis of patients, analysis of data, revising the manuscript. MK: Preparation of sera, follow-up of patients, revising the manuscript. GP: Analysis and interpretation of data, revising the manuscript. EK: Interpretation of data and revising the manuscript. EC: Design of the study, interpretation of data and revising the manuscript. PAT: Conception and design of the study, analysis and interpretation of data, drafting and revising the manuscript. All of the authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 9 November 2009

Accepted: 8 March 2010 Published: 8 March 2010

References

1. Georgatos SD, Theodoropoulos PA: Rules to remodel by: what drives nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis?. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999, **9**:373-81.

2. Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT, Matunis MJ: Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* 2002, **158**:915-27.
3. Enarson P, Rattner JB, Ou Y, Miyachi K, Horigome T, Fritzier MJ: Autoantigens of the nuclear pore complex. *J Mol Med* 2004, **82**:423-33.
4. Rigopoulou EI, Davies ET, Pares A, Zachou K, Liaskos C, Bogdanos DP, Rodes J, Dalekos GN, Vergani D: Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gut* 2005, **54**:528-32.
5. Wesierska-Gadek J, Penner E, Battezzati PM, Selmi C, Zuin M, Hitchman E, Worman HJ, Gershwin ME, Podda M, Invernizzi P: Correlation of initial autoantibody profile and clinical outcome in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006, **43**:1135-44.
6. Lassoued K, Brenard R, Degos F, Courvalin JC, Andre C, Danon F, Brouet JC, Zine-el-Abidine Y, Degott C, Zafrani S, et al: Antinuclear antibodies directed to a 200-kilodalton polypeptide of the nuclear envelope in primary biliary cirrhosis. A clinical and immunological study of a series of 150 patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1990, **99**:181-6.
7. Miyachi K, Hankins RW, Matsushima H, Kikuchi F, Inomata T, Horigome T, Shibata M, Onozuka Y, Ueno Y, Hashimoto E, Hayashi N, Shibuya A, Amaki S, Miyakawa H: Profile and clinical significance of anti-nuclear envelope antibodies found in patients with primary biliary cirrhosis: a multicenter study. *J Autoimmun* 2003, **20**:247-54.
8. Miyachi K, Shibata M, Onozuka Y, Kikuchi F, Imai N, Horigome T: Primary biliary cirrhosis sera recognize not only gp210 but also proteins of the p62 complex bearing N-acetylglucosamine residues from rat liver nuclear envelope. Anti-p62 complex antibody in PBC. *Mol Biol Rep* 1996, **23**:227-34.
9. Muratori P, Muratori L, Ferrari R, Cassani F, Bianchi G, Lenzi M, Rodrigo L, Linares A, Fuentes D, Bianchi FB: Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2003, **98**:431-7.
10. Wesierska-Gadek J, Hohenuer H, Hitchman E, Penner E: Autoantibodies against nucleoporin p62 constitute a novel marker of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1996, **110**:840-7.
11. Tsiakalou V, Tsangaridou E, Polioudaki H, Nifli AP, Koulentaki M, Akoumianaki T, Kouroumalis E, Castanas E, Theodoropoulos PA: Optimized detection of circulating anti-nuclear envelope autoantibodies by immunofluorescence. *BMC Immunol* 2006, **7**:20.
12. Courvalin JC, Lassoued K, Bartnik E, Blobel G, Wozniak RW: The 210-kD nuclear envelope polypeptide recognized by human autoantibodies in primary biliary cirrhosis is the major glycoprotein of the nuclear pore. *J Clin Invest* 1990, **86**:279-85.
13. Invernizzi P, Podda M, Battezzati PM, Crosignani A, Zuin M, Hitchman E, Maggioni M, Meroni PL, Penner E, Wesierska-Gadek J: Autoantibodies against nuclear pore complexes are associated with more active and severe liver disease in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2001, **34**:366-72.
14. Nakamura M, Kondo H, Mori T, Komori A, Matsuyama M, Ito M, Takii Y, Koyabu M, Yokoyama T, Migita K, et al: Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007, **45**:118-27.
15. Courvalin JC, Lassoued K, Worman HJ, Blobel G: Identification and characterization of autoantibodies against the nuclear envelope lamin B receptor from patients with primary biliary cirrhosis. *J Exp Med* 1990, **172**:961-7.
16. Nickowitz RE, Worman HJ: Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a restricted region within the cytoplasmic tail of nuclear pore membrane glycoprotein Gp210. *J Exp Med* 1993, **178**:2237-42.
17. Wesierska-Gadek J, Hohenauer H, Hitchman E, Penner E: Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis preferentially react with the amino-terminal domain of nuclear pore complex glycoprotein gp210. *J Exp Med* 1995, **182**:1159-62.
18. Tartakovsky F, Worman HJ: Detection of Gp210 autoantibodies in primary biliary cirrhosis using a recombinant protein containing the predominant autoepitope. *Hepatology* 1995, **21**:495-500.
19. Bandin O, Courvalin JC, Poupon R, Dubel L, Homberg JC, Johanet C: Specificity and sensitivity of gp210 autoantibodies detected using an enzyme-linked immunosorbent assay and a synthetic polypeptide in the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1996, **23**:1020-4.

20. Bauer A, Habior A: **Measurement of gp210 autoantibodies in sera of patients with primary biliary cirrhosis.** *J Clin Lab Anal* 2007, **21**:227-31.
21. Bogdanos DP, Liaskos C, Pares A, Norman G, Rigopoulou EI, Caballeria L, Dalekos GN, Rodes J, Vergani D: **Anti-gp210 antibody mirrors disease severity in primary biliary cirrhosis.** *Hepatology* 2007, **45**:1583, author reply 1583-4.
22. Bogdanos DP, Pares A, Rodes J, Vergani D: **Primary biliary cirrhosis specific antinuclear antibodies in patients from Spain.** *Am J Gastroenterol* 2004, **99**:763-4, author reply 765.
23. Gao L, Tian X, Liu B, Zhang F: **The value of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis.** *Clin Exp Med* 2008, **8**:9-15.
24. Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, Komori A, Yokoyama T, Ueki T, Daikoku M, Yano K, Matsumoto T, Migita K, Yatsuhashi H, Ito M, Masaki N, Adachi H, Watanabe Y, Nakamura Y, Saoshiro T, Sodeyama T, Koga M, Shimoda S, Ishibashi H: **Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis.** *J Hepatol* 2005, **42**:386-92.
25. Wesierska-Gadek J, Klima A, Komina O, Ranftler C, Invernizzi P, Penner E: **Characterization of autoantibodies against components of the nuclear pore complexes: high frequency of anti-p62 nucleoporin antibodies.** *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1109**:519-30.
26. Wesierska-Gadek J, Klima A, Ranftler C, Komina O, Hanover J, Invernizzi P, Penner E: **Characterization of the antibodies to p62 nucleoporin in primary biliary cirrhosis using human recombinant antigen.** *J Cell Biochem* 2008, **104**:27-37.
27. Lin F, Noyer CM, Ye Q, Courvalin JC, Worman HJ: **Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a region within the nucleoplasmic domain of inner nuclear membrane protein LBR.** *Hepatology* 1996, **23**:57-61.
28. Nickowitz RE, Wozniak RW, Schaffner F, Worman HJ: **Autoantibodies against integral membrane proteins of the nuclear envelope in patients with primary biliary cirrhosis.** *Gastroenterology* 1994, **106**:193-9.
29. Kaplan MM: **Primary biliary cirrhosis.** *N Engl J Med* 1996, **335**:1570-80.
30. Makatsori D, Kourmouli N, Polioudaki H, Shultz LD, McLean K, Theodoropoulos PA, Singh PB, Georgatos SD: **The inner nuclear membrane protein lamin B receptor forms distinct microdomains and links epigenetically marked chromatin to the nuclear envelope.** *J Biol Chem* 2004, **279**:25567-73.
31. Blobel G, Potter VR: **Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield.** *Science* 1966, **154**:1662-5.
32. Matunis MJ: **Isolation and fractionation of rat liver nuclear envelopes and nuclear pore complexes.** *Methods* 2006, **39**:277-83.
33. Trinkle-Mulcahy L, Boulon S, Lam YW, Urcia R, Boisvert FM, Vandermoere F, Morrice NA, Swift S, Rothbauer U, Leonhardt H, Lamond A: **Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes.** *J Cell Biol* 2008, **183**:223-39.
34. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, Georgatsou E, Bonanou S, Simos G: **Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha.** *J Biol Chem* 2006, **281**:33095-106.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:<http://www.biomedcentral.com/1471-230X/10/28/prepub>

doi:10.1186/1471-230X-10-28

Cite this article as: Tsangaridou et al.: Differential detection of nuclear envelope autoantibodies in primary biliary cirrhosis using routine and alternative methods. *BMC Gastroenterology* 2010 **10**:28.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

