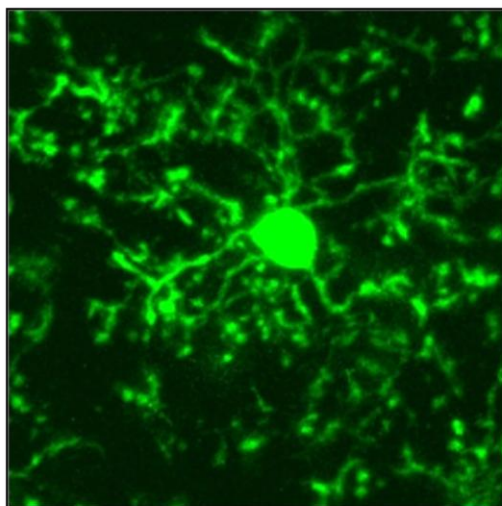




Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Μοριακής Βιολογίας και Βιοϊατρικής (ΜΠ-ΜΒΒ)
Τμήματα Βιολογίας και Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης,
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας - ΙΤΕ

Μεταπτυχιακή ερευνητική εργασία: «Μελέτη της έκφρασης των τάξης II μορίων του ΜHC στη Μικρογλοία»



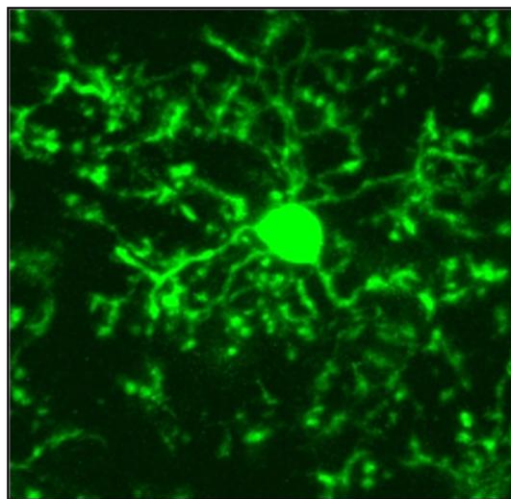
Μαρία Καλογνώμου
Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ειρήνη Αθανασάκη

Ηράκλειο 2011



Joint Graduate program in Molecular Biology and
Biomedicine Departments of Biology and Medicine,
University of Crete and Institute of Molecular Biology and
Biotechnology - FORTH

Master thesis:
**“Regulation of MHC II expression in
microglia”**



Maria Kalognomou
Supervisor: Prof. Irene Athanassakis

Herakleion 2011

Ευχαριστίες...

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανοσοβιολογίας του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Ειρήνης Αθανασάκη. Θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω την κ. Αθανασάκη για την πολύτιμη βοήθεια και την κατευθύνσεις που μου έδωσε όσον αφορά στο ερευνητικό θέμα της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την προσωπική υποστήριξη καθώς και γιατί με ενέπνευσε και μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα θέμα το οποίο μου με ενδιαφέρει πολύ.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τους καθηγητές κ. Ιωσήφ Παπαμαθθαϊάκη και κ. Β. Πάχνη για το ενδιαφέρον τους και το χρόνο που διέθεσαν.

Επίσης τον καθηγητή κ. Γ. Χαλεπάκη και τα μέλη του εργαστηρίου του για την πολύτιμη βοήθεια τους που μου προσέφεραν όλο αυτό το χρονικό διάστημα καθώς και την καθηγήτρια κ. Κ. Σιδηροπούλου γιατί μέσα από το σύντομο χρονικό διάστημα που ήμουν μέλος του εργαστηρίου της ανακάλυψα νέα ερευνητικά ενδιαφέροντα τα οποία με βοήθησαν στα επόμενα βήματα μου.

Ακόμη ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στα μέλη του εργαστηρίου Ανοσοβιολογίας Κατερίνα Μπακέλα, Ιωάννα Ζέρβα, Αθηνά Χαϊδάκη, Δεβόρα Καραλή, Κατερίνα Βαρδάκη, Αμαλία Ανθούση και Μαρία Κουτσάκη για το ευχάριστο κλίμα, την εξαιρετική συνεργασία και την βοήθεια που μου προσέφεραν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την Χριστιάνα Κυβελίδου, τη Δάφνη Μοάτσου, την Εύα Καρακατσάνη και τον Αλέξανδρο Γαμβρέλλη για την υποστήριξη και την συμπαράσταση τους σ' αυτόν τον δύσκολο χρόνο που πέρασε, τους γονείς μου γιατί με στήριξαν με οποιοδήποτε δυνατό τρόπο όλα αυτά τα χρόνια και την Δέσποινα και τον Μιχάλη που μου έδωσαν την αγάπη για όσα κάνω σήμερα και τη δύναμη να φτάσω ως εδώ.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 ΓΛΟΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΟ ΚΝΣ	8
1.1.1 ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΑΡΑ	8
1.1.2 ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ	8
1.1.3 ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑ	9
1.2 ΤΟ ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ	13
1.2.1 ΤΑΞΗΣ I ΜΟΡΙΑ ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ	13
1.2.2 ΤΑΞΗΣ II ΜΟΡΙΑ ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ	14
1.2.3 ΤΟ ΕΝΔΟΣΩΜΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ	15
1.2.4 ΜΗ ΚΛΑΣΙΚΑ ΤΑΞΗΣ II ΜΟΡΙΑ ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ	16
1.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΝ ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΣ ΣΕ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	19
1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	23
2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	24
2.1 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	24
2.1.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ BV-2	24
2.1.2 ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	24
2.1.3 ΞΕΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	25
2.2 ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΚΑΙ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ	26
2.3 ELISA	28
2.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΗΣ ΘΥΜΙΔΙΝΗΣ	29
2.5 RT-PCR	31
2.5.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ mRNA(POLY A ⁺ RNA).....	31
2.5.2 RT-PCR	32
2.5.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	33
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	34
3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ H2-A, H2-O ΚΑΙ H2-M ΚΑΙ ΤΟΥ CD74 ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ BV-2.	34
3.1.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ H2-A, H2-O ΚΑΙ H2-M ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ BV-2.	34
3.1.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΤΟΥ CD74 ΜΕ RT-PCR.....	35
3.1.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ H2-A, H2-O ΚΑΙ H2-M ΜΕ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ	36
3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ H2-A, H2-O ΚΑΙ H2-M ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ BV-2 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ(LPS)	38
3.2.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΕ BV-2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ LPS.....	38
3.2.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ H2-A, H2-O ΚΑΙ H2-M ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ BV-2 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ LPS.....	38
3.2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΜHC II ΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ TNF-Α ΣΕ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ BV-2 ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ LPS.....	41

3.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ Η2-Α, Η2-Ο ΚΑΙ Η2-Μ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ BV-2 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΑΓΩΓΗ ΜΕ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗ-Γ.....	42
3.3.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΕ BV-2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙFN-Γ	42
3.3.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ Η2-Α, Η2-Ο ΚΑΙ Η2-Μ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ BV-2 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΑΓΩΓΗ ΜΕ ΙFN-Γ.....	43
3.3.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΜHC II ΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ TNF-Α ΣΕ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ BV-2 ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΑΓΩΓΗ ΜΕ ΙFN-Γ.....	45
3.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ Η2-Α, Η2-Ο ΚΑΙ Η2-Μ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ BV-2 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΑΓΩΓΗ ΜΕ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-4.	46
3.4.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΕ BV-2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙL-4	46
3.4.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ Η2-Α, Η2-Ο ΚΑΙ Η2-Μ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ BV-2 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΑΓΩΓΗ ΜΕ ΙL-4.....	47
3.4.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΜHC II ΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ TNF-Α ΣΕ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ BV-2 ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΕΠΑΓΩΓΗ ΜΕ ΙL-4.....	49
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη των μικρογλοιακών κυττάρων, τα οποία αποτελούν τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του εγκεφάλου, παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον, καθώς ανάλογα με την ενεργοποίησή τους μπορούν να προωθήσουν τόσο την προστασία των νευρικών κυττάρων όσο και τον νευροεκφυλισμό. Επιπλέον σε πολλές νευροεκφυλιστικές καταστάσεις, όπως η γήρανση, η νόσος του Parkinson, η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Huntington και η σχιζοφρένεια, έχει δειχθεί ότι η απορρύθμιση των μηχανισμών ενεργοποίησης της μικρογλοίας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη παθολογικών φαινομένων.

Η ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων έχει συνδεθεί με την έκφραση τάξης II μορίων του Μείζονος Συμπλόκου Ισοσυμβατότητας. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής ερευνητικής εργασίας ήταν η μελέτη του προφίλ έκφρασης μεμβρανικών και ενδοκυτταρικών κλασικών MHC II μορίων (H2-A), η έκφραση των ενδοκυτταρικών μη κλασικών MHC II μορίων H2-O και H2-M καθώς και η έκφραση του CD74 σε διαφορετικά στάδια ενεργοποίησης της μικρογλοίας. Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε η μικρογλοιακή κυτταρική σειρά BV-2. Αρχικά, χρησιμοποιώντας πειραματικούς χειρισμούς κυτταρομετρίας ροής, RT-PCR και συνεστιακής μικροσκοπίας, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα εκφράζουν όλα τα απαραίτητα μόρια για την μεταμεταφραστική ρύθμιση των τάξης II μορίων του MHC και για την μεταφορά τους στην κυτταρική μεμβράνη. Επίσης μελέτη της ενεργοποίησης μικρογλοίας υπό την επίδραση LPS, της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης IFN- γ και της αντι-φλεγμονώδους κυτοκίνης IL-4 έδειξε ότι διαφορετικοί παράγοντες ενεργοποίησης μπορούν να οδηγούν σε διαφορετικό τύπο ενεργοποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων.

Η μελέτη των μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης MHC II μορίων στη μικρογλοία θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις και να υποδείξει νέες στρατηγικές όσων αφορά στη θετική ή αρνητική ρύθμιση της ενεργοποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων κατά την ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων σε περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

Λέξεις- Κλειδιά: Ενεργοποίηση Μικρογλοίας, Ρύθμιση των τάξης II μορίων του MHC, αντιγονοπαρουσίαση, κυτταρική σειρά BV-2

ABSTRACT

In the last decade, microglia activation has been the subject of intense investigation since it can promote a variety of events ranging from neuroprotection to neurodegeneration. Moreover, in neurodegenerative conditions like ageing, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and schizophrenia, studies have shown that deregulation of microglial activation mechanisms plays a critical role in the development of pathological conditions related to these diseases.

The neurodegenerative role of microglia has been highly correlated with the expression of MHC-II molecules. The aim of the present study was to define the surface and intracellular expression of H-2A and also the intracellular expression of H-2M, H-2O and CD74 in different activation states of microglial cells, using the BV-2 cell line. Flow Cytometry, RT-PCR and Confocal microscopy analysis show that microglial cells express all necessary components for post-translational regulation of MHC class II molecules and their transport to the cell surface. Additionally, stimulation of BV-2 cells with LPS, IFN- γ and IL-4 demonstrated that different activation stimuli can lead to different activation pathways of microglia.

Studying the regulatory pathways of microglial MHC II expression could delineate mechanisms of stimulation versus suppression, surface expression versus secretion of MHC-II molecules during pathological conditions in neurodegenerative diseases and dictate new strategies of therapeutic approaches.

Key words: Microglial activation, MHC class II regulation, antigen presentation, BV-2 cell line

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

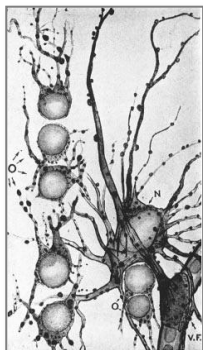
1.1 Γλοιακά κύτταρα στο ΚΝΣ

1.1.1 Αστροκύτταρα

Τα αστροκύτταρα αποτελούν τον πιο πολυάριθμο πληθυσμό γλοιακών κυττάρων στο ΚΝΣ. Χαρακτηρίζονται από το αστεροειδές σχήμα στο κυτταρικό τους σώμα και από τους ευρείς ποδίσκους στις αποφυάδες τους. Τα αστροκύτταρα εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια και λόγω της μορφολογίας τους, του φαινοτύπου τους και της τοπολογίας τους κατηγοριοποιούνται σε τουλάχιστον δύο κατηγορίες. Τα πρωτοπλασματικά αστροκύτταρα, τα οποία συναντώνται στην φαιά ουσία και οι αποφυάδες τους περιβάλλουν συνάψεις καθώς και αιμοφόρα αγγεία και τα ινώδη αστροκύτταρα τα οποία συναντώνται στην λευκή ουσία και έρχονται σε επαφή με τους κόμβους Ranvier και αιμοφόρα αγγεία.

Τα αστροκύτταρα διαθέτουν την ικανότητα να ελέγχουν τα επίπεδα νευροδιαβιστων καθώς επίσης, εξ' αιτίας της μεγάλης διαπερατότητας τους σε κάλιο, έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν και να αποθηκεύουν την περίσσεια καλίου που υπάρχει στον εξωκυττάριο χώρο λόγω της επανειλημμένης εκπόλωσης νευρώνων, και με τον τρόπο αυτό να προστατεύουν τους παρακείμενους νευρώνες από εκφόρτιση. Επίσης, συμβάλουν στη δημιουργία και διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού καθώς και τη διατήρηση της μεταβολικής ομοιόστασης του εγκεφάλου. Εκφράζουν επιφανειακούς υποδοχείς για ένα μεγάλο εύρος νευροδιαβιστων και απελευθερώνουν νευροενεργές ουσίες και αυξητικούς παράγοντες. Μέσω της σηματοδότησης αυτής φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και λειτουργικότητα των συνάψεων και την επιβίωση των νευρικών κυττάρων.

1.1.2 Ολιγοδενδροκύτταρα



Εικόνα 1.
Ολιγοδενδροκύτταρα(O) σε
επαφή με νευρώνες(N)

Τα ολιγοδενδροκύτταρα αποτελούν κύτταρα μικρού μεγέθους τα οποία φέρουν αποφυάδες. Ο ρόλος τους στο ΚΝΣ είναι εξαιρετικά σημαντικός εφόσον συμμετέχουν στη μυελίνωση των νευραξόνων στο ΚΝΣ περικλείοντας με τις μεμβράνες τους άξονες και σχηματίζοντας ένα έλυτρο μυελίνης. Κάθε ολιγοδενδροκύτταρο μπορεί να συμμετέχει στη μυελίνωση πολλών νευραξόνων. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε στάδια τα οποία υπόκεινται σε

αυστηρή ρύθμιση από σήματα τα οποία λαμβάνουν οι άξονες των νευρώνων, πιθανώς μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch. Συνεπώς τα ολιγοδενδροκύτταρα ελέγχουν την λειτουργία του ΚΝΣ εφόσον παρέχουν μόνωση στους άξονες των νευρικών κυττάρων και καθορίζουν τη δομικές και ηλεκτρικές ιδιότητες των νευραξόνων ελέγχοντας τη διάμετρο τους, την τοπολογία και την διάταξη καναλιών ιόντων στην περιοχή των κόμβων και παρακόμβων. Επίσης υποστηρίζουν τροφικά τους νευρώνες.

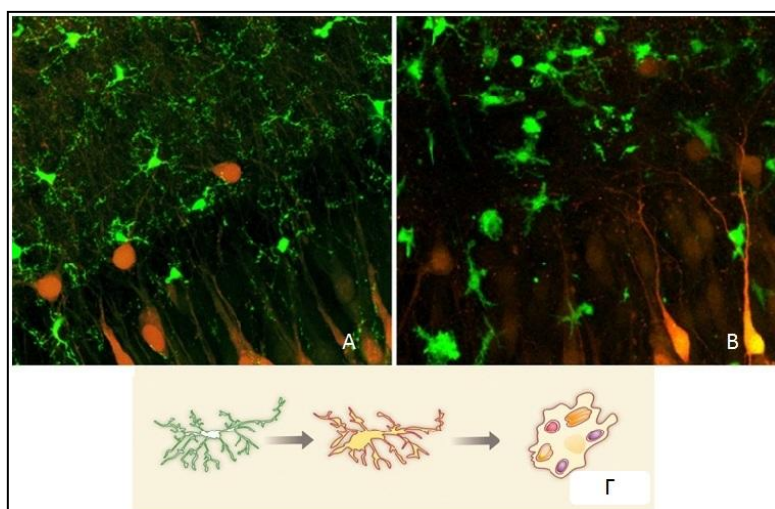
1.1.3 Μικρογλοία

Η Μικρογλοία αποτελεί 5-15% των συνολικών κυττάρων του ΚΝΣ και συνιστά τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στον εγκέφαλο. Η κύρια λειτουργία τους είναι ο σχηματισμός ενός δικτύου κυττάρων που συμβάλλουν στην ανοσολογική επαγρύπνηση και προστασία του ΚΝΣ .

Ο συγκεκριμένος κυτταρικός πληθυσμός αρχικά περιγράφηκε από τον Pio del Rio-Hortega (1932). Πρόκειται για κύτταρα μυελογενούς προέλευσης τα οποία εισβάλλουν στον ιστό του ΚΝΣ κατά τα εμβρυικά στάδια και κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης μετά την γέννηση (Kim and De Vellis, 2005, van Rossum and Hanisch, 2004) και μεταναστεύουν εντός του παρεγχύματος του εγκεφάλου ώστε να κατανεμηθούν σε όλες τις περιοχές του ιστού αυτού. Τα κύτταρα αυτά συνιστούν ένα πληθυσμό μακροφάγων κυττάρων στον εγκέφαλο, συνεπώς διαθέτουν φαγοκυττωτικές ιδιότητες και είναι θετικά για επιφανειακούς μάρτυρες των μακροφάγων όπως για παράδειγμα είναι ο CD11b (Mac1) και ο Fc υποδοχέας, iba-1, F4/80 (Carson 2002, Aloisi 2001, Kreutzberg 1996). Επίσης τα μικρογλοιακά κύτταρα διακρίνονται από τους άλλους πληθυσμούς μακροφάγων λόγω της διαφορετικής έκφρασης του επιφανειακού μάρτυρα CD45, όπου στην περίπτωση των μικρογλοιακών κυττάρων η έκφραση του παρατηρείται σε χαμηλά επίπεδα.

Η μορφολογία των μικρογλοιακών κυττάρων που βρίσκονται σε ήρεμη κατάσταση (resting microglia) στον ενήλικο υγιή εγκέφαλο είναι χαρακτηριστική. Το σχήμα τους είναι επίμηκες και φέρουν αποφυάδες οι οποίες διαθέτουν έντονες διακλαδώσεις (Εικ. 2Α). Η δομή των μικρογλοιακών κυττάρων δεν είναι στατική καθώς παρατήρηση με χρήση μικροσκοπίας δύο φωτονίων έχει δείξει συνεχή κίνηση των προεκβολών, με στόχο προφανώς την καταγραφή των αλλαγών του μικροπεριβάλλοντος του εγκεφάλου στο οποίο βρίσκονται. (Nimmerjahn et al 2005, Davalos et al., 2005). Αμέσως μετά την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων από οποιοδήποτε ερέθισμα (π.χ. δημιουργία τραύματος ή μικροβιακή μόλυνση), ακολουθεί δραματική αλλαγή στη μορφολογία τους, η

οποία χαρακτηρίζεται «αμοιβαδοειδής» (Kreutzberg 1996, Εικ. 2B). Παρατηρείται συρρίκνωση των προεκβολών τους και μετανάστευση στο σημείο της παθολογίας.



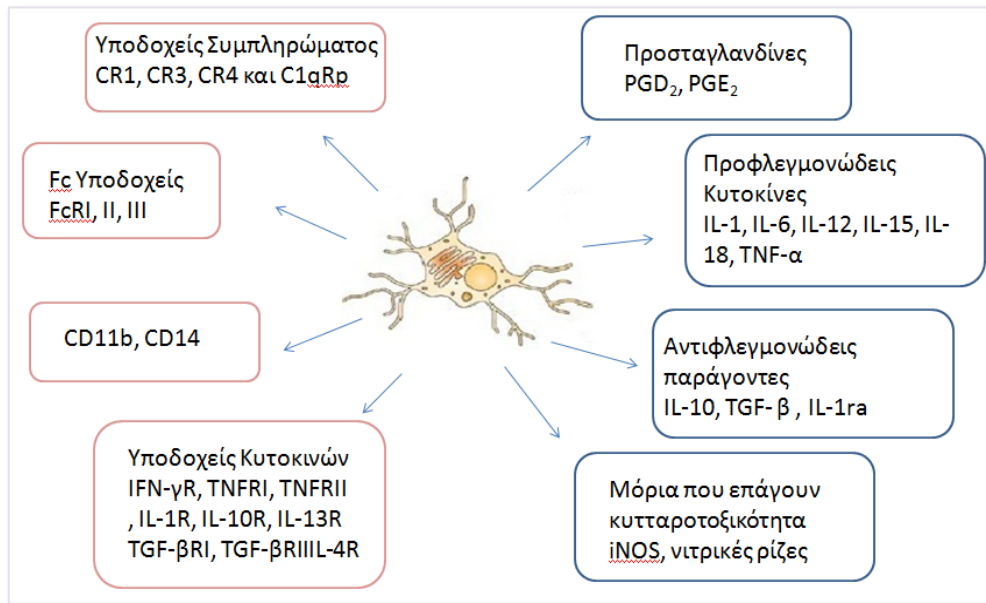
Εικόνα 2. Α. Μη ενεργοποιημένη Μικρογλοία, Β. Ενεργοποιημένη Μικρογλοία, Γ. Σχηματική απεικόνιση της πορείας ενεργοποίησης Μικρογλοίας.

Κατά την ενεργοποίηση της μικρογλοίας δεν συμβαίνουν μόνο μορφολογικές αλλά και λειτουργικές αλλαγές. Τα μικρογλοιακά κύτταρα σε ήρεμη κατάσταση, απουσία κάποιου ερεθίσματος που προκαλεί την ενεργοποίησή τους, εκφράζουν χαμηλά επίπεδα των συνδιεγερτικών μορίων Β7.2 και CD40 αλλά και τάξης I και II αντιγόνα του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC).

Η άμεση ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων μετά από κάποια μικροβιακή μόλυνση ή κάποιο φλεγμονώδες ερέθισμα οφείλεται στην συνεχή ή επαγόμενη έκφραση επιφανειακών υποδοχέων μέσω των οποίων μπορούν να αντιλαμβάνονται πολύ γρήγορα τις αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του εγκεφάλου. Έχει δειχθεί ότι η μικρογλοία σε μη ενεργοποιημένη κατάσταση εκφράζει τους επιφανειακούς υποδοχείς του συμπληρώματος CR1, CR3, CR4 και C1qRp (Barnum, 1999, Gasque et al., 1998) καθώς και τους FcRI, II, III (Peress et al., 1993, Ulvestad et al., 1994). Επίσης κατά την ενεργοποίησή τους τα κύτταρα αυτά εκφράζουν τον επιφανειακό μάρτυρα CD14 ο οποίος προσδένει τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS), μόριο το οποίο είναι βασικό συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των gram αρνητικών βακτηρίων. Επίσης η μικρογλοία εκφράζει και υποδοχείς προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών, η ισορροπία των οποίων παίζει καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση της ανοσολογικής δράσης τους στο περιβάλλον του εγκεφάλου. Στην επιφάνεια της μικρογλοίας εκφράζεται συνεχώς, απουσία ερεθίσματος, ο υποδοχέας της ιντερφερόνης- γ (IFN- γ) η οποία είναι φλεγμονώδης κυτοκίνη και επάγει την έκφραση των

MHC I και II μορίων και γενικότερα την μεταγραφή γονιδίων που προωθούν την δράση των μικρογλοιακών κυττάρων σαν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Επίσης επάγει την έκφραση και άλλων συνδιεγερτικών μορίων όπως είναι τα B7 (CD80/86) και LFA-1. Επιπλέον εκφράζονται και υποδοχείς για τον tumor necrosis factor- α (TNF- α), οι TNFRI και II οι οποίοι επάγουν την έκφραση τόσο προ- και αντι-φλεγμονωδών παραγόντων. Ο TNF- α είναι μια κυτοκίνη η οποία παράγεται από τα Th1 κύτταρα, τα μακροφάγα και τα μικρογλοιακά κύτταρα και δρα σαν αυτοκρινής παράγοντας. Η δράση του περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF- κ B και την ενεργοποίηση πολλών γονιδίων στόχων τα οποία σχετίζονται με την ανοσολογική απάντηση σε κάποιο φλεγμονώδες ερέθισμα. Τέλος η φλεγμονώδης δράση των κυτοκινών που μόλις αναφέρθηκε παρεμποδίζεται από τη δράση αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως είναι οι IL-4, IL-10, IL-13 και ο TGF- β (Chao et al., 1993, Frei et al., 1994, Benveniste, 1998).

Μετά την ενεργοποίηση από κάποιο ερέθισμα η Μικρογλοία εκφράζει ένα μεγάλο φάσμα διαλυτών προφλεγμονωδών παραγόντων οι οποίοι μπορούν να έχουν κυτταροτοξική δράση όπως είναι οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-1 α/β , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 και TNF- α (Liu et al. 2005a, Laurenzi et al. 2001, Suk et al. 2001, Nagai et al. 2001, Pulliam et al. 1995, Stalder et al. 1997, Lee et al. 1993), PGE₂ (Rasley et al. 2004) καθώς και το μονοξείδιο του αζώτου (NO) (Chao et al. 1992). Εν τούτοις μετά την ενεργοποίησή τους τα μικρογλοιακά κύτταρα απελευθερώνουν τόσο αυξητικούς παράγοντες όσο και αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, δηλαδή παράγοντες που προάγουν την προστασία και επιβίωση των νευρικών κυττάρων όπως οι IL-10, TGF- β , IL-1ra (Ledebouer et al. 2002, Lodge et al. 1996, Williamse et al. 1996). Συνεπώς τα κύτταρα αυτά στην ενεργοποιημένη τους κατάσταση επιτελούν δύο ρόλους και μπορούν να προάγουν τόσο κυτταροτοξικότητα όσο και προστασία των νευρικών κυττάρων ανάλογα με τη σηματοδότηση που προκαλεί την ενεργοποίησή τους. Για παράδειγμα έχει δειχθεί σε μελέτες ότι παρουσία του LPS και β -amyloid η μικρογλοία καθίσταται κυτταροτοξική και παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του TNF- α , ενώ παρουσία IFN- γ και IL-4 προάγεται η προστασία των νευρικών κυττάρων (Butovsky et al. 2005). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως φαίνεται να υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ προ- και αντι-φλεγμονωδών παραγόντων σε μη παθολογικές καταστάσεις. Σε περιπτώσεις όμως απορρύθμισης της διαδικασίας της ενεργοποίησης, η ισορροπία διαταράσσεται και μπορούμε να οδηγηθούμε σε νευροτοξικότητα.

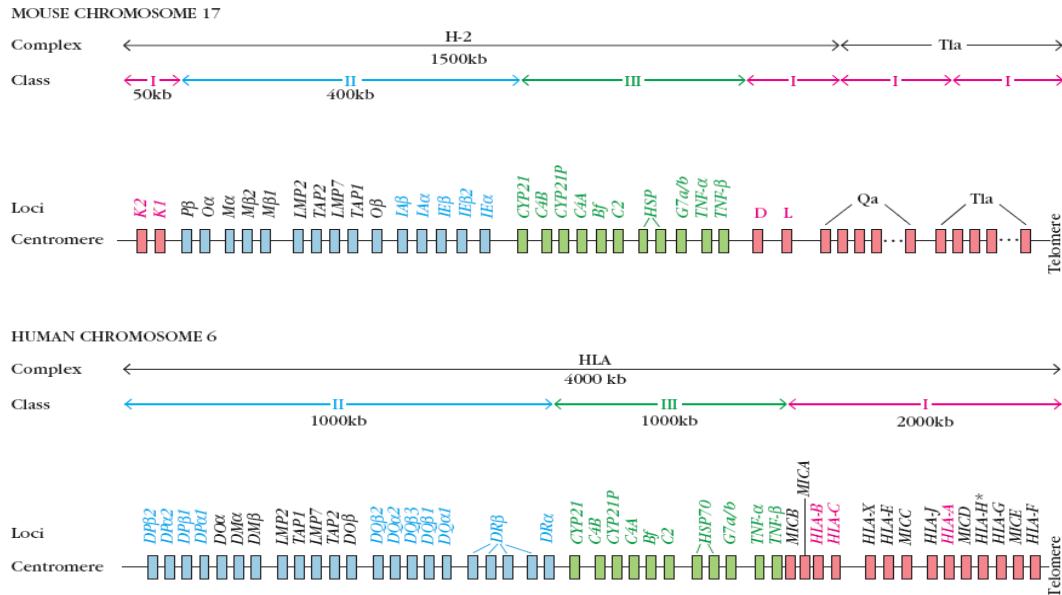


Εικόνα 3: Αριστερά: Μοριακή σηματοδότηση σε μικρογλοιακά κύτταρα. Το στάδιο και ο τύπος ενεργοποίησης της μικρογλοίας ελέγχεται από σηματοδότηση μέσω επαγόμενων ή συνεχώς εκφραζόμενων επιφανειακών υποδοχέων. Δεξιά: Προ- και αντι-φλεγμονώδεις παράγοντες που εκφράζονται από ενεργοποιημένη μικρογλοία

Μια ακόμα πολύ σημαντική παράμετρος που καθορίζει το στάδιο ενεργοποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων είναι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικρογλοίας και νευρικών κυττάρων. Τα μικρογλοιακά κύτταρα διαθέτουν πληθώρα επιφανειακών υποδοχέων για σηματοδοτικά μόρια του ΚΝΣ (ATP, νευροπεπτίδια, νευροδιαβιβαστές) και νευροτροφικούς παράγοντες γεγονός που υποδηλώνει ότι το στάδιο ενεργοποίησης των συγκεκριμένων κυττάρων ελέγχεται από το χημικό περιβάλλον που διαμορφώνεται από τη νευρική δραστηριότητα. Για παράδειγμα η έκφραση μορίων που είναι απαραίτητα για την δράση της μικρογλοίας σαν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα καταστέλλεται από νευρώνες οι οποίοι είναι ηλεκτρικά ενεργοί και επάγεται όταν μειώνεται η ηλεκτρική δραστηριότητα τους (Neumann 2001). Επίσης η έκφραση neurotrophins από νευρικά κύτταρα καταστέλλει την έκφραση MHC II καθώς και άλλων συνδιεγερτικών μορίων (B7-2/CD86 and CD40) σε μικρογλοιακά κύτταρα (Neumann 1998).

1.2 Το Μείζον Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας

Το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility complex-MHC) αποτελείται από ένα συνδεδεμένο σύμπλεγμα γονιδίων, προϊόντα του οποίου παίζουν



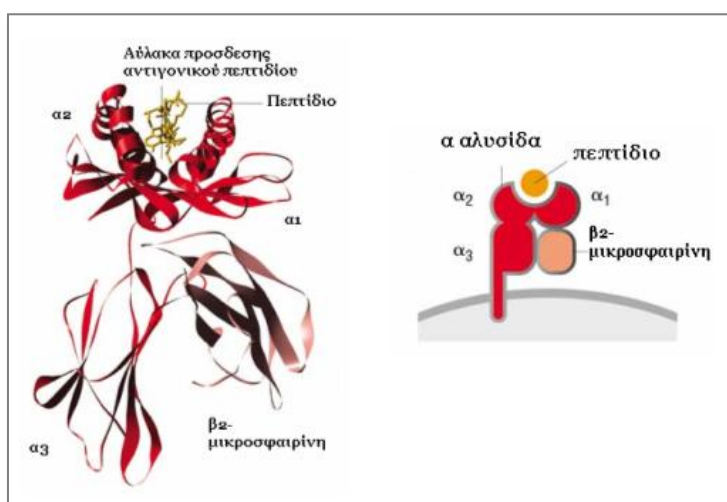
Εικόνα 4 Αναλυτικός γονιδιωματικός χάρτης του MHC στο ποντίκι και στον άνθρωπο.

πολύ σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση του εαυτού από τον μη εαυτό. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 στον άνθρωπο στον γονιδιακό τόπο HLA (Human Leukocyte Antigens-HLA) ενώ ο αντίστοιχος γενετικός τόπος H-2 (Histocompatibility-2) στο ποντίκι βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17. Τα γονίδια του MHC κωδικοποιούν τάξης I και τάξης II μόρια του MHC.

1.2.1 Τάξης I μόρια του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας

Τα κλασικά τάξης I μόρια κωδικοποιούνται από τους γενετικούς τόπους HLA-A –B – C στον άνθρωπο και K, D και L στο ποντίκι και εκφράζονται στην επιφάνεια σχεδόν όλων των εμπύρηνων κυττάρων του οργανισμού αν και διαφέρει το επίπεδο έκφρασης μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων (Geraghty, 1993, Gobin and van den Elsen, 2000, Heinrichs and Orr, 1990). Πρόκειται για γλυκοπρωτεϊνικές δομές οι οποίες διαθέτουν εξωκυττάριο, διαμεμβρανικό και κυτταροπλασματικό τμήμα. Στο εξωκυττάριο τμήμα το μόριο αποτελείται από μια βαριά αλυσίδα, την α- αλυσίδα, μεγέθους 45kD η οποία οργανώνεται σε τρεις επικράτειες, τις α1, α2 και α3 και μια ελαφριά αλυσίδα, την β₂-μικροσφαιρίνη μεγέθους 12kD. Η β₂-μικροσφαιρίνη κωδικοποιείται από μια εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή του χρωμοσώματος 2 και 15 στο ποντίκι και στον άνθρωπο αντίστοιχα. Οι α1 και α2 επικράτειες της βαριάς αλυσίδας, οι οποίες βρίσκονται μακριά από την μεμβράνη,

διαθέτουν μεγαλύτερο πολυμορφισμό και σχηματίζουν την αύλακα πρόσδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου. Η επικράτεια α_3 , η οποία βρίσκεται κοντά στη μεμβράνη, έχει παρόμοια δομή και μέγεθος με το μόριο της β_2 -μικροσφαιρίνης και είναι το τμήμα της βαριάς αλυσίδας που συνδέεται με το μόριο αυτό μη-ομοιοπολικά.



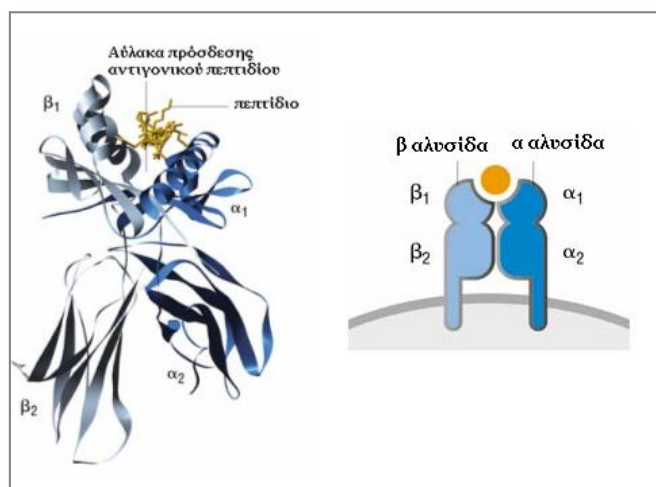
Εικόνα 5. Δομή των τάξης I μορίων του MHC

Ο ρόλος των τάξης I μορίων του MHC είναι κυρίως η επαγωγή της κυτταρικής ανοσίας και κατά συνέπεια η προστασία από ιικές μολύνσεις και κύτταρα που εκφράζουν τροποποιημένα αντιγόνα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων. Τα τάξης I μόρια του MHC έχουν την ιδιότητα πρόσδεσης πεπτιδίων τα οποία παρουσιάζονται στα $CD8^+$ T-κυτταροτοξικά κύτταρα. Τα πεπτίδια αυτά προέρχονται από ενδογενείς πρωτεΐνες οι οποίες υφίστανται πέψη μέσω του ανοσοπρωτεασώματος και πρωτεασών του ενδοπλασματικού δικτύου. Εν συνεχεία μεταφέρονται και φορτώνονται στα τάξης I μόρια και μέσω του συστήματος Golgi το σύμπλοκο μεταναστεύει στην κυτταρική μεμβράνη.

1.2.2 Τάξης II μόρια του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας

Τα κλασικά τάξης II μόρια του MHC αποτελούνται από δύο γλυκοπρωτεϊνικές αλυσίδες οι οποίες κωδικοποιούνται από τους γονιδιακούς τόπους HLA-DR, DP, DQ στον άνθρωπο και H2-A, H2-E στο ποντίκι. Το ετεροδιμερές αποτελείται από μια α αλυσίδα μεγέθους 33kD και μια β αλυσίδα μεγέθους 28kD οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και κωδικοποιούνται από διαφορετικά α και β γονίδια για όλους τους ισότυπους των κλασικών τάξης II μορίων. Το τάξης II μόριο διαθέτει εξωκυτταρικό, διαμεμβρανικό και κυτταροπλασματικό τμήμα. Στο εξωκυτταρικό τμήμα κάθε αλυσίδα είναι χωρισμένη σε δύο επικράτειες, α_1 - α_2 και β_1 - β_2 αντίστοιχα. Οι

επικράτειες α_1 και β_1 παρουσιάζουν μεγαλύτερο πολυμορφισμό και είναι εκείνες που σχηματίζουν την αύλακα πρόσδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου.



Εικόνα 6. Δομή των τάξης II μορίων του MHC

1.2.3 Το ενδοσωμικό μονοπάτι

Τα τάξης II μόρια, όπως ήδη αναφέρθηκε, συμμετέχουν στην έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης χάρη στην ικανότητα τους να παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια στα $CD4^+$ T βοηθητικά κύτταρα (Unanue 1984, Cresswell 1994). Τα πεπτίδια αυτά προέρχονται από εξωγενή αντιγόνα τα οποία εισέρχονται στο κύτταρο είτε μέσω φαγοκυττάρωσης είτε μέσω ενδοκυττάρωσης και υφίστανται επεξεργασία διαμέσου του ενδοκυττωτικού μονοπατιού.

Η βιοσυνθετική οδός των τάξης II μορίων ξεκινάει με τη σύνθεση τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Jones, 1979, Machamer, 1982) και στη συνέχεια συνδέονται με μια εξειδικευμένη πρωτεΐνη γνωστή ως μη-μεταβλητή αλυσίδα (invariant chain, Ii). Αρχικά σχηματίζονται τριμερή μη-μεταβλητών αλυσίδων που στη συνέχεια ενώνονται με τρία ετεροδιμερή τάξης II σχηματίζοντας έτσι ένα εννιαμερές σύμπλοκο $(\alpha\beta Ii)_3$ (Roche, 1991). Κατά το στάδιο αυτό η σύνδεση του τάξης II μορίου με την μη-μεταβλητή αλυσίδα αποτρέπει την πρόωρη πρόσδεση ενδογενών πεπτιδίων, βοηθώντας τη σωστή αναδίπλωση του ετεροδιμερούς. Επιπλέον η ύπαρξη μηνυμάτων οδηγών στην κυτταροπλασματική της ουρά της Ii βοηθά τη καθοδήγηση του συμπλόκου μέσω του Συστήματος Golgi στο ενδοκυττωτικό μονοπάτι (Busch and Mellins, 1996, Bakke and Dobberstein, 1990, Chervonsky et al., 1994). Στη συνέχεια το μεγαλύτερο μέρος της μη-μεταβλητής αλυσίδας αποικοδομείται σταδιακά και τελικά παραμένει συνδεδεμένο ένα πολύ μικρό τμήμα της το

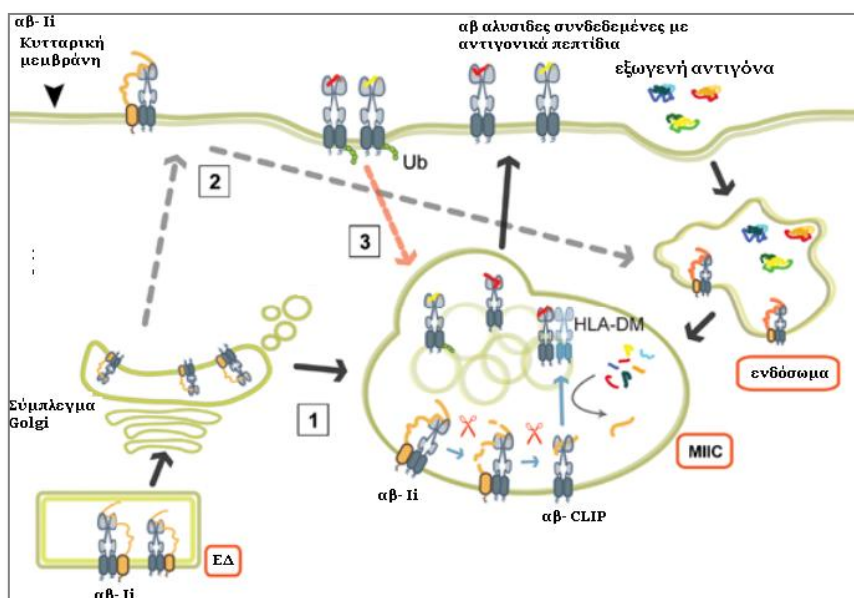
οποίο ονομάζεται CLIP (Class II associated invariant chain peptide, Cresswell, 1994). Όταν τα κυστίδια που μεταφέρουν τάξης II μόρια συντηχθούν με τα όξινα ενδοσώματα, λόγω αλλαγής του pH το CLIP αποσυνδέεται και τη θέση του μπορεί να καταλάβει ένα καταλληλότερο μόριο. Η διαδικασία αυτή συμβαίνει σε εξειδικευμένα κυστίδια που ονομάζονται MIICs (MHC class II compartments, MIICs, Peters et al., 1991, Qui et al., 1994, Tuip et al., 1994, West et al., 1994). Στο εσωτερικό αυτών των κυστιδίων τα τάξης II μόρια συναντούν κυρίως τα πεπτιδία τα οποία έχουν προέλθει από πρωτεόλυση εξωγενών αντιγόνων. Τελικά, μετά την πρόσδεση ενός πεπτιδίου υψηλής συγγένειας το σύμπλοκο μεταφέρεται στην μεμβράνη.

1.2.4 Μη κλασικά τάξης II μόρια του Μείζονος Συμπλόκου **Ιστοσυμβατότητας**

Εκτός από τα κλασικά τάξης II μόρια του MHC, HLA-DR -DQ και -DP τα οποία έχουν μελετηθεί και περιγραφεί είναι σημαντικό να αναφέρουμε την ύπαρξη των μη κλασικών τάξης II μορίων HLA-DM (H2-M) και HLA-DO (H2-O). Τα μόρια αυτά κωδικοποιούνται επίσης από το γενετικό τόπο του MHC, διαθέτουν υψηλή ομολογία με τα κλασικά τάξης II μόρια και διαθέτουν μεγάλη ομοιότητα ως προς τη δομή τους καθώς είναι ετεροδιμερή αποτελούμενα από α και β αλυσίδα όπως και στην περίπτωση των κλασικών τάξης II μορίων.

Το ετεροδιμερές του HLA-DM αποτελείται συνολικά από 261-263 αμινοξέα. Δεν παρουσιάζει υψηλό πολυμορφισμό και οι εξωτερικές περιοχές του μορίου διαθέτουν συντηρημένα κατάλοιπα που είναι χαρακτηριστικά των τάξης II μορίων και σχηματίζουν αύλακα πρόσδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου παρόμοια με των HLA-DR μορίων (Kelly et al., 1991). Παρ' όλη την ομοιότητα που παρουσιάζει με τα κλασικά τάξης II μόρια, το DM διαθέτει εντελώς διαφορετικό και εξειδικευμένο ρόλο. Η βιοχημεία του μορίου και η στερεοδιάταξή του υποδεικνύουν ότι δεν έχει δυνατότητα σύνδεσης με αντιγονικό πεπτιδίο. Δεν εμφανίζεται στην κυτταρική επιφάνεια αλλά εντοπίζεται στα MIIC κυστίδια όπου συνδέεται παροδικά με HLA-DR μόρια. Ελλείψει DM, παρατηρείται συσσώρευση συμπλόκων DR-CLIP και καθίσταται μη δυνατή η παρουσίαση αντιγονικών πεπτιδίων στην κυτταρική μεμβράνη. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι η σύνδεση DR-DM καταλύει την απομάκρυνση του CLIP από το HLA-DR με αποτέλεσμα την διευκόλυνση πρόσδεσης άλλων πεπτιδίων στα ελεύθερα τάξης II μόρια (Morris et al., 1994). Μετά την απελευθέρωση του CLIP από το HLA-DR, το DM δρα σαν συνοδό μόριο σταθεροποιώντας το HLA-DR (το οποίο διαφορετικά θα αποικοδομούταν στο όξινο περιβάλλον των ενδοσωμικών διαμερισμάτων)

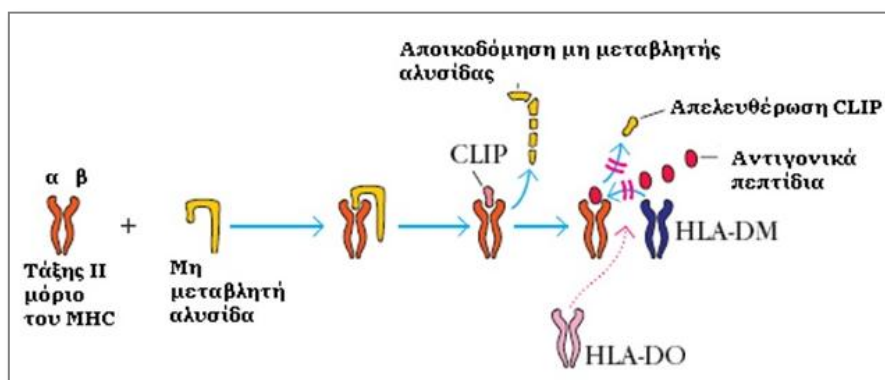
και βοηθά στη διατήρηση της ανοιχτής του διαμόρφωσης. Πειραματικά έχει δειχθεί επίσης ότι το DM είναι υπεύθυνο για την επιλογή του καταλληλότερου πεπτιδίου το οποίο θα παρουσιαστεί στη μεμβράνη (Kropshofer et al., 1996, Kropshofer et al., 1997, Weber et al., 1996). Η επιλογή κατευθύνεται με βάση τη σταθερότητα του συμπλόκου τάξης II-πεπτιδίου, καταλύοντας την απελευθέρωση μη σταθερά συνδεδεμένων αντιγονικών πεπτιδίων (Denzin and Cresswell, 1996). Ο μηχανισμός αυτός εξασφαλίζει την αντιγονοπαρουσίαση πεπτιδίων με ισχυρή συγγένεια πρόσδεσης στα τάξης II, επιτρέποντας έτσι την αναγνώρισή του από τα CD4⁺ T κύτταρα. Επίσης ελαχιστοποιεί τον αριθμό των τάξης II «αδειανών» μορίων που μπορούν να μεταναστεύσουν στη μεμβράνη, όπως και την αντιγονοπαρουσίαση ακατάλληλων πεπτιδίων.



Εικόνα 7. Αντιγονοπαρουσίαση μέσω τάξης II μορίων του MHC

Ένα άλλο μη κλασικό τάξης II μόριο που παίζει σημαντικό ρόλο στη αντιγονοπαρουσίαση είναι το HLA-DO (Densin et al., 2005). Το HLA-DO κωδικοποιείται από τα γονίδια DNA και DOB στον γενετικό τόπο του MHC αλλά σε αντίθεση με τα άλλα τάξης II α και β γονίδια τα DNA και DOB εντοπίζονται σε μεγάλη απόσταση το ένα από το άλλο. Διαθέτει κι αυτό μορφή ετεροδιμερούς, αποτελούμενο από α και β αλυσίδες, και η δομή του ομοιάζει με τη δομή των υπόλοιπων τάξης II μορίων του MHC. Όπως και το DM, το DO δεν εμφανίζει υψηλό πολυμορφισμό και δεν έχει ικανότητα πρόσδεσης αντιγονικού πεπτιδίου. Εκφράζεται σε B λεμφοκύτταρα, στα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου αδένος ενώ σε νεότερες μελέτες έχει βρεθεί να εκφράζεται σε δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και τροφοβλάστες. Στα B λεμφοκύτταρα το DO συνδέεται ισχυρά με το DM και η σύνδεση αυτή φαίνεται να είναι απαραίτητη για την έξοδο του από το Ενδοπλασματικό Δίκτυο μιας και

απουσία DM παρατηρείται συσσώρευση του DO στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο (Liljedahl et al., 1996). Συνεντοπίζεται ενδοκυτταρικά με το DM στα MIIC κυστίδια. Η ισχυρή σύνδεση των δύο μορίων αλλά και ο συνεντοπισμός τους μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι συνδέονται λειτουργικά και μάλιστα το DO φαίνεται να παίζει ρόλο ρυθμιστή της καταλυτικής δράσης του DM. Η ισχυρή σύνδεση αναστέλλει την δράση του DM αφού εμποδίζει την απελευθέρωση του CLIP από το τάξης II μόριο και συνεπώς μειώνει την ικανότητα αντιγονοπαρουσίασης (Denzin et al., 2005, van Ham et al., 2000).



Το DO λοιπόν φαίνεται να δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής της δράσης του DM με έναν pH-εξαρτώμενο τρόπο αφού επιτρέπει την σύνδεση πεπτιδίου-τάξης II στο pH που διαθέτουν τα MIIC κυστίδια, ενώ εμποδίζει την σύνδεση πεπτιδίων πρόωρα στα ενδοσωμικά/λυσosomalικά διαμερίσματα όπου το pH είναι μεγαλύτερο. Πειράματα έδειξαν ότι τα αντιγόνα τα οποία συνδέονται ισχυρά με τους υποδοχείς των B κυττάρων (BCR) οδηγούνται στα όψιμα ενδοσώματα ενώ αντιγόνα τα οποία συνδέονται ασθενώς οδηγούνται στα πρώιμα ενδοσώματα. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι με τη ρυθμιστική δράση του το DO διαθέτει καθοριστικό ρόλο στην επιλογή του αντιγονικού πεπτιδίου που θα παρουσιαστεί στην μεμβράνη, διότι μειώνει την πιθανότητα μη-ειδικής ενεργοποίησης των B κυττάρων και συνεπώς τη παραγωγή χαμηλής συγγένειας αντισωμάτων.

Άλλες μελέτες υποδεικνύουν έναν ακόμα τρόπο δράσης του DO. Το DO φαίνεται να αυξάνει την ικανότητα φόρτωσης του αντιγονικού πεπτιδίου σταθεροποιώντας το DM σε περιβάλλον όπου το pH είναι χαμηλό, προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο την δράση του σαν συνοδό μόριο των τάξης II. Το σύμπλοκο DO-DM παρατηρείται ότι σταθεροποιεί περισσότερο ελεύθερα DR μόρια από ότι το DM μόνο του (Kropshofer et al., 1996). Άρα εκτός από αρνητικός ρυθμιστής της δράσης του DM, το DO μπορεί να έχει και θετική επίδραση η οποία εξαρτάται από το είδος του αντιγονικού πεπτιδίου και από την αλληλική

ποικιλομορφία των τάξης II μορίων (Katz et al., 1996, Kropshofer et al., 1996, Van Ham et al., 1996, Weber et al., 1996, Kropshofer et al., 1998).

Επιπλέον έχει δειχθεί ότι σε Β λεμφοκύτταρα η αυξημένη έκφραση του HLA-DO σχετίζεται με την αρνητική ρύθμιση της φόρτωσης πεπτιδίων σε μη ενεργοποιημένους πληθυσμούς, ενώ αντίθετα μειωμένη έκφραση των μορίων αυτών σχετίζεται με την ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων (Chen et al., 2002). Εν τούτοις οι τροφοβλάστες οι οποίοι δεν εκφράζουν μεμβρανικά HLA-DR μόρια (Athanasakis et al., 1995), διαθέτουν ενδοκυτταρικά αποθέματα HLA-DR και HLA-DO αλλά όχι HLA-DM μόρια (Ranella et al., 2005). Επιπλέον η απουσία έκφρασης HLA-DR στην κυτταρική μεμβράνη αποτελεί και έναν μηχανισμό τον οποίο χρησιμοποιούν τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να διαφύγουν από την ανοσολογική επαγρύπνηση του οργανισμού. Φαίνεται λοιπόν ότι η έκφραση του HLA-DO συνδέεται με την απουσία μεμβρανικών HLA-DR, είτε μόνιμα, όπως στην περίπτωση των τροφοβλαστικών κυττάρων, είτε ανάλογα με το στάδιο ενεργοποίησης, όπως στα Β λεμφοκύτταρα, σε δενδριτικά κύτταρα και πιθανώς στα επιθηλιακά κύτταρα του αδένα. Στην περίπτωση λευχαιμικών κυττάρων και των τροφοβλαστών, παρά το γεγονός ότι υπάρχει αρνητική ρύθμιση των μεμβρανικών MHC II μορίων, τα κύτταρα αυτά διαθέτουν ενδοκυτταρικά αποθέματα των μορίων αυτών τα οποία μπορούν να εκκριθούν είτε σε διαλυτή μορφή είτε με τη μορφή εξωσωμικών κυστιδίων (Papadimitriou et al., 2009, Ranella et al., 2005, Kalognomou et al., 2009). Τα διαλυτά MHC II μόρια έχει δειχθεί ότι ανταγωνίζονται τα μεμβρανικά και οδηγούν σε διαφορετική ενεργοποίηση Τ λεμφοκυττάρων (Sardis et al., 2010).

1.3 Ο ρόλος την μικρογλοίας σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες

Με τον όρο νευροεκφυλισμό αναφερόμαστε στην προοδευτική απώλεια της δομής ή της λειτουργίας των νευρώνων η οποία μπορεί να οδηγήσει και στο θάνατό τους. Πολλές νευροεκφυλιστικές παθήσεις όπως είναι, η γήρανση, η νόσος του Parkinson, η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Huntington και τη σχιζοφρένια είναι αποτέλεσμα νευροεκφυλιστικών διεργασιών. Πρόσφατες ερευνητικές μελέτες δείχνουν ότι οι παθολογικές αυτές καταστάσεις παρουσιάζουν ομοιότητες σε μοριακό-υποκυτταρικό επίπεδο. Μια ομοιότητα είναι η ενεργοποίηση της μικρογλοίας, μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η επικοινωνία και η αλληλεπίδραση μεταξύ νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος. Κατ' αρχάς ερευνητικές μελέτες δείχνουν ότι κατά τη γήρανση του εγκεφάλου

η μικρογλοία συναντάται σε ενεργοποιημένη μορφή γεγονός που συνοδεύεται και από αύξηση της έκφρασης των MHC II μορίων (Streit et al., 2004). Όμως είναι πολύ σημαντικό να αναφέρουμε ότι οι αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης των MHC II μορίων οι οποίες παρατηρούνται με την αύξηση της ηλικίας δεν συνοδεύονται από το συνεντοπισμό Τ λεμφοκυττάρων ή κάποια ένδειξη νευροπαθολογίας, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μικρογλοία δεν εξυπηρετεί αποκλειστικά τον ρόλο της αντιγονοπαρουσίασης. Επιπλέον στον εγκέφαλο σε φυσιολογικές καταστάσεις διατηρείται μια ισορροπία μεταξύ προ- και αντι- φλεγμονωδών παραγόντων, η οποία όταν διαταράσσεται δημιουργεί ένα προ-φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον κατά την φυσιολογική διαδικασία της γήρανσης. Πειράματα *ex vivo* σε καλλιέργειες μικρογλοιακών κυττάρων τα οποία προήλθαν από νεαρούς και ηλικιωμένους αρουραίους δείχνουν ότι η μικρογλοία σε εγκεφάλους ηλικιωμένου οργανισμού παρουσιάζουν αξιοσημείωτη αύξηση των επιπέδων IL-6 και TNF- α (Njie et al., 2010). Σε περιπτώσεις απορρύθμισης του μηχανισμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας, η υπερ-ενεργοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροτοξικότητα και να συμβάλλει στον νευροεκφυλισμό. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να οφείλεται στη γήρανση της μικρογλοίας η οποία επέρχεται με την αύξηση της ηλικίας και έχει σαν αποτέλεσμα την μη ομαλή λειτουργία των μικρογλοιακών κυττάρων, την ανικανότητα να ανταποκριθούν σε εξωτερικά ερεθίσματα με αποτέλεσμα να προωθούν τον νευροεκφυλισμό (Luo et al., 2010).

Στη νόσο του Alzheimer έχει ανιχνευθεί μικρογλοία σε ενεργοποιημένη κατάσταση, γεγονός που υποδεικνύει χρόνια φλεγμονή και συνοδεύεται από αύξηση της έκφρασης MHC II μορίων. Ιστολογικές αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί μετά το θάνατο ασθενών και μελέτες από μικρογλοιακές κυτταρικές σειρές έχουν δείξει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών παραγόντων, οι οποίοι μπορεί να είναι τοξικοί για τους νευρώνες (Walker & Lue, 2005). Παρομοίως, έχει διατυπωθεί η υπόθεση για το φλεγμονώδες υπόβαθρο της νόσου του Parkinson όπου πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση της μικρογλοίας αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό στην εξέλιξη της νόσου. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι η μικρογλοία σε ενεργοποιημένη κατάσταση ανιχνεύεται στην μέλανα ουσία (substantia nigra, SN) ασθενών, όπου παρατηρείται απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων. Επιπροσθέτως, αυξημένα επίπεδα κυτοκινών και άλλων φλεγμονωδών παραγόντων ανιχνεύθηκαν στην μέλανα ουσία και το ραβδωτό σώμα (striatum) των ασθενών αυτών. Όμως τα επίπεδα λεμφοκυττάρων στην περιοχή αυτή σε ασθενή άτομα κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα συγκριτικά με τα επίπεδα που ανιχνεύονται σε ασθενείς που πάσχουν από αυτοάνοσα νοσήματα όπως είναι για παράδειγμα η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS). Πιστεύεται ότι η ενεργοποιημένη μικρογλοία είναι υπεύθυνη

για την δημιουργία νευροφλεγμονωδών αντιδράσεων οι οποίες συμβάλλουν σημαντικά στον προοδευτικό νευροεκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Επίσης, ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα έχουν βρεθεί να παράγουν μεγάλες ποσότητες ελεύθερων ριζών, γεγονός που σημαίνει ότι η απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων ενδέχεται να οφείλεται σε οξειδωτικό στρες (McGeer & McGeer, 2008).

Πρόσφατες μελέτες κάνουν λόγο και για το νευροεκφυλιστικό υπόβαθρο της σχιζοφρένιας το οποίο περιλαμβάνει την παρουσία ενεργοποιημένης μικρογλοίας (Mojji, 2009). Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μετά το θάνατο σχιζοφρενικών ατόμων έχουν δείξει παρουσία ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων ή αξιοσημείωτη συσσώρευσή τους σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Αύξηση του αριθμού των συγκεκριμένων κυττάρων έχει παρατηρηθεί στον πρόσθιο φλοιό του προσαγωγίου και τον μεσοραχιαίο θάλαμο ασθενών με σχιζοφρένια οι οποίοι διέπραξαν αυτοκτονία μετά από οξύ ψυχωτικό επεισόδιο. Η αρνητική επίδραση του φλεγμονώδους περιβάλλοντος στην διαφοροποίηση και την επιβίωση των νευρικών κυττάρων θεωρείται ότι οφείλεται σε παράγοντες που απελευθερώνονται από μικρογλοιακά κύτταρα όπως είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και ο TNF-α. Επιπλέον φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η IL-1b και ο TNF-α έχουν δειχθεί να καταστέλλουν την νευρογένεση *in vivo*. Τέλος η κατανομή της μικρογλοίας που εκφράζει μεμβρανικά HLA-DR φαίνεται να υποδηλώνει αποπροσανατολισμό της εγκεφαλικής πλαγίωσης (Steiner et al., 2006).

Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας φαίνεται να είναι το κοινό στοιχείο των όλων των παθολογικών καταστάσεων που περιγράφηκαν παραπάνω. Ο ρόλος της μικρογλοίας και η συμμετοχή των κυττάρων αυτών σε νευροεκφυλιστικές καταστάσεις δεν έχει μέχρι σήμερα διευκρινιστεί. Τα μικρογλοιακά κύτταρα, σαν μακροφάγα, έχουν τη δυνατότητα να φαγοκυττώνουν και μελέτες έχουν δείξει ότι μια από τις κύριες λειτουργίες τους είναι η φαγοκύττωση της μυελίνης η οποία προκαλεί την ενεργοποίησή τους και έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης επιφανειακών MHC II μορίων αλλά και την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών. Επιπλέον, η φαγοκύττωση μυελίνης από τη μικρογλοία έχει δειχθεί ότι οδηγεί στην ενεργοποίηση αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων. Όπως όμως ήδη αναφέρθηκε, στις περιπτώσεις των νευροεκφυλιστικών νόσων του Parkinson, Alzheimer και Huntington, παρόλο που η μικρογλοία εκφράζει μεμβρανικά MHC II μόρια, δεν έχουμε παρουσία T λεμφοκυττάρων στο περιβάλλον του εγκεφάλου, όπως στις περιπτώσεις ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας. Συνεπώς ο ρόλος της μικρογλοίας και της έκφρασης μεμβρανικών MHC II μορίων στις περιπτώσεις αυτές δεν έχει διευκρινιστεί. Πιθανώς να εξυπηρετεί κάποιου άλλου είδους σηματοδότηση και όχι

απαραίτητα της ενεργοποίησης Τ λεμφοκυττάρων. Έχει δειχθεί από τους Hiremath et al. (2008) ότι τα μεμβρανικά MHC II μόρια είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση της μικρογλοίας ανεξάρτητα από την παρουσία Τ λεμφοκυττάρων και μάλιστα φαίνεται ότι το κυτταροπλασματικό τμήμα του ετεροδιμερούς είναι ικανό να προκαλέσει απομυελίνωση των αξόνων *in vivo*. Η ενεργοποίηση αυτή πιθανώς να εξυπηρετεί την παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων, όπως είναι ο TNF-α, οι οποίοι αρχικά ενισχύουν την απομυελίνωση αλλά συμβάλλουν αργότερα στην επαναμυελίνωση των αξόνων. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι ο TNF-α έχει επιβλαβείς επιδράσεις σε ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα κατά την απομυελίνωση αλλά είναι απαραίτητος για τα αδιαφοροποίητα ολιγοδενδροκύτταρα κατά τη διάρκεια της επαναμυελίνωσης των αξόνων (Arnett et al., 2001).

Ο όρος «ενεργοποιημένη μικρογλοία» συνεπώς περιλαμβάνει ένα σύνολο διαφορετικών διεγερτικών αλλά και κατασταλτικών μηχανισμών οι οποίοι έχουν σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ισορροπίας και τη διατήρηση της ομοιόστασης στο περιβάλλον του εγκεφάλου. Είναι λοιπόν σημαντικό να διευκρινιστεί ακριβώς ο τύπος της ενεργοποίησης που αναφέρεται στην εκάστοτε περίπτωση και να εξεταστεί το πώς θα μπορούσε να ρυθμιστεί θετικά ή αρνητικά ανάλογα με την παθολογία της κάθε διαφορετικής παθολογικής κατάστασης.

1.4 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Οι μέχρι τώρα μελέτες αναφέρονται αποκλειστικά στην έκφραση ή μη των επιφανειακών MHC II μορίων στη μικρογλοία. Καμία μελέτη δεν εστιάζεται στο μονοπάτι ωρίμανσης αυτών των μορίων και τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη μετανάστευσή τους από το ενδοπλασματικό δίκτυο στην κυτταρική μεμβράνη. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του προφίλ έκφρασης μεμβρανικών και ενδοκυτταρικών κλασικών MHC II μορίων (H2-A), η έκφραση των ενδοκυτταρικών μη κλασικών MHC II μορίων H2-O και H2-M καθώς και η έκφραση του CD74 σε διαφορετικά στάδια ενεργοποίησης της μικρογλοίας. Η κυτταρική σειρά που θα χρησιμοποιηθεί είναι η μικρογλοιακή κυτταρική σειρά BV-2, η οποία δημιουργήθηκε από τους Blasi et al. (1990) μέσω διαμόλυνσης πρωτογενούς καλλιέργειας μικρογλοίας ποντικού με ρετροϊό ο οποίος έφερε το ογκογονίδιο *v-raf/v-myc* (J2). Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν ικανότητα φαγοκύτωσης, εκκρίνουν λυσοζύμη και μετά από κατάλληλο ερέθισμα μπορούν να παράγουν IL-1 και TNF- α . Είναι θετικά για MAC1 και MAC2 αντιγόνα αλλά δεν εκφράζουν MAC3, glial fibrillary acidic protein (GFAP), και galactocerebroside (GC). Εφόσον η κυτταρική σειρά BV-2 διατηρεί τα περισσότερα φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά πρωτογενούς μικρογλοίας χρησιμοποιείται σαν μοντέλο για την μελέτη αυτών των κυττάρων.

Προκειμένου να μελετηθούν τα διαφορετικά στάδια ενεργοποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων θα εξεταστεί η έκφραση των MHC II μορίων και του CD74 στην κυτταρική σειρά BV-2 κάτω από την επίδραση του LPS, της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης IFN- γ και της αντι-φλεγμονώδους κυτοκίνης IL-4. Επίσης θα μελετηθεί η παραγωγή TNF- α και διαλυτών MHC II μορίων στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών κάτω από την επίδραση των παραπάνω παραγόντων.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1 Χειρισμός κυτταροκαλλιιεργειών

2.1.1 Κυτταρική σειρά BV-2

Η κυτταρική σειρά BV-2 προέκυψε από πρωτογενείς καλλιέργειες μικρογλοιακών κυττάρων α οποία διαμολύνθηκαν με ρετροϊό ο οποίος έφερε το ογκογονίδιο v-raf/v-myc.

Υλικά καλλιέργειας:

- DMEM 10% v/v FBS(GIBCO)
50 ml DMEM 10x, 400 ml ddH₂O, 15 ml Sodium Bicarbonate, 7,5% solution (GIBCO).
Στη συνέχεια ρυθμίζουμε το pH=7,5 με NaOH 5 N. Προσθέτουμε 5 ml Glutamine 100x, 5 ml Sodium Pyruvate(100 mM), 5 ml Penicillin/Streptomycin(10⁴ U/ml), 50 ml FBS.
- Φλάσκες καλλιέργειας 25 cm² και 75 cm²
- Τρυβλία petri
- Επωαστήρας (Forma Scientific, USA)
- Scraper

Τα κύτταρα αυτά έχουν την ιδιότητα να προσκολλούνται στην πλαστική επιφάνεια της φλάσκας ή του τρυβλίου petri στο οποίο αναπτύσσονται. Η καλλιέργεια κυττάρων γίνεται σε συγκέντρωση 5x10⁵ cells/ml σε επωαστήρα Forma Scientific στους 37°C παρουσία 5% CO₂ και αλλαγή θρεπτικού μέσου πραγματοποιείται κάθε 48-72 ώρες. Για την αποκόλληση των κυττάρων πιπετάρουμε ήπια στην επιφάνεια όπου έχουν προσκολληθεί τα κύτταρα ή χρησιμοποιείται scraper.

2.1.2 Πάγωμα Κυττάρων

Υλικά και διαλύματα:

- Cryovials
- Tubes 15ml
- Πιπέτες Pasteur

- Φυγόκεντρος Kubota
- Αιμοκυτταρόμετρο
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (DMEM-10% v/v FBS)
- DMSO (Dimethyl-sulphoxide Sigma, Germany)

Πειραματική διαδικασία:

Τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια στην οποία αναπτύσσονται είτε με ήπιο πιπετάρισμα είτε με την χρήση scraper. Στη συνέχεια μετράμε τα κύτταρα με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου και επαναδουλεύουμε σε θρεπτικό μέσο έτσι ώστε το πάγωμα να γίνει σε τελική συγκέντρωση 10^6 cells/ml. Για το πάγωμα των κυττάρων χρησιμοποιείται DMEM 10% v/v FBS, 10% v/v DMSO. Η προσθήκη του DMSO γίνεται πολύ ήπια με ταυτόχρονη ανάδευση, ενώ η διαδικασία πρέπει να γίνει όσο το δυνατόν ταχύτερα διότι το DMSO αποτελεί τοξικό παράγοντα για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Το εναιώρημα το κυττάρων τοποθετείται σε cryovials και φυλάσσεται στους -80°C .

2.1.3 Ξεπάγωμα κυττάρων

Υλικά και διαλύματα:

- Tubes 15 ml
- Πιπέτες Pasteur
- water bath
- Φυγόκεντρος Kubota
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (DMEM-10% v/vFBS)
- Φλάσκες καλλιέργειας 25 cm^2 και 75 cm^2
- Τρυβλία petri
- Επωαστήρας (Forma Scientific, USA)

Πειραματική διαδικασία:

Τοποθετούμε τα κύτταρα στους 37°C . Αμέσως μόλις ξεπαγώσουν τα αραιώνουμε 10 φορές σε DMEM-20% v/v FBS. Κατόπιν φυγοκεντρούμε στις 1200 rpm για 6 min ώστε να

απομακρυνθεί το DMSO που περιέχεται στο διάλυμα στο οποίο έχει γίνει το πάγωμα. Στη συνέχεια τα επαναδιαλύουμε σε DMEM-20% FBS και τα τοποθετούμε σε φλάσκες καλλιέργειας ή σε τρυβλία petri μέσα στον επωαστήρα (37°C). Η διαδικασία πρέπει να γίνει όσο το δυνατόν ταχύτερα διότι το DMSO αποτελεί τοξικό παράγοντα για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2 Εσωτερικός και Εξωτερικός Ανοσοφθορισμός

Σκοπός της τεχνικής είναι ο εντοπισμός και ο προσδιορισμός του επίπεδου έκφρασης μιας πρωτεΐνης ενδοκυτταρικά ή στην κυτταρική μεμβράνη. Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών (εσωτερικός ανοσοφθορισμός) στα διαλύματα χρησιμοποιείται saponine, η οποία αποτελεί ήπιο απορρυπαντικό που καθιστά παροδικά διαπερατή την κυτταρική μεμβράνη.

Υλικά και διαλύματα:

- Φυγόκεντρος (Kubota)
- PBS 1x, pH 7,5
0,2 M φωσφορικού άλατος και 1,5 M NaCl
(Το διάλυμα παρασκευάζεται αρχικά σαν PBS 10x διαλύοντας 2,28 g NaH₂PO₄ (0,038 M) ή 2,62 g NaH₂PO₄(H₂O) (0,038 M), 11,5 g Na₂HPO₄ (0,162 M) και 43,84 g NaCl σε 500 ml dH₂O. Ακολουθώς ρυθμίζεται το pH στο 7,5 και το χρησιμοποιούμε σε τελική συγκέντρωση 1x)
- PBS-BSA 3% w/v
- PBS-BSA 1% w/v
- PBS-BSA 3%-saponine 0,3% v/v
- PBS-BSA 1%-saponine 0,3% v/v
- PFA 4% in PBS v/v
- FACScan (Becton Dickinson)
- Confocal microscope (Leica)

Αντισώματα :

- α-I-A^d, monoclonal mouse-anti-mouse antibody FITC conjugated, clone: AMS-32.1, BD Pharmingen™ Cat.no:553547, 0,5 mg (use 1:200)

- α -H2-Ob, purified armenian hamster-anti-mouse antibody, Mags.Ob1 bioreactor supernatant (use 1:1000), ευγενική προσφορά της καθ. Lisa K. Denzin, Gerstner Sloan-Kettering Graduate School of Biomedical Sciences, New York
- α -H2-M, purified rat-anti-mouse antibody (use 1:1000), ευγενική προσφορά του καθ. L. Karlsson, R.W. Johnson Research Institute, San Diego.
- α -CD11b, monoclonal anti-mouse antibody PE conjugated, Eurobiosciences Cat. No: M22127P (use 1:100)
- α -IgG, goat anti mouse IgG1-PE, Santa Cruz Cat.no: sc-3764 (use 1:700)

Πειραματική διαδικασία:

Προκειμένου να διεξάγουμε το πείραμα ξεκινάμε με αρχική συγκέντρωση κυττάρων 5×10^5 cells/δείγμα. Ακολουθούμε την εξής διαδικασία:

- 1) Μονιμοποιούμε τα κύτταρα χρησιμοποιώντας PFA 4% (100 μ l/ 5×10^5 κυττάρων) και επωάζουμε για 10 min στους 4°C.
- 2) Για το πλύσιμο των κυττάρων διαλύουμε σε PBS 1x και κατόπιν φυγοκεντρούμε στις 1200 rpm για 6 min. Κατόπιν επαναλαμβάνουμε το βήμα.
- 3) Κάνουμε blocking χρησιμοποιώντας PBS-BSA 3% αν πραγματοποιούμε εξωτερικό ανοσοφθορισμό είτε PBS-BSA 3%-saronine 0.3% αν πραγματοποιούμε εσωτερικό ανοσοφθορισμό και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.
- 4) Ακολουθούν δύο πλυσίματα με PBS 1x.
- 5) Στο κυτταρικό ίζημα προσθέτουμε το πρώτο αντίσωμα διαλυμένο σε PBS-BSA 1% αν πραγματοποιούμε εξωτερικό ανοσοφθορισμό, είτε PBS-BSA 1%-saronine 0.3% αν πραγματοποιούμε εσωτερικό ανοσοφθορισμό. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min - 1 h. Εφόσον κάποια από τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι συνδεδεμένα με το δεύτερο αντίσωμα που φέρει φθορίζουσα ουσία η επώαση γίνεται σε συνθήκες σκότους.
- 6) Ακολουθούν δύο πλυσίματα με PBS 1x.
- 7) Στο κυτταρικό ίζημα προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα διαλυμένο σε PBS-BSA 1% αν πραγματοποιούμε εξωτερικό ανοσοφθορισμό, είτε PBS-BSA 1%-saronine 0.3% αν πραγματοποιούμε εσωτερικό ανοσοφθορισμό. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 30-45min σε συνθήκες σκότους.
- 8) Πλένουμε τα κύτταρα δύο φορές με PBS 1x.

9) Μετράμε τα δείγματα στο FACScan.

Εάν τα δείγματα πρόκειται να παρατηρηθούν σε μικροσκόπιο φθορισμού ή με συνεστιακή μικροσκοπία τα κύτταρα απλώνονται σε αντικειμενοφόρους. Προσθέτουμε 20 μl glycerol 25% in PBS ,τοποθετούμε καλυπτρίδα και παρατηρούμε στο μικροσκόπιο.

2.3 ELISA

Η τεχνική αυτή αποτελεί μια ιδιαίτερα ευαίσθητη βιοχημική μέθοδο για τον εντοπισμό αντιγόνων σε υπερκείμενα καλλιέργειών τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων.

Υλικά και διαλύματα:

- Πλάκες καλλιέργειας flat bottom 96 οπών (Costar Europe LTD, The Netherlands)
- PBS, tween-20 0.05% v/v
- PBS-BSA 2% w/v
- PBS-BSA 0,1% w/v
- Coating Buffer
0,025 M NaHCO₃ και 0,025 M Na₂CO₃, pH=9.6
(Το διάλυμα παρασκευάζεται διαλύοντας 2,1 g NaHCO₃ σε 500 ml H₂O, 2,65 g Na₂CO₃ σε άλλα 500 ml H₂O, ρύθμιση του pH σε κάθε διάλυμα στο 9,6 και ανάμειξη των δύο διαλυμάτων)
- Υπόστρωμα υπεροξειδάσης (TMB), (TMB Substrate Kit, Pierce , 34021)
- Peroxide Solution (H₂O₂), (TMB Substrate Kit, Pierce , 34021)
- H₂SO₄, 1 M
- ELISA plate reader (450 nm)

Αντισώματα:

- α-TNF-α, purified anti-mouse antibody, clone: MPG-XT3, Serotec, Cat.no:MCA1487
- α-H2-A, N22 hybridoma
- α-IgG, goat-anti-mouse IgG (Fab specific) peroxidase conjugated, Sigma Cat No.: A9917

Πειραματική διαδικασία:

Τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών που έχουμε συλλέξει στρώνονται σε plate σε αραιώση 1:1 σε coating buffer (100 μl/well). Ως θετικό control χρησιμοποιούμε ορό από BALB/c ποντίκι σε αραιώση 1/1000 (100 μl/well) είτε TNF-α σε αραιώση 1:5 σε coating buffer. Σαν αρνητικό control χρησιμοποιούμε 100 μl coating buffer/well και DMEM σε αραιώση 1:1 σε coating buffer. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούμε δύο επαναλήψεις.

Ακολουθούμε την εξής διαδικασία:

- 1) Τοποθετούμε την πλάκα overnight στους 4°C
- 2) Ακολουθούν τρία πλυσίματα με PBS - tween-20 0,05% (200 μl/well).
- 3) Επιάζουμε με PBS-BSA 2% για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου (200 μl/well) και στη συνέχεια κάνουμε τρία πλυσίματα με PBS - tween-20 0,05% (200 μl/well).
- 4) Επιάζουμε με τα πρώτα αντισώματα για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια κάνουμε τρία πλυσίματα με PBS - tween-20 0,05% (200 μl/well).
- 5) Επιάζουμε με το δεύτερο αντίσωμα για 45 min σε συνθήκες σκότους σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρία πλυσίματα με PBS - tween-20 0,05% (200 μl/well).
- 6) Φτιάχνουμε διάλυμα ίσου όγκου χρωμογόνου και υποστρώματος υπεροξειδάσης και προσθέτουμε 100 μl/well.
Περιμένουμε ωστόσο δούμε την αλλαγή χρώματος (μέγιστος χρόνος 20 min) και σταματάμε την αντίδραση προσθέτοντας 50 μl/well H₂SO₄, 1 M.
- 7) Μετράμε τα αποτελέσματα στο ELISA plate reader 450 nm.

2.4 Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρήση ραδιενεργής θυμιδίνης

Η μέτρηση ραδιενεργής θυμιδίνης είναι μια ραδιο-ισοτοπική μέθοδος μέτρησης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων.

Υλικά και διαλύματα:

- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας Flat bottom 96 πηγαδιών (Sarstedt, Germany)
- Αιμοκυτταρόμετρο
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός (Olympus, Japan)
- Επωαστήρας (Forma Scientific, USA)

- Χάρτινα φίλτρα (Filter paper discs)
- Συσκευή micro-plate Harvesting
- Μετρητής β-ακτινοβολίας LKB (LKB beta-counter)
- Scintillation vials 20 ml (Sarstedt, Germany)
- DMEM serum free
- [³H]-TdR
- Σπινθηριστικό διάλυμα:
(Τολουένιο (Sigma, USA), Omnifluor (Amersham, International plc), 3,18 g Omnifluor/1 l Toluene)

Πειραματική διαδικασία:

Κατά το πείραμα αυτό θελήσαμε να μελετήσουμε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό BV-2 κυττάρων που πραγματοποιείται κάτω από την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων λιποπολυσακχαρίτη (LPS), ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) και ιντερλευκίνης-4 (IL-4). Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις των παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

LPS	IFN-γ	IL-4
500 ng/ml	12,5 U/ml	10 U/ml
800 ng/ml	25 U/ml	20 U/ml
1000 ng/ml	50 U/ml	40 U/ml
2000 ng/ml	100 U/ml	80 U/ml
4000 ng/ml		160 U/ml
8000 ng/ml		320 U/ml
16000 ng/ml		640 U/ml

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί το συγκεκριμένο πείραμα, συλλέγουμε τα κύτταρα, με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου τα μετράμε και στη συνέχεια τα επαναδουλεύουμε σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου, έτσι ώστε να έχουμε τις επιθυμητές συγκεντρώσεις κυττάρων (50.000, 100.000 και 200.000 cells/ml). Τέλος στρώνουμε την καλλιέργεια σε πλάκες flat bottom σε τελικό όγκο 200 μl. Για κάθε διαφορετικό δείγμα πραγματοποιούμε τρεις επαναλήψεις.

Μετά από 24 h καλλιέργειας προσθέτουμε 1 μCi/ml [³H]-TdR σε κάθε well αραιωμένο σε 10 μl θρεπτικού μέσου και επωάζουμε για 18 h στους 37°C.

Μετά το τέλος της επώασης συλλέγουμε τα κύτταρα με τη συσκευή κυτταρικού συλλέκτη έτσι ώστε το περιεχόμενο των πηγαδιών να μεταφερθεί στα χάρτινα φίλτρα. Αφήνουμε τα

φίλτρα να στεγνώσουν και τελικά τοποθετούμε κάθε ένα σε 2ml σπινθηριστικού διαλύματος. Ακολούθως τα δείγματα μας μετριούνται σε μετρητή β-ακτινοβολίας LKB, όπου η ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης εκφράζεται σε κρούσεις / λεπτό (c.p.m.).

2.5 RT-PCR

Η RT-PCR είναι μια απλή μέθοδος που μας επιτρέπει τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης στα κύτταρα πραγματοποιώντας την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής αλλά και την αντίδραση πολυμερισμού σε ένα βήμα.

2.5.1 Απομόνωση mRNA(poly A⁺ RNA)

Για την απομόνωση mRNA (poly A⁺ RNA) από 2×10^6 κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το Oligotex Direct mRNA Mini Kit (QIAGEN)

Πειραματική διαδικασία:

- 1) Προσθέτουμε 600 μl διαλύματος OL1- β-μερκαπταιθανόλη 0,3% και ανακινούμε ελαφρά το δείγμα ώστε να γίνει διάρρηξη των κυττάρων (η β-μερκαπταιθανόλη θα πρέπει να διαλυθεί στο OL1 πριν χρησιμοποιηθεί).
- 2) Προσθέτουμε 600 μl ODB, αναδεύουμε και φυγοκεντρούμε 3 min 10000 rpm ώστε να πέσουν τα κύτταρα που δεν έχουν σπάσει.
- 3) Συλλέγουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 40 μl σφαιρίδια oligotext, τα οποία έχουμε νωρίτερα θερμάνει στους 37°C για 5 min. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Φυγοκεντρούμε στις 12.000-15.000 rpm για 20 min ώστε το υπερκείμενο να είναι διαυγές.
- 5) Επαναδιαλύουμε σε 100 μl OL1 και προσθέτουμε 400 μl ODB.
- 6) Επωάζουμε στους 70°C για 3 min και κατόπιν επωάζουμε άλλα 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- 7) Φυγοκεντρούμε στις 10.000 rpm για 10 min.
- 8) Επαναδιαλύουμε σε 350 μl OW1 και αναδεύουμε. Φορτώνουμε τα δείγματα σε κολώνα και φυγοκεντρούμε στις 10.000 rpm για 1 min.
- 9) Απομακρύνουμε το περιεχόμενο του tube και προσθέτουμε στην κολώνα 350 μl OW2. Φυγοκεντρούμε στις 10.000 rpm για 1 min.

10) Επαναλαμβάνουμε το προηγούμενο βήμα.

11) Αλλάζουμε tube, προσθέτουμε 100 μl ΟΕΒ στην κολώνα και αναδεύουμε με ήπιο πιπετάρισμα. Φυγοκεντρούμε στις 10.000 rpm για 1 min.

Η έκλουση γίνεται στα 100 μl. Το δείγμα μας μπορεί να χρησιμοποιηθεί αμέσως ή να φυλαχτεί στους -80°C όπου διατηρείται.

2.5.2 RT-PCR

Για την RT-PCR χρησιμοποιήθηκε το OneStep RT-PCR kit (QIAGEN) και ακολουθήθηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο της εταιρίας.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα Primer BLAST (Primer3 and BLAST). Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ειδικοί εκκινητές:

Mouse CD74:

Γονίδιο	εκκινητής	προϊόν
forward	5'-AGGTCTGGACCCCTGGAGTA-3'	151bp
reverse	5'-CCAGGGAGTTCTTGCTCATC-3'	

Σε κάθε μια αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν:

dNTPs	1 μl
enzyme	1 μl
buffer 5x	5 μl
H₂O	3 μl
Ειδικοί εκκινητές	5 μl
RNA	10 μl

Για την πραγματοποίηση RT-PCR χρησιμοποιήθηκε εξής πρόγραμμα:

	Θερμοκρασία	Χρόνος
Step 1	55°C	30'
Step 2	95°C	15'
Step 3	94°C	1'
Step 4	55°C	1'
Step 5	72°C	1'
Step 6	Back to step 3 x 40 times	
Step 7	72°C	10'
Step 8	4°C	

2.5.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Υλικά και διαλύματα:

- Πήκτωμα αγαρόζης 1%
(0,8 g αγαρόζη, 800 μl TEA buffer 0,5x, 80 ml dH₂O)
- 10 μl βρωμιούχο αιθίδιο
- loading buffer
25% w/v Bromophenol Blue, 50% Glycerol. Ρυθμίζουμε το pH με NaOH.
- DNA ladder (100 bp. Applichem, Cat.no: A3470)
- συσκευή ηλεκτροφόρησης

Πειραματική διαδικασία:

Για το gel αγαρόζης 1% διαλύουμε 0,8 g αγαρόζη σε dH₂O και θερμαίνουμε μέχρι διαλυθεί πλήρως και να είναι το διάλυμα διαυγές. Κατόπιν προσθέτουμε 800μl TEA buffer 0,5x. και 10 μl βρωμιούχο αιθίδιο. Αφήνουμε το gel να πήξει στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και μετά γεμίζουμε τη δεξαμενή της συσκευής με TAE buffer 0,5x. Προσθέτουμε και πάλι 10 μl βρωμιούχο αιθίδιο. Στη συνέχεια φορτώνουμε τα δείγματα μας στο gel προσθέτοντας σε κάθε δείγμα 5 μl loading buffer.

Ρυθμίζουμε στα 100 Volt.

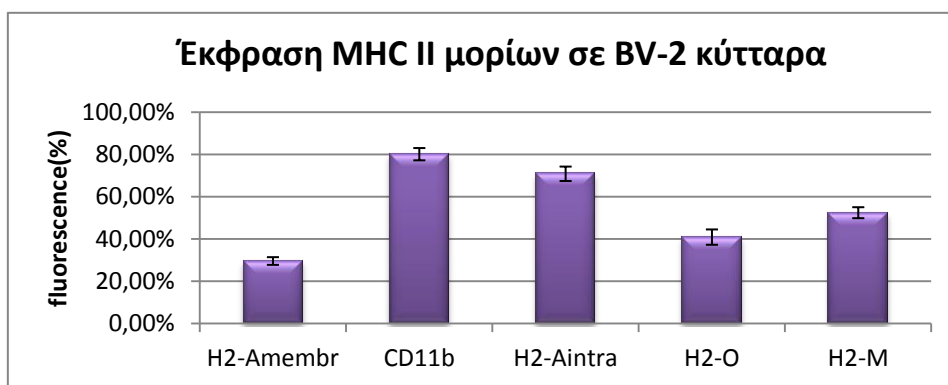
3.Αποτελέσματα

3.1 Μελέτη του προφίλ έκφρασης των H2-A, H2-O και H2-M και του CD74 στην κυτταρική σειρά BV-2.

3.1.1 Ανίχνευση των H2-A, H2-O και H2-M με κυτταρομετρία ροής στην κυτταρική σειρά BV-2.

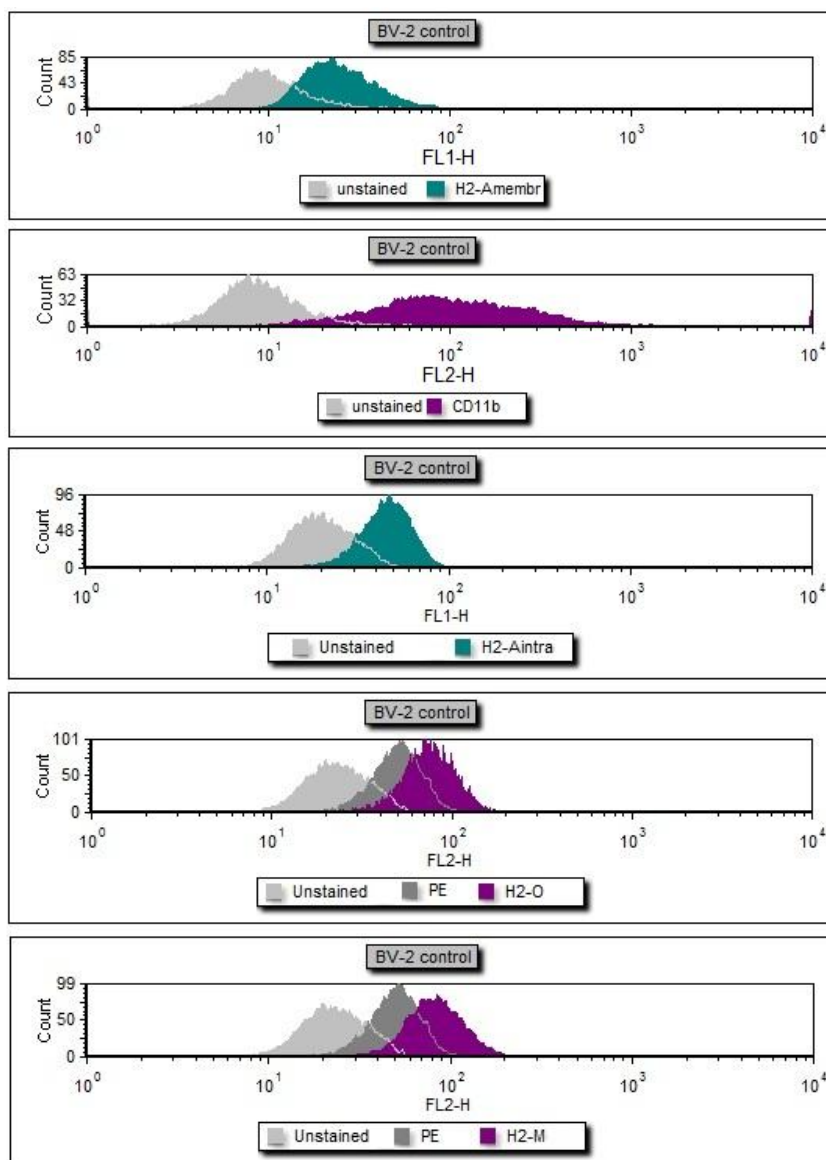
Χρησιμοποιώντας σαν μοντέλο μικρογλοιακών κυττάρων την κυτταρική σειρά BV-2 μελετήθηκαν τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των H2-A, H2-O και H2-M με κυτταρομετρία ροής. Η χρώση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας την διαδικασία του εξωτερικού ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των μεμβρανικών MHC II μορίων (H2-A) και του εσωτερικού ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των H2-A, H2-O και H2-M ενδοκυτταρικά. Τέλος στα BV-2 κύτταρα ελέγχθηκε ταυτόχρονα η έκφραση του CD11b ο οποίος αποτελεί επιφανειακό μάρτυρα των μακροφάγων. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα τα οποία ήταν είτε συνδεδεμένα απευθείας με φθορίζουσα χρωστική (FITC, PE) είτε ανιχνεύθηκαν με χρήση δευτέρου αντισώματος συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα χρωστική PE.

Από το σύνολο των πειραμάτων προκύπτει ότι το ποσοστό έκφρασης του H2-A στην κυτταρική μεμβράνη ανέρχεται στο 29,55% (Διάγραμμα 1). Όσον αφορά στην ενδοκυττάρια έκφραση των MHC II μορίων, το H2-A εκφράζεται σε ποσοστό 70,79%, ενώ τα H2-O και H2-M εκφράζονται σε ποσοστό 40,86% και 52,39% αντίστοιχα. Τέλος, ο επιφανειακός μάρτυρας CD11b εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα, σε ποσοστό 80,07% (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: Ποσοστό έκφρασης τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας και CD11 στη BV-2 κυτταρική σειρά. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στον μέσο όρο έκφρασης από 15 πειράματα \pm SEM

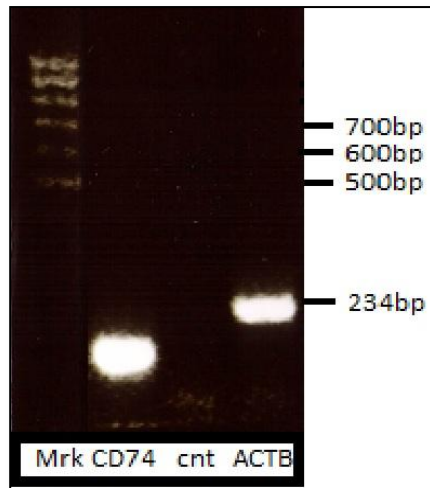
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής υπό μορφή ιστογράμματος ενός ενδεικτικού πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 8. Ανίχνευση των μεμβρανικών μορίων H2-A και CD11b και των ενδοκυττάρων H2-A, H2-O και H2-M με κυτταρομετρίας ροής στην κυτταρική σειρά BV-2.

3.1.2 Ανίχνευση μεταγράφου του CD74 με RT-PCR

Η ανίχνευση του CD74 στην BV-2 κυτταρική σειρά πραγματοποιήθηκε σε μεταγραφικό επίπεδο με RT-PCR. Poly-A mRNA απομονώθηκε από 2×10^6 κύτταρα με το Oligotex Direct mRNA Mini Kit (QIAGEN) και στη συνέχεια χρησιμοποιώντας έναν ειδικά σχεδιασμένο εκκινητή για τον CD74 πραγματοποιήθηκε RT-PCR με το OneStep RT-PCR kit (QIAGEN) (Εικόνα 2).



Εικόνα 9: Ανίχνευση του μετάγραφου CD74 στη BV-2 κυτταρική σειρά. Ως θετικό control του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη (actb) και ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε μίγμα της αντίδρασης στο οποίο προστέθηκαν οι εκκινητές της β-ακτίνης αλλά δεν προστέθηκε mRNA

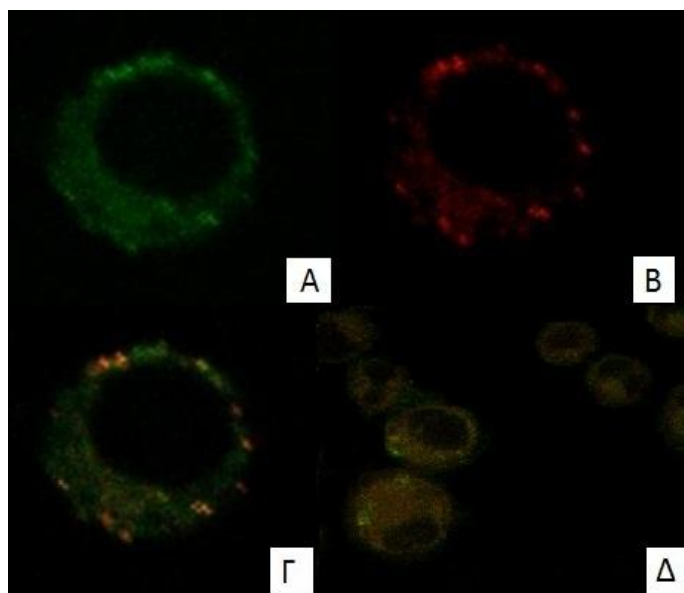
Τα αποτελέσματα έδειξαν την εμφάνιση μιας ζώνης στις 151 bp η οποία αντιστοιχεί στο προϊόν του ειδικού εκκινητή που κατασκευάστηκε για την ανίχνευση του CD74.

Άρα συνολικά, η BV-2 κυτταρική σειρά εκφράζει όλα τα απαραίτητα μόρια που επιτρέπουν την μετα-μεταφραστική ρύθμιση των τάξης II για την μεταφορά τους στην κυτταρική μεμβράνη.

3.1.3 Ανίχνευση των H2-A, H2-O και H2-M με συνεστιακή μικροσκοπία

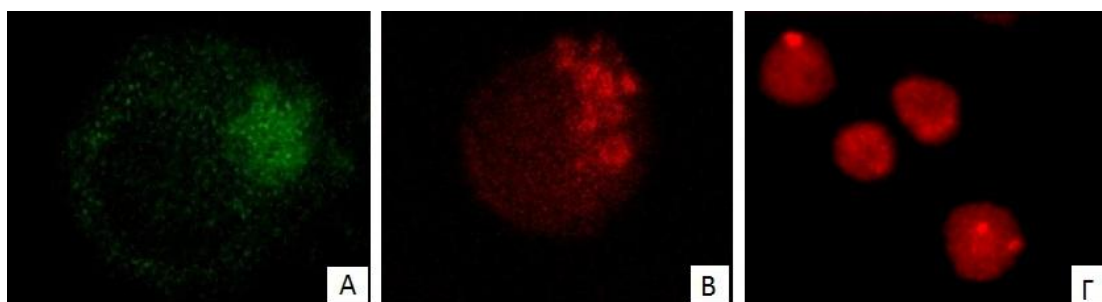
Στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, εκτός από τα κλασικά μόρια H-2A, που εντοπίζονται τόσο στην κυτταρική επιφάνεια όσο και σε ενδοκυττάρια ενδοσωμικά διαμερίσματα, τα μη-κλασικά H-2M και H-2O βρίσκονται μόνο σε ενδοκυττάρια μορφή. Για να ελεγχθεί αν αυτό ισχύει και στα BV-2 κύτταρα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα εντοπισμού των H2-A, H2-O και H2-M μορίων με συνεστιακή μικροσκοπία.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικ. 3 είναι εμφανής η έκφραση των μεμβρανικών H2-A μορίων (εικόνα 3A) και του επιφανειακού μάρτυρα CD11b (εικόνα 3B) στη κυτταρική σειρά BV-2, καθώς και ο συνεντοπισμός των μορίων αυτών στην κυτταρική μεμβράνη (εικόνες 3Γ και 3Δ), όπως άλλωστε έδειξαν και τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής.



Εικόνα 10 Ανίχνευση του μεμβρανικού H2-A και του επιφανειακού μάρτυρα CD11b με συνεστιακή μικροσκοπία στην κυτταρική σειρά BV-2. Η χρώση των κυττάρων έγινε με την μέθοδο του εσωτερικού και εξωτερικού ανοσοφθορισμού που περιγράφεται στην ενότητα των μεθόδων. Μετά τη χρώση τα κύτταρα απλώνονται με μια σταγόνα γλυκερόλης (25% v/v) σε αντικειμενοφόρους και παρατηρούνται σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα τα οποία ήταν είτε συνδεδεμένα απευθείας με φθορίζουσα χρωστική (FITC) είτε ανιχνεύθηκαν με χρήση δεύτερου αντισώματος συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα χρωστική PE. (Α) Χρώση με anti-H-2A-FITC, (Β) Χρώση με anti-CD11-PE. (Γ) και (Δ) Συνεντοπισμός χρώσεων FITC-PE

Η συνεστιακή μικροσκοπία εντόπισε την ενδοκυττάρια έκφραση των MHC II μορίων, H2-A, H2-O και H2-M στην BV-2 κυτταρική σειρά (Εικ. 4). Ο εντοπισμός τόσο του H-2A (Εικ. 4Α) όσο και των H-2O (Εικ. 4Β) και H-2M (Εικ. 4Γ) φαίνεται να εστιάζεται σε συγκεκριμένες περιοχές του κυτταροπλάσματος οι οποίες, όπως έχει δειχθεί σε άλλες μελέτες, θα μπορούσαν να είναι ενδοσωμικά κυστίδια.

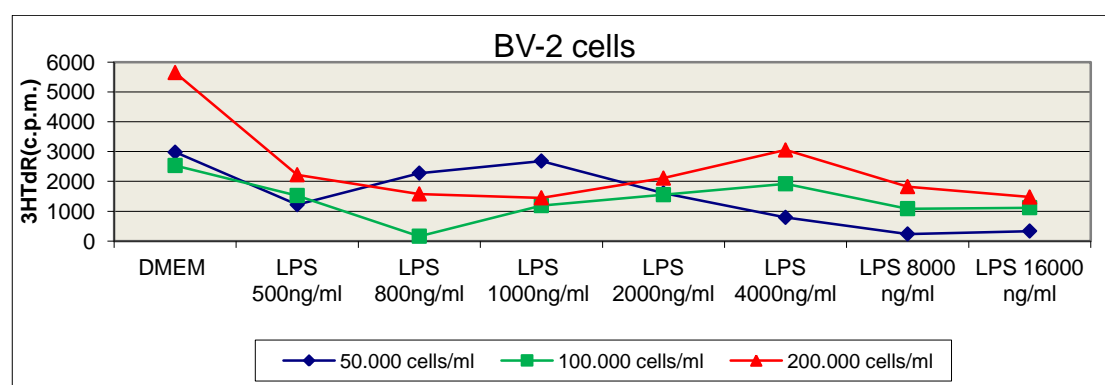


Εικόνα 11 Εικόνα 12 Ανίχνευση των H2-A, H2-O και H2-M ενδοκυτταρικά στην κυτταρική σειρά BV-2 με συνεστιακή μικροσκοπία. (Α) Χρώση με anti-H-2A-FITC (Β) χρώση με anti-H-2O-PE και (Γ) χρώση με H-2M-PE.

3.2 Μελέτη του προφίλ έκφρασης των H2-A, H2-O και H2-M στην κυτταρική σειρά BV-2 μετά από ενεργοποίηση με λιποπολυσακχαρίτη (LPS)

3.2.1 Κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε BV-2 κύτταρα υπό την επίδραση LPS

Προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση του LPS στην έκφραση των MHC II μορίων στα BV-2 κύτταρα, αρχικά καθορίστηκε η κατάλληλη δόση του παράγοντα σε πειράματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού των BV-2. Έτσι λοιπόν χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις LPS (500 ng/ml, 800 ng/ml, 1000 ng/ml, 2000 ng/ml, 4000 ng/ml, 8000 ng/ml και 160000 ng/ml) και διαφορετικές συγκεντρώσεις κυττάρων (50.000, 100.000 και 200.000 cells/ml). Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αξιολογήθηκε με πειράματα ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2: Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού BV-2 κυττάρων υπό την επίδραση LPS

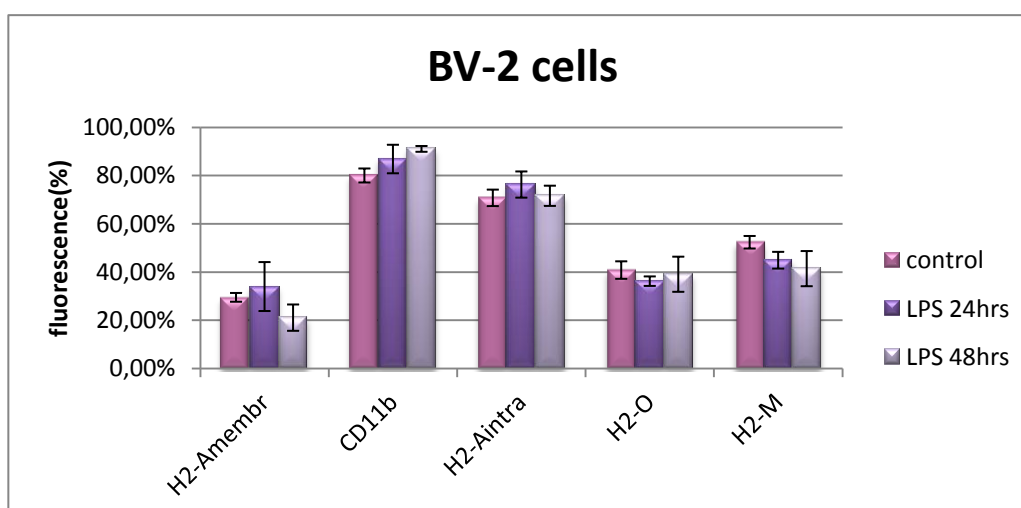
Από τα αποτελέσματα αυτά παρατηρείται ότι το LPS καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των BV-2 κυττάρων και συγκεκριμένα η καταστολή κυμαίνεται από 97% έως 45% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα απουσία LPS. Από τα πειράματα αυτά θεωρήθηκε ότι η συγκέντρωση των 500 ng/ml αποτελεί τη βέλτιστη δόση εφόσον παρουσιάζει τη ελάχιστη καταστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού στη μέγιστη συγκέντρωση κυττάρων (200.000 cells/ml), η οποία επιλέχθηκε για την συνέχεια των πειραμάτων μας.

3.2.2 Ανίχνευση των H2-A, H2-O και H2-M με κυτταρομετρία ροής στην κυτταρική σειρά BV-2 μετά από ενεργοποίηση με LPS

Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνικών μορίων H2-A, H2-O και H2-M όπως και του CD11b σε BV-2 κύτταρα μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής μετά από ενεργοποίηση με

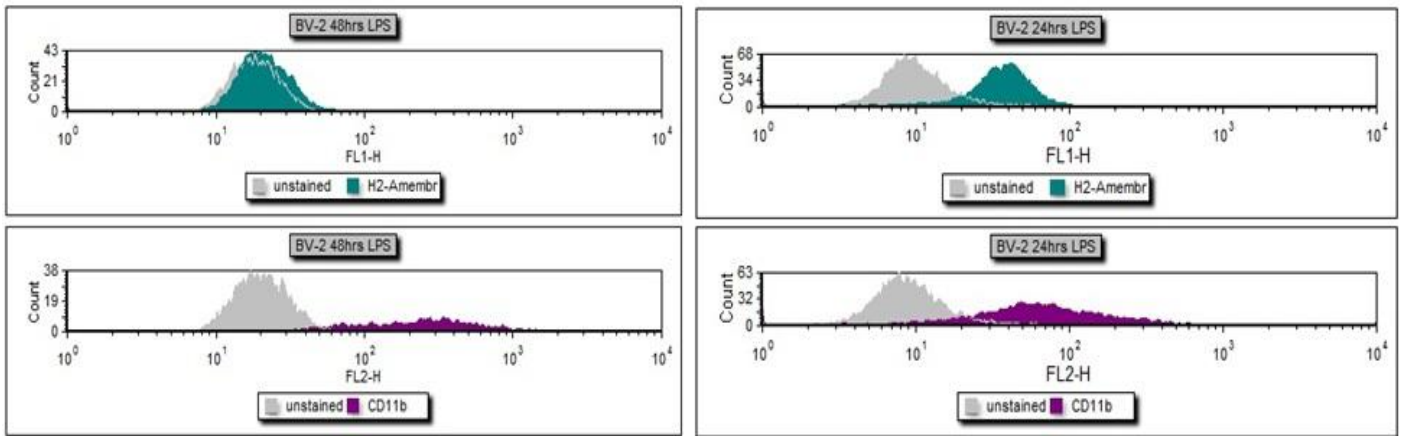
LPS για 24 και 48 ώρες. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3, η παρουσία του LPS δεν δημιουργεί σημαντικές τροποποιήσεις στο πρωτεϊνικό προφίλ που ελέγχθηκε. Η πλέον σημαντική διαφοροποίηση εμφανίζεται στη μείωση της έκφρασης του μεμβρανικού H-2A μετά από 48 h επώαση με LPS (μείωση κατά 27%, $p < 0.005$) η οποία ακολουθείται από μείωση του H-2M κατά 20% μετά από 48 h επώαση με LPS ($p < 0.005$). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι παρά την πτώση των επιπέδων έκφρασης των H-2A και H-2M, το LPS ενισχύει την μακροφαγική φύση των BV-2 κυττάρων, εφόσον η έκφραση του CD11b αυξάνεται κατά 14% μετά από την 48-ωρη επώαση. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε αντίθεση με τα όσα είναι γνωστά σήμερα στη βιβλιογραφία για την αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα των μακροφάγων, η οποία ενισχύεται με την αύξηση των επιπέδων τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας. Επομένως, η αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα των μικρογλοιακών κυττάρων πιθανόν να υπόκειται σε ιδιαίτερους κανόνες έκφρασης των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας.

	Control	24 h LPS	48 h LPS
H2-A membr	29,55%	34,03%	21,13%
CD11b	80,07%	86,89%	91,09%
H2-Aintra	70,79%	76,31%	71,64%
H2-O	40,86%	36,26%	39,13%
H2-M	52,39%	44,94%	41,46%

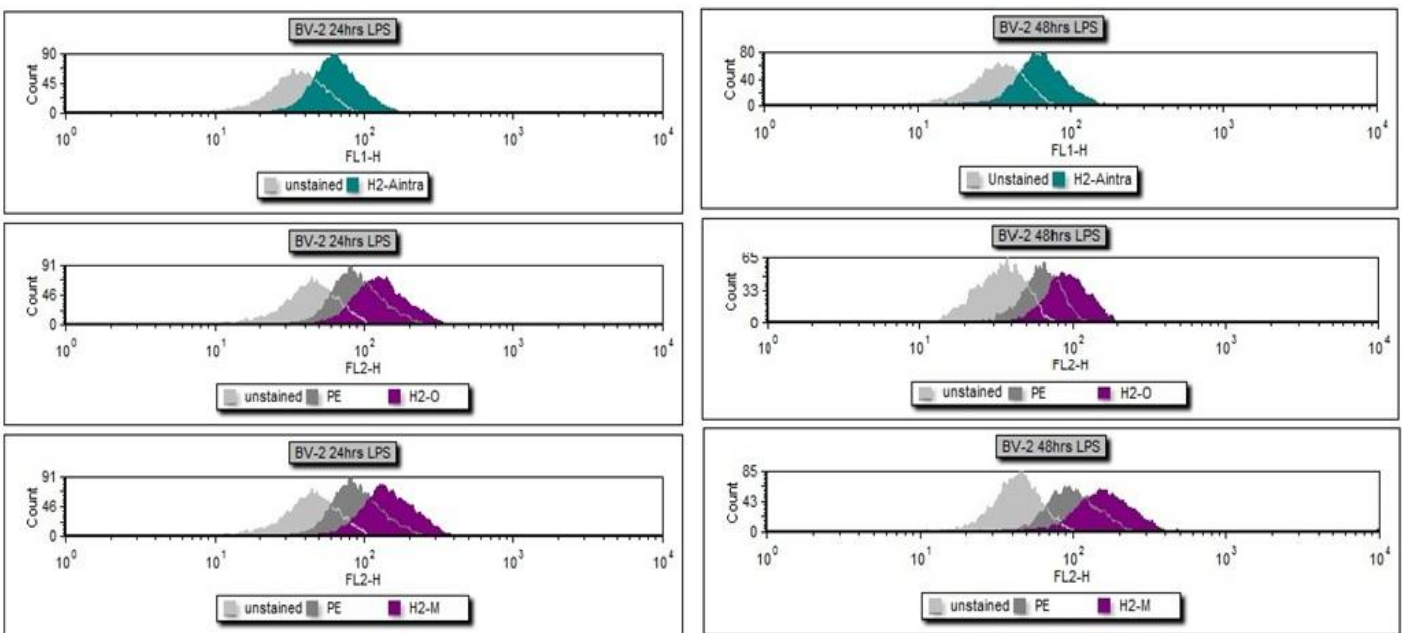


Διάγραμμα 3: Έκφραση των μεμβρανικών μορίων H2-A και CD11b και ενδοκυττάρων μορίων H2-A, H2-O και H2-M μετά από ενεργοποίηση με LPS μετά από 24 και 48 ώρες.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής υπό μορφή ιστογράμματος ενός ενδεικτικού πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 13: Ανίχνευση των μεμβρανικών μορίων H2-A και CD11b μετά από ενεργοποίηση με LPS μετά από 24 και 48 ώρες, με την χρήση κυτταρομετρίας ροής στην κυτταρική σειρά BV-2.

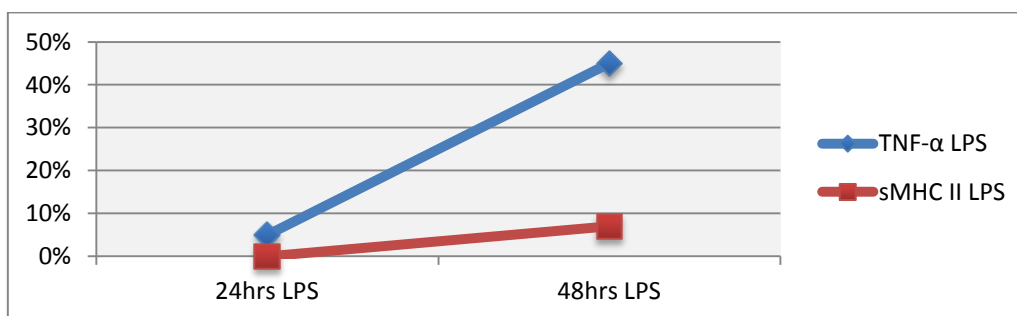


Εικόνα 14: Ενδοκυτταρική ανίχνευση των μορίων H2-A, H2-O και H2-M μετά από ενεργοποίηση με LPS μετά από 24 και 48 ώρες, με την χρήση κυτταρομετρίας ροής στην κυτταρική σειρά BV-2.

3.2.3 Ανίχνευση διαλυτών MHC II μορίων και TNF-α σε υπερκείμενα καλλιέργειας BV-2 κυττάρων μετά από ενεργοποίηση με LPS.

Εφόσον δεν υπήρξε τροποποίηση έκφρασης των H2-A, H2-O και H2-M σε πρωτεϊνικό επίπεδο, το επόμενο ερώτημα που τέθηκε ήταν το αν η παρουσία του LPS μεταβάλλει τα επίπεδα έκκρισης διαλυτών MHC II μορίων και TNF-α. Έτσι πραγματοποιήθηκαν πειράματα ELISA σε υπερκείμενα καλλιέργειας BV-2 κυττάρων υπό την επίδραση ή μη του LPS (500 ng/ml) μετά από 24 και 48 ώρες καλλιέργειας σε serum-free συνθήκες καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται ως ποσοστιαία διαφορά με βάση το αρνητικό control (Coating Buffer) (Διάγραμμα 4).

Ποσοστιαία αύξηση βάσει του control		
	TNF-α	sMHC II
24hrs LPS	5%	0%
48hrs LPS	45%	7%



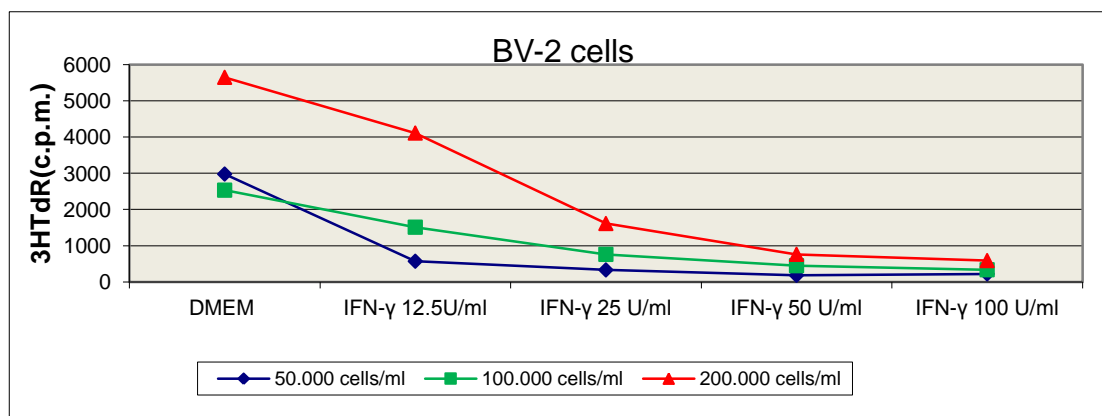
Διάγραμμα 4: Ανίχνευση διαλυτών MHCII και TNF-α σε υπερκείμενα καλλιέργειών BV-2 κυττάρων παρουσία LPS (500 ng/ml). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ποσοστό αύξησης της απορρόφησης σε σχέση με υπερκείμενα καλλιέργειών στα οποία δεν προστέθηκε LPS (control)

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι ενώ κατά την ενεργοποίηση των BV-2 κυττάρων με LPS δεν παρατηρείται έκκριση διαλυτών MHC II μορίων στις 24 και 48 ώρες, ανιχνεύεται σημαντική αύξηση έκκρισης του TNF-α κατά 45% μόνο μετά από 48 ώρες καλλιέργειας παρουσία LPS σε σχέση με τα επίπεδα έκκρισης TNF-α σε υπερκείμενα καλλιέργειας απουσία LPS.

3.3 Μελέτη του προφίλ έκφρασης των H2-A, H2-O και H2-M στην κυτταρική σειρά BV-2 μετά από επαγωγή με ιντερφερόνη-γ.

3.3.1 Κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε BV-2 κύτταρα υπό την επίδραση IFN-γ

Ο επόμενος επαγωγέας που ελέγχθηκε ήταν η IFN-γ. Για την επιλογή της βέλτιστης συγκέντρωσης του παράγοντα πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις IFN-γ (12,5 U/ml, 25 U/ml, 50 U/ml και 100 U/ml) και διαφορετικές συγκεντρώσεις κυττάρων (50.000, 100.000 και 200.000 cells/ml) μετρήθηκε η ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης μετά από 48 h καλλιέργειας (Διάγραμμα 5).



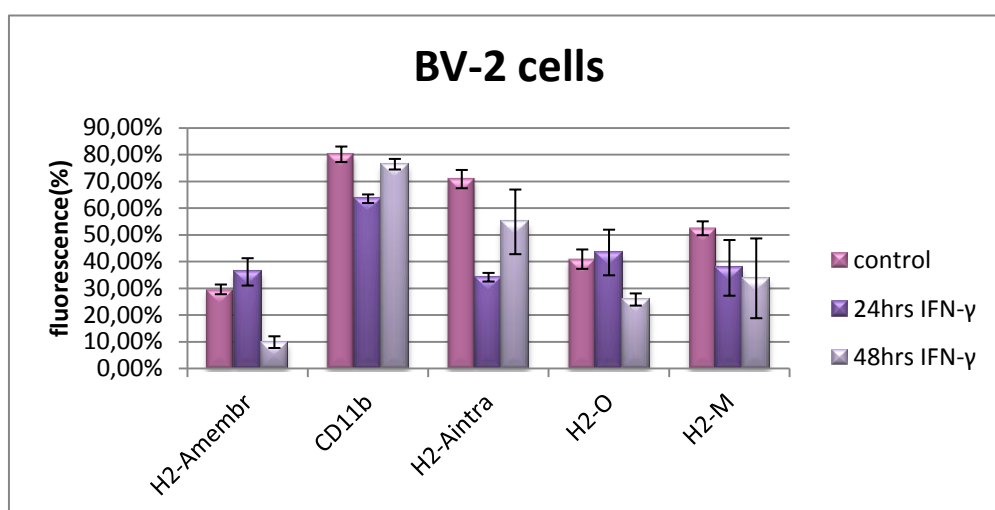
Διάγραμμα 5: Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού BV-2 κυττάρων μετά από επαγωγή με IFN-γ. Η ενσωμάτωση ³H-TdR ανιχνεύθηκε μετά από 48h καλλιέργειας

Όπως ήταν αναμενόμενο η IFN-γ μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και συγκεκριμένα η καταστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων κυμαίνεται από 96% έως 27% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα απουσία IFN-γ. Από τα πειράματα αυτά θεωρήθηκε ότι η συγκέντρωση των 12,5 U/ml αποτελεί τη βέλτιστη δόση εφόσον παρουσιάζει τη ελάχιστη καταστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού στη μέγιστη συγκέντρωση κυττάρων (200.000 cells/ml), η οποία επιλέχθηκε για την συνέχεια των πειραμάτων μας.

3.3.2 Ανίχνευση των H2-A, H2-O και H2-M με κυτταρομετρία ροής στην κυτταρική σειρά BV-2 μετά από επαγωγή με IFN-γ

Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνικών μορίων H2-A, H2-O, H2-M και CD11b σε BV-2 κύτταρα μετά από επαγωγή με IFN-γ (12,5 U/ml) σε serum-free συνθήκες καλλιέργειας για 24 και 48 ώρες μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής (Διάγραμμα 6).

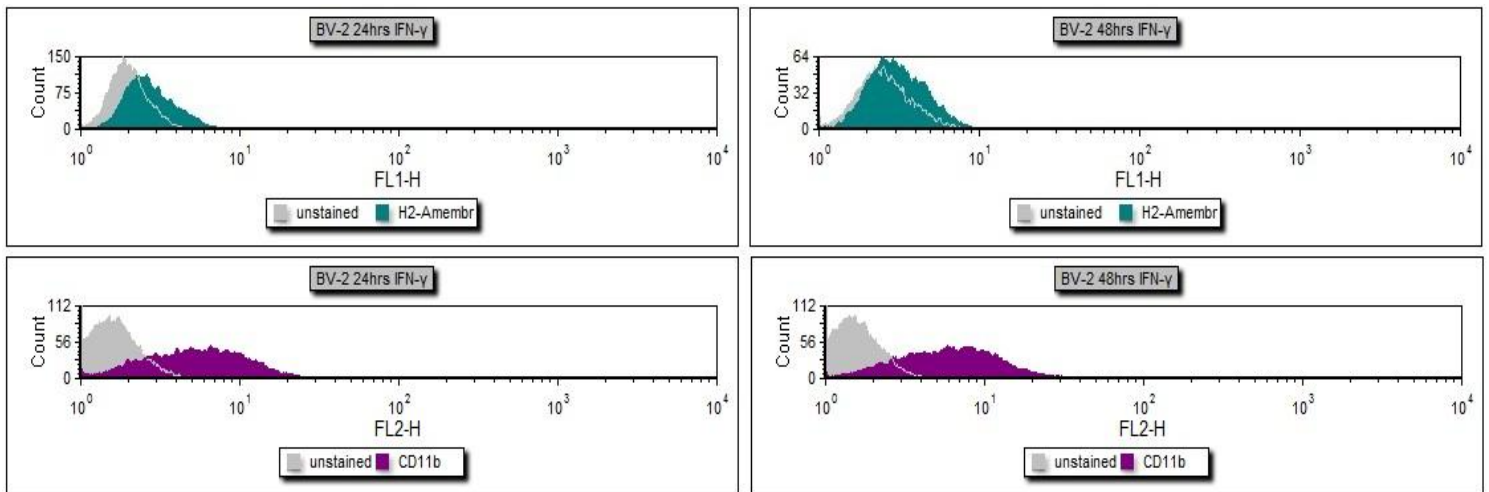
	Control	24 h IFN-γ	48 h IFN-γ
H2-A membr	29,55%	36%	9,81%
CD11b	80,07%	61,82%	76,36%
H2-Aintra	70,79%	34,10%	54,80%
H2-O	40,86%	43,34%	25,76%
H2-M	52,39%	63,11%	33,69%



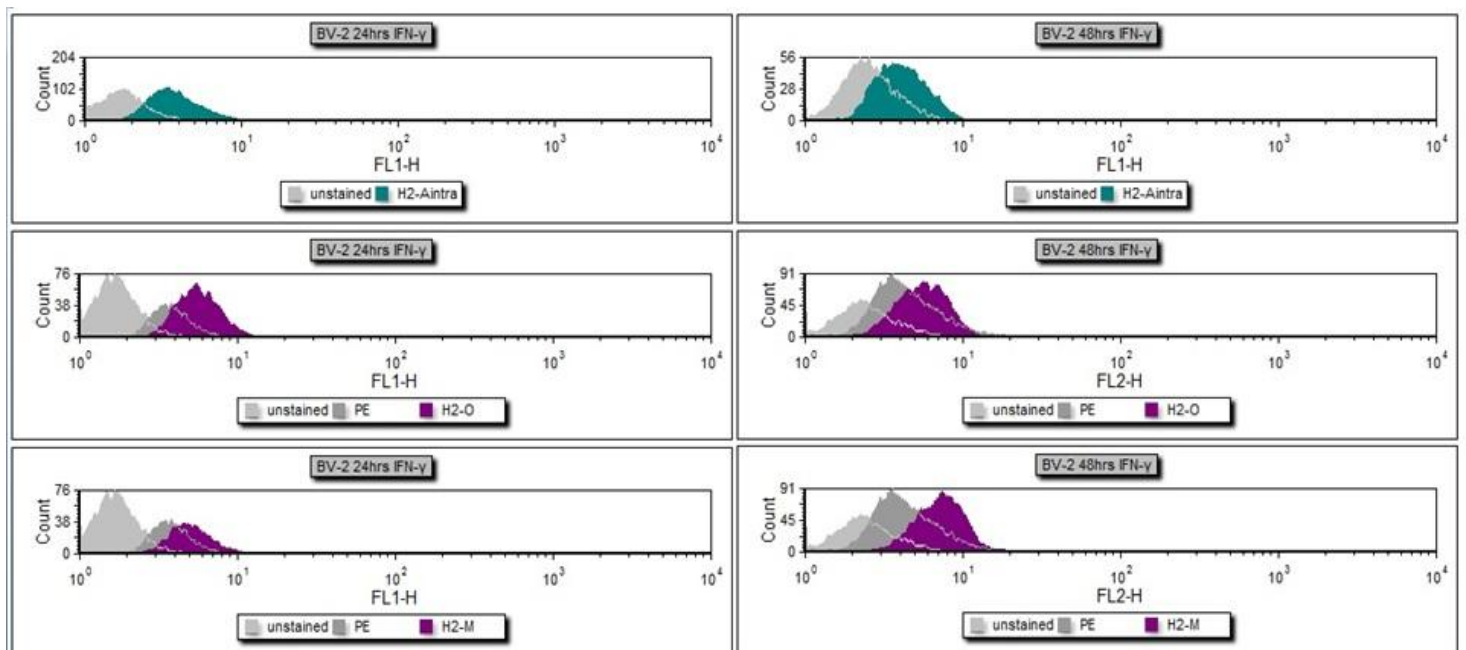
Διάγραμμα 6: Έκφραση των μεμβρανικών μορίων H2-A και CD11b και ενδοκυττάρων μορίων H2-A, H2-O και H2-M μετά από επαγωγή με IFN-γ μετά από 24 και 48 ώρες

Όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 6, η παρουσία την IFN-γ γενικά μειώνει την έκφραση των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, γεγονός που αντιβαίνει στη μέχρι τώρα επαγωγική δράση του παράγοντα. Μετά από 48 h επώαση με IFN-γ παρατηρείται μείωση κατά 66 ($p < 0.001$), 24 ($p < 0.005$), 37 ($p < 0.005$) και 36 ($p < 0.005$) % στην έκφραση των μεμβρανικών H-2A, ενδοκυττάρων H-2A, H-2O και H-2M αντίστοιχα. Για άλλη μια φορά επιβεβαιώνεται ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα υπόκειται σε ιδιαίτερους κανόνες έκφρασης των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής υπό μορφή ιστογράμματος ενός ενδεικτικού πειράματος παρουσιάζονται στις εικόνες 7 και 8.



Εικόνα 15: Ανίχνευση των μεμβρανικών μορίων H2-A και CD11b μετά από επαγωγή με IFN-γ μετά από 24 και 48 ώρες, με την χρήση κυτταρομετρίας ροής στην κυτταρική σειρά BV-2.

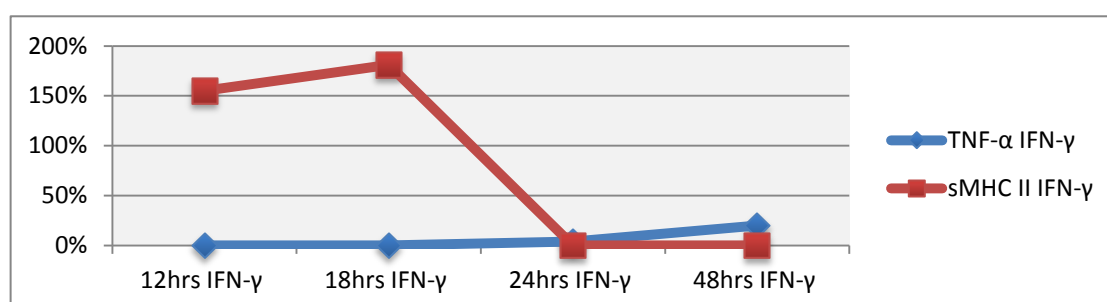


Εικόνα 16: Ενδοκυτταρική ανίχνευση των μορίων H2-A, H2-O και H2-M μετά από επαγωγή με IFN-γ μετά από 24 και 48 ώρες, με την χρήση κυτταρομετρίας ροής στην κυτταρική σειρά BV-2.

3.3.3 Ανίχνευση διαλυτών MHC II μορίων και TNF-α σε υπερκείμενα καλλιέργειας BV-2 κυττάρων μετά από επαγωγή με IFN-γ

Με σκοπό να ελεγχθεί το κατά πόσο η μείωση των επιπέδων H-2A από την κυτταρική μεμβράνη και τα ενδοκυττάρια διαμερίσματα των BV-2 κυττάρων οφείλεται σε έκκριση των μορίων αυτών, τα υπερκείμενα των καλλιεργειών υποβλήθηκαν σε δοκιμασίες ELISA. Επιπλέον, με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου η IFN-γ φαίνεται να επάγει την παραγωγή TNF-α, τα υπερκείμενα των serum-free καλλιεργειών ελέγχθηκαν για την παρουσία διαλυτών MHC II μορίων και TNF-α μετά από 12, 18, 24 και 48 ώρες επαγωγής με IFN-γ.

Ποσοστιαία αύξηση βάσει του control		
	sMHC II	TNF-α
12 hrs IFN-γ	155%	0%
18 hrs IFN-γ	181%	0%
24hrs IFN-γ	0%	4%
48hrs IFN-γ	0%	20%



Διάγραμμα 7: Ανίχνευση διαλυτών MHCII και TNF-α σε υπερκείμενα καλλιεργειών BV-2 κυττάρων παρουσία IFN-γ (12,5 U/ml). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ποσοστό αύξησης της απορρόφησης σε σχέση με υπερκείμενα καλλιεργειών στα οποία δεν προστέθηκε IFN-γ (control) .

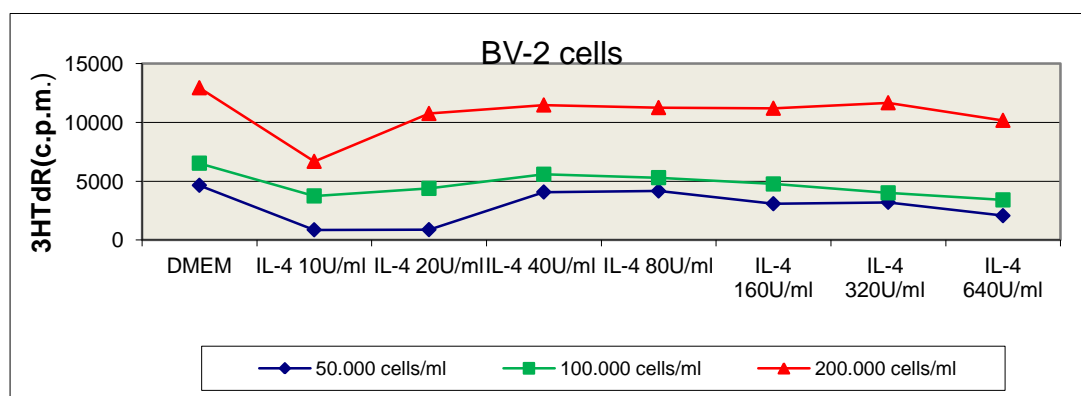
Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 7, η IFN-γ επάγει την έκκριση των τάξης II μετά από την 12-ωρη και 18-ωρη καλλιέργεια, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων H-2A που ανιχνεύθηκαν στα πειράματα του ανοσοφθορισμού. Επιπλέον, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται δείχνουν ότι η IFN-γ επάγει την παραγωγή TNF-α, μόνο μετά από 48-ωρη επώαση.

3.4 Μελέτη του προφίλ έκφρασης των H2-A, H2-O και H2-M στην κυτταρική σειρά BV-2 μετά από επαγωγή με ιντερλευκίνη-4.

Ο τελευταίος επαγωγέας που μελετήθηκε ήταν η IL-4, η οποία φαίνεται να εμπλέκεται στην ρύθμιση των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας στα μικρογλοιακά κύτταρα.

3.4.1 Κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε BV-2 κύτταρα υπό την επίδραση IL-4

Οι βέλτιστες συνθήκες για την χρήση της IL-4 ελέγχθηκαν σε πειράματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Έτσι, 10 U/ml, 20 U/ml, 40 U/ml, 80 U/ml, 160 U/ml, 320 U/ml και 640 U/ml του παράγοντα επωάστηκαν με 50.000, 100.000 και 200.000 cells/ml BV-2 κύτταρα για 48 h σε serum-free συνθήκες καλλιέργειας. Όπως και στην περίπτωση του LPS και της IFN- γ , παρατηρείται μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρουσία της IL-4, η οποία είναι πιο έντονη στη συγκέντρωση των 10 U/ml (Διάγραμμα 10).



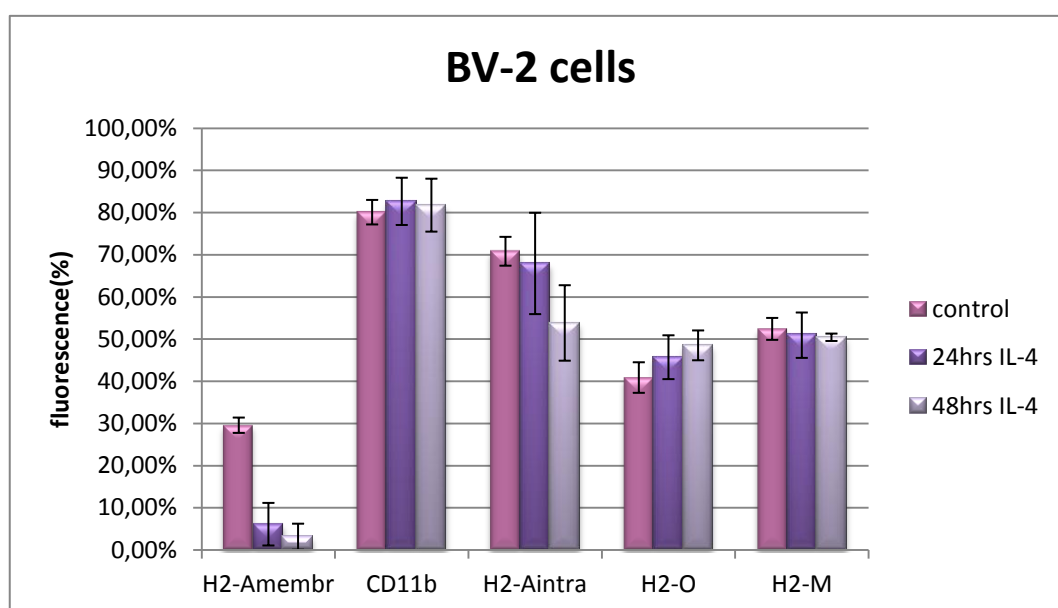
Διάγραμμα 8: Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού BV-2 κυττάρων μετά από επαγωγή με IL-4.

Από τα αποτελέσματα αυτά παρατηρείται ότι η IL-4 καταστέλλει σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με την IFN- γ τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των BV-2 κυττάρων (η καταστολή που παρατηρείται κυμαίνεται από 93% έως 9% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα απουσία IL-4). Από τα πειράματα αυτά θεωρήθηκε ότι η συγκέντρωση των 80 U/ml αποτελεί τη βέλτιστη δόση .

3.4.2 Ανίχνευση των H2-A, H2-O και H2-M με κυτταρομετρία ροής στην κυτταρική σειρά BV-2 μετά από επαγωγή με IL-4

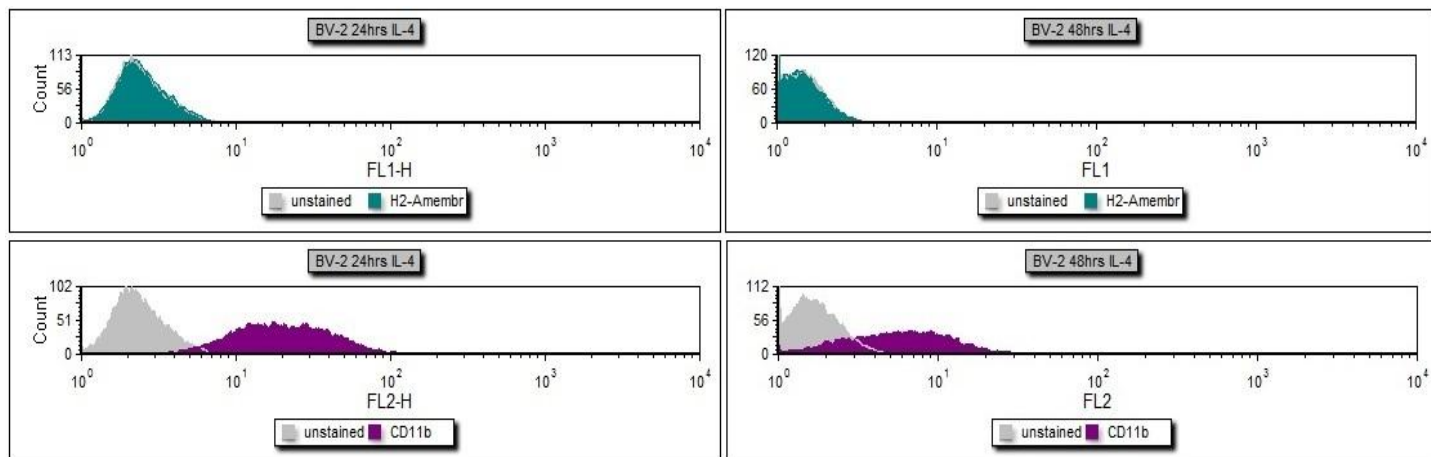
Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνικών μορίων H2-A, H2-O, H2-M και CD11b σε BV-2 κύτταρα μετά από επαγωγή με IL-4 (80 U/ml) σε serum-free συνθήκες καλλιέργειας για 24 και 48 ώρες μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής (Διάγραμμα 9). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και σε αυτή τη περίπτωση υπάρχει μείωση της έκφρασης των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας. Ειδικότερα παρατηρείται 89% ($p<0.001$) και 24% ($p<0.005$) μείωση έκφρασης στο μεμβρανικό και ενδοκυττάριο H-2A αντίστοιχα μετά από 48-ωρη επώαση με την IL-4, ενώ υπάρχει μια αύξηση της τάξεως του 19% στην έκφραση του H-2O.

	Control	24 h IL-4	48 h IL-4
H2-A membr	29,55%	6%	3,12%
CD11b	80,07%	82,63%	81,73%
H2-Aintra	70,79%	67,91%	53,80%
H2-O	40,86%	45,68%	48,49%
H2-M	52,39%	50,90%	50,40%

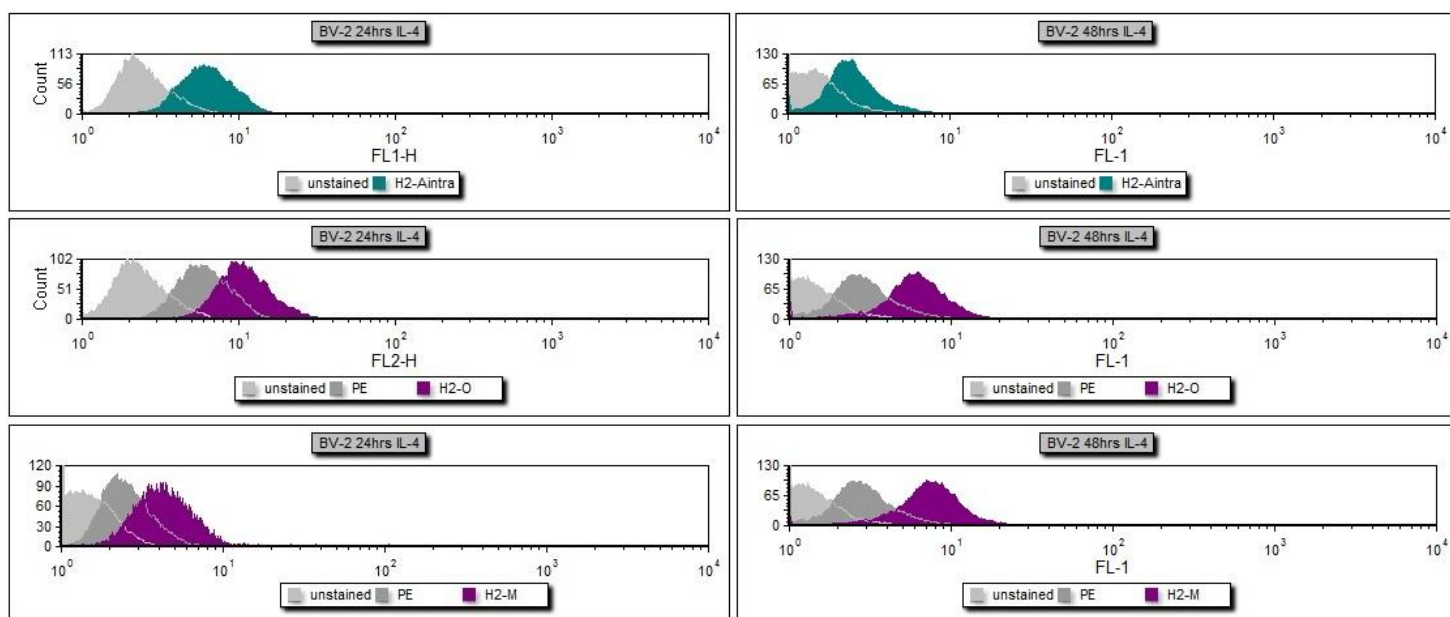


Διάγραμμα 9: Έκφραση των μεμβρανικών μορίων H2-A και CD11b και ενδοκυττάρων μορίων H2-A, H2-O και H2-M μετά από επαγωγή με IL-4. μετά από 24 και 48 ώρες.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής υπό μορφή ιστογράμματος ενός ενδεικτικού πειράματος παρουσιάζονται στις Εικόνες 9 και 10.



Εικόνα 17: Ανίχνευση των μεμβρανικών μορίων H2-A και CD11b μετά από επαγωγή με IL-4 μετά από 24 και 48 ώρες, με την χρήση κυτταρομετρίας ροής στην κυτταρική σειρά BV-2.

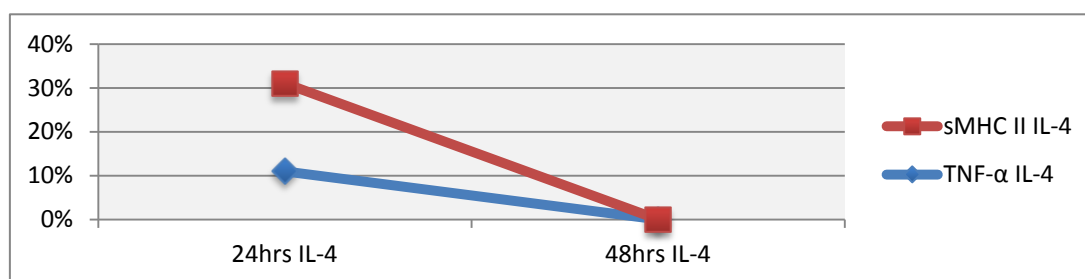


Εικόνα 18: Ενδοκυτταρική ανίχνευση των μορίων H2-A, H2-O και H2-M μετά από επαγωγή με IL-4 μετά από 24 και 48 ώρες, με την χρήση κυτταρομετρίας ροής στην κυτταρική σειρά BV-2.

3.4.3 Ανίχνευση διαλυτών ΜHC II μορίων και TNF-α σε υπερκείμενα καλλιέργειας BV-2 κυττάρων από επαγωγή με IL-4

Μετά την επαγωγή των BV-2 κυττάρων με IL-4 (80 U/ml), τα υπερκείμενα καλλιεργείων μελετήθηκαν προκειμένου να ερευνηθεί η έκκριση διαλυτών ΜHC II μορίων και TNF-α μετά από 24 και 48 ώρες serum-free καλλιέργειας (Διάγραμμα 10).

Ποσοστιαία αύξηση βάσει του control		
	sMHC II	TNF-α
24hrs IL-4	11%	20%
48hrs IL-4	0%	0%



Διάγραμμα 10: Ανίχνευση διαλυτών ΜHCII και TNF-α σε υπερκείμενα καλλιεργείων BV-2 κυττάρων παρουσία IL-4 (80 U/ml). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ποσοστό αύξησης της απορρόφησης σε σχέση με υπερκείμενα καλλιεργείων στα οποία δεν προστέθηκε IL-4 (control) .

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 10, η IL-4 προκαλεί έκκριση των τάξης II μετά από την 24-ωρη καλλιέργεια, γεγονός που συμφωνεί και με την μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων H-2A που ανιχνεύθηκαν στα πειράματα του ανοσοφθορισμού. Επίσης, η 24-ωρη επώαση με IL-4 επάγει την παραγωγή TNF-α σε χαμηλά επίπεδα.

4.Συζήτηση

Η μελέτη των μικρογλοιακών κυττάρων τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αντικείμενο έρευνας καθώς με την ενεργοποίησή τους τα μικρογλοιακά κύτταρα μπορούν να προωθήσουν τόσο την προστασία των νευρικών κυττάρων όσο και τον νευροεκφυλισμό. Επιπλέον σε πολλές νευροεκφυλιστικές καταστάσεις, όπως η γήρανση, η νόσος του Parkinson, η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Huntington και τη σχιζοφρένεια έχει δειχθεί ότι η απορρύθμιση των μηχανισμών ενεργοποίησης της μικρογλοίας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη παθολογικών φαινομένων. Η ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων έχει συνδεθεί με την έκφραση τάξης II μορίων του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας. Παρόλα αυτά μέχρι τώρα οι ερευνητικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους αποκλειστικά στην μελέτη των επιφανειακών τάξης II μορίων. Μέχρι τώρα δεν έχει μελετηθεί το μονοπάτι ωρίμανσης τους και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη μετανάστευσή τους από το ενδοπλασματικό δίκτυο στην κυτταρική μεμβράνη.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του προφίλ έκφρασης μεμβρανικών και ενδοκυτταρικών κλασικών MHC II μορίων (H2-A), η έκφραση των ενδοκυτταρικών μη κλασικών MHC II μορίων H2-O και H2-M καθώς και η έκφραση του CD74 σε διαφορετικά στάδια ενεργοποίησης της μικρογλοίας. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε είναι η μικρογλοιακή κυτταρική σειρά BV-2, η οποία προέκυψε μέσω διαμόλυνσης πρωτογενούς καλλιέργειας μικρογλοίας ποντικού με ρετροϊό ο οποίος έφερε το ογκογονίδιο *v-raf/v-myc* (J2) (Blasi et al., 1990). Η κυτταρική σειρά BV-2 διατηρεί τα περισσότερα φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά πρωτογενούς μικρογλοίας χρησιμοποιείται σαν μοντέλο για την μελέτη αυτών των κυττάρων.

Αρχικά μελετήθηκε η έκφραση των επιφανειακών τάξης II μορίων H2-A και η έκφραση του CD11b, ο οποίος αποτελεί επιφανειακό μάρτυρα των μικρογλοιακών κυττάρων, καθώς και η ενδοκυτταρική έκφραση των τάξης II H2-A, H2-O και H2-M με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής. Η χρώση των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο του εξωτερικού και εσωτερικού ανοσοφθορισμού όπως περιγράφηκε νωρίτερα στην ενότητα 2.2. Από το σύνολο των πειραμάτων του ανοσοφθορισμού προκύπτει ότι το ποσοστό έκφρασης του μεμβρανικού H2-A ανέρχεται στο 29,55% και ο επιφανειακός μάρτυρας CD11b εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα, σε ποσοστό 80,07%. Όσον αφορά στο προφίλ της

ενδοκυτταρικής έκφρασης των τάξης II μορίων, το H2-A εκφράζεται σε ποσοστό 70,79%, ενώ τα H2-O και H2-M εκφράζονται σε ποσοστό 40,86% και 52,39% αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας όπου η έκφραση μεμβρανικών τάξης II μορίων συνεντοπίζεται με τον επιφανειακό μάρτυρα CD11b. Επίσης παρατηρήθηκε ενδοκυτταρική έκφραση των κλασικών και μη κλασικών τάξης II μορίων H2-A, H2-O και H2-M η οποία εντοπίστηκε σε συγκεκριμένα σημεία του κυτταροπλάσματος τα οποία πιθανώς αποτελούν ενδοσωμικά κυστίδια όπως προκύπτει από άλλες μελέτες που έχουν γίνει σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.

Η έκφραση του CD74 μελετήθηκε σε μεταγραφικό επίπεδο με πειράματα RT-PCR όπου φάνηκε ότι όντως η κυτταρική σειρά BV-2 εκφράζει τουλάχιστον σε μεταγραφικό επίπεδο τον παράγοντα.

Συνεπώς από τα παραπάνω δεδομένα των πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής, συνεστιακής μικροσκοπίας και RT-PCR συμπεραίνουμε ότι η κυτταρική σειρά BV-2 εκφράζει όλα τα απαραίτητα μόρια για την μετα-μεταφραστική ρύθμιση των τάξης II για την μεταφορά τους στην κυτταρική μεμβράνη.

Βιβλιογραφικές μελέτες δείχνουν ότι τα επίπεδα έκφρασης των MHC II μορίων επηρεάζεται από το στάδιο ενεργοποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων BV-2. Για το σκοπό αυτό μελετήσαμε την έκφραση των τάξης II κάτω από την επίδραση του LPS, της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης IFN- γ και της αντι-φλεγμονώδους κυτοκίνης IL-4. Αρχικά πραγματοποιώντας πειράματα ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης ελέγχθηκε ο πολλαπλασιασμός των BV-2 κυττάρων υπό την επίδραση του LPS, της IFN- γ και της IL-4 προκειμένου να επιλεγεί σε κάθε περίπτωση η βέλτιστη δόση παράγοντα για την συνέχεια των πειραμάτων μας. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των παραπάνω παραγόντων (ενότητα 2.4) και διαφορετικές συγκεντρώσεις καλλιέργειας BV-2 κυττάρων και ακολούθως μετρήθηκε η ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης μετά από 48h καλλιέργειας. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας προκύπτει ότι ο LPS καταστέλλει σε μεγάλο βαθμό τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των BV-2 κυττάρων (97% έως 45% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα απουσία LPS). Η βέλτιστη δόση για την συνέχεια των πειραμάτων μας θεωρήθηκε η συγκέντρωση των 500 ng/ml εφόσον παρουσιάζει τη ελάχιστη καταστολή στη μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση που ελέγχθηκε, την οποία χρησιμοποιήσαμε για τη συνέχεια των πειραμάτων μας. Η IFN- γ επίσης μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (96% έως 27% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα απουσία IFN- γ). Από τα πειράματα αυτά θεωρήθηκε ότι η συγκέντρωση των 12,5 U/ml αποτελεί τη βέλτιστη δόση εφόσον παρουσιάζει τη ελάχιστη ποσότητα του παράγοντα που προκαλεί

σημαντική καταστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού στη μέγιστη συγκέντρωση που ελέγχθηκε (200.000 cells/ml). Τέλος η IL-4 καταστέλλει σε μικρό βαθμό τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των BV-2 κυττάρων (93% έως 9% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα απουσία IL-4). Από τα πειράματα αυτά θεωρήθηκε ότι η συγκέντρωση των 80 U/ml αποτελεί τη βέλτιστη δόση.

Πειράματα ανοσοφθορισμού και ανάλυση με κυτταρομετρίας ροής έδειξαν ότι το LPS δεν προκαλεί αξιοσημείωτη διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των τάξης II μορίων συγκριτικά με το προφίλ έκφρασης που ελέγχθηκε αρχικά στα BV-2 κύτταρα. Η πλέον σημαντική διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε αφορούσε στην μείωση της έκφρασης των μεμβρανικών τάξης II μορίων κατά 27% μετά από 48-ωρη επώαση με LPS, η οποία συνοδευόταν από ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης του H2-M κατά 20%. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία δείχνουν ότι ο LPS προκαλεί την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων ωστόσο όμως δεν επάγει την έκφραση μεμβρανικών τάξης II μορίων η οποία απαιτεί την έκφραση της σταθερής αλυσίδας Ii και του μεταγραφικού παράγοντα CIITA (Butovsky et al., 2005). Ωστόσο ενδιαφέρον είναι να παρατηρήσουμε ότι η 48-ωρη επώαση με LPS έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του επιφανειακού μάρτυρα CD11b κατά 14%, γεγονός που υποδηλώνει την αύξηση των μακροφαγικών ικανοτήτων των κυττάρων αυτών υπό την επίδραση του συγκεκριμένου παράγοντα. Η αύξηση αυτή παρουσιάζει ενδιαφέρον διότι με τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα η αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα των μακροφάγων φαίνεται να ενισχύεται από την αύξηση των επιπέδων τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα πειραματικά μας δεδομένα.

Πειράματα ELISA σε υπερκείμενα καλλιέργειών μετά από 24-ωρη και 48-ωρη επώαση με LPS έδειξαν ότι ο παράγοντας αυτός δεν επηρεάζει την έκκριση των διαλυτών MHC II μορίων, ενώ αυξάνει σημαντικά την έκκριση TNF- α (αύξηση κατά 45%) μετά από 48 ώρες καλλιέργειας. Έχει άλλωστε δειχθεί σε μελέτες ότι η ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων σχετίζεται με την παραγωγή TNF- α η οποία οδηγεί σε νευροτοξικότητα και απώλεια νευρικών κυττάρων (Butovsky et al., 2005).

Η επίδραση της IFN- γ στα BV-2 κύτταρα έδειξε μείωση της έκφρασης των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, γεγονός που αντιβαίνει στη μέχρι τώρα επαγωγική δράση του παράγοντα. Μετά από 48 h επώαση με IFN- γ παρατηρήθηκε μείωση κατά 66% ($p < 0.001$), 24% ($p < 0.005$), 37% ($p < 0.005$) και 36% ($p < 0.005$) στην έκφραση των μεμβρανικών H-2A, ενδοκυττάρων H-2A, H-2O και H-2M αντίστοιχα. Στην περίπτωση όμως αυτή η IFN- γ φάνηκε να επάγει την έκκριση των τάξης II μετά από την 12-ωρη και 18-ωρη καλλιέργεια,

γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων H-2A που ανιχνεύθηκαν στα πειράματα του ανοσοφθορισμού μετά από 24 και 48 ώρες επώασης με τον παράγοντα. Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 48-ωρη επώαση με IFN- γ επάγει την παραγωγή TNF- α σε χαμηλά επίπεδα.

Τέλος, μελετήθηκε το προφίλ έκφρασης των τάξης II μορίων κάτω από την επίδραση της αντι-φλεγμονώδους κυτοκίνης IL-4. Η μελέτη της έκφρασης των μορίων αυτών με ανοσοφθορισμό έδειξε μείωση της έκφρασης των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας. Παρατηρείται 89% ($p < 0.001$) και 24% ($p < 0.005$) μείωση έκφρασης στο μεμβρανικό και ενδοκυττάριο H-2A αντίστοιχα μετά από 48-ωρη επώαση με την IL-4, ενώ υπάρχει μια αύξηση της τάξεως του 19% στην έκφραση του H-2O. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η έκφραση του H2-O έχει συνδεθεί με την απουσία μεμβρανικών τάξης II μορίων, είτε μόνιμα, όπως στην περίπτωση των τροφοβλαστικών κυττάρων, είτε ανάλογα με το στάδιο ενεργοποίησης, όπως στα B λεμφοκύτταρα και σε στα δενδριτικά κύτταρα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η IL-4 προκαλεί την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων αλλά καταστέλλει την έκφραση μεμβρανικών τάξης II μορίων (Suzumura et al., 1994) γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα μας και πιθανώς οφείλεται σε ρύθμιση η οποία περιλαμβάνει την ταυτόχρονη αύξηση του H2-O η οποία αποτρέπει την έκφραση των H2-A στην μεμβράνη. Η παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων των μεμβρανικών τάξης II συνοδεύεται από αύξηση των εκκρινόμενων τάξης II μορίων, όπως αυτό ανιχνεύτηκε με πειράματα ELISA στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών μετά από 24 ώρες επώασης με IL-4. Επίσης η 24-ωρη επώαση με IL-4 επάγει την παραγωγή TNF- α σε χαμηλά επίπεδα γεγονός που συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα όπου η IL-4 φαίνεται να προωθεί την προστασία των νευρικών κυττάρων (Butovsky et al., 2005).

Τα μικρογλοιακά κύτταρα τα οποία αποτελούν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στο κεντρικό νευρικό σύστημα έχουν τη δυνατότητα να αντιλαμβάνονται γρήγορα τις αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος του εγκεφάλου στο οποίο βρίσκονται με αποτέλεσμα την γρήγορη ενεργοποίησή τους, συνοδευόμενη από μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές. Από το σύνολο των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται φαίνεται ότι ανάλογα με το ερέθισμα που δέχεται ο κυτταρικός αυτός πληθυσμός προκύπτει διαφορετικός τύπος ενεργοποίησης. Όπως συζητήθηκε και παραπάνω η ενεργοποίηση της μικρογλοίας από τον LPS φαίνεται να μην επηρεάζει σημαντικά την έκφραση των τάξης II μορίων αλλά φαίνεται να επηρεάζει την έκκριση TNF- α , προωθώντας με τον τρόπο αυτό την νευροτοξικότητα και την απώλεια νευρικών κυττάρων στο περιβάλλον του εγκεφάλου. Επίσης ο LPS φαίνεται να αυξάνει την φαγοκυττωτική ικανότητα των μικρογλοιακών

κυττάρων παρά την ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης των τάξης II μορίων κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα. Όσον αφορά στην ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων υπό την επίδραση της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης IFN- γ , φαίνεται ότι σε αντίθεση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η έκφραση των τάξης II μορίων μειώνεται μεν, αλλά παράλληλα παρατηρείται έκκριση των μορίων αυτών σε διαλυτή μορφή. Σε άλλα κυτταρικά συστήματα, η έκκριση των διαλυτών τάξης II μορίων αποτελεί μέρος του μηχανισμού ρύθμισης των μορίων αυτών (Ranella et al., 2006) καθώς έχει δειχθεί ότι τα διαλυτά τάξης II μόρια επηρεάζουν αρνητικά τη λειτουργία των T λεμφοκυττάρων, εξυπηρετώντας έτσι μηχανισμούς ανοσοκαταστολής (Sardis et al., 2010). Ταυτόχρονα, στην περίπτωση επαγωγής με IFN- γ δεν παρατηρείται παραγωγή TNF- α , γεγονός που υποδηλώνει ενεργοποίηση διαφορετικών μονοπατιών ρύθμισης της μικρογλοίας. Τέλος, η μείωση των μεμβρανικών και ενδοκυτταρικών μορίων H2-A που παρατηρείται παρουσία της αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-4, συνοδευόμενη από την ταυτόχρονη αύξηση μη κλασικών H2-O, πιθανόν να εξυπηρετεί την καταστολή της έκφρασης μεμβρανικών τάξης II μορίων με στόχο τη προστασία των νευρικών κυττάρων. Στο περιβάλλον του εγκεφάλου θεωρείται ότι υπάρχουν συνεχώς ενεργοποιημένα αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα (Schwartz and Ziv, 2008). Η αναγνώριση τάξης II μορίων του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας συνδεδεμένων με πεπτίδια του εαυτού έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή αυξητικών παραγόντων οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση της ομοιόστασης. Πιθανώς η ενεργοποίησή τους από διαλυτά τάξης II μόρια, τα οποία παράγονται από ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα, να έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή IL-4, γεγονός που συμβάλλει στη η προστασία των νευρικών κυττάρων (Butovsky et al. 2005).

5.Βιβλιογραφία

- Aloisi, F., (2001). Immune function of microglia. *Glia* 36(2):165-179
- Arnett, H.A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G.K., Ting, J.P., (2001). TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4(11):1116-1122
- Athanassakis, I., Aifantis, I., Makrygiannakis, A., Koumantakis, E., Vassiliadis, S., (1995). Placental tissue from human miscarriages expresses class II HLA-DR antigens. *Am J Reprod Immunol* 34(5):281-287
- Bakke, O., and Dobberstein, B., (1990). MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63(4):707-716
- Barnum, S.R., (1999). Inhibition of complement as a therapeutic approach in inflammatory central nervous system (CNS) disease. *Mol Med* 5(9):569-582
- Benveniste, E.N., (1998). Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 9(3-4):259-275
- Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R., Bistoni, F., (1990). immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 27(2-3):229-237
- Busch R., Mellins ED., (1996). Developing and shedding inhibitors: how MHC class II molecules reach maturity. *Current Opin Immunol* 8(1):51-58
- Butovsky, O., Talpalar, A.E., Ben-Yaakov, K., Schwartz, M., (2005). Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Mol Cell Neurosci* 29(3):381-393
- Carson, M.J., (2002). Microglia as liaisons between the immune and central nervous systems: functional implications on multiple sclerosis. *Glia* 40(2):218-231
- Chao, C.C., Hu, S., Molitor, T.W., Shaskan, E.G., Peterson, P.K., (1992). Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 149(8):2736-2741
- Chao, C.C., Molitor, T.W., Hu, S., (1993). Neuroprotective role of IL-4 against activated microglia. *J Immunol* 151(3):1473-1481

Chen, X., Laur, O., Kambayashi, T., Li, S., Bray, R.A., Weber, D.A., Karlsson, L., Jensen, P.E., (2002). Regulated expression of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO during antigen-dependent and antigen-independent phases of B cell development. *J Exp Med* 195(8):1053-1062

Chervonsky, A.V., Gordon, L., and Sant, A.J., (1994). A segment of the MHC class II beta chain plays a critical role in targeting class II molecules to the endocytic pathway. *Int immunol* 6(7):973-982

Cresswell, P., (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 12:259-293

da Cunha, A., Jefferson, J.J., Tyor, W.R., Glass, J.D., Jannotta, F.S., Cottrell, J.R., Resau, J.H. , (1997). Transforming growth factor-beta1 in adult human microglia and its stimulated production by interleukin-1. *J Interferon Cytokine Res* 17(11):655-664

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., Gan, W.B., (2005). ATP mediates rapid microglial responses to local injury in vivo. *Nat Neurosci.* 8(6):752-758

Denzin, L.K., Hammond, C., and Cresswell, P., (1996). HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J Exp Med* 184(6):2153-2165

Denzin, L.K., Fallas, J.L., Prendes, M., Yi, W., (2005). Right place, right time, right peptide: DO keeps DM focused. *Immunol Rev* 207:279-292

Frei, K., Lins, H., Schwerdel, C., Fontana, A., (1994). Antigen presentation in the central nervous system. The inhibitory effect of IL-10 on MHC class II expression and cytokine production depends on the inducing signals and the type of cell analyzed. *J Immunol* 152(6):2720-2728

Gasque, P., Tenner, A.J., Morgan, B.P., (1998). Expression of the C1q/MBL/SPA receptor involved in phagocytosis and innate immune defense on human glia. *Mol Immunol* 35:379

Geraghty, D.E., (1993). Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. *Curr Opin Immunol* 5(1):3-7

Gobin, S.J., and van den Elsen, P.J., (2000). Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G. *Hum Immunol* 61(11):1102-1107

- Hanisch, U.K., (2002). Microglia as a Source and Target of Cytokines. *Glia* 40(2):140-155
- Heinrichs, H., and Orr, H.T., (1990). HLA non ABC class I genes: their structure and expression. *Immunol Res* 9(4):265-274
- Hiremath, M.M., Chen, V.S., Suzuki, K., Ting, J.P., Matsushima, G.K., (2008). MHC class II exacerbates demyelination in vivo independently of T cells. *J Neuroimmunol* , 203(1):23-32
- Jones, P.P., Murphy, D.B., Hewgill, D., and McDevitt, H.O. (1979). Detection of a common polypeptide chain in I--A and I--E sub-region immunoprecipitates. *Mol immunol* 16(1):51-60
- Katz, J.F., Stebbins, C., Appella, E., and Sant, A.J., (1996). Invariant chain and DM edit self-peptide presentation by major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. *J Exp Med* 184(5):1747-1753
- Kelly, A.P., Monaco, J.J., Cho, S., and Trowsdale, J., (1991). A new human HLA Class II-related locus, DM. *Nature* 353(6344):571-573
- Kim S.U., and De Vellis, J., (2005). Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81(3):302-313
- Kreutzberg, G.W., (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19(8):312-318
- Kropshofer, H., Vogt, A.B., Moldenhauer, G., Hammer, J., Blum, J.S., and Hammerling, G.J., (1996). Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J* 15(22):6144-6154
- Kropshofer, H., Hammerling, G.J., and Vogt, A.B., (1997). How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: survival of the fittest? *Immunol Today* 18(2):77-82
- Kropshofer, H., Vogt, A.B., They, C., Armandola, E.A., Li, B.C., Moldenhauer, G., Amigorena, S., and Hammerling, G.J., (1998). A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J* 17(11):2971-2981
- Laurenzi, M.A., Arcuri, C., Rossi, R., Marconi, P., Bocchini, V., (2001). Effects of microenvironment on morphology and function of the microglial cell line BV-2. *Neurochem Res* 26(11):1209-1216
- Ledeboer, A., Brevé, J.J., Wierinckx, A., van der Jagt, S., Bristow, A.F., Leysen, J.E., Tilders, F.J., Van Dam, A.M., (2002). Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *Eur J Neurosci* 16(7):1175-1185

Lee, S.C, Liu, W., Roth, P., Dickson, D.W., Berman, J.W., Brosnan, C.F., (1993a). Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* 150(7):2659-2667

Liljedahl, M., Kuwana, T., Fung-Leung, W.P., Jakson, M.R., Peterson, P.A., and Karlsson, L., (1996). HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J* 15(18):4817-4824

Liu, L., Li, Y., Van Eldik, L.J., Griffin, W.S., Barger, S.W., (2005a). S100B induced microglial and neuronal IL-1 expression is mediated by cell type-specific transcription factors. *J Neurochem* 92(3):546-553

Lodge, P. A., and Sriram, S., (1996). Regulation of microglial activation by TGB-beta, IL-10, and CSF-1. *J Leukoc Biol* 60(4):502-508

Luo, X. Jian-Qing Ding, J., and Chen, S., (2010). Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 5:12

Machamer, C.E., and Cresswell, P., (1982). Biosynthesis and glycosylation of the invariant chain associated with HLA-DR antigens. *J Immunol* 129(6):2564-2569

McGeer, P.L., and McGeer, E.G., (2008). Glial Reactions in Parkinson's Disease. *Mov Disord* 23(4):474-483

Monji, A., Kato T., Kanba, S., (2009). Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci* 63(3):257-265

Morris, P., Shaman, J., Attaya, M., Amaya, M., Goodman, S., Bergman, C., (1994). An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* 368(6471):551-554

Nagai, A., Nakagawa, E., Hatori, K., Choi, H. B., McLarnon, J. G., Lee, M. A., and Kim, S. U., (2001). Generation and characterization of immortalized human microglial cell lines: expression of cytokines and chemokines. *Neurobiol Dis* 8(6):1057-1068

Neumann, H., Misgeld, T., Matsumuro, K., Wekerle, H., (1998). Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(10): 5779- 5784

Neumann, H., (2001). Control of glial immune function by neurons. *Glia* 36(2):191-199

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F., (2005). Resting Microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308(5726):1314-1318

Njie, E.G., Boelen, E., Stassen, F.R., Steinbusch, H.W.M., Borchelt, D.R., and Streit W.J., (2010). Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging* [Epub ahead of print]

Peress, N.S., Fleit, B.H., Perillo, E., Kuljis, R., Pezzullo, C., (1993). Identification of FcγRI, II and III on normal human brain ramified microglia and on microglia in senile plaques in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 48(1):71-80

Peters, P.J., Neefjes, J.J., Oorschot, V., Ploegh, H.L., and Geuze, H.J., (1991). Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 349(6311):669-676

Pratt, B. M., and J. M. McPherson. (1997). TGF-beta in the central nervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 8(4):267-292

Pulliam, L., D. Moore, and D. C. West, (1995). Human cytomegalovirus induces IL-6 and TNF alpha from macrophages and microglial cells: possible role in neurotoxicity. *J Neurovirol* 1(2):219-227

Qiu, Y., Xu, X., Wandinger-Ness, A., Dalke, D.P., and Pierce, S.K., (1994). Separation of subcellular compartments containing distinct functional forms of MHC class II. *J Cell Biol* 125(3):595-605

Ranella, A., Vassiliadis, S., Mastora, C., Valentina, M., Dionyssopoulou, E., and Athanassakis, I., (2005). Constitutive intracellular expression of human leukocyte antigen (HLA)-DO and HLA-DR but not HLA-DM in trophoblast cells. *Hum Immunol* 66(1):43-55

Rasley, A., Marriott, I., Halberstadt, C.R., Bost, K.L., Anguita, J., (2004). Substance P augments *Borrelia burgdorferi*-induced prostaglandin E2 production by murine microglia. *J Immunol* 172(9):5707-5713

Roche, P.A., Marks, M.S., and Cresswell, P., (1991). Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354(6352):392-394

Sardis M., Miltiadiou P., Bakela K., Athanassakis I., (2010). Serum-derived MHC class II molecules: Potent regulators of the cellular and humoral immune response. *Immunobiology* 215(3):194-205

Stalder, A. K., Pagenstecher, A., Yu, N. C., Kincaid, C., Chiang, C.S., Hobbs, M. V., Bloom, F. E., and Campbell, I. L., (1997). Lipopolysaccharide-induced IL-12 expression in the central nervous system and cultured astrocytes and microglia. *J Immunol* 159(3):1344-1351

Steiner, J., Mawrin, C., Ziegeler, A., Biela, H., Ullrich, O., Bernstein H.G., and Bogerts, B., (2006). Distribution of HLA-DR-positive microglia in schizophrenia reflects impaired cerebral lateralization. *Acta Neuropathol* 112(3):305-316

Streit, W.J., Sammons, N.W., Kuhns, A.J., Sparks, D.L., (2004). Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia*. 45(2):208-212

Suk, K., Yeou Kim, S., Kim, H., (2001). Regulation of IL-18 production by IFN gamma and PGE2 in mouse microglial cells: involvement of NF-kB pathway in the regulatory processes. *Immunol Lett* 77(2):79-85

Suzumura, A., Sawada, M., Ito, Y., Marunouchi, T., (1994). Interleukin-4 induces proliferation and activation of microglia but suppresses their induction of class II major histocompatibility complex antigen expression. *J Neuroimmunol* 53(2):209-218

Tulp, A., Verwoerd, D., Dobberstein, B., Ploegh, H.L., and Pieters, J., (1994). Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature* 369(6476):120-126

Ulvestad, E., Williams, K., Vedeler, C., Antel, J., Nyland, H., Mork, S., Matre, R., (1994). Reactive microglia in multiple sclerosis lesions have an increased expression of receptors for the Fc part of IgG. *J Neurol Sci* 121(2):125-131

Unanue, E.R., (1984). Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu Rev Immunol* 2:395-428

van Ham, S.M., Gruneberg, U., Malcherek, G., Broker, I., Melms, A., and Trowsdale, J., (1996). Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM edits peptides presented by HLA-DR according to their ligand binding motifs. *J Exp Med* 184(5):2019-2024

van Ham, S.M., van Lith, M., Lillemeier, B.F., Tjin, E.P., Gruneberg, U., Rahman, D., (2000). Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. *J Exp Med* 191(7):1127-1136

- van Rossum, D., and Hanisch, U.K., (2004). Microglia. *Metab Brain Dis* 19(3-4):393-441
- Walker, D.G., and Lue, L.F., (2005). Investigations with cultured human microglia on pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *J Neurosci Res* 81(3):412-425
- Weber, D.A., Evavold, B.D., and Jensen, P.E., (1996). Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science* 274(5287):618-620
- West, M.A., Lucocq, J.M., and Watts, C., (1994). Antigen processing and class II MHC peptide-loading compartments in human B-lymphoblastoid cells. *Nature* 369(6476):147-151
- Williams, K., Dooley, N., Ulvestad, E., Becher, B. and Antel, J. P., (1996). IL-10 production by adult human derived microglial cells. *Neurochem Int* 29(1):55-64