

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα: Μοριακή Βιολογία και Βιοϊατρική

Εργαστήριο Ανοσοβιολογίας

Μεταπτυχιακή Διατριβή

***Ο ρόλος των προερχόμενων από CD4+ κύτταρα διαλυτών MHC-II μορίων  
στην ανοχή και αυτοανοσία***

Υπεύθυνη Καθηγήτρια: Αθανασάκη Ειρήνη

Παπαδογιάννη Γεωργία

Ηράκλειο 2014

## ***Ευχαριστίες.....***

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Ανοσοβιολογίας και επιβλέπουσα της μεταπτυχιακής διατριβής κ. Αθανασάκη για την υποστήριξη και την καθοδήγηση τόσο σε πειραματικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο. Κυρίως όμως την ευχαριστώ για όλες εκείνες τις φορές που αφιέρωσε πολύτιμο χρόνο έτσι ώστε να λύσει τις απορίες μου, να με συμβουλέψει και γενικότερα να με ενθαρρύνει στις πιο αγχωτικές περιόδους!

Επιπλέον, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής κ. Μπερτσιά Γιώργο και κ. Πετράτο Κυριάκο για το χρόνο που αφιέρωσαν αλλά και για το ενδιαφέρον που έδειξαν ως προς το θέμα της διατριβής.

Δεν θα μπορούσα να ξεχάσω και τις κ. Βλατά Χαρά και κ. Γουναλάκη Νίκη για τη βοήθειά τους κατά τη διαδικασία του cell sorting. Αφιέρωσαν κυριολεκτικά ατελείωτες ώρες δείχνοντας πραγματικό ενδιαφέρον.

Για το τέλος άφησα τα μέλη του εργαστηρίου: τις διδακτορικές φοιτήτριες Ιωάννα Ζέρβα και Κατερίνα Βαρδάκη, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Βαγγέλη Δρούγκα και Αμαλία Ανθούση καθώς και τα μικρότερα μέλη, Σοφία Τσαγδή, Κατερίνα Μπούνταλη και Μαρία Βακάμη. Η συνεργασία μαζί τους ήταν άψογη ενώ συντέλεσε και στη δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος που τελικά ήταν απαραίτητο κατά τη διάρκεια της πολύωρης παραμονής μας στο εργαστήριο.

Το μεγαλύτερο όμως ευχαριστώ δικαιωματικά ανήκει στις διδακτορικές φοιτήτριες Κατερίνα Μπακέλα και Χριστιάνα Κυβελίδου. Την Κατερίνα την ευχαριστώ για την καθοδήγηση, τις συμβουλές και γενικότερα για όλο το χρόνο που μου αφιέρωσε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής αλλά κυρίως για την υποστήριξη και τη βοήθεια τις μέρες των τελικών εξετάσεων. Τη Χριστιάνα την ευχαριστώ γιατί ήταν ο πρώτος άνθρωπος που μου έμαθε να δουλεύω μέσα σε ένα εργαστήριο κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας ενώ ακόμη και τώρα ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει. Παρόλο που πέρασαν αρκετά χρόνια από τότε παραμένει ακόμα η εργαστηριακή μου μαμά την οποία απλά δεν γίνεται να μην ευχαριστώ σε κάθε ευκαιρία!!

# Περιεχόμενα

---

<b>Περίληψη/Abstract</b> .....	σελ. 4
<b>1. Εισαγωγή</b> .....	σελ. 5
<b>1.1</b> Το ανοσοποιητικό σύστημα.....	σελ. 5
<b>1.2</b> Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος .....	σελ. 5
<b>1.2.1</b> Β-λεμφοκύτταρα.....	σελ. 6
<b>1.2.2</b> Τ-λεμφοκύτταρα.....	σελ. 7
<b>1.2.2.1</b> CD4+ κύτταρα .....	σελ. 9
<b>1.2.2.2</b> Ενεργοποίηση των CD4+ κυττάρων .....	σελ. 11
<b>1.3</b> Το Μείζον Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας.....	σελ. 13
<b>1.3.1</b> Τάξης I μόρια ιστοσυμβατότητας .....	σελ. 13
<b>1.3.2</b> Τάξης II μόρια ιστοσυμβατότητας .....	σελ. 14
<b>1.3.3</b> Διαλυτά μόρια ιστοσυμβατότητας .....	σελ. 14
<b>1.4</b> Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής .....	σελ. 17
<b>2. Υλικά και μέθοδοι</b> .....	σελ. 18
<b>2.1</b> Χειρισμός πειραματόζων.....	σελ. 18
<b>2.1.1</b> <i>In vivo</i> ανοχοποίηση και ανοσοποίηση.....	σελ. 18
<b>2.1.2</b> <i>In vivo</i> και <i>in vitro</i> χορήγηση sMHC-II.....	σελ. 18
<b>2.2</b> Εξωτερικός ανοσοφθορισμός.....	σελ. 19
<b>2.3</b> Απομόνωση CD4+ κυττάρων από συνολικά σπληνοκύτταρα .....	σελ. 19
<b>2.3.1</b> FACScan sorter .....	σελ. 20
<b>2.4</b> Ανοσοκατακρήμνιση .....	σελ. 21
<b>2.4.1</b> Ακινητοποίηση αντισώματος στα σφαιρίδια .....	σελ. 21
<b>2.4.2</b> Απομόνωση sMHC-II από υπερκείμενα CD4+ κυττάρων .....	σελ. 22
<b>2.5</b> Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσροφητική Δοκιμή (ELISA).....	σελ. 23
<b>2.6</b> Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση ακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	σελ. 24
<b>2.7</b> Χρώση αργύρου (Silver staining).....	σελ. 25
<b>2.8</b> Μέθοδος Lowry.....	σελ. 25
<b>2.9</b> Έλεγχος πολλαπλασιασμού κυττάρων με ραδιενεργή θυμιδίνη .....	σελ. 26

<b>3. Αποτελέσματα</b> .....	σελ. 27
<b>3.1</b> Απομόνωση CD4+ κυττάρων.....	σελ. 27
<b>3.2</b> Απομόνωση και ταυτοποίηση sMHC-II μορίων από τα υπερκείμενα CD4+ κυττάρων .....	σελ. 27
<b>3.3</b> <i>in vivo</i> χορήγηση sMHC-II σε ανοσοποιημένα BALB/c.....	σελ. 29
<b>3.3.1</b> Επίδραση των sMHC-II μορίων στην παραγωγή αντι-HSA αντισώματος .....	σελ. 29
<b>3.3.2</b> Επίδραση των sMHC-II μορίων στα σπληνοκύτταρα .....	σελ. 30
<b>3.4</b> <i>in vitro</i> χορήγηση sMHC-II σε ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα .....	σελ. 33
<b>3.4.1</b> Επίδραση των sMHC-II μορίων στην παραγωγή αντι-HSA αντισώματος .....	σελ. 33
<b>3.4.2</b> Επίδραση των sMHC-II μορίων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.....	σελ. 34
<b>3.4.3</b> Επίδραση των sMHC-II μορίων στα σπληνοκύτταρα .....	σελ. 34
<b>4. Συζήτηση</b> .....	σελ 39
<b>5. Βιβλιογραφία</b> .....	σελ 42

## Περίληψη

---

Τα διαλυτά μόρια ιστοσυμβατότητας (sMHC) κυκλοφορούν στον ορό και στα σωματικά υγρά των υγιών ατόμων σε ποικίλες συγκεντρώσεις οι οποίες έχειδειχθεί ότι μεταβάλλονται σε παθολογικές καταστάσεις. Τα μόρια αυτά έχουν συσχετιστεί με τη διαδικασία της ανοχής και γενικότερα της ανοσολογικής ρύθμισης. Στη συγκεκριμένη μελέτη απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν sMHC-II από τα υπερκείμενα CD4+ κυττάρων που προέρχονταν από φυσιολογικά ή από ανοχοποιημένα με HSA BALB/c και μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα ρύθμισης της ανοσολογικής απόκρισης τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα sMHC-II που χορηγήθηκαν *in vivo* σε ανοσοποιημένα με HSA BALB/c μείωσαν την παραγωγή α-HSA αντισώματος χωρίς να επηρεάζουν σημαντικά την έκφραση ειδικών μαρτύρων των T-λεμφοκυττάρων. Τα sMHC-II που χορηγήθηκαν *in vitro* σε ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα οδήγησαν σε μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων καθώς και του CD28 επιφανειακού μάρτυρα χαρακτηριστικού της ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων. Ταυτόχρονα οδήγησαν σε αύξηση της παραγωγής α-HSA αντισώματος σε αντίθεση με την *in vivo* χορήγηση.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη παρούσα εργασία, οδηγούν σε τρία βασικά συμπεράσματα: την ικανότητα των CD4+ κυττάρων να εκκρίνουν sMHC-II μόρια, την κατασταλτική δράση των μορίων αυτών στη χυμική ανοσία σε επίπεδο οργανισμού αλλά και την αρνητική τους ρύθμιση στα T-λεμφοκύτταρα *in vitro*.

## Abstract

---

Soluble MHC molecules are present in healthy human serum and body fluids in various concentrations which however change in pathological conditions. These molecules have been associated with the process of tolerance and with immunological regulation in general. In the present study sMHC-II molecules have been isolated from the supernatants of CD4+ cells. These cells came from either control or tolerized with HSA BALB/c mice and their role as to the regulation of the immune response was evaluated *in vivo* as well as *in vitro*.

The sMHC-II molecules that were injected in immunized with HSA mice resulted in reduction of the anti-HSA antibody while they had no significant influence on the T cell specific markers. The sMHC-II molecules that were provided to HSA-immunized spleen cells resulted in reduced cell proliferation and downregulation of CD28, the marker of T-cell activation. They also induced an increase of the anti-HSA antibody in contrast with the *in vivo* experiments.

The results presented here concentrate on three major conclusions: CD4+ cells secrete sMHC-II molecules, sMHC-II repress the humoral response *in vivo* while downregulating T-cells *in vitro*.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1 Το ανοσοποιητικό σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα αμυντικό σύστημα απαραίτητο για την επιβίωση καθώς μπορεί να διακρίνει και να προστατεύσει τον οργανισμό από ξένους προς αυτόν εισβολείς. Η κατάσταση προστασίας ενάντια σε ξένους οργανισμούς ή ουσίες (αντιγόνα) ονομάζεται ανοσία. Τα σπονδυλωτά διαθέτουν δύο τύπους ανοσίας την έμφυτη και την προσαρμοστική.

Η έμφυτη ανοσία δεν είναι ειδική για κανένα παθογόνο αλλά αποτελεί μία πρώτη γραμμή άμυνας που περιλαμβάνει φραγμούς ανατομικούς (δέρμα, βλενώδεις επιφάνειες) και φυσιολογικούς (θερμοκρασία, pH, διαλυτοί παράγοντες όπως ιντερφερόνες, λυσοζύμη, συμπλήρωμα) καθώς και μηχανισμούς φαγοκυττάρωσης και φλεγμονής.

Η προσαρμοστική ανοσία είναι ικανή να αναγνωρίζει και να αφαιρεί ειδικά συγκεκριμένους μικροοργανισμούς και μόρια και χαρακτηρίζεται από αντιγονική ειδικότητα και μνήμη. Αυτά τα δύο χαρακτηριστικά επιτρέπουν στο ανοσοποιητικό σύστημα να διακρίνει λεπτές διαφορές μεταξύ των αντιγόνων καθώς και να επάγει μια πιο ισχυρή και άμεση ανοσοαπόκριση σε μία δεύτερη επαφή με το ίδιο αντιγόνο.

Η προσαρμοστική ανοσία περιλαμβάνει δύο μηχανισμούς, τη χυμική και την κυτταρική ανοσία. Στη χυμική ανοσία, η οποία προστατεύει κυρίως ενάντια σε εξωκυτταρικά βακτήρια και ξένα μακρομόρια, οι αμυντικές αποκρίσεις του ξενιστή μεσολαβούνται από αντισώματα που κυκλοφορούν στο πλάσμα, τη λέμφο και τα υγρά των ιστών. Στην κυτταρική ανοσία, η οποία προστατεύει κυρίως από ενδοκυτταρικά βακτήρια, ιούς και καρκινικά κύτταρα, οι αποκρίσεις μεσολαβούνται από αντιγονοειδικά και μη κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

## 1.2 Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος

Όλα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αναπτύσσονται από ένα κοινό πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο κατά τη διάρκεια της αιμοποίησης. Το αρχέγονο αυτό κύτταρο μπορεί να ακολουθήσει δύο διαφορετικά μονοπάτια διαφοροποίησης δίνοντας γένεση είτε σε ένα κοινό λεμφοειδές προγονικό κύτταρο είτε σε ένα κοινό μυελοειδές προγονικό κύτταρο. Τα λεμφοειδή προγονικά κύτταρα δίνουν γένεση στα Β-λεμφοκύτταρα, στα Τ-λεμφοκύτταρα, στους φυσικούς φονιάδες (NK) καθώς και σε μερικά δενδριτικά κύτταρα. Τα μυελοειδή προγονικά κύτταρα δίνουν γένεση στα ερυθροκύτταρα, στα αιμοπετάλια καθώς όμως και σε πολυμορφοπήρινα όπως ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, ηωσινόφιλα, δενδριτικά κύτταρα και μονοκύτταρα που διαφοροποιούνται σε μακροφάγα.

Τα Β-λεμφοκύτταρα συμμετέχουν στη χυμική ανοσία ενώ τα Τ-λεμφοκύτταρα συμμετέχουν τόσο στη χυμική όσο και στην κυτταρική ανοσία καθώς αποτελούνται από διαφορετικούς υποπληθυσμούς. Τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα δρουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, παρουσιάζουν δηλαδή το αντιγόνο στο ανοσοποιητικό σύστημα ενώ παράλληλα τα μακροφάγα διαθέτουν και την ικανότητα

της φαγοκυττάρωσης, της πέψης δηλαδή του αντιγόνου σε μικρότερα τμήματα. Ως αντιγονοπαρουσιαστικά μπορούν να δράσουν και τα Β-λεμφοκύτταρα. Τέλος τα ουδετερόφιλα διαθέτουν και αυτά φαγοκυτταρικές ιδιότητες, τα ηωσινόφιλα προκαλούν βλάβες στη δομή της μεμβράνης παρασιτικών παραγόντων ενώ τα βασεόφιλα παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη αλλεργικών αντιδράσεων.

### **1.2.1 Β-λεμφοκύτταρα**

Τα Β-λεμφοκύτταρα αναπτύσσονται και ωριμάζουν στο μυελό των οστών. Συμμετέχουν στο μηχανισμό της χυμικής ανοσίας εκκρίνοντας αντισώματα, πρωτεΐνες δηλαδή της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών που δεσμεύουν τα αντιγόνα. Κάθε αντίσωμα χαρακτηρίζεται από μία σταθερή και μία μεταβλητή περιοχή έτσι ώστε να μπορεί να δεσμεύει ειδικά μόνο έναν αντιγονικό επίτοπο.

Κατά την ωρίμανσή τους, τα Β-λεμφοκύτταρα εκφράζουν τις μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες mIgM και mIgD. Αν οι μεμβρανικοί αυτοί υποδοχείς εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για αντιγόνα του εαυτού που υπάρχουν στο μυελό των οστών γίνεται επανενεργοποίηση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών έτσι ώστε να εκφράσουν μία νέα μεταβλητή περιοχή που αντίστοιχα θα αναγνωρίζει κάποιο άλλο αντιγόνο (Tiegs et al., 1993; Retter et al., 1998). Σε περίπτωση που ο μηχανισμός αυτός αποτύχει τότε τα κύτταρα θανατώνονται με απόπτωση, υφίστανται δηλαδή αρνητική επιλογή. Και οι δύο αυτοί μηχανισμοί έχουν ως στόχο την παραγωγή ώριμων Β-λεμφοκυττάρων που θα αναγνωρίζουν μόνο ξένα ως προς τον οργανισμό αντιγόνα. Με αυτόν τον τρόπο διατηρείται μια κατάσταση ανοχής, ικανότητας δηλαδή του οργανισμού να μην αναπτύσσει ανοσολογική απόκριση σε αντιγόνα του εαυτού.

Τα ώριμα πλέον Β-λεμφοκύτταρα εγκαταλείπουν το μυελό των οστών και μεταφέρονται στον σπλήνα και στους λεμφαδένες μέσω του αίματος και της λέμφου. Χαρακτηρίζονται ως παρθένα κύτταρα καθώς δεν έχουν ακόμη έρθει σε επαφή με κάποιο αντιγόνο. Όταν όμως ένα κύτταρο ενεργοποιηθεί από ένα αντιγόνο εναντίον του οποίου ειδικεύονται οι μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες που φέρει τότε πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα και σε Β-κύτταρα μνήμης. Σε περίπτωση που ο οργανισμός έρθει για πρώτη φορά σε επαφή με ένα αντιγόνο τότε ενεργοποιούνται τα παρθένα κύτταρα (πρωτογενής απόκριση) ενώ αν ο οργανισμός έχει αντιμετωπίσει ξανά το αντιγόνο αυτό τότε ενεργοποιούνται τα πλασματοκύτταρα (δευτερογενής απόκριση). Και στα δύο είδη αποκρίσεων εκκρίνονται αντισώματα με τη διαφορά πως στην πρωτογενή απόκριση εκκρίνεται αρχικά IgM και στη συνέχεια IgG ενώ στη δευτερογενή απόκριση τα επίπεδα της IgG είναι κατά πολύ υψηλότερα της IgM (Goldsby et al., 2007).

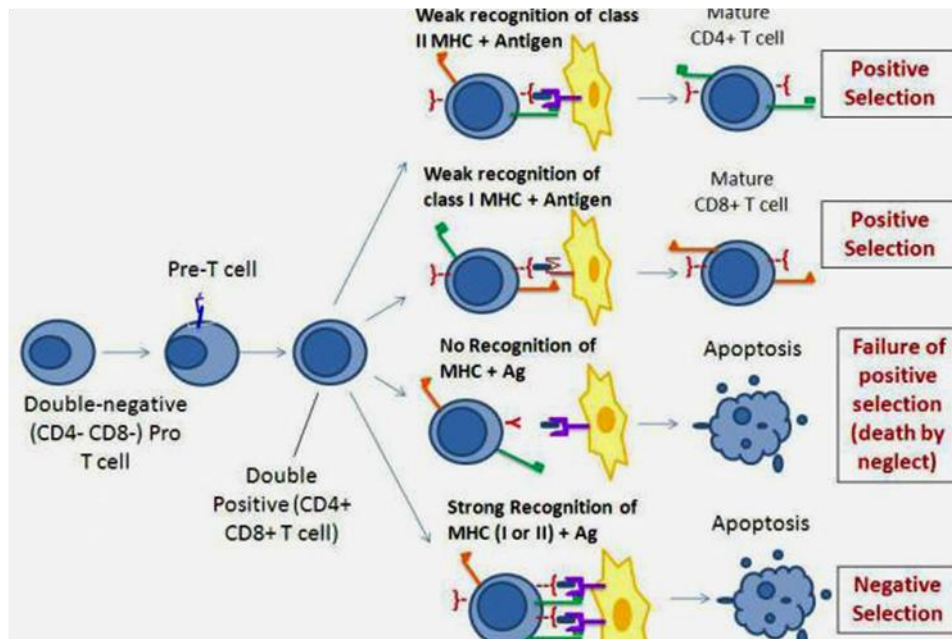
## 1.2.2 T-λεμφοκύτταρα

Τα T-λεμφοκύτταρα αναπτύσσονται στον μυελό των οστών όμως μεταναστεύουν και ωριμάζουν στο θύμο αδένα ο οποίος αποτελείται από δύο στιβάδες, τον φλοιό και τον μυελό. Στις στιβάδες αυτές υπάρχουν επιθηλιακά κύτταρα, μακροφάγα καθώς και δενδριτικά κύτταρα που προέρχονται από τον μυελό των οστών. Οι αλληλεπιδράσεις των T-λεμφοκυττάρων με το μικροπεριβάλλον αυτό του θύμου είναι καθοριστικές για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους. Η ωρίμανση και διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων χαρακτηρίζεται από την έκφραση επιφανειακών μαρτύρων όπως CD4, CD8, CD3, CD44, CD25 καθώς και ενός μεμβρανικού υποδοχέα (T cell receptor, TCR). Διακρίνουμε δύο είδη υποδοχέων: τον TCRαβ και τον TCRγδ οι οποίοι αποτελούνται από τις αλυσίδες α και β ή γ και δ αντίστοιχα.

Κατά την είσοδό τους στο θύμο αδένα, τα πρόδρομα T-λεμφοκύτταρα δεν εκφράζουν ούτε τον CD4 αλλά ούτε και τον CD8 επιφανειακό μάρτυρα και ονομάζονται διπλά αρνητικά κύτταρα (double negative, DN). Η μετακίνηση των DN κυττάρων στις διαφορετικές περιοχές του φλοιού σχετίζεται και με ένα στάδιο της διαφοροποίησής τους (Lind et al., 2001). Συγκεκριμένα, τα DN κύτταρα εκφράζουν αρχικά μόνο τον CD44 μάρτυρα αλλά κατά την μετακίνησή τους στον φλοιό αρχίζουν σταδιακά να εκφράζουν τον CD25 ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η έκφραση του CD44. Όταν πλέον τα κύτταρα εκφράζουν μόνο τον CD25 μάρτυρα γίνεται μία αναδιάταξη των γονιδίων που κωδικοποιούν τις αλυσίδες γ, δ και β του TCR. Επάγεται τότε η έκφραση των CD4 και CD8, μειώνεται η έκφραση του CD25 και τα κύτταρα πλέον ονομάζονται διπλά θετικά (double positive, DP). Παράλληλα εκφράζεται και η α αλυσίδα του TCR καθώς και η CD3 πρωτεΐνη που σχηματίζει σύμπλοκο με τον TCR. Επομένως στο στάδιο των DP κυττάρων έχει ολοκληρωθεί η έκφραση του μεμβρανικού υποδοχέα. (Starr et al., 2003).

Στη συνέχεια, τα DP κύτταρα που εκφράζουν είτε τον αβ είτε τον γδ TCR υπόκεινται σε μια διαδικασία που ονομάζεται θετική επιλογή και διεξάγεται στον φλοιό του θύμου. Με τη θετική επιλογή μόνο τα κύτταρα των οποίων ο TCR αναγνωρίζει ένα εαυτό μόριο του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC) θα επιβιώσουν ενώ τα υπόλοιπα υπόκεινται σε απόπτωση. Επομένως με τη θετική επιλογή εξασφαλίζεται ο περιορισμός των T-λεμφοκυττάρων σε MHC μόρια του εαυτού, μια διαδικασία καθοριστική τόσο για την χυμική όσο και για την κυτταρική ανοσία. Συγκεκριμένα εξασφαλίζεται πως τα CD4 μόρια θα δεσμεύουν τα τάξης II μόρια ιστοσυμβατότητας (MHC-II) ενώ τα CD8 τα τάξης I (MHC-I). Τα DP κύτταρα που επιβιώνουν και που εκφράζουν τον αβ TCR μεταναστεύουν στον μυελό του θύμου αδένα όπου πλέον εκφράζουν είτε τον CD4 είτε τον CD8 επιφανειακό μάρτυρα και ονομάζονται μονά θετικά κύτταρα (single positive, SP). Τα SP κύτταρα υπόκεινται σε μία διαδικασία που ονομάζεται αρνητική επιλογή όπου θανατώνονται εκείνα των οποίων ο TCR δεσμεύει με υψηλή συγγένεια είτε εαυτά μόρια MHC είτε σύμπλοκα MHC με αντιγόνα του εαυτού. Επομένως με την αρνητική επιλογή εξασφαλίζεται η ανοχή του οργανισμού στα δικά του αντιγόνα και πλέον τα T-λεμφοκύτταρα είναι ώριμα για να μεταναστεύσουν στην περιφέρεια (Goldsby et al., 2007).





Εικόνα 1: Η θετική και η αρνητική επιλογή των T-λεμφοκυττάρων

Τα CD4+ κύτταρα ονομάζονται T-βοηθοί και αναγνωρίζουν και δεσμεύουν μόρια MHC-II σε σύμπλοκο με κάποιο αντιγόνο που εντοπίζεται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Antigen Presenting Cells, APCs). Με αυτή την αλληλεπίδραση επάγουν την έναρξη είτε της χυμικής είτε της κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης. Στην πρώτη περίπτωση ενεργοποιούν τα B-λεμφοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα ενώ στη δεύτερη περίπτωση ενεργοποιούν τα T-κυτταροτοξικά.

Τα CD8+ κύτταρα ονομάζονται T-κυτταροτοξικά και αναγνωρίζουν και δεσμεύουν μόρια MHC-I σε σύμπλοκο με κάποιο αντιγόνο. Ενεργοποιούνται από τους T-βοηθούς και επάγουν την κυτταρική ανοσολογική απόκριση που έχει ως αποτέλεσμα τη θανάτωση του κυττάρου-στόχου.

Εκτός όμως από τους T-βοηθούς και τα T-κυτταροτοξικά κύτταρα, υπάρχει και ένας τρίτος υποπληθυσμός T-λεμφοκυττάρων, τα T-ρυθμιστικά κύτταρα (T-regulatory cells, Tregs). Τα Tregs εκφράζουν ως επιφανειακό μάρτυρα την CD25 πρωτεΐνη ενώ παράλληλα είναι είτε CD4 είτε CD8 θετικά αποτελώντας το 10% των CD4+ και μόλις το 1% των CD8 κυττάρων στην περιφέρεια (Sakaguchi et al., 2008). Ο βασικός τους ρόλος είναι η καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης επομένως διαταραχές στην ανάπτυξη ή στη λειτουργία τους οδηγούν στην έναρξη αυτοάνοσων καταστάσεων.

### 1.2.2.1 CD4+ κύτταρα

Τα CD4+ κύτταρα μπορεί να είναι είτε CD25 θετικά (CD4+CD25+) είτε CD25 αρνητικά (CD4+CD25-). Τα CD4+CD25- κύτταρα που αποτελούν και το μεγαλύτερο ποσοστό των CD4+ κυττάρων ονομάζονται T-βοηθοί και μπορούν να διαχωριστούν σε υποπληθυσμούς με βάση κυρίως τον ρόλο τους αλλά και τις κυτοκίνες τις οποίες παράγουν και από τις οποίες ενεργοποιούνται. Οι κυτοκίνες είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους που εκκρίνονται από λευκοκύτταρα και διάφορους άλλους κυτταρικούς τύπους του σώματος, ως απόκριση σε ένα πλήθος ερεθισμάτων. Δεσμεύονται σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς σε κύτταρα-στόχους και ρυθμίζουν την ένταση και τη διάρκεια μιας ανοσολογικής απόκρισης. Αυτό το επιτυγχάνουν μέσω διέγερσης ή αναστολής του πολλαπλασιασμού ή/και της διαφοροποίησης διαφόρων κυττάρων καθώς και μέσω του ελέγχου έκκρισης αντισωμάτων ή άλλων κυτοκινών (Goldsby et al., 2007). Αρχικά τα CD4+ κύτταρα είχαν χωριστεί σε δύο κατηγορίες: τους T-βοηθούς τύπου 1 (Th1) και τους T-βοηθούς τύπου 2 (Th2). Πλέον όμως υπάρχουν και άλλες κατηγορίες δύο εκ των οποίων είναι οι Th17 αλλά και τα επαγόμενα ρυθμιστικά κύτταρα (inducible T regulatory cells, iT-regs).

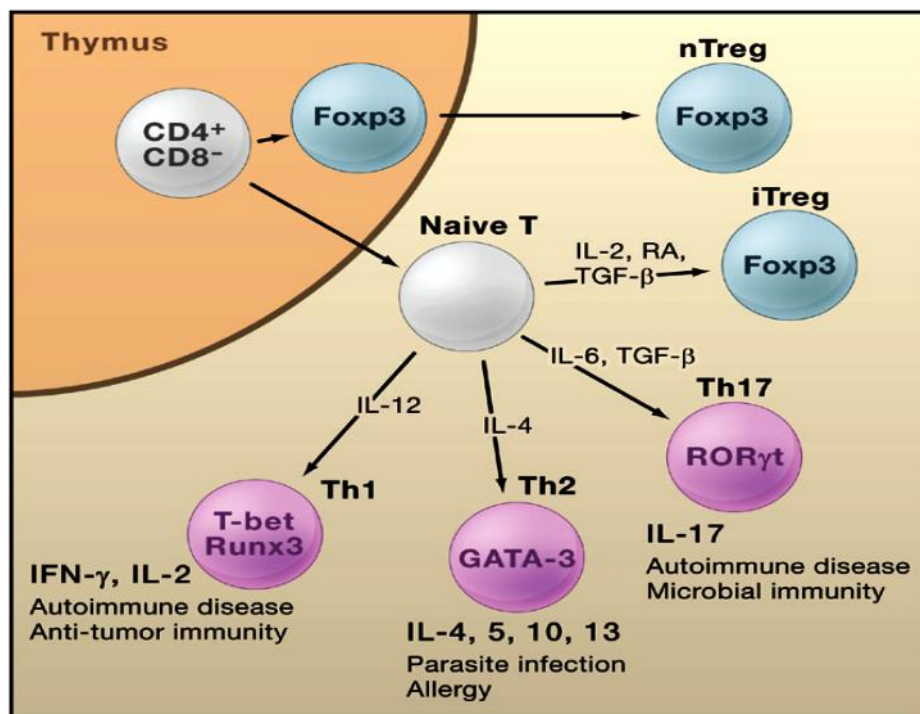
Οι **Th1** επάγονται κυρίως από την ιντερλευκίνη 12 (IL-12) και από την ιντερφερόνη  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Lighvani et al., 2001 ; Trinchieri et al., 2003) που αλληλεπιδρούν με τον μεταγραφικό παράγοντα T-box transcription factor (T-bet) (Afkarian et al., 2003 ; Lugo-Villarín et al., 2003). Ευθύνονται για κυτταρομεσολαβητικές λειτουργίες και καταστάσεις φλεγμονής ενάντια σε ενδοκυτταρικούς ιούς και βακτήρια (Zhu & Paul, 2010). Εκκρίνουν κυρίως IFN- $\gamma$ , ιντερλευκίνη 2 (IL-2) και τον παράγοντα νέκρωσης όγκου  $\beta$  (TNF- $\beta$ ), κυτοκίνες που προάγουν τη διαφοροποίηση των CD8+ κυττάρων σε πλήρως κυτταροτοξικά κύτταρα, ενεργοποιούν τα μακροφάγα, συμμετέχουν σε αργοποιημένου τύπου υπερευαισθησίες και αναστέλλουν την αύξηση των Th2 κυττάρων (Glimcher & Murphy, 2000; Goldsby et al., 2007).

Οι **Th2** επάγονται κυρίως από την ιντερλευκίνη 4 (IL-4) που οδηγεί σε ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3 (Glimcher & Murphy, 2000 ; Zhu et al., 2001) και ευθύνονται για την αντιμετώπιση εξωκυτταρικών παρασίτων και την για υποστήριξη των αλλεργικών αντιδράσεων (Goldsby et al., 2007 ; Zhu & Paul, 2010). Εκκρίνουν κυρίως τις IL-4, IL-5, IL-10 και IL-13, κυτοκίνες που προάγουν την έκκριση αντισωμάτων από τα B-λεμφοκύτταρα, ενεργοποιούν τα εωσινόφιλα και αναστέλλουν την αύξηση των Th1 κυττάρων (Glimcher & Murphy, 2000 ; Goldsby et al., 2007).

Οι **Th17** επάγονται κυρίως από την ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού  $\beta$  (Transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ) που ενεργοποιούν τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-T (ROR $\gamma$ t) ο οποίος δρα ως μεταγραφικός παράγοντας (Luckheeram et al., 2012). Οι Th17 συντελούν στην αντιμετώπιση μολύνσεων από βακτήρια και μύκητες εκκρίνοντας τις κυτοκίνες IL-17 και IL-22 (Zhu & Paul, 2010)

ενώ έχουν βρεθεί να συμμετέχουν και σε καταστάσεις αυτοανοσίας (Annunziato et al., 2007).

Τα επαγόμενα ρυθμιστικά κύτταρα (**iTregs**) προέρχονται από  $CD4^+$  κύτταρα στα οποία η IL-2 καθώς και το ρετινοϊκό οξύ παρουσία TGF- $\beta$  προκαλούν την έκφραση της foxp3 του βασικού μεταγραφικού παράγοντα των T-ρυθμιστικών κυττάρων. (Laurence et al., 2007; Benson et al., 2007). Μετατρέπονται έτσι σε  $CD4^+CD25^+$  κύτταρα που όπως και τα φυσικά ρυθμιστικά (natural regulatory cells, nTregs) προκαλούν καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης εκκρίνοντας κυρίως IL-10. Η κυτοκίνη αυτή είναι συνδεδεμένη με την ανοσολογική παρεμπόδιση καθώς οδηγεί στον τερματισμό της φλεγμονής ενώ ρυθμίζει την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των περισσότερων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα T και B-λεμφοκύτταρα, τους φυσικούς φονιάδες καθώς και τα δενδριτικά κύτταρα (Moore et al., 2001).



Εικόνα 2: Τα μονοπάτια διαφοροποίησης των  $CD4^+$  κυττάρων (Sakaguchi et al., 2008)

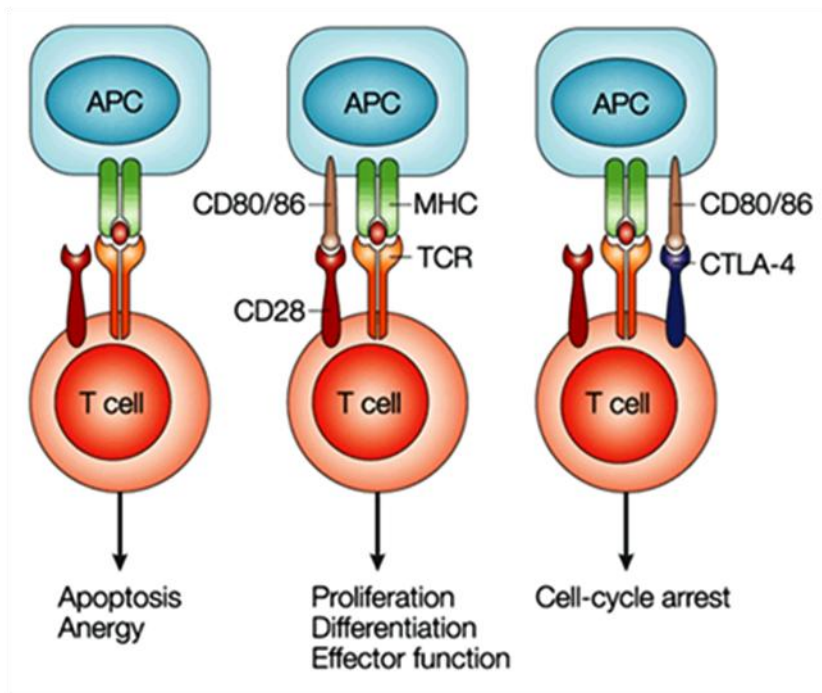
Επομένως διακρίνονται δύο υποπληθυσμοί των  $CD4^+CD25^+$  ρυθμιστικών κυττάρων: τα φυσικά ρυθμιστικά κύτταρα που προέρχονται απευθείας από τον θύμο αδένα και τα επαγόμενα που προέρχονται έπειτα από σηματοδότηση στα  $CD4^+$  στην περιφέρεια. Τα βασικά χαρακτηριστικά και στις δύο κατηγορίες κυττάρων είναι όπως προαναφέρθηκε η έκφραση του επιφανειακού μάρτυρα CD25 καθώς και του μεταγραφικού παράγοντα foxp3. Η CD25 πρωτεΐνη αποτελεί τον υποδοχέα της IL-2 (Sakaguchi et al., 1995), κυτοκίνης απαραίτητης για την ενεργοποίηση και τη λειτουργία των Tregs. Ανεπάρκεια στην παραγωγή είτε της IL-2 είτε του υποδοχέα της οδηγεί σε μείωση των Tregs (Antony et al., 2006) κάτι που συμβαίνει και με

απενεργοποίηση της δράσης της IL-2 με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος (Setoguchi et al., 2005). Σε κάθε περίπτωση επάγεται η έναρξη αυτοάνοσων καταστάσεων επομένως η IL-2 κρίνεται απαραίτητη τόσο για την ενεργοποίηση των nTregs στο θύμο αδένα όσο και για την παραγωγή των iTregs στην περιφέρεια (Sakaguchi et al., 2008). Όσον αφορά στο μεταγραφικό παράγοντα foxp3, έχει πολύ σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των αβ TCR κυττάρων σε nTregs στο θύμο αδένα (Sakaguchi et al., 2008). Εκτοπική έκφραση του γονιδίου της foxp3, σε CD4+CD25- κύτταρα επάγει την μετατροπή τους σε CD4+CD25+ Tregs που μπορούν και καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και τη δράση των T-λεμφοκυττάρων *in vitro* ενώ εμποδίζουν την ανάπτυξη αυτοάνοσων καταστάσεων *in vivo* (Khattari et al., 2003 ; Fontenot et al., 2003). Επομένως η foxp3 όπως και η IL-2 συμμετέχει στην παραγωγή και των φυσικών αλλά και των επαγόμενων ρυθμιστικών κυττάρων (Sakaguchi et al., 2008).

### 1.2.2.2 Ενεργοποίηση των CD4+ κυττάρων

Για την έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης είναι απαραίτητα δύο ανεξάρτητα σήματα ενεργοποίησης των CD4+ κυττάρων. Το πρώτο βήμα είναι η αναγνώριση και η πρόσδεση του αντιγόνου με τον TCR ενώ το δεύτερο απαιτεί την πρόσδεση ενός μορίου συνενεργοποίησης που βρίσκεται στην επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων με το αντίστοιχο συνδετικό μόριο που βρίσκεται στην επιφάνεια των APCs. Το μόριο αυτό της συνενεργοποίησης ονομάζεται CD28 και είναι μία διαμεμβρανική γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Aruffo & Seed, 1987). Σε περίπτωση που δεν υπάρχει αυτό το συνενεργοποιητικό σήμα δεν υπάρχει απόκριση και το T-λεμφοκύτταρο θεωρείται ανεργικό. Αντίστοιχα υπάρχει και ένα δεύτερο μόριο που ευθύνεται για την απενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και ονομάζεται Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4). Πρόκειται για μια επίσης γλυκοζυλιωμένη διαμεμβρανική πρωτεΐνη των T-λεμφοκυττάρων που ανήκει και αυτή στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Brunet et al., 1987).

Παρά την αντίθετη τους δράση τα CD28 και CTLA-4 μόρια αλληλεπιδρούν με τα ίδια μόρια στην επιφάνεια των APCs τις πρωτεΐνες CD80 και CD86 (Sansom, 2000). Τα CTLA-4 μόρια έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για τις CD80 και CD86 πρωτεΐνες σε σχέση με τα CD28 γεγονός που όμως ισορροπείται από την ενδοκυτταρική κυρίως έκφραση του CTLA-4 (Chuang et al., 1997) και την αντίστοιχα σχεδόν μόνιμη έκφραση του CD28 στην κυτταρική μεμβράνη. Τα CD86 μόρια εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στην επιφάνεια των APCs και η παραγωγή τους αυξάνεται γρήγορα παρουσία κάποιου αντιγόνου σε αντίθεση με τα CD80 των οποίων η έκφραση επάγεται μόνο παρουσία κάποιου αντιγόνου και σε ρυθμούς πολύ πιο αργούς από τα CD86 (Sansom, 2000).



Εικόνα 3: Το σύστημα CD28/CTLA-4 στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων (Alegre et al., 2001)

Επομένως κατά την έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης παράλληλα με την αλληλεπίδραση του TCR με το αντιγόνο τα CD28 μόρια αλληλεπιδρούν με τα CD86 και ξεκινά ένα σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποίησης. Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει κυρίως αντιδράσεις φωσφορυλίωσης ενώ οι πρωτεΐνες που κατέχουν βασικό ρόλο ανήκουν στην οικογένεια των Src κινασών (Lck, Fyn) και των Syk κινασών (ZAP-70). Αρχικά στρατολογείται η Lck έπειτα από αλληλεπίδραση με τη CD4 πρωτεΐνη και αυτοφωσφορυλιώνεται έτσι ώστε να ενεργοποιηθεί. Επάγεται τότε και η στρατολόγηση της Fyn στην πλασματική μεμβράνη. Στη συνέχεια η Lck φωσφορυλιώνει κάποια κατάλοιπα τυροσίνης που βρίσκονται στον TCR και συγκεκριμένα σε περιοχές που ονομάζονται ITAMS (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) ενώ παράλληλα φωσφορυλιώνει και την ZAP-70. Η ZAP-70 τότε ξεκινά μια περαιτέρω σηματοδότηση κινασών και ενζύμων που έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των CD4+ κυττάρων. Η ενεργοποίηση αυτή χαρακτηρίζεται από την είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο, από αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση έτσι ώστε τα κύτταρα να είναι λειτουργικά στο μέγιστο βαθμό καθώς και από αυξημένη έκκριση της IL-2 για την οποία είναι απαραίτητη η Fyn κινάση (Palacios & Weiss, 2004).

Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης αυτής τόσο των APCs όσο και των CD4+ κυττάρων επάγεται η έκφραση του CD80 και του CTLA-4 αντίστοιχα. Ξεκινά τότε μία διαδικασία απενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων που περιλαμβάνει παρεμπόδιση του κυτταρικού τους κύκλου και της έκκρισης IL-2 πιθανόν λόγω μη σωστής σηματοδότησης στις απαραίτητες κινάσες (Walunas et al., 1996; Krummel & Allison, 1996) οδηγώντας σε καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης. Σημαντικό ρόλο έχουν φυσικά και τα T-ρυθμιστικά κύτταρα καθώς στην επιφάνειά τους

επάγεται από την foxp3 η έκφραση της CTLA-4 πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται μόνιμα στα Tregs σε αντίθεση με τα υπόλοιπα T-λεμφοκύτταρα όπου η έκφρασή της επάγεται αφού τα κύτταρα ενεργοποιηθούν (Takahashi et al., 2000 ; Read et al., 2000). Δίνεται έτσι η δυνατότητα στα Tregs να αλληλεπιδράσουν με τα APCs και να οδηγήσουν σε καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί πως η CTLA-4 πρωτεΐνη μπορεί και απομακρύνει τα συνδετικά μόρια CD80 και CD86 από τα APCs με ένα μηχανισμό trans-ενδοκύτωσης εμποδίζοντας έτσι την αλληλεπίδραση των APCs με τον CD28 υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων. Η ιδιότητα αυτή εμφανίζεται τόσο στα Tregs όσο και στα υπόλοιπα T-λεμφοκύτταρα με τη διαφορά πως στα Tregs είναι περισσότερο έντονη λόγω της συνεχούς παρουσίας της CTLA-4 πρωτεΐνης στη μεμβράνη (Qureshi et al., 2011).

### 1.3 Το Μείζον Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας

Το Μείζον Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex-MHC) είναι ένα σύμπλεγμα γονιδίων του οποίου τα προϊόντα ευθύνονται για την διάκριση του εαυτού από τον μη-εαυτό. Έχει εντοπιστεί σε όλα τα θηλαστικά που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα και συγκεκριμένα στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 6, ενώ στο ποντίκι στο χρωμόσωμα 17. Στον άνθρωπο το MHC αναφέρεται ως σύμπλεγμα HLA (Human Leukocyte Antigens complex) και στο ποντίκι ως σύμπλεγμα H-2 (Histocompatibility-2 complex). Η βασική λειτουργία των MHC μορίων είναι η δέσμευση αντιγόνων και η παρουσίασή τους στο ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτό το επιτυγχάνουν μεταφέροντας τα αντιγόνα στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με σκοπό την αναγνώρισή τους από τα κατάλληλα T-λεμφοκύτταρα και την έναρξη της ανοσολογικής αντίδρασης. Τα MHC μόρια χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τα τάξης I και τα τάξης II μόρια ιστοσυμβατότητας.

#### 1.3.1 Τάξης I μόρια ιστοσυμβατότητας

Τα τάξης I μόρια ιστοσυμβατότητας είναι γλυκοπρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια σχεδόν όλων των εμπύρηνων κυττάρων. Αποτελούνται από δύο αλυσίδες: μία βαριά με μοριακό βάρος 45kDa και μία ελαφριά με μοριακό βάρος 12kDa. Η βαριά αλυσίδα αποτελείται από δύο μεταβλητές επικράτειες ( $\alpha 1, \alpha 2$ ) και από μία σταθερή επικράτεια ( $\alpha 3$ ) ενώ διαθέτει ένα διαμεμβρανικό και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα. Η ελαφριά αλυσίδα αποτελείται από τη  $\beta 2$ -μικροσφαιρίνη. Οι  $\alpha 1, \alpha 2$  και  $\alpha 3$  αλυσίδες κωδικοποιούνται από τους γονιδιακούς τόπους H-2 K,D,L στο ποντίκι και από τους HLA-A, -B, -C στον άνθρωπο ενώ η  $\beta 2$ -μικροσφαιρίνη κωδικοποιείται από το χρωμόσωμα 2 στο ποντίκι και από το χρωμόσωμα 15 στον άνθρωπο. Στον άνθρωπο έχουν επίσης βρεθεί και μη κλασσικά τάξης I μόρια τα οποία κωδικοποιούνται από τους HLA-E,-F -G γονιδιακούς τόπους και σε αντίθεση με τα κλασσικά εκφράζονται μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς. Η κύρια λειτουργία των τάξης I μορίων ιστοσυμβατότητας είναι η δέσμευση ενδογενών κυρίως πεπτιδικών αντιγόνων και η παρουσίασή τους στα CD8+ κύτταρα.



Ενεργοποιείται έτσι η κυτταρική ανοσία που έχει ως τελικό σκοπό τη θανάτωση των κυττάρων που φέρουν τα συγκεκριμένα αντιγόνα.

### 1.3.2 Τάξης II μόρια ιστοσυμβατότητας

Τα τάξης II μόρια ιστοσυμβατότητας είναι γλυκοπρωτεΐνες που εκφράζονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα, δενδριτικά, Β κύτταρα). Αποτελούνται από δύο αλυσίδες: μία βαριά αλυσίδα  $\alpha$  με μοριακό βάρος 30-33 kDa και μία ελαφριά αλυσίδα  $\beta$  με μοριακό βάρος 27-29 kDa. Κάθε αλυσίδα αποτελείται από δύο επικράτειες ( $\alpha 1, \alpha 2$  και  $\beta 1, \beta 2$ ) και έχει ένα διαμεμβρανικό και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα. Η  $\alpha 1$  και η  $\beta 1$  αποτελούν τη μεταβλητή επικράτεια ενώ η  $\alpha 2$  και η  $\beta 2$  τη σταθερή. Τα κλασσικά τάξης II μόρια ιστοσυμβατότητας κωδικοποιούνται από τους γονιδιακούς τόπους H-2 I-A, I-E στο ποντίκι και από τους HLA-DP, -DQ, -DR στον άνθρωπο οι οποίοι κωδικοποιούν και για την  $\alpha$  και για την  $\beta$  αλυσίδα. Τα μη κλασσικά τάξης II μόρια κωδικοποιούνται από τους γονιδιακούς τόπους H-2 I-M, I-O στο ποντίκι και από τους HLA-DM, -DO στον άνθρωπο. Η κύρια λειτουργία των τάξης II μορίων ιστοσυμβατότητας είναι η δέσμευση εξωγενών κυρίως αντιγόνων και η παρουσίασή τους στα CD4 + κύτταρα. Ενεργοποιείται έτσι η χυμική ανοσία με σκοπό την παραγωγή ειδικού αντισώματος για το συγκεκριμένο αντιγόνο.

### 1.3.3 Διαλυτά μόρια ιστοσυμβατότητας

Ενώ τα τάξης I και τάξης II μόρια που προαναφέρθηκαν εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, πλέον είναι γνωστή η ύπαρξη και των διαλυτών μορίων ιστοσυμβατότητας (soluble MHC, sMHC) που αντίστοιχα διακρίνονται σε τάξης I (sMHC-I) και τάξης II μόρια (sMHC-II). Η ύπαρξη των μορίων αυτών επιβεβαιώθηκε έπειτα από ταύτισή τους με διαλυτούς παράγοντες που εκκρίνονταν από αλλομόσχευμα ήπατος με σκοπό τη διατήρηση της ανοχής σε πειράματα μεταμόσχευσης σε χοίρους (Calne et al., 1967; van Rood et al., 1970).

Όσον αφορά στη δομή τους, τόσο τα sMHC-I όσο και τα sMHC-II παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τα αντίστοιχα μεμβρανικά καθώς τα sMHC-I αποτελούνται από την  $\alpha$  αλυσίδα και τη  $\beta 2$ -μικροσφαιρίνη ενώ τα sMHC-II κυκλοφορούν ως ετεροδιμερή αποτελούμενα από τις  $\alpha$  και  $\beta$  αλυσίδες (Tabayoyong & Zavazava, 2007). Όπως έχει δειχθεί για το HLA-G υπάρχει μία ετερογένεια σχετικά με τα μοριακά βάρη και κατ' επέκταση τη μορφή των sMHC σε σχέση με τα μεμβρανικά μόρια. Τα sMHC-I κυκλοφορούν σε τρεις ισομορφές με μοριακά βάρη 44-46, 35-37 και 39-41 kD. Η ισομορφή με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος (44-46 kD) θεωρείται πως προκύπτει έπειτα από αποκοπή από τη μεμβράνη καθώς διαθέτει τόσο το διαμεμβρανικό όσο και το κυτταροπλασματικό τμήμα. Η ισομορφή μικρότερου μοριακού βάρους (35-37 kD) θεωρείται πως προκύπτει έπειτα από πρωτεόλυση καθώς δεν διαθέτει ούτε το διαμεμβρανικό ούτε το κυτταροπλασματικό τμήμα. Τέλος η ενδιάμεση ισομορφή (39-41 kD) θεωρείται πως είναι προϊόν εναλλακτικού ματίσματος καθώς διαθέτει μόνο το κυτταροπλασματικό τμήμα και όχι το

διαμεμβρανικό (Tabayoyong & Zavazava, 2007). Τα sMHC-II έχουν επίσης εντοπιστεί σε διαφορετικές isoμορφές. Συγκεκριμένα στον ορό υγιών ατόμων έχουν βρεθεί sMHC-II μοριακού βάρους 60 kD (Jendro et al., 1991) αλλά σε μετέπειτα μελέτες εντοπίστηκαν τα ίδια μόρια σε δύο τμήματα μοριακού βάρους 28 και 43 kD (Aultman et al., 1999). Η προέλευση των sMHC-II θεωρείται παρόμοια με αυτή των sMHC-I καθώς υπάρχουν υποθέσεις για αποκοπή από τη μεμβράνη, εναλλακτικό μάτισμα ή απευθείας έκκριση ενώ έχει αποδειχθεί η έκκριση HLA-DR από τροφοβλάστες έπειτα από ενεργοποίηση με IFN- $\gamma$  (Athanasakis et al., 2000).

Σε υγιή άτομα τα sMHC ανιχνεύονται στον ορό καθώς και στα σωματικά υγρά (σάλιο, δάκρυα, ιδρώτας) (van Rood et al., 1970; Aultman et al., 1999). Οι συγκεντρώσεις τους ποικίλλουν ανάμεσα στα άτομα αλλά παραμένουν σταθερές ενώ στα σωματικά υγρά τα sMHC-II βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα από τα sMHC-I τα οποία είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμα (Aultman et al., 1999; Adamashvili et al., 2005).

Σε παθολογικές και κυρίως αυτοάνοσες καταστάσεις όμως παρατηρείται μεταβολή των συγκεντρώσεων των sMHC τόσο στον ορό όσο και στα σωματικά υγρά. Συγκεκριμένα τα sMHC-I αυξάνονται στον ορό ασθενών που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα, συστηματικό ερεθυματώδη λύκο και διαβήτη τύπου I (Tsuchiya et al., 1996; Adamashvili et al., 1997; Tabayoyong & Zavazava, 2007) καθώς και στον ορό ατόμων έπειτα από απόρριψη μοσχεύματος καρδιάς, ήπατος και νεφρού (Rhynes et al., 1993; Tabayoyong & Zavazava, 2007). Επιπλέον τα sMHC-I αυξάνονται στο σάλιο ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και συστηματικό ερεθυματώδη λύκο (Adamashvili et al., 2002) καθώς και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας (Wiendl et al., 2005). Όσον αφορά στα sMHC-II μόρια, αυξάνονται στον ορό και στο αρθρικό υγρό σε περιπτώσεις ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Stevenson et al., 1990; Verbruggen et al., 2000) καθώς και στο σάλιο και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε περιπτώσεις σκλήρυνσης κατά πλάκας (Adamashvili et al., 2005).

Το γεγονός ότι η συγκέντρωση των sMHC αυξάνεται σε όλες τις παραπάνω παθολογικές καταστάσεις σε συνδυασμό με τις αρχικές ενδείξεις για τη μεσολάβησή τους στη διατήρηση ανοχής σε περιπτώσεις μεταμοσχεύσεων οδήγησε στην υπόθεση πως τα μόρια αυτά έχουν ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες. Πράγματι έχει αποδειχθεί πως τα sMHC-II επάγουν την απόπτωση των CD4+ κυττάρων (Nag et al., 1996) ενώ τα sMHC-I ενεργοποιούν τα CD8+ κύτταρα (Ge et al., 2002) και ρυθμίζουν αρνητικά την κυτταροτοξικότητα των φυσικών φονιάδων (Webb et al., 1994).

Τα sMHC-II μόρια φαίνεται να συμμετέχουν ενεργά στη διατήρηση της ανοχής ως προς το αντιγόνο με το οποίο είναι φορτωμένα. Συγκεκριμένα σε πειράματα ανοχοποίησης σε ποντίκια όπου το αντιγόνο χορηγούνταν μέσω της τροφής, βρέθηκε πως η ανοχή που αναπτυσσόταν ως προς αυτό οφειλόταν σε κάποιες δομές του ορού των ζώων παρόμοιες με εξωσώματα που ονομάστηκαν tolerosomes. Τα tolerosomes αποδείχθηκε πως εξέφραζαν MHC-II μόρια τα οποία ήταν απαραίτητα για την επίτευξη της ανοχής όχι μόνο στα ποντίκια που χορηγήθηκε το αντιγόνο αλλά και σε συγγενετικά ποντίκια στα οποία ενέθησαν οι δομές αυτές (Ostman et al., 2005). Επιπλέον σε μετέπειτα έρευνα της ίδιας ερευνητικής ομάδας βρέθηκε πως τα



tolerosomes που χορηγούνταν σε συγγενετικά ποντίκια στα οποία είχε προκληθεί αντίδραση άσθματος οδηγούσαν σε μείωση της αλλεργικής αντίδρασης (Almqvist et al., 2008). Πιο πιθανός στόχος των sMHC-II μορίων φαίνεται να είναι τα CD4+ κύτταρα, ενώ έχει βρεθεί πως τα μόρια αυτά ανταγωνίζονται τα αντίστοιχα μεμβρανικά ως προς την πρόσδεση με τον TCR των CD4+ κυττάρων και έχουν κυρίως κατασταλτική δράση (Sardis et al., 2009). Υπήρξε επομένως η υπόθεση πως τα sMHC-II μόρια φορτωμένα με αντιγόνα στα οποία ο οργανισμός έχει ανοχή δεν επιτρέπουν στα αντίστοιχα μεμβρανικά να προσδεθούν στον TCR και να ξεκινήσουν την ανοσολογική απόκριση. Πράγματι πρόσφατη έρευνα του εργαστηρίου έδειξε πως τα sMHC-II μόρια προκαλούν καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης όταν επωάζονται σε καλλιέργεια με CD4+ κύτταρα. Τα μόρια αυτά μοριακού βάρους 60 kD απομονώθηκαν από ορό ποντικών ανοχοποιημένων ως προς την ανθρώπινη αλβουμίνη (human serum albumin, HSA) και με φασματοσκοπία μάζας επιβεβαιώθηκε πως στο μεγαλύτερο μέρος τους ήταν φορτωμένα με την HSA ή με κάποιο πεπτίδιο του εαυτού δίνοντας μια επιπλέον ένδειξη για τον κατασταλτικό τους χαρακτήρα (Bakela et al., 2014). Επιπλέον έχει δειχθεί ότι sMHC-II μόρια εκκρίνονται από CD4+ κύτταρα (Kyvelidou et al., 2009), ενώ πρόσφατα μη δημοσιευμένα αποτελέσματα έδειξαν πως παρόμοιο κατασταλτικό χαρακτήρα έχουν και τα sMHC-II μόρια απομονωμένα από υπερκείμενα CD4+CD25+ κυττάρων. Εκτός όμως από το φαινόμενο αυτό της καταστολής, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως τα CD4+CD25+ εκκρίνουν sMHC-II μοριακού βάρους επίσης 60 kD μία ιδιότητα που πιθανόν να συμβάλλει στον ανοσορρυθμιστικό τους χαρακτήρα.

#### 1.4 Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής

Λαμβάνοντας υπόψη αφ' ενός ότι τα Τ-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν sMHC-II μόρια και προσπαθώντας αφ' ετέρου να μειώσουμε και να εξειδικεύσουμε το αντιγονικό ρεπερτόριο που είναι φορτωμένο στα sMHC-II, σκοπός της παρούσης μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης διαλυτών τάξης-II μορίων εκκρινόμενων από CD4<sup>+</sup> κύτταρα στην παραγωγή αντιγονοειδικού αντισώματος έπειτα από ανοσοποίηση με το ίδιο αντιγόνο σε συγγενετικά ποντίκια BALB/c. Το αντιγόνο που επιλέχθηκε για την ανοσοποίηση των ποντικών είναι η HSA ενώ τα sMHC-II απομονώθηκαν από τα υπερκείμενα CD4<sup>+</sup> κυττάρων που προέρχονταν από φυσιολογικά ή από ανοχοποιημένα με HSA ποντίκια. Οι δύο αυτές κατηγορίες διαλυτών μορίων χορηγούνταν είτε *in vivo* σε ανοσοποιημένα BALB/c είτε *in vitro* σε καλλιέργεια συνολικών σπληνοκυττάρων που προέρχονταν από επίσης ανοσοποιημένα BALB/c ζώα. Σε κάθε περίπτωση γινόταν ανίχνευση του ειδικού ως προς την HSA αντισώματος ενώ τα σπληνοκύτταρα ελέγχονταν ως προς την έκφραση των επιφανειακών μαρτύρων CD28, CTLA-4, CD25 καθώς και ως προς τον πολλαπλασιασμό τους παρουσία sMHC-II έτσι ώστε να έχουμε μια καθολική εικόνα της επίδρασης των sMHC-II τόσο έπειτα από *in vivo* όσο και από *in vitro* χορήγησή τους.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 2.1 Χειρισμός πειραματόζωων

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν συγγενετικά αρσενικά ποντίκια BALB/c 2 έως 6 μηνών από το ζωοτροφείο του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τα ποντίκια αυτά εκτρέφονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία (18-25°C), υγρασία (-50%) και φωτοπερίοδο με 12 ώρες φως (από 6.30 π.μ. έως 18.30 μ.μ.) και 12 ώρες σκοτάδι.

Η συλλογή του αίματος των ποντικών γινόταν είτε με ολική αφαίμαξη είτε με μία τομή στην ουρά του ζώου. Σε κάθε περίπτωση το αίμα παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 30' και στην συνέχεια για 30' στους 4° C. Ο ορός συλλέγονταν μετά από φυγοκέντριση για 3' στις 3000 rpm και φυλασσόταν στους -20° C.

Για τη συλλογή της σπλήνας χρησιμοποιούνταν αποστειρωμένα εργαλεία καθώς και θρεπτικό μέσο HBSS για τη μεταφορά της. Στη συνέχεια σε ένα τρυβλίο petri και με τη βοήθεια μιας βελόνας ινσουλίνης συλλέγονταν τα σπληνοκύτταρα τα οποία και καλλιεργούνταν σε θρεπτικό μέσο RPMI 10% FBS.

#### 2.1.1 *In vivo* ανοχοποίηση και ανοσοποίηση

Τόσο στη διαδικασία της ανοχοποίησης όσο και της ανοσοποίησης των ζώων η πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο ήταν η ανθρώπινη αλβουμίνη (Human Serum Albumin, HSA, Sigma) ενώ όλες οι ενέσεις γίνονταν ενδοπεριτοναϊκά.

Για την ανοχοποίηση των ζώων χορηγούνταν 100 μg HSA απουσία ανοσοενισχυτικού και 6 μέρες αργότερα τα ζώα θανατώνονταν για τη συλλογή των σπληνοκυττάρων.

Για την ανοσοποίηση των ζώων 3 μέρες πριν την πρώτη χορήγηση του αντιγόνου χορηγούνταν 0,5 mg κυκλοφωσφαμιδίου/ποντίκι έτσι ώστε να μεγιστοποιήσουμε την ανοσοαπόκριση δεδομένου πως η ένωση αυτή έχει δείχθει να μπλοκάρει τη δράση των T ρυθμιστικών κυττάρων (Zhao et al., 2010). Η πρώτη χορήγηση του αντιγόνου, τη μέρα 0, περιείχε 100 μg HSA σε αναλογία 1:1 με πλήρες ανοσοενισχυτικό (Freund complete adjuvant, FCA, Sigma) ενώ η δεύτερη χορήγηση, την 7<sup>η</sup> μέρα, περιείχε 100 μg HSA σε αναλογία 1:1 με μη πλήρες ανοσοενισχυτικό (Freund incomplete adjuvant, FIA, Sigma).

#### 2.1.2 *In vivo* και *in vitro* χορήγηση sMHC-II

Στα *in vivo* πειράματα τα sMHC-II χορηγούνταν σε ανοσοποιημένα BALB/c ζώα τη 14<sup>η</sup> μέρα της ανοσοποίησης σε συγκέντρωση 1,2 μg/ένεση. Πραγματοποιούνταν τρεις αιμοληψίες: τη 14<sup>η</sup>, 15<sup>η</sup> και 17<sup>η</sup> μέρα.

Στα *in vitro* πειράματα τα sMHC-II χορηγούνταν σε ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα που συλλέγονταν τη 14<sup>η</sup> μέρα της ανοσοποίησης, σε συγκέντρωση 30ng/ml, και παρέμεναν στην καλλιέργεια για 48h.

## 2.2 Εξωτερικός ανοσοφθορισμός

Η μέθοδος του εξωτερικού ανοσοφθορισμού χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών στο εξωτερικό του κυττάρου με τη βοήθεια κατάλληλων αντισωμάτων.

### Υλικά

- PBS 1X, pH 7,2-7,4
- Blocking buffer: PBS-BSA 3%
- Ab solution: PBS-BSA 1%
- 96 v-bottom plate
- Αντισώματα ειδικά για τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν
  - α-mouse CD4 FITC conjugated (rat IgG2b, immunotools)
  - α-mouse CD28 PE conjugated (Armenian hamster IgG, biolegend)
  - α-mouse CD152 (CTLA-4) PE conjugated (Syrian hamster IgG, biolegend)
  - α-mouse CD25 PE conjugated (rat IgG1, eurobiosciences)
  - α-mouse CD19 FITC conjugated (rat IgG2a, immunotools)

Όλα τα παραπάνω αντισώματα χρησιμοποιούνταν σε αραίωση 1/100 (1μg/ml) σε PBS-BSA 1%

### Πειραματική Διαδικασία

1. Χωρίζουμε τον κυτταρικό πληθυσμό (συνήθως σε v-bottom plate) και πλένουμε 2X με PBS 1X 200μl/well. Σε κάθε πλύσιμο μεσολαβεί φυγοκέντριση στις 1800rpm για 3'.
2. Επιάζουμε με το blocking buffer για 30' σε RT. Τελικός όγκος 200μl/well.
3. Πλένουμε 2X με PBS 1X 200μl/well.
4. Επιάζουμε με το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα (συνήθως 1/100) σε PBS-BSA 1% σε για 45'. Τελικός όγκος 100 μl/well.
5. Πλένουμε 2X με PBS 1X 200μl/well.
6. Επιάζουμε με το 2<sup>ο</sup> αντίσωμα-φθορίζον (συνήθως 1/500) σε PBS-BSA 1% για 30'. Τελικός όγκος 100μl/well. Αυτό το βήμα δεν είναι απαραίτητο αν τα αντισώματα είναι conjugated με την φθορίζουσα ουσία.
7. Πλένουμε 2X με PBS 1X 200μl/well.

## 2.3 Απομόνωση CD4+ κυττάρων από συνολικά σπληνοκύτταρα

Η διαδικασία της απομόνωσης CD4+ κυττάρων περιλαμβάνει τη μέθοδο του εξωτερικού ανοσοφθορισμού που προαναφέρθηκε ενώ στη συνέχεια με τη βοήθεια του FACScan sorter μπορούμε να συλλέξουμε τον πληθυσμό που επιθυμούμε, στη συγκεκριμένη περίπτωση τα CD4+ κύτταρα.

## Υλικά

- Θρεπτικά μέσα RPMI (10% FBS) και HBSS
- Lysing RC: Ammonium chloride 0,83g, Sodium hydrogen Carbonate 0,1g EDTA 0,032g, dH<sub>2</sub>O 100ml, pH 7,4
- PBS 1X, pH 7,2- 7,4
- Blocking buffer: PBS-BSA 3%
- Antibody solution: PBS-BSA 1%
- Αντίσωμα α-mouse CD4 FITC conjugated, αραιώση 1/100 σε PBS-BSA 1%

## Πειραματική Διαδικασία

Όλη η διαδικασία γίνεται σε στείρες συνθήκες ενώ σε κάθε πλύσιμο γίνεται φυγοκέντριση στις 1200 rpm για 6 λεπτά.

1. Συλλέγουμε τα σπληνοκύτταρα με την βοήθεια μίας βελόνας ινσουλίνης και μαζεύουμε σε θρεπτικό μέσο RPMI 10% FBS.
2. Στρώνουμε σε τρυβλίο petri και επωάζουμε στους 37 ° C για 14-18 ώρες έτσι ώστε να προσκολληθούν τα μακροφάγα στο πλαστικό.
3. Συλλέγουμε το υπερκείμενο και φυγοκεντρούμε.
4. Επαναδιαλυτοποιούμε σε 1ml/σπλήνα Lysing RC έτσι ώστε να απομακρύνουμε τα ερυθροκύτταρα.
5. Πλένουμε 2X με PBS 1X 1ml.
6. Επωάζουμε με το blocking buffer PBS-BSA 3% (400μl/σπλήνα) για 30' σε RT.
7. Πλένουμε 2X με PBS 1X 1ml.
8. Επωάζουμε με το α-mouse CD4 FITC conjugated (200 μl/σπλήνα) για 45' σε RT. Παράλληλα κρατάμε και ένα άβαφο δείγμα (unstained).
9. Πλένουμε 2X με PBS 1X 1ml/δείγμα.
10. Επαναδιαλυτοποιούμε κάθε δείγμα σε 1ml PBS 1X.
11. Φιλτράρουμε κάθε δείγμα πριν από την μέτρηση στο FACScan sorter.
12. Ρυθμίζουμε τις παραμέτρους του FACScan sorter με το unstained δείγμα.
13. Συλλέγουμε τον διαχωρισμένο πληθυσμό σε θρεπτικό μέσο RPMI 10% FBS.
14. Φυγοκεντρούμε στις 1200 rpm για 6'.
15. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε RPMI (10% FBS) συνήθως 10<sup>6</sup> κύτταρα/ ml, και επωάζουμε στους 37 ° C.

### **2.3.1 FACScan sorter**

Η αρχή λειτουργίας του FACScan sorter είναι ίδια με αυτή του απλού κυτταρομετρητή ροής (FACScan) με τη βασική διαφορά πως με το cell sorting μας δίνεται η δυνατότητα να συλλέξουμε τον πληθυσμό που επιθυμούμε.

Συγκεκριμένα μια δέσμη laser χτυπάει κάθε κύτταρο ξεχωριστά δίνοντας στοιχεία τόσο για την ένταση φθορισμού όσο και για την μορφολογία του. Τα

κύτταρα που θα επεξεργαστούν από τον κυτταρομετρητή ροής ρέουν με τη μορφή υγρού σε ειδικό κανάλι όπου υδροδυναμικά η ροή στενεύει σε διάμετρο αναγκάζοντας έτσι τα κύτταρα να διέλθουν ένα-ένα από οπή πριν συναντήσουν τη δέσμη laser. Κάθε κύτταρο δέχεται τότε ακτινοβολία, ένα μέρος της οποίας απορροφάται ενώ το υπόλοιπο σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο και ανιχνεύεται υπό διαφορετικές γωνίες από φωτοανιχνευτές. Όταν η ανίχνευση του σκεδαζόμενου φωτός γίνεται υπό γωνία 20 έως 28° έχουμε τη μέτρηση του προσθίως σκεδαζόμενου φωτός (Forward Light Scatter, FSC) η οποία μας πληροφορεί για το μέγεθος του κυττάρου. Όταν η ανίχνευση γίνεται υπό γωνία 90° τότε έχουμε τη μέτρηση του πλαγίως σκεδαζόμενου φωτός (Side Scatter SSC) η οποία μας πληροφορεί για την κοκκιότητα του κυττάρου.

Εκτός από τη σκέδαση του φωτός στην κυτταρομετρία ροής μελετάται και αναλύεται ο φθορισμός ο οποίος βασίζεται στις φθορίζουσες ουσίες με τις οποίες έχουμε σημάνει τα κύτταρα μας (FITC και PE). Οι ουσίες αυτές εκπέμπουν ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος από αυτή που δέχονται, η οποία ανιχνεύεται από τα κανάλια FL-1 και FL-2. Το FL-1 κανάλι ανιχνεύει ακτινοβολία με μήκος κύματος που αντιστοιχεί στο πράσινο χρώμα (FITC) ενώ το FL-2 κανάλι ανιχνεύει ακτινοβολία με μήκος κύματος που αντιστοιχεί στο κόκκινο χρώμα (PE).

Το επιπλέον βήμα που παρέχει το FACScan sorter είναι όπως προαναφέρθηκε η συλλογή του κυτταρικού πληθυσμού που επιθυμούμε. Για τον διαχωρισμό των κυττάρων σε υποπληθυσμούς, το κάθε κύτταρο αφού διέλθει από την δέσμη φωτός φορτίζεται και τελικά διέρχεται από μαγνητικό πεδίο όπου γίνεται η διαλογή και συλλογή σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο.

## 2.4 Ανοσοκατακρήμνιση

Η ανοσοκατακρήμνιση είναι μέθοδος που χρησιμοποιείται για απομόνωση πρωτεϊνών από ορούς, υπερκείμενα ή εκχυλίσματα και βασίζεται στην ειδικότητα αντισωμάτων για διάφορα αντιγόνα (επιτόπους πρωτεϊνών).

### 2.4.1 Ακινητοποίηση αντισώματος στα σφαιρίδια

#### Υλικά

- Υπερπαραμαγνητικά σφαιρίδια (DynaL Biotech)-διαμέτρου M-280, α-IgG
- Αποστειρωμένο PBS 1X, pH 7,2-7,4
- 3-φαινολαμίνη 0,2M σε dH<sub>2</sub>O , pH 8,2
- Διάλυμα DMP/3-φαινολαμίνης (0,2M) 20Mm, pH 8,2
- Tris buffer 50mM σε dH<sub>2</sub>O , pH 7,5
- Αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει  
- α-mouse N22 (δεσμεύει MHC-II μόρια)

## Πειραματική διαδικασία

Όλη η διαδικασία γίνεται σε στείρες συνθήκες

1. Ξεπλένουμε  $10^8$  beads 2X με αποστειρωμένο PBS 1X 2ml χρησιμοποιώντας μαγνήτη. Χρησιμοποιούμε tube 5ml.
2. Προσθέτουμε το επιθυμητό αντίσωμα (ειδικό για την πρωτεΐνη που θέλουμε να απομονώσουμε) σε ποσότητα για τα παραπάνω beads 250μg. Συμπληρώνουμε με  $dH_2O$  για τελικό όγκο 1ml. Επωάζουμε για 1h στους  $4^\circ C$  με ήπια ανάδευση.
3. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και πλένουμε 2X με αποστειρωμένο PBS 1X.
4. Προσθέτουμε 1ml 3-φαινολαμίνης και επαναλαμβάνουμε 2 φορές ακόμα. Η φαινολαμίνη δημιουργεί τους ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των 2 αντισωμάτων.
5. Επαναδιαλυτοποιούμε σε διάλυμα DMP/3-φαινολαμίνης 1ml και επωάζουμε για 30' σε RT με ήπια ανάδευση.
6. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και σταματάμε την αντίδραση με διάλυμα Tris 1ml. Επωάζουμε για 15' σε RT με ήπια ανάδευση.
7. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και πλένουμε 2X με διάλυμα PBS 1X-BSA 0,1%.
8. Διατηρούμε στους  $4^\circ C$  σε PBS 1X 1ml.

### **2.4.2 Απομόνωση sMHC-II από υπερκείμενα CD4+ κυττάρων**

#### Υλικά

- Μαγνητικά σφαιρίδια συνδεδεμένα με ειδικό για την πρωτεΐνη Ab (N22)
- Washing buffer: PBS 1X, pH 7,2-7,4
- NaCl 2M

#### Διαδικασία

1. Πλένουμε 2X τα σφαιρίδια με 2ml PBS 1X για 10' με ήπια ανάδευση, χρησιμοποιώντας μαγνήτη.
2. Προσθέτουμε 600 μl από τα υπερκείμενα στα σφαιρίδια και επωάζουμε για 2h στους  $4^\circ C$  με ήπια ανάδευση.
3. Χρησιμοποιώντας μαγνήτη, συλλέγουμε το υπερκείμενο για επόμενη χρήση.
4. Πλένουμε 2X τα σφαιρίδια με 2 ml PBS 1X, χρησιμοποιώντας μαγνήτη, για να απομακρυνθούν τα μη ειδικά προσδεμένα μόρια.
5. Για την έκλυση της πρωτεΐνης μας προσθέτουμε 1ml NaCl 2M και επωάζουμε για 20' σε RT με ήπια ανάδευση.
6. Χρησιμοποιώντας μαγνήτη συλλέγουμε το υπερκείμενο (πρωτεΐνη) και φυλάσσουμε στους  $4^\circ C$ .
7. Πλένουμε 2X τα σφαιρίδια με PBS 1X και τα διατηρούμε στους  $4^\circ C$  σε PBS 1X

Για την συμπύκνωση της πρωτεΐνης, τοποθετούμε το δείγμα μας σε κολόνα MILLIPORE φίλτρου 1:10.000 Dalton . Φυγοκεντρούμε στις 3.300 rpm για 15'

στους 4°C Επαναλαμβάνουμε όσες φορές χρειαστεί μέχρι να φτάσουμε στον επιθυμητό όγκο.

## 2.5 Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσροφητική Δοκιμή (ELISA)

Η ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική δοκιμή (ELISA) είναι μία αρκετά ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών σε διαλύματα μέσω αντισωμάτων. Υπάρχουν 3 είδη της ELISA μεθόδου. Εδώ αναφέρεται η indirect ELISA.

### Υλικά

- Coating buffer: 0.05M NaHCO<sub>3</sub>, 0.05, pH 9,6
- Washing buffer: PBS 1X -tween 20%, 0.05%
- Blocking buffer: PBS 1X-BSA 2%
- Ab buffer: PBS 1X-BSA 0.1%
- Υπόστρωμα-χρωμογόνο: TMB substrate-Peroxidase solution H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M
- 96-flat bottom plate

### Διαδικασία

1. Στρώνουμε τα δείγματα στην plate σε αντίστοιχη αραιώση (π.χ ορός σε 1/1000) σε coating buffer και όσες επαναλήψεις επιθυμούμε. Τελικός όγκος 100μl/well. Επωάζουμε στους 4°C για 14-18h.
2. Πλένουμε 3X με το washing buffer. 200 μl/well.
3. Στρώνουμε το blocking buffer, 200μl/well για να παρεμποδίσουμε την μη-ειδική σύνδεση των πρωτεϊνών στα αντισώματα. Επωάζουμε σε RT για 2h.
4. Πλένουμε 3X με το washing buffer. 200 μl/well.
5. Στρώνουμε το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα (το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει) σε κατάλληλη αραιώση (συνήθως 1/1000) σε Ab buffer. Τελικός όγκος 100 μl/well. Επωάζουμε σε RT για 1,5h.
6. Πλένουμε 3X με το washing buffer. 200 μl/well.
7. Στρώνουμε το 2<sup>ο</sup> αντίσωμα (a-IgG peroxidase) σε κατάλληλη αραιώση (συνήθως 1/5000) σε Ab buffer. Τελικός όγκος 100 μl/well. Επωάζουμε σε RT για 1h στο σκοτάδι.
8. Πλένουμε 3X με το washing buffer. 200 μl/well.
9. Προσθέτουμε το διάλυμα χρωμογόνου-υποστρώματος σε αραιώση 1:1. Τελικός όγκος 100μl/well. Περιμένουμε μέχρις ότου τα πηγαδάκια εμφανίσουν το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα της αντίδρασης.
10. Ολοκληρώνουμε την αντίδραση με H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Τελικός όγκος 50 μl/well.
11. Μετράμε σε ELISA reader στα 450nm.

Στα πειράματα εφαρμόστηκε και μία παραλλαγή του πρωτοκόλλου της ELISA όπου στην plate στρώναμε αρχικά την HSA διαλυμένη 1/1000 σε coating buffer με τελική συγκέντρωση 100 ng/100 μl σε κάθε πηγάδι. Σαν πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιούνταν είτε



οι οροί των ζώων σε αραιώση 1/1000 σε Ab buffer είτε τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών σε αναλογία 1:1 με Ab buffer. Σαν δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιούταν α-mouse IgG peroxidase. Και στις δύο περιπτώσεις σκοπός ήταν η ανίχνευση ειδικού αντι-HSA αντισώματος εκκρινόμενου στους ορούς ή στα υπερκείμενα αντίστοιχα.

## 2.6 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση ακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης που βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ηλεκτρικά πεδία, προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για να διαχωριστούν πρωτεΐνες καθώς και να πιστοποιηθούν με βάση το μοριακό τους βάρος. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε ένα δείγμα που υπόκειται σε ηλεκτροφόρηση, κινούνται ανάμεσα στους πόρους του πηκτώματος ανάλογα με το μέγεθος τους. Οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται εδώ είναι αποδιατακτικές για να μην διατηρούνται τυχόν σύμπλοκα.

### Υλικά

- **5X loading buffer:** 0.0625M Tris, 5% β-mercaptethanol, 2% SDS, 20% Glycerol, 0,1% Bromophenol blue
- **1X running buffer:** 0.025M Tris, 0,192M Glycine, 0,1% w/v SDS
- **Running gel 12%**
  - 3,35 ml dH<sub>2</sub>O
  - 4 ml Acrylamide (Acrylamide/0,8 Bisacrylamide)
  - 100 μl SDS (10% SDS σε dH<sub>2</sub>O)
  - 50 μl APS (10% APS σε dH<sub>2</sub>O)
  - 2,5 ml Tris (1,5M Tris-HCl, pH 8,8)
  - 10 μl TEMED
- **Stacking gel 4%**
  - 3 ml dH<sub>2</sub>O
  - 650 μl Acrylamide (Acrylamide/0,8 Bisacrylamide)
  - 50 μl SDS (10% SDS σε dH<sub>2</sub>O)
  - 25 μl APS (10% APS σε dH<sub>2</sub>O)
  - 1,25 ml Tris (0,5M Tris-HCl, pH 6)
  - 10 μl TEMED

### Πειραματική διαδικασία

1. Τοποθετούμε στην συσκευή το gel ανάλυσης (running gel) και καλύπτουμε με αιθανόλη για να προκύψει ενιαίο το gel. Στην συνέχεια προσθέτουμε το gel πακεταρίσματος (stacking gel) και βάζουμε το ειδικό χτενάκι για να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια για τα δείγματα.
2. Ετοιμάζουμε τα δείγματα στον επιθυμητό όγκο και προσθέτουμε αντίστοιχη ποσότητα 5X loading buffer (ώστε να αποτελεί το 1/5 του συνολικού όγκου). Τα βράζουμε στους 95° C για 5' ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες.

3. Φορτώνουμε τα δείγματα στα πηγαδάκια μαζί με κατάλληλο marker και πραγματοποιούμε την ηλεκτροφόρηση σε τάση 120 V.
4. Μετά το τέλος της διαδικασίας προχωρούμε σε χρώση του running gel.

## 2.7 Χρώση αργύρου (Silver staining)

### Υλικά

- Methanol
- 5%, 1% CH<sub>3</sub>COOH
- Sodium Trisulfate (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>•5H<sub>2</sub>O) 0,02%
- AgNO<sub>3</sub> 0,1%
- Διάλυμα εμφάνισης (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, 0,04% φορμαλδεΐδη)  
(όλα τα διαλύματα γίνονται τελικό όγκο 50ml)

### Διαδικασία

1. Φιξάρουμε το gel σε 50% methanol, 5% CH<sub>3</sub>COOH για τουλάχιστον 20' με ανάδευση.
2. Ξεπλένουμε με 50% methanol για 10' με ανάδευση.
3. Ενυδατώνουμε με H<sub>2</sub>O 2x για 10' με ανάδευση.
4. Ευαισθητοποιούμε το gel σε Sodium Trisulfate για 1' με ανάδευση.
5. Ξεπλένουμε με H<sub>2</sub>O 2x για 1' με ανάδευση.
6. Βάφουμε με AgNO<sub>3</sub> (pre-chilled) για 20' στους 4° C με ανάδευση.
7. Ξεπλένουμε με H<sub>2</sub>O 2x για 1' με ανάδευση.
8. Εμφανίζουμε με το διάλυμα εμφάνισης με ανάδευση.
9. Σταματάμε την διαδικασία με 5% CH<sub>3</sub>COOH.
10. Διατηρούμε σε 1% CH<sub>3</sub>COOH.

## 2.8 Μέθοδος Lowry

Η μέθοδος Lowry χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα.

### Υλικά

- TCA 20%
- A reagent: 2gr NaOH, 10gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1gr Na-K-tartrate (V=500ml)
- B reagent: 0,5gr CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O
- C reagent: 10ml A, 0,2ml B
- D reagent: 1,5ml Follin-Ciocalteau 2N + 1,5ml H<sub>2</sub>O

### Πειραματική Διαδικασία

1. Σε 10μl δείγματος προσθέτουμε 10μl TCA 20%. (2 επαναλήψεις/δείγμα).
2. Επωάζουμε για 30' στους 4 °C.
3. Φυγοκεντρούμε στις 12.000 rpm στους 4 °C για 10'.
4. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 100μl A και 1ml C reagent.
5. Επωάζουμε για 10' στους 4 °C.
6. Προσθέτουμε 100μl D reagent στα δείγματα.
7. Επωάζουμε σε RT για 30'.
8. Φωτομετρούμε στα 625nm.
9. Η συγκέντρωση του δείγματος υπολογίζεται με τον τύπο:  $OD \times 8 = \text{mg/ml}$   
Το "τυφλό" δείγμα ξεκινά από το βήμα 4.

### **2.9 Έλεγχος πολλαπλασιασμού κυττάρων με ραδιενεργή θυμιδίνη**

Η μέθοδος αυτή μας επιτρέπει να ελέγχουμε τον πολλαπλασιασμό σε έναν κυτταρικό πληθυσμό μετρώντας την ραδιενεργή θυμιδίνη που θα προσλάβουν τα κύτταρα κατά την διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης τους.

#### Υλικά

- Θρεπτικά μέσα HBSS και RPMI (10% FBS)
- Lysing RC, pH 7,4
- 96-V bottom plate sterile
- Ραδιενεργή θυμιδίνη ( $^3\text{H}$ ) TdR (INC, 35Ci/mmol, 1mCi/ml)
- Φίλτρα κυτταρίνης (Scatron filter MAT)
- Συλλέκτης κυττάρων Tirectek Cell Harvester, Flow Laboratories
- Σπινθηριστικό υγρό (τολουένιο Chromasol Sigma-Aldrich)
- Μετρητής β-ακτινοβολίας LSI701 Beckman UK.

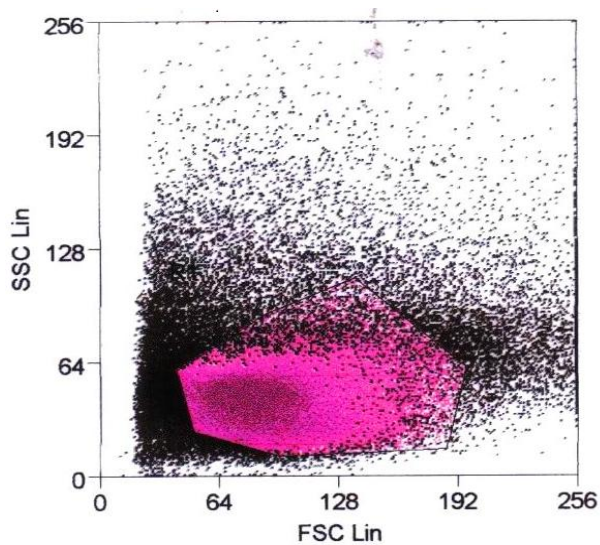
#### Διαδικασία

1. Συλλέγουμε τα σπληνοκύτταρα από τον σπλήνα.
2. Επαναδιαλυτοποιούμε σε 1ml/σπλήνα Lysing RC.
3. Πλένουμε 2X με RPMI. Ανάμεσα η φυγοκέντρωση γίνεται στις 1200rpm, στους 4° C για 6'. Μετράμε τα κύτταρα.
4. Ετοιμάζουμε και στρώνουμε σε τριπλέτες τα δείγματα και τα control. Τελικός όγκος 200μl/well και  $10^6$  κύτταρα/ml.
5. Επωάζουμε σε επωαστήρα για 48h στους 37° C.
6. Με το πέρας των 48h προσθέτουμε 1μCi ραδιενεργής θυμιδίνης σε κάθε πηγαδάκι και τοποθετούμε στον επωαστήρα για άλλες 18 ώρες.
7. Μεταφέρουμε τα κύτταρα στα φίλτρα με την χρήση του συλλέκτη κυττάρων και τα τοποθετούμε σε δοχεία που περιέχουν 2ml σπινθηριστικό υγρό. Οι κρούσεις καταγράφονται στον μετρητή β-ακτινοβολίας.

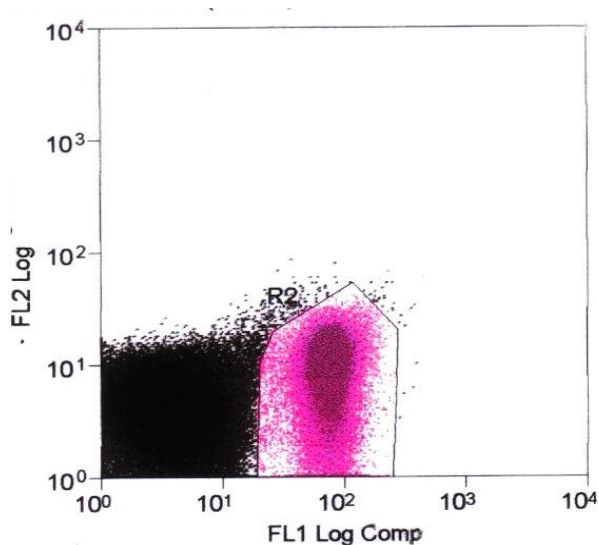
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Απομόνωση CD4+ κυττάρων

Για την απομόνωση των CD4+ κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα α-mouse CD4 FITC conjugated και ο διαχωρισμένος αυτός πληθυσμός συλλέχθηκε μέσω του FACScan sorter. (Διάγραμμα 3.1.1 και 3.1.2).



Διάγραμμα 3.1.1: density plot όπου απεικονίζονται τα λεμφοκύτταρα (ροζ χρώμα) σε συνολικό πληθυσμό σπληνοκυττάρων (μαύρο χρώμα).



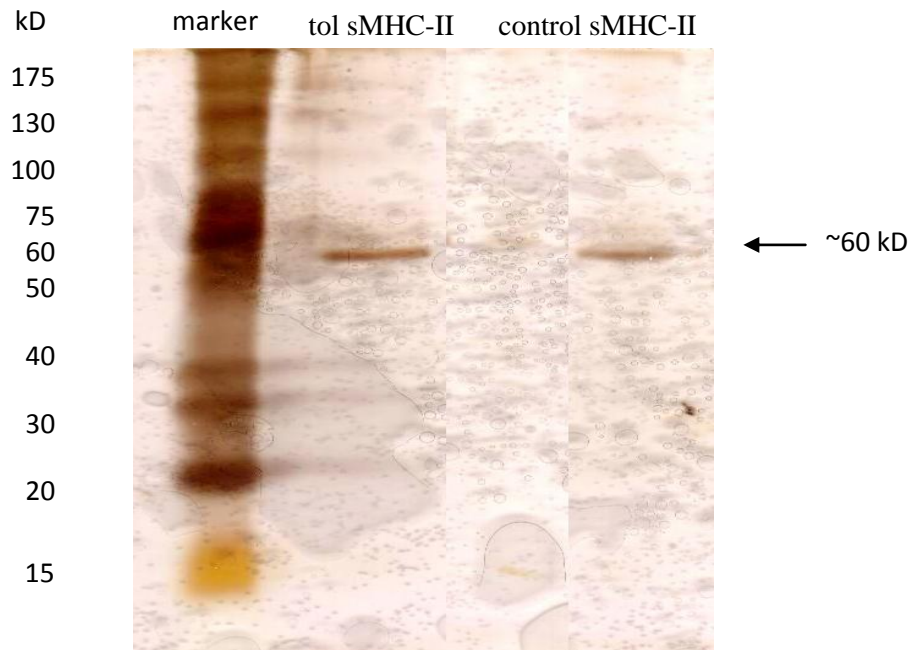
Διάγραμμα 3.1.2: density plot όπου απεικονίζονται τα CD4+ κύτταρα (ροζ χρώμα) σε συνολικό πληθυσμό σπληνοκυττάρων (μαύρο χρώμα).

Τα CD4+ κύτταρα προέρχονταν είτε από control ποντίκια είτε από ποντίκια έπειτα από δήμερη ανοχοποίηση με HSA. Σε κάθε περίπτωση τα κύτταρα αυτά αποτελούσαν το 18-20% των συνολικών σπληνοκυττάρων (πλην μακροφάγων).

#### 3.2 Απομόνωση και ταυτοποίηση sMHC-II μορίων από τα υπερκείμενα CD4+ κυττάρων

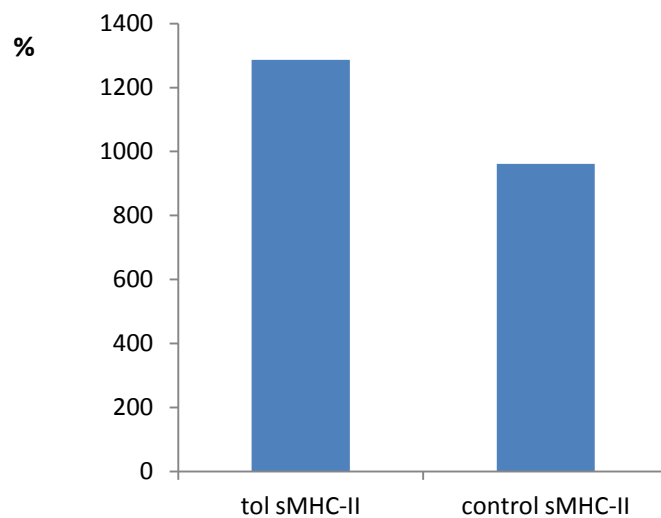
Τα διαχωρισμένα CD4+ κύτταρα παρέμεναν σε καλλιέργεια για 48h. Στη συνέχεια συλλέγονταν τα υπερκείμενα από τα οποία γινόταν η απομόνωση των sMHC-II μορίων με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων. Η ταυτοποίησή τους γινόταν με τη μέθοδο ELISA καθώς και με ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης όπου διακρινόταν μία ζώνη 60kD ενώ η συγκέντρωσή τους προσδιοριζόταν με τη μέθοδο Lowry. Έχουμε επομένως δύο κατηγορίες sMHC-II μορίων, εκείνα που προέρχονται από CD4+ φυσιολογικών ποντικών (control sMHC-II) και εκείνα που προέρχονται

από CD4+ ποντικών ύστερα από δήμερη ανοχοποίηση (tolerance) με HSA (tol sMHC-II) (Εικ. 3.2.1).



Εικόνα 3.2.1: SDS PAGE, τα απομονωμένα sMHC-II εντοπίζονται ως μία ζώνη ~60kD

Η συγκέντρωση των μορίων με βάση τη μέθοδο Lowry προσδιορίστηκε στα 2mg/ml για τα tol sMHC-II και στα 185μg/ml για τα control sMHC-II. Με βάση τις παραπάνω συγκεντρώσεις έγινε επιπλέον ταυτοποίηση των μορίων με τη μέθοδο ELISA όπου φορτώθηκαν 20 μg και 1,85 μg από τα δείγματα αντίστοιχα. (Διάγραμμα 3.2.1).



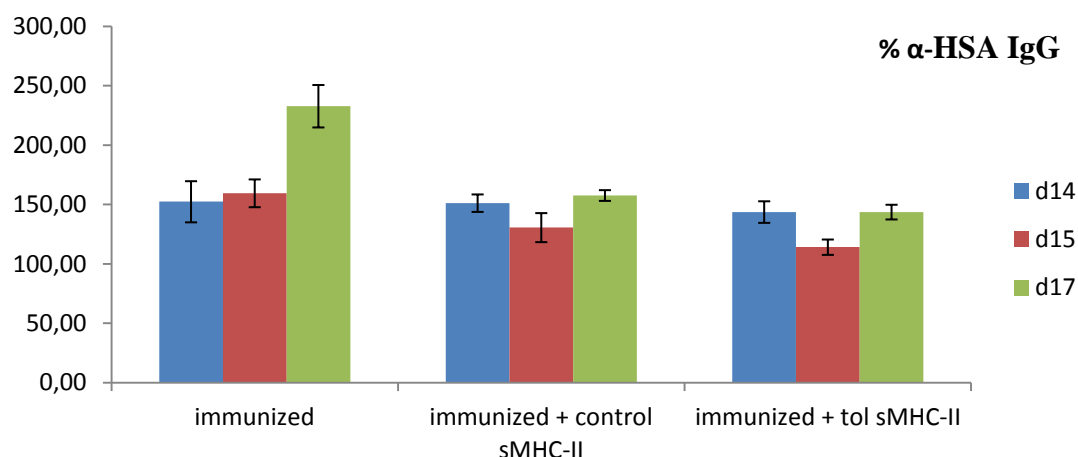
Διάγραμμα 3.2.1: ELISA, ταυτοποίηση των sMHC-II σε δείγματα πρωτεΐνης. Απεικονίζεται η ποσοστιαία αύξηση σε σχέση με το coating buffer.

### 3.3 *in vivo* χορήγηση sMHC-II σε ανοσοποιημένα BALB/c

Τα απομονωμένα sMHC-II χορηγούνταν ενδοπεριτοναϊκά σε συγκέντρωση 1,2μg/ένεση σε ανοσοποιημένα με HSA BALB/c τη 14<sup>η</sup> μέρα της ανοσοποίησης. Πραγματοποιούνταν 3 αιμοληψίες: πριν τη χορήγηση των sMHC-II (14<sup>η</sup> μέρα), την επόμενη μέρα από τη χορήγηση (15<sup>η</sup> μέρα) και 3 μέρες μετά τη χορήγηση (17<sup>η</sup> μέρα). Τη 17<sup>η</sup> μέρα τα ποντίκια θανατώνονταν και τα σπληνοκύτταρα ελέγχονταν για έκφραση των επιφανειακών μαρτύρων CD28, CTLA-4 και CD25 έπειτα από overnight επώαση για απομάκρυνση των μακροφάγων.

#### 3.3.1 Επίδραση των sMHC-II μορίων στην παραγωγή αντι-HSA αντισώματος

Οι οροί από τις 3 διαφορετικές αιμοληψίες χρησιμοποιήθηκαν ως αντίσωμα σε HSA υπόστρωμα έτσι ώστε να γίνει ανίχνευση των επιπέδων του αντι- HSA αντισώματος που περιείχαν με τη μέθοδο ELISA.



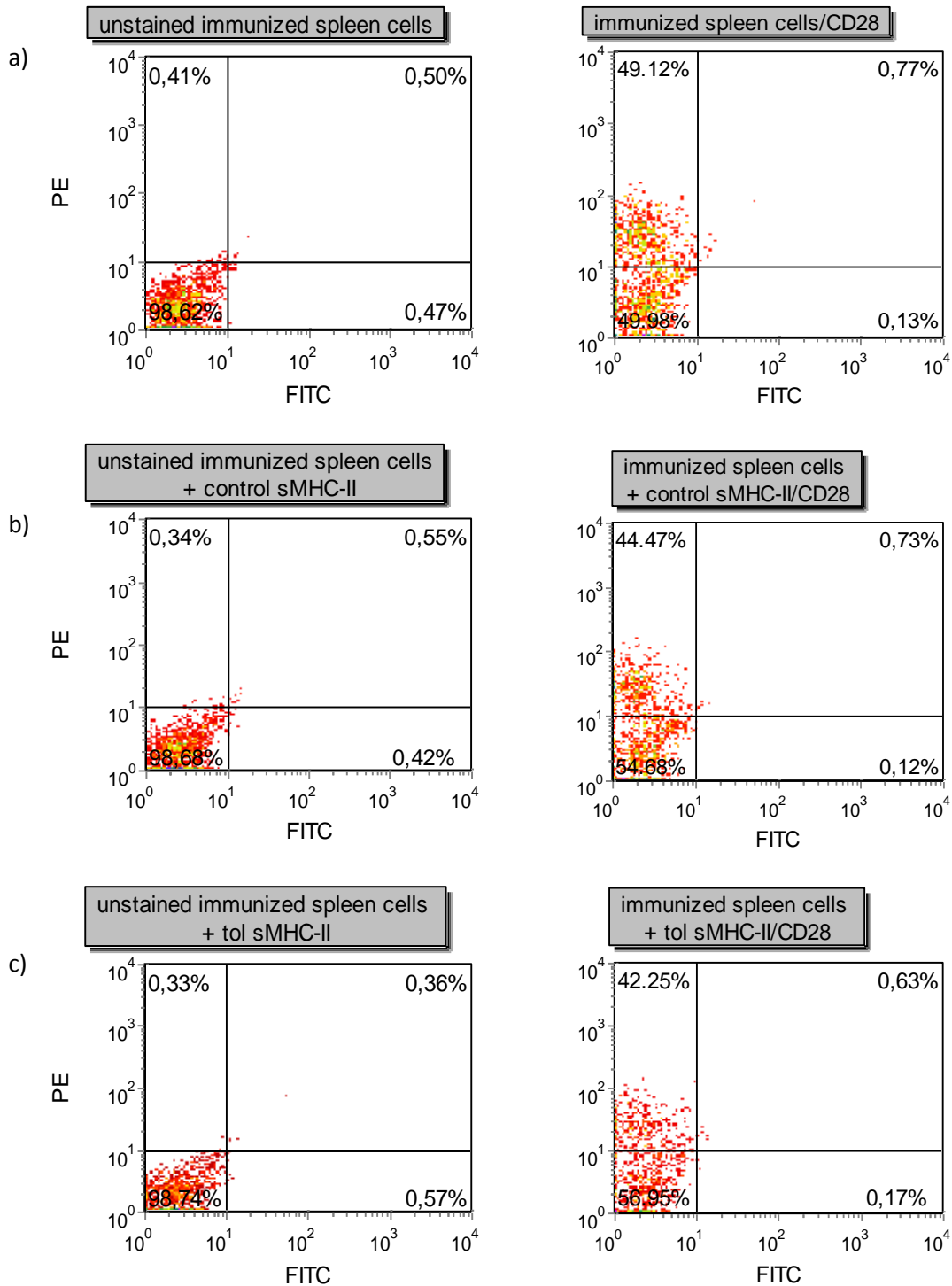
**Διάγραμμα 3.3.1.1:** ELISA, έλεγχος της ποσότητας του α-HSA αντισώματος στον ορό ανοσοποιημένων ζώων, ανοσοποιημένων ζώων με control sMHC-II και ανοσοποιημένων ζώων με tol sMHC-II σε 3 διαφορετικές αιμοληψίες. Απεικονίζεται η ποσοστιαία αύξηση σε σχέση με το coating buffer. Οι μπάρες εκφράζουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενώ τη 14<sup>η</sup> μέρα η ποσότητα του α- HSA αντισώματος είναι σχεδόν η ίδια και στις 3 κατηγορίες, υπάρχουν σημαντικές διαφορές τη 15<sup>η</sup> και κυρίως την 17<sup>η</sup> μέρα. Τη 15<sup>η</sup> μέρα, δηλαδή μία μέρα μετά τη χορήγηση των sMHC-II παρατηρείται μείωση της ποσότητας του αντισώματος σε σχέση με τη 14<sup>η</sup> μέρα κατά 13,6% στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκαν control sMHC-II και κατά 20,5% στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκαν tol sMHC-II. Αντίθετα στα ποντίκια που δεν χορηγήθηκαν sMHC-II η ποσότητα του αντισώματος παρέμεινε σταθερή. Τη 17<sup>η</sup> μέρα, 3 μέρες δηλαδή μετά τη χορήγηση, η ποσότητα του αντισώματος επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα και στις 2 κατηγορίες ποντικίων που δέχθηκαν sMHC-II ενώ στα ποντίκια της 1<sup>ης</sup> κατηγορίας υπήρξε αύξηση του αντισώματος κατά 52,8% σε σχέση με την 14<sup>η</sup> μέρα (Διάγραμμα 3.3.1.1).

### 3.3.2 Επίδραση των sMHC-II μορίων στα σπληνοκύτταρα

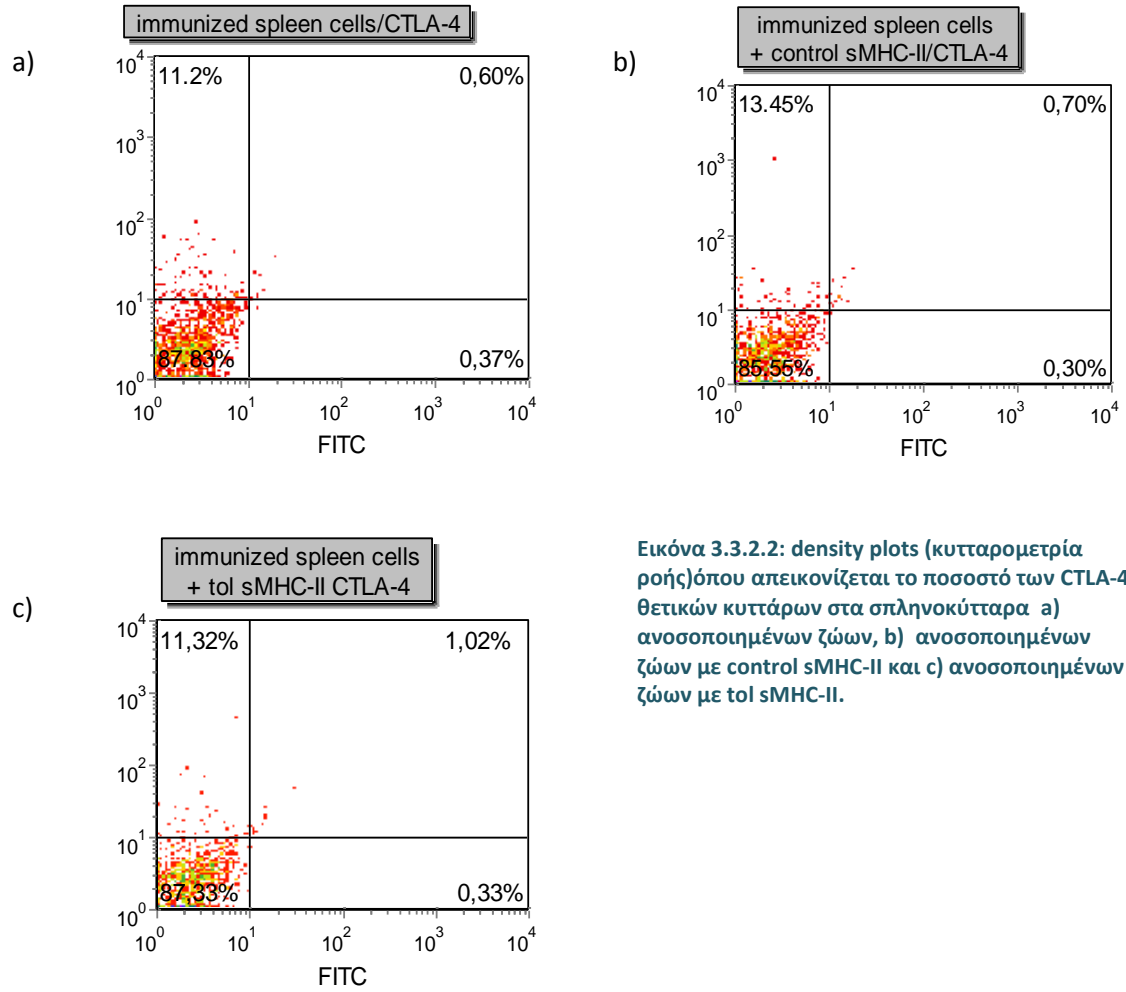
Τη 17<sup>η</sup> μέρα τα σπληνοκύτταρα ελέγχονταν με ανοσοφθορισμό ως προς την επιφανειακή έκφραση των CD28, CTLA-4 και CD25 πρωτεϊνών (Εικ. 3.3.2.1-3).

#### CD28

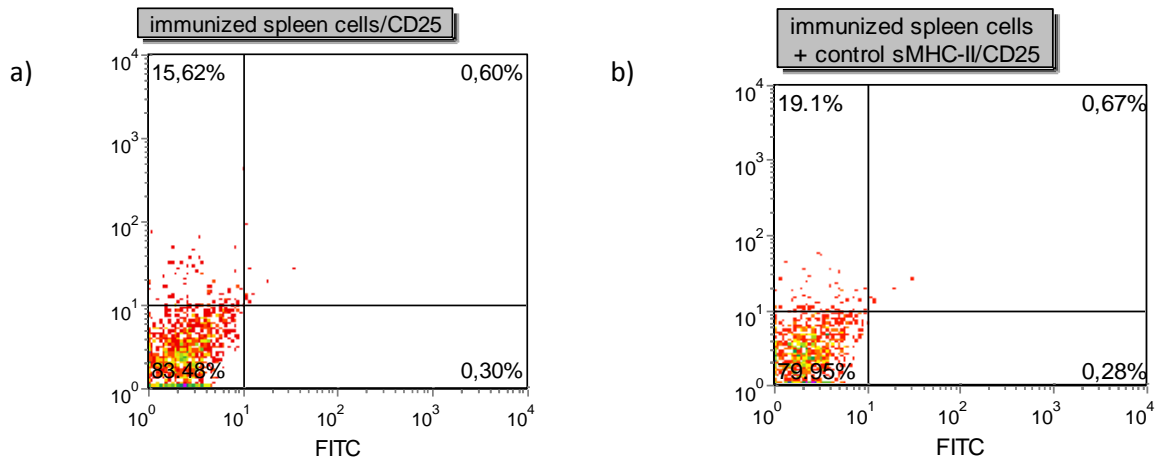


Εικόνα 3.3.2.1: density plots (κυτταρομετρία ροής) όπου απεικονίζεται το ποσοστό των CD28 θετικών κυττάρων στα σπληνοκύτταρα α) ανοσοποιημένων ζώων, β) ανοσοποιημένων ζώων με control sMHC-II και γ) ανοσοποιημένων ζώων με tol sMHC-II.

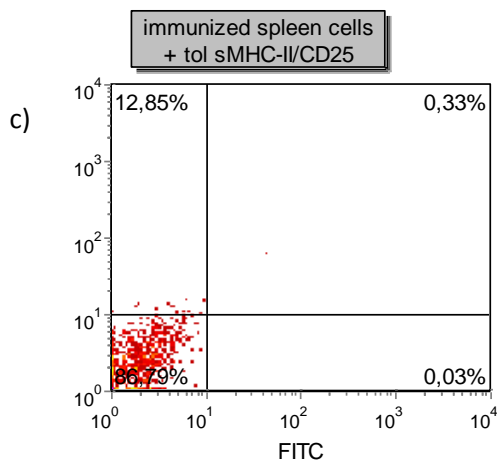
## CTLA-4



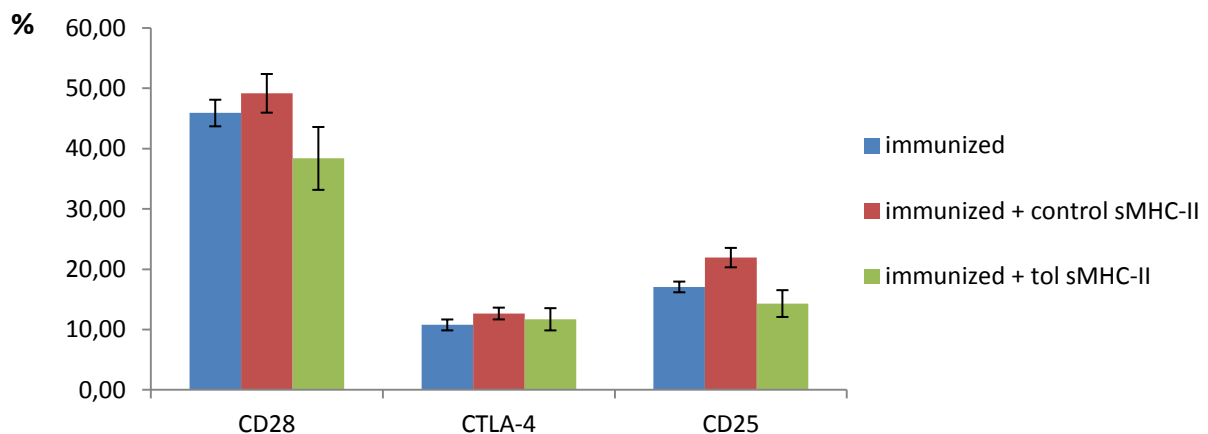
## CD25







Εικόνα 3.3.2.3: density plots (κυτταρομετρία ροής) όπου απεικονίζεται το ποσοστό των CD25 θετικών κυττάρων στα σπληνοκύτταρα a) ανοσοποιημένων ζώων, b) ανοσοποιημένων ζώων με control sMHC-II και c) ανοσοποιημένων ζώων με tol sMHC-II.



Διάγραμμα 3.3.2.1: Απεικόνιση των ποσοστών των CD28, CTLA-4 και CD25 θετικών κυττάρων στα σπληνοκύτταρα ανοσοποιημένων ζώων, ανοσοποιημένων ζώων με control sMHC-II και ανοσοποιημένων ζώων με tol sMHC-II. Οι μπάρες εκφράζουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

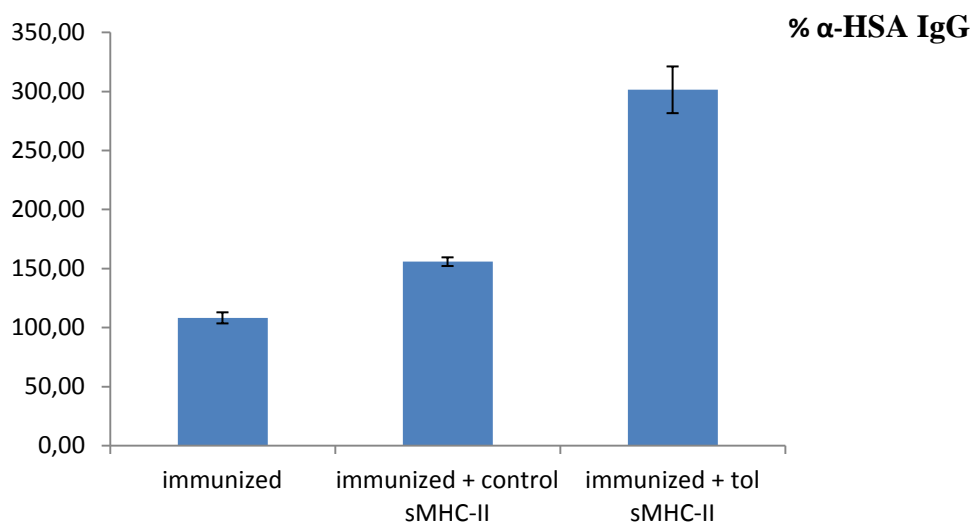
Μετά από αυτούς τους χειρισμούς παρατηρούμε πως το ποσοστό των CD28 θετικών κυττάρων είναι παρόμοιο στα ανοσοποιημένα ζώα και σε εκείνα στα οποία χορηγήθηκαν control sMHC-II. Στα ζώα όμως που χορηγήθηκαν tol sMHC-II υπάρχει μία πτώση κατά 16% σε σχέση με τα ανοσοποιημένα που όμως δεν φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική. Τα CTLA-4 θετικά κύτταρα βρίσκονται σε παρόμοια επίπεδα και στις 3 κατηγορίες κυττάρων. Τέλος παρατηρείται αύξηση των CD25 θετικών κυττάρων κατά 28% έπειτα από χορήγηση control sMHC-II ενώ τα tol sMHC-II δεν φαίνεται να επηρεάζουν ιδιαίτερα τον συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό (Διάγραμμα 3.3.2.1).

### 1.1 *in vitro* χορήγηση sMHC-II σε ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα

Τη 14<sup>η</sup> μέρα της ανοσοποίησης τα ζώα θανατώνονταν και συλλέγονταν τα σπληνοκύτταρα τα οποία καλλιεργούνται για 48h παρουσία ή μη sMHC-II μορίων. Επομένως είχαμε τρεις κατηγορίες κυττάρων: 1) ανοσοποιημένα κύτταρα, 2) ανοσοποιημένα κύτταρα + control sMHC-II και 3) ανοσοποιημένα κύτταρα + tol sMHC-II. Με το πέρας των 48h συλλέγονταν τα κύτταρα τα οποία ελέγχονταν για την έκφραση των CD28, CTLA-4 και CD25 επιφανειακών μαρτύρων καθώς και τα υπερκείμενα με σκοπό την ανίχνευση των επιπέδων του αντι- HSA αντισώματος που περιείχαν. Επιπλέον πραγματοποιούταν και έλεγχος του πολλαπλασιασμού των κυττάρων στις τρεις διαφορετικές κατηγορίες.

#### 3.4.1 Επίδραση των sMHC-II μορίων στην παραγωγή αντι-HSA αντισώματος

Τα υπερκείμενα από τις τρεις διαφορετικές κατηγορίες κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν ως αντίσωμα σε HSA υπόστρωμα έτσι ώστε να γίνει ανίχνευση των επιπέδων του αντι- HSA αντισώματος που περιείχαν με τη μέθοδο ELISA (Διάγραμμα 3.4.1.1).



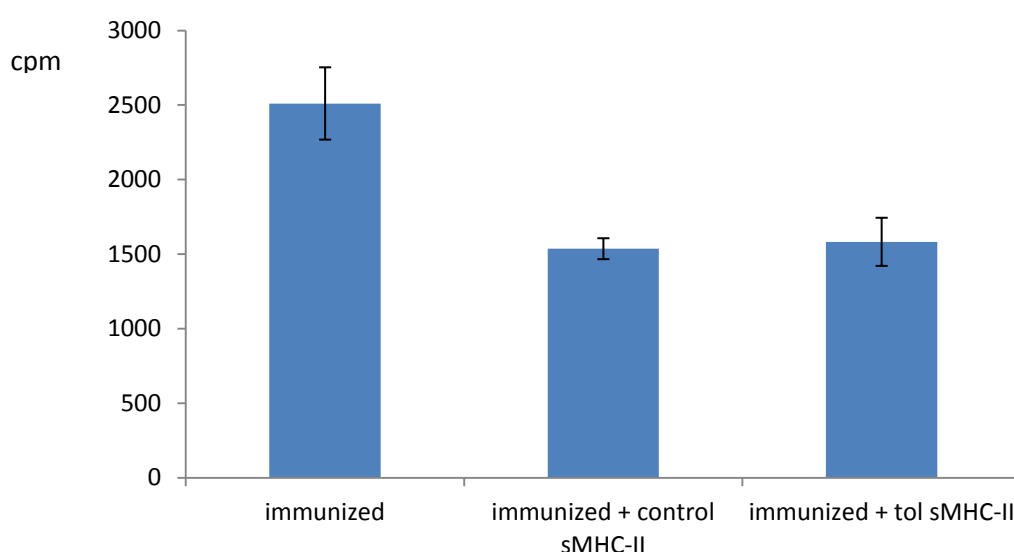
Διάγραμμα 3.4.1.1: ELISA, έλεγχος της ποσότητας του α-HSA αντισώματος στα υπερκείμενα ανοσοποιημένων κυττάρων, ανοσοποιημένων κυττάρων με control sMHC-II και ανοσοποιημένων κυττάρων με tol sMHC-II έπειτα από συνκαλλιέργεια 48h. Απεικονίζεται η ποσοστιαία αύξηση σε σχέση με το coating buffer. Οι μπάρες εκφράζουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

Σε αυτή τη περίπτωση, παρατηρούμε αύξηση του α-HSA αντισώματος έπειτα από συνκαλλιέργεια των ανοσοποιημένων κυττάρων με sMHC-II. Συγκεκριμένα με

τη χορήγηση control sMHC-II υπάρχει μία αύξηση κατά 44% ενώ με τη χορήγηση tol sMHC-II η αύξηση αυτή είναι πολύ μεγαλύτερη της τάξεως του 178%.

### 3.4.2 Επίδραση των sMHC-II μορίων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Με το πέρας της 48ωρης επώασης των ανοσοποιημένων κυττάρων με τα sMHC-II, προσθέταμε ραδιενεργή θυμιδίνη στην καλλιέργεια για 18h. Στη συνέχεια γινόταν καταμέτρηση των κρούσεων ανά λεπτό (counts per minute, cpm) που μας πληροφορούσε για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Διάγραμμα 3.4.2.1).



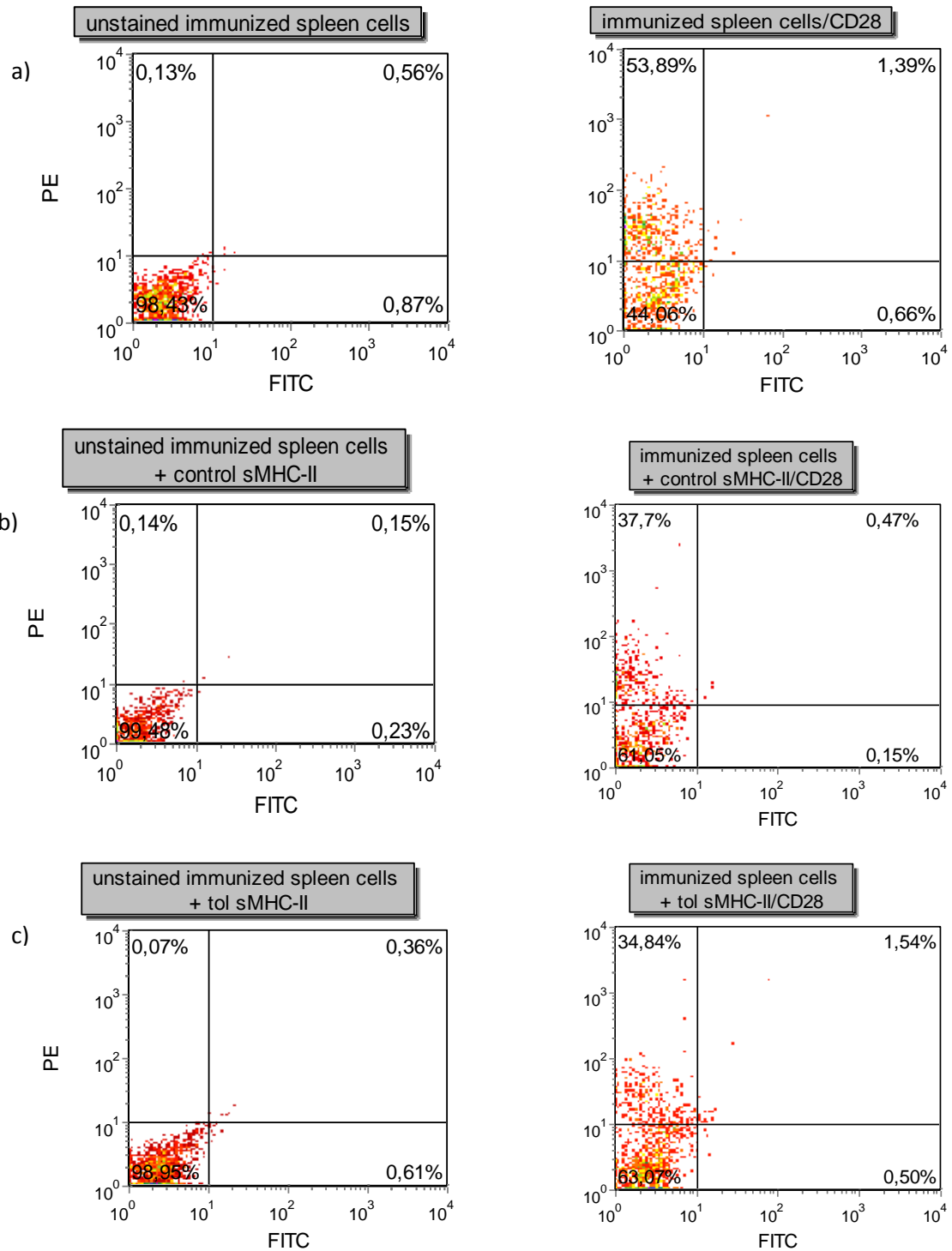
Διάγραμμα 3.4.2.1: Απεικόνιση των κρούσεων (cpm) ανοσοποιημένων κυττάρων, ανοσοποιημένων κυττάρων με control sMHC-II και ανοσοποιημένων κυττάρων με tol sMHC-II έπειτα από συνκαλλιέργεια 48h. Οι μπάρες εκφράζουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

Παρατηρούμε μείωση του πολλαπλασιασμού των ανοσοποιημένων κυττάρων όταν αυτά καλλιεργηθούν μαζί με sMHC-II μόρια. Η μείωση αυτή είναι της τάξεως του 40% τόσο έπειτα από επώαση με control sMHC-II όσο και με tol sMHC-II μόρια.

### 3.4.3 Επίδραση των sMHC-II μορίων στα σπληνοκύτταρα

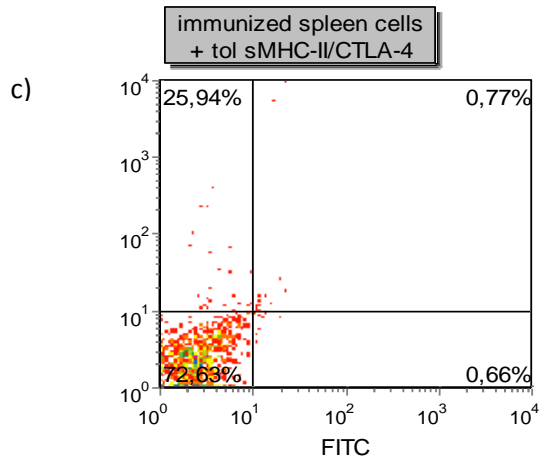
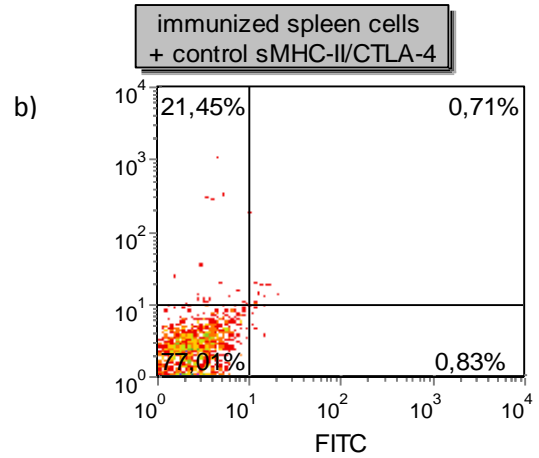
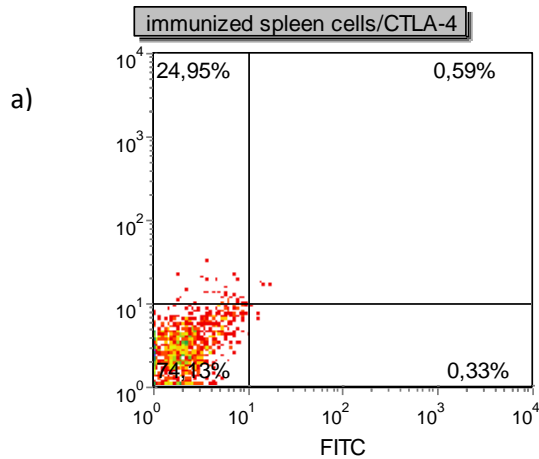
Με το πέρας της 48ωρης επώασης των ανοσοποιημένων κυττάρων με τα sMHC-II, τα σπληνοκύτταρα ελέγχονταν με ανοσοφθορισμό και κυτταρομετρία ροής ως προς την επιφανειακή έκφραση των CD28, CTLA-4 και CD25 πρωτεϊνών (Εικ. 3.4.3.1-3).

## CD28



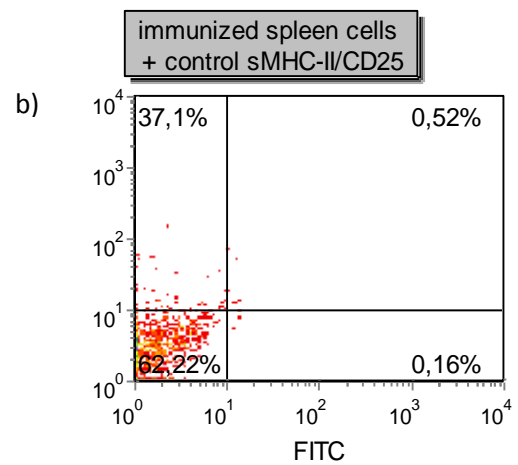
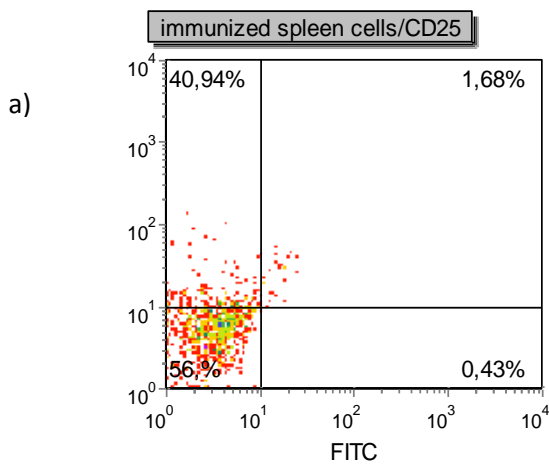
Εικόνα 3.4.3.1: density plots (κυτταρομετρία ροής) όπου απεικονίζεται το ποσοστό των CD28 θετικών κυτάρων σε a) ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα, b) ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα + control sMHC-II και c) ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα + tol sMHC-II. Οι μπάρες εκφράζουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

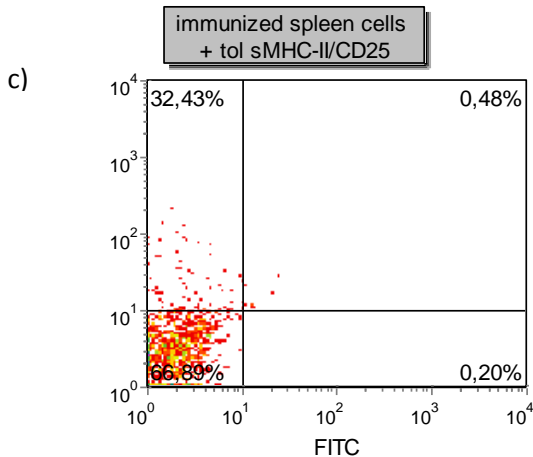
## CTLA-4



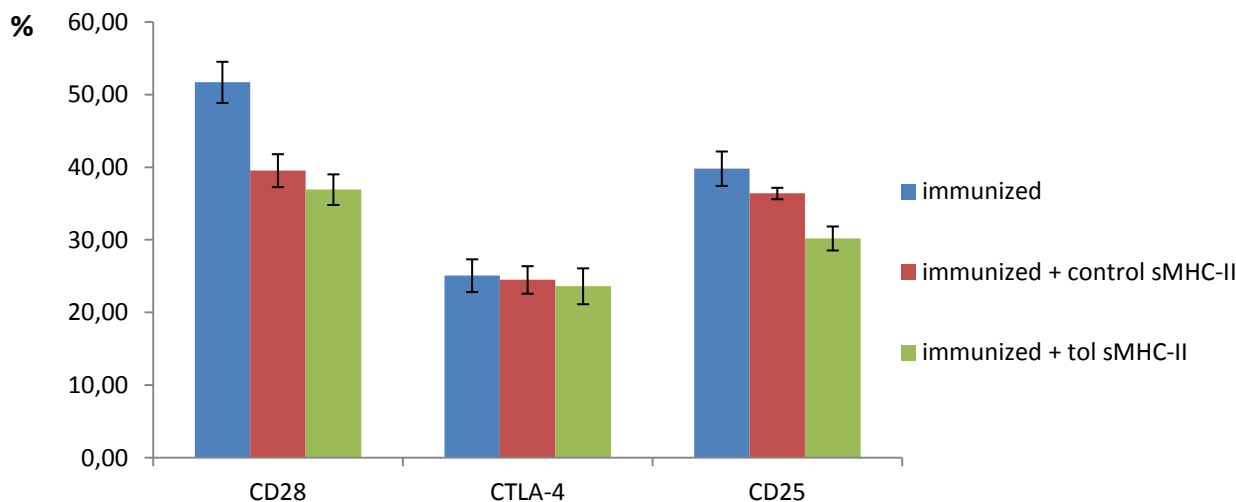
Εικόνα 3.4.3.2: density plots (κυτταρομετρία ροής) όπου απεικονίζεται το ποσοστό των CTLA-4 θετικών κυττάρων σε a) ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα, b) ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα + control sMHC-II και c) ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα + tol sMHC-II.

## CD25





Εικόνα 3.4.3.3: density plots (κυτταρομετρία ροής) όπου απεικονίζεται το ποσοστό των CD25 θετικών κυττάρων σε α) ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα, β) ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα + control sMHC-II και γ) ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα + tol sMHC-II.

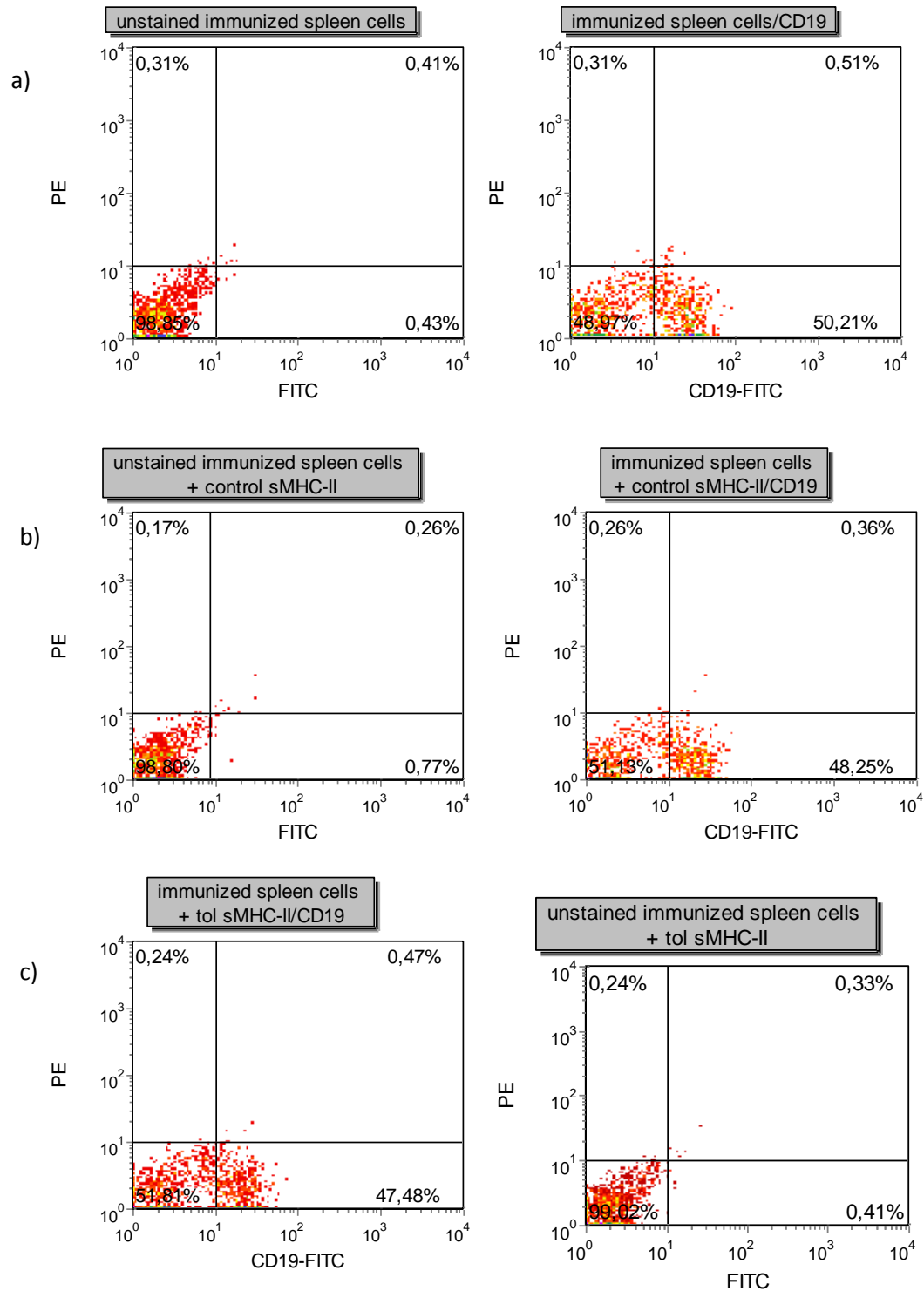


Διάγραμμα 3.4.3.1: Απεικόνιση των ποσοστών των CD28, CTLA-4 και CD25 θετικών κυττάρων σε ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα, ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα + control sMHC-II και ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα + tol sMHC-II. Οι μπάρες εκφράζουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

Παρατηρούμε μία σημαντική πτώση των CD28 θετικών κυττάρων κατά 24% στα ανοσοποιημένα κύτταρα που επώαστηκαν με control sMHC-II και κατά 29% σε εκείνα που επώαστηκαν με tol sMHC-II σε σχέση με τα ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα. Το ποσοστό των CTLA-4 θετικών κυττάρων παραμένει σταθερό και στις τρεις κατηγορίες. Τέλος πτώση παρατηρείται και ως προς την έκφραση της CD25 πρωτεΐνης κατά 25% έπειτα από επώαση των ανοσοποιημένων κυττάρων με tol sMHC-II ενώ με τα control sMHC-II το ποσοστό μειώνεται ελάχιστα (Διάγραμμα 3.4.3.1).

Το γεγονός πως έπειτα από τη χορήγηση sMHC-II μορίων στην καλλιέργεια παρατηρείται μείωση των CD28 και CD25 θετικών κυττάρων καθώς και αύξηση του α-HSA αντισώματος μας ώθησε στην υπόθεση πως πιθανόν να αυξάνονται τα Β-λεμφοκύτταρα παρουσία sMHC-II μορίων. Επομένως τα ανοσοποιημένα

σπληνοκύτταρα ελέγχθηκαν με ανοσοφθορισμό και κυτταρομετρία ροής ως προς την έκφραση του επιφανειακού μάρτυρα των Β-λεμφοκυττάρων CD19 όπου και παρατηρήσαμε πως δεν υπάρχει κάποια αύξηση παρουσία των sMHC-II μορίων (Εικ. 3.4.3.4).



Εικόνα 3.4.3.4: density plots (κυτταρομετρία ροής) όπου απεικονίζεται το ποσοστό των CD19 θετικών κυττάρων σε α) ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα, β) ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα + control sMHC-II και γ) ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα + tol sMHC-II.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Τα διαλυτά μόρια ιστοσυμβατότητας (sMHC) ανιχνεύονται στον ορό καθώς και στα σωματικά υγρά (σάλιο, δάκρυα, ιδρώτας) υγιών ατόμων (van Rood et al., 1970; Aultman et al., 1999) σε συγκεντρώσεις που ποικίλλουν ανάμεσα στα άτομα αλλά όμως παραμένουν σταθερές. Αντίθετα οι συγκεντρώσεις αυτές μεταβάλλονται σε παθολογικές και κυρίως αυτοάνοσες καταστάσεις (Stevenson et al., 1990; Tsuchiya et al., 1996; Adamashvili et al., 1997; Verbruggen et al., 2000; Adamashvili et al., 2002; Wiendl et al., 2005; Tabayoyong & Zavazava, 2007) όπως και σε περιπτώσεις απόρριψης μοσχεύματος (Rhynes et al., 1993; Tabayoyong & Zavazava, 2007).

Όλες οι παραπάνω ενδείξεις σε συνδυασμό με την αρχική υπόθεση για τη μεσολάβηση των sMHC-II στη διατήρηση ανοχής σε περιπτώσεις μεταμοσχεύσεων οδήγησε στην υπόθεση πως τα μόρια αυτά έχουν ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες. Πράγματι μετέπειτα έρευνες έδειξαν πως τα sMHC-II μόρια φαίνεται να συμμετέχουν ενεργά στη διατήρηση της ανοχής ως προς το αντιγόνο με το οποίο είναι φορτωμένα (Ostman et al., 2005; Almqvist et al., 2008). Πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου έδειξε πως τα sMHC-II μόρια προκαλούν καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης όταν επωάζονται σε καλλιέργεια με CD4+ κύτταρα (Bakela et al., 2014) ενώ μη δημοσιευμένα πειράματα έδειξαν πως παρόμοιο κατασταλτικό χαρακτήρα έχουν και τα sMHC-II μόρια απομονωμένα από υπερκείμενα CD4+CD25+ κυττάρων.

Παρατηρώντας επομένως πως τα CD4+ κύτταρα είναι ικανά να εκκρίνουν sMHC-II μόρια τα οποία έχουν κατασταλτικό χαρακτήρα επικεντρωθήκαμε στον συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό. Σημαντικό ρόλο έπαιξε και το γεγονός πως το 10% των κυττάρων αυτών αποτελείται από τα T-ρυθμιστικά κύτταρα (Sakaguchi et al., 2008). Σκοπός ήταν η μελέτη της επίδρασης των εκκρινόμενων από CD4+ κύτταρα sMHC-II μορίων έπειτα από *in vivo* χορήγησή τους σε ανοσοποιημένα BALB/c ή *in vitro* χορήγηση σε ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα. Τα CD4+ κύτταρα προέρχονταν είτε από φυσιολογικά είτε από ανοχοποιημένα με HSA BALB/c ποντίκια ενώ και η ανοσοποίηση των ζώων έγινε με το ίδιο αντιγόνο. Τα διαλυτά μόρια που προέρχονταν από τα ανοχοποιημένα ζώα (toI sMHC-II) υποθέτουμε πως στο μεγαλύτερο μέρος τους είναι φορτωμένα με την HSA πρωτεΐνη ή με πεπτίδια του εαυτού όπως φάνηκε να ισχύει στα sMHC-II προερχόμενα από ορό ανοχοποιημένων ζώων (Bakela et al., 2014).

Τα CD4+ κύτταρα διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο του FACScan sorter ενώ τα sMHC-II μόρια απομονώθηκαν από τα υπερκείμενα των κυττάρων αυτών έπειτα από 48ωρη καλλιέργεια. Η ηλεκτροφόρηση της απομονωμένης πρωτεΐνης φανέρωσε μία ζώνη 60kD, του ίδιου δηλαδή μοριακού βάρους με τα sMHC-II που προέρχονται από τον ορό ενώ έγινε επιπλέον επιβεβαίωση ότι πρόκειται για αυτά τα μόρια έγινε με τη μέθοδο ELISA.

Στα *in vivo* πειράματα τα sMHC-II μόρια χορηγούνταν σε ανοσοποιημένα BALB/c μετά το πέρας της ανοσοποίησης (14<sup>η</sup> μέρα). Γίνονταν 3 αιμοληψίες, τη 14<sup>η</sup>, 15<sup>η</sup> και 17<sup>η</sup> μέρα ενώ τη 17<sup>η</sup> μέρα τα ζώα θανατώνονταν και γινόταν συλλογή των σπληνοκυττάρων. Παρατηρήσαμε πτώση του α-HSA αντισώματος τη 14<sup>η</sup> σε σχέση



με τη 15<sup>η</sup> μέρα έπειτα δηλαδή από τη χορήγηση των διαλυτών μορίων. Συγκεκριμένα υπήρξε πτώση κατά 13,6% στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκαν control sMHC-II και κατά 20,5% στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκαν tol sMHC-II. Αντίθετα στα ποντίκια που δεν χορηγήθηκαν sMHC-II η ποσότητα του αντισώματος παρέμεινε σταθερή. Σημαντική όμως παρατήρηση υπήρξε και τη 17<sup>η</sup> μέρα, 3 μέρες δηλαδή μετά τη χορήγηση, όπου η ποσότητα του αντισώματος επανερχόταν στα αρχικά επίπεδα και στις 2 κατηγορίες ποντικίων που δέχθηκαν sMHC-II. Αντίθετα στα ποντίκια που δεν χορηγήθηκαν sMHC-II υπήρξε αύξηση του αντισώματος κατά 52,8% σε σχέση με την 14<sup>η</sup> μέρα. Παρατηρούμε επομένως πως τα διαλυτά αυτά μόρια και κυρίως εκείνα που προέρχονται από ανοχοποιημένα ζώα οδηγούν σε μειωμένη παραγωγή αντισώματος ενισχύοντας την υπόθεση πως συμμετέχουν στη διαδικασία της ανοχής. Όσον αφορά στα σπληνοκύτταρα, έγινε έλεγχος ως προς την έκφραση των επιφανειακών μαρτύρων CD28, CTLA-4 και CD25 όπου δεν υπήρξε κάποια ιδιαίτερα σημαντική διαφορά. Υπήρξε μόνο μία αύξηση των CD25 θετικών κυττάρων κατά 28% έπειτα από χορήγηση control sMHC-II και δεδομένου πως πρόκειται για τα T-ρυθμιστικά κύτταρα ίσως τα διαλυτά μόρια να επιτυγχάνουν τον ανοσορρυθμιστικό τους ρόλο μέσω αύξησης του συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού.

Στα *in vitro* πειράματα τα sMHC-II μόρια χορηγούνταν σε ανοσοποιημένα σπληνοκύτταρα που συλλέγονταν τη 14<sup>η</sup> μέρα της ανοσοποίησης και παρέμεναν στην καλλιέργεια για 48h. Παρατηρήσαμε αύξηση του α-HSA αντισώματος παρουσία των sMHC-II μορίων η οποία ήταν ιδιαίτερα έντονη στην περίπτωση των tol sMHC-II (178%) αποτέλεσμα που έρχεται σε αντίθεση με εκείνο των *in vivo* πειραμάτων. Η αρχική υπόθεση ήταν πως ίσως τα διαλυτά μόρια να επάγουν την αύξηση των B-λεμφοκυττάρων και κατ' επέκταση την αυξημένη παραγωγή αντισώματος κάτι που όπως αποδείχθηκε δεν ισχύει. Μία άλλη πιθανή εκδοχή είναι η HSA με την οποία είναι πιθανό να είναι φορτωμένα τα tol sMHC-II μόρια να αναγνωρίζεται από τα αντιγονοειδικά B-κύτταρα μνήμης και να ξεκινά έτσι η παραγωγή αντισώματος από τα B-λεμφοκύτταρα. Όσον αφορά στα σπληνοκύτταρα, υπήρξε μείωση του πολλαπλασιασμού τους κατά 40% τόσο κατά την επώαση τους με control όσο και με tol sMHC-II ενισχύοντας έτσι την υπόθεση για συμμετοχή των μορίων αυτών σε μηχανισμούς ανοχής. Επιπλέον υπήρξε μείωση των CD28 θετικών κυττάρων παρουσία των sMHC-II ενώ τα CTLA-4 θετικά κύτταρα παρέμεναν στα ίδια επίπεδα σε κάθε περίπτωση. Δεδομένου πως το μονοπάτι CD28/CTLA-4 είναι το πιο αντιπροσωπευτικό για την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, η επίδραση αυτή των sMHC-II δείχνει πως τα μόρια αυτά μπορούν *in vitro* να μειώσουν την ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών. Τα CD25 θετικά κύτταρα μειώνονται και αυτά παρουσία των διαλυτών μορίων ενώ η μείωση είναι μεγαλύτερη με τα tol sMHC-II. Επομένως η μείωση των CD28 και CD25 θετικών κυττάρων ίσως υποδεικνύει μια καθολική μείωση των T-λεμφοκυττάρων παρουσία των sMHC-II μορίων παρατήρηση που συμβαδίζει με την μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την ταυτόχρονα σταθερή παρουσία των B-λεμφοκυττάρων.

Το πρώτο και βασικό συμπέρασμα των πειραμάτων είναι πως τα CD4+ κύτταρα είναι ικανά να εκκρίνουν διαλυτά τάξης II μόρια ιστοσυμβατότητας. Η επίδραση όμως των μορίων αυτών βλέπουμε πως είναι διαφορετική σε ένα *in vivo* από ότι σε

ένα *in vitro* σύστημα. Όσον αφορά την παραγωγή του  $\alpha$ -HSA αντισώματος, το γεγονός ότι μειώνεται έπειτα από *in vivo* ενώ αυξάνεται έπειτα από *in vitro* χορήγηση sMHC-II μορίων ίσως υποδεικνύει πως η επίδραση των μορίων αυτών στη χυμική ανοσία είναι κατασταλτική σε επίπεδο οργανισμού όπου εμπλέκονται όλοι οι φυσιολογικοί μηχανισμοί ενώ αντίθετα σε ένα ελεγχόμενο σύστημα όπου οι παράγοντες που συμπεριλαμβάνονται είναι ελάχιστοι τα μόρια αυτά έχουν το ακριβώς αντίθετο αποτέλεσμα. Αντίθετα αποτελέσματα βλέπουμε και ως προς τα σπληνοκύτταρα όπου μόνο στο *in vitro* σύστημα παρατηρείται ξεκάθαρη μείωση των CD28 και CD25 θετικών κυττάρων παρουσία των sMHC-II μορίων ενώ τα CTLA-4 θετικά κύτταρα παραμένουν σταθερά και στο *in vivo* αλλά και στο *in vitro* σύστημα.

Είναι επομένως φανερή η πολύπλευρη δράση των διαλυτών μορίων ιστοσυμβατότητας και μετέπειτα μελέτες είναι απαραίτητες για τη διαλεύκανση όχι μόνο του μηχανισμού με τον οποίο δρουν σε κάθε περίπτωση αλλά και του τρόπου έκκρισής τους ο οποίος μέχρι τώρα παραμένει άγνωστος. Επιπλέον, πειράματα φασματοσκοπίας μάζας θα επιβεβαιώσουν αν όντως τα sMHC-II που εκκρίνονται από CD4+ κύτταρα ανοχοποιημένων ζώων είναι φορτωμένα με πρωτεΐνες στις οποίες ο οργανισμός έχει ανοχή όπως αποδείχθηκε να ισχύει στα sMHC-II του ορού. Μια τέτοια παρατήρηση θα ενίσχυε την υπόθεση για την συμμετοχή των μορίων αυτών στη διατήρηση της ανοχής. Παρόλο που όλα τα παραπάνω μας είναι ακόμα άγνωστα ο ανοσορρυθμιστικός ρόλος των διαλυτών μορίων ιστοσυμβατότητας δεν πρέπει να αμφισβητείται αλλά αντίθετα περαιτέρω έρευνες θα δώσουν επιπλέον στοιχεία για τους μηχανισμούς στους οποίους συμμετέχουν.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- 1) Adamashvili I., McVie R., Gelder F., Gautreaux M., McDonald J., **Soluble HLA class I antigens in patients with type I diabetes and their family members**, Hum Immunol 1997; 55:176-183.
- 2) Adamashvili I., Minagar A., Gonzalez-Toledo E., Featherston L., Kelley R.E., **Soluble HLA measurement in saliva and cerebrospinal fluid in Caucasian patients with multiple sclerosis: a preliminary study**, J Neuroinflammation. 2005; 2:13-20.
- 3) Adamashvili I., Pressly T., Gebel H., Milford E., Mancini M., Sittig K., Ghali G., Hall V., McDonald J., **Soluble HLA in saliva of patients with autoimmune rheumatic diseases**, Rheumatol Int 2002; 22:71-76.
- 4) Afkarian M., Sedy J. R., Yang J. Jacobson N.G., Cereb N., Yang S.Y., Murphy T.L., Murphy K.M. **T-bet is a STAT1-induced regulator for IL-12R expression in naive CD4+ T cells**, Nature Immunology 2002; 3(6): 549–557.
- 5) Almqvist N., Lonnqvist A., Hultkrantz S., Rask C., Telemo E., **Serum-derived exosomes from antigen-fed mice prevent allergic sensitization in a model of allergic asthma**, Immunology 2008; 125: 21–27.
- 6) Annunziato F., Cosmi L., Santarlasci V. Maggi L., Liotta F., Mazzinghi B., Parente E., Fili L., Ferri S., Frosali F., Giudici F., Romagnani P., Parronchi P., Tonelli F., Maggi E., Romagnani S., **Phenotypic and functional features of human Th17 cells**, Journal of Experimental Medicine, 2007; 204(8): 1849–1861.
- 7) Antony P.A., Paulos C.M., Ahmadzadeh M., Akpınarli A., Palmer D.C., Sato N., Kaiser A., Hinrichs C.S., Klebanoff C.A., Tagaya Y., Restifo N.P., **Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo**, J. Immunol. 2006; 176: 5255–5266.
- 8) Aruffo A., Seed B., **Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system**, Proc. Natl. Acad. Sci USA 1987; 84: 8573-8577.
- 9) Athanassakis I., Ranella A., Vassiliadis S., **IFN- $\gamma$  facilitates release of class II-loaded intracellular pools in trophoblast cells: a novel property independent of protein synthesis**, J. Interferon Cytokine Res. 2000; 20: 823–830.

- 10) Aultman D., Adamashvili I., Yaturu K., Langford M., Gelder F., Gautreaux M., Ghali G.E., McDonald J., **Soluble HLA in human body fluids**, Hum. Immunol. 1999; 60: 239–244.
- 11) Bakela K., Kountourakis N., Aivaliotis M., Athanassakis I., **Soluble MHC-II proteins promote suppressive activity in CD4+ T-cells**, Immunology 2014;
- 12) Benson M.J., Pino-Lagos K., Roseblatt M., and Noelle R.J., **All trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation**, J. Exp. Med. 2007; 204: 1765–1774.
- 13) Brunet J.F., Denzot F., Luciani M.F., Roux-Dosseto M., Suzan M., Mattei M.G., Golstein P., **A new member of the Immunoglobulin superfamily-CTLA-4**, Nature 1987; 328:267-270.
- 14) Calne R.Y., White H.J., Yoffa D.E., Binns R.M., Maginn R.R., Herbertson R.M., Millard P.R., Molina V.P., Davis D.R., **Prolonged survival of liver transplants in the pig**. Br. Med. J. 1967; 4: 645–648.
- 15) Chuang E., Alegre M.L., Duckett C.S., Noel P.J., Vander Heiden M.G., Thompson CB., **Interaction of CTLA-4 with the clathrin associated protein AP50 results in ligand-independent endocytosis that limits cell surface expression**, J Immunol 1997; 159:144-151.
- 16) Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y., **Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells**, Nat Immunol 2003; 4(4): 330-336.
- 17) Ge Q., Stone J.D., Thompson M.T., Cochran J.R., Rushe M., Eisen H.N., Chen J., Stern J.L., **Soluble peptide-MHC monomers cause activation of CD8+ T cells through transfer of the peptide to T cell MHC molecules**, Proc. Natl.Acad.Sci.USA 2002; 99: 13729–13734.
- 18) Glimcher L.H., Murphy K.M., **Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up**, Genes and Development 2000; 14(14):1693–1711.
- 19) Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A., Kuby J., **Immunology**, 2007; 5<sup>th</sup> Edition
- 20) Jendro M., Goronzy J.J., Weyand C.M., **Structural and functional characterization of HLA-DR molecules circulating in the serum**, Autoimmunity 1991; 8(4):289–296.

- 21) Khattri R., Cox T., Yasayko S.A., Ramsdell F., **An essential role for scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells**, Nat Immunol 2003; 4(4):337-342.
- 22) Krummel M.F., Allison J.P., **CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells**, J Exp Med 1996; 183:2533-2540.
- 23) Kyvelidou C., Chatzi K., Semitekolou M., Papathanassiou X., Vassiliadis S., Athanassakis I., **Characterization of CD25-positive T cells during syngeneic pregnancy: production of stimulatory class II MHC molecules**, Scand J Immunol. 2009; 70(6):584-595.
- 24) Laurence A., Tato C.M., Davidson T.S., Kanno Y., Chen Z., Yao Z., Blank R.B., Meylan F., Siegel R., Hennighausen L., Shevach E.M., O'Shea J.J. **Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation**. Immunity 2007; 26: 371–381.
- 25) Lighvani A.A., Frucht D.M., Jankovic D., Yamane H., Aliberti J., Hissong B.D., Nguyen B.V., Gadina M., Sher A., Paul W.E., O'Shea J.J., **T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells**, Proc. Natl. Acad. Sci USA 2001; 98:15137–15142.
- 26) Lind E.F., Prockop S.E., Porritt H.E., Petrie H.T., **Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development**, J. Exp. Med. 2001; 194:127–134.
- 27) Luckheeram R.V., Zhou R., Verma A.D., Xia B., **CD4+T Cells: Differentiation and Functions**, Clin Dev Immunol. 2012; 4:925135.
- 28) Lugo-Villarin G., Maldonado-Lopez R., Possemato R., Penaranda C., Glimcher L.H., **T-bet is required for optimal production of IFN- $\gamma$  and antigen-specific T cell activation by dendritic cells**, Proc. Natl. Acad. Sci USA 2003; 100(13):7749–7754.
- 29) Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A.: **Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor**, Annu Rev Immunol 2001; 19:683–765.
- 30) Nag B., Kendrick T., Arimilli S., Yu S.C.T., Sriram S., **Soluble MHC II-peptide complexes induce antigen-specific apoptosis in T cells**, Cell Immunol. 1996; 170:25–33.
- 31) Ostman S., Taube M., Telemo E., **Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent**, Immunology 2005; 116:464–476.

- 32) Palacios E.H., Weiss A., **Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation**, *Oncogene* 2004; 23:7990-8000.
- 33) Qureshi O.S., Zheng Y., Nakamura K., Attridge K., Manzotti C., Schmidt E.M., Baker J., Jeffery L.E., Kaur S., Briggs Z., Hou T.Z., Futter C.E., Anderson G., Walker L.S.K., Sansom D.M., **Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell extrinsic function of CTLA-4**, *Science* 2011; 332(6029): 600–603.
- 34) Read S., Malmström V., Powrie F., **Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>(+)</sup>CD4<sup>(+)</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation**, *J. Exp. Med.* 2000; 192: 295–302.
- 35) Retter M.W., Nemazee D., **Receptor editing occurs frequently during normal B cell development**, *J Exp Med* 1998; 188:1231-123.
- 36) Rhynes V.K., McDonald J.C., Gelder F.B. Aultman D.F, Hayes J.M., McMillan R.W., Mancini M.C., **Soluble HLA class I in the serum of transplant recipients**, *Annals of Surgery* 1993; 217(5):485–9.
- 37) Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M, **Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases**, *J Immunol* 1995;155:1151–1164.
- 38) Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M., **Regulatory T Cells and Immune Tolerance**, *Cell* 2008; 133: 775-787.
- 39) Sansom D.M., **CD28, CTLA-4 and their ligands: Who does what and to whom?**, *Immunology* 2000; 101:169-177.
- 40) Sardis M., Miltiadou P., Bakela K., Athanassakis I., **Serum-derived MHC class II molecules: Potent regulators of the cellular and humoral immune response**. *Immunobiology* 2009; 215:194-205.
- 41) Setoguchi R., Hori S., Takahashi T., and Sakaguchi S. **Homeostatic maintenance of natural Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization**, *J. Exp.Med.* 2005; 201: 723–735
- 42) Starr T.K., Jameson S.C., Hogquist K.A., **Positive and negative selection of T cells**, *Annu Rev Immunol.* 2003; 21:139-76.

- 43) Stevenson F.K., Douglass W.A., Spellerberg M.B., Walters M.T., Cawley M.I., **Soluble histocompatibility antigens in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis**, *Clin Exp Immunol.* 1990; 80(1): 32–37.
- 44) Tabayoyong W.B., Zavazava N., **Soluble HLA revisited**, *Leuk Res.* 2007; 31(2):121-125.
- 45) Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Mak T.W., Sakaguchi S., **Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4**, *J. Exp. Med.* 2000; 192: 303–310.
- 46) Tiegs S.L., Russell D.M., Nemazee D., **Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells**, *J Exp Med* 1993; 177:1009-1020.
- 47) Tsuchiya N., Shiota M., Yamaguchi A., Ito K., **Elevated serum level of soluble HLA class I antigens in patients with systemic lupus erythematosus**, *Arthritis and Rheumatism* 1996; 39(5):792–796.
- 48) Trinchieri G., Pflanz S., Kastelein R.A., **The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses**, *Immunity* 2003; 19 (5):641–644.
- 49) van Rood J.J., van Leeuwen A., van Santen M.C.T., **Anti-HL-A2 inhibitor in normal human serum**, *Nature* 1970; 226: 366–367.
- 50) 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* 2000; 56:436–440.
- 51) Walunas T.L., Bakker C.Y., Bluestone J.A., **CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation**, *J Exp Med* 1996; 183:2541-50.
- 52) Webb B.J., Bochan M.R., Montel A., Padilla L.M., Brahmi Z., **The lack of NK cytotoxicity associated with fresh HUCB may be due to the presence of soluble HLA in the serum**, *Cell Immunol.* 1994; 159:246-261.
- 53) Wiendl H., Feger U., Mittelbronn M., Jack C., Schreiner B., Stadelmann C., Antel J., Brueck W., Meyermann R., Bar-Or A., Kieseier B.C., Weller M., **Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity**, *Brain* 2005; 128:2689–2704.

- 54) Zhao J., Cao Y., Lei Z., Yang Z., Zhang B., Huang B., **Selective depletion of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells by low-dose cyclophosphamide is explained by reduced intracellular ATP levels**, *Cancer Res.* 2010; 70:4850–4858.
- 55) Zhu J., Guo L., Watson C. J, Hu-Li J., Paul W.E., **Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in TH2 differentiation and cell expansion**, *Journal of Immunology* 2001; 166 (12):7276–7281.
- 56) Zhu J., Paul W.E., **Peripheral CD4 T cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors**, *Immunol Rev.* 2010; 238(1): 247–262.