



ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ (ΠΜ-ΜΒΒ) ΤΜΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΚΡΗΤΗΣ, ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΤΕ

Μεταπτυχιακή Διατριβή :

**Ο διττός ρόλος της σταθερής αλυσίδας: «HLA-DR μεταφορέας
και υποδοχέας του MIF»**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Γεωργούλη Μαριγούλα Μιρέλλα

Υπεύθυνη Καθηγήτρια: Ειρήνη Αθανασάκη

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012



JOINT GRADUATE PROGRAMME IN MOLECULAR BIOLOGY AND
BIOMEDICINE DEPARTMENTS OF BIOLOGY AND MEDICINE, UNIVERSITY OF CRETE AND
INSITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY-FORTH

Master thesis:

**The dual role of invariant chain: «HLA-DR transporter and MIF
receptor»**

LABORATORY OF IMMUNOLOGY

Georgouli Marigoula Mirella

Supervisor: Professor Irene Athanassakis

Herakleion 2012

Ευχαριστίες...

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανοσοβιολογίας του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας κ. Ειρήνης Αθανασάκη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Αθανασάκη για την καθοδήγηση αλλά και τις πολύτιμες συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής εργασίας μου. Νιώθω όμως την ανάγκη να την ευχαριστήσω κυρίως για την αμέριστη υποστήριξη που συνετέλεσε στο να ενισχύσει το ενδιαφέρον μου στον τομέα της Ανοσοβιολογίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τους καθηγητές κ. Α. Γραβάνη και κ. Τ. Οικονόμου για το ενδιαφέρον τους και το χρόνο που διέθεσαν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα εργαστήρια Βιοαισθητήρων , Μοριακής Εντομολογίας και την μονάδα Κυτταροκαλλιεργειών του IMBB (κ. Γ. Βρέντζο) καθώς συνετέλεσαν στη διεξαγωγή των πειραμάτων μου. Ένα θερμό ευχαριστώ στα μέλη του εργαστηρίου της Κυτταρικής Βιολογίας και στον καθηγητή κ. Γ. Χαλεπάκη για τη βοήθεια που μου προσέφεραν όλο το διάστημα της εργασίας μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ανοσοβιολογίας Καλογνώμου Μαρία, Κυβελίδου Χριστιάνα, Ζέρβα Ιωάννα, Μπακέλα Κατερίνα, Βαρδάκη Κατερίνα, Ανθούση Αμαλία, Παπαδογιάννη Γεωργία και Σκόρδο Γιάννη για το ευχάριστο κλίμα. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στα παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου που με στήριζαν με κάθε τρόπο σε όλη τη διάρκεια της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένεια μου και τους φίλους μου Ανθή, Ιωάννα, Βίβιαν και Ευθύμη για την συμπαράσταση τους σε αυτήν την προσπάθεια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 ΤΟ ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ.....	7
1.1.1 ΤΑΞΗΣ II ΜΟΡΙΑ ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ	7
1.1.2 ΤΟ ΕΝΔΟΣΩΜΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ	8
1.1.3 ΜΗ ΚΛΑΣΙΚΑ ΤΑΞΗΣ ΜΟΡΙΑ ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ... 9	9
1.1.4 ΤΑΞΗΣ II ΜΟΡΙΑ ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ.....	10
1.2 Η ΣΤΑΘΕΡΗ ΑΛΥΣΙΔΑ (Ii)	12
1.2.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ Ii ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΓΟΝΟΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ	12
1.2.2 ΠΡΟΣΘΕΤΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΗΣ Ii(CD74)	13
1.3.Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ (MIF) ΚΑΙ ΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΟΥ.....	16
1.3.1 Ο MIF ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΑΠΟΚΡΙΣΗ	16
1.3.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ MIF ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	17
1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	18
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
2.1 Χειρισμός κυτταροκαλλιιεργειών.....	19
2.1.1 Κυτταρικές σειρές.....	19
2.1.2 Πάγωμα κυττάρων.....	20
2.1.3 Ξεπάγωμα κυττάρων	20
2.2 Αντισώματα	21
2.3 Εσωτερικός και εξωτερικός φθορισμός	21
2.4 Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική δοκιμή (ELISA)	22
2.5 RT-PCR	23
2.5.1 Απομόνωση ολικού RNA	24
2.5.2 RT-PCR.....	25
2.5.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	26

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	19
3.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ HLA-DR, CD74, MIF ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	28
3.1.1 K562 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ.....	28
3.1.1.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ CD74 ΜΕ RT-PCR	33
3.1.2 HL-60 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ.....	34
3.1.3 RAJI ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ.....	36
3.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ HLA-DR, HLA-DM, HLA-DO, CD74 ΚΑΙ MIF ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	38
3.2.1 ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΠΡΟ-Β ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	38
3.2.2 HeLa ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ.....	40
3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ IFN- γ ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ K562 ΚΑΙ HL-60	42
3.3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ IFN-γ ΣΤΑ K562 ΚΥΤΤΑΡΑ.....	43
3.3.1.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ IFN-γ ΣΤΑ K562-ΣΙΙΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	45
3.3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ IFN-γ ΣΤΑ HL-60 ΚΥΤΤΑΡΑ.....	47
3.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΟΚΙΝΗΣ MIF ΣΕ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	49
3.4.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ MIF ΣΕ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΤΩΝ K562 ΚΑΙ K562-ΣΙΙΤΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΑΓΩΓΗ IFN-γ	49
3.4.1.1 ΈΚΚΡΙΣΗΤΟΥ MIF ΣΕ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΑΠΟ K562 ΚΑΙ K562-ΣΙΙΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ IFN-γ.....	50
3.4.2 HL-60 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ.....	51
3.4.3 RAJI ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ.....	52
3.4.4 HeLa ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ.....	53
3.4.5 ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΠΡΟ-Β ΛΕΥΧΑΜΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	54
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	57
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63

Η σταθερή αλυσίδα (Ii) ή CD74 είναι μία τύπου II μη-πολυμορφική διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ο ρόλος της αρχικά ήταν συνυφασμένος με τη διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης χάρη στη δράση της ως μοριακή σαπερόνη των τάξης II μορίων του Κ.Σ.Ι. Γνωρίζουμε πλέον ότι στην εξωκυττάρια περιοχή του CD74 προσδέεται ο παράγοντας αναστολής της μετανάστευσης των μακροφάγων, MIF γεγονός που αναδεικνύει τον CD74 ως υψηλής συγγένειας υποδοχέα για την κυτοκίνη αυτή. Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να ορίσουμε το ρόλο των δύο αυτών μορίων στο μηχανισμό διαφυγής της ανοσοεπιτήρησης, χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών λευχαιμιών. Για το σκοπό αυτό μελετήσαμε το προφίλ έκφρασης των τάξης II μορίων HLA-DR, DM, DO και του CD74 και MIF στα κυτταρικά μοντέλα λευχαιμιών HL-60, Raji, K562. Η μελέτη των πρωτογενών προ-B λευχαιμικών κυττάρων ενίσχυσε τα αποτελέσματά μας ενώ η κυτταρική σειρά HeLa χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας, εξαιτίας της έλλειψης ενδογενούς έκφρασης του CD74. Με πειράματα κυτταρομετρίας ροής μετρήσαμε τα ποσοστά των μορίων σε όλες τις κυτταρικές σειρές ενώ παράλληλα εξετάστηκε η επαγόμενη έκφραση των τάξης II μορίων από IFN- γ στα K562 και HL-60 κύτταρα. Η έκκριση της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης MIF εκτιμήθηκε με πειράματα Elisa. Προς την κατεύθυνση της διαλεύκανσης του προφίλ έκκρισης της, μελετήσαμε την πιθανότητα ο MIF να εξωκυττώνεται με τη βοήθεια των εξωσωμάτων. Η μελέτη για πρώτη φορά των επιπέδων έκφρασης του MIF σε λευχαιμικά κύτταρα αλλά και του ενδοκυτταρικού και μεμβρανικού CD74 σε μία πλειάδα κυτταρικών μοντέλων φανέρωσαν μία πιθανή συνεργατική αλληλεπίδραση των δύο μορίων που βοηθά τη διαφυγή της ανοσοεπιτήρησης. Μελλοντικές μελέτες θα εξακριβώσουν το ρόλο του συμπλόκου στο ενδοσωμικό μονοπάτι και την επίδραση του στην αντιγονοπαρουσίαση μέσω τάξης II μορίων.

Λέξεις-κλειδιά: σταθερή αλυσίδα, MIF, λευχαιμικά κύτταρα, διαφυγή ανοσοεπιτήρησης

Abstract

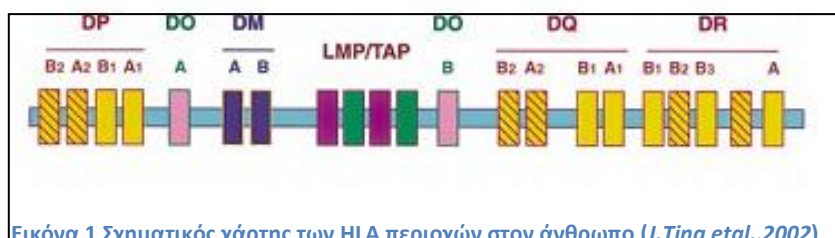
Invariant chain (Ii) or CD74 is a non-polymorphic glycoprotein whose initial role in antigen presentation was recognized two decades ago. Apart from its role as a chaperone dedicated to MHC-II molecules, CD74 is known to be a high-affinity receptor for Macrophage Migration Inhibitory (MIF). The aim of the present study was to define the roles of CD74 and MIF in the immune surveillance escape process. To this direction, the leukemia cell lines HL-60, Raji, K562 as well as primary pre-B leukemic cells were used, whereas HeLa cells, lacking MHC-II molecules and Ii, were used as control cells. In order to clarify MIF's involvement in the endosomal pathway, we examined the secretion profile of MIF. Flow cytometry analysis was used to define expression of HLA-DR, CD74, HLA-DM, HLA-DO and MIF in HL-60, Raji, K562, HeLa and primary leukemic cells. Isolated mRNAs were submitted to RT-PCR experiments using CD74 specific primers. Regulation of CD74 and MIF expression by IFN- γ , used as inducer, was tested in K562 and HL-60 cell lines by flow cytometry analysis. The secretion of MIF in a free or exosome-engaged form was evaluated by Elisa experiments. Flow cytometry analysis detected high levels of expression of MIF and CD74 at the cell membrane of all leukemic cells tested, whereas IFN- γ increased MIF expression and induced secretion of MIF in exosome-engaged forms. The unexpected expression of MIF in leukemia cells and the detection of CD74 both intracellularly and membrane bound provides a novel mechanism for escape from immune surveillance. CD74 seemed to possess a key-role in this pathway and react with MIF synergistically. Future studies determining the precise role of the CD74-MIF complex will allow understanding the involvement of MIF in the antigen presentation process.

Key words: MIF, Invariant chain, leukemic cells, immune surveillance

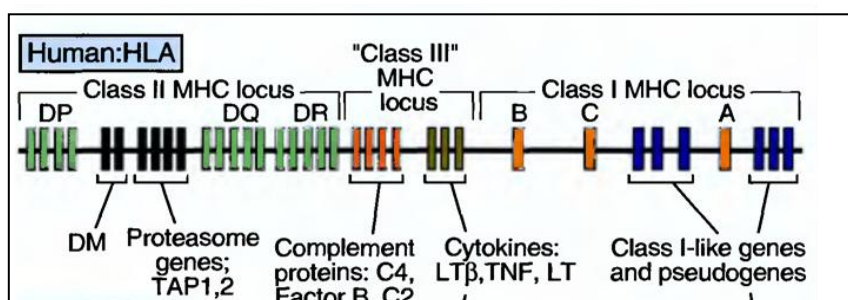
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΤΟ ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

Το μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας (**Major Histocompatibility Complex, MHC**) αφορά την ομάδα των στενά συνδεδεμένων γονιδίων (Εικόνες 1 &2), τα προϊόντα της οποίας σχετίζονται με την κυτταρική αναγνώριση και με τη διάκριση των αυτο- και άλλο- αντιγόνων. Εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 6 στον άνθρωπο και αναφέρονται ως ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (**Human Leukocyte Antigen, HLA**) (*Jean Dausset, βραβείο Νόμπελ 1981*). Τα αντιγόνα αυτά ονομάστηκαν έτσι, επειδή, αναφέρονται στις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια του MHC και εκφράζονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των λευκοκυττάρων.



Εικόνα 1 Σχηματικός χάρτης των HLA περιοχών στον άνθρωπο (*J.Ting et al., 2002*)



Εικόνα 2 Τα γονίδια του HLA γενετικού τόπου (*Abul.K Abbas and Andrew H.Lichtman*

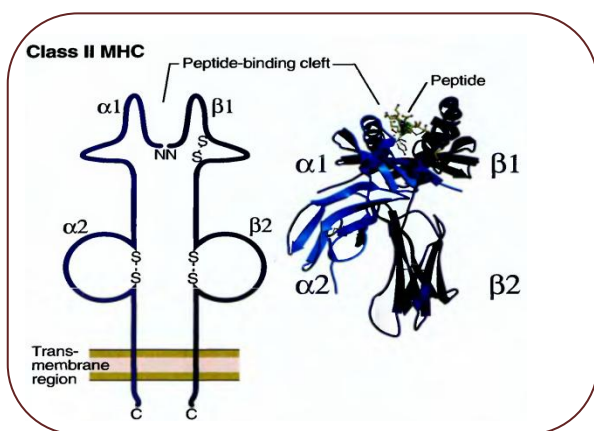
Basic Immunology Saunders)

1.1.1 ΤΑΞΗΣ II ΜΟΡΙΑ ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

Τα τάξης II μόρια του MHC είναι διαμεμβρανικά μόρια και διαθέτουν μία αύλακα, όπου μπορούν να προσδέσουν ένα γραμμικό πεπτίδιο μεγέθους τουλάχιστον 12-15 αμινοξικών καταλοίπων. Κατά αυτό τον τρόπο φορτώνονται πεπτίδια στα MHC II μόρια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs) και κατόπιν μεταφέρονται στην κυτταρική επιφάνεια για αντιγονοπαρουσίαση στους T-βοηθούς (CD4+) μέσω του TCR υποδοχέα των T κυττάρων και άλλων συνδιεγερτικών μορίων που σκοπό έχουν να ενδυναμώσουν τη σύνδεση του TCR με MHC II/φορτωμένο πεπτίδιο.

Πρόκειται για μόρια συνοδούς που συμμετέχουν στην προσκόλληση και στην κυτταρική σηματοδότηση (LFA-1 αναγνωρίζει το ICAM-1 ,ο CD28 αναγνωρίζει τα B7-1/B7-2).

Κάθε μόριο MHC II(Εικόνα 3) αποτελείται από 2 αλυσίδες, τις α και β των οποίων οι αμινο-τελικές επικράτειες: $\alpha 1$ και $\beta 1$ επικράτειες περιέχουν πολυμορφικά κατάλοιπα και διαμορφώνουν την πεπτιδική αύλακα. Η αύλακα αυτή που σχηματίζεται, αποτελείται από δύο πλευρικές α -έλικες στο κάτω μέρος β -πτυχωτών - και ακολουθούνται από Ig-τύπου επικράτειες ($\alpha 2$ και $\beta 2$),διαμεμβρανικές περιοχές και κοντές κυτταροπλασματικές ουρές (Stern et al.,1994). Για να επιτιχύνουν σταθερότητα τα MHC II $\alpha\beta$ διμερή πρέπει να "φιλοξενήσουν" ένα τρίτο μόριο-συνδέτη, που είναι είτε το κατάλληλο πεπτιδίδιο που οδηγεί σε αντιγονοπαρουσίαση του σε T-βοηθούς,όπως προαναφέρθηκε, είτε τη σταθερή αλυσίδα (Invariant chain,Ii), (Vogt et al.,1995 και Stumptner et al.,1997). Η αύλακα των MHC II μορίων είναι ανοιχτή και από τα δύο άκρα (Brown et al., 1993) ,επιτρέποντας έτσι την "παρέλαση" διάφορων πεπτιδίων. Ο ανοιχτός σχηματισμός της αύλακας πρόσδεσης πιθανότατα είναι συνέπεια συν-εξέλιξης των MHC II μορίων και της Ii (CD74) , καθώς η πρόσδεση του ετεροδιμερούς MHC II $\alpha\beta$ μέσω της περιοχής CLIP (το τελευταίο λειτουργικό κομμάτι της Ii που προκύπτει από την πρωτεολυτική της επεξεργασία στα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα),είναι βασικής σημασίας για το ρόλο της Ii ως συνοδό μόριο (chaperone) (Zhong et al.,1996).



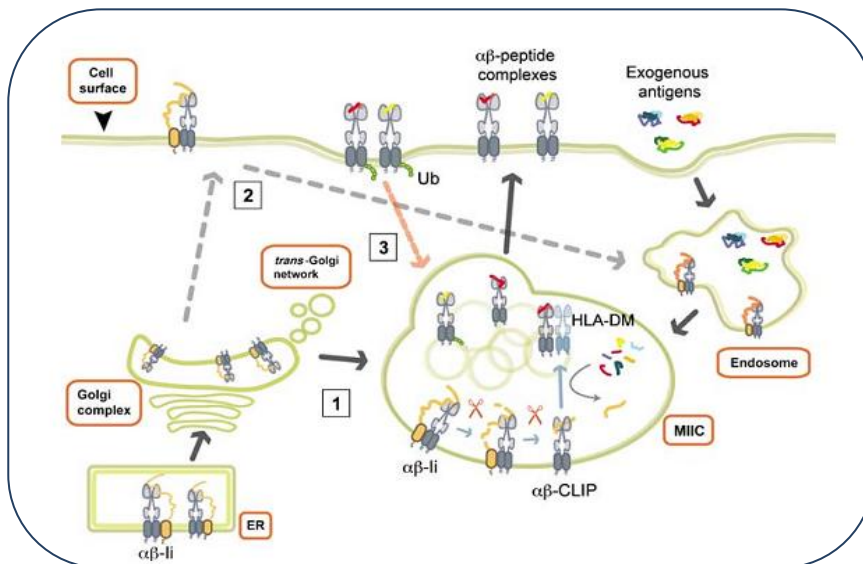
Εικόνα 3 Η δομή των MHC II μορίων

Τα κλασικά τάξης II μόρια του MHC κωδικοποιούνται από τους γονιδιακούς τόπους HLA-DR,DP,DQ στον άνθρωπο και εμφανίζουν έντονο πολυμορφισμό και στις δύο αλυσίδες (α,β), όπου η α αλυσίδα από το ένα αλληλόμορφο φαίνεται να συνδέεται με τη β αλυσίδα του άλλου αλληλομόρφου.

1.1.2 ΤΟ ΕΝΔΟΣΩΜΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ

Η επεξεργασία (και ακολούθως η παρουσίαση ενός εξωγενούς αντιγόνου από τα τάξης II μόρια του MHC) διαμέσου του μονοπατιού ενδοκύττωσης του αντιγόνου αποτελεί το ένα σκέλος της αντιγονοπαρουσίασης. Το άλλο απαραίτητο μονοπάτι είναι το ενδοσωμικό διαμέσου του οποίου μετακινούνται τα τάξης II μόρια από το

ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου συντίθενται, στο σύμπλεγμα Golgi και τέλος στα MIICs κυστίδια, όπου συναντούν τα ενδοκυττωμένα και επεξεργασμένα αντιγονικά πεπτίδια. Η βιοσυνθετική οδός των τάξης MHC II μορίων ξεκινά με τη συναρμολόγηση τους στο ΕΔ, υπό τη συντονισμένη δράση των σαπερονών καλνεξίνη και Ii. Η Ii είναι εξειδικευμένη πρωτεΐνη για τα MHC II μόρια και λόγω της μη πολυμορφικής της ιδιότητας μπορεί να συνδέεται γρήγορα με όλα τα εναλλακτικά αλληλόμορφα των MHC II (Cresswell et al.,1996). Η επακόλουθη πρόσδεση της καλνεξίνης και της Ii στις νέο-συντιθέμενες α και β αλυσίδες διευκολύνει τη συναρμολόγηση του ετεροτριμερούς $\alpha\beta Ii$. Στη συνέχεια, ακολουθεί η αποσύνδεση της καλνεξίνης και τελικώς ο σχηματισμός του συμπλόκου $(\alpha\beta Ii)_3$ (nonamer). Η Ii προστατεύει τα διμερή $\alpha\beta$ από τη πρόωρη πρόσδεση πεπτιδίων και βοηθά στην αναδίπλωση του ετεροδιμερούς χάρη στην ιδιότητα της ως σαπερόνη. Έτσι, το $(\alpha\beta Ii)_3$ σύμπλοκο μεταφέρεται διαμέσου του Golgi στο trans- Golgi δίκτυο. Ακολουθεί η διαλογή στα ώριμα ενδοσωμικά διαμερίσματα με λυσοσωμικά χαρακτηριστικά, τα MIICs που περιέχουν μερικώς διασπασμένη την πρωτεΐνη που προέρχεται από την ενδοκύττωση του εξωγενούς αντιγόνου. Η αποικοδόμηση της Ii αφήνει το CLIP (class II-associated invariant chain peptide) να βρίσκεται πλέον συνδεδεμένο στην πεπτιδική αύλακα, υπό την επιρροή του μη κλασικού τάξης II μορίου HLA-DM. Ο ρόλος του DM είναι η επιτυχής αφαίρεση του CLIP με σκοπό την πρόσδεση του πεπτιδίου στην αύλακα (Morris et al.,1994).



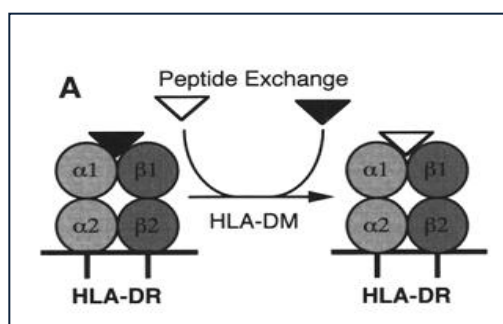
Εικόνα 4 Αντιγονοπαρουσίαση μέσω τάξης II μορίων (Rocha,2008)

1.1.3 ΜΗ ΚΛΑΣΙΚΑ ΤΑΞΗΣ ΜΟΡΙΑ ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

Εκτός από τα κλασικά τάξης II μόρια του MHC, υπάρχουν άλλα δύο μόρια που λαμβάνουν καθοριστικό ρόλο στη αντιγονοπαρουσίαση και ανήκουν στα μη-

κλασικά MHC II μόρια. Πρόκειται για τα HLA-DM(DM) και HLA-DO (DO) τα οποία εμφανίζουν περιορισμένο πολυμορφισμό.

Το DM (*Kelly et al.,1991*) κωδικοποιείται από τους γονιδιακούς τόπους DMα και DMβ αλλά δεν μπορεί να προσδέσει πεπτίδια (*Mosyak et al.,1998*).Το DM συσσωρεύεται στα ώριμα ενδοσωμικά/λυσosomalικά διαμερίσματα, όπου συνεντοπίζεται με τα HLA-DR μόρια (*Sanderson et al.,1994;Pierre et al.,1996,*) και δρα σαν πραγματικός καταλύτης (*Vogt et al.,1998*), αφαιρώντας το CLIP(*Sloan et al.,1995*) (Εικόνα 5). Επίσης ,το DM κατέχει και ρόλο σαπερόνης (*Kropshofer et al.,1997*) αφού με την πρόσδεση του σε άδεια τάξης II μόρια επιτρέπει τη διατήρηση της αναδίπλωσης των μορίων. Η πιο πρόσφατη δυνατότητα που έχει βρεθεί για το DM είναι η δράση του ως "peptide editor"(*Sloan et al.,1995*), δηλαδή παίρνει μέρος στην επιλογή πεπτιδίου ανταλλάσσοντας τα χαμηλής σταθερότητας πεπτίδια με εκείνα που εμφανίζουν υψηλή σταθερότητα πρόσδεσης (*Kropshofer et al.,1996*).



Εικόνα 5 Η επίδραση της πρόσδεσης του HLA-DM στα MHCII μόρια (*Jensen et al.,1999*)

Το DO κωδικοποιείται από τους γονιδιακούς τόπους DOα και DOβ και όπως το DM, δεν προσδέει πεπτίδια (*Kropshofer et al.,1999*) και απαιτείται η πρόσδεση του με DM για να μπορέσει να αφήσει το ΕΔ (*Liljedahl et al.,1996*).Εμφανίζεται κυρίως σε Β λεμφοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα του θύμου, δενδρτικά και τροφοβλάστες. Συνεντοπίζεται ενδοκυτταρικά με το DM στα MIICs κυστίδια. Η ισχυρή αυτή σύνδεση αναστέλει τη δράση του DM αφού εμποδίζει την απελευθέρωση του CLIP από το τάξης II μόριο και άρα μειώνει την ικανότητα αντιγονοπαρουσίασης (*Ham et al.,2000*).Το DO, συνεπώς, φαίνεται να δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής της δράσης του DM με έναν pH-εξαρτώμενο τρόπο αφού επιτρέπει τη σύνδεση πεπτιδίου-τάξης II στο pH όπου διαθέτουν τα MIIC κυστίδια, ενώ εμποδίζει την πρόωμη σύνδεση στα λυσοσωμικά/ενδοσωμικά διαμερίσματα όπου pH είναι μεγαλύτερο.

1.1.4 ΤΑΞΗΣ II ΜΟΡΙΑ ΤΟΥ ΜΕΙΖΟΝΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ

Οι όγκοι του ανοσοποιητικού συστήματος ταξινομούνται σε λεμφώματα και λευχαιμίες. Τα λεμφώματα πολλαπλασιάζονται ως συμπαγείς όγκοι μέσα σε λεμφικούς ιστούς όπως ο μυελός των οστών, οι λεμφαδένες και ο θύμος αδένας. Μεταξύ των λεμφωμάτων κατατάσσονται και αυτά του Hodgkin και μη- Hodgkin. Οι

λευχαιμίες πολλαπλασιάζονται υπό μορφή απλών κυτταρικών πληθυσμών που εντοπίζονται σε αυξημένους αριθμούς στο αίμα και στην λέμφο. Υπάρχουν δύο κατηγορίες λευχαιμιών: οι μυελογενείς και οι λεμφοβλαστικές και αφορούν τους αντίστοιχους κυτταρικούς τύπους/γενεαλογίες.

Γνωρίζοντας ότι οι περισσότεροι όγκοι δεν εκφράζουν τάξης II μόρια του MHC, το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει πλέον στραφεί σε αυτά τα μόρια με σκοπό την άνοσο-θεραπεία του καρκίνου (*Walter et al., 2000*). Η μείωση της έκφρασης των τάξης II στα καρκινικά κύτταρα είναι ένας τρόπος που χρησιμοποιούν με στόχο τη διαφυγή της άνοσο-επιτήρησης. Παρότι κάποια καρκινικά κύτταρα εκφράζουν τάξης II μόρια του MHC, συνήθως αυξάνεται σε αυτά η έκφραση της li και έτσι αποτρέπεται η αντιγονοπαρουσίαση των ενδογενών καρκινικών αντιγόνων. Στο Β-λέμφωμα, ενώ τα κύτταρα εκφράζουν τάξης II μόρια και li, δεν είναι ικανά να αντιγονοπαρουσιάσουν τα καρκινικά πεπτίδια άμεσα και έτσι τα κύτταρα αυτά θεωρούνται τάξης II αρνητικά (*Koch, et al., 1984*). Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό που παρατηρείται είναι η απουσία έκφρασης όχι μόνο των τάξης II μορίων αλλά και όλων των απαραίτητων συνοδών μορίων για την αντιγονοπαρουσίαση όπως το DM και η li (*Siegrist et al., 1995*).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, υψηλά επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στους καρκίνους του μαστού και του γαστρεντερικού σωλήνα και συχνά αυτό συνδέεται με την καλύτερη πρόγνωση αναδεικνύοντας έτσι τα CD4+T κύτταρα να κατέχουν άνοσο-προσατευτικό ρόλο ενάντια στον καρκίνο (*Sato et al., 2004*).

Γνωρίζουμε ότι η γονιδιακή έκφραση των τάξης II μορίων ρυθμίζεται κυρίως σε μεταγραφικό επίπεδο. Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες είναι ο CIITA (class II transactivator) που δρα σαν συν-ενεργοποιητής αλληλεπιδρώντας με άλλα στοιχεία στο ενισχυόσωμα από ενεργοποιητές των τάξης II. Εκτός από αυτόν, όλοι οι υπόλοιποι μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν στο MHCII μεταγραφόσωμα εκφράζονται διαρκώς μέσα στα κύτταρα. Συνεπώς η επαγωγή των τάξης II μορίων εξαρτάται αποκλειστικά από την παρουσία ή όχι του CIITA. Ο CIITA εκφράζεται διαρκώς μόνο στα APCs κύτταρα, αλλά μπορεί να επαχθεί από IFN- γ σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, η γονιδιακή έκφραση των άλλων συνοδών μορίων που εμπλέκονται στην αντιγονοπαρουσίαση, η σταθερή αλυσίδα και το HLA-DM μόριο, παρότι δεν εξαρτάται αποκλειστικά από τον CIITA, αυξάνεται έντονα παρουσία του.

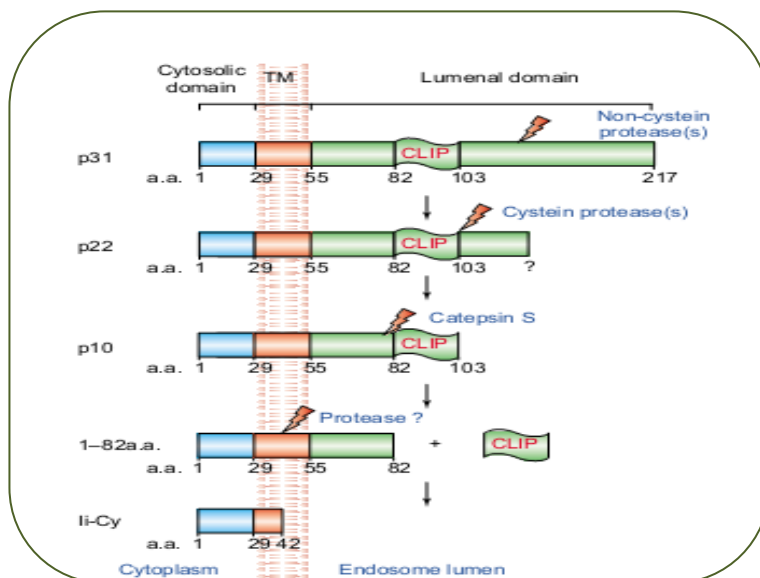
Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος της IFN- γ , ως μία από τις κυτοκίνες που παράγουν τα T_H1(κατηγορία των CD4+T κυττάρων) παίζοντας σημαντικό ρόλο στην άνοσο-απόκριση ενάντια των καρκινικών κυττάρων. Έχει την ικανότητα της (α) απευθείας κυτταροτοξικής δράσης στα καρκινικά κύτταρα, μεσολαβούμενη από οξειδωτικά παράγωγα και μονοξειδίου του αζώτου (β) αύξησης της έκφρασης των τάξης II μορίων και συνεπώς αυξημένη άνοσο-αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων και

άρα περιορισμός τους, (γ) τροποποίησης την οδού επεξεργασίας των ενδογενών αντιγόνων και (δ) εισαγωγής αναστολέων της αγγειογένεσης στα κύτταρα (Gerloni et al.,2005; Dighe et al.,1994).

1.2 Η ΣΤΑΘΕΡΗ ΑΛΥΣΙΔΑ (Ii)

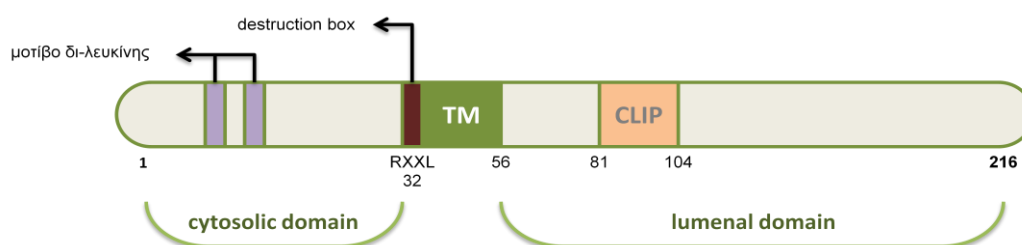
1.2.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ Ii ΑΝΤΙΓΟΝΟΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

Ο ρόλος της Ii στην αντιγονοπαρουσίαση, όπως ήδη αναφέρθηκε είναι καταλυτικός. Ανήκει στις δια-μεμβρανικές τύπου II γλυκοπρωτεΐνες, (Wraight et al.,1990) και είναι μη-πολυμορφική. Διαθέτει μια μικρή κυτταροπλασματική επικράτεια στο αμινικό της άκρο, μια μόνο δια-μεμβρανική επικράτεια, το CLIP τμήμα που αναφέρθηκε πριν και ένα πρότυπο για τον τριμερισμό στο καρβοξυτελικό άκρο (Εικόνα 7). Στο κυτταροπλασματικό κομμάτι περιέχεται μοτίβο τύπου δι-λευκίνης που είναι απαραίτητο για την μετακίνηση στα ενδοσώματα αλλά συμβάλλει και στην ανακύκλωση των μορίων από την πλασματική μεμβράνη (Bakke and Dobberstein,1990). Ο ρόλος της σταθερής αλυσίδας είναι πολλαπλός. Καταρχάς, σταθεροποιεί τη δομή του ετεροδιμερούς αβ και βοηθά τον αρχικό διμερισμό των α,β αλυσίδων των τάξης II. Επίσης, βοηθά την μεταφορά του αβ στο ΕΔ/Golgi αλλά και τη στόχευση/διαμονή του ετεροδιμερούς στα ενδοσώματα. Τέλος, εμποδίζει την πρόωπη πρόσδεση του πεπτιδίου στο ετεροδιμερές και λαμβάνει μέρος στη διαδικασία επιλογής του πεπτιδίου που παρουσιάζεται στα τάξης II. Έχει βρεθεί ότι τα τάξης II μόρια που βρίσκονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων δημιουργούν σύμπλοκο με την CD74(Ii) πρωτεΐνη, η οποία όμως έχει τροποποιηθεί έχοντας μία ομάδα θειικού άλατος (CD74-CS) (Sant et al.,1985).



Εικόνα 6 Επεξεργασία της Ii. (Matza et al.,2003)

Κατά τη μετακίνηση μέσω του μονοπατιού των ενδοσωμάτων η li σταδιακά διασπάται(Εικόνα 6) με τη βοήθεια διαφόρων πρωτεασών και κυρίως των εξειδικευμένων ενζύμων cathepsin S και L, καθώς φαίνεται να διακόπτεται η αντιγονοπαρουσίαση από τάξης II μόρια με την αναστολή της ενζυμικής τους δραστηριότητας (Riese et al.,1998; Riese et al., 1996). Το εναλλακτικό μάτισμα και η παρουσία δύο διαφορετικών κωδικονίων έναρξης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή τεσσάρων(p33, p35, p41 και p43)απομακρυσμένων προϊόντων από το ανθρώπινο γονίδιο της li, (Strubin et al.,1986). Η p35 οδηγεί κυρίως τα τάξης II μόρια απευθείας στα MIIC, ενώ η p33 τα κατευθύνει στα ίδια διαμερίσματα μέσω ενδιάμεσης μεταφοράς τους στην πλασματική μεμβράνη (Howard et al.,1999;Petra et al.,1996). Έχει βρεθεί (Warmerdam et al.,1996; Arunachalam et al.,1994) ότι η lip33 μπορεί να μεταφέρεται έξω από το ΕΔ στα Β λεμφοκύτταρα και στα HeLa κύτταρα.

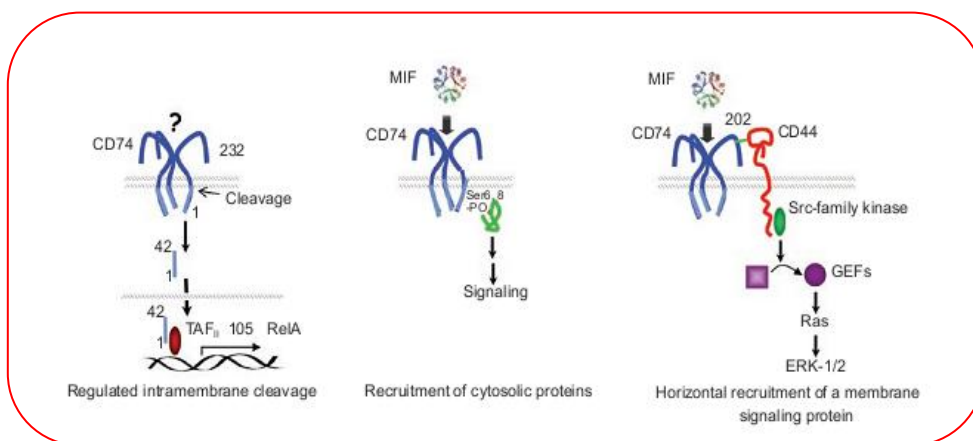


Εικόνα 7 Οι επικράτειες της σταθερής αλυσίδας (Ii)

1.2.2 ΠΡΟΣΘΕΤΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΗΣ Ii(CD74)

Η διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη CD74/Ii πέρα από το ρόλο της ως MHCII μοριακή σαπερόνη, έχει βρεθεί ότι έχει ρόλο σηματοδοτικού μορίου-συνοδού. Βρέθηκε να αλληλεπιδρά με το CD44 κατά τη διάρκεια Τ-μεσολαβούμενων άνοσο-αποκρίσεων (Naujokas et al.,1993). Ένας επιπρόσθετος ρόλος που αφορά τη λειτουργία της σε σηματοδοτικά μονοπάτια έχει επίσης περιγραφεί τα τελευταία χρόνια και αφορά την ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων με τελικό στόχο την ενεργοποίηση της μεταγραφής μέσω του p65/RelA ομοδιμερούς, μέλος της οικογένειας του NF-κΒ καθώς και του συν-ενεργοποιητή του,TAI₁105,επιτρέποντας την ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων (Matza et al.,2003;Becker Herman et al.,2005). Η ενεργοποίηση αυτή του NF-κΒ μεσολαβείται από την ενδοκυτταρική περιοχή της Ii (CD74-ICD) (Εικόνα 8) (Matza et al.,2002),που απελευθερώνεται από την μεμβράνη (Matza et al., 2003; Starlets et al.,2006). Αυτή η διαδικασία της ενδομεμβρανικής αφαίρεσης ,ακολουθούμενη από μετατόπιση στον πυρήνα και τέλος μεταγραφική ενεργοποίηση χαρακτήρισε CD74 ως μέλος της οικογένειας των RIP πρωτεϊνών (regulated intramembrane cleavage) (Becker-Herman et al.,2005).

Γνωρίζοντας ότι τα νέο-συντιθέμενα μόρια CD74 στην επιφάνεια των κυττάρων (2-5% των κυτταρικών μορίων CD74) ακολουθούν γρήγορη υποβάθμιση στα ενδοσωμικά διαμερίσματα, αυτό που δείχτηκε σε Β-λεμφοκύτταρα από ασθενείς με Χρόνια Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (CLL), ήταν ότι μετά από ερέθισμα με αντι-CD74 αντίσωμα τα μόρια ενεργοποιούνταν στην επιφάνεια των κυττάρων, επάγοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι της Syk κινάσης-τυροσίνης και το μονοπάτι PI3K/Akt, φέροντας ως αποτέλεσμα την ενδομεμβρανική αφαίρεση, την απελευθέρωση CD74-ICD (42-44α.α απαραίτητα για τη διάσπαση του μορίου, *Matza et al., 2002*), τον πολλαπλασιασμό των Β-λεμφοκυττάρων, καθιστώντας τον CD74 ως υποδοχέα επιβίωσης των κυττάρων, αφού οδηγούσε σε αύξηση της μεταγραφής του αντι-αποπτωτικού BCL- χ_L (*Starlets et al., 2006*). Η εξωκυττάρια επικράτεια του CD74 έχει ήδη δείχθει, (*Leng et al., 2003*) ότι σε τάξης II-θετικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου των μονοκυττάρων/μακροφάγων και Β λεμφοκυττάρων, αποτελεί υποδοχέα του MIF (macrophage migration inhibitory factor) με σταθερά αποσύνδεσης $\sim 9 \times 10^{-9}$ Kd όπως δείχτηκε με BIAcore ανάλυση, στοιχείο που κατατάσσει το CD74 στον υποδοχέα με την υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης για την κυτοκίνη MIF. Ο CD74 απαιτείται για την μεσολαβούμενη από MIF φωσφορυλίωση της ERK-1/2, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την παραγωγή της προσταγλανδίνης E2 (PGE2) (*Leng et al., 2003*). Έχουν προταθεί τρία πιθανά μονοπάτια για τη σηματοδότηση του MIF μέσω του CD74-EXC (*Leng and Bukala, 2006*).

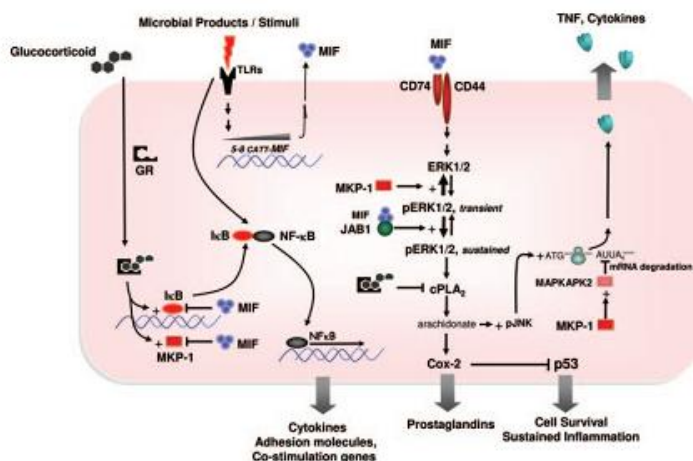


Εικόνα 8 Τα τρία πιθανά μονοπάτια σηματοδότησης μέσω MIF (*Leng and Bukala, 2006*)

Οι πρόσφατες μελέτες για τη CLL, έδειξαν ότι από το πρώιμο στάδιο της ασθένειας τα Β-κύτταρα εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα CD74-ICD, το οποίο προσδένεται με το φυσικό συνδέτη του, το MIF ο οποίος με τη σειρά ενεργοποιεί τον NF- κ B και οδηγεί σε έκκριση της IL-8. Η έκκριση αυτή της κυτοκίνης εισάγει την έκφραση του αντι-αποπτωτικού BCL- χ_L προωθώντας έτσι την κυτταρική επιβίωση και άρα επιτείνει την ασθένεια (*Binsky et al., 2007*). Στην προσπάθεια θεραπευτικής προσέγγισης της CLL στοχεύοντας στην πρόσδεση CD74/MIF, η ίδια ερευνητική ομάδα λίγα χρόνια μετά (*Binsky et al., 2010*) απέδειξαν ότι ο CD74 και τα γονίδια στόχοι του TAp63 και

VLA-4 διευκολύνουν την μετανάστευση των CLL κυττάρων προς το μυελό των οστών, όπου αλληλεπιδρώντας με το υποστηρικτικό περιβάλλον του διαφεύγουν της απόπτωσης. Αναδεικνύεται έτσι μία άλλη ιδιότητα του CD74/Ii ως υποδοχέα επιβίωσης των CLL κυττάρων (*Shachar and Haran,2011*). Αξιοσημείωτο είναι το ότι η πρόσδεση CD74/MIF είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση μέσω MIF του εξωκυττάρου μονοπατιού MAP κινασών, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την παραγωγή της προσταγλανδίνης E2 (*Leng et al.,2003*).

Επιπλέον, δείχτηκε, ότι η πρόσδεση CD74/MIF διευκολύνει την προσκόλληση του *Helicobacter pylori* σε επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντέρου(GECs) (*Beswick et al.,2005*) Η αύξηση της έκφρασης του CD74 κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από το Gram-αρνητικό Βακτήριο οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή της γαστρεντερικής οδού και σε καρκίνο του παχέος εντέρου (*Beswick and Reyes,2009*). Η αυξανόμενη έκφραση του CD74 στην επιφάνεια των GECs οφείλεται στην έκκριση της IL-8. Η κυτοκίνη αυτή είναι μέλος της οικογένειας των CXC χημειοκινών, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην αυτοανοσία, σε φλεγμονώδεις και λοιμώδεις ασθένειες (*Harada et al.,1994;Koch et al.,1992;Smyth et al.,1991*), ενώ προωθεί την καρκινογένεση και την αγγειογένεση (*Brat et al.,2005*). Έτσι, η IL-8 ενεργοποιείται μετά την πρόσδεση του MIF ή του *H. pylori* στον CD74 καθώς ενεργοποιείται έτσι ο NF-κB και το μονοπάτι των κινασών ERK-1/2. Ακόμη όμως και το ίδιο το MIF αυξάνει τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, συμπεριλαμβανομένου κυτοκινών όπως η IL-8 (*Calandra et al.,1995*) καθώς ο κύριος ρόλος της έκκρισης του είναι η απόκριση στη διέγερση των γλυκοκορτικοειδών (Εικόνα 9) αφού δρα σαν ισοζύγιο μεταξύ των αντι-φλεγμονωδών αποκρίσεων και των άνοσο-κατασταλτικών επιδράσεων των γλυκοκορτικοειδών στα κύτταρα του ανοσοποιητικού(*Calandra et al.,1997*).



Εικόνα 9 Σχηματικά η αναπαράσταση της ρύθμισης των ανοσοκατασταλτικών επιδράσεων των γλυκοκορτικοειδών (*Flaster et al.,2007*)

Τέλος, άλλος ένας ρόλος της I β που ενισχύει την ιδιότητα της ως μόριο-συνοδό αφορά την μεταφορά του CD70 μορίου, μέλος της οικογένειας TNF, σε MHCII διαμερίσματα στα δενδριτικά κύτταρα (Zwart *et al.*,2010).

1.3.0 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ (MIF) ΚΑΙ ΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΟΥ

1.3.1 Ο MIF ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΑΠΟΚΡΙΣΗ

Ο παράγοντας MIF είναι από τις πρώτες κυτοκίνες που ταυτοποιήθηκαν, στην προσπάθεια των επιστημόνων να βρουν μόρια-κλειδιά για την κύτταρο-μεσολαβούμενη ανοσία (George *et al.*,1962). Το 1966,"ξανά-ανακαλύφθηκε" ως ένα μόριο που εκκρίνεται όμοια με μια ορμόνη. Θεωρήθηκε λεμφοκίνη των T λεμφοκυττάρων που αναστέλλει την τυχαία μετακίνηση μονοκυττάρων/μακροφάγων, έξω από τα τριχοειδή αγγεία(capillary tubes) *in vitro*, (Bloom and Bennett,1966;David 1966). Παρότι, ο ρόλος που είχε αποδοθεί αρχικά στο μόριο αυτό ήταν η αναστολή της μετανάστευσης των μακροφάγων, (Bloom *et al.*,1966), πλέον έχει δειχτεί ότι λειτουργεί κυρίως ως ενεργοποιητής των μακροφάγων. Εκφράζεται από μια πλειάδα κυττάρων (μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά της περιφέρειας, B λεμφοκύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα) και σε αντίθεση με άλλες κυτοκίνες, ο MIF εκφράζεται συνεχώς και αποθηκεύεται σε ενδοκυτταρικές δεξαμενές (pools) και συνεπώς δεν απαιτείται *de novo* σύνθεση του πριν την έκκριση. Οι κύριες πηγές παραγωγής του MIF μετά από φλεγμονώδες ερέθισμα είναι η υπόφυση (κεντρικά) και τα μακροφάγα (περιφερικά) (Calandra *et al.*, 1994).Στον άνθρωπο υπάρχει μόνο ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για MIF (22q11.2) (Weiser *et al.*,1989) και δεν έχει ομολογία με καμία άλλη προ-φλεγμονώδη κυτοκίνη (Donn and Ray,2004).

Όσον αφορά του υποδοχείς της κυτοκίνης, εκτός από τον CD74 έχει δειχτεί ότι αποτελεί μόριο-συνδέτη για τους υποδοχείς χημοκινών CXCR2&CXCR4 (Bernhagen *et al.*,2007;Cho *et al.*, 2010). Επίσης η πρόσδεση CXCR4/ MIF ρυθμίζει την μετανάστευση των πρώιμων ενδοθηλιακών κυττάρων και την καρκινική μετάσταση, (Dessein *et al.*,2010; Simons *et al.*,2011).Αξίζει να σημειώσουμε ότι, ο CD74 μπορεί να συζευγνύεται με τον CXCR4 σε ένα ετερομερές σύμπλοκο υποδοχέων (Schwartz *et al.*,2009), αλλά είναι άγνωστο το αν αποτελούν οι δύο υποδοχείς μέρος ενός μεγαλύτερου σηματοδοτικού συμπλόκου ή εάν αλληλεπιδρούν ευθέως ή αμφίπλευρα (Noels *et al.*,2009).

Ενώ υπήρχαν ενδείξεις ότι το MIF ρυθμίζει την έμφυτη (Roger *et al.*,2001) και την προσαρμοστική ανοσία αυτό που την ενίσχυσε ήταν το ότι δείχτηκε πως η εξωγενής εισαγωγή *in vitro* (κυτταρικές σειρές ποντικών και αρουραίων) και *in vivo*(ποντικών),της ανασυνδυασμένη πρωτεΐνης του MIF (rMIF) ρυθμίζει την επιφανειακή έκφραση των τάξης II(I-A^k) μορίων καθώς και μορίων συν-διέγερσης

και προσκόλλησης αλλά και υποδοχείς και κυτοκίνες σε διάφορους τύπους κυττάρων (Stravitsky et al.,2002). Επίσης σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα (UC), δείχτηκε ότι μετά από ενεργοποίηση με MIF, τα δενδριτικά κύτταρα της περιφέρειας δρώντας ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, παράγουν φλεγμονώδεις κυτοκίνες(IL-1β,IL-8), (Murakami et al.,2002).

1.3.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ MIF ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Επιπρόσθετα με τις ανοσολογικές δράσεις του, ο MIF θεωρείται ότι παίζει βασικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση σύμφωνα με μια σειρά αναφορών. Την τελευταία δεκαετία έχει δείχτεί ότι κατέχει ρόλο-κλειδί στην ανάπτυξη του καρκίνου και την νέο-αγγειογένεση σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες σε λεμφοκύτταρα ποντικού (Chesney et al.,1999),κύτταρα ανθρώπινου μελανώματος (Shimizu et al.,1999),αλλά και σε καρκινικά του παχέος εντέρου (Takahashi et al.,1998;Ogawa et al.,2000). Σύμφωνα με τα παραπάνω, ο MIF αναδείχθηκε να έχει τη δυνατότητα να καταστέλλει τη δράση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53,προωθώντας έτσι την κυτταρική ανάπτυξη καθώς και την αναστολή της απόπτωσης (Hudson et al.,1999). Επίσης, δείχτηκε ότι ο MIF, με το να καταστέλλει την ενεργοποίηση του p53 και ως εκ τούτου την κυτταρική απόπτωση στις περιοχές χρόνιας φλεγμονής, ουσιαστικά καταστέλλει τη δράση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου ακριβώς στο σημείο που τα γενετικά κατεστραμμένα κύτταρα έχουν διαφύγει του ελέγχου. Αυτό φέρει ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ογκογένεση (Fingerle-Rowson et al.,2003). Αντιθέτως, όταν ο MIF έχει χαθεί, η επιβίωση και οι λειτουργίες των κυττάρων προχωρούν με p53- εξαρτώμενο τρόπο (Hudson et al.,1999;Mitchell et al.,2002). Κάτι που δείχτηκε *in vivo*, χρησιμοποιώντας το Εμ-Μγς μοντέλο λεμφώματος ποντικού, όπου η απώλεια του MIF καθυστέρωσε την έναρξη της ανάπτυξης Β- λεμφώματος, (Talos et al.,2005).Μία από τις τελευταίες μελέτες σχετικά με τη συνεισφορά του MIF στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, αφορά τη σίγιση (knockdown) της έκφρασης της πρωτεΐνης σε HeLa κύτταρα(μία σειρά που μελετήσαμε και εμείς) που είχε ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και *in vivo* την ανάπτυξη όγκων (Xiao et al.,2011).

1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι μέχρι τώρα μελέτες που αφορούν τον CD74 ως υποδοχέα του MIF δεν αποσαφηνίζουν την ενδεχόμενη εμπλοκή του MIF, ως φυσικό συνδέτη του CD74, στο ενδοσωμικό μονοπάτι και ακολούθως στη διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης. Παρότι ο MIF έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση και έχει μελετηθεί σε λευχαιμίες όπως η CLL, καμία μελέτη δεν έχει επικεντρωθεί σε πιθανή συμμετοχή του MIF(με ανταγωνιστικό ή όχι ρόλο) στην κύρια ιδιότητα του CD74/ li ως μοριακή σαπερόνη στη δημιουργία του συμπλόκου $(\alpha\beta li)_3$ στο ενδοσωμικό μονοπάτι. Η li γνωρίζουμε ότι είναι απαραίτητη για την επιτυχή αντιγονοπαρουσίαση και εφόσον η επιφανειακή της μορφή (CD74) αποτελεί τον υποδοχέα με την μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης για το MIF, θα ήταν αναμενόμενο πως η ενδοκυττάρωση του MIF/ CD74 θα σήμανε μεταβολή του ενδοσωμικού μονοπατιού και της διαδικασίας φόρτωσης του πεπτιδίου στα τάξης II μόρια προς παρουσίαση.

Τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να διαφύγουν της άνοσο-επιτήρησης δεν εκφράζουν τάξης II μόρια και άρα δεν αντιγονοπαρουσιάζουν. Λαμβάνοντας υπόψη τον κεντρικό ρόλο του CD74 στη διαδικασία αυτή, αλλά και το ρόλο του MIF σε μία πλειάδα ασθενειών συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου στόχος μας είναι η πληρέστερη κατανόηση του μηχανισμού της άνοσο-διαφυγής και εν προκειμένω της συνεισφοράς του συμπλόκου MIF/ CD74 σε αυτήν. Το γεγονός ότι ο CD74 (και τα γονίδια στόχοι του) αποτελεί πλέον μόριο στόχο για θεραπευτικές προσεγγίσεις των λευχαιμιών, μας προτρέπει στο να τον εντάξουμε στο γενικότερο πλαίσιο δράσης του. Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, η μελέτη των λευχαιμιών πρέπει να γίνει κάτω από την επίδραση όλων των παραγόντων και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του προφίλ έκφρασης του CD74 σε μία σειρά από λευχαιμικά κυτταρικά μοντέλα αλλά και πρωτογενή κύτταρα λαμβάνοντας υπόψη το διττό ρόλο του: ως υποδοχέα του MIF και ως μόριο-συνοδό του HLA-DR. Παράλληλα με την μελέτη του CD74 ενδοκυτταρικά και επιφανειακά ελέχθησαν μόρια απαραίτητα για την αντιγονοπαρουσίαση, όπως το DR, αλλά και τα μη-κλασικά τάξης II DM και DO καθώς και ο παράγοντας MIF ενδοκυτταρικά αλλά και εκκρινόμενος ως κυτοκίνη. Για το σκοπό αυτό, επιλέξαμε τις πολύ καλά χαρακτηρισμένες ανθρώπινες σειρές K562, HL-60, HeLa. Ως μάρτυρα ελέγχου των λευχαιμικών σειρών χρησιμοποιήσαμε την ανθρώπινη κυτταρική σειρά Raji ενώ τα πειράματα με πρωτογενή λευχαιμικά κύτταρα ισχυροποίησαν τα δεδομένα μας.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Χειρισμός κυτταροκαλλιιεργειών

Όλα τα κύτταρα αναπτυχθήκαν σε επωαστήρα κλίβανο Forma Scientific στους 37 °C παρουσία 5% CO₂. Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρίας GIBCO –BRL. Τα υλικά καλλιέργειας ήταν τα ακόλουθα:

RPMI 10% v/v FBS(GIBCO):

- 440 ml 440ml RPMI 1x
- 5ml L-Glutamine
- 5 ml Penicillin/Streptomycin(10⁴ U/ml)
- 50ml FBS (Fetal bovine serum)

DMEM 10% v/v FBS(GIBCO):

- 50 ml DMEM 10x
- 400 ml ddH₂O
- 15 ml Sodium Bicarbonate
- 7,5% solution (GIBCO)
- 5 ml L-Glutamine
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (10⁴ U/ml)
- 50 ml FBS(Fetal bovine serum)

Ακολούθως τα θρεπτικά φιλτράρονται και αφού κλειστούν με Parafilm φυλάσσονται στους 4°C και χρησιμοποιούνται πάντοτε σε στείρες συνθήκες. Τα κύτταρα διατηρούνται σε φλάσκες καλλιέργειας 25 cm² και 75 cm² αντικαθιστώντας το θρεπτικό υλικό κάθε 2-3 ημέρες.

2.1.1 Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές:

- **K562**: μυελογενής λευχαιμική σειρά που οφείλεται σε παρουσία του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια (Ph¹+ chr.) και προέρχεται από ασθενή σε βλαστική κρίση με χρόνια μυελογενή λευχαιμία.
- **Raji**: λεμφοβλαστικού τύπου κυτταρική σειρά προερχόμενη από ασθενή με λέμφωμα Burkitt.
- **HL-60**: οξεία προ-μυελογενής λευχαιμική σειρά
- **K562 CIITA K9**: κύτταρα K562 που υπερεκφράζουν τον παράγοντα CIITA
- **HeLa** : καρκινική σειρά προερχόμενη από ασθενή με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας(ευγενική προσφορά του καθ. Ιωσήφ Παπαματθαϊάκη).

Εκτός από τα παραπάνω κυτταρικά μοντέλα, χρησιμοποιήθηκαν και πρωτογενή κύτταρα από ασθενή(παιδί) με ALL.

- **Προ-B λεμφοβλαστική λευχαιμία** (ευγενική προσφορά της καθ. Ελένης Δημητρίου).

2.1.2 Πάγωμα κυττάρων

Υλικά και διαλύματα:

- DMSO (Dimethyl- sulphoxide Sigma, Germany)
- Cryovials
- Tubes 15ml
- Πιπέτες Pasteur
- Φυγόκεντρος Kubota
- Αιμοκυτταρόμετρο
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (RPMI-FBS 10%, DMEM-FBS 10%)

Διαδικασία:

- Για τα αιωρούμενα κύτταρα (K562, Raji, HL-60, πρωτογενή λευχαιμικά) Συλλέγουμε τα κύτταρα και φυγοκεντρούμε για 6 λεπτά στις 1200 rpm και επαναδιαλύουμε σε RPMI 20% FBS ώστε να επιτύχουμε συγκέντρωση 2×10^6 κύτταρα/ml. Προσθέτουμε σιγά-σιγά και αναδεύοντας συγχρόνως ίση ποσότητα διαλύματος RPMI με 20% v/v DMSO και μοιράζουμε 1 ml στα vials ώστε να έχουμε 1×10^6 κύτταρα ανά vial σε RPMI 20% FBS και 10% DMSO. Τα μεταφέρουμε πολύ γρήγορα στους -80°C για μία εβδομάδα και έπειτα σε υγρό άζωτο.
- Για τα προσκολλητικά κύτταρα HeLa, αφαιρούμε από την καλλιέργεια το θρεπτικό μέσο, προσθέτουμε διάλυμα Trypsin-EDTA και τοποθετούμε τη φλάσκα στον επωαστήρα για 2-3min ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα από τα τοιχώματα της φλάσκας. Στη συνέχεια προσθέτουμε θρεπτικό υλικό για να σταματήσει η δράση της Trypsin και ξεπλένουμε τα κύτταρα (wash: φυγοκέντρηση για 6min, 1200rpm). Κατόπιν μετράμε τα κύτταρα με χρήση αιμοκυτταρόμετρου και το επαναδιαλύουμε σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10%FBS. Προσθέτουμε ίσο όγκο DMSO 20% διαλυμένο σε θρεπτικό υλικό έτσι ώστε το πάγωμα να γίνει σε τελική συγκέντρωση 10^6 cells/ml. Η προσθήκη του DMSO γίνεται πολύ ήπια ενώ ταυτόχρονα αναδεύουμε έτσι ώστε να διαλυθεί. Η διαδικασία πρέπει να γίνει όσο το δυνατόν γρηγορότερα διότι το DMSO είναι ιδιαίτερα τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος το εναιώρημα των κυττάρων χωρίζεται σε cryovials (1ml/vial= 10^6 cells) και τοποθετούνται στους -80°C .

2.1.3 Ξεπάγωμα κυττάρων

Υλικά και διαλύματα:

- Tubes 15ml
- Πιπέτες Pasteur
- Φυγόκεντρος Kubota
- Φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων 25cm²
- Θρεπτικό υλικό: RPMI 20%FBS και Ham's F12 20%FBS
- Water bath
- Επωαστήρας Forma Scientific

Διαδικασία:

Βυθίζουμε γρήγορα τα vials με τα κύτταρα στο υδατόλουτρο στους 37°C. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο σε δοκιμαστικό σωλήνα όπου προσθέτουμε σιγά-σιγά 9 ml θρεπτικού υλικού αναδεύοντας συγχρόνως. Φυγοκεντρούμε για 6 λεπτά στις 1200 rpm και επαναδιαλύουμε σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 20% FBS και τοποθετούμε σε φλάσκα καλλιέργειας 25cm² στον επωαστήρα. Μετά το πέρας της μίας εβδομάδας αντικαθιστούμε το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας εμπλουτισμένο με 10% FBS, το οποίο και ανανεώνουμε κάθε 2-3 ημέρες.

2.2 Αντισώματα

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα:

- **CD74-PE** purified mouse anti-human monoclonal antibody PE conjugated clone By2 (IgG1) anti human li (short & long forms), Santa Cruz Cat.number sc - 20062 –PE, 0,2mg/ml
- **HLA-DM-PE** purified mouse anti-human monoclonal antibody PE conjugated clone MaP.DM1 (Mouse IgG1, κ), Santa Cruz Cat. number sc - 32248 –PE, 0,2 mg/ml
- **HLA-DR** Hybridoma , clone IVA12 (Mouse IgG1, κ) , ATCC Cat. number HB -145
- **HLA-DO** purified mouse anti -human monoclonal antibody, clone DOB.L1, (Mouse IgG2b, κ), BD Pharmingen™ Cat. number 559895
- **HLA-DR-FITC** mouse anti-human FITC conjugated (L243), Santa Cruz Cat.number sc-18875-FITC, 0,2 mg/ml
- **MIF**: goat anti-human/rat/mouse (N/20) Santa Cruz Cat.number sc-16965, 0,2 mg/ml
- **Anti-IgG₁ PE** goat anti-mouse PE conjugated Santa Cruz Cat.number sc-3764, 0,2 mg/ml
- **Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG(H+L)** Molecular probes Cat.number sc-A11055, 2 mg/ml (ευγενική προσφορά από τον καθ. Γεώργιο Χαλεπάκη)
- **Anti-IgG HRP** rabbit anti-goat (ευγενική προσφορά της κ. Χαράς Βλατά)

2.3 Εσωτερικός και εξωτερικός φθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός πραγματοποιείται για την ανίχνευση και τον κυτταρικό εντοπισμό αντιγόνων που μας ενδιαφέρουν με τη βοήθεια φθοριζόντων αντισωμάτων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό επιφανειακών (εξωτερικός ανοσοφθορισμός) ή ενδοκυττάρων αντιγόνων (εσωτερικός

ανοσοφθορισμός) με την προϋπόθεση ότι στη δεύτερη περίπτωση τα διαλύματα περιέχουν σαπονίνη, η οποία αποτελεί ένα ήπιο απορρυπαντικό που καθιστά διαπερατή την κυτταρική μεμβράνη.

Υλικά και διαλύματα:

- Eppendorf 1.5ml
- Tubes 15ml
- Φυγόκεντρος Kubota
- Πιπέτες Pasteur
- Πιπέτες Gilson 20μl, 200μl, 1000μl
- Διάλυμα πλυσίματος: PBS 1x, pH=7.4, 0,2 M φωσφορικού άλατος και 1,5M NaCl (Το διάλυμα παρασκευάζεται αρχικά σαν PBS 10x διαλύοντας 2,28g NaH_2PO_4 (0,038M) ή 2,62g $\text{NaH}_2\text{PO}_4(\text{H}_2\text{O})$, 11,5g Na_2HPO_4 (0,162M) και 43,84g NaCl σε 500ml dH_2O .Ακολουθως ρυθμίζεται το pH στο 7,4 και το χρησιμοποιούμε σε τελική συγκέντρωση 1x).
- Διάλυμα blocking: PBS-BSA 3%- saponine 0.3%
- Διάλυμα αντίσωμάτων: PBS-BSA 1%- saponine 0.3%
- Διάλυμα Μονιμοποίησης: Παραφορμαλδεύδη, PFA 4% in PBS
- FACScan (Becton Dickinson)

Διαδικασία:

Η διεξαγωγή του πειράματος ξεκινά με αρχική συγκέντρωση των κυττάρων 10^6 cells/δείγμα. Κάνουμε μονιμοποίηση των κυττάρων με PFA 4% (100μl/δείγμα) και επωάζουμε στον πάγο για 10min. Ξεπλένουμε 2 φορές με PBS 1x φυγοκεντρώντας στις 1200rpm για 6min. Στη συνέχεια βάζουμε το blocking PBS-BSA 3% saponine 0.3% (100μl/δείγμα) και επωάζουμε για 30min. Ξεπλένουμε με τον ίδιο τρόπο 2 φορές και έπειτα βάζουμε το πρώτο αντίσωμα διαλυμένο σε PBS- BSA 1%- saponine 0.3% (100μl/δείγμα), και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 45min-1h. Ξεπλένουμε 2 φορές με τον ίδιο τρόπο και προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα διαλυμένο σε PBS- BSA 1%- saponine 0.3%, (100μl/δείγμα). Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες σκότους για 30min. Ξεπλένουμε 2 φορές με τον ίδιο τρόπο και επαναδιαλύουμε την πελέτα των κυττάρων σε 0.5ml PBS1x. Τα δείγματα είναι έτοιμα για μέτρηση στο FACScan Becton Dickinson.

2.4 Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική δοκιμή (ELISA)

Η ELISA αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη βιοχημική μέθοδο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών σε υγρά όπως ορός αίματος, εκχυλίσματα κυττάρων ή υπερκείμενα καλλιιεργειών. Οι πρωτεΐνες αρχικά επικάθονται στην επιφάνεια πηγαδιών (wells) 96-well plate κι έπειτα προστίθεται σ' αυτή ένα συγκεκριμένο αντίσωμα με τη δυνατότητα να δεσμεύσει την πρωτεΐνη. Το αντίσωμα ανίχνευσης συνδέεται με ένα δεύτερο αντίσωμα (Indirect ELISA). Μεταξύ κάθε βήματος η plate πλένεται και μετά το τελευταίο πλύσιμο προστίθεται το κατάλληλο υπόστρωμα που βοηθά την οπτικοποίηση της αντίδρασης που μπορεί να μετρηθεί με φωτόμετρο.

Υλικά και διαλύματα:

- Coating buffer(διάλυμα προσκόλλησης). Διαλύουμε 2.1gr Na₂CO₃ σε 500ml H₂O και 2.65gr Na₂CO₃ σε άλλα 500ml H₂O. Αναμειγνύουμε τα δύο διαλύματα ρυθμίζοντας το pH= 9.6.
- PBS 10x(διάλυμα φωσφορικών αλάτων)
PBS 1x, pH=7.4, 0,2 M φωσφορικού άλατος και 1,5M NaCl (Το διάλυμα παρασκευάζεται αρχικά σαν PBS 10x διαλύοντας 2,28g NaH₂PO₄ (0,038M) ή 2,62g NaH₂PO₄(H₂O), 11,5g Na₂HPO₄(0,162M) και 43,84g NaCl σε 500ml dH₂O.Ακολούθως ρυθμίζεται το pH στο 7,4 και το χρησιμοποιούμε σε τελική συγκέντρωση 1x). Διάλυμα πλυσίματος : PBS, Tween-20 0.05% v/v
- Διάλυμα blocking: PBS-BSA 2%
Η BSA (λευκωματίνη βοοειδών ορών ή καζεΐνη) προστίθεται σε όλα τα wells, επειδή οι πρωτεΐνες ορών εμποδίζουν τη μη συγκεκριμένη προσρόφηση άλλων πρωτεϊνών στην plate.
- Διάλυμα αντισωμάτων: PBS-BSA 0.1%w/v
- Υπόστρωμα: TMB Substrate Kit (Pierce, 34021)
- Ορός από ποντίκι (positive control), 1/1000 v/v σε coating buffer
- Πλάκες καλλιέργειας flat bottom 96 οπών (Costar Europe LTD, The Netherlands)
- ELISA plate reader στα 450nm (BIO-TEK Synergy HT)
- Πολυπιπέτα Gilson 200μl
- Πιπέτες Gilson 20μl, 200μl, 1000μl

Διαδικασία:

Τοποθετούμε τα δείγματα, το θετικό control του ορού και το αρνητικό control του θρεπτικού υλικού σε 96άρα plate αραιωμένα 1/1 σε coating buffer (50μl δείγματος και 50μl coating buffer). Επωάζουμε για 16-18 ώρες στους 4°C. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε τα πηγάδια της plate 3 φορές με το διάλυμα πλυσίματος. Προσθέτουμε το διάλυμα του blocking PBS-BSA 2% 100μl/well και επωάζουμε για 2 ώρες. Ξεπλένουμε ξανά 3 φορές και προσθέτουμε το πρώτο αντίσωμα σε αραιώση 1/1000 σε PBS-BSA 0.1%. Επωάζουμε για 11/2ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ξεπλένουμε ξανά 3 φορές και προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα (100μl/well) σε αραιώση 1/10.000 σε PBS-BSA 0.1%. Επωάζουμε για 1 ώρα, ξεπλένουμε 3 φορές και προσθέτουμε το υπόστρωμα 100μl/well. Επωάζουμε για 15-20 λεπτά ώστε να δράσει το υπόστρωμα και τα πηγάδια μας να γίνουν μπλε και σταματάμε την αντίδραση προσθέτοντας 50μl/well θειικού οξέως (H₂SO₄).Μετράμε σε φωτόμετρο ELISA READER στα 450nm.

2.5 RT-PCR

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

2.5.1 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση RNA από αιωρούμενα κύτταρα (K562, CIITA-K562) έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Ambion/RNA από τη life technologies, όπου προερχόταν το TRIzol® Reagent. Όλα τα tips & erpendorfs ήταν αποστειρωμένα και η διαδικασία της απομόνωσης γίνεται στην απαγωγό σε στείρες συνθήκες.

Υλικά και διαλύματα:

- 100% ισοπροπανόλη
- Trizol
- 75% αιθανόλη
- Φυγόκεντρος 5415C erpendorf
- Πιπέτες Gilson 20μl, 200μl, 1000μl
- Αποστειρωμένα tips & erpendorfs

Ομογενοποίηση: Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα (ικανός αριθμός: 5×10^6 /δείγμα) και αφαιρούμε το υπερκείμενο. Δεν κάνουμε πλύσιμο των κυττάρων με PBS. Προσθέτουμε 0,5ml Trizol για κάθε 250λ κυττάρων. Προκαλούμε λύση με έντονο πιπετάρισμα.

Διαχωρισμός φάσης: Το ομογενοποιημένο υλικό το επωάζουμε για 5' σε θερ/σία δωματίου. Έπειτα, προσθέτουμε 200λ χλωροφόρμιο για κάθε 1ml Trizol και κουνάμε έντονα για 15". Επωάζουμε τώρα για 2-3' σε θερ/σία δωματίου. Ύστερα, φυγοκεντρούμε το δείγμα για 15' στις 12.000g στροφές. Αφαιρούμε την υδατική φάση έχοντας το erpendorf σε γωνία. Η φάση αυτή αποτελεί ~50% του συνολικού όγκου. Προσοχή, η μεσόφαση και η οργανική φάση πρέπει να μείνουν ανέπαφες. Ακολουθώς, μεταφέρουμε την υδατική φάση που περιέχει το RNA σε νέο erpendorf.

Απομόνωση RNA

- a) Κατακρήμνιση: Προσθέτουμε 500λ 100% ισοπροπανόλη για κάθε 1ml Trizol και επωάζουμε για 10' σε θερ/σία δωματίου. Φυγοκεντρούμε για 10' στις 12.000g στροφές.
- b) RNA πλύσιμο: Απομακρύνουμε το υπερκείμενο αφήνοντας την πελέτα (RNA). Κάνουμε πλύσιμο στην πελέτα με 1ml 75% αιθανόλη/1ml Trizol. Στη συνέχεια κάνουμε vortex και φυγοκέντρηση για 5' στις 7.500g στροφές. Απομακρύνουμε τελείως το υπερκείμενο και αφήνουμε την πελέτα να στεγνώσει για 5-10' στον αέρα της απαγωγού.

Επαναδιαλυτοποίηση: Επαναδιαλυτοποιούμε την RNA πελέτα σε 20-25λ RNase free dH₂O και κατόπιν επωάζουμε στο υδατόλουτρο στους 55-60°C για 10-15'. Το RNA μπορεί να αποθηκευτεί στους -70°C.

2.5.2 RT-PCR

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν από το πρόγραμμα Primer BLAST(Prmer3 and BLAST).Για τη σταθερή αλυσίδα (li) επιλέχθηκαν τα εξώνια 1 και 2 που αποτελούν το διαμεμβρανικό και το κυτταροπλασματικό κομμάτι της. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως θετικό control όλων των πειραμάτων.

Human CD74:

Γονίδιο	εκκινητής	προϊόν
forward	5' εκκινητής GCCCTGTACACAGGCTTTTC-3'	180bp
reverse	3' εκκινητής CATCTTGCTCACAGGCTTGG-5'	

Actin beta:

Γονίδιο	εκκινητής	προϊόν
forward	5' εκκινητής GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'	234bp
reverse	3' εκκινητής AGCACTGTGTTGGCGTACAG-5'	

Σε κάθε μια αντίδραση(πρώτο βήμα της αντίδρασης) χρησιμοποιήθηκαν:

Για 2 μg poly(A)⁺ RNA σε τελικό όγκο της αντίδρασης 40λ

4λ 10× M-MuLV reaction buffer

2 λ dNTPs

0,1 λ ribonuclease inhibitors

2 λ random primers(examers)

0,2 λ reverse transcriptase (40u/reaction)

Διαδικασία:

- Σε αποστειρωμένο erpendorf βάζω το RNA και τους εκκινητές διαλυμένο σε 15λ 25λ RNase free H₂O.
- Θερμαίνω στους 70°C για 5 λεπτά
- Τοποθετώ κατ' ευθείαν στον πάγο να κρυώσει
- Κάνω ένα σύντομο spin.
- Προσθέτω RNase free H₂O για να έχω ίσο όγκο αντίδρασης
- Προσθέτω τα dNTPs
- Προσθέτω 10× M-MuLV reaction buffer
- Προσθέτω RNase αναστολείς
- Προσθέτω την αντίστροφη μεταγραφή
- Ανακατεύω ήπια και βάζω στο υδατόλουτρο για 1 ώρα στους 40°C.

Περνώντας στο δεύτερο βήμα της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

Για 2λ c DNA/ αντίδραση σε τελικό όγκο 20λ

2λ 10× Taq buffer

2 λ MgCl₂ (25mM)

0,4 λ dNTPs mix (10mM:stock)

0,2 λ από κάθε εκκινητή (left&right), (stock:100Mμ)

0,2 λ Taq polymerase (stock: 50/λ)

Για την πραγματοποίηση του δεύτερου βήματος της RT-PCR χρησιμοποιήθηκε το εξής πρόγραμμα:

	Θερμοκρασία	Χρόνος
Βήμα 1	53°C	1'
Βήμα 2	95°C	15'
Βήμα 3	94 °C	1'
Βήμα 4	55 °C	1'
Βήμα 5	72 °C	1'
Βήμα 6	Back to step 3×40 times	
Βήμα 7	72 °C	10'
Βήμα 8	4°C	

2.5.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Υλικά και διαλύματα:

- Πήκτωμα αγαρόζης 2%(1,6 g αγαρόζη,800 μl TAE buffer 0,5×, 80 μl dH₂O)
- 10 μl βρωμιούχο αιθίδιο
- Loading buffer (25%w/v , Bromophenol Blue, 50% Glycerol. Ρυθμίζουμε το pH με NaOH.
- DNA ladder
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Διαδικασία:

Για το gel αγαρόζης 2% διαλύουμε 1,6g αγαρόζης σε dH₂O και θερμαίνουμε μέχρι να διαλυθεί πλήρως και να είναι το διάλυμα διαυγές. Κατόπιν, προσθέτουμε 800 μl TAE buffer 0,5× και 10 μl βρωμιούχο αιθίδιο. Αφήνουμε το gel να πήξει στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και μετά γεμίζουμε τη δεξαμενή της συσκευής με TAE buffer 0,5×. 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 τη συσκευή.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

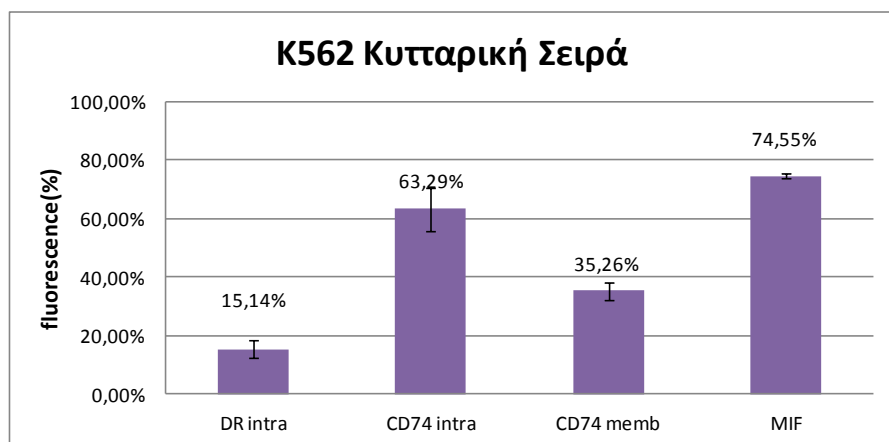
3.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ HLA-DR, CD74, MIF ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

3.1.1 K562 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ

Ένα από τα κυτταρικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της έκφρασης του παράγοντα MIF ήταν η λευχαιμική σειρά K562, που σε φυσιολογικές συνθήκες δεν παράγει τάξης II μόρια του Κ.Σ.Ι. Η χρώση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τη διαδικασία του εξωτερικού ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση του μεμβρανικού μορίου CD74 και του εσωτερικού ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των μορίων ενδοκυτταρικά (CD74, HLA-DR, MIF). Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα τα οποία ήταν είτε συνδεδεμένα απευθείας με φθορίζουσα χρωστική (FITC, PE) είτε ανιχνεύθηκαν με χρήση δευτέρου αντισώματος, όπως έγινε στην περίπτωση του MIF (Alexa Fluor®, 488nm).

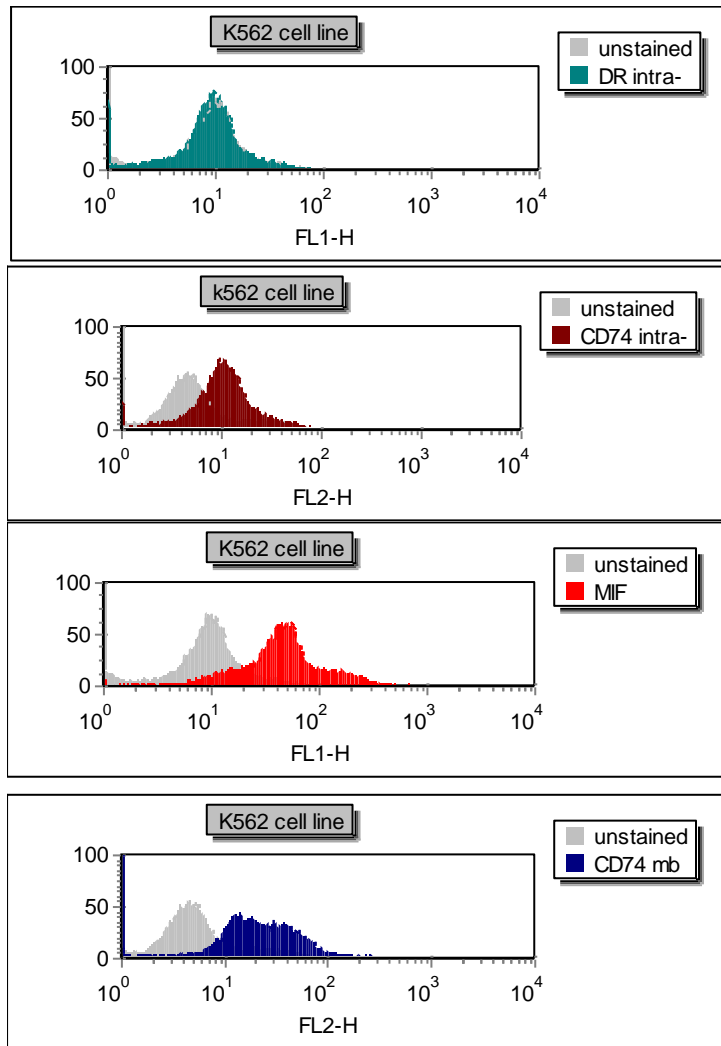
(Οι πίνακες με τα ποσοστά των μέσων όρων όπως και της τυπικής απόκλισης για όλα τα πειράματα παρατίθενται στο τέλος της ενότητας.)

Από το σύνολο των πειραμάτων προκύπτει ότι το ποσοστό έκφρασης του MIF ενδοκυτταρικά είναι 74,55% και του DR 15,14%(±3,02%). Το γεγονός ότι βρίσκουμε ενδοκυτταρικά αποθέματα του DR φαίνεται σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες(*Paradimitriou et al.,2008*),όπου το ποσοστό είχε βρεθεί 18%(±7%) Μεμβρανικά το CD74 είναι 35,26% ενώ ενδοκυτταρικά η τιμή του είναι 63,29%, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 1. Αξιοσημείωτη είναι η μεγάλη έκφραση του CD74 ενδοκυτταρικά (το μονοκλωνικό αντίσωμα αναγνωρίζει όλες τις ισομορφές της Σταθερής Αλυσίδας) σε συνδυασμό με την εξίσου υψηλή έκφραση του MIF. Το γεγονός ότι μεμβρανικά το CD74 το βρίσκουμε σχεδόν στα μισά επίπεδα (με απόκλιση μόλις 2,98%) από ότι το ενδοκυτταρικό δικαιολογεί το ρόλο του ως υποδοχέα, καθώς γνωρίζουμε ότι τα μεμβρανικά επίπεδα του DR είναι σχεδόν μηδενικά, άρα ο CD74 στην μεμβράνη υπάρχει πιθανότατα μόνο ως σύμπλοκο με τον MIF. Παράλληλα, η αυξημένη έκφραση του MIF δε θα μπορούσε να εξεταστεί παρά μόνο συναρτήσει του ενδοσωμικού μονοπατιού. Κι αυτό γιατί η constitutive έκφραση του μορίου έχει παρατηρηθεί μόνο σε φυσιολογικά κύτταρα και τα ενδοκυτταρικά ροολς του MIF (δεν υπάρχει *de novo* έκφραση) (*Calandra and Roger,2003*) όπως γνωρίζουμε βιβλιογραφικά, δεν αφορά λευχαιμικά κύτταρα. Άρα, πρόκειται ενδεχομένως για έναν νέο ρόλο του MIF στην αντιγονοπαρουσίαση που τα τελευταία χρόνια προτείνεται (*Potolicchio et al.,2003*).



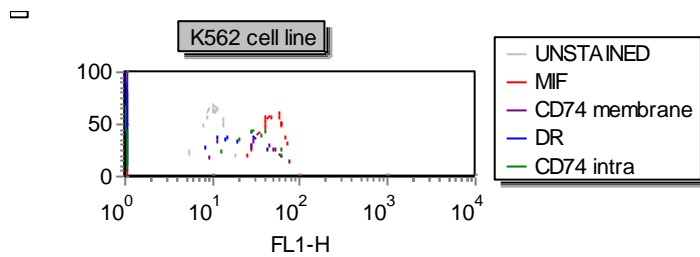
Διάγραμμα 1 Ποσοστό έκφρασης των μορίων: DR,CD74 και MIF στην K562 κυτ.σειρά. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στο Μ.Ο. έκφρασης 3 πειραμάτων. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων υπό μορφή ιστογράμματος ενός ενδεικτικού πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 11.

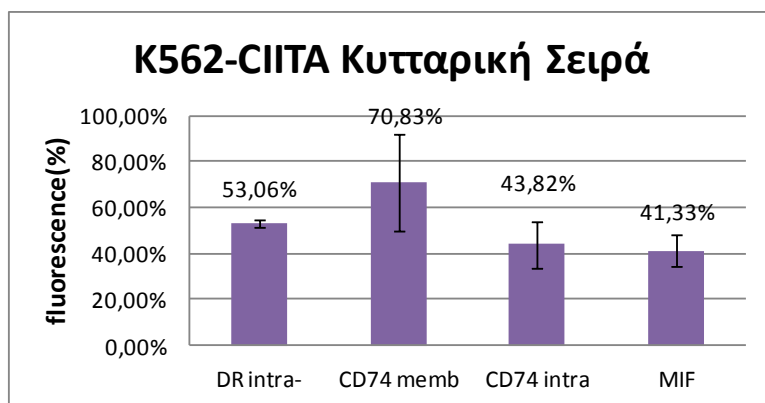


Εικόνα 101 Ανίχνευση των μορίων: DR, CD74 και MIF στα K562 κύτταρα με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής.

Συνολικά :

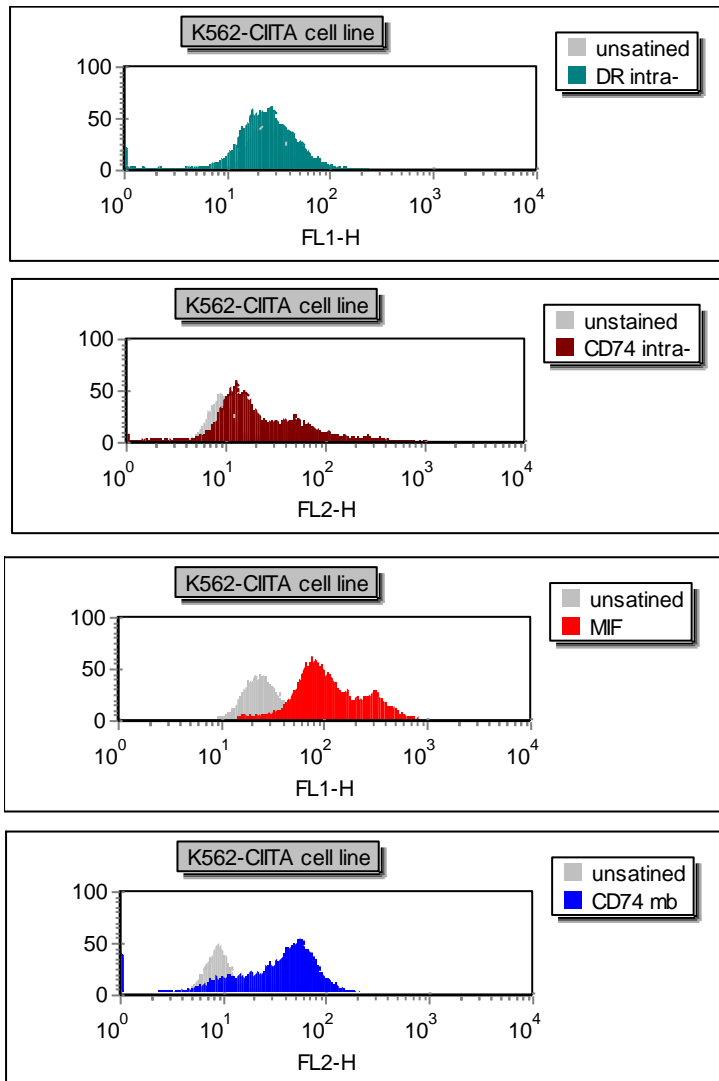


Στην προσπάθεια μας να μελετήσουμε πληρέστερα το κυτταρικό μοντέλο K562, χρησιμοποιήσαμε την ίδια σειρά αλλά διαμολυσμένη με τον CIITA μεταγραφικό παράγοντα. Δηλαδή, τα κύτταρα υπερεκφράζουν τον CIITA, άρα αναμένεται να βρούμε και υψηλότερα ποσοστά έκφρασης των τάξης II που είναι υπό τον κύριο έλεγχο του παράγοντα αυτού. Έτσι, προκύπτει ότι το ποσοστό του DR είναι 53,06% ενώ στο CD74 παρατηρούμε μία απόκλιση στα ποσοστά, δηλαδή ενδοκυτταρικά είναι 43,82% ($\pm 10,19\%$) ενώ μεμβρανικά είναι 70,83% ($\pm 21,34\%$) (Διάγραμμα 2). Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η διαμόλυνση των κυττάρων δεν έγινε το χρονικό διάστημα που διεξάγονταν τα πειράματα και άρα τα κύτταρα όντας παγωμένα θα είχαν χάσει το φυσιολογικό προφίλ της έκφρασης τους.



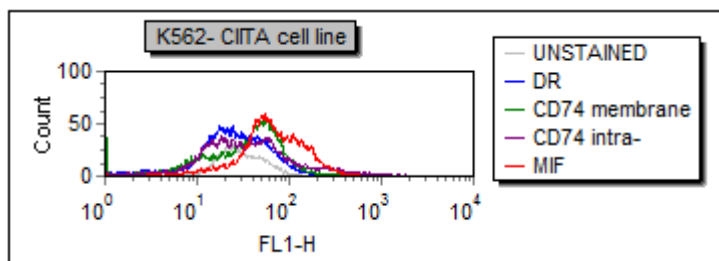
Διάγραμμα 2 Ποσοστό έκφρασης των μορίων: DR,CD74 και MIF στην K562-CIITA κυτ.σειρά. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στο Μ.Ο. έκφρασης 3 πειραμάτων. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων υπό μορφή ιστογράμματος ενός ενδεικτικού πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 12.

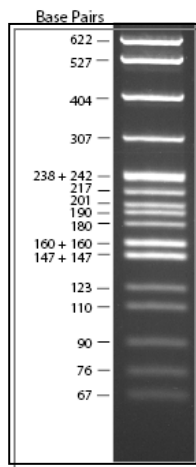


Εικόνα 12 Ανίχνευση των μορίων: DR, CD74 και MIF στα K562-CITTA κύτταρα με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής

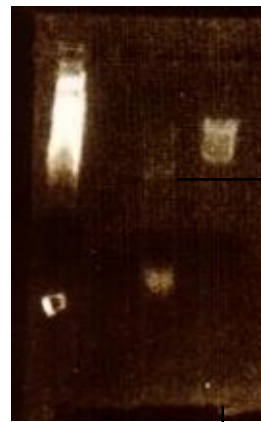
Συνολικά:



3.1.1.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ CD74 ΜΕ RT-PCR



Marker: pBR322DNA/*Hinf*I Digest

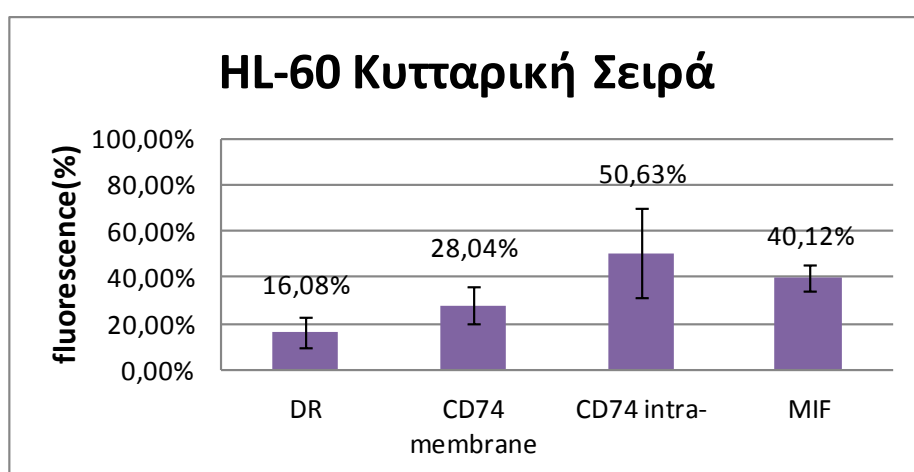


CD74:181 bp

Actin: 234 bp

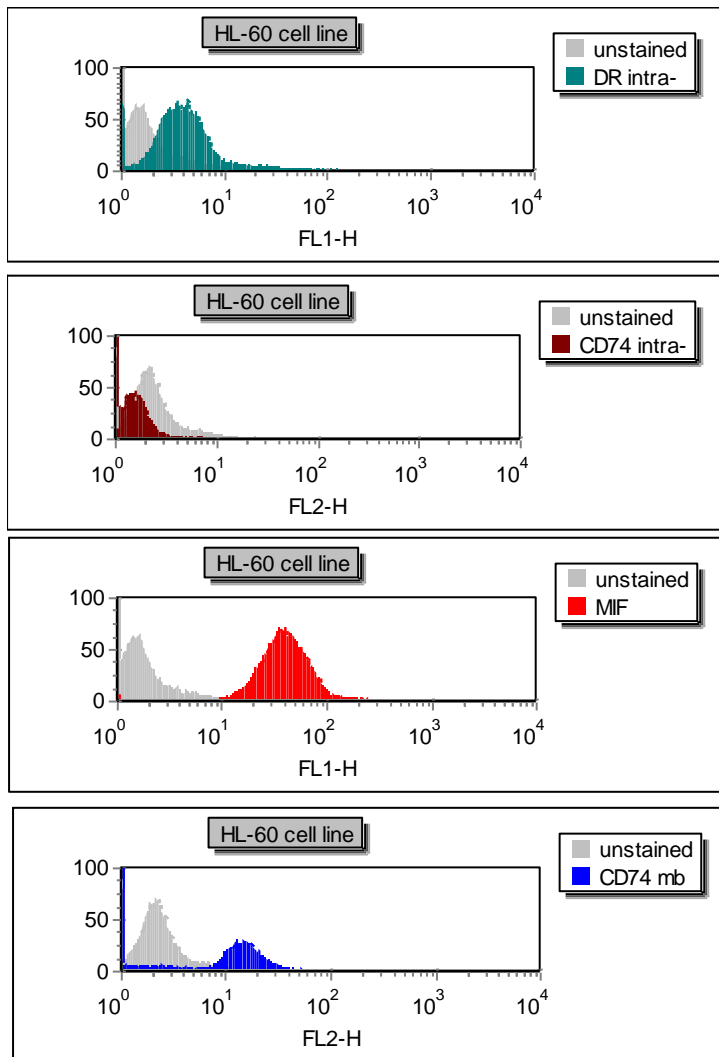
3.1.2 HL-60 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ

Ένα ακόμη καλά μελετημένο κυτταρικό μοντέλο λευχαιμιών είναι η HL-60 κυτ.σειρά η οποία έχει παρόμοιο προφίλ έκφρασης των τάξης II με την K562. Οι ίδιες διαδικασίες ακολουθήθηκαν και εδώ και τα ποσοστά που πήραμε φαίνονται στο Διάγραμμα 3. Το ποσοστό του DR , αν και είναι μικρότερο σε σχέση με τα K562 κύτταρα, είναι σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (Διδακτορικό Λίνας Παπαδημητρίου), όπου υπήρχε διακύμανση της τάξης του 14% (20-55% DR). Έτσι, αν λάβουμε καταρχάς, υπόψη την τυπική απόκλιση που είναι 6,46% αλλά και το γεγονός ότι στα παλαιότερα πειράματα το αντίσωμα για το DR αναγνώριζε ολόκληρη την περιοχή στα DR,DP ,DQ μόρια μπορούμε να συμπεράνουμε ότι σίγουρα το DR γνωρίζει διακύμανση στα HL-60, αλλά το ποσοστό του φαίνεται να είναι ~20%.



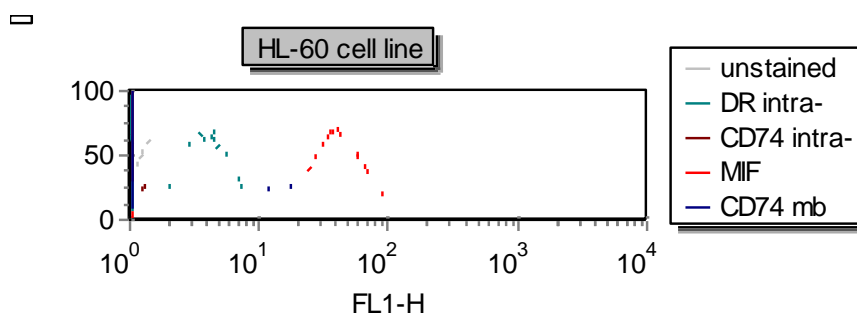
Διάγραμμα 3 Ποσοστό έκφρασης των μορίων DR,CD74 και MIF στην HL-60 κυτ.σειρά. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στο Μ.Ο. έκφρασης 3 πειραμάτων. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων υπό μορφή ιστογράμματος ενός ενδεικτικού πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 13.



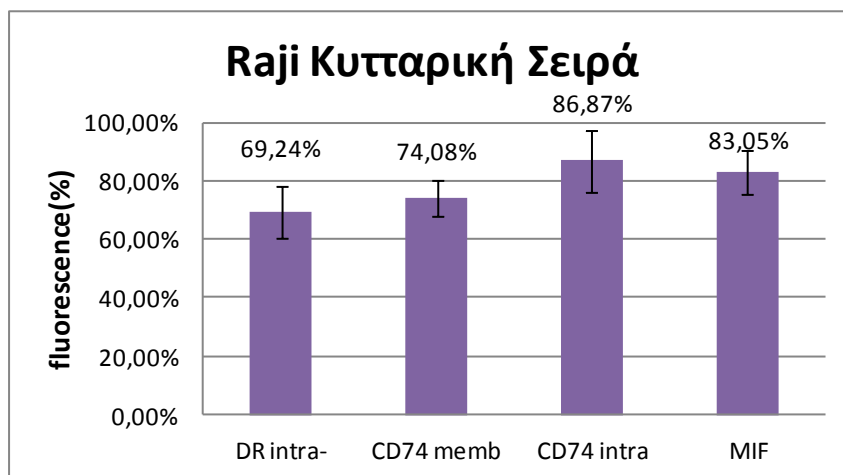
Εικόνα13 Ανίχνευση των μορίων: DR, CD74 και MIF στα HL-60 κύτταρα με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής

Συνολικά :



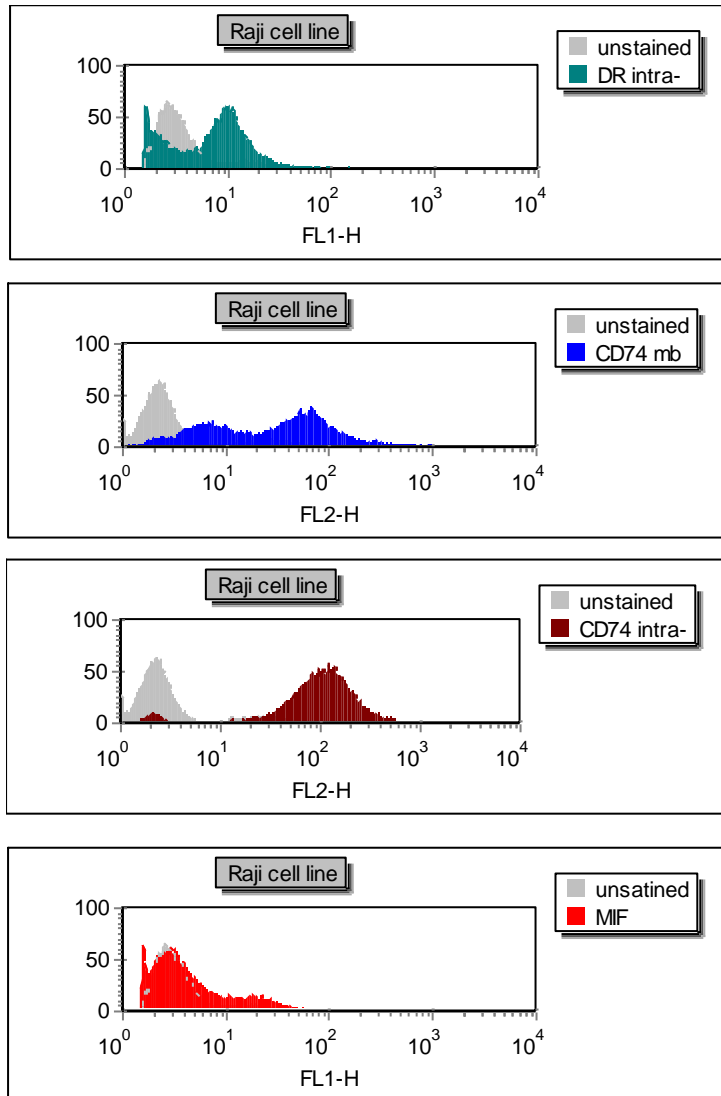
3.1.3 RAJI ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί χρησιμοποιήσαμε την κυτταρική σειρά Raji ως μάρτυρα έλεγχου, καθώς εκφράζει τόσο τα κλασικά τάξης II όσο και τα μη κλασικά. Έτσι, αποτελεί μία ακόμη ένδειξη του ρόλου του CD74 αλλά και του συμπλόκου του CD74/MIF που πιθανώς εμπλέκεται στο ενδοσωμικό μονοπάτι. Τα ποσοστά έκφρασης φαίνονται στο Διάγραμμα 4. Παρατηρούμε ότι η έκφραση του DR είναι πολύ υψηλή (69,24%), καθώς και του CD74 μεμβρανικά (74,08%). Όσον αφορά το ποσοστό του CD74 ενδοκυτταρικά κυμαίνεται 86,87% ($\pm 10,36\%$). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το MIF έχει συγκριτικά με τις δύο άλλες κυτ. Σειρές το υψηλότερο ποσοστό 83,05% με μικρή τυπική απόκλιση (7,48%) κάτι που ενισχύει την υπόθεση μας για το γεγονός ότι αλληλεπίδραση του MIF με τον CD74 δεν είναι ανεξάρτητη του ρόλου του CD74 ως μεταφορέα του DR. Το γεγονός ότι ο CD74 εμφανίζεται σε μικρότερο ποσοστό στην κυτ. μεμβράνη και παράλληλα το υψηλό ποσοστό του MIF εσωτερικά δηλώνουν πιθανή επαναπρόσληψη του MIF ως σύμπλοκο με τον CD74 ή/και ενδοκυτταρικό ανταγωνισμό των μορίων MIF και DR.



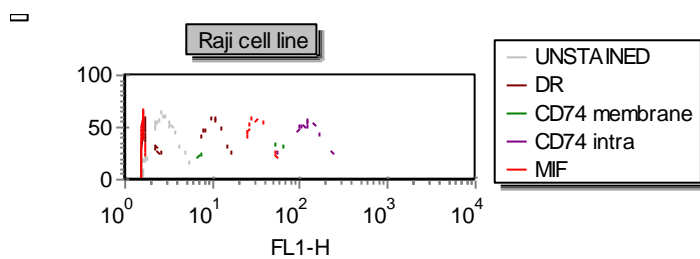
Διάγραμμα 4 Ποσοστό έκφρασης των μορίων DR,CD74 και MIF στην Raji κυτ.σειρά. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στο Μ.Ο. έκφρασης 3 πειραμάτων. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων υπό μορφή ιστογράμματος ενός ενδεικτικού πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 14.



Εικόνα 14 Ανίχνευση των μορίων: DR, CD74 και MIF στα Raji κύτταρα με τη χρήση της κυταρομετρίας ροής

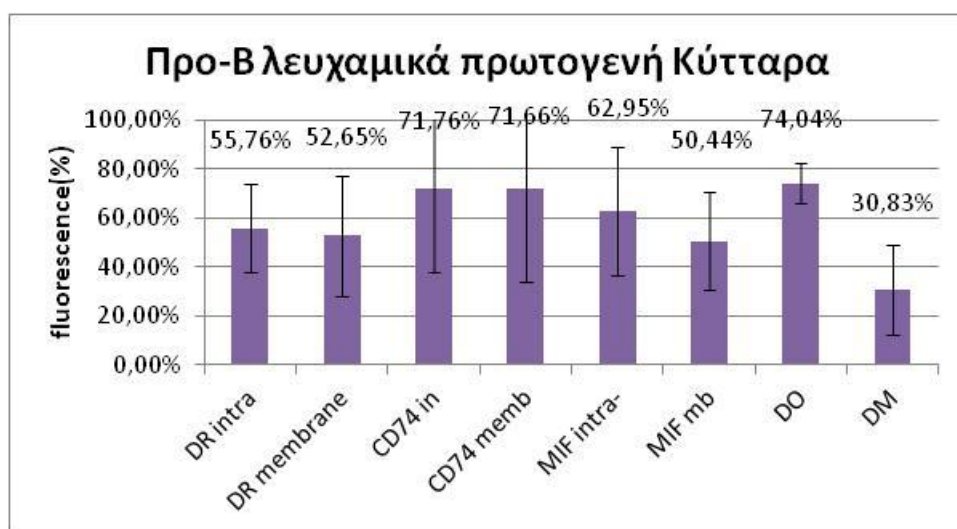
Συνολικά :



3.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ HLA-DR, HLA-DM, HLA-DO, CD74 ΚΑΙ MIF ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

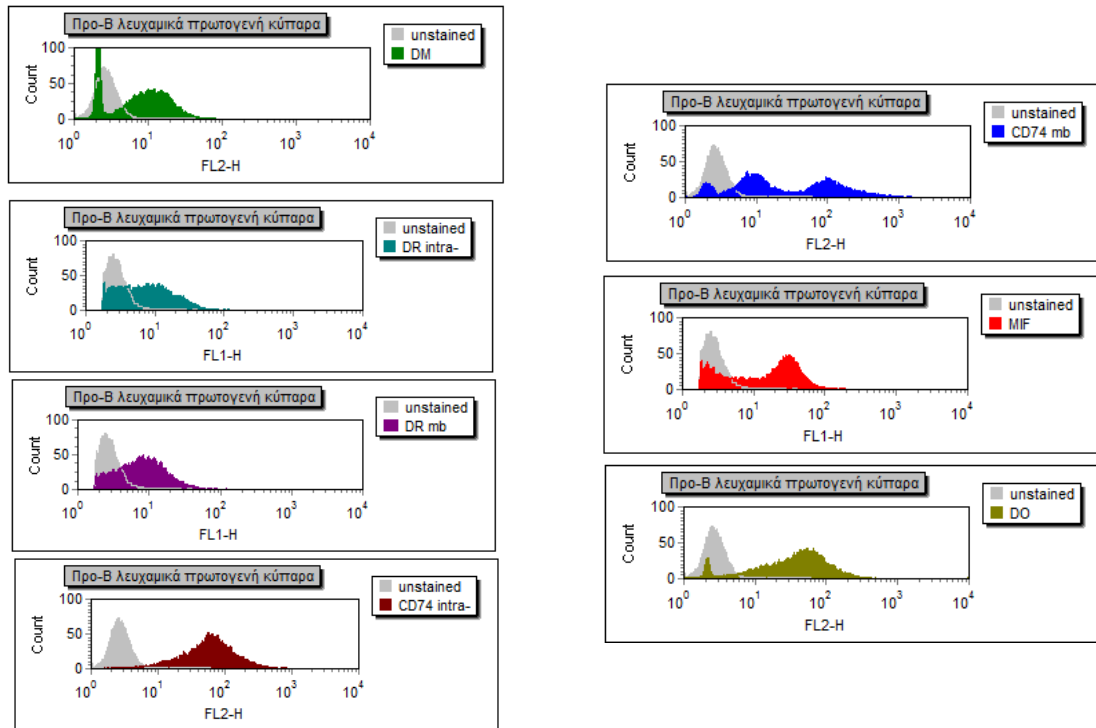
3.2.1 ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΠΡΟ-B ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Εκτός από τα καλά μελετημένα κυτταρικά μοντέλα για τη διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης, συμπεριλαμβανομένου του εργαστήριου μας, θέλαμε να εξετάσουμε τι συμβαίνει και σε ανθρώπινα πρωτογενή πλέον κύτταρα που προέκυψαν από λεμφοβλαστική λευχαιμία. Επειδή τα κύτταρα δεν είχαν έως τώρα μελετηθεί εξετάσαμε όλο το προφίλ έκφρασης τους (κλασικά τάξης II: DR μη-κλασικά τάξης II: DM, DO). Τα ποσοστά που προέκυψαν φαίνονται στο Διάγραμμα 5. Η τυπική απόκλιση που φαίνεται να είναι μεγάλη δικαιολογείται από την πρωτογενή ιδιότητα των κυττάρων. Το υψηλό ποσοστό του DO εσωτερικά (74,04%), που γνωρίζουμε ότι λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της αντιγονοπαρουσίασης, συνάδει με το γεγονός ότι έχουμε αρκετά υψηλό ποσοστό του CD74 μεμβρανικά πράγμα που σημαίνει ότι τα τάξης II μόρια βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων φορτωμένα το CLIP και όχι με το κατάλληλο πεπτίδιο. Είχε ενδιαφέρον να ανιχνεύσουμε και την μεμβρανική έκφραση του MIF, με στόχο να διευκρινίσουμε την υπόθεση μας σε πρωτογενή κύτταρα. Γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία ότι ο MIF δε συντίθεται *de novo* αλλά αποθηκεύεται σε ενδοκυτταρικά ροοίς και εκκρίνεται μόνο όταν χρειαστεί (ή με κατάλληλο ερέθισμα). Η παρουσία του στη μεμβράνη (50,44%) δεν θα μπορούσε να είχε ρόλο ύπαρξης παρά μόνο ως σύμπλοκο με τον CD74. Έχουμε λοιπόν, άλλη μία απόδειξη της υπόθεσης μας για πιθανή επαναπρόσληψη του MIF και συμμετοχή του στο ενδοσωμικό μονοπάτι, γεγονός που δικαιολογείται από το εξίσου υψηλό ποσοστό του CD74 μεμβρανικά (71,66%). Τα δύο μόρια φαίνεται να έχουν παρόμοιες τιμές και ενδοκυτταρικά (CD74 :71,76% και MIF: 62,95%) γεγονός που ενισχύει τα παραπάνω.



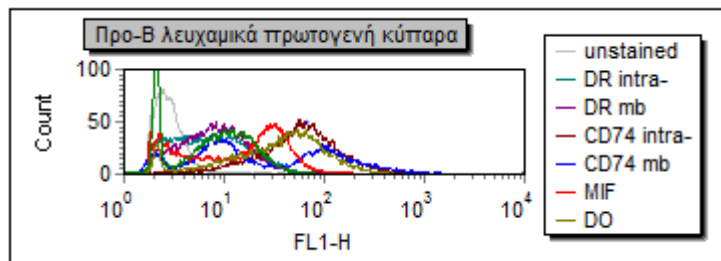
Διάγραμμα 5 Ποσοστό έκφρασης των μορίων DR,CD74,DM,DO και MIF σε πρωτογενή λεμφοβλαστικά κύτταρα. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στο M.O. έκφρασης 3 πειραμάτων. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων υπό μορφή ιστογράμματος ενός ενδεικτικού πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 15.



Εικόνα 15 Ανίχνευση των μορίων: DR, CD74 και MIF στα λεμφοβλαστικά κύτταρα με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής.

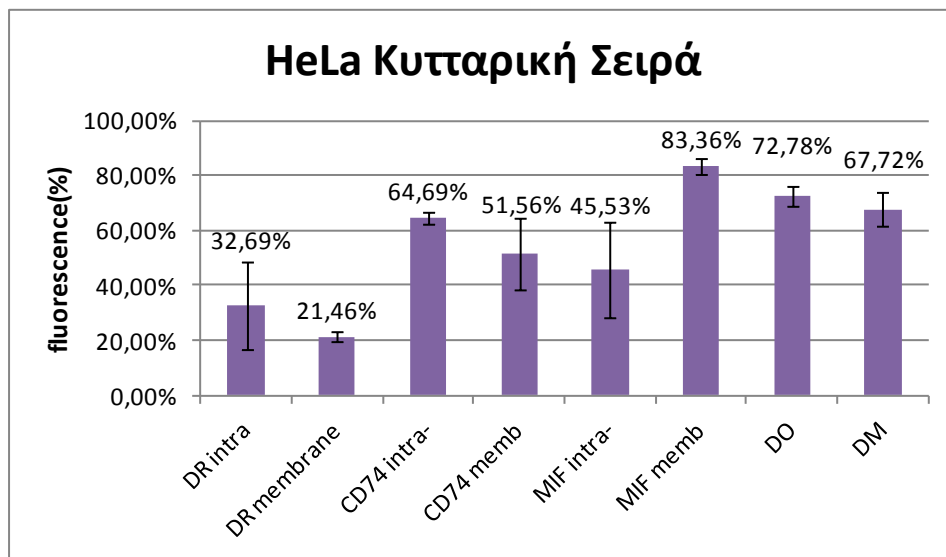
Συνολικά:



3.2.2 HeLa ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ

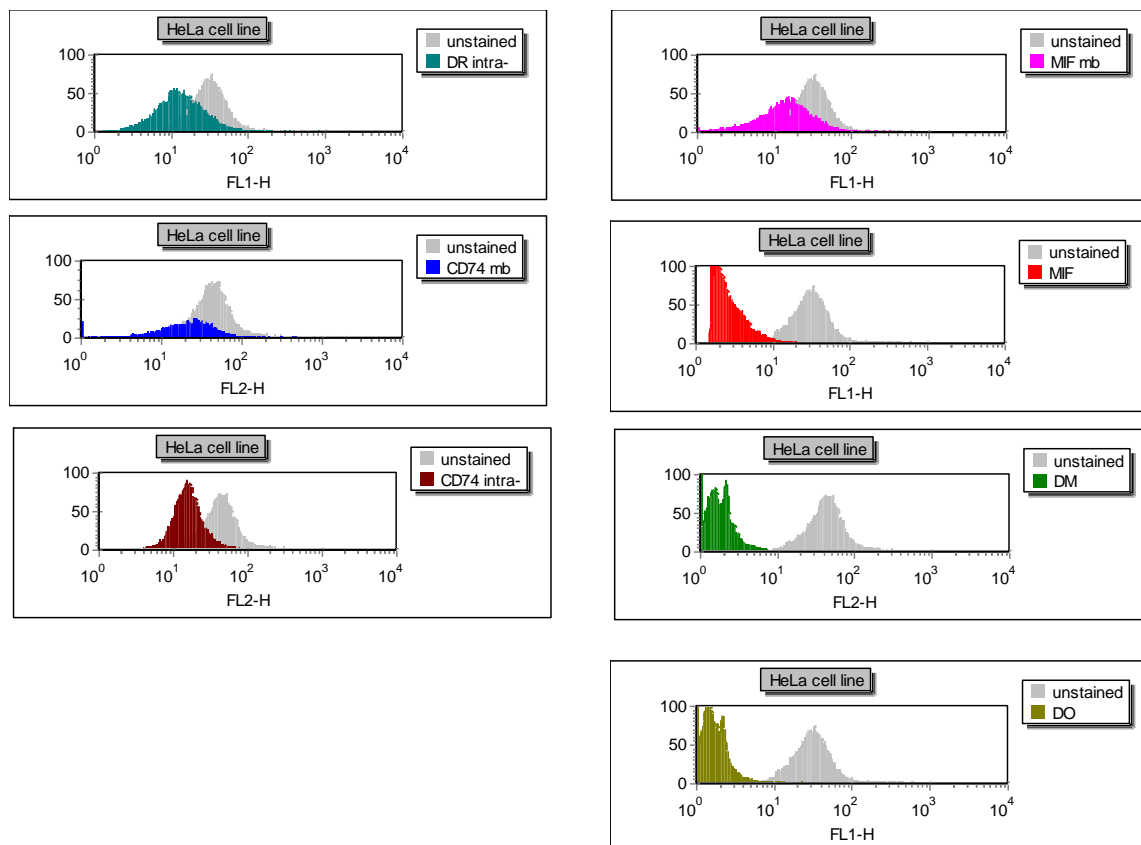
Στην προσπάθεια αποσαφήνισης του διττού ρόλου του CD74, χρησιμοποιήσαμε μία ακόμη κυτταρική σειρά, όχι καλά μελετημένη για τη διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης. Παρομοίως και εδώ εξετάσαμε όλο το προφίλ της έκφρασης του κλασικών τάξης II DR μορίου και των μη-κλασικών τάξης II DM ,DO. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Διάγραμμα 6.

Όπως παρατηρούμε το σχετικά χαμηλό ποσοστό του μεμβρανικού DR (21,46%) δικαιολογεί τα αυξημένα ποσοστά των DM(62,72%) και DO (72,78%). Παρόμοια με τα πρωτογενή λευχαιμικά, είναι και εδώ τα ποσοστά του MIF. Μάλιστα, το MIF στην κυτ.επιφάνεια φαίνεται να υπερβαίνει το ενδοκυτταρικό (83,86% μεμβρανικά-44,03% ενδοκυτταρικά). Τέλος, τα αυξημένα ποσοστά του CD74 τόσο ενδοκυτταρικά(64,69%) όσο και μεμβρανικά(51,56%) δικαιολογούν τη διττή φύση του μορίου και την απαραίτητη ύπαρξη του ως υποδοχέα για τη σηματοδότηση μέσω MIF, καθώς είναι γνωστό πως τα HeLa κύτταρα ενδογενώς δεν εκφράζουν CD74 παρά μόνο μετά από επαγωγή.



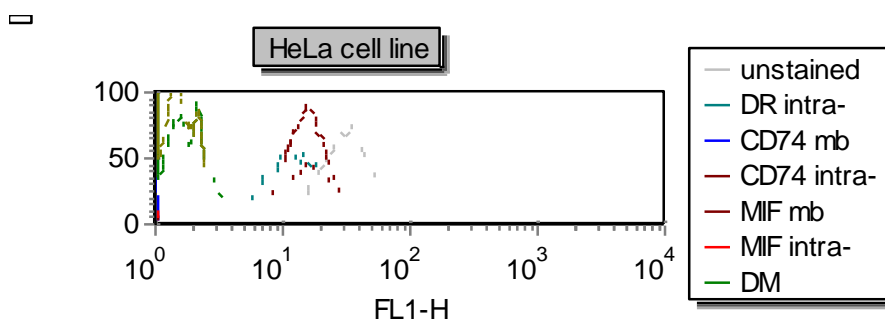
Διάγραμμα 6 Ποσοστό έκφρασης των μορίων DR,CD74,DM,DO και MIF στη HeLa κύτταρική σειρά. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στο Μ.Ο. έκφρασης 3 πειραμάτων. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων υπό μορφή ιστογράμματος ενός ενδεικτικού πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 16.



Εικόνα 16 Ανίχνευση των μορίων: DR, CD74 και MIF στα HeLa κύτταρα με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής.

Συνολικά:



3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ IFN- γ ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ K562 ΚΑΙ HL-60

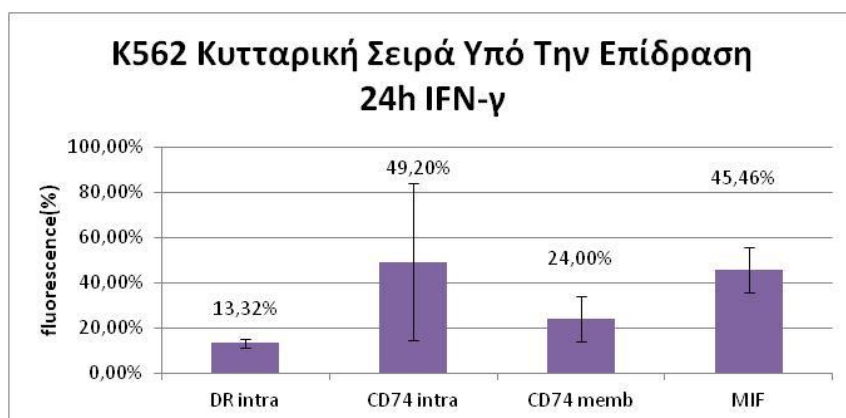
Η IFN- γ είναι μια πολυλειτουργική κυτταροκίνη που συντονίζει ποικίλες κυτταρικές διεργασίες μέσω μεταγραφικής ρύθμισης ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων. Σημαντικότερη επίδραση της IFN- γ είναι η ενίσχυση της ανοσολογικής επαγρύπνισης έναντι καρκινικών κυττάρων και η υποβοήθηση της ανοσολογικής απόκρισης έναντι παθογόνων παραγόντων.

Όσον αφορά την προσαρμοστική ανοσία, η IFN- γ προκαλεί αύξηση των τάξης II μορίων του Κ.Σ.Ι τόσο στα κύτταρα όπου αυτά εκφράζονται συστηματικά (αντιγονοαπρυσιαστικά κύτταρα) όσο και στα κύτταρα που μπορούν να εμφανίσουν επαγόμενη έκφραση. Επίσης επάγει την έκφραση της σταθερής αλυσίδας (Ii) αλλά και διαφόρων λυσοσωμικών πρωτεασών και των cathepsins B,H και L. Όσον αφορά τις κυτταρικές σειρές που μελετάμε (K562 και HL-60) η επαγωγή των τάξης II μορίων αποτελεί ακόμη σημείο ανιπαράθεσης για τους επιστήμονες (*Stanley et al.,1991; Krief et al.,1987*). Γνωρίζοντας τους πολλαπλούς ρόλους της κυτταροκίνης και το γεγονός ότι χρησιμοποιείται εδώ και χρόνια ως υποβοηθητικός αντι-καρκινικός παράγοντας διευκολύνοντας τη διαδικασία της αντιγονοαπρυσίασης, προχωρήσαμε σε πειράματα επαγωγής και στις δύο κυτταρικές σειρές.

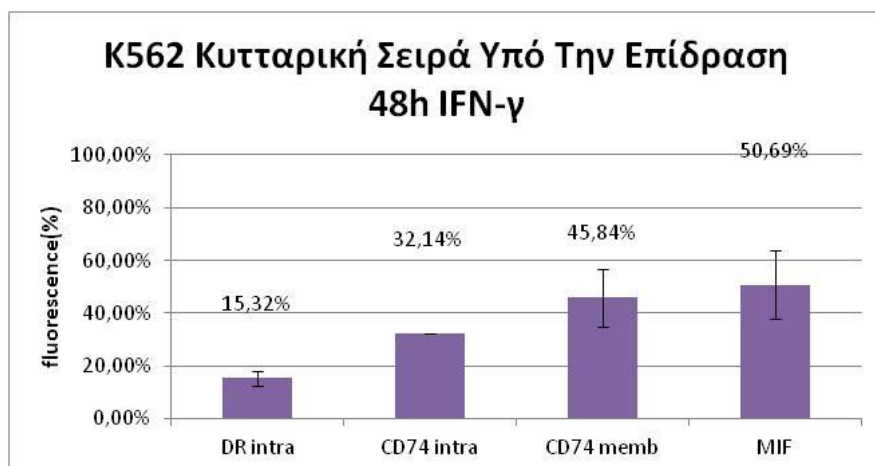
Για κάθε 10^6 κύτταρα/ml τοποθετήθηκαν σε βάρα πλάκα καλλιέργειας και επώαστηκαν με 10^4 U/ml για 24 και 48 ώρες. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν στις ίδιες ακριβώς ώρες απουσία IFN- γ . Στη συνέχεια συλλέχθηκαν τα κύτταρα και ακολουθήθηκε ανοσοφθορισμός και κυτταρομετρία ροής και τα αποτελέσματα φαίνονται στις παρακάτω εικόνες/διαγράμματα.

3.3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ IFN- γ ΣΤΑ K562 ΚΥΤΤΑΡΑ

Ακολουθούν τα Διαγράμματα 7&8 που δείχνουν τα ποσοστά έκφρασης των μορίων DR,CD74 και MIF στις 24h και 48h επαγωγές IFN- γ αντίστοιχα.

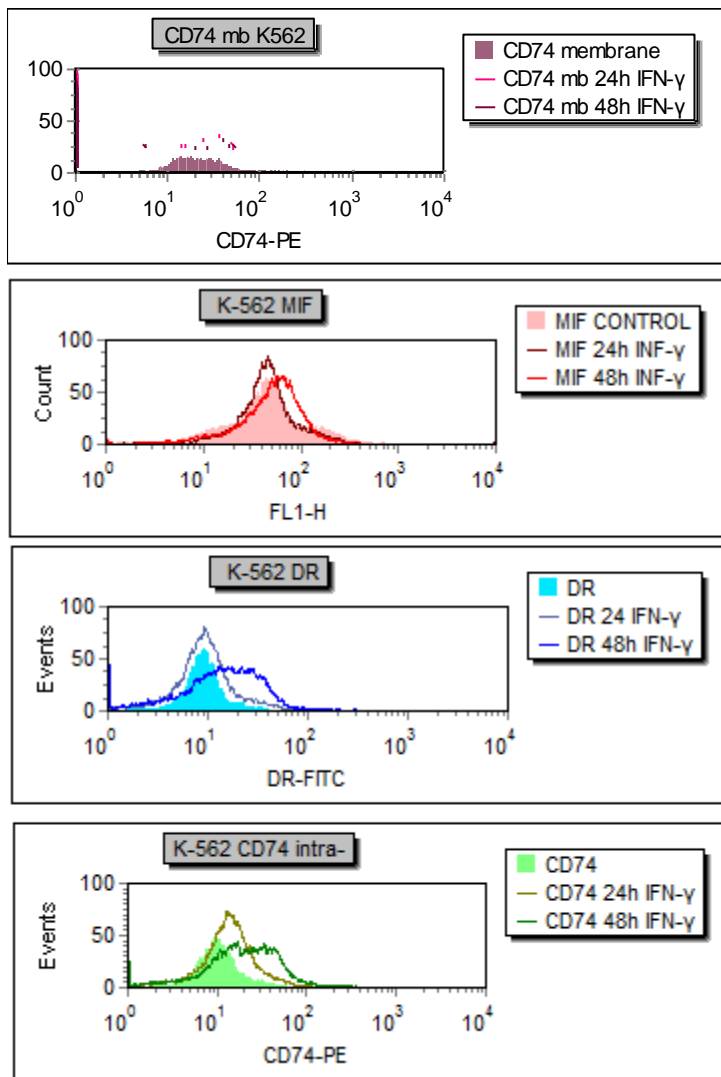


Διάγραμμα 7 Ποσοστό έκφρασης των μορίων: DR,CD74 και MIF μετά από 24h επαγωγή IFN- γ στην K562 κυτ.σειρά. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στο Μ.Ο. έκφρασης 3 πειραμάτων. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).



Διάγραμμα 8 Ποσοστό έκφρασης των μορίων: DR,CD74 και MIF μετά από 48h επαγωγή IFN- γ στην K562 κυτ.σειρά. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στο Μ.Ο. έκφρασης 3 πειραμάτων. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

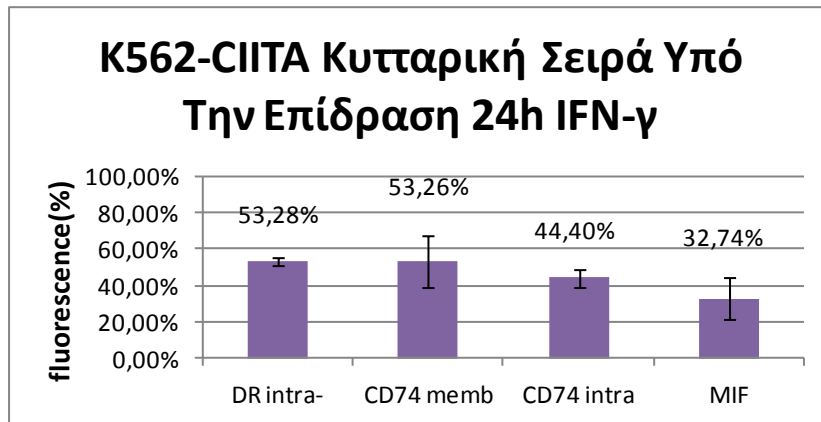
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων υπό μορφή ιστογράμματος συγκριτικά για κάθε μόριο στις δύο επαγωγές (24h και 48h) ενός ενδεικτικού πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 17.



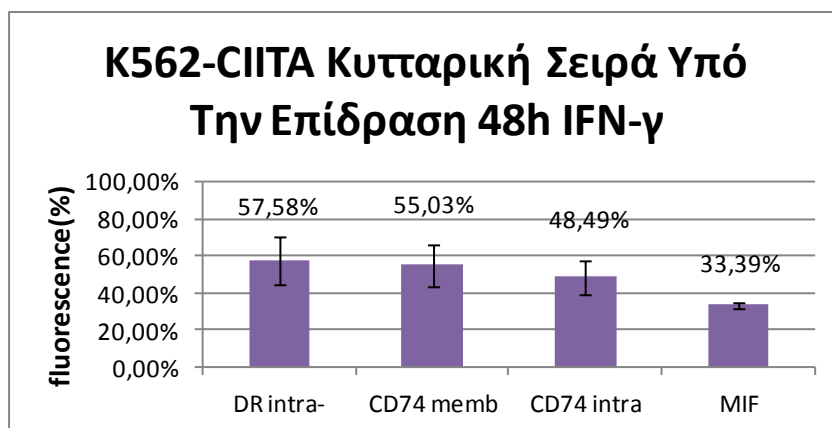
Εικόνα 17 Ανίχνευση των μορίων: DR, CD74 και MIF από 24h &48h επαγωγή IFN- γ στα K562 κύτταρα με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής.

3.3.1.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ IFN-γ ΣΤΑ K562-CIITA ΚΥΤΤΑΡΑ

Ακολουθούν τα Διαγράμματα 9&10 που δείχνουν τα ποσοστά έκφρασης των μορίων DR,CD74 και MIF στις 24h κα 48h επαγωγές IFN-γ αντίστοιχα.

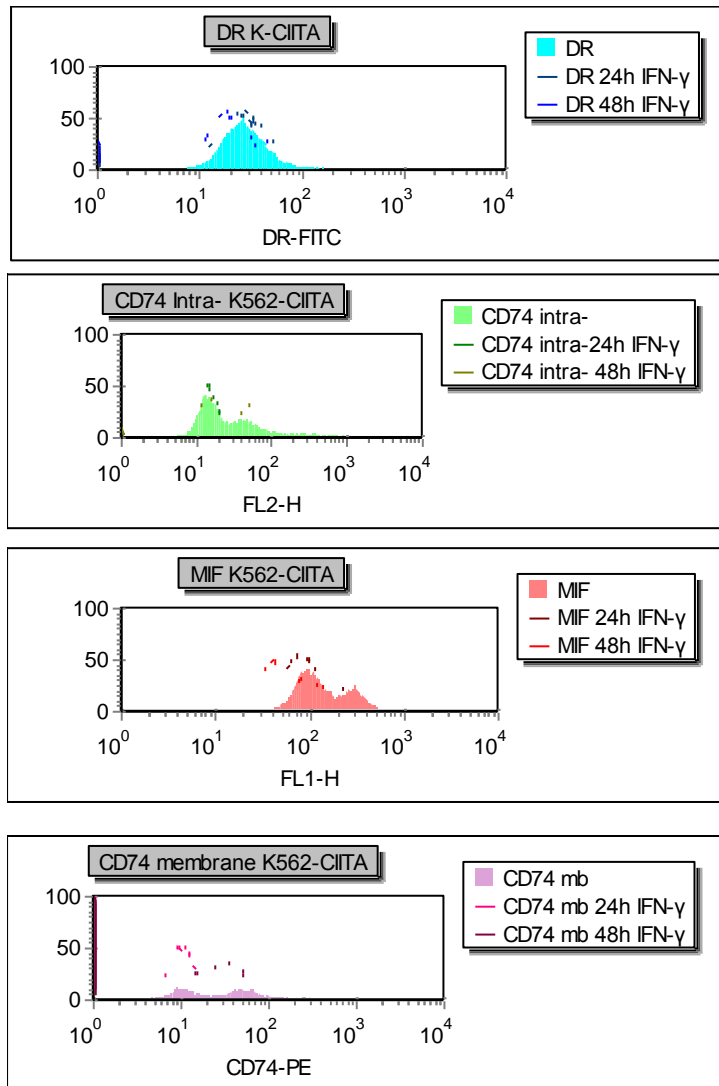


Διάγραμμα 9 Ποσοστό έκφρασης των μορίων: DR,CD74 και MIF μετά από 24h επαγωγή IFN-γ στην K562-CIITA κυτ.σειρά. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στο Μ.Ο. έκφρασης 3 πειραμάτων. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).



Διάγραμμα 10 Ποσοστό έκφρασης των μορίων: DR,CD74 και MIF μετά από 48h επαγωγή IFN-γ στην K562-CIITA κυτ.σειρά. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στο Μ.Ο. έκφρασης 3 πειραμάτων. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

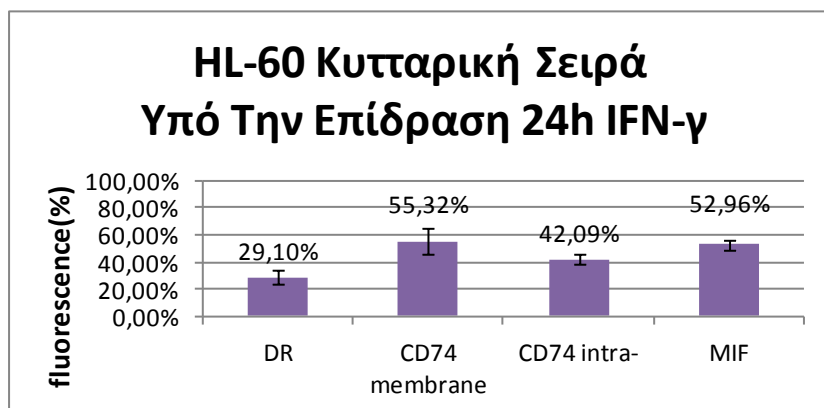
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων υπό μορφή ιστογράμματος συγκριτικά για κάθε μόριο στις δύο επαγωγές (24h και 48h) ενός ενδεικτικού πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 18.



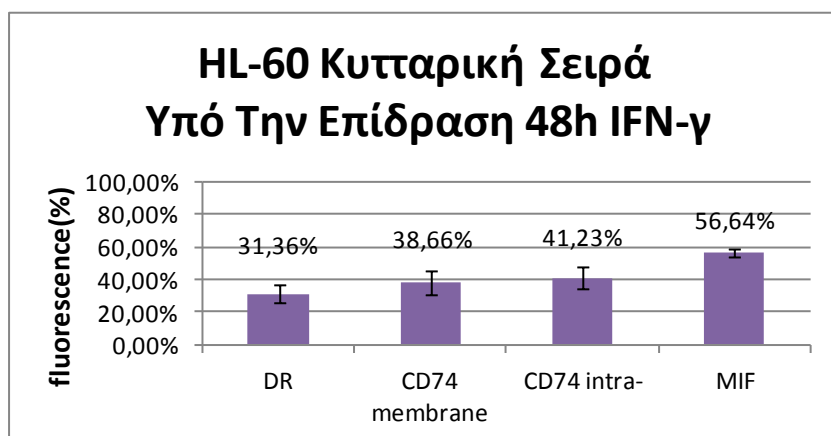
Εικόνα 18 Ανίχνευση των μορίων: DR, CD74 και MIF από 24h &48h επαγωγή IFN-γ στα K562-CIITA κύτταρα με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής.

3.3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ IFN- γ ΣΤΑ HL-60 ΚΥΤΤΑΡΑ

Ακολουθούν τα Διαγράμματα 11&12 που δείχνουν τα ποσοστά έκφρασης των μορίων DR,CD74 και MIF στις 24h κα 48h επαγωγές IFN- γ αντίστοιχα.

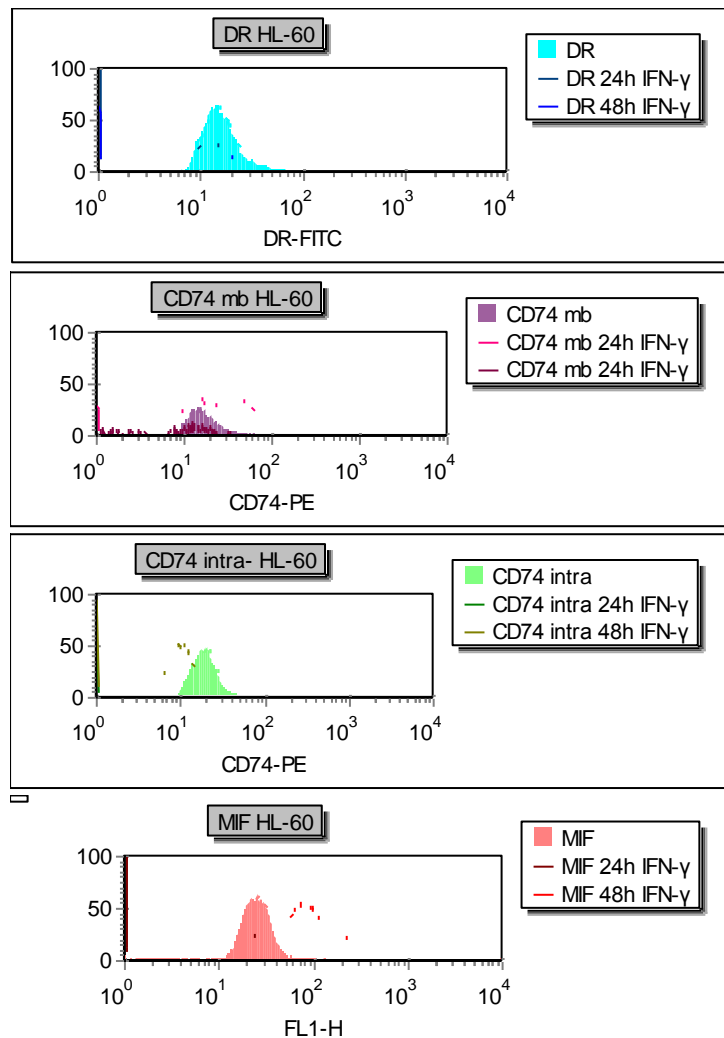


Διάγραμμα 11 Ποσοστό έκφρασης των μορίων: DR,CD74 και MIF μετά από 24h επαγωγή IFN- γ στην HL-60 κυτ.σειρά. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στο Μ.Ο. έκφρασης 3 πειραμάτων. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).



Διάγραμμα 12 Ποσοστό έκφρασης των μορίων: DR,CD74 και MIF μετά από 48h επαγωγή IFN- γ στην HL-60 κυτ.σειρά. Τα ποσοστά αντιστοιχούν στο Μ.Ο. έκφρασης 3 πειραμάτων. Οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων υπό μορφή ιστογράμματος συγκριτικά για κάθε μόριο στις δύο επαγωγές (24h και 48h) ενός ενδεικτικού πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 19.



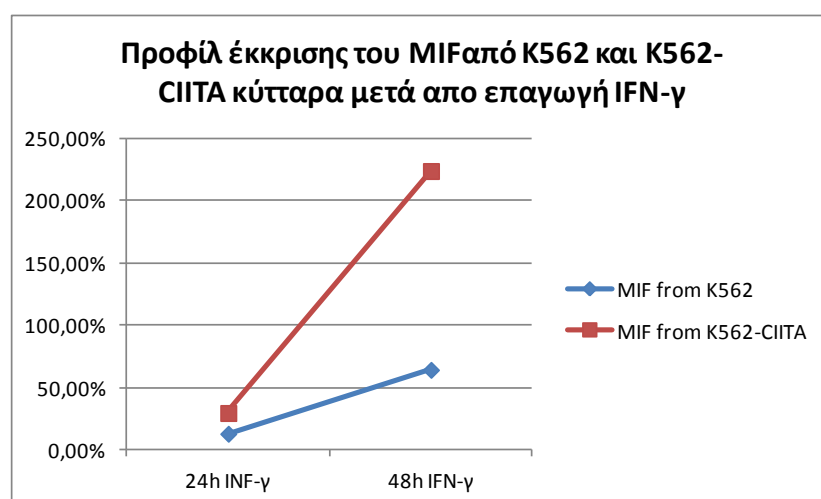
Εικόνα 19 Ανίχνευση των μορίων: DR, CD74 και MIF από 24h & 48h επαγωγή IFN-γ στα HL-60 κύτταρα με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής.

3.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΟΚΙΝΗΣ MIF ΣΕ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

3.4.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ MIF ΣΕ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΤΩΝ K562 ΚΑΙ K562-ClITA ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΑΓΩΓΗ IFN- γ

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο MIF αποτελεί μία από τις πρώτες κυτοκίνες που ταυτοποιήθηκαν (Bloom and Bennett, 1966; David 1966) και επάγεται από την IFN- γ σε μακροφάγα (Calandra et al., 1994), θέλαμε να εξετάσουμε την έκκριση του MIF μετά από 24 ώρες 48 ώρες καλλιέργειας. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ELISA σε υπερκείμενα καλλιέργειας K562 και K562-ClITA κυττάρων. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρουσιάζονται ως ποσοστιαία διαφορά με βάση το αρνητικό control (Coating Buffer) (Διάγραμμα 7).

Ποσοστιαία αύξηση του MIF βάσει του control	K562 υπερκείμενα κυττάρων	K562-ClITA υπερκείμενα κυττάρων
24h IFN- γ	13,04%	29,71%
48h IFN- γ	64,35%	224,00%



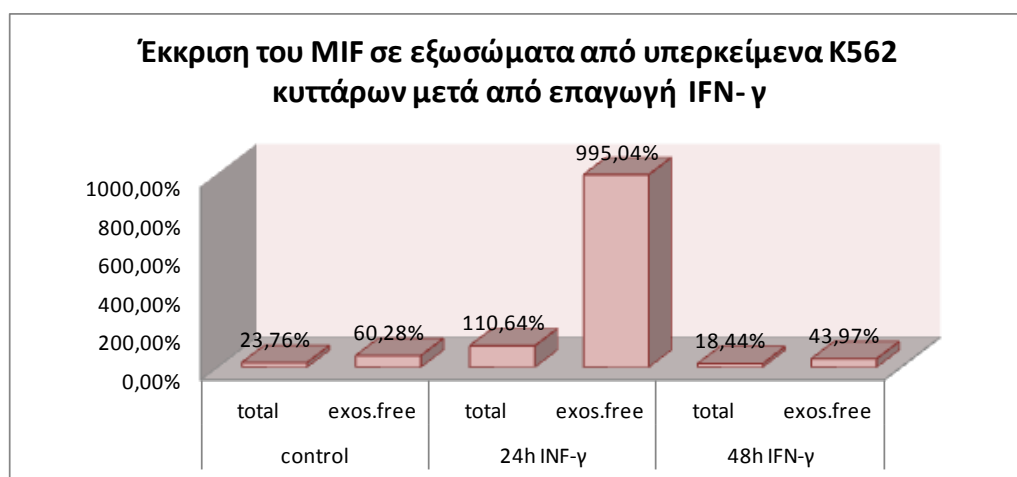
Διάγραμμα 13 Ανίχνευση του εκκρινόμενου μορίου MIF σε υπερκείμενα καλλιέργειών μετά από επαγωγή με IFN- γ . Τα ποσοστά εκφράζονται συγκριτικά για τα K562 και K562-ClITA κύτταρα, 24 και 48 ώρες μετά την επαγωγή εξίσου.

Από τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι η IFN- γ είναι ικανή να επάγει την έκκριση του MIF και μάλιστα με σημαντική ποσοστιαία διαφορά με το πέρασ των ωρών στα K562 και K562-ClITA εξίσου.

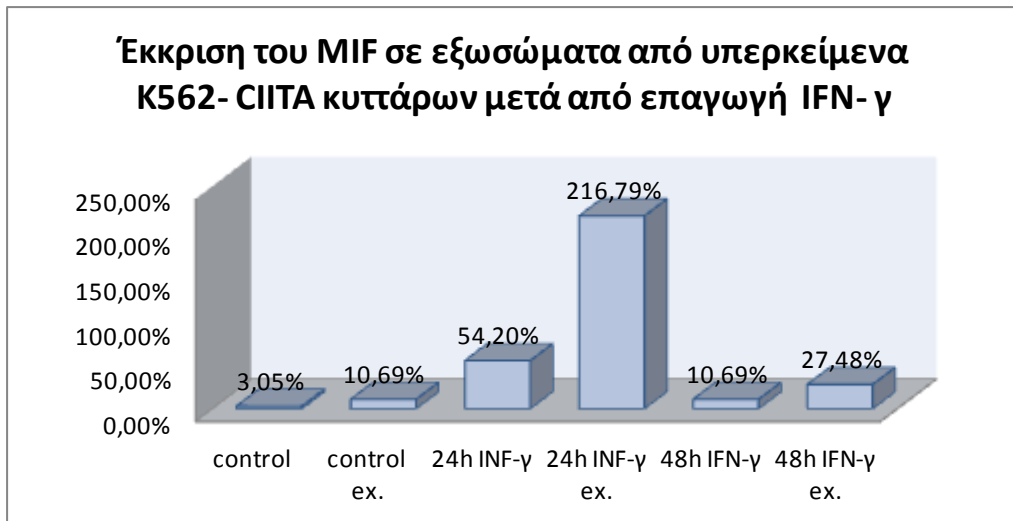
3.4.1.1 ΈΚΚΡΙΣΗΤΟΥ ΜΙΦ ΣΕ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΑΠΟ Κ562 ΚΑΙ Κ562-ΣΙΙΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ IFN- γ

Γνωρίζουμε ήδη από μελέτες του εργαστηρίου ότι τα το κλασικό τάξης II μόριο DR εκκρίνεται με τη μορφή εξωσωμάτων (exosomes-engaged) τα οποία είναι μεμβρανικές δομές που επιτελούν τη διαδικασία της εξωκυττώσης. Σε ένα, λοιπόν, επόμενο στάδιο εξετάσαμε το ενδεχόμενο της εξωκύττωσης με τη βοήθεια των εξωσωμάτων και για το MIF. Από υπερκείμενα καλλιιεργειών Κ562 ΚΑΙ Κ562-ΣΙΙΤΑ κυττάρων, χρησιμοποιούσαμε το μισό κάθε φορά για 'σπάσιμο' των μεμβρανικών αυτών δομών με την μέθοδο freezing-throwing, δηλαδή περνάγαμε το υπερκείμενο από το υγρό άζωτο (-80°C) στο υδατόλουτρο στους 37°C, κάτι που είναι ικανό να θραυματοποιήσει αυτές τις δομές και να απελευθερωθούν μόρια που κουβαλούσαν, εν προκειμένω το MIF. Τα ποσοστά έκκρισης για τα Κ562 και Κ562-ΣΙΙΤΑ κύτταρα φαίνονται στα Διαγράμματα 8&9 αντίστοιχα.

Με τον όρο total εννοούμε το υπερκείμενο που δεν έχει υποστεί τη διεργασία της θραυματοποίησης, ενώ με τον όρο exosomes free εννοούμε τα μόρια MIF που απελευθερώθηκαν από τα εξωσώματα.



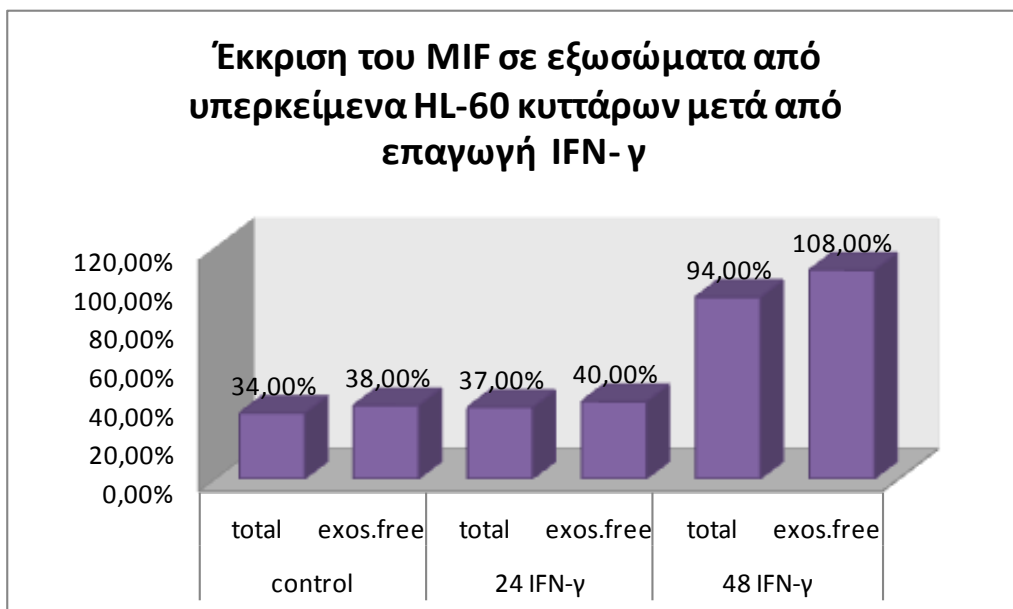
Διάγραμμα 14 Ανίχνευση του εκκρινόμενου μορίου MIF με μορφή εξωσωμάτων σε υπερκείμενα καλλιιεργειών μετά από επαγωγή με IFN- γ . Τα ποσοστά αφορούν τα Κ562 κύτταρα χωρίς IFN- γ (control), 24 και 48 ώρες μετά την επαγωγή με IFN- γ .



Διάγραμμα 15 Ανίχνευση του εκκρινόμενου μορίου MIF με μορφή εξωσωμάτων σε υπερκείμενα καλλιιεργειών μετά από επαγωγή με IFN-γ. Τα ποσοστά αφορούν τα K562-CIITA κύτταρα χωρίς IFN-γ (control), 24 και 48 ώρες μετά την επαγωγή με IFN-γ.

3.4.2 HL-60 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ

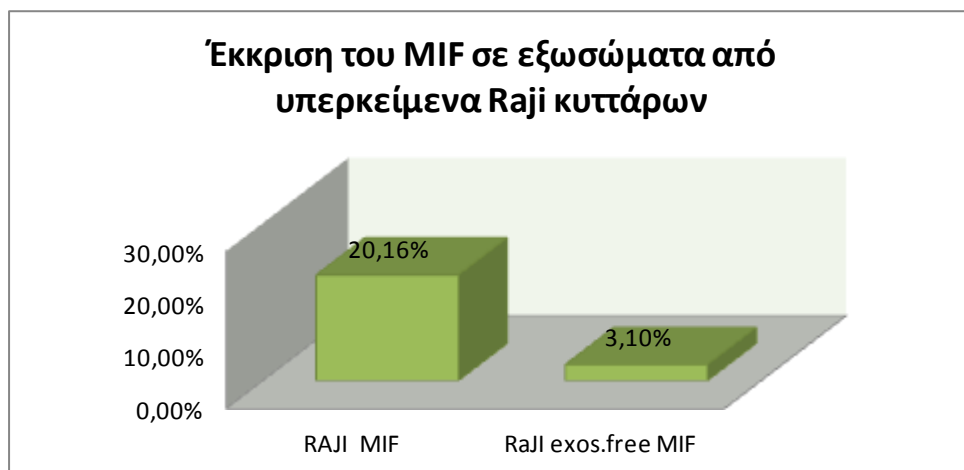
Παρομοίως, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και στα υπερκείμενα των HL-60 κυττάρων και τα αποτελέσματα της έκκρισης του MIF φαίνονται ως ποσοστά στο Διάγραμμα 10. Παρατηρούμε μία μικρή αύξηση στα ποσοστά της έκκρισης του MIF σε υπερκείμενα exosomes free η οποία δεν είναι ικανή να μας οδηγήσει σε συμπεράσματα σχετικά με την έκκριση του με τη βοήθεια των εξωσωμάτων.



Διάγραμμα 16 Ανίχνευση του εκκρινόμενου μορίου MIF με μορφή εξωσωμάτων σε υπερκείμενα καλλιιεργειών μετά από επαγωγή με IFN-γ. Τα ποσοστά αφορούν τα HL-60 κύτταρα χωρίς IFN-γ (control), 24 και 48 ώρες μετά την επαγωγή με IFN-γ.

3.4.3 RAJI ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ

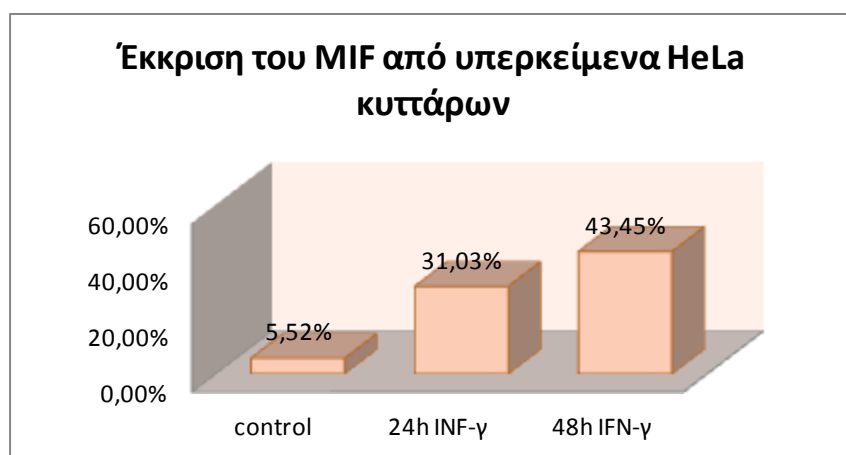
Όσον αφορά την κυτταρική σειρά Raji, όπως έχουμε ήδη αναφέρει πρόκειται για Β-λευχαιμία όπου τα κύτταρα εκφράζουν τάξης II μόρια, οπότε η επαγωγή της IFN-γ δεν είχε νόημα σε αυτά τα κύτταρα. Τα ποσοστά του εκκρινόμενου MIF φαίνονται στο Διάγραμμα 11. Το χαμηλό ποσοστό του MIF στα exos.free υπερκείμενα υποδηλώνει ότι πιθανόν δεν εκκρίνεται με τη μορφή εξωσωμάτων.



Διάγραμμα 17 Ανίχνευση του εκκρινόμενου μορίου MIF με μορφή εξωσωμάτων σε υπερκείμενα καλλιιεργειών. Τα ποσοστά αφορούν τα Raji κύτταρα.

3.4.4 HeLa ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ

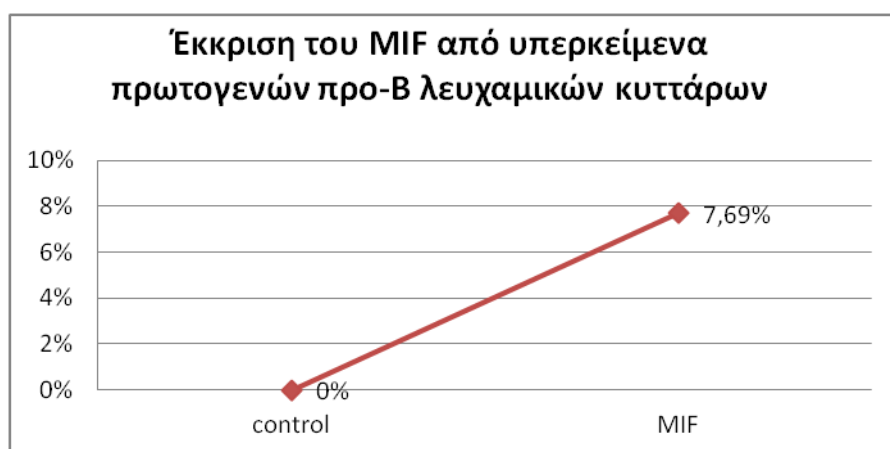
Όσον αφορά το κυτταρικό μοντέλο HeLa είναι γνωστό ότι απαιτείται η επαγωγή με IFN- γ προκειμένου να μελετήσουμε την έκφραση των τάξης II μορίων. Ως εκ τούτου εξετάστηκε και η ποσοστιαία μεταβολή του MIF ως προς τις 24 ώρες και 48 ώρες επαγωγής με IFN- γ . Παρατηρούμε αύξηση των ποσοστών έκκρισης με το πέρασμα των ωρών επαγωγής των κυττάρων. Βιβλιογραφικά, δεν υπάρχει καμία μελέτη που να υποδεικνύει τα HeLa κύτταρα ικανά να κάνουν εξωκύτωση με τη βοήθεια των εξωσωμάτων. Γι' αυτό και δεν ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδος εδώ, παρά μόνο ανιχνεύθηκε η έκκριση του MIF συναρτήσει των ωρών επαγωγής της IFN- γ .



Διάγραμμα 18 Ανίχνευση του εκκρινόμενου μορίου MIF σε υπερκείμενα καλλιέργειών. Τα ποσοστά αφορούν τα HeLa κύτταρα.

3.4.5 ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΠΡΟ-B ΛΕΥΧΑΜΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Όσον αφορά τα ανθρώπινα πρωτογενή κύτταρα λευχαιμικά κύτταρα, η έκκριση του MIF όπως δείχτηκε με τη μέθοδο της ELISA από υπερκείμενα καλλιιεργειών τους, κυμαίνεται στο 7,69%, συγκριτικά με το control του πειράματος που είναι το coating buffer, όπως έχουμε αναφέρει. Το γεγονός ότι το ενδοκυτταρικό MIF σύμφωνα με την ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής (Διάγραμμα 5) ήταν ~62,95%, με την ταυτόχρονη μειωμένη έκκριση της κυτοκίνης μας ωθεί στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται μεν στα κύτταρα αυτά αλλά δεν προλαβαίνει να εκκριθεί πιθανώς λόγω της ενδοκύττωσης της με τη βοήθεια του CD74 υποδοχέα της.



Διάγραμμα 19 Ανίχνευση του εκκρινόμενου μορίου MIF σε υπερκείμενα καλλιιεργειών. Τα ποσοστά αφορούν τα πρωτογενή λεμφοβλαστικά κύτταρα.

ΠΑΡΑΘΕΜΑ:

ΠΙΝΑΚΕΣ ΤΩΝ ΜΕΣΩΝ ΟΡΩΝ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΥΠΙΚΗΣ ΑΠΟΚΛΙΣΗΣ ΤΟΥΣ

Παράθεμα 1(Διάγραμμα 1)

	M.O.	stdev
DR intra	15,14%	3,02%
CD74 intra	63,29%	7,30%
CD74 memb	35,26%	2,98%
MIF	74,55%	0,83%

Παράθεμα 3 (Διάγραμμα 3)

	M.O.	stdev
DR	16,08%	6,46%
CD74memb	28,04%	7,93%
CD74 intra-	50,63%	19,04%
MIF	40,12%	5,54%

Παράθεμα 2 (Διάγραμμα 2)

	M.O control	stdev
DR intra-	53,06%	1,56%
CD74 memb	70,83%	21,34%
CD74 intra	43,82%	10,19%
MIF	41,33%	6,66%

Παράθεμα 4 (Διάγραμμα 4)

	M.O.	stdev
DR intra-	69,24%	8,93%
CD74 memb	74,08%	6,33%
CD74 intra	86,87%	10,36%
MIF	83,05%	7,48%

Παράθεμα 5 (Διάγραμμα 5)

	M.O.	STDEV
DR intra	55,76%	17,83%
DR membrane	52,65%	24,74%
CD74 in	71,76%	33,66%
CD74 memb	71,66%	37,48%
MIF intra-	62,95%	26,22%
MIF mb	50,44%	20,11%
DO	74,04%	8,33%
DM	30,83%	18,29%

Παράθεμα 6 (Διάγραμμα 6)

	M.O.	stdev
DR intra	32,69%	15,70%
DR membrane	21,46%	1,58%
CD74 intra-	64,69%	2,15%
CD74 memb	51,56%	12,88%
MIF intra-	45,53%	17,47%
MIF memb	83,36%	3,10%
DO	72,78%	3,57%
DM	67,72%	6,07%

Παράθεμα 7 (Διάγραμμα 7)

M.O 24h	M.O.	stdev
DR intra	13,32%	1,99%
CD74 intra	49,20%	34,54%
CD74 memb	24,00%	10,00%
MIF	45,46%	10,00%

Παράθεμα 9 (Διάγραμμα 9)

M.O 24h	M.O	stdev
DR intra-	53,28%	1,92%
CD74 memb	53,26%	14,12%
CD74 intra	44,40%	4,91%
MIF	32,74%	11,70%

Παράθεμα 8 (Διάγραμμα 8)

M.O 48h	M.O.	stdev
DR intra	15,32%	2,88%
CD74 intra	32,14%	0,04%
CD74 memb	45,84%	11,03%
MIF	50,69%	13,00%

Παράθεμα 10 (Διάγραμμα 10)

M.O 48h	M.O	stdev
DR intra-	57,58%	12,45%
CD74 memb	55,03%	11,03%
CD74 intra	48,49%	9,50%
MIF	33,39%	1,34%

Παράθεμα 11 (Διάγραμμα 11)

M.O.24h	M.O.	STDEV
DR	29,10%	5,56%
CD74 memb	55,32%	9,34%
CD74 intra-	42,09%	3,43%
MIF	52,96%	3,89%

CD74 intra-	41,23%	6,48%
MIF	56,64%	2,13%

Παράθεμα 12 (Διάγραμμα 12)

M.O.48h	M.O.	STDEV
DR	31,36%	5,36%
CD74 membrane	38,66%	7,30%

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη των πολλαπλών ρόλων του CD74 μόριου τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αντικείμενο έρευνας, καθώς το μόριο-συνοδός (chaperone) φαίνεται να εμπλέκεται σε πολλές διαδικασίες/μονοπάτια. Ενώ, λοιπόν, αρχικά ο ρόλος του είχε συνδεθεί με την μεταφορά του κλασικού τάξης II μορίου (DR) και συνεπώς με το ενδοσωμικό μονοπάτι, οι τελευταίες έρευνες έχουν στραφεί στο ρόλο του ως υποδοχέα της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης MIF.

Σε φυσιολογικούς ιστούς, ο CD74 εκφράζεται στα τάξης II-θετικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των Β κυττάρων, μονοκυττάρων, μακροφάγων, δενδριτικών, κάποιων ενεργοποιημένων Τ κυττάρων, Langerhans κυττάρων και του επιθήλιου του θύμου. Κάτω από φλεγμονώδεις συνθήκες, μπορεί να παρατηρηθεί η έκφραση του στο ενδοθήλιο και σε ορισμένα επιθηλιακά κύτταρα (*Moller et al.,1995*). Επίσης, ο CD74 εκφράζεται σε μία ποικιλία από καρκινικά κύτταρα. Η έκφραση του έχει παρατηρηθεί σε ~90% καρκίνους των Β λεμφοκυττάρων, μαζί με τις κυτταρικές σειρές που έχουν προέλθει από αυτούς τους καρκίνους (*Burton et al.,2004; Stein et al., 2004*). Η έκφραση του CD74 έχει διαπιστωθεί σε κακοήγη όγκο του γαστρικού (*Ishigami et al.,2001*), νεοπλάσματα του επιθήλιου του θύμου (*Datta et al.,2000*) κ.ά. Η έκφραση του CD74 σε πολλούς από αυτούς τους τύπους καρκίνου έχει προταθεί ως παράγοντας πρόγνωσης, θεωρώντας τα υψηλότερα σχετικά επίπεδα του μορίου ως δείκτη της επιδείνωσης της ασθένειας (*Chamuleau et asl.,2004*). Αυτή η συσχέτιση πιθανότατα πηγάζει από την καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης του ασθενούς. Επιπρόσθετα, τόσο σε κανονικούς όσο και σε καρκινικούς κυτταρικούς τύπους έχει διαπιστωθεί η συν-έκφραση του DR με το CD74. Γνωρίζουμε ότι στους περισσότερους τύπους καρκίνου δεν παρατηρείται έκφραση των τάξης II μορίων, όπως στα K562 και HL-60 κυτταρικά μοντέλα που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματα. Μία από τις εξαιρέσεις αποτελεί η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (AML), όπου η διαφυγή της άνοσο-επιτήρησης συμβαίνει μέσω της παρουσίας του HLA-DR /CLIP στην επιφάνεια των λευχαιμικών κυττάρων και έτσι εμποδίζεται η ενεργοποίηση των CD4+ Τ κυττάρων (*Marvin et al.,2012*), γεγονός που βάζει στο επίκεντρο της έρευνας το CD74 με σκοπό την θεραπεία των λευχαιμιών. Προς την κατεύθυνση της θεραπείας των Β- κυτταρικών νεοπλασμάτων (μη-Hodgkin λέμφωμα και το πολλαπλούν μύελωμα) και έχοντας στο επίκεντρο της έρευνας το CD74 μόριο, εξετάστηκε εν μέρει ο διττός ρόλος του (*Stein et al.,2007*).

Παρότι το επιστημονικό ενδιαφέρον για τις θεραπευτικές προσεγγίσεις λευχαιμιών έχει στραφεί στην παραγωγή του μονοκλωνικού αντισώματος anti-CD74 (hLL1 milatuzumab or IMMU-115) και ο CD74 έχει καταταχθεί ως νέο υποψήφιο μόριο-στόχος, οι έρευνες επικεντρώνονται στην ιδιότητα του ως σηματοδοτικό μόριο. Έχει δειχθεί ότι παίζει καθοριστικό ρόλο την ωρίμανση των Β κυττάρων μέσω ενός

μονοπατιού που οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-κΒ (*Matza et al.,2003;Becker-Herman et al.,2005*). Επιπλέον, με τη χρήση αντισωμάτων anti-CD74 σε ποντικούς δείχθηκε (*Starlets et al.,2005*) ότι οι Syk, PI3K και Akt κινάσες ενεργοποιούνται μετά από την πρόσδεση του CD74 σε Β κύτταρα και η ενεργοποίηση του NF-κΒ συμβαίνει με ακόλουθη μεταγραφή των αντι-αποπτωτικών γονιδίων, όπως το *Bcl-X_L*. Αργότερα, μελέτες σε κύτταρα του γαστρεντερικού επιθηλίου έδειξαν ότι ο CD74 αποτελεί υποδοχέα για το Gram αρνητικό Βακτήριο *H.pylori* και σηματοδοτεί τον παράγοντα NF-κΒ καθώς και δίνει ερέθισμα για την παραγωγή της κυτοκίνης IL-8. (*Beswick et al.,2005;Beswick et al.,2006*).

Όσον αφορά τον παράγοντα MIF, υπάρχει πληθώρα αναφορών για το ρόλο του ως (α) καταστολέα της δράσης ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, (*Hudson et al.,1999; Mitchell et al.,2002*), (β) ενεργοποιητή στοιχείων των μονοπατιών της MAPK κινάσης και του Jun-activation domain binding protein (JAB1) (*Lolis et al.,2003;Donn et al.,2004; Kleemann et al.,2000*), (γ) ανταγωνιστή της δράσης των γλυκοκορτικοειδών (*Roger et al.,2005*,) και (δ) υπέρ-εκφράζεται σε όγκους (solid tumors) (*Bando et al.,2002;Meyer-Siegler et al.,1996*) αλλά και συσχετίζεται με την καρκινική επιδείνωση (*Meyer-Siegler et al.,2006;Nishira et al.,2003;Tallos et al.,2005*). Αξιοσημείωτη ήταν η μελέτη της *in vitro* και *in vivo* ρύθμισης της εισαγωγής του rMIF και η επίδραση της στην έκφραση των τάξης II μορίων (*Stavitsky et al.,2002*). Αυτό που δείχθηκε ήταν ότι, η αυξημένη έκκριση της κυτοκίνης MIF (που ήταν περισσότερη από τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις του μορίου, εξαιτίας της εξωγενούς πρόσληψης) συνεπαγόταν μείωση της έκφρασης των τάξης II μορίων των περιτοναϊκών μακροφάγων και ενδοθηλιακών κυττάρων. Η μείωση αυτή θα σήμανε εμπόδιο στην αντιγονοπαρουσίαση πράγμα που ενισχύει την άποψη μας για την εμπλοκή του MIF στη διαδικασία αυτή.

Η υπόθεση μας για επαναπρόσληψη του MIF ενισχύεται από πρόσφατη μελέτη (*Schwartz et al.,2011*) σχετικά με την ενδοκύτωση του MIF, μια διαδικασία που βρέθηκε να εξαρτάται από κυστίδια-clathrin και από την GTPase dynamin σε κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένου της HeLa σειράς, που εξετάσαμε και εμείς. Απέδειξαν λοιπόν, ότι αφού εισέλθει(γρήγορα) η κυτοκίνη, βρέθηκε να συν-εντοπίζεται με τα πρώιμα και τα ώριμα ενδοσωμικά κυστίδια. Αξιοσημείωτο, ωστόσο είναι ότι τόσο ο CD74 όσο και ο CXCR4, υποδοχείς του MIF φαίνεται να κατέχουν καθοριστικό ρόλο στην ενδοκύτωση του μορίου. Η παρουσία του CD74 επιταχύνει την ενδοκύτωση ενώ και οι δύο υποδοχείς βρέθηκε να συν-εντοπίζονται με το MIF τόσο στην κυτταρική μεμβράνη όσο και ενδοκυτταρικά στο ενδοσωμικό μονοπάτι, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση μας για συμμετοχή του μορίου στην αντιγονοπαρουσίαση. Το αν ο MIF, μετά την ενδοκύτωση του πηγαίνει προς υποβάθμιση στα λυσοσωμικά διαμερίσματα ή εάν ανακυκλώνεται στην μεμβράνη μένει να εξακριβωθεί. Τέλος σημαντικό είναι ότι δεν έχει βρεθεί μέχρι τώρα, ποιες

πρωτεΐνες στρατολογούνται στα ενδοσωμικά διαμερίσματα απουσία των τάξης II μορίων του Κ.Σ.Ι.

Επίσης, σε μελέτη (*Potolicchio et al., 2003*) σχετικά με την ενζυμική ενεργότητα του μορίου (αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών σε οξειδωμένα πεπτιδία σε ουδέτερο pH), βρέθηκε (με τη χρήση ELISA και CD ανάλυσης) ότι μπορεί ικανώς να προσδένει πεπτιδία και συγκεκριμένα το επιφανειακό αντιγόνο της ηπατίτιδας Β (HBsAg) και της ινσουλίνης Β (InsB), πεπτιδία που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με τα τάξης II: HLA-DP2 και HLA-DQ8, αντίστοιχα. Επίσης, λόγω του ότι το MIF βρέθηκε να συνκατακρημνίζεται με τα HLA-DP2/15 μόρια, ο ρόλος της κυτοκίνης ως chaperone στην αντιγοπαρυσίαση μέσω τάξης II μορίων προτάθηκε στην μελέτη αυτή και μάλιστα χωρίς να έχει ακόμη αποδειχτεί πως ο CD74 αποτελεί τον υποδοχέα του (*Leng et al., 2003*).

Γνωρίζοντας την αλληλεπίδραση του CD74 και το MIF στην ανάπτυξη καρκίνου και λαμβάνοντας υπόψη την απαραίτητη παρουσία του CD74 για τη σηματοδότηση μέσω MIF, δε θα μπορούσαμε να ελέγξουμε τον ουσιώδη ρόλο του CD74 στην αντιγοπαρυσίαση χωρίς να εξετάσουμε το ενδεχόμενο ο MIF να λαμβάνει μέρος στη διαδικασία αυτή. Έτσι, στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του διττού ρόλου του CD74, ενώ για πρώτη φορά μελετάται σε λευχαιμικές σειρές η ανίχνευση του MIF με σκοπό την ένταξη του συμπλόκου CD74, /MIF στο ευρύτερο πλαίσιο της ανοσίας.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση του CD74 τόσο ενδοκυτταρικά όσο και μεμβρανικά με ανοσοφθορισμό και κυτταρομετρία ροής σε μία σειρά από λευχαιμικές σειρές αλλά και πρωτογενή λεμφοβλαστικά κύτταρα καθώς και στην καρκινική σειρά HeLa. Η έκφραση του εξετάστηκε ταυτόχρονα με τη μελέτη του κλασικού τάξης II μορίου HLA-DR αλλά και του συνδέτη του CD74, τον MIF. Η έκφραση του MIF ελέγχθηκε ενδοκυτταρικά με ανοσοφθορισμό και κυτταρομετρία ροής αλλά μελετήσαμε και την έκκριση του (ως κυτοκίνη) με τη μέθοδο της ELISA. Στα πρωτογενή λευχαιμικά κύτταρα καθώς και στα HeLa μελετήθηκε το συνολικό προφίλ έκφρασης τους (DR, DO, DM, CD74_{intra}, CD74_{mb}, MIF_{intra}, MIF_{mb}) εφόσον επρόκειτο για κύτταρα που δεν είχαν ξανά-μελετηθεί. Τα παραπάνω πειράματα επαναλάβαμε μετά από επαγωγή της IFN-γ στα K562 και HL-60 κύτταρα, που η επαγόμενη έκφραση των τάξης II μορίων έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης και συζήτησης σε προηγούμενες έρευνες, καθώς πρόκειται για λευχαιμικά κυτταρικά μοντέλα που διαφεύγουν της άνοσο-επιτήρησης εφόσον εμποδίζεται η αντιγονοπαρυσίαση, πράγμα που συμβαίνει στις περισσότερες λευχαιμίες. Παρόλα αυτά και σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες (*Papadimitriou et al., 2008*) δείξαμε ότι υπάρχουν ενδοκυτταρικά αποθέματα του DR παρόλο που δεν το συναντάμε στην μεμβράνη των κυττάρων (K562: 15,14%±3,02% K562-CIITA: 53,06%±1,56% και HL-60: 16,08%±6,46%).

Γνωρίζουμε ότι ο CD74 περνά από φάσεις ανακύκλωσης στην πλασματική μεμβράνη με χρόνο ημιζωής στα 3-4 λεπτά στην κυτταρική επιφάνεια (*Henne et al., 1995*). Έκπληξη προκαλεί το γεγονός ότι παρόλο που τα K562 και τα HL-60 είναι τάξης II αρνητικά κύτταρα εμφανίζουν τόσο ενδοκυτταρικά όσο και μεμβρανικά τη σταθερή αλυσίδα, li. Αυτό που δείξαμε είναι ότι ο CD74 ανιχνεύεται μεμβρανικά σε ικανά ποσοστά σε όλα τα κυτταρικά μοντέλα που χρησιμοποιήσαμε (K562:35,26% , K562-CIITA:70,83%, HL-60:28,04%, Raji:74,08%, HeLa:51,56% και πρωτογενή λεμφοβλαστικά:52,65%), πράγμα που σημαίνει πως ο ρόλος του δεν σταματά στο ενδοσωμικό μονοπάτι, καθώς ο χρόνος ημιζωής του στην κυτταρική επιφάνεια δεν μπορεί να δικαιολογήσει τα ποσοστά αυτά. Μέχρι πρότινος δεν είχε μελετηθεί ο επιφανειακός ρόλος του CD74 σε καμία από αυτές τις κυτταρικές σειρές.

Αξιοσημείωτο είναι ότι ενώ τα HeLa κύτταρα δεν εκφράζουν ενδογενώς CD74, ανιχνεύσαμε τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη τόσο εσωτερικά(64,69%) όσο και μεμβρανικά (51,56%) πράγμα που ενισχύει τα δεδομένα για ενδοκύτωση του CD74 μέσω MIF που υπάρχει στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών (MIF_{membrane}: 83,36%±3,10%) και μάλιστα σε πολύ μεγάλο ποσοστό. Το γεγονός ότι εντοπίσαμε CD74 μεμβρανικά και ενδοκυτταρικά έρχεται σε αντίθεση με τα δεδομένα της μελέτης των Schwartz et al., 2011, όπου ισχυριζόμενοι ότι τα HeLa κύτταρα δεν παράγουν CD74 σε φυσιολογικές συνθήκες, καταλήγουν ότι η ενδοκύτωση του MIF πραγματοποιείται μέσω του CXCR4 υποδοχέα της κυτταροκίνης (που εκφράζεται ενδογενώς σε χαμηλά επίπεδα από τα κύτταρα αυτά). Η πιθανή εμπλοκή του CXCR4 υποδοχέα, απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση καθώς δεν έχει δείχθει κατά πόσο επαρκεί το επίπεδο έκφρασης του στα HeLa κύτταρα για την ενδοκύτωση του MIF. Για την ακρίβεια, αυτό που δείχτηκε στην παραπάνω μελέτη ήταν ότι διαμολύνοντας τα κύτταρα με τον CD74, επιταχύνεται η ενδοκύτωση, ενώ στα ίδια διαμολυσμένα κύτταρα όταν προστεθεί ο ειδικός για τον CXCR4 αναστολέας, AMD3100 μειώνεται η ενδοκύτωση(20%). Άλλη μία παράμετρος που μένει να διαλευκανθεί είναι ποιες διαδικασίες ακολουθούνται και έχουμε εντοπισμό του MIF στα Rab7+ κυστίδια (ώριμα ενδοσώματα), πράγμα που έχει δείχθει ότι συμβαίνει και για τα DR, DM, DOB μόρια, μετά από υποκυτταρική κλασμάτωση (*Papadimitriou et al., 2008*).

Συμπερασματικά, αυτό που προκύπτει είναι ότι ενδεχομένως υπάρχει αλληλεπίδραση των δύο υποδοχέων για MIF, όμως σύμφωνα με τα πειράματα της παρούσας εργασίας ο εντοπισμός του CD74 σίγουρα σχετίζεται με την ενδοκύτωση της κυτταροκίνης, καθώς τα καρκινικά αυτά κύτταρα δεν εκφράζουν σε φυσιολογικές συνθήκες τάξης II μόρια και άρα ο ρόλος που επιτελεί ο CD74 αφορά τη σηματοδότηση διαμέσου της πρόσδεσης με το MIF.

Τα παραπάνω ενισχύονται από το προφίλ ανίχνευσης των μορίων αυτών σε πρωτογενή λεμφοβλαστικά κύτταρα (MIF_{membrane}: 50,44%, MIF_{ενδοκυτταρικό}:62,95% CD74_{membrane}:71,66% και CD74_{ενδοκυτταρικό}:71,76%). Επίσης, σημαντικό είναι ότι

μελετώντας για πρώτη φορά πρωτογενή κύτταρα, παρατηρούμε δύο ξεκάθαρους υπό-πληθυσμούς για το MIF_{membrane} και το CD74_{membrane} που αντιστοιχούν σε δύο κορυφές (Εικόνα 15). Το γεγονός ότι ο CD74 ενδοκυτταρικά όμως, δημιουργεί δύο πληθυσμούς CD74_{high} και CD74_{low} είχε διαπιστωθεί σε παλαιότερη μελέτη για τα HL-60 κύτταρα (Διδακτορικό Λίνας Παπαδημητρίου). Μελετώντας όμως το μεμβρανικό πλέον CD74 αλλά και το MIF, διαπιστώνουμε ότι παρόμοια εικόνα υπάρχει στην μεμβράνη των πρωτογενών κυττάρων. Έτσι, ενώ παλαιότερα έμοιαζε παράξενο να υπάρχει η σταθερή αλυσίδα σε τάξης II αρνητικά κύτταρα, τώρα μπορούμε να αιτιολογήσουμε την παρουσία της γνωρίζοντας το πλειοτροπικό ρόλο του μορίου. Σίγουρα, χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να εξακριβωθεί εάν μία από τις ιδιότητες του CD74 είναι να μπλοκάρει την αντιγοπαρουσίαση σε συνεργασία με το MIF. Γνωρίζουμε ήδη ότι και σε λευχαιμικά κύτταρα που είναι τάξης II-θετικά αυτό που παρουσιάζουν στην μεμβράνη τους είναι DR-CLIP κάνοντας έτσι το CLIP πεπτίδιο (91-99 α.α.) έναν από τους σημαντικότερους στόχους καταστολής για τις θεραπείες των ασθενειών (Marvin et al.,2012, Marvin et al.,2011,Martine et al.,2004).

Κάτι ακόμη που προξένησε το ενδιαφέρον είναι ότι στα κύτταρα Raji που εκφράζουν κλασικά και μη-κλασικά τάξης II μόρια του Κ.Σ.Ι, παρατηρείται πολύ υψηλό ποσοστό του CD74_{membrane}(74,08%) αλλά εξίσου υψηλό και MIF_{ενδοκυτταρικό} (83,05%) γεγονός που σχετίζεται με την αλληλεπίδραση τους. Δηλαδή, κατά τη βιοσύνθεση των τάξης II μορίων παράγεται και η σταθερή αλυσίδα (Ii) και άρα ο CD74 πηγαίνει στην μεμβράνη για ανακύκλωση. Η αυξημένη έκφραση του CD74 μπλοκάρει την παρουσίαση μέσω τάξης II των ενδογενών-καρκινικών αντιγόνων.

Όσον αφορά τον ρόλο του MIF στην αντιγονοπαρουσίαση, ελέγξαμε την κυτοκίνη ενδοκυτταρικά σε όλες τις κυτταρικές σειρές αλλά και μεμβρανικά στα HeLa και στα πρωτογενή λευχαιμικά κύτταρα. Το υψηλό ποσοστό του MIF που γενικά εκφράζεται από φυσιολογικά κύτταρα και αποθηκεύεται σε ενδοκυτταρικά pools δεν δικαιολογείται παρά μόνο εάν συμμετέχει σε κάποια άλλη διαδικασία, όπως στο ενδοσωμικό μονοπάτι, καθώς έχει βρεθεί ότι η σηματοδότηση μέσω MIF ξεκινά από τα ενδοσωμικά διαμερίσματα (εν μέρει ενεργοποίηση της Akt κινάσης) (Schwartz et al.,2011). Άρα, είναι πολύ πιθανόν να αλληλεπιδρούν με την CD74/Ii πρωτεΐνη ήδη κατά την συναρμολόγηση των τάξης II μορίων. Μένει λοιπόν, να διαλευκανθεί ο ρόλος του MIF συναρτήσει του υποδοχέα του, CD74.

Στα πειράματα όπου μελετήσαμε την ανίχνευση του MIF σε υπερκείμενα καλλιέργειών με τη μέθοδο της ELISA, διαπιστώσαμε ότι η προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη διατηρεί το προφίλ έκκρισης της σε όλα τα κυτταρικά μοντέλα που εξετάσαμε (Διαγράμματα 13-19). Επιπρόσθετα, η επαγωγή της με IFN-γ φαίνεται να επιδρά στην έκκριση της (Διαγράμματα 13-16) κάτι που ήταν γνωστό ότι συμβαίνει σε μακροφάγα (Calandra et al.,1994).Η επαγωγή της IFN-γ δε φαίνεται να αυξάνει

ενδοκυτταρικά την έκφραση της πρωτεΐνης στα K562 και K562-CITTA κύτταρα (Διαγράμματα 7-10) παρά μόνο στα HL-60 κύτταρα (Διαγράμματα 11&12). Όπως έχει αναφερθεί, παραμένει ακόμη υπό συζήτηση το αν επάγονται τα κύτταρα αυτά από την IFN- γ και λαμβάνοντας υπόψη ότι και τα υπόλοιπα μόρια παρουσιάζουν διακυμάνσεις ίσως πρέπει να εξεταστεί ο χρόνος επαγωγής των κυττάρων. Στα HL-60 κύτταρα (Διαγράμματα 11&12) η αύξηση της έκφρασης του MIF συμπίπτει με αύξηση της έκφρασης του DR πράγμα που περιπλέκει την υπόθεση μας καθώς εάν λαμβάνει μέρος το MIF στο ενδοσωμικό μονοπάτι θα αναμενόταν να έχει ανταγωνιστικό ρόλο δηλαδή να εμποδίζει την αντιγονοπαρουσίαση. Παράλληλα, στα HL-60 κύτταρα, το CD74_{ενδοκυτταρικό} μειώνεται ενώ αυξάνεται το CD74_{membrane} κάτι που αιτιολογεί την αύξηση του MIF. Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το επιφανειακό CD74 δρα συντονισμένα με το συνδέτη του MIF, ελέγχοντας την παραγωγή τους με θετικό 'feedback loop' που παρέχει αυξημένη έκφραση και των δύο κατά την καρκινογένεση. Φαίνεται, λοιπόν, πως ο MIF αυξανόμενος μπλοκάρει την αντιγονοπαρουσίαση επιτρέποντας στον CD74 να βγει στη μεμβράνη (Beswick *et al.*,2005). Άρα ενώ εξωγενώς επάγουμε το σύστημα (με την λεμφοκίνη IFN- γ) για την ανοσοαπόκριση ο MIF φαίνεται να δρα ανασταλτικά.

Τέλος, γνωρίζουμε ότι το DR συν-εντοπίζεται με τον CD9-marker των εξωσωμάτων στις ίδιες σειρές (αδημοσίευτα αποτελέσματα) αλλά και εξωκυττώνεται με τη βοήθεια των μεμβρανικών αυτών δομών, όπως έχει δειχτεί από παλαιότερες μελέτες. Στα πειράματα όπου πραγματοποιήθηκε θραυσματοποίηση των εξωσωμάτων στα υπερκείμενα των κυττάρων (Διαγράμματα 14-17) παρατηρούμε αύξηση στα ποσοστά της κυτοκίνης, πράγμα που ενισχύει την υπόθεση μας καθώς φαίνεται πως η πρωτεΐνη χρησιμοποιεί παρόμοιους μηχανισμούς δράσης με τα τάξης II μόρια του Κ.Σ.Ι.

Υπάρχουν δύο πιθανά μοντέλα που μένει να εξεταστούν περαιτέρω:(α) εξαιτίας του ρόλου του ως υποδοχέα υψηλής συγγένειας για το MIF δημιουργεί σύμπλοκο και με αυτόν τον τρόπο ενδοκυττώνεται η κυτοκίνη (β) τα κύτταρα όντας λευχαιμικά υπέρ-εκφράζουν MIF και CD74, μόρια γνωστά για την συμμετοχή τους (ως σύμπλοκο) στην κυτταρική επιβίωση/ πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και άρα λειτουργεί ως μηχανισμός άνοσο-διαφυγής αυτή η αυξανόμενη έκφραση. Άλλωστε ο CD74 έχει αναφερθεί ως υποδοχέας επιβίωσης, (Binsky *et al.*,2010;Shachar *et al.*,2011).

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Abbas, A., Lichtman, A. Basic Immunology. Second Edition, Saunders
- 2) Arunachalam, B., Lamb, C. A. & Cresswell, P. (1994). Transport properties of free and MHC class II-associated oligomers containing different isoforms of human invariant chain. *Int. Immunol.* 6, 439 – 451.
- 3) Bakke, O. and Dobberstein, B. (1990) MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell*, 63, 707 -716.
- 4) Becker-Herman, S. Arie, G., Medvedovsky, H., Kerem, A., Shachar I. (2005). CD74 is a member of the regulated intramembrane proteolysis-processed protein family. *Molecular Biology of the Cell*. 16, 5061-5069.
- 5) Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zerneck, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S.R., Bucala, R., Hickey, M.J., Weber, C., 2007. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and athero-genic cell recruitment. *Nat. Med.* 13, 587–596.
- 6) Beswick EJ, Pinchuk IV, Minchuk, et al. (2006). The Helicobacter pylori urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF- κ B activation and interleukin-8 production. *Infect Immun.* 74, 1148-1155.
- 7) Beswick, E. J. and Reyes, V. E. (2009). CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract. *W. J. of Gastroenterology*. 23. 2855-2861.
- 8) Beswick, E. J. Bland, D.A., Suarez, G., Barrera, C.A., Fan, X., Reyes, V.E. (2005). Helicobacter pylori binds to CD74 on gastric epithelial cells and stimulates Interleukin-8 production. *Infection and Immunity*. 73, 2736–2743.
- 9) Beswick EJ, Bland DA, Suarez G, Barrera CA, Fan X, Reyes VE. (2005). Helicobacter pylori binds to CD74 on gastric epithelial cells and stimulates interleukin-8 production. *Infect Immun.* 73, 2736-2743.
- 10) Binsky, I., Haran, M., Starlets, D., Gore, Y., Lantner, F., Harpaz, N., Leng L., Goldenberg D., M., Shvidel L., Berrebi, A., Bucala, R., Shachar I. (2007). IL-8 secreted in a macrophage migration-inhibitory factor and CD74-dependent manner regulates B cell chronic lymphocytic leukemia survival. *J. PNAS*. 104, 13408-13413.
- 11) Binsky, I., Lantner, L., Grabovsky, V., Harpaz, N., Shvidel, L., Berrebi, A., Goldenberg D., M., Leng L., Bucala, R., Alon, R., Haran, M., Shachar, I. (2010). TAp63 Regulates VLA-4 expression and chronic lymphocytic leukemia cell migration to the bone marrow in a CD74-dependent manner. *J. of Immunology*. 184, 4761-4769.
- 12) Bloom BR, Bennett B. (1966). Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*. 153:80– 82.
- 13) Brat DJ, Bellail AC, Van Meer EG (2005). IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets. *Neuro Oncol* 7:122–133.
- 14) Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364, 33–39.

- 15) Burton JD, Ely S, Reddy PK, et al.(2004). CD74 is expressed by multiple myeloma cells and is a promising target for therapy. *Clin Cancer Res.*10. 6606-6611.
- 16) Busch, R., Cloutier, I., S kaly, R.-P. and Hammerling, G. J. (1996). Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 15, 418–428.
- 17) Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R.(1995). MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377: 68-71.
- 18) Calandra T. and Roger T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature*. 3,791-800.
- 19) Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A. & Bucala, R. (1994). The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.* 179 , 1895–1902.
- 20) Chamuleau ME, Souwer Y, Van Ham SM, et al. (2004). Class II-associated invariant chain peptide expression on myeloid leukemic blasts predicts poor clinical outcome. *Cancer Res.*64.5546-5550.
- 21) Chesney, J., C.N., Metz, M., Bacher et al. (1999). An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med.*5,181-191.
- 22) Cho, Y., Crichlow, G.V., Vermeire, J.J., Leng, L., Du, X., Hodsdon, M.E., Bucala, R., Cap-pello, M., Gross, M., Gaeta, F., Johnson, K., Lolis, E.J., (2010). Allosteric inhibition of macrophage migration inhibitory factor revealed by ibudilast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 11313–11318.
- 23) Cresswell, P. (1996). Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84, 505–507.
- 24) Datta MW, Shahsafaei A, Nadler LM, Freeman GJ, Dorfman DM.(2000). Expression of MHC class II-associated invariant chain (Ii;CD74) in thymic epithelial neoplasms. *Appl Immunohistochem. Mol. Morphol.* 8,210-215.
- 25) David JR.(1966). Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci USA.*56,72 –77.
- 26) Dessein, A.F., Stechly, L., Jonckheere, N., Dumont, P., Monte, D., Leteurtre, E., Truant, S., Pruvot, F.R., Figeac, M., Hebbbar, M., Lecellier, C.H., Lesuffleur, T., Dessein, R., Grard, G., Dejonghe, M.J., de Launoit, Y., Furuichi, Y., Prevost, G., Porchet, N., Gespach, C., Huet, G. (2010). Autocrine induction of invasive and metastatic phenotypes by the MIF-CXCR4 axis in drug-resistant human colon cancer cells. *Cancer Res.* 70, 4644–4654.
- 27) Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD.(1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity.*1: 447-56.
- 28) Donn, R.P., Ray, D.W.(2004). Macrophage migration inhibitory factor: molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule. *Journal of Endocrinology.* 182: 1-9.

- 29) DonnRP, RayDW. (2004).Macrophage migration inhibitory factor:molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule.JEndocrinol.182, 1-9.
- 30) Fingerle-Rowson,G.,Petrenko,P., Metz,C.N., Forsthuber,T.G., Mitchell,R., Huss,R., Moll,U.,Muller W.(2003).The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting.PNAS.100, 9354 –9359. Hudson JD, Shoaibi MA,
- 31) Flaster, H., Bernhagen, J., Calandra, T., Bucala, R. (2007). The Macrophage Migration Inhibitory Factor-Glucocorticoid Dyad: Regulation of Inflammation and Immunity.Molecular Endocrinology.6, 1267-1280.
- 32) George M, Vaughn JH.(1962). In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity. Proc Soc Exptl Biol Med. 111, 514-21.
- 33) George, M., and J.H. Vaughn. (1962).In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111:514–521.
- 34) Gerloni M, Zanetti M.(2005).CD4 T cells in tumor immu-nity. Springer Semin Immunopathol.27, 37-48
- 35) Ham, van M., Lith van M., Lillemeier, B., Tjin, E., Gruneberg, U., Rahman, D.,Pastoors, L., Meijgaarden van K., Rou-card, C., Trowsdale, J., Ottenhoff, T.,Pappin, D. and Neefjes, J. (2000). Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. J. Exp.Med. 191, 1127–1136.
- 36) Harada A, Sek ido N, Ak ahoshi T, Wada T, Muk aida N, Matsushima K. (1994) Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation..J L eukoc Biol. 56,559 –564.
- 37) Henne, C., Schwenk, F., Koch, N., Moller, P.(1995). Surface expression of the invariant chain (CD74) is independent of concomitant expression of major histocompat-ibility complex class II antigens. Immunology 84, 177–182.
- 38) Howard A. Anderson, Daniel T. Bergstralh, Tatsuyoshi Kawamura, Andrew Blauvelt and Paul A. Roche. (1999). Phosphorylation of the Invariant Chain by protein kinase C regulates MHC Class II trafficking to antigen-processing compartments. Journal of Immunology 163, 5435-5443.
- 39) Hudson,J.D.,M.A.Shoaibi,R.Maestro et al.(1999).A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity.J.Exp.Med.190,1375-1382.
- 40) Ishigami S, Natsugoe S,Tokuda K, et al. (2001).Invariant chain expression in gastric cancer. Cancer Lett.168,87-91.
- 41) Jensen,P., Weber,D.Thayer, W., Chen,X., Dao, C.(1999). HLA-DM and the MHC Class II antigen presentation pathway. Immunological Rersearch. 20, 195-205.
- 42) Kelly, A. P., Monaco, J. J., Cho, S. and Trowsdale, J. (1991). A new human HLA class II-related locus.Nature 353,571–573.
- 43) Kleemann R, HausserA, Geiger G,et al.(2004).Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1activity and the cell cycle throughJab1. Nature. 408,211-216.
- 44) Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM. (1992).Interleukin-8 as a macrophagederived mediator of angiogenesis. Science 258, 1798-1801.

- 45) Koch N, Harris AW. (1984). Differential expression of the invariant chain in mouse tumor cells: relationship to B lymphoid development. *J Immunol.* 132, 12-5
- 46) Kropshofer, H., Arndt, S. O., Molden-hauer, G., Hammerling, G. J. and Vogt, A. B. (1997). HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity* 6, 293–302.
- 47) Kropshofer, H., Hammerling, G. J. and Vogt, A.B. (1999). The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. *Immunol. Rev.* 172, 267–278.
- 48) Kropshofer, H., Vogt, A. B., Molden-hauer, G., Hammer, J., Blum, J. S. and Hammerling, G. J. (1996). Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J.* 15, 6144–6154.
- 49) Leng, L., Bucala R. (2006). Insight into the biology of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) revealed by the cloning of its cell surface receptor. *Cell Research.* 16, 162-168.
- 50) Liljedahl, M., Kuwana, T., Fung-Leung, W.-P., Jackson, 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, 4817–4824.
- 51) Lolis E, Bucala R. (2003). Macrophage migration inhibitory factor. *Expert Opin Ther Targets.* 7, 153-164.
- 52) Maestro R, Carnero A, Hannon GJ and Beach DH. (1999.) A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J. Exp. Med.* 190, 1375–1382.
- 53) Marvin M. van L., Chamuleau M E.D, Ossenkoppele, G.J., Arjan A. van de L. Marieke van Ham S. (2012). *Oncol Immunology* 2, 211-213.
- 54) Matza D. Kerem A., Medvedovsky H., Lantner F., Shachar I. (2002). Invariant Chain-induced B cell differentiation requires intramembrane proteolytic release of the cytosolic domain. *Immunity* .17, 549-560.
- 55) Matza, D., Kerem, A., Shachar, I. (2003). Invariant chain, a chain of command. *Elsevier.* 24, 264-268.
- 56) Meyer-Siegler K.L., Iczkowski K. A., Leng L, Bucala R, Vera PL. (2006). Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells. *J Immunol.* 177, 8730-8739.
- 57) Meyer-Siegler K.L., Hudson P.B. (1996). Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology.* 48, 448-452.
- 58) Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, Bucala R. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 345–350.
- 59) Moller P, Henne C, Moldenhauer G. CD74 workshop panel report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, editors. (1995). *Leukocyte typing V, white cell differentiation antigens, vol.1.* New York: Oxford University Press, Inc. 568-571.
- 60) Morris, P., Shaman, J., Attaya, M., Amaya, M., Goondman, S., Bergman, C., Monaco, J., Mellins, E. (1994). An essential role for HLA-DM in antigen

- presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature*.368, 551-554.
- 61) Mosyak, L., Zaller, D. M. and Wiley, D.C. (1998). The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity*9, 377–383.
 - 62) Murakami, H., Akbar, S.M.F., Matsui, H., Horiike, N., Onji, M. (2002). Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunology*. 128, 504–510.
 - 63) Naujokas, M. F., Morin, M., Anderson, M. S., Peterson, M., and Miller, J. (1993). The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell* 74, 257–268.
 - 64) Nishihira, J., Ishibashi, T., Fukushima, T., Sun, B., Sato, Y., Todo, S. (2003). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its potential role in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*.995,171-182.
 - 65) Noels, H., Bernhagen, J., Weber, C., (2009). Macrophage migration inhibitory factor: a noncanonical chemokine important in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med*.19, 76–86.
 - 66) Ogawa, H., Nishihira, Y., Sato, et al. (2002). An antibody for migration inhibitory factor suppresses tumor growth and inhibits tumor-associated angiogenesis. *Cytokine*.12, 309-314.
 - 67) Pan-Yun Ting, J. and Trowsdale, J. (2002). Genetic control of MHC class II expression. *Cell*.109, 21-33.
 - 68) Papadimitriou L., Morianos I., Michailidou V., Dionyssopoulou E., Vassiliadis S., Athanassakis E. (2008). Characterization of intracellular HLA-DR, DM and DO profile in K562 and HL-60 leukemic cells. *Molecular Immunology*. 45, 3965–3973.
 - 69) Petra A.M., Warmerdam, Eric O., Long and Paul A. Roche. (1996). Isoforms of the Invariant Chain regulate transport of MHC Class II molecules to antigen processing compartments. *The Journal of Cell Biology* 133: 281-291.
 - 70) Pierre, P., Denzin, L.K., Hammond, C., Drake, J.R., Amigorena, S., Cresswell, P., and Mellman, I. (1996). HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments. *Immunity*, 4, 229–239.
 - 71) Potolicchio P., Santambrogio L., Strominger J.L. (2003). Molecular interaction and enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor with immunorelevant peptides. *J. of Biological Chemistry*.33, 30889-30895.
 - 72) Riese, R.J., Mitchell, R.N., Villadangos, J.A., Shi, G.P., Palmer, J.T., Karp, E.R., De Sanctis, G.T., Ploegh, H.L. and Chapman, H.A. (1998). Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin Invest*, 101, 2351-2363.
 - 73) Riese, R.J., Wolf, P.R., Bromme, D., Natkin, L.R., Villadangos, J.A., Ploegh, H.L. and Chapman, H.A. (1996). Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity*. 4, 357 - 366.
 - 74) Rocha, N. and Neefjes, J. (2008). MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. *EMBO J*. 27, 1-5.

- 75) Roger T, David J, Glauser MP & Calandra T. (2001). MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor4. *Nature* 414 920–924.
- 76) Roitt, I., Delves, P., ROITT'S ESSENTIAL IMMUNOLOGY. Tenth Edition, Blackwell
- 77) Sanderson, F., Kleijmeer, M., Kelly, A., Verwoerd, D., Tulp, A., Neefjes, J., Geuze, H.J., and Trowsdale, J. (1994). Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science*. 266, 1566–1569.
- 78) Sant AJ, Cullen SE, Schwartz BD. (1985). Biosynthetic relationships of the chondroitin sulfate proteoglycan with Ia and invariant chain glycoproteins. *J Immunol.* 135, 416-422.
- 79) Satoh A, Toyota M, Ikeda H, Morimoto Y, Akino K, Mita H, et al. (2004). Epigenetic inactivation of class II transactivator (CIITA) is associated with the absence of interferon-gamma-induced HLA-DR expression in colorectal and gastric cancer cells. *Oncogene*. 23, 8876-86
- 80) Schwartz V., Krüttgen A., Weis J., Weber C., Ostendorf T., Lue H., Bernhagen J. (2011). Role for CD74 and CXCR4 in clathrin-dependent endocytosis of the cytokine MIF. *Eur. J. Of Cell Biology*. 91435-449.
- 81) Schwartz, V., Lue, H., Kraemer, S., Korbiel, J., Krohn, R., Ohl, K., Bucala, R., Weber, C., Bernhagen, J., (2009). A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett.* 583, 2749–2757.
- 82) Shachar, I. and Haran, M. (2011). The secret second life of an innocent chaperone: the story of CD74 and B cell/chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Leukemia & Lymphoma*. 8, 1446-1454.
- 83) Shimizu, T., Abe, H., Nakamura et al. (1999). High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 751-758.
- 84) Siegrist, C.A., Martinez-Soria, E., Kern, I. and Mach, B. (1995). A novel antigen-processing-defective phenotype in major histocompatibility complex class II-positive CIITA transfectants is corrected by interferon-gamma. *J Exp Med*, 182, 1793-1799.
- 85) Simons, D., Grieb, G., Hristov, M., Pallua, N., Weber, C., Bernhagen, J., Steffens, G., (2011). Hypoxia-induced endothelial secretion of macrophage migration inhibitory factor and role in endothelial progenitor cell recruitment. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 668–678.
- 86) Sloan, V.S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Melins, E., and Zaller, D.M. (1995). Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature*. 375, 802–806.
- 87) Starlets, D Gore, Y., Binsky, I., Haran, M., Harpaz, N., Shvidel, L., Becker-Herman, S., Alain A., Shachar, I. (2006). Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood*. 107, 4807-4816.
- 88) Stavitsky, A.B, Xianli, J. (2002). In vitro and in vivo regulation by macrophage migration inhibitory factor (MIF) of expression of MHC-II, costimulatory, adhesion, receptor, and cytokine molecules. *Cellular Immunology*. 217, 95-104.

- 89) Stein R, Qu Z, Cardillo TM, et al. (2004). Anti-proliferative activity of a humanized anti-CD74 monoclonal anti-body, hLL1, on B-cell malignancies. *Blood*. 104.3705-3711.
- 90) Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1994). Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*. 368, 215–221.
- 91) Strubin, M., Berte, C. & Mach, B. (1986). Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J*. 5, 3483–3488.
- 92) Stumptner, P. and Benaroch, P. (1997). Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region. *EMBO J*. 16, 5807–5818.
- 93) T. Calandra, R. Bucala, . (1997). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) a glucocorticoid counter-regulator within the immune system, *Crit. Rev. Immunol*. 17, 77–88.
- 94) Takahashi, N., Nishihira, Y., Sato et al. (1998). Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med*. 4, 707-714.
- 95) Talos, F., Mena, P., Fingerle-Rowson, G., Moll, U., Petrenko, O. (2005). MIF loss impairs Myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death and Differentiation*. 12, 1319-1328.
- 96) Vogt, A. B., Kropshofer, H., Molden-hauer, G. and Hammerling, G. J. (1996). Kinetic analysis of peptide load-ing onto HLA-DR molecules mediated by HLA-DM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9724–9729.
- 97) Vogt, A. B., Stern, L. J., Amshoff, C., Dobberstein, B., Hammerling, G. J. and Kropshofer, H. (1995). Interference of distinct invariant chain regions with superantigen contact area and antigenic peptide binding groove of HLA-DR. *J. Immunol*. 155, 4757–4765.
- 98) Walter W, Lingnau K, Schmitt E, Loos M, Maeurer MJ. (2000). MHC class II antigen presentation pathway in murine tumours: tumour evasion from immuno-surveillance? *Br J Cancer* . 83: 1192-201.
- 99) Walter W, Lingnau K, Schmitt E, Loos M, Maeurer MJ. (2002) MHC class II antigen presentation pathway in murine tumours: tumour evasion from immuno-surveillance? *Br J Cancer* .83, 1192-201.
- 100) Warmerdam, P. A., Long, E. O. & Roche, P. A. (1996). Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *J. Cell Biol*. 133, 281–291.
- 101) Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, Remold HG, Clark SC, David JR. (1989). Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* , 86,7522-6.
- 102) Xiao, D.Z., Dai, B., Chen, J., Luo, Q., Liu, X.Y., Lin, Q.X., Li, H., Huang W., Yu X.Y. (2011). Loss of macrophage migration inhibitory factor impairs the growth properties of human HeLa cervical cancer cells. *Cell Proliferation*. 44, 582–590.
- 103) Zhong, G., Castellino, F., Romagnoli, P. and Germain, R. N. (1996). Evidence that binding site occupancy is necessary and sufficient for effective

major histo-compatibility complex (MHC) class II transport through the secretory pathway redefines the primary function of class II-associated invariant chain peptides (CLIP). *J. Exp. Med.* 184, 2061–2066.

- 104) Zwart W., Peperzak V., Vries E., Keller A., Horst G, Veraar E.A.M, Geumann U., Janssen H., Janssen L., Naik S.H, Neefjes J., Borst J. (2010). The invariant chain transports TNF family member CD70 to MHC class II compartments in dendritic cells. *J. Cell Science.* 123, 3817-3827.