

# Βιολογικοί δείκτες του Συστηματικού ερυθηματώδους λύκου Από τα αντισώματα στην Παθογένεια

Μια ιστορική μαρτυρία για την αυτοανοσία του ανθρώπου

Π.Γ.Βλαχογιαννόπουλος  
ΕΚΠΑ

# Γιατί ανασκοπούμε την ιστορία;

- Κατανόηση της παθογένειας των νόσων
- Κατανόηση της βιολογικής βάσης των διαγνωστικών τεχνικών
- Μαθήματα για τα μελλοντικά μας σχέδια προς αποκάλυψη της παθογένεσης των νόσων
- Αποκάλυψη κρυμμένων λεπτομερειών που γεφυρώνουν τα χάσματα της σύγχρονης γνώσης
- Κατανόηση της εξέλιξης των ιδεών στη Βιολογία και στην Ιατρική

# Θέματα που θα συζητηθούν

- Αντιπυρηνικά αντισώματα
- Αντισώματα κατά διπλής έλικας DNA
- Αντισώματα κατά εκχυλισμάτων πυρήνα [extractable nuclear antigens (ENAs)]
- Αντισώματα κατά φωσφολιπιδίων
- Συμπλήρωμα
- Κυτταροκίνες

# Αυτοανοσία αντί για «ανατριχιαστική αυτοτοξικότητα»: Η πάλη για ταυτότητα

P.Ehrlich



*Horror autotoxicus: Η απροθυμία του οργανισμού να αυτοκαταστραφεί παράγοντας τοξικά αυτοαντισώματα*

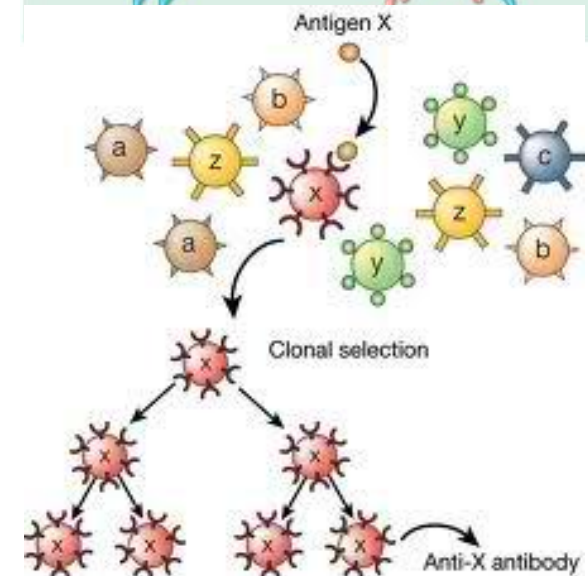
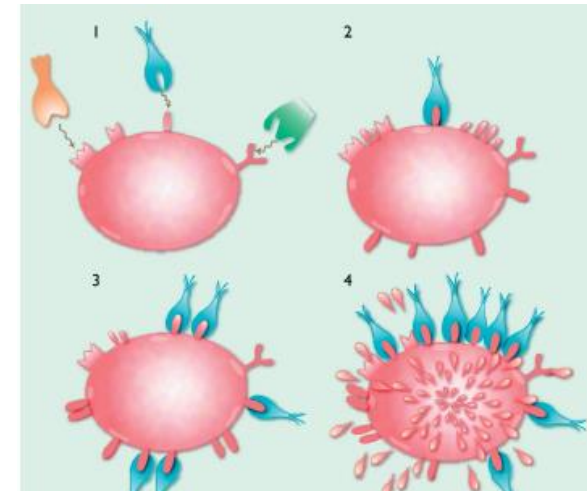
*Γιατί όμως αυτοαντισώματα παράγονται στα ζώα κατά του ιδίου του σπέρματός τους;*

Sir M. Burnett



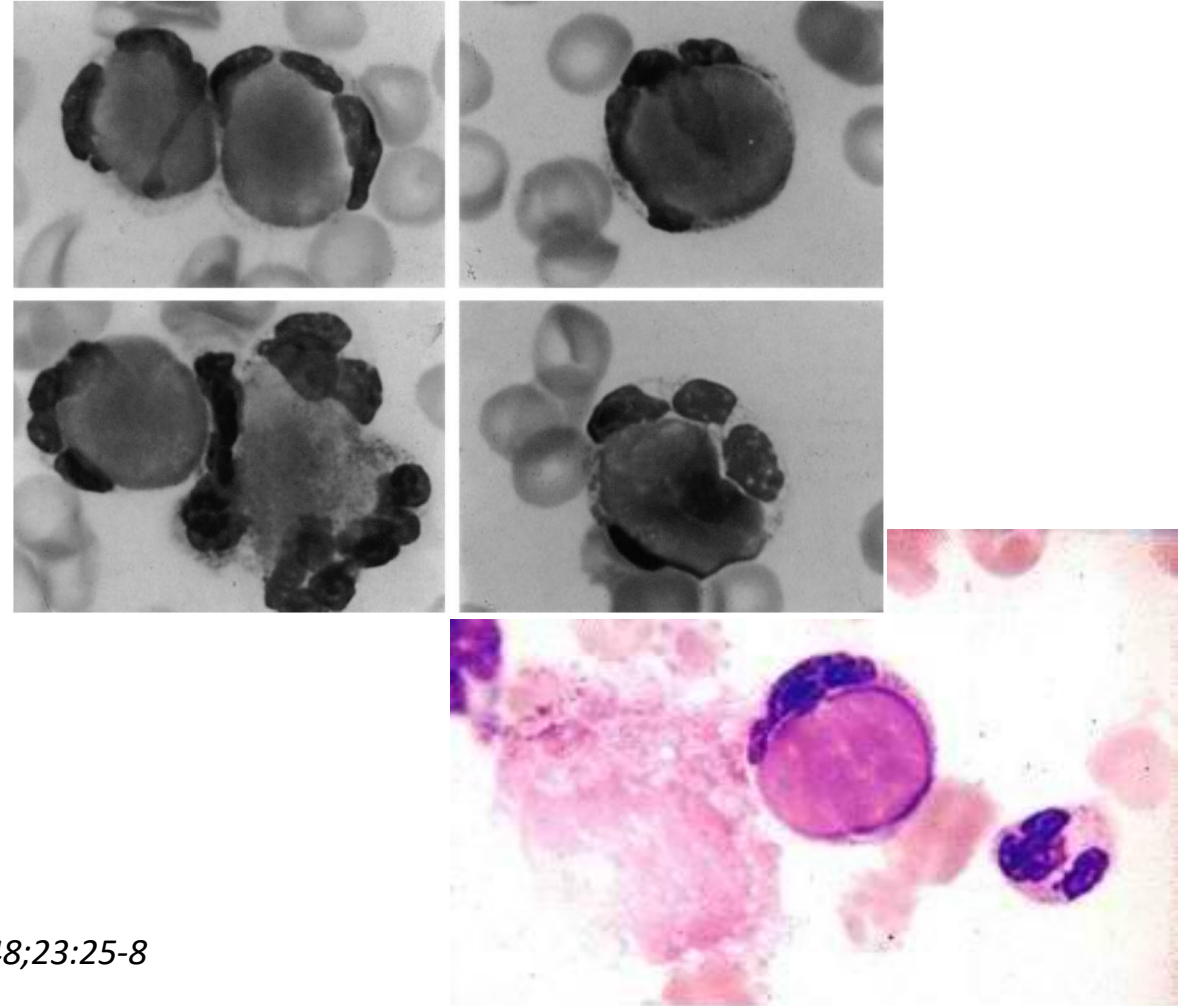
*Η απάντηση του Ehrlich: Αυτά δεν είναι αυτοτοξικά με την έννοια που το εννοώ εγώ επειδή δεν παράγουν νόσο*

*Silvestein A: Nature Immunology 2001;: 279*



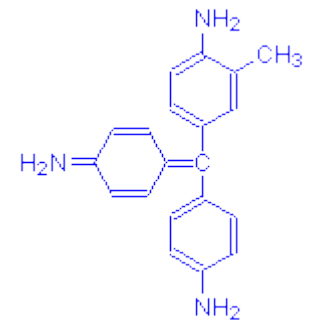
# Το «κύτταρο Λύκου»: Ένα *in vitro* φαινόμενο που οφείλεται σε συστατικά του ορού

- Τα πρώτα 3 περιστατικά:
- 9 χρονο παιδί με υπερ-γ σφαιριναιμία, πλασματοκυτάρωση και πρωτεϊνουρία Bence-Jones
- 9 χρονο παιδί με ανεξήγητη αναιμία και πορφύρα
- ένα αγόρι με κρυοσφαιριναιμία και πορφύρα



# Το «κύτταρο Λύκου»: Ένα *in vitro* φαινόμενο που οφείλεται σε συστατικά του ορού

- Υποθέσεις του Hargraves και συν. για τα κύτταρα Λύκου
  - Αυτόλυση ενός ή περισσότερων από τους λοβούς του πυρήνα του πολυμορφοπυρήνου, μάλλον κατά τη διαδικασία παρασκευής των επιχρισμάτων
  - Φαγοκυττάρωση ελεύθερου πυρηνικού υλικού ή ολόκληρου κυττάρου ενός άλλου κυττάρου που οδηγεί σε δημιουργία ενός κυστιδίου που περιέχει άμορφη ηωσινόφιλη ουσία
  - Γνωρίζω, λέει ο Hargraves, ότι αυτή η ουσία είναι πυρηνικό υλικό του κυττάρου και ιδιαίτερα DNA επειδή βάφεται με τη χρώση feulgen

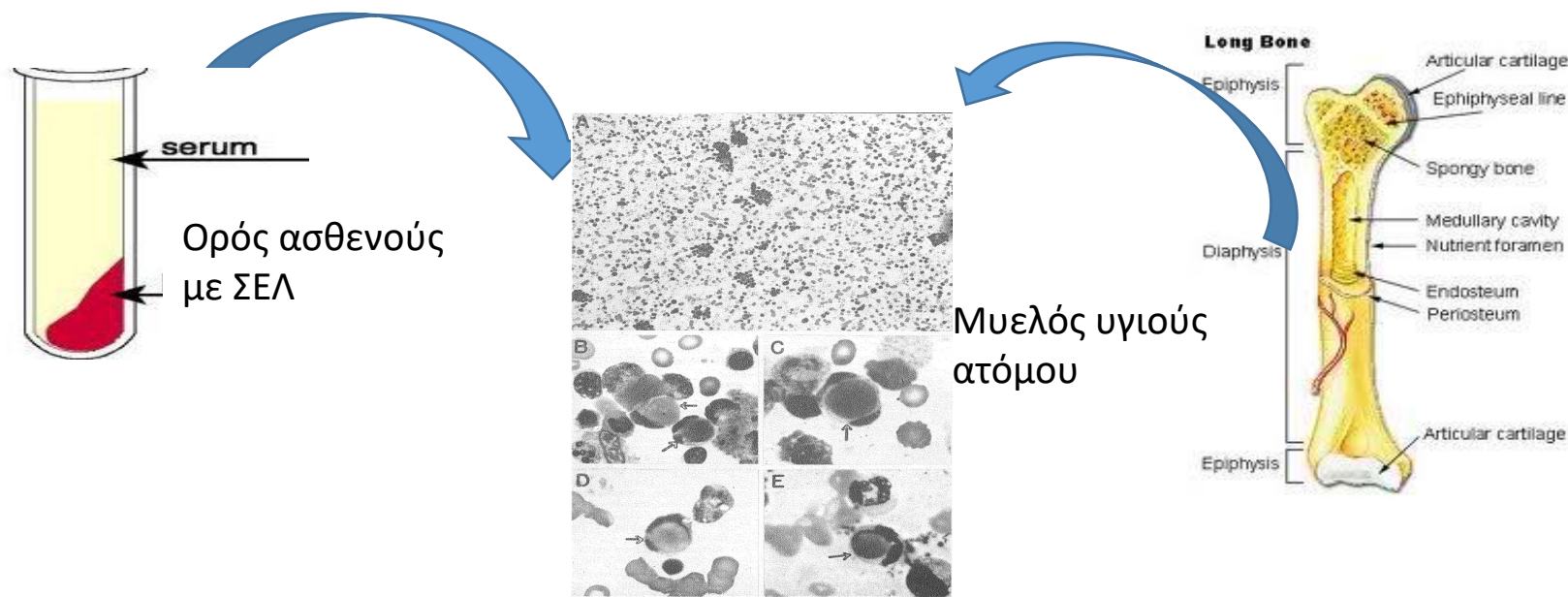


Χρώση feulgen

# Το «κύτταρο Λύκου»: Ένα *in vitro* φαινόμενο που οφείλεται σε συστατικά του ορού

Haserick και Bortz: Προσπάθησαν να απαντήσουν το εξής ερώτημα:

- Είναι τα κύτταρα λύκου φυσιολογικά φαινόμενα κυτταρικών εγκλείστων που οφείλονται στο πλάσμα των ασθενών;
- Μήπως δεν πρόκειται για μια Πρωτογενή κυτταρική ανωμαλία, αλλά για ένα artifact που οφείλεται στο πλάσμα των ασθενών;



# Το «κύτταρο Λύκου»: Ένα *in vitro* φαινόμενο που οφείλεται σε συστατικά του ορού

A. Συγκόλληση λευκών από το κλάσμα της γ σφαιρίνης πλάσματος ασθενών με ΣΕΛ

B→E: κύτταρα λύκου που προκύπτουν από μυελό φυσιολογικού ατόμου όταν αναμείχθηκε με το κλάσμα γ-σφαιρίνης ασθενών με ΣΕΛ

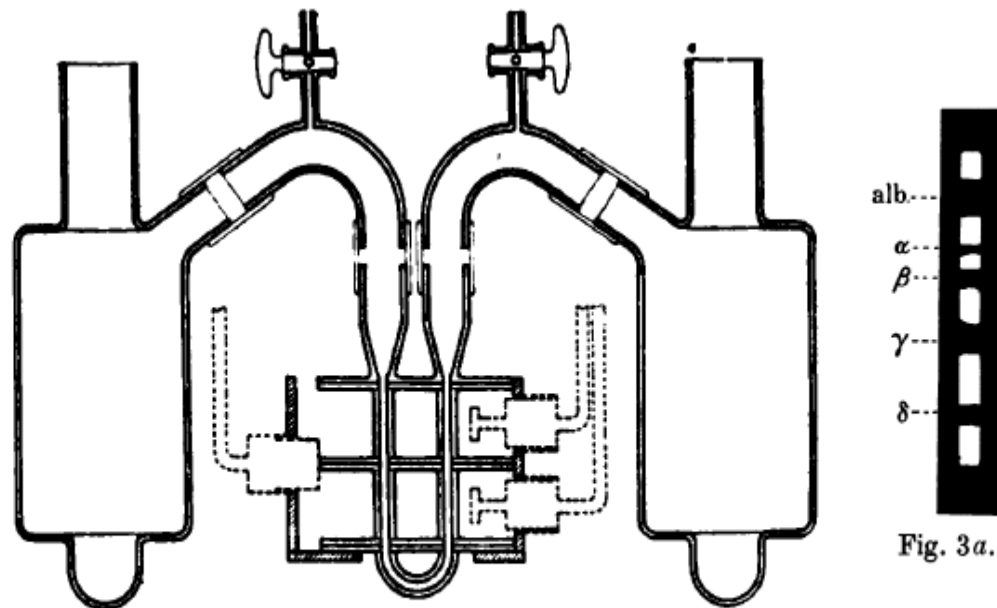
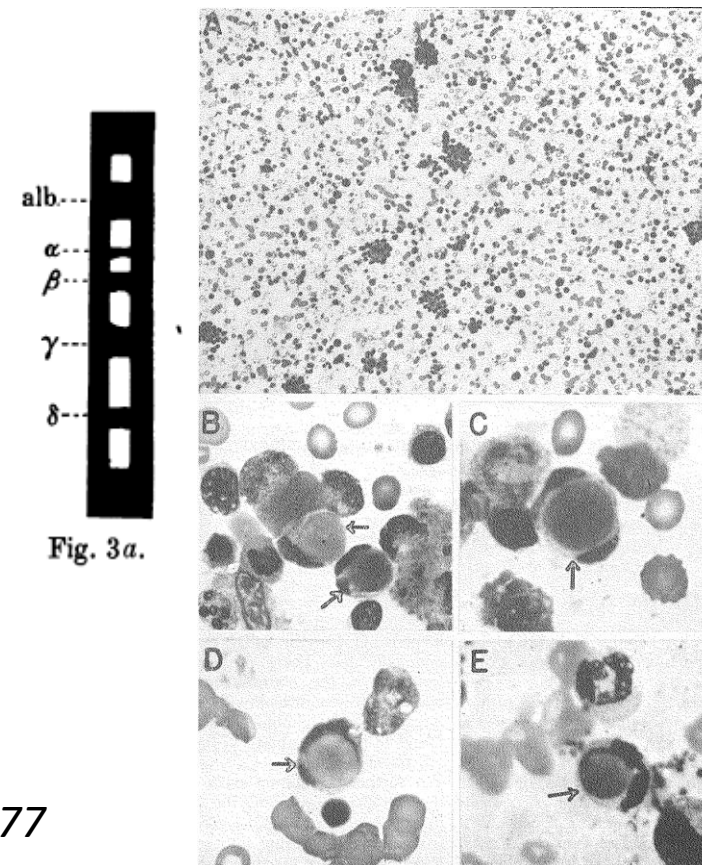


Fig. 1. Apparatus for electrophoretic analysis.

*Tiselius A Biochem J. 1937;31(9):1464-1477*



*Haserick JR et al, Am J Med. Sc., 1950; 219:660*



Ηλεκτροφόρηση αντι-ορού κατά αλβουμίνης αυγού  
έδειξε ότι όλο το αντίσωμα κινείται στην περιοχή των γ-  
σφαιρινών

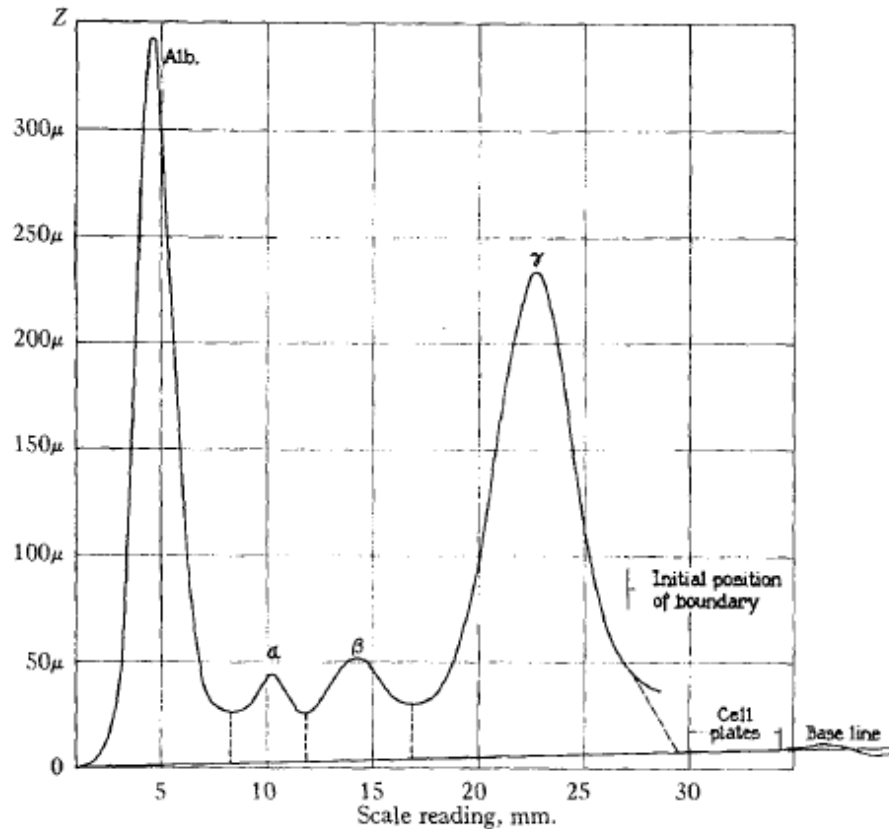


FIG. 1 a

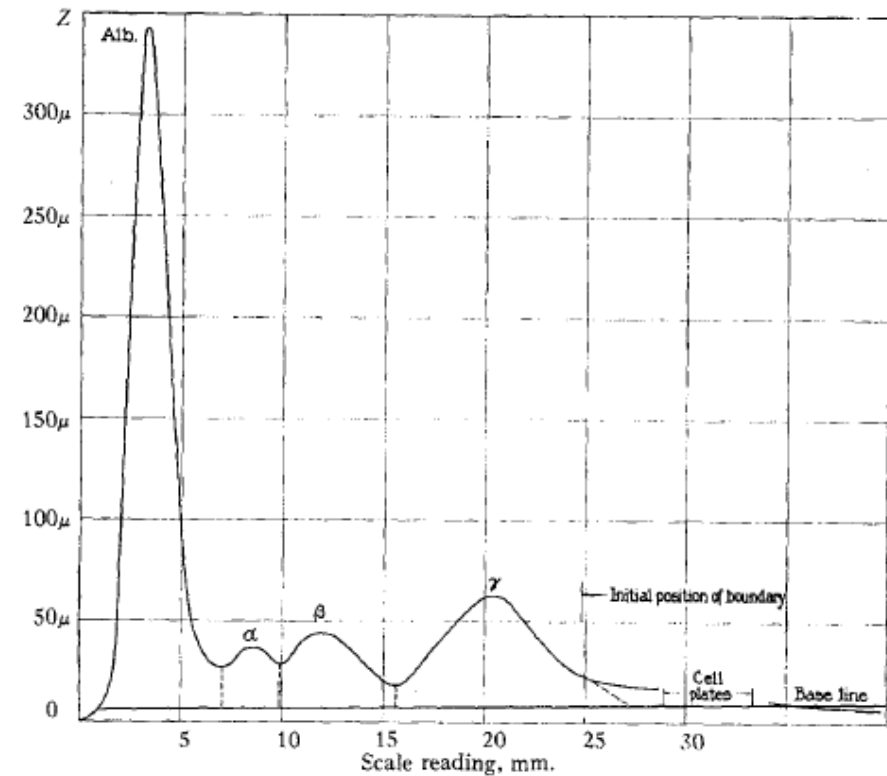


FIG. 1 b

*Tiselius A, and Kabat E. J Exp Med 1939;Jan, 1; 119-131*

Arne Tiselius



Henry Kunkel

Uppsala 1949-50

# Determination of gamma globulin as a specific plasma fraction inducing the leukocyte clumping

**TABLE 1-PLASMA FRACTIONS PRODUCING LEUKOCYTIC CLUMPING**

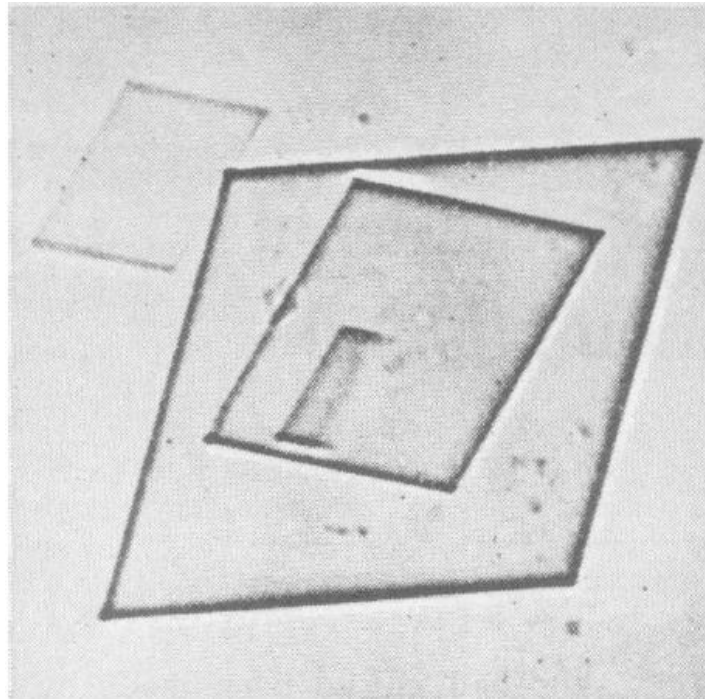
| Patients with SLE | Whole plasma | Albumin | Albumin, $\alpha$ and $\beta$ globulin | Gamma globulin | Gamma globulin and fibrinogen |
|-------------------|--------------|---------|----------------------------------------|----------------|-------------------------------|
| Mrs V.            | +            | 0       | 0                                      | +              | +                             |
| Miss S.           | +            | 0       | 0                                      | +              |                               |
| Miss H            | +            | 0       | 0                                      | +              |                               |
| Mrs L.            | +            | 0       |                                        | +              |                               |
| Mrs S.            | +            | 0       |                                        | +              |                               |

# Determination of gamma globulin as a specific plasma fraction inducing the LE cell

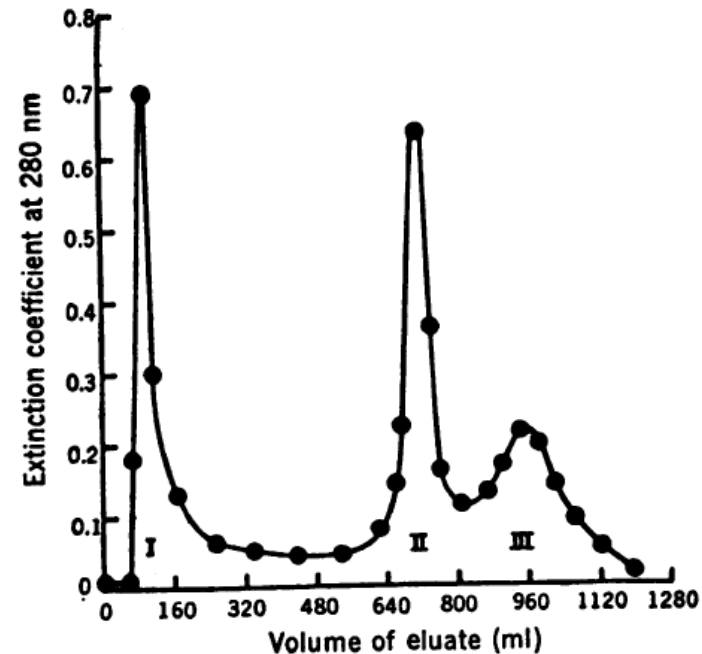
TABLE 2-PLASMA FRACTIONS PRODUCING THE LE CELL

| patient | Whole plasma | albumin | Albumin, $\alpha$ and $\beta$ globulin | Gamma globulin | Gamma globulin and fibrinogen |
|---------|--------------|---------|----------------------------------------|----------------|-------------------------------|
| Mrs V.  | +            | 0       | 0                                      | 0              | +                             |
| Miss S. | +            | 0       | 0                                      | +              |                               |
| Miss H  | +            | 0       | 0                                      | +              |                               |
| Mrs L.  | +            | 0       | 0                                      | +              |                               |
| Mrs S.  | +            | 0       |                                        | +              |                               |

Επώαση με παπαΐνη κόβει το καρβοξυτελικό τμήμα των μακρών αλυσίδων το οποίο κρυσταλλώνεται εύκολα (Fc=fragment crystalizable)



**Fig. 1.** Crystals formed from a papain digest of rabbit IgG, the Fc fragment.



**Fig. 2.** Fractionation of a papain digest of rabbit IgG on carboxymethyl cellulose in sodium acetate buffer at pH 5.5, with a gradient from 0.01 to 0.9M. Fractions I and II (Fab) carry the antibody combining sites, and fraction III (Fc) will crystallize easily.

Η ελαφρά αλυσος IgG κουνελιού αντιδρά μόνο κατά αντιορού κατσίκας εναντίον Fab, ενώ η βαριά αλυσίδα αντιδρά εναντίον αντιορών Fab και Fc

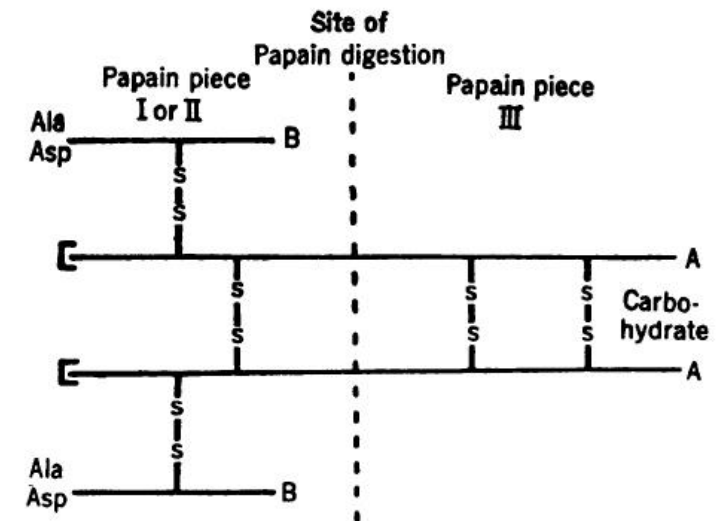
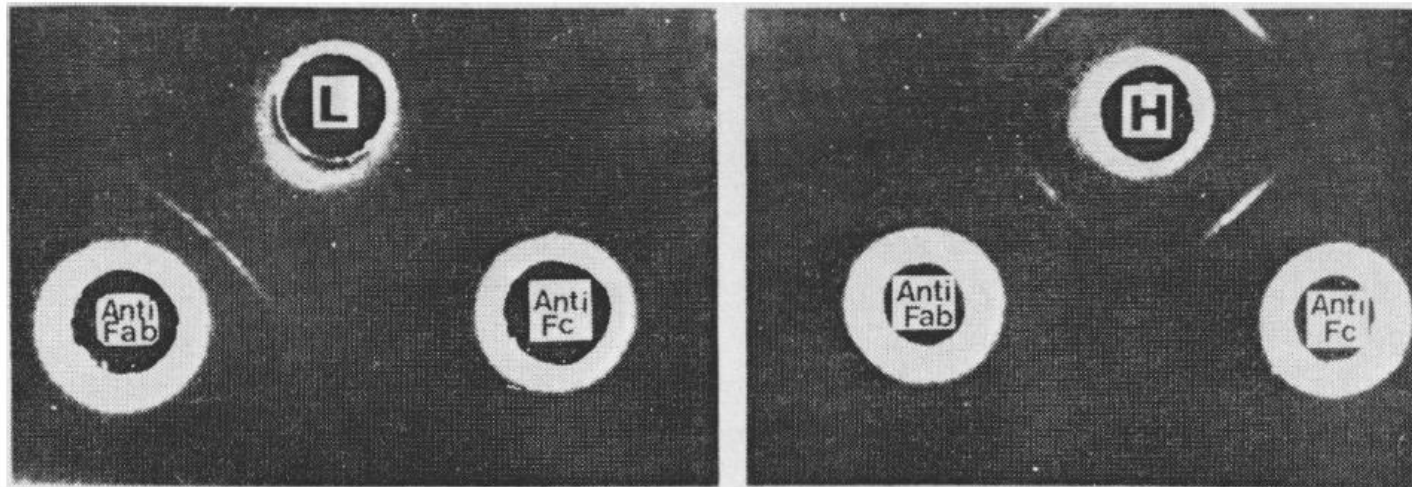
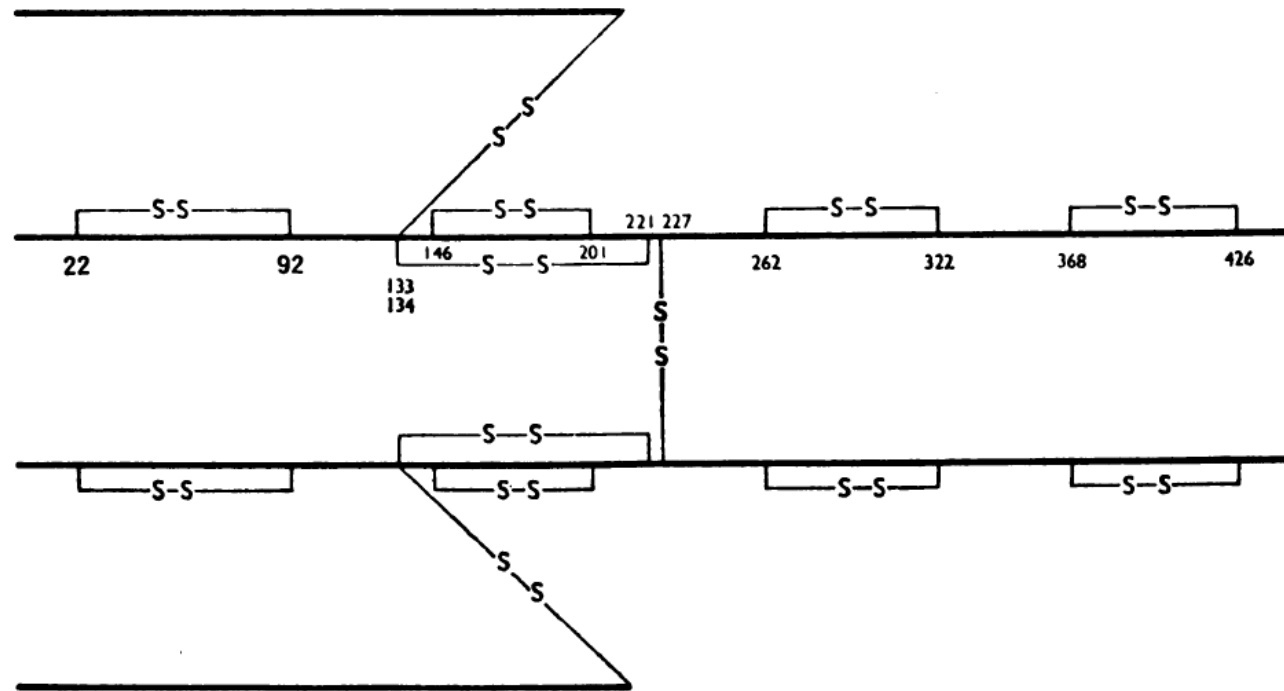


Fig. 3 (left). Double diffusion of the heavy and light chains of rabbit IgG against goat antiserum to rabbit Fab and goat antiserum to rabbit Fc. The light chain reacts only with antiserum to Fab while the heavy chain reacts with both antisera; that is, Fab contains parts of heavy and light chains while Fc contains only parts of the heavy chain. Fig. 4 (right). The four-chain structure of rabbit IgG postulated on the basis of the double diffusion experiment of Fig. 3 and supporting chemical evidence.

R. R. Porter, Biochem. J. 46, 479 (1950).

R.R. Porter, Science 1973, May, 18, Vol: 80; 713-715

Οι μεταξύ των αλύσεων και εντός των αλύσεων  
δισουλφιδικοί δεσμοί κάνουν ακόμη πιο  
πολύπλοκη την δομή του αντισώματος

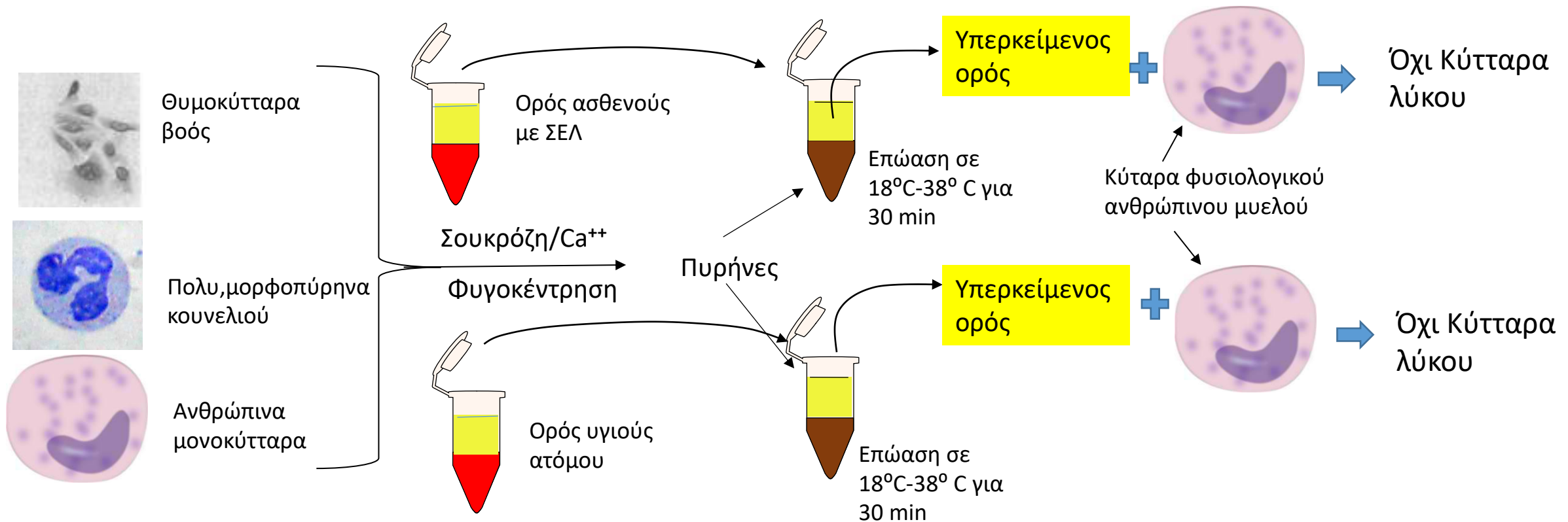


**Fig. 5. The structure of rabbit IgG. The rather complex arrangement of inter- and intrachain disulfide bonds in the heavy chain is shown.**

R. R. Porter, Biochem. J. 46, 479 (1950).

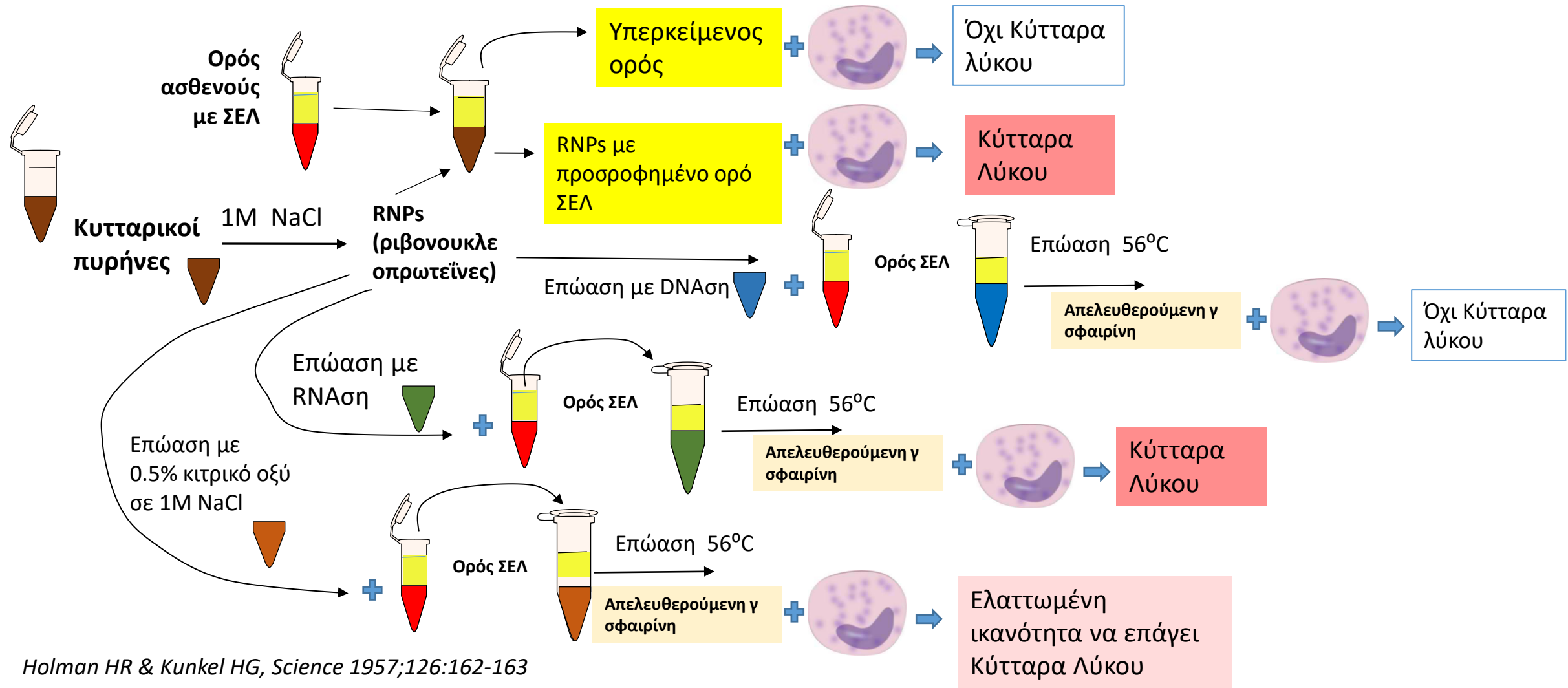
R.R. Porter, Science 1973, May, 18, Vol: 80; 713-715

# Συγγένεια μεταξύ κάποιου παράγοντα του ορού ασθενών με ΣΕΛ και κυτταρικών πυρήνων και ριβονουκλεοπρωτεΐνης

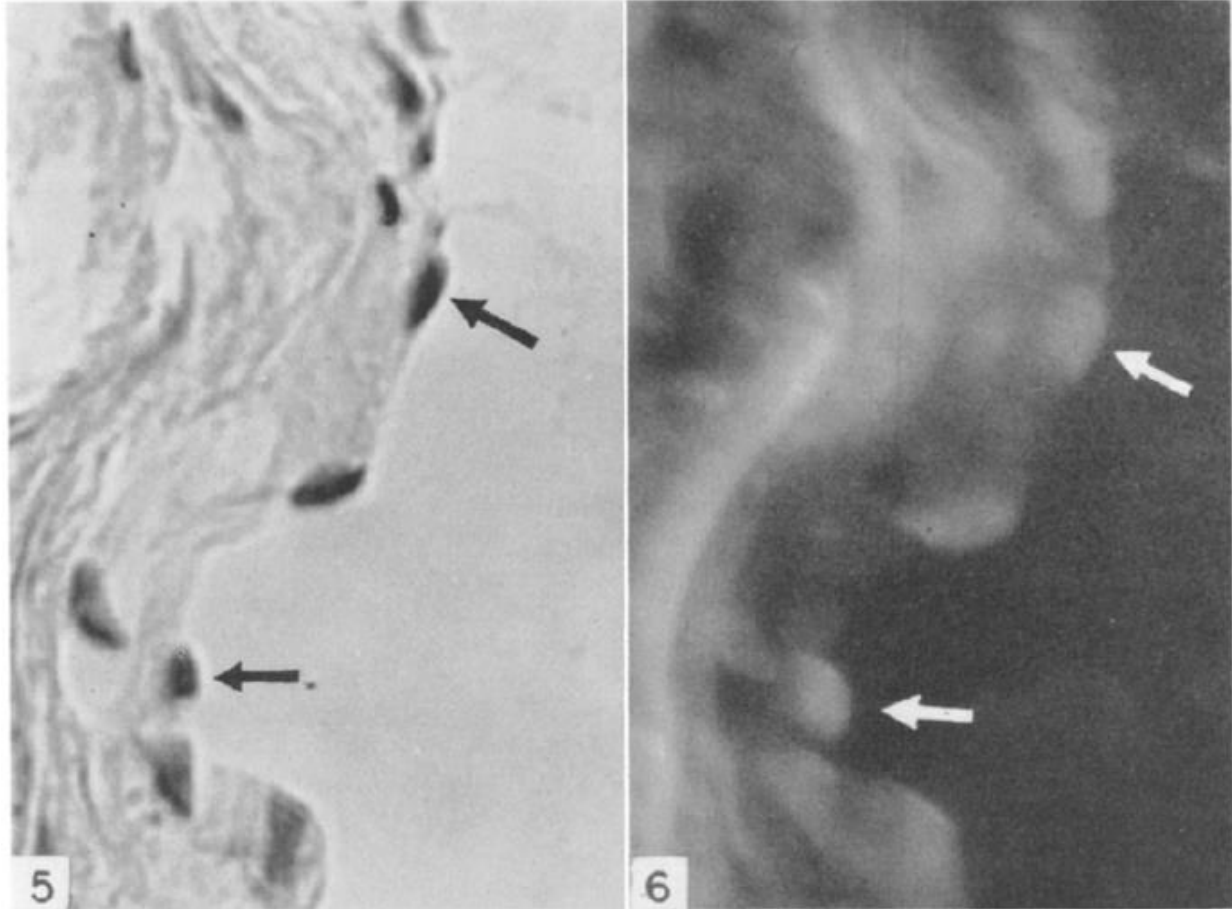




Το κύριο πυρηνικό συστατικό που αναγνωρίζεται από τις γ σφαιρίνες των ασθενών με ΣΕΛ φαίνεται να είναι το DNA και σε μικρότερο βαθμό οι ιστόνες



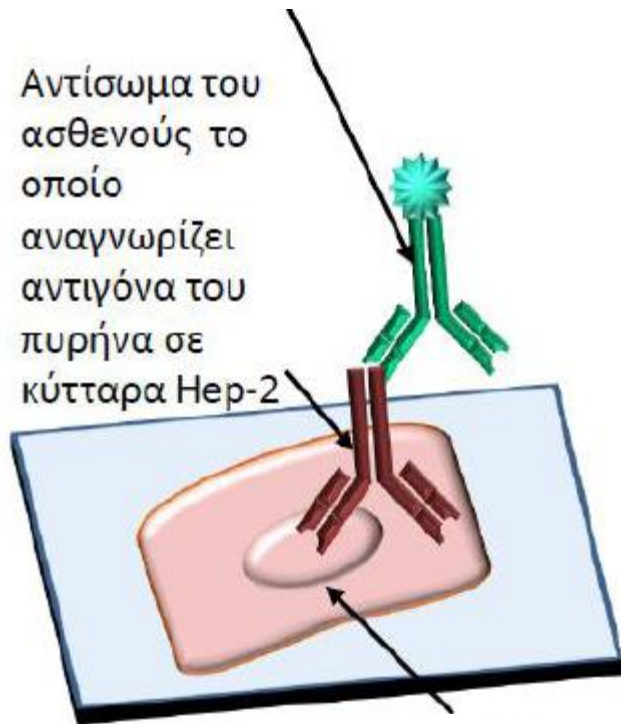
# Έμμεσος ανοσοφθορισμός αποδεικνύει την αλληλεπίδραση των $\gamma$ σφαιρινών του ΣΕΛ με τους κυτταρικούς πυρήνες



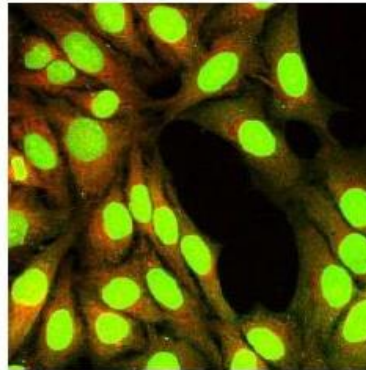
Βιοψία δέρματος, εν σειρά τομές  
Μικρή δερματική αρτηρία  
5. Αιματοξυλίνη-ηωσίνη  
6. Ανοσοφθορισμός

# Αντιπυρηνικά αντισώματα ανιχνευόμενα με έμμεσο ανοσοφθορισμό- μια εξέταση ρουτίνας σήμερα

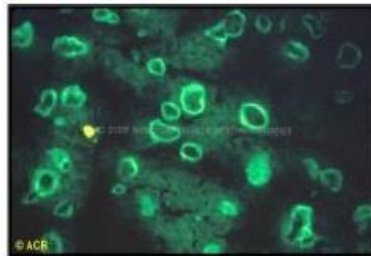
Αντι-ανθρώπινο αντίσωμα  
σεσημασμένο με φθορίζουσα  
χρωστική που είναι ορατή σε  
σκοτεινό πεδίο



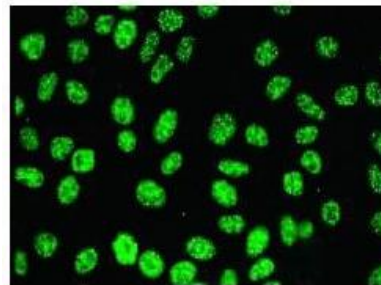
Κύτταρα Hep-2, που προέρχονται από καρκίνο



Διάχυτος φθορισμός του  
πυρήνα: αντισώματα κατά  
ιστόνης



Δακτυλιοειδής φθορισμός του  
πυρήνα: Αντισώματα κατά  
διπλής έλικας DNA



Λεπτός-στικτός φθορισμός του  
κυτταροπλάσματος:  
αντισώματα κατά μικρών  
ριβονουκλεοπρωτεϊνών

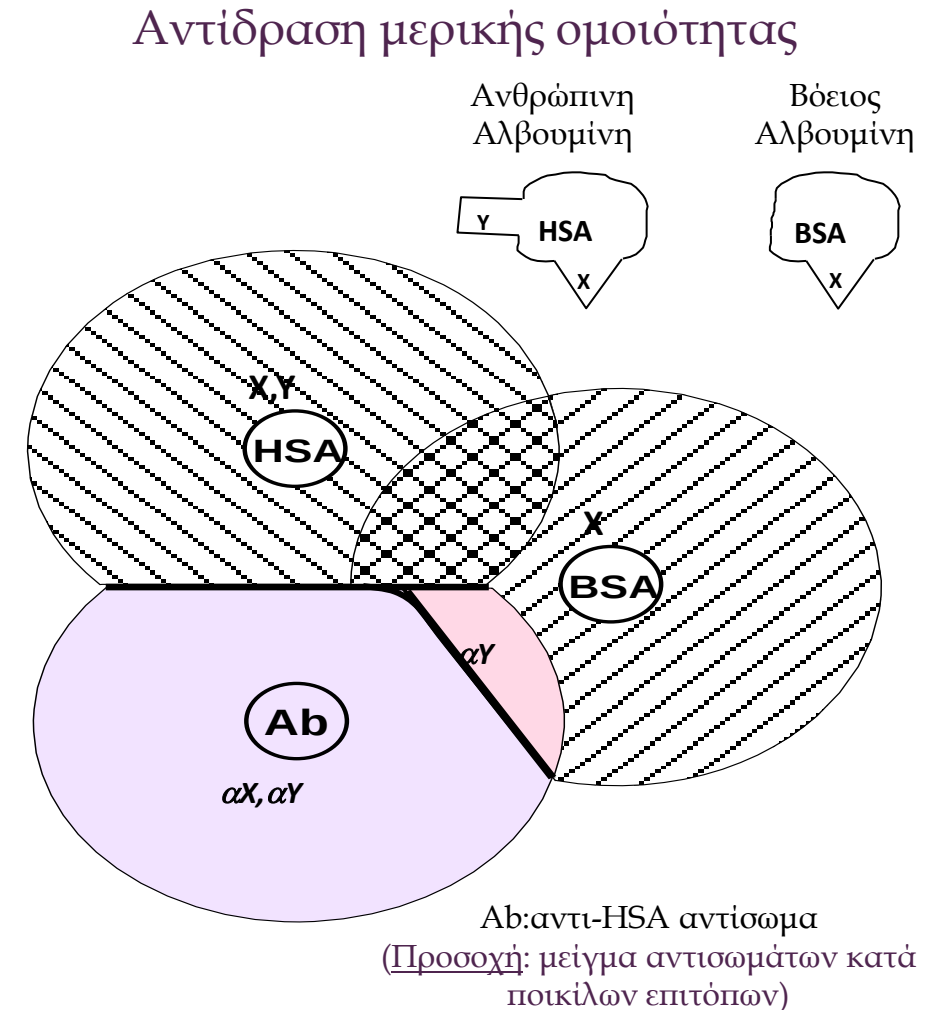
Αντι-ανθρώπινο αντίσωμα δείχνει την αλληλεπίδραση της γ σφαιρίνης ασθενών με ΣΕΛ με τους κυτταρικούς πυρήνες

| Diagnosis                     | ANA positive (%) |
|-------------------------------|------------------|
| SLE                           | 96               |
| Rheumatoid arthritis          | 20               |
| Allergic drug reactions       | 18               |
| Acute Rheumatic fever         | 0                |
| Hematologic malignances       | 0                |
| Active pulmonary tuberculosis | 0                |

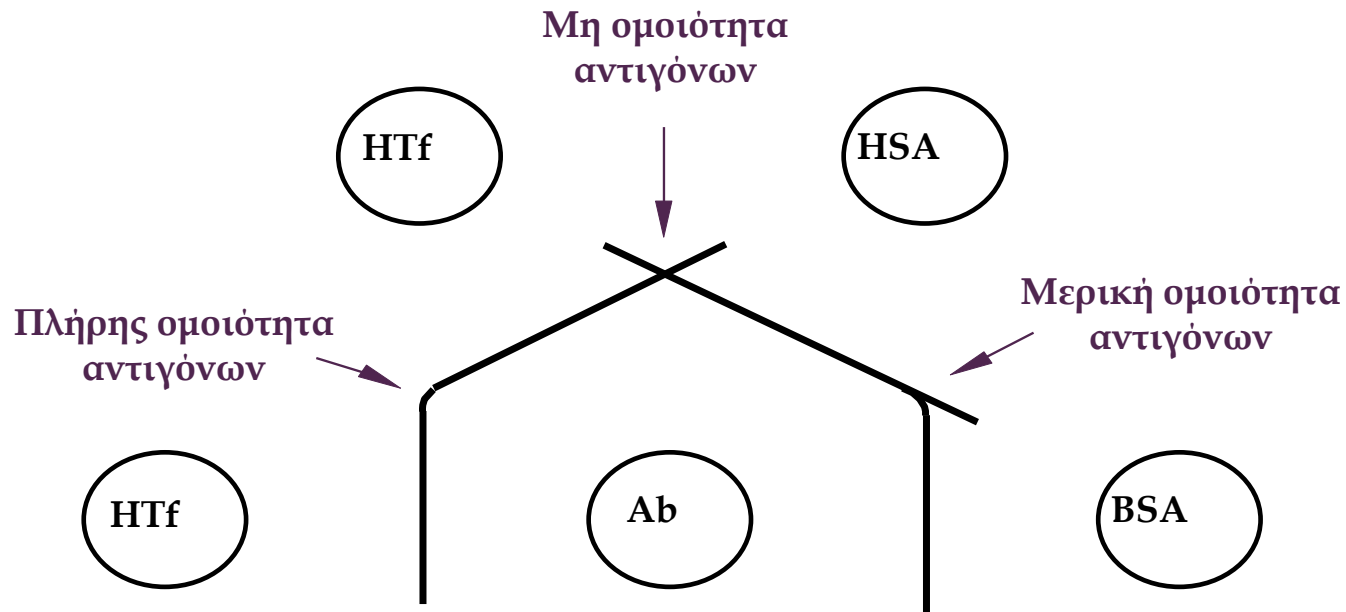
# Τεχνικές Καθίξης Ανοσοσυμπλεγμάτων

## Καθίξη κατά Ouchterlony (Διπλή ανοσοδιάχυση)

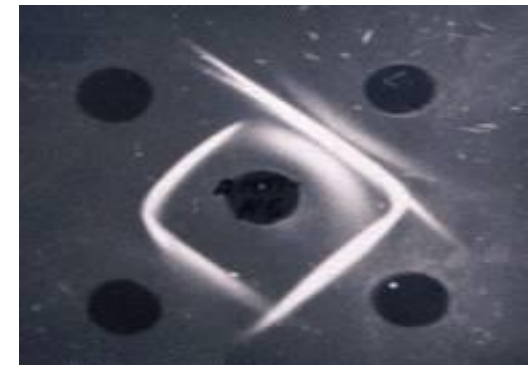
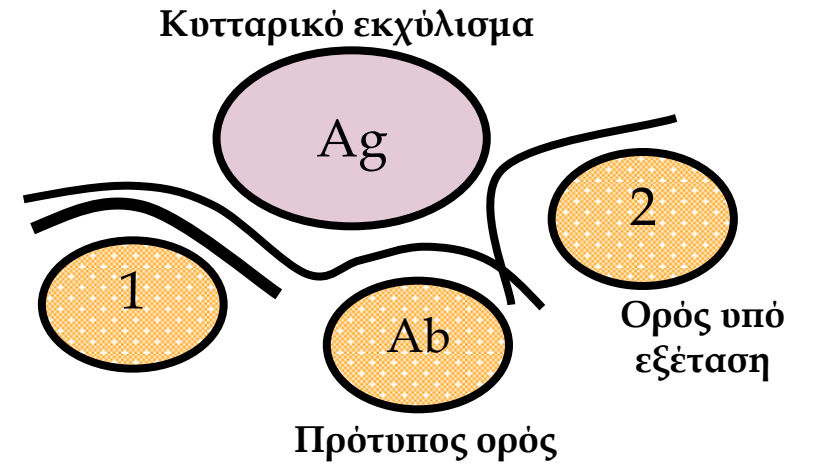
- Καθίξη δύο διαστάσεων σε πήκτωμα αγαρόζης
  - Διάχυση αντιγόνων & αντισωμάτων (*πρωτεϊνών ορού*)
- Σχηματισμός ανοσοσυμπλεγμάτων  $\Rightarrow$  καθίξη  $\Rightarrow$  γραμμές
- Πλήρης ομοιότητα αντιγόνων
  - Μερική ομοιότητα
  - Καμία ομοιότητα



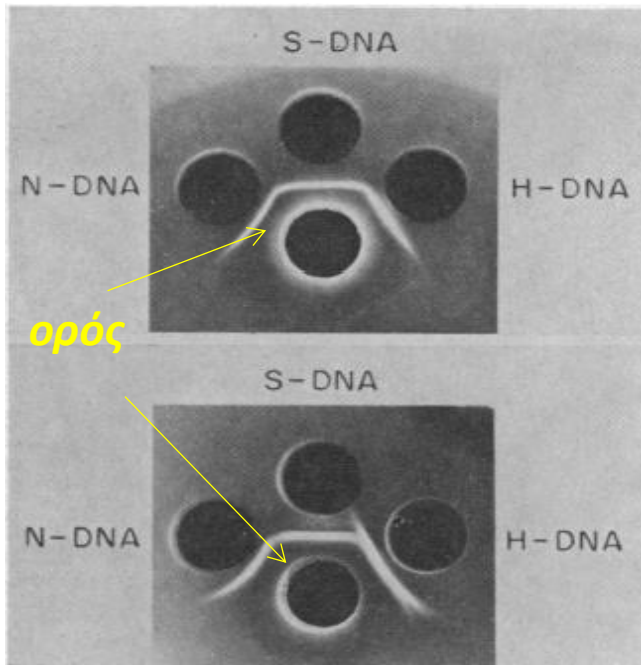
# Καθίζηση κατά Ouchterlony (Διπλή ανοσοδιάχυση) Παραδείγματα



Εφαρμογή στην ανίχνευση  
αντισωμάτων



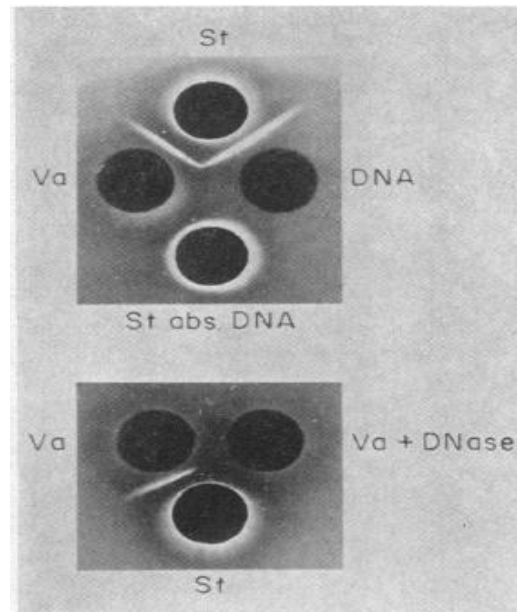
# Antibodies to DNA as well as free serum DNA, are associated with disease activity in SLE patients



*S-DNA*=αλλοιωμένο με υπερήχους DNA

*N-DNA*= φυσικό DNA

*H-DNA*= DNA αλλοιωμένο με θέρμανση



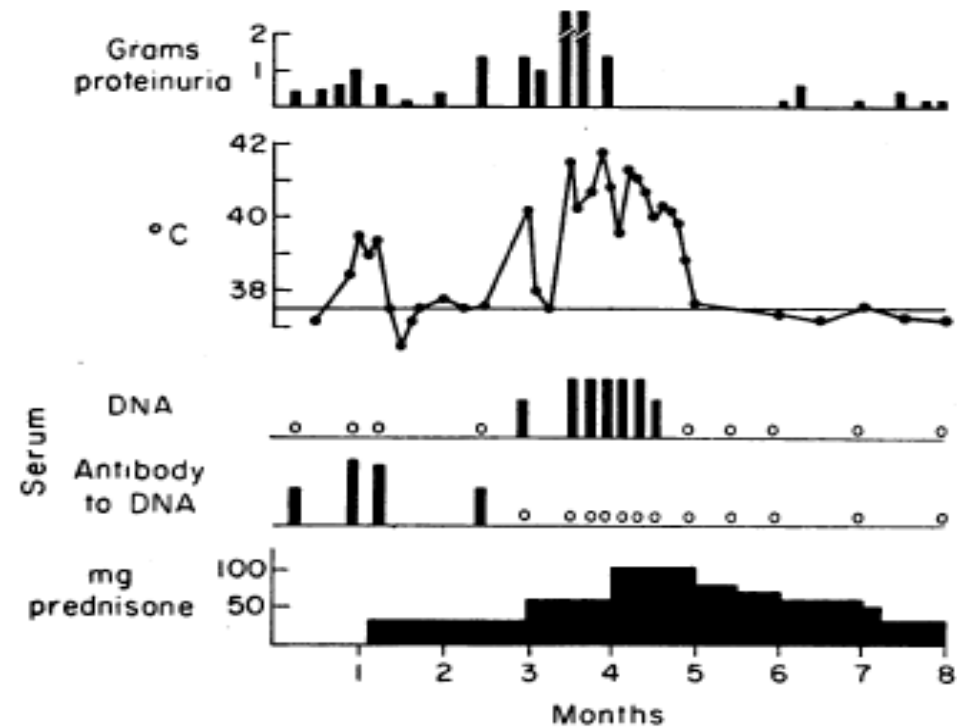
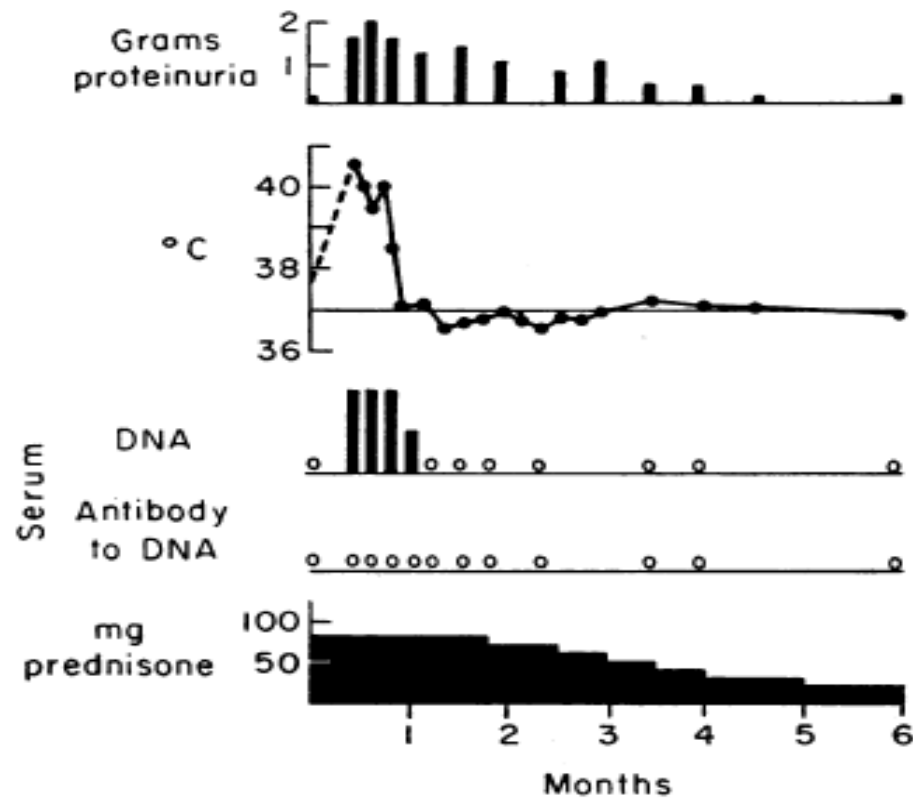
Ο ορός St αντιδρά με DNA αλλά και με κάτι που υπάρχει στον ορό Va. Η αντίδραση αυτή εξαφανίζεται όταν ο ορός St επωαστεί με DNA ή όταν ο ορός Va επωαστεί με DNAση

*Comparison of immunologic and chemical determinations of DNA in serum*

| Systemic lupus erythematosus serum | Precipitin analysis | Diphenylamine reaction |
|------------------------------------|---------------------|------------------------|
|                                    |                     | <i>μg/ml</i>           |
| Va                                 | ++++                | 60                     |
| Sa                                 | ++                  | 18                     |
| Th                                 | ++                  | 16                     |
| Jo                                 | +                   | 5                      |
| Ci                                 | 0                   | 0                      |



# Αντισώματα κατά DNA, αλλά και ελεύθερο DNA συσχετίζονται με ενεργότητα του ΣΕΛ





# Ελεύθερο DNA στον ορό φαίνεται να είναι πολύ ειδικό για τον ΣΕΛ

TABLE II  
*Serum DNA in other conditions*

|                                                                                          | No. of sera tested | Positive for DNA |
|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|------------------|
| Leukemia, lymphosarcoma, and lymphoma                                                    | 29                 | 3                |
| Multiple myeloma                                                                         | 15                 | 0                |
| Acute rheumatic fever                                                                    | 9                  | 0                |
| Rheumatoid arthritis                                                                     | 17                 | 0                |
| Liver disease                                                                            | 40                 | 6                |
| Miscellaneous (myocardial infarction, renal disease, lung disease, infection, carcinoma) | 72                 | 1                |
| Normal                                                                                   | 30                 | 0                |

Τα επίπεδα των παραγόντων της κλασσικής ακολουθίας ενεργοποίησης του συμπληρώματος είναι ελαττωμένα στο ΣΕΛ

TABLE III.—COMPARISON OF CLASSICAL COMPLEMENT COMPONENTS IN NINE PATIENTS WITH SLE

| <i>Patient</i> | <i>C' 1</i> | <i>Per cent normal</i> |             |             |
|----------------|-------------|------------------------|-------------|-------------|
|                |             | <i>C' 2</i>            | <i>C' 3</i> | <i>C' 4</i> |
| M.B.           | 100         | 50                     | 100         | 83          |
| R.C.           | 48          | 45                     | 48          | 46          |
| J.C.           | 100         | 50                     | 100         | 62          |
| T.E.           | 100         | 62                     | 100         | 100         |
| N.G.           | 82          | 25                     | 100         | 50          |
| M.R.           | 83          | 25                     | 63          | 36          |
| Ca.S.          | 83          | 25                     | 83          | 100         |
| CLS.           | 100         | 25                     | 100         | 36          |
| K.W            | 42          | 47                     | 52          | 48          |

Χαμηλά επίπεδα συμπληρώματος συσχετίζονται με ενεργότητα νόσου και υψηλούς τίτλους αυτοαντισωμάτων

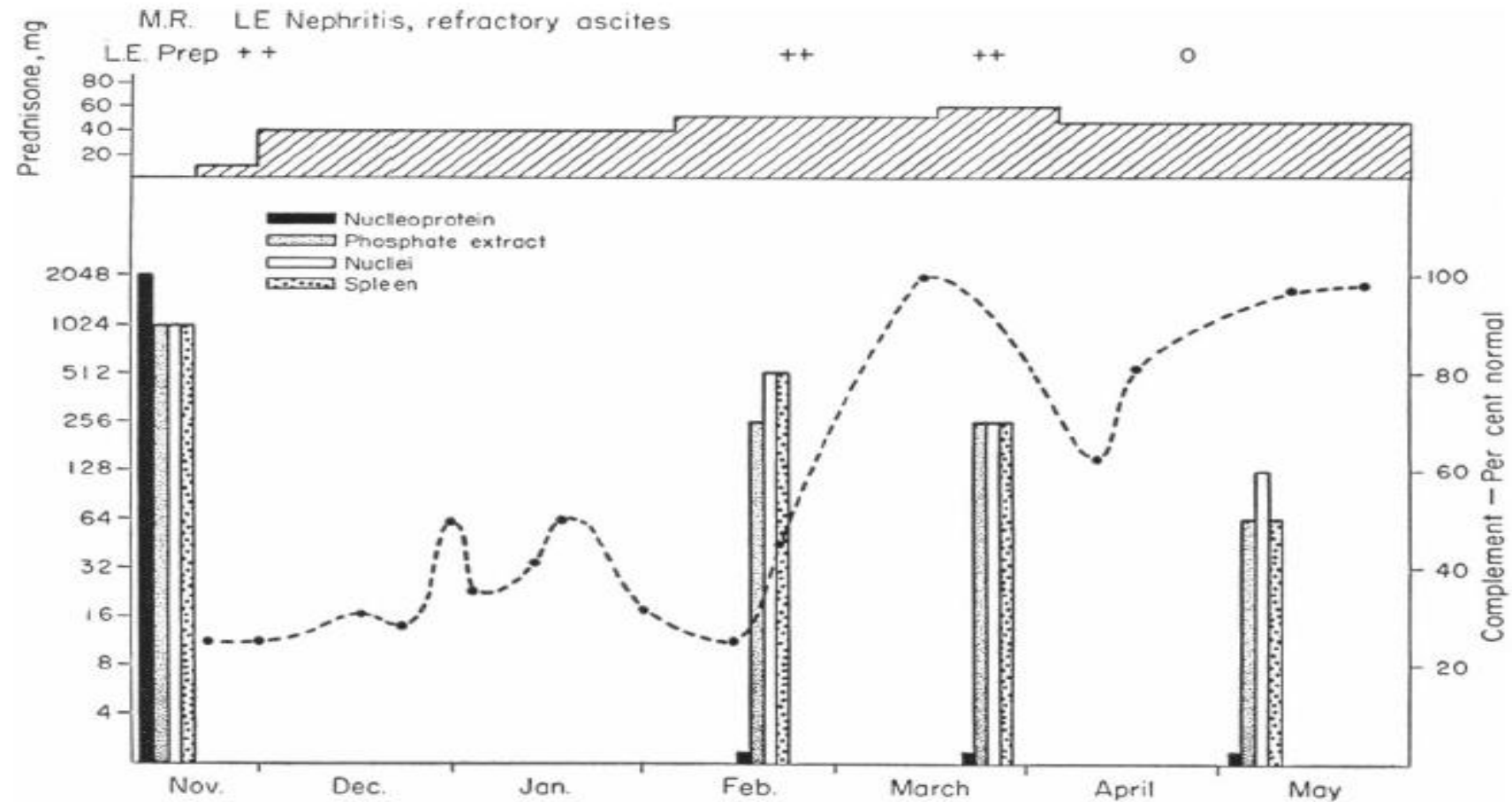


Fig. 3A

Από τους δείκτες νόσου στην παθογένεση

# Ανίχνευση αντι-DNA/DNA ανοσοσυμπλεγμάτων και συμπληρώματος στους νεφρούς ασθενών που πέθαναν από νεφρίτιδα του Λύκου

**TABLE I**

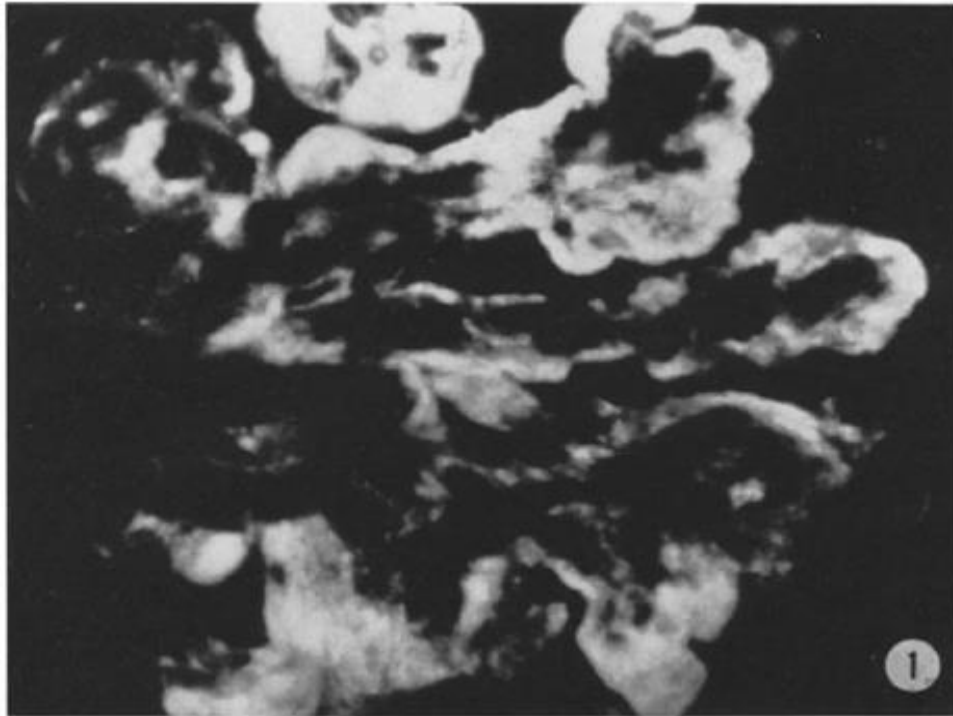
*Localization of Immunoglobulins and Complement in Renal Glomeruli of Patients with SLE  
by the Fluorescent Antibody Technique*

| Case No. | γ G-globulin | γM-globulin | γG-globulin<br>(pH 3.2)* | γM-globulin<br>(pH 3.2)* | β <sub>1</sub> C-globulin<br>(C3 ) |
|----------|--------------|-------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| 1        | 2+‡          | 1+          | ±                        | 0                        | 2+                                 |
| 2        | 2+           | ±           | ±                        | 0                        | 1+                                 |
| 4        | 3+           | 2+          | ±                        | 0                        | 1+                                 |
| 5        | 2+           | 0           | 1+                       | 0                        | ±                                  |
| 6        | 3+           | ±           | ±                        | 0                        | 3+                                 |
| 7        | 3+           | 1+          | 2+                       | 1+                       | 2+                                 |
| 9        | 2+           | 1+          | 1+                       | ±                        | 2+                                 |

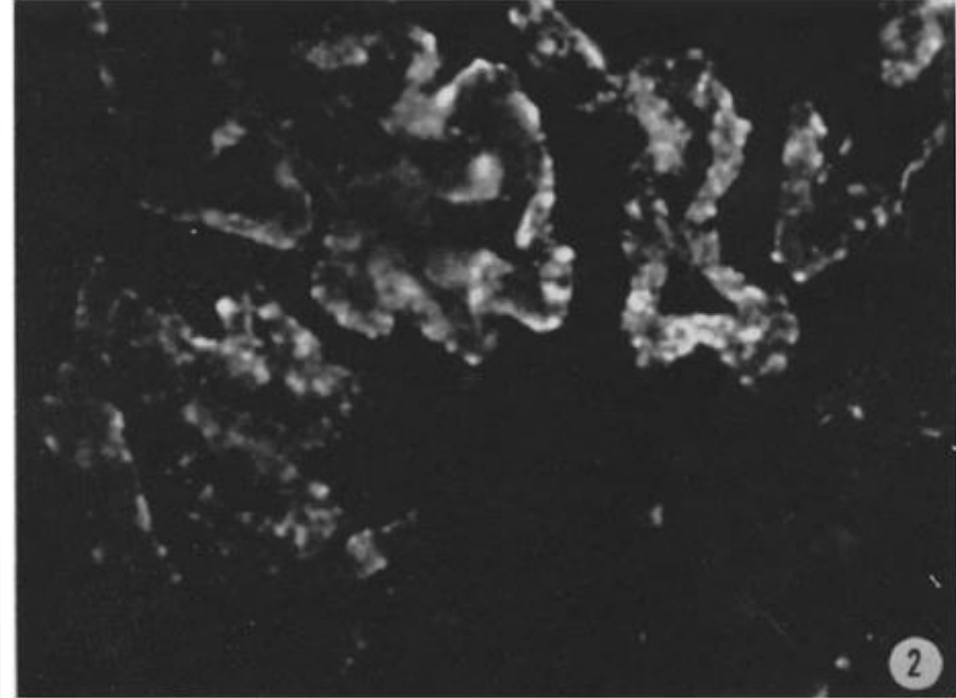
(\*) γ σφαιρίνη που παρέμενε μετά επώαση των τομών κρυοστάτη σε pH 3.2, 0.02 M  
ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού

Koffler D et al J.Exp.Med, 1967;126:607-623

# Ανοσοσφαιρίνες και συμπλήρωμα ανιχνεύονται με ανοσοφθορισμό στο σπείραμα του νεφρού

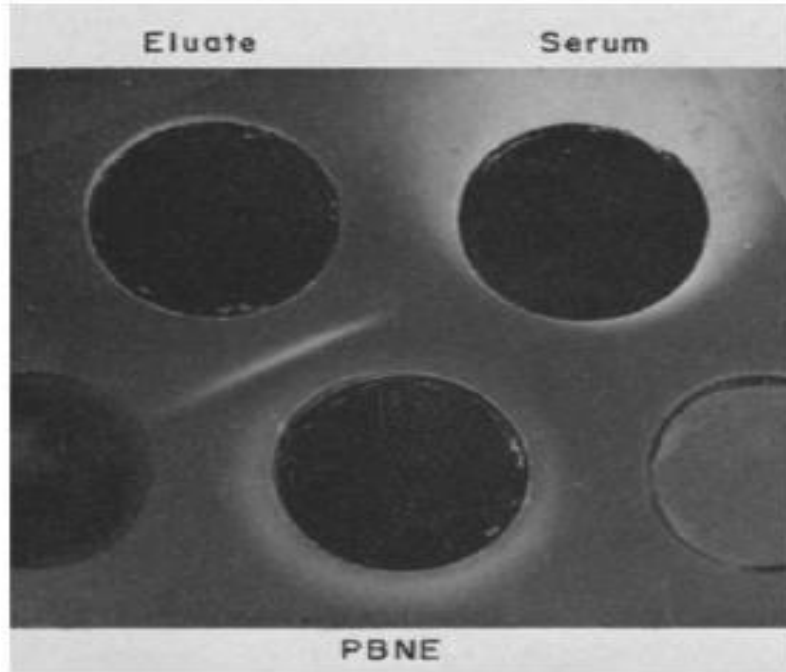


*Γραμμικές εναποθέσεις γ-σφαιρίνης*

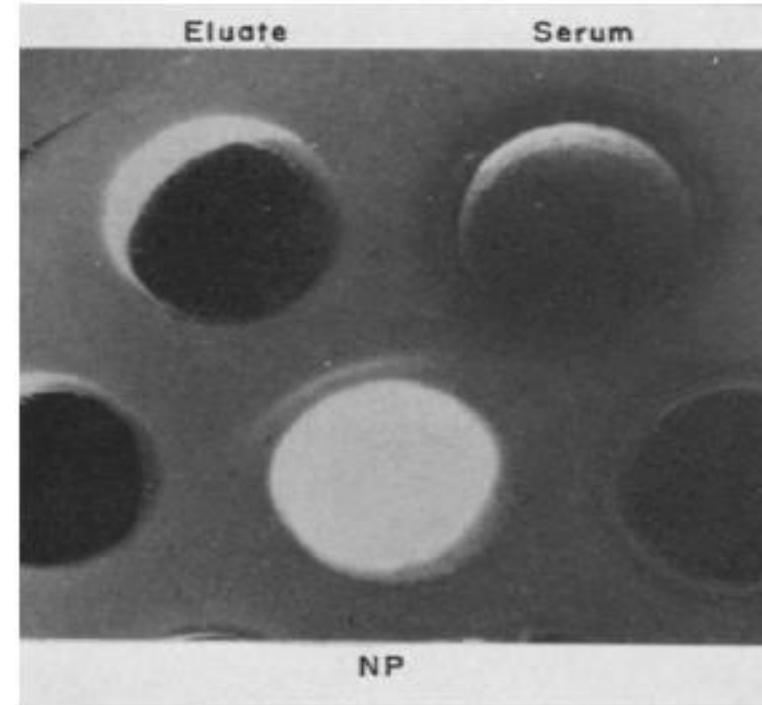


*Κοκκιώδεις εναποθέσεις C3 συστατικού  
του συμπληρώματος*

# Ανοσοσφαιρίνες που εκκλύονται από τους νεφρούς ασθενών με ΣΕΛ αντιδρούν με ριβονουκλεοπρωτεΐνες και DNA



*Agar gel precipitin reaction between phosphate buffer nuclear extract (PBNE) and  $\gamma$ G globulin eluted from glomeruli (Eluate)*



*Agar gel precipitin reaction between nucleoprotein (NP) and an eluate from glomeruli treated with DNase and acid buffer*

# Ανοσοσφαιρίνες και συμπλήρωμα προσκολλώνται σε πολλούς ιστούς ασθενών με ΣΕΛ

TABLE IV  
*Organ distribution of bound  $\gamma$ G-globulin and complement in vessel walls\**

| Patient | Clinical diagnosis    | Bound protein     | Kidney    | Spleen    | Lymph node | Liver    | Heart     | Skeletal muscle | Aorta  | Skin   | Lung   | Thy-roid |
|---------|-----------------------|-------------------|-----------|-----------|------------|----------|-----------|-----------------|--------|--------|--------|----------|
| 1. FP   | Systemic lupus        | $\gamma$ G<br>C'  | 3+<br>2+  | 3+<br>2+  |            | 0<br>0   | 1+<br>1+  |                 |        | 0<br>0 | 0<br>0 |          |
| 2. DR   | Systemic lupus        | $\gamma$ G<br>C'  | 3+†<br>2+ | 4+†<br>2+ |            | 0<br>0   | 2+†<br>2+ |                 |        |        | 0<br>0 | 0<br>0   |
| 3. CC   | Systemic lupus        | $\gamma$ G<br>C'  | 3+<br>2+  | 3+<br>2+  | 4+<br>1+   | 1+<br>1+ | ±<br>±    | 1+<br>1+        | ±<br>± | ±<br>± | 0<br>0 |          |
| 4. SS   | Systemic lupus        | $\gamma$ G<br>C'  | 3+<br>2+  | 4+<br>2+  |            | 1+<br>1+ |           |                 |        |        |        |          |
| 5. FH   | Systemic lupus        | $\gamma$ G<br>C'  | 2+<br>2+  |           |            |          |           |                 |        |        |        |          |
| 6. BV   | Chronic liver disease | $\gamma$ G†<br>C' | 0<br>0    | 0<br>0    | 0<br>0     | 0<br>0   | 0<br>0    | 0<br>0          | 0<br>0 | 0<br>0 | 0<br>0 | 0<br>0   |
| 7. RC   | Chronic liver disease | $\gamma$ G<br>C'  | 0<br>0    | 0<br>0    |            | 0<br>0   |           |                 |        |        |        |          |

\* Intensity of fluorescence is graded on a 1 to 4+ scale.

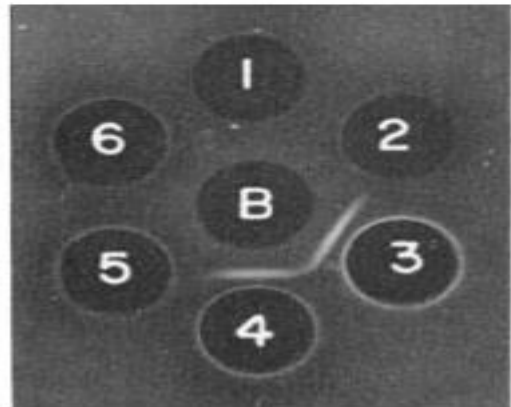
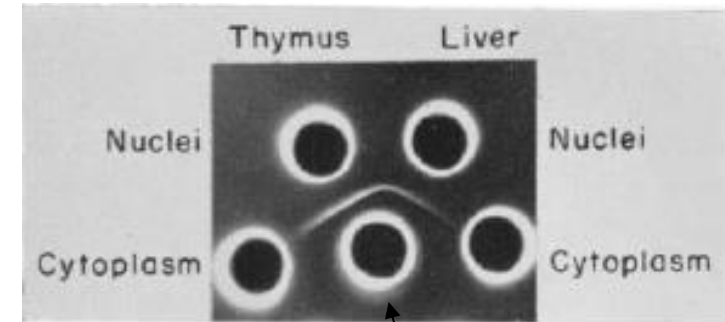
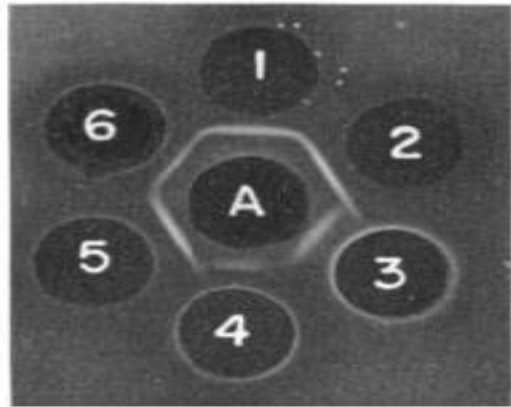
†  $\gamma$ A-Globulin was also present.

‡  $\gamma$ G-Globulin and complement were also absent from vessels in esophagus, brain, adrenal, and pancreas.



Αυτοαντισώματα κατά εκχυλιζόμενων από  
τον πυρήνα αντιγόνων: Πολύτιμα εργαλεία  
να σημάνουν ειδικά χαρακτηριστικά του ΣΕΛ  
και την έκβαση

Οροί ασθενών με ΣΕΛ αντιδρούν εναντίον όχι  
μόνον του DNA, αλλά και εναντίον ενός διαλυτού  
αντιγόνου που ονομάστηκε Sm



**A:** Πυρήνες θύμου μοσχαριού  
**B:** DNA

**A:** πυρηνικό εκχύλισμα θυμοκυττάρων  
**B:** εκχύλισμα νεφρού  
**C:** εκχύλισμα ήπατος

Sm: από το όνομα της  
ασθενούς στον ορό της οποίας  
πρωτοπαρουσιάστηκε

**TABLE I**  
*Comparison of precipitating and complement-  
fixing titers of SLE sera with Sm antigen*

| Serum | Precipitin Titer<br>with DNA | Precipitin Titer<br>with Sm<br>Antigen | Complement-<br>Fixing Titer<br>with Sm<br>Antigen |
|-------|------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Ru    | 0                            | 4                                      | 8                                                 |
| Ro    | 0                            | 8                                      | 32                                                |
| As    | 0                            | 8                                      | 16                                                |
| Sm    | 0                            | 16                                     | 64                                                |
| Sw    | 0                            | 128                                    | 512                                               |
| Jo    | 16                           | 0                                      | 0                                                 |
| St    | 32                           | 0                                      | 0                                                 |
| Kl    | 0                            | 0                                      | 0                                                 |
| Ju    | 0                            | 0                                      | 0                                                 |

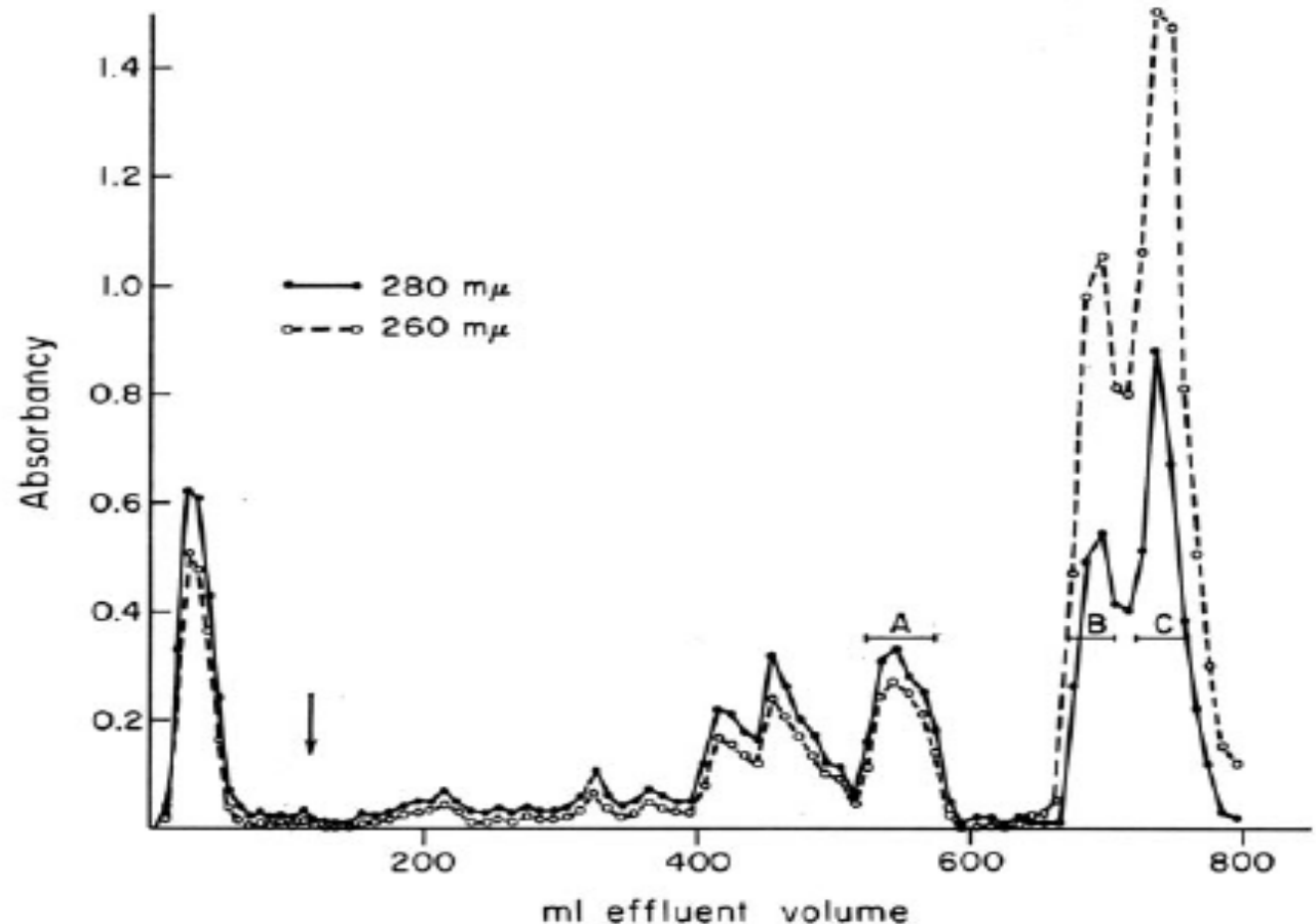
Titers represent inverse ratios of serum dilutions.

Το αντιγόνο Sm λούεται από στήλες νιτροκυτταρίνης και περιέχει λίγο RNA, πρωτεΐνες, αλλά όχι DNA

Κλάσμα A: πρωτεΐνη, μικρή ποσότητα RNA, όχι DNA

Κλάσμα B: Πρωτεΐνη, RNA, DNA

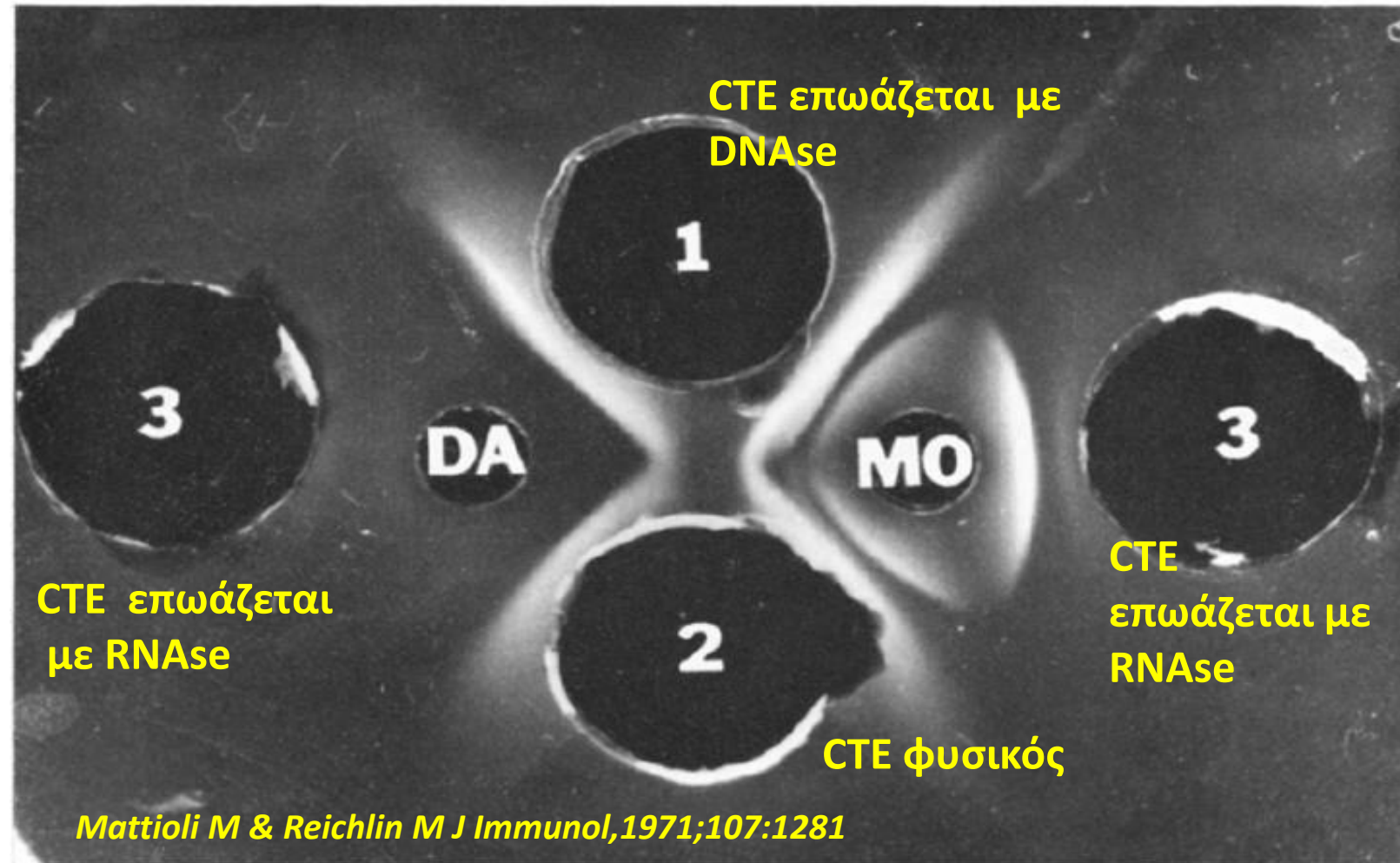
Κλάσμα C: DNA, λίγο RNA, όχι πρωτεΐνη



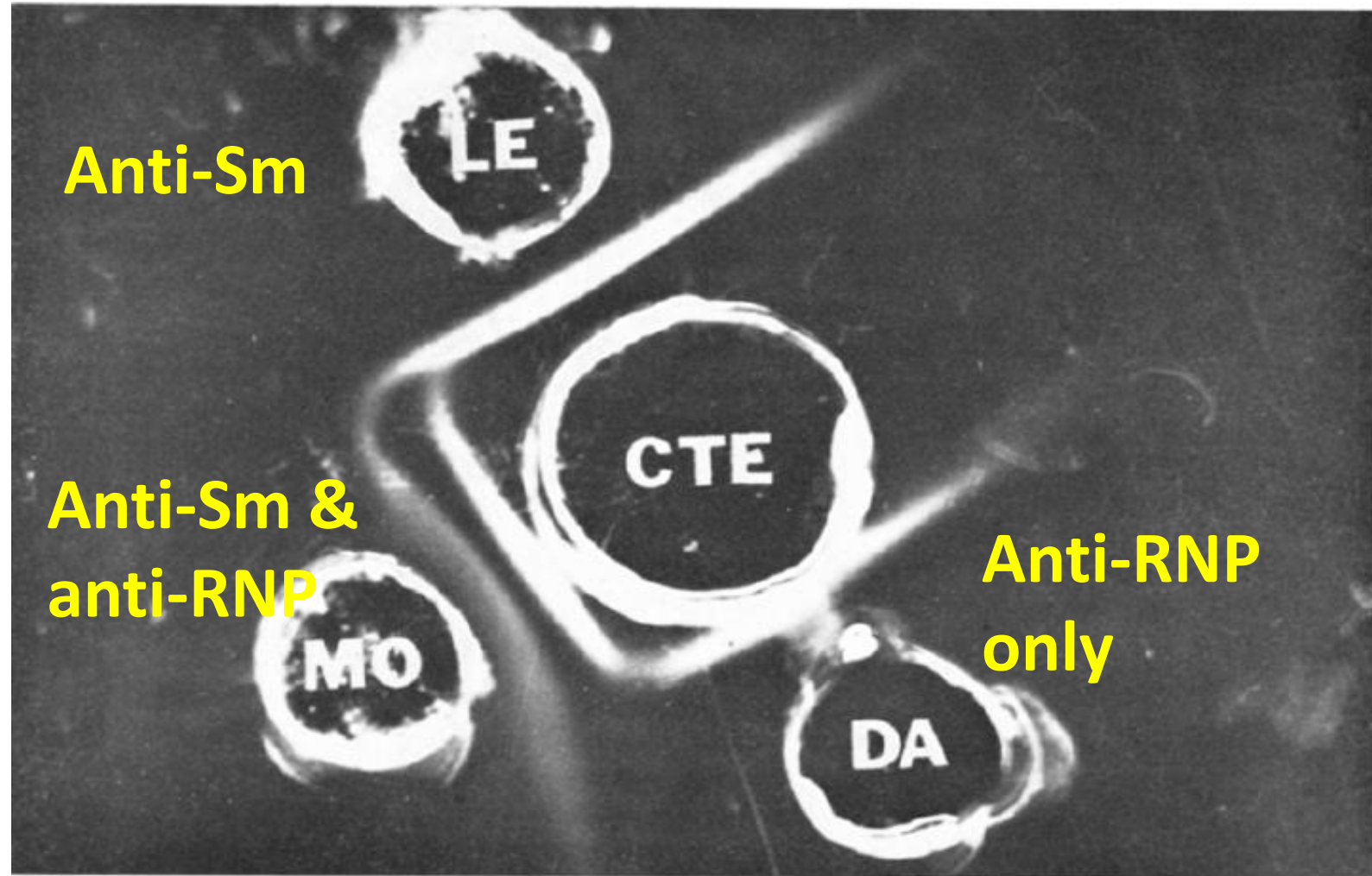
# Χαρακτηρισμός ενός πυρηνικού ριβονουκλεοπρωτεϊνικού αντιγόνου (hRNP) που αντιδρά με ορούς ασθενών με ΣΕΛ

CTE: Calf thymus  
extract:  
Εκχύλισμα θύμου  
μοσχαριού

Η αντιγονική  
ειδικότητα χάνεται  
μετά επώαση του  
εκχυλίσματος του  
θύμου με RNAση  
αλλά και τρυψίνη

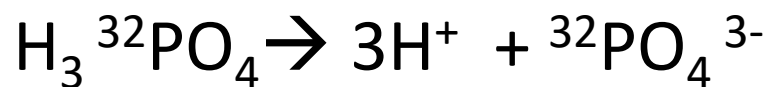
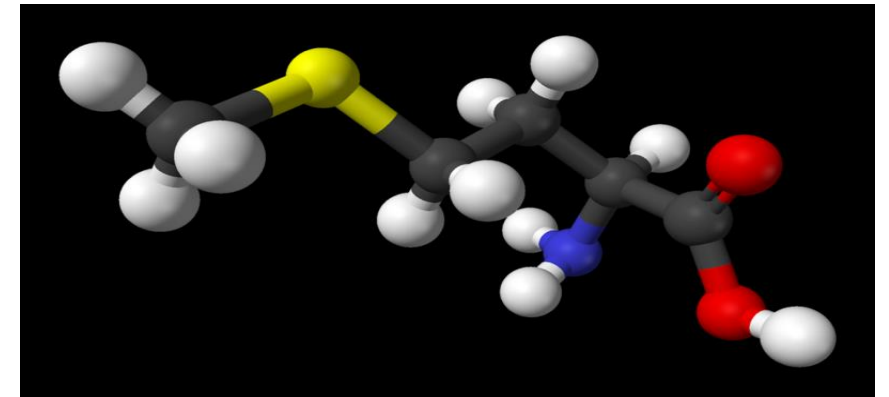
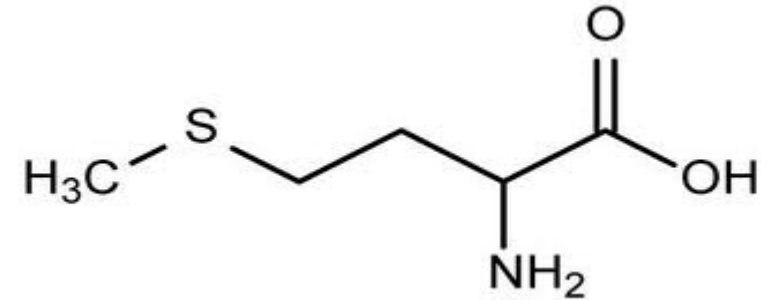
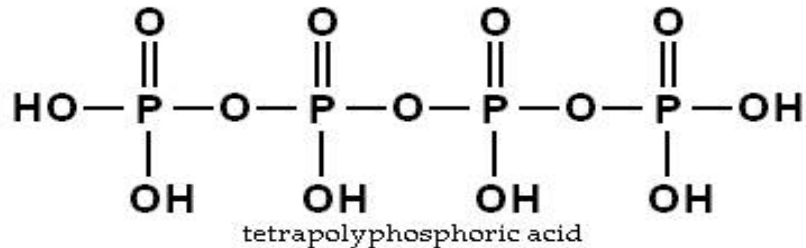
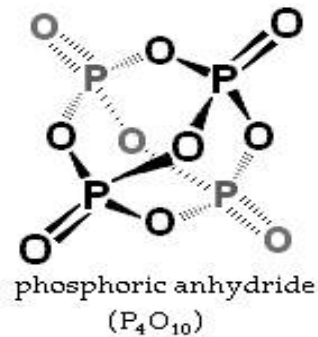
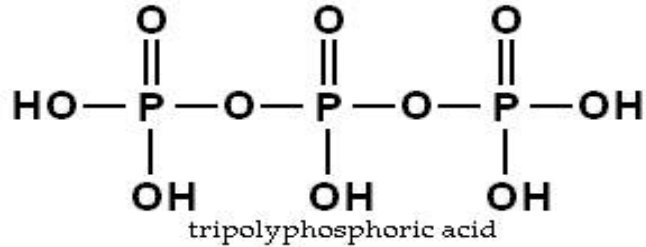
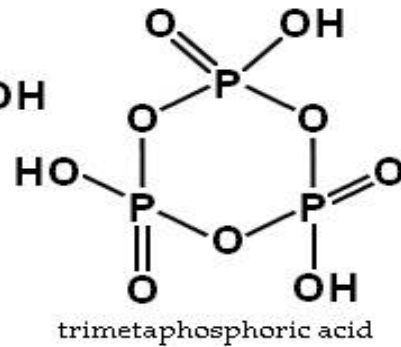
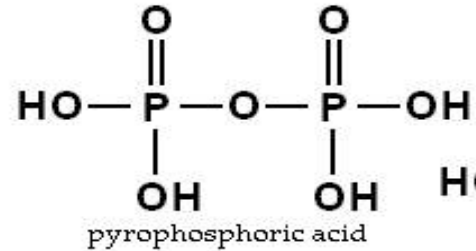
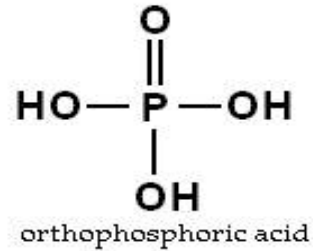


Πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη (nRNP) είναι διαφορετική από το Sm





Ραδιοσημασμένα φωσφορικά ιόντα και αμινοξέα ενσωματώνονται σε καλλιεργούμενα κύτταρα και σημαίνουν RNA και πρωτεΐνες



<sup>35</sup>S- Μεθειονίνη

# Ραδιοσήμανση πυρηνικών RNA και πρωτεϊνών εντός ζώντων κυττάρων οδηγεί σε κατανόηση της δομής των πυρηνικών αντιγόνων

Κύτταρα Ehrlich ασκτικού υγρού  
Καλλιέργεια σε GIBCO

Παρουσία [ $^{32}\text{P}$ ] ορθοφωσφορικού ιόντος  
Παρουσία [ $^{35}\text{S}$ ] Μεθειονίνης

Απομόνωση πυρήνων και εκχύλιση των  
συμπλεγμάτων RNA και πρωτεϊνών



Δημιουργία πυρηνικού εναιωρήματος με διαδοχικές κρούσεις υπερήχων, εκχυλίσεις σε ρυθμιστικά διαλύματα και υπερφυγοκεντρήσεις

Επώαση του εναιωρήματος με ανοσοσφαιρίνες ασθενών με ΣΕΛ

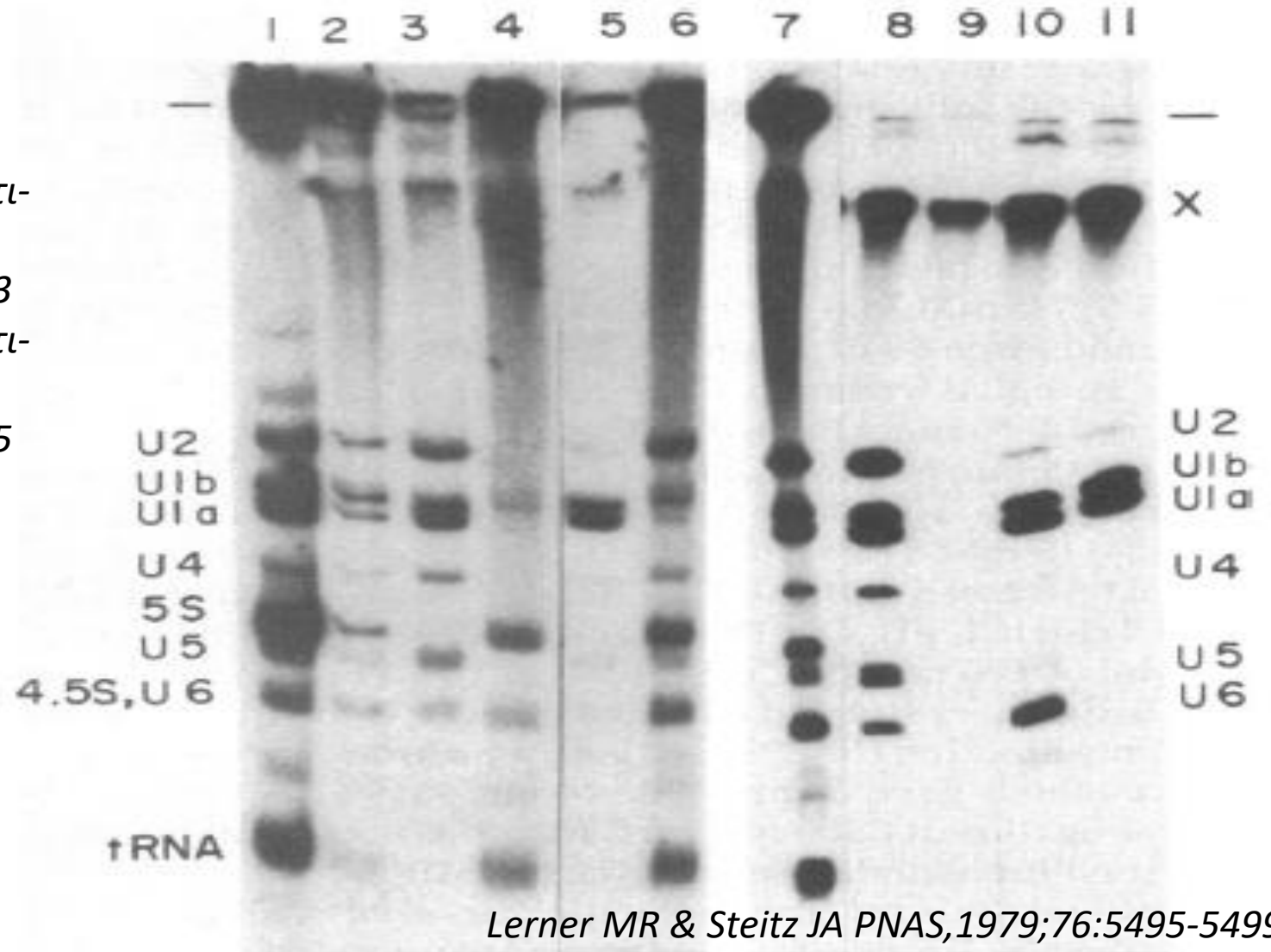
Τα ανοσοσυμπλέγματα απομονώνονται μέσω συνδέσεώς των σε πρωτεΐνη A συνδεδεμένη σε σεφαρόζη

5mM HCl σε ακετόνη  
Απομόνωση πρωτεϊνών

Εκχύλιση με  
φαινόλη  
Απομόνωση RNA

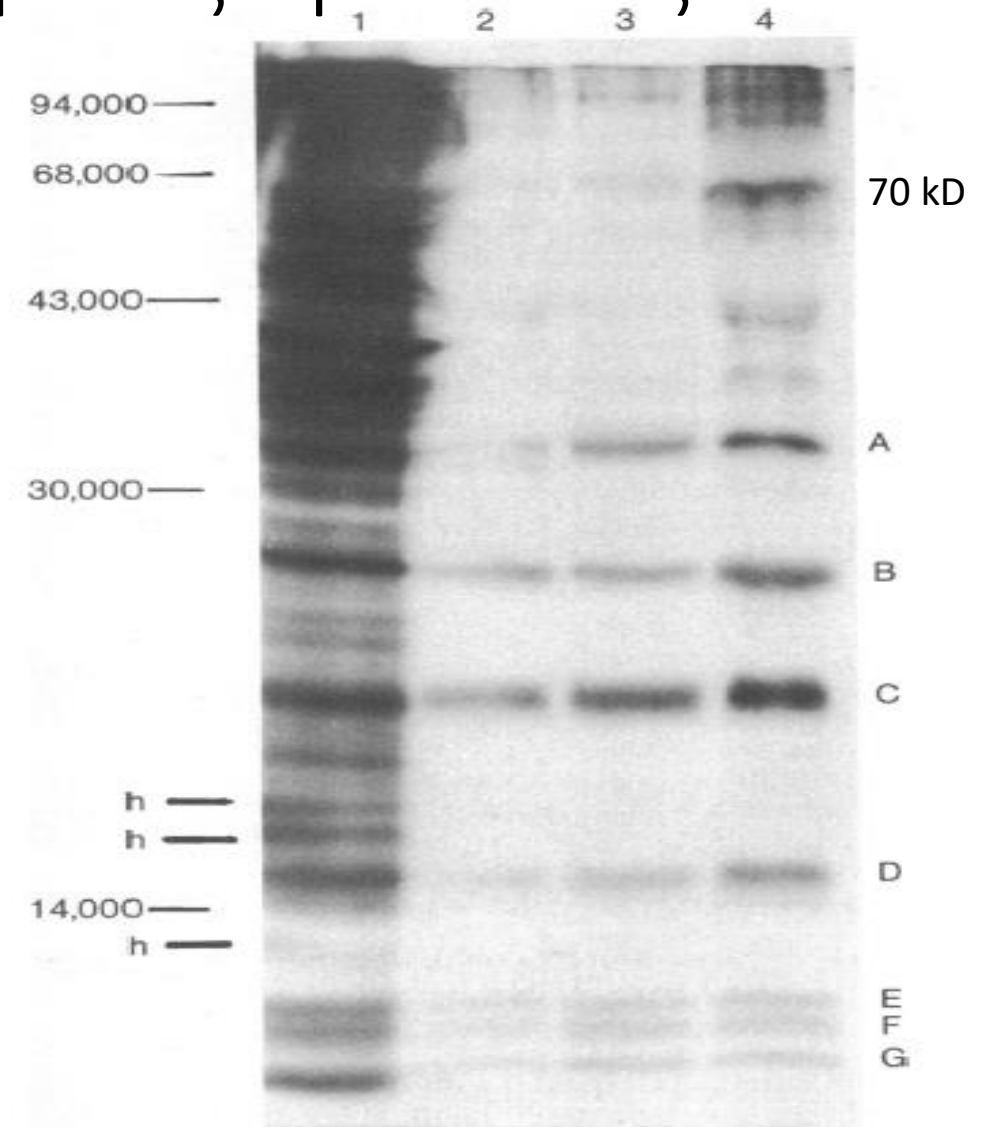
# Οροί ασθενών με ΣΕΛ αναγνωρίζουν πυρηνικά αντιγόνα που περιέχουν πυρηνικά RNAs

1. Ολικό πυρηνικό εκχύλισμα
2. Πυρηνικό εκχύλισμα μετά κρούση με υπερήχους
3. Εναιώρημα που απομονώθηκε από αντι-Sm ορό
4. Το εναπομείναν εναιώρημα της ζώνης 3
5. Εναιώρημα που απομονώθηκε από αντι-RNP ορό
6. Το εναπομείναν εναιώρημα της ζώνης 5
7. Πυρήνες μετά κρούση με υπερήχους
8. Ιζήματα αντι-Sm
9. Ίζημα φυσιολογικού ορού
10. Αντι-RNP /αντι-Sm
11. Αποκλειστικά αντι-RNP

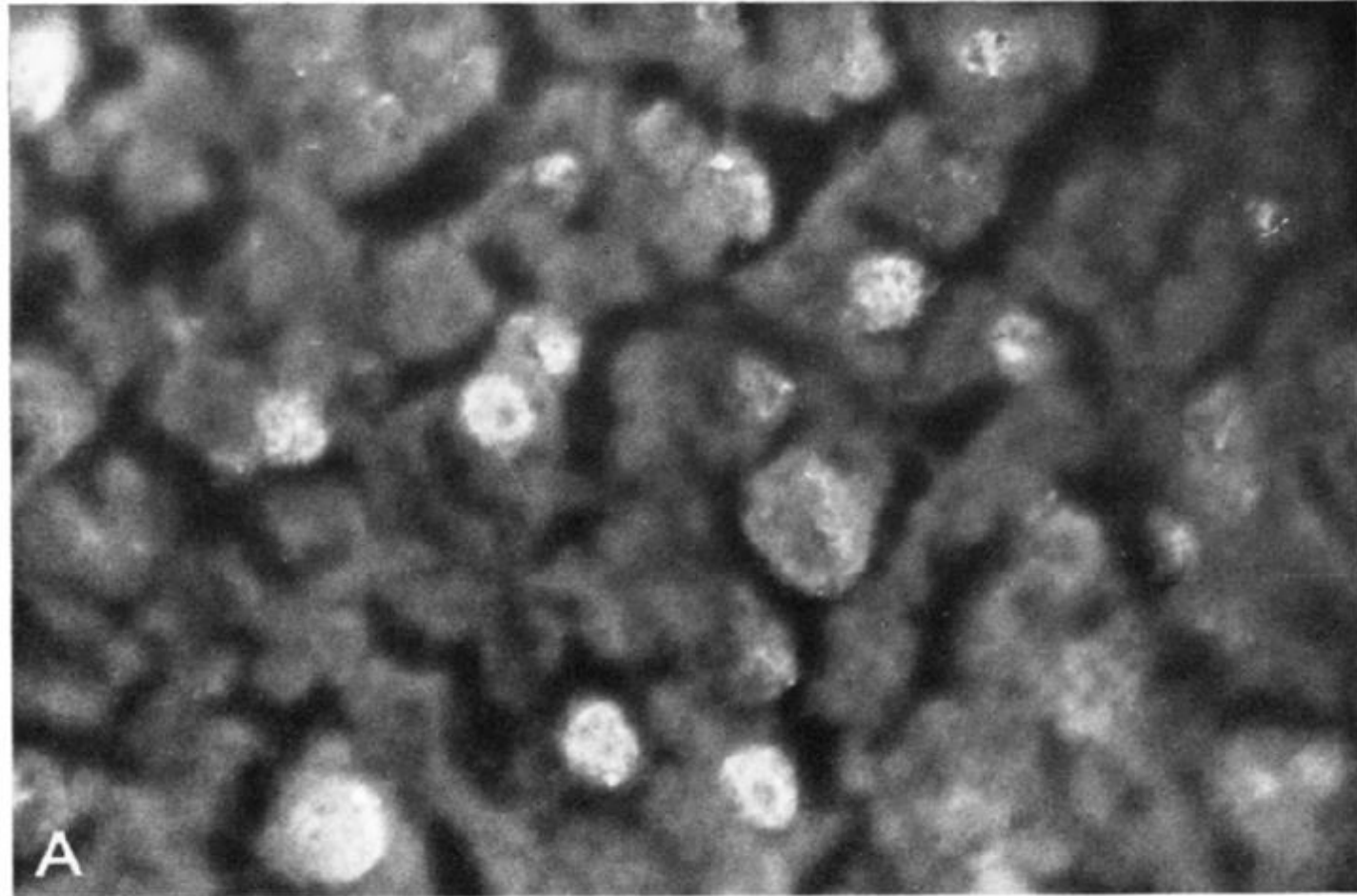


# Οροί ασθενών με ΣΕΛ αναγνωρίζουν πυρηνικά αντιγόνα που περιέχουν πυρηνικές πρωτεΐνες

1. Ολικό πυρηνικό εκχύλισμα
2. Πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται από αντι-Sm ορό
3. Πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται από αντι-RNP ορό
4. Πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται από αντι-RNP ορό με κατ' εξοχήν αντι- RNP δραστικότητα



Το πρότυπο ανοσοφθορισμού των αντι-RNP  
αντισωμάτων είναι λεπτός-στικτός φθορισμός του  
πυρήνα



*Mattioli M & Reichlin M J Immunol, 1971;107:1281*

Ασθενείς με  
αντισώματα κατά RNP  
παρουσιάζουν μεικτές  
κλινικές εικόνες  
αρθρίτιδας-μυοσίτιδας  
και σκληροδέρματος

αντισώματα κατά Sm  
είναι ειδικά για ΣΕΛ

Table 2. Clinical Characteristics of 100 Patients with Hemagglutinating Antibodies to RNase-Sensitive and 27 with Antibodies to RNase-Resistant Components of Extractable Nuclear Antigen.

| CHARACTERISTIC                                                       | % RNase<br>SENSITIVE<br><i>Anti-RNP</i> | % RNase<br>RESISTANT<br><i>anti-Sm</i> |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| Raynaud's phenomenon                                                 | 85                                      | 22                                     |
| Swollen hands                                                        | 66                                      | 15                                     |
| Sclerodermatous changes                                              | 33                                      | 7                                      |
| Myositis                                                             | 63                                      | 22                                     |
| Skin rash                                                            | 38                                      | 70                                     |
| Fever                                                                | 33                                      | 63                                     |
| Neurologic abnormalities                                             | 10                                      | 33                                     |
| Renal disease definite                                               | 5                                       | 37                                     |
| Renal disease possible                                               | 5                                       | 15                                     |
| Serositis                                                            | 27                                      | 46                                     |
| Arthritis/arthralgia                                                 | 95                                      | 89                                     |
| Decreased esophageal motility                                        | 67 (75)*                                | 50 (14)                                |
| Decreased pulmonary diffusing capacity                               | 67 (43)                                 | 46 (13)                                |
| Lymphadenopathy                                                      | 39                                      | 48                                     |
| Splenomegaly                                                         | 19                                      | 23                                     |
| Hepatomegaly                                                         | 15                                      | 15                                     |
| Salivary-gland enlargement, xerostomia or keratoconjunctivitis sicca | 7                                       | 4                                      |
| Hashimoto's thyroiditis                                              | 6                                       | 0                                      |

\*Figures in parentheses denote no. of patients tested.

# Type II Interferon (*IFN-α*) in the sera of patients with SLE is associated with disease activity

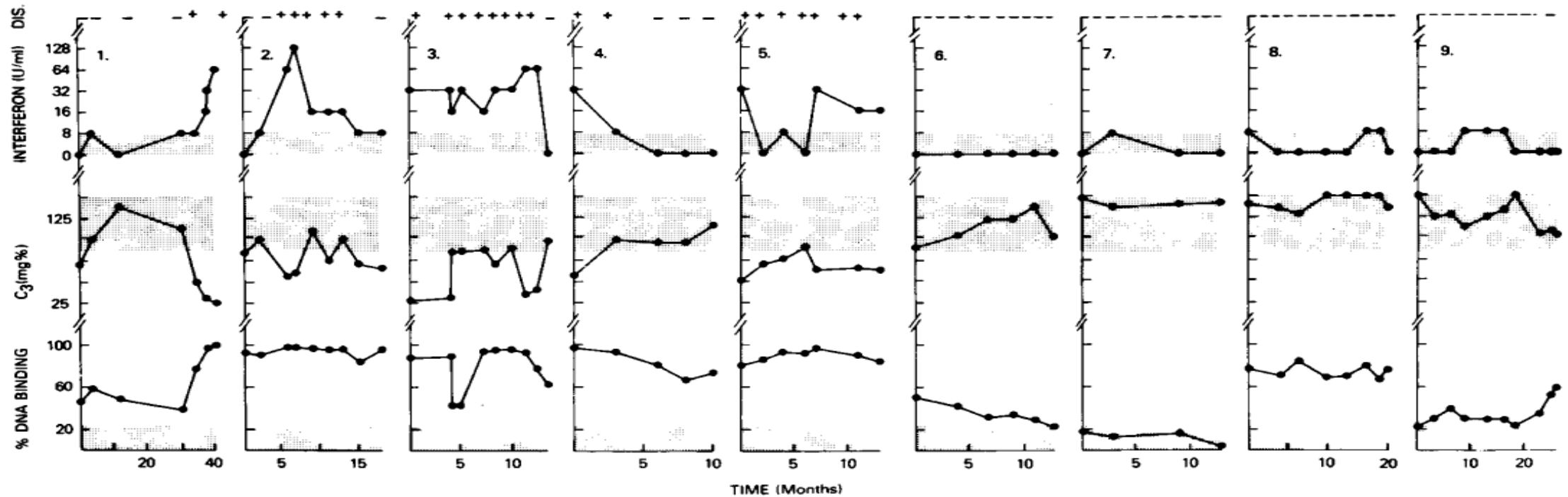
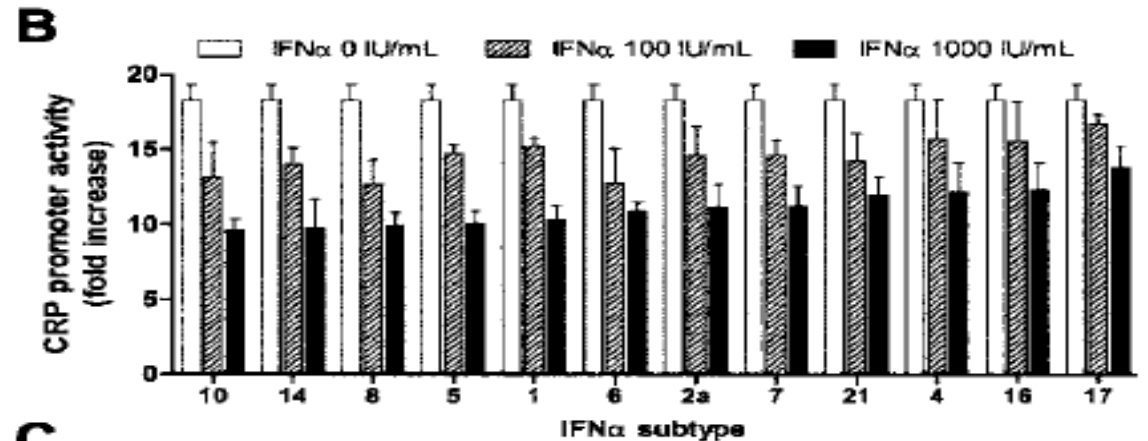
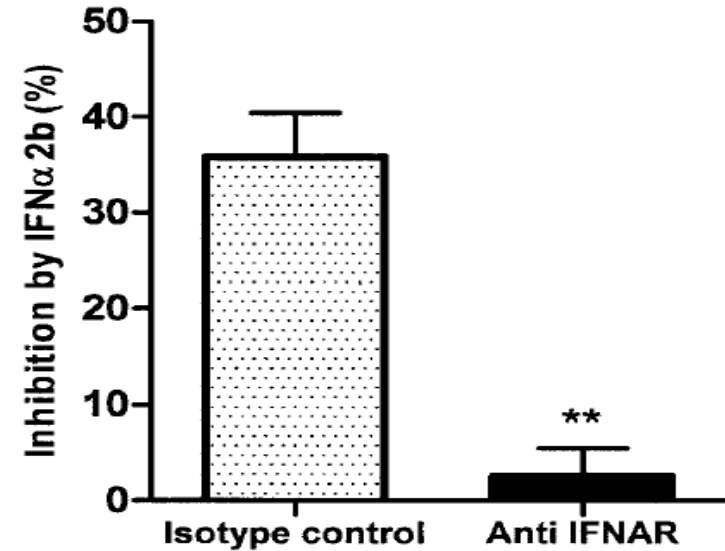
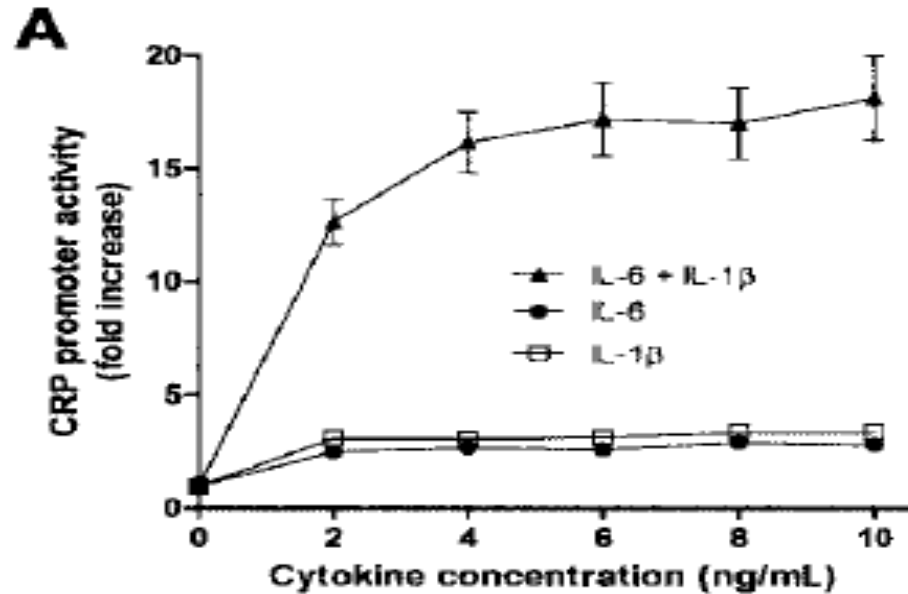


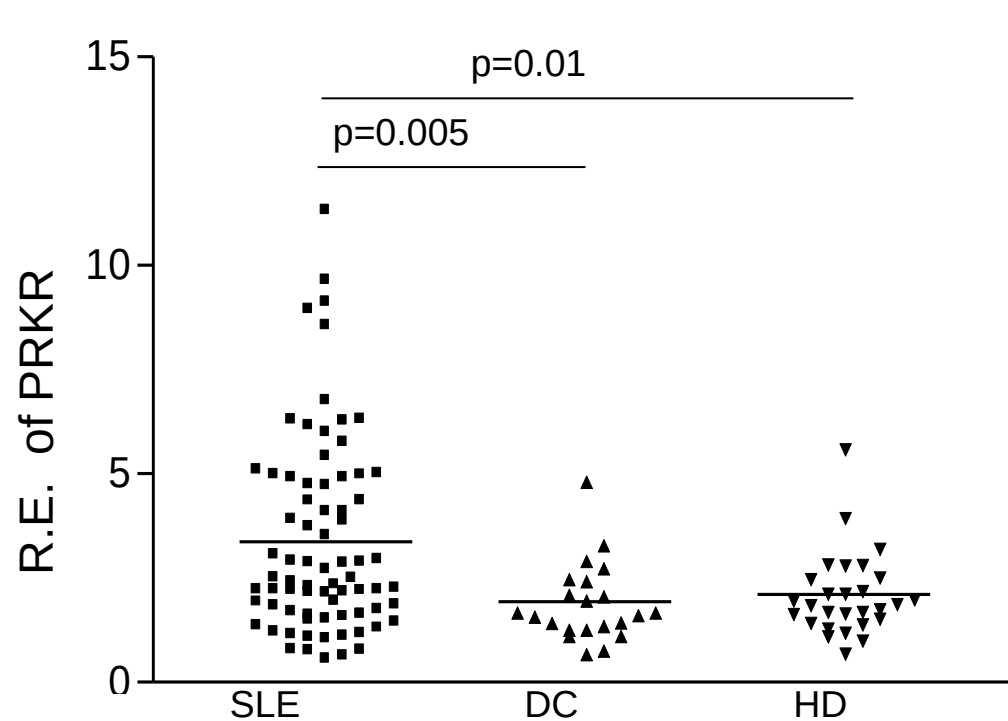
Figure 1. Comparison of Disease Activity with Interferon, C3 and DNA Binding in Serial Serum Specimens from Nine Patients with Systemic Lupus Erythematosus.

# Η IFN-α καταστέλλει την μεταγραφή του γονιδίου της CRP

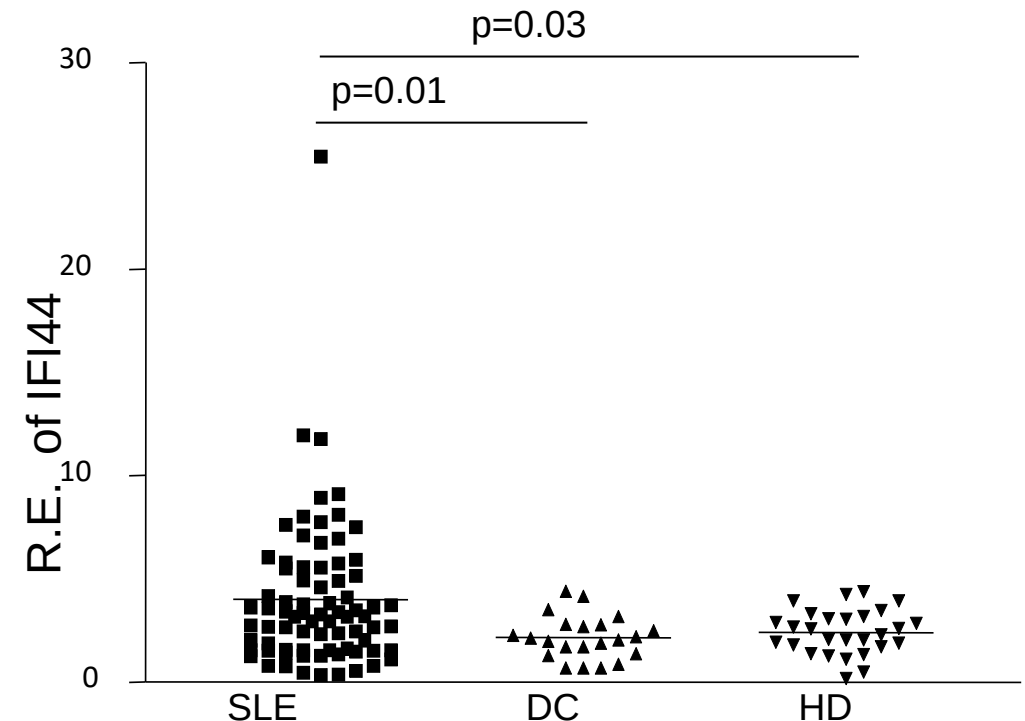


Enocsson H, et al, Arthritis & Rheum 2009;60: 3755-3760

# Η έκφραση των γονιδίων που επάγονται από την IFN $\alpha$ είναι αυξημένη στο >40% των ασθενών με ΣΕΛ



Interferon-Inducible Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase (PRKR)



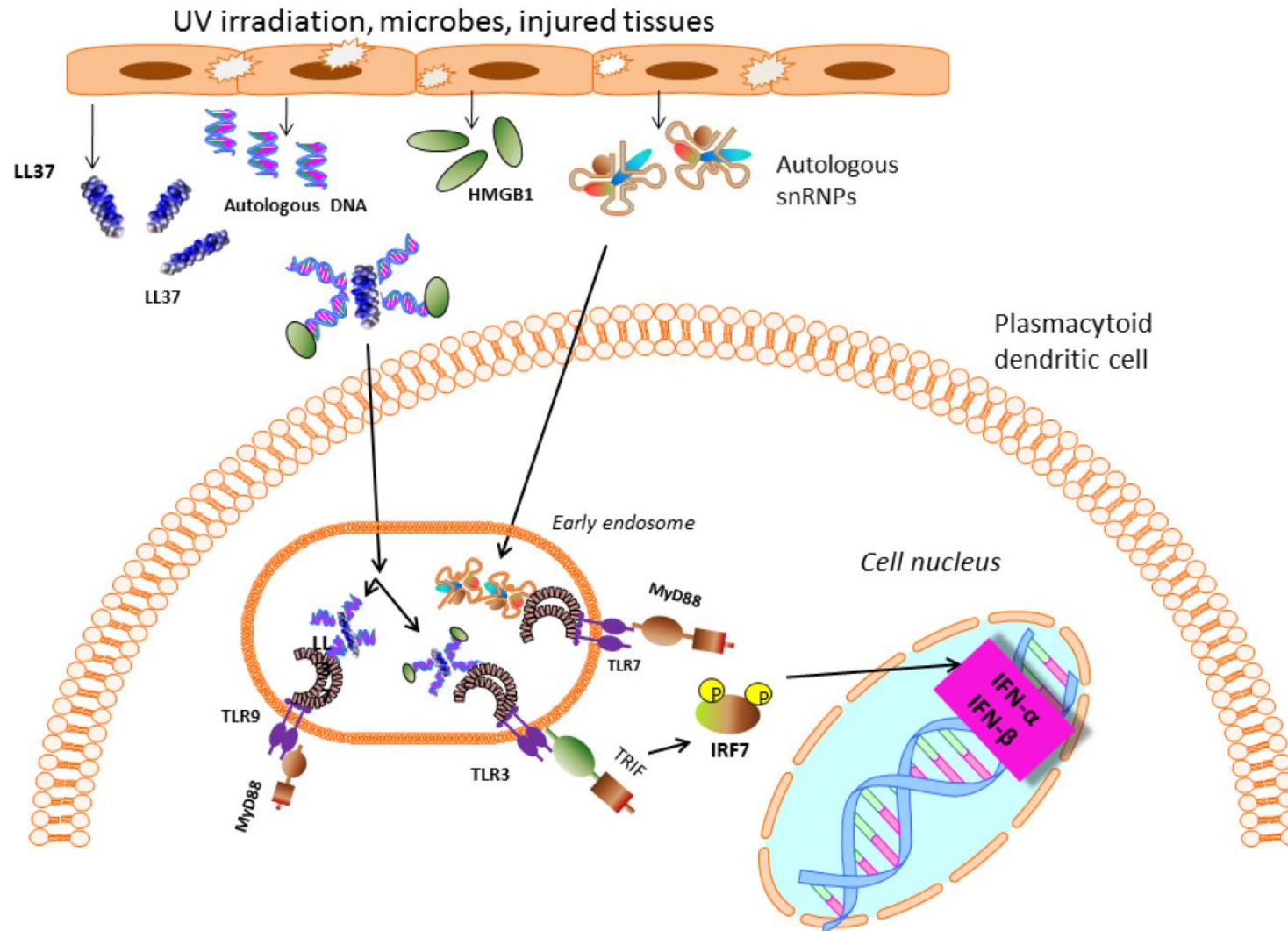
Human IFN- $\alpha$ -Inducible Protein (IFI44)

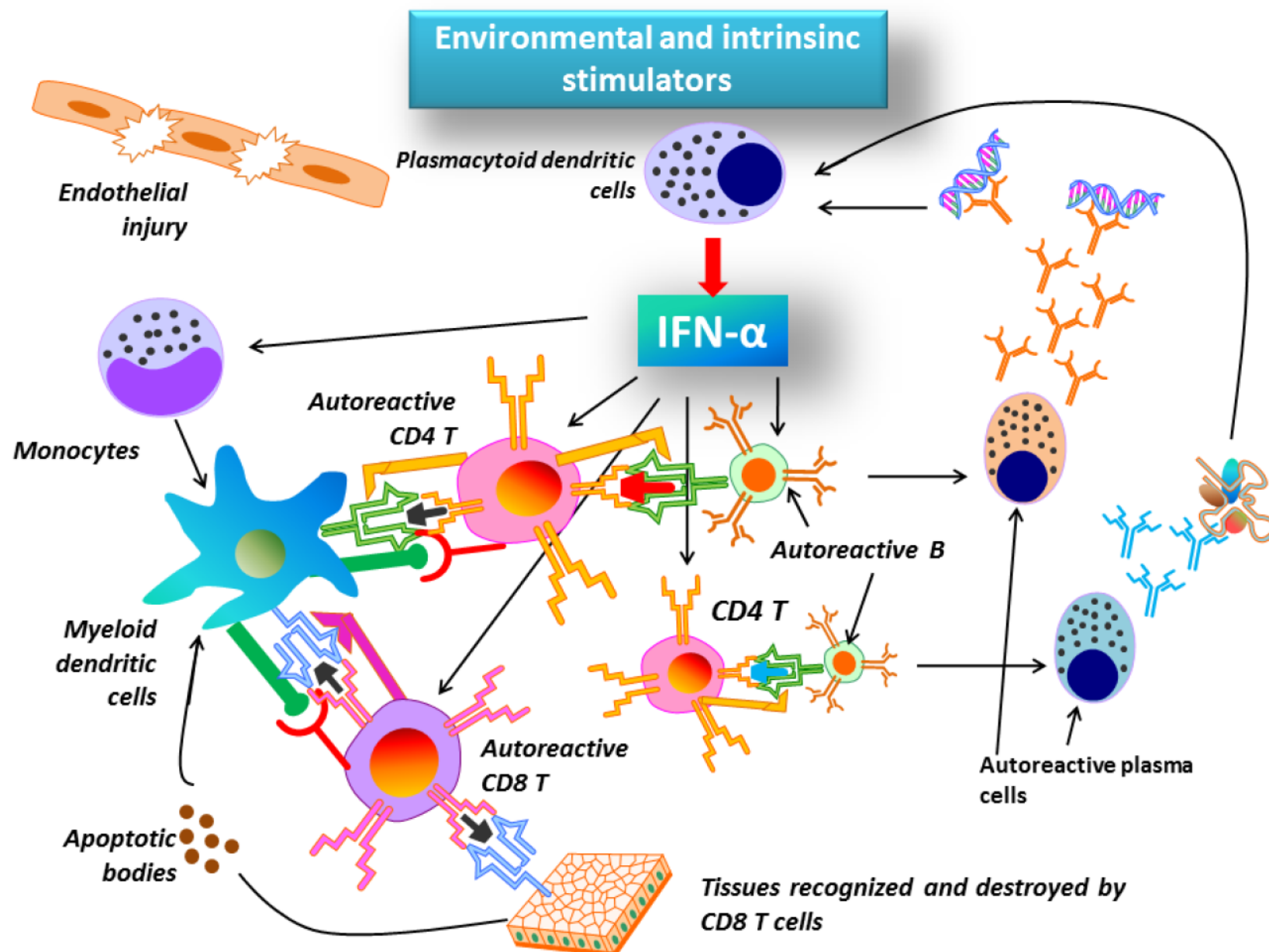


# Χαρακτηριστικά του DNA ασθενών με ΣΕΛ

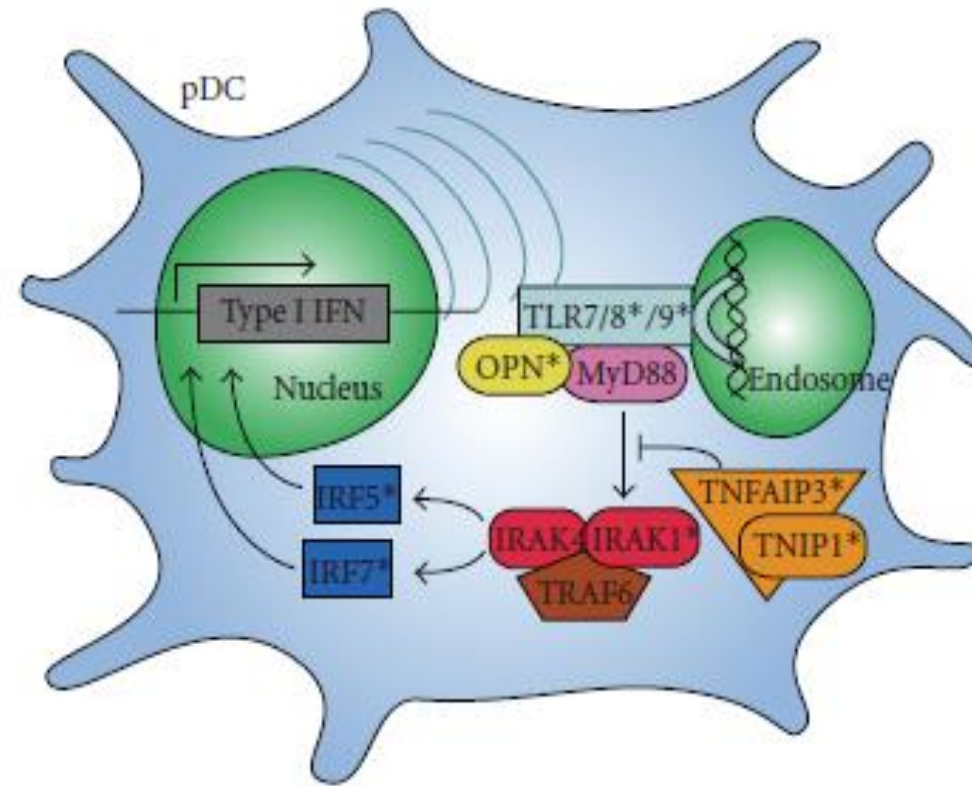
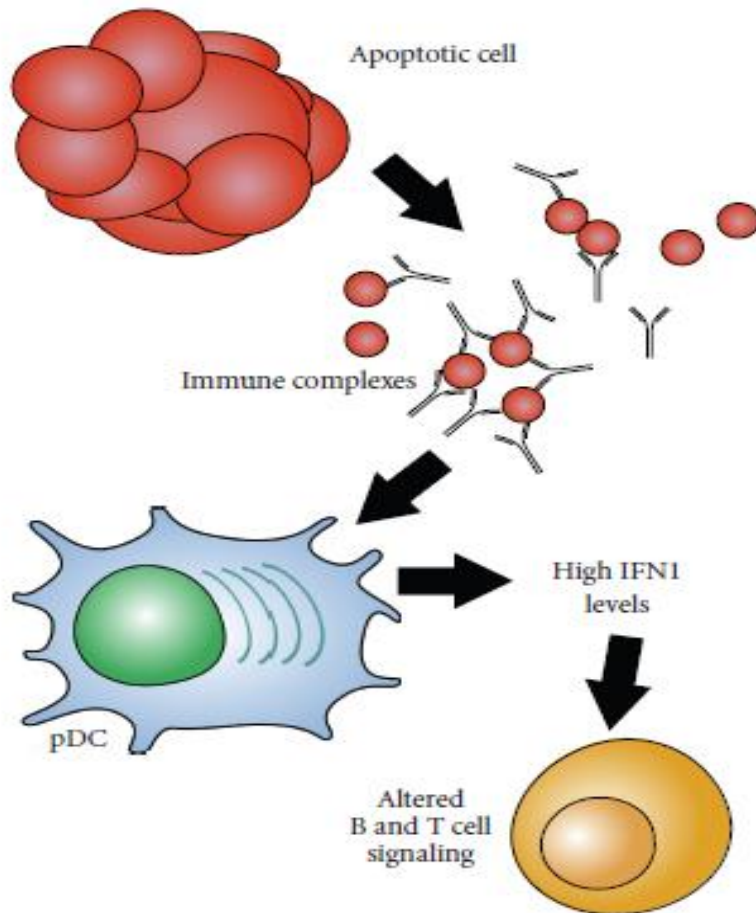
- Βραχέα διπλής έλικας μόρια με περιοχές μονής έλικας
- Τα συστατικά γουανίνης-κυττοσίνης είναι όμοια με αυτά του ανθρώπινου DNA
- Ανωμαλίες στην κινητική αναδιάταξης.
- Κυτταρική απελευθέρωση εξω-γονιδιακού DNA πλούσιου σε αλληλουχίες *Alu*
  - Σημείωση: Στοιχεία *Alu* είναι βραχέα τμήματα DNA αρχικά χαρακτηρισθέντα από τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης του *Arthrobacter luteus* (*Alu*). Σχετίζονται με την έκφραση γονιδίων

Προϊόντα ιών και βεβλαμμένων ιστών καθώς και εξωγονιδιακό DNA παρουσιάζονται στους TLR του ενδοσώματος των πλασματοκυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων





Τα συμπλέγματα RNA/πρωτεΐνης, καθώς και τα ανοσοσυμπλέγματα είναι δυνητικοί ενεργοποιητές της παραγωγής IFN-I



# Συμπεράσματα

- Απλές κλινικές παρατηρήσεις οδήγησαν στην ιδέα ότι σε ασθενείς με ΣΕΛ αναπτύσσονται αντισώματα που στρέφονται εναντίον ιδίων ιστών (αυτοαντισώματα)
- Αναλυτική χημεία βοήθησε την διάκριση μεταξύ ποικίλλων αυτοαντισωμάτων αλλά και στην ανακάλυψη της δομής των αντιστοιχών αυτοαντιγόνων
- Τα αυτοαντισώματα πιθανώς βοηθούν στην ταξινόμηση και ως ένα βαθμό στην πρόγνωση των ασθενών
- Η ανακάλυψη του ελεύθερου DNA στον ορό των ασθενών με ΣΕΛ, άνοιξε τον δρόμο για την κατανόηση μέρους της παθογένειας της νόσου