



Μελέτη της αλληλεπίδρασης του διαλυτού αντιγόνου ιστοσυμβατότητας τάξης II με T λεμφοκύτταρα με χρήση ακουστικού βιοαισθητήρα

Γρηγόριου Μαρία
AM 1618

Υπεύθυνη καθηγήτρια:
Γκιζελή Ήλεκτρα

Σύμβουλος καθηγητής:
Αθανασάκη Ειρήνη

Επιβλέπουσα εργασίας:
Υπόψηφια Δίδακτωρ
Μπακέλα Κατερίνα

Ιανουάριος, 2013

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Βιολογίας

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν για αυτή την εργασία. Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Ηλέκτρα Γκιζελή, υπεύθυνη του εργαστηρίου Τεχνολογία Βιοαισθητήρων και Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, και την Δρ. Ειρήνη Αθανασάκη υπεύθυνη του εργαστηρίου Ανοσοβιολογίας και Καθηγήτρια του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης που με δέχτηκαν και με εμπιστεύτηκαν για αυτήν την εργασία. Τις ευχαριστώ βαθύτατα για την προθυμία τους, τις συμβουλές και την πολύτιμη καθοδήγησή τους. Επίσης, την υποψήφια διδάκτωρ Ανοσοβιολογίας Κατερίνα Μπακέλα επιβλέπουσα της εργασίας, για τη καθοδήγηση, τις συμβουλές και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας. Βεβαίως, δεν μπορώ να παραλείψω τα δύο πολύτιμα μέλη του εργαστηρίου Τεχνολογίας Βιοαισθητήρων, Δρ. Γεώργιο Παπαδάκη και Δρ. Αχιλλέα Τσορτό για τις συμβουλές και βοήθεια σε τεχνικές δυσκολίες που προέκυπταν. Ακόμα δεν θα ήθελα να ξεχάσω τα υπόλοιπα μέλη των εργαστηρίων και συμφοιτητές μου Χριστιάννα, Μαρία, Ιωάννα, Μιρέλλα, Αμαλία, Μαρία, Παντελή, Θεοδώρα, Αντώνη και Λευτέρη για τη βοήθεια, συντροφιά και το ευχάριστο κλίμα εργασίας. Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την υποστήριξη και υπομονή τους στις επιλογές μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	2
Σκοπός της εργασίας.....	3
Εισαγωγή	
Εισαγωγή στο Ανοσοποιητικό σύστημα.....	4
Εισαγωγή στη Τεχνολογία Βιοαισθητήρων.....	8
Υλικά και μέθοδοι	
Προετοιμασία Βιολογικών Υλικών.....	11
Αποτελέσματα.....	19
Προετοιμασία Ακουστικού Βιοαισθητήρα	22
Αποτελέσματα Ακουστικού Βιοαισθητήρα.....	23
Συζήτηση.....	33
Βιβλιογραφία.....	35

Περίληψη

Η παρούσα εργασία πραγματεύεται την προσπάθεια ανάπτυξης μιας τεχνολογίας που θα μελετά την αλληλεπίδραση διαλυτών μορίων και κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος με τη χρήση ακουστικού βιοαισθητήρα. Τα μόρια που εξετάζονται εντάσσονται στην ευρύτερη κατηγορία των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας. Η ομάδα των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας αποτελείται από πρωτεΐνες του ανοσοποιητικού συστήματος, μεμβρανικές ή διαλυτές, οι οποίες ανάλογα με τη λειτουργία τους μεσολαβούν για την ομαλή εξέλιξη της ανοσολογικής απόκρισης. Συγκεκριμένα, το διαλυτό αντιγόνο ιστοσυμβατότητας τάξης II έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στην διαδικασία της ανοχής και σε ποικίλες ασθένειες. Σε προηγούμενες μελέτες, έχουν βρεθεί πληθυσμοί T λεμφοκυττάρων που αποτελούν πιθανοί στόχοι του διαλυτού αντιγόνου ιστοσυμβατότητας τάξης II. Σχεδιάστηκε, λοιπόν, μια μέθοδος για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του διαλυτού αντιγόνου με τους διάφορους υποπληθυσμούς T λεμφοκυττάρων. Η χρήση του ακουστικού βιοαισθητήρα προσέφερε γρήγορα αποτελέσματα με ιδιαίτερη ευαισθησία και εξειδίκευση, ενώ σημαντικό είναι ότι η παρακολούθηση των αποτελεσμάτων έγινε σε πραγματικό χρόνο. Με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε, επαληθεύτηκαν αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες. Παράλληλα, καθίσταται σαφές ότι υπάρχουν περιθώρια βελτίωσης της μεθόδου όσο αφορά την επιφάνεια ακινητοποίησης των διαλυτών μορίων και την επαναχρησιμοποίησή της για μελέτη περισσότερων πληθυσμών T λεμφοκυττάρων πιο γρήγορα και εύκολα.

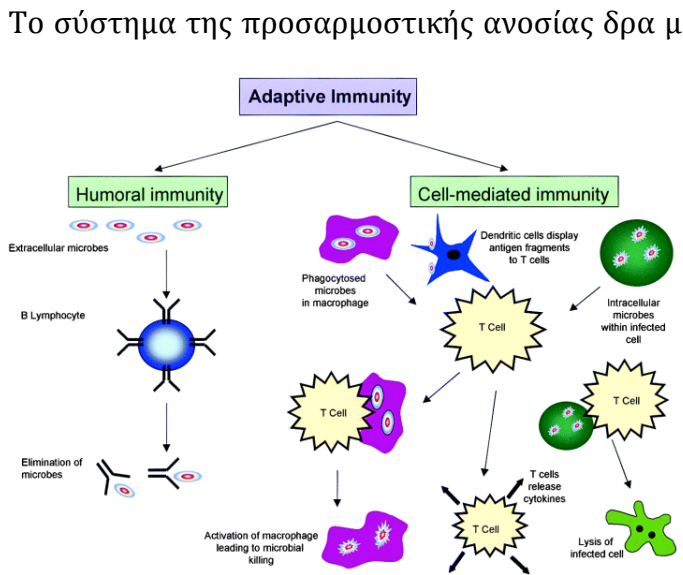
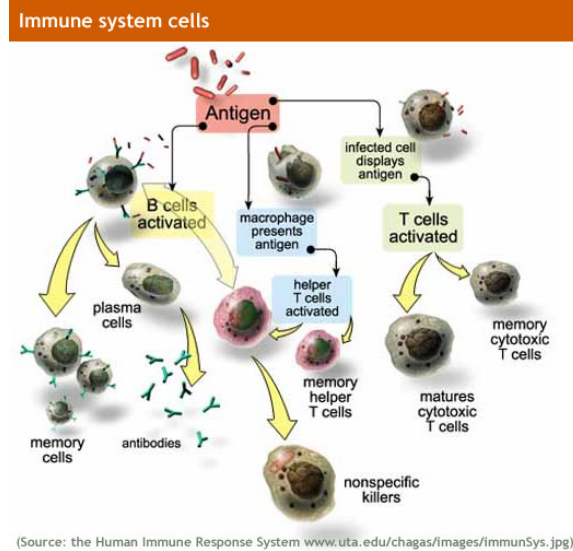
Σκοπός της εργασίας

Αρχικά, σκοπός της εργασίας ήταν να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση των διαλυτών αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II με διάφορους υποπληθυσμούς T λεμφοκυττάρων με τη χρήση ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love. Τα διαλυτά MHC II μόρια απομονώνονταν από ορό αρσενικών Balb/c ποντικών τα οποία όμως πρώτα είχαν ανοχοποιηθεί με HSA αντιγόνο. Στον ακουστικό βιοαισθητήρα, χρησιμοποιήθηκε τεχνολογία που είχε μελετηθεί σε προηγούμενες έρευνες. Όμως, εξαιτίας του γεγονότος ότι προέκυψαν διάφορα προβλήματα στην πορεία, εγκαταλείψαμε τη συγκεκριμένη τεχνολογία και κύριο μέλημα ήταν να σχεδιάσουμε μια νέα μεθοδολογία. Η νέα τεχνολογία που σχεδιάστηκε εξυπηρετούσε τον αρχικό στόχο, να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση του διαλυτού αντιγόνου τάξης II με φυσικούς πληθυσμούς T λεμφοκυττάρων. Μελετήθηκαν κυρίως πληθυσμοί αναφοράς για τους οποίους μας ενδιέφερε να ταυτοποιηθούν με τον ακουστικό βιοαισθητήρα ότι αλληλεπιδρούν με το διαλυτό αντιγόνο ιστοσυμβατότητας τάξης II και ότι αποτελούν φυσικοί του στόχοι. Ο ακουστικός βιοαισθητήρας έχει κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις κλασικές μοριακές τεχνικές. Το σημαντικότερο ίσως είναι η δυνατότητα παρακολούθησης των αποτελεσμάτων σε πραγματικό χρόνο καθώς και ότι αποτελεί μια label-free τεχνική γεγονός που επιτρέπει να εξάγουμε γρήγορα και εύκολα αποτελέσματα.

Εισαγωγή

Εισαγωγή στο Ανοσοποιητικό Σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί ένα αξιόλογο σύστημα άμυνας των σπονδυλωτών έναντι μικρών «εισβολέων» ή οποιασδήποτε απειλής. Διαθέτει δύο κύριους μηχανισμούς άμυνας, την έμφυτη και την προσαρμοστική ανοσία. Η έμφυτη ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού ενάντια στις μολύνσεις. Η προσαρμοστική ανοσία ανταποκρίνεται στους «εχθρούς» με ιδιαίτερη εξειδίκευση και έχει το πλεονέκτημα της «μνήμης». Η προσαρμοστική ανοσία δεν είναι ανεξάρτητη της έμφυτης ανοσίας, τα δυο συστήματα συνεργάζονται προκειμένου να περιορίσουν το εισβολέα.

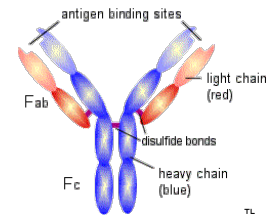


Το σύστημα της προσαρμοστικής ανοσίας δρα με δύο διαφορετικούς τρόπους, την χυμική και την κυτταρική ανοσία. Η χυμική ανοσία μεσολαβείται από τα αντισώματα, που είναι πρωτεΐνες και ονομάζονται αλλιώς ανοσοσφαιρίνες. Τα αντισώματα παράγονται από τα Β λεμφοκύτταρα της σειράς των λευκών αιμοσφαιρίων και δρουν ως στοιχεία αναγνώρισης και σηματοδότησης μιας εισβολής ενάντια σε κάθε αντιγόνο. Με τον όρο αντιγόνο εννοείται κάθε ουσία (συνήθως ξένη) που δεσμεύεται ειδικά σε ένα

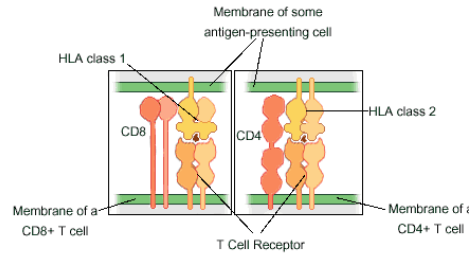
αντίσωμα ή έναν υποδοχέα Τ κυττάρου.

Η κυτταρική ανοσία επιτυγχάνεται με τα Τ λεμφοκύτταρα που παράγονται στο μυελό των οστών και ωριμάζουν στο θύμο αδέν. Διακρίνονται στα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (cytotoxic T cells- T_C), το οποία είναι ειδικά για τα μολυσμένα κύτταρα στόχους, και στα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (helper T cells- T_H), το οποία συντονίζουν την απόκριση της κυτταρικής καθώς και της χυμικής ανοσίας.

Οι ανοσοσφαιρίνες μπορούν να υπάρξουν είτε ως διαλυτά αντισώματα είτε ως μεμβρανικοί υποδοχείς των Β λεμφοκυττάρων. Τα αντισώματα είναι γλυκοπρωτεΐνες. Αποτελούνται από δύο πανομοιότυπες βαριές και δύο πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες. Η Fc περιοχή επιτελεί λειτουργίες όπως αλληλεπίδραση με υποδοχείς Fc σε μακροφάγα, ουδετερόφιλα και ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος. Η περιοχή αυτή αναγνωρίζεται και από την Protein G (και Protein A) ιδιότητα που χρησιμοποιείται σε διάφορες τεχνικές. Η Fab περιοχή είναι υπεύθυνη για την ειδικότητα και εξειδίκευση των αντισωμάτων.



Τα Τ λεμφοκύτταρα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης αποκτούν στη μεμβράνη τους κάποιες γλυκοπρωτεΐνες (CD4, CD8) με βάση τις οποίες μπορούν να διακριθούν σε T_H και T_C αντίστοιχα. Παράλληλα, εκφράζουν στη μεμβράνη τους ειδικούς υποδοχείς για μεμβρανικές πρωτεΐνες που ονομάζονται μόρια μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC). Τα αντιγόνα μείζονος ιστοσυμβατότητας, το οποία κωδικοποιούνται από το MHC, έχουν σημαντικό ρόλο στην αντιγονοπαρουσίαση. Αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών που καθορίζουν την ικανότητα ενός ατόμου να αποδέχεται μοσχεύματα ιστού ή κυττάρων από άλλο άτομο. Τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

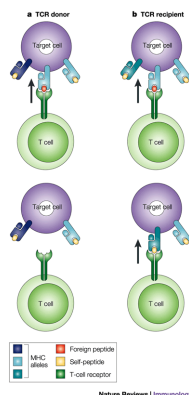


i) Τα γονίδια MHC τάξης I: εκφράζονται σε όλα σχεδόν τα εμπύρνηνα κύτταρα, η κύρια λειτουργία τους είναι η παρουσίαση αντιγονικών πεπτιδικών αντιγόνων στα T κυτταροτοξικά κύτταρα (T_C).

ii) Τα γονίδια MHC τάξης II: εκφράζονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, παρουσιάζουν επεξεργασμένα αντιγονικά πεπτίδια στα T βοηθητικά κύτταρα (T_H).

iii) Τα γονίδια MHC τάξης III: κωδικοποιούν διάφορες εκκριτικές πρωτεΐνες με ανοσολογικές λειτουργίες, ανάμεσα στις οποίες περιλαμβάνονται και συστατικά του συμπληρώματος που σχετίζονται με τη φλεγμονή.

Το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας είναι ένα σύνολο γονιδίων που εδράζονται στο χρωμόσωμα 6 στον άνθρωπο και στο χρωμόσωμα 17 στο ποντίκι. Στον άνθρωπο αναφέρεται ως HLA-complex και στο ποντίκι ως H-2 complex.



Ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η ικανότητα των κυττάρων να ξεχωρίζουν τα κύτταρα του οργανισμού από τα μολυσμένα ή ξένα κύτταρα. Η ιδιότητα αυτή ονομάζεται ανοχή, αποτελεί μία κατάσταση απουσίας ανοσολογικής απόκρισης σε συγκεκριμένα αντιγόνα ή ομάδες αντιγόνα. Συγκεκριμένα, όταν ένας οργανισμός είναι ανεκτικός σε

εαυτά αντιγόνα, ονομάζουμε την κατάσταση ως ανοχή του εαυτού.

Η ανοχή θεωρείται μια ενεργή κατάσταση μη ανταπόκρισης των ειδικών για το αντιγόνο και αναπτύσσεται μέσω των έξης μηχανισμών: clonal deletion, anergy και καταστολή. Clonal deletion είναι η αρνητική επιλογή των αυτοαντιδρώντων T κυττάρων που λαμβάνει χώρα στο θύμο αδένα, όπου τα T με μεγάλη συγγένεια για τα αυτο-αντιγόνα διαγράφονται. Ο όρος anergy αναφέρεται στα κύτταρα που απέτυχαν να ανταποκριθούν σε ένα αντιγονικό ερέθισμα στο οποίο είχαν ανταποκριθεί προηγουμένως. [19, 20, 21]

➤ Διαλυτά αντιγόνα ιστοσυμβατότητας

Στα σωματικά υγρά (αίμα, σάλιο, σπέρμα, ιδρώτας, δάκρυα, ούρα) έχουν ταυτοποιηθεί διαλυτά μόρια MHC I και II^(11, 12, 15, 16, 17). Η συγκέντρωσή τους σε κάθε άτομο εξαρτάται μερικώς από το γονότυπο, καθώς και την ανοσολογική ικανότητα και δραστηριότητα του κάθε ατόμου. Σε υγιή άτομα, στον ορό έχουν ανιχνευθεί διαλυτά μόρια τάξης II σε ποσοστό 98%^[22].

Τα διαλυτά μόρια MHC έχουν συνδεθεί με τη διαδικασία της ανοχής. Έχειδειχθεί η δυνατότητα απενεργοποίησης αυτοδραστικών T κυττάρων για την MBP (myelin basic protein) όταν επωάστηκαν με sMHC II/MBP πεπτίδιο σε ποντίκια με πειραματική αλλεργική εγκεφαλομυελίτιδα⁽¹³⁾. Επίσης, έχουν άμεση και κρίσιμη σχέση με τη μητρική ανοσοκαταστολή και ανοσοδιέγερση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Τα διαλυτά τάξης I συνδέονται με την μητρική ανοσοκαταστολή προς τα πατρικά αλλοαντιγόνα του ημι-αλλογενετικού εμβρύου, ενώ τα διαλυτά τάξης II με το φαινόμενο της ανοσοδιέγερσης⁽¹⁸⁾. Υπάρχουν έρευνες που δείχνουν ότι οι συγκεντρώσεις των διαλυτών μορίων στα υγρά του σώματος κατά τα στάδια ανάπτυξης μιας ασθένειας αλλάζουν, γεγονός που υποδεικνύει πως εμπλέκονται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Χαρακτηριστικές έρευνες έχουν γίνει σε ρευματοειδή αρθρίτιδα, ιικές εγκεφαλίτιδες, AIDS και εγκυμοσύνες. Ακόμα, φαίνεται ότι έχουν ρυθμιστικό ρόλο κατά τη μετάγχιση αίματος από αλλογενετικό δότη. [15, 16, 23, 24]

Τα διαλυτά μόρια τάξης II φαίνεται να ανταγωνίζονται τα αντίστοιχα μεμβρανικά στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα των T κυττάρων. Βιοχημικά είναι γνωστό ότι τα μοριακά βάρη διαφέρουν σε σχέση με τα μεμβρανικά μόρια. Συγκεκριμένα, το διαλυτό αντιγόνο τάξης II έχει μοριακό βάρος περίπου 60kDa που είναι αυξημένο σε σχέση με το μεμβρανικό μόριο⁽¹⁴⁾. Αποτελείται από δύο αλυσίδες και φαίνεται πως δεν αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες, καθώς σε gel ηλεκτροφόρησης η μοναδική ζώνη που προκύπτει είναι εκείνη των 60kDa. Επίσης, έχειδειχθεί ότι είναι βαριά γλυκοζυλιωμένη όπως το μεμβρανικό σύμπλοκο. Μπορούν να προσδεθούν στους φυσικούς τους υποδοχείς και να αναστείλουν τα T κύτταρα μέσω απόπτωσης ή μπλοκάροντας τον υποδοχέα. Πιθανώς, στόχοι τους αποτελούν τα CD4+, CD25+, B κύτταρα και μακροφάγα ⁽⁴⁾. Επιπρόσθετα, υπάρχει η υπόθεση πως ίσως τα T

κατασταλτικά κύτταρα (T suppressors) οφείλουν τις κατασταλτικές τους ιδιότητες σε διαλυτούς παράγοντες που περιέχουν ενεργότητα MHC II μορίων⁽¹²⁾.

Φαίνεται πως αποτελούν ρυθμιστή της ανοσοαπόκρισης στην αντιγονοπαρουσίαση και παίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της κύησης ειδικά όταν η έκφραση των αντιγόνων αυτών στο πλακούντα συνδέεται με αποβολή του εμβρύου. Ακόμα, πιθανόν εμποδίζουν ή προωθούν αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συμμετέχοντας ενεργά στην ανάπτυξη της αυτοανοσίας. ^[14]

Εισαγωγή στην Τεχνολογία των Βιοαισθητήρων

Ο βιοαισθητήρας αποτελεί μια μικρή αυτόνομη αναλυτική συσκευή που μπορεί να μετατρέψει μια βιολογική απόκριση σε ηλεκτρικό σήμα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτη βιολογικών δειγμάτων και παρέχει ποσοτικές ή ποιοτικές πληροφορίες βάσει των ιδιοτήτων των δειγμάτων. Αποτελείται από τα εξής μέρη: τον υποδοχέα, που είναι συνήθως ένα βιολογικό μόριο, το μεταγωγέα, που βρίσκεται σε επαφή με τον υποδοχέα, και το ηλεκτρονικό κομμάτι. Όταν ο αναλύτης για τον οποίο ο υποδοχέας είναι ειδικός βρίσκεται στο διάλυμα, συμβαίνει αλληλεπίδραση μεταξύ τους, προκαλώντας την παραγωγή ενός φυσικοχημικού σήματος το οποίο μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα μέσω του μεταγωγέα. Το ηλεκτρονικό κομμάτι του αισθητήρα ανιχνεύει το σήμα αυτό. Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται ποικίλλουν, για παράδειγμα DNA, RNA, πρωτεΐνες, κύτταρα κλπ. Οι βιοαισθητήρες, επομένως, έχουν την ιδιότητα να εξάγουν πληροφορίες για πολλούς διαφορετικούς τομείς. Σημαντικό πλεονέκτημα στη χρήση των βιοαισθητήρων αποτελεί το γεγονός ότι προσφέρουν γρήγορη ειδική ανίχνευση χωρίς σήμανση (label-free technique). Οι τεχνικές με φθορίζουσες ουσίες κοστίζουν τόσο σε χρήμα όσο και σε χρόνο, ενώ μπορεί να υπάρξει κάποια ανεπιθύμητη αντίδραση με αρνητικά αποτελέσματα.

Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες βιοαισθητήρων ανάλογα με την αντίδραση που μελετούν, οι βιοσυγγενικοί και οι βιοκαταλυτικοί. Οι βιοσυγγενικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν ως υποδοχέα ένα βιολογικό μόριο το οποίο έχει συγγένεια για τον αναλύτη και ανιχνεύουν αλλαγή στη μάζα όταν τα μόρια προσδένονται ειδικά πάνω στους υποδοχείς. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται οι ηλεκτροχημικοί, οι οπτικοί και οι ακουστικοί βιοαισθητήρες. Οι βιοκαταλυτικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν ως υποδοχέα ένα ένζυμο ή κύτταρο και ανιχνεύουν το προϊόν της αντίδρασης του ενζύμου ή του κυττάρου με το επιθυμητό μόριο, όπως για παράδειγμα είναι οι αμπερομετρικοί οι οποίοι ανιχνεύουν την αλλαγή στο δυναμικό. Υπάρχει ακόμα η κατηγορία των ανοσοαισθητήρων, μια πιο ειδική και πολύ διαδεδομένη κατηγορία.

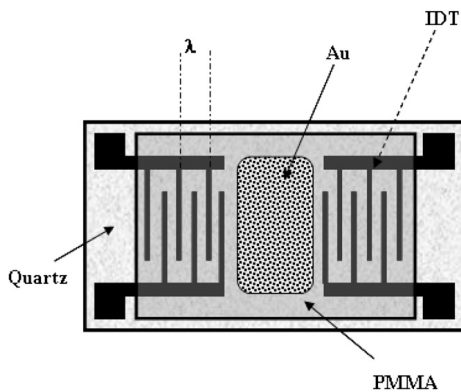
Ακουστικοί βιοαισθητήρες

Τα ακουστικά κύματα είναι αρμονικές ελαστικές παραμορφώσεις που μπορούν να παραχθούν σε στερεά. Χρησιμοποιούν ως μεταγωγέα ένα πιεζοηλεκτρικό υλικό όπως ο χαλαζίας. Τα πιεζοηλεκτρικά υλικά έχουν την ιδιότητα να εμφανίζουν παραμόρφωση αν εφαρμοστεί σε αυτά ένα ηλεκτρικό πεδίο. Το ακουστικό κύμα αποτελεί τέτοια παραμόρφωση. Η διάταξη ενός ακουστικού βιοαισθητήρα περιλαμβάνει το πιεζοηλεκτρικό υλικό και ηλεκτρόδια. Τα ηλεκτρόδια δημιουργούν ένα ηλεκτρικό πεδίο παράγοντας έτσι ακουστικό κύμα και ταυτόχρονα χρησιμεύουν για την ανίχνευσή του. Το ακουστικό κύμα μπορεί να διαδίδεται με διάφορους τρόπους στο πιεζοηλεκτρικό υλικό. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε, ακουστικό κύμα που διαδίδεται στην επιφάνεια του αισθητήρα (surface acoustic wave).

Οι SAW αισθητήρες λειτουργούν με εγκάρσιο οριζόντιο επιφανειακό κύμα (shear horizontal SAW), το οποίο προκαλεί μετατόπιση στα στοιχειώδη σωματίδια του

στερεού παράλληλη με την επιφάνεια του αισθητήρα και κάθετη στη διεύθυνση διάδοσης.

Στην περίπτωση αυτή, τα ηλεκτρόδια του αισθητήρα έχουν τη μορφή αλληλοδιαπλεκόμενων μεταγωγέων (interdigitated transducers, IDTs) και σε αυτά εφαρμόζεται εναλλασσόμενο ρεύμα. Το ρεύμα αυτό προκαλεί εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο ανάμεσα στα IDTs, το οποίο με τη σειρά του προκαλεί ταλάντωση των ατόμων του πιεζοηλεκτρικού κρυστάλλου. Έτσι παράγεται ακουστικό κύμα που διαδίδεται πάνω στην επιφάνεια του αισθητήρα. Η απόσταση μεταξύ των IDTs αντιστοιχεί στο μήκος κύματος του ακουστικού κύματος.



Σχηματική απεικόνιση ενός ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love. πιεζοηλεκτρικό υλικό (quartz) με τα IDTs (όπου το λ είναι το μήκος κύματος του ακουστικού κύματος). Υπάρχει PMMA και στρώμα χρυσού.

Ο πιο ευαίσθητος τύπος του συγκεκριμένου βιοαισθητήρα είναι εκείνος που λειτουργεί με κύματα τύπου Love. Το κύμα Love περιορίζεται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα χρησιμοποιώντας στρώμα κυματοδηγού (waveguide) που εναποτίθενται στην επιφάνεια. Ως κυματοδηγοί χρησιμοποιούνται διάφορα πολυμερή υλικά, π.χ. poly-methyl-methacrylate (PMMA). Η εναπόθεση του κυματοδηγού γίνεται πάνω στον κρύσταλλο, και περιλαμβάνει τα IDTs και την επιφάνεια ευαισθησίας (sensing surface). Το πάχος του στρώματος του κυματοδηγού είναι σημαντικό καθώς καθορίζει την ευαισθησία του βιοαισθητήρα που συμβάλλει στη μετάδοση του κύματος στην επιφάνεια.

Το ακουστικό κύμα που διαδίδεται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, όταν έρχεται σε επαφή με το υγρό στη διεπιφάνεια του υγρού/στερεού προκαλεί την ταλάντωση στο υγρό. Έτσι, δημιουργείται ένα αποσβένον πεδίο (evanescent acoustic field) το οποίο εξαρτάται από τη συχνότητα του ακουστικού κύματος και από το ιξώδες και την πυκνότητα του διαλύματος. Πιο συγκεκριμένα, το βάθος διείσδυσης υπολογίζεται από τον τύπο: $\delta = \sqrt{2\eta/2\pi\rho f}$ όπου η και ρ το ιξώδες και η πυκνότητα του διαλύματος και f η συχνότητα λειτουργίας του αισθητήρα. Σε συχνότητα λειτουργία 155MHz για τον ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love, το βάθος διείσδυσης δ για το καθαρό νερό υπολογίζεται στα 45nm. [2, 29] Αντίστοιχα, για συχνότητα λειτουργίας 110MHz, το δ για το καθαρό νερό υπολογίζεται στα 54nm.

Οι αισθητήρες τύπου Love εμφανίζουν ευαισθησία σε εναπόθεση μάζας στην επιφάνειά τους, η οποία ανιχνεύεται ως αλλαγή στην ταχύτητα διάδοσης του επιφανειακού κύματος και καταγράφεται ως μεταβολή στη φάση (phase) του

κύματος^[28]. Ακόμη, είναι ευαίσθητοι σε ιξωδοελαστικές και μηχανικές αλλαγές, οι οποίες ανιχνεύονται ως απώλεια ενέργειας του κύματος και καταγράφονται ως μεταβολή του πλάτους (amplitude).

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παρακολούθηση των αλλαγών στις ιδιότητες συντονισμού του πιεζοηλεκτρικού υλικού σε πραγματικό χρόνο δίνει την ευκαιρία για υπολογισμό κινητικών παραμέτρων και σταθερά συγγένειας για τις αλληλεπιδράσεις που μελετώνται. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ευαισθησία των ακουστικών βιοαισθητήρων σε αλλαγές στη μάζα που εναποτίθενται στην επιφάνεια. Επιπλέον, εμφανίζουν ευαισθησία σε αλλαγές στην ιξωδοελαστικότητα που συμβαίνουν στην διεπιφάνεια υγρού/στερεού. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι αλλαγές στη μάζα αντιστοιχούν σε αλλαγές στη φάση του κύματος και οι αλλαγές στην ιξωδοελαστικότητα σε αλλαγές στο πλάτος του κύματος. Σύμφωνα με έρευνες, ο λόγος αλλαγών του πλάτους/αλλαγές στη φάση ορίζει τον ακουστικό λόγο, ο οποίος προσδιορίζει το εγγενές ιξώδες $[\eta]$ (intrinsic viscosity) για τα μόρια που βρίσκονται προσδεδεμένα πάνω στην επιφάνεια. ^[27, 29] Για παράδειγμα, στην περίπτωση του DNA, το $[\eta]$ αντικατοπτρίζει το μέγεθός του και τη διαμόρφωση που αποκτά αυτό στο χώρο.

Υλικά και Μέθοδοι

Προετοιμασία Βιολογικών Υλικών

Τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή διαλυτού αντιγόνου ιστοσυμβατότητας τάξης II ανήκουν στην εργαστηριακή σειρά Balb/c. Τα ποντίκια αυτά στεγάζονται στο ζωοτροφείο του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, σε δωμάτια με ελεγχόμενο κύκλο φωτός 12h. Πρώτα από όλα, ανοχοποιήθηκαν για την πρωτεΐνη human serum albumin (HSA, Sigma, St. Louis, MO) σε συγκέντρωση 100μg/ml. Η συλλογή του αίματος και απομόνωση του ορού που μας ενδιαφέρει γινόταν με ολική αφαιμάξη μετά από 6 ημέρες από την ένεση (short-term ανοχοποίηση). Το αίμα είναι απαραίτητο να μείνει σε θερμοκρασία δωματίου για 30min και έπειτα στους 4°C για 30min. Ο ορός συλλέγεται μετά από φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 3min. Το υπερκείμενο-ορός συλλέγεται και φυλάσσεται σε erpedorf στους -20°C. Ακόμη, για τις κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν ίδιου τύπου ποντίκια, ανοχοποιημένα ή μη (control). Με κατάλληλα αποστειρωμένα εργαλεία αφαιρούνταν ο σπλήνας και στη συνέχεια γινόταν η απομόνωση των επιθυμητών κυττάρων.

Παρακάτω αναφέρεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση και καθαρισμό του διαλυτού αντιγόνου ιστοσυμβατότητας τάξης II, καθώς και για την απομόνωση των κυττάρων.

✚Ομοιοπολική πρόσδεση αντισώματος σε μαγνητικά σφαιρίδια α-IgG

Σε μαγνητικά σφαιρίδια προσδένουμε το επιθυμητό αντίσωμα (N22 ειδικό για το αντιγόνο ιστοσυμβατότητας τάξης II) ώστε στη συνέχεια να τα χρησιμοποιήσουμε για την απομόνωση της πρωτεΐνης. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας απαιτούνται στείρες συνθήκες, και χρησιμοποιούνται tube των 5ml.

Υλικά:

- ✓ Υπερμαγνητικά σφαιρίδια (DynaL Biotech) διάμετρος M-280, anti-IgG
- ✓ Αποστειρωμένο PBS 1X (pH 7.4)
- ✓ 3-phenolamine 0.2M σε dH₂O, pH 8.2
- ✓ Διάλυμα DMP/3-phenolamine (0.2M) 20mM, pH 8.2
- ✓ Tris buffer 50mM σε dH₂O, pH 7.5
- ✓ Διάλυμα PBS 1X
- ✓ Αναδευτήρας

Ποσότητες:

- 10⁸ σφαιρίδια σε 1ml PBS (150μl από αρχική C=6.7*10⁸ mg/ml)
- 5μg αντισώματος (N22) για 10⁸ σφαιρίδια
- 3-phenolamine 7.5%
- DMP/3-phenolamine 20mM: 0,005gr DMP για 1ml 3-phenolamine
- Tris 50mM: 0,006gr Tris για 1ml dH₂O

Διαδικασία:

- 1) Ξεπλύνουμε τα σφαιρίδια 2x με αποστειρωμένο PBS 1ml χρησιμοποιώντας μαγνήτη.
- 2) Προσθέτουμε το αντίσωμα N22 (συμπληρώνουμε ως 1ml PBS) στα σφαιρίδια και επωάζουμε για 1h στους 4° C με ήπια ανάδευση.
- 3) Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλύνουμε 2x με PBS sterile 1ml.
- 4) Προσθέτουμε 1ml 3-phenolamine 0,2M pH 8,2 και επαναλαμβάνουμε 2x. Η φαινολαμίνη δημιουργεί το χημικό περιβάλλον για να δράσει ο cross-linker.
- 5) Επαναδιαλυτοποιούμε σε διάλυμα DMP/3-phenolamine 20mM 1ml και επωάζουμε για 30min με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το DMP δημιουργεί τους ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των δύο αντισωμάτων.
- 6) Αφαιρούμε το υπερκείμενο και σταματάμε την αντίδραση με διάλυμα Tris 50mM pH 7,5 1ml και επωάζουμε για 15min με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου
- 7) Αφαιρούμε το υπερκείμενο και πλένουμε 3x με PBS
- 8) Διατηρούμε σε 1ml PBS στους 4°C

✚Ανοσοκατακρήμνιση διαλυτών μορίων από ορό ποντικού με μαγνητικά σφαιρίδια

Με την ανοσοκατακρήμνιση έχουμε τη δυνατότητα να απομονώσουμε το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει. Ακόμα, είναι μια ευαίσθητη και ειδική διαδικασία αφού χρησιμοποιείται ειδικό για την πρωτεΐνη αντιγόνο. Με τη βοήθεια του μαγνήτη επιτυγχάνεται καλή πλύση για τα μη δεσμευμένα μόρια ώστε στη συνέχεια να παραλάβουμε μόνο το επιθυμητό αντιγόνο.

Χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο το οποίο όμως στη συνέχεια τροποποιήθηκε προκειμένου να μην δημιουργούνται προβλήματα στο βιοασθητήρα. Σε επόμενο κεφάλαιο θα δοθεί η αιτιολόγηση της τροποποίησης αυτής.

Υλικά:

- ✓ Μαγνητικά σφαιρίδια συνδεδεμένα με ειδικό για την πρωτεΐνη αντίσωμα (N22)
- ✓ Washing buffer: PBS 1X-Tween 20, 0.05%
- ✓ CH₃COOH 0.1M pH 4, 600μl (10%)
- ✓ Tris-HCl 0.2M σε dH₂O pH 8.2
- ✓ Διάλυμα PBS 1X
- ✓ NaCl 2M
- ✓ Αναδευτήρας

Αρχικό πρωτόκολλο[1]

Διαδικασία:

- 1) Ξεπλύνουμε τα σφαιρίδια 2x με washing buffer PBS-Tween 0,05% 1ml (αν τα σφαιρίδια έχουν ξαναχρησιμοποιηθεί). Ξεπλύνουμε 2x με 2ml PBS 1x.
- 2) Φορτώνουμε το δείγμα (αραιώνουμε τον ανοχοποιημένο ορό 1:1) ως 1ml και

- επωάζουμε για 2h με ήπια ανάδευση στους 4°C. Αναδεύουμε έντονα τακτικά.
- 3) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και πλένουμε με PBS-Tween (0.05% 2ml 2x) χρησιμοποιώντας μαγνήτη, για να απομακρυνθούν τα μη ειδικά προσδεμένα μόρια.
 - 4) Πλένουμε 2x με PBS 1x 2ml, χρησιμοποιώντας μαγνήτη.
 - 5) Για την έκλυση της πρωτεΐνης προσθέτουμε 1ml CH₃COOH 10% και επωάζουμε για 20min σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση.
 - 6) Συλλέγουμε το υπερκείμενο και εξουδετερώνουμε το όξινο pH με Tris-HCl 0,2M 2ml. Μετράμε το pH και ρυθμίζουμε περαιτέρω αν χρειαστεί μέχρι pH~7 (χρησιμοποιώντας KOH 1N, NaOH 5N, HCl 6N). Έπειτα, το δείγμα φυγοκεντρείται με χρήση κολώνας συμπίκνωσης (cut-off 10000kDa, δηλαδή κάτω από αυτό το MW περνάνε οι πρωτεΐνες, άρα όχι η δική μας) ώστε να το συμπυκνωθεί και να απαλλαχθεί από τα άλατα που προσθέσαμε, φυγοκεντρούμε στις 3000rpm για 5-10min.
 - 7) Εξουδετερώνουμε και τα σφαιρίδια με Tris-HCl 1ml.
 - 8) Ξεπλένουμε τα σφαιρίδια 2x με PBS-Tween, 2x με PBS 1X και τα διατηρούμε στους 4°C σε PBS 1X.

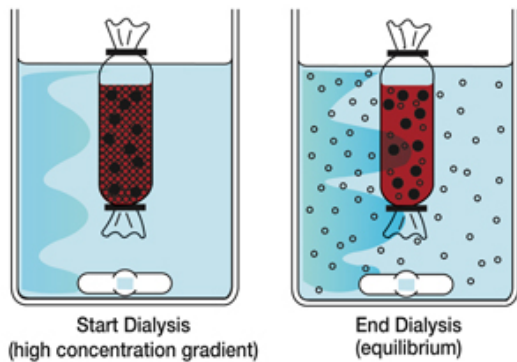
Τροποποιημένο πρωτόκολλο [2]

- 1) Ξεπλένουμε τα σφαιρίδια 2x με 2ml PBS 1X.
- 2) Φορτώνουμε το δείγμα (αραιώνουμε τον ανοχοποιημένο ορό 1:1) ως 1ml και επωάζουμε για 2h με ανάδευση στους 4°C. Αναδεύουμε έντονα τακτικά.
- 3) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και πλένουμε 4x με 1ml PBS 1X χρησιμοποιώντας μαγνήτη, για να απομακρυνθούν τα μη ειδικά προσδεμένα μόρια.
- 4) Για την έκλυση της πρωτεΐνης προσθέτουμε 1ml NaCl 2M και επωάζουμε για 20min σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση.
- 5) Συλλέγουμε το υπερκείμενο που περιέχει την πρωτεΐνη μας. Έπειτα, το δείγμα φυγοκεντρείται με χρήση κολώνας συμπίκνωσης (cut-off 10000kDa, δηλαδή κάτω από αυτό το MW περνάνε οι πρωτεΐνες, άρα όχι η δική μας) ώστε να το συμπυκνώσουμε και να απαλλαγούμε από τα άλατα που προσθέσαμε, φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 5-10min.
- 6) Ξεπλένουμε τα σφαιρίδια 2x με PBS 1X 1ml.
- 7) Διατηρούμε τα μαγνητικά σφαιρίδια στους 4°C σε PBS 1X.

Dialysis

Υλικά:

- ✓ Spectra/Por molecularporous membrane tubing (MMWCO: 6-8,000 (reorder no 132 650)
- ✓ PBS 1X
- ✓ Μαγνήτης
- ✓ Αναδευτήρας



Διαδικασία:

Φορτώνουμε στη μεμβράνη το δείγμα και επωάζουμε, με ήπια ανάδευση, μέσα στο PBS για 4h στους 4°C. Έπειτα αλλάζουμε το PBS και επωάζουμε overnight 4°C.

Lowry method

Ευαίσθητη βιοχημική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα μέσω φωτομέτρησης (μήκος κύματος 625nm).

Υλικά:

- ✓ TCA 20%
- ✓ A reagent: 2gr NaOH, 10gr Na₂CO₃, 0,1gr Na-K-tartarate
- ✓ B reagent: 0,5gr CuSO₄ · 5H₂O
- ✓ C reagent: 10ml A, 0,2ml B
- ✓ D reagent: 1,5ml follin-ciocalteau 2N+1,5 ml H₂O
- ✓ Φωτόμετρο

Διαδικασία:

- 1) Σε 10μl δείγματος προσθέτουμε 10μl TCA 20%.
- 2) Επωάζουμε για 30min στους 4°C.
- 3) Φυγοκέντρωση στις 12.000rpm στους 4°C για 10min
- 4) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, και προσθέτουμε 100μl A και 1ml C reagent.
- 5) Επωάζουμε για 10min στον πάγο.
- 6) Προσθέτουμε 100μl D reagent στα δείγματα.
- 7) Επωάζουμε για 30min σε θερμοκρασία δωματίου (σε σκοτάδι)
- 8) Φωτομετρούμε στα 625 nm.

Χρησιμοποιούμε ένα διάλυμα ακόμα το "τυφλό" από το βήμα (4).

Χρησιμοποιούμε 2 επαναλήψεις/δείγμα.

Η συγκέντρωση του δείγματος υπολογίζεται από τον τύπο: $OD \times 8 = \text{mg/ml}$

Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση ακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Η διαδικασία αυτή μας βοηθάει να πιστοποιήσουμε πρωτεΐνες με βάση το μοριακό βάρος τους. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε ένα δείγμα που υπόκειται ηλεκτροφόρηση, κινούνται ανάμεσα στους πόρους του πηκτώματος ανάλογα με το

μέγεθός τους. Οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται εδώ είναι αποδιατακτικές για να μην διατηρούνται τυχόν σύμπλοκα.

Υλικά:

- ✓ Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Gibco BRL)
- ✓ 5X loading buffer για τα δείγματα: 0,0625M Tris, 5% β-mercaptethanol, 2% SDS, 20% glycerol, 0,1% bromophenol blue
- ✓ 1X running buffer για την ηλεκτροφόρηση: 0,025M Tris, 0,192M glycine, 0,1% w/v SDS
- ✓ για τα πηκτώματα χρησιμοποιούνται
 - running gel (12%) : 3,35ml dH₂O, 4ml acrylamide (30% acrylamide/0.8 bisacrylamide), 100μl SDS (10% SDS σε dH₂O), 50μl APS (10% APS σε dH₂O), 2,5ml Tris (1.5M Tris-HCl pH 8.8), 10μl TEMED
 - staking gel (4%) : 3ml dH₂O, 650μl acrylamide (30% acrylamide/0.8 bisacrylamide), 50μl SDS (10% SDS σε dH₂O), 25μl APS (10% APS σε dH₂O), 1,25ml Tris (1.5M Tris-HCl pH 8.8), 10μl TEMED

Διαδικασία:

1) Τοποθετούμε στη συσκευή το gel ανάλυσης (running gel) και καλύπτουμε με αιθανόλη για να προκύψει ενιαίο το gel.

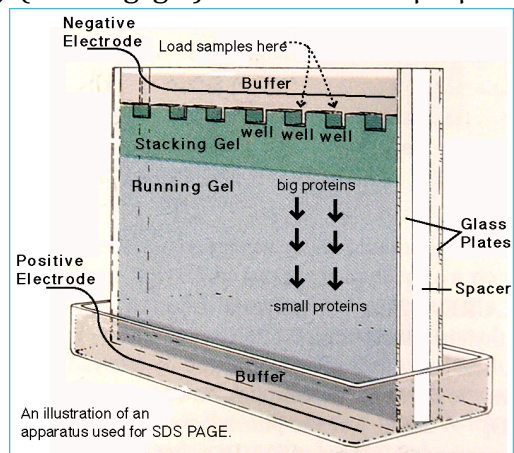
2) Στη συνέχεια προσθέτουμε το gel πακεταρίσματος (stating gel) και βάζουμε το ειδικό χτενάκι για να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια για τα δείγματα.

Ετοιμάζουμε τα δείγματα στον επιθυμητό όγκο και προσθέτουμε αντίστοιχη ποσότητα 5X loading buffer (ώστε να αποτελεί το 1/5 του συνολικού όγκου). Επιθυμητός όγκος 25μl σε κάθε πηγάδι: 5μl loading buffer και 20μl δείγματος

3) Τα βράζουμε στους 95°C για 10min ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες.

4) Φορτώνουμε τα δείγματα στα πηγάδια μαζί με κατάλληλο marker και πραγματοποιούμε την ηλεκτροφόρηση σε τάση 120V.

5) Μετά το πέρας της διαδικασίας προχωρούμε σε χρώση του running gel.



✚ Silver staining

Υλικά:

- ✓ Methanol
 - ✓ 5%, 1% CH₃COOH
 - ✓ Sodium Trisulfate (Na₂S₂O₃·5H₂O) 0.02%
 - ✓ Silver nitrate (AgNO₃ 1%)
 - ✓ Διάλυμα εμφάνισης (Na₂CO₃ 2%, formaldeyde 0.04%)
- Όλα τα διαλύματα γίνονται σε τελικό όγκο 50ml

Διαδικασία:

- 1) Φιξάρουμε το gel σε 50% methanol, 5% CH₃COOH για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση.
- 2) Ξεπλύνουμε με 50% methanol για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση.
- 3) Επαναυδρολύουμε σε dH₂O ~50ml, 2x για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση.
- 4) Ευαισθητοποιούμε το gel σε 0,02% sodium trisulfate για 1min σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση.
- 5) Ξεπλύνουμε 2x με dH₂O για 1min σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση.
- 6) Βάφουμε σε πάγο με 0,1% silver nitrate (pre-chilled) για 20 min στους 4°C υπό ανάδευση.
- 7) Ξεπλύνουμε 2x με dH₂O για 1min σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση.
- 8) Εμφανίζουμε με διάλυμα 0,04% formaldeyde, 2% sodium carbonate. Ανακατεύουμε έως ότου βαφτεί.
- 9) Σταματάμε την αντίδραση με 5% acetic acid.
- 10) Διατηρούμε το gel σε 1% acetic acid.

✚Στύπωμα κατά Western

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση παρουσίας πρωτεϊνών. Στηρίζεται στην ειδικότητα ενός αντισώματος για την πρωτεΐνη που μελετάμε. Πραγματοποιείται σε 2 στάδια, το transfer όπου μεταφέρονται οι πρωτεΐνες σε μεμβράνη κατάλληλη για την εμφάνιση και στην συνέχεια επώαση με το ειδικό αντίσωμα.

A) Transfer

Υλικά:

- ✓ Whatman χαρτιά (3mm, Chr)
- ✓ Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Gelman Science)
- ✓ Transfer buffer: 25mM Tris, 98mM Glycine, 20% Methanol, pH 8.3

Διαδικασία:

- 1) Τοποθετούμε το gel στη δεξαμενή μεταφοράς πάνω σε ένα εμποτισμένο σε transfer buffer χαρτί Whatman. Το χαρτί έχει τις ίδιες διαστάσεις με το gel. Προσέχουμε να μην δημιουργούνται φυσαλίδες.
- 2) Μεταφέρουμε πάνω του προσεκτικά την μεμβράνη, κομμένη στις ίδιες διαστάσεις και προσθέτουμε ένα ακόμα Whatman.
- 3) Γεμίζουμε τη δεξαμενή με transfer buffer μέχρι να καλυφθεί το gel. Συνδέουμε με πηγή ενέργειας και ρυθμίζουμε τα A στα m² του gel. Αφήνουμε σε rt για 1,5h.

B) Western

Υλικά:

- ✓ TBS solution: 20mM Tris, 150mM NaCl pH 7,2-7,4
- ✓ Wash solution: TBS/Tween 20 0,05%

- ✓ Blocking buffer: TBS/Tween 20 0,05% - non fat milk 5%
- ✓ Ab solution: TBS/Tween 20 0,05% - non fat milk 0,1%
- ✓ Διάλυμα χημειοανταύγειας (Chemiluminescence)-(SuperSignal West Pico της Pierce)

Διαδικασία:

- 1) Πλύσιμο της μεμβράνης 3X για 10min με wash solution και ήπια ανάδευση.
- 2) Επώαση με το blocking buffer για 1h με ήπια ανάδευση. Τελικός όγκος 20ml.
- 3) Πλύσιμο της μεμβράνης 3X για 10 min με wash solution με ήπια ανακίνηση.
- 4) Επώαση με το 1ο αντίσωμα N22 (ειδικό για το αντιγόνο ιστοσυμβατότητας II) σε Ab solution (overnight) για 11/2h σε θερμοκρασία δωματίου σε συγκέντρωση 1/1000 με ήπια ανακίνηση. Τελικός όγκος 10ml.
- 5) Πλύσιμο της μεμβράνης 3X για 10min με wash solution με ήπια ανακίνηση.
- 6) Επώαση με 2ο αντίσωμα HRP (goat anti-mouse IgG HRP hyperoxidase) σε συγκέντρωση 1/10.000 με ήπια ανακίνηση. Τελικό όγκος 10ml.
- 7) Πλύσιμο της μεμβράνης 3X για 10 min με wash solution με ήπια ανακίνηση.
- 8) Προσθήκη σε διάλυμα χημειοανταύγειας 1:1 1ml για 3min στον σκοτεινό θάλαμο.
- 9) Έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

- ❖ Για την αναγνώριση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης από ένα μίγμα πρωτεϊνών, χρησιμοποιούνται και οι δύο παραπάνω διαδικασίες. Αρχικά, το πρωτεϊνικό διάλυμα αναλύεται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα SDS-PAGE, που είναι εμποτισμένο με θειικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS) ο οποίος είναι αποδιατακτικός παράγοντας. Οι πρωτεϊνικές ζώνες μεταφέρονται ηλεκτροφορητικά σε μεμβράνη νικτροκυτταρίνης και οι ζώνες αναγνωρίζονται με τον εμποτισμό της μεμβράνης με συζευγμένο με ένζυμο αντίσωμα (πολυκλωνικό ή μονοκλωνικό) με ειδικότητα έναντι της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει. Μετά τη δέσμευση του συζευγμένου με ένζυμου αντισώματος, προστίθεται χρωμογόνο υπόστρωμα το οποίο τελικά παράγει ένα έγχρωμο και αδιάλυτο προϊόν που προκαλεί την εμφάνιση μιας έγχρωμης ζώνης στην περιοχή που βρίσκεται το αντιγόνο.
Εναλλακτικά, μπορεί να ακολουθηθεί η μέθοδος silver staining με την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Με τη μέθοδο αυτή, βάφουμε το gel χρησιμοποιώντας παράλληλα ένα marker γνωστών μοριακών βαρών, με τον οποίον συγκρίνουμε τα αποτελέσματα της χρώσης.

🚦 Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοροφητική δοκιμή (ELISA)

Ευαίσθητη μέθοδος για ανίχνευση πρωτεϊνών σε διαλύματα και κυτταρικές επιφάνειες μέσω αντισωμάτων. Υπάρχουν τρία είδη, εδώ χρησιμοποιήθηκε η indirect ELISA. Δείγμα (στην περίπτωση αυτή ορός) το οποίο περιέχει το πρωτογενές αντίσωμα προστίθεται σε φρεάτιο μικροτιτλοδότησης, το οποίο είναι επικαλυμμένο με το αντιγόνο και αφήνεται να αντιδράσει με το ακινητοποιημένο αντιγόνο του φρεατίου. Μετά την απομάκρυνση των ελευθέρων μορίων από το

πρωτογενές αντίσωμα με εκπλύσεις, η παρουσία αντισώματος δεσμευμένου στο αντιγόνο ανιχνεύεται με την προσθήκη συζευγμένου με αντίσωμα δευτερογενούς αντι-ισοτυπικού αντισώματος, το οποίο δεσμεύεται στο πρωτογενές αντίσωμα. Τα ελεύθερα μόρια του δεύτερου αντισώματος απομακρύνονται με εκπλύσεις και προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου. Η ποσότητα του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασης μετριέται με ειδικούς φασματοφωτομετρικούς μετρητές πλακών που μετρούν απορρόφηση.

Υλικά:

- ✓ Coating buffer: 0.05M NaHCO₃, 0.05 Na₂CO₃ 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 H₂O₂
- ✓ H₂SO₄ 1M
- ✓ 96-flat bottom plate (Sarstedt, Numbrecht, Germany)
- ✓ Elisa reader

Διαδικασία:

- 1) Στρώνουμε τα δείγματα στην plate σε δύο επαναλήψεις το καθένα. Τελικός όγκος 100μl/well. Επωάζουμε για 14-18h στους 4°C.
- 2) Πλένουμε 3X με το washing buffer 200μl/well.
- 3) Στρώνουμε το blocking buffer, 200μl/well για να παρεμποδίσουμε τη μη-ειδική σύνδεση των πρωτεϊνών στα αντισώματα. Επωάζουμε για 2h σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Πλένουμε 3X με το washing buffer 200μl/well.
- 5) Στρώνουμε το 1ο αντίσωμα N22 σε συγκέντρωση 1/1000 σε Ab buffer. Τελικός όγκος 100μl/well. Επωάζουμε για 2h σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6) Πλένουμε 3X με το washing buffer 200μl/well.
- 7) Στρώνουμε το 2ο αντίσωμα (anti-mouse IgG horseradish peroxidase, Sigma) σε συγκέντρωση 1/5000 σε Ab buffer. Τελικός όγκος 100μl/well. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1h στο σκοτάδι.
- 8) Πλένουμε 3X με το washing buffer 200μl/well.
- 9) Προσθέτουμε το διάλυμα χρωμογόνου-υποστρώματος σε αραιώση 1:1. Τελικός όγκος 100μl/well. Περιμένουμε μέχρι τα πηγαδάκια γίνουν μπλε, χαρακτηριστικό χρώμα για την αντίδραση.
- 10) Ολοκληρώνουμε την αντίδραση με H₂SO₄. Τελικός όγκος 50μl/well.
- 11) Μετράμε σε ELISA reader στα 450nm.

✚ Διαχωρισμός κυττάρων από σπλήνα και απομόνωση T λεμφοκυττάρων με εξωτερικό ανοσοφθορισμό

Υλικά:

- ✓ Σπληνοκύτταρα

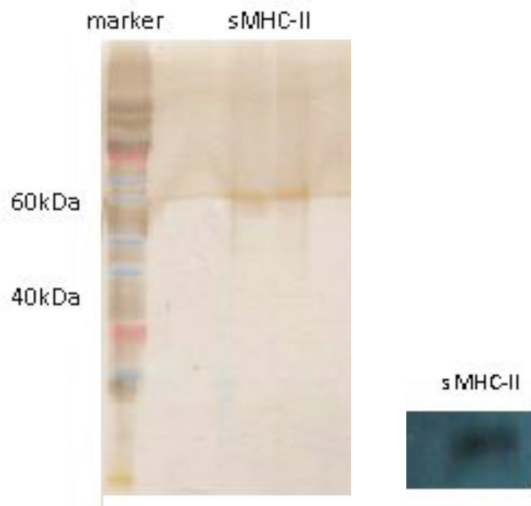
- ✓ Θρεπτικά μέσα RPMI (+/- FBS) και HBSS (Gibco, BRL, Grand Island, NY)
- ✓ Lysing Rc: Ammonium chloride 0.83 g, Sodium hydrogen Carbonate 0.1g, EDTA 0.032g, dH₂O 100ml pH 7.4 (4°C)
- ✓ PBS 1X pH 7.4
- ✓ Petri plates
- ✓ Blocking buffer: PBS-BSA 3%
- ✓ Ab solution: PBS-BSA 1%
- ✓ Anti-mouse IgG conjugated to the FITC (Sgima, St. Louis, MO)
- ✓ DakoCytomation (now Beckman-coulter) MoFloT High-Performance Cell Sorter with the SummitT software program

Διαδικασία:

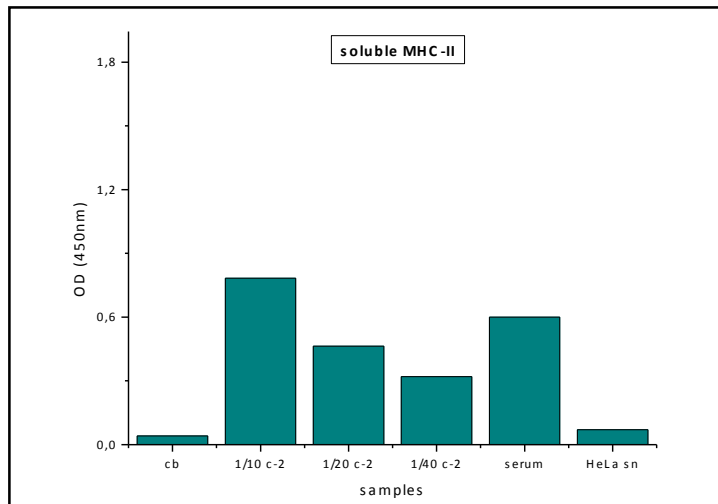
- 1) Παίρνουμε σπλήνα αρσενικού ποντικού και τη διατηρούμε σε HBSS για λίγο.
- 2) Τοποθετούμε τη σπλήνα σε petri με 2ml RPMI, απομακρύνουμε τα κύτταρα με τη βοήθεια βελόνα ινσουλίνης.
- 3) Συλλέγουμε σε 15άρι tube τα κύτταρα (χωρίς τους ιστούς). Ο Vτελ να μην ξεπερνά τα 15ml.
- 4) Φορτώνουμε σε petri και επωάζουμε στους 37°C overnight ώστε να απομακρυνθούν τα μακροφάγα (προσκολλητικά κύτταρα στο πλαστικό).
- 5) Συλλέγουμε το υπερκείμενο και πλένουμε 2x με sterile PBS 1X. Ξεπλένουμε και το petri.
- 6) Φυγοκέντρηση για 6min στις 12000rpm στους 4°C.
- 7) Προσθήκη Lysing RC 1ml/σπλήνα (ανάλογα τον αριθμό των κυττάρων) με ήπια ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 12000rpm.
- 8) Πλύσιμο 2x με PBS 1X 1ml. Απομάκρυνση ερυθροκυττάρων. Φυγοκέντρηση στις 12000 και πέταμα υπερκειμένου.
- 9) Χωρίζουμε τους πληθυσμούς που χρειαζόμαστε ανάλογα με το πείραμα.
- 10) Επώαση με το blocking 3% για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Τελικός όγκος/plate 200μl. Κρατάμε ένα πληθυσμό unstained για control δείγμα.
- 11) Επώαση με το κατάλληλο αντίσωμα (συνήθως 1/100) το οποίο είναι conjugated FITC (φθορίζον στο πορτοκαλί) σε PBS-BSA1% για 60min.
- 12) Πλύσιμο 2x με PBS 1X.
- 13) Παρατήρηση από FACS sorter.

Αποτελέσματα

- Η απομόνωση των διαλυτών μορίων έγινε με ανοσοκατακρήμνιση με μαγνητικά σφαιρίδια συνδεδεμένα με αντίσωμα N22 (-mouse MHC class II). Ακολούθησε έλεγχος με SDS-PAGE, Western (εικ. 2.1) και Elisa (εικ. 2.2). Παράλληλα, υπολογίστηκε η συγκέντρωσή τους με τη μέθοδο Lowry.

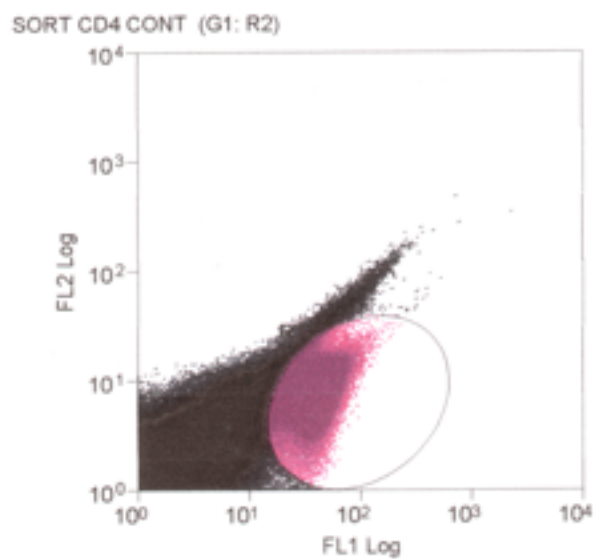
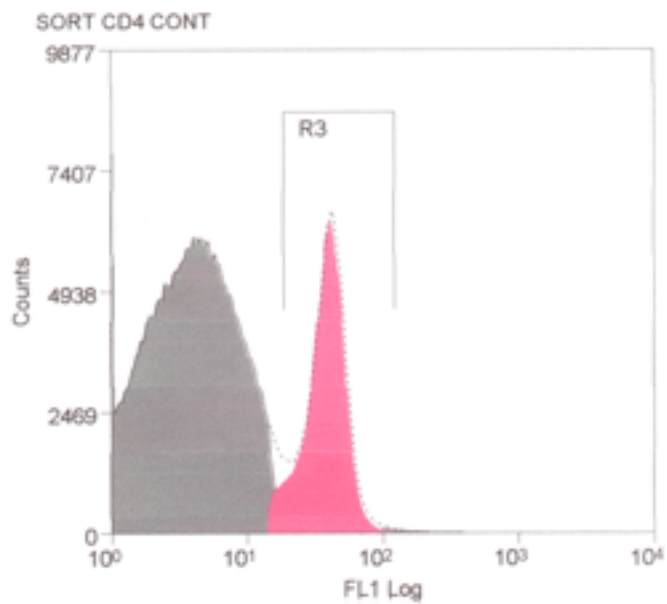


Εικ. 2.1 SDS-PAGE και Western απομονωμένων sMHC II μορίων. Φαίνεται το μοριακό βάρος στα 60kDa. Ακόμα, δεν αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες της κυκλοφορίας αφού εμφανίζεται μια μοναδική μπάντα. Το Western έγινε με N22.

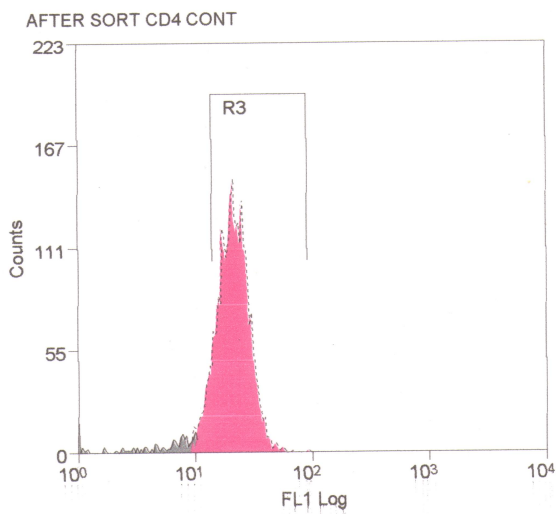


Εικ. 2.2 Ταυτοποίηση των sMHC II με Elisa. Χρησιμοποιήθηκε το N22. Προστίθενται 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις οι οποίες δείχνουν αυξημένη παρουσία μορίων. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε ορός ανοχοποιημένων ποντικών και ως αρνητικό υπερκεείμενα HeLa κυττάρων. (cb= coating buffer)

- Η απομόνωση των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν έγινε με εξωτερικό ανοσοφθορισμό. Απομονώθηκαν T λεμφοκύτταρα από σπληνοκύτταρα control ποντικών. Στη συνέχεια ακολούθησε εξωτερικός ανοσοφθορισμός για επιφανειακούς markers (CD4+/CD8+). Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού μετρήθηκαν σε FACS (cell sorting protocol). Η καθαρότητα του απομονωμένου κυτταρικού πληθυσμού CD4+ έφτασε και το 92%. Σε Κάθε περίπτωση περίπου το 19-21% του κυτταρικού πληθυσμού εξέφραζε στη μεμβράνη του τον επιφανειακό μάρτυρα CD4+ και άρα διαχωριζόταν.



Εικ. 2.3 Αποτελέσματα κατά την κυτταρομετρία ροής επιθυμητού πληθυσμού κυττάρων T λεμφοκυττάρων (CD4+)

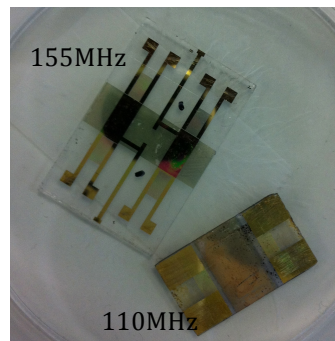


Εικ. 2.4 Αποτελέσματα καθαρότητας του προηγούμενου επιθυμητού πληθυσμού (CD4+)

Προετοιμασία Ακουστικού Βιοαισθητήρα

Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ακουστικός βιοαισθητήρας τύπου Love, συχνότητα λειτουργίας 110 MHz και 155 MHz.

Στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, στην περιοχή διάδοσης του ακουστικού κύματος, προστίθεται στρώμα του πολυμερούς poly-methyl-methacrylate (PMMA) συγκέντρωσης 17%. Το στρώμα δημιουργείται με επικάλυψη της επιφάνειας έπειτα από φυγοκέντρωση στη συσκευή Spincoater Model P6700 Series (Specialty Coating Systems Inc) στις 4000rpm για 40s. Ακολουθεί επώαση των συσκευών στους 195°C για 2h ώστε ο διαλύτης (2-αιθοξυαιθυλαιθέρας) να εξατμιστεί.



Πάνω στο στρώμα του κυματοδηγού της συσκευής του ακουστικού βιοαισθητήρα 110 MHz και 155 MHz γίνεται εναπόθεση (sputtering) 20nm χρυσού (Au) στην περιοχή ανάμεσα στα IDTs σε πίεση 4×10^{-2} mbar με τη χρήση του συστήματος BALTEC SCD 050 Sputter Coater. Η κάθε συσκευή επώαστηκε στους 150°C για 30min. Πριν από κάθε πείραμα, η επιφάνεια χρυσού υφίσταται χάραξη με χημεία πλάσματος οξυγόνου για 3min (Plasma Cleaner/Sterilizer PDC-002, Harrick) ώστε να καθαριστεί πλήρως η επιφάνεια. Η συσκευή του βιοαισθητήρα 155 MHz με PMMA (χωρίς χρυσό) καθαρίζεται προσεκτικά με αιθανόλη.

Η συσκευή του βιοαισθητήρα τοποθετείται σε ειδική θήκη (holder) που φέρει ηλεκτρόδια (τα οποία καταλήγουν στον αναλυτή δικτύου). Πάνω από τη θήκη αυτή εφαρμόζεται η κυψελίδα συνεχούς ροής (flow cell), η οποία δίνει τη δυνατότητα να διατηρείται σταθερή και ελεγχόμενη η ροή του υγρού διαλύματος στην περιοχή ανάμεσα στα IDTs μέσω περισταλτικής αντλίας (Gilson). Η κυψελίδα συνεχούς ροής σταθεροποιείται στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα μέσω ενός λαστιχένιου gasket. Για τη μεταφορά των υγρών διαλυμάτων χρησιμοποιούνται σωληνάκια διαμέτρου 0,25mm (Anachem). Η ροή που εφαρμόζεται στα πειράματα είναι 10μl/min.



Εικ. 2.5 Αναλυτής δικτύου Agilent Technologies E5061A



Εικ. 2.6 Αναλυτής δικτύου Hwelett Hewlett Packard 4195A

Η συσκευή του ακουστικού βιοαισθητήρα συνδέεται με έναν αναλυτή δικτύου με τον οποίο εφαρμόζεται τάση και λαμβάνονται μετρήσεις των ιδιοτήτων του ακουστικού κύματος που δημιουργείται. Ο αναλυτής δικτύου είναι συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή ο οποίος διαθέτει κατάλληλο λογισμικό (Labview 5.1-National Instruments) για τη συνεχή καταγραφή των δεδομένων του πειράματος σε πραγματικό χρόνο. Οι μετρήσεις αφορούν τη ταχύτητα διάδοσης του κύματος και την ενέργειά του. Η μεταβολή στην ταχύτητα ανιχνεύεται ως μεταβολή στη φάση (deg) και η μεταβολή στην ενέργεια ως μεταβολή στο πλάτος (dB). Η μεταβολή στη φάση είναι ευαίσθητη σε μεταβολές της μάζας, της ιξωδοελαστικότητας και των ηλεκτρικών ιδιοτήτων της διεπιφάνειας του υγρού/στερεού. Παράλληλα, η μεταβολή στο πλάτος είναι ευαίσθητη σε μεταβολές της ιξωδοελαστικότητας και των ηλεκτρικών ιδιοτήτων της διεπιφάνειας. Πρακτικά, αύξηση της μάζας στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα έχει ως αποτέλεσμα την πτώση της φάσης του κύματος, ενώ αύξηση τους ιξώδους έχει ως αποτέλεσμα την πτώση της φάσης και του πλάτους.

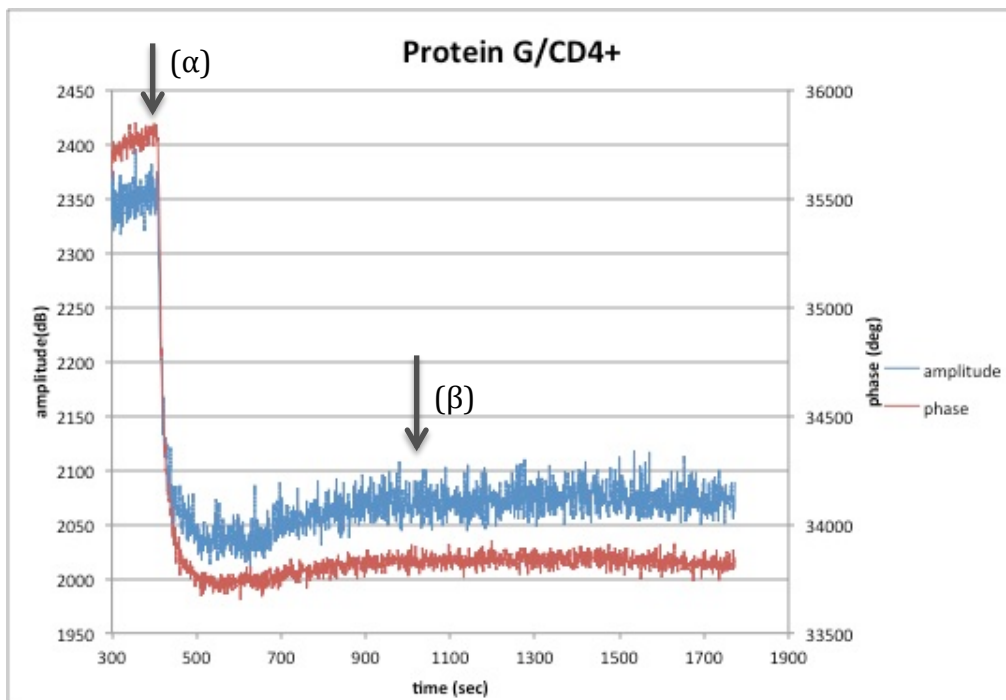
Έπειτα από όλα τα παραπάνω η επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα είναι έτοιμη. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε PBS buffer (Sigma) σε θερμοκρασία δωματίου για να αποφευχθούν τυχόν φυσαλίδες αέρα κατά τη διάρκεια του πειράματος οι οποίες μπορεί να στεγνώσουν την επιφάνεια και να προκαλέσουν πρόβλημα στο πείραμα.

Αποτελέσματα Ακουστικού Βιοαισθητήρα

Η πραγμάτωση της εργασίας απαιτούσε την ακινητοποίηση του διαλυτού αντιγόνου ιστοσυμβατότητας (soluble MHC II) σε μια μη ειδική επιφάνεια για τα κύτταρα. Τα πειράματα, λοιπόν, σχεδιάστηκαν σύμφωνα με πρωτόκολλο που είχε χρησιμοποιηθεί προηγουμένως^[6]. Το πρώτο βήμα είναι η προσρόφηση της Protein G (1mg Protein G, Recombinant, *E. coli*/ CalbioChem) στην επιφάνεια του χρυσού. Η Protein G έχει την ιδιότητα να προσδένει το Fc τμήμα των αντισωμάτων, γεγονός το

οποίο μας βοήθησε ώστε να δέσουμε το αντίσωμα N22. Το αντίσωμα αυτό είναι ειδικό για το διαλυτό αντιγόνο ιστοσυμβατότητας. Αυτά τα βήματα ήταν απαραίτητα για την ακινητοποίηση του διαλυτού αντιγόνου ιστοσυμβατότητας, ώστε μετά να προστεθούν τα επιθυμητά κύτταρα που θέλουμε να εξετάσουμε. Για τη σωστή μελέτη της αλληλεπίδρασης των επιθυμητών κυττάρων με το διαλυτό αντιγόνο ιστοσυμβατότητας τάξης II πρέπει να αποφευχθούν οποιεσδήποτε μη ειδικές αλληλεπιδράσεις και να πραγματοποιηθούν κάποια θετικά και αρνητικά πειράματα ελέγχου. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα ήταν απαραίτητα να μείνουν 24h σε θρεπτικό χωρίς ορό (RPMI, -FBS) προκειμένου να αποφευχθούν μη ειδικές αλληλεπιδράσεις από τις πρωτεΐνες του ορού (εικ.2.8). Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων προέκυψαν διάφορες τεχνικές δυσκολίες όπως θα αναφερθεί. Παρακάτω θα παρατεθεί η πορεία των πειραμάτων, τα προβλήματα που προέκυψαν, τα ερωτήματα που τέθηκαν και ο τρόπος με το οποίο προσπαθήσαμε να τα επιλύσουμε.

- ❖ Αρχικά, η πρώτη αλλαγή από το προηγούμενο πρωτόκολλο ήταν να γίνουν τα πειράματα σε ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love συχνότητας 155MHz αντί 110MHz. Επίσης, η ροή μειώθηκε από 25μl/min στα 10μl/min. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν για την Protein G 1mg/ml και για το αντίσωμα N22 75μg/ml. Η συγκέντρωση του sMHC II είχε μεγάλο εύρος ανάλογα την κάθε απομόνωση, όμως στα παρακάτω πειράματα χρησιμοποιήθηκε ίδια συγκέντρωση κάθε φορά και ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων τουλάχιστον τρεις φορές.



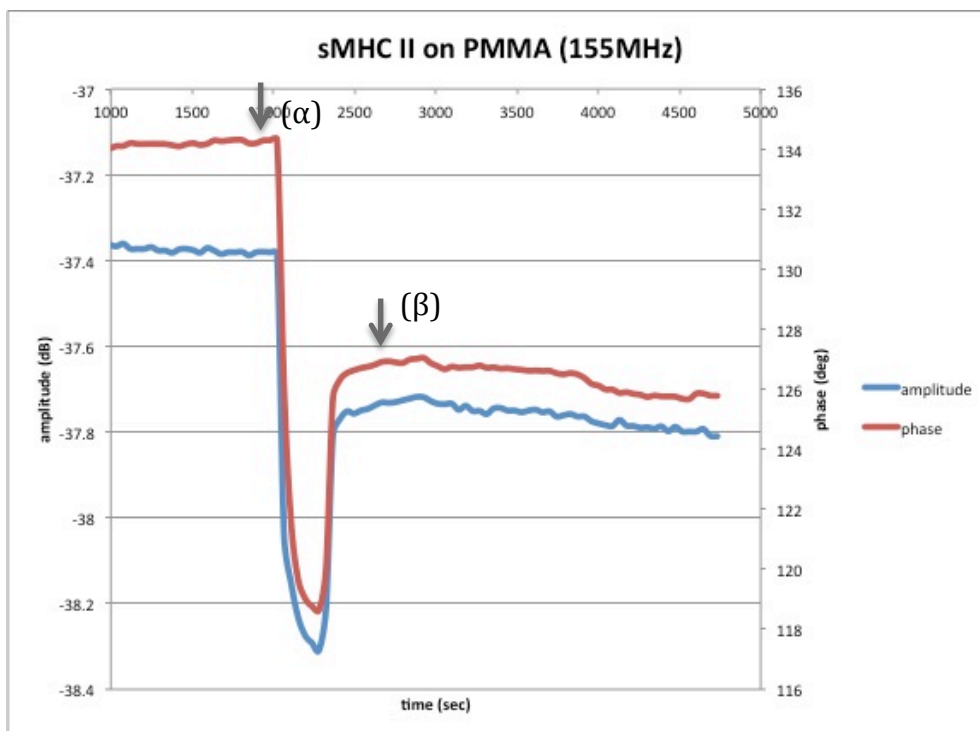
Εικ. 2.7 (α) Προσθήκη Protein G (1mg/ml) σε επιφάνεια χρυσού Au (155MHz). Όπως φαίνεται, (β) ακολουθεί προσθήκη CD4+ (2×10^5 κυτ/ml) T

λεμφοκυττάρων. Η Protein G αποτελεί μια ειδική επιφάνεια καθώς τα κύτταρα CD4+ (σε διάλυμα PBS) δεν αλληλεπιδρούν καθόλου με τη πρωτεΐνη. Έχει πραγματοποιηθεί αντίστοιχο πείραμα με Protein G/αντίσωμα N22 και CD4+ κύτταρα τα οποία δεν αλληλεπιδρούν ούτε με το αντίσωμα N22. Επομένως, η επιφάνεια Protein G-αντίσωμα N22 προσφέρεται για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του διαλυτού αντιγόνου με τα κύτταρα, καθώς είναι ειδική μονάχα για το αντιγόνο.

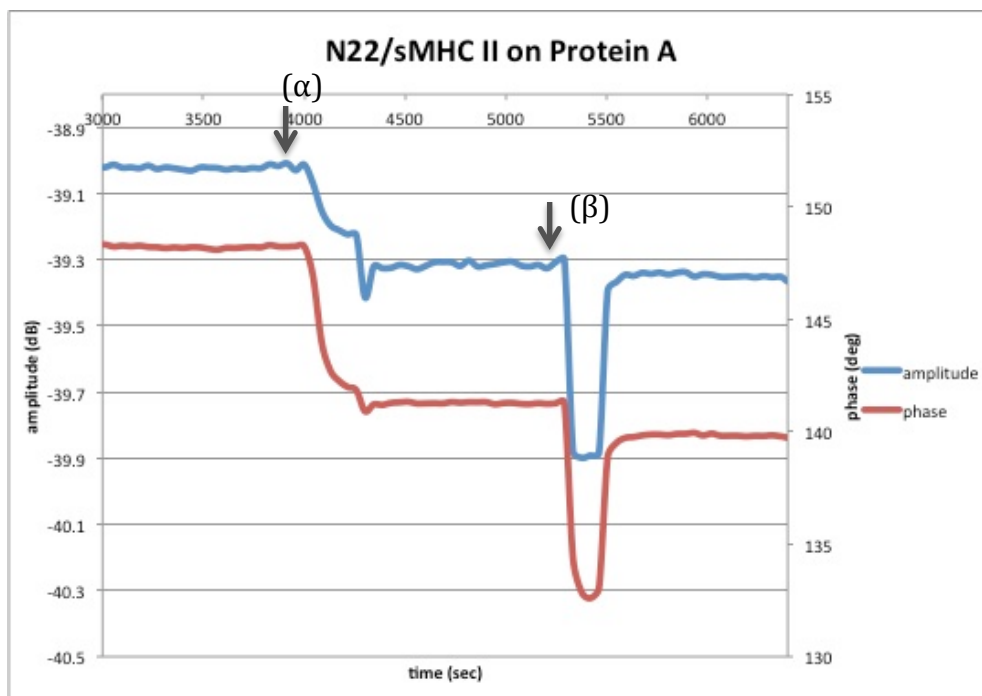


Εικ. 2.8 (α) Προσρόφηση Protein G (1mg/ml) σε πραγματικό χρόνο και (β) προσθήκη τυχαίας κυτταρικής σειράς Raji (μη προσκολλητικά κύτταρα). Στο δεύτερο βήμα φαίνεται πρόσδεση γεγονός που δεν περιμένουμε. Για το λόγο αυτό στο επόμενο βήμα (γ) προστέθηκε μικρή ποσότητα από το θρεπτικό στο οποίο βρισκόταν η κυτταρική σειρά και πάλι εμφανίζεται αλλαγή στη μάζα. Η πρόσδεση οφείλεται στις πρωτεΐνες του θρεπτικού μέσου που περιέχονται στον ορό (RPMI, 10% FBS). Επομένως, τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται παρακάτω έχουν μείνει 24h σε θρεπτικό χωρίς ορό.

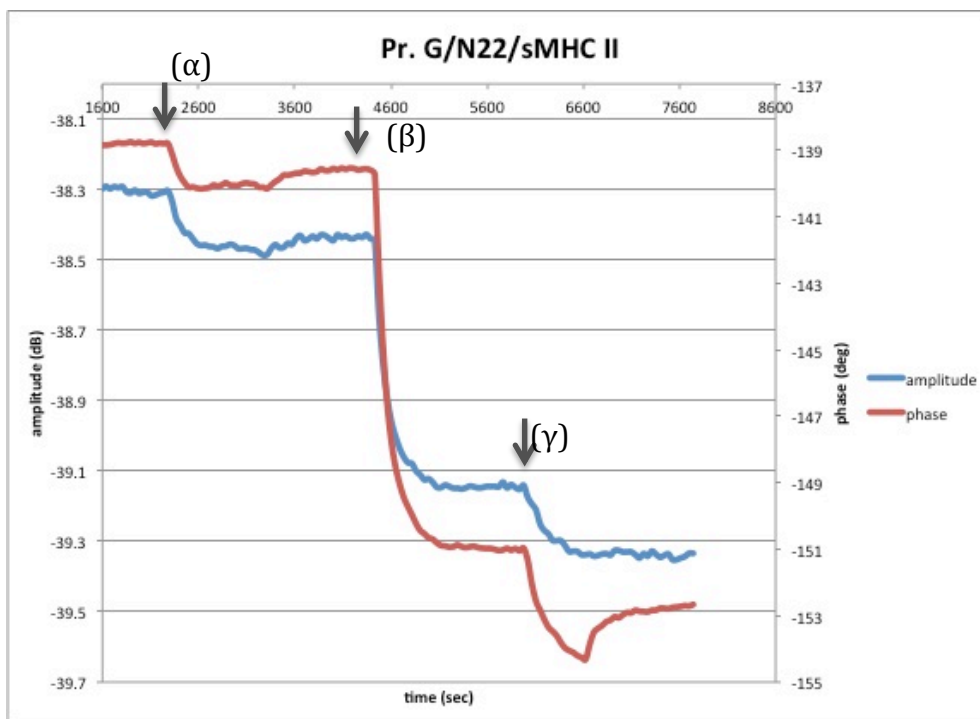
❖ Έκλυση διαλυτού αντιγόνου ιστοσυμβατότητας τάξης II με CH_3COOH
 Η απομόνωση του διαλυτού αντιγόνου αρχικά γινόταν με CH_3COOH , ακολουθούσε φυγοκέντρηση με φίλτρο ώστε να απαλλαγεί από διάφορα άλατα που τυχόν υπήρχαν κατά την απομόνωση. Στον ακουστικό βιοαισθητήρα χρησιμοποιήθηκε PBS buffer. Η διαφορά αυτή των υγρών στην απομόνωση και στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα προκαλούσε ένα απότομο “πήδημα” στο ακουστικό σήμα και δεν επέτρεπε την πρόσδεση του αντιγόνου.



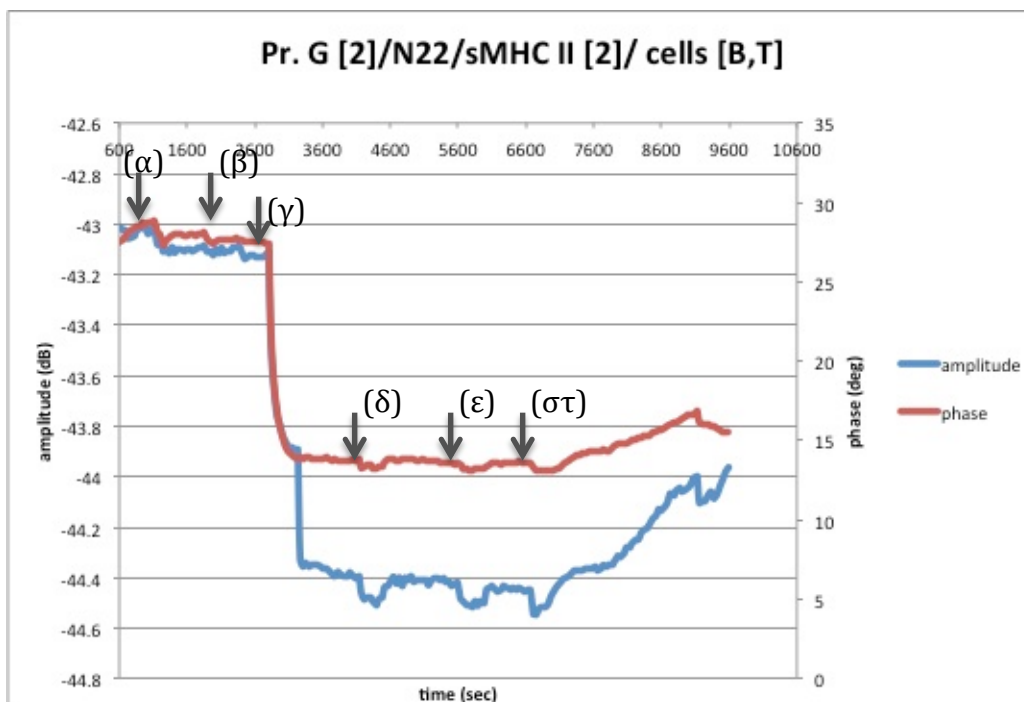
Εικ. 2.9 (α) Διαλυτό αντιγόνο ιστοσυμβατότητας (0.064mg/ml) πάνω σε καθαρή επιφάνεια PMMA σε ακουστικό βιοαισθητήρα συχνότητας 155MHz. Στο (β) βήμα φαίνεται η αλλαγή όταν προστίθεται διάλυμα PBS buffer. Δεν ακολουθεί πρόσδεση, το σήμα αλλάζει λόγω του drift (απόκλιση μηχανήματος).



Εικ. 2.10 Επώαση Protein A (1mg/ml) (δεν απεικονίζεται) και (α) πρόσδεση αντισώματος N22 (75μg/ml). (β) Προσθήκη sMHC II (50μg/ml) από διάλυμα CH₃COOH (on PMMA, 155MHz)



Εικ. 2.11 (α) Προσθήκη Protein G (1mg/ml) σε πραγματικό χρόνο. (β) Ακολουθεί προσθήκη αντισώματος N22 (75μg/ml) και (γ) αντιγόνου sMHC II (0.9mg/ml). (on PMMA, 155MHz)

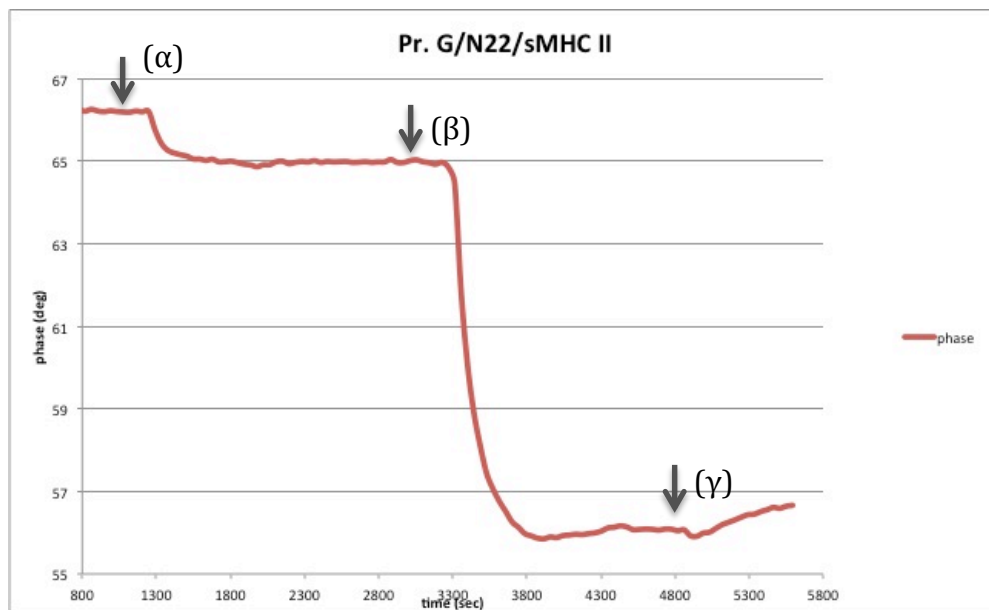


Εικ. 2.12 (α,β) Προσθήκη Protein G (1mg/ml) (2x) σε πραγματικό χρόνο, (γ) ακολουθεί πρόσδεση αντισώματος N22 (75μg/ml) και (δ,ε) προσθήκη sMHC II

(75 μ g/ml) (2x) και έπειτα (σ) Β και Τ λεμφοκυττάρων (8×10^5 κυτ/ml). (on PMMA, 155MHz)

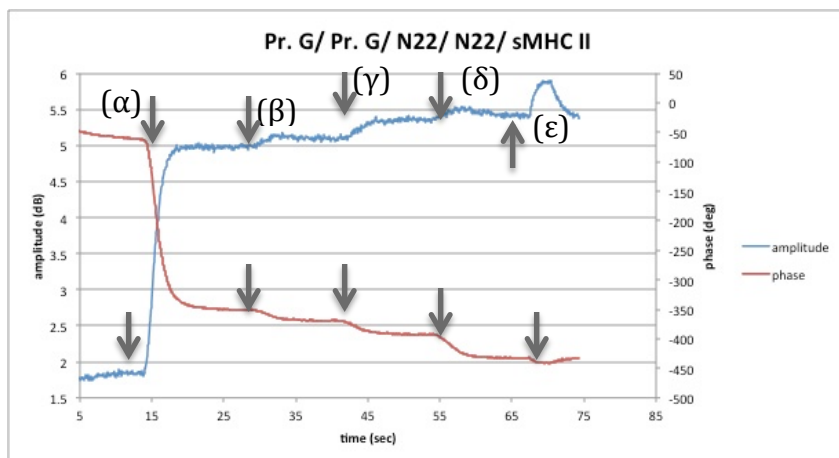
Το «πήδημα» στο ακουστικό σήμα συνέβαινε σε κάθε περίπτωση, ανεξάρτητα από την ποσότητα του αντιγόνου, λόγω των ιόντων και αλάτων που υπήρχαν στο διάλυμα. Παράλληλα, αφαιρέσαμε από το πρωτόκολλο της απομόνωσης το βήμα με το washing buffer, διότι σε παλαιότερη εργασία στο εργαστήριο προκαλούσε πρόβλημα στο ακουστικό σήμα και στην επιφάνεια. Όπως φαίνεται, η επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν ήταν αξιόπιστη καθώς τα άλατα απέτρεπαν την πρόσδεση του αντιγόνου (εικ. 2.12). Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε σε αναζήτηση διαφορετικού πρωτοκόλλου απομόνωσης του διαλυτού αντιγόνου ιστοσυμβατότητας. Στο πρωτόκολλο [2], όπως αναφέρεται στο προηγούμενο κεφάλαιο, χρησιμοποιείται NaCl για την έκλυση από το αντίσωμα-σφαιρίδια. Δοκιμάσαμε αυτό το πρωτόκολλο διότι δεν απαιτείται περαιτέρω ρύθμιση του pH και υποθέσαμε ότι μπορεί να μην υπάρξει το ίδιο πρόβλημα.

- ❖ Έκλυση διαλυτού αντιγόνου ιστοσυμβατότητας τάξης II με NaCl 2M

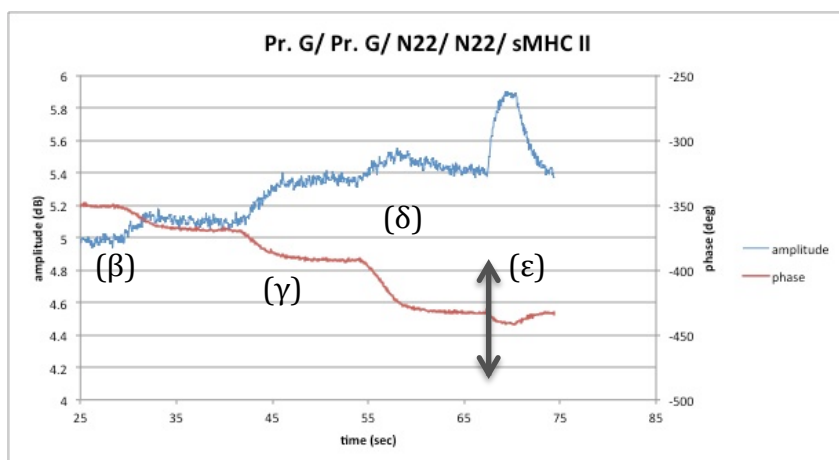


Εικ. 2.13 (α) Προσθήκη Protein G (1mg/ml), (β) αντισώματος N22 (75 μ g/ml) και (γ) sMHC II (72 μ g/ml). Στο συγκεκριμένο πείραμα, η γραφική παράσταση του πλάτους δεν ήταν καλή για το λόγο αυτό δεν απεικονίζεται στο γράφημα. (on PMMA, 155MHz)

Η αλλαγή του πρωτοκόλλου δεν άλλαξε κάτι στο ακουστικό σήμα. Όμως, για να επιβεβαιώσουμε ότι το πρόβλημα οφειλόταν στη διαφορά των buffer και όχι σε κάποιο τεχνικό πρόβλημα του βιοαισθητήρα, έγιναν πειράματα στον ακουστικό βιοαισθητήρα QCM-D 300 (Quartz Crystal Microbalance) (Q-Sense, Sweden) (εικ. 2.14, 2.15)



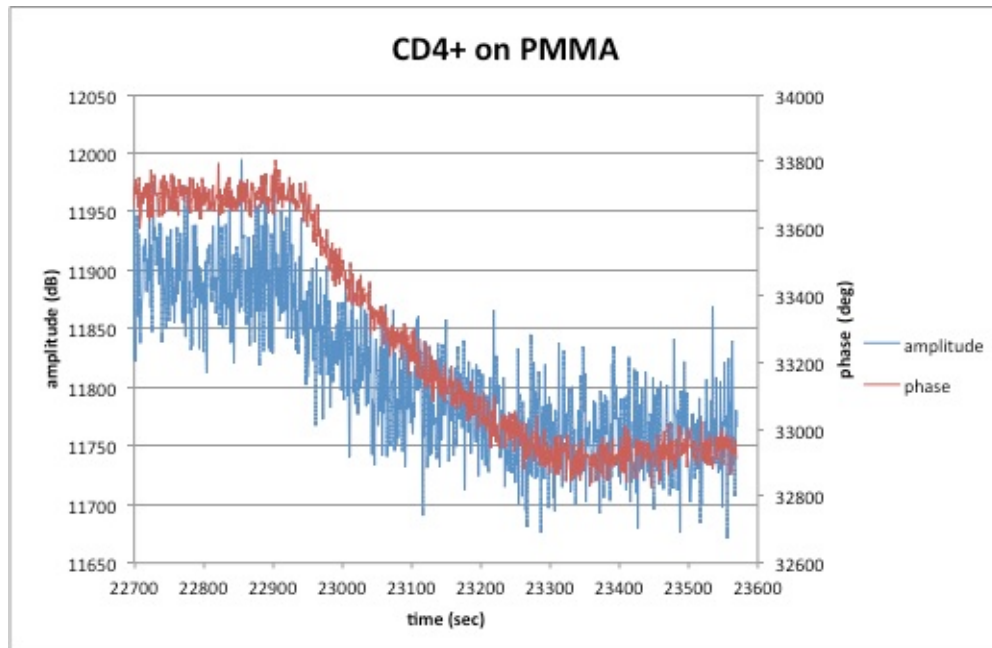
Εικ. 2.14 (α) Σε πλήρη επιφάνεια με Protein G (1mg/ml) και (β-δ) αντίωμα N22 (75μg/ml), (ε) προστέθηκε διαλυτό αντιγόνο ιστοσυμβατότητας τάξης II (70μg/ml) από απομόνωση με NaCl. (on Au, 155MHz)



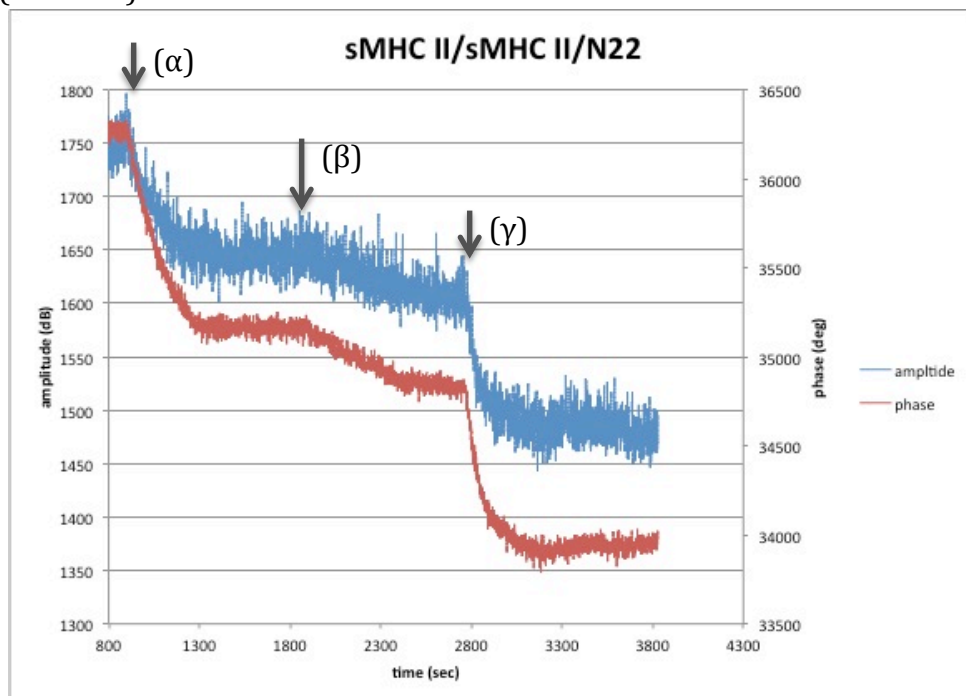
Εικ. 2.15 Μεγέθυνση της παραπάνω εικόνας ώστε να φαίνεται καλύτερα η χαρακτηριστική αλλαγή του σήματος όταν προστίθεται το διαλυτό αντιγόνο. Το σήμα επιστρέφει στην αρχική του ισορροπία με το PBS buffer (βήμα ε).

- ❖ Εν τέλει, αποφασίσαμε να απομονώνουμε περισσότερη ποσότητα διαλυτού αντιγόνου ιστοσυμβατότητας τάξης II, ώστε να προχωρούμε σε dialysis και τελικά όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στον ακουστικό βιοαισθητήρα να είναι σε PBS buffer.
- ❖ Επιπλέον, αποφασίσαμε να ακινητοποιήσουμε το διαλυτό αντιγόνο στην επιφάνεια (PMMA/χρυσού) ακόμα και αν δεν είναι ειδική. Έγιναν πειράματα που έδειξαν ότι τα κύτταρα μπορούν να προσδένονται σε καθαρή επιφάνεια PMMA/χρυσού. Όμως, παράλληλα, έγιναν πειράματα (αρνητικά control) που

έδειξαν ότι αν η επιφάνεια είναι πλήρως γεμάτη από το διαλυτό αντιγόνο τότε μόνο τα επιθυμητά κύτταρα αλληλεπιδρούν ειδικά με αυτό.

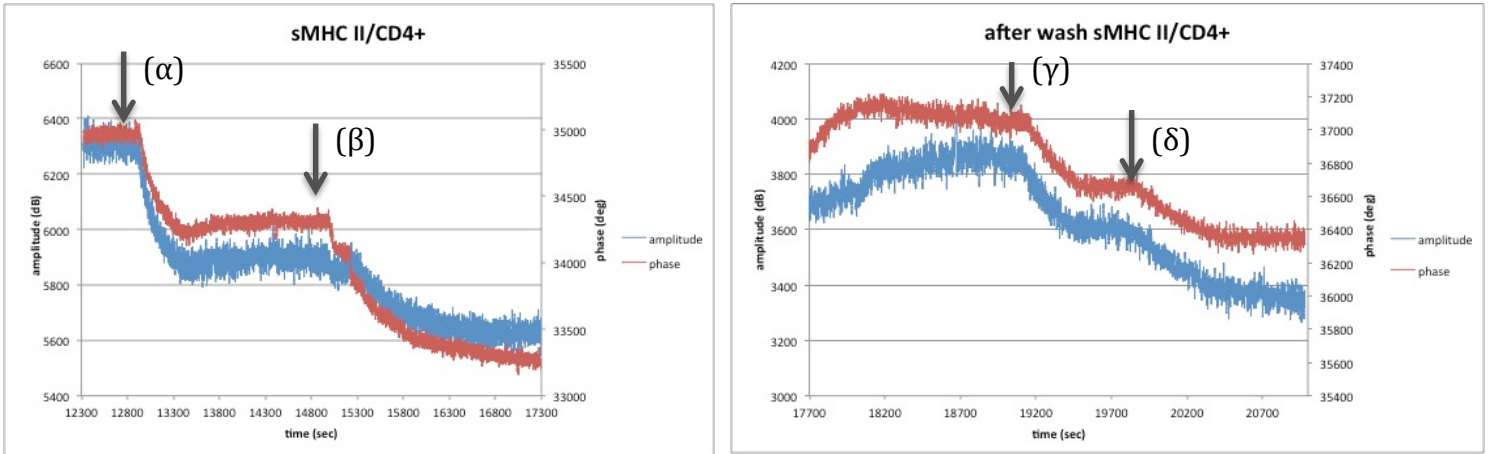


Εικ. 2.16 CD4+ T λεμφοκύτταρα (1×10^6 κυτ/ml) σε καθαρή επιφάνεια PMMA (155MHz)

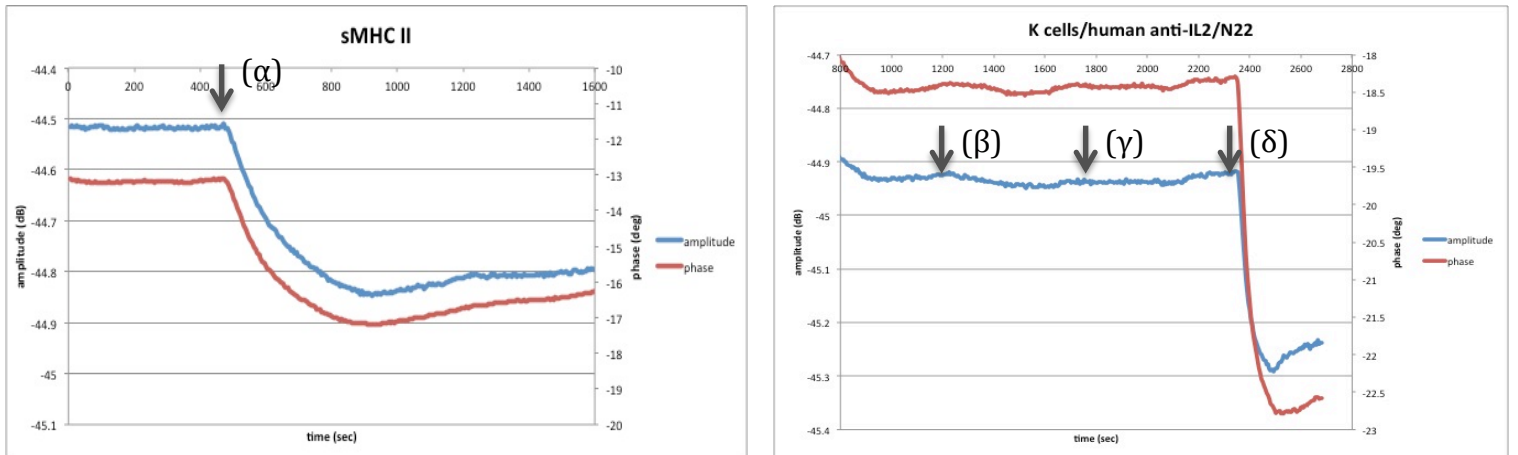


Εικ. 2.17 Σε κάθε καινούργια απομόνωση, από dialysis, γινόταν το παραπάνω πείραμα προκειμένου να ταυτοποιηθεί και με τον ακουστικό βιοαισθητήρα η πρωτεΐνη. (α,β) Σε πλήρως γεμάτη επιφάνεια χρυσού με το

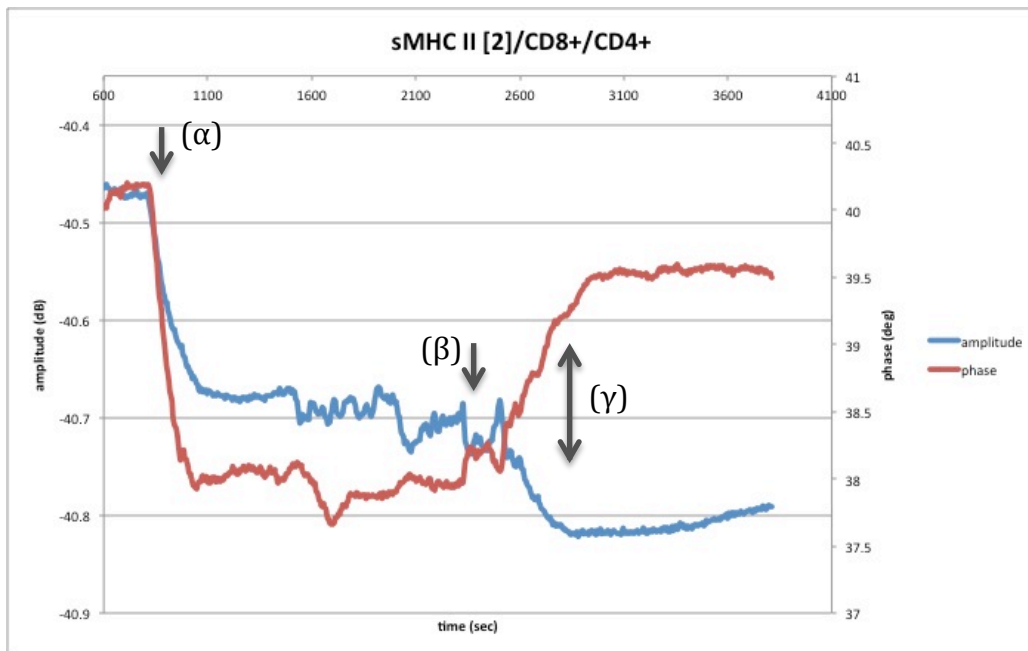
διαλυτό αντιγόνο τάξης II (90 $\mu\text{g}/\text{ml}$), (γ) προστίθεται το ειδικό αντίσωμα N22 (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (155MHz).



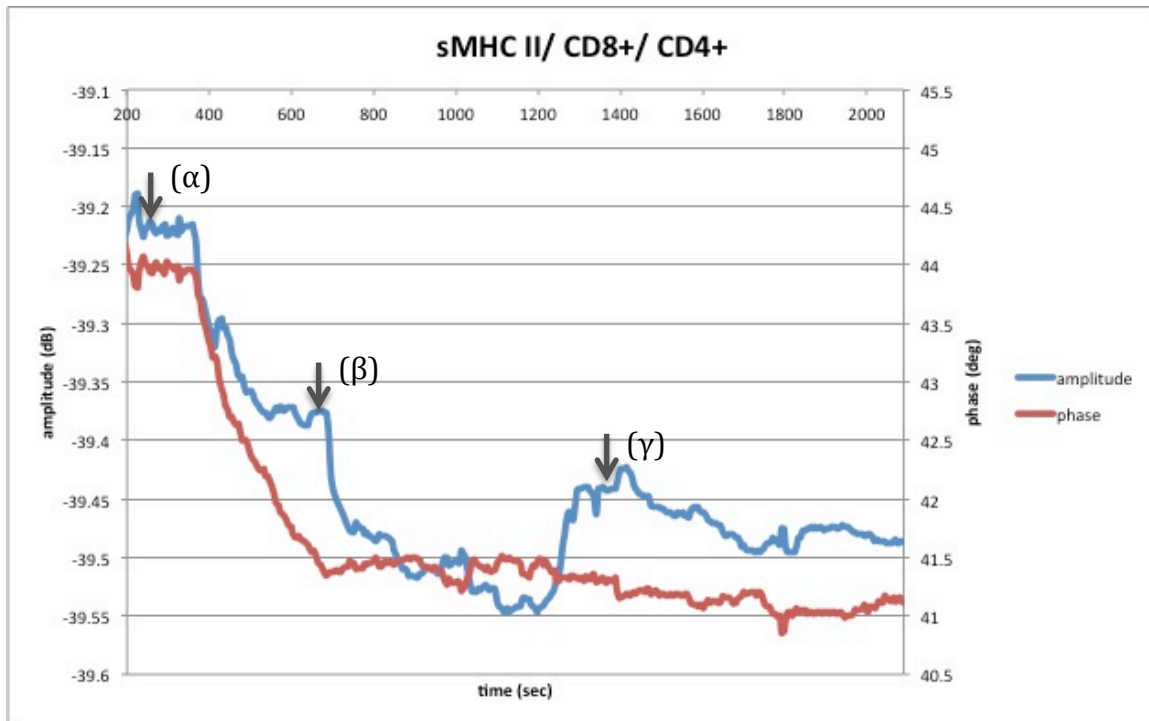
Εικ. 2.18 (α) Προσρόφηση αντιγόνου (83.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) σε επιφάνεια PMMA και (β) προσθήκη CD4+ T λεμφοκυττάρων (1 $\times 10^6$ κυτ/μl). Πλύσιμο με Hellmanex και (γ) προσθήκη αντιγόνου (83.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) και (δ) κυττάρων (1 $\times 10^6$ κυτ/μl) ξανά. (155 MHz)



Εικ. 2.19 Παρουσιάζεται ένα negative control πείραμα, αλλά για χάρην ευκολίας απεικονίζεται σε δύο διαγράμματα. (α) Διαλυτό αντιγόνο (112 $\mu\text{g}/\text{ml}$) σε επιφάνεια χρυσού (155MHz), (β) προσθήκη κυτταρικής λευχαιμικής σειράς K562 (5 $\times 10^5$ κυτ/μl) και (γ) αντίσωμα human anti-IL2 (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Τέλος, (δ) προστίθεται το N22 (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Όπως φαίνεται υπάρχει ειδική αλληλεπίδραση ανάμεσα στο αντιγόνο και το αντίσωμα, καθώς και με τα T λεμφοκύτταρα (εικ. 2.18) αφού τα λευχαιμικά κύτταρα δεν προσδένονται.



Εικ. 2.20 (α) Διαλυτό αντιγόνο ιστοσυμβατότητας τάξης II (140μg/ml) σε επιφάνεια χρυσού (110MHz), (β) προσθήκη CD8+ (2×10^5 κυτ/ml) και (γ) CD4+ (2×10^6 κυτ/ml) T λεμφοκυττάρων (μία ημέρα μετά τον ανοσοφθορισμό).



Εικ. 2.21 (α) Διαλυτό αντιγόνο ιστοσυμβατότητας τάξης II (90μg/ml) σε επιφάνεια χρυσού (110MHz), (β) προσθήκη CD8+ (85×10^3 κυτ/ml) και (γ)

CD4+ (361.3×10^3 κυτ/ml) T λεμφοκυττάρων (δύο ημέρες μετά τον ανοσοφθορισμό). Αν και στο συγκεκριμένο πείραμα υπάρχει αρκετός θόρυβος, φαίνεται η διαφορά στο σήμα με το προηγούμενο (εικ. 2.20).

- Τελειώνοντας, δεν πρέπει να ξεχάσουμε ότι η τεχνολογία των βιοαισθητήρων προσφέρει και ποσοτικές πληροφορίες μετρώντας τη φάση και το πλάτος του ακουστικού κύματος. Ακολουθούν πίνακες με τις μετρήσεις αυτές για το sMHC II σε χρυσό/ PMMA, για το αντίσωμα N22 σε επιφάνεια με sMHC II και για τα κύτταρα CD4+ πάνω στο sMHC II.

<i>soluble MHC II</i>		
on Au (155 MHz)		
Amplitude	Phase	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)
0.35	3.84	41.6
0.12	6.30	90
0.3	3.45	112
0.14	0.90	112
0.61	6.47	220
on PMMA (155 MHz)		
Amplitude	Phase	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)
0.25	3.82	83.2
2.08	2.31	83.2

<i>Antibody N22 (75$\mu\text{g/ml}$) on sMHC II (155MHz)</i>	
Amplitude	Phase
0.86	7.99
0.34	4.42
0.41	4.49
Stdev: 0.28	Stdev: 2.04

<i>CD4+ on sMHC II (1x10⁶ cells/ml)</i>	
Amplitude	Phase
0.05	2.37
2.89	3.76

Συζήτηση

Τα διαλυτά αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης II εντοπίζονται φυσιολογικά στα υγρά του σώματος (αίμα, ούρα, σάλιο, ιδρώτας, σπέρμα, δάκρυα) υγιών ατόμων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Έχουν ρυθμιστικό ρόλο κατά τη διάρκεια της κύησης και συνδέονται με αυτοάνοσες ασθένειες. [11, 12, 14, 15, 16, 17, 18] Το γεγονός αυτό φανερώνει πόσο σημαντική είναι η μελέτη αυτών των μορίων και ανίχνευση τυχόν αλληλεπιδράσεων με άλλα μόρια ή κύτταρα.

Η χρήση του ακουστικού βιοαισθητήρα προσφέρει νέα γνώση για τη διαδικασία της αναγνώρισης του διαλυτού αντιγόνου ιστοσυμβατότητας από τα T λεμφοκύτταρα γρηγορότερα σε σχέση με άλλες μοριακές τεχνικές. Ακόμη, προσφέρει τη δυνατότητα μέτρησης μοριακής συγγένειας σε 2D ανάμεσα σε κύτταρο και υπόστρωμα το οποίο, για παράδειγμα, μπορεί αργότερα να χρησιμοποιηθεί στην αντιμετώπιση αυτοάνοσων ασθενειών.

Προηγούμενα ερευνητικά αποτελέσματα μελέτης ανοσολογικών αλληλεπιδράσεων με χρήση ακουστικού βιοαισθητήρα έχουν παρουσιάσει μια νέα, ειδική και αποτελεσματική τεχνολογία. Με βάση αυτή τη τεχνολογία ξεκίνησε η μελέτη για το διαλυτό αντιγόνο ιστοσυμβατότητας τάξης II. Αρχικά, έγιναν κάποια απαραίτητα πειράματα control προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ειδικότητα της επιφάνειας (χρυσού/PMMA). Ελέγχθηκαν, λοιπόν, αν τα επιθυμητά κύτταρα CD4+ αλληλεπιδρούν με Protein G ή αντίσωμα N22 (εικ. 2.7). Επιπλέον, ελέγχθηκε αν το θρεπτικό υλικό προκαλεί μη ειδικές αλληλεπιδράσεις και μας δίνει λανθάνων σήμα (false positive response) (εικ. 2.8). Παράλληλα, φάνηκε πως η απομόνωση του sMHC II προκαλούσε πρόβλημα στο ακουστικό σήμα και χρειάστηκε να τροποποιήσουμε το πρωτόκολλο. Ωστόσο, όμως, εξαιτίας της ανάγκης εξαγωγής αποτελεσμάτων αναγκαστήκαμε να προσεγγίσουμε διαφορετικά τη μελέτη στον ακουστικό βιοαισθητήρα και να εγκαταλείψουμε την αρχική τεχνική. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε επιφάνεια χρυσού/PMMA πάνω στην οποία προσροφόταν το sMHC II. Η επιφάνεια χρυσού/PMMA αποτελεί μη ειδική επιφάνεια που έχει την ιδιότητα να προσφορά διάφορα μόρια ακόμα και κύτταρα (εικ. 2.16). Όμως, μετά από πειράματα control αποδείχθηκε ότι η αλληλεπίδραση των T κυττάρων με το διαλυτό αντιγόνο ιστοσυμβατότητας τάξης II είναι ειδική (εικ. 2.18). Για τα πειράματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν K λευχαιμικά κύτταρα και αντίσωμα για την ανθρώπινη IL2 (εικ. 2.19). Ένα ακόμα αρνητικό πείραμα control αφορά τα CD8+ T κύτταρα (εικ. 2.21) τα οποία φυσικά δεν αλληλεπιδρούν με τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης II. Σε αυτό το σημείο πρέπει να υπογραμμίσουμε ότι κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρατηρήθηκε διαφορετική ακουστική απόκριση από τα κύτταρα ανάλογα τις ώρες που είχαν μείνει σε καλλιέργεια μετά τον απαραίτητα ανοσοφθορισμό για FACS sorting (εικ. 2.20, 2.21). Στην περίπτωση που τα κύτταρα είχαν μείνει σε καλλιέργεια μόλις μια ημέρα, παρατηρήθηκε αντίστροφο σήμα από το αναμενόμενο. Ακολούθησε, παρατήρηση της συσκευής του ακουστικού βιοαισθητήρα σε οπτικό μικροσκόπιο. Αν και φάνηκαν κύτταρα πάνω στην επιφάνεια, κυριαρχούσε η χρωστική ουσία που είχε μείνει από τον ανοσοφθορισμό.

Σε κάθε περίπτωση, τα πειράματα έγιναν τουλάχιστον 3 φορές, δηλαδή ένα συγκεκριμένο πείραμα. Πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον 3 φορές με τις ίδιες συγκεντρώσεις ώστε οι ποσοτικές πληροφορίες να είναι συγκρίσιμες. Όμως για διάφορους λόγους –όπως θόρυβος- δεν ήταν εφικτή η μέτρηση της φάσης και του πλάτους σε κάθε πείραμα. Έτσι, λοιπόν, όπως φαίνεται και από τους παραπάνω πίνακες δεν έχουμε αρκετά δεδομένα ώστε να μετρήσουμε την τυπική τους απόκλιση. Ακόμα, στις περισσότερες περιπτώσεις οι μετρήσεις έχουν μεγάλη διαφορά γεγονός που δεν μας επιτρέπει να αποφανθούμε για την επαναληψιμότητα των πειραμάτων. Οι συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων διατηρούνταν ίδιες, όμως παρόλα αυτά έχουμε μεγάλες αποκλίσεις. Η μόνη ίσως διαφορά ήταν το διαλυτό αντιγόνο ιστοσυμβατότητας τάξης II, δηλαδή συνήθως μία απομόνωση δεν αρκούσε για 3 πειράματα και αναγκαστικά το sMHC II που χρησιμοποιούταν ήταν από διαφορετικές απομονώσεις.

Η μέχρι τώρα μελέτη έδωσε κάποια αποτελέσματα αλλά με βελτιώσεις μπορεί να εξάγει περισσότερα ωφέλιμα δεδομένα.

Ίσως όταν είναι γνωστές περισσότερες πληροφορίες για το sMHC II μόριο να είναι πιο εύκολη η μελέτη σε ακουστικό βιοαισθητήρα. Πληροφορίες σχετικές με τη διαμόρφωση στο χώρο και δεδομένα από κρυσταλλογραφικές μελέτες. Γνωρίζοντας τη διαμόρφωση του στο χώρο και συγκρίνοντας τον ακουστικό λόγο από τα πειράματα του ακουστικού βιοαισθητήρα μπορούν να εξαχθούν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα για το μόριο και τις αλληλεπιδράσεις του με τα κύτταρα.

Επιπρόσθετα, θα ήταν πολύ χρήσιμο αν υπάρξει πιο γρήγορος και εύκολος τρόπος απομόνωσης ή παραγωγής μεγαλύτερης ποσότητας μορίων. Έτσι, δεν θα χάνεται τόσος χρόνος για την απομόνωση και ταυτοποίησης των μορίων.

Πιθανόν με μεγαλύτερη συγκέντρωση διαλυτών μορίων να δουλέψει το αρχικό πρωτόκολλο με την Protein G. Στην περίπτωση αυτή, θα μειωθεί η χρησιμοποιούμενη ποσότητα διαλυτού αντιγόνου ιστοσυμβατότητας τάξης II για κάθε πείραμα και ίσως η αλληλεπίδραση με τα κύτταρα να είναι αποδοτικότερη (είτε λόγω προσανατολισμού είτε λόγω χώρου). Όπως φαίνεται υπάρχουν περιθώρια βελτίωσης της τεχνικής.

Η τεχνολογία του βιοαισθητήρα έχει τη δυνατότητα να δώσει σημαντική και ποικίλη πληροφορία για την αλληλεπίδραση των διαλυτών MHC II μορίων με T κύτταρα. Αυτές οι πληροφορίες μπορούν να συνδυαστούν με άλλες τεχνικές για περαιτέρω ανάλυση σε αυτοάνοσες ασθένειες και παθολογικές κυήσεις.

Βιβλιογραφία

1. Μπακέλα Κ., Μοριακή ανάλυση των διαλυτών MHC τάξης II μορίων και ο ρόλος τους στη ρύθμιση των T-λεμφοκυττάρων, Μεταπτυχιακή διατριβή (2011)
2. Σαϊτάκης Μ., Χαρακτηρισμός μοριακών ανοσολογικών αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιώντας βιοαισθητήρες και ολόκληρα κύτταρα, Διδακτορική διατριβή (2010)
3. Goldsby R., Kindt T., Osborne B., Kuby J., Immunology, 5th Edition (2007)
4. Sardis M., Miltiadou P., Bakela K., Athanassakis I.. Serum-derived MHC class II molecules: Potent regulators of the cellular and humoral immune response. *Immunobiology*, **215**, 194-205 (2010)
5. Saitakis M., Tsortos A., Gizeli E.. Probing the interaction of a membrane receptor with a surface-attached ligand using whole cells on acoustic biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **25**, 1688-1693 (2010)
6. Saitakis M., Dellaporta A., Gizeli E.. Measurement of Two-Dimensional Binding Constants between Cell-Bound Major Histocompatibility Complex and Immobilized Antibodies with an Acoustic Biosensor. *Biophysical Journal*, **95**, 4963-4971 (2008)
7. Saitakis M., Gizeli E.. Quantification of the effect of glycocalyx condition on membrane receptor interactions using an acoustic wave sensor. *Biophysics Letter*, **40**, 209-215 (2011)
8. Gizeli E., Lowe Ch.R.. Biomolecular Sensors
9. Schumacher T.N.M.. T-cell-receptor gene therapy, *Nature Reviews Immunology*, **2**, 512-519 (July 2002)
10. Athanassakis I., Vassiliadis S.. T-regulatory cells: are we re-discovering T suppressors? *Immunology Letters*, **84**, 179-183 (2002)
11. Puppo F., Indiverl F., Scudeletti M., Ferrone S.. Soluble HLA antigens: new roles and uses, *Immunology Today*, (April 1997)
12. van Rood JJ., van Leeuwen A.. Soluble HLA Antigens: How It All Started, *Human Immunology*, **60**, 412-413 (1999)
13. Sharma S., Nag B., Su X., Green D., Spack E., Clark B., Sriram S.. Antigen-specific therapy of experimental allergic encephalomyelitis by soluble class II major histocompatibility complex-peptide complexes, *Immunology*, **88**, 11465-11469 (December 1991)
14. Jendro M, Goronzy J. J., Weyand C. M.. Structural and functional characterization of HLA-DR molecules circulating in the serum, *Autoimmunity*, **8**, 289-296 (1991)
15. Pfeiffer K. A., Rebmann V., Passler M., van der Ven K., van der Ven H., Krebs D., Grosse-Wilde H.. Soluble HLA levels in early pregnancy after *in vitro* fertilization, *Human Immunology*, **61**, 559-564 (2000)
16. Aultman D., Adamashvili I., Yaturu K., Langford M., Gelder F., Gautreaux M., Ghali G. E., McDonald J.. Soluble HLA in Human Body Fluids, *Human Immunology*, **60**, 239-244 (1999)
17. Hagihara M., Shimura T., Yamamoto K., Takebe K., Munkhbat B., Tsuji K.. Soluble HLA Class I and Class II in Japanese, *Human Immunology*, **40**, 171-173 (1994)

18. Vassiliadis S., Paflis M., Athanassakis I.. Serum-soluble HLA class I and class II levels as an alternative diagnostic test for determining immune indexes required for normal pregnancies, *Reprod. Fertil. Dev.*, **13**, 427-433 (2001)
19. Kappler, J.W., Roehm, N., Marrack, P.C., T cell tolerance by clonal elimination in the thymus, *Cell*, **49**, 273-280 (1987)
20. Jenkins, M. K., Mueller D., Schwartz, R.H., Carding, S., Bottomley, K., Stadecker, M.J., Urdahl, K.B., Norton, S.D., Induction and maintenance of anergy in mature T cells, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **292**, 167-176 (1991)
21. Gershon, R.K., Kondo, K., Infectious immunological tolerance, *Immunol.*, **21**, 903-914 (1971)
22. Westhoff U, Thinnes FP, Goetz H, Grosse-Wilde H, Quantitation of soluble HLA class II molecules by an enzyme-linked immunosorbent assay, *Vox Sang*, **61**, 106-110 (1991)
23. Ghio, M., Contini, P., Mazzei, C., Brenci, S., Barberis, G., Filaci, G., Indiveri, F., Puppo, F., Soluble HLA class I, HLA class II, and Fas ligand in blood components: a possible key to explain the immunomodulatory effects of allogeneic blood transfusions, *Blood*, **93**, 1770-1777 (1999)
24. Verbruggen, L.A., Dumarey, N., van de Velde, H., REbmann, V., Flament, J., van Wayenberge, C., Grosse-Wilde, H., Demanet, C., Soluble HLA-DR antigen levels in serum correlate with rheumatoid arthritis disease activity and the presence of disease-associated epitopes, *Tissue Antigens*, **56**, 436-440 (2000)
25. Gizeli E., Bender F., Rasmusson A., Saha K., Josse F., Cernosek R., Sensitivity of the acoustic waveguide biosensor to protein binding as a function of the waveguide properties, *Biosensors and Bioelectronics*, **18**, 1399-1406 (2003)
26. Cooper A.M., Label-free screening of bio-molecular interactions, *Anal. Bioanal. Chem*, **377**, 834-842 (2003)
27. Tsortos A., Papadakis G., Mitsakakis K., Melzak A.K., Gizeli E., Quantitative Determination of Size and Shape of Surface-Bound DNA Using an Acoustic Wave Sensor, *Biophysical Journal*, **94**, 2706-2715 (2008)
28. Ballantine D.S., White R.M., Martin S.J., Ricco A.J., Zellers E.T., Frye G.C., Wohltjen H., Acoustic Wave Sensors, *Academic Press*, San Diego, CA (1997)
29. Tsortos A., Papadakis G., Gizeli E., Shear acoustic wave biosensor for detecting DNA intrinsic viscosity and conformation: A study with QCM-D, *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 836-841 (2008)

Ιστοσελίδες

- <http://www.spectrumlabs.com/dialysis/Fund.html>
- http://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html
- http://www.imbb.forth.gr/facilities/facs_sorting.html
- <http://www.alliancetesteq.com/equipment/agilent-hp-e5061a>
- http://www.testequipmentdepot.com/usedequipment/hewlettpackard/network_analyzers/4195a.htm
- <http://futuresurgeon0607.blogspot.gr/2010/12/immune-system.html>
- <http://yang-sheng.com/?p=2114>
- <http://courses.washington.edu/conj/immune/antibody.htm>
- <http://www.mcl.d.co.uk/hiv/?q=Human%20Leukocyte%20Antigen>