

Πανεπιστήμιο Κρήτης – Τμήμα Βιολογίας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Πρωτεϊνική Βιοτεχνολογία

**Χαρακτηρισμός μοριακών ανοσολογικών
αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιώντας
βιοαισθητήρες και ολόκληρα κύτταρα**

Μιχάλης Σαϊτάκης

Διδακτορική διατριβή

2010

University of Crete – Department of Biology

Graduate Program
Protein Biotechnology

**Characterization of molecular immunological
interactions using biosensors and whole cells**

Michael Saitakis

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy

2010

Στον Κωνσταντίνο και την Ελευθερία

Πρόλογος

Η δουλειά που παρουσιάζεται στη διατριβή αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοαισθητήρων της Καθ. Ηλέκτρας Γκιζελή στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, εκτός από την προετοιμασία Τ κυτταρικών σειρών που έγινε στο εργαστήριο του Prof. Hugh Reybourn στο Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογίας (CNB) στη Μαδρίτη. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και τα πειράματα που παρουσιάζονται προετοιμάστηκαν και πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα από το συγγραφέα, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Τίποτα από αυτά δε θα είχε γίνει χωρίς την καθοδήγηση της επιβλέπουσας καθηγήτριας, Ηλέκτρας Γκιζελή, στην οποία θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για τα τόσα χρόνια συνεργασίας και επιτυχιών καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή που ήρθα στο εργαστήριο το μακρινό πλέον 2005. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθ. Ειρήνη Αθανασάκη για τις πολύτιμες συμβουλές της όλα αυτά τα χρόνια σχετικά με ανοσολογία και κυτταρικές καλλιέργειες. Επίσης, ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω προς τον Καθ. Αριστείδη Ηλιόπουλο για την πολύτιμη συμβολή του στην τριμελή μου επιτροπή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ πηγαίνει στα μέλη του εργαστηρίου Βιοαισθητήρων, Δρ. Αχιλλέα Τσορτό, Δρ. Γιώργο Παπαδάκη και Αλέξανδρο Πανταζή καθώς και τα παλαιότερα μέλη Δρ. Κωνσταντίνο Μητσακάκη, Dr. Florian Bender, Αριάδνη Πριγκηπάκη, Δρ. Μαρία Χατζηνικολαΐδου, Dr. Kathryn Melzak, Μάκη Καπέλλιο και Σταλω Χατζηχαραλάμπους. Αυτό για την συνεργασία και τις ευχαριστες στιγμές εντός και εκτός του εργαστηρίου. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη των υπόλοιπων εργαστηρίων και συγκεκριμένα των εργαστηρίων Ανοσοβιολογίας, Κρυσταλλογραφίας, Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας, Βιοϋλικών και Βιοτεχνολογίας Φυτών.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στους εξωτερικούς συνεργάτες του εργαστηρίου, τον Prof. Hugh Reybourn από το Centro Nacional de Biotecnologia, Madrid, Spain για τη συνεργασία του τους μήνες που δούλεψα στο εργαστήριο του και τον Prof. Robert Tampe από το Biozentrum, Frankfurt, Germany για τα δείγματα λιπιδίων που μας έστειλε.

Το κυριότερο ευχαριστώ πηγαίνει στην οικογένεια μου, Κωνσταντίνο, Ελευθερία και Κίμωνα για την υποστήριξη τους, ψυχολογική και οικονομική. Τίποτα από αυτά δε θα είχε γίνει χωρίς αυτούς. Ένα τελικό ευχαριστώ πηγαίνει στους φίλους για τις μέρες και τις νύχτες που έχουμε περάσει όλα αυτά τα χρόνια στο Ηράκλειο.

Περίληψη

Οι μοριακές αλληλεπιδράσεις που καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου/κυττάρου μεσολαβούνται από μόρια ενσωματωμένα στην κυτταρική μεμβράνη, είναι άφθονες στο ανοσοποιητικό σύστημα και είναι διαφορετικές από ότι ανάμεσα σε διαλυτά μόρια. Εστίαση έγινε στην ανάπτυξη τεχνικών μελέτης τέτοιων αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιώντας βιοαισθητήρες. Ένα καλά ορισμένο μοντέλο κυτταρικό σύστημα χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των αποκρίσεων βιοαισθητήρων κατά την αλληλεπίδραση μεμβρανικών υποδοχέων, τάξης I MHC μορίων HLA-A2 στην επιφάνεια κυττάρων, με προσδέτες τους, μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά έναντι του HLA-A2, ακινητοποιημένου στην επιφάνεια των αισθητήρων. Οι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιήθηκαν, ένας αισθητήρας τύπου Love και ένας αισθητήρας-μικροζυγός κρυσταλλικού χαλαζία (QCM), ανίχνευσαν ποσοτικά τη μοριακή αλληλεπίδραση. Επίσης, εμφάνισαν διαφορετική ευαισθησία σε διαφορετικούς χειρισμούς των κυττάρων, όπως διατάραξη του κυτταροσκελετού από κυτοχλασίνη (στον QCM), ή διαχωρισμός των κυτταρικών τύπων με βάση την επιφανειακή πυκνότητα των HLA μορίων (στον αισθητήρα Love). Για τον αισθητήρα Love, η απώλεια ενέργειας του ακουστικού κύματος έδειξε γραμμική συσχέτιση με τον αριθμό των μεμβρανικών υποδοχέων που προσδένονται ειδικά στα ακινητοποιημένα αντισώματα και χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό της αλληλεπίδρασης υπολογίζοντας τις κινητικές παραμέτρους και τη συγγένεια σε 2D. Επιπλέον, φανερώθηκε η εξάρτηση της κυτταρικής προσκόλλησης από την κατάσταση του γλυκοκάλυκα των κυττάρων. Για τη μετάβαση σε ένα περισσότερο βιολογικά σημαντικό ζεύγος αλληλεπίδρασης, αναπτύχθηκαν μοντέλα μεμβρανών σε επιφάνειες βιοαισθητήρων για την πρόσδεση πρωτεϊνών ενδιαφέροντος. Δυο τύποι λιπιδικών μεμβρανών προετοιμάστηκαν, λιπιδικές μονοστοιβάδες σε μονοστοιβάδες θειολών και λιπιδικές διπλοστοιβάδες σε υδρόφιλες επιφάνειες silica. Επίσης, προτάθηκε μια τεχνική βιοαισθητήρα για τη μελέτη της πρόσδεσης T κυττάρων σε επιφάνεια με pMHCs. Ως σύστημα TCR, επιλέχθηκε ο JM22 TCR, ο οποίος αναγνωρίζει το πεπτίδιο MP(58-66) από τον ιό της γρίπης παρουσιασμένο στο HLA-A2. Η επιφάνεια του βιοαισθητήρα προετοιμάστηκε με λιπιδική μονοστοιβάδα που παρουσίαζε σύμπλοκα HLA-A2/MP(58-66). Δυο συστήματα T κυττάρων προετοιμάστηκαν, μια μεταμολυσμένη με JM22 TCR κυτταρική σειρά και πρωτογενείς T κυτταρικοί κλώνοι απομονωμένοι από περιφερικό αίμα. Αυτά τα κύτταρα χαρακτηρίστηκαν για έκφραση TCR και κυτταροτοξικότητα. Ο μακροπρόθεσμος στόχος είναι η μέτρηση παραμέτρων πρόσδεσης σε 2D για την αλληλεπίδραση TCR/pMHC και η συσχέτισή τους με την φυσιολογική απόκριση των κυττάρων στην αναγνώριση αντιγόνου.

Λέξεις-κλειδιά: μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας, ακουστικοί βιοαισθητήρες, ολόκληρα κύτταρα, μοντέλα μεμβρανών, αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης- πρωτεΐνης, κινητική δυο διαστάσεων, συγγένεια δυο διαστάσεων

Abstract

Molecular interactions that govern cell-cell interactions are mediated by molecules embedded in the cell membrane, are very common in the immune system and are distinct from interactions between soluble molecules. Assays that can detect these interactions in a non-invasive way are particularly useful. Work was focused towards the development of such assays using biosensors. A well-defined cellular model system was used to study the responses of biosensor systems during the interaction of cell membrane receptors, class I MHC HLA-A2 molecules on the surface of cells, bound to ligands, anti-HLA-A2 monoclonal antibodies, immobilized on the sensor devices. The acoustic biosensor systems used, a Love-wave sensor and a quartz crystal microbalance (QCM) sensor detected the molecular interaction quantitatively but showed different sensitivity to different cell treatments: the QCM sensor detected cytoskeleton perturbations by cytochalasin whereas the Love-wave sensor distinguished cell types on the basis of cell surface HLA densities. For the Love-wave sensor, acoustic energy dissipation was found to correlate directly with the number of cell-membrane receptors specifically attached to immobilized antibodies, which enabled the characterization of the interaction via the calculation of the 2D kinetic and affinity parameters. Also, the dependence of cell adhesion on glycocalyx condition was demonstrated for HLA/anti-HLA binding. In order to move towards the characterization of a more biologically significant interaction pair, membrane models on biosensor surfaces were developed for the attachment of proteins of interest. Two types of lipid membranes were prepared, lipid monolayers on self-assembled thiol layers and lipid bilayers on hydrophilic silica surfaces. A real-time biosensing technique to study the binding of T cells to a pMHC-modified surface was proposed. As a TCR system, the JM22 TCR, which recognizes the influenza matrix peptide MP(58-66) presented on HLA-A2, was selected. The biosensor surface was prepared using a lipid monolayer presenting HLA-A2/MP(58-66) complexes. Two T cell systems were prepared for the biosensor technique, a cell line transfected with JM22 TCR and primary T cell clones isolated from peripheral blood. These cells were characterized for TCR expression and cytotoxicity. The long-term goal is to measure the 2D binding parameters of the TCR-pMHC interaction and correlate these with the physiological response of cells to antigen recognition.

Keywords: major histocompatibility complex, acoustic biosensors, whole cells, model membranes, protein-protein interactions, two-dimensional kinetics, two-dimensional affinity

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1

Αλληλεπιδράσεις μεμβρανικών μορίων στο ανοσοποιητικό σύστημα

	<u>1</u>
1. Προσαρμοστική ανοσία	<u>1</u>
2. Μεμβρανικά μόρια στο ανοσοποιητικό σύστημα	<u>3</u>
2.1. Ανοσοσφαρίνες	<u>3</u>
2.1.1. Δομή και λειτουργία των ανοσοσφαιρινών	<u>3</u>
2.1.2. Εφαρμογές των ανοσοσφαιρινών	<u>5</u>
2.2. Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας	<u>6</u>
2.2.1. Τάξης I MHC μόρια	<u>6</u>
2.2.2. Τάξης II MHC μόρια	<u>7</u>
2.2.3. Άλλα MHC μόρια	<u>8</u>
2.3. Υποδοχέας T κυττάρων	<u>9</u>
2.4. Συνυποδοχείς και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης	<u>11</u>
3. Μοριακή αναγνώριση σε κυτταρικό επίπεδο	<u>12</u>
4. Μελέτη κυτταρικών αλληλεπιδράσεων σε μοριακό επίπεδο	<u>14</u>
5. Ανοσολογική σύναψη και αναγνώριση αντιγόνου από τα T κύτταρα	<u>15</u>
6. Βιβλιογραφία	<u>16</u>

Κεφάλαιο 2

Εισαγωγή στους βιοαισθητήρες

	<u>21</u>
1. Βιοαισθητήρες-Γενικά	<u>21</u>
2. Οπτικοί βιοαισθητήρες	<u>23</u>
2.1. Οπτικοί βιοαισθητήρες τύπου SPR	<u>23</u>
2.2. Εφαρμογές οπτικών βιοαισθητήρων	<u>24</u>
3. Ακουστικοί Βιοαισθητήρες	<u>27</u>
3.1. Βιοαισθητήρες μικροζυγοί κρυσταλλικού χαλαζία	<u>28</u>
3.2. Βιοαισθητήρες επιφανειακού ακουστικού κύματος	<u>29</u>
4. Εφαρμογές των ακουστικών βιοαισθητήρων	<u>31</u>
4.1. Ανίχνευση και μελέτη μοριακών αλληλεπιδράσεων	<u>32</u>
4.2. Ανίχνευση και μελέτη λιπιδικών μεμβρανών με βιοαισθητήρες	<u>33</u>
4.3. Ακουστικοί βιοαισθητήρες και μελέτη κυτταρικής προσκόλλησης	<u>33</u>
5. Βιβλιογραφία	<u>36</u>

Κεφάλαιο 3

Πειραματικές διατάξεις

	<u>43</u>
1. Ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love	<u>43</u>
2. Ακουστικός βιοαισθητήρας QCM-D	<u>46</u>
3. Οπτικός Βιοαισθητήρας SPR	<u>48</u>
4. Μικροσκοπία	<u>49</u>
5. Κυτταρομετρία ροής	<u>50</u>
6. Βιβλιογραφία	<u>52</u>

Κεφάλαιο 4

Μοντέλο βιολογικό σύστημα για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεμβρανικών μορίων με τη χρήση βιοαισθητήρων – Χειρισμός και μελέτη κυτταρικών σειρών	<u>53</u>
1. Μοριακή αλληλεπίδραση του HLA-A2 με μονοκλωνικό αντίσωμα	<u>53</u>
2. Κυτταρικές σειρές και καλλιέργειες	<u>54</u>
3. Χειρισμοί κυττάρων	<u>55</u>
3.1. Παραγωγή κυττάρων με διαφορετικούς αριθμούς μεμβρανικών HLA μορίων	<u>55</u>
3.2. Παραγωγή κυττάρων με τροποποιημένο γλυκοκάλυκα	<u>55</u>
3.3. Παραγωγή κυττάρων με τροποποιημένη συσσωμάτωση των HLA μορίων	<u>55</u>
3.4. Παραγωγή μονιμοποιημένων κυττάρων	<u>56</u>
3.5. Παραγωγή κυττάρων με τροποποιημένο κυτταροσκελετό ακτίνης	<u>56</u>
4. Κυτταρομετρία ροής	<u>56</u>
5. Μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων	<u>57</u>
6. Βιβλιογραφία	<u>60</u>

Κεφάλαιο 5

Μελέτη αλληλεπιδράσεων HLA μορίων στη μεμβράνη κυττάρων και anti-HLA αντισωμάτων ακινητοποιημένων στην επιφάνεια βιοαισθητήρων	<u>63</u>
1. Ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love	<u>63</u>
1.1 Προετοιμασία επιφάνειας βιοαναγνώρισης	<u>63</u>
1.2 Αλληλεπίδραση κυττάρων με την επιφάνεια του βιοαισθητήρα	<u>64</u>
2. Ακουστικός βιοαισθητήρας QCM-D	<u>70</u>
2.1. Προετοιμασία επιφάνειας βιοαναγνώρισης	<u>70</u>
2.2. Αλληλεπίδραση κυττάρων με την επιφάνεια του βιοαισθητήρα	<u>71</u>
3. Οπτικός βιοαισθητήρας SPR	<u>73</u>
3.1. Προετοιμασία επιφάνειας βιοαναγνώρισης	<u>73</u>
3.2. Αλληλεπίδραση κυττάρων με την επιφάνεια του βιοαισθητήρα	<u>74</u>
4. Επίδραση του κυτταροσκελετού στην αλληλεπίδραση των κυττάρων με την επιφάνεια του βιοαισθητήρα	<u>76</u>
5. Συμπεράσματα	<u>78</u>
6. Βιβλιογραφία	<u>78</u>

Κεφάλαιο 6

Ο ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love ως εργαλείο για το χαρακτηρισμό αλληλεπιδράσεων κυττάρου/υποστρώματος	<u>81</u>
1. Βιοφυσική μελέτη της αλληλεπίδρασης HLA/anti-HLA	<u>82</u>
1.1. Υπολογισμός κινητικών σταθερών και σταθεράς συγγένειας δύο διαστάσεων	<u>82</u>
1.2. Επίδραση του γλυκοκάλυκα στην αλληλεπίδραση HLA/anti-HLA	<u>86</u>
2. Επιπρόσθετα ποιοτικά αποτελέσματα	<u>88</u>
2.1. Επίδραση της συσσωμάτωσης και της πλευρικής διάχυσης στην	

αλληλεπίδραση HLA/anti-HLA	<u>88</u>
2.2. Επίδραση του κυτταροσκελετού	<u>91</u>
3. Συμπεράσματα	<u>93</u>
4. Βιβλιογραφία	<u>93</u>

Κεφάλαιο 7

Σχηματισμός λιπιδικών μεμβρανών για τη μελέτη αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών στην επιφάνεια βιοαισθητήρων	<u>97</u>
1. Σχηματισμός λιπιδικών διπλοστοιβάδων στην επιφάνεια ακουστικών βιοαισθητήρων	<u>98</u>
1.1. Υδρόφιλες επιφάνειες για τη δημιουργία λιπιδικών διπλοστοιβάδων	<u>99</u>
1.2. Πρωτεϊνικές επιφάνειες για την δημιουργία προσδεμένων λιπιδικών διπλοστοιβάδων	<u>101</u>
2. Σχηματισμός μονοστοιβάδων λιπιδίων σε αυτοσυγκροτούμενες στοιβάδες θειολών στην επιφάνεια βιοαισθητήρων	<u>106</u>
3. Συμπεράσματα	<u>113</u>
4. Βιβλιογραφία	<u>114</u>

Κεφάλαιο 8

Σχεδιασμός για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης TCR/MHC/πεπτιδίου με τη χρήση του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love	<u>119</u>
1. Βιολογικό σύστημα: ο JM22 TCR που αναγνωρίζει το πεπτιδιο MP(58-66) του ιού της γρίπης παρουσιασμένο στο HLA-A2	<u>119</u>
2. Προετοιμασία T κυττάρων με TCR που αναγνωρίζει το HLA-A2/MP(58-66)	<u>121</u>
2.1. Κλωνοποίηση των γονιδίων των αλυσίδων α και β του JM22 TCR σε φορέα έκφρασης και μεταμόλυνση TCR ⁺ κυτταρικών σειρών	<u>121</u>
2.2. Προετοιμασία HLA-A2-εξαρτώμενων πρωτογενών κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων έναντι του MP(58-66)	<u>124</u>
3. Προετοιμασία επιφάνειας του ακουστικού βιοαισθητήρα με το σύμπλοκο HLA-A2/MP(58-66) σε λιπιδική μεμβράνη	<u>126</u>
4. Μελλοντικά πειράματα: αλληλεπίδραση TCR στη μεμβράνη T κυττάρων με HLA-A2/MP(58-66) στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love	<u>129</u>
5. Βιβλιογραφία	<u>130</u>

Επίλογος	<u>133</u>
-----------------	-------------------

Δημοσιεύσεις και Συνέδρια	<u>135</u>
----------------------------------	-------------------

Κεφάλαιο 1

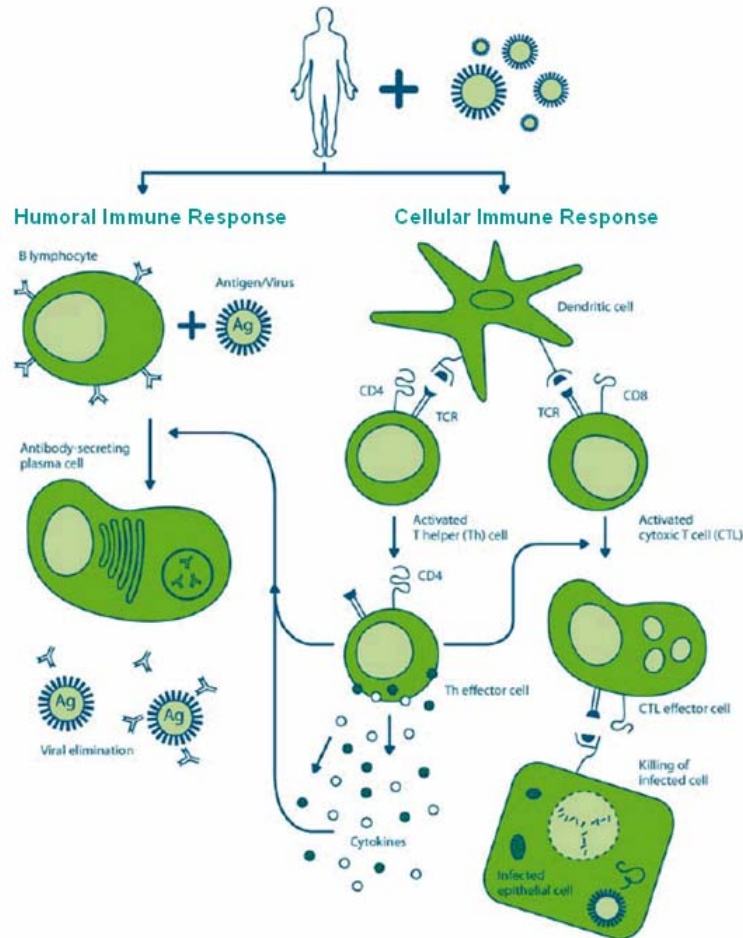
Αλληλεπιδράσεις μεμβρανικών μορίων στο ανοσοποιητικό σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί τη γραμμή άμυνας ενός οργανισμού έναντι σε παράσιτα, ιούς ή άλλου είδους απειλή. Αποτελείται από πολλαπλούς μηχανισμούς, ενώ μορφές ανοσίας απαντώνται σε όλες σχεδόν τις μορφές ζωής, από μονοκύτταρους οργανισμούς ως φυτά, έντομα και ανώτερα σπονδυλωτά. Συγκεκριμένα στα σπονδυλωτά, το ανοσοποιητικό σύστημα εμφανίζει μια πολύπλοκη μορφή αποτελούμενο από εξειδικευμένα μόρια, κύτταρα και όργανα, τα οποία έχουν εξελιχθεί για να ανιχνεύουν και να εξολοθρεύουν ιούς, βακτήρια, παράσιτα και άλλες απειλές προς τον οργανισμό. Επίσης, το ανοσοποιητικό σύστημα έχει τη δυνατότητα να ξεχωρίζει ανάμεσα σε «ξένες» απειλές και τον ίδιο τον οργανισμό αλλά και να προσαρμόζεται σε νέες και παλιές απειλές διατηρώντας μια μορφή ανοσολογικής μνήμης. Γενικά, η αντιμετώπιση ενός ξένου σώματος συμβαίνει κλιμακωτά, καθώς το ανοσοποιητικό σύστημα προσφέρει πολλαπλές γραμμές άμυνας. Ως πρώτη γραμμή άμυνας μπορούν να θεωρηθούν τα φυσικά εμπόδια που μπορεί να συναντήσουν οι εισβολείς για την είσοδο στον οργανισμό, όπως το δέρμα στα θηλαστικά ή ο εξωσκελετός στα αρθρόποδα. Κατόπιν, μπορούν να λάβουν δράση, οι δύο κύριοι κλάδοι του ανοσοποιητικού συστήματος, δηλαδή η έμφυτη και η προσαρμοστική ανοσία. Η έμφυτη ανοσία είναι εξελικτικά αρχαιότερη και προσφέρει άμεση απόκριση σε απειλές χωρίς όμως κάποια ειδικότητα. Μορφές έμφυτης ανοσίας στα σπονδυλωτά αποτελούν τα αντιμικροβιακά πεπτιδία, το σύστημα του συμπληρώματος και η αντίδραση φλεγμονής^{1,2}. Αν δεν αντιμετωπιστεί πλήρως η απειλή από τους μηχανισμούς έμφυτης ανοσίας, ακολουθεί η ενεργοποίηση της προσαρμοστικής ανοσίας. Η προσαρμοστική ανοσία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση εξειδικευμένων κυττάρων, την αναγνώριση της απειλής και την προσαρμογή της απόκρισης για την αύξηση της αποτελεσματικότητας. Η κατανόηση του τρόπου λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος έχει συμβάλει και συνεχίζει να συμβάλλει στην αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς. Αυτό έγινε κυρίως μέσω της διαδικασίας του εμβολιασμού³, ο οποίος βασίστηκε στην προσαρμοστική ανοσία και αποτελεί μια τεχνητή επαγωγή ανοσολογικής απόκρισης για την πρωτογενή αναγνώριση ενός πιθανού επικίνδυνου εισβολέα από το ανοσοποιητικό σύστημα. Επιπλέον, η καλή κατανόηση του ανοσοποιητικού συστήματος θα μπορέσει να βοηθήσει στην καλύτερη αντιμετώπιση ορισμένων μορφών καρκίνου, όπως συμβαίνει με τις ανοσοθεραπείες⁴.

1. Προσαρμοστική ανοσία

Το σύστημα της προσαρμοστικής ανοσίας των ανώτερων σπονδυλωτών αποτελείται από εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους και διαδικασίες, οι οποίοι ανιχνεύουν και αντιμετωπίζουν πιθανούς εισβολείς του οργανισμού. Η προσαρμοστική ανοσία εξελίχθηκε αργότερα από την έμφυτη και προσφέρει ειδική αναγνώριση και μνήμη των παθογόνων που συναντά ο οργανισμός. Οι τρόποι δράσης της προσαρμοστικής ανοσίας είναι δύο, η χυμική ανοσολογική απόκριση και η κυτταρική (Εικ. 1.1). Στη χυμική ανοσία, η απόκριση του οργανισμού

μεσολαβείται από τα αντισώματα (antibodies), διαλυτές πρωτεΐνες που ονομάζονται ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulins), οι οποίες λειτουργούν ως στοιχεία αναγνώρισης και προσδένονται ειδικά σε ξένα μόρια, τα αντιγόνα (antigens). Δρουν, επίσης, ως μόρια σηματοδότησης μιας εισβολής. Τα αντισώματα παράγονται από τα Β λεμφοκύτταρα της σειράς των λευκών αιμοσφαιρίων. Η κυτταρική ανοσολογική απόκριση χρησιμοποιεί τα Τ λεμφοκύτταρα που παράγονται στο θύμο αδέν. Οι δύο κύριες τάξεις Τ κυττάρων συνεργάζονται για την καλύτερη αναγνώριση και αντιμετώπιση κυττάρων του οργανισμού που έχουν είτε μολυνθεί από ιό ή παράσιτο είτε μεταμορφωθεί σε καρκινικά. Συγκεκριμένα, τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (cytotoxic T lymphocytes) σκοτώνουν ειδικά τα μολυσμένα κύτταρα στόχους ενώ τα βοηθητικά Τ κύτταρα (helper T cells) συντονίζουν την απόκριση τόσο της κυτταρικής όσο και της χυμικής ανοσίας.



Εικ. 1.1. Προεπισκόπηση των δύο κλάδων της προσαρμοστικής ανοσίας του ανθρώπινου οργανισμού (Πηγή: www.flucenter.org)

Η προσαρμοστική ανοσία βασίζεται στην εκπληκτικά μεγάλη ποικιλία που εμφανίζει στην αναγνώριση αντιγόνων μέσω ειδικών υποδοχέων (αντισώματα, υποδοχείς Τ κυττάρων). Συγκεκριμένα στον άνθρωπο, μπορούν να παραχθούν πάνω από 10^8 διαφορετικά αντισώματα και πάνω από 10^{12} διαφορετικοί υποδοχείς Τ κυττάρων, αριθμοί εξωπραγματικοί αν κανείς λάβει υπόψη το συνολικό αριθμό των γονιδίων⁵ (λιγότερα από 25000). Αυτή η εκπληκτική ευελιξία οφείλεται στον ανασυνδυασμό των γονιδίων των αντισωμάτων και των υποδοχέων Τ κυττάρων και στην αυξημένο ρυθμό μεταλλαγών στα γονίδια αυτά σε συνθήκες διαφοροποίησης

και ανάπτυξης. Οι μηχανισμοί αυτοί επιτρέπουν σε ένα μικρό αριθμό γονιδίων να παράγει ένα τεράστιο αριθμό διαφορετικών υποδοχέων αντιγόνων, καθένας από τους οποίους εκφράζεται σε διαφορετικό λεμφοκύτταρο. Επίσης, τα λεμφοκύτταρα αυτά μπορούν να αυξηθούν μεταδίδοντας στις επόμενες γενιές τους την ειδικότητα του υποδοχέα τους. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται και διατηρείται η ανοσολογική μνήμη. Το άλλο βασικό χαρακτηριστικό της προσαρμοστικής ανοσίας είναι η ικανότητα των κυττάρων μεσολαβητών να ξεχωρίζουν ανάμεσα στα κύτταρα του ίδιου του οργανισμού (self) και σε ξένα σώματα (non-self) και μολυσμένα ή τροποποιημένα (missing-self) κύτταρα του οργανισμού. Η διαδικασία αναγνώρισης εξελίχθηκε έτσι ώστε τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος να περνούν από μια διαδικασία «εκπαίδευσης» για να ξεχωρίζουν τον εαυτό πριν από την ελεύθερη κυκλοφορία τους στον οργανισμό. Κατόπιν, για την αναγνώριση των αντιγόνων στην περιοχή μόλυνσης, συμβαίνει αντιγονοπαρουσίαση για την επαγωγή ανοσολογικής απόκρισης.

2. Μεμβρανικά μόρια στο ανοσοποιητικό σύστημα

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μεσολαβούν για τις αποκρίσεις του οργανισμού σε μολύνσεις. Για την επαγωγή των κυτταρικών αποκρίσεων απαιτούνται διαδικασίες μοριακής αναγνώρισης και σηματοδότησης. Σε αυτές τις διαδικασίες, κυρίαρχο ρόλο παίζουν οι μεμβρανικές πρωτεΐνες των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα, για την προσαρμοστική ανοσία, ρόλους κλειδιά κατέχουν οι ανοσοσφαιρίνες ως υποδοχείς των Β κυττάρων, οι υποδοχείς των Τ κυττάρων (T cell receptors, TCRs), τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC) ως προσδέτες των TCRs αλλά και οι κυτταροκίνες με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους. Οι TCRs και τα MHC μόρια συμμετέχουν στην διακυτταρική επαφή και επικοινωνία, ενώ οι ανοσοσφαιρίνες αλληλεπιδρούν με διαλυτά αντιγόνα και οι κυτταροκίνες ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις μέσω της πρόσδεσης στους ειδικούς υποδοχείς τους ως εξειδικευμένες ορμόνες του ανοσοποιητικού συστήματος.

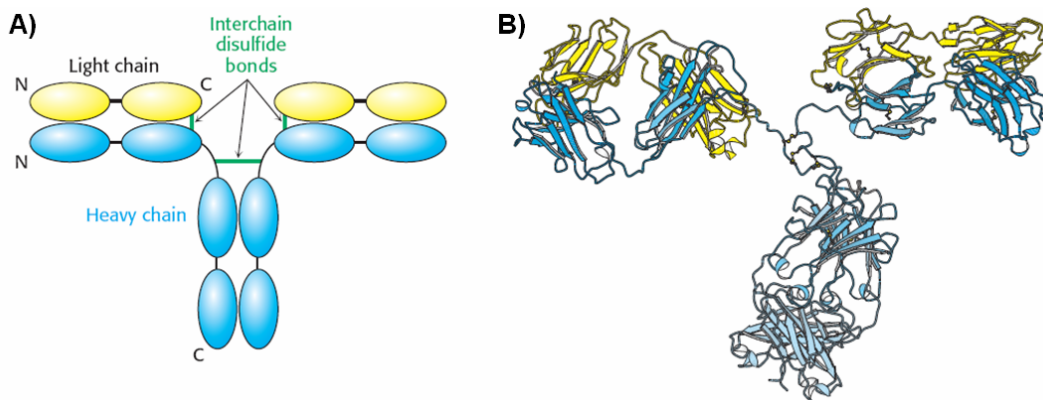
2.1. Ανοσοσφαιρίνες

Οι ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulins) απαντώνται είτε ως διαλυτά αντισώματα (antibodies) είτε ως μεμβρανικοί υποδοχείς των Β κυττάρων (B cell receptors). Η παραγωγή ανοσοσφαιρινών έναντι ενός ξένου σώματος αποτελεί την κύρια έκφραση της χυμικής ανοσολογικής απόκρισης.

2.1.1. Δομή και λειτουργία των ανοσοσφαιρινών

Οι ανοσοσφαιρίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες (150 kDa) που έχουν δομική μονάδα ένα τετραμερές από δύο βαριές και δύο ελαφριές αλυσίδες (Εικ. 1.2) οι οποίες συγκρατώνται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Υπάρχουν πέντε τύποι βαριών αλυσίδων (α, γ, δ, ε, μ) και δύο τύποι ελαφριών αλυσίδων (κ, λ) στα θηλαστικά. Σε καθεμιά από την ελαφριά και βαριά αλυσίδα υπάρχει η σταθερή (C) και η μεταβλητή (V) περιοχή της πρωτεΐνης, η οποία παράγεται έπειτα από ανασυνδυασμό της γονιδιακής περιοχής. Οι μεταβλητές περιοχές της βαριάς και

ελαφριάς αλυσίδας σχηματίζουν την περιοχή πρόσδεσης του αντιγόνου. Κάθε V περιοχή εμφανίζει στη δομή της συγκεκριμένες θηλιές, οι οποίες εμφανίζουν υπερμεταβλητότητα (hypervariability) και ονομάζονται περιοχές καθορισμού συμπληρωματικότητας (complementarity determining regions, CDRs). Οι CDRs προσδέονται με την περιοχή αναγνώρισης πάνω στο αντιγόνο, τον επίτοπο¹. Οι C περιοχές σχηματίζονται από μια ή περισσότερες επαναλήψεις της χαρακτηριστικής επικράτειας αναδίπλωσης ανοσοσφαιρίνης (Ig-fold domain). Οι C περιοχή της βαριάς αλυσίδας είναι σχεδόν τριπλάσια από αυτή της ελαφριάς αλυσίδας και σχηματίζει με την C περιοχή της άλλης βαριάς αλυσίδας την Fc περιοχή της ανοσοσφαιρίνης. Η Fc περιοχή επιτελεί λειτουργίες όπως αλληλεπίδραση με υποδοχείς Fc σε μακροφάγα, ουδετερόφιλα και μαστοκύτταρα και ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος².

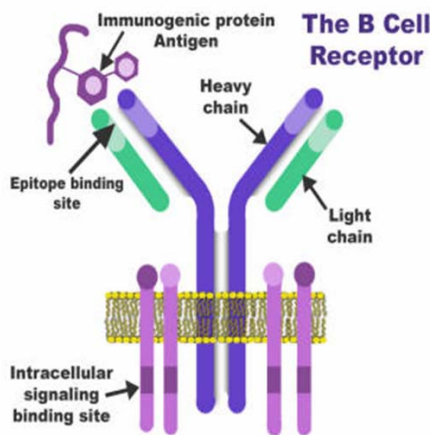


Εικ. 1.2. A) Απλοποιημένη παρουσίαση της δομής των ανοσοσφαιρινών. Οι βαριές (Heavy) και οι ελαφριές αλυσίδες συγκρατούνται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. B) Δομή των ανοσοσφαιρινών σε διάγραμμα «κορδέλας» (Ribbon diagram). (Πηγή: Berg et al., 2006)

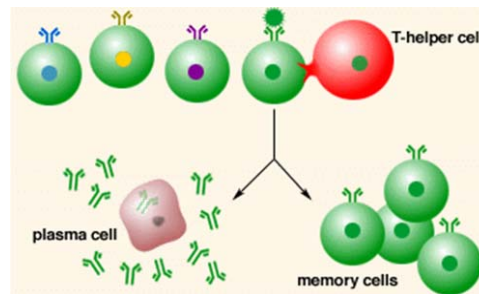
Ο ανασυνδυασμός των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών επιτρέπει την παραγωγή ενός τεράστιου αριθμού διαφορετικών ειδικοτήτων (περίπου 10^8). Για την έκφραση μιας βαριάς αλυσίδας, συμβαίνει στα B κύτταρα ανασυνδυασμός μεταξύ των ομάδων των γονιδιακών κομματιών (V, D, J και C) που συνθέτουν το γονίδιο. Επομένως, το ώριμο γονίδιο της βαριάς αλυσίδας θα αποτελείται από καθένα από τα γονιδιακά κομμάτια, δηλαδή από ένα των V, D, J και C. Ομοίως, η ελαφριά αλυσίδα θα σχηματιστεί από τον ανασυνδυασμό των V, J και C γονιδιακών κομματιών της. Έπειτα από τον ανασυνδυασμό, το B κύτταρο θα παράγει μόνο από έναν τύπο βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας, δηλαδή θα παράγει αντίσωμα με μοναδική ειδικότητα.

Η λειτουργία των ανοσοσφαιρινών είναι να αναγνωρίσουν και να προσδέονται σε αντιγόνα, σε ξένα δηλαδή σώματα ως προς τον οργανισμό. Η αναγνώριση των αντιγόνων από τις ανοσοσφαιρίνες ουσιαστικά τα σημαδεύει για επίθεση και καταστροφή από άλλα μέρη του ανοσοποιητικού συστήματος. Έπειτα από την αναγνώριση και πρόσδεση στο αντιγόνο, το τελευταίο μπορεί να εξουδετερωθεί από το σύστημα του συμπληρώματος ή από κύτταρα τελεστές όπως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Το σύστημα του συμπληρώματος ενεργοποιείται από την Fc περιοχή ανοσοσφαιρινών που έχουν προσδεθεί σε επιφανειακά αντιγόνα, λόγω χάρη στην επιφάνεια ενός βακτηρίου. Η πρόσδεση

προκαλεί την έναρξή του σηματοδοτικού μονοπατιού του συμπληρώματος και οδηγεί στο σχηματισμό οπών στη μεμβράνη του βακτηρίου. Επίσης, οι ανοσοσφαιρίνες μπορούν να εξουδετερώσουν άμεσα ένα αντιγόνο, λόγω χάρη μέσω της αλληλεπίδρασης τους με την ενεργή περιοχή ενός παθογόνου. Τα κύτταρα τελεστές δεσμεύουν τις ανοσοσφαιρίνες στην επιφάνεια τους μέσω των υποδοχών Fc και με τον τρόπο αυτό αναγνωρίζουν, δεσμεύουν και φαγοκυτταρώνουν τα ξένα ως προς τον οργανισμό σώματα ή μεσολαβούν για την εξουδετέρωση μολυσμένων κυττάρων του οργανισμού. Οι ανοσοσφαιρίνες προσδένονται επίσης σε υποδοχείς Fc στην επιφάνεια των μαστοκυττάρων. Η διασύνδεση των ανοσοσφαιρινών από αντιγόνο, στην προκειμένη περίπτωση θεωρείται αλλεργιογόνο, στην επιφάνεια των μαστοκυττάρων προκαλεί την έκκριση ισταμίνης και κυτταροκινών που μεσολαβούν την αλλεργική αντίδραση⁶.



Εικ. 1.3. Η ανοσοσφαιρίνη ως υποδοχέας B κυττάρου. (Πηγή: www.arthritis.co.za)



Εικ. 1.4. Ενεργοποίηση των B κυττάρων από αντιγόνο και βοηθητικά T κύτταρα προς την επαγωγή πλασμοκυττάρων και κυττάρων μνήμης. (Πηγή: www.biology.arizona.edu)

Οι ανοσοσφαιρίνες εμφανίζονται αρχικά ως μεμβρανικές πρωτεΐνες στην επιφάνεια των B κυττάρων, δηλαδή ως υποδοχείς B κυττάρων (B cell receptors, BCRs) (Εικ. 1.3). Αλληλεπίδραση με αντιγόνα στην επιφάνεια των B κυττάρων οδηγεί σε ωρίμανση αρχικά και ενεργοποίηση αργότερα των B κυττάρων. Για τη σωστή ωρίμανση και ενεργοποίηση των B κυττάρων, τα γεγονότα αυτά συμβαίνουν παρουσία και άλλων κυττάρων, λόγω χάρη βοηθητικών T κυττάρων, και κυτταροκινών⁷. Για την επαγωγή ενδοκυτταρικής σηματοδότησης έπειτα από αλληλεπίδραση με αντιγόνο, χρειάζεται πάντως η διασύνδεση (cross-linking) ενός αντιγόνου με παραπάνω από ένα μεμβρανικό BCR. Μετά την ενεργοποίηση των B κυττάρων στην περιφέρεια, συμβαίνει ωρίμανση της συγγένειας των ανοσοσφαιρινών μέσω αυξημένου ρυθμού μεταλλαγής στις περιοχές των CDRs. Έπειτα από αυτό το στάδιο, τα B κύτταρα διαιρούνται προς την παραγωγή είτε πλασμοκυττάρων, τα οποία παράγουν μεγάλες ποσότητες διαλυτών αντισωμάτων, είτε B κυττάρων μνήμης (Εικ. 1.4).

2.1.2. Εφαρμογές των ανοσοσφαιρινών

Εκτός από τη μεγάλη σημασία τους για τον οργανισμό και το ανοσοποιητικό σύστημα, οι ανοσοσφαιρίνες έχουν πάρα πολλές εφαρμογές στην βιολογική έρευνα

και τη διάγνωση και θεραπεία ασθενειών. Γενικά, μπορούν να παραχθούν αντισώματα για ερευνητικούς σκοπούς έναντι ενός συγκεκριμένου αντιγόνου τα οποία θα προέρχονται από πολλούς κλώνους Β κυττάρων (πολυκλωνικά) ή από έναν και μόνο κλώνο (μονοκλωνικά)⁸. Τα πολυκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν το ίδιο αντιγόνο ή επίτοπο αλλά διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την αλληλουχία των V περιοχών τους. Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι πανομοιότυπα μεταξύ τους και αναγνωρίζουν τον ίδιο επίτοπο. Οι εφαρμογές των αντισωμάτων στην έρευνα περιλαμβάνουν τη χρήση των αντισωμάτων για εντοπισμό και χρώση μορίων ενδιαφέροντος, σε τεχνικές ανοσοϊστοχημείας ή ανοσοφθορισμού, στην κυτταρομετρία ροής, σε ανοσοσύπωση Western καθώς και στις τεχνικές ELISA και ELISPOT. Τα αντισώματα στις περιπτώσεις αυτές αποτελούν ένα ανεκτίμητο εργαλείο για τη ανίχνευση και μελέτη ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών μορίων.

Η σημαντική ιατρική εφαρμογή των αντισωμάτων είναι στη γρήγορη και ειδική διάγνωση ασθενειών και μολύνσεων. Η συνήθης διαδικασία περιλαμβάνει την ανίχνευση αντισωμάτων του ορού του ασθενούς έναντι κάποιου αντιγόνου και ταυτοποίηση της ασθένειας από την ειδική αλληλεπίδραση των αντισωμάτων με χαρακτηριστικά αντιγόνα της ασθένειας ή μόλυνσης. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων ως θεραπευτικούς παράγοντες. Η στρατηγική της τεχνικής αυτής είναι η ειδική πρόσδεση του μονοκλωνικού θεραπευτικού αντισώματος σε ένα μοριακό στόχο του καρκινικού κυττάρου και η εξουδετέρωσή του είτε μέσω συμπληρώματος και κυττάρων τελεστών του ανοσοποιητικού συστήματος είτε μέσω μιας ουσίας (τοξίνη ή ραδιοϊσότοπο) συζευγμένης με το αντίσωμα⁹. Τέτοια παραδείγματα θεραπευτικών αντισωμάτων αποτελούν το Trastuzumab (Herceptin™), ειδικό για τον υποδοχέα HER2/neu στον καρκίνο του μαστού, και το Becacizumab (Avastin™), το οποίο αναστέλλει τον αυξητικό παράγοντα Α του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF-A).

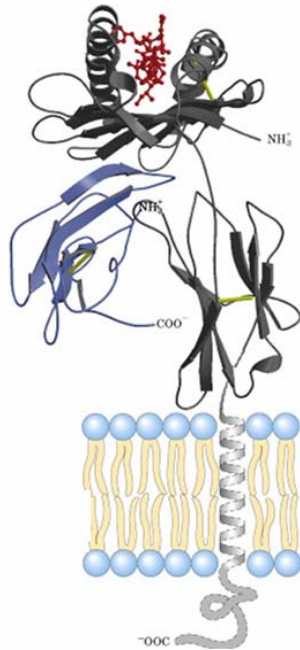
2.2. Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας

Στα σπονδυλωτά υπάρχει ένας γενετικός τύπος που ορίζει τη συμβατότητα των ιστών μεταξύ διαφορετικών ατόμων. Η περιοχή αυτή ονομάζεται Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται στο MHC είναι υπεύθυνες για τη συμβατότητα των ιστών και δρουν ως αντιγόνα αν εισαχθούν σε διαφορετικό άτομο. Στα θηλαστικά, τα μόρια ιστοσυμβατότητας είναι γλυκοπρωτεΐνες που εκφράζονται στη μεμβράνη σχεδόν όλων των εμπύρηνων κυττάρων. Η λειτουργία τους είναι η παρουσίαση αντιγόνων στη μεμβράνη των κυττάρων ώστε να αναγνωρισθούν από τα Τ λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Στον άνθρωπο, τα MHC μόρια ονομάζονται HLA μόρια (Human Leukocyte Antigens)¹⁰. Οι κύριες κατηγορίες MHC μορίων είναι δύο: τα τάξης I και II MHC μόρια¹.

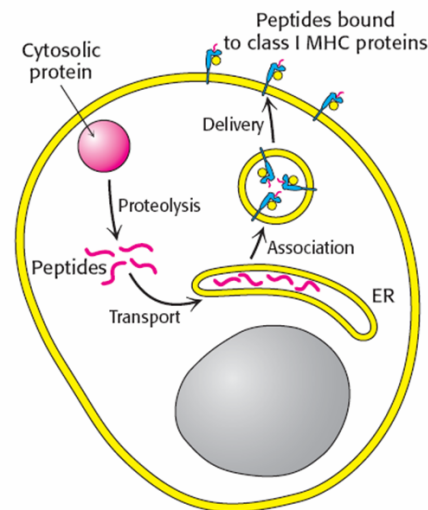
2.2.1. Τάξης I MHC μόρια

Τα τάξης I MHC μόρια είναι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που εμφανίζονται σχεδόν σε όλα τα εμπύρηννα κύτταρα και αποτελούνται από μία α αλυσίδα (45 kDa) και τη β_2 μικροσφαιρίνη (12 kDa) (Εικ. 1.5). Η α αλυσίδα είναι αγκυροβολημένη στη μεμβράνη μέσω μίας διαμεμβρανικής υδρόφοβης επικράτειας και της μικρής C-

τελικής υδρόφιλης ουράς της και έχει άλλες τρεις επικράτειες τις α_1 , α_2 , α_3 . Για την συγκρότηση ενός τάξης I MHC μορίου χρειάζεται να γίνει η αλληλεπίδραση και σύνδεση της α αλυσίδας και της β_2 μικροσφαιρίνης κατά τη σύνθεση της α αλυσίδας στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η α_3 επικράτεια αλληλεπιδρά κυρίως με τη β_2 μικροσφαιρίνη ενώ οι επικράτειες α_1 , α_2 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, για να σχηματίσουν μία σχισμή στην οποία προσδένονται ενδογενή πεπτίδια, αλλά και με τη β_2 μικροσφαιρίνη¹¹. Η πρόσδεση της β_2 μικροσφαιρίνης και του πεπτιδίου είναι σημαντική για τη διαμόρφωση και τη σταθερότητα της δομής του MHC μορίου^{12, 13}. Η λειτουργία τους είναι να παρουσιάζουν αντιγόνα προερχόμενα από ενδογενείς πρωτεΐνες σε $CD8^+$ T κύτταρα. Τέτοια αντιγόνα είναι πεπτίδια 8-11 αμινοξικών καταλοίπων που έχουν προκύψει από την αποικοδόμηση ενδογενών πρωτεϊνών (για παράδειγμα κυτταροπλασματικά ένζυμα, μεμβρανικές ή ριβοσωμικές πρωτεΐνες) αλλά και πρωτεϊνών ιών (σε μολυσμένα με ιούς κύτταρα) ή τροποποιημένων πρωτεϊνών (σε καρκινικά κύτταρα)¹⁴ (Εικ. 1.6). Τα «ξένα» αυτά πεπτίδια μπορούν να αναγνωριστούν από τα $CD8^+$ T κύτταρα μέσω του ειδικού τους υποδοχέα (T cell receptor, TCR) και τα κύτταρα αυτά μπορούν να επάγουν απόπτωση των κυττάρων-στόχων¹⁵.



Εικ. 1.5. Τάξης I MHC μόριο, όπου διακρίνονται η α αλυσίδα (μαύρο), η β_2 μικροσφαιρίνη (μπλε) και το αντιγονικό πεπτίδιο (κόκκινο).

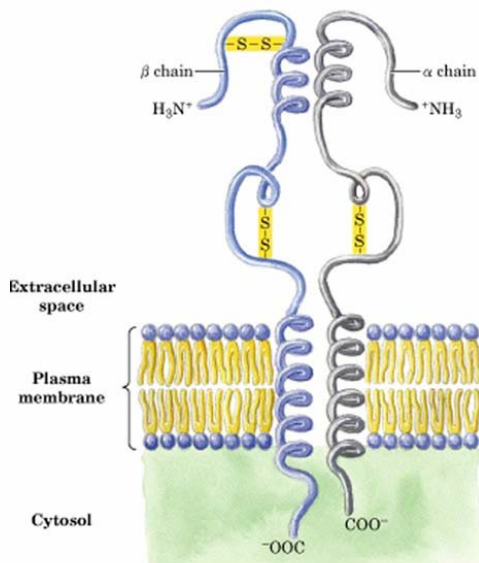


Εικ. 1.6. Αντιγονοπαρουσίαση από τα τάξης I MHC μόρια. Τα τάξης I MHC μόρια σχηματίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου αλληλεπιδρούν με πεπτίδια από την πέψη ενδογενών πρωτεϊνών, και κατόπιν μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη. (Πηγή: Berg et al., 2006)

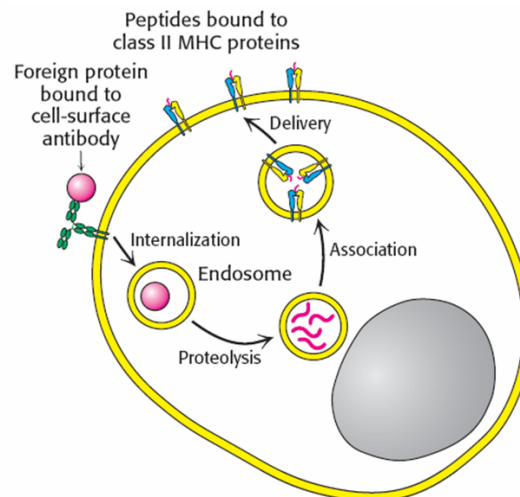
2.2.2. Τάξης II MHC μόρια

Τα τάξης II MHC μόρια εμφανίζονται στη μεμβράνη μόνο ειδικών κυττάρων, των λεγόμενων αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (antigen presenting cells, APCs). Αποτελούνται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες που ονομάζονται α (33kDa) και β (28kDa) (Εικ. 1.7) και η λειτουργία τους είναι να παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια 15-24 αμινοξικών καταλοίπων τα οποία προέρχονται από εξωγενείς ή

εσωτερικοποιημένες (μέσω φαγοκυττάρωσης) πρωτεΐνες¹⁶ (Εικ. 1.8). Τα τάξης II MHC μόρια αρχικά συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο παρουσία μιας ενδογενούς αλυσίδας (invariant chain, Ii), η οποία σταθεροποιεί τη δομή του ετεροδιμερούς απουσία αντιγονικού πεπτιδίου. Κατά το μονοπάτι της ενδοκυττάρωσης και φαγοκύτταρωσης ξένων σωμάτων από τα APCs, τα οποία μπορεί να είναι δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και B κύτταρα, συμβαίνει στα ενδοσώματα αποικοδόμηση των πρωτεϊνών των αντιγόνων και ανταλλαγή της Ii με τα παραγόμενα από την αποικοδόμηση αντιγονικά πεπτίδια. Τα τάξης II MHC μόρια με τα αντιγονικά πεπτίδια μεταφέρονται κατόπιν στην κυτταρική μεμβράνη όπου παρουσιάζουν τα πεπτίδια στα CD4⁺ T κύτταρα¹ μέσω της αλληλεπίδρασης με τον TCR.



Εικ. 1.7. Τάξης II MHC μόριο, όπου διακρίνονται η α και η β αλυσίδα.



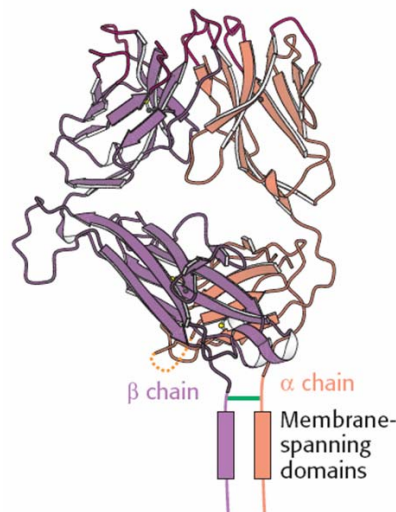
Εικ. 1.8. Αντιγονοπαρουσίαση από τα τάξης II MHC μόρια. Εσωτερικοποιημένες πρωτεΐνες μεταφέρονται και αποικοδομούνται στα ενδοσώματα και παραγόμενα πεπτίδια δεσμεύονται στα τάξης II MHC μόρια, τα οποία κατόπιν μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη. (Πηγή: Berg et al., 2006)

2.2.3. Άλλα MHC μόρια

Άλλες πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται στο γενετικό τόπο του MHC παίζουν έμμεσο ρόλο στην αντιγονοπαρουσίαση, όπως οι πρωτεΐνες DM και DO, ή δεν παίζουν κανένα ρόλο στην διαδικασία αυτή, όπως λόγω χάρη κάποια στοιχεία του συστήματος του συμπληρώματος (C2, C4) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor, TNF- α)². Επίσης, υπάρχουν και τα μη κλασικά MHC μόρια, όπως το HLA-E στον άνθρωπο που παίζει ρόλο στην εξειδικευμένη αναγνώριση μολυσμένων κυττάρων από τα κύτταρα φυσικούς φονείς¹⁷. Τα μη κλασικά MHC μόρια MICA και MICB αποτελούν και αυτά προσδέτες για τα κύτταρα φυσικούς φονείς και, αντίθετα με την απανταχού έκφραση των τάξης I MHC μορίων, εκφράζονται συνήθως ως απόκριση σε μολύνσεις ιών¹⁸.

2.3. Υποδοχέας T κυττάρων

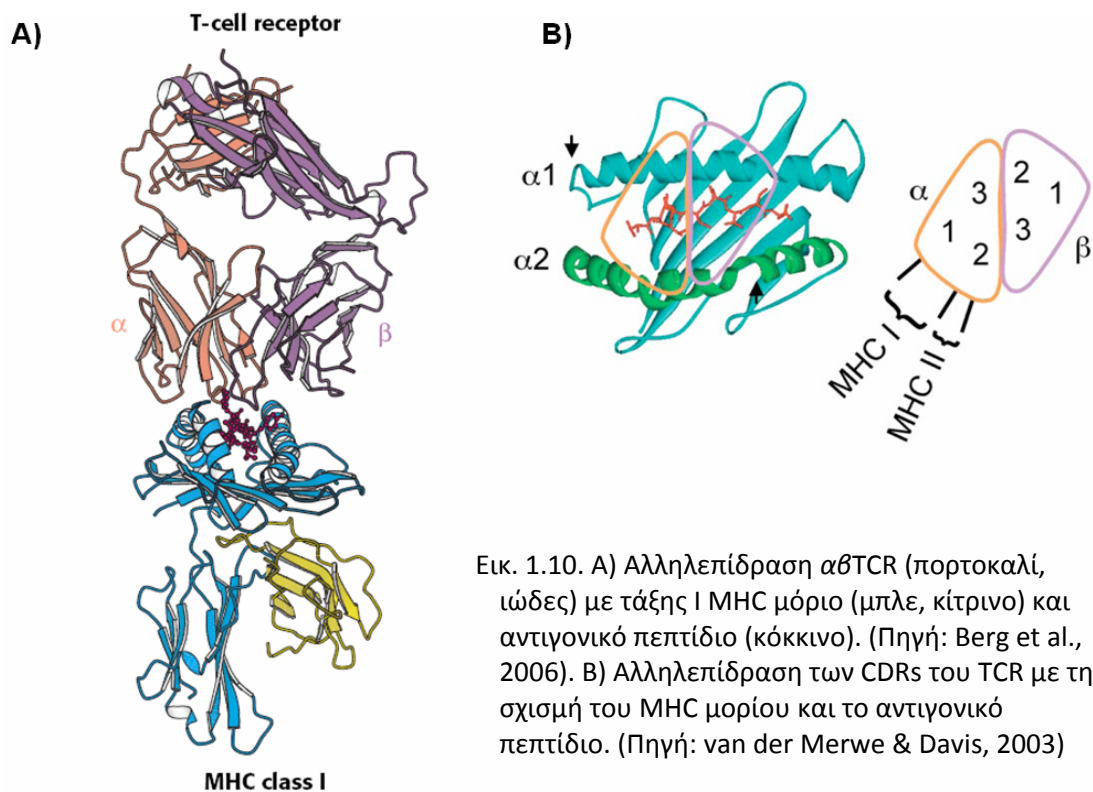
Ο υποδοχέας των T κυττάρων (T cell receptor, TCR) είναι υπεύθυνος για την αναγνώριση αντιγονικών πεπτιδίων που παρουσιάζονται από τα MHC μόρια. Ο TCR είναι ένα ετεροδιμερές (~85 kDa) αποτελούμενο από την α και τη β αλυσίδα ($\alpha\beta$ TCR, απαντάται στο 95% των T κυττάρων) (Εικ. 1.9) ή από τη γ και δ αλυσίδα ($\gamma\delta$ TCR, στο υπόλοιπο 5% των T κυττάρων). Η αλληλεπίδραση του TCR με αντιγόνο και MHC οδηγεί στην ενεργοποίηση του T κυττάρου¹. Οι δυο αλυσίδες του $\alpha\beta$ TCR έχουν από μια μεταβλητή V και μια σταθερή C περιοχή και προκύπτουν, εν αντιστοιχία με τις ανοσοσφαιρίνες, από γενετικό ανασυνδυασμό των κομματιών V, J και C του γονιδιακού τύπου της α και V, D, J και C του γονιδιακού τύπου της β αλυσίδας. Ο ανασυνδυασμός των α και β αλυσίδων του TCR προσφέρει τη δυνατότητα παραγωγής ενός τεράστιου αριθμού (~ 10^{18}) διαφορετικών TCR¹⁹. Στη δομή των V περιοχών παρατηρούνται τρεις θηλιές οι οποίες είναι οι περιοχές καθορισμού συμπληρωματικότητας (complementarity determining regions, CDRs) και εμφανίζουν υπερμεταβλητότητα. Κατά την αλληλεπίδραση του TCR με ένα σύμπλοκο MHC/πεπτιδίου, συμβαίνει πρόσδεση των CDRs τόσο με το αντιγονικό πεπτίδιο, όσο και με το MHC μόριο²⁰ (Εικ. 1.10). Τα T κύτταρα περνούν κατά την ωρίμανση τους από ένα στάδιο «εκπαίδευσης» στο θύμο αδένα πριν βγουν για ελεύθερη κυκλοφορία στον οργανισμό. Η εκπαίδευση αυτή εξυπηρετεί αφενός την αναγνώριση αντιγονικών πεπτιδίων που παρουσιάζονται μόνο από τα MHC μόρια του ίδιου του οργανισμού και αφετέρου τη μη αναγνώριση «εαυτών» πεπτιδίων, δηλαδή πεπτιδίων του ίδιου του οργανισμού. Κατόπιν, στην περιφέρεια και στα ανοσολογικά όργανα (σπλήνας και λεμφαδένες), τα T κύτταρα μπορούν να συναντήσουν αντιγόνο και να ενεργοποιηθούν είτε προς καταστροφή μολυσμένων κυττάρων²¹ (τα κυτταροτοξικά CD8⁺ T κύτταρα) είτε να ρυθμίσουν ποικιλοτρόπως την ανοσολογική απόκριση²² (τα βοηθητικά CD4⁺ και ρυθμιστικά CD4⁺CD25⁺ T κύτταρα).



Εικ. 1.9. Υποδοχέας T κυττάρου, όπου διακρίνονται η α και η β αλυσίδα. (Πηγή: Berg et al., 2006)

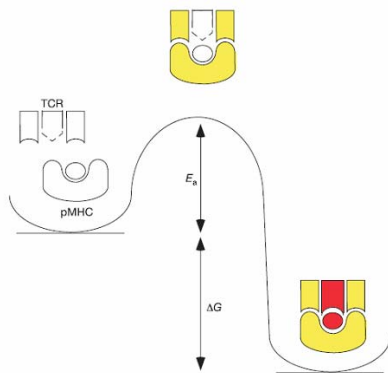
Κατά την αλληλεπίδραση TCR/MHC/πεπτιδίου, έχει παρατηρηθεί ότι συμβαίνει αλλαγή στη διαμόρφωση των δομών των CDRs και όχι στη δομή του συμπλόκου MHC/πεπτιδίου. Ο τρόπος αυτός σύνδεσης μέσω επιφερόμενης προσαρμογής^{20, 23} (induced fit) της δομής είναι διαφορετικός από αυτόν που παρατηρείται στα περισσότερα αντισώματα, όπου η σύνδεση είναι τύπου

«κλειδί/κλειδαριά». Επιπλέον, έχουν μετρηθεί οι σταθερές συγγένειας για την αλληλεπίδραση TCR/MHC/πεπτίδιο και είναι αρκετές τάξεις μεγέθους χαμηλότερες από τις παρατηρούμενες σταθερές συγγένειας για αλληλεπιδράσεις αντιγόνου/αντισώματος²³. Αυτό εξηγείται λόγω της παρατηρούμενης αλλαγής στη διαμόρφωση των CDRs, και κυρίως στη θηλιά CDR3, και λόγω της ύπαρξης δύο σταδίων πρόσδεσης στο σύμπλοκο MHC/πεπτιδίου²⁴, αφού πρώτα γίνεται η αλληλεπίδραση των CDR1 και CDR2 με τις α έλικες της σχισμής του MHC μορίου και ακολουθεί η πρόσδεση της CDR3 στο αντιγονικό πεπτίδιο συνοδευόμενη από αλλαγή στη διαμόρφωση (**Εικ. 1.11**). Θεωρείται ότι ο τρόπος αυτός διευκολύνει τη σάρωση πολλών διαφορετικών συμπλόκων MHC/πεπτιδίου που απαντώνται στην επιφάνεια του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου ή του κυττάρου στόχου με μια διαδικασία που ονομάζεται κινητική ανάγνωση²³ (kinetic proofreading).

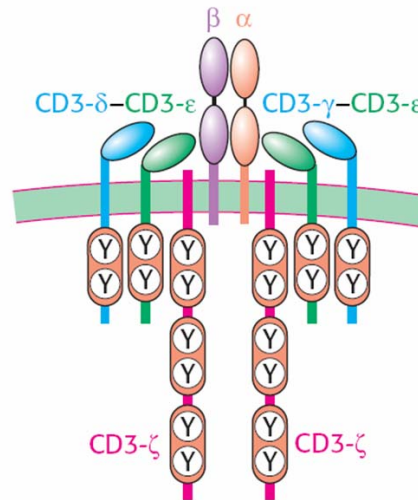


Εικ. 1.10. Α) Αλληλεπίδραση $\alpha\beta$ TCR (πορτοκαλί, ιώδες) με τάξης I MHC μόριο (μπλε, κίτρινο) και αντιγονικό πεπτίδιο (κόκκινο). (Πηγή: Berg et al., 2006). Β) Αλληλεπίδραση των CDRs του TCR με τη σχισμή του MHC μορίου και το αντιγονικό πεπτίδιο. (Πηγή: van der Merwe & Davis, 2003)

Ο TCR στη μεμβράνη του T κυττάρου δε βρίσκεται μόνος, αλλά είναι σε σύμπλοκο με τις αλυσίδες του CD3 (**Εικ. 1.12**). Το CD3 αποτελείται στον άνθρωπο από τις υπομονάδες γ , δ , ϵ , και ζ που σχηματίζουν τα ετεροδιμερή CD3 $\epsilon\delta$, CD3 $\epsilon\gamma$ και το ομοδιμερές CD3 $\zeta\zeta$. Το σύμπλοκο σχηματίζεται από φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα στη διαμεμβρανική επικράτεια των αλυσίδων του TCR που σχηματίζουν «γέφυρες» με φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα στα διαμεμβρανικά τμήματα των αλυσίδων του CD3. Εφόσον ο TCR αποτελεί το κομμάτι του ανιχνευτή, το CD3 παίζει το ρόλο του μεταγωγέα σήματος στο ολοσύμπλοκο του TCR. Αυτό συμβαίνει μέσω των αλληλουχιών για φωσφορυλίωση και σηματοδότηση²⁵ που υπάρχουν στα ενδοκυτταρικά κομμάτια των αλυσίδων του CD3 (intracellular tyrosine activation motifs, ITAMs).



Εικ. 1.11. Η αλληλεπίδραση του TCR με το σύμπλοκο MHC/πεπτιδίου συμβαίνει αρχικά με την αλληλεπίδραση των CDRs με το MHC μόριο και έπειτα με την αναδίπλωση των CDR3 (κόκκινο) και την αλληλεπίδραση τους με το πεπτίδιο. (Πηγή: Wu et al., 2002)



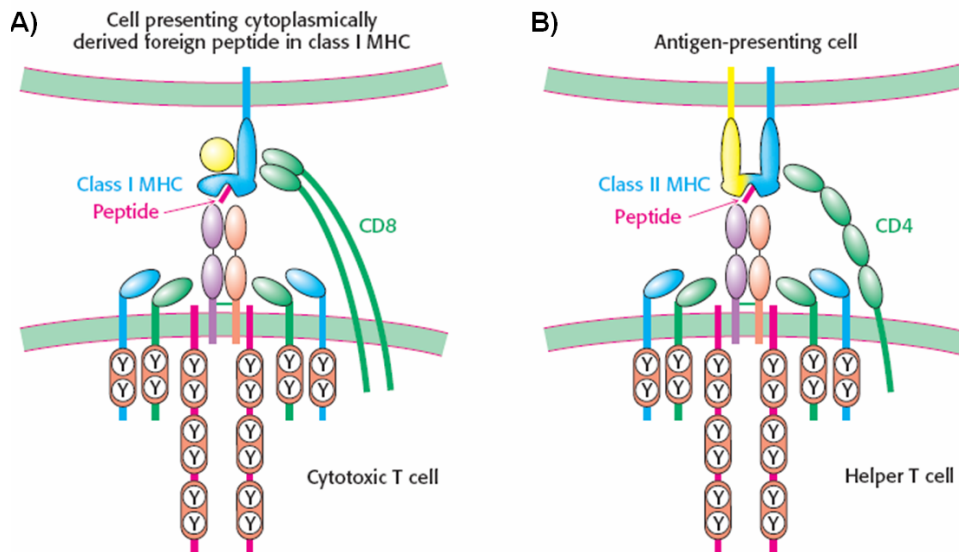
Εικ. 1.12. Το ολοσύνθετο του TCR, όπου διακρίνονται οι αλυσίδες του TCR και του CD3 με τις ενδοκυτταρικές αλληλουχίες μεταγωγής σήματος (Y). (Πηγή: Berg et al., 2006)

2.4. Συνυποδοχείς και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης

Στη μεμβράνη των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος υπάρχουν πολλά μεμβρανικά μόρια που με τον τρόπο τους ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις BCR/αντιγόνου και TCR/MHC/πεπτιδίου. Ειδικά στην περίπτωση των T κυττάρων, σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση αντιγόνου και την ενεργοποίηση των κυττάρων παίζουν οι συνυποδοχείς CD4 και CD8. Οι συνυποδοχείς (coreceptors) αυτοί ξεχωρίζουν λειτουργικά τα T κύτταρα, καθώς τα CD4⁺ είναι βοηθητικά T κύτταρα που αλληλεπιδρούν με σύμπλοκα MHC II/πεπτιδίου και ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση ενώ τα CD8⁺ είναι κυτταροτοξικά T κύτταρα που αλληλεπιδρούν με σύμπλοκα MHC I/πεπτιδίου και έχουν ως λειτουργία την εξολόθρευση κυττάρων στόχων^{1, 2}. Το CD8 είναι ένα διμερές από μια α και μια β αλυσίδα, οι οποίες σχηματίζουν από μια επικράτεια αναδίπλωσης ανοσοσφαιρίνης (Ig-fold), ενώ το CD4 είναι μονομερές με τέσσερις επικράτειες Ig-fold. Και τα δυο αυτά μόρια συμμετέχουν στο σύμπλοκο του TCR κατά την αλληλεπίδραση με τα MHC μόρια (Εικ. 1.13). Τα CD4 και CD8 αλληλεπιδρούν με τη βάση των τάξης II MHC μορίων και με την α_3 επικράτεια των τάξης I MHC μορίων, αντίστοιχα^{20, 26}. Η κυτταροπλασματική περιοχή των συνυποδοχέων CD4 και CD8 έχει θέσεις πρόσδεσης της κινάσης p56^{lck} και συμβάλλει στην ενίσχυση του σήματος που παράγεται από την αναγνώριση και πρόσδεση του TCR σε ένα σύμπλοκο MHC/πεπτιδίου σε άλλο κύτταρο. Η συγγένεια MHC I/CD8 είναι αρκετά μικρή και μάλιστα χαμηλότερη από την συγγένεια της αλληλεπίδρασης TCR/MHC/πεπτιδίου, ενώ το ίδιο ισχύει και για το CD4, το οποίο εμφανίζει ακόμα μικρότερη συγγένεια²⁰. Αυτό σημαίνει ότι η πρόσδεση του CD8 και του CD4 στα MHC μόρια δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση TCR/MHC/πεπτιδίου αλλά, στην περίπτωση ισχυρής πρόσδεσης ενός TCR σε ένα σύμπλοκο MHC/πεπτιδίου, υπάρχει χρόνος για την σύνδεση των συνυποδοχέων και την στρατολόγηση επιπλέον κινασών για την έναρξη και

διατήρηση της σηματοδότησης^{20, 23, 27} ενώ, παράλληλα, η σύνδεση των συνυποδοχέων βοηθά στη σταθερότητα του συμπλόκου TCR/MHC/πεπτιδίου.

Άλλα μεμβρανικά μόρια που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση Τ κυττάρων και κυττάρων στόχων είναι οι μεμβρανικές πρωτεΐνες CD28 και CTLA-4 που ονομάζονται συνδιεγερτικά μόρια (*costimulatory molecules*). Είναι και τα δύο ομοδιμερή μεμβρανικών πρωτεϊνικών αλυσίδων με εξωκυτταρικές επικράτειες Ig-fold και κυτταροπλασματικές αλληλουχίες για αλληλεπίδραση με κινάσες και μεταγωγή σήματος. Τα συνδιεγερτικά αυτά μόρια παίζουν δευτερογενή ρόλο στην ενεργοποίηση των Τ κυττάρων καθορίζοντας ένα κατώφλι για την έκταση της ενεργοποίησης. Το CD28 έχει γενικά θετικό ρόλο και το CTLA-4 αρνητικό ρόλο στην ενεργοποίηση των Τ κυττάρων^{20, 27}. Πέρα από τα συνδιεγερτικά μόρια, υπάρχουν και βοηθητικά μεμβρανικά μόρια στην επιφάνεια των Τ κυττάρων, όπως το CD2. Το CD2 είναι ένα μόριο κυτταρικής προσκόλλησης με επικράτειες Ig-fold που αλληλεπιδρά με το CD58 στον άνθρωπο, ένα άλλο μόριο κυτταρικής προσκόλλησης στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων. Η λειτουργία του CD2 είναι να δημιουργεί περιοχές εγγύτητας μεταξύ των κυττάρων ώστε να διευκολύνεται η σάρωση των συμπλόκων MHC/πεπτιδίου από τον TCR. Τέλος, άλλα μεμβρανικά μόρια, μέλη είτε της υπερικογένειας Ig-fold είτε της υπερικογένειας TNFR (*tumor necrosis factor receptor*), συνεισφέρουν στην προσκόλληση των κυττάρων (LFA-1) και στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση²⁸ (CD40, CD45).



Εικ. 1.13. Α) Αλληλεπίδραση του ολοσυμπλόκου του TCR και του συνυποδοχέα CD8 με τάξης I MHC μόριο. Β) Αλληλεπίδραση του ολοσυμπλόκου του TCR και του συνυποδοχέα CD4 με τάξης II MHC μόριο. (Πηγή: Berg et al., 2006)

3. Μοριακή αναγνώριση σε κυτταρικό επίπεδο

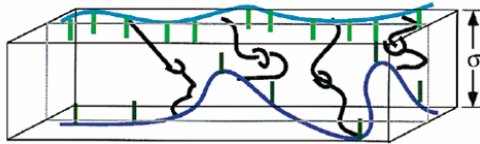
Η διακυτταρική επικοινωνία είναι κεντρικής σημασίας στην επαγωγή αποκρίσεων στο ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτές οι διαδικασίες αναγνώρισης κυττάρου/κυττάρου βασίζονται σε μοριακές αλληλεπιδράσεις των μεμβρανικών τους μορίων οι οποίες συμβαίνουν σε κλίμακα nm και ανάμεσα σε παρατιθέμενες

κυτταρικές μεμβράνες. Το γεγονός ότι τα μόρια που μεσολαβούν για την διακυτταρική αναγνώριση και επικοινωνία είναι ενσωματωμένα στην κυτταρική μεμβράνη έχει μερικές σημαντικές συνέπειες. Καταρχήν, περιορίζει τη δυνατότητα των μορίων να συναντούν τους προσδέτες τους, έχοντας ως προϋπόθεση την εγγύτητα των μεμβρανών. Επομένως, χρειάζεται να γίνει συνήθως αλληλεπίδραση άλλων μορίων για την προσέγγιση των μεμβρανών καθώς και πλευρική διάχυση των μορίων στην περιοχή εγγύτητας. Άλλη συνέπεια είναι το μέγεθος των μορίων, αφού θα πρέπει τα μόρια να έχουν το κατάλληλο μήκος και διαμόρφωση ώστε να μπορούν να έρθουν σε επαφή ανάμεσα στις μεμβράνες και να αλληλεπιδράσουν. Επίσης, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων για κυτταρική αναγνώριση υπόκεινται σε μηχανικές δυνάμεις, όπως η μετακίνηση των κυττάρων και η διαδικασία έκτασης ή απόσυρσης των κυτταρικών προβολών. Τέλος, η κίνηση των μεμβρανικών μορίων περιορίζεται στις δύο διαστάσεις της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτό έχει ως σημαντική συνέπεια να αντιμετωπίζεται η συγκέντρωση ενός μορίου ως επιφανειακή πυκνότητα. Επομένως, οι αλληλεπιδράσεις αναγνώρισης κυττάρου/κυττάρου βασίζονται σε χημεία δύο διαστάσεων (two dimensional, 2D, chemistry), εν αντιθέσει με την κλασική χημεία σε τρεις διαστάσεις που ισχύει για διαλυτά μόρια^{27, 29, 30}.

Short rigid adhesion molecules (high 2D affinity)



Long flexible adhesion molecules (low 2D affinity)



Εικ. 1.14. Η μοριακή συγγένεια σε 2D εξαρτάται όχι μόνο από τη μοριακή αλληλεπίδραση αλλά και τις τοπολογικές παραμέτρους της περιοχής επαφής δύο κυττάρων. Για την ίδια μοριακή αλληλεπίδραση, η συγγένεια σε 2D είναι μεγαλύτερη αν τα μόρια είναι σε μια πεπλατυσμένη από ότι σε μία περισσότερο τραχεία περιοχή επαφής. (Πηγή: Shaw and Dustin, 1997)

Η χημεία σε 2D όχι μόνο είναι βιολογικά πιο σχετική με τη διαδικασία αναγνώρισης κυττάρου/κυττάρου από ότι η χημεία σε 3D (χαρακτηρισμός αλληλεπιδράσεων διαλυτών μορίων), αλλά διαφέρει και όσον αφορά τις φυσικές παραμέτρους. Ως αποτέλεσμα για μια αλληλεπίδραση σε 2D, υπολογίζεται²⁹ η σταθερά συγγένειας σε 2D, K_A^{2D} , με μονάδα μm^2 ανά μόριο (έναντι M^{-1}) και η σταθερά ρυθμού της αντίδρασης σύνδεσης, k_a^{2D} , με μονάδα $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ανά μόριο (έναντι $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Η συγγένεια σε 2D θεωρείται πιο πληροφοριακή για τη δράση ενός μεμβρανικού μορίου. Γενικά, η συγγένεια σε 2D δεν είναι απόλυτη αλλά μπορεί να επηρεαστεί από την τοπολογία της περιοχής επαφής δύο κυτταρικών μεμβρανών. Επομένως, ανάλογα με τις κυτταρικές συνθήκες, μια χαμηλή μοριακή συγγένεια στο διάλυμα μπορεί να δώσει μια υψηλή συγγένεια σε μια περιοχή επαφής. Μια τέλεια σταθερά συγγένειας σε 2D προϋποθέτει ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των μεμβρανικών μορίων συμβαίνει σε ένα επίπεδο και μπορούν αυτά να κινηθούν μόνο σε δύο διαστάσεις (Εικ. 1.14). Πρακτικά όμως, η περιοχή επαφής ανάμεσα σε δύο κύτταρα δεν είναι ποτέ τέλεια. Η ευελιξία της μεμβράνης και η ελαστικότητα που προσφέρει για τα ενσωματωμένα μόρια επιτρέπουν στις μεμβρανικές πρωτεΐνες να κινούνται σε τρεις διαστάσεις. Αυτό σημαίνει ότι η παρατηρούμενη

συγγένεια σε 2D αλλάζει εφόσον μεταβάλλεται η ακαμψία και η απόσταση μεταξύ των δύο μεμβρανών. Συνθήκες που φέρνουν τις μεμβράνες πιο κοντά ή αυξάνουν την ακαμψία των μεμβρανών θα συμβάλλουν στην αύξηση της συγγένειας σε 2D. Τέτοιες συνθήκες μπορούν να είναι ο διαχωρισμός των μορίων στην επιφάνεια με βάση το μέγεθός τους, η απώθηση μεταξύ των κυττάρων λόγω φορτίου, η πλευρική διάχυση των μορίων στην κυτταρική μεμβράνη και η βοήθεια του κυτταροσκελετού^{27, 30, 31}. Όλα αυτά σημαίνουν ότι η σταθερά συγγένειας σε 2D είναι μια δυναμική μοριακή παράμετρος που παρέχει πληροφορίες για τις τοπολογικές συνθήκες των μεμβρανικών μορίων.

Για τον αρχικό σχηματισμό αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε δύο μεμβράνες είναι πολύ σημαντική η σχετική κίνηση μεταξύ των μεμβρανών³². Κατόπιν, η συγγένεια σε 2D θα ορίσει το σχηματισμό της περιοχής επαφής. Ακολουθεί η αναγνώριση και η αλληλεπίδραση των μεμβρανικών μορίων και η επαγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών εντός των κυττάρων. Αυτές οι αντιδράσεις σηματοδότησης εξαρτώνται από την κινητική³³ των αλληλεπιδράσεων των μεμβρανικών μορίων που συμβαίνουν σε 2D. Επίσης, εφόσον σχηματιστούν διακυτταρικά μοριακά σύμπλοκα, η κινητική της αλληλεπίδρασης επηρεάζει τις κινήσεις στη μεμβράνη για τα διακυτταρικά σύμπλοκα σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι η πλευρική διάχυση των μεμβρανικών μορίων σε αδέσμευτη μορφή^{31, 34}. Το τελικό αποτέλεσμα μιας διακυτταρικής αλληλεπίδρασης θα είναι ο σχηματισμός σύναψης ανάμεσα στα κύτταρα, όπου στην περίπτωση του ανοσοποιητικού συστήματος γίνεται λόγος για την ανοσολογική σύναψη³⁵, μια υπερμοριακή δομή με σταθερή και πεπλατυσμένη διεπιφάνεια ανάμεσα σε ένα λεμφοκύτταρο και το κύτταρο στόχο του²⁸.

4. Μελέτη κυτταρικών αλληλεπιδράσεων σε μοριακό επίπεδο

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεμβρανικών μορίων στην επιφάνεια κυττάρων δεν έχουν μελετηθεί διεξοδικά μέσω βιοχημικής ανάλυσης έως πρόσφατα, με την ανάπτυξη διάφορων τεχνικών φθορίζουσας απεικόνισης και μηχανικών τεχνικών. Οι τεχνικές φθορισμού εφαρμόστηκαν για τον υπολογισμό σταθερών συγγένειας 2D κατά την προσθήκη κυττάρων με υποδοχείς πάνω σε λιπιδικές στοιβάδες με προσδέτες συζευγμένους με φθορίζουσες χρωστικές³⁶⁻³⁹. Παραδείγματα αποτελούν οι μεμβρανικές πρωτεΐνες CD2 και οι προσδέτες του CD48 και CD58, και CD28 με τον προσδέτη του CD80. Οι μηχανικές τεχνικές, όπως η δοκιμασία θαλάμου ροής (flow chamber assay)⁴⁰⁻⁴², η δοκιμασία μικροπιπέτας (micropipette assay)^{43, 44} και η δοκιμασία φυγοκέντρησης (centrifugation assay)⁴⁵, βασίζονται στο γεγονός ότι δύο επιφάνειες (λόγου χάρη κύτταρο/κύτταρο ή κύτταρο/υπόστρωμα) διασυνδέονται μέσω του σχηματισμού δεσμών υποδοχέα/προσδέτη. Οι τεχνικές αυτές επιτρέπουν τον υπολογισμό σταθερών ρυθμού αποσύνδεσης σε 2D από μετρήσεις του χρόνου ζωής για πρόσδεση του κυττάρου που μεσολαβείται από ένα μόριο. Παραδείγματα αποτελούν οι μετρήσεις της σταθεράς ρυθμού αποσύνδεσης για την αλληλεπίδραση της L- και της P-σελεκτίνης με τους προσδέτες τους. Οι συγκεκριμένες τεχνικές, φθορισμού και μηχανικών ιδιοτήτων, δεν μπορούν να προσφέρουν αυτές καθαυτές ολοκληρωμένη ανάλυση τόσο για τις κινητικές παραμέτρους όσο και για την σταθερά συγγένειας σε 2D. Συνδυασμός των παραπάνω μεθόδων θα μπορούσε να προσφέρει τόσο τις κινητικές παραμέτρους

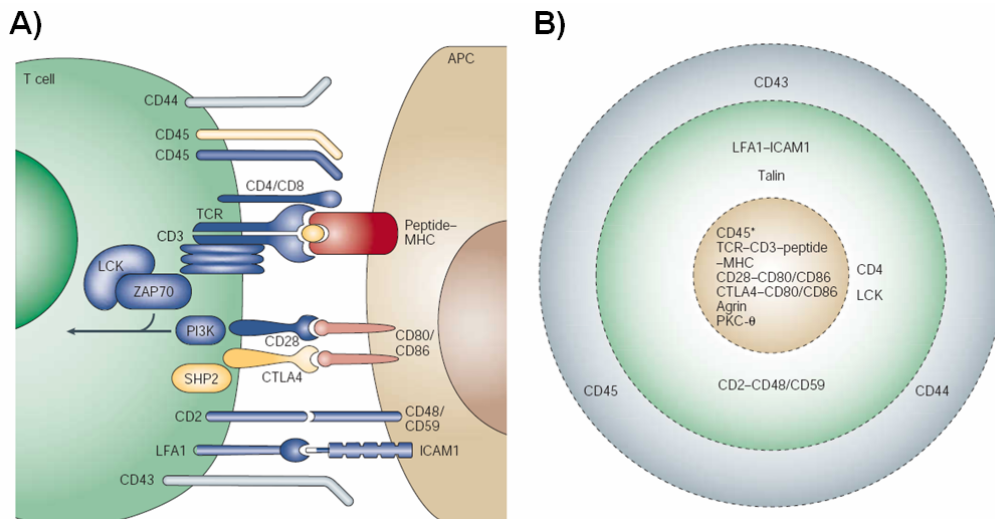
όσο και την σταθερά συγγένειας σε 2D. Οι αλληλεπιδράσεις των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελούν ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα που θα επιτρέψει την ανάπτυξη τεχνικών για την φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των μηχανισμών που διέπουν τέτοια μεμβρανικά φαινόμενα. Επομένως, για να επιτευχθεί η μελέτη των μηχανισμών που κυριαρχούν στην κυτταρική αναγνώριση και στην επαγωγή της ανοσολογικής απόκρισης, χρειάζεται να παρατηρηθούν σε συνθήκες που ομοιάζουν όσο το δυνατό περισσότερο στις φυσικές συνθήκες του οργανισμού. Αυτό μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας συστήματα μοντέλα που πλησιάζουν τη φυσιολογική κατάσταση^{29, 46, 47}, λόγω χάρη για ένα μεμβρανικό μόριο η μελέτη του στην κυτταρική μεμβράνη⁴⁸. Η παράλληλη χρησιμοποίηση νέων τεχνικών απεικόνισης και χειρισμού για μοντέλα συστήματα αποτελεί μια σημαντική σύγκλιση για τα πεδία της ανοσολογίας, της κυτταρικής βιολογίας και της φυσικοχημείας. Γενικά, θα είναι πολύ σημαντικό μέσω τέτοιων νέων τεχνικών να μελετηθεί σε μεγαλύτερο βάθος η αλληλεπίδραση μεταξύ μεμβρανικών μορίων σε διάφορες φυσιολογικές συνθήκες αλλά και να διερευνηθεί η σχέση ανάμεσα σε συγγένεια σε 2D και 3D.

5. Ανοσολογική σύναψη και αναγνώριση αντιγόνου από τα T κύτταρα

Ένα κυτταρικό σύστημα που έχει εκτενώς μελετηθεί ως προς τη μοριακή του αλληλεπίδραση και τις παραμέτρους που το επηρεάζουν είναι η πρόσδεση των T κυττάρων σε κύτταρο στόχο μέσω της αλληλεπίδρασης TCR και συμπλόκου MHC/πεπτιδίου και ο σχηματισμός ανοσολογικής σύναψης³⁵. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι από τις σημαντικότερες για την προσαρμοστική ανοσία, αφού καθορίζει την ειδικότητα και την ενεργοποίηση των T κυττάρων και κατ' επέκταση την επαγωγή ανοσολογικής απόκρισης. Εφόσον τα T κύτταρα συναντήσουν και έρθουν σε επαφή με κύτταρα στόχους, συμβαίνει σάρωση των συμπλόκων MHC/πεπτιδίου του κυττάρου στόχου από τους TCR του T κυττάρου στην περιοχή επαφής. Η αναγνώριση ενός πολύ μικρού αριθμού συμπλόκων MHC/πεπτιδίου (1-10) μπορεί να δώσει αναγνώριση και ενεργοποίηση του T κυττάρου^{49, 50}. Γενικά, θεωρείται ότι συμβαίνει αναγνώριση αντιγόνου από τα T κύτταρα όταν επιτευχθεί αλληλεπίδραση ενός TCR μορίου με ένα σύμπλοκο MHC/πεπτιδίου στην παρατιθέμενη μεμβράνη και ακολουθήσει φωσφορυλίωση των ITAMs των CD3 αλυσίδων στο σύμπλοκο του TCR⁵¹. Έχουν προταθεί αρκετά μοντέλα σηματοδότησης από τον TCR, τα οποία βασίζονται σε έναν ή περισσότερους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος μέσω μεμβρανών, δηλαδή συσσωμάτωση, αλλαγή στη διαμόρφωση και διαχωρισμός λόγω μεγέθους, και το καθένα από τα οποία εμφανίζει διάφορα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Το αποτέλεσμα της σηματοδότησης του TCR είναι ο σχηματισμός μιας υπερμοριακής δομής ανάμεσα στο T κύτταρο και το κύτταρο στόχο, της ανοσολογικής σύναψης³⁵. Η εξειδικευμένη αυτή δομή αποτελείται από ένα κεντρικό συσσωμάτωμα (central supramolecular activation cluster, cSMAC) που περιέχει πολλούς TCRs και μόρια κυτταρικής σηματοδότησης και το οποίο περιβάλλεται από ένα δακτύλιο με μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (peripheral SMAC, pSMAC) (Εικ. 1.16). Η αλληλεπίδραση με σύμπλοκα MHC/πεπτιδίου οδηγεί στο σχηματισμό μικροσυσσωματωμάτων TCR με 10-20 μόρια TCRs⁵²⁻⁵⁴. Αυτά τα σύμπλοκα μεταφέρονται σε κεντρική θέση ανάμεσα στα δύο κύτταρα, σχηματίζοντας το

cSMAC. Κατά το σχηματισμό τους και κατά τη μεταφορά τους προς στο cSMAC, η σηματοδότηση από τα μικροσυσσωματώματα είναι μέγιστη ενώ τερματίζεται όταν φτάσουν στο cSMAC. Όλα τα στάδια σηματοδότησης και σχηματισμού των συσσωματωμάτων και της ανοσολογικής σύναψης εξαρτώνται από τον κυτταροσκελετό της ακτίνης^{35, 52, 53}. Η λειτουργία της ανοσολογικής σύναψης⁵⁵ είναι να προσφέρει αφενός ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση για πρώιμα T κύτταρα και αφετέρου προσανατολισμένη έκκριση κυτταροκινών (για βοηθητικά T κύτταρα) ή κυτταρολυτικών ενζύμων (για κυτταροτοξικά T κύτταρα). Παρά την εκτεταμένη μελέτη των αλληλεπιδράσεων TCR/MHC/πεπτιδίου, παραμένουν ακόμα ζητήματα που δεν έχουν διερευνηθεί σε βάθος, όπως λόγω χάρη η επίδραση που έχει στη σηματοδότηση του TCR και την ενεργοποίηση των T κυττάρων η συγγένεια σε 2D. Επιπλέον, χρειάζεται να γίνει περισσότερο εκτεταμένη μελέτη του ολοσυμπλόκου TCR/CD3 και των συνυποδοχέων στις φυσικές τους συνθήκες²⁶. Ακολουθώντας την κατεύθυνση αυτή, ο στόχος θα είναι η δημιουργία μοντέλων που θα αντιμετωπίζουν ποσοτικά την αναγνώριση αντιγόνου και την ενεργοποίηση των T κυττάρων²⁷.



Εικ. 1.16. Ανοσολογική σύναψη ανάμεσα σε T κύτταρο και κύτταρο στόχο. Α) Πλευρική άποψη, όπου διακρίνονται τα μεμβρανικά μόρια που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση. Β) Κάτοψη της ανοσολογικής σύναψης με το cSMAC (καστανό) και το rSMAC (πράσινο) και τα μόρια που περιέχονται σε αυτά. (Πηγή: Huppa and Davis, 2003)

6. Βιβλιογραφία

1. Goldsby, R.A., Kindt, T.A. & Osborne, B.A. *Kuby Immunology*, Edn. Fourth Edition. (W. H. Freeman and Co., New York; 2000).
2. Roitt, I., Brostoff, J. & Male, D. *Immunology*, Edn. Sixth Edition. (Mosby, London; 2002).
3. Lombard, M., Pastoret, P.P. & Moulin, A.M. A brief history of vaccines and vaccination. *Rev Sci Tech* **26**, 29-48 (2007).
4. Schultze, J.L. & Vonderheide, R.H. From cancer genomics to cancer immunotherapy: toward second-generation tumor antigens. *Trends Immunol* **22**, 516-523 (2001).

5. Consortium, I.H.G.S. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931-945 (2004).
6. Prussin, C. & Metcalfe, D.D. 4. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* **111**, S486-494 (2003).
7. Parker, D.C. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* **11**, 331-360 (1993).
8. Cole, S.P., Campling, B.G., Atlaw, T., Kozbor, D. & Roder, J.C. Human monoclonal antibodies. *Mol Cell Biochem* **62**, 109-120 (1984).
9. Waldmann, T.A. Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med* **9**, 269-277 (2003).
10. Bodmer, J.G. *et al.* Nomenclature for factors of the HLA system, 1994. *Hum Immunol* **41**, 1-20 (1994).
11. Bjorkman, P.J. *et al.* Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* **329**, 506-512 (1987).
12. Elliott, T., Cerundolo, V., Elvin, J. & Townsend, A. Peptide-induced conformational change of the class I heavy chain. *Nature* **351**, 402-406 (1991).
13. Parker, K.C., DiBrino, M., Hull, L. & Coligan, J.E. The beta 2-microglobulin dissociation rate is an accurate measure of the stability of MHC class I heterotrimers and depends on which peptide is bound. *J Immunol* **149**, 1896-1904 (1992).
14. Bjorkman, P.J. & Parham, P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* **59**, 253-288 (1990).
15. Podack, E.R. & Kupfer, A. T-cell effector functions: mechanisms for delivery of cytotoxicity and help. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 479-504 (1991).
16. Cresswell, P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* **12**, 259-293 (1994).
17. Rodgers, J.R. & Cook, R.G. MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nat Rev Immunol* **5**, 459-471 (2005).
18. Gonzalez, S., Groh, V. & Spies, T. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* **298**, 121-138 (2006).
19. Venturi, V., Price, D.A., Douek, D.C. & Davenport, M.P. The molecular basis for public T-cell responses? *Nat Rev Immunol* **8**, 231-238 (2008).
20. van der Merwe, P.A. & Davis, S.J. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* **21**, 659-684 (2003).
21. Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P. & Becker, J.C. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* **126**, 32-41 (2006).
22. Singer, A., Adoro, S. & Park, J.H. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol* **8**, 788-801 (2008).
23. Krogsgaard, M. & Davis, M.M. How T cells 'see' antigen. *Nat Immunol* **6**, 239-245 (2005).
24. Wu, L.C., Tuot, D.S., Lyons, D.S., Garcia, K.C. & Davis, M.M. Two-step binding mechanism for T-cell receptor recognition of peptide MHC. *Nature* **418**, 552-556 (2002).
25. Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. *Biochemistry*, Edn. Fifth Edition. (W.H. Freeman, New York; 2006).
26. Rudolph, M.G., Stanfield, R.L. & Wilson, I.A. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* **24**, 419-466 (2006).
27. Davis, S.J. *et al.* The nature of molecular recognition by T cells. *Nat Immunol* **4**, 217-224 (2003).
28. Huppa, J.B. & Davis, M.M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**, 973-983 (2003).

29. Dustin, M.L., Bromley, S.K., Davis, M.M. & Zhu, C. Identification of self through two-dimensional chemistry and synapses. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 133-157 (2001).
30. Shaw, A.S. & Dustin, M.L. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* **6**, 361-369 (1997).
31. Groves, J.T. Molecular organization and signal transduction at intermembrane junctions. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 3524-3538 (2005).
32. Chang, K.C. & Hammer, D.A. The forward rate of binding of surface-tethered reactants: effect of relative motion between two surfaces. *Biophys J* **76**, 1280-1292 (1999).
33. McKeithan, T.W. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5042-5046 (1995).
34. Davis, D.M. Mechanisms and functions for the duration of intercellular contacts made by lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **9**, 543-555 (2009).
35. Grakoui, A. *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221-227 (1999).
36. Bromley, S.K. *et al.* The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol* **2**, 1159-1166 (2001).
37. Dustin, M.L., Ferguson, L.M., Chan, P.Y., Springer, T.A. & Golan, D.E. Visualization of CD2 interaction with LFA-3 and determination of the two-dimensional dissociation constant for adhesion receptors in a contact area. *J Cell Biol* **132**, 465-474 (1996).
38. Dustin, M.L. *et al.* Low affinity interaction of human or rat T cell adhesion molecule CD2 with its ligand aligns adhering membranes to achieve high physiological affinity. *J Biol Chem* **272**, 30889-30898 (1997).
39. Zhu, D.M., Dustin, M.L., Cairo, C.W. & Golan, D.E. Analysis of two-dimensional dissociation constant of laterally mobile cell adhesion molecules. *Biophys J* **92**, 1022-1034 (2007).
40. Alon, R., Hammer, D.A. & Springer, T.A. Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature* **374**, 539-542 (1995).
41. Chen, S. & Springer, T.A. Selectin receptor-ligand bonds: Formation limited by shear rate and dissociation governed by the Bell model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 950-955 (2001).
42. Swift, D.G., Posner, R.G. & Hammer, D.A. Kinetics of adhesion of IgE-sensitized rat basophilic leukemia cells to surface-immobilized antigen in Couette flow. *Biophys J* **75**, 2597-2611 (1998).
43. Chesla, S.E., Selvaraj, P. & Zhu, C. Measuring two-dimensional receptor-ligand binding kinetics by micropipette. *Biophys J* **75**, 1553-1572 (1998).
44. Williams, T.E., Nagarajan, S., Selvaraj, P. & Zhu, C. Quantifying the impact of membrane microtopology on effective two-dimensional affinity. *J Biol Chem* **276**, 13283-13288 (2001).
45. Piper, J.W., Swerlick, R.A. & Zhu, C. Determining force dependence of two-dimensional receptor-ligand binding affinity by centrifugation. *Biophys J* **74**, 492-513 (1998).
46. Dustin, M.L. Supported bilayers at the vanguard of immune cell activation studies. *J Struct Biol* **168**, 152-160 (2009).
47. Groves, J.T. & Dustin, M.L. Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication. *J Immunol Methods* **278**, 19-32 (2003).
48. Cooper, M.A. Advances in membrane receptor screening and analysis. *J Mol Recognit* **17**, 286-315 (2004).
49. Irvine, D.J., Purbhoo, M.A., Krogsgaard, M. & Davis, M.M. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* **419**, 845-849 (2002).

50. Purbhoo, M.A., Irvine, D.J., Huppa, J.B. & Davis, M.M. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol* **5**, 524-530 (2004).
51. Choudhuri, K. & Van der Merwe, A. Molecular mechanisms involved in T cell receptor signalling. *Semin Immunol* **19**, 255-261 (2007).
52. Campi, G., Varma, R. & Dustin, M.L. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *The Journal of experimental medicine* **202**, 1031-1036 (2005).
53. Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T. & Dustin, M.L. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* **25**, 117-127 (2006).
54. Yokosuka, T. *et al.* Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat Immunol* **6**, 1253-1262 (2005).
55. Fooksman, D.R. *et al.* Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu Rev Immunol* **28**, 79-105 (2010).

Κεφάλαιο 2

Εισαγωγή στους Βιοαισθητήρες

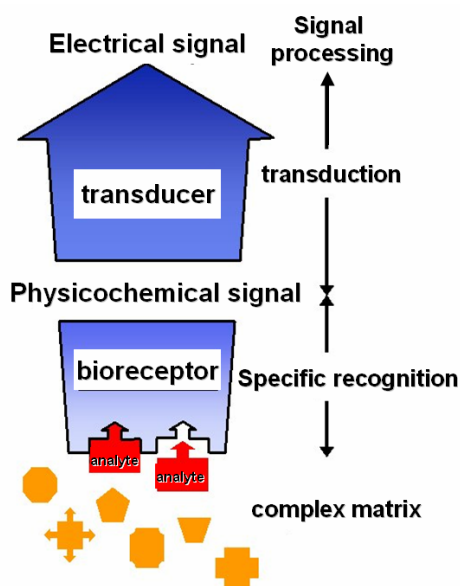
1. Βιοαισθητήρες-Γενικά

Στην εποχή της γονιδιωματικής και της πρωτεϊνωματικής, η χαρτογράφηση ολόκληρων γονιδιωμάτων έχει οδηγήσει στη συσσώρευση μεγάλων ποσών πληροφορίας. Για την γονιδιωματική, ο στόχος είναι ο προσδιορισμός της αλληλουχίας για όλα τα γονίδια ενός οργανισμού. Όμως, για την πλήρη κατανόηση των βιολογικών φαινομένων, θα χρειαστεί η ανάλυση του συνόλου των πρωτεϊνών, του πρωτεϊνώματος, για έναν οργανισμό, καθώς και ο προσδιορισμός των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών και άλλων μορίων που συμβαίνουν είτε σε φυσιολογικές συνθήκες είτε σε παθολογικές συνθήκες. Επομένως, το πεδίο της πρωτεϊνωματικής θα χρειαστεί την ανάπτυξη νέων τεχνικών μελέτης των πρωτεϊνικών μορίων και περισσότερο ευαίσθητων αναλυτικών συσκευών για τον προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βιομορίων. Επιπλέον, για την γρηγορότερη και περισσότερο αποτελεσματική ταυτοποίηση και έλεγχο υποψήφιων φαρμάκων, χρειάζονται τεχνικές που θα προσφέρουν ανίχνευση μοριακών αλληλεπιδράσεων μαζί με υπολογισμό συγγένειας και ενεργότητας. Οι περισσότερες τέτοιες τεχνικές χρησιμοποιούν προς το παρόν σήμανση με ένζυμα και φθορίζουσες ή ραδιενεργές χρωστικές. Η διαδικασία χρώσης κοστίζει τόσο σε χρόνο όσο και σε χρήμα ενώ συχνά μπορεί να εμπλακεί στην αντίδραση πρόσδεσης, με αρνητικά αποτελέσματα. Αντίθετα, τεχνικές που έχουν τη δυναμική να προσφέρουν ανίχνευση χωρίς σήμανση και ταυτόχρονα γρήγορη και πολύ ειδική πληροφορία, είναι σε θέση να βοηθήσουν στην πρόοδο αφενός της βιολογικής έρευνας και αφετέρου της ταυτοποίησης νέων φαρμάκων.

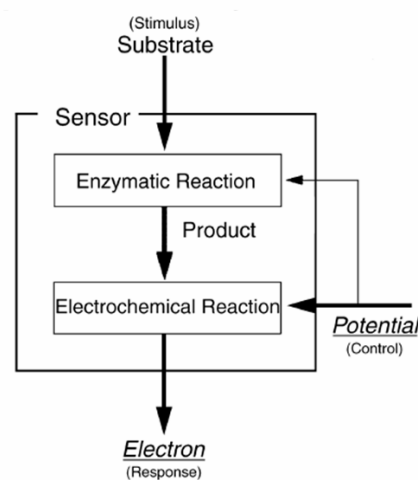
Στην κατηγορία αυτή εμπίπτουν οι βιοαισθητήρες (biosensors), των οποίων η ανάπτυξη εκμεταλλεύτηκε διάφορα επιστημονικά πεδία εκτός της βιολογίας, όπως αυτό της φυσικής και της ηλεκτρονικής¹. Ο βιοαισθητήρας (biosensor) είναι μια αναλυτική συσκευή που μπορεί να μετατρέψει μια βιολογική απόκριση σε ηλεκτρικό σήμα². Αποτελείται από τρία μέρη: τον υποδοχέα, που είναι συνήθως ένα βιολογικό μόριο, το μεταγωγέα, που βρίσκεται σε επαφή με τον υποδοχέα, και το ηλεκτρονικό κομμάτι. Όταν ο αναλύτης για τον οποίο ο υποδοχέας είναι ειδικός βρίσκεται στο διάλυμα, συμβαίνει αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί την παραγωγή ενός φυσικοχημικού σήματος το οποίο μετατρέπεται μέσω του μεταγωγέα σε ηλεκτρικό σήμα. Το ηλεκτρονικό κομμάτι του βιοαισθητήρα ανιχνεύει το σήμα αυτό (Εικ. 2.1).

Ο πρώτος βιοαισθητήρας³ αποτελείτο από το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης συζευγμένο σε ένα αμπερομετρικό ηλεκτρόδιο για τη μέτρηση του δυναμικού $P(O_2)$. Η οξείδωση της γλυκόζης από το ένζυμο ελάττωνε το $P(O_2)$ στο διάλυμα, το οποίο ανιχνευόταν από το ηλεκτρόδιο ενώ η αλλαγή στο $P(O_2)$ ήταν ανάλογη με τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο διάλυμα. Στα επόμενα χρόνια βέβαια, αναπτύχθηκαν αναρίθμητοι τρόποι ανίχνευσης των βιολογικών μορίων. Παρόλα αυτά, οι βιοαισθητήρες μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες ανάλογα με την αντίδραση που μελετούν, τους βιοκαταλυτικούς και τους βιοσυγγενικούς. Οι βιοκαταλυτικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν ως υποδοχέα ένα

ένζυμο ή ένα κύτταρο και ανιχνεύουν το προϊόν της αντίδρασης του ενζύμου ή του κυττάρου με το μόριο που μας ενδιαφέρει⁴. Οι περισσότερο διαδεδομένοι βιοκαταλυτικοί βιοαισθητήρες είναι οι αμπερομετρικοί (Εικ. 2.2), όπου συμβαίνει μια αντίδραση οξείδωσης ή αναγωγής από το ένζυμο του βιοαισθητήρα και το ηλεκτρόδιο ανιχνεύει την αλλαγή στο δυναμικό⁵. Τέτοιοι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική διάγνωση, λόγω χάρη στη μέτρηση της συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα ή σε άλλα βιολογικά υγρά. Η τελευταία εφαρμογή λαμβάνει και τη μερίδα του λέοντος από την παγκόσμια αγορά των βιοαισθητήρων⁶.



Εικ. 2.1. Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρα. Ο προσδέτης (analyte) συνδέεται ειδικά με ένα βιο-υποδοχέα (bioreceptor). Η αλληλεπίδραση προκαλεί την παραγωγή ενός φυσικοχημικού σήματος που μετατρέπεται από το μεταγωγέα (transducer) σε μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα.



Εικ. 2.2. Αρχή λειτουργίας αμπερομετρικών βιοαισθητήρων. Το υπόστρωμα (substrate) ανιχνεύεται έπειτα από την ενζυμική αντίδραση που οδηγεί τελικά σε αλλαγή του ηλεκτρικού δυναμικού. (Πηγή: D'Orazio, 2003)

Οι βιοσυγγενικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν ως υποδοχέα ένα βιολογικό μόριο (πρωτεΐνη, πεπτίδιο, DNA, πολυσακχαρίτη) το οποίο έχει συγγένεια για τον αναλύτη και ανιχνεύουν αλλαγή στη μάζα όταν μόρια δεσμεύονται ειδικά πάνω στους υποδοχείς^{4, 7}. Μια ειδική και πολύ διαδεδομένη κατηγορία είναι οι ανοσοαισθητήρες⁸ (North, 1985). Οι βιοσυγγενικοί βιοαισθητήρες μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το είδος του μεταγωγέα που φέρουν. Υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες: α) οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες, οι οποίοι ανιχνεύουν αλλαγές σχετιζόμενες με την παραγωγή ή κατανάλωση ηλεκτρονίων και χρησιμοποιούνται κυρίως όταν ένζυμα συνδυάζονται με τους ειδικούς υποδοχείς, β) οι οπτικοί βιοαισθητήρες, οι μεταγωγείς των οποίων μπορούν να ανιχνεύσουν αλλαγές σε φθορισμό, φωταύγεια ή δείκτη διάθλασης, και γ) οι ακουστικοί βιοαισθητήρες, που ανιχνεύουν προσδεμένη μάζα ή αλλαγές στην ιξωδοελαστικότητα στην εγγύτητα της επιφάνειας του αισθητήρα. Οι βιοσυγγενικοί

βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται κυρίως στη βιολογική έρευνα, όπου βοηθούν στην ανίχνευση και ανάλυση αλληλεπιδράσεων μεταξύ διάφορων βιομορίων⁹⁻¹¹.

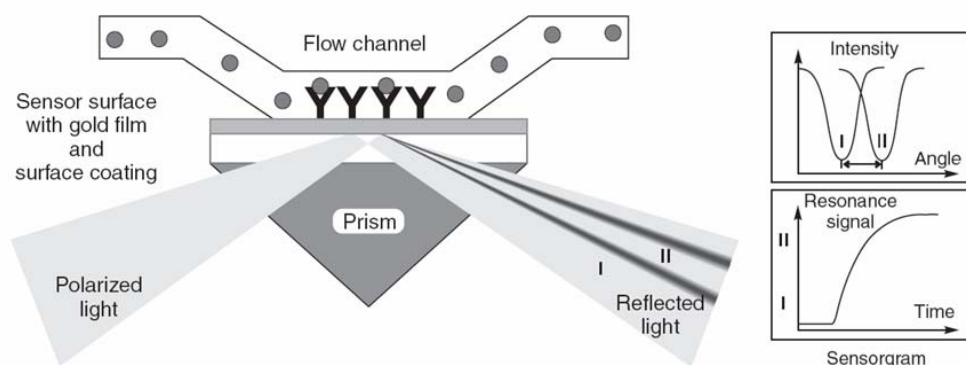
2. Οπτικοί βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούν οπτική μεταγωγή σήματος έχουν φθάσει τα τελευταία χρόνια σε σημαντική ανάπτυξη και σχετίζονται με την πλειοψηφία των εφαρμογών στην έρευνα και τη βιομηχανία⁹. Οι οπτικοί βιοαισθητήρες γενικά εκμεταλλεύονται τα αποσβένοντα πεδία που δημιουργούνται στην επιφάνεια ευαισθησίας τους. Η πρόσδεση μορίων αναλύτη στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα έχει ως αποτέλεσμα μικρή αλλαγή στο δείκτη διάθλασης στη διεπιφάνεια υγρού/στερεού που μπορεί να ανιχνευθεί είτε με τεχνικές αποσβένοντων κυμάτων είτε με φασματοσκοπία επιφανειακού συντονισμού πλάσματος (surface plasmon resonance, SPR). Στη δεκαετία του 1980, τα συστήματα που λειτουργούσαν με SPR και άλλες σχετικές τεχνικές που αφορούσαν αποσβένοντα πεδία άρχισαν να χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση χημικών και βιολογικών αλληλεπιδράσεων σε πραγματικό χρόνο και χωρίς την ανάγκη σήμανσης. Οι βελτιώσεις και αναβαθμίσεις σε οργανολογία και πειραματικές διαδικασίες έχουν οδηγήσει στην ολοένα αυξανόμενη χρήση των οπτικών βιοαισθητήρων, κυρίως στη διαδικασία ταυτοποίησης νέων φαρμάκων¹². Οι οπτικοί βιοαισθητήρες προσφέρουν την ανάλυση ενός μεγάλου εύρους μορίων, από φαρμακολογικούς παράγοντες μικρής μοριακής μάζας ως μεγαλομοριακά πρωτεϊνικά σύμπλοκα και σωματίδια ιών, ενώ η ευαισθησία¹³ τους φτάνει σε επίπεδα 100-1000 pg mm⁻².

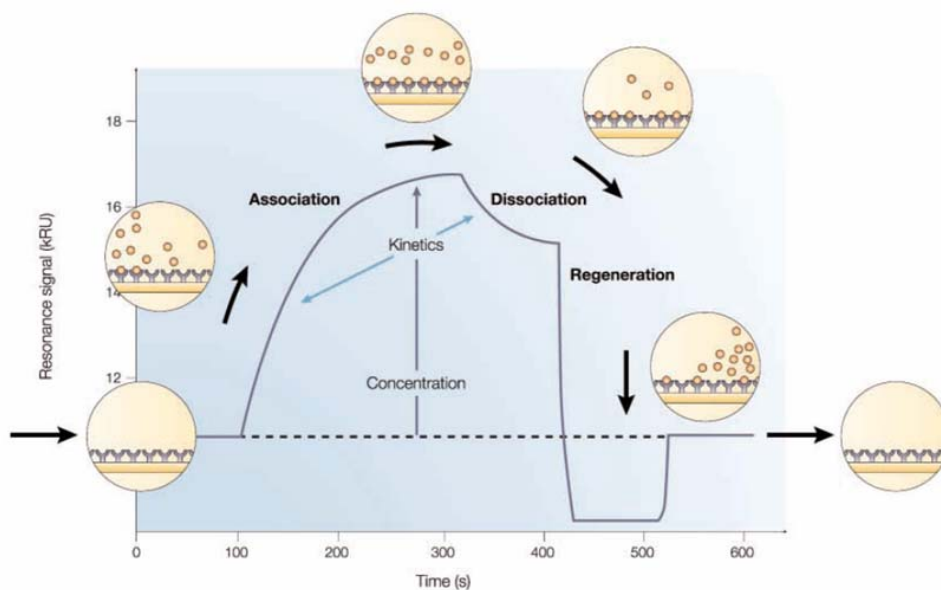
2.1. Οπτικοί βιοαισθητήρες τύπου SPR

Οι οπτικοί βιοαισθητήρες που είναι βασισμένοι στο φαινόμενο του SPR είναι οι περισσότερο διαδεδομένοι και χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα τα τελευταία 15 χρόνια. Στην τεχνική SPR, δημιουργείται ένα αποσβένον ηλεκτρομαγνητικό πεδίο ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του φωτός με μια μεταλλική επιφάνεια. Καθώς το φως υφίσταται σύζευξη με το μεταλλικό στρώμα, παράγονται κύματα που σχετιζόμενα με την πυκνότητα φορτίου, τα πλασμόνια. Η διάδοση των πλασμονίων δημιουργεί ένα αποσβένον ηλεκτρομαγνητικό πεδίο το οποίο είναι εξαιρετικά ευαίσθητο σε αλλαγές του δείκτη διάθλασης του γειτονικού υγρού μέσου. Η συνέπεια είναι ότι ο δείκτης διάθλασης του υλικού που βρίσκεται δίπλα σε ένα λεπτό στρώμα μετάλλου επηρεάζει τη γωνία ανάκλασης πολωμένου φωτός που προσπίπτει στην αντίθετη επιφάνεια του μεταλλικού στρώματος¹⁴. Η προτιμώμενη μεταλλική επιφάνεια είναι από χρυσό, ο οποίος είναι συμβατός με διάφορες χημικές διαδικασίες τροποποίησης και δεν υφίσταται οξείδωση¹⁵. Οπότε, η προσθήκη μάζας στην επιφάνεια του μετάλλου, δηλαδή μέσα στο αποσβένον πεδίο, μπορεί να προκαλέσει αλλαγή στο δείκτη διάθλασης του υγρού μέσου και αυτή η διαδικασία θα ανιχνευθεί ως μετατόπιση της γωνίας ανάκλασης του προσπιπτόμενου φωτός¹⁶. Η γωνία ανάκλασης στην οποία παρατηρείται η μικρότερη ένταση πολωμένου φωτός εξαρτάται από τη μάζα και τον αριθμό των μορίων που προσδένονται στην επιφάνεια του αισθητήρα. Ο αισθητήρας μετρά τη γωνιακή θέση του ελάχιστου έντασης την οποία αποδίδει ως μονάδες συντονισμού

(resonance units, RU) (**Εικ. 2.3**). Αυτή η μονάδα μέτρησης έχει αντιστοιχηθεί με πρόσδεση μάζας 1 pg mm^{-2} στην επιφάνεια του αισθητήρα SPR¹⁷ και προέκυψε αρχικά για τα συστήματα της εταιρίας Biacore.



Εικ. 2.3. Αναγνώριση βιομορίων από τον οπτικό βιοαισθητήρα SPR. Ο αναλύτης περνά πάνω από την επιφάνεια του αισθητήρα και με τη σύνδεση του στον υποδοχέα προκαλεί μετατόπιση της γωνίας του ανακλώμενου πολωμένου φωτός. Η ανίχνευση του αναλύτη εμφανίζεται ως αλλαγή του σήματος συντονισμού στο διάγραμμα πραγματικού χρόνου του αισθητήρα (sensorgram). (Πηγή: Gizeli and Lowe, 2002)



Εικ. 2.4. Ανίχνευση προσδέτη από οπτικό βιοαισθητήρα SPR. Τα μόρια του υποδοχέα ακινητοποιούνται στην επιφάνεια του αισθητήρα. Ακολουθεί η προσθήκη των μορίων του προσδέτη που βρίσκονται ελεύθερα στο διάλυμα. Η σύνδεση του προσδέτη με τον υποδοχέα (association) ανιχνεύεται ως αλλαγή σήματος. Ακολουθεί ξέπλυμα της επιφάνειας και μερική αποσύνδεση του προσδέτη (dissociation). Η επιφάνεια του υποδοχέα μπορεί πιθανώς να αναγεννηθεί για την επαναχρησιμοποίηση της (regeneration). (Πηγή: Cooper, 2002)

2.2. Εφαρμογές οπτικών βιοαισθητήρων

Υπάρχουν πολυάριθμες εφαρμογές στην μελέτη και ανάλυση βιομοριακών αλληλεπιδράσεων, όπως υπολογισμός κινητικών σταθερών, ανάλυση ισορροπίας

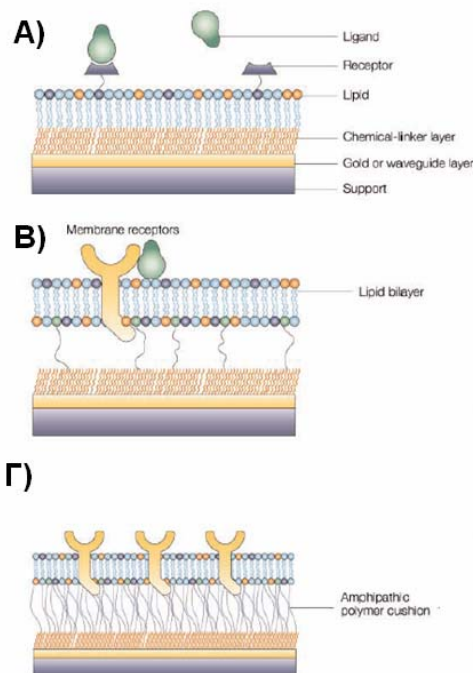
και θερμοδυναμική ανάλυση της αντίδρασης σύνδεσης, ποιοτικές μετρήσεις και ανταγωνιστικές αναλύσεις, ανάλυση στοιχειομετρίας και χαρτογράφηση επιτόπων¹⁸. Αυτό οφείλεται στην ευελιξία που προσφέρουν οι οπτικοί βιοαισθητήρες καθώς μπορούν να ανιχνεύσουν σχεδόν οποιαδήποτε αλληλεπίδραση μεταξύ βιολογικών συστημάτων, συμπεριλαμβανομένου μικρομοριακών ουσιών, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, λιπιδίων, βακτηρίων, ιών και ολόκληρων ευκαρυωτικών κυττάρων, αλλά και στην υψηλή ευαισθησία τους, αφού αρκούνται σε μικρές ποσότητες των αναλυόμενων δειγμάτων και χωρίς την ανάγκη για σήμανση των μορίων. Ως στρατηγική, τα μόρια του υποδοχέα αρχικά ακινητοποιούνται σταθερά στην επιφάνεια του αισθητήρα διατηρώντας παράλληλα τη φυσική τους διαμόρφωση. Ακολουθεί η προσθήκη των μορίων του προσδέτη που βρίσκονται ελεύθερα στο διάλυμα. Η ειδική αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τον προσδέτη μπορεί έπειτα να ανιχνευθεί ως αλλαγή του σήματος του βιοαισθητήρα (Εικ. 2.4).

Πέρα από την ανάλυση συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων σε μικρή κλίμακα (low-scale/low-throughput), οι οπτικοί βιοαισθητήρες έχουν μεγάλη δυναμική για την ανάλυση αλληλεπιδράσεων σε μεγάλη κλίμακα (high-throughput). Για αυτό το λόγο αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο στην ταυτοποίηση νέων φαρμάκων¹². Η στρατηγική που ακολουθείται είναι συνήθως η μελέτη της αλληλεπίδρασης ενός υποδοχέα με ένα μεγάλο αριθμό πιθανών προσδετών και η ανίχνευση και ιεράρχηση των θετικών και αρνητικών δειγμάτων. Με τον ίδιο τρόπο, μπορεί να γίνει τροποποίηση ενός φαρμάκου ως την τελική του μορφή από τον αρχικής μορφής φαρμακολογικό παράγοντα^{19,20} (lead compound).

Επειδή η πλειοψηφία των φαρμακολογικών στόχων είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες, υπάρχει εξαιρετικό ενδιαφέρον στην ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεμβρανικών υποδοχέων, όπως GPCRs, υποδοχείς αντισωμάτων και κυτταροκινών και κανάλια ιόντων, με τους προσδέτες τους¹². Για την καλύτερη κατανόησή τους, χρειάζεται να γίνει μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων στο φυσικό τους περιβάλλον, δηλαδή τη λιπιδική μεμβράνη. Επομένως, χρειάστηκε η ανάπτυξη τεχνικών για το σχηματισμό λιπιδικών μεμβρανών που θα περιέχουν τους υποδοχείς ενδιαφέροντος. Εφόσον οι τεχνικές αυτές αφορούν διαδικασίες που σχετίζονται άμεσα με επιφάνειες, οι οπτικοί βιοαισθητήρες ευνοούνται στην ανάλυση αλληλεπιδράσεων σε μεμβράνες, λόγω της υψηλής ευαισθησίας τους σε τέτοιες επιφανειακές διεργασίες. Ως αποτέλεσμα, έχουν γίνει πολλές μελέτες που διερεύνησαν το μηχανισμό σχηματισμού λιπιδικών μεμβρανών και την αλληλεπίδραση μεμβρανικών υποδοχέων με προσδέτες τους στην επιφάνεια αισθητήρων SPR²¹. Τρεις στρατηγικές (Εικ. 2.5) έχουν δώσει αξιολογικά αποτελέσματα για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεμβρανικών υποδοχέων με τους προσδέτες τους. Η πιο απλή μέθοδος περιλαμβάνει το σχηματισμό λιπιδικής μονοστοιβάδας πάνω σε μια υδρόφοβη επιφάνεια βιοαισθητήρα²²⁻²⁴. Άλλη τεχνική αφορά το σχηματισμό μιας προσδεμένης με την επιφάνεια λιπιδικής διπλοστοιβάδας, όπου λιπίδια της διπλοστοιβάδας σχηματίζουν δεσμούς (ομοιοπολικούς ή μη) με ακινητοποιημένα μόρια της επιφάνειας²⁵⁻²⁷. Η άλλη στρατηγική περιλαμβάνει το σχηματισμό λιπιδικής διπλοστοιβάδας πάνω σε ένα στρώμα πολυμερούς^{21,28} (polymer cushion).

Οπτικά συστήματα βασισμένα σε SPR έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυττάρων και υποστρώματος²⁹⁻³². Διάφορα

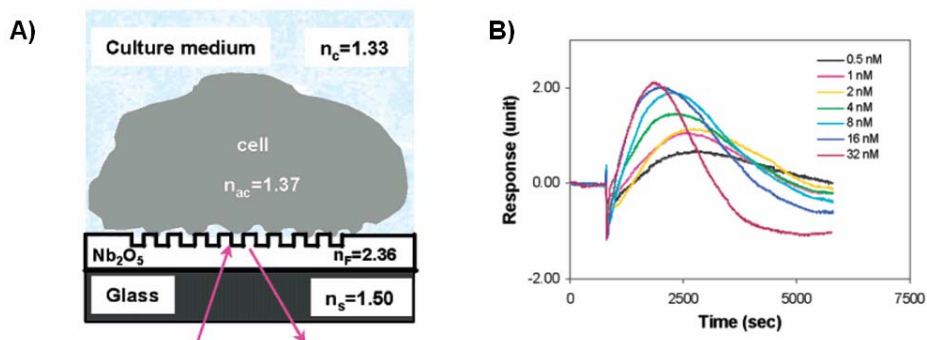
επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία μικροβιακά στελέχη έχουν ανιχνευθεί με καλή ευαισθησία, όπως λόγω χάρη κύτταρα *Listeria monocytogenes*³³ και παθογόνου *Escherichia coli* O157:H7³⁴. Οπτική απεικόνιση κυττάρων γλοίας με μικροσκοπία SPR έχει αναφερθεί²⁹, η οποία μπορεί να προσφέρει μελέτη της κυτταρικής προσκόλλησης σε ημιδιαφανείς μεταλλικές επιφάνειες. Επιπλέον, έχει αναφερθεί με βιοαισθητήρες SPR ειδική ανίχνευση ανθρώπινων ερυθρών αιμοσφαιρίων^{31, 35} καθώς και παρακολούθηση της απόκρισης στρωμάτων κυττάρων σε διαλυτούς φαρμακολογικούς παράγοντες³⁶⁻³⁸.



Εικ. 2.5. Στρατηγικές σχηματισμού λιπιδικών μεμβρανών στην επιφάνεια οπτικών βιοαισθητήρων. Α) Λιπιδική μονοστοιβάδα. Β) Προσδεμένη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Γ) Λιπιδική διπλοστοιβάδα πάνω σε στρώμα πολυμερούς. (Πηγή: Cooper, 2002)

Μια άλλη διαμόρφωση οπτικού βιοαισθητήρα που έχει αναπτυχθεί πρόσφατα για τη διερεύνηση διεργασιών κυτταρικής απόκρισης σε φαρμακολογικούς παράγοντες είναι ο αισθητήρας με δικτυωτό κυματοδηγό συντονισμού³⁹⁻⁴³ (resonant waveguide grating, RWG). Ο αισθητήρας αυτός (Εικ. 2.6) μπορεί να ανιχνεύσει ανακατανομή του περιεχομένου των κυττάρων ως απόκριση σε φαρμακολογικούς παράγοντες που επιδρούν στον κυτταροσκελετό⁴¹, σε αναστολές της κυτταρικής σηματοδότησης^{40, 43} και σε αφαίρεση της κυτταρικής χοληστερόλης⁴². Οι αισθητήρες RWG προσφέρουν ένα αναλυτικό³⁹, μη καταστρεπτικό και χωρίς σημάση τρόπο για τη μελέτη απόκρισης των κυττάρων.

Οι οπτικοί βιοαισθητήρες θεωρούνται λιγότερο ευαίσθητοι σε ειδικές αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν παρουσία οργανικών διαλυτών και ακατέργαστων δειγμάτων⁴⁴ από ότι, λόγω χάρη, οι ακουστικοί βιοαισθητήρες. Αυτό συμβαίνει γιατί η παρουσία και μόνο ενός μορίου εντός του αποσβένοντος πεδίου του αισθητήρα ανιχνεύεται μέσω της μεταβολής του δείκτη διάθλασης της διεπιφάνειας. Τέτοια απόκριση μπορεί να θεωρηθεί ως μειονέκτημα όταν κανείς αναφέρεται σε ειδική αλληλεπίδραση κυττάρων με το υπόστρωμα, καθώς η παρουσία του όγκου της κυτταρικής μάζας μέσα στο αποσβένον πεδίο προκαλεί αλλαγή σήματος ανεξάρτητα από ειδική ή μη ειδική αλληλεπίδραση.

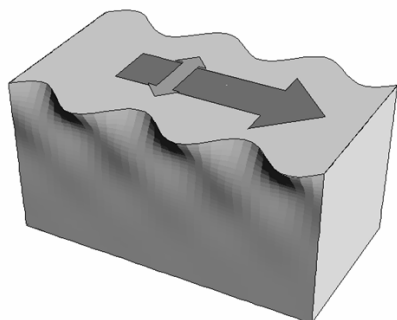


Εικ. 2.6. Α) Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης του οπτικού βιοαισθητήρα RWG. Η ανίχνευση βασίζεται στη διαφορά του δείκτη διάθλασης ανάμεσα στο στρώμα κυματοδηγού Nb_2O_5 , το στρώμα των προσκολλημένων κυττάρων και το θρεπτικό μέσο. Β) Απόκριση του αισθητήρα RWG στη δυναμική ανακατανομή της μάζας προσκολλημένων κυττάρων σε διάφορες συγκεντρώσεις του παράγοντα αύξησης επιδερμικών κυττάρων (epidermal growth factor, EGF). (Πηγή: Fang et al., 2005a)

Το επόμενο βήμα στο πεδίο των οπτικών βιοαισθητήρων είναι η ανάπτυξη συστημάτων συστοιχιών αισθητήρων (sensor arrays) που θα προσφέρουν πολλαπλές μετρήσεις ταυτόχρονα. Διάφορες εταιρίες, όπως οι Biacore και HTS Biosystems, δουλεύουν ήδη προς αυτήν την κατεύθυνση. Οι συστοιχίες οπτικών βιοαισθητήρων θα μπορούν εύκολα να προσφέρουν σάρωση ολόκληρων πρωτεϊνωμάτων κυττάρων και ανίχνευση φαρμακευτικών στόχων και νέων ουσιών σε μεγάλη κλίμακα, και ταυτόχρονα να ελαττώσουν το χρόνο και το κόστος στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων.

3. Ακουστικοί Βιοαισθητήρες

Τα ακουστικά κύματα είναι αρμονικές ελαστικές παραμορφώσεις που μπορούν να παραχθούν σε στερεά. Παραμόρφωση σε στερεό συμβαίνει όταν οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων μεταβάλλονται εξαιτίας της άσκησης μιας εξωτερικής δύναμης. Αν η δύναμη αυτή παύσει, οι δυνάμεις επαναφοράς θα αποκαταστήσουν τα άτομα στην αρχική τους θέση. Αν η εφαρμοζόμενη δύναμη εμφανίζει περιοδικότητα τότε μπορεί να παραχθεί μια κυματοειδής παραμόρφωση ή ταλάντωση που είναι ακουστικό κύμα⁴⁵ (Εικ. 2.7). Οι ακουστικοί βιοαισθητήρες ως μεταγωγέα χρησιμοποιούν ένα πιεζοηλεκτρικό υλικό. Τέτοιο υλικό είναι ο χαλαζίας (quartz) ή το τανταλικό λίθιο (LiTaO_3) από τα οποία έχουν κατασκευαστεί διάφορα συστήματα βιοαισθητήρων⁴⁶. Τα πιεζοηλεκτρικά υλικά έχουν την ιδιότητα να εμφανίζουν παραμόρφωση αν εφαρμοστεί σε αυτά ένα ηλεκτρικό πεδίο. Τέτοια παραμόρφωση είναι ένα ακουστικό κύμα⁴⁷.



Εικ. 2.7. Διάδοση μιας περιοδικής κυματοειδούς παραμόρφωσης στην επιφάνεια ενός στερεού.

Σε έναν ακουστικό βιοαισθητήρα, η διάταξη περιλαμβάνει το πιεζοηλεκτρικό υλικό και ηλεκτρόδια. Τα ηλεκτρόδια εφαρμόζουν ένα ηλεκτρικό πεδίο για την παραγωγή του ακουστικού κύματος ενώ ταυτόχρονα χρησιμεύουν και στην ανίχνευση του⁴⁸. Το ακουστικό κύμα μπορεί να διαδίδεται στο πιεζοηλεκτρικό υλικό του βιοαισθητήρα με διάφορους τρόπους. Δύο διαφορετικοί τύποι κυμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν, το επιφανειακό ακουστικό κύμα (surface acoustic wave, SAW) και το ακουστικό κύμα όγκου (bulk acoustic wave, BAW). Στην πρώτη περίπτωση, το ακουστικό κύμα διαδίδεται στη επιφάνεια του αισθητήρα⁴⁹. Στην περίπτωση του BAW, το ακουστικό κύμα διαδίδεται σε όλο τον όγκο του πιεζοηλεκτρικού υλικού. Οι βιοαισθητήρες που λειτουργούν με SAW είναι πιο ευαίσθητοι από εκείνους που λειτουργούν με BAW καθώς συνήθως χρησιμοποιούν υψηλότερης συχνότητας ακουστικό κύμα για να ανιχνεύσουν αλλαγές μάζας στην επιφάνεια του αισθητήρα^{50, 51}.

Η μεγάλη ανάπτυξη των ακουστικών βιοαισθητήρων ξεκίνησε στη δεκαετία 1980 από το πεδίο των τηλεπικοινωνιών, όπου συσκευές ακουστικών κυμάτων άρχισαν να παράγονται σε βιομηχανική κλίμακα για εφαρμογές που χρησιμοποιούσαν υψηλές συχνότητες κυμάτων. Νωρίτερα, είχε δείχθει ότι ένας ακουστικός αισθητήρας μπορεί να εμφανίζει γραμμική σχέση ανάμεσα στη μάζα που έχει προσροφηθεί στην επιφάνεια και τη συχνότητα συντονισμού του⁵². Η μεταφορά των ακουστικών αισθητήρων στη μελέτη βιομοριακών αλληλεπιδράσεων έγινε με την ανάπτυξη κυκλωμάτων που μπορούν να λειτουργούν παρουσία υγρών μέσων⁵³⁻⁵⁵ και την αντίστοιχη εξέλιξη των θεωρητικών μοντέλων σε υγρή φάση^{56, 57}. Πλέον, οι ακουστικοί βιοαισθητήρες έχουν πολυάριθμες εφαρμογές στο χαρακτηρισμό αλληλεπιδράσεων πληθώρας βιομορίων, όπως μικρο-μοριακές ενώσεις, πεπτίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, βακτήρια, σωματίδια ιών και ολόκληρα κύτταρα^{9, 10, 58}.

Όπως και στην περίπτωση των αισθητήρων SPR, η παρακολούθηση των αλλαγών στις ιδιότητες συντονισμού του πιεζοηλεκτρικού υλικού του αισθητήρα σε πραγματικό χρόνο μπορεί να προσφέρει υπολογισμό κινητικών παραμέτρων και σταθερά συγγένειας για τις μελετώμενες αλληλεπιδράσεις. Αυτό οφείλεται στην ευαισθησία των ακουστικών αισθητήρων σε αλλαγές στη μάζα που εναποτίθεται στην επιφάνεια τους, οπότε και λειτουργούν ως μικροζυγοί. Εκτός από αυτήν την ιδιότητα όμως, οι ακουστικοί βιοαισθητήρες εμφανίζουν ευαισθησία σε αλλαγές στην ιζωδοελαστικότητα που συμβαίνουν στη διεπιφάνεια υγρού/στερεού και προσφέρουν, επομένως, κάτι περισσότερο από τους οπτικούς βιοαισθητήρες^{44, 59}.

3.1. Βιοαισθητήρες μικροζυγοί κρυσταλλικού χαλαζία

Οι βιοαισθητήρες που λειτουργούν με ακουστικό κύμα όγκου (BAW) χρησιμοποιούν κυρίως εγκάρσια κύματα⁶⁰ (thickness shear mode, TSM). Οι αισθητήρες TSM ονομάζονται και αλλιώς μικροζυγοί κρυσταλλικού χαλαζία (quartz crystal microbalance, QCM). Η διάταξη ενός αισθητήρα QCM είναι ένα λεπτό υπόστρωμα πιεζοηλεκτρικού υλικού με δύο ηλεκτρόδια χρυσού να εναποτίθενται σε καθεμιά από τις πλευρές του υλικού (Εικ. 2.8). Η πολύ απλή γεωμετρία καθιστά τους βιοαισθητήρες QCM ως την πιο διαδεδομένη κατηγορία ακουστικών βιοαισθητήρων. Οι συχνότητες λειτουργίας κυμαίνονται συνήθως από 5 ως 50 MHz

καθώς σε υψηλότερες συχνότητες οι συσκευές γίνονται πολύ λεπτές και εύθραυστες.

Οι αισθητήρες QCM εμφανίζουν ευαισθησία στην εναπόθεση στην επιφάνειά τους της μάζας είτε ενός λεπτού άκαμπτου στρώματος⁵² είτε ενός υγρού με μεταβαλλόμενο ιξώδες⁶¹. Η απόκριση αυτή εκφράζεται ως αλλαγή στη συχνότητα του ακουστικού κύματος. Συγχρόνως, εκτός από αυτήν την ευαισθησία στην δεσμευόμενη μάζα, παρατηρείται και απώλεια ενέργειας προκαλούμενη από το ιξώδες του εναποτιθέμενου στρώματος. Η απώλεια αυτή μπορεί να καταγραφεί και να προσφέρει ανίχνευση όχι μόνο για εναπόθεση μάζας αλλά και για ιξωδοελαστικές ή μηχανικές αλλαγές πάνω στην επιφάνεια του αισθητήρα QCM⁶⁰. Η ανίχνευση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι ένα ιξωδοελαστικό ή «μαλακό» στρώμα δε θα συζευχθεί πλήρως με την ταλάντωση του πιεζοηλεκτρικού υλικού αλλά θα μετριάσει την ταλάντωση. Η απώλεια ενέργειας που προκύπτει περιέχει πληροφορία για την ιξωδοελαστικότητα του στρώματος αυτού. Για τους βιοαισθητήρες QCM, η απώλεια ενέργειας μπορεί να μετρηθεί μέσω της καταγραφής της απόκρισης μιας ελεύθερα ταλαντευόμενης συσκευής QCM στη συχνότητα συντονισμού. Αυτό δίνει επίσης την ευκαιρία για τη χρήση διαφορετικών συχνοτήτων λειτουργίας και ταλαντώσεων (overtones). Έτσι, οι βιοαισθητήρες που προσφέρουν ταυτόχρονη μέτρηση της απώλειας ενέργειας του ακουστικού κύματος ονομάζονται QCM-D (quartz crystal microbalance with dissipation). Ένα στρώμα μάζας πάνω στην επιφάνεια του αισθητήρα QCM-D μπορεί να χαρακτηριστεί με μεγάλη λεπτομέρεια, μέσω της μέτρησης σε περισσότερες από μια συχνότητες και της εφαρμογής ενός μοντέλου ιξωδοελαστικότητας⁶²⁻⁶⁶. Αυτό καθιστά τους βιοαισθητήρες QCM-D ένα πολύ σημαντικό εργαλείο μελέτης των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων, εφόσον προσφέρουν πληροφορία για τις ιξωδοελαστικές και μηχανικές ιδιότητες των εγγενώς δομικά εύκαμπτων μελετώμενων βιομορίων, όπως λόγου χάρη λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Παρόλα αυτά, χρειάζεται προσοχή στην ανάλυση των δεδομένων από τους αισθητήρες QCM-D, καθώς δεν υπάρχει ακόμα απόλυτη συμφωνία για την ερμηνεία των παρατηρούμενων αλλαγών σε συχνότητα και απώλεια ενέργειας του ακουστικού κύματος.



Εικ. 2.8. Συσκευή ακουστικού βιοαισθητήρα QCM. (Πηγή: www.wikipedia.org)

3.2. Βιοαισθητήρες επιφανειακού ακουστικού κύματος

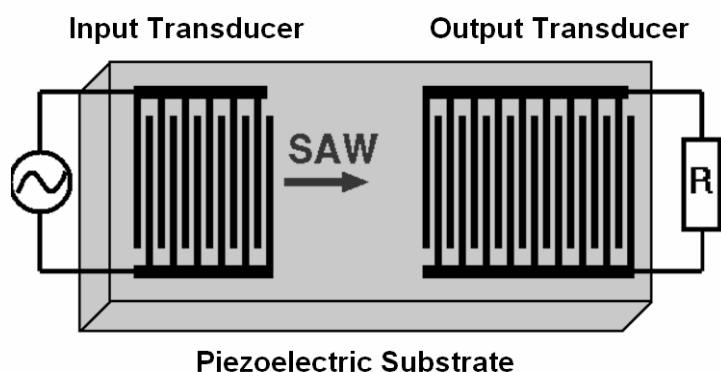
Οι βιοαισθητήρες επιφανειακού ακουστικού κύματος (surface acoustic wave, SAW) είναι η άλλη μεγάλη κατηγορία ακουστικών βιοαισθητήρων. Η θεωρία των επιφανειακών ακουστικών κυμάτων προήλθε αρχικά από το πεδίο της

σεισμολογίας στο τέλος του 19ου και τις αρχές του 20ου αιώνα, αλλά τα επιφανειακά ακουστικά κύματα άρχισαν να χρησιμοποιούνται σε ηλεκτρονικές συσκευές τη δεκαετία 1960, οπότε και αναπτύχθηκαν τεχνικές για την παραγωγή και ανίχνευση ακουστικών κυμάτων σε πιεζοηλεκτρικά υλικά⁴⁸. Αργότερα, στη δεκαετία 1980, έγινε ανάπτυξη αισθητήρων SAW που εμφάνιζαν καλή ευαισθησία παρουσία υγρού μέσου^{53, 55}, οι οποίοι ήταν περισσότερο κατάλληλοι για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων. Για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων SAW, κατασκευάστηκαν συσκευές από πιεζοηλεκτρικό υλικό σε μορφή A-T cut, δηλαδή παρασκευασμένο με κοπή που διαφυλάσσει σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες και καθαρή εγκάρσια κίνηση όταν υποβάλλεται σε ηλεκτρικό πεδίο. Οι αισθητήρες αυτοί, επομένως, λειτουργούν με εγκάρσιο οριζόντιο επιφανειακό κύμα (shear horizontal SAW), το οποίο προκαλεί στα στοιχειώδη σωματίδια του στερεού μετατόπιση παράλληλη με την επιφάνεια του αισθητήρα και κάθετη στη διεύθυνση διάδοσης⁵⁰.

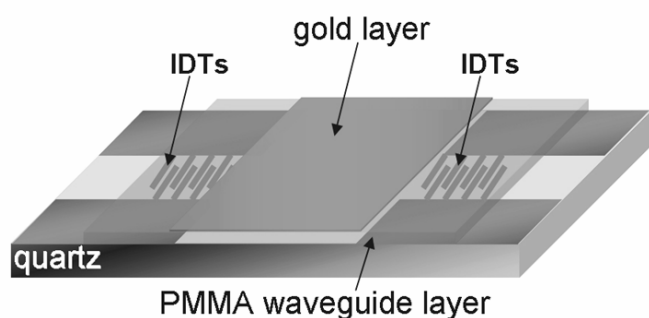
Η περισσότερο διαδεδομένη γεωμετρία αισθητήρων SAW περιλαμβάνει ένα κρύσταλλο A-T cut πιεζοηλεκτρικού υλικού (χαλαζίας ή τανταλικό λίθιο) και μεταλλικά ηλεκτρόδια τοποθετημένα στην επιφάνεια του κρυστάλλου (**Εικ. 2.9**). Τα ηλεκτρόδια έχουν τη μορφή αλληλοδιαπλεκόμενων μεταγωγέων (interdigitated transducers, IDTs) και σε αυτά εφαρμόζεται ένα εναλλασσόμενο ρεύμα. Αυτό προκαλεί ένα ταλαντευόμενο ηλεκτρικό πεδίο ανάμεσα στα IDTs, το οποίο με τη σειρά του επιφέρει εκτόπιση των σωματιδίων του πιεζοηλεκτρικού κρυστάλλου. Το ακουστικό κύμα που παράγεται διαδίδεται πάνω στην επιφάνεια του αισθητήρα και μπορεί να ανιχνευθεί από παρόμοιο σχηματισμό IDTs μέσω της αντίστροφης διαδικασίας⁵¹. Η απόσταση μεταξύ των IDTs ταυτίζεται με το μήκος κύματος του ακουστικού κύματος ενώ η συχνότητα λειτουργίας εξαρτάται από το μήκος κύματος και την ταχύτητα διάδοσης του κύματος στο υλικό. Ο πιο ευαίσθητος τύπος τέτοιου βιοαισθητήρα είναι εκείνος που λειτουργεί με κύματα Love (**Εικ. 2.10**). Το κύμα Love⁶⁷ περιορίζεται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα χρησιμοποιώντας στρώμα κυματοδηγού (waveguide) που εναποτίθεται στην επιφάνεια. Ως κυματοδηγός χρησιμοποιούνται διάφορα πολυμερή υλικά^{51, 68, 69} όπως, λόγω χάρη, poly-methyl-methacrylate (PMMA), photoresist ή novolak. Εναπόθεση του κυματοδηγού γίνεται επάνω στον κρύσταλλο, περιλαμβάνοντας τα IDTs και την επιφάνεια ευαισθησίας (sensing surface). Το πάχος του στρώματος του κυματοδηγού είναι ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την ευαισθησία του βιοαισθητήρα αφού συμβάλλει στη μετάδοση του κύματος στην επιφάνεια⁶⁸. Οι ακουστικοί βιοαισθητήρες SAW και τύπου Love εμφανίζουν ευαισθησία σε εναπόθεση μάζας στην επιφάνεια τους, η οποία ανιχνεύεται ως αλλαγή στην ταχύτητα διάδοσης του επιφανειακού κύματος και καταγράφεται ως μεταβολή στη φάση (phase) του κύματος^{51, 70}. Επιπλέον, όπως και οι ακουστικοί βιοαισθητήρες QCM-D, οι ακουστικοί βιοαισθητήρες SAW και τύπου Love εμφανίζουν ευαισθησία σε ιξωδοελαστικές και μηχανικές αλλαγές του εναποτιθέμενου στρώματος⁷¹. Αυτές ανιχνεύονται ως απώλεια της ενέργειας του ακουστικού κύματος και καταγράφονται ως μεταβολή του πλάτους (amplitude) του κύματος.

Παρόλο που οι ακουστικοί βιοαισθητήρες SAW, και συγκεκριμένα οι αισθητήρες τύπου Love, είναι οι πιο ευαίσθητοι ακουστικοί αισθητήρες⁷², καταλαμβάνουν μικρότερο κομμάτι της παρούσας έρευνας και εφαρμογής εν συγκρίσει με τους ακουστικούς βιοαισθητήρες QCM. Αυτό συμβαίνει γιατί αφενός η

διαδικασία παραγωγής τους χρειάζεται περισσότερη τεχνολογική εξειδίκευση και αφετέρου δεν ήταν απόλυτα ξεκάθαρο πως «μεταφράζονται» φυσικά οι μετρήσεις των αισθητήρων SAW. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορα μοντέλα για την φυσική εξήγηση των μεταβολών φάσης και του πλάτους του ακουστικού κύματος για βιομόρια (πρωτεΐνες⁷³ και DNA⁷⁴) που αναμφίβολα θα βοηθήσουν στη διεύρυνση της χρήσης ακουστικών βιοαισθητήρων SAW.



Εικ. 2.9. Διάταξη βιοαισθητήρα επιφανειακού ακουστικού κύματος. (Πηγή: www.wikipedia.org)



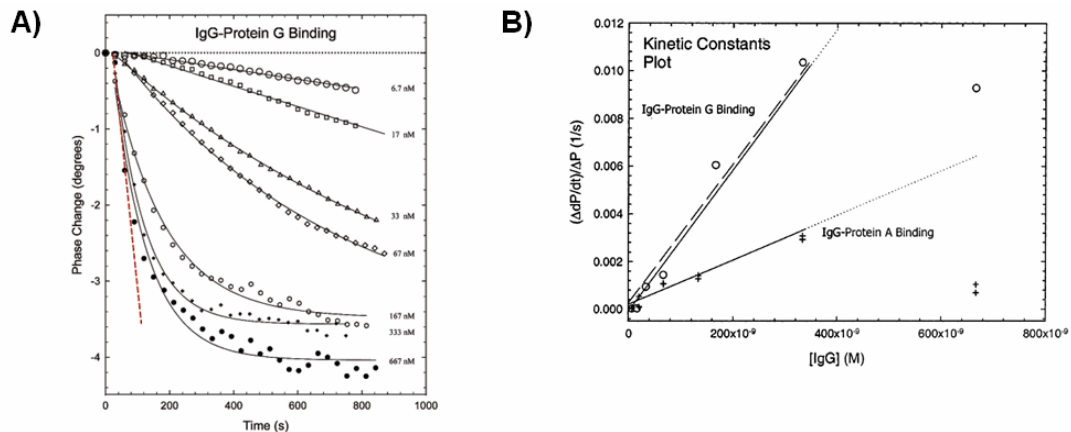
Εικ. 2.10. Σχηματική απεικόνιση ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love. (Πηγή: Saitakis et al., 2008)

4. Εφαρμογές των ακουστικών βιοαισθητήρων

Στη σύγχρονη βιολογική και βιοϊατρική έρευνα, η μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο ή περισσότερων βιομορίων αποτελεί θεμελιώδες βήμα για την κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στις διάφορες βιολογικές διεργασίες. Οι βιοαισθητήρες έχουν πολλές εφαρμογές στην ανίχνευση αλληλεπιδράσεων μεταξύ βιομορίων, συμπεριλαμβανομένων αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών¹¹, πρωτεϊνών και DNA⁷⁵ καθώς και στην ανίχνευση βακτηρίων σε κλινικά ή περιβαλλοντικά δείγματα ή τρόφιμα⁷⁶. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα που προσφέρουν οι ακουστικοί βιοαισθητήρες, εκτός από την ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο με τρόπο ταχύ, μη καταστρεπτικό και χωρίς σήμανση, είναι η ευαισθησία τους σε μεταβολές στις μηχανικές ιδιότητες των μελετώμενων μορίων μαζί με την υψηλή ευαισθησία τους στην εναπόθεση μάζας. Οι εφαρμογές των ακουστικών βιοαισθητήρων, επομένως, αντανακλούν ακριβώς αυτές τις ιδιότητες των αισθητήρων.

4.1. Ανίχνευση και μελέτη μοριακών αλληλεπιδράσεων

Οι ακουστικοί βιοαισθητήρες (είτε QCM-D είτε Love) έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση μοριακών αλληλεπιδράσεων σε πραγματικό χρόνο^{10, 46, 59, 72}. Μια χρήση είναι στη μελέτη της προσρόφησης πρωτεϊνών σε διάφορα υλικά και επιφάνειες, μια διαδικασία σημαντική τόσο για το πεδίο της βιοτεχνολογίας όσο για την ιατρική και διαγνωστική^{44, 77}. Άλλη εφαρμογή είναι ο υπολογισμός σταθερών κινητικής και συγγένειας για μοριακές αλληλεπιδράσεις⁷⁸⁻⁸⁰ (Εικ. 2.11). Όπως και με τους οπτικούς βιοαισθητήρες, έχουν αναπτυχθεί ανοσοαισθητήρες βασισμένοι σε συστήματα ακουστικών βιοαισθητήρων^{46, 81}. Επιπλέον, έχει αναφερθεί παρακολούθηση του υβριδισμού μεταξύ μορίων DNA^{82, 83} και ανίχνευση αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης/DNA^{84, 85}. Άλλα βιομόρια που έχουν μελετηθεί είναι οι υδατάνθρακες^{86, 87} και τα λιπίδια (βλ. §4.2). Οι ακουστικοί βιοαισθητήρες προσφέρουν, επομένως, τη δυνατότητα παρακολούθησης και χαρακτηρισμού της ειδικότητας, της κινητικής και της συγγένειας μοριακών αλληλεπιδράσεων. Επιπλέον, επιτρέπουν τη διεξαγωγή των πειραμάτων σε διάφορες συνθήκες, λόγω χάρη παρουσία οργανικών διαλυτών ή ακατέργαστων δειγμάτων, χωρίς την ανάγκη για περαιτέρω καθαρισμό και απομόνωση των μελετώμενων μορίων.



Εικ. 2.11. Χρήση των καμπύλων πρόσδεσης σε πραγματικό χρόνο (A) για αλληλεπίδραση πρωτεΐνης/πρωτεΐνης (PrG/IgG) για τον υπολογισμό των σταθερών ρυθμού σύνδεσης (B). (Πηγή: Saha et al., 2003)

Οι ακουστικοί βιοαισθητήρες προσφέρουν την ανίχνευση και ανάλυση δομικών αλλαγών των μελετώμενων βιομορίων μέσω της ευαισθησίας τους σε μηχανικές αλλαγές. Συγκεκριμένα παραδείγματα περιλαμβάνουν ανάλυση μορίων DNA διαφορετικού μήκους και διαφορετικής διαμόρφωσης⁷⁴ καθώς και ανίχνευση αλλαγής στη διαμόρφωση συμπλόκων DNA/ιστονών⁸⁴ μέσω ακουστικού αισθητήρα τύπου Love. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ανίχνευση της αλλαγής στη διαμόρφωση προσροφημένων πρωτεϊνών⁸⁸ και στην μεταβολή στη διαμόρφωση πρωτεΐνης έπειτα από αλληλεπίδραση με τον προσδέτη της⁸⁹. Αυτές οι μοναδικές εφαρμογές των ακουστικών βιοαισθητήρων μπορούν να τους καθιερώσουν ως σημαντικά εργαλεία για την ανάλυση βιομοριακών αλληλεπιδράσεων.

4.2. Ανίχνευση και μελέτη λιπιδικών μεμβρανών

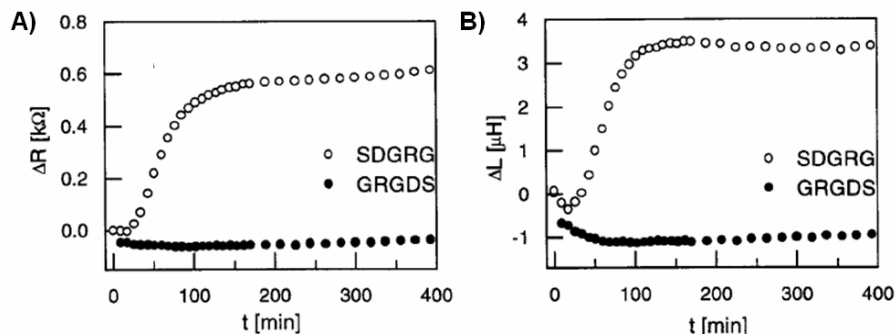
Πολλές από τις μελετώμενες αλληλεπιδράσεις στις βιολογικές και βιοϊατρικές επιστήμες συμβαίνουν σε μεμβρανικές επιφάνειες. Επίσης, η πλειοψηφία των σύγχρονων φαρμάκων αφορά μόρια στόχους που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη. Για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών πρόσδεσης μορίων σε μεμβρανικά μόρια, είτε λιπίδια, είτε μεμβρανικές πρωτεΐνες, χρειάζεται να γίνει μελέτη των αλληλεπιδράσεων αυτών σε όσο το δυνατό φυσικές συνθήκες. Αυτό σημαίνει μελέτη των μορίων αυτών σε μοντέλα μεμβρανών ή σε ολόκληρα κύτταρα⁹⁰. Οι ακουστικοί βιοαισθητήρες προσφέρουν μια ιδανική τεχνική για τη μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων μέσω του συνδυασμού μέτρησης της προσροφημένης μάζας και των μηχανικών ιδιοτήτων της. Με ακουστικούς βιοαισθητήρες έχει μελετηθεί η προσρόφηση λιποσωμάτων⁹¹⁻⁹³ και η αλλαγή στις μηχανικές ιδιότητες τους ως απόκριση στην αφαίρεση και προσθήκη χοληστερόλης^{94, 95}. Άλλες μελέτες παρακολούθησαν το σχηματισμό σε πραγματικό χρόνο λιπιδικών μονο- ή διπλοστοιβάδων στην τροποποιημένη επιφάνεια ακουστικών βιοαισθητήρων^{91, 96-98}. Επίσης, έγινε μελέτη της πρόσδεσης πρωτεϊνών σε λιπιδικές μεμβράνες^{78, 99-101}. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η αλληλεπίδραση IgG προσδεμένου σε λιπιδική διπλοστοιβάδα με αντίσωμα anti-IgG με τη χρήση του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love⁷⁸ και η ανάλυση της πρόσδεσης των αννεξίνων A1 και A2t σε λιπιδικές μεμβράνες παρουσία ή απουσία ιόντων Ca²⁺ με τη χρήση του ακουστικού βιοαισθητήρα QCM^{101, 102}.

4.3. Ακουστικοί βιοαισθητήρες και μελέτη κυτταρικής προσκόλλησης

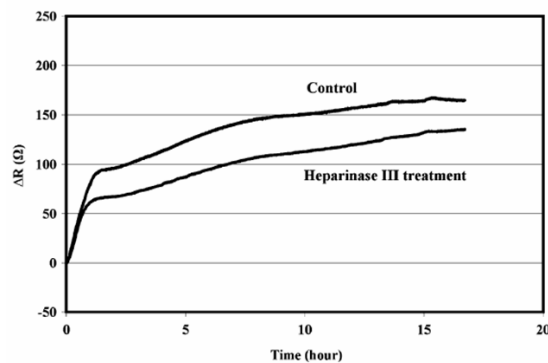
Οι ακουστικοί βιοαισθητήρες έχουν τη δυναμική να μελετήσουν διεργασίες που περιλαμβάνουν κύτταρα και την αλληλεπίδραση τους με επιφάνειες ή διαλυτά μόρια και έχουν χρησιμοποιηθεί στην άμεση ανίχνευση επικίνδυνων μικροβιακών στελεχών με μεγάλη ευαισθησία¹⁰³⁻¹⁰⁶ καθώς και στο χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων βιοφίλμ βακτηριακών κυττάρων^{107, 108} (ταχύτητα ανάπτυξης, ευαισθησία σε τοξικούς φαρμακολογικούς παράγοντες). Επιπλέον, ακουστικοί βιοαισθητήρες QCM έχουν εφαρμοστεί στη μελέτη της κυτταρικής προσκόλλησης ευκαρυωτικών κυττάρων σε επιφάνειες. Αυτές οι μελέτες εκμεταλλεύτηκαν την ικανότητα του αισθητήρα να μελετά διαδικασίες προσρόφησης σε επιφάνεια είτε σε υγρή είτε σε στερεή φάση^{52, 54} και να ανιχνεύει διαφορές στην ιξωδοελαστικότητα ενώ προσπάθησαν να προσφέρουν νέα πληροφορία για τη συμπεριφορά κυττάρων συναρτήσει του χρόνου και διάφορων εξωτερικών παραγόντων.

Γενικά, για ευκαρυωτικά κύτταρα, έχει γίνει παρατήρηση της κυτταρικής προσκόλλησης σε πραγματικό χρόνο για διάφορα υποστρώματα και κυτταρικούς τύπους. Αναφέροντας μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα, διάφορα εργαστήρια έχουν μελετήσει την προσκόλληση κυτταρικών σειρών (κύτταρα MDCK κυνός, ινοβλάστες Swiss 3T3, αρθρικά ενδοθηλιακά κύτταρα βοδιού, ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου ωοθηκών ή νευροβλαστώματος) σε επιφάνειες όπως απλός χρυσός^{109, 110} και επιφάνειες επικαλυμμένες με πρωτεΐνες¹¹¹⁻¹¹⁴. Επίσης, ελέγχθηκε η επίδραση αναστολέων της κυτταρικής προσκόλλησης^{112, 113} καθώς και ουσιών που επεμβαίνουν στην αυτοδιάταξη και ομοίωση των στοιχείων του κυτταροσκελετού^{109, 114}. Κατά την αλληλεπίδραση κυττάρων με προσροφημένες σε

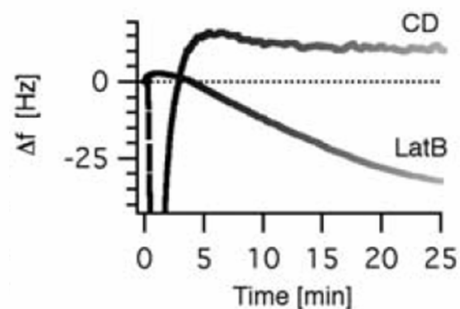
χρυσό πρωτεΐνες, λόγω χάρη φιβρονεκτίνη, βιτρονεκτίνη, παρατηρήθηκε αναστολή της προσκόλλησης έπειτα από προσθήκη πεπτιδίων, που περιέχουν την αμινοξική αλληλουχία RGDS για την ειδική προσκόλληση μορίων της κυτταρικής μεμβράνης (ιντεγκρίνες) σε πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου (Εικ. 2.12), με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση¹¹²⁻¹¹⁴. Σε μια άλλη εργασία, μελετήθηκε ακουστικά η επίδραση του επιφανειακού φορτίου στην κυτταρική προσκόλληση μέσω της χρήσης ηπαρινάσης σε κύτταρα ενδοθηλίου^{115, 116}. Τα επωασμένα με ηπαρινάση κύτταρα ενδοθηλίου προστέθηκαν σε επιφάνειες αισθητήρα QCM καλυμμένες με πολυ-D-λυσίνη (Εικ. 2.13). Η ακουστική παρατήρηση σε πραγματικό χρόνο έδειξε ότι η επώαση με το ενζυμο ελάττωσε τη μη ειδική αλληλεπίδραση των αρνητικά φορτισμένων (λόγω πρωτεογλυκανών θειικής ηπαράνης) κυττάρων με τη θετικά φορτισμένη (λόγω πολυ-D-λυσίνης) επιφάνεια του αισθητήρα, αφού η ηπαρινάση ελάττωσε την ποσότητα των αρνητικά φορτισμένων πρωτεογλυκανών στη μεμβράνη.



Εικ. 2.12. Μεταβολή στην αντίσταση (A) και την αγωγιμότητα (B) ενός αισθητήρα QCM (που σχετίζονται αντίστοιχα με το πλάτος και τη φάση του ακουστικού κύματος) κατά την προσκόλληση κυττάρων (MDCK-II) σε επιφάνεια φιβρονεκτίνης και βιτρονεκτίνης παρουσία είτε του πεπτιδίου GRGDS (που αναστέλλει την κυτταρική προσκόλληση) είτε του ουδέτερου πεπτιδίου SDGRG. (Πηγή: Wegener et al., 2000)



Εικ. 2.13. Μεταβολή στην αντίσταση (ενέργεια) ενός αισθητήρα QCM κατά την προσκόλληση σε επιφάνεια πολυ-D-λυσίνης κυττάρων ενδοθηλίου που έχουν επωαστεί ή μη με ηπαρινάση III. (Πηγή: Hong et al., 2006)



Εικ. 2.14. Μεταβολή στη συχνότητα ενός αισθητήρα QCM ενός στρώματος προσκολλημένων κυττάρων έπειτα από την προσθήκη και την επίδραση ουσιών αποπολυμερισμού ακτίνης (κυτοχαλάσινη-CD, λατρουνκουλίνη-LatB). (Πηγή: Galli Marxer et al., 2003)

Μια άλλη εφαρμογή των ακουστικών βιοαισθητήρων είναι η ανίχνευση της απόκρισης ήδη προσδεμένων κυττάρων σε διαλυτούς φαρμακολογικούς παράγοντες. Κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων μεταχείρισης στρώματος κυττάρων

στην επιφάνεια βιοαισθητήρα με φάρμακα όπως η κυτοχαλασίνη (cytochalasin) και η λατρουνκουλίνη (latrunculin) (αναστέλλουν το σχηματισμό ινώδους ακτίνης) ή η νοκοδαζόλη (nocodazole) (διαταράσσει τη δυναμική ανισορροπία των μικροσωληνίσκων), παρατηρούνται μεταβολές στο σήμα του βιοαισθητήρα (Εικ. 2.14) λόγω μεταβολών στο σχήμα και στο ιξώδες των κυττάρων^{109, 114}. Τέλος, μια άλλη ομάδα¹¹⁷ ανέπτυξε μία συστοιχία αισθητήρων QCM για την ανίχνευση καρκινικών δεικτών σε κλινικά δείγματα. Τα Fab κομμάτια αντισωμάτων έναντι ειδικών καρκινικών δεικτών για διαφορετικές σειρές οξείας λευχαιμίας ακινητοποιήθηκαν στις επιφάνειες του αισθητήρα και καθαρισμένα ή μη δείγματα ανθρώπινων λευκοκυττάρων προστέθηκαν στον αισθητήρα. Η μέθοδος αυτή επέτρεψε γρήγορη ταυτοποίηση φαινοτύπων λευχαιμικών βλαστών εμφανίζοντας όμοιες δυνατότητες με τις κλινικά χρησιμοποιούμενες τεχνικές.

Οι παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι το σήμα του αισθητήρα QCM μεταβάλλεται τόσο ως προς τη συχνότητα όσο και ως προς την απώλεια ενέργειας του ακουστικού κύματος κατά την προσκόλληση των κυττάρων. Η αλλαγή της συχνότητας του κύματος δείχθηκε από την αρχή ότι ήταν γραμμικά μεταβαλλόμενη με την κάλυψη της επιφάνειας από κύτταρα^{118, 119}. Η μεταβολή αυτή εξαρτάται, για συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, πέρα από τον αριθμό των κυττάρων που προσκολλώνται, από τον αριθμό των μορίων στην επιφάνεια των κυττάρων που αλληλεπιδρούν με ακινητοποιημένα μόρια, από τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων, από την απόσταση ανάμεσα στην κυτταρική μεμβράνη και την επιφάνεια του αισθητήρα και από την κατάσταση του κυτταροσκελετού. Η απώλεια ενέργειας του ακουστικού κύματος έχει δείχθει ότι ανιχνεύει μηχανικά φαινόμενα με την μεμβράνη και τη μάζα του κυττάρου που βρίσκονται σε εγγύτητα με την επιφάνεια του αισθητήρα^{112, 114, 120, 121}, όπως ακαμψία των κυττάρων έπειτα από διατάραξη του υπομεμβρανικού κυτταροσκελετού¹⁰⁹. Η απώλεια ενέργειας οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι τα κύτταρα δε συμπεριφέρονται σαν ελαστικές μάζες στην επιφάνεια του αισθητήρα αλλά εμφανίζουν μια πλήρως ιξώδη συμπεριφορά, όχι πολύ διαφορετική από διαλύματα γλυκερόλης⁹⁴. Παρόλα αυτά, παραμένει ακόμα σχετικά άγνωστο κατά πόσο και με ποιο μηχανισμό κάθε μεταβλητή που ανιχνεύεται, λόγου χάρη ο κυτταρικός τύπος, το μέγεθος και η φυσιολογία των κυττάρων, τα μεμβρανικά μόρια και οι επιφανειακές τροποποιήσεις, συνεισφέρουν για την αλλαγή στο ακουστικό κύμα¹²².

Επιπρόσθετα, οι παραπάνω μελέτες περισσότερο προσφέρουν ποιοτικές πληροφορίες για την αλληλεπίδραση κυττάρου/υποστρώματος παρά κάποια ποσοτική ανάλυση ειδικών αλληλεπιδράσεων. Επομένως, παρόλο που μπορούν να έχουν μεγάλη χρησιμότητα στο πεδίο της κυτταρικής βιολογίας, το γεγονός ότι οι ακουστικοί βιοαισθητήρες QCM εστιάζονται σε μεγάλης έκτασης μεταβολές στη δομή των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό στη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ μεμβρανικών μορίων και μορίων στην επιφάνεια του αισθητήρα. Οι αλληλεπιδράσεις κυττάρου/υποστρώματος είναι λιγότερο καλά μελετημένες, παρόλο που προσομοιάζουν περισσότερο την *in vivo* κατάσταση και θα πρόσφεραν σημαντικές πληροφορίες, είτε ποσοτικές είτε ποιοτικές. Αυτό το κενό θα μπορούσαν ίσως να καλύψουν οι βιοαισθητήρες SAW καθώς είναι περισσότερο ευαίσθητοι και εστιάζουν περισσότερο στην περιοχή που συμβαίνουν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρου και υποστρώματος.

5. Βιβλιογραφία

1. Gizeli, E. & Lowe, C.R. Biomolecular Sensors. (Taylor & Francis Inc., London; 2002).
2. McNaught, A.D. & Wilkinson, A. (eds.) IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, Edn. 2nd. (Blackwell Scientific Publications, Oxford; 1997).
3. Clark, L.C., Jr. & Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci* **102**, 29-45 (1962).
4. D'Orazio, P. Biosensors in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* **334**, 41-69 (2003).
5. Heller, A. Amperometric biosensors. *Current Opinion in Biotechnology* **7**, 50-54 (1996).
6. Newman, J.D., Tigwell, L.J., Warner, P.J. & Turner, A.P.F. Biosensors: boldly going into the new millennium. *Sens Rev* **21**, 268-271 (2001).
7. Scheller, F., Wollenberger, U., Warsinke, A. & Lisdat, F. Research and Development in Biosensors. *Curr Opin Biotechnol* **12**, 35-40 (2001).
8. North, J.R. Immunosensors - Antibody-Based Biosensors. *Trends in Biotechnology* **3**, 180-186 (1985).
9. Cooper, M.A. Label-free screening of bio-molecular interactions. *Anal Bioanal Chem* **377**, 834-842 (2003).
10. Cooper, M.A. & Singleton, V.T. A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions. *J Mol Recognit* **20**, 154-184 (2007).
11. Lakey, J.H. & Raggett, E.M. Measuring protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 119-123 (1998).
12. Cooper, M.A. Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 515-528 (2002).
13. Chien, F.C. & Chen, S.J. A sensitivity comparison of optical biosensors based on four different surface plasmon resonance modes. *Biosens Bioelectron* **20**, 633-642 (2004).
14. Liley, M. in Biomolecular Sensors. (eds. E. Gizeli & C.R. Lowe) 123-175 (Taylor & Francis Inc., London; 2002).
15. Nice, E.C. & Catimel, B. Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions. *Bioessays* **21**, 339-352 (1999).
16. Homola, J. & Piliarik, M. in Surface Plasmon Resonance Based Sensors, Vol. 4. (ed. J. Homola) 45-68 (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg; 2006).
17. Stenberg, E., Persson, B., Roos, H. & Urbaniczky, C. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J Colloid Interf Sci* **143**, 513-526 (1990).
18. Homola, J. (ed.) Surface Plasmon Resonance Based Sensors, Vol. 4. (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg; 2006).
19. Hamalainen, M.D. et al. Characterization of a set of HIV-1 protease inhibitors using binding kinetics data from a biosensor-based screen. *J Biomol Screen* **5**, 353-360 (2000).
20. Markgren, P.O., Hamalainen, M. & Danielson, U.H. Kinetic analysis of the interaction between HIV-1 protease and inhibitors using optical biosensor technology. *Anal Biochem* **279**, 71-78 (2000).
21. Besenicar, M., Macek, P., Lakey, J.H. & Anderluh, G. Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chem Phys Lipids* **141**, 169-178 (2006).
22. Cooper, M.A., Try, A.C., Carroll, J., Ellar, D.J. & Williams, D.H. Surface plasmon resonance analysis at a supported lipid monolayer. *Biochim Biophys Acta* **1373**, 101-111 (1998).
23. Plant, A.L., Brigham-Burke, M., Petrella, E.C. & O'Shannessy, D.J. Phospholipid/alkanethiol bilayers for cell-surface receptor studies by surface plasmon resonance. *Anal Biochem* **226**, 342-348 (1995).
24. Terretaz, S., Stora, T., Duschl, C. & Vogel, H. Protein binding to supported lipid membranes: investigation of the cholera ganglioside interaction by simultaneous

- impedance spectroscopy and surface plasmon resonance. *Langmuir* **9**, 1361-1369 (1993).
25. Bieri, C., Ernst, O.P., Heyse, S., Hofmann, K.P. & Vogel, H. Micropatterned immobilization of a G protein-coupled receptor and direct detection of G protein activation. *Nat Biotechnol* **17**, 1105-1108 (1999).
 26. Lang, H., Duschl, C. & Vogel, H. A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces. *Langmuir* **10**, 197-210 (1994).
 27. Stora, T., Lakey, J.H. & Vogel, H. Ion-channel gating in transmembrane receptor proteins: Functional activity in tethered lipid membranes. *Angewandte Chemie-International Edition* **38**, 389-392 (1999).
 28. Tanaka, M. & Sackmann, E. Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature* **437**, 656-663 (2005).
 29. Giebel, K. et al. Imaging of cell/substrate contacts of living cells with surface plasmon resonance microscopy. *Biophys J* **76**, 509-516 (1999).
 30. Morgan, C.L., Newman, D.J., Cohen, S.B., Lowe, P. & Price, C.P. Real-time analysis of cell surface HLA class I interactions. *Biosens Bioelectron* **13**, 1099-1105 (1998).
 31. Quinn, J.G. et al. Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. *Anal Biochem* **281**, 135-143 (2000).
 32. Ramsden, J.J. & Horvath, R. Optical biosensors for cell adhesion. *J Recept Signal Transduct Res* **29**, 211-223 (2009).
 33. Hearty, S., Leonard, P., Quinn, J. & O'Kennedy, R. Production, characterisation and potential application of a novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes*. *Journal of microbiological methods* **66**, 294-312 (2006).
 34. Subramanian, A., Irudayaraj, J. & Ryan, T. A mixed self-assembled monolayer-based surface plasmon immunosensor for detection of *E. coli* O157:H7. *Biosens Bioelectron* **21**, 998-1006 (2006).
 35. Li, B., Chen, J. & Long, M. Measuring binding kinetics of surface-bound molecules using the surface plasmon resonance technique. *Anal Biochem* **377**, 195-201 (2008).
 36. Endo, T., Yamamura, S., Kerman, K. & Tamiya, E. Label-free cell-based assay using localized surface plasmon resonance biosensor. *Anal Chim Acta* **614**, 182-189 (2008).
 37. Hide, M. et al. Real-time analysis of ligand-induced cell surface and intracellular reactions of living mast cells using a surface plasmon resonance-based biosensor. *Anal Biochem* **302**, 28-37 (2002).
 38. Yanase, Y. et al. The SPR signal in living cells reflects changes other than the area of adhesion and the formation of cell constructions. *Biosens Bioelectron* **22**, 1081-1086 (2007).
 39. Fang, Y., Ferrie, A.M., Fontaine, N.H., Mauro, J. & Balakrishnan, J. Resonant waveguide grating biosensor for living cell sensing. *Biophys J* **91**, 1925-1940 (2006).
 40. Fang, Y., Ferrie, A.M., Fontaine, N.H. & Yuen, P.K. Characteristics of dynamic mass redistribution of epidermal growth factor receptor signaling in living cells measured with label-free optical biosensors. *Anal Chem* **77**, 5720-5725 (2005).
 41. Fang, Y., Ferrie, A.M. & Li, G. Probing cytoskeleton modulation by optical biosensors. *FEBS Lett* **579**, 4175-4180 (2005).
 42. Fang, Y., Ferrie, A.M. & Li, G. Cellular functions of cholesterol probed with optical biosensors. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 254-261 (2006).
 43. Fang, Y., Li, G.G. & Peng, J. Optical biosensor provides insights for bradykinin B(2) receptor signaling in A431 cells. *FEBS Lett* **579**, 6365-6374 (2005).
 44. Cooper, M.A. & Whalen, C. Profiling molecular interactions using label-free acoustic screening. *Drug Discov Today: Technologies* **2**, 241-245 (2005).

45. Morgan, D.P. *Surface Acoustic Wave Devices for Signal Processing*. (Elsevier, New York; 1985).
46. Lange, K., Rapp, B.E. & Rapp, M. Surface acoustic wave biosensors: a review. *Anal Bioanal Chem* **391**, 1509-1519 (2008).
47. Cady, W.P. *Piezoelectricity, an Introduction to the Theory and Applications of Electromechanical Phenomena in Crystals*. (Dover, New York; 1964).
48. White, R.M. Surface Elastic Waves. *Proc IEEE* **58**, 138-177 (1970).
49. Dieulesaint, E. & Royer, D. in *Elastic Waves In Solids, Applications to Signal Processing* (John Wiley & Sons Inc., New York; 1980).
50. Ballantine, D.S. et al. *Acoustic Wave Sensors*. (Academic Press, San Diego; 1997).
51. Gizeli, E., Goddart, N., Lowe, C.R. & Stevenson, A.C. A Love plate biosensor utilising a polymer layer. *Sens Actuators, B* **6**, 131-137 (1992).
52. Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquartzen zur Wagung dunner Schichten und zur microwagung. *Z Phys* **155**, 206-222 (1959).
53. Flory, C.A. & Baer, R.L. Surface transverse wave mode analysis and coupling to interdigital transducers. *Proc IEEE Ultrason Symp*, 313-318 (1987).
54. Nomura, T. & Okuhara, M. Frequency-Shifts of Piezoelectric Quartz Crystals Immersed in Organic Liquids. *Analytica Chimica Acta* **142**, 281-284 (1982).
55. Shiokawa, S. & Moriizumi, T. Design of SAW sensor in liquid. *Jpn J Appl Phys* **27**, 142-144 (1988).
56. Kanazawa, K.K. & Gordon, J.G. The Oscillation Frequency of a Quartz Resonator in Contact with a Liquid. *Analytica Chimica Acta* **175**, 99-105 (1985).
57. Kanazawa, K.K. & Gordon, J.G. Frequency of a Quartz Microbalance in Contact with Liquid. *Analytical Chemistry* **57**, 1770-1771 (1985).
58. Steinem, C. & Janshoff, A. (eds.) *Piezoelectric Sensors*, Vol. 5. (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg; 2006).
59. Janshoff, A., Galla, H.J. & Steinem, C. Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors- An Alternative to Optical Biosensors? *Angew Chem Int Ed Engl* **39**, 4004-4032 (2000).
60. Rodahl, M., Hook, F., Krozer, A., Brzezinski, P. & Kasemo, B. Quartz-Crystal Microbalance Setup for Frequency and Q-Factor Measurements in Gaseous and Liquid Environments. *Review of Scientific Instruments* **66**, 3924-3930 (1995).
61. Kanazawa, K.K. Mechanical behaviour of films on the quartz microbalance. *Faraday Discuss* **107**, 77-90 (1997).
62. Hook, F. & Kasemo, B. in *Piezoelectric Sensors*, Vol. 5. (eds. C. Steinem & A. Janshoff) 425-448 (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg; 2006).
63. Hook, F. & Rudh, M. Quartz crystal microbalances (QCM) in biomacromolecular recognition. *BTi* **February/March** (2005).
64. Tsortos, A., Papadakis, G. & Gizeli, E. Shear acoustic wave biosensor for detecting DNA intrinsic viscosity and conformation: a study with QCM-D. *Biosens Bioelectron* **24**, 842-847 (2008).
65. Voinova, M.V., Jonson, M. & Kasemo, B. Missing mass effect in biosensor's QCM applications. *Biosens Bioelectron* **17**, 835-841 (2002).
66. Voinova, M.V., Rodahl, M., Jonson, M. & Kasemo, B. Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: continuum mechanics approach. *Phys Scripta* **59**, 391-396 (1999).
67. Love, A.E.H. *Some problems of geodynamics*. (Cambridge University Press, Cambridge; 1911).
68. Gizeli, E. et al. Sensitivity of the acoustic waveguide biosensor to protein binding as a function of the waveguide properties. *Biosens Bioelectron* **18**, 1399-1406 (2003).
69. Rasmusson, A. & Gizeli, E. Comparison of poly(methylmethacrylate) and Novolak waveguide coatings for an acoustic biosensor. *J Appl Phys* **90**, 5911-5914 (2001).

70. Kovacs, G. & Venema, A. Theoretical comparison of sensitivities of acoustic shear wave modes for (bio)chemical sensing in liquids. *Appl Phys Lett* **61**, 639-641 (1992).
71. Gizeli, E. in *Biomolecular Sensors*. (eds. E. Gizeli & C.R. Lowe) (Taylor & Francis Inc., London; 2002).
72. Gronewold, T.M. Surface acoustic wave sensors in the bioanalytical field: recent trends and challenges. *Anal Chim Acta* **603**, 119-128 (2007).
73. Saha, K., Bender, F., Rasmusson, A. & Gizeli, E. Probing the viscoelasticity and mass of a surface-bound protein layer with an acoustic waveguide device. *Langmuir* **19**, 1304-1311 (2003).
74. Tsortos, A., Papadakis, G., Mitsakakis, K., Melzak, K.A. & Gizeli, E. Quantitative determination of size and shape of surface-bound DNA using an acoustic wave sensor. *Biophys J* **94**, 2706-2715 (2008).
75. Nilsson, P., Persson, B., Uhlen, M. & Nygren, P.A. Real-time monitoring of DNA manipulations using biosensor technology. *Anal Biochem* **224**, 400-408 (1995).
76. Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P. & Wilkins, E. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors & Bioelectronics* **14**, 599-624 (1999).
77. Si, S.H., Si, L., Ren, F.L., Zhu, D.R. & Fung, Y.S. Study of adsorption behavior of bilirubin on human-albumin monolayer using a quartz crystal microbalance. *J Colloid Interf Sci* **253**, 47-52 (2002).
78. Gizeli, E., Liley, M., Lowe, C.R. & Vogel, H. Antibody binding to a functionalized supported lipid layer: a direct acoustic immunosensor. *Anal Chem* **69**, 4808-4813 (1997).
79. Okahata, Y. et al. Kinetic measurements of DNA hybridisation on an oligonucleotide-immobilized 27-MHz quartz crystal microbalance. *Analytical Chemistry* **70**, 1288-1296 (1998).
80. Saha, K., Bender, F. & Gizeli, E. Comparative study of IgG binding to proteins G and A: nonequilibrium kinetic and binding constant determination with the acoustic waveguide device. *Anal Chem* **75**, 835-842 (2003).
81. Gizeli, E. & Lowe, C.R. Immunosensors. *Curr Opin Biotechnol* **7**, 66-71 (1996).
82. Su, H.B. & Thompson, M. Kinetics of Interfacial Nucleic-Acid Hybridization Studied by Acoustic Network Analysis. *Biosensors & Bioelectronics* **10**, 329-340 (1995).
83. Towery, R.B., Fawcett, N.C., Zhang, P. & Evans, J.A. Genomic DNA hybridizes with the same rate constant on the QCM biosensor as in homogeneous solution. *Biosensors & Bioelectronics* **16**, 1-8 (2001).
84. Papadakis, G., Tsortos, A., Mitsakakis, K. & Gizeli, E. Characterization of DNA-Hv1 histone interactions; discrimination of DNA size and shape. *Febs Letters* **584**, 935-940 (2010).
85. Stengel, G., Hook, F. & Knoll, W. Viscoelastic modeling of template-directed DNA synthesis. *Analytical Chemistry* **77**, 3709-3714 (2005).
86. Hoshi, T., Akase, S. & Anzai, J. Preparation of multilayer thin films containing avidin through sugar-lectin interactions and their binding properties. *Langmuir* **18**, 7024-7028 (2002).
87. Nishino, H., Nihira, T., Mori, T. & Okahata, Y. Direct monitoring of enzymatic glucan hydrolysis on a 27-MHz quartz-crystal microbalance. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 2264-2265 (2004).
88. Voros, J. The density and refractive index of adsorbing protein layers. *Biophysical Journal* **87**, 553-561 (2004).
89. Carmon, K.S., Baltus, R.E. & Luck, L.A. A piezoelectric quartz crystal biosensor: The use of two single cysteine mutants of the periplasmic Escherichia coli glucose/galactose receptor as target proteins for the detection of glucose. *Biochemistry* **43**, 14249-14256 (2004).
90. Cooper, M.A. Advances in membrane receptor screening and analysis. *J Mol Recognit* **17**, 286-315 (2004).

91. Keller, C.A. & Kasemo, B. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophysical Journal* **75**, 1397-1402 (1998).
92. Melzak, K.A., Bender, F., Tsortos, A. & Gizeli, E. Probing mechanical properties of liposomes using acoustic sensors. *Langmuir* **24**, 9172-9180 (2008).
93. Tellechea, E., Johannsmann, D., Steinmetz, N.F., Richter, R.P. & Reviakine, I. Model-Independent Analysis of QCM Data on Colloidal Particle Adsorption. *Langmuir* **25**, 5177-5184 (2009).
94. Melzak, K., Tsortos, A. & Gizeli, E. Use of acoustic sensors to probe the mechanical properties of liposomes. *Methods Enzymol* **465**, 21-41 (2009).
95. Melzak, K.A. & Gizeli, E. Relative activity of cholesterol in OPPC/cholesterol/sphingomyelin mixtures measured with an acoustic sensor *Analyst* **134**, 609-614 (2009).
96. Melzak, K.A., Ralph, E. & Gizeli, E. Effect of the surface hydrophilicity on the formation of a membrane-type interface: study using an acoustic wave device *Langmuir* **17**, 1594-1598 (2001).
97. Richter, R., Mukhopadhyay, A. & Brisson, A. Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: A combined QCM-D and AFM study. *Biophysical Journal* **85**, 3035-3047 (2003).
98. Shahal, T., Melzak, K., Lowe, C.R. & Gizeli, E. Poly(dimethylsiloxane)-coated sensor devices for the formation of supported lipid bilayers and the subsequent study of membrane interactions *Langmuir* **24**, 11268-11275 (2008).
99. Gizeli, E. & Glad, J. Single-step formation of a biorecognition layer for assaying histidine-tagged proteins. *Anal Chem* **76**, 3995-4001 (2004).
100. Glasmaster, K., Larsson, C., Hook, F. & Kasemo, B. Protein adsorption on supported phospholipid bilayers. *Journal of Colloid and Interface Science* **246**, 40-47 (2002).
101. Ross, M., Gerke, V. & Steinem, C. Membrane composition affects the reversibility of annexin A2t binding to solid supported membranes: A QCM study. *Biochemistry* **42**, 3131-3141 (2003).
102. Kastl, K., Ross, M., Gerke, V. & Steinem, C. Kinetics and thermodynamics of annexin A1 binding to solid-supported membranes: A QCM study. *Biochemistry* **41**, 10087-10094 (2002).
103. Kim, G.H., Rand, A.G. & Letcher, S.V. Impedance characterization of a piezoelectric immunosensor Part I: Antibody coating and buffer solution. *Biosensors & Bioelectronics* **18**, 83-89 (2003).
104. Kim, G.H., Rand, A.G. & Letcher, S.V. Impedance characterization of a piezoelectric immunosensor part II: Salmonella typhimurium detection using magnetic enhancement. *Biosensors & Bioelectronics* **18**, 91-99 (2003).
105. Moll, N. et al. A Love wave immunosensor for whole E-coli bacteria detection using an innovative two-step immobilisation approach. *Biosensors & Bioelectronics* **22**, 2145-2150 (2007).
106. Vaughan, R.D., O'Sullivan, C.K. & Guilbault, G.G. Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Enzyme and Microbial Technology* **29**, 635-638 (2001).
107. Otto, K. & Hermansson, M. Inactivation of ompX causes increased interactions of type 1 fimbriated *Escherichia coli* with abiotic surfaces. *Journal of Bacteriology* **186**, 226-234 (2004).
108. Pavey, K.D. et al. A rapid, non-destructive method for the determination of *Staphylococcus epidermidis* adhesion to surfaces using quartz crystal resonant sensor technology. *Letters in Applied Microbiology* **33**, 344-348 (2001).
109. Galli Marxer, C., Collaud Coen, M., Greber, T., Greber, U.F. & Schlapbach, L. Cell spreading on quartz crystal microbalance elicits positive frequency shifts indicative of viscosity changes. *Anal Bioanal Chem* **377**, 578-586 (2003).

110. Marx, K.A., Zhou, T., Montrone, A., Schulze, H. & Braunhut, S.J. A quartz crystal microbalance cell biosensor: detection of microtubule alterations in living cells at nM nocodazole concentrations. *Biosens Bioelectron* **16**, 773-782 (2001).
111. Khraiche, M.L., Zhou, A. & Muthuswamy, J. Acoustic sensor for monitoring adhesion of Neuro-2A cells in real-time. *J Neurosci Methods* **144**, 1-10 (2005).
112. Li, J., Thielemann, C., Reuning, U. & Johannsmann, D. Monitoring of integrin-mediated adhesion of human ovarian cancer cells to model protein surfaces by quartz crystal resonators: evaluation in the impedance analysis mode. *Biosens Bioelectron* **20**, 1333-1340 (2005).
113. Wegener, J., Janshoff, A. & Galla, H.J. Cell adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance: comparative analysis of different mammalian cell lines. *Eur Biophys J* **28**, 26-37 (1999).
114. Wegener, J., Seebach, J., Janshoff, A. & Galla, H.J. Analysis of the composite response of shear wave resonators to the attachment of mammalian cells. *Biophys J* **78**, 2821-2833 (2000).
115. Ergezen, E., Hong, S., Barbee, K.A. & Lec, R. Real time monitoring of the effects of Heparan Sulfate Proteoglycan (HSPG) and surface charge on the cell adhesion process using thickness shear mode (TSM) sensor. *Biosens Bioelectron* **22**, 2256-2260 (2007).
116. Hong, S., Ergezen, E., Lec, R. & Barbee, K.A. Real-time analysis of cell-surface adhesive interactions using thickness shear mode resonator. *Biomaterials* **27**, 5813-5820 (2006).
117. Wang, H. et al. Immunophenotyping of acute leukemia using an integrated piezoelectric immunosensor array. *Anal Chem* **76**, 2203-2209 (2004).
118. Gryte, D.M., Ward, M.D. & Hu, W.S. Real-Time Measurement of Anchorage-Dependent Cell-Adhesion Using a Quartz Crystal Microbalance. *Biotechnology Progress* **9**, 105-108 (1993).
119. Redepenning, J., Schlesinger, T.K., Mechalke, E.J., Puleo, D.A. & Bizios, R. Osteoblast Attachment Monitored with a Quartz-Crystal Microbalance. *Analytical Chemistry* **65**, 3378-3381 (1993).
120. Janshoff, A., Wegener, J., Sieber, M. & Galla, H.J. Double-mode impedance analysis of epithelial cell monolayers cultured on shear wave resonators. *Eur Biophys J* **25**, 93-103 (1996).
121. Li, F., Wang, J.H. & Wang, Q.M. Monitoring cell adhesion by using thickness shear mode acoustic wave sensors. *Biosens Bioelectron* **23**, 42-50 (2007).
122. Heitmann, V., Reiss, B. & Wegener, J. in *Piezoelectric Sensors*. (eds. C. Steinem & A. Janshoff) 303-338 (Springer-Verlag, Berlin; 2007).

Κεφάλαιο 3

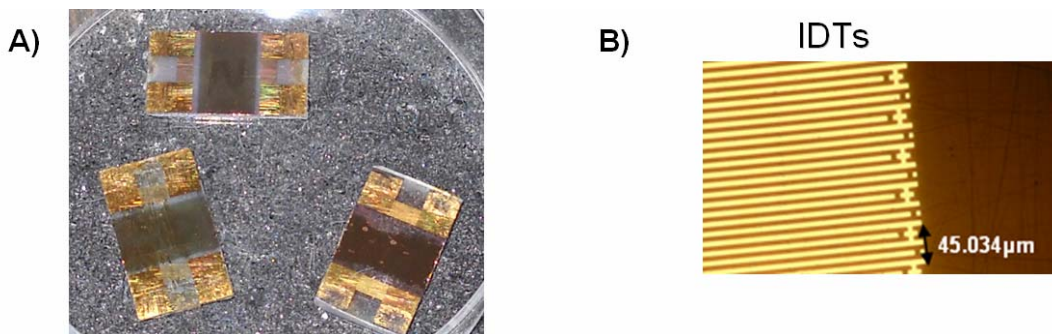
Πειραματικές διατάξεις

1. Ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν συσκευές βιοαισθητήρα τύπου Love με συχνότητα λειτουργίας 110 MHz. Οι συσκευές του ακουστικού βιοαισθητήρα 110 MHz (Εικ. 3.1) κατασκευάστηκαν σε πλάκα χαλαζία πάχους 0,5 mm. Ο χαλαζίας έχει κοπεί κατά τον άξονα γ (42,5°) και η διάδοση του κύματος είναι κάθετη στον άξονα χ. Οι αλληλοδιαπλεκόμενοι μεταγωγείς (IDTs) αποτελούνται από 80 ζεύγη ηλεκτροδίων με απόσταση 45 μm μεταξύ τους. Καθένα έχει πάχος 210 nm και αποτελείται από Cr/Au (10/200 nm). Η απόσταση αυτή ανάμεσα στα IDTs είναι εκείνη που καθορίζει τη συχνότητα λειτουργίας. Το ακουστικό κύμα που διαδίδεται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, όταν έρχεται σε επαφή με το υγρό στη διεπιφάνεια υγρού/στερεού, προκαλεί την ταλάντωση στο σώμα του υγρού. Έτσι, δημιουργείται ένα αποσβένον πεδίο (evanescent acoustic field) (Εικ. 3.2), το οποίο εξαρτάται από τη συχνότητα του ακουστικού κύματος και από το ιξώδες και την πυκνότητα του διαλύματος. Συγκεκριμένα, το βάθος διείσδυσης του κύματος δ (penetration depth) υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\delta = \sqrt{\frac{2\eta}{2\pi\rho f}}$$

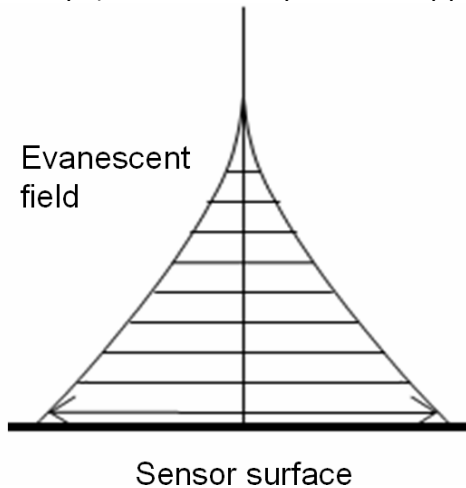
όπου η και ρ το ιξώδες και η πυκνότητα του διαλύματος αντίστοιχα και f η συχνότητα λειτουργίας του αισθητήρα. Για τη συχνότητα λειτουργίας 110 MHz, το βάθος διείσδυσης υπολογίζεται ως $\delta_{\text{Love-wave}}=54$ nm στο καθαρό νερό. Μεταβολές στο διάλυμα που επηρεάζουν τη μάζα, το ιξώδες και την πυκνότητα του διαλύματος μέσα στο αποσβένον πεδίο μπορούν να αλλάξουν την ταχύτητα διάδοσης ή την ενέργεια του ακουστικού κύματος στη διεπιφάνεια υγρού στερεού¹. Όπως φαίνεται από τον τύπο, αύξηση της συχνότητας του κύματος οδηγεί σε ελάττωση του βάθους διείσδυσης, αλλά προσφέρει μεγαλύτερη ευαισθησία.



Εικ. 3.1. A) Συσκευές ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love. B) Μικροσκοπική παρατήρηση των IDTs.

Στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, στην περιοχή διάδοσης του ακουστικού κύματος, προστίθεται στρώμα του πολυμερούς poly-methyl-methacrylate (PMMA),

συγκέντρωσης 17%. Το στρώμα δημιουργείται με επικάλυψη της επιφάνειας έπειτα από φυγοκέντρωση στη συσκευή Spincoater Model P6700 Series (Specialty Coating Systems Inc) στις 4000 rpm για 40 s. Ο διαλύτης (2-αιθοξυαιθυλαιθέρας) εξατμίστηκε έπειτα από επώαση των συσκευών στους 195°C για δύο ώρες. Το στρώμα του κυματοδουγού έχει πάχος περίπου 700 nm. Οι συσκευές μετρήθηκαν πριν και μετά την εναπόθεση του πολυμερούς και οι αλλαγές στη φάση και το πλάτος του ακουστικού κύματος καταγράφηκαν. Πάνω στο στρώμα κυματοδηγού της συσκευής του ακουστικού βιοαισθητήρα 110 MHz γίνεται εναπόθεση (sputtering) 20 nm χρυσού στην περιοχή ανάμεσα από τους IDTs σε πίεση 4×10^{-2} mbar με τη χρήση του συστήματος BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater. Η συσκευή επώαστηκε στους 150°C για 30 λεπτά. Πριν από κάθε πείραμα, η επιφάνεια χρυσού υφίσταται χάραξη με χημεία πλάσματος σε ατμόσφαιρα αργού πίεσης 8.0×10^{-2} mbar για 3 λεπτά ή χάραξη με χημεία πλάσματος οξυγόνου για 10 λεπτά (Plasma Etcher, Harrick). Σύντομο sputtering χρησιμοποιείται για τη διατήρηση του πάχους του στρώματος χρυσού. Για τον καθαρισμό των συσκευών και την αφαίρεση του στρώματος του κυματοδηγού, οι συσκευές αφήνονται *overnight* σε ακετόνη, καθαρίζονται από στερεά υπολείμματα και στεγνώνονται υπό αέριο άζωτο.



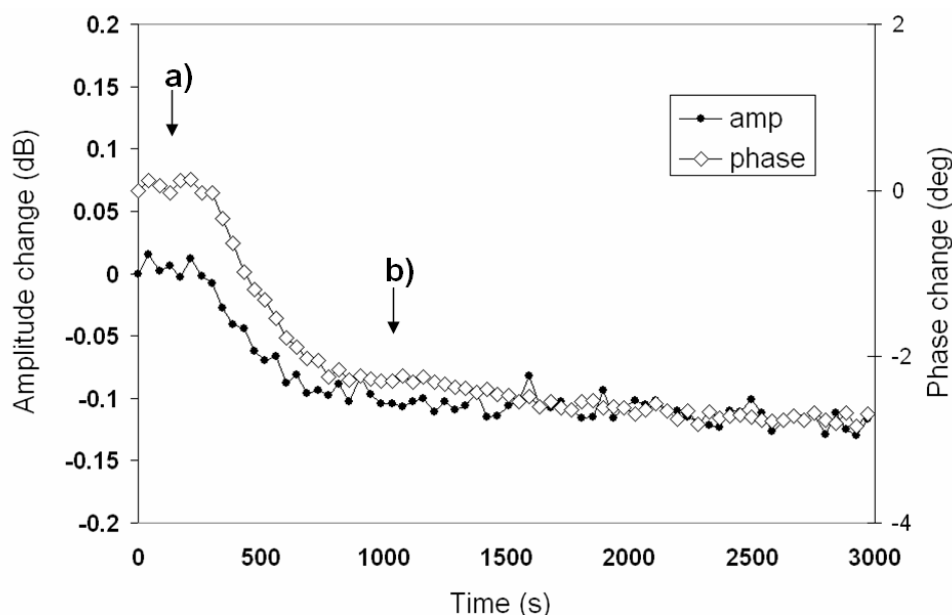
Εικ. 3.2. Αποσβένον πεδίο που δημιουργείται από τη διάδοση του ακουστικού κύματος στη διεπιφάνεια υγρού/στερεού.



Εικ. 3.3. Αναλυτής δικτύου για την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου και καταγραφής του ακουστικού κύματος.

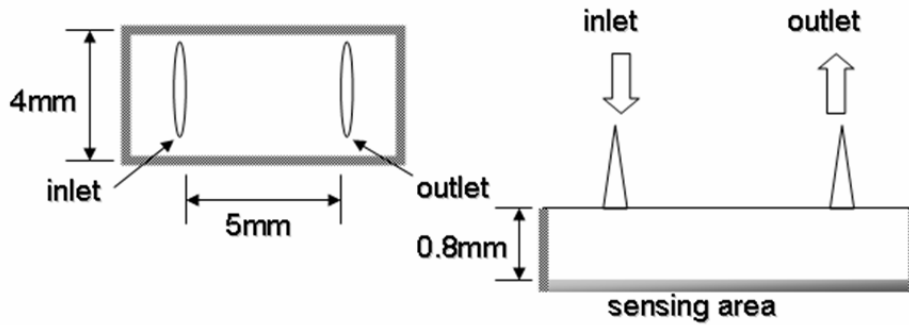
Η συσκευή του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love συνδέεται με έναν αναλυτή δικτύου (network analyzer, Hewlett Packard 4195A ή Agilent Technologies E5061A) (Εικ. 3.3), με τον οποίο εφαρμόζεται τάση και λαμβάνονται μετρήσεις των ιδιοτήτων του κύματος. Οι μετρήσεις αφορούν την ταχύτητα διάδοσης και την ενέργεια του κύματος στο υλικό. Η μεταβολή στην ταχύτητα διάδοσης μετράται ως μεταβολή στη φάση (σε deg) και είναι ευαίσθητη σε μεταβολές της μάζας, της ιξωδοελαστικότητας και των ηλεκτρικών ιδιοτήτων της διεπιφάνειας υγρού/στερεού. Η μεταβολή στην ενέργεια του κύματος μετράται ως μεταβολή στο πλάτος (σε dB) και είναι ευαίσθητη σε μεταβολές της ιξωδοελαστικότητας και των ηλεκτρικών ιδιοτήτων της διεπιφάνειας. Αύξηση στη μάζα που εναποτίθεται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα έχει ως αποτέλεσμα πτώση στη φάση, ενώ αύξηση του ιξώδους πάνω από την επιφάνεια οδηγεί σε πτώση του πλάτους και της φάσης. Ο

αναλυτής δικτύου είναι συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή για την συνεχή εγγραφή και αποθήκευση της προόδου του πειράματος σε πραγματικό χρόνο (Εικ. 3.4) μέσω του λογισμικού Labview 5.1 (National Instruments).



Εικ. 3.4. Παράδειγμα πειράματος πραγματικού χρόνου στον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love. Μεταβολή του πλάτους (amplitude) και της φάσης (phase) κατά την αλληλεπίδραση IgG με επιφάνεια PrG. a) Προσθήκη IgG ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$), b) ξέπλυμα με PBS.

Για την πραγματοποίηση πειραμάτων σε πραγματικό χρόνο, η συσκευή του βιοαισθητήρα τοποθετείται σε μία ειδική θήκη, που φέρει τα ηλεκτρόδια. Πάνω από τη θήκη αυτή εφαρμόζεται η κυψελίδα συνεχούς ροής, με την οποία διατηρείται σταθερή η ροή του υγρού διαλύματος στην περιοχή ανάμεσα στους IDTs μέσω περισταλτικής αντλίας (Gilson). Η κυψελίδα συνεχούς ροής (Εικ. 3.5) εφαρμόζεται στην επιφάνεια του αισθητήρα με τη βοήθεια ενός λαστιχένιου gasket. Για τη μεταφορά των υγρών διαλυμάτων χρησιμοποιούνται σωληνάκια διαμέτρου 0,25 mm (Anachem). Η ροή που εφαρμόζεται στα πειράματα είναι συνήθως 10 , 25 ή 50 ml min^{-1} . Στην κυψελίδα ροής του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love, η ροή που εφαρμόζεται προκαλεί την κίνηση του υγρού μέσου κατά μήκος της επιφάνειας του αισθητήρα. Υπολογίζοντας τον αριθμό Reynolds ($R = \rho V D / \mu$, όπου ρ η πυκνότητα, V η ταχύτητα του υγρού, D η απόσταση που διανύει το υγρό και μ το ιξώδες) για κάθε ροή που εφαρμόζεται (10 , 25 και 50 ml min^{-1}) λαμβάνεται για κάθε περίπτωση χαμηλή τιμή του R (Πίνακας 3.1), επομένως η ροή του υγρού πάνω από την επιφάνεια του αισθητήρα είναι ινώδης. Επιπλέον, από τον τύπο $\tau = 3\mu Q / 2a^2b$, όπου μ ο συντελεστής ιξώδους, Q η ροή, $2a$ το ύψος και b το πλάτος του θαλάμου ροής, είναι δυνατό να υπολογιστεί το εγκάρσιο στρες τ στο θάλαμο ροής² (Πίνακας 3.1).



Εικ. 3.5. Διαστάσεις της κυψελίδας ροής πάνω από την επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love.

Πίνακας 3.1. Οι τιμές για τις παραμέτρους ροής στην κυψελίδα του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love.

Ροή (flow rate) ($\mu\text{l min}^{-1}$)	Ταχύτητα υγρού (cm s^{-1})	Αριθμός Reynolds	Εγκάρσια ροή (shear rate) (s^{-1})	Εγκάρσιο στρες (shear stress) (dynes/cm^2)
10	5.21×10^{-3}	0,463	3.91×10^{-2}	3.91×10^{-3}
25	10.42×10^{-3}	1,1575	7.81×10^{-2}	7.81×10^{-3}
50	26.04×10^{-3}	2,315	19.53×10^{-2}	19.53×10^{-3}

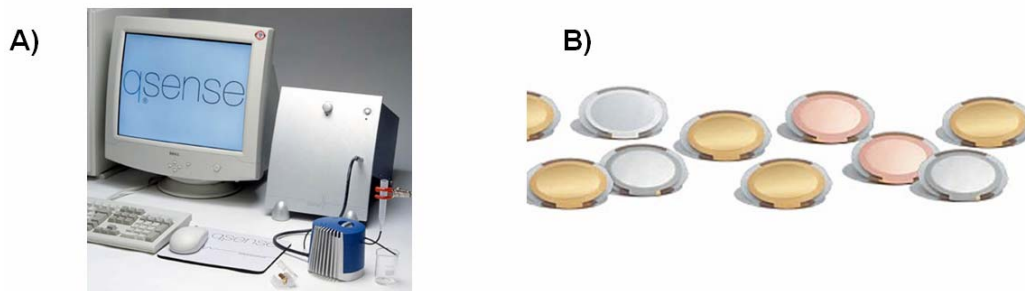
2. Ακουστικός βιοαισθητήρας QCM-D

Ως ακουστικός βιοαισθητήρας QCM-D χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Q-Sense D300 (Q-Sense). Το σύστημα αυτό προσφέρει ταυτόχρονες μετρήσεις σε συχνότητες λειτουργίας 5, 15, 25 και 35 MHz. Ανάλογα με την εφαρμογή, οι συσκευές QCM (Εικ. 3.6) προσφέρονται είτε με επιφάνεια Au 50 nm, είτε με επιφάνεια silica (SiO_2), είτε με άλλες επιστρώσεις υλικών ανάλογα με την εφαρμογή (www.q-sense.com). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν συσκευές με Au και SiO_2 . Στον αισθητήρα QCM-D μπορεί να εφαρμοστεί η εξίσωση του Sauerbrey³ με την οποία μπορεί να υπολογιστεί η μάζα που εναποτίθεται στην επιφάνεια του αισθητήρα. Αρχικά εφαρμόστηκε για την εναπόθεση στρωμάτων μετάλλων σε αέρα και έπειτα τροποποιήθηκε για την χρήση της σε υγρό μέσο⁴. Στον αισθητήρα QCM-D, η εξίσωση εφαρμόζεται με την παρακάτω μορφή, στην οποία συνδέονται θεωρητικά η αλλαγή στη συχνότητα με την εναπόθεση μάζας^{5,6}:

$$\Delta m = -\frac{C \cdot \Delta f}{n}$$

όπου Δm είναι η μεταβολή της μάζας που εναποτίθεται, Δf είναι η μεταβολή της συχνότητας του αισθητήρα, C είναι μια σταθερά του συγκεκριμένου αισθητήρα Q-Sense, και n η ταλάντωση στην οποία λαμβάνεται η μέτρηση. Η σταθερά C αφορά τη σχέση μεταξύ του πάχους και της πυκνότητας του κρυσταλλικού χαλαζία με την συχνότητα λειτουργίας του αισθητήρα. Γενικά, όταν η εξίσωση αυτή χρησιμοποιείται για βιομόρια, εμφανίζονται αποκλίσεις λόγω των ιζωδοελαστικών

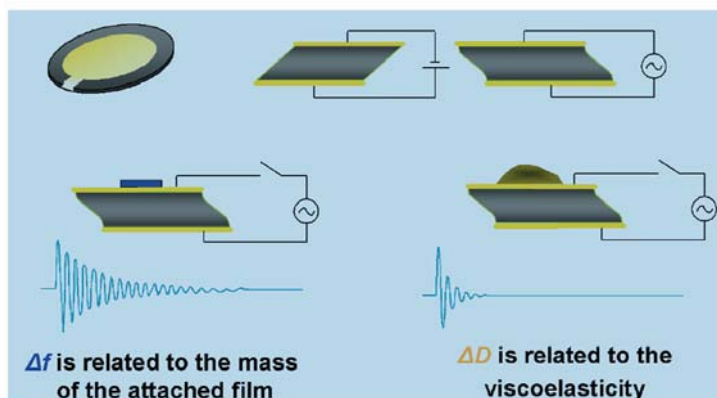
ιδιοτήτων του στρώματος των προσροφημένων βιομορίων. Η αλλαγή στην απώλεια ενέργειας μετράται από την περιοδική ενεργοποίηση και απενεργοποίηση του ηλεκτρικού πεδίου στον κρύσταλλο του αισθητήρα και την καταγραφή της διαφοράς δυναμικού από τον ελεύθερα ταλαντευόμενο αισθητήρα (Εικ. 3.8). Για τον καθαρισμό και την αναγέννηση των επιφανειών των συσκευών, πραγματοποιείται χάραξη με χημεία πλάσματος οξυγόνου για 1 λεπτό (Plasma Etcher, Harrick). Πριν από κάθε πείραμα, η συσκευή εισέρχεται στην ειδική θήκη της (Εικ. 3.7), η οποία προσφέρει έλεγχο θερμοκρασίας. Στα πειράματα με τον ακουστικό βιοαισθητήρα QCM-D έγινε χρήση κυρίως της συχνότητας 35 MHz, δηλαδή της ταλάντωσης $n=7$, καθώς αυτή προσφέρει μεγαλύτερη ευαισθησία. Το βάθος διείσδυσης για τη συχνότητα αυτή υπολογίζεται ως $\delta_{\text{QCM-D}}=95$ nm. Η αλλαγή στη συχνότητα (frequency) του ακουστικού κύματος και η ενεργειακή απώλεια (dissipation) παρακολουθούνται και καταγράφονται σε πραγματικό χρόνο με το λογισμικό Qsoft 3.1 (Q-Sense) (Εικ. 3.9). Παρόμοια με τον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love, η αλλαγή στη συχνότητα σχετίζεται με την προσδεμένη μάζα και τη μεταβολή στο ιξώδες, ενώ η ενεργειακή απώλεια σχετίζεται με μεταβολές στο ιξώδες.



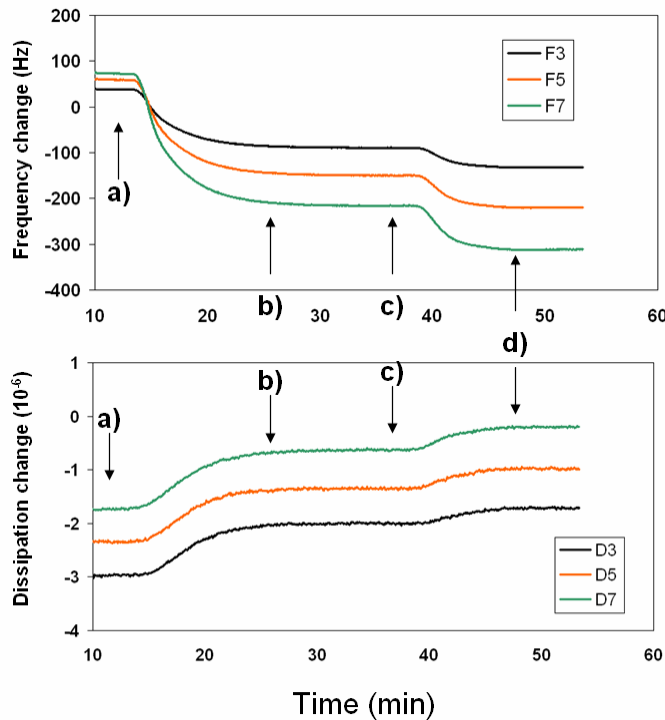
Εικ. 3.6. A) Το σύστημα Q-Sense D300. B) Συσκευές ακουστικού βιοαισθητήρα QCM-D. (Πηγή: www.q-sense.com)



Εικ. 3.7. Εισαγωγή της συσκευής βιοαισθητήρα QCM-D στην ειδική θήκη. (Πηγή: www.q-sense.com)



Εικ. 3.8. Αρχή λειτουργίας του αισθητήρα QCM-D. Η διαφορά στη συχνότητα (Δf) σχετίζεται με τη μάζα του εναποτιθέμενου στρώματος και η διαφορά στην ενεργειακή απώλεια (ΔD) σχετίζεται με την ιξωδοελαστικότητα. (Πηγή: Hook and Rudh, 2005)



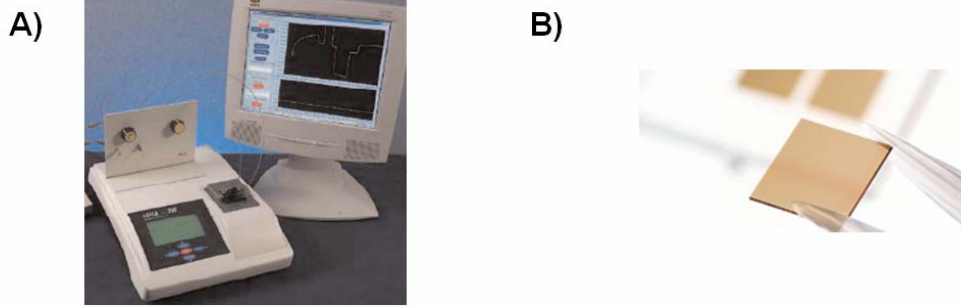
Εικ. 3.9. Παράδειγμα πειράματος πραγματικού χρόνου στον ακουστικό βιοαισθητήρα QCM-D. Μεταβολή της συχνότητας (frequency) και της απώλειας ενέργειας (dissipation) σε τρεις ταλαντώσεις του κρυστάλλου κατά την προσρόφηση νουτραβιδίνης σε στρώμα χρυσού και την αλληλεπίδρασή της με βιοτινυλιωμένη BSA. a) Προσθήκη νουτραβιδίνης ($0,5 \text{ mg ml}^{-1}$), b) ξέπλυμα με PBS, c) προσθήκη b-BSA (50 mg ml^{-1}), d) ξέπλυμα με PBS.

3. Οπτικός Βιοαισθητήρας SPR

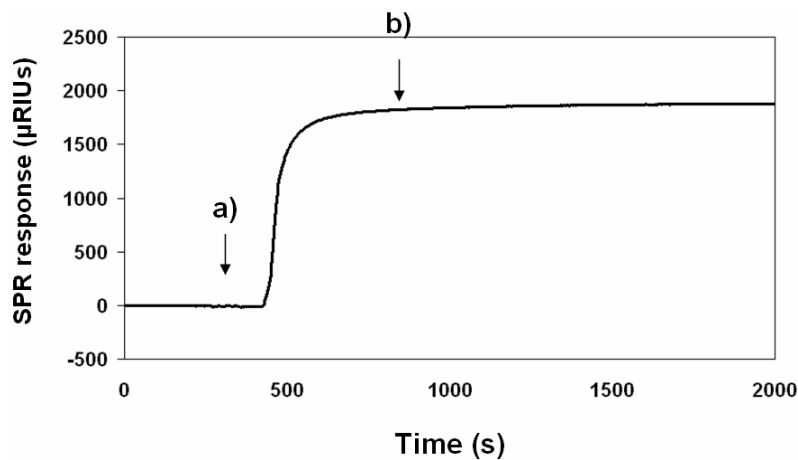
Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση του οπτικού συστήματος SPR SR7000 (Reichert Analytical Instruments) (Εικ. 3.10A). Πλάκες γυαλιού ($12.5 \times 12.5 \times 0.9 \text{ mm}$) με ένα λεπτό στρώμα χρυσού (50 nm) (XanTec) χρησιμοποιήθηκαν ως συσκευές του βιοαισθητήρα (Εικ. 3.10B). Οι πλάκες τοποθετούνται στην ειδική θέση και εφαρμόζεται η κυψελίδα ροής και το ειδικό gasket. Η ροή ελέγχεται μέσω περισταλτικής αντλίας και εφαρμόζεται στα πειράματα σε τιμές $10, 25, 30$ και 50 ml min^{-1} . Οι μετρήσεις αλλαγής του δείκτη διάθλασης του βιοαισθητήρα λαμβάνονται σε πραγματικό χρόνο (Εικ. 3.11) μέσω του παρεχόμενου λογισμικού. Πριν από κάθε πείραμα, η επιφάνεια χρυσού καθαρίζεται με χάραξη με χημεία πλάσματος οξυγόνου για 1 λεπτό (Plasma Etcher, Harrick). Η σχέση μεταξύ αλλαγής στο δείκτη διάθλασης και μάζας που εναποτίθεται στην επιφάνεια για το συγκεκριμένο σύστημα ορίζεται από τον κατασκευαστή ως εξής:

$$1.6145 \text{ } \mu\text{RIUs (micro refractive index units)} = 1 \text{ pg/mm}^2$$

Η σχέση μεταξύ RU (Biacore) και μRIU (Reichert) είναι η εξής: $1 \text{ RU} = 1.6145 \text{ } \mu\text{RIUs}$. Η σχέση αυτή επιτρέπει αφενός τον υπολογισμό της προσδεμένης μάζας στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα και αφετέρου την άμεση συσχέτιση πειραμάτων που έχουν πραγματοποιηθεί με συστήματα βιοαισθητήρων SPR διαφορετικού κατασκευαστή.



Εικ. 3.10. A) Το σύστημα SR 7000. (Πηγή: www.reichertai.com) B) Συσκευές οπτικού βιοαισθητήρα SPR. (Πηγή: www.xantec.com)



Εικ. 3.11. Παράδειγμα πειράματος πραγματικού χρόνου στον οπτικό βιοαισθητήρα SPR. Μεταβολή του δείκτη διάθλασης (σε μRIUs) κατά την αλληλεπίδραση IgG με επιφάνεια PrG. a) Προσθήκη IgG ($0,2 \text{ mg ml}^{-1}$), b) ξέπλυμα με PBS.

4. Μικροσκοπία

Το μικροσκόπιο αποτελεί το κλασικό εργαλείο παρατήρησης του μικρόκοσμου. Πέρα από την απλή χρήση φακών για τη μεγέθυνση μιας εικόνας, έχει γίνει αρκετή πρόοδος στην ανάπτυξη τεχνικών μικροσκοπίας που βοήθησαν στη βιολογική έρευνα. Τέτοιες τροποποιήσεις της κλασικής οπτικής μικροσκοπίας είναι η εκμετάλλευση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στην απεικόνιση του ειδώλου, όπως συμβαίνει στη μικροσκοπία αντίθεσης φάσεων (phase contrast) και αντίθεσης παρεμβολής (interference contrast). Στις περιπτώσεις αυτές, διαφορές στην οπτική πυκνότητα είναι εμφανείς, λόγω χάρη ένας πυρήνας κυττάρου θα εμφανίζεται σκουρότερος από το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα, χωρίς την ανάγκη για χρώση του δείγματος.

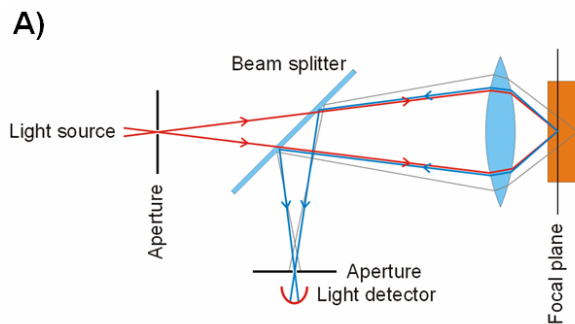
Στην παρούσα εργασία, μικροσκοπικές παρατηρήσεις γίνονταν με τη χρήση του μικροσκοπίου Nikon Eclipse E800 (Εικ. 3.12) που προσφέρει πολλές διατάξεις χειρισμού. Φωτογραφίες λαμβάνονταν με μια ενσωματωμένη ψηφιακή μηχανή Nikon Coolpix E5400 ή με συνδεδεμένη βιντεοκάμερα ProgRes CF (Jenoptik).

Η μεγάλη ανάπτυξη της μικροσκοπίας στην βιολογική έρευνα έγινε με την εισαγωγή φθορίζουσων χρωστικών. Η επιλεγμένη χρώση συγκεκριμένων μορίων στόχων και η παρακολούθηση αυτών στο μικροσκόπιο προσέφερε και συνεχίζει να προσφέρει σημαντική πληροφορία για τις διεργασίες βιολογικών φαινομένων. Επιπλέον, η ανάπτυξη της συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal microscopy), στην οποία αυξάνεται αισθητά η οπτική ανάλυση και αντίθεση της μικροσκοπικής

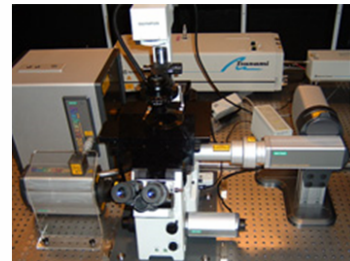
εικόνας, αποτέλεσε ένα άλλο εξαιρετικά σημαντικό εργαλείο με πολλές εφαρμογές. Η αρχή λειτουργίας ενός συνεστιακού μικροσκοπίου (**Εικ. 3.13A**) περιλαμβάνει το σημειακό φωτισμό μέσω μιας μικρής οπής ενός οπτικά συζευγμένου πεδίου μπροστά από τον ανιχνευτή φωτός για την επίτευξη αυξημένης ανάλυσης και αντίθεσης μέσω της εξάλειψης του ανεστίαστου φωτός. Λόγω του φωτισμού ενός μόνο σημείου κάθε φορά, χρειάζεται να γίνει σάρωση ενός πεδίου σε δύο διαστάσεις για την εξαγωγή μιας εικόνας. Η σάρωση ενός διδιάστατου πεδίου μπορεί να γίνει στην ίδια θέση και για διαφορετικό βάθος του δείγματος, δίνοντας μια τρισδιάστατη απεικόνιση του δείγματος. Αυτό αποτελεί ένα από τα πιο δημοφιλή χαρακτηριστικά του συνεστιακού μικροσκοπίου.

Σαρώσεις συνεστιακής μικροσκοπίας πραγματοποιήθηκαν με το σύστημα Radiance 2100 Laser Scanning System (Biorad) (**Εικ. 3.13B**), χρησιμοποιώντας αντικειμενικό φακό 63x. Οι ρυθμίσεις διατηρούνται σταθερές για όλες τις εικόνες που ελήφθησαν.

Εικ. 3.12. Μικροσκόπιο Nikon Eclipse E800.



B)

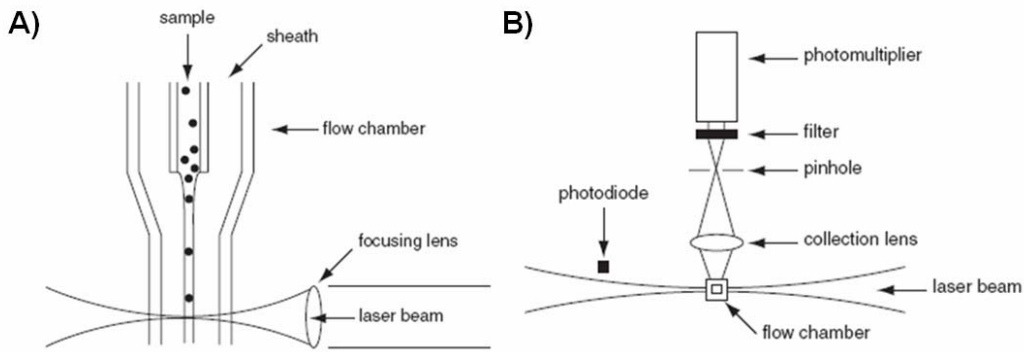


Εικ. 3.13. A) Αρχή λειτουργίας συνεστιακής μικροσκοπίας. Το πεδίο φωτίζεται σημειακά μέσω μιας μικρής οπής και γίνεται ανίχνευση μόνο του φωτός που εστιάζεται στο πεδίο. (Πηγή: www.wikipedia.org) B) Το συνεστιακό μικροσκόπιο BioRad Radiance 2100.

5. Κυτταρομετρία ροής

Η τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής προσφέρει μια ποικιλία διαφορετικών μετρήσεων σε κύτταρα, κυτταρικά οργανίδια και άλλα αντικείμενα που κινούνται υπό ροή σε διάλυμα. Οι εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής είναι ευρείς, από διάγνωση ασθενειών έως μελέτη κυτταρικής λειτουργίας και κυτταρικής ανάπτυξης⁷. Σε ένα κυτταρόμετρο ροής, τα κύτταρα στο διάλυμα κινούνται υπό ροή και ένα κάθε φορά στο θάλαμο ροής. Εκεί, λαμβάνονται μετρήσεις καθώς τα κύτταρα περνούν από μία ακτίνα φωτός (**Εικ. 3.14**). Σε ένα απλό σύγχρονο κυτταρόμετρο ροής, υπάρχουν ανιχνευτές φθορισμού (τουλάχιστον ένας) και ανιχνευτής σκέδασης φωτός. Ο ανιχνευτής σκέδασης φωτός λαμβάνει πληροφορίες για το σχήμα και το μέγεθος των κυττάρων ενώ οι ανιχνευτές φθορισμού για τις

διάφορες χρωστικές με τις οποίες έχουν σημανθεί τα μόρια ενδιαφέροντος είτε εξω- ή ενδοκυτταρικά.

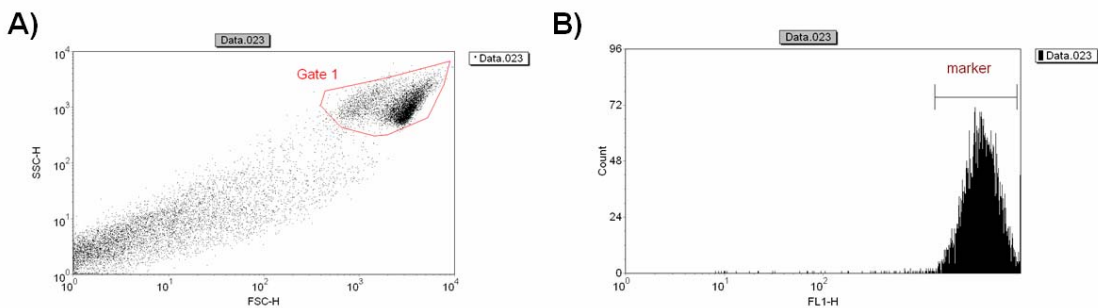


Εικ. 3.14. Α) Διάταξη θαλάμου (flow chamber) ροής σε κυτταρόμετρο ροής. Β) Διάταξη ενός κυτταρομέτρου ροής με έναν ανιχνευτή φθορισμού (photomultiplier) και έναν ανιχνευτή σκέδασης φωτός (photodiode). (Πηγή: Dean et al., 1997)

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν τα κυτταρόμετρα FACS Culiber (Εικ. 3.15) και FACScan (Becton Dickinson). Στα συστήματα αυτά, η μέτρηση κυττάρων γίνεται σε πραγματικό χρόνο και παρακολουθείται με το λογισμικό CellQuest (Becton Dickinson). Οι μετρήσεις παρουσιάζονται είτε ως διαγράμματα κουκκίδων (dot plot) είτε ως ιστογράμματα, ανάλογα με την εφαρμογή. Με τα διαγράμματα κουκκίδων διακρίνονται οι διαφορετικοί πληθυσμοί κυττάρων (Εικ. 3.16Α) σε ένα δείγμα ενώ με τα ιστογράμματα μπορεί να διακριθεί και υπολογιστεί το ποσοστό του πληθυσμού που φέρει ένα φθορίζον μόριο (Εικ. 3.16Β).



Εικ. 3.15. Κυτταρόμετρο ροής Becton Dickinson FACS Culiber.



Εικ. 3.16. Α) Διαγράμματα κουκκίδων σκέδασης φωτός για δείγμα κυττάρων. Οι επιλεγμένες κουκκίδες (Gate 1) αντιστοιχούν στα ζώντα κύτταρα ενώ οι υπόλοιπες είναι είτε νεκρά κύτταρα είτε κυτταρικά υπολείμματα. Β) Ιστόγραμμα για φθορισμό δείγματος κυττάρων. Τα κύτταρα που εμφανίζουν αυξημένο φθορισμό μετρώνται από το μάρτυρα.

6. Βιβλιογραφία

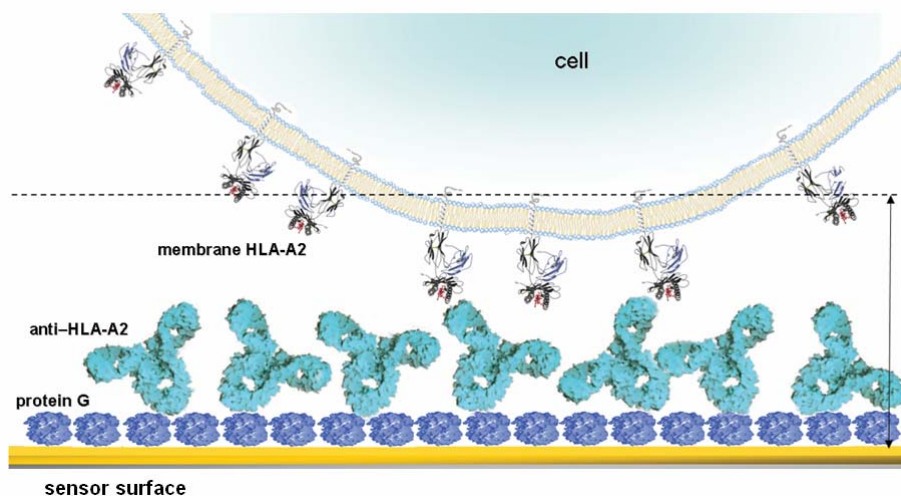
1. Gizeli, E. & Lowe, C.R. *Biomolecular Sensors*. (Taylor & Francis Inc., London; 2002).
2. Lawrence, M.B., McIntire, L.V. & Eskin, S.G. Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion. *Blood* **70**, 1284-1290 (1987).
3. Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquartzen zur Wagung dünner Schichten und zur microwagung. *Z Phys* **155**, 206-222 (1959).
4. Kanazawa, K.K. & Gordon, J.G. Frequency of a Quartz Microbalance in Contact with Liquid. *Analytical Chemistry* **57**, 1770-1771 (1985).
5. Hook, F. & Rudh, M. Quartz crystal microbalances (QCM) in biomacromolecular recognition. *BTi February/March* (2005).
6. Rodahl, M., Dahlgqvist, P., Hook, F. & Kasemo, B. The quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D), in *Biomolecular Sensors*. (eds. E. Gizeli & C.R. Lowe) (Taylor & Francis Inc., London; 2002).
7. Dean, P.N. Overview of Flow Cytometry Instrumentation, in *Current Protocols In Cytometry* 1.1.1-1.1.8 (John Wiley & Sons Inc., New York; 1997).

Κεφάλαιο 4

Μοντέλο βιολογικό σύστημα για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεμβρανικών μορίων με τη χρήση βιοαισθητήρων – Χειρισμός και μελέτη κυτταρικών σειρών

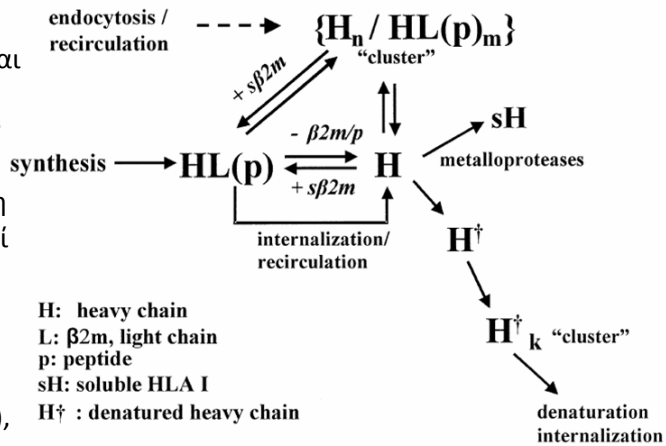
1. Μοριακή αλληλεπίδραση του HLA-A2 με μονοκλωνικό αντίσωμα

Για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεμβρανικών μορίων με τη χρήση βιοαισθητήρων και ολόκληρων κυττάρων, χρειάζεται ένα μοντέλο σύστημα το οποίο θα επιτρέψει τη μελέτη μοριακής αλληλεπίδρασης με καθορισμένο τρόπο και χωρίς προβλήματα. Θα πρέπει, επίσης, να προσφέρει ευελιξία χειρισμού από την άποψη αλλαγής συνθηκών κατά τη διάρκεια του πειράματος ώστε να επιτρέπεται η μελέτη επιπρόσθετων παραγόντων. Ένα τέτοιο σύστημα αναπτύχθηκε στο εργαστήριο (Μιχάλης Σαϊτάκης, Μεταπτυχιακή Διατριβή, 2006; Νατάσα Δελλαπόρτα, Διδακτορική Διατριβή, 2008) και βασίζεται στην αλληλεπίδραση αντιγόνου/αντισώματος και συγκεκριμένα στην αλληλεπίδραση του τάξης I MHC μορίου HLA-A2 με το anti-HLA μονοκλωνικό αντίσωμα BB7.2. Το HLA-A2 είναι το πιο κοινό αλληλόμορφο τάξης I MHC μορίου στον ανθρώπινο πληθυσμό. Τα HLA μόρια χρησιμοποιήθηκαν ως μεμβρανικοί υποδοχείς στην επιφάνεια κυττάρων. Το μονοκλωνικό αντίσωμα, αντίθετα, έπαιξε το ρόλο του ακινητοποιημένου προσδέτη (Εικ. 4.1). Το anti-HLA αντίσωμα είναι ειδικό για την α αλυσίδα¹ του HLA-A2 όταν αυτό βρίσκεται στην ετεροτριμερή μορφή που αποτελείται από την α αλυσίδα τη β_2 μικροσφαιρίνη και το αντιγονικό πεπτιδίο². Εκτός από την ετεροτριμερή μορφή, το HLA-A2 μπορεί να εμφανίζεται στην επιφάνεια του κυττάρου είτε ως ετεροδιμερές, δηλαδή ως α αλυσίδα και β_2 μικροσφαιρίνη, ή ως μονομερές α αλυσίδα^{3,4} (Εικ. 4.2). Οι δύο αυτές μορφές δεν αναγνωρίζονται από το μονοκλωνικό αντίσωμα. Επιπλέον, σε κύτταρα της Β-λεμφοβλαστικής σειράς, το HLA-A2 έχει ανιχνευθεί να σχηματίζει μικρά συσσωματώματα στην κυτταρική μεμβράνη⁴.



Εικ. 4.1. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης HLA-A2 μορίων που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και ακινητοποιημένων anti-HLA στην επιφάνεια του αισθητήρα.

Εικ. 4.2. Τα τάξης I MHC μόρια μπορούν να βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη σε διάφορες μορφές: ετεροτριμερή (HL(p)), μονομερή α αλυσίδας (H), συσσωματώματα ετεροτριμερών και μονομερών (H/HL(p)) ή συσσωματώματα αποδιαταγμένων α αλυσίδων (H[†]). Τα ετεροτριμερή (HL(p)) εμφανίζονται στη μεμβράνη αμέσως μετά τη σύνθεσή τους. Εκεί μπορεί να χάσουν το πεπτίδιο και την β_2m μικροσφαιρίνη (β_2m). Τα μονομερή αυτά α αλυσίδας (H) μπορούν να συσσωματωθούν (H/HL(p)) ή να αποδιαταχθούν (H[†]), κάτι που θα οδηγήσει σε ενδοκυττάρωση τους, ή να αποκοπούν από μεταλλοπρωτεΐνάσες. (Πηγή: Bodnar et al., 2003)



2. Κυτταρικές σειρές και καλλιέργειες

Ως φορέας των HLA μορίων χρησιμοποιήθηκε η μετασχηματισμένη με Epstein-Barr virus (EBV) Β-λεμφοβλαστική κυτταρική σειρά LG2, ομόζυγη για το γονίδιο HLA-A*0201 (ευγενική προσφορά του Καθ. Hugh Reychurn, Department of Immunology & Oncology, National Center of Biotechnology, CSIC, Madrid, Spain). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά K562 χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (ευγενική προσφορά της Δρ. Perez, Κέντρο Καρκινικής Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας, Νοσοκομείο Άγιος Σάββας, Αθήνα) που δεν εκφράζει HLA-A, -B ή -C,

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen) στο οποίο έχει προστεθεί το αντιβιοτικό gentamycin 1mg L^{-1} (Gibco-Invitrogen) καθώς και 10% εμβρυϊκός ορός βοδιού. Οι φλάσκες καλλιέργειας διατηρούνται σε ατμόσφαιρα υγρασίας και 5% CO₂ στους 37°C. Αλλαγές το θρεπτικού γίνονται κάθε 2-3 μέρες. Η μέση πυκνότητα των κυττάρων ήταν $3-8 \times 10^5$ κύτταρα ml⁻¹. Για τη διεξαγωγή πειραμάτων, κύτταρα συλλέγονται και ελέγχεται η θνησιμότητά τους με τη μέθοδο αποκλεισμού με τη χρωστική trypan blue (Gibco-Invitrogen). Τα ζωντανά κύτταρα μετρούνται σε αιμοκυττάρωμα τύπου Neubauer. Για κάθε πείραμα, δεν χρησιμοποιήθηκε δείγμα κυττάρων με νεκρά κύτταρα πάνω από το 5% του ολικού αριθμού. Η συλλογή των κυττάρων γινόταν έπειτα από φυγοκέντρηση σε 250 g. Τα κύτταρα ξεπλένονταν με PBS (Sigma) πριν από κάθε πείραμα, υφίσταντο φυγοκέντρηση σε 250 g και επαναιωρούντο σε PBS.

3. Χειρισμοί κυττάρων

Πραγματοποιήθηκαν διάφοροι χειρισμοί των κυττάρων είτε για την αλλαγή του αριθμού των HLA μορίων στη μεμβράνη των κυττάρων είτε για την τροποποίηση της κυτταρικής επιφάνειας.

3.1. Παραγωγή κυττάρων με διαφορετικούς αριθμούς μεμβρανικών HLA μορίων

Ο αριθμός των HLA στην επιφάνεια των κυττάρων που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το anti-HLA αντίσωμα μπορεί να τροποποιηθεί εύκολα καταστρέφοντας την ετεροτριμερή μορφή του HLA μέσω της αφαίρεσης αντιγονικών πεπτιδίων από τη σχισμή της α αλυσίδας. Για την αφαίρεση των πεπτιδίων σχετιζόμενων με τα μεμβρανικά HLA, τα κύτταρα LG2 επώαστηκαν με ένα ήπια όξινο ρυθμιστικό διάλυμα⁵ (pH 3.2). Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS, φυγοκεντρήθηκαν σε 250 g και αφέθηκαν σε πάγο για 5 λεπτά. Ακολούθησε μία επώαση 90 s με παγωμένο ρυθμιστικό κιτρικού-φωσφορικού (μίγμα ίσων όγκων 0,263 M κιτρικό και 0,123 M Na₂HPO₄). Τα κύτταρα έπειτα ξεπλύθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε RPMI χωρίς ορό. Τα κύτταρα αυτά έχουν πλέον πολύ μικρό αριθμό ετεροτριμερών HLA στη μεμβράνη τους (**Πίνακας 4.1**). Πριν από κάθε πείραμα, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν σε PBS, φυγοκεντρήθηκαν σε 250 g και πάλι επαναιωρήθηκαν σε PBS.

Για την αντίστροφη συνθήκη, δηλαδή υψηλό αριθμό HLA στην επιφάνεια των κυττάρων LG2, ακολουθήθηκε καλλιέργεια των κυττάρων LG2 σε υψηλές πυκνότητες κυττάρων ($2-3 \times 10^6$ κύτταρα ml⁻¹). Αυτός ο τρόπος καλλιέργειας έχει δείξει ότι αυξάνει τον αριθμό ετεροτριμερών HLA στην κυτταρική μεμβράνη⁴. Πράγματι, ο αριθμός των ετεροτριμερών HLA στην κυτταρική μεμβράνη είναι σχεδόν διπλάσιος από τις κανονικές καλλιέργειες (**Πίνακας 4.1**).

3.2. Παραγωγή κυττάρων με τροποποιημένο γλυκοκάλυκα

Τα κύτταρα LG2 χρειάστηκε να επωαστούν με το ένζυμο νευραμινιδάση για τη διερεύνηση του τρόπου δράσης του γλυκοκάλυκα στην αλληλεπίδραση του μεμβρανικού HLA με το ακινητοποιημένο anti-HLA. Η νευραμινιδάση «κόβει» κατάλοιπα σιαλικού οξέος από μεμβρανικές γλυκάνες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα λιγότερο πυκνό γλυκοκάλυκα με λιγότερο αρνητικό φορτίο. Επομένως, τα κύτταρα LG2 επώαστηκαν για 40 λεπτά με 100 U ml⁻¹ νευραμινιδάσης (New England BioLabs) στους 37°C. Έπειτα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS. Οι αρνητικοί μάρτυρες έτυχαν του ίδιου χειρισμού απουσία του ενζύμου.

3.3. Παραγωγή κυττάρων με τροποποιημένη συσσωμάτωση των HLA μορίων

Τα κύτταρα LG2 επώαστηκαν με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη (Sigma) για τη διερεύνηση του τρόπου δράσης της συσσωμάτωσης (clustering) των μεμβρανικών μορίων στην αλληλεπίδραση HLA/anti-HLA. Η επώαση με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη αφαιρεί τη χοληστερόλη από την κυτταρική μεμβράνη⁶ σε ποσοστό περίπου 80-90% και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσωμάτωση των μορίων HLA στη μεμβράνη⁷. Επομένως, τα κύτταρα LG2 επώαστηκαν με 10 mM μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνης για 30

λεπτά και κατόπιν ξεπλύθηκαν με PBS. Οι αρνητικοί μάρτυρες έτυχαν του ίδιου χειρισμού απουσία της μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνης. Για το αντίστροφο αποτέλεσμα, δηλαδή την απώλεια των ενδογενών συσσωματωμάτων των μορίων HLA στην κυτταρική μεμβράνη^{3, 4}, τα κύτταρα LG2 καλλιιεργήθηκαν *overnight* παρουσία β_2 μικροσφαιρίνης (AbD Serotec) σε συγκέντρωση 5 μ M.

3.4. Παραγωγή μονιμοποιημένων κυττάρων

Τα κύτταρα LG2 επώαστηκαν με μικρή ποσότητα γλουταραλδεΐδης (g/a) για τη μονιμοποίηση της μεμβράνης ώστε να μην είναι δυνατό να γίνεται πλευρική διάχυση των μεμβρανικών πρωτεϊνών στην κυτταρική μεμβράνη. Τα κύτταρα επώαστηκαν στον πάγο για 5 λεπτά με g/a 0,01% σε PBS. Ακολούθησαν ξεπλύματα σε PBS (4x) και τελική επαναιώρηση σε PBS.

3.5. Παραγωγή κυττάρων με τροποποιημένο κυτταροσκελετό ακτίνης

Τέλος, τα κύτταρα LG2 επώαστηκαν με την ουσία κυτοχαλασίνη D (cytochalasin D, CytD) (Sigma) για τη διερεύνηση της επίδρασης της διάλυσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης στην αλληλεπίδραση του μεμβρανικού HLA με το ακινητοποιημένο anti-HLA. Επομένως, τα κύτταρα επώαστηκαν με 5 μ M ή 10 μ M CytD (σε PBS) σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά. Το αρχικό διάλυμα CytD (stock) ήταν 10 mM σε DMSO (dimethyl-sulfoxide). Έπειτα, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS. Οι αρνητικοί μάρτυρες επώαστηκαν με την αντίστοιχη ποσότητα του διαλύτη DMSO.

4. Κυτταρομετρία ροής

Αρχικά, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των HLA-A2 μορίων στη μεμβράνη των κυττάρων LG2 που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το anti-HLA αντίσωμα μαζί με το κιτ έμμεσης ποσοτικής δοκιμασίας ανοσοφθορισμού (QIFIKIT, Dako) Οι υπολογισμένες τιμές για τον αριθμό των HLA-A2 μορίων που αλληλεπιδρούν με το αντίσωμα, εμφανίζονται στον **Πίνακα 4.1**.

Πίνακας 4.1. Αριθμός των HLA μορίων στην επιφάνεια των κυττάρων που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το anti-HLA αντίσωμα υπολογισμένος από κυτταρομετρία ροής.

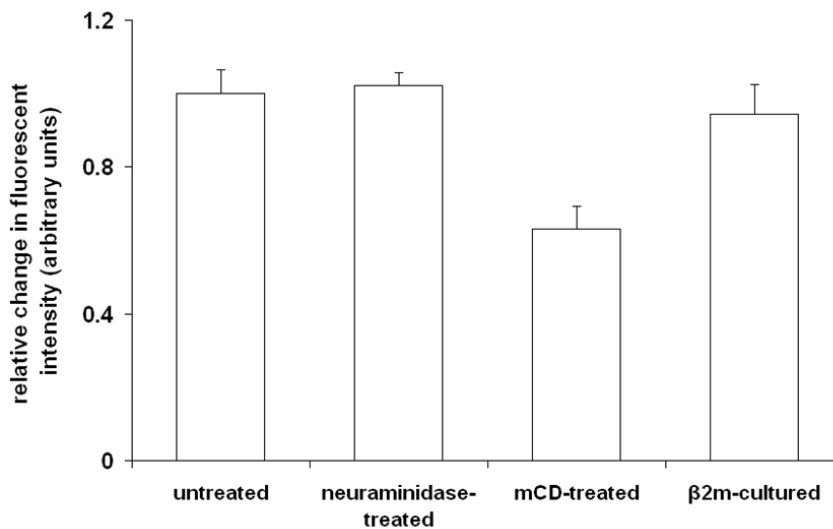
Κανονικά κύτταρα LG2 (untreated) (μόρια ανά κύτταρο) (n=12)	Επωασμένα με ήπιο οξύ κύτταρα LG2 (mild acid treated) (μόρια ανά κύτταρο) (n=6)	Κύτταρα LG2 από πυκνές καλλιέργειες (high density cultures) (μόρια ανά κύτταρο) (n=4)
3,7-5,7×10 ⁵	1-10×10 ⁴	9,7-10,0×10 ⁵

Εκτός από τη μέτρηση του αριθμού των ετεροτριμερών HLA στην επιφάνεια των κυττάρων LG2 σε τρεις διαφορετικές συνθήκες (κανονικές, επωασμένα με ήπιο οξύ και καλλιιεργημένα σε μεγάλη πυκνότητα), έγιναν πειράματα κυτταρομετρίας

ροής για τα κύτταρα LG2 έπειτα από τους παραπάνω χειρισμούς. Σε κάθε συνθήκη τα κύτταρα επώαστηκαν με το anti-HLA αντίσωμα BB7.2 και ένα δεύτερο αντίσωμα (Dako) anti-mouse IgG συζευγμένο με τη φθορίζουσα χρωστική FITC (fluorescein isothiocyanate), και τα δύο σε συνθήκες κορεσμού. Τα δείγματα αναλύθηκαν στο κυτταρόμετρο ροής (FACScan) και υπολογίστηκε η μέση ένταση φθορισμού FITC (Εικ. 4.3).

Για τον έλεγχο της επώασης με τη νευραμινιδάση και αν αυτή επηρεάζει την αλληλεπίδραση του HLA με το anti-HLA αντίσωμα, έγιναν πειράματα κυτταρομετρίας ροής. Δείχθηκε ότι η πρόσδεση του διαλυτού anti-HLA δεν επηρεάζεται από την επώαση με το ένζυμο και άρα ότι ο αριθμός των HLA μορίων δεν επηρεάστηκε.

Επίσης, κύτταρα LG2 επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη και καλλιεργημένα με β_2 μικροσφαιρίνη ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την αλληλεπίδραση HLA/anti-HLA. Τα επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη κύτταρα LG2 εμφάνισαν λιγότερο συνολικό προσδεμένο αντίσωμα εν συγκρίσει με τα κανονικά και τα καλλιεργημένα με β_2 μικροσφαιρίνη κύτταρα LG2. Αυτό πιθανόν να συνέβη λόγω της περισσότερο εκτεταμένης συσσωμάτωσης των HLA μορίων στην κυτταρική μεμβράνη έπειτα από την επώαση με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη. Η συσσωμάτωση αυτή μπορεί να παρεμποδίζει στερεοχημικά την πρόσδεση των anti-HLA μορίων σε όλα τα μεμβρανικά HLA μόρια που σχηματίζουν τα συσσωματώματα ή αλλιώς μπορεί να συμβαίνει διφασική πρόσδεση των μορίων του αντισώματος.

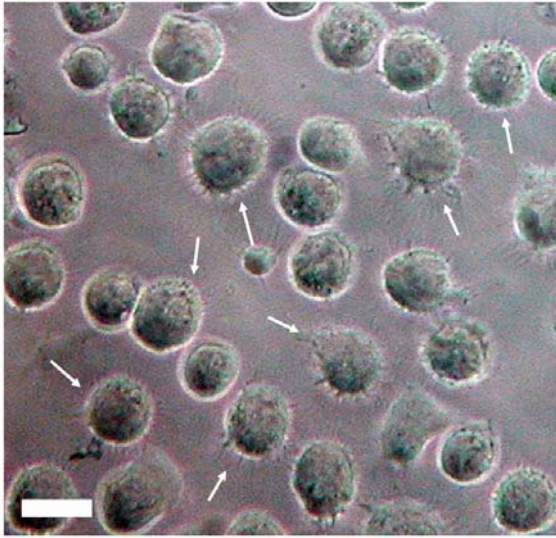


Εικ. 4.3. Μέσες τιμές φθορισμού για την ανίχνευση HLA μορίων στην κυτταρική μεμβράνη υπολογισμένος από κυτταρομετρία ροής για διάφορους χειρισμούς των κυττάρων LG2.

5. Μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων

Τα κύτταρα LG2 παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων έπειτα από αλληλεπίδραση τους με επιφάνεια με ακινητοποιημένο anti-HLA. Έπειτα από επώαση περίπου 1 ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, τα κύτταρα LG2 θεωρούνται ότι έχουν φτάσει σε ισορροπία και η παρατήρηση στο μικροσκόπιο δείχνει ότι

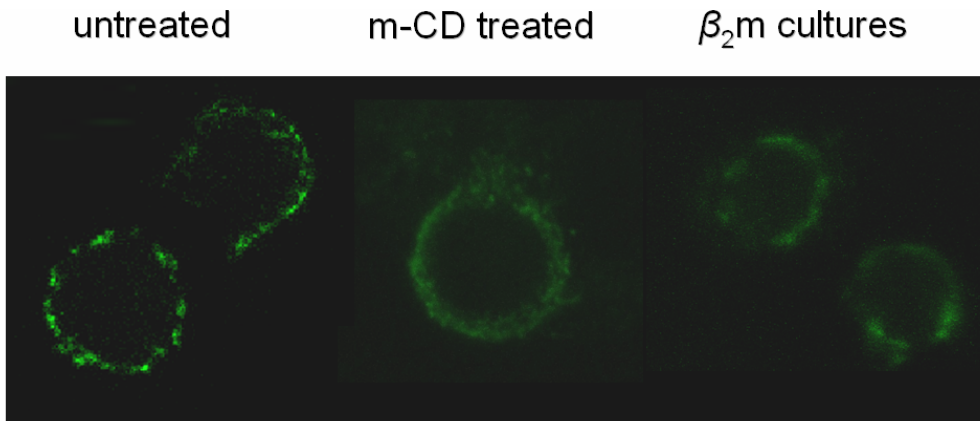
διατήρησαν το σφαιρικό τους σχήμα και εμφάνισαν προσκόλληση που μεσολαβείται από μικρά φιλοπόδια (Εικ. 4.4).



Εικ. 4.4. Κύτταρα LG2 σε επιφάνεια με ακινητοποιημένο anti-HLA έπειτα από 1 ώρα επώαση σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα διατηρούν το σφαιρικό τους σχήμα και σχηματίζουν μικρά φιλοπόδια (λευκά βέλη) κατά την αλληλεπίδραση τους με την επιφάνεια. (γραμμή κλίμακας 15 μm)

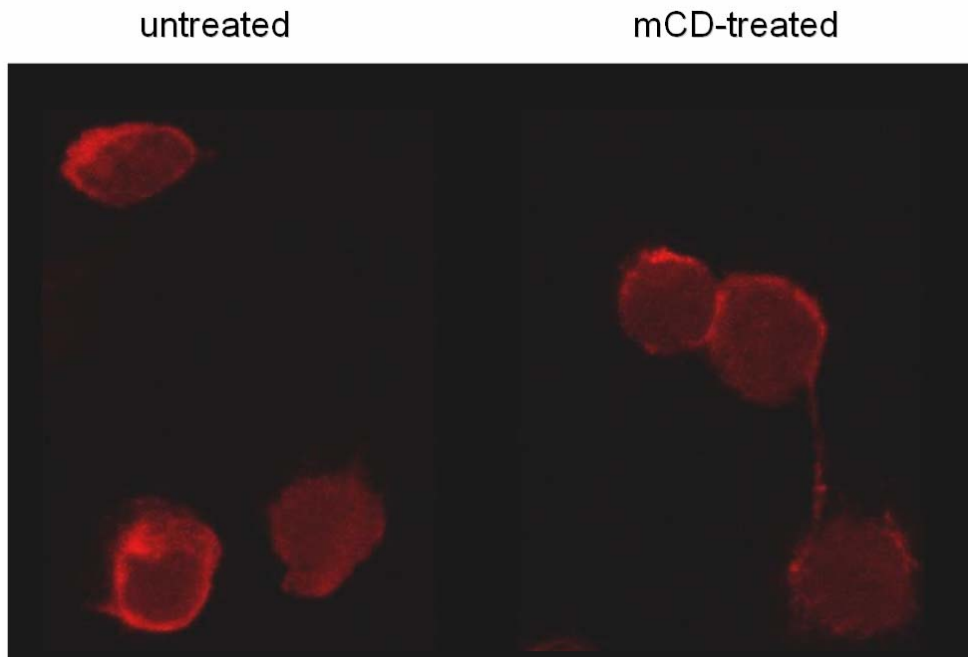
Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν επίσης με συνεστιακό μικροσκόπιο για την κατανομή των HLA μορίων στην επιφάνεια των κυττάρων και για την κατάσταση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Στην πρώτη περίπτωση, τα κύτταρα επώαστηκαν με το αντίσωμα BB7.2 και το δεύτερο αντίσωμα anti-mouse IgG-FITC, και έπειτα μονιμοποιήθηκαν με παραφορμαλδεΐδη (Sigma) 4% πάνω σε καλυπτρίδες γυαλιού. Για τη μελέτη του κυτταροσκελετού της ακτίνης, τα κύτταρα πρώτα επώαστηκαν με παραφορμαλδεΐδη 4% σε καλυπτρίδες γυαλιού και έπειτα προστέθηκε Triton X-100 (Fluka) 0,5%. Κατόπιν, τα κύτταρα σημάνθηκαν με φαλλοϊδίνη (Fluka) συζευγμένη με τη φθορίζουσα χρωστική ροδαμίνη. Η φαλλοϊδίνη προσδέεται με υψηλή συγγένεια πάνω σε ινίδια του κυτταροσκελετού της ακτίνης⁸ και χρησιμοποιείται ευρέως, σε σύζευξη με μία φθορίζουσα χρωστική, για την σήμανση του κυτταροσκελετού της ακτίνης κατά την παρατήρηση σε μικροσκόπιο. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν είτε στο μικροσκόπιο φθορισμού είτε στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

Κύτταρα LG2 επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη και κύτταρα από καλλιέργειες με β_2 μικροσφαιρίνη παρατηρήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση με τα αντισώματα anti-HLA και anti-mouse IgG-FITC. Τα επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη κύτταρα LG2 εμφάνισαν ένα πιο έντονα φθορίζον προφίλ για τα HLA μόρια εν συγκρίσει με τα κανονικά κύτταρα και αυτά από καλλιέργειες με β_2 μικροσφαιρίνη (Εικ. 4.5). Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς τα μεγαλύτερα συσσωματώματα HLA μορίων στα επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη κύτταρα LG2 έχουν μεγαλύτερη συσσωμάτωση των αντισωμάτων, και άρα της φθορίζουσας χρωστικής, δίνοντας πιο φωτεινά σημεία φθορισμού. Τέτοια φωτεινά σημεία παρατηρήθηκαν και με πειράματα FRET σε άλλα κύτταρα επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη⁷ αλλά όχι σε κύτταρα καλλιεργημένα παρουσία β_2 μικροσφαιρίνης³.



Εικ. 4.5. Παρατήρηση κυττάρων LG2 στο συνεστιακό μικροσκόπιο μετά από χρώση για την κατανομή των HLA μορίων. Τα επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη κύτταρα LG2 (m-CD treated) εμφάνισαν πιο έντονο προφίλ φθορίζουσας χρώσης εν συγκρίσει με τα κανονικά (untreated) και τα καλλιεργημένα παρουσία β₂ μικροσφαιρίνης (β₂m cultures).

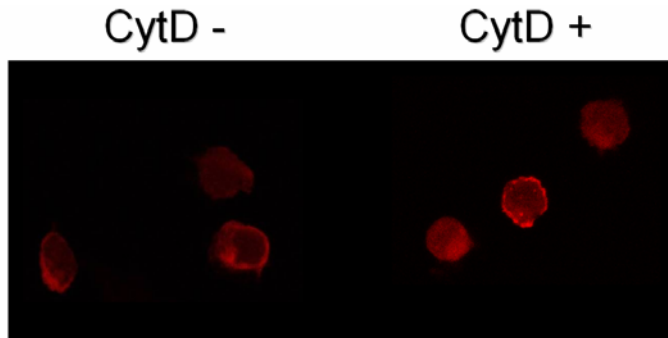
Τα επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη κύτταρα παρατηρήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο και μετά από χρώση με φαλλοϊδίνη συζευγμένη με ροδαμίνη. Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης για τα επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη κύτταρα LG2 εμφανίστηκε λιγότερο εύρωστος εν συγκρίσει με τα κανονικά κύτταρα LG2 (Εικ. 4.6).



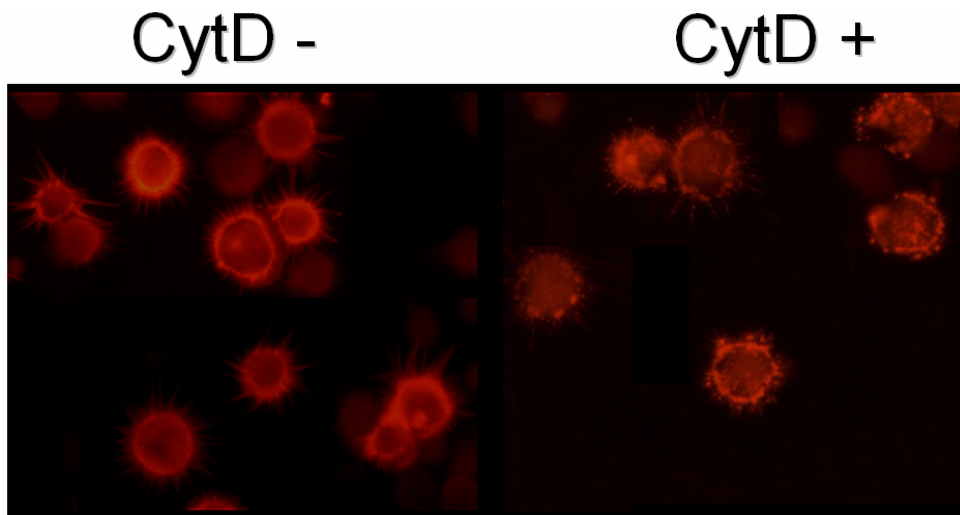
Εικ. 4.6. Παρατήρηση των κυττάρων LG2 στο συνεστιακό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Τα επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη κύτταρα LG2 (mCD-treated) εμφάνισαν λιγότερο εύρωστο προφίλ του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Αυτό συμβαίνει γιατί η επώαση με την μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη προκαλεί απομάκρυνση της χοληστερόλης και χαλάρωση της κυτταρικής μεμβράνης. Ως απόκριση, παρατηρείται μεγαλύτερη ακαμψία των υπομεμβρανικών μικροϊνιδίων της ακτίνης⁹ και διατάραξη του συνολικού κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Κύτταρα LG2 επωασμένα με CytD παρατηρήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση με φαλλοϊδίνη συζευγμένη με ροδαμίνη. Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης και το υπομεμβρανικό πλέγμα μικροϊνιδίων ακτίνης ήταν λιγότερο εύρωστο και εμφάνισε διάχυτο φθορισμό και συσσωματώματα εν συγκρίσει με τους αρνητικούς μάρτυρες (Εικ. 4.7). Αυτό συμβαίνει γιατί η CytD διαταράσσει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης εμποδίζοντας τον πολυμερισμό της ακτίνης σε ινίδια^{8, 10}. Επίσης, παρατήρηση των επωασμένων με CytD κυττάρων LG2 φανέρωσε ένα σφαιρικό και λείο σχήμα χωρίς κυτταρικές προβολές, εν αντιθέσει με το κανονικό προφίλ προσκόλλησης (Εικ. 4.8), όπως άλλωστε αναμενόταν⁸.



Εικ. 4.7. Παρατήρηση των κυττάρων LG2 στο συνεστιακό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Η επώαση των κυττάρων με CytD προκαλεί το σχηματισμό διάχυτου φθορισμού και συσσωματωμάτων ακτίνης.



Εικ. 4.8. Παρατήρηση των κυττάρων LG2 πάνω σε επιφάνεια με anti-HLA στο συνεστιακό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Η επώαση με CytD προκαλεί το σχηματισμό συσσωματωμάτων ακτίνης και καταστροφή των δομών των φιλοποδίων.

6. Βιβλιογραφία

1. Parham, P. & Brodsky, F.M. Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28. *Hum Immunol* **3**, 277-299 (1981).
2. Hogan, K.T. & Brown, S.L. Localization and characterization of serologic epitopes on HLA-A2. *Hum Immunol* **33**, 185-192 (1992).

3. Bodnar, A. et al. Class I HLA oligomerization at the surface of B cells is controlled by exogenous beta(2)-microglobulin: implications in activation of cytotoxic T lymphocytes. *International immunology* **15**, 331-339 (2003).
4. Matko, J., Bushkin, Y., Wei, T. & Edidin, M. Clustering of class I HLA molecules on the surfaces of activated and transformed human cells. *J Immunol* **152**, 3353-3360 (1994).
5. van der Burg, S.H. et al. An HLA class I peptide-binding assay based on competition for binding to class I molecules on intact human B cells. Identification of conserved HIV-1 polymerase peptides binding to HLA-A*0301. *Hum Immunol* **44**, 189-198 (1995).
6. Zidovetzki, R. & Levitan, I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1311-1324 (2007).
7. Fooksman, D.R., Gronvall, G.K., Tang, Q. & Edidin, M. Clustering class I MHC modulates sensitivity of T cell recognition. *J Immunol* **176**, 6673-6680 (2006).
8. Cooper, J.A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of cell biology* **105**, 1473-1478 (1987).
9. Kwik, J. et al. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13964-13969 (2003).
10. Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N.C. & Elson, E.L. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *Journal of cell science* **114**, 1025-1036 (2001).

Κεφάλαιο 5

Μελέτη αλληλεπιδράσεων HLA μορίων στη μεμβράνη κυττάρων και anti-HLA αντισωμάτων ακινητοποιημένων στην επιφάνεια βιοαισθητήρων

Η μελέτη των μοριακών αλληλεπιδράσεων που καθορίζουν την επικοινωνία μεταξύ κυττάρων και μεταξύ κυττάρου και υποστρώματος έχει μεγάλη βιολογική σημασία. Επομένως, θα ήταν εξαιρετικά χρήσιμη η ανάπτυξη τεχνικών οι οποίες θα χρησιμοποιούν ολόκληρα κύτταρα και θα εστιάζουν στις αλληλεπιδράσεις που καθοδηγούν μια συγκεκριμένη βιολογική διαδικασία με μη καταστρεπτικό τρόπο^{1, 2}. Οι βιοαισθητήρες φέρονται ως τέτοιες τεχνικές αφού προσφέρουν μερικά αναμφισβήτητα πλεονεκτήματα: ταχύτητα ανάλυσης, ευελιξία, μη χρήση μαρτύρων και χρώσεων και μη καταστροφή του δείγματος. Επίσης, οι ακουστικοί βιοαισθητήρες έχουν τη μοναδική δυνατότητα να ανιχνεύσουν και να μελετήσουν την αλληλεπίδραση ενός μεμβρανικού υποδοχέα με τον προσδέτη του εφόσον εμφανίζουν ευαισθησία όχι μόνο σε καθαρές αλλαγές της μάζας αλλά και σε διαφορές στην ιξωδοελαστικότητα του δείγματος των κυττάρων που βρίσκονται σε επαφή με την επιφάνεια του αισθητήρα³. Έχοντας ως ζευγάρι μορίων το μοντέλο σύστημα που παρουσιάστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο (HLA μόρια στην επιφάνεια των κυττάρων LG2 που αλληλεπιδρούν με το anti-HLA μονοκλωνικό αντίσωμα BB7.2 στην επιφάνεια του αισθητήρα), θα χρησιμοποιηθούν τα δύο συστήματα ακουστικών βιοαισθητήρων που παρουσιάστηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο, δηλαδή ο ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love και ο ακουστικός βιοαισθητήρας QCM-D. Για λόγους σύγκρισης, παρουσιάζονται και επιπρόσθετα αποτελέσματα από τη χρήση του οπτικού βιοαισθητήρα SPR.

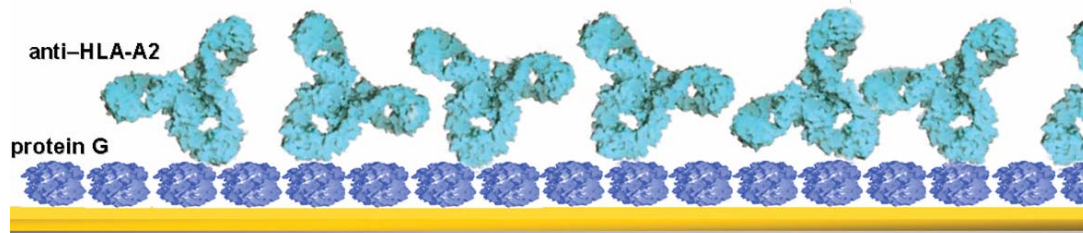
1. Ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love

1.1 Προετοιμασία επιφάνειας βιοαναγνώρισης

Πριν την προσθήκη των κυττάρων στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα απαιτείται κατάλληλη προετοιμασία του στρώματος βιοαναγνώρισης. Στην περίπτωση του μοντέλου συστήματος HLA/anti-HLA, χρειάζεται η σωστή ακινητοποίηση του αντισώματος. Για το λόγο, αυτό χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνη G προερχόμενη από το γένος των *Streptococcus*, η οποία προσροφάται μη αναστρέψιμα στην επιφάνεια χρυσού και προσδένει με μεγάλη συγγένεια την Fc περιοχή των ανοσοσφαιρινών G^{4, 5} (όπως το anti-HLA). Η αλληλεπίδραση των αντισωμάτων με την πρωτεΐνη G στην επιφάνεια του αισθητήρα έχει ως αποτέλεσμα την προσανατολισμένη ακινητοποίηση των αντισωμάτων⁵, δηλαδή την παρουσίαση των Fab περιοχών που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το HLA (Εικ. 5.1).

Για ακινητοποίηση της πρωτεΐνης G στην επιφάνεια του αισθητήρα, μια καθαρή επιφάνεια χρυσού επώαστηκε με διάλυμα πρωτεΐνης G (Calbiochem) 1 mg ml⁻¹ για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, η συσκευή του βιοαισθητήρα τοποθετήθηκε στην ειδική θήκη και ξεκίνησε πείραμα πραγματικού χρόνου. Το anti-

HLA προστέθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις στον ακουστικό βιοαισθητήρα υπό ροή 25 ml min^{-1} και η επιφανειακή συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίστηκε με τη χρήση του οπτικού βιοαισθητήρα SPR (βλ. §3.1). Όπως φαίνεται από τον **Πίνακα 5.1**, μια μείωση στην επιφανειακή συγκέντρωση του anti-HLA ως και 5 φορές από τη μέγιστη τιμή (από 5858 ως 1181 μόρια mm^{-2}) επηρεάζει ελάχιστα τον αριθμό των κυττάρων που προσδένονται στην επιφάνεια του αισθητήρα (από 1287 ως 1236 κύτταρα mm^{-2}). Επομένως, από αυτές τις συγκεντρώσεις επιλέχθηκε αυτή των 10 mg ml^{-1} για χρήση σε περαιτέρω πειράματα, εφόσον προσέφερε, επιπλέον από τη διευκόλυνση της πρόσδεσης των κυττάρων, καλύτερη επαναληψιμότητα του ακουστικού σήματος. Η αλλαγή σήματος για την ακινητοποίηση του anti-HLA ήταν $2,83 \pm 0,14 \text{ deg}$ για τη φάση και $0,073 \pm 0,014 \text{ dB}$ για το πλάτος του ακουστικού κύματος. Η ακουστική αναλογία, επομένως, ήταν $\Delta A/\Delta \text{Phase} = 0,0258 \text{ (dB/deg)}$ για την πρωτεΐνη anti-HLA. Η αναλογία αυτή είναι σχεδόν ίδια με αυτήν που παρατηρείται για προσρόφηση πρωτεΐνης σε μια καθαρή επιφάνεια χρυσού και δίνει πληροφορίες για τις μηχανικές ιδιότητες του προσροφημένου στρώματος. Στην περίπτωση του anti-HLA, η τιμή της ακουστικής αναλογίας προτείνει την παρουσία ενός πολύ άκαμπτου και ελαστικού στρώματος^{6, 7}. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η σταθερά ρυθμού αποσύνδεσης k_d της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεΐνης G και μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού⁵ (όπως το anti-HLA) είναι πιο αργή ($2,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) από το χρόνο στον οποίο συμβαίνει η αλληλεπίδραση HLA/anti-HLA και δεν προβλέπεται να την επηρεάσει ποσοτικά και κινητικά.



Εικ. 5.1. Σχηματισμός επιφάνειας βιοαναγνώρισης στην επιφάνεια βιοαισθητήρων. Η προσανατολισμένη ακινητοποίηση του αντισώματος επιτυγχάνεται με ένα προσροφημένο στρώμα στρεπτοκοκκικής πρωτεΐνης G.

1.2. Αλληλεπίδραση κυττάρων με την επιφάνεια του βιοαισθητήρα

Ο ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love είναι ευαίσθητος σε προσθήκη μάζας και σε αλλαγές των ιξωδοελαστικών ιδιοτήτων του βιολογικού στρώματος που βρίσκεται σε επαφή με την επιφάνεια. Οι αλλαγές στη μάζα εξαιτίας της εναπόθεσης ενός άκαμπτου στρώματος θα επηρεάσουν μόνο τη φάση του ακουστικού κύματος, ενώ το πλάτος του κύματος θα επηρεαστεί μόνο από διαφορές στην ιξωδοελαστικότητα. Προηγούμενες μελέτες με ακουστικούς βιοαισθητήρες έδειξαν ότι η απώλεια ενέργειας του ακουστικού κύματος είναι πιο ευαίσθητη στην προσκόλληση κυττάρων από την φάση ή τη συχνότητα. Αυτό οφείλεται στην απόσβεση του ακουστικού κύματος ως αποτέλεσμα της παρουσίας των ισχυρά ιξωδοελαστικών κυττάρων^{8, 9}. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το ακουστικό σήμα είναι περισσότερο ευαίσθητο σε ειδικούς δεσμούς ανάμεσα στο κύτταρο και την επιφάνεια, ενώ απλά η παρουσία του κυττάρου κοντά στην επιφάνεια δεν ήταν αρκετή για να προκαλέσει αλλαγή του σήματος¹⁰⁻¹².

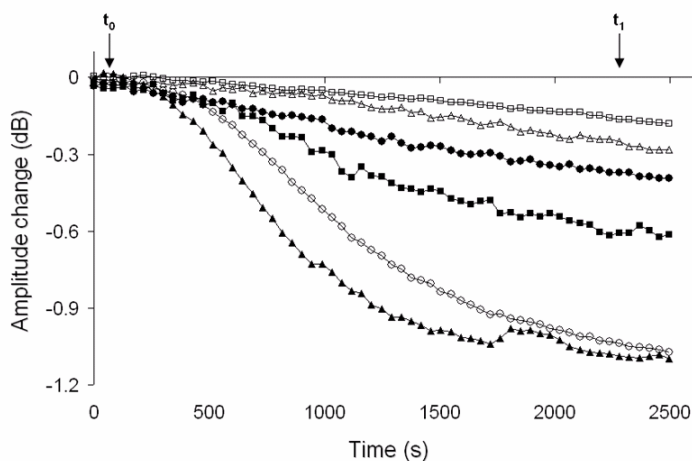
Πίνακας 5.1. Επίδραση της επιφανειακής συγκέντρωσης του anti-HLA αντισώματος στο πλάτος του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love και τον αριθμό των κυττάρων που προσδένονται στην επιφάνεια κατά την προσθήκη $2,5 \times 10^5$ κυττάρων ml^{-1} .

Συγκέντρωση anti-HLA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Επιφανειακή συγκέντρωση anti-HLA* ($\text{molecules } \mu\text{m}^{-2}$)	Μεταβολή του πλάτους (dB) από την προσθήκη 2.5×10^5 κυττάρων ml^{-1}	Κύτταρα LG2 που προσδένονται στην επιφάνεια του αισθητήρα [†] (κύτταρα mm^{-2})
0.1	88	0.06	13
0.5	572	0.29	257
1	1181	0.84	1236
10	5858	0.99	1287

* Οι τιμές προέκυψαν από τον οπτικό βιοαισθητήρα SPR.

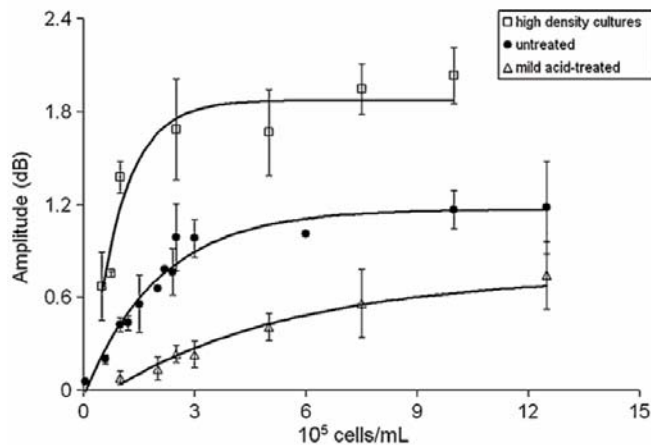
[†] Τα κύτταρα στην επιφάνεια του αισθητήρα μετρήθηκαν στο μικροσκόπιο από τρεις τουλάχιστον διαφορετικές περιοχές.

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, χρησιμοποιήσαμε τον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεμβρανικού HLA και ακινητοποιημένου anti-HLA. Επομένως, κύτταρα LG2 προστέθηκαν στην επιφάνεια του αισθητήρα σε πραγματικό χρόνο και αφού είχε προηγηθεί η ακινητοποίηση του anti-HLA αντισώματος. Οι αριθμοί κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν είχαν εύρος από 6×10^4 ως $1,25 \times 10^6$ κύτταρα ml^{-1} . Επιπλέον, τα κύτταρα προστέθηκαν σε χαμηλή ροή ($10 \mu\text{l min}^{-1}$). Η προσθήκη των κυττάρων επηρέασε σημαντικά το πλάτος του ακουστικού κύματος και μάλιστα σε συσχέτιση με τον αριθμό των κυττάρων που προστέθηκε (Εικ. 5.2), ενώ αντίθετα η φάση του κύματος δεν ήταν δυνατό να ξεχωρίσει ανάμεσα σε δείγματα με διαφορετικούς αριθμούς κυττάρων.



Εικ. 5.2. Μεταβολή του πλάτους (amplitude) του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love ως προς το χρόνο κατά την προσθήκη διαφόρων αριθμών κυττάρων στην επιφάνεια με ακινητοποιημένο anti-HLA. t_0) Προσθήκη κυττάρων, t_1) ξέπλυμα με PBS. Αριθμοί κυττάρων: $6,0 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ (\square), $1,2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ (Δ), $1,5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ (\bullet), $2,4 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ (\blacksquare), $3,0 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ (\circ), $6,0 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ (\blacktriangle). (Πηγή: Saitakis et al., 2008)

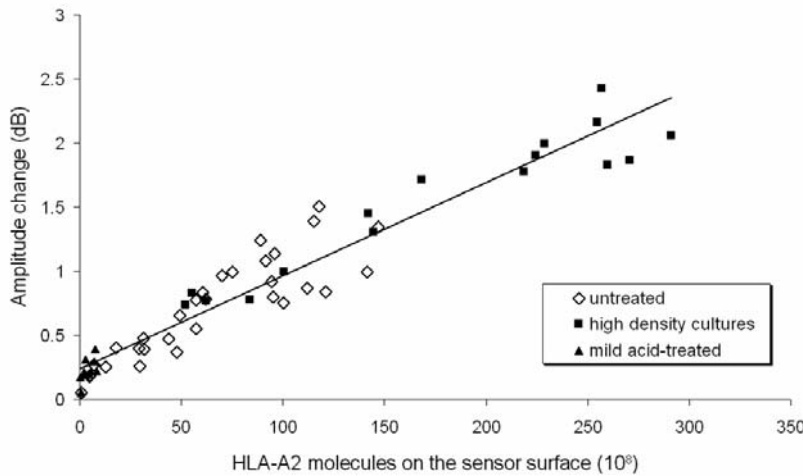
Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά τρεις υποπληθυσμοί των κυττάρων LG2: κανονικά κύτταρα LG2, κύτταρα επωασμένα με ήπιο οξύ και κύτταρα καλλιεργημένα σε υψηλές πυκνότητες. Οι υποπληθυσμοί αυτοί εμφανίζουν διαφορετικό αριθμό HLA μορίων στη κυτταρική μεμβράνη το οποίο μπορεί να αναγνωριστεί από το anti-HLA (βλ. Κεφάλαιο 4 **Πίνακας 4.1**) και χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση της αλλαγής του ακουστικού σήματος ως αποτέλεσμα του σχηματισμού δεσμών ανάμεσα στο κυτταρικό HLA και το ακινητοποιημένο anti-HLA. Οι τρεις αυτοί υποπληθυσμοί κυττάρων LG2 προστέθηκαν στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα σε πραγματικό χρόνο και καταγράφηκε η συνολική αλλαγή πλάτους του ακουστικού κύματος που προκαλούν. Η ισόθερμη καμπύλη, εκφρασμένη ως αλλαγή πλάτους σε θέση ισορροπίας ως προς τον αριθμό των κυττάρων του δείγματος, (**Εικ. 5.3**) δείχνει πως ο ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love μπορεί να ξεχωρίσει δείγματα με διαφορετικό αριθμό κυττάρων του ίδιου υποπληθυσμού αλλά και δείγματα ίδιου αριθμού κυττάρων από διαφορετικό υποπληθυσμό.



Εικ. 5.3. Ισόθερμη καμπύλη για τη μεταβολή του πλάτους του κύματος σε θέση ισορροπίας ως προς τον αριθμό των κυττάρων κάθε δείγματος για τον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love. (Πηγή: Saitakis et al., 2010)

Για να εξηγηθεί η παρατήρηση αυτή χρειάστηκε μικροσκοπική μελέτη της επιφάνειας του αισθητήρα και επεξεργασία των δεδομένων των ακουστικών πειραμάτων. Αυτά έδειξαν ότι αν γίνει αντικατάσταση του αριθμού των κυττάρων στο διάλυμα με τον αριθμό των προσδεμένων στην επιφάνεια κυττάρων για κάθε δείγμα, η ισόθερμη καμπύλη διατηρούσε τη μορφή της Εικ. 5.3. Επιπλέον, για την διερεύνηση της επίδρασης του αριθμού των HLA μορίων στη αλλαγή του πλάτους του ακουστικού κύματος, η ισόθερμη καμπύλη για τον αριθμό των προσκολλημένων κυττάρων μετατράπηκε σε γράφημα της αλλαγής του πλάτους ως προς το συνολικό αριθμό των HLA μορίων που είναι διαθέσιμα για πρόσδεση στο ακινητοποιημένο αντίσωμα (**Εικ. 5.4**). Ο αριθμός αυτός των HLA μορίων προέκυψε για καθένα πείραμα διαφορετικού αριθμού κυττάρων και υποπληθυσμού από τον πολλαπλασιασμό του αριθμού των κυττάρων στην επιφάνεια του αισθητήρα στο τέλος του πειράματος (μετρημένα από παρατήρηση στο μικροσκόπιο) με τον αριθμό των HLA μορίων στην επιφάνεια του κυττάρου (υπολογισμένο από κυτταρομετρία ροής). Το γράφημα αυτό εμφανίζει μια γραμμική σχέση ανάμεσα στην αλλαγή του πλάτους και το συνολικό αριθμό των HLA μορίων διαθέσιμων για πρόσδεση στο ακινητοποιημένο αντίσωμα (και άρα τον αριθμό των δεσμών που δημιουργούνται ανάμεσα σε κύτταρο και επιφάνεια, εφόσον ο αριθμός των μορίων του αντισώματος παραμένει σε όλα τα δείγματα σταθερός). Από το γράφημα αυτό μπορεί να υποστηριχθεί ότι ο σχηματισμός ειδικών δεσμών ανάμεσα σε HLA και

anti-HLA είναι η σημαντική αιτία της ακουστικής απόκρισης και όχι από μόνη της η ακινητοποίηση των κυττάρων στην επιφάνεια.

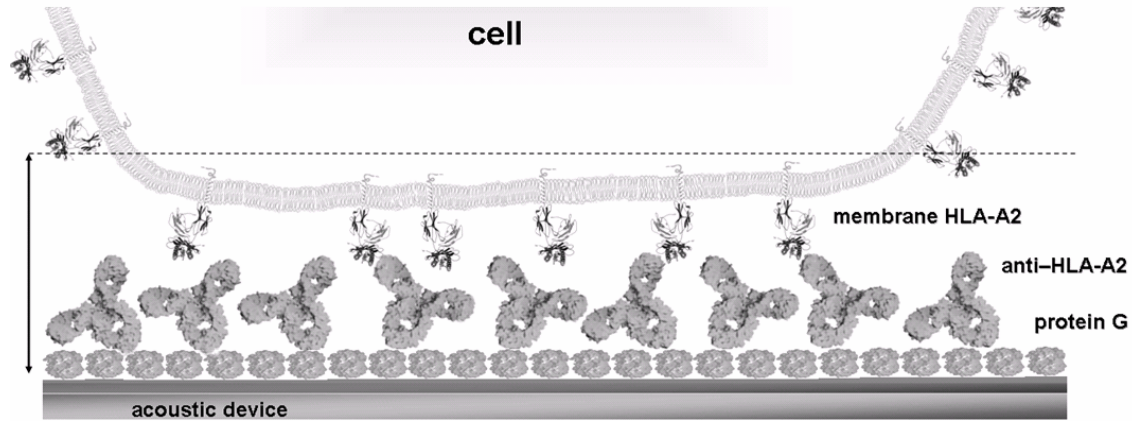


Εικ. 5.4. Αλλαγή του πλάτους του ακουστικού κύματος ως προς το συνολικό αριθμό HLA μορίων που είναι διαθέσιμα για πρόσδεση στο ακινητοποιημένο αντίσωμα για καθένα από τους υποπληθυσμούς των κυττάρων LG2. (Πηγή: Saitakis et al., 2008)

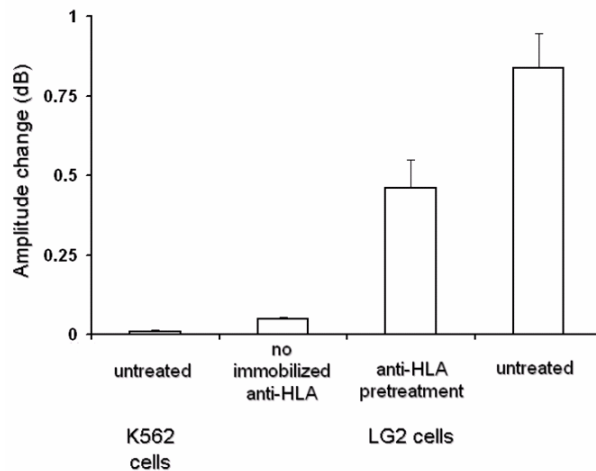
Από τα αποτελέσματα, αυτά μπορούν να εξαχθούν ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Αρχικά, η ισχυρή απόκριση του πλάτους του ακουστικού κύματος μπορεί να εξηγηθεί από την προσεκτική παρατήρηση της διεπιφάνειας κυττάρου και βιοαισθητήρα. Στα παραπάνω πειράματα, πριν την προσθήκη κυττάρων, υπάρχουν ήδη δύο πρωτεϊνικά στρώματα στην επιφάνεια του αισθητήρα, αυτά της πρωτεΐνης G και του anti-HLA αντισώματος. Η πρωτεΐνη G σχηματίζει ένα στρώμα με πάχος 5-10 nm. Τα μονοκλωνικά αντισώματα από ποντικό, όπως το anti-HLA που χρησιμοποιήθηκε, έχουν μήκος¹³ 15 nm. Έπειτα από προσθήκη των κυττάρων, τα HLA μόρια που είναι ενσωματωμένα στην κυτταρική μεμβράνη (πάχους 6-10 nm) αλληλεπιδρούν με το anti-HLA μέσω των εξωκυτταρικών επικρατειών τους, μήκους¹⁴ 7 nm. Λαμβάνοντας υπόψη το βάθος διείσδυσης του ακουστικού βιοαισθητήρα (54 nm για τη συχνότητα λειτουργίας 110 MHz), είναι προφανές ότι σχεδόν το σύνολο της μάζας του κυττάρου (διάμετρος κυττάρου $14,4 \pm 2,2 \mu\text{m}$) βρίσκεται εκτός του όγκου ανίχνευσης του αισθητήρα (Εικ. 5.5). Η ενεργειακή απόσβεση γενικά προκαλείται από την ιξώδη σύζευξη του περιβάλλοντος μέσου στη διεπιφάνεια συσκευής και υγρού καθώς και από τη ροή ενέργειας στα προσκολλημένα κύτταρα μέσω των δεσμών HLA/anti-HLA, η οποία είναι αυτή που ανιχνεύεται από το πλάτος του κύματος. Επομένως, η μεμβράνη των κυττάρων πιθανώς συμπεριφέρεται ως ένας πολύ ικανός αποσβεστήρας ταλαντώσεων προσφέροντας αξιοσημείωτη ευαισθησία στην ανίχνευση δεσμών μεταξύ κυττάρου και επιφάνειας του αισθητήρα. Επίσης, η συνολική μάζα των HLA μορίων ανά κύτταρο παρουσιάζει μια πυκνότητα μάζας $0,6-10 \text{ pg mm}^{-2}$, η οποία είναι πολύ μικρή για να προκαλέσει σημαντική αλλαγή στη φάση του ακουστικού κύματος ώστε αυτή η αλλαγή να μπορεί να ξεχωρίσει ανάμεσα σε διαφορετικά δείγματα. Το τελικό συμπέρασμα από τα παραπάνω είναι ότι η αλλαγή του πλάτους του ακουστικού κύματος εμφανίζει άμεση συσχέτιση με τον αριθμό των δεσμών που σχηματίζονται ανάμεσα στα κύτταρα και την επιφάνεια του αισθητήρα.

Παράλληλα, ελέγχθηκε η ειδικότητα της αλληλεπίδρασης για τα πειράματα με τον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα K562, τα οποία δεν φέρουν HLA μόρια στη μεμβράνη, και κύτταρα LG2 προεπωασμένα με το anti-HLA. Προστιθέμενα στην επιφάνεια με anti-HLA και συγκρινόμενα με τα

κανονικά κύτταρα LG2, η απόκριση του βιοαισθητήρα ήταν μηδενική και μειωμένη αντίστοιχα (Εικ 5.6), όπως θα περίμενε κανείς για μια ειδική αλληλεπίδραση. Επιπλέον, κανονικά κύτταρα LG2 προστέθηκαν σε επιφάνεια αισθητήρα που δεν είχε ακινητοποιημένο αντίσωμα. Η απόκριση του αισθητήρα ήταν ξανά σχεδόν μηδενική (Εικ 5.6). Τα πειράματα αυτά αποδεικνύουν την ειδικότητα του παρατηρούμενου σήματος στο σχηματισμό δεσμών HLA/anti-HLA.



Εικ. 5.5. Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα. Τα μεμβρανικά HLA μόρια των κυττάρων αλληλεπιδρούν με το ακινητοποιημένο anti-HLA. Η γραμμή δείχνει περίπου την περιοχή μέσα στην οποία είναι ευαίσθητος ο ακουστικός βιοαισθητήρας. (Πηγή: Saitakis et al., 2008)



Εικ. 5.6. Η ειδικότητα της αλληλεπίδρασης των κυττάρων με την επιφάνεια του αισθητήρα ελέγχθηκε από τη μεταβολή του πλάτους του κύματος έπειτα από προσθήκη $2,5 \times 10^5$ κυττάρων ml^{-1} . (Πηγή: Saitakis et al., 2008)

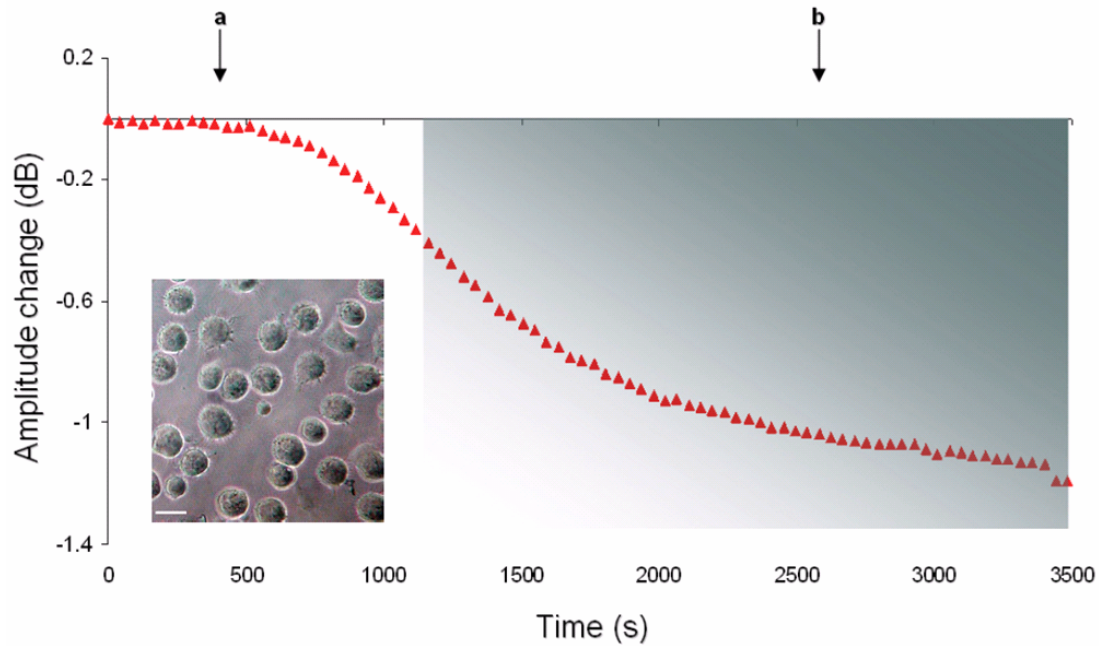
Οι αλληλεπιδράσεις των μεμβρανικών μορίων με ακινητοποιημένους προσδέτες μπορεί να μην εξαρτώνται μόνο από τη μοριακή κινητική και τη συγγένεια εφόσον η πρόσδεση συμβαίνει υπό την επίδραση μιας εξωτερικά επιβαλλόμενης μηχανικής δύναμης¹⁵, όπως στην περίπτωση υψηλών δυνάμεων αποκοπής από την επιφάνεια (εγκάρσιο στρες – shear stress). Σε συνθήκες ροής, η σχετική κίνηση μεταξύ δύο επιφανειών μπορεί να επηρεάζει το αποτέλεσμα των αρχικών αλληλεπιδράσεων¹⁶ αφού οι κυτταρικοί υποδοχείς μπορεί να έχουν υψηλότερη σχετική ταχύτητα σε σχέση με αυτή που θα είχαν ως ελεύθερα μόρια στις ίδιες ροές¹⁷. Επίσης, για την ακινητοποίηση ενός κυττάρου σε μια επιφάνεια απαιτείται ο σχηματισμός ενός κρίσιμου αριθμού δεσμών ανάμεσα στους κυτταρικούς υποδοχείς και τους επιφανειακούς προσδέτες^{17, 18}. Στα ακουστικά

πειράματα με τα κύτταρα LG2, διερευνήθηκαν αρχικά τρεις διαφορετικές ροές: 10, 20 και 50 $\mu\text{l min}^{-1}$. Αυτές οι ροές αντιστοιχούν στους παρακάτω εγκάρσιες ροές (shear rates) μέσα στην κυψελίδα ροής του αισθητήρα τύπου Love^{5, 19}: $3,91 \times 10^{-2}$, $7,81 \times 10^{-2}$, και $19,53 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ αντίστοιχα. Η υψηλότερη απόκριση του αισθητήρα για πρόσδεση των κυττάρων LG2 παρατηρήθηκε για τον εγκάρσιο ρυθμό $3,91 \times 10^{-2}$ (με ρυθμό ροής 10 $\mu\text{l min}^{-1}$) (Πίνακας 5.2). Οι υψηλότεροι εγκάρσιοι ρυθμοί εμφάνισαν μικρότερη απόκριση λόγω πρόσδεσης μικρότερου αριθμού κυττάρων στην επιφάνεια. Επομένως, ο ρυθμός ροής των 10 $\mu\text{l min}^{-1}$ προσφέρει αποτελεσματικότερη μεταφορά των κυττάρων στην επιφάνεια και χρόνο ικανό για την ανάπτυξη αρκετών σταθερών δεσμών ανάμεσα στο κύτταρο και την επιφάνεια που οδηγούν σε κυτταρική πρόσδεση.

Πίνακας 5.2. Επίδραση της ροής ή του εγκάρσιου ρυθμού προσθήκης 2.5×10^5 κυττάρων LG2 ml^{-1} στη μεταβολή του πλάτους του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love και τον αριθμό των κυττάρων που προσδένονται στην επιφάνεια.

Ροή (flow rate) ($\mu\text{l min}^{-1}$)	Εγκάρσια ροή (shear rate) (s^{-1})	Μεταβολή του πλάτους (dB) από την προσθήκη 2.5×10^5 κυττάρων ml^{-1}	Κύτταρα LG2 που προσδένονται στην επιφάνεια του αισθητήρα [†] (κύτταρα mm^{-2})
10	3.91×10^{-2}	0.988 ± 0.215	1497 ± 398
25	7.81×10^{-2}	0.445 ± 0.059	912 ± 298
50	19.53×10^{-2}	0.179 ± 0.08	172 ± 88

Η αλληλεπίδραση των κυττάρων LG2 με το anti-HLA στην επιφάνεια του αισθητήρα εμφανίζει ένα τύπο σιγμοειδούς απόκρισης (Εικ. 5.7), όπως εμφανίζεται από την παρακολούθηση της αλλαγής του πλάτους του ακουστικού κύματος σε πραγματικό χρόνο. Γενικά, τα κύτταρα σε συνθήκες υψηλής επιφανειακής συγκέντρωσης προσδέτη και απουσίας πρωτεϊνών του ορού αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια και απλώνουν ισοτροπικά^{20, 21}. Στα ακουστικά πειράματα, η επιφανειακή συγκέντρωση του anti-HLA είναι υψηλή και τα πειράματα πραγματοποιούνται σε απλό διάλυμα PBS. Επομένως, τα κύτταρα LG2 έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια του αισθητήρα μέσω μικρών προβολών των κυττάρων (micronilli) και αρχικές επαφές πραγματοποιούνται μεταξύ των μεμβρανικών HLA μορίων και των ακινητοποιημένων anti-HLA στις άκρες των προβολών αυτών. Στα πρώτα λεπτά της αλληλεπίδρασης, τα κύτταρα θα σχηματίσουν μια μεγάλη κυκλική περιοχή επαφής²², η οποία θα είναι ασυνεχής, δηλαδή θα αποτελείται από χωρικά διακριτά σημεία επαφής, τις άκρες των κυτταρικών προβολών. Έπειτα από αυτήν την αρχική φάση αλληλεπίδρασης που συμβαίνει στα πρώτα περίπου 500 s, η αλλαγή σήματος που παρατηρείται οφείλεται σε σχηματισμό νέων δεσμών HLA/anti-HLA ως αποτέλεσμα του απλώματος των κυτταρικών προβολών και της πλευρικής διάχυσης των μεμβρανικών HLA μορίων στην περιοχή επαφής. Με την πάροδο χρόνου, οι κυτταρικές προβολές θα απλωθούν για να σχηματίσουν μια επίπεδη περιοχή επαφής^{23, 24}. Η μικροσκοπική παρατήρηση της επιφάνειας του αισθητήρα εμφάνισε τα κύτταρα να διατηρούν το σφαιρικό τους σχήμα και να εμφανίζουν περιορισμένο άπλωμα, μεσολαβούμενο από κοντά φιλοπόδια (Εικ. 5.7).



Εικ. 5.7. Μεταβολή του πλάτους του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love ως προς το χρόνο κατά την προσθήκη και αλληλεπίδραση κυττάρων LG2 στο ακινητοποιημένο anti-HLA. Η καμπύλη πρόσδεσης χωρίζεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη (πρώτα περίπου 500 s) αντιστοιχεί στο χρόνο που χρειάζεται για τα κύτταρα να φτάσουν στην επιφάνεια και να δημιουργήσουν τους αρχικούς δεσμούς. Η δεύτερη φάση (ορθογώνιο) αντιστοιχεί στο σχηματισμό δεσμών HLA/anti-HLA μεταξύ κυττάρου και υποστρώματος. a) Προσθήκη κυττάρων ($2,5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$), b) ξέπλυμα με PBS.

2. Ακουστικός βιοαισθητήρας QCM-D

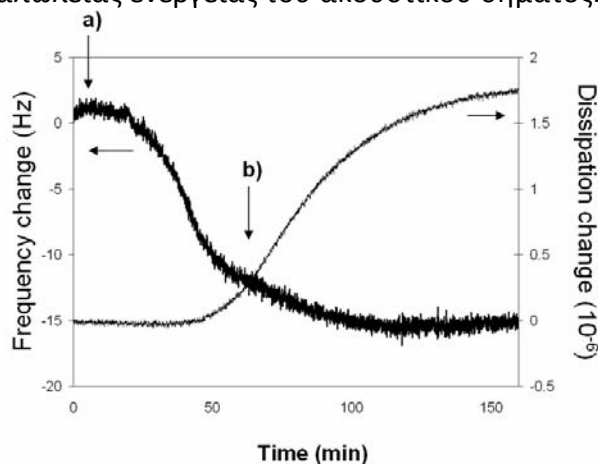
2.1. Προετοιμασία επιφάνειας βιοαναγνώρισης

Η προετοιμασία της επιφάνειας του αισθητήρα QCM-D έγινε ως ανωτέρω (βλ. §1.1), δηλαδή έγινε προεπώαση της επιφάνειας χρυσού με διάλυμα πρωτεΐνης G, η συσκευή του βιοαισθητήρα προστέθηκε στην ειδική θήκη και το anti-HLA προστέθηκε κατόπιν σε πραγματικό χρόνο. Στα πειράματα με τον αισθητήρα QCM-D, χρησιμοποιήθηκε η έβδομη ταλάντωση του κρυστάλλου, η οποία συμβαίνει στα 35 MHz και εμφανίζει τη μεγαλύτερη ευαισθησία. Η αλλαγή της συχνότητας για την πρόσδεση του anti-HLA στη επιφάνεια με πρωτεΐνη G ήταν $333 \pm 28 \text{ Hz}$ ενώ η απώλεια ενέργειας παρέμεινε πρακτικά αμετάβλητη. Η ακουστική αναλογία επομένως ήταν $\Delta D/\Delta F \approx 0$. Το αποτέλεσμα αυτό προτείνει ότι ένα άκαμπτο στρώμα έχει εναποτεθεί στην επιφάνεια του αισθητήρα, κάτι που είναι σε συμφωνία με το αποτέλεσμα από τον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love. Επιπλέον, στον αισθητήρα QCM-D μπορεί να εφαρμοστεί η τροποποιημένη εξίσωση του Sauerbrey (βλ. Κεφάλαιο 3 §2). Με την εξίσωση αυτή μπορεί να υπολογιστεί η μάζα που εναποτίθεται στην επιφάνεια του αισθητήρα. Επομένως, χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της προσδεμένης μάζας του anti-HLA στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα: $1,2 \text{ ng mm}^{-2}$. Η τιμή αυτή είναι σε καλή συμφωνία με την τιμή για την εναπόθεση μάζας του anti-HLA που υπολογίστηκε από τον οπτικό βιοαισθητήρα SPR (βλ. §3.1).

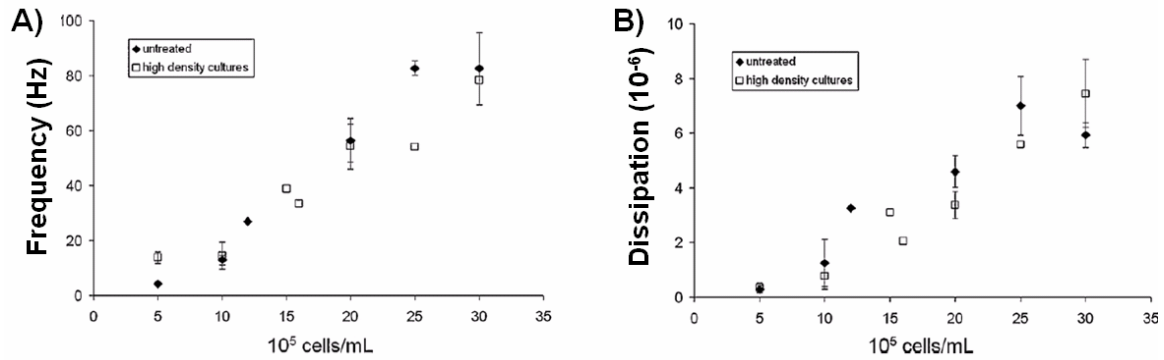
2.2. Αλληλεπίδραση κυττάρων με την επιφάνεια του βιοαισθητήρα

Ακουστικοί βιοαισθητήρες τύπου QCM έχουν χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες δυναμικών κυτταρικών διαδικασιών^{10, 12, 25-29}. Στις μελέτες αυτές το σήμα του αισθητήρα (συνήθως η συχνότητα του ακουστικού κύματος) βρέθηκε να εξαρτάται από την έκταση της πρόσδεσης των κυττάρων μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην επιφάνεια των κυττάρων και στην επιφάνεια του αισθητήρα, από την απόσταση ανάμεσα στην κυτταρική μεμβράνη και την επιφάνεια καθώς και την κατάσταση του κυτταροσκελετού. Η πρόσδεση των κυττάρων δείχθηκε να προκαλεί αυξημένη απώλεια ενέργειας του ακουστικού κύματος^{8, 9}. Παρόλα αυτά, παραμένει ακόμα άγνωστο κατά πόσο και με ποιόν τρόπο συνεισφέρει στην αλλαγή του ακουστικού κύματος κάθε μεταβλητή, λόγου χάρη ο τύπος, το μέγεθος και η φυσιολογία των κυττάρων, τα μεμβρανικά μόρια και οι τροποποιήσεις της επιφάνειας³⁰.

Επομένως, όπως και παραπάνω με τον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love, πραγματοποιήθηκαν ακουστικά πειράματα σε πραγματικό χρόνο με τα κύτταρα LG2 πάνω στην επιφάνεια του αισθητήρα με ακινητοποιημένο anti-HLA. Οι αριθμοί κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν είχαν εύρος από 5×10^5 ως 3×10^6 κύτταρα ml^{-1} και τα κύτταρα προστέθηκαν σε χαμηλή ροή (10 ml min^{-1}). Η αλλαγή στη συχνότητα και την απώλεια ενέργειας του ακουστικού κύματος (**Εικ. 5.8**) εμφάνισαν, όπως και στην περίπτωση του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love, σιγμοειδή απόκριση ως προς το χρόνο. Εκτός από κανονικά κύτταρα LG2, χρησιμοποιήθηκαν επίσης κύτταρα LG2 από καλλιέργειες υψηλής πυκνότητας. Οι ισόθερμες καμπύλες ως προς τον αριθμό των κυττάρων κάθε δείγματος για τη συχνότητα (**Εικ. 5.9A**) και την ενεργειακή απώλεια (**Εικ. 5.9B**) έδειξαν την ευαισθησία του βιοαισθητήρα στον αριθμό των κυττάρων κάθε δείγματος αλλά όχι και στον υποπληθυσμό κυττάρων, δηλαδή στον αριθμό HLA μορίων στην επιφάνεια των κυττάρων. Αυτή η απόκριση είναι διαφορετική από ότι η αντίστοιχη του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love, ο οποίος μπόρεσε και ξεχώρισε τα δείγματα των κυττάρων με βάση είτε τον αριθμό των κυττάρων είτε τον αριθμό των μεμβρανικών HLA μορίων αλλά μόνο μέσω της απώλειας ενέργειας του ακουστικού σήματος.



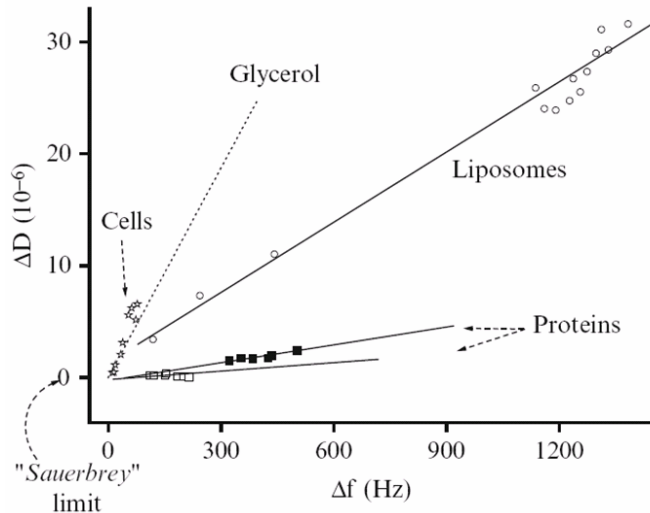
Εικ. 5.8. Μεταβολή της συχνότητας (frequency) και της ενεργειακής απώλειας (dissipation) στα 35 MHz του ακουστικού βιοαισθητήρα QCM-D ως προς το χρόνο κατά την προσθήκη και αλληλεπίδραση κυττάρων LG2 στο ακινητοποιημένο anti-HLA. a) Προσθήκη κυττάρων (10^6 ml^{-1}), b) ξέπλυμα με PBS.



Εικ. 5.9. Ισόθερμες καμπύλες για τη μεταβολή της συχνότητας και της ενεργειακής απώλειας σε θέση ισορροπίας του ακουστικού βιοαισθητήρα QCM-D (35 MHz) ως προς τον αριθμό των κυττάρων κάθε δείγματος. (Πηγή: Saitakis et al., 2010)

Για την εξήγηση των παραπάνω παρατηρήσεων, χρειάζεται να εξεταστούν οι διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν το ακουστικό σήμα. Όπως έχει αναφερθεί, μεταβολές στη συχνότητα του κύματος για τον αισθητήρα QCM-D φανερώνουν αλλαγές στην προσδεμένη μάζα (σε αντιστοιχία με τη φάση του κύματος του αισθητήρα τύπου Love), ενώ μεταβολές στην απώλεια ενέργειας του κύματος (σε αντιστοιχία με το πλάτος του κύματος) φανερώνουν την απορρόφηση ενέργειας που λαμβάνει χώρα στο στρώμα της διεπιφάνειας. Ένας πιθανός λόγος για τις παρατηρούμενες διαφορές ανάμεσα στα δύο αυτά συστήματα βιοαισθητήρα θα μπορούσε να είναι οι διαφορές στην τραχύτητα των επιφανειών ή διαφορές στην πειραματική διαδικασία. Ένας τρόπος να ελεγχθούν οι μηχανικές ιδιότητες των προσδεμένων κυττάρων είναι μέσω της σύγκρισης των ακουστικών αναλογιών $\Delta A/\Delta Ph$ για τον αισθητήρα τύπου Love και $\Delta D/\Delta F$ για τον αισθητήρα QCM-D. Έχει δειχθεί ότι οι δύο αναλογίες, που αντιπροσωπεύουν την ενεργειακή απώλεια ανά μονάδα προσδεμένης μάζας, προσφέρουν ποιοτική και ποσοτική πληροφορία για τις εγγενείς ιδιότητες και τη μορφολογία της διεπιφάνειας^{6, 7, 31, 32}. Οι αναλογίες για τα προσδεμένα κύτταρα LG2 στην επιφάνεια ήταν $\Delta D/\Delta F=0,083\pm 0,028$ ($10^{-6}/\text{Hz}$) για τον αισθητήρα QCM-D και $\Delta A/\Delta Ph=0,444\pm 0,198$ (dB/deg) για τον αισθητήρα τύπου Love. Παρόλο που δεν μπορεί να γίνει άμεση σύγκριση των αναλογιών αυτών, οι δύο τιμές αυτές είναι περίπου 16 φορές μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες αναλογίες που προκύπτουν για την προσρόφηση πρωτεϊνών σε χρυσό. Αυτό δείχνει ότι και στις δύο περιπτώσεις το στρώμα των προσδεμένων κυττάρων εμφανίζει τις ίδιες μηχανικές ιδιότητες, το οποίο είναι μια «μαλακή» δομή που προκαλεί μεγάλη απώλεια ενέργειας, σε αντίθεση με την σχεδόν καθαρά ελαστική συμπεριφορά των πρωτεϊνών³³. Επίσης, η ακουστική αναλογία των προσδεμένων κυττάρων είναι παρόμοια με αυτήν που προκύπτει από την προσθήκη διαλυμάτων γλυκερόλης στην επιφάνεια (Εικ. 5.10), κάτι που προτείνει μια σχεδόν πλήρως ιξώδη συμπεριφορά.

Ένας δεύτερος πιθανός λόγος για τις διαφορές στην απόκριση των δύο ακουστικών βιοαισθητήρων μπορεί να είναι η διαφορά στην συχνότητα λειτουργίας. Ο αισθητήρας QCM-D έχει συχνότητα λειτουργίας 35 MHz και βάθος διείσδυσης 95 nm στο καθαρό νερό. Ο αισθητήρας τύπου Love έχει συχνότητα λειτουργίας 110 MHz και βάθος διείσδυσης 54 nm. Το βάθος διείσδυσης εξαρτάται από τη συχνότητα λειτουργίας και αποτελεί την περιοχή όπου οι αισθητήρες είναι ευαίσθητοι σε πρόσδεση μάζας και αλλαγές της ιξωδοελαστικότητας. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το βάθος διείσδυσης του αισθητήρα τύπου Love



Εικ. 5.10. Διάγραμμα μεταβολής ενεργειακής απώλειας (ΔD) ως προς τη μεταβολή της συχνότητας (Δf) για διάφορα συστήματα πάνω στον ακουστικό βιοαισθητήρα QCM-D. Διακρίνεται η ιξωδοελαστική συμπεριφορά κάθε συστήματος: κύτταρα, γλυκερόλη, λιποσώματα και πρωτεΐνες. (Πηγή: Melzak et al., 2009)

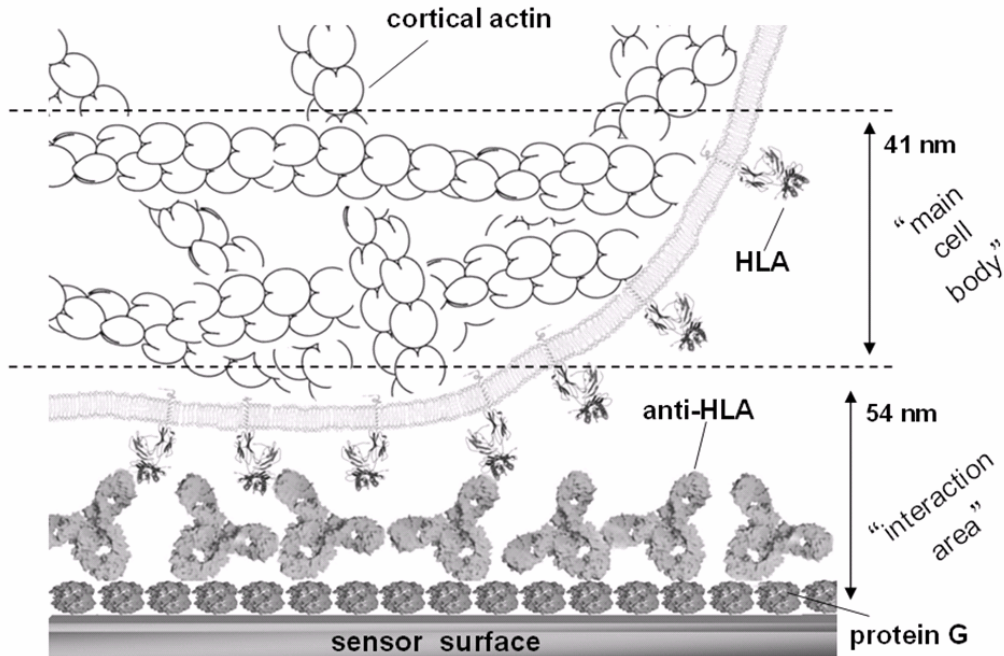
συμπίπτει με την απόσταση στην οποία συμβαίνει η αλληλεπίδραση του κυττάρου με την επιφάνεια. Στην περίπτωση του αισθητήρα QCM-D, το βάθος διείσδυσης είναι σχεδόν διπλάσιο και ανιχνεύει ένα μεγαλύτερο κομμάτι της κυτταρικής μάζας (Εικ. 5.11). Αυτό παρατηρείται από την ικανότητα του αισθητήρα QCM-D για ανίχνευση και διαχωρισμό των κυτταρικών δειγμάτων με τη συχνότητα του κύματος που είναι ευαίσθητη στην κυτταρική μάζα (Εικ. 5.9A). Παρόλα αυτά, η συχνότητα του ακουστικού κύματος δε μπορεί να ξεχωρίσει τον τύπο των προσδεμένων κυττάρων εξαιτίας της μικρής μεταβολής της μάζας στην κυτταρική μεμβράνη από τις διαφορές του αριθμού των μεμβρανικών HLA μορίων για κάθε υποπληθυσμό κυττάρων. Παρομοίως για την απώλεια ενέργειας, η παρουσία της μάζας του κυττάρου και η συνεισφορά της μαζί με του περιβάλλοντος μέσου στην απορρόφηση ενέργειας από το ακουστικό κύμα έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ικανότητα του αισθητήρα QCM-D να ξεχωρίσει ανάμεσα στους διαφορετικούς κυτταρικούς υποπληθυσμούς.

3. Οπτικός βιοαισθητήρας SPR

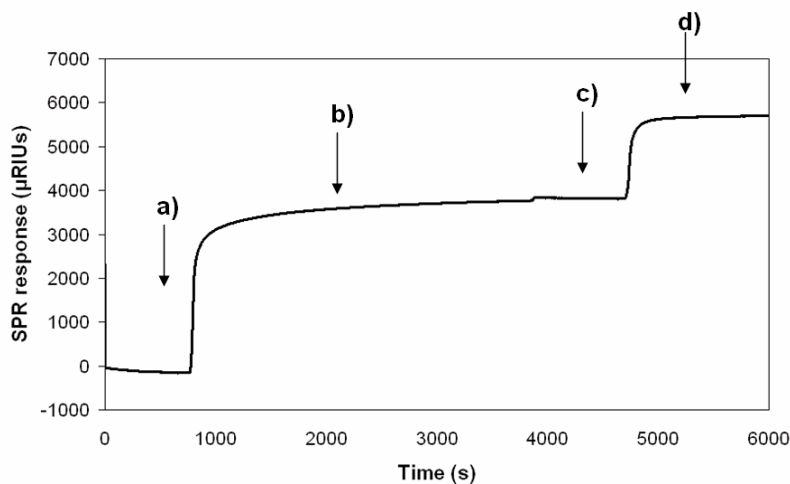
3.1. Προετοιμασία επιφάνειας βιοαναγνώρισης

Η προετοιμασία της επιφάνειας του οπτικού αισθητήρα SPR έγινε με παρόμοια διαδικασία όπως για τους ακουστικούς βιοαισθητήρες. Διάλυμα πρωτεΐνης G προστέθηκε στην επιφάνεια χρυσού σε πραγματικό χρόνο και ακολούθησε η εναπόθεση του anti-HLA (Εικ. 5.12). Η αλλαγή σήματος για εναπόθεση πρωτεΐνης στην επιφάνεια μπορεί να μετατραπεί σε μονάδες προσδεμένης μάζας της πρωτεΐνης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επομένως, η δεσμευμένη μάζα της προσροφημένης πρωτεΐνης G ήταν $2,19 \text{ ng mm}^{-2}$. Για το anti-HLA, προστέθηκαν στην επιφάνεια διάφορες συγκεντρώσεις. Η συγκέντρωση $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ έδειξε πρόσδεση μάζας $1,46 \text{ ng mm}^{-2}$ που αντιστοιχεί σε επιφανειακή συγκέντρωση $5,9 \pm 1,9 \times 10^3$ μόρια μm^{-2} (Πινάκας 5.1) Λαμβάνοντας υπόψη τις διαστάσεις του συγκεκριμένου υποτύπου IgG που ανήκει το anti-HLA^{13, 34} και το εμβαδόν της επιφάνειας του βιοαισθητήρα SPR (12 mm^2), υπολογίστηκε ότι η μέση απόσταση των anti-HLA μορίων στην επιφάνεια είναι 15 nm. Αυτό σημαίνει

ότι τα μόρια του αντισώματος είναι στενά πακεταρισμένα στην επιφάνεια του αισθητήρα. Τέτοιο στενό πακετάρισμα εμποδίζει το σχηματισμό μη ειδικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε πρωτεΐνες της επιφάνειας των κυττάρων και το στρώμα της πρωτεΐνης G.



Εικ. 5.11. Σχηματική απεικόνιση της επιφάνειας βιοαναγνώρισης. Τα HLA μόρια στη μεμβράνη των κυττάρων αλληλεπιδρούν με το ακινητοποιημένο anti-HLA. Διακρίνεται το υπομεμβρανικό πλέγμα της ακτίνης μέσα στα κύτταρα. Οι γραμμές υποδεικνύουν το βάθος διείσδυσης των δύο ακουστικών αισθητήρων: 54 nm είναι το βάθος διείσδυσης για τον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love και 95 nm για τον QCM-D. (Πηγή: Saitakis et al., 2010)



Εικ. 5.12. Μεταβολή της απόκρισης του οπτικού βιοαισθητήρα SPR ως προς το χρόνο κατά την προετοιμασία της επιφάνειας βιοαναγνώρισης. a) Προσθήκη πρωτεΐνης G (1 mg ml^{-1}), b) ξέπλυμα με PBS, c) προσθήκη anti-HLA ($0,2 \text{ mg ml}^{-1}$), d) ξέπλυμα με PBS.

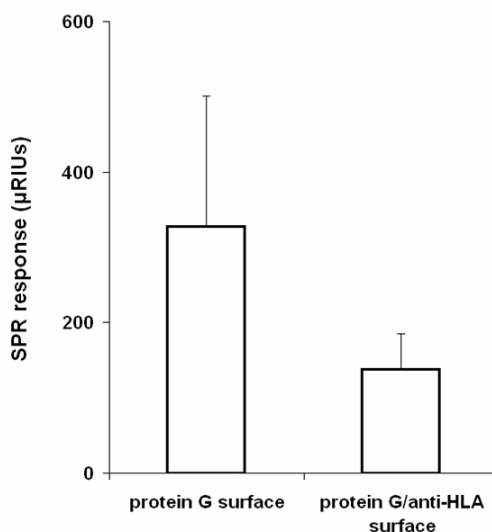
3.2. Αλληλεπίδραση κυττάρων με την επιφάνεια του βιοαισθητήρα

Οι οπτικοί βιοαισθητήρες SPR χρησιμοποιούνται κυρίως στον υπολογισμό κινητικών σταθερών και σταθερών συγγένειας για αλληλεπιδράσεις βιομορίων³⁵. Γενικά, οι οπτικοί βιοαισθητήρες θεωρούνται λιγότερο ευαίσθητοι σε ειδικές

αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν παρουσία οργανικών διαλυτών ή σε ανεπεξέργαστα δείγματα³⁶ (λόγου χάρη δείγματα αίματος) εν συγκρίσει με ακουστικούς βιοαισθητήρες. Αυτό συμβαίνει γιατί οποιοδήποτε μόριο εμφανίζεται μέσα στο αποσβένον πεδίο του αισθητήρα ανιχνεύεται μέσω της αλλαγής που προκαλεί στο δείκτη διάθλασης της διεπιφάνειας³⁶. Μια τέτοια απόκριση θεωρείται ως μειονέκτημα όταν κανείς αναφέρεται σε ανίχνευση κυττάρων, αφού απλά η παρουσία του όγκου της κυτταρικής μάζας μέσα στο αποσβένον πεδίο θα μπορούσε να προκαλέσει αλλαγή σήματος ανεξαρτήτως ειδικής ή μη ειδικής πρόσδεσης.

Κύτταρα LG2 προστέθηκαν σε αριθμό 5×10^5 ανά ml και υπό ροή $10 \mu\text{l min}^{-1}$ στην επιφάνεια του οπτικού βιοαισθητήρα SPR που είχε ακινητοποιηθεί anti-HLA. Ως πείραμα αρνητικού μάρτυρα, κύτταρα LG2 προστέθηκαν σε επιφάνεια χωρίς anti-HLA. Η αλλαγή στο δείκτη διάθλασης για τον αρνητικό μάρτυρα ήταν πάνω από 100% μεγαλύτερη από ότι για το κανονικό πείραμα (Εικ. 5.13). Επομένως, ο αισθητήρας SPR δεν μπορεί να ξεχωρίσει ανάμεσα σε ειδικές και μη ειδικές αλληλεπιδράσεις για το σύστημα μοντέλο του μεμβρανικού HLA και του ακινητοποιημένου anti-HLA, σε αντίθεση με τους ακουστικούς βιοαισθητήρες που χρησιμοποιήθηκαν παραπάνω.

Το αποτέλεσμα αυτό σημαίνει ότι ο αισθητήρας δεν μπόρεσε να ανιχνεύσει τις μοριακές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε κύτταρο και επιφάνεια. Ο λόγος για αυτό θα μπορούσε να είναι η αλλαγή του σήματος ως απόκριση στην παρουσία της μάζας του κυττάρου στο αποσβένον πεδίο αντί στο σχηματισμό δεσμών ανάμεσα στο κύτταρο και την επιφάνεια, εφόσον οι αισθητήρες SPR ανιχνεύουν κυρίως αλλαγές σε μάζα. Επίσης, το αποσβένον πεδίο για τους αισθητήρες SPR είναι της τάξης των 300 nm με $1 \mu\text{m}$, αρκετά μεγαλύτερο από ότι για ακουστικούς αισθητήρες, οπότε ανιχνεύεται συγκριτικά μεγαλύτερο κομμάτι της μάζας του κυττάρου. Γενικά, οι οπτικοί βιοαισθητήρες δεν έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τη μελέτη επιφανειακών αλληλεπιδράσεων ζωικών κυττάρων εξαιτίας, προφανώς, της αδυναμίας τους να ξεχωρίσουν ανάμεσα στην απλή παρουσία και την πρόσδεση μάζας. Αντίθετα, έχουν περισσότερο εφαρμοστεί για την ανίχνευση της απόκρισης κυτταρικών στρωμάτων σε διαλυτούς παράγοντες³⁷⁻³⁹.

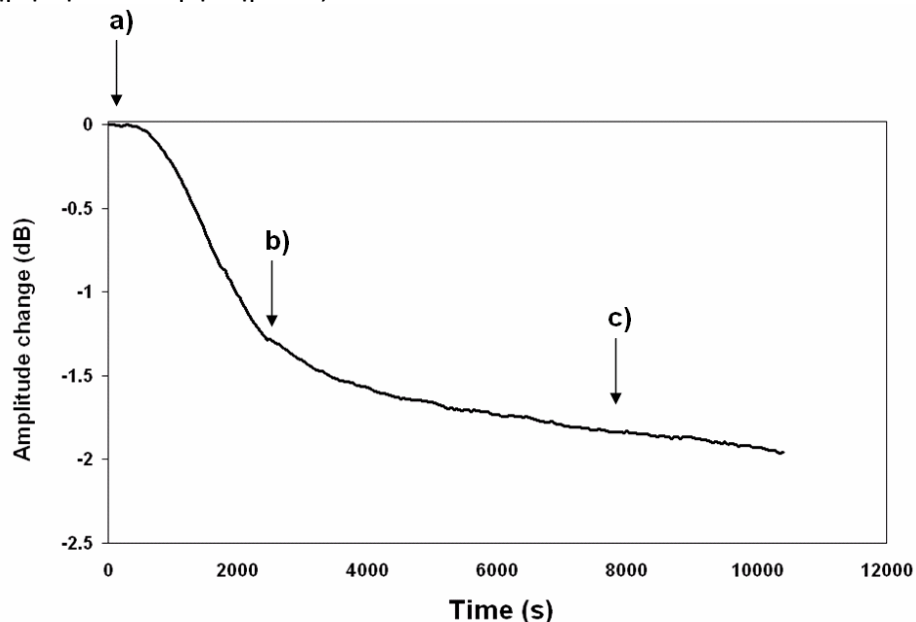


Εικ. 5.13. Απόκριση του βιοαισθητήρα SPR στην προσθήκη κυττάρων LG2 σε επιφάνεια χωρίς (protein G surface) ή με anti-HLA (protein G/anti-HLA surface).

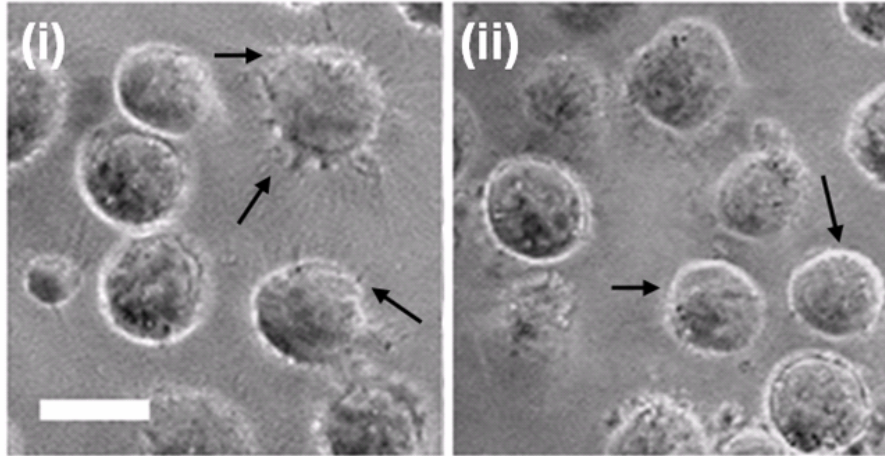
4. Επίδραση του κυτταροσκελετού στην αλληλεπίδραση των κυττάρων με την επιφάνεια του βιοαισθητήρα

Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης σχηματίζει ένα εκτεταμένο και πυκνό στρώμα από μικροϊνίδια ακτίνης κάτω από την κυτταρική μεμβράνη⁴⁰ το οποίο καθοδηγεί τοπολογικές ανακατατάξεις της κυτταρικής μεμβράνης, όπως ο σχηματισμός της περιοχής επαφής με μια επιφάνεια²⁴. Για την διερεύνηση της επίδρασης του κυτταροσκελετού στην αλληλεπίδραση των κυττάρων με την επιφάνεια των ακουστικών βιοαισθητήρων τύπου Love και QCM-D, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στα οποία προστέθηκε η ουσία κυτοχάλασίνη D (CytD). Η CytD διαταράσσει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω της παρεμπόδισης του πολυμερισμού της ακτίνης σε ινίδια^{41, 42}. Η CytD προστέθηκε (5 μM παρουσία 0,05% DMSO για 1 h) σε πραγματικό χρόνο πάνω σε στρώμα κυττάρων LG2 το οποίο είχε προσδεθεί σε επιφάνεια βιοαισθητήρα με ακινητοποιημένο anti-HLA. Για πείραμα αρνητικού μάρτυρα, απλά προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα DMSO (0,05%), διαλύτη της CytD.

Για τον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love, η προσθήκη της CytD δεν προκάλεσε αλλαγή στη φάση και το πλάτος του ακουστικού κύματος (**Εικ. 5.14**). Η παρατήρηση της επιφάνειας στο μικροσκόπιο όμως έδειξε ότι τα κύτταρα που επώαστηκαν με CytD έχασαν την κανονική μορφή προσκόλλησης και εμφανίστηκαν λεία και σφαιρικά χωρίς κυτταρικές προβολές (**Εικ. 5.15**), οι οποίες διατηρούνται από το υπομεμβρανικό πλέγμα των ινιδίων ακτίνης. Επομένως, παρά την διατάραξη του κυτταροσκελετού στα κύτταρα LG2 στην επιφάνεια του αισθητήρα, δεν παρατηρήθηκε αλλαγή σήματος.

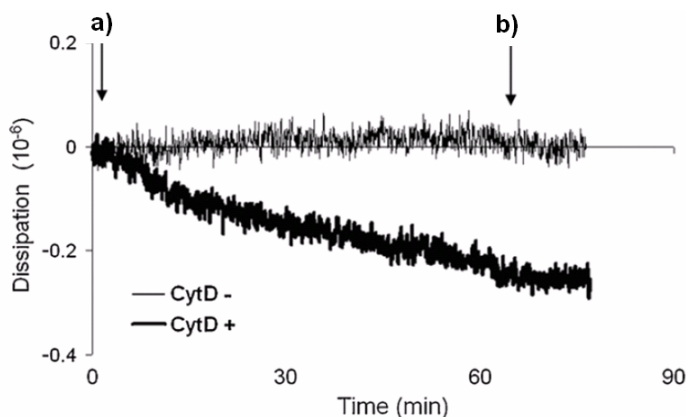


Εικ. 5.14. Επίδραση της CytD σε πείραμα πραγματικού χρόνου στον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love. Η προσθήκη CytD δεν επηρεάζει το πλάτος του κύματος κατά την αλληλεπίδραση των κυττάρων LG2 με το ακινητοποιημένο anti-HLA. a) Προσθήκη κυττάρων ($3 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$), b) ξέπλυμα με PBS-CytD 5 μM , c) ξέπλυμα με PBS.



Εικ. 5.15. Μικροσκοπικές φωτογραφίες κυττάρων LG2 στην επιφάνεια του αισθητήρα τύπου Lohne μετά το τέλος του πειράματος στο οποίο τα κύτταρα ξεπλύθηκαν στην επιφάνεια με i) PBS ή ii) PBS-CytD 5 μM . Οι κυτταρικές προβολές (μαύρα βέλη στο i) εξαφανίζονται με την επίδραση της CytD (μαύρα βέλη στο ii). (γραμμή κλίμακας 15 μm) (Πηγή: Saitakis et al., 2010)

Στον ακουστικό βιοαισθητήρα QCM-D, η προσθήκη CytD σε πραγματικό χρόνο οδήγησε μία σταθερή μικρή πτώση στην ενεργειακή απώλεια του κύματος η οποία διατηρήθηκε μετά την ανταλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος (Εικ. 5.16) σε αντίθεση με την προσθήκη του DMSO που προκάλεσε μια μικρή αλλά αναστρέψιμη μεταβολή. Η συχνότητα μεταβλήθηκε ελάχιστα αλλά μη αναστρέψιμα. Τα κύτταρα LG2 παρατηρήθηκαν μετά το τέλος του πειράματος σε μικροσκόπιο φθορισμού έπειτα από μονιμοποίηση και χρώση με φαλλοϊδίνη συζευγμένη με ροδαμίνη. Οι κυτταρικές προβολές και το υπομεμβρανικό πλέγμα των ινιδίων ακτίνης εμφανίστηκαν φυσιολογικά ακόμα και έπειτα από την επώαση απλά με DMSO. Η επώαση με την CytD, αντίθετα, προκάλεσε στα κύτταρα αποδιοργανωμένες κυτταρικές προβολές και συσσωματώματα ινιδίων ακτίνης (βλ. Κεφάλαιο 4 §5 και Εικ. 4.7).



Εικ. 5.16. Επίδραση της CytD σε πείραμα πραγματικού χρόνου στον ακουστικό βιοαισθητήρα QCM-D. Η προσθήκη CytD επηρεάζει την ενεργειακή απώλεια του κύματος ($-0,38 \pm 0,1 \cdot 10^{-6}$) ενός στρώματος κυττάρων LG2 ($1,5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) πάνω από το ακινητοποιημένο anti-HLA. a) Προσθήκη PBS-CytD 5 μM , b) ξέπλυμα με PBS. (Πηγή: Saitakis et al., 2010)

Ο ακουστικός βιοαισθητήρας QCM-D ήταν ο μόνος από τους δύο αισθητήρες που ανίχνευσε τις αλλαγές στον κυτταροσκελετό που προκάλεσε η επίδραση με CytD, κυρίως ως αλλαγή στην ενεργειακή απώλεια του ακουστικού σήματος. Η αλλαγή στην ενεργειακή απώλεια είναι σύμφωνη και με παρόμοια πειράματα

επίδρασης CytD σε προσδεμένα στρώματα κυττάρων και έχει αποδοθεί σε μικρότερη ακαμψία των κυττάρων ως αποτέλεσμα της παρεμπόδισης του πολυμερισμού της ακτίνης^{12, 26}. Επιπλέον, το βάθος διείσδυσης των 95 nm πιθανώς επέτρεψε στον ακουστικό βιοαισθητήρα QCM-D την ανίχνευση της διατάραξης του υπομεμβρανικού πλέγματος της ακτίνης από την CytD (Εικ. 5.11). Αντίθετα, το βάθος διείσδυσης των 54 nm του ακουστικού αισθητήρα τύπου Love ήταν προφανώς πολύ μικρό για να περιέχει και να ανιχνεύσει τη διατάραξη του κυτταροσκελετού.

5. Συμπεράσματα

Διαφορετικά συστήματα βιοαισθητήρων χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και μελέτη της αλληλεπίδρασης ενός μεμβρανικού υποδοχέα, HLA στην επιφάνεια του κυττάρου, με τον ακινητοποιημένο προσδέτη του, anti-HLA στην επιφάνεια του αισθητήρα. Τα τρία συστήματα βιοαισθητήρων εμφάνισαν διαφορετικές αποκρίσεις. Οι δύο ακουστικοί βιοαισθητήρες ανίχνευσαν τη μοριακή αλληλεπίδραση, σε αντίθεση με τον οπτικό βιοαισθητήρα. Συγκεκριμένα, ο αισθητήρας QCM-D και ο αισθητήρας τύπου Love αποκρίθηκαν σε δείγματα με κύτταρα με βάση τον αριθμό των κυττάρων κάθε δείγματος. Οι ακουστικοί αισθητήρες εμφάνισαν όμως και διαφορές στη μεταξύ τους απόκριση. Η αλλαγή στην αριθμό των HLA μορίων ανά κύτταρο ανιχνεύθηκε μόνο από τον αισθητήρα τύπου Love, ενώ η διατάραξη του κυτταροσκελετού της ακτίνης από CytD ανιχνεύθηκε μόνο από τον αισθητήρα QCM-D. Τα παραπάνω δείχνουν ότι οι ακουστικοί βιοαισθητήρες μπορούν να αποτελέσουν σημαντικά εργαλεία στη μελέτη διαδικασιών της βιολογίας του κυττάρου. Η χρήση τους με συμπληρωματικό τρόπο μπορεί να δώσει νέα και σημαντική πληροφορία για διάφορα κυτταρικά φαινόμενα όπου παίζουν ρόλο η πρόσδεση μεταξύ κυττάρου και επιφάνειας, καθώς και η συγγένεια, η έκταση και η ημιζωή αυτών των αλληλεπιδράσεων.

6. Βιβλιογραφία

1. Cooper, M.A. Advances in membrane receptor screening and analysis. *J Mol Recognit* **17**, 286-315 (2004).
2. Fang, Y., Ferrie, A.M., Fontaine, N.H., Mauro, J. & Balakrishnan, J. Resonant waveguide grating biosensor for living cell sensing. *Biophysical journal* **91**, 1925-1940 (2006).
3. Ballantine, D.S. *et al. Acoustic Wave Sensors*. (Academic Press, San Diego; 1997).
4. Fahnstock, S.R., Alexander, P., Nagle, J. & Filpula, D. Gene for an immunoglobulin-binding protein from a group G streptococcus. *J Bacteriol* **167**, 870-880 (1986).
5. Saha, K., Bender, F. & Gizeli, E. Comparative study of IgG binding to proteins G and A: nonequilibrium kinetic and binding constant determination with the acoustic waveguide device. *Anal Chem* **75**, 835-842 (2003).
6. Tsortos, A., Papadakis, G. & Gizeli, E. Shear acoustic wave biosensor for detecting DNA intrinsic viscosity and conformation: a study with QCM-D. *Biosensors & bioelectronics* **24**, 842-847 (2008).
7. Tsortos, A., Papadakis, G., Mitsakakis, K., Melzak, K.A. & Gizeli, E. Quantitative determination of size and shape of surface-bound DNA using an acoustic wave sensor. *Biophysical journal* **94**, 2706-2715 (2008).

8. Janshoff, A., Wegener, J., Sieber, M. & Galla, H.J. Double-mode impedance analysis of epithelial cell monolayers cultured on shear wave resonators. *Eur Biophys J* **25**, 93-103 (1996).
9. Li, J., Thielemann, C., Reuning, U. & Johannsmann, D. Monitoring of integrin-mediated adhesion of human ovarian cancer cells to model protein surfaces by quartz crystal resonators: evaluation in the impedance analysis mode. *Biosensors & bioelectronics* **20**, 1333-1340 (2005).
10. Hong, S., Ergezen, E., Lec, R. & Barbee, K.A. Real-time analysis of cell-surface adhesive interactions using thickness shear mode resonator. *Biomaterials* **27**, 5813-5820 (2006).
11. Wegener, J., Janshoff, A. & Galla, H.J. Cell adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance: comparative analysis of different mammalian cell lines. *Eur Biophys J* **28**, 26-37 (1999).
12. Wegener, J., Seebach, J., Janshoff, A. & Galla, H.J. Analysis of the composite response of shear wave resonators to the attachment of mammalian cells. *Biophysical journal* **78**, 2821-2833 (2000).
13. Harris, L.J., Larson, S.B., Hasel, K.W. & McPherson, A. Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry* **36**, 1581-1597 (1997).
14. Bjorkman, P.J. *et al.* Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* **329**, 506-512 (1987).
15. Hubble, J. Affinity cell separations: problems and prospects. *Trends Biotechnol* **15**, 249-255 (1997).
16. Chen, S. & Springer, T.A. Selectin receptor-ligand bonds: Formation limited by shear rate and dissociation governed by the Bell model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 950-955 (2001).
17. Chang, K.C. & Hammer, D.A. The forward rate of binding of surface-tethered reactants: effect of relative motion between two surfaces. *Biophysical journal* **76**, 1280-1292 (1999).
18. Hammer, D.A. & Lauffenburger, D.A. A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces. *Biophysical journal* **52**, 475-487 (1987).
19. Swift, D.G., Posner, R.G. & Hammer, D.A. Kinetics of adhesion of IgE-sensitized rat basophilic leukemia cells to surface-immobilized antigen in Couette flow. *Biophysical journal* **75**, 2597-2611 (1998).
20. Dubin-Thaler, B.J., Giannone, G., Dobereiner, H.G. & Sheetz, M.P. Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. *Biophysical journal* **86**, 1794-1806 (2004).
21. Reinhart-King, C.A., Dembo, M. & Hammer, D.A. The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. *Biophysical journal* **89**, 676-689 (2005).
22. Cuvelier, D. *et al.* The universal dynamics of cell spreading. *Curr Biol* **17**, 694-699 (2007).
23. Dustin, M.L., Bromley, S.K., Davis, M.M. & Zhu, C. Identification of self through two-dimensional chemistry and synapses. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 133-157 (2001).
24. Dustin, M.L. *et al.* Low affinity interaction of human or rat T cell adhesion molecule CD2 with its ligand aligns adhering membranes to achieve high physiological affinity. *J Biol Chem* **272**, 30889-30898 (1997).
25. Ergezen, E., Hong, S., Barbee, K.A. & Lec, R. Real time monitoring of the effects of Heparan Sulfate Proteoglycan (HSPG) and surface charge on the cell adhesion process using thickness shear mode (TSM) sensor. *Biosensors & bioelectronics* **22**, 2256-2260 (2007).

26. Galli Marxer, C., Collaud Coen, M., Greber, T., Greber, U.F. & Schlapbach, L. Cell spreading on quartz crystal microbalance elicits positive frequency shifts indicative of viscosity changes. *Anal Bioanal Chem* **377**, 578-586 (2003).
27. Li, F., Wang, J.H. & Wang, Q.M. Monitoring cell adhesion by using thickness shear mode acoustic wave sensors. *Biosensors & bioelectronics* **23**, 42-50 (2007).
28. Marx, K.A., Zhou, T., Montrone, A., McIntosh, D. & Braunhut, S.J. A comparative study of the cytoskeleton binding drugs nocodazole and taxol with a mammalian cell quartz crystal microbalance biosensor: different dynamic responses and energy dissipation effects. *Analytical biochemistry* **361**, 77-92 (2007).
29. Marx, K.A., Zhou, T., Montrone, A., Schulze, H. & Braunhut, S.J. A quartz crystal microbalance cell biosensor: detection of microtubule alterations in living cells at nM nocodazole concentrations. *Biosensors & bioelectronics* **16**, 773-782 (2001).
30. Heitmann, V., Reiss, B. & Wegener, J. The Quartz Crystal Microbalance in Cell Biology: Basics and Applications, in *Piezoelectric Sensors*. (eds. C. Steinem & A. Janshoff) 303-338 (Springer-Verlag, Berlin; 2007).
31. Papadakis, G., Tsortos, A. & Gizeli, E. Triple-helix DNA structural studies using a Love wave acoustic biosensor. *Biosensors & bioelectronics* **25**, 702-707 (2009).
32. Tellechea, E., Johannsmann, D., Steinmetz, N.F., Richter, R.P. & Reviakine, I. Model-Independent Analysis of QCM Data on Colloidal Particle Adsorption. *Langmuir* **25**, 5177-5184 (2009).
33. Melzak, K., Tsortos, A. & Gizeli, E. Use of acoustic sensors to probe the mechanical properties of liposomes. *Methods Enzymol* **465**, 21-41 (2009).
34. Parham, P. & Brodsky, F.M. Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28. *Hum Immunol* **3**, 277-299 (1981).
35. Cooper, M.A. Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 515-528 (2002).
36. Cooper, M.A. & Whalen, C. Profiling molecular interactions using label-free acoustic screening. *Drug Discov Today: Technologies* **2**, 241-245 (2005).
37. Endo, T., Yamamura, S., Kerman, K. & Tamiya, E. Label-free cell-based assay using localized surface plasmon resonance biosensor. *Analytica chimica acta* **614**, 182-189 (2008).
38. Hide, M. *et al.* Real-time analysis of ligand-induced cell surface and intracellular reactions of living mast cells using a surface plasmon resonance-based biosensor. *Analytical biochemistry* **302**, 28-37 (2002).
39. Yanase, Y. *et al.* The SPR signal in living cells reflects changes other than the area of adhesion and the formation of cell constructions. *Biosensors & bioelectronics* **22**, 1081-1086 (2007).
40. Welch, M.D., Mallavarapu, A., Rosenblatt, J. & Mitchison, T.J. Actin dynamics in vivo. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 54-61 (1997).
41. Cooper, J.A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of cell biology* **105**, 1473-1478 (1987).
42. Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N.C. & Elson, E.L. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *Journal of cell science* **114**, 1025-1036 (2001).

Κεφάλαιο 6

Ο ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love ως εργαλείο για το χαρακτηρισμό αλληλεπιδράσεων κυττάρου/υποστρώματος

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα κύτταρα είναι σε συνεχή επικοινωνία με το περιβάλλον τους μέσω των μεμβρανικών τους μορίων. Η πρόσδεση αυτών των μεμβρανικών μορίων σε προσδέτες τους σε άλλη επιφάνεια είναι ζωτικής σημασίας για ένα μεγάλο αριθμό φυσιολογικών και αναπτυξιακών διεργασιών, όπως η προσκόλληση και κύλιση των λευκοκυττάρων¹⁻⁴ και οι μεσολαβούμενες από κύτταρα ανοσολογικές αποκρίσεις⁵⁻⁷. Οι αλληλεπιδράσεις στις οποίες εμπλέκονται τα μόρια σε κυτταρικές μεμβράνες είναι διαφορετικές φυσικά από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων ελεύθερων στο διάλυμα, εφόσον τα μεμβρανικά μόρια είναι περιορισμένα σε δύο διαστάσεις εξαιτίας χωρικών περιορισμών που τους επιβάλλει η κυτταρική μεμβράνη. Ως αποτέλεσμα, τα φαινόμενα σύνδεσης σε μεμβράνες κυριαρχούνται από κινητική και συγγένεια υπολογισμένες σε δύο διαστάσεις⁸ (two-dimensional, 2D, kinetics and affinity). Ο υπολογισμός αυτών των παραμέτρων σε δύο διαστάσεις (2D) προσφέρει ένα μέσο για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών πρόσδεσης μεταξύ παρατιθέμενων επιφανειών, καθώς οι παράμετροι σε 2D είναι άμεσα σχετιζόμενες με τη λειτουργία των μεμβρανικών μορίων⁹⁻¹³.

Παράλληλα, εκτός από την μοριακή αλληλεπίδραση αυτή καθαυτή, διάφοροι άλλοι παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό και τη διατήρηση δεσμών των μεμβρανικών μορίων. Οι παράγοντες αυτοί επηρεάζουν τη διαθεσιμότητα και την προσβασιμότητα μεταξύ υποδοχέα και προσδέτη. Αυτό συμβαίνει καθώς για την πραγματοποίηση της αλληλεπίδρασης μιας κυτταρικής επιφάνειας με μια άλλη (κυτταρική ή μη) απαιτείται στενή επαφή ανάμεσα στις επιφάνειες¹⁴. Η στενή επαφή χρειάζεται για το σχηματισμό μίας περιοχής επαφής που θα επιτρέψει τη «γεφύρωση» μεταξύ των επιφανειών από τις αλληλεπιδράσεις των μεμβρανικών μορίων¹². Η περιοχή επαφής σχηματίζεται μέσω δυναμικών ανακατατάξεων της μεμβράνης που καθοδηγούνται από τον κυτταροσκελετό¹⁵. Επιπλέον, στην περιοχή επαφής υπάρχει μια πληθώρα μορίων με διαφορετικά εξωκυτταρικά μεγέθη. Η αλληλεπίδραση των μορίων αυτών με τους προσδέτες τους στην άλλη μεμβράνη προϋποθέτει το διαχωρισμό ανάμεσα σε άλλα κυτταρικά μόρια μεγαλύτερου ή μικρότερου μεγέθους καθώς και την πιθανή παραμόρφωση μεγάλων μορίων και γλυκανών^{6, 16}. Το επόμενο βήμα είναι ο σχηματισμός των δεσμών μεταξύ μεμβρανικού υποδοχέα και του προσδέτη του, οι οποίοι προσδένουν το κύτταρο στην επιφάνεια.

Όπως δείχθηκε στο Κεφάλαιο 5, ο ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love ήταν ευαίσθητος στον αριθμό κυττάρων που αλληλεπιδρούν ειδικά με την επιφάνειά του και το πλάτος του ακουστικού κύματος εμφάνισε γραμμική σχέση με τον αριθμό των δεσμών μεταξύ των μεμβρανικών υποδοχέων των κυττάρων και της επιφάνειας. Η ευαισθησία του αισθητήρα στη μοριακή αλληλεπίδραση αυτή καθαυτή και όχι τόσο στον όγκο της μάζας του κυττάρου τον καθιστά ένα πολύ ισχυρό όργανο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης ενός υποδοχέα στην επιφάνεια κυττάρου με τον ακινητοποιημένο προσδέτη του. Χρησιμοποιώντας το μοντέλο

σύστημα μεμβρανικού HLA/ακίνητοποιημένου anti-HLA και τον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love, έγινε ανάλυση της αλληλεπίδρασης μέσα από τον υπολογισμό των παραμέτρων πρόσδεσης σε 2D και τη διερεύνηση της επίδρασης διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν τη μοριακή αλληλεπίδραση σε κυτταρικό επίπεδο.

1. Βιοφυσική μελέτη της αλληλεπίδρασης

Εφόσον το πλάτος του ακουστικού κύματος για τον αισθητήρα τύπου Love έχει γραμμική σχέση με το συνολικό αριθμό των HLA μορίων που είναι διαθέσιμα για αλληλεπίδραση με την επιφάνεια, η αλλαγή σήματος του αισθητήρα προσφέρει ένα τρόπο μέτρησης των δεσμών HLA/anti-HLA ανάμεσα σε κύτταρο και επιφάνεια. Αυτό επιτρέπει την βιοφυσική ανάλυση της αλληλεπίδρασης, τον υπολογισμό δηλαδή των σταθερών ρυθμού σύνδεσης και αποσύνδεσης και της σταθεράς συγγένειας σε 2D υπό διαφορετικές συνθήκες.

1.1. Υπολογισμός κινητικών σταθερών και σταθεράς συγγένειας δύο διαστάσεων

Οι παράμετροι πρόσδεσης σε 2D θεωρούνται γενικά περισσότερο βιολογικά σχετικές από ότι οι αντίστοιχες για τρεις διαστάσεις. Η συγγένεια σε 2D αντιμετωπίζει το πρόβλημα της αλληλεπίδρασης μορίων που βρίσκονται σε παρατιθέμενες μεμβράνες θεωρώντας τις συγκεντρώσεις των μορίων ως δισδιάστατες πυκνότητες μορίων^{8,17}. Επομένως, οι μονάδες στις οποίες εκφράζεται είναι μονάδες επιφάνειας (μm^2 ανά μόριο) σε αντίθεση με τις μονάδες όγκου στις οποίες εκφράζεται η παραδοσιακή συγγένεια τριών διαστάσεων (M^{-1}) που ισχύει για αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαλυτών μορίων⁸. Παρομοίως, η σταθερά ρυθμού σύνδεσης (k_a) σε 2D εκφράζεται σε $\mu\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ανά μόριο αντί $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Η σταθερά ρυθμού αποσύνδεσης (k_d) είναι μέτρο του χρόνου ζωής της αλληλεπίδρασης, οπότε εκφράζεται πάντα ως s^{-1} .

Ο υπολογισμός των κινητικών σταθερών και της σταθεράς συγγένειας σε 2D μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες τεχνικές. Οι κυριότερες τεχνικές χρησιμοποιούν είτε φθορισμό είτε μηχανικές δυνάμεις για το χαρακτηρισμό αλληλεπιδράσεων μεμβρανικών πρωτεϊνών σε 2D. Οι συγκεκριμένες τεχνικές όμως δεν μπορούν να προσφέρουν αυτές καθαυτές ολοκληρωμένη ανάλυση τόσο για τις κινητικές παραμέτρους όσο και για την σταθερά συγγένειας σε 2D. Ο συνδυασμός των παραπάνω μεθόδων θα μπορούσε να προσφέρει τόσο τις κινητικές παραμέτρους όσο και την σταθερά συγγένειας σε 2D. Τέτοια προσέγγιση όμως θα ήταν τεχνικά πολύ απαιτητική και με μικρή προοπτική εξέλιξης για το ταυτόχρονο και ταχύτερο υπολογισμό των παραμέτρων αυτών, λόγου χάρη με τη μορφή δοκιμασιών high throughput. Ο ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love αντίθετα προσφέρεται για την εργασία αυτή, καθώς μπορεί και ανιχνεύει ποσοτικά τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε κύτταρο και υπόστρωμα.

Επομένως, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στον ακουστικό βιοαισθητήρα με διάφορους αριθμούς κυττάρων ανά δείγμα. Από τις καμπύλες πρόσδεσης σε πραγματικό χρόνο μπορούν να προκύψουν οι κινητικές παράμετροι για την αλληλεπίδραση HLA/anti-HLA. Βέβαια, μια απαραίτητη προϋπόθεση είναι η αντίδραση αλληλεπίδρασης να μην εξαρτάται από τη μεταφορά μάζας λόγω

διάχυσης στην επιφάνεια του αισθητήρα. Στα πρώτα περίπου 500 s μετά την προσθήκη των κυττάρων, συμβαίνει μεταφορά λόγω διάχυσης των κυττάρων στην επιφάνεια του αισθητήρα και σχηματισμός των αρχικών δεσμών. Για την ελαχιστοποίηση οποιωνδήποτε παρεμβάσεων από την κινητική της διάχυσης των κυττάρων κατά τη μεταφορά τους προς την επιφάνεια του αισθητήρα, χρησιμοποιήθηκαν για την κινητική ανάλυση που ακολουθεί μόνο τα μέρη των γραφημάτων πρόσδεσης σε πραγματικό χρόνο τα οποία εμφάνισαν καλή εναρμόνιση με μονοεκθετικές καμπύλες^{18, 19} (95%, υποθέτοντας αντίδραση 1-προς-1). Κατά το κομμάτι αυτό της καμπύλης πρόσδεσης σε πραγματικό χρόνο, θεωρείται εξάλλου ότι η αλλαγή σήματος που παρατηρείται οφείλεται σε σχηματισμό νέων δεσμών HLA/anti-HLA (βλ. Κεφάλαιο 5 §1.2). Η καμπύλη σύνδεσης θεωρείται ότι τελειώνει όταν το πλάτος ακουστικού κύματος έρθει σε ισορροπία και όχι όταν προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα, αφού έως εκείνο το σημείο συμβαίνει ακόμα αλληλεπίδραση και σχηματισμός δεσμών HLA/anti-HLA στην επιφάνεια του αισθητήρα.

Για τον υπολογισμό κινητικών παραμέτρων, ακολουθήθηκε η διαδικασία που εφαρμόζεται για αλληλεπιδράσεις με διαλυτά μόρια^{20, 21}, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\Delta(dA/dt) / \Delta A = k_a C + k_d \quad (1)$$

όπου τα $\Delta(dA/dt)$ και ΔA αντιπροσωπεύουν την αλλαγή στο ρυθμό και το συνολικό πλάτος αντίστοιχα, εξαγόμενα από τα γραφήματα πραγματικού χρόνου, το C αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του αναλύτη στο διάλυμα, και k_a και k_d αντιπροσωπεύουν τις σταθερές ρυθμού σύνδεσης και αποσύνδεσης αντίστοιχα. Στην περίπτωση των κυττάρων, η μοριακή συγκέντρωση C (σε 3D) αντικαθίσταται από την επιφανειακή συγκέντρωση C^{2D} . Αυτή η συγκέντρωση αντιπροσωπεύει τον αριθμό των HLA μορίων που είναι διαθέσιμα για αλληλεπίδραση ανά μονάδα επιφάνειας και οι σταθερές k_a και k_d είναι οι αντίστοιχες σταθερές ρυθμού σε 2D.

Για τον υπολογισμό του C^{2D} , δύο παράμετροι είναι σημαντικές: ο συνολικός αριθμός των διαχεόμενων στη μεμβράνη HLA μορίων που είναι διαθέσιμα για αλληλεπίδραση [HLA], και ο συνολικός αριθμός των προσδεμένων κυττάρων LG2 ή αλλιώς η επί % κάλυψη της επιφάνειας από τα κύτταρα. Ο αριθμός των κινούμενων HLA μορίων στη μεμβράνη που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το ακινητοποιημένο anti-HLA προκύπτει από¹³:

$$[HLA] = N_{HLA} \times (f / S_{cell}) \quad (2)$$

όπου N_{HLA} είναι ο συνολικός αριθμός HLA μορίων στην επιφάνεια των κυττάρων, f είναι το κλάσμα των κινούμενων μορίων και S_{cell} το εμβαδό του κυττάρου. Το τελευταίο υπολογίζεται από τον τύπο $S_{cell} = \pi d^2$ (εμβαδό σφαίρας) με τη διάμετρο των κυττάρων LG2 να είναι 14,4 μm (από παρατήρηση στο μικροσκόπιο). Άρα, $S_{cell} = 633,15 \mu\text{m}^2$. Επιπλέον, για την συνεκτίμηση των ανωμαλιών της κυτταρικής μεμβράνης¹³, η παραπάνω τιμή πολλαπλασιάστηκε από ένα παράγοντα τραχύτητας επιφάνειας με τιμή 1,8. Η τελική τιμή είναι επομένως, $S_{cell} = 1172,6 \mu\text{m}^2$. Σύμφωνα με τον αριθμό των HLA μορίων ανά κανονικό κύτταρο LG2 και το κλάσμα των κινούμενων μορίων²² (93,5%), προκύπτει: $[HLA] = 374 \pm 80$ μόρια μm^{-2} . Αξίζει να

σημειωθεί ότι επειδή τα πειράματα διεξήχθησαν απουσία θρεπτικού μέσου και ορού, θεωρείται ότι δε συμβαίνει καθαρή αλλαγή στον αριθμό των HLA μορίων στην κυτταρική μεμβράνη και ότι η συνολική επιφάνεια των κυττάρων παραμένει σταθερή στο χρονικό πλαίσιο που συμβαίνουν οι μετρήσεις. Άρα, το [HLA] θεωρείται σταθερό κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Η δεύτερη σημαντική παράμετρος είναι η επί % κάλυψη της επιφάνειας από τα κύτταρα. Στα ακουστικά πειράματα, ο συνολικός αριθμός HLA μορίων ανά κύτταρο ήταν ουσιαστικά σταθερός, ενώ η μεταβλητή ήταν ο αριθμός των προστιθέμενων κυττάρων. Αυτό υπονοεί ότι η επιφανειακή συγκέντρωση [HLA]=374±80 μόρια μm^{-2} είναι η μέγιστη επιφανειακή συγκέντρωση που μπορεί να παρουσιαστεί στην επιφάνεια του αισθητήρα, και θα αντιστοιχεί στην ιδανική περίπτωση της πλήρους κάλυψης της επιφάνειας από κύτταρα, με αποτέλεσμα μια σχεδόν επίπεδη μεμβρανική επιφάνεια παρατιθέμενη με την επιφάνεια του αισθητήρα (**Εικ. 6.1**). Αν θεωρηθεί ως C_{full}^{cells} ο αριθμός των κυττάρων στον οποίο παρατηρείται πλήρης κάλυψη της επιφάνειας, τότε, για χαμηλότερους αριθμούς από τον C_{full}^{cells} , η επιφανειακή συγκέντρωση των HLA μορίων θα παραμένει ίδια ανά κύτταρο ([HLA]=374±80 μόρια μm^{-2}) όμως η δραστική [HLA] που θα ανιχνεύεται από τον αισθητήρα θα είναι συνάρτηση της κάλυψης της επιφάνειας του αισθητήρα από τα κύτταρα, δηλαδή $d^{cells}_i/d^{cells}_{full}$, όπου d είναι ο αριθμός των κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας του αισθητήρα. Επειδή παρατηρείται γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό των κυττάρων στο διάλυμα (C^{cells}) και την επιφάνεια του αισθητήρα (d^{cells}) έως ένα σημείο κορεσμού (**Εικ. 6.2**), η παραπάνω αναλογία μπορεί να εκφραστεί και ως $C^{cells}_i/C^{cells}_{full}$. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η δραστική [HLA], η οποία ταυτίζεται με την C^{2D} και είναι αντίστοιχη της μοριακής συγκέντρωσης της εξίσωσης (1), μπορεί να υπολογιστεί από τον παρακάτω τύπο:

$$C^{2D} = [HLA] \times C^{cells}_i / C^{cells}_{full} \quad (3)$$

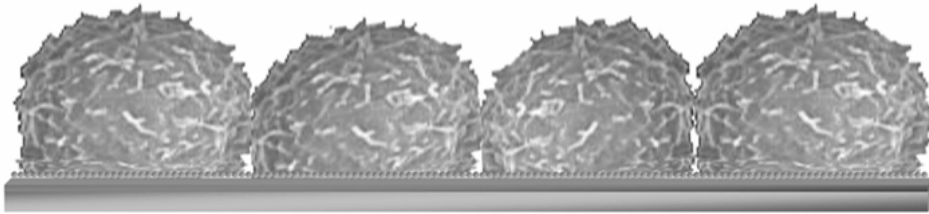
Πρακτικά, η μέγιστη κάλυψη της επιφάνειας του αισθητήρα παρατηρήθηκε για αριθμούς κυττάρων μεγαλύτερων ή ίσων από $C^{cells}_{max}=6 \times 10^5$ κύτταρα ml^{-1} σε συνδυασμό μετρήσεων του πλάτους του ακουστικού κύματος και μικροσκοπικής παρατήρησης της επιφάνειας. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι για την αντίστοιχη $d^{cells}_{max}=2603$ κύτταρα mm^{-2} , η κάλυψη της επιφάνειας του αισθητήρα ήταν 42,4%. Αυτή η κάλυψη προέκυψε ως εξής: έπειτα από πειράματα με 6×10^5 κύτταρα LG2 ml^{-1} ή περισσότερα, ο μέγιστος αριθμός κυττάρων στην επιφάνεια ήταν 31236 κύτταρα. Λαμβάνοντας υπόψη τη μέγιστη επιφάνεια επαφής ανά κύτταρο ($162,9 \mu\text{m}^2$) και το εμβαδό της επιφάνειας του αισθητήρα (12mm^2), η παρατηρούμενη μέγιστη κάλυψη (42,4%) υπολογίστηκε από το λόγο της συνολικής επιφάνειας που καλύπτουν τα κύτταρα ως προς το εμβαδο της επιφάνειας. Αυτός ο παράγοντας διόρθωσης λήφθηκε υπόψη κατά τον υπολογισμό του C^{2D} . Επομένως, η εξίσωση (3) γίνεται:

$$C^{2D} = 374 \times 0.424 \times C^{cells}_i / C^{cells}_{full} = 158.6 \times C^{cells}_i / C^{cells}_{full} \quad (4)$$

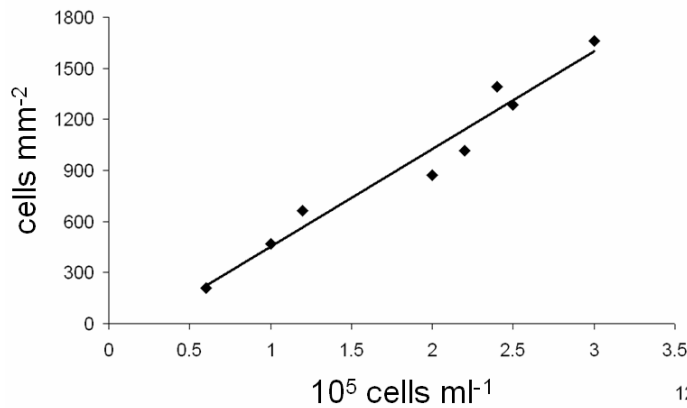
Για τον υπολογισμό πλέον των κινητικών παραμέτρων σε 2D αρκεί η κατασκευή γραφικής παράστασης των τιμών $\Delta(dA/dt)/\Delta A$ ως προς τις τιμές C^{2D} για κάθε δείγμα (**Εικ. 6.3**). Στη γραφική παράσταση αυτή, η σταθερά ρυθμού σύνδεσης

k_a είναι η κλίση της ευθείας που προκύπτει: $k_a^{2D}=2,77 \times 10^{-6} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ανά μόριο. Η σταθερά ρυθμού αποσύνδεσης k_d είναι η τιμή των γ για $x=0$: $k_d^{2D}=4,36 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$. Κατόπιν, η σταθερά συγγένειας σε 2D υπολογίζεται από: $K_A = k_a/k_d = 0.0064 \mu\text{m}^2$ ανά μόριο

Παρόλο που αποσύνδεση δεν παρατηρήθηκε για ολόκληρα κύτταρα, μπορεί να συμβεί για μεμονωμένους δεσμούς HLA/anti-HLA. Βέβαια, η επανασύνδεση αποσυνδεδεμένων HLA μορίων μπορεί να συμβεί άμεσα, δεδομένης της υψηλής επιφανειακής συγκέντρωσης του anti-HLA ($5,9 \times 10^3$ μόρια μm^{-2}). Επιπρόσθετα, η πλευρική διάχυση των HLA μορίων στην κυτταρική μεμβράνη Β-λεμφοβλαστικών κυττάρων, όπως τα κύτταρα LG2, είναι υψηλότερη²² ($1.75 \times 10^{-1} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) από τη μετρούμενη σταθερά ρυθμού σύνδεσης στην επιφάνεια ($k_a^{2D}=2,77 \times 10^{-6} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ανά μόριο), επομένως δεν είναι αυτή το περιοριστικό βήμα της αντίδρασης πρόσδεσης και δεν επηρέασε την μέτρηση της σταθεράς ρυθμού σύνδεσης σε 2D.

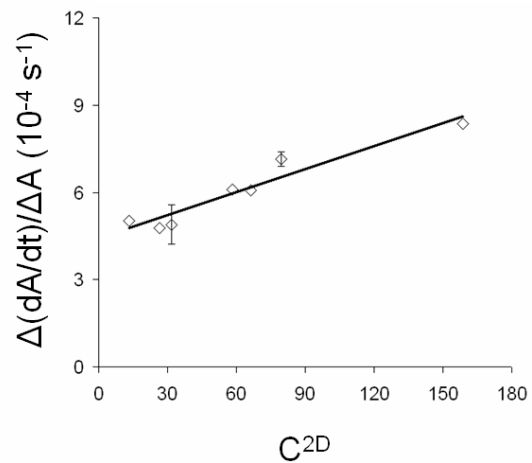


Εικ. 6.1. Σχηματική απεικόνιση της επιφάνειας του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love σε συνθήκες πλήρους κάλυψης από κύτταρα. (Πηγή: Saitakis et al., 2008)



Εικ. 6.3. Διάγραμμα των τιμών $\Delta(dA/dt)/\Delta A$ ως προς την επιφανειακή συγκέντρωση C^{2D} των HLA μορίων. Η σταθερά ρυθμού σύνδεσης σε 2D υπολογίζεται από την κλίση της ευθείας ($k_a^{2D}=2,77 \times 10^{-6} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ανά μόριο), η σταθερά ρυθμού αποσύνδεσης υπολογίζεται από το σημείο τομής με τον άξονα γ ($k_d^{2D}=4,36 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$). Η σταθερά συγγένειας σε 2D υπολογίζεται ως $K_A = k_a/k_d = 0.0064 \mu\text{m}^2$ ανά μόριο.

Εικ. 6.2. Ο αριθμός των κυττάρων που προστίθεται στην επιφάνεια εμφανίζει γραμμικότητα (96%) με τον αριθμό των κυττάρων που εναποτίθενται στην επιφάνεια του αισθητήρα.



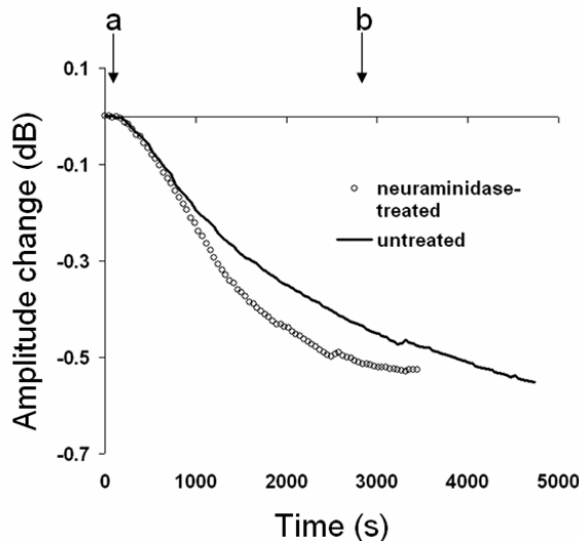
1.2. Επίδραση του γλυκοκάλυκα στην αλληλεπίδραση HLA/anti-HLA

Οι παράμετροι πρόσδεσης σε 2D δεν είναι απόλυτες. Η συγγένεια σε 2D εξαρτάται, εκτός από τη μοριακή αλληλεπίδραση, από μικροτοπολογικές συνθήκες της επαφής κυττάρου/υποστρώματος και κυττάρου/κυττάρου^{8, 17}. Επιπλέον, μοριακή κίνηση, μεμβρανική ακαμψία, κατάσταση του κυτταροσκελετού και διαχωρισμός μορίων ανά μέγεθος μπορούν να έχουν όλα σημαντική επίδραση στις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν σε 2D. Αυτό συμβαίνει γιατί η κυτταρική μεμβράνη είναι μια πολύπλοκη δομή αποτελούμενη από πολλά διαφορετικά μόρια. Επομένως, η σύνδεση μεταξύ ενός υποδοχέα και ενός προσδέτη ανάμεσα σε δύο επιφάνειες χρειάζεται να ξεπεράσει τους μικροτοπολογικούς περιορισμούς που επιβάλλονται από άλλες πρωτεΐνες ή γλυκάνες. Επίσης, για τα περισσότερα κύτταρα, ένας γλυκοκάλυκας πάχους περίπου 20 nm υπάρχει στην κυτταρική μεμβράνη και σχηματίζει ένα αρνητικά φορτισμένο «σύννεφο». Το αρνητικό φορτίο προκύπτει κυρίως από τα κατάλοιπα σιαλικού οξέος των γλυκοπρωτεϊνών και γλυκολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Η δομή αυτή μπορεί να επιβάλλει περιορισμούς στην πρόσδεση των μορίων της κυτταρικής μεμβράνης με τους προσδέτες τους, αφού πρέπει να προηγηθεί τοπική παραμόρφωση του γλυκοκάλυκα για να συμβεί προσέγγιση και αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων^{6, 16, 17, 23}.

Στην περίπτωση του συστήματος μοντέλου HLA/anti-HLA, το εξωκυτταρικό κομμάτι του HLA, με μήκος²⁴ 7 nm, είναι αρκετά μικρό εν συγκρίσει με άλλα μόρια της κυτταρικής μεμβράνης²⁵. Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα HLA μόρια θα πρέπει να αλληλεπιδράσουν με τους ειδικούς υποδοχείς των T κυττάρων (TCRs), επίσης μήκους¹⁷ 7 nm. Για τέτοια ζευγάρια υποδοχέα/προσδέτη, ο γλυκοκάλυκας, μαζί με παράγοντες όπως η συσσωμάτωση μεμβρανικών μορίων και η πλευρική διάχυση²⁶⁻²⁸, αναμένεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αλληλεπίδρασης. Για τη διερεύνηση της επίδρασης του γλυκοκάλυκα στην αλληλεπίδραση ενός μεμβρανικού υποδοχέα και του ακινητοποιημένου προσδέτη του, χρησιμοποιήθηκε ο ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love. Το μοντέλο σύστημα HLA/anti-HLA εφαρμόστηκε σε διαφορετικές συνθήκες: κανονικά κύτταρα LG2, κύτταρα LG2 επωασμένα με νευραμινιδάση και κύτταρα LG2 από πυκνές καλλιέργειες. Τα κύτταρα LG2 είναι καρκινικά κύτταρα προερχόμενα από τη Β-λεμφοβλαστική σειρά και η κυτταρική μεμβράνη τους καλύπτεται από ένα εκτεταμένο γλυκοκάλυκα^{17, 29, 30}. Η νευραμινιδάση «κόβει» κατάλοιπα σιαλικού οξέος από μεμβρανικές γλυκάνες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα λιγότερο πυκνό γλυκοκάλυκα με λιγότερο αρνητικό φορτίο. Επιπλέον, πειράματα κυτταρομετρίας ροής έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση HLA/anti-HLA δεν επηρεάζεται σε μοριακό επίπεδο από την επώαση με νευραμινιδάση.

Ακουστικά πειράματα σε πραγματικό χρόνο έδειξαν ότι τα κύτταρα που έχουν προεπωαστεί με νευραμινιδάση εμφανίζουν γρηγορότερο προφίλ πρόσδεσης από ότι τα κανονικά κύτταρα LG2 παρά την παρόμοια συνολική αλλαγή σήματος (Εικ. 6.4). Επίσης, ο συνολικός χρόνος που χρειάζεται για την εξισορρόπηση του σήματος είναι μικρότερος για τα επωασμένα με νευραμινιδάση κύτταρα LG2 (Πίνακας 6.1). Επομένως, η επώαση με το ένζυμο δε διατάραξε τη μοριακή πρόσδεση του HLA στο anti-HLA, αλλά είχε επίδραση στην κινητική της

αλληλεπίδρασης σε κυτταρικό επίπεδο, όπως παρατηρήθηκε από το σήμα του αισθητήρα.



Εικ. 6.4. Καμπύλη πρόσδεσης σε πραγματικό χρόνο κατά την αλληλεπίδραση κανονικών (untreated) και επωασμένων με νευραμινιδάση (neuraminidase-treated) κυττάρων LG2 με ακινητοποιημένο anti-HLA. Η μεταβολή στο πλάτος του ακουστικού κύματος ήταν $0,584 \pm 0,143$ dB για 1393 ± 401 κανονικά κύτταρα mm^{-2} και $0,471 \pm 0,17$ dB για 1179 ± 279 επωασμένα με νευραμινιδάση κύτταρα mm^{-2} . a) Προσθήκη κυττάρων ($3 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$), b) ξέπλυμα με PBS.

Πίνακας 6.1. Χρονική διάρκεια (s) για την εξισορρόπηση του πλάτους του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love από την προσθήκη κυττάρων LG2 ($3 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$) στην επιφάνεια με anti-HLA έπειτα από διάφορους χειρισμούς.

Κανονικά κύτταρα LG2	Επωασμένα με νευραμινιδάση κύτταρα LG2	Επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη κύτταρα LG2	Κύτταρα LG2 από καλλιέργειες με β_2 μικροσφαιρίνη	Επωασμένα με γλουταραλδεΐδη κύτταρα LG2
3720±1080	3123±780	4854±1186	3142±776	2311±623

Για την ποσοτικοποίηση της διαδικασίας της πρόσδεσης και της επίδρασης της νευραμινιδάσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με διάφορους αριθμούς κυττάρων ($0,6 \times 10^5$ ως $12,5 \times 10^5$ κύτταρα ml^{-1}) και έγινε υπολογισμός των παραμέτρων πρόσδεσης σε 2D για τα κύτταρα LG2 σε κανονικές συνθήκες, για επωασμένα με νευραμινιδάση και για κύτταρα από πυκνές καλλιέργειες (Πίνακας 6.2). Ο υπολογισμός έγινε όπως παραπάνω, χρησιμοποιώντας $[\text{HLA}] = 374 \pm 80$ μόρια μm^{-2} για τα κανονικά και τα επωασμένα με νευραμινιδάση κύτταρα LG2 και $[\text{HLA}] = 694 \pm 21$ μόρια μm^{-2} για τα κύτταρα LG2 από πυκνές καλλιέργειες. Η επώαση με τη νευραμινιδάση είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη σταθερά ρυθμού σύνδεσης k_a , αυξημένη σταθερά συγγένειας K_A και ελαττωμένη σταθερά ρυθμού αποσύνδεσης k_d εν συγκρίσει με κύτταρα κανονικά ή από πυκνές καλλιέργειες.

Η επώαση με τη νευραμινιδάση έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια καταλοίπων σιαλικού οξέος από το γλυκοκάλυκα, ο οποίος γίνεται λιγότερο πυκνός και λιγότερο αρνητικά φορτισμένος. Ο υπολογισμός των παραμέτρων πρόσδεσης σε 2D έδειξε ότι η επώαση με το ένζυμο διευκόλυνε την αλληλεπίδραση HLA/anti-HLA στη διεπιφάνεια κυττάρου/υποστρώματος, καθώς η σταθερά συγγένειας σε 2D για τα επωασμένα κύτταρα ήταν 3,6 φορές μεγαλύτερη από ότι για τα κανονικά κύτταρα LG2. Επίσης, η επίδραση του γλυκοκάλυκα φάνηκε ισχυρότερη και από το διπλασιασμό των HLA μορίων στη μεμβράνη, καθώς η σταθερά συγγένειας σε 2D ήταν 1,6 φορές μεγαλύτερη. Το ίδιο προκύπτει και από τις τιμές για τις σταθερές

ρυθμού σύνδεσης σε 2D. Η γρηγορότερη k_a για τα επωασμένα με νευραμινιδάση κύτταρα LG2 μπορεί να αποδοθεί σε ευκολότερη παραμόρφωση του λιγότερου πυκνού γλυκοκάλυκα κατά το σχηματισμό των δεσμών HLA/anti-HLA. Επιπλέον, η μικρότερη απώθηση λόγω φορτίου και η μικρότερη πυκνότητα των γλυκανών θα εφάρμοζαν μικρότερη πίεση στους ήδη σχηματισμένους δεσμούς HLA/anti-HLA, κάτι που παρατηρείται ως μικρότερη σταθερά ρυθμού αποσύνδεσης για τα επωασμένα με νευραμινιδάση κύτταρα LG2. Η επίδραση του γλυκοκάλυκα είναι επομένως ισχυρή στην αλληλεπίδραση HLA/anti-HLA του μοντέλου συστήματος, όπως φάνηκε από τον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love και την κινητική ανάλυση σε 2D.

Πίνακας 6.2. Σταθερές ρυθμού σύνδεσης και αποσύνδεσης και συγγένειας σε 2D για την αλληλεπίδραση HLA μορίων στη μεμβράνη των κυττάρων LG2 με anti-HLA ακινητοποιημένο στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love έπειτα από διάφορους χειρισμούς των κυττάρων.

	k_a^{2D} ($\mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ per molecule)	k_d^{2D} (s^{-1})	K_A^{2D} (μm^2 per molecule)
untreated (n=7)	2.77×10^{-6}	4.36×10^{-4}	0.0064
neuraminidase-treated (n=4)	5.33×10^{-6}	2.30×10^{-4}	0.0232
high density cultures (n=5)	4.04×10^{-6}	2.74×10^{-4}	0.0147

Όλες οι τιμές εμπεριέχουν σφάλμα 10%.

2. Επιπρόσθετα ποιοτικά αποτελέσματα

Εκτός από το γλυκοκάλυκα υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν άμεσα την αλληλεπίδραση μεταξύ μεμβρανικού υποδοχέα και ακινητοποιημένου προσδέτη. Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η πλευρική διάχυση και η συσσωμάτωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών^{12-14, 26, 27} και η κατάσταση του κυτταροσκελετού³¹⁻³³. Η επίδραση των παραγόντων αυτών στην αλληλεπίδραση HLA/anti-HLA του μοντέλου συστήματος ελέγχθηκε με τη χρήση του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love μέσω της απόκρισης του πλάτους στην πρόσδεση των κυττάρων καθώς και της χρονικής διάρκειας της αλληλεπίδρασης των κυττάρων με την επιφάνεια.

2.1. Επίδραση της συσσωμάτωσης και της πλευρικής διάχυσης στην αλληλεπίδραση HLA/anti-HLA

Η συσσωμάτωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών στην κυτταρική μεμβράνη έχει δειχθεί ότι επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και μεταξύ κυττάρου και υποστρώματος. Η συσσωμάτωση μπορεί να είναι είτε ομοτυπική, όταν συμβαίνει μεταξύ ίδιων πρωτεϊνών, είτε ετεροτυπική όταν συμβαίνει ανάμεσα σε διαφορετικές πρωτεΐνες. Τα τάξης I MHC μόρια έχουν βρεθεί σε ομοτυπικά συσσωματώματα στην επιφάνεια ενεργοποιημένων φυσιολογικών B και T κυττάρων

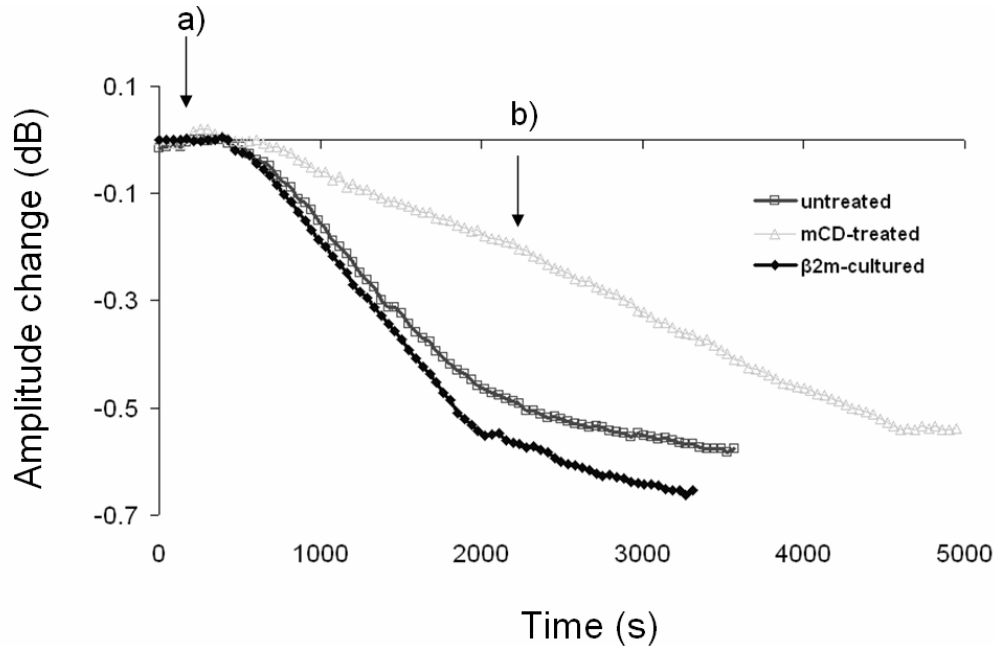
καθώς και στην επιφάνεια Β- και Τ-λεμφοβλαστικών σειρών³⁴. Τα συσσωματώματα αυτά μπορεί να είναι επίσης ετεροτυπικά, αφού μπορεί να περιέχουν και άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες, λόγω χάρη υποδοχέα της IL-2 και CD48³⁵. Η συσσωμάτωση των ΜHC μορίων έχει βρεθεί να παίζει ρόλο στην αναγνώριση αντιγόνου από τα Τ κύτταρα. Συγκεκριμένα, η συσσωμάτωση των τάξης Ι ΜHC μορίων δείχθηκε ότι αύξησε την απόκριση Τ κυττάρων σε αντιγόνα που παρουσιάστηκαν σε πολύ μικρή ποσότητα²⁷, ενώ η απώλεια των συσσωματωμάτων των ΜHC μορίων είχε ως αποτέλεσμα λιγότερο δραστική αναγνώριση αντιγόνου και λύση κυττάρων στόχων από τα Τ κύτταρα²⁶. Σε κύτταρα της Β-λεμφοβλαστικής σειράς, όπως τα κύτταρα LG2, τα HLA μόρια σχηματίζουν μικρά συσσωματώματα στην κυτταρική μεμβράνη³⁴. Τα συσσωματώματα αυτά μπορούν να μεταχειριστούν είτε προς την αύξηση είτε προς την ελάττωση του ολιγομερισμού των HLA μορίων^{26, 27}. Επομένως, χρησιμοποιήθηκε ο ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love για τη διερεύνηση της επίδρασης της αύξησης και της ελάττωσης της συσσωμάτωσης των μεμβρανικών HLA μορίων στην αλληλεπίδραση HLA/anti-HLA στο μοντέλο σύστημα.

Κύτταρα LG2 προστέθηκαν στην επιφάνεια του αισθητήρα με το ακινητοποιημένο anti-HLA έπειτα από επώαση τους με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη. Τα επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη κύτταρα LG2 έχουν υποστεί αφαίρεση της χοληστερόλης από την κυτταρική μεμβράνη, κάτι που προκαλεί την εκτεταμένη συσσωμάτωση των HLA μορίων στην επιφάνεια των κυττάρων. Η απόκριση του βιοαισθητήρα για τα επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη κύτταρα LG2 ήταν χαμηλότερη από ότι για κανονικά κύτταρα LG2 (**Εικ. 6.5**). Η χαμηλότερη απόκριση οφείλετο σε πρόσδεση λιγότερων κυττάρων από την προσθήκη ίδιου αριθμού κυττάρων για τις δύο διαφορετικές συνθήκες. Σε πειράματα που παρατηρήθηκε ίδια πρόσδεση κυττάρων (ανεξάρτητα από τον αριθμό των προστιθέμενων κυττάρων), η συνολική απόκριση του πλάτους του αισθητήρα ήταν παρόμοια (**Εικ. 6.5**), αλλά η χρονική διάρκεια για την επίτευξη ισορροπίας ήταν αρκετά μεγαλύτερη για τα επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη κύτταρα LG2 (**Πίνακας 6.1**).

Επιπλέον, κύτταρα LG2 προστέθηκαν στην επιφάνεια του αισθητήρα με το ακινητοποιημένο anti-HLA έπειτα από καλλιέργεια τους *overnight* παρουσία β_2 μικροσφαιρίνης. Τα κύτταρα LG2 από καλλιέργειες με β_2 μικροσφαιρίνη χάνουν τα μικρά ενδογενή συσσωματώματα των HLA μορίων στη μεμβράνη^{26, 34}. Ένα οριακά γρηγορότερο προφίλ πρόσδεσης παρατηρήθηκε για τα κύτταρα LG2 από καλλιέργειες με β_2 μικροσφαιρίνη σε σχέση με τα κανονικά κύτταρα LG2 (**Εικ. 6.5**) καθώς και παρόμοια απόκριση στο σήμα του αισθητήρα. Επίσης, η χρονική διάρκεια για την επίτευξη ισορροπίας ήταν μικρότερη για τα κύτταρα LG2 από καλλιέργειες με β_2 μικροσφαιρίνη από ότι για τα κανονικά κύτταρα LG2 (**Πίνακας 6.1**).

Σύμφωνα με τα παραπάνω πειράματα με τον ακουστικό βιοαισθητήρα, η επώαση με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη ουσιαστικά εμφάνισε διαφορά στην απόκριση του σήματος μόνο από την άποψη της κινητικής και την χρονικής διάρκειας της αλληλεπίδρασης κυττάρου και υποστρώματος. Όμως, σύμφωνα με τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής (βλ. Κεφάλαιο 4 §4 και **Εικ. 4.3**), η έκταση της αλληλεπίδρασης του μεμβρανικού HLA με το anti-HLA είναι μικρότερη για τα επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη κύτταρα LG2 από ότι για τα κανονικά κύτταρα LG2, κάτι που δεν παρατηρείται με τον ακουστικό αισθητήρα, εφόσον η αλλαγή του πλάτους του ακουστικού κύματος είναι ίδια για τον ίδιο αριθμό προσδεμένων κυττάρων.

Επομένως, ίσως να μην είναι όλα τα HLA μόρια στην επιφάνεια των κυττάρων διαθέσιμα για πρόσδεση στο ακινητοποιημένο anti-HLA, παρά την πολύ υψηλή επιφανειακή συγκέντρωση του τελευταίου ($5,9 \times 10^3$ μόρια μm^{-2}). Ένα άλλο συμπέρασμα είναι ότι η απώλεια HLA μορίων από τα ενδογενή συσσωματώματα στη μεμβράνη έπειτα από καλλιέργεια των κυττάρων παρουσία β_2 μικροσφαιρίνης δίνει γρηγορότερη αλληλεπίδραση για τα κύτταρα, πιθανώς λόγω της μεγαλύτερης κυκλοφορίας ελεύθερων HLA μορίων στη μεμβράνη.

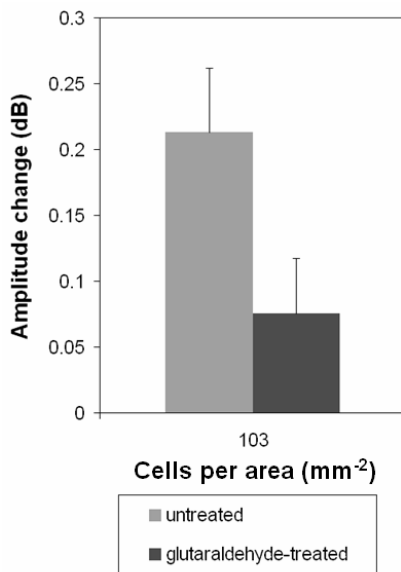


Εικ. 6.5. Καμπύλη πρόσδεσης σε πραγματικό χρόνο κατά την αλληλεπίδραση κανονικών (untreated) και επωασμένων με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη (mCD-treated) και καλλιεργημένων με β_2 μικροσφαιρίνη ($\beta_2\text{m-cultured}$) κυττάρων LG2 με ακινητοποιημένο anti-HLA. Η μεταβολή του πλάτους του ακουστικού κύματος ήταν $1,15 \pm 0,346$ dB για 1780 ± 398 κανονικά κύτταρα mm^{-2} , $0,897 \pm 0,27$ dB για 1229 ± 355 επωασμένα με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη κύτταρα mm^{-2} και $0,994 \pm 0,283$ dB για 1808 ± 417 καλλιεργημένα με β_2 μικροσφαιρίνη κύτταρα mm^{-2} . a) Προσθήκη κυττάρων (untreated/ $\beta_2\text{m-cultured}$: 3×10^5 ml^{-1} , mCD-treated: 6×10^5 ml^{-1}), b) ξέπλυμα με PBS.

Σύμφωνα με τα πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας (βλ. Κεφάλαιο 4 §5 και Εικ. 4.6) και τη βιβλιογραφία^{27, 36}, η επώαση με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη προκαλεί συσσωμάτωση των HLA μορίων έπειτα από σύσφιξη των υπομεμβρανικών μικροϊνιδίων της ακτίνης και ελάττωση της πλευρικής διάχυσης των μεμβρανικών HLA μορίων. Η πλευρική διάχυση των μεμβρανικών πρωτεϊνών θεωρείται μείζων παράγοντας για αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και μεταξύ κυττάρου και υποστρώματος καθώς μπορεί να επηρεάσει τη συσσώρευση υποδοχέων και προσδετών στην περιοχή επαφής και, επομένως, την ισχύ της κυτταρικής πρόσδεσης¹²⁻¹⁴. Αντίθετα, η συσσωμάτωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται περισσότερο σε διαδικασίες κυτταρικής σηματοδότησης^{27, 35, 37}.

Επομένως, επειδή η πλευρική διάχυση ίσως είναι σημαντικότερος παράγοντας από τη συσσωμάτωση των HLA μορίων για την αλληλεπίδραση HLA/anti-HLA, τα κύτταρα LG2 προστέθηκαν στον αισθητήρα έπειτα από επώαση με γλουταραλδεϋδη. Η επώαση αυτή προκαλεί μονιμοποίηση της κυτταρικής

μεμβράνης, ώστε να μην επιτρέπεται η πλευρική διάχυση των μεμβρανικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου των HLA μορίων. Παρατηρήθηκε πολύ μικρή απόκριση του πλάτους του ακουστικού κύματος στην προσθήκη των επωασμένων με γλουταραλδεΐδη κυττάρων LG2 η οποία οφείλετο σε πολύ μικρή πρόσδεση κυττάρων αλλά και κατά 68% χαμηλότερη αλλαγή σήματος για τον ίδιο αριθμό κυττάρων (Εικ. 6.6). Η χρονική διάρκεια της αλληλεπίδρασης ήταν κατά περίπου 1000 s μικρότερη (Πίνακας 6.1). Αυτό πρακτικά συνέβη λόγω της πρόσδεσης στο ακινητοποιημένο anti-HLA μόνο για τα HLA μόρια που βρίσκονται στην περιοχή επαφής, καθώς η πλειοψηφία των άλλων HLA μορίων του κυττάρου δεν είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν.



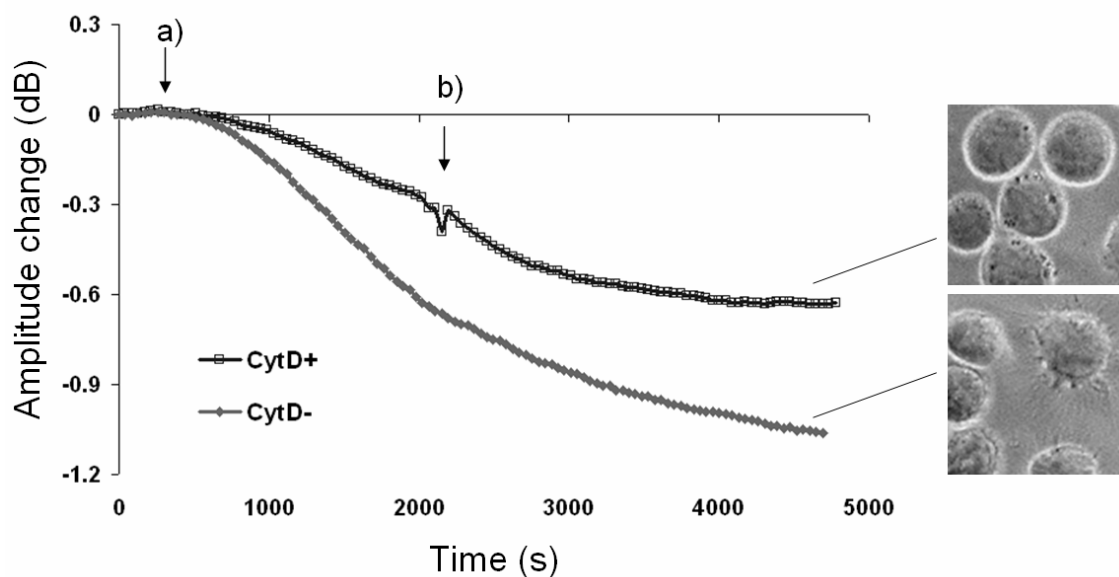
Εικ. 6.6. Μεταβολή του πλάτους του ακουστικού κύματος κατά την αλληλεπίδραση κανονικών (untreated) και επωασμένων με γλουταραλδεΐδη (glutaraldehyde-treated) κυττάρων LG2.

Η επίδραση της επώασης με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη έμοιαζε με την επίδραση που είχε η γλουταραλδεΐδη στα κύτταρα LG2 εφόσον προκάλεσε πρόσδεση μικρότερου αριθμού κυττάρων εν συγκρίσει με τα κανονικά κύτταρα LG2. Επιπλέον, η χαμηλότερη πλευρική διάχυση για τα HLA μόρια στη μεμβράνη απουσία χοληστερόλης μπορεί να εξηγήσει τη μεγαλύτερη χρονική διάρκεια της κυτταρικής αλληλεπίδρασης.

2.2. Επίδραση του κυτταροσκελετού

Για τη σταθερή πρόσδεση ενός κυττάρου σε ένα υπόστρωμα πρέπει να προηγηθεί ο σχηματισμός μίας περιοχής επαφής, όπου οι δεσμοί ανάμεσα στα μεμβρανικά μόρια και τους προσδέτες τους θα «γεφυρώνουν» τις δύο επιφάνειες. Ο σχηματισμός της περιοχής επαφής είναι μία ενεργή διαδικασία για την κυτταρική μεμβράνη¹² και τέτοιες ανακατατάξεις της τοπολογίας της μεμβράνης καθοδηγούνται από τον κυτταροσκελετό της ακτίνης συγκεκριμένα από το υπομεμβρανικό πλέγμα μικροϊνιδίων ακτίνης¹⁵. Η επίδραση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στην αλληλεπίδραση HLA/anti-HLA του συστήματος μοντέλου διερευνήθηκε με τον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love. Κύτταρα LG2 προεπώαστηκαν με CytD, η οποία διαταράσσει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης^{32, 38}, και προστέθηκαν στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα με το ακινητοποιημένο anti-

HLA. Τα επωασμένα με 5 μM CytD κύτταρα εμφάνισαν 39% μικρότερη απόκριση του πλάτους του ακουστικού κύματος σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες (επωασμένα με ίδια ποσότητα του διαλύτη DMSO) για ίδιο αριθμό προσδεμένων κυττάρων (**Εικ. 6.7**). Τα επωασμένα με 10 μM CytD κύτταρα εμφάνισαν ακόμα μικρότερη απόκριση αλλά και μεγαλύτερο αριθμό νεκρών κυττάρων, ίσως λόγω της διπλάσιας ποσότητας του τοξικού για τα κύτταρα διαλύτη DMSO. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η επώαση με CytD επηρέασε τη συνολική αλλαγή σήματος, δηλαδή το συνολικό αριθμό των δεσμών HLA/anti-HLA, για τον ίδιο αριθμό προσδεμένων κυττάρων.



Εικ. 6.7. Καμπύλη πρόσδεσης σε πραγματικό χρόνο κατά την αλληλεπίδραση επωασμένων με CytD ή χωρίς CytD κυττάρων LG2 με ακινητοποιημένο anti-HLA. Η μεταβολή του πλάτους του ακουστικού κύματος ήταν $0,721 \pm 0,094$ dB για 2108 ± 231 επωασμένα με CytD κύτταρα mm^{-2} και $1,15 \pm 0,346$ dB για 1987 ± 182 μη επωασμένα με CytD κύτταρα mm^{-2} . Τα επωασμένα με CytD κύτταρα εμφανίζουν στην επιφάνεια του αισθητήρα ένα σφαιρικό και λείο σχήμα χωρίς κυτταρικές προβολές. a) Προσθήκη κυττάρων ($3 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$), b) ξέπλυμα με PBS.

Η μικροσκοπική παρατήρηση της επιφάνειας του βιοαισθητήρα έπειτα από το τέλος του πειράματος έδειξε ότι τα επωασμένα με CytD κύτταρα LG2 δεν εμφανίζουν κανονικό προφίλ προσκόλλησης με κυτταρικές προβολές αλλά ένα σφαιρικό και λείο σχήμα χωρίς προεκτάσεις του κυτταρικού σώματος (**Εικ. 6.7**), όπως άλλωστε αναμενόταν³⁸. Η επίδραση της CytD είχε ως αποτέλεσμα ένα λιγότερο εύρωστο υπομεμβρανικό πλέγμα μικροϊνιδίων ακτίνης με διάχυτο φθορισμό και συσσωματώματα, σε αντίθεση με τους αρνητικούς μάρτυρες (βλ. Κεφάλαιο 4 §5 και **Εικ. 4.7, 4.8**).

Η λιγότερο ισχυρή πρόσδεση των επωασμένων με CytD κυττάρων LG2 μπορεί να εξηγηθεί από μια πιο κοντινή ματιά στην περιοχή της αλληλεπίδρασης. Τα κύτταρα LG2 έρχονται σε επαφή και σχηματίζουν αρχικούς δεσμούς με την επιφάνεια μέσω των άκρων των κυτταρικών προβολών. Στις συνθήκες του ακουστικού πειράματος, τα κύτταρα σχηματίζουν μία περιοχή επαφής αποτελούμενη από διακριτά σημεία επαφής (βλ. Κεφάλαιο 5 §1.2) τα οποία όμως δε θα απλώσουν για το σχηματισμό μιας επίπεδης περιοχής επαφής λόγω της διατάραξης του κυτταροσκελετού της ακτίνης από την CytD. Επομένως, η περιοχή

επαφής για τα επωασμένα με CytD κύτταρα LG2 ήταν μικρότερη ή λιγότερο ευνοϊκή για το σχηματισμό δεσμών HLA/anti-HLA από ότι για τους αρνητικούς μάρτυρες. Τα παραπάνω πειράματα προτείνουν ότι, έπειτα από την αρχική πρόσδεση στην επιφάνεια, μια δυναμική ανακατανομή της μεμβράνης εξαρτώμενη από τον κυτταροσκελετό της ακτίνης είναι απαραίτητη για ισχυρή πρόσδεση των κυττάρων.

3. Συμπεράσματα

Ο ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love, με τη μοναδική ιδιότητα του πλάτους του ακουστικού κύματος να ανιχνεύει ποσοτικά δεσμούς ανάμεσα σε κύτταρο και υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκε για τη βιοφυσική μελέτη της αλληλεπίδρασης HLA μορίων στην επιφάνεια κυττάρου με ακινητοποιημένο anti-HLA στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα. Οι βιολογικά περισσότερο σχετικές παράμετροι πρόσδεσης σε 2D υπολογίστηκαν για κανονικές συνθήκες αλλά και για συνθήκες λιγότερο πυκνού και αρνητικά φορτισμένου γλυκοκάλυκα. Η κατάσταση αυτή του γλυκοκάλυκα διευκόλυνε την αλληλεπίδραση κυττάρου/υποστρώματος όπως φάνηκε από τις παραμέτρους πρόσδεσης σε 2D. Επιπλέον, η επίδραση άλλων παραγόντων που επηρεάζουν τη διαθεσιμότητα και προσβασιμότητα μεταξύ HLA και anti-HLA ελέγχθηκε με τον ακουστικό βιοαισθητήρα. Η συσσωμάτωση HLA μορίων στη μεμβράνη παίζει ρόλο στη χρονική διάρκεια της κυτταρικής αλληλεπίδρασης, η πλευρική διάχυση των μεμβρανικών HLA μορίων επηρεάζει τον αριθμό των κυττάρων που μπορούν να προσδεθούν στην επιφάνεια ενώ ο κυτταροσκελετός της ακτίνης επηρεάζει την ισχύ της πρόσδεσης των κυττάρων, δηλαδή τον αριθμό των δεσμών HLA/anti-HLA, μέσα από τον έλεγχο του σχηματισμού της περιοχής επαφής. Τα παραπάνω δείχνουν την εξάρτηση της αλληλεπίδρασης σε κυτταρικό επίπεδο από επιπλέον παράγοντες εκτός της μοριακής αλληλεπίδρασης αυτής καθαυτής. Επίσης, δείχνουν τη δυναμική του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love για τη μελέτη βιολογικών διεργασιών με μεμβράνες και ολόκληρα κύτταρα, όπως συμβαίνουν, λόγω χάρη, στο ανοσοποιητικό σύστημα. Διάφορες διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις που καθορίζουν την τύχη μεμονωμένων κυττάρων και ανοσολογικών αποκρίσεων⁵ θα μπορούσαν να μελετηθούν με τη χρήση του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love. Ένα τέτοιο σύστημα είναι η αλληλεπίδραση του υποδοχέα των T κυττάρων (TCR) με HLA μόρια που παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια. Η χρήση του βιοαισθητήρα για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης αυτής σε κυτταρικό επίπεδο αφαιρεί την ανάγκη για την απομόνωση και επαναφορά μεμβρανικών πρωτεϊνών και μπορεί να προσφέρει σημαντική νέα γνώση για τη διαδικασία αναγνώρισης αντιγόνου από τα T κύτταρα.

4. Βιβλιογραφία

1. Alon, R., Hammer, D.A. & Springer, T.A. Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature* **374**, 539-542 (1995).
2. Berg, E.L. *et al.* Homing receptors and vascular addressins: cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic. *Immunol Rev* **108**, 5-18 (1989).
3. Chen, S. & Springer, T.A. Selectin receptor-ligand bonds: Formation limited by shear rate and dissociation governed by the Bell model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 950-955 (2001).

4. Juliano, R.L. Membrane receptors for extracellular matrix macromolecules: relationship to cell adhesion and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* **907**, 261-278 (1987).
5. Huppa, J.B. & Davis, M.M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**, 973-983 (2003).
6. Springer, T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425-434 (1990).
7. van der Merwe, P.A. & Davis, S.J. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* **21**, 659-684 (2003).
8. Dustin, M.L., Bromley, S.K., Davis, M.M. & Zhu, C. Identification of self through two-dimensional chemistry and synapses. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 133-157 (2001).
9. Alon, R., Chen, S., Puri, K.D., Finger, E.B. & Springer, T.A. The kinetics of L-selectin tethers and the mechanics of selectin-mediated rolling. *J Cell Biol* **138**, 1169-1180 (1997).
10. Bromley, S.K. *et al.* The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol* **2**, 1159-1166 (2001).
11. Dustin, M.L., Ferguson, L.M., Chan, P.Y., Springer, T.A. & Golan, D.E. Visualization of CD2 interaction with LFA-3 and determination of the two-dimensional dissociation constant for adhesion receptors in a contact area. *J Cell Biol* **132**, 465-474 (1996).
12. Dustin, M.L. *et al.* Low affinity interaction of human or rat T cell adhesion molecule CD2 with its ligand aligns adhering membranes to achieve high physiological affinity. *J Biol Chem* **272**, 30889-30898 (1997).
13. Zhu, D.M., Dustin, M.L., Cairo, C.W. & Golan, D.E. Analysis of two-dimensional dissociation constant of laterally mobile cell adhesion molecules. *Biophys J* **92**, 1022-1034 (2007).
14. Chang, K.C. & Hammer, D.A. The forward rate of binding of surface-tethered reactants: effect of relative motion between two surfaces. *Biophys J* **76**, 1280-1292 (1999).
15. Welch, M.D., Mallavarapu, A., Rosenblatt, J. & Mitchison, T.J. Actin dynamics in vivo. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 54-61 (1997).
16. Bell, G.I., Dembo, M. & Bongrand, P. Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys J* **45**, 1051-1064 (1984).
17. Shaw, A.S. & Dustin, M.L. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* **6**, 361-369 (1997).
18. Duschl, C. Binding isotherms and kinetics of immobilized biological systems, in *Biomolecular Sensors*. (eds. E. Gizeli & C.R. Lowe) 87-120 (Taylor & Francis Inc., London; 2002).
19. Duschl, C., Sevin-Landais, A.F. & Vogel, H. Surface engineering: optimization of antigen presentation in self-assembled monolayers. *Biophys J* **70**, 1985-1995 (1996).
20. Karlsson, R., Michaelsson, A. & Mattsson, L. Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J Immunol Methods* **145**, 229-240 (1991).
21. Saha, K., Bender, F. & Gizeli, E. Comparative study of IgG binding to proteins G and A: nonequilibrium kinetic and binding constant determination with the acoustic waveguide device. *Anal Chem* **75**, 835-842 (2003).
22. Bierer, B.E., Herrmann, S.H., Brown, C.S., Burakoff, S.J. & Golan, D.E. Lateral mobility of class I histocompatibility antigens in B lymphoblastoid cell membranes: modulation by cross-linking and effect of cell density. *J Cell Biol* **105**, 1147-1152 (1987).

23. van der Merwe, P.A. *et al.* Human cell-adhesion molecule CD2 binds CD58 (LFA-3) with a very low affinity and an extremely fast dissociation rate but does not bind CD48 or CD59. *Biochemistry* **33**, 10149-10160 (1994).
24. Bjorkman, P.J. *et al.* Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* **329**, 506-512 (1987).
25. Evans, E.J. *et al.* The T cell surface--how well do we know it? *Immunity* **19**, 213-223 (2003).
26. Bodnar, A. *et al.* Class I HLA oligomerization at the surface of B cells is controlled by exogenous beta(2)-microglobulin: implications in activation of cytotoxic T lymphocytes. *International immunology* **15**, 331-339 (2003).
27. Fooksman, D.R., Gronvall, G.K., Tang, Q. & Edidin, M. Clustering class I MHC modulates sensitivity of T cell recognition. *J Immunol* **176**, 6673-6680 (2006).
28. Oh, S., Belz, G.T. & Eichelberger, M.C. Viral neuraminidase treatment of dendritic cells enhances antigen-specific CD8(+) T cell proliferation, but does not account for the CD4(+) T cell independence of the CD8(+) T cell response during influenza virus infection. *Virology* **286**, 403-411 (2001).
29. Fuster, M.M. & Esko, J.D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature reviews* **5**, 526-542 (2005).
30. Hollingsworth, M.A. & Swanson, B.J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature reviews* **4**, 45-60 (2004).
31. Galli Marxer, C., Collaud Coen, M., Greber, T., Greber, U.F. & Schlapbach, L. Cell spreading on quartz crystal microbalance elicits positive frequency shifts indicative of viscosity changes. *Anal Bioanal Chem* **377**, 578-586 (2003).
32. Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N.C. & Elson, E.L. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *Journal of cell science* **114**, 1025-1036 (2001).
33. Wegener, J., Seebach, J., Janshoff, A. & Galla, H.J. Analysis of the composite response of shear wave resonators to the attachment of mammalian cells. *Biophys J* **78**, 2821-2833 (2000).
34. Matko, J., Bushkin, Y., Wei, T. & Edidin, M. Clustering of class I HLA molecules on the surfaces of activated and transformed human cells. *J Immunol* **152**, 3353-3360 (1994).
35. Vereb, G. *et al.* Cholesterol-dependent clustering of IL-2Ralpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6013-6018 (2000).
36. Kwik, J. *et al.* Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13964-13969 (2003).
37. Campi, G., Varma, R. & Dustin, M.L. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med* **202**, 1031-1036 (2005).
38. Cooper, J.A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* **105**, 1473-1478 (1987).

Κεφάλαιο 7

Σχηματισμός λιπιδικών μεμβρανών στην επιφάνεια βιοαισθητήρων για τη μελέτη αλληλεπίδρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών

Οι βιολογικές μεμβράνες είναι ζωτικό μέρος όλων των ζώντων οργανισμών και σχηματίζουν το εξωτερικό σύνορο τόσο των ζώντων κυττάρων όσο και των εσωτερικών κυτταρικών οργανιδίων. Αποτελούνται κυρίως από μια λιπιδική διπλοστοιβάδα σε ρευστή μορφή, στην οποία είναι ενσωματωμένες πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Τα μεμβρανικά αυτά μόρια διευκολύνουν την επικοινωνία και τη μεταφορά διαμέσου της μεμβράνης. Η πολυπλοκότητα των βιολογικών μεμβρανών και των αλληλεπιδράσεων τους με εξω- και ενδοκυτταρικά δίκτυα κάνει δύσκολη την άμεση μελέτη τους. Για το λόγο αυτό, αναπτύχθηκαν μοντέλα τεχνητών μεμβρανών, οι οποίες έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στη μελέτη και τη διαλεύκανση των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των βιολογικών μεμβρανών^{1, 2}. Οι υποστηριζόμενες λιπιδικές μεμβράνες (supported lipid membranes) είναι τα περισσότερο κοινά χρησιμοποιούμενα μοντέλα μεμβρανών και έχουν βοηθήσει στη μελέτη των μοριακών αλληλεπιδράσεων που μεσολαβούν για την κυτταρική προσκόλληση και τις ανοσολογικές αποκρίσεις^{3, 4}. Οι μεμβράνες αυτές προκύπτουν από την επίστρωση μονο- ή διπλοστοιβάδων λιπιδίων σε στερεή επιφάνεια και εμφανίζουν μηχανική σταθερότητα διατηρώντας τη ρευστότητα των λιπιδίων^{1, 5}. Ο συνδυασμός σταθερότητας και ρευστότητας επιτρέπει την εφαρμογή τεχνικών μελέτης επιφανειών, όπως μικροσκοπία φθορισμού εσωτερικής ανάκλασης⁶ (total internal reflection fluorescence) και βιοαισθητήρες^{7, 8} για τη μελέτη δομικών και δυναμικών χαρακτηριστικών της μεμβράνης. Για την περαιτέρω μελέτη των λειτουργιών των βιολογικών μεμβρανών, μπορούν στα μοντέλα μεμβρανών να προστεθούν τα λειτουργικά τους «εξαρτήματα», οι μεμβρανικές πρωτεΐνες. Αυτό γίνεται συνήθως με δύο τρόπους. Ο ένας τρόπος αφορά το σχηματισμό λιπιδικών μεμβρανών που περιέχουν ολόκληρες μεμβρανικές πρωτεΐνες, δηλαδή μαζί με τις διαμεμβρανικές τους επικράτειες. Ο άλλος τρόπος αφορά το σχηματισμό μεμβρανών που περιέχουν λιπίδια στα οποία μπορούν να προσδεθούν οι εξωκυτταρικές επικράτειες των μεμβρανικών πρωτεϊνών μέσω ειδικών μορίων, λόγου χάρη βιοτίνης ή ουράς ιστιδινών² (His-tag).

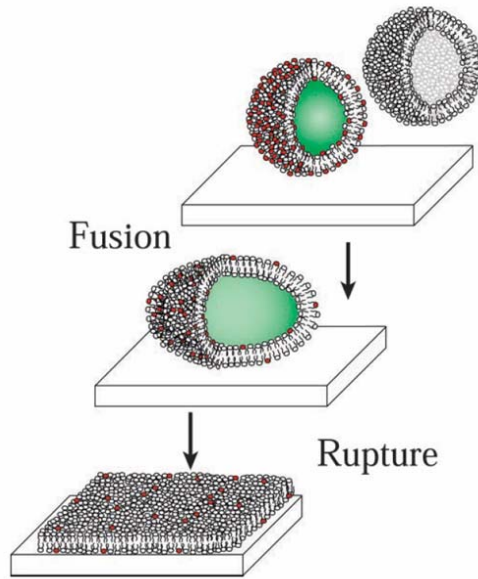
Οι ακουστικοί βιοαισθητήρες έχουν εκτενώς χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του σχηματισμού λιπιδικών μεμβρανών⁹⁻¹¹ και αλληλεπιδράσεων μεταξύ μεμβρανών και διαλυτών ουσιών ή μεμβρανικών πρωτεϊνών και προσδετών τους¹²⁻¹⁵. Το επόμενο βήμα είναι μελέτη της αλληλεπίδρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών στην επιφάνεια των βιοαισθητήρων με προσδέτες τους στην κυτταρική μεμβράνη ολόκληρων κυττάρων. Η διαδικασία αυτή είναι προέκταση της μελέτης της πρόσδεσης μεταξύ μεμβρανικών υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων και ακινητοποιημένων σε μια επιφάνεια προσδετών, η οποία πλησιάζει ακόμα περισσότερο στη φυσιολογική κατάσταση που διέπει την διακυτταρική αλληλεπίδραση και επικοινωνία. Επομένως, στόχος είναι ο σχηματισμός λιπιδικών μεμβρανών στην επιφάνεια βιοαισθητήρων όπου θα παρουσιάζουν πρωτεΐνες σε συνθήκες που θα ομοιάζουν στη φυσική κατάσταση, θα εμφανίζουν δηλαδή

ρευστότητα και πλευρική διάχυση, και οι οποίες θα μπορούν άμεσα να αλληλεπιδράσουν με κύτταρα.

1. Σχηματισμός λιπιδικών διπλοστοιβάδων στην επιφάνεια ακουστικών βιοαισθητήρων

Υποστηριζόμενες λιπιδικές διπλοστοιβάδες έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη μελέτη μοριακών αλληλεπιδράσεων σε διεπιφάνειες ως μοντέλα για διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις⁴. Το βασικό χαρακτηριστικό της υποστηριζόμενης λιπιδικής διπλοστοιβάδας είναι ότι τα μεμονωμένα λιπίδια εμφανίζουν μεγάλη κινητικότητα, καθώς και όποιο μόριο συνδεθεί στην ανώτερη στοιβάδα λιπιδίων. Υποστηριζόμενες διπλοστοιβάδες μπορούν να σχηματιστούν σε επιφάνειες γυαλού, μίκας ή χαλαζία όπου γίνεται είτε εναπόθεση μιας στοιβάδας από διεπιφάνεια αέρα/νερού με τη μέθοδο Langmuir-Blodgett είτε από σύντηξη προσχηματισμένων λιποσωμάτων^{1, 5}. Η περισσότερο κοινή μέθοδος σχηματισμού λιπιδικών διπλοστοιβάδων στην επιφάνεια βιοαισθητήρων είναι η σύντηξη και το άπλωμα λιποσωμάτων. Ο μηχανισμός σχηματισμού έχει μελετηθεί με τεχνικές μικροσκοπίας φθορισμού, μικροσκοπίας ατομικών δυνάμεων (atomic force microscopy) και ακουστικούς βιοαισθητήρες^{9, 11, 16-18}. Η διαδικασία αυτή έχει διάφορα βήματα: προσκόλληση στην επιφάνεια, πεπλάτυνση των λιποσωμάτων, ρήξη και σχηματισμός μονής διπλοστοιβάδας (**Εικ. 7.1**). Κατά την προσκόλληση των λιποσωμάτων στην επιφάνεια και τη συσσώρευση ολοένα και περισσότερων λιποσωμάτων, συμβαίνουν διάφορες αλληλεπιδράσεις που μπορούν να παίξουν το ρόλο τους στον τελικό σχηματισμό της διπλοστοιβάδας. Αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν ανάμεσα στα λιποσώματα και την επιφάνεια, ανάμεσα στα λιποσώματα μεταξύ τους αλλά και μέσα στα ίδια τα λιποσώματα. Όλες αυτές θα δράσουν παραμορφωτικά στο στρώμα λιποσωμάτων στην επιφάνεια. Όταν ξεπεραστεί ένα κατώφλι για την παραμόρφωση των λιποσωμάτων, συμβαίνει σύντηξη λιποσωμάτων σε μεγαλύτερες πιο ασταθείς δομές, οι οποίες διαρρινύονται για να σχηματίσουν «φύλλα» διπλοστοιβάδας, ενώ το περιεχόμενο των λιποσωμάτων χάνεται. Τα «φύλλα» διπλοστοιβάδας που παράγονται συνδέονται τελικά μεταξύ τους για το σχηματισμό μιας μεγάλης επιφάνειας διπλοστοιβάδας λιπιδίων. Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τον τελικό σχηματισμό διπλοστοιβάδας και την κινητική της διαδικασίας. Γενικά, ο σχηματισμός εξαρτάται από την ποσότητα λιπιδίων και το χρόνο έκθεσης τους με την επιφάνεια⁹. Άλλοι παράγοντες είναι η ωσμωτική πίεση, η οποία διευκολύνει τη διαδικασία της σύντηξης και ρήξης των λιποσωμάτων¹⁷, και το επιφανειακό φορτίο των λιποσωμάτων, το οποίο καθορίζει τη διαδικασία προσκόλλησης των λιποσωμάτων στην επιφάνεια και την μεταξύ τους αλληλεπίδραση¹¹.

Οι εφαρμογές των υποστηριζόμενων λιπιδικών διπλοστοιβάδων έγιναν εμφανείς έπειτα από το σχηματισμό τέτοιων μεμβρανών με ενσωματωμένες πρωτεΐνες και την αλληλεπίδρασή τους με κύτταρα¹⁹. Ακολούθως, οι υποστηριζόμενες διπλοστοιβάδες έχουν βοηθήσει στην ανάλυση της κυτταρικής προσκόλλησης, μέσα από τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των μεμβρανικών πρωτεϊνών CD2-CD58^{20, 21}, και τη μελέτη της ανοσολογικής σύναψης⁶. Επίσης, σε τέτοια συστήματα επιτρέπεται ο υπολογισμός κινητικών παραμέτρων και συγγένειας σε 2D στην περιοχή επαφής κυττάρου/λιπιδικής μεμβράνης.



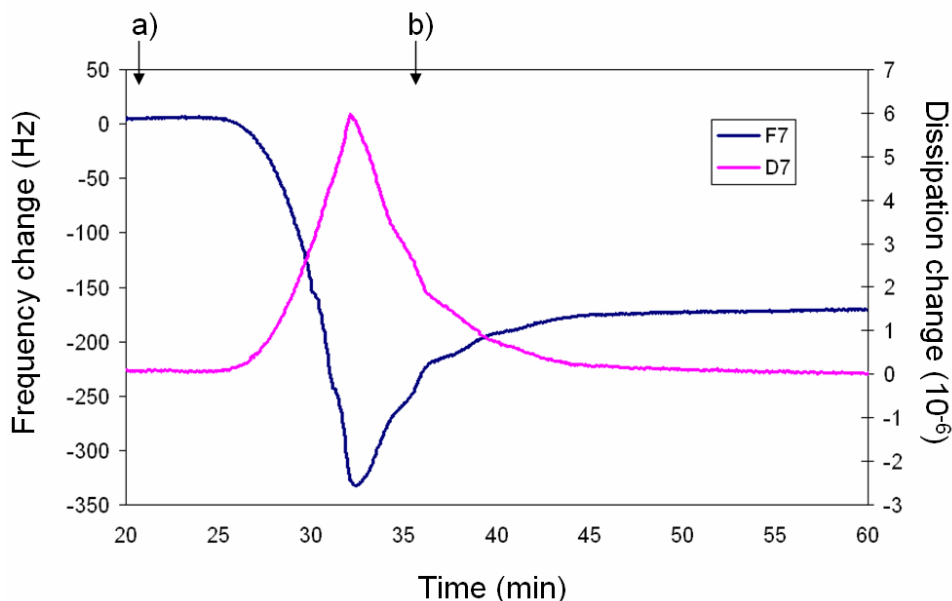
Εικ. 7.1. Σχηματισμός υποστηριζόμενης λιπιδικής διπλοστοιβάδας μέσω σύντηξης λιποσωμάτων. Τα προσροφημένα λιποσώματα συντήκονται μέχρι ένα κρίσιμο μέγεθος και κατόπιν διαρρηγνύονται για να σχηματίσουν διπλοστοιβάδα. (Πηγή: Johnson et al., 2002)

1.1. Υδρόφιλες επιφάνειες για τη δημιουργία λιπιδικών διπλοστοιβάδων

Με τη χρήση βιοαισθητήρων, έχει παρατηρηθεί σχηματισμός λιπιδικών διπλοστοιβάδων σε διάφορες επιφάνειες^{9-12, 22}, όπως SiO_2 , χρυσός με συζευγμένη αυτοσυγκροτούμενη μονοστοιβάδα (self-assembled monolayer) θειολών και πολυμερή. Γενικά, απαιτείται μια υδρόφιλη επιφάνεια^{10, 11, 23}. Για το σχηματισμό λιπιδικών διπλοστοιβάδων στην επιφάνεια βιοαισθητήρων, ακολουθήθηκε η διαδικασία σχηματισμού σε επιφάνεια SiO_2 με τη χρήση συσκευών του ακουστικού βιοαισθητήρα QCM-D που προσφέρονται με έτοιμες επιφάνειες SiO_2 (www.q-sense.com). Λιποσώματα από φωσφατιδυλοχολίνη (egg phosphatidylcholine, eggPC) (Avanti Polar Lipids) δημιουργήθηκαν έπειτα στέγνωμα των λιπιδίων σε χλωροφόρμιο υπό αέριο N_2 και διαλυτοποίηση σε HBS (Hepes buffered saline, 10mM Hepes, 150mM NaCl). Τα εναιωρήματα λιπιδίων κατόπιν σχημάτισαν λιποσώματα μέσω φιλτραρίσματος (Syringe-type extruder, Avestin) σε πολυκαρβονικές μεμβράνες διαμέτρου πόρων 50 nm.

Η επιφάνεια SiO_2 γίνεται πολύ υδρόφιλη μετά από χάραξη της με χημεία πλάσματος (Plasma Etcher, Harrick). Η προσθήκη διαλύματος λιποσωμάτων υπό χαμηλή ροή στην επιφάνεια SiO_2 του ακουστικού βιοαισθητήρα QCM-D παρακολούθηθηκε σε πραγματικό χρόνο από το ακουστικό σήμα σε συχνότητα 35 MHz (Εικ. 7.2). Τα λιποσώματα προσέγγισαν την επιφάνεια μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην επιφάνεια SiO_2 και τις υδρόφιλες κεφαλές των λιπιδίων. Ακολούθησε σχηματισμός διπλοστοιβάδας λιπιδίων, που διακρίνεται από χαρακτηριστική επαναφορά του σήματος. Σύμφωνα με την αλλαγή της συχνότητας του κύματος στην ταλάντωση (overtone) $n=7$ (176 ± 15 Hz), η προσροφημένη μάζα των λιπιδίων στην επιφάνεια του αισθητήρα μπορεί να υπολογιστεί^{9, 11}: $\Delta m = 445 \text{ ng cm}^{-2}$. Η τιμή αυτή είναι παρόμοια με τιμές που έχουν παρατηρηθεί για σχηματισμό λιπιδικής διπλοστοιβάδας στην επιφάνεια SiO_2 του ακουστικού βιοαισθητήρα QCM-D, παρά τη διαφορετική σύσταση σε λιπίδια. Η σύγκριση μεταξύ τιμών συχνότητας ανάμεσα στις ταλαντώσεις γενικά δεν προτείνεται, αν και εμφανίζεται στη

βιβλιογραφία για τη σύγκριση της εναπόθεσης λιπιδίων στην επιφάνεια του αισθητήρα QCM-D^{9, 11}.

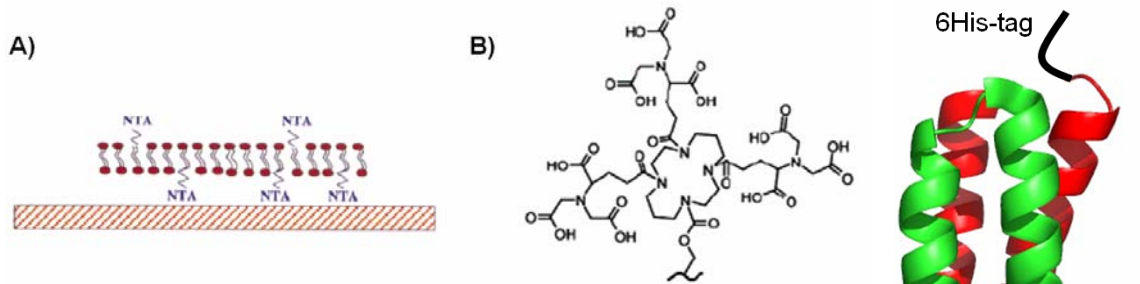


Εικ. 7.2. Μεταβολή της συχνότητας και της ενεργειακής απώλειας του ακουστικού βιοαισθητήρα QCM-D ως προς το χρόνο κατά την εναπόθεση και αλληλεπίδραση λιποσωμάτων με επιφάνεια SiO₂. a) Προσθήκη λιποσωμάτων (0,4 mg ml⁻¹), b) ξέπλυμα με HBS.

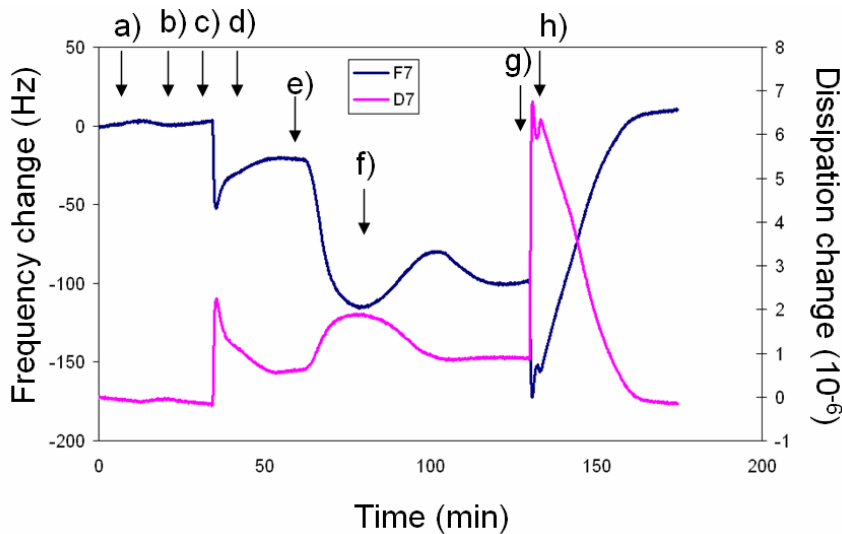
Ανάλογα με τη λιπιδική σύσταση των λιποσωμάτων, οι λιπιδικές μεμβράνες που δημιουργούνται στην επιφάνεια βιοαισθητήρων μπορούν να έχουν διάφορες εφαρμογές. Μια χρήσιμη εφαρμογή είναι η χρήση λιπιδίων συζευγμένων με ενεργές ομάδες, λόγω χάρη βιοτίνη ή ομάδες νιτριλοτριοξικού (nitrilotriacetic acid, NTA), για την πρόσδεση πρωτεϊνών στα λιπίδια και την περαιτέρω μελέτη των πρωτεϊνών πάνω στη λιπιδική μεμβράνη^{2, 12, 13, 23}. Επομένως, κατά το σχηματισμό των λιποσωμάτων, προστέθηκε σε μοριακή αναλογία 5% ένα συνθετικό λιπίδιο^{23, 24}, διοκυλδωδεκυλαμίνη (DODA) συζευγμένη στην κεφαλή της με ομάδα τρις-νιτριλοτριοξικού οξέος (tris-nitrilotriacetic acid, tris-NTA) (προσφορά του Dr. A. Kleefen, Biocenter, Germany). Τα λιποσώματα αυτά προστέθηκαν στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα για το σχηματισμό λιπιδικής διπλοστοιβάδας που θα παρουσιάζει ομάδες tris-NTA (**Εικ. 7.3**). Οι ομάδες NTA επιτρέπουν την πρόσδεση πρωτεϊνών που φέρουν ουρά ιστιδινών παρουσία Ni²⁺ πάνω στην επιφάνεια του αισθητήρα.

Για τη δοκιμή της λιπιδικής μεμβράνης με NTA, δοκιμάστηκε η πρωτεΐνη Rop, γενετικά σχεδιασμένη να περιέχει μια ουρά ιστιδινών στο C τελικό άκρο. Η Rop είναι μια βακτηριακή πρωτεΐνη που ελέγχει την αντιγραφή της οικογένειας πλασμιδίων ColE1 μέσω αλληλεπίδρασης με δύο RNA αλληλουχίες σχετιζόμενες με την περιοχή έναρξης αντιγραφής^{25, 26}. Η πρωτεΐνη Rop είναι μια μικρή ομοδιμερής πρωτεΐνη. Κάθε μονομερές έχει μοριακό βάρος 7 kDa και αποτελείται από 63 αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία σχηματίζουν δύο α έλικες συνδεδεμένες με μια στροφή. Η Rop αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα 4- α -ελικοειδούς δεματίου²⁷ (4- α -helical bundle) (**Εικ. 7.4**). Οι α έλικες είναι αμφιπαθικές, σχηματίζοντας ένα υδρόφοβο πυρήνα που συγκρατεί τις α έλικες μεταξύ τους, ενώ εξωτερικά παρουσιάζουν υδρόφιλα αμινοξικά κατάλοιπα. Η Rop-(His-tag) προστέθηκε στην

επιφάνεια του βιοαισθητήρα QCM-D που παρουσίαζε μια λιπιδική διπλοστοιβάδα με λιπίδια tris-NTA παρουσία Ni^{2+} . Το ακουστικό σήμα έδειξε την ειδική αλληλεπίδραση της Rop-(His-tag) με τα λιπίδια tris-NTA ($71,5 \pm 13,1$ Hz και $0,293 \pm 0,099 \cdot 10^{-6}$ στη συχνότητα 35 MHz) (Εικ. 7.5) η οποία είναι αναστρέψιμη, καθώς προσθήκη του χηλικού παράγοντα αιθυλενο-διαμινοτριοξικό οξύ (EDTA) που δεσμεύει τα ιόντα Ni^{2+} προκαλεί το ξέπλυμα όλης της ποσότητας της προσδεμένης πρωτεΐνης. Επιπλέον, παρατηρείται πολύ μικρή μη ειδική αλληλεπίδραση της Rop-(His-tag) με τη λιπιδική μεμβράνη απουσία του Ni^{2+} . Η μεταβολή σήματος και η ακουστική αναλογία για την Rop-(His-tag), $\Delta D/\Delta F = 0,004 \pm 0,002$ ($10^{-6}/\text{Hz}$), προδίδουν μια πολύ σταθερή και άκαμπτη δομή²⁸. Επομένως, η λιπιδική διπλοστοιβάδα με tris-NTA στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πρόσδεση οποιασδήποτε πρωτεΐνης με ουρά ιστιδίνης.



Εικ. 7.3. Α) Λιπιδική διπλοστοιβάδα με λιπίδια NTA σε υδρόφιλη επιφάνεια βιοαισθητήρα. (Πηγή: Gizeli and Glad, 2004). Β) Ομάδα τρις-νιτριλοτριοξικού οξέος (tris-NTA). (Πηγή: Valiokas et al., 2008)



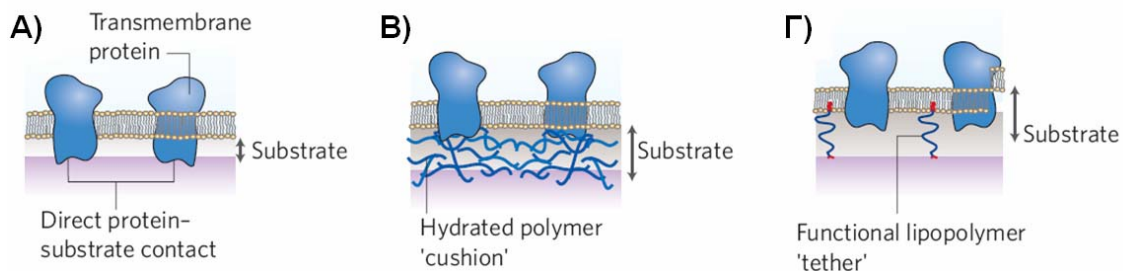
Εικ. 7.5. Μεταβολή της συχνότητας και της ενεργειακής απώλειας του ακουστικού βιοαισθητήρα QCM-D ως προς το χρόνο κατά την προσθήκη της πρωτεΐνης Rop-(His-tag) σε λιπιδική διπλοστοιβάδα με λιπίδια tris-NTA. a) Προσθήκη Rop-(His-tag) ($0,4 \text{ mg ml}^{-1}$), b) ξέπλυμα με tris-buffered saline (TBS), c) προσθήκη $NiSO_4$ (100 mM), d) ξέπλυμα με TBS, e) προσθήκη Rop-(His-tag) ($0,4 \text{ mg ml}^{-1}$), f) ξέπλυμα με TBS, g) προσθήκη EDTA (350 mM), h) ξέπλυμα με TBS.

Εικ. 7.4. Δομή του διμερούς της πρωτεΐνης Rop με ουρά 6 ιστιδινών στο C τελικό άκρο. (Πηγή: PDB ID 1rop)

1.2. Πρωτεϊνικές επιφάνειες για την δημιουργία προσδεμένων λιπιδικών διπλοστοιβάδων

Οι λιπιδικές διπλοστοιβάδες που είναι υποστηριζόμενες σε στερεό υπόστρωμα εμφανίζουν μερικά μειονεκτήματα. Το κυριότερο είναι ότι λόγω της

εγγύτητας τους με το στερεό υπόστρωμα δυσκολεύουν την ενσωμάτωση ολόκληρων μεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες μπορεί να χάνουν πλευρική διάχυση και ακόμα να αποδιατάσσονται^{4, 29}. Επομένως, δεν είναι δυνατή με αυτό τον τρόπο η μελέτη ολόκληρων μεμβρανικών πρωτεϊνών. Το πρόβλημα της εγγύτητας μπορεί να ξεπεραστεί με δύο τρόπους, το διαχωρισμό της λιπιδικής μεμβράνης από το στερεό υπόστρωμα με ένα στρώμα μαλακού πολυμερούς ή την πρόσδεση λιπιδίων της διπλοστοιβάδας στην επιφάνεια μέσω ενός μορίου διαχωριστή που θα δημιουργεί κενό ανάμεσα στη μεμβράνη και το στερεό υπόστρωμα^{2, 30}. Οι δύο αυτοί τρόποι (Εικ. 7.6) ελαττώνουν την τριβή ανάμεσα στην κατώτερη επιφάνεια της διπλοστοιβάδας και το στερεό υπόστρωμα και προσφέρουν ένα μη αποδιατακτικό περιβάλλον για ενσωματωμένες ολόκληρες μεμβρανικές πρωτεΐνες.



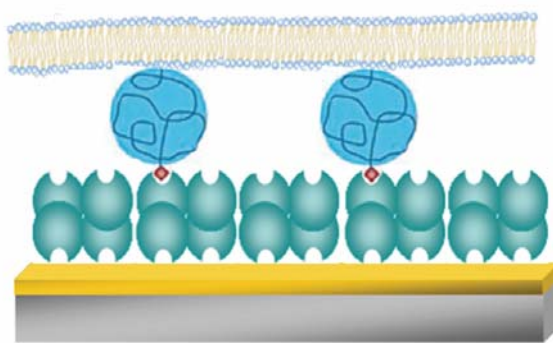
Εικ. 7.6. Σχηματισμός λιπιδικών διπλοστοιβάδων για την ενσωμάτωση μεμβρανικών πρωτεϊνών.

A) Υποστηριζόμενη λιπιδική διπλοστοιβάδα όπου οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι σε άμεση επαφή με το υπόστρωμα. B) Λιπιδική διπλοστοιβάδα πάνω σε στρώμα πολυμερούς όπου οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να διαχέονται πλευρικά στη διπλοστοιβάδα. Γ) Λιπιδική διπλοστοιβάδα προσδεμένη μέσω πολυμερικών μορίων διαχωριστών, όπου οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να διαχέονται πλευρικά στη διπλοστοιβάδα. (Πηγή: Tanaka and Sackmann, 2005)

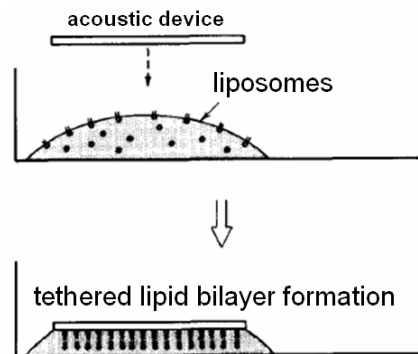
Για το σχηματισμό λιπιδικών διπλοστοιβάδων στην επιφάνεια βιοαισθητήρων, επιλέχθηκε η τεχνική των προσδεμένων διπλοστοιβάδων³⁰, οι οποίες επιτρέπουν το σχηματισμό λιπιδικής μεμβράνης στην επιφάνεια βιοαισθητήρα με ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες σε συνθήκες που προσομοιάζουν το φυσικό τους περιβάλλον. Οι προσδεμένες διπλοστοιβάδες μπορούν να σχηματιστούν με διάφορες τεχνικές, οι οποίες εξαρτώνται από το μόριο διαχωριστή (spacer). Η περισσότερο συνηθισμένη μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση τροποποιημένων λιπιδίων για το σχηματισμό προσδεμένης λιπιδικής μεμβράνης. Τα λιπίδια αυτά είναι συζευγμένα με μόρια διαχωριστές που έχουν μία αλυσίδα πολυαιθυλενογλυκόλης (poly-ethylene glycol, PEG) και τελειώνουν σε μια ενεργή ομάδα, λόγω χάρη βιοτίνη ή θειόλη³¹⁻³³. Η αλυσίδα PEG δεν εμφανίζει μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια και προσφέρει ένα μαλακό και υδρόφιλο στρώμα διαχωρισμού^{1, 34}. Για λιπίδια συζευγμένα με PEG-θειόλη, έχει αναφερθεί σχηματισμός σε κατάλληλη επιφάνεια χρυσού μιας αυτοσυγκροτούμενης μονοστοιβάδας (self-assembled monolayer, SAM) από μόρια θειολών, ανάμεσα στα οποία υπάρχουν θειόλες ομοιοπολικά συζευγμένες με λιπίδια. Ακολούθως, ο σχηματισμός της λιπιδικής διπλοστοιβάδας συμβαίνει με προσθήκη και σύντηξη λιποσωμάτων³⁵ ή με αραίωση μικκυλίων λιπιδίων/απορρυπαντικού για την απομάκρυνση των μορίων του απορρυπαντικού και την αυτοσυγκρότηση λιπιδικής μεμβράνης^{31, 36, 37}. Άλλος τρόπος που έχει αναφερθεί είναι ο σχηματισμός

προσδεμένης λιπιδικής μεμβράνης στην οποία το ρόλο του μορίου διαχωριστή παίζει μια μεμβρανική πρωτεΐνη. Η μεμβρανική πρωτεΐνη προσδέεται στην επιφάνεια με μια επικράτειά της ενώ το διαμεμβρανικό της τμήμα βρίσκεται ψηλότερα από την επιφάνεια και βοηθά στην αυτοσυγκρότηση λιπιδικής μεμβράνης μέσω αραίωσης μικκυλίων λιπιδίων/απορρυπαντικού^{32, 36, 38}.

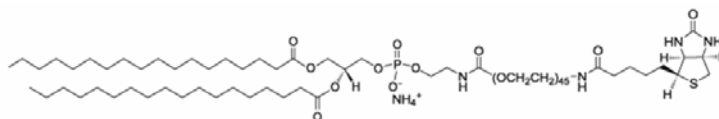
Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στόχευσε στο σχηματισμό προσδεμένης λιπιδικής διπλοστοιβάδας πάνω σε επιφάνεια βιοαισθητήρα όπου ήταν προσροφημένη η πρωτεΐνη νουτραβιδίνη (neutravidin) (Thermo Scientific). Η νουτραβιδίνη ήταν στερεό υπόστρωμα και ταυτόχρονα υποδοχέας για την πρόσδεση λιπιδίων συζευγμένων με μόρια διαχωριστές PEG/βιοτίνης³⁹. Ο σχηματισμός λιπιδικής διπλοστοιβάδας έγινε με προσθήκη λιποσωμάτων στην επιφάνεια νουτραβιδίνης του αισθητήρα τύπου Love (**Εικ. 7.7**).



Εικ. 7.7. Σχηματική απεικόνιση μιας προσδεμένης λιπιδικής διπλοστοιβάδας σε στρώμα νουτραβιδίνης στην επιφάνεια βιοαισθητήρα.

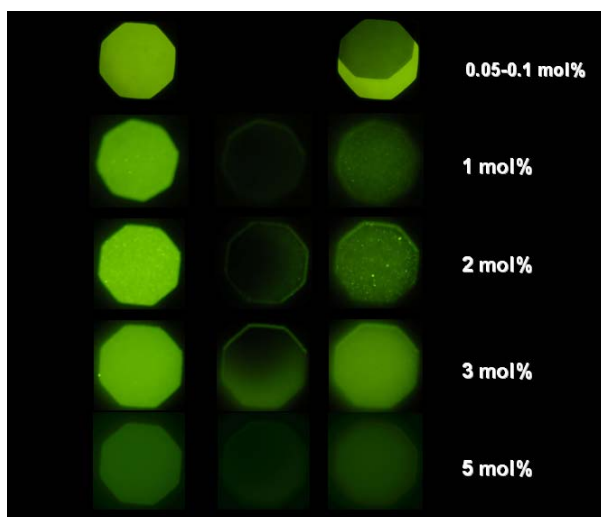


Εικ. 7.8. Σχηματισμός προσδεμένης λιπιδικής διπλοστοιβάδας στην επιφάνεια των συσκευών των ακουστικών βιοαισθητήρων.



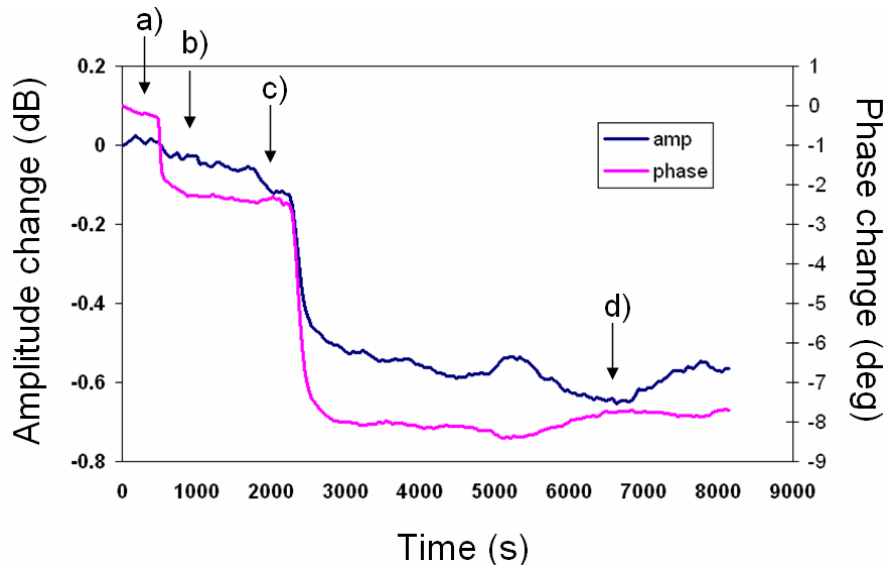
Εικ. 7.9. Βιοτινυλιωμένο φωσφολιπίδιο (PE) με PEG ως μόριο διαχωριστή. (Πηγή: www.avantilipids.com)

Αρχικά, για την διερεύνηση των συνθηκών σχηματισμού λιπιδικών μεμβρανών από λιποσώματα στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, έγιναν δοκιμές εκτός του συστήματος του αισθητήρα χρησιμοποιώντας μόνο τις συσκευές του βιοαισθητήρα (**Εικ. 7.8**) και παρατηρώντας την επιφάνεια των συσκευών σε μικροσκόπιο φθορισμού. Λιποσώματα σχηματίστηκαν από eggPC και ένα συνθετικό λιπίδιο, φωσφατιδυλαιθανολαμίνη συζευγμένη με ένα μια αλυσίδα PEG (2 kDa) που τελειώνει σε μόριο βιοτίνης (b-PEG-PE) (Avanti Polar Lipids) (**Εικ. 7.9**). Η μοριακή αναλογία του λιπιδίου b-PEG-PE στο τελικό μίγμα κυμάνθηκε από 0,5 ως 15%. Επίσης, στο μίγμα των λιπιδίων προστέθηκε σε μοριακή αναλογία 1% ένα λιπίδιο συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική, PC συζευγμένη με τη χρωστική NBD (νιτρο-βενζοξυ-διαζόλη) στη μια από τις αλειφατικές αλυσίδες (NBD-PC) (Avanti Polar Lipids). Το λιπίδιο αυτό επιτρέπει την παρατήρηση της μεμβρανικής επιφάνειας στο μικροσκόπιο φθορισμού. Τα λιποσώματα σχηματίστηκαν σε διάλυμα HBS έπειτα από φιλτράρισμα σε πολυκαρβονικές μεμβράνες διαμέτρου πόρων 100 nm.

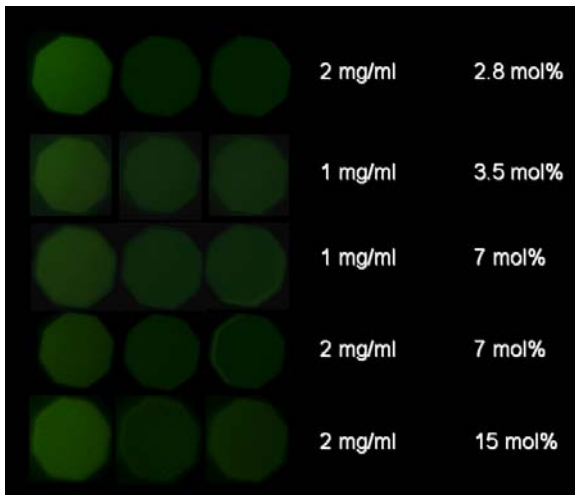


Εικ. 7.10. Δοκιμασία FRAP σε επιφάνειες νουτραβιδίνης για το σχηματισμό προσδεμένης λιπιδικής διπλοστοιβάδας από λιποσώματα eggPC/NBD-PC(1% mol) με διαφορετικές μοριακές αναλογίες του λιπιδίου με το μόριο διαχωριστή b-PEG-PE. Χαμηλή μοριακή αναλογία του λιπιδίου δίνει σχηματισμό λιποσωμικού στρώματος ενώ καλύτερος σχηματισμός λιπιδικής διπλοστοιβάδας συνέβη με τη μοριακή αναλογία 3%. Ο χρόνος αναμονής για την επαναφορά του φθορισμού ήταν 10 λεπτά.

Η επιφάνεια χρυσού του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love καθαρίστηκε και επώαστηκε με 20 μl νουτραβιδίνης 1 mg ml^{-1} για 1 ώρα. Έπειτα, η συσκευή του βιοαισθητήρα τοποθετήθηκε πάνω σε σταγόνα λιποσωμάτων eggPC/NBD-PC/b-PEG-PE συγκέντρωσης 2 mg ml^{-1} για 30-60 min. Ακολούθησε αραίωση με νερό, κάτι που βοηθά στη διάρρηξη των λιποσωμάτων λόγω ώσμωσης¹⁷. Η συσκευή του αισθητήρα μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα χωρίς να έρθει σε επαφή με αέρα για παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού. Ο σχηματισμός λιπιδικής διπλοστοιβάδας ελέγχθηκε με την δοκιμασία επαναφοράς φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP). Εν συντομία, μια μικρή περιοχή της επιφάνειας του αισθητήρα που επώαστηκε με λιποσώματα παρατηρείται στο μικροσκόπιο. Χρησιμοποιώντας το ειδικό διάφραγμα, το μονοχρωματικό φως εστιάζεται στη μικρή περιοχή προκαλώντας φωτολεύκανση των χρωμοφώρων που βρίσκονται εκεί. Το αποτέλεσμα είναι να χαθεί ο φθορισμός από την περιοχή αυτή. Η παροχή φωτός διακόπτεται για ένα χρονικό διάστημα 10 λεπτών και η περιοχή παρατηρείται ξανά. Η παρουσία λιπιδικής διπλοστοιβάδας επιβεβαιώνεται αν έχει επανέλθει ο φθορισμός στην περιοχή φωτολεύκανσης, καθώς τα σκοτεινιασμένα χρωμοφόρα λιπίδια θα έχουν δώσει τη θέση τους σε φθορίζοντα λιπίδια λόγω της πλευρικής διάχυσης των λιπιδίων στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Σε αντίθετη περίπτωση δε θα παρατηρείται επαναφορά φθορισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μοριακή αναλογία λιπιδίων που προσφέρει καλύτερο σχηματισμό λιπιδικής διπλοστοιβάδας είναι 3% (Εικ. 7.10). Η ίδια μοριακή αναλογία παρατηρήθηκε ότι δίνει καλύτερη προσδεμένη λιπιδική διπλοστοιβάδα έπειτα από σύντηξη λιποσωμάτων PC/PEG-PE σε επιφάνεια σιλανίου³⁴. Η απόσταση ανάμεσα στην επιφάνεια και τη λιπιδική διπλοστοιβάδα που προσφέρει η αλυσίδα PEG έχει υπολογιστεί³⁴ στα 3,5 nm, απόσταση που επιτρέπει την ενσωμάτωση πολλών μεμβρανικών πρωτεϊνών με μικρή ενδοκυτταρική επικράτεια, όπως λόγου χάρη το HLA-A2. Γενικά, η μοριακή αναλογία του λιπιδίου διαχωριστή παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στο σχηματισμό της λιπιδικής μεμβράνης όσο και στη ρευστότητα της σχηματιζόμενης μεμβράνης³⁰, καθώς μεγάλη συγκέντρωση του λιπιδίου διαχωριστή ενδέχεται να εμποδίζει την πλευρική διάχυση ενσωματωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών.



Εικ. 7.11. Μεταβολή του πλάτους και της φάσης του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love ως προς το χρόνο κατά την αλληλεπίδραση λιποσωμάτων eggPC/b-PEG-PE(7% mol) με επιφάνεια νουτραβιδίνης. a) Προσθήκη νουτραβιδίνης ($0,25 \text{ mg ml}^{-1}$), b) ξέπλυμα με HBS, c) προσθήκη λιποσωμάτων (1 mg ml^{-1}), d) ξέπλυμα με HBS.



Εικ. 7.12. Δοκιμασία FRAP σε επιφάνειες νουτραβιδίνης για το σχηματισμό προσδεμένης λιπιδικής διπλοστοιβάδας από λιποσώματα eggPC/NBD-PC(1% mol) με διαφορετικές μοριακές αναλογίες του λιπιδίου με το μόριο διαχωριστή b-PEG-PE. Οι συσκευές του βιοαισθητήρα τύπου Love παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού μετά το τέλος του πειράματος πραγματικού χρόνου. Καλύτερος σχηματισμός προσδεμένης λιπιδικής διπλοστοιβάδας παρατηρήθηκε για τις μοριακές αναλογίες 3,5 και 7%. Ο χρόνος αναμονής για την επαναφορά του φθορισμού ήταν 10 λεπτά.

Οι λιπιδικές μεμβράνες που σχηματίστηκαν στην επιφάνεια της συσκευής του αισθητήρα δε μπορούν να μεταφερθούν στην ειδική θήκη του αισθητήρα για τη διεξαγωγή ακουστικού πειράματος σε πραγματικό χρόνο. Επομένως, χρειάστηκε να γίνει σχηματισμός της λιπιδικής διπλοστοιβάδας στην επιφάνεια του αισθητήρα σε πραγματικό χρόνο. Στον ακουστικό βιοαισθητήρα προστέθηκε η νουτραβιδίνη (250 μg ml^{-1}) σε πραγματικό χρόνο και ακολούθησε η προσθήκη λιποσωμάτων μοριακής αναλογίας 2,8, 3,5, 7 ή 15% (Εικ. 7.11). Τα λιποσώματα προστέθηκαν σε διάφορες συνθήκες: συγκέντρωση 1 ή 2 mg ml^{-1} , χρόνος αλληλεπίδρασης με την επιφάνεια 1 ή 2 ώρες παρουσία ή απουσία CaCl_2 και ξέπλυμα με διάλυμα HBS ή νερό. Αυτές οι διαφορετικές συνθήκες έχουν δώσει θετικά αποτελέσματα για το σχηματισμό διπλοστοιβάδας από σύντηξη λιποσωμάτων^{10, 34, 39, 40}. Για τον έλεγχο της πλήρους κάλυψης της επιφάνειας του αισθητήρα σε πραγματικό χρόνο, προστέθηκε βιοτινυλιωμένη αλβουμίνη ορού βοδιού (bovine serum albumin, BSA) (Sigma). Μετά

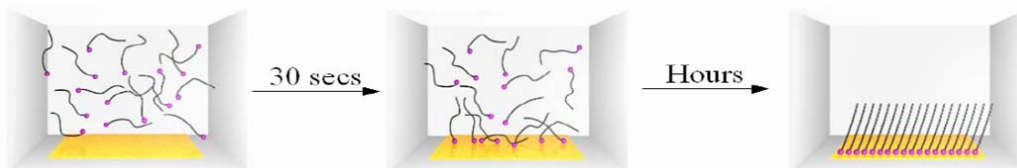
το πέρας του πειράματος, η συσκευή του αισθητήρα παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο φθορισμού για τον έλεγχο σχηματισμού λιπιδικής διπλοστοιβάδας με τη δοκιμασία FRAP (Εικ. 7.12). Καλύτερα αποτελέσματα στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα παρατηρήθηκαν για τις μοριακές αναλογίες 3,5 και 7% b-PEG-PE σε συγκέντρωση 1 mg ml^{-1} και επώαση μιας ώρας. Η συνολική αλλαγή σήματος ($\Delta P=5,8\pm 0,3 \text{ deg}$, $\Delta A=0,47\pm 0,07 \text{ dB}$, $n=3$) ήταν παρόμοια για σχηματισμό λιπιδικής διπλοστοιβάδας σε υδρόφιλη επιφάνεια με SAM μερκαπτοενδεκανόλης¹⁰ ή με πολύ-διμεθυλ-σιλοξάνιο²². Παρόλα αυτά, ο σχηματισμός της λιπιδικής διπλοστοιβάδας δεν ήταν δυνατό να επιβεβαιωθεί πλήρως με τη δοκιμασία FRAP, καθώς κατά την αφαίρεση της συσκευής του αισθητήρα από την ειδική θήκη είναι αναπόφευκτη η έκθεση της επιφάνειας σε αέρα, κάτι που καταστρέφει τη ρευστότητα της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Για την ενσωμάτωση μεμβρανικών πρωτεϊνών στα λιπιδώματα, θα χρειαστεί ανάμιξη των λιποσωμάτων και της πρωτεΐνης παρουσία ήπιου απορρυπαντικού. Το απορρυπαντικό, λόγω χάρη οκτυλ-γλυκοκυρανοσίδιο (octyl- β -gluco-D-pyranoside), θα βοηθήσει στην ενσωμάτωση της ολόκληρης μεμβρανικής πρωτεΐνης στη λιπιδική διπλοστοιβάδα των λιποσωμάτων και θα απομακρυνθεί έπειτα από διάλυση σε ημιδιαπερατές μεμβράνες¹⁹.

2. Σχηματισμός μονοστοιβάδων λιπιδίων σε αυτοσυγκροτούμενες στοιβάδες θειολών στην επιφάνεια βιοαισθητήρων

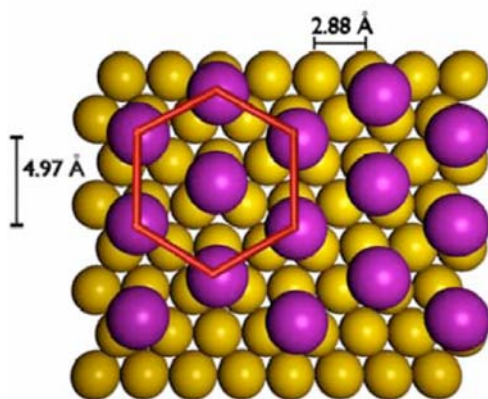
Μια εναλλακτική στρατηγική για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεμβρανικών μορίων είναι η χρήση υβριδικών διπλοστοιβάδων που αποτελούνται από μια μονοστοιβάδα λιπιδίων και μια μονοστοιβάδα αλκανθειολών. Η μέθοδος αυτή έχει ήδη χρησιμοποιηθεί σε επιφάνειες βιοαισθητήρων για την εναπόθεση πρωτεϊνών στη λιπιδική μονοστοιβάδα μέσω τροποποιημένων λιπιδίων^{41, 42}. Λιπιδική μονοστοιβάδα μπορεί να σχηματιστεί με την προσθήκη λιποσωμάτων στην επιφάνεια των αισθητήρων που έχει ήδη καλυφθεί με υδρόφοβη αυτοσυγκροτούμενη μονοστοιβάδα (self-assembled monolayer, SAM) αλκανθειολών. Τα SAMs χρησιμοποιούνται εκτενώς στην χημεία επιφανειών και γενικά προσφέρουν ευκολία στην προετοιμασία τους καθώς και διάφορες ιδιότητες στην επιφάνεια που εναποτίθενται, όπως, υδροφιλικότητα, υδροφοβικότητα και δραστικές ή μη ενεργές ομάδες^{43, 44}. Τα SAMs μπορούν να σχηματιστούν αυθόρμητα σε επιφάνεια χρυσού από διάφορα μόρια που περιέχουν θειο-ομάδες (-SH), όπως αλκανθειόλες, διακυλδισουφίδια ή διακυλσουλφίδια. Οι αλκανθειόλες που χρησιμοποιούνται έχουν τρία χαρακτηριστικά: την θειο-ομάδα, μια αλυσίδα υδρογονανθράκων και την ομάδα κεφαλής (head group). Ο δεσμός που σχηματίζεται ανάμεσα στο χρυσό και το θείο είναι πολύ ισχυρός και επιτρέπει το σχηματισμό μονοστοιβάδων παρουσία και άλλων ενεργών ομάδων. Οι δεσμοί van der Waals ανάμεσα στις αλυσίδες υδρογονάνθρακα των αλκανθειολών αποτελούν την κινητήρια δύναμη για την αυτοσυγκρότηση της μονοστοιβάδας. Οι ιδιότητες των ομάδων κεφαλής καθορίζουν και τις ιδιότητες της επιφάνειας.

Η προετοιμασία των SAMs περιλαμβάνει την επώαση μιας επιφάνειας χρυσού με αλκοολικό διάλυμα αλκανθειόλης και μια μονοστοιβάδα σχηματίζεται αυθόρμητα στην επιφάνεια του αισθητήρα μέσα στις επόμενες ώρες. Αρχικά, σχηματίζεται μια ανοργάνωτη μονοστοιβάδα στα πρώτα δευτερόλεπτα της

αλληλεπίδρασης, η οποία με το χρόνο οργανώνεται με την προσθήκη στην επιφάνεια περισσότερων μορίων και το στενό πακετάρισμα μεταξύ των αλυσίδων υδρογονάνθρακα (Εικ. 7.13). Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός πάνω στο χρυσό ενός καλά οργανωμένου και στενά πακεταρισμένου στρώματος αλκανθειολών σε εξαγωνικό σχήμα⁴⁴ (Εικ. 7.14) από το οποίο έχει απομακρυνθεί ο διαλύτης καθώς και διάφορα μολύνοντα υλικά. Η οργάνωση και η ποιότητα των SAMs εξαρτάται τελικά από διάφορους παράγοντες: τον καθαρισμό της επιφάνειας χρυσού, την καθαρότητα της αλκανθειόλης, το μήκος της αλυσίδας υδρογονανθράκων και το χρόνο επώασης για το σχηματισμό της μονοστιβάδας^{10, 24, 45-48}.



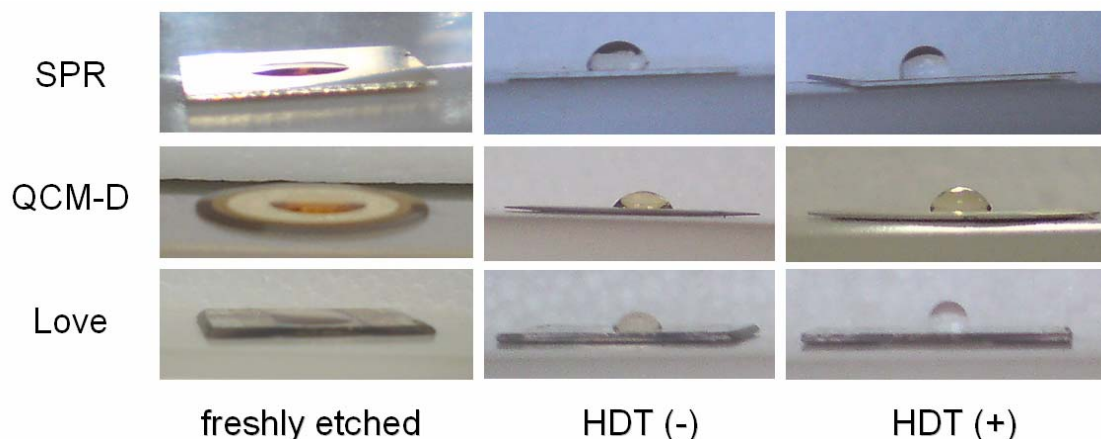
Εικ. 7.13. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας αυτοσυγκρότησης. Για τη μεγιστοποίηση των δεσμών van der Waals μεταξύ των αλυσίδων, οι αλκανθειόλες σχηματίζουν γωνία 30° με την επιφάνεια. (Πηγή: www.asemblon.com)



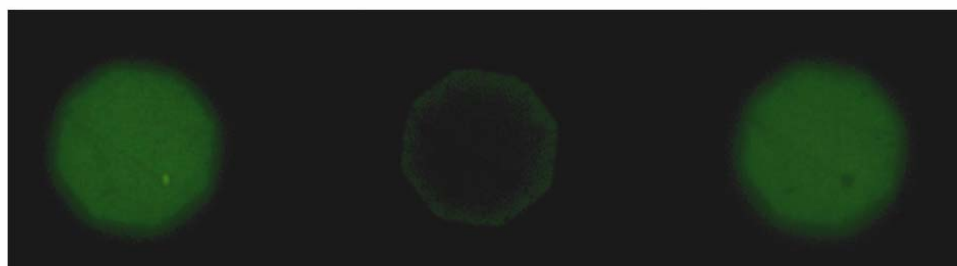
Εικ. 7.14. Κάτοψη ενός στενά πακεταρισμένου SAM αλκανθειόλης σε εξαγωνικό σχήμα. Διακρίνονται οι αποστάσεις μεταξύ των μεμονωμένων μορίων αλκανθειόλης. (Πηγή: www.asemblon.com)

Για το σχηματισμό λιπιδικής μονοστιβάδας πάνω σε SAM, χρειάζεται οι ομάδες κεφαλής των αλκανθειολών να παρουσιάζουν μια υδρόφοβη επιφάνεια. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας μεθυλ-ομάδες (-CH₃) ως ομάδες κεφαλής^{9, 10, 23, 41, 42}. Επομένως, χρησιμοποιήθηκε η δεκαεξανθειόλη (hexadecanethiol, HDT) (Sigma) ως αλκανθειόλη για το σχηματισμό υδρόφοβων SAM στην επιφάνεια βιοαισθητήρων. Χρησιμοποιήθηκαν επιφάνειες χρυσού από τις συσκευές των βιοαισθητήρων SPR, QCM-D και Love. Οι επιφάνειες χρυσού ξεπλύθηκαν εκτενώς με νερό και οργανικούς διαλύτες (αιθανόλη, ακετόνη) και έπειτα καθαρίστηκαν με χάραξη πλάσματος. Κατόπιν προστέθηκαν σε καθαρά φιαλίδια με αλκοολικό διάλυμα HDT 10⁻⁶ M και αφέθηκαν *overnight*. Την επόμενη μέρα, ο σχηματισμός του SAM ελέγχθηκε με την προσθήκη μιας σταγόνας νερού (8 μl) στο SAM. Η γωνία επαφής της σταγόνας νερού με την επιφάνεια ήταν αρκετά μεγαλύτερη για τα καλά σχηματισμένα υδρόφοβα SAMs εν συγκρίσει με τους αρνητικούς μάρτυρες (Εικ. 7.15). Στις συσκευές του βιοαισθητήρα QCM-D, η διαφορά στη γωνία επαφής είναι λιγότερο εμφανής. Αυτό ίσως οφείλεται σε μεγαλύτερη τραχύτητα της επιφάνειας χρυσού στις συσκευές αυτές. Οι συσκευές βιοαισθητήρα με σχηματισμένο

υδρόφοβο SAM χρησιμοποιήθηκαν για το σχηματισμό λιπιδικής μονοστοιβάδας μέσω σύντηξης λιποσωμάτων στην επιφάνειά τους. Οι συσκευές τοποθετήθηκαν πάνω σε σταγόνα λιποσωμάτων eggPC/NBD-PC(1% mol) συγκέντρωσης 2 mg ml^{-1} για 30-60 min. Ακολούθησε αραίωση με νερό και μεταφορά σε αντικειμενοφόρο πλάκα χωρίς επαφή με αέρα. Ο επιτυχής σχηματισμός λιπιδικής μονοστοιβάδας πάνω στο SAM ελέγχθηκε με τη δοκιμασία FRAP (Εικ. 7.16).



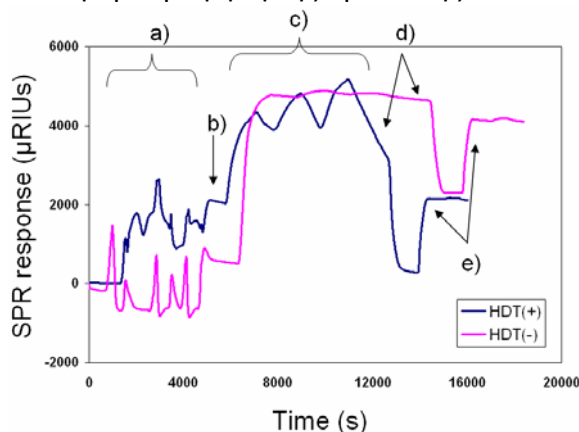
Εικ. 7.15. Αναγνώριση υδροφιλικότητας/υδροφοβικότητας των επιφανειών συσκευών βιοαισθητήρων. Προσθήκη σταγόνας νερού και παρατήρηση γωνίας επαφής για τις επιφάνειες χρυσού των βιοαισθητήρων αμέσως μετά τη χάραξη με χημεία πλάσματος (freshly etched), επωασμένα σε αλκοολικό διάλυμα χωρίς HDT και επωασμένα σε αλκοολικό διάλυμα με HDT. Οι επιφάνειες είναι πολύ υδροφιλικές αμέσως μετά τη χάραξη, ενώ είναι πολύ υδρόφοβες μετά από την επώαση με HDT, κάτι που υποδεικνύει το σχηματισμό υδρόφοβου SAM από την HDT.



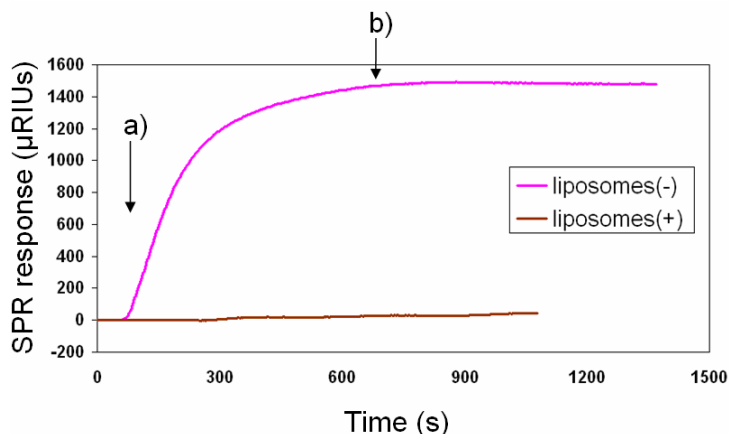
Εικ. 7.16. Δοκιμασία FRAP σε επιφάνεια SAM από HDT για το σχηματισμό λιπιδικής μονοστοιβάδας από λιποσώματα eggPC/NBD-PC(1mol%)/DODA-tris-NTA(5mol%). Ο χρόνος αναμονής για την επαναφορά του φθορισμού ήταν 10 λεπτά.

Ακολούθησε σχηματισμός λιπιδικής μονοστοιβάδας στην επιφάνεια των βιοαισθητήρων σε πραγματικό χρόνο. Οι τροποποιημένες με το υδρόφοβο SAM επιφάνειες τοποθετήθηκαν στο αντίστοιχο σύστημα βιοαισθητήρα (SPR, QCM-D ή Love) και ξεπλύθηκαν με το ήπιο και μη ιονικό απορρυπαντικό octyl- β -gluco-D-pyranoside (OG) (40mM) (Sigma). Το OG βοηθά στην καλύτερη προσέγγιση των υδρόφιλων εξωτερικά λιποσωμάτων στο υδρόφοβο SAM καθώς προκαλεί καλύτερη ενυδάτωση στη διεπιφάνεια υγρού/στερεού. Ακολούθησε προσθήκη των λιποσωμάτων υπό χαμηλή ροή (10 ml min^{-1}) και σε συγκέντρωση $0,2$ ή $0,4 \text{ mg ml}^{-1}$.

Μετά τα λιποσώματα, προστέθηκε νερό για διάρρηξη των λιποσωμάτων και ξέπλυμα. Το συνεχές ξέπλυμα με νερό βοηθά επίσης στην απομάκρυνση του OG και κομματιών των λιποσωμάτων που δεν σχημάτισαν τη λιπιδική μονοστοιβάδα. Μετά από αυτή τη διαδικασία, έχει σχηματιστεί μία λιπιδική μονοστοιβάδα με πλευρική διάχυση λιπιδίων πάνω στο υδρόφοβο SAM της επιφάνειας των βιοαισθητήρων. Στον αισθητήρα SPR, η μεταβολή σήματος (**Εικ. 7.17**) για το σχηματισμό λιπιδικής μονοστοιβάδας (2130 μ RIUs) ήταν παρόμοια με τη μεταβολή που έχει παρατηρηθεί για λιπιδικές μονοστοιβάδες άλλης σύστασης και λαμβάνοντας υπόψη το διαφορετικό σύστημα αισθητήρα SPR: 2430 RU για λιπιδική μονοστοιβάδα POPC⁸ (μεταφράζεται ως 1505 μ RIUs σύμφωνα με το Κεφάλαιο 3 §3) και 2800 RU για λιπιδική μονοστοιβάδα SOPC²³ (μεταφράζεται ως 1734 μ RIUs σύμφωνα με το Κεφάλαιο 3 §3). Ο σχηματισμός λιπιδικής διπλοστοιβάδας ελέγχθηκε επίσης έπειτα από προσθήκη BSA 0,5 mg ml⁻¹ στον αισθητήρα SPR (**Εικ. 7.18**). Η παρουσία της μονοστοιβάδας μονώνει το υδρόφοβο SAM και την επιφάνεια χρυσού από τη μη ειδική προσρόφηση της πρωτεΐνης BSA.



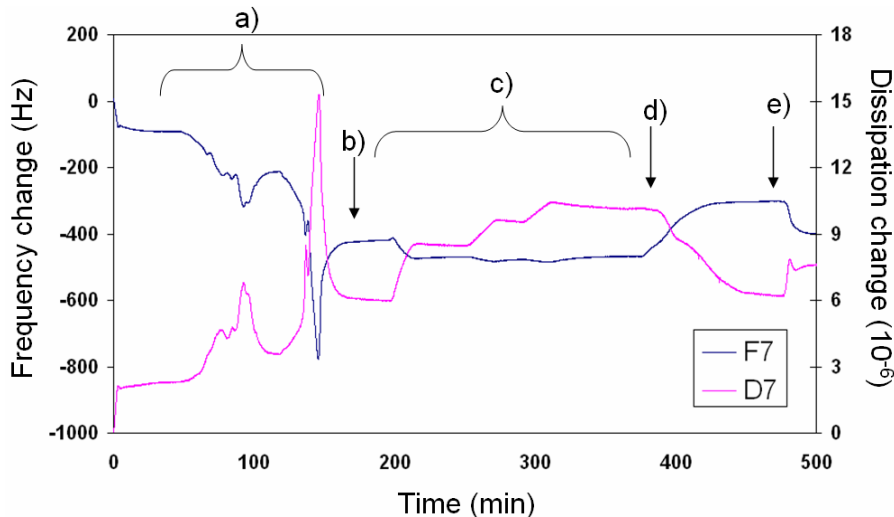
Εικ. 7.17. Μεταβολή της απόκρισης του οπτικού βιοαισθητήρα SPR κατά την εναπόθεση και αλληλεπίδραση λιποσωμάτων σε επιφάνεια χρυσού με ή χωρίς SAM από HDT. a) 3x προσθήκη OG (40 mM), b) ξέπλυμα με HBS, c) 3x προσθήκη λιποσωμάτων (0,2 mg ml⁻¹), d) ξέπλυμα με νερό, e) ξέπλυμα με HBS.



Εικ. 7.18. Μεταβολή της απόκρισης του οπτικού βιοαισθητήρα SPR κατά την εναπόθεση BSA σε επιφάνεια SAM με ή χωρίς την προηγούμενη προσθήκη λιποσωμάτων. a) Προσθήκη BSA (0,5 mg ml⁻¹), b) ξέπλυμα με HBS.

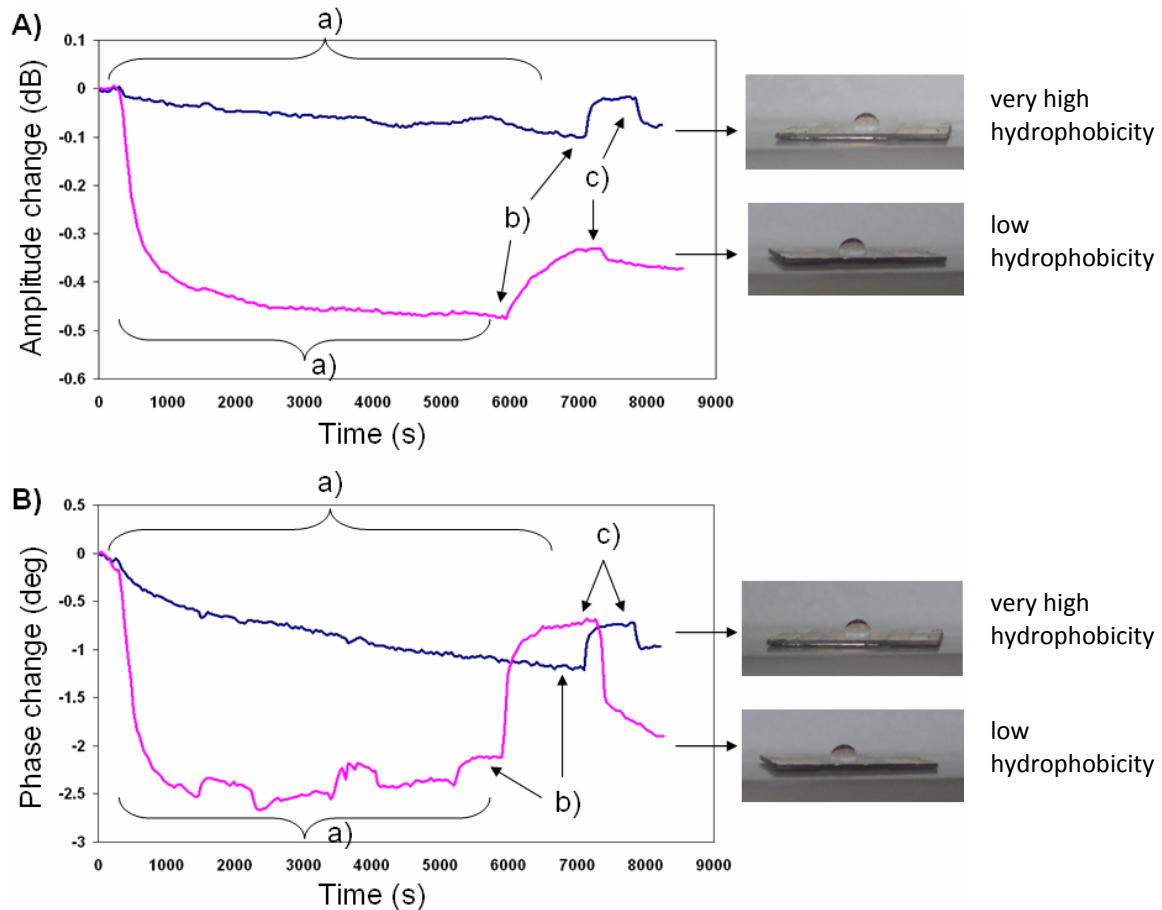
Στον αισθητήρα QCM-D, η μεταβολή σήματος για την προσθήκη των λιποσωμάτων και το σχηματισμό της λιπιδικής μονοστοιβάδας (**Εικ. 7.19**) είναι μεγαλύτερη από ότι έχει παρατηρηθεί στη βιβλιογραφία⁹ και αναμενόταν σε σχέση με τη λιπιδική διπλοστοιβάδα στον ίδιο αισθητήρα: 444±141 Hz και 7,02±2,73 10⁻⁶ στη συχνότητα 35 MHz (n=10). Επιπλέον, η προσθήκη BSA 0,5 mg ml⁻¹ έδωσε σημαντική μεταβολή σήματος (107±23 Hz και 0,99±0,37 10⁻⁶), αν και χαμηλότερη από την προσρόφηση της BSA σε επιφάνεια χρυσού (223 Hz και 1,43 10⁻⁶). Η ακουστική αναλογία υπολογίζεται ως $\Delta D/\Delta F=0,015\pm0,004$ (10⁻⁶/Hz), και είναι

παρόμοια με την ακουστική αναλογία που έχει παρατηρηθεί για την εναπόθεση στρώματος λιποσωμάτων σε προσροφημένη νουτραβιδίνη μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων: $\Delta D/\Delta F=0,023\pm 0,003$ ($10^{-6}/\text{Hz}$). Τα παραπάνω προτείνουν ελλiptικό σχηματισμό λιπιδικής μονοστοιβάδας και περισσότερο σχηματισμό ενός στρώματος λιποσωμάτων στην επιφάνεια SAM του αισθητήρα QCM-D, λόγω μη σύντηξης μεταξύ των λιποσωμάτων. Αυτό ίσως οφείλετο σε μη καλό σχηματισμό του SAM και λιγότερη υδροφοβικότητα στην επιφάνεια, όπως φάνηκε επίσης από τη γωνία επαφής σταγόνας νερού (Εικ. 7.15).



Εικ. 7.19. Μεταβολή της συχνότητας και της ενεργειακής απώλειας του ακουστικού βιοαισθητήρα QCM-D κατά την εναπόθεση και αλληλεπίδραση λιποσωμάτων σε επιφάνεια SAM από HDT. a) 3x προσθήκη OG (40 mM), b) ξέπλυμα με HBS, c) 3x προσθήκη λιποσωμάτων ($0,4 \text{ mg ml}^{-1}$), c) ξέπλυμα με νερό, d) ξέπλυμα με HBS.

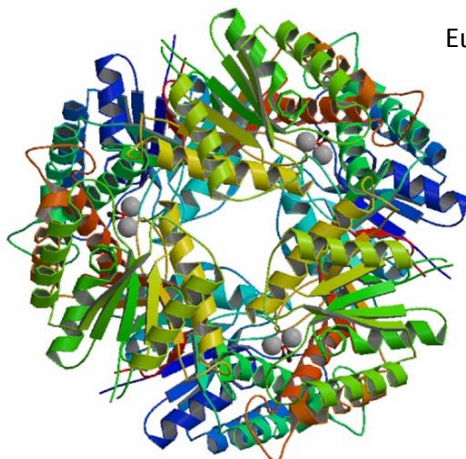
Στον αισθητήρα τύπου Love, η μεταβολή σήματος που παρατηρείται (Εικ. 7.20) είναι παρόμοια με αυτήν που έχει αναφερθεί για το σχηματισμό λιπιδικής μονοστοιβάδας στον ίδιο αισθητήρα και σε ίδια επιφάνεια HDT¹⁰. Η προσθήκη BSA $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ έδωσε πολύ μικρή μεταβολή σήματος ($0,337\pm 0,086 \text{ deg}$ και $0,07\pm 0,003 \text{ dB}$) εν συγκρίσει με μη ειδική προσρόφηση πρωτεΐνης στο χρυσό ($>4 \text{ deg}$ και $>0,2 \text{ dB}$). Η μικρή προσρόφηση της BSA αφενός φανερώνει τις ατέλειες τις επιφάνειας, αφετέρου όμως καλύπτει τις μη ειδικές θέσεις προσρόφησης για πρωτεΐνες, προσφέροντας τη δυνατότητα για περαιτέρω μελέτη αλληλεπιδράσεων στην επιφάνεια του αισθητήρα. Η ποιότητα και η κατάσταση του SAM είναι κρίσιμες για τον επιτυχή σχηματισμό λιπιδικής μονοστοιβάδας, καθώς απαιτείται μέγιστη υδροφοβικότητα. Συνθήκες διαφορετικές από τις ιδανικές μπορεί να μην οδηγήσουν στο σχηματισμό λιπιδικής μονοστοιβάδας αλλά πιθανώς σε ένα ανάμικτο στρώμα από μονοστοιβάδα και άθικτα λιποσώματα.



Εικ. 7.20. Μεταβολή του πλάτους (A) και της φάσης (B) του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love κατά την εναπόθεση και αλληλεπίδραση λιποσωμάτων σε επιφάνεια SAM από HDT σε συνθήκες πολύ υψηλής ή χαμηλότερης υδροφοβικότητας. α) 3x προσθήκη λιποσωμάτων ($0,4 \text{ mg ml}^{-1}$), β) ξέπλυμα με νερό c), ξέπλυμα με HBS.

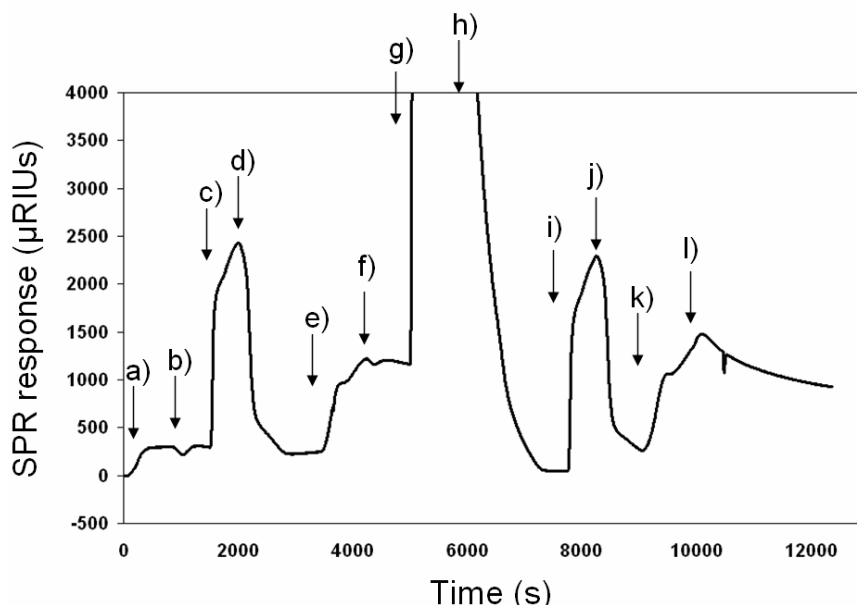
Για τη δοκιμή της λιπιδικής μονοστιβάδας, χρησιμοποιήθηκαν λιποσώματα σύστασης eggPC/DODA-trisNTA(5% mol) στην επιφάνεια των αισθητήρων καθώς και η πρωτεΐνη BC1534, μια προσφάτως χαρακτηρισμένη⁴⁹⁻⁵¹ N-αποακετυλάση του *Bacillus cereus*. Η BC1534 έχει 234 αμινοξέα (27 kDa) και η δομή της αποτελείται από μια επικράτεια Rossmann στο N-τελικό άκρο και δύο α έλικες και δύο β πτυχωτές επιφάνειες στο C-τελικό άκρο. Η BC1534 σχηματίζει ένα πολύ συμπαγές εξαμερές (Εικ. 7.21) τόσο στο διάλυμα όσο και στον κρύσταλλο^{50, 51}. Το C-τελικό άκρο σχεδιάστηκε να περιέχει μια ουρά 6 ιστιδινών⁴⁹ (His-tag). Η BC1534(His-tag) ως εξαμερές προστέθηκε στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα SPR, έπειτα από τον σχηματισμό λιπιδικής μονοστιβάδας σε πραγματικό χρόνο και την προσθήκη BSA $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ για την κάλυψη μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης, ακολουθώντας την εξής διαδικασία: προσθήκη BC1534(His-tag) για τον προσδιορισμό της μη ειδικής αλληλεπίδρασης με την επιφάνεια ($309 \pm 35 \text{ mRIUs}$), προσθήκη ιόντων Ni^{2+} (ως NiSO_4 , 100mM) στις ομάδες tris-NTA των λιπιδίων και ξανά προσθήκη BC1534(His-tag) για τον προσδιορισμό της ειδικής πρόσδεσης της πρωτεΐνης στα λιπίδια tris-NTA ($832 \pm 160 \text{ mRIUs}$) (Εικ. 7.22). Η αλληλεπίδραση ήταν αναστρέψιμη, καθώς με την προσθήκη EDTA, το οποίο δεσμεύει τα ιόντα Ni^{2+} , απομακρύνθηκε όλη η ποσότητα της δεσμευμένης BC1534(His-tag). Επίσης, η αλληλεπίδραση εμφάνισε

επαναληψιμότητα αφού η επαναπροσθήκη ιόντων Ni^{2+} στα λιπίδια NTA οδήγησε σε πρόσδεση ίδιας ποσότητας της BC1534(His-tag).

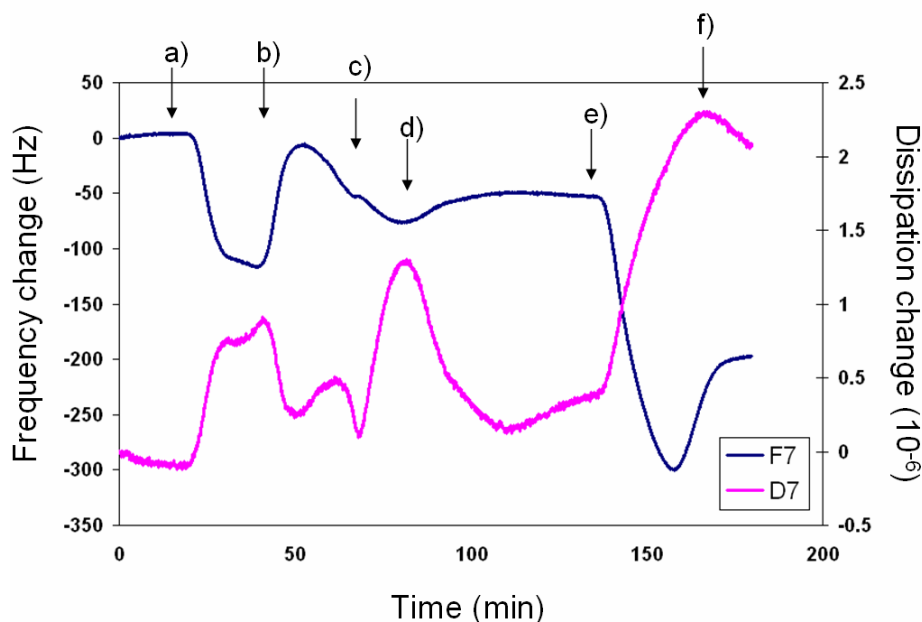


Εικ. 7.21. Δομή του εξαμερούς της πρωτεΐνης BC1534 (Πηγή: PDB ID 2ixd)

Εικ. 7.22. Μεταβολή της απόκρισης του οπτικού βιοαισθητήρα SPR ως προς το χρόνο κατά την προσθήκη της πρωτεΐνης BC1534(His-tag) σε λιπιδική μονοστοιβάδα με λιπίδια tris-NTA. a) Προσθήκη BC1534(His-tag) ($45 \mu\text{g ml}^{-1}$), b) ξέπλυμα με HBS, c) προσθήκη $NiSO_4$ (100 mM), d) ξέπλυμα με HBS, e) προσθήκη BC1534(His-tag) ($45 \mu\text{g ml}^{-1}$), f) ξέπλυμα με HBS, g) προσθήκη EDTA (350 mM), h) ξέπλυμα με HBS, i) προσθήκη $NiSO_4$ (100 mM), j) ξέπλυμα με HBS, k) προσθήκη BC1534(His-tag) ($45 \mu\text{g ml}^{-1}$), l) ξέπλυμα με HBS.



Η BC1534(His-tag) προστέθηκε επίσης στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα QCM-D έπειτα από σχηματισμό λιπιδικής μονοστοιβάδας και κάλυψης μη ειδικών θέσεων από BSA. Η λιπιδική μονοστοιβάδα στην επιφάνεια του αισθητήρα QCM-D δεν είναι χωρίς σημαντικές ατέλειες. Παρόλα αυτά, ακολουθώντας την παραπάνω πειραματική διαδικασία, παρατηρήθηκε ειδική αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης BC1534(His-tag) με τα λιπίδια tris-NTA παρουσία Ni^{2+} (157 ± 18 Hz και $1,77 \pm 0,18 \cdot 10^{-6}$) (Εικ. 7.23) καθώς και πλήρης έκλυση της μετά από προσθήκη του χηλικού παράγοντα EDTA. Η ακουστική αναλογία της BC1534(His-tag), $\Delta D/\Delta F = 0,010 \pm 0,004$ ($10^{-6}/\text{Hz}$), προδίδει μια σταθερή δομή σφαιρικής πρωτεΐνης²⁸.

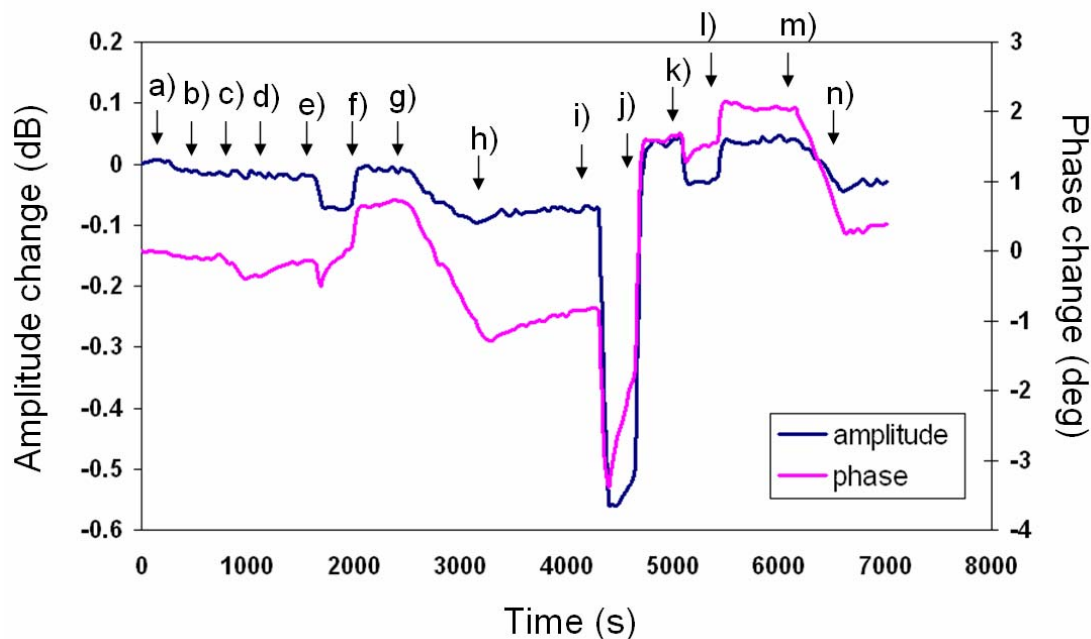


Εικ. 7.23. Μεταβολή της συχνότητας και της ενεργειακής απώλειας του ακουστικού βιοαισθητήρα QCM-D ως προς το χρόνο κατά την προσθήκη της πρωτεΐνης BC1534(His-tag) σε πιθανή λιπιδική μονοστοιβάδα με λιπίδια tris-NTA. a) Προσθήκη BC1534(His-tag) (45 mg ml^{-1}), b) ξέπλυμα με HBS, c) προσθήκη NiSO_4 (100 mM), d) ξέπλυμα με HBS, e) προσθήκη BC1534(His-tag) (45 mg ml^{-1}), f) ξέπλυμα με HBS.

Επιπλέον, η BC1534(His-tag) προστέθηκε σε λιπιδική μονοστοιβάδα στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love (Εικ. 7.24). Η μη ειδική προσρόφηση της πρωτεΐνης BC1534(His-tag) στην επιφάνεια του αισθητήρα ήταν μικρότερη ($0,59 \pm 0,52 \text{ deg}$ και $0,030 \pm 0,016 \text{ dB}$, $n=3$) σε σχέση με την αλληλεπίδραση παρουσία ιόντων Ni^{2+} ($2,3 \pm 0,54 \text{ deg}$ και $0,102 \pm 0,022 \text{ dB}$, $n=6$). Επίσης, η αλληλεπίδραση ήταν αναστρέψιμη και επαναλήψιμη, καθώς η προσθήκη EDTA προκάλεσε την έκλυση της πρωτεΐνης και η επαναπροσθήκη Ni^{2+} οδήγησε σε πρόσδεση ίδιας ποσότητας της BC1534(His-tag).

3. Συμπεράσματα

Εφόσον πολλές από τις μελετώμενες αλληλεπιδράσεις στα βιολογικά συστήματα συμβαίνουν σε μεμβρανικές επιφάνειες, ο σχηματισμός συστημάτων μοντέλων για τις βιολογικές μεμβράνες είναι πολύ χρήσιμος για την κατανόηση των μηχανισμών πρόσδεσης μορίων ή κυττάρων σε μεμβρανικά μόρια. Οι βιοαισθητήρες αποτελούν το κατάλληλο εργαλείο για την μελέτη τέτοιων αλληλεπιδράσεων. Επομένως, έγινε σχεδιασμός και σχηματισμός συστημάτων μοντέλων για μεμβράνες σε επιφάνειες βιοαισθητήρων με στόχο διάφορες εφαρμογές. Λιπιδικές διπλοστοιβάδες που σχηματίστηκαν σε επιφάνεια SiO_2 ή λιπιδικές μονοστοιβάδες που σχηματίστηκαν σε επιφάνεια SAM μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόσδεση πρωτεϊνών σε αυτές και τη μετέπειτα μελέτη της αλληλεπίδρασης τους με διαλυτά μόρια ή ολόκληρα κύτταρα. Ομοίως, προσδεμένες λιπιδικές διπλοστοιβάδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη αλληλεπίδρασης ολόκληρων μεμβρανικών πρωτεϊνών.



Εικ. 7.24. Μεταβολή του πλάτους και της φάσης του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love ως προς το χρόνο κατά την προσθήκη της πρωτεΐνης BC1534(His-tag) σε λιπιδική μονοστοιβάδα με λιπίδια tris-NTA. a) Προσθήκη BSA ($0,5 \text{ mg ml}^{-1}$), b) ξέπλυμα με HBS, c) προσθήκη BC1534(His-tag) ($45 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) d) ξέπλυμα με HBS, e) προσθήκη NiSO₄ (100 mM), f) ξέπλυμα με HBS, g) προσθήκη BC1534(His-tag) ($45 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$), h) ξέπλυμα με HBS, i) προσθήκη EDTA (350 mM), j) ξέπλυμα με HBS, k) προσθήκη NiSO₄ (100 mM), l) ξέπλυμα με HBS, m) προσθήκη BC1534(His-tag) ($45 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$), n) ξέπλυμα με HBS.

4. Βιβλιογραφία

1. Sackmann, E. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* **271**, 43-48 (1996).
2. Tanaka, M. & Sackmann, E. Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature* **437**, 656-663 (2005).
3. Dustin, M.L. Supported bilayers at the vanguard of immune cell activation studies. *J Struct Biol* **168**, 152-160 (2009).
4. Groves, J.T. & Dustin, M.L. Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication. *J Immunol Methods* **278**, 19-32 (2003).
5. McConnell, H.M., Watts, T.H., Weis, R.M. & Brian, A.A. Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system. *Biochim Biophys Acta* **864**, 95-106 (1986).
6. Grakoui, A. et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221-227 (1999).
7. Besenicar, M., Macek, P., Lakey, J.H. & Anderluh, G. Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chem Phys Lipids* **141**, 169-178 (2006).
8. Cooper, M.A. & Singleton, V.T. A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions. *J Mol Recognit* **20**, 154-184 (2007).
9. Keller, C.A. & Kasemo, B. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophysical Journal* **75**, 1397-1402 (1998).

10. Melzak, K.A., Ralph, E. & Gizeli, E. Effect of the surface hydrophilicity on the formation of a membrane-type interface: study using an acoustic wave device *Langmuir* **17**, 1594-1598 (2001).
11. Richter, R., Mukhopadhyay, A. & Brisson, A. Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: A combined QCM-D and AFM study. *Biophysical Journal* **85**, 3035-3047 (2003).
12. Gizeli, E. & Glad, J. Single-step formation of a biorecognition layer for assaying histidine-tagged proteins. *Anal Chem* **76**, 3995-4001 (2004).
13. Gizeli, E., Liley, M., Lowe, C.R. & Vogel, H. Antibody binding to a functionalized supported lipid layer: a direct acoustic immunosensor. *Anal Chem* **69**, 4808-4813 (1997).
14. Glasmastar, K., Larsson, C., Hook, F. & Kasemo, B. Protein adsorption on supported phospholipid bilayers. *Journal of Colloid and Interface Science* **246**, 40-47 (2002).
15. Ross, M., Gerke, V. & Steinem, C. Membrane composition affects the reversibility of annexin A2t binding to solid supported membranes: A QCM study. *Biochemistry* **42**, 3131-3141 (2003).
16. Jass, J., Tjarnhage, T. & Puu, G. From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophys J* **79**, 3153-3163 (2000).
17. Johnson, J.M., Ha, T., Chu, S. & Boxer, S.G. Early steps of supported bilayer formation probed by single vesicle fluorescence assays. *Biophys J* **83**, 3371-3379 (2002).
18. Pignataro, B., Steinem, C., Galla, H.J., Fuchs, H. & Janshoff, A. Specific adhesion of vesicles monitored by scanning force microscopy and quartz crystal microbalance. *Biophys J* **78**, 487-498 (2000).
19. Brian, A.A. & McConnell, H.M. Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6159-6163 (1984).
20. Dustin, M.L. et al. Low affinity interaction of human or rat T cell adhesion molecule CD2 with its ligand aligns adhering membranes to achieve high physiological affinity. *J Biol Chem* **272**, 30889-30898 (1997).
21. Zhu, D.M., Dustin, M.L., Cairo, C.W. & Golan, D.E. Analysis of two-dimensional dissociation constant of laterally mobile cell adhesion molecules. *Biophys J* **92**, 1022-1034 (2007).
22. Shahal, T., Melzak, K.A., Lowe, C.R. & Gizeli, E. Poly(dimethylsiloxane)-coated sensor devices for the formation of supported lipid bilayers and the subsequent study of membrane interactions. *Langmuir* **24**, 11268-11275 (2008).
23. Radler, U., Mack, J., Persike, N., Jung, G. & Tampe, R. Design of supported membranes tethered via metal-affinity ligand-receptor pairs. *Biophys J* **79**, 3144-3152 (2000).
24. Valiokas, R. et al. Self-assembled monolayers containing terminal mono-, bis-, and tris-nitriiotriacetic acid groups: characterization and application *Langmuir* **24**, 4959-4967 (2008).
25. Castagnoli, L. et al. Genetic and structural analysis of the ColE1 Rop (Rom) protein. *Embo J* **8**, 621-629 (1989).
26. Cesareni, G., Muesing, M.A. & Polisky, B. Control of ColE1 DNA replication: the rop gene product negatively affects transcription from the replication primer promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 6313-6317 (1982).
27. Banner, D.W., Kokkinidis, M. & Tsernoglou, D. Structure of the ColE1 rop protein at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* **196**, 657-675 (1987).
28. Ozeki, T., Morita, M., Yoshimine, H., Furusawa, H. & Okahata, Y. Hydration and energy dissipation measurements of biomolecules on a piezoelectric quartz oscillator by admittance analyses. *Anal Chem* **79**, 79-88 (2007).
29. Salafsky, J., Groves, J.T. & Boxer, S.G. Architecture and function of membrane proteins in planar supported bilayers: a study with photosynthetic reaction centers. *Biochemistry* **35**, 14773-14781 (1996).

30. Rossi, C. & Chopineau, J. Biomimetic tethered lipid membranes designed for membrane-protein interaction studies. *Eur Biophys J* **36**, 955-965 (2007).
31. Lang, H., Duschl, C. & Vogel, H. A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces. *Langmuir* **10**, 197-210 (1994).
32. Stora, T., Lakey, J.H. & Vogel, H. Ion-channel gating in transmembrane receptor proteins: Functional activity in tethered lipid membranes. *Angewandte Chemie-International Edition* **38**, 389-392 (1999).
33. Terretaz, S., Mayer, M. & Vogel, H. Highly electrically insulating tethered lipid bilayers for probing the function of ion channel proteins. *Langmuir* **19**, 5567-5569 (2003).
34. Wagner, M.L. & Tamm, L.K. Tethered polymer-supported planar lipid bilayers for reconstitution of integral membrane proteins: silane-polyethyleneglycol-lipid as a cushion and covalent linker. *Biophys J* **79**, 1400-1414 (2000).
35. Naumann, R. et al. Incorporation of Membrane-Proteins in Solid-Supported Lipid Layers. *Angewandte Chemie-International Edition* **34**, 2056-2058 (1995).
36. Karlsson, O.P. & Lofas, S. Flow-mediated on-surface reconstitution of G-protein coupled receptors for applications in surface plasmon resonance biosensors. *Anal Biochem* **300**, 132-138 (2002).
37. Terretaz, S., Stora, T., Duschl, C. & Vogel, H. Protein binding to supported lipid membranes: investigation of the cholera ganglioside interaction by simultaneous impedance spectroscopy and surface plasmon resonance. *Langmuir* **9**, 1361-1369 (1993).
38. Bieri, C., Ernst, O.P., Heyse, S., Hofmann, K.P. & Vogel, H. Micropatterned immobilization of a G protein-coupled receptor and direct detection of G protein activation. *Nat Biotechnol* **17**, 1105-1108 (1999).
39. Berquand, A. et al. Two-step formation of streptavidin-supported lipid bilayers by PEG-triggered vesicle fusion. Fluorescence and atomic force microscopy characterization. *Langmuir* **19**, 1700-1707 (2003).
40. Ma, Z.Y., Sharp, K.A., Janmey, P.A. & Finkel, T.H. Surface-anchored monomeric agonist pMHCs alone trigger TCR with high sensitivity. *Plos Biology* **6**, 328-342 (2008).
41. Dorn, I.T., Pawlitschko, K., Pettinger, S.C. & Tampe, R. Orientation and two-dimensional organization of proteins at chelator lipid interfaces. *Biological Chemistry* **379**, 1151-1159 (1998).
42. Plant, A.L., Brighamburke, M., Petrella, E.C. & Oshannessy, D.J. Phospholipid Alkanethiol Bilayers for Cell-Surface Receptor Studies by Surface-Plasmon Resonance. *Analytical Biochemistry* **226**, 342-348 (1995).
43. Schreiber, F. Structure and growth of self-assembling monolayers. *Prog Surf Sci* **65**, 151-256 (2000).
44. Ulman, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical Reviews* **96**, 1533-1554 (1996).
45. Bain, C.D., Evall, J. & Whitesides, G.M. Formation of Monolayers by the Coadsorption of Thiols on Gold - Variation in the Head Group, Tail Group, and Solvent. *Journal of the American Chemical Society* **111**, 7155-7164 (1989).
46. Bain, C.D. & Whitesides, G.M. Formation of Monolayers by the Coadsorption of Thiols on Gold - Variation in the Length of the Alkyl Chain. *Journal of the American Chemical Society* **111**, 7164-7175 (1989).
47. Biebuyck, H.A., Bian, C.D. & Whitesides, G.M. Comparison of Organic Monolayers on Polycrystalline Gold Spontaneously Assembled from Solutions Containing Dialkyl Disulfides or Alkenethiols. *Langmuir* **10**, 1825-1831 (1994).
48. Duschl, C., Sevin-Landais, A.F. & Vogel, H. Surface engineering: optimization of antigen presentation in self-assembled monolayers. *Biophys J* **70**, 1985-1995 (1996).

49. Deli, A. et al. LmbE proteins from *Bacillus cereus* are de-N-acetylases with broad substrate specificity and are highly similar to proteins in *Bacillus anthracis*. *Febs Journal* (2010).
50. Fadouloglou, V.E. et al. Crystal structure of the BcZBP, a zinc-binding protein from *Bacillus cereus* - Functional insights from structural data. *Febs Journal* **274**, 3044-3054 (2007).
51. Fadouloglou, V.E. et al. Purification, crystallization and preliminary characterization of a putative LmbE-like deacetylase from *Bacillus cereus*. *Acta Crystallographica Section F- Structural Biology and Crystallization Communications* **62**, 261-264 (2006).

Κεφάλαιο 8

Σχεδιασμός για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης TCR/MHC/πεπτιδίου με τη χρήση του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love

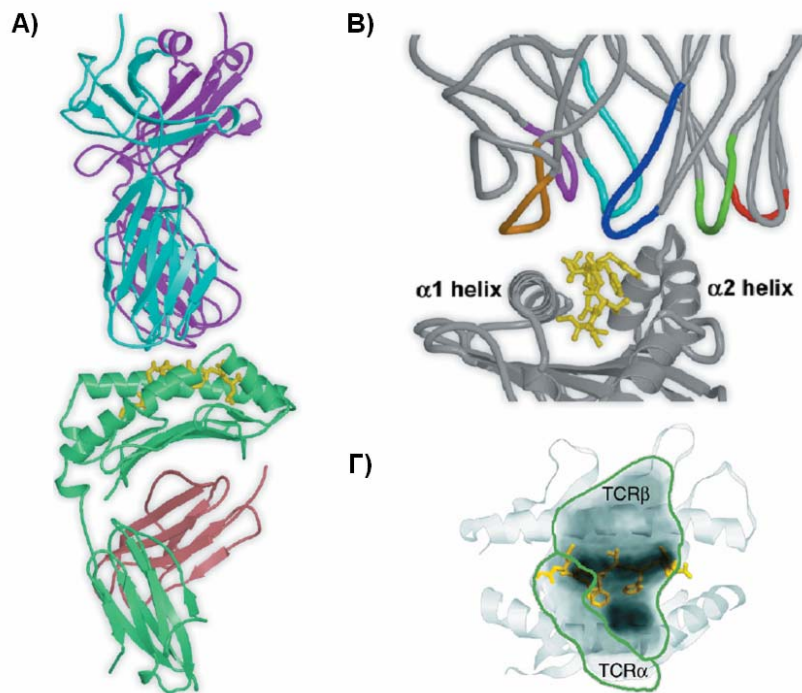
Η αλληλεπίδραση μεταξύ του TCR και του συμπλόκου MHC/πεπτιδίου αποτελεί μια από τις σημαντικότερες για το ανοσοποιητικό σύστημα καθώς καθορίζει την ειδικότητα και την ενεργοποίηση των T κυττάρων και κατ' επέκταση την επαγωγή ανοσολογικής απόκρισης. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει μελετηθεί διεξοδικά τόσο σε μοριακό όσο και σε κυτταρικό επίπεδο. Παρόλα αυτά παραμένουν ακόμα σημαντικά ερωτήματα όσον αφορά την έναρξη της σηματοδότησης του TCR και την επίδραση της συγγένειας σε 2D. Εφόσον ο ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love μπορεί να ανιχνεύσει με ειδικό τρόπο την πρόσδεση υποδοχέων που βρίσκονται στη μεμβράνη κυττάρων σε προσδέτες που βρίσκονται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα και να επιτρέψει τον υπολογισμό κινητικών παραμέτρων και συγγένειας σε 2D, η χρήση του θα προσέφερε σημαντική επιπρόσθετη πληροφορία για την αναγνώριση αντιγόνου από τα T κύτταρα. Επομένως, για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης TCR/MHC/πεπτιδίου, ο ακουστικός βιοαισθητήρας θα χρησιμοποιηθεί με τρόπο αντίστοιχο της φθορίζουσας απεικόνισης των κυττάρων πάνω σε τεχνητές λιπιδικές μεμβράνες^{1,2}, με τη διαφορά ότι αντί να γίνεται παρακολούθηση της τοπολογίας και της μετακίνησης των χρωσμένων μορίων θα παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο ο σχηματισμός δεσμών ανάμεσα στο κύτταρο και το υπόστρωμα.

Ο πειραματικός σχεδιασμός έχει ως στόχο τη μελέτη της αλληλεπίδρασης σε όσο το δυνατό φυσικές συνθήκες. Αυτό ισχύει απόλυτα για τον TCR, ο οποίος βρίσκεται στη μεμβράνη ολόκληρων και ζώντων T κυττάρων, και εν μέρει για το σύμπλοκο MHC/πεπτιδίου, που βρίσκεται σε μία λιπιδική μεμβράνη με πλευρική διάχυση. Εν συντομία, στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα σχηματίζεται μια λιπιδική μεμβράνη η οποία παρουσιάζει σύμπλοκα MHC/πεπτιδίου. Κατόπιν, γίνεται η προσθήκη του «αναλύτη» (T κύτταρα) στην επιφάνεια του αισθητήρα. Τα T κύτταρα που χρησιμοποιούνται φέρουν στην επιφάνειά τους TCR που αναγνωρίζει το συγκεκριμένο σύμπλοκο MHC/πεπτιδίου και εμφανίζουν ενεργοποίηση παρουσία αυτού. Μεταβάλλοντας είτε την επιφανειακή συγκέντρωση του συμπλόκου MHC/πεπτιδίου είτε τον αριθμό των T κυττάρων στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, μπορεί να γίνει ο υπολογισμός των κινητικών σταθερών και της σταθεράς συγγένειας σε 2D για την αλληλεπίδραση και να συσχετιστεί με τις ήδη υπολογισμένες σταθερές για τα διαλυτά μόρια.

1. Βιολογικό σύστημα: ο JM22 TCR που αναγνωρίζει το πεπτιδιο MP(58-66) του ιού της γρίπης παρουσιασμένο στο HLA-A2

Σχεδόν ο μισός ανθρώπινος πληθυσμός παγκοσμίως εκφράζει το τάξης I MHC μόριο HLA-A2. Στα άτομα αυτά, η απόκριση των CD8⁺ T κυττάρων στον ιό της γρίπης κυριαρχείται από T κύτταρα που αναγνωρίζουν ένα πεπτιδιο από τις θέσεις 58 ως 66 της μητρικής πρωτεΐνης του ιού (influenza matrix protein, MP) με αμινοξική αλληλουχία^{3,4} GILGFVFTL. Πάνω από το 85% των κυκλοφορούντων T

κυττάρων που αναγνωρίζουν το πεπτίδιο MP(58-66) χρησιμοποιούν στη β αλυσίδα του TCR τους το κομμάτι^{5, 6} $V_{\beta}17$, ενώ η αλληλουχία της CDR3 περιοχής του εμφανίζει την υψηλά συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία IRSSY στα κατάλοιπα 97-101. Αυτή η ανοσοκυριαρχική απόκριση (immunodominant response) του $V_{\beta}17$ προκύπτει από επαναλαμβανόμενες μολύνσεις από τον ιό της γρίπης και φανερώνει ότι οι TCRs με $V_{\beta}17$ αποτελούν μια καλή λύση στην παρουσίαση του πεπτιδίου από τα MHC μόρια. Ο πιο καλά μελετημένος $V_{\beta}17$ TCR είναι ο JM22 TCR ($V_{\beta}17:V_{\alpha}10.2$). Η αλληλεπίδραση JM22 TCR/HLA-A2/MP(58-66) έχει χαρακτηριστεί με διάφορες τεχνικές όπως SPR, μικροθερμιδομετρία και κρυσταλλογραφία ακτίνων X^{7-9} . Η πρόσδεση του JM22 TCR στο σύμπλοκο HLA-A2/MP(58-66) έχει υπολογιστεί για διαλυτά μόρια και εμφανίζει χαμηλή σταθερά συγγένειας ($K_A=5,9-7,1 \times 10^4 M^{-1}$) καθώς και χαμηλές κινητικές σταθερές ($k_a=6.8 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$, $k_d=1.1 s^{-1}$), μέσα στο εύρος των τιμών για αλληλεπίδραση TCR/MHC/πεπτιδίου^{9, 10}. Η δομή του συμπλόκου JM22 TCR/HLA-A2/MP(58-66) (Εικ. 8.1) έδειξε ότι η εμφάνιση όλα τα χαρακτηριστικά μιας αλληλεπίδρασης TCR/MHC/πεπτιδίου, δηλαδή ορθογωνικό τρόπο πρόσδεσης και σύνδεση με επιβαλλόμενη προσαρμογή⁸ (induced fit). Ο JM22 TCR δείχθηκε ότι χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό καταλοίπων μοναδικών για τις θηλιές V_{β} CDR1 και V_{β} CDR2, τα οποία σε συνδυασμό με την συντηρημένη αλληλουχία στη θηλιά V_{β} CDR3, σχηματίζουν ειδικές αλληλεπιδράσεις με το HLA-A2 μόριο και το πεπτίδιο MP(58-66).



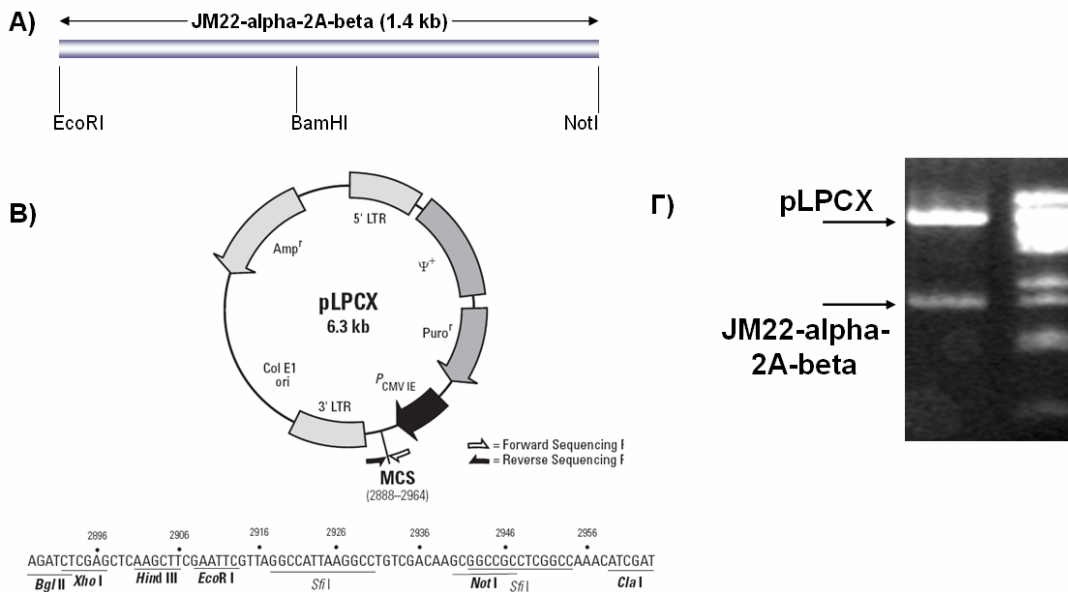
Εικ. 8.1. Α) Προεπισκόπηση της δομής του συμπλόκου του JM22 TCR (μπλε/ιώδες) με το HLA-A2 (πράσινο/κόκκινο) που περιέχει το MP(58-66) (κίτρινο) σε διάγραμμα «κορδέλλας» (Ribbon diagram). Β) Οι CDR θηλιές του TCR (V_{α} CDR1-πράσινο, CDR2-κόκκινο, CDR3-μπλε, V_{β} CDR1-ιώδες, CDR2-πορτοκαλί, CDR3-κυανό) συνδέονται με το σύμπλοκο HLA-A2/MP(58-66). Γ) Κάτοψη της θέσης πρόσδεσης, με την V_{β} περιοχή του TCR να συνεισφέρει περισσότερο στην αλληλεπίδραση. (Πηγή: Steward-Jones et al., 2003)

2. Προετοιμασία T κυττάρων με TCR που αναγνωρίζει το HLA-A2/MP(58-66)

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης TCR/MHC/πεπτιδίου, ο TCR θα χρησιμοποιηθεί στο καθαρά φυσικό του περιβάλλον, δηλαδή στην μεμβράνη ολόκληρων T κυττάρων. Για τα πειράματα με τον ακουστικό βιοαισθητήρα, δύο τύποι T κυττάρων θα χρησιμοποιηθούν: 1) T κυτταρικές σειρές μεταμολυσμένες με τα γονίδια για συγκεκριμένο TCR και 2) πρωτογενείς T κυτταρικοί κλώνοι απομονωμένοι από περιφερικό αίμα. Η χρήση του μεταμολύσματος με TCR αποτελεί ένα καλά χαρακτηρισμένο σύστημα με μικρή μεταβλητότητα και θα βοηθήσει στην εστίαση της μελέτης στη μοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ του TCR στην επιφάνεια του κυττάρου και του συμπλόκου MHC/πεπτιδίου στην λιπιδική μεμβράνη πάνω στον βιοαισθητήρα. Αντίθετα, οι επαγόμενοι T κυτταρικοί κλώνοι αποτελούν μια διαδικασία γενικής προσέγγισης της φυσιολογικής κατάστασης με πιθανή διαφοροποίηση μεταξύ δειγμάτων, επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την άμεση συσχέτιση της μοριακής αλληλεπίδρασης, καθώς και των παραγόντων που την επηρεάζουν, με τη φυσιολογική απόκριση των κυττάρων στην αναγνώριση αντιγόνου.

2.1. Κλωνοποίηση των γονιδίων των αλυσίδων α και β του JM22 TCR σε φορέα έκφρασης και μεταμόλυνση TCR⁻ κυτταρικών σειρών

Τα γονίδια της α και της β αλυσίδας του JM22 TCR παραλήφθησαν μαζί στο ίδιο μετάγραφο (ευγενική προσφορά της Dr. Yvonne Jones, University of Oxford, United Kingdom), στο οποίο οι δύο αλυσίδες διαχωρίζονται από την αλληλουχία του πεπτιδίου¹¹ 2A, ενώ όλο το κομμάτι περιβάλλεται από θέσεις περιορισμού για EcoRI και NotI (**Εικ. 8.2A**). Η αλληλουχία 2A χρησιμοποιείται από διάφορους ιούς (κυρίως του γένους *Lentivirus*) και προσφέρει τη δυνατότητα παραγωγής διαφορετικών πρωτεϊνών από το ίδιο μετάγραφο μέσω υπερπήδησης του ριβοσώματος. Η κωδικωποίηση και των δύο αλυσίδων σε ένα μετάγραφο βοηθά στην ευκολότερη κλωνοποίηση του JM22 TCR σε φορέα έκφρασης και στην ευκολότερη μεταμόλυνση κυττάρων. Ως φορέας έκφρασης επιλέχθηκε το πλασμιδίο rLPCX (Clontech), το οποίο βασίζεται σε αλληλουχίες *Lentivirus* για την έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών και περιέχει επίσης σημείο έναρξης αντιγραφής για πολλαπλασιασμό σε βακτήρια καθώς και γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη (**Εικ. 8.2B**). Για γονίδιο επιλογής σε κύτταρα θηλαστικών, το rLPCX περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας σε πουρομυκίνη. Οι θέσεις περιορισμού του διπλού μεταγράφου του JM22 TCR χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή του στην περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (multiple cloning site, MCS) του πλασμιδίου rLPCX. Έπειτα από διπλή πέψη με EcoRI και NotI και απομόνωση μέσω αφαίρεσης από πήκτωμα ηλεκτροφόρησης (gel extraction), το γονίδιο του JM22 TCR συνδέθηκε με το φορέα έκφρασης επωάζοντας *overnight* με τη λιγάση T4 (New England Biolabs). Τα προϊόντα της σύνδεσης προστέθηκαν μέσω μετασχηματισμού σε κύτταρα *E. coli* DH5a, τα οποία έπειτα καλλιεργήθηκαν παρουσία αμπικιλίνης. Από τις αποικίες που προέκυψαν, συλλέχθηκε το πλασμιδιακό DNA (QIAprep Spin), το οποίο ελέγχθηκε για την ύπαρξη του γονιδίου του JM22 με πέψη (EcoRI, NotI) και ηλεκτροφόρηση (**Εικ. 8.2Γ**).

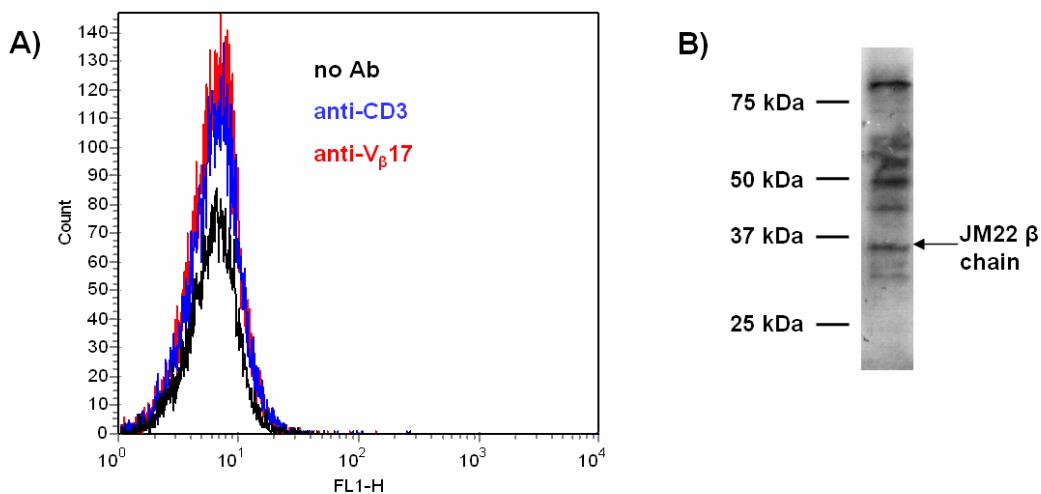


Εικ. 8.2. Α) Το γονίδιο των α και β αλυσίδων του JM22 TCR σε ένα κοινό μετάγραφο. Οι αλυσίδες διαχωρίζονται από την αλληλουχία του πεπτιδίου 2A και το γονίδιο περιβάλλεται από τις θέσεις περιορισμού για EcoRI και NotI. Β) Ο φορέας έκφρασης για κύτταρα θηλαστικών, pLPCX, με την περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS). (Πηγή: www.clontech.com) Γ) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του απομονωμένου πλασμιδίου από επιλεγμένες αποικίες μετασηματισμένων βακτηριακών κυττάρων έπειτα από διπλή πέψη (EcoRI, NotI). Οι θετικές αποικίες περιέχουν τόσο τον πλασμιδιακό φορέα pLPCX (6,3 kb) όσο και το γονίδιο των αλυσίδων του JM22 TCR (1,4 kb).

Για την μεταμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων, χρειάζεται σημαντική ποσότητα του πλασμιδίου. Επομένως, υγρές καλλιέργειες Luria broth που περιείχαν αμπικιλίνη εμβολιάστηκαν με μετασηματισμένα κύτταρα *E. coli* από αποικίες θετικές για το γονίδιο JM22 TCR. Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε (QIAGEN Midi Kit) και χρησιμοποιήθηκε για τη μεταμόλυνση των κυτταρικών σειρών BW5147 και J.RT3-T3.5 με ηλεκτροδιαπίδωση (electroporation). Τα κύτταρα BW5147 είναι T κύτταρα ποντικού (European Collection of Cell Cultures) που δεν εκφράζουν TCR. Τα κύτταρα J.RT3-T3.5 είναι ανθρώπινα T κύτταρα (American Type Cell Culture), παράγωγα των T κυττάρων Jurkat, από τα οποία λείπει γονίδιο της β αλυσίδας του TCR και δεν εκφράζουν στην επιφάνεια τους TCR. Το μίγμα που προετοιμάστηκε για μεταμόλυνση μέσω ηλεκτροδιαπίδωσης περιείχε $5-10 \times 10^6$ κύτταρα και περίπου 20 μg πλασμιδιακού DNA. Η ηλεκτροδιαπίδωση πραγματοποιήθηκε με το BioRad Gene Pulser για 16 s σε συνθήκες 300 V και 975 mC. Ακολούθησε η αραιώση των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό (RPMI 1640 με 10% FBS) και η στρώση τους σε πλάκα καλλιέργειας 24 πηγαδιών. Την τρίτη μέρα, προστέθηκε θρεπτικό υλικό με το αντιβιοτικό πουρομυκίνη ($2 \mu\text{g ml}^{-1}$ για τα κύτταρα BW5147 και $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ για τα κύτταρα J.RT3-T3.5), για την επιλογή των κυττάρων που περιέχουν το πλασμίδιο.

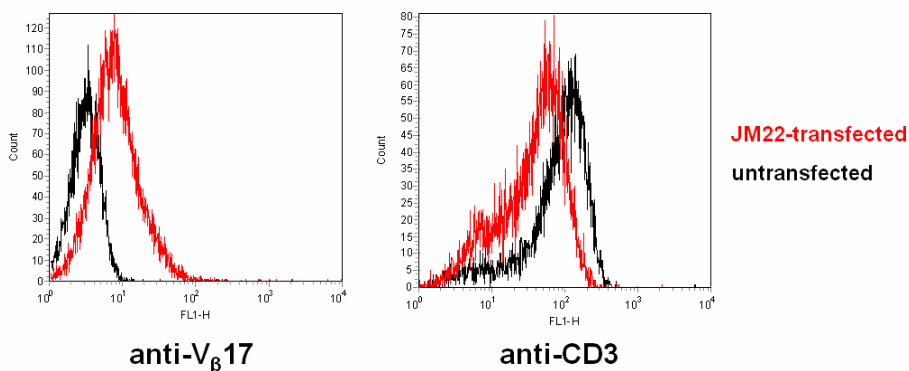
Τα πηγάδια όπου παρατηρήθηκε αύξηση των κυττάρων ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την παρουσία του ολοσυμπλόκου TCR/CD3 στην κυτταρική μεμβράνη με αντισώματα anti-V β 17, από την κυτταρική σειρά υβριδώματος¹² C1, και anti-CD3, από την κυτταρική σειρά υβριδώματος T3D. Ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε ένα anti-mouse IgG αντίσωμα συζευγμένο με τη φθορίζουσα χρωστική FITC (Dako). Για τα κύτταρα BW5147, τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής

έδειξαν ότι τα κύτταρα από τα πηγάδια που μεγάλωναν δεν εκφράζουν στην επιφάνεια τους ούτε CD3 ούτε $V_{\beta}17$ (Εικ. 8.3A). Για τα κύτταρα αυτά ακολούθησε έλεγχος της έκφρασης του JM22 TCR με ανοσοσύτρωση τύπου western. Εν συντομία, τα κύτταρα υπέστησαν λύση παρουσία αναστολέων πρωτεασών και ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-SDS 10%. Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν κατόπιν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη αρχικά επώαστηκε για 1 ώρα με διάλυμα PBS-Tween 5% που περιείχε άπαχο γάλα. Ακολούθησε επώαση με το πρώτο αντίσωμα (anti- C_{β} από την κυτταρική σειρά υβριδώματος bF1) *overnight* για τον εντοπισμό της C περιοχής της β αλυσίδας του JM22 TCR. Μετά από ξέπλυμα με PBS-Tween, η μεμβράνη επώαστηκε με anti-mouse IgG αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση ραδικιού (horse radish peroxidase). Έπειτα η μεμβράνη επώαστηκε με κιτ χημειοφωταύγειας (Amersham-Pharmacia) και εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ (Kodak) στο σκοτάδι. Η ανοσοσύτρωση έδειξε εντοπισμό της β αλυσίδας του JM22 TCR στο εσωτερικό των κυττάρων BW5147 (Εικ. 8.3B). Αυτό σημαίνει ότι οι αλυσίδες α και β του JM22 TCR εκφράστηκαν μεν, εφόσον η β αλυσίδα ακολουθεί την α στο γονιδιακό κατασκεύασμα, αλλά δε σχημάτισαν ολοσύνπλοκο με το CD3 ώστε να μεταφερθούν στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτό ίσως οφείλεται σε ασυμβατότητα των συγκεκριμένων αλυσίδων του ανθρώπινου TCR με τις αλυσίδες CD3 του ποντικού, αν και έχουν αναφερθεί παραδείγματα συμβατότητας και σχηματισμού υβριδικού ολοσύνπλοκου TCR/CD3 στην επιφάνεια κυττάρων ποντικού από ανθρώπινο TCR και ποντικίσιο CD3¹³.



Εικ. 8.3. A) Ιστόγραμμα φθορισμού από κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση CD3 και $V_{\beta}17$ στη μεμβράνη των μεταμολυσμένων με JM22 TCR κυττάρων BW5147. B) Ανοσοσύτρωση western για την ανίχνευση της β αλυσίδας του JM22 TCR σε μεταμολυσμένα κύτταρα με BW5147

Για τα κύτταρα J.RT3-T3.5, τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής έδειξαν ότι μερικά κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνεια τους τον JM22 TCR, αν και σε μικρή ποσότητα (Εικ. 8.4). Τα κύτταρα αυτά αφέθηκαν να αυξηθούν, παρουσία του επιλεκτικού αντιβιοτικού πουρομυκίνη, σε αριθμούς ικανούς για τη χρησιμοποίησή τους σε περαιτέρω πειράματα στον ακουστικό βιοαισθητήρα. Επιπλέον, μπορεί να γίνει περαιτέρω εμπλουτισμός σε κύτταρα που εκφράζουν JM22 TCR με τη διαδικασία κυτταρικού διαχωρισμού^{14, 15} (cell sorting).



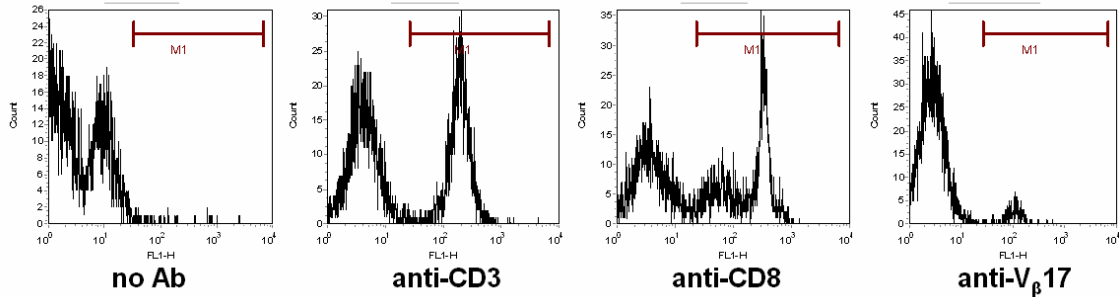
Εικ. 8.4. Ιστογράμματα φθορισμού από κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση V_β17 και CD3 στη μεμβράνη των μεταμολυσμένων ή μη με JM22 TCR κυττάρων J.RT.3-T3.5. Όλα τα κύτταρα είναι CD3⁺ ενώ μικρός αριθμός μεταμολυσμένων κυττάρων εμφανίζει τον JM22 TCR στην κυτταρική μεμβράνη.

2.2. Προετοιμασία HLA-A2-εξαρτώμενων πρωτογενών κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων έναντι του MP(58-66)

Πρωτογενείς T κυτταρικοί κλώνοι έναντι του MP(58-66) προέκυψαν από δείγμα αίματος ενός HLA-A2⁺ δότη με καλή ανοσολογική απόκριση στον ιό της γρίπης. Αρχικά, τα μονοπύρνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση σε κλίση Ficoll-Hyraque. Κατόπιν, τα κύτταρα χωρίστηκαν σε 2 μέρη, ένα για την επαγωγή κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (cytotoxic T lymphocytes, CTLs) και ένα για την παραγωγή με ακτινοβολία αυτόλογων τροφοκυττάρων για τις καλλιέργειες. Μια αυτόλογη HLA-A2⁺ B λεμφοκυτταρική σειρά χρησιμοποιήθηκε για την παρουσίαση αντιγόνου (προσφορά του Prof. Hugh Reyburn, National Biotechnology Center, Spain). Για την αντιγονοπαρουσίαση, τα αυτόλογα B κύτταρα προεπώαστηκαν με 1 μM MP(58-66) για 1 ώρα στους 37°C και κατόπιν ακτινοβολήθηκαν. Για την επαγωγή κλώνων CTL έναντι του MP(58-66), έγιναν καλλιέργειες των PBMCs σε πλάκες 96 πηγαδιών, οι οποίες περιείχαν PBMCs, αυτόλογα ακτινοβολημένα PBMCs και προεπωασμένα με πεπτίδιο B κύτταρα σε αναλογία 1:1:0,1 και αριθμό κυττάρων 10⁵ ανά ml. Ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το RPMI 1640 (Lonza) συμπληρωμένο με 5% FBS, 5% αυτόλογο ανθρώπινο ορό (HBS) και 5 U ml⁻¹ ανθρώπινης ανασυνδυασμένης ιντερλευκίνης 2 (IL-2) (Preprotech). Την τέταρτη μέρα, οι καλλιέργειες συμπληρώθηκαν με επιπλέον θρεπτικό μέσο και IL-2. Την έβδομη μέρα, και επίσης μια βδομάδα πριν από λειτουργικές δοκιμασίες, πραγματοποιείται ένα στάδιο επαναδιέγερσης. Στο στάδιο αυτό συλλέγονται τα κύτταρα από τα πηγάδια που παρουσιάζουν αύξηση και στρώνονται σε πλάκα 24 πηγαδιών με ακτινοβολημένα και προεπωασμένα με πεπτίδιο B κύτταρα σε αναλογία 1:1 και αριθμούς κυττάρων 2-6×10⁵ ανά ml, πάντα παρουσία 5 U ml⁻¹ IL-2.

Μετά από 2 βδομάδες της καλλιέργειας για την επαγωγή κλώνων CTL, μπορούν να συλλεχθούν τα κύτταρα για λειτουργικές δοκιμασίες. Αρχικά, οι καλλιέργειες ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την επιφανειακή έκφραση CD3, CD8 και V_β17. Τα ακόλουθα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν: anti-CD3 (από την κυτταρική σειρά υβριδώματος T3D), anti-CD8 (από την κυτταρική

σειρά υβριδώματος B9.4), anti-V β 17 (από την κυτταρική σειρά υβριδώματος C1) και ένα μη ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού από την κυτταρική σειρά υβριδώματος Mo*C21. Τα CD3⁺ ήταν το 45%, τα CD8⁺ το 48% και τα V β 17⁺ κύτταρα το 6% των συνολικών κυττάρων (**Εικ. 8.5**). Οι τιμές αυτές φανερώνουν μια καλή επαγωγή κλώνων CTL.



Εικ. 8.5. Ιστογράμματα φθορισμού από κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση CD3, CD8 και V β 17 στη μεμβράνη κυττάρων από τις καλλιέργειες για την επαγωγή κλώνων CTL. Τα CD3⁺ κύτταρα ήταν το 45%, τα CD8⁺ το 48% και τα V β 17⁺ το 6% των συνολικών κυττάρων.

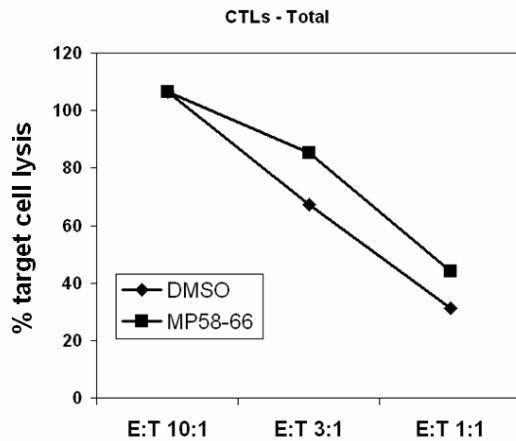
Οι καλλιέργειες ελέγχθηκαν επίσης για κυτταροτοξικότητα έναντι κυττάρων στόχων. Η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας¹⁶ περιλαμβάνει την καλλιέργεια των επαγμένων για ενεργότητα CTL κυττάρων με B κύτταρα προεπωασμένα είτε με το πεπτίδιο MP(58-66) είτε απλά με το διαλύτη DMSO σε κυτταρικές αναλογίες 10:1, 3:1 και 1:1. Η καλλιέργεια έγινε σε πλάκα 96 πηγαδιών, σε καθένα από το οποίο προστέθηκε η χρωστική alamarBlue (Molecular Probes) (20 μ l). Η πλάκα τοποθετήθηκε στον επωαστήρα για 24 ώρες. Η χρώση με alamarBlue προσφέρει ευκολία και υψηλή ευαισθησία για την ανίχνευση κυτταροτοξικότητας¹⁶. Το alamarBlue προστίθεται στις καλλιέργειες στην οξειδωμένη του μορφή και ανάγεται από τη δράση των μιτοχονδριακών ενζύμων των ζώντων κυττάρων. Επομένως, μετά από 24 ώρες, μετράται ο φθορισμός του alamarBlue στα πηγάδια της πλάκας και υπολογίζεται η κυτταροτοξικότητα των CTLs από τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ λύση} = 100 \times [F_t - (F_{e:t} - F_e)] / F_t$$

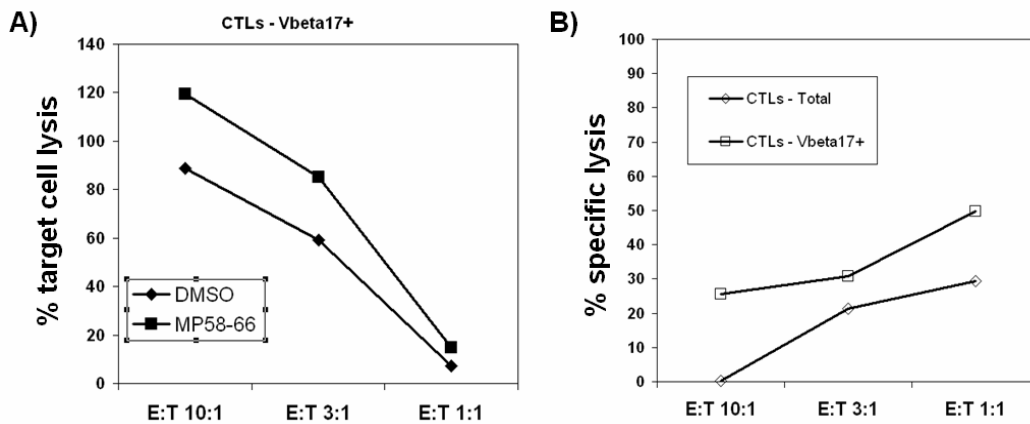
όπου F_t είναι ο φθορισμός για τα πηγάδια μόνο με κύτταρα στόχους, F_e είναι ο φθορισμός για τα πηγάδια μόνο με επαγμένα κύτταρα και $F_{e:t}$ ο φθορισμός για τα πηγάδια με κύτταρα στόχους και κύτταρα επαγμένα για ενεργότητα CTL. Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλή κυτταροτοξικότητα από τις επαγμένες για CTLs καλλιέργειες (**Εικ. 8.6**), τόσο ειδική όσο και μη ειδική, λόγω χάρη εξαιτίας της δράσης των NK κυττάρων που μπορούν να επάγουν κυτταρική λύση μη εξαρτώμενη από αντιγόνο. Η ειδική κυτταροτοξικότητα ήταν πιο εμφανής σε χαμηλότερες αναλογίες επαγμένων για CTL κυττάρων και κυττάρων στόχων.

Εφόσον η CD8⁺ κυτταροτοξική απόκριση έναντι στο MP(58-66) μεσολαβείται κυρίως από V β 17⁺ T κύτταρα^{5, 6}, για την επίτευξη υψηλότερης αντιγονοεξαρτώμενης κυτταροτοξικότητας, έγινε απομόνωση των V β 17⁺ κυττάρων από τις καλλιέργειες, τα οποία αποτελούν το 6% των συνολικών κυττάρων. Ακολουθήθηκε θετική απομόνωση των V β 17⁺ κυττάρων της καλλιέργειας χρησιμοποιώντας μαγνητικά σφαιρίδια (Dynal) συζευγμένα με αντίσωμα. Συγκεκριμένα, μαγνητικά σφαιρίδια συζευγμένα με anti-mouse IgG προβάτου επώαστηκαν με το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-V β 17 από το υβρίδωμα C1. Τα σφαιρίδια αναμίχθηκαν με τα κύτταρα και τα

συσσωματώματα κυττάρων/σφαιριδίων απομονώθηκαν με τη βοήθεια μαγνήτη. Τα $V_{\beta}17^{+}$ κύτταρα καλλιεργήθηκαν και διεγέρθηκαν σε ίδιες συνθήκες. Κατόπιν, ελέγχθηκαν για κυτταροτοξικότητα έναντι Β κυττάρων προεπωασμένων είτε με το πεπτίδιο MP(58-66) είτε με το διαλύτη DMSO. Τα $V_{\beta}17^{+}$ κύτταρα εμφάνισαν υψηλή κυτταροτοξικότητα που ήταν περισσότερο αντιγονοειδική από ότι παρατηρήθηκε για τις συνολικές επαγμένες για ενεργότητα CTL καλλιέργειες (Εικ. 8.7). Τα απομονωμένα $V_{\beta}17^{+}$ κύτταρα μπορούν κατόπιν να χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω πειράματα με τον ακουστικό βιοαισθητήρα.



Εικ. 8.6. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας για κύτταρα από τις καλλιέργειες για την επαγωγή κλώνων CTL. Διακρίνεται η % λύση των κυττάρων στόχων, επωασμένων ή μη με το αντιγονικό πεπτίδιο MP(58-66), ως προς την αναλογία κυττάρων τελεστών και κυττάρων στόχων (E:T).



Εικ. 8.7. Α) % λύση των κυττάρων στόχων, επωασμένων ή μη με το αντιγονικό πεπτίδιο MP(58-66), ως προς την αναλογία κυττάρων τελεστών (απομονωμένα $V_{\beta}17^{+}$ κύτταρα) και κυττάρων στόχων (E:T). Β) % ειδική (αντιγονο-εξαρτώμενη) λύση κυττάρων στόχων για κύτταρα από τις καλλιέργειες επαγωγής κλώνων CTL (CTLs - Total) και απομονωμένα $V_{\beta}17^{+}$ κύτταρα (CTLs - Vbeta17+). Η ειδική λύση υπολογίζεται από την αφαίρεση της % λύσης των μη επωασμένων με MP(58-66) κυττάρων στόχων από την % λύση των επωασμένων με MP(58-66) κυττάρων στόχων.

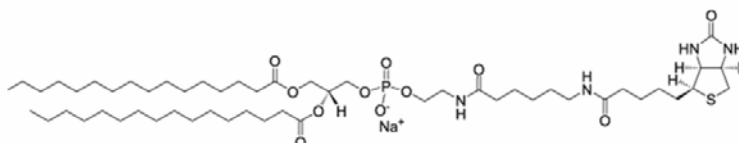
3. Προετοιμασία επιφάνειας του ακουστικού βιοαισθητήρα με το σύμπλοκο HLA-A2/MP(58-66) σε λιπιδική μεμβράνη

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης TCR/MHC/πεπτιδίου στις φυσικές της συνθήκες απαιτεί την παρουσία κάθε μορίου στη λιπιδική μεμβράνη. Επομένως ο προσδέτης στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, δηλαδή το σύμπλοκο

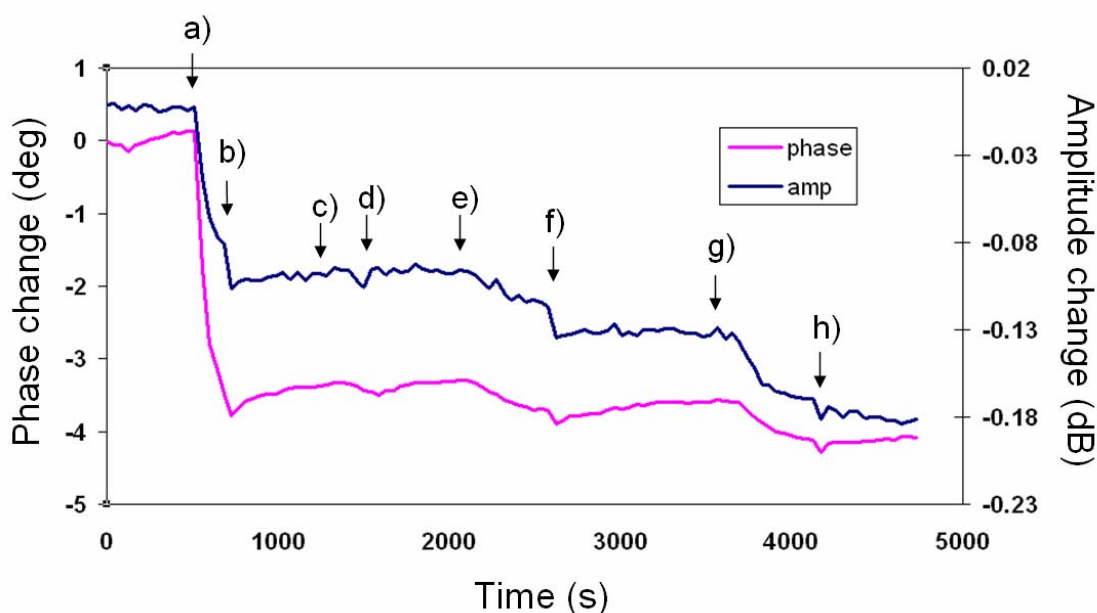
MHC/πεπτιδίου, θα πρέπει να είναι ενσωματωμένο σε λιπιδική μεμβράνη η οποία πρέπει να εμφανίζει ρευστότητα. Για τον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love, δύο στρατηγικές μπορούν να ακολουθηθούν για το σχηματισμό λιπιδικής μεμβράνης στην επιφάνεια χρυσού. Η μια στρατηγική είναι η χρήση προσδεμένης λιπιδικής διπλοστοιβάδας σε επιφάνεια χρυσού που έχει προσροφηθεί νουτραβιδίνη (όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 7 §1.2). Το σύμπλοκο HLA-A2/MP(58-66) θα έχει ενσωματωθεί σε λιποσώματα έπειτα από καθαρισμό της α αλυσίδας από κύτταρα και αναδίπλωσή της παρουσία β_2 μικροσφαιρίνης και πεπτιδίου MP(58-66). Η άλλη στρατηγική περιλαμβάνει το σχηματισμό λιπιδικής μονοστοιβάδας σε υδρόφοβο SAM (όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 7 §2) πάνω στην οποία θα συνδεθεί σε τροποποιημένα λιπίδια το σύμπλοκο HLA-A2/MP(58-66) στη διαλυτή του μορφή, δηλαδή χωρίς τη διαμεμβρανική επικράτεια. Από τις δύο στρατηγικές, επιλέχθηκε η δεύτερη αφενός γιατί εμφανίζει μεγαλύτερη πιθανότητα επιτυχίας και προσφέρει μια καλύτερα χαρακτηρισμένη επιφάνεια και αφετέρου γιατί προσφέρει ενδεχομένως μεγαλύτερη ευαισθησία για τη μελέτη αλληλεπίδρασης με τον TCR στην επιφάνεια του κυττάρου. Το τελευταίο μπορεί να προκύψει από τον υπολογισμό της απόστασης που θα συμβαίνει η αλληλεπίδραση TCR/MHC/πεπτιδίου από την επιφάνεια του βιοαισθητήρα για τις δύο περιπτώσεις. Στην πρώτη περίπτωση (βλ. Κεφάλαιο 7 **Εικ. 7.7**), υπάρχουν στην επιφάνεια του αισθητήρα: ένα στρώμα νουτραβιδίνης (6-10 nm), η αλυσίδα PEG που δρα ως μόριο διαχωριστής της λιπιδικής διπλοστοιβάδας (4 nm), η ίδια η λιπιδική διπλοστοιβάδα (6 nm) καθώς και το σύμπλοκο HLA-A2/MP(58-66) (7 nm). Η αλληλεπίδραση επομένως θα συμβαίνει σε απόσταση περίπου 25-27 nm από την επιφάνεια. Στη δεύτερη περίπτωση, στην επιφάνεια του αισθητήρα θα περιλαμβάνει: το υδρόφοβο SAM (3 nm), τη λιπιδική μονοστοιβάδα (3 nm) και ένα ή δύο στρώματα πρωτεΐνης (ανάλογα με τη χρήση λιπιδίων συζευγμένων με NTA ή βιοτίνη) (7-14 nm). Η μέγιστη απόσταση από την επιφάνεια θα είναι περίπου 20 nm. Επειδή στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love σχηματίζεται ένα αποσβέον πεδίο με βάθος διείσδυσης 54 nm, ευνοείται η στρατηγική που θα επιτρέπει την αλληλεπίδραση σε όσο το δυνατό μικρότερη απόσταση από την επιφάνεια καθώς ενδέχεται να προσφέρει αυξημένη ευαισθησία.

Επομένως, στην επιφάνεια του αισθητήρα τύπου Love σχηματίστηκε λιπιδική μονοστοιβάδα πάνω σε υδρόφοβο SAM, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την δέσμευση και παρουσίαση του συμπλόκου HLA-A2/MP(58-66). Τα λιποσώματα που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν eggPC και ένα φωσφολιπίδιο συζευγμένο στην κεφαλή του με μια ομάδα βιοτίνης μέσω μικρής αλυσίδας (**Εικ. 8.8**), φωσφοαιθανολαμίνη με N-cap βιοτίνη (Avanti Polar Lipids), σε μοριακή αναλογία 5%. Σε πειράματα πραγματικού χρόνου στον ακουστικό βιοαισθητήρα και έπειτα από προσθήκη BSA για τη δέσμευση μη ειδικών θέσεων, έγινε προσθήκη νουτραβιδίνης ($2,52 \pm 0,74$ deg και $0,057 \pm 0,030$ dB, $n=3$) (**Εικ. 8.9**). Η πρόσδεση της νουτραβιδίνης, η οποία περιέχει 4 θέσεις δέσμευσης βιοτίνης, αναμένεται να γίνει μονοσθενώς, τόσο λόγω της μικρής μοριακής αναλογίας του βιοτινυλιωμένου λιπιδίου στην λιπιδική μονοστοιβάδα όσο και λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης στην ταυτόχρονη δέσμευση δύο βιοτινυλιωμένων λιπιδίων σε ένα μόριο νουτραβιδίνης. Η νουτραβιδίνη χρησίμευσε ως ενδιάμεση πλατφόρμα για την πρόσδεση βιοτινυλιωμένου συμπλόκου HLA-A2/MP(58-66). Σύμπλοκα HLA-A2/MP(58-66) τα οποία έχουν εκφραστεί χωρίς τη διαμεμβρανική επικράτεια της α

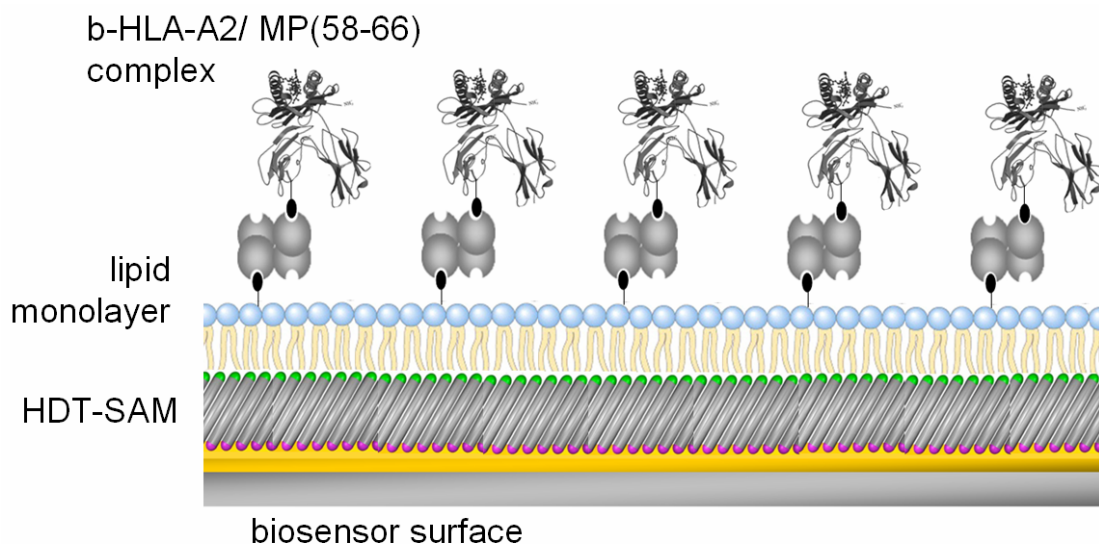
αλυσίδας και περιέχουν μια ομάδα βιοτίνης συζευγμένη στην β_2 μικροσφαιρίνη (Glycotopre Biotechnology) προστέθηκαν στην επιφάνεια του αισθητήρα και δεσμεύθηκαν ειδικά στη νουτραβιδίνη (Εικ. 8.9). Η δέσμευση του βιοτινυλιωμένου συμπλόκου b-HLA-A2/MP(58-66) ($0,43 \pm 0,021$ deg και $0,018$ dB, $n=3$) επιβεβαιώθηκε με την προσθήκη του anti-HLA-A2 μονοκλωνικού αντισώματος BB7.2 ($0,53 \pm 0,22$ deg και $0,031$ dB, $n=3$). Επειδή το b-HLA-A2/MP(58-66) συνδέεται απευθείας με λιπίδιο, η πλευρική του διάχυση είναι αρκετά ψηλή, όπως παρατηρείται και στην κυτταρική μεμβράνη¹⁷. Κατά συνέπεια, στην επιφάνεια του αισθητήρα τύπου Love σχηματίστηκε λιπιδική μεμβράνη που παρουσιάζει το σύμπλοκο HLA-A2/MP(58-66) (Εικ. 8.10) σε συνθήκες που μοιάζουν με τη φυσιολογική κατάσταση στην επιφάνεια του κυττάρου, δηλαδή με πλευρική διάχυση του συμπλόκου.



Εικ. 8.8. Βιοτινυλιωμένο φωσφολιπίδιο (PE). (Πηγή: www.avantilipids.com)



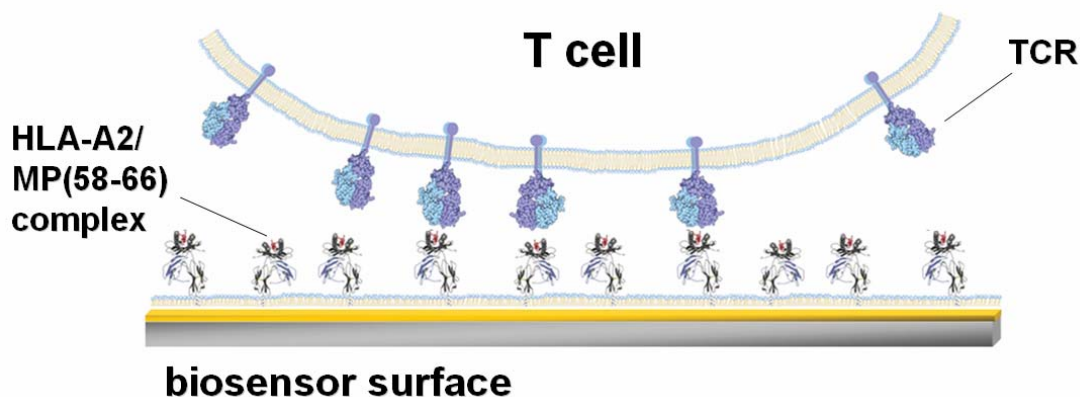
Εικ. 8.9. Μεταβολή της φάσης και του πλάτους του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love ως προς το χρόνο κατά την προσθήκη των πρωτεϊνών νουτραβιδίνη, b-HLA-A2/MP(58-66) και anti-HLA σε λιπιδική μονοστιβιάδα με βιοτινυλιωμένα λιπίδια. a) Προσθήκη νουτραβιδίνης ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$), b) ξέπλυμα με PBS, c) προσθήκη BSA ($0,5 \text{ mg ml}^{-1}$), d) ξέπλυμα με PBS, e) προσθήκη b-HLA-A2/MP(58-66) ($0,9 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$), f) ξέπλυμα με PBS, g) προσθήκη anti-HLA ($2,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$), h) ξέπλυμα με PBS.



Εικ. 8.10. Σχηματική απεικόνιση της επιφάνειας βιοαναγνώρισης στον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love.

4. Μελλοντικά πειράματα: αλληλεπίδραση TCR στη μεμβράνη T κυττάρων με HLA-A2/MP(58-66) στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love

Τα T κύτταρα που προετοιμάστηκαν θα προστεθούν στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα όπου θα υπάρχει το πλευρικά διαχεόμενο HLA-A2 συζευγμένο με το αντιγονικό πεπτιδίο MP(58-66) (Εικ. 8.11). Η μεταμολυσμένη με τον JM22 TCR T κυτταρική σειρά θα προστεθεί στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα ώστε να παρακολουθηθεί σε πραγματικό χρόνο η αλληλεπίδραση μεταξύ TCR και MHC/πεπτιδίου. Ο ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love μπορεί να συσχετίσει το ακουστικό σήμα με τον αριθμό των δεσμών ανάμεσα σε κυτταρικό υποδοχέα και ακινητοποιημένο προσδέτη. Επομένως, θα χρησιμοποιηθούν δείγματα με διαφορετικό αριθμό κυττάρων καθώς και λεπτομερής μαθηματική ανάλυση για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων και της σταθεράς συγγένειας σε 2D για τη μοριακή αλληλεπίδραση JM22 TCR/HLA-A2/MP(58-66). Ακολούθως, μπορεί να γίνει η σύγκριση των παραμέτρων σε 2D με τις παραμέτρους πρόσδεσης που έχουν υπολογιστεί στο διάλυμα^{9, 10}. Επίσης, στην τροποποιημένη με το σύμπλοκο HLA-A2/MP(58-66) επιφάνεια του βιοαισθητήρα θα προστεθούν οι πρωτογενείς T κυτταρικοί κλώνοι και θα παρακολουθηθεί σε πραγματικό χρόνο η αναγνώριση αντιγόνου. Επιπλέον, το πειραματικό αυτό σύστημα είναι ευκόλως διαχειρίσιμο και μπορούν να ελεγχθούν διάφοροι εξωγενείς (ροή, θερμοκρασία) και ενδογενείς (κυτταροσκελετός, γλυκοκάλυκας) παράγοντες για την επίδραση τους στην φυσιολογική διαδικασία των T κυττάρων. Σε συνδυασμό με τη διεξαγωγή πειραμάτων σε συνεστιακό μικροσκόπιο με τα T κύτταρα και τη λιπιδική μεμβράνη, θα μπορούν να εξαχθούν σημαντικά συμπεράσματα για την σχέση μεταξύ της συγγένειας της αλληλεπίδρασης, της έκτασης της κυτταρικής προσκόλλησης και της λειτουργικής απόκρισης, δηλαδή της αναγνώρισης του αντιγόνου.



Εικ. 8.11. Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα. Κύτταρα που εκφράζουν TCR θα προστεθούν στην επιφάνεια που παρουσιάζει το σύμπλοκο HLA-A2/MP(58-66) με πλευρική διάχυση σε λιπιδική μεμβράνη.

5. Βιβλιογραφία

1. Dustin, M.L. Supported bilayers at the vanguard of immune cell activation studies. *J Struct Biol* **168**, 152-160 (2009).
2. Groves, J.T. & Dustin, M.L. Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication. *J Immunol Methods* **278**, 19-32 (2003).
3. Gotch, F., McMichael, A., Smith, G. & Moss, B. Identification of viral molecules recognized by influenza-specific human cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **165**, 408-416 (1987).
4. Morrison, J. et al. Identification of the nonamer peptide from influenza A matrix protein and the role of pockets of HLA-A2 in its recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* **22**, 903-907 (1992).
5. Lehner, P.J. et al. Human HLA-A0201-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of influenza A is dominated by T cells bearing the V beta 17 gene segment. *J Exp Med* **181**, 79-91 (1995).
6. Moss, P.A. et al. Extensive conservation of alpha and beta chains of the human T-cell antigen receptor recognizing HLA-A2 and influenza A matrix peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 8987-8990 (1991).
7. Ishizuka, J. et al. The structural dynamics and energetics of an immunodominant T cell receptor are programmed by its Vbeta domain. *Immunity* **28**, 171-182 (2008).
8. Stewart-Jones, G.B., McMichael, A.J., Bell, J.I., Stuart, D.I. & Jones, E.Y. A structural basis for immunodominant human T cell receptor recognition. *Nature immunology* **4**, 657-663 (2003).
9. Willcox, B.E. et al. TCR binding to peptide-MHC stabilizes a flexible recognition interface. *Immunity* **10**, 357-365 (1999).
10. van der Merwe, P.A. & Davis, S.J. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* **21**, 659-684 (2003).
11. Yang, S. et al. Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition. *Gene Ther* **15**, 1411-1423 (2008).
12. Friedman, S.M. et al. Characterization of human T cells reactive with the Mycoplasma arthritidis-derived superantigen (MAM): generation of a monoclonal antibody against V

- beta 17, the T cell receptor gene product expressed by a large fraction of MAM-reactive human T cells. *J Exp Med* **174**, 891-900 (1991).
13. Zumla, A. et al. Co-expression of human T cell receptor chains with mouse CD3 on the cell surface of a mouse T cell hybridoma. *J Immunol Methods* **149**, 69-76 (1992).
 14. Chisholm, S.E. & Reyburn, H.T. Recognition of vaccinia virus-infected cells by human natural killer cells depends on natural cytotoxicity receptors. *Journal of virology* **80**, 2225-2233 (2006).
 15. Vales-Gomez, M. & Reyburn, H.T. Intracellular trafficking of the HCMV immunoevasin UL16 depends on elements present in both its cytoplasmic and transmembrane domains. *Journal of molecular biology* **363**, 908-917 (2006).
 16. Nociari, M.M., Shalev, A., Benias, P. & Russo, C. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* **213**, 157-167 (1998).
 17. Bierer, B.E., Herrmann, S.H., Brown, C.S., Burakoff, S.J. & Golan, D.E. Lateral mobility of class I histocompatibility antigens in B lymphoblastoid cell membranes: modulation by cross-linking and effect of cell density. *J Cell Biol* **105**, 1147-1152 (1987).

Επίλογος

Αυτό που επιτεύχθηκε κυρίως στην παρούσα εργασία ήταν η ανάδειξη των βιοαισθητήρων, και κυρίως των ακουστικών, ως εξαιρετικά εργαλεία για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ μεμβρανικών μορίων. Διαφορετικά συστήματα βιοαισθητήρων χρησιμοποιήθηκαν και εμφάνισαν διαφορετικές αποκρίσεις. Επομένως, η χρήση τους με συμπληρωματικό τρόπο μπορεί να δώσει νέα και σημαντική πληροφορία για διάφορα κυτταρικά φαινόμενα, όπως φάνηκε και από τη μελέτη του μοντέλου συστήματος που χρησιμοποιήθηκε. Σε αυτό το σύστημα πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση των αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν ανάμεσα σε κύτταρο και υπόστρωμα καθώς και μελέτη της επίδρασης τοπολογικών παραγόντων που παίζουν ρόλο στην διαθεσιμότητα και προσβασιμότητα των μεμβρανικών μορίων. Επιπλέον, στην παρούσα εργασία, επιβεβαιώθηκε η δυναμική των βιοαισθητήρων για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων γενικά σε μεμβράνες χρησιμοποιώντας μοντέλα λιπιδικών μεμβρανών. Διάφορα μοντέλα λιπιδικών μεμβρανών προετοιμάστηκαν σε διάφορες επιφάνειες βιοαισθητήρων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για οποιαδήποτε εφαρμογή. Μια εφαρμογή που προτάθηκε ήταν η μελέτη της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα των T κυττάρων (TCR) με HLA μόρια που παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια. Η χρήση του βιοαισθητήρα για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης αυτής σε κυτταρικό επίπεδο αφαιρεί την ανάγκη για την απομόνωση και επαναφορά μεμβρανικών πρωτεϊνών και μπορεί να προσφέρει σημαντική νέα γνώση για τη διαδικασία αναγνώρισης αντιγόνου από τα T κύτταρα. Επιπλέον, η τεχνική ομοιάζει με τις σύγχρονες τεχνικές φθορισμού, εφόσον προσφέρει τη μέτρηση μοριακής συγγένειας σε 2D ανάμεσα σε κύτταρο και υπόστρωμα. Τα επόμενα στάδια για την ανάπτυξη ακουστικών βιοαισθητήρων θα πρέπει επομένως να εστιάσουν στη διευκόλυνση της μελέτης αλληλεπιδράσεων κυττάρου/υποστρώματος. Αυτό μπορεί να γίνει με το συνδυασμό ακουστικού βιοαισθητήρα μαζί με μια άλλη τεχνική στην ίδια πειραματική διάταξη, λόγου χάρη συνδυασμός αισθητήρα με μικροσκόπιο, ή με το σχεδιασμό νέων τύπων αισθητήρων που ενσωματώνουν τις ιδιότητες τόσο των ακουστικών όσο και των οπτικών βιοαισθητήρων. Οι ακουστικοί βιοαισθητήρες εμφανίζουν τη δυνατότητα να εφαρμοστούν και σε πολλαπλή διάταξη, δηλαδή συστοιχία αισθητήρων (sensor array), για την χρήση τους είτε ως συστήματα πολλαπλής διάγνωσης είτε ως συστήματα αναζήτησης και ταυτοποίησης νέων φαρμακολογικών παραγόντων για μεμβρανικούς υποδοχείς. Αυτό μπορεί να διευκολυνθεί και από περαιτέρω ανάπτυξη στο πεδίο των συστημάτων microfluidics και των συστημάτων Lab-on-a-Chip, όπου οι ακουστικοί βιοαισθητήρες μπορούν να αποτελέσουν το κομμάτι ανίχνευσης αλληλεπιδράσεων. Οι ακουστικοί αισθητήρες επομένως εμφανίζουν εξαιρετική δυναμική για την εφαρμογή τους τόσο στη βασική βιολογική έρευνα όσο και την εφαρμοσμένη έρευνα στη διάγνωση και ταυτοποίηση νέων φαρμάκων.

Δημοσιεύσεις και Συνέδρια

Επιστημονικά Περιοδικά (Peer-reviewed Journals)

Saitakis M., Gizeli E.

Quantification of the effect of glycocalyx condition on membrane receptor interactions using an acoustic wave sensor, *Eur Biophys J* Epub 2010 Oct 17

Link: <http://www.springerlink.com/content/5q788126k65mu825/fulltext.html>

Saitakis M., Tsortos A., Gizeli E.

Probing the interaction of a membrane receptor with a surface-attached ligand using whole cells on acoustic biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2010 Mar 15;25(7):1688-1693. Epub 2009 Dec 14

Link: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TFC-4XY5DVS-1&_user=83470&_coverDate=03/15/2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_acct=C000059627&_version=1&_urlVersion=0&_userid=83470&md5=51fd3cd55c0d39d38539c1c5b1028714&searchtype=a

Saitakis M., Dellaporta A., Gizeli E.

Measurement of two-dimensional binding constants between cell-bound major histocompatibility complex and immobilized antibodies with an acoustic biosensor. *Biophys J.* 2008 Nov 15;95(10):4963-71. Epub 2008 Aug 15.

Link: [http://www.cell.com/biophysj/abstract/S0006-3495\(08\)78634-X](http://www.cell.com/biophysj/abstract/S0006-3495(08)78634-X)

At the media: <http://www.newsrx.com/newsletters/Blood-Weekly/2009-01-08/801082009223BW.html>

Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας (Patent)

Gizeli E., Saitakis M.

WO/2009/037660: "Analysing the binding of cell membrane bound molecules"

Link: <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2009037660>

Διεθνή Συνέδρια και Πρακτικά (International Conferences & Proceedings)

2nd European Congress of Immunology, Berlin, Germany, 2009

Παρουσίαση Poster: "Acoustic biosensor for characterizing immune-cell receptor ligand interactions" – Michael Saitakis & Electra Gizeli

IEEE International Frequency Control Symposium, Honolulu, HI, USA, 2008

Προφορική παρουσίαση: "A Surface Acoustic Wave Sensor for the Study of Membrane-Protein/Ligand Interactions Using Whole Cells" – Michael Saitakis, Anastasia Dellaporta & Electra Gizeli

Saitakis M., Dellaporta A., Gizeli E.

A surface acoustic wave sensor for the study of membrane-protein/ligand interactions using whole cells. *Frequency Control Symposium*, 2008 IEEE International. 19-21 May 2008, p356-359

Link: http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=4623019&tag=1

