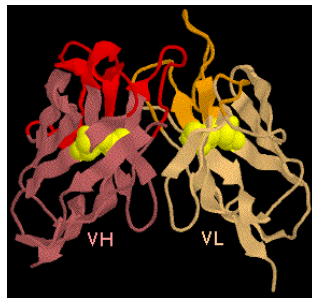


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ  
ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΦΑΓΟΥΣ  
ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΑΝΤΙ-MUC1  
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

ΜΑΡΙΑ ΚΑΝΔΗΛΟΓΙΑΝΝΑΚΗ



ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2000

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ  
ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΦΑΓΟΥΣ  
ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΑΝΤΙ-MUC1  
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

ΜΑΡΙΑ ΚΑΝΔΗΛΟΓΙΑΝΝΑΚΗ  
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2000

## Ευχαριστίες

Και να που τέλειωσε και αυτό το ταξίδι.....

Η αλήθεια είναι ότι όταν πήρα την απόφαση να το ξεκινήσω, πριν από τέσσερα χρόνια, δεν είχα συνειδητοποιήσει τις πραγματικές συνέπειες μιας τέτοιας κίνησης. Τότε πίστευα ότι η διεξαγωγή μιας διδακτορικής διατριβής θα με βοηθήσει να αποκτήσω γνώσεις και επιστημονική κατάρτιση στον τομέα που είχα διαλέξει. Με γοήτευε η ιδέα του ερευνητή που ψάχνει και ανακαλύπτει το καινούργιο, το διαφορετικό. Τώρα, μετά από τέσσερα χρόνια συνεχούς προσπάθειας να βρω λύσεις για τα προβλήματα που συναντούσα στο διάβα μου, καταλαβαίνω ότι εκτός από την επιστημονική κατάρτιση κατάφερα να βελτιώσω τα όρια της αντοχής μου. Ελπίζω ότι απέκτησα επιμονή και υπομονή και έμαθα να παλεύω χωρίς να καταθέτω τα όπλα στην πρώτη δυσκολία. Έμαθα να σκέφτομαι και να μάχομαι. Για όλα αυτά θα ήθελα να ευχαριστήσω εκείνους που με βοήθησαν και στάθηκαν δίπλα μου στις δύσκολες ώρες. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή και συγκεκριμένα τον κ.Ι Τσελέντη, τον κ. Α. Γκίκα και κυρίως τον κ. Η. Κραμποβίτη για τις ατέλειωτες συζητήσεις και τις συμβουλές οι οποίες με βοήθησαν να ξεπεράσω τους σκόπελους που συναντούσα μπροστά μου και να συνεχίσω ως το τέλος. Στην ψυχική ισορροπία που ήταν απαραίτητη για να μπορέσω να επιτύχω το σκοπό μου, συνέβαλαν τα μέγιστα τα παιδιά της ερευνητικής ομάδας της οποίας μέλος ήμουν και εγώ: η Χαρούλα Βλατά, ο Αλέξης Ζαφειρόπουλος, η Φανή Ανδρουλάκη, η Μαρία Σιουμπάρα, ο Μανώλης Πολίτης, η Βούλα Μπαριτάκη και ο Γιώργος Κουτσουδάκης. Τους ευχαριστώ από τα βάθη της ψυχής μου για τη φιλία τους και την υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια καθώς και την βοήθεια τους σε θέματα δουλειάς. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Henpie Hoogenboom για τις επιστημονικές του συμβουλές και την χορήγηση σημαντικών υλικών που συνέβαλαν στην επιτυχία αυτής της μελέτης. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω τους δικούς μου ανθρώπους, την οικογένεια μου και τον Αντώνη, που στάθηκαν δίπλα μου και με στήριξαν ψυχικά.

Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών που με υποστήριξε οικονομικά με την απονομή τριετούς υποτροφίας η οποία χορηγήθηκε μετά από την επιτυχή συμμετοχή μου σε πανελλαδικές εξετάσεις.

# Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	1
Περιεχόμενα	2
Περίληψη	6
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b>	
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	8
<b>1.1. ΓΕΝΙΚΑ</b>	9
1.1.1 Η συνεχής και ανελέητη πάλη - Το ανοσιακό σύστημα	9
1.1.2 Η φυσική ανοσία	9
1.1.3 Η επίκτητη ανοσία	9
<b>1.2. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ</b>	11
1.2.1 Δομή	11
1.2.2 Η ποικιλομορφία των αντισωμάτων και τα γονίδια τους	13
<b>1.3. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ-ΤΑ ΕΡΓΑΛΕΙΑ</b>	19
1.3.1 Γενικά	19
1.3.2 Χιμαιρικά και ανθρωποποιημένα αντισώματα	20
1.3.3 Ανθρώπινα αντισώματα από διαγονιδιακά ποντίκια	21
1.3.4 Ανθρώπινα αντισώματα στην επιφάνεια φάγων (phage display)	22
<b>1.4. Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΦΑΓΩΝ</b>	23
1.4.1 Γενικά-Η αρχή	23
1.4.2 Η βιολογία του νηματοειδούς βακτηριοφάγου	23
1.4.3 Παράγωγα των νηματοειδών βακτηριοφάγων	25
1.4.3.α Φαγικοί φορείς κλωνοποίησης	25
1.4.3.β Φαγεμίδια	25
1.4.4 Μεθοδολογία της παρουσίασης	26
1.4.4.α Παρουσίαση πολυπεπτιδικών αλυσίδων στην pVIII	26
1.4.4.β Παρουσίαση πολυπεπτιδικών αλυσίδων στην pIII	26
1.4.5 Η βασική μεθοδολογία παρουσίασης αντισωμάτων	27
1.4.5.α Φάγοι ή Φαγεμίδια;	27
1.4.5.β Ποια φαγεμίδια χρησιμοποιήθηκαν;	29
1.4.6. Βιβλιοθήκες αντισωμάτων	30
1.4.6.α Παρθενικές βιβλιοθήκες από μη ανοσοποιημένους δότες	30
1.4.6.β Συνθετικές βιβλιοθήκες	32
1.4.6.γ Βιβλιοθήκες από ανοσοποιημένους δότες	32
1.4.6.δ Βιβλιοθήκες δεύτερης γενιάς για βελτίωση της ανοσοσυγγένειας	33
1.4.7 Μέθοδοι επιλογής αντισωμάτων	33
1.4.8 Αναλυτικές μέθοδοι για τη μελέτη των αντισωμάτων	35
<b>1.5. ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ</b>	37
1.5.1. Γενικά	37
1.5.2 Οι βλεννίνες ως καρκινικά αντιγόνα	38

1.5.3 Μονοκλωνικά αντισώματα κατά των βλεννινών	40
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</b>	
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	42
<b>2.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ</b>	43
2.1.1 Βακτηριακά στελέχη και φορείς κλωνοποίησης	43
2.1.2 Ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές	43
2.1.3 Πεπτίδια-Αντιγόνα	43
2.1.4 Απομόνωση ολικού RNA από Β λεμφοκύτταρα	44
2.1.5 Σύνθεση cDNA από ολικό RNA (αντίστροφη μεταγραφή, RT)	45
2.1.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	46
2.1.6.α Επέκταση των γονιδίων των ανθρώπινων αντισωμάτων από το cDNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (πρωταρχικά PCRs)	46
2.1.6.β Επέκταση του συνδετικού κομματιού (linker) με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	46
2.1.6.γ Κατασκευή της Fab και της scFv κασέτας με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	47
2.1.7 Περιοριστική πέψη των συναρμολογημένων κασετών και των φορέων κλωνοποίησης	48
2.1.8 Κλωνοποίηση της κασέτας στον φορέα-φαγεμίδιο	50
2.1.9 Ηλεκτρομετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	50
2.1.10 Μελέτη και υπολογισμός της ποικιλομορφίας της βιβλιοθήκης (γενετικό αποτύπωμα, DNA fingerprinting)	51
<b>2.2 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ-ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΙΛΟΓΗΣ</b>	53
2.2.1 Παραγωγή δεξαμενής φάγων που παρουσιάζουν στην επιφάνεια τους την βιβλιοθήκη των ανθρώπινων αντισωμάτων	53
2.2.2 Επιλογή της βιβλιοθήκης με τη χρήση βιοτινιλιωμένου αντιγόνου και μαγνητικών σφαιριδίων που είναι καλυμμένα με στρεπταβιδίνη	54
2.2.3 Τιτλοδότηση των φάγων	55
<b>2.3 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	56
2.3.1 Επαγωγή διαλυτού αντισώματος σε πλάκες 96 πηγαδιών	56
2.3.2 Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA) για την ανίχνευση διαλυτού αντισώματος	56
2.3.3 Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA) ανταγωνιστικής εκτόπισης	57
2.3.4 Μέτρηση στον ανιχνευτή BIAcore	57
2.3.5 Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS)	58
2.3.6 Ανάλυση με ανοσοϊστοχημεία	59
2.3.7 Ανάλυση πυκνότητας	59
<b>2.4 ΓΕΝΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ</b>	60
2.4.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια	60
2.4.2 Απομόνωση κομματιών DNA από πηκτική αгарόζη	61
2.4.2.α Με τη χρήση κολώνων	61
2.4.2.β Με ηλεκτροέκλυση	61

2.4.3 Αλληλούχιση κομματιών DNA (sequencing)	62
2.4.4 Επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης με IPTG	62
2.4.5 Απομόνωση περιπλασμικών πρωτεϊνών	63
2.4.6 Καθαρισμός πρωτεϊνών με 6xHis ουρά	63
2.4.7 Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE	64
2.4.8 Ανάλυση πρωτεϊνών με western blotting ή με dot blot	64
2.4.9 Προετοιμασία κυττάρων δεκτικών για ηλεκτρομετασχηματισμό (electro-competent)	66
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</b>	
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	67
<b>3.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ CDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ</b>	68
Εισαγωγή	68
3.1.1 Σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών	68
3.1.2 Κατασκευή των DNA κασετών	79
3.1.2.α Η Fab κασέτα	79
3.1.2.β Η scFv κασέτα	83
3.1.3 Η Περιοριστική Πέψη	86
3.1.3.α Η περιοριστική πέψη των Fab κασετών και του φαγεμιδίου pCES1	86
3.1.3.β Η περιοριστική πέψη των scFv κασετών και του φαγεμιδίου pCANTAB6	87
3.1.4 Η σύνδεση των κασετών με τους αντίστοιχους φορείς	87
3.1.5 Έλεγχος της απόδοσης του μετασχηματισμού και υπολογισμός του μεγέθους και της πολυπλοκότητας της βιβλιοθήκης	89
3.1.5.α Η βιβλιοθήκη των αντισωμάτων με μορφή Fab	89
3.1.5 β Η βιβλιοθήκη των αντισωμάτων με μορφή scFv	90
3.1.6 Έλεγχος της βιβλιοθήκης για την έκφραση αντισωμάτων	91
3.1.7 Επιλογή των βιβλιοθηκών με τον κατάλληλο αντιγονικό επίτοπο	93
3.1.7.α Η επιλογή της βιβλιοθήκης των αντισωμάτων με τη μορφή Fab	93
3.1.7.β Η επιλογή της βιβλιοθήκης των αντισωμάτων με τη μορφή scFv	94
Συζήτηση	95
<b>3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙ-MUC1 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΦΑΓΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ</b>	98
Εισαγωγή	98
3.2.1 Επιλογή των ανθρώπινων αντι-MUC1 αντισωμάτων	98
3.2.2 Ανίχνευση ειδικών κλώνων με την ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA)	99
3.2.3 Έλεγχος των κλώνων με PCR και ανάλυση γενετικού αποτυπώματος (DNA fingerprinting)	102
3.2.4 Ανάλυση των αντισωμάτων με ELISA ειδικότητας και ανταγωνιστικής παρεμπόδισης	104
3.2.5 Αλληλούχιση των γονιδίων των αντι-MUC1 αντισωμάτων	105
3.2.6 Ανάλυση της ειδικότητας μέσω του ανιχνευτή BIAcore	106
3.2.7 Προσδιορισμός του αντιγονικού επιτόπου	109
3.2.8 Η σύνδεση των αντισωμάτων σε κύτταρα και ιστούς.	109
Συζήτηση	114

<b>3.3 ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΑΝΤΙ-MUC1 SCFV 10Α ΣΕ ΜΕΤΑΛ- ΛΑΓΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ <i>E. COLI</i></b>	121
Εισαγωγή	121
3.3.1 Υπολογισμός της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford	122
3.3.2 Υπολογισμός της έκφρασης λειτουργικού αντισώματος με ELISA ειδικότητας	122
3.3.3 Ανάλυση με Western blot	123
Συζήτηση	124
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</b>	
<b>ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	127
<b>Βιβλιογραφία</b>	131
<b>Λεξιλόγιο αγγλικών όρων</b>	142
<b>Παράρτημα Α-Υλικά</b>	144
<b>Παράρτημα Β-Ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές</b>	148
<b>Παράρτημα Γ-Η στοίχιση scFvs – βλαστικών γονιδίων</b>	151

## Περίληψη στα ελληνικά

Στόχος της μελέτης ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ανθρώπινων ανασυνδυασμένων αντισωμάτων ειδικών για διάφορα μέλη της οικογένειας των ανθρώπινων βλεννινών. Οι γλυκοπρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό γλυκοσιλίωσης και μεγάλο μοριακό βάρος. Η υπερέκφραση τους σε καρκινικά κύτταρα σε συνδυασμό με την περιορισμένη γλυκοσιλίωση, καθιστά τις βλεννίνες και συγκεκριμένα τη MUC1 βλεννίνη, σημαντικούς καρκινικούς μάρτυρες. Για το σκοπό αυτό οργανώθηκε η μεθοδολογία, ώστε να αναπτυχθεί η τεχνολογία της παρουσίασης αντισωμάτων στην επιφάνεια βακτηριοφάγων (phage display). Η παρουσίαση αντισωμάτων και γενικότερα πεπτιδίων στην επιφάνεια του βακτηριοφάγου M13 είναι μια πολυδύναμη τεχνολογία που δίνει τη δυνατότητα επιλογής γονιδίων με βάση τις ιδιότητες των πολυπεπτιδικών αλυσίδων που αυτά κωδικοποιούν. Έτσι είναι δυνατό να κατασκευαστούν βιβλιοθήκες ανθρώπινων αντισωμάτων *in vitro*, οι οποίες στη συνέχεια επιλέγονται με τον κατάλληλο αντιγονικό επίτοπο.

Στα πλαίσια αυτής της τεχνολογίας κατασκευάστηκαν βιβλιοθήκες αντισωμάτων με τη μορφή Fab και scFv από ανθρώπινα B λεμφοκύτταρα τα οποία είχαν ανοσοποιηθεί *in vitro* με τις VNTR (μεταβαλλόμενος αριθμός επαναλήψεων της σταθερής πεπτιδικής περιοχής) περιοχές της MUC1 και της MUC2 βλεννίνης. Η ανοσοποίηση αποσκοπούσε στον εμπλουτισμό του κυτταρικού πληθυσμού σε B λεμφοκύτταρα που εκφράζουν αντισώματα ειδικά προς τον υπό μελέτη αντιγονικό επίτοπο. Η επιλογή των ανοσοποιημένων βιβλιοθηκών με συνθετικό 100μερές MUC1 πεπτίδιο (5 VNTR) και 46μερές MUC2 πεπτίδιο (2 VNTR) οδήγησε στην απομόνωση scFv και Fab αντισωμάτων μη ικανοποιητικής ανοσοσυγγένειας και ειδικότητας. Παράλληλα επιλέχθηκαν δύο βιβλιοθήκες ανθρώπινων αντισωμάτων (η μία ήταν παρθενική από υγιείς δότες και η άλλη από καρκινοπαθείς) με το 100μερές MUC1 και στην πρώτη περίπτωση απομονώθηκαν ανθρώπινα scFv αντισώματα ειδικά για τη VNTR περιοχή της MUC1 βλεννίνης. Η ειδικότητα τους επιβεβαιώθηκε με την ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA), τον βιοανιχνευτή BIAcore, την κυτταρομετρία ροής και την ανοσοϊστοχημεία. Η ειδικότητα των συγκεκριμένων αντισωμάτων τα καθιστά χρήσιμα εργαλεία για τη διάγνωση αλλά και τη θεραπευτική αντιμετώπιση διαφόρων τύπων καρκίνου που εκφράζουν την υπογλυκοσιλιωμένη μορφή της MUC1 βλεννίνης.

Η έκφραση του ανασυνδυασμένου αντι-MUC1 scFv αντισώματος με τη μεγαλύτερη συγγένεια, 10A, επιχειρήθηκε σε στελέχη *E. coli* που περιείχαν μεταλλαγές σε γονίδια περιπλασματικών πρωτεασών. Σκοπός ήταν να μελετηθεί η επίδραση της πρωτεολυτικής δράσης των περιπλασματικών πρωτεασών στην έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών, όπως τα ανασυνδυασμένα αντισώματα, που μεταφέρονται στον περιπλασματικό χώρο του βακτηρίου για να αναδιπλωθούν. Μελετήθηκαν τέσσερα στελέχη *E. coli* που περιείχαν διακριτούς συνδυασμούς μεταλλαγών στις βασικές περιπλασματικές πρωτεάσες *tsp*, *protease III*, *degP* και *ompT*. Οι περισσότερες πρωτεάσες που μελετήθηκαν δεν επηρεάζουν την έκφραση του αντισώματος, εκτός από την *ompT* που φάνηκε να σχετίζεται με την παρουσία ενός πρωτεολυτικού προϊόντος. Επίσης η παρουσία πολλών μεταλλαγών σε γονίδια πρωτεασών οδήγησε στην συσσώρευση μη λειτουργικού αντισώματος. Η κατανόηση της επίδρασης των περιπλασματικών πρωτεασών στην διαδικασία της έκφρασης αντισωμάτων στα βακτήρια θα



επιτρέψει το σχεδιασμό στελεχών *E. coli* που παρουσιάζουν βελτίωση στην έκφραση λειτουργικών αντισωμάτων.

## Περίληψη στα αγγλικά

The aim of the thesis was the isolation and characterization of human anti-MUC1 recombinant antibodies. MUC1 belongs to a family of high molecular weight glycoproteins (mucins), which are heavily glycosylated and are expressed by normal and malignant tissues. The tumor-associated antigen MUC1 is overexpressed and underglycosylated in human adenocarcinomas of diverse origin, such as breast, ovary and colon. The technology of phage display was used as a tool for the isolation of specific anti-MUC1 antibodies.

We constructed scFv and Fab antibody libraries by isolating RNA from human B cells which were immunized *in vitro* with the MUC1 and MUC2 VNTR peptide epitopes. The antibody libraries were selected with synthetic biotinylated MUC1 100mer peptide corresponding to five tandem repeats of the protein core and MUC2 46mer peptide corresponding to two tandem repeats of the protein core. The antibody molecules which were isolated, didn't present a satisfactory anti-MUC1 or anti-MUC2 specificity. Two other libraries were selected with the synthetic MUC1 peptide: one naïve scFv antibody library and one immunized Fab antibody library. In the first case, five human anti-MUC1 scFv antibodies were isolated. Two of them were highly specific for MUC1 as was analysed by ELISA, flow cytometry, BIAcore and immunohistochemistry. The best scFv molecule, 10A, appeared to distinguish normal cells from adenocarcinoma cells, which makes it an important candidate for use in antibody-based tumor targeting.

Finally we investigated whether four *E. coli* strains that were deficient in the periplasmic proteases *tsp*, protease III, *degP*, *ompT*, in different combinations, affect the expression levels of the best anti-MUC1 scFv antibody fragment, 10A. The *ompT* protease appeared to be involved in partial degradation of the scFv since degradation products were observed in all *ompT* unmutated strains in Western blotting, whereas such products were absent in the *ompT* mutated strains. The HM120 strain that contained most mutations, expressed the antibody fragment efficiently but the level of functional antibody activity was low. This was probable due to an accumulation of incorrectly folded antibody molecules in the periplasm as it was characterized by low enzyme immunoassay reactions in contrast to the intense staining of the tag in Western blots. The better understanding of the periplasmic protease involvement in the process of the antibody expression in bacteria may allow us to design host *E. coli* strains that are more efficient in producing functional antibodies.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## **1.1. ΓΕΝΙΚΑ**

### **1.1.1 Η συνεχής και ανελέητη πάλη - Το ανοσιακό σύστημα**

Ο βασικός νόμος που κυριαρχεί στην κοινωνία των οργανισμών είναι η συνεχής και ανελέητη πάλη για την επιβίωση. Ο άνθρωπος σπλισμένος με τη δύναμη της λογικής κατάφερε να οικοδομήσει ένα θαυμαστό πολιτισμό και παράλληλα να δαμάσει την ίδια τη φύση, ανατρέποντας κανόνες και φραγμούς προς όφελος του. Ωστόσο ως μέλος αυτής της κοινωνίας δεν μπορεί να ξεφύγει από τον παραπάνω νόμο που καθορίζει τις σχέσεις των οργανισμών μέσα στη φύση. Οι εχθροί μπορεί να είναι ορατοί, εφόσον ανήκουν στον μακρόκοσμο ή αόρατοι δια γυμνού οφθαλμού και γι' αυτό πιο επικίνδυνοι, εάν ανήκουν στον μικρόκοσμο. Το ανθρώπινο όμως σώμα δεν είναι αβοήθητο και αδύναμο απέναντι σ' αυτή τη σκληρή πραγματικότητα. Εκατομμύρια χρόνια εξελικτικής πορείας είχαν σαν αποτέλεσμα τον εξοπλισμό του μ' ένα σύνολο αμυντικών μηχανισμών και την ανάπτυξη ενός περίτεχνου και θαυμαστού συστήματος που συμβάλλει καταλυτικά στην επιβίωση του οργανισμού ενάντια στους απειλητικούς εισβολείς. Το ανοσιακό σύστημα είναι επομένως ένα σύνολο από ιστούς, κύτταρα και μόρια του οποίου η βασική λειτουργία είναι η διατήρηση της δομικής και λειτουργικής σταθερότητας του οργανισμού (ομοιόσταση) μέσω της καταπολέμησης των εξωτερικών μολυσματικών παραγόντων. Η ικανότητα του οργανισμού να αντιστέκεται στις μολύνσεις περιγράφεται με τον όρο ανοσία και διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: στη φυσική ή μη ειδική και στην επίκτητη ή ειδική ανοσία.

### **1.1.2 Η φυσική ανοσία**

Η φυσική ανοσία είναι η πιο πρωτόγονη –εξελικτικά- μορφή ανοσίας που επιτρέπει τη μη ειδική αντιμετώπιση οποιουδήποτε εισβολέα. Υπάρχει ανεξάρτητα από την έκθεση του οργανισμού σε ξένες ουσίες και δεν χαρακτηρίζεται από βελτιωμένη δράση σε περίπτωση επαναλαμβανόμενων μολύνσεων. Συνιστάται από:

- ◆ φυσικά εξαρτήματα του σώματος που λειτουργούν σαν ασπίδα προστασίας όπως το δέρμα και οι βλεννογόνοι.
- ◆ περιοδεύοντα μόρια όπως το σύστημα του συμπληρώματος.
- ◆ κύτταρα όπως τα φαγοκύτταρα (μακροφάγα, πολυμορφοπύρρηνα) και τα NK κύτταρα.
- ◆ διαλυτές ουσίες όπως πρωτεολυτικά ένζυμα.

### **1.1.3 Η επίκτητη ανοσία**

Η επίκτητη ανοσία είναι ένα “αναμνηστικό” σύστημα όπου σε δεύτερη έκθεση του οργανισμού στο παθογόνο, η αντίδραση είναι πιο άμεση και ισχυρότερη. Ενεργοποιείται μετά την έκθεση του οργανισμού σε μια ξένης προέλευσης ουσία, το αντιγόνο. Τα βασικά χαρακτηριστικά της επίκτητης ανοσίας που τη διακρίνουν από τη φυσική είναι:

- η ειδικότητα: η ανοσολογική απάντηση είναι ειδική ενάντια στο συγκεκριμένο αντιγόνο που την προκάλεσε. Παράλληλα το ανοσιακό σύστημα “εκπαιδεύεται” έτσι ώστε να αναγνωρίζει τα δικά του αντιγόνα ως “εαυτό” και να μην αναπτύσσει ανοσολογική απάντηση εναντίον τους (ανοχή).
- η μνήμη: η ανοσολογική απάντηση παρουσιάζει βελτίωση μετά από επαναλαμβανόμενη έκθεση στο συγκεκριμένο αντιγόνο.

Το αντιγόνο παρουσιάζεται από τα κύτταρα-αντιγονοπαρουσιαστές (μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα) στους βασικούς συντελεστές της ανοσολογικής απάντησης, δηλαδή στα λεμφοκύτταρα που διακρίνονται σε Β και Τ. Αυτά κυκλοφορούν μέσα στα δύο βασικά υγρά του σώματος, το αίμα και τη λέμφο και εγκαθίστανται στους λεμφικούς ιστούς που αποτελούν το λεγόμενο λεμφικό σύστημα. Η επίκτητη ανοσία διακρίνεται σε κυτταρική η οποία αναπτύσσεται μέσω των Τ λεμφοκυττάρων και σε χυμική μέσω των αντισωμάτων που παράγονται από τα Β λεμφοκύτταρα. Τα αντισώματα αποτελούν τα βασικά συστατικά της χυμικής ανοσολογικής απάντησης επειδή παρουσιάζουν ειδικότητα ενάντια σε ένα συγκεκριμένο αντιγονικό επίτοπο. Γι' αυτό το λόγο βρίσκουν σημαντικές εφαρμογές στη διάγνωση και θεραπεία ασθενειών. Η πιο βασική χρήση των αντισωμάτων αφορά στον εντοπισμό και στη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου, αφού λόγω της φύσης τους μπορούν να επιτρέψουν την εξειδικευμένη καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, αφήνοντας ανέπαφο τον φυσιολογικό ιστό.

## 1.2. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

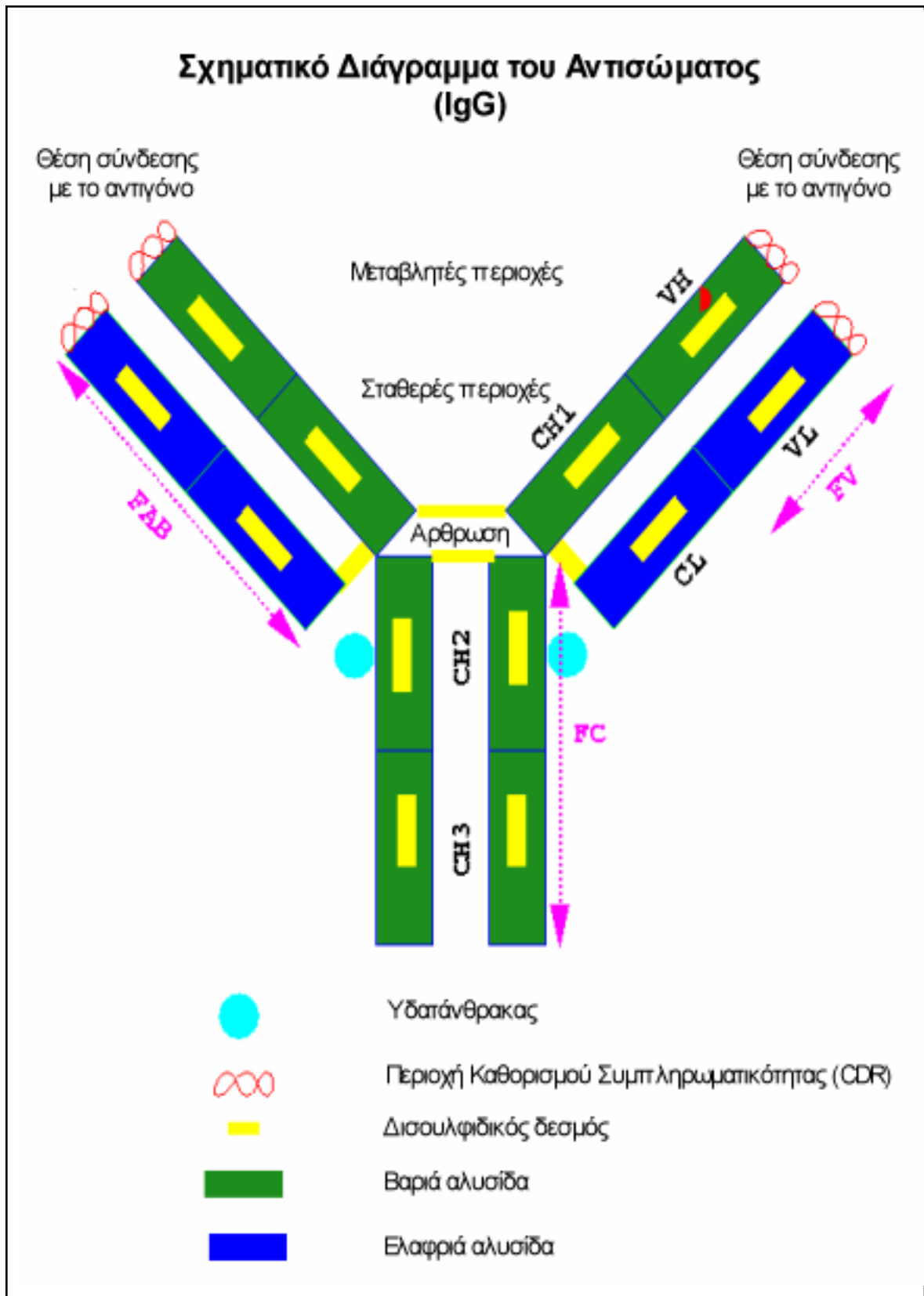
### 1.2.1 Δομή

Τα αντισώματα είναι πρωτεϊνικά μόρια και αποτελούνται από δύο όμοιες βαριές [H] και δύο όμοιες ελαφριές [L] αλυσίδες (Εικόνα 1.2.1). Οι αλυσίδες αυτές παραμένουν συνδεδεμένες χάρη στην παρουσία δισουλφιδικών δεσμών έτσι ώστε το μόριο να αποκτά ένα χαρακτηριστικό Y σχήμα. Τα αντισώματα διακρίνονται σε πέντε τάξεις (IgM, IgD, IgG, IgA, IgE) ανάλογα με τον τύπο της βαριάς αλυσίδας (μ, δ, γ, α, ε). Σε μερικά είδη οι τάξεις των ανοσοσφαιρινών διακρίνονται σε υποτάξεις, προσθέτοντας ένα ακόμα επίπεδο ποικιλομορφίας στη δομή αυτών των μορίων. Συγκεκριμένα στον άνθρωπο τα IgG αντισώματα χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 και τα IgA σε δύο: IgA1 και IgA2, ανάλογα με το γονίδιο που επιλέγεται να εκφραστεί (γ1, γ2, γ3, γ4 και α1, α2). Επίσης υπάρχουν δύο τύποι ελαφριών αλυσίδων, κ και λ. Κάθε βαριά αλυσίδα αποτελείται από ένα μεταβλητό τμήμα [VH] και τρία ή τέσσερα σταθερά τμήματα [CH] ανάλογα με την τάξη στην οποία ανήκει το αντίσωμα. Κάθε ελαφριά αλυσίδα αποτελείται από ένα μεταβλητό [VL] και ένα σταθερό [CL] τμήμα. Τα μεταβλητά τμήματα της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας συνιστούν τη θέση σύνδεσης με το αντίστοιχο αντιγόνο, εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία και αποτελούν καθένα χωριστά το Fv κομμάτι του αντισώματος. Τα μεταβλητά τμήματα της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας μαζί με το [CH1] και το [CL] αντίστοιχα συνιστούν τα κομμάτια Fab. Τα υπόλοιπα σταθερά τμήματα των δύο βαριών αλυσίδων αποτελούν το Fc κομμάτι του μορίου που σχετίζεται με την βιολογική δράση του αντισώματος.

Στις αρχές της δεκαετίας του '70 οι Wu και Kabat σύγκριναν τις αμινοξικές ακολουθίες των μεταβλητών τμημάτων των ανοσοσφαιρινών και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν περιοχές οι οποίες εμφανίζουν μεγαλύτερη ποικιλομορφία. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα κάθε μεταβλητό τμήμα να χωρίζεται σε τρεις υπερμεταβλητές περιοχές, τις "περιοχές καθορισμού συμπληρωματικότητας" ή CDR περιοχές (Complementarity Determining Region), οι οποίες περιβάλλονται από FR περιοχές-πλαίσια (Framework Region) που παρουσιάζουν σχετική συντήρηση (**Chothia et al., 1992-Tomlinson et al., 1995-Williams et al., 1996**). Υπάρχουν τρία CDRs και τέσσερις περιοχές-πλαίσια σε κάθε βαριά και σε κάθε ελαφριά αλυσίδα αντίστοιχα. Κάθε υπερμεταβλητή περιοχή σχηματίζει μια θηλιά (L1, L2, L3 για την ελαφριά και H1, H2, H3 για την βαριά αλυσίδα) η οποία συνδέεται με την επόμενη μέσω β-πτυχωτών δομών που δημιουργούνται από τις συντηρημένες περιοχές πλαίσια (FR1, FR2, FR3, FR4). Τα περισσότερα αμινοξέα του μορίου της ανοσοσφαιρίνης που έρχονται σε επαφή με το αντιγόνο βρίσκονται στις CDR περιοχές. Αυτές είναι επομένως που καθορίζουν την αντιγονική ειδικότητα του μορίου και τον βαθμό πρόσδεσης που ονομάζεται ανοσοσυγγένεια.

Η χαρακτηριστική δομή των αντισωμάτων παρουσιάζει συντήρηση μεταξύ των διαφόρων ειδών και διευκολύνει την τροποποίηση τους μέσω της γενετικής και πρωτεϊνικής μηχανικής. Συγκεκριμένα είναι δυνατή η αλλαγή των Fc περιοχών, οι CDR περιοχές μπορούν να μεταμοσχευτούν από το ένα αντίσωμα στο άλλο με σκοπό την μεταφορά της ικανότητας σύνδεσης με ένα αντιγόνο κ.α. Επίσης μπορούν να παραχθούν μόρια που διαθέτουν μόνο ικανότητα πρόσδεσης με κάποιο αντιγονι-

## Σχηματικό Διάγραμμα του Αντισώματος (IgG)



Εικόνα 1.2.1 Η δομή του αντισώματος. Οι μεταβλητές περιοχές (VH, VL) αποτελούν το Fv τμήμα, ενώ μαζί με

τις σταθερές περιοχές (CH1 και CL) αποτελούν το Fab τμήμα του αντισώματος. Οι υπόλοιπες σταθερές περιοχές της βαριάς αλυσίδας συνιστούν την Fc ουρά του αντισώματος.



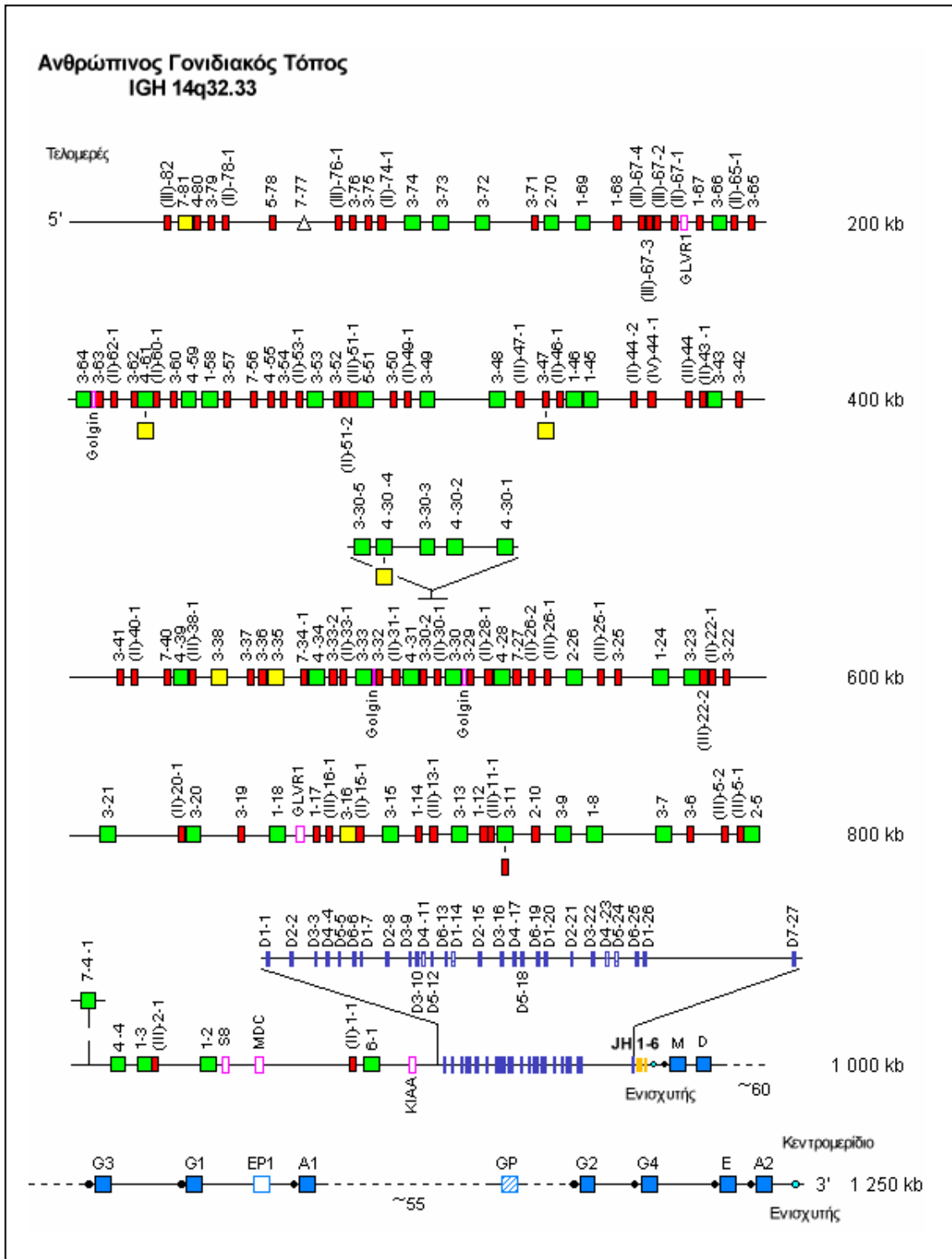
κό επίτοπο και αυτά περιλαμβάνουν τα Fab, τα F(ab')<sub>2</sub>, τα μονής αλυσίδας scFvs, τα διπλής ειδικότητας scFvs (diabodies) (Εικόνα 1.3.2).

## 1.2.2 Η ποικιλομορφία των αντισωμάτων και τα γονίδια τους

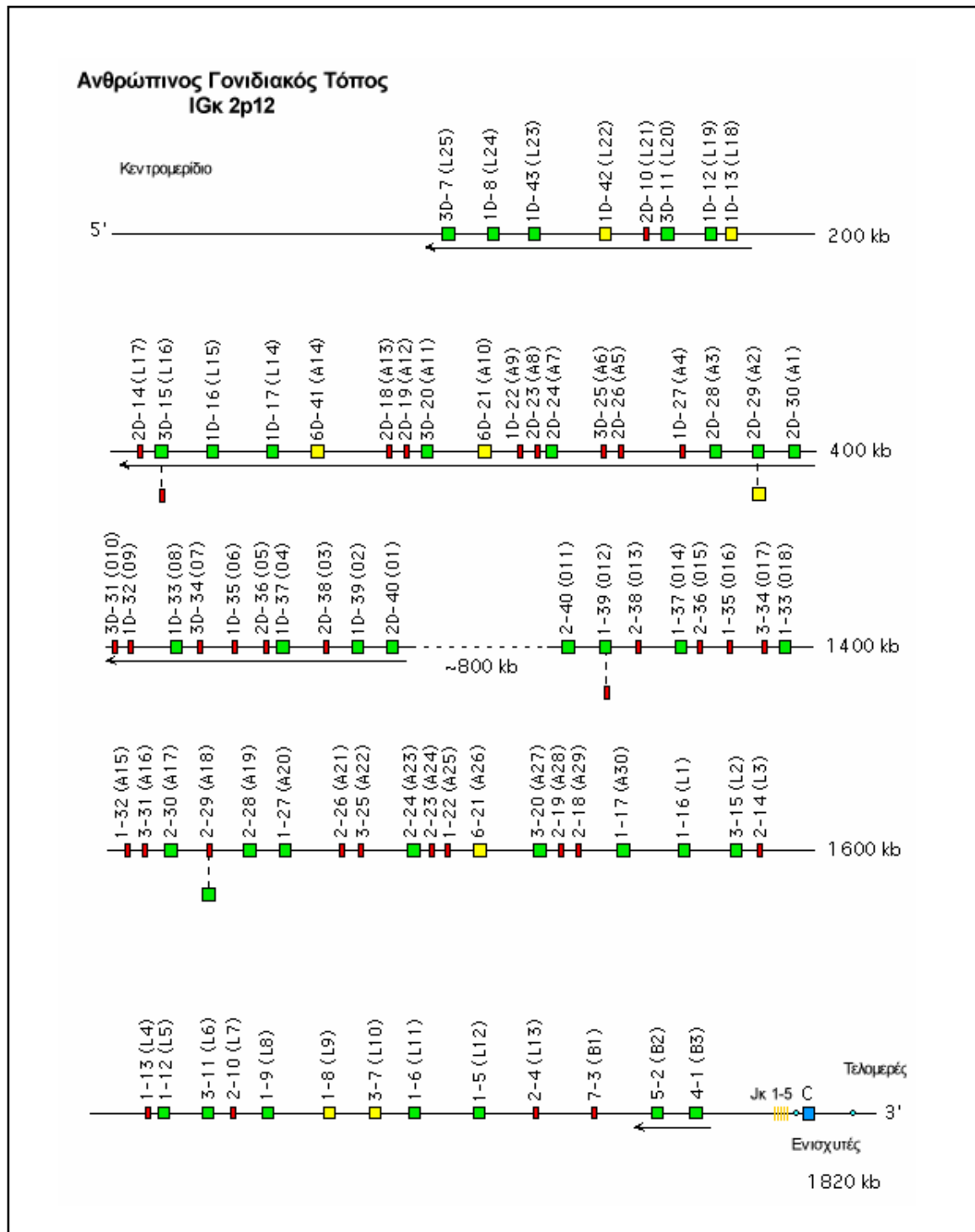
Αν και ένα μέρος της ετερογένειας των αντισωμάτων προκύπτει από τις διαφορετικές τάξεις και υποτάξεις τους, το βασικό κομμάτι της είναι αποτέλεσμα της εξαιρετικά πολυμορφικής φύσης των μεταβλητών τμημάτων των αντισωμάτων. Υπολογίζεται ότι ο συνολικός αριθμός των διακριτών μεταβλητών περιοχών, δηλαδή των διαφορετικών αντιγονικών θέσεων σύνδεσης που μπορεί να δημιουργηθεί στα Β λεμφοκύτταρα ενός ανθρώπου, ξεπερνάει τα 10 εκατομμύρια. Η ποικιλομορφία των μεταβλητών περιοχών των ανοσοσφαιρινών οδηγεί στην ποικιλομορφία της ειδικότητάς τους, η οποία καθορίζεται με συγκεκριμένους μοριακούς μηχανισμούς κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των Β λεμφοκυττάρων. Κάθε ώριμο Β λεμφοκύτταρο κωδικοποιεί μόνο ένα συγκεκριμένο αντίσωμα. Αν όλα τα αντισώματα κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, τότε περισσότερο από το 1/3 του ανθρώπινου γονιδιώματος θα ήταν απαραίτητο για την παραγωγή τους (**Abbas et al.,1994**). Φυσικά κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει. Κάθε Β λεμφοκύτταρο διαθέτει DNA που αποτελείται από ομάδες γονιδιακών τμημάτων τα οποία ανασυνδυάζονται τυχαία ώστε να δημιουργηθούν τα λειτουργικά γονίδια που κωδικοποιούν τις μεταβλητές περιοχές των βαριών και ελαφριών αλυσίδων. Συγκεκριμένα στον άνθρωπο οι VH περιοχές δημιουργούνται από την συναρμολόγηση των V<sub>H</sub>, D, και J<sub>H</sub> τμημάτων ενώ οι VL περιοχές από την συναρμολόγηση των V<sub>K</sub>, J<sub>K</sub> τμημάτων για τις κ αλυσίδες και των V<sub>λ</sub> J<sub>λ</sub> τμημάτων για τις λ αλυσίδες (Εικόνα 1.2.2). Τα επιμέρους γονίδια από κάθε τμήμα συνδέονται με σωματικό ανασυνδυασμό και δημιουργούν την λεγόμενη συνδυαστική ποικιλομορφία (combinatorial diversity). Επιπλέον η προσθήκη ή η αφαίρεση νουκλεοτιδίων στις θέσεις σύνδεσης δημιουργεί διαφορετικές αμινοξικές ακολουθίες και συμβάλει ακόμα περισσότερο στην ποικιλομορφία (junctional diversity). Εξάλλου σε πρωτεϊνικό επίπεδο κάθε βαριά αλυσίδα μπορεί να συνδυαστεί με κάθε ελαφριά αλυσίδα. Το σύνολο αυτών των διαδικασιών έχουν σαν αποτέλεσμα την δημιουργία 10<sup>9</sup>-10<sup>11</sup> διαφορετικών μορίων από τα οποία μπορεί να επιλεγεί το καταλληλότερο σε μια επικείμενη πρωτογενή ανοσολογική απάντηση (**Abbas et al.,1994**).

Επιπλέον κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απάντησης, η δημιουργία σωματικών μεταλλαγών έχει σαν αποτέλεσμα την βελτίωση της συγγένειας πρόσδεσης με το αντιγόνο και όπως είναι φανερό συνεισφέρει ακόμα περισσότερο στην ποικιλομορφία των αντισωματικών μορίων. Οι σωματικές μεταλλάξεις συμβαίνουν μετά από την αντιγονική διέγερση και εντοπίζονται κυρίως στις CDR περιοχές των μεταβλητών τμημάτων ενώ έχει παρατηρηθεί ότι μεταλλάξεις στις περιοχές-πλαίσια μπορούν να συμβάλλουν, σε μικρότερο βαθμό, στην αύξηση της ανοσοσυγγένειας (**Foote et al.,1992**). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν πρόσφατες θεωρίες οι οποίες προτείνουν ότι τα αντισώματα που παράγονται κατά την ανοσολογική απάντηση παρουσιάζουν ανώτατα όρια σ' ότι αφορά στην ανοσοσυγγένεια τους εξαιτίας του επιλεκτικού μηχανισμού των Β λεμφοκυττάρων. (**Foote et al., 1995**). Αυτό σημαίνει ότι είναι δυνατή η παραγωγή αντισωμάτων *in vitro* με μεγαλύτερη συγγένεια από αυτή που επιτρέπει ο παραπάνω *in vivo* περιορισμός.

A)



B)

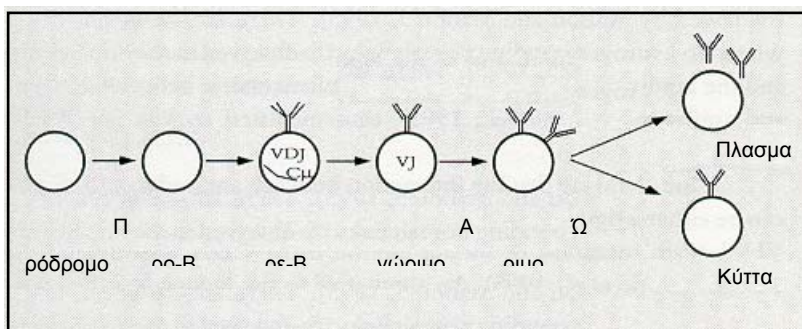




### 1.2.3 Β Λεμφοκύτταρα-Τα κέντρα παραγωγής των αντισωμάτων

Τα αντισώματα παράγονται *in vivo* από τα Β λεμφοκύτταρα. Στο αναπτυσσόμενο έμβρυο τα κύτταρα μεταναστεύουν από το συκώτι στο μυελό των οστών όπου αποτελούν τα πρόδρομα κύτταρα τα οποία στη συνέχεια περνάνε από διάφορα στάδια ωρίμανσης μέχρι την ανάπτυξη του ώριμου Β λεμφοκυττάρου (Εικόνα 1.2.3). Στο μυελό των οστών τα κύτταρα δημιουργούν αντιγονοειδικά επιφανειακά αντισώματα (IgM και IgD). Στη συνέχεια τα παρθένα Β λεμφοκύτταρα που δεν έχουν έρθει ακόμα σε επαφή με το αντιγόνο, μπαίνουν στην κυκλοφορία και ταξιδεύουν μέσα στο αίμα και στη λέμφο προς τους ιστούς και τα διάφορα λεμφικά όργανα. Κάθε ένα από αυτά τα κύτταρα έχει διαφορετικό αντίσωμα στην επιφάνεια του, δηλαδή διαθέτει διαφορετική ειδικότητα. Επιπλέον από τη στιγμή που θα δημιουργήσει το επιφανειακό IgM μόριο, το Β λεμφοκύτταρο έχει τη δυνατότητα να φτιάξει διαφορετικής τάξης αντισώματα (αλλαγή ισότυπου), τα οποία ωστόσο διατηρούν την ίδια αντιγονική ειδικότητα. Μ' άλλα λόγια η Fab περιοχή παραμένει αμετάβλητη ενώ η Fc που καθορίζει την τάξη του αντισώματος αλλάζει. Από τη στιγμή που ένα παρθένο Β λεμφοκύτταρο έρθει σε επαφή με το αντίστοιχο αντιγόνο μια σειρά από σημαντικά γεγονότα λαμβάνουν χώρα μέσα στο σώμα:

- ενεργοποίηση του Β λεμφοκυττάρου
- αλληλεπίδραση των Β και Τ λεμφοκυττάρων
- μετανάστευση των Β λεμφοκυττάρων στα βλαστικά κέντρα
- διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα
- έκκριση αντισωμάτων από τα πλασματοκύτταρα και αλλαγή ισότυπου
- δημιουργία Β κυττάρων μνήμης

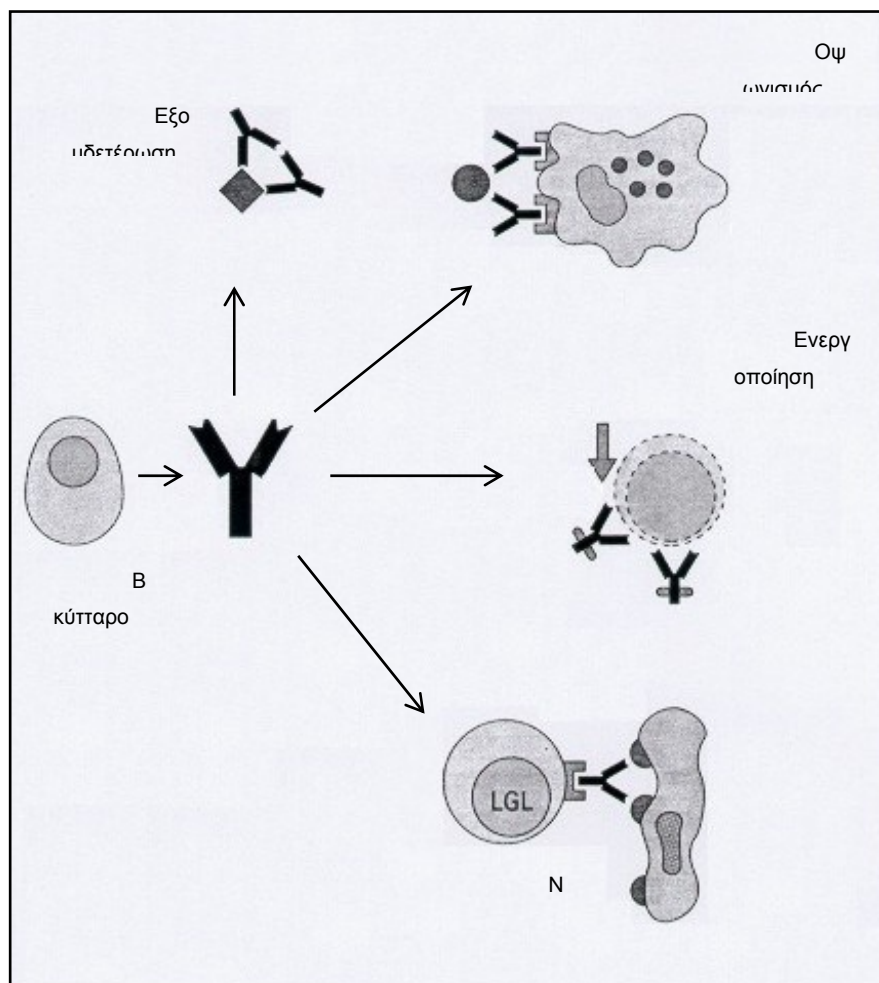


Εικόνα 1.2.3 Η διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων

Κατά τη διάρκεια της αντιγονικής διέγερσης, στα πρωτογενή θυλάκια των λεμφικών οργάνων (λεμφαδένες, σπλήνα) εμφανίζονται περιοχές όπου βρίσκονται Τ και Β κύτταρα που πολλαπλασιάζονται συνεχώς (κλωνική επέκταση), καθώς και πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα. Τα κύτταρα αυτά μαζί με τα δένδρικά (αντιγόνο-παρουσιαστές) σχηματίζουν εστίες που είναι γνωστές ως βλαστικά κέντρα. Τα βλαστικά κέντρα παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των Β κυττάρων μνήμης.

Η αναγνώριση και η σύνδεση με το αντιγόνο επιτρέπει στα αντισώματα να επιτελέσουν κάποια από τις παρακάτω λειτουργίες, ανάλογα με το τμήμα Fc που διαθέτουν (Εικόνα 1.2.4):

- ♦ τον οψωνισμό .Πρόκειται για μια διαδικασία όπου βακτήρια και μολυσμένα από ιούς κύτταρα σημαίνονται με σκοπό την καταστροφή. Το ρόλο των σημάτων τον παίζουν τα αντισώματα τα οποία συνδέονται μέσω του τμήματος Fab στον αντιγονικό επίτοπο και μέσω του τμήματος Fc στον αντίστοιχο υποδοχέα στην επιφάνεια φαγοκυττάρων όπως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Η σύνδεση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την φαγοκύτωση και καταστροφή του ανοσοσυμπλόκου.
- ♦ την ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Αυτή η λειτουργία επιτελείται κυρίως από τα IgG και IgM μόρια και έχει σαν αποτέλεσμα την εξουδετέρωση του στόχου, δηλαδή τη λύση του κυττάρου.
- ♦ την εξουδετέρωση τοξινών και τοξικών οργανισμών.
- ♦ την εξουδετέρωση μικροοργανισμών και κυττάρων με το μηχανισμό της κυτταρο-μεσολαβητικής κυτταροτοξικότητας που εξαρτάται από αντισώματα (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC), στον οποίο παίρνουν μέρος τα NK κύτταρα.

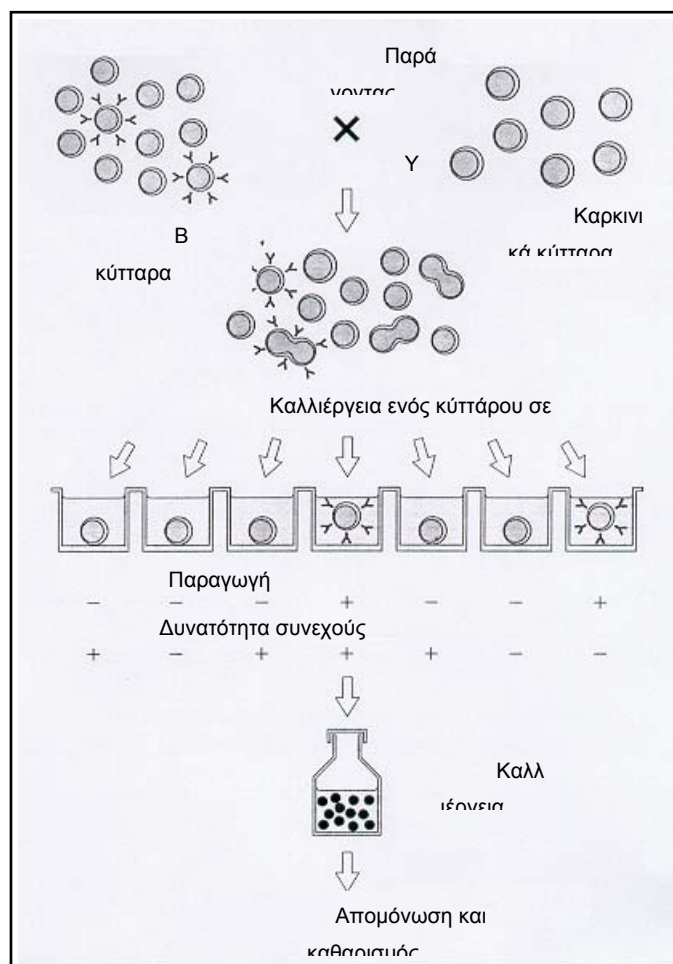


Εικόνα 1.2.4 Ο ρόλος του αντισώματος

## 1.3. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ-ΤΑ ΕΡΓΑΛΕΙΑ

### 1.3.1 Γενικά

Μια τυπική ανοσολογική απόκριση ενάντια σε κάποιο εισβολέα, έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μιας ποικιλίας ανοσοσφαιρινικών μορίων διαφόρων συγγενειών πρόσδεσης και ειδικοτήτων για τους επίτοπους που βρίσκονται στο αντιγονικό μόριο. Τα αντισωματικά μόρια που κατευθύνονται ενάντια σ' ένα συγκεκριμένο αντιγονικό επίτοπο, αποτελούν μόνο μια μικρή μερίδα της δεξαμενής των παραγόμενων αντισωμάτων που συνιστούν τον πολυκλωνικό αντιπόρο. Η αποτελεσματικότητα αυτών των μορίων στην ανοσολογική απάντηση ποικίλλει. Έτσι αν επιλεγεί το αντίσωμα με την μεγαλύτερη ανοσοσυγγένεια και υπάρχει η δυνατότητα να κατασκευαστεί ένας μονοκλωνικός αντιπόρος, η αποτελεσματικότητά του στην θεραπευτική διαδικασία θα είναι η μέγιστη. Παράλληλα ο αντιπόρος θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς και ερευνητικούς σκοπούς.



Εικόνα 1.3.1 Η τεχνολογία των υβριδωμάτων

Σήμερα, είναι δυνατή η παραγωγή αντισωμάτων με μία ειδικότητα τα οποία βρίσκουν σημαντικές εφαρμογές στην έρευνα και την κλινική ιατρική και ονομάζονται μονοκλωνικά. Τα μόρια αυτά παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον γιατί μιμούνται τον φυσικό ρόλο που παίζουν τα αντισώματα μέσα στο σώμα ενώ δεν παρουσιάζουν τοξικότητα.

Τα πρώτα μονοκλωνικά αντισώματα παράχθηκαν στα ποντίκια (**Kohler et al., 1975**) και απομονώθηκαν με τη τεχνολογία των υβριδωμάτων (Εικόνα 1.3.1). Σύμφωνα με αυτή λεμφοκύτταρα από ένα ανοσοποιημένο ποντίκι, αναμειγνύονται με κύτταρα μυελώματος παρουσία κάποιου παράγοντα σύντηξης (πολυαιθυλενική γλυκόλη, PEG). Τα λεμφοκύτταρα υβριδίζονται με τα κύτταρα του μυελώματος και αθανατοποιούνται. Στη συνέχεια χωρίζονται σε καλλιέργειες, έτσι ώστε σε κάθε πηγάδι να μπει ένα κύτταρο και οι καλλιέργειες που προκύπτουν ελέγχονται για την παραγωγή ειδικού αντισώματος. Τα μονοκλωνικά αντισώματα που προκύπτουν, έχουν τρωκτική προέλευση γι' αυτό το λόγο αναγνωρίζονται σαν ξένα από τους ασθενείς και οδηγούν στην ανάπτυξη ανθρώπινων αντιπρωκτικών απαντήσεων (HAMA-Human Anti-Mouse Antibody Response). Οι τεχνικές δυσκολίες καθώς και οι ηθικοί φραγμοί σ' ότι αφορά στην "κατά παραγγελία" ανοσοποίηση των ανθρώπων έχουν παρεμποδίσει την ανάπτυξη ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων με την διαδικασία της σύντηξης κυττάρων. Έτσι στην προσπάθεια δημιουργίας μονοκλωνικών αντισωμάτων που μοιάζουν περισσότερο με τα ανθρώπινα, ώστε να μην προκαλούν την ανάπτυξη ανεπιθύμητης ανοσολογικής αντίδρασης, οι επιστήμονες οδηγήθηκαν στην παραγωγή χιμαιρικών και ανθρωποποιημένων αντισωματικών μορίων (Εικόνα 1.3.2). Τα μόρια αυτά παρουσιάζουν περιορισμένη ή απουσία HAMA απάντησης. Βέβαια η δημιουργία εξολοκλήρου ανθρώπινων αντισωμάτων θα είχε σαν αποτέλεσμα την εξάλειψη παρόμοιων ανοσολογικών απαντήσεων και γι' αυτό το λόγο τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί μεγάλη σημασία στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών όπως είναι η παρουσίαση αντισωμάτων στην επιφάνεια βακτηριοφάγων (phage display) και παραγωγή αντισωμάτων σε διαγονιδιακά ποντίκια.

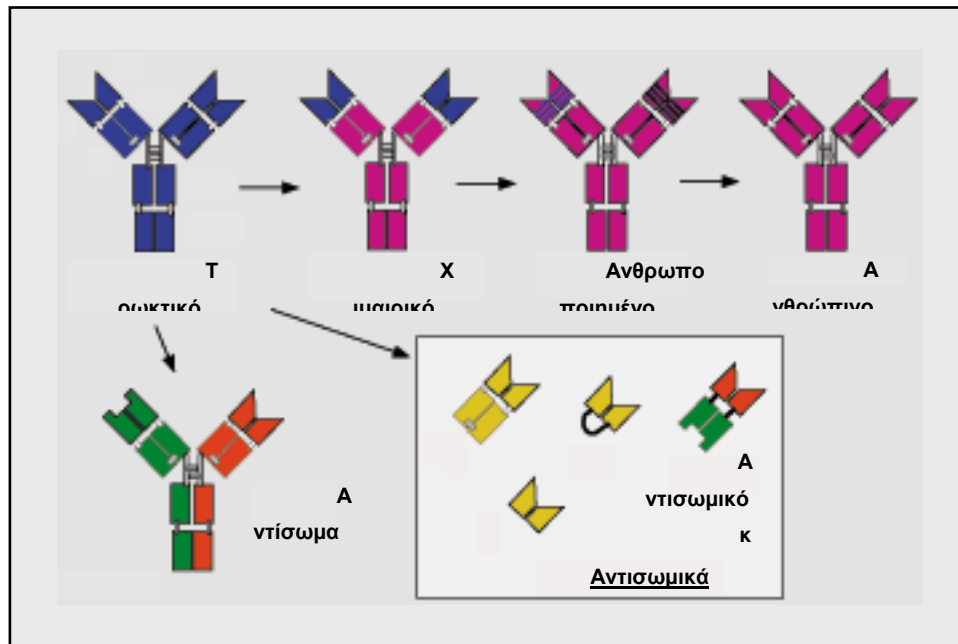
### **1.3.2 Χιμαιρικά και ανθρωποποιημένα αντισώματα**

Όπως ήδη έχει αναφερθεί το βασικό μειονέκτημα των ποντικίσων αντισωμάτων είναι ότι αναγνωρίζονται σαν ξένα από τους ασθενείς. Στην προσπάθεια επίλυσης αυτού του προβλήματος αρχικά κατασκευάστηκαν τα χιμαιρικά αντισώματα, στα οποία οι ποντικίσες σταθερές περιοχές [CH] αντικαταστάθηκαν από τις αντίστοιχες ανθρώπινες (**Neuberger et al., 1984**). Η κλινική εφαρμογή αυτών των μορίων έδειξε ότι παρουσιάζουν μειωμένη ανοσογονικότητα σε σχέση με τα αρχικά, ωστόσο πάνω από το 50% των ασθενών εμφανίζουν ανοσολογική απόκριση ενάντια στις ποντικίσες μεταβλητές περιοχές μετά από επαναλαμβανόμενες δόσεις (**Elliott et al., 1994**).

Όταν οι επιστήμονες διαπίστωσαν ότι οι θέσεις σύνδεσης με το αντιγόνο εμφανίζουν ομολογία στα διαφορετικά είδη, οδηγήθηκαν στην δημιουργία των ανθρωποποιημένων αντισωμάτων, όπου μόνο οι CDR περιοχές δεν έχουν ανθρώπινη προέλευση (**Riechmann et al., 1988**). Ωστόσο στην πορεία αποδείχτηκε ότι ήταν απαραίτητη η εισαγωγή μη ανθρώπινων αμινοξικών ακολουθιών στις περιοχές-πλαίσια με σκοπό την αποκατάσταση της συγγένειας πρόδεσης, η οποία εμφάνιζε



σημαντική ελάττωση στα μόρια αυτά. Έτσι τα πρώτα πειράματα δημιουργίας ανθρωποποιημένων αντισωμάτων βασίζονται σε ανθρώπινες μεταβλητές περιοχές, γνωστής κρυσταλλικής δομής, με



Εικόνα 1.3.2 Η μετάβαση από τα τρωκτικά αντισώματα στα χιμαιρικά, στα ανθρωποποιημένα και στα εξολοκλήρου ανθρώπινα αντισώματα. Τα ανασυνδυασμένα αντισωμακιά κομμάτια Fv, scFv, Fab, scFv διπλής ειδικότητας (diabodies).

σκοπό τον εντοπισμό συγκεκριμένων θέσεων στις περιοχές-πλαίσια που συνεισφέρουν στη σύνδεση με το αντιγόνο (**Padlan et al., 1994**). Μια άλλη προσέγγιση είναι ο εντοπισμός ανθρώπινων μεταβλητών περιοχών που εμφανίζουν ομολογία με την ξένη μεταβλητή περιοχή και ακολούθως η κατασκευή μοντέλων στον υπολογιστή ώστε να επιλεχθούν οι θέσεις στις περιοχές-πλαίσια που πρέπει να αλλαχθούν. Αν και η συγκεκριμένη τεχνολογία μπορεί να αποδειχτεί αρκετά επιτυχής, ωστόσο εμφανίζει μια σειρά πρακτικών περιορισμών:

- ♦ απαιτείται συνήθως λεπτομερής γνώση της δομής του αντισώματος.
- ♦ πρέπει να διατηρηθεί η συγγένεια πρόσδεσης με το αντιγόνο, χωρίς ωστόσο την ανάπτυξη ανοσογονικότητας εξαιτίας της μετατροπής συγκεκριμένων θέσεων σε ξένες.
- ♦ το ποντικίσιο αντίσωμα της απαιτούμενης ειδικότητας πρέπει να έχει ήδη δημιουργηθεί.
- ♦ η επιλογή του κατάλληλου αντισώματος περιορίζεται από τη δυναμική του ποντικίσιου ανοσολογικού συστήματος.

### 1.3.3 Ανθρώπινα αντισώματα από διαγονιδιακά ποντίκια

Η τεχνολογία των διαγονιδιακών ποντικίων δίνει τη δυνατότητα να παραχθούν εξολοκλήρου ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα (**Bruggemann et al., 1996-Jakobovits et al., 1995**). Περιλαμβάνει δύο *in vivo* γενετικές διαδικασίες: την απενεργοποίηση των ποντικίσιων

αντισωματικών γονιδίων και ακολούθως την εισαγωγή των μη ανασυνδυασμένων γονιδιακών τόπων των ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών. Αυτό σημαίνει ότι μεγάλα τμήματα των παραπάνω γονιδιακών τόπων πρέπει να εισαχθούν μέσα στην ποντικίσια βλαστική σειρά. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται τα τεχνητά χρωμοσώματα των μυκήτων (yeast artificial chromosomes, YACs), τα οποία δίνουν τη δυνατότητα κλωνοποίησης μεγάλων κομματιών που μπορούν να υπερβούν το 1Mb σε μήκος. Το βασικό πλεονέκτημα του διαγονιδιακού συστήματος είναι ότι παράγονται ολόκληρα μονοκλωνικά αντισώματα και όχι κομμάτια του μορίου. Βέβαια η τεχνολογία αυτή παραμένει στενά συνδεδεμένη με τη διαδικασία της ανοσοποίησης και η ειδικότητα όπως και η συγγένεια των παραγόμενων αντισωμάτων είναι συνάρτηση της ανοσολογικής απάντησης του διαγονιδιακού ποντικίου.

### **1.3.4 Ανθρώπινα αντισώματα στην επιφάνεια φάγων (phage display)**

Η παρουσίαση αντισωμάτων στην επιφάνεια φάγων με τη μορφή Fab ή scFv περιγράφεται για πρώτη φορά το 1990 (McCafferty *et al.*, 1990) και τα πρώτα ανθρώπινα αντισώματα δεν αργούνε να δημιουργηθούν (Winter *et al.*, 1994). Η χρήση της σημαντικής αυτής τεχνολογίας προϋποθέτει την κατασκευή μιας βιβλιοθήκης όπου αντιπροσωπεύεται το σύνολο των ανθρώπινων αντισωμάτων μετά από *in vitro* ανασυνδυασμό των επιμέρους γονιδιακών τμημάτων. Τα ανασυνδυασμένα αντισώματα παρουσιάζονται στην επιφάνεια φάγων και με τη χρήση κατάλληλων τεχνικών επιλογής απομονώνεται το μόριο εκείνο που εμφανίζει συγγένεια πρόσδεσης με τον κατάλληλο αντιγονικό επίτοπο. Εκτός από το γεγονός ότι τα αντισώματα που απομονώνονται είναι εξολοκλήρου ανθρώπινα, εφόσον η βιβλιοθήκη περιέχει ανθρώπινα γονίδια, ένα βασικό πλεονέκτημα της τεχνολογίας αυτής είναι η ταχύτητα με την οποία επιτυγχάνεται η απομόνωση. Η επιλογή μιας βιβλιοθήκης με το κατάλληλο αντιγόνο και η απομόνωση των αντίστοιχων αντισωματικών μορίων μπορεί να διαρκέσει 1-2 βδομάδες. Μάλιστα με την βελτίωση των τεχνικών μοριακής βιολογίας έχει επιτευχθεί η δημιουργία βιβλιοθηκών όπου αντιπροσωπεύεται ένας μεγάλος αριθμός αντισωμάτων της τάξης των  $10^{10}$  διαφορετικών μορίων. Επιπλέον η δυναμική του συστήματος είναι τέτοια ώστε παρέχεται η δυνατότητα βελτίωσης της ανοσοσυγγένειας με την εφαρμογή μοριακών τεχνικών, αφού παράλληλα με την απομόνωση του πρωτεϊνικού μορίου επιτυγχάνεται η απομόνωση των ανασυνδυασμένων γονιδιακών τμημάτων του.

Η τεχνολογία της παρουσίασης στην επιφάνεια φάγων ξεπερνάει τον περιορισμό της ανοσολογικής απάντησης και της ανοσογονικότητας του αντιγονικού επιτόπου. Η ειδικότητα και η συγγένεια του απομονωμένου αντισώματος είναι συνάρτηση μιας ελεγχόμενης επιλεκτικής διαδικασίας. Γι'αυτό το λόγο είναι δυνατή η απομόνωση αντισωμάτων ενάντια σε αντιγόνα που θεωρούνται παραδοσιακά "δύσκολα", όπως γλυκοσυλιόμενοι επίτοποι, τοξικές ενώσεις και άλλα. Ανάλογα η τεχνολογία αυτή δίνει τη δυνατότητα να απομονωθούν αντισώματα ενάντια σε συστατικά του ίδιου του οργανισμού (αυτοαντισώματα), καθώς και αντισώματα κατά ποικίλων καρκινικών αντιγόνων, η σημασία των οποίων είναι προφανής στη διάγνωση και στη θεραπεία.

Τα πρώτα ανθρώπινα αντισώματα που απομονώθηκαν με τη χρήση της παραπάνω τεχνολογίας έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί κλινικά για την θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (αντι-TNFα) και της οφθαλμικής ινωμάτωσης (αντι-TGFβ) (**CAT assay, 1997**). Η χρήση των αντισωμάτων αυτών υποδηλώνει την ισχυρή δυναμική των αντισωματικών βιβλιοθηκών που παρουσιάζονται στην επιφάνεια φάγων.

## 1.4. Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΦΑΓΩΝ-ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

### 1.4.1 Γενικά-Η αρχή

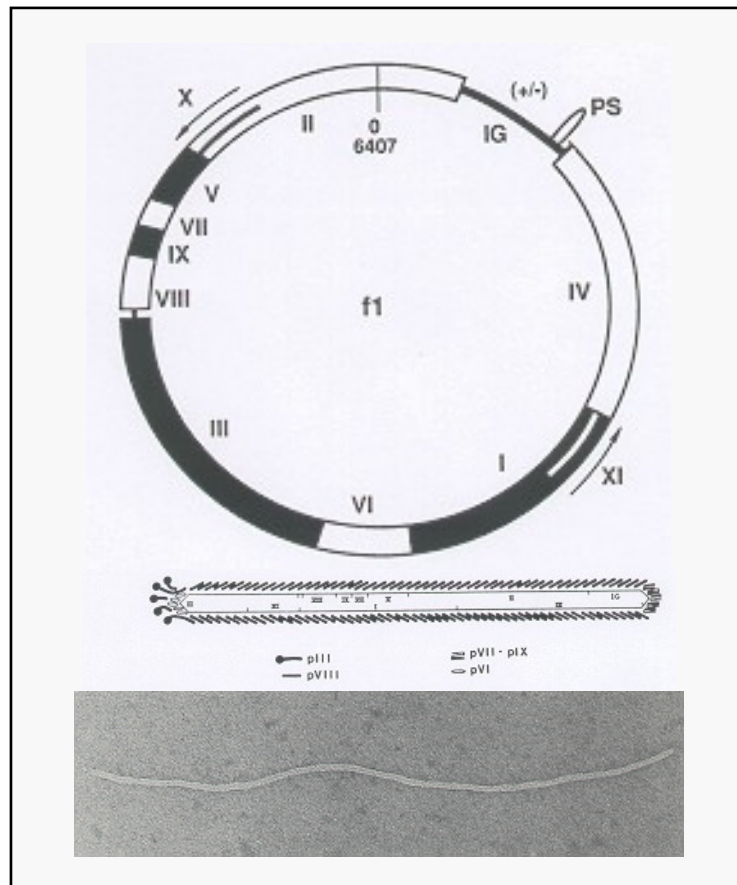
Η παρουσίαση διαφόρων πρωτεϊνών ή πεπτιδίων στην επιφάνεια φάγων αποτελεί μια πολυδύναμη τεχνολογία παρουσίασης βιβλιοθηκών που περιέχουν εκατομμύρια ή στην καλύτερη περίπτωση δισεκατομμύρια διαφορετικά πεπτίδια ή πρωτεΐνες. Η τεχνική αυτή περιγράφηκε στα μέσα της δεκαετίας του '80 (**Smith et al., 1985**) και βασίζεται στη βιολογία των νηματοειδών φάγων που χρησιμοποιούν σαν ξενιστή το βακτήριο *E.coli*. Μια από τις πιο σημαντικές εφαρμογές του συστήματος είναι η απομόνωση αντισωμάτων από μεγάλες αντισωματικές βιβλιοθήκες φάγων. Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στην ανάπτυξη τεχνικών για τη δημιουργία μεγάλων βιβλιοθηκών και στην οργάνωση αποδοτικών επιλεκτικών μεθόδων με σκοπό την απομόνωση ειδικών αντισωμάτων ενάντια σε ένα συγκεκριμένο αντιγονικό επίτοπο.

Συγκεκριμένα DNA που κωδικοποιεί εκατομμύρια διαφορετικά πρωτεϊνικά μόρια-δεσμευτές όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, ή πρωτεϊνικά τμήματα (αντισωματικά κομμάτια) κλωνοποιείται στο φαγικό γονιδίωμα σαν τμήμα του γονιδίου που κωδικοποιεί μια από τις πρωτεΐνες του καλύμματος του φάγου (pIII, pVI, ή pVIII). Κατά την έκφραση, η υβριδική πρωτεΐνη του καλύμματος ενσωματώνεται στα νέα ιοσωμάτια που σχηματίζονται μέσα στο βακτήριο (**Parmley et al., 1988**). Μ' αυτό τον τρόπο το πρωτεϊνικό μόριο-δεσμευτής παρουσιάζεται στην επιφάνεια του φάγου και συγχρόνως το γενετικό υλικό του βρίσκεται στο εσωτερικό του ιοσωματίου. Έτσι επιτυγχάνεται, η σύνδεση ανάμεσα στο γονότυπο και το φαινότυπο του πρωτεϊνικού μορίου. Με την επιλογή της βιβλιοθήκης με το κατάλληλο αντιγόνο-στόχο εμπλουτίζονται οι ειδικοί φάγοι. Εκείνοι που παρουσιάζουν τον ειδικό δεσμευτή συγκρατούνται ενώ οι μη ειδικοί απομακρύνονται με διαδοχικούς κύκλους πλουσίματος. Οι συνδεδεμένοι φάγοι μπορούν να ανακτηθούν, να μολύνουν νέα βακτήρια και να πολλαπλασιαστούν για επόμενο κύκλο επιλογής. Τελικά αναλύονται οι κλώνοι που προκύπτουν κυρίως με ανοσοενζυμικές τεχνικές (ELISA) με σκοπό την απομόνωση των ειδικών. Η επιτυχία του συστήματος λοιπόν εξαρτάται από τον επιτυχημένο συνδυασμό δύο διαδικασιών: την κατασκευή μιας αντιπροσωπευτικής φαγικής βιβλιοθήκης και τη χρησιμοποίηση της κατάλληλης επιλεκτικής μεθόδου.

### 1.4.2 Η βιολογία του νηματοειδούς βακτηριοφάγου

Οι νηματοειδείς βακτηριοφάγοι που κυρίως χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία αυτή, είναι ο f1, ο fd και ο M13 (Εικόνα 1.4.1). Έχουν μακριές, λεπτές δομές μήκους 1-2μm και διαμέτρου 2-7nm (**Glucksman et al., 1992**). Το μήκος του ιοσωματίου εξαρτάται από το μέγεθος του γονιδιώματος, το οποίο είναι ένα κυκλικό μονόκλωνο μόριο DNA μήκους 6400 βάσεων περίπου και περιλαμβάνει 10 γονίδια (**Beck et al., 1981**). Ένα μικρό τμήμα του γονιδιώματος δεν κωδικοποιεί

γονίδια και αποτελεί την διαγονιδιακή περιοχή IG (intergenic region). Εκεί βρίσκεται η θέση έναρξης της αντιγραφής και το σήμα για το πακετάρισμα (mos μορφογενετικό σήμα, PS).



Εικόνα 1.4.1 Α) Το γονιδίωμα του βακτηριοφάγου f1. Β) Σχηματική αναπαράσταση του ισωματίου όπου φαίνονται οι πρωτεΐνες του περιβλήματος. Γ) Ηλεκτρονική μικρογραφία του φάγου.

Οι νηματοειδείς φάγοι μπορούν να μολύνουν στελέχη του βακτηρίου *E.coli*, τα οποία περιέχουν το επίσωμα F. Στο επίσωμα αυτό βρίσκονται γονίδια που κωδικοποιούν τις λάχνες F (F pili). Τα ισωμάτια συνδέονται στην άκρη των F pili και το φαγικό γονιδίωμα εισέρχεται μέσα στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου (**Jacobson, 1972**). Ακολουθεί ο λυτικός κύκλος όπου το γονιδίωμα αντιγράφεται με τη συμμετοχή φαγικών και βακτηριακών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες του καψιδίου μεταφέρονται στο περίπλασμα όπου τα νέα ισωμάτια πακετάρονται και απελευθερώνονται στο θρεπτικό μέσο χωρίς να σκοτώνουν ή να παρεμποδίζουν την διαίρεση του βακτηρίου. Η πρωτεΐνη του καλύμματος που κυρίως χρησιμοποιείται για τη σύντηξη με το μόριο-δεσμευτή είναι η pIII, η οποία παρουσιάζεται στην άκρη του φάγου σε 3-5 αντίγραφα ανά ισωμάτιο και ενέχεται στη διαδικασία μόλυνσης του βακτηρίου. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελείται από δύο λειτουργικά τμήματα, μήκους 200 αμινοξέων περίπου το καθένα: ένα εκτεθειμένο αμινοτελικό τμήμα που συνδέεται με το F pilus προκαλώντας τη μόλυνση αλλά δε συμμετέχει στο πακετάρισμα και ένα καρβοξυτελικό κομμάτι που είναι τμήμα του καλύμματος και εισέρχεται στο εσωτερικό του καψιδίου (**Crissman et al., 1984**). Το

αμινοτελικό κομμάτι προκαλεί επίσης το χάσιμο των F pilii από το μολυσμένο κύτταρο. Μ' αυτό το τρόπο παρεμποδίζεται η είσοδος άλλων φάγων στο ήδη μολυσμένο βακτήριο. Τα μολυσμένα κύτταρα που βρίσκονται σε έντονη αυξητική φάση, παράγουν περίπου 100 φάγους ανά κύτταρο και μια καλλιέργεια που παραμένει στη στατική φάση για μερικές ώρες παρουσιάζει ένα τίτλο  $10^{12}$  rfu/ml (plaque forming units/ml). Ο συνολικός αριθμός των φάγων είναι τουλάχιστον διπλάσιος από των αριθμό των rfu's, ενώ οι μολυσματικοί φάγοι αποτελούν το 4-5%.

### **1.4.3 Παράγωγα των νηματοειδών βακτηριοφάγων**

#### **1.4.3.α Φαγικοί φορείς κλωνοποίησης**

Πολλοί φαγικοί φορείς που χρησιμοποιούνται στη μοριακή βιολογία και τη τεχνολογία της παρουσίασης στην επιφάνεια φάγων είναι παράγωγα των M13 και fd, όπως ο fd-CAT1 (McCafferty *et al.*, 1990), ο fd-tet-DOG (Hoogenboom *et al.*, 1991) κ.α. Φυσικά είναι τροποποιημένοι ώστε να περιέχουν χρήσιμες περιοριστικές θέσεις και κατάλληλους μάρτυρες επιλογής όπως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Τα μολυσμένα βακτήρια μεγαλώνουν και σχηματίζουν αποικίες στα τρυβλία με το αντίστοιχο αντιβιοτικό. Σ' αυτή την περίπτωση οι φάγοι τιτλοδοτούνται μετρώντας τις αποικίες αντί τις πλάκες, οπότε αναφερόμαστε σε cfu μονάδες (colony forming units) αντί σε rfu. Καθώς το μήκος του κλωνοποιημένου τμήματος μεγαλώνει, η ανάπτυξη των μολυσμένων βακτηρίων και η παραγωγή των φάγων τείνει να μειωθεί. Γι' αυτό το λόγο όταν κατασκευάζονται βιβλιοθήκες πρέπει να δοθεί προσοχή ώστε να μη χαθούν οι κλώνοι εκείνοι που τείνουν να αναπτύσσονται με βραδύτερο ρυθμό. Ο ανταγωνισμός στην ανάπτυξη μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με τη χρήση τρυβλίων για το μεγάλωμα των κλώνων.

#### **1.4.3.β Φαγεμίδια**

Πρόκειται για πλασμίδια που περιέχουν την διαγονιδιακή περιοχή IG του νηματοειδή φάγου, ένα μη ιικό σημείο έναρξης της αντιγραφής και κάποιο γονίδιο ανθεκτικότητας σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό (Vieira *et al.*, 1987). Επίσης τα πλασμίδια αυτά περιέχουν το γονίδιο μιας από τις πρωτείνες του ιικού καλύμματος ώστε να παρέχεται η δυνατότητα κλωνοποίησης του πρωτεϊνικού μορίου-δεσμευτή στην άκρη της ιικής πρωτεΐνης. Όταν ένα κύτταρο που περιέχει το φαγεμίδιο μολυνθεί από ένα φάγο-βοηθό, παράγονται ισοσώματα τα οποία παρουσιάζουν στην επιφάνεια τους ένα μείγμα πρωτεϊνών άγριου τύπου (από το γονίδιο στον φάγο-βοηθό) και πρωτεϊνών συνδεδεμένων με το κλωνοποιημένο μόριο-δεσμευτή.(από το υβριδικό γονίδιο δεσμευτή-ιικής πρωτεΐνης στο φαγεμίδιο) Ο φάγος-βοηθός παρέχει όλα τα ιικά γονίδια, ενώ φέρει κάποιες μεταλλαγές που έχουν σαν αποτέλεσμα να μην μπορεί να αντιγραφεί αποδοτικά. Έτσι το γονιδίωμα του φαγεμιδίου πακετάρεται και εκκρίνεται πιο αποτελεσματικά από το γονιδίωμα του φάγου-βοηθού. Φυσικά οι ιοί με το φαγεμίδιο μπορούν εύκολα να διακριθούν γιατί προσδίδουν αντίσταση στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, στα βακτηριακά κύτταρα τα οποία μολύνουν.

Το μέγεθος της βιβλιοθήκης περιορίζεται κυρίως από την απόδοση μετασχηματισμού (transformation efficiency) των αντιγραφικών μορφών (replication forms, RFs) των νηματοειδών φάγων. Τα φαγεμίδια θεωρούνται καταλληλότεροι φορείς κλωνοποίησης για την κατασκευή μεγάλων βιβλιοθηκών, γιατί παρουσιάζουν αρκετά μεγαλύτερη απόδοση μετασχηματισμού σε σχέση με το DNA του φάγου. Προς την κατεύθυνση αυτή, η μέθοδος που χρησιμοποιείται κυρίως είναι ο ηλεκτρομετασχηματισμός (**Zabarovsky et al., 1990**). Τα κύτταρα που υπόκεινται στη διαδικασία αυτή παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες αποδόσεις μετασχηματισμού που μπορούν να επιτευχθούν: έως και  $10^{10}$  αποικίες/μg DNA.

#### **1.4.4 Μεθοδολογία της παρουσίασης**

##### **1.4.4.α Παρουσίαση πολυπεπτιδικών αλυσίδων στην pVIII**

Η pVIII βρίσκεται στο κάλυμμα του φάγου σε 2700 αντίγραφα. Αυτό σημαίνει ότι τα κλωνοποιημένα γονίδια που είναι συνδεδεμένα με το γονίδιο της pVIII στο γονιδίωμα του φάγου θα δώσουν 2700 αντίγραφα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Όμως υπό αυτές τις συνθήκες το μεγαλύτερο πεπτίδιο που μπορεί να παρουσιαστεί είναι μήκους 6 αμινοξέων. Γι' αυτό το λόγο έχουν χρησιμοποιηθεί φαγεμίδια για έκφραση πεπτιδίων συνδεδεμένων με την pVIII ώστε να μειωθούν τα αντίγραφα της υβριδικής pVIII λόγω της παρουσίας πρωτεΐνης του άγριου τύπου. Η πρωτεΐνη αυτή προέρχεται από την έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου στον φάγο-βοηθό, ο οποίος χρησιμοποιείται για την παραγωγή των ιοσωματίων. Το αυξημένο σθένος (valence) της pVIII παρουσιάζει πλεονεκτήματα σε πειράματα όπου ο στόχος είναι πρωτεΐνες-δεσμευτές χαμηλής συγγένειας.

##### **1.4.4.β Παρουσίαση πολυπεπτιδικών αλυσίδων στην pIII**

Οι πιο επιτυχημένες κατασκευές περιέχουν το γονίδιο της pIII γιατί δίνει τη δυνατότητα σύνδεσης και παρουσίασης μεγαλύτερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων χωρίς να παρεμποδίζεται η λειτουργία τους. Επίσης η πρωτεΐνη αυτή υπάρχει σε λίγα αντίγραφα στην επιφάνεια του φάγου γεγονός που επιτρέπει την παρουσίαση λιγότερων αντιγράφων του πρωτεϊνικού μορίου-δεσμευτή. Έτσι η μικρότερη σθενική συγγένεια (avidity) των ιοσωματίων επιτρέπει την επιλογή μορίων υψηλότερης συγγένειας. Συντήξεις έχουν πραγματοποιηθεί στο αμινοτελικό άκρο της pIII (**Hoogenboom et al., 1991**) ή σε μικρότερα τμήματα της χωρίς να έχει αναφερθεί διαφορά σ' ότι αφορά στην απόδοση της παρουσίασης ή στη μολυσματικότητα των φάγων (**Barbas et al., 1991**). Όταν όμως αντικαθίσταται ολόκληρο το πρώτο τμήμα της pIII (1-198aa) με μια εξωγενή ακολουθία παρατηρείται σημαντική μείωση της μολυσματικότητας του φάγου. Γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η παρουσία της pIII του άγριου τύπου η οποία εκφράζεται είτε από ένα δεύτερο γονίδιο III στον φορέα, είτε από το γονιδίωμα του φάγου-βοηθού.

## 1.4.5 Η βασική μεθοδολογία παρουσίασης αντισωμάτων

### 1.4.5.α Φάγοι ή Φαγεμίδια;

Τα αντισώματα είναι οι πρώτες πρωτεΐνες που παρουσιάστηκαν με επιτυχία στην επιφάνεια των φάγων (**McCafferty et al., 1990**) (Εικόνα 1.1.8). Αυτό επιτεύχθηκε με την σύνδεση της κωδικής ακολουθίας των αντισωματικών μεταβλητών περιοχών [VH, VL] στο αμινοτελικό άκρο της pIII. Ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε ένας φαγικός φορέας που προήλθε από το γονιδίωμα του βακτηριοφάγου fd-tet (**Zacher et al., 1980**). Τα γονίδια που κωδικοποιούν ένα αντισωματικό scFv κομμάτι κλωνοποιήθηκαν ανάμεσα στην ακολουθία-σινιάλο και την κωδική ακολουθία του γονιδίου gIII. Η ακολουθία-σινιάλο φυσιολογικά κατευθύνει την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη στο περίπλασμα όπου γίνεται το πακετάρισμα των ιοσωματίων. Εκεί οι [VH] και [VL] περιοχές διπλώνουν και σταθεροποιούνται με μια ενδομοριακή δισουλφιδική γέφυρα, ώστε να σχηματίσουν ένα λειτουργικό scFv μόριο (**Skerra et al., 1988-Better et al., 1988**). Από τότε αναπτύχθηκαν και άλλες δομές αντισωματικών μορίων όπως είναι τα Fab μόρια (**Garrard et al., 1991**), τα Fvs που περιέχουν ένα ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό για τη σταθεροποίηση του [VH-VL] ζεύγους (**Brinkmann et al., 1995**) και τα diabodies (**Holliger et al., 1993**).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι φαγικοί φορείς έχουν χαμηλή απόδοση μετασχηματισμού όταν συγκριθούν με τα φαγεμίδια, τα οποία επιτρέπουν 100 φορές μεγαλύτερες αποδόσεις (**Sambrook et al., lab manual**). Οι υψηλές αποδόσεις μετασχηματισμού είναι απαραίτητες όταν κατασκευάζονται μεγάλες βιβλιοθήκες όπως ρεπερτόρια αντισωματικών γονιδίων.

Εξάλλου η κλωνοποίηση σε φαγεμίδια επιτρέπει στον αριθμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που παρουσιάζονται στο ιοσωμάτιο να εμφανίζει ποικιλία. Όταν χρησιμοποιείται ένας φαγικός φορέας, όλα τα αντίγραφα του γονιδίου gIII εκφράζονται σαν συντήξεις αφού αποτελούν την μόνη πηγή της pIII στο κύτταρο. Από την άλλη πλευρά η έκφραση από φαγεμίδια και η μόλυνση των βακτηριακών κυττάρων από φάγο-βοηθό π.χ. τον M13K07 οδηγούν στη δημιουργία φάγων που παρουσιάζουν ένα μείγμα πρωτεϊνών pIII του άγριου τύπου που προέρχεται από τον φάγο-βοηθό και ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών pIII που προέρχονται από το φαγεμίδιο. Η αναλογία αυτού του μείγματος στο περίπλασμα μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη συγκέντρωση του ισοπροπυλθειογαλακτοσιδίου (IPTG), το οποίο ενεργοποιεί την έκφραση από τον lac υποκινητή. Αυτός ο υποκινητής χρησιμοποιείται κυρίως για τον έλεγχο της μεταγραφής των κλωνοποιημένων γονιδίων στους διάφορους τύπους φαγεμιδίων. Βέβαια η πλειονότητα των pIII είναι του άγριου τύπου ανεξάρτητα από τα επίπεδα έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Κι αυτό γιατί όταν μέσα σε ένα κύτταρο βρίσκονται δύο εκδόσεις ενός γονιδίου, εκείνη του άγριου τύπου και εκείνη του ανασυνδυασμένου/μεταλλαγμένου, παρατηρείται επιλεκτική έκφραση του μη μεταλλαγμένου γονιδίου. Όταν προσπαθεί κανείς να επιλέξει ένα υψηλής συγγένειας αντίσωμα τότε είναι χρήσιμο αν όχι απαραίτητο, να εκφράζεται ένα αντίγραφο αυτού του μορίου ανά ιοσωμάτιο. Έτσι παρεμποδίζεται η πιθανή συνεπιλογή φάγων που παρουσιάζουν πολλά αντίγραφα ενός χαμηλότερης συγγένειας



αντισωμικού μορίου και γι' αυτό το λόγο εμφανίζουν παρόμοια σθενική συγγένεια με εκείνους οι οποίοι φέρουν το υψηλής συγγένειας μόριο στην επιφάνεια τους.

Η χρήση των φαγεμιδίων επιτρέπει την έκφραση διαλυτού αντισώματος εκτός από την ανασυνδυασμένη μορφή του μορίου. Πολλοί φορείς-φαγεμίδια έχουν προκύψει από το φαγεμίδιο puc119, το οποίο βασίζεται στο πλασμίδιο puc19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). Συνήθως χρησιμοποιούν τον lacZ υποκινητή για τον έλεγχο της έκφρασης των ανασυνδυασμένων αντισωμάτων με την pIII. Παραδείγματα τέτοιων φορέων μερικοί από τους οποίους χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι οι: pHEN-1 (Hoogenboom *et al.*, 1991), pCANTAB-6 (McCafferty *et al.*, 1994) και pCES-1 (Haard *et al.*, 1999). Ο pHEN-1 επιτρέπει την κλωνοποίηση των αντισωμικών γονιδίων σαν Sfil-NotI κομμάτια στο 5' άκρο του γονιδίου της pIII και περιέχει ένα amber κωδικόνιο λήξης μεταξύ του γονιδίου που κωδικοποιεί το αντίσωμα και του γονιδίου της pIII. Τα παραγόμενα ανασυνδυασμένα αντισωμικά μόρια μεταφέρονται στο περίπλασμα χάρη στην παρουσία του πεπτιδίου-σήματος pelB. Επιτρέπει έτσι την παραγωγή του αντισώματος σε διαλυτή μορφή σε μη κατασταλτικά στελέχη της *E.coli* όπως το HB2151, χωρίς να απαιτείται η κλωνοποίηση του σε άλλο φορέα έκφρασης. Επιπλέον η επαγωγή της έκφρασης με IPTG σε κατασταλτικά στελέχη όπως το TG1 και το XL1Blue οδηγεί σε γρήγορη κατανάλωση του sup-tRNA (tRNA που μεταφέρει το αμινοξύ το οποίο αντιστοιχεί στο amber κωδικόνιο), με αποτέλεσμα εκτός από την παραγωγή του συντηγμένου αντισωμικού μορίου-pIII να δημιουργείται διαλυτό αντίσωμα. Το αντίσωμα που παράγεται με τον παραπάνω τρόπο σε κατασταλτικά βακτηριακά στελέχη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση με διάφορες μεθόδους όπως την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA αλλά όταν απαιτείται μεγάλης κλίμακας παραγωγή με σκοπό τον καθαρισμό του αντισωμικού μορίου τότε επιβάλλεται η χρήση μη κατασταλτικών βακτηριακών στελεχών. Η δυνατότητα αυτή που παρέχουν τα φαγεμίδια, δηλαδή η παραγωγή ανασυνδυασμένου και διαλυτού αντισώματος από το ίδιο στέλεχος ανάλογα με την ρύθμιση του lacZ υποκινητή αποτελεί ένα σημαντικό πρακτικό πλεονέκτημα της χρήσης τους.

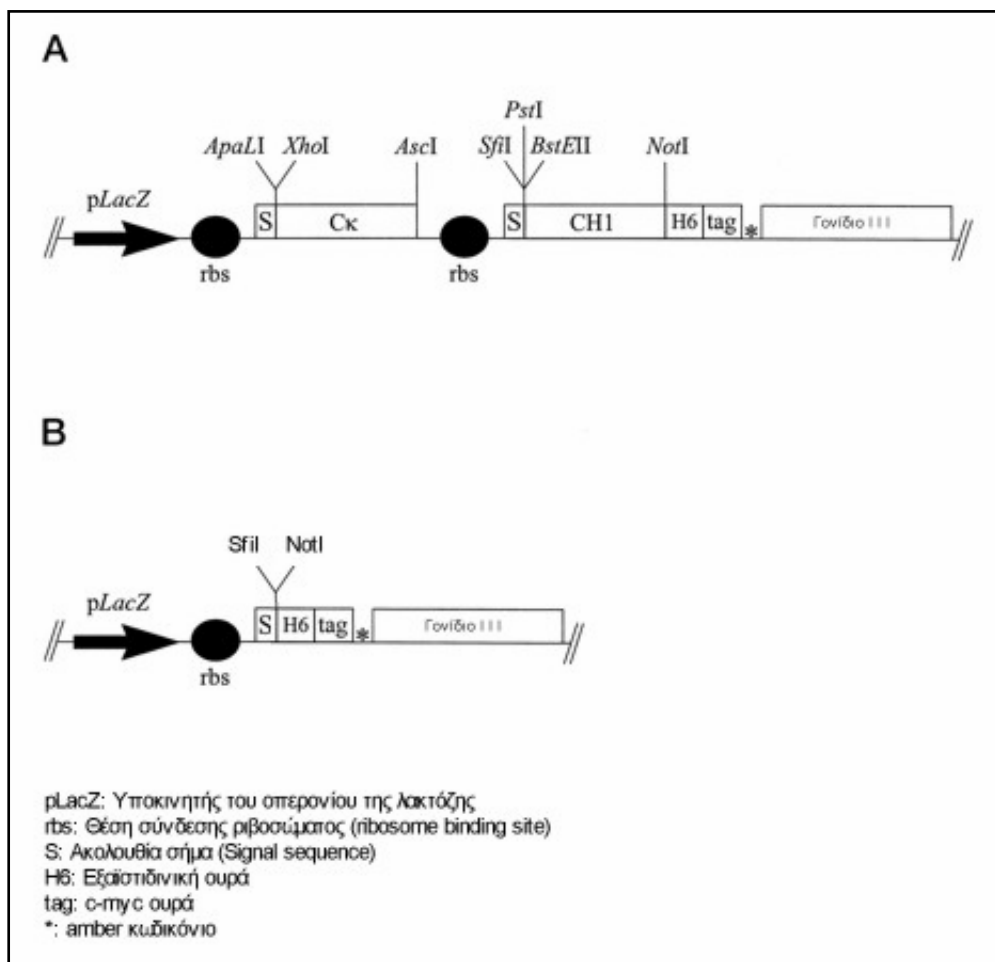
Η χρήση των φαγεμιδίων μπορεί να συγκεντρώνει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τους φάγους παρουσιάζει όμως και μια σειρά από βασικά χαρακτηριστικά τα οποία πρέπει να ληφθούν υπόψη. Συγκεκριμένα η παρουσία του γονιδίου της pIII σε ένα πλασμίδιο που παρουσιάζει υψηλά επίπεδα αντιγραφής (multicopy plasmid) μπορεί να αποβεί μοιραία για το βακτηριακό κύτταρο, σε περίπτωση απορύθμισης της έκφρασης της pIII. Επομένως είναι απαραίτητη η καταστολή της έκφρασης της, όταν δεν χρειάζεται για κάποιο συγκεκριμένο σκοπό όπως στην περίπτωση της μόλυνσης των κυττάρων με τον φάγο-βοηθό, ώστε να παραχθούν οι φάγοι με το αντισωμικό μόριο στην επιφάνεια τους. Γι' αυτό το λόγο τα βακτηριακά κύτταρα που επιλέγονται σαν ξενιστές πρέπει να είναι lacI<sup>q</sup>, δηλαδή να περιέχουν το γονίδιο του καταστολέα του οπερονίου της λακτόζης ο οποίος μαζί με την καταστολή που προκαλεί η παρουσία της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο, ρυθμίζει αρνητικά τον lac υποκινητή. Έτσι παρεμποδίζεται η μεταγραφή του γονιδίου της pIII. Η απομάκρυνση της γλυκόζης αυτή καθ' εαυτή ενεργοποιεί τον υποκινητή και σε συνεργασία με την παρουσία του IPTG, το οποίο είναι ένας μη ανιστρεπτός απενεργοποιητής του lacI καταστολέα, επιτυγχάνεται η πλήρης δράση του lacZ συστήματος.

Η ανάπτυξη των κυττάρων κατά την έκφραση γίνεται στους 30°C σαν ένα επιπρόσθετο μέτρο προφύλαξης των βακτηρίων. Ωστόσο τα κύτταρα πρέπει να μεγαλώνουν στους 37°C όταν γίνεται η

μόλυνση με τον φάγο-βοηθό, ώστε να επιτρέπεται η έκφραση των F pilii, τα οποία είναι απαραίτητα για τη διαδικασία αυτή.

### 1.4.5.β Ποια φαγεμίδια χρησιμοποιήθηκαν;

Το φαγεμίδιο pCANTAB-6 έχει προκύψει από τον φορέα pHEN-1 και χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση αντισωμικών μορίων με την μορφή των scFvs (Vaughan *et al.*, 1996) (Εικόνα 1.4.2 B). Και εδώ τα αντισωματικά γονίδια κλωνοποιούνται αφού κοπούν από τα περιοριστικά ένζυμα SfiI και NotI ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα κολλώδη άκρα, στην αρχή του γονιδίου της pIII. Το φαγεμίδιο περιέχει μία τροποποιημένη ακολουθία-οδηγητή της pIII (leader sequence), η οποία χρησιμεύει σαν σήμα έκκρισης στο περίπλασμα. Στο 3' άκρο της NotI θέσης κλωνοποίησης υπάρχει μια ακολουθία που κωδικοποιεί μια πεπτιδική ουρά από 6 μόρια ιστιδίνης και επιτρέπει την απομόνωση των αντισωμικών μορίων με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας μετάλλου (metal affinity chromatography). Ακολουθεί μια σειρά νουκλεοτιδίων που κωδικοποιούν ένα μικρό κομμάτι του γονιδίου c-myc (Watt *et al.*, 1985) το οποίο αναγνωρίζεται από το αντίσωμα 9E10 (Evan *et al.*, 1985)



Εικόνα 1.4.2 Σχηματική αναπαράσταση της θέσης κλωνοποίησης του φαγεμιδίου pCES-1 (A) και του φαγεμιδίου pCANTAB-6 (B).

και επιτρέπει την ανάλυση των αντισωματικών μορίων με διάφορες ανοσολογικές τεχνικές όπως η ELISA, το western blotting, καθώς και την απομόνωση του με χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας. Το μικρότερο μέγεθος των scFvs κάνει τις βιβλιοθήκες που έχουν κατασκευαστεί με βάση αυτό το σχήμα, πιο σταθερές σε σχέση με τις Fab βιβλιοθήκες. Ωστόσο τα scFvs, παρουσιάζουν την τάση να δημιουργούν διμερή και τριμερή. Το γεγονός αυτό κάνει πιο περίπλοκες τις διαδικασίες της επιλογής και του χαρακτηρισμού των αντισωμάτων.

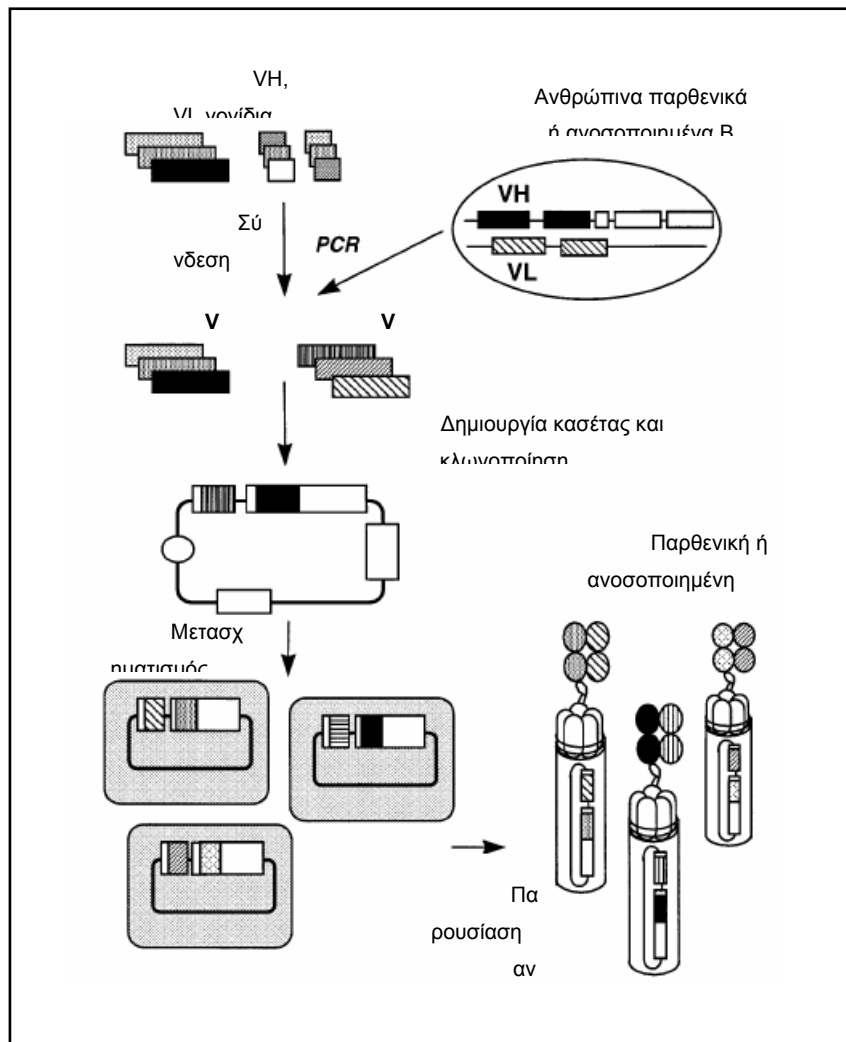
Για την κλωνοποίηση των αντισωμάτων με την μορφή Fab μορίου, ένας από τους φορείς που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι το φαγεμίδιο pCES-1 (**de Haard et al., 1999**) (Εικόνα 1.4.2 Α). Το φαγεμίδιο αυτό περιέχει τα ανθρώπινα γονίδια για τη σταθερή περιοχή της ελαφριάς [Ck] αλυσίδας και για το CH1 κομμάτι της βαριάς γ1 αλυσίδας. Επιτρέπει την κλωνοποίηση των ανθρώπινων [VL] και [VH] γονιδίων ή των [VLCL] και [VH] γονιδίων είτε σαν ένα ενιαίο κομμάτι το οποίο προκύπτει μετά από μια διαδικασία σύνδεσης με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (assembly PCR) είτε με δύο διαδοχικές κλωνοποιήσεις. Για την κλωνοποίηση χρησιμοποιούνται οι κατάλληλες περιοριστικές θέσεις ανάλογα με τη διαδικασία που επιλέγεται. Το φαγεμίδιο αυτό όπως και το pCANTAB-6 από το οποίο προήλθε περιέχει ολόκληρο το γονίδιο της pIII, τις ακολουθίες που κωδικοποιούν την ιστιδινική και την c-myc ουρά, καθώς και το amber κωδικόνιο. Στην περίπτωση του pCES-1 η βαριά αλυσίδα των αντισωμάτων είναι εκείνη που συνδέεται με την pIII. Η δημιουργία του διπλωμένου Fab μορίου επιτυγχάνεται στο περίπλασμα, όπου οι δύο αλυσίδες που παράγονται από το φαγεμίδιο ενώνονται μέσω δισουλφιδικού δεσμού. Τα αντισωματικά μόρια που παράγονται με τη μορφή Fab δεν παρουσιάζουν τάση για διμερισμό, γεγονός που διευκολύνει την ανάλυση της κινητικής σύνδεση των μορίων αυτών. Επίσης επιτρέπει την απομόνωση αντισωμάτων υψηλής συγγένειας.

### **1.4.6. Βιβλιοθήκες αντισωμάτων**

#### **1.4.6.α Παρθενικές βιβλιοθήκες από μη ανοσοποιημένους δότες**

Το ρεπερτόριο των αντισωμάτων που συνιστούν αυτές τις βιβλιοθήκες, περιέχει ένα μεγάλο πληθυσμό IgM μορίων που αναγνωρίζουν μια ποικιλία αντιγόνων. Η δημιουργία τέτοιων βιβλιοθηκών βασίζεται στην απομόνωση του mRNA των IgM μορίων από μη ανοσοποιημένα Β λεμφοκύτταρα, τα οποία προέρχονται από το αίμα (peripheral blood lymphocytes, PBLs) (**Marks et al., 1991, a**), τη σπλήνα (**de Haard et al., 1999**), το μυελό των οστών και τις αμυγδαλές (**Vaughan et al., 1996**). Τα γονίδια των μεταβλητών περιοχών επεκτείνονται με τη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών (**Marks et al., 1991, b**), που πολλαπλασιάζουν τις διάφορες αντισωματικές οικογένειες με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Ακολουθεί ο τυχαίος συνδυασμός των βαριών και των ελαφριών αλυσίδων και η κλωνοποίηση τους, ώστε να κατασκευαστούν συνδυαστικές βιβλιοθήκες

scFv ή Fab ανασυνδυασμένων αντισωματικών κομματιών (Εικόνα 1.4.3). Αυτή η διαδικασία δίνει τη δυνατότητα απομόνωσης αντισωμάτων τα οποία δεν έχουν έρθει ποτέ σε επαφή με το αντιγόνο. Μια τέτοια παρθενική βιβλιοθήκη αντισωμάτων μπορεί να οδηγήσει στην απομόνωση αντισωμάτων ενάντια σ' ένα μεγάλο αριθμό αντιγόνων, όπως μη ανοσογονικά, τοξικά ή αυτοαντιγόνα,



εφόσον είναι

Εικόνα 1.4.3 Η κατασκευή μιας βιβλιοθήκης αντισωμάτων και η παρουσίαση τους στην επιφάνεια φάγων

αρκετά μεγάλη και παρουσιάζει ποικιλομορφία. Η ανοσοσυγγένεια των ανοσοσφαιρινικών μορίων που επιλέγονται με τον κατάλληλο αντιγονικό επίτοπο είναι ανάλογη προς το μέγεθος της βιβλιοθήκης. Συνήθως τα αντισώματα που απομονώνονται από μικρές βιβλιοθήκες της τάξης των  $10^7$  κλώνων παρουσιάζουν ανοσοσυγγένεια περίπου  $10^6 \text{ M}^{-1}$  (Marks *et al.*, 1991, a), ενώ εκείνα που απομονώνονται από μεγαλύτερες βιβλιοθήκες της τάξης των  $10^{10}$  κλώνων παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης όπως  $10^8$ - $10^{10} \text{ M}^{-1}$  (Vaughan *et al.*, 1996). Βέβαια η δημιουργία τόσο μεγάλων βιβλιοθηκών αντιμετωπίζει αρκετές πρακτικές δυσκολίες και περιορισμούς που προκύπτουν από τη δυναμική των μεθόδων που χρησιμοποιούνται. Ένας ανασταλτικός παράγοντας για τη δημιουργία

μεγάλων βιβλιοθηκών, είναι η απόδοση μετασχηματισμού των βακτηριακών κυττάρων. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται η μέθοδος του ηλεκτρομετασχηματισμού η οποία παρουσιάζει τις μεγαλύτερες αποδόσεις σε σχέση με τις συνήθεις μεθόδους μετασχηματισμού βακτηριακών κυττάρων.

#### 1.4.6.β Συνθετικές βιβλιοθήκες

Τα αντισώματα που συνιστούν αυτές τις βιβλιοθήκες κατασκευάζονται τεχνητά με *in vitro* σύνδεση των γονιδίων των μεταβλητών [V] τμημάτων και των [D/J] τμημάτων (Εικόνα 1.4.3) Αυτό επιτυγχάνεται με την τροποποίηση των CDR περιοχών μέσα σε [V] γονίδια της βλαστικής σειράς (**Hoogenboom et al., 1992**) ή σε ανασυνδυασμένα [V] γονίδια (**Barbas et al., 1992**). Η μεγαλύτερη ποικιλομορφία στη δομή και την ακολουθία εντοπίζεται στην CDR3 περιοχή της βαριάς αλυσίδας, ενώ οι υπόλοιπες πέντε CDR περιοχές παρουσιάζουν περιορισμένη ποικιλομορφία (**Chothia et al., 1989**). Γι' αυτό το λόγο η περιοχή που κυρίως επιλέγεται για την εισαγωγή της ποικιλομορφίας είναι η CDR3 περιοχή της βαριάς αλυσίδας. Τα αντισώματα που προκύπτουν με αυτό τον τρόπο παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλομορφία από εκείνη που η ίδια η φύση επιτρέπει κατά την *in vivo* κατασκευή τους μέσα στα Β λεμφοκύτταρα

#### 1.4.6.γ Βιβλιοθήκες από ανοσοποιημένους δότες

Οι βιβλιοθήκες αυτές κατασκευάζονται από IgG γονίδια των Β λεμφοκυττάρων που προέρχονται από διάφορες πηγές, όπως το ποντίκι (**Clackson et al., 1991**), τον άνθρωπο (**Barbas et al., 1993, b-Cai et al., 1995**), το κουνέλι (**Lang et al., 1996**) και άλλα είδη ζώων (**Arbabi Ghahroudi et al., 1997**). Το ρεπερτόριο των αντισωμάτων που προκύπτουν είναι εμπλουτισμένο σε αντιγονοειδικά αντισώματα, μερικά από τα οποία έχουν υποστεί βελτίωση της ανοσοσυγγένειας από το ανοσοποιητικό σύστημα (**Burton et al., 1991-Clackson et al., 1991**). Αυτή η διαδικασία έχει αναφερθεί ότι οδηγεί στην απομόνωση υψηλότερης συγγένειας αντισωματικών μορίων σε σύγκριση με εκείνα που προκύπτουν από τα υβριδώματα. Επιπλέον η παράλληλη απομόνωση των γονιδίων τους, επιτρέπει το γενετικό χειρισμό των αντισωμάτων όπως την βελτίωση της ανοσοσυγγένειας με μοριακές τεχνικές, της έκφρασης και παραγωγής των αντισωματικών μορίων με την επιλογή του κατάλληλου συστήματος. Βέβαια είναι φανερό ότι οι βιβλιοθήκες αυτές δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση ενός μεγάλου εύρους αντισωματικών ειδικοτήτων και ότι είναι απαραίτητη η κατασκευή διαφορετικής κάθε φορά βιβλιοθήκης ανάλογα με τον υπό μελέτη αντιγονικό επίτοπο. Οι βιβλιοθήκες αυτές είναι χρήσιμες για την ανάλυση των φυσιολογικών ανθρώπινων ανοσολογικών απαντήσεων, όπως σε άτομα με αυτοάνοσες ασθένειες, με καρκίνους ή ιώσεις. Επίσης δίνουν την δυνατότητα να μελετηθεί η διαδικασία της *in vitro* ανοσοποίησης (**Duenas et al., 1996**). Ο συνδυασμός της *in vitro* ανοσοποίησης με την τεχνολογία της παρουσίασης αντισωμάτων στην επιφάνεια φάγων μπορεί να οδηγήσει στην απομόνωση ειδικών αντισωμάτων ενάντια σε οποιοδήποτε αντιγόνο χρησιμοποιηθεί ως στόχος (**Zafiropoulos et al., 2000**).

#### 1.4.6.δ Βιβλιοθήκες δεύτερης γενιάς για βελτίωση της ανοσοσυγγένειας

Συχνά η συγγένεια πρόσδεσης των αντισωμάτων που απομονώνονται με τη τεχνολογία της παρουσίασης στην επιφάνεια φάγων, δεν είναι αρκετή ώστε τα μόρια αυτά να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες εφαρμογές όπως στην ανοσοθεραπεία, στη διάγνωση, στην εξουδετέρωση ιών και τοξινών κ.α. Η σύνδεση του γονότυπου με το φαινότυπο του αντισωματικού μορίου επιτρέπει την επέμβαση στο επίπεδο του DNA, όπου με μοριακές τεχνικές επιχειρείται η *in vitro* βελτίωση της ανοσοσυγγένειας του μορίου. Αρχικά εισάγεται ποικιλομορφία στα γονίδια των μεταβλητών περιοχών, η οποία συχνά επικεντρώνεται στις CDR περιοχές ώστε να δημιουργηθεί μια δευτερογενής βιβλιοθήκη μεταλλαγμένων κλώνων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μια πληθώρα τεχνικών όπως i) η χρήση μεταλλαξογόνων βακτηριακών στελεχών, (**Low et al., 1996**) ii) η διαδικασία του error-prone PCR όπου η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης γίνεται υπό συνθήκες εισαγωγής λανθασμένων νουκλεοτιδίων, (**Hawkins et al., 1992**) iii) το ανακάτεμα των αντισωματικών αλυσίδων (chain shuffling), (**Clackson et al., 1991**) iv) η εισαγωγή μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα σημεία όπου επιχειρείται η αλλαγή συγκεκριμένων θέσεων ή περιοχών με τη χρήση τεχνικών PCR, με μεταλλαξιγένεση που βασίζεται σε ολιγονουκλεοτίδια (oligonucleotide-directed mutagenesis) ή σε κωδικόνια (codon based mutagenesis) (**Schier et al., 1996, b-Yang et al., 1995**) κ.α. Οι παραπάνω μεθοδολογίες χρησιμοποιούνται όταν η ανοσοσυγγένεια του αντισώματος είναι αρκετά χαμηλή. Στην περίπτωση που το αντίσωμα έχει ήδη υψηλή ανοσοσυγγένεια, η προσοχή εστιάζεται κατευθείαν στις CDR περιοχές και συγκεκριμένα σε αμινοξικές θέσεις που βρίσκονται σε επαφή με το αντιγόνο ή επηρεάζουν έμμεσα την αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Οι θέσεις αυτές εντοπίζονται μέσω σάρωσης με αλανίνη (alanine scanning) των CDR περιοχών (**Schier et al., 1996, a**), με ανακάτεμα των αλυσίδων (**Thompson et al., 1996**), με "parsimonious" μεταλλαξιγένεση (**Schier et al., 1996, c**) και με μοντελοποίηση (**Schier et al., 1996, a-Vasmatzis et al., 1994**). Ακολουθεί η επιλογή της δευτερογενούς βιβλιοθήκης με σκοπό την απομόνωση μορίων μεγαλύτερης ανοσοσυγγένειας σε σχέση με το αρχικό και η ανάλυση των απομονωμένων αντισωμάτων ώστε να συλλεχθούν πληροφορίες για την κινητική της σύνδεσης και το ρόλο συγκεκριμένων αμινοξικών θέσεων στην πρόσδεση με τον αντιγονικό επίτοπο.

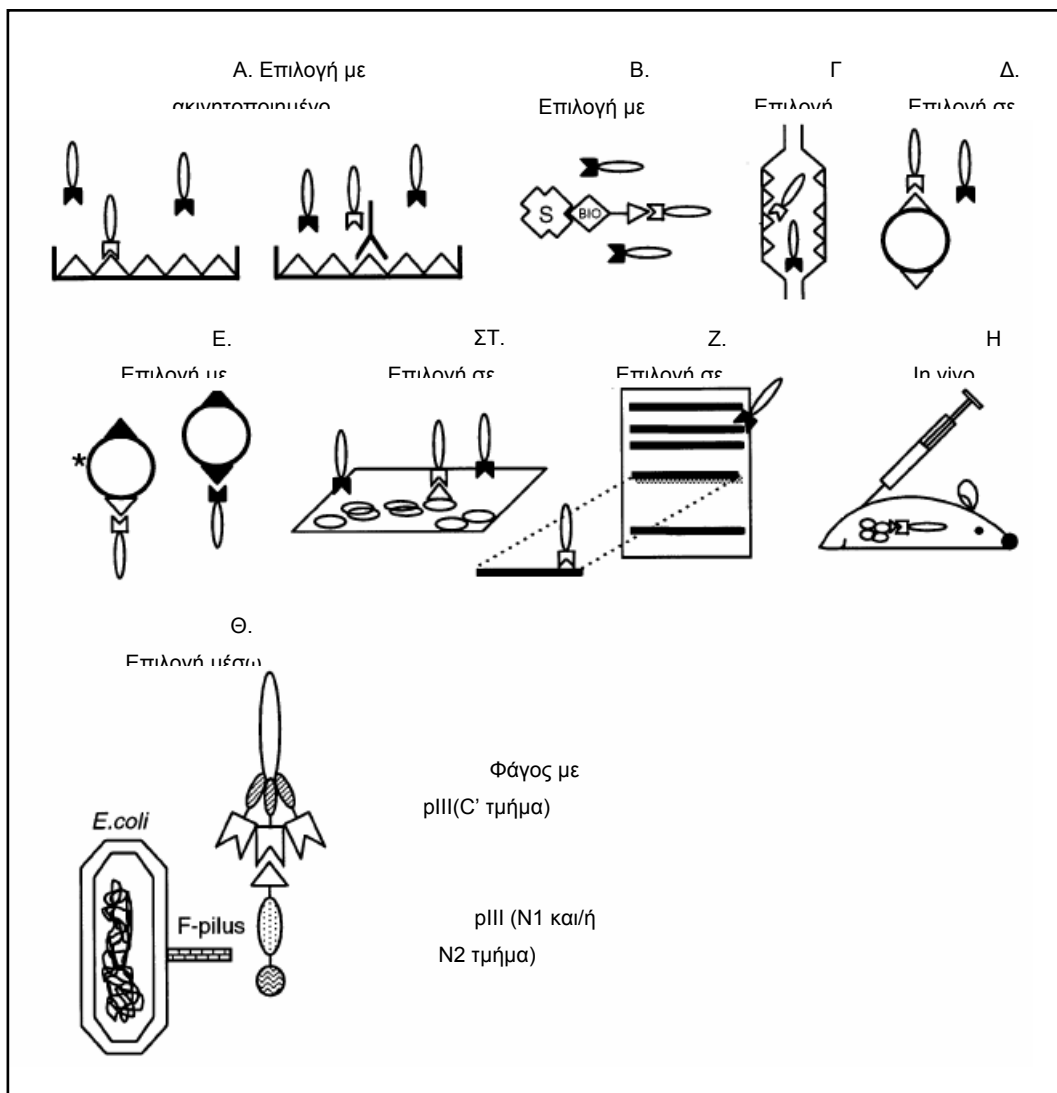
#### 1.4.7 Μέθοδοι επιλογής αντισωμάτων

Ο εμπλουτισμός των ειδικών φάγων μέσα σ' ένα πληθυσμό κλώνων επιτυγχάνεται με την εφαρμογή διαδοχικών κύκλων επιλογής χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο αντιγονικό επίτοπο-στόχο. Ακολουθούν πολλαπλοί κύκλοι πλουσίματος, όπου απομακρύνονται οι μη ειδικοί φάγοι, και η έκλουση των ειδικών με σκοπό την περαιτέρω ανάλυση τους. Έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές διαφορετικές μέθοδοι επιλογής ανάλογα με τη φύση του υπό μελέτη αντιγόνου όπως (Εικόνα 1.4.4):

- Επιλογή πάνω σε ακινητοποιημένο σε στερεή επιφάνεια αντιγόνο όπου μετά το πλύσιμο οι ειδικοί φάγοι εκλύονται κάτω από όξινες (διαλύματα HCl ή γλυκίνης) (**Kang et al., 1991**), βασικές

συνθήκες (διαλύματα τριαιθυλαμίνης) (Marks *et al.*, 1991 a), ή με περίσσεια αντιγόνου (Clackson *et al.*, 1991) κ.α.

- Επιλογή με τη χρήση βιοτινιομένου αντιγόνου όπου δεν παρεμβαίνουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις, αφού η όλη διαδικασία γίνεται υπό διαλυτές συνθήκες (Hawkins *et al.*, 1992-Henderikx *et al.*, 1998). Οι κλώνοι που συνδέονται με τη διαδικασία αυτή, απομονώνονται από τους μη ειδικούς με την χρήση μαγνητικών σφαιριδίων, τα οποία είναι καλυμμένα με στρεπταβιδίνη.
- Επιλογή με τη χρήση κυττάρων, όταν το αντιγόνο εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη (Cai *et al.*, 1995-Marks *et al.*, 1993).
- Επιλογή με απομόνωση μέσω FACS όπου τα υπό μελέτη κύτταρα σημαίνονται με φθορισμό και απομονώνονται από άλλα με διαχωρισμό των κυττάρων (cell sorting) (Siegel *et al.*, 1997-de Kruif *et al.*, 1995).



Εικόνα 1.4.4 Μέθοδοι επιλογής αντισωμάτων που παρουσιάζονται στην επιφάνεια βακτηριοφάγων.

- Επιλογή με τη χρήση χρωματογραφικών κολόνων όπου βρίσκεται ακινητοποιημένο το αντιγόνο.
- Επιλογή πάνω σε τομές ιστού ή σε κρουτομές (**Van Ewijk et al., 1997**).
- Επιλογή πάνω σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Western blotting), κυρίως όταν τα αντιγόνα δεν είναι καθαρά ή δεν έχουν ταυτοποιηθεί.
- Επιλογή σε *in vivo* συνθήκες (**Pasqualini et al., 1996**).
- Επιλογή μέσω μόλυνσης όπου τα αντισώματα παρουσιάζονται πάνω σε μη μολυσματικά ιοσωμάτια (selectively infected phage, SIP) (**Duenas et al., 1994-Spada et al., 1997**). Η ικανότητα μόλυνσης αποκαθίσταται μέσω της σύνδεσης με μια υβριδική πρωτεΐνη που αποτελείται από το αντιγόνο και το αμινοτελικό τμήμα της pIII, η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με τα F pili.

Κατά την επιλογή εκτός από τους ειδικούς φάγους υψηλής συγγένειας απομονώνεται και ένας μεγάλος αριθμός μη ειδικών ή χαμηλής συγγένειας φάγων και γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η διαδοχική επανάληψη της επιλεκτικής διαδικασίας. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να ελαττωθεί ακόμα περισσότερο αν γίνουν επαναλαμβανόμενες επιλογές χωρίς την ενδιάμεση διαδικασία της μόλυνσης των βακτηρίων από τους επιλεγμένους φάγους ή χρησιμοποιώντας πιο αυστηρές συνθήκες έκλουσης των συνδεδεμένων φάγων (**de Bruin et al., 1999**).

Εξάλλου είναι δυνατό να απομονωθούν αντισώματα με μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης σε σχέση με τα χαμηλότερης συγγένειας μόρια, μέσω της εφαρμογής διαδοχικών κύκλων επιλογής όπου μειώνεται σταδιακά η συγκέντρωση του αντιγόνου. Η όλη διαδικασία διευκολύνεται όταν η επιλογή γίνεται υπό συνθήκες διαλύματος, όπου δεν υπάρχουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις, οι οποίες ευνοούν τους πολυσθενείς κλώνους. Όταν χρησιμοποιούνται βιβλιοθήκες δεύτερης γενιάς με σκοπό την απομόνωση ενός αντισώματος με βελτιωμένη συγγένεια πρόσδεσης, τότε η συγκέντρωση του αντιγόνου μειώνεται κάτω από την σταθερά αποσύνδεσης  $K_d$  του μητρικού κλώνου ώστε να απομονωθούν οι υψηλότερης ανοσοσυγγένειας μεταλλαγμένοι κλώνοι (**Hawkins et al., 1992**).

Ένα σημαντικό κριτήριο που συμβάλλει στην επιτυχία της επιλογής είναι η χρήση καθαρού αντιγόνου. Οι επιλογές με μη καθαρό αντιγόνο είναι πιο δύσκολες και συνήθως απομονώνονται κλώνοι ειδικοί σε άλλες ουσίες που συνυπάρχουν με το υπό μελέτη αντιγόνο. Στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιείται καθαρό ή συνθετικό αντιγόνο, τα αποτελέσματα της επιλογής είναι πολύ ικανοποιητικά (**Henderikx et al., 1998**).

### **1.4.8 Αναλυτικές μέθοδοι για τη μελέτη των αντισωμάτων**

Μετά από τη διαδικασία της επιλογής είναι απαραίτητη η ανάλυση των αντισωμάτων που απομονώθηκαν, ώστε να εντοπιστούν εκείνα που συγκεντρώνουν τα καλύτερα χαρακτηριστικά. Συχνά κρίνεται απαραίτητη η ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού κλώνων, ειδικά όταν οι βιβλιοθήκες των αντισωμάτων είναι πολύ μεγάλες. Για το σκοπό αυτό εφαρμόζεται η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA σε πλάκες 96 θέσεων, όπου είναι δυνατό να αναλυθούν πολλοί κλώνοι ταυτόχρονα. Στη διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθούν είτε φάγοι που παρουσιάζουν στην επιφάνεια τους το αντίσωμα, είτε διαλυτά αντισώματα στο βακτηριακό περίπλασμα ή στο υπερκείμενο της καλλιέργειας. Παράλληλα με την ανοσοενζυμική μέθοδο οι διαφορετικοί κλώνοι ταυτοποιούνται με την χρήση περιοριστικών



ενζύμων, τα οποία κόβουν συχνά μέσα στα γονίδια των αντισωμάτων όπως το BstNI (**Marks et al., 1991, a**). Από το πρότυπο των ζωνών που παράγονται κατά την πέψη γίνεται ομαδοποίηση των όμοιων κλώνων με σκοπό την περαιτέρω ανάλυση τους (DNA fingerprinting). Η παραπάνω μέθοδος χρησιμοποιείται και για τον έλεγχο της πολυπλοκότητας της υπό κατασκευή βιβλιοθήκης. Η εισαγωγή ενός amber κωδικονίου λήξης μεταξύ του αντισώματος και της pIII επιτρέπει την παραγωγή διαλυτού αντισώματος και αντισώματος συνδεδεμένου με την pIII για την παρουσίαση στην επιφάνεια φάγων, χωρίς να είναι απαραίτητη η κλωνοποίηση σε διαφορετικό φορέα. Επίσης η παρουσία διαφόρων πεπτιδικών ουρών στην άκρη των αντισωματικών μορίων επιτρέπει την απομόνωση τους με χρωματογραφία συγγένειας ή την ανάλυση τους με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας, ή ανοσοκυττοχημείας (c-myc/9E10, 6His/antiHis ή χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου), όπως έχει ήδη αναφερθεί.

Μετά την επιλογή των αντισωμάτων με τη μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης είναι απαραίτητη η μελέτη της ανοσοσυγγένειας και της κινητικής της αντίδρασης σύνδεσης. Έχουν περιγραφεί μέθοδοι που βασίζονται στην διαδικασία της ELISA (ELISA παρεμπόδισης, inhibition ELISA) (**Rath et al., 1988**). Όμως τα πιο καλά αποτελέσματα επιτυγχάνονται με τη χρήση του βιοανιχνευτή BIAcore (**Yang et al., 1995-Schier et al 1996, a**). Η μελέτη του ρυθμού αποσύνδεσης και της ανοσοσυγγένειας με το μηχάνημα του BIAcore οδηγεί σε αξιόπιστα συμπεράσματα, όταν τα υπό μελέτη αντισώματα βρίσκονται στη μορφή του Fab μορίου. Κι αυτό γιατί δεν παρουσιάζουν τάση πολυμερισμού όπως συμβαίνει με τα scFv μόρια (**Pluckthun et al., 1997**). Ο πολυμερισμός κάνει τη διαδικασία πιο περίπλοκη όταν χρησιμοποιούνται μη καθαρισμένα scFv μόρια. Έτσι στην περίπτωση που τα αντισώματα βρίσκονται στη μορφή των scFvs είναι απαραίτητη η μεσολάβηση μιας διαδικασίας απομόνωσης των μονομερών μορίων (FPLC), πριν να χρησιμοποιηθούν για ανάλυση στο BIAcore. Είναι πολύ σημαντική η εφαρμογή αξιόπιστων διαδικασιών ώστε να επιλεγθούν τελικά τα μόρια εκείνα που συγκεντρώνουν τα καλύτερα χαρακτηριστικά, με σκοπό την περαιτέρω μελέτη και ανάλυση τους. Στα πλαίσια των παραπάνω είναι απαραίτητο να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης του αντισώματος, η αντίδραση με άλλες ουσίες (cross-reactivity) κ.α.

Συγκεκριμένα τα επίπεδα έκφρασης των αντισωμάτων μέσα στην E.coli παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις της τάξης των 10μg-100mg ανά λίτρο. Έτσι αν η έκφραση του αντισώματος δεν είναι ικανοποιητική, κρίνεται απαραίτητη η κλωνοποίηση του σε άλλα συστήματα έκφρασης, όπως σε μεταλλαγμένα βακτηριακά κύτταρα που παρουσιάζουν μειωμένη παραγωγή πρωτεασών (**Meerman et al., 1994**), σε κύτταρα θηλαστικών ή σε κύτταρα μυκήτων (**Eldin et al., 1997**).

## 1.5. ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

### 1.5.1. Γενικά

Το ανοσοποιητικό σύστημα εκτός από την προστασία που προσφέρει ενάντια στους μολυσματικούς παράγοντες, προστατεύει τον οργανισμό από την εμφάνιση διαφόρων τύπων καρκίνου. Για να επιτευχθεί αυτό απαραίτητη προϋπόθεση είναι η εμφάνιση αλλαγών στα καρκινικά κύτταρα, οι οποίες μπορούν να αναγνωριστούν και να καταπολεμηθούν από τον ανοσοποιητικό μηχανισμό. Αν δηλαδή τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν αντιγόνα διαφορετικά από εκείνα που βρίσκονται στον περιβάλλοντα φυσιολογικό ιστό, τότε η ανοσολογική απάντηση θα είναι ικανή να τα καταστρέψει. Ωστόσο οι διαφορές που εντοπίζονται στα καρκινικά κύτταρα είναι πολύ μικρές και συνήθως ποσοτικές και όχι τόσο ποιοτικές και αφορούν πρωτείνες του “εαυτού”. Η επαγόμενη ανοχή που παρουσιάζει το ανοσολογικό σύστημα προς τα συστατικά του “εαυτού” ώστε να αποφεύγονται οι καταστάσεις αυτοανοσίας έχει ένα άκομα, αυτή τη φορά μη επιθυμητό, αποτέλεσμα: την αδυναμία διάκρισης και καταπολέμησης των καρκινικών κυττάρων.

Για την αντιμετώπιση του καρκίνου οι μέθοδοι που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα είναι η χειρουργική επέμβαση, η ακτινοβολία και η χημειοθεραπεία.. Η εφαρμογή τους συμβάλλει αρκετά αποτελεσματικά στην καταπολέμηση των καρκινικών κυττάρων. Δεν μπορεί ωστόσο να περάσει απαρατήρητη η αρνητική επίδραση τους στον φυσιολογικό ιστό. Πώς μπορούμε λοιπόν να καταπολεμήσουμε τα καρκινικά κύτταρα, χωρίς να βλάψουμε τον φυσιολογικό “εαυτό” μας; Για το σκοπό αυτό προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Ehrlich η χρήση των αντισωμάτων σαν “μαγικές σφαίρες” που καταπολεμούν τα καρκινικά κύτταρα μέσω των τοξινών με τις οποίες είναι συνδεδεμένα, ενώ αφήνουν τα γειτονικά φυσιολογικά ανέπαφα. Τα αντισώματα αυτά είναι βέβαια απαραίτητο να αναγνωρίζουν καρκινικά αντιγόνα, ώστε να κατευθύνονται ενάντια μόνο στα κύτταρα του όγκου που τα εκφράζουν. Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας των υβριδωμάτων (**Kohler and Milstein, 1975**) η χρήση των αντισωματικών μορίων-μαγικών σφαιρών έγινε ο αντικειμενικός στόχος των ερευνητικών προσπαθειών στο χώρο της ανοσοθεραπείας. Ποντικίσια μονοκλωνικά αντισώματα ενάντια σε καρκινικά αντιγόνα έχουν ελεγχθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Βέβαια τα αντισώματα αυτά, όπως έχει ήδη αναφερθεί, παρουσιάζουν σημαντικούς περιορισμούς λόγω του ξενογονικού χαρακτήρα τους που έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανοσολογικών απαντήσεων από τον ανθρώπινο οργανισμό. Η χρήση χιμαιρικών ή ανθρωποποιημένων αντισωμάτων αμβλύνει τις παρενέργειες του προβλήματος, χωρίς όμως να τις εξαφανίζει.

Από την άλλη πλευρά η δημιουργία ανθρώπινων υβριδωμάτων είναι μια διαδικασία που μέχρι στιγμής δεν έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα λόγω της δυσκολίας που παρουσιάζεται στο να διατηρήσει κανείς τα ανθρώπινα Β λεμφοκύτταρα ζωντανά έξω από το σώμα (**Winter et al., 1991**). Επίσης είναι εξαιρετικά δύσκολο να κατασκευαστούν ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα ενάντια σε ανθρώπινα αντιγόνα όπως το μεμβρανικό καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο ή λεμφοκυτταρικά αντιγόνα. Αυτή η δυσκολία είναι αποτέλεσμα των μηχανισμών της ανοσολογικής ανοχής που παρεμποδίζει την κλωνική επέκταση Β λεμφοκυττάρων με ειδικότητα ενάντια σε συστατικά του εαυτού (**Burnet, 1959-**

**Nossal, 1989**). Συγκεκριμένα μετά τον ανασυνδυασμό των αντισωματικών γονιδίων τα παρθένα B λεμφοκύτταρα είναι δυνατό να παρουσιάζουν στην επιφάνεια τους αντισώματα που αντιδρούν με συστατικά του εαυτού. Μάλιστα υπολογίζεται ότι το 10-30% των B κυττάρων σε υγιή άτομα έχει τη δυνατότητα να δημιουργεί αυτοαντισώματα (**Cohen et al., 1986**) τα οποία ωστόσο είναι συνήθως IgM, χαμηλής ανοσοσυγγένειας και πολυειδικά (**Rossi et al., 1990-Avrames, 1991**). Αυτά τα B κύτταρα συνήθως δεν επεκτείνονται λόγω της απουσίας της βοηθητικής δράσης των αντίστοιχων T λεμφοκυττάρων.

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας της παρουσίασης αντισωμάτων στην επιφάνεια φάγων (**McCafferty et al., 1990**), η οποία επιτρέπει την απομόνωση ανθρώπινων αντισωμάτων που δεν παρουσιάζουν HAMA απαντήσεις, έφερε επανάσταση στον χώρο της ανοσοθεραπείας. Εξάλλου ο τυχαίος ανασυνδυασμός των αντισωματικών γονιδίων και η κατασκευή πολύ μεγάλων βιβλιοθηκών έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού ειδικοτήτων από τις οποίες μπορούμε να επιλέξουμε αντισώματα ενάντια σε διαφόρων τύπων αντιγόνα όπως αυτοαντιγόνα, καρκινικά αντιγόνα κ.α. Τα αντισωματικά μόρια που απομονώνονται μπορούν να μελετηθούν και να αλλαχθούν με την βοήθεια της γενετικής μηχανικής με σκοπό την αύξηση της ανοσοσυγγένειας, την αλλαγή της δομής, την σύνδεση με τοξικές ουσίες, με φθορίζουσες ουσίες και άλλα. Επίσης επειδή τα ανασυνδυασμένα αντισώματα είναι μικρά μόρια μπορούν να διαπεράσουν εύκολα τους ιστούς και να φτάσουν στο στόχο. Εκεί δρουν είτε καταπολεμώντας τα καρκινικά κύτταρα, είτε χρησιμεύοντας σαν διαγνωστικά εργαλεία.

### **1.5.2 Οι βλεννίνες ως καρκινικά αντιγόνα**

Οι βλεννίνες είναι μια οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών που παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά γλυκοσυλίωσης και μεγάλο μοριακό βάρος (>200KD) (**Devine et al., 1992-Gum, et al., 1995**). Βρίσκονται είτε στην κορυφαία επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων στο μαστικό αδέν, στο σιελογόνο αδέν, στην πεπτική και αναπνευστική οδό, στο συκώτι, στον προστάτη, στη μήτρα, στην ουροδόχο κύστη και στους όρχεις είτε εκκρίνονται στο εσωτερικό του γαστροεντερικού, του αναπνευστικού και του αναπαραγωγικού σωλήνα. Αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό σκελετό που μοιάζει με σχοινί και περιέχει έντονα γλυκοσιλιωμένες και μη γλυκοσιλιωμένες περιοχές. Οι βλεννίνες περιέχουν μεγάλο αριθμό σερινών, θρεονινών, αλανινών, γλυκινών, προλινών και μικρό αριθμό αρωματικών αμινοξέων και αμινοξέων που περιέχουν θείο. Το μέγεθος του πρωτεϊνικού σκελετού ποικίλει εξαιτίας ενός γενετικού πολυμορφισμού με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός μεταβλητού αριθμού σειριακών επαναλήψεων (variable number of tandem repeats, VNTR) πλούσιων σε Ο-θέσεις γλυκοσυλίωσης (θρεονίνη, σερίνη). Η μεταβλητότητα στο μέγεθος αυτών των μορίων φαίνεται να μην επηρεάζει την λειτουργία τους. Στον άνθρωπο συναντάμε επτά τύπους βλεννινών που κωδικοποιούνται από αντίστοιχα γονίδια και των οποίων τα χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Τύπος Βλεννίνης	Επαναλαμβανόμενη πεπτιδική ακολουθία	Υπερέκφραση	Χρωμοσωμική θέση	Μορφή
MUC1	PDTRPAPGSTAP PAHGV TSA	Μαστός, Πάγκρεας, Παχύ Έντερο, Μήτρα	1q21	Μεμβρανική
MUC2	PTTTRITTTTIVT PTPTPTGTQT	Έντερο (λεπτό, παχύ) τραχειοβρογχικός αγωγός	11p1 5	Εκκρινόμενη (δίκτυο)
MUC3	HSTPSFTSSITTT ETTS	Έντερο (λεπτό, παχύ)	7q22	Εκκρινόμενη (δίκτυο)
MUC4	TSSASTGHATPL PVTD	Παχύ έντερο, τραχεία	3q29	Μη καθορισμένη
MUC5	TTSTTSAP	Στομάχι, τραχεία, παχύ έντερο	11p1 5	Εκκρινόμενη (δίκτυο)
MUC6	SPFSSTGPM TAT SFQTTTTPSHPQTTL P THVPPFSTSLVTPSTGTVIT P THAQMAT S ASIHSTPTGT IPPTTLKATGSTHTAPPM TP TTS GYSQAHSSTSTAA KTSTSLHSHTSSTHHPEVT PTSTTTITPNPTSTGTSTPV AHTTSATSSRLPTPFTTHS PPTGS	Στομάχι	11p1 5	Εκκρινόμενη (δίκτυο)
MUC7	TTAAPPTPSAT TPAPPSSSAPG	Σιελογόνοι αδένες	4	Εκκρινόμενη (δε σχηματίζει δίκτυο)

Πίνακας 1.5.1 Τα χαρακτηριστικά των βλεννινών

Οι βλεννίνες εμφανίζονται είτε σε μεμβρανική είτε σε εκκρινόμενη μορφή. Συγκεκριμένα η MUC1 βλεννίνη είναι μεμβρανική (**Gendler et al., 1990-Lan et al., 1990-Ligtenberg et al., 1990**), ενώ η MUC2 είναι εκκρινόμενη αφού δε διαθέτει διαμεμβρανικό τμήμα και περιέχει κυστείνες στο μόριο της με αποτέλεσμα να εμφανίζει τάση για πολυμερισμό και σχηματισμό δικτύου (**Gum et al., 1992-Gum et al., 1994**).

Οι παρουσία των βλεννινών στα φυσιολογικά κύτταρα φαίνεται να εξυπηρετεί μια σειρά από λειτουργίες όπως:

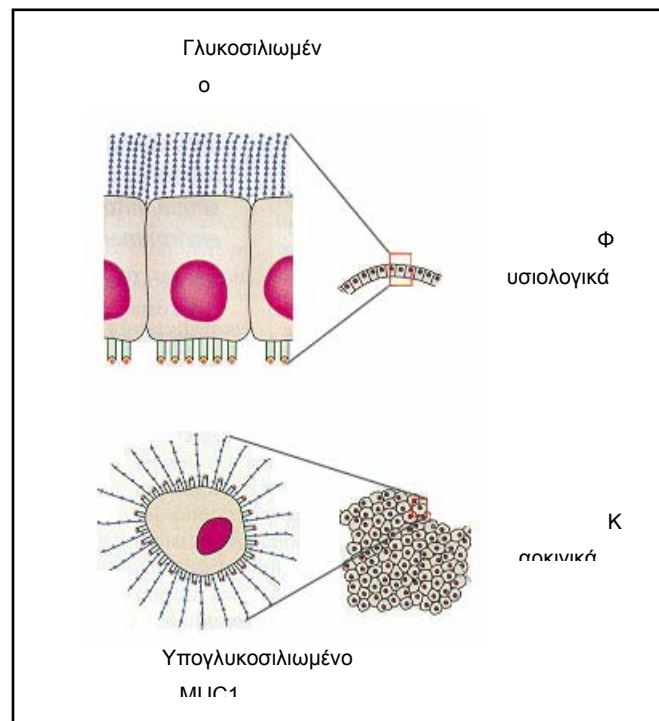
- την παρεμπόδιση της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης.
- την διευκόλυνση της απορρόφησης των λιπαρών οξέων (**Shiau et al., 1990**).
- την προστασία από τη δράση των βακτηριακών τοξινών.

➤ την παρουσίαση υδατανθρακικών υποδοχών για μικροοργανισμούς με σκοπό την εξουδετέρωση τους και τον ανταγωνισμό των συμβιωτικών στελεχών με τα παθογόνα στελέχη (**Roussel et al., 1988**).

➤ ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης (**Shimizu et al., 1990**)

Η αυξημένη σύνθεση του πρωτεϊνικού σκελετού καθώς και η αλλαγές στα επίπεδα και το πρότυπο της γλυκοσιλίωσης έχει παρατηρηθεί ότι σχετίζονται και παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων. Η υπογλυκοσιλίωση έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση πολλών αντιγονικών διαφορών μεταξύ του καρκινικού και του γειτονικού φυσιολογικού επιθηλιακού ιστού (**Burchell et al., 1987-Burchell et al., 1993**). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι διαφορές εντοπίζονται και στον πρωτεϊνικό σκελετό του μορίου. Έχει προταθεί μια σειρά από πιθανές λειτουργίες των βλεννινών στα καρκινικά κύτταρα όπως:

- προστασία του κυττάρου από το χαμηλό pH που δημιουργείται εξαιτίας των μεγάλων επιπέδων λακτικού οξέως, τα οποία οφείλονται στην υψηλή γλυκολυτική ενεργότητα στα καρκινικά κύτταρα (**Jentoft, 1990**).
- δημιουργία ενός στρώματος που παρεμποδίζει την κυτταρική συνάθροιση και προωθεί τη μετάσταση.
- προστασία του καρκινικού κυττάρου από τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος όπως παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης των λευκοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων (**Hayes et al., 1990-Fung et al., 1991**)



Εικόνα 1.5.1 Η έκφραση της MUC1 βλεννίνης σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα

### **1.5.3 Μονοκλωνικά αντισώματα κατά των βλεννινών**

Μονοκλωνικά αντισώματα που εντοπίζουν αλλαγές στη δομή των βλεννινών και μπορούν να χρησιμεύσουν σαν καρκινικοί δείκτες ή σαν θεραπευτικά μέσα, έχουν ήδη απομονωθεί. Η πιο μελετημένη βλεννίνη σ' αυτό τον τομέα είναι η MUC1. Η βλεννίνη αυτή εκφράζεται με μη πολικό τρόπο και εμφανίζει χαμηλά επίπεδα γλυκοσυλίωσης με αποτέλεσμα την έκθεση πεπτιδικών και υδατανθρακικών επιτόπων (Εικόνα 1.5.1), οι οποίοι τροποποιούν το μόριο σε καρκινικό αντιγόνο στα αδενοκαρκινώματα (**Burchell et al., 1987-Burchell et al., 1993**). Μια μεγάλη ποικιλία μονοκλωνικών αντισωμάτων έχουν δημιουργηθεί κατά του μορίου, τα περισσότερα από τα οποία αναγνωρίζουν επίτοπους που περιλαμβάνουν την PDTR ακολουθία στην VNTR περιοχή (**Fontenot et al., 1993-Price et al., 1998**). Αρκετά από αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί σαν διαγνωστικά μέσα για τον εντοπισμό αδενοκαρκινωμάτων και τη μελέτη της θεραπευτικής στρατηγικής που ακολουθείται (**Epenetos et al., 1986-Athanassiou et al., 1988-Kunkler et al., 1995**). Βέβαια τα τρωκτικά αντισώματα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, παρουσιάζουν περιορισμούς στη χρήση εξαιτίας του ξενογονικού τους χαρακτήρα (**DeNardo et al., 1997**) ενώ τα χιμαιρικά και τα ανθρωποποιημένα αντισώματα βοηθούν αλλά δεν εξαφανίζουν το πρόβλημα (**Baker et al., 1994-Fiorentini et al., 1997**). Η δημιουργία εξολοκλήρου ανθρώπινων αντισωμάτων είναι το ζητούμενο (**Winter et al., 1994**) και για το σκοπό αυτό έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνολογία της παρουσίασης αντισωμάτων στην επιφάνεια φάγων (**Henderikx et al., 1998-de Haard et al., 1999**).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



## 2.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

### 2.1.1 Βακτηριακά στελέχη και φορείς κλωνοποίησης

Οι γονότυποι των βακτηριακών στελεχών της *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι:

- XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)]*
- TG1: *supE thi Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>-</sup>) [F' traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15]*
- HB2151: *Δ(lac-pro) ara thi [F' proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15]*
- KS272: *F<sup>-</sup> ΔlacX74 galE galK thi rpsL(strA) ΔPhoA(PvuII)*
- HM101: *KS272 eda tsp*
- HM112: *KS272 eda tsp ptr*
- HM120: *KS272 eda tsp degP ompT*
- SF110: *KS272 degP ompT*

Οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα φαγεμίδια: pCANTAB-6 (McCafferty *et al.*, 1994) για την κλωνοποίηση αντισωματικών κομματιών με τη μορφή των sc-Fvs και pCES-1 (Haard *et al.*, 1999) για την κλωνοποίηση αντισωματικών κομματιών με τη μορφή των Fabs.

### 2.1.2 Ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές

Τα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, κατασκευάστηκαν με την φωσφοραμιδιτική σύνθεση στον ABI 394 (Εργαστήριο Μικροχημείας, IMBB, ΙΤΕ) και παρουσιάζονται στο Παράρτημα Β.

### 2.1.3 Πεπτίδια-Αντιγόνα

Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα στην παρούσα μελέτη είναι τα παρακάτω:

MUC-1	PAHGVTSAPDTRPAPG
	STAP
MU	TTTTTTTTTNTPTPTPT
C-2	GTQTP
MU	TSSITTTGTTSHSTPSP
C-3	

Η σύνθεση των πεπτιδίων αυτών πραγματοποιήθηκε στον αυτόματο **430A Peptide Synthesizer (APPLIED BIOSYSTEMS)**, σύμφωνα με την Fmoc στρατηγική σε στέρεα φάση. Η σύνθεση των ολιγομερών που προέκυψαν από την σύνδεση των αντίστοιχων μονομερών πεπτιδίων έλαβε χώρα στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Εφαρμοσμένης Βιοχημείας (IMBB, ITE), σύμφωνα με την στρατηγική της επαναληπτικής συμπύκνωσης προστατευμένων πεπτιδίων (**Krambovitis et al., 1998**). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα πεπτιδία 253B και 254B που προέρχονται από τον υποδοχέα της αγγειοτενσίνης.

### 2.1.4 Απομόνωση ολικού RNA από Β λεμφοκύτταρα

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι. Η πρώτη βασίζεται στο διάλυμα **RNAzol B** της εταιρείας **CAMPRO Scientific**, το οποίο περιέχει ισοθειοκυανικό γουανιδίο **GITC**. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε αναλύεται παρακάτω:

- Τα Β λεμφοκύτταρα αφού πλυθούν με φωσφορικό διάλυμα **PBS** (0,01M  $K_2HPO_4$ , 0,01M  $KH_2PO_4$ , 0,15M NaCl, pH 7,4) κατακρημνίζονται και λύνονται με την προσθήκη 0,2 ml **RNAzol B** ανά  $10^6$  κύτταρα. Τα κύτταρα διαλύονται, περνώντας μερικές φορές το μείγμα από μια λεπτή βελόνα, για να διασπαστούν.
- Στη συνέχεια προστίθεται 1/10V χλωροφόρμιο όπου V είναι ο όγκος του μείγματος μετά από την ομογενοποίηση. Το δείγμα ανακινείται έντονα χωρίς να γίνει vortex και παραμένει στον πάγο για 5 min. Αφού το διάλυμα φυγοκεντρηθεί (12000g, 4°C, 15min), σχηματίζονται δύο φάσεις: η κατώτερη μπλε φάση της φαινόλης με το χλωροφόρμιο και η ανώτερη άχρωμη υδατική φάση που περιέχει το RNA ενώ το DNA και οι πρωτεΐνες μένουν στη μεσόφαση.
- Στην υδατική φάση που έχει αφαιρεθεί και μεταφερθεί σε καθαρό σωληνάκι, προστίθεται ίσος V ισοπροπανόλης και το δείγμα παραμένει στον πάγο για 15 min. Το RNA κατακρημνίζεται με φυγοκέντρηση (12000g, 4°C, 15min).
- Στο τέλος το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα του RNA πλένεται με 75% αιθανόλη με ανακάτεμα-vortex και ανακτάται με φυγοκέντρηση (7500g, 4°C, 8min). Το ίζημα αποξηραίνεται αν και είναι σημαντικό να μη στεγνώσει εντελώς γιατί μειώνεται η διαλυτότητα του. Το ίζημα του RNA διαλύεται σε κατάλληλο όγκο νερού το οποίο έχει κατεργαστεί κατάλληλα με διεθυλπυροκαρβονικό διάλυμα **DEPC (Chirgwin et al., 1979)**.

Εναλλακτικά η απομόνωση του RNA έγινε με το **Rneasy Mini Kit (QIAGEN)** κατά τη διάρκεια του οποίου το RNA συνδέεται σε μια μεμβράνη (silica gel) υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας:

- Τα Β λεμφοκύτταρα λύνονται με την προσθήκη ενός διαλύματος **RLT** που περιέχει ισοθειοκυανικό γουανιδίο **GITC**. Συγκεκριμένα οι όγκοι του διαλύματος **RLT** είναι: 350μl/ $0-5 \times 10^6$  κύτταρα και 600μl/ $5 \times 10^6-10^7$  κύτταρα. Τα κύτταρα ομογενοποιούνται με το πέρασμα του μείγματος από λεπτή βελόνα.

- Προστίθεται 1V 70% αιθανόλη και μετά από ανακίνηση το διάλυμα μεταφέρεται στην κολώνα του **Rneasy Mini Kit**, η οποία φυγοκεντρείται (>10000rpm, Τδωμ., 35sec).
- Η κολώνα πλένεται με 700μl διαλύματος **RW1** και φυγοκεντρείται (>10000rpm, Τδωμ., 35sec).
- Το πλύσιμο επαναλαμβάνεται δύο φορές με το διάλυμα **RPE** που περιέχει αιθανόλη. Η τελευταία φυγοκέντρωση διαρκεί 2min, ώστε να στεγνώσει πλήρως η μεμβράνη της κολώνας.
- Τελικά το RNA εκλύεται με την προσθήκη 30-50μl νερού κατευθείαν πάνω στην μεμβράνη και την ακόλουθη φυγοκέντρωση (>10000rpm, Τδωμ., 1min). Η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί αν η αναμενόμενη ποσότητα του RNA ξεπερνάει τα 30μg.

Η καθαρότητα του απομονωμένου RNA καθορίζεται με τον λόγο των απορροφήσεων A260/280 ο οποίος πρέπει να ξεπερνάει την τιμή 1,8. Η ποσότητα καθώς και η κατάσταση του RNA μπορούν να ελεγχθούν σε μία 1% πηκτή αγαρόζης. Επίσης για τον καθορισμό της συγκέντρωσης του RNA ισχύει ότι: A260=1 για 40μg RNA/ml.

### 2.1.5 Σύνθεση cDNA από ολικό RNA (αντίστροφη μεταγραφή, RT)

Για την σύνθεση του cDNA χρησιμοποιείται η αντίστροφη μεταγραφάση **M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, BOEHRINGER MANNHEIM)** παρουσία τυχαίων εξανουκλεοτιδίων-εκκινητών (**PROMEGA**) ενός μείγματος των τεσσάρων δεσοξυριβονουκλεοτιδίων [dNTPs] (**PROMEGA**) και του αναστολέα RNασών (**PROMEGA**). Το μείγμα της αντίδρασης είναι το ακόλουθο:

RT διάλυμα (5x)	1 0μl
Διθειοθρεϊτόλη DTT(0,1M)	5 μl
dNTPs (10mM το καθένα)	2, 5μl
Εκκινητές (10μM)	1 0μl
Αναστολέας RNασών (40u/μl)	2 μl
RNA(1μg/μl)	5 μl
H <sub>2</sub> O	1 2,5μl
Τελικός Όγκος	5

	0μl
--	-----

Το δείγμα τοποθετείται στους 68<sup>0</sup>C για 5min ώστε να καταστραφούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA. Αφού κρυώσει προστίθεται σ' αυτό 1μl αντίστροφης μεταγραφάσης **M-MLV** (200u/μl). Η διαδικασία της σύνθεσης του cDNA πραγματοποιείται στους 42<sup>0</sup>C για 1h. Τελικά το δείγμα τοποθετείται στους 100<sup>0</sup>C για 2min και έπειτα φυγοκεντρείται (14000rpm, Τδωμ., 5min). Το υπερκείμενο διατηρείται στους -20<sup>0</sup>C.

## 2.1.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

### 2.1.6.α Επέκταση των γονιδίων των ανθρώπινων αντισωμάτων από το cDNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (πρωταρχικά PCRs)

Κατά τη διαδικασία αυτή επεκτείνονται τα γονίδια των μεταβλητών περιοχών [VH], [Vk], [VL] των ανθρώπινων αντισωμάτων ή τα γονίδια των μεταβλητών και σταθερών περιοχών [VHCH], [VkCk], [VLCk] ανάλογα με τους 5' και 3' εκκινητές που χρησιμοποιούνται. Η επέκταση γίνεται κατά οικογένειες αντισωματικών γονιδίων χρησιμοποιώντας κάθε φορά ένα 5' εκκινητή και το αντίστοιχο μείγμα του ή των 3' εκκινητών με το ένζυμο **AmpliTaq** DNA πολυμεράση (**ROCHE**). Το μείγμα της αντίδρασης είναι το ακόλουθο:

<b>Διάλυμα PCR (10x)</b>	<b>5μl</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	<b>2,5μl</b>
<b>dNTPs (5mM το καθένα)</b>	<b>2,5μl</b>
<b>5' εκκινητής (10μM)</b>	<b>2,5μl</b>
<b>3' εκκινητής ή μείγμα εκκινητών (10μM)</b>	<b>2,5μl</b>
<b>cDNA (RT αντίδραση [2.1.4.])</b>	<b>2,5μl</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>32μl</b>
<b>AmpliTaq (5u/μl)</b>	<b>0,5μl</b>
<b>Τελικός Όγκος</b>	<b>50μl</b>

Το πρόγραμμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης περιλαμβάνει:  
1 κύκλος: 94<sup>0</sup>C 10min (αποδιάταξη)

30 κύκλοι: 94°C 1min (αποδιάταξη), 60°C 1min (υβριδισμός εκκινητών), 72°C 2min (σύνθεση

αλυσίδων)

1 κύκλος: 72°C 10min (σύνθεση αλυσίδων)

Τα τμήματα DNA που προκύπτουν από την αντίδραση του PCR καθαρίζονται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1,5%).

### **2.1.6.β Επέκταση του συνδετικού κομματιού (linker) με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Για την επέκταση του συνδετικού κομματιού ώστε να κατασκευαστεί η Fab κασέτα χρησιμοποιείται σαν μήτρα το φαγεμίδιο pCES-1 και οι κατάλληλοι 5' και 3' εκκινητές (Fab-LINK 5' και Fab-LINK 3'). Αντίστοιχα για την επέκταση του (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> συνδετικού κομματιού ώστε να κατασκευαστεί το scFv αντίσωμα χρησιμοποιείται το φαγεμίδιο pCANTAB-6 που περιέχει κάποιο κλωνοποιημένο γονίδιο υπό τη μορφή scFv και οι κατάλληλοι υποκινητές (scFv-LINK 5' και scFv-LINK-3'). Η αντίδραση σε κάθε περίπτωση είναι:

<b>Διάλυμα PCR (10x)</b>	<b>5μl</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	<b>2,5μl</b>
<b>dNTPs (5mM το καθένα)</b>	<b>2,5μl</b>
<b>5' εκκινητής (10μM)</b>	<b>2,5μl</b>
<b>3' εκκινητής (10μM)</b>	<b>2,5μl</b>
<b>pCES-1 ή pCANTAB-6[scFv] (100ng/μl)</b>	<b>0,2μl</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>34,3μl</b>
<b>AmpliTaq (5u/μl)</b>	<b>0,5μl</b>
<b>Τελικός Όγκος</b>	<b>50μl</b>

Το πρόγραμμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης περιλαμβάνει:

1 κύκλος: 94°C 10min (αποδιάταξη)

30 κύκλοι: 94°C 1min (αποδιάταξη), 60°C 1min (υβριδισμός εκκινητών), 72°C 2min (σύνθεση

αλυσίδων)

1 κύκλος: 72°C 10min (σύνθεση αλυσίδων)

Τα συνδετικά τμήματα που προκύπτουν από την διαδικασία του PCR καθαρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2-2,5%).

## 2.1.6.γ Κατασκευή της Fab και της scFv κασέτας με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Κατά τη διαδικασία αυτή DNA κομμάτια που διαθέτουν συμπληρωματικές ακολουθίες στα 5' και 3' άκρα τους συνδέονται μέσω της αποδιάταξης του DNA και της επακόλουθης σύνδεσης των συμπληρωματικών άκρων τα οποία λειτουργούν σαν εκκινητές στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Τα τμήματα DNA που χρησιμοποιούνται έχουν καθαριστεί σε πηκτή αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης, ανάλογα με το μέγεθος της ζώνης που πρέπει να απομονωθεί. Ακολουθεί δεύτερη αντίδραση με τους κατάλληλους εξωτερικούς 5' και 3' εκκινητές με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός DNA μορίου που αποτελείται από τις συνδεδεμένες επιμέρους αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Επιτελούνται δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR οι οποίες οργανώνονται ως εξής:

**Αντίδραση Α (κασέτα scFv)**

Διάλυμα PCR (10x)		2μl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)		1μl
dNTPs (5mM το καθένα)		1μl
Μείγμα [VH] (100ng)		X1μl
Μείγμα [VL] (100ng)		X2μl
scFv linker (50ng)		X3μl
H <sub>2</sub> O		Υμl
AmpliTaq (5u/μl)		0,2μl
Τελικός Όγκος		20μl

**Αντίδραση Α (κασέτα Fab)**

Διάλυμα PCR (10x)		2μl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)		1μl
dNTPs (5mM το καθένα)		1μl
Μείγμα [VH] (100ng)		X1μl
Μείγμα [VLCL] (200ng)		X2μl
Fab linker (50ng)		X3μl
H <sub>2</sub> O		Υμl
AmpliTaq (5u/μl)		0,2μl
Τελικός Όγκος		20μl

Το πρόγραμμα της **αντίδρασης Α** περιλαμβάνει:

1 κύκλος: 94°C 10min (αποδιάταξη)

25 κύκλοι: 94°C 1min (αποδιάταξη), 55-60°C 1min (σύνδεση αλυσίδων), 72°C 2min (σύνθεση αλυσίδων)

1 κύκλος: 72°C 10min (σύνθεση αλυσίδων)

**Αντίδραση Β (κασέτα scFv)**

Διάλυμα PCR (10x)	5 μl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2, 5μl
dNTPs (5mM το καθένα)	2, 5μl

Sfil 5' εκκινητής (10μM)	2, 5μl
Μείγμα Jκ 3'εκκιν. (10μM)	2, 5μl
Διάλυμα αντίδρασης Α	2 μl
H <sub>2</sub> O	3

	2.5μl
<b>AmpliTaq (5u/μl)</b>	0, 5μl
<b>Τελικός Όγκος</b>	5 0μl

#### Αντίδραση B (Κασέτα Fab)

<b>Διάλυμα PCR (10x)</b>	5 μl
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	2, 5μl
<b>dNTPs (5mM το καθένα)</b>	2, 5μl
<b>Μείγμα VL 5' εκκιν.</b>	2,

<b>(10μM)</b>	5μl
<b>JH 3' εκκινητής (10μM)</b>	2, 5μl
<b>Διάλυμα αντίδρασης A</b>	2 μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3 2,5μl
<b>AmpliTaq (5u/μl)</b>	0, 5μl
<b>Τελικός Όγκος</b>	5 0μl

Το πρόγραμμα της **αντίδρασης B** περιλαμβάνει:

1 κύκλος: 94<sup>o</sup>C 10min (αποδιάταξη)

25 κύκλοι: 94<sup>o</sup>C 1min (αποδιάταξη), 60<sup>o</sup>C 1min (υβριδισμός εκκινητών), 72<sup>o</sup>C 2min (σύνθεση αλυσίδων)

1 κύκλος: 72<sup>o</sup>C 10min (σύνθεση αλυσίδων)

Οι DNA κασέτες που προκύπτουν από τις δύο διαδοχικές PCR αντιδράσεις καθαρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης (1-1,5%). Οι κασέτες αυτές φέρουν στα άκρα τους συγκεκριμένες περιοριστικές θέσεις ανάλογα με τον εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε, οι οποίες χρησιμεύουν στην επακόλουθη κλωνοποίηση τους στον κατάλληλο φορέα-φαγεμίδιο.

### 2.1.7 Περιοριστική πέψη των συναρμολογημένων κασετών και των φορέων κλωνοποίησης

Οι συναρμολογημένες κασέτες κόβονται με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, ώστε να δημιουργηθούν κολλώδη άκρα και να γίνει δυνατή η κλωνοποίηση τους στους φορείς. Φυσικά οι φορείς κόβονται με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα έτσι ώστε να δημιουργηθούν συμπληρωματικά κολλώδη άκρα ως προς εκείνα των υπό κλωνοποίηση κασετών. Για την κατεργασία της scFv κασέτας και του φαγεμιδίου pCANTAB-6 χρησιμοποιούνται τα ένζυμα **Sfil** και **NotI (MINOTECH)** ενώ για την κατεργασία της Fab κασέτας και του φαγεμιδίου pCES-1 τα ένζυμα **ApaLI** και **BstEII (NEW ENGLAND BIOLABS)**. Τα ένζυμα αυτά, εκτός από το **BstEII**, απαιτούν την παρουσία αλβουμίνης ορού βοδιού (**Bovine Serum Albumin, BSA**), στο διάλυμα της αντίδρασης.

κασέτα scFv

Περιοριστική αντίδραση A(Sfil)

Διάλυμα πέψης (10x)	0μl
BSA (100x)	μl
Ένζυμο Sfil (10u/μl)	μl
DNA scFv (1μg)	μl
H <sub>2</sub> O	μl
Τελικός Όγκος	00μl

Διάλυμα πέψης (10x)	0μl
BSA (100x)	μl
Ένζυμο ApaLI (10u/μl)	μl
DNA Fab (1μg)	μl
H <sub>2</sub> O	μl
Τελικός Όγκος	00μl

#### κασέτα Fab

#### Περιοριστική αντίδραση

#### A(ApaLI)

Τα δείγματα επωάζονται στους 50<sup>0</sup>C (Sfil) και στους 37<sup>0</sup>C (ApaLI) για 4h. Στη συνέχεια στην πρώτη αντίδραση προστίθεται το κατάλληλο διάλυμα (περιοριστική αντίδραση B), έτσι ώστε να γίνει η πέψη με το δεύτερο περιοριστικό ένζυμο:

#### κασέτα scFv

#### Περιοριστική αντίδραση B(NotI)

Διάλυμα πέψης (10x)	μl
BSA (100x)	,5μl
NaCl (1M)	0μl
Ένζυμο NotI (10u/μl)	μl
H <sub>2</sub> O	9,5μl
Τελικός Όγκος	0μl

#### κασέτα Fab

#### Περιοριστική αντίδραση

#### B(BstEII)

Διάλυμα πέψης (10x)	μl
NaCl (1M)	0μl
Tris-HCl (1M) pH 8	μl
Ένζυμο BstEII (10u/μl)	μl
H <sub>2</sub> O	7μl
Τελικός Όγκος	0μl

Τα δείγματα επωάζονται στους 37<sup>0</sup>C (NotI) και στους 60<sup>0</sup>C (BstEII) για άλλες 4h. Ακολουθεί ο καθαρισμός των κομμένων κομματιών με τα κολλώδη άκρα με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1-1,5%).

Οι περιοριστικές πέψεις για τους φορείς κλωνοποίησης γίνονται ως εξής:



**pCANTAB-6**  
Περιοριστική αντίδραση A(SfiI)

Διάλυμα πέψης (10x)	μl
BSA (100x)	,2μl
Ένζυμο SfiI (10u/μl)	,5μl
DNA pCANTAB- 6 (1μg)	μl
H <sub>2</sub> O	μl
Τελικός Όγκος	0μl

Περιοριστική αντίδραση  
A(ApaLI)

Διάλυμα πέψης (10x)	μl
BSA (100x)	,2μl
Ένζυμο ApaLI (10u/μl)	,5μl
DNA pCES-1 (1μg)	μl
H <sub>2</sub> O	μl
Τελικός Όγκος	0μl

**pCES-1**

Τα δείγματα επωάζονται στους 50°C (SfiI) και στους 37°C (ApaLI) για 1,5-2h. Στη συνέχεια οι φορείς αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (0,7%, 50Volts, overnight) και απομονώνονται με ηλεκτροέκλυση σε μεμβράνες διαπίδωσης (dialysis bags). Καθαρίζονται με διαδοχικές πλύσεις με ίσο όγκο φαινόλης/χλωροφόρμιου και χλωροφόρμιου και το DNA κατακρημνίζεται με 1/10V 3M οξικό νάτριο pH 5,2 και 2,5V αιθανόλη στους -80°C. Την επόμενη μέρα το DNA φυγοκεντρείται (14000rpm, 4°C, 30min), πλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο νερού, ώστε να συνεχιστεί η δεύτερη περιοριστική αντίδραση:

**pCANTAB-6**  
Περιοριστική αντίδραση B(NotI)

Διάλυμα πέψης (10x)	μl
BSA (100x)	,2μl
Ένζυμο NotI (10u/μl)	,5μl
H <sub>2</sub> O	7,3μl
Τελικός Όγκος	0μl

Περιοριστική αντίδραση  
B(BstEII)

Διάλυμα πέψης (10x)	μl
Ένζυμο BstEII (10u/μl)	,5μl
H <sub>2</sub> O	7,5μl
Τελικός Όγκος	0μl

**pCES-1**

Τα δείγματα επωάζονται στους 37<sup>0</sup>C (**NotI**) και στους 60<sup>0</sup>C (**BstEII**) για 1,5-2h. Στη συνέχεια το DNA του φορέα απομονώνεται από το μικρό κομμάτι (insert), το οποίο παράγεται μετά και τη δεύτερη πέψη και καθαρίζεται με τον τρόπο που έχει ήδη αναφερθεί.

### 2.1.8 Κλωνοποίηση της κασέτας στον φορέα-φαγεμίδιο

Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για αυτή την αντίδραση είναι η **T4 DNA δεσμάση (NEW ENGLAND BIOLABS, NEB)**, η οποία συνδέει το DNA της δεξαμενής των scFv κασετών με τον φορέα pCANTAB-6 και το DNA της δεξαμενής των Fab κασετών με τον φορέα pCES-1. Η αντίδραση της κλωνοποίησης είναι η ακόλουθη:

Διάλυμα κλωνοπ/σης (10x)	1 μl
DNA φορέα (1μg)	x μl
DNA κασέτας (100ng)	y μl
T4 DNA δεσμάση (400u/μl)	0 ,5μl
H <sub>2</sub> O	z μl
Τελικός Όγκος	1 0μl

Το δείγμα της αντίδρασης τοποθετείται στους 16<sup>0</sup>C για 16h (overnight). Την επομένη το DNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη στους -80<sup>0</sup>C για να απομακρυνθούν τα αλάτια και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο νερού.

### 2.1.9 Ηλεκτρομετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται κατάλληλα κατεργασμένα βακτηριακά κύτταρα XL1-Blue που συνήθως αποθηκεύονται στους -80<sup>0</sup>C.

- Συγκεκριμένα σε 50-100μl κύτταρα μεταφέρεται το 1/10V του DNA του φορέα με τις κλωνοποιημένες κασέτες το οποίο προέκυψε από την αντίδραση κλωνοποίησης. Το μείγμα ανακινείται και μεταφέρεται σε ειδική παγωμένη κυψελίδα διαμέτρου 0.1cm (**BIORAD**).
- Η κυψελίδα παραμένει στον πάγο για 1min και έπειτα αφού σκουπιστεί με ένα πανί μεταφέρεται στον ηλεκτρομετασχηματιστή, όπου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση (1,7kV τάση, 25μF χωρητικότητα, 200Ohm αντίσταση). Η σταθερά χρόνου που εμφανίζεται στην οθόνη του μηχανήματος μετά τον ηλεκτρικό παλμό πρέπει να κυμαίνεται στα 4-5msec.

- Στην κυψελίδα προστίθεται κατευθείαν 1ml 2xTY+2% γλυκόζη (2xTYG). Τα κύτταρα διαλύονται μέσα στο θρεπτικό υλικό και μεταφέρονται σε ένα σωλήνα καλλιέργειας, ο οποίος τοποθετείται στους 37°C για 1h, ώστε να επανέλθουν τα κύτταρα στη φυσιολογική κατάσταση και να εκφράσουν την αντίσταση στο αντιβιοτικό που καθορίζεται από το αντίστοιχο γονίδιο που φέρει ο φορέας κλωνοποίησης, δηλαδή στην αμπικιλίνη.
- Στη συνέχεια τα κύτταρα απλώνονται σε τρυβλία με άγαρ που περιέχουν 2xTY+2% γλυκόζη+100μg/ml Αμπικιλίνη (2xTYAG), τα οποία επωάζονται στους 37°C για 16h (overnight). Παράλληλα απλώνονται κατάλληλες αραιώσεις των κυττάρων, ώστε να γίνει δυνατός ο υπολογισμός της απόδοσης της αντίδρασης μετασχηματισμού και το μέγεθος της υπό κατασκευή βιβλιοθήκης.
- Την επόμενη μέρα οι βακτηριακοί κλώνοι που συνιστούν την βιβλιοθήκη μαζεύονται από το τρυβλίο με τη βοήθεια θρεπτικού υλικού (2xTYAG). Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται (4000rpm, 4°C, 10min) και το ίζημα τους επαναδιαλύεται σε διπλάσιο όγκο θρεπτικού υλικού (2xTYAG). Τελικά στο διάλυμα των κυττάρων προστίθεται 1/4V 60% γλυκερόλη και το μείγμα χωρίζεται σε σωληνάκια, τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C.

### **2.1.10 Μελέτη και υπολογισμός της ποικιλομορφίας της βιβλιοθήκης (γενετικό αποτύπωμα, DNA fingerprinting)**

Μετά την κατασκευή της βιβλιοθήκης οι βακτηριακοί κλώνοι μπορούν να ελεγχθούν, έτσι ώστε να υπολογιστεί η ποικιλομορφία της βιβλιοθήκης. Για το σκοπό αυτό επιλέγονται 10-20 κλώνοι, για κάθε ένα από τους οποίους πραγματοποιείται μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Σ' αυτή την αντίδραση χρησιμοποιούνται οι εκκινητές: *ruc*-reverse (5' εκκινητής) και *fd*-tet-seq (3' εκκινητής).

<b>Διάλυμα PCR (10x)</b>	<b>2μl</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	<b>1μl</b>
<b>dNTPs (5mM το καθένα)</b>	<b>1μl</b>
<b>5' εκκινητής (10μM)</b>	<b>1μl</b>
<b>3' εκκινητής (10μM)</b>	<b>1μl</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>13,8μl</b>
<b>AmpliTaq (5u/μl)</b>	<b>0,2μl</b>
<b>Τελικός Όγκος</b>	<b>20μl</b>

Στο διάλυμα κάθε αντίδρασης ενοφθαλμίζεται με τη βοήθεια οδοντογλυφίδας μια μικρή ποσότητα κυττάρων από το τρυβλίο που περιέχει τους κλώνους της βιβλιοθήκης.

Το πρόγραμμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης περιλαμβάνει:

1 κύκλος: 94<sup>o</sup>C 10min (αποδιάταξη)

30 κύκλοι: 94<sup>o</sup>C 1min (αποδιάταξη), 55-60<sup>o</sup>C 1min (υβριδισμός εκκινητών), 72<sup>o</sup>C 2min (σύνθεση αλυσίδων)

1 κύκλος: 72<sup>o</sup>C 10min (σύνθεση αλυσίδων)

Το τμήμα του DNA που έχει επεκταθεί και περιλαμβάνει την κλωνοποιημένη κασέτα scFv ή Fab, κατεργάζεται με μία περιοριστική ενδονουκλεάση, η οποία κόβει τα γονίδια των αντισωμάτων σε πολλά σημεία. Ένα τέτοιο ένζυμο περιορισμού είναι το **BstNI (MINOTECH)**.

<b>Διάλυμα πέψης (10x)</b>	<b>3μl</b>
<b>BSA (100x)</b>	<b>0,3μl</b>
<b>Ένζυμο BstNI (10u/μl)</b>	<b>0,5μl</b>
<b>DNA από την αντίδραση PCR</b>	<b>15μl</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>11,2μl</b>
<b>Τελικός Όγκος</b>	<b>30μl</b>

Το δείγμα της αντίδρασης τοποθετείται στους 60<sup>o</sup>C για 2-3h και στη συνέχεια 10-20μl αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2,5-4%). Από το πρότυπο των ζωνών γίνεται ο υπολογισμός της ποικιλομορφίας της βιβλιοθήκης.

## 2.2 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ-ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΙΛΟΓΗΣ

### 2.2.1 Παραγωγή δεξαμενής φάγων που παρουσιάζουν στην επιφάνεια τους την βιβλιοθήκη των ανθρώπινων αντισωμάτων

Για την παραγωγή των φάγων που παρουσιάζουν την βιβλιοθήκη των ανθρώπινων αντισωμάτων στην επιφάνεια τους, χρησιμοποιείται κατάλληλη ποσότητα βακτηριακών κυττάρων, έτσι ώστε να αντιπροσωπεύεται το σύνολο των αντισωματικών ειδικοτήτων που βρίσκονται στην βιβλιοθήκη των βακτηριακών κλώνων. Συγκεκριμένα η ποσότητα των βακτηριακών κυττάρων που χρησιμοποιούνται για αυτό τον σκοπό, πρέπει να είναι ίση τουλάχιστον με 10x το μέγεθος της βιβλιοθήκης:

- Κατάλληλη ποσότητα κυττάρων, ώστε να ικανοποιείται το παραπάνω κριτήριο, ενοφθαλμίζεται σε 50 ml θρεπτικό υλικό (2xTYAG) που βρίσκεται μέσα σε κωνική φιάλη. Συνήθως ενοφθαλμίζονται 10 μl από το δείγμα της βιβλιοθήκης που βρίσκεται αποθηκευμένο στους  $-80^{\circ}\text{C}$  (2.1.8). Η καλλιέργεια επωάζεται στους  $37^{\circ}\text{C}$ , ώσπου η απορρόφηση A600 γίνει ίση με 0,5. Σ' αυτή την απορρόφηση τα κύτταρα έχουν ήδη εκφράσει τις F λάχνες, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη μόλυνση από τους φάγους-βοηθούς.
- Όταν η απορρόφηση A600 φτάσει την προαναφερθείσα τιμή, τότε 5ml από την καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα falcon που περιέχει την κατάλληλη ποσότητα φάγου-βοηθού **M13KO7 (PHARMACIA)**. Η αναλογία φάγων-βοηθών:βακτηριακών κυττάρων πρέπει να βρίσκεται μεταξύ των τιμών 10:1 και 20:1. Για παράδειγμα από δείγμα φάγων-βοηθών συγκέντρωσης  $10^{12}$ rfu/ml αρκούν 40μl. Το δείγμα κυττάρων και φάγων-βοηθών, αφού ανακινηθεί, τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 30min, ώστε να γίνει η μόλυνση.
- Μετά τη διαδικασία της μόλυνσης τα κύτταρα φυγοκεντρούνται (4000rpm, Tδωμ, 10min), το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 50 ml θρεπτικό υλικό 2xTYA, στο οποίο προστίθεται 25μg/ml καναμυκίνη (2xTYAK). Το διάλυμα των κυττάρων μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 250ml. Η καλλιέργεια επωάζεται στους  $30^{\circ}\text{C}$  για 16-24h (overnight).
- Την επόμενη μέρα η καλλιέργεια φυγοκεντρείται (4000rpm, Tδωμ, 20min) και το υπερκείμενο με τους φάγους μεταφέρεται σε σωλήνα Falcon όπου προστίθεται 1/5V 20% PEG 6000, 2,5M NaCl. Το υπερκείμενο παραμένει στον πάγο για 1h για να κατακρημνιστούν οι φάγοι.
- Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται (4000rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15min) και το ίζημα των φάγων επαναδιαλύεται σε 1ml PBS σε σωληνάκι erpendorf. Το δείγμα φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο (14000rpm, Tδωμ, 2min) για να απομακρυνθούν τυχόν υπάρχοντα βακτηριακά κύτταρα. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε άλλο σωληνάκι erpendorf, όπου προστίθεται 1/5V 20% PEG 6000, 2,5M NaCl. Το δείγμα παραμένει για 10min στον πάγο και κατόπιν φυγοκεντρείται (14000rpm, Tδωμ, 5min). Το ίζημα των φάγων επαναδιαλύεται σε 1ml PBS. Ακολουθεί η επιλογή των φάγων με το κατάλληλο αντιγόνο.

## **2.2.2 Επιλογή της βιβλιοθήκης με τη χρήση βιοτινιλιωμένου αντιγόνου και μαγνητικών σφαιριδίων που είναι καλυμμένα με στρεπταβιδίνη**

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται συνθετικό, βιοτινιλιωμένο) και τα μαγνητικά σφαιρίδια **Dynabeads M-280 (DYNAL)** που είναι καλυμμένα με στρεπταβιδίνη.

- Οι φάγοι που παράχθηκαν (2.2.1) εξισορροπούνται σε 2% MPBS (αποβουτυρωμένο γάλα σε PBS) με παράλληλη ανακίνηση για 1h. Συγκεκριμένα 500μl από το διάλυμα των φάγων σε PBS αναμειγνύονται με 500μl 4% MPBS ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 2% MPBS.
- Παράλληλα εξισορροπούνται 200μl μαγνητικά σφαιρίδια σε 1ml 2% MPBS με ανακίνηση για 1-2h. Τα μαγνητικά σφαιρίδια βρίσκονται διαλυμένα σε PBS που περιέχει 0,1% BSA και 0,02%  $\text{NaN}_3$ . Με τη βοήθεια ενός ειδικού μαγνήτη (**DYNAL**) τα σφαιρίδια συγκεντρώνονται στην μία πλευρά του σωλήνα errendorf και το διάλυμα απομακρύνεται. Έπειτα τα σφαιρίδια διαλύονται στο διάλυμα εξισορρόπησης.
- Αφού εξισορροπηθούν οι φάγοι, ακολουθεί η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας βιοτινιλιωμένου αντιγόνου (10-500nM). Οι φάγοι επωάζονται παρουσία του αντιγόνου με παράλληλη ανακίνηση για 1h.
- Τα μαγνητικά σφαιρίδια συγκεντρώνονται με τη βοήθεια του μαγνήτη και αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο, επαναδιαλύονται σε 200μl 2% MPBS. Το διάλυμα των μαγνητικών σφαιριδίων αναμειγνύεται με το διάλυμα φάγων-αντιγόνου και το μείγμα ανακινείται για 15min.
- Το δείγμα τοποθετείται στον μαγνήτη για 20sec ώστε τα μαγνητικά σφαιρίδια να συγκεντρωθούν και να γίνει δυνατή η απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων φάγων.
- Ακολουθεί μια σειρά κύκλων πλυσίματος ώστε να απομακρυνθούν οι μη ειδικοί φάγοι. Τα πλυσίματα γίνονται ως εξής:
  - 5x 1ml 2% MPBS
  - 8x 1ml 0.1% Tween PBS
  - 2x 1ml PBS

Μετά το τέλος κάθε πλυσίματος το διάλυμα των μαγνητικών σφαιριδίων μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι errendorf. Τελικά τα μαγνητικά σφαιρίδια διαλύονται σε 100μl PBS.

- Στο τελικό διάλυμα των μαγνητικών σφαιριδίων προστίθεται 1ml βακτηριακών κυττάρων (XL1-Blue ή TG1) που βρίσκονται σε φάση ανάπτυξης ( $A_{600}=0,5$ ). Το δείγμα παραμένει στους 37<sup>0</sup>C για 30min για να γίνει η μόλυνση των κυττάρων από τους φάγους και τελικά τα κύτταρα απλώνονται σε μεγάλα τρυβλία που περιέχουν άγαρ και 2xTYAG. Η επώαση πραγματοποιείται στους 37<sup>0</sup>C για τα XL1-Blue κύτταρα ή στους 30<sup>0</sup>C για τα TG1 κύτταρα (overnight).
- Παράλληλα πραγματοποιείται η διαδικασία τιτλοποίησης των φάγων πριν την επιλογή (Input) και μετά την επιλογή (Output), έτσι ώστε να υπάρχουν αριθμητικά δεδομένα για τον υπολογισμό του εμπλουτισμού μετά από διαδοχικούς κύκλους επιλογής (2.2.3).

### 2.2.3 Τιτλοδότηση των φάγων

Για να γίνει η τιτλοδότηση των φάγων φτιάχνεται μια σειρά αραιώσεων του αρχικού διαλύματος.

- Ετοιμάζονται σωλήνες errendorf που περιέχουν 495μl 2xTY. Στον πρώτο σωλήνα διαλύονται 5μl από το αρχικό διάλυμα των φάγων, οπότε οι φάγοι αραιώνονται 100x ( $10^{-2}$  αραιώση). Για τον υπολογισμό του “input” σε μια επιλογή τα 5μl προέρχονται από το διάλυμα των φάγων πριν την επιλογή, ενώ για τον υπολογισμό του “output” τα 5μl προέρχονται από το διάλυμα των μαγνητικών σφαιριδίων-βακτηριακών κυττάρων μετά την διαδικασία της επιλογής. Ακολούθως 5μl από τον πρώτο σωλήνα errendorf μεταφέρεται σε δεύτερο ( $10^{-4}$  αραιώση), από το δεύτερο σε τρίτο ( $10^{-6}$  αραιώση) κλπ. Για τον υπολογισμό του “input” γίνονται αραιώσεις μέχρι  $10^{-10}$  ανάλογα με την ποσότητα των φάγων ενώ για τον υπολογισμό του “output” γίνονται αραιώσεις μέχρι  $10^{-4}$  για τον πρώτο κύκλο επιλογής και μέχρι  $10^{-6}$  για τους επόμενους κύκλους.
- Σε κάθε αραιώση προστίθεται 0,5ml κυττάρων που βρίσκονται σε φάση εκθετικής ανάπτυξης ( $A_{600}=0,4-0,6$ ) και τα δείγματα επωάζονται στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 30min για να γίνει η μόλυνση.
- Τελικά απλώνονται 10μl ή 100μl από κάθε αραιώση σε μικρά τρυβλία που περιέχουν άγαρ και 2xTYAG: για το “input” απλώνονται οι αραιώσεις  $10^{-8}/10^{-10}$ , ενώ για το “output” απλώνονται οι αραιώσεις  $10^{-2}/10^{-4}$  για τον πρώτο κύκλο επιλογής και  $10^{-4}/10^{-6}$  για τους επόμενους κύκλους. Η επώαση πραγματοποιείται στους  $37^{\circ}\text{C}$  για τα XL1-Blue κύτταρα ή στους  $30^{\circ}\text{C}$  για τα TG1 κύτταρα (overnight).
- Είναι απαραίτητο να απλωθεί ένα δείγμα των βακτηριακών κυττάρων σαν αρνητικός μάρτυρας, ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητα τους.
- Την επόμενη μέρα γίνονται οι υπολογισμοί του τίτλου των φάγων ως εξής:  
Αριθμός αποικιών x 1/αραιώση x 1/όγκος που απλώθηκε στο τρυβλίο x 2 = τίτλος φάγων

## 2.3 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.3.1 Επαγωγή διαλυτού αντισώματος σε πλάκες 96 πηγαδιών

Οι πλάκες καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται έχουν επίπεδη βάση και διαθέτουν καπάκι που παρεμποδίζει την εξάτμιση (**COSTAR**).

- Σε κάθε πηγάδι που περιέχει 100μl θρεπτικό υλικό 2xTYAG γίνεται ενοφθαλμισμός ενός από τους βακτηριακούς κλώνους της βιβλιοθήκης. Η πλάκα τοποθετείται σε επωαστήρα με ανακίνηση στους 30°C για 16h (overnight).
- Την επόμενη μέρα μεταφέρονται σε νέα πλάκα 2μl από κάθε πηγάδι της πρώτης πλάκας. Η νέα πλάκα που ετοιμάστηκε περιέχει 100μl θρεπτικό υλικό 2xTYA με 0,1% γλυκόζη. Η πλάκα παραμένει στους 37°C για 2-3h (TG1) ή 3-4h (XL-1Blue), ώσπου η απορρόφηση να γίνει  $A_{600}=0,7-0,9$ . Παράλληλα στην πρώτη πλάκα γίνεται προσθήκη 30μl 60% γλυκερόλη σε κάθε πηγάδι. Ακολούθως η πλάκα αυτή φυλάσσεται στους -80°C.
- Αφού η απορρόφηση φτάσει στην επιθυμητή τιμή, γίνεται προσθήκη 20μl 2xTYA με 6mM IPTG, ώστε η τελική συγκέντρωση του να είναι 1mM, σε κάθε πηγάδι της πλάκας. Τελικά η πλάκα επωάζεται στους 30°C για 16-24h (overnight).
- Την επόμενη μέρα η πλάκα φυγοκεντρείται (1700rpm, Τδωμ, 20min) και το υπερκείμενο της καλλιέργειας χρησιμοποιείται στην ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA).

### 2.3.2 Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA) για την ανίχνευση διαλυτού αντισώματος

Αρχικά μια πλάκα 96 πηγαδιών επιστρώνεται με το αντιγόνο (Εικόνα 3.1.1):

- Σε κάθε πηγάδι γίνεται προσθήκη 100μl 2μg/ml βιοτινιλιωμένη BSA σε PBS. Η πλάκα παραμένει στους 37°C για 1h.
- Στη συνέχεια η πλάκα πλένεται 3 φορές με 0,05% Tween σε νερό ή PBS.
- Σε κάθε πηγάδι γίνεται προσθήκη 100μl 10μg/ml στρεπταβιδίνη σε PBS που περιέχει 0,5% ζελατίνη. Η πλάκα παραμένει σε Τδωμ για 1h.
- Στη συνέχεια η πλάκα πλένεται 3 φορές με 0,05% Tween σε νερό ή PBS. Η πλάκα μπορεί να χρησιμοποιηθεί αμέσως ή να φυλαχτεί στους 4°C.
- Για να πραγματοποιηθεί η ανοσοενζυμική μέθοδος, σε κάθε πηγάδι γίνεται προσθήκη 100μl 0,5-1μg/ml αντιγόνου σε 2% MPBS. Η πλάκα ανακινείται σε Τδωμ για 1h.
- Στη συνέχεια η πλάκα πλένεται 3 φορές με 0,05% Tween σε νερό ή PBS.
- Σε κάθε πηγάδι γίνεται προσθήκη 45μl 4% MPBS και 45μl από το υπερκείμενο της βακτηριακής καλλιέργειας που περιέχει το διαλυτό αντίσωμα (2.3.1). Η πλάκα παραμένει σε Τδωμ για 1-2h.
- Στη συνέχεια η πλάκα πλένεται 3 φορές με 0,05% Tween σε νερό ή PBS.



- Σε κάθε πηγάδι γίνεται προσθήκη 90μl διαλύματος του αντισώματος **9E10** σε 2% MPBS. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει την c-myc ουρά των αντισωματικών κομματιών και έχει παραχθεί σε ποντίκια. Το αντίσωμα αραιώνεται 1000-2000 φορές. Η πλάκα παραμένει σε Τδωμ για 1h.
- Στη συνέχεια η πλάκα πλένεται 3 φορές με 0,05% Tween σε νερό ή PBS.
- Σε κάθε πηγάδι γίνεται προσθήκη 90μl διαλύματος 1μg/ml ενός αντι-τρωκτικού αντισώματος σε 2% MPBS (**THE BINDING SITE**). Το αντίσωμα αυτό είναι συζευγμένο (conjugate) με το ένζυμο **HRP**. Η πλάκα παραμένει σε Τδωμ για 1h.
- Στη συνέχεια η πλάκα πλένεται 3 φορές με 0,05% Tween σε νερό ή PBS.
- Ακολουθεί προσθήκη 100μl διαλύματος 1:1 υπόστρωμα-χρωμογόνο σε κάθε πηγάδι της πλάκας. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα, έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση μπλε χρώματος στα πηγάδια εκείνα που υπάρχει ειδικό αντίσωμα.
- Μετά από 10-20 min ανάλογα με την εξέλιξη της αντίδρασης, γίνεται προσθήκη 45μl 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, οπότε η αντίδραση τερματίζεται.
- Τελικά η πλάκα τοποθετείται σε ειδικό σπεκτροφωτόμετρο, όπου πραγματοποιείται η μέτρηση της απορρόφησης A450.

Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν πλάκες χωρίς ακινητοποιημένο αντιγόνο. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και στην περίπτωση που επιχειρείται η ανίχνευση ειδικού αντισώματος σε διάλυμα περιπλάσματος βακτηριακών κυττάρων, οπότε γίνονται κατάλληλες αραιώσεις του περιπλάσματος σε 2% MPBS.

### **2.3.3 Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA) ανταγωνιστικής εκτόπισης**

Κατά τη διαδικασία αυτή γίνεται προεπώαση του αντισώματος με διαλυτό αντιγόνο πριν τοποθετηθεί στην πλάκα των 96 πηγαδιών, ώστε να γίνει η επώαση στο ακινητοποιημένο αντιγόνο 100μερές MUC1 (2.3.2). Η τιμή της απορρόφησης A450 που μετράται στο τέλος της διαδικασίας είναι αντιστρόφως ανάλογη της ειδικότητας του αντισώματος προς το αντιγόνο της προεπώασης. Αυτό σημαίνει ότι εφόσον το αντίσωμα παρουσιάζει συγγένεια προς το αντιγόνο αυτό, θα παρατηρηθεί πτώση της τιμής της απορρόφησης A450, ενώ αν το αντίσωμα δεν είναι ειδικό δεν θα παρατηρηθεί ανάλογη πτώση. Η σύγκριση γίνεται με ένα δείγμα ελέγχου όπου το αντίσωμα δεν προεπωάζεται με το διαλυτό αντιγόνο (**Dahlenborg et al., 1996**).

### **2.3.4 Μέτρηση στον ανιχνευτή BIAcore**

Η μέτρηση της κινητικής των αντισωμάτων έγινε με τη βοήθεια του ανιχνευτή BIAcore 2000 (**PHARMACIA**). Μία ειδική πλάκα CM-5 επιστρώθηκε με στρεπταβιδίνη στην οποία συνδέθηκε το βιοτινιλιωμένο 100μερές MUC1 (245RU) σύμφωνα με το πρωτόκολλο 4.4.3 που υπάρχει στο εγχειρίδιο του μηχανήματος. Συγκεκριμένα η ακινητοποίηση της στρεπταβιδίνης (400μg/ml) έγινε σε

10mM οξικό νάτριο pH 5 και η ακόλουθη ακινητοποίηση του βιοτινιλιωμένου αντιγόνου (100μg/ml) έγινε σε 10mM HEPES pH 7,4, 0,3M NaCl. Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μια άδεια επιφάνεια που είχε ενεργοποιηθεί και απενεργοποιηθεί. Τα περιπλασματικά διαλύματα που περιείχαν το αντίσωμα ενέθηκαν τρεις φορές με ταχύτητα ροής 20μl/min σε διάλυμα HBS (**PHARMACIA**) ώστε να επιτευχθεί ο κορεσμός των αντιγονικών θέσεων.

### **2.3.5 Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS)**

Η ανάλυση έγινε στο μηχάνημα FACScalibur (**BECTON DICKINSON, OXNARD, CA**). Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι μαστικές σειρές T47D και MCF7 και η κυτταρική σειρά του παχέως εντέρου CaCO<sub>2</sub> (**AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, ROCKVILLE, MD**). Η χρώση των κυττάρων έγινε σύμφωνα με υπάρχοντα πρωτόκολλα με κάποιες τροποποιήσεις (**Coligan et al., 1996**).

- Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν περίπου 500.000 κύτταρα, τα οποία μετά από την επώαση με τρυψίνη, πλύθηκαν με PBS και επαναδιαλύθηκαν σε 2% αποβουτυρωμένο γάλα/0,1% BSA/0,01% NaN<sub>3</sub> σε PBS (διάλυμα επώασης).
- Τα περιπλασματικά διαλύματα που περιείχαν τα αντισώματα διαλύθηκαν σε αναλογία 1:1 με 200μl διάλυμα επώασης και προεπωάστηκαν παρουσία ή απουσία του 100μερούς MUC1 (50μg/ml) για 1h σε Τδωμ.
- Στη συνέχεια τα δείγματα προστέθηκαν στα κύτταρα και η επώαση διήρκεσε 1h σε Τδωμ.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση (611g, Τδωμ, 3min) και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Η πελέττα των κυττάρων πλύθηκε δύο φορές με PBS.
- Τα κύτταρα επωάστηκαν με το αντίσωμα 9E10 (από υπερκείμενο καλλιέργειας υβριδωμάτων) σε αραιώση 1:1 στο διάλυμα επώασης για 1h σε Τδωμ.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση (611g, Τδωμ, 3min) και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Η πελέττα των κυττάρων πλύθηκε δύο φορές με PBS.
- Τα κύτταρα επωάστηκαν με το αντι-τροκτικό αντίσωμα που ήταν συζευγμένο με την R-φυκοερυθρίνη (**DAKO**) σε αραιώση 1:20 στο διάλυμα επώασης για 1h σε Τδωμ.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση (611g, Τδωμ, 3min) και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Η πελέττα των κυττάρων πλύθηκε δύο φορές με PBS.
- Η ανίχνευση των συνδεδεμένων αντισωμάτων έγινε με την κυτταρομετρία ροής και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα CELLQuest (**BECTON DICKINSON**)

Για τη μέτρηση του κυτταροπλασματικού MUC1 ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία με τις εξής αλλαγές: δεν προστέθηκε 0,01% NaN<sub>3</sub> διάλυμα επώασης, ενώ προστέθηκε 0,3% σαπονίνη στο διάλυμα της πρώτης επώασης και 0,1% σαπονίνη στα διαλύματα των επόμενων επωάσεων, καθώς και κατά τα διαδοχικά πλυσίματα. Μ' αυτό τον τρόπο τα κύτταρα έγιναν διαπερατά από τα αντισώματα.

### 2.3.6 Ανάλυση με ανοσοϊστοχημεία

Χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικοί και καρκινικοί ιστοί που είχαν τοποθετηθεί σε παραφίνη. Οι τομές των ιστών τοποθετήθηκαν σε γυάλινες πλάκες και η παραφίνη απομακρύνθηκε μετά από κατεργασία με ξυλένιο και αιθανόλη.

- Η δράση της ενδογενούς περοξειδάσης μπλοκαρίστηκε με επώαση με 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε μεθανόλη για 30min.
- Οι ιστοί προεπώαστηκαν σε 2% αποβουτυρωμένο γάλα/0,1% BSA σε PBS (διάλυμα επώασης) για 1h σε Τδωμ.
- Οι ιστοί πλύθηκαν 3 φορές με PBS.
- Τα περιπλασματικά διαλύματα που περιείχαν τα αντισώματα διαλύθηκαν σε αναλογία 1:1 στο διάλυμα επώασης και προστέθηκαν στους ιστούς. Η επώαση διήρκεσε 2h σε Τδωμ.
- Οι ιστοί πλύθηκαν 3 φορές με PBS.
- Οι ιστοί επώαστηκαν με το αντίσωμα 9E10 (από υπερκείμενο καλλιέργειας υβριδωμάτων) σε αραιώση 1:1 στο διάλυμα επώασης για 1h σε Τδωμ.
- Οι ιστοί πλύθηκαν 3 φορές με PBS.
- Τελικά οι ιστοί επώαστηκαν με το αντι-τρωκτικό αντίσωμα που ήταν συζευγμένο με περοξειδάση (**THE BINDING SITE**) σε αραιώση 1/2000 στο διάλυμα επώασης για 1h σε Τδωμ.
- Οι ιστοί πλύθηκαν 3 φορές με PBS.
- Η χρώση έγινε με 0,5mg/ml διαμινοβενζιδίνη σε 0,05M Tris-HCl pH 7,6 και 0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 2.3.7 Ανάλυση πυκνότητας

Η ανάλυση της πυκνότητας των ζωνών στα Western blots έγινε με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Scion Image. Το εμβαδόν και η ένταση των ζωνών υπολογίστηκαν ανεξάρτητα και οι δύο τιμές πολλαπλασιάστηκαν, ώστε να ποσοτικοποιηθεί η αντίστοιχη πρωτεΐνη.

## 2.4 ΓΕΝΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

### 2.4.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι κολώνες **QIAGEN-tip 20** ή **QIAGEN-tip 100** ανάλογα με τον όγκο της βακτηριακής καλλιέργειας και το αντίστοιχο πρωτόκολλο (**QIAGEN**). Συγκεκριμένα η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μικρές καλλιέργειες των 3ml πραγματοποιήθηκε με το **QIAGEN-tip 20** και από μεγαλύτερες καλλιέργειες των 30ml με το **QIAGEN-tip 100**. Το θρεπτικό μέσο των καλλιεργειών ήταν το διάλυμα **Luria Bertani (LB)** με 2% γλυκόζη και 100μg/ml αμπικιλίνη (LBAG).

- Η βακτηριακή καλλιέργεια των 3ml αφού επωαστεί για 16h (overnight) φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο (14000rpm, 4°C, 1min), ενώ εκείνη των 30 ml φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο Beckman (4000rpm, 4°C, 20min).
- Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 0,3/4ml διαλύματος P1 που περιέχει 0,1mg/ml **Rnase A**, ένα ένζυμο που αποικοδομεί το RNA.
- Γίνεται προσθήκη 0,3/4ml διαλύματος P2, το διάλυμα ανακινείται μερικές φορές και επωάζεται για 5min σε Τδωμ.
- Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 0,3/4ml διαλύματος P3, το διάλυμα ανακινείται αμέσως μερικές φορές και επωάζεται για 15-20min στον πάγο.
- Το διάλυμα φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο (14000rpm, 4°C, 30min) ή σε φυγόκεντρο Sorvall (16000rpm, 4°C, 30min).
- Το υπερκείμενο διηθίζεται μέσα από ειδικό γυάλινο μαλλί (glass wool), ώστε να απομακρυνθούν τα αιωρήματα που τυχόν υπάρχουν. Παράλληλα η κολώνα εξισορροπείται με 1/4ml διαλύματος QBT.
- Ακολουθεί η προσθήκη του υπερκειμένου στην κολώνα. Αφού περάσει το υπερκείμενο η κολώνα πλένεται δύο φορές με 2/10ml διαλύματος QC.
- Τελικά γίνεται έκλουση του DNA από την κολώνα με 0,8/5ml διαλύματος QF.
- Στο διάλυμα προστίθεται 0,7V ισοπροπανόλη σε Τδωμ και φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο (14000rpm, 4°C, 30min) ή σε φυγόκεντρο Sorvall (16000rpm, 4°C, 30min).
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα πλένεται με 70% αιθανόλη και στεγνώνει στον αέρα για 5min. Τελικά το ίζημα του DNA διαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE ή σε νερό. Σε πηκτή αγαρόζης (1%) γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδιακού DNA καθώς και ο έλεγχος της κατάστασης του. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης μπορεί να γίνει μετρώντας την απορρόφηση A260. Ισχύει: A260=1 τότε η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA είναι 50μg/ml.

## 2.4.2 Απομόνωση κομματιών DNA από πηκτική αγαρόζη

### 2.4.2.α Με τη χρήση κολώνων

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι κολώνες **Wizard Minicolumns (PROMEGA)** και οι **QIAquick Spin Columns (QIAGEN)**. Η ηλεκτροφόρηση έγινε στο διάλυμα 1x TAE. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Promega:

- Το κομμάτι της πηκτικής αγαρόζης (μέχρι 300mg) που περιέχει την ζώνη του DNA προς απομόνωση τοποθετείται σε σωλήνα errendorf και επωάζεται στους 50°C, ώσπου να λιώσει η αγαρόζη, οπότε γίνεται προσθήκη 1ml διαλύματος ρητίνης **PCR Preps DNA Purification Resin (PROMEGA)**. Το διάλυμα ανακινείται για 20sec.
- Το διάλυμα προστίθεται στην κολώνα με τη βοήθεια μιας σύριγγας των 2,5ml.
- Η κολώνα πλένεται με 2ml 80% ισοπροπανόλη και φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο (11000rpm, Τδωμ, 2min), ώστε να απομακρυνθεί η ισοπροπανόλη.
- Τελικά το DNA εκλούεται με την προσθήκη στην κολώνα 50μl TE ή νερού. Η κολώνα παραμένει για 1-5min στον πάγκο και τελικά φυγοκεντρείται (11000rpm, Τδωμ, 20sec). Για την έκλουση κομματιών DNA που είναι μεγαλύτερα από 3kb το διάλυμα της έκλουσης θερμαίνεται στους 65-80°C.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Qiagen:

- Το κομμάτι της πηκτικής αγαρόζης που περιέχει την ζώνη του DNA προς απομόνωση τοποθετείται σε σωλήνα errendorf και ζυγίζεται. Έπειτα γίνεται προσθήκη 3V διαλύματος QG. Ισχύει ότι 100mg αγαρόζης έχουν όγκο περίπου 100μl. Για κομμάτια αγαρόζης μέχρι 400mg χρησιμοποιείται μία κολώνα. Το διάλυμα επωάζεται στους 50°C, ώσπου να λιώσει η αγαρόζη. Κατά τη διάρκεια της επώασης το σωληνάκι ανακινείται.
- Στην περίπτωση που το μέγεθος του DNA κομματιού είναι μικρότερο από 500bp και μεγαλύτερο από 4kb, γίνεται προσθήκη 1V (όπου V είναι ο όγκος του κομματιού της αγαρόζης) ισοπροπανόλης, ώστε να αυξηθεί η απόδοση της απομόνωσης.
- Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται στην κολώνα και η κολώνα φυγοκεντρείται (13000rpm, Τδωμ, 1min).
- Η κολώνα πλένεται με 0,75ml διαλύματος PE και φυγοκεντρείται (13000rpm, Τδωμ, 1min).
- Η κολώνα φυγοκεντρείται για άλλη μια φορά, ώστε να απομακρυνθούν τα τελευταία ίχνη της αιθανόλης που υπάρχει στο διάλυμα PE.
- Τελικά το DNA εκλούεται με την προσθήκη 50μl διαλύματος EB ή νερού και την φυγοκέντρωση της (14000rpm, Τδωμ, 1min).

### 2.4.2.β Με ηλεκτροέκλουση

Το κομμάτι της πηκτικής αγαρόζης τοποθετείται μέσα σε ειδικό πλαστικό σακουλάκι διαπίδωσης (dialysis bag). Μέσα στο σακουλάκι προστίθεται ποσότητα νερού, ώστε να καλυφθεί η πηκτική και να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα. Το σακουλάκι τοποθετείται στην συσκευή της

ηλεκτροφόρησης, όπου εφαρμόζεται τάση 130V για 15-30min, ώστε το DNA να μετακινηθεί από την πηκτή της αγαρόζης και μπει μέσα στο νερό. Έπειτα αναστρέφονται οι πόλοι και εφαρμόζεται η ίδια τάση για 10-15sec, ώστε να ξεκολλήσει το DNA από το πλαστικό. Τελικά το νερό με το διαλυμένο DNA μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf και καθαρίζεται από τυχόν ίχνη της αγαρόζης με ίσο όγκο φαινόλης/χλωροφορμίου και ίσο όγκο χλωροφόρμιου. Στο διάλυμα προστίθεται 1/10V 3M οξικό νάτριο και 2,5V 100% αιθανόλη. Το διάλυμα τοποθετείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  ή στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 1h-16h (overnight). Το DNA κατακρημνίζεται με φυγοκέντρηση (14000rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 30min), πλένεται με 70% αιθανόλη, και διαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE ή νερού. Ακολουθεί υπολογισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου DNA με ηλεκτροφόρηση του σε πηκτή αγαρόζης, παρουσία ενός μάρτυρα ποσοτικοποίησης. Ο μάρτυρας ποσοτικοποίησης που χρησιμοποιείται είναι το DNA του λ φάγου που είναι κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο PstNI. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται ως μάρτυρας μία κλιμακωτή σκάλα DNA ζωνών που διαφέρουν κατά 100bp.

### 2.4.3 Αλληλούχιση κομματιών DNA (sequencing)

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής ακολουθίας έγινε σύμφωνα με τον κατασκευαστή του μηχανήματος **ALF-Express (PHARMACIA)**. Πλασμιδικό DNA απομονώθηκε όπως έχει περιγραφεί (2.4.1) και οι ακολουθίες των αντισωμικών γονιδίων καθορίστηκαν με το **AutoRead Sequencing Kit (PHARMACIA)** με τη χρήση των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών fd-tet seq και ruc-reverse (Παράρτημα Β).

### 2.4.4 Επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης με IPTG

Για το σκοπό αυτό ετοιμάζεται μια overnight βακτηριακή καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό 2xTYAG, από όπου γίνεται αραίωση 1/100 των κυττάρων σε καινούργιο θρεπτικό υλικό 2xTYA που περιέχει 0,1% γλυκόζη:

- Σε 50ml του θρεπτικού υλικού αραιώνονται 500μl από τα κύτταρα της κορεσμένης βακτηριακής καλλιέργειας. Το διάλυμα τοποθετείται σε κωνική φιάλη των 250ml και επωάζεται στους  $37^{\circ}\text{C}$  με ανακίνηση στις 270 στροφές, ώσπου η απορρόφηση A600 να γίνει 0,7-0,9.
- Η κωνική φιάλη παραμένει για λίγο στον πάγκο για να κατέβει η θερμοκρασία στους  $30^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια γίνεται η προσθήκη 1mM IPTG.
- Η καλλιέργεια επωάζεται στους  $30^{\circ}\text{C}$  με ανακίνηση στις 270 στροφές, για 3-4h και τελικά το θρεπτικό υλικό με τα κύτταρα φυγοκεντρείται (4000rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 20min).

Εναλλακτικά η αραίωση των κυττάρων μπορεί να γίνει σε θρεπτικό υλικό 2xTYAG. Όταν η καλλιέργεια φτάσει στην επιθυμητή τιμή απορρόφησης, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται (4000rpm, Tδωμ, 10min) και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 50ml θρεπτικό υλικό 2xTYA, που περιέχει 1mM IPTG. Ακολουθεί η ίδια διαδικασία.

### 2.4.5 Απομόνωση περιπλασμικών πρωτεϊνών

Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων μετά από την επαγωγή με IPTG (2.4.4) κατεργάζεται ως εξής:

- Επαναδιαλύεται σε 0,53ml παγωμένου διαλύματος TES και παραμένει στον πάγο για 5-10min με περιοδική ανακίνηση.
- Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάκι errendorf όπου γίνεται προσθήκη 0.59ml TES/H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα που προκύπτει παραμένει στον πάγο για 20min.
- Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται (14000rpm, 4<sup>0</sup>C, 2min) και το υπερκείμενο τοποθετείται σε νέο σωληνάκι errendorf. Η φυγοκέντρωση επαναλαμβάνεται για 10min, ώστε να απομακρυνθούν εντελώς τα βακτηριακά κύτταρα. Στο υπερκείμενο προστίθεται 1mM PMSF σαν συντηρητικό, ώστε να απενεργοποιηθούν όλες οι υπάρχουσες πρωτεάσες. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -20<sup>0</sup>C.
- Εναλλακτικά εφόσον οι πρωτεΐνες του περιπλάσματος πρόκειται να καθαριστούν με χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου, το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων του προηγούμενου βήματος επαναδιαλύεται σε 0,67ml TES που περιέχει 15mM MgSO<sub>4</sub>. Το διάλυμα που προκύπτει παραμένει στον πάγο για 15min. Τελικά τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται (14000rpm, 4<sup>0</sup>C, 2min) και το υπερκείμενο τοποθετείται σε νέο σωληνάκι errendorf. Η φυγοκέντρωση επαναλαμβάνεται για 10min, ώστε να απομακρυνθούν εντελώς τα βακτηριακά κύτταρα. Στο υπερκείμενο προστίθεται 1mM PMSF σαν συντηρητικό, ώστε να απενεργοποιηθούν όλες οι υπάρχουσες πρωτεάσες. Για να χρησιμοποιηθεί το διάλυμα στην χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου είναι απαραίτητη η απομάκρυνση του EDTA που περιέχεται στο TES. Γι' αυτό το λόγο το διάλυμα του περιπλάσματος τοποθετείται σε πλαστικές σακούλες διαπίδυσης (dialysis bags). Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιείται μέσα στο διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση της πρωτεΐνης με την κολώνα χρωματογραφίας συγγένειας μετάλλου. Πραγματοποιούνται 2-3 αλλαγές του διαλύματος κάθε 1-2h. Για την απομόνωση με την ρητίνη **TALON** χρησιμοποιείται το sonication διάλυμα, ενώ για την απομόνωση με την ρητίνη **Ni-NTA** χρησιμοποιείται το διάλυμα λύσης (2.4.6).

### 2.4.6 Καθαρισμός πρωτεϊνών με 6xHis ουρά

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο εναλλακτικά πρωτόκολλα: το πρώτο βασίστηκε στη ρητίνη **TALON (CLONTECH)** και το δεύτερο στη ρητίνη **Ni-NTA (QIAGEN)**. Στην πρώτη περίπτωση το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

- Μέσα σε ένα σωλήνα falcon γίνεται προσθήκη 2ml/5mg 6x-His πρωτεΐνης από το 50% διάλυμα της ρητίνης TALON. Το διάλυμα φυγοκεντρείται (2000rpm, Τδωμ, 2min). Η ρητίνη κατακρημνίζεται και το υπερκείμενο που αποτελείται από 20% αιθανόλη, απομακρύνεται.
- Γίνεται προσθήκη 5V διαλύματος sonication όπου V είναι ο όγκος της ρητίνης, για να εξισορροπηθεί η ρητίνη. Το διάλυμα φυγοκεντρείται (2000rpm, Τδωμ, 2min). Η ρητίνη κατακρημνίζεται και το υπερκείμενο απομακρύνεται.

- Στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα του περιπλάσματος (2.4.5). Η ρητίνη ανακινείται σε Τδωμ για 20min, ώστε να συνδεθεί η 6x-His πρωτεΐνη. Γίνεται φυγοκέντρηση (2000rpm, Τδωμ, 2min) και το υπερκείμενο απομακρύνεται.
- Η ρητίνη πλένεται με 10V διαλύματος sonication και ανακίνηση σε Τδωμ για 10min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (2000rpm, Τδωμ, 2min) και το υπερκείμενο απομακρύνεται.
- Η διαδικασία του πλυσίματος επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά.
- Τελικά η 6x-His πρωτεΐνη εκλούεται με την προσθήκη 4V διαλύματος έκλουσης. Το διάλυμα που εκλούεται από την κολώνα μαζεύεται κατά τμήματα των 200-500μl. Η συγκέντρωση της 6x-His πρωτεΐνης υπολογίζεται με την μέτρηση της απορρόφησης A280, όπου A280=1,45 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 1mg/ml πρωτεΐνης.  
Στη δεύτερη περίπτωση το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:
- Σε 1ml 50% διαλύματος της Ni-NTA ρητίνης γίνεται προσθήκη 4ml διαλύματος περιπλάσματος (2.4.5). Το μείγμα πακετάρεται σε κολώνα και η κολώνα πλένεται 2x με 4ml διάλυμα πλυσίματος.
- Η 6x-His πρωτεΐνη εκλούεται με 4x 0.5ml διάλυμα έκλουσης. Η συγκέντρωση της 6x-His πρωτεΐνης υπολογίζεται με την μέτρηση της απορρόφησης A280.

### **2.4.7 Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE**

Στο διάλυμα των πρωτεϊνών προστίθεται κατάλληλος όγκος από το 5x διάλυμα ηλεκτροφόρησης που περιέχει SDS και μερκαπτοαιθανόλη και το μείγμα βράζεται για 5min. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε το σύστημα **Phastsystem (PHARMACIA)**. Η πηκτή πολυακρυλαμίδης ήταν ομογενής με συγκέντρωση 12,5%. Ο μάρτυρας μοριακού βάρους (**PHARMACIA**) που χρησιμοποιήθηκε, περιελάμβανε τις πρωτεΐνες: φωσφορυλάση-β (94000), αλβουμίνη (67000), οβαλβουμίνη (43000), καρβονική ανυδράση (30000), αναστολέας της τρυψίνης (20100), α-λακταλβουμίνη (14400). Στην περίπτωση που μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (western blotting), ο μάρτυρας μεγέθους **Rainbow (AMERSHAM)** περιελάμβανε τις πρωτεΐνες: μιοσίνη (220000, μπλε), φωσφορυλάση-β (97400, καφέ), αλβουμίνη βοδινού ορού (66000, κόκκινο), οβαλβουμίνη (46000, κίτρινο) καρβονική ανυδράση (30000, πορτοκαλί), αναστολέας της τρυψίνης (21500, μπλε), λυσοζύμη (14300, μωβ).

### **2.4.8 Ανάλυση πρωτεϊνών με western blotting ή με dot blot**

Στην περίπτωση του dot blot οι πρωτεΐνες ή τα πεπτίδια ακινητοποιούνται πάνω στην μεμβράνη είτε με τη χρήση ειδικού μηχανήματος και την εφαρμογή κενού, είτε με την απλή προσθήκη στην επιφάνεια της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης ή PVDF. Στην περίπτωση του western blotting οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορούνται (2.4.7) και στη συνέχεια μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά γίνεται με τη βοήθεια του συστήματος **Phastsystem (PHARMACIA)** με την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Η μεμβράνη καθώς και τα απορροφητικά χαρτιά κόβονται στο σχήμα της πηκτής και εμβαπτίζονται στο διάλυμα μεταφοράς. Αφού ολοκληρωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών στην



μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ακολουθεί η κατεργασία της μεμβράνης ώστε να ανιχνευθούν με τα κατάλληλα αντισώματα τα scFv μόρια, οι VHCH και VLCL αλυσίδες ανάλογα με την περίπτωση. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε αναφέρεται στο Development Technique File No. 221 (**PHARMACIA**). Σύμφωνα με αυτό:

- Η μεμβράνη μεταφέρεται στο διάλυμα μπλοκαρίσματος των διαθέσιμων θέσεων (blocking solution), όπου επωάζεται για 0,5-1h.
- Ακολουθεί πλύσιμο με το διάλυμα πλυσίματος (wash solution) για 2x5min.
- Η μεμβράνη επωάζεται στο διάλυμα του πρώτου αντισώματος για 1-16h. Αν ανιχνεύεται η 6x-His ουρά τότε χρησιμοποιείται το αντίσωμα 9E10 σε μια αραιώση 1/200, αν ανιχνεύεται η pIII τότε χρησιμοποιείται ένα αντίσωμα αντι-pIII σε μια αραιώση 1/200, ενώ αν ανιχνεύεται η παρουσία ανθρώπινων Fab αλυσίδων, χρησιμοποιείται ένα αντι-Fab αντίσωμα σε συγκέντρωση 1mg/ml. Το 9E10 που προέρχεται από ποντίκι (υβρίδωμα) και το αντι-pIII που προέρχεται από κουνέλι έχουν φτιαχτεί στο εργαστήριο. Το αντι-Fab προέρχεται από πρόβατο και έχει αγοραστεί από την **THE BINDING SITE**.
- Ακολουθεί το πλύσιμο της μεμβράνης όπως έχει ήδη αναφερθεί.
- Η μεμβράνη επωάζεται στο δεύτερο αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο **HRP (Horse Radish Peroxidase)** ή με το ένζυμο **αλκαλική φωσφατάση** για 1h. Στην περίπτωση που το πρώτο αντίσωμα είναι το 9E10, χρησιμοποιείται ένα αντίσωμα από πρόβατο το οποίο είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο HRP σε αραιώση 1/2000 (**sheep anti-mouse HRP, THE BINDING SITE**). Στην περίπτωση που το πρώτο αντίσωμα είναι το αντι-pIII, χρησιμοποιείται ένα αντίσωμα από κατσίκια το οποίο είναι συνδεδεμένο επίσης με το ένζυμο HRP σε αραιώση 1/4000 (**goat anti-rabbit HRP**) και έχει φτιαχτεί στο εργαστήριο. Στην περίπτωση που το πρώτο αντίσωμα είναι το αντι-Fab, χρησιμοποιείται ένα αντίσωμα από κουνέλι το οποίο είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση σε αραιώση 1/2000 (**rabbit anti-sheep alkaline phosphatase**) και έχει επίσης φτιαχτεί στο εργαστήριο.
- Ακολουθεί το πλύσιμο της μεμβράνης όπως έχει ήδη αναφερθεί.
- Τελικά αν το τελευταίο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο HRP, ακολουθεί η ανίχνευση με την διαδικασία της χημειοφωταύγειας όπου χρησιμοποιείται το σύστημα **ECL (AMERSHAM)**, ενώ στην περίπτωση που το τελευταίο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, η ανίχνευση γίνεται με την επώαση της μεμβράνης στο διάλυμα εμφάνισης για όσο χρονικό διάστημα κριθεί αναγκαίο από την ένταση των ζωνών που θα προκύψουν. Η αντίδραση σταματάει με το πλύσιμο της μεμβράνης με νερό.

#### **2.4.9 Προετοιμασία κυτάρων δεκτικών για ηλεκτρομετασχηματισμό (electro competent)**

Γίνεται προετοιμασία 500ml θρεπτικού υλικού 2xTY σε κωνική φιάλη των 2lt καθώς και μιας overnight καλλιέργειας XL1-Blue κυτάρων σε θρεπτικό υλικό 2xTY με τετρακυκλίνη για να επιλεγθούν τα κύτταρα που φέρουν το επίσωμα F. Το επίσωμα F παίζει ως γνωστό ρόλο στην

ανάπτυξη των F λαχνών οι οποίες είναι απαραίτητες για τη μόλυνση των βακτηρίων από τον φάγο-βοηθό.

- Το θρεπτικό υλικό μολύνεται με 1/100V από την φρέσκια overnight καλλιέργεια. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37<sup>0</sup>C για 3h περίπου, ώσπου η απορρόφηση A600 να φτάσει τη τιμή 0,7-0,8.
- Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνες falcon των 50ml και τα κύτταρα παραμένουν στον πάγο για 20min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (2800rpm, 4<sup>0</sup>C, 10min).
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε ίσο V αποστειρωμένο νερό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (2800rpm, 4<sup>0</sup>C, 10min).
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 1/2V αποστειρωμένο νερό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (2800rpm, 4<sup>0</sup>C, 10min).
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 1/50V 10% γλυκερόλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (2800rpm, 4<sup>0</sup>C, 10min).
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 1,5ml 10% γλυκερόλη ανά 1ml ιζήματος κυττάρων. Τελικά τα κύτταρα χωρίζονται σε κλάσματα των 50-100μl, τα οποία αποθηκεύονται στους -80<sup>0</sup>C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Απαραίτητος κρίνεται ο έλεγχος της καθαρότητας των κυττάρων με ηλεκτρομετασχηματισμό μιας μικρής ποσότητας κυττάρων χωρίς την παρουσία DNA, οπότε δεν πρέπει να εμφανιστούν βακτηριακές αποικίες σε τρυβλία με 2xTYAG. Επίσης είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί η απόδοση μετασχηματισμού (electroporation efficiency) των κυττάρων, με τον ηλεκτρομετασχηματισμό μιας μικρής ποσότητας κυττάρων με συγκεκριμένη ποσότητα πλασμιδιακού DNA, οπότε γίνεται ο υπολογισμός της απόδοσης με την καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύσσονται. Η απόδοση μετασχηματισμού ανάγεται σε αριθμό αποικιών ανά μg πλασμιδιακού DNA.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## 3.1 Κατασκευή και χειρισμός cDNA βιβλιοθηκών ανθρώπινων αντισωμάτων

### Εισαγωγή

Η κατασκευή μιας βιβλιοθήκης όπου περιλαμβάνονται όσο το δυνατό περισσότερες αντισωματικές ειδικότητες είναι το κρίσιμο σημείο στην τεχνολογία της παρουσίασης στην επιφάνεια φάγων. Το μέγεθος της βιβλιοθήκης, ειδικά αν είναι παρθενική, έχει σημασία για την απομόνωση σπάνιων αντισωμάτων υψηλής συγγένειας ενάντια σ' ένα αντιγονικό επίτοπο. Αυτό σημαίνει ότι όσο μεγαλύτερη είναι η βιβλιοθήκη τόσο μεγαλύτερη πιθανότητα υπάρχει ν' ανακαλυφθεί ένα τέτοιο αντίσωμα. Ωστόσο η κατασκευή μιας μεγάλης βιβλιοθήκης είναι μια περίπλοκη διαδικασία κατά τη διάρκεια της οποίας συναντάει κανείς πολλά προβλήματα. Με στόχο την αποφυγή τέτοιων προβλημάτων έγινε προσπάθεια να συνδυαστεί η τεχνολογία της παρουσίασης στην επιφάνεια φάγων με τη τεχνολογία της *in vitro* ανοσοποίησης. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την κατά παραγγελία ανοσοποίηση των Β λεμφοκυττάρων με τον επιθυμητό επίτοπο, έτσι ώστε να επιτευχθεί ο εμπλουτισμός του κυτταρικού πληθυσμού σε πλασματοκύτταρα που παράγουν και εκκρίνουν ειδικά αντισώματα. Τα αντισώματα αυτά έχει αναφερθεί ότι μπορούν να υποστούν σωματικές μεταλλαγές με αποτέλεσμα την βελτίωση της ανοσοσυγγένειας προς το αντιγόνο. Το μέγεθος της βιβλιοθήκης που πρέπει να κατασκευαστεί, μειώνεται σημαντικά γεγονός που διευκολύνει τη διαδικασία και αυξάνει την πιθανότητα απομόνωσης του ειδικού αντισώματος. Ειδικά στην περίπτωση που το αντιγόνο-στόχος είναι ένα αυτοαντιγόνο, όπως οι βλεννίνες, επιτυγχάνεται η παράκαμψη της ανοχής του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι μπορούν να κατασκευαστούν αντισώματα υψηλής ειδικότητας ενάντια σε συστατικά του "εαυτού". Στη μελέτη που ακολουθεί, χρησιμοποιήθηκε σαν αντιγόνο-στόχος η VNTR περιοχή της MUC1 και MUC2 βλεννίνης που αποτελούν καρκινικά αντιγόνα σε διάφορους καρκίνους όπως τον καρκίνο του μαστού, της μήτρας του παχέως εντέρου.

### 3.1.1 Σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών

Τα γονίδια των μεταβλητών περιοχών VH, JH, Vk, Jk, VL, JL των ανθρώπινων αντισωμάτων έχουν σχεδόν όλα χαρτογραφηθεί και η νουκλεοτιδική αλληλουχία τους έχει καθοριστεί. Σ' αυτά συμπεριλαμβάνονται γονίδια λειτουργικά (ανοικτό πλαίσιο διαβάσματος-ORF και έκφραση), γονίδια μη λειτουργικά (ανοικτό πλαίσιο διαβάσματος-ORF χωρίς έκφραση) και ψευδογονίδια. Για την κατασκευή των βιβλιοθηκών η προσοχή εστιάζεται στα λειτουργικά γονίδια. Ο αριθμός των γονιδίων αυτών είναι αρκετά μεγάλος με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός ενός μεγάλου αριθμού ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών, ώστε να αντιπροσωπεύονται ικανοποιητικά στην cDNA αντισωματική βιβλιοθήκη. Για να ελαχιστοποιηθεί ο αριθμός των εκκινητών με σκοπό την εξοικονόμηση χρήματος και χρόνου, χωρίς ωστόσο να υπάρξει ελλιπής αντιπροσώπευση του συνόλου των

ανθρώπινων αντισωματικών γονιδίων, έγινε προσεκτική ανάλυση των διαφόρων οικογενειών των λειτουργικών γονιδίων (Πίνακας 3.1.1).

Οικογ ένεια VH	Λειπο υργικά γονίδια	Οικογ ένεια Vκ	Λειπο υργικά Γονίδια	Οικογ ένεια Vλ	Λειπο υργικά Γονίδια
VH1	11	VκI	19	Vλ1	5
VH2	3	VκII	9	Vλ2	5
VH3	22	VκIII	7	Vλ3	8
VH4	11	VκIV	1	Vλ4	3
VH5	2	VκV	1	Vλ5	3
VH6	1	VκVI	3	Vλ6	1
VH7	1	<b>Σύνολο</b>	<b>40</b>	Vλ7	2
		ο			
<b>Σύνολο</b>	<b>51</b>			Vλ8	1
ο					
Πίνακας 3.1.1 Το γονιδιακό ρεπερτόριο των μεταβλητών περιοχών των ανθρώπινων αντισωμάτων				Vλ9	1
				Vλ10	1
				<b>Σύνολο</b>	<b>30</b>
				ο	

Εκτός από τα γονίδια των μεταβλητών περιοχών υπάρχουν 6JH (JH1, JH2, JH3, JH4, JH5, JH6), 5Jκ (Jκ1, Jκ2, Jκ3, Jκ4, Jκ5) και 4Jλ (Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ7) περιοχές.

Μετά από προσεκτική ανάλυση των στοιχίσεων των ανθρώπινων αντισωματικών γονιδίων της βλαστικής σειράς σχεδιάστηκαν οι εκκινήτες που είναι συμπληρωματικοί με τα 5' και 3' άκρα των γονιδίων των μεταβλητών περιοχών (Εικόνες 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων V-Base (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html>). Βασικό κριτήριο για τον σχεδιασμό ήταν η διατήρηση της αμινοξικής ακολουθίας των 5' και 3' περιοχών των γονιδίων.

VH1	1-02 (DP-8, 75)	CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
	1-03 (DP-25)	... ..C ... ..I ... ..
	1-08 (DP-15)	... ..
	1-18 (DP-14)	... ..T ... ..
	1-24 (DP-5)	... ..C ... ..A ... ..
	1-45 (DP-4)	... A... ..
	1-46 (DP-7)	... ..
	1-58 (DP-2)	..A A... ..
	1-69 (DP-10)	... ..
	1-e (DP-88)	... ..
	1-f (DP-3)	G... ..C ... ..A ... ..
VH5	7-4.1 (DP-21)	CAG GTG CAG CTG GTG CAA TCT GG
VH7	5-51 (DP-73)	GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
	5-a	..A ... ..
<b>Εκκινητής VH1/5/7</b>		<b>SAG RTG CAG CTG GCG CAG TCT GG</b>

VH2	2-05 (DP-76)	CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT GG
	2-26 (DP-26)	... G... ..
	2-70 (DP-27,28)	... G... ..

<b>Εκκινητής VH2</b>		<b>CAG RTC ACC TTG ARG GAG TCT GG</b>
----------------------	--	---------------------------------------

VH3	3-07 (DP-54)	GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT
	3-09 (DP-31)	..A ... ..
	3-11 (DP-35)	C... ..
	3-13 (DP-48)	... ..
	3-15 (DP-38)	... ..
	3-20 (DP-32)	... ..
	3-21 (DP-77)	... ..
	3-23 (DP-47)	... .. T... ..
	3-30 (DP-49)	C... ..
	3-30.3 (DP-46)	C... ..
	3-30.5 (DP-49)	C... ..
	3-33 (DP-50)	C... ..
	3-43 (DP-33)	..A ... ..
	3-48 (DP-51)	... ..
	3-49	... ..
	3-53 (DP-42)	... .. A... ..
	3-64 (DP-61)	... ..
	3-66 (DP-86)	... ..
	3-72 (DP-29)	... ..
	3-73	... ..
	3-74 (DP-53)	... .. C... ..
	3-d	... ..

<b>Εκκινητής VH3</b>		<b>SAG GTG CAK CTG KTG GAG WCT</b>
----------------------	--	------------------------------------

VH4	4-04 (DP-70)	CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC
	4-28 (DP-68)	... ..
	4-30.1 (DP-65)	... ..
	4-30.2 (DP-64)	... C.. ... .. .C ...
	4-30.4 (DP-78)	... ..
	4-31 (DP-65)	... ..
	4-34 (DP-63)	... .. ..A .. C.. .G. ...
	4-39 (DP-79)	... C.. ... ..
	4-59 (DP-71)	... ..
	4-61 (DP-66)	... ..
	4-b (DP-67)	... ..
<b>Εκκινητής VH4</b>		<b>CAG STG CAG CTG CAG SAG TSG GGC</b>
VH6	6-1 (DP-74)	CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG
<b>Εκκινητής VH6</b>		<b>CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG</b>
	JH1	G GTC ACC GTC TCC TCA G
	JH2	. ... ..T ... .. .
	JH3	. ... .. ..T ... .
	JH4	. ... ..
	JH5	. ... ..
	JH6	. ... ..
<b>Συμπληρωματική ακολουθία</b>		<b>3' C CAG TGG CAG AGG AGT C 5'</b>
<b>Εκκινητής JH univ.</b>		<b>5' C TGA GGA GAC GGT GAC C 3'</b>

Εικόνα 3.1.1 Η στοίχιση των 5' VH και JH γονιδιακών περιοχών και οι αντίστοιχοι εκκινητές που Σχεδιάστηκαν.



VkI	O12 (DPK9)	GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC
	O2 (DPK9)	... ..
	O18 (DPK1)	... ..
	O8 (DPK1)	... ..
	A20 (DPK4)	... ..
	A30	... ..
	L14 (DPK2)	A.. ..
	L1	... ..
	L15 (DPK7)	... ..
	L4	.C. ... .. T.. ..
	L18	.C. ... .. T.. ..
	L5 (DPK5)	... ..
	L19 (DPK6)	... ..
	L8 (DPK8)	... .. T.. ..
	L23	.C. ... .G. ... ..
	L8	.C. ... .G. ... ..
	L24 (DPK10)	.T. ... TG. ... ..
	L11 (DPK3)	.C. ... ..
	L12	... ..

**Εκκινητής VkI** RHC ATC YRG WTG ACC CAG TCT CC

VkIII	A27 (DPK22)	GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC
	A11 (DPK20)	... ..
	L2 (DPK21)	... ..A ... A.. ..
	L16	... ..A ... A.. ..
	L6	... .. ..A ..
	L20	... .. ..A ..
	L25 (DPK23)	... ..A A.. ..A ..
VkVI	A26 (DPK26)	GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC
	A10 (DPK26)	... ..
	A14 (DPK25)	..T G.. .. A.. ..A ..

**Εκκινητής Vk3/6** GAW RTT GTG WTG AYG CAG TCT CC

VkII	O11 (DPK13)	GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CC
	O1 (DPK13)	... ..
	A17 (DPK18)	... G.. ... ..T ... T.. ..
	A1 (DPK19)	... G.. ... ..T ... T.. ..
	A18 (DPK28)	... ..
	A2 (DPK12)	... ..
	A19 (DPK15)	... ..T ... T.. ..
	A3 (DPK15)	... ..T ... T.. ..
	A23 (DPK16)	... ..

VkIV B3 (DPK24) GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CC

**Εκκινητής Vk2/4** GAT RTT GTG ATG ACC CAG WCT CC

VκV	Ε2	GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC
<b>Εκκινητής Vκ5</b>		<b>GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC</b>
	Jκ1	GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA C
	Jκ2	... .. C.. ..G ... ..
	Jκ3	... .. A ... ..T ... ..
	Jκ4	... .. ..G ... ..
<b>Συμπληρωματική ακολουθία</b>		<b>3' CCC TGG TTC SAC CTM TAG TTT G 5'</b>
<b>Εκκινητής Jκupiv</b>		<b>5' G TTT GAT MTC CAS CTT GGT CCC 3'</b>
	Jκ5	GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA C
<b>Συμπληρωματική ακολουθία</b>		<b>3' CCC TGT GCT GAC CTC TAA TTT G 5'</b>
<b>Εκκινητής Jκ5</b>		<b>5' G TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC 3'</b>

Εικόνα 3.1.2 Η στοίχιση των 5' Vκ και Jκ γονιδιακών περιοχών και οι αντίστοιχοι εκκινητές που σχεδιάστηκαν

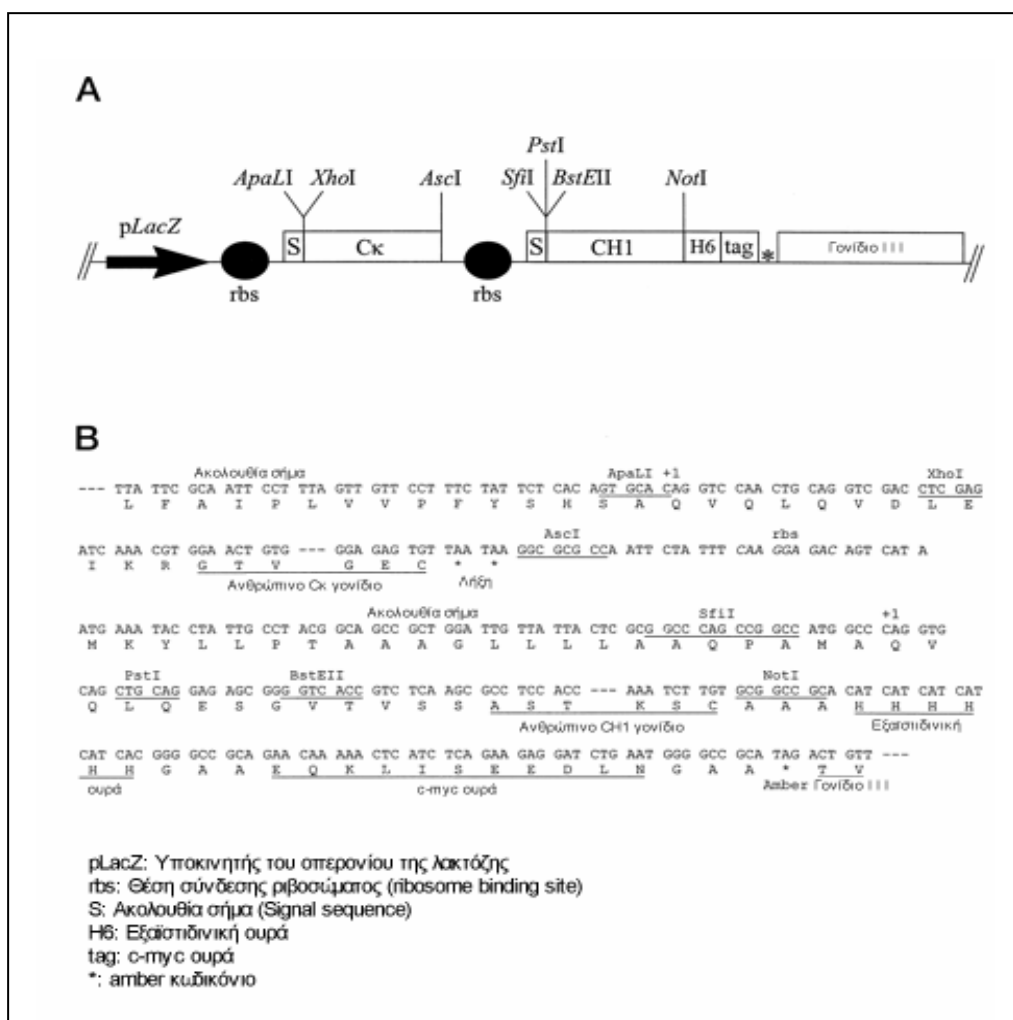
<b>VΛ1</b>	1a	CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CCC
	1e	... ..G ... ..G ...
	1c	... ..
	1g	... ..
	1b	... .. T... ..G ... ..G ...
<b>Εκκινητής VΛ1</b>		<b>CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CCC</b>
<b>VΛ2</b>	2c	CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT
	2e	... ..
	2a2	... ..
	2d	... ..
	2c2	... ..
<b>Εκκινητής VΛ2</b>		<b>CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT</b>
<b>VΛ3</b>	3r	TCC TAT GAG CTG ACT CAG CCA CC
	3j	... .. .T
	3p	... ..A ... ..
	3a	... ..A ... ..
	3h	... ..T... ..
	3e	... ..A ... ..T... ..
	3n	... ..TG ... ..
<b>Εκκινητής VΛ3α</b>		<b>TCC TAT GWG CTG AYK CAG CYA CY</b>
<b>VΛ3</b>	3l	...T...C... ..GAC...'
<b>Εκκινητής VΛ3β</b>		<b>TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC</b>
<b>VΛ4</b>	4c	CTG CCT GTG CTG ACT CAG CCC CCG TCT
	4a	.A. ... ..A T.A T.C ...
	4b	.A. .T. ... ..A T.G .C ...
<b>Εκκινητής VΛ4</b>		<b>CWG CYT GTG CTG ACT CAG YCC YCC TCT</b>
<b>VΛ5</b>	5e	CAG CCT GTG CTG ACT CAG CCA
	5c	... G... ..G
<b>VΛ9</b>	9a	CAG CCT GTG CTG ACT CAG CCA
<b>VΛ10</b>	10a	CAG GCA GGG CTG ACT CAG CCA
<b>Εκκινητής VΛ5/9/10</b>		<b>CAG SCT GKG CTG ACT CAG CCR</b>
<b>VΛ6</b>	6a	AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA
<b>Εκκινητής VΛ6</b>		<b>AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA</b>

VΛ7	7a	CAG ACT GTG GTG ACT CAG GAG CC
VΛ8	8a	CAG ACT GTG GTG ACC CAG GAG CC
<b>Εκκινητής VΛ7/8</b>		<b>CAG RCT GTG GTG ACT CAG GAG CC</b>
	JΛ1	ACC AAG GTC ACC GTC CTA G
	JΛ2	... ... C.G ... .. .
	JΛ3	... ... C.G ... .. .
	JΛ7	... C.. C.G ... .. .C .
<b>Συμπληρωματική ακολουθία</b>		<b>3' TGG KTC SAS TGG CAG GAT C 5'</b>
<b>Εκκινητής Jλuniv</b>		<b>5' C TAG GAC GGT SAS CTK GGT 3'</b>

Εικόνα 3.1.3 Η στοίχιση των 5' Vλ και Jλ γονιδιακών περιοχών και οι αντίστοιχοι εκκινητές που σχεδιάστηκαν

Στο 5' άκρο των παραπάνω εκκινητών προστέθηκε η ακολουθία που αναγνωρίζεται από το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο ανάλογα με τον φορέα κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε. Τα ένζυμα αυτά δυσκολεύονται να αναγνωρίσουν και να δράσουν σε ακολουθίες που βρίσκονται στην άκρη κομματιών DNA. Γι'αυτό το λόγο εκτός από την περιοριστική ακολουθία προστέθηκε μια μικρή ακολουθία νουκλεοτιδίων, ώστε να διευκολύνεται η αναγνώριση και η σύνδεση του περιοριστικού ενζύμου στο DNA. Έτσι σχεδιάστηκαν δύο σειρές εκκινητών οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την επέκταση του συνόλου των γονιδίων των μεταβλητών περιοχών καθώς και για την κλωνοποίηση τους στα κατάλληλα φαγεμίδια (Παράρτημα Β). Οι εκκινητές που είναι συμπληρωματικοί με τα 3' άκρα των σταθερών περιοχών Cκ, Cλ σχεδιάστηκαν με ανάλογο τρόπο.

Η πρώτη σειρά επέτρεψε την κατασκευή ανθρώπινων αντισωμάτων με την μορφή Fab τα γονίδια των οποίων κλωνοποιήθηκαν στο φαγεμίδιο pCES1 (Εικόνα 3.1.4).



Εικόνα 3.1.4 Το φαγεμίδιο pCES1 για την κλωνοποίηση και την παρουσίαση των αντισωμάτων με

την μορφή Fab. A: σχηματική παρουσίαση της θέσης κλωνοποίησης, B: νουκλεοτιδι-

κή ακολουθία της θέσης κλωνοποίησης

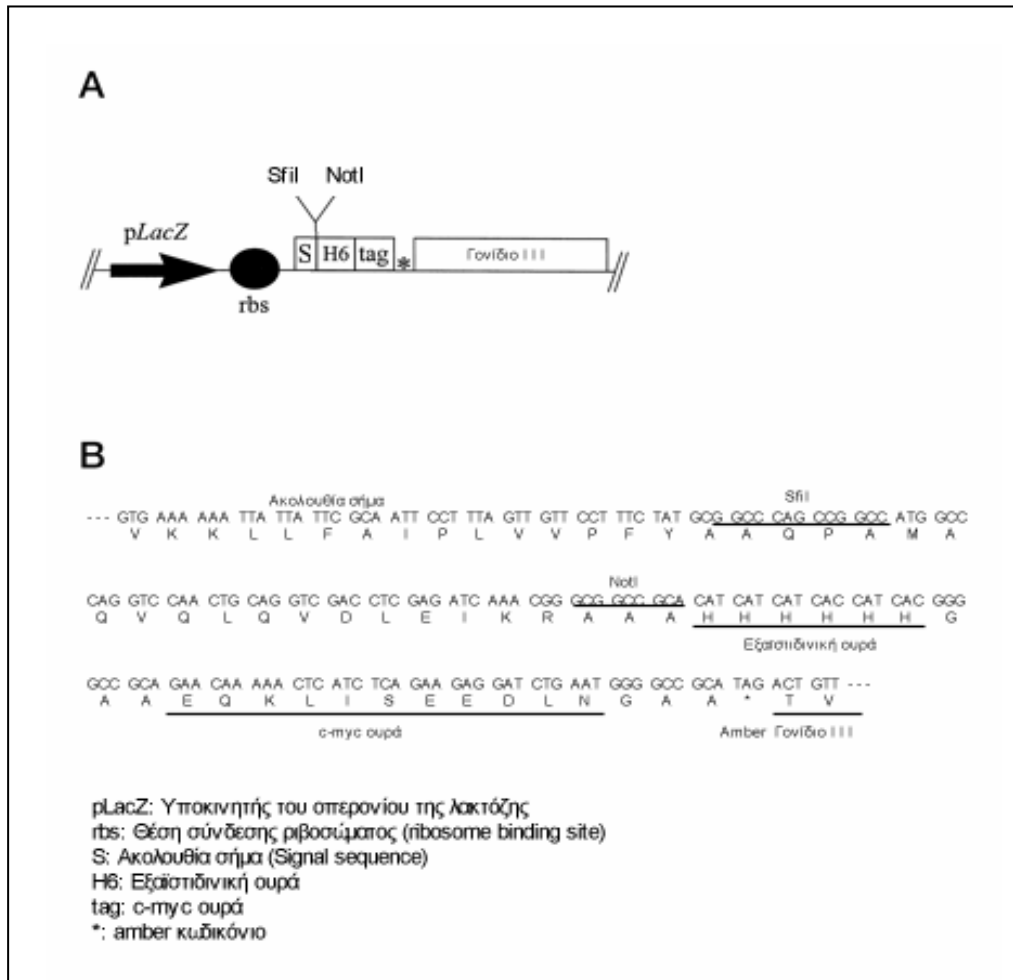
Τα γονίδια των μεταβλητών περιοχών VL ή VLCL μπορούν να κλωνοποιηθούν σαν κομμάτια ApaLI-XhoI ή ApaLI-Ascl αντίστοιχα, ενώ τα γονίδια των μεταβλητών περιοχών VH ή VHCH1 σαν κομμάτια Sfil/PstI-BstEII ή Sfil-NotI αντίστοιχα. Επίσης είναι δυνατή η σύνδεση των επιμέρους κομματιών των μεταβλητών περιοχών παρουσία ενός συνδετικού κομματιού που διαθέτει συμπληρωματικά -ως προς αυτές- 5' και 3' άκρα. Έτσι με την βοήθεια μιας αντίδρασης PCR σύνδεσης δύο σταδίων (PCR assembly) κατασκευάστηκε μια DNA κασέτα που αποτελείται από τα τμήματα: VLCL-Fab ενδιάμεσο τμήμα-VH ή VHCH1. Στην παρούσα μελέτη ακολουθήθηκε η δεύτερη προσέγγιση της αντίδρασης PCR σύνδεσης. Τα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές για την επέκταση των αντισωμικών γονιδίων με τη μορφή Fab παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1.1, και παράλληλα φαίνονται οι περιοριστικές θέσεις που χρησιμοποιούνται για τη διαδικασία της κλωνοποίησης. Η κλωνοποίηση της DNA κασέτας έγινε με την βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων ApaLI-BstEII (VLCL-Fab συνδετικό κομμάτι -VH) ή των περιοριστικών ενζύμων ApaLI-NotI (VLCL-Fab συνδετικό κομμάτι-VHCH). Οι εκκινητές Fab-LINK 5' και Fab-LINK 3' χρησιμεύουν για την επέκταση του Fab συνδετικού κομματιού χρησιμοποιώντας σαν πρότυπο το φαγεμίδιο pCES1.

5' Εκκινητής	3' Εκκινητής
VH1/5/7 Sfil	JH BstEII για τα VH κομμάτια
VH2 Sfil VH3 Sfil VH4 Sfil VH6 Sfil	CH1 NotI για τα VHCH κομμάτια
Vκ1 ApaLI Vκ2/4 ApaLI Vκ3/6 ApaLI Vκ5 ApaLI	Cκ Ascl για τα VκCκ κομμάτια
Vλ1 ApaLI Vλ2 ApaLI Vλ3α ApaLI Vλ3β	Cλ Ascl για τα VλCλ κομμάτια

ApaLI Vλ4	
ApaLI Vλ5/9/10	
ApaLI Vλ6	
ApaLI Vλ7/8	
ApaLI	
Fab-LINK 5'	Fab-LINK 3' για το Fab συνδετικό κομμάτι

Πίνακας 3.1.2 Εκκινήτες για την επέκταση των αντισωματικών γονιδίων με τη μορφή Fab

Η δεύτερη σειρά εκκινήτων επιτρέπει την κατασκευή ανθρώπινων αντισωμάτων με την μορφή scFv, τα γονίδια των οποίων μπορούν να κλωνοποιηθούν στο φαγεμίδιο pCANTAB6 (Εικόνα 3.1.5). Επεκτείνονται χωριστά τα γονίδια των μεταβλητών περιοχών VH και VL (Vκ ή Vλ), καθώς και ένα ενδιάμεσο κομμάτι που διαθέτει συμπληρωματικά 5' και 3' άκρα με τα παραπάνω γονίδια. Οι τρεις ομάδες κομματιών συναρμολογούνται με μια αντίδραση PCR σύνδεσης δύο σταδίων (PCR assembly), ώστε να κατασκευαστεί μια DNA κασέτα που αποτελείται από τα τμήματα: VH-scFv συνδετικό κομμάτι-VL. Για την επέκταση των μεταβλητών περιοχών VH χρησιμοποιούνται οι ίδιοι 5' εκ



Εικόνα 3.1.5 Το φαγεμίδιο pCANTAB6 για την κλωνοποίηση και την παρουσίαση των αντισωμά-

των με τη μορφή scFv. A: σχηματική παρουσίαση της θέσης κλωνοποίησης, B: νου- κλεοτιδική ακολουθία της θέσης κλωνοποίησης

κινητές όπως στην περίπτωση των αντισωμάτων Fab και ο JH εκκινητής. Παράλληλα σχεδιάστηκε ένας 5' εκκινητής, ο οποίος εισάγει μια μικρή ακολουθία νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο της περιοριστικής θέσης SfiI. Η ακολουθία αυτή προστίθεται με σκοπό την διευκόλυνση της δράσης του περιοριστικού ενζύμου. Επίσης για την επέκταση των μεταβλητών περιοχών VL χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι 5' εκκινητές χωρίς όμως την παρουσία της περιοριστικής θέσης ApaI στο 5' άκρο τους. Οι 3' εκκινητές διαθέτουν στο 3' άκρο τους την περιοριστική θέση NotI. Τα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές για την επέκταση των αντισωματικών γονιδίων με τη μορφή scFv παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1.2, και παράλληλα φαίνονται οι περιοριστικές θέσεις που χρησιμοποιούνται για τη διαδικασία της κλωνοποίησης. Οι εκκινητές scFv-LINK 5' και scFv-LINK 3' χρησιμεύουν για την επέκταση του scFv συνδετικού κομματιού χρησιμοποιώντας σαν πρότυπο το φαγεμίδιο pCANTAB6. Η κλωνοποίηση της DNA κασέτας έγινε με την βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων SfiI-NotI (VH-scFv συνδετικό κομμάτι-VL).



5' Εκκινητής	3' Εκκινητής
VH1/5/7 Sfil VH2 Sfil VH3 Sfil VH4 Sfil VH6 Sfil Sfil univ.	JH
Vκ1 Vκ2/4 Vκ3/6 Vκ5	Jκ5 NotI Jκuniv. NotI
Vλ1 Vλ2 Vλ3α Vλ3β Vλ4 Vλ5/9/10 Vλ6 Vλ7/8	Jλuniv. NotI
ScFv- LINK 5'	scFv-LINK 3' για το scFv συνδετικό κομμάτι

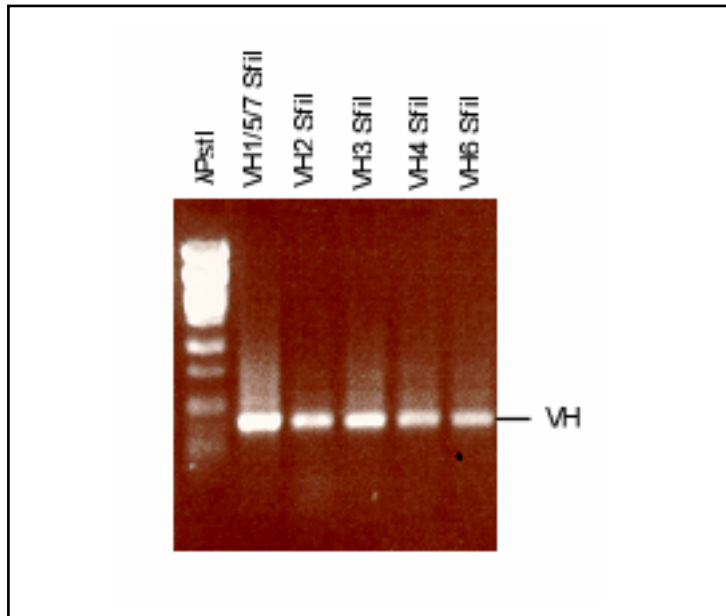
Πίνακας 3.1.3 Εκκινητές για την επέκταση των αντισωματικών γονιδίων με τη μορφή scFv

### 3.1.2 Κατασκευή των DNA κασετών

#### 3.1.2.α Η Fab κασέτα

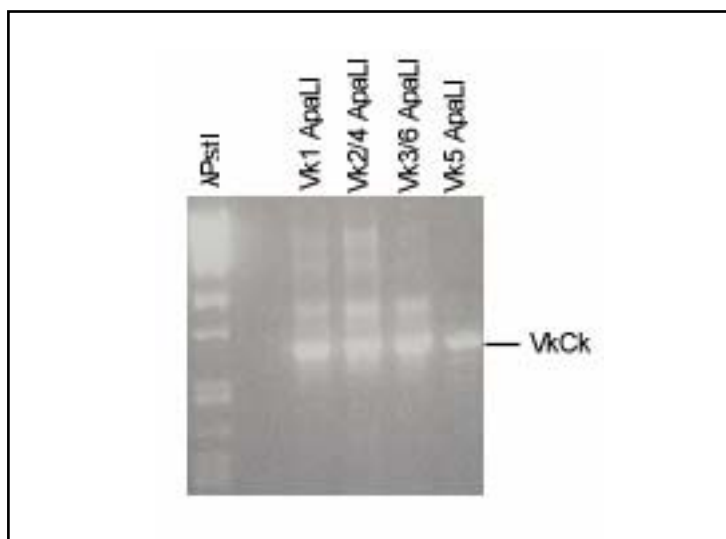
Αρχικά επεκτάθηκαν με την αντίδραση PCR τα γονίδια των VLCL και των VH περιοχών. Για την επέκταση χρησιμοποιήθηκαν καθένας από τους 5' εκκινητές με τον αντίστοιχο 3' εκκινητή ή το σύνολο των 3' εκκινητών εφόσον υπήρχαν περισσότεροι από έναν, σε χωριστές αντιδράσεις PCR (πρωταρχικά PCR). Σαν πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το cDNA που κατασκευάστηκε με την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Στη διαδικασία αυτή το RNA απομονώθηκε από Β λεμφοκύτταρα τα οποία είχαν υποστεί τη διαδικασία της *in vitro* ανοσοποίησης (Zafiropoulos *et al.*, 1997) και είχαν μολυνθεί με τον ιό EBV ώστε να μετασχηματιστούν και να ξεκινήσουν τη συνεχή έκκριση

αντισωμάτων. Στην διαδικασία της *in vitro* ανοσοποίησης χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα το 25μερές MUC1 (1 VNTR) και το 23μερές MUC2 (1 VNTR) σε δύο διαφορετικά παράλληλα πειράματα. Η απομόνωση του ολικού RNA από  $0,75 \times 10^6$  κύτταρα από το πρώτο πείραμα και από  $1,5 \times 10^6$  κύτταρα από το δεύτερο πείραμα. Το RNA αναμείχθηκε και ακολούθησε η πραγματοποίηση των πρωταρχικών PCR, με αποτέλεσμα την επέκταση των VH (Εικόνα 3.1.6), των VκCκ (Εικόνα 3.1.7) και VλCλ (Εικόνα



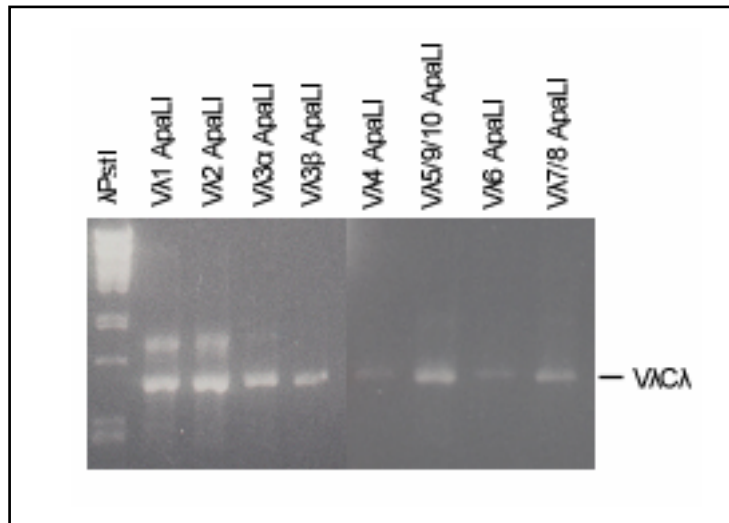
### 3.1.8) γονιδιακών περιοχών.

Εικόνα 3.1.6 Οι πρωταρχικές αντιδράσεις PCR των VH γονιδίων. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (1.7%).

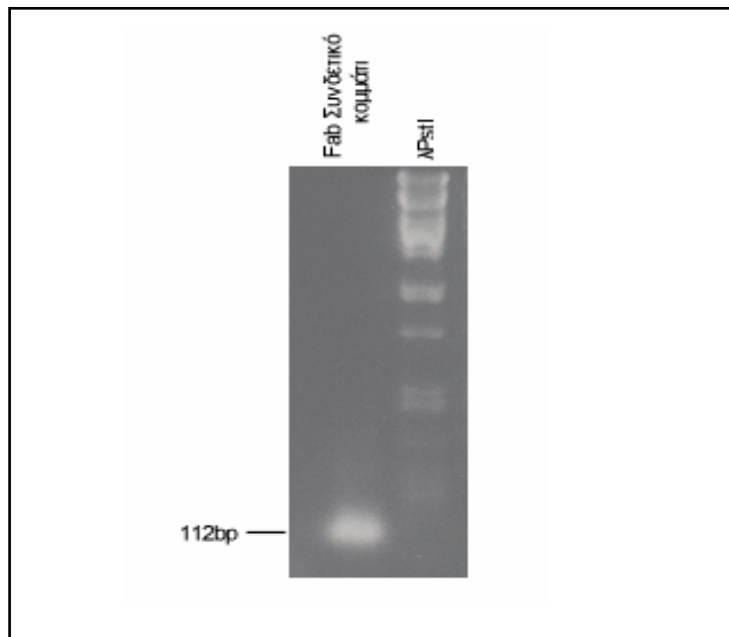


Εικόνα 3.1.7 Οι πρωταρχικές αντιδράσεις PCR των VκCκ γονιδίων. Ηλεκ/ση σε πηκτή αгарόζης (1.5%).

Παράλληλα επεκτάθηκε με αντίδραση PCR το Fab συνδετικό κομμάτι, χρησιμοποιώντας το φαγεμίδιο pCES1 ως πρότυπο DNA (Εικόνα 3.1.9).



Εικόνα 3.1.8 Οι πρωταρχικές αντιδράσεις PCR των VLCL γονιδίων. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1.5%).

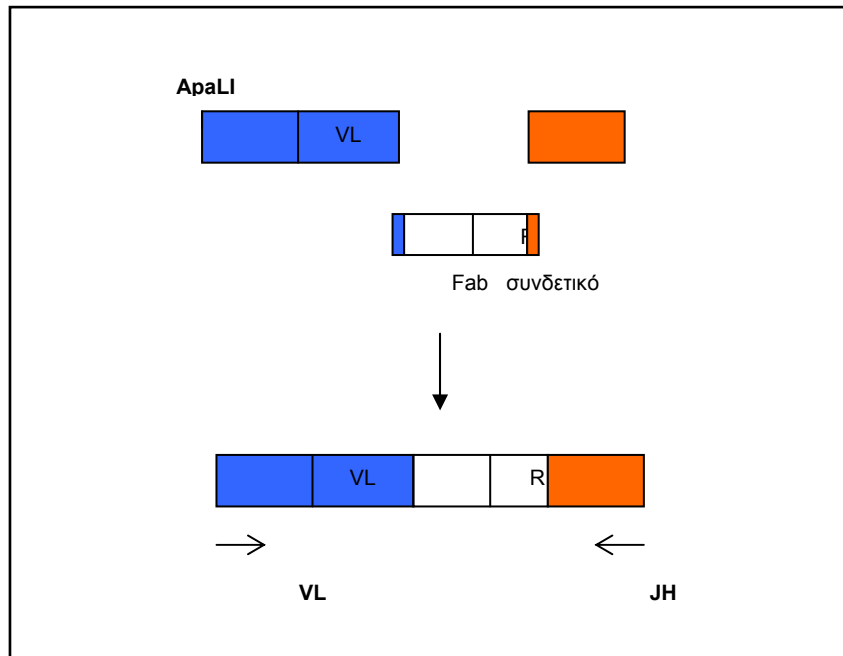


Εικόνα 3.1.9 Η αντίδραση PCR του Fab συνδετικού κομματιού. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2%).

Το μέγεθος των γονιδίων που επεκτάθηκαν είναι: 400-450bp για το VH και 700-750bp για το VLCL.

Τα τμήματα DNA που προέκυψαν από τις παραπάνω αντιδράσεις PCR καθαρίστηκαν και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν σε κατάλληλη μοριακή αναλογία (4VLCL:1Fab συνδετικό κομμάτι:2VH)

για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR σύνδεσης. Η αντίδραση αυτή περιλαμβάνει δύο διαδοχικές PCR αντιδράσεις (Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.1.6.γ): στην πρώτη -η οποία γίνεται απουσία εκκινητών- τα επιμέρους κομμάτια VLCL, Fab συνδετικό κομμάτι και VH συνδέονται λόγω



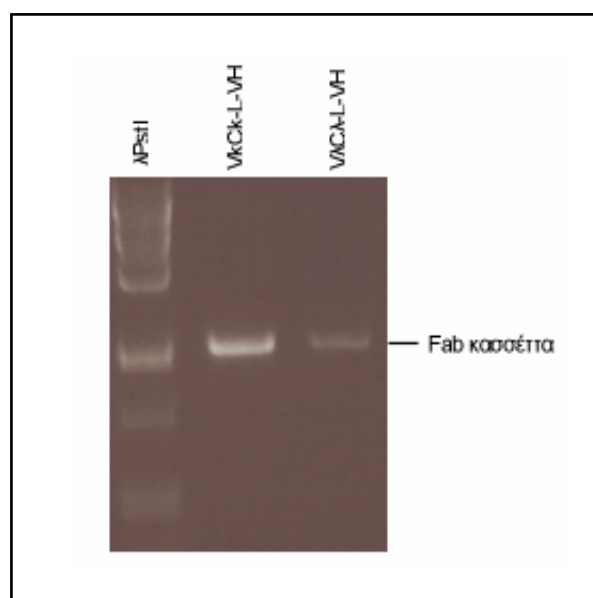
των συμπληρωματικών περιοχών που διαθέτουν στα άκρα τους και στη δεύτερη -η οποία γίνεται παρουσία του μείγματος των εξωτερικών εκκινητών- επεκτείνονται οι Fab κασέτες που κατασκευάστηκαν (Εικόνα 3.1.10).

Εικόνα 3.1.10 Η αντίδραση PCR σύνδεσης για την κατασκευή της Fab κασέτας.

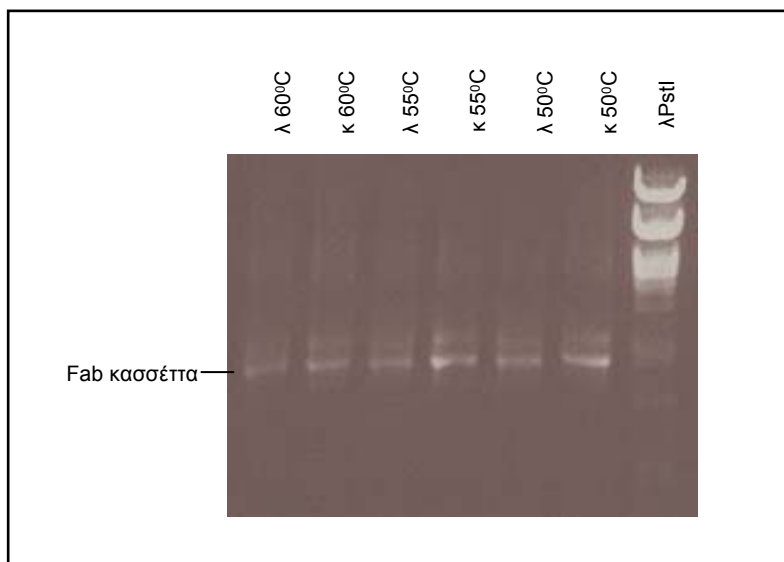
Εικόνα 3.1.11 Η Fab κασέτα μετά από καθαρισμό από τα παραπροϊόντα της αντίδρασης PCR.

Το μέγεθος της Fab κασέτας που προέκυψε, κυμαίνεται μεταξύ 1100-1200bp (Εικόνα 3.1.11).

Η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η σύνδεση των εκκινητών με το πρότυπο DNA (θερμοκρασία σύνδεσης, T annealing), αποτέλεσε αντικείμενο πειραματισμού. Συγκεκριμένα η πρώτη αντίδραση έγινε σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες με σκοπό τον καθορισμό της τιμής εκείνης που



δίνει καλύτερο αποτέλεσμα μετά και την δεύτερη αντίδραση PCR, η οποία και στις τρεις περιπτώσεις έγινε σε θερμοκρασία σύνδεσης 60<sup>0</sup>C. Σύμφωνα με την εικόνα 3.1.12 όπου φαίνονται τα αποτελέσματα μετά το πέρας της δεύτερης αντίδρασης, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές σε συνάρτηση με τις διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας που επιλέχθηκαν. Η τιμή που τελικά χρησιμοποιήθηκε ήταν εκείνη των 55<sup>0</sup>C, ώστε να περιοριστούν τα παραπροϊόντα χωρίς να παρεμποδιστεί η σύνδεση τυχόν “προβληματικών ακολουθιών”.

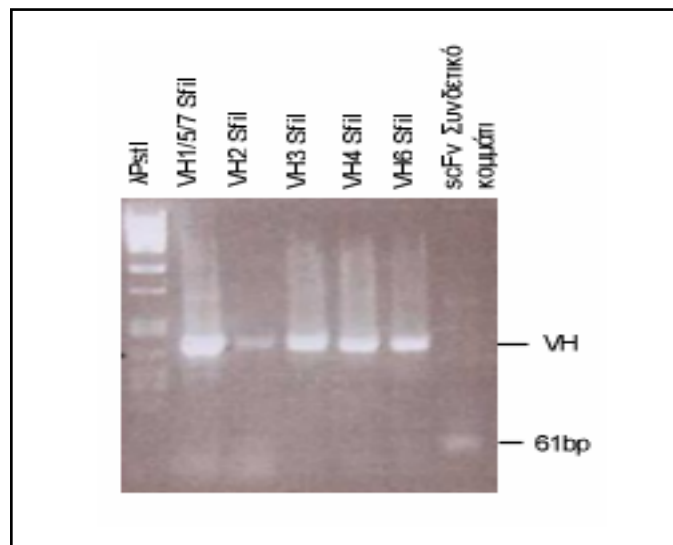


Εικόνα 3.1.12 Έλεγχος της θερμοκρασίας σύνδεσης της πρώτης αντίδρασης PCR κατά την κατασκευή της Fab κασέτας. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1%).

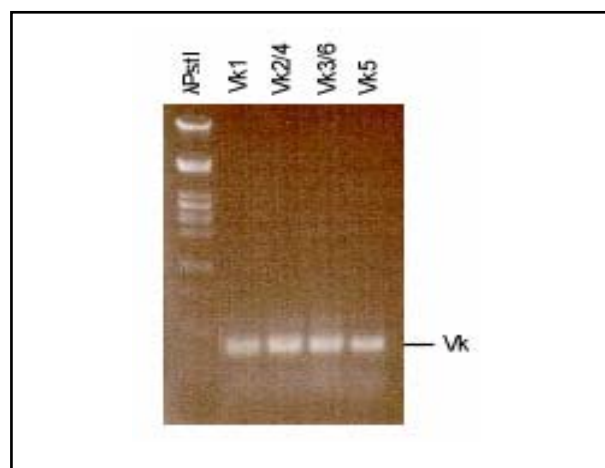
### 3.1.2.β Η scFv κασέτα

Τα περιοριστικά ένζυμα *Apa*I και *Bst*EII που χρησιμοποιούνται για την κλωνοποίηση των Fab κασετών είναι σπάνια ένζυμα με την έννοια ότι υπάρχουν λίγες αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις στα γονίδια των αντισωμάτων τις οποίες αναγνωρίζουν. Ωστόσο κατά την διάρκεια της προσπάθειας να κατασκευαστούν οι βιβλιοθήκες αντισωμάτων με τη μορφή Fab, αντιμετωπίστηκε το πρόβλημα μεγάλο μέρος των Fab κασετών να κόβεται από τα ένζυμα αυτά. Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι το DNA των γονιδίων προήλθε από B λεμφοκύτταρα, τα οποία είχαν υποβληθεί στην διαδικασία της *in vitro* ανοσοποίησης και επομένως παρουσίαζαν εμπλουτισμό προς συγκεκριμένες οικογένειες γονιδίων. Για το λόγο αυτό όταν αντιμετωπίστηκε το συγκεκριμένο πρόβλημα η προσπάθεια στράφηκε στην κατασκευή βιβλιοθηκών αντισωμάτων με τη μορφή των scFv, όπου χρησιμοποιούνται τα περιοριστικά ένζυμα *Sfi*I και *Not*I για την κλωνοποίηση των scFv κασετών στο φαγεμίδιο pCANTAB6. Τα ένζυμα αυτά δεν κόβουν τα γονίδια των αντισωμάτων και επομένως δεν υπάρχουν “απώλειες” γονιδίων κατά τη διαδικασία κλωνοποίησης.

Από  $2 \times 10^7$  B λεμφοκύτταρα που είχαν περάσει από τη διαδικασία της *in vitro* ανοσοποίησης με το αντιγόνο 23μερές MUC2 (1VNTR), είχαν μετασχηματιστεί με τον ιό EBV και το υπερκείμενο καλλιέργειας τους είχε παρουσιάσει θετικές τιμές απορρόφησης κατά την ανοσοενζυμική μέθοδο, απομονώθηκε ολικό RNA. Μετά την κατασκευή της Fab κασέτας διαπιστώθηκε ότι σημαντικό μέρος των γονιδίων κόβονταν από το ένζυμο BstEII. Για το λόγο αυτό επιχειρήθηκε η ανάπτυξη της κατασκευής μιας scFv βιβλιοθήκης. Αφού δημιουργήθηκε το cDNA με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, πραγματοποιήθηκαν τα πρωταρχικά PCR, ώστε να επεκταθούν τα γονίδια των αντισωμάτων.



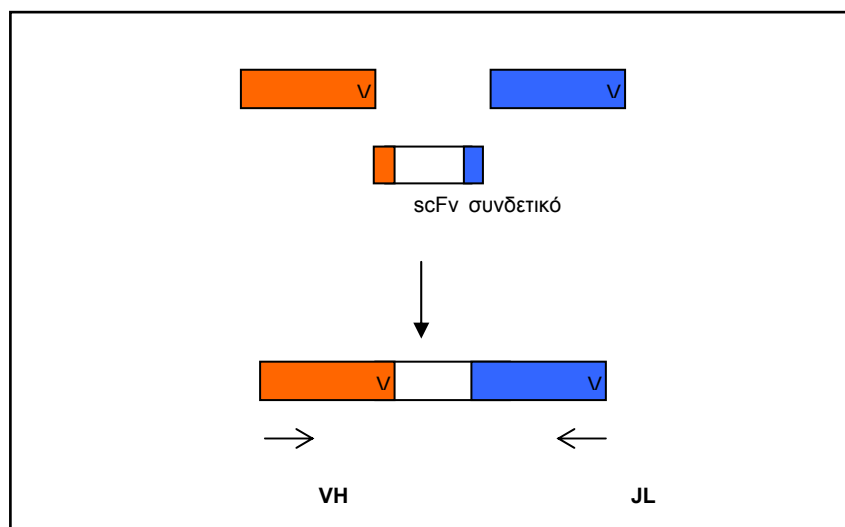
Εικόνα 3.1.13 Οι πρωταρχικές αντιδράσεις PCR των VH γονιδίων και του scFv συνδετικού κομματιού. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (2%).



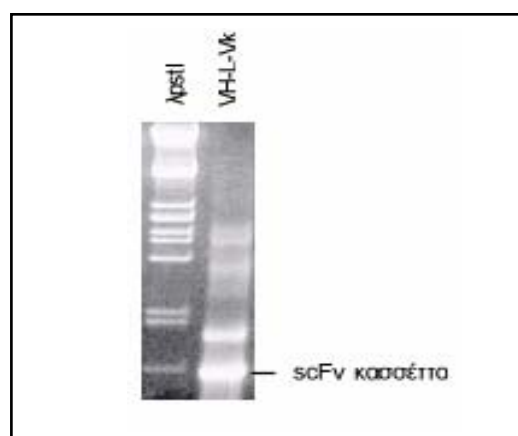
Εικόνα 3.1.14 Οι πρωταρχικές αντιδράσεις PCR των Vk γονιδίων. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (1,7%).

Το μέγεθος των γονιδίων που επεκτάθηκαν ήταν: 400-450bp για τα VH και 300-350bp για τα Vκ (Εικόνες 3.1.13, 3.1.14). Οι πρωταρχικές αντιδράσεις PCR των VL γονιδίων δεν έδωσαν αποτέλεσμα πιθανότατα λόγω του εμπλουτισμού των B λεμφοκυττάρων προς συγκεκριμένες κατηγορίες Vκ αλυσίδων. Στην αντίδραση PCR για την επέκταση του scFv συνδετικού κομματιού χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο DNA το φαγεμίδιο pCANTAB6, στο οποίο ήταν κλωνοποιημένη η scFv κασέτα του αντισώματος 10A.

Τα τμήματα DNA που προέκυψαν από τις παραπάνω αντιδράσεις PCR καθαρίστηκαν και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν σε κατάλληλη μοριακή αναλογία (2VH:1scFv συνδετικό κομμάτι:2Vκ) για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR σύνδεσης (Εικόνα 3.1.15). Ακολουθήθηκε η διαδικασία που έχει περιγραφεί στην παράγραφο 3.1.2.α.



Εικόνα 3.1.15 Η αντίδραση PCR σύνδεσης για την κατασκευή της scFv κασέτας.



Εικόνα 3.1.16 Η scFv κασέτα. Ηλεκ/ση σε πηκτική αгарόζης (1,5%).

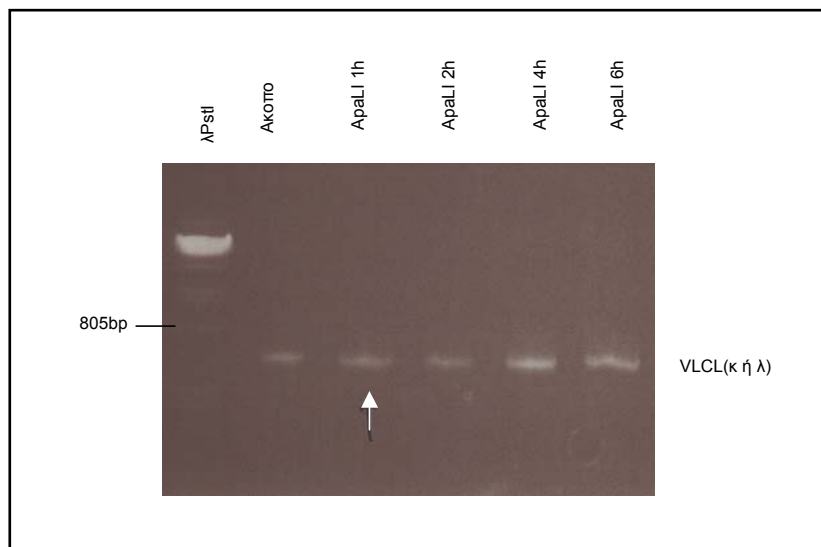
Το μέγεθος της scFv κασέτας (VH-scFv συνδετικό κομμάτι-Vk) που προέκυψε κυμαίνεται μεταξύ 750-850bp (Εικόνα 3.1.16).

### 3.1.3 Η Περιοριστική Πέψη

#### 3.1.3.α Η περιοριστική πέψη των Fab κασετών και του φαγεμιδίου pCES1

Για να κλωνοποιηθεί η δεξαμενή των Fab κασετών στο φορέα κλωνοποίησης pCES1 ήταν απαραίτητη η περιοριστική πέψη των 5' και 3' άκρων τους. Συγκεκριμένα στο 5' άκρο υπάρχει μια περιοριστική θέση για το ένζυμο ApaI, ενώ στο 3' άκρο υπάρχει αντίστοιχα μια περιοριστική θέση που αναγνωρίζεται από ένζυμο BstEII. Η δεύτερη αυτή θέση υπάρχει φυσιολογικά στο σύνολο των JH γονιδιακών περιοχών. Τα κομμάτια DNA που απομακρύνθηκαν μετά από τις δύο παραπάνω διαδοχικές πέψεις ήταν πολύ μικρά (10bp) με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η αξιολόγηση της διαδικασίας με τη χρήση των συμβατικών πηκτών αγαρόζης. Για το λόγο αυτό αντικείμενο πειραματισμού αποτέλεσε το χρονικό διάστημα που πρέπει να διαρκέσει κάθε περιοριστική πέψη.

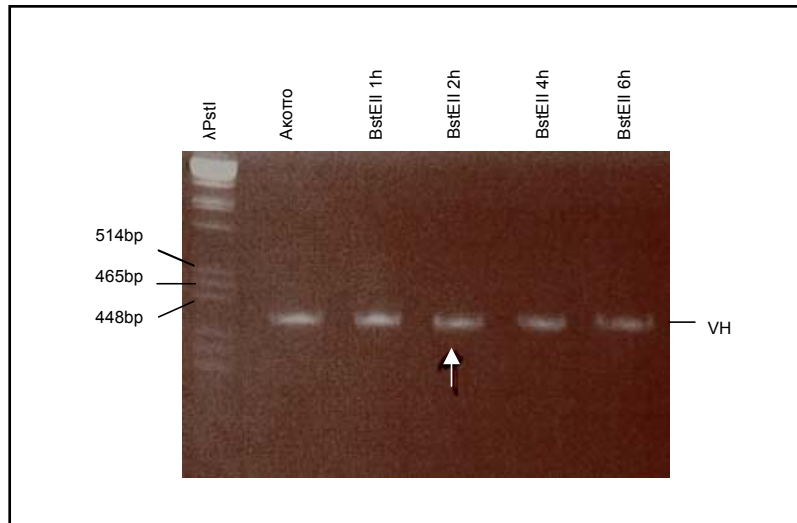
Σε ανεξάρτητες ενζυμικές αντιδράσεις ελέγχθηκε ο χρόνος που απαιτείται για να κοπεί το σύνολο των κομματιών DNA. Χρησιμοποιώντας την ίδια ποσότητα ενζύμου ανά συγκεκριμένη ποσότητα DNA (Κεφάλαιο 2, Παράγραφος 2.1.7) οργανώθηκαν τέσσερις σειρές αντιδράσεων που διήρκεσαν: 1h, 2h 4h και 6h. Στην περίπτωση του ενζύμου ApaI τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (7%) έδειξαν ότι 1-2 h ήταν αρκετές για να ολοκληρωθεί η πέψη σύμφωνα με τις συγκεκριμένες συνθήκες (Εικόνα 3.1.17).



Εικόνα 3.1.17 Πέψη με το ένζυμο ApaI σε διάφορα χρονικά διαστήματα, του γονιδιακού κομματιού VLCL που διαθέτει στο 5' άκρο την αντίστοιχη περιοριστική θέση. Ηλε/ση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (7%).



Στην περίπτωση του ενζύμου BstEII τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (7%) έδειξαν ότι 2-4h ήταν απαραίτητες για την ολοκλήρωση της πέψης με τις συγκεκριμένες συνθήκες (Εικόνα 3.1.18). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης λόγω



της μεγαλύτερης διακριτικής ικανότητας που προσφέρει σε σχέση με την πηκτή αγαρόζης. Τελικά στα πειράματα που ακολούθησαν κάθε πέψη διήρκεσε 3-4h, ώστε να κοπεί το σύνολο των περιοριστικών θέσεων χωρίς απώλειες.

Εικόνα 3.1.18 Πέψη με το ένζυμο BstEII σε διάφορα χρονικά διαστήματα, του γονιδιακού κομματιού VH που διαθέτει στο 3' άκρο την αντίστοιχη περιοριστική θέση. Ηλε/ση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (7%).

Η πέψη του φορέα pCES1 με τα ένζυμα ApaI και BstEII είχε σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός τμήματος DNA μήκους 487bp. Μετά από τις περιοριστικές αντιδράσεις ακολούθησε ο καθαρισμός των Fab κασετών που διέθεταν κολλώδη άκρα (sticky ends) καθώς και του φορέα pCES1 με τα συμπληρωματικά κολλώδη άκρα.

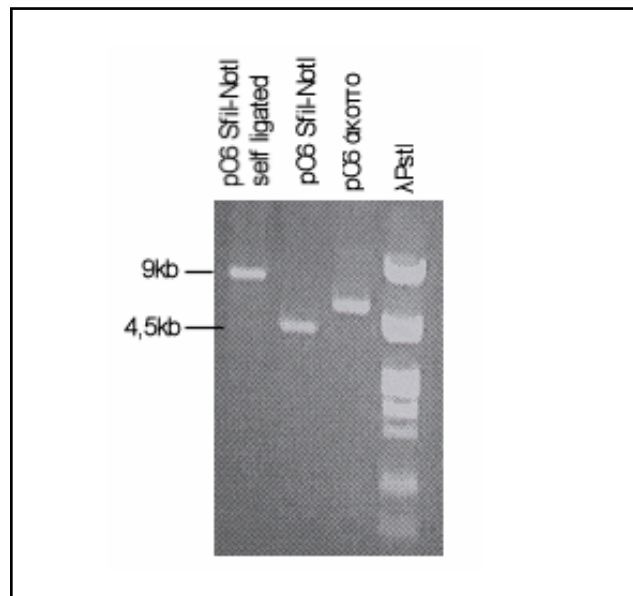
### 3.1.3.β Η περιοριστική πέψη των scFv κασετών και του φαγεμιδίου pCANTAB6

Ανάλογα για την κλωνοποίηση των scFv κασετών στον φορέα κλωνοποίησης pCANTAB6 ήταν απαραίτητη η περιοριστική πέψη των 5' και 3' άκρων τους. Σε αυτή την περίπτωση στο 5' άκρο υπάρχει μια περιοριστική θέση για το ένζυμο SfiI και στο 3' άκρο υπάρχει μια αντίστοιχη περιοριστική θέση για το ένζυμο NotI. Έγιναν ανάλογοι πειραματισμοί όπως και στην περίπτωση των Fab κασετών με παρόμοια αποτελέσματα. Η πέψη του φορέα pCANTAB6 με τα ένζυμα SfiI και NotI είχε σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός τμήματος DNA μήκους 51bp.

### 3.1.4 Η σύνδεση των κασετών με τους αντίστοιχους φορείς

Η καθαρισμός και ο έλεγχος της κατάστασης των κομμένων φορέων κλωνοποίησης είναι τα πιο κρίσιμα βήματα για την επιτυχία της κλωνοποίησης των κασετών. Για το λόγο αυτό ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην διαδικασία καθαρισμού των φορέων από τα άλατα των ενζυμικών αντιδράσεων καθώς και από τα τυχόν άκοπα μόρια που είχαν παραμείνει. Ο καθαρισμός έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (0,7%) κατά τη διάρκεια της οποίας εφαρμόστηκε χαμηλή τάση (50V), ώστε να διαχωριστούν τα κομμένα μόρια από τα άκοπα όσο το δυνατό καλύτερα, ενώ ακολούθησε η απομόνωση των κομμένων μορίων με ηλεκτροέκλουση από το κομμάτι της πηκτής που τα περιείχε. Για τον εντοπισμό της θέσης τους στην πηκτή αгарόζης απομακρύνθηκαν μικρά ακραία τμήματα της πηκτής δίπλα από τα οποία υπήρχε κατάλληλος μάρτυρας μεγέθους και ακολούθησε ο εντοπισμός με τη βοήθεια της υπεριώδους ακτινοβολίας. Στη συνέχεια σημάνθηκε το σημείο όπου είχαν εντοπιστεί τα κομμένα μόρια του φορέα και ακολούθησε η στοίχιση με το κύριο τμήμα της πηκτής αгарόζης ώστε να απομακρυνθεί το κομμάτι της πηκτής που περιείχε το σύνολο του κομμένου φορέα. Μ' αυτό τον τρόπο τα μόρια του DNA δεν εκτέθηκαν στην υπεριώδη ακτινοβολία, η οποία καταστρέφει το γενετικό υλικό.

Μετά τον καθαρισμό ελέγχθηκε η κατάσταση των κομμένων άκρων του φορέα με σκοπό την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του κατά την κλωνοποίηση των κασετών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μια ενζυμική αντίδραση σύνδεσης παρουσία μόνο του κομμένου φορέα κλωνοποίησης (self-ligation). Το αποτέλεσμα της αντίδρασης εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (1%), παρουσία κατάλληλου μάρτυρα μεγέθους, του άκοπου φορέα και του κομμένου με τα ένζυμα SfiI και NotI, για να γίνουν οι απαραίτητες συγκρίσεις (Εικόνα 3.1.19).



Εικόνα 3.1.19 Ηλεκ/ση του φορέα κλωνοποίησης pCANTAB6 σε πηκτή αгарόζης (1%) μετά από ενζυμική αντίδραση σύνδεσης (self-ligation).

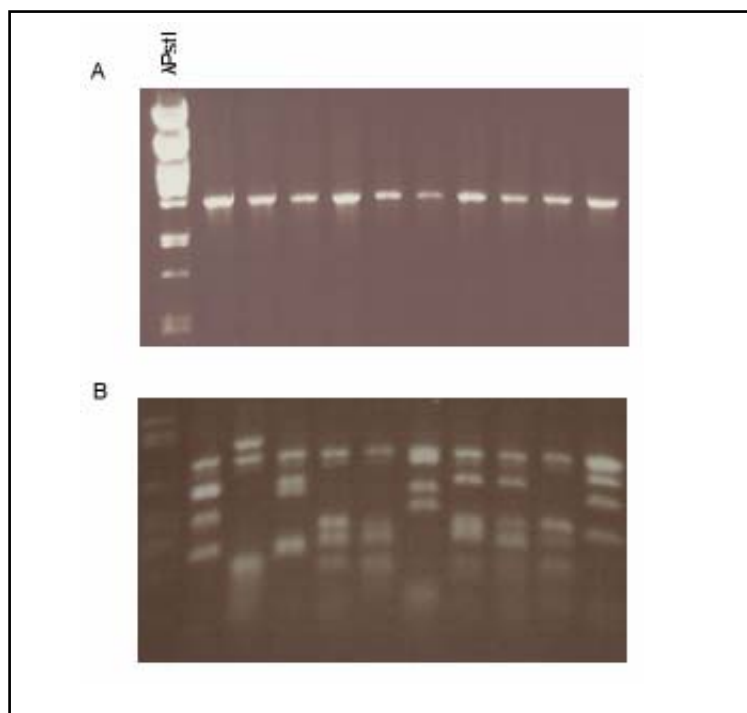
Το μέγεθος του κομμένου φορέα pCANTAB6 είναι 4,5kb, ενώ το κομμάτι που απομακρύνεται μετά από τη διπλή πέψη με τα ένζυμα SfiI και NotI έχει μέγεθος 50bp. Τα μονόκλιωνα άκρα που προκύπτουν είναι ασύμβατα μεταξύ τους με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η σύνδεση άκρων που ανήκουν στο ίδιο μόριο, δηλαδή η επανακυκλοποίηση του φορέα. Η ζώνη που εμφανίζεται μετά την αντίδραση σύνδεσης έχει μέγεθος 9kb. Η ζώνη αυτή οφείλεται στη σύνδεση SfiI και NotI άκρων που ανήκουν σε διαφορετικά μόρια με αποτέλεσμα τη δημιουργία διμερών του φορέα και αποτελεί ένδειξη της καλής κατάστασης των άκρων του φορέα. Ανάλογα μπορούν να δημιουργηθούν τριμερή, τετραμερή κλπ. αν και η αντίδραση ευνοεί το σχηματισμό των διμερών μορίων. Με ανάλογο τρόπο ελέγχθηκε η κατάσταση του φορέα pCES1.

Ακολούθησε η πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης σύνδεσης παρουσία των κομμένων κασετών και των φορέων (η scFv κασέτα με το φαγεμίδιο pCANTAB6 και η Fab κασέτα με το φαγεμίδιο pCES1) και ο ηλεκτρομετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων XL1-Blue με τα ανασυνδυασμένα μόρια με σκοπό τη δημιουργία των βιβλιοθηκών έκφρασης αντισωμάτων.

### **3.1.5 Έλεγχος της απόδοσης του μετασχηματισμού και υπολογισμός του μεγέθους και της πολυπλοκότητας της βιβλιοθήκης**

#### **3.1.5.α Η βιβλιοθήκη των αντισωμάτων με μορφή Fab**

Με κατάλληλες αραιώσεις υπολογίστηκε το μέγεθος της βιβλιοθήκης που κατασκευάστηκε σε  $0,65 \times 10^6$  κλώνους. Στη συνέχεια εξετάστηκε η απόδοση του μετασχηματισμού με την πραγματοποίηση αντιδράσεων PCR ελέγχου ώστε να εκτιμηθεί το ποσοστό των κλώνων που περιέ-

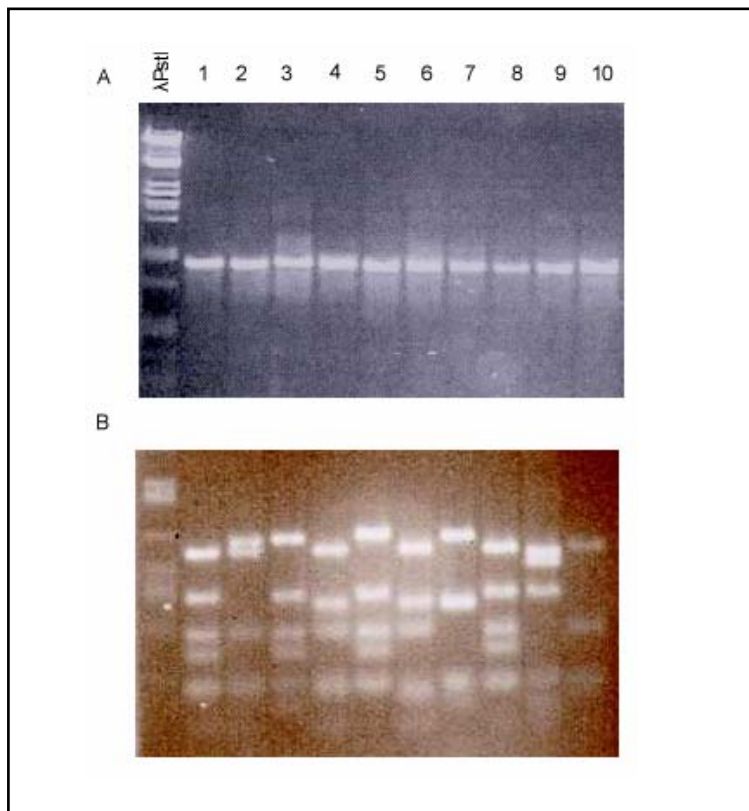


Εικόνα 3.1.20 A. Ηλεκ/ση των αντιδράσεων PCR ελέγχου σε πηκτή αγα-  
ρόζης (1,5%) B. Ηλεκ/ση των πέψων με το ένζυμο BstNI  
σε πηκτή αγαρόζης (2,5%)

χουν κλωνοποιημένες Fab κασέτες. Ελέγχθηκαν συνολικά 10 κλώνοι. Στην ηλεκτροφόρηση που ακολούθησε όλοι οι κλώνοι περιείχαν κλωνοποιημένες Fab κασέτες αφού το μέγεθος των ζωνών που εμφανίστηκαν μετά την ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων PCR ελέγχου ήταν το αναμενόμενο δηλαδή 1,85-1,95kb (Εικόνα 3.1.20 A). Οι κασέτες που επεκτάθηκαν, κόπηκαν στη συνέχεια με το περιοριστικό ένζυμο BstNI, ώστε να δημιουργηθεί το γενετικό αποτύπωμα τους (DNA fingerprinting) και να υπολογιστεί το ποσοστό της πολυπλοκότητας της βιβλιοθήκης. Όλοι οι κλώνοι εμφάνισαν διαφορετικό γενετικό αποτύπωμα γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι η πολυπλοκότητα της βιβλιοθήκης ξεπερνάει το 90% (Εικόνα 3.1.20 B).

### 3.1.5 β Η βιβλιοθήκη των αντισωμάτων με μορφή scFv

Όπως στην περίπτωση της βιβλιοθήκης των αντισωμάτων με τη μορφή Fab με κατάλληλες αραιώσεις υπολογίστηκε το μέγεθος της βιβλιοθήκης που κατασκευάστηκε σε  $0,27 \times 10^6$  κλώνους. Στη συνέχεια εξετάστηκε η απόδοση του μετασχηματισμού με την πραγματοποίηση αντιδράσεων PCR ελέγχου ώστε να εκτιμηθεί το ποσοστό των κλώνων που περιέχουν κλωνοποιημένες scFv κασέτες.



Εικόνα 3.1.21 A. Ηλεκ/ση των αντιδράσεων PCR ελέγχου σε πηκτή αγα-  
ρόζης (1,5%) B. Ηλεκ/ση των πέψων με το ένζυμο BstNI

σε πηκτή αγαρόζης (2,5%)

Ανάλογα ελέγχθηκαν 10 κλώνοι. Όλοι οι κλώνοι περιείχαν κλωνοποιημένες Fab κασέτες αφού το μέγεθος των ζωνών που εμφανίστηκαν στην ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων PCR ελέγχου ήταν το αναμενόμενο δηλαδή 1,05-1,15kb (Εικόνα 3.1.21 Α). Οι κασέτες που επεκτάθηκαν, κόπηκαν στη συνέχεια με το περιοριστικό ένζυμο BstNI, ώστε να δημιουργηθεί το γενετικό αποτύπωμα τους (DNA fingerprinting) και να υπολογιστεί το ποσοστό της πολυπλοκότητας της βιβλιοθήκης. Οι κλώνοι εμφάνισαν 8 διαφορετικά πρότυπα ζωνών γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι η πολυπλοκότητα της βιβλιοθήκης κυμαίνεται στο 80% (Εικόνα 3.1.21 Β και Πίνακας 3.1.4).

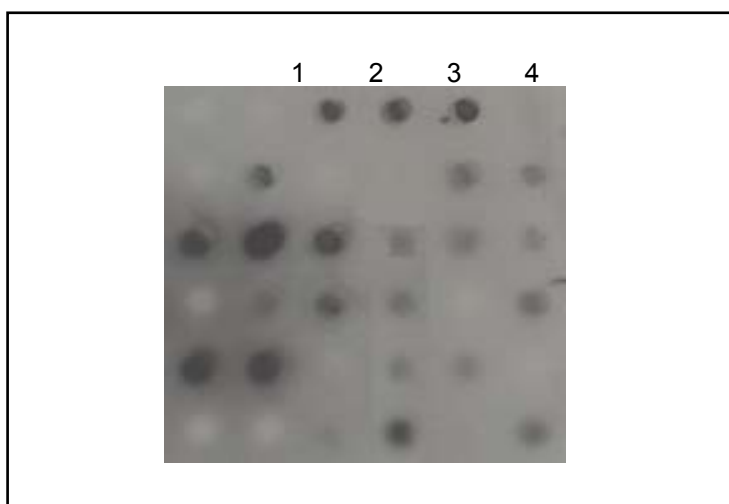
<b>Πρότυπο 1</b>	Κλώνοι 1 και 8
<b>Πρότυπο 2</b>	Κλώνος 2
<b>Πρότυπο 3</b>	Κλώνος 3
<b>Πρότυπο 4</b>	Κλώνοι 4 και 6
<b>Πρότυπο 5</b>	Κλώνος 5
<b>Πρότυπο 6</b>	Κλώνος 7
<b>Πρότυπο 7</b>	Κλώνος 9
<b>Πρότυπο 8</b>	Κλώνος 10

Πίνακας 3.1.4 Η ομαδοποίηση των κλώνων με βάση το γενετικό αποτύπωμα.

### **3.1.6 Έλεγχος της βιβλιοθήκης για την έκφραση αντισωμάτων**

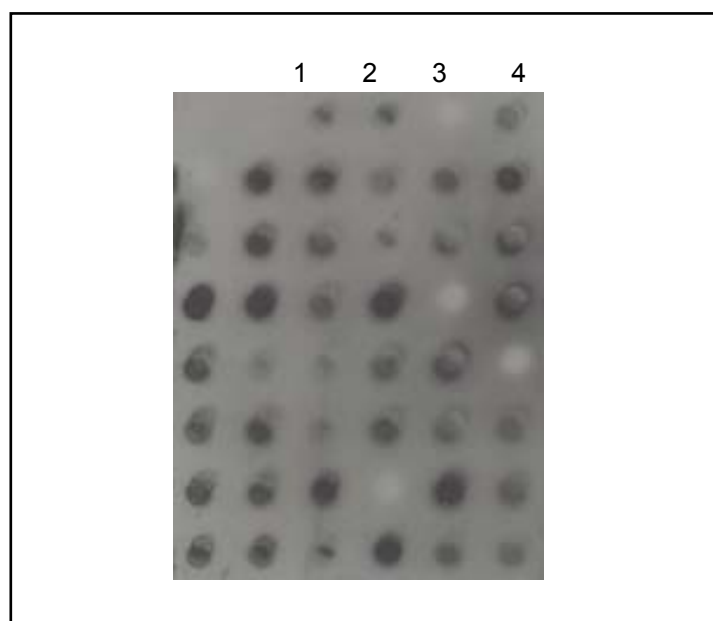
Αφού ελέγχθηκαν η βιβλιοθήκες σε επίπεδο ποικιλομορφίας, ακολούθησε ο έλεγχος τους σε επίπεδο έκφρασης αντισωμάτων. Συγκεκριμένα υπερκείμενα από βακτηριακές καλλιέργειες που είχαν επαχθεί για να εκφράσουν διαλυτό αντίσωμα σε πλάκες 96 πηγαδιών, ακινητοποιήθηκαν με προσρόφηση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (dot blot). Η μεμβράνη επωάστηκε με το αντίσωμα 9E10 και τελικά με κατάλληλο αντι-9E10 αντίσωμα που ήταν συνδεδεμένο με το ένζυμο περοξειδάση (HRP).

Εικόνα 3.1.22 Έκφραση διαλυτών αντισωμάτων με τη μορφή Fab. A1,



A2: αρνητικοί μάρτυρες (θρεπτικό υλικό). A3, A4: θετικοί μάρτυρες (10A scFv).

Από την βιβλιοθήκη των αντισωμάτων Fab χρησιμοποιήθηκαν 32 διαφορετικοί κλώνοι, οι οποίοι παρουσίασαν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης (Εικόνα 3.1.22).



Εικόνα 3.1.23 Έκφραση διαλυτών αντισωμάτων με τη μορφή scFv. A1, A2: αρνητικοί μάρτυρες (θρεπτικό υλικό). A3, A4: θετικοί μάρτυρες (10A scFv).

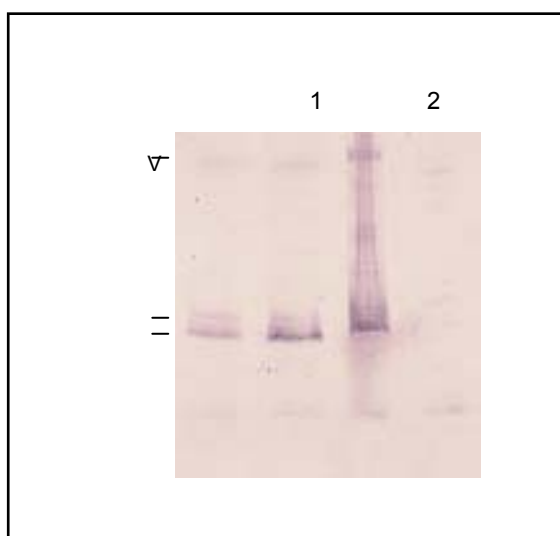
Ανάλογα από τη βιβλιοθήκη των αντισωμάτων scFv χρησιμοποιήθηκαν 44 διαφορετικοί κλώνοι, οι οποίοι παρουσίασαν καλύτερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τους κλώνους της βιβλιοθήκης Fab (Εικόνα 3.1.23). Το ποσοστό των κλώνων που παρουσίαζαν έκφραση αντισωμάτων ήταν μεγαλύτερο στην περίπτωση της βιβλιοθήκης scFv, γεγονός που συμφωνεί με την παρατήρηση

ότι τα αντισώματα scFv εκφράζονται καλύτερα από τα αντισώματα Fab (Kay *et al.*, 1996) (Πίνακας 3.1.5).

Βιβλιοθήκη	Κλώνοι με έκφραση/Σύνολο κλώνων	Ποσοστό έκφρασης
Fab	22/32	69%
scFv	39/44	89%

Πίνακας 3.1.5 Επίπεδα έκφρασης αντισωμάτων από τις βιβλιοθήκες.

Παράλληλα ελέγχθηκε η έκφραση των αντισωμάτων Fab με Western blotting (Εικόνα 3.1.24). Επιλέχθηκαν δύο τυχαίοι κλώνοι, στους οποίους επάχθηκε η έκφραση των διαλυτών αντισωμάτων με IPTG. Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένα αντίσωμα Fab ενάντια στη στρεπταβιδίνη, που ήταν επίσης κλωνοποιημένο στο φαγεμίδιο pCES1 και σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το κενό φαγεμίδιο pCES1. Το περίπλασμα των βακτηριακών κλώνων ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (12% SDS-PAGE), και οι πρωτείνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Για την ανίχνευση των Fab μορίων χρησιμοποιήθηκε σαν πρωτογενές αντίσωμα ένα αντι-Fab αντίσωμα και σαν δευτερογενές ένα αντίσωμα που ήταν



συζευγμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση. Τελικά οι ζώνες εμφανίστηκαν με τη χρήση του κατάλληλου υποστρώματος (Παράρτημα Α). Οι ζώνες που παρουσιάστηκαν αντιστοιχούσαν στις [VLCL] και [VHCH] αλυσίδες οι οποίες έχουν μέγεθος 27-29KD. Επίσης υπήρχε η ζώνη της υβριδικής πρωτεΐνης VHCH-pIII (περίπου 72KD) η οποία παράγεται στα XL1-Blue κύτταρα (κατασταλτικό στέλεχος). Οι υπόλοιπες ζώνες που εμφανίστηκαν είναι αποτέλεσμα της δράσης των βακτηριακών πρωτεασών.

Εικόνα 3.1.24 Ανάλυση κατά Western της έκφρασης των αντισωμάτων Fab. 1: κλώνος Α, 2: κλώνος Β, 3: θετικός μάρτυρας, 4: αρνητικός μάρτυρας

Ανάλογη ανάλυση έγινε και για τους scFv κλώνους με αποτέλεσμα την επιβεβαίωση των ενδείξεων του dot blot σ' ότι αφορά στην έκφραση των αντισωμάτων.

### 3.1.7 Επιλογή των βιβλιοθηκών με τον κατάλληλο αντιγονικό επίτοπο

#### 3.1.7.α Η επιλογή της βιβλιοθήκης των αντισωμάτων με τη μορφή Fab

Η μέθοδος επιλογής βασίστηκε στην επιλογή με βιοτινιλιωμένο αντιγόνο και την απομόνωση με μαγνητικά σφαιρίδια που ήταν καλυμμένα με στρεπταβιδίνη. Πραγματοποιήθηκαν δύο παράλληλες διαδικασίες επιλογής: στη μια χρησιμοποιήθηκε βιοτινιλιωμένο 100μερές αντιγόνο που αποτελείται από 5 επαναλήψεις της VNTR περιοχής της MUC1 βλεννίνης, ώστε να διατηρείται όσο το δυνατό η φυσική διαμόρφωση του μη γλυκοσυλιωμένου μορίου (**Krambovitis et al., 1998**) και στην άλλη χρησιμοποιήθηκε το βιοτινιλιωμένο 23μερές αντιγόνο που αποτελεί 1 επανάληψη της VNTR περιοχής της MUC2 βλεννίνης. Σε κάθε περίπτωση έγιναν δύο κύκλοι επιλογής. Στον πρώτο κύκλο η συγκέντρωση του αντιγόνου ήταν 500nM, ενώ στο δεύτερο ήταν 100nM. Μετά από κάθε κύκλο καταμετρήθηκε το πλήθος των φάγων πριν την επιλογή (Input) και το πλήθος των φάγων μετά την επιλογή (Output). Ακολούθως υπολογίστηκε ο λόγος  $\Lambda = \text{Input}/\text{Output}$  για κάθε κύκλο επιλογής. Ο εμπλουτισμός που επιτεύχθηκε μεταξύ των δύο κύκλων επιλογής είναι ίσος με το λόγο  $\Lambda_1/\Lambda_2$  (Πίνακας 3.1.6).

<u>Αντιγονικός</u> <u>Επίτοπος</u>	$\Lambda = \text{Input}/\text{Output}$	
	Κύκλος 1	Κύκλος 2
MUC1	$\Lambda_1 = 0,45 \times 10^6$	$\Lambda_2 = 6,6 \times 10^6$
<b>Εμπλουτισμός</b>		<b><math>\Lambda_1/\Lambda_2 = 0,07</math></b>
MUC2	$\Lambda_1 = 4,2 \times 10^7$	$\Lambda_2 = 7,6 \times 10^7$
<b>Εμπλουτισμός</b>		<b><math>\Lambda_1/\Lambda_2 = 0,55</math></b>

Πίνακας 3.1.6 Ο εμπλουτισμός μεταξύ των διαδοχικών κύκλων επιλογής των φαγικών βιβλιοθηκών.

Όπως είναι φανερό, δεν παρατηρήθηκε εμπλουτισμός μετά τον δεύτερο κύκλο επιλογής και γι'αυτό το λόγο δεν επιχειρήθηκε τρίτος επιλεκτικός κύκλος. Οι ενδείξεις επιβεβαιώθηκαν με την ανοσοενζυμική μέθοδο ανίχνευσης ειδικών κλώνων (Παράγραφος 3.2.2), όπου δεν βρέθηκαν κλώνοι ειδικοί προς τα αντιγόνα επιλογής που χρησιμοποιήθηκαν (100μερές MUC1 και 23μερές MUC2). Στην περίπτωση του MUC2 κρίθηκε απαραίτητη η επανάληψη της επιλογής με το 46μερές MUC2 (2 VNTR). Αυτό έγινε γιατί θεωρήθηκε ότι το μικρό μέγεθος του βιοτινιλιωμένου πεπτιδίου το οποίο συνδέεται με την στρεπταβιδίνη στην επιφάνεια των μαγνητικών σφαιριδίων, αποτέλεσε αρνητικό



παράγοντα για την επιλογή των ειδικών φάγων λόγω της παρουσίας στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Τα αποτελέσματα ωστόσο ήταν παρόμοια και σ' αυτή τη δεύτερη επιλεκτική προσπάθεια.

### 3.1.7.β Η επιλογή της βιβλιοθήκης των αντισωμάτων με τη μορφή scFv

Ανάλογα η μέθοδος επιλογής βασίστηκε στην επιλογή με βιοτινιλιωμένο αντιγόνο και την απομόνωση με μαγνητικά σφαιρίδια που ήταν καλυμμένα με στρεπταβιδίνη. Ως αντιγονικός επίτοπος χρησιμοποιήθηκε το βιοτινιλιωμένο 46μερές MUC2 (2 VNTR) σε συγκέντρωση 500 nM για καθένα από τους δύο κύκλους επιλογής που πραγματοποιήθηκαν. Μετά από κάθε κύκλο καταμετρήθηκε το πλήθος των φάγων πριν την επιλογή (Input) και το πλήθος των φάγων μετά την επιλογή (Output). Ακολούθως υπολογίστηκε ο λόγος  $\Lambda = \text{Input}/\text{Output}$  για κάθε κύκλο επιλογής. Ο εμπλουτισμός που επιτεύχθηκε μεταξύ των δύο κύκλων επιλογής είναι ίσος με το λόγο  $\Lambda_1/\Lambda_2$  (Πίνακας 3.1.7).

<u>Αντιγονικός</u> <u>Επίτοπος</u>	$\Lambda = \text{Input}/\text{Output}$	
	Κύκλος 1	Κύκλος 2
MUC2	$\Lambda_1 = 12,6 \times 10^7$	$\Lambda_2 = 2 \times 10^7$
Εμπλουτισμός	$\Lambda_1/\Lambda_2 = 6,3$	

Πίνακας 3.1.7 Ο εμπλουτισμός μεταξύ των διαδοχικών κύκλων επιλογής των φαγικών βιβλιοθηκών.

Όπως είναι φανερό, δεν παρατηρήθηκε εμπλουτισμός μετά τον δεύτερο κύκλο επιλογής. Οι ενδείξεις επιβεβαιώθηκαν με την ανοσοενζυμική μέθοδο ανίχνευσης ειδικών κλώνων (Παράγραφος 3.2.2), όπου δεν βρέθηκαν κλώνοι ειδικοί προς το αντιγόνο επιλογής που χρησιμοποιήθηκε (46μερές MUC2).

## Συζήτηση

Επιχειρήθηκε η κατασκευή cDNA βιβλιοθηκών έκφρασης ανθρώπινων αντισωμάτων με τη μορφή Fab και scFv. Ως πηγή αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα B λεμφοκύτταρα τα οποία είχαν ανοσοποιηθεί *in vitro* με κατάλληλο αντιγόνο. Ο συνδυασμός της διαδικασίας της *in vitro* ανοσοποίησης με την τεχνολογία της παρουσίασης αντισωμάτων στην επιφάνεια φάγων επιχειρήθηκε με σκοπό την μείωση του απαιτούμενου μεγέθους της βιβλιοθήκης, καθώς και εξαιτίας των δυνατοτήτων που θα έδινε ένας τέτοιος συνδυασμός τεχνολογιών σε ότι αφορά στην κατά παραγγελία παραγωγή ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων. Η ανοσοσυγγένεια των ανοσοσφαιρινικών μορίων που επιλέγονται με τον κατάλληλο αντιγονικό επίτοπο είναι ανάλογη προς το μέγεθος της παρθενικής βιβλιοθήκης. Συνήθως τα αντισώματα που απομονώνονται από μικρές βιβλιοθήκες της τάξης των  $10^7$  κλώνων παρουσιάζουν ανοσοσυγγένεια περίπου  $10^6 \text{ M}^{-1}$  (Marks *et al.*, 1991, a), ενώ

εκείνα που απομονώνονται από μεγαλύτερες βιβλιοθήκες της τάξης των  $10^{10}$  κλώνων παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης όπως  $10^8$ - $10^{10}$   $M^{-1}$  (Vaughan et al., 1996). Ωστόσο η δημιουργία τόσο μεγάλων βιβλιοθηκών αντιμετωπίζει αρκετές πρακτικές δυσκολίες και περιορισμούς που προκύπτουν από τη δυναμική των μεθόδων που χρησιμοποιούνται. Για παράδειγμα ένας ανασταλτικός παράγοντας για τη δημιουργία μεγάλων βιβλιοθηκών, είναι η απόδοση μετασχηματισμού των βακτηριακών κυττάρων. Η ανοσοποίηση των Β λεμφοκυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό του πληθυσμού των κυττάρων με ειδικά Β λεμφοκύτταρα, τα οποία έχουν επιπλέον περάσει από τη διαδικασία των σωματικών μεταλλαγών με αποτέλεσμα την παραγωγή καλύτερων αντισωμάτων (Zafiropoulos et al., 2000). Το άμεσο αποτέλεσμα είναι η μείωση του απαιτούμενου μεγέθους της βιβλιοθήκης και η διευκόλυνση της κατασκευής της.

Τα αντιγόνα που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στην οικογένεια των ανθρώπινων βλεννινών που θεωρούνται καρκινικά αντιγόνα. Μέχρι σήμερα το σύνολο των μονοκλωνικών αντισωμάτων ενάντια στις ανθρώπινες βλεννίνες ήταν τρωκτικής προέλευσης. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, όπως έχει ήδη αναφερθεί, απομονώθηκαν τα πρώτα αντί-MUC1 scFv ανθρώπινα αντισώματα. Οι γνωστές παρενέργειες της χρήσης τρωκτικών αντισωμάτων στους ανθρώπους όπως η απάντηση HAMA, εξηγούν την ανάγκη της δημιουργίας εξολοκλήρου ανθρώπινων αντισωμάτων ενάντια στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των βλεννινών. Τα ανθρώπινα αντισώματα κατά αυτών των αντιγόνων θα αποτελέσουν διαγνωστικά και θεραπευτικά εργαλεία για διάφορους τύπους καρκίνων.

Τα Β λεμφοκύτταρα υπέστησαν πρωτογενή και δευτερογενή ανοσοποίηση και μετασχηματίστηκαν με τον EBV ιό (Zafiropoulos et al., 2000). Έπειτα ελέγχθηκαν τα υπερκείμενα των καλλιέργειών για την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων με την ανοσοενζυμική μέθοδο ειδικότητας (ELISA). Στις περιπτώσεις που υπήρχε θετικό σήμα, δηλαδή ειδικά IgG αντισώματα, τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ολικού RNA ενώ ακολούθησε η κατασκευή του cDNA με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής παρουσία τυχαίων εξαμερών ολιγονουκλεοτιδίων. Συγκεκριμένα απομονώθηκε RNA από  $2,25 \times 10^6$  κύτταρα τα οποία είχαν ανοσοποιηθεί με την VNTR περιοχή του MUC2 αντιγόνου και το 100μερές MUC1 (5 VNTR) και από  $2 \times 10^7$  κύτταρα που είχαν ανοσοποιηθεί με την VNTR περιοχή του MUC2 αντιγόνου. Μετά την κατασκευή του cDNA ακολούθησε ο πολλαπλασιασμός του συνόλου των αντισωματικών γονιδίων που εκφράζονταν από τον αρχικό πληθυσμό των Β λεμφοκυττάρων. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν δύο σειρές εκκινητών ανάλογα με το τύπο των ανασυνδυασμένων αντισωμάτων. Οι εκκινητές ήταν ειδικοί για το 5' άκρο των VH, Vk και VL βλαστικών γονιδίων και το 3' άκρο των JH, Jk και Jλ γονιδιακών περιοχών για τα scFv αντισώματα ή το 3' άκρο των JH, Ck και Cλ γονιδιακών περιοχών για τα Fab αντισώματα (Παράρτημα Β). Για να γίνει δυνατός ο πολλαπλασιασμός του συνόλου των βλαστικών γονιδίων ήταν απαραίτητο να σχεδιαστεί ένας μεγάλος αριθμός εκκινητών. Οι εκκινητές ήταν εκφυλισμένοι σε κάποιες θέσεις έτσι ώστε να μειωθεί ο απαιτούμενος αριθμός τους και επομένως το κόστος κατασκευής τους και παράλληλα να απλουστευθεί η διαδικασία πολλαπλασιασμού των αντισωματικών γονιδίων. Κατά τον σχεδιασμό δόθηκε προσοχή α) στο 3' άκρο κάθε εκκινητή ώστε τα 3 τελευταία νουκλεοτίδια να είναι πλήρως συμπληρωματικά με κάθε γονίδιο που έπρεπε να πολλαπλασιαστεί και β) στη διατήρηση της αμινοξικής ακολουθίας στα άκρα των αντισωμάτων με τη βοήθεια του εκφυλισμού του γενετικού

κώδικα. Στα πρωταρχικά PCR χρησιμοποιήθηκε χωριστά κάθε ένας 5' εκκινήτης με το σύνολο του ή των 3' εκκινήτων με σκοπό την διατήρηση της ποικιλομορφίας. Έτσι κατασκευάστηκε το σύνολο των VH, Vk και VL γονιδίων για τα scFv αντισώματα και το σύνολο των VH, VkCk και VLCL γονιδίων για τα Fab αντισώματα. Αρχικά επιχειρήθηκε η κατασκευή Fab αντισωμάτων εξαιτίας του μονομερή τους χαρακτήρα που κάνει πιο απλές τις διαδικασίες της επιλογής και του χαρακτηρισμού των αντισωμάτων. Η κασέτα Fab που συναρμολογείται με ένα PCR σύνδεσης δύο σταδίων είναι της μορφής: (ApaI)VLCL-Συνδετικό κομμάτι-VH(BstEII). Η κασέτα scFv που επίσης συναρμολογείται μ'ένα PCR σύνδεσης δύο σταδίων είναι της μορφής (SfiI)VH-Συνδετικό κομμάτι-VL(NotI). Το ζεύγος των SfiI και NotI περιοριστικών ένζυμων δεν κόβουν τα ανθρώπινα αντισωματικά βλαστικά γονίδια σε αντίθεση με το ζεύγος των ApaI και BstEII ( το ApaI κόβει 2 VH και 2 VL βλαστικά γονίδια, ενώ το BstEII κόβει 4 VH και 7 VL βλαστικά γονίδια) όπως επιβεβαίωσε η χαρτογράφηση των αντίστοιχων περιοριστικών θέσεων στο ρεπερτόριο των γνωστών ανθρώπινων αντισωματικών γονιδίων. Στη δεύτερη βιβλιοθήκη ένα μεγάλο μέρος των πολλαπλασιασμένων VH γονιδίων κόπηκε από το ένζυμο BstEII και για το λόγο αυτό η βιβλιοθήκη των αντισωμάτων κατασκευάστηκε υπό την μορφή των scFv μορίων .

Μετά την κλωνοποίηση των κασετών στον κατάλληλο φορέα οι βιβλιοθήκες ελέγχθηκαν σ'ότι αφορά στην ποικιλομορφία και στη δυνατότητα τους να παράγουν αντισώματα. Μετά τη δευτερογενή ανοσοποίηση τα κύτταρα μοιράστηκαν σε πηγαδάκια σε συγκέντρωση  $10^4$  B κύτταρα/πηγάδι. Η επιμόλυνση με τον EBV ιό είχε σαν αποτέλεσμα το μετασηματισμό του 30% των B κυττάρων από τα οποία μόνο το 1% αθανατοποιήθηκε και παρήγαγε ανοσοσφαιρίνες (**Ifversen et al., 1993**). Επομένως υπολογίστηκε ότι ο μέγιστος δυνατός αριθμός των πιθανών ειδικοτήτων θα ήταν  $10^2$ /πηγάδι. Στην πραγματικότητα ο αριθμός αυτός ήταν μικρότερος αν λάβει κανείς υπόψη ότι υπήρχε εμπλουτισμός των ειδικών B λεμφοκυττάρων. Κατά την κατασκευή των ανασυνδυασμένων αντισωμάτων έγινε τυχαίος συνδυασμός των VH και VL γονιδίων με αποτέλεσμα την δημιουργία  $10^4$  πιθανών συνδυασμών. Αυτό σημαίνει ότι η βιβλιοθήκη που θα κατασκευαζόταν πρέπει να περιλάμβανε τουλάχιστον  $10^4$  διαφορετικούς κλώνους, ώστε να γίνει δυνατή η απομόνωση του ειδικού αντισώματος. Το μέγεθος των βιβλιοθηκών που κατασκευάστηκαν θεωρήθηκε αρκετό για την απομόνωση του ειδικού αντισώματος. Η συνθετική φύση των αντιγόνων καθόρισε την επιλεκτική διαδικασία, η οποία έγινε με τη χρήση βιοτινιλιωμένου αντιγόνου και μαγνητικών σφαιριδίων καλυμμένων με στρεπταβιδίνη. Τα αντιγόνα επιλογής ήταν το βιοτινιλιωμένο 100μερές MUC1 (5 VNTR) και το βιοτινιλιωμένο 46μερές MUC2 (2 VNTR). Μετά από διαδοχικούς κύκλους επιλογής δεν επιτεύχθηκε εμπλουτισμός ως προς τα ειδικά αντισώματα, ενώ ο έλεγχος διακριτών κλώνων για την παραγωγή ειδικού αντισώματος με τη διαδικασία της ELISA δεν έδωσε ειδικούς κλώνους.

Τα αντισώματα με τη μορφή Fab εκφράζονται με χαμηλή απόδοση από τα βακτηριακά κύτταρα και περιλαμβάνουν, όπως και τα scFv μόρια, μία θέση σύνδεσης με το αντιγόνο σε σύγκριση με τα IgG αντισώματα, γεγονός που σημαίνει ότι τυχόν ειδικά αντισώματα μπορεί να χαθούν κατά τη διάρκεια των επιλεκτικών διαδικασιών, κύριως αν έχουν μικρή συγγένεια πρόσδεσης στο αντιγόνο. Πάντως το πιο κρίσιμο σημείο στη διαδικασία της κατασκευής των βιβλιοθηκών είναι η χρονική στιγμή κατά την οποία γίνεται η συλλογή των κυττάρων και η απομόνωση του ολικού RNA. Τα μετασηματισμένα με EBV B λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στις καλλιεργητικές

συνθήκες με αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση της παραγωγής αντισωμάτων. Παραμένει λοιπόν υπό εξέταση η δυνατότητα επέκτασης της χρονικής περιόδου παραγωγής των ειδικών αντισωμάτων, έτσι ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα απομόνωσης του ειδικού mRNA και κατασκευής του αντίστοιχου αντισώματος.

## 3.2 Απομόνωση και χαρακτηρισμός αντι-MUC1 αντισωμάτων από φαγική βιβλιοθήκη ανθρώπινων αντισωμάτων

### Εισαγωγή

Στα πλαίσια της προσπάθειας να απομονωθούν ειδικά ανθρώπινα αντι-MUC1 αντισώματα που θα αποτελέσουν δυνητικά διαγνωστικά ή θεραπευτικά εργαλεία ενάντια σε διάφορους τύπους καρκίνων, επιχειρήθηκε η επιλογή μιας παρθενικής και μιας ανοσοποιημένης βιβλιοθήκης με ένα συνθετικό πεπτιδίο που περιλαμβάνει 5 επαναλήψεις της VNTR περιοχής της ανθρώπινης MUC1 βλεννίνης (100μερές MUC1). Όπως έχει ήδη αναφερθεί η MUC1 βλεννίνη παρουσιάζει υπερέκφραση και μειωμένο βαθμό γλυκοσιλίωσης σε αδενοκαρκινώματα του μαστού, της μήτρας και του παχέως εντέρου με αποτέλεσμα την εμφάνιση πεπτιδικών επιτόπων, οι οποίοι είναι καλυμμένοι με υδατάνθρακες στα φυσιολογικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό καθιστά τη MUC1 βλεννίνη ένα σημαντικό καρκινικό αντιγόνο-στόχο για ανοσοθεραπεία.

### 3.2.1 Επιλογή των ανθρώπινων αντι-MUC1 αντισωμάτων

Ο βασικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η επιλογή ανθρώπινων αντισωμάτων, ειδικών για την VNTR περιοχή της MUC1 βλεννίνης που βρίσκεται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, με την βοήθεια της τεχνολογίας της παρουσίασης αντισωμάτων στην επιφάνεια βακτηριοφάγων. Για τις επιλογές χρησιμοποιήθηκαν 2 βιβλιοθήκες φαγικών αντισωμάτων (Πίνακας 3.2.1).

Όνομασία βιβλιοθήκης	Προέλευση	Μορφή αντισωμάτων	Μέγεθος βιβλιοθήκης
Vaughan	Ανθρώπινη παρθενική	scFv	$6 \times 10^9$ κλώνοι
LN-BC-OVC	Ανθρώπινη καρκινική (καρκίνος μαστού και μήτρας)	Fab	$3 \times 10^8$ κλώνοι

Πίνακας 3.2.1 Οι βιβλιοθήκες που επιλέχθηκαν.

Η μέθοδος επιλογής βασίστηκε στην επιλογή με βιοτινιλιωμένο αντιγόνο και την απομόνωση με μαγνητικά σφαιρίδια που ήταν καλυμμένα με στρεπταβιδίνη. Η χρήση μη καθαρισμένου αντιγόνου θα δημιουργούσε προβλήματα λόγω της παράλληλης επιλογής μη ειδικών αντισωμάτων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε συνθετικό 100μερές αντιγόνο που αποτελείται από 5 επαναλήψεις της VNTR περιοχής της MUC1 βλεννίνης, ώστε να διατηρείται όσο το δυνατό η φυσική διαμόρφωση του μη γλυκοσιλιωμένου μορίου (**Krambovitis et al., 1998**). Πραγματοποιήθηκαν 4 κύκλοι επιλογής με βιοτινιλιωμένο 100μερές MUC1. Μετά από κάθε κύκλο καταμετρήθηκε το πλήθος των φάγων πριν την

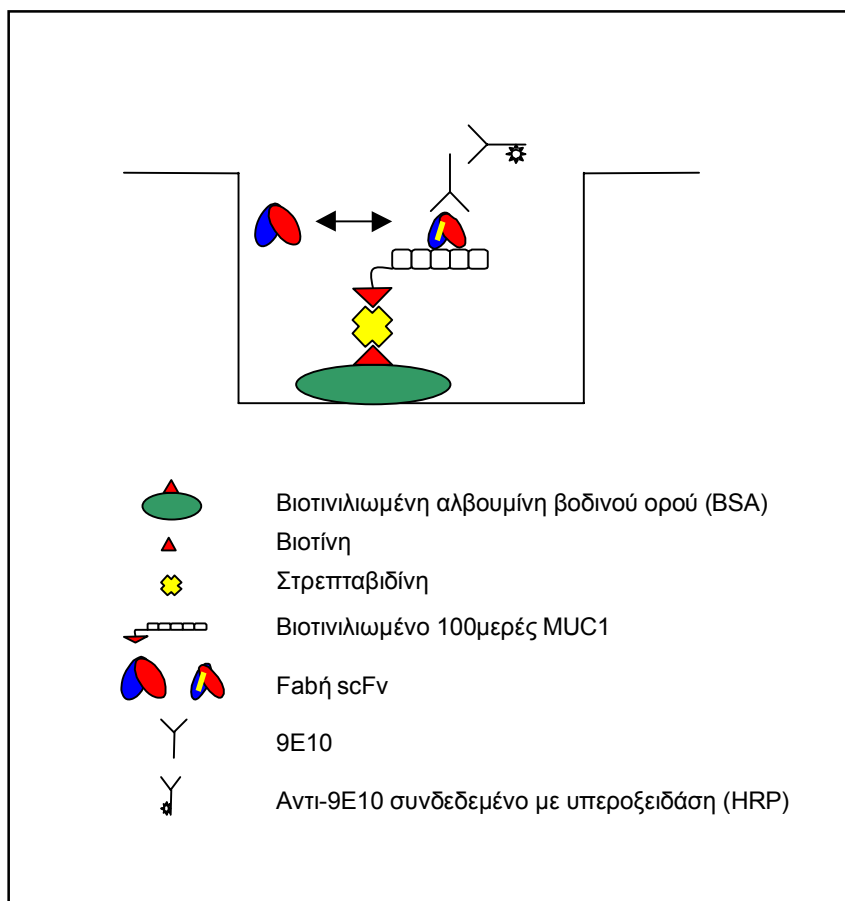
επιλογή (Input) και το πλήθος των φάγων μετά την επιλογή (output). Ακολούθως υπολογίστηκε ο λόγος  $\Lambda = \text{Input}/\text{Output}$  για κάθε κύκλο επιλογής. Ο διαδοχικός εμπλουτισμός που επιτεύχθηκε μεταξύ των διαφόρων κύκλων επιλογής είναι ίσος με το λόγο  $\Lambda_1/\Lambda_2$ ,  $\Lambda_2/\Lambda_3$  και  $\Lambda_3/\Lambda_4$  (Πίνακας 3.2.2).

	$\Lambda = \text{Input}/\text{Output}$			
	Κύκλος 1	Κύκλος 2	Κύκλος 3	Κύκλος 4
Vaughan	$\Lambda_1 = 1,8 \times 10^8$	$\Lambda_2 = 1,5 \times 10^5$	$\Lambda_3 = 5,44 \times 10^3$	$\Lambda_4 = 1 \times 10^4$
<b>Εμπλουτισμός</b>		$\Lambda_1/\Lambda_2 = 1200$	$\Lambda_2/\Lambda_3 = 27$	$\Lambda_3/\Lambda_4 = 0,5$
LN-BC-OVC	$\Lambda_1 = 3,2 \times 10^8$	$\Lambda_2 = 9,4 \times 10^6$	$\Lambda_3 = 11,6 \times 10^4$	$\Lambda_4 = 4 \times 10^4$
<b>Εμπλουτισμός</b>		$\Lambda_1/\Lambda_2 = 34$	$\Lambda_2/\Lambda_3 = 81$	$\Lambda_3/\Lambda_4 = 3$

Πίνακας 3.2.2 Ο εμπλουτισμός μεταξύ των διαδοχικών κύκλων επιλογής των φαγικών βιβλιοθηκών

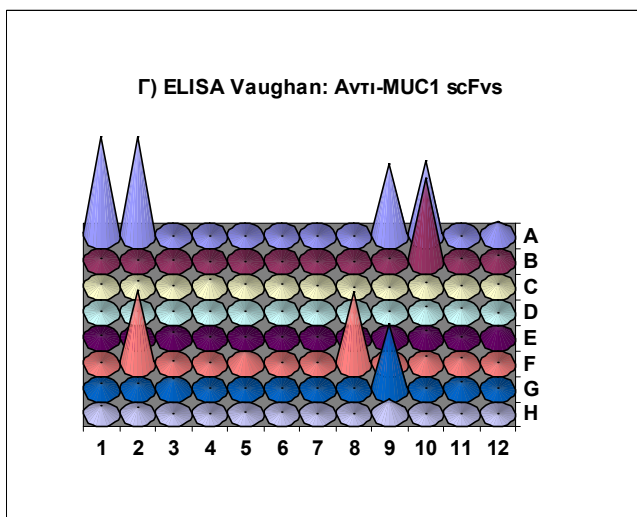
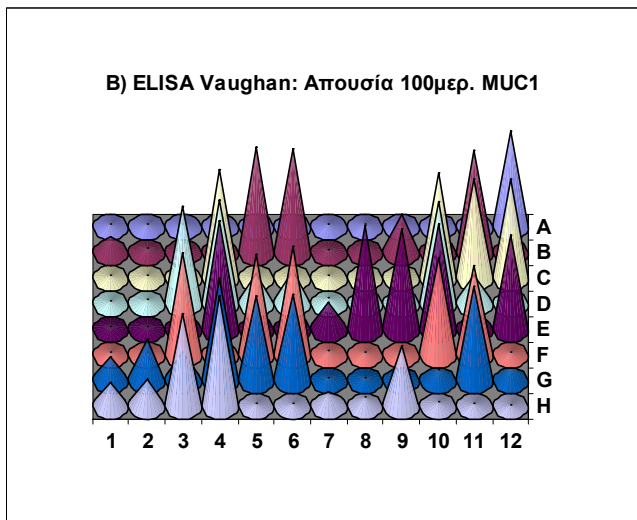
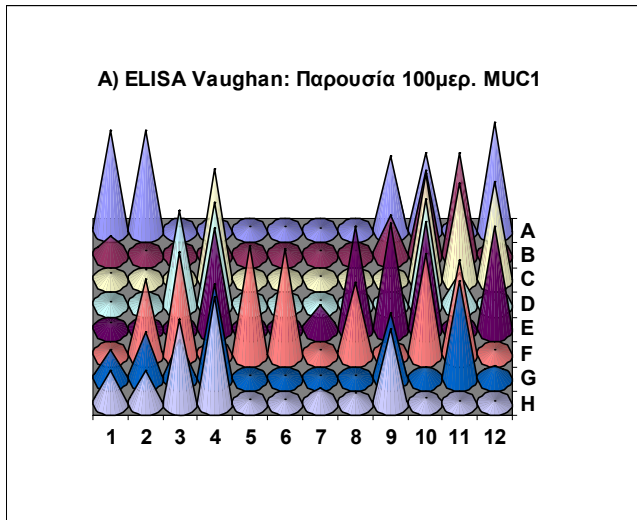
### 3.2.2 Ανίχνευση ειδικών κλώνων με την ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA)

Σε πλάκα 96 πηγαδιών πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος μια σειράς κλώνων, ώστε να εντοπιστούν τα ειδικά αντι-MUC1 αντισώματα. Η ανοσοενζυμική μέθοδος που εφαρμόστηκε



παρουσιάζεται αναλυτικά στο Εικόνα 3.2.1.

Εικόνα 3.2.1 Ανοσοενζυμική μέθοδος ανίχνευσης διαλυτών αντισωμάτων με τη μορφή scFv ή Fab.

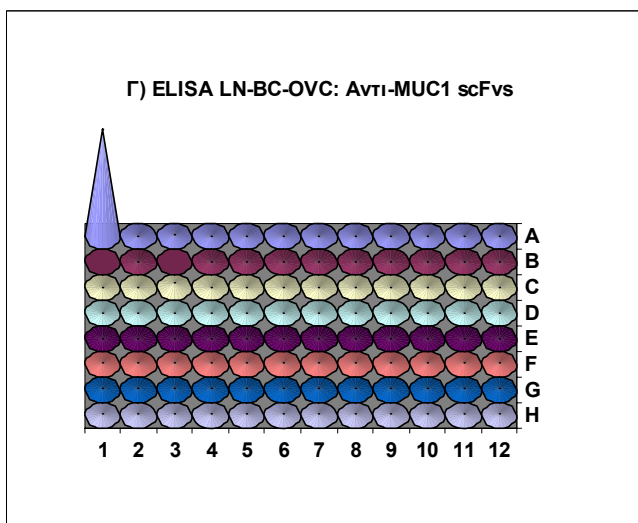
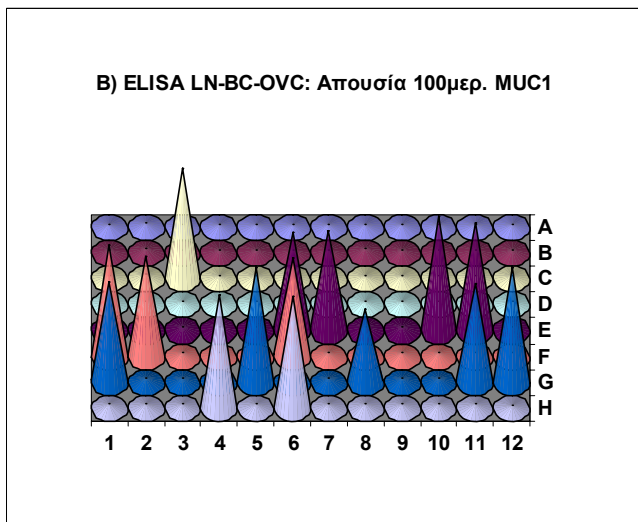
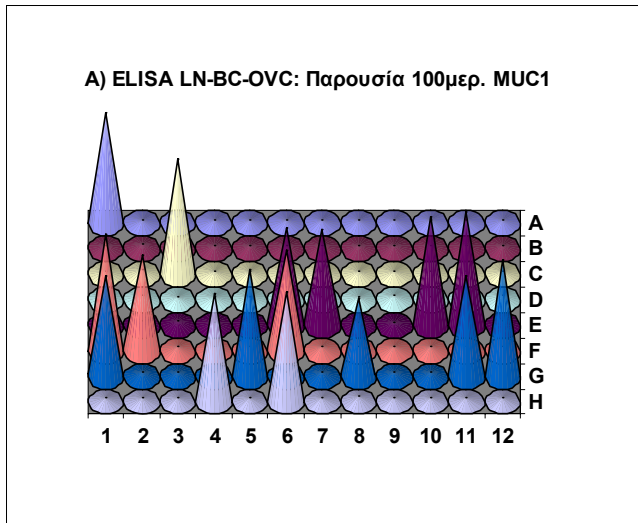


Εικόνα 3.2.2 Σχηματική απεικόνιση των απορροφήσεων A450 σε πλάκα 96 πηγαδιών:

- A1, A2: Θετικοί μάρτυρες (1G5 μονοκλωνικό αντι-MUC1)
- A3, A4, H11, H12: Αρνητικοί Μάρτυρες (Θρεπτικό υλικό )

- Οι σειρές A, B, C, D περιέχουν κλώνους από τον τρίτο κύκλο επιλογής.
- Οι σειρές E, F, G, H περιέχουν κλώνους από τον τέταρτο κύκλο επιλογής.





κλώνους από τον τέταρτο κύκλο επιλογής.

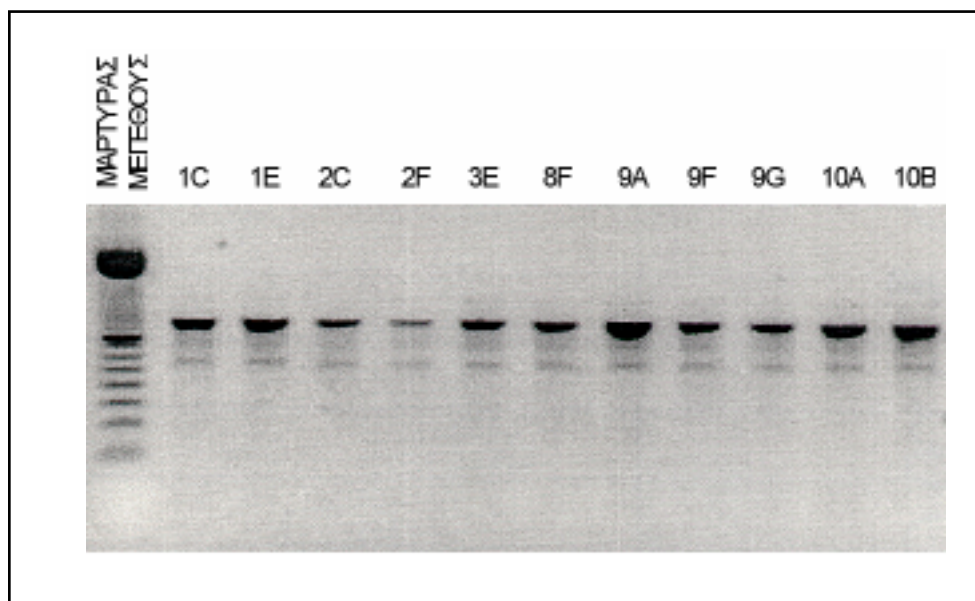
Εικόνα 3.2.3 Σχηματική απεικόνιση των απορροφήσεων A450 σε πλάκα 96 πηγαδιών:

- A1: Θετικός Μάρτυρας (1G5 μονοκλωνικό αντι-MUC1)
- A2, H11, H12: Αρνητικοί Μάρτυρες (Θρεπτικό υλικό)
- Οι σειρές A,B,C,D περιέχουν κλώνους από τον τρίτο κύκλο επιλογής.
- Οι σειρές E,F,G,H περιέχουν

Για κάθε βιβλιοθήκη χρησιμοποιήθηκαν δύο πλάκες 96 πηγαδιών: στην μια η ανοσοενζυμική μέθοδος έγινε παρουσία του 100μερούς MUC1 (Εικόνα 3.2.2 Α, Εικόνα 3.2.3 Α), ενώ στην άλλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε απουσία του αντιγόνου (Εικόνα 3.2.2 Β, Εικόνα 3.2.3 Β). Ως θετικά πηγάδια, δηλαδή πηγάδια που περιείχαν ειδικά αντι-MUC1 scFv αντισώματα, θεωρήθηκαν εκείνα που παρουσίαζαν υψηλές απορροφήσεις στην πρώτη πλάκα και χαμηλές απορροφήσεις στη δεύτερη (Εικόνα 3.2.2 Γ, Εικόνα 3.2.3 Γ). Τα πηγάδια εκείνα που παρουσίαζαν υψηλές απορροφήσεις και στις δύο πλάκες, περιείχαν μη ειδικά scFv αντισώματα ως προς το αντιγόνο MUC1. Πιθανότατα πρόκειται για αντισώματα που παρουσιάζουν ειδικότητα πρόσδεσης στην στρεπταβιδίνη ή στην αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA).

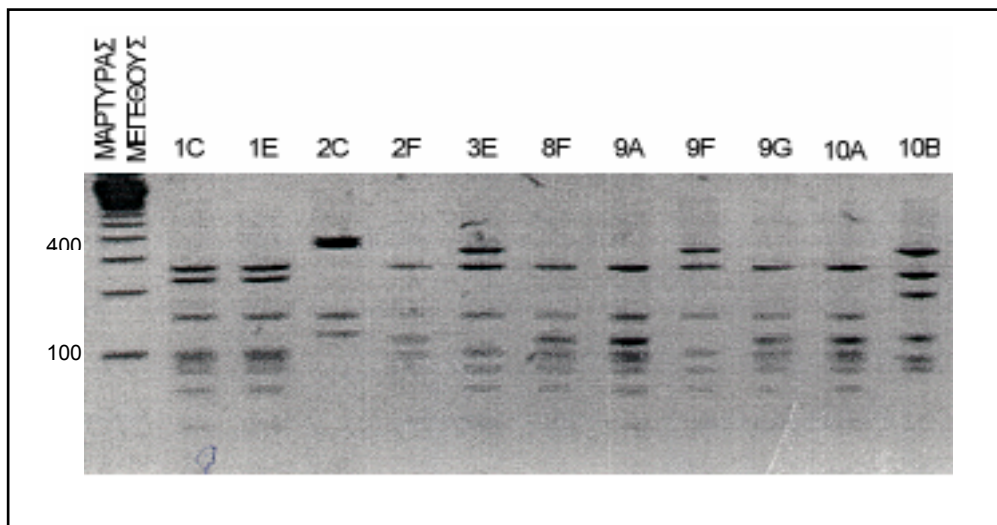
### 3.2.3 Έλεγχος των κλώνων με PCR και ανάλυση γενετικού αποτυπώματος (DNA fingerprinting)

Τα αντισώματα που απομονώθηκαν παρουσιάζουν ειδικότητα σύνδεσης με το 100μερές MUC1 και προέρχονται από την παρθενική βιβλιοθήκη Vaughan (Εικόνα 3.2.2 Γ). Αντίστοιχα Fab αντισώματα από την καρκινική βιβλιοθήκη LN-BC-OVC δεν εντοπίστηκαν (Εικόνα 3.2.3 Γ). Με τους κατάλληλους εκκινητές έγινε PCR, ώστε να ελεγχθεί το μέγεθος των συναρμολογημένων γονιδίων, το οποίο ήταν το αναμενόμενο (Εικόνα 3.2.4). Ο 5' εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε είναι ο *puc-reverse* και ο 3' εκκινητής είναι ο *fd-tet-seq* (Κεφάλαιο 2 Παράρτημα Β). Ο πρώτος είναι συμπληρωματικός με το πλασμίδιο *puc119*, ενώ ο δεύτερος είναι συμπληρωματικός με το 5' άκρο του γονιδίου της *p3* που είναι κλωνοποιημένο στο φαγεμίδιο *pCANTAB-6*. Το μέγεθος των τμημάτων DNA που προκύπτουν από μια τέτοια αντίδραση PCR υπολογίζεται γύρω στις 900-1000bp.

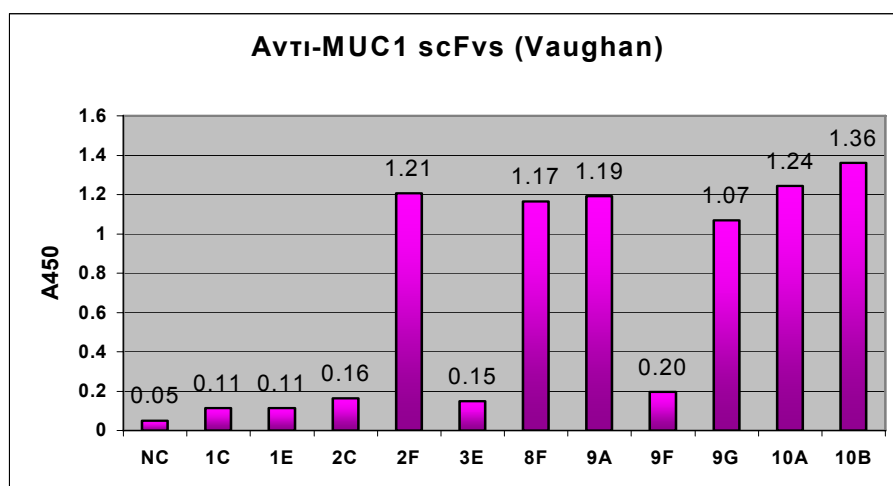


Εικόνα 3.2.4 Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε 1% πηκτή αγαρόζης μετά από PCR των κλώνων με τους εκκινητές *Puc-reverse* και *Fd-tet-seq*. Μάρτυρας Μεγέθους: σκάλα των 100bp

Στη συνέχεια τα κομμάτια DNA που επεκτάθηκαν, κόπηκαν με το περιοριστικό ένζυμο BstNI με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός προτύπου ζωνών το οποίο είναι χαρακτηριστικό για κάθε κλώνο (Εικόνα 3.2.5). Το ένζυμο αυτό επιλέχθηκε γιατί παρουσιάζει πολλές περιοριστικές θέσεις στα γονίδια των μεταβλητών περιοχών των ανθρώπινων αντισωμάτων. Το πρότυπο των ζωνών επέτρεψε την κατάταξη των scFvs σε κατηγορίες, οι οποίες μάλιστα συμφωνούν με τις τιμές της απορρόφησης A450 της ELISA (Εικόνα 3.2.6). Έτσι σχηματίστηκαν πέντε κατηγορίες scFv κλώνων με βάση το πρότυπο των ζωνών του DNA fingerprinting και τις τιμές της απορρόφησης A450 που προέκυψαν από την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA (Πίνακας 3.2.3). Από κάθε κατηγορία επιλέχθηκε ένας κλώνος για περαιτέρω ανάλυση. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν οι κλώνοι: 1C, 2C, 10A, 3E και 10B.



Εικόνα 3.2.5 DNA fingerprinting σε 4% πηκτή αραρόζης μετά από κόψιμο των scFv γονιδίων με το περιοριστικό ένζυμο BstNI.



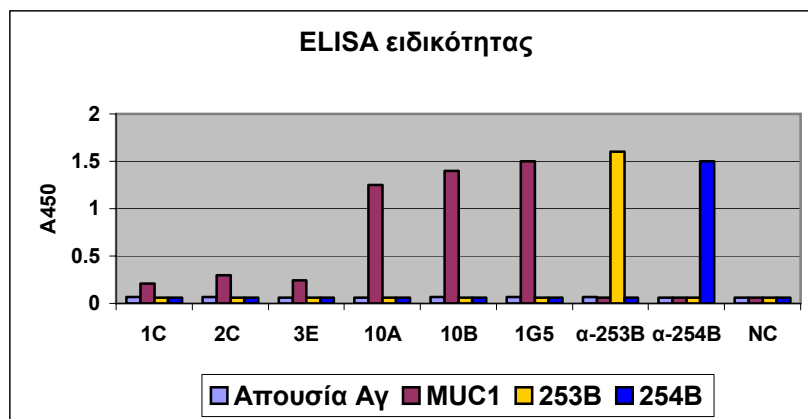
Εικόνα 3.2.6 Οι απορροφήσεις των αντι-MUC1 scFvs όπου NC είναι ο αρνητικός μάρτυρας (θρεπτικό υλικό).

Κατηγορία 1	1C,1E
Κατηγορία 2	2C
Κατηγορία 3	2F, 8F, 9A, 9G, 10A
Κατηγορία 4	3E, 9F
Κατηγορία 5	10B

Πίνακας 3.2.3 Οι πέντε κατηγορίες των αντι-MUC1 scFv αντισωμάτων

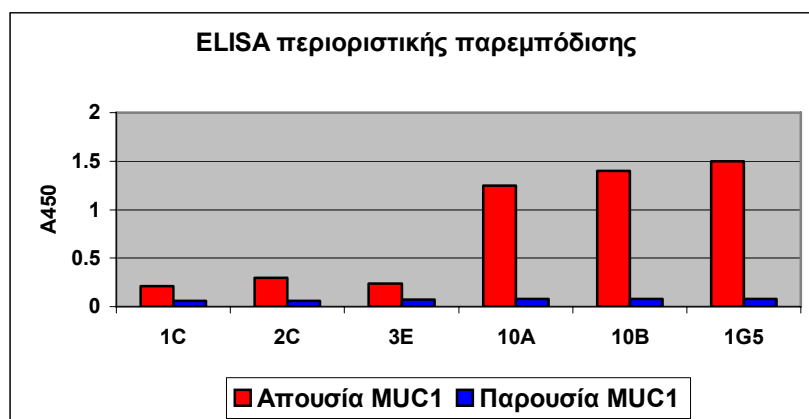
### 3.2.4 Ανάλυση των αντισωμάτων με ELISA ειδικότητας και με ELISA ανταγωνιστικής παρεμπόδισης

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε υπερκείμενο καλλιέργειών όπου είχε εκφραστεί διαλυτό αντίσωμα. Η ανάλυση έδειξε ότι τα αντι-MUC1 scFv αντισώματα ήταν ειδικά μόνο για το 100μερές MUC1 αντιγόνο (Εικόνα 3.2.7). Σαν αντιγόνα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν: το 253B και το 254B, ενώ σαν αντισώματα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν το αντι-MUC1 τρωκτικό μονοκλωνικό αντίσωμα 1G5, το αντι-253B τρωκτικό μονοκλωνικό αντίσωμα και το αντι-254B τρωκτικό μονοκλωνικό αντίσωμα. Τα αντισώματα 10A και 10B παρουσίασαν την μεγαλύτερη τιμή απορρόφησης A450.



Εικόνα 3.2.7 Ειδικότητα των αντι-MUC1 scFvs. Αντιγόνα Μάρτυρες: 253B, 254B Αντισώματα Μάρτυρες: 1G5, α-253B, α-254B

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε μια ELISA περιοριστικής παρεμπόδισης (Εικόνα 3.2.8). Σε πλάκα 96- πηγαδιών στρώθηκε το 100μερές MUC1 και επιχειρήθηκε η παρεμπόδιση της σύνδεσης των διαλυτών αντισωμάτων παρουσία του 60μερούς MUC1 σε συγκέντρωση 100μg/ml. Η σύνδεση των διαλυτών αντισωμάτων παρεμποδίστηκε με επιτυχία γεγονός που αποδεικνύει την ειδικότητα τους προς το συγκεκριμένο αντιγόνο.



Εικόνα 3.2.8 ELISA περιοριστικής παρεμπόδισης. Αντίσωμα Μάρτυρας: 1G5

Τα αντισώματα 10A και 10B που παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές απορρόφησης εξετάστηκαν περαιτέρω σε δεύτερη ELISA ειδικότητας, όπου εκτός από το 100μερές MUC1, ελέγχθηκαν τα αντιγόνα MUC2 (2 VNTR), MUC3 (2 VNTR) και MUC4 (1 VNTR). Τα αντισώματα δεν παρουσίασαν ειδικότητα πρόσδεσης στα αντιγόνα αυτά.

### 3.2.5 Αλληλούχιση των γονιδίων των αντι-MUC1 αντισωμάτων

Οι ακολουθίες των γονιδίων των μεταβλητών περιοχών καθώς και η στοίχιση τους με τον πιο συγγενικό γονίδιο της βλαστικής σειράς παρουσιάζονται στο Παράρτημα Γ. Τα αποτελέσματα αυτά ομαδοποιήθηκαν, ώστε να γίνει η συγκριτική μελέτη τους (Πίνακας 3.2.4)

Αντίσωμα	Αλυσίδα	Οικογένεια	Βλαστικό γονίδιο
<b>1C</b>	VH	VH1 (JH3)	DP75
	VL	VL1 (JL1)	DPL5/DPL2
<b>2C</b>	VH	VH4 (JH6)	DP63
	Vκ	Vκ1 (Jκ4)	L12a
<b>3E</b>	VH	VH3 (JH4)	COS-3
	VL	VL1 (JL1)	DPL5
<b>10A</b>	VH	VH1 (JH3)	DP75
	VL	VL1 (JL1)	DPL5/DPL2
<b>10B</b>	VH	VH1 (JH6)	DP75
	VL	VL2 (JL1)	DPL11

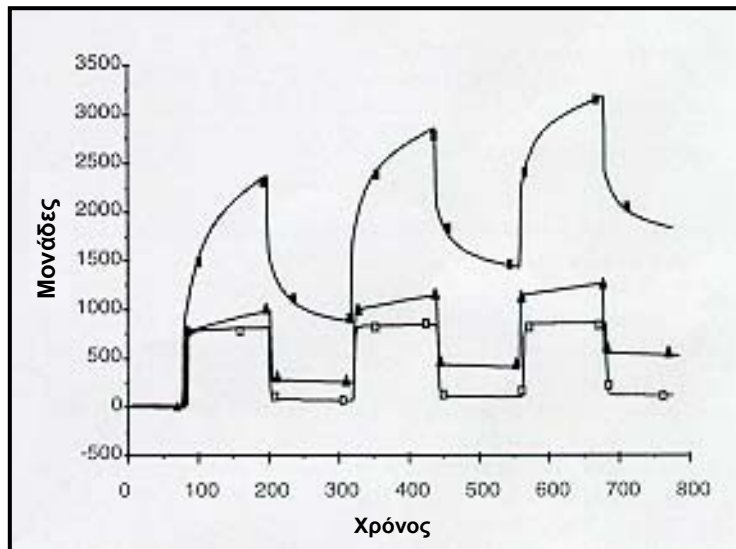
Πίνακας 3.2.4 Η προέλευση των βαριών και ελαφριών αλυσίδων των αντι-MUC1 scFvs.

Όπως είναι φανερό από τις αλληλουχίες το 1C και το 10A είναι στην ουσία το ίδιο αντίσωμα με ελάχιστες διαφορές. Οι διαφορές αυτές προκαλούν αμινοξικές αλλαγές σε δύο σημεία (Παράρτημα Γ, Ζ). Το πρώτο σημείο εντοπίζεται στο αμινοξύ 6 της βαριάς αλυσίδας το οποίο είναι η γλουταμίνη (Q) στο 10A, ενώ στο 1C το αμινοξύ αυτό έχει αντικατασταθεί από το γλουταμινικό οξύ (E). Η αλλαγή αυτή, η οποία οφείλεται στον εκκινητή, πιθανότατα δεν παίζει ρόλο στην ειδικότητα και στην ανοσοσυγγένεια του αντισώματος, αφού εντοπίζεται στην πρώτη περιοχή πλαίσιο [FR1]. Προκαλεί ωστόσο τη δημιουργία μιας επιπλέον θέσης αναγνώρισης από το ένζυμο BstNI στο 1C αντίσωμα, με αποτέλεσμα το διαφορετικό πρότυπο ζωνών στο γενετικό αποτύπωμα των δύο αντισωμάτων (Εικόνα 3.2.5). Το δεύτερο σημείο εντοπίζεται στην συνδετικό κομμάτι (linker). Συγκεκριμένα η δεύτερη σερίνη (S) που φυσιολογικά υπάρχει στο συνδετικό κομμάτι του 10A, έχει αντικατασταθεί από μια θρεονίνη (T). Το 1C αντίσωμα παράγεται μόνο σε μονομερή μορφή όπως έδειξε η ανάλυση καθαρισμένου δείγματος με χρωματογραφία φιλτραρίσματος πηκτής (gel filtration) σε κολώνα υψηλής πίεσης (Superdex) (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Αντίθετα το 10A, όπως και τα περισσότερα scFvs παράγονται τόσο ως μονομερή όσο και ως διμερή. Η διαφορά αυτή πιθανότατα οφείλεται στην αμινοξική αλλαγή στο συνδετικό κομμάτι, το οποίο προωθεί αποκλειστικά την αλληλεπίδραση της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας του ίδιου μορίου scFv στο αντίσωμα 1C, με αποτέλεσμα τις χαμηλές απορροφήσεις στην ανοσοενζυμική μέθοδο σε σύγκριση με το αντίσωμα 10A. Οι χαμηλές απορροφήσεις του 1C μπορεί να οφείλονται επίσης σε τροποποίηση της θέσης σύνδεσης του αντιγόνου λόγω της αμινοξικής αλλαγής στο συνδετικό κομμάτι.

Η ελαφριά αλυσίδα του 10A (και του 1C) είναι αποτέλεσμα ανασυνδυασμού του βλαστικού γονιδίου DPL5 (αμινοξέα 1-53) με το βλαστικό γονίδιο DPL2 (αμινοξέα 54-95b). Τα [VH] γονίδια των αντισωμάτων 10A (1C) και 10B έχουν προκύψει από βλαστικό γονίδιο, το DP75, αλλά παρουσιάζουν διαφορετικό αριθμό και διαφορετική θέση μεταλλάξεων από αυτό. Επίσης το [VL] γονίδιο του αντισώματος 3E έχει προκύψει από το ίδιο βλαστικό γονίδιο DPL5, όπως και τα πρώτα 53 κωδικόνια του [VL] γονιδίου του αντισώματος 10A (1C). Τα υπόλοιπα γονίδια ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες (Πίνακας 3.2.4). Αξίζει να σημειωθεί ότι με εξαίρεση την κ ελαφριά αλυσίδα του αντισώματος 2C, όλα τα υπόλοιπα αντισώματα διαθέτουν λ ελαφριές αλυσίδες.

### **3.2.6 Ανάλυση της ειδικότητας μέσω του ανιχνευτή BIAcore**

Η ειδικότητα των αντισωμάτων επιβεβαιώθηκε μέσω του ανιχνευτή μοριακών αλληλεπιδράσεων BIAcore. Για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση αυτή έγινε ενεργοποίηση της έκφρασης διαλυτών αντισωμάτων από τους scFv κλώνους και απομονώθηκαν τα περιπλάσματα τους. Από τα παραπάνω δείγματα περιπλάσματος απομονώθηκαν τα διαλυτά αντισώματα με χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου (TALON και Ni-NTA Metal Affinity Chromatography) και αναλύθηκαν με χρωματογραφία φιλτραρίσματος πηκτής (gel filtration) σε κολώνα υψηλής πίεσης (Superdex). Η τελευταία ανάλυση επέτρεψε τον διαχωρισμό των scFv αντισωμάτων που βρίσκονται σε μονομερή μορφή από εκείνα που βρίσκονται σε διμερή μορφή, ώστε να μην εμφανιστεί το πρόβλημα του σθένους (avidity) με αποτέλεσμα την αλλοίωση των αποτελεσμάτων. Το βιοτινιλιόμοιο 100μερές MUC1 ακινητοποιήθηκε στον αισθητήρα του BIAcore μέσω σύνδεσης με τη στρεπταβιδίνη,



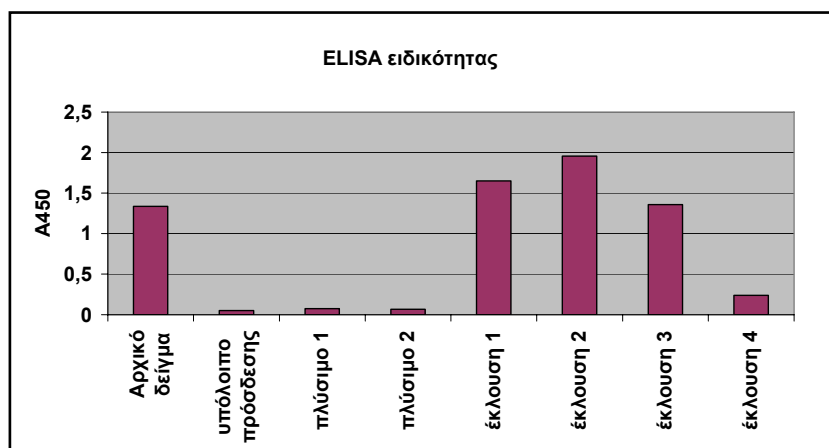
Εικόνα 3.2.9 Σύνδεση στο BIAcore: □: σύνδεση του 10A και του 10B σε άδεια επιφάνεια, ■: η κινητική σύνδεσης του 10A, ▲: η κινητική σύνδεσης του 10B.

η οποία είχε προηγουμένως ακινητοποιηθεί. Η στρεπταβιδίνη χρησιμοποιήθηκε γιατί η απευθείας ακινητοποίηση του αντιγόνου δεν ήταν ικανοποιητική.

Αρχικά έγινε η ανάλυση του συνόλου των αντισωμάτων, τα αποτελέσματα της οποίας συμφώνησαν με τις παρατηρήσεις από την ανοσοενζυμική μέθοδο. Οι περαιτέρω αναλύσεις επικεντρώθηκαν στα αντισώματα 10A και 10B που παρουσίασαν τις μεγαλύτερες απορροφήσεις. Επαναλήφθηκε η ανάλυση της ειδικότητας τους μέσω του ανιχνευτή BIACORE (Εικόνα 3.2.9). Τα καθαρισμένα αντισώματα παρουσίασαν ειδικότητα ως προς το ακινητοποιημένο αντιγόνο, ωστόσο η ταχύτητα αποσύνδεσης (off rate) κυμάνθηκε στα  $10^{-1}$ - $10^{-2}$  δευτερόλεπτα.

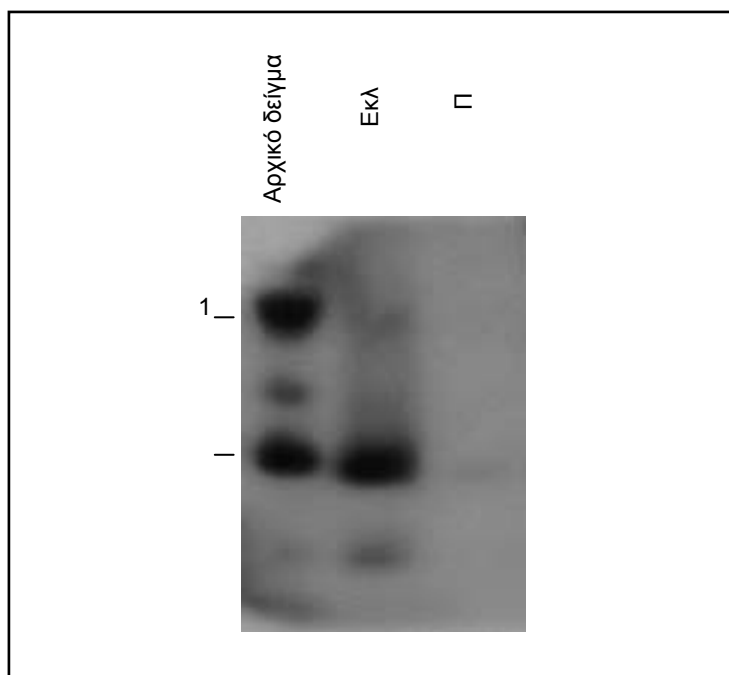
Παράλληλα μελετήθηκε η απόδοση καθαρισμού με την ανοσοενζυμική μέθοδο όπου μετρήθηκε η απορρόφηση των διαφόρων κλασμάτων κατά τη διάρκεια της απομόνωσης του διαλυτού αντισώματος 10A από υπερκείμενο καλλιέργειας με την χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.2.10 η απόδοση είναι αρκετά ικανοποιητική αφού το σύνολο του αντισώματος εντοπίζεται στα διάφορα κλάσματα της έκλουσης και κυρίως στο πρώτο και δεύτερο κλάσμα. Η υψηλότερη απορρόφηση σε σχέση με το αρχικό δείγμα οφείλεται στη συμπύκνωση του αντισώματος που επιτυγχάνθηκε εξαιτίας της πρόσδεσης του στην ρητίνη της χρωματογραφίας και της έκλουσης του σε μικρότερο όγκο διαλύματος.

Επίσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Western χρησιμοποιώντας ανάλογο πρωτόκολλο ανίχνευσης του ακινητοποιημένου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αντισώματος (Εικόνα 3.2.11). Τα πρωτεϊνικά δείγματα αρχικά ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE (12%) και στη συνέχεια οι αναλυμένες πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Ακολούθησε η ανίχνευση του scFv αντισώματος με το αντίσωμα 9E10. Οι δύο κύριες ζώνες που εμφανίστηκαν στο αρχικό δείγμα αντιστοιχούν στο αντίσωμα 10A (28KD) και στην υβριδική πρωτεΐνη 10A-pIII (70KD). Στο κλάσμα της έκλουσης εμφανίστηκε κυρίως η ζώνη του



Εικόνα 3.2.10 Η απορρόφηση σε ELISA ειδικότητας των διαδοχικών σταδίων καθαρισμού του αντισώματος 10A με χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου Ni-NTA. Τα κλάσματα των 4 εκλούσεων περιέχουν το σύνολο του αντισώματος και αποτελούν το 1/8 του όγκου του αρχικού δείγματος.

10A, αφού η παρουσία της pIII στην υβριδική πρωτεΐνη παρεμποδίζει την απομόνωση της μέσω της ιστοιδινικής ουράς. Στο κλάσμα του πλυσίματος παρατηρούμε ελάχιστες πρωτεϊνικές απώλειες. Οι υπόλοιπες ζώνες οφείλονται στην πρωτεολυτική δράση των ενζύμων της *E.coli*. Η δράση των πρωτεασών είναι πιο έντονη, καθώς αυξάνεται ο χρόνος της έκφρασης του αντισώματος στα βακτήρια.

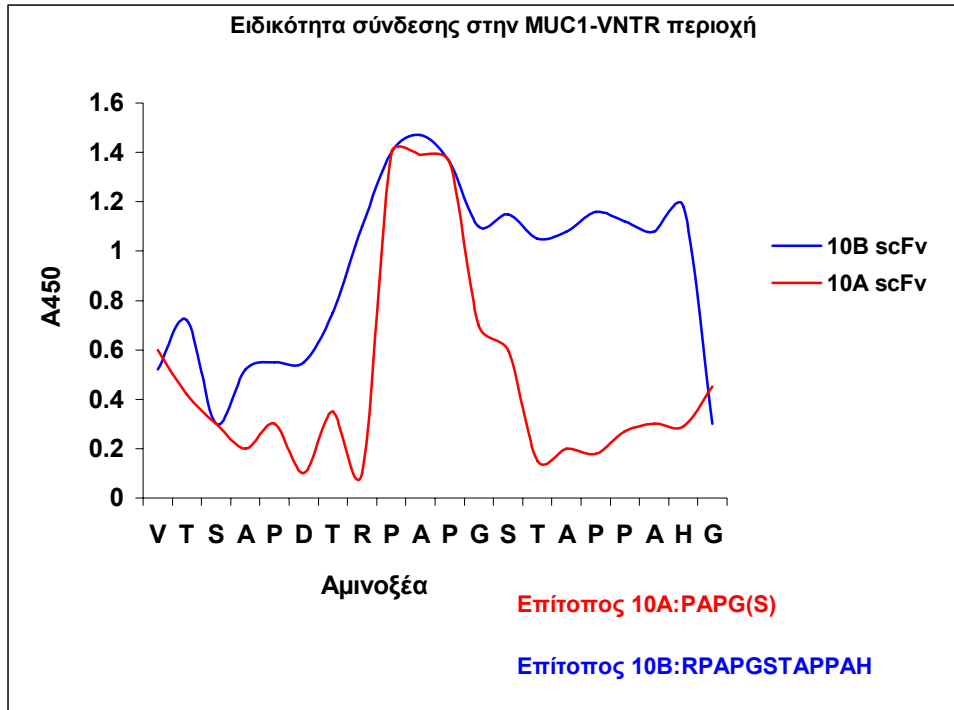


Εικόνα 3.2.11 Ανάλυση κατά Western των διαδοχικών κλασμάτων κατά τον καθαρισμό του αντισώματος 10A από την ρητίνη Ni-NTA.



### 3.2.7 Προσδιορισμός του αντιγονικού επιτόπου

Η λεπτή ειδικότητα των αντισωμάτων καθορίστηκε με τη διαδικασία της έμμεσης ταυτοποίησης επιτόπου (indirect epitope fingerprinting) που πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό νοσοκομείο του Maastricht. Συγκεκριμένα μετρήθηκε η σύνδεση του αντισώματος στο ακινητοποιημένο 100μερές MUC1 σε πλάκα 96 πηγαδιών, παρουσία περίσσειας διαφορετικού κάθε



Εικόνα 3.2.12 Η έμμεση ταυτοποίηση του αντιγονικού επιτόπου των αντισωμάτων 10A και 10B στη VNTR περιοχή της βλεννίνης MUC1.

φορά επικαλυπτόμενου 20μερούς πεπτιδίου. Χρησιμοποιήθηκαν 20 πεπτίδια: το πρώτο προέκυψε από τη VNTR περιοχή της βλεννίνης MUC1, το δεύτερο προέκυψε από την μετατόπιση του τελευταίου αμινοξέος του πρώτου πεπτιδίου στην αρχή του δεύτερου πεπτιδίου κ.ο.κ. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι κάθε αντίσωμα συνδέεται με διαφορετικό σημείο της VNTR περιοχής του αντιγόνου MUC1. Το 10A αντίσωμα συνδέεται στην ακολουθία PAPG(S), όπου η σερίνη (S) παίζει κάποιο ρόλο στη σύνδεση και το 10B αντίσωμα συνδέεται σε μια μεγαλύτερη ακολουθία: RPAPGSTAPPAAH (Εικόνα 3.2.12).

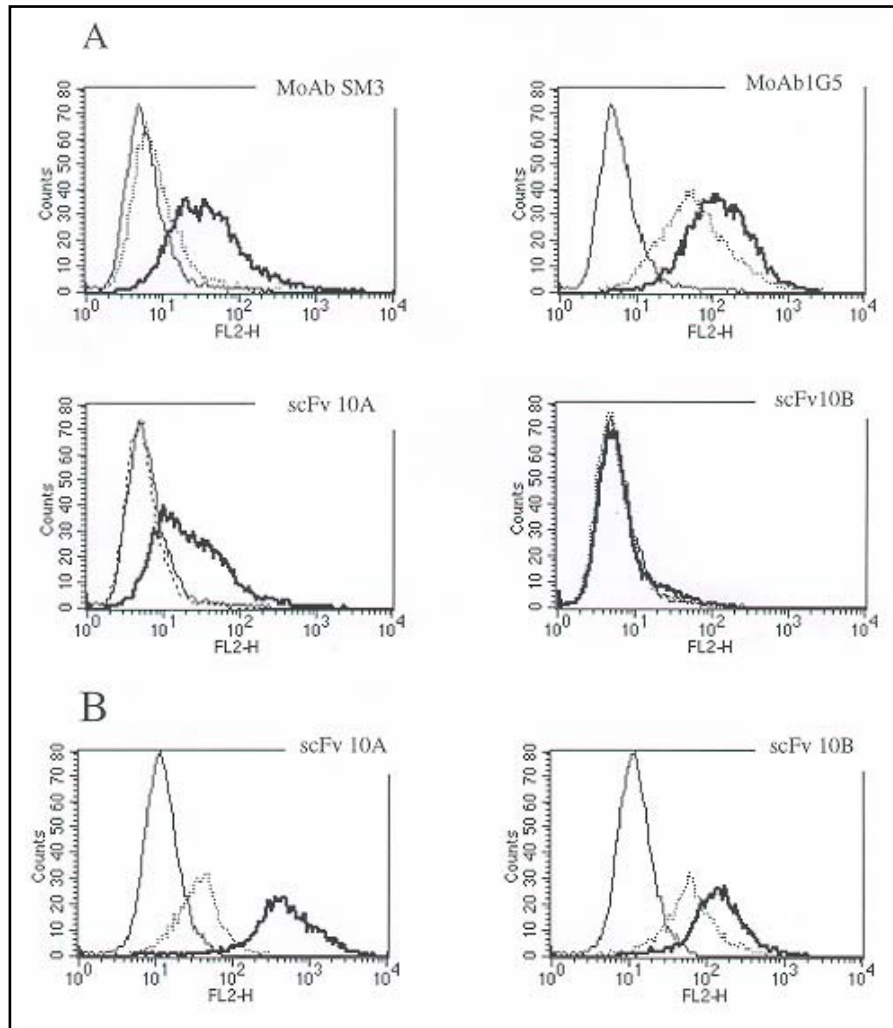
### 3.2.8 Η σύνδεση των αντισωμάτων σε κύτταρα και ιστούς.

Η ειδικότητα των αντισωμάτων 10A και 10B καθορίστηκε και με την φθορίζουσα κυτταρομετρία ροής (fluorescence activated cell sorting, FACS). Στη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές μαστού T47D και MCF-7 και η κυτταρική σειρά του παχέως εντέρου CaCO<sub>2</sub>. Σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα μονοκλωνικά αντισώματα SM3 και 1G5 (Burchell *et al.*, 1987-

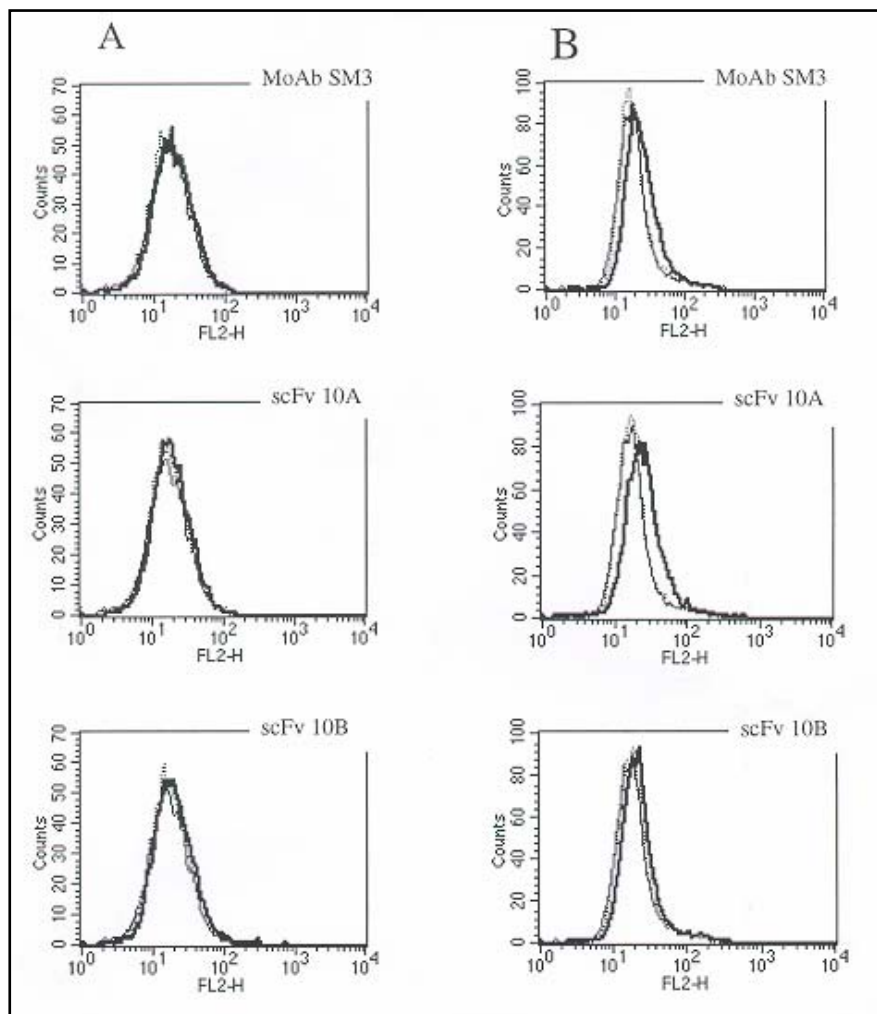
**Cao et al., 1998**) που αναγνωρίζουν τον πρωτεϊνικό πυρήνα της MUC1 βλεννίνης. Έγινε μέτρηση τόσο του μεμβρανικού, όσο και του κυτταροπλασματικού MUC1 στην κυτταρική σειρά T47D ενώ παράλληλα επιχειρήθηκε η ανταγωνιστική παρεμπόδιση του φθορίζοντος σήματος με το 100μερές MUC1. Οι κυτταρικές σειρές MCF-7 και CaCO<sub>2</sub> ελέγχθηκαν για την μεμβρανική σύνδεση.

Σ' ότι αφορά στο αντίσωμα 10A παρατηρήθηκε μεμβρανική καθώς και κυτταροπλασματική σύνδεση σε T47D κύτταρα (Εικόνα 3.2.13). Η μεμβρανική σύνδεση στα κύτταρα MCF-7 ήταν πιο χαμηλή, ενώ δεν παρατηρήθηκε σύνδεση του αντισώματος στην μεμβρανική βλεννίνη MUC1 των CaCO<sub>2</sub> κυττάρων (Εικόνα 3.2.14). Επίσης στις περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκε σύνδεση, επιτεύχθηκε η ανταγωνιστική της παρεμπόδιση με το 100μερές MUC1. Οι θετικοί μάρτυρες ακολούθησαν παρόμοια πρότυπα σύνδεσης και ανταγωνιστικής παρεμπόδισης. Αντίθετα το αντίσωμα 10B αναγνώρισε και συνδέθηκε μόνο με την κυτταροπλασματική βλεννίνη των T47D κυττάρων (Εικόνα 3.2.13).

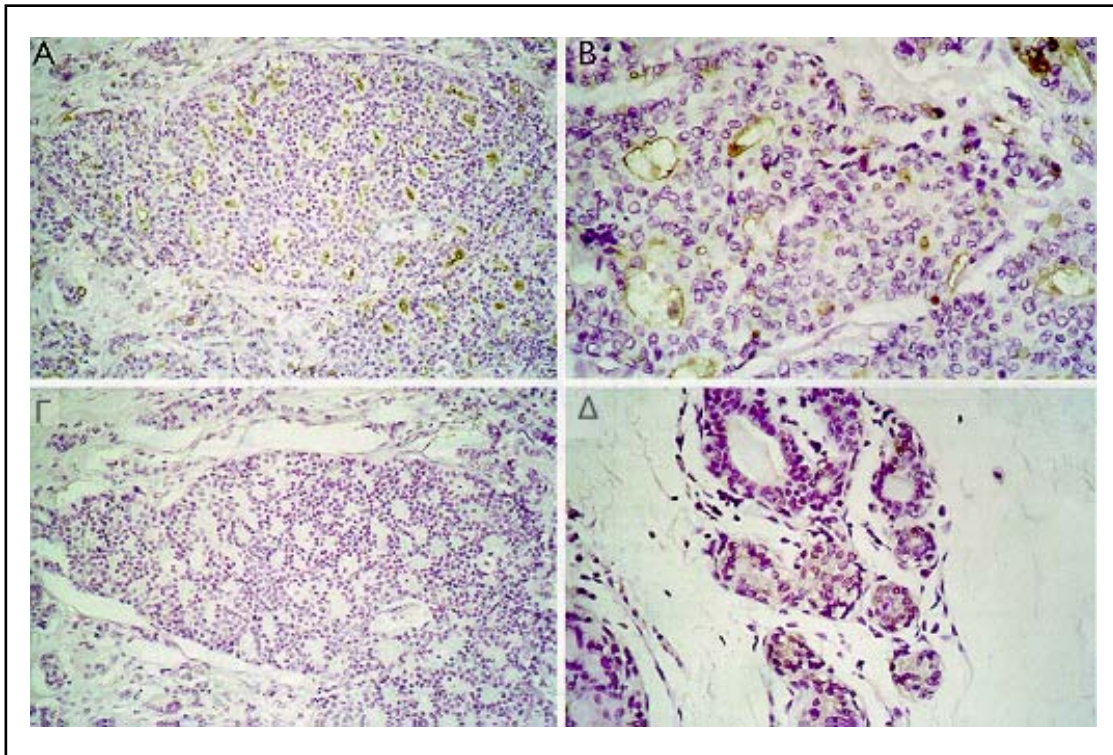
Παράλληλα έγινε ανοσοϊστοχημική χρώση διαφόρων φυσιολογικών και καρκινικών ιστών (Πίνακας 3.2.5 και Εικόνα 3.2.15). Παρατηρήθηκε μεμβρανική χρώση τόσο με το 10A όσο και με το 10B αντίσωμα σε αδenoκαρκινώματα μήτρας και μαστού, ενώ ανάλογη χρώση δεν εμφανίστηκε σε καρκινώματα του παχέως εντέρου και σε φυσιολογικούς ιστούς που επίσης εξετάστηκαν. Τα αντισώματα δεν παρουσίασαν πάντα σύνδεση με το κυτταροπλασματικό MUC1 στους φυσιολογικούς ιστούς και η ένταση της χρώσης ήταν μικρότερη σε σύγκριση με εκείνη των καρκινικών ιστών. Γενικά το αντίσωμα 10B παρουσίασε μικρότερη ένταση χρώσης από το 10A αντίσωμα.



Εικόνα 3.2.13 Η σύνδεση των αντισωμάτων 10A και 10B καθώς και των μονοκλωνικών αντισωμάτων SM3 και 1G5 (θετικοί μάρτυρες) στα T47D κύτταρα σε κυταρομετρία ροής. Α) μεμβρανική χρώση, Β) κυταροπλασματική χρώση. Λεπτή γραμμή: αρνητικός μάρτυρας. Παχιά γραμμή: η σύνδεση των αντι-MUC1 αντισωμάτων. Στικτή γραμμή: η ανταγωνιστική παρεμπόδιση της σύνδεσης με το 100μερές MUC1.



Εικόνα 3.2.14 Η σύνδεση των αντισωμάτων 10A και 10B καθώς και του μονοκλωνικού αντισώματος SM3 (θετικός μάρτυρας) στα  $\text{CaCO}_2$  κύτταρα (A) και στα MCF-7 κύτταρα (B) σε κυτταρομετρία ροής. Λεπτή γραμμή: αρνητικός μάρτυρας. Παχιά γραμμή: η σύνδεση των αντι-MUC1 αντισωμάτων. Στικτή γραμμή: η ανταγωνιστική παρεμπόδιση της σύνδεσης με το 100μερές MUC1.



Εικόνα 3.2.15 Ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα 10A (Α,Β,Δ) και το αντίσωμα 10B (Γ). Α-Γ: αδenoκαρκίωμα μαστού. Δ: φυσιολογικός επιθηλιακός ιστός μαστού. Παρατηρείται ειδική μεμβρανική και κυτταροπλασματική χρώση στο καρκίνωμα του μαστού (Α, Β) και ασθενής κυτταροπλασματική χρώση στον φυσιολογικό ιστό (Δ).

Τύπος ιστού	Προέλευση ιστού	10A	10B
Φυσιολογικός ιστός	Πνεύμονας	--	--
	Μαστός 1	--	--
	Μαστός 2	Κ	Κ
	Παχύ έντερο	κ	--
Καρκινικός ιστός (αδenoκαρκίνωμα)	Μαστός 1	μ+Κ	μ+Κ
	Μαστός 2	μ+Κ	μ+Κ
	Μαστός 3	μ+Κ	--
	Μήτρα	μ+Κ	μ+Κ
	Παχύ έντερο	Κ	--
Καρκινικός ιστός (Μη αδenoκαρκίνωμα)	Πνεύμονας	--	--

Πίνακας 3.2.5 Ανοσοϊστοχημική χρώση ιστών. --: αρνητικό. Κ: έντονη κυτταροπλασματική. κ: ασθενής κυτταροπλασματική. μ: ασθενής μεμβρανική.

## Συζήτηση

Ένα βασικό αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός μιας σειράς αντι-MUC1 scFv αντισωμάτων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο βιβλιοθήκες παρουσίασης ανθρώπινων αντισωμάτων σε φάγους. Η πρώτη βιβλιοθήκη που ονομάστηκε Vaughan προήλθε από τα B λεμφοκύτταρα φυσιολογικών ανθρώπων (παρθενική βιβλιοθήκη) (Vaughan *et al.*, 1996). Η βιβλιοθήκη περιελάμβανε  $6 \times 10^9$  διαφορετικούς βακτηριακούς κλώνους, οι οποίοι μπορούσαν να εκφράσουν ανθρώπινα αντισώματα με τη μορφή των scFv μορίων. Η δεύτερη βιβλιοθήκη που ονομάστηκε LN-BC-OVC προήλθε από B λεμφοκύτταρα γυναικών που έπασχαν από καρκίνο του μαστού και της μήτρας (ανοσοποιημένη βιβλιοθήκη). Περιελάμβανε  $3 \times 10^8$  διαφορετικούς βακτηριακούς κλώνους, οι οποίοι μπορούσαν να εκφράσουν αντισώματα με τη μορφή των Fab μορίων.

Προσπάθεια έγινε να απομονωθούν ειδικά αντισώματα από τις παραπάνω βιβλιοθήκες ενάντια σε συνθετικό πεπτιδίο της MUC1 βλεννίνη. Η βλεννίνη αυτή αποτελείται κυρίως από μία ακολουθία 20 αμινοξέων που επαναλαμβάνεται στη σειρά 30-90 φορές, ώστε να σχηματίζεται ένας μεταβλητός αριθμός σειριακών επαναλήψεων (VNTR). Οι επαναλήψεις αυτές είναι πλούσιες σε σερίνες και θρεονίνες που σχηματίζουν O-θέσεις γλυκοσυλίωσης σε όλη την επιφάνεια της πρωτεΐνης. Η βλεννίνη καλύπτεται κυριολεκτικά από τους O-συνδεδεμένους ολιγοσακχαρίτες. Το αντιγόνο αυτό επιλέχθηκε λόγω της χαρακτηριστικής συμπεριφοράς που παρουσιάζει στα καρκινικά κύτταρα. Σ' αυτά οι διαφορές στην έκφραση της MUC1 βλεννίνης είναι υπεύθυνες για τον χαρακτηρισμό της ως καρκινικό αντιγόνο (Finn *et al.*, 1998). Συγκεκριμένα παρατηρείται σημαντική αύξηση της ποσότητας της βλεννίνης που εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα. Η κατανομή της δεν περιορίζεται αποκλειστικά στην κορυφαία περιοχή των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων στους αδένες και στους αγωγούς του σώματος, αλλά εντοπίζεται σε όλη την επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 1.5.1). Μια άλλη εξίσου σημαντική αλλαγή αφορά τη γλυκοσυλίωση της πρωτεΐνης. Στα φυσιολογικά κύτταρα το κύριο σώμα της πρωτεΐνης καλύπτεται από O-συνδεδεμένους ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι στα καρκινικά κύτταρα εμφανίζονται κοντύτεροι και λιγότεροι στον αριθμό, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανοσογονικών πεπτιδικών ακολουθιών σε κάθε VNTR περιοχή. Έχει διαπιστωθεί ότι οι αλλαγές στην έκφραση της MUC1 βλεννίνης παρουσιάζονται στο μεγαλύτερο ποσοστό των καρκίνων όπως στους καρκίνους του μαστού, της μήτρας, του παχέως εντέρου κλπ. Πολλά μονοκλωνικά αντισώματα έχουν παραχθεί ενάντια στην VNTR περιοχή της MUC1 βλεννίνης (Price *et al.*, 1998). Αρκετά έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες χωρίς να τροποποιηθούν ενώ άλλα έχουν ανθρωποποιηηθεί, ώστε να περιοριστούν οι HAMA απαντήσεις. Ωστόσο τα πρώτα εξολοκλήρου ανθρώπινα scFv αντισώματα που συνδέονται με την VNTR περιοχή της MUC1 βλεννίνης απομονώθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Τα αντισώματα αυτά αναγνωρίζουν την MUC1 βλεννίνη σε κυτταρικές σειρές και συνδέονται με τον πρωτεϊνικό πυρήνα της μεμβρανικής βλεννίνης σε καρκινικούς ιστούς αλλά όχι σε φυσιολογικούς ιστούς του μαστού της μήτρας και του παχέως εντέρου.

Για την επιλογή των αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκε βιοτινιλιωμένο συνθετικό 100μερές MUC1 αντιγόνο που αποτελούνταν από 5 επαναλήψεις της VNTR περιοχής. Το συνθετικό αυτό αντιγόνο

παρουσίαζε ένα σημαντικό πλεονέκτημα: ήταν καθαρό με αποτέλεσμα την αποφυγή της απομόνωσης μη ειδικών κλώνων όπως συμβαίνει όταν χρησιμοποιούνται αντιγόνα στην επιφάνεια κυττάρων ή μη καθαρισμένα διαλυτά αντιγόνα. Η σύνθεση του ήταν μια αρκετά επίπονη διαδικασία (**Krambovitis et al., 1998**). Οι 5 επαναλήψεις που το συνιστούν, συνέβαλαν στη μίμηση της φυσική διαμόρφωσης του μη-γλυκοσυλιωμένου μορίου. Η απομόνωση των ειδικών κλώνων έγινε με τη βοήθεια μαγνητικών σφαιριδίων που ήταν καλυμμένα με στρεπταβιδίνη. Προηγουμένως είχε γίνει προσπάθεια από την επιστημονική ομάδα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Maastricht να απομονωθούν ειδικά αντισώματα με δύο άλλες επιλεκτικές μεθόδους. Στην μια περίπτωση το 100μερές ακινητοποιήθηκε σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες, ενώ στην άλλη έγινε ένας συνδυασμός επιλογής με ακινητοποιημένο 100μερές στους ειδικούς σωλήνες για δύο διαδοχικούς κύκλους και επιλογής σε κύτταρα για ένα τελευταίο τρίτο κύκλο. Μόνο στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το βιοτινιομένο συνθετικό αντιγόνο, απομονώθηκαν ειδικά αντί MUC1 αντισώματα που παρουσίαζαν δυνατότητα σύνδεσης με το αντιγόνο στην κυτταρομετρία ροής (FACS) και στην ανοσοϊστοχημεία. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η ακινητοποίηση του αντιγόνου στην επιφάνεια των πλαστικών σωλήνων είχε σαν αποτέλεσμα την κάλυψη ή την διαταραχή της τρισδιάστατης διαμόρφωσης των αντιγονικών επιτόπων του μορίου. Σ'ότι αφορά στην επιλογή με τη χρήση καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν στην επιφάνεια τους το αντιγόνο είναι πιθανό η περιορισμένη γλυκοσυλίωση να προκαλεί προβλήματα στερεοχημικής παρεμπόδισης με αποτέλεσμα την αδυναμία να επιλεχθούν ειδικοί φάγοι. Αντίθετα η χρήση του βιοτινιομένου αντιγόνου επιτρέπει την επιλογή υπό διαλυτές συνθήκες, όπου δεν υφίστανται ανάλογα προβλήματα στερεοχημικής παρεμπόδισης και απόκρυψης των αντιγονικών επιτόπων.

Τα αντισώματα που απομονώθηκαν προέρχονται αποκλειστικά από την παρθενική βιβλιοθήκη. Η αδυναμία επιλογής ειδικών αντισωμάτων από την ανοσοποιημένη βιβλιοθήκη μπορεί να οφείλεται κυρίως: στο μικρότερο μέγεθος της βιβλιοθήκης αυτής, στη μορφή των ανασυνδυασμένων αντισωμάτων (Fab μόρια), στη φύση του υπό μελέτη αντιγόνου και στο ότι τα Β λεμφοκύτταρα προήλθαν από ασθενείς που έπασχαν από καρκίνο. Όπως είναι γνωστό το μέγεθος της βιβλιοθήκης παίζει καθοριστικό ρόλο στην απομόνωση ειδικών αντισωμάτων υψηλής συγγένειας. Συνήθως τα αντισώματα που απομονώνονται από μικρές βιβλιοθήκες της τάξης των  $10^7$  κλώνων παρουσιάζουν ανοσοσυγγένεια περίπου  $10^6 M^{-1}$  (**Marks et al., 1991, a**), ενώ εκείνα που απομονώνονται από μεγαλύτερες βιβλιοθήκες της τάξης των  $10^{10}$  κλώνων παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης όπως  $10^8-10^{10} M^{-1}$  (**Vaughan et al., 1996**). Ωστόσο οι ανοσοποιημένες βιβλιοθήκες είναι συνήθως εμπλουτισμένες ως προς τα ειδικά αντισώματα με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του απαιτούμενου μεγέθους τους. Το γεγονός λοιπόν ότι δεν επιλέχθηκαν ειδικά αντισώματα αντικατοπτρίζει είτε την απουσία τους, είτε τη χαμηλή συγγένεια τους που είχε σαν αποτέλεσμα να χαθούν κατά τη διάρκεια των επιλογών. Από την άλλη πλευρά τα αντισώματα με τη μορφή Fab εκφράζονται από τα βακτηριακά κύτταρα με χαμηλότερες αποδόσεις σε σχέση με τα scFv μόρια και ταυτόχρονα περιέχουν μία θέση σύνδεσης με το αντιγόνο με αποτέλεσμα τη δύσκολη επιλογή των ειδικών μορίων ειδικά εφόσον παρουσιάζουν χαμηλή συγγένεια πρόσδεσης με το αντιγόνο. Στην προκειμένη περίπτωση πρέπει να γίνει επίσης κατανοητό ότι η βλεννίνη MUC1 είναι ουσιαστικά ένα αυτοαντιγόνο. Τα αντι-MUC1 αντισώματα που παράγονται φυσιολογικά από τον οργανισμό είναι

αυτοαντισώματα, τα οποία παρουσιάζουν χαμηλή συγγένεια πρόσδεσης (**Cohen et al., 1986**). Η χαμηλή συγγένεια των αντισωμάτων αυτών είναι αποτέλεσμα της απουσίας ειδικών Τ βοηθητικών κυττάρων, η δράση των οποίων είναι απαραίτητη για την ωρίμανση της συγγένειας των αντισωμάτων στα βλαστικά κέντρα (επαγωγή σωματικών μεταλλαγών). Έχει αναφερθεί ότι τα αντι-MUC1 αντισώματα που εντοπίζονται στον ορό φυσιολογικών ατόμων και καρκινοπαθών ανήκουν κυρίως στον ισότυπο IgM (**Kotera et al., 1994**). Ωστόσο εκτός από τα IgM έχουν εντοπιστεί και IgG αντι-MUC1 αντισώματα (**von Mensdorff-Pouilly et al., 2000 b**). Σ' αυτή την περίπτωση η αλλαγή ισότυπου είναι αποτέλεσμα μιας ανοσολογικής απάντησης ανεξάρτητης από τη βοηθητική δράση των Τ λεμφοκυττάρων. Ο τίτλος των αντισωμάτων δεν εμφανίζει διαφορές στατιστικά σημαντικές μεταξύ των φυσιολογικών ατόμων και των καρκινοπαθών, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι τα αντι-MUC1 αντισώματα είναι πολυειδικά (**Krambovitis et al., υπό κατασκευή**), γεγονός που συμφωνεί με την χαρακτηριστική συμπεριφορά των φυσιολογικών αυτοαντισωμάτων (**Avrameas, 1991**). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένοι ασθενείς που παρουσιάζουν υψηλούς τίτλους αντι-MUC1 αντισωμάτων, έχουν καλύτερη πρόγνωση ως προς την εξέλιξη της ασθένειας (**von Mensdorff-Pouilly et al., 2000 α**). Στο παρελθόν έχει αναφερθεί ότι οι καρκινοπαθείς που εκφράζουν διαφοροποιημένη την MUC1 βλεννίνη στην επιφάνεια των κυττάρων τους έχουν Τ λεμφοκύτταρα (CD8) που μπορούν να επεκταθούν *in vitro*, αναγνωρίζουν έναν επίτοπο στην VNTR περιοχή και παρουσιάζουν κυτταροτοξικότητα ενάντια στους καρκίνους (**Jerome et al., 1991-Barnd et al., 1989**). Ανάλογα υπάρχουν Β λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν την VNTR περιοχή. Ωστόσο φαίνεται ότι η απάντηση των Τ βοηθητικών κυττάρων δεν αφορά την κατεργασμένη μορφή της βλεννίνης που παρουσιάζεται στην επιφάνεια των κυττάρων και έτσι πιθανότατα παρεμποδίζεται η ανάπτυξη καταστάσεων αυτοανοσίας. Μ' αυτό το τρόπο περιορίζεται η πιθανότητα της αλληλεπίδρασης των ειδικών Τ και Β λεμφοκυττάρων, της επαγόμενης αλλαγής ισότυπου και των σωματικών μεταλλαγών στα αντι-MUC1 αντισώματα (**Croft et al., 1992**). Με τη χρήση εμβολίων που περιλαμβάνουν την MUC1 βλεννίνη συνδεδεμένη με ένα Τ επίτοπο είναι δυνατή η επαγωγή αποτελεσματικής βοήθειας από τα Τ λεμφοκύτταρα (**von Mensdorff-Pouilly et al., 2000 α-Karanikas et al., 1997**). Πάντως δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής ικανοποιητική αντικαρκινική δράση σαν αποτέλεσμα της χορήγησης των εμβολίων αυτών. Είναι επίσης σημαντικό να γίνει κατανοητό ότι κάθε περίπτωση ασθενή είναι μοναδική και δεν μπορούν να γίνουν γενικεύσεις σ' ότι αφορά την παρουσία των αντι-MUC1 αντισωμάτων.

Η περιοχή που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανοσογονικότητα στα ποντίκια κατά μήκος του VNTR πεπτιδίου είναι η υδρόφιλη ακολουθία PDTRPAP και κυρίως το τετραπεπτίδιο PDTR (**Apostolopoulos et al., 1994-Burchell et al., 1989**). Ανάλογα φαίνεται ότι η ανθρώπινη ανοσολογική απάντηση ενάντια στη MUC1 βλεννίνη σχετίζεται με τον επίτοπο PDTR (**Kotera et al., 1994**). Ωστόσο πρόσφατα έχουν περιγραφεί νέοι ανοσογονικοί επίτοποι μέσα στην ακολουθία PAPGSTAPPAN (**Petrarca et al., 1996-Karanikas et al., 1997**). Πάντως τα περισσότερα τρωκτικά αντί-MUC1 μονοκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν ολόκληρη ή τμήμα της περιοχής PDTRPAP (**Price et al., 1998**). Τον κανόνα αυτό ακολούθησε το αντίσωμα 3E που απομονώθηκε κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης. Όπως έδειξε η μέθοδος της έμμεσης ταυτοποίησης επιτόπου, το αντίσωμα αυτό συνδέεται με την ακολουθία PDTRPA της VNTR περιοχής. Αντίθετα τα δύο αντισώματα που αποτέλεσαν το



κυρίως αντικείμενο της παρούσας μελέτης αναγνωρίζουν μοναδικούς επιτόπους δίπλα στην PDTR περιοχή, οι οποίοι έχουν αναφερθεί σπάνια ως ανοσογονικοί στο παρελθόν. Συγκεκριμένα το 10A αναγνωρίζει τον επίτοπο PAPG(S) και το 10B αναγνωρίζει τον επίτοπο TRPAPGSTAPPAN. Το τρωκτικό αντίσωμα BCP9 συνδέεται μ' ένα παρόμοιο επίτοπο, τον PAPGSTAP (**Xing et al., 1992-Schol et al., 1998-Blockzjil et al., 1998**), ενώ πρόσφατη μελέτη όπου ελέγχθηκε ένας μεγάλος αριθμός ανθρώπινων φυσιολογικών ορών αναφέρει ότι η ακολουθία RPAPGS είναι ο επίτοπος που αναγνωρίζεται περισσότερο από τα φυσιολογικά αντί-MUC1 αντισώματα (**von Mensdorff-Pouilly et al., 2000 a**). Ο επίτοπος του αντισώματος BC9 περιλαμβάνει μια θρεονίνη (T) η οποία μπορεί να αποτελέσει πιθανή θέση γλυκοσιλίωσης με αποτέλεσμα το αντίσωμα να αντιδρά με την υπογλυκοσιλιωμένη μορφή της βλεννίνης και όχι με την γλυκοσιλιωμένη βλεννίνη των φυσιολογικών κυττάρων (**Ciborowski et al., 1998-Reis et al., 1998**). Από την άλλη πλευρά το αντίσωμα 10A αναγνωρίζει την αρχή του συγκεκριμένου επιτόπου ενώ η σερίνη συμμετέχει στη σύνδεση χωρίς όμως να παίζει καθοριστικό ρόλο, αφού δεν παρατηρείται ολοκληρωτική αναστολή της παρεμπόδισης κατά τη διαδικασία της έμμεσης ταυτοποίησης του επιτόπου. Επιπλέον η σύνδεση του αντισώματος 10A στον συγκεκριμένο επίτοπο φαίνεται να μην παρεμποδίζεται από την πιθανή γλυκοσιλίωση των σερινών (S) και θρεονινών (T), αφού το αντίσωμα παρουσιάζει δυνατότητα σύνδεσης σε μεγαλύτερο εύρος ιστών (π.χ. μεμβρανική χρώση σε αδενοκαρκινώματα), σε σύγκριση με το BCP9 αντίσωμα, το οποίο παρουσιάζει κυτταροπλασματική χρώση (**Cao et al., 1998**). Αξίζει να αναφερθεί ότι ένα βασικό χαρακτηριστικό των τρωκτικών αντί-MUC1 αντισωμάτων που προκύπτουν μετά από ανοσοποίηση με την MUC1 βλεννίνη, είναι η εμπλοκή της αργινίνης (R) στη σύνδεση με το αντίσωμα (**Price et al., 1998**). Αντίθετα το αμινοξύ αυτό δεν ενέχεται στη σύνδεση του αντιγόνου με το ανθρώπινο scFv αντίσωμα 10A. Ο επίτοπος του αντισώματος 10B περιλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της VNTR περιοχής. Συγκεκριμένα 14 από τα 20 αμινοξέα ενέχονται στη σύνδεση με το αντίσωμα. Αυτό σημαίνει πιθανότατα ότι τα 10B αναγνωρίζει έναν τρισδιάστατο επίτοπο διαμόρφωσης, ο οποίος υπάρχει στο 100μερές πεπτιδίο που σχηματίζεται από 5 επαναλήψεις της VNTR περιοχής, αλλά όχι στο 20μερές πεπτιδίο της μίας επανάληψης. Στη γλυκοσιλιωμένη μορφή της MUC1 βλεννίνης των φυσιολογικών επιθηλιακών ιστών ο επίτοπος αυτό μπορεί να αποκρύπτεται.

Η ανάλυση με το βιοανιχνευτή BIAcore έδειξε ότι τα αντισώματα 10A και 10B συνδέονται με υψηλή ειδικότητα στο 100μερές MUC1. Ωστόσο η ταχύτητα αποσύνδεσης τους – της τάξης του  $10^{-1} \text{ sec}^{-1}$  για το 10B και του  $10^{-2} \text{ sec}^{-1}$  για το 10A είναι σχετικά υψηλή για αντισώματα που έχουν επιλεγθεί από μια τόσο μεγάλη βιβλιοθήκη. Τα αντισώματα που είχαν απομονωθεί στο παρελθόν από την συγκεκριμένη βιβλιοθήκη παρουσίασαν ανοσοσυγγένειες της τάξεως των 10nM και ταχύτητες αποσύνδεσης της τάξεως των  $10^{-3}$ - $10^{-4} \text{ sec}^{-1}$  (**Vaughan et al., 1996**). Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο πρόβλημα της επιλογής αντισωμάτων χαμηλότερης ανοσοσυγγένειας που παρουσιάζονται σε περισσότερα του ενός αντίγραφα στην επιφάνεια των φάγων είτε λόγω της παρουσίας των 5 μορίων της πρωτεΐνης pIII στην κορυφή του ιοσωματίου, είτε λόγω της τάσης για διμερισμό που παρουσιάζουν τα scFv μόρια. Η επιλογή βιβλιοθηκών που εκφράζουν τα αντισώματα με τη μορφή των Fab μορίων, τα οποία δεν παρουσιάζουν τάση για διμερισμό, πιθανώς θα οδηγούσε στην απομόνωση αντισωμάτων υψηλότερης ανοσοσυγγένειας. Τα αντί-MUC1 αντισώματα που απομονώθηκαν πρόσφατα από μια τέτοια βιβλιοθήκη αναφέρεται ότι παρουσίασαν σχετικά

μικρότερες ταχύτητες αποσύνδεσης (**de Haard et al., 1999**). Τα στοιχεία ωστόσο δεν παρουσιάζονται στη μελέτη και οι διαφορές που αναφέρονται είναι μικρές. Έτσι η χαμηλή συγγένεια των αντί-MUC1 scFv αντισωμάτων θα πρέπει να συσχετιστεί με τη φύση του υπό μελέτη αντιγόνου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί πρόκειται ουσιαστικά για ένα αυτοαντιγόνο. Είναι γνωστό ότι τα αυτοαντισώματα που απομονώνονται από τον ορό φυσιολογικών ατόμων τείνουν να είναι χαμηλής ανοσοσυγγένειας και πολυειδικά (**Avrameas, 1991-Casali et al., 1989**). Αντίθετα τα αντί-MUC1 scFv αντισώματα παρουσιάζουν υψηλή ειδικότητα παρά το γεγονός ότι η συγγένεια τους είναι της τάξεως των 10 $\mu$ M. Η υψηλή ειδικότητα οφείλεται στον τυχαίο συνδυασμό των [VH] και [VL] γονιδίων των μεταβλητών περιοχών που επιτυγχάνεται κατά την κατασκευή των αντισωματικών βιβλιοθηκών. Η μεγάλη ταχύτητα αποσύνδεσης που έχει σαν αποτέλεσμα τη χαμηλή ανοσοσυγγένεια, πιθανότατα οφείλεται στη φύση αυτών των αντισωμάτων δηλαδή στο γεγονός ότι πρόκειται για αυτοαντισώματα (**Griffiths et al., 1993**).

Η αλληλούχιση της ακολουθίας των αντί-MUC1 scFvs έδειξε ότι τα αντισώματα 10A και 10B χρησιμοποιούν την ίδια [VH] βλαστική ακολουθία [VH1/DP75]. Το 10B που έχει χαμηλότερη ανοσοσυγγένεια, παρουσιάζει ελάχιστες διαφορές από την βλαστική ακολουθία: συνολικά τέσσερις μεταλλαγές, δύο από τις οποίες βρίσκονται στη [CDR2] περιοχή. Το υψηλότερης συγγένειας 10A αντίσωμα περιέχει δώδεκα μη σιωπηλές μεταλλαγές (nonsilent mutations) που απλώνονται σε όλο το μήκος του γονιδίου, τόσο στις [CDR] όσο και στις [FR] περιοχές. Τα δύο αντισώματα χρησιμοποιούν διαφορετικές [VL] βλαστικές ακολουθίες που ανήκουν στις  $\lambda$  ελαφριές αλυσίδες. Η ίδια [VH] ακολουθία από την [FR1] ως την [CDR2] περιοχή είχε βρεθεί σ' ένα άλλο αντί-MUC1 αντίσωμα, το  $\alpha$ MUC1-1 (**Griffiths et al., 1993**). Το αντίσωμα αυτό είχε απομονωθεί από μια παρθενική scFv βιβλιοθήκη μικρότερου μεγέθους με χρωματογραφίας συγγένειας. Το σήμα όμως του κλώνου στην ανοσοενζυμική μέθοδο ήταν αρκετά χαμηλό και επιπλέον το αντίσωμα δε παρουσίαζε σύνδεση σε κύτταρα. Η ελαφριά αλυσίδα του αντισώματος αυτού είναι επίσης  $\lambda$  αλυσίδα που προέρχεται από διαφορετικό βλαστικό γονίδιο [DPL10]. Από τα υπόλοιπα αντισώματα που επιλέχθηκαν το 1C έχει την ίδια αμινοξική ακολουθία με το 10A με ελάχιστες διαφορές. Οι διαφορές αυτές εντοπίζονται σε δύο σημεία. Το πρώτο σημείο είναι το αμινοξύ 6 της βαριάς αλυσίδας, όπου η γλουταμίνη (Q) στο 10A έχει αντικατασταθεί από το γλουταμινικό οξύ (E). Η αλλαγή αυτή η οποία οφείλεται στον εκκινητή, πιθανότατα δεν επιδρά στην ειδικότητα και την ανοσοσυγγένεια του αντισώματος, αφού εντοπίζεται στην [FR1] περιοχή. Προκαλεί ωστόσο τη δημιουργία μιας επιπλέον περιοριστικής θέσης για το ένζυμο BstNI στο αντίσωμα 1C, με αποτέλεσμα το διαφορετικό πρότυπο ζωνών στο γενετικό αποτύπωμα των δύο αντισωμάτων (Εικόνα 3.1.5). Το δεύτερο σημείο εντοπίζεται στο συνδετικό κομμάτι (linker). Συγκεκριμένα η δεύτερη σερίνη (S) που φυσιολογικά υπάρχει στο συνδετικό κομμάτι του 10A έχει αντικατασταθεί από μια θρεονίνη (T). Το 1C παράγεται μόνο σε μονομερή μορφή σε αντίθεση με το 10A που παράγεται τόσο ως μονομερές όσο και ως διμερές. Η διαφορά αυτή πιθανότατα οφείλεται στην αμινοξική αλλαγή στο συνδετικό κομμάτι, η οποία προωθεί αποκλειστικά την αλληλεπίδραση της βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας του ίδιου μορίου scFv στο αντίσωμα 1C, με αποτέλεσμα τις χαμηλές απορροφήσεις στην ανοσοενζυμική μέθοδο σε σύγκριση με το αντίσωμα 10A. Ωστόσο δεν αποκλείεται οι χαμηλές απορροφήσεις του 1C να οφείλονται σε τροποποίηση της θέσης σύνδεσης του αντιγόνου λόγω της αμινοξικής αλλαγής στο συνδετικό κομμάτι. Το αντίσωμα 3E

χρησιμοποιεί την βαριά αλυσίδα [VH3/COS-3] και την ελαφριά αλυσίδα [VL1/DPL5]. Το αντίσωμα 2C χρησιμοποιεί την βαριά αλυσίδα [VH4/DP63] και την ελαφριά αλυσίδα [Vk/L12a]. Είναι το μοναδικό αντίσωμα από όσα επιλέχθηκαν που περιέχει κ ελαφριά αλυσίδα. Τα τρία αντί-MUC1 αντισώματα που απομονώθηκαν πρόσφατα χρησιμοποιούν διαφορετικές βαριές και κ ελαφριές αλυσίδες από τα αντί-MUC1 αντισώματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής (**de Haard et al., 1999**).

Η απομόνωση αντισωμάτων ενάντια σ' ένα καρκινικό αντιγόνο έχει χρησιμότητα μόνο εφόσον τα επιλεγμένα αντισώματα μπορούν να συνδεθούν με το αντιγόνο που παρουσιάζεται στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό η προσοχή εστιάστηκε στη χρώση μαστικών κυττάρων και ιστών. Είναι γνωστό ότι η MUC1 βλεννίνη εκφράζεται στην υπογλυκοσιλιωμένη της μορφή στο 90% των καρκινικών μαστικών ιστών (**Girling et al., 1989**). Επίσης, περισσότερο από το 80% των μεταστάσεων του καρκίνου του μαστού μπορούν να διαγνωστούν με αντί-MUC1 αντισώματα (**Peterson et al., 1997**). Τα αντί-MUC1 αντισώματα 10A και 10B συνδέθηκαν με κύτταρα στην κυτταρομετρία ροής. Το αντίσωμα 10A συνδέθηκε ειδικά στις μαστικές κυτταρικές σειρές T47D και MCF7 αλλά όχι στην καρκινική κυτταρική σειρά του παχέως εντέρου CaCO<sub>2</sub>. Το γεγονός αυτό σχετίστηκε με το βαθμό γλυκοσιλίωσης της MUC1 βλεννίνης σ' αυτές τις κυτταρικές σειρές. Το αντίσωμα 10A παρουσίασε σημαντική ομοιότητα σ' ότι αφορά στο πρότυπο της σύνδεσης του, με το SM3 αντίσωμα που αναγνωρίζει ένα διαφορετικό επίτοπο (PDTRP) και η σύνδεση του με το αντιγόνο παρεμποδίζεται από τη γλυκοσιλίωση (**Cao et al., 1998**). Το αντίσωμα 10B συνδέεται με το αντιγόνο μόνο στο εσωτερικό των κυττάρων (κυτταροπλασματική χρώση), γεγονός που σημαίνει ότι το αντίσωμα αυτό είναι περισσότερο ευαίσθητο στα επίπεδα της γλυκοσιλίωσης και πιθανότατα αναγνωρίζει ένα πρόδρομο υπογλυκοσιλιωμένο MUC1 μόριο (**Litvinov et al., 1993**). Στην ανοσοϊστοχημεία τα αντισώματα 10A και 10B συνδέθηκαν με το κυτταροπλασματικό και μεμβρανικό MUC1 αντιγόνο σε ιστούς αδενοκαρκινωμάτων διαφορετικής προέλευσης ενώ το πρότυπο της χρώσης σε φυσιολογικούς ιστούς ήταν εντοπισμένο στο κυτταρόπλασμα ή απουσίαζε πλήρως. Τα παραπάνω δείχνουν ότι και τα δύο αντισώματα αναγνωρίζουν την βλεννίνη MUC1 στην υπογλυκοσιλιωμένη ή μη γλυκοσιλιωμένη μορφή στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων και επιβεβαιώνει το γεγονός ότι στα καρκινικά κύτταρα η μεμβρανική MUC1 βλεννίνη εκθέτει τον πρωτεϊνικό της πυρήνα.

Συμπερασματικά τα αντι-MUC1 ανθρώπινα scFv αντισώματα που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους στην VNTR περιοχή της MUC-1 βλεννίνης, σε σχέση με τα αντίστοιχα τρωκτικά αντισώματα που έχουν περιγραφεί στο παρελθόν. Τα αντισώματα αυτά αναγνωρίζουν την MUC1 βλεννίνη σε κυτταρικές σειρές και συνδέονται με τον υπογλυκοσιλιωμένο πρωτεϊνικό πυρήνα του μορίου σε καρκινικά κύτταρα, ενώ συνδέονται ελάχιστα έως καθόλου με την βλεννίνη που εκφράζεται στην επιφάνεια φυσιολογικών ιστών του μαστού, του παχέως εντέρου και της μήτρας. Η σύνδεση του φαινοτύπου με τον γονότυπο που επιτρέπει η τεχνολογία της παρουσίασης πρωτεϊνών στην επιφάνεια φάγων, δίνει τη δυνατότητα για περαιτέρω επέμβαση στην ανοσοσυγγένεια των μορίων καθώς και για σύνδεση του με τοξικές ή φθορίζουσες ουσίες με σκοπό τη χρήση τους ως αντικαρκινικά θεραπευτικά και ως μέσα εντοπισμού του όγκου. Η τροποποιημένη έκφραση της MUC1 βλεννίνης στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά εξασφαλίζει ότι η δράση των συγκεκριμένων αντισωμάτων θα

περιορίζεται αποκλειστικά στον καρκινικό ιστό, όπως η θεωρία της μαγικής σφαίρας υποστηρίζει, αφήνοντας ανέπαφο τον φυσιολογικό ιστό. Η μεμβρανική βλεννίνη ανακυκλώνεται από τα κύτταρα **(Litvinov et al., 1993)** και χάρη στην ιδιότητα αυτή έχει αναφερθεί ότι το αντίσωμα CTMO1, το οποίο αναγνωρίζει τον επίτοπο RPAP, μαζί με τα κυττοτοξικά μόρια που μετέφερε, μπήκε στο εσωτερικό των κυττάρων. Η εισαγωγή και η δράση του αντισώματος αυτού στο εσωτερικό των κυττάρων ήταν πιο αποτελεσματική σε σύγκρισή με ένα άλλο αντίσωμα που αναγνώριζε τον επίτοπο APDTR **(Pietersz et al., 1997)**. Αυτό σημαίνει ότι το αντίσωμα 10A που αναγνωρίζει τον επίτοπο PAPG(S) μπορεί να δράσει με ανάλογο τρόπο σαν μεταφορέας κυττοτοξικών φαρμάκων ενάντια στα καρκινικά κύτταρα.

### 3.3 Έκφραση του ανασυνδυασμένου ανθρώπινου αντι-MUC1 scFv 10A σε μεταλλαγμένα στελέχη *Escherichia coli*

#### Εισαγωγή

Για να μελετηθεί η δράση των περιπλαστικών πρωτεασών στην έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών στο περιπλαστικό χώρο των βακτηρίων, επιχειρήθηκε η έκφραση του αντι-MUC1 scFv αντισώματος 10A σε στελέχη *E. coli* που περιείχαν μεταλλαγές σε γονίδια περιπλαστικών πρωτεασών. Μελετήθηκαν τέσσερα στελέχη *E. coli* που περιείχαν διακριτούς συνδυασμούς μεταλλαγών στις βασικές περιπλαστικές πρωτεάσες *tsp*, *protease III*, *degP* και *ompT* (Πίνακας 3.3.1). Η *degP* είναι μια πρωτεάση σερίνης που ενεργοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες (heat shock) και βρίσκεται στην περιπλαστική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου (Skorko-Glonek *et al.*, 1997-Strauch *et al.*, 1989). Πρόσφατα προτάθηκε ότι η *degP* μπορεί να κόψει τις λανθασμένα διπλωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες ή να συμβάλλει στη σωστή αναδίπλωση τους ανάλογα με τις συνθήκες τις καλλιέργειας (Spiess *et al.*, 1999). Η *ompT* είναι μια ενδοπεπτιδάση της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου που κόβει πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ δύο βασικών αμινοξέων και μπορεί να είναι ενεργή ακόμη και σε αποδιατακτικές συνθήκες (Baneyx *et al.*, 1990-White *et al.*, 1995-Stathopoulos, 1998). Η *tsp* αναγνωρίζει και κόβει μη πολικά καρβοξυτελικά άκρα (Silber *et al.*, 1992-Keiler *et al.*, 1995). Η *protease III* είναι μια 110KD πρωτεάση που κόβει την ινσουλίνη και άλλα μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεϊνικά υποστρώματα (Baneyx *et al.*, 1991) Η κατανόηση της επίδρασης των περιπλαστικών πρωτεασών στην διαδικασία της έκφρασης αντισωμάτων στα βακτήρια θα επιτρέψει το σχεδιασμό στελεχών *E. coli* που παρουσιάζουν βελτίωση στην έκφραση λειτουργικών αντισωμάτων.

Στελέχη	Στελ	Γονότυποι
72	KS2	<i>F ΔlacX74 galE galK thi rpsL(strA) ΔPhoA(Pvull)</i>
01	HM1	KS272 <i>eda tsp</i>
12	HM1	KS272 <i>eda tsp ptr</i>
20	HM1	KS272 <i>eda tsp degP ompT</i>
10	SF1	KS272 <i>degP ompT</i>

TG1	<i>SupE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mrcB-hsdSM) 5 (rk<sup>-</sup> mk<sup>-</sup>) [F' traD36 proAB lacI<sup>f</sup>ZΔM15]</i>
151	<i>Δ(lac-pro) ara thi [F' proAB lacI<sup>f</sup> ZΔM15]</i>

Πίνακας 3.3.1 Τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση του scFv 10A.

### 3.3.1 Υπολογισμός της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης στο περιπλάσμα κάθε βακτηριακής καλλιέργειας υπολογίστηκε μετά από την έκφραση του αντισώματος 10A κάτω από παρόμοιες συνθήκες καλλιέργειας. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης εφαρμόστηκε η μέθοδος Bradford (Πίνακας 3.3.2).

Στελέχη	Πρωτεϊνική Συγκέντρωση (mg/ml)
HM101	6.3
HM112	8.2
HM120	10.4
SF110	1.8
KS272	4.4
TG1	5.4
HB2152	4.3

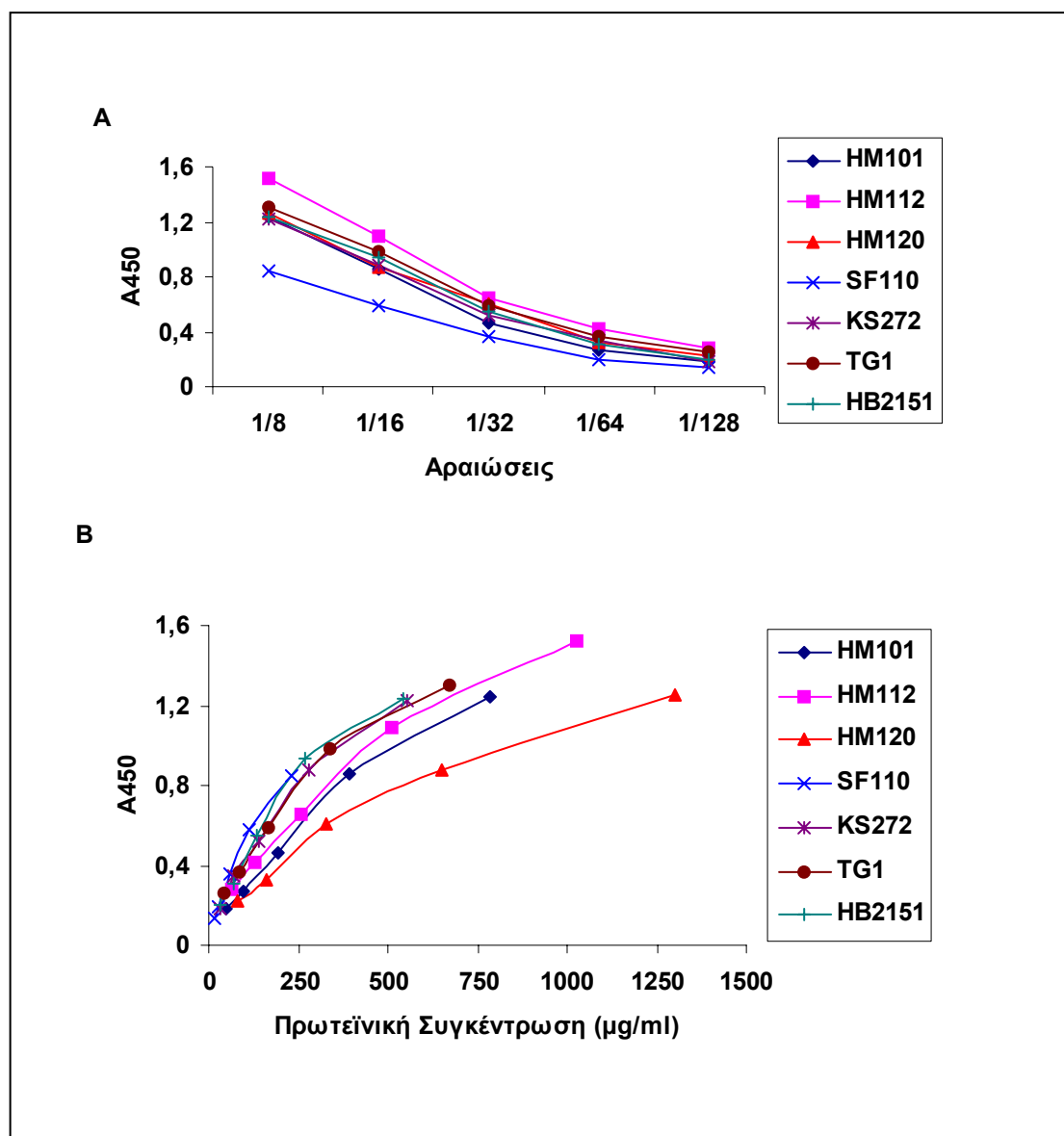
Πίνακας 3.3.2 Η πρωτεϊνική συγκέντρωση στα περιπλάσματα των διαφόρων στελεχών μετά από την έκφραση του scFv 10A.

Τα μεταλλαγμένα στελέχη HM101, HM112, HM120 παρουσίασαν μεγαλύτερες πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις σε σχέση με το μητρικό στέλεχος KS272 και τα στελέχη μάρτυρες TG1 και HB2151. Το στέλεχος SF110 έδωσε χαμηλή πρωτεϊνική συγκέντρωση.

### 3.3.2 Υπολογισμός της έκφρασης λειτουργικού αντισώματος με ELISA ειδικότητας

Για τον υπολογισμό της έκφρασης του λειτουργικού αντισώματος χρησιμοποιήθηκε η ανοσοενζυμική μέθοδος ειδικότητας που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.2. Το μεταλλαγμένο

στέλεχος HM120 παρουσίασε χαμηλή ενεργότητα σε σύγκριση με την υψηλή πρωτεϊνική συγκέντρωση του. Το αποτέλεσμα αυτό δεν ήταν συνάρτηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, καθώς το αντίσωμα παρουσίασε σταθερά χαμηλά επίπεδα ενεργότητας σε διαδοχικές αραιώσεις του περιπλάσματος. Η έκφραση της ενεργότητας του αντισώματος σε συνάρτηση με την πρωτεϊνική συγκέντρωση επιβεβαίωσε την παραπάνω παρατήρηση, γεγονός που σημαίνει ότι το συγκεκριμένο στέλεχος παρήγαγε περιορισμένη ποσότητα λειτουργικού αντισώματος. Αντίθετα το μεταλλαγμένο στέλεχος SF110 εξέφρασε το λειτουργικό αντίσωμα σε μεγαλύτερη συγκέντρωση παρά την χαμηλή πρωτεϊνική συγκέντρωση του περιπλάσματος του.

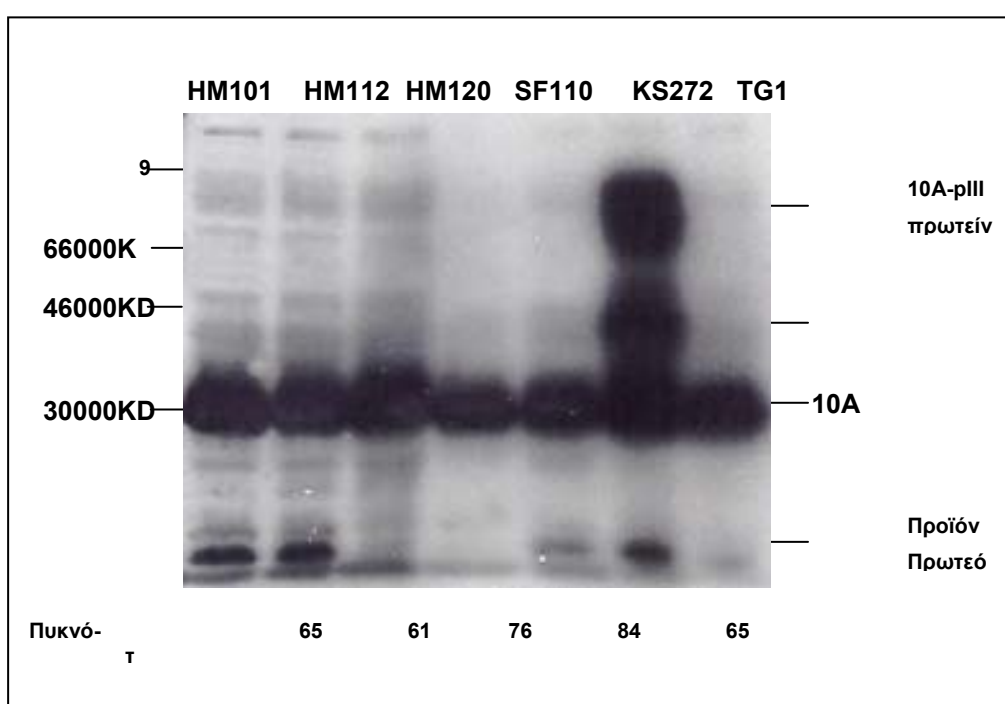


Εικόνα 3.3.1 Σύγκριση της ενεργότητας του λειτουργικού αντισώματος 10A που εκφράζεται σε διάφορα

στελέχη *E. coli*. A: σε συνάρτηση με την αραίωση του περιπλάσματος B: σε συνάρτηση με την πρωτεϊνική συγκέντρωση του περιπλάσματος.

### 3.3.3 Ανάλυση με Western blot

Τα Western blot των περιπλάσμάτων έδειξαν ότι όλα τα βακτηριακά στελέχη εκτός από το HM120 και το SF110 περιέχουν μία ζώνη χαμηλού μοριακού βάρους που αποτελεί προϊόν πρωτεολυτικής δράσης (Εικόνα 3.3.2). Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ένα κανονικοποιημένο Western blot, το οποίο αναλύθηκε με το υπολογιστικό πρόγραμμα Scion Image ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα του scFv 10A που εκφράζεται από κάθε στέλεχος.



Εικόνα 3.3.2 Το Western blot και η ανάλυση πυκνότητας των περιπλάσμάτων για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του scFv 10A όπως υπολογίστηκε από το πρόγραμμα Scion Image.

Το στέλεχος SF110 παρουσίασε την πιο αποδοτική παραγωγή σε συνάρτηση με την ενεργότητα του αντισώματος ανά μάζα πρωτεΐνης, με το στέλεχος HM120 να ακολουθεί.

## Συζήτηση

Ένα κρίσιμο βήμα για την απομόνωση αντισωμάτων υψηλής ανοσοσυγγένειας μέσω της τεχνολογίας της παρουσίασης πεπτιδίων στην επιφάνεια φάγων είναι η στρατηγική επιλογής που θα



χρησιμοποιηθεί (**Hoogenboom et al., 1997**). Οι βιβλιοθήκες των φαγικών αντισωμάτων εμπλουτίζονται με διαδοχικούς κύκλους επιλογής με τον κατάλληλο αντιγονικό επίτοπο. Για να επιτευχθεί ωστόσο η απομόνωση ενός ειδικού αντισώματος, είναι απαραίτητο να παρουσιαστεί στην επιφάνεια ενός ικανοποιητικού αριθμού ισοσωματίων. Η σημασία του επιπέδου έκφρασης του λειτουργικού αντισώματος είναι εμφανής, αφού τα υψηλής ανοσοσυγγένειας αντισώματα είναι σε γενικές γραμμές σπάνια. Η μεταφορά της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο περιπλασμα ώστε να αναδιπλωθεί και να πάρει την τελική τρισδιάστατη δομή της, συμβάλλει στην βελτίωση των επιπέδων έκφρασης, αν και πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη η πρωτεολυτική δράση των περιπλασματικών πρωτεασών. Έχει περιγραφεί ότι μεταλλαγές που παρεμποδίζουν την παραγωγή τέτοιων περιπλασματικών ενζύμων, επηρεάζουν θετικά την έκφραση των ετερόλογων πρωτεϊνών στα βακτήρια (**Strauch et al., 1988-Baneyx et al., 1991-Silber et al., 1992**). Η επίδραση αυτών των μεταλλαγών στα επίπεδα παραγωγής της ετερόλογης πρωτεΐνης εξαρτάται από την πρωτοταγή της δομή.

Οι πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο που οι περιπλασμικές πρωτεάσες επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης των λειτουργικών αντισωματικών κομματιών, είναι περιορισμένες. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του ανθρώπινου αντι-MUC1 scFv 10A σε τέσσερα μεταλλαγμένα βακτηριακά στελέχη *E. coli* (HM101, HM112, HM120, SF110). Τα στελέχη αυτά περιείχαν διάφορους συνδυασμούς μεταλλαγών στα γονίδια των τεσσάρων βασικών περιπλασματικών πρωτεασών: *tsp*, *protease III (ptr)*, *degP* και *ompT* (**Meerman et al., 1994**). Το μητρικό στέλεχος ήταν το KS272 ενώ το TG1 και το HB2151 χρησιμοποιήθηκαν σαν στελέχη μάρτυρες λόγω της εκτεταμένης τους χρήσης στην τεχνολογία της παρουσίασης στην επιφάνεια φάγων: το TG1 για την κατασκευή αντισωματικών βιβλιοθηκών και το HB2151 για την υπερέκφραση του διαλυτού αντισώματος μετά από την απομόνωση του.

Η μεταλλαγή *eda* αφορά το ένζυμο 2-κετο-3-δεοξυγλουκονική-6-φωσφορική αλδολάση που δεν επηρεάζει την παραγωγή ή την σταθερότητα των εκφραζόμενων ετερόλογων πρωτεϊνών. Η απουσία σημαντικών ποιοτικών διαφορών μεταξύ των διαφόρων στελεχών στην ανοσοενζυμική μέθοδο μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι όλα τα βακτηριακά στελέχη παρήγαγαν το ίδιο scFv κομμάτι που παρουσιάζει ανοσοσυγγένεια (Kd) στα επίπεδα των  $\mu\text{M}$  (**Henderikx et al., 1998**). Το πιο αποδοτικό στέλεχος σε ότι αφορά στην ενεργότητα του αντισώματος ανά πρωτεϊνική μάζα ήταν το SF110. Αυτό το αποτέλεσμα συμφώνησε με την ανάλυση πυκνότητας των ειδικών ζωνών στο Western blot, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε ένα προϊόν πρωτεόλυσης χαμηλού μοριακού βάρους σε όλα τα στελέχη εκτός από το SF110 και το HM120. Το κοινό χαρακτηριστικό αυτών των δύο στελεχών ήταν η παρουσία των μεταλλαγών *degP* και *ompT*, οι οποίες δεν υπήρχαν στα άλλα δύο μεταλλαγμένα στελέχη. Εφόσον η *degP* πρωτεάση είναι ενεργή μόνο σε αυξημένη θερμοκρασία (**Skorko-Glonek et al., 1997-Strauch et al., 1989**) και τα στελέχη καλλιεργήθηκαν στους 30°C, τα πρωτεολυτικά προϊόντα που παρατηρήθηκαν πρέπει να οφείλονται στην ενζυμική δράση της πρωτεάσης *ompT*. Οι μεταλλαγές *tsp* και *ptr* δεν φαίνεται να επηρεάζουν την έκφραση του αντισώματος 10A. Η χαμηλή ενεργότητα του αντισώματος ανά μάζα πρωτεΐνης στο μεταλλαγμένο στέλεχος HM120 δεν ήταν αποτέλεσμα παρεμπόδισης λόγω κορεσμού του περιπλασματικού διαλύματος, αφού το Western blot και η ανάλυση πυκνότητας έδωσαν δυνατά σήματα. Η πιο πιθανή εξήγηση είναι ότι το στέλεχος HM120 εκφράζει το αντίσωμα με μεγάλη απόδοση αλλά το πρωτεϊνικό

μόριο δεν μπορεί να αναδιπλωθεί σωστά στο περίπλασμα με αποτέλεσμα να μην είναι λειτουργικό. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να παρατηρηθεί όταν οι πρωτεάσες, οι οποίες κόβουν τα πρωτεϊνικά μόρια που δεν έχουν αναδιπλωθεί σωστά ή συμβάλλουν στη σωστή τους αναδίπλωση (chaperones), δεν εκφράζονται (**Spiess et al., 1999**).

Γενικά, η αποδοτική έκφραση των λειτουργικών ανασυνδυασμένων αντισωμάτων στην *E. coli* προσφέρει αρκετά πρακτικά και τεχνολογικά πλεονεκτήματα κυρίως εφόσον το σύστημα έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε η πρωτεΐνη να μεταφέρεται στο χώρο του περιπλάσματος, όπου μπορεί να αναδιπλωθεί σωστά. Οι περισσότερες περιπλασμικές πρωτεάσες που μελετήσαμε δεν επηρεάζουν την έκφραση του αντισώματος, εκτός από την ompT που φάνηκε να σχετίζεται με την παρουσία του πρωτεολυτικού προϊόντος. Η παρουσία πολλών μεταλλαγών σε γονίδια πρωτεασών οδήγησε στην συσσώρευση μη λειτουργικού αντισώματος. Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να συνεισφέρουν στην κατανόηση της δράσης των περιπλασμικών πρωτεασών και να επιτρέψουν τον διεξοδικό σχεδιασμό βακτηριακών στελεχών που εκφράζουν λειτουργικά αντισώματα σε υψηλές συγκεντρώσεις.





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου στις δυτικές κοινωνίες, μετά τις καρδιακές παθήσεις. Μέχρι σήμερα, η στρατηγική ενάντια στον καρκίνο περιελάμβανε κυρίως τη χειρουργική επέμβαση, τη χημειοθεραπεία και τη θεραπεία με τη χρήση ακτινοβολιών. Η αποτελεσματικότητα των μεθόδων αυτών σ' ότι αφορά στην καταπολέμηση των καρκινικών κυττάρων είναι αναμφισβήτητη. Η αρνητική επίδραση τους όμως στους φυσιολογικούς ιστούς είναι ένα γεγονός που δεν μπορεί να περάσει απαρατήρητο. Το ερώτημα που ανακύπτει λοιπόν είναι: πώς μπορούμε να καταπολεμήσουμε τα καρκινικά κύτταρα, χωρίς να βλάψουμε το φυσιολογικό ιστό;

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των επιστημόνων τράβηξε μια νέα μορφή θεραπείας που χρησιμοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα άμεσα ή έμμεσα για να αντιμετωπίσει τον καρκίνο ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι παρενέργειες οι οποίες προκαλούνται από τη χρήση των χημικών ουσιών και των ακτινοβολιών: η ανοσοθεραπεία. Το ανοσοποιητικό σύστημα έχει τη δυνατότητα υπό φυσιολογικές συνθήκες να προστατεύει τον οργανισμό καταπολεμώντας τα καρκινικά κύτταρα. Για να επιτευχθεί αυτό, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η εμφάνιση αλλαγών στα καρκινικά κύτταρα, οι οποίες μπορούν να αναγνωριστούν από το ανοσιακό σύστημα. Ωστόσο οι διαφορές που εντοπίζονται στα καρκινικά κύτταρα είναι συνήθως ποσοτικές και όχι ποιοτικές και αφορούν κυτταρικές πρωτεΐνες που ονομάζονται καρκινικά αντιγόνα. Τα καρκινικά αντιγόνα δηλαδή είναι αυτοαντιγόνα. Η ανοχή που έχει αναπτύξει το ανοσοποιητικό σύστημα προς τα συστατικά του οργανισμού ώστε να αποφεύγονται οι καταστάσεις αυτοανοσίας, συχνά παρεμποδίζει την αποτελεσματική καταπολέμηση των καρκινικών κυττάρων. Όπως είναι γνωστό τα Τ λεμφοκύτταρα επιλέγονται στο θύμο αδένα: εκείνα που αντιδρούν με αντιγόνα του εαυτού καταστρέφονται, ενώ τα υπόλοιπα περνάνε στην κυκλοφορία. Δεν ισχύει ωστόσο το ίδιο για τα Β λεμφοκύτταρα με αποτέλεσμα την κυκλοφορία κυττάρων που παρουσιάζουν στην επιφάνεια τους αντισώματα ειδικά για συστατικά του "εαυτού". Τα κύτταρα αυτά δεν επεκτείνονται, ούτε περνάνε από τη διαδικασία των σωματικών μεταλλαγών λόγω της απουσίας της βοηθητικής δράσης των Τ λεμφοκυττάρων και τα τυχόν αντισώματα που παράγονται είναι ισότυπου IgM και χαμηλής συγγένειας.

Η αποκρυπτογράφηση του ρόλου των αντισωμάτων στην προστασία του οργανισμού και η μαζική παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων που επιτεύχθηκε από τους Kohler και Milstein το 1975 με την ανάπτυξη της τεχνολογίας των υβριδωμάτων έφερε πραγματική επανάσταση στο χώρο της Ανοσολογίας. Για πρώτη φορά η πρόταση του Elrich ότι τα αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν μαγικές σφαίρες που σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα μέσω της σύζευξης τους με τοξικές ουσίες ή μέσω της ενεργοποίησης του συμπληρώματος και της κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας, μπορούσε να ελεγχθεί επιστημονικά.

Οι πρώτες ενδείξεις στην αρχή της δεκαετίας του '80 ότι τα μονοκλωνικά αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για θεραπευτικούς σκοπούς ήταν ενθαρρυντικές (**Miller, 1982**). Ωστόσο ο ενθουσιασμός της επιστημονικής κοινότητας δεν κράτησε για πολύ. Ο ξενογονικός χαρακτήρας των αντισωμάτων (ποντικίσια) με την αναμενόμενη ανάπτυξη αντιπρωκτικών ανοσολογικών απαντήσεων (HAMA) από το ανοσολογικό σύστημα των ασθενών δεν επέτρεπε επαναλαμβανόμενες δόσεις. Η γρήγορα αναπτυσσόμενη γενετική μηχανική επέτρεψε να δοθούν

λύσεις όπως η μετατροπή ποντικίσια μονοκλωνικών αντισωμάτων σε α) χιμαιρικά αντισώματα όπου οι σταθερές περιοχές έχουν ανθρώπινη προέλευση και β) ανθρωποποιημένα αντισώματα όπου μόνο οι CDR περιοχές έχουν ποντικίσια προέλευση. Το πρόβλημα αντιμετωπίστηκε μ' αυτό το τρόπο ως ένα βαθμό.

Πρόσφατα, η τεχνολογία των διαγονιδιακών ποντικίων και της παρουσίασης αντισωμάτων στην επιφάνεια φάγων, ήρθε να δώσει μια πιο ορθολογική λύση στο πρόβλημα της ανοσογονικότητας των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Οι τεχνολογίες αυτές επιτρέπουν την απομόνωση ανθρώπινων αντισωμάτων που δεν παρουσιάζουν HAMA απαντήσεις. Στην περίπτωση ωστόσο των διαγονιδιακών ποντικίων η ειδικότητα και η ανοσοσυγγένεια των παραγόμενων αντισωμάτων καθορίζεται από το ανοσολογικό σύστημα, όπως συμβαίνει με τα χιμαιρικά και με τα ανθρωποποιημένα αντισώματα. Με την τεχνολογία της παρουσίασης στην επιφάνεια φάγων (**McCafferty et al., 1990**), τα αντισώματα μπορούν να φτιαχτούν εξολοκλήρου *in vitro* ανεξάρτητα από τη δράση του ανοσολογικού μηχανισμού και της διαδικασίας της *in vivo* ανοσοποίησης, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα παραγωγής αντισωμάτων ενάντια σε οποιοδήποτε αντιγονικό επίτοπο ακόμα και σε παραδοσιακά “δύσκολα” αντιγόνα, όπως αυτοαντιγόνα, πολυσακχαρίτες κ.α. Ο τυχαίος ανασυνδυασμός των αντισωματικών γονιδίων και η κατασκευή μεγάλων βιβλιοθηκών έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού ειδικοτήτων από τις οποίες μπορούμε να επιλέξουμε αντισώματα με την εφαρμογή της κατάλληλης επιλεκτικής μεθόδου. Τα αντισωματικά μόρια που απομονώνονται μπορούν να μελετηθούν και να αλλαχθούν με την βοήθεια της γενετικής μηχανικής με σκοπό την αύξηση της ανοσοσυγγένειας, την αλλαγή της δομής, τη σύνδεση με τοξικές ουσίες, με φθορίζουσες ουσίες και άλλα. Επίσης επειδή τα ανασυνδυασμένα αντισώματα είναι μικρότερα μόρια, αφού αποτελούνται από τα τεμάχια πρόσδεσης του αντιγόνου μόνο, μπορούν να διαπεράσουν πιο εύκολα τους ιστούς και να φτάσουν στο στόχο. Εκεί μπορούν να δράσουν είτε χρησιμεύοντας σαν διαγνωστικά εργαλεία για τον εντοπισμό του όγκου, είτε καταπολεμώντας τα καρκινικά κύτταρα.

Η βλεννίνη MUC1 αποτελεί ένα σημαντικό καρκινικό αντιγόνο σε διάφορους τύπους καρκίνων όπως τον καρκίνο του μαστού που αποτελεί τη συχνότερη μορφή καρκίνου και την πρώτη αιτία θανάτου στις γυναίκες 39-54 ετών στις αναπτυσσόμενες χώρες του κόσμου. Η υπερέκφραση της υπογλυκοσυλιωμένης μορφής της έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση τμημάτων του πρωτεϊνικού πυρήνα στα καρκινικά κύτταρα τα οποία είναι κρυμμένα από τους πολυσακχαρίτες στα φυσιολογικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη διάκριση καρκινικού και φυσιολογικού ιστού που είναι βασική προϋπόθεση για την επιτυχή εφαρμογή της ανοσοθεραπείας. Τα περισσότερα αντισώματα ενάντια στη MUC1 βλεννίνη είναι ποντικίσια προέλευσης (**Price et al., 1998**) ενώ υπάρχουν κάποια χιμαιρικά και ανθρωποποιημένα αντι-MUC1 αντισώματα (**Pietersz et al., 1997**).

Για το λόγο αυτό η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στην προσπάθεια να δημιουργηθούν εξολοκλήρου ανθρώπινα αντισώματα με την εφαρμογή της τεχνολογίας της παρουσίασης στην επιφάνεια φάγων. Ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Στην πρώτη περίπτωση έγινε προσπάθεια να συνδυαστεί η τεχνολογία της *in vitro* ανοσοποίησης ανθρώπινων Β λεμφοκυττάρων με τη τεχνολογία της παρουσίασης σε φάγους. Η διαδικασία της ανοσοποίησης αποσκοπούσε στον εμπλουτισμό του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού σε κύτταρα που παράγουν και εκκρίνουν ειδικά αντι-

MUC1 και αντι-MUC2 αντισώματα. Το mRNA αυτών των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε για να φτιαχτούν ανοσοποιημένες βιβλιοθήκες που θεωρητικά περιείχαν το ειδικό αντίσωμα. Με αυτό το τρόπο η απαιτούμενη ποικιλομορφία (μέγεθος) φαγικής βιβλιοθήκης μειώθηκε σημαντικά με αποτέλεσμα τη διευκόλυνση των μοριακών χειρισμών. Η επιλογή των βιβλιοθηκών αυτών οδήγησε στην απομόνωση scFv και Fab αντισωμάτων με μη ικανοποιητική ανοσοσυγγένεια και ειδικότητα. Το πιο κρίσιμο σημείο στη διαδικασία της κατασκευής των βιβλιοθηκών ήταν η χρονική στιγμή κατά την οποία έγινε η συλλογή των κυττάρων και η απομόνωση του ολικού RNA. Τα μετασχηματισμένα με EBV Β λεμφοκύτταρα, μετά τη διαδικασία της *in vitro* ανοσοποίησης, παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στις καλλιεργητικές συνθήκες με αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση της παραγωγής αντισωμάτων. Παραμένει λοιπόν υπό εξέταση κατά πόσο μπορεί να επεκταθεί η χρονική περίοδος παραγωγής των ειδικών αντισωμάτων, έτσι ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα απομόνωσης του ειδικού mRNA και κατασκευής του ειδικού αντισώματος.

Στη δεύτερη περίπτωση επιλέχθηκαν δύο βιβλιοθήκες: μία μεγάλη παρθενική scFv βιβλιοθήκη και μία βιβλιοθήκη από καρκινοπαθείς (καρκίνος του μαστού και της μήτρας). Η επιλογή της παρθενικής βιβλιοθήκης είχε σαν αποτέλεσμα την ανακάλυψη των πρώτων ανθρώπινων αντι-MUC1 scFv αντισωμάτων που αναγνωρίζουν την MUC1 βλεννίνη σε κυτταρικές σειρές και συνδέονται με τον πρωτεϊνικό πυρήνα της μεμβρανικής βλεννίνης σε καρκινικούς ιστούς αλλά όχι σε φυσιολογικούς ιστούς του μαστού της μήτρας και του παχέως εντέρου (**Henderikx et al., 1998**). Τα αντισώματα αυτά και κυρίως το αντίσωμα 10A αναγνωρίζουν διαφορετικούς επίτοπους στην VNTR περιοχή της MUC-1 βλεννίνης, σε σχέση με τα αντίστοιχα τρωκτικά αντισώματα που έχουν περιγραφεί στο παρελθόν. Η ανακύκλωση της μεμβρανικής βλεννίνης από τα κύτταρα μπορεί να συμβάλλει αποτελεσματικά στη χρήση του 10A σαν μεταφορέα κυττοτοξικών φαρμάκων, όπως έχει ήδη αναφερθεί για το ανθρωποποιημένο αντίσωμα CTMO1 (**Pietersz et al., 1997**) το οποίο αναγνωρίζει τον επίτοπο RPAP, όπως και το αντίσωμα 10A. Η σύζευξη του αντισώματος αυτού με το κυττοτοξικό μόριο ινταρουμπισίνη (idarubicin) είχε σαν αποτέλεσμα την δραματική μείωση των μαστικών καρκινικών κυττάρων που αναπτύσσονταν σε ποντίκια. Στο μέλλον η σύνδεση του 10A με τοξικές ουσίες ή με μόρια όπως η Fc ουρά, που μπορούν να προκαλέσουν ενεργοποίηση των μηχανισμών του ανοσολογικού συστήματος για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, θα συμβάλλει στην μελέτη της *in vivo* δράσης του αντισώματος. Η επίδραση του αντισώματος 10A μπορεί να ελεγχθεί σε ανθρώπινους καρκίνους σε ποντίκια, ώστε να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητά του. Η μετατροπή του αντισώματος 10A σε scFv διπλής ειδικότητας (diabody) θα οδηγήσει στον διπλασιασμό της ανοσοσυγγένειας λόγω της παρουσίας δύο θέσεων σύνδεσης του αντιγόνου, χωρίς σημαντική αύξηση του μεγέθους σε αντίθεση με τα (Fab)<sub>2</sub> μόρια. Το μικρό μέγεθος του αντισώματος είναι απαραίτητο κριτήριο για την αποτελεσματικότητά της *in vivo* δράσης του, ώστε να διαπερνά τους ιστούς και να φτάνει στον στόχο. Επίσης η ανοσοσυγγένεια του μορίου μπορεί να βελτιωθεί με την εφαρμογή τεχνικών μεταλλαξιγένεσης. Προσοχή ωστόσο πρέπει να δοθεί κατά το σχεδιασμό των πειραμάτων ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα τροποποίησης της ειδικότητας του.



## Βιβλιογραφία

- Adelstein, S., Pritchard-Briscoe, H., Anderson, T.A., Crosbie, J., Gammon, G., Loblay, R.H., Basten, A. and Goodnow, C.C. (1991) Induction of self-tolerance in T cells but not B cells of transgenic mice expressing little self antigen. *Science* 251, 1223-5.
- Apostolopoulos, V. and McKenzie, I.F. (1994) Cellular mucins: targets for immunotherapy. *Crit Rev Immunol* 14, 293-309.
- Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R. and Muyldermans, S. (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett* 414, 521-6.
- Athanassiou, A., Pectasides, D., Pateniotis, K., Tzimis, L., Natsis, P., Lafi, A., Arapantoni, P., Koutsidouba, P., Taylor-Papadimitriou, J. and Epenetos, A. (1988) Immunoscintigraphy with <sup>131</sup>I-labelled HMFG2 and HMFG1 F(ab')<sub>2</sub> in the pre-operative detection of clinical and subclinical lymph node metastases in breast cancer patients. *Int J Cancer Suppl* 3, 89-95.
- Avrameas, S. (1991) Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today* 12, 154-9.
- Baker, T.S., Bose, C.C., Caskey-Finney, H.M., King, D.J., Lawson, A.D., Lyons, A., Mountain, A., Owens, R.J., Rolfe, M.R., Sehdev, M. and et al. (1994) Humanization of an anti-mucin antibody for breast and ovarian cancer therapy. *Adv Exp Med Biol* 353, 61-82.
- Baneyx, F. and Georgiou, G. (1990) In vivo degradation of secreted fusion proteins by the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *J Bacteriol* 172, 491-4.
- Baneyx, F. and Georgiou, G. (1991) Construction and characterization of *Escherichia coli* strains deficient in multiple secreted proteases: protease III degrades high-molecular-weight substrates in vivo. *J Bacteriol* 173, 2696-703.
- Barbas, C.F.d., Kang, A.S., Lerner, R.A. and Benkovic, S.J. (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7978-82.
- Barbas, C.F.d., Bain, J.D., Hoekstra, D.M. and Lerner, R.A. (1992) Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4457-61.
- Barbas, C.F.d., Amberg, W., Simoncsits, A., Jones, T.M. and Lerner, R.A. (1993) Selection of human anti-hapten antibodies from semisynthetic libraries. *Gene* 137, 57-62.
- Barbas, C.F.d., Collet, T.A., Amberg, W., Roben, P., Binley, J.M., Hoekstra, D., Cababa, D., Jones, T.M., Williamson, R.A., Pilkington, G.R. and et al. (1993) Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. *J Mol Biol* 230, 812-23.
- Barnd, D.L., Lan, M.S., Metzgar, R.S. and Finn, O.J. (1989) Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7159-63.
- Beck, E. and Zink, B. (1981) Nucleotide sequence and genome organisation of filamentous

bacteriophages fl and fd. *Gene* 16, 35-58.

Better, M., Chang, C.P., Robinson, R.R. and Horwitz, A.H. (1988) Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 240, 1041-3.

Blockzijl, A., Nilsson, K. and Nilsson, O. (1998) Epitope characterization of MUC1 antibodies. *Tumour Biol* 19, 46-56.

Brinkmann, U., Chowdhury, P.S., Roscoe, D.M. and Pastan, I. (1995) Phage display of disulfide-stabilized Fv fragments. *J Immunol Methods* 182, 41-50.

Bruggemann, M. and Neuberger, M.S. (1996) Strategies for expressing human antibody repertoires in transgenic mice. *Immunol Today* 17, 391-7.

Buchner, J., Pastan, I. and Brinkmann, U. (1992) A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. *Anal Biochem* 205, 263-70.

Burchell, J., Gendler, S., Taylor-Papadimitriou, J., Girling, A., Lewis, A., Millis, R. and Lampion, D. (1987) Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin. *Cancer Res* 47, 5476-82.

Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Boshell, M., Gendler, S. and Duhig, T. (1989) A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes. *Int J Cancer* 44, 691-6.

Burchell, J. and Taylor-Papadimitriou, J. (1993) Effect of modification of carbohydrate side chains on the reactivity of antibodies with core-protein epitopes of the MUC1 gene product. *Epithelial Cell Biol* 2, 155-62.

Burton, D.R., Barbas, C.F.d., Persson, M.A., Koenig, S., Chanock, R.M. and Lerner, R.A. (1991) A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10134-7.

Cai, X. and Garen, A. (1995) Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6537-41.

Cao, Y., Karsten, U. and Hilgers, J. (1998) Immunohistochemical characterization of a panel of 56 antibodies with normal human small intestine, colon, and breast tissues. *Tumour Biol* 19, 88-99.

Casali, P. and Notkins, A.L. (1989) CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire [see comments]. *Immunol Today* 10, 364-8.

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-9.

Chothia, C., Lesk, A.M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S.J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E.A., Davies, D., Tulip, W.R. and et al. (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions [see comments]. *Nature* 342, 877-83.

Chothia, C., Lesk, A.M., Gherardi, E., Tomlinson, I.M., Walter, G., Marks, J.D., Llewelyn, M.B. and

- Winter, G. (1992) Structural repertoire of the human VH segments. *J Mol Biol* 227, 799-817.
- Ciborowski, P., Konitzki, W.M., Blander, J.M. and Finn, O.J. (1998) Screening of anti-MUC1 antibodies for reactivity with native (ascites) and recombinant (baculovirus) MUC1 and for blocking MUC1 specific cytotoxic T-lymphocytes. *Tumour Biol* 19, 147-51.
- Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D. and Winter, G. (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624-8.
- Cohen, I.R. (1986) Regulation of autoimmune disease physiological and therapeutic. *Immunol Rev* 94, 5-21.
- Crissman, J.W. and Smith, G.P. (1984) Gene-III protein of filamentous phages: evidence for a carboxyl-terminal domain with a role in morphogenesis. *Virology* 132, 445-55.
- Croft, M. and Swain, S.L. (1992) Analysis of CD4+ T cells that provide contact-dependent bystander help to B cells. *J Immunol* 149, 3157-65.
- de Bruin, R., Spelt, K., Mol, J., Koes, R. and Quattrocchio, F. (1999) Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nat Biotechnol* 17, 397-9.
- de Haard, H.J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S.E., Roovers, R.C., Henderikx, P., de Bruine, A.P., Arends, J.W. and Hoogenboom, H.R. (1999) A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem* 274, 18218-30.
- de Kruijff, J., Terstappen, L., Boel, E. and Logtenberg, T. (1995) Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3938-42.
- DeNardo, S.J., Kramer, E.L., O'Donnell, R.T., Richman, C.M., Salako, Q.A., Shen, S., Noz, M., Glenn, S.D., Ceriani, R.L. and DeNardo, G.L. (1997) Radioimmunotherapy for breast cancer using indium-111/yttrium-90 BrE-3: results of a phase I clinical trial. *J Nucl Med* 38, 1180-5.
- Devine, P.L. and McKenzie, I.F. (1992) Mucins: structure, function, and associations with malignancy. *Bioessays* 14, 619-25.
- Duenas, M. and Borrebaeck, C.A. (1994) Clonal selection and amplification of phage displayed antibodies by linking antigen recognition and phage replication. *Biotechnology (N Y)* 12, 999-1002.
- Duenas, M., Chin, L.T., Malmberg, A.C., Casavilla, R., Ohlin, M. and Borrebaeck, C.A. (1996) In vitro immunization of naive human B cells yields high affinity immunoglobulin G antibodies as illustrated by phage display. *Immunology* 89, 1-7.
- Eldin, P., Pauza, M.E., Hieda, Y., Lin, G., Murtaugh, M.P., Pentel, P.R. and Pennell, C.A. (1997) High-level secretion of two antibody single chain Fv fragments by *Pichia pastoris*. *J Immunol Methods* 201, 67-75.
- Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H. and Woody, J.N. (1994) Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet* 344, 1125-7.
- Enfors, S.O. (1992) Control of in vivo proteolysis in the production of recombinant proteins. *Trends*

Biotechnol 10, 310-5.

Epenetos, A.A., Hooker, G., Krausz, T., Snook, D., Bodmer, W.F. and Taylor-Papadimitriou, J. (1986) Antibody-guided irradiation of malignant ascites in ovarian cancer: a new therapeutic method possessing specificity against cancer cells. *Obstet Gynecol* 68, 71S-74S.

Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G. and Bishop, J.M. (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5, 3610-6.

Finn, O.J. (1992) Antigen-specific, MHC-unrestricted T cells. *Biotherapy* 4, 239-49.

Finn, O.J. and Gendler, S.J. (1998) Mimic 1 of MUC1 [news; comment]. *Nat Biotechnol* 16, 236-7.

Fiorentini, S., Matczak, E., Gallo, R.C., Reitz, M.S., Keydar, I. and Watkins, B.A. (1997) Humanization of an antibody recognizing a breast cancer specific epitope by CDR-grafting. *Immunotechnology* 3, 45-59.

Fontenot, J.D., Tjandra, N., Bu, D., Ho, C., Montelaro, R.C. and Finn, O.J. (1993) Biophysical characterization of one-, two-, and three-tandem repeats of human mucin (muc-1) protein core. *Cancer Res* 53, 5386-94.

Foote, J. and Winter, G. (1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol* 224, 487-99.

Foote, J. and Eisen, H.N. (1995) Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses [comment]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1254-6.

Fung, P.Y. and Longenecker, B.M. (1991) Specific immunosuppressive activity of epiglycanin, a mucin-like glycoprotein secreted by a murine mammary adenocarcinoma (TA3-HA). *Cancer Res* 51, 1170-6.

Garrard, L.J., Yang, M., O'Connell, M.P., Kelley, R.F. and Henner, D.J. (1991) Fab assembly and enrichment in a monovalent phage display system. *Biotechnology (N Y)* 9, 1373-7.

Gendler, S.J., Lancaster, C.A., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Lalani, E.N. and Wilson, D. (1990) Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem* 265, 15286-93.

Girling, A., Bartkova, J., Burchell, J., Gendler, S., Gillett, C. and Taylor-Papadimitriou, J. (1989) A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. *Int J Cancer* 43, 1072-6.

Glucksman, M.J., Bhattacharjee, S. and Makowski, L. (1992) Three-dimensional structure of a cloning vector. X-ray diffraction studies of filamentous bacteriophage M13 at 7 Å resolution. *J Mol Biol* 226, 455-70.

Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Marks, J.D., Bye, J.M., Embleton, M.J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K.P., Gorick, B.D., Hughes-Jones, N.C. and et al. (1993) Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *Embo J* 12, 725-34.

Gum, J.R., Hicks, J.W., Swallow, D.M., Lagace, R.L., Byrd, J.C., Lampert, D.T., Siddiki, B. and Kim, Y.S. (1990) Molecular cloning of cDNAs derived from a novel human intestinal mucin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 407-15.

Gum, J.R., Jr., Hicks, J.W., Toribara, N.W., Rothe, E.M., Lagace, R.E. and Kim, Y.S. (1992) The human MUC2 intestinal mucin has cysteine-rich subdomains located both upstream and downstream of its central repetitive region. *J Biol Chem* 267, 21375-83.

Gum, J.R., Jr., Hicks, J.W., Toribara, N.W., Siddiki, B. and Kim, Y.S. (1994) Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. *J Biol Chem* 269, 2440-6.

Gum, J.R., Jr. (1995) Human mucin glycoproteins: varied structures predict diverse properties and specific functions. *Biochem Soc Trans* 23, 795-9.

Hartley, S.B., Crosbie, J., Brink, R., Kantor, A.B., Basten, A. and Goodnow, C.C. (1991) Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* 353, 765-9.

Hawkins, R.E., Russell, S.J. and Winter, G. (1992) Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol* 226, 889-96.

Hayes, D.F., Silberstein, D.S., Rodrigue, S.W. and Kufe, D.W. (1990) DF3 antigen, a human epithelial cell mucin, inhibits adhesion of eosinophils to antibody-coated targets. *J Immunol* 145, 962-70.

Henderikx, P., Kandilogiannaki, M., Petrarca, C., von Mensdorff-Pouilly, S., Hilgers, J.H., Krambovitis, E., Arends, J.W. and Hoogenboom, H.R. (1998) Human single-chain Fv antibodies to MUC1 core peptide selected from phage display libraries recognize unique epitopes and predominantly bind adenocarcinoma. *Cancer Res* 58, 4324-32.

Holliger, P., Prospero, T. and Winter, G. (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6444-8.

Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P. and Winter, G. (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* 19, 4133-7.

Hoogenboom, H.R. and Winter, G. (1992) By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J Mol Biol* 227, 381-8.

Hoogenboom, H.R. (1997) Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol* 15, 62-70.

Huston, J.S., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., McCartney, J., Warren, F., Haber, E. and Oppermann, H. (1991) Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods Enzymol* 203, 46-88.

Ifversen, P., Zhang, X.M., Ohlin, M., Zeuthen, J. and Borrebaeck, C.A. (1993) Effect of cell-derived growth factors and cytokines on the clonal outgrowth of EBV-infected B cells and established lymphoblastoid cell lines. *Hum Antibodies Hybridomas* 4, 115-23.

Jacobson, A. (1972) Role of F pili in the penetration of bacteriophage  $\phi$ 1. *J Virol* 10, 835-43.

Jakobovits, A. (1995) Production of fully human antibodies by transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol* 6, 561-6.

Jentoft, N. (1990) Why are proteins O-glycosylated? [see comments]. *Trends Biochem Sci* 15, 291-4.

Jerome, K.R., Barnd, D.L., Bendt, K.M., Boyer, C.M., Taylor-Papadimitriou, J., McKenzie, I.F., Bast, R.C., Jr. and Finn, O.J. (1991) Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. *Cancer Res* 51, 2908-16.

Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S. and Winter, G. (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-5.

Kang, A.S., Barbas, C.F., Janda, K.D., Benkovic, S.J. and Lerner, R.A. (1991) Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4363-6.

Karanikas, V., Hwang, L.A., Pearson, J., Ong, C.S., Apostolopoulos, V., Vaughan, H., Xing, P.X., Jamieson, G., Pietersz, G., Tait, B., Broadbent, R., Thynne, G. and McKenzie, I.F. (1997) Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunized with mannan-MUC1 fusion protein. *J Clin Invest* 100, 2783-92.

Keiler, K.C., Silber, K.R., Downard, K.M., Papayannopoulos, I.A., Biemann, K. and Sauer, R.T. (1995) C-terminal specific protein degradation: activity and substrate specificity of the Tsp protease. *Protein Sci* 4, 1507-15.

Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-7.

Kotera, Y., Fontenot, J.D., Pecher, G., Metzgar, R.S. and Finn, O.J. (1994) Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Res* 54, 2856-60.

Krambovitis, E., Hatzidakis, G. and Barlos, K. (1998) Preparation of MUC-1 oligomers using an improved convergent solid-phase peptide synthesis. *J Biol Chem* 273, 10874-9.

Kramer, R.A., Dekker, N. and Egmond, M.R. (2000) Identification of active site serine and histidine residues in *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *FEBS Lett* 468, 220-4.

Kunkler, R.B., Bishop, M.C., Green, D.J., Pimm, M.V., Price, M.R. and Frier, M. (1995) Targeting of bladder cancer with monoclonal antibody NCRC48--a possible approach for intravesical therapy. *Br J Urol* 76, 81-6.

Lan, M.S., Batra, S.K., Qi, W.N., Metzgar, R.S. and Hollingsworth, M.A. (1990) Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J Biol Chem* 265, 15294-9.

Lang, I.M., Barbas, C.F., 3rd and Schleef, R.R. (1996) Recombinant rabbit Fab with binding activity to type-1 plasminogen activator inhibitor derived from a phage-display library against human alpha-granules. *Gene* 172, 295-8.

Lazdunski, A.M. (1989) Peptidases and proteases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Rev* 5, 265-76.

Ligtenberg, M.J., Vos, H.L., Gennissen, A.M. and Hilkens, J. (1990) Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J Biol*

Chem 265, 5573-8.

Litvinov, S.V. and Hilkens, J. (1993) The epithelial sialomucin, episialin, is sialylated during recycling. *J Biol Chem* 268, 21364-71.

Low, N.M., Holliger, P.H. and Winter, G. (1996) Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J Mol Biol* 260, 359-68.

Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D. and Winter, G. (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222, 581-97.

Marks, J.D., Tristem, M., Karpas, A. and Winter, G. (1991) Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes. *Eur J Immunol* 21, 985-91.

Marks, J.D., Ouwehand, W.H., Bye, J.M., Finnern, R., Gorick, B.D., Voak, D., Thorpe, S.J., Hughes-Jones, N.C. and Winter, G. (1993) Human antibody fragments specific for human blood group antigens from a phage display library. *Biotechnology (N Y)* 11, 1145-9.

Maurizi, M.R. (1992) Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia* 48, 178-201.

McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. and Chiswell, D.J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-4.

McCafferty, J., Fitzgerald, K.J., Earnshaw, J., Chiswell, D.J., Link, J., Smith, R. and Kenten, J. (1994) Selection and rapid purification of murine antibody fragments that bind a transition-state analog by phage display. *Appl Biochem Biotechnol* 47, 157-71; discussion 171-3.

Meerman, H.J. and Georgiou, G. (1994) Construction and characterization of a set of *E. coli* strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Biotechnology (N Y)* 12, 1107-10.

Miller, R.A. (1982) Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *New Engl J Med* 306, 517-522.

Neuberger, M.S., Williams, G.T. and Fox, R.O. (1984) Recombinant antibodies possessing novel effector functions. *Nature* 312, 604-8.

Nossal, G.J. (1989) Immunologic tolerance: collaboration between antigen and lymphokines. *Science* 245, 147-53.

Padlan, E.A. (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 31, 169-217.

Parmley, S.F. and Smith, G.P. (1988) Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73, 305-18.

Pasqualini, R. and Ruoslahti, E. (1996) Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 380, 364-6.

Persson, M.A., Caothien, R.H. and Burton, D.R. (1991) Generation of diverse high-affinity human monoclonal antibodies by repertoire cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2432-6.

Peterson, J.A., Blank, E.W. and Ceriani, R.L. (1997) Effect of multiple, repeated doses of

radioimmunotherapy on target antigen expression (breast MUC-1 mucin) in breast carcinomas. *Cancer Res* 57, 1103-8.

Petrarca, C., Rughetti, A., Rahimi, H., D'Agostini, F., Turchi, V., Apollonj Ghetti, C., Scambia, G., Frati, L. and Nuti, M. (1996) Human antibodies against the polymorphic epithelial mucin in ovarian cancer patients recognise a novel sequence in the tandem repeat region. *Eur J Cancer* 32A, 2155-63.

Pietersz, G.A., Wenjun, L., Krauer, K., Baker, T., Wreschner, D. and McKenzie, I.F. (1997) Comparison of the biological properties of two anti-mucin-1 antibodies prepared for imaging and therapy. *Cancer Immunol Immunother* 44, 323-8.

Pluckthun, A. and Pack, P. (1997) New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology* 3, 83-105.

Polymenis, M. and Stollar, B.D. (1995) Single-chain anti-DNA FV. *Methods Mol Biol* 51, 265-79.

Porchet, N., Nguyen, V.C., Dufosse, J., Audie, J.P., Guyonnet-Duperat, V., Gross, M.S., Denis, C., Degand, P., Bernheim, A. and Aubert, J.P. (1991) Molecular cloning and chromosomal localization of a novel human tracheo- bronchial mucin cDNA containing tandemly repeated sequences of 48 base pairs. *Biochem Biophys Res Commun* 175, 414-22.

Price, M.R., Rye, P.D., Petrakou, E., Murray, A., Brady, K., Imai, S., Haga, S., Kiyozuka, Y., Schol, D., Meulenbroek, M.F., Snijdwint, F.G., von Mensdorff-Pouilly, S., Verstraeten, R.A., Kenemans, P., Blockzijl, A., Nilsson, K., Nilsson, O., Reddish, M., Suresh, M.R., Koganty, R.R., Fortier, S., Baronic, L., Berg, A., Longenecker, M.B., Hilgers, J. and et al. (1998) Summary report on the ISOBM TD-4 Workshop: analysis of 56 monoclonal antibodies against the MUC1 mucin. San Diego, Calif., November 17-23, 1996. *Tumour Biol* 19, 1-20.

Rath, S. and Devey, M.E. (1988) IgG subclass composition of antibodies to HBsAg in circulating immune complexes from patients with hepatitis B virus infections. *Clin Exp Immunol* 72, 164-7.

Reis, C.A., Hassan, H., Bennett, E.P. and Clausen, H. (1998) Characterization of a panel of monoclonal antibodies using GalNAc glycosylated peptides and recombinant MUC1. *Tumour Biol* 19, 127-33.

Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. and Winter, G. (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332, 323-7.

Rossi, F., Guilbert, B., Tonnelle, C., Ternynck, T., Fumoux, F., Avrameas, S. and Kazatchkine, M.D. (1990) Idiotypic interactions between normal human polyspecific IgG and natural IgM antibodies. *Eur J Immunol* 20, 2089-94.

Roussel, P., Lamblin, G., Lhermitte, M., Houdret, N., Lafitte, J.J., Perini, J.M., Klein, A. and Scharfman, A. (1988) The complexity of mucins. *Biochimie* 70, 1471-82.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schier, R., McCall, A., Adams, G.P., Marshall, K.W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R.S., Weiner, L.M., Marks, C. and Marks, J.D. (1996) Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular



evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J Mol Biol* 263, 551-67.

Schier, R., Bye, J., Apell, G., McCall, A., Adams, G.P., Malmqvist, M., Weiner, L.M. and Marks, J.D. (1996) Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J Mol Biol* 255, 28-43.

Schier, R., Balint, R.F., McCall, A., Apell, G., Larrick, J.W. and Marks, J.D. (1996) Identification of functional and structural amino-acid residues by parsimonious mutagenesis. *Gene* 169, 147-55.

Schol, D.J., Meulenbroek, M.F., Snijdwint, F.G., von Mensdorff-Pouilly, S., Verstraeten, R.A., Murakami, F., Kenemans, P. and Hilgers, J. (1998) 'Epitope fingerprinting' using overlapping 20-mer peptides of the MUC1 tandem repeat sequence. *Tumour Biol* 19, 35-45.

Shiau, Y.F., Kelemen, R.J. and Reed, M.A. (1990) Acidic mucin layer facilitates micelle dissociation and fatty acid diffusion. *Am J Physiol* 259, G671-5.

Shimizu, M., Tanimoto, H., Azuma, N. and Yamauchi, K. (1990) Growth inhibition of BALB/c 3T3 cells by a high-molecular-weight mucin-like glycoprotein of human milk fat globule membrane. *Biochem Int* 20, 147-54.

Siegel, D.L., Chang, T.Y., Russell, S.L. and Bunya, V.Y. (1997) Isolation of cell surface-specific human monoclonal antibodies using phage display and magnetically-activated cell sorting: applications in immunohematology. *J Immunol Methods* 206, 73-85.

Silber, K.R., Keiler, K.C. and Sauer, R.T. (1992) Tsp: a tail-specific protease that selectively degrades proteins with nonpolar C termini. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 295-9.

Skerra, A. and Pluckthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-41.

Skorko-Glonek, J., Lipinska, B., Krzewski, K., Zolese, G., Bertoli, E. and Tanfani, F. (1997) HtrA heat shock protease interacts with phospholipid membranes and undergoes conformational changes. *J Biol Chem* 272, 8974-82.

Smith, G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-7.

Spada, S., Krebber, C. and Pluckthun, A. (1997) Selectively infective phages (SIP). *Biol Chem* 378, 445-56.

Spiess, C., Beil, A. and Ehrmann, M. (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97, 339-47.

Stader, J.A. and Silhavy, T.J. (1990) Engineering *Escherichia coli* to secrete heterologous gene products. *Methods Enzymol* 185, 166-87.

Stathopoulos, C. (1998) Structural features, physiological roles, and biotechnological applications of the membrane proteases of the OmpT bacterial endopeptidase family: a micro-review. *Membr Cell Biol* 12, 1-8.

Strauch, K.L., Johnson, K. and Beckwith, J. (1989) Characterization of degP, a gene required for

proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *J Bacteriol* 171, 2689-96.

Thompson, J., Pope, T., Tung, J.S., Chan, C., Hollis, G., Mark, G. and Johnson, K.S. (1996) Affinity maturation of a high-affinity human monoclonal antibody against the third hypervariable loop of human immunodeficiency virus: use of phage display to improve affinity and broaden strain reactivity. *J Mol Biol* 256, 77-88.

Tomlinson, I.M., Cox, J.P., Gherardi, E., Lesk, A.M. and Chothia, C. (1995) The structural repertoire of the human V kappa domain. *Embo J* 14, 4628-38.

Van Ewijk, W., de Kruif, J., Germeraad, W.T., Berendes, P., Ropke, C., Platenburg, P.P. and Logtenberg, T. (1997) Subtractive isolation of phage-displayed single-chain antibodies to thymic stromal cells by using intact thymic fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3903-8.

Vasmatazis, G., Brower, R. and Delisi, C. (1994) Predicting immunoglobulin-like hypervariable loops. *Biopolymers* 34, 1669-80.

Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hodits, R.A., Wilton, J. and Johnson, K.S. (1996) Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library [see comments]. *Nat Biotechnol* 14, 309-14.

Vieira, J. and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol* 153, 3-11.

von Mensdorff-Pouilly, S., Verstraeten, A.A., Kenemans, P., Snijdwint, F.G., Kok, A., Van Kamp, G.J., Paul, M.A., Van Diest, P.J., Meijer, S. and Hilgers, J. (2000) Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin. *J Clin Oncol* 18, 574-83.

von Mensdorff-Pouilly, S., Petrakou, E., Kenemans, P., van Uffelen, K., Verstraeten, A.A., Snijdwint, F.G., van Kamp, G.J., Schol, D.J., Reis, C.A., Price, M.R., Livingston, P.O. and Hilgers, J. (2000) Reactivity of natural and induced human antibodies to MUC1 mucin with MUC1 peptides and *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) peptides. *Int J Cancer* 86, 702-12.

Watt, R.A., Shatzman, A.R. and Rosenberg, M. (1985) Expression and characterization of the human *c-myc* DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* 5, 448-56.

White, C.B., Chen, Q., Kenyon, G.L. and Babbitt, P.C. (1995) A novel activity of OmpT. Proteolysis under extreme denaturing conditions. *J Biol Chem* 270, 12990-4.

Williams, S.C., Frippiat, J.P., Tomlinson, I.M., Ignatovich, O., Lefranc, M.P. and Winter, G. (1996) Sequence and evolution of the human germline V lambda repertoire. *J Mol Biol* 264, 220-32.

Winter, G. and Milstein, C. (1991) Man-made antibodies. *Nature* 349, 293-9.

Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. and Hoogenboom, H.R. (1994) Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12, 433-55.

Xing, P.X., Prenzoska, J., Quelch, K. and McKenzie, I.F. (1992) Second generation anti-MUC1 peptide monoclonal antibodies. *Cancer Res* 52, 2310-7.

Yang, W.P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A.T., Burton, D.R. and Barbas, C.F., 3rd. (1995) CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J Mol Biol* 254, 392-403.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-19.

Zabarovsky, E.R. and Winberg, G. (1990) High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria. *Nucleic Acids Res* 18, 5912.

Zacher, A.N.d., Stock, C.A., Golden, J.W.d. and Smith, G.P. (1980) A new filamentous phage cloning vector: fd-tet. *Gene* 9, 127-40.

Zafiropoulos, A., Andersson, E., Krambovitis, E. and Borrebaeck, C.A. (1997) Induction of antigen-specific isotype switching by in vitro immunization of human naive B lymphocytes. *J Immunol Methods* 200, 181-90.

Zafiropoulos, A., Kandilogiannaki, M., Dahlenborg, C., Borrebaeck, C.A. and Krambovitis, E. (2000) In vitro induction of somatic mutations in human peripheral B lymphocytes. *Int J Mol Med* 6, 475-484.

## Λεξιλόγιο αγγλικών όρων

<b>ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity)</b> κυτταροτοξικότητας	Κυτταρο-μεσολαβητικής  που εξαρτάται από αντισώματα Συγγένεια σθένους
<b>Avidity</b>	
<b>CDR (Complementarity Determining Region)</b> συμπληρωματικότητας	Περιοχή καθορισμού
<b>cfus (colony forming units)</b> σχη-	Μονάδα μέτρησης ιικού φορτίου μέσω  ματισμού βακτηριακών αποικιών
<b>CH</b>	Σταθερή περιοχή της βαριάς αλυσίδας
<b>CL (κ or λ)</b> (κ ή	Σταθερή περιοχή της ελαφριάς αλυσίδας  λ)
<b>Combinatorial diversity</b>	Συνδυαστική ποικιλομορφία
<b>D (diversity)</b>	D κομμάτι της VH περιοχής
<b>Diabody</b>	scFv αντίσωμα διπλής ειδικότητας
<b>DNA fingerprinting</b>	Γενετικό αποτύπωμα
<b>Dot blot</b> μορφή	Αποτύπωση πρωτεϊνών ή DNA σε  κουκίδα
<b>Electrocompetent cells</b> ηλεκτρομετασχημα-	Κύτταρα επιδεκτικά σε  τισμό
<b>Electroelution</b>	Εκλουση με χρήση ηλεκτρικού πεδίου
<b>Electroporation</b> ηλεκτρικού	Μετασχηματισμός με εφαρμογή  πεδίου
<b>ELISA (Enzyme linked Immuno-Sorbent Assay)</b>	Ανοσοενζυμική μέθοδος
<b>Fab</b>	Fv περιοχή μαζί με τη CL και τη CH1 περιοχή
<b>FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)</b> ενεργοποιείται	Κυτταρομετρητής ροής που  με φθορισμό
<b>Fc</b> απο-	Σταθερή περιοχή του αντισώματος που

	τελείται από τις CH2-CH4(5) περιοχές
<b>FR (Framework Region)</b>	Περιοχή-πλαίσιο
<b>Fv</b>	Μεταβλητή περιοχή σύνδεσης του
αντιγόνου	
<b>Gel filtration chromatography</b>	Χρωματογραφία φιλτραρίσματος μέσω
	πηκτής
<b>HAMA (Human Anti-Mouse Antibody) Response</b>	Ανθρώπινη αντιπρωκτική απάντηση
<b>Ig (Immunoglobulin)</b>	Ανοσοσφαιρίνη
<b>Indirect epitope fingerprinting</b>	Έμμεση ταυτοποίηση επιτόπου
<b>Input</b>	Το μέγεθος της βιβλιοθήκης πριν την
επιλογή	
<b>Intergenic region (IG)</b>	Διαγονιδιακή περιοχή
<b>JH</b>	J κομμάτι της VH περιοχής
<b>Junctional diversity</b>	Ποικιλομορφία σύνδεσης
<b>JL (κ, λ)</b>	J κομμάτι της VL περιοχής (κ, λ)
<b>Leader sequence-S (signal peptide)</b>	Ακολουθία Οδηγητής (πεπτιδίο-σήμα)
<b>Metal affinity chromatography</b>	Χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου
<b>Mucins (MUC)</b>	Βλεννίνες
<b>Multicopy plasmid</b>	Πλασμίδιο πολλαπλών αντιγράφων
<b>Off rate</b>	Ταχύτητα αποσύνδεσης από το
αντιγόνο	
<b>On rate</b>	Ταχύτητα σύνδεσης στο αντιγόνο
<b>ORF (Open Reading Frame)</b>	Ανοικτό Πλαίσιο Διαβάσματος
<b>Output</b>	Το μέγεθος της βιβλιοθήκης μετά την
επιλογή	
<b>PAGE (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis)</b>	Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή
Πολυακρυλαμίδης	
<b>PCR (Polymerase Chain Reaction)</b>	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
<b>PCR assembly</b>	PCR σύνδεσης
<b>pfus (plaque forming units)</b>	Μονάδα μέτρησης ιικού φορτίου μέσω
	δημιουργίας βακτηριακών πλακών
<b>Phage display</b>	Παρουσίαση στην επιφάνεια φάγων
<b>RBS (Ribosome Binding Site)</b>	Θέση σύνδεσης του ριβοσώματος
<b>RT (Reverse Transcription)</b>	Αντίστροφη Μεταγραφή
<b>scFv (single chain Fv)</b>	Fv περιοχή μονής αλυσίδας
<b>Valency</b>	Σθένος

**VH**  
αλυσίδα

**VL (κ, λ)**  
αλυσίδα

**VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)**

**Western blot**

**YACs (Yeast artificial chromosomes)**

Μεταβλητή περιοχή της βαρίας

Μεταβλητή περιοχή της ελαφριάς

(κ, λ)

Μεταβλητός Αριθμός Σειριακών Επανα-  
λήψεων

Αποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western

Τεχνητά χρωμοσώματα ζύμης

## Παράρτημα Α-Υλικά

### Θρεπτικά υλικά

**2xTY (1lt):** 16gr βακτο-τρουπτόνη

10gr κατεργασμένη ζύμη

5gr NaCl, pH 7

**LB (1lt):** 10gr βακτο-τρουπτόνη

5gr κατεργασμένη ζύμη

5gr NaCl, pH 7

### Διάλυμα ηλεκτροφόρησης κομματιών DNA σε πηκτή αγαρόζης

**50x TAE (1lt):** 242gr Tris βάση

57,1ml CH<sub>3</sub>COOH

100ml 0,5M EDTA (pH 8)

### Διάλυμα φορτώματος κομματιών DNA σε πηκτή αγαρόζης

**Πορτοκαλί διάλυμα 10x:** 100mM EDTA, pH 8

87% γλυκερόλη

Χρωστική orange G

**Μπλε διάλυμα 6x:** 0,25% βρωμοφαινόλη μπλε

0,25% xylene cyanol

30% γλυκερόλη

### Διάλυμα φορτώματος κομματιών DNA σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

**Μπλε διάλυμα:** 0,25% βρωμοφαινόλη μπλε

0,25% xylene cyanol σε TE, pH 7,5

### Διάλυμα φορτώματος πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

**Διάλυμα SDS 5x :** 12,5% SDS

25% β-μερκαπτοαιθανόλη

0,05% βρωμοφαινόλη μπλε (bromphenol blue)

### Διαλύματα ενζυμικών αντιδράσεων

**AmpliTaq DNA πολυμεράση (ROCHE)**

Διάλυμα 10x: 100mM Tris-HCl, pH 8,3  
500mM KCl

**Taq DNA πολυμεράση (GIBCOBRL)**

Διάλυμα 10x: 200mM Tris-HCl, pH 8,4  
500mM KCl

**MMLV RT (GIBCOBRL)**

Διάλυμα 5x: 250mM Tris-HCl, pH 8,3  
375mM KCl  
15mM MgCl<sub>2</sub>

**ApaLI (NEB)**

Διάλυμα 10x: 500mM CH<sub>3</sub>COOK  
200mM Tris acetate  
100mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg  
10mM DTT, pH 7,9

**BstEII (NEB)**

Διάλυμα 10x: 500mM Tris-HCl, pH 7,9  
100mM MgCl<sub>2</sub>  
1000mM NaCl  
10mM DTT

**SfiI (MINOTECH)**

Διάλυμα 10x: 100mM Tris-HCl, pH 7,9  
100mM MgCl<sub>2</sub>  
500mM NaCl  
10mM DTT

**NotI (MINOTECH)**

Διάλυμα 10x: 100mM Tris-HCl, pH 7,9  
100mM MgCl<sub>2</sub>  
1500mM NaCl  
1% Triton X-100

**BstNI (MINOTECH)**

Διάλυμα 10x: 100mM Tris-HCl, pH 7,9  
100mM MgCl<sub>2</sub>  
500mM NaCl  
10mM DTT

**T4 DNA δεσμάση(NEB)**

Διάλυμα 10x: 500mM Tris-HCl, pH 7,8



100mM MgCl<sub>2</sub>  
100mM DTT  
10mM ATP  
250μg/ml BSA

## **Διαλύματα για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA**

**P1:** 50mM Tris-HCl  
10mM EDTA, pH 8 (100μg/ml Rnάση A)

**P2:** 200mM NaOH  
1% SDS

**P3:** 3M CH<sub>3</sub>COOK, pH 5,5 (CH<sub>3</sub>COOH)

**QBT:** 750mM NaCl  
50mM MOPS  
15% αιθανόλη  
0,15% Triton X-100, pH 7

**QC:** 1M NaCl  
50mM MOPS  
15% αιθανόλη, pH 7

**QF:** 1,25M NaCl  
50mM Tris-HCl  
15% αιθανόλη, pH 8,5

**TE:** 10mM Tris-HCl  
1mM EDTA, pH 8

## **Διαλύματα για την ELISA**

**PBS:** 0,150mM NaCl  
10mM PB, pH 7,4

**PB:** 87gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (500ml)  
34,5 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (250ml), pH 7,4

**Χρωμογόνο (1lt):** 16,4gr CH<sub>3</sub>COONa  
2,64ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Υπόστρωμα (1lt):** 26,56gr κιτρικό οξύ  
10gr μανιτόλη  
600mg τετρα-μεθυλ-βενζιδίνη (TMB)

## **Διαλύματα για απομόνωση πρωτεϊνών από κλώνες χρωματογραφίας μετάλλου**

**Sonication διάλυμα (TALON):** 20mM Tris-HCl, pH 8  
100mM NaCl

**Διάλυμα πλυσίματος (TALON):** 20mM Tris-HCl, pH 8  
100mM NaCl  
10-15mM ιμιδαζόλη

**Διάλυμα έκλουσης (TALON):** 20mM Tris-HCl, pH 8  
100mM NaCl  
50mM ιμιδαζόλη (μονομερή)  
100mM ιμιδαζόλη (διμερή)

**Διάλυμα λύσης (QIAGEN):** 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8  
30mM NaCl  
10mM ιμιδαζόλη

**Διάλυμα πλυσίματος (QIAGEN):** 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8  
30mM NaCl  
20mM ιμιδαζόλη

**Διάλυμα έκλουσης(QIAGEN):** 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8  
30mM NaCl  
250mM ιμιδαζόλη

## **Διαλύματα για ανάλυση πρωτεϊνών κατά western ή σε dot blotting**

**Διάλυμα μεταφοράς:** 25mM Tris-HCl, pH 8,3  
192 mM γλυκίνη  
20% μεθανόλη

**TBS:** 20mM Tris-HCl, pH 7,5  
500mM NaCl

**Διάλυμα μπλοκαρίσματος:** 3% ζελατίνη (TBS)

**Διάλυμα πλυσίματος:** 0,05% Tween (TBS)

**Διάλυμα πρώτου αντισώματος:** 0,1% ζελατίνη, 0,05% Tween (TBS)

**Διάλυμα δεύτερου αντισώματος:** 1% ζελατίνη, 0,05% Tween (TBS)

## **Διαλύματα για την ανίχνευση της αλκαλικής φωσφατάσης**

**Διάλυμα A (1ml):** 30mg Nitro Blue tetrazolium  
0,7ml DMF (dimethylformamide)  
0,3ml H<sub>2</sub>O

**Διάλυμα Β (1ml):** 15mg BCIP (5-Bromo-4chloro-3-indolyl phosphate)  
1ml DMF

**Καρβονικό διάλυμα:** 0,1M NaHCO<sub>3</sub>  
1mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,8

**Διάλυμα εμφάνισης:** Διάλυμα Α (1ml)  
Διάλυμα Β (1ml)  
100ml καρβονικό διάλυμα

## Παράρτημα Β-Ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές

### Ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές για την κατασκευή ανθρώπινων αντισωμάτων με τη μορφή Fab

#### ***VH 5' εκκινητές***

VH 1/5/7 SfiI	GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC <b>SAG RTG CAG CTG GTG CAG TCT GG</b>
VH 2 Sfi I	GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC <b>CAG RTC ACC TTG ARG GAG TCT GG</b>
VH 3 Sfi I	GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC <b>SAG GTG CAK CTG KTG GAG WCT</b>
VH 4 Sfi I	GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC <b>CAG STG CAG CTG CAG SAG TSG GGC</b>
VH 6 Sfi I	GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC <b>CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG</b>

#### ***CH 3' εκκινητής***

CH NotI	CCA CGA TTC TGC GGC CGC <b>ACA AGA TTT GGG CTC AAC TBT CTT GTC CAC CTT GGT</b>
------------	--

#### ***JH 3' εκκινητής***

JH univ.	CTG AGG AGA CGG TGA CCA
-------------	-------------------------

#### ***Vκ 5' εκκινητές***

Vκ 1 ApaLI	CAT GAC CAC AGT GCA CTC <b>RHC ATC YRG WTG ACC CAG TCT CC</b>
Vκ 2/4 ApaLI	CAT GAC CAC AGT GCA CTC <b>GAT RTT GTG ATG ACC CAG WCT CC</b>
Vκ 3/6 ApaLI	CAT GAC CAC AGT GCA CTC <b>GAW RTT GTG WTG AYG CAG TCT CC</b>
Vκ 5 ApaLI	CAT GAC CAC AGT GCA CTC <b>GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC</b>

#### ***Cκ 3' εκκινητής***

Cκ AseI	ACC GCC TCC ACC GGG CGC GCC TTA TTA <b>ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT</b>
------------	--

**VL 5' εκκινητές**

Vλ1 ApaLI	CAT GAC CAC AGT GCA CTC <b>CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CCC</b>
Vλ2 ApaLI	CAT GAC CAC AGT GCA CTC <b>CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT</b>
Vλ3α ApaLI	CAT GAC CAC AGT GCA CTC <b>TCC TAT GWG CTG AYK CAG CYA CY</b>
Vλ3β ApaLI	CAT GAC CAC AGT GCA CTC <b>TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC</b>
Vλ4 ApaLI	CAT GAC CAC AGT GCA CTC <b>CWG CYT GTG CTG ACT CAG YCC YCC</b> <b>TCT</b>
Vλ5/9/ 10 ApaLI	CAT GAC CAC AGT GCA CTC <b>CAG SCT GKG CTG ACT CAG CCR</b>
Vλ6 ApaLI	CAT GAC CAC AGT GCA CTC <b>AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA</b>
Vλ7/8 ApaLI	CAT GAC CAC AGT GCA CTC <b>CAG RCT GTG GTG ACT CAG GAG CC</b>

**CL 3' εκκινητής**

CL Ascl	ACC GCC TCC ACC GGG CGC GCC TTA TTA <b>TGA ACA TTC YGT AGG</b> <b>GGC MAC</b>
------------	--

**5' εκκινητής για το ενδιάμεσο κομμάτι**

Fa b LINK 5'	<b>TAA TAA GGC GCG CCC GGT GGA GGC GGT</b> AAT TCT ATT TCA AGG AGA CAG T
-----------------	---

**3' εκκινητής για το ενδιάμεσο κομμάτι**

Fa b LINK 3'	<b>ABC TSG</b> GCC ATG GCC GGC TGG GCC GC
-----------------	---

**Ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές για την κατασκευή ανθρώπινων αντισωμάτων****με τη μορφή scFv****Sfil 5' εκκινητής**

Sfil univ.	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG
---------------	---

**Vκ 5' εκκινητές**

1	Vκ	GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG <b>RHC ATC YRG WTG ACC CAG</b> <b>TCT CC</b>
2/4	Vκ	GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG <b>GAT RTT GTG ATG ACC CAG</b> <b>WCT CC</b>
3/6	Vκ	GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG <b>GAW RTT GTG WTG AYG CAG</b> <b>TCT CC</b>
5	Vκ	GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG <b>GAA ACG ACA CTC ACG CAG</b> <b>TCT CC</b>

### **JK 3' ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ**

NotI	Jκ5	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC <b>ACG TTT AAT CTC CAG TCG</b> <b>TGT CCC</b>
univ. NotI	Jκ	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC <b>ACG TTT GAT MTC CAS CTT</b> <b>GGT CCC</b>

### **VL 5' ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ**

λ1	V	GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG <b>CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA</b> <b>CCC</b>
λ2	V	GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG <b>CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT</b>
λ3α	V	GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG <b>TCC TAT GWG CTG AYK CAG CYA</b> <b>CY</b>
λ3β	V	GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG <b>TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC</b> <b>CC</b>
λ4	V	GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG <b>CWG CYT GTG CTG ACT CAG YCC</b> <b>YCC TCT</b>
λ5/9/10	V	GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG <b>CAG SCT GKG CTG ACT CAG CCR</b>
λ6	V	GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG <b>AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC</b> <b>CA</b>
λ7/8	V	GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG <b>CAG RCT GTG GTG ACT CAG GAG</b> <b>CC</b>

### **JL 3' ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ**

NotI	Jλ1	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC <b>ACC TAG GAC GGT GAC CTT</b> <b>GGT</b>
univ. NotI	Jλ	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC <b>ACC TAG GAC GGT CAG CTK</b> <b>GGT</b>

**Ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές για την επέκταση και τον προσδιορισμό της ακολουθίας των κλωνοποιημένων γονιδίων στα φαγεμίδια pCANTAB-6 και pCES-**

**1**

**5' εκκινητής**

Pu c-reverse	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG
-----------------	--------------------------------

**3' εκκινητής**

Fd- tet-seq	TTT GTC GTC TTT CCA GAC GTT AGT
----------------	---------------------------------

Όπου R[A,G], Y[C,T], M[A,C], K[G,T], S[G,C] W[A,T], H[A,T,C], B[G,T,C]

## Παράρτημα Γ-Η στοίχιση scFvs - βλαστικών γονιδίων

```

12 13 14 15 16 17 18 19 20 21      1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11
Locus      10AVH      CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG
AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTC TCC
1-02      DP-75/VI-2...+

```

**CDR1**

```

31b 32 33 34 35 36 37 38 39 40      22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 31a
Locus      10AVH      TGC AAG GCT TCT GGA TAC AGC TTC ACC GAC ...
... TAC TAT ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCC
1-02      DP-75/VI-2...+

```

**CDR2**

```

52 52a 52b 52c 53 54 55 56 57 58      41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51
Locus      10AVH      CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC
AAC CCT ... .. AAG AGT GGC GGC ATA AAT
1-02      DP-75/VI-2...+

```

```

70 71 72 73 74 75 76 77 78 79      59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69
Locus      10AVH      TAT GCA CAG AAG TTT CAG GGC AGG GTC ACC ATG
ACC TGG GAC ACG TCC CTC AGC ACG GCC TAC
1-02      DP-75/VI-2...+

```

```

88 89 90 91 92 93 94      80 81 82 82a 82b 82c 83 84 85 86 87
Locus      10AVH      ATG GAC CTG AGC AGG CTG ACA TCT GCC GAT GCG
GCC GTA TAT TTT TGT GCG AGG
1-02      DP-75/VI-2...+

```

**CDR3**

```

110      95      100
Locus      10AVH      GAT TCG GGC AGC TCG TCT ACA GAT CAC TGG GGC
CAG GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCG AGT
6-06      D6-6/DN4      ..G .AT A.. ... ..C
JH3a      GAT G.. TTT ... GT. ... ..
..A ... .. .. .. ..T TCA

```

Εικόνα Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε κατά τον Chothia με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος που βρίσκεται στη διεύθυνση: <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/DNAPLOT.html>. A1) Η VH αλυσίδα του αντισώματος 10A ανήκει στην VH1 οικογένεια.



```

13 14 15 16 17 18 19 20 21 22      1  2  3  4  5  6  7  8  9 11 12
Locus      10AVL                CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CCC TCA GTG TCT
GCG GCC CCA GGA CAG AAG GTC ACC ATT TCC
1b          1b.366F5/DPL5...+    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

**CDR1**

```

31c 32 33 34 35 36 37 38 39 40      23 24 25 26 27 28 29 30 31 31a 31b
Locus      10AVL                TGC TCT GGA AGC ACC TCC AAC ATT GGG AAT AAT
... TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA
1b          1b.366F5/DPL5...+    --- --- --- --- -G- --- --- --- --- --- ---
... --- --A --- --- --- --G --- -T- ---

```

**CDR2**

```

51a 51b 51c 51d 51e 52 53 54 55 56      41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51
Locus      10AVL                GGC AAA GCC CCC AAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC
... ... ... ... ... AGT AAG CGG CCC TCA
1b          1b.366F5/DPL5...+    --A -C- --- --- --- --- C-C --- --- --C AAT
... ... ... ... ... -A- --- --A --- ---
1c          1c.10.2/DPL2...+
--- --- ---

```

```

68 68a 68b 69 70 71 72 73 74 75      57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67
Locus      10AVL                GGG GTC CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT
GGC ... ... AAC TCA GCC TCC CTG GAC ATC
1b          1b.366F5/DPL5...+    --- A-T --- --- --- --- --- --- --- --- ---
-- ... ... -CG --- --- A-- --- -G- ---
1c          1c.10.2/DPL2...+    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
-- ... ... -C- --- --- --- --- -C- ---

```

**CDR3**

```

87 88 89 90 91 92 93 94 95 95a      76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86
Locus      10AVL                AGT GGG CTC CAG TCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT
TAC TGT GCA GCA TGG GAT GAC AGC CTG AGT
1b          1b.366F5/DPL5...+    -CC --A --- --- A-- -G- --C --- --C --- ---
-- --C -G-
1c          1c.10.2/DPL2...+    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -A-

```

```

Locus      10AVL                95b          100
GTC CTA GGT                GAA TTT CTC TTC GGA ACT GGG ACC AAG CTG ACC
1c          1c.10.2/DPL2...+    -GT
JL1                T .A. G.. ... .. G.C ... ..
... .

```

A2) Η VL αλυσίδα του αντισώματος 10A ανήκει στην Vλ1 οικογένεια.

```

12 13 14 15 16 17 18 19 20 21      1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11
Locus      10BVH      GAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG
AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTC TCC
1-02      DP-75/VI-2...+      C-- --G --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

**CDR1**

```

31b 32 33 34 35 36 37 38 39 40      22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 31a
Locus      10BVH      TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACC GGG ...
... TAC TAT ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCC
1-02      DP-75/VI-2...+      --- --- --- --- --- --- --- --- --- -C ...

```

**CDR2**

```

52 52a 52b 52c 53 54 55 56 57 58      41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51
Locus      10BVH      CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC
AAC CCT ... AAC AGT GGT GAC ACT AAC
1-02      DP-75/VI-2...+      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

```

70 71 72 73 74 75 76 77 78 79      59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69
Locus      10BVH      AAT GCA CAG AAG TTT CAG GGC AGG GTC ACC ATG
ACC AGG GAC ACG TCC ATC AGC ACA GCC TAC
1-02      DP-75/VI-2...+      T-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

```

88 89 90 91 92 93 94 95      80 81 82 82a 82b 82c 83 84 85 86 87
Locus      10BVH      ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAC GAC ACG
GCC GTG TAT TAC TGT GCG ATA GAT TCG CAG
1-02      DP-75/VI-2...+      --- --- --- --- --G --- --- --- --- --- ---
6-06      D6-6/DN4
G. .TA .A. ...

```

**CDR3**

```

110      100
Locus      10BVH      CTC GTC CCC CAT TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC
TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCG AGT
6-06      D6-6/DN4      ... ..
JH6a      AT TA. T.C ... ..
... ..C

```

B1) Η VH αλυσίδα του αντισώματος 10B ανήκει στην VH1 οικογένεια.

```

13 14 15 16 17 18 19 20 21 22      1  2  3  4  5  6  7  8  9 11 12

```

```

Locus          10BVL          CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT
GGA TCT CGT GGA CAG TCG ATC ACC ATC TCC
2a2          2a2.272A12/DPL11...+
--G --- -C- ---

```

```

----- CDR1 -----
31c 32 33 34 35 36 37 38 39 40 23 24 25 26 27 28 29 30 31 31a 31b
Locus          10BVL          TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT GGT TAT
AAC TAT GTC TCT TGG TAC CAA CAG CAC CCA
2a2          2a2.272A12/DPL11...+
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
--C --- --- --- ---

```

```

----- CDR2 -----
51a 51b 51c 51d 51e 52 53 54 55 56 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51
Locus          10BVL          GGC AAA GCC CCC AAA CTC ATG ATT TAT CAG GTC
... ... ... ... ... AGT AAT CGG CCC TCA
2a2          2a2.272A12/DPL11...+
... ... ... ... ... --- --- --- --- --- --- --- G-- ---

```

```

68 68a 68b 69 70 71 72 73 74 75 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67
Locus          10BVL          GGG GTT TCT AAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT
GGC ... ... AAC ACG GCC TCC CTG ACC ATC
2a2          2a2.272A12/DPL11...+
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
... ... --- --- --- --- ---

```

```

----- CDR3 -----
87 88 89 90 91 92 93 94 95 95a 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86
Locus          10BVL          TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT
TAC TGC AAC TCA TAT ACG ACC ACC AAC AGT
2a2          2a2.272A12/DPL11...+
--- --- -G- --- --- -A -G- -G- -G- -C-

```

```

95b          100
TTT GTC TTC GGA ACT GGG ACC AAG GTC ACC GTC
CTA GGT
JL1          .A. ... ..
... .

```

B2) Η VL αλυσίδα του αντισώματος 10B ανήκει στην Vλ2 οικογένεια.

```

12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Locus          1CVH          CAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GCT GAG GTG
AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTC TCC
1-02          DP-75/VI-2...+
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

CDR1

```

22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 31a
31b 32 33 34 35 36 37 38 39 40
Locus 1CVH TGC AAG GCT TCT GGA TAC AGC TTC ACC GAC ...
... TAC TAT ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCC
1-02 DP-75/VI-2...+ --- --- --- --- --- --- -C- --- --- -G- ...
... --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

CDR2

```

41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51
52 52a 52b 52c 53 54 55 56 57 58
Locus 1CVH CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC
AAC CCT ... AAG AGT GGC GGC ATA AAT
1-02 DP-75/VI-2...+ --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -
-- --- ... --- --C --- --T --- -C- --C

```

```

59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69
70 71 72 73 74 75 76 77 78 79
Locus 1CVH TAT GCA CAG AAG TTT CAG GGC AGG GTC ACC ATG
ACC TGG GAC ACG TCC CTC AGC ACG GCC TAC
1-02 DP-75/VI-2...+ --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -
-- A-- --- --- --- A-- --- --A --- ---

```

```

80 81 82 82a 82b 82c 83 84 85 86 87
88 89 90 91 92 93 94
Locus 1CVH ATG GAC CTG AGC AGG CTG ACA TCT GCC GAT GCG
GCC GTA TAT TTT TGT GCG AGA
1-02 DP-75/VI-2...+ --- --G --- --- --- --- -G- --- -A- --C A-- -
-- --G --- -AC --- --- --- ---

```

CDR3

```

95 100
110
Locus 1CVH GAT TCG GGC AGC TCG TCT ACA GAT CAC TGG GGC
CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCG AGT
6-06 D6-6/DN4 ..G .AT A.. ... ..C
JH3a GAT G.. TTT ... GT. ... ...
... ..T TCA

```

Γ1) Η VH αλυσίδα του αντισώματος 1C ανήκει στην VH1 οικογένεια.

```

1 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
Locus 1CVL CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CCC TCA GTG TCT
GCG GCC CCA GGA CAG AAG GTC ACC ATT TCC
1b 1b.366F5/DPL5...+ --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -
-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

CDR1

```

                23 24 25 26 27 28 29 30 31 31a 31b
31c 32 33 34 35 36 37 38 39 40
Locus          1CVL          TGC TCT GGA AGC ACC TCC AAC ATT GGG AAT AAT
... TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA
1b              1b.366F5/DPL5...+ --- --- --- --- -G- --- --- --- ---
... --- -A- --- --- --- -G- --- -T- ---

```

**CDR2**

```

                41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51
51a 51b 51c 51d 51e 52 53 54 55 56
Locus          1CVL          GGC AAA GCC CCC AAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC
... ... .. AGT AAG CGG CCC TCA
1b              1b.366F5/DPL5...+ --A -C- --- --- --- --- C-C --- --- --C AAT
... ... .. -A- --- --A --- ---
1c              1c.10.2/DPL2...+
--- --- ---

```

```

                57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67
68 68a 68b 69 70 71 72 73 74 75
Locus          1CVL          GGC GTC CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT
GGC ... .. AAC TCA GCC TCC CTG GAC ATC
1b              1b.366F5/DPL5...+ --- A-T --- --- --- --- --- --- ---
-- ... .. -CG --- --- A-- --- -G- ---
1c              1c.10.2/DPL2...+ --- --- --- --- --- --- --- --- ---
-- ... .. -C- --- --- --- -C- ---

```

**CDR3**

```

                76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86
87 88 89 90 91 92 93 94 95 95a
Locus          1CVL          AGT GGG CTC CAG TCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT
TAC TGT GCA GCA TGG GAT GAC AGC CTG AGT
1b              1b.366F5/DPL5...+ -CC --A --- --- A-- -G- --C --- --C --- ---
-- --C -G-
1c              1c.10.2/DPL2...+ --- --- --- --- --- --- --- --- ---
--- --- --- --- --- --- --- --- -A-

```

```

                95b              100
Locus          1CVL          GAA TTT CTC TTC GGA ACT GGG ACC AAG CTG ACC
GTC CTA GGT
1c              1c.10.2/DPL2...+ GT
                JL1              T .A. G.. ... .. G.C ...
... .. .

```

Γ2) Η VL αλυσίδα του αντισώματος 1C ανήκει στην Vλ1 οικογένεια.

```

                1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
Locus          2CVH          CAA GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG
TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG TCT CTC ACC
4-34          DP-63/VH4.21...+ --G --- --- --- --- --- --- --- ---
--- --- --- --- --- --- --- --- -C- ---

```

**CDR1**

```

                22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 31a
31b 32 33 34 35 36 37 38 39 40
Locus          2CVH          TGC GCT GTG TAT GGT GAG TCC TTC AGT GGT ...
... TAC TAC TGG AGC TGG ATC CGC CAG TCT
4-34          DP-63/VH4.21...+ --- --- --C --- --- -G- --- --- --- ...
... --- --- --- --- --- --- --- C-C

```

```



---


                                CDR2
                41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51
52 52a 52b 52c 53 54 55 56 57 58
Locus          2CVH          CCA AGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC
ACT ... .. . . . CAT AGT GGA GAC ACC AAC
4-34          DP-63/VH4.21...+ --- G-- --- --- --- --- --- --- --- -
A- ... .. . . . --- --- --- AG- --- ---

```

```

                59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69
70 71 72 73 74 75 76 77 78 79
Locus          2CVH          TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC GCC ATT
TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC
4-34          DP-63/VH4.21...+ --- --- --- --- --- --- --- --- A-- --A -
--- --- --- --- --- --- --- ---

```

```

                80 81 82 82a 82b 82c 83 84 85 86 87
88 89 90 91 92 93 94
Locus          2CVH          CTG AAA CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCC GAC ACG
GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA
4-34          DP-63/VH4.21...+ --- --G --- --- --- --- --- --G --- --- -
--- --- --- --- --- --- --- ---

```

```



---


                                CDR3
                95                                100
110
Locus          2CVH          GAT CGC GGA GGG GTA TAC GGT ATG GAC GTC TGG
GGC CGG GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCG AGT
JH6b          .. TA. TAC TAC TAC ... .. . . . . . . . .
... .AA ... ..C .C. ... .. . . . .C TCA G

```

Δ1) Η VH αλυσίδα του αντισώματος 2C ανήκει στην VH4 οικογένεια.

```

                1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
Locus          2CVL          GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCT TCC ACC CTG
TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC
L12          L12a/PCRD16-5+ --- --- CA- --- --- --- --- --- --- ---
--- --- --- --- --- --- --- ---

```

```



---


                                CDR1
                22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 31a
31b 31c 31d 31e 31f 32 33 34 35 36
Locus          2CVL          ACC TGC CGG GCC AGT GAG GGT ATT TAT CAC ...
... .. . . . . . TGG TTG GCC TGG TAT

```

L12 L12a/PCRDil6-5+ --T --- --- --- --- C-- A-- --- AG- AG- ...  
 ... ..

**CDR2**

37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47  
 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57  
 Locus **2CVL** CAG CAG AAG CCA GGG AAA GCC CCT AAA CTC CTG  
 ATC TAT AAG GCC TCT AGT TTA GCC AGT GGG  
 L12 L12a/PCRDil6-5+ --- --- --A --- --- --- --- --G --- ---  
 --- --- --G --- --- --- -AA --- ---

58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68  
 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78  
 Locus **2CVL** GCC CCA CCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG  
 ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG  
 L12 L12a/PCRDil6-5+ -T- --- T-- --- --- --- --- --- ---  
 --- -A --- --- --- --- --- --- --- ---

**CDR3**

79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89  
 90 91 92  
 Locus **2CVL** CAG CCT GAT GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA  
 CAA TAT AGT AAT TAT CCG CTC ACT TTC GGC  
 L12 L12a/PCRDil6-5+ --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 -G --- -A- -G- --- T-  
 JK4  
 . . . . .

100  
**2CVL** GGA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA C  
 JK4 ... .. G.. .. .

Δ2) Η VL αλυσίδα του αντισώματος 2C ανήκει στην Vκ1 οικογένεια.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11  
 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21  
 Locus **3EVH** CAA GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGG GGA GGC TTG  
 GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC  
 3-30 COS-3/BHGH1+ --G --- --- --G GT- G-- -CT --- --- --- G-- --  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

**CDR1**

22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 31a  
 31b 32 33 34 35 36 37 38 39 40  
 Locus **3EVH** TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGT AGC ...  
 ... TAT TGG ATG AGC TGG GTC CGC CAA GCT  
 3-30 COS-3/BHGH1+ --- --- --G --- --- --- --- --C --- --- ...  
 ... --- G-C --- CA- --- --- --- --G ---

CDR2

52 52a 52b 52c 53 54 55 56 57 58 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51  
 Locus **3EVH** CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA TTT ATA  
 CGG TAT ... .. GAT GGA AGT AAT AAA TAC  
 3-30 COS-3/BHGH1+ --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 --- ... .. --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

CDR2

70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69  
 Locus **3EVH** TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC  
 TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT  
 3-30 COS-3/BHGH1+ --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

CDR2

88 89 90 91 92 93 94 80 81 82 82a 82b 82c 83 84 85 86 87  
 Locus **3EVH** CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG  
 GCT GTT TAT TAC TGT GCG AGA  
 3-30 COS-3/BHGH1+ --- --- --- --- --- --- --- --T --- --- ---  
 --- -G --- --- --- -A-

CDR3

110 95 100  
 Locus **3EVH** GTG GAT ACA GCT ATG GCC TTT GAC TTT GAC TAC  
 TGG GGG CGA AGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA  
 5-05 D5-5/DK4 ... .. .TT AC  
 JH4d GC T... ..  
 ... ..C .A. G.. ... CT. ... ..

E1) Η VH αλυσίδα του αντισώματος 3E ανήκει στην VH3 οικογένεια.

13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 1 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12  
 Locus **3EVL** CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CCC TCA GTG TCT  
 GCG GCC CCA GGA CAG AAG GTC ACC ATT TCC  
 1b 1b.366F5/DPL5...+ --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

CDR1

31c 32 33 34 35 36 37 38 39 40 23 24 25 26 27 28 29 30 31 31a 31b  
 Locus **3EVL** TGC TCT GGA AGC ACC TCC AAC ATT GGG AAT AAT  
 ... TAT GTC TCT TGG TAC CAA CAG CAC CCA  
 1b 1b.366F5/DPL5...+ --- --- --- --- -G- --- --- --- --- ---  
 ... --- --A --C --- --- --G --- -T- ---

CDR2

51a 51b 51c 51d 51e 52 53 54 55 56 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51



```

Locus      3EVL      GGC AAA GCC CCC AAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC
... .. AGT AAG CGG CCC TCA
1b      1b.366F5/DPL5...+  --A -C- --- --- --- --- C-C --- --- --C AAT
... .. -A- --- --A --- ---

57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67
68 68a 68b 69 70 71 72 73 74 75
Locus      3EVL      GGG GTC CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT
GGC ... .. AAC TCA GCC TCC CTG GAC ATC
1b      1b.366F5/DPL5...+  --- A-T --- --- --- --- --- --- --- --- -
-- ... .. -CG --- --- A-- --- -G- ---

----- CDR3 -----
87 88 89 90 91 92 93 94 95 95a
Locus      3EVL      AGT GGG CTC CAG TCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT
TAC TGT GCA GCA TGG GAT GAC AGC CTG AGT
1b      1b.366F5/DPL5...+  -CC --A --- --- A-- -G- --C --- --C --- --- -
-- --C -G-

95b      100
3EVL      GAA TTT CTC TTC GGA ACT GGG ACC AAG CTG ACC
GTC CTA G
JL1      T .A. G.. ... .. . . . . . . . . . . G.C ...
... .. .

```

E2) Η VL αλυσίδα του αντισώματος 3E ανήκει στην Vλ1 οικογένεια.

```

10A      1
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGWINPKSGGINY
          *****
*****
1C      1
QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGWINPKSGGINY

10A      61
AQKFQGRVTMTWDTSLSTAYMDLSRLTSADAAYVFCARDSGSSSTDHWGQGTMTVTVSSGG
*****
1C      61
AQKFQGRVTMTWDTSLSTAYMDLSRLTSADAAYVFCARDSGSSSTDHWGQGTMTVTVSSGG

          LINKER
10A      121
GGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAPKL
          **
*****
1C      121
GGTGGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAPKL

10A      181
MIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYCAAWDDSLSEFLFGTGTKL
*****
1C      181
MIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYCAAWDDSLSEFLFGTGTKL

10A      241   TVLG
          ****
1C      241   TVLG

```

Z) Η στοιχηση της αμινοξικής ακολουθίας των scFvs 10A—1C. Με έντονα γράμματα φαίνονται τα διαφορετικά αμινοξέα. Η οργάνωση των scFvs είναι: VH-Linker-VL.