

Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

<u>Πτυχιακή εργασία</u>

¨ Μελέτη του προφίλ έκφρασης των MHC II μορίων και της μορφολογίας της Μικρογλοίας σε ενεργοποιημένη και μη ενεργοποιημένη κατάσταση ¨



Υπεύθυνη Καθηγήτρια:Ειρήνη Αθανασάκη

Φοιτητής : **Σκόρδος Ιωάννης**

A.M : **1687**

Ηράκλειο 2013

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Ειρήνης Αθανασάκη.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ίδια την κ.Αθανασάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε, τις πολύτιμες συμβουλές της και την εμψύχωση σε όλη τη διαδικασία πραγμάτωσης της εργασίας μου. Πάντα με αμέριστη προσοχή και ενδιαφέρον ήταν δίπλα μου για να με διδάξει και να με καθοδηγήσει.

Επίσης την καθηγήτρια Ανθή Ρανέλλα, για την καθοδήγηση των πειραμάτων ,όσο καιρό πραγματοποιούσα τα πειράματα μου στο Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας. Καθώς επίσης και την ερευνήτρια Χαρά Συμιτζή.

Επιπρόσθετα τον καθηγητή Γεώργιο Φιλιππίδη και όλα τα μέλη του εργαστηρίου του, της Μη-Γραμμικής Μικροσκοπίας ,Ευαγγελία Γαβιοτάκη και Άννα Τσούκο, για τα πολύτιμα πειράματα της τρίτης αρμονικής που κάναμε και τις ευχάριστες ώρες που περάσαμε.

Βέβαια δεν θα μπορούσα ποτέ να παραβλέψω και να μην αναφέρω τα άτομα που με εκπαίδευσαν και με μύησαν στις εργαστηριακές τεχνικές. Και γι αυτό θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην ερευνήτρια Μαρία Καλογνόμου.

Επιπρόσθετα, ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στα μέλη του εργαστηρίου Ανοσοβιολογίας Γεωργία Παπαδογιάννη, Χριστιάνα Κυβελίδου, Κατερίνα Μπακέλα, Ιωάννα Ζέρβα,Κατερίνα Βαρδάκη, Αμαλία Ανθούση, Φωτάκη Μαξ ,Παντελή Πετρουλάκη και Μαρία Κουτσάκη για το ευχάριστο κλίμα, την εξαιρετική συνεργασία και την βοήθεια που μου προσέφεραν.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου που χωρίς τη βοήθειά τους δεν θα είχα καταφέρει τίποτα και όλους τους φίλους μου για τα υπέροχα φοιτητικά χρόνια που περάσαμε και που ήταν πάντα στο πλευρό μου. Και φυσικά στο πιο γλυκό κομμάτι της ζωής μου την Κυριακή.

Το ταξίδι της έρευνας τώρα αρχίζει.....

<u>Περιεχόμενα</u>

- 1 Εισαγωγή σελ 5
- 1.1 Μικρογλοία σελ 5
- 1.1.1 Φυσιολογία της μικρογλοίας σελ 6
- 1.1.2 Η διαδικασία ενεργοποίησης της μικρογλοίας σελ 8
- 1.1.3 Ο ρόλος της Μικρογλοίας σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες σελ 12
- 1.2 Το Μείζον Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας σελ 14
- 1.2.1 Τάξης Ι μόρια του ΜΗC σελ 15
- 1.2.2 Τάξης ΙΙ μόρια του ΜΗC σελ 16
- 1.2.3 Το ενδοσωμικό μονοπάτι σελ 18
- 1.2.4 Μη Κλασικά Τάξης ΙΙ μόρια σελ 19
- 1.3 Λιπιδικά Σωμάτια σελ 23
- 1.4 Μη γραμμική μικροσκοπία 3η Αρμονική σελ 25
- 1.5 Σκοπός της παρούσας εργασίας σελ 26
- 2 Υλικά και μέθοδοι σελ 27
- 2.1 Χειρισμός κυτταροκαλλιεργειών σελ 27
- 2.1.1 Κυτταρική σειρά BV-2 σελ 27
- 2.1.2 Ξεπάγωμα κυττάρων σελ 28
- 2.1.3 Πάγωμα κυττάρων σελ 29
- 2.2 Ανοσοφθορισμός και κυτταρομετρία ροής σελ 30
- 2.2.1 Εσωτερικός και εξωτερικός ανοσοφθοριμός σελ 30
- 2.3 Ανοσοφθορισμός και Confocal microscopy σελ 33
- 2.3.1 Εσωτερικός και εξωτερικός ανοσοφθορισμός σελ 34
- 2.4 Ανοσοφθορισμός και 3η αρμονική σελ 34
- 2.4.1 Εσωτερικός και εξωτερικός ανοσοφθορισμός σελ 34
- 2.5 Φθορισμός με Nile Red σελ 35
- 2.6 Κυτταρικός διαχωρισμός με τη χρήση Cell Sorter σελ 37

2.7 ELISA σελ 39

- 3 Αποτελέσματα σελ 41
- 3.1 Μελέτη του profile έκφρασης των H2-Α ενδοκυτταρικό και H2-Α μεμβρανικό στην μικρογλοιακή κυτταρική σειρά BV-2, η οποία δε βρίσκεται σε resting κατάσταση, μετά από επαγωγή με LPS, IFN-γ και IL-4. Σελ 41
- 3.1.1 Ανίχνευση των επιπέδων των Η2-Α μορίων με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής μετά την επαγωγή με IFN-γ σελ 41
- 3.1.2 Ανίχνευση των επιπέδων των Η2-Α μορίων με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής μετά την επαγωγή με LPS σελ 44
- 3.1.3 Ανίχνευση των επιπέδων των Η2-Α μορίων με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής μετά την επαγωγή με ΙL-4 σελ 46
- 3.2 Μελέτη του προφίλ έκφρασης των κλασσικών Η2-Α μορίων (ενδοκυτταρικό, μεμβρανικό) στην μικρογλοιακή κυτταρική σειρά BV-2 σε resting κατάσταση σελ 51
- 3.2.1 Ανίχνευση- Μελέτη των διαλυτών MHC ΙΙ μορίων στα υπερκείμενα της καλλιέργειας των BV-2 κυττάρων σελ 57
- 3.3 Μελέτη της έκφρασης των κλασικών και μη κλασικών Τάξης ΙΙ μορίων στην κατάσταση της resting μικρογλοίας μετά από επαγωγή με IFN-γ. Σελ 58
- 3.4 Μελέτη της έκφρασης των κλασικών και μη κλασικών Τάξης ΙΙ μορίων στην κατάσταση της resting μικρογλοίας μετά από επαγωγή με LPS σελ 61
- 3.4.1 Ανίχνευση- Μελέτη των διαλυτών MHC ΙΙ μορίων στα υπερκείμενα της καλλιέργειας των BV-2 κυττάρων τα οποία έχουν επαχθεί με LPS. Σελ 65
- 3.5 Μελέτη της Κοκκιότητας της Μικρογλοίας με τη χρησιμοποίηση της BV-2 κυτταρικής σειράς. Σελ 66
- 3.5.1 Μελέτη της κοκκιότητας μέσα από την έρευνα των λιπιδικών σωματιδίων. Σελ 66

3.5.1.1 Κυταρικές καλλιέργειες BV-2 πάνω σε cover slips. Επαγωγή με LPS. Σελ 67

- 3.5.1.2 Κυταρικές καλλιέργειες BV-2 σε φλάσκες. Επαγωγή με LPS. Σελ 71
- 3.5.2 Μελέτη της κοκκιότητας μέσα από την έρευνα των (πρώϊμων) ενδοσωμάτων. Σελ 78

3.5.2.1 Κυταρικές καλλιέργειες BV-2 πάνω σε cover slips.Επαγωγή με LPS σελ 79

3.5.2.2 Κυταρικές καλλιέργειες BV-2 σε φλάσκες. Επαγωγή με LPS. Σελ 81

- 3.6 Κυτταρικός διαχωρισμός με τη χρήση Cell Sorter για τη μελέτη του CD14 επιφανειακού υποδοχέα του LPS των BV-2 κυττάρων. Σελ 84
- 4. Συζήτηση σελ 88
- 5 Βιβλιογραφία σελ 94

<u>1 Εισαγωγή</u>

1.1 <u>Μικρογλοία</u>

Η Μικρογλοία αποτελεί το 20% των γλοιακών κυττάρων του εγκεφάλου και το 5-15% των συνολικών κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ).⁶³ Συνιστά τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στον εγκέφαλο. Έχει πολλούς ρόλους και καθήκοντα μέσα στο ΚΝΣ με κύρια λειτουργία τη διατήρηση της ομοιόστασης στο ΚΝΣ μέσα από τη συνεχή ανοσολογική επαγρύπνηση και απόκριση.

Ο Pio del Rio-Hortega το 1932 ήταν ο πρώτος ερευνητής που μελέτησε τη Μικρογλοία και περιέγραψε το συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό.³³ Σύμφωνα με τον Pio del Rio-Hortega καθώς και με τα μέχρι πρότινος πειραματικά αποτελέσματα, η μικρογλοία προέρχεται από πρόδρομα μυελικά κύτταρα έχουν μεταναστεύσει από την περιφέρεια στο ΚΝΣ και τα οποία είναι μεσεγχυματικής/μεσοδερμικής προέλευσης.²⁰ Τα αιμοποιητικά κύτταρα εισβάλλουν στον ιστό του ΚΝΣ κατά τα εμβρυϊκά στάδια ⁵³, δίνουν τα πρόδρομα μυελικά κύτταρα και διαφοροποιούνται σε μονοκύτταρα μέσα στο μυελό των οστών κατά την αιμοποίηση. Κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης μετά τη γέννηση, τα κύτταρα αυτά μεταναστεύουν στον παρεγχυματικό ιστό του εγκεφάλου (έχοντας αμοιβαδοειδή μορφή ^{14,44}), εγκαθίστανται σε όλες του τις περιοχές και διαφοροποιούνται σε μικρογλοιακά.^{4,93}



Εικόνα 1) Μικρογλοιακά κύτταρα που ανακαλύφθηκαν από τον Pio del Rio Hortega A)o Pio del Rio Hortega B) εικόνα με μικρογλοιακά κύτταρα που παρουσιάζουν διακλαδώσεις-ψευδοπόδια όπως σχεδιάστηκε από τον Hortega³²

Όταν τα μικρογλοιακά κύτταρα κατανεμηθούν στον παρεγχυματικό ιστό τότε αποκτούν τον "διακλαδισμένο" τους φαινότυπο, γνωστός ως ramified phenotype, ο οποίος είναι χαρακτηριστικός της ήρεμης - μη ενεργοποιημένης μικρογλοίας (resting microglia).

Τα μικρογλοιακά κύτταρα αποτελούν έναν πληθυσμό μακροφάγων κυττάρων του εγκεφάλου και συνεπώς έχουν φαγοκυττωτικές ιδιότητες. Επίσης είναι θετικά για επιφανειακούς μάρτυρες των μακροφάγων όπως ο CD11b (Mac1), ο Fc υποδοχέας, iba-1 ,F4/80.^{2,18,19,55,114.} Τέλος μπορούμε να διακρίνουμε εύκολα τα μικρογλοιακά κύτταρα από τους υπόλοιπους μακροφαγικούς πληθυσμούς διάκριση έγκειται στο ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα, εκφράζουν τον επιφανειακό μάρτυρα CD45 σε χαμηλά επίπεδα σε σχέση με τους υπόλοιπους πληθυσμούς μακροφάγων.⁹⁸

1.1.1 Φυσιολογία της Μικρογλοίας

Τα μικρογλοιακά κύτταρα χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες. Τα μη ενεργοποιημένα και τα ενεργοποιημένα. Κάθε κατηγορία παρουσιάζει τα δικά της διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά.

Μέσα στο ενήλικο υγιές ΚΝΣ (εγκέφαλο, νωτιαίο μυελό, οπτικό νεύρο και μάτια), τα μικρογλοιακά κύτταρα βρίσκονται σε ήρεμη κατάσταση μη

ενεργοποιημένα (resting microglia) και έχουν χαρακτηριστική διακλαδισμένη μορφή (ramified morphology)⁸².

Το σχήμα τους είναι επίμηκες και φέρουν προεκβολές οι οποίες εκφύονται από το κυρίως σώμα και διακλαδίζονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας ένα μεγάλο "δίκτυο".

Η χρήση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αποκάλυψε ότι το σώμα των μικρογλοιακών κυττάρων παρουσιάζει μικρή κινητικότητα σε αντίθεση με τις προεκβολές του,οι οποίες κινούνται διαρκώς. Η διαρκής αυτή κίνηση πραγματοποιείται με σκοπό την καταγραφή αλλαγών στο μικροπεριβάλλον του ΚΝΣ στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα.^{28,56}

Στην κατάσταση της ενεργοποιημένης μικρογλοίας, από αλλαγές στο μικροπεριβάλλον, τα μικρογλοιακά κύτταρα, αποκτούν τον επονομαζόμενο αμοιβαδοειδή σχηματισμό.

Αυτός ο σχηματισμός χαρακτηρίζεται από μείωση της πολυπλοκότητας του σχήματος των κυττάρων ,συρρίκνωση των προεκβολών τους, σημαντική αύξηση της κοκκιότητάς τους και έντονη κυτταρική κινητικότητα.⁹¹

Όσον αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της μικρογλοίας, πρέπει να σημειωθεί ότι στις in vitro κυτταροκαλλιέργειες, παρουσιάζεται μεγάλη ετερογένεια στο σχήμα τους. Τα κύτταρα μπορεί να αποκτήσουν αμοιβαδοειδής ή δι-πολικούς ή τρι-πολικούς, ατρακτοειδής ή ραβδωτούς μορφολογικούς σχηματισμούς ^{79,98} ανάλογα με το είδος της ενεργοποίησης-προσβολής.



Εικόνα 2) Μορφολογία της ήρεμης και ενεργοποιημένης μικρογλοίας. Ποντικίσια μικρογλοία σε εγκεφαλικό ιστό και και κυτταροκαλιέργεια Α) ήρεμη μικρογλοία με τις προεκβολές της (ramified),χρώση με Iba1 στον εγκεφαλικό φλοιό του ποντικών Β) μικρογλοία σε εγκεφαλικές τομές ποντικού, χρώση με Lucifer yellow, C) ενεργοποιημένη μικρογλοία (κυτταροκαλιέργεια), χρώση με FITC conjugated ILB4, D) φαγοκυττωτική μικρογλοία, χρώση με FITC-ILB4

1.1.2 Η διαδικασία ενεργοποίησης της μικρογλοίας

Η μικρογλοία μέσα στο ενήλικο υγιή εγκέφαλο και γενικά σε όλο το ΚΝΣ εντοπίζεται σε ήρεμη μη ενεργοποιημένη κατάσταση. Όμως ανά πάσα στιγμή, μπορεί να μετατραπεί σε ενεργοποιημένη. Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας επέρχεται σε περιπτώσεις μολύνσεων, τραυμάτων, ισχαιμίας, νευροεκφυλιστικών ασθενειών και σε νευρικές δυσλειτουργίες. Η ενεργοποίηση έχει ως στόχο να επαναφέρει την εγκεφαλική ομοιόσταση , να προστατέψει τα νευρικά κύτταρα και να αποτρέψει μια ενδεχόμενη παροδική ή μόνιμη βλάβη του ΚΝΣ.

Η ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων, οδηγεί στην ταχύτατη και ριζική αλλαγή του μεγέθους τους ,της γονιδιακής τους έκφρασης και της

λειτουργικής τους συμπεριφοράς .Επίσης, προκαλεί την κινητοποίησή και τη μεταφορά των μικρογλοιακών κυττάρων στο σημείο της μόλυνσης, στον πολλαπλασιασμό τους και στην οργάνωσή τους, με στόχο την προστασία και την αποκατάσταση της ομοιοστατικής ισορροπίας του προσβαλλόμενου ιστού.^{7,25,29,42,45,54,97,106}

Συγκεκριμένα, όσον αφορά τις λειτουργικές αλλαγές της μικρογλοίας, έχει παρατηρηθεί ότι κατά την ενεργοποίηση της, μεταβάλλονται τα επίπεδα έκφρασης των τάξης Ι και ΙΙ αντιγόνων του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) καθώς επίσης και τα συνδιεγερτικά μόρια B7.2, CD40,τα οποία στην κατάσταση της μη ενεργοποιημένης μικρογλοίας, εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα.

Η άμεση ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων μετά από κάποια μικροβιακή μόλυνση ή κάποιο φλεγμονώδες ερέθισμα, οφείλεται στη συνεχή ή επαγόμενη έκφραση επιφανειακών υποδοχέων, μέσω των οποίων μπορούν να αντιλαμβάνονται πολύ εύκολα τις αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του εγκεφάλου.

Η μικρογλοία σε μη ενεργοποιημένη κατάσταση, εκφράζει τους επιφανειακούς υποδοχείς του συμπληρώματος CR1, CR3, CR4 και 38,84 καθώς και τους FcRI, ΙΙ, ΙΙΙ.^{8,102} Επίσης, κατά την $C1_{a}R_{p}$ ενεργοποίησή τους τα κύτταρα αυτά εκφράζουν σε μεγάλο ποσοστό τον επιφανειακό μάρτυρα CD14 ,0 οποίος προσδένει TOV λιποπολυσακχαρίτη (LPS).To LPS είναι βασικό συστατικό της βακτηρίων.10,86 εξωτερικής μεμβράνης των gram, αρνητικών Επιπρόσθετα, η μικρογλοία εκφράζει και υποδοχείς προ- και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών, η ισορροπία των οποίων παίζει καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση της ανοσολογικής δράσης τους, στο περιβάλλον του εγκεφάλου.

Στην επιφάνεια της μικρογλοίας, εκφράζεται συνεχώς απουσία ερεθίσματος, **ο υποδοχέας της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ)** ,η οποία είναι φλεγμονώδης κυτοκίνη και επάγει την έκφραση των MHC I και II μορίων και γενικότερα την μεταγραφή γονιδίων που προωθούν την δράση των μικρογλοιακών κυττάρων σαν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.

Επίσης επάγει την έκφραση και άλλων συνδιεγερτικών μορίων, όπως είναι τα B7 (CD80/86) και LFA-1. Επιπλέον εκφράζονται και υποδοχείς

για τον tumor necrosis factor-α (TNF-α), οι TNFRI και ΙΙ ,οι οποίοι επάγουν την έκφραση τόσο προ- και αντι-φλεγμονωδών παραγόντων.

Ο TNF-α, είναι μια κυτοκίνη η οποία παράγεται από τα Th1 κύτταρα, τα μακροφάγα και τα μικρογλοιακά κύτταρα και δρα σαν αυτοκρινής παράγοντας.

Η δράση του περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-κB και την ενεργοποίηση πολλών γονιδίων στόχων τα οποία σχετίζονται με την ανοσολογική απάντηση σε κάποιο φλεγμονώδες ερέθισμα.

Τέλος η φλεγμονώδης δράση των κυτοκινών που μόλις αναφέρθηκε, παρεμποδίζεται από τη δράση αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως είναι οι IL-4, IL-10, IL-10 IL-13 και ο TGF-β^{9,21,37}



Εικόνα 3) Στάδια ενεργοποίησης της Μικρογλοίας και παραγωγής προ ή άντι φλεγμονώδων παραγόντων.

Τα μικρογλοιακά κύτταρα μετά την ενεργοποίηση τους, μπορεί να έχουν είτε κυτταροτοξικό είτε κυτταροπροστατευτικό ρόλο για τα νευρικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ευρύ φάσμα διαλυτών, παραγόντων που απελευθερώνουν κατά την ενεργοποίησή τους. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να είναι είτε προφλεγμονώδεις (προφλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-1 α/β, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, TNF-α, PGE₂, μονοξείδιο του αζώτου NO)^{21,62,65,67,78,87,90,96,100} και συνεπώς να

έχουν κυτταροτοξική δράση, είτε αυξητικοί, οι οποίοι σε συνδυασμό με την απελευθέρωση αντιφλεγμονωδών κυτοκινών (L-10, TGF- β, IL-1ra)^{64,68,112} οδηγούν στην προστασία και την επιβίωση των νευρικών κυττάρων.

Ποιόν από τους δύο ρόλους θα ακολουθήσει η Μικρογλοία όταν ενεργοποιηθεί, εξαρτάται από το είδος του ερεθίσματος που θα την ενεργοποιήσει και από τους παράγοντες που θα εκφράσει.

Για παράδειγμα έχει δειχθεί μέσα από πειραματικές μελέτες ότι η παρουσία του LPS καθιστά τα μικρογλοιακά κύτταρα κυτταροτοξικά , ενώ παράλληλα αυξάνονται και τα ποσοστά του TNF-α. Αντίθετα, η ενεργοποίηση της Μικρογλοίας από IL-4 ή IFN-γ, επάγει την προστασία των νευρικών κυττάρων.¹⁶

Όπως φαίνεται υπάρχει μία λεπτή ισορροπία μεταξύ των προ-και αντιφλεγμονωδών παραγόντων σε μη παθολογικές καταστάσεις, η οποία σε μια πιθανή απορρύθμιση της ενεργοποίησης της Μικρογλοίας μπορεί να οδηγήσει σε νευροτοξικότητα.



Εικόνα 4) Μοριακή συματοδότηση σε μικρογλοιακά κύτταρα. Το στάδιο και ο τύπος ενεργοποίησης της μικρογλοίας ελέγχεται από σηματοδότηση μέσω επαγόμενων ή συνεχώς εκφραζόμενων επιφανειακών υποδοχέων. Δεξιά: Προ- και αντι-φλεγμονώδεις παράγοντες που εκφράζονται από ενεργοποιημένη μικρογλοία.

Μια ακόμα πολύ σημαντική παράμετρος που καθορίζει το στάδιο ενεργοποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων ,είναι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικρογλοίας και νευρικών κυττάρων.

Τα μικρογλοιακά κύτταρα, διαθέτουν πληθώρα επιφανειακών υποδοχέων για σηματοδοτικά μόρια του **ΚΝΣ** (ΑΤΡ, νευροπεπτίδια, νευροδιαβιβαστές) και νευροτροφικούς παράγοντες γεγονός που υποδηλώνει ότι το στάδιο ενεργοποίησης των συγκεκριμένων κυττάρων ελέγχεται από το χημικό περιβάλλον που διαμορφώνεται από τη νευρική δραστηριότητα.

Για παράδειγμα, η έκφραση μορίων που είναι απαραίτητα για την δράση της μικρογλοίας σαν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα καταστέλλεται από νευρώνες οι οποίοι είναι ηλεκτρικά ενεργοί και επάγεται όταν μειώνεται η ηλεκτρική δραστηριότητα τους.⁸⁰ Επίσης η έκφραση neurotrophins από νευρικά κύτταρα καταστέλλει την έκφραση MHC ΙΙ καθώς και άλλων συνδιεγερτικών μορίων (B7-2/CD86 και CD40) σε μικρογλοιακά κύτταρα.⁸¹

1.1.3 Ο ρόλος της Μικρογλοίας σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες

Οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές, χαρακτηρίζονται από την προοδευτική κυτταρική απώλεια μέσα σε συγκεκριμένους πληθυσμούς νευρικών κυττάρων.¹¹³ Η προοδευτική αυτή απώλεια της δομής ή της λειτουργίας των νευρώνων, μπορεί να οδηγήσει στο θάνατό τους και στην εκδήλωση σοβαρών παθήσεων. Ορισμένες από τις παθήσεις αυτές είναι η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Huntington,η σχιζοφρένεια, η νόσος του Parkinson ακόμα και η γήρανση.

Όλες αυτές οι παθήσεις παρουσιάζουν ομοιότητες σε μοριακό υποκκυταρικό επίπεδο. Μια από τις ομοιότητές τους είναι και η ενεργοποίηση της μικρογλοίας - στα άτομα που πάσχουν - μέσω της οποίας το νευρικό σύστημα επικοινωνεί με το ανοσοποιητικό.

Σε όλες τις παθήσεις που αναφέρθηκαν, η ενεργοποιημένη μορφή της Μικρογλοίας συνοδεύεται από αύξηση της έκφρασης των **MHC II** μορίων, από την παραγωγή νευροτοξικών προ-φλεγμονωδών παραγόντων όπως η **IL-1b**, **IL-6**, **TNF-α** κ.α, καθώς και από την παραγωγή ελευθέρων ριζών **NO**, οι οποίες οδηγούν σε **οξειδωτικό**

stress και στην απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων(Parkinson).^{73,76,107}

Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη φυσιολογική γήρανση έχουμε νευροεκφυλιστικές καταστάσεις, εξαιτίας της ανικανότητας των ΄΄γερασμένων΄΄ μικρογλοιακών κυττάρων, να ανταποκριθούν σε εξωτερικά ερεθίσματα.⁶⁹

Ωστόσο, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ,παρόλο που έχουμε ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων και αύξηση της έκφρασης των MHC II μορίων, τα επίπεδα των T- λεμφοκυττάρων στο περιβάλλον του εγκεφάλου είναι χαμηλά, ίσως και έλλειψη των **T**, όπως θα περιμέναμε και όπως συμβαίνει στις περιπτώσεις των αυτοάνοσων νοσημάτων ,π.χ. σκλήρυνση κατά πλάκας. Επομένως θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι η Μικρογλοία, εξυπηρετεί μια άλλου είδους και όχι απαραίτητα της ενεργοποίησης σηματοδότηση των Т λεμφοκυττάρων, η οποία λόγω ανεπαρκών πειραματικών ενεργειών δεν έχει μέχρι πρότινος διευκρινιστεί. Έχει αποδειχθεί ότι τα μεμβρανικά MHC II μόρια, είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση της μικρογλοίας ανεξάρτητα από την παρουσία Τ λεμφοκυττάρων και μάλιστα φαίνεται ότι το κυτταροπλασματικό τμήμα του ετεροδιμερούς, είναι ικανό να προκαλέσει απομυελίνωση των αξόνων in vivo.47

Η ενεργοποίηση αυτή πιθανώς να εξυπηρετεί την παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων, όπως είναι ο TNF-α, οι οποίοι αρχικά ενισχύουν την απομυελίνωση, αλλά συμβάλλουν αργότερα στην επαναμυελίνωση των αξόνων. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι ο TNF-α έχει επιβλαβείς επιδράσεις σε ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα κατά την απομυελίνωση, αλλά είναι απαραίτητος για τα αδιαφοροποίητα ολιγοδενδροκύτταρα κατά τη διάρκεια της επαναμυελίνωσης των αξόνων.³

Ο όρος **«ενεργοποιημένη μικρογλοία»,** περιλαμβάνει ένα μεγάλο σύνολο διαφορετικών διεγερτικών αλλά και κατασταλτικών μηχανισμών, οι οποίοι έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ισορροπίας και τη διατήρηση της ομοιόστασης στο περιβάλλον του εγκεφάλου.

Είναι λοιπόν σημαντικό να διευκρινιστεί ακριβώς ο τύπος της ενεργοποίησης που αναφέρεται στην εκάστοτε περίπτωση και να

εξεταστεί το πως και μπορεί να ρυθμιστεί θετικά ή αρνητικά ανάλογα με την παθολογία της κάθε διαφορετικής παθολογικής κατάστασης.

1.2 Το Μείζον Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας

Το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (**Major Histocompatibility-MHC**), είναι ένα στενά συνδεδεμένο σύμπλεγμα γονιδίων που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 στον άνθρωπο και στο χρωμόσωμα 17 στο ποντίκι. Χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλό πολυμορφισμό.

Στον άνθρωπο αναφέρεται ως **HLA** σύμπλοκο (Human Leukocyte Antigen) και στο ποντίκι ως **H-2**.Τα γονίδια του συμπλόκου οργανώνονται σε περιοχές που κωδικοποιούν τρεις τάξεις μορίων. Τα τάξης Ι (MHC I), τα τάξης ΙΙ (MHC II) και τα τάξης ΙΙΙ (MHC III) μόρια. Επίσης τα προϊόντα των γονιδίων του συμπλέγματος παίζουν το πολύ σημαντικό ρόλο της αναγνώρισης του εαυτού από το μη εαυτό.



Εικόνα 5) Αναλυτικός γονιδιωματικός χάρτης των ΜΗC γονιδίων στον άνθρωπο και στο ποντίκι.

1.2.1**Τάξης Ι μόρια του ΜΗC**

Τα κλασικά **τάξης Ι** μόρια κωδικοποιούνται από τις περιοχές H2-K, H2-D, H2-L στο ποντίκι και από τις HLA-A, HLA-B, HLA-C και εκφράζονται στην επιφάνεια όλων σχεδόν των εμπύρηνων κυττάρων του οργανισμού, αν και τα επίπεδα της έκφρασής τους διαφέρουν ανάμεσα σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και ιστούς.^{39,40,46} Είναι μεμβρανοσυνδεμένες γλυκοπρωτεϊνικές δομές, οι οποίες διαθέτουν εξωκυττάριο, διαμεμβρανικό και κυτταροπλασματικό τμήμα.

Στο εξωκυττάριο τμήμα,το μόριο αποτελείται από μια βαριά αλυσίδα, την α- αλυσίδα, μεγέθους 45kD η οποία οργανώνεται σε τρεις επικράτειες, τις α1, α2 και α3 και μια ελαφριά αλυσίδα, την β2-μικροσφαιρίνη μεγέθους 12kD.



Εικόνα 6) Δομή των τάξης Ι μορίων του ΜΗC

Η α αλυσίδα κωδικοποιείται από τα πολυμορφικά γονίδια των περιοχών των τάξης Ι μορίων, ενώ η ελαφριά αλυσίδα κωδικοποιείται από ένα υψηλά συντηρημένο γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα **μ15**.

Οι α1 και οι α2 επικράτειες της βαριάς αλυσίδας, οι οποίες βρίσκονται μακριά από τη μεμβράνη, αλληλεπιδρούν σχηματίζοντας την αύλακα πρόσδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου καθώς και τις θέσεις αναγνώρισης του ίδιου του μορίου από τον TCR.

Η α-3 επικράτεια, βρίσκεται κοντά στη μεμβράνη, είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση με τον **co receptor CD8** και διαθέτει ανοσοσφαιρινική αναδίπλωση. Γενικά , η αλληλεπίδραση της β2-μικροσφαιρίνης και του πεπτιδίου με την α αλυσίδα είναι κρίσιμη, προκειμένου το μόριο **MHC τάξης I**, να προσλάβει την πλήρως αναδιπλωμένη διαμόρφωσή του και να μπορέσει να λειτουργήσει ως αντιγονοπαρουσιαστικό μόριο.^{1,22,49,61,83,92}

Ο ρόλος των τάξης Ι μορίων του ΜΗC είναι κυρίως η επαγωγή της κυτταρικής ανοσίας και κατά συνέπεια η προστασία από ιικές μολύνσεις και κύτταρα που εκφράζουν τροποποιημένα αντιγόνα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων.

Τα τάξης Ι μόρια του MHC έχουν την ιδιότητα πρόσδεσης πεπτιδίων τα οποία παρουσιάζονται στα **CD8⁺ Τ-κυτταροτοξικά κύτταρα**. Τα πεπτίδια αυτά προέρχονται από ενδογενείς πρωτεΐνες, οι οποίες υφίστανται πέψη μέσω του ανοσοπρωτεασώματος και πρωτεασών του ενδοπλασματικού δικτύου. Εν συνεχεία μεταφέρονται και φορτώνονται στα τάξης Ι μόρια και μέσω του συστήματος Golgi το σύμπλοκο μεταναστεύει στην κυτταρική μεμβράνη.

1.2.2**Τάξης ΙΙ μόρια του ΜΗC**

Τα μόρια MHC τάξης ΙΙ κωδικοποιούνται από τις γονιδιακές περιοχές H2-A, H2-E στο ποντίκι και από τις HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR στον άνθρωπο. Αποτελούνται από δύο διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, μια α αλυσίδα μεγέθους 32-34 kDa και μια β αλυσίδα μεγέθους 29-32 kDa, που συνδέονται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές μόριο. Οι δύο αλυσίδες κωδικοποιούνται από διαφορετικά α και β γονίδια για όλους τους ισότυπους των κλασικών τάξης ΙΙ μορίων. Το τάξης ΙΙ μόριο διαθέτει εξωκυτταρικό, διαμεμβρανικό και κυτταροπλασματικό τμήμα. Στο εξωκυτταρικό τμήμα κάθε αλυσίδα είναι χωρισμένη σε δύο επικράτειες, α1-α2 και β1-β2 αντίστοιχα. Οι επικράτειες α1 και β1 παρουσιάζουν μεγαλύτερο πολυμορφισμό και είναι εκείνες που σχηματίζουν την αύλακα πρόσδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου.



Εικόνα 7) Δομή των τάξης ΙΙ μορίων του ΜΗC

Τα τάξης ΙΙ μόρια εκφράζονται σε μια υποομάδα κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που περιλαμβάνει τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα κ.α),ενεργοποιημένα Τ κύτταρα και θυμικά επιθυλιακά κύτταρα.^{61,49} <u>Μόνο</u> στα **APCs** (αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα), εκφράζονται σταθερά τα τάξης ΙΙ μόρια.

Τα μακροφαγικά κύτταρα της μικρογλοίας, μπορούν να επαχθούν με κατάλληλη κυτταροκίνη και κάτω από κατάλληλες συνθήκες και να

εκφράσουν τάξης ΙΙ μόρια. Για παράδειγμα υπό την επίδραση της IFN-γ διάφοροι κυτταρικοί τύποι, μπορεί να εκφράσουν MHC ΙΙ μόρια.⁴⁹ Ωστόσο, μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών τύπων που εκφράζουν MHC ΙΙ μόρια, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ως προς την έκφρασή τους.⁴⁹

1.2.3<u>Το ενδοσωμικό μονοπάτι</u>

<u>Τα τάξης ΙΙ μόρια</u>, όπως ήδη αναφέρθηκε, συμμετέχουν στην έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης, χάρη στην ικανότητά τους να παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια στα CD4⁺ Τ βοηθητικά κύτταρα.^{26,103} Τα πεπτίδια αυτά προέρχονται από εξωγενή αντιγόνα τα οποία εισέρχονται στο κύτταρο είτε μέσω φαγοκυττάρωσης είτε μέσω ενδοκυττάρωσης και υφίστανται επεξεργασία διαμέσου του ενδοκυττωτικού μονοπατιού.

Η βιοσυνθετική οδός των τάξης ΙΙ μορίων ξεκινάει με τη σύνθεσή τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο^{50,70} και στη συνέχεια συνδέονται με μια εξειδικευμένη πρωτεΐνη γνωστή ως μη-μεταβλητή αλυσίδα (invariant chain, li).

Αρχικά σχηματίζονται τριμερή μη-μεταβλητών αλυσίδων που στη συνέχεια ενώνονται με τρία ετεροδιμερή τάξης ΙΙ, σχηματίζοντας έτσι ένα εννιαμερές σύμπλοκο (αβli)₃.⁹⁴ Κατά το στάδιο αυτό η σύνδεση του τάξης ΙΙ μορίου με την μη-μεταβλητή αλυσίδα αποτρέπει την πρόωρη πρόσδεση ενδογενών πεπτιδίων, βοηθώντας τη σωστή αναδίπλωση του ετεροδιμερούς. Επιπλέον, η ύπαρξη μηνυμάτων οδηγών στην κυτταροπλασματική ουρά της li, βοηθά την καθοδήγηση του συμπλόκου μέσω του συστήματος Golgi στο ενδοκυττωτικό μονοπάτι.^{5,15,24} Στη μεγαλύτερο μη-μεταβλητής συνέχεια **ρο**α3μ της то αλυσίδας αποικοδομείτε σταδιακά και τελικά παραμένει συνδεδεμένο ένα πολύ μικρό τμήμα της το οποίο ονομάζεται CLIP (Class II associated invariant chain peptide²⁷).

Όταν τα κυστίδια που μεταφέρουν τάξης ΙΙ μόρια συντηχθούν με τα όξινα ενδοσώματα, λόγω αλλαγής του pH το CLIP αποσυνδέεται και τη θέση του μπορεί να καταλάβει ένα καταλληλότερο μόριο. Η διαδικασία αυτή

συμβαίνει σε εξειδικευμένα κυστίδια που ονομάζονται **MIICs** (MHC class II compartments, MIICs 85,88,101,111).

Στο εσωτερικό αυτών των κυστιδίων, τα τάξης ΙΙ μόρια συναντούν κυρίως τα πεπτίδια τα οποία έχουν προέλθει από πρωτεόλυση εξωγενών αντιγόνων. Τελικά, μετά την πρόσδεσή ενός πεπτιδίου υψηλής συγγένειας το σύμπλοκο μεταφέρεται στην μεμβράνη.

1.2.4*Μη Κλασικά Τάξης ΙΙ μόρια*

Η περιοχή των τάξης ΙΙ μορίων παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον διότι κωδικοποιεί και άλλα γονίδια, τα οποία ονομάζονται μη κλασικά τάξης ΙΙ μόρια, όπως ταυτοποιήθηκε έπειτα από μοριακή χαρτογράφηση στο ποντίκι και στον άνθρωπο. Στις περιοχές για τα τάξης ΙΙ, περιέχονται αρκετά και πολύ σημαντικά για την αντιγονοπαρουσίαση μόρια. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα γονίδια για τις **TAP** πρωτείνες, τις **LMP** υπομονάδες του ανοσοπρωτεασώματος και τα μη κλασικά τάξης ΙΙ γονίδια **DM** και **DO**.

Στον άνθρωπο τα γονίδια αυτά αναφέρονται ως **HLA-DM**, **HLA-DO**, ενώ στο ποντίκι ως **H2-M**, **H2-O**.Τα δύο αυτά μόρια διαθέτουν υψηλή ομολογία με τα κλασικά τάξης ΙΙ μόρια και διαθέτουν μεγάλη ομοιότητα ως προς τη δομή τους καθώς είναι ετεροδιμερή αποτελούμενα από α και β αλυσίδα όπως και στην περίπτωση των κλασικών τάξης ΙΙ μορίων.

Το ετεροδιμερές του **HLA-DM**, αποτελείται συνολικά από 261-263 αμινοξέα. Δεν παρουσιάζει υψηλό πολυμορφισμό και οι εξωτερικές περιοχές του μορίου διαθέτουν συντηρημένα κατάλοιπα που είναι χαρακτηριστικά των τάξης ΙΙ μορίων και σχηματίζουν αύλακα πρόσδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου παρόμοια με των **HLA-DR** μορίων.⁵²

Παρ' όλη την ομοιότητα που παρουσιάζει με τα κλασικά τάξης ΙΙ μόρια, το **DM** διαθέτει εντελώς διαφορετικό και εξειδικευμένο ρόλο. Η βιοχημεία του μορίου και η στερεοδιάταξή του υποδεικνύουν ότι δεν έχει δυνατότητα σύνδεσης με αντιγονικό πεπτίδιο. Δεν εμφανίζεται στην κυτταρική επιφάνεια αλλά εντοπίζεται στα **MHC ΙΙ** κυστίδια όπου συνδέεται παροδικά με **HLA-DR** μόρια. Ελλείψει **DM**, παρατηρείται συσσώρευση συμπλόκων **DR-CLIP** και καθίσταται μη δυνατή η παρουσίαση αντιγονικών πεπτιδίων στην κυτταρική μεμβράνη.

λοιπόν ότι η σύνδεση DR-DM Αποδεικνύεται καταλύει τηv απομάκρυνση του CLIP από το **HLA-DR** με αποτέλεσμα тην διευκόλυνση της πρόσδεσης άλλων πεπτιδίων στα ελεύθερα τάξης ΙΙ μόρια.⁷⁷ Μετά την απελευθέρωση του CLIP από το HLA-DR, το DM δρα σαν συνοδό μόριο σταθεροποιώντας το HLA-DR (το οποίο διαφορετικά αποικοδομούνταν στο όξινο περιβάλλον των θα ενδοσωμικών διαμερισμάτων) βοηθά διατήρηση και στη της ανοιχτής TOU διαμόρφωσης.

Πειραματικά έχει δειχθεί ότι το DM είναι υπεύθυνο για την επιλογή του καταλληλότερου πεπτιδίου то οποίο θα παρουσιαστεί στη μεμβράνη.^{57,59,77,109} Η επιλογή κατευθύνεται με βάση τη σταθερότητα του συμπλόκου τάξης ΙΙ-πεπτιδίου, καταλύοντας την απελευθέρωση μη σταθερών συνδεδεμένων αντιγονικών πεπτιδίων.³⁵ Ο μηχανισμός αυτός εξασφαλίζει την αντιγονοπαρουσίαση πεπτιδίων με ισχυρή συγγένεια πρόσδεσης στα τάξης ΙΙ, επιτρέποντας έτσι την αναγνώριση του από τα <u>CD4[±] Τ</u> κύτταρα. Επίσης ελαχιστοποιεί τον αριθμό των τάξης ΙΙ «αδειανών» μορίων που μπορούν να μεταναστεύσουν στη μεμβράνη, όπως και την αντιγονοπαρουσίαση ακατάλληλων πεπτιδίων.



Ένα άλλο μη κλασικό τάξης ΙΙ μόριο που παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγονοπαρουσίαση είναι το **HLA-DO**.³⁴ Το **HLA-DO** κωδικοποιείται από τα γονίδια DNA και DOB στον γενετικό τόπο του MHC αλλά σε αντίθεση με τα άλλα τάξης ΙΙ α και β γονίδια τα DNA και DOB εντοπίζονται σε μεγάλη απόσταση το ένα από το άλλο.

Διαθέτει κι αυτό μορφή ετεροδιμερούς, αποτελούμενο από α και β αλυσίδες, και η δομή του είναι όμοια με τη δομή των υπόλοιπων τάξης ΙΙ μορίων του ΜΗC. Όπως και το DM, το DO δεν εμφανίζει υψηλό πολυμορφισμό και δεν έχει ικανότητα πρόσδεσης αντιγονικού πεπτιδίου. Εκφράζεται σε Β λεμφοκύτταρα, στα επικηλιακά κύτταρα του θύμου αδένα ενώ σε πρόσφατες μελέτες έχει βρεθεί να εκφράζεται σε δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και τροφοβλάστες.

Στα Β λεμφοκύτταρα το DO συνδέεται ισχυρά με το DM και η σύνδεση αυτή φαίνεται να είναι απαραίτητη για την έξοδό του από το ενδοπλασματικό δίκτυο μιας και απουσία DM παρατηρείται συσσώρευση του DO στο ενδοπλασματικό δίκτυο.⁶⁶

Συνεντοπίζεται ενδοκυτταρικά με το DM στα MHC II κυστίδια. Η ισχυρή σύνδεση των δύο μορίων αλλά και ο συνεντοπισμός τους, μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι συνδέονται λειτουργικά και μάλιστα το DO φαίνεται να παίζει ρόλο ρυθμιστή της καταλυτικής δράσης του DM. Η ισχυρή σύνδεση αναστέλλει την δράση του DM αφού εμποδίζει την απελευθέρωση του CLIP από το τάξης II μόριο και συνεπώς μειώνει την ικανότητα αντογονοπαρουσίασης.^{35,105}



Εικόνα 9) Αλληλεπίδραση DO, DM κατά τη φόρτωση του αντιγονικού πεπτιδίου

Το DO λοιπόν φαίνεται να δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της δράσης του DM, με έναν pH-εξαρτώμενο τρόπο αφού επιτρέπει τη σύνδεση πεπτιδίου-τάξης II στο pH που διαθέτουν τα MHC II κυστίδια, ενώ εμποδίζει την σύνδεση πεπτιδίων πρόωρα στα ενδοσωμικά/λυσοσωμικά διαμερίσματα όπου το pH είναι μεγαλύτερο. Πειράματα έδειξαν ότι τα αντιγόνα τα οποία συνδέονται ισχυρά με τους υποδοχείς των B κυττάρων (BCR) οδηγούνται στα όψιμα ενδοσώματα, ενώ αντιγόνα τα

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι με τη ρυθμιστική δράση του, το **DO** παίζει καθοριστικό ρόλο στην επιλογή του αντιγονικού πεπτιδίου που θα παρουσιαστεί στην μεμβράνη, διότι μειώνει την πιθανότητα μη-ειδικής ενεργοποίησης των Β κυττάρων και συνεπώς την παραγωγή χαμηλής συγγένειας αντισωμάτων.

Άλλες μελέτες υποδεικνύουν έναν ακόμα τρόπο δράσης του **DO**.

Το **DO** φαίνεται να αυξάνει την ικανότητα φόρτωσης του αντιγονικού πεπτιδίου σταθεροποιώντας το DM σε περιβάλλον όπου το pH είναι χαμηλό, προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο τη δράση του σαν συνοδό μόριο των τάξης ΙΙ. Το σύμπλοκο **DO-DM** παρατηρείται ότι σταθεροποιεί περισσότερο ελεύθερα DR μόρια από ότι το DM μόνο του.⁵⁸ Άρα εκτός από αρνητικός ρυθμιστής της δράσης του DM, το DO μπορεί να έχει και θετική επίδραση η οποία εξαρτάται από το είδος του αντιγονικού πεπτιδίου και από την αλληλική ποικιλομορφία των τάξης ΙΙ.^{51,58,60,104,110}

Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι σε Β λεμφοκύτταρα η αυξημένη έκφραση του HLA-DO σχετίζεται με την αρνητική ρύθμιση της φόρτωσης πεπτιδίων σε μη ενεργοποιημένους πληθυσμούς, ενώ αντίθετα μειωμένη έκφραση των μορίων αυτών σχετίζεται με την ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων.²³ Εν τούτοις οι τροφοβλάστες οι οποίοι δεν εκφράζουν μεμβρανικά HLA-DR μόρια,⁴ διαθέτουν ενδοκυτταρικά αποθέματα HLA-DR και HLA-DO αλλά όχι HLA-DM μόρια.⁸⁹ Επιπλέον η απουσία έκφρασης HLA-DR στην κυτταρική μεμβράνη, αποτελεί και έναν μηχανισμό τον οποίο χρησιμοποιούν τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να διαφύγουν από την ανοσολογική επαγρύπνηση του οργανισμού. Φαίνεται λοιπόν ότι η έκφραση του HLA-DO συνδέεται με την απουσία μεμβρανικών HLA-DR, είτε μόνιμα, όπως στην περίπτωση των τροφοβλαστικών κυττάρων, είτε ανάλογα με το στάδιο ενεργοποίησης, όπως στα Β λεμφοκύτταρα, σε δενδριτικά κύτταρα και πιθανώς στα επικηλιακά κύτταρα του αδένα. Στην περίπτωση λευχαιμικών κυττάρων και των τροφοβλαστών, παρά το γεγονός ότι υπάρχει αρνητική ρύθμιση των μεμβρανικών MHC ΙΙ μορίων, τα κύτταρα αυτά διαθέτουν ενδοκυτταρικά αποθέματα των μορίων αυτών τα οποία μπορούν να εκκριθούν είτε σε διαλυτή μορφή είτε με τη μορφή εξωσωμικών κυστιδίων.⁸⁹ Τα διαλυτά MHC ΙΙ μόρια έχει δειχθεί ότι ανταγωνίζονται τα μεμβρανικά και οδηγούν σε διαφορετική ενεργοποίηση Т λεμφοκυττάρων.95

1.3 Λιπιδικά Σωμάτια

Τα λιπιδικά σωμάτια ή λιπιδικά σταγονίδια, είναι κυτταρικές δομές πλούσιες σε λιπίδια που ρυθμίζουν την αποθήκευση και την υδρόλυση των ουδέτερων λιπιδίων.⁷² Επιπρόσθετα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποθέματα χοληστερόλης και ακυλο-γλυκερόλης σαν που θα χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό και τη συντήρηση της μεμβράνης. Τα συναντάμε σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς στους οποίους αποθηκεύουν ένα μεγάλο μέρος των λιπιδίων στα θηλαστικά λιποκύτταρα. Ο ρόλος τους, εκτός από μέσο αποθήκευσης λιπιδίων και χοληστερόλης, ερευνάται ακόμα, ενώ οι μέχρι πρότινος, έρευνες συνδέονται φλεγμονώδεις αποκρίσεις δείχνουν ÓΤΙ ЗЦ που δημιουργούνται από το μεταβολισμό και τη σύνθεση των eicosanoids

(εικοσανοειδών), από διαταραχές του μεταβολισμού (τύπου ΙΙ σακχαρώδης διαβήτης, παχυσαρκία), από τον καρκίνο^{12,75} και από την αθηροσκλήρωση.⁴³

Στα μη λιπώδη κύτταρα, τα λιπιδικά σωμάτια, έχουν το ρόλο της προστασίας από την lipotoxicity (τοξικότητα των λιπιδίων) με το να αποθηκεύουν ελεύθερα λιπαρά οξέα μέσα από την εστεροποίηση.

Δομικά, τα λιπιδικά σωμάτια, αποτελούνται από έναν ΄΄πυρήνα΄΄ ουδέτερων λιπιδίων. Τα ουδέτερα αυτά λιπίδια είναι τριακυλογλυκερόλες και εστέρες χοληστερόλης, τα οποία περιβάλλονται από μια στοιβάδα φωσφολιπιδίων. Στην επιφάνεια τους φέρουν έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, κυρίως PAT, που εμπλέκονται στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων.^{71,13} Ακόμα, μελέτες έχουν αποκαλύψειπ ότι φέρουν στην επιφάνεια τους και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην μεμβρανική κυκλοφορία, στη υποδοχή των κυστιδίων, στην ενδοκύττωση και στην εξωκύττωση.⁴¹



Εικόνα 10) Δομή λιπιδικού σωμάτιου ή αλλίωε λιπιδικής σταγόνας.

Η δημιουργία τους δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. Παρόλα αυτά, στα μη λιποκύτταρα (πχ μικρογλοιακά) έχει δειχθεί ότι διάφορες ουσίες, διάφοροι παράγοντες μπορούν να επάγουν το σχηματισμό τους. Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνονται αυξητικοί παράγοντες μακράς αλυσίδας, ακόρεστα λιπαρά οξέα (ελαϊκο οξύ, αραχιδονικό οξύ), το οξειδωτικό στρες, φλεγμονώδεις διεγερτικές ουσίες όπως το βακτηριακό LPS, εικοσανίδια, παθογόνοι μικροοργανισμοί και κυτοκίνες.⁷⁴



Εικόνα 11) Λιπιδικά σωμάτια (κουκίδες με πράσινο φθορισμό, Bodipy dye) σε ποντικίσια μικρογλοιακά κύττταρ N9.

1.4 <u>Μη γραμμική μικροσκοπία 3^η Αρμονική</u>

Η **3^η Αρμονική** είναι μια in vitro μέθοδος απεικόνισης βιολογικών δειγμάτων. Η διαδικασία παραγωγής της 3^{ης} Αρμονικής αντιπροσωπεύεται από ένα μη γραμμικό φαινόμενο σκέδασης. Κατά την επίδραση της προπίπτουσας ισχυρής δέσμης του λέιζερ πάνω στην υπο μελέτη ύλη (κύτταρο), καταστρέφονται τρία φωτόνια της γωνιακής συχνότητας ω, ενώ παράλληλα δημιουργείται ένα φωτόνιο της γωνιακής

Η 3^η Αρμονική είναι ευαίσθητη σε τοπικές διαφορές στην τρίτης τάξης μη γραμμικής ευαισθησίας χ³, στο δείκτη διάθλασης και διασποράς.³⁰ Στην μικροσκοπία Τρίτης αρμονικής, η αντίθεση που προκύπτει από τις διεπαφές, οι αλλαγές στις τιμές του δείκτη διάθλασης και οι οπτικές ανομοιογένειες όσον αφορά το μέγεθος, συγκρίνονται με την προσπίπτουσα δέσμη λέιζερ.

Επιπλέον, η 3^η Αρμονική με την τροπικότητά της, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα χρήσιμο μη καταστρεπτικό διαγνωστικό μέσω για την παροχή σημαντικών πληροφοριών όσον αφορά τη δομή, την ανατομία και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά πολλών βιολογικών δειγμάτων τόσο κυτταρικού,όσο και υποκυτταρικού επιπέδου.

Τα λιπίδια και τα μιτοχόνδρια εκπέμπουν το μεγαλύτερο μέρος του σήματος της 3^{ης} Αρμονικής.^{31,48,108} Επιπρόσθετα, η χρήση της πολύ μικρής παλμικής έντασης του λέιζερ επιτρέπει στην 3^η Αρμονική να λειτουργεί σε χαμηλές ενέργειες και ως επακόλουθο να μη βλάπτει τα κύτταρα αλλά να τα διατηρεί ζωντανά.

Ο συνδυασμός 3^{ης} αρμονικής, 2^{ης} αρμονικής και φθορισμού δύο φωτονίων, μπορούν να παρέχουν σημαντικές συμπληρωματικές πληροφορίες για πολλά βιολογικά δείγματα

Επομένως, η 3^η αρμονική καθώς και οι άλλες δύο μη καταστροφικές τεχνικές (2^η αρμονική, φθορισμός δύο φωτονίων) αποτελούν και αντιπροσωπεύουν την πρώτη γραμμή της έρευνας στην κυτταρική βιολογία, δεδομένου ότι έχουν τη δυνατότητα να προσφέρουν νέες γνώσεις για πολύπλοκες αναπτυξιακές διαδικασίες. Επιπλέον, μπορούν να ανιχνεύσουν μορφολογικές αλλαγές αλλά και να διαφωτίσουν τις λειτουργίες των ιστών και των μεμονωμένων κυττάρων σε πολλές βιολογικές διαδικασίες.^{17,36,115}

1.5 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Οι μέχρι τώρα μελέτες αναφέρονται αποκλειστικά στην έκφραση η όχι των επιφανειακών MHC II μορίων στη μικρογλοία. Καμία μελέτη δεν εστιάζεται στο μονοπάτι ωρίμανσης αυτών των μορίων και τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη μετανάστευση τους από το ενδοπλασματικό δίκτυο στην κυτταρική μεμβράνη. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του προφίλ έκφρασης των μεμβρανικών και ενδοκυτταρικών κλασικών MHC II μορίων (H2-A) στην resting κατάσταση των μικρογλοιακών κυττάρων και η μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης των τάξης II μορίων του MHC κλασικών και μη κλασικών (H2-M, H2-O) όταν τα μικρογλοιακά κύτταρα επαχθούν με LPS, με την προφλεγμονώδη κυτοκίνη IFN-γ και την αντιφλεγμονώδη κυτοκίνη IL-4. Τέλος θα μελετηθεί και θα προσδιοριστεί το είδος της χαρακτηριστικής κοκκιότητας των ενεργοποιημένων μικρογλοίακών κυττάρων. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την έρευνά μας είναι η μικρογλοιακή κυτταρική σειρά BV-2, η οποία προέκυψε μέσω διαμόλυνσης πρωτογενούς καλλιέργειας μικρογλοίας ποντικιού με ρετροϊό, ο οποίος έφερε το ογκογονίδιο v-raf/v-myc. Η κυτταρική σειρά BV-2 διατηρεί τα περισσότερα φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά πρωτογενούς μικρογλοίας και χρησιμοποιείται σαν μοντέλο για την μελέτη αυτών των κυττάρων.

<u>2 Υλικά και μέθοδοι</u>

2.1 Χειρισμός κυτταροκαλλιεργειών

2.1.1 Κυτταρική σειρά BV-2

Η κυτταρική σειρά **BV-2** προέκυψε από πρωτογενείς καλλιέργειες ποντικίσιων (C57BL/6) μικρογλοιακών κυττάρων τα οποία διαμολύνθηκαν με κατάλληλο ρετροϊό, ο οποίος έφερε το ογκογονίδιο vraf/ v-myc. Η κυτταρική αυτή σειρά έχει μορφολογικά, φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά μακροφάγων (μικρογλοίας).

Υλικά καλλιέργειας :

DMEM 10% v/v FBS (Fetus Bovine Serum) 1% PenStrep GIBCO

50ml DMEM 10x , 400ml dH20 , 15ml Sodium Bicarbonate , 7,5% Solution (GIBCO) , 5ml Glutamine 100x , 5ml Sodium Pyruvate (100mM), pH=7,5. Προσθέτουμε 50ml FBS και 5ml αντιβιοτικό Penicillin/ Streptomycin (10⁴ U/ml).

- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας 25cm² και 75cm²
- ✤ 6 well plates
- Cover slips
- Επωαστήρας Forma Scientific USA
- Scrapers
- DMEM serum free (GIBCO)+Trypsin 0,05%
- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer
- Οπτικό Μικροσκόπιο

Τα BV-2 κύτταρα έχουν την ιδιότητα να προσκολλώνται στην πλαστική επιφάνεια της φλάσκας, της 6-well plate και στα cover slips. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε συγκέντρωση 5x10⁵ cell/ml στις φλάσκες, 25x10³ cell/ml στις 6 well plates και στα cover slips, μέσα στον επωαστήρα Forma Scientific στους 37°C και υπό την παρουσία 5% CO2. Αλλαγή του θρεπτικού πραγματοποιείται κάθε 2-3 ημέρες. Σε τακτά χρονικά διαστήματα υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων μέσα στην καλλιέργεια με τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου και του οπτικού μικροσκόπιου. Όταν παρατηρηθεί υπερπληθυσμός σε μια φλάσκα τότε μεταφέρεται ένας αριθμός κυττάρων σε μία καινούρια (σπάσιμο διαδικασιών αποκόλλησης φλάσκας) μέσω των κυττάρων. Н αποκόλληση, πραγματοποιείται είτε με τη χρήση του scraper είτε με τη χρήση του διαλύματος DMEM Trypsin 0,05%.

<u>2.1.2 Ξεπάγωμα κυττάρων</u>

<u>Υλικά και διαλύματα</u>

- Tubes 15ml
- Πιπέτες Pasteur
- Water Bath
- Φυγόκεντρος Kubota
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (DMEM 10% v/v FBS και DMEM 20% v/v FBS)
- Φλάσκες καλλιέργειας 25cm²
- Επωαστήρας Forma Scientific USA

<u>Διαδικασία</u>

a) Αρχικά ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία του •Water Bath στους 37ºC.Στη συνέχεια παίρνουμε τα κύτταρα από τους -80ºC και τα τοποθετούμε στο Water Bath (37°C).Τα αφήνουμε για ένα λεπτό στο υδατόλουτρο και αφού ξεπαγώσουν τα αραιώνουμε 10 φορές σε DMEM 10% v/v FBS (9ml DMEM 10% v/v FBS + 1ml παγωμένων κυττάρων) μέσα σε σωληνάρια 15ml.Κατόπιν φυγοκεντρούμε στις 1200rpm για 6min ώστε να απομακρυνθεί το DMSO που περιέχεται στο διάλυμα στο οποίο έχει γίνει το πάγωμα των κυττάρων. Τέλος, μετά τη φυγοκέντριση, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 5ml DMEM 20% v/v FBS και τοποθετούνται σε φλάσκες καλλιέργειας και εν συνεχεία στον επωαστήρα. Το σημαντικό στην όλη διαδικασία είναι η όσο το δυνατόν ταχύτερη πραγματοποίηση της, εξαιτίας της τοξικότητας του DMSO και της αρνητικής δράσης του για τα κύτταρα που έχει όταν βρεθεί σε θερμοκρασία δωματίου RT.

2.1.3 Πάγωμα κυττάρων

<u>Υλικά και διαλύματα</u>

- Cryovials
- ➤ 15ml Tubes
- Πιπέτες Pasteur
- Φυγόκεντρος Kubota
- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer
- Οπτικό Μικροσκόπιο
- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (DMEM 10% v/v FBS και DMEM 20% v/v FBS)
- DMSO (Dimethy-Sulphoxide Sigma, Germany)

<u>Διαδικασία</u>

Τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια στην οποία αναπτύσσονται είτε με τη χρήση DMEM Trypsin 0,05% είτε με τη χρήση του scraper. Μετράμε τα κύτταρα στο οπτικό μικροσκόπιο με τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου. Συλλέγουμε τα κύτταρα και φυγοκεντρούμε στις1200rpm για 6 min. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο ,σπάμε την πιλέτα κυττάρων και επαναδιαλύουμε σε DMEM 20% v/v FBS ,ώστε να επιτύχουμε συγκέντρωση 2*10⁶ κύτταρα/ml. Επειδή το πάγωμα θέλουμε να γίνει σε τελική συγκέντρωση 10⁶ cells/ml, προσθέτουμε ίση ποσότητα DMEM 10%v/v FBS or Serum free -20%DMSO.To DMEM-DMSO προστίθεται σιγά σιγά και με ταυτόχρονη ανάδευση ώστε να πάει παντού το DMSO.Η διαδικασία πρέπει να γίνει γρήγορα, εξαιτίας της τοξικότητας του DMSO για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου RT.Moιράζουμε από 1ml σε Cryovials για να έχουμε 10⁶ κύτταρα/ml σε κάθε vial με DMEM 10% v/v FBS και 10% DMSO.Στο τέλος τα κύτταρα τοποθετούνται πολύ γρήγορα στους -80⁰C.Όλη η διαδικασία απαιτεί τη χρήση γαντιών.

2.2 Ανοσοφθορισμός και κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής παρέχει τη δυνατότητα ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού των κυττάρων ενός πληθυσμού που δεσμεύουν αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές και βασίζεται στην τεχνική του ανοσοφθορισμού.

Βασική αρχή του ανοσοφθορισμού είναι ότι τα φθορίζοντα μόρια που φως συγκεκριμένου μήκους κύματος (διέγερση), απορροφούν εκπέμπουν φως σε διαφορετικό μήκος κύματος (εκπομπή). Με αυτόν τον τρόπο, μόρια αντισωμάτων σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες, επιτρέπουν την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης ενδοκυττάριων και εξωκυττάριων-μεμβρανικών πρωτεϊνώναντιγόνων από την εκπομπή φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος, αφού έχει προηγηθεί διέγερση με φως κατάλληλου μήκους κύματος. Το εκπεμπόμενο φως μπορεί να γίνει ορατό με τη βοήθεια ενός κυτταρομετρητή ροής (FACScan), ο οποίος φέρει δέσμη laser για τη διέγερση των φθοριζόντων ουσιών, μέσω καναλιών που επιτρέπουν την καταγραφή των επιπέδων φθορισμού.

2.2.1 Εσωτερικός και εξωτερικός ανοσοφθοριμός

Πραγματοποιείται για τον προσδιορισμό του επιπέδου έκφρασης μιας πρωτεΐνης ενδοκυτταρικά ή στην κυτταρική μεμβράνη. Για να πραγματοποιηθεί η μελέτη της έκφρασης ενδοκυττάριων πρωτεϊνών (εσωτερικός ανοσοφθοριμός) στα διαλύματα χρησιμοποιείται saponine.Η saponine είναι ένα ήπιο απορρυπαντικό, λειτουργεί ανοίγοντας πόρους στην κυτταρική μεμβράνη και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να γίνεται παροδικά διαπερατή από τα αντισώματα.

<u>Υλικά και διαλύματα</u>

- Tubes 15ml
- Φυγόκεντρος Kubota
- Πιπέτες Pasteur
- Πιπέτες Gilson 20μl, 200μl, 1000μl
- ✤ PBS 1x pH=7,5

(Το διάλυμα παρασκευάζεται αρχικά σαν PBS 10x διαλύοντας 2,28g NaH₂PO₄ (0,038M) ή 2,62g NaH₂PO₄(H₂O) (0,038M) , 11,5g Na₂HPO₄ (0,162M) και 43,84g NaCl σε 500ml dH₂O.Ακολούθως ρυθμίζεται το pH έτσι ώστε να έχουμε pH =7,1-7,5 και το χρησιμοποιούμε σε τελική συγκέντρωση 1x)

- PBS-BSA 3% w/v
- PBS-BSA 1% w/v
- PBS-BSA 3%-saponine 0,3% v/v
- PBS-BSA 1%- saponine 0,3%v/v
- PFA 4% in PBS 1x v/v
- Scraper
- DMEM Trypsin 0,05%
- FACScan (Becton Dickinson)

<u>Αντισώματα</u>

- ➢ Rat a-mouse MHCII IA^{d/k}-IE^{d/k} (2G9) BD06341D (use 1:100)
- IgG FITC a-rat FITC , Santa Cruz (1:250)
- a-mouse H2-M 2C3A (1:1000) 30mg/ml
- a H2-Ob,purified Armenian hamster anti-mouse antibody, Mags.Ob1 bioreactor supernatant (use 1:1000) ,ευγενική προσφορά του καθηγητή.Lisa K.Denzin, Gerstner Sloan-Kettering Graduate School of Biomedical Sciences, New York
- a-IgG ,goat anti mouse IgG1-PE ,Santa Cruz cat no:sc-3764 (use 1:700)
- Rab7 (c-19) Goat polyclonal IgG a-human Rab7 (use 1:100) 200µg/ml, Santa Cruz Biotechnology

Donkey a-goat FITC, (use 1:1000), ALEXA 488 Jackson Immunoresearch

Διαδικασία

Το πείραμα ξεκινάει με αρχική συγκέντρωση 5x10⁵ cells/δείγμα και τα βήματα είναι τα ακόλουθα:

- Παίρνουμε τα κύτταρα αποκολλώντας τα από την επιφάνεια που αναπτύσσονται είτε με τη χρήση scraper είτε με επώαση για 5 min στους 37°C μέσα σε διάλυμα DMEM Trypsin 0,05%.
- b. Στη συνέχεια μετά τα 5 λεπτά επώασης με Θρυψίνη εισάγουμε στο διάλυμα DMEM 10% v/v FBS για να απενεργοποιήσουμε τη δραστικότητά της.
- c. Τοποθετούμε το διάλυμα σε 15ml Tube
- d. Φυγοκεντρούμε στην Kubota για 6 min στις 1200rpm
- Ε. Πετάμε το υπερκείμενο-θρεπτικό και σπάμε την πελλέτα κυττάρων που έχει σχηματιστεί σαν ίζημα στον πάτο του tube.
- f. Πραγματοποιούμε 2xπλύσεις με PBS 1x pH=7,1-7,5 (1ml)
- g. Μετά από κάθε πλύση πραγματοποιούμε φυγοκέντριση στις
 1200 rpm για 6 min
- h. Μονιμοποιούμε τα κύτταρα με PFA 4% (100μ L/5x 10^5 cells).Τοποθετούμε το δείγμα στους 4⁰C για 10min
- i. 2xΠλύσεις με PBS 1x και διαδοχικές φυγοκεντρίσεις στις 1200 rpm για 6 min
- j. Κάνουμε Blocking. Αν γίνεται εξωτερικός ανοσοφθορισμός τότε χρησιμοποιούμε PBS-BSA 3% ενώ αν είναι εσωτερικός ανοσοφθορισμός τότε χρησιμοποιούμε PBS-BSA 3% -Saponin 0,3% v/v.Τέλος αφήνουμε τα δείγματα με τα διαλύματα σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά
- k. Ακολουθούν 2xπλυσίματα και 2xφυγοκεντρίσεις
- Στο κυτταρικό ίζημα, προσθέτουμε το πρώτο αντίσωμα διαλυμένο σε PBS-BSA 1% για τον εξωτερικό ανοσοφθορισμό ενώ σε PBS-BSA 1%-saponine 0,3% για τον εσωτερικό ανοσοφθορισμό

- m. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου RT για 45-60min.Στις περιπτώσεις που τα αντισώματά μας είναι συνδεδεμένα με μία φθορίζουσα ουσία η όλη διαδικασία της επώασης πραγματοποιείται σε απόλυτο σκοτάδι.
- n. Μετά τα 45-60 λεπτά πραγματοποιούνται 2xπλύσεις με PBS
 1x και ακόλουθες φυγοκεντρίσεις
- ο. Η πελέττα των κυττάρων επαναδιαλύεται με την προσθήκη του δεύτερου ανντισώματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε PBS-BSA 1% στην περίπτωση του εξωτερικού ανοσοφθορισμού και σε PBS-BSA 1%-saponine 0,3% για τον εσωτερικό ανοσοφθορισμό
- p. Επωάζουμε για 30-45 λεπτά σε RT .Στην περίπτωση conjugated αντισωμάτων με φθορίζουσα χρωστική (στην περίπτωσή μας FITC , PE) , η επώαση γίνεται σε απόλυτο σκοτάδι
- q. Μετά την επώαση, κάνουμε 2x πλυσίματα με PBS 1x και ανάλογες φυγοκεντρίσεις
- r. Στο τέλος η κυτταρική πελλέτα επαναδιαλύεται σε 500μL
 PBS 1x και μεταφέρεται στα FACs tubes
- s. Μετράμε τα δείγματα στο FACScan

2.3 Ανοσοφθορισμός και Confocal microscopy

Η συνεστιακή μικροσκοπία (Confocal microscopy) είναι μια τεχνική οπτικής απεικόνισης, εξαρτάται και στηρίζεται από την φθορίζουσα χρωστική ουσία που χρησιμοποιούμε (φθορίζον αντίσωμα), όπως συμβαίνει και με το μικροσκόπιο φθορισμού. Χρησιμοποιείται για να παίρνουμε εικόνες δειγμάτων (κύτταρα ,ιστούς κ.α),οι οποίες έχουν σημανθεί με κατάλληλη χρωστική, με πολύ υψηλότερη ανάλυση και αντίθεση, από αυτές του απλού μικροσκοπίου φθορισμού, ενώ παράλληλα μας δίνει τη δυνατότητα να δημιουργούμε 3D απεικονίσεις των δειγμάτων μας. Η λειτουργία του βασίζεται στον εστιακό σημειακό φωτισμό και επιτυγχάνει εικόνες μεγάλης ακρίβειας επειδή εξαλείφει τον out-of-focus φωτισμό.

2.3.1 Εσωτερικός και εξωτερικός ανοσοφθορισμός

Τα υλικά, τα αντισώματα και η διαδικασία του πειράματος είναι η ίδια, έτσι όπως περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 2.2.1.

Η μόνη διαφορά έγκειται στο τέλος της διαδικασίας κατά την οποία αντί η κυτταρική πελέττα να τοποθετηθεί στα FACs tubes, επαναδιαλύεται σε PBS 1x και απλώνεται πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα (απλώνουμε τουλάχιστον 10μl). Στη συνέχεια οι ανικειμενοφόρες πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν συνθήκες σκότους. Αφού στεγνώσουν σε OI πλάκες, προσθέτουμε 25% αντικειμενοφόρες 20µl γλυκερόλης ,τοποθετούμε την καλυπτρίδα και παρατηρούμε στο μικροσκόπιο.

<u>2.4 Ανοσοφθορισμός και 3ⁿ αρμονική</u>

Η 3^η αρμονική είναι μια μέθοδος μη γραμμικής μικροσκοπίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απεικόνιση και την παροχή δομικών, μορφολογικών και ανατομικών πληροφοριών διάφορων κυτταρικών ή υποκυτταρικών βιολογικών δειγμάτων.Τ έλος, μέσα σε ένα κύτταρο σήμα 3ης αρμονικής, εκπέμπεται κυρίως από τα λιπίδια του και τα λιπιδικά του σωμάτια.

2.4.1 Εσωτερικός και εξωτερικός ανοσοφθορισμός

Τα υλικά, τα αντισώματα και η διαδικασία του πειράματος είναι η ίδια, έτσι όπως περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 2.2.1.

Διαφέρει στο γεγονός ότι αφού τελειώσει ο φθορισμός, μια ποσότητα του κυτταρικού διαλύματος 10μΙ τοποθετείται πάνω στο ειδικό τζαμάκι της 3^{ης} αρμονικής. Εν συνεχεία μελετάται.

<u>2.5 Φθορισμός με Nile Red</u>

Πρόκειται για περίπτωση εσωτερικού φθορισμού, αλλά διαδικασία είναι διαφορετική. Η Nile Red είναι λιπόφυλη χρωστική. Έχει την ικανότητα να εισχωρεί μέσα στα κύτταρα ,μέσω της διάχυσης και να βάφει κε κόκκινο χρώμα τα ενδοκυτταρικά λιπιδικά σωμάτια.

Υλικά και διαλύματα

- Tubes 15ml
- Φυγόκεντρος Kubota
- Πιπέτες Pasteur
- Πιπέτες Gilson 20μl, 200μl ,1000μl
- PBS 1x pH=7,5 (Το διάλυμα παρασκευάζεται αρχικά σαν PBS 10x διαλύοντας 2,28g NaH2PO4 (0,038M) ή 2,62g NaH2PO4(H2O) (0,038M), 11,5g Na2HPO4 (0,162M) και 43,84g NaCl σε 500ml dH2O.Ακολούθως ρυθμίζεται το pH έτσι ώστε να έχουμε pH =7,1-7,5 και το χρησιμοποιούμε σε τελική συγκέντρωση 1x)
- PFA 4% in PBS 1x v/v
- DMEM Trypsin 0,05%
- Scraper
- DMEM -10% FBS v/v 1% PenStrep v/v
- ✤ 6 well plate
- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας 25cm², 50cm2
- cover slips
- αντικειμενοφόρες πλάκες
- καλυπτρίδες

<u>Χρωστική</u>

Nile red διαλυμένη σε PBS 1x (1:50)

<u>Διαδικασία 1ⁿ</u>

Η παρακάτω διαδικασία εφαρμόζεται στις περιπτώσεις κυτταροκαλλιεργειών σε κύτταρο-καλλιεργιτικές φλάσκες ή σε 6 well plates

- α. Παίρνουμε τα κύτταρα (50.000-100.000 κύτταρα) από την επιφάνεια της φλάσκας ή της 6 well plate πάνω στην οποία αναπτύσσονται. Αυτό γίνεται είτε με τη χρήση των ειδικών Scraper είτε με 5min επώαση σε διάλυμα DMEM Trypsin 0,05% (1,5ml) στους 37⁰C
- b. Μετά τα πέντε λεπτά επώασης, εισάγουμε στο διάλυμα ,DMEM Trypsin 0,05%, 2-3ml DMEM -10% FBS v/v – 1% PenStrep v/v για να απενεργοποιήσουμε τη δράση της θρυψίνης
- C. Παίρνουμε το κυτταρικό διάλυμα και το φυγοκεντρούμε για
 6min στις 1200rpm
- Πετάμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε την πελλέτα σε
 1ml PBS 1x και φυγοκεντρούμε πάλι για 6min στις 1200rpm
- Μετά πετάμε πάλι το υπερκείμενο και σπάμε την πελλέτα με ελαφριά ανάδευση
- f. Μονιμοποιούμε , με εισαγωγή 75μΙ PFA 4%.Το διάλυμα τοποθετείται στον πάγο για 10min
- g. Μετά τα 10min , πραγματοποιούνται 2x πλύσεις με PBS 1x (1ml)ακολουθούμενες κάθε φορά από ανάλογες φυγοκεντρίσεις στις 1200rpm για 6min
- Μετά την τελευταία φυγοκέντριση, εισάγουμε το διάλυμα Nile red-PBS 1x.Επωάζουμε για 10-15min, σε συνθήκες σκότους και σε θερμοκρασία δωματίου, RTv
- Ακολουθούν, 3x πλύσεις με PBS 1x (1ml) και ακόλουθες φυγοκεντρίσεις στις 1200rpm για 6min
- Μετά το πέρας της τελευταίας φυγοκέντρισης, πετάμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε την πελλέτα σε 50μl PBS
 1x.Κρατάμε το διάλυμα σε συνθήκες σκότους

Ανάλογα με το αν τα κύτταρα του διαλύματος παρατηρηθούν με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal microscopy), μικροσκοπίας φθορισμού ή με τη χρήση μη γραμμικής μικροσκοπίας-3^η αρμονική κάνουμε και διαφορετικά πράγματα.

Στην περίπτωση της συνεστιακής μικροσκοπίας και του μικροσκόπιου φθορισμού, 10μl του διαλύματος απλώνονται πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Αφήνονται να στεγνώσουν σε συνθήκες
σκότους. Αφού στεγνώσουν, απλώνουμε πάνω στις αντικειμενοφόρους πλάκες 20μl γλυκερόλης 25% και τοποθετούμε την καλυπτίδα.

Στην αντίθετη περίπτωση, τοποθετούμε 10μΙ του διαλύματος σε ειδικά για την 3^η αρμονική τζαμάκια και τα παρατηρούμε.

<u>Διαδικασία 2ⁿ</u>

Εφαρμόζεται στην περίπτωση κυτταρικής καλλιέργειας πάνω στα ειδικά πλαστικά cover slip.

Η διαδικασία είναι η ίδια όπως περιγράφηκε παραπάνω, με τη διαφορά ότι δεν χρειάζεται να γίνει επώαση με θρυψίνη, τα πλυσίματα γίνονται με PBS1x (500µL), έχουν διάρκεια 1min το κάθε ένα και δεν κάνουμε φυγοκεντρίσεις. Τέλος τα δείγματα μας ,μπορούν να παρατηρηθούν μόνο με συνεστιακή μικροσκοπία και με μικροσκόπιο φθορισμού αφού πρώτα τα cover slips τοποθετηθούν με κατάλληλη κόλα πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

2.6 Κυτταρικός διαχωρισμός με τη χρήση Cell Sorter

Το μηχάνημα του FACS (fluorescent activated cell sorter) αποτελεί μια προσαρμογή του μηχανήματος FACScan (κυτταομετρητής ροής) και επιτρέπει το διαχωρισμό και την κατανομή κυττάρων σε διαφορετικά σωληνάρια ανάλογα με το φθορισμό τους. Η τεχνική αυτή επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ενός ηλεκτρομαγνητικού πεδίου σε κάθε σταγόνα, η οποία περιέχει ένα μόνο κύτταρο, καθώς περνάει από τις πλάκες εκτροπής. Προτού η μικροσταγόνα περάσει από τις πλάκες εκτροπής ίρια ακτίνα laser. Αυτό γίνεται με σκοπό να διεγερθεί το φθοριόχρωμα του κυττάρου από ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος και να καταγραφεί το πρότυπο και η ένταση του φθορισμού του. Η καταγραφή αυτή απεικονίζεται σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Τέλος, μέσα από την εφαρμογή ενός στιγμιαίου φορτίου στην πλάκα εκτροπής, καθώς η σταγόνα περνάει ανάμεσά της, είναι πολύ εύκολο να γίνει συλλογή των κυττάρων που φθορίζουν στο ίδιο μήκος κύματος, σε ένα δοχείο.

Υλικά και διαλύματα

Αποστειρωμένο PBS 1x pH=7,5 (Το διάλυμα παρασκευάζεται αρχικά σαν PBS 10x διαλύοντας 2,28g NaH2PO4 (0,038M) ή 2,62g

NaH2PO4(H2O) (0,038M), 11,5g Na2HPO4 (0,162M) και 43,84g NaCl σε 500ml dH2O.Ακολούθως ρυθμίζεται το pH έτσι ώστε να έχουμε pH =7,1-7,5 και το χρησιμοποιούμε σε τελική συγκέντρωση 1x DMEM 10% EBS v/v-1% PepStrep v/v

- DMEM 10% FBS v/v-1% PenStrep v/v
- Πιπέτες Pasteur
- Tubes 5µl, 15µl
- Φυγόκεντρος Kubota
- Cell sorter
- 🛠 Φίλτρα
- Πάγος
- Αιμοκυτταρόμετρο
- Οπτικό μικροσκόπιο
- DMEM-0,05% v/v Trypsin
- Scraper
- PBS-BSA 3% w/v
- PBS-BSA 1% w/v

<u>Αντισώματα</u>

a-mouse CD14 conjugated FITC (use 1:200)

<u>Διαδικασία</u>

Όλη η διαδικασία γίνεται σε συνθήκες αποστείρωσης γιατί τα κύτταρα θα ξανακαλλιεργηθούν. Πρέπει να έχουμε αρχικό πληθυσμό στην κυτταροκαλλιέργεια 5-7x10⁶ cell/ml.

- Παίρνουμε τα κύτταρα με τη χρήση DMEM-0,05% v/v trypsin ή scraper
- Αρχικά τα κύτταρα καταμετρώνται με το αιμοκυτταρόμετρο σε οπτικό μικροσκόπιο
- Στη συνέχεια φυγοκεντρώνται στις 1200rpm για 6min
- Απομακρύνουμε το θρεπτικό και επαναδιαλύουμε την πελλέτα σε 1ml αποστειρωμένου PBS1x.
- Φυγοκεντρούμε ξανά στις ίδιες στροφές και λεπτά

- Κάνουμε blocking στα κύτταρα για να πιάσει το αντίσωμα ειδικά. Αυτό γίνεται επαναδιαλύοντας την πελλέτα στο PBS-BSA 3%. Επωάζουμε για 30min σε θερμοκρασία δωματίου RT.
- Κάνουμε 2xπλυσίματα με 1 ml αποστειρωμένου PBS1x και φυγοκεντρούμε αναλόγως.
- Εισάγουμε το αντίσωμά μας διαλυμένο σε PBS-BSA 1% και επωάζουμε σε συνθήκες σκότους και RT για 45-60min.
- Μετά την επώαση ακολουθούν 2xπλυσίματα και φυγοκεντρίσεις
- Τέλος, επαναδιαλύουμε τα κύτταρα μας σε 500μl αποστειρωμένου PBS 1x και τα τοποθετούμε σε πάγο για να μην σχηματίσουν συσσωματώματα. Από εκεί φιλτράρονται στα FACs tubes περνάνε μέσα στο sorter.

2.7 ELISA

Είναι μια βιοχημική μέθοδος υπερευαισθησίας με σκοπό τον εντοπισμό αντιγόνων μέσα σε υπερκείμενα καλλιεργειών με τη χρήση αντισωμάτων.

Υλικά και διαλύματα

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

<u>Αντισώματα</u>

- α-H2-A, N22 hybridoma
- α-IgG, goat-anti-mouse IgG (Fab specific) peroxidase conjugated, Sigma Cat No.: A9917

<u>Διαδικασία</u>

Στρώνουμε τα υπερκείμενα των καλλιεργειών που έχουμε συλλέξει plate σε αραίωση 1:1 σε coating buffer (100 μl/well). Ως θετικό control χρησιμοποιούμε ορό από BALB/c ποντίκι σε αραίωση 1/1000 (100 μl/well) είτε TNF-α σε αραίωση 1:5 σε coating buffer. Σαν αρνητικό control χρησιμοποιούμε 100 μl coating buffer/well και DMEM σε αραίωση 1:1 σε coating buffer. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούμε 3 επαναλήψεις.

- Τοποθετούμε την πλάκα overnight στους 4⁰C
- Ακολουθούν 3x πλυσίματα με PBS tween-20 0,05% (200 μl/well).
- Επωάζουμε με PBS-BSA 2% για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (200 μl/well) και στη συνέχεια κάνουμε 3x πλυσίματα με PBS - tween-20 0,05% (200 μl/well).
- Επωάζουμε με τα πρώτα αντισώματα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία κάνουμε 3x πλυσίματα με PBS - tween-20 0,05% (200 µl/well).
- Επωάζουμε με το δεύτερο αντίσωμα για 45min σε συνθήκες σκότους σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρία πλυσίματα με PBS - tween-20 0,05% (200 μl/well).
- Φτιάχνουμε διάλυμα ίσου όγκου χρωμογόνου και υποστρώματος υπεροξειδάσης και προσθέτουμε 100 μl/well. Περιμένουμε ωσότου δούμε την αλλαγή χρώματος (το πολύ 20min) και σταματάμε την αντίδραση προσθετοντας 50 μl/well H2SO4, 1 M.
- Μετράμε τα αποτελέσματα στο ELISA plate reader 450 nm.

<u>3 Αποτελέσματα</u>

3.1 Μελέτη του profile έκφρασης των H2-A ενδοκυτταρικό και H2-A μεμβρανικό στην μικρογλοιακή κυτταρική σειρά BV-2, η οποία δε βρίσκεται σε resting κατάσταση, μετά από επαγωγή με LPS, IFN-γ και IL-4.

Χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά BV-2 ως πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη της μικρογλοίας ερευνήθηκαν και μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των ενδοκυττάριων και μεμβρανικών H2-A μορίων με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής.

Η χρώση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη διαδικασία του εξωτερικού ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση του μεμβρανικού H2-Α και του εσωτερικού ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση του ενδοκυτταρικού H2-A.Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των μορίων δεν ήταν απευθείας συνδεδεμένα με φθορίζουσα χρωστική γι αυτό ανιχνεύθηκαν με τη χρήση δεύτερου αντισώματος συνδεδεμένο με χρωστική FITC (πράσινη φθορίζουσα χρωστική).

3.1.1 Ανίχνευση των επιπέδων των Η2-Α μορίων με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής μετά την επαγωγή με IFN-γ

Μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνικών μορίων H2-A (μεμβρανικό, ενδοκυτταρικό) σε BV-2 κύτταρα, μετά από επαγωγή για 24 και 48 ώρες με IFN-γ (12,5 U/ml) σε serum free συνθήκες καλλιέργειας.

Παρουσιάζονται τα ιστογράμματα του πειράματος:









Εικόνες 12-17) Ανίχνευση του ενδοκυτταρικού μορίου H2-A και του μεμβρανικού μορίου H2-A με κυτταρομετρία ροής στην κυτταρική σειρά BV-2 μετά από επαγωγές 24 κα 48 ωρών με IFN-γ.Τα ποσοστά τα οποία αναγράφονται προκύπτουν από τη χρήση της εφαρμογής Histogram Subtraction

3.1.2 Ανίχνευση των επιπέδων των Η2-Α μορίων με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής μετά την επαγωγή με LPS

Μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνικών μορίων H2-A μεμβρανικό, H2-A ενδοκυττάριο σε BV-2 κύτταρα, μετά από 24 και 48 ώρες επαγωγή με LPS (500 ng/mL), σε serum free συνθήκες καλλιέργειας.

Παρουσιάζονται τα ιστογράμματα του πειράματος:







Εικόνες 18-23) Ανίχνευση του ενδοκυτταρικού μορίου H2-A και του μεμβρανικού μορίου H2-A με κυτταρομετρία ροής στην κυτταρική σειρά BV-2 μετά από επαγωγές 24 και 48 ωρών με LPS.Τα ποσοστά τα οποία αναγράφονται προκύπτουν από τη χρήση της εφαρμογής Histogram Subtraction

3.1.3 Ανίχνευση των επιπέδων των Η2-Α μορίων με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής μετά την επαγωγή με IL-4

Μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνικών μορίων H2-A μεμβρανικό, H2-A ενδοκυττάριο σε BV-2 κύτταρα, μετά από επαγωγή με IL-4 (80 U/mL) για 24 και 48 ώρες σε serum free συνθήκες καλλιέργειας.

Παρουσιάζονται τα ιστογράμματα του πειράματος:







Εικόνες 24-29) Ανίχνευση του ενδοκυτταρικού μορίου H2-A και του μεμβρανικού μορίου H2-A με κυτταρομετρία ροής στην κυτταρική σειρά BV-2 μετά από επαγωγές 24 και 48 ωρών με LPS.Τα ποσοστά τα οποία αναγράφονται προκύπτουν από τη χρήση της εφαρμογής Histogram Subtraction

Συνοψίζοντας, από τις τρεις επιμέρους επαγωγές με διαφορετικούς παράγοντες παίρνουμε το ακόλουθο διάγραμμα:



Εικόνα 30) Διάγραμμα-γράφημα που απεικονίζει την αλλαγή των επιπέδων έκφρασης των Τάξης ΙΙ H2-A (μεμβρανικό και ενδοκυτταρικό) στην κυτταρική σειρά BV-2, μετά από επαγωγές 24, 48 ωρών με LPS,IFN-g και IL-4.Τα επί της % ποσοστά προέρχονται απο την χρήση της εφαρμογής του Histogram Subtraction στα αποτελέσματα που απεικονίζονται παραπάνω.

Από το διάγραμμα της εικόνας 30, φαίνεται ότι όλοι οι επαγωγείς εμπλέκονται στη ρύθμιση των τάξης ΙΙ αντιγόνων ιστοσυμβατότητας και ότι σε όλες τις περιπτώσεις 24ωρης επαγωγής, με LPS, με IFN-γ, με IL-4, έχουμε αύξηση της έκφρασης των επιπέδων του ενδοκυτταρικού και μεμβρανικού H2-A.

Συγκεκριμένα,μετά από 24ώρες επαγωγής με LPS τα επίπεδα έκφρασης των H2-A μορίων (ενδοκυτταρικό, μεμβρανικό) αυξάνονται κατά 11,30% και 16.38% (*p*<0,005%) αντίστοιχα, επί των αρχικών επιπέδων, ενώ υπό την επίδραση της γ-ιντερφερόνης η αύξηση είναι της τάξεως 21,36% για το H2-A ενδοκυτταρικό (*p*<0,005%) και 28,52% (*p*<0,005%) για το H2-A μεμβρανικό. Από τους τρεις όμως επαγωγείς, η αντιφλεγμονώδης κυτοκίνη IL-4 επάγει περισσότερο την έκφραση των επιπέδων των H2-A μορίων (αύξηση κατά 28,32% για το ενδοκυτταρικό H2-A σε σχέση με το control και 55,77% αύξηση για το H2-A μεμβρανικό (*p*<0,005%)). Επίσης, μετά τις 48 ώρες επαγωγής με τους τρεις παράγοντες παρατηρείται μείωση των επιπέδων έκφρασης των Η2-Α μορίων σε σχέση με τα επίπεδά τους στις 24 ώρες επαγωγής. Όμως, παρόλη τη μείωση των επιπέδων έκφρασης των Η2-Α μορίων, μόνο στην περίπτωση της επώασης με LPS τα επίπεδα πέφτουν κάτω από αυτά του control.Στους άλλους δύο παράγοντες τα επίπεδα έκφρασης διατηρούνται υψηλά σε σχέση με αυτά των control.Η αυξομείωση των επιπέδων έκφρασης των Η2-Α μορίων, μόνο στην επιπέδων έκφρασης των control.Η αυξομείωση των επιπέδων έκφρασης των ταξης με αυτά των control.Η αυξομείωση των επιπέδων έκφρασης των Η2-Α μορίων, μέσα στο διάστημα των 48 ωρών, επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η μικρογλοία υπόκειται σε ιδιαίτερους κανόνες έκφρασης των τάξης ΙΙ αντιγόνων ιστοσυμβατότητας.

3.2 Μελέτη του προφίλ έκφρασης των κλασσικών H2-A μορίων (ενδοκυτταρικό, μεμβρανικό) στην μικρογλοιακή κυτταρική σειρά BV-2 σε resting κατάσταση.

Για τη μελέτη του προφίλ της πρωτεϊνικής έκφρασης των κλασσικών τάξης ΙΙ μορίων (H2-A μεμβρανικού, ενδοκυτταρικού) στην resting κατάσταση της μικρογλοίας, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής πάνω στην κυτταρική σειρά BV-2.Τα πειράματα κινητικής καλύπτουν ένα μεγάλο χρονικό διάστημα από την ημέρα ξεπαγώματος των κυττάρων και μετά. Συγκεκριμένα, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν 5,12,15,22,27 και 37 ημέρες μετά το ξεπάγωμα των κυττάρων και παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τη μεταβολή της πρωτεϊνικής έκφρασης των τάξης ΙΙ (H2-A) μορίων καθώς περνάμε από τη μορφολογία της μη resting μικρογλοίας στη resting.

Ο έλεγχος και η ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεϊνικής έκφρασης των H2-A μορίων έγινε με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής.Η χρώση των κυττάρων έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία του εξωτερικού και εσωτερικού ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των μορίων του H2-A μεμβρανικού και H2-A ενδοκυτταρικού αντίστοιχα. Τα αντισώματα για την ανίχνευση των μορίων δεν ήταν συνδεδεμένα με κάποια φθορίζουσα ουσία, γι αυτό χρησιμοποιήθηκαν δεύτερα αντισώματα που έφεραν την πράσινη χρωστική FITC.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι όλα τα κύτταρα βρίσκονται σε πλήρη ηρεμία από την εικοστή δεύτερη μέρα ξεπαγώματος και μετά. Στη συνέχεια παρουσιάζεται η ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής υπό μορφή density plot και ιστογραμμάτων ορισμένων ενδεικτικών πειραμάτων κινητικής.



Εικόνες 31-32) Η αριστερή εικόνα (31) παρουσιάζει τη μορφολογία των κυττάρων BV-2 (FSC=μέγεθος,SSC=πολυπλοκότητα-κοκκιότητα).Όσο μετακινείται το δείγμα στον άξονα χ προς τα δεξιά τόσο αυξάνεται το μέγεθος των κυττάρων, ενώ όσο μετακινείται προς τα πάνω στον άξονα ψ τόσο αυξάνεται η πολυπλοκότητα τους. Η εικόνα στα δεξιά (32) παρουσιάζει των αυτοφθορισμό των BV-2 κυττάρων.Η FL1 μας δείχνει τον πράσινο φθορισμό ενώ η FL2 τον κόκκινο. Όσο μετακινείται το δείγμα προς τα δεξιά στον χ άξονα τόσο αυξάνεται ο πράσινος φθορισμός,των κυττάρων του ενώ όσο μετακινείται προς τα πάνω στον ψ άξονα τόσο αυξάνεται ο κόκκινος φθορισμός των κυττάρων του.



Εικόνες 33-34) Η εικόνα στα αριστερά (33) απεικονίζει το ποσοστό του μη ειδικού φθορισμού του 2^{ου} αντισώματος το οποίο είναι συνδεδεμένο με FITC.Ο φθορισμός του FITC ανιχνεύεται από το κανάλι

FL1.Η δεξιά εικόνα (34) απεικονίζει το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν μεμβρανικό H2-A και στα οποία έχει προσδεθεί ειδικά το 2° αντίσωμα που συνδέεται με FITC.



Εικόνα 35) Ιστόγραμμα του ποσοστού έκφρασης του μεμβρανικού H2-A σε κύτταρα 12 ημερών μετά το ξεπάγωμα. Τα άβαφα κύτταρα παρουσιάζονται με το πράσινο χρώμα, ο μάρτυρας FITC με κόκκινο χρώμα και το μεμβρανικό H2-A με το μπλε χρώμα. Το ποσοστό των θετικών κυττάρων για το H2-A μεμβρανικό κατόπιν αφαίρεσης του δείγματος ελέγχου FITC και υπολογισμένο με τη χρήση του histogram subtraction είναι 99,36%.Είναι χαρακτηριστικό ότι μέσα στον ίδιο πληθυσμό κυττάρων παρουσιάζονται δυο διαφορετικοί μορφολογικοί φαινότυποι ο M1 και ο M2.Αυτό, πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι ορισμένα κύτταρα έχουν αρχίσει να μεταβαίνουν στην resting κατάσταση και να αλλάζουν μορφολογικά από τα υπόλοιπα.



Εικόνα 36) Αντίστοιχα παρουσιάζεται το ιστόγραμμα του ποσοστού έκφρασης του ενδοκυτταρικού H2-Α στα ίδια κύτταρα (12 ημέρες μετά το ξεπάγωμα τους).Ισχύουν τα παραπάνω για τα χρώματα του άβαφου δείγματος, του μάρτυρα και του ενδοκυτταρικού H2-A.Με το histogram subtraction υπολογίστηκε ότι το ενδοκυτταρικό H2-A εκφράζεται σε ποσοστό 91,05%.



Εικόνες 37-38) Στο αριστερό μέρος (37) έχουμε το density plot των BV-2 κυττάρων μετά από 37 ημέρες ξεπαγώματος και τα οποία βρίσκονται σε πλήρη ηρεμία, resting κατάσταση..Είναι χαρακτηριστική η μορφολογική τους διαφορά σε σύγκριση με την εικόνα 31 και η αλλαγή τους με το πέρασμα των ημερών.Στην δεξιά εικόνα (38) εμφανίζεται ο αυτοφθορισμός των κυττάρων.



Εικόνες 39-40) Στην αριστερή εικόνα (39) φαίνεται η μη ειδική πρόσδεση του FITC (εξηγήθηκαν παραπάνω), ενώ στη δεξιά (40) το ποσοστό του H2-A μεμβρανικού και του 2^{ου} αντισώματος που έχει πιάσει ειδικά το πρώτο αντίσωμα.



Εικόνα 41) Απεικονίζεται το ιστόγραμμα του ποσοστού έκφρασης του μεμβρανικού H2-A μετά από 37 ημέρες ξεπαγώματος και καλλιέργειας των BV-2 κυττάρων. Στην χρονική αυτή στιγμή τα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας. Με κίτρινο χρώμα είναι η καμπύλη των άβαφων κυττάρων, με γαλάζιο του μάρτυρα FITC και με μπορντό του μεμβρανικού H2-A. Με το histogram subtraction υπολογίστηκε ότι το μεμβρανικό H2-A εκφράζεται σε ποσοστό 48,57%



Εικόνα 42) Απεικονίζεται το ιστόγραμμα για την ενδοκυττάρια έκφραση του H2-A μορίου σε BV-2 κύτταρα μετά από 37 ημέρες ξεπαγώματος και καλλιέργειας. Με γαλάζιο χρώμα έχουμε την καμπύλη των άβαφων κυττάρων, με κίτρινο του μάρτυρα FITC και με μπορντό το ενδοκυτταρικό H2-A.Το ποσοστό πρωτεϊνικής έκφρασης του ενδοκυτταρικού H2-A είναι 25,89%.Πάρα πολύ μειωμένο σε σχέση με αυτό των 12 ημερών που παρουσιάζεται στην εικόνα 36.

Συλλέγοντας όλα τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας για το κλασικό τάξης ΙΙ αντιγόνο ιστοσυμβατότητας H2-A, κατασκευάζουμε το ακόλουθο γράφημα για τη resting μικρογλοία.

Εικόνα 43) Γράφημα της μεταβολής του H2-A μορίου με το πέρασμα των ημερών.Με γαλάζιο χρώμα είναι το γράφημα για το H2-A το ενδοκυτταρικό, ενώ με μπορντό για το μεμβρανικό



Στο παραπάνω γράφημα (43) απεικονίζονται τα ποσοστά πρωτεϊνικής έκφρασης των μεμβρανικών και των ενδοκυτταρικών H2-A μορίων, με το πέρασμα των ημερών από την ημέρα του ξεπαγώματός τους. Ως ημέρα 0 θεωρούμε την ημέρα που ξεπάγωσαν. Τα ποσοστά υπολογίστηκαν με κυτταρομετρία ροής. Τα μικρογλοιακά κύτταρα άρχισαν να αποκτούν πόδια από την 7 ημέρα ξεπαγώματος τους, ενώ μέχρι την 22 ημέρα όλη η κυτταροκαλιέργεια είχε αποκτήσει πόδια βρισκόταν δηλαδή, σε resting κατάσταση. Αξίζει να σημειωθεί ότι από το σημείο των 22 ημερών όπου όλα σχεδόν τα μικρογοιακά βρίσκονται σε ήρεμη κατάσταση, τα επίπεδα έκφρασης τόσο του μεμβρανικού όσο και του ενδοκυτταρικού H2-A μειώνονται συνεχώς.

3.2.1 Ανίχνευση- Μελέτη των διαλυτών MHC ΙΙ μορίων στα υπερκείμενα της καλλιέργειας των BV-2 κυττάρων.

Για να μελετήσουμε πως μεταβάλλονται τα επίπεδα των διαλυτών τάξης ΙΙ μορίων από την ημέρα 0 του ξεπαγώματος των BV-2 εώς και την 37 ημέρα, για να δούμε αν και κατά πόσο μια πιθανή μείωση της έκφρασης των μεμβρανικών και ενδοκυτταρικών εππέδων του H2-A οφείλεται στην έκκριση των μορίων αυτών και για να καταλάβουμε τι συμβαίνει στην ήρεμη μικρογλοία αν εκκρίνει ή όχι διαλυτά τάξης ΙΙ μόρια, συλλέχθηκαν υπερκείμενα όλων των πειραμάτων και υποβλήθηκαν σε δοκιμασίες ELISA. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται ως ποσοστιαία διαφορά με βάση το αρνητικό control (Coating Buffer).



Εικόνα 44) Αποτελέσματα ELISA για τα διαλυτά MHC ΙΙ μόρια. Παρατηρούμε ότι τα επίπεδα έκκρισης των διαλυτών τάξης ΙΙ μορίων μειώνονται με το πέρασμα των ημερών, με εξαίρεση την 27η ημέρα από το ξεπάγωμα στην οποία παρουσιάζουν μία απροσδόκητη αύξηση.

3.3 Μελέτη της έκφρασης των κλασικών και μη κλασικών Τάξης ΙΙ μορίων στην κατάσταση της resting μικρογλοίας μετά από επαγωγή με IFN-γ.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα 24ωρης και 48ωρης επαγωγής με IFN-γ (12,5 U/mL) στην μικρογλοιακή κυτταρική σειρά BV-2.Τα κύτταρα βρίσκονταν σε resting κατάσταση ήδη 5 ημέρες, έχοντας αποκτήσει ολοκληρωτικά <<πόδια>> και έχοντας σχηματίσει το χαρακτηριστικό τους δίκτυο. Η επαγωγή πραγματοποιήθηκε με σκοπό την μελέτη των MHC II μορίων,το πως αλλάζουν τα επίπεδά τους, κατά την ενεργοποίηση της <<απενεργοποιημένης>> μικρογλοίας. Οι μετρήσεις έγιναν με κυτταρομετρία ροής και τα πρωτόκολλα του εσωτερικού και του εξωτερικού ανοσοφθορισμού.Το 2° αντίσωμα για τα H2-A μόρια ήταν συνδεδεμένο με φθορίζουσα χρωστική FITC, ενώ για τα μη κλασικά τάξης II (H2-O, H2-M) το 2° αντίσωμα ήταν συνδεδεμένο με την κόκκινη χρωστική PE.

Παρατίθενται ενδεικτικά αποτελέσματα υπό μορφή density plot και ιστογραμμάτων.





Στις εικόνες 45-47 απεικονίζονται τα density plot των κυττάρων της μικρογλοίας. Στην εικόνα 45 παρουσιάζεται η μικρογλοία η οποία βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας. Στην εικόνα 46 φαίνεται η μορφολογική της διαφορά μετά από 24 ώρες επαγωγής με γ-ιντερφερόνη, ενώ στη τελευταία εικόνα (47) φαίνεται η αλλαγή της μετά από 48 ώρες επαγωγής. Πρέπει να τονιστεί ότι η διαφορά στη μορφολογία κατά την ενεργοποίηση της ήρεμης μικρογλοίας είναι πολύ μικρή.



Εικόνα 48) Ιστόγραμμα της έκφρασης του μεμβρανικού H2-A στα control BV-2 κύτταρα.Με το μπλε χρώμα απεικονίζεται η καμπύλη των άβαφων κυττάρων, με κόκκινο του μάρτυρα FITC,ενώ με πράσινο η καμπύλη του μεμβρανικού H2-A.Με το histogram subtraction το ποσοστό πρωτεϊνικής έκφρασης του μεμβρανικού H2-A ανέρχεται στο 6,75%.



Εικόνα 49) Ιστόγραμμα που απεικονίζει το ποσοστό πρωτεϊνικής έκφρασης του μεμβρανικού H2-A μετά από 48 ώρες επαγωγής με IFN-γ. Το ποσοστό έκφρασης είναι 56,87%.



Εικόνα 50) Διάγραμμα απεικόνισης της μεταβολής των κλασικών και μη κλασικών Τάξης ΙΙ αντιγόνων ιστοσυμβατότητας. Είναι πολύ δύσκολο να αναλύσουμε τα αποτελέσματα. Μπορούμε να αναφέρουμε όμως ότι τα επίπεδα των κλασικών τάξης ΙΙ σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία είναι χαμηλά και αυξάνονται όταν επαχθούν με ιντερφερόνη και επίσης τα μη κλασικά MHC ΙΙ μόρια H2-O,H2-M βρίσκονται σε υψηλά ποσοστά στα control κύτταρα, τα οποία είναι σε ηρεμία.

3.4 Μελέτη της έκφρασης των κλασικών και μη κλασικών Τάξης ΙΙ μορίων στην κατάσταση της resting μικρογλοίας μετά από επαγωγή με LPS

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής-επαγωγής στην μικρογλοιακή κυτταρική σειρά BV-2, η οποία βρισκόταν σε resting κατάσταση.Οι επαγωγές ήταν 24ωρες και 48ωρες και είχαν ως στόχο την μελέτη του προφίλ έκφρασης των τάξης ΙΙ μορίων καθώς τα κύτταρα μεταβαίνουν από την ηρεμία στην φλεγμονώδη κατάσταση που προκαλείται από το LPS (500ng/mL).Τα επίπεδα των Τάξης ΙΙ μορίων ανιχνεύθηκαν με κυτταρομετρία ροής μετά από τη διαδικασία του εσωτερικού και εξωτερικού ανοσοφθορισμού.

Παρατίθενται ενδεικτικά τα αποτελέσματα

Ιστογράμματα





Εικόνες 51-54) Ενδεικτικά Ιστογράμματα για τα ποσοστά έκφρασης των κλασικών (H2-A μεμβρανικό,ενδοκυτταρικό) και μη κλασικων (H2-M) τάξης ΙΙ αντιγόνων ιστοσυμβατότητας.Τα ποσοστά πρωτεϊνικής έκφρασης που αναγράφονται προέρχονται από τη χρήση histogram subtraction και είναι χαρακτηριστικά για το κάθε ένα μόριο.

Τα αποτελέσματα όλων των επαγωγών με LPS στην ήρεμη μικρογλοία αναλύθηκαν και δημιουργήθηκε το παρακάτω διάγραμμα.



Εικόνα 55) Διάγραμμα απεικόνισης της αλλαγής στην πρωτεϊνική έκφραση των H2-A (μεμβρανικών,ενδοκυτταρικών), H2-M, H2-Ο μορίων, μετά την 24ωρη και 48ωρη επαγωγή με LPS.Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής.

Από το διάγραμμα φαίνεται ότι το H2-A μεμβρανικό εκφράζεται σε πολύ μικρό ποσοστό 6,29% στην resting μικρογλοία, ενώ αυξάνεται μετά την επίδραση του LPS φτάνοντας την κορυφή των 53,51% μετά από 48 ώρες επαγωγής. Το ίδιο συμβαίνει και για το μη κλασικό H2-M το οποίο αυξάνει την έκφρασή του κατα 302 % μετά από 24 ώρες επαγωγής με LPS.

Από την άλλη τα ενδοκυτταρικά επίπεδα έκφρασης του H2-A αυξάνονται κατά 11 % μέσα σε 24 ώρες επαγωγής, αλλά στη συνέχεια μειώνονται κατά 80% των αρχικών. Τέλος, τα επίπεδα του H2-O μειώνονται κατά 58,21 % μέσα στις 24 ώρες επαγωγής αλλά μετά παρουσιάζουν μία μικρή αύξηση η οποία όμως δεν ξεπερνά το ποσοστό έκφρασής που είχαν στην resting κατάσταση.

3.4.1 Ανίχνευση- Μελέτη των διαλυτών ΜΗC ΙΙ μορίων στα υπερκείμενα της καλλιέργειας των BV-2 κυττάρων τα οποία έχουν επαχθεί με LPS.

Για να απαντήσουμε στο ερώτημα για το αν η παρουσία του LPS μεταβάλλει τα επίπεδα έκκρισης των διαλυτών MHC II μορίων και TNF-α, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ELISA στα υπερκείμενα της καλλιέργειας των BV-2 κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά βρίσκονταν υπό την επίδραση του LPS (500 ng/ml) για 24 και 48 ώρες καλλιέργειας σε serum-free συνθήκες. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται ως ποσοστιαία διαφορά με βάση το αρνητικό control (Coating Buffer).



Εικόνα 56) Διάγραμμα απεικόνισης της έκκρισης του TNF-α μετά από 24 και 48 ώρες επαγωγής με LPS.



Εικόνα 57) Διάγραμμα απεικόνισης της έκκρισης των διαλυτών Τάξης ΙΙ μετά από επαγωγή 24 και 48 ωρών με LPS.

3.5 Μελέτη της Κοκκιότητας της Μικρογλοίας με τη χρησιμοποίηση της BV-2 κυτταρικής σειράς.

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, όταν τα μικρογλοιακά κύτταρα ενεργοποιούνται από κάποιο ερέθισμα, χάνουν τα χαρακτηριστικά της ήρεμης τους κατάστασης <<πόδια>> και αποκτούν την <<αμοιβαδοειδή>> μορφή τους. Χαρακτηριστικό της ενεργοποίησης τους και κατ' επέκταση της μορφολογίας τους είναι η αυξημένη κοκκιότητα που παρουσιάζουν.

Μέχρι πρότινος αποτελέσματα δεν έχουν καταφέρει να δώσουν μια σαφή απάντηση για το τι είδους είναι η κοκκιότητα αυτή. Μέσα από τα ακόλουθα πειράματα προσπαθήσαμε να βρούμε μία πιθανή απάντηση.

Εστιάσαμε τα πειράματα μας σε δύο πιθανά ενδεχόμενα. Είτε αυτή η κοκκιότητα να οφείλεται στην αύξηση του αριθμού των λιπιδικών σωμάτων είτε να πρόκειται για αύξηση των ενδοσωμάτων.

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήσαμε ήταν η μικρογλοιακή BV-2 η οποία είναι κατάλληλη για τη μελέτη της μικρογλοίας και η ενεργοποίηση των κυττάρων έγινε μέσω της επώασης με LPS.

3.5.1 Μελέτη της κοκκιότητας μέσα από την έρευνα των λιπιδικών σωματιδίων.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε πάνω σε ενεργοποιημένη και σε resting μικρογλοία.Η κυτταρική σειρά ήταν η BV-2.Η ενεργοποίηση γινόταν με LPS (500ng/mL) σε serum free συνθήκες. Η επαγωγή διαρκούσε 24 ώρες.Μετά το πέρας της επαγωγής μελετούσαμε το πως έχουν αλλάξει τα επίπεδα παραγωγής των λιπιδικών σωματίων μέσα στα ενεργοποιημένα κύτταρα, έχοντας ως control BV-2 κύτταρα τα οποία βρίσκονταν σε resting κατάσταση.

Η χρώση των λιπιδικών σωματίων έγινε με τη χρήση της λιπόφιλης Nile Red και η παρακολούθηση των σωματιδίων γινόταν κατά κύριο λόγο με τη χρήση της 3^{ης} Αρμονικής. Επίσης τα κύτταρα μελετιόνταν με συνεστιακή μικροσκοπία και μικροσκοπία φθορισμού δύο ηλεκτρονίων.

Τέλος, τα κύτταρα BV-2 μεγάλωναν και επάγονταν με LPS

είτε πάνω σε cover slips για να φαίνεται στο μικροσκόπιο φθορισμού η κανονική τους μορφολογία, είτε κανονικά μέσα σε φλάσκες

3.5.1.1 Κυταρικές καλλιέργεις BV-2 πάνω σε cover slips.Επαγωγή με LPS.

Η μελέτη της κοκκιότητας των ενεργοποιημένων κυττάρων πάνω στα cover slips ήταν πολύ δύσκολη. Παρόλα αυτά καταφέραμε να πάρουμε τις εξής φωτογραφίες-αποτελέσματα.









Οι εικόνες 58-61 απεικονίζουν καλλιεργημένα κύτταρα BV-2 πάνω σε cover slips στα οποία έχει γίνει σύμανση των λιπιδικών τους σωμάτιων με Nile Red χρωστική. Έχουν τραβηχτεί από μικροσκόπιο φθορισμού 2 φωτονίων και είναι δείγματα control.Στην ουσία είναι μικρογλοία που βρίσκεται σε resting κατάσταση. Παρατηρούμε ότι έχει βάψει ειδικά η Nile Red και ότι μας είναι εύκολο να διακρίνουμε τα λιπιδικά σωμάτια (κόκκινες κουκίδες μέσα στα κύτταρα).Συγκεκριμένα, στην φωτογραφία νούμερο 61 φαίνεται ευκρινέστερα το πλήθος των λιπιδικών σωμάτιων που φέρουν τα ήρεμα μικρογλοιακά κύτταρα.

Δυστυχώς με τη χρήση του μικροσκοπίου φθορισμού ήταν ακατόρθωτο να πάρουμε ειδικό φθορισμό της Nile Red στα ενεργοποιημένα με LPS κύτταρα. Παρόλα αυτά με τη χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας τραβήξαμε τις εξής δύο φωτογραφίες για να διαλευκάνουμε την υπόθεση των λιπιδικών σωμάτιων και της κοκκιότητας των κυττάρων



Εικόνα 62)

Φωτογραφία confocal.40x φακός.

control BV-2 κύτταρο σε resting κατάσταση.Χαρακτηριστικό βάψιμο των λιπιδικών σωμάτιων με Nile red.Οι κίτρινες κουκίδες απεικονίζουν τα λιπιδικά σωμάτια. Εικόνα 63)Φωτογραφία confocal.20x φακός.control BV-2 κύτταρο σε resting κατάσταση.Χαρακτηριστικό βάψιμο των λιπιδικών σωμάτιων με Nile red.Οι κόκκιινες κουκίδες απεικονίζουν τα λιπιδικά σωμάτια.





3.5.1.2 Κυταρικές καλλιέργεις BV-2 σε φλάσκες.Επαγωγή με LPS.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την καλύτερη και ποιοτικότερη μελέτη των λιπιδικών σωμάτιων των μικρογλοιακών κυττάρων.Γι αυτό, από κυτταροκαλλιέργειες BV-2 πέρναμε 200.000 κύτταρα, τα μεγαλώναμε σε 6 well plate και τα επωάζαμε για 24 ώρες με LPS 500ng/mL.Μετά τις 24 ώρες τα βάφαμε με Nile Red και τα
χτυπάγαμε με την ενέργεια της 3^{ης} αρμονικής ή τα βλέπαμε στο confocal.Η 3^η αρμονική είναι στην ουσία, ένα lazer το οποίο όπως αναφέρεται στην εισαγωγή απεικονίζει κυρίως τα λιπίδια του κυττάρου και τα μιτοχόνδρια.Επίσης, μπορεί να διακρίνει τα λιπιδικά σωμάτια μέσα στα κύτταρα του δείγματος,χωρίς να χρειαστεί κάποια χρωστική.Άρα το μέσο της 3^{ης} αρμονικής είναι πολύ χρήσιμο ώστε να διελευκάνουμε ακόμη περισσότερο τι είδους είναι η κοκκιότητα των ενεργοποιημένων κυττάρων

Ακολουθούν φωτογραφίες confocal microscopy των BV-2 κυττάρων πρίν και μετά την επαγωγή με LPS.





Πρέπει να σημειωθεί ότι ήταν πολύ δύσκολο να λάβουμε φωτογραφίες κυττάρων BV-2 που έχουν επαχθεί και να ενεργοποιηθεί από το LPS.Ο λόγος θα εξηγηθεί στα παρακάτω αποτελέσματα.

Πάντως παρ'όλες τις πειραματικές δυσκολίες και μετά από πολλές επαναλήψεις, κατάφεραμε να πάρουμε κάποιες εικόνες. Χαρακτηριστική εικόνα ενός κυττάρου BV-2 που έχει υποστεί ενεργοποίηση είναι η ακόλουθη.

Εικόνα 67) confocal microscopy.60x φακός. Απεικονίζεται ένα ενεργοποιημένο κύτταρο BV-2 μετά από 24 ώρες επαγωγής με LPS.Είναι χαρακτηριστικό ότι έχει αλλάξει μορφολογία σε σχέση με το resting της εικόνας 66 και δίνει πάρα πολλά λιπιδικά σωμάτια. Τα λιπιδικά σωμάτια είναι βαμμένα με Nile red και φαίνονται ως πορτοκαλοκίτρινες κουκίδες πάνω στο κύτταρο.



Είναι σαφές από τις παραπάνω εικόνες ότι όταν το κύτταρο μεταβαίνει από το στάδιο της ηρεμίας ,όπου φέρει ψευδοπόδια,στο στάδιο της ενεργοποίησης όπου παίρνει το χαρακτηριστικό του αμοιβαδοειδές σχήμα έχουμε αύξηση των λιπιδικών του σωμάτιων.

Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και από τα πειράματα της 3^{ης} αρμονικής.

Αποτελέσματα 3^{ης} αρμονικής:

Εικόνα 68) THG 3^η αρμονική.Κύτταρα control BV-2 resting μικρογλοία.οι δομές που διακρίνονται με κίτρινες κουκίδες είναι το σήμα της 3^{ης} αρμονικής.Λιπιδικά σωμάτια.





Εικόνα 69) THG microscopy 3^{''} αρμονική.Κύτταρα BV-2 activated μετά από 24 ώρες επαγωγής με LPS.Τα κίτρινα spots, είναι το σήμα της 3^{ης} αρμονικής που παίονουμε από τα λιπιδικά σωμάτια των κυττάοων.



Group Statistics											
	aroup	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean						
area	control	15	516,00	294,923	76,149						
	active	15	2026,53	818,036	211,216						

Independent Samples Test												
	Levene's Test for Equality of Variances			t-test for Equality of Means								
									95% Confidence Interval of the Difference			
		F	Siq.	t	df ,	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper		
area	Equal variances assumed	5,142	,031	-6,728	28	,000	-1510,533	224,524	-1970,449	-1050,618		
	Equal variances not assumed			-6,728	17,579	,000	-1510,533	224,524	-1983,051	-1038,016		
-	_	-						-	-	_		

P<0.01 Νδιαγορά του μέσου όρου είναι στατιστικά σημαντική!!! Συνεντοπισμός σήματος 3^{ης} αρμονικής και Nile red χρωστικής.Επειδή υποτίθεται ότι η 3^η αρμονική λαμβάνει σήμα από τα λιπιδικά σωμάτια πραγματοποιήθηκαν πάρα πολλά πειράματα συνεντοπισμού.

Τα αποτελέσματα ήταν τα ακόλουθα:



Οι εικόνες 71-72 παρουσιάζουν τα εξής:

Οι εικόνες 71α,72α ,δείχνουν τα σήματα της 3^{ης} αρμονικής σε κύτταρα μη ενεργοποιημένης μικρογλοίας-control.

Οι εικόνες 71 β και 72 β παρουσιάζουν τα σημεία στα οποία έχει βάψει ειδικά η Nile Red και στα οποία φαίνονται τα λιπιδικά σωμάτια(μπλε κουκίδες).

Τέλος, στις εικόνες 71γ και 72γ απεικονίζεται το κατά πόσο το σήμα της 3^{ης} αρμονικής συνεντοπίζεται με το σήμα του φθορισμού της Nile red.Εκεί που συνεντοπίζεται το σήμα οι κουκίδες παίρνουν ένα πιο πράσινο τόνο χρώματος.

Γενικά από όλα τα πειράματα συνεντοπισμού στα control κύτταρα και από τις δύο παραπάνω εικόνες βλέπουμε ότι υπάρχει μερικός συνεντοπισμός της τρίτης αρμονικής με τα λιπιδικά σωμάτια στα κύτταρα της ήρεμης μικρογλοίας.Όμως συνεχίζουμε να παίρνουμε σήμα 3^{ης} αρμονικής και από άλλα ενδοκυτταρικά σωματίδια.

Όσον αφορά το συνεντοπισμό της 3^{ης} αρμονικής με τη φθορίζουσα χρωστική Nile red και κατ'επέκταση της επιβεβαίωσης ότι οι δομές που βλέπουμε να αυξάνονται στην 3^η αρμονική κατά την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων είναι στην πλειονότητά τους λιπιδικά σωμάτια, δεν μπορούμε να το επιβεβαιώσουμε με τα τωρινά αποτελέσματα επειδή δεν ήταν επαναλήψιμα.Υπάρχει η πιθανότητα να βγάλουμε κάποιο λανθασμένο συμπέρασμα.

Παραθέτω μια φωτογραφία ενεργοποιημένου κυττάρου στο οποίο παρουσιάζεται μερικός συνεντοπισμός και το οποίο φέρει πολλές περισσότερες δομές λιπιδικών σωμάτιων, σύμφωνα με τη χρώση της nile red, σε σχέση με τα control.



Η εικόνα 73 α δείχνει το σήμα της 3 αρμονικής με κόκκινες κουκίδες εκεί που είναι πιο έντονο, η β δείχνει το σήμα από τη nile red (πράσινα spots) και τέλος η γ το συνεντοπισμό του σήματος της 3^{ης} αρμονικής με το σήμα της nile red.

3.5.2 Μελέτη της κοκκιότητας μέσα από την έρευνα των (πρώϊμων) ενδοσωμάτων.

Επίσης εκτός από την υπόθεση ότι η κοκκιότητα που παρατηρείται κατά την ενεργοποίηση της μικρογλοίας οφείλεται στην αύξηση του αριθμού των λιπιδικών της σωμάτιων, υποθέσαμε και ερευνήσαμε το ενδεχόμενο να οφείλεται και σε μια πιθανή αύξηση των ενδοσωμάτων της.

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήσαμε για την μελέτη μας ήταν η μικρογλοιακή σειρά BV-2 και οι επαγωγές πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα τα οποία βρίσκονταν σε πλήρη ηρεμία, δηλαδή όλα είχαν σχηματίσει τις χαρακτηριστικές μορφολογικές προεκβολές τους. Η επαγωγή των κυττάρων είχε διάρκεια 24 ώρες και έγινε με LPS (500ng/mL). Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των ενδοσωμάτων ήταν το Rab7, το οποίο πιάνει τα πρώιμα ενδοσώματα, και ως δεύτερο αντίσωμα, χρησιμοποιήθηκε ένα αντίσωμα το οποίο έφερε τη φθορίζουσα χρωστική FITC.

3.5.2.1 Κυταρικές καλλιέργεις BV-2 πάνω σε cover slips.Επαγωγή με LPS.

Η μελέτη της κοκκιότητας των ενεργοποιημένων κυττάρων πάνω στα cover slips ήταν πολύ δύσκολη με αποτέλεσμα να μην έχουμε επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μας.

Εικόνα 74)Μικροσκοπία φθορισμού.40χ φακός Παρουσιάζονται κύπταρα BV-2 σε ήρεμη κατάσταση –control.Το Rab7 και κατ επέκταση το FITC δεν φαίνεται να έχει προσδεθεί ειδικά.

Για το control

Για την ενεργοποιημένη μικρογλοία, μόνο σε ένα πείραμα καταφέραμε να δούμε τα ενδοσώματα μετά από 24 ώρες επαγωγής με LPS.



Εικόνα 76)Μικροσκόπιο φθορισμού.40χ φακός.

Ενεργοποιημένη μικρογλοιακά κύτταρα BV-2 στα οποία φαίνεται η παραγωγή των ενδοσωμάτων.Το αντίσωμα Rab 7 έχει προσδεθεί με επιτυχία στο στόχο του.



Από τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα δεν μπορεί να βγει κάποιο συμπέρασμα παρά μόνο ότι ίσως να επηρεάζονται και τα ενδοσώματα των μικρογλοιακών κυττάρων κατά την ενεργοποίηση τους από κάποιο παράγοντα.

3.5.2.2 Κυταρικές καλλιέργεις BV-2 σε φλάσκες.Επαγωγή με LPS.

Η καλλιέργεια των κυττάρων γινόταν σε 6 well plates,200.000 περίπου κύττταρα/well, και οι επαγωγές ήταν 24 ώρες.Τα αποτελέσματα αναλύονταν με τη μικροσκοπία της 3^{ης} αρμονικής. Δυστυχώς λόγω τεχνικού προβλήματος δεν ήταν δυνατή η χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας για την παρατήρηση της πράινης FITC χρωστικής.

Αποτελέσματα από την 3^η αρμονική:

Όσον αφορά τα δείγματα control



Και στις δύο εικόνες παρουσιάζονται στο αριστερό τμήμα τους η 3^η αρμονική, στο μεσαίο το αντίσωμα του Rab7 που είναι προσδεδεμένο στα ενδοσώματα και στο τελευταίο κομμάτι ο συνεντοπισμός της 3^{ης} αρμονικής με τα ενδοσώματα.

Μέσα από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών καθώς και από άλλα τα οποία πραγματοποήθηκαν, συμπεραίνουμε ότι και οι δομές των ενδοσωμάτων δίνουν σήμα 3^{ης} αρμονικής, γεγονός που εξηγείται από το μερικό συνεντοπισμό τους.

Όσον αφορά το συνεντοπισμό της 3^{ης} αρμονικής με το σήμα των ενδοσωμάτων στην ενεργοποιημένη μικρογλοία, καθώς επίσης και στο πως μεταβάλλονται τα επίπεδα έκφρασης των ενδοσωμάτων όταν τα κύτταρα ενεργοποιούνται, πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω πειράματα για να έχουμε ασφαλή αποτελέσματα.

Τα μόνα αποτελέσματα συνεντοπισμού που έχω είναι τα ακόλουθα

Eικόνα 79) THG microscopy.Activated BV-2.Rab7 antibody



Euxóvα 80) THG microscopy.Activated BV-2.Rab7 antibody

Στις εικόνες 79 και 80 το αριστερό μέρος απεικονίζει το σήμα της 3^{ης} αρμονικής που παίρνουμε από τα ενεργοποιημένα μικρογλοικά κύτταρα BV-2. Οι κόκκινες τελείες, δείχνουν τα μέρη από τα οποία εκπέμπεται το σήμα της 3^{ης} αρμονικής. Στο μέσο της εικόνας, απεικονίζεται ο ειδικός φθορισμός των κυττάρων και συγκεκριμένα τα ενδοσώματά του, τα οποία απεικονίζονται ως πράσινες κουκίδες. Τέλος, στο τελευταίο τμήμα των φωτογραφιών φαίνεται ο συνεντοπισμός των ενδοσωμάτων με το σήμα της 3^{ης} αρμονικής.

Παρ'όλο που δεν μπορούμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα για το συνεντοπισμό του σήματος της 3^{ης} αρμονικής και της σχέσης του με τα ενδοσωμάτα κατά την ενεργοποίηση της μικρογλοίας,μπορούμε να πούμε ότι από τις εικόνες φαίνεται μερικώς συνεντοπισμός.

Τέλος συγκρίνοντας τα επίπεδα έκφρασης των ενδοσωμάτων στην resting μικρογλοία και στην ενεργοποιημένη, θα μπορούσαμε να πούμε ότι στην ενεργοποιημένη, παρουσιάζεται μεγαλύτερη έκφραση σε σχέση με τη resting.

3.6 Κυτταρικός διαχωρισμός με τη χρήση Cell Sorter για τη μελέτη του CD14 επιφανειακού υποδοχέα του LPS των BV-2 κυττάρων.

Εξαιτίας του γεγονότος ότι μόνο λίγα εώς ελάχιστα BV-2 κύτταρα ενεργοποιούνταν από τον παράγοντα του LPS, μετά από 24 ώρη επαγωγή και δε μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες από τα πειράματά μας με Nile Red και Rab7,πραματοποιήσαμε έρευνα για όσον αφορά τον υποδοχέα του LPS, CD14.

Με τη διαδικασία του εξωτερικού φθορισμού και τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής μελετήσαμε 4 κυτταροκαλλιέργειες BV-2 όσον αφορά το ποσοστό έκφρασης του CD14.

Τα αποτελέσματα φαίνονται από τα ακόλουθα ιστογράμματα









Εικόνα 81)BV-2 Κυτταροαλλιέργειες σύμφωνα με τους υπολογισμούς από το histogram subtraction.A) Το ποσοστό των CD14⁺ κυττάρων μέσα στον πληθυσμό είναι 92,14% B) Το ποσοστό του CD14 μέσα στα κύτταρα είναι μόλις 4,20% Γ) Το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν CD14 είναι 12,95%.Δ) Μόνο το 4,65% των κυττάρων εκφράζει CD14

Επομένως από τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, βλέπουμε ότι παρ'όλο που οι κυτταρικοί πληθυσμοί που προέρχονται από την ίδια κυτταρική σειρά και έχουν αναπτυχθεί και μεγαλώσει στις ίδιες

συνθήκες, παρουσιάζουν ανομοιογένεια όσον αφορά την έκφραση CD14.

Για να συνεχίσουμε τα πειράματα σε ενεργοποιημένη απο LPS μικρογλοία θα έπρεπε να δημιουργήσουμε έναν CD14⁺ ομοιογενή BV-2 πληθυσμό. Αυτό έγινε με το FACs cell sorter και με τη χρησιμοποίηση της φλάσκας που είχε το μεγαλύτερο ποσοστό CD14⁺ κυττάρων.



Από τα αποτελέσματα του FACs cell sorter είδαμε ότι το 63,05% από τα συνολικά κύτταρα εκφράζει τον επιφανειακό υποδοχέα CD14 και

επομένως μπορεί να επαχθεί από LPS.Τα κύτταρα αυτά συλλέχθηκαν και αφέθηκαν να μεγαλώσουν για περαιτέρω ερευνητικά πειράματα.

<u>4.Συζήτηση</u>

Η μελέτη των μικρογλοιακών κυττάρων τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αντικείμενο έρευνας καθώς με την ενεργοποίηση τους τα μικρογλοιακά κύτταρα μπορούν να προωθήσουν τόσο την προστασία των νευρικών κυττάρων όσο και τον νευροεκφυλισμό.

Επιπλέον σε πολλές νευροεκφυλιστικές καταστάσεις, όπως η γήρανση, η νόσος του Parkinson, η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Huntington και της σχιζοφρένιας έχει αποδειχθεί ότι η απορρύθμιση των μηχανισμών ενεργοποίησης της μικρογλοίας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων. Η ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων έχει συνδεθεί με την έκφραση τάξης ΙΙ μορίων του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας. Εκτός όμως από τη σύνδεση της ενεργοποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων με την έκφραση των Τάξης ΙΙ μορίων υπάρχει και μία άλλη σύνδεση. Η σύνδεση αυτή αφορά τη μορφολογία της μικρογλοίας και συγκεκριμένα την αύξηση της κοκκιότητάς που παρουσιάζεται κατά τη μετάβασή της από το ήρεμο στο ενεργοποιημένο στάδιο.

Ωστόσο οι μέχρι πρότινος ερευνητικές μελέτες έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους αποκλειστικά στην μελέτη των επιφανειακών τάξης ΙΙ μορίων. Μέχρι τώρα δεν έχει μελετηθεί το μονοπάτι ωρίμανσης τους και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη μετανάστευσή τους από το ενδοπλασματικό δίκτυο στην κυτταρική μεμβράνη. Επιπλέον δεν έχει πραγματοποιηθεί κάποια έρευνα που να δίνει μια σαφή απάντηση στο ερώτημα τι είδους είναι αυτή η χαρακτηριστική κοκκιότητα.

Η παρούσα εργασία χωρίζεται σε τρία σκέλη:

Το πρώτο σκέλος αφορά τη μελέτη του προφίλ έκφρασης των μεμβρανικών και ενδοκυτταρικών κλασικών MHC II μορίων H2-A μετά από επαγωγή με προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες (IFN-γ, LPS, IL-4) σε διαφορετικά στάδια ενεργοποίησης της μικρογλοίας.

Το δεύτερο σκέλος εστιάζεται στη μελέτη του προφίλ έκφρασης των κλασικων Τάξης ΙΙ μορίων Η2-Α σε μικρογλοία που βρίσκεται σε resting στάδιο.Επίσης μελέτη του προφίλ έκφρασης των κλασικών Τάξης ΙΙ μορίων Η2-Α,των μη κλασικών ενδοκυτταρικών MHC ΙΙ μορίων Η2-Ο,Η2-Μ μετά από ενεργοποίηση της ήρεμης μικρογλοίας με προφλεγμονώδεις παράγοντες.

Τέλος το τρίτο σκέλος αφορά τη μελέτη της κοκκιότητας των ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων με στόχο τον πιθανό προσδιορισμό τους. Γι αυτό και τα πειράματα επικεντρώθηκαν πάνω στη μεταβολή των επιπέδων των λιπιδικών σωματίων και των ενδοσωμάτων της μικρογλοίας κατά την ενεργοποίησή της.

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την έρευνά μας είναι η μικρογλοιακή κυτταρική σειρά BV-2, η οποία προέκυψε μέσω διαμόλυνσης πρωτογενούς καλλιέργειας μικρογλοίας ποντικιού με ρετροϊό, ο οποίος έφερε το ογκογονίδιο v-raf/v-myc.

Η κυτταρική σειρά BV-2 διατηρεί τα περισσότερα φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά πρωτογενούς μικρογλοίας και χρησιμοποιείται σαν μοντέλο για την μελέτη αυτών των κυττάρων.

Αρχικά για το πρώτο σκέλος της έρευνας μελετήθηκε ή έκφραση των κλασικών Τάξης ΙΙ (H2-A) μορίων στα μικρογλοιακά κύτταρα BV-2 τα οποία είχαν επαχθεί για 24 και 48 ώρες είτε με LPS (500ng/mL), είτε με IFN-γ(12,5 U/mL), είτε με IL-4 (80 U/mL).

Οι διαδικασίες που έγιναν για την ανίχνευση των μορίων ήταν οι ίδιες με του εσωτερικού (H2-A ενδοκυτταρικό) και του εξωτερικού (H2-A μεμβρανικό) ανοσοφθορισμού. Η ανάλυση έγινε με την κυτταρομετρία ροής. Συγκεκριμένα, όσον αφορά την επαγωγή με LPS παρατηρούμε ότι μετά από 24 ώρες επαγωγής τόσο το H2-A μεμβρανικό όσο και το ενδοκυτταρικό, αυξάνονται αισθητά της τάξεως του 16,40% και 11,40% αντίστοιχα. Βέβαια μετά από 48 ώρες επαγωγής με LPS τα επίπεδα έκφρασης των κλασικών Τάξης ΙΙ μορίων πέφτουν κατά 23,03% για το ενδοκυτταρικό και 37,80% για το μεμβρανικό. Η μείωση αυτή συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα στα οποία αναφέρεται ότι το LPS επάγει την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων. Ωστόσο όμως δεν επάγει την έκφραση των μεμβρανικών τάξης ΙΙ μορίων η οποία απαιτεί την έκφραση της σταθερής αλυσίδας Ιi και του μεταγραφικού παράγοντα CIITA, Butovsky et al., 2005.

Όσον αφορά την επίδραση της . αντι-φλεγμονώδους κυτοκίνης IL-4 στο προφίλ έκφρασης των κλασικών Τάξης ΙΙ Η2-Α μορίων μπορούμε να πούμε τα εξής:

Παρατηρούμε μια σταδιακή αύξηση των επιπέδων της πρωτεϊνικής έκφρασης καθώς περνάνε οι ώρες επαγωγής. Με αποτέλεσμα να έχουμε μετά από 48 ώρες επαγωγής μια αύξηση της έκφρασης του ενδοκυτταρικού H2-A κατά 26,93% (*p*<0.005) επί της αρχικής και του μεμβρανικού κατά 18,68% (*p*<0.001).Το γεγονός αυτό αντιβαίνει στη μέχρι πρότινος βιβλιογραφία Suzumura et al., 1994, στην οποία αναφέρεται ότι η IL-4 ενεργοποιεί τα μικρογλοιακά κύτταρα, ενώ παράλληλα καταστέλλει την έκφραση των μεμβρανικών τάξης II μορίων γεγονός που δε συνάδει με τα αποτελέσματά μου.

Τέλος, όσον αφορά το πρώτο σκέλος της έρευνας, μέσα από τις επαγωγές των BV-2 κυττάρων με IFN-γ παρατηρούμε την αύξηση της έκφρασης των κλασικών Τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας. Συγκεκριμένα παρατηρείται μια τεράστια αύξηση του ενδοκυτταρικού H2-Α μέσα σε 24 ώρες επαγωγής (αύξηση κατά 21,34% (*p*<0.005)) αλλά και του μεμβρανικού (αύξηση κατά 28,53% (*p*<0.001).), ενώ μετά την κορυφή της έκφρασης των 24 ωρών παρατηρείται μία πτώση στην πρωτεϊνική έκφραση των Τάξης II, η οποία όμως δεν πέφτει κάτω από τα επίπεδα της έκφρασης των control κυττάρων.

<u>Ως γενικό συμπέρασμα από αυτά τα πειράματα θα μπορούσαμε να</u> <u>πούμε ότι η γ-ιντερφερόνη προκαλεί τη σημαντικότερη αύξηση της</u> <u>πρωτεϊνικής έκφρασης των κλασικών τάξης ΙΙ αντιγόνων</u> Ιστοσυμβατότητας.

Το δεύτερο σκέλος πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με σκοπό να αποκτήσουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την έκφραση και τη ρύθμιση των κλασικών και μη κλασικών Τάξης ΙΙ αντιγόνων ιστοσυμβατότητας στη μικρογλοία.

Πρέπει να επισημανθεί ότι μέσα στον ενήλικο και υγιή εγκέφαλο η μικρογλοία απαντάται στη resting κατάστασή της. Όμως τα μέχρι

πρότινος πειραματικά αποτελέσματα για την έκφραση των κλασικών και μη Τάξης ΙΙ μορίων προέρχονται από πειράματα κινητικής πάνω σε μη ήρεμη μικρογλοία. Επομένως ήταν επακόλουθο να μελετήσουμε τη συμβαίνει στη resting κατάσταση των κυττάρων και τι γίνεται όταν από αυτή μεταπίπτουν στην κατάσταση της ενεργοποίησης. Για τη μελέτη χρησιμοποιήσαμε την ίδια κυτταρική σειρά, την BV-2.

Συγκεκριμένα, σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήσαμε πειράματα κινητικής στα BV-2 για τη μέτρηση της έκφρασης των πρωτεϊνικών επιπέδων των κλασικών Τάξης II H2-A μορίων. Τα πειράματα καλύπτουν ένα μεγάλο χρονικό διάστημα από την ημέρα 0 (ημέρα ξεπαγώματος της καλλιέργειας) έως και την 37η ημέρα, ενώ επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα άρχισαν να βρίσκονται σε πλήρη ηρεμία μετά τη 13η ημέρα καλλιέργειας και ανάπτυξής τους.

Τα αποτελέσματά όπως προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής έδειξαν ότι όσο περνάνε οι μέρες καλλιέργειας και όσο μεγαλώνει το ποσοστό των κυττάρων τα οποία αποκτούν τη ramify τους δομή και συνεπώς βρίσκονται σε resting κατάσταση τόσο τα επίπεδα έκφρασης των κλασικών Τάξης ΙΙ μορίων πέφτουν. Συγκεκριμένα ο κυτταρικός πληθυσμός των BV-2 κυττάρων όταν ξεπάγωσε δε βρισκόταν σε ηρεμία. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι την πέμπτη ημέρα ξεπαγώματος και καλλιέργειας τα ποσοστά έκφρασης του μεμβρανικού αλλά και του ενδοκυτταρικού H2-A είναι υψηλά (95,19% ενδοκυτταρικό, 79,27%), ενώ την τελευταία μέρα μετρήσεων, όπου όλα τα κύτταρα βρίσκονται σε ηρεμία, έχουμε μικρότερου επιπέδου έκφραση των πρωτεϊνικών μορίων (25,89% ενδοκυτταρικά και 48,57% μεμβρανικά).

Και ενώ θα περίμενε κάποιος αυτή η μείωση των κλασικών Τάξης ΙΙ να συνεπάγεται με αύξηση των εκκρίσεών τους στο υπερκείμενο της καλλιέργειας, κάτι τέτοιο δεν υφίσταται καθώς παρατηρείται και ταυτόχρονη μείωση των διαλυτών Τάξης ΙΙ μορίων, σύμφωνα με την ELISA. Εξαίρεση στην όλη πτωτική τάση των διαλυτών MHC ΙΙ μορίων αποτελεί το γεγονός ότι την 27η μέρα, μετά το ξεπάγωμα έχουμε αύξηση των εκκρίσεων. Ίσως οφείλεται σε λάθος πειραματικό χειρισμό. Όμως, αν εξαιρέσουμε το αποτέλεσμα αυτο μπορούμε να πούμε, ότι η παραγωγή των Τάξης ΙΙ μορίων αρχίζει και πέφτει με το πέρασμα των ημερών και καθώς τα κύτταρα μεταβαίνουν στη resting κατάσταση.

Όσον αφορά τις 24 ώρες και 48 ώρες επαγωγές της μη ενεργοποιημένης μικρογλοίας με ιτνερφερόνη-γ και LPS μπορούμε να πούμε τα εξής.

Για την επαγωγή με ιντερφερόνη-γ δεν μπορούμε να καταλήξουμε σε ένα γενικό συμπέρασμα διότι μας λείπει η επαναληψημότητα των πειραμάτων. Όμως, μπορούμε να πούμε ότι φαίνεται να επάγει την έκφραση του μεμβρανικού H2-A μορίου και να την αυξάνει πάρα πολύ διαταράσσοντας την ηρεμία του κυττάρου.

Από την άλλη το LPS φαίνεται ότι επάγει και αυξάνει την έκφραση των κλασικών H2-A Τάξης ΙΙ μορίων και του μη κλασικού H2-M,όπως φαίνεται από τον πίνακα της εικόνας 55, ενώ μειώνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του H2-O.

Όμως, οι αυξήσεις του μεμβρανικού μορίου H2-A, δε συνάδουν με την μέχρι τώρα βιβλιογραφία μας Butovsky et al., 2005 .Όσον αφορά τα αποτελέσματα από την ELISA για την έκκριση των διαλυτών τάξης II μορίων του MHC, φαίνεται ότι στο διάστημα των 24 ωρών και 48 ωρών επαγωγής, έχουμε μία μικρή αύξηση της έκκρισής τους της τάξεως του 23%. Σε αντίθεση η αύξηση της έκκρισης του TNF-α μέσα στο διάστημα των 24-48 ωρών είναι μεγάλη, αύξηση 64,28%.

Έχει άλλωστε αποδειχθεί σε μελέτες, ότι,η ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων σχετίζεται με την παραγωγή TNF-α, η οποία οδηγεί σε νευροτοξικότητα και απώλεια νευρικών κυττάρων Butovsky et al., 2005.

Στο τρίτο σκέλος των ερευνών μας, προσπαθήσαμε να μελετήσουμε τη χαρακτηριστική κοκκιότητα των κυττάρων της μικρογλοίας, που αποκτούν όταν ενεργοποιούνται, να ανακαλύψουμε τι είδους είναι και να δώσουμε απαντήσεις σε πολλά βιολογικά ερωτήματα.

Η κυτταρική σειρά που έγιναν τα πειράματα ήταν η BV-2. Με στόχο να παρατηρήσουμε την κοκκιότητα της μικρογλοίας και να τη μελετήσουμε,τα BV-2 αρχικά αφήνονταν να έρθουν σε πλήρη ηρεμία και μετά επάγονταν για 24 ώρες με LPS (500ng/mL) σε serum free συνθήκες. Τα κύτταρα είτε μεγάλωναν σε φλάσκες είτε πάνω στα cover slips.

Μετά από την επαγωγή κάναμε εσωτερικό φθορισμό των ενδοσωμάτων με τη Rab7 και των λιπιδικών σωμάτων με Nile red.Τη χρώση των

κυττάρων τη βλέπαμε είτε με την 3η αρμονική,με μικροσκοπία φθορισμού, είτε με συνεστιακή μικροσκοπία.

Καταλήξαμε, μέσα από τα πειράματά μας και την έρευνα με την 3^η αρμονική ότι:

Όταν ένα μικρογλοιακό κύτταρο ενεργοποιείται, από LPS στην περίπτωσή μας, αυξάνει έως και 4 φορές το σήμα της τρίτης αρμονικής σε σχέση με τα control μη ενεργοποιημένα κύτταρα. Το σήμα της τρίτης αρμονικής σύμφωνα με τη βιβλιογραφία προέρχεται από λιπίδια-λιπιδικά σωμάτια και τα μιτοχόνδρια.

Εξαιτίας του γεγονότος ότι ορισμένες φορές στη συνεστιακή μικροσκοπία παρατηρούσαμε αύξηση των λιπιδικών σωμάτων από ενεργοποιημένα BV-2 κύτταρα, προσπαθήσαμε να συνεντοπίσουμε τη Nile red χρωστική με το σήμα της τρίτης αρμονικής και να αποδείξουμε ότι η κοκκιότητα οφείλεται εξ ολοκλήρου στην αύξηση των λιπιδικών σωμάτων.

Το αποτέλεσμα ήταν ικανοποιητικό μόνο στα control δείγματα, στα οποία αποδείχθηκε μερικώς συνεντοπισμός του σήματος της τρίτης αρμονικής με το σήμα του φθορισμού της Nile Red.

Δυστυχώς, εξαιτίας της μη επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων για το συνεντοπισμό της 3^{ης} αρμονικής με το σήμα της Nile Red στα ενεργοποιημένα με LPS BV-2 κύτταρα, οι έρευνες ακόμα συνεχίζονται. Ίσως να είχαμε θετικά αποτελέσματα αν ανακαλύπταμε πιο γρήγορα ότι μόνο ένα πολύ μικρο ποσοστό των BV-2 κυττάρων μας είναι θετικά για τον CD14 υποδοχέα του LPS.

Επίσης, εξαιτίας του γεγονότος ότι σε ένα πείραμα επαγωγής με λιποπολυσακχαρίτη είχαμε αύξηση των ενδοσωμάτων προσπαθήσαμε να ερευνήσουμε το θέμα περαιτέρω.

Τα αποτελέσματα της τρίτης αρμονικής έδειξαν με σαφήνεια και επαναληψιμότητα τα ακόλουθα:

Όντως υπάρχει μερικώς συνεντοπισμός, στα ήρεμα-control BV-2 κύτταρα, στο σήμα της τρίτης αρμονικής με το σήμα της πράσινης χρωστικής του FITC του αντισώματος Rab7 (ειδικό για τα πρώιμα ενδοσώματα) και κατ'επέκταση με τα ενδοσώματα.

Δυστυχώς για τα activated με LPS μικρογλοιακά κύτταρα, δεν μπορούμε να έχουμε σαφή αποτελέσματα ακόμα , λόγω μικρής επαναληψιμότητας, παρόλο που φαίνεται πάλι να υπάρχει μερικώς συνεντοπισμός.

Τα αποτελέσματα ήταν θετικά διότι ανακαλύφθηκε και ένα άλλο σωματίδιο από το οποίο αντλεί σήμα η 3^η αρμονική σε σχέση με τα ήδη γνωστά :**Τα ενδοσώματα**.

Επίσης τα αποτελέσματα ότι η κοκκιότητα παρουσιάζεται να προέρχεται μερικώς από τα ενδοσώματα και μερικώς από τα λιπιδικά σωμάτια, θα βοηθήσει περισσότερο στην κατανόηση της λειτουργίας της μικρογλοίας και την ρύθμιση της έκφρασης των τάξης ΙΙ αντιγόνων ιστοσυμβατότητας έτσι ώστε να αντιμετωπιστούν ασθένειες που ταλαιπωρούν τόσα χρόνια την ανθρωπότητα.

5 Βιβλιογραφία

- 1. Abul K.Abbas, Anderw H. Lichtman and Shiv Pillai.2007.Cellular and Molecular Immunology 6th edition. Saunders Elsevier, Philadelphia
- 2. Aloisi, F., (2001). Immune function of microglia. Glia 36(2):165-179
- Arnett, H.A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G.K., Ting, J.P., (2001). TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. Nat Neurosci 4(11):1116-1122
- Athanassakis, I., Aifantis, I., Makrygiannakis, A., Koumantakis, E., Vassiliadis, S., (1995). Placental tissue from human miscarriages expresses class II HLA-DR antigens. Am J Reprod Immunol 34(5):281-287
- 5. Bakke, O., and Dobberstein, B., (1990). MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. Cell 63(4):707-716
- Barad, Y., Eisenberg, H., Horowitz, M., Silberberg, Y., 1997. Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation. Appl. Phys. Lett. 70, 922–924.

- Barnum, S.R., (1999). Inhibition of complement as a therapeutic approach in inflammatory central nervous system (CNS) disease. Mol Med 5(9):569-582
- Bate C, Boshuizen R, Williams A. Microglial cells kill priondamaged neurons in vitro by a CD14-dependent process. J Neuroimmunol 170: 62–70, 2005.
- 9. Benveniste, E.N., (1998). Cytokine actions in the central nervous system. Cytokine Growth Factor Rev 9(3-4):259-275
- Beschorner R, Nguyen TD, Gozalan F, Pedal I, Mattern R,Schluesener HJ, Meyermann R, Schwab JM. CD14 expression by activated parenchymal microglia/macrophages and infiltrating monocytes following human traumatic brain injury. Acta Neuropathol 103: 541–549, 2002.
- 11. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity uncovering the molecular mechanisms. Nat Rev Neurosci 8: 57–69, 2007.
- Bozza, PT; Viola, JP (2010 Apr-Jun). "Lipid droplets in inflammation, cancer". Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 82 (4-6): 243–50. PMID 20206487.
- Brasaemle, D. L. (25 August 2007). "Thematic review series: Adipocyte Biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis". The Journal of Lipid Research 48 (12): 2547–2559. doi:10.1194/jlr.R700014-JLR200
- Brockhaus J, Ilschner S, Banati RB, Kettenmann H. Membrane properties of ameboid microglial cells in the corpus callosumslice from early postnatal mice. J Neurosci 13: 54412– 4421,1993.87. Brockhaus J, Moller T, Kettenmann
- Busch R., Mellins ED., (1996). Developing and shedding inhibitors: how MHC class II molecules reach maturity. Current Opin Immunol 8(1):51-58

- Butovsky, O., Talpalar, A.E., Ben-Yaakov, K., Schwartz, M., (2005). Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. Mol Cell Neurosci 29(3):381-393
- Campagnola, P.J., Loew, L.M., 2003. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. Nat. Biotechnol. 21, 1356–1360
- Carson, M.J., (2002). Microglia as liaisons between the immune and central nervous systems: functional implications on multiple sclerosis. Glia 40(2):218-231
- Carson MJ, Bilousova TV, Puntambekar SS, Melchior B,Doose JM, Ethell IM. A rose by any other name? The potential consequences of microglial heterogeneity during CNS health and disease. Neurotherapeutics 4: 571–579, 2007.
- 20. Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. Brain Res Rev 53: 344–354, 2007.
- Chao, C.C., Molitor, T.W., Hu, S., (1993). Neuroprotective role of IL-4 against activated microglia. J Immunol 151(3):1473-1481
- 22. Charles A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport and Mark J. Schlomchik.2001.Immunobiology: the immune system in health and disease. Garland Publishing, New York
- Chen, X., Laur, O., Kambayashi, T., Li, S., Bray, R.A., Weber, D.A., Karlsson, L., Jensen, P.E., (2002). Regulated expression of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO during antigen-dependent and antigen-independent phases of B cell development. J Exp Med 195(8):1053-1062
- 24. Chervonsky, A.V., Gordon, L., and Sant, A.J., (1994). A segment of the MHC class II beta chain plays a critical role in targeting class II molecules to the endocytic pathway. Int immunol 6(7):973-982

- 25. Colton CA, Wilcock DM. Assessing activation states in microglia.CNS Neurol Disord Drug Targets 9: 174–191, 2010
- 26. Cresswell, P., (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. Annu Rev Immunol 12:259-293
- 27. Cresswell, P., (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. Annu Rev Immunol 12:259-293
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., Gan, W.B., (2005). ATP mediates rapid microglial responses to local injury in vivo. Nat Neurosci. 8(6):752-758
- 29. Davoust N, Vuaillat C, Androdias G, Nataf S. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. Trends Immunol 29:227–234, 2008.
- Debarre, D., Beaurepaire, E., 2007. Quantitative characterization of biological liquids for third harmonic generation microscopy. Biophys. J. 92, 603–612
- Debarre, D., Supatto, W., Pena, A.M., Fabre, A., Tordjmann, T., et al., 2006. Imaging lipid bodies in cells and tissues using thirdharmonic generation microscopy.Nat. Methods 3, 47–53.
- 32. Del Rio-Hortega P. El tercer elemento de los centros nerviososI La microglia en estado normal II Intervencíon de la microglia enlos procesos patológicos III Naturaleza probable de la microglia.Bol de la Soc esp de biol 9: 69–120, 1919. 9
- Del Rio-Hortega P. Microglia. In: Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System, edited by Penfield W. New York:Hoeber, 1932, p. 482–1924–534. 2
- Denzin, L.K., Fallas, J.L., Prendes, M., Yi, W., (2005). Right place,right time, right peptide: DO keeps DM focused. Immunol Rev 207:279-292
- 35. Denzin, L.K., Hammond, C., and Cresswell, P., (1996). HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a

role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. J Exp Med 184(6):2153-2165

- 36. Filippidis, G., Gualda, E.J., Mari, M., Troulinaki, K., Fotakis, C., et al., 2009. In vivo imaging of cell morphology and cellular processes in Caenorhabditis elegans, using non-linear phenomena. Micron 40, 876–880.
- 37. Frei, K., Lins, H., Schwerdel, C., Fontana, A., (1994). Antigen presentation in the central nervous system. The inhibitory effect of IL-10 on MHC class II expression and cytokine production depends on the inducing signals and the type of cell analyzed. J Immunol 152(6):2720–2728
- 38. Gasque, P., Tenner, A.J., Morgan, B.P., (1998). Expression of the C1q/MBL/SPA receptor involved in phagocytosis and innate immune defense on human glia. Mol Immunol 335:379
- 39. Geraghty, D.E., (1993). Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. Curr Opin Immunol 5(1):3-7
- 40. Gobin, S.J., and van den Elsen, P.J., (2000). Transcriptional regulation of the MHC class lb genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G. Hum Immunol 61(11):1102-1107
- 41. Goodman, JM (2008 Oct 17). "The gregarious lipid droplet.". The Journal of biological chemistry 283 (42): 28005–9. PMID 18611863.
- 42. Graeber MB, Streit WJ. Microglia: biology and pathology. Acta Neuropathol 119: 89–105, 2010.
- Greenberg, Andrew S.; Coleman, Rosalind A.; Kraemer, Fredric B.; McManaman, James L.; Obin, Martin S.; Puri, Vishwajeet; Yan, Qing-Wu; Miyoshi, Hideaki; Mashek, Douglas G. (1 June 2011). "The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans". Journal of Clinical Investigation 121 (6): 2102–2110. doi:10.1172/JCI46069
- 44. Haas S, Brockhaus J, Verkhratsky A, Kettenmann H. ATPinducedmembrane currents in ameboid microglia acutely

isolated from mouse brain slices. Neuroscience 75: 257–261, 1996.

- 45. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci 10: 1387–1394, 2007.
- 46. Heinrichs, H., and Orr, H.T., (1990). HLA non ABC class I genes: their structure and expression. Immunol Res 9(4):265-274
- Hiremath, 47. M.M., Chen, V.S., Suzuki, K., Ting, J.P., G.K.. MHC Ш Matsushima. (2008). class exacerbates demyelination in vivo independently of T cells. J Neuroimmunol, 203(1):23-32
- Hsieh, C.S., Chen, S.U., Lee, Y.W., Yang, Y.S., Sun, C.K., 2008. Higher harmonic generation microscopy of in vitro cultured mammal oocytes and embryos. Opt.Express 16, 11574–11588. 114
- 49. Jan Klein and Akie Sato. 2000. The HLA system: First of Two Parts. The New England Journal of Medicine 343:702-709
- 50. Jones, P.P., Murphy, D.B., Hewgill, D., and McDevitt, H.O. (1979). Detection of a common polypeptide chain in I--A and I--E sub-region immunoprecipitates. Mol immunol 16(1):51-60
- 51. Katz, J.F., Stebbins, C., Appella, E., and Sant, A.J., (1996). Invariant chain and DM edit self-peptide presentation by major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. J Exp Med 184(5):1747-1753
- 52. Kelly, A.P., Monaco, J.J., Cho, S., and Trowsdale, J., (1991). A new human HLA Class II-related locus, DM. Nature 353(6344):571-573
- 53. Kim S.U., and De Vellis, J., (2005). Microglia in health and disease. J Neurosci Res 81(3):302-313
- 54. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19: 312–318, 1996.

- 55. Kreutzberg, G.W., (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19(8):312-318
- 56. Kreutzberg, G.W., (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19(8):312-318
- 57. Kropshofer, H., Hammerling, G.J., and Vogt, A.B., (1997). How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: survival of the fittest? Immunol Today 18(2):77-82
- Kropshofer, H., Hammerling, G.J., and Vogt, A.B., (1997). How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: survival of the fittest? Immunol Today 18(2):77-82
- 59. Kropshofer, H., Vogt, A.B., Moldenhauer, G., Hammer, J., Blum, J.S., and Hammerling, G.J., (1996). Editing of the HLA-DRpeptide repertoire by HLA-DM. EMBO J 15(22):6144-6154
- 60. Kropshofer, H., Vogt, A.B., Moldenhauer, G., Hammer, J., Blum, J.S., and Hammerling, G.J., (1996). Editing of the HLA-DRpeptide repertoire by HLA-DM. EMBO J 15(22):6144-6154
- 61. Kuby.2007 Ανοσολογία.Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδη, Αθήνα
- Laurenzi, M.A., Arcuri, C., Rossi, R., Marconi, P., Bocchini, V., (2001). Effects of microenvironment on morphology and function of the microglial cell line BV-2. Neurochem Res 26(11)1209-1216
- Lawson L J, Perry V H, Gordon S (1992). "Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain". Neuroscience 48: 405–415.
- Ledeboer, A., Brevé, J.J., Wierinckx, A., van der Jagt, S., Bristow, A.F., Leysen, J.E., Tilders, F.J., Van Dam, A.M., (2002). Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. Eur J Neurosci 16(7):1175-1185
- 65. Lee, S.C, Liu, W., Roth, P., Dickson, D.W., Berman, J.W., Brosnan, C.F., (1993a). Cytokine production by human fetal

microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. J Immunol 150(7):2659-2667

- 66. Liljedahl, M., Kuwana, T., Fung-Leung, W.P., Jakson, M.R., Peterson, P.A., and Karlsson, L., (1996). HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. EMBO J 15(18):4817-4824
- Liu, L., Li, Y., Van Eldik, L.J., Griffin, W.S., Barger, S.W., (2005a). S100B induced microglial and neuronal IL-1 expression is mediated by cell type-specific transcription factors. J Neurochem 92(3):546-553
- 68. Lodge, P. A., and Sriram, S., (1996). Regulation of microglial activation by TGB-beta, IL-10, and CSF-1. J Leukoc Biol 60(4):502-508
- 69. Luo, X. Jian-Qing Ding, J., and Chen, S., (2010). Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. Mol Neurodegener 5:12
- 70. Machamer, C.E., and Cresswell, P., (1982). Biosynthesis and glycosylation of the invariant chain associated with HLA-DR antigens. J Immunol 129(6):2564-2569
- Martin, S; Parton, RG (2005 Apr). "Caveolin, cholesterol, and lipid bodies.". Seminars in cell & developmental biology 16 (2): 163–74. PMID 15797827. 107
- 72. Martin, Sally; Parton, Robert G. (8 March 2006). "Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle". Nature Reviews Molecular Cell Biology 7 (5): 373–378. doi:10.1038/nrm1912 103
- 73. McGeer, P.L., and McGeer, E.G., (2008). Glial Reactions in Parkinson's Disease. Mov Disord 23(4):474-483 59
- Melo, R. C. N.; D'Avila, H.; Wan, H.-C.; Bozza, P. T.; Dvorak, A. M.; Weller, P. F. (23 March 2011). "Lipid Bodies in Inflammatory Cells: Structure, Function, and Current Imaging Techniques". Journal of Histochemistry & Cytochemistry 59 (5): 540–556. doi:10.1369/0022155411404073. 110

- Melo, Rossana C. N.; Dvorak, Ann M.; Chitnis, Chetan E. (5 July 2012). "Lipid Body–Phagosome Interaction in Macrophages during Infectious Diseases: Host Defense or Pathogen Survival Strategy?". PLoS Pathogens 8 (7): e1002729. doi:10.1371/journal.ppat.1002729. 105
- Monji, A., Kato T., Kanba, S., (2009). Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. Psychiatry Clin Neurosci 63(3):257-265 58
- 77. Morris, P., Shaman, J., Attaya, M., Amaya, M., Goodman, S., Bergman, C., (1994). An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. Nature 368(6471):551-554 86
- 78. Nagai, A., Nakagawa, E., Hatori, K., Choi, H. B., McLarnon, J. G., Lee, M. A., and Kim, S. U., (2001). Generation and characterization of immortalized human microglial cell lines: expression of cytokines and chemokines. Neurobiol Dis 8(6):1057-1068 45
- 79. Nelson PT, Soma LA, Lavi E. Microglia in diseases of the central nervous system. Ann Med 34: 491–500, 2002 19
- 80. Neumann, H., (2001). Control of glial immune function by neurons. Glia 36(2):191-199 54
- Neumann, H., Misgeld, T., Matsumuro, K., Wekerle, H., (1998). Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. Proc Natl Acad Sci USA 95(10): 5779- 5784 55
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F., (2005). Resting Microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science 308(5726):1314-1318 15
- P.J. Bjorkman, M.A. Saper, B. Samraoui, W.S Bennett, J.L. Strominger and D.C Wiley. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature 329: 506-512 70

- Peress, N.S., Fleit, B.H., Perillo, E., Kuljis, R., Pezzullo, C., (1993). Identification of FcgRI, II and III on normal human brain ramified microglia and on microglia in senile plaques in Alzheimer's disease. J Neuroimmunol 48(1):71-80 32
- Peters, P.J., Neefjes, J.J., Oorschot, V., Ploegh, H.L., and Geuze, H.J., (1991). Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. Nature 349(6311):669-676 81
- Prinz M, Kann O, Draheim HJ, Schumann RR, Kettenmann H, Weber JR, Hanisch UK. Microglial activation by components of gram-positive and -negative bacteria: distinct and common routes to the induction of ion channels and cytokines. J Neuropathol Exp Neurol 58: 1078–1089, 1999 36
- 87. Pulliam, L., D. Moore, and D. C. West, (1995). Human cytomegalovirus induces IL-6 and TNF alpha from macrophages and microglial cells: possible role in neurotoxicity. J Neurovirol 1(2):219-227 46
- Qiu, Y., Xu, X., Wandinger-Ness, A., Dalke, D.P., and Pierce, S.K., (1994). Separation of subcellular compartments containing distinct functional forms of MHC class II. J Cell Biol 125(3):595-605 82
- 89. Ranella, A., Vassiliadis, S., Mastora, C., Valentina, M., Dionyssopoulou, E., and Athanassakis, I., (2005). Constitutive intracellular expression of human leukocyte antigen (HLA)-DO and HLA-DR but not HLA-DM in trophoblast cells. Hum Immunol 66(1):43-55 101
- Rasley, A., Marriott, I., Halberstadt, C.R., Bost, K.L., Anguita, J., (2004). Substance P augments Borrelia burgdorferi-induced prostaglandin E2 production by murine microglia. J Immunol 172(9):5707-5713 47
- 91. Rezaie P, Trillo-Pazos G, Greenwood J, Everall IP, Male DK.Motility and ramification of human fetal microglia in culture: an investigation using time-lapse video microscopy and image analysis.Exp Cell Res 274: 68–82, 2002 18

- 92. Richard Coico, Geoffrey Sunshine and Eli Benjamin.2003.Immunology: a short course 5th edition. John Wiley & Sons, New Jersey. 68
- Ritter MR, Banin E, Moreno SK, Aguilar E, Dorrel MI, Friedlander M, (2006). "Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy". Journal of Clinical Investigation 116 (12): 3266–3276. doi:10.1172/JCI29683. PMC 1636693. PMID 17111048. 7
- 94. Roche, P.A., Marks, M.S., and Cresswell, P., (1991). Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. Nature 354(6352):392-394 76
- 95. Sardis M., Miltiadou P., Bakela K., Athanassakis I., (2010). Serum-derived MHC class II molecules: Potent regulators of the cellular and humoral immune response. Immunobiology 215(3):194-205 102
- Stalder, A. K., Pagenstecher, A., Yu, N. C., Kincaid, C., Chiang, C.S., Hobbs, M. V., Bloom, F. E., and Campbell, I. L., (1997). Lipopolysaccharide-induced IL-12 expression in the central nervous system and cultured astrocytes and microglia. J Immunol 159(3):1344-1351 48
- 97. Streit WJ, Conde JR, Fendrick SE, Flanary BE, Mariani CL. Role of microglia in the central nervous system's immune response. Neurol Res 27: 685–691, 2005 28
- 98. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. Prog Neurobiol 57: 563–581, 1999. 20,14
- 99. Streit WJ, Xue QS. Life and death of microglia. J Neuroimmune Pharmacol 4: 371–379, 2009. 21
- 100. Suk, K., Yeou Kim, S., Kim, H., (2001). Regulation of IL-18 production by IFN gamma and PGE2 in mouse microglial cells: involvement of NF-kB pathway in the regulatory processes. Immunol Lett 77(2):79-85 49

- Tulp, A., Verwoerd, D., Dobberstein, B., Ploegh, H.L., and Pieters, J., (1994). Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. Nature 369(6476):120-126 83
- 102. Ulvestad, E., Williams, K., Vedeler, C., Antel, J., Nyland, H., Mork, S., Matre, R., (1994). Reactive microglia in multiple sclerosis lesions have an increased expression of receptors for the Fc part of IgG. J Neurol Sci 121(2):125-131 33
- 103. Unanue, E.R., (1984). Antigen-presenting function of the macrophage. Annu Rev Immunol 2:395-428 73
- 104. Van Ham, S.M., Gruneberg, U., Malcherek, G., Broker, I., Melms, A., and Trowsdale, J., (1996). Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM edits peptides presented by HLA-DR according to their ligand binding motifs. J Exp Med 184(5):2019-2024 97
- 105. van Ham, S.M., van Lith, M., Lillemeier, B.F., Tjin, E.P., Gruneberg, U., Rahman, D., (2000). Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. J Exp Med 191(7):1127-1136 93
- 106. Van Rossum D, Hanisch UK. Microglia. Metab Brain Dis 19:393–411, 2004. 29
- 107. Walker, D.G., and Lue, L.F., (2005). Investigations with cultured human microglia on pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. J Neurosci Res 81(3):412-425 57
- Watanabe, T., Thayil, A., Jesacher, A., Grieve, K., Debarre, D., et al., 2010.Characterisation of the dynamic behaviour of lipid droplets in the early mouse embryo using adaptive harmonic generation microscopy. BMC Cell Biol.11, 38–49. 115
- 109. Weber, D.A., Evavold, B.D., and Jensen, P.E., (1996). Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. Science 274(5287):618-620 89

- 110. Weber, D.A., Evavold, B.D., and Jensen, P.E., (1996). Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. Science 274(5287):618-620 98
- 111. West, M.A., Lucocq, J.M., and Watts, C., (1994). Antigen processing and class II MHC peptide-loading compartments in human B-lymphoblastoid cells. Nature 369(6476):147-151 84
- Williams, K., Dooley, N., Ulvestad, E., Becher, B. and Antel, J. P., (1996). IL-10 production by adult human derived microglial cells. Neurochem Int 29(1):55-64 52
- 113. Wood, Paul (2003). Neuroinflammation: Mechanisms and Management. Humana Press 56
- 114. Zhang GX, Li J, Ventura E, Rostami A. Parenchymal microglia of naive adult C57BL/6J mice express high levels of B7.1, B7.2, and MHC class II. Exp Mol Pathol 73: 35–45, 2002.13
- Zipfel, W.R., Williams, R.M., Webb, W.W., 2003. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. Nat. Biotechnol. 21, 1369–1377. 118
- Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R., Bistoni, F., (1990). Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. J Neuroimmunol 27(2-3):229-237