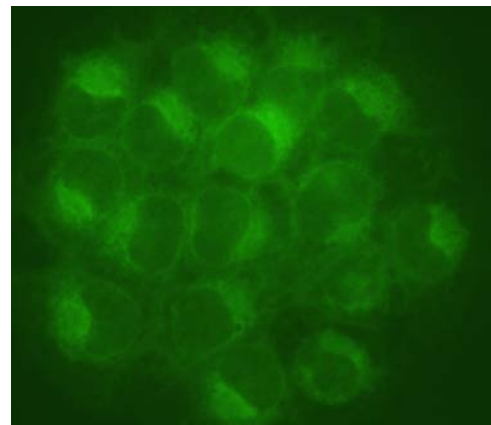
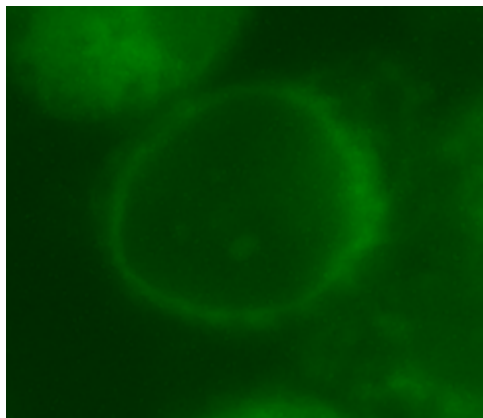




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ &  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη της έκφρασης του κλασσικού τάξης II μορίου MHC HLA-DR, μετά την αναστολή της έκφρασης του μη κλασσικού HLA-DO σε ανθρώπινες τροφοβλαστικές κυτταρικές σειρές.»



Μητροπούλου Μαρία

Υπεύθυνη καθηγήτρια: Αθανασάκη Ειρήνη

Ηράκλειο 2012

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας του τμήματος βιολογίας στο πανεπιστήμιο Κρήτης, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Ειρήνης Αθανασάκη.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ μου ανήκει σ' εκείνη, γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω την εργαστηριακή εργασία μέσα στο δικό της χώρο. Με βοήθησε, με εμπιστεύτηκε, έδειξε υπομονή, αλλά πάνω απ' όλα καλλιέργησε μια σχέση μεταξύ μας πολύ περισσότερη από αυτή καθηγήτριας-φοιτήτριας και μου έδωσε μια γερή ώθηση να ανοίξω τα φτερά μου, να γνωρίσω τις δυνατότητές μου και να πιστέψω στον εαυτό μου. Ευχαριστώ από καρδιάς!

Ευχαριστώ τα παιδιά που με βοήθησαν να ενταχθώ στο χώρο του εργαστηρίου, Μαρία Καλογνώμου, Χριστιάννα Κυβελίδου, Ιωάννα Ζέρβα, Αναστασία Τσελεκίδου.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα όλα τα παιδιά-συνδοιπόρους μου όλο το διάστημα στο εργαστήριο, με τα οποία περάσαμε όμορφες, δύσκολες, αστείες, ατελείωτες, αλλά σίγουρα εν τέλει, δημιουργικές στιγμές, την Αθηνά Χαϊδάκη, τη Μαρία Γλυμενάκη, τον Άγγελο Ματθαιακάκη, την Αναστασία Κάββαλου, την Κατερίνα Βαρδάκη, τη Δεβόρα Κάραλη, την Κατερίνα Μπακέλα, το Βασίλη Πατριαρχέα, την Αμαλία Ανθούση, τη Μαρία Κουτσάκη.

Ευχαριστώ επίσης το Στέλιο Ψυχαράκη για τη βοήθειά του στο μικροσκόπιο confocal στο ΙΤΕ και όλα τα παιδιά στα εργαστήρια Κρυσταλλογραφίας και Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας για την παραχώρηση των οργάνων.

Τέλος, ξεχωριστά ευχαριστώ ήθελα να πω στους γονείς μου και την αδερφή μου, γιατί είναι πάντα εδώ για μένα και φυσικά στην αδερφική μου φίλη, Έρη, για όλα!!!

*Μαρία Μητροπούλου*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	5
1.1. Ανοσία .....	5
1.2. Ανοσοποιητικό σύστημα .....	6
1.2.1. Τα πρωτογενή λεμφικά όργανα.....	7
1.2.2. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος .....	8
1.3. Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC).....	12
1.3.1. Μόρια MHC τάξης I.....	14
1.3.2. Μόρια MHC τάξης II.....	16
1.3.3. Μόρια MHC τάξης III.....	18
1.3.4. Μη κλασσικά MHC τάξης II .....	19
1.4. Ενδοκυτταρική οδός επεξεργασίας .....	20
1.5. Καρκίνος.....	22
1.6. Σκοπός της εργασίας.....	23
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
2.1. Χειρισμός κυτταροκαλλιιεργειών.....	26
2.1.1. Θρεπτικά υλικά .....	27
2.1.2. Πώς χρησιμοποιούμε τα κύτταρα από τη φλάσκα.....	27
2.1.3. Πάγωμα κυττάρων στους -80°C .....	28
2.1.4. Ξεπάγωμα κυττάρων από τους -80°C.....	29
2.2. siRNA διαμόλυνση.....	30
2.3. Εσωτερικός & εξωτερικός ανοσοφθορισμός .....	31
2.3.1. Μεταφορά δειγμάτων σε αντικειμενοφόρους για παρατήρηση στο confocal.....	33
2.4. RT-PCR.....	34
2.4.1. Απομόνωση poly-A mRNA από τα κύτταρα .....	34
2.4.2. RT-PCR.....	36
2.4.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	38
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	40
3.1. Ποσοστά φθορισμού από μετρήσεις σε οπτικό μικροσκόπιο.....	40

3.2. Εικόνες δειγμάτων από οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο confocal.....	43
3.3. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε gel αγαρόζης.....	49
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	51
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	53

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΑΝΟΣΙΑ

Ο λατινικός όρος **immunity** αναφέρεται στην κατάσταση προστασίας από μολυσματικές ασθένειες. Η ανοσία λοιπόν έχει να κάνει με την ιδιότητα του οργανισμού να αμύνεται σε κάποιον εξωτερικό παράγοντα και να μην υφίσταται τις συνέπειές του. Ο οργανισμός αναπτύσσει αυτή την ιδιότητα με τη βοήθεια ενός πολύπλοκου, σημαντικού συστήματος, το λεγόμενο ανοσοποιητικό σύστημα, για το οποίο θα αναφερθούμε παρακάτω. Η αντίδραση και η παραγωγή εξειδικευμένων κυττάρων και προϊόντων κατά του ξένου παράγοντα ονομάζεται **ανοσοβιολογική απόκριση**. Ο εξωτερικός παράγοντας που προκαλεί αυτήν την απόκριση ονομάζεται **αντιγόνο**, ενώ ο οργανισμός στον οποίο εισβάλλει το αντιγόνο είναι ο **ξενιστής**.

Η ανοσία, η προστασία δηλαδή από μολυσματικές ασθένειες, διαθέτει τόσο μη ειδικά, όσο και ειδικά συστατικά. Το μη ειδικό συστατικό, η **έμφυτη ανοσία**, αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στις μολύνσεις. Τα περισσότερα συστατικά της έμφυτης ανοσίας υπάρχουν πριν την έναρξη της μόλυνσης και συνιστούν μια ομάδα μηχανισμών για αντοχή στις ασθένειες. Αυτοί οι μηχανισμοί δεν είναι ειδικοί για ένα συγκεκριμένο παθογόνο, αλλά περιλαμβάνουν κυτταρικά και μοριακά συστατικά τα οποία αναγνωρίζουν τάξεις μορίων, που μοιάζουν με τα συνήθη παθογόνα. Φαγοκύτταρα, φραγμοί (πχ. δέρμα) και μια ποικιλία αντιμικροβιακών συστατικών που συντίθενται από τον ξενιστή, παίζουν σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία. (Calandra, 2003)

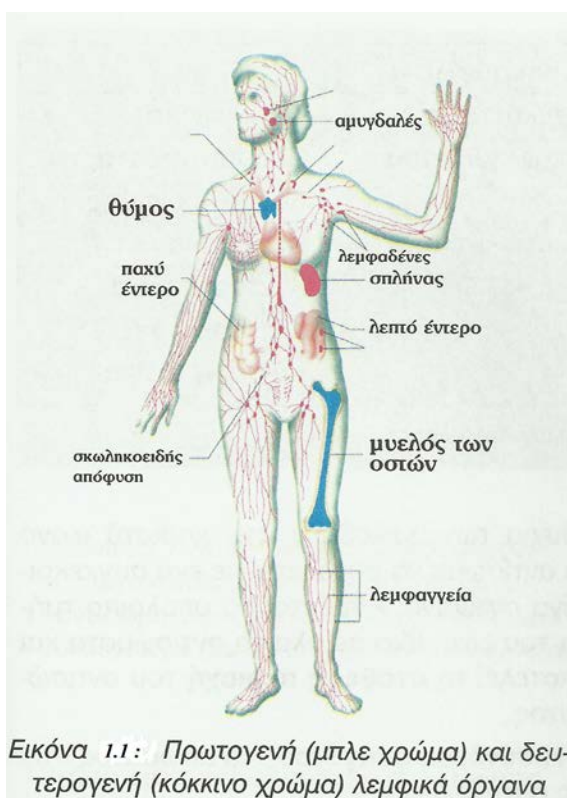
Αντίθετα, το ειδικό συστατικό, η **προσαρμοστική ανοσία**, δε συμμετέχει μέχρις ότου συμβεί αντιγονική επίθεση στον οργανισμό. Η προσαρμοστική ανοσία αποκρίνεται στην επίθεση με έναν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης, καθώς επίσης και την ιδιότητα της «μνήμης». Η έκθεση σε ένα αντιγόνο για πρώτη φορά οδηγεί σε μια προσαρμοστική ανοσολογική

απόκριση μέσα σε πέντε με έξι μέρες. Μια δεύτερη έκθεση στο ίδιο αντιγόνο προκαλεί μια απόκριση μνήμης. Η ανοσολογική απόκριση στη δεύτερη επαφή συμβαίνει πιο γρήγορα από την πρώτη, είναι ισχυρότερη και συχνά πιο δραστική στην εξουδετέρωση και την κάθαρση του παθογόνου. Οι βασικοί κυτταρικοί παράγοντες της προσαρμοστικής ανοσίας είναι τα λεμφοκύτταρα, τα αντισώματα και άλλα παραγόμενα μόρια.

Η ανοσία διακρίνεται σε δύο τύπους, ανάλογα με το αν τα αντισώματα παράγονται στον ίδιο τον οργανισμό ξενιστή ή παρέχονται σε αυτόν έτοιμα αντισώματα προερχόμενα από άλλον οργανισμό. Έτσι έχουμε την **ενεργητική** και την **παθητική ανοσία**, αντίστοιχα.

## 1.2 ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι υπεύθυνο για την άμυνα του οργανισμού. Αποτελείται από πολλά διαφορετικά όργανα και ιστούς, που βρίσκονται σχεδόν σε κάθε σημείο του σώματος. Τα όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος κατατάσσονται λειτουργικά σε δύο κύριες



κατηγορίες (εικόνα 1.1):

1. **τα πρωτογενή λεμφικά όργανα**, τα οποία περιλαμβάνουν το μυελό των οστών και το θύμο αδέν. Σε αυτά λαμβάνει χώρα η ωρίμανση των λεμφοκυττάρων.

2. **τα δευτερογενή λεμφικά όργανα**, τα οποία περιλαμβάνουν τους λεμφοαδένες, τον σπλήνα, και διάφορους λεμφικούς ιστούς που σχετίζονται με τους βλεννογόνους. Αυτά εγκλωβίζουν τα αντιγόνα και παρέχουν στα ώριμα λεμφοκύτταρα τον κατάλληλο

χώρο, ώστε να αλληλεπιδράσουν με αυτά τα αντιγόνα.

Επιπλέον, υπάρχουν και οι **τριτογενείς λεμφικοί ιστοί** οι οποίοι, σε φυσιολογικές συνθήκες, περιέχουν λιγότερα λεμφοειδή κύτταρα από τα δευτερογενή λεμφικά όργανα, αλλά μπορούν να φιλοξενήσουν λεμφοειδή κύτταρα κατά τη διάρκεια μιας φλεγμονώδους απόκρισης. Τους πιο σημαντικούς λεμφικούς ιστούς αποτελούν εκείνοι που σχετίζονται με το δέρμα.

### **1.2.1 ΤΑ ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΛΕΜΦΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ**

#### **A. Θύμος αδένας**

Ο θύμος αδένας αποτελεί το μέρος που λαμβάνει χώρα η ανάπτυξη και η ωρίμανση των T λεμφοκυττάρων. Είναι ένα όργανο που βρίσκεται πάνω από την καρδιά, έχει επίπεδο σχήμα και αποτελείται από δύο λοβούς. Κάθε λοβός περιβάλλεται από κάψα και διαιρείται σε λοβίδια. Κάθε λοβίδιο είναι οργανωμένο σε δύο διαμερίσματα: το εξωτερικό που ονομάζεται φλοιός και περιέχει πυκνούς πληθυσμούς ανώριμων T λεμφοκυττάρων, τα θυμοκύτταρα και το εσωτερικό που ονομάζεται μυελός και σπάνια περιέχει θυμοκύτταρα.

Η λειτουργία του θύμου περιλαμβάνει τη δημιουργία και την επιλογή μιας σειράς T λεμφοκυττάρων, τα οποία θα αναλάβουν την προστασία του οργανισμού από διάφορες μολύνσεις. Έτσι ο οργανισμός μαθαίνει να αναγνωρίζει και να ξεχωρίζει τον «εαυτό» από τον ξένο «εισβολέας» και να προστατεύεται από αυτόν.

#### **B. Μυελός των οστών**

Ο μυελός των οστών αποτελεί το σημείο προέλευσης και ανάπτυξης των B λεμφοκυττάρων, τόσο στον άνθρωπο, όσο και στο ποντίκι. Πιο συγκεκριμένα, στο μυελό των οστών αναπτύσσονται και ωριμάζουν τα αιμοποιητικά κύτταρα μέσα σε ένα δίκτυο στρωματικών κυττάρων, τα οποία είναι μη αιμοποιητικά κύτταρα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των αντίστοιχων αιμοποιητικών. Στα στρωματικά κύτταρα περιλαμβάνονται λιπώδη, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και μακροφάγα. Τα στρωματικά κύτταρα επηρεάζουν τη

διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, παρέχοντας τις συνθήκες ενός μικροπεριβάλλοντος που επάγει την αιμοποίηση.

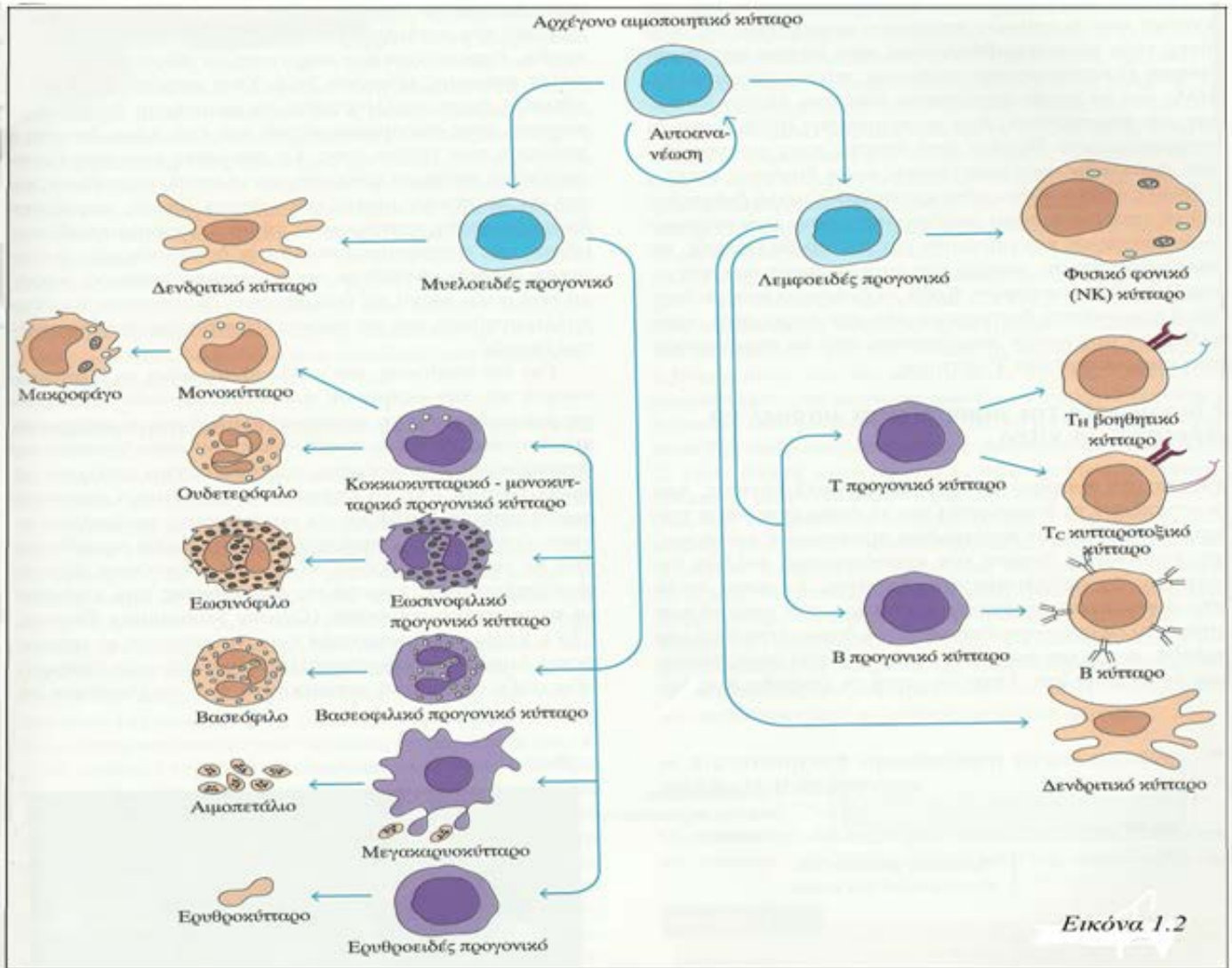
Σημείωση 1: Τα **αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα** αποτελούν έναν τύπο κυττάρων από τον οποίο προέρχονται όλα τα κύτταρα του αίματος. Έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε διάφορους άλλους τύπους κυττάρων, να ανανεώνονται αυτόματα και να διατηρούν σταθερά τα πληθυσμιακά τους επίπεδα, μέσω κυτταρικών διαιρέσεων.

Σημείωση 2: Στον άνθρωπο, η **αιμοποίηση**, η διαδικασία δηλαδή παραγωγής και ανάπτυξης των ερυθρών και των λευκών αιμοσφαιρίων, ξεκινά στον εμβρυϊκό λεκιθικό σάκο κατά τις πρώτες εβδομάδες της ανάπτυξης και συνεχίζει κατά τον τρίτο μήνα της κύησης στο εμβρυϊκό ήπαρ και μετά στο σπλήνα. Έπειτα, στον έβδομο μήνα την κύησης, η διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων συμβαίνει κυρίως στο μυελό των οστών, και με τη γέννηση, παρατηρείται ελάχιστη ή και καθόλου αιμοποιητική δραστηριότητα στο ήπαρ και το σπλήνα.

### **1.2.2 ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

Στα αρχικά στάδια της αιμοποίησης, ένα πολυδύναμο αρχέγονο κύτταρο μπορεί να ακολουθήσει δύο διαφορετικά μονοπάτια διαφοροποίησης, παράγοντας είτε ένα κοινό λεμφοειδές προγονικό κύτταρο, είτε ένα κοινό μυελοειδές προγονικό κύτταρο. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της λεμφικής και της μυελικής σειράς, τα αρχέγονα κύτταρα διαφοροποιούνται σε προγονικά, τα οποία χάνουν την ικανότητα αυτόματης ανανέωσης και ανήκουν πλέον σε μία από τις παραπάνω σειρές. Τα κοινά λεμφοειδή προγονικά κύτταρα δίνουν γένεση στα Β, Τ, ΝΚ (κύτταρα φονιάδες) και σε μερικά δενδριτικά κύτταρα. Τα μυελοειδή αρχέγονα κύτταρα δημιουργούν προγονικά κύτταρα των ερυθρών αιμοσφαιρίων (ερυθροκύτταρα), πολλών λευκών αιμοσφαιρίων (ουδετερόφιλα, εωσινόφιλα, βασεόφιλα, μονοκύτταρα, ιστιοκύτταρα, δενδριτικά) και αιμοπεταλίων (βλέπε εικόνα 1.2).





Εικόνα 1.2

Σημαντικό ρόλο στην εκκίνηση της ανοσολογικής απόκρισης παίζουν τα **μονοκύτταρα** και τα παράγωγά τους. Αυτό οφείλεται στην ιδιότητά τους να φαγοκυτώνουν ένα αντιγόνο και, με τη βοήθεια των λυσοσωμικών τους ενζύμων, να το αποδιατάσσουν και να το επαναφέρουν στην κυτταρική μεμβράνη σε νέα ανοσολογική μορφή, ώστε να μπορεί να αναγνωριστεί από τα λεμφικά κύτταρα. Λόγω της ικανότητάς τους να πραγματοποιούν την παραπάνω διαδικασία, τα μακροφάγα (μονοκύτταρα) ονομάζονται **αντιγονοπαρουσιαστές**.

Τα λεμφικά κύτταρα είναι επίσης πολύ σημαντικά στην ανοσολογία, καθώς κατευθύνουν την ειδική αναγνώριση του αντιγόνου και περιλαμβάνουν τους δύο βασικούς υποπληθυσμούς λεμφοκυττάρων, τα B και τα T λεμφοκύτταρα.

## **B λεμφοκύτταρα**

Στα θηλαστικά, τα B λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται και ωριμάζουν στο μυελό των οστών και οδηγούνται κατευθείαν στην περιφέρεια. Τα ώριμα B λεμφοκύτταρα διακρίνονται από τα υπόλοιπα λεμφοκύτταρα λόγω της σύνθεσης και έκφρασης μεμβρανικών ανοσοσφαιρινών (αντισώματα), οι οποίες λειτουργούν ως υποδοχείς αντιγόνων.

Κάθε ένα από τα περίπου  $1,5 \times 10^5$  μόρια αντισωμάτων της μεμβράνης ενός μόνο B κυττάρου, διαθέτει πανομοιότυπη θέση δέσμευσης για το αντιγόνο. Μεταξύ των μορίων που εκφράζονται στην επιφάνεια των ώριμων B λεμφοκυττάρων είναι και τα μόρια MHC τάξης II, τα οποία επιτρέπουν στα B λεμφοκύτταρα να λειτουργούν και ως αντιγονοπαρουσιαστικά (APC). Παρακάτω θα εξεταστούν αναλυτικότερα τα MHC τάξης II μόρια, όπως και το μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας (MHC).

Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο αντιγόνο και το μεμβρανικό αντίσωμα των παρθένων B λεμφοκυττάρων, καθώς επίσης και οι αλληλεπιδράσεις με τα T κύτταρα και τα μακροφάγα, επάγουν με επιλεκτικό τρόπο την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των αντίστοιχων ειδικών B κυτταρικών κλώνων. Στα πλαίσια αυτής της διαδικασίας, το B λεμφοκύτταρο διαιρείται επανειλημμένα και διαφοροποιείται εντός 4-5 ημερών, ώστε να σχηματίσει πληθυσμούς **πλασματοκυττάρων** και **κυττάρων μνήμης**. Τα πλασματοκύτταρα που διαθέτουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης μεμβρανικών αντισωμάτων, συνθέτουν και εκκρίνουν αντισώματα. Όλα τα μέλη ενός κλώνου από ένα δεδομένο B λεμφοκύτταρο, εκκρίνουν αντισώματα με την ίδια αντιγονοδεσμευτική ειδικότητα (χυμική ανοσία). Επίσης, είναι πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα και πολλά από αυτά πεθαίνουν εντός 1-2 εβδομάδων.

## **T λεμφοκύτταρα**

Τα T λεμφοκύτταρα προέρχονται από το μυελό των οστών και διαφοροποιούνται σε αυτόν και ωριμάζουν στο θύμο αδέν. Διαθέτουν, όπως και τα B κύτταρα, μεμβρανικούς υποδοχείς για αντιγόνα. Παρόλο

που ο αντιγονοδεσμευτικός T κυτταρικός υποδοχέας διαφέρει δομικά από τις ανοσοσφαιρίνες, διαθέτει κάποια κοινά χαρακτηριστικά με αυτές, που εντοπίζονται κυρίως στη δομή της θέσης δέσμευσης του αντιγόνου. Αντίθετα όμως με τα μεμβρανικά αντισώματα των B κυττάρων, ο T κυτταρικός υποδοχέας (TCR) δεν αναγνωρίζει ελεύθερα αντιγόνα, αλλά αντιγόνα που είναι συνδεδεμένα με μόρια συγκεκριμένων τάξεων. Τα περισσότερα T λεμφοκύτταρα γνωρίζουν αντιγόνα μόνο όταν είναι συνδεδεμένα με μόρια του «εαυτού», που κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται μέσα στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC). Η θεμελιώδης διαφορά μεταξύ χυμικής και κυτταρικής ανοσίας, έγκειται στο γεγονός ότι στη χυμική ανοσία τα B κύτταρα είναι ικανά να δεσμεύσουν διαλυτά αντιγόνα, ενώ στην κυτταρική ανοσία τα T περιορίζονται στην αναγνώριση αντιγόνων, που παρουσιάζονται από κύτταρα του ίδιου του οργανισμού. -Η κυτταρική ανοσία, έχει να κάνει με την κυτταρική θανάτωση μολυσμένων κυττάρων από T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα.- Ένα αντιγόνο, για να αναγνωριστεί από τα περισσότερα T κύτταρα, πρέπει να παρουσιάζεται σε συνδυασμό με μόρια MHC στην επιφάνεια αντιγονοπαραστατικών κυττάρων, μολυσμένων με ιό κυττάρων, καρκινικών κυττάρων ή κυττάρων μοσχευμάτων.

Τα T λεμφοκύτταρα, όπως και τα B, εκφράζουν διακριτά μεμβρανικά μόρια. Όλοι οι υποπληθυσμοί των T κυττάρων εκφράζουν τον TCR, ένα σύμπλεγμα πολυπεπτιδίων που περιλαμβάνει και το μόριο CD3, ενώ η πλειοψηφία τους διακρίνεται από την παρουσία ή του CD4 ή του CD8 επιφανειακού μορίου.

Τα T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν το μεμβρανικό γλυκοπρωτεϊνικό μόριο CD4, περιορίζονται στην αναγνώριση αντιγόνων που συνδέονται με μόρια MHC τάξης II και ανήκουν στην κατηγορία των **T βοηθητικών λεμφοκυττάρων (T<sub>h</sub>)**. Τα T<sub>h</sub> κύτταρα ενεργοποιούνται μετά από αναγνώριση ενός συμπλέγματος αντιγόνου-μορίου MHC II, που βρίσκεται πάνω σε ένα αντιγονοπαραστατικό κύτταρο. Μετά την ενεργοποίηση το T<sub>h</sub> λεμφοκύτταρο διαιρείται και δημιουργεί έναν κλώνο δραστικών κυττάρων, καθένα από τα οποία παρουσιάζει εξειδίκευση για το συγκεκριμένο σύμπλεγμα αντιγόνου-μορίου MHC II. Αυτά τα T<sub>h</sub>

κύτταρα εκκρίνουν διάφορες κυτταροκίνες, οι οποίες παίζουν κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση των B, των T και άλλων κυττάρων που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση.

Από την άλλη μεριά, τα T κύτταρα που εκφράζουν το διμερές μεμβρανικό γλυκοπρωτεϊνικό μόριο CD8, περιορίζονται στην αναγνώριση αντιγόνων που συνδέονται με μόρια MHC τάξης I, και ανήκουν σε μία άλλη κατηγορία T λεμφοκυττάρων, τα λεγόμενα **κυτταροτοξικά (T<sub>c</sub>)**. Αυτά λοιπόν, ενεργοποιούνται όταν αλληλεπιδράσουν με ένα σύμπλεγμα αντιγόνου-μορίου MHC τάξης I, που βρίσκεται στην επιφάνεια ενός μολυσμένου από ιό ή καρκινικού κυττάρου του οργανισμού, παρουσία κατάλληλων κυτταροκινών. Η ενεργοποίηση αυτή, που έχει σαν αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό, επάγει τη διαφοροποίηση του προ-T<sub>c</sub> κυττάρου σε μια δραστική μορφή κυττάρου, το κυτταροτοξικό T λεμφοκύτταρο (CTL). Αντίθετα με τα T<sub>h</sub> κύτταρα, τα περισσότερα CTL εκκρίνουν λίγες κυτταροκίνες, ενώ διαθέτουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να καταστρέφουν κύτταρα του οργανισμού που είναι είτε μολυσμένα με κάποιο ιό, είτε καρκινικά, είτε προερχόμενα από μόσχευμα.

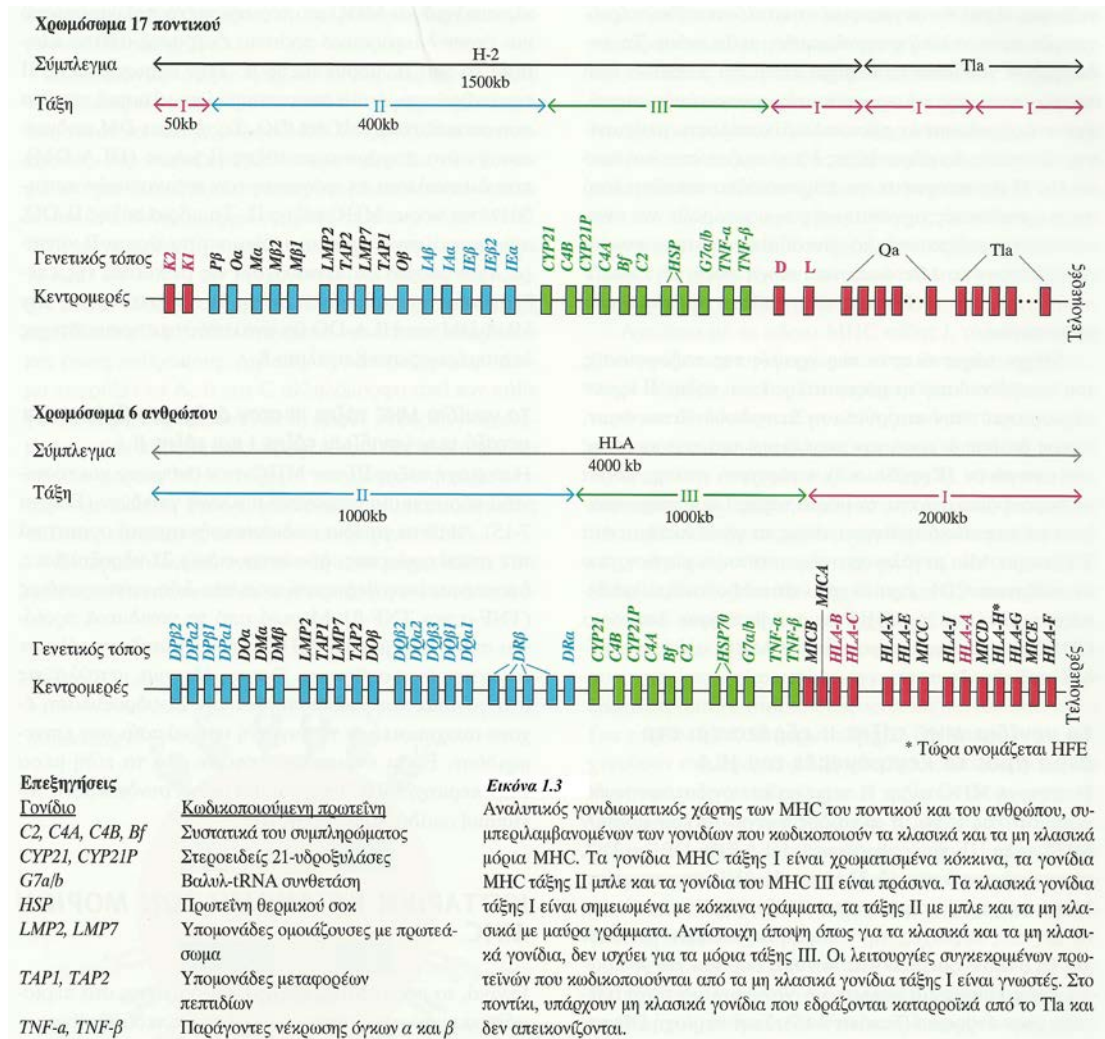
Ένας άλλος υποπληθυσμός T λεμφοκυττάρων είναι τα **κατασταλτικά T λεμφοκύτταρα (T<sub>s</sub>)**. Τα κύτταρα αυτά βοηθούν στην καταστολή της χυμικής και κυτταρικής ανοσίας. Επιπλέον παίζουν σημαντικό ρόλο στην αυτοανοσία και την ανοχή.

### **1.3 ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ (MHC)**

Σε όλα σχεδόν τα σπονδυλωτά, τα οποία έχουν μελετηθεί έως σήμερα και κυρίως στα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη μιας στενά συνδεδεμένης ομάδας γονιδίων, υψηλά πολυμορφικών, που ονομάζεται μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (**Major Histocompatibility Complex, MHC**). Τα προϊόντα της ομάδας αυτής παίζουν σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική αναγνώριση και τη διάκριση του εαυτού από το μη εαυτό.

Το MHC συμμετέχει στην ανάπτυξη τόσο των χυμικών, όσο και των κυτταρομεσολαβητικών ανοσολογικών αποκρίσεων. Ενώ τα αντισώματα μπορούν να αναγνωρίζουν τα αντιγόνα μόνα τους, τα περισσότερα T κύτταρα αναγνωρίζουν ένα αντιγόνο μόνο όταν αυτό συνδυάζεται με ένα μόριο MHC. Επιπλέον, τα μόρια MHC λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικές δομές, έτσι ώστε το συγκεκριμένο σύνολο των μορίων MHC που εκφράζονται σε ένα άτομο επηρεάζει το ρεπερτόριο των αντιγόνων στα οποία τα T<sub>H</sub> και τα T<sub>C</sub> κύτταρα του ατόμου μπορούν να αποκριθούν. Άρα τα MHC μόρια καθορίζουν εν μέρει την απόκριση ενός ατόμου σε αντιγόνα παθογόνων μικροοργανισμών και μ' αυτόν τον τρόπο εμπλέκονται στην ευαισθησία σε ασθένειες και στην ανάπτυξη αυτοανοσίας.

Το MHC, η ομάδα αυτή των γονιδίων που διατάσσονται σε μια μακρά συνεχόμενη περιοχή του DNA, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 στο ποντίκι και λέγεται **H-2** και στο χρωμόσωμα 6 στον άνθρωπο και αναφέρεται ως **σύμπλεγμα ανθρώπινων λευκοκυτταρικών αντιγόνων** (Human Leucocyte Antigen, **HLA**), επειδή αναφέρονται στις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια του MHC και εκφράζονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των λευκοκυττάρων. Και στις δύο περιπτώσεις, το MHC αποτελείται από εκφραζόμενα γονίδια και ψευδογονίδια, τα οποία οργανώνονται σε τρία μεγάλα αθροίσματα, τα τάξης I, II και III MHC μόρια, όπως φαίνεται στην εικόνα 1.3, με βασική διαφορά στο MHC των δύο οργανισμών στην τοποθέτηση των τάξης I και II μορίων. Στο ποντίκι τα τάξης II μόρια περιέχονται μέσα στα τάξης I.



### 1.3.1 Μόρια MHC τάξης I

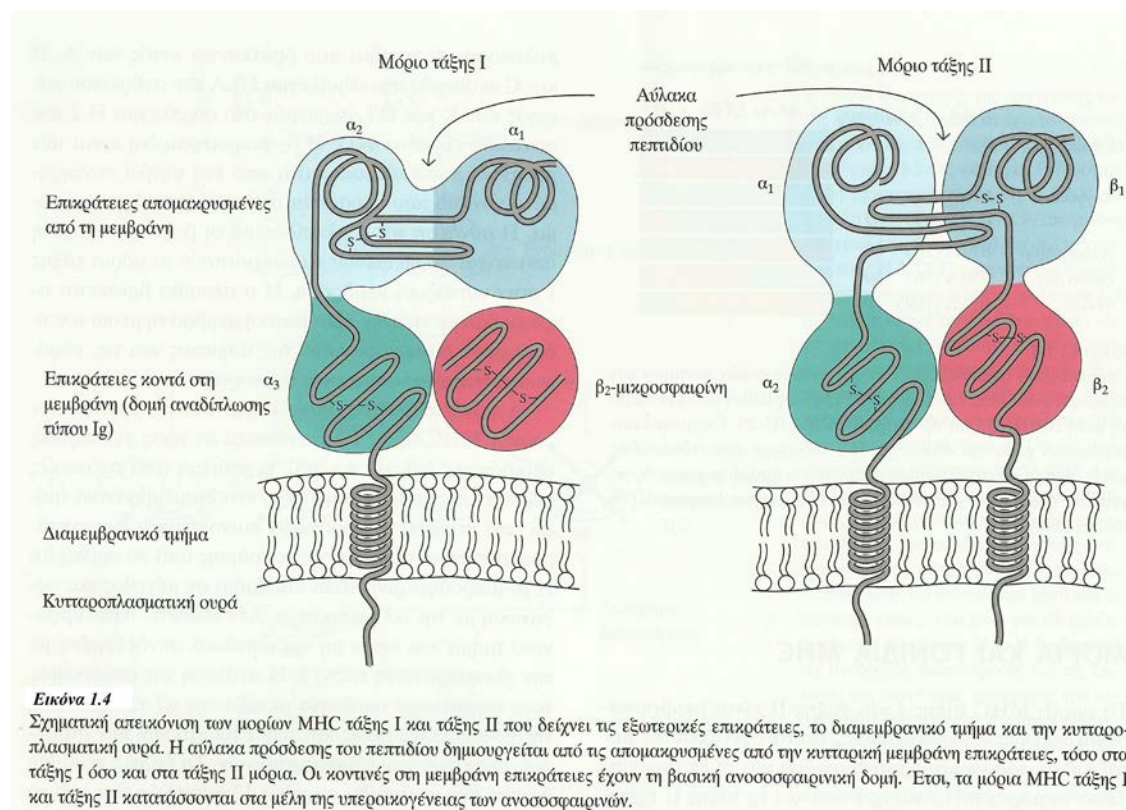
Τα γονίδια MHC τάξης I κωδικοποιούν γλυκοπρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια σχεδόν όλων των εμπύρηνων κυττάρων. Η κύρια λειτουργία των προϊόντων των γονιδίων τάξης I είναι η παρουσίαση των πεπτιδικών αντιγόνων στα T<sub>C</sub> κύτταρα. (Natarajan et al., 1999).

Τα μόρια MHC τάξης I, τα οποία ανακαλύφθηκαν πρώτα κωδικοποιούνται απ' τις περιοχές K και D στο ποντίκι και τις A, B και C γενετικές θέσεις στον άνθρωπο, εκφράζονται στο ευρύτερο φάσμα των κυτταρικών τύπων και αναφέρονται ως **κλασικά μόρια τάξης I**. Επιπλέον γονίδια ή ομάδες γονιδίων μέσα στα συμπλέγματα H-2 ή HLA, κωδικοποιούν μόρια τάξης I και ονομάζονται **μη κλασικά τάξης I** (HLA-G, HLA-F και HLA-E). (Heinrichs and Orr, 1990).



Τα μόρια MHC τάξης I αποτελούνται από μία α-αλυσίδα μεγέθους 45kDa, η οποία συνδέεται μη ομοιοπολικά με ένα μόριο β<sub>2</sub>-μικροσφαιρίνης με μέγεθος 12kDa. Η α-αλυσίδα είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που κωδικοποιείται από πολυμορφικά γονίδια που βρίσκονται εντός των A, B και C περιοχών στο σύμπλεγμα HLA του ανθρώπου και εντός των K και D/L περιοχών στο σύμπλεγμα H-2 του ποντικού. Η β<sub>2</sub>-μικροσφαιρίνη είναι μία πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από ένα υψηλά συντηρημένο γονίδιο που εδράζεται σε διαφορετικό χρωμόσωμα. Η σύνδεση της α-αλυσίδας με τη β<sub>2</sub>-μικροσφαιρίνη απαιτείται προκειμένου να εκφραστούν τα μόρια τάξης I στην κυτταρική μεμβράνη. Η α-αλυσίδα βρίσκεται αγκυροβολημένη στην πλασματική μεμβράνη μέσω του υδρόφοβου διαμεμβρανικού της τμήματος και της υδρόφιλης κυτταροπλασματικής της ουράς.

Η α-αλυσίδα των μορίων MHC τάξης I οργανώνεται σε τρεις εξωτερικές επικράτειες (α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub> και α<sub>3</sub>), η καθεμιά από τις οποίες περιέχει περίπου 90 αμινοξέα, ένα διαμεμβρανικό τμήμα από περίπου 25 υδρόφοβα αμινοξέα και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα σταθεροποίησης από 30 αμινοξέα.



Η  $\beta_2$ -μικροσφαιρίνη είναι παρόμοια σε μέγεθος και οργάνωση με την  $\alpha_3$  επικράτεια. Δε διαθέτει διαμεμβρανικό τμήμα και είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένη με τη γλυκοπρωτεΐνη τάξης I. Υπάρχει ομολογία μεταξύ της  $\alpha_3$  επικράτειας, της  $\beta_2$ -μικροσφαιρίνης και των επικρατειών των σταθερών περιοχών των ανοσοσφαιρινών. Έχουν βρεθεί δύο ζεύγη επικρατειών αλληλεπίδρασης: ένα ζεύγος απομακρυσμένο από τη μεμβράνη (επικράτειες  $\alpha_1$  και  $\alpha_2$ ), το οποίο σχηματίζει μία αύλακα πρόσδεσης πεπτιδίων μήκους 8-10 αμινοξέα και ένα ζεύγος κοντά στη μεμβράνη, που δημιουργείται από την  $\alpha_3$  επικράτεια και τη  $\beta_2$ -μικροσφαιρίνη. Η  $\alpha_3$  επικράτεια παρουσιάζει ιδιαίτερη συντηρητικότητα μεταξύ των διαφορετικών μορίων MHC τάξης I και περιέχει μια ακολουθία που αλληλεπιδρά με το CD8 επιφανειακό μόριο των  $T_C$  κυττάρων (βλέπε εικόνα 1.4).

Τα μόρια MHC τάξης I λοιπόν, προσδένουν πεπτίδια και τα παρουσιάζουν στα  $CD8^+$  T κύτταρα. Τα πεπτίδια αυτά προέρχονται από ενδογενείς, ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες που υφίστανται πέψη στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, μεταφέρονται μέσα στα κυστίδια του ενδοπλασματικού δικτύου, όπου και αλληλεπιδρούν με τα μόρια MHC τάξης I.

### 1.3.2 Μόρια MHC τάξης II

Τα γονίδια MHC τάξης II κωδικοποιούν γλυκοπρωτεΐνες που εκφράζονται κυρίως στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και B κύτταρα), όπου και παρουσιάζουν επεξεργασμένα αντιγονικά πεπτίδια στα  $T_H$  κύτταρα.

Οι δύο αλυσίδες των μορίων MHC τάξης II κωδικοποιούνται από τις περιοχές IA και IE στο ποντίκι και από τις περιοχές DR, DP και DQ στον άνθρωπο, οι οποίες ονομάζονται **κλασσικά μόρια τάξης II**, και παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με τα τάξης I μόρια στην τριτοταγή τους δομή (Brown et al, 1993). Όπως και στα τάξης I μόρια, υπάρχουν και τα **μη κλασσικά μόρια τάξης II**, τα I-M και I-O στα ποντίκια και τα HLA-DM και HLA-DO στον άνθρωπο, τα οποία εκφράζονται μόνο



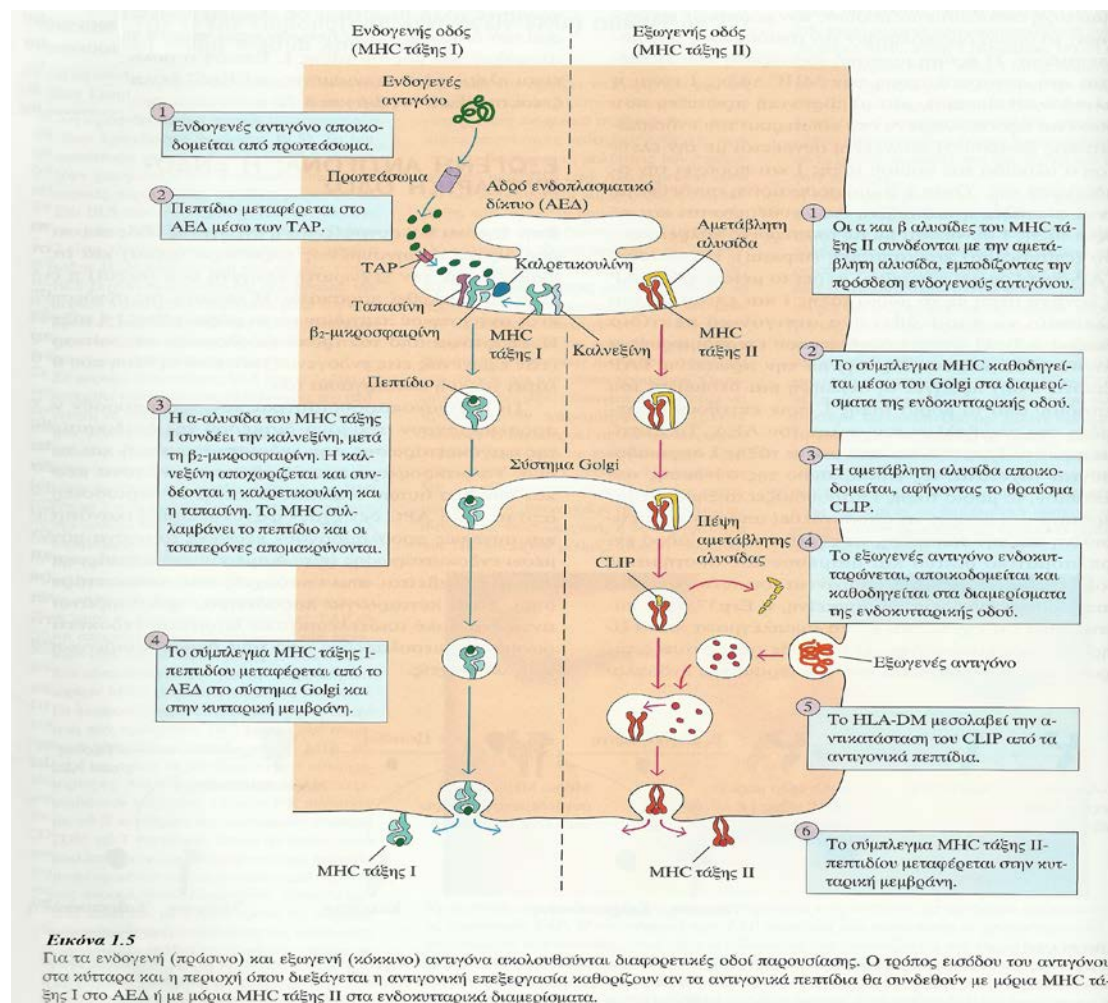
ενδοκυττάρια και λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης.

Τα μόρια MHC τάξης II αποτελούνται από δύο διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, μία α αλυσίδα μεγέθους 33kDa και μία β αλυσίδα 28kDa, που συνδέονται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Τα μόρια MHC τάξης II είναι μεμβρανοσυνδεδεμένες γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούνται από εξωτερικές επικράτειες, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα αγκυροβόλησης, όπως και στα τάξης I μόρια. Κάθε αλυσίδα σε ένα μόριο τάξης II περιέχει δύο εξωτερικές περιοχές, τις επικράτειες α1 και α2 στη μία αλυσίδα και τις επικράτειες β1 και β2 στην άλλη αλυσίδα. Οι δύο κοντινές στη μεμβράνη α2 και β2 επικράτειες, όπως και εκείνες των μορίων MHC τάξης I, παρουσιάζουν ομοιότητες στην ακολουθία τους και εμφανίζουν δομές με ανοσοσφαιρινικές αναδιπλώσεις. Το απομακρυσμένο από τη μεμβράνη τμήμα των μορίων τάξης II αποτελείται από τις επικράτειες α1 και β1 και δημιουργεί την αύλακα πρόσδεσης του επεξεργασμένου αντιγόνου (εικόνα 1.4, δεξιά).

Τα μόρια MHC τάξης II προσδέουν πεπτίδια και τα παρουσιάζουν στα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα (ένα CD4 μόριο μπορεί να προσδεθεί στις γειτονικές επικράτειες α2 και β2 του ετεροδιμερούς α2β2 και να σταθεροποιήσει τα διμερή τάξης II). Τα μόρια τάξης II μπορούν να προσδέσουν ποικιλία πεπτιδίων, τα οποία προέρχονται από εξωγενείς πρωτεΐνες (είτε εαυτές είτε μη εαυτές), που αποικοδομούνται μέσω της ενδοκυτταρικής οδού επεξεργασίας. Τα περισσότερα απ' τα πεπτίδια που συνδέονται με μόρια MHC τάξης II προέρχονται από μεμβρανοσυνδεδεμένες πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες συνδεδεμένες με τα κυστίδια της ενδοκυτταρικής οδού επεξεργασίας. Οι μεμβρανοσυνδεδεμένες πρωτεΐνες εισέρχονται μέσω φαγοκυττάρωσης ή ενδοκυττάρωσης που μεσολαβείται από υποδοχείς και σε αυτό το σημείο ακριβώς εισέρχονται στην ενδοκυτταρική οδό επεξεργασίας.

Οι δομικές και ανοσολογικές διαφορές που υπάρχουν μεταξύ των τάξης I και II στρατηγικών δέσμευσης πεπτιδίου, καθορίζουν τελικά την

ικανότητα ενός ατόμου να ανταποκριθεί με επιτυχία στις προκλήσεις του ανοσοποιητικού (Madden, 1995).



### 1.3.3 Μόρια MHC τάξης III

Τα γονίδια MHC τάξης III κωδικοποιούν, εκτός των άλλων προϊόντων, διάφορες εκκριτικές πρωτεΐνες με ανοσολογικές λειτουργίες, ανάμεσα στις οποίες περιλαμβάνονται και συστατικά του συστήματος του συμπληρώματος που σχετίζονται με τη φλεγμονή.

Ενώ τα μόρια MHC τάξης I και τάξης II έχουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά και επιπλέον και τα δύο παίζουν ρόλο στην επεξεργασία του αντιγόνου, η περιοχική MHC τάξη III, που περιβάλλεται από τις περιοχές τάξης I και II, κωδικοποιεί μόρια που είναι κρίσιμα στην ανοσολογική λειτουργία και έχουν λίγα κοινά στοιχεία με τα τάξης I και II μόρια. Τα προϊόντα της περιοχικής MHC τάξης III συμπεριλαμβάνουν τα

συστατικά του συμπληρώματος C4, C2, BF και κυτταροκίνες φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF) και των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

### **1.3.4 Μη κλασσικά μόρια MHC τάξης II**

#### ***HLA-DM***

Το HLA-DM είναι ένα μη κλασσικό μόριο MHC τάξης II, αρκετά συντηρημένο μεταξύ των διαφόρων ειδών θηλαστικών και με μεγάλη ομοιότητα με τα κλασσικά μόρια MHC τάξης II (Fling et al, 1994, Kelly et al, 1991). Τα μόρια HLA-DM είναι ετεροδιμερή δύο αλυσίδων α και β. Σε αντίθεση όμως με άλλα τάξης II μόρια, τα HLA-DM δεν είναι πολυμορφικά και δεν εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη, άλλα βρίσκονται κυρίως στα ενδοσωμικά διαμερίσματα. Η παρουσία του HLA-DM βοηθάει την πρόσδεση πεπτιδίων στα μόρια MHC τάξης II, όπως θα δούμε και παρακάτω (Morris et al, 1994).

#### ***HLA-DO***

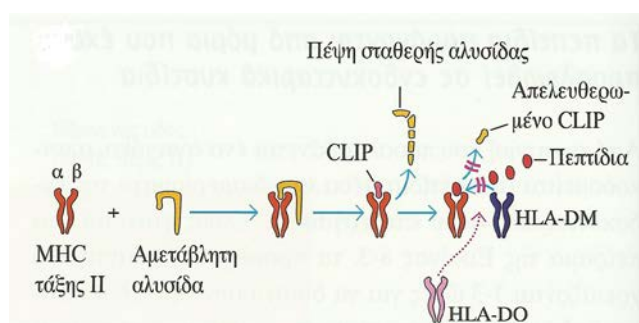
Το HLA-DO, όπως και το HLA-DM, είναι ένα μη κλασσικό και μη πολυμορφικό μόριο τάξης II και συναντάται μεταξύ των μορίων MHC και άλλων ειδών. Το HLA-DO διαφέρει από το HLA-DM στο ότι εκφράζεται μόνο στα B κύτταρα και το θύμο αδένα (Denzin et al, 2005), και αντίθετα με τα άλλα μόρια τάξης II, η έκφρασή του δεν επάγεται από την IFN- $\gamma$  (Ranella et al, 2005). Ένα μόριο HLA-DO συνίσταται από γονίδια που κωδικοποιούν τις αλυσίδες α και β, σχηματίζοντας ετεροδιμερή (Tonnellet et al, 1985). Τα γονίδια αυτά δεν είναι γειτονικά μέσα στο γενετικό τόπο του MHC, όπως συμβαίνει με όλα τα άλλα ζεύγη α και β αλυσίδων των μορίων τάξης II (βλέπε εικόνα 1.3). Το HLA-DO αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστή του HLA-DM. Όταν συνδέεται σταθερά με το HLA-DM, η καταλυτική δράση του δεύτερου στη φόρτωση του πεπτιδίου αναστέλλεται. Έτσι το HLA-DO επηρεάζει το ρεπερτόριο των πεπτιδίων που τελικά παρουσιάζεται από τα τάξης II MHC μόρια (van Ham et al, 1997).

## 1.4 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΟΔΟΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η επιλογή της σύνδεσης ενός αντιγονικού πεπτιδίου με τα μόρια τάξης I ή τάξης II, εξαρτάται από τον τρόπο εισόδου του στο κύτταρο (είτε εξωγενώς είτε ενδογενώς) και από τη θέση που θα λάβει χώρα η επεξεργασία του. Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μπορούν να προσλαμβάνουν αντιγόνα διαμέσου της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης ή της ενδοκυττάρωσης. Από τη στιγμή που προσλαμβάνεται ένα αντιγόνο, αποικοδομείται σε πεπτίδια μέσα στα διαμερίσματα της ενδοκυτταρικής οδού επεξεργασίας.

Τα προσληφθέντα αντιγόνα χρειάζονται 1-3 ώρες για να διασχίσουν την ενδοκυτταρική οδό και να εμφανιστούν στην κυτταρική επιφάνεια με τη μορφή των συμπλεγμάτων πεπτιδίου – μορίου MHC τάξης II. Μέσα στα διαμερίσματα της ενδοκυτταρικής οδού, το αντιγόνο αποικοδομείται σε ολιγοπεπτίδια των 13-18 καταλοίπων, τα οποία δεσμεύονται στα μόρια MHC τάξης II.

Κατά τη σύνθεση ενός μορίου MHC τάξης II μέσα στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ΑΕΔ), τρία ζεύγη αλυσίδων αβ τάξης II συνδέονται με ένα προσυγκροτημένο πρωτεϊνικό τριμερές, που ονομάζεται αμετάβλητη αλυσίδα (invariant chain, Ii, CD74). Αυτή η τριμερής πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τη θέση δέσμευσης πεπτιδίων των μορίων MHC τάξης II, παρεμποδίζοντας τη σύνδεση όλων των ενδογενώς παραγόμενων πεπτιδίων στην αύλακα, εφόσον το μόριο MHC τάξης II βρίσκεται ακόμα μέσα στο ΑΕΔ. Η



Εικόνα 1.6

Συγκρότηση των μορίων MHC τάξης II. Στο ΑΕΔ, ένα νεοσυντιθέμενο μόριο MHC τάξης II δεσμεύει μία αμετάβλητη αλυσίδα. Η δεσμευμένη αμετάβλητη αλυσίδα (Ii) εμποδίζει την πρόωξη δέσμευσης πεπτιδίων στο μόριο τάξης II και βοηθά στην καθοδήγηση του συμπλέγματος προς τα ενδοκυτταρικά κυστιδιακά διαμερίσματα που περιέχουν πεπτίδια προερχόμενα από εξωγενή αντιγόνα. Η πέψη της αμετάβλητης αλυσίδας αφήνει το μόριο CLIP, ένα μικρό θραύσμα που παραμένει δεσμευμένο στην αύλακα του μορίου MHC τάξης II. Το HLA-DM, ένα μη κλασικό μόριο MHC τάξης II, που εκφράζεται στα ενδοσωμικά διαμερίσματα, ρυθμίζει την ανταλλαγή των αντιγονικών πεπτιδίων με το μόριο CLIP. Το μη κλασικό μόριο MHC τάξης II, HLA-DO, ίσως δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της επεξεργασίας και παρουσίας αντιγόνων από τα μόρια τάξης II, αφού συνδέεται με το μόριο HLA-DM και παρεμποδίζει τη δράση του στην αποσύνδεση του CLIP από τα μόρια τάξης II.

αμετάβλητη αλυσίδα εμπλέκεται επίσης στην αναδίπλωση των αλυσίδων  $\alpha$  και  $\beta$  των μορίων τάξης II, στη διαδικασία εξόδου τους απ' το ΑΕΔ και στην επακόλουθη καθοδήγηση των μορίων MHC τάξης II προς την ενδοκυτταρική οδό επεξεργασίας από το δίκτυο trans-Golgi, αφού περιέχει μηνύματα-οδηγούς στην κυτταροπλασματική της ουρά, που κατευθύνουν τη μεταφορά του συμπλέγματος MHC τάξης II από το δίκτυο trans-Golgi προς τα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα.

Τα περισσότερα συμπλέγματα MHC τάξης II – αμετάβλητης αλυσίδας μεταφέρονται απ' το ΑΕΔ όπου σχηματίζονται, διαμέσου του συστήματος Golgi, του δικτύου trans-Golgi και της ενδοκυτταρικής οδού, μετακινούμενα σε μία σειρά από ολοένα και περισσότερο όξινα διαμερίσματα, από τα πρώιμα ενδοσώματα στα όψιμα και τελικά στα λυσοσώματα. Η πρωτεολυτική δραστηριότητα αυξάνει σε κάθε διαδοχικό διαμέρισμα και η αμετάβλητη αλυσίδα σταδιακά αποικοδομείται. Το μικρότερο λειτουργικό μέρος της αμετάβλητης αλυσίδας, που ονομάζεται **CLIP** και σχετίζεται με τα μόρια τάξης II, παραμένει συνδεδεμένο με το μόριο MHC τάξης II μετά την πέψη της αμετάβλητης αλυσίδας στο ενδοσωμικό διαμέρισμα και καταλαμβάνει τη θέση δέσμευσης του πεπτιδίου στα μόρια MHC τάξης II, παρεμποδίζοντας πιθανόν την πρόωρη δέσμευση οποιουδήποτε αντιγονικού πεπτιδίου. (Cresswell, 1994, Denzin and Cresswell, 1995).

Η αντικατάσταση του CLIP με τα αντιγονικά πεπτίδια καταλύεται από το μη κλασσικό μόριο MHC τάξης II, HLA-DM (Karlsson, 2005) (εικόνα 1.6). Η αντίδραση μεταξύ του HLA-DM και του συμπλέγματος μορίου τάξης II – CLIP που διευκολύνει την αντικατάσταση του CLIP από κάποιο άλλο πεπτίδιο παρεμποδίζεται από την παρουσία του HLA-DO, μη κλασσικού μορίου MHC τάξης II, το οποίο προσδένεται στο HLA-DM και ελαττώνει την απόδοση της αντικατάστασης (Denzin et al, 2005, van Ham et al, 2000).

Για τη διατήρηση της δομής και της σταθερότητας των μορίων MHC τάξης II απαιτείται η δέσμευση ενός πεπτιδίου. Από τη στιγμή που θα δεσμευθεί ένα πεπτίδιο, το σύμπλεγμα πεπτιδίου-μορίου τάξης II μεταφέρεται στην πλασματική μεμβράνη, όπου το ουδέτερο pH

επιτρέπει στο σύμπλεγμα να προσλάβει μια συμπαγή και σταθερή μορφή. Το πεπτίδιο δεσμεύεται με τέτοια σταθερότητα σε αυτή τη συμπαγή μορφή, ώστε σε φυσιολογικές συνθήκες είναι δύσκολη η οποιαδήποτε απόπειρα αντικατάστασης του πεπτιδίου που έχει δεσμευτεί στα μόρια τάξης II στη μεμβράνη από ένα άλλο πεπτίδιο.

## 1.5 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

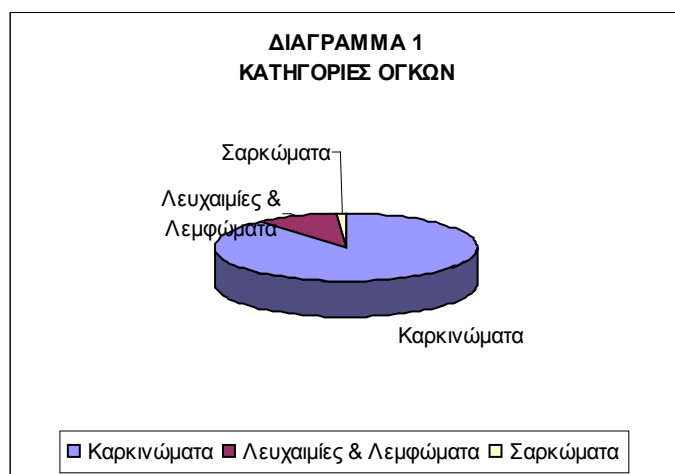
Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Οι στατιστικές δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Από την ανοσολογική πλευρά, τα καρκινικά κύτταρα θεωρούνται ως τροποποιημένα εαυτά κύτταρα του οργανισμού τα οποία διέφυγαν από μηχανισμούς που ρυθμίζουν την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων.

Στα περισσότερα όργανα και ιστούς ενός ώριμου ζώου επικρατεί, συνήθως, μια ισορροπία μεταξύ της κυτταρικής ανανέωσης και του κυτταρικού θανάτου. Οι διάφοροι τύποι ώριμων κυττάρων του οργανισμού έχουν συγκεκριμένη διάρκεια ζωής και καθώς τα κύτταρα πεθαίνουν, αντικαθίστανται από νέα ίδιου τύπου κύτταρα που προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η παραγωγή νέων κυττάρων ρυθμίζεται έτσι ώστε ο συνολικός αριθμός των κυττάρων ενός συγκεκριμένου τύπου να παραμένει σταθερός. Περιστασιακά όμως, ένας αυξανόμενος κυτταρικός πληθυσμός είναι δυνατόν να μην ανταποκρίνεται στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη. Από αυτόν τον κυτταρικό πληθυσμό, προκύπτουν κλώνοι που αναπτύσσονται σε μεγάλη κλίμακα, δημιουργώντας έναν όγκο.

Οι όγκοι μπορεί να είναι καλοήθεις ή κακοήθεις. Ένας όγκος που δεν αναπτύσσεται απεριόριστα και δε διηθεί ευρέως τους περιβάλλοντες ιστούς είναι **καλοήθης**. Ενώ **κακοήθης** όγκος είναι εκείνος που αυξάνεται διαρκώς και γίνεται προοδευτικά διηθητικός. Ο όρος καρκίνος

αναφέρεται ειδικά σε έναν κακοήγη όγκο. Μικρές ομάδες καρκινικών κυττάρων μπορεί να αποκοπούν από τον κύριο (πρωτογενή) όγκο και, μέσω του περιφερικού αίματος ή των λεμφικών αγγείων, να μεταφερθούν σε άλλους ιστούς, όπου συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται σχηματίζοντας δευτερογενείς όγκους, φαινόμενο που ονομάζεται μετάσταση.

Οι κακοήθεις όγκοι κατατάσσονται ανάλογα με την εμβρυϊκή προέλευση του ιστού από τον οποίον πηγάζει ο όγκος. Οι περισσότεροι είναι **καρκινώματα**, δηλαδή όγκοι που προέρχονται από ενδοδερμικούς ή εξωδερμικούς ιστούς, όπως το δέρμα ή το επιθήλιο εσωτερικών οργάνων και αδένων. Καρκινώματα είναι η πλειοψηφία των καρκίνων του παχέος εντέρου, του μαστού, του προστάτη και του πνεύμονα. Οι



**Λευχαιμίες** και τα **Λεμφώματα** είναι κακοήθεις όγκοι των αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών και αποτελούν το 9% περίπου του συνόλου των καρκίνων στις ΗΠΑ. Στις λευχαιμίες, τα καρκινικά

κύτταρα πολλαπλασιάζονται υπό μορφή μεμονωμένων κυτταρικών κλώνων, ενώ τα λεμφώματα έχουν την τάση να αυξάνονται ως καρκινική μάζα. Τα **σαρκώματα**, που εμφανίζονται με χαμηλότερη συχνότητα, προέρχονται από μεσοδερμικούς συνδετικούς ιστούς, όπως είναι τα οστά, ο λιπώδης ιστός και ο χόνδρος (διάγραμμα 1).

## 1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να ελέγξουμε πώς επηρεάζεται η έκφραση των μορίων MHC τάξης II στις κυτταρικές σειρές JAR και BEWO, όταν καταστειλούμε την έκφραση της αλυσίδας HLA-DOβ, μέσω της διαδικασίας siRNA διαμόλυνσης.

## **Κυτταρικές σειρές**

✓ Η κυτταρική σειρά **JAR** προέκυψε από κύτταρα ανθρώπινου χοριοκαρκινώματος από τροφοβλαστικό όγκο πλακούντα 24χρονης γυναίκας. Τα συγκεκριμένα κύτταρα αναπτύσσονται *in vitro* σε θρεπτικό υλικό RPMI (10% FBS) και μια φυσική τους ιδιότητα είναι να προσκολλούνται στην επιφάνεια της φλάσκας, όπου αναπτύσσονται.

✓ Η κυτταρική σειρά **BEWO** προέρχεται κι αυτή από κύτταρα ανθρώπινου χοριοκαρκινώματος εμβρυϊκού πλακούντα. Αυτά τα κύτταρα αναπτύσσονται εργαστηριακά στο θρεπτικό υλικό Ham 's F12 (10% FBS) και προσκολλούνται επίσης στο τοίχωμα του δοχείου ανάπτυξης τους (φλάσκα).

## **Τροφοβλάστη**

Η τροφοβλάστη, ή αλλιώς χόριο, αποτελεί έναν ιστό από τον οποίο αναπτύσσεται ο πλακούντας και οι μεμβράνες κατά την εγκυμοσύνη. Εισέρχεται στην επένδυση της μήτρας για να ξεκινήσει την εγκυμοσύνη και να τη βοηθήσει να εξελιχθεί. Το χοριοκαρκίνωμα αποτελεί μία κακοήγη νεοπλασία (όγκο) των κυττάρων των χοριακών λαχνών του πλακούντα. Οι τροφοβλάστες δεν εκφράζουν κάποιο επιφανειακό αντιγόνο τάξης II, εκφράζουν όμως ενδοκυτταρικά HLA-DR καθώς και το μη κλασσικό μόριο HLA-DO, αλλά όχι και το HLA-DM (Ranella et al, 2005). Με την παραπάνω ρύθμιση πετυχαίνεται να μην απορριφθεί το έμβρυο. Αν αντίθετα επαχθεί η έκφραση αυτών των μορίων, θα προκληθούν μητρική ανοσολογική επίθεση και απόρριψη του εμβρύου (Athanasakis et al, 1996, Athanasakis-Vassiliadis et al, 1990).

Θα έχει λοιπόν εξαιρετικό ενδιαφέρον να δούμε τα αποτελέσματα μετά την αποσιώπηση της HLA-DOβ αλυσίδας του συγκεκριμένου μορίου MHC τάξης II στα κύτταρα που περιγράψαμε, με τη διαδικασία siRNA διαμόλυνσης.



## **siRNA Διαμόλυνση**

Τα siRNAs (siRNA: βραχύ παρεμβαλλόμενο RNA) είναι μικρά συνθετικά μόρια RNA τα οποία εισάγονται στα κύτταρα με διαμόλυνση (transfection) για να προκαλέσουν την αδρανοποίηση γονιδίων.

Κάθε αλληλουχία siRNA που δημιουργείται, έχει στόχο ένα συγκεκριμένο μόριο mRNA, που πρόκειται να αποσιωπήσει και μόνο ο κλώνος που είναι συμπληρωματικός προς το mRNA-στόχο μπορεί να κατευθύνει την αποσιώπηση του γονιδίου. Η αποσιώπηση του mRNA-στόχου μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω αποικοδόμησης του mRNA (πλήρης συμπληρωματικότητα siRNA και mRNA-στόχου), είτε μέσω καταστολής της μετάφρασής του (μεταλλαγή της αλληλουχίας siRNA και ύπαρξη αναντιστοιχίας στο κέντρο του siRNA).

Παρόλο που τα siRNAs είναι πολύ αποτελεσματικά στην αποικοδόμηση του mRNA των γονιδίων-στόχων, είναι δύσκολο να επινοηθούν μέθοδοι γενικής χρήσης, μέσω των οποίων θα μπορούσαν να εκφραστούν σταθερά μέσα σε ένα κύτταρο ξεχωριστά οι κλώνοι του siRNA. Πειράματα αποσιώπησης γονιδίων πραγματοποιούνται λοιπόν, διαμολύνοντας τα κύτταρα με συνθετικά siRNAs. Έτσι, επιτυγχάνεται η παροδική αποσιώπηση του γονιδίου στόχου, ενώ η έκφρασή του επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα μόλις μειωθούν τα επίπεδα του εξωγενούς siRNA, είτε γιατί αυτά αποικοδομούνται με την πάροδο του χρόνου, είτε επειδή αραιώνονται καθώς τα κύτταρα διαιρούνται.

## 2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Ο χειρισμός των κυτταροκαλλιεργειών πραγματοποιείται σε αυστηρά στείρες συνθήκες. Για να το επιτύχουμε αυτό, εκτός των άλλων, συνηθίζουμε να φοράμε πάντα γάντια. Τα κύτταρα τα οποία



Εικόνα 2.1

αναπτύσσονται μέσα σε φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας 25cm<sup>2</sup> ( $V_{\text{τελ}}=5\text{ml}$ ) ή 75cm<sup>2</sup> ( $V_{\text{τελ}}=15\text{ml}$ ) (εικόνα 2.1), τοποθετούνται σε επωαστήρα, στον οποίο διατηρούνται σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (37°C) και CO<sub>2</sub> (5%). Αλλαγές θρεπτικού υλικού πραγματοποιούνται κάθε 2-3 ημέρες διατηρώντας πάντα στείρες συνθήκες. Το θρεπτικό υλικό είναι συγκεκριμένο για κάθε διαφορετική κυτταρική σειρά. Σε κάθε αλλαγή θρεπτικού υλικού:

1. ελέγχουμε για τυχόν μόλυνση στα κύτταρα κάθε φλάσκας, παρατηρώντας εάν το θρεπτικό υλικό είναι θολό, εάν σε περίπτωση προσκολλητικών κυττάρων έχουν ξεκολλήσει από την επιφάνεια της φλάσκας ή εάν υπάρχει ανάπτυξη ανεπιθύμητου μικροοργανισμού στη φλάσκα με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου,

2. παρατηρούμε τον πληθυσμό των κυττάρων της φλάσκας, ώστε πάντα να βρίσκεται σε ιδανικά επίπεδα για την ανάπτυξή τους, πιο συγκεκριμένα από  $0,5 \times 10^6$  έως  $10^6$  κύτταρα/ml. Για τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων, τοποθετούμε μικρή ποσότητα από αυτά σε αιμοκυτταρόμετρο και μετράμε σε οπτικό μικροσκόπιο,

3. παρατηρούμε επίσης και τη βιωσιμότητα των κυττάρων με χρήση trypan blue. Ιδανικά θα πρέπει να υπάρχουν περίπου 90-95% ζωντανά για να πραγματοποιήσουμε ένα πείραμα.

### 2.1.1 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των συγκεκριμένων κυτταρικών σειρών ήταν τα:

#### A) **RPMI – FBS 10%**

Για την παραγωγή 500ml θρεπτικού υλικού χρειάζονται:

- 440ml RPMI 1x (GIBCO)
- 5ml L-glutamine
- 5ml στρεπτομυκίνη
- 50ml ορός βοοειδούς FBS (10%)

Προσθέτουμε NaOH ώστε το θρεπτικό υλικό να έχει pH=7-7,5. Φιλτράρεται σε στείρες συνθήκες. Κλείνουμε με parafilm το καπάκι του μπουκαλιού και φυλάσσουμε το θρεπτικό υλικό στους 4°C.

#### B) **Ham 's F12 – FBS 10%**

Για την παραγωγή 500ml θρεπτικού υλικού χρειάζονται:

- 445ml Ham 's F12 1x (GIBCO)
- 5ml στρεπτομυκίνη
- 50ml ορός βοοειδούς FBS (10%)

Όμοια με το προηγούμενο, ρυθμίζουμε την τιμή του pH σε ουδέτερα επίπεδα, φιλτράρουμε, κλείνουμε με parafilm το καπάκι και αποθηκεύουμε στους 4°C.

### 2.1.2 ΠΩΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΦΛΑΣΚΑ

Λόγω της ιδιότητας των κυττάρων που χειριζόμαστε να προσκολλάνε στην επιφάνεια του δοχείου που αναπτύσσονται, είναι απαραίτητη μια διαδικασία για να τα «ξεκολλάμε» κάθε φορά που χρειάζεται να τα μετακινήσουμε από τη φλάσκα, είτε για να αραιώσουμε τον αριθμό τους είτε για να τα παγώσουμε-αποθηκεύσουμε είτε για να τα χρησιμοποιήσουμε σε κάποια πειραματική διαδικασία.

Για αυτή τη διαδικασία χρησιμοποιούμε το ένζυμο **τροψίνη** (trypsin – EDTA (1x) Gibco), το οποίο έχει την ιδιότητα να καταστρέφει όλους τους μεμβρανικούς υποδοχείς. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα.
  - Προσθέτουμε trypsin – EDTA (1x) Gibco, 2ml στην 25cm<sup>2</sup>- και 4ml στην 75cm<sup>2</sup> φλάσκα.
  - Επωάζουμε 3-5min στον επωαστήρα, ώστε να δράσει η τρυψίνη.
  - Προσθέτουμε 4ml στην 25cm<sup>2</sup>- και 6ml στην 75cm<sup>2</sup> φλάσκα από το κατάλληλο για την εκάστοτε κυτταρική σειρά θρεπτικό υλικό – FBS (10%), ώστε να σταματήσει η δράση της τρυψίνης.
- Πλέον στο εναιώρημα που έχουμε υπάρχουν τα κύτταρα και, μετά από φυγοκέντρηση για 6min σε 1200rpm, είναι στη διάθεσή μας ως ίζημα.

### **2.1.3 ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟΥΣ -80°C**

- Υλικά & Διαλύματα

- cryovials
- tubes 15ml
- πιπέτες Pasteur
- φυγόκεντρος Kubota
- DMSO (Dimethyl-sulphoxide)
- αιμοκυτταρόμετρο Neubauer
- οπτικό μικροσκόπιο
- θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (αναλόγως την κυτταρική σειρά: RPMI-FBS 10% και RPMI-FBS 20% ή Ham 's F12-FBS 10% και Ham 's F12-FBS 20%)

- Διαδικασία

Μετά τη διαδικασία που προαναφέραμε με τη χρήση της τρυψίνης για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα, τα έχουμε στη διάθεσή μας σαν ίζημα. Προσθέτουμε λοιπόν, ποσότητα θρεπτικού μέσου περιεκτικότητας 20% σε FBS, τόση ώστε τα κύτταρά μας να είναι σε συγκέντρωση  $2 \times 10^6$ ml (tube 1). Έχει προηγηθεί μέτρηση αυτών στο αιμοκυτταρόμετρο και, γνωρίζοντας τον αριθμό κυττάρων που επιθυμούμε, ξέρουμε και την ποσότητα στην οποία θα είναι διαλυμένα, και άρα θα πρέπει να πάρουμε. Η τελική συγκέντρωση που θα πραγματοποιηθεί το πάγωμα

είναι  $10^6$  κύτταρα/ml, κι επειδή σε κάθε cryovial τοποθετούμε συνολικό όγκο 1ml, ουσιαστικά θα τοποθετηθούν  $10^6$  κύτταρα/vial.

Σε άλλο σωληνάριο φτιάχνουμε ένα διάλυμα ίσης τελικής ποσότητας με αυτή του tube 1, το οποίο θα περιέχει θρεπτικό μέσο (FBS 10%) με 20% DMSO (tube 2). Στη συνέχεια, τοποθετούμε στα cryovials από 0,5ml από κάθε σωληνάριο, ώστε να φτάσουμε στον τελικό όγκο 1ml και στην επιθυμητή συγκέντρωση κυττάρων  $10^6$  κύτταρα/cryovial. Τέλος, τοποθετούμε τα cryovials στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

(*Σημείωση:* Επειδή το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα σε συνθήκες περιβάλλοντος, από τη στιγμή που θα έρθει σε επαφή με αυτά, οι κινήσεις μας είναι πάρα πολύ γρήγορες, ώστε να έχουμε όσο το δυνατόν λιγότερες απώλειες.)

#### **2.1.4 ΞΕΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟΥΣ $-80^{\circ}\text{C}$**

- Υλικά & Διαλύματα

-tubes 15ml

-πιπέτες Pasteur

-water bath

-φυγόκεντρος Kubota

-επωαστήρας (incubator)

-φλάσκες καλλιέργειας  $25\text{cm}^2$  και  $75\text{cm}^2$

-θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (αναλόγως την κυτταρική σειρά: RPMI-FBS 10% και RPMI-FBS 20% ή Ham 's F12-FBS 10% και Ham 's F12-FBS 20%)

- Διαδικασία

Παίρνουμε τα κύτταρα απ' τους  $-80^{\circ}\text{C}$  και τα τοποθετούμε στους  $37^{\circ}\text{C}$  στο water bath. Μόλις ξεπαγώσουν, τα αραιώνουμε 10 φορές, τοποθετώντας το 1ml διαλύματος που υπάρχει στο cryovial σε 9ml θρεπτικού μέσου. Φυγοκεντρούμε για 6min σε 1200rpm και στη συνέχεια επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 5ml θρεπτικού μέσου (20%FBS). Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε φλάσκα  $25\text{cm}^2$  και την τοποθετούμε

(οριζόντια, ώστε να προσκολληθούν στη μεγάλη επιφάνεια της φλάσκας τα «προσκολλητικά» μας κύτταρα) στον επωαστήρα.

✓ *Παρατήρηση 1:* Επειδή κατά το πάγωμα έχει προστεθεί στα κύτταρα το τοξικό, σε RT συνθήκες, DMSO, όλες οι κινήσεις μας ως την απομάκρυνσή του από τα κύτταρα είναι ταχύτατες!

✓ *Παρατήρηση 2:* Για τις πρώτες τρεις αλλαγές θρεπτικού μέσου, θα χρησιμοποιούμε το θρεπτικό υλικό με 20% FBS, ώστε να βοηθηθούν τα κύτταρα στην ανάπτυξή τους μετά το «σοκ» του ξεπαγώματος και μετά συνεχίζουμε με το 10% FBS.

## 2.2 siRNA ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ

Σκοπός της συγκεκριμένης τεχνικής στη δική μας πειραματική διαδικασία είναι να σταματήσει η έκφραση της HLA-DOβ αλυσίδας στις κυτταρικές σειρές JAR και BEWO.

- Υλικά & Διαλύματα
- 6-well plate
- eppendorfs 1,5ml
- πιπέτες Gilson 20μl, 200μl, 1000μl
- πιπέτες Pasteur
- καλυπτρίδες αποστειρωμένες
- pipette tip 200μl, yellow & 1000μl, blue
- αποστειρωμένη λαβίδα
- θρεπτικό υλικό μέσο, χωρίς αντιβιοτικό, 10% FBS
- siRNA duplex (DOβ)
- siRNA Transfection Medium (sc-36868, Santa Cruz Biotechnology)
- siRNA Transfection Reagent (sc-29528)
- θρεπτικό υλικό μέσο, με αντιβιοτικό, 10% FBS & 20% FBS
- λιποφεκταμίνη
- επωαστήρας (incubator)



- Διαδικασία

-Τοποθετούμε 200.000 κύτταρα/well σε μία 6-well plate σε 2ml θρεπτικού υλικού μέσου (RPMI ή Ham 's F12), χωρίς αντιβιοτικό, με FBS (10%). Πριν τοποθετήσουμε τα κύτταρα, προσθέτουμε σε κάθε well μία καλυπτρίδα.

-Επωάζουμε για 24h σε incubator (37°C).

-Προετοιμάζουμε τα διαλύματα που θα χρειαστούμε (για κάθε transfection):

Διάλυμα A: αραιώνουμε 4μl siRNA duplex σε 100μl siRNA Transfection Medium.

Διάλυμα B: αραιώνουμε 4μl siRNA Transfection Reagent (ή 2μl λιποφεκταμίνη) σε 100μl siRNA Transfection Medium.

-Προσθέτουμε το διάλυμα A στο B με πιπέττα. Πιπετάρουμε ελαφρά το μίγμα πάνω-κάτω και το αφήνουμε για επώαση 20min σε θερμοκρασία δωματίου.

-Πλένουμε τα κύτταρα μία φορά με 2ml siRNA Transfection Medium. Απομακρύνουμε το μέσο.

-Για κάθε transfection, προσθέτουμε 0,8ml siRNA Transfection Medium σε κάθε tube που περιέχει το μίγμα «siRNA – Transfection Reagent», συνολικού όγκου 1ml. Ανακατεύουμε καλά και επιστρώνουμε το μίγμα πάνω στα πλυμένα κύτταρα.

-Επωάζουμε τα κύτταρα για 6h σε incubator (37°C).

-Προσθέτουμε 1ml θρεπτικού υλικού μέσου με αντιβιοτικό, FBS (20%), χωρίς να αφαιρέσουμε το transfection μίγμα.

-Επωάζουμε για 18h στους 37°C.

-Αλλάζουμε το μέσο με θρεπτικό υλικό μέσο FBS 10%, με αντιβιοτικό.

-Επειτα από 24h, τα κύτταρα είναι έτοιμα για περαιτέρω επεξεργασία.

## **2.3 ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ & ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ**

Η τεχνική αυτή πραγματοποιείται για έλεγχο των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών ενδοκυτταρικά (εσωτερικός ανοσοφθορισμός) και εκκρινόμενα στην κυτταρική μεμβράνη (εξωτερικός ανοσοφθορισμός).

- Υλικά & Διαλύματα

- eppendorfs 1,5ml
- tubes 15ml, 50ml
- πιπέτες Gilson 20μl, 200μl, 1000μl
- πιπέτες Pasteur
- pipette tip 200μl, yellow & 1000μl, blue
- φυγόκεντρος Kubota
- confocal
- μικροσκόπιο φθορισμού
- PBS 1x, pH=7,5
- PBS-BSA 3%, σαπονίνη 0,3%, NaN<sub>3</sub> 0,02%
- PBS-BSA 1%, σαπονίνη 0,3%, NaN<sub>3</sub> 0,02%
- PBS-BSA 3%, NaN<sub>3</sub> 0,02%
- PBS-BSA 1%, NaN<sub>3</sub> 0,02%
- PFA 4% in PBS

- Αντισώματα

- HLA-DR (L243) FITC sc-18875 FITC, Lot# BO304, FITC Conjugated, Santa Cruz Biotechnology (συγκέντρωση 1/100)
- α-HLA-DO purified mouse anti-human monoclonal antibody, clone DOB.L1, (mouse IgG2b, κ), BD Pharmigen Cat. Number 559895 (συγκέντρωση 1/200)
- α-IgG-FITC Sheep anti-Mouse Immunoglobulin (gamma and light chains) F(ab')<sub>2</sub> fragment, fluorescein conjugated) (συγκέντρωση 1/250)

- Διαδικασία

1. Ο αρχικός αριθμός κυττάρων ανά δείγμα θα πρέπει να είναι 10<sup>6</sup>-2x10<sup>6</sup> cells, όμως λόγω και της προηγούμενης επεξεργασίας που υπόκεινται, ο αρχικός τους αριθμός ανά δείγμα κυμαίνεται από 3x10<sup>5</sup>-5x10<sup>5</sup> cells.
2. Προσθέτουμε PBS (1x) στα κύτταρα. (Αν τα κύτταρα είναι προσκολλημένα στις καλυπτρίδες δε φυγοκεντρούμε, ενώ αν βρίσκονται σε eppendorfs φυγοκεντρούμε για 6min σε 1200rpm, ώστε να πάρουμε τα



κύτταρα στο ίζημα. Τα δικά μας ανήκουν στην πρώτη περίπτωση.) Αφαιρούμε το PBS με μία πιπέττα. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 2 φορές.

3. Σ' αυτό το σημείο υπάρχει ένα επιπλέον βήμα στον εσωτερικό φθορισμό. Μονιμοποιούμε τα δείγματα του εσωτερικού φθορισμού με προσθήκη 100λ PFA 4%/δείγμα και επωάζουμε 10min στους 4°C. Εν συνεχεία, επαναλαμβάνουμε το βήμα 2.

4. Συνεχίζουμε και με τις δύο διαδικασίες (εσωτερικό & εξωτερικό ανοσοφθορισμό) ως εξής, προσθέτουμε το blocking:

- 100λ PBS-BSA 3%, σαπωνίνη 0,3%,  $\text{NaN}_3$  0,02% στα εσωτερικού ανοσοφθορισμού δείγματα
- 100λ PBS-BSA 3%,  $\text{NaN}_3$  0,02% στα εξωτερικού ανοσοφθορισμού δείγματα.

Επωάζουμε για 30min σε RT. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 2.

5. Προσθέτουμε 100λ πρώτου αντισώματος (Ab), διαλυμένο σε PBS-BSA 1%, σαπωνίνη 0,3%,  $\text{NaN}_3$  0,02% για τα δείγματα του εσωτερικού φθορισμού ή σε PBS-BSA 1%,  $\text{NaN}_3$  0,02% για αυτά του εξωτερικού φθορισμού. Επωάζουμε για 45min σε σκοτάδι, σε περίπτωση που κάποιο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με φθορίζον 2<sup>ο</sup> Ab. Επαναλαμβάνουμε το 2<sup>ο</sup> βήμα.

6. Προσθέτουμε 100λ 2<sup>ο</sup> Ab, στα δείγματα που χρειάζεται, το οποίο είναι διαλυμένο στο αντίστοιχο διάλυμα αναλόγως το είδος του ανοσοφθορισμού. Επωάζουμε για 30min σε σκοτάδι. (Στα δείγματα που δε χρειάζονται 2<sup>ο</sup> Ab, προσθέτουμε 500μl PBS (1x) και τα τοποθετούμε σε θερμοκρασία 4°C.) Επανάληψη του βήματος 2.

7. Τα δείγματα είναι έτοιμα για παρατήρηση.

### **2.3.1 Μεταφορά δειγμάτων σε αντικειμενοφόρους για παρατήρηση στο Confocal**

- Υλικά & Διαλύματα
- αντικειμενοφόροι πλάκες
- 1 λαβίδα
- γλυκερόλη

- Διαδικασία

-Αφήνουμε τα δείγματα να στεγνώσουν πάνω στις καλυπτρίδες σε σκοτάδι.

-Προσθέτουμε 20λ γλυκερόλης πάνω στο δείγμα και γυρίζουμε την καλυπτρίδα ανάποδα, τοποθετώντας την πάνω στην αντικειμενοφόρο, ώστε το δείγμα να είναι ανάμεσά τους.

-Παρατηρούμε στο μικροσκόπιο.

(Η αποθήκευση των δειγμάτων γίνεται στους 4°C, σε σκοτάδι.)

## **2.4 RT-PCR**

Η RT-PCR είναι μια παραλλαγή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Πρόκειται για μια εργαστηριακή τεχνική κατά την οποία ένα μόριο RNA (mRNA) πραγματοποιεί την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής για την παραγωγή του αντίστοιχου cDNA μορίου, με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση και ακολούθως το νεοσυντιθέμενο μόριο υπόκειται αντίδραση πολυμερισμού. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα χωρίς αλλαγή ή προσθήκη κάποιου υλικού.

### **2.4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ poly-A mRNA ΑΠΟ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

- Υλικά & Διαλύματα

-epredorfs 1,5ml αποστειρωμένα

-tubes 15ml

-πιπέτες Gilson 20μl, 200μl, 1000μl

-pipette tip 200μl, yellow & 1000μl, blue αποστειρωμένα

-φυγόκεντρος

-υδατόλουτρο

-β-μερκαπτοαιθανόλη

-PBS 1x

-διαλύματα από το Oligotext Direct mRNA Midi/Maxi Kit (QIAGEN):  
OL1, ODB, Oligotext σφαιρίδια, OW1, κολώνες, OW2 και OEB

- Διαδικασία

Για τη συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήσαμε τα διαλύματα του Oligotext Direct mRNA Midi/Maxi Kit (QIAGEN) και ακολουθήσαμε τις οδηγίες της εταιρίας, οι οποίες έχουν ως εξής (ανά δείγμα):

-Φτιάχνουμε 800λ «OL1, β-μερκαπτοαιθανόλη 3%» (776λ OL1, 24λ β-μερκαπτοαιθανόλη)

-Ξεπλύνουμε τα κύτταρα με PBS και φυγοκεντρούμε για 6min σε 1200rpm.

-Προσθέτουμε 600λ μίγματος «OL1, β-μερκαπτοαιθανόλη 3%» ανά πελέτα και ανακατεύουμε ελαφρά, οπότε και τα κύτταρα διαρρηγνύονται.

-Προσθέτουμε 1200λ ODB και αναδεύουμε ελαφρά. Φυγοκεντρούμε για 10min σε 10.000rpm και συλλέγουμε το υπερκείμενο.

-Έχουμε επώασει τα Oligotext σφαιρίδια για 5min στους 37°C. Εν συνεχεία, προσθέτουμε 40λ από αυτά σε κάθε δείγμα και επωάζουμε για 10min σε RT, ώστε να προσδεθεί το RNA στα σφαιρίδια. Φυγοκεντρούμε σε 12.000-15.000rpm για 20min περίπου και ως ότου το υπερκείμενο γίνει διαυγές και αφαιρούμε το υπερκείμενο.

-Επαναδιαλύουμε την πελέτα με τα σφαιρίδια σε 100λ «OL1, β-μερκαπτοαιθανόλη 3%». Αναδεύουμε και προσθέτουμε 400λ ODB. Επωάζουμε για 3min στους 70°C και αμέσως μετά για 10min σε RT. Φυγοκεντρούμε για 10min σε 10.000rpm και αφαιρούμε το υπερκείμενο.

-Επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 350λ διαλύματος OW1, ανακατεύουμε και φορτώνουμε το δείγμα στην κολώνα, που κατακρατούνται τα σφαιρίδια. Φυγοκεντρούμε για 1min σε 10.000rpm και πετάμε το υγρό κάτω από την κολώνα.

-Προσθέτουμε στην κολώνα 350λ OW2. Φυγοκεντρούμε για 1min σε 10.000rpm και πετάμε το υγρό κάτω από την κολώνα. Επανάληψη αυτού του βήματος.

-Αλλάζουμε *epredorf* και προσθέτουμε 100λ OEB στην κολώνα και αναδεύουμε (ήπιο πιπετάρισμα). Φυγοκεντρούμε για 1min σε

10.000rpm. Έτσι εκλύεται το poly-A mRNA από τα σφαιρίδια σε 100λ ΟΕΒ.

### **2.4.2 RT-PCR**

- Υλικά & Διαλύματα

-epredorfs αποστειρωμένα 1,5ml

-αποστειρωμένα PCR tubes

-πιπέτες Gilson 20μl, 200μl, 1000μl

-pipette tip 200μl, yellow & 1000μl, blue αποστειρωμένα

-συσκευή PCR

-διαλύματα από το One Step RT-PCR kit (QIAGEN): dNTPs, enzyme, buffer 5x, dH<sub>2</sub>O και primer mix

- Διαδικασία

Για τη συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήσαμε τα διαλύματα του One Step RT-PCR kit (QIAGEN) και ακολουθήσαμε τις οδηγίες της εταιρίας.

Τα δείγματά μας είναι :

1) αρνητικό control

3) HLA-DOα

2) ακτίνη

4) HLA-DOβ

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιούμε:

-1λ dNTPs

-5λ buffer 5x

-5λ primer mix

-1λ enzyme

-3λ dH<sub>2</sub>O

-10λ mRNA.

Σημειώσεις:

1. Στο αρνητικό control αντί για mRNA, προσθέτουμε 10λ dH<sub>2</sub>O.
2. Το primer mix για κάθε δείγμα πρέπει να περιέχει και τους δύο εκκινητές.

### **ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ**

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα ήταν οι εξής:

HLA-DOα

5' εκκινητής: ACCATTTGTTCCGCAAGTTC

3' εκκινητής: GCATCTGGTGGTGGGAATAGG

Το μέγεθος του προϊόντος με και χωρίς εσώνιο είναι 237bp και 142bp αντίστοιχα.

#### HLA-DOβ

5' εκκινητής: ATGTCCACTGGCCCTATCAG

3' εκκινητής: GCCACTCAGCATCTTTCTCC

Το μέγεθος του προϊόντος με και χωρίς εσώνιο είναι 666bp και 180bp αντίστοιχα.

#### Ακτίνη

5' εκκινητής: GGACTTCGAGCAAGAGATGG

3' εκκινητής: AGCACTGTGTTGGCGTACAG

Το μέγεθος του προϊόντος είναι 234bp.

Πιο συγκεκριμένα, αρχικά φτιάχνουμε το λεγόμενο mastermix, σε όση ποσότητα μας χρειάζεται αναλόγως με τον αριθμό των δειγμάτων μας. Τοποθετούμε λοιπόν σε καθαρό eppendorf 5λ dNTPs, 5λ enzyme, 25λ buffer 5x και 15λ dH<sub>2</sub>O. Τα δείγματά μας είναι τέσσερα, αλλά φτιάχνουμε λίγο περισσότερο mastermix, για να αποφύγουμε πιθανώς λανθασμένες και ελλιπείς ποσότητες υλικών που προσθέτουμε σ' αυτό.

Στη συνέχεια προσθέτουμε σε αποστειρωμένα PCR tubes και με την ακόλουθη σειρά: 10λ mastermix, 5λ primer mix (το αντίστοιχο για κάθε δείγμα) και 10λ mRNA.

Τελικά, τοποθετούμε τα δείγματα στη συσκευή PCR και τη ρυθμίζουμε στο ακόλουθο πρόγραμμα:

<b>ΒΗΜΑ</b>	<b>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ</b>	<b>ΧΡΟΝΟΣ</b>
1 <sup>ο</sup>	55°C	30'
2 <sup>ο</sup>	95°C	15'
3 <sup>ο</sup>	94°C	1'
4 <sup>ο</sup>	55°C	1'
5 <sup>ο</sup>	72°C	1'
6 <sup>ο</sup>	40 επαναλήψεις των 3 προηγούμενων βημάτων	
7 <sup>ο</sup>	72°C	10'

Κατά το πρώτο βήμα πραγματοποιείται η σύνθεση του DNA. Στη συνέχεια ξεκινάει η PCR, η οποία ολοκληρώνεται με το στάδιο της επιμήκυνσης κατά το τελευταίο στάδιο.

### **2.4.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ**

- Υλικά & Διαλύματα

- epredorfs 1,5ml
- πιπέτες Gilson 20μl, 200μl, 1000μl
- pipette tip 200μl, yellow & 1000μl, blue
- dH<sub>2</sub>O
- αγαρόζη
- TAE 50x
- βρωμιούχο αιθίδιο
- loading buffer
- marker
- συσκευή ηλεκτροφόρησης

- Διαδικασία

Αρχικά φτιάχνουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τη μονώνουμε στα κατάλληλα σημεία, ώστε να διατηρηθεί εντός της το gel, πριν ακόμα στερεοποιηθεί.

Εν συνεχεία, φτιάχνουμε το μίγμα του gel. Σε 80ml dH<sub>2</sub>O προσθέτουμε 1,2gr αγαρόζης και θερμαίνουμε το μίγμα ως ότου γίνει διαφανές. Πριν πήξει το gel, αλλά όσο είναι ακόμα χλιαρό, προσθέτουμε 800λ TAE 50x και 10λ βρωμιούχο αιθίδιο. Έπειτα ρίχνουμε το gel στη συσκευή, απομακρύνουμε τυχόν φυσαλίδες και περιμένουμε να σταθεροποιηθεί το gel.

Όταν είναι πλέον στερεό το gel, φτιάχνουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην τελική της μορφή και προσθέτουμε 1lt TAE buffer 0,5x (990ml dH<sub>2</sub>O, 10ml TAE 50x και 10λ βρωμιούχο αιθίδιο).

Προσθέτουμε σε κάθε ένα από τα δείγματά μας 5λ loading buffer και φορτώνουμε 25λ δείγματος σε κάθε πηγάδι (well) του gel. Σε ένα πηγάδι φορτώνουμε 10λ από το marker.

Τέλος, ολοκληρώνουμε τη συναρμολόγηση της συσκευής, τη ρυθμίζουμε στα 100-120 Volt και αφήνουμε να τρέξουν τα δείγματα μέχρι περίπου τα  $\frac{3}{4}$  του gel. Για να απεικονίσουμε το αποτέλεσμα, φωτογραφίζουμε το gel σε κατάλληλο μηχάνημα.

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Μετά από τις πειραματικές διαδικασίες, που πραγματοποιήσαμε διαδοχικά, διαμόλυνσης των κυτταρικών σειρών JAR και BEWO με siRNA για την HLA-DOβ αλυσίδα, ανοσοφθορισμού, απομόνωσης mRNA, RT-PCR και ηλεκτροφόρησης σε gel αγαρόζης, πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα

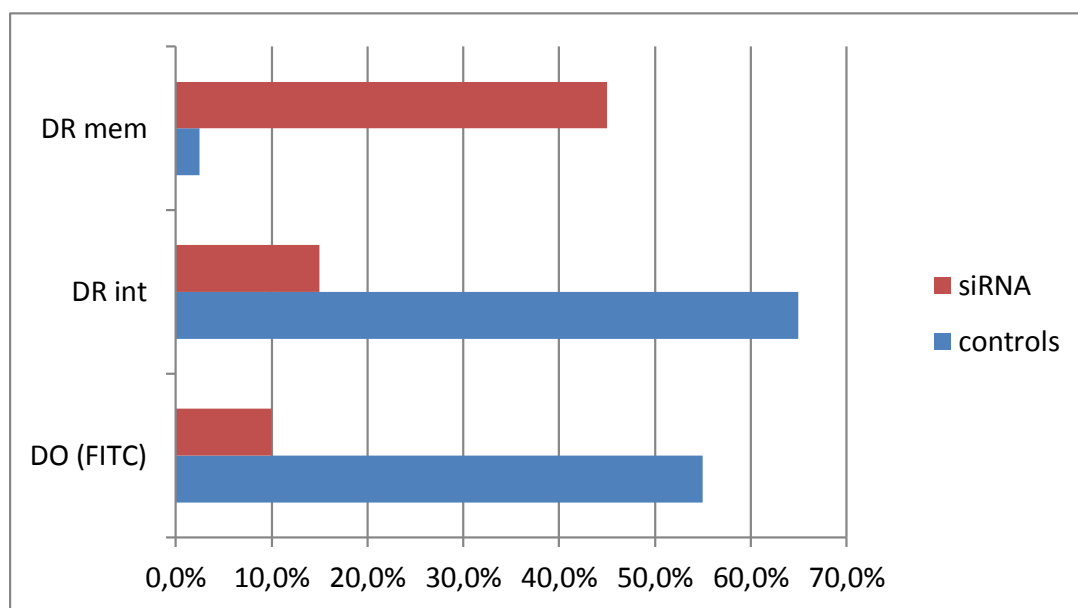
- Ποσοστά φθορισμού των δειγμάτων μετά από μέτρηση στο οπτικό μικροσκόπιο
- Φωτογραφίες των κυττάρων από οπτικό μικροσκόπιο και μικροσκόπιο confocal
- Φωτογραφίες των gels ηλεκτροφόρησης.

#### **3.1 ΠΟΣΟΣΤΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΑΠΟ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ**

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας εσωτερικού και εξωτερικού ανοσοφθορισμού και τη μονιμοποίηση των δειγμάτων μας με την προσθήκη γλυκερόλης, μπορέσαμε να παρατηρήσουμε τα δείγματά μας στο οπτικό μικροσκόπιο και να μετρήσουμε τι ποσοστό από αυτά φθόριζε. Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού συνήθως παίρνουμε από κατάλληλο μηχάνημα (FACs) απ' το οποίο περνάμε τα δείγματά μας και παίρνουμε το αποτέλεσμα στην οθόνη του υπολογιστή με τον οποίο είναι συνδεδεμένο το FACs. Στην περίπτωσή μας όμως, λόγω της μεγάλης ταλαιπωρίας που υφίστανται τα κύτταρα που επεξεργαζόμαστε και σε συνδυασμό με τον περιορισμένο αρχικό αριθμό κυττάρων που ξεκινάμε την πειραματική διαδικασία λόγω μικρής ποσότητας ενός αντιδραστηρίου, καταλήγουμε να έχουμε έναν αριθμό κυττάρων ανά δείγμα, ο οποίος δε δίνει αποτέλεσμα στο μηχάνημα. Ως εκ τούτου, αποφασίσαμε να ακολουθήσουμε την πρώτη διαδικασία μέτρησης του ποσοστού φθορισμού των δειγμάτων μας.

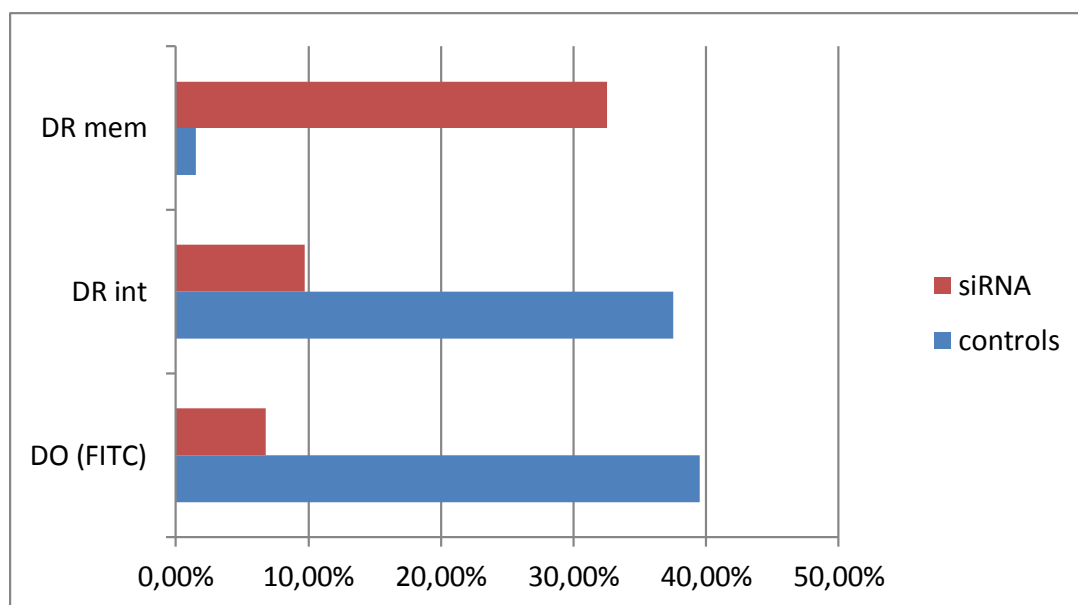


JAR



**ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 1**

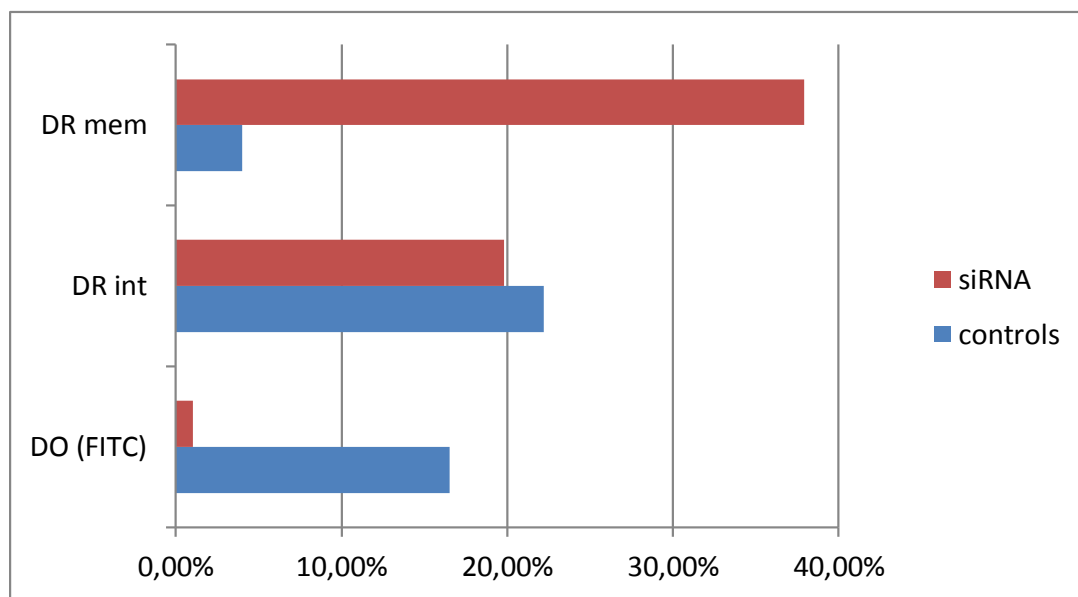
(κυτταρική σειρά JAR) 1η επανάληψη του πειράματος εσωτερικού ανοσοφθορισμού για τα δείγματα HLA-DR και HLA-DO και εξωτερικού ανοσοφθορισμού για το δείγμα HLA-DR. Με κόκκινο απεικονίζονται τα δείγματα που έχουν υποστεί τη διαδικασία της διαμόλυνσης με siRNA HLA-DOβ, ενώ με μπλε φαίνονται τα controls δείγματα, δηλαδή αυτά στα οποία έγινε μόνο ανοσοφθορισμός.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 2**

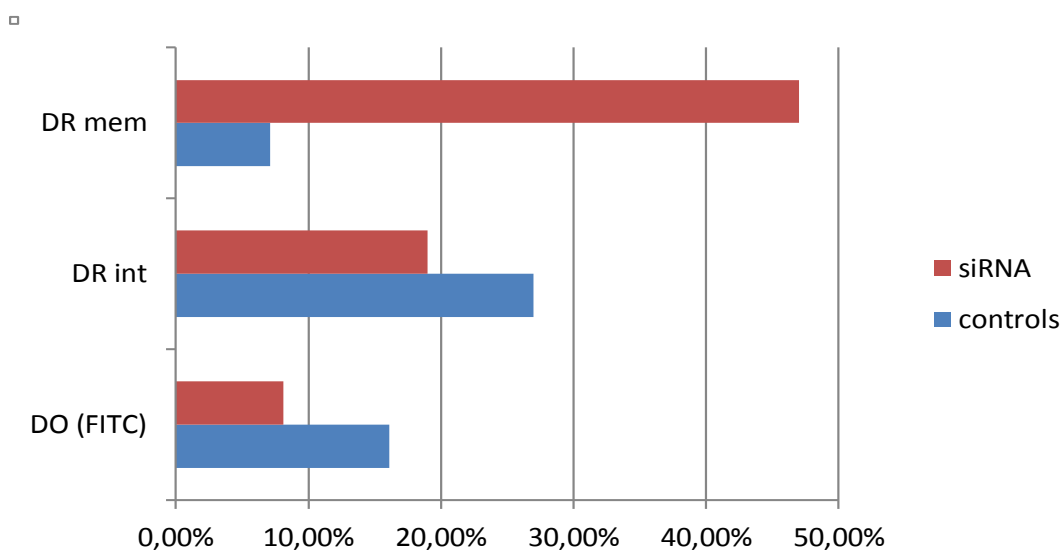
(κυτταρική σειρά JAR) 2η επανάληψη του πειράματος εσωτερικού ανοσοφθορισμού για τα δείγματα HLA-DR και HLA-DO και εξωτερικού ανοσοφθορισμού για το δείγμα HLA-DR. Με κόκκινο απεικονίζονται τα δείγματα που έχουν υποστεί τη διαδικασία της διαμόλυνσης με siRNA HLA-DOβ, ενώ με μπλε φαίνονται τα controls δείγματα, δηλαδή αυτά στα οποία έγινε μόνο ανοσοφθορισμός.

## BEWO



**ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 3**

(κυτταρική σειρά BEWO) 1η επανάληψη του πειράματος εσωτερικού ανοσοφθορισμού για τα δείγματα HLA-DR και HLA-DO και εξωτερικού ανοσοφθορισμού για το δείγμα HLA-DR. Με κόκκινο απεικονίζονται τα δείγματα που έχουν υποστεί τη διαδικασία της διαμόλυνσης με siRNA HLA-DOβ, ενώ με μπλε φαίνονται τα controls δείγματα, δηλαδή αυτά στα οποία έγινε μόνο ανοσοφθορισμός.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 3. 4**

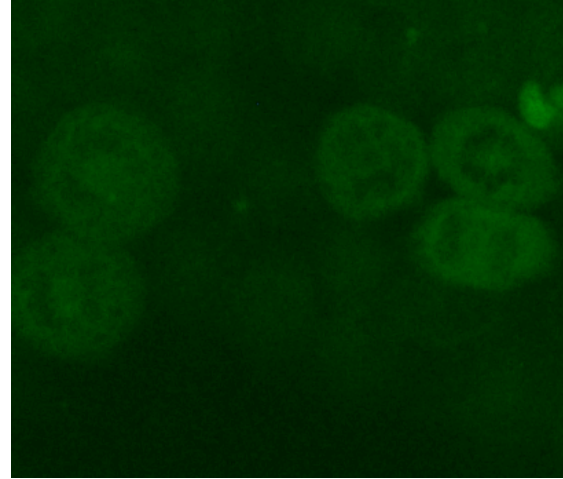
(κυτταρική σειρά BEWO) 2η επανάληψη του πειράματος εσωτερικού ανοσοφθορισμού για τα δείγματα HLA-DR και HLA-DO και εξωτερικού ανοσοφθορισμού για το δείγμα HLA-DR. Με κόκκινο απεικονίζονται τα δείγματα που έχουν υποστεί τη διαδικασία της διαμόλυνσης με siRNA HLA-DOβ, ενώ με μπλε φαίνονται τα controls δείγματα, δηλαδή αυτά στα οποία έγινε μόνο ανοσοφθορισμός.

### 3.2 ΕΙΚΟΝΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ CONFOCAL

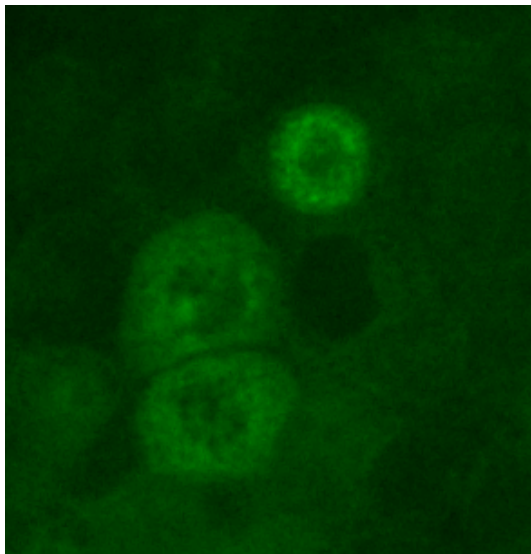
*JAR*



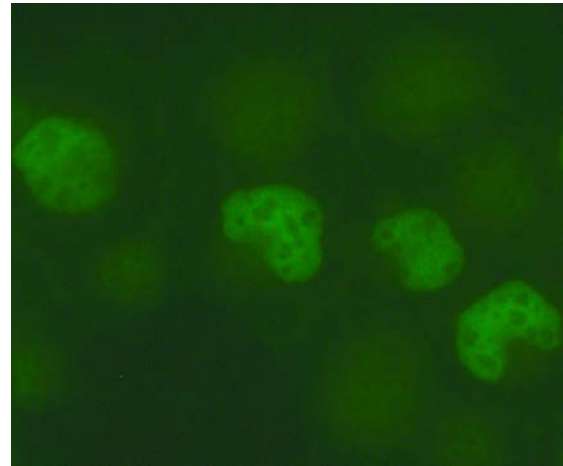
*Εικόνα 3.1* Δείγμα siRNA HLA-DO, confocal



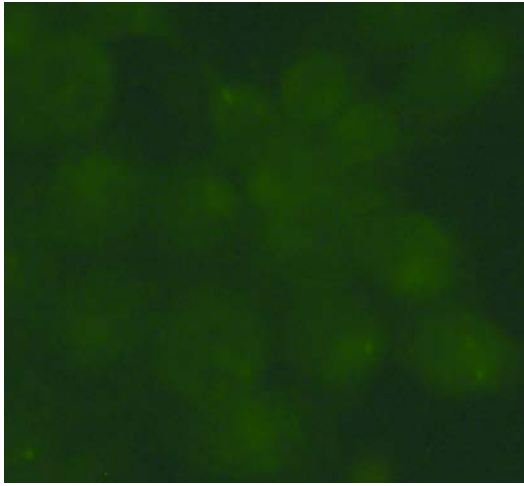
*Εικόνα 3.2* Δείγμα siRNA HLA-DO, οπτικό



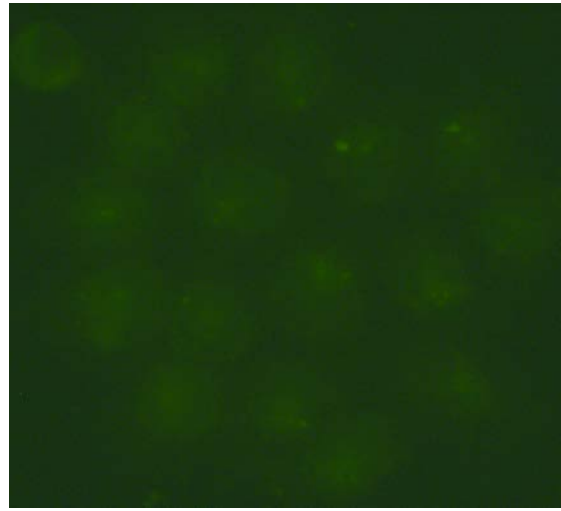
*Εικόνα 3.3* Δείγμα siRNA HLA-DO, οπτικό



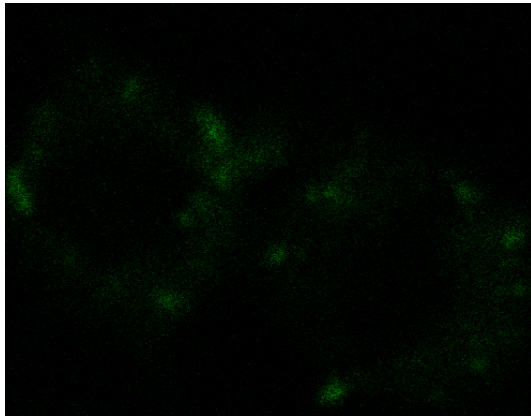
*Εικόνα 3.4* Δείγμα siRNA HLA-DO, οπτικό



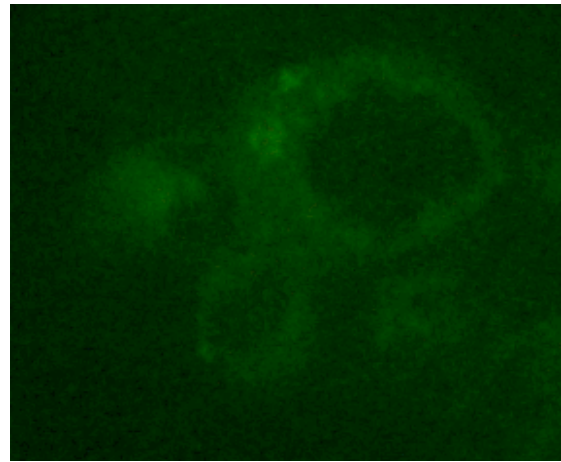
*Εικόνα 3.5* Δείγμα siRNA HLA-DR int, οπτικό



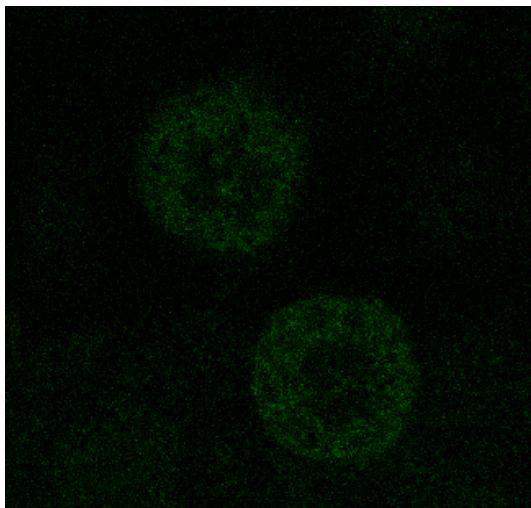
*Εικόνα 3.6* Δείγμα siRNA HLA-DR int, οπτικό



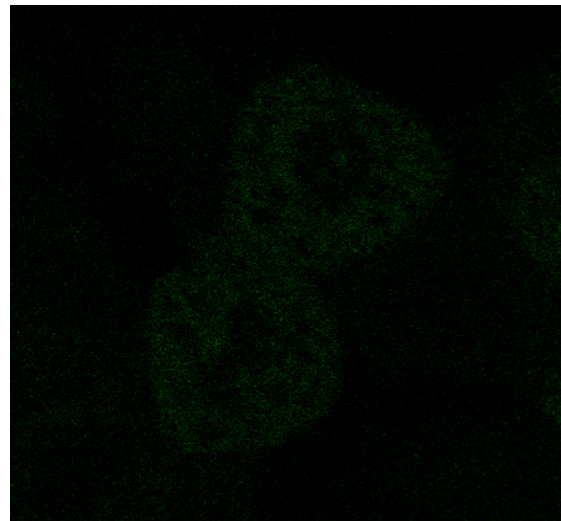
*Εικόνα 3.7* siRNA HLA-DR mem, confocal



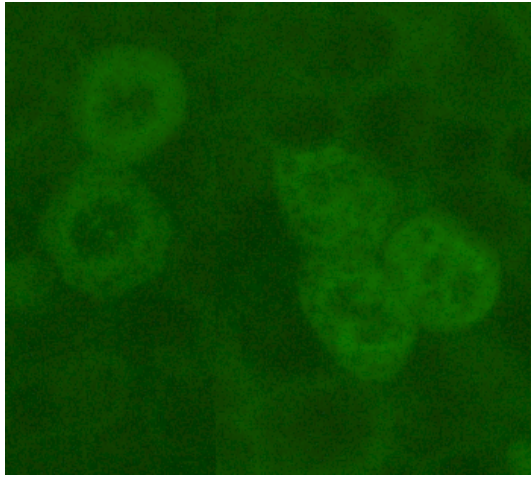
*Εικόνα 3.8* siRNA HLA-DR mem, confocal



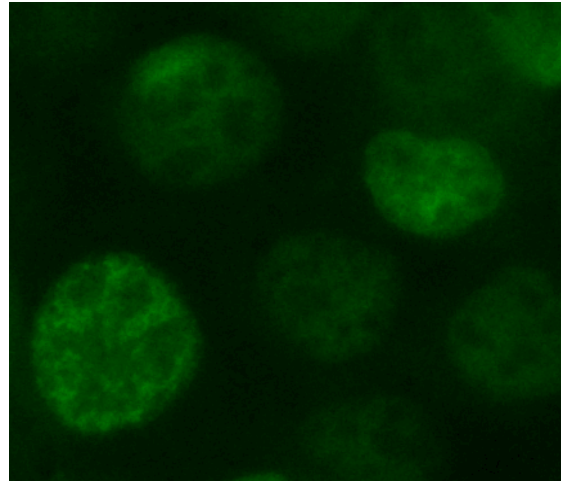
*Εικόνα 3.9* Δείγμα control HLA-DO, confocal



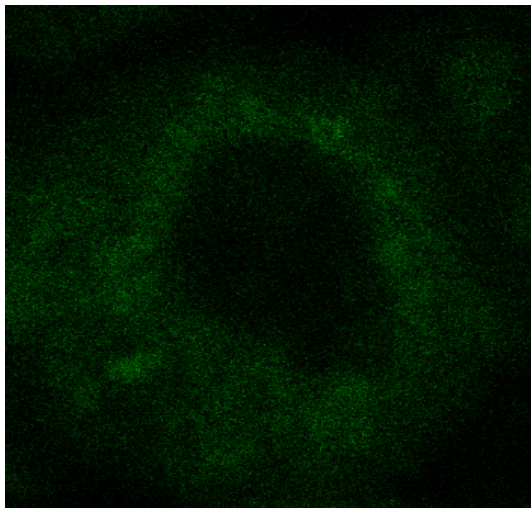
*Εικόνα 3.10* Δείγμα control HLA-DO, confocal



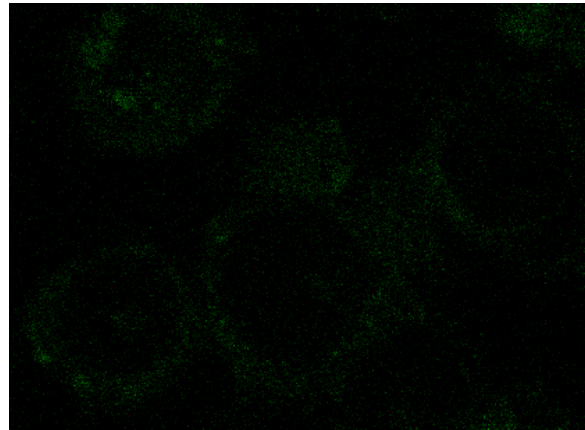
*Εικόνα 3.11* Δείγμα control HLA-DO, οπτικό



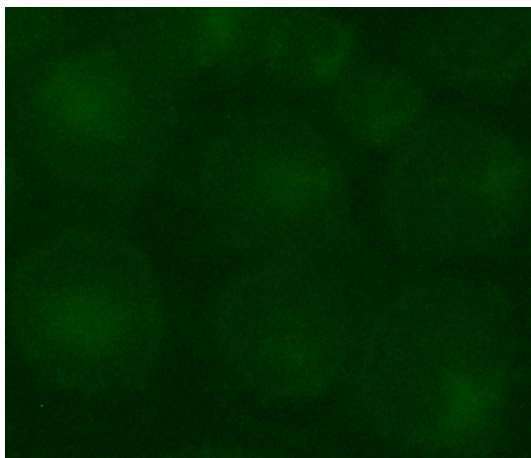
*Εικόνα 3.12* Δείγμα control HLA-DO, οπτικό



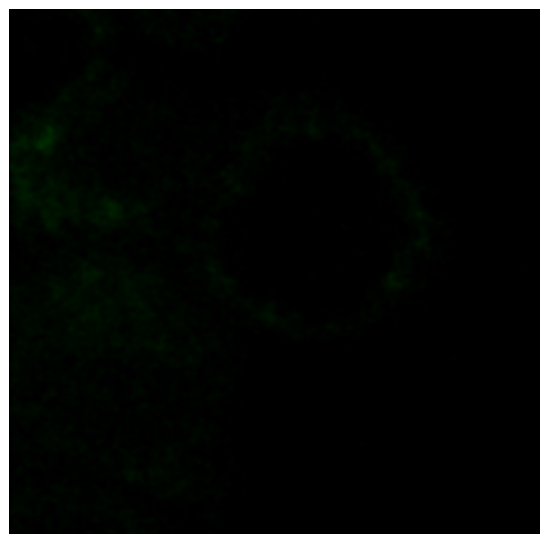
*Εικόνα 3.13* control HLA-DR int, confocal



*Εικόνα 3.14* control HLA-DR int, confocal

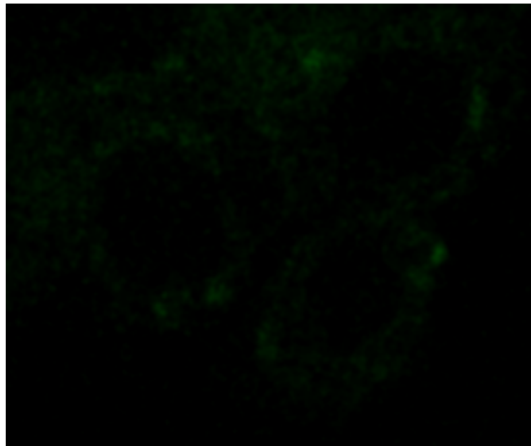


*Εικόνα 3.15* control HLA-DR int, οπτικό

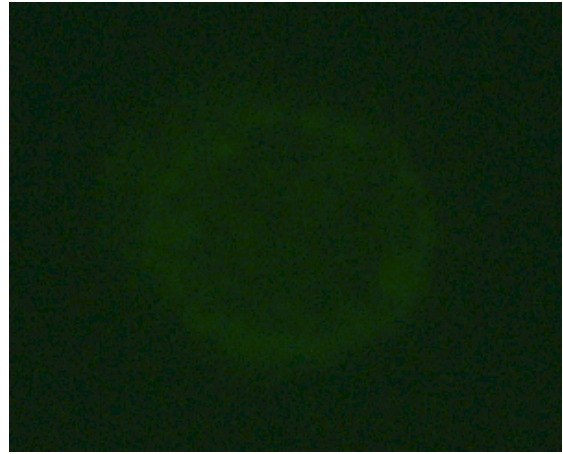


*Εικόνα 3.16* control HLA-DR mem, confocal



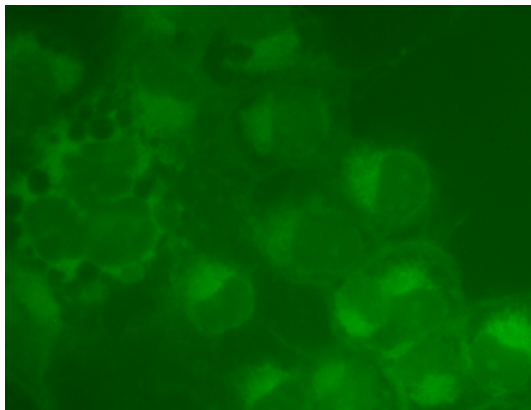


*Εικόνα 3.17 control HLA-DR mem, confocal*

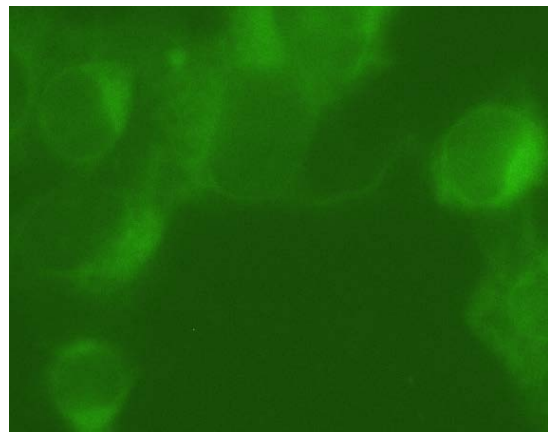


*Εικόνα 3.18 control HLA-DR mem, οπτικό*

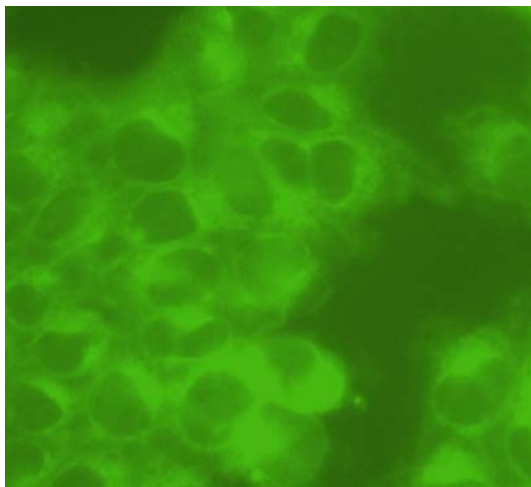
BEWO



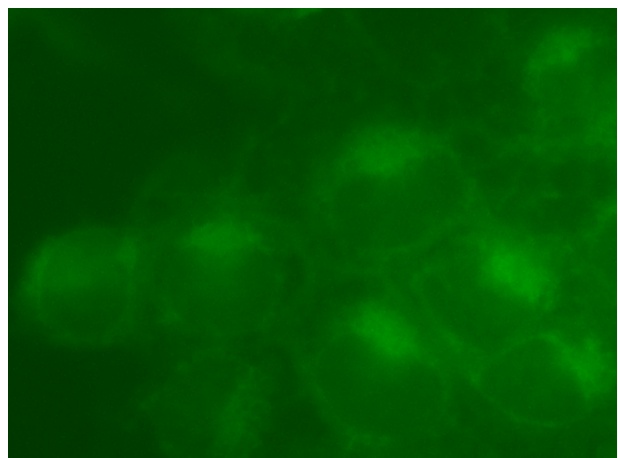
*Εικόνα 3.19 Δείγμα siRNA HLA-DO, confocal*



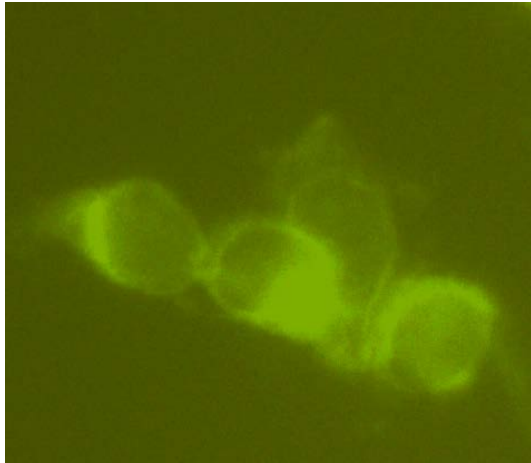
*Εικόνα 3.20 Δείγμα siRNA HLA-DO, οπτικό*



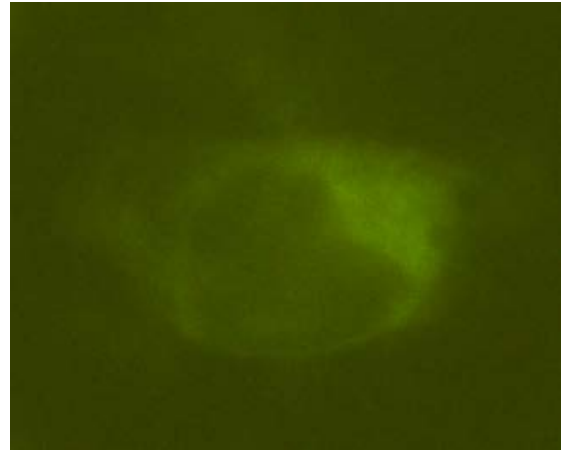
*Εικόνα 3.21 Δείγμα siRNA HLA-DO, οπτικό*



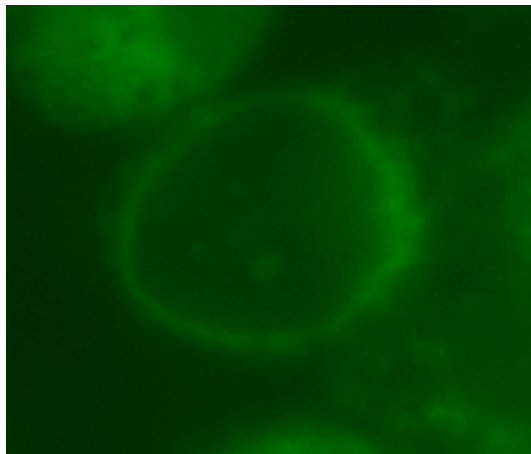
*Εικόνα 3.22 siRNA HLA-DR int, confocal*



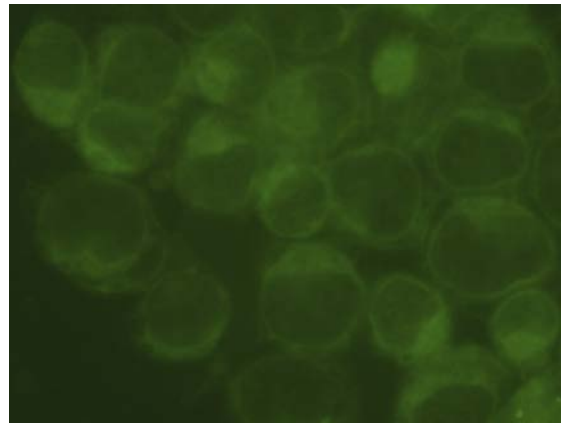
*Εικόνα 3.23* siRNA HLA-DR int, οπτικό



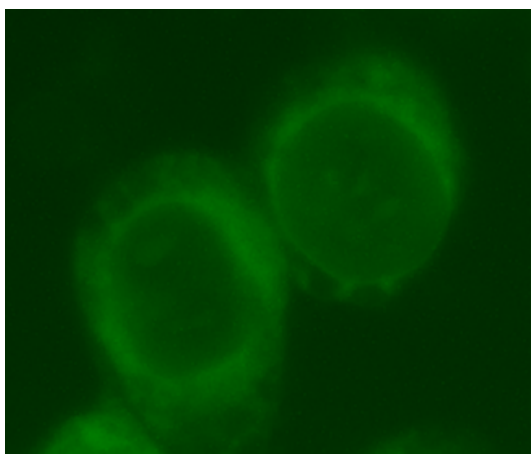
*Εικόνα 3.24* siRNA HLA-DR int, οπτικό



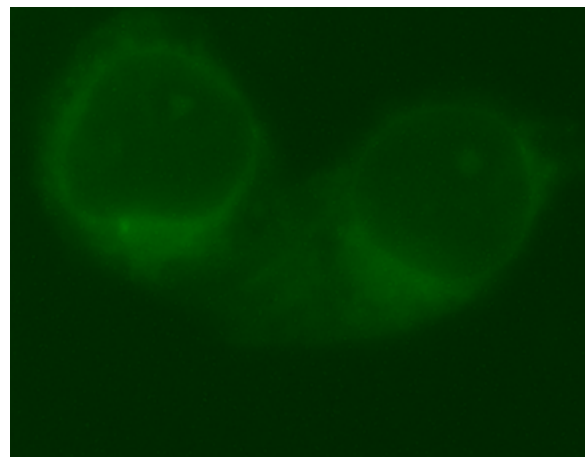
*Εικόνα 3.25* siRNA HLA-DR mem, confocal



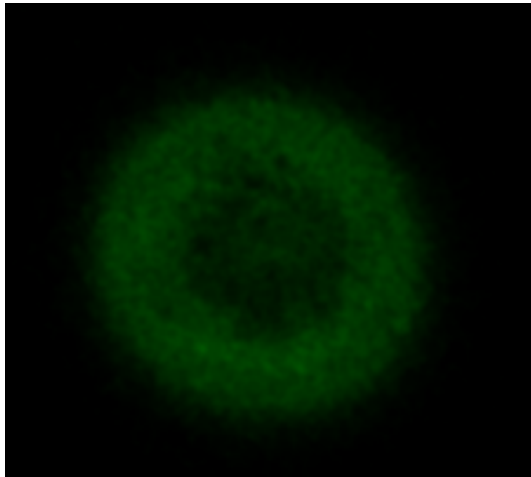
*Εικόνα 3.26* siRNA HLA-DR mem, οπτικό



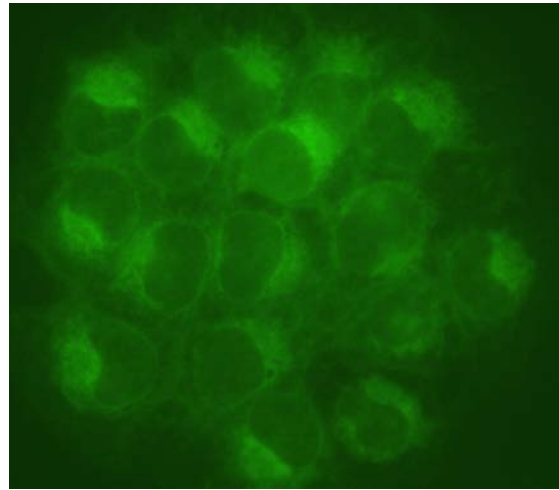
*Εικόνα 3.27* siRNA HLA-DR mem, οπτικό



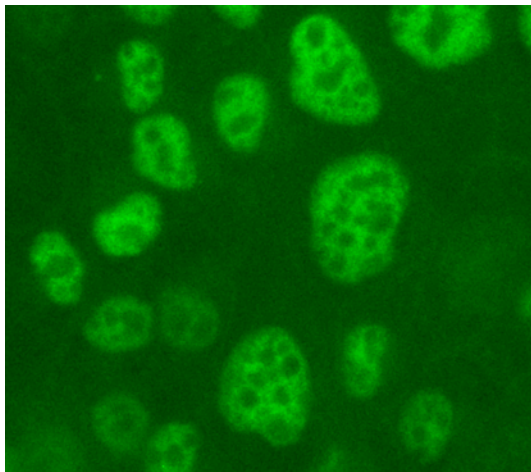
*Εικόνα 3.28* siRNA HLA-DR mem, οπτικό



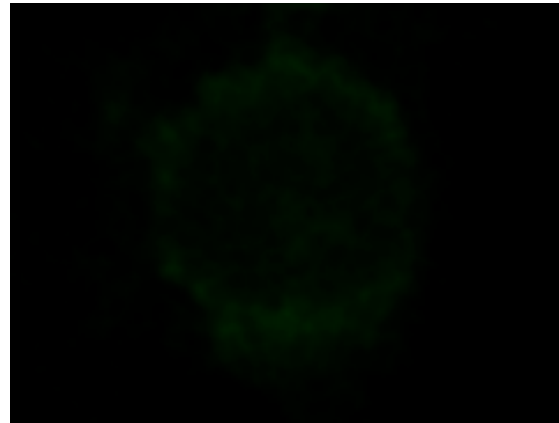
*Εικόνα 3.29* Δείγμα control HLA-DO, confocal



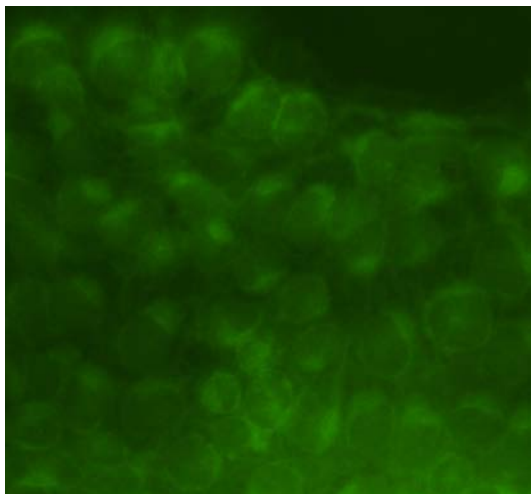
*Εικόνα 3.30* Δείγμα control HLA-DO, οπτικό



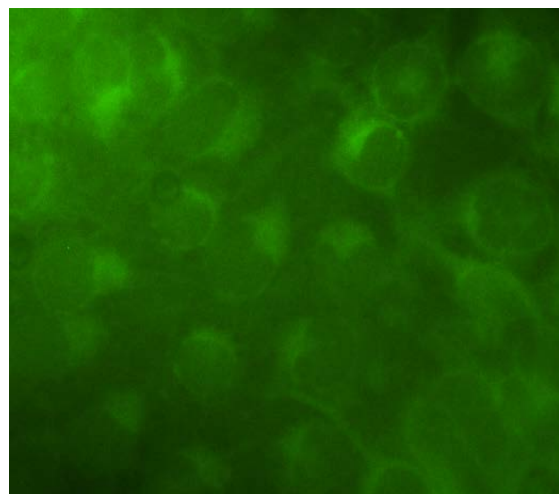
*Εικόνα 3.31* Δείγμα control HLA-DO, οπτικό



*Εικόνα 3.32* control HLA-DR int, confocal

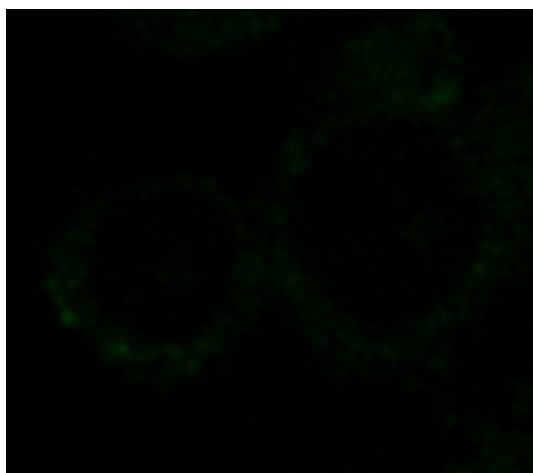


*Εικόνα 3.33* control HLA-DR int, οπτικό

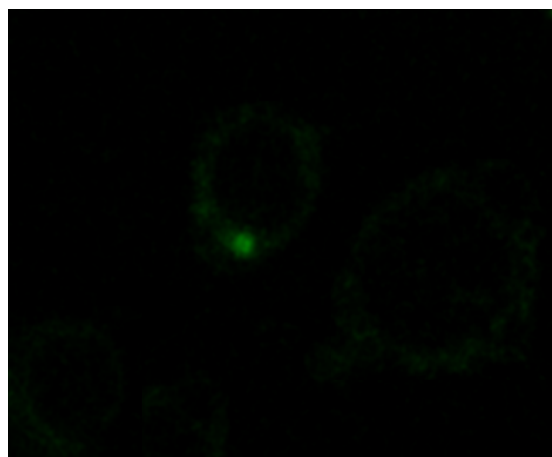


*Εικόνα 3.34* control HLA-DR int, οπτικό

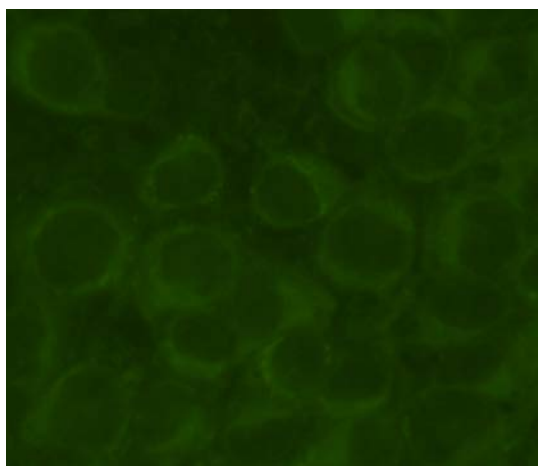




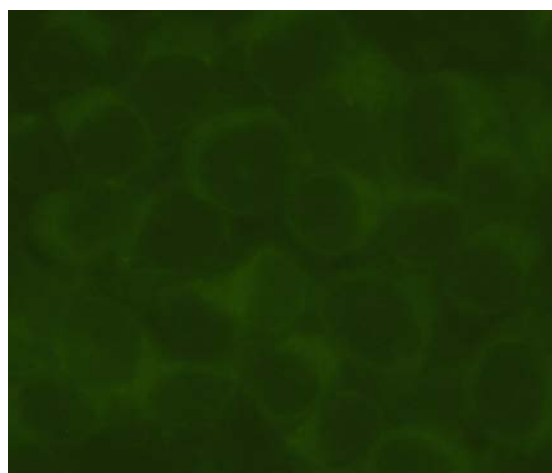
*Εικόνα 3.35 control HLA-DR mem, confocal*



*Εικόνα 3.36 control HLA-DR mem, confocal*



*Εικόνα 3.37 control HLA-DR mem, οπτικό*

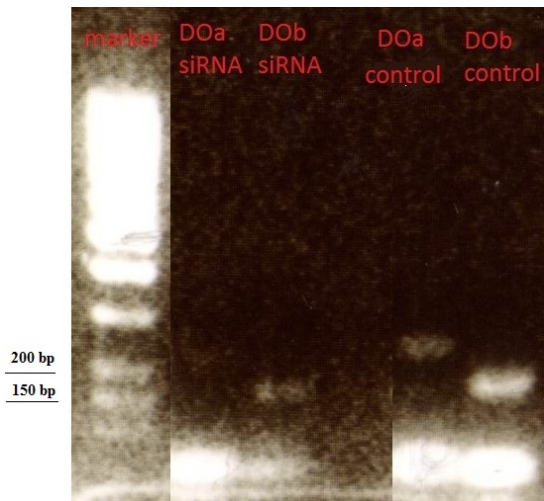


*Εικόνα 3.38 control HLA-DR mem, οπτικό*

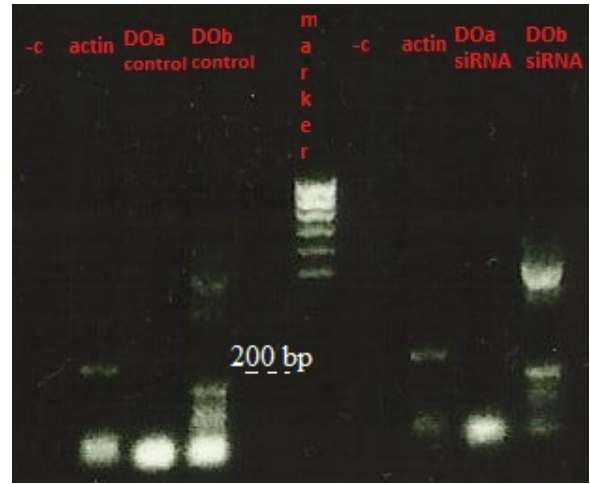
### **3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΣΕ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ**

Από την ολοκλήρωση του πειράματος ηλεκτροφόρησης σε gel αγαρόζης, πήραμε τις παρακάτω φωτογραφίες, στις οποίες παρατηρούμε την πιθανή έκφραση των αλυσίδων του μορίου HLA-DO (α και β) που εξετάζουμε και συνεπώς την ύπαρξη ή όχι του συγκεκριμένου μορίου στα δείγματά μας.

JAR



Εικόνα 3.39 1<sup>η</sup> επανάληψη (JAR)

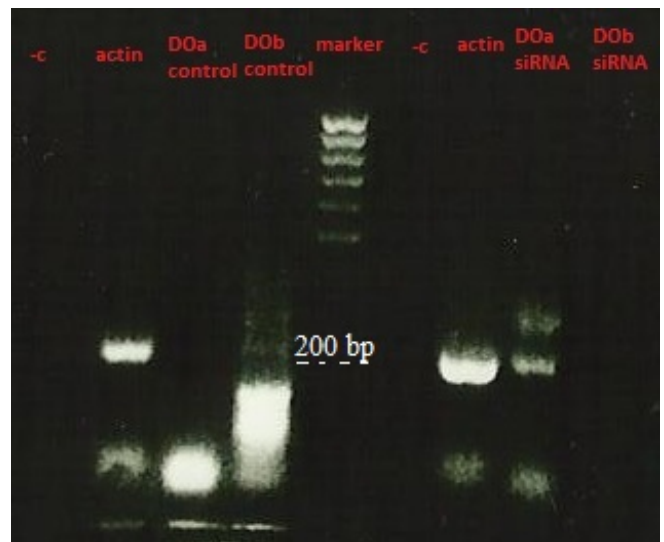


Εικόνα 3.40 2<sup>η</sup> επανάληψη (JAR)

BEWO



Εικόνα 3.41 1<sup>η</sup> επανάληψη (BEWO)



Εικόνα 3.42 2<sup>η</sup> επανάληψη (BEWO)

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας, από τα αποτελέσματα που πήραμε από την ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης, διαπιστώσαμε ότι η siRNA διαμόλυνση έγινε σε μεγάλο βαθμό επιτυχώς. Μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι και στις δύο κυτταρικές σειρές (Jar και Bewo) υπάρχει ελάττωση του σήματος για την DOβ αλυσίδα στα siRNA δείγματα.

Όπως είδαμε και παραπάνω, σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα περιμένουμε έκφραση του HLA-DR και του HLA-DO ενδοκυτταρικά στα control δείγματα, ενώ στα siRNA δείγματα αναμένουμε σαφώς μειωμένα ποσοστά έκφρασης του μη κλασσικού τάξης II μορίου HLA-DO και ακόμα, μεταβολή στην έκφραση του κλασσικού HLA-DR.

### JAR

Ξεκινώντας με την κυτταρική σειρά Jar, μπορούμε να διακρίνουμε (βλέπε πίνακα 3.1 και 3.2) ότι επιβεβαιώνονται όσα αναμέναμε στα control δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του HLA-DR είναι αισθητά μεγαλύτερη ενδοκυτταρικά απ' ότι στη μεμβράνη (1<sup>η</sup> επανάληψη: 65% ενδοκυτταρικά, 2,5% στη μεμβράνη, 2<sup>η</sup> επανάληψη: 37,5% ενδοκυτταρικά, 1,5% στη μεμβράνη). Επίσης, και στις δύο επαναλήψεις της πειραματικής διαδικασίας διακρίνουμε τη μείωση του ποσοστού του μορίου HLA-DO μετά από τη διαμόλυνση με το siRNA (1<sup>η</sup> επανάληψη: control δείγμα 55%, siRNA δείγμα 10%, 2<sup>η</sup> επανάληψη: control δείγμα 39,5%, siRNA δείγμα 6,8%). Επιπλέον, παρατηρούμε ότι μετά τη διαμόλυνση, το HLA-DR είναι σε αρκετά χαμηλότερα επίπεδα ενδοκυτταρικά, συγκριτικά με τα αντίστοιχα control δείγματα, ενώ συσσωρεύεται στη μεμβράνη (1<sup>η</sup> επανάληψη: α) ενδοκυτταρικά, control δείγμα 65%, siRNA δείγμα 15%, β) μεμβρανικά, control δείγμα 2,5%, siRNA δείγμα 45%, 2<sup>η</sup> επανάληψη: α)

ενδοκυτταρικά, control δείγμα 37,5%, siRNA δείγμα 9,7%, β) μεμβρανικά, control δείγμα 1,5%, siRNA δείγμα 32,5%).

## BEWO

Για τα δείγματα της κυτταρικής σειράς Bewo οι διακυμάνσεις στις τιμές είναι ανάλογες. Πιο συγκεκριμένα, βλέπουμε (πίνακας 3.3 και 3.4) τις διαφορές στις τιμές του HLA-DO για τα siRNA και control δείγματα (1<sup>η</sup> επανάληψη: control δείγμα 16,5%, siRNA δείγμα 1%, 2<sup>η</sup> επανάληψη: control δείγμα 16,1%, siRNA δείγμα 8,1%). Κατ' επέκταση, επηρεάζονται και τα ποσοστά του μορίου HLA-DR πριν και μετά τη διαμόλυνση ως εξής: πριν τη διαμόλυνση παρατηρούμε 22,2% ενδοκυτταρικά, 4% στη μεμβράνη και 27% ενδοκυτταρικά, 7,1% στη μεμβράνη, στην 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> επανάληψη αντίστοιχα. Μετά την siRNA διαμόλυνση οι τιμές του HLA-DR είναι: 19,8% ενδοκυτταρικά, 37,9% μεμβρανικά και 19% ενδοκυτταρικά, 47% μεμβρανικά, κατά την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> επανάληψη αντίστοιχα.

Συνεπώς μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το μη κλασσικό τάξης II μόριο HLA-DO ρυθμίζει την παρουσία του κλασσικού τάξης II μορίου HLA-DR ενδοκυτταρικά ή στη μεμβράνη, επιβεβαιώνοντας τις αρχικές υποθέσεις μας ότι παρουσία του HLA-DO, το μόριο HLA-DR εγκλωβίζεται στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Goldsby R., Kindt T., Osborne B., Kuby J.: Immunology. Fifth edition.

Athanassakis-Vassiliadis I., 2007. Immunology. University of Crete.

Athanassakis, I., Aifantis, Y., Ranella, A., Vassiliadis, S., 1996. Production of embryotoxic IgG antibodies during IFN-gamma treatment of pregnant mice. *Am J Reprod Immunol.* 36, 111-117.

Athanassakis-Vassiliadis, I., Galanopoulos, V.K., Grigoriou, M., Papamatheakis, J., 1990. Induction of class II MHC antigen expression on the murine placenta by 5-azacytidine correlates with fetal abortion. *Cell Immunol.* 128, 438-449.

Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L., Wiley, D.C., 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature.* 364, 33-39.

Calandra, T., 2003. Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune responses to microbes. *Scand J Infect Dis.* 35, 573-576.

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

Denzin, L.K., Cresswell, P., 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimmers and facilitates peptide loading. *Cell.* 14, 155-165.

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

Fling, S.P., Arp, B., Pious, D., 1994. HLA-DMA and -DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells. *Nature.* 368, 554-558.

Heinrichs, H., Orr, H.T., 1990. HLA non A,B,C class I genes: their structure and expression. *Immunol Res.* 9, 265-274.

Karlsson, L., 2005. DM and DO shape the repertoire of peptide-MHC-class-II complexes. *Curr Opin Immunol.* 17, 65-70.

Kelly, A.P., Monaco, J.J., Cho, S.G., Trowsdale, J., 1991. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature.* 353, 571-573.

Madden, D.R., 1995. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol.* 13, 587-622.

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

Natarajan, K., Li, H., Mariuzza, R.A., Margulies, D.H., 1999. MHC class I molecules, structure and function. *Rev Immunogenet.* 1, 32-46.

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

Tonnelle, C., DeMars, R., Long, E.O., 1985. DO beta: a new beta chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J.* 4, 2839-2847.

van Ham, S.M., Tjin, E.P., Lillemeier, B.F., Grüneberg, U., van Meijgaarden, K.E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B., Rahman, D., Ottenhoff, T.H., Pappin, D.J., Trowsdale, J., Neefjes, J., 1997. HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol.* 7, 950-957.

van Ham, M., van Lith, M., Lillemeier, B., Tjin, E., Grüneberg, U., Rahman, D., Pastoors, L., van Meijgaarden, K., Roucard, C., Trowsdale, J., Ottenhoff, T., Pappin, D., Neefjes, J., 2000. Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. *J Exp Med.* 191, 1127-1136.