

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ  
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα:  
**Πρωτεϊνική Βιοτεχνολογία**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ Fc ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ Γ  
(IgG) ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ  
ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΚΑΙ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΩΝ*

**ΔΡΟΥΓΚΑΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ (Α.Μ 644)**

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: **ΑΘΑΝΑΣΑΚΗ ΕΙΡΗΝΗ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2014

## Ευχαριστίες

---

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής έγινε στο εργαστήριο ανοσοβιολογίας υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας κ. Αθανασάκη. Αρχικά λοιπόν, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Αθανασάκη που μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ υπό την καθοδήγησή της. Η συνεργασία μας, κατά το τριμηνιαίο rotation αλλά και τον 1 χρόνο της διατριβής, υπήρξε παραπάνω από άψογη. Η καθοδήγησή της καθώς και οι συμβουλές της υπήρξαν οδηγός για την εκπόνηση της διατριβής αυτής με επιτυχία. Όλες μας οι συζητήσεις επί επιστημονικού αλλά και γενικότερου ενδιαφέροντος ήταν πάντα εποικοδομητικές και αισθάνομαι πως φεύγοντας είμαι πλέον πολύ καλύτερος ερευνητής αλλά και καλύτερος άνθρωπος.

Θα ήθελα επιπρόσθετα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, τον καθηγητή κ. Χαλεπάκη αλλά και τον καθηγητή κ. Πετράτο για την συμμετοχή τους. Τον κ. Πετράτο θέλω να τον ευχαριστήσω περαιτέρω και για την καθοδήγηση του κατά την διάρκεια του δεύτερου τριμηνιαίου rotation που έγινε στο εργαστήριο κρυσταλλογραφίας II. Στα πλαίσια αυτά δεν θα αμελήσω την σημαντική βοήθεια που πήρα από την κ. Γκέσμαν καθώς και την κ. Παπαδοβασιλάκη.

Σημαντικότερη συνεισφορά, είτε εργαστηριακά, είτε βοηθώντας στην εξαιρετική ατμόσφαιρα μέσα στο εργαστήριο έχουν όλα τα μέλη σε αυτό. Η υπεύθυνος διδακτορικός για την διατριβή μου, Μπακέλα Κατερίνα η οποία ήταν αυτή που ανέλαβε την εκπαίδευσή μου από την πρώτη μέρα στο εργαστήριο. Ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για όλη την συμβολή τους, την Βαρδάκη Κατερίνα, την Ζέρβα Ιωάννα, την Κυβελίδου Χριστιάνα, την Παπαδογιάννη Γεωργία, καθώς και όλα τα νεότερα μέλη, την Στρατήγη Κατερίνα, την Μπούνταλη Κατερίνα, Τσαγδή Σοφία, Κατσώνη Ελένη και Γιαννάκη Αλεξάνδρα. Η ανταλλαγή απόψεων και η μετάδοση γνώσεων υπήρξε σημαντικό εφόδιο για εμένα.

Επί προσωπικού θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου που με βοήθησαν να κρατήσω την υγεία του μυαλού μου και κυριότερα τον επί 19 χρόνια αδερφικό φίλο μου Γιώργο ο οποίος ανεξαρτήτως απόστασης είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζει. Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου και τον δικό μου «Ζορμπά», γένους θηλυκού, την Λαμπρίνα η οποία σε ένα μικρό χρονικό διάστημα μου έδειξε πως είναι να ζεις έντονα και να παθιάζεσαι με την καθημερινότητα είτε αυτή λέγεται δουλειά ή προσωπική ζωή.

Τέλος, τις μεγαλύτερες και σημαντικότερες ευχαριστίες θέλω να τις δώσω στους γονείς και στην αδερφή μου οι οποίοι στήριξαν την απόφασή μου να έρθω στην Κρήτη και ήταν δίπλα μου υλικά, αλλά σημαντικότερα ψυχικά και ηθικά να με στηρίξουν σε αυτήν την προσπάθεια τόσο μακριά από το σπίτι μου.

Σας ευχαριστώ  
Βαγγέλης.

# Περιεχόμενα

<b>Περίληψη</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>1. Εισαγωγή</b> .....	3
1.1 Ανοσοσφαιρίνες .....	3
1.1.1 Βασική δομή των ανοσοσφαιρινών .....	4
1.1.2 Γενετική ποικιλομορφία των ανοσοσφαιρινών .....	5
1.1.3 Οικογένειες Ανοσοσφαιρινών .....	7
1.2 Ανοσοσφαιρίνη Γ (IgG) .....	8
1.2.1 Δομή των IgG .....	9
1.2.2 Βιολογικές ιδιότητες των IgG .....	11
1.3 Υποδοχείς Fc για την IgG(FcγR) .....	12
1.3.1 Δομή των FcγR .....	13
1.3.2 Τοπολογία και τύποι των FcγR .....	13
1.4 Ανοσολογία της κύησης .....	14
1.4.1 Πλακούντας .....	15
1.4.2 Μηχανισμοί της ανοχής κατά την κύηση .....	15
1.4.3 Χυμική και κυτταρική ανοσία κατά την κύηση .....	16
1.4.4 Κυτοκίνες στην εγκυμοσύνη .....	17
1.4.5 Καθ' ἑξιν αποβολές .....	17
1.5 Ενδοφλέβιες ανοσοσφαιρίνες (IVIg) .....	18
1.5.1 Μηχανισμός δράσης των IVIG .....	18
1.5.2 Εφαρμογές και παρενέργειες των IVIGs .....	19
<b>2. Σκοπός της εργασίας</b> .....	20
<b>3. Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	21
<b>4. Αποτελέσματα</b> .....	33
4.1 Περιορισμένη θρυψινόλυση IgG .....	33
4.2 In Vitro δοκιμές σε μακροφάγα .....	34
4.2.1 Έλεγχος πολλαπλασιασμού με ραδιενεργή θυμιδίνη .....	34
4.2.2 Έλεγχος για την παρουσία οξειδίων του αζώτου .....	35

4.3 In Vitro δοκιμές σε κύτταρα τροφοβλάστη .....	37
4.3.1 Έλεγχος πολλαπλασιασμού με ραδιενεργή θυμιδίνη .....	37
4.3.2 Δοκιμή ELISA για την έκφραση των κυτοκινών IL – 3, IL – 10, IL – 15 και GM – CSF από τροφοβλάστες.....	38
4.4 Παραγωγή ανασυνδυασμένου C <sub>H</sub> 2 από κύτταρα N22.....	39
4.4.1 Εκκνητές και PCR .....	39
4.4.2 Απομόνωση ολικού RNA και gel αγαρόζης .....	39
<b>5. Συμπεράσματα - Συζήτηση .....</b>	<b>41</b>
<b>6. Βιβλιογραφία .....</b>	<b>44</b>

## Περίληψη

---

Οι καθ' ἑξίν αποβολές είναι ένα σημαντικό πρόβλημα που επηρεάζει τον οικογενειακό προγραμματισμό δημιουργώντας ψυχολογικά, κοινωνικά και οικονομικά προβλήματα. Ο όρος περιγράφει τρεις ή περισσότερες συνεχόμενες απώλειες εμβρύου μέχρι τη 10-12<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης οι οποίες δεν οφείλονται σε κάποιο παθολογικό ή κατασκευαστικό ή γενετικό πρόβλημα. Διεθνώς, ο έλεγχος συμβατότητας μητέρας – πατέρα και οι ενδοφλέβιες ανοσοσφαιρίνες (IVIg) είναι ένα από τα προτεινόμενα πρωτόκολλα για την αντιμετώπιση του φαινομένου. Η θεραπεία με IVIg η οποία χρησιμοποιείται για διάφορες περιπτώσεις όπως τα αυτοάνοσα νοσήματα, νευρολογικές διαταραχές κλπ, φαίνεται να αυξάνει την μητρική ανοσοδιέγερση στις πρώτες εβδομάδες της κύησης χωρίς ωστόσο να είναι γνωστός ο μηχανισμός δράσης του σκευάσματος. Το γεγονός ότι στους τροφοβλάστες υπάρχουν υποδοχείς Fc (FcγR) μας οδήγησε στην υπόθεση ότι το Fc τμήμα των IgG είναι υπεύθυνο για τη διεγερτική δράση της IVIg θεραπείας και τη για την προστασία του εμβρύου στις περιπτώσεις των καθ' ἑξίν αποβολών.

Στην παρούσα εργασία καταφέραμε να απομονώσουμε IgG από ορό ποντικίου και στην συνέχεια με περιορισμένη θρυψινόλυση να αποκόψουμε ένα 70kDa τμήμα του μορίου, το οποίο ταυτοποιήθηκε ως Fc με δοκιμασίες ELISA. Το αποκομμένο Fc μόριο, σε πειράματα ενσωμάτωσης ραδιενεργούς θυμιδίνης, ήταν σε θέση να αυξήσει το πολλαπλασιασμό τόσο σπληνικών μακροφάγων όσο και πλακουντικών κυττάρων 12<sup>ης</sup> ημέρας κύησης. Υπερκείμενα από τις καλλιέργειες δοκιμάστηκαν με την ELISA για την παραγωγή κυτοκινών που φάνηκε ότι Fc μόριο επάγει τη παραγωγή IL-3, IL-15 και GM-CSF που όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία προστατεύουν το έμβρυο κατά την κύηση.

Το γεγονός ότι για την αποτελεσματική *in vivo* χορήγηση απαιτούνται μεγάλες ποσότητες Fc μορίων, μας οδήγησε στην προσπάθεια κατασκευής ανασυνδυασμένου Fc τμήματος. Το γονίδιο για την IgG απομονώθηκε από τη κυτταρική σειρά N22 μετά από σχεδιασμό ειδικών εκκινητών για το τμήμα C<sub>H</sub>2 της IgG, που δεσμεύεται στους Fc υποδοχείς. Ολική απομόνωση RNA ακολουθούμενη από RT – PCR μας έδωσε το αναμενόμενο προϊόν το οποίο στην συνέχεια θα κλωνοποιηθεί. Ταυτόχρονα έγινε κλωνοποίηση του Hinge – C<sub>H</sub>2 τμήματος παρουσία His – Tag και απομόνωση με χρωματογραφία συγγένειας.

Τα *in vitro* αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν εδώ, δείχνουν πως το Fc τμήμα που απομονώθηκε έχει θετική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των τροφοβλαστών. Ο σκοπός είναι να προωθηθεί το ανασυνδυασμένο τμήμα για την παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων οι οποίες θα επιτρέψουν τον έλεγχο της υπόθεσής μας στα *in vivo* πειράματα.

## Abstract

---

Recurrent miscarriages are a major concern in family programming affecting psychologically, socially and economically the couple. This term defines three or more consecutive pregnancy failures until the 10-12<sup>th</sup> week of gestation in the absence of any pathologic, anatomical or genetic cause. Internationally, the maternal anti-paternal immunization protocols and the intravenous IgG treatments (IVIG) constitute one of the suggested protocols on that matter, which however are still under investigation. The IVIG treatment, which is used for a variety of other cases like autoimmune diseases, neurologic disorders etc. has been shown to increase maternal immunostimulation during the first weeks of gestation without however knowing the exact mechanism. The fact that trophoblasts express Fc receptors (FcγR) leads to the hypothesis that the Fc portion of IgG is responsible for the stimulatory effect of IVIG and fetus protection in the cases of recurrent abortions.

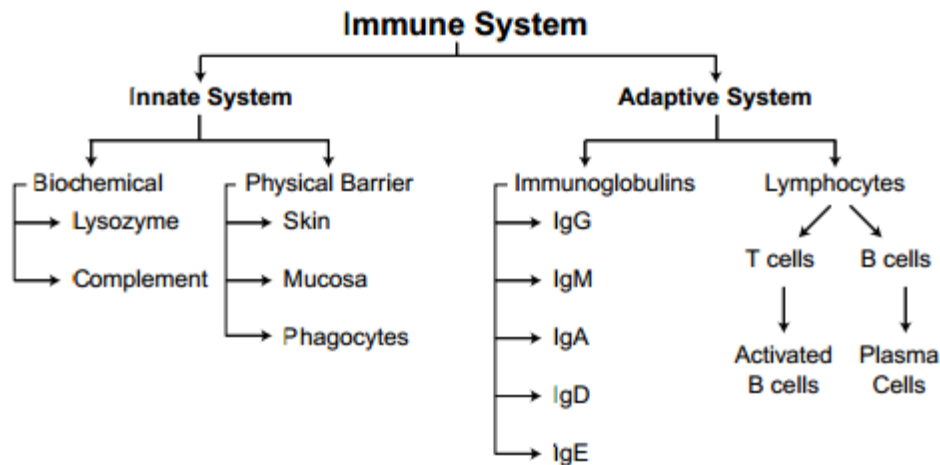
In the current essay we managed to isolate IgG from mouse serum and using limited trypsinolysis to obtain a 70kDa molecule corresponding to the Fc fragment as tested by ELISA. The Fc fragment, when used in radioactive thymidine experiments, increased proliferation of spleen macrophages as well as 12<sup>th</sup> day of gestation placental cells. ELISA experiments using supernatants from the placental cell culture showed a significant increase of IL-3, IL-15 and GM-CSF cytokine production, which are known to protect fetus during pregnancy.

The fact that an effective *in vivo* administration requires high concentrations of IgG proteins, led us to the production of recombinant Fc fragment. IgG gene was isolated from the N22 cell line using specific primers for the C<sub>H</sub>2 domain, which binds to the FcγRs. RNA extraction followed by RT – PCR experiments produced the expected product which should be cloned. Furthermore, cloning of the C<sub>H</sub>2 – Hinge region in the presence of His – Tag and purification by affinity chromatography was achieved.

The *in vitro* results presented here show that the isolated Fc fragment has a positive effect on the trophoblast proliferation. The goal thereafter will be the construction the recombinant CH2 – Hinge fragment for the production of larger concentrations, which will allow the confirmation of the initial hypothesis *in vivo*.

# 1. Εισαγωγή

Το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών αποτελείται από καλά διαφοροποιημένα κύτταρα και μόρια τα οποία είναι υπεύθυνα να ανταποκρίνονται σε αντιγόνα με πολύπλοκο τρόπο και αλληλεπιδράσεις. Διαχωρίζεται σε δύο ευρύτερες κατηγορίες. Στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο περιλαμβάνει τη πρώτη άμυνα το οργανισμού που αποτελείται πρωτεϊνικά μόρια (αντισώματα, συμπλήρωμα, λυσοζύμη, κ.α.) και κύτταρα (φαγοκύτταρα, κύτταρα NK). Η προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση περιλαμβάνει τα Β και τα Τ Λεμφοκύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της ανοσολογικής αντίδρασης και την ανάπτυξη χυμικής και κυτταρικής ανοσίας στον οργανισμό. (Εικόνα 1.1)



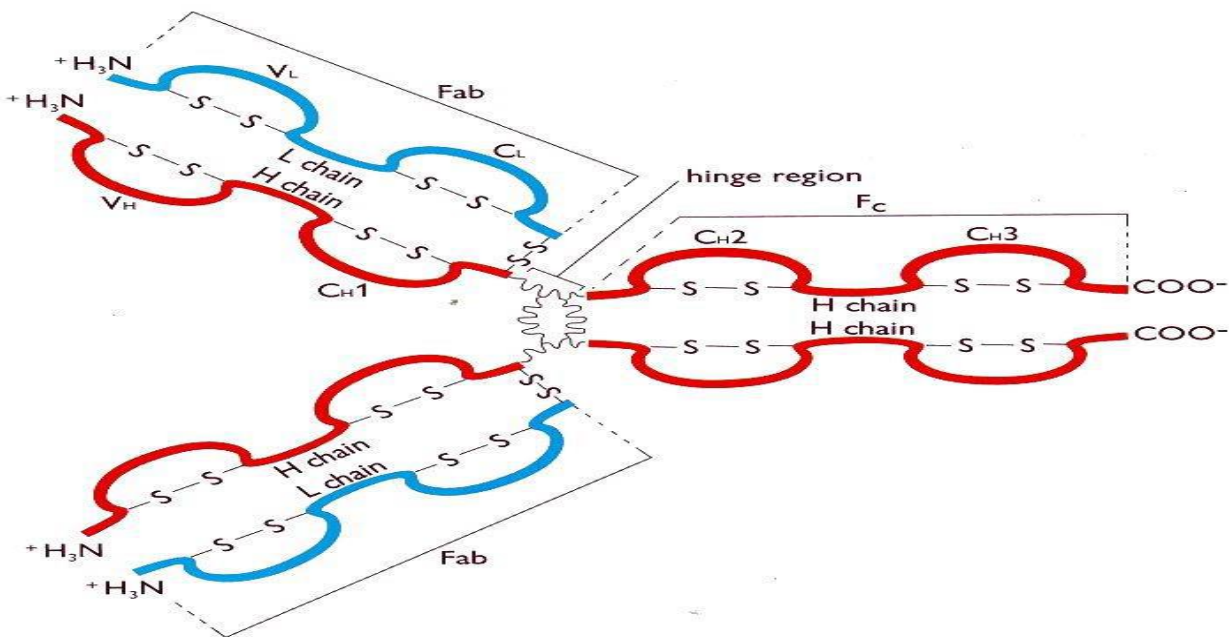
Εικόνα 1.1 Οργάνωση του ανοσοποιητικού συστήματος των θηλαστικών (Hamilton et al. 2001)

## 1.1 Ανοσοσφαιρίνες

Οι ανοσοσφαιρίνες παράγονται από τα πλασματοκύτταρα και χρησιμοποιούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα για την αναγνώριση και αντιμετώπιση διαφορετικών αντιγόνων. Χαρακτηρίζονται ως γλυκοπρωτεΐνες καθότι αποτελούνται κατά 82 – 96% από αμινοξέα, ενώ η υπόλοιπη σύστασή τους είναι υδατάνθρακες (Spielberg, 1974). Λόγω του ειδικού τους ρόλου που είναι η αντιμετώπιση του κάθε πιθανού αντιγόνου, απαιτείται μεγάλη ποικιλομορφία η οποία διασφαλίζεται σε γονιδιακό επίπεδο. Για την εκάστοτε αντιγονική ειδικότητα υπάρχουν 5 κύριοι ισότυποι ανοσοσφαιρινών (IgG, IgM, IgD, IgE και IgA) με διαφορετικούς ρόλους αλλά και σημαντικές ομοιότητες.

### 1.1.1 Βασική δομή των ανοσοσφαιρινών

Το βασικό μόριο των ανοσοσφαιρινών είναι ετεροδιμερές και αποτελείται από 2 όμοιες βαριές (H), μοριακού βάρους περίπου 50kDa και δύο όμοιες ελαφριές αλυσίδες (L) με μοριακό βάρος 25kDa (Εικόνα 1.2). Οι ελαφριές και οι βαριές αλυσίδες συγκρατούνται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς ενώ όλο το μόριο με τις 2 βαριές και τις 2 ελαφριές αλυσίδες συγκρατείται επίσης με δισουλφιδικούς δεσμούς περίπου στο κέντρο σχηματίζοντας την περιοχή του αρμού (Hinge Region) η οποία δίνει στο μόριο ευλυγισία και αποτελείται μόνο από αμινοξέα της βαριάς αλυσίδας. Περαιτέρω, υπάρχουν και άλλοι ενδομοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί οι οποίοι σχηματίζουν βρόχους δίνοντας έτσι μια πιο συμπαγή δομή στην πρωτεΐνη.



**Εικόνα 1.2** Σχηματική αναπαράσταση της γενικής δομής μιας ανοσοσφαιρίνης. Διακρίνονται τα τμήματα Fab και Fc καθώς και οι δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των αλυσίδων. Οι Υδατάνθρακες στην CH2 περιοχή δεν εμφανίζονται (A.J. Meulenbroek. 2008).

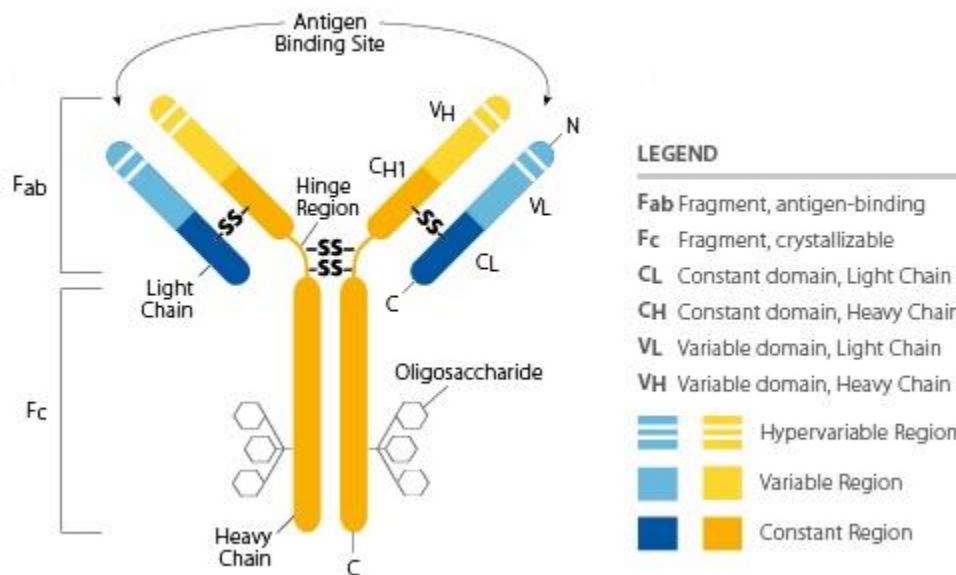
Η ελαφριά αλυσίδα αποτελείται από μια σταθερή ( $C_L$ ) και μια μεταβλητή περιοχή ( $V_L$ ) η οποία βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο. Υπάρχουν 2 διαφορετικοί τύποι ελαφριάς αλυσίδας, η κ και η λ. Κάθε ανοσοσφαιρίνη έχει είτε, 2 κ ή 2 λ ελαφριές αλυσίδες και ποτέ μια από κάθε είδος. Δεν φαίνεται να υπάρχουν λειτουργικές διαφορές μεταξύ των 2 τύπων ελαφριάς αλυσίδας. Σε κάθε είδος η αναλογία κ:λ διαφέρει. Χαρακτηριστικά στο ποντίκι η αναλογία κ:λ είναι 20:1, στον άνθρωπο 2:1 και στα βοοειδή 1:20 (Hamilton et al. 2001).

Η βαριά αλυσίδα αποτελείται από 4 διαφορετικές ξεχωριστές περιοχές. Το μεταβλητό μέρος το οποίο είναι επίσης στο αμινοτελικό άκρο ( $V_H$ ) και 3 σταθερά μέρη ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ). Οι περιοχές  $C_{H2}$  και  $C_{H3}$  είναι υπεύθυνες για τις αλληλεπιδράσεις με το οργανισμό ενώ η περιοχή  $C_{H1}$  καθώς και η  $V_H$  παίζουν ρόλο στις αλληλεπιδράσεις με το



αντιγόνο. Στην περιοχή CH2 εντοπίζονται και οι υδατάνθρακες του μορίου οι οποίοι φαίνεται να παίζουν ρόλο στην δέσμευση των ανοσοσφαιρινών με τους υποδοχείς τους καθώς και κυρίτερα στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος (Immunology 5<sup>th</sup> edition 2001).

Τα τμήματα αυτά έχουν χαρακτηριστεί με βάση την λειτουργία τους και τη δεκτικότητα τους σε πέψη με παπαΐνη. Όταν γίνει χειρισμός των ανοσοσφαιρινών με το ένζυμο τότε προκύπτουν 2 διακριτά θραύσματα. Το ένα περιλαμβάνει τις περιοχές C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> και την περιοχή του αρμού και ονομάζεται Fc (Fragment Crystallizable) και δεν έχει αντιγονική δράση. Το δεύτερο τμήμα περιλαμβάνει το V<sub>H</sub> και C<sub>H1</sub> τμήμα ενωμένο με την



**Εικόνα 1.3** Λεπτομερής απεικόνιση ενός μορίου ανοσοσφαιρινών (Ebioscience)

ελαφριά αλυσίδα και διατηρεί την αντιγονική του δράση. Ονομάζεται Fab (Fragment, antigen binding). Περαιτέρω αναλύσεις του Fab τμήματος έδειξαν ότι στο αμινοτελικό άκρο της μεταβλητής περιοχής της κάθε αλυσίδα υπάρχουν 3 βρόχοι σε κάθε αλυσίδα οι οποίοι σχηματίζονται από τις β – πτυχωτές επιφάνειες, δημιουργώντας μια υπερμεταβλητή περιοχή η οποία παίζει και τον πιο καθοριστικό ρόλο στην δέσμευση του αντιγόνου. Αυτές οι περιοχές ονομάζονται συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές (CDRs. Complementarity Determining Regions) (Clothia et al. 1997). (Εικόνα 1.3)

### 1.1.2 Γενετική ποικιλομορφία των ανοσοσφαιρινών

Πρακτικά όλοι οι μικροοργανισμοί μπορούν να προκαλέσουν ανοσολογική απόκριση. Συνεπώς απαιτείται ποικιλομορφία στα αντισώματα τα οποία παράγονται. Το μέγεθος του γονιδιώματος των σπονδυλωτών είναι ένας ανασταλτικός παράγοντας για τον αριθμό των γονιδίων που ελέγχουν τους μηχανισμούς παραγωγής των αντισωμάτων.

(Πίνακας 1.1). Έτσι έχουν αναπτυχθεί μηχανισμοί οι οποίοι επιτρέπουν την ποικιλομορφία παρά αυτούς τους περιορισμούς. Υπολογίζεται ότι στον ανθρώπινο οργανισμό μπορούν να παραχθούν περίπου 10 εκατομμύρια διαφορετικές ανοσοσφαιρίνες όλες ικανές να δεσμεύσουν έναν διαφορετικό επίτοπο κάποιου αντιγόνου.

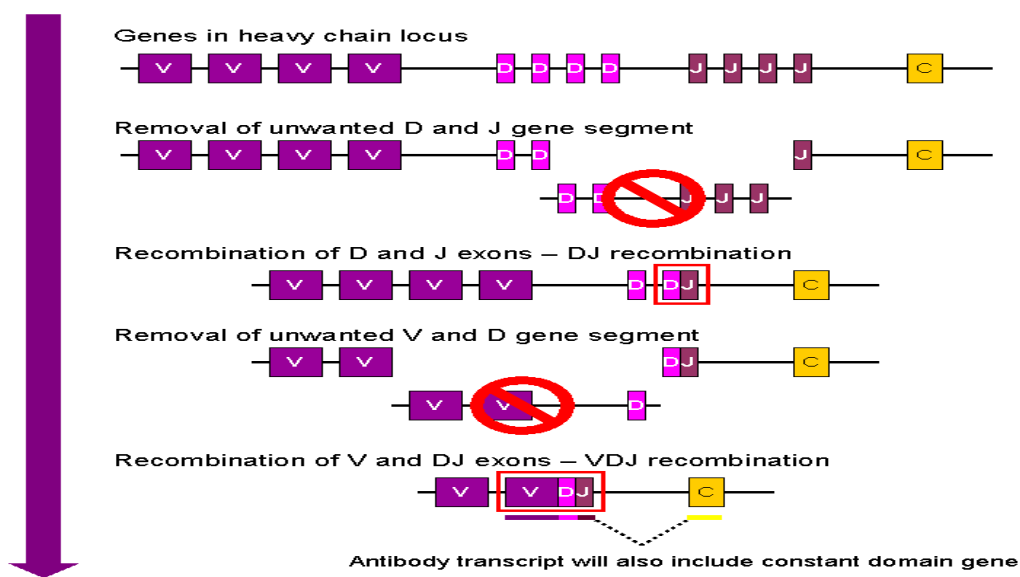
Τα γονιδιακά τμήματα που ελέγχουν την παραγωγή της βαριάς αλυσίδας καλούνται V (Variable), D (Diverse) και J (Joining). Στην ελαφριά αλυσίδα δεν υπάρχει το γονιδιακό τμήμα D. Ο αριθμός των V, D και J γονιδιακών τμημάτων διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό. Στον άνθρωπο η οικογένεια πολυγονιδίων της λ αλυσίδας έχει 31 V και 4 J γονιδιακά τμήματα, η οικογένεια της κ αλυσίδας υπάρχουν 85 V και 5 J τμήματα. Αντίστοιχα για την παραγωγή της βαριάς αλυσίδας, στον άνθρωπο, οι ανοσοσφαιρίνες προκύπτουν από τον ανασυνδυασμό 44 V, 27 D και 6 J γονιδιακών τμημάτων.

Γονίδιο	Χρωμόσωμα	
	Άνθρωπος	Ποντίκι
Ελαφριά αλυσίδα λ	22	16
Ελαφριά αλυσίδα κ	2	6
Βαριά αλυσίδα	14	12

**Πίνακας 1.1 Χρωμοσωμικές θέσεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών στον άνθρωπο και στο ποντίκι**

Η παραγωγή στην βαριά αλυσίδα ξεκινάει με την τυχαία επιλογή ενός D και ενός J γονιδιακού τμήματος, τα οποία ανασυνδυάζονται. Τα υπόλοιπα τμήματα διαγράφονται. Στην



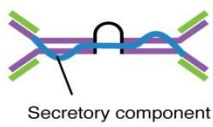
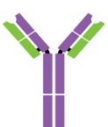

συνέχεια προστίθεται και το V κομμάτι ενώ επίσης τα υπόλοιπα τμήματα ανάμεσά τους διαγράφονται. Αντίστοιχα γίνεται και η λειτουργία στην παραγωγή της ελαφριάς αλυσίδας (κ ή λ) με την διαφορά ότι εφόσον δεν υπάρχει το D τμήμα, το πρώτο στάδιο είναι ο σχηματισμός του V και J συμπλόκου πριν την προσθήκη του γονιδίου για την σταθερή αλυσίδα κατά την μετάφραση (Papavasiliou and Market, 2003). (Εικόνα 1.4)



**Εικόνα 1.4 Απεικόνιση του V(D)J ανασυνδυασμού της βαριάς αλυσίδας (Immunobiology 5th edition, 2001)**

### 1.1.3 Οικογένειες Ανοσοσφαιρινών

Υπάρχουν 5 διαφορετικοί ισότυποι ανοσοσφαιρινών. Διαχωρίζονται με βάση την αμινοξική αλληλουχία στην σταθερή περιοχή των βαριών αλυσίδων. Όλες οι ανοσοσφαιρίνες σε ένα συγκεκριμένο ισότυπο έχουν μεγάλες ομοιότητες στο σταθερό τμήμα. Οι 5 ισότυποι είναι οι IgG, IgM, IgA, IgD και IgE (Πίνακας 1.2). Η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στην ανοσοσφαιρίνη Γ (IgG) και αυτή θα αναλυθεί εκτενώς.

The Five Immunoglobulin (Ig) Classes					
	IgM pentamer	IgG monomer	Secretory IgA dimer	IgE monomer	IgD monomer
					
Heavy chains	μ	γ	α	ε	δ
Number of antigen binding sites	10	2	4	2	2
Molecular weight (Daltons)	900,000	150,000	385,000	200,000	180,000
Percentage of total antibody in serum	6%	80%	13%	0.002%	1%
Crosses placenta	no	yes	no	no	no
Fixes complement	yes	yes	no	no	no
Fc binds to		phagocytes		mast cells and basophils	
Function	Main antibody of primary responses, best at fixing complement; the monomer form of IgM serves as the B cell receptor	Main blood antibody of secondary responses, neutralizes toxins, opsonization	Secreted into mucus, tears, saliva, colostrum	Antibody of allergy and antiparasitic activity	B cell receptor

Πίνακας 1.2 Οι 5 ισότυποι των Ανοσοσφαιρινών

#### α) Ανοσοσφαιρίνη Μ (IgM)

Η IgM είναι συνήθως πενταμερής αλλά μπορεί να βρεθεί και ως μονομερές. Στην μορφή του πενταμερούς όλες οι βαριές και όλες οι ελαφριές αλυσίδες είναι όμοιες μεταξύ τους. Η βαριά αλυσίδα έχει ένα ακόμα σταθερό κομμάτι το C<sub>H</sub>4 ενώ στον πολυμερισμό της βοηθάει μια ακόμα πρωτεΐνη η οποία συνδέεται με δισουλφιδικούς δεσμούς και ονομάζεται αλυσίδα J. Είναι η τρίτη πιο κοινή ανοσοσφαιρίνη στον ορό, ενώ είναι η πρώτη που παράγεται από το έμβρυο και η πρώτη που παράγεται από τα Β λεμφοκύτταρα όταν αυτά διεγείρονται από ένα αντιγόνο. Είναι η πιο ικανή για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και μπορεί να αλληλεπιδράσει με κάποια κύτταρα

μέσω των Fc υποδοχέων. Τέλος το μονομερές της IgM βρίσκεται αγκυροβολημένο στην μεμβράνη των B λεμφοκυττάρων και λειτουργεί ως αντιγονικός υποδοχέας για την μετάδοση σημάτων.

#### β) Ανοσοσφαιρίνη A (IgA)

Η IgA στο ορό βρίσκεται ως μονομερές. Αντίθετα ο εκκρινόμενος τύπος της σχηματίζει διμερή με μια ενδιάμεση J αλυσίδα. Επίσης στην εκκρινόμενη IgA υπάρχει και ένα ακόμα πρωτεϊνικό τμήμα το οποίο ονομάζεται «εκκρινόμενο τμήμα» ή T τμήμα. Αυτό παράγεται στα επιθηλιακά κύτταρα και προστίθεται στην IgA καθώς περνάει από τα μονοπάτια της έκκρισης. Χάρη σε αυτό το κομμάτι η IgA έχει την δυνατότητα να διαπερνάει τον βλενογόνο και να προστατεύεται από αποδόμηση. Είναι η δεύτερη πιο κοινή ανοσοσφαιρίνη στον ορό. Βρίσκεται στις περισσότερες εκκρίσεις (σάλιο, δάκρυα, βλέννα) και βοηθάει στην τοπική ανοσοαπόκριση. Η IgA δεν ενεργοποιεί το συμπλήρωμα εκτός αν βρεθεί σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις.

#### γ) Ανοσοσφαιρίνη D (IgD)

Η IgD βρίσκεται μόνο ως μονομερές στον ορό και ο ρόλος της είναι ασαφής. Βρίσκεται πιο συχνά αγκυροβολημένη στην μεμβράνη των B λεμφοκυττάρων και για να το πετύχει αυτό έχει μια μακριά ουρά στο καρβόξυ – τελικό άκρο της η οποία την σταθεροποιεί στην μεμβράνη. Είναι υποδοχέας αντιγόνων ενώ δεν ενεργοποιεί το συμπλήρωμα.

#### δ) Ανοσοσφαιρίνη E (IgE)

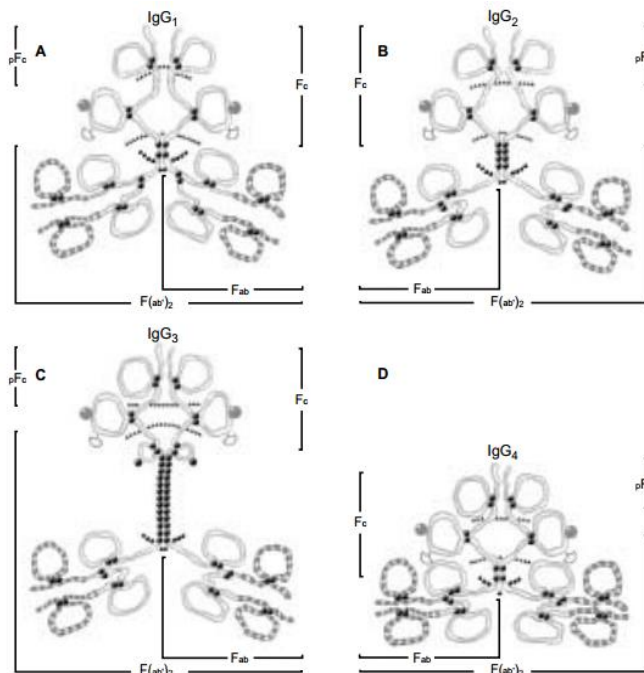
Η IgE εμφανίζεται ως μονομερές. Η δομή της περιλαμβάνει ένα ακόμα τμήμα στο σταθερό κομμάτι του μορίου. Είναι η μικρότερη σε συγκέντρωση ανοσοσφαιρίνη στον ορό, καθώς δεσμεύεται πολύ ισχυρά στους υποδοχείς Fc των βασεόφιλων και των μαστοκυττάρων πολύ πριν αλληλεπιδράσει με το αντιγόνο. Είναι η ανοσοσφαιρίνη που ευθύνεται για τις αλλεργίες. Εξαιτίας του πολύ ισχυρού δεσμού που δημιουργείται με τα βασεόφιλα και τα μαστοκύτταρα η δέσμευση της με ένα αλλεργιογόνο οδηγεί στην αποκοκκίωση αυτών των κυττάρων και την απελευθέρωση φλεγμονωδών παραγόντων που προκαλούν αλλεργικά συμπτώματα. Επιπλέον η IgE αποτελεί ένδειξη για την παρουσία παρασιτικής ασθένειας στον οργανισμό καθώς η δέσμευση της στα ηωσινόφιλα αυξάνεται παρουσία κάποιου παρασίτου. Τέλος, η IgE δεν έχει την δυνατότητα ενεργοποίησης του συμπληρώματος.

## **1.2 Ανοσοσφαιρίνη Γ (IgG)**

Η IgG είναι η πιο διαδεδομένη ανοσοσφαιρίνη του ορού. Βρίσκεται σε ποσοστό 75% - 80% του συνολικού ποσοστού των ανοσοσφαιρινών στον ορό. Ο χρόνος ημιζωής είναι 23 με 25 μέρες, μεγαλύτερος από τις άλλες ανοσοσφαιρίνες, κάτι που μπορεί να δικαιολογεί και το γεγονός ότι είναι η πιο διαδεδομένη ανοσοσφαιρίνη.

### 1.2.1 Δομή των IgG

Οι ανθρώπινες ανοσοσφαιρίνες όπως και αυτές στο ποντίκι έχουν μοριακό βάρος περίπου 150kDa και αποτελούνται από 2 βαριές αλυσίδες των 50kDa και 2 ελαφριές των 25kDa περίπου. Υπάρχουν 4 διαφορετικοί υπότυποι. IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4 στον άνθρωπο, ενώ στο ποντίκι δεν υπάρχει IgG4 αλλά IgG2a και IgG2b. Οι σχετικές συγκεντρώσεις των διαφόρων ισοτύπων στον ορό είναι  $IgG1 > IgG2 > IgG3 = IgG4$ . Οι 4 υπότυποι εμφανίζουν ομολογία 95% στην σταθερή τους περιοχή ενώ οι σημαντικότερες διαφορές τους εντοπίζονται στην περιοχή του αρμού στον οποίο διαφέρουν στον αριθμό των δισουλφιδικών δεσμών. (Εικόνα 1.5)



**Εικόνα 1.5 Σχηματική αναπαράσταση των 4 ισοτύπων των ανοσοσφαιρινών στον άνθρωπο. Στην εικόνα φαίνονται και τα σημεία κοπής με παπαΐνη και πεψίνη (Immunology Today, June 1980)**

Με αυτόν τον τρόπο η διαφορά των 4 ανοσοσφαιρινών επικεντρώνεται στην ευλυγισία του μορίου. Η περιοχή του αρμού της IgG1 περιλαμβάνει 15 αμινοξέα. Τα Fab τμήματα μπορούν και περιστρέφονται γύρω από τους άξονες τους και κινούνται γύρω από μια σφαίρα που έχει ως κέντρο τους 2 πρώτους δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα στις 2 βαριές αλυσίδες. Η IgG2 περιέχει 12 αμινοξέα και 4 δισουλφιδικούς δεσμούς στην περιοχή του αρμού. Η απουσία γλυκίνης και η παρουσία προλίνης στον αρμό, σε συνδυασμό με τους δισουλφιδικούς δεσμούς κάνουν το μόριο λιγότερο ευέλικτο. Η περιοχή του αρμού της IgG3 είναι μεγάλη και περιέχει 62 αμινοξέα (21 προλίνες και 11 κυστεΐνες) σχηματίζοντας ένα τμήμα που έχει χαρακτηριστεί σαν μια άκαμπτη πολυπρολινική διπλή έλικα. Παρ' όλα αυτά η IgG3 φαίνεται να έχει παρόμοια κίνηση με την IgG1. Η απόσταση όμως του Fc και του Fab κομματιού δίνει την δυνατότητα στα δύο τμήματα να αλληλεπιδρούν λιγότερο, καθιστώντας την IgG3 πιο ικανή για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Τέλος η IgG4 έχει την μικρότερη περιοχή αρμού ενώ η ευλυγισία της είναι κάπως ανάμεσα στην IgG1 και IgG2 καθώς κάποια περιστροφή μπορεί να επιτευχθεί από τα μόρια της γλυκίνης στην περιοχή του αρμού. Το γεγονός ότι η IgG4 έχει τον μικρότερο αρμό και συνεπώς την μικρότερη απόσταση μεταξύ Fc και Fab τμήματος την καθιστά λιγότερο ικανή να δεσμεύσει το συμπλήρωμα. (Πίνακας 1.3)

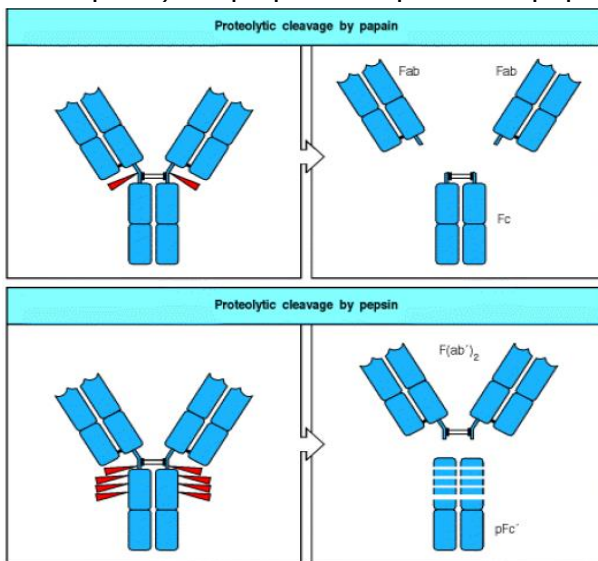
Διαφορετικό επίσης ανάμεσα στους ισοτύπους είναι και το σημείο δέσμευσης μεταξύ των βαριών και των ελαφριών αλυσίδων. Η ελαφριά αλυσίδα της IgG1

δεσμεύεται με την βαριά περίπου στο μέσο ενώ στους άλλους ισότυπους η δέσμευση μεταξύ βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας γίνεται περίπου στο ένα τέταρτο της απόστασης από το αμινοτελικό άκρο. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται μέσα στην βαριά αλυσίδα σχηματίζοντας τους βρόχους μετατρέπουν τα μόρια σε συμπαγής δομές και συμμετέχουν στις διάφορες βιολογικές διεργασίες (Hamilton et al. 2001).

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Ισότυπος	Gamma1	Gamma2	Gamma3	Gamma4
Μοριακό Βάρος (kDa)	146	146	170	146
Αμινοξέα αρμού	15	12	62	12
Δισουλφιδικοί αρμού	2	4	11	2
Δεκτικότητα σε προτεολυτικά ένζυμα	++	+/-	+++	+
Αναλογία κ:λ	2,4	1,1	1,4	8,0
pI	8,6 ± 0,4	7,4 ± 0,6	8,3 ± 0,7	7,2 ± 0,8

**Πίνακας 1.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες των ανθρώπινων IgG**

Διάφορα προτεολυτικά ένζυμα μπορούν να κόψουν συγκεκριμένες αλληλουχίες του αντισώματος και βοηθούν στην κατανόηση του μηχανισμού των επί μέρους τμημάτων του. Η παπαΐνη κόβει το αντίσωμα σε 3 περιοχές προς το αμινοτελικό άκρο του μορίου. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτουν τα 2 Fab τμήματα και το Fc τμήμα το οποίο μένει άθικτο. Η πεψίνη αντίθετα αφήνει άθικτα τα Fab τμήματα και κόβει το Fc τμήμα ανάμεσα στην περιοχή C<sub>H</sub>2. (Εικόνα 1.6).



**Εικόνα 1.6 Σημεία κοπής και προϊόντα αυτής, της IgG με παπαΐνη και πεψίνη (Immunobiology 5<sup>th</sup> edition, 2001)**

Η παπαΐνη κόβει το αντίσωμα σε 3 περιοχές προς το αμινοτελικό άκρο του μορίου. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτουν τα 2 Fab τμήματα και το Fc τμήμα το οποίο μένει άθικτο. Η πεψίνη αντίθετα αφήνει άθικτα τα Fab τμήματα και κόβει το Fc τμήμα ανάμεσα στην περιοχή C<sub>H</sub>2. (Εικόνα 1.6). Επίσης η IgG μπορεί να δεχτεί προτεόλυση με θρυψίνη η οποία αν δράσει πλήρως κόβει το μόριο σε 270 περίπου περιοχές. Ελεγχόμενα όμως μπορούν να προκύψουν υπό μελέτη επιθυμητά τμήματα (Περιορισμένη θρυψινόλυση). (πίνακας 1.4)

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Παπαΐνη (Απουσία Κυστεΐνης)	+	+/-	+	+
Πλασμίνη	+++	+	+++	+
Θρυψίνη	+++	+	+++	+++
Πεψίνη	+	+	+++	+++

**Πίνακας 1.4 Ικανότητα πέψης των IgG με τη χρήση διαφόρων ενζύμων**



## 1.2.2 Βιολογικές ιδιότητες των IgG

Οι βιολογικές ιδιότητες των IgG μεσολαβούνται τόσο από το αντιγονο-ειδικό Fab τμήμα του μορίου όσο και το Fc τμήμα το οποίο αναγνωρίζει και δεσμεύεται στους Fc υποδοχείς που εκφράζονται σε πολλά διαφορετικά κύτταρα. Οι βασικότερες ρυθμιστικές ιδιότητες των IgG εμφανίζονται στον πίνακα 1.5.

Properties	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2</sub>	IgG <sub>3</sub>	IgG <sub>4</sub>
Human myeloma protein frequency (%)	60-70	14-20	4-8	2-6
Proportion of total IgG in normal adult serum (%) (54)	60.3-71.5	19.4-31.0	5.0-8.4	0.7-4.2
Average serum concentration (mg/ml)	8	4	0.8	0.4
Range in normal serum (mg/ml) (2)	5-12	2-6	0.5-1	0.2-1
Subclass distribution on circulating B cells by immunofluorescence (%) (270)	40	48	8	1
Subclass distribution on IgG plasma cells in bone marrow, spleen, tonsil (%) (270)	64	26	8	1
Half-life (days)	21-23	20-23	7-8	21-23
Transport across the placenta	++	+	++	++
Complement fixation (classical pathway)	++	+	++	0
Antibody response to:				
Proteins	++	+/-	++	+/-
Polysaccharides	+	++	-	-
Allergens	+	-	-	++
Cytophilic properties*				
Human monocytes (FcR-I, II & I <sub>o</sub> )	++	+	++	+/-
Human neutrophils (FcR-II)	++	+/-	++	+
Human platelets (FcR-II)	++	+	++	+
Human lymphocytes (FcR-II or I <sub>o</sub> )	++	+/-	++	+
Nonimmunological Reaction with				
<i>S. aureus</i> protein A	+	+	0	+
Cystic fibrosis factor	+	+	0	0
Rheumatoid factors	+	+	0	0
Functional valency (70, 71)	2	2	2	2
Blocking activity in allergy	0	0	0	+
Binding to Protein A	++	++	Alotype dependent	++
Binding to Protein G	++	++	++	++

\*Three types of human IgG Fc receptors (FcR) can reside on human leukocytes (FcR-I, FcR-II and/or FcR-I<sub>o</sub> [low affinity]) (72).

**Πίνακας 1.5 Βιολογικές ιδιότητες των IgG (Hamilton et al. 2001)**

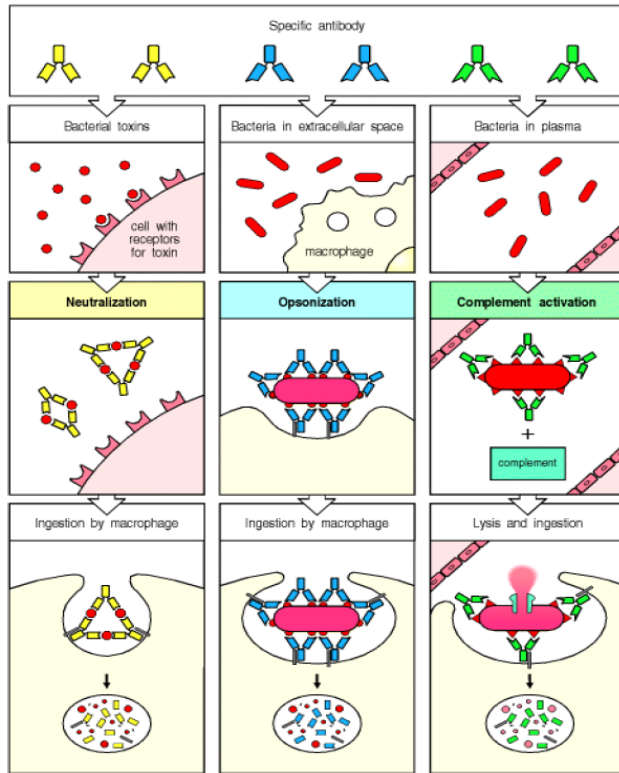
πως οι IgG είναι υπεύθυνες για την ανοσοποίηση του εμβρύου και ένας από τους παράγοντες αναγνώρισης του από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας. Είναι χαρακτηριστικό ότι κατά τη διάρκεια της κύησης το έμβρυο έχει IgG καθαρά μητρικής προέλευσης και όχι δικές του.

Η βασική διεργασία των IgG είναι η ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Το συμπλήρωμα αποτελείται από ένα σύνολο πρωτεϊνών οι οποίες παράγονται στο ήπαρ και

Η συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών στα υγιή άτομα διαφέρει. Σε μεγάλη ποσότητα εμφανίζεται η IgG1 (5 – 12 mg/ml) και ακολουθεί η IgG2 (2 – 6mg/ml). Η IgG3 και IgG4 βρίσκονται σε ποσότητες μικρότερες του 1mg/ml. Η IgG βρίσκεται ελάχιστα στις εκκρίσεις. Η αναλογία 5:1 μεταξύ IgG και IgA στον ορό γίνεται 1:20 στις εκκρίσεις.

Όλες οι IgG φαίνεται να είναι ικανές να διαπερνούν τον πλακούντα ωστόσο η IgG2 είναι λιγότερο ικανή από τις άλλες. Η μεταφορά φαίνεται να ρυθμίζεται από έναν μηχανισμό που περιλαμβάνει το Fc τμήμα της IgG στην μεμβράνη των τροφοβλαστών η οποία δεσμεύει IgG μέσω των υποδοχέων Fc που διαθέτουν. Το γεγονός ότι κάποιες IgG διαπερνάνε τον πλακούντα με μεγαλύτερη ευκολία από κάποιες άλλες υποδηλώνει την ύπαρξη επιλεκτικής διαδικασίας. Φαίνεται

κυκλοφορούν στο αίμα σε μια πρόδρομη μορφή. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης και αντιμετώπισης του εκάστοτε αντιγονικού παράγοντα. Στο κλασικό μονοπάτι της ενεργοποίησης του συμπληρώματος απαιτείται η δέσμευση της πρωτεΐνης C1 στο Fc τμήμα του



**Εικόνα 1.7 Αλληλεπίδραση IgG με μακροφάγα (Immunobiology 5<sup>th</sup> edition, 2001)**

(οψονισμός). Οι IgG1 και IgG3 είναι πιο ικανές στο να ενισχύουν την φαγοκυττάρωση γιατί δένονται πιο ισχυρά με το Fc κομμάτι τους. Επειδή η φαγοκυττάρωση είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία και μπορεί να προκαλέσει φλεγμονή πρέπει οι υποδοχείς για τις Fc περιοχές πάνω στα φαγοκύτταρα να μπορούν να διαχωρίσουν την δεσμευμένη με αντίσωμα IgG σε σχέση με την ελεύθερη. Αυτό φαίνεται να γίνεται λόγω της υψηλότερης συγγένειας που εμφανίζουν οι δεσμευμένες με αντιγόνο IgG. (Εικόνα 1.7) Οι IgG, έχουν υψηλότερο δείκτη διάχυσης από τις άλλες ανοσοσφαιρίνες και έτσι βρίσκονται ομοιόμορφα κατανεμημένες στον ένδο- και έξω-αγγειακό χώρο. Έτσι, παίζουν σημαντικό ρόλο στην αδρανοποίηση ιών και τοξινών.

### 1.3 Υποδοχείς Fc για την IgG (FcγR)

Ο οψονισμός ενός κυτταρικού αντιγόνου από τις ανοσοσφαιρίνες είναι μια από τις βασικές διεργασίες που οδηγούν στην απομάκρυνση του εν λόγω αντιγόνου από την

αντισώματος που αλληλεπιδρά με το αντιγόνο σε μια κυτταρική επιφάνεια. Αυτό γίνεται μέσω του C<sub>H2</sub> τμήματος. Το πόσο ικανό είναι ένας ισότυπος IgG να ενεργοποιήσει το συμπλήρωμα εξαρτάται από τις στερικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Fab και του C<sub>H2</sub> κομματιού και την ευκολία που έχει η C1 να πλησιάσει το μόριο εξαιτίας αυτών. Έτσι η δέσμευση της C1 στην IgG3 είναι 40 φορές μεγαλύτερη από την IgG2 ενώ δεν έχει δείξει ικανότητα δέσμευσης με την IgG4 (Immunobiology 5<sup>th</sup> edition, 2001).

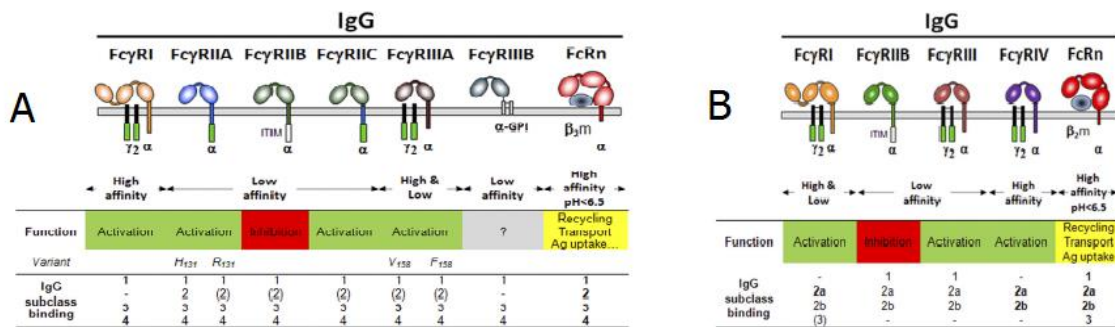
Τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα, έχουν υποδοχείς στην επιφάνειά τους που δεσμεύουν το Fc κομμάτι των IgG. Αυτό φαίνεται να ενισχύει τις επαφές μεταξύ αντιγόνου και φαγοκυτταρικού κυττάρου και γενικά ενισχύει την απόδοση της φαγοκυττάρωσης



κυκλοφορία. Τα κύτταρα εκφράζουν ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνειά τους (FcRs) που είναι υπεύθυνοι για την ανοσολογική αντίδραση δεσμεύοντας το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών. Με την δέσμευση αυτή διάφοροι μηχανισμοί του ανοσοποιητικού συστήματος ενεργοποιούνται. Μερικοί από αυτούς είναι, η φαγοκυττάρωση, η ενδοκυττάρωση του συμπλόκου αντιγόνου – αντισώματος, η παραγωγή αντισωμάτων από τα πλασματοκύτταρα, η εξαρτώμενη από τα αντισώματα κυτταροτοξικότητα, η έκκριση προ – φλεγμονωδών κυτοκινών που με την σειρά τους ενεργοποιούν άλλα στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος. Υπάρχουν 4 διαφορετικοί τύποι FcγR. Αυτοί είναι οι FcγRI, II και III και ο Fcγn (Neonatal) ενώ στο ποντίκι υπάρχει και ο FcγRIV.

### 1.3.1 Δομή των FcγR

Η γενική δομή των FcγR είναι παρόμοια. Ένα εξωκυττάριο τμήμα (EC) το οποίο αποτελείται από 2 (FcγRII και FcγRIII) ή 3 (FcγRI) μοτίβα της υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών, ένα υδρόφοβο, διαμεμβρανικό τμήμα (TM) και μία ενδοπλασματική (IC) ουρά. Για την παραγωγή των FcγR απαιτούνται 1 γονίδιο στο ποντίκι και 2 στον άνθρωπο τα οποία βρίσκονται στο χρωμόσωμα 1. Υπάρχει πολύ υψηλή ομολογία (70 – 95%) στο EC μεταξύ των FcγR στο ποντίκι και στον άνθρωπο. Αντίθετα οι περιοχές TM και IC διαφέρουν σημαντικά. Εναλλακτικό μάτισμα δημιουργεί διάφορους ισότυπους μεταξύ των υποδοχέων. Ο FcγRn έχει παρόμοια δομή με την τάξης I πρωτεΐνη του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (Bruhns, 2012). (Εικόνα 1.8)



Εικόνα 1.8 Σχηματική αναπαράσταση των Fcγ υποδοχέων στον άνθρωπο (A) και στο ποντίκι (B). Η δέσμευση με την IgG εμφανίζεται με έντονα γράμματα (ισχυρή δέσμευση), με απλά γράμματα (χαμηλή δέσμευση) και σε παρένθεση (πολύ χαμηλή δέσμευση) (Bruhns, 2012)

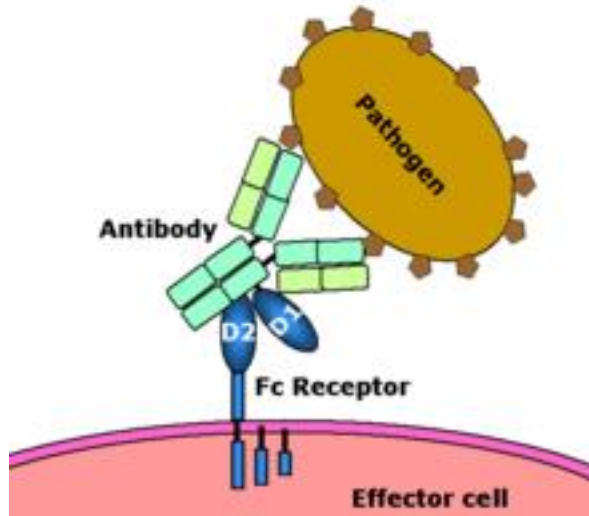
### 1.3.2 Τοπολογία και τύποι των FcγR

Ο FcγRI βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στα μακροφάγα και στα δενδριτικά κύτταρα (DC). Δεσμεύει με πολύ υψηλή συγγένεια τις IgG1 και IgG3, ισχυρότερα από τους υπόλοιπους υποδοχείς. Η βασική του λειτουργία είναι να ενεργοποιεί την φαγοκυττάρωση. Στον πλακούντα συναντάται μόνο στα κύτταρα Hofbauer τα οποία έχουν ομοιότητες με τα μακροφάγα και όχι στους τροφοβλάστες.

Ο FcγRII και III εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερη συγγένεια για την IgG. Επίσης εντοπίζονται σε περισσότερα είδη κυττάρων. Βρίσκονται στα μακροφάγα, στα

ουδετερόφιλα, τα Β λεμφοκύτταρα, στα αιμοπετάλια, ενώ στον πλακούντα βρίσκονται στα Hofbauer κύτταρα, στα κύτταρα του εμβρυϊκού ενδοθηλίου ενώ ο FcγRIII βρίσκεται και στους τροφοβλάστες. Η δέσμευση των υποδοχέων II και III είναι για τις IgG1, 2a και 2b. Ο FcγRIII δεσμεύει με μεγαλύτερη συγγένεια τις IgG1 και IgG3 στον άνθρωπο και τις IgG1 και IgG2b στο ποντίκι (Bruhns, 2012).

Ο FcγII θεωρείται ο υποδοχέας που βρίσκεται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση στους τροφοβλάστες. Επίσης εντοπίζεται στα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα του ενδοθηλίου και τα ηπατοκύτταρα. Είναι μια



Εικόνα 1.9 Σχηματική αναπαράσταση της δέσμευσης IgG στον υποδοχέα FcγR.

πρωτεΐνη παρόμοια με αυτή των τάξης I αντιγόνων ιστοσυμβατότητας αλλά δεν μπορεί να ενεργοποιήσει το συμπλήρωμα. Είναι ο υποδοχέας ο οποίος είναι υπεύθυνος για την μεταφορά των IgG από την μητέρα στο έμβryo. Έχει συγγένεια με όλα τα είδη των IgG και η μέγιστη δέσμευση γίνεται σε pH 6.5.

Σε όλες τις περιπτώσεις των υποδοχέων η αλληλεπίδραση φαίνεται να γίνεται με την δέσμευση της IgG στο σημείο της CH2 περιοχής και της χαμηλότερης περιοχής του αρμού, με τον υποδοχέα. Αντίστοιχα η περιοχή CH3 δεν φαίνεται να έχει κάποιο ξεκάθαρο ρόλο στην δέσμευση ενώ το τμήμα των

υδατανθράκων φαίνεται πως επηρεάζει την κινητική της δέσμευσης χωρίς αυτό να σημαίνει πως είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με τους FcγR (Εικόνα 1.9)

## 1.4 Ανοσολογία της κύησης

Η κύηση θεωρείται ως το ανοσολογικό παράδοξο όπου μεταξύ αντιγονικά διαφορετικών ιστών, επικρατεί η φυσική ομοιότητα. Το έμβryo αποτελεί για την μητέρα ένα ημί – άλλο μόσχευμα εφ’ όσον προέρχεται από άτομο του ίδιου είδους, αλλά κατά το ήμισυ διαφορετικού γενετικού υπόβαθρου. Το ανοσολογικό σύστημα της μητέρας ενώ απορρίπτει κάθε άλλο πατρικής προέλευσης μόσχευμα προστατεύει το αλλογενετικό έμβryo (Bouma et al. 1996; Thellin et al. 2000). Κατά τη διάρκεια της κύησης, το ανοσολογικό σύστημα της μητέρας είναι πλήρως λειτουργικό ώστε να προστατεύεται από την εμφάνιση παθογόνων ή νεοπλασιών, ενώ παρατηρείται ειδική ανοχή έναντι του ημί – αλλογενετικού εμβρύου.

### 1.4.1 Πλακούντας

Ο πλακούντας παίζει το σημαντικότερο ρόλο στην ανάπτυξη και προστασία του εμβρύου, παρέχοντας τις κατάλληλες θρεπτικές ουσίες και δρώντας σαν προστατευτικό φίλτρο μεταξύ μητρικού και εμβρυϊκού οργανισμού. Επίσης, εκπέμπει σήματα στον οργανισμό της μητέρας προστατεύοντας το έμβρυο από το ανοσοποιητικό της σύστημα.

Τα πρώτα στάδια διαφοροποίησης των τροφοβλαστών πραγματοποιούνται στο στάδιο της βλαστοκύστης, πριν την εμφύτευση. Οι τροφοβλάστες είναι εξειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα που συμβάλλουν στο σχηματισμό του πλακούντα. Τα τροφοβλαστικά κύτταρα θα δώσουν γένεση στη κυτοτροφοβλάστη και συγγκιοτροφοβλάστη. Στη δεύτερη δεν παρατηρείται διαίρεση του κυτταροπλάσματος αλλά μόνο των πυρήνων (συγκύτιο). Στη συνέχεια το συγκύτιο προσκολλάται στο ενδομήτριο και διεισδύει σε αυτό με την βοήθεια πρωτεολυτικών ενζύμων που εκκρίνονται από την τροφοβλάστη. Αυτή η πρωτεολυτική δράση επιφέρει την επαναδιάταξη των θέσεων των αιμοφόρων αγγείων, ώστε αυτά να έρθουν σε επαφή με τα αιμοφόρα αγγεία του εμβρύου. Το ολοκληρωμένο όργανο που σχηματίζεται ονομάζεται χόριο και προέρχεται αποκλειστικά από το έμβρυο. Στη συνέχεια το χόριο συντήκεται με το τοίχωμα της μήτρας και σχηματίζει τον πλακούντα.

Η ωρίμανση του πλακούντα στο ποντίκι ολοκληρώνεται την 10<sup>η</sup> μέρα κύησης και στο στάδιο αυτό αποτελείται από 3 κύριες στιβάδες. Την εξωτερική στιβάδα των γιγάντιων τροφοβλαστών (layer of trophoblast giant cells), μια ενδιάμεση, την στιβάδα του σπογγιοτροφοβλάστη (spongiotrophoblast layer) που επικοινωνεί με το έμβρυο και αποτελείται από κύτταρα εμβρυϊκής και μητρικής προέλευσης και τέλος μια εσωτερική στιβάδα, αυτή του λαβυρίνθου (Labyrinth layer) που επικοινωνεί με το έμβρυο και αποτελείται μόνο από κύτταρα εμβρυϊκής προέλευσης (Cross et al. 2002; Hemberger and Cross, 2001).

Η στιβάδα του λαβυρίνθου περιέχει κύτταρα τροφοβλάστη αλλά και μεσοδερμικής προέλευσης τα οποία υφίστανται διαδοχικές διαιρέσεις και μορφογενετικές αλλαγές για να σχηματιστεί τελικά η μεγάλη επιφάνεια του πλακούντα μέσω της οποίας πραγματοποιείται η ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών και αερίων. Η τροφοβλαστική περιοχή αποτελείται κυρίως από συγγκιοτροφοβλάστες και σε μικρότερο βαθμό από μικρά μονοπύρνα κύτταρα και γιγάντιους τροφοβλάστες. Τα κύτταρα του μεσοδέρματος, όπως και τα στρωματικά κύτταρα (stromal cells) θα δώσουν τα αιμοφόρα αγγεία του πλακούντα.

### 1.4.2 Μηχανισμοί της ανοχής κατά την κύηση

Οι μηχανισμοί που προστατεύουν το έμβρυο από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας περιλαμβάνουν την έκφραση μη κλασικών μορίων του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC) από τα κύτταρα των τροφοβλαστών, καταβολισμό της τρυπτοφάνης από το ένζυμο IDO, απόπτωση των T κυττάρων, ισορροπία T βοηθών όπως επίσης την αδυναμία λύσης από το συμπλήρωμα. Επίσης φαίνεται να παίζουν ρόλο τα ρυθμιστικά T κύτταρα.

Στους συγγκιωτροφοβλάστες εμφανίζεται συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης μορίων του MHC. Τα HLA – A (Human Leukocyte Antigen) και HLA – B μόρια δεν εκφράζονται ενώ τα HLA – C εκφράζονται σε πολύ μικρές ποσότητες. Αντίθετα εμφανίζεται το μη κλασικό HLA – G. Τα μόρια αυτά δεσμεύονται στα NK (Natural Killers) κύτταρα εμποδίζοντας της κυτταροτοξικότητα τους κάτι που φαίνεται να συμβάλλει στην ανάπτυξη ανοχής (Kovats et al. 1990).

Η indoleamine 2,3 – dioxygenase (IDO) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταβολίζει την τρυπτοφάνη. Το ένζυμο συντίθεται και εκκρίνεται από τους τροφοβλάστες και κρίνεται απαραίτητο για την επιτυχή έκβαση της εγκυμοσύνης στο ποντίκι. Πιστεύεται ότι το ένζυμο καταβολίζει την τρυπτοφάνη των κυττάρων του ανοσοποιητικού της μητέρας, που βρίσκονται στην περιοχή του πλακούντα, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της τρυπτοφάνης και συνεπώς την καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης (Munn et al. 1998).

Η ισορροπία των  $T_{H1}$  και  $T_{H2}$  στον πλακούντα έχει μελετηθεί ευρέως και δείχνουν ότι η ενεργοποίηση τύπου  $T_{H1}$  οδηγεί κυρίως σε φλεγμονώδη απόκριση και συνήθως ακολουθείται από αποβολή του εμβρύου ενώ η επαγωγή  $T_{H2}$  είναι συμβατή με την επιβίωση του εμβρύου. Εκτός από τα T λεμφοκύτταρα οι συγγκιωτροφοβλάστες και οι κυτοτροφοβλάστες είναι ικανοί να παράγουν κυτοκίνες ρυθμίζοντας τον λόγο  $T_{H1}/T_{H2}$  προς την παραγωγή  $T_{H2}$  (Piccini et al. 1998; Raghupathy, 1997; Wegmann et al. 1993).

Πολυάριθμες ορμόνες και κυτοκίνες παράγονται ή ενεργοποιούνται στον πλακούντα. Επιδρούν στους τροφοβλάστες με διάφορους τρόπους και κάποιες από αυτές ρυθμίζουν ανοσολογικές αποκρίσεις. Από τις πιο σημαντικές ορμόνες είναι η προγεστερόνη, η οποία παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τον πλακούντα και είναι ικανή να εξασθενίσει την ανοσολογική απόκριση όπως και να μετατοπίσει την ισορροπία  $T_{H1}/T_{H2}$  προς την παραγωγή  $T_{H2}$  (Siiteri and Stites, 1982).

Τέλος, ένας ακόμα λόγος της ανοχής είναι και η μειωμένη ενεργότητα του συμπληρώματος. Το συμπλήρωμα είναι ένας συνηθισμένος τρόπος αντιμετώπισης ξένων και καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένου ισοτύπου αντισώματα, συνδέονται με το μεμβρανικό αντιγόνο τους και ξεκινούν έναν καταρράκτη διαδοχικών αντιδράσεων του συμπληρώματος. Σχηματίζεται έτσι το μεμβρανικό σύστημα επίθεσης, δημιουργώντας ανοίγματα στην επιφάνεια των κυττάρων – στόχων που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Το συμπλήρωμα θα μπορούσε να ενεργοποιηθεί από την αναγνώριση των πατρικών αντιγόνων στην επιφάνεια των συγγκιωτροφοβλαστών με αποτέλεσμα τον θάνατό τους. Ειδικά μόρια μπορούν και εμποδίζουν το παραπάνω φαινόμενο, είτε αδρανοποιώντας τις θέσεις πρόσδεσης του συμπληρώματος στα αντισώματα, είτε αυξάνοντας τον ρυθμό αποδιάταξης του συστήματος.

### **1.4.3 Χυμική και κυτταρική ανοσία κατά την κύηση**

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ανιχνεύονται φυσιολογικά επίπεδα των ανοσοσφαιρινών IgG, IgM και IgA. Επίσης φυσιολογική είναι και η ανοσολογική απόκριση της μητέρας, η παραγωγή αντισωμάτων, τα επίπεδα των πρωτεϊνών του συμπληρώματος και η ενεργότητα του συμπλόκου του συμπληρώματος. Η μητρικές IgG είναι οι κύριες

ανοσοσφαιρίνες που εντοπίζονται στο έμβρυο όταν αυτό βρίσκεται στη μήτρα αλλά και στην νεογνική του ηλικία (Garcia – Gonzalez et al. 1999). Συνεπώς φαίνεται ότι η χυμική ανοσία διατηρείται σε όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Τόσο ο αριθμός των Β κυττάρων, όσο και ο αριθμός των περιφερικών Τ λεμφοκυττάρων των εγκύων γυναικών δεν εμφανίζει διακυμάνσεις μεταξύ των τριών τριμήνων της κύησης (Adelsberg, 1985).

Η κυτταρική ανοσία φαίνεται να διατηρείται επίσης σε φυσιολογικά επίπεδα κατά την διάρκεια της κύησης, παρ' όλο που τα λευκοκύτταρα του ορού εμφανίζουν μειωμένη κυτταροτοξικότητα ενάντια στα εμβρυικά κύτταρα. Η επιλεκτική αυτή καταστολή της κυτταρικής ανοσίας είναι αποτέλεσμα απόκρισης σε εμβρυικά αντιγόνα. Γενικά μια φυσιολογική εγκυμοσύνη χαρακτηρίζεται τόσο από κυτταρικής όσο και χυμική αντιπατρική ανοσολογικής απόκρισης (Raghupathy, 1997).

#### 1.4.4 Κυτοκίνες στην εγκυμοσύνη

Είναι αποδεκτό πως για την επιτυχή έκβαση μιας εγκυμοσύνης πρέπει να υπάρχει αλληλεπίδραση μηχανισμών τόσο της κυτταρικής όσο και της χυμικής ανοσίας. Συνδυετικό κρίκο των δύο παραπάνω τύπων ανοσολογικής απόκρισης, αποτελούν οι κυτοκίνες. Αυτές παράγονται και εκκρίνονται από τα πρώτα στάδια μιας ανοσολογικής διέγερσης και συμμετέχουν ενεργά τόσο στην κυτταρική όσο και στην χυμική ανοσία. Εφόσον όπως αναφέρθηκε παραπάνω η εγκυμοσύνη απαιτεί την ισορροπία  $T_{H1}/T_{H2}$  προς την παραγωγή  $T_{H2}$  αυτό σημαίνει πως κυτοκίνες που ανήκουν σε αυτή τη κατηγορία όπως είναι η IL – 3, IL – 10, GM – CSF έχουν προστατευτικό ρόλο για την εγκυμοσύνη. Επίσης υπάρχουν και ενδείξεις ότι η IL – 15 παράγεται στην εγκυμοσύνη κατά την διαφοροποίηση των τροφοβλαστών (Ye et al. 1996).

#### 1.4.5 Καθ' ἔξιν αποβολές

Ως αποβολή ορίζεται ο φυσικός θάνατος του εμβρύου στην μήτρα. Συμβαίνει σε στάδια αρχικά της εγκυμοσύνης ενώ το ποσοστό των αποβολών σε γυναίκες που γνωρίζουν ότι κυοφορούν είναι 15 – 20%. Το πιο συχνό σύμπτωμα για τις αποβολές είναι η κολπική αιμορραγία. Καθ' ἔξιν αποβολή είναι η εμφάνιση τριών ή περισσότερων αποβολών σε συνεχόμενες εγκυμοσύνες οι οποίες εμφανίζονται πριν την 24<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης. Περίπου το 1% των ζευγαριών τα οποία προσπαθούν να αποκτήσουν παιδιά επηρεάζονται από τις καθ' ἔξιν αποβολές

Πρόωρες εμβρυικές αποβολές μπορεί να οφείλονται σε ανατομικές παθήσεις όπως κακός σχηματισμός της μήτρας ή του τραχήλου, σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως μεταθέσεις και ανευπλοϊδίες, παθολογικά προβλήματα όπως υποθυρεοειδισμός και θρομβοφιλία. Εφόσον δεν συντρέχουν ανατομικοί, χρωμοσωμικοί ή παθολογικοί λόγοι, οι απόρριψη του εμβρύου χαρακτηρίζεται ως καθ' ἔξιν και θεωρείται ότι οφείλεται σε ανοσολογικούς παράγοντες ανοσοδιέγερσης ή ανοσοκαταστολής του μητρικού οργανισμού ενάντια στα πατρικά αντιγόνα.

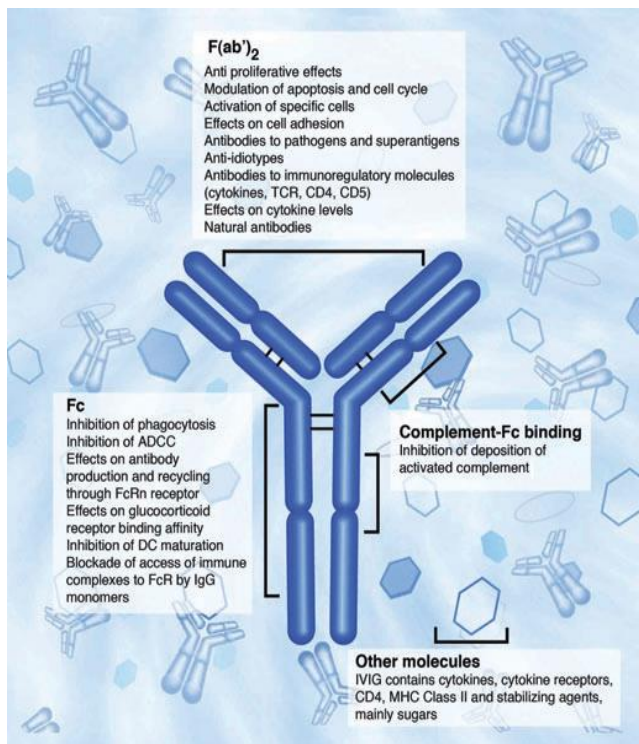


## 1.5 Ενδοφλέβιες ανοσοσφαιρίνες (IVIG)

Η IVIG (Intravenous Immunoglobulin) είναι ένα αιματολογικό προϊόν το οποίο παράγεται από τον ορό μεταξύ 1000 και 15000 δοτών ανά παρτίδα. Ο λόγος για την ύπαρξη τόσων δοτών είναι η διασφάλιση της ποικιλομορφίας όλων των πιθανών ισοτύπων αλλά και η μικρή ποσότητα IgG που μπορεί να απομονωθεί από κάθε δότη. Η βασική εφαρμογή του σκευάσματος είναι για ασθενείς με ανοσολογικές ανεπάρκειες και για αυτοάνοσα νοσήματα. Για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα για τις ανοσοσφαιρίνες του οργανισμού σε μια δόση της τάξης των 200 – 400mg/kg μάζας σώματος περίπου ανά 4 εβδομάδες. Στις περιπτώσεις αυτοάνοσων νοσημάτων η χορήγηση είναι ακόμα μεγαλύτερη φτάνοντας τα 1 – 2g/kg μάζας σώματος τον μήνα (Joles et al. 2005).

Το κόστος της θεραπείας είναι πολύ μεγάλο καθώς στην Ελλάδα τα 5gr κοστίζουν περί τα 300€. Στις περιπτώσεις χορήγησης σε καθ' ἑξιν αποβολές χρειάζεται περίπου δοσολογία των 0.3 – 0.5mg/kg μάζας σώματος με συνολική απαίτηση περίπου 15 – 20 gr το μήνα για κάθε θεραπεία κάτι που κοστολογείται περίπου στα 1000€ τον μήνα.

### 1.5.1 Μηχανισμός δράσης των IVIG



**Εικόνα 1.10 Δράσεις της IVIG ανάλογα με το πιθανό μηχανισμό δράσης του σκευάσματος (Janes et al.)**

μέσω του Fab τμήματος επίσης να λειτουργεί προστατευτικά για τον κυτταρικό θάνατο σε περιπτώσεις επιδερμικής νεκρόλυσης (TEN). Σε περιπτώσεις λευχαιμικών λευκοκυττάρων και μονοκυττάρων η IVIG επάγει την απόπτωση. Η ύπαρξη επίσης

Ο μηχανισμός δράσης της IVIG είναι πολύπλοκος και όχι ξεκάθαρος (Εικόνα 1.10). Ο κυρίαρχος μηχανισμός σε κάθε περίπτωση φαίνεται να διαφέρει και εξαρτάται και από την δοσολογία αλλά κυριότερα εξαρτάται από το είδος της ασθένειας για την οποία χορηγείται. Επειδή η IgG ως μόριο έχει δύο λειτουργικές επικράτειες η δράση του μπορεί να είναι είτε συνεργιακή είτε αποτέλεσμα της Fab ή της Fc περιοχής.

Η Fab περιοχή εμφανίζεται ο κύριος μηχανισμός δράσης όταν πρόκειται για αντιγόνο-ειδική αναγνώριση στον οργανισμό. Φαίνεται να έχει ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό των T

λεμφοκυττάρων όταν αυτός επάγεται από μιτογόνα. Φαίνεται

πολλών διαφορετικών αντισωμάτων (λόγο του πλήθους των δοτών) προστατεύει από διάφορες μολύνσεις. Σε *in vitro* δοκιμές δείχτηκε πως επάγεται η διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων σε ασθενείς με αγαμμασφαιριναιμία οι οποίοι δεν έχουν Β λεμφοκύτταρα.

Επίσης μέσω του Fc υποδοχέα υπάρχουν διάφορες δράσεις για την IVIG. Η δέσμευση στους FcγR έχει δράση είτε ανασταλτική (FcγRII) ή επαγωγική (FcγRI και FcγRIII). Σε αυτές τις περιπτώσεις η δράση μπορεί να είναι ανταγωνιστική, όπου η IVIG συναγωνίζεται τις IgG του οργανισμού και δεσμεύεται στα μακροφάγα σε περιπτώσεις αυτοάνοσων νοσημάτων. Επίσης η δράση της μπορεί να είναι επαγωγική σε περιπτώσεις όπου υπάρχει έλλειψη IgG ή ελλιπής δέσμευσης αυτής στα κύτταρα στόχους.

Μέσω του Fc μπορεί να γίνει και η ενεργοποίηση του συμπληρώματος από τις IVIG. Αυτό έχει εμφανή αποτελέσματα σε μικροαγγειοπάθειες οι οποίες εξαρτώνται από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Επίσης μικρές δόσεις IVIG φαίνεται να ενεργοποιούν τόσο το κλασικό αλλά όσο και το μη κλασικό μονοπάτι, κάτι που υποδηλώνει πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση.

### **1.5.2 Εφαρμογές και παρενέργειες των IVIGs**

Οι IVIGs λόγω των πολλαπλών δράσεων τους, έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Βάσει των κανονισμών της FDA οι εγκεκριμένες περιπτώσεις στις οποίες μπορεί να χορηγηθεί είναι περιπτώσεις, αλλογενετικής μεταμόσχευσης μυελού των οστών, χρόνια λεμφοκυτταρική αναιμία, σε περίπου 150 περιπτώσεις αυτοάνοσων νοσημάτων, σε παιδιατρικές περιπτώσεις HIV, στην νόσο Kawasaki και σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης νεφρού είτε σε δέκτη με υψηλά αντισώματα ή σε περιπτώσεις μη συμβατής ABO ομάδας αίματος.

Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις στις οποίες η χρήση της δεν είναι εγκεκριμένη πλήρως καθότι δεν υπάρχουν ασφαλή συμπεράσματα και αποτελέσματα, αλλά χορηγείται όπως οι καθ' ἑξίν αποβολές, ο αυτισμός, η νόσος Alzheimer, το σύνδρομο Guillain – Barre, η σκλήρυνση κατά πλάκας, ο Λύκος και πολλές άλλες περιπτώσεις.

Παρότι οι IVIGs χορηγούνται σε πολύ συχνές περιπτώσεις υπάρχουν παρενέργειες κυρίως σε χρόνια χρήση, οι οποίες περιλαμβάνουν, πονοκεφάλους, δερματίτιδες, αλλεργικές αντιδράσεις, τραυματισμό του νεφρού, ασηπτική μηνιγγίτιδα και πνευμονικό οίδημα.

## 2. Σκοπός της εργασίας

---

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η απομόνωση, παραγωγή και ταυτοποίηση και έλεγχος λειτουργικότητας του Fc τμήματος IgG ανοσοσφαιρινών που απομονώνονται από ορό ποντικού. Ο έλεγχος λειτουργικότητας του ανακτηθέντος Fc τμήματος των IgG ανοσοσφαιρινών περιλαμβάνει τη δράση του στον πολλαπλασιασμό σπληνικών μακροφάγων καθώς και τη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου. Η επίδρασή του ανακτηθέντος Fc τμήματος σε πλακουντικά κύτταρα θα μπορέσει να υποδείξει το ρόλο του στην ανάπτυξη του πλακούντα και συνεπώς τη προστασία του εμβρύου. Για το λόγο αυτό ελέγχεται τόσο ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, όσο και η παραγωγή των κυτοκινών IL – 3, IL – 10, IL – 15 και GM – CSF οι οποίες ενεργούν θετικά στη προστασία του εμβρύου. Για την παραγωγή επαρκών ποσοτήτων για in vivo χορήγηση των Fc τμημάτων στόχος γίνεται προσπάθεια κατασκευής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.



### 3. Υλικά και Μέθοδοι

---

#### Ποντίκια και συλλογή ορού

Τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στο πειραματικό στέλεχος BALB/c. Στεγάζονται στο ζωοτροφείο του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο με σταθερή θερμοκρασία και κύκλο φωτός 12 ωρών. Η συλλογή του αίματος γίνεται με ολική αφαίμαξη. Για τις διαδικασίες όπου απαιτήθηκαν κύτταρα ιστού, αφαιρέθηκε από αρσενικά ποντίκια ο σπλήνας, ενώ από τα θηλυκά στην 12<sup>η</sup> μέρα εγκυμοσύνης αφαιρούνταν ο πλακούντας και ο φθαρτός των εμβρύων. Σε όλες τις διαδικασίες χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα εργαλεία. Για την συλλογή του ορού το αίμα επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου (rt) για 30 λεπτά και στην συνέχεια στους 4° C για άλλα 30. Ο ορός στην συνέχεια συλλέγεται μετά από φυγοκέντρηση 3' στις 3000rpm και φυλάσσεται στους -20° C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

#### Ανοσοκατακρήμνιση

Η ανοσοκατακρήμνιση είναι μέθοδος που χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών από ορούς, υπερκείμενα ή εκχυλίσματα κυττάρων και βασίζεται στην ειδικότητα των αντισωμάτων για διάφορα αντιγόνα (επιτόπους πρωτεϊνών). Γίνεται με την χρήση μαγνητικών σφαιριδίων τα οποία έχουν ακινητοποιημένο κάποιο αντίσωμα με ομοιοπολικό δεσμό. Στην συγκεκριμένη εργασία η απομόνωση των IgG μορίων έγινε άμεσα χωρίς την χρήση κάποιου αντισώματος καθώς τα σφαιρίδια είχαν ήδη ακινητοποιημένο anti – IgG.

#### Υλικά:

- Μαγνητικά σφαιρίδια Dynabeads M – 280, sheep – anti mouse IgG.
- PBS buffer 1X
- NaCl 2M

#### Διαδικασία

- Τα σφαιρίδια πλένονται 2 φορές με 1ml PBS 1X για 10' με την χρήση μαγνήτη.
- Στην συνέχεια γίνεται προσθήκη 1ml δείγματος (500μl ορός + 500μl PBS 1X) και επώαση για 2 ώρες στους 4° C υπό ανάδευση. Σε αυτό το στάδιο δεσμεύεται η πρωτεΐνη στα σφαιρίδια.
- Μετά το τέλος της επώασης, τα σφαιρίδια πλένονται 2 φορές με 1ml PBS 1X για την απομάκρυνση των μη ειδικά προσδεμένων μορίων.
- Στην συνέχεια προστίθεται 1ml NaCl 2M και επώαση σε rt για 20'. Στο βήμα αυτό η πρωτεΐνη ελευθερώνεται στο διάλυμα NaCl.
- Το υπερκείμενο συλλέγεται σε Eppendorf.

- Τα σφαιρίδια ξεπλένονται 2 φορές με 1ml PBS 1X και φυλάσσονται σε 1ml PBS 1X για την επόμενη χρήση.

### ELISA (Enzyme – linked immunosorbent assay)

Η ELISA είναι μια ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών σε διαλύματα και κυτταρικές επιφάνειες. Έχει εύρος ανίχνευσης το οποίο ξεκινάει από ποσότητα πρωτεΐνης της τάξεως των 3pg/ml. Υπάρχουν 3 διαφοροποιήσεις τις μεθόδου με την indirect ELISA να είναι αυτή που αναφέρεται.

### Υλικά:

- Coating Buffer: 0.05M NaHCO<sub>3</sub>, 0.05M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.6
- Washing Buffer: PBS 1X – Tween 20% 0.05%
- Blocking Buffer: PBS 1X – BSA (Bovine Serum Albumin) 2%
- Ab Buffer: PBS 1X – BSA 0.1%
- Υπόστρωμα – Χρωμογόνο: TMB substrate, Peroxidase Solution H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M
- 96 – flat bottom plate
- Elisa Reader

### Αντισώματα:

- 1<sup>ο</sup> αντίσωμα:
  - Rat – anti mouse IL – 3
  - Rat – anti mouse IL – 10
  - Rat – anti mouse GM – CSF
  - Goat – anti mouse IL – 15
- 2<sup>ο</sup> αντίσωμα:
  - Anti – Mouse IgG Peroxidase
  - Anti – Rat IgG Peroxidase
  - Anti – Goat IgG Peroxidase

### Διαδικασία

- Τα δείγματα στρώθηκαν στην ELISA plate σε επιλεγμένη αραιώση (1:1 για τα υπερκείμενα και 1/10, 1/20, 1/40 για διαγνωστικό έλεγχο) με coating buffer. Για υπερκείμενα καλλιέργειας έγιναν 3 επαναλήψεις ανά δείγμα ενώ για τον έλεγχο 2 επαναλήψεις ανά δείγμα. Τελικός όγκος 100μl/well. Τα δείγματα επώζονται στους 4° C για 14 με 18 ώρες.
- Τα δείγματα πλένονται 3 φορές με Washing buffer. Τελικός όγκος 200μl/well

- Στη συνέχεια στρώνεται το blocking buffer σε τελικό όγκο 200μl/well. Με τον τρόπο αυτό παρεμποδίζεται η μη ειδική πρόσδεση πρωτεϊνών στα αντισώματα. Τα δείγματα επωάζονται για 2 ώρες.
- Τα δείγματα πλένονται 3 φορές με Washing buffer. Τελικός όγκος 200μl/well
- Στρώνεται το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα σε κατάλληλη συγκέντρωση (1/1000) το οποίο είναι ειδικό για την υπό μελέτη πρωτεΐνη. Το αντίσωμα διαλύεται σε Ab buffer. Τελικός όγκος 100μl/well. Τα δείγματα επωάζονται για 1 ώρα και 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τα δείγματα πλένονται 3 φορές με Washing buffer. Τελικός όγκος 200μl/well
- Στρώνεται το δεύτερο αντίσωμα σε κατάλληλη συγκέντρωση (1/5000) το οποίο είναι διαλυμένο σε Ab Buffer. Τελικός όγκος 100μl/well. Τα δείγματα επωάζονται για 1 ώρα στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τα δείγματα πλένονται 3 φορές με Washing buffer. Τελικός όγκος 200μl/well
- Προστίθεται το διάλυμα χρωμογόνου - υποστρώματος σε αναλογία 1:1. Τελικός όγκος 100μl/well.
- Όταν εμφανιστεί το χαρακτηριστικό χρώμα της αντίδρασης, ολοκληρώνεται με την προσθήκη H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Τελικός όγκος 50μl/well.
- Τα αποτελέσματα μετριοούνται σε ELISA reader στα 450nm.

#### Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης (SDS – PAGE)

Με την μέθοδο αυτή γίνεται διαχωρισμός και αναγνώριση των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Στο δείγμα ασκείται ηλεκτρικό φορτίο και έτσι οι πρωτεΐνες μετακινούνται στο gel ανάλογα με το μέγεθός τους. Χρησιμοποιούνται αποδιατακτικές συνθήκες για να μην διατηρηθούν τυχόν σύμπλοκα και παρεμποδίσουν την κίνηση στο gel.

#### Υλικά:

##### **Για τα δείγματα:**

*5X loading buffer:* 0.0625M Tris – HCl, 5% β – mercaptethanol, 2% SDS, 20% glycerol, 0.1% Bromophenol Blue. Λόγω εξάτμισης η β – mercaptethanol δεν θα πρέπει να προστίθεται πολύ καιρό πριν την χρήση του loading buffer.

##### **Για την ηλεκτροφόρηση:**

1X running buffer το οποίο είτε φτιάχνεται άμεσα είτε ως 10X και αραιώνεται στην συνέχεια.

10X running buffer: 0.250M Tris – HCl, 1.92M glycine, 1% SDS

##### **Για το gel:**

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Running gel 12% (10 ml)</b>	<b>Stacking gel 4% (5ml)</b>
dH <sub>2</sub> O	3,35ml	3ml

Acrylamide (30% Acrylamide)	4ml	650μl
SDS (10% SDS σε dH2O)	100μl	50μl
APS (10% APS σε dH2O)	50μl	67μl
Tris - HCl	2,5ml (1,5M Tris-HCl, pH 8,8)	1,25ml (0,5M Tris-HCl, pH 6)
TEMED	5μl	5μl

### Διαδικασία

- Τοποθετείται στην συσκευή το running gel και καλύπτεται με αιθανόλη μέχρι να πήξει. Στην συνέχεια προστίθεται το stacking gel και το ειδικό χτενάκι για την δημιουργία των wells όπου θα τοποθετηθεί το δείγμα
- Τα δείγματα ετοιμάζονται στον κατάλληλο όγκο μαζί με 5X loading buffer (με τέτοιο τρόπο ώστε το loading buffer να αποτελεί το 1/5 του τελικού όγκου). Η παρουσία του SDS ευθυγραμμίζει τις αλυσίδες της πρωτεΐνης και τις φορτίζει αρνητικά, ενώ η β – mercaptoethanol αποδιατάσσει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Προαιρετικά για καλύτερη αποδιάταξη του δείγματος μπορεί να γίνει θέρμανση στους 95° C για 10 λεπτά.
- Τα δείγματα φορτώνονται στο gel μαζί με molecular weight (MW) marker.
- Μετά το τέλος της διαδικασίας γίνεται χρώση του running gel

### Χρώση Αργύρου (Silver Stain)

Η χρώση αργύρου είναι ένας ευαίσθητος τρόπος για την ανίχνευση πρωτεϊνών μέσα σε ένα gel πολυακρυλαμίδης. Σε αντίθεση με την πιο κλασική μέθοδο χρώσης την Coomassie είναι πολύ πιο ευαίσθητη εντοπίζοντας μέχρι και 1ng πρωτεΐνης στο δείγμα.

### Υλικά

- Μεθανόλη
- 5%, 1% CH<sub>3</sub>COOH
- Sodium Trisulfate (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>•5H<sub>2</sub>O) 0.02%
- AgNO<sub>3</sub> 0.1%
- Διάλυμα εμφάνισης (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, 0.04% Φορμαλδεΰδη)

Τα διαλύματα όλα γίνονται σε όγκο 50ml.

### Διαδικασία

- Το gel φιξάρεται σε 50% Μεθανόλη, 5% CH<sub>3</sub>COOH για τουλάχιστον 20 λεπτά υπό ανάδευση
- Ξεπλένεται για 10' σε 50% Μεθανόλη

- Γίνεται ενυδάτωση με H<sub>2</sub>O 2 φορές για 10' υπό ανάδευση
- Το gel ευαισθητοποιείται σε sodium Trisulfate για 1' υπό ανάδευση
- Γίνεται πλύσιμο με H<sub>2</sub>O 2 φορές για 1' υπό ανάδευση
- Το gel βάφεται με AgNO<sub>3</sub> (pre – chilled) για 20' στους 4° C με ανάδευση.
- Γίνεται πλύσιμο με H<sub>2</sub>O 2 φορές για 1' υπό ανάδευση
- Γίνεται εμφάνιση με το διάλυμα εμφάνισης
- Η διαδικασία σταματάει με 5% CH<sub>3</sub>COOH
- Το gel διατηρείται σε 1% CH<sub>3</sub>COOH

### Περιορισμένη Θρυψινόλυση

Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο το οποίο έχει την ικανότητα να υδρολύει τον πεπτιδικό δεσμό στο καρβοξυτελικό άκρο, μεταξύ Λυσίνης και Αργινίνης εκτός αν ακολουθεί προλίνη. Η βέλτιστες συνθήκες δράσης είναι οι 37°C με pH 7.5 – 8.5. Η θρυψίνη θα κόψει όλους τους δεσμούς στις θέσεις δράσης της σε ένα μόριο μέχρι να μην υπάρχουν άλλοι ενώ και σε αυτήν την περίπτωση μπορεί να κόψει τον εαυτό της. (Αυτόλυση). Γι' αυτό το λόγο πρέπει να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες θερμοκρασίας, χρόνου και αναλογία δείγματος – ενζύμου ώστε κοπεί το επιθυμητό τμήμα. Το κάθε πρωτόκολλο περιορισμένη θρυψινόλυσης διαφέρει ανάλογα με την πρωτεΐνη.

### Υλικά

- IgG απομονωμένη από ορό ποντικού
- Roche Trypsin Sequencing Grade
- PMSF 100mM

### Διαδικασία

- Στην υπό κόψιμο ποσότητα IgG προστίθεται θρυψίνη σε αναλογία 1/200
- Τα δείγματα επωάζονται σε incubator στους 37° C για τα υπό μελέτη χρονικά διαστήματα.
- Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη PMSF 100mM σε συνολική αραιώση 1/10
- Ακολουθεί απομόνωση με την χρήση μαγνητικών σφαιριδίων για να απομονωθεί το Fc τμήμα της IgG.
- Τα άκοπα τμήματα της IgG απομακρύνονται με την χρήση φίλτρου 100K cut – off.
- Ελέγχεται το απομονωμένο τμήμα για την ύπαρξη Fc τμήματος με SDS – PAGE και ELISA

### Έλεγχος πολλαπλασιασμού κυττάρων με ραδιενεργή θυμιδίνη

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού σε έναν κυτταρικό πληθυσμό μετρώντας την ραδιενεργή θυμιδίνη που θα προσλάβουν τα κύτταρα κατά την διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης τους.

#### Υλικά

- Θρεπτικά μέσα RPMI και DMEM (10% FBS, 1% pen – strep)
- 96 – V bottom plate sterile
- Ραδιενεργή θυμιδίνη ( $^3\text{H}$ ) TdR (INC, 35Ci/mmol, 1mCi/ml)
- Φίλτρα κυτταρίνης (Scatron filtre MAT)
- Συλλέκτη κυττάρων Tirectek Cell Harvester, Flow Laboratories
- Σπινθηριστικό υγρό (τολουένιο Chromasol Sigma-Aldrich)
- Μετρητής β-ακτινοβολίας LSI701 Beckman UK.

#### Διαδικασία

- Μετά την συλλογή των κυττάρων, μετρούνται με την χρήση αιματοκυτταρόμετρου.
- Γίνεται φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 6΄
- Τα κύτταρα αραιώνονται σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου ώστε να υπάρχουν 2 εκατομμύρια κύτταρα/ml.
- Τα δείγματα στρώνονται σε στην Plate σε τριπλέτες. Τελικός όγκος 100μl/well και 200.000 κύτταρα/ well.
- Στην τριπλέτα control όπου υπάρχουν μόνο κύτταρα συμπληρώνεται θρεπτικό μέσο μέχρι τα 200μl. Στις τριπλέτες του υπό μελέτη παράγονται προστίθεται ο παράγοντας στην κατάλληλη συγκέντρωση και στην συνέχεια θρεπτικό μέσο μέχρι 200μl τελικό όγκο.
- Γίνεται επώαση στους 37° C 24 (για διήμερη καλλιέργεια) ή 72 (για τετραήμερη καλλιέργεια) ώρες.
- Μετά το τέλος των 24 ή των 72 ωρών προστίθεται 1μCi ραδιενεργής θυμιδίνης σε κάθε πηγαδάκι και ακολουθεί επώαση για 18 ώρες.
- Τα κύτταρα μεταφέρονται σε φίλτρα με την χρήση του συλλέκτη κυττάρων και τοποθετούνται σε δοχεία που περιέχουν 4ml σπινθηριστικού υγρού.
- Οι κρούσεις καταγράφονται στον μετρητή.

#### Ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός είναι η μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντοπισμό μιας υπό μελέτης ουσίας σε ιστούς ή κύτταρα.

## Υλικά

- PBS 1X, pH 7.4
- Blocking Buffer: PBS – BSA 3%
- Ab solution: PBS – BSA 1%
- FACScan (Becton Dickinson)

## Διαδικασία

- Ο κυτταρικός πληθυσμός χωρίζεται (συνήθως σε Vee – Bottom Plates) και γίνεται πλύσιμο 2 φορές με PBS 1X. Ανάμεσα στα πλυσίματα μεσολαβεί φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 6'.
- Προστίθεται blocking buffer και γίνεται επώαση για 30' σε θερμοκρασία δωματίου. Τελικός όγκος 200μl/well.
- Γίνεται πλύσιμο με PBS 1X, 3 φορές. Τελικός όγκος 200μl/well. Ανάμεσα στα πλυσίματα μεσολαβεί φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 6'. Το υπερκείμενο αφαιρείται ήπια.
- Προστίθεται το πρώτο αντίσωμα ή ο υπό μελέτη παράγοντας σε κατάλληλη αραιώση. Γίνεται επώαση σε Ab solution για 45'. Τελικός όγκος 100μl/well.
- Γίνεται πλύσιμο με PBS 1X, 3 φορές. Τελικός όγκος 200μl/well. Ανάμεσα στα πλυσίματα μεσολαβεί φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 6'. Το υπερκείμενο αφαιρείται ήπια.
- Εφόσον το πρώτο αντίσωμα δεν είναι φθορίζον, προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα το οποίο φθορίζει, σε συγκέντρωση κατάλληλη (1/2000 συνήθως) σε Ab solution. Γίνεται επώαση για 30'. Τελικός όγκος 100μl/well
- Γίνεται πλύσιμο με PBS 1X, 3 φορές. Τελικός όγκος 200μl/well. Ανάμεσα στα πλυσίματα μεσολαβεί φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 6'. Το υπερκείμενο αφαιρείται ήπια.
- Τα δείγματα επαναδιαλύονται σε 500μl όγκο και μετρούνται στο FACScan.
- Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και η ύπαρξη ή όχι φθορισμού γίνεται με το πρόγραμμα FCS Express V3.

## Δοκιμή Griess

Τα οξειδία του αζώτου(NO) είναι μοριακά ενδιάμεσα σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες του κυττάρου συμπεριλαμβανομένης και της ανοσοαπόκρισης. Ένας τρόπος εντοπισμού των οξειδίων του αζώτου είναι η δοκιμή Griess που βασίζεται στον φωτομετρικό εντοπισμό νιτρικών ιόντων τα οποία σχηματίζονται από την αυθόρμητη οξειδωση των NO υπό φυσιολογικές συνθήκες.

### Υλικά

- Διάλυμα A: N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NED), 0.1%
- Διάλυμα B: Sulfanilamide, 1% σε 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- Διάλυμα Γ: Nitrite standard solution. 0.1M Νιτρικό Νάτριο σε νερό
- 96 well flat – bottom plate

### Διαδικασία

- Στην plate προετοιμάζονται διαδοχικές αραιώσεις (1 – 100μM) από το διάλυμα Γ για την πρότυπη καμπύλη σε τριπλέτες
- Προστίθενται 50μl από το υπό έλεγχο δείγμα για οξειδίο του αζώτου σε τριπλέτες
- Προστίθενται 50μl διαλύματος Β και τα δείγματα επωάζονται για 5 – 10' σε θερμοκρασία δωματίου
- Προστίθενται 50μl διαλύματος Α και τα δείγματα επωάζονται για 5 – 10' σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Θα εμφανιστεί το μωβ χρώμα της αντίδρασης
- Η απορρόφηση μετρείται σε φωτόμετρο μέσα σε 30 λεπτά στα 520nm με 550nm το οποίο είναι το optimum απορρόφησης.
- Με τα δεδομένα κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη και στην συνέχεια υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις NO του δείγματος με βάση την εξίσωση που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη

### Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς N22

Η κυτταρική σειρά N22 έχει προκύψει από την σύντηξη σπληνοκυττάρων με sp2/0 κύτταρα μυελώματος. Στο υπερκείμενό τους παράγουν IgG όλων των υποτύπων καθώς και μονοκλωνικά αντισώματα για τα τάξης II διαλυτά του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας.

### Υλικά

- Παγωμένα κύτταρα N22 (-80° C) (1 εκατομμύριο κύτταρα σε 1ml)
- Θρεπτικό μέσο RPMI, 20% FBS, 10% FBS με 1% pen – strep
- Φλάσκες κυτταρικής καλλιέργειας 10ml
- Υδατόλουτρο



### Διαδικασία

- Τα παγωμένα κύτταρα μεταφέρονται σε υδατόλουτρο στους 37° C
- Προστίθενται 9ml RPMI, 20% FBS, 1% pen – strep
- Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 1200rpm για 6 λεπτά
- Προστίθενται 5ml RPMI, 20% FBS, 1% pen – strep
- Εκ νέου φυγοκέντρηση 1200rpm για 6 λεπτά.
- Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 5ml RPMI 20% FBS, 1% pen – strep και μεταφέρονται σε φλάσκα
- Η επώαση γίνεται σε Incubator στους 37° C.
- Μετά από 2 μέρες αφαιρείται το μισό θρεπτικό υλικό και προστίθεται καινούργιο RPMI 10% FBS.
- Όταν αναπτυχθεί ένας ικανός αριθμός περίπου 10 εκατομμύρια κύτταρα, τότε γίνεται RNA extraction

### Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα

Η απομόνωση ολικού RNA από τον κυτταρικό πληθυσμό N22, έγινε με βάση το πρωτόκολλο με την χρήση Trizol. Όλα τα tips και τα Eppendorf ήταν αποστειρωμένα όπως επίσης και το νερό που χρησιμοποιήθηκε. Η χρήση του δείγματος RNA έγινε στον απαγωγό όπως επίσης και με την χρήση πάγου. Η προφυλάξεις αυτές παίρνονται για να αποφευχθεί η δράση νουκλεασών που μπορεί να καταστρέψουν το RNA.

### Υλικά

- Trizol life technologies
- 100% ισοπροπανόλη
- 75% Αιθανόλη
- Χλωροφόρμιο
- PBS 1X

### Διαδικασία

- Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται (5 – 10·10<sup>6</sup> κύτταρα) στις 1200rpm για 6 λεπτά
- Ακολουθούν 2 πλυσίματα με 1ml PBS 1X
- Το κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 1200rpm για 6 λεπτά
- Προστίθεται 0.5ml Trizol για κάθε 5·10<sup>6</sup> κύτταρα
- Ακολουθεί έντονο πιπετάρισμα για την λύση των κυττάρων
- Το δείγμα επωάζεται για 5' σε θερμοκρασία δωματίου
- Προστίθενται 120μl χλωροφόρμιο
- Γίνεται ανάδευση για 15"
- Το δείγμα επωάζεται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15' στις 12000rpm

- Το υπερκείμενο το οποίο περιέχει το RNA βρίσκεται στην υδατική φάση. Αφαιρείται όλη η υδατική φάση με προσοχή για να μην μολυνθεί από στοιχεία της μεσόφασης και της οργανικής φάσης.
- Προστίθενται 250μl ισοπροπανόλη για κάθε 0.5ml Trizol για να κατακρημνιστεί το RNA.
- Το δείγμα επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15' σε 12000rpm
- Το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθεται στην πελέτα 0.5ml αιθανόλη
- Το μείγμα αναμειγνύεται και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10' στις 9500rpm
- Το υπερκείμενο αφαιρείται και η πελέτα αφήνεται να στεγνώσει στον απαγωγό
- Προστίθεται 50μl αποστειρωμένο νερό και γίνεται επαναδιάλυση της πελέτας.
- Το δείγμα επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 55° C για 15'
- Ακολουθεί μέτρηση στο nanodrop για την ποσοτικοποίηση του δείγματος
- Το δείγμα μπορεί να φυλαχθεί στους -80° C

### RT - PCR

Η PCR είναι η μέθοδος με την οποία πολλαπλασιάζεται σε πολλούς κύκλους ένα επιλεγμένο τμήμα γενετικού υλικού. Με την χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση είναι εφικτή η μετατροπή του RNA σε DNA και στην συνέχεια η περαιτέρω επιμήκυνση του επιθυμητού τμήματος. Χρησιμοποιήθηκε το QIAGEN OneStep RT-PCR Kit. Και σε αυτήν την περίπτωση απαιτούνται αποστειρωμένα tips και eppendorfs.

### Υλικά

- QIAGEN OneStep RT-PCR Kit.
- RNA 1μg.
- Θερμοκυκλοποιητής

### Διαδικασία

- Για την επιμήκυνση του υπό μελέτη τμήματος χρησιμοποιήθηκε RNA 1μg
- Ο τελικός όγκος του μείγματος ανά δείγμα ήταν 25μl.
- Το μείγμα περιλάμβανε:

<b>Συστατικό</b>	<b>Ποσότητα</b>	<b>Συγκέντρωση</b>
5x Buffer	5μl	1x
dNTP mix (10mM/dNTP)	1μl	400μM/ dNTP
Primer up	2.5μl	Ανάλογα με τον primer (0.6μM)
Primer Down	2.5μl	Ανάλογα με τον primer (0.6μM)
Ένζυμο	1μl	1 unit/αντίδραση
RNA	1μl	1pg – 2μg/μl
Νερό	12μl	

Η αντίδραση γίνεται σε συγκεκριμένες συνθήκες. Απαιτείται ένα στάδιο στο οποίο το RNA μετατρέπεται σε DNA, στην συνέχεια υπάρχει ένα στάδιο στο οποίο η αλυσίδα DNA που προέκυψε ανοίγει στους 95° C (denaturation). Στο στάδιο αυτό το δίκλωνο DNA γίνεται μονόκλωνο ενώ ταυτόχρονα το ένζυμο Taq πολυμεράση παραμένει δραστική. Ακολουθεί το βήμα το οποίο θα επαναληφθεί 35 με 40 φορές ανάλογα με την αντίδραση στο οποίο περιλαμβάνεται ένα μικρό στάδιο στους 95° C για να μετατρέπεται σε κάθε κύκλο το μονόκλωνο DNA σε δίκλωνο. Στην συνέχεια υπάρχει το στάδιο της δέσμευσης των εκκινητών στο εκμαγείο (annealing). Σε αυτό το στάδιο οι θερμοκρασίες είναι διαφορετικές και εξαρτώνται από το Tm των εκκινητών. Η γενική οδηγία είναι πως χρησιμοποιείται θερμοκρασία 5° C χαμηλότερη από το Tm των εκκινητών. Χρόνος 30'' είναι αρκετός για την δέσμευση. Το τελευταίο βήμα των κύκλων της αντίδρασης είναι η επιμήκυνση(extension) του τμήματος όπου το ένζυμο Taq πολυμεράση προσθέτει τα συμπληρωματικά νουκλεοτίδια. Αυτό γίνεται στην βέλτιστη θερμοκρασία της συγκεκριμένης πολυμεράσης η οποία είναι η 72° C. Η γενική οδηγία για τον χρόνο επιμήκυνσης είναι 1' ανά 1000 βάσεις προϊόντος. Μετά το τέλος των κύκλων ακολουθεί ένα τελευταίο στάδιο επιμήκυνσης στους 72° C για 2 λεπτά έτσι ώστε να ολοκληρωθούν όλα όσα μόρια δεν έχουν επιμηκυνθεί.

#### Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι εφικτό να εντοπιστεί το DNA. Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA ως αρνητικά φορτισμένο μόριο μπορεί να μετακινηθεί όταν εφαρμοστεί φορτίο και ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μέγεθος σε αζωτούχες βάσεις. Το σήμα του DNA στην πηκτή είναι ανιχνεύσιμο εξαιτίας του βρωμιούχου αιθιδίου, ενός χημικού που χρωματίζει το DNA και το κάνει να ανιχνεύεται κάτω από λάμπα υπεριώδους.

#### Υλικά

- TAE buffer 50X stock (242gr Tris – Base, 57.1ml οξικό οξύ 100%, 100ml EDTA σε όγκο 1l)
- TAE buffer 1X
- 10μl βρωμιούχο αιθίδιο
- Loading buffer (25%w/v Bromophenol Blue, 50% Glycerol)
- DNA marker

#### Διαδικασία

- Για πηκτή αγαρόζης 1.5% σε όγκο 50ml TAE 1X προστίθενται 0.75gr αγαρόζης
- Το μείγμα θερμαίνεται μέχρι να γίνει διαυγές
- Στην συσκευή το μείγμα πήζει και η δεξαμενή της συσκευής γεμίζει με TAE 1X στο οποίο προστίθενται 10μl βρωμιούχου αιθιδίου

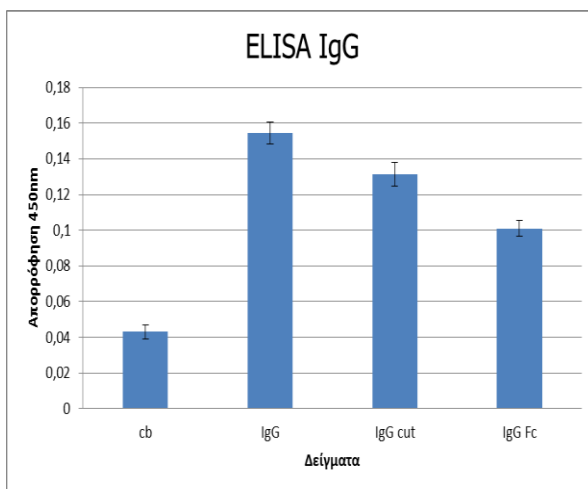
- Τα δείγματα φορτώνονται στα πηγαδάκια που διαμορφώθηκαν μετά την πήξη του gel σε τελικό όγκο 20μl και 5μl Loading buffer.
- Εφαρμόζεται τάση στην συσκευή
- Ο χρόνος που θα τρέξουν τα δείγματα εξαρτάται αλλά προτείνεται να τρέξουν πάνω από το μισό της συσκευής ηλεκτροφόρησης για τον κατάλληλο διαχωρισμό του σήματος
- Μετά το τέλος της διαδικασίας το gel ελέγχεται κάτω από λάμπα υπεριώδους.

## 4. Αποτελέσματα

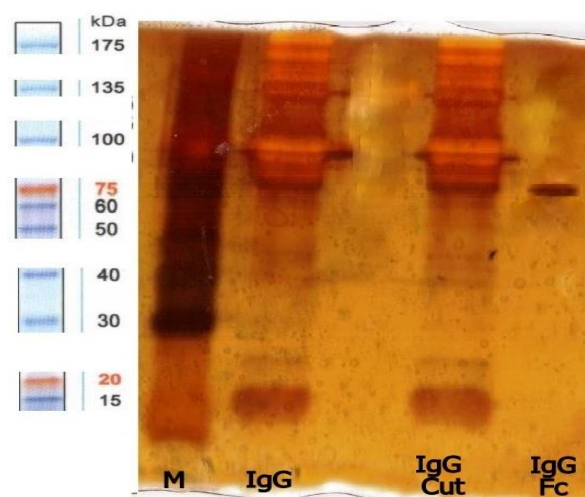
### 4.1 Περιορισμένη θρυψινόλυση IgG

Η IgG απομονώθηκε από τον ορό αρσενικών BALB/c ποντικών με την διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης με μαγνητικά σφαιρίδια. Το κάθε δείγμα συμπυκνώθηκε μέχρι τελικού όγκου 500μl και στην συνέχεια για την ελαχιστοποίηση της ποσότητας του NaCl το δείγμα αραιώθηκε και επανασυμπυκνώθηκε με την βοήθεια 10k cut – off amicon φίλτρων μέχρι η συγκέντρωση του NaCl φτάσει τα 0.1mM. Το δείγμα ποσοτικοποιήθηκε με την χρήση nanodrop και η ποσότητα που απομονώθηκε ήταν 200μg/ml σε τελικό όγκο 500μl. Στην συνέχεια η ύπαρξη της IgG επιβεβαιώθηκε με την δοκιμή ELISA και με SDS – PAGE.

Ακολουθως τα 50μg ποσότητας επιλέχθηκαν για να γίνει η θρυψινόλυση. Προστέθηκε θρυψίνη σε αραιώση 1/200 δηλαδή συνολικά 250ng και το δείγμα επωάστηκε για 4 ώρες στους 37°C. Μετά το πέρας των 4 ωρών η θρυψίνη απενεργοποιήθηκε με 10mM PMSF. Η επιβεβαίωση του κοψίματος έγινε με ELISA για την ύπαρξη τμήματος Fc καθώς επίσης και με SDS – PAGE. Η μη αισθητή διαφορά στην εικόνα στο SDS – PAGE μας οδήγησε στην υπόθεση ότι πολλά θραύσματα μπορεί να υπάρχουν στο διάλυμα. Τα μαγνητικά σφαιρίδια δεσμεύουν την IgG στο Fc τμήμα τους και έτσι στο δείγμα έγινε εκ νέου ανοσοκατακρήμνιση. Στην συνέχεια έγινε και πάλι δοκιμή ELISA και SDS – PAGE. Μετά την ανοσοκατακρήμνιση προέκυψε μια διπλή μπάντα της τάξεως των 70kDa και των 120kDa. Με την χρήση φίλτρων 100k cut – off η υψηλού μοριακού βάρους μπάντα αφαιρέθηκε. Η ELISA επιβεβαίωσε ότι πρόκειται για Fc τμήμα. Τα αποτελέσματα της ELISA φαίνονται στην εικόνα 4.1, ενώ το SDS – PAGE στην εικόνα 4.2 Μετά την επιβεβαίωση με τις παραπάνω μεθόδους το κομμένο τμήμα ποσοτικοποιήθηκε στο Nanodrop και μετρήθηκε στα 20μg.



**Εικόνα 4.1** Ανίχνευση της IgG με την δοκιμή ELISA στο ορό, μετά το κόψιμο με την θρυψίνη και μετά την απομόνωση της μπάντας των 60kDa. Το cb δηλώνει το τυφλό μας δείγμα (coating buffer)



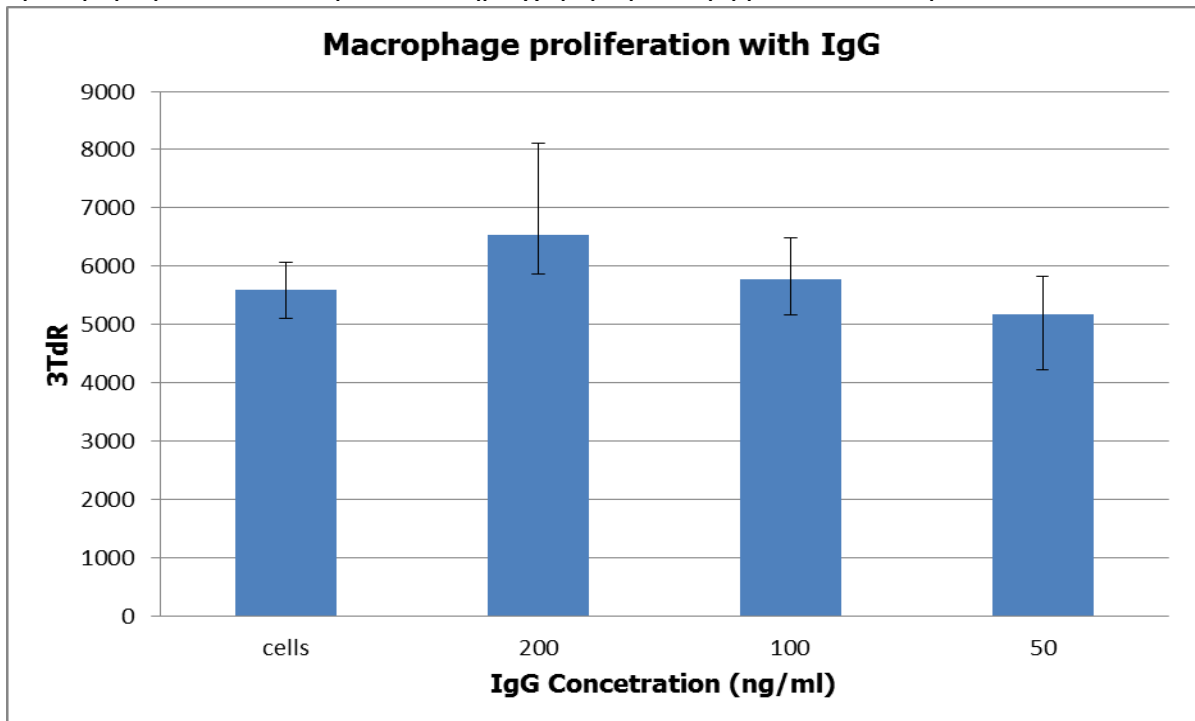
**Εικόνα 4.2** SDS PAGE από τα στάδια της θρυψινόλυσης. α) Ολόκληρη IgG, β) IgG μετά την επεξεργασία με θρυψίνη, γ) Fc τμήμα μετά την ανοσοκατακρήμνιση και τον διαχωρισμό με τα φίλτρα.

## 4.2 In Vitro δοκιμές σε μακροφάγα

Στην συνέχεια το δείγμα φιλτραρίστηκε και αραιώθηκε σε συγκέντρωση 1μg/ml. Το ίδιο έγινε και σε ολόκληρη IgG για τον έλεγχο της επίδρασης ολόκληρου του μορίου. Κύτταρα από την σπλήνα αρσενικών BALB/c ποντικών απομονώθηκαν και έγινε καλλιέργεια για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό. Στην συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και με την βοήθεια ειδικής ξύστρας τα μακροφάγα απομονώθηκαν και μετρήθηκαν. Τα μακροφάγα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο πολλαπλασιασμού με ραδιενεργή θυμιδίνη.

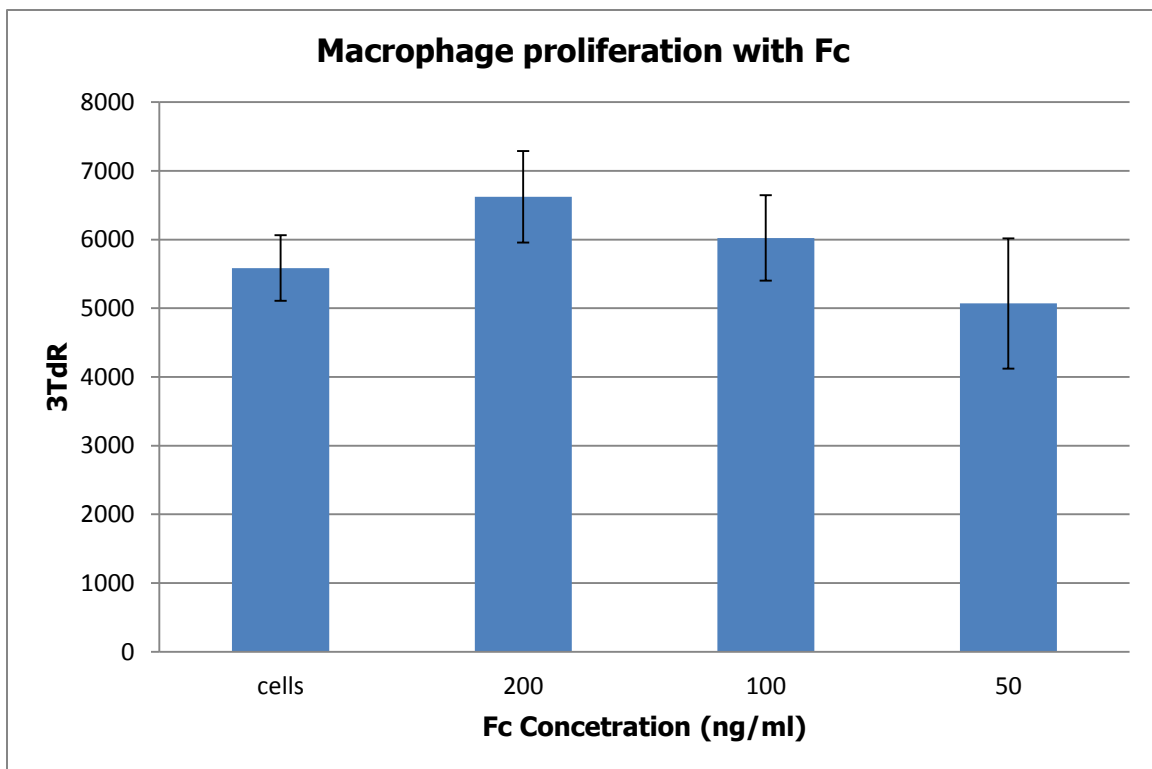
### 4.2.1 Έλεγχος πολλαπλασιασμού με ραδιενεργή θυμιδίνη

Για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού με ραδιενεργό θυμιδίνη 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν και για το υπό μελέτη Fc τμήμα αλλά και για ολόκληρο το μόριο. Οι συγκεντρώσεις αυτές ήταν 200, 100 και 50ng/ml σε συνολική ποσότητα 200000 κυττάρων ανά δείγμα και σε τριπλέτα επαναλήψεων. Στο ολόκληρο μόριο IgG βλέπουμε αύξηση του πολλαπλασιασμού κατά 16.9% στην συγκέντρωση των 200ng/ml, 3.5% αύξηση στα 100ng/ml και μείωση του πολλαπλασιασμού κατά 7.5% στην συγκέντρωση των 50ng/ml (Εικόνα 4.3). Από αυτό βλέπουμε πως υπάρχει μια μικρή διέγερση των μακροφάγων με την χορήγηση ολόκληρης IgG υποδηλώνοντας μια θετική δράση προς το ανοσοποιητικό σύστημα χωρίς την ύπαρξη κάποιου αντιγόνου.



Εικόνα 4.3 Πολλαπλασιασμός μακροφάγων με την μέθοδο της ραδιενεργής θυμιδίνης παρουσία ολόκληρου μορίου IgG

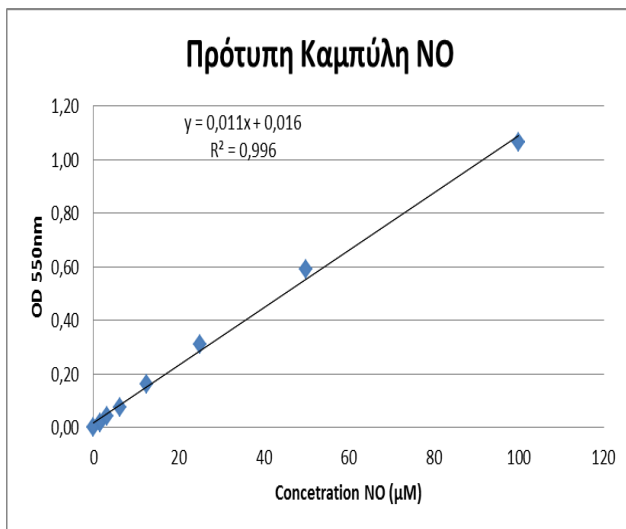
Η ίδια πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε και με το Fc που απομονώθηκε μετά την περιορισμένη θρυψινόλυση. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως και το ολόκληρο μόριο αλλά και το κομμένο έχουν την παρόμοια δράση στα μακροφάγα με το κομμένο Fc να αυξάνει τον πολλαπλασιασμό στις μεγάλες συγκεντρώσεις ελάχιστα παραπάνω. Παρατηρήθηκε λοιπόν, αύξηση του πολλαπλασιασμού των μακροφάγων κατά 18.5% στην συγκέντρωση των 200ng/ml, αύξηση κατά 7.8% στην συγκέντρωση των 100ng/ml ενώ και πάλι κατ' αντιστοιχία με το ολόκληρο μόριο, υπάρχει μια μικρή μείωση της τάξης του 9.2% στην συγκέντρωση των 50ng/ml. (Εικόνα 4.4) Αυτό που φαίνεται είναι πως και το Fc τμήμα λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο στα μακροφάγα, ενώ ταυτόχρονα φαίνεται πως οι συγκεντρώσεις των 100ng/ml και των 50ng/ml δεν έχουν ιδιαίτερη επίδραση στον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων. Αυτά τα αποτελέσματα μας οδήγησαν στο να δοκιμάσουμε το Fc για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των τροφοβλαστών σε μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις.



**Εικόνα 4.4 Πολλαπλασιασμός μακροφάγων με την μέθοδο της ραδιενεργής θυμιδίνης παρουσία του από περιορισμένη θρυψινόλυση τμήματος Fc**

#### **4.2.2 Έλεγχος για την παρουσία οξειδίων του αζώτου**

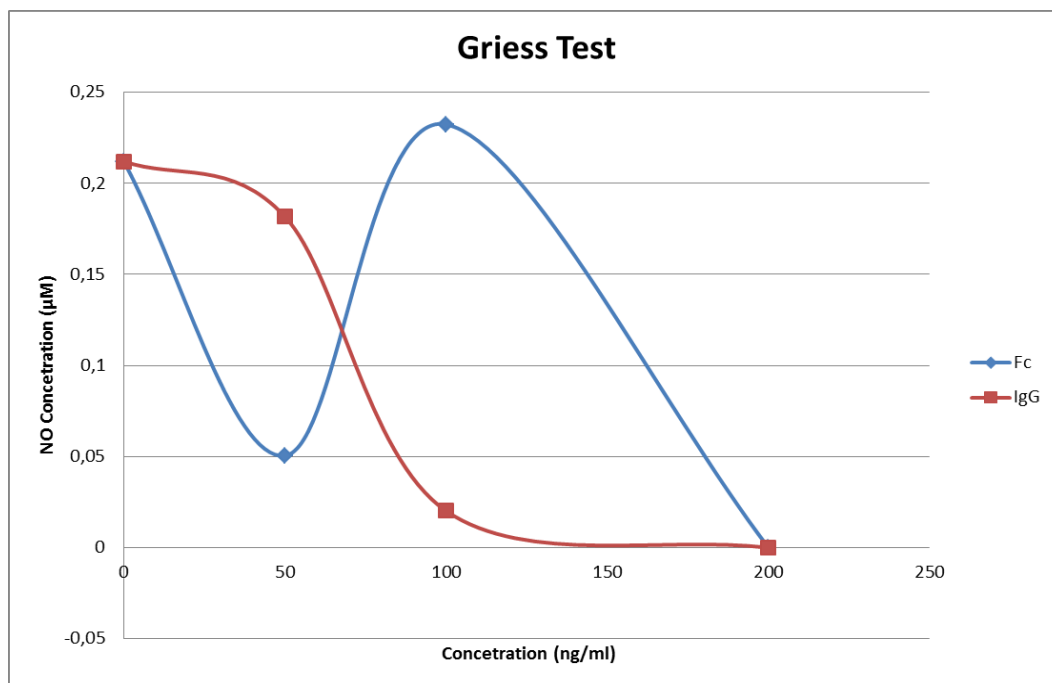
Πριν γίνει ο έλεγχος στους τροφοβλάστες έπρεπε να ελεγχθεί κατά πόσο η αύξηση στον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων ως αποτέλεσμα του υπό μελέτη τμήματος καθώς και ολόκληρου του μορίου, χωρίς την παρουσία κάποιου αντιγόνου, οφείλεται σε



**Εικόνα 4.5 Πρότυπη Καμπύλη NO με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις sodium nitrate**

κάποια θετική επίδραση του μορίου ή έχει κάποια τοξικότητα για τα κύτταρα. Τα μακροφάγα λόγω των κυτταρικών τους διεργασιών μπορεί να εκκρίνουν στο περιβάλλον οξειδία του αζώτου τα οποία είναι τοξικά για τον οργανισμό. Στην περίπτωση που η IgG αλλά και ο Fc επάγουν την παραγωγή οξειδίου του αζώτου τότε μπορεί η αύξηση που παρατηρήσαμε να ήταν εξαιτίας κάποιας έναρξης της ανοσοαπόκρισης για την καταστροφή του παράγοντα. Χρησιμοποιήθηκαν και πάλι οι ίδιες συγκεντρώσεις των 200ng/ml, 100ng/ml και 50ng/ml. Από την πρότυπη καμπύλη που σχεδιάστηκε (Εικόνα 4.5) φάνηκε ότι

τα κύτταρα απουσία παράγοντα εκκρίναν 0,21μM οξειδίου του αζώτου. Αντίστοιχα η παρουσία της IgG και του Fc (Εικόνα 4.6) δεν άλλαξαν αυτή τη συγκέντρωση και σε μερικές περιπτώσεις την μειώνει. Αυτό δείχνει πως το υπό μελέτη τμήμα δεν είναι τοξικό για τον οργανισμό και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις δοκιμές στους τροφοβλάστες.



**Εικόνα 4.6 Έκκριση NO από τα μακροφάγα στον Fc και στην IgG βασισμένες στην πρότυπη καμπύλη**

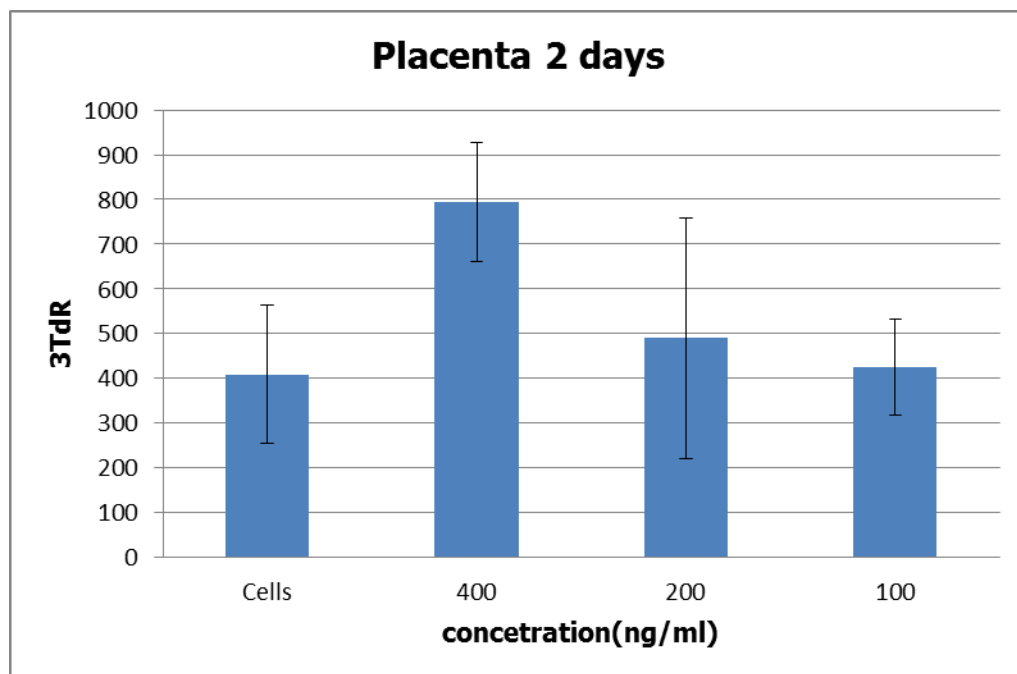


### 4.3 In Vitro δοκιμές σε κύτταρα τροφοβλάστη

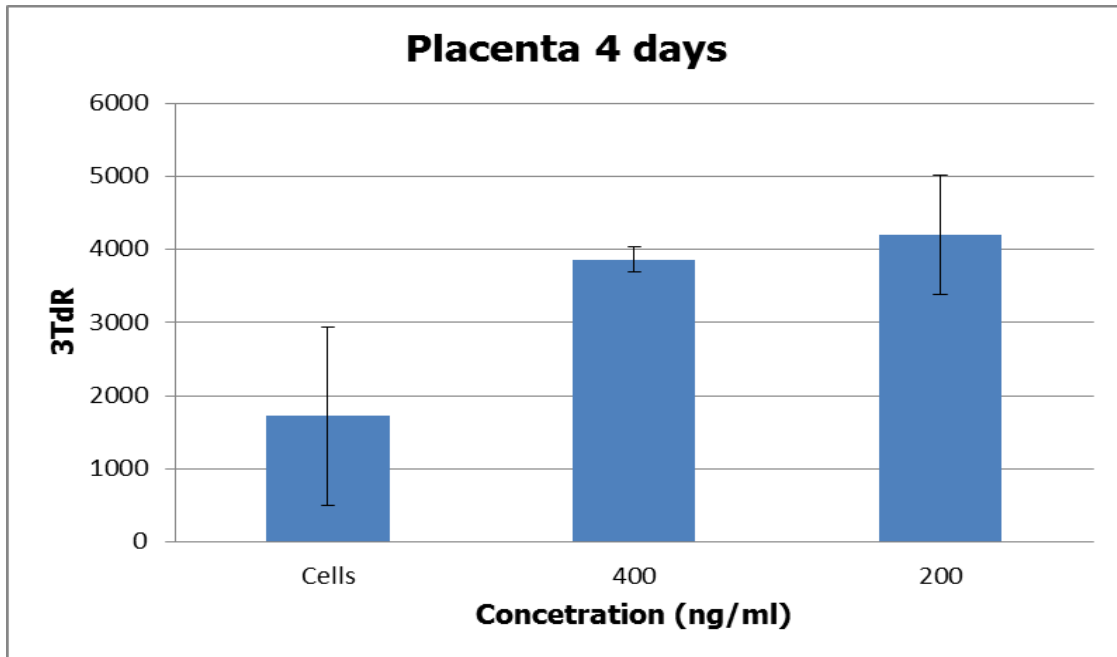
Μετά τον έλεγχο στα μακροφάγα έγινε ο έλεγχος σε τροφοβλάστες. Πλακούντας και φθαρτός απομονώθηκαν από 12<sup>η</sup> μέρα εγκυμοσύνης θηλυκών BALB/c ποντικών. Τα κύτταρα μετρήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για 2ήμερες και 4ήμερες καλλιέργειες με ραδιενεργή θυμιδίνη καθώς και τα υπερκείμενα τους χρησιμοποιήθηκαν για δοκιμές ELISA για την έκφραση κυτοκινών οι οποίες επάγουν μια επιτυχημένη εγκυμοσύνη.

#### 4.3.1 Έλεγχος πολλαπλασιασμού με ραδιενεργή θυμιδίνη

Για τον έλεγχο με την ραδιενεργή θυμιδίνη στα κύτταρα του τροφοβλάστη χρησιμοποιήθηκαν και πάλι 3 συγκεντρώσεις. Έχοντας την ένδειξη από τα μακροφάγα αντί για την συγκέντρωση των 50ng/ml χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις των 400ng/ml, 200ng/ml και 100ng/ml για τις καλλιέργειες των 2 ημερών ενώ χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις των 400ng/ml και των 200ng/ml για τις καλλιέργειες των 4 ημερών. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού των τροφοβλαστών στην συγκέντρωση των 400ng/ml (95%) και τις 2 (Εικόνα 4.5) και στις 4 ημέρες καλλιέργειας (124%) (Εικόνα 4.6). Στην συγκέντρωση των 200ng/ml όπως και σε αυτήν των 100ng/ml η αύξηση ήταν παρόμοια με αυτήν των μακροφάγων στις 2 ημέρες (20% και 4% αντίστοιχα) ενώ τις 4 ημέρες η συγκέντρωση των 200ng/ml έφτασε να είναι παρόμοια με αυτήν των 400ng/ml (142%) η οποία έδειξε να φτάνει σε ένα πλατώ.

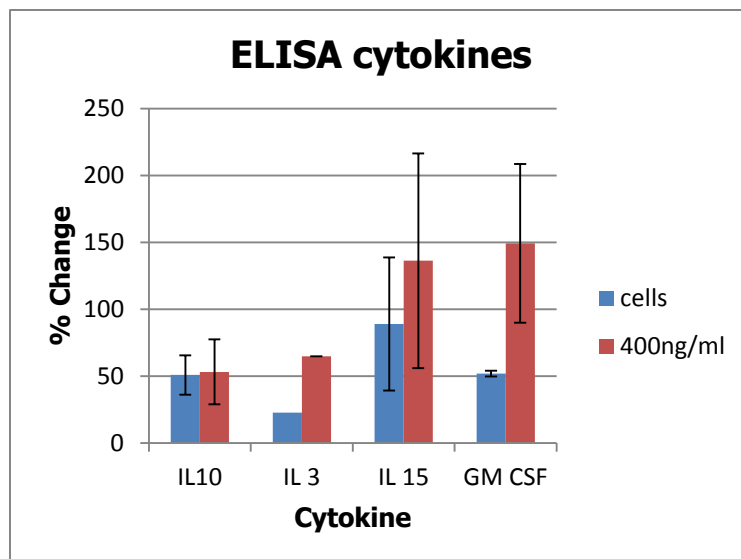


Εικόνα 4.5 Πολλαπλασιασμός κυττάρων τροφοβλάστη από πλακούντα μετά από καλλιέργεια 2 ημερών με τον Fc παράγοντά με την μέθοδο της ραδιενεργής θυμιδίνης



Εικόνα 4.6 Πολλαπλασιασμός κυττάρων τροφοβλάστη από πλακούντα μετά από καλλιέργεια 4 ημερών με τον Fc παράγοντά με την μέθοδο της ραδιενεργής θυμιδίνης

#### 4.3.2 Δοκιμή ELISA για την έκφραση των κυτοκινών IL – 3, IL – 10, IL – 15 και GM – CSF από τροφοβλάστες



Εικόνα 4.7 Έκφραση των IL – 10, IL – 3, IL – 15 και GM – CSF στα υπερκείμενα καλλιιεργειών τροφοβλαστών. Εμφανίζεται η % αύξηση σε σχέση με το cb

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή οι κυτοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιτυχή έκβαση της εγκυμοσύνης. Τροφοβλάστες σε συγκέντρωση  $1 \cdot 10^6$  cells/ml καλλιεργήθηκαν 2 μέρες παρουσία 400ng/ml Fc και στην συνέχεια ελέγχθηκαν με ELISA για να δούμε την έκφραση των κυτοκινών σε σχέση με κύτταρα στα οποία δεν έχει χορηγηθεί ο παράγοντας. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αύξηση των επιπέδων των 3 από τις 4 κυτοκίνες που μελετήθηκαν. Για την ακρίβεια υπήρξε μικρή αύξηση της τάξεως του 2% για

την IL – 10, ενώ σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στην IL – 3 κατά 183%, την IL – 15 κατά 52% ενώ ο GM – CSF αυξήθηκε κατά 192%. (Εικόνα 4.7)

## 4.4 Παραγωγή ανασυνδυασμένου C<sub>H</sub>2 από κύτταρα N22

Η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων Fc τμήματος για *in vivo* πειράματα δεν είναι εφικτή μέσω του ορού του ποντικίου. Η απαίτηση για μια ελάχιστη ποσότητα 3mg σε ένα μικρού μεγέθους ποντίκι το καθιστά απαγορευτικό. Γι' αυτό το λόγο ξεκινήσαμε την κατασκευή ανασυνδυασμένου τμήματος Fc. Βιβλιογραφικά αναφέρθηκε στην εισαγωγή ότι το υπεύθυνο τμήμα για την δέσμευση με τους υποδοχείς Fcγ φαίνεται να είναι κυρίως το C<sub>H</sub>2 τμήμα του Fc. Γι αυτό το λόγο κατασκευάστηκαν ειδικοί εκκινητές για την παραγωγή και έκφραση του επιθυμητού τμήματος του Fc.

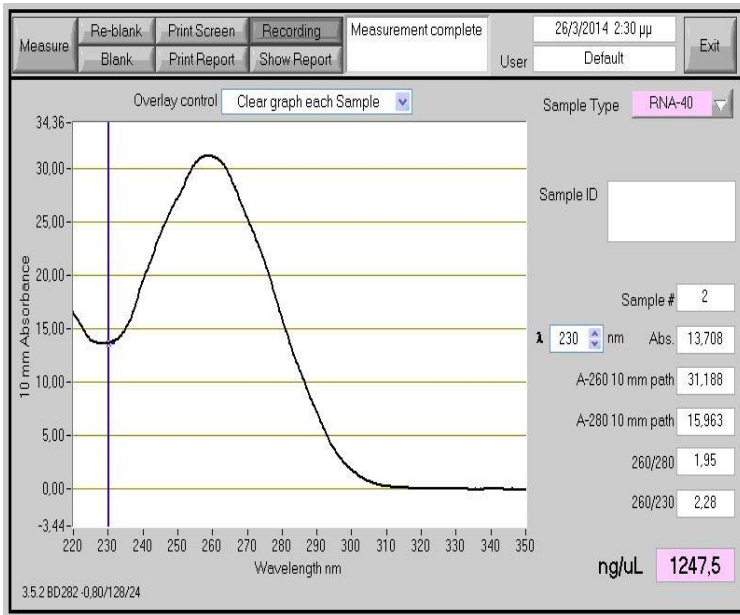
### 4.4.1 Εκκινητές και PCR

Η κυτταρική σειρά N22 περιέχει τα γονίδια και για τους 4 ισότυπους IgG. Δεδομένου ότι οι τροφοβλάστες εκφράζουν υποδοχείς FcγRII και FcγRIII επιλέχθηκαν αρχικά για σχεδιασμό εκκινητών οι IgG2a και IgG2b. Μέσω της βάσης δεδομένων NCBI εντοπίστηκαν οι δημοσιευμένες αλληλουχίες για το mRNA των IgG2a και IgG2b. Μέσω των διαθέσιμων πληροφοριών εντοπίστηκε η αλληλουχία που εκφράζει το C<sub>H</sub>2 και στις 2 περιπτώσεις. Κατασκευάστηκαν στην συνέχεια οι εκκινητές IgG2a up με αλληλουχία AGA GGG CCC ACA ATC AAG C και Tm 65° C, IgG2b do με αλληλουχία CCT GTG GAG CTC TTA CTG AC και Tm 62° C. Το εκτιμώμενο προϊόν για την περίπτωση της IgG2a είναι 393 βάσεις. Αντίστοιχα για την IgG2b κατασκευάστηκαν οι εκκινητές IgG2b up CAT GCA AGG AGT GTC ACA AA με Tm 54° C και ο IgG2b do ACT TGT GGA GCT CTG ACT AG με Tm 54° C και με εκτιμώμενο προϊόν 375 βάσεις. Ακολούθησε σχεδιασμός των συνθηκών που θα χρησιμοποιούνταν στον θερμοκυκλοποιητή οι οποίες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

IgG2a		IgG2b	
Θερμοκρασία	Χρόνος	Θερμοκρασία	Χρόνος
55° C	30'	55° C	30'
95° C	15'	95° C	15'
95° C	30''	95° C	30''
60° C	30''	50° C	30''
72° C	30''	72° C	30''
72° C	2'	72° C	2'
15° C	συντήρηση	15° C	συντήρηση

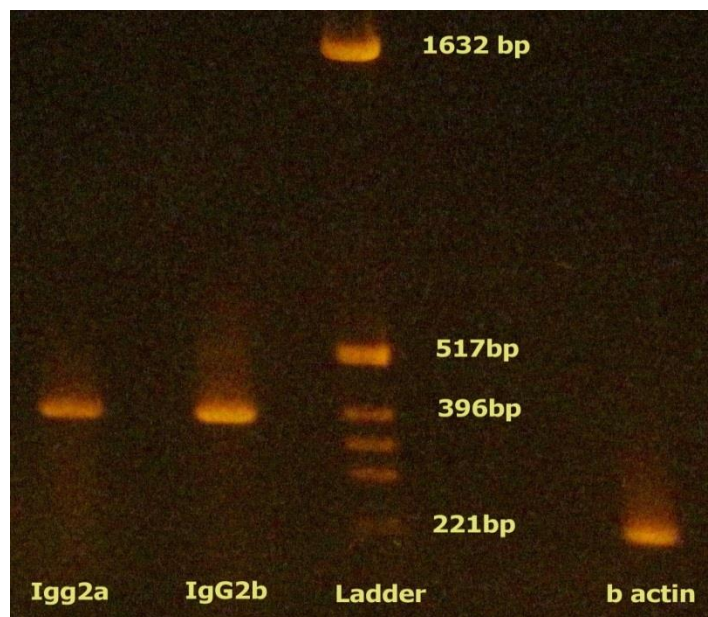
### 4.4.2 Απομόνωση ολικού RNA και gel αгарόξης

Όταν ο κυτταρικός πληθυσμός N22 έφτασε περίπου τα 10·10<sup>6</sup> κύτταρα, τότε τα κύτταρα υπέστησαν λύση και το ολικό RNA απομονώθηκε με το πρωτόκολλο του Trizol. Στη συνέχεια μετρήθηκε η ποσότητα και η καθαρότητα του RNA με την χρήση του nanodrop. Ο λόγος 260/280 σε τιμή κοντά στο 2 υποδηλώνει καθαρό RNA, ενώ τιμή το λόγου 260/230 κοντά στο 2.2 υποδηλώνει πως δεν υπάρχουν άλλες προσμείξεις. (Εικόνα 4.8)



**Εικόνα 4.8** Γράφημα από το nanodrop μετά την απομόνωση του RNA από τα κύτταρα N22

Στην συνέχεια έγινε PCR με τις συνθήκες που περιγράφηκαν πιο πάνω και για την IgG2a και για την IgG2b. Τα αποτελέσματα έδωσαν τα αναμενόμενα μεγέθη σε νουκλεοτίδια και μίγμα καθαρό από προσμείξεις, κάτι που σημαίνει πως οι εκκινητές δουλεύουν σωστά. (Εικόνα 4.9)



**Εικόνα 4.9** Ανίχνευση του υπό ενίσχυση τμήματος IgG2a και IgG2b. Θετικός μάρτυρας είναι η β – ακτίνη ενώ το ladder είναι το PBR322 DNA/Hinf I digest της Minotech

## 5. Συμπεράσματα - Συζήτηση

---

Η IgG ως βασικό συστατικό του IVIG σκευάσματος φαίνεται να παίζει τον βασικό ρόλο για την κατάλληλη αρχική διέγερση η οποία απαιτείται στις περιπτώσεις τον καθ' έξιν αποβολών. Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι τα υπόλοιπα συστατικά του σκευάσματος, όπως τα διαλυτά τάξης II δεν μπορούν να δεσμευτούν σε κάποιους από τους υποδοχείς των τροφοβλαστών. Αυτή τη στιγμή η αλληλεπίδραση των MHC II μορίων και η δράση τους στις περιπτώσεις των εγκυμοσυνών είναι υπό μελέτη. Ταυτόχρονα στους τροφοβλάστες δεν υπάρχουν μηχανισμοί ενεργοποίησης του συμπληρώματος μέσω των IgG μορίων. Επίσης είναι γνωστό πως τα μόρια τα οποία εκφράζονται επιφανειακά στους τροφοβλάστες είναι οι υποδοχείς FcγRII και FcγRIII μαζί με τον Fcγn. Αυτό σημαίνει πως το κομμάτι της IgG που πιθανότατα εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με τους τροφοβλάστες για την επαγωγή της ανοσολογικής διέγερσης είναι το Fc τμήμα της και πιο συγκεκριμένα φαίνεται πως η αλληλεπίδραση οφείλεται κυρίως στο C<sub>H</sub>2 τμήμα και στην χαμηλότερη περιοχή του αρμού.

Γι' αυτό το λόγο αποφασίσαμε να ελέγξουμε την επίδραση Fc τμήματος πρώτα σε μακροφάγα τα οποία είναι από τα βασικά κύτταρα τα οποία η αύξηση του πολλαπλασιασμού τους δηλώνει διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος ενώ έχουν και FcγRI υποδοχείς για να δεσμεύσουν την IgG και στην συνέχεια σε κύτταρα τροφοβλάστη. Για την παραγωγή του Fc τμήματος επιλέχθηκε η μέθοδος της περιορισμένης θρυψινόλυσης. Παρότι η παπαΐνη έχει δείξει να κόβει με επιτυχία την IgG, απαιτεί να υπάρχει ενεργοποίηση με κυστεΐνη και ταυτόχρονα να διακοπεί η αντίδραση με το ιοδοακεταμίδιο, 2 παράγοντες οι οποίοι δεν γνωρίζουμε πως θα μπορούσαν να επηρεάσουν *in vivo* και *in vitro* έστω και ως ιχνοστοιχεία. Επίσης η θρυψίνη παρότι μόριο το οποίο μπορεί και έχει μεγάλη δραστηριότητα έχει χρησιμοποιηθεί μόνο ως ένζυμο για την πλήρη πέψη μορίων IgG κάνοντας την επιλογή της μεθόδου μας κάτι καινοτόμο. Δείξαμε μέσα από τα πειράματά μας πως μια επώαση σε βέλτιστες συνθήκες για την δράση της θρυψίνης και χρήση ελάχιστης ποσότητας PMSF μπορεί δημιουργήσει ένα θραύσμα της τάξεως των 70kDa το οποίο δοκιμάστηκε θετικό για Fc. Η απόδοση της αντίδρασης κρίνεται ικανοποιητική καθώς από ποσότητα 50μg IgG μπορέσαμε και ανακτήσαμε τα 20μg, δηλαδή περίπου το 40% της αρχικής ποσότητας. Η απομόνωση του Fc από τα άλλα θραύσματα έγινε με την χρήση μαγνητικών σφαιριδίων. Αντίστοιχα θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε χρωματογραφία συγγένειας με την χρήση protein A κυρίως σε περιπτώσεις που χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες, γιατί η ανοσοκατακρήμνιση με μαγνητικά σφαιρίδια έχει συγκεκριμένο ποσό ανάκτησης ανάλογα με τον αριθμό των σφαιριδίων. Επίσης θα πρέπει να δοκιμαστεί και η παπαΐνη για να συγκριθεί το ποσό της ανάκτησης μέσω της μεθόδου πέψης και με παπαΐνη.

Μετά την πέψη με θρυψίνη το Fc δείγμα χορηγήθηκε σε μακροφάγα για τον έλεγχο της διέγερσης μέσω πολλαπλασιασμού. Σε μακροφάγα επίσης χορηγήθηκε και IgG ολόκληρη για να έχουμε συγκριτικά αποτελέσματα. Πράγματι η χορήγηση και των 2

παραγόντων έδειξε αύξηση του πολλαπλασιασμού των μακροφάγων περίπου κατά 16.5% στην IgG και 18% στο Fc, στην συγκέντρωση των 200ng/ml. Από αυτό διαπιστώνουμε πως υπάρχει κάποια δράση πάνω στα μακροφάγα πιθανότατα μέσω των FcγR που υπάρχουν στην επιφάνεια του κυττάρου και οι οποίοι δεσμεύουν ισχυρά IgG όλων των ισοτύπων. Η συνέπεια των αποτελεσμάτων και στον Fc ενισχύει περαιτέρω την υπόθεση της αλληλεπίδρασης μέσω Fc. Αυτό ήταν μια πρώτη θετική ένδειξη και για περαιτέρω έλεγχο της διέγερσης στα μακροφάγα θα μπορούσαμε να αυξήσουμε σημαντικά την συγκέντρωση στα 400ng/ml ή και παραπάνω αν υπάρχει διαθέσιμη ποσότητα όπως έγινε στους τροφοβλάστες.

Οι τροφοβλάστες είναι τα πρώτα κύτταρα που διαφοροποιούνται κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης. Είναι από τα βασικά κυτταρικά συστατικά του πλακούντα και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανταλλαγή ουσιών μεταξύ της μήτρας και του εμβρύου. Στους τροφοβλάστες υπάρχουν η χαμηλής δέσμευσης FcγRII και FcγRIII καθώς και ο FcγRn. Ταυτόχρονα δεν έχουν τρόπους ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Συνεπώς οι αλληλεπιδράσεις της IgG με φαίνεται να γίνονται μέσω των υποδοχέων Fcγ και η όποια διέγερση υπάρχει μπορεί να οφείλεται σε αυτήν την αλληλεπίδραση. Ο FcγRn είναι ο υποδοχέας μέσω του οποίου η IgG ανακυκλώνεται και επίσης περνάει στο έμβρυο. Οι FcγRII και III έχουν παρακείμενα ITAM τα οποία με την δέσμευση IgG μπορεί να ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια στους τροφοβλάστες. Η επιλογή της 12<sup>ης</sup> μέρας εγκυμοσύνης έγινε διότι από εκείνη την ημέρα και μετά ο πλακούντας στα ποντίκια σταματάει να μεγαλώνει και συνεπώς ότι αλλαγή στον πολλαπλασιασμό βλέπουμε οφείλεται στον παράγοντα που χορηγούμε. Έτσι η χορήγηση Fc *in vitro* σε κύτταρα τροφοβλαστών και ο έλεγχος του πολλαπλασιασμού με ραδιενεργή θυμιδίνη σε καλλιέργειες 2 και 4 ημερών έδειξε σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού των τροφοβλαστών. Στην καλλιέργεια των 4 ημερών φάνηκε να φτάνει ο πολλαπλασιασμός ένα επίπεδο κορεσμού καθώς και στα 200ng/ml αλλά και στα 400ng/ml είχαμε παρόμοια αποτελέσματα. Αυτό σημαίνει πως υπάρχει αλληλεπίδραση του Fc με τους τροφοβλάστες πιθανόν μέσω των υποδοχέων με τέτοιο τρόπο ώστε να ενεργοποιείται ο πολλαπλασιασμός τους. Στην καλλιέργεια των 2 ημερών εμφανίστηκε σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού στα 400ng/ml, ενώ στα 200ng/ml η αύξηση ήταν παρόμοια με αυτή των μακροφάγων. Σαν μια ακόμα θετική δοκιμή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ολόκληρη IgG για να δούμε αν η επίδραση της σε κύτταρα τροφοβλαστών είναι η ίδια.

Για τον περαιτέρω έλεγχο της διέγερσης των τροφοβλαστών ελέγξαμε και τα επίπεδα των κυτοκινών οι οποίες μπορεί να εκκρίνονται από τους τροφοβλάστες. Πράγματι τα πειραματικά αποτελέσματα δείξαν αύξηση της IL – 3, της IL – 15 και του GM – CSF, κυτοκινών που μετακινούν την ισορροπία T<sub>h</sub>1/T<sub>h</sub>2 προς την πλευρά T<sub>h</sub>2 που αυξάνει τις πιθανότητες μιας επιτυχημένης εγκυμοσύνης. Η μη έκκριση της IL – 10 αντίθετα η οποία παραμένει σχεδόν σταθερή υποδηλώνει την μη ύπαρξη κάποια φλεγμονής. Μελέτες που γίνανε στο εργαστήριό μας, έδειξαν ότι η IL – 10 αυξανόταν στην κυκλοφορία τον πρώτο καιρό της κύησης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η IL-10 μπορεί να εκκρίνεται από άλλα κύτταρα και όχι τους τροφοβλάστες. Η IL – 15, παρότι πρόκειται για κυτοκίνη η οποία μοιάζει στην IL – 2 και στην δράση, δεν ανήκει στις T<sub>h</sub>1

και έχει δείχτει ότι η έκφραση της προάγει την κυτταρική διαφοροποίηση κατά την εγκυμοσύνη.

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό πως υπάρχει σημαντική διέγερση και αύξηση του πολλαπλασιασμού και στα μακροφάγα και στους τροφοβλάστες. Το σημαντικό πρόβλημα όμως είναι πως από τον ορό του ποντικού απομονώνονται μικρές ποσότητες. Υπολογίστηκε πως για μια δόση της τάξεως των 2mg συνολικά θα χρειαζόμασταν 50 ποντίκια. Αυτό όπως είναι κατανοητό δεν είναι εφικτό. Έτσι προτείνουμε την λύση του ανασυνδυασμένου C<sub>H</sub>2 τμήματος για το οποίο κατασκευάσαμε ειδικούς εκκινητές για τις IgG2a και IgG2b και το υπό σχεδιασμό τμήμα το ανιχνεύσαμε με επιτυχία. Επιπρόσθετα μέσω της GeneScript έγινε κατασκευή Hinge – CH2 τμήματος και για την IgG2a και την IgG2b κλωνοποιημένο σε πλασμιδιακό φορέα παρουσία His – Tag για την απομόνωση. Τα πρώτα πειράματα δείχνουν πως παράγεται η επιθυμητή επικράτεια αλλά μπορεί να σχηματίζει συσσωματώματα. Η έκφραση του επιθυμητού γονιδίου με ένα ετερόλογο σύστημα έκφρασης θα μπορούσε να λύσει το πρόβλημα των ποσοτήτων. Η έλλειψη γλυκοσυλιώσεων είναι ίσως το βασικότερο πρόβλημα των βακτηρίων και της έκφρασης σε *E. Coli*. Αυτό το οποίο έχει αναφερθεί είναι πως οι γλυκοσυλιώσεις παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος και δευτερεύον ρόλο στην δέσμευση στους υποδοχείς. Εάν τα πειράματα με κλωνοποίηση σε *E. Coli* δεν δώσουν τα αποτελέσματα που αναμένουμε από της *in vitro* δοκιμές θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή κάποιο άλλο ετερόλογο σύστημα έκφρασης, το οποίο προσομοιώνει τις μετα – μεταφραστικές τροποποιήσεις των ευκαρυωτικών οργανισμών. Προς αυτή τη κατεύθυνση η χρήση βακίλων ή του ετερόλογου συστήματος έκφρασης της *Pichia pastoris* θα μπορούσε να δώσει C<sub>H</sub>2 – Hinge επικράτεια παρουσία γλυκοσυλιώσεων. Η έκφραση αυτή θα μπορούσε να δώσει μεγάλες ποσότητες της επικράτειας που μας ενδιαφέρει. Ως συνέπεια, αν τα αποτελέσματα σε νέες *in vitro* δοκιμές είναι παρόμοια με αυτά από τις *in vitro* δοκιμές με το Fc που προήλθε από τον ορό τότε θα μπορούσε να περάσει η δοκιμή σε *in vivo* μοντέλα, είτε χρησιμοποιώντας ποντίκια τα οποία παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό καθ' έξιν αποβολών, είτε χορηγώντας την ουσία και κάνοντας δοκιμές όπως το βάρος του πλακούντα ή το μέγεθος του εμβρύου σε συγκεκριμένες μέρες εγκυμοσύνης.

## 6. Βιβλιογραφία

---

### BIBΛΙΑ

- Hamilton G. Robert, Mohan Chandra. **"The Human IgG Subclasses"**. Asthma and allergy center, Johns Hopkins University school of Medicine, p. 1 - 11
- **Immunobiology 5th edition**, Chapter 3, p. 115 – 121
- Mayer G. **Microbiology and Immunology**, university of South Carolina school of medicine, Chapter 4, Immunoglobulins – structure and function, online handbook
- Stevens C. D. **"Clinical Immunology and Serology 3rd Edition"**. P 54 - 65
- **"The Adaptive Immune Response: B-lymphocytes and Antibodies"**, Openstax College

### ΑΡΘΡΑ

- Adelsberg B., (1985). **"Immunology of Pregnancy"**. Mt Sinai J Med 52: 5 - 15
- Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C (1997). **"Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins"**. J Mol Biol 273: 927–948.
- Andrew M. S. and Titus A. J. (2000). **"Fragmentation of Immunoglobulin Gamma"**. Current protocols in Cell Biology 16: 400 - 410
- Bouma G.S, Van Caubergh P., Van Bree S., Castelli VisserR. Witvliet M., van der Meer - Prins E., Van Roo J., Claas F. (1996). **"Pregnancy can induce priming of cytotoxic T lymphocytes specific for paternal HLA antigens that is associated with antibody formation"**. Transplantation 62: 672 - 678
- Chappel S., Isenman D., Everett M., Xu Y., Dorrington K., Klein M. (1991). **"Identification of the Fc<sub>γ</sub> receptor class I binding site in human IgG through the use of recombinant IgG1/IgG2 hybrid and point-mutated antibodies"**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9036 - 9040
- Cross J., Hemberger M., Lu Y., Nozaki T., Whiteley K., Masutani M., Adamson S. (2002). **"Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta"**. Molecular and cellular Endocrinology 187: 207 - 212
- Fridman W. (1991). **"Fc Receptors and Immunoglobulin Binding factors"**. FASEB J. 5: 2684 - 2690
- Garcia - Gonzalez, Ahued - Ahued R., Arroyo E., Montes - De - Oca D., Granados J. (1999). **"Immunology of the cutaneous disorders of pregnancy"**. International Journal of Dermatology 38: 721 - 729
- Garcia E. G. and Rosalos C. (2002). **"Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis"**. J.leukoc. Biol. 72: 1092 - 1108
- Guhr T., Derksen N., Aalberse R., Rispens T. (2012). **"Use of a Human Recombinant Immunoglobulin G1 CH3 Domain as a Probe for Detecting Alternatively Folded Human IgG in Intravenous Ig Products"** .J Pharm Sci 101: 978 - 986



- Hartung H.P, Mouthon L, Ahmed R., Jordan S., Laupland K. B. and Jolles S. (2009). **"Clinical applications of intravenous immunoglobulins (IVIg) – beyond immunodeficiencies and neurology"**. J. Trans. Immunol. 158: 23 - 33
- Hemberger M. and Cross J. (2001). **"Genes governing placental development"**. Trends Endocrinol. Metab 12: 162 - 168
- Hutton B., Sharma R., Fergusson D., Tinmouth A., Hebert P., Jamieson J., Walker M. (2006). **"Use of Intravenous Immunoglobulin for treatment of recurrent miscarriage: a systematic review"**. BJOG 114: 134 - 142
- Jolles S., Sewell W.A.C, Misbah S.A. (2005). **"Clinical uses of intravenous immunoglobulin"**. Clinical and Experimental Immunology 142: 1 - 11
- Kim J., Tsen M., Ward G. (1994). **"Catabolism of the Murine IgG1 Molecule: Evidence that Both CH2-CH3 Domain Interfaces are Required for Persistence of IgG1 in the Circulation of Mice"**. Scand J Immunol. 40: 457 - 465
- Kovats S., Main K., Librach C., Stubblebine M., Fisher J., DeMars R. (1990). **"A Class I Antigen, HLA - G, expressed in Human Trophoblasts"**. Science 248:220 - 223
- Kristoferssen E. (2000). **"Placental Fc Receptors and the transfer of Maternal IgG"**. Transfusion Medicine Reviews 14: 234 - 243
- Market E, Papavasiliou FN (October 2003). **"V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system"**. PLoS Biol. 1: E16
- Meulenbroek A.J. (2008). **"Human IgG Subclasses: useful diagnostic markers for immunocompetence"**. Sanquin 1: 6 - 12
- Munn D., Zhou M., Attwood J., Bondarev I., Conway., Marshall B., Brown C., Mellor A. (1998). **"Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism"**. Science 281: 1191 - 1193
- Nimmerjahn F. and Ravetch J. (2007). **"Fc Receptors as regulators of Immunity"**. Advances in Immunology 96: 180 - 196
- Palmeira P., Quinello C., Silveira - Lessa A., Zago C. - Carneiro Sampaio M. (2011). **"IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies"**. Clinical and Developmental Immunology 2012: 1 - 13
- Piccini M., Beloni L., Livi C., Maggi E., Scarselli G., Romagnani S. (1998). **"Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2T - Helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions"**. Nat Med. 4: 1020 - 1024
- Pierre Bruhns (2012). **"Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models"**. Blood 119: 5640 - 5649
- Putnam FW, Liu YS, Low TL (1979). **"Primary structure of a human IgA1 immunoglobulin. IV. Streptococcal IgA1 protease, digestion, Fab and Fc fragments, and the complete amino acid sequence of the alpha 1 heavy chain"**. J Biol Chem 254: 2865–74.

- Raghupathy R. (1997). **"Th1 - type immunity is incompatible with successful pregnancy"**. Immunol Today 18: 478 - 482
- Sayegh M., Guleria I. (2007). **"Maternal Acceptance of the Fetus: True Human Tolerance"**. J.Immunol. 178: 3345 - 3351
- Siiteri P., Stites D. (1982). **"Immunologic and endocrine interrelationships in pregnancy"**. Biol Reprod. 26: 1 - 14
- Simister N.E. (2003). **"Placental transport of Immunoglobulin G"**. Vaccine 21: 3365 - 3369
- Simister N.E., Story M.C. (1997). **"Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus"**. J. Reproduct. Immunol. 37: 1 - 23
- Spiegelberg, H.L. (1974) **"Biological activities of Igs of different classes and subclasses"**. Adv. Immunol. 19: 259 - 294
- Thellin O., Curmans B., Zorzi W., Igout A., Heinen E. (2000). **"Tolerance to the foeto - placental "graft": ten ways to support a child for 9 months"**. Cur Opin Immunol. 12: 731 - 737
- Wainwright S.D. and Holmes C.H. (1993) **"Distribution of Fcγ receptors on trophoblast during human placental development: an immunohistochemical and immunoblotting study"**. Immunology 80: 343 - 351
- Wegmann T., Lin H., Guilbert L., Mossmann R. (1993). **"Bidirectional cytokine interactions in the maternal - fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?"**. Immunol Today 14: 353 - 356
- Wines B., Powell M., Parren P., Barnes N., Hogarth M. (2000). **"The IgG Fc Contains Distinct Fc Receptor (FcR) binding Sites: The Leukocyte Receptors FcγRI and FcγRIIa Bind to a Region in the Fc Distinct from That Recognized by Neonatal FcR and Protein A"**. J. Immunol 164: 5313 - 5318
- Ye W., Zheng L., Young D., Liu C. (1996). **"The Involvement of Interleukin (IL)-15 in Regulating the Differentiation of Granulated Metrial Gland Cells in Mouse Pregnant Uterus"**. J. Exp. Med. 184: 2405 - 2410