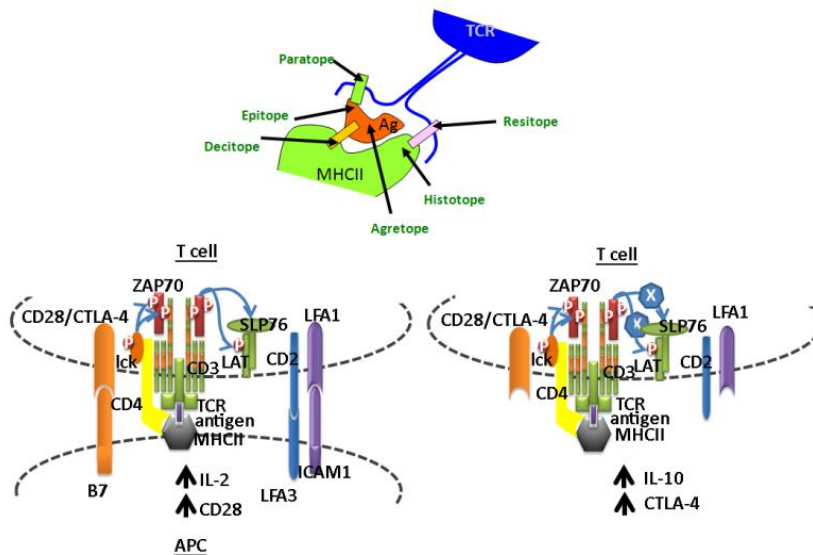




«Η ανοσοκατασταλτική δράση των διαλυτών  
MHC class-II μορίων του ορού σε  
CD4+ T-λεμφοκύτταρα»



Μπακέλα Αικατερίνη

Επιβλέπουσα καθ.: Αθανασάκη Ε.

Ηράκλειο, 2015

## Πρόλογος

---

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Ειρήνης Αθανασάκη.

Η κοινή μας πορεία με το εργαστήριο ξεκίνησε το 2007 όταν η κ. Αθανασάκη μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία. Στην συνέχεια ακολούθησε το μεταπτυχιακό και 7 χρόνια μετά ήρθε η ολοκλήρωση του διδακτορικού, όχι χωρίς μεγάλο κόπο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Αθανασάκη που υπήρξε ο πιο ένθερμος υποστηρικτής μου, για την βοήθεια και την ολόπλευρη καθοδήγηση της όλα αυτά τα χρόνια. Πέραν των υπολοίπων με δίδαξε το πώς να γίνω ολοκληρωμένη επιστήμονας με γνώμονα πάντα να προσφέρω στην κοινωνία.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας κ. Κοκκινίδη Μιχάλη και τον καθηγητή της Ιατρικής Σχολής κ. Ηλιόπουλο Αριστείδη για την ενεργό συμμετοχή τους στην τριμελή επιβλέπουσα επιτροπή και μάλιστα από την περίοδο του μεταπτυχιακού. Οι συμβουλές τους, το ενδιαφέρον τους αλλά και οι καίριες παρατηρήσεις τους κατά την διάρκεια αυτών των χρόνων υπήρξαν πολύτιμες.

Επίσης, ένα θερμό ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας Παπαματθαϊάκη Ιωσήφ, τον αναπληρωτή καθηγητή της Ιατρικής Σχολής Τσατσάνη Χρήστο, τον ερευνητή του IMBB-ITE Πετράτο Κυριάκο και τον λέκτορα της Ιατρικής Σχολής Μπερτσιά Γιώργο για την τιμή που μου έκαναν και τον χρόνο που διέθεσαν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και την αναπληρώτρια καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας Γκιζελή Ηλέκτρα για την συμβολή της στην εκπόνηση της διατριβής, και την συνεργασία μας δίνοντας την ευκαιρία να πραγματοποιήσουμε στο εργαστήριο της τα πειράματα των βιοαισθητήρων αλλά και για την επιστημονική της καθοδήγηση. Επιπλέον, μεγάλο ευχαριστώ και το προσωπικό του εργαστηρίου PROFI του IMBB-ITE, τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Αιβαλιώτη Μιχάλη και τον τεχνικό Κουντουράκη Νίκο για την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθεια τους στα πειράματα της φασματομετρίας μάζας.

Ακόμα, ειδική μνεία για τους όλους τους συναδέλφους που στον ένα ή στον άλλο βαθμό είχαν συμβολή στην ολοκλήρωση της διατριβής και το εργαστηριακό προσωπικό των εργαστηρίων Κρυσταλλογραφίας I και II, καθώς και του εργαστηρίου ηλεκτρονικής μικροσκοπίας για την βοήθεια τους σε όλα τα επίπεδα. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ αξίζει στο μέλος του ερευνητικού προσωπικού του imbb-ITE και διδάκτωρ κ. Βλατά Χαρούλα χωρίς την βοήθεια της οποίας ένα σημαντικό κομμάτι της διατριβής δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί.

Φυσικά δεν θα μπορούσαν να λείπουν οι συνάδελφοι και συνοδοιπόροι μου στο εργαστήριο όλα αυτά τα χρόνια Καλογνώμου Μαρία και Κυβελίδου Χριστιάνα για τις ατέλειωτες ώρες που περάσαμε σχολιάζοντας αποτελέσματα και ευρήματα και προσπαθώντας να αντιμετωπίσουμε τις καθημερινές δυσκολίες που παρουσιάζονταν.

Τις ευχαριστώ για τα πολλά κουράγια που μου πρόσφεραν αλλά και τις γόνιμες συζητήσεις για όλα τα θέματα. Επίσης, ευχαριστώ και τις διδακτορικές φοιτήτριες Βαρδάκη Κατερίνα και Ζέρβα Ιωάννα για την άψογη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια και για την φιλία τους. Εύχομαι σε όλες να ολοκληρώσουν την διατριβή τους και καλή συνέχεια στην σταδιοδρομία τους.

Φυσικά δε θα μπορούσα να ξεχάσω τους μικρότερους του εργαστηρίου: τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Παπαδογιάννη Γιωργία, Δρούγκα Βαγγέλη και Ανθούση Αμαλία. Η ενασχόληση με τα πειράματα τους υπήρξε πολύτιμη πείρα αλλά και το πολύ καλό κλίμα που δημιουργούσαν στο εργαστήριο ήταν ευχάριστο διάλειμμα από την καθημερινότητα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Γρηγορίου Μαρία για την άψογη συνεργασία της στα πειράματα με τους βιοαισθητηρες και τα συνέδρια που συμμετείχαμε μαζί.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου που στηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια όλες τις επιλογές μου καθώς και όλους τους συντρόφους και φίλους μου που έχουν σταθεί στο πλευρό μου.

Ευχαριστώ και τον Μάνο μου για την αμέριστη συμπαράσταση, την υπομονή του και την επιμονή του να γίνομαι συνέχεια καλύτερη. Κυρίως, τον ευχαριστώ για την ισορροπία που διατηρεί στην ζωή μου.

Μπακέλα Κατερίνα  
Ηράκλειο 2015

*“Η επιστήμη είναι δεδομένα. Ακριβώς όπως τα σπίτια χτίζονται με τούβλα, έτσι και η επιστήμη χτίζεται με δεδομένα. Αλλά όπως ένας σωρός τούβλα δεν κάνει ένα σπίτι, έτσι και μια συλλογή δεδομένων δεν είναι απαραίτητα επιστήμη.”*

Ανρί Πουανκαρέ (1854-1912), Γάλλος Μαθηματικός

## Περίληψη

Τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια (sMHCII) είναι παρόντα στα σωματικά υγρά υγιών ατόμων και θεωρείται πως εμπλέκονται στην διατήρηση της ανοχής σε αντιγόνα του εαυτού αλλά σχετίζονται και με μία σειρά ασθενειών. Από τις μελέτες προκύπτει ότι τα διαλυτά μόρια έχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των ασθενειών, αλλά δεν έχει ξεκαθαριστεί αν αποτελούν προϊόντα της πάθησης ή αν συνεισφέρουν κάπως στην εξέλιξή της. Η συγκεντρωσή τους αυξάνει κατά την *in vivo* αντιγονοειδική ανοχογόνα διέγερση και έχει αποδειχθεί σχετικά πρόσφατα πως η ανοχή η οποία μεσολαβείται από εξωσώματα (exosomes) είναι εξαρτώμενη από τάξης II MHC μόρια. Σε κυτταρικό επίπεδο, οι διαλυτές τάξης II πρωτεΐνες ανταγωνίζονται με τις αντίστοιχες μεμβρανικές για την πρόσδεση στον TCR των CD4+ T-λεμφοκυττάρων.

Τα διαλυτά μόρια απομονώνονταν με τεχνικές ανοσοσυγγένειας από ορό ανοχοποιημένων Balb/c ποντικών με την πρωτεΐνη Human Serum Albumin (HSA). Η πηκτή πολυακρυλαμίδης αποκάλυψε μία μοναδική ζώνη των 60.000Da υψηλά γλυκοζυλιωμένη, η οποία αλληλεπιδρούσε ειδικά με μονοκλωνικό anti-class II αντίσωμα σε στύπωμα κατά Western και τεχνικές ELISA. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση επιβεβαιώθηκε και με πειράματα ακουστικών βιοαισθητήρων. Η ανάλυση μετά από τη φασματομετρία μάζας αποκάλυψε πως τα διαλυτά μόρια είναι «φορτωμένα» με ανοχογόνα πεπτίδια καθώς και αντιγονικά πεπτίδια του εαυτού.

Σε κυτταρικό επίπεδο, τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια κατέστειλλαν τον αντιγονοειδικό, και σε μικρότερο βαθμό τον μη-αντιγονοειδικό πολλαπλασιασμό των σπληνοκυττάρων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* ενώ αφού επιβεβαιώσαμε μέσω πειραμάτων ακουστικών βιοαισθητήρων την ειδική αλληλεπίδραση CD4+ T-λεμφοκυττάρων και διαλυτών μορίων, τα τελευταία επήγαγαν την έκφραση του επιφανειακού δείκτη CD25 σε ανώριμα CD4+ T-λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, σε CD4+ T-λεμφοκύτταρα, τα οποία είχαν ενεργοποιηθεί από μακροφάγα, τα διαλυτά μόρια μείωσαν την έκφραση του μεμβρανικού δείκτη CD28 και αύξησαν τον μεμβρανικό δείκτη CTLA-4 ενώ ταυτόχρονα μείωσαν την έκκριση της κυτοκίνης IL-2 αυξάνοντας αυτή της κυτοκίνης IL-10. Όσον αφορά τα μονοπάτια σηματοδότησης του TCR, τα διαλυτά μόρια ήταν ικανά να μειώσουν την φωσφορυλίωση των ZAP-70 και LAT κινασών.

Η σύγκριση πρωτοκόλλων ανοχοποίησης, διαφορετικών ημερών, υπέδειξε πως η ανοχοποίηση ενός οργανισμού η οποία μεσολαβείται από κύτταρα είναι μια διαδικασία που αργεί και πιθανά στα αρχικά στάδια να μεσολαβείται από διαλυτούς παράγοντες

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ παρέχουν αποδείξεις για το ρόλο των διαλυτών τάξης II MHC πρωτεϊνών στην καταστολή ανοσολογικών αποκρίσεων και τη διατήρηση της ανοχής, αποκαλύπτοντας νέους ρυθμιστικούς μηχανισμούς για την διαχείριση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη απέδειξε πως οι διαλυτές τάξης II πρωτεΐνες απομονωμένες από τον ορό ποντικού ανοχοποιημένου για την HSA πρωτεΐνη μπορούν να επάγουν τόσο ειδικά όσο και μη ειδικά κατασταλτικά γεγονότα στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα τα οποία μεσολαβούνται όχι μόνο από την έκφραση επιφανειακών κατασταλτικών δεικτών αλλά και με την παραγωγή κατασταλτικών διαλυτών προϊόντων όπως της IL-10.

## Abstract

---

Soluble MHCII (sMHCII) molecules are present in body fluids of healthy individuals and are considered to be involved in the maintenance of self tolerance, and related to various diseases. Many studies have shown that sMHC molecules play an important role in the physiology of disease but it has not yet been clarified whether they are products of the disease or contribute on its progression. Their concentration increases during *in vivo* antigen-specific tolerogenic stimulation and it was recently shown that exosome-mediated tolerance is MHCII dependent. At the cellular level, sMHCII proteins compete with membrane MHCII for T-cell receptor binding on CD4+ T cells.

Immunoaffinity purification techniques isolated sMHCII antigens from the serum of human serum albumin (HSA)-tolerant mice as a single highly glycosylated protein with a molecular weight of ~60.000, specifically interacting with anti-class II antibodies in Western blotting, ELISA, and acoustic biosensor techniques. Mass spectroscopy analysis showed that these sMHCII proteins were loaded with the tolerogenic peptide as well as multiple self peptides.

At the cellular level, sMHCII suppressed antigen-specific, and to a lesser degree antigen-non-specific, spleen cell proliferation *in vitro* as well as *in vivo*. Using, acoustic biosensor techniques, we confirmed the interaction between sMHCII molecules and CD4+ T-cells. sMHCII were able to induced CD25 expression in naive T cells and in T cells activated by antigen-seeded macrophages. In addition, sMHCII decreased CD28 and increased CTLA-4 protein expression, while decreasing interleukin-2 and increasing interleukin-10 production. In this case, sMHCII proteins were shown to decrease ZAP-70 and LAT phosphorylation.

When we compared different tolerization protocols (different days), we concluded that the tolerization mediated by cells is a late response of the organism and is possible that soluble factors are produced first.

The results presented here for the first time provide evidence for the role of sMHCII proteins in immune response suppression and maintenance of tolerance, revealing novel regulatory mechanisms for immune system manipulation.

In conclusion, the present work demonstrated that sMHCII proteins isolated from HSA-tolerant mouse serum exerted antigen-specific as well as antigen-non-specific suppressive effects on CD4+ T cells which are mediated not only by inhibitory marker expression but also by production of suppressive soluble products (i.e. IL-10).

## Περιεχόμενα

---

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
Περιεχόμενα.....	6
Κεφάλαιο 1- Εισαγωγή.....	8
1.1. Το ανοσοποιητικό σύστημα.....	9
1.2. Η διαδικασία της αιμοποίησης.....	9
1.3. Τα δευτερογενή λεμφικά όργανα.....	11
1.3.1. Σπλήνας και κυτταρικοί πληθυσμοί.....	12
1.4. Το Κύριο Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας (MHC) .....	12
1.4.1. Τα κλασσικά τάξης I μόρια του MHC.....	13
1.4.2. Τα κλασσικά τάξης II μόρια του MHC.....	14
1.4.3. Τα κλασσικά τάξης III μόρια του MHC.....	15
1.5. Κυτοκίνες.....	16
1.6. Αντιγονικοί καθοριστές.....	18
1.7. Τα T-λεμφοκύτταρα.....	19
1.7.1 Ο υποδοχέας των T-λεμφοκυττάρων (T-Cell Receptor, TCR).....	21
1.7.2. Η αλληλεπίδραση του TCR με το σύμπλοκο MHC-II/πεπτιδίου.....	22
1.7.3. Ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων.....	23
1.7.4. Τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα.....	25
1.7.5. Οι επιφανειακοί υποδοχείς CD28/CTLA-4 (CD152).....	26
1.8. Τα T-ρυθμιστικά κύτταρα.....	29
1.8.1. Η κατασταλτική δράση των T-ρυθμιστικών κυττάρων.....	31
1.8.1.1. Επιφανειακοί δείκτες των T-ρυθμιστικών κυττάρων: Foxp3.....	32
1.8.1.2. Επιφανειακοί δείκτες των T-ρυθμιστικών κυττάρων: CD25.....	33
1.8.2. Τα T-ρυθμιστικά κύτταρα στα αυτοάνοσα νοσήματα.....	35
1.9. Τα διαλυτά τάξης I και II MHC μόρια.....	36
1.9.1. Βιοχημικές ιδιότητες των διαλυτών τάξης I και II MHC μορίων.....	36
1.9.2. Προέλευση και κυκλοφορία των διαλυτών τάξης I και II MHC μορίων.....	37
1.9.3. Η ρύθμιση των διαλυτών τάξης I και II MHC μορίων στην εγκυμοσύνη.....	38
1.9.4. Η παρουσία των διαλυτών τάξης I και II MHC μορίων σε παθολογικές καταστάσεις.....	38
1.9.5. Η παρουσία των διαλυτών τάξης I και II MHC μορίων στις αυτοανοσίες.....	39
1.9.6. Τα διαλυτά τάξης I και II MHC μόρια καθοριστές του οσμότυπου.....	40
1.9.7. Τα διαλυτά τάξης I και II MHC μόρια ως ρυθμιστές της ανοσολογικής απόκρισης.....	40
1.10. Σκοπός της εργασίας.....	43
Κεφάλαιο 2- Μέθοδοι και Υλικά.....	44
2.1. Ποντίκια και συλλογή ορού και οργάνων.....	45
2.2. Αντισώματα.....	46

2.3. Ανοσοκατακρίμνηση πρωτεϊνών.....	46
2.3.1. Ακινητοποίηση αντισώματος στα σφαιρίδια.....	46
2.3.2. Ανοσοκατακρίμνηση πρωτεϊνών.....	47
2.4. Dialysis.....	48
2.5. Επεξεργασία πρωτεϊνών με PGNaseF protease.....	48
2.6. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	48
2.6.1. Ηλεκτροφόρηση.....	49
2.6.2. Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver staining).....	49
2.7. Western Blot.....	50
2.7.1. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Transfer).....	50
2.7.2. Western.....	51
2.8. Μέθοδος Lowry.....	51
2.9. Φασματομετρία Μάζας (MS analysis).....	52
2.10. Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσοφητική Δοκιμή (ELISA).....	53
2.11. Η τεχνολογία των βιοαισθητήρων.....	54
2.11.1. Ακουστικοί βιοαισθητήρες.....	55
2.11.2. Ακουστικός βιοαισθητήρας Love.....	55
2.11.3. Μέθοδοι και υλικά για την προετοιμασία του βιοαισθητήρα και των δειγμάτων.....	56
2.12. Πρωτόκολλα ανοσοποίησης και ανοχοποίησης.....	57
2.13. Έλεγχος πολλαπλασιασμού κυττάρων με ραδιενεργή θυμιδίνη ( <sup>3</sup> HTdR).....	58
2.14. Απομόνωση λεμφοκυττάρων από κύτταρα σπλήνα.....	58
2.15. Εξωτερικός ανοσοφθορισμός.....	59
2.16. Κυτταρομετρία Ροής.....	59
2.16.1. Διαγράμματα απεικόνισης αποτελεσμάτων της Κυτταρομετρίας Ροής.....	60
2.17. Whole cell extracts.....	62
2.18. Στατιστική ανάλυση.....	62
Κεφάλαιο 3- Αποτελέσματα.....	63
3.1. Απομόνωση και ταυτοποίηση των διαλυτών τάξης II μορίων.....	64
3.2. Πειράματα φασματομετρίας μάζας.....	69
3.3. Πειράματα ταυτοποίησης των διαλυτών μορίων μέσω βιοαισθητήρων.....	74
3.4. Επίδραση των διαλυτών ταξης II MHC μορίων σε <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> ανοσοποιημένα κύτταρα σπλήνα.....	79
3.5. Αλληλεπίδραση των διαλυτών ταξης II MHC με CD4+ T-λεμφοκύτταρα.....	83
3.6. Επίδραση των διαλυτών μορίων στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα.....	86
3.6.1. Μελέτη της έκφρασης του μεμβρανικού υποδοχέα CD25.....	86
3.6.2. Μελέτη της έκφρασης των μεμβρανικών υποδοχέων CD28/CTLA-4.....	89
3.6.3. Μελέτη της έκκρισης κυτοκινών.....	92
3.7. Μελέτη σηματοδοτικών μονοπατιών των CD4+ T-λεμφοκυττάρων.....	94
3.8. Ρυθμιστικοί δείκτες σε διάφορα πρωτόκολλα ανοχοποίησης.....	96
Κεφάλαιο 4- Συζήτηση.....	102
Κεφάλαιο 5- Βιβλιογραφία.....	109
Παράρτημα.....	115

## Κεφάλαιο 1-Εισαγωγή

---



# Κεφάλαιο 1-Εισαγωγή

## 1.1. Το ανοσοποιητικό σύστημα

---

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα αξιόλογο προσαρμοστικό σύστημα που αναπτύχθηκε στα σπονδυλωτά για να τα προστατεύει από τους παθογόνους μικροοργανισμούς και τον καρκίνο. Είναι αρμόδιο να παράγει τεράστια ποικιλία κυττάρων και μορίων, ικανών για την ειδική αναγνώριση ξένων αντιγόνων. Το ανοσοποιητικό σύστημα περιλαμβάνει συστατικά της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας

*Η μη ειδική ανοσία, η έμφυτη ανοσία, αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στις μολύνσεις. Οι μηχανισμοί αυτοί δεν είναι ειδικοί για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο, αλλά περιλαμβάνουν κυτταρικά και μοριακά συστατικά τα οποία αναγνωρίζουν τάξεις μορίων, που μοιάζουν με τα συνήθη παθογόνα. Φαγοκύτταρα, όπως μακροφάγα και ουδετερόφιλα, φραγμοί, όπως π.χ το δέρμα ή οι βλεννογόνοι καθώς και μία ποικιλία αντιμικροβιακών συστατικών (προπερδίνη, ιντερφερόνες, συμπλήρωμα) του ξενιστή παίζουν σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία.*

*Αντίθετα, η ειδική ανοσία, η προσαρμοστική ανοσία, δεν συμμετέχει μέχρις ότου να συμβεί αντιγονική επίθεση στον οργανισμό. Η προσαρμοστική ανοσία αποκρίνεται στην επίθεση με ένα υψηλό βαθμό εξειδίκευσης, καθώς επίσης και την ιδιότητα της «μνήμης». Υπάρχουν 2 είδη μηχανισμών της προσαρμοστικής ανοσίας:*

- Αυτός που έχει σαν «μεσολαβητή» της ανοσίας κυτταρικά προϊόντα του λεμφικού ιστού, τα αντισώματα, που συλλογικά αποτελούν τη χυμική ανοσία.
- Αυτός που έχει σαν «μεσολαβητή» της ανοσίας ειδικά ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα (Τ-κυτταροτοξικά και φυσικοί φονιάδες), που συλλογικά αποτελούν την κυτταρομεσολαβητική ανοσία.

## 1.2. Η διαδικασία της αιμοποίησης

---

Αιμοποίηση είναι το σύνολο των διεργασιών που απαιτούνται για την παραγωγή των κυττάρων του αίματος και πραγματοποιείται στον μυελό των οστών. Όλα τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από τη διαφοροποίηση ενός αδιαφοροποίητου πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου (stem cell). Τα ώριμα κύτταρα του αίματος δεν διαιρούνται, έχουν μικρή διάρκεια ζωής και έτσι είναι απαραίτητη η συνεχής αντικατάστασή τους.

Η αιμοποίηση περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων τα οποία διαιρούνται, σύμφωνα με το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκεται το stem cell. Τα αίμα των θηλαστικών αποτελείται από ένα υποκίτρινο υγρό, το πλάσμα, μέσα στο οποίο κυκλοφορούν τα έμμορφα συστατικά του, τα ερυθρά και τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. (Εικ. 1.1)

Τα λευκά αιμοσφαίρια είναι εμπύρνηνα κύτταρα που συμμετέχουν στο σύστημα της ανοσίας. Αποτελούν λιγότερο από το 1% των συστατικών του αίματος. Διακρίνονται σε πολυμορφοπύρνηνα κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα), μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα.

### ΠΟΛΥΜΟΡΦΟΠΥΡΗΝΑ

Τα πολυμορφοπύρνηνα κοκκιοκύτταρα προέρχονται από το μητρικό κύτταρο μυελοβλάστη, το οποίο διαφοροποιείται σε προμυελοκύτταρο, μυελοκύτταρο και τελικά σε μεταμυελοκύτταρο. Το τελευταίο θα διαφοροποιηθεί σε ουδετερόφιλο, ηωσινόφιλο και βασεόφιλο.

*Ουδετερόφιλα (40-75%):* κύτταρα με πολύλοβο πυρήνα και χαρακτηριστική ικανότητα φαγοκυττάρωσης. Στο κυτταρόπλασμα τους ανιχνεύονται κοκκία.

*Ηωσινόφιλα (5%):* κοκκιοκύτταρα με χαρακτηριστική μορφολογία. Έχουν δίλοβο πυρήνα και οξύφιλα κοκκία.

*Βασεόφιλα (0,5%):* κύτταρα με δίλοβο ή τρίλοβο πυρήνα και κυτταρόπλασμα με μεγάλα βασεόφιλα κοκκία.

### ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ

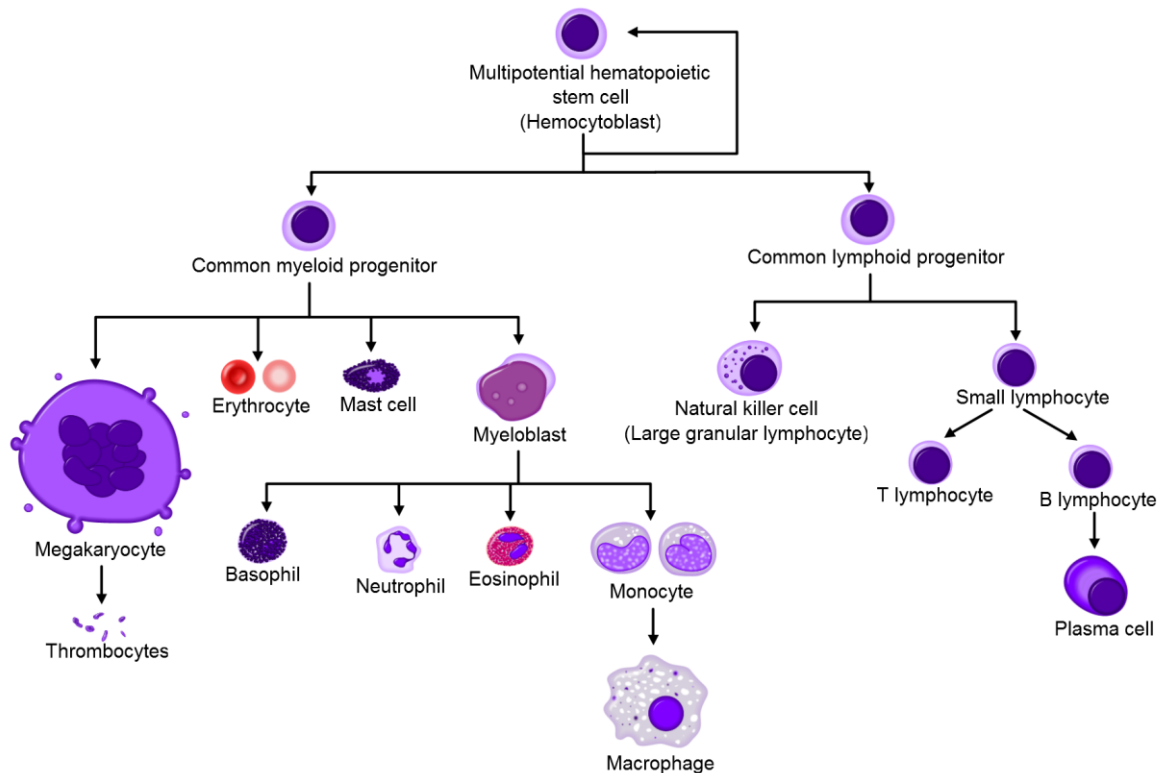
Εντοπίζονται σε ποσοστό 1-5% στο αίμα. Είναι κύτταρα με πεταλοειδή ή ωσειδή πυρήνα και ελαφρά βασεόφιλο κυτταρόπλασμα. Τα μονοκύτταρα αποτελούν πρόδρομες μορφές των μακροφάγων που απαντούν στους ιστούς και τα λεμφικά όργανα. Προέρχονται από το ίδιο αρχέγονο κύτταρο με τα πολυμορφοπύρνηνα, το οποίο διαφοροποιείται σε μονοβλάστη. Επόμενο στάδιο ωρίμανσης είναι το προμονοκύτταρο, που θα δώσει και την τελική ώριμη μορφή, το μονοκύτταρο.

### ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Εντοπίζονται σε ποσοστό 20-50% στο αίμα. Τα λεμφοκύτταρα είναι τα μικρότερα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος και είναι σφαιρικά με παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά. Προέρχονται από το stem cell, το οποίο διαφοροποιείται σε λεμφοβλάστη. Αυτό θα δώσει το προλεμφοκύτταρο από το οποίο θα προκύψουν τα Β- και Τ-λεμφοκύτταρα και τα ΝΚ-κύτταρα (natural killer/φυσικούς φονιάδες). (Εικ. 1.1)

Τα Β-λεμφοκύτταρα παράγουν εξειδικευμένα αντισώματα ενάντια σε εισβάλλοντα αντιγόνα (χυμική ανοσία) ενώ τα Τ-λεμφοκύτταρα χωρίζονται σε 2 κύριες κατηγορίες: τα Τ-βοηθητικά τα οποία απελευθερώνουν σηματοδοτικά μόρια για την προσέλκυση των Β-λεμφοκυττάρων και τα Τ-κυτταροτοξικά τα οποία εκκρίνουν τοξικές ουσίες για την θανάτωση κυττάρων που έχουν προσβληθεί από ιούς, νεοπλασματικών κυττάρων αλλά και κατά την απόρριψη μωσχεύματος (κυτταρική ανοσία).

Οι φυσικοί φονιάδες είναι μεγάλα κοκκιώδη κύτταρα που εμπλέκονται στην άμυνα εναντίων των ιών και των νεοπλαστικών κυττάρων. Επιπλέον, τα λεμφοκύτταρα εκκρίνουν ένα σημαντικό αριθμό λεμφοκινών και κυτοκινών και παίζουν ρόλο στην ρύθμιση πολλών ανοσολογικών μηχανισμών του οργανισμού.



**Εικόνα 1.1:** Η διαδικασία της αιμοποίησης. Από τα αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα στα διαφοροποιημένα κύτταρα του αίματος. (Regenerative Medicine, 2006).

### 1.3. Τα δευτερογενή λεμφικά όργανα

Στα δευτερογενή λεμφικά όργανα ανήκουν ο σπλήνας, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τα αντιγόνα που μεταφέρονται με την ροή του αίματος, οι λεμφαδένες, που προστατεύουν τον οργανισμό από αντιγόνα τα οποία μεταφέρονται από το δέρμα ή από εσωτερικές επιφάνειες, και τέλος ιστοί που σχετίζονται με βλεννογόνες επιφάνειες (MALT, Mucosa Associated Lymphoid Tissue). Στους τελευταίους ανήκουν οι αμυγδαλές και οι πλάκες του Peyer στον ειλεό. Τα λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν από τα πρωτογενή λεμφικά όργανα στα δευτερογενή, τα οποία παρέχουν το κατάλληλο περιβάλλον για την αλληλεπίδραση των λεμφοκυττάρων με διάφορα αντιγόνα και άλλα κύτταρα. Όταν ένα ξένο αντιγόνο πετύχει την είσοδό του στους ιστούς παραλαμβάνεται από το λεμφικό σύστημα και μεταφέρεται σε διάφορους οργανωμένους λεμφικούς ιστούς όπως οι λεμφαδένες και το παγιδεύουν.<sup>1</sup>

### 1.3.1. Σπλήνας και κυτταρικοί πληθυσμοί

Ο σπλήνας είναι ένα μεγάλο ωοειδές, έντονα αγγειώδες δευτερογενές λεμφοειδές όργανο που εδράζεται ψηλά στην αριστερή πλευρά της περιτοναϊκής κοιλότητας, το οποίο εξειδικεύεται στην αντιμετώπιση αντιγόνων που βρίσκονται στο αίμα. Τα διάφορα αντιγόνα που βρίσκονται στο αίμα εισέρχονται στον σπλήνα διαμέσου της σπληνικής αρτηρίας. Στο εσωτερικό του, στα ξεχωριστά διαμερίσματα, εντοπίζονται διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί. Τα 2 διαμερίσματα που χαρακτηρίζουν τον σπλήνα είναι ο λευκός πολφός, ο οποίος διαχωρίζεται από το δεύτερο διαμέρισμα τον ερυθρό πολφό.

Στον λευκό πολφό εντοπίζονται κυρίως T- και B-λεμφοκύτταρα. Τα T-λεμφοκύτταρα εντοπίζονται κυρίως στο περιαρτηριακό λεμφοειδές κάλυμμα και τα B κυριαρχούν στην περιοχή των λεμφοειδών αδένων και στην οριακή ζώνη. Στον ερυθρό πολφό εντοπίζονται κυρίως τα μακροφάγα, τα οποία αποικοδομούν τα ερυθροκύτταρα που έχουν συμπληρώσει τον χρόνο ζωής τους. Επιπλέον, μακροφάγα εντοπίζονται και στην περιθωριακή περιοχή. Αθροιστικά, ο σπλήνας δημιουργεί ένα περιβάλλον που επιτρέπει τον εντοπισμό διαφόρων αντιγόνων που έχουν εισέλθει στο αίμα, την ενεργοποίηση των διαδικασιών της έμφυτης και της επίκτητης ανοσίας.<sup>1</sup>

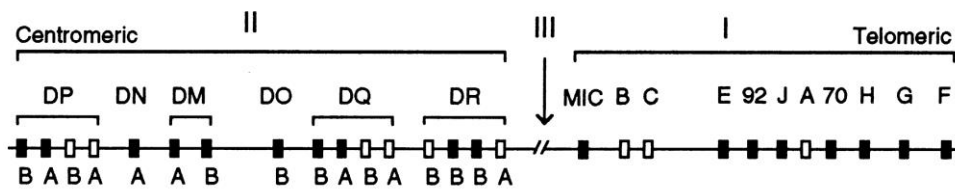
### 1.4. Το Κύριο Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας (MHC)

Κάθε είδος θηλαστικού που έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα διαθέτει στο γονιδίωμά του ένα στενά συνδεδεμένο σύμπλεγμα γονιδίων, το *Κύριο Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας (MHC)*, του οποίου τα προϊόντα παίζουν σημαντικό ρόλο στην διακυτταρική αναγνώριση και την διάκριση του εαυτού από τον μη εαυτό. Το MHC συμμετέχει στην ανάπτυξη τόσο των χυμικών όσο και των κυτταρομεσολαβητικών αποκρίσεων. Ενώ τα αντισώματα μπορούν να αναγνωρίσουν το αντιγόνο σαν ελεύθερο μόριο, τα T κύτταρα αναγνωρίζουν ένα αντιγόνο μόνο όταν αυτό συνδέεται με ένα μόριο MHC.<sup>1</sup>

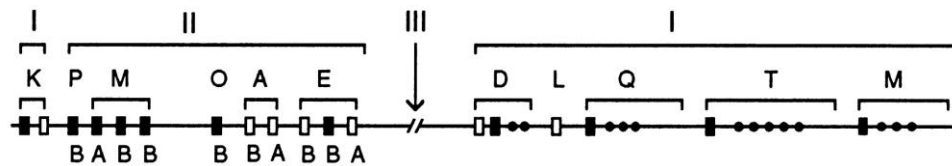
Επιπλέον, επειδή τα μόρια MHC λειτουργούν ως αντιγονοπαραρυσιαστικές δομές, το συγκεκριμένο σύνολο των μορίων MHC που εκφράζονται σε ένα άτομο επηρεάζει το ρεπερτόριο των αντιγόνων στα οποία τα T-λεμφοκύτταρα του ατόμου μπορούν να αποκριθούν. Για αυτό το λόγο τα μόρια MHC καθορίζουν εν μέρει την απόκριση ενός ατόμου σε αντιγόνα παθογόνων μικροοργανισμών και συνεπώς έχουν εμπλακεί στην ευαισθησία σε ασθένειες και στην ανάπτυξη αυτοανοσίας.<sup>1</sup> Στον ποντικό, *Mus musculus*, το σύμπλοκο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17, ενώ στον άνθρωπο, *Homo sapiens*, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6. Οι γενετικοί τόποι που εντοπίζονται στο MHC, περιλαμβάνουν γονίδια και ψευδογονίδια και ομαδοποιούνται σε 3 τάξεις γονιδίων, τα τάξης I, II και III που διαφοροποιούνται με βάση διάφορα δομικά αλλά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των προϊόντων τους. (Εικ. 1.2)

Οι 2 τάξεις μορίων σε χωρίζονται σε *κλασσικά μόρια* που εκφράζονται στην πλασματική μεμβράνη και είναι υψηλά πολυμορφικά και σε *μη κλασσικά μόρια*, DM/DO στον άνθρωπο και H2-M/H2-O στο ποντίκι, η έκφραση των οποίων είναι περιορισμένη σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους και δεν εμφανίζουν πολυμορφικότητα.<sup>1</sup>

## Human (HLA)



## Mouse (H2)



**Εικόνα 1.2:** Η οργάνωση του γενετικού τόπου του Κυρίου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας στον άνθρωπο (HLA) και στο ποντίκι (H2). Παρατηρούνται οι 3 τάξεις γονιδίων καθώς και τα μη-κλασσικά μόρια (DM/DO και H2-M/H2-O). ([www.pnas.org](http://www.pnas.org))

#### 1.4.1. Τα κλασσικά τάξης I μόρια του MHC

Τα κλασσικά μόρια MHC τάξης I που κωδικοποιούνται από τις περιοχές K, D και L στο ποντίκι και από τις A, B και C γενετικές θέσεις στον άνθρωπο. Τα κλασσικά μόρια MHC τάξης I ονομάζονται στον άνθρωπο HLA-A,-B και -C, ενώ στον ποντικό *Mus musculus*, H-2D, -2K και -2L. Εκφράζονται στο ευρύτερο φάσμα των κυτταρικών τύπων. Σημαντικές εξαιρέσεις, αποτελούν τα κύτταρα του τροφοβλάστη και τα κύτταρα του οφθαλμού και του εγκεφάλου, τα οποία παρουσιάζουν μειωμένη δυνατότητα αναγέννησης. Αυτό συμβαίνει για την προστασία των συγκεκριμένων κυττάρων (λόγω της εξειδικευμένης λειτουργίας τους) από κυτταροτοξικές επιθέσεις.

Τα μόρια του MHC τάξης I εμφανίζονται 'αγκυροβολημένα' σε μεμβράνες και σε διαλυτή μορφή σε διάφορα υγρά του σώματος όπως ο ορός και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό.<sup>2,3</sup>

Οι αλυσίδες συνδυάζονται με τέτοιο τρόπο, ώστε να δημιουργηθεί μια θήκη μέσα στην οποία τοποθετούνται πεπτίδια του εαυτού (ρύθμιση ανοχής) ή πεπτίδια που είναι ξένα για τον οργανισμό αλλά θεωρούνται ενδογενή (ιϊκές πρωτεΐνες, μη φυσιολογικές πρωτεΐνες του εαυτού) και οι οποίες αναγνωρίζονται από άλλους πληθυσμούς κυττάρων<sup>1</sup>, οι οποίοι οδηγούν το 'μολυσμένο' κύτταρο στην καταστροφή. Ο υποπληθυσμός των T κυττάρων που αναγνωρίζουν πεπτίδια, τα οποία βρίσκονται προσδεμένα με μόρια MHC τάξης I, παρουσιάζουν έντονη κυτταροτοξική δράση.

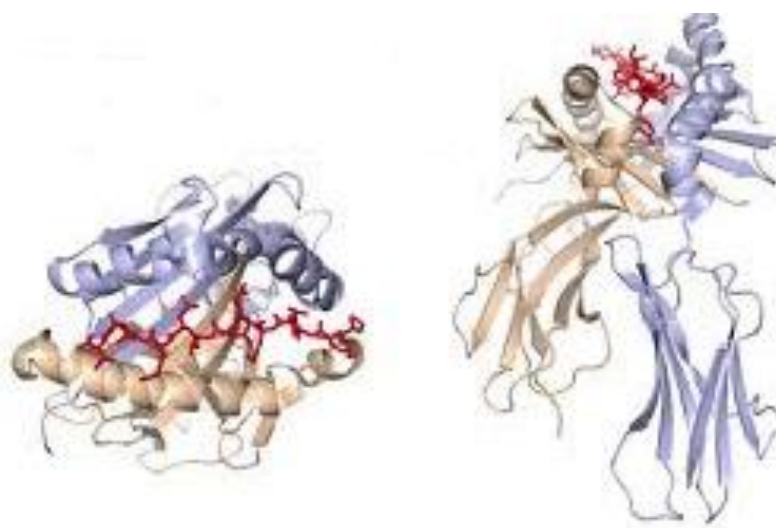
### 1.4.2. Τα κλασσικά τάξης II μόρια του MHC

Τα κλασσικά μόρια MHC τάξης II (HLA-DR, DP, DQ στον άνθρωπο και I-A, I-E στον ποντικό) διαφοροποιούνται σημαντικά από τα μόρια MHC τάξης I. Δομικά, αποτελούνται από 2 διαμεμβρανικές βαριά γλυκοζυλιωμένες αλυσίδες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με μη-ομοιοπολικούς δεσμούς και σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές  $\alpha/\beta$ . Κάθε αλυσίδα διαθέτει ένα τμήμα που διαπερνά την κυτταροπλασματική μεμβράνη, δένοντας έτσι το σύμπλοκο στην επιφάνεια του κυττάρου.

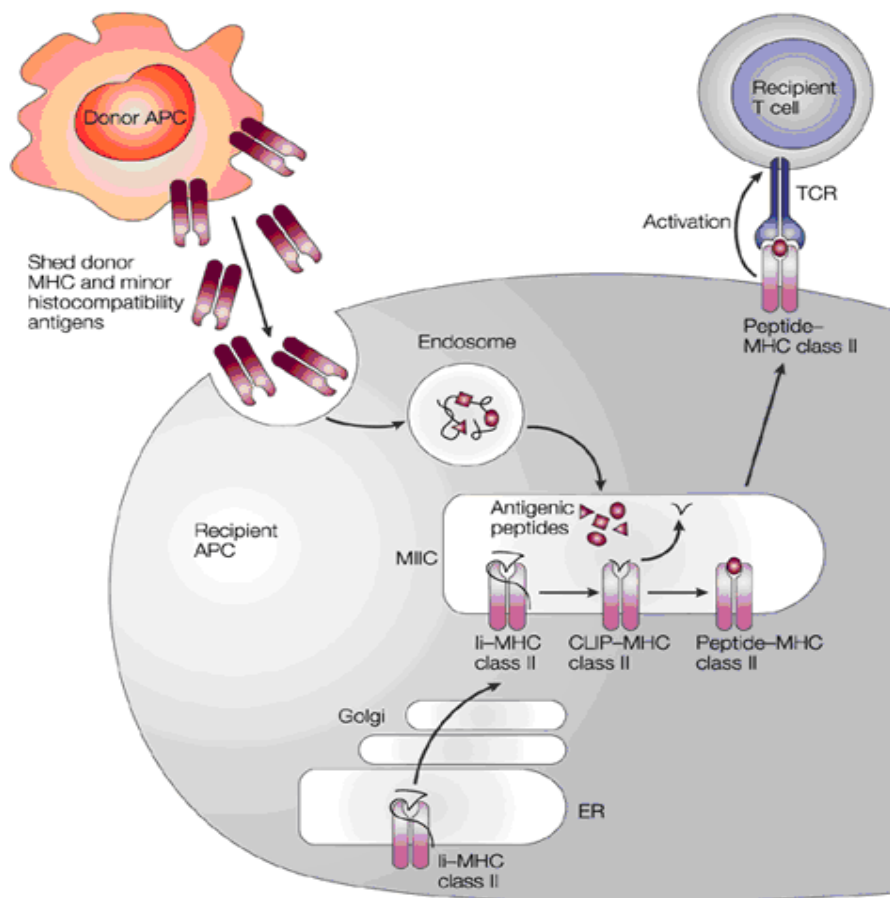
Η  $\alpha$  αλυσίδα έχει μέγεθος 33KD και η  $\beta$  αλυσίδα 28 KD. Η διαφορά συνδέεται με το βαθμό γλυκοζυλίωσης. Κάθε αλυσίδα έχει δυο επικράτειες  $\alpha 1/\alpha 2$  και  $\beta 1/\beta 2$ . Οι περιοχές  $\alpha 1$  και  $\beta 1$  (χαρακτηριστικές δομές μορίων MHC τάξης II, έντονα πολυμορφικές), σχηματίζουν μια θήκη, στην οποία προσδέονται πεπτίδια μήκους 10-15 καταλοίπων.<sup>4</sup> (Εικ. 1.3<sup>α</sup>) Το ετεροδιμερές συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου προσδέεται και ένα ακόμα μόριο, η σταθερή αλυσίδα (invariant chain, Ii) σχηματίζοντας τριμερές ενώ τελικά τρία τέτοια ετεροτριμερή συνδέονται σχηματίζοντας ένα εννιαμερές.

Η σταθερή αλυσίδα δρα ως ένα είδος ψευδοϋποστρώματος καλύπτοντας με ένα μικρό της τμήμα που ονομάζεται Class II associated Ii Peptide-CLIP την αύλακα πρόσδεσης πεπτιδίου του τάξης II μορίου και κατευθύνει την μετακίνηση του συμπλόκου από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Ενώ οι περισσότερες πρωτεΐνες κατευθύνονται μέσω του συμπλέγματος Golgi στην πλασματική μεμβράνη, η Ii οδηγεί τα τάξης II στο σύστημα των ώριμων ενδοσωμάτων και σε συγκεκριμένα κυστίδια που ονομάζονται MHC class II containing Compartments- MIIICs. (Εικ. 1.3<sup>β</sup>)

Τα MHC τάξης II μόρια προσδέουν πεπτίδια και τα παρουσιάζουν στα CD4+ κύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασης με τον TCR υποδοχέα. Γενικά τα πεπτίδια αυτά προέρχονται από εξωγενείς πρωτεΐνες (είτε εαυτές, είτε μη εαυτές), που αποικοδομούνται μέσω της ενδοκυτταρικής οδού επεξεργασίας (φαγοκυττάρωση, λυσοσώματα κτλ).<sup>5,6</sup> (Εικ. 1.3<sup>β</sup>)



**Εικόνα 1.3α:** Η δομή του κλασσικού τάξης-II μορίου ιστοσυμβατότητας (κρυσταλλογραφική ανάλυση). Με κόκκινο εμφανίζεται το συνδεδεμένο πεπτίδιο στην αύλακα πρόσδεσης. (nfs.uniprv.it)



**Εικόνα 1.36:** Το μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης. Τα πεπτίδια επεξεργάζονται στα ενδοσώματα και συναντώνται με τα τάξης II μόρια που είναι συνδεδεμένα με την Ii αλυσίδα στα MIICs ώστε να σχηματιστεί το σύμπλοκο τάξης-II/πεπτιδίου που θα κατευθυνθεί στην πλασματική μεμβράνη. (Nature reviews, Immunology)

### 1.4.3. Τα κλασσικά τάξης III μόρια του MHC

Τα γονίδια MHC τάξης III κωδικοποιούν εκτός των άλλων προϊόντων, διαφορετικές εκκριτικές πρωτεΐνες με σημαντικές ανοσολογικές λειτουργίες ανάμεσα στις οποίες και συστατικά του συστήματος του συμπληρώματος που σχετίζονται με την φλεγμονή. Εμφανίζουν λίγα κοινά στοιχεία με τα τάξης I και II μόρια και συμπεριλαμβάνουν τα συστατικά του συμπληρώματος C4, C2, Bf και κυτοκίνες φλεγμονής όπως ο TNF και των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

## 1.5. Κυτοκίνες

Οι κυτοκίνες είναι χαμηλού μοριακού βάρους πολυπεπίδια ή γλυκοπρωτείνες χαμηλού μοριακού βάρους, που εκκρίνονται από λεμφοκύτταρα και διάφορους άλλους κυτταρικούς τύπους του σώματος, ως απόκριση σε ένα πλήθος ερεθισμάτων. Βασικός τους ρόλος είναι η ρύθμιση των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος.<sup>1</sup>

Παράγονται κύρια από τα λευκά αιμοσφαίρια αλλά και από άλλα κύτταρα κατά τη διάρκεια ανοσολογικής απόκρισης μετά από ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων τους από κατάλληλα ερεθίσματα (φλεγμονή, ιογενείς λοιμώξεις, όγκοι, πολλαπλασιασμό T- και B-λεμφοκυττάρων). Ο τρόπος δράσης των κυτοκινών διακρίνεται σε αυτοκρινή (προσδένεται σε υποδοχείς του ίδιου του κυττάρου που την εκκρίνει), σε παρακρινή (προσδένεται σε υποδοχείς κυττάρων στόχων που βρίσκονται κοντά στο κύτταρο που την εκκρίνει), καθώς και σε ενδοκρινή (προσδένεται σε υποδοχείς κυττάρων στόχων που βρίσκονται σε απομακρυσμένα μέρη, από το κύτταρο έκκρισης της).

Οι κυτοκίνες επιτελούν τις βιολογικές τους δράσεις δεσμευόμενες σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς των κυττάρων στόχων, πυροδοτώντας μηχανισμούς μεταγωγής μηνύματος, με τελικό αποτέλεσμα τη μεταβολή του προτύπου της γονιδιακής τους έκφρασης. Η ευαισθησία ενός κυττάρου-στόχου στην επίδραση μίας συγκεκριμένης κυτοκίνης εξαρτάται από την παρουσία κατάλληλου ειδικού υποδοχέα στην μεμβράνη του. Γενικά οι κυτοκίνες και οι υποδοχείς τους επιδεικνύουν υψηλή συγγένεια στη μεταξύ τους σύνδεση. Μέχρι τώρα έχουν μελετηθεί 5 τύποι υποδοχέων:

1. υποδοχείς τύπου I (αιμοποιητίνης)
2. υποδοχείς τύπου II (ιντερφερονών)
3. υποδοχείς της υπεροικογένειας του TNF (tumor necrosis factor)
4. υποδοχείς τύπου IV (IL-1 /Toll)
5. υποδοχείς της οικογένειας του TGF-beta
6. υποδοχείς τύπου τυροσινικής κινάσης

Οι κυτοκίνες επηρεάζουν την κυτταρική διαφοροποίηση, το πολλαπλασιασμό και ενεργοποιούν προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις απαντήσεις επιτρέποντας την αντίδραση του ξενιστή σε παθογόνα. Η πιο πρόσφατη ταξινόμηση των κυτοκινών βασίζεται στο είδος των υποδοχέων με τους οποίους συνδέονται αλλά το πιο διαδεδομένο σύστημα ταξινόμησης αφορά τη λειτουργία τους. (Πίν. 1.1)

Κάθε κυτοκίνη μπορεί να παραχθεί από/και να δρα σε πολλούς διαφορετικούς τύπου κυττάρων με διαφορετικές δράσεις ανάλογα με το τύπο του κυττάρου. Πολλές κυτοκίνες παρουσιάζουν αλληλεπικαλυπτόμενη ή συνεργική δράση μεταξύ τους ενώ άλλες έχουν ανταγωνιστική δράση. Με τον τρόπο αυτό, οι κυτοκίνες ελέγχουν την ένταση και τη διάρκεια της ανοσοαπόκρισης με τη διέγερση ή την αναστολή της ενεργοποίησης, του πολλαπλασιασμού ή και της διαφοροποίησης διαφόρων κυττάρων, καθώς επίσης και με το να ρυθμίζουν την έκκριση αντισωμάτων ή άλλων κυτοκινών. Οι κυτοκίνες που εκκρίνονται από ένα λεμφοκύτταρο όταν αυτό ενεργοποιηθεί, μπορούν να επηρεάσουν και να ενεργοποιήσουν ένα ολόκληρο δίκτυο αλληλεπιδρώντων κυττάρων.



<b>ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΚΥΤΟΚΙΝΩΝ</b>
<b>Προφλεγμονώδεις κυτοκίνες</b>
Παράγων νέκρωσης των όγκων $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), Ιντερλευκίνη 1 (IL-1) Ιντερλευκίνη 6 ( IL-6)
<b>Ανοσορυθμιστικές κυτοκίνες</b>
Ιντερφερόνη $\gamma$ (INF- $\gamma$ ), Ιντερλευκίνη 2 ( IL-2) Ιντερλευκίνη 4 ( IL-4) Ιντερλευκίνη 5 ( IL-5) Ιντερλευκίνη 7 ( L-7) Ιντερλευκίνη 9 (IL-9) έως Ιντερλευκίνη 18 ( IL-18)
<b>Αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες (Colony stimulating Factors, CSF)</b>
Αυξητικός παράγοντας των ουδετερόφιλων –μακροφάγων (GM-CSF) Αυξητικός παράγοντας των ουδετερόφιλων (G-CSF) Αυξητικός παράγοντας των μακροφάγων (M-CSF) Ιντερλευκίνη 3 (IL-3) Ερυθροποιητίνη (EPO)
<b>Αυξητικοί παράγοντες και παράγοντες διαφοροποίησης</b>
Αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων (Platelet derived growth factor, PDGF) Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor,EGF) Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (fibroblast growth factor ,FGF) Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας (Transforming growth factor ,TGF)
<b>Αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες</b>
Ιντερλευκίνη 1Ra ( IL-1Ra) Ιντερλευκίνη 10 ( IL-10) Ιντερλευκίνη 13 ( IL-13)

**Πίνακας 1.1:** Κατάταξη των σημαντικότερων κυτοκινών με βάση την λειτουργία τους.

## 1.6. Αντιγονικοί καθοριστές

Τα λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν και προσδένονται σε συγκεκριμένα τμήματα των ανοσογόνων μακρομορίων τα οποία αναφέρονται ως επίτοποι ή αντιγονικοί καθοριστές.<sup>7</sup>

Αντιγονικός επίτοπος ή αντιγονικός καθοριστής λέγεται κάθε προέχουσα χημική διαμόρφωση πάνω στην εξωτερική επιφάνεια του αντιγόνου που μπορεί να συνδεθεί στερεοχημικά με το ομόλογό της αντίσωμα ή τον ομόλογο της μεμβρανικό υποδοχέα του T-λεμφοκυττάρου.

Δυνητικά, κάθε περιοχή της επιφάνειας ενός μακρομορίου μπορεί να λειτουργήσει ως επίτοπος και, κατά συνέπεια, κάθε μακρομόριο περιέχει μεγάλο αριθμό επιτόπων. Όσον αφορά στα πρωτεϊνικά αντιγόνα, οι επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα έχουν μήκος περίπου 5-7 αμινοξέα με συχνή την παρουσία των αμινοξέων λυσίνη, τρυπτοφάνη, γλουταμίνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη.

Τα T-λεμφοκύτταρα δεν αναγνωρίζουν ελεύθερα πεπτίδια αλλά μόνο πεπτίδια που παρουσιάζονται σε συνδυασμό πάντοτε με ένα μόριο του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC). Οι επίτοποι που συνδέονται με τα T-λεμφοκύτταρα έχουν μεγαλύτερο μέγεθος (10-15 αμινοξέα) καθώς ένα μέρος του επιτόπου συνδέεται με τμήμα του αντιγόνου ιστοσυμβατότητας, ενώ το υπόλοιπο μέρος του επιτόπου συνδέεται με τον υποδοχέα τους (TCR).

Οι πρωτεϊνικοί επίτοποι είναι είτε συνεχείς (γραμμικοί) που αποτελούνται από αλληλουχία αμινοξέων τα οποία βρίσκονται σε συνεχή διάταξη στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, είτε ασυνεχείς (διαμορφωτικοί) όταν αποτελούνται από αλληλουχία αμινοξέων που έχουν ασυνεχή διάταξη στην πρωτοταγή δομή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, αλλά συνεχή διάταξη στην τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης. Επιπλέον υπάρχουν οι νεοεπίτοποι (neoperitopes) που δημιουργούνται μετά από αντιδράσεις που αλλάζουν τη στερεοδομή των πρωτεϊνών (φωσφορυλιώσεις, πρωτεόλυση κ.ά.) καθώς και υπεραντιγόνα.

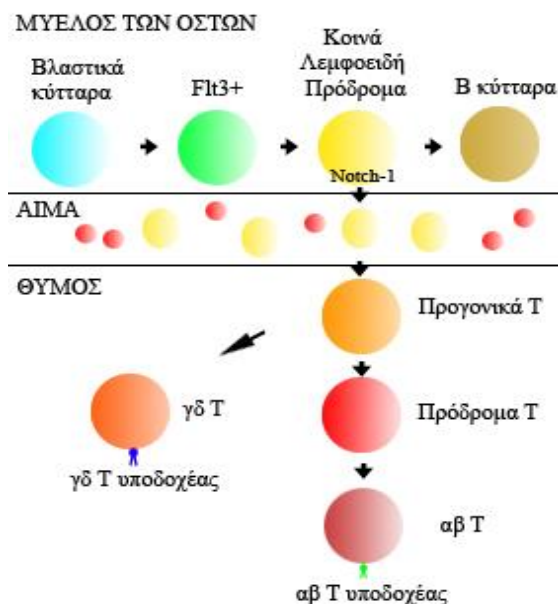
Στα σακχαρικά αντιγόνα, οι επίτοποι σχηματίζονται από 4-6 μονοσάκχαρα, συνηθέστερα γλυκόζη, γαλακτόζη, φουκόζη, γλυκοζαμίνη και γαλακτοζαμίνη. Τέτοιες μικρές ετεροσακχαρικές αλυσίδες βρίσκονται συνήθως πάνω σε άλλα μεγάλα πολυσακχαρικά μόρια: πρωτεΐνες (γλυκοπρωτεΐνες), ή λιπίδια (γλυκολιπίδια). Κάθε αλλαγή σε ένα ή περισσότερα από τα μονοσάκχαρα που σχηματίζουν τον επίτοπο, είναι ικανή να αλλάξει σε μεγάλο βαθμό τη μορφή της προέχουσας στερεοχημικής διαμόρφωσης ώστε τελικά να προκύψει ένας νέος αντιγονικός επίτοπος. Κλασικό παράδειγμα είναι τα αντιγόνα A και B των ερυθρών αιμοσφαιρίων του ανθρώπου.

Για κάθε αντιγονικό επίτοπο παράγονται στον οργανισμό πολλά αντισώματα έτσι ώστε η έννοια της απόλυτης ειδικότητας του αντισώματος με τον επίτοπο δεν είναι ακριβής. Τα αντισώματα συνδέονται με ένα συγκεκριμένο αντιγονικό επίτοπο με διαφορετική γωνία σύνδεσης και με διαφορετική ευκολία που καθορίζει τη συγγένεια (affinity) του αντισώματος με τον επίτοπο. Η δύναμη σύνδεσης των επιμέρους αντισωμάτων με τον αντιγονικό επίτοπο ορίζει τον βαθμό ειδικότητας του αντισώματος.

Τέλος, δύο ουσίες μπορεί να έχουν κοινούς έναν ή περισσότερους επιτόπους με αποτέλεσμα στοιχεία της ανοσοαπόκρισης που διεγείρονται έναντι επιτόπου της πρώτης ουσίας ν' αναγνωρίζουν έναν, ή περισσότερους, επιτόπους της δεύτερης. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται διασταυρούμενη αντίδραση (cross-reactivity) ή «φαινόμενο πληθυσμού» (population phenomenon).<sup>8</sup>

## 1.7. Τα T-λεμφοκύτταρα

Η διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων ξεκινάει στον μυελό των οστών όπου τα βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται, μέσω των Flt3<sup>+</sup> κυττάρων, στα Κοινά Λεμφοειδή Πρόδρομα κύτταρα (Common Lymphoid Precursor), από τα οποία στην συνέχεια προκύπτουν όλα τα λεμφοκύτταρα.<sup>9</sup> Αρκετά ΚΛΠ μεταφέρονται με το αίμα στον θύμο (από όπου τα T-λεμφοκύτταρα πήραν το όνομά τους), όπου και διαφοροποιούνται σε προγονικά T-λεμφοκύτταρα, τα οποία δεν εκφράζουν συνυποδοχείς. Σε αυτό το στάδιο οι αναδιατάξεις που επιτελούνται στον γενετικό τόπο του TCR (T-Cell Receptor), οδηγούν στην εμφάνιση των κυττάρων που εκφράζουν τον γδ TCR υποδοχέα ή των προδρόμων T κυττάρων που εκφράζουν τον πρόδρομο TCR υποδοχέα. Στην πρώτη περίπτωση, τα κύτταρα καθορίζονται ως γδ T κύτταρα και στην δεύτερη ως αβ T κύτταρα.<sup>9</sup> Η σηματοδότηση Notch-1 φαίνεται πως παίζει κρίσιμο ρόλο στον καθορισμό των λεμφοκυττάρων.<sup>10</sup> (Εικ. 1.4)



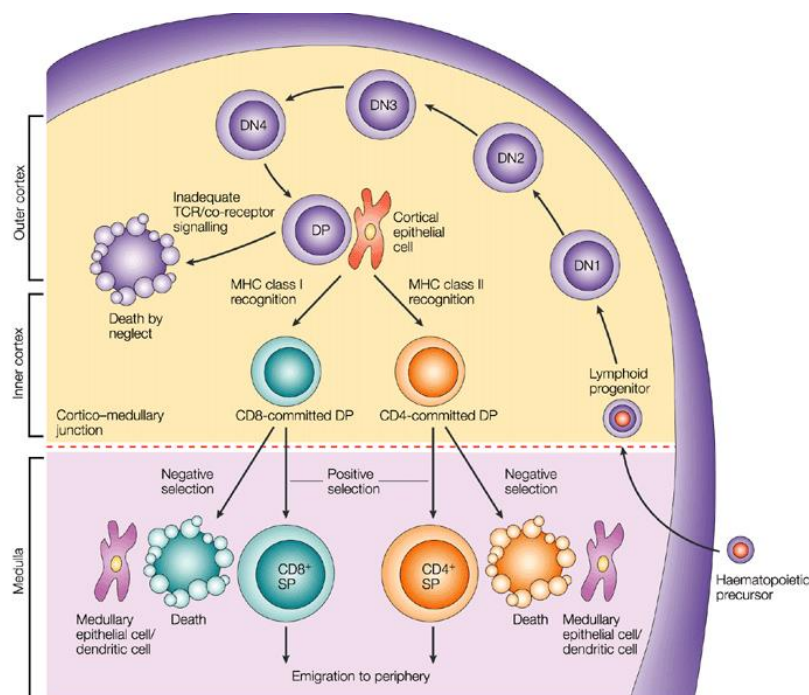
**Εικόνα 1.4.** Σχεδιάγραμμα που απεικονίζει τα βασικά στάδια στην ωρίμανση των T-λεμφοκυττάρων μέχρι την έκφραση του υποδοχέα τους. Τα T-λεμφοκύτταρα προέρχονται από τα βλαστικά κύτταρα τα οποία και διαφοροποιούνται δημιουργώντας όλα τα ώριμα λεμφοκύτταρα του οργανισμού. (Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Immunology, 2007; 5<sup>th</sup> Edition)

Όλοι οι υποπληθυσμοί των T-λεμφοκυττάρων εκφράζουν, εκτός από τον TCR, ένα σύμπλεγμα πολυπεπτιδίων που περιλαμβάνει και το μόριο CD3, ενώ η πλειοψηφία τους διακρίνεται από την παρουσία ή του CD4 ή του CD8 επιφανειακού μορίου. Κατά την είσοδό τους στο θύμο αδένα, τα πρόδρομα T-λεμφοκύτταρα δεν εκφράζουν τους CD4 ή 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.<sup>11</sup>

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  $\gamma$ ,  $\delta$  και  $\beta$  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  $\alpha$  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.<sup>12</sup>

Στη συνέχεια, τα DP κύτταρα που εκφράζουν είτε τον  $\alpha\beta$  είτε τον  $\gamma\delta$  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 μόριο του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC) θα επιβιώσουν ενώ τα υπόλοιπα υπόκεινται σε απόπτωση. Επομένως με τη θετική επιλογή εξασφαλίζεται ο περιορισμός των Τ-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 ενώ τα CD8 τα τάξης I.

Τα DP κύτταρα που επιβιώνουν και που εκφράζουν τον  $\alpha\beta$  TCR μεταναστεύουν στον μυελό του θύμου αδένου 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 μόρια MHC εαυτού είτε σύμπλοκα MHC με πεπτίδια αυτοαντιγόνων. Επομένως με την αρνητική επιλογή εξασφαλίζεται η ανοχή του οργανισμού στα δικά του αντιγόνα και πλέον τα Τ-λεμφοκύτταρα είναι ώριμα για να μεταναστεύσουν στην περιφέρεια.<sup>1</sup> (Εικ. 1.5)



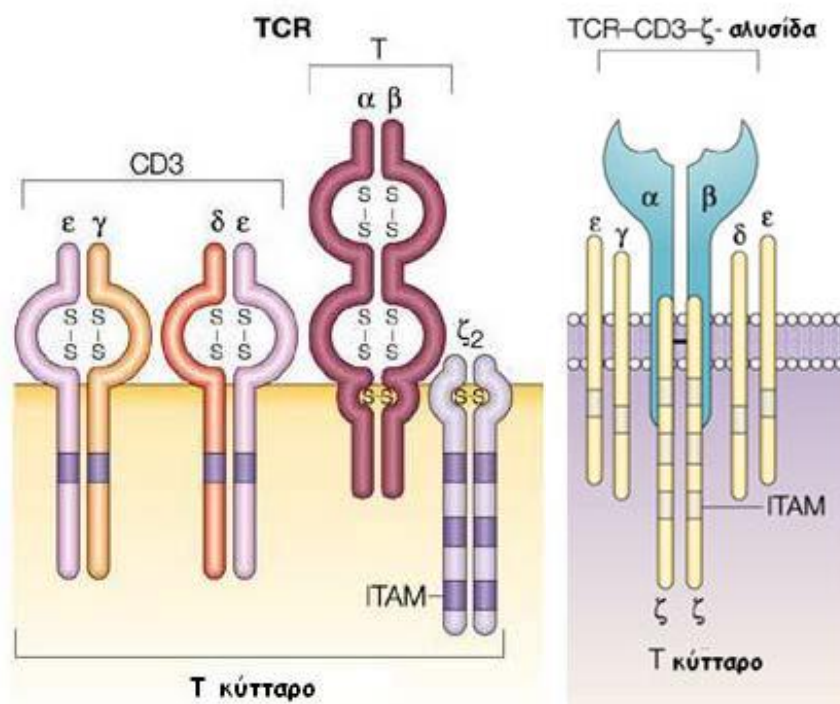
Εικόνα 1.5. Η αναπτυξιακή πορεία και διαφοροποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων στο θύμο αδένου. (www.nature.com)

### 1.7.1. Ο υποδοχέας των T-λεμφοκυττάρων (T-Cell Receptor, TCR)

Ο TCR αναγνωρίζει ως αντιγόνα μόνο πεπτίδια συνδεδεμένα με MHC μόρια, τα οποία του παρουσιάζονται από συγκεκριμένα κύτταρα π.χ. δενδριτικά κύτταρα ή μακροφάγα, γνωστά ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί την έναρξη των ανοσοαποκρίσεων.<sup>1,13</sup>

Πρόκειται για μια ετεροδιμερή γλυκοπρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από δυο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες γνωστές ως  $\alpha$  και  $\beta$  αλυσίδες, καθεμιά από τις οποίες αποτελείται από δύο περιοχές ομόλογες των περιοχών των ανοσοσφαιρινών. Τα αμινοτελικά άκρα των δύο αλυσίδων αποτελούν τη μεταβλητή (V, Variable) περιοχή του μορίου και σχηματίζουν τη θέση πρόσδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου. Τα καρβοξυτελικά τμήματα αποτελούν τη σταθερή (C, Constant) περιοχή του μορίου και χρησιμεύουν για τη σύνδεσή του υποδοχέα με την κυτταρική μεμβράνη, συμμετέχοντας ταυτόχρονα στην έναρξη της δραστικής λειτουργίας του κυττάρου.<sup>1,13</sup>

Για την έκφραση του TCR στη μεμβράνη του T-λεμφοκυττάρου, είναι απαραίτητη η μη ομοιοπολική σύνδεσή του με ένα σύμπλεγμα τριών τουλάχιστον διαμεμβρανικών πολυπεπτιδίων γνωστών ως μόριο CD3. (Εικ. 1.6) Το CD3 αποτελείται από τρεις πολυπεπτικές αλυσίδες  $\gamma$ ,  $\delta$  και  $\epsilon$ , και είναι ειδικό για τα T-λεμφοκύτταρα. Οι αλυσίδες του TCR και του CD3, συνδέονται στενά και με ένα άλλο μόριο, που αποτελείται από δύο  $\zeta$  αλυσίδες που περιέχουν εξειδικευμένες περιοχές, τα ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine Based Activation Motifs). Στα αμινοξέα που απαρτίζουν αυτές τις δομές γίνεται η φωσφωρυλίωση που αποτελεί το πρώτο συμβάν στη σηματοδότηση των T-λεμφοκυττάρων.<sup>14</sup>



**Εικόνα 1.6:** Η δομή του υποδοχέα (TCR), του μορίου CD3 και της  $\zeta$  αλυσίδας καθώς και το σύμπλοκο TCR/CD3 μορίου/ $\zeta$  αλυσίδας που σχηματίζεται κατά την ενεργοποίηση. (nemertes.lis.upatras.gr)

Ένα είδος TCR που εκφράζεται στην επιφάνεια των ανώριμων θυμοκυττάρων, καθώς και σε μικρό ποσοστό περιφερικών Τ-λεμφοκυττάρων, αποτελείται από  $\gamma$  και  $\delta$  αντί  $\alpha$  και  $\beta$  αλυσίδες. Ο  $\gamma/\delta$  TCR εμφανίζει περιορισμένη ετερογένεια σε σχέση με τον  $\alpha/\beta$ , με τον οποίο ουδέποτε συνεκφράζεται στο ίδιο κύτταρο. Τα κύτταρα που εκφράζουν  $\gamma/\delta$  TCR, βρίσκονται συγκεντρωμένα σε ορισμένους επιθηλιακούς ιστούς και διαφέρουν από εκείνα που εκφράζουν  $\alpha/\beta$  TCR ως προς τους μηχανισμούς αναγνώρισης του αντιγόνου, τις συνθήκες ενεργοποίησης και το ρόλο τους στην ανοσιακή απάντηση.<sup>1,13</sup>

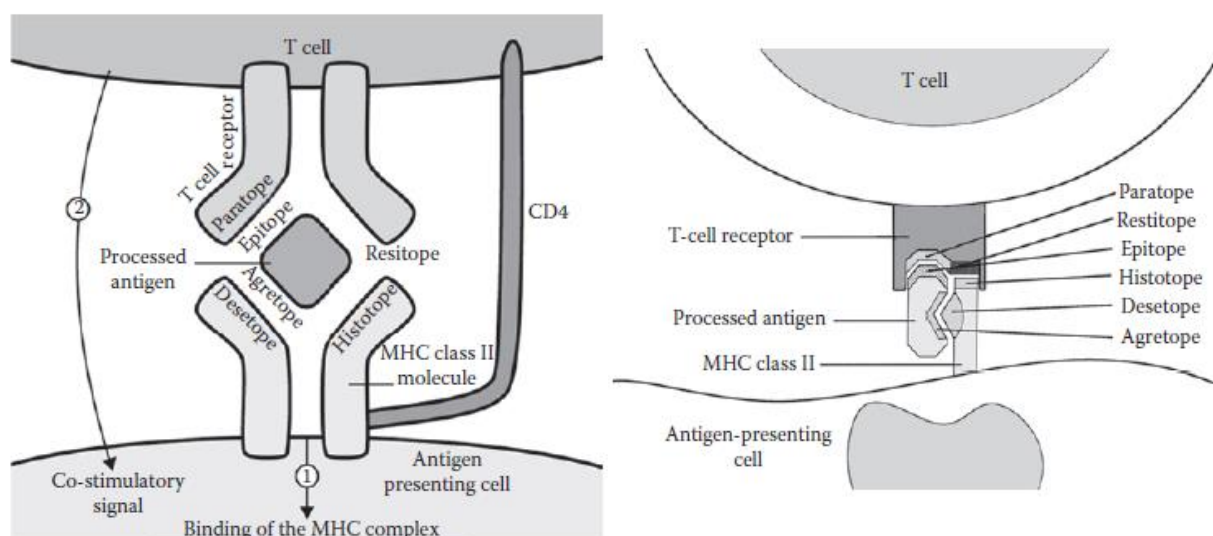
### 1.7.2. Η αλληλεπίδραση του TCR με το σύμπλοκο MHC-II/πεπτιδίου

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο (1.6), τα Τ-λεμφοκύτταρα δεν αναγνωρίζουν ελεύθερα πεπτίδια-επιτόπους αλλά μόνο πεπτίδια που παρουσιάζονται σε συνδυασμό πάντοτε με ένα μόριο του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC). Εντούτοις, η αλληλεπίδραση του συμπλόκου MHC-II/πεπτιδίου δεν περιλαμβάνει μόνο την ειδική πρόσδεση του αντιγονικού επιτόπου με τον TCR αλλά και μία σειρά αλληλεπιδράσεων ειδικών και στερεοχημικών των αλυσίδων του TCR με το αντιγόνο, του αντιγόνου με το MHC-II αλλά και των αλυσίδων του TCR με τις αλυσίδες του MHC-II μορίου.<sup>14</sup>

Αρχικά τα υπερμεταβαλλόμενα αμινοξικά κατάλοιπα της μίας από τις δύο αλυσίδες του TCR τα οποία αλληλεπιδρούν με τον επεξεργασμένο αντιγονικό επίτοπο ονομάζονται *paratope*. Αντίστοιχα, η περιοχή του μορίου MHC-II η οποία συνδέεται με το αντιγόνο ονομάζεται *desetope*. Ο *desetope* ως όρος προκύπτει από την “determinant selection”, επιλογή καθοριστή και η αλληλική ποικιλία επιτρέπει στα κατάλοιπα αυτής της αλληλεπίδρασης να διαφέρουν κάτι που αποτελεί έναν από τους παράγοντες επιλογής του MHC-II μορίου για τον συγκεκριμένο επίτοπο που παρουσιάζεται. Η περιοχή του πεπτιδικού αντιγόνου η οποία αλληλεπιδρά με τον *desetope* ονομάζεται *agretope* και περιλαμβάνει διαφορετικά αμινοξικά κατάλοιπα από αυτά του επιτόπου ο οποίος συνδέεται με το MHC-II μόριο.

Επιπλέον, το MHC-II μόριο και ο TCR αλληλεπιδρούν και απευθείας, χωρίς την παρέμβαση του αντιγόνου. *Histotope* ονομάζεται η περιοχή του MHC-II που αλληλεπιδρά με τον TCR κατά την διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης μέσω του *restitope* που αποτελεί εκείνο το τμήμα της μίας από τις 2 αλυσίδες του TCR.<sup>14</sup> (Εικ. 1.7)

Τέλος, η ιδιαίτερη κατηγορία των αντιγόνων που ονομάζονται υπεραντιγόνα (*superantigens*), τα οποία διεγείρουν τα Τ-λεμφοκύτταρα, έχουν ιδιαίτερο τρόπο σύνδεσης που τα καθιστά ικανά να διεγείρουν πολύ μεγάλους αριθμούς Τ-λεμφοκυττάρων και μαζική απελευθέρωση κυτοκινών.<sup>15</sup> Τα υπεραντιγόνα αναγνωρίζονται από αλληλουχίες ανεξάρτητα από τις συμβατικές θέσεις πρόσδεσης του αντιγόνου του TCR και των μορίων του MHC, ιδιότητα που εξηγεί την ικανότητα τους να ενεργοποιούν μεγάλους αριθμούς Τ λεμφοκυττάρων. Οι ασθένειες που συνδέονται με την έκθεση σε υπεραντιγόνα οφείλονται, εν μέρει, σε υπερ-ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος κι επακόλουθη μαζική απελευθέρωση κυτοκινών από τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.<sup>16,17</sup>



**Εικόνα 1.7:** Σχηματική αναπαράσταση όλων των θέσεων αλληλεπίδρασης μεταξύ του MHC-II μορίου, του αντιγονικού πεπτιδίου προς παρουσίαση καθώς και του TCR. (Cruse MJ & Lewis ER, Atlas of Immunology, 2010)

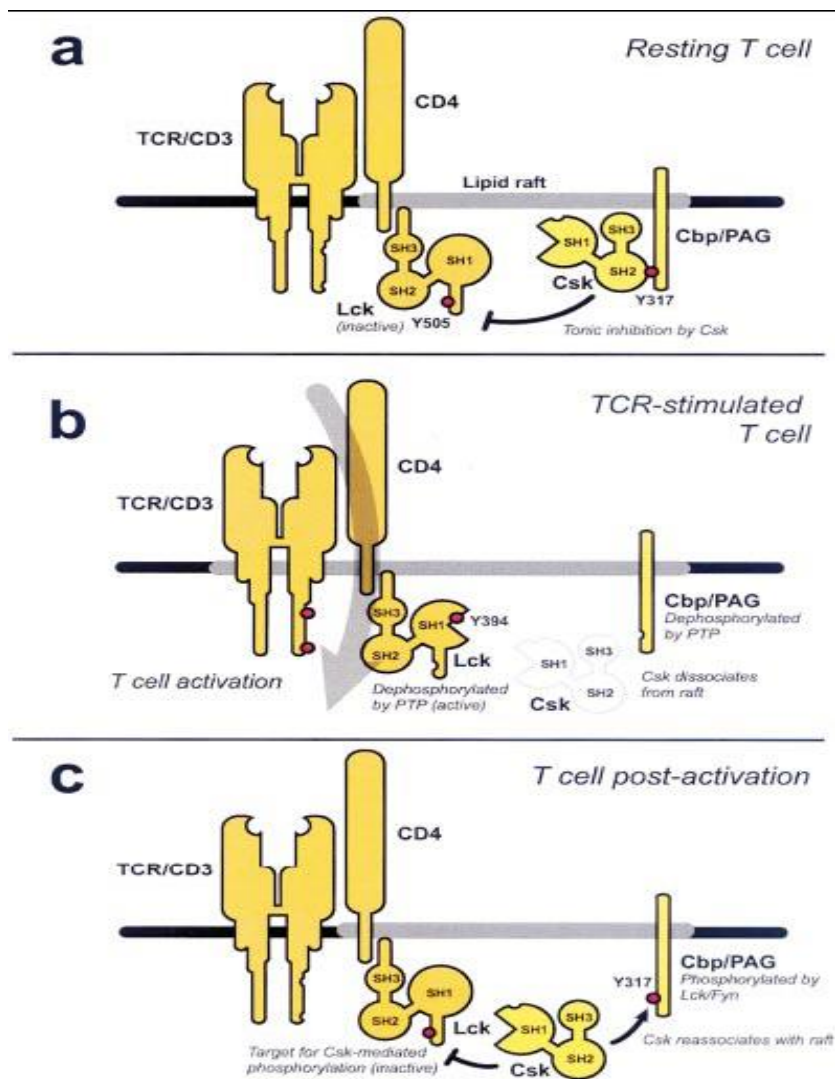
### 1.7.3. Ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων

Η ενεργοποίηση του T-λεμφοκυττάρου πυροδοτεί μια σειρά βιοχημικών αλληλεπιδράσεων, συγκεκριμένα φωσφορυλιώσεων, οι οποίες είναι ικανές να μεταφέρουν το σήμα ενεργοποίησης από την επιφάνεια του κυττάρου στον πυρήνα του. Οι φωσφορυλιώσεις αυτές διαμεσολαβούνται από πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (protein tyrosin kinases-PTK) και ρυθμίζονται ποιοτικά και ποσοτικά από φωσφατάσες τυροσινών και άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες. Τα γεγονότα αυτά διαδραματίζονται σε εξειδικευμένες μικροπεριοχές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του T-λεμφοκυττάρου που περιέχουν υψηλές ποσότητες χοληστερόλης και γλυκοσφιγκολιπιδίων και είναι γνωστές ως λιπιδικές σχεδίες, lipid rafts.<sup>18</sup>

Ειδικά για τα T-λεμφοκύτταρα σημαντική επίσης είναι η δράση της *Lck*. Η *Lck*, μια πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης που είναι συνδεδεμένη με τις κυτταροπλασματικές ουρές των συνυποδοχέων CD4/CD8, πλησιάζει τις κυτταροπλασματικές ουρές του συμπλέγματος του TCR (στις ζ αλυσίδες και του CD3) και φωσφορυλιώνει τυροσίνες σε μοτίβα ενεργοποίησης του υποδοχέα-ITAMs).<sup>19,20</sup>

Φυσιολογικά σε ένα naïve T-λεμφοκύτταρο το σύμπλοκο PAG/Cbr παραμένει στην λιπιδική σχεδία του TCR συμπλόκου και κρατά την *Lck* κατεσταλμένη (φωσφορυλίωση Y505) μέσω του *Csk* (Εικ. 1.8<sup>a</sup>) ενώ όταν το T-λεμφοκύτταρο ενεργοποιηθεί τότε το σύμπλοκο απομακρύνεται από την λιπιδική σχεδία (το *Csk* αποδιατάσσεται), η *Lck* αποφωσφορυλιώνεται και μπορεί να ενεργοποιήσει άλλα ενδοκυττάρια σήματα απαραίτητα για την ενεργοποίηση του κυττάρου.<sup>21</sup> (Εικ. 1.8<sup>b</sup>)

Μετά το τέλος της σηματοδότησης στον TCR, το σύμπλοκο PAG/Cbr επανέρχεται στην λιπιδική σχεδία, το *Csk* συγκροτείται και φωσφορυλιώνει την *Lck* απενεργοποιώντας την. (Εικ. 1.8<sup>c</sup>)



**Εικόνα 1.8:** Οι φωσφορυλιώσεις/απόφωσφορυλιώσεις που πραγματοποιούνται κατά την διάρκεια των φάσεων ενεργοποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων. α. Ανώριμο Τ-λεμφοκύτταρο. β. Ενεργοποιημένο Τ-λεμφοκύτταρο. γ. Τ-λεμφοκύτταρο μετά την ενεργοποίηση. (Mustelin et al. 2003)

Επιπλέον, οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες των ITAM της ζ αλυσίδας αποτελούν σημεία πρόσδεσης της πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης ZAP-70, η οποία ενεργοποιείται. Η ZAP-70 είναι μία κινάση τυροσίνης της Syk οικογένειας η οποία παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων.<sup>22</sup> Μετά την πρόσδεση στον TCR, η ZAP-70 φωσφορυλιώνεται γρήγορα σε πολλά καταλοιπα τυροσίνης πιθανά μέσω δύο μηχανισμών: αυτοφωσφορυλίωση και φωσφορυλίωση από την Lck.<sup>23,24,25,26,27</sup> Στην συνέχεια, καταλύει την φωσφορυλίωση της LAT, μεμβρανική πρωτεΐνη επαφής,<sup>28</sup> σε πολλά συντηρημένα κατάλοιπα τυροσίνης με μοτίβα πρόσδεσης SH2, τα οποία αποτελούν σημεία ενεργοποίησης πολλών ενδοκυτταρικών οδών μεταγωγής μηνυμάτων π.χ οδοί PKC, Ca, Ras κτλ.<sup>29,30</sup>



#### 1.7.4. Τα CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα

Τα CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα (εμφανίζονται ως T-βοηθοί) συντονίζουν την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού με την έκκριση διαφόρων κυτοκινών, οι οποίες πολώνουν την λειτουργία των κυττάρων στα οποία επιδρούν.

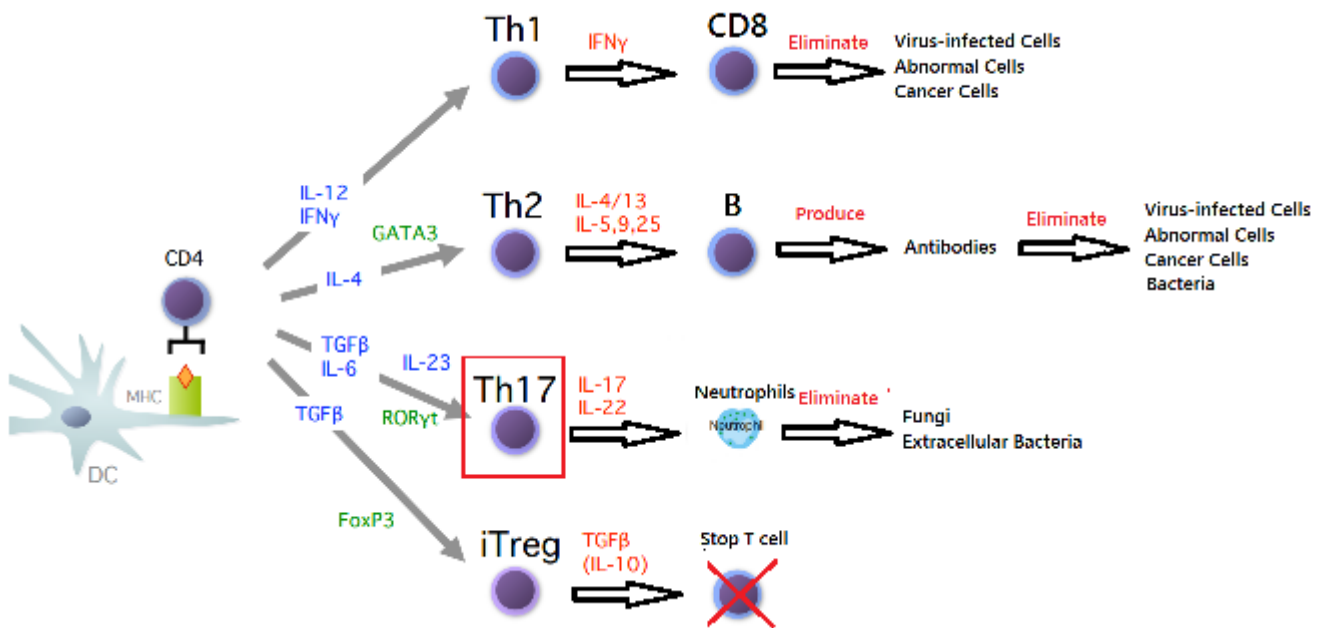
Τα ανώριμα CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα (naïve CD4<sup>+</sup> T-cells) παραμένουν σε μια σχετικά αδρανή κατάσταση καθώς περιφέρονται με το κυκλοφορικό σύστημα στα δευτερογενή λεμφοειδή όργανα αναζητώντας σήματα ενεργοποίησης από κύτταρα αντιγονοπαρουσιαστές, όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Αρχικά τα CD4<sup>+</sup> 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, iTregs). (Εικ. 1.9)

Τα Th1 θεωρούνται προφλεγμονώδη κύτταρα και επάγονται κυρίως από την ιντερλευκίνη 12 (IL-12) και από την ιντερφερόνη γ (IFN-γ)<sup>31,32</sup> που αλληλεπιδρούν με τον μεταγραφικό παράγοντα T-box transcription factor (T-bet).<sup>33,34</sup> Ευθύνονται για κυτταρομεσολαβιτικές λειτουργίες και καταστάσεις φλεγμονής ενάντια σε ενδοκυτταρικούς ιούς και βακτήρια.<sup>35</sup> Εκκρίνουν κυρίως IFN-γ, ιντερλευκίνη 2 (IL-2) και τον παράγοντα νέκρωσης όγκου β (TNF-β), κυτοκίνες που προάγουν τη διαφοροποίηση των CD8<sup>+</sup> κυττάρων σε πλήρως κυτταροτοξικά κύτταρα, ενεργοποιούν τα μακροφάγα, συμμετέχουν σε αργοπορημένου τύπου υπερευαισθησίες.

Οι Th2 επάγονται κυρίως από την ιντερλευκίνη 4 (IL-4) που οδηγεί σε ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3<sup>36,37</sup> και ευθύνονται για την αντιμετώπιση εξωκυτταρικών παρασίτων και την για υποστήριξη των αλλεργικών αντιδράσεων.<sup>1,37</sup> Εκκρίνουν κυρίως τις IL-4, IL-5 και IL-13, κυτοκίνες που προάγουν την έκκριση αντισωμάτων από τα B-λεμφοκύτταρα, ενεργοποιούν τα ηωσινόφιλα, και έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν αρνητικά τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις κυρίως μέσω της παραγωγής της IL-10. Ενδιαφέρον επίσης αποτελεί το γεγονός ότι η διέγερση των T-λεμφοκυττάρων παρουσία ιντερλευκίνης-12 οδηγεί σε φαινότυπο τύπου Th1 αναστέλλοντας τον Th2 φαινότυπο, ενώ η διέγερση τους παρουσία IL-4 οδηγεί σε φαινότυπο τύπου Th2 και αναστέλλει τον Th1.<sup>38</sup>

Οι Th17 επάγονται κυρίως από την ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και τον αυξητικό παράγοντα TGF-β που ενεργοποιούν τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος RORγt ο οποίος δρα ως μεταγραφικός παράγοντας.<sup>39</sup> Οι Th17 συντελούν στην αντιμετώπιση μολύνσεων από βακτήρια και μύκητες εκκρίνοντας τις κυτοκίνες IL-17 και IL-2<sup>26</sup> ενώ έχουν βρεθεί να συμμετέχουν και σε καταστάσεις αυτοανοσίας.<sup>40</sup>

Τα επαγόμενα ρυθμιστικά κύτταρα (iTregs) προέρχονται από CD4<sup>+</sup> κύτταρα στα οποία η IL-2 καθώς και το ρετινοϊκό οξύ παρουσία TGF-β προκαλούν την έκφραση της foxp3 του βασικού μεταγραφικού παράγοντα των T-ρρυθμιστικών κυττάρων.<sup>41,42</sup> Μετατρέπονται έτσι σε CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 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.<sup>43</sup>



**Εικόνα 1.9:** Η κατηγοριοποίηση των CD4+ T-λεμφοκυττάρων ανάλογα με το προφίλ των κυτοκινών από τις οποίες επάγονται και εκκρίνουν. (www.nature.com)

### 1.7.5. Οι επιφανειακοί υποδοχείς CD28/CTLA-4 (CD152)

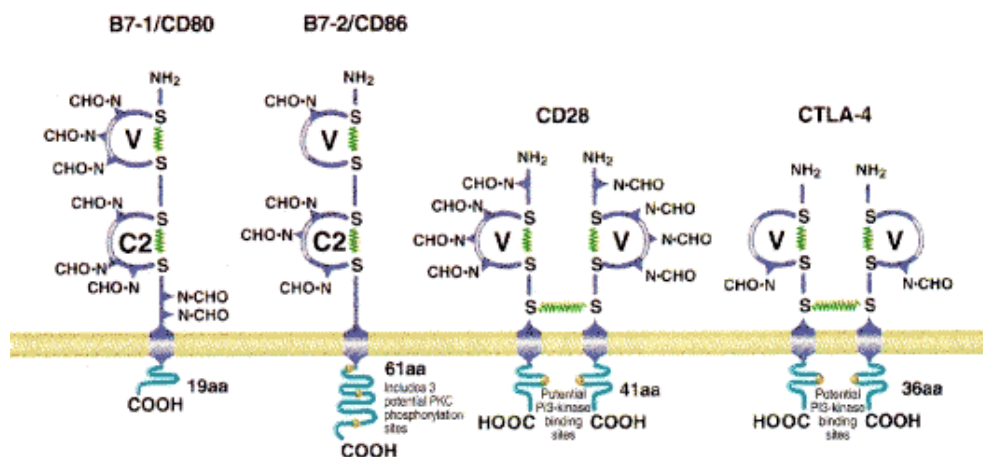
Η ενεργοποίηση του T-λεμφοκυττάρου μέσω του TCR, αποτελεί γεγονός υψίστης σημασίας για την επιβίωση του T-λεμφοκυττάρου, καθώς μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα αποκρίσεις που κυμαίνονται από τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων ή την παραγωγή των κυτοκινών έως την ανεργία και την απόπτωση. Ως ανεργία-αδυναμία αντίδρασης (clonal anergy) χαρακτηρίζεται η κατάσταση εκείνη κατά την οποία τα T-λεμφοκύτταρα δεν μπορούν να αποκριθούν σε αντιγόνο-ειδικά σήματα.<sup>44</sup>

Η ενεργοποίηση του T-λεμφοκυττάρου εξαρτάται από την αναγνώριση συγκεκριμένων αντιγονικών επιτόπων συνδεδεμένων με ένα MHC μόριο στην επιφάνεια των αντιγόνοπαρουσιαστικών κυττάρων (1.7.1). Όμως, η πρόσδεση στον TCR μόνο δεν είναι επαρκής για την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων (σήμα 1). Η βέλτιστη κατάσταση για την ενεργοποίηση ενός T-λεμφοκυττάρου και των δραστικών γεγονότων που ακολουθούν απαιτεί σήματα από συνδιεγερτικά μόρια (σήμα 2), όπως το CD28 και το CTLA-4.

Το CD28 αποτελεί το πρώτο συνδιεγερτικό μόριο στην επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων που αναγνωρίστηκε, αρχικά ως T44 και τελικά το 1987 ως CD28. Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη 44 kDa, που σχηματίζει ομοδιμερές, η οποία εκφράζεται στο 90% των παύει CD4+ T-λεμφοκυττάρων και στο 50 % των CD8+ T-λεμφοκυττάρων. Μετά την πρόσδεση στους συνδέτες (ligands-ανήκουν στην ίδια υπεροικογένεια υποδοχέων με το CD28) του, CD80 (B7-1) και CD86 (B7-2) που

εντοπίζονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και των οποίων η έκφραση είναι απύουσα ή πολύ χαμηλή στα εν ηρεμία αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) αλλά επάγεται μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών, το CD28 ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται με την αύξηση της μεταγραφής και της σταθερότητας του m-RNA της IL-2 και αλλά και την θετική ρύθμιση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X.<sup>45</sup>

Το CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4), ανακαλύφθηκε το 1987,<sup>46</sup> είναι ένα στενά σχετιζόμενο μόριο με το CD28, 223 αμινοξέων (ομολογία 20% αλλά μοιράζονται το 27% των αμινοξέων στο ποντίκι) αλλά συνδέεται στους ίδιους συνδέτες με το CD28 με πολύ μεγαλύτερη συγγένεια.<sup>47</sup> (Εικ. 1.10) Αντίθετα με το CD28, το CTLA-4 περιορίζει την ενεργοποίηση του Τ-λεμφοκύτταρου, όπως αποδεικνύεται από το γεγονός πως η σύνδεση του CTLA-4 παρεμποδίζει την παραγωγή της IL-2, την έκφραση του υποδοχέα της IL-2 αλλά και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, τα CTLA-4-deficient ποντίκια πεθαίνουν από δυσλειτουργία του λεμφικού συστήματος στις 3-4 εβδομάδες ζωής.<sup>48</sup>



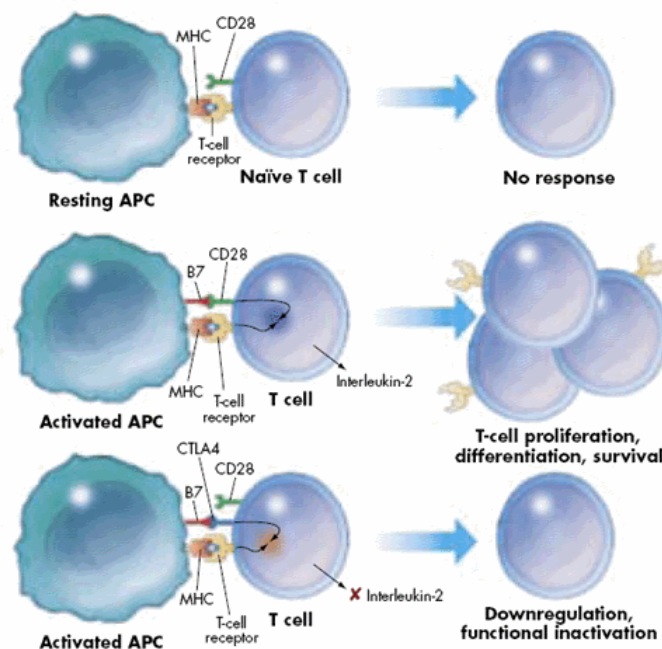
**Εικόνα 1.10:** Η δομή των υποδοχέων CD28 και CTLA-4 καθώς και των συνδετών τους (ligands) CD80 (B7-1) και CD86 (B7-2) οι οποίοι ανήκουν στην ίδια υπερικογένεια υποδοχέων. ([www.revhematologia.sld.cu](http://www.revhematologia.sld.cu))

Παρά τις δομικές ομοιότητες μεταξύ των CD28 και CTLA-4, τα πρότυπα κυκλοφορίας αλλά και η κατανομή τους στο κύτταρο είναι τελείως διαφορετικά. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως πριν την ενεργοποίηση, το CD28 είναι καταμετρημένο ενιαία στην πλασματική μεμβράνη. Όμως, όταν ένα Τ-λεμφοκύτταρο συναντά ένα αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο που διαθέτει σύμπλοκο MHC/αντιγονικού πεπτιδίου, το CD28 συγκεντρώνεται στην ανοσολογική σύναψη σε λιγότερο από ένα λεπτό.<sup>49</sup> Αντίθετα, το CTLA-4 φυσιολογικά εντοπίζεται σε ενδοκυτταρικά κυστίδια του Τ-λεμφοκύτταρου σε κυκλοφορία. Μετά την πρόσδεση στον TCR αυτά τα κυστίδια αναπροσανατολίζονται προς το αντιγονοπαρουσιαστικό με ένα μέρος του CTLA-4 να εντοπίζεται τελικά στην σύναψη.<sup>45</sup> Το ενδιαφέρον είναι πως η ποσότητα του CTLA-4 που μεταφέρεται στην σύναψη σχετίζεται με την δυναμική του σήματος στον TCR, αποδεικνύοντας πως το CTLA-4 μπορεί να παρεμποδίζει τις αποκρίσεις των Τ-λεμφοκυττάρων σε περιπτώσεις ισχυρών σημάτων στον TCR.<sup>48,49</sup> Εικ. 1.11.

Επιπλέον, διαφορές εντοπίζονται και στην πρόσδεση των 2 μορίων με τους συνδέτες τους. Μελέτη του 2004 απέδειξε πως το CD28 μπορεί να συγκεντρωθεί στην σύναψη απουσία των B7-1 και B7-2 (αρκεί η πρόσδεση του συμπλόκου MHC/πεπτιδίου στον TCR για την στρατολόγηση του CD28), εντούτοις, οι δύο συνδέτες μπορούν να σταθεροποιήσουν το CD28 παρεμποδίζοντας την διάχυσή του μακριά από το σημείο πρόσδεσης ή με την δημιουργία σήματος που προκαλεί την μεγαλύτερη συγκέντρωση του στη σύναψη.<sup>50</sup> Αντίθετα, η παρουσία των B7-1 και B7-2 φαίνεται να αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στην στρατολόγηση του CTLA-4 στην σύναψη.<sup>50</sup>

Τέλος, από μία πληθώρα μελετών προκύπτει πως ενώ το B7-1 προσδέεται επιλεκτικά στο CTLA-4 και συνεπώς παρεμποδίζει την λειτουργία του T-λεμφοκυττάρου, το B7-2 προωθεί την απόκριση όντας ο προτιμώμενος συνδέτης για το CD28.<sup>50,51</sup> Έτσι, η αναλογία του προσδεμένου CD28 σχέση με το προσδεμένο CTLA-4 είναι μεγαλύτερη όταν στο αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο είναι παρόν το B7-2 σε σχέση με το B7-1.<sup>47</sup>

Η ισορροπία των CD28 και CTLA-4 σημάτων μπορεί να καθορίσει όχι μόνο το επίπεδο αλλά και τη σύνθεση και λειτουργία της ανερχόμενης ενεργοποίησης του T-λεμφοκυττάρου. Τα σχετικά επίπεδα των B7-1 και B7-2 στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα καθορίζονται από την κατάσταση ενεργοποίησης τους, η οποία επηρεάζεται από συστατικά της έμφυτης (Toll-like υποδοχείς) αλλά και της επίκτητης ανοσίας (κυτοκίνες, επιφανειακός μάρτυρας CD40 των αντιγονοπαρουσιαστικών). Ο βαθμός στον οποίο το CTLA-4 διαμορφώνει την απόκριση επηρεάζεται από το την δυναμική της σηματοδότησης στον TCR και τα σχετικά επίπεδα των B7-1/B7-2 διαθέσιμα για πρόσδεση.



**Εικόνα 1.11:** Η απόκριση του T-λεμφοκυττάρου με βάση την έκφραση των υποδοχέων στην επιφάνεια του. Απουσία ενός B7 υποδοχέα το T-λεμφοκύτταρο βρίσκεται σε ηρεμία εκφράζοντας CD28 ενώ παρουσία του B7-1 το CD28 πολλαπλασιάζεται και εκκρίνεται η IL-2. Αντίθετα, παρουσία του B7-2 το CTLA-4 σταθεροποιείται και το T-λεμφοκύτταρο οδηγείται σε καταστολή. (cancerlink.ru)

## 1.8. Τα T-ρυθμιστικά κύτταρα

Το ανοσοποιητικό σύστημα βρίσκεται σε μια λεπτή ισορροπία μεταξύ της δημιουργίας ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι παθογόνων και της ανοχής σε στοιχεία του «εαυτού», με σκοπό να διατηρήσει την ομοιόσταση του. Πρόσφατα, έχει ευρέως αναγνωριστεί πως τα σήματα από τα στοιχεία του εαυτού παίζουν βασικό ρόλο στην βιολογία των ώριμων T-λεμφοκυττάρων της περιφέρειας καθώς η απουσία αντίδρασης σε αυτοαντιγόνα είναι μία ενεργή διαδικασία που πραγματοποιείται σε συνθήκες μη φλεγμονώδεις.

Το εάν ένα T-λεμφοκύτταρο θα διαφοροποιηθεί σε βοηθητικό ή ρυθμιστικό T-λεμφοκύτταρο μετά από την αλληλεπίδρασή του με το αντιγόνο, επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες και εξαρτάται από τη συγγένεια του για τον TCR, τις συνδιεγερτικές ιδιότητες των αντιγονοπαρουσιαστικών κύτταρων και τις κυτοκίνες που υπάρχουν στο μικροπεριβάλλον που πραγματοποιείται η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων.

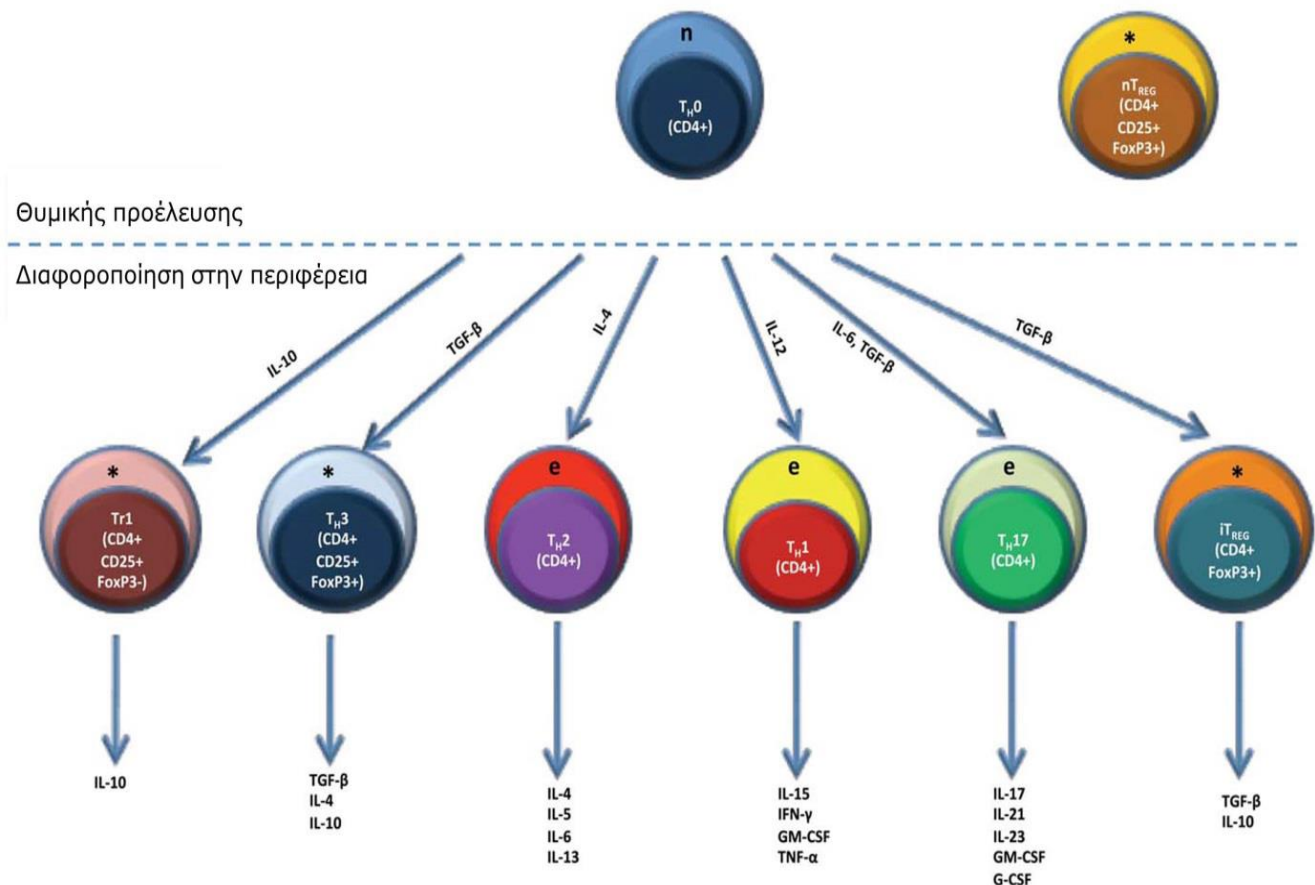
Διαταραχή της ισορροπίας της αναγνώρισης ξένου αντιγόνου/αυτοαντιγόνου όπως π.χ., η έλλειψη ανοσολογικών αποκρίσεων (ανοσοανεπάρκεια), ή η απάντηση έναντι στοιχείων «εαυτού» (αποτέλεσμα της ενεργοποίησης αυτοδραστικών T-λεμφοκυττάρων ή βλάβη των υγιών κυττάρων από τους ανοσολογικούς μηχανισμούς, που κινητοποιούνται για τον περιορισμό ενός εξωγενούς αντιγόνου ή κάποιου όγκου) οδηγούν σε παθολογικές καταστάσεις και συχνά σε ασθένεια.

Η επιβολή και η ρύθμιση της αυτο-ανοχής εντός του ρεπερτορίου των T-λεμφοκυττάρων ασκείται σε δύο επίπεδα: α) την *κεντρική ανοχή*, που συμβαίνει κατά την οντογένεση των T-λεμφοκυττάρων στο θύμο (κλώνοι που αναγνωρίζουν αντιγόνα «εαυτού», καταστρέφονται)<sup>7,52</sup> και β) την *περιφερική ανοχή*. Στους μηχανισμούς της περιφερικής ανοχής περιλαμβάνεται αφενός μια σειρά διαδικασιών αρνητικής ανατροφοδότησης, που αποτελούν ενδογενές χαρακτηριστικό της ενεργοποίησης από το αντιγόνο και της διαφοροποίησης των T-λεμφοκυττάρων (π.χ., απόπτωση επαγόμενη από την ενεργοποίηση, επαγωγή αδυναμίας αντίδρασης (clonal anergy), διαφοροποίηση των υποπληθυσμών των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων)<sup>53,54</sup>, και αφετέρου η λειτουργία των ρυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων (regulatory T-cells, Tregs).<sup>55,56</sup>

Οι πρώτες αναφορές T-λεμφοκυτταρικών πληθυσμών με την ικανότητα να καταστέλλουν ανοσολογικές αποκρίσεις σημειώθηκαν στις αρχές του 1970, ωστόσο το ενδιαφέρον γι' αυτά τα κατασταλτικά T-λεμφοκύτταρα ατόνησε λόγω της αδυναμίας να διευκρινιστούν οι μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί της κατασταλτικής δράσης τους.<sup>57,58</sup> Το ενδιαφέρον άρχισε να αναζωπυρώνεται το 1995 μετά από μελέτες των Sakaguchi et al, που έδειξαν ότι η θυμεκτομή νεογνών ποντικών οδηγεί στην εμφάνιση οργανοειδικών αυτοάνοσων διαταραχών, οι οποίες προλαμβάνονται με τη χορήγηση CD4+CD25+ κυττάρων από μη ακτινοβολημένα πειραματόζωα.<sup>59</sup> Οι ίδιοι ερευνητές χαρακτήρισαν αυτά τα CD4+ κύτταρα με κατασταλτική δράση ως ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα δίνοντας ισχυρή ώθηση στο σχετικό πεδίο έρευνας, ενώ παράλληλα πρόσθεσαν μια νέα διάσταση στο πολύπλοκο πρόβλημα της περιφερικής ανοχής. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί λεπτομερώς δύο πληθυσμοί Tregs: α) τα θυμικής προέλευσης Tregs (thymus-derived Treg cells, tTregs), τα οποία μέχρι πρότινος ονομάζονταν φυσικά Tregs (natural, constitutive, professional, nTregs) και β) τα περιφερικά επαγόμενα Tregs (peripherally-derived Treg cells, pTregs), τα οποία προηγούμενα ονομάζονταν επαγώγιμα

Tregs (inducible/adaptive, iTregs) (Εικ.1.12) Οι δύο αυτοί πληθυσμοί έχουν διαφορετική προέλευση, αντιγονική ειδικότητα και μηχανισμούς δράσης αλλά, πιθανότατα, συμπληρωματική ή και αλληλεπικαλυπτόμενη δράση, αναφορικά με τον έλεγχο των ανοσολογικών απαντήσεων.<sup>60, 61</sup>

\* Ρυθμιστικά T-κύτταρα, n= παρθένα T-κύτταρα, e= δραστικά T-κύτταρα



**Εικόνα 1.12.** Πληθυσμοί T-κυττάρων. Τα Tregs είτε σχηματίζονται κατά τη διαφοροποίηση στο θύμο (thymus-derived Treg cells, tTregs) είτε επάγονται στην περιφέρεια (peripherally-derived Treg cells, pTregs) από παρθένα T-κύτταρα (Th0). Στις υπο-ομάδες των pTregs περιλαμβάνονται τα Th3 και Treg1 κύτταρα, τα οποία είναι CD4+CD25+FOXP3+ και CD4+CD25-FOXP3+, αντίστοιχα. Οι κύριες υπο-ομάδες CD4+ δραστικών κυττάρων είναι τα Th1, Th2, και Th17 κύτταρα. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι κυτταροκίνες που παίζουν κομβικό ρόλο στην επαγωγή αυτών των κυττάρων από Th0 κύτταρα, καθώς και οι κυτταροκίνες που εκκρίνουν. (Peterson RA, 2012)

### 1.8.1. Η κατασταλτική δράση των T-ρυθμιστικών κυττάρων

Η κατασταλτική δράση των tTregs ασκείται έπειτα από αντιγονική διέγερσή τους μέσω του υποδοχέα TCR, ενώ είναι ανεξάρτητη από την αντιγονική ειδικότητα των κυττάρων-στόχων (bystander suppression).<sup>62,63</sup> Τα tTregs (θυμικής προέλευσης) αποτελούν μια ξεχωριστή σειρά δεσμευμένων T-λεμφοκυττάρων που προέρχεται από το θύμο με την ικανότητα να καταστέλλουν την ενεργοποίηση και τη λειτουργία μιας πληθώρας ανοσοδραστικών κυττάρων, τόσο της φυσικής (μη ειδικής), όσο και της επίκτητης (ειδικής) ανοσίας. Ειδικότερα, τα tTregs καταστέλλουν την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την εκκριτική δραστηριότητα των CD4+ (βοηθητικών) και CD8+ (κυτταροτοξικών) T-κυττάρων.<sup>64,65,66</sup>

Επιπρόσθετα, καταστέλλουν αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό, την ιστυπική μεταστροφή<sup>67</sup> και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών των B-λεμφοκυττάρων,<sup>68</sup> ενώ είναι ικανά να παρεμποδίζουν την κυτταροτοξική δράση των φυσικών φονιάδων (natural killer cells, NK)<sup>69</sup> καθώς και την ωρίμανση και λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων.<sup>70</sup>

Μελέτες σε τρωκτικά και ανθρώπους δείχνουν ότι η κατασταλτική λειτουργία των tTregs ασκείται μέσω άμεσης διακυτταρικής επαφής.<sup>71,72</sup> Διάφορα βοηθητικά μόρια των T-κυττάρων τα οποία εκφράζονται από τα tTregs, όπως τα CTLA4 και LAG3, καθώς και τα συνδιεγερτικά μόρια CD80 και CD86 που εκφράζονται από APCs συμβάλουν σε αυτόν τον εξαρτώμενο από επαφή κατασταλτικό μηχανισμό.<sup>56,73</sup> Ειδικότερα το CTLA-4 ασκεί πολλαπλές επιδράσεις στην tTreg-μεσολαβούμενη καταστολή. Για παράδειγμα, μπορεί να αλληλεπιδρά με τα μόρια CD80 και CD86 των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων μετάγοντας συνδιεγερτικό σήμα στα tTregs<sup>71,72</sup> ή να επάγει την έκφραση του μορίου IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase), το οποίο ασκεί πιθανή ανοσοκατασταλτική δράση στο τοπικό περιβάλλον των δενδριτικών κυττάρων, είτε μέσω κυτταροτοξικότητας είτε επάγοντας την *de novo* δημιουργία Tregs από ανώριμα T-κύτταρα.<sup>74</sup>

Ενώ τα δεδομένα από τις περισσότερες *in vitro* μελέτες δείχνουν ότι η ρυθμιστική ικανότητα των tTregs εξαρτάται από τη διακυτταρική επαφή, πολλοί διαλυτοί παράγοντες έχουν σχετιστεί με την κατασταλτική δράση αυτών των κυττάρων. Μία από τις πιο κοινές κυτταροκίνες είναι η IL-10, η οποία αποτελεί ισχυρό ανοσορρυθμιστικό παράγοντα με αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες.<sup>75,76</sup> Διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού, συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων, των δενδριτικών, των B-λεμφοκυττάρων και των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων παράγουν IL-10, αλλά ο ρόλος της στα tTregs δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Πράγματι, σε πολλές λειτουργικές μελέτες των ανθρώπινων tTregs δεν ανιχνεύθηκε έκκριση της IL-10 έπειτα από διέγερση,<sup>77,78</sup> καθιστώντας τη ρυθμιστική ικανότητα των tTregs ανεξάρτητη της IL-10.<sup>79,80</sup> Ωστόσο, έχουν προταθεί σημαντικοί ρόλοι που πιθανά ασκεί η IL-10 στη ρυθμιστική λειτουργία των tTregs, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.<sup>81</sup> Όλα τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι η IL-10 κατέχει σημαντικό ρόλο σε συγκεκριμένες υποομάδες των tTregs ή σε ένα ξεχωριστό ιστοειδικό περιβάλλον, χωρίς όμως είναι απαραίτητη για την tTreg-μεσολαβούμενη καταστολή.

Δύο αντίθετες φαινομενικά απόψεις έχουν πρόσφατα προκύψει ως προς το ρόλο της περιφερειακής επαφής με αντιγόνα του εαυτού για την λειτουργία των CD4+ T-λεμφοκυττάρων. Η μία άποψη υποστηρίζει πως η συνεχής διέγερση με στοιχεία του εαυτού συμβάλλει στην αυτοανοχή, ενώ η αντίθετη άποψη σημειώνει πως η επαφή με στοιχεία του εαυτού ενισχύει την ανοσία. Η απουσία επαφής με μόρια MHC για εβδομάδες έχει ως αποτέλεσμα την αρνητική ρύθμιση της έκφρασης του CD5 (αρνητικός ρυθμιστής της απόκρισης των T-λεμφοκυττάρων)<sup>82,83</sup> και σε ενισχυμένη απόκριση μετά από πρόσδεση στον TCR.<sup>82,84</sup> Αυτές οι παρατηρήσεις είναι συνεπείς με την ιδέα πως η συνεχής διέγερση με στοιχεία του εαυτού ανεβάζει τον βαθμό διέγερσης που απαιτείται για την απόκριση του TCR και επομένως αποφεύγεται η αυτοδραστικότητα.<sup>85,86,87</sup>

### 1.8.1.1. Επιφανειακοί δείκτες των T-ρυθμιστικών κυττάρων: Foxp3

Ο μεταγραφικός παράγοντας Foxp3 εκφράζεται σταθερά στα tTregs και ενεργεί ως κύριος ρυθμιστής της ανάπτυξης και της κατασταλτικής λειτουργίας τους.<sup>88,89</sup> Ωστόσο, από τη στιγμή που δεσμεύονται στην κυτταρική σειρά τους, δεν εξαρτώνται από την έκφραση του Foxp3 για την επιβίωσή τους.<sup>90,91</sup>

Το Foxp3 περιέχει 3 διακριτές δομικά λειτουργικές περιοχές: α) ένα C2H2 μοτίβο δακτυλίου ψευδαργύρου, β) ένα μοτίβο όμοιο με φερμουάρ λευκίνης και γ) μια καρβοξυτελική περιοχή φουρκέτας, ασκώντας έτσι τη λειτουργία του ως μεταγραφικός παράγοντας. (Εικ. 1.13<sup>c</sup>) Μεταξύ των γονιδίων-στόχων του, το Foxp3 δρα ως μεταγραφικός παράγοντας για τα γονίδια που εκφράζονται από τα tTregs (όπως για παράδειγμα το CD25 και το CTLA-4), ενώ καταστέλλει την μεταγραφή κυτταροκινών που είναι χαρακτηριστικές για τα Th-κύτταρα.<sup>92</sup>

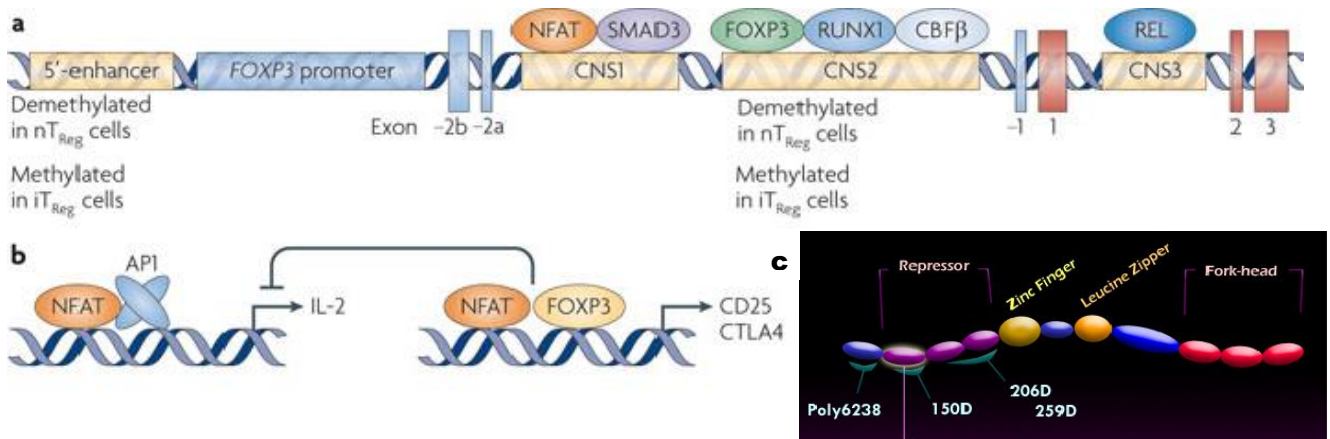
Αναλύσεις των tTregs ποντικών σε επίπεδο του γονιδιώματος (genome-wide analyses) επιβεβαιώνουν την άποψη ότι το Foxp3 μπορεί να ενεργεί είτε ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή ως καταστολέας περίπου 700 γονιδίων.<sup>93</sup>

Εκτός από αυτή την άμεση δράση ως μεταγραφικός ρυθμιστής, το Foxp3 μπορεί επίσης να ασκήσει τη ρυθμιστική του λειτουργία μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι το Foxp3 αλληλεπιδρά με τον παράγοντα NFAT (nuclear factor of activated T-cells) στον υποκινητή της IL-2 εκτοπίζοντας την AP-1 (activator protein-1) από το σύμπλοκο, καταστέλλοντας έτσι την επαγωγή της μεταγραφής της IL-2. (Εικ. 1.13<sup>b</sup>) Παρόμοιοι μηχανισμοί μπορεί επίσης να συμβάλουν στην καταστολή άλλων κυτταροκινών.<sup>94</sup>

Η σημασία του Foxp3 για την ανάπτυξη των tTregs τονίζεται από το γεγονός ότι μεταλλάξεις του *FOXP3* έχουν ως αποτέλεσμα την εκδήλωση της φυλοσύνδετης ανοσοανεπάρκειας που φέρεται ως *σύνδρομο* IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome) και η οποία χαρακτηρίζεται από αυτοάνοση πολυενδοκρινοπάθεια (διαβήτης τύπου I, θυρεοειδίτιδα κ.ά.), φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, αλλεργία (ατοπική δερματίτιδα, τροφική αλλεργία) και σοβαρές λοιμώξεις.<sup>95,96</sup>



Πρόσφατα διευκρινίστηκε ο μοριακός μηχανισμός που διατηρεί σταθερή την έκφραση του Foxp3 στα Tregs μέσω της ταυτοποίησης μιας εξελικτικά συντηρημένης περιοχής με νησίδες CpG εντός της μη-κωδικοποιούσας γονιδιακής περιοχής. Αυτή η περιοχή είναι μη-μεθυλιωμένη στα Tregs και μεθυλιωμένη στα παρθένα και δραστικά T-κύτταρα κι έχει χαρακτηριστεί ως «μη-μεθυλιωμένη περιοχή ειδικά στα Tregs» (Treg-specific demethylated region, TSDR) και εντοπίζεται στην περιοχή του ενισχυτή του γονιδιακού τύπου.<sup>97,,98,99,100</sup> (Εικ. 1.13<sup>α</sup>)



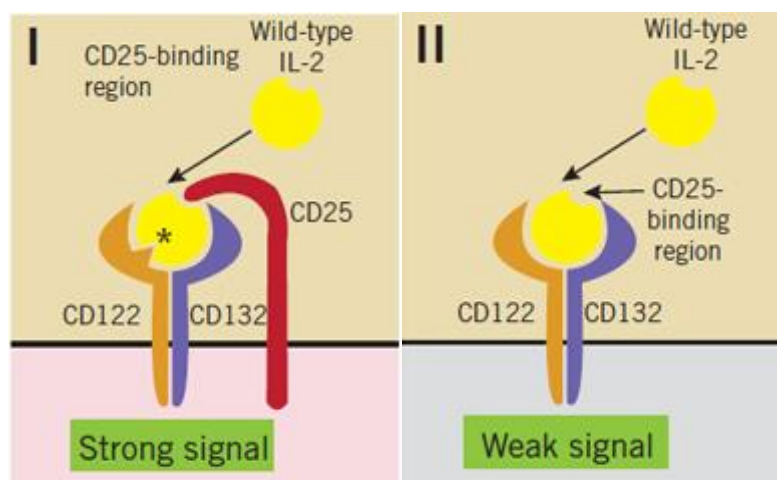
**Εικόνα 1.13:** a. Η περιοχή TSDR στον ενισχυτή του γονιδίου του Foxp3 παραμένει μη μεθυλιωμένη στα Tregs. b. Ο Foxp3 αλληλεπιδρά με τον NFAT και απομακρύνει την AP1, καταστέλλοντας την έκφραση της IL-2. (www.nature.com) c. Η δομή του γονιδίου Foxp3. (www.biolegend.com)

### 1.8.1.2. Επιφανειακοί δείκτες των T-ρυθμιστικών κυττάρων: CD25

Η IL-2 έχει εδώ και χρόνια αναγνωριστεί για τον ρόλο της στην ενίσχυση του πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων αλλά πρόσφατα ανακαλύφθηκε ο ρόλος της στην διατήρηση της περιφερειακής ανοχής που περιλαμβάνει την επαγωγή των CD4+CD25+ T-λεμφοκυττάρων. Το 1995, ο Sakagushi και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν την α αλυσίδα του υποδοχέα της IL-2 (CD25) ως πιθανό μάρτυρα των T-ρυθμιστικών κυττάρων.<sup>101</sup>

Το τριμερές σύμπλοκο του υποδοχέα της IL-2, ο οποίος αποτελεί υποδοχέα υψηλής συγγένειας, αποτελείται από 3 μεγάλες υπομονάδες: την α αλυσίδα (CD25), την β αλυσίδα (CD122) και τον κοινό υποδοχέα κυτοκινών, την γ αλυσίδα (CD132).<sup>102</sup> (Εικ. 1.14<sup>β,γ</sup>) Αυτές οι υπομονάδες, όπως και άλλα τμήματα του μορίου φαίνονται να παίζουν σημαντικό ρόλο όχι μόνο στην φυσιολογία της ανοσίας αλλά και ως δείκτες της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος.

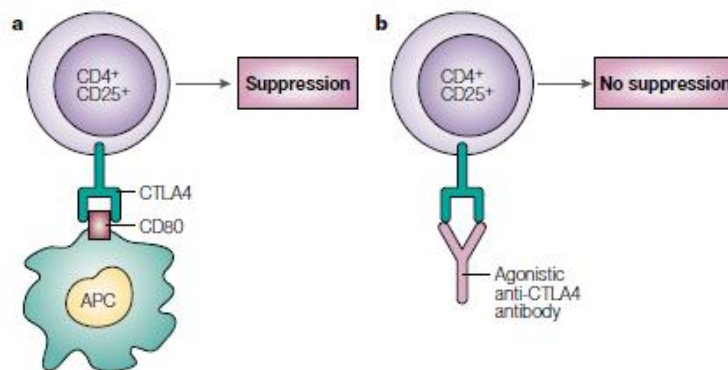
Στα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα στα οποία η σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα της IL-2 έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του υποδοχέα υψηλής συγγένειας, επάγεται ο κυτταρικός θάνατος στο κύτταρο στόχο μέσω της θετικής ρύθμισης της πρωτεΐνης Fas και του συνδέτη της.<sup>103</sup> Επιπλέον, η καταστολή πραγματοποιείται όταν τα CD25+ Τ-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται μέσω του υποδοχέα TCR.<sup>104</sup> (Εικ.1. 14<sup>1/1</sup>) Τα CD25+ Τ-λεμφοκύτταρα δεν παράγουν ποτέ IL-2, άρα η αντίδρασή τους εξαρτάται από σήματα γειτονικών κυττάρων, τόσο υποδοχέων όσο και της κυκλοφορίας των κυτοκινών.



**Εικόνα 1.14:** Η παρουσία του επιφανειακού δείκτη CD25 στο CD4+ Τ-λεμφοκύτταρο ενισχύει το σήμα που προέρχεται από την πρόσδεση της IL-2 στον υποδοχέα της. (www.nature.com)

Τα CD4+CD25+ Τ-λεμφοκύτταρα είναι τα μόνα που εκφράζουν συστατικά CTLA-4. Υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν πως τα σήματα που ακολουθούν την πρόσδεση του CTLA-4 στους CD80/CD86 απαιτούνται για την επαγωγή της κατασταλτικής δραστηριότητας. Όταν παρεμποδίστηκε η αλληλεπίδραση του CTLA-4 με το CD80 χρησιμοποιώντας αντι-CTLA-4 αντίσωμα *in vitro*, παρεμποδίστηκε και η φυσιολογική αρνητική ρύθμιση στην ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων.<sup>105</sup> (Εικ. 1.15.)

Όσον αφορά το προφίλ των κυτοκινών, δεν είναι ξεκάθαρο εάν οι αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες παράγονται από τα κατασταλτικά/ρυθμιστικά κύτταρα ή εάν τα κύτταρα-στόχοι που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς αυτών τις εκκρίνουν. Εντούτοις, τα CD25+ Τ-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν IL-10<sup>106</sup> αλλά η πηγή του TGFβ για παράδειγμα θα μπορούσε να είναι τα CD25+ Τ-λεμφοκύτταρα, άλλοι υποπληθυσμοί των Τ-λεμφοκυττάρων ή και άλλα κύτταρα όπως τα επιθηλιακά υπό αυτοθεραπεία.<sup>107</sup>



**Εικόνα 1.15:** Όταν το CTLA-4 εκφράζεται στα CD4+/CD25+ T-λεμφοκύτταρα και συνδέεται με τον προσδέκτη του στο αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο τότε επάγει καταστολή. (www.nature.com)

### 1.8.2. Τα T-ρυθμιστικά κύτταρα στα αυτοάνοσα νοσήματα

Η μειωμένη λειτουργική δραστηριότητα των Tregs μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση αυτοανοσίας. Νοσήματα όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας (multiple sclerosis, MS),<sup>108</sup> η ρευματοειδής αρθρίτιδα (rheumatoid arthritis, RA)<sup>109</sup>, ο διαβήτης τύπου-1<sup>110</sup> και η ψωριακή αρθρίτιδα<sup>111</sup>, φαίνεται ότι σχετίζονται με σημαντικά ελαττωμένη κατασταλτική ικανότητα των CD4+CD25+ Tregs σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα από υγιείς δότες. Επειδή το ποσοστό των CD4+CD25+ Tregs στο περιφερικό αίμα των ασθενών αυτών είναι αμετάβλητο συγκριτικά με τους υγιή υποκείμενα, έχει προταθεί ότι κυρίως η ελαττωματική λειτουργία των Tregs, και όχι ο αριθμός τους, συμβάλλει στην ανάπτυξη αυτών των νοσημάτων. Αν και σε ορισμένα αυτοάνοσα νοσήματα έχουν παρατηρηθεί μειωμένα επίπεδα των CD4+CD25+ Tregs στο περιφερικό αίμα των ασθενών,<sup>112,113</sup> ωστόσο, αυτή η μείωση πιθανά οφείλεται στη μετανάστευση των Tregs από το αίμα στη θέση της φλεγμονής. Πράγματι, μελέτες σε ασθενείς με RA ή νεανική ιδιοπαθή αρθρίτιδα (juvenile idiopathic arthritis, JIA) έδειξαν ότι το ποσοστό των CD4+CD25+ Tregs στο σημείο της φλεγμονής (π.χ., στο αρθρικό υγρό) ήταν σημαντικά αυξημένο σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό στο περιφερικό αίμα.<sup>114</sup> Πολυμορφισμοί του γονιδίου *CD25* έχουν σχετιστεί με αυτοάνοσες ασθένειες όπως ο διαβήτης τύπου I, η σκλήρυνση κατά πλάκας, και η μυασθένεια Grave's.<sup>115,116,117</sup>

Εκτός από τις περιπτώσεις αυτοανοσίας που περιγράφονται παραπάνω, σε αλλεργικούς ασθενείς υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για δυσλειτουργία των CD4+CD25+ Tregs στην καταστολή των Th2 λεμφοκυττάρων, που αποτελούν τον κύριο μεσολαβητή της αλλεργικής αντίδρασης.<sup>118,119</sup> Τα άτομα που πάσχουν από άσθμα ή αλλεργικά νοσήματα, έχει παρατηρηθεί πως εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα ή και δυσλειτουργία των Tr1 κυττάρων (των ρυθμιστικών κυττάρων που εκκρίνουν IL-10) σε σύγκριση με υγιή άτομα.<sup>120,121,122,123</sup>

## 1.9. Τα διαλυτά τάξης I και II MHC μόρια

Το ενδιαφέρον για τα διαλυτά τάξης I και II μόρια σχετίζεται με τις μελέτες του Calne και τις ανοχογόνες ιδιότητες των αλλογενετικών μοσχευμάτων ήπατος. Το 1967, ο Calne και οι συνεργάτες του ανέφεραν πρώιμες δοκιμές μεταμόσχευσης ήπατος σε χοίρους. Η δοκιμή περιελάμβανε 19 μοσχεύματα. Όλα τα ζώα απεβίωσαν σε διάστημα 14 ημερών. Όμως, ένα επεβίωσε για επτά μήνες χωρίς ανοσοκαταστολή και απεβίωσε εξαιτίας φραγής του εντέρου.<sup>124</sup> Δύο χρόνια αργότερα, δημοσιεύτηκε μία πιο εκτεταμένη μελέτη η οποία παρουσίασε πως η μακρόχρονη επιβίωση των χοίρων μετά από μεταμόσχευση με αλλογενετικό μόσχευμα ήπατος ήταν κοινή. Τα ζώα τα οποία ανέπτυσσαν ανοχή στο αλλομόσχευμα ήπατος, ανέπτυσσαν ανοχή και σε άλλα όργανα του δότη. Για να εξηγήσουν αυτή την παρατήρηση, υποστήριξαν πως από το ήπαρ εκκρίνονταν ανοχογόνα αντιγόνα του δότη τα οποία παρέμεναν στην κυκλοφορία του δέκτη όσο το ηπατικό μόσχευμα λειτουργούσε και δεν εντοπιζόνταν πια όταν το μόσχευμα απορριπτόταν ή αφαιρείτο.<sup>125</sup>

Στην συνέχεια, ο van Rood έκανε την υπόθεση πως αυτά τα αντιγόνα ήταν πιθανά διαλυτές μορφές των HLA μορίων. Αυτή μελετήθηκε χρησιμοποιώντας ορό από άτομα που περιείχε HLA-A2 μόρια, ο οποίος ουδετεροποιήθηκε από αντι-HLA-A2 ορό.<sup>126,127</sup> Αυτή η δημοσίευση χρησιμοποιείται συχνά ως η πρώτη που απέδειξε την ύπαρξη των διαλυτών HLA τάξης I. Τα επόμενα χρόνια, χρησιμοποιώντας πρωτόγονες τεχνικές, διαλυτά HLA βρέθηκαν στα ούρα ασθενών με ασθένεια νεφρών ενώ μικρότερες ποσότητες βρέθηκαν στα ούρα υγιών ατόμων.<sup>128</sup>

Η μελέτη των διαλυτών αντιγόνων τάξης I και II εξαρτιόταν από τις τεχνικές που αναπτύσσονταν ώστε να υπολογιστούν οι χαμηλές τους συγκεντρώσεις. Ο Lucas χρησιμοποίησε ραδιοσημασμένο πολυκλωνικό αντί-HLA αντίσωμα σε μία δοκιμή παρεμπόδισης ώστε να μελετήσει την αντι-HLA δραστηριότητα του ορού,<sup>129</sup> ενώ άλλοι χρησιμοποίησαν ραδιοσημασμένα αντισώματα για να ανιχνεύσουν διαλυτά HLA μόρια σε υπερκείμενα καλλιέργειών.<sup>130</sup> Αργότερα, που επινοήθηκε η τεχνική της ELISA, και κατανοήθηκε η σημαία της ανάπτυξης αυτής της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκε ώστε υπολογιστούν οι ποσότητες τόσο διαλυτών τάξης I,<sup>131,132,133,134,135,136,137</sup> όσο και τάξης II μορίων.<sup>138</sup>

### 1.9.1. Βιοχημικές ιδιότητες των διαλυτών τάξης I και II MHC μορίων

Το 1973, ο Miyakawa και οι συνεργάτες του μελέτησαν τις ετερογενείς ισομορφές των διαλυτών HLA-I στο ανθρώπινο πλάσμα χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντί-ορό και ανακάλυψαν 2 πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Η μία είχε μοριακό βάρος 48kDa και φαινόταν να είναι ταυτόσημη με αυτή που προέκυπτε μετά από πρωτεόλυση με παπαΐνη σε μεμβράνες λεμφοκυττάρων ενώ ένα μεγαλύτερο μόριο 80kDa έφτανε το μοριακό βάρος του προηγούμενου μετά από επεξεργασία με παπαΐνη.<sup>130</sup> Το υλικό μπορούσε να διαχωριστεί σε 2 αλυσίδες, μία των 33kDa και μία μικρότερη των 12kDa η οποίες ταυτοποιήθηκαν αργότερα ως HLA και β2-μικρογλομπίνη αντίστοιχα.<sup>139</sup> Επιπλέον, άλλες μελέτες απέδειξαν πως το μοριακό βάρος των διαλυτών στον ορό ήταν το ίδιο με αυτά που απομονώνονταν από ούρα.<sup>140,141,142</sup>

Όταν μελετήθηκε ορός από φυσιολογικό ανθρώπινο πλάσμα με την μέθοδο Western βρέθηκαν 3 ισομορφες διαλυτών μορίων, MB 44, 40 και 37-35kDa. Το μεγαλύτερο μόριο περιελάμβανε ένα διαμεμβρανικό βραχίονα και κυτταροπλασματική ουρά, το μικρότερο δεν διέθετε κανένα από τα 2 ενώ το ενδιάμεσο μόνο την κυτταροπλασματική ουρά.<sup>143</sup> Ο Krangel έδειξε πως το ενδιάμεσο πιθανά προέκυψε από εναλλακτικό μάτισμα.<sup>144,145</sup> Αυτή η μελέτη επιβεβαιώθηκε χρησιμοποιώντας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αλλά και μέσω αλληλούχισης του DNA.<sup>146</sup> Οι τρέχουσες πληροφορίες για την βιοχημεία των διαλυτών τάξης II μορίων αναφέρουν ένα μόριο μοριακού βάρους 60kDa (HLA-DR) που είναι αυξημένο σε σχέση με το μεμβρανικό μόριο αλλά όπως και το μεμβρανικό κυκλοφορεί ως ετεροδιμερές.<sup>147</sup> Ενώ έχουν αναφερθεί από μία άλλη μελέτη μόρια μοριακού βάρους 28 και 43kDa.<sup>148</sup> Αντίστοιχα, και η ακριβής ποσοτικοποίηση των διαλυτών τάξης II στον ορό έχει βασιστεί στην μέθοδο ELISA.<sup>149,150</sup> Προκύπτει πως υπάρχει μεγάλη ετερογένεια όσον αφορά την συγκέντρωση τους ανάμεσα στον πληθυσμό υγιών ατόμων, η οποία δεν αλλάζει στον χρόνο στο ίδιο άτομο.<sup>147</sup>

### 1.9.2. Προέλευση και κυκλοφορία των διαλυτών τάξης I και II MHC μορίων

Σήμερα, είναι γενικά αποδεκτό πως τα σωματικά υγρά (αίμα, σάλιο, σπέρμα, ιδρώτας, δάκρυα, ούρα) υγιών ατόμων περιέχουν ποικίλες συγκεντρώσεις διαλυτών μορίων MHC-I και II.<sup>126,148,151,152,153,154</sup> Με την μελέτη του Aultman και των συνεργατών του αποδείχθηκε πως τα διαλυτά τάξης I μόρια κύρια εντοπίζονται στον ορό ενώ είναι ανύπαρκτα ή μη ανιχνεύσιμα σε σάλιο, ιδρώτα και δάκρυα, σε αντίθεση με τα τάξης II που εντοπίζονται σε ικανές ποσότητες σε όλα τα σωματικά υγρά.<sup>148</sup> Αυτή η παρατήρηση επιβεβαίωσε και μία άλλη μελέτη του 1994, η οποία υποστήριξε πως η φυσιολογική κατανομή των διαλυτών τάξης I ήταν διαφορετική από τα τάξης II και μάλιστα η συγκεντρωσή τους είναι πολύ μικρότερη.<sup>155</sup>

Οι διαφορετικές ισομορφές των τάξης I που προκύπτουν όπως επιβεβαιώνονται και από τα πειράματα με PCR και αλληλούχισης είναι αποτέλεσμα είτε εναλλακτικού ματίσματος, είτε κυτταρικής αναδίπλωσης (shedding) στην μεμβράνη ή ενεργής έκκρισης. Επιπλέον, φαίνεται πως μία πηγή σημαντικής ποσότητας των διαλυτών τάξης I μορίων είναι το ήπαρ καθώς μπορεί να εξηγήει το γεγονός πως η οξεία απόρριψη μοσχεύματος είναι ασυνήθης στις μεταμοσχεύσεις ήπατος. Αντίθετα, ο μηχανισμός με τον οποίο τα τάξης II εμφανίζονται στην κυκλοφορία είναι άγνωστος καθώς δεν υπάρχουν μελέτες που να χαρακτηρίζουν δομικά τα μόρια. Παρ'όλα αυτά, είναι πιθανό ο μηχανισμός απελευθέρωσης των τάξης II στα σωματικά υγρά να είναι διαφορετικός από εκείνον που είναι υπεύθυνος για τα τάξης I.

Πρόσφατα αποκαλύφθηκε πως τα διαλυτά MHC μόρια που βρίσκονται στην κυκλοφορία τόσο σε άνθρωπο όσο και σε ποντίκι δεν εκκρίνονται μέσω εξωσωμάτων.<sup>156</sup> Όμως, υπάρχουν μελέτες *in vitro* που παρουσιάζουν κυτταρικές σειρές αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, κυρίως Β-λεμφοκύτταρα,<sup>157</sup> να εκκρίνουν εξωσώματα που περιέχουν μεγάλες ποσότητες MHC μορίων.<sup>156</sup> Είναι φανερό πως τα διαλυτά μόρια του ορού με αυτά που εκκρίνονται από τις κυτταρικές σειρές διαφέρουν. Επιπλέον, έχει δειχθεί πως τα Β-λεμφοκύτταρα και τα CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα μετά από ενεργοποίηση με IL-2 εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες διαλυτών HLA-DR ενώ παρουσία μακροφάγων τα Τ-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν 4 φορές περισσότερη ποσότητα HLA-DR.<sup>14</sup>

### 1.9.3. Η ρύθμιση των διαλυτών τάξης I και II MHC μορίων στην εγκυμοσύνη

Όσον αφορά την εγκυμοσύνη τα διαλυτά MHC τάξης I έχουν άμεση σχέση με την μητρική ανοσοκαταστολή προς τα πατρικά αλλοαντιγόνα του ημι-αλλογενετικού εμβρύου ενώ τα MHC τάξης II με το αντίστοιχο φαινόμενο της ανοσοδιέγερσης. Κατά την διάρκεια μίας εγκυμοσύνης οι συγκεντρώσεις των διαλυτών τάξης I μορίων είναι υψηλές κατά τα 2 πρώτα τρίμηνα, μειώνονται το τρίτο και επιστρέφουν σε φυσιολογικά επίπεδα μετά τον τοκετό.<sup>158</sup> Επιπλέον, μία φυσιολογική εγκυμοσύνη απαιτεί αύξηση των επιπέδων των μορίων MHC τάξης I, με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων των MHC τάξης II.<sup>159</sup>

Τα συγκεκριμένα επίπεδα των διαλυτών MHC μορίων που χαρακτηρίζουν ένα στάδιο της εγκυμοσύνης μπορεί να βοηθήσει στην προσέγγιση περιπτώσεων αποβολών που σχετίζονται με ανοσορρυθμιστικές και ανοσοκατασταλτικές αντιδράσεις. Έχει αποδειχθεί *in vitro* και *in vivo* πως οι τροφοβλάστες (στην ζώνη του πλακούντα) απελευθερώνουν στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας τους διαλυτά MHC τάξης II (HLA-DR) μετά από ενεργοποίηση με IFN-γ.<sup>160</sup> Πιθανώς σε αυτό οφείλεται η αύξηση στην συγκέντρωση των διαλυτών MHC τάξης II κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης.<sup>161</sup> Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη της διαδικασίας αποβολή των εμβρύων. Επιπλέον, επιβεβαιώνεται πως τα HLA αντιγόνα μπορούν να περνούν τον φραγμό του πλακούντα καθώς έχουν βρεθεί διαλυτά HLA-I μόρια εμβρυικής προέλευσης στο μητρικό αίμα ακόμα και οχτώ εβδομάδες από την σύλληψη.<sup>162</sup> Σε μία σχετική μελέτη, φυσικοί φονιάδες (NK κύτταρα) από τον ομφάλιο λώρο είχαν υψηλά μειωμένη κυτταροτοξική δραστηριότητα σε σχέση με τους ενήλικους φυσικούς φονιάδες. Αυτή η μείωση της δραστηριότητας σχετίστηκε πειραματικά με την παρουσία διαλυτών HLA αντιγόνων στον ομφάλιο λώρο.<sup>163</sup>

### 1.9.4. Η παρουσία των διαλυτών τάξης I, II MHC μορίων σε παθολογικές καταστάσεις

Τα διαλυτά MHC μόρια φαίνεται να εμπλέκονται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις καθώς οι συγκεντρώσεις τους στα σωματικά υγρά αλλάζουν κατά τα στάδια ανάπτυξης της ασθένειας σε σχέση με τις συγκεντρώσεις υγιών ατόμων.

Όσον αφορά τις κακοήθειες και τους όγκους φαίνεται πως οι συγκεντρώσεις των Ia του ορού ήταν χαμηλές σε πολλά μοντέλα μυών που ανέπτυσαν διαφορετικούς όγκους, κάτι που παρατηρήθηκε και σε ανθρώπους.<sup>164</sup> Τα επίπεδα μειώνονταν όσο ο όγκος εξελισσόταν το οποίο επιβεβαιώθηκε και αργότερα από μελέτη σε γαστρικό καρκίνο.<sup>165</sup> Επιπλέον, ασθενείς με κακοήθεια στο ήπαρ είχαν χαμηλότερα επίπεδα διαλυτών HLA-I σε σχέση με άτομα που έπασχαν από άλλες ηπατικές νόσους.<sup>166</sup> Αντίστοιχα, τα διαλυτά HLA-II συνδέονται βιβλιογραφικά περισσότερο με ορισμένους τύπους λευχαιμιών. Αυξημένες συγκεντρώσεις διαλυτών HLA-II (HLA-DR) παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία σε σχέση με αυτούς που έπασχαν από οξεία μυελογενής λευχαιμία<sup>167</sup> αλλά και χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.<sup>138</sup> Τέλος, ασθενείς με μελανώματα σε αναπτυγμένο στάδιο εμφανίζουν μειωμένη συγκέντρωση διαλυτών HLA-DR, που πιθανά συνδέεται με την μειωμένη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος σε αυτούς τους ασθενείς.<sup>168</sup>

Υπάρχουν επίσης καταγραφές σε ικές εγκεφαλίτιδες,<sup>148</sup> μελέτες για την παρουσία των HLA-DR διαλυτών μορίων καθώς και των HLA-I μορίων σε παθολογικές εγκυμοσύνες,<sup>151,169</sup> άσθμα,<sup>170</sup> καθώς και χρόνια φλεγμονή της ίριδας.<sup>171</sup> Τα διαλυτά HLA-I του ορού έχει αναφερθεί πως είναι ιδιαίτερα αυξημένα στην χρόνια ηπατίτιδα και σχετίζονται με την αύξηση της γλουταμινική τρανσαμινάση του ορού<sup>172,173</sup> αλλά και την ενεργή φυματίωση.<sup>174</sup> Αυξημένα είναι επίσης σε ασθενείς με αιμορραγικό πυρετό εξαιτίας νεφρικού συνδρόμου,<sup>175</sup> παιδιά με ατοπική δερματίτιδα,<sup>176</sup> ενώ ασθενείς μολυσμένοι με τον ιό την μηνιγγίτιδας εμφάνισαν ενισχυμένα επίπεδα διαλυτών HLA-I στο εγκεφαλονωτιαίο τους υγρό.<sup>177</sup> Ακόμα, έχει παρατηρηθεί πως τα διαλυτά HLA μόρια παίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο κατά την διάρκεια μετάγγισης αίματος από αλλογενετικό δότη.<sup>178</sup>

Τέλος, τα διαλυτά HLA-II είναι αυξημένα στον ορό σε πάσχοντες από AIDS<sup>179</sup> ενώ αυξημένη είναι και η συγκέντρωση των HLA-I σε ασθενείς μολυσμένους με HIV-I κατά τρεις φορές σε σχέση με τους υγιείς ασθενείς.<sup>180</sup> Υψηλές συγκεντρώσεις επίσης βρέθηκαν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό τέτοιων ασθενών που σχετίστηκε με τον βαθμό της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό.<sup>181</sup> Τα ίδια εργαστήρια δημοσίευσαν μία σειρά μελετών που έδειξαν πως ο βαθμός αύξησης των διαλυτών HLA-I συνδέεται με το στάδιο της ασθένειας. Προτάθηκε πως αυτά τα αυξημένα επίπεδα μπορεί να παίζουν ρόλο στην καταστολή των ανοσολογικών αποκρίσεων σε ασθενείς με AIDS.<sup>182,183,184</sup> Αυτές οι ανεβασμένες συγκεντρώσεις αναμένεται λογικά να παρεμβαίνουν με την ικανότητα αυτών των ασθενών να αποκρίνονται στον HIV-I.

Συμπερασματικά, παρατηρείται πως τα διαλυτά μόρια αυξάνονται σε μολυσματικές και φλεγμονώδεις ασθένειες ενώ μειώνονται σε ασθενείς με καρκίνο όσο εξελίσσεται η πάθηση. Ίσως αυτές οι αλλαγές υποδεικνύουν συνεχή ανοσολογική ενεργότητα και η παρουσία τους αντανάκλα την δυνατότητα να εγείρουν μία αντίδραση. Ενισχύοντας αυτή την εκτίμηση, υπάρχουν μελέτες όπου διαλυτά HLA-I και II εκκρίνονται σε υπερκείμενα καλλιιεργειών κυτταρικών σειρών μετά από έκθεση σε ιντερφερόνη,<sup>185,186</sup> ενώ εμφανίζονται σε υπερκείμενα μη ενεργοποιημένων ανθρώπινων κυτταρικών σειρών.<sup>187</sup>

#### 1.9.5. Η παρουσία των διαλυτών τάξης I και II MHC μορίων στις αυτοανοσίες

Έχουν μελετηθεί διεξοδικά ως προς την παρουσία των διαλυτών μορίων η ρευματοειδή αρθρίτιδα, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η πολλαπλή σκλήρυνση και το σύνδρομο Sjogren's. Τα διαλυτά HLA-I έχει αναφερθεί πως είναι σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, συστηματικό ερυθηματώδη λύκο και σύνδρομο Sjogren's.<sup>188,189,190,191</sup> Η κλινική σημασία των αυξημένων συγκεντρώσεων των διαλυτών HLA-I στον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο είναι υπό διερεύνηση μιας και η αύξηση συνδέεται με την ενεργότητα της ασθένειας<sup>192,189</sup> αλλά όχι με κάποια ανωμαλία στους αιματολογικούς δείκτες. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως τα διαλυτά HLA-II έχουν βρεθεί στο αρθρικό υγρό των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα.<sup>193</sup> Για παράδειγμα στην ρευματοειδή αρθρίτιδα έχει αποδειχθεί πως τα διαλυτά HLA-DR μόρια αυξάνονται με την πρόοδο της ασθένειας και μειώνονται με την θεραπεία αυτής. Ο συνδυασμός της μεθοδρεξάτης και του prednisolone εκτός από μείωση των συμπτωμάτων της ασθένειας

προκαλεί μείωση των sMHC-DR μορίων, πιθανά μπλοκάροντας τους μηχανισμούς έκκρισης τους.<sup>194,195</sup> Διαφοροποιήσεις έχουν παρατηρηθεί επίσης στα HLA-I και II, οι οποίες εντοπίζονται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση.<sup>196</sup> Γενικά πάντως τα διαλυτά μόρια συνδέονται με την καλή λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος.<sup>197</sup>

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα διαλυτά μόρια έχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ασθένειας, αλλά δεν έχει ξεκαθαριστεί αν αποτελούν προϊόντα της πάθησης ή αν συνεισφέρουν κάπως στην εξέλιξή της. Ενδεχομένως, θα μπορούσαν μετά από κλινικές μελέτες που να καταλήξουν σε ένα προφίλ συγκεντρώσεων σε σχέση με το στάδιο εξέλιξης της κάθε ασθένειας να χρησιμοποιηθούν διαγνωστικά για την επιβεβαίωση της νόσου αλλά και το στάδιο αυτής.

#### 1.9.6. Τα διαλυτά τάξης I και II MHC μόρια καθοριστές του οσμότυπου

Υπάρχουν μία σειρά δημοσιεύσεων οι οποίες υποστηρίζουν πως τα MHC μόρια είναι αυτά που καθορίζουν την μοναδική οσμή του κάθε ατόμου. Αυτό αρχικά αποδείχθηκε από τον Kaltus ο οποίος διευκρίνισε πως οι σκύλοι είχαν δυσκολία να ξεχωρίσουν τις οσμές μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων.<sup>198</sup> Φαίνεται πως οι διαφορετικοί οσμότυποι καθορίζονται από διαλυτά MHC αντιγόνα ή τα προϊόντα καταβολισμού τους αλλά αυτό δεν έχει ακόμα αποδειχθεί. Επιπλέον, με την διαφορά ιστοσυμβατότητας έχει συνδεθεί και η επιλογή αναπαραγωγικού ταιριού αφού ως σημαντικό εξελικτικό θέμα διαφυλάσσεται με αυτόν τον τρόπο ο πολυμορφισμός των MHC αντιγόνων και συνεπώς η επιβίωση του είδους.<sup>199</sup> Μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει πως η επιλογή για αναπαραγωγή βασίζεται στον H-2 γονότυπο<sup>200</sup> και αυτές οι διακρίσεις γίνονται με βάση την οσμή.<sup>201</sup> Πιθανή πηγή αυτών των διακριτών οσμών (οσμότυπος) θεωρήθηκαν τα ούρα,<sup>202</sup> τα οποία καθορίζονται από αιμοποιητικά κύτταρα,<sup>203</sup> και περιέχουν ποσότητες διαλυτών μορίων άρα τα διαλυτά μόρια που είναι παρόντα στα ούρα καθορίζουν και τον οσμότυπο.<sup>204</sup>

Τέλος, αποδείχθηκε πως οι γενετικές διαφοροποιήσεις τόσο στο γενετικό τόπο των MHC-I όσο και στα MHC-II συνεισφέρουν στους διακριτούς οσμότυπους.<sup>205</sup> Επομένως, η ύπαρξη των οσμοτύπων και ο έλεγχός τους από τα MHC μόρια δεν αμφισβητείται, ακόμα και αν δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος ο μηχανισμός.

#### 1.9.7. Τα διαλυτά τάξης I και II MHC μόρια ως ρυθμιστές της ανοσολογικής απόκρισης

Τα διαλυτά MHC μόρια έχουν συνδεθεί από πολύ νωρίς με την διαδικασία της ανοχής. Τα sMHC-I αν μεταμοσχευθούν στον δότη μαζί με το μόσχευμα έχουν ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες κατά την διαδικασία απόρριψής του.<sup>206,207,208,209</sup> Μάλιστα αποδείχθηκε πως τα αντιγόνα που απομονώνονταν από το ήπαρ ήταν ικανά να καταστείλουν χυμικές αποκρίσεις και λιγότερο κυτταρικές.<sup>210,211</sup> Επιπλέον, κατά την διάρκεια των δεκαετιών του '70 και του '80 που κορυφώθηκαν οι έρευνες για τα T-κατασταλτικά κύτταρα, είχε προταθεί πως οφείλουν τις κατασταλτικές τους ιδιότητες σε διαλυτούς παράγοντες που περιείχαν ενεργότητα MHC τάξης II μορίων.<sup>212</sup>



Υπάρχουν επίσης αρκετές μελέτες που αποδεικνύουν πως πεπτιδικές αλληλουχίες από μέρη των HLA-I προκαλούν ανοχή ή καταστολή των ανοσολογικών αποκρίσεων.<sup>213,214</sup> Οι φυσικοί φονιάδες και τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα φαίνεται να ρυθμίζονται αρνητικά και να οδηγούνται στην απόπτωση,<sup>215,216</sup> τα CD8+ T-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται,<sup>217</sup> ενώ τα διαλυτά HLA-I επάγουν απόπτωση στα κυτταροτοξικά αλλοδραστικά T-λεμφοκύτταρα.<sup>218</sup> Τέλος, ο Kress και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν ένα γονίδιο σχετιζόμενο με τα τάξης I στο ήπαρ του ποντικού το οποίο παρήγαγε ένα αντιγόνο που δεν μπορούσε να αγκυροβολήσει στην μεμβράνη αλλά εκκρινόταν στον ορό και είχε χαρακτηριστικά αντιγόνου κατά την μεταμόσχευση. Πρότειναν πως αυτό το αντιγόνο μπορεί να σχετίζεται με την ανοχή του εαυτού.<sup>219</sup>

Όσον αφορά τα διαλυτά τάξης II έχει αποδειχθεί πως τα HLA-DR μόρια σε ασθενείς με αυτοάνοσες ασθένειες μπορούν να ενεργοποιήσουν πληθυσμούς των T-λεμφοκυττάρων,<sup>220</sup> ενώ τα διαλυτά τάξης II μόρια που έχουν απομονωθεί από υπερκείμενα καλλιιεργειών μονοκυττάρων μπορούν να καταστείλουν την σύνθεση και την έκφραση της IL-2.<sup>214</sup> Δεδομένα από την Οξφόρδη πως τα διαλυτά HLA-II μόρια μπορούν να επάγουν ανοχή μακράς διαρκείας σε αλλοδραστικά T-λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με μυασθένεια Gravis, στην οποία τα αυτοαντιγόνα που είναι εξαρτώμενα από T-λεμφοκύτταρα δρουν ενάντια στον υποδοχέα ακετυλοχολίνης.<sup>221</sup> Επίσης, σε μοντέλα πειραματικής αλλεργικής εγκεφαλομυελίτιδας (EAE) σε ποντίκια αποδείχθηκε η δυνατότητα απενεργοποίησης αυτοδραστικών T-cells για την MBP όταν επώαστηκαν με sMHC-II/MBP πεπτίδιο.<sup>222</sup>

Στο παρελθόν υπήρχε η πεποίθηση πως η δράση τους συμβαδίζει με το γενικό πλαίσιο δράσης των μεμβρανικών.<sup>147</sup> Με βάση πρόσφατες μελέτες, τα διαλυτά MHC τάξης II φαίνεται να ανταγωνίζονται σημαντικά τα μεμβρανικά MHC τάξης II στην αλληλεπίδραση με τον TCR καθώς ακολουθούν βήματα παρόμοια των μεμβρανικών όσον αφορά την πρόσδεση αλλά και στην ικανότητα τους να προκαλούν την έναρξη χυμικής ή κυτταρομεσολαβητικής απόκρισης.<sup>223</sup> Αυτό ενισχύεται από το γεγονός πως η σύνδεση των MHC τάξης II με τον TCR προκαλεί την ενεργοποίηση των Src κινασών, όπως και με τα μεμβρανικά ενώ, πειράματα έχουν αποδείξει πως αν ο CD4 υποδοχέας απενεργοποιηθεί τα διαλυτά MHC τάξης II αδυνατούν να προκαλέσουν πολλαπλασιασμό στα Th.<sup>223</sup> Επομένως, προκύπτει πως τα διαλυτά μόρια μπορούν να προσδεθούν στους φυσικούς υποδοχείς τους και να αναστείλουν τα T-cells μέσω απόπτωσης ή μπλοκαρίσματος υποδοχέα. Πιθανοί στόχοι των διαλυτών MHC τάξης II φαίνονται να είναι τα CD4+ και CD25+ T-λεμφοκύτταρα, τα B λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα.<sup>223</sup>

Για να ερμηνευτεί η δράση τους η αρχική υπόθεση ήταν πως έχουν φορτωμένο κάποιο πεπτίδιο του εαυτού και έτσι αναπτύσσουν παρεμποδιστικό ρόλο για να διατηρηθεί η ανοχή, χωρίς να γνωρίζουμε αν οφείλεται στο ίδιο το μόριο ή τα κύτταρα-στόχους του. Όμως, μετέπειτα μελέτες απέδειξαν πως προσλαμβάνουν και αντιγονικά πεπτίδια παίζοντας ρόλο στην ανοσοαπόκριση του οργανισμού.<sup>147</sup> Η ίδια ομάδα επέδειξε πως τα διαλυτά HLA-DR που δεν έχουν ενσωματώσει κάποιο αντιγονικό πεπτίδιο αδυνατούν να ενεργοποιήσουν τα T-cells.<sup>147</sup> Επιπλέον, τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα που προκύπτουν από ανοχοποίηση με κάποιο αντιγόνο εκκρίνουν tolerosomes (εξωσώματα στον ορό) τα οποία είναι MHC-εξαρτώμενα.<sup>224</sup> Η θέση αυτή ενισχύθηκε αργότερα όταν αποδείχθηκε πως η μεσολαβούμενη από εξωσώματα ανοχή είναι εξαρτώμενη από MHC-II.<sup>225</sup>

Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανοσορυθμιστική δράση των διαλυτών τάξης II (I-A) στην εγκυμοσύνη καθώς όταν αυτά αφαιρέθηκαν από υπερκείμενα καλλιιεργειών CD25-CD4+, CD25+CD8+ και CD25+CD4+ T-λεμφοκυττάρων σταμάτησε η επίδραση που είχαν στον πολλαπλασιασμό, αποδεικνύοντας πως είχαν ενεργοποιητικές ιδιότητες. Αντίθετα, η απομακρυσή τους από CD25-CD8+ υπερκείμενα καλλιιεργειών είχε σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση του πολλαπλασιασμού, υποδεικνύοντας την κατασταλτική τους δράση.<sup>226</sup> Φαίνεται πως τα διαλυτά I-A μόρια μπορούν να προκαλέσουν αρνητικά και θετικά σήματα που εξαρτώνται από το αντιγονικό πεπτίδιο με το οποίο είναι φορτωμένα ή τον κυτταρικό τους στόχο. Έτσι, τα αντιγόνα του εαυτού μπορούν να καθοδηγήσουν μία κατασταλτική δραστηριότητα ώστε να εξασφαλίσουν την αυτοανοχή.<sup>227,228</sup>

Με βάση τα παραπάνω, προκύπτουν αρκετά στοιχεία ώστε να συμπεράνουμε πως τα διαλυτά μόρια MHC μπορούν να καταστείλουν ανοσοαποκρίσεις και δύναται να χαρακτηριστούν ως ανοχογόνα. Παρολαυτά, ο ακριβής τρόπος με τον οποίο τα διαλυτά μόρια διατηρούν ή επάγουν την αυτοανοχής δεν είναι ξεκάθαρος. Όμως, οι αποδεδειγμένες ανοσορυθμιστικές τους ιδιότητες καθώς και η εμπλοκή τους σε μεγάλο αριθμό παθολογικών καταστάσεων καθιστά την συνέχεια της μελέτης του ρόλου τους εξαιρετικά σημαντική.

### 1.11. Σκοπός της εργασίας

---

Τα διαλυτά τάξης II μόρια του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (sMHCII) φαίνεται να εμπλέκονται στους μηχανισμούς διατήρησης της ανοχής σε αντιγόνα του εαυτού, ενώ οι συγκεντρώσεις τους αλλάζουν κατά την εξέλιξη μίας σειρά ασθενειών όπως οι αυτοανοσίες στις οποίες το ανοσοποιητικό σύστημα αδυνατεί να διατηρήσει την ανοχή στα αντιγόνα του εαυτού και αναπτύσσει αυτοαντισώματα ή/και αυτοδραστικά Τ-λεμφοκύτταρα.<sup>188-196</sup> Αυτό υποδεικνύει ότι τα διαλυτά μόρια έχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της κάθε ασθένειας αλλά δεν έχει ξεκαθαριστεί αν αποτελούν προϊόντα της πάθησης ή αν συνεισφέρουν στην εξέλιξή της. Ενδεχομένως, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν διαγνωστικά, όμως η ελλιπής μελέτη τους έχει οδηγήσει στην εγκατάλειψη αυτής της ιδέας.

Επιπλέον, σε παλαιότερες δημοσιεύσεις είχε αποδειχθεί τόσο ο ανταγωνισμός των διαλυτών τάξης II (MHC) μορίων με τα αντίστοιχα μεμβρανικά όσο και η αρνητική ρύθμιση σε διάφορους πληθυσμούς κυττάρων.<sup>223</sup> Σε πιο πρόσφατες μελέτες, πιθανολογείται ότι τα διαλυτά τάξης II μόρια να είναι «φορτωμένα» με αντιγονικά πεπτίδια του εαυτού κάτι που δεν συμβαίνει με τα αντίστοιχα μεμβρανικά τα οποία συνδέονται με εξωγενή αντιγόνα.<sup>232</sup>

Μέχρι σήμερα, οι τρόποι με τους οποίους τα διαλυτά τάξης II εμπλέκονται στην διαδικασία της ανοχής, δεν έχουν μελετηθεί, ενώ ελάχιστα γνωρίζουμε για την δομή τους και την αμινοξική αλληλουχία των.

Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να διαλευκάνουμε τους μηχανισμούς με τους οποίους τα διαλυτά τάξης II μόρια εμπλέκονται στην ανοχή του ανοσοποιητικού συστήματος για τα αντιγόνα του εαυτού, την διατήρηση ή την επαγωγή της. Η διαλεύκανση αυτών των μηχανισμών θα μας δώσει την δυνατότητα της αξιοποίησης των διαλυτών τάξης II μορίων στην επανανοχοποίηση του οργανισμού σε αυτοαντιγόνα στην περίπτωση αυτοανοσιών ή στην στοχευμένη απενεργοποίηση αυτοδραστικών κυττάρων.

Για την παρούσα μελέτη επιλέξαμε την απομόνωση των διαλυτών μορίων από ανοχοποιημένα ποντίκια αφενός λόγω της αυξημένης τους συγκέντρωσης στον ορό του αίματος και αφετέρου για την δυνατότητα ελέγχου κάποιου συγκεκριμένου αντιγόνου στο σύστημα εργασίας.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει 2 διακριτές κατευθύνσεις. Η μία αφορά την μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των διαλυτών τάξης II μορίων και η δεύτερη μελέτησε την δραστικότητα αυτών των μορίων στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος.

## Κεφάλαιο 2-Μέθοδοι & Υλικά

---

## Κεφάλαιο 2-Μέθοδοι & Υλικά

### 2.1. Ποντίκια, συλλογή ορού και οργάνων

---

Τα αρσενικά ποντίκια BALB/c (H-2<sup>d</sup>) 4-8 εβδομάδων που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από τον Charles River (Milan, Italy) και στεγάζονται στο ζωοτροφείο του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, σε δωμάτια με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (18-25°C), υγρασίας (45-50%) και φωτοπερίοδο 12 ωρών φωτός και 12 σκοτάδι. Ο χειρισμός των ποντικών έγινε σύμφωνα με τους διεθνείς και ευρωπαϊκούς κανονισμούς βιοηθικής και συμβάδιζε με αυτούς του Πανεπιστημίου Κρήτης, εγκεκριμένους από τον υπεύθυνο ζωοτροφείου του Τμήματος Βιολογίας. Η συλλογή του αίματος γίνονταν με ολική αφαίμαξη υπό αναισθησία και τα ζώα θυσιάζονταν με αυχενική εξάρθρωση. Το αίμα παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου (rt) για 30' και στην συνέχεια για 30' στους 4° C. Ο ορός συλλέγονταν μετά από φυγοκέντρηση για 3' στις 3000 rpm και φυλασσόταν στους -20 °C. Οι σπλήνες αφαιρούνταν υπό στείρες συνθήκες με την χρήση αποστειρωμένων εργαλείων.

### 2.2. Αντισώματα

---

- Mouse anti-IA/IE mAb (HB-225<sup>TM</sup> hybridoma: *Mus musculus* (myeloma), Hamster Armenian B cell, συνδέεται με μονομορφικό επίτοπο στην I-A και I-E περιοχή, ισότυπου IgG, ευγενική προσφορά από τογ καθηγητή R. Steinman Rockefeller (University, NY). Απομονώθηκε από τα υπερκείμενα κυττάρων και χρησιμοποιήθηκε στην συγκέντρωση των 0,1μg/ml για τα πειράματα της ELISA και το Western blot σε συγκέντρωση 0,1μg/ml. Για την ομοιοπολική σύνδεση στα παραμαγνητικά σφαιρίδια χρησιμοποιήθηκαν 5μg.
- PE-labeled mouse anti-CD152 mAb (IgG, produced in Syrian Hamster, Biolegent, San Diego, CA), χρησιμοποιήθηκε στην συγκέντρωση των 1μg/ml.
- PE-labeled mouse anti-CD28 (IgG, produced in Armenian Hamster, Biolegent, San Diego, CA), χρησιμοποιήθηκε στην συγκέντρωση των 1μg/ml.
- PE-labeled mouse anti-CD25 (IgG1, produced in rat, Eurobioscience, Germany), χρησιμοποιήθηκε στην συγκέντρωση των 1μg/ml.

- FITC-labeled mouse anti-CD4 (IgG2b, produced in rat, Eurobioscience, Germany), χρησιμοποιήθηκε στην συγκέντρωση των 1μg/ml για τα πειράματα του cell sorting.
- Mouse anti-IL-2 (IgG2a, k, produced in rat, Immunotools, USA), χρησιμοποιήθηκε στην συγκέντρωση των 0,1μg/ml για πειράματα ELISA.
- Human anti-IL-2 (IgG2a, k, produced in mouse, Immunotools, USA), χρησιμοποιήθηκε στην συγκέντρωση των 0,1μg/ml για πειράματα βιοαισθητήρων.
- Mouse anti-IL-10 (IgG2b, k, produced in rat, Immunotools, USA), χρησιμοποιήθηκε στην συγκέντρωση των 0,1μg/ml για πειράματα ELISA.
- Goat anti-mouse IgG (Fab fragment) secondary antibody, συνδεδεμένο με ένζυμο υπεροξειδάση (Sigma, Germany), χρησιμοποιήθηκε στην συγκέντρωση των 0,02 μg/ml. για πειράματα ELISA
- Τα αντισώματα για τα πειράματα σηματοδότησης του TCR με την μέθοδο ELISA: purified rabbit anti-mouse ZAP-70, purified rabbit anti-mouse phospho-ZAP-70 (Tyr319)/Syk (Tyr352) (65EA), purified rabbit anti-mouse LAT, purified rabbit anti-mouse phospho-LAT (Tyr191), purified rabbit anti-mouse Lck, purified rabbit anti-mouse phospho Lck (Tyr505) (Cell Signaling Technology, Boston, USA). Χρησιμοποιήθηκαν στην συγκέντρωση των 0,1μg/ml.
- HRP-conjugated anti-rabbit IgG (produced in goat, NIDA, IMBB-FORTH, Heraklion, Greece), χρησιμοποιήθηκε στην συγκέντρωση των 0,02μg/ml για πειράματα ELISA.
- HRP-conjugated anti-hamster IgG (produced in goat, NIDA, IMBB-FORTH, Heraklion, Greece), χρησιμοποιήθηκε στην συγκέντρωση των 0,02μg/ml για πειράματα Western.

### 2.3. Ανοσοκατακρίμηση πρωτεϊνών

---

Η ανοσοκατακρίμηση είναι μία απλή, γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος που χρησιμοποιείται για απομόνωση πρωτεϊνών από ορούς, υπερκείμενα ή εκχυλίσματα και βασίζεται στην ειδικότητα των αντισωμάτων που ακινητοποιούνται πάνω στα σφαιρίδια για τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν

#### 2.3.1. Ακινητοποίηση αντισώματος στα σφαιρίδια

---

- Υπερπαραμαγνητικά σφαιρίδια (DynaL Biotech)-διαμέτρου M-280, a-IgG
- Αποστειρωμένο PBS (pH 7,4)
- Triethanolamine 0,2M σε dH<sub>2</sub>O , pH 8,2
- Διάλυμα dimethyl pimelimidate dihydrochloride (DMP, Pierce, Rockford, IL, USA /Triethanolamine (0,2M) 20Mm, pH 8.2
- Tris buffer 50mM σε dH<sub>2</sub>O , pH 7,5

(Δουλεύουμε σε στείρες συνθήκες)

1. Ξεπλένουμε  $10^8$  beads 2x με αποστειρωμένο PBS 2ml χρησιμοποιώντας μαγνήτη. Χρησιμοποιούμε tube 5ml.
2. Προσθέτουμε το επιθυμητό αντίσωμα (ειδικό για την πρωτεΐνη που θέλουμε να απομονώσουμε) σε ποσότητα 5μg. 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.
4. Προσθέτουμε 1ml triethanolamine και επαναλαμβάνουμε 2 φορές ακόμα. Η triethanolamine δημιουργεί τους ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των 2 αντισωμάτων.
5. Επαναδιαλυτοποιούμε σε διάλυμα DMP/triethanolamine 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 και ήπια ανάδευση.
7. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και πλένουμε 2x με διάλυμα PBS-BSA 0,1%.
8. Διατηρούμε στους  $4^\circ C$  σε PBS 1ml.

### 2.3.2. Ανοσοκατακρίμνηση πρωτεϊνών

---

- Μαγνητικά σφαιρίδια συνδεδεμένα με ειδικό για την πρωτεΐνη αντίσωμα.
  - *Washing buffer*: PBS-Tween 20, 0.05%
  - $CH_3COOH$  0,1M, pH 4
  - Tris-HCl 0,2M σε  $dH_2O$ , pH 8,2
9. Πλένουμε 2x τα σφαιρίδια με 2ml washing buffer για 10' με ήπια ανάδευση, χρησιμοποιώντας μαγνήτη. Ξεπλένουμε 2x με 2 ml PBS.
  10. Προσθέτουμε 1ml πρωτεϊνικού εκχυλίσματος ή ορού στα σφαιρίδια. Τον αραιώνουμε αν χρειάζεται. Επωάζουμε για 2h στους  $4^\circ C$  με ήπια ανάδευση.
  11. Πλένουμε 2x τα σφαιρίδια με 2 ml washing buffer, χρησιμοποιώντας μαγνήτη, για να απομακρυνθούν τα μη ειδικά προσδεμένα μόρια.
  12. Πλένουμε 2x τα σφαιρίδια με 2ml PBS, χρησιμοποιώντας μαγνήτη.
  13. Για την έκλυση της πρωτεΐνης μας προσθέτουμε  $CH_3COOH$  0,1M στον επιθυμητό όγκο και επωάζουμε για 20' σε rt με ήπια ανάδευση.
  14. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (πρωτεΐνη) και εξουδετερώνουμε το όξινο pH με ανάλογο Tris-HCl 0,2M. Μετράμε το pH και ρυθμίζουμε περαιτέρω αν χρειαστεί. Διατηρούμε την πρωτεΐνη στους  $4^\circ C$  ή σε aliquots των 500λ στους  $-20^\circ C$ .
  15. Ξεπλένουμε 2x με 2ml washing buffer τα σφαιρίδια και 2x με PBS.
  16. Διατηρούμε τα σφαιρίδια στους  $4^\circ C$  σε PBS 1ml.

## 2.4. Dialysis

---

Με αυτή την μέθοδο μας δίνεται η δυνατότητα να αλλάξουμε ένα διάλυμα στο οποίο έχουμε διαλυτοποιήσει μία πρωτεΐνη ή/και να συμπυκνώσουμε μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών.

1. Φορτώνουμε το δείγμα σε ημιπερατή μεμβράνη (molecularporous membrane tubing, diameter 25,5mm, Spectra/Por) και επωάζουμε σε διάλυμα PBS, pH 7,4 για 24h στους 4° C χρησιμοποιώντας για ανάδευση μαγνήτη.
2. Συμπυκνώνουμε το κλάσμα χρησιμοποιώντας φίλτρα Amicon Ultra-15 (10.000 Nominal Molecular Weight Limit). Φυγοκεντρούμε στους 4° C, στις 3000rpm έως ότου να φτάσει στον επιθυμητό όγκο.

## 2.5. Επεξεργασία πρωτεϊνών με PNGaseF protease

---

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

1. Σε 1-20 μg πρωτεΐνης προσθέτουμε 1μl 10x Denaturation buffer (New England Biolabs, Ipswich, MA) και dH<sub>2</sub>O ως τα 10μl.
2. Επωάζουμε για 10' στους 100° C.
3. Προσθέτουμε 2μl 10X G7 Reaction Buffer, 1-2μl PNGaseF, 2μl NP40 1-% (New England Biolabs, Ipswich, MA) και dH<sub>2</sub>O ως τα 20μl.
4. Επωάζουμε για 1h στους 37° C.

## 2.6. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

---

Η διαδικασία αυτή μας βοηθά στο διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος τους. Οι πρωτεΐνες του δείγματος που υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση, κινούνται ανάμεσα στους πόρους του πηκτώματος ανάλογα με το μέγεθος τους. Η ταυτοποίηση του μοριακού βάρους γίνεται με οδηγό (marker) πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους μετά την εμφάνιση τους χρησιμοποιώντας μία μέθοδο χρώσης. Όλες οι ηλεκτροφορήσεις έγιναν σε αποδιατακτικές συνθήκες, για να μην διατηρούνται τυχών σύμπλοκα και σε μη συνεχή πηκτή πολυακρυλαμίδης που αποτελείται από ένα στρώμα πυκνότητας 4% σε ακρυλαμίδη και pH 6,8 (Stacking gel), το οποίο βοηθά στο πακετάρισμα των δειγμάτων, πάνω από ένα μεγαλύτερο στρώμα πυκνότητας 12% σε ακρυλαμίδη και pH 6,8 (Running gel) μέσα στο οποίο διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες.



### 2.6.1. Ηλεκτροφόρηση

Για τα δείγματα:

5X loading buffer: 0,0625M Tris, 5% β-mercaptethanol, 2% SDS, 20% Glycerol, 0,1% Bromophenol blue

Για την ηλεκτροφόρηση:

1X Running buffer: 0,025M Tris, 0,192M Glycine, 0,1%w/v SDS

Για τα πηκτώματα:

Αντιδραστήριο	Running gel 12% (10 ml)	Staking gel 4% (5ml)
dH <sub>2</sub> O	3,35ml	3ml
Acrylamide (30% Acrylamide/ 0,8 Bisacrylamide)	4ml	650μl
SDS (10% SDS σε dH <sub>2</sub> O)	100μl	50μl
APS (10% APS σε dH <sub>2</sub> O)	50μl	67μl
Tris	2,5ml (1,5M Tris-HCl, pH 8,8)	1,25ml (0,5M Tris-HCl, pH 6)
TEMED	5μl	5μl

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 (stating gel) και βάζουμε το ειδικό χτενάκι για να δημιουργηθούν οι θέσεις 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. Τοποθετούμε τα δείγματα στις θέσεις μαζί με κατάλληλο οδηγό (marker) και πραγματοποιούμε την ηλεκτροφόρηση σε τάση 120-150 V.
4. Μετά το τέλος της διαδικασίας προχωρούμε σε χρώση του running gel.

### 2.6.2. Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver staining)

- Methanol 50%
- 5%, 1% CH<sub>3</sub>COOH
- Sodium Triosulfate (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>•5H<sub>2</sub>O) 0,02%
- AgNO<sub>3</sub> 0,1%
- Διάλυμα εμφάνισης (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, 0,04% φορμαλδεΰδη)

(όλα τα διαλύματα γίνονται σε V=50ml για gel δέκα θέσεων)

1. Μονιμοποιούμε τις πρωτεΐνες στο 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, ανακινώντας και σταματάμε την διαδικασία με 5% CH<sub>3</sub>COOH.
9. Διατηρούμε σε 1% CH<sub>3</sub>COOH.

## 2.7. Western Blot

---

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

### 2.7.1. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Transfer)

---

- Whatman χαρτιά (3mm, Chr)
  - Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Gelman Science)
  - *Transfer buffer*: 25mM Tris, 98mM Glycine, 20% Methanol, pH 8,3
1. Τοποθετούμε το gel στην δεξαμενή μεταφοράς πάνω σε 1 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 1 ακόμα Whatman.
  3. Γεμίζουμε την δεξαμενή με transfer buffer μέχρι να καλυφθεί το gel. Συνδέουμε με πηγή ενέργειας και ρυθμίζουμε τα A στα m<sup>2</sup> του gel. Αφήνουμε σε rt για 1h.

### 2.7.2. Western

---

- *TBS solution*: 20mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,2-7,4
  - *Wash solution*: TBS/Tween 20 0,05%
  - *Blocking solution*: 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, Thermo Scientific, Waltham, MA)
  - φίλμ αυτοραδιογραφίας
1. Πλύσιμο της μεμβράνης 3X για 10' με Wash solution και ήπια ανάδευση.
  2. Επώαση με το Blocking solution για 1h με ήπια ανακίνηση. Τελικός όγκος 20ml.
  3. Πλύσιμο της μεμβράνης 3X για 10' με Wash solution και ήπια ανάδευση.
  4. Επώαση με 1<sup>ο</sup> αντίσωμα (ειδικό για την πρωτεΐνη μας) σε Ab solution για 90min σε rt σε κατάλληλη C (π.χ 1/1000) και ήπια ανακίνηση. Τελικός όγκος 10ml.
  5. Πλύσιμο της μεμβράνης 3X για 10' με Wash solution και ήπια ανάδευση.
  6. Επώαση με 2<sup>ο</sup> αντίσωμα HRP σε Ab solution για 1h σε κατάλληλη C π.χ 1/5000 και ήπια ανακίνηση. Τελικός όγκος 10ml.
  7. Πλύσιμο της μεμβράνης 3X για 10' με Wash solution και ήπια ανάδευση.
  8. Προσθήκη σε διάλυμα χημειοανταύγειας 1ml 1:1 για 3' στον σκοτεινό θάλαμο.
  9. Έκθεση σε φίλμ αυτοραδιογραφίας χρησιμοποιώντας το Kodak digital Science 1D<sup>TM</sup> software.

### 2.8. Μέθοδος Lowry

---

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

- 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 reagent A, 0,2ml reagent B
  - *D reagent*: 1,5ml Follin-Ciocalteau 2N + 1,5ml H<sub>2</sub>O
1. Σε 10μl δείγματος προσθέτουμε 10μl TCA 20%. (2 επαναλήψεις/δείγμα)
  2. Επώαζουμε 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. Επώαζουμε για 10' στον πάγο

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. Φασματομετρία Μάζας (nLC-MS/MS analysis)

Για την ανάλυση με φασματομετρία μάζας, οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί με SDS-PAGE, εμφανίστηκαν χρησιμοποιώντας συμβατό για την φασματομετρία μάζας πρωτόκολλο χρώσης **Coomassie blue silver**. (πρωτόκολλο για πέψη πρωτεϊνών σε SDS-PAGE)

1. Οι επιλεγμένες μπάντες αφαιρούνται από το gel και επεξεργάζονται περαιτέρω σε κομμάτια περίπου 1mm.
2. Μεταφορά σε 1,5ml tube και κάλυψη με 100 μl 50% Acetonitril/dH<sub>2</sub>O με ανακίνηση για 15' σε rt.
3. Αφαίρεση και κάλυψη με 100 μl 50 mM Ammonium bicarbonate solution (ABS), με ανακίνηση για 15' σε rt.
4. Αφαίρεση του ABS και επανάληψη του 2-3 2x (αποχρωματισμός).
5. Αφαίρεση του ABS και κάλυψη με 100 μl 10 mM Dithiothreitol (DTT σε 50 mM ABS), με ανακίνηση για 45' σε 56°C (αναγωγή).
6. Αφαίρεση του DTT, και κάλυψη με 100 μl 55 mM Iodacetamide (IAA σε 50 mM ABS) με ανακίνηση για 45' σε rt (αλκυλίωση).
7. Αφαίρεση του IAA, και κάλυψη με 100 μl dH<sub>2</sub>O με ανακίνηση για 15'.
8. Αφαίρεση του dH<sub>2</sub>O, και κάλυψη με 100 μl 50 mM ABS με ανακίνηση για 15'.
9. Αφαίρεση του ABS και επανάληψη του 7-8 2x.
10. Αφαίρεση του ABS και κάλυψη με 25-30 μl διαλύματος Trypsin και επώαση στους 37°C για 14h (πέψη).
11. Την επόμενη μέρα, μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο 1,5ml tube και κάλυψη των κομματιών με 50 μl Nanopure-H<sub>2</sub>O με ανακίνηση για 20'.
12. Μεταφορά των 50 μl στο υπερκείμενο και κάλυψη των κομματιών με 50 μl 50% acetonitril (ACN) με ανακίνηση για 20'.
13. Μεταφορά των 50 μl στα υπερκείμενα και κάλυψη των κομματιών με 50 μl of 0.1% TFA (σε 50% ACN/dH<sub>2</sub>O) με ανακίνηση για 20'.
14. Μεταφορά των 50 μl στα υπερκείμενα και ψύξη αυτών σε υγρό άζωτο. Αποξήρανση χρησιμοποιώντας Speed Vac Concentrator (Savant ISS110, Thermo Scientific) έως ότου μετατραπούν σε σκόνη.
15. Επαναδιαλυτοποίηση της σκόνης σε 100 μl H<sub>2</sub>O, ψύξη και επανάληψη του 15. (2x)
16. Επαναδιαλυτοποίηση σε διάλυμα 0.5% formic acid πριν την ανάλυση nLC-MS/MS.

Διάλυμα Trypsin : Αραίωση 20 μg Trypsin (Promega) σε 20 μl διαλύματος 50 mM acetic acid/dH<sub>2</sub>O. Αραίωση του επιθυμητού όγκου 260x με ABS.

## 2.10. Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσοφθητική Δοκιμή (ELISA)

Η ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφθητική δοκιμή (ELISA) είναι μία πολύ ευαίσθητη βιοχημική μέθοδος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών σε διαλύματα και κυτταρικές επιφάνειες μέσω αντισωμάτων. Η οπτικοποίηση της αντίδρασης γίνεται με την χρήση ενζύμου-υποστρώματος και μπορεί να μετρηθεί με φωτόμετρο. Υπάρχουν 3 είδη ELISA. Εδώ αναφέρεται η *indirect ELISA*.

- Coating buffer: 0.05M NaHCO<sub>3</sub>, 0.05 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9.6
  - Washing buffer: PBS -tween 20%, 0.05%
  - Blocking buffer: PBS-BSA (Bovine Serum Albumin) 2%
  - Ab buffer: PBS-BSA 0.1%
  - Tetramethylbenzidine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TMB Substrate Kit, Thermo Scientific, Waltham, MA)
  - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1M
  - 96-flat bottom plate
1. Τοποθετούμε τα δείγματα στην plate σε αντίστοιχη αραιώση (π.χ ορός σε 1/1000) σε coating buffer και όσες επαναλήψεις επιθυμούμε (τουλάχιστον 2). Τελικός όγκος 100μl/well. Επωάζουμε στους 4° C για 14-18h.
  2. Πλένουμε 3x με το washing buffer. 200μl/well.
  3. Προσθέτουμε το blocking buffer, 200μl/well για να παρεμποδίσουμε την μη-ειδική σύνδεση των πρωτεϊνών στα αντισώματα. Επωάζουμε σε rt για 2h.
  4. Αφαιρούμε και πλένουμε 3x με το washing buffer. 200μl/well.
  5. Προσθέτουμε το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα (το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει) σε κατάλληλη C (συνήθως 1/1000) σε Ab buffer. Τελικός όγκος 100μl/well. Επωάζουμε σε rt για 2h.
  6. Αφαιρούμε και πλένουμε 3x με το washing buffer. 200μl/well.
  7. Προσθέτουμε το 2<sup>ο</sup> αντίσωμα (α-IgG peroxidase) σε κατάλληλη C (συνήθως 1/5000) σε Ab buffer. Τελικός όγκος 100μl/well. Επωάζουμε σε rt για 1h στο σκοτάδι.
  8. Αφαιρούμε και πλένουμε 3x με το washing buffer. 200μl/well.
  9. Προσθέτουμε το διάλυμα TMB σε αραιώση 1:1. Τελικός όγκος 100μl/well. Περιμένουμε μέχρις ότου εμφανιστεί το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα της αντίδρασης.
  10. Ολοκληρώνουμε την αντίδραση με H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Τελικός όγκος 50μl/well.
  11. Μετράμε σε ELISA reader στα 450nm.

## 2.11. Η 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 μέρος. Όταν ο αναλύτης για τον οποίο ο υποδοχέας είναι ειδικός βρίσκεται στο διάλυμα, υπάρχει 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. Σημαντικό πλεονέκτημα στη χρήση των βιοαισθητήρων αποτελεί το γεγονός ότι προσφέρουν γρήγορη ειδική ανίχνευση χωρίς σήμανση (label-free technique). 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.

### 2.11.1. Ακουστικοί βιοαισθητήρες

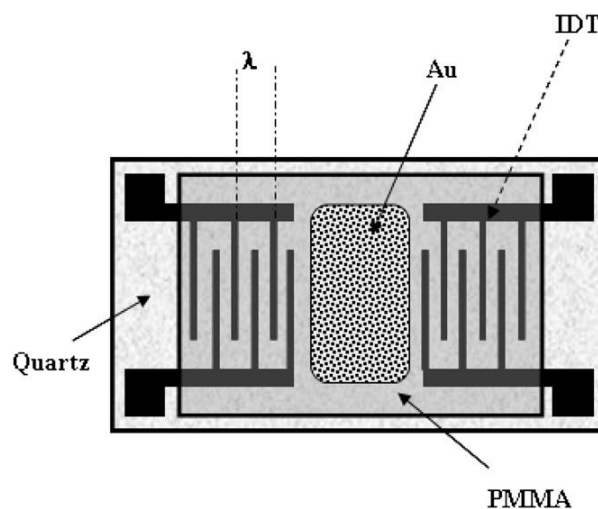
---

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.

### 2.11.2. Ακουστικός βιοαισθητήρας Love

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) π.χ στρώμα χρυσού. *Εικ. 2.11.1.* Το πάχος του στρώματος του κυματοδηγού είναι σημαντικό καθώς καθορίζει την ευαισθησία του βιοαισθητήρα που συμβάλλει στη μετάδοση του κύματος στην επιφάνεια.



**Εικ. 2.11.1:** Σχηματική απεικόνιση ενός ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love. Πιεζοηλεκτρικό υλικό (Quartz) με τα IDTs (όπου το  $\lambda$  είναι το μήκος κύματος του ακουστικού κύματος). Υπάρχει κυματοδηγός PMMA και στρώμα χρυσού (Au).

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:  $\delta = \nu(2\eta/2\pi\rho f)$  όπου  $\eta$  και  $\rho$  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  $\delta$  για το καθαρό νερό υπολογίζεται στα 45nm.<sup>229</sup> Αντίστοιχα, για συχνότητα λειτουργίας 110MHz, το  $\delta$  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.<sup>230</sup> Ακόμη, είναι ευαίσθητοι σε ιξωδοελαστικές και μηχανικές αλλαγές, οι οποίες ανιχνεύονται ως απώλεια ενέργειας του κύματος και καταγράφονται ως μεταβολή του πλάτους (amplitude).

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 προηγούμενα, 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 προσδεμένα πάνω στην επιφάνεια.<sup>229,231</sup> Για παράδειγμα, στην περίπτωση του DNA, το « $\eta$ » αντικατοπτρίζει το μέγεθός του και τη διαμόρφωση που αποκτά αυτό στο χώρο.

### 2.11.3. Μέθοδοι και υλικά για την προετοιμασία του βιοαισθητήρα και των δειγμάτων

1. 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 φυγοκέντρηση στη συσκευή Spincoater Model P6700 Series (Specialty Coating Systems Inc) στις 4000rpm για 40'.
2. Επώαση της συσκευής στους 195°C για 2h ώστε ο διαλύτης (2--αιθοξυαιθυλαιθέρας) να εξατμιστεί.
3. Πάνω στο στρώμα του κυματοδηγού της συσκευής γίνεται εναπόθεση (sputtering) 20nm χρυσού (Au) στην περιοχή ανάμεσα στα IDTs σε πίεση  $4 \times 10^{-2}$  mbar με τη χρήση του συστήματος BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater.
4. Επώαστηκε στους 150 °C για 30'.
5. Πριν από κάθε χρήση, η επιφάνεια χρυσού υφίσταται χάραξη με χημεία πλάσματος οξυγόνου για 3' (Plasma Cleaner/Sterilizer PDC-002, Harrick) ώστε να καθαριστεί πλήρως η επιφάνεια. Αν δεν υπάρχει στρώμα χρυσού το PMMA καθαρίζεται προσεκτικά με αιθανόλη.
6. Η συσκευή του βιοαισθητήρα τοποθετείται σε ειδική θήκη (holder) που φέρει ηλεκτρόδια (τα οποία καταλήγουν στον αναλυτή δικτύου).



7. Πάνω από τη θήκη 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 της συσκευής μέσω ενός λαστιχένιου gasket.
8. Για τη μεταφορά των υγρών διαλυμάτων χρησιμοποιούνται σωληνάκια διαμέτρου 0,25mm (Anachem). Η ροή που εφαρμόζεται στα πειράματα είναι 10μl/λεπτό.
9. 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.
10. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε PBS buffer (pH 7,4) 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.

## 2.12. Πρωτόκολλα ανοσοποίησης και ανοχοποίησης

---

Για την διαδικασία της ανοχοποίησης και ανοσοποίησης χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (HSA, Albumin from human serum, Sigma, Germany).

Για την *in vitro* ανοσοποίηση σε κυτταρικές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1μg/ml και για την *in vivo* σε 100μg/ποντίκι. Η πρωτεΐνη SecA (SecA, *Staphylococcus aureus*) χρησιμοποιήθηκε για *in vivo* ανοσοποίηση σε συγκέντρωση 26μg/ποντίκι και η πρωτεΐνη MBP (Myelin Basic Protein bovine, Sigma, Germany) που χρησιμοποιήθηκε για *in vitro* ανοσοποίηση σε συγκέντρωση 1μg/ml. Για τα *in vivo* πρωτόκολλα ανοσοποίησης, οι ενέσεις στα ποντίκια πραγματοποιήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά (ip) με HSA ή SecA σε μίξη με ίσο όγκο πλήρους συμπληρώματος Freund (1.0mg *Mycobacterium tuberculosis*, Sigma, Germany) και 7 μέρες αργότερα με HSA ή SecA σε μίξη με ίσο όγκο μη πλήρους συμπληρώματος Freund (Sigma, Germany). Την 15<sup>η</sup> ημέρα, ο σπλήνας αφαιρέθηκε και τα κύτταρα απομονώθηκαν.

Η ανοχοποίηση πραγματοποιούνταν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 100μg/ποντίκι HSA απουσία συμπληρώματος. Το αίμα συλλεγόταν 6 ημέρες αργότερα ο ορός και σπληνοκύτταρα απομονωνόταν (short-term ανοχοποίηση). Τα πρωτόκολλα για την ανοχοποίηση των 15 και 30 ημερών (long-term ανοχοποιήσεις) πραγματοποιούνταν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 100μg/ποντίκι HSA απουσία συμπληρώματος και επανάληψη της δόσης στις 8 και 15 ημέρες αντίστοιχα. Με το πέρας των 15 και 30 ημερών συλλεγόταν τα σπληνοκύτταρα.

### 2.13. Έλεγχος πολλαπλασιασμού κυττάρων με ραδιενεργή θυμιδίνη ( $^3\text{HTdR}$ )

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.

- Θρεπτικό μέσο RPMI (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA), με προσθήκη 10% πρωτεϊνικό ορό (FBS, Gibco)
  - 96-V bottom plate sterile (Sarstedt, Numbrecht, Germany)
  - Ραδιενεργή θυμιδίνη ( $^3\text{H}$ ) TdR (INC, 35Ci/mmol, 1mCi/ml, Costa Mesa, CA)
  - Φίλτρα κυτταρίνης (Scatron filter MAT)
  - Σπινθηριστικό υγρό (toluene-omnifluor; 1.38 g/l, NEN, Chromasol Sigma-Aldrich, Germany)
  - Συλλέκτη κυττάρων Tirectek Cell Harvester, Flow Laboratories
  - Μετρητής β-ακτινοβολίας LKB (Finland).
1. Ετοιμάζουμε και τοποθετούμε στην plate σε τριπλέτες τα δείγματα. Τελικός όγκος 200μl/well και  $1 \times 10^6$  κύτταρα/well σε θρεπτικό μέσο. Επωάζουμε σε επωαστήρα για 72h στους  $37^\circ\text{C}$ .
  2. Με το πέρας των 72h προσθέτουμε 1μCi ραδιενεργής θυμιδίνης σε κάθε δείγμα και τοποθετούμε στον επωαστήρα για άλλες 18 ώρες.
  3. Μεταφέρουμε τα κύτταρα στα φίλτρα με την χρήση του συλλέκτη κυττάρων και τα τοποθετούμε σε δοχεία που περιέχουν 2ml σπινθηριστικό υγρό και μετράμε σε μετρητή β-ακτινοβολίας.

### 2.14. Απομόνωση λεμφοκυττάρων από κύτταρα σπλήνα

- Θρεπτικά μέσα RPMI (10% FBS) και HBSS
  - *Ab solution*: PBS-BSA 0,1%
  - Lysing RC: Ammonium chloride 0,83g, Sodium hydrogen Carbonate 0,1g  
EDTA 0,032g, dH<sub>2</sub>O 100ml, pH 7,4 ( $4^\circ\text{C}$ )
  - PBS, pH 7,4
1. Απομακρύνουμε όλο τον ερυθρό πολφό από τον σπλήνα (είχε τοποθετηθεί σε 1ml HBSS) με την βοήθεια μίας βελόνας ινσουλίνης. Μαζεύουμε σε θρεπτικό μέσο RPMI.
  2. Στρώνουμε σε τρυβλίο petri και επωάζουμε στους  $37^\circ\text{C}$  για 18h. **Απομάκρυνση μακροφάγων.**

3. Μάζεμα του υπερκειμένου και πλύσιμο 2x με RPMI του τρυβλίου. Η φυγοκέντρηση γίνεται στις 1200rpm, στους 4°C για 6'.
4. Επαναδιαλυτοποιούμε σε 1ml (ανάλογα και τον αριθμό των κυττάρων) Lysing RC και ήπια ανακίνηση.
5. Πλύσιμο 2x με PBS. **Απομάκρυνση ερυθροκυττάρων.**
6. Επώαση σε RPMI στους 37°C.

### 2.15. Εξωτερικός ανοσοφθορισμός

---

Ο ανοσοφθορισμός πραγματοποιείται για την ανίχνευση και τον κυτταρικό εντοπισμό αντιγόνων που μας ενδιαφέρουν με την βοήθεια φθορίζοντων αντισωμάτων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό των επιφανειακών (εξωτερικός) ή ενδοκυτταρικών αντιγόνων (εσωτερικός).

- PBS, pH 7,4
- *Blocking buffer*: PBS-BSA 2%
- *Ab solution*: PBS-BSA 0,1%

1. Χωρίζουμε τον κυτταρικό πληθυσμό (συνήθως σε Vee-bottom plate) και πλένουμε 2x με PBS 200μl. Σε κάθε πλύσιμο μεσολαβεί φυγοκέντρηση στις 800rpm, στους 4°C για 3'.
2. Επώαση με το blocking 3% για 30' σε rt. Τελικός όγκος 200μl/well.
3. Πλύσιμο 2x με PBS 200μl.
4. Επώαση με το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα-ειδικό για την πρωτεΐνη (συνήθως 1/100) σε PBS-BSA 1% σε για 45'. Τελικός όγκος 100μl/well.
5. Πλύσιμο 2x με PBS 200μl.
6. Επώαση με το 2<sup>ο</sup> αντίσωμα-ειδικό για το 1<sup>ο</sup> και φθορίζον (συνήθως 1/500) σε PBS-BSA 1% για 30'. Τελικός όγκος 100μl. Αυτό το βήμα δεν είναι απαραίτητο αν τα αντισώματα είναι conjugated με την φθορίζουσα ουσία.
7. Πλύσιμο 2x με PBS 200μl.

### 2.16. Κυτταρομετρία Ροής (FACS)

---

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.τ.λ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μια ακτίνα laser. Στα πειράματα που αφορούν την συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήσαμε την κυτταρομετρία ροής για τη μελέτη κυτταρικών πληθυσμών.

Για κάθε ένα κύτταρο καθώς αυτό διέρχεται από την ακτίνα laser καταγράφονται στοιχεία που σχετίζονται με το μέγεθός του (Forward Scatter Channel, FSC), την κοκκιότητα του (Side Scatter Channel, SSC) και την ένταση του φθορισμού (FL1 για Green Channel και FL2 για Red Channel) εφόσον έχει σημειωθεί με χρωστικές ή φθορίζοντα αντισώματα.

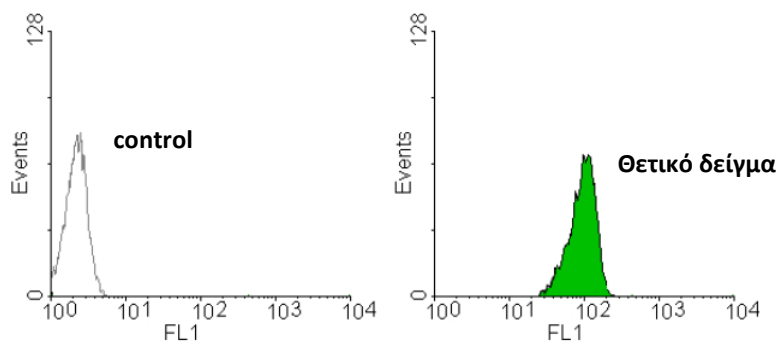
Πιο συγκεκριμένα στον άξονα FSC καταγράφεται η ένταση του φωτός που σκεδάζεται υπό γωνία περίπου  $20^\circ$  σε σχέση με τον άξονα της ακτίνας laser. Η ένταση στον άξονα FSC ισοδυναμεί με το μέγεθος του σωματιδίου που διέρχεται εκείνη τη στιγμή από την ακτίνα laser και μας βοηθά να διαχωρίσουμε τα ζωντανά από τα νεκρά κύτταρα και τα κυτταρικά υπολείμματα ή τους διαφορετικούς υποπληθυσμούς μέσα σε ένα σύνθετο μείγμα κυττάρων. Στον άξονα SSC καταγράφεται η ένταση του φωτός που σκεδάζεται υπό γωνία  $90^\circ$  σε σχέση με τον άξονα της ακτίνας laser και έτσι μας δίνει πληροφορίες για την κοκκιότητα του σωματιδίου. Ο συνδυασμός της πληροφορίας από αυτούς τους δύο ξεχωριστούς άξονες είναι μοναδικός για κάθε κύτταρο και έτσι συμβάλλει ουσιαστικά στη μελέτη ετερογενών κυτταρικών πληθυσμών.

Από την άλλη οι μετρήσεις της έντασης του φθορισμού σε διαφορετικά μήκη κύματος στα αντίστοιχα κανάλια (FL-channels) μπορούν να αποδώσουν ποιοτικά και ποσοτικά δεδομένα, που αφορούν τη σήμανση επιφανειακών αντιγόνων ή ενδοκυτταρικών παραγόντων με φθορίζοντα αντισώματα και χρωστικές. Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά φθορίζοντα αντισώματα συνδεδεμένα είτε με FITC είτε με PE. Τα συνδεδεμένα με FITC αντισώματα απορροφούν στα 490nm και εκπέμπουν στα 525nm και συνεπώς η ένταση τους καταγράφεται στο κανάλι FL1. Τα συνδεδεμένα με PE αντισώματα απορροφούν στα 490 και 565nm και εκπέμπουν στα 578nm και συνεπώς η ένταση τους καταγράφεται στο κανάλι FL2.

Στα πειράματά μας οι μετρήσεις έγιναν με το FACScan της εταιρίας Becton Dickinson και η στατιστική ανάλυση με το Cell Quest software και τα software WinMDI 2.9 και FCS express 3.0.

### 2.16.1. Διαγράμματα απεικόνισης αποτελεσμάτων της Κυτταρομετρίας Ροής

Ένας τρόπος απεικόνισης των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής είναι η χρήση μονοπαραγοντικών ιστογραμμάτων. Σε αυτή την περίπτωση απεικονίζεται στον άξονα των x ένα μόνο χαρακτηριστικό π.χ. η ένταση του φθορισμού στο πράσινο (FL1). Στην *Εικ. 2.16.1* που ακολουθεί, φαίνονται χωριστά τα ιστογράμματα για τον αρνητικό μάρτυρα και το δείγμα. Ο πληθυσμός του αρνητικού μάρτυρα τοποθετείται στην αρχή των αξόνων ενώ ο θετικός πληθυσμός μετατοπίζεται δεξιά στον άξονα των x. Παρατηρούμε ότι το θετικό δείγμα είναι αρκετά απομακρυσμένο από την αρχή των αξόνων αλλά και σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα και συνεπώς μπορούμε να συμπεράνουμε ότι όλος ο πληθυσμός είναι θετικός και εκφράζει σε υψηλά επίπεδα (όσον πιο δεξιά στον άξονα x μετακινείται) το υπό διερεύνηση μόριο. Η μετατόπιση προς τα δεξιά στο άξονα FL1 μας δείχνει όχι μόνο το ποσοστό του πληθυσμού που εκφράζει το μόριο που ανιχνεύεται αλλά και μια εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης του μορίου κατά μέσο όρο στον θετικό πληθυσμό.

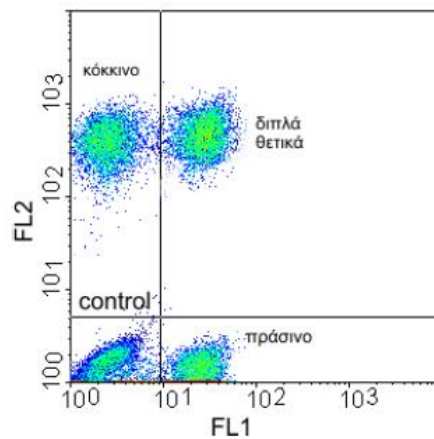


**Εικ.2.16.1:** Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής με τη μορφή μονοδιάστατων ιστογραμμάτων. Ο πληθυσμός του αρνητικού μάρτυρα (control) τοποθετείται στην αρχή των αξόνων ενώ ο θετικός πληθυσμός μετατοπίζεται δεξιά στον άξονα των  $x$ . Η μετατόπιση αυτή μας δείχνει το ποσοστό των θετικών κυττάρων μέσα στον πληθυσμό και αποτελεί ένδειξη της έντασης του φθορισμού.

Η χρήση ιστογραμμάτων είναι απλή και δίνει σαφή αποτελέσματα αλλά στερεί τη δυνατότητα παρακολούθησης των διπλά θετικών δειγμάτων. Όταν κανείς θέλει να παρακολουθήσει την ταυτόχρονη έκφραση δύο διαφορετικών μορίων στον πληθυσμό η δημιουργία κοκκιογραμμάτων (dot plots) αποτελεί πιο κατάλληλο τρόπο απεικόνισης των αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής.

Το κοκκιογράμμα που ακολουθεί, *Εικ. 1.16.2*, προέκυψε από την υπέρθεση (overlay) τεσσάρων ξεχωριστών κοκκιογραμμάτων, ένα για τον αρνητικό μάρτυρα (κάτω αριστερό τεταρτημόριο), ένα για το θετικό δείγμα στο κανάλι FL2 (πάνω αριστερό τεταρτημόριο), ένα για το θετικό δείγμα στο κανάλι FL1 (κάτω δεξιό τεταρτημόριο) και ένα για το διπλά θετικό δείγμα (πάνω δεξιό τεταρτημόριο). Στο κοκκιογράμμα κάθε κουκίδα αντιστοιχεί σε ένα κύτταρο και παρατηρούμε την έκφραση δυο διαφορετικών μορίων κατόπιν χρώσης με φθορίζοντα αντισώματα στο πράσινο (FL1) και το κόκκινο (FL2). Οι ρυθμίσεις γίνονται ώστε ο αρνητικός μάρτυρας να τοποθετείται εξ' ολοκλήρου στο κάτω αριστερό τεταρτημόριο του διαγράμματος. Έτσι τα θετικά δείγματα μετατοπίζονται προς τα δεξιά στον άξονα των  $x$  όπου απεικονίζεται η ένταση του φθορισμού στο πράσινο, προς τα πάνω στον άξονα των  $y$  όπου απεικονίζεται η ένταση του φθορισμού στο κόκκινο και στο πάνω δεξιό τεταρτημόριο τα διπλά θετικά κύτταρα. Η μετατόπιση του δείγματος σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα μας δείχνει τόσο το ποσοστό των θετικών κυττάρων μέσα στον πληθυσμό αλλά και την ένταση του φθορισμού.

Για κάθε δείγμα υπολογίζουμε το ποσοστό των θετικών κυττάρων για ένα συγκεκριμένο μάρτυρα μέσα στον πληθυσμό βάση της μετατόπισης του ιστογράμματος στον άξονα που αντιστοιχεί στην ένταση του φθορισμού. Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον πέντε φορές και παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα αλλά και ο μέσος όρος των μετρήσεων όλων των ξεχωριστών πειραμάτων. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν μη σημασμένα κύτταρα (unstained).



**Εικ.2.16.2:** Απεικόνιση αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής με τη χρήση κοκκιογραμμάτων. Το κοκκιογράμμα προκύπτει από την υπέρθεση (overlay) τεσσάρων ξεχωριστών κοκκιογραμμάτων. Ο αρνητικός μάρτυρας τοποθετείται εξ' ολοκλήρου στο κάτω αριστερό τεταρτημόριο του διαγράμματος ενώ τα μονά θετικά δείγματα μετατοπίζονται προς τα δεξιά στον άξονα των χ, προς τα πάνω στον άξονα των ψ και στο πάνω δεξιό τεταρτημόριο τοποθετούνται τα διπλά θετικά κύτταρα.

## 2.17. Whole cell extracts

---

1. Τα κύτταρα συλλέγονται και πλένονται 2x με 1ml PBS
2. Η λύση πραγματοποιείται με 1x SDS διάλυμα (62,5 mM Tris-HCl, 2%w/v SDS, 50mM DTT), 25μl/10<sup>6</sup> κυττάρων.
3. Sonication για 10-15'' για πέψη του DNA και για να μειωθεί το ιξώδες του δείγματος
4. Άμεση αποθήκευση στους -20°C.

## 2.18 Στατιστική ανάλυση

---

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ανάλυσης δεδομένων Origin Pro 8. Το t-test χρησιμοποιήθηκε ώστε να συγκριθούν τα στατιστικά σημαντικά επίπεδα (p) μεταξύ των τιμών ελέγχου και των τιμών των αποτελεσμάτων.

## Κεφάλαιο 3-Αποτελέσματα

---

## Κεφάλαιο 3-Αποτελέσματα

### 3.1. Απομόνωση και ταυτοποίηση των διαλυτών τάξης II μορίων

Τα διαλυτά τάξης II μόρια του MHC απομονώθηκαν από τον ορό αρσενικών Balb/c ποντικών τα οποία είχαν ανοχοποιηθεί για την πρωτεΐνη HSA (Human Serum Albumin) χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο των 6 ημερών (short-term ανοχοποίηση). Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με anti-IgG παραμαγνητικά σφαιρίδια στα οποία είχε προσδεθεί ομοιοπολικά το μονοκλωνικό mouse anti-IA/IE (HB-225™) αντίσωμα. Μετά την απομόνωση, οι πρωτεΐνες υποβάλλονταν σε Dialysis με PBS pH 7,4, ώστε να μην παραμείνουν στο όξινο περιβάλλον του CH<sub>3</sub>COOH με το οποίο έγινε η έκλυση των μορίων. Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε αφενός λόγω του υψηλού βαθμού καθαρότητας του τελικού προϊόντος και αφετέρου διότι επιτρέπει το χειρισμό μικρών ποσοτήτων πρωτεΐνης.

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των απομονωμένων μορίων, επιλέχθηκε η μέθοδος Lowry λόγω της υψηλής της ευαισθησίας καθώς η ποσότητα του υλικού ενδιαφέροντος είναι σχετικά μικρή. Ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία απομόνωσης ήταν δυνατό να απομονωθούν 400 με 500 µg/ml διαλυτών τάξης II μορίων από 1 ml ορού αίματος ποντικού, ανοχοποιημένου με HSA.

Η ταυτοποίηση και καθαρότητα των διαλυτών τάξης II πραγματοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης (12%) και ανάλυση κατά Western καθώς και με τη μέθοδο ELISA. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβανόταν σε κάθε απομόνωση. Το gel πολυακρυλαμίδης αποκάλυψε μία μοναδική ζώνη στα ~60kDa, κάτι που συνάδει και με την παλαιότερη βιβλιογραφία.<sup>147</sup> Λόγω της μικρής συγκέντρωσης των απομονωμένων πρωτεϊνών καθώς και της πιθανότητας πρόσμιξης με άλλες πρωτεΐνες, για την χρώση της πηκτής χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εμφάνισης με νιτρικό άργυρο (silver staining). Κατά την διάρκεια της ανάλυσης κατά Western, οι διαλυτές πρωτεΐνες αλληλεπίδρασαν με το ειδικό anti-IA/IE μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb HB-225™) με το οποίο πραγματοποιήθηκε και η απομόνωσή τους (Εικ. 3.1.1<sup>A</sup>). Σε παλαιότερες μελέτες στον άνθρωπο (1991), ο Jendro και οι συνεργάτες του αποκάλυψαν 2 αλυσίδες κατά την ηλεκτροφόρηση των HLA-DR μορίων που απομόνωσαν από ορό, όπως και στα αντίστοιχα μεμβρανικά MHC μόρια και έτσι τα διαλυτά HLA-DR χαρακτηρίστηκαν ως ετεροδιμερή<sup>147</sup>, κάτι που επιβεβαιώθηκε και από τον Aultman και τους συνεργάτες του (1999).<sup>148</sup>

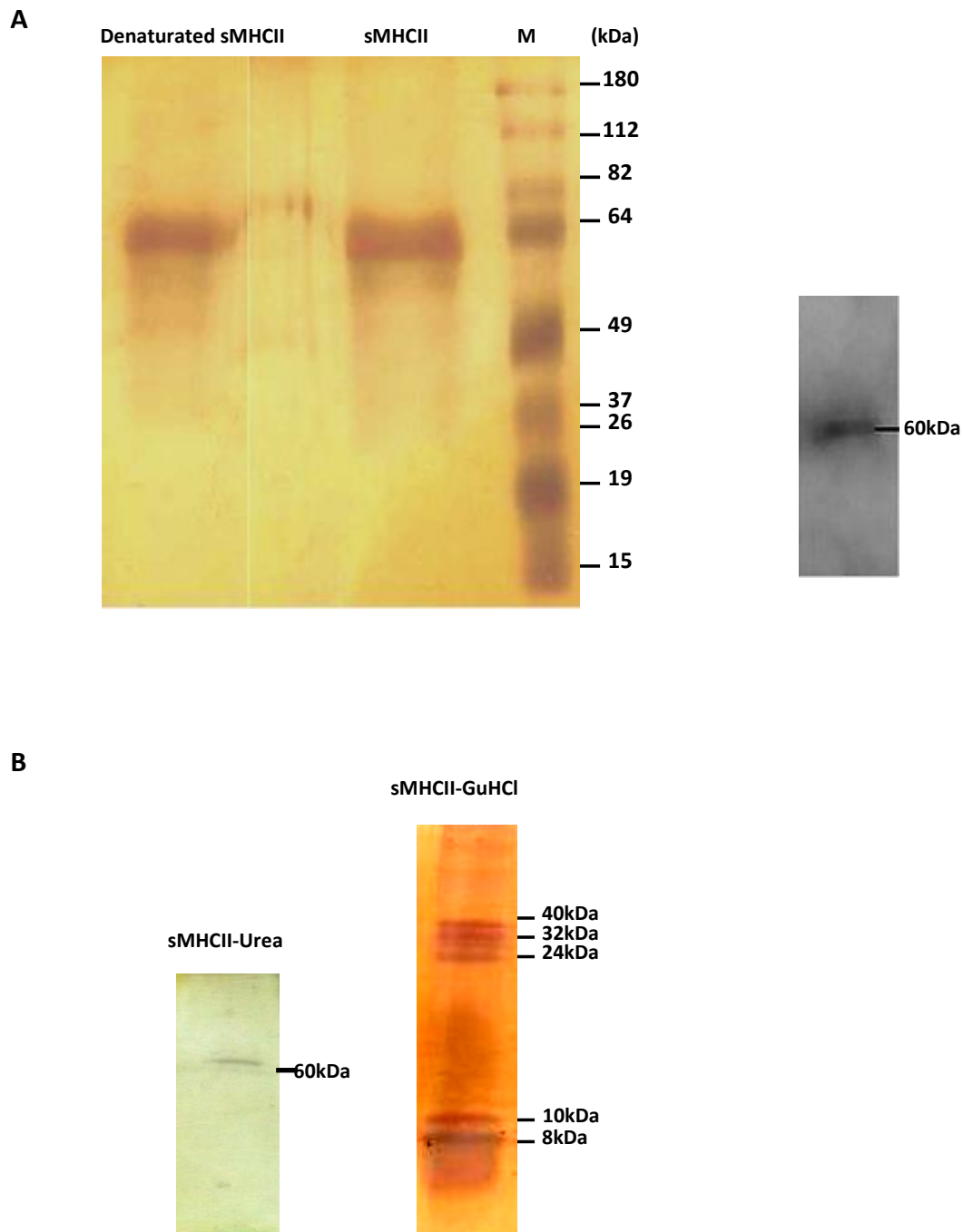


Στην περίπτωση των απομονωμένων MHC διαλυτών μορίων από τον ορό του ανοχοποιημένου ποντικού αυτό δεν παρατηρήθηκε. Πραγματοποιήθηκαν εκτεταμένες προσπάθειες ώστε να ενισχυθεί, πέρα του SDS, η αποδιάταξη του μορίου. Αυτές περιελάμβαναν αύξηση του χρόνου παραμονής των πρωτεϊνών στους 95°C αλλά και επεξεργασία με υψηλής συγκέντρωσης σε άλατα διάλυμα. Αυτές οι επεξεργασίες όμως δεν κατάφεραν να αλλάξουν την εικόνα της ηλεκτροφόρησης. (Εικ. 3.1.1<sup>A</sup>). Επίσης, πραγματοποιήθηκε επώαση της πρωτεΐνης με ένα διάλυμα ουρίας 8M (Sigma-Aldrich, Germany), μετά την οποία ακολούθησε κατακρίμνηση με TCA ώστε το δείγμα να είναι συμβατό με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης. Και πάλι δεν ήταν δυνατό να αποκαλυφθούν α και β αλυσίδες στα διαλυτά τάξης II μόρια. (Εικ. 3.1.1<sup>B</sup>).

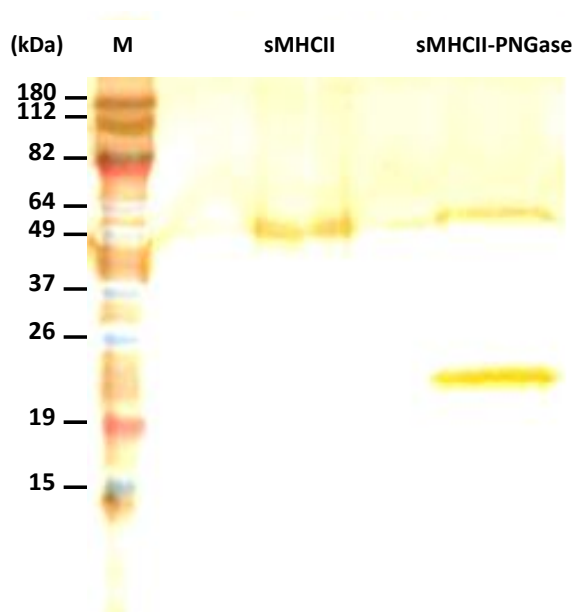
Επειδή, και η παραπάνω διαδικασία δεν έδωσε κάποιο στοιχείο για την ύπαρξη ετεροδιμερούς ή πολλαπλών αλυσίδων, προχωρήσαμε σε επεξεργασία των πρωτεϊνών με την χημική ένωση Guanidine hydrochloride (GuHCl, Sigma-Aldrich, Germany, υδροχλωρικό άλας της γουανιδίνης  $\text{HCN}(\text{NH}_2)_2$ ), η οποία αποτελεί μία ισχυρή χροτροπική ουσία και ένα από τα πιο ισχυρά αποδιατακτικά μόρια που χρησιμοποιείται στις φυσικοχημικές μελέτες της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Σε υψηλές συγκεντρώσεις π.χ 6M, οι πρωτεΐνες χάνουν την καθορισμένη δομή τους. Επιπλέον, το GuHCl είναι συμβατό με την ηλεκτροφόρηση ακρυλαμίδης και δεν χρειάζεται η απομακρυσή του όπως στην περίπτωση της ουρίας. 4,3μg διαλυτών τάξης II μορίων επώαστηκαν με διάλυμα GuHCl 6M για 2 ώρες και στην συνέχεια το αποτέλεσμα της αντίδρασης εξετάστηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Παρατηρήθηκαν αρκετές ζώνες οι οποίες δεν αντιστοιχούσαν στα μοριακά βάρη των α και β αλυσίδων των τάξης II μορίων ενώ η ζώνη των 60kDa απουσίαζε. Οι διαφορετικές ζώνες πιθανά αντιστοιχούν σε κατακερματισμένα μόρια αποτέλεσμα της ισχυρής αποδιατακτικής ικανότητας του GuHCl. (Εικ. 3.1.1<sup>B</sup>).

Στην συνέχεια, εξετάστηκε ο βαθμός γλυκοζυλίωσης των διαλυτών τάξης II μορίων ως παράγοντας που θα μπορούσε να αποτελεί τροχοπέδη στην αποδιάταξή τους. Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο PGAase N-γλυκοζυλάση, η οποία απομακρύνει τις N-γλυκοζυλιώσεις στα αμινοξικά κατάλοιπα. Η ηλεκτροφόρηση αποκάλυψε 2 ζώνες, μία στα ~40kDa και μία στα 60kDa εξαιτίας πιθανά της μη ολοκληρωμένης ενζυμικής αντίδρασης. Η ζώνη των 60kDa αντιστοιχεί στο αρχικό γλυκοζυλιωμένο μόριο ενώ η ζώνη των 40kDa αντιστοιχεί σε μη γλυκοζυλιωμένα μόρια αποδεικνύοντας πως οι πρωτεΐνες αυτές είναι υψηλά γλυκοζυλιωμένες αφού οι γλυκοζυλιώσεις αποτελούν το 1/3 του μοριακού τους βάρους. Ο υψηλός βαθμός γλυκοζυλίωσης είναι συνήθης σε πρωτεΐνες που κυκλοφορούν στον ορό. (Εικ. 3.1.2).

Επιπλέον, τα διαλυτά μόρια υποβλήθηκαν σε πειράματα ελέγχου ELISA, χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα με το οποίο απομονώθηκαν. Οι διαδοχικές αραιώσεις των διαλυτών πρωτεϊνών (4,3μg, 2,15μg και 1,075μg) οδήγησαν σε μία γραμμική γραφική απεικόνιση ( $\gamma=272,08x$ ,  $R^2=0.9773$ ), επιβεβαιώνοντας την ειδική αναγνώριση των διαλυτών τάξης II μορίων από το μονοκλωνικό mouse anti-IA/IE (HB-225<sup>TM</sup>) αντίσωμα. Εικ. 3.1.3<sup>A</sup>. Ο αντίστοιχος όγκος διαλυτών MHC τάξης II μορίων απομονωμένων από ορό αρσενικού Balb/c ποντικού ελέγχου (μη ανοχοποιημένου) παρουσίασε >4 φορές μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με τον ανοχοποιημένο ορό. Αυτό επιβεβαιώνει και προηγούμενες μελέτες που μιλούν για αύξηση των διαλυτών τάξης II μορίων του ορού κατά την ανοχοποίηση του οργανισμού.<sup>232</sup> (Εικ. 3.1.3<sup>B</sup>).

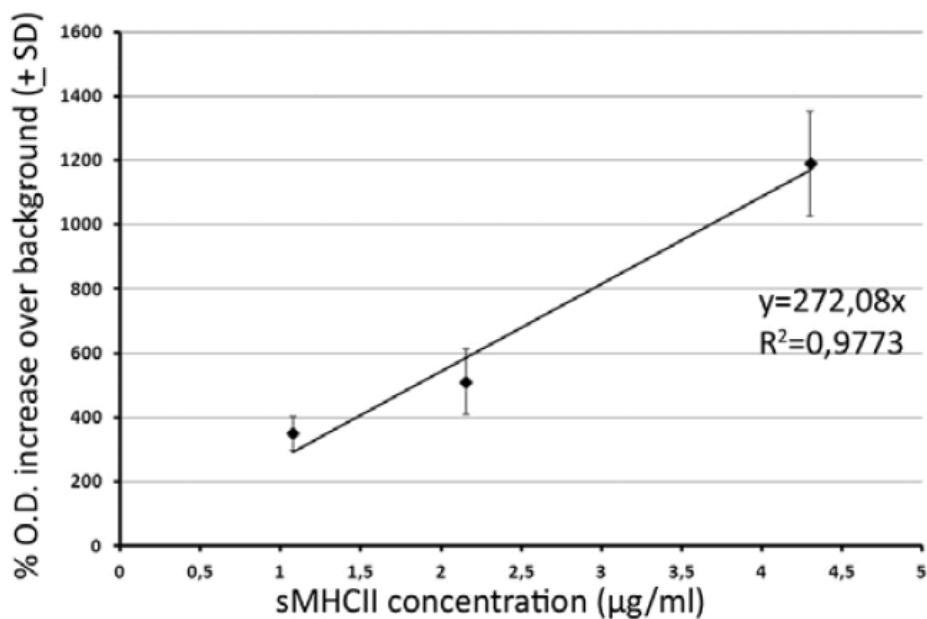


**Εικ. 3.1.1:** **A.** Πηκτή πολυακρυλαμίδης, μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο, των διαλυτών τάξης II MHC μορίων απομονωμένων από τον ορό ανοχοποιημένου ποντικού (sMHCII) και των επεξεργασμένων με υψηλής συγκέντρωσης σε άλατα διάλυμα (Denaturated sMHCII). Εμφανίζεται και στις 2 συνθήκες μία ζώνη, των 60kDa. Αντίστοιχα, οι πρωτεΐνες αντιδρούν με το μονοκλωνικό αντίσωμα  $\alpha$ -IA/IE (HB-225<sup>TM</sup>) στην ανάλυση κατά Western. **B.** Πηκτή πολυακρυλαμίδης, μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο, των διαλυτών τάξης II μορίων απομονωμένων από τον ορό ανοχοποιημένου ποντικού, επεξεργασμένων με ουρία 8M (sMHCII-Urea) και με υδροχλωρικό άλας της γουανιδίνης (sMHCII-GuHCl). Κατά την επεξεργασία με ουρία δεν παρατηρήθηκε άλλη ζώνη εκτός των 60kDa ενώ αντίθετα η επεξεργασία με γουανιδίνη αποκάλυψε μία σειρά ζωνών μικρότερων των 60kDa.

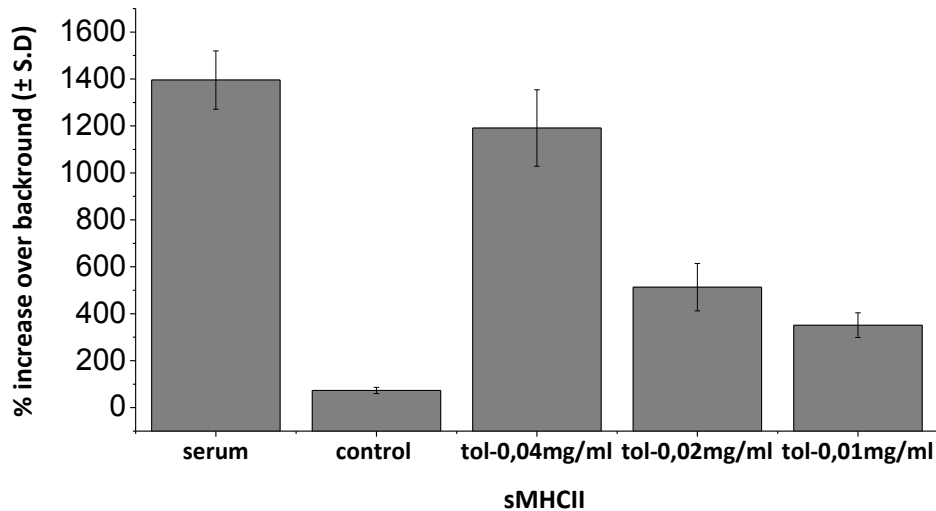


**Εικ. 3.1.2:** Πηκτή πολυακρυλαμίδης, μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο, των διαλυτών τάξης II MHC μορίων απομονωμένων από τον ορό ανοχοποιημένου ποντικού (sMHCII) και των επεξεργασμένων με το ένζυμο PNGase N-γλυκοζυλάση (sMHCII-PNGase). Εμφανίζονται 2 ζώνες, μία στα ~40kDa και μία στα 60kDa εξαιτίας πιθανά της μη ολοκληρωμένης ενζυμικής αντίδρασης. Η ζώνη των 60kDa αντιστοιχεί στο αρχικό γλυκοζυλιωμένο μόριο, η οποία ταυτίζεται με τα αντίστοιχα μη επεξεργασμένα μόρια (sMHCII) ενώ η ζώνη των 40kDa αντιστοιχεί σε μη γλυκοζυλιωμένα μόρια.

A



B



**Εικ. 3.1.3:** A. Πειράματα ελέγχου ELISA των διαλυτών τάξης II MHC μορίων απομονωμένων από ορό ανοχοποιημένου ποντικού. Χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα με το οποίο απομονώθηκαν. Οι διαδοχικές αραιώσεις των διαλυτών πρωτεϊνών (4,3μg, 2,15μg και 1,075μg) οδήγησαν σε μία γραμμική γραφική απεικόνιση ( $\gamma=272,08x$ ,  $R^2=0.9773$ ), επιβεβαιώνοντας την ειδική αναγνώριση των διαλυτών τάξης II MHC μορίων από το μονοκλωνικό mouse anti-IA/IE αντίσωμα. B. Πειράματα ελέγχου ELISA των απομονωμένων διαλυτών τάξης II MHC μορίων από ανοχοποιημένο ορό (tol) και ορό ελέγχου (control). Ο αντίστοιχος όγκος διαλυτών μορίων απομονωμένων από ορό ποντικού ελέγχου παρουσίασε >4 φορές μικρότερη συγκέντρωση μορίων σε σχέση με τον ανοχοποιημένο ορό. Η %OD εκφράζει την ποσοστιαία αύξηση της οπτικής πυκνότητας του δείγματος σε σχέση με την οπτική πυκνότητα του διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer). Η τυπική απόκλιση (±SD) προκύπτει από 6 επαναλήψεις του πειράματος.

### 3.2. Ταυτοποίηση των διαλυτών τάξης II μορίων με φασματομετρίας μάζας

Το γεγονός πως τα διαλυτά τάξης II αναγνωρίζονται και απομονώνονται με την χρήση ειδικών anti-class II μονοκλωνικών αντισωμάτων υποδεικνύει ότι τα μόρια αυτά δεν διαφέρουν από αντίστοιχα μεμβρανικά. Όπως είδαμε όμως, υπάρχουν και διαφορές ως προς την σταθερότητα σύνδεσης των αλυσίδων  $\alpha$  και  $\beta$ , και επιπλέον, υποθέτουμε ότι απουσιάζει το διαμεμβρανικό και το ενδοκυττάριο τμήμα του μορίου.

Σε μία ακόμα προσπάθεια να ταυτοποιήσουμε τα διαλυτά τάξης MHC II μόρια χρησιμοποιήθηκε η φασματομετρία μάζας (*nLC-MS/MS analysis*). Η φασματομετρία μάζας είναι μία ευαίσθητη τεχνική για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων. Για να πραγματοποιηθεί αυτό χρειάζεται τα προς μελέτη μόρια να υποστούν πέψη ώστε να μειωθεί αρκετά το μοριακό τους βάρος και να πραγματοποιηθεί η ανάλυση. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών, πέψη πραγματοποιείται με τη χρήση της τρυψίνης, πεπτιδάσης η οποία δημιουργεί πεπτίδια 7-10 αμινοξέων.

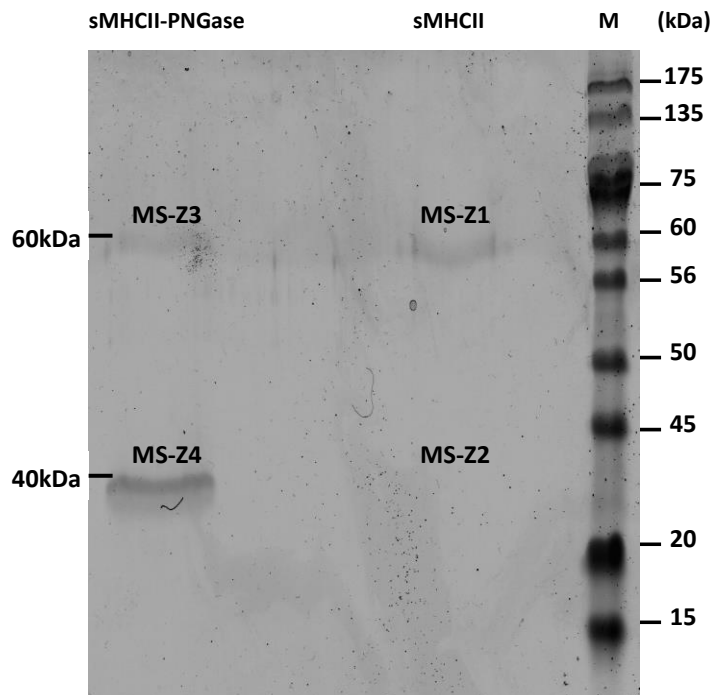
Για να διευκολυνθεί η διαδικασία της τρυψινολύσης καθώς και η ανάλυση των πεπτιδίων στη συνέχεια, εκτός από τα διαλυτά μόρια που απομόνωσαμε από τον ορό αίματος ανοχοποιημένου ποντικού, χρησιμοποιήσαμε και μόρια που είχαν προηγούμενα επεξεργαστεί με το ένζυμο PGAase N-γλυκοζυλάση, η οποία απομακρύνει τις N-γλυκοζυλιώσεις από τα αμινοξικά κατάλοιπα των μορίων.

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των πρωτεϊνών ώστε να γίνουν κατάλληλες για την πέψη με τρυψίνη είναι το «in-gel digestion protocol», δηλαδή οι πρωτεΐνες αφού διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υποβάλλονται σε χρώση με Coomassie blue silver, η οποία είναι συμβατή με την διαδικασία της φασματομετρίας μάζας.<sup>233</sup> Τα δείγματα, όπως φαίνεται και στην Εικ. 3.2.1, αφού αφαιρέθηκαν από την πηκτή πολυακρυλαμίδης υπέστησαν μία σειρά οξειδώσεων των S-S δεσμών και αναγωγών των S-H δεσμών ώστε να αποκτήσουν την πρωτοταγή τους δομή και να γίνουν προσβάσιμα προς πέψη στην τρυψίνη.<sup>234</sup> Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ένα κομμάτι πολυακρυλαμίδης το οποίο δεν αντιστοιχούσε σε κάποια ζώνη. Επιπλέον, η ζώνη των 40kDa αντιστοιχεί σε απογλυκοζυλιωμένο μόριο μετά την επεξεργασία με τη γλυκοζυλάση. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές στις ίδιες συνθήκες, δεδομένης και της τυχαιότητας της πέψης της τρυψίνης.

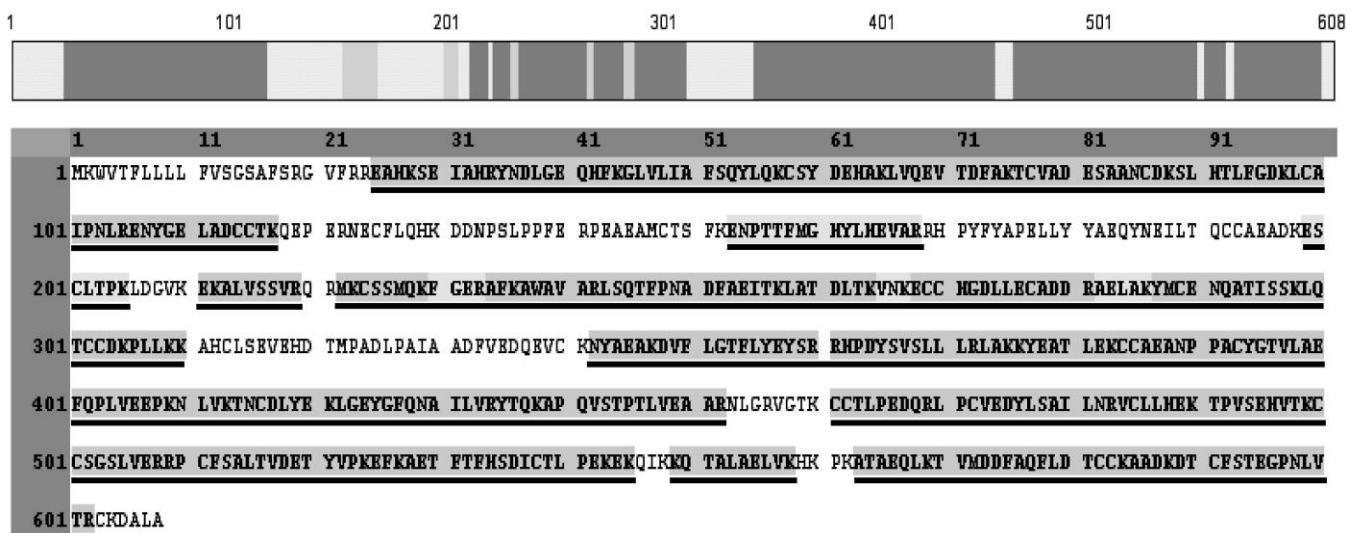
Κατά την nLC-MS/MS ανάλυση προέκυψε ταυτοποίηση της Αβ αλυσίδας των τάξης II MHC μορίων του ποντικού (H-2 class II histocompatibility antigen, A beta chain), με ποσοστό κάλυψης 12,83%. Όμως, η πιο σημαντική ταυτοποίηση και μάλιστα με υψηλό ποσοστό κάλυψης (75.66%) ήταν με την πρωτεΐνη Human Serum Albumin (HSA). Ταυτοποιήθηκαν συνολικά 59 πεπτίδια. (Εικ. 3.2.2, Πιν. 3.2.1). Επιπλέον, εμφανίστηκαν μία σειρά από πεπτίδια, τα οποία αποτελούν ενδογενή πεπτίδια, δηλαδή προέρχονται από πρωτεΐνες του εαυτού. Ανάμεσα σε αυτές τις πρωτεΐνες συγκαταλέγονται ο αναστολέας πρωτεάσης σερίνης A3K (Serine protease inhibitor A3K), το Fc domain των IgG πρωτεϊνών πρόσδεσης (Fc fragment of IgG binding protein), η πρωτεΐνη Antithrombin-III, η πρωτεΐνη 152 του κεντροσώματος (Centrosomal protein 152). Ένα από τα πιο σημαντικά ευρήματα αποτελεί ένα πεπτίδιο το οποίο ταυτοποιήθηκε ως πεπτίδιο της Myelin basic protein (MBP). (Πιν. 3.2.2, Παράρτημα).

Το παραπάνω επιβεβαιώνει πως τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια είναι φορτωμένα τόσο με πεπτίδια στα οποία ο οργανισμός αποκτά ανοχή (είχαμε χρησιμοποιήσει την HSA

ως ανοχογόνο για το πρωτόκολλο ανοχοποίησης των ποντικών), όσο και μια πληθώρα αντιγόνων του εαυτού.



**Εικ. 3.2.1:** Πηκτή πολυακρυλαμίδης, μετά από χρώση με Coomassie blue silver των διαλυτών τάξης II MHC μορίων απομονωμένων από τον ορό ανοχοποιημένου ποντικού (sMHCII) και των επεξεργασμένων με το ένζυμο PNGase N-γλυκοζυλάση (sMHCII-PNGase). Τα 4 δείγματα (ζώνες) τα οποία διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση και στην συνέχεια αφαιρέθηκαν από την πηκτή είναι: *MS-Z1*: διαλυτά τάξης II MHC μόρια, *MS-Z2*: δείγμα ελέγχου χωρίς ζώνη, *MS-Z3*: διαλυτά τάξης II MHC μόρια μη ολοκληρωμένης ενζυμικής αντίδρασης, *MS-Z4*: διαλυτά τάξης II MHC μόρια απογλυκοζυλιωμένα.



**Εικ. 3.2.1:** Σύγκριση των πεπτιδίων που προέκυψαν από την πέψη με τρυψίνη των διαλυτών τάξης II MHC μορίων με την αλβουμίνη του ορού (Human Serum Albumin-HSA). Τα υπογραμμισμένα κομμάτια αφορούν την ταυτοποίηση των συγκεκριμένων πεπτιδίων στο σύνολο της πρωτεΐνης ενώ οι γκρι και σκούρο γκρι περιοχές υποδεικνύουν την μεσαία και υψηλή πιθανότητα ταυτοποίησης του συγκεκριμένου πεπτιδίου.

Serum albumin								
			Mascot	Sequest	Mascot	Sequest	Mascot	Sequest
Sequence	Modifications	MH+ [Da]	IonScore 1	XCorr 1	IonScore 3	XCorr 3	IonScore 4	XCorr 4
TNCDLYEKLGEYGFQNAILVR	C3(Carbamidomethyl)	2503,237596	112,97	5,45765543	89,52	5,21732378		
TCVADESAANCDK	C2(Carbamidomethyl); C11(Carbamidomethyl)	1440,574266	102,46	4,143375874	99,5	3,809905767		
TVMDDFAQFLDTCCCK	C13(Carbamidomethyl); C14(Carbamidomethyl)	1850,788988	90,12	5,048080444	95,47	5,296284199		
LGEYGFQNAILVR		1479,802538	83,53	3,746269464	83,51	3,682885647	61,09	3,673059464
AADKDTCFSTEGPNLVTR	C7(Carbamidomethyl)	1981,936449	75,77	4,996917248	67,11	4,676267147		
TVMDDFAQFLDTCCCK	M3(Oxidation); C13(Carbamidomethyl); C14(Carbamidomethyl)	1866,778368	75,29	4,794067383	75,13	4,283768177		
GLVLIAFSQYLQK		1479,86162	69,26	4,341384411	55,64	4,55583477		
YMCENQATISSK	M2(Oxidation); C3(Carbamidomethyl)	1447,621385	67,2	3,743159294	64,49	3,505158424		
YMCENQATISSK	C3(Carbamidomethyl)	1431,627489	66,76	3,959610462	63,28	3,749179363		
AFKAWAVAR		1019,578234	61,14	2,273886204	49,98	2,795743704		
RHPDYSVSLLLR		1455,811937	60,2	4,388532639	47,85	3,71447134		
YTQKAPQVSTPTLVEAAR		1960,055834	56,75	3,601038694	64,06	4,054014206		
DVFLGTFLYEYSR		1609,796678	55,1	3,294255495	56,22	3,362820625		
YNDLGEQHFK		1250,581957	54,81	3,125363111	51,72	2,723819971		
CCSGSLVER	C1(Carbamidomethyl); C2(Carbamidomethyl)	1067,461473	54,7	2,834038258	56,66	3,037601471		
KQTALAEIVK		1100,670336	53,9	3,016848564	61,83	3,097617388		
RPCFSALTVDETYVPK	C3(Carbamidomethyl)	1882,942173	51,43	3,537879229	45,93	3,721270323		
ECCHGDLLCADDR	C2(Carbamidomethyl); C3(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)	1749,666429	49,37	3,587756157	46,17	3,419830799		
CCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPK	C1(Carbamidomethyl); C2(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)	2950,352024	49,23	4,018793106				
ATAEQLKTMDDFAQFLDTCCCK	C20(Carbamidomethyl); C21(Carbamidomethyl)	2592,182163	48,25	5,808740616	16,87	3,902000189		
LSQTFPNADFAEITK		1681,848314	47,15	4,293437958	42,81	4,300148964		
LVQEVTFDAK		1149,61809	45,91	2,930488825	44,31	2,693347692		
CSYDEHAKLVQEVTFDAK	C1(Carbamidomethyl)	2140,008884	44,76	3,879589081				
EAHKSEIAHR		1177,607714	42,93	2,330142021	21,88	1,661907434		
TPVSEHVTK		997,5307483	41,4	2,759349108	39,85	2,685306549		
CCTLPEDQLPCVEDYLSAILNR	C1(Carbamidomethyl); C2(Carbamidomethyl); C12(Carbamidomethyl)	2822,337864	39,7	3,986272097	31,68	3,591317177		
SLHTLFGDKLCAIPNLR	C11(Carbamidomethyl)	1955,061191	38,63	4,385734558	30,7	3,519776344		
NLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVR	C7(Carbamidomethyl)	2957,526266	37,58	3,405800104	24,36	3,504509926		
TNCDLYEK	C3(Carbamidomethyl)	1042,452318	36,34	2,283287048	24,52	1,909129024		
VCLLHEKTPVSEHVTK	C2(Carbamidomethyl)	1876,996738	34,23	4,134838104	24,93	3,341202259		
CCTLPEDQR	C1(Carbamidomethyl); C2(Carbamidomethyl)	1178,494432	33,22	2,815416574	29,24	2,345575094		
HPDYSVSLLLR		1299,710497	33,22	2,151894808	32,7	1,883259535		
LSQTFPNADFAEITKLATDLTK		2424,276279	31,92	2,490050316	27,44	2,547836065		
KYEATLEK		981,5262927	31,77	2,173885345				
QTALAEIVK		972,5749988	30,71	1,565485954	39	1,530791283		
LQTCCKDKPLKK	C4(Carbamidomethyl); C5(Carbamidomethyl)	1503,807176	30,22	2,421876669	30,55	2,384445906		
VCLLHEK	C2(Carbamidomethyl)	898,4827746	28,94	2,326005697	26,32	1,879588246		1,24349916
NYAEAKDVLGTFLYEYSR		2286,114963	28,6	4,003848076				
CSYDEHAK	C1(Carbamidomethyl)	1009,405077	28,14	1,885462642		1,606666327		
EKALVSSVR		988,5762805	28,02	2,110307217	28,86	1,655912161		

Serum albumin								
			Mascot	Sequest	Mascot	Sequest	Mascot	Sequest
Sequence	Modifications	MH+ [Da]	IonScore 1	XCorr 1	IonScore 3	XCorr 3	IonScore 4	XCorr 4
LQTCDDKPLLK	C4(Carbamidomethyl); C5(Carbamidomethyl)	1375,711229	27,22	1,215888381	32,68	3,271360636		
LCAIPNLR	C2(Carbamidomethyl)	956,5370959	27,03	1,998490572		1,398517966		
EFKAETFTFHSDICTLPEKEK	C14(Carbamidomethyl)	2557,235386	25,08	3,617240429	16,44	3,026830196		
LPCVEDYLSAILNR	C3(Carbamidomethyl)	1662,85869	20,26	3,479505539	58,83	3,142203808		
MKCSSMQK	C3(Carbamidomethyl)	999,4432239	19,74	2,181661367	17,08	1,680973649		
MKCSSMQK	M1(Oxidation); C3(Carbamidomethyl)	1015,437914	16,42	1,229861259		0,652685642		0,487639397
YNDLGEQHFGLVLIAFSQYLQK		2711,42275	13,14	1,975801706				
LAKKYEATLEK		1293,742832	12,26	3,03576088	17,59	2,342482328		
CSSMQKFGFR	C1(Carbamidomethyl); M4(Oxidation)	1245,536747	11,12	1,275619268		1,34452045		
EAHKSEIAHRYNDLGEQHFK		2409,176656		2,912589312				
LSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNK		2765,474752		1,698603988				
ESCLTPK	C3(Carbamidomethyl)	834,4029407		1,174447417				
ECCHGDLLECADDRAELAK	C2(Carbamidomethyl); C3(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)	2261,967014		0,903379977		0,773424625		
CSSMQKFGFR	C1(Carbamidomethyl)	1229,542026		0,617228508				
ENYGEADCCCK	C9(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl)	1459,586229		0,5228706	43,88	3,501679897		
APQVSTPTLVEAAR		1439,787157						
AETFTFHSDICTLPEKEK	C11(Carbamidomethyl)	2153,029148			30,09	4,590544701		
VNKECCHGDLLECADDRAELAK	C5(Carbamidomethyl); C6(Carbamidomethyl); C13(Carbamidomethyl)	2603,176901			19,62	2,780385256		
ENPTTFMGHYLHEVAR		1901,899082			13,38	1,935751438		
TVMDDFAQLDTCCKAADK	C13(Carbamidomethyl); C14(Carbamidomethyl)	2235,983616				0,613478363		

**Πιν. 3.2.1:** Πίνακας όλων των πεπτιδίων αλβουμίνης του ορού (Serum Albumin), τα οποία υπέστησαν πέψη με τρυψίνη και ταυτοποιήθηκαν από την ανάλυση nLC-MS/MS.

M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides					
	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S		
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
Serum albumin	1630,72	253,55	1265,82	205,40	61,09	3,67	68,59	73,03	67,27	69,24	2,14	14,05	46	51	42	47	1	9
Hemopexin	75,67	14,60		0,00			18,26	27,17		6,52		2,21	7	11		1		1
Serine protease inhibitor A3K	49,34	8,99					10,29	14,83					2	3				
Serotransferrin	37,84	3,49		4,74			2,01	8,75		5,45			1	5		3		
Neurofilament heavy polypeptide	35,11	1,87	34,82	2,57	28,06	1,97	6,88	11,10	0,83	16,42	0,83	6,93	2	5	2	9	1	4
Fc fragment of IgG binding protein	34,56	2,06	0,00	2,08	0,00	1,83	0,35	1,97	0,35	0,35	0,35	6,15	1	3	1	1	1	3
Antithrombin-III	30,38	4,52					3,66	6,02					2	3				
Ras-responsive element binding protein 1	27,94						1,88					2,43	1					1



M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides					
	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S
S= Sequest	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
Isoform 2 of Fibroblast growth factor receptor 4	27,67						0,93						1					
zinc finger and BTB domain-containing protein 43 isoforma	26,92	2,11	0,00			0,00	1,98	1,98	1,98	3,77		3,62	1	1	2	3		2
Isoform 8 of Myelin basic protein						1,53						3,77						2
Centrosomal protein 152		1,63		1,64		0,00		11,00		9,62		3,72		10		9		2
Zinc finger homeobox protein 4		2,02		3,53		4,07		4,08		1,63		15,89		8		5		11
Polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 6		2,18		1,92		3,95		7,88		9,49		15,57		3		4		11
Isoform 1 of TRAF-interacting protein		1,75		2,06		2,53		15,96		5,96		10,54		6		3		7
Stress-70 protein, mitochondrial		1,63		0,00		2,11		3,83		4,71		8,38		2		2		4
growth arrest-specific protein 7 isoform b		1,62		1,70		1,78		6,97		5,29		5,69		2		2		3
Isoform 1 of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 45				1,72		1,70				5,54		5,30				4		3
Isoform 1 of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit		2,08		0,00		1,63		4,60		4,77		4,35		13		16		2
Histone-lysine N-methyltransferase setd3		15,23		11,89		0,00		26,45		26,45		3,76		2		2		2
nuclear mitotic apparatus protein 1		1,84		0,00		0,00		10,27		6,64		3,39		12		9		1
Isoform 1 of Rab GTPase-activating protein 1		2,41						6,02				0,86		4				

**Πιν. 3.2.2:** Ενδεικτικός πίνακας όλων των πεπτιδίων (35.128), τα οποία ταυτοποιήθηκαν από την ανάλυση nLC-MS/MS. Βλ. και Παράρτημα.

### 3.3. Πειράματα ταυτοποίησης των διαλυτών μορίων μέσω βιοαισθητήρων

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 αξιόπιστα αποτελέσματα.

Ο σκοπός αυτής της σειράς πειραμάτων ήταν να ταυτοποιήσουμε τα διαλυτά μόρια με έναν τρόπο που δεν είχε χρησιμοποιηθεί ποτέ στο παρελθόν. Επιπλέον, θέλαμε να αποδείξουμε την ειδικότητα του anti-IA/IE μονοκλωνικού αντισώματος (mAb HB-225<sup>TM</sup>) για τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια. Η αρχική μας προσέγγιση βασίστηκε σε πρωτόκολλο που είχε χρησιμοποιηθεί προηγουμένα και αφορούσε μεμβρανικά αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης I τα οποία ήταν ακινητοποιημένα σε CD8+ T-λεμφοκύτταρα.<sup>235</sup>

Η πραγμάτωση αυτής της προσέγγισης απαιτούσε την ακινητοποίηση του διαλυτού τάξης II MHC μορίου (sMHCII). Το πρώτο βήμα είναι η προσρόφηση της Protein G (Protein G, Recombinant, *E.coli*, CalbioChem) στην επιφάνεια που έχει εναποτεθεί RMMA ή στρώμα Au 20nm. Η Protein G έχει την ιδιότητα να προσδένει το Fc τμήμα (σταθερή περιοχή) των αντισωμάτων, γεγονός το οποίο μας βοήθησε ώστε να δέσουμε το μονοκλωνικό αντίσωμα HB-225<sup>TM</sup>. Αυτά τα βήματα ήταν απαραίτητα για την ακινητοποίηση του αντισώματος, ώστε στη συνέχεια να προστεθούν τα διαλυτά μόρια. Με βάση και το πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί στην παράγραφο 2.11.3 ανάμεσα στις φάσεις του πειράματος, απομακρύναμε τις μη ειδικές προσδέσεις με διάλυμα PBS.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ακουστικό βιοαισθητήρα τύπου Love συχνότητας 110MHz. Επιπλέον, για τη σωστή μελέτη της αλληλεπίδρασης των επιθυμητών κυττάρων με το διαλυτό τάξης II MHC μόριο πρέπει να αποφευχθούν οποιεσδήποτε μη ειδικές αλληλεπιδράσεις και να πραγματοποιηθούν πειράματα ελέγχου. Οι μετρήσεις οι οποίες καταγράφονται στον βιοαισθητήρα αφορούν την ταχύτητα διάδοσης του κύματος που καταγράφονται ως αλλαγή στην φάση του κύματος (phase) και την ενέργεια στην επιφάνεια που αναπαριστάται με τις αλλαγές στο πλάτος του κύματος (amplitude). Πρακτικά, αύξηση της μάζας στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα (πρόσδεση/αλληλεπίδραση μορίων) έχει ως αποτέλεσμα την πτώση της φάσης. Οι μετρήσεις είναι αξιόπιστες όταν η καμπύλη της φάσης και του πλάτους του κύματος ακολουθούν την πορεία και ιδανικές όταν ταυτίζονται. Το κάθε πείραμα έχει πραγματοποιηθεί τουλάχιστον 3 φορές.

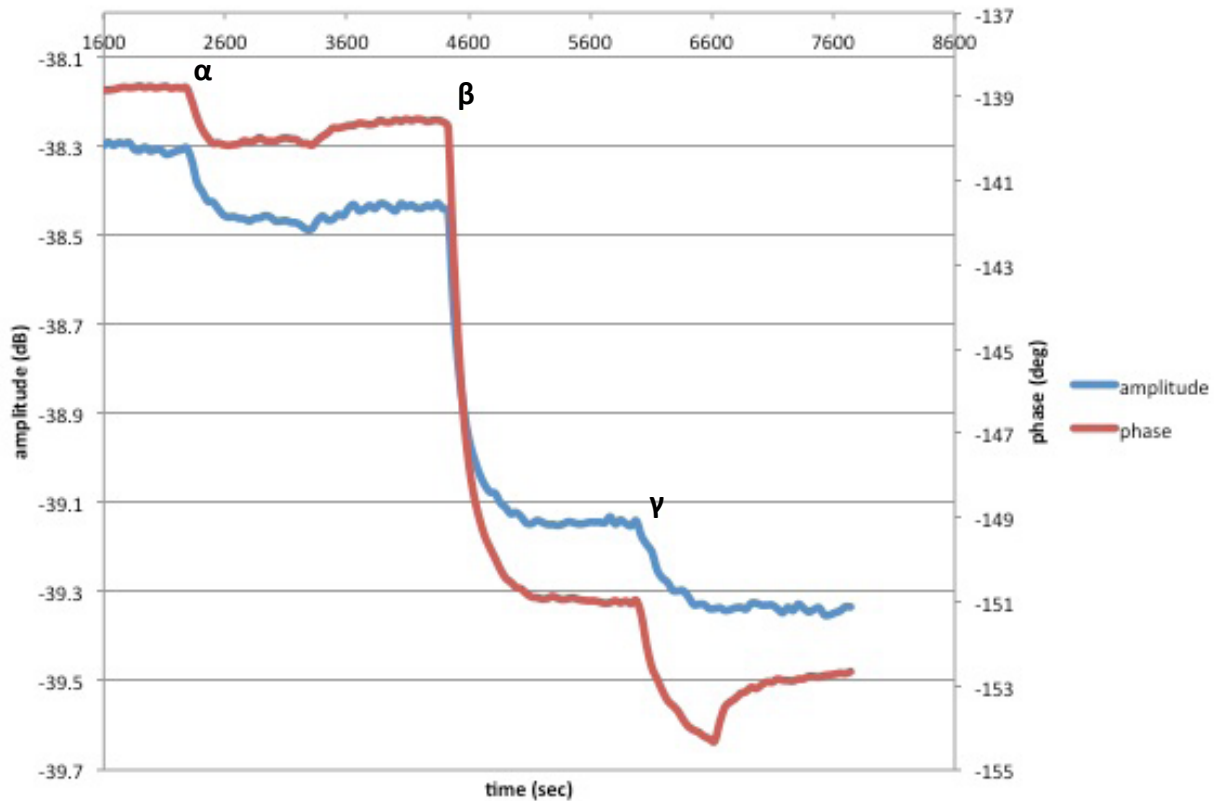
Αρχικά, δοκιμάστηκε το πρωτόκολλο που είχε αξιοποιηθεί πρότερα αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν εμπιστεύσιμα καθώς υπήρχε δυσκολία πρόσδεσης του διαλυτού μορίου με το μονοκλωνικό αντίσωμα HB-225<sup>TM</sup>. Αυτό πιθανά οφειλόταν και στην μεγάλη μάζα των μορίων που υπήρχαν στην διάταξη. Αντίθετα, η πρόσδεση της Protein G με το αντίσωμα πραγματοποιούνταν κανονικά όπως φαίνεται και στην εικόνα, (Εικ. 3.3.1). Για τις συγκεντρώσεις της Protein G και του αντισώματος ακολουθήσαμε τις προτεινόμενες από το πρωτόκολλο, 1mg/ml και 75μg/ml αντίστοιχα.<sup>235</sup> Υπήρξε δυσκολία στην ταυτοποίηση της βάλτιστης συγκέντρωσης των διαλυτών τάξης II μορίων, καθώς σε μικρές ποσότητες, ενώ έδειχνε αρχικά να προσδένεται στο αντί-τάξης II αντίσωμα, μετά τη πλύση με PBS buffer στην προσπάθεια αφαίρεσης των φυσαλίδων, απομακρυνόταν.

Μόνο στην ποσότητα των 0,9mg/ml υπήρξε μικρή σταθερή αλληλεπίδραση, αλλά υπήρχε πρόβλημα στην ταύτιση των καμπυλών φάσης και πλάτους. (Εικ. 3.3.1).

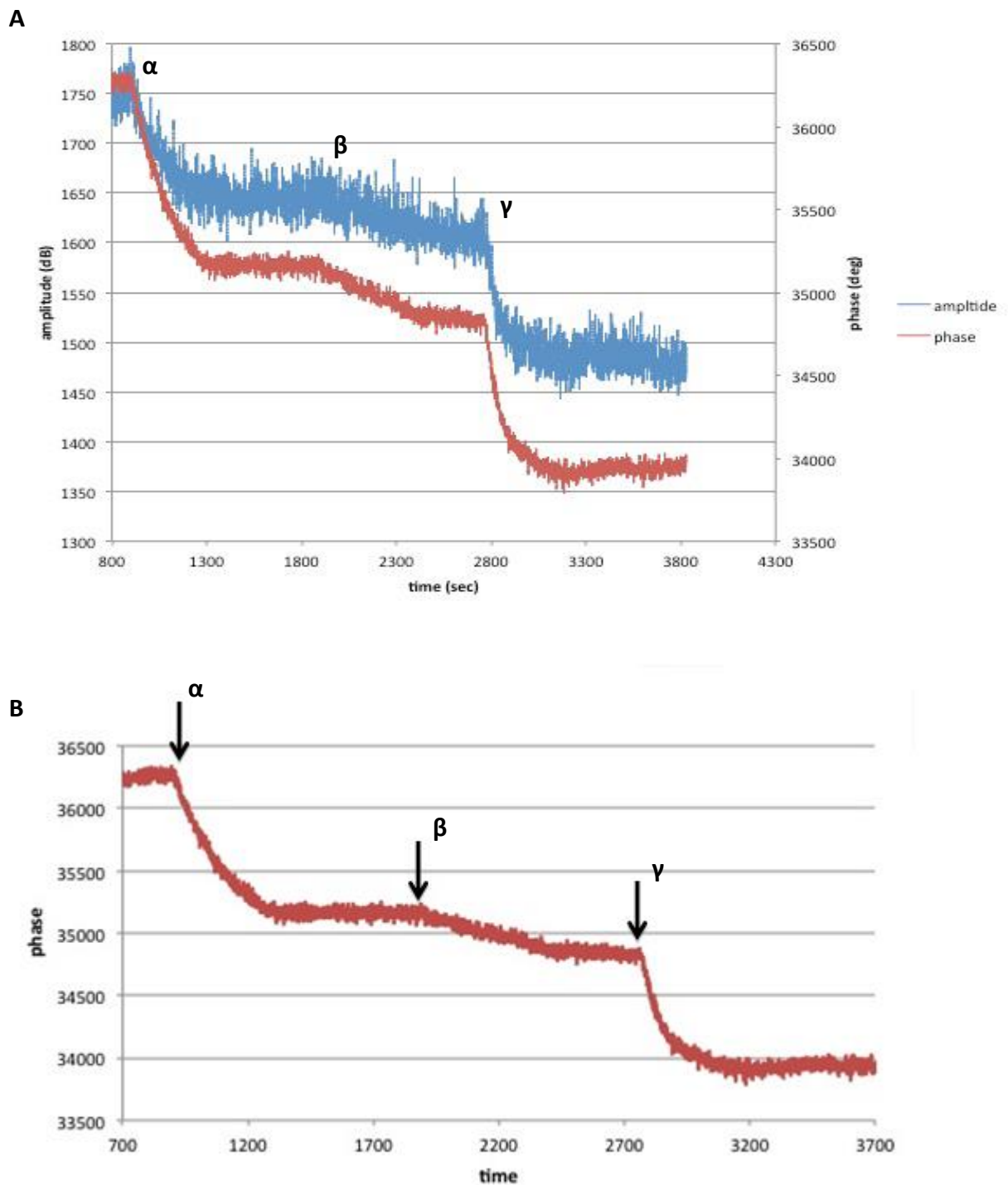
Εξαιτίας των δυσκολιών που αντιμετωπίσαμε με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο αλλά και την μεγάλη ποσότητα διαλυτών μορίων που απαιτούσε κάνοντας απαγορευτική την συγκεκριμένη διάταξη, στη συνέχεια αποφασίσαμε να προσδέσουμε απευθείας στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια και στην συνέχεια το αντίσωμα. Επιπλέον, αποφασίσαμε για αύξηση της ευαισθησίας να προσθέσουμε ένα στρώμα Au 20nm πάνω στο PMMA. Ξεκινήσαμε με 10 φορές μειωμένη την συγκέντρωση των διαλυτών μορίων σε σχέση με την πρώτη διάταξη, δηλαδή 90μg/ml και καλύψαμε την επιφάνεια σε 2 στάδια, με ένα πλύσιμο με διάλυμα PBS ανάμεσα, ώστε να είμαστε σίγουροι για την πλήρη κάλυψη της επιφάνειας. Η συγκέντρωση του αντισώματος παρέμεινε στα 75μg/ml.

Πράγματι, όπως φαίνεται και στις *Εικ. 3.3.2<sup>A,B</sup>* η διάταξη αυτή εκτός της οικονομίας των υλικών έδωσε και αξιόπιστα αποτελέσματα όσον αφορά την ειδικότητα του μονοκλωνικού αντισώματος HB-225<sup>TM</sup> για το διαλυτό τάξης II MHC μόριο. Η real time καμπύλη που δείχνει την μείωση στην φάση και το πλάτος του κύματος αποδεικνύει την αλληλεπίδραση και πρόσδεση των 2 μορίων και επομένως την ειδικότητα του αντισώματος για το διαλυτό μόριο.

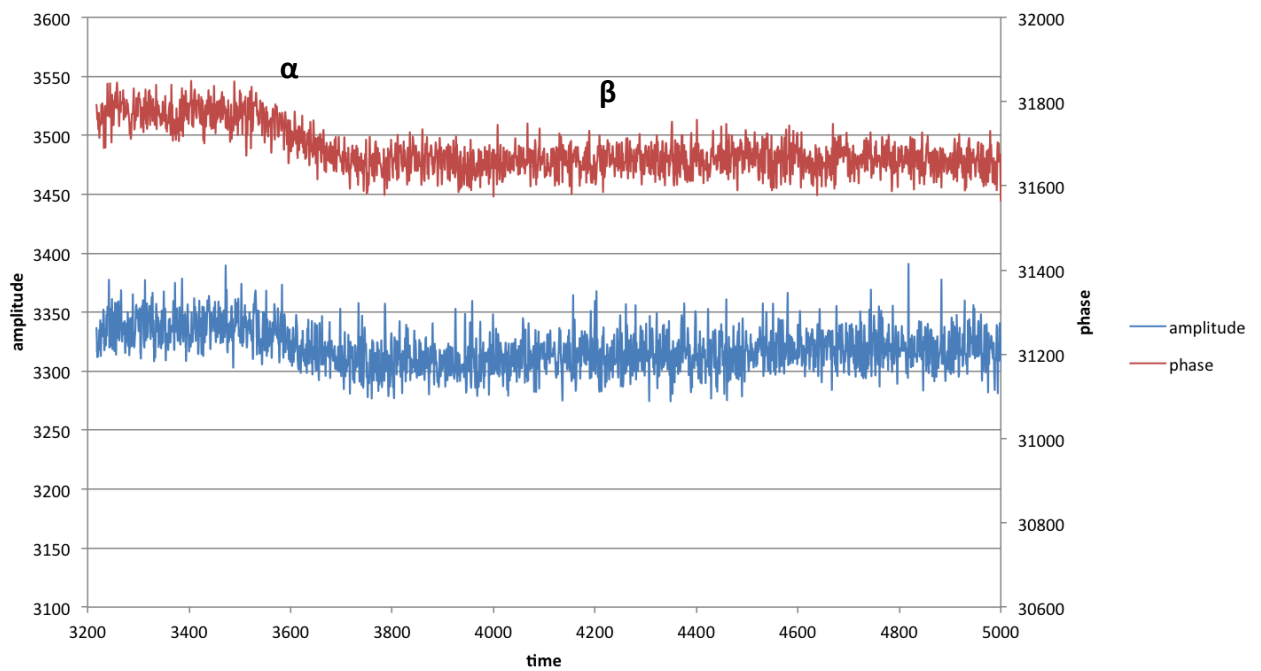
Ως πείραμα ελέγχου για την διάταξη αλλά και την ειδικότητα αντιγόνου αντισώματος που ελέγξαμε προηγούμενα χρησιμοποιήσαμε ένα αντίσωμα το οποίο λειτούργησε ως αρνητικός μάρτυρας για το μονοκλωνικό αντίσωμα HB-225<sup>TM</sup> και ήταν το μονοκλωνικό αντίσωμα human anti-IL-2 σε αντίστοιχη συγκέντρωση, 74μg/ml. Η διαδικασία ήταν ίδια με την δεύτερη διάταξη, δηλαδή κάλυψη της επιφάνειας του βιοαισθητήρα με το διαλυτό μόριο και στη συνέχεια πρόσθεση του αντισώματος. Οι μετρήσεις δεν κατέγραψαν αλλαγή στην φάση και στο πλάτος του κύματος μετά τη πρόσθεση του αντισώματος human anti-IL-2 αποδεικνύονταν την έλλειψη ειδικότητας. (Εικ. 3.3.3).



**Εικ. 3.3.1:** Μέτρηση σε πραγματικό χρόνο (x άξονας) των αλλαγών στην φάση (z άξονας-κόκκινη γραμμή) και το πλάτος (y άξονας-μπλε γραμμή) του κύματος στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα. Σε στρώμα PMMA στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα: α. Προσθήκη Protein G. β. Ακολουθεί προσθήκη αντισώματος HB-225™ και παρατηρούμε την πτώση φάσης και πλάτους που αποδεικνύει την αλληλεπίδραση και πρόσδεση και γ. προσθήκη του διαλυτού sMHCII όπου η πτώση στην φάση και το πλάτος είναι μικρή ενώ οι καμπύλες δεν ταυτίζονται και άρα η αλληλεπίδραση δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί απόλυτα ενώ παρατηρούμε στην συνέχεια το διαλυτό μόριο να απομακρύνεται καθώς οι καμπύλες επανέρχονται.



**Εικ. 3.3.2:** A. Μέτρηση σε πραγματικό χρόνο (x άξονας) των αλλαγών στην φάση (z άξονας-κόκκινη γραμμή) και το πλάτος (y άξονας-μπλε γραμμή) του κύματος στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα. Σε στρώμα Au 20nm στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα: α,β. Κάλυψη σε 2 στάδια της επιφάνειας του βιοαισθητήρα με το διαλυτό τάξης II MHC μόριο, γ. πρόσθήκη του αντισώματος HB-225<sup>TM</sup>. Μετά την προσθήκη του αντισώματος παρατηρείται σταθερή πτώση της φάσης και του πλάτους του κύματος και ταύτιση των 2 καμπυλών αποδεικνύοντας την ειδικότητα του αντισώματος για το διαλυτό μόριο. B. Μέτρηση σε πραγματικό χρόνο (x άξονας) των αλλαγών στην φάση (y άξονας-κόκκινη γραμμή) του κύματος στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα. α,β,γ. Ομοίως με την εικόνα A. Αφαιρέθηκαν οι μετρήσεις του πλάτους λόγω μεγάλου «θορύβου».



**Εικ. 3.3.3:** Πείραμα ελέγχου. Μέτρηση σε πραγματικό χρόνο (x άξονας) των αλλαγών στην φάση (y άξονας- κόκκινη γραμμή) του κύματος στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα. Σε στρώμα Au 20nm στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα:  $\alpha, \beta$ . Κάλυψη σε 2 στάδια της επιφάνειας του βιοαισθητήρα με το διαλυτό τάξης II MHC μόριο,  $\gamma$ . πρόσθήκη του αντισώματος human anti-IL-2. Παρατηρούμε την έλλειψη πτώσης της φάσης μετά την πρόσθεση του αντισώματος που αποδεικνύει την μη αλληλεπίδραση και την έλλειψη πρόσδεση αντισώματος και διαλυτού μορίου.

### 3.4. Επίδραση των διαλυτών τάξης II MHC μορίων σε *in vitro* και *in vivo* ανοσοποιημένα κύτταρα σπλήνα

Στο παρελθόν είχαμε αποδείξει την ικανότητα των διαλυτών μορίων να επάγουν ή να καταστέλλουν μία σειρά κυτταρικών πληθυσμών.<sup>223</sup> Επιθυμώντας να ξεκαθαρίσουμε το ρόλο τους μελετήσαμε την επίδρασή τους σε ενεργοποιημένους κυτταρικούς πληθυσμούς. Στις διαδικασίες αυτές επιλέχθηκε ο έλεγχος στο συνολικό πληθυσμό των σπληνοκυττάρων ώστε να υπάρχουν όλα τα απαραίτητα κυτταρικά στοιχεία για την ανοσολογική απόκριση.

Η βιολογική επίδραση των διαλυτών τάξης II MHC μορίων στον αντιγονοειδικό και μη-αντιγονοειδικό πολλαπλασιασμό των σπληνοκυττάρων ελέγχθηκε μετά από *in vitro* και *in vivo* πρωτόκολλα ανοσοποίησης, χρησιμοποιώντας την μέθοδο ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης (<sup>3</sup>HTdR). Τα σπληνοκύτταρα, τα οποία προήλθαν από ποντίκι που δεν είχε υποστεί ανοσολογική διέγερση, αφού αφαιρέθηκαν, επώαστηκαν *in vitro* για 24 ώρες με HSA (με την οποία ανοχοποιήσαμε τα ποντίκια για την απομόνωση των διαλυτών μορίων) ή MBP (ως πρωτεΐνη ελέγχου) σε συγκέντρωση 1 μg/ml καλλιέργειας, η οποία βιβλιογραφικά καταγράφεται ως ανοσογόνος δόση,<sup>232</sup> και ακολούθησε προσθήκη ή μη των διαλυτών τάξης II MHC μορίων, σε συγκέντρωση 30ng/ml καλλιέργειας με βάση παλαιότερη δημοσίευση,<sup>223</sup> την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας.

Απουσία κάποιας αντιγονικής ανοσολογικής, τα διαλυτά μόρια προκάλεσαν μία μείωση στον πολλαπλασιασμό των σπληνοκυττάρων, η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Όμως, τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια ήταν ικανά να μειώσουν με αντιγονοειδικό τρόπο την ανοσολογική απόκριση κατά 65% ( $p < 0,01$ ) και με μη-αντιγονοειδικό τρόπο κατά 59% ( $p < 0,01$ ) παρουσία HSA ή MBP αντίστοιχα. (Εικ. 3.4.1<sup>A</sup>). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως ενώ τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια απομονώθηκαν από ποντίκια τα οποία ήταν ανοχοποιημένα και με βάση πρότερη βιβλιογραφία θα είναι φορτωμένα στο μεγαλύτερο ποσοστό τους με κάποιο πεπτίδιο HSA<sup>225</sup>, κατέστειλαν και άλλες αποκρίσεις οι οποίες σχετίζονται με αντιγόνα του εαυτού.

Τα παραπάνω αποτελέσματα ήταν αναμενόμενα, καθώς παρά τον αυξημένο αριθμό των διαλυτών μορίων του ανοχοποιημένου συνολικού ορού που είναι φορτωμένα με πεπτίδια HSA, τα μόρια αυτά είναι φυσιολογικό να είναι φορτωμένα και με πεπτίδια του εαυτού και μπορούν να έχουν εξίσου κατασταλτική ικανότητα. Όντως, η MS/MS ανάλυση που πραγματοποιήθηκε και υπήρξε σύγκριση μεταξύ της MBP και πεπτιδίων τα οποία προέκυψαν κατά την επεξεργασία των διαλυτών μορίων με τρυψίνη, είχε ως αποτέλεσμα τον χαρακτηρισμό ενός πεπτιδίου που αντιστοιχούσε σε ποσοστό κάλυψης 18,53% με την πρωτεΐνη. Το παραπάνω επιβεβαιώθηκε με το φάσμα του πεπτιδίου κατά την MS/MS ανάλυση η οποία έδειξε αξιόπιστη ταυτοποίηση. (Εικ.3.4.1<sup>B</sup>).

Για να εκτιμήσουμε περαιτέρω εάν τα διαλυτά μόρια μπορούσαν να καταστείλουν μία ανοσολογική απόκριση που αναπτύσσεται *in vivo*, απομονώσαμε σπληνοκύτταρα τα οποία είχαν ανοσοποιηθεί *in vivo*, με πρωτόκολλο ανοσοποίησης 15 ημερών, με HSA (100 μg/ποντίκι) ή μία πρωτεΐνη ελέγχου προερχόμενη από το βακτήριο *Staphylococcus aureus*, την SecA (100 μg/ποντίκι).

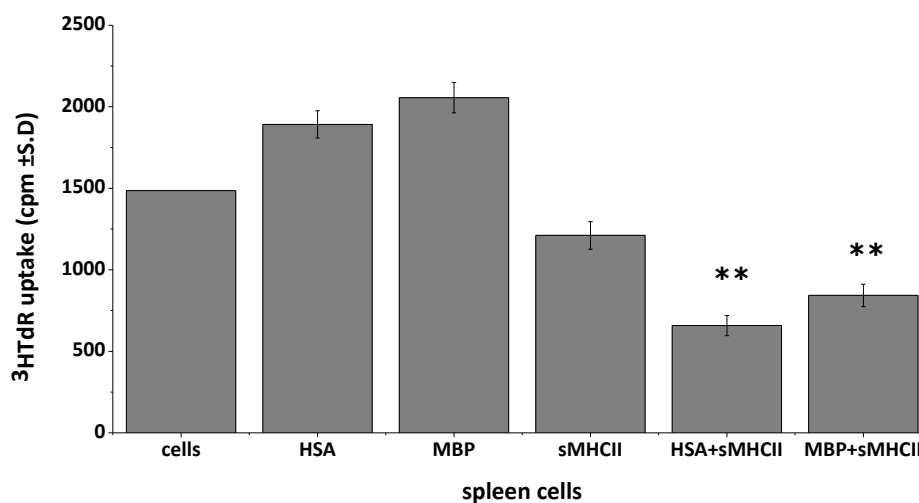
Τα ανοσοποιημένα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία ή απουσία των διαλυτών μορίων, σε συγκέντρωση 30ng/ml καλλιέργειας. Για να ενισχύσουμε την ανοσοποίηση και για να ελέγξουμε την αντιγονοειδική απόκριση, το κάθε είδος κυττάρων που ήταν ανοσοποιημένων *in vivo*, επωαστηκε *in vitro* και με το ένα ή το άλλο αντιγόνο, σε συγκέντρωση 1 µg/ml καλλιέργειας.

Στα σπληνοκύτταρα τα οποία προήλθαν από τα ποντίκια που ήταν ανοσοποιημένα *in vivo* με την HSA, τα διαλυτά μόρια μείωσαν σημαντικά την ενσωμάτωση της ραδιενεργής θυμιδίνης, απουσία πρόσθετης *in vitro* αντιγονικής ενεργοποίησης, κατά 65% ( $p < 0,01$ ) και κατέστειλλαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων κατά 77% ( $p < 0,01$ ) όταν υπήρχε *in vitro* παρουσία της HSA ή της SecA. (Εικ. 3.4.2<sup>A</sup>). Τα αποτελέσματα αυτά, αν και δεν ήταν αναμενόμενα, μπορεί να οφείλονται σε κατασταλτική ικανότητα των μορίων η οποία να είναι μη-αντιγονοειδική καθώς η αντιγονική ενεργοποίηση μέσω της SecA πραγματοποιήθηκε *in vitro* και η ίδια η πρωτεΐνη αποτελεί ένα ξένο αντιγόνο (μη-εαυτού), στο οποίο το ζώο δεν θα μπορούσε να έχει αναπτύξει στο παρελθόν ανοσολογική απόκριση.

Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε στην περίπτωση των σπληνοκυττάρων τα οποία ήταν ανοσοποιημένα *in vivo* με την SecA. Παρά την έλλειψη πρόσθετης *in vitro* αντιγονικής ενεργοποίησης, τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια μείωσαν την ενσωμάτωση της ραδιενεργής θυμιδίνης (ποσοστό στατιστικά μη σημαντικό), ενώ κατέστειλλαν κατά 30% ( $p < 0,05$ ) και 37% ( $p < 0,05$ ) τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατά την παρουσία της *in vitro* ενεργοποίησης μέσω HSA ή SecA αντίστοιχα.

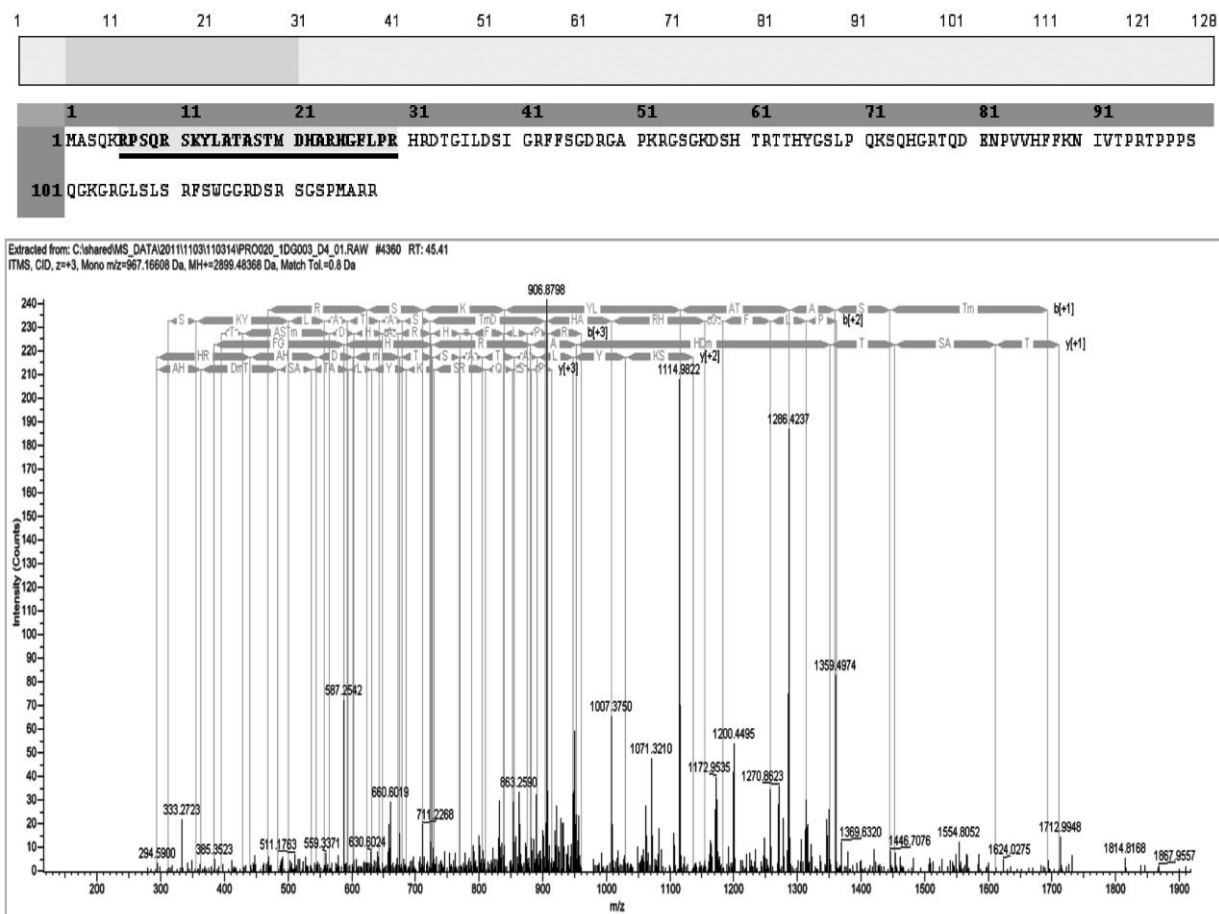
Τα αποτελέσματα αυτά εγείρουν ερωτήματα για τον τρόπο δράσης των διαλυτών τάξης II μορίων και την επίδραση τους στους κυτταρικούς στόχους. Πιθανά το αντιγονικό πεπτίδιο να μην είναι το πρωτεύον αλλά ρόλο να παίζει η στερεοχημεία των διαλυτών μορίων.

A



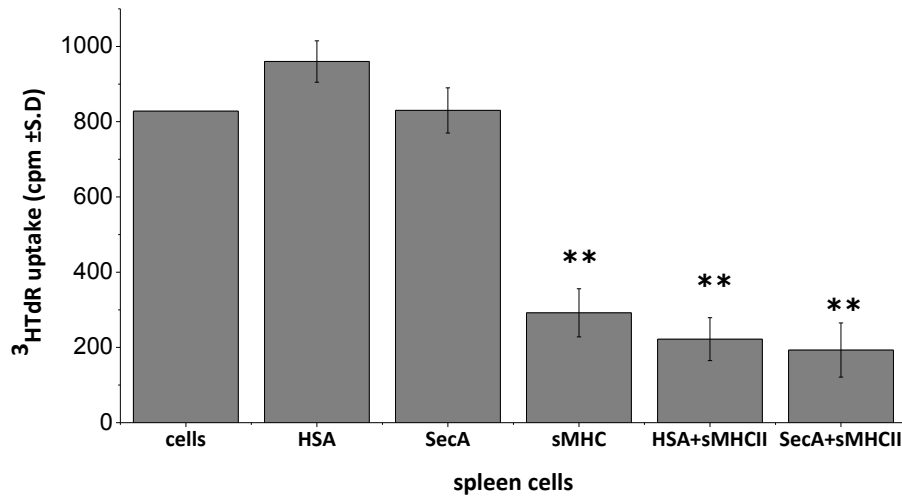


B

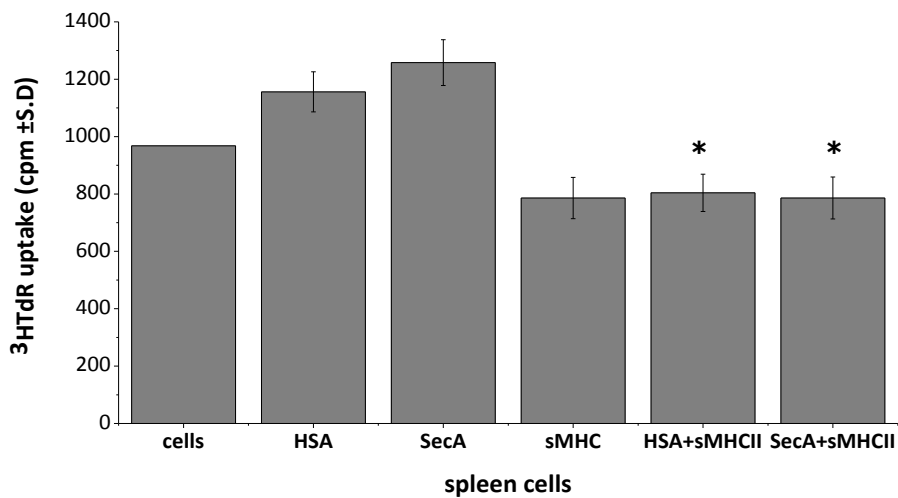


**Εικ. 3.4.1:** A. Η επίδραση των διαλυτών τάξης II MHC μορίων σε πρωτόκολλο ανοχοποίησης *in vitro*. Σπληνοκύτταρα ανοσοποιήθηκαν *in vitro* με ανθρώπινη αλβουμίνη (HSA) ή μυελίνη (MBP) παρουσία ή απουσία διαλυτών μορίων. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων ελέγχθηκε με την μέθοδο ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης ( $^3\text{HTdR}$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν τις κρούσεις των ραδιενεργών σωματιδίων (cpm) και η τυπική απόκλιση (SD) υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων. (\*\* $p < 0,01$ ) B. Χαρακτηρισμός της MBP μέσω ανάλυσης MS/MS. Η σύγκριση μεταξύ της MBP και πεπτιδίων τα οποία προέκυψαν κατά την επεξεργασία των διαλυτών μορίων με τρυψίνη, είχε ως αποτέλεσμα τον χαρακτηρισμό ενός πεπτιδίου που αντιστοιχούσε σε ποσοστό κάλυψης 18.53% με την πρωτεΐνη (γκρι υπογραμμισμένη περιοχή πάνω στην αλληλουχία της πρωτεΐνης). Οι ανοικτές και σκούρες γκρι περιοχές δείχνουν την μεσαία και μεγάλη πιθανότητα ταυτοποίησης συγκεκριμένων πεπτιδίων μετά από πέψη με τρυψίνη. Το φάσμα της ανάλυσης MS/MS του ταυτοποιημένου πεπτιδίου που παρουσιάζεται στο κάτω μέρος επιβεβαιώνει την αξιόπιστη ταυτοποίηση με μεγάλο ποσοστό κάλυψης. Το "m" που σημειώνεται στην αλληλουχία του πεπτιδίου επισημαίνει την οξείδωση καταλοίπου μεθειονίνης.

A



B



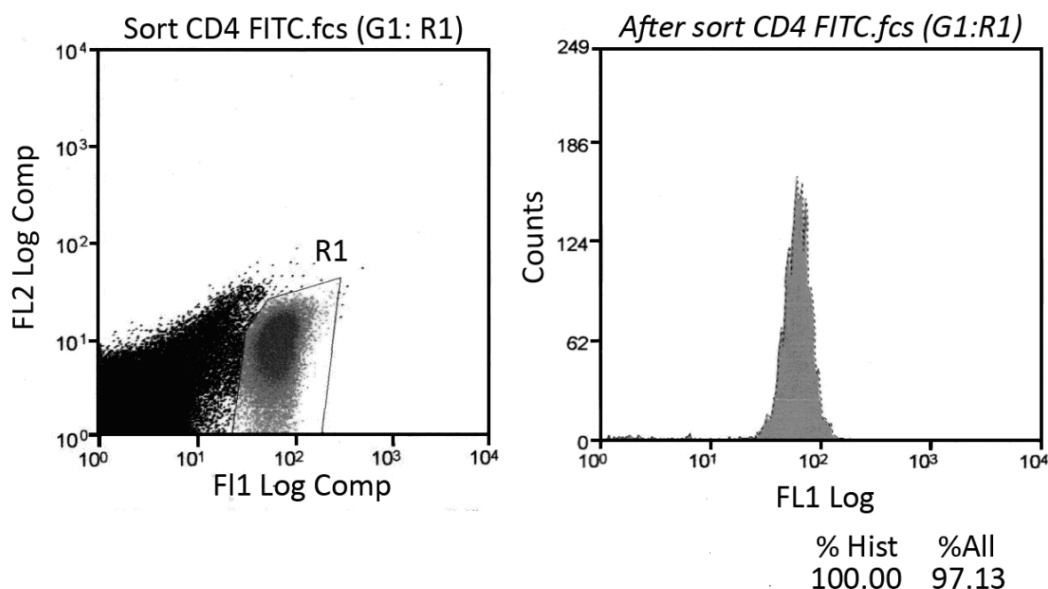
**Εικ. 3.4.2:** Η επίδραση των διαλυτών τάξης II MHC μορίων σε πρωτόκολλο ανοχοποίησης *in vivo*. Σπληνοκύτταρα ανοσοποιήθηκαν *in vivo* είτε με ανθρώπινη αλβουμίνη (HSA) (A) ή SecA (B) ενεργοποιήθηκαν περαιτέρω με HSA ή SecA *in vitro*, και επώαστηκαν παρουσία ή απουσία διαλυτών μορίων. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων ελέγχθηκε με την μέθοδο ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης ( $^3\text{HTdR}$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν τις κρούσεις των ραδιενεργών σωματιδίων (cpm) και η τυπική απόκλιση (SD) υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων. (\*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ )

### 3.5. Αλληλεπίδραση των διαλυτών τάξης II ΜHC με CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα

Τα αποτελέσματα μέχρι τώρα έχουν δείξει πως τα διαλυτά τάξης II μόρια έχουν κατασταλτικές ιδιότητες σε συνολικά σπληνοκύτταρα. Επιπλέον, τα μόρια αυτά έχει αποδειχθεί παλαιότερα πως μπορούν να ανταγωνιστούν τα κλασικά τάξης II μεμβρανικά μόρια<sup>223</sup> υποδεικνύοντας πως τα CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα αποτελούν τουλάχιστον ένα από τα κύτταρα στόχους τους.

Για να μπορέσουμε να μελετήσουμε την επίδραση των διαλυτών μορίων σε αυτό τον υποπληθυσμό, έπρεπε ο πληθυσμός των κυττάρων να είναι όσο το δυνατόν ομοιογενής. Η κυτταρική σειρά δεν επιλέχθηκε λόγω της αναγκαστικής απόστασης από τη φυσική κατάσταση και, στη προκειμένη περίπτωση του συνόλου των διαφορετικών αντιδράσεων που μπορούν να έχουν τα πρωτογενή κύτταρα.

Επιλέχθηκαν για την απομόνωση του CD4+ υποπληθυσμού σπληνοκύτταρα από ζώα που δεν έχουν υποστεί κάποια ενεργοποίηση. Μετά την απομάκρυνση των μακροφάγων, τα σπληνοκύτταρα υπόκειντο σε εξωτερικό ανοσοφθορισμό με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για τον υποδοχέα CD4+, το οποίο έφερε πράσινη φθορίζουσα ουσία (FITC-labeled mouse anti-CD4, 1μg/ml). Στην συνέχεια και μέσω της μεθόδου της Διαχωριστικής Κυτταρομετρίας Ροής (Cell Sorting) τα CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα διαχωρίζονταν από τα υπόλοιπα σπληνοκύτταρα. Η τεχνική επιλέχθηκε γιατί μας επιτρέπει με έναν εύκολο και γρήγορο τρόπο να διαχωρίζουμε υποπληθυσμούς ακόμα και αν είναι σε μικρή συγκέντρωση στον συνολικό πληθυσμό. Μετά την απομόνωση εξεταζόνταν η καθαρότητα του πληθυσμού η οποία έφτανε το 97% επί των διαχωρισμένων κυττάρων. (Εικ. 3.5.1).

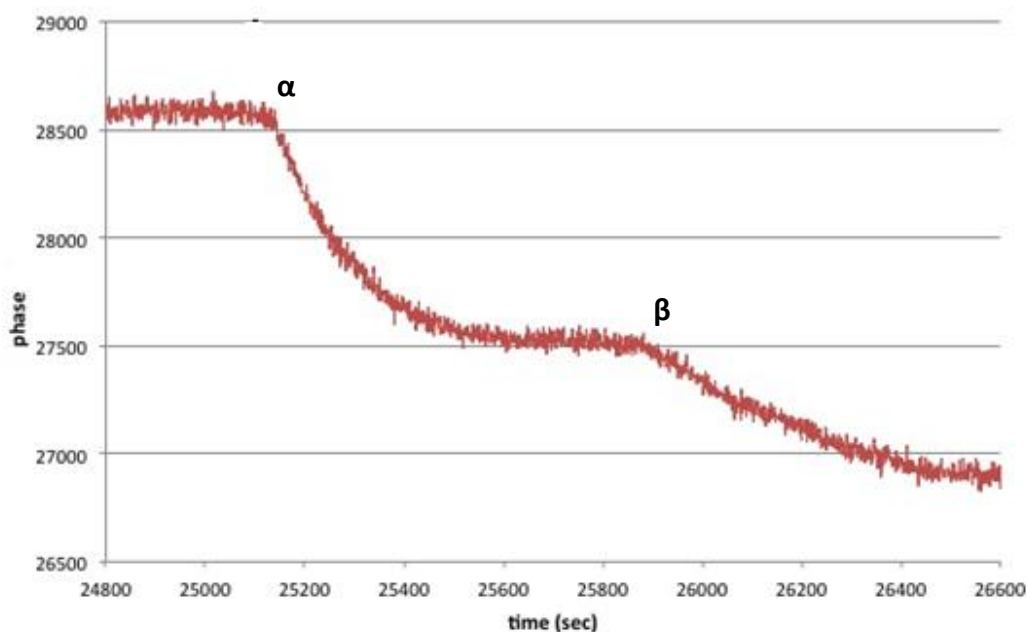


**Εικ. 3.5.1:** Διαχωριστική Κυτταρομετρία Ροής (Cell Sorting) των CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα τα οποία έχουν υποστεί ανοσοφθορισμό με FITC-labelled anti-CD4 μονοκλωνικό αντίσωμα. Το FL-1 (x άξονας) αντιπροσωπεύει τον φθορισμό στο πράσινο. Αρχικά από το συνολικό πληθυσμό επιλέγεται ο επιθυμητός πληθυσμός (Gate 1=R1) ο οποίος λόγω του φθορισμού έχει διαχωριστεί στην εικόνα. Μετά τον διαχωρισμό, τα απομονωμένα κύτταρα ελέγχονται για την καθαρότητα του τελικού πληθυσμού. Η καθαρότητα του απόμονωμένου CD4+ πληθυσμού έφτασε το 97%.

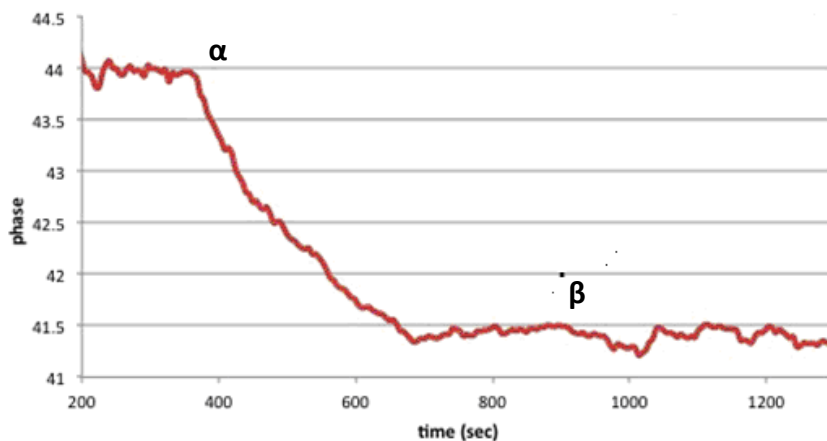
Για να επιβεβαιώσουμε την αλληλεπίδραση των διαλυτών τάξης II MHC μορίων με τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε και πάλι την τεχνική του ακουστικού βιοαισθητήρα η οποία μας δίνει μετρήσιμα αποτελέσματα.

Στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα τύπου Love, 110MHz, και σε στρώμα PMMA, προστέθηκε το διαλυτό μόριο σε συγκέντρωση 90μg/ml, με ένα πλύσιμο με διάλυμα PBS ανάμεσα, ώστε να είμαστε σίγουροι για την πλήρη κάλυψη της επιφάνειας. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα, τα οποία είχαν απομονωθεί με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, σε συγκέντρωση  $10^6$  κύτταρα/ml. Τα κύτταρα παρέμειναν πριν την διαδικασία για 24h σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό πρωτεϊνών (RPMI, FBS free, Gibco, Germany) προκειμένου να αποφευχθούν μη ειδικές αλληλεπιδράσεις από τις πρωτεΐνες του ορού. Πράγματι, τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούσαν σταθερά με τα διαλυτά τάξης II μόρια, παρέχοντας μία real time καταγραφή αυτής της αλληλεπίδρασης, η οποία μέχρι τώρα αποδεικνυόταν με έμμεσους τρόπους. (Εικ. 3.5.2).

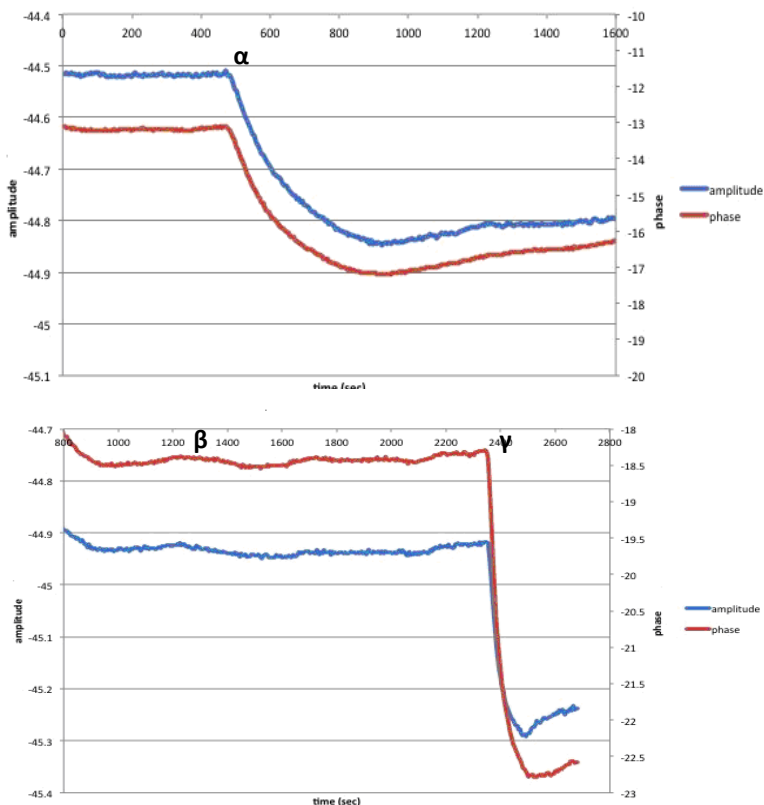
Ως πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν η λευχαιμική κυτταρική σειρά μυελογενούς προέλευσης K562, και τα CD8+ T-λεμφοκύτταρα, σε συγκεντρώσεις  $10^6$  κύτταρα/ml, τα οποία δεν αλληλεπιδρούν αποδεδειγμένα με τάξης II μόρια. Όντως, σε καμία από τις περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στη φάση του κύματος κατά την πρόσθεση των κυττάρων στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα που ήταν προσδεσμένο το διαλυτό τάξης II μόριο, αποδεικνύοντας έτσι την ειδική αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα CD4. (Εικ. 3.5.3 και 3.5.4).



**Εικ. 3.5.2:** Μέτρηση σε πραγματικό χρόνο (x άξονας) των αλλαγών στην φάση (y άξονας-κόκκινη γραμμή) του κύματος στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα. Σε στρώμα PMMA στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα: α. Κάλυψη της επιφάνειας του βιοαισθητήρα με το διαλυτό τάξης II MHC μόριο, β. πρόσθκη των CD4+ T-λεμφοκυττάρων. Η μείωση της φάσης του κύματος αποδεικνύει την αλληλεπίδραση των διαλυτών μορίων με τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα. Αφαιρέθηκαν οι μετρήσεις του πλάτους λόγω μεγάλου «θορύβου».



**Εικ. 3.5.3:** Μέτρηση σε πραγματικό χρόνο (x άξονας) των αλλαγών στην φάση (y άξονας-κόκκινη γραμμή) του κύματος στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα. Σε στρώμα PMMA στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα: **α.** Κάλυψη της επιφάνειας του βιοαισθητήρα με το διαλυτό τάξης II MHC μόριο, **β.** πρόσθκη των CD8+ T-λεμφοκυττάρων. Η μικρή προσωρινή μείωση της φάσης του κύματος και στην συνέχεια η επαναφορά της αποδεικνύει την έλλειψη αλληλεπίδρασης των διαλυτών μορίων με τα CD8+ T-λεμφοκύτταρα. Αφαιρέθηκαν οι μετρήσεις του πλάτους λόγω μεγάλου «θορύβου».



**Εικ. 3.5.4:** Μέτρηση σε πραγματικό χρόνο (x άξονας) των αλλαγών στην φάση (z άξονας-κόκκινη γραμμή) και το πλάτος (y άξονας-μπλε γραμμή) του κύματος στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα. Σε στρώμα PMMA στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα: **α.** Κάλυψη της επιφάνειας του βιοαισθητήρα με τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια, **β.** Μετά την προσθήκη των K562 κυττάρων δεν παρατηρείται πτώση της φάσης και του πλάτους του κύματος αποδεικνύοντας την έλλειψη αλληλεπίδρασης των κυττάρων με το διαλυτό μόριο. **γ.** Για να επιβεβαιώσουμε πως δεν υπάρχει πρόβλημα με την πειραματική διαδικασία προσθέσαμε μετά την μη πρόσδεση των K562 κυττάρων, το αντίσωμα HB-225™ και παρατηρήσαμε την σταθερή αλληλεπίδραση με το διαλυτό μόριο, όπως αυτή εκφράζεται με την σταθερή μείωση της φάσης και του πλάτους του κύματος.

### 3.6. Επίδραση των διαλυτών μορίων στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα

Έχοντας ως δεδομένο πως τα διαλυτά τάξης II μόρια αλληλεπιδρούν με τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα καταστέλλοντας το πολλαπλασιασμό τους, θέλησαμε να μελετήσουμε την επίδραση τους στην έκφραση των CD25, και CD28/CTLA-4 καθώς και την έκκριση των κυτοκινών.

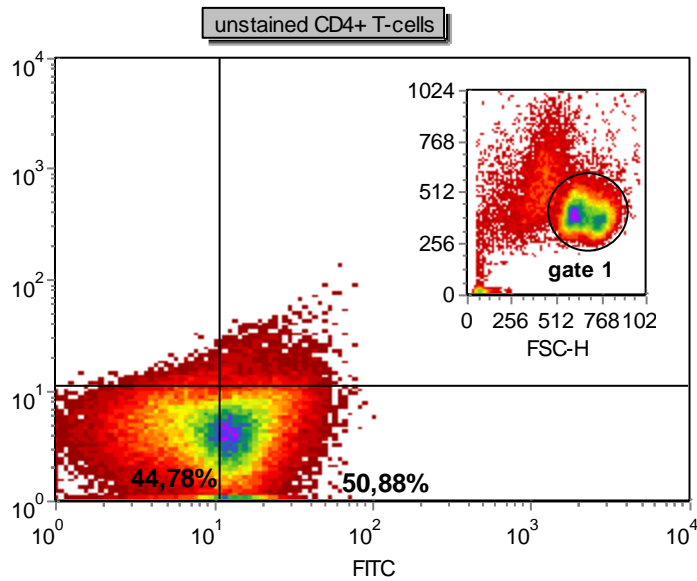
#### 3.6.1. Μελέτη της έκφρασης του μεμβρανικού υποδοχέα CD25

Από τότε που ο Sakagushi και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν την αλυσίδα του υποδοχέα της IL-2 (CD25) ως πιθανό μάρτυρα των T-ρυθμιστικών κυττάρων<sup>101</sup>, αυτός ο επιφανειακός μάρτυρας έχει μελετηθεί διεξοδικά και έχει γίνει αποδεκτός ως επιφανειακός δείκτης των T-ρυθμιστικών κυττάρων ενώ πρόσφατα ανακαλύφθηκε ο ρόλος του στην διατήρηση της περιφερειακής ανοχής μέσω της επαγωγής των CD4+CD25+ T-λεμφοκυττάρων.

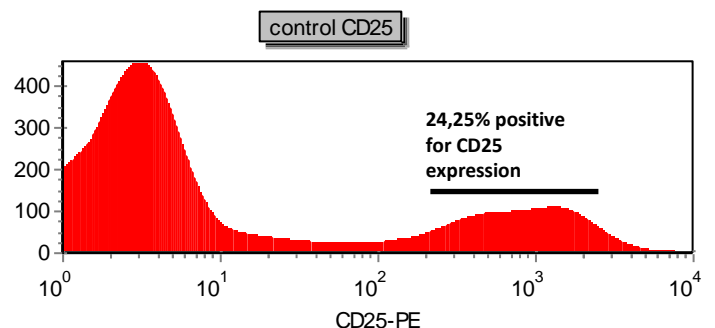
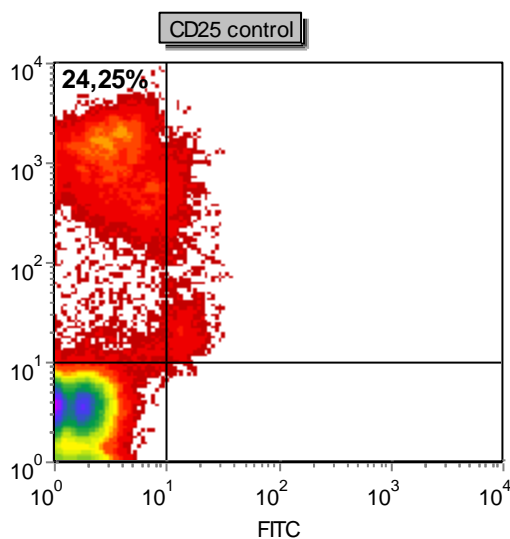
Το μοτίβο της εκφράσης του CD25 μελετήθηκε σε CD4 T-λεμφοκύτταρα τα οποία είχαν προέλθει από σπληνοκύτταρα που δεν είχαν υποστεί καμία ενεργοποίηση και διαχωρίστηκαν από τον συνολικό κυτταρικό πληθυσμό με την μέθοδο της Διαχωριστικής Κυτταρομετρίας Ροής (FACS Sorting). Τα κύτταρα μετά την απομονωσή τους παρέμειναν σε καλλιέργεια για 48h παρουσία ή απουσία διαλυτών τάξης II MHC μορίων, σε συγκέντρωση 30 ng/ml. Στην συνέχεια υπόκειντο σε εξωτερικό ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD25, το οποίο έφερε κόκκινη φθορίζουσα ουσία (PE-labeled mouse anti-CD25, 1μg/ml). Η κόκκινη φθορίζουσα ουσία επελέχθηκε καθώς τα κύτταρα προέρχονταν από έναν ακόμα εξωτερικό ανοσοφθορισμό με πράσινη φθορίζουσα ουσία, την οποία ένα κομμάτι του πληθυσμού δεν θα είχε αποβάλλει. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την μέθοδο της Κυτταρομετρίας Ροής (FACS). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν CD4+ T-λεμφοκύτταρα τα οποία δεν είχαν σημανθεί για τον μεμβρανικό υποδοχέα CD25.

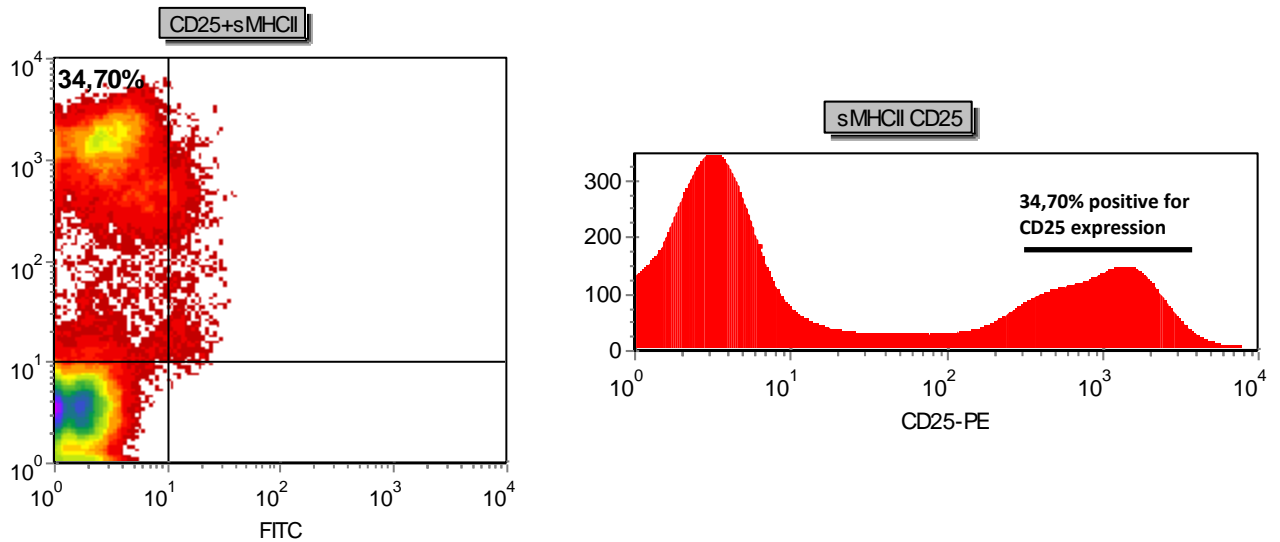
Τα αποτελέσματα της Κυτταρομετρίας Ροής έδειξαν πως όντως τα διαλυτά τάξης II μόρια είναι ικανά να επάγουν την έκφραση του μεμβρανικού υποδοχέα CD25. Η παρουσία των διαλυτών μορίων επέφερε αύξηση την επιφανειακή έκφραση του CD25 κατά 30% ( $p < 0,05$ ) σε σχέση με τα CD4+T-λεμφοκύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί απουσία των διαλυτών μορίων.

Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά, τα κοκκιογράμματα και τα ιστογράμματα των 2 ειδών κυττάρων, (Εικ. 3.6.1.1), που αποτυπώνουν την επιφανειακή παρουσία του CD25 (φθορισμός στο κόκκινο-PE) καθώς και τα μη σημασμένα κύτταρα (unstained cells) στα οποία βασιστήκαμε για να καθορίσουμε τον πληθυσμό που θα χρησιμοποιήσουμε για τις μετρήσεις του φθορισμού των κυττάρων. (Εικ. 3.6.1.2). Τέλος, τα ποσοστά της έκφρασης καθώς και η τυπική απόκλιση υπολογίστηκαν με βάση τα δεδομένα 4 πειραμάτων. (Εικ. 3.6.1.3).

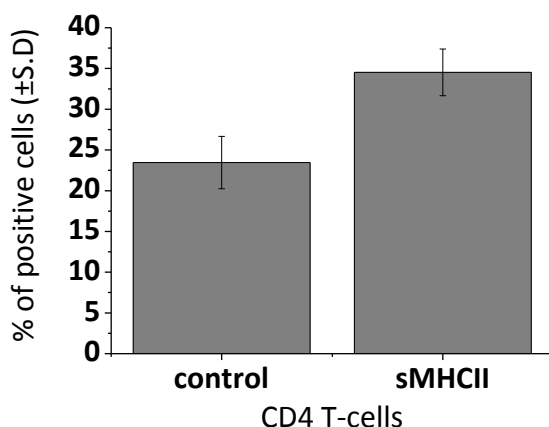


**Εικ. 3.6.1.1:** Διαγραμματική παρουσίαση (κοκκιογράμμα) των CD4+ T-λεμφοκυττάρων που δεν έχουν σημανθεί με το φθορίζον (PE) αντίσωμα anti-CD25 (unstained cells). Στον άξονα x απεικονίζεται ο φθορισμός στο πράσινο (FITC) και στον άξονα y απεικονίζεται ο φθορισμός στο κόκκινο (PE). Στο εσωτερικό διάγραμμα παρουσιάζεται ο συνολικός πληθυσμός ο οποίος μετρήσαμε με βάση το μέγεθος (FSC-H) και την κοκκιότητα (SSC-H). Ο πληθυσμός ο οποίος επελέχθηκε για τις μετρήσεις με βάση την ομοιογένεια του αλλά και και άλλους παράγοντες π.χ αποκλείστηκαν τα νεκρά κτλ απεικονίζεται με την gate 1. Με βάση αυτό το πληθυσμό, παρατηρούμε πως ένα μεγάλο ποσοστό των κυττάρων, 50,88%, φθορίζει ως προς το πράσινο (FITC) και κατ' επέκταση κινείται δεξιά κατά μήκος του x άξονα. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του προηγούμενου ανοσοφθορισμού που έχουν υποστεί τα κύτταρα για να διαχωριστούν κατά το Cell Sorting με το anti-CD4 FITC αντίσωμα. Η διαμερισματοποίηση πραγματοποιείται θεωρώντας πως κάτω από  $10^1$  τα κύτταρα δεν φθορίζουν.





**Εικ. 3.6.1.2:** Διαγραμματική παρουσίαση (κοκκιογράμματα και ιστογράμματα) των CD4+ T-λεμφοκυττάρων που έχουν επωαστεί παρουσία (sMHCII) και απουσία (control) των διαλυτών τάξης II MHC μορίων και ελέγχθηκαν για την έκφραση του επιφανειακού δείκτη CD25. Στο κοκκιογράμμα στον άξονα x απεικονίζεται ο φθορισμός στο πράσινο (FITC) και στον άξονα y απεικονίζεται ο φθορισμός στο κόκκινο (CD25-PE). Στο ιστογράμμα στον άξονα x απεικονίζεται ο φθορισμός στο κόκκινο (PE) και στον άξονα y απεικονίζεται ο αριθμός των κυττάρων (events). Οι μετρήσεις του φθορισμού πραγματοποιήθηκαν στον πληθυσμό που είχε επιλεγεί με βάση τα unstained κύτταρα (gate 1). Με βάση αυτό το πληθυσμό, παρατηρούμε πως φυσιολογικά τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα εκφράζουν σε ποσοστό 24,25% τον επιφανειακό δείκτη CD25 στο σύνολο του πληθυσμού. Η παρουσία όμως του διαλυτού αντιγόνου προκαλεί αύξηση της έκφρασης του επιφανειακού δείκτη στο συνολικό πληθυσμό (% αύξηση 30%, από 24,25% σε 34,70%). Η διαμερισματοποίηση πραγματοποιείται θεωρώντας πως κάτω από  $10^1$  τα κύτταρα δεν φθορίζουν.



**Εικ. 3.6.1.3:** Παρουσίαση του Μ.Ο και της τυπικής απόκλισης (S.D) 4 πειραμάτων των ποσοστών των θετικών στην έκφραση του CD25 κυττάρων παρουσία (sMHCII) και απουσία (control) των διαλυτών τάξης II MHC μορίων. Οι τιμές είναι 23,46% και 34,52 με τυπική απόκλιση 3,21 και 2,87 αντίστοιχα. ( $p < 0,05$ ).



### 3.6.2. Μελέτη της έκφρασης των μεμβρανικών υποδοχέων CD28/CTLA-4

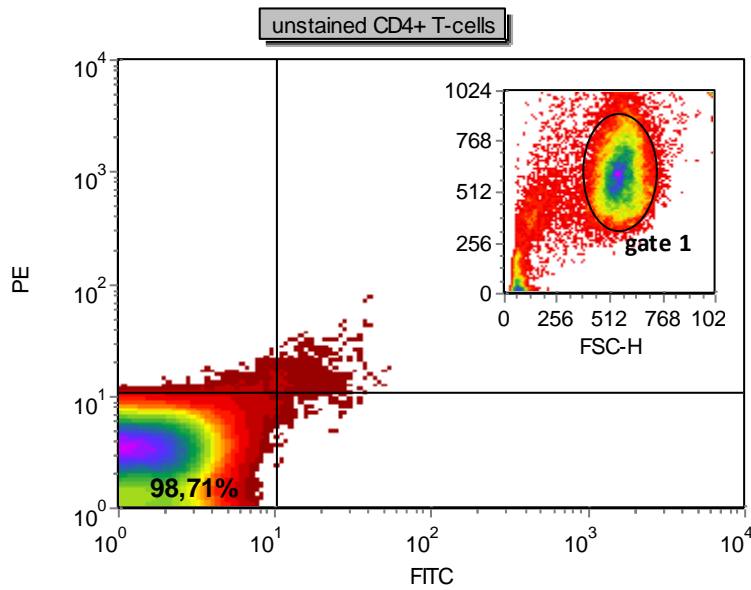
Για να ενισχύσουμε ακόμα περισσότερο την υπόθεση μας μελετήσαμε την έκφραση του συστήματος CD28/CTLA-4 επιφανειακών μαρτύρων καθώς αποτελεί το καλύτερα μελετημένο συνεργητικό μονοπάτι των T-λεμφοκυττάρων. Έτσι, το CD28 θεωρείται πως επάγει τη ανοσολογική απόκριση όταν εκφράζεται στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα, ενώ αντίθετα η έκφραση του CTLA-4 θεωρείται κρίσιμη στην αρνητική ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης.

Αφού τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια, τα οποία απομονώθηκαν από ανοχοποιημένα με HSA ποντίκια, αποδείχθηκε πως είναι φορτωμένα με αντιγονικά πεπτίδια HSA, ελέγξαμε εάν αυτά ήταν ικανά να αλλάξουν τη πορεία της ενεργοποίησης των CD4+ T-λεμφοκυττάρων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μιας αντιγονοειδικής ανοσολογικής απόκρισης.

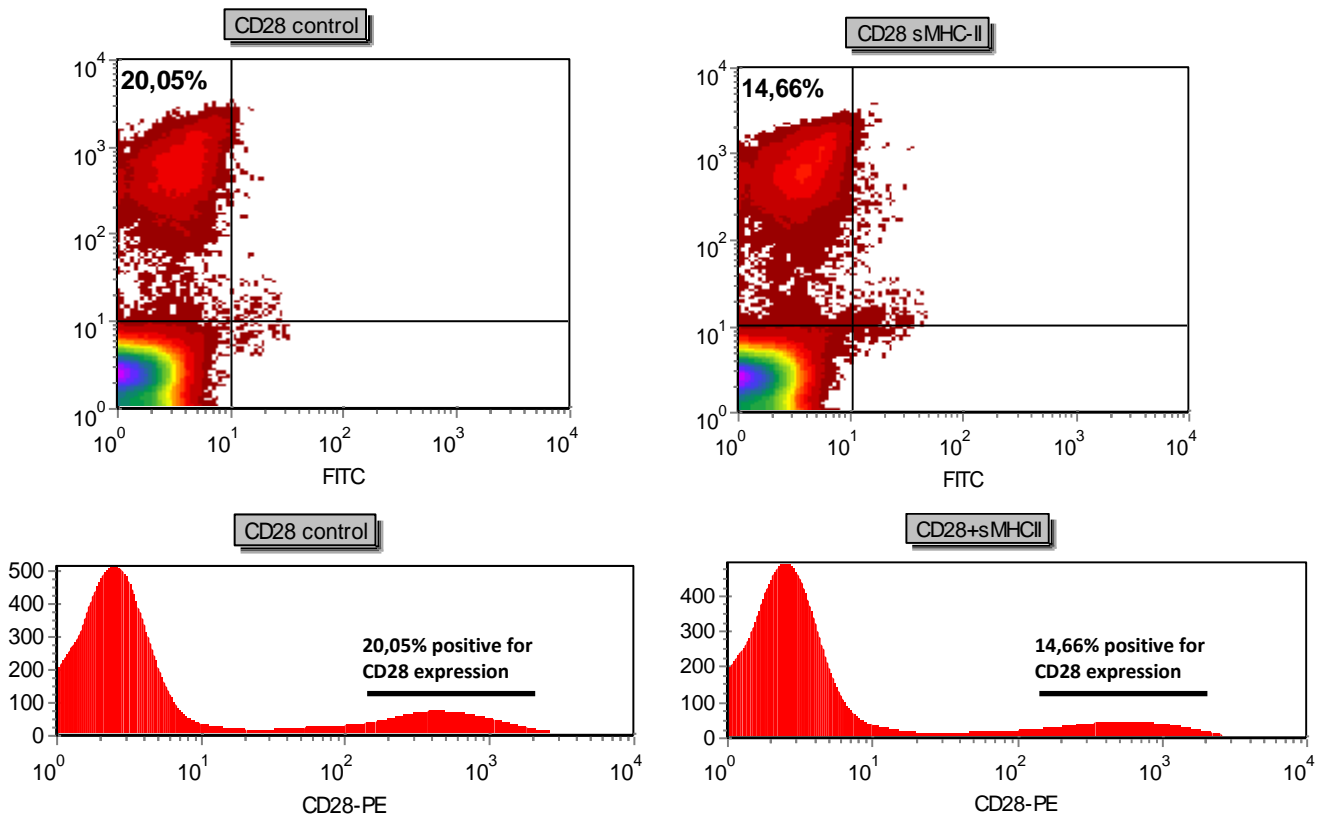
Αρχικά, τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα (απομόνωση όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.5) καλλιεργήθηκαν μαζί με μακροφάγα, τα οποία προήλθαν από σπληνοκύτταρα που δεν είχαν υποστεί κάποια ενεργοποίηση *in vivo* αλλά επώαστηκαν *in vitro* με HSA ώστε να επάγουν ανοσολογική απόκριση η οποία θα μεταφερθεί στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα. Η συγκαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε παρουσία και απουσία των διαλυτών τάξης II MHC μορίων (30ng/ml καλλιέργειας) για 48 ώρες. Τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα στη συνέχεια ελέγχθηκαν μέσω εξωτερικού ανοσοφθορισμού για την έκφραση των επιφανειακών δεικτών CD28 και CTLA-4. Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν έφεραν κόκκινη φθορίζουσα ουσία, PE-labeled mouse anti-CD28 και PE-labeled mouse anti-CD152 αντίστοιχα, και η μέτρηση της έκφρασης πραγματοποιήθηκε με Κυτταρομετρία Ροής (FACS). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν CD4+ T-λεμφοκύτταρα τα οποία δεν είχαν σημανθεί για τους μεμβρανικούς υποδοχείς CD28 και CTLA-4.

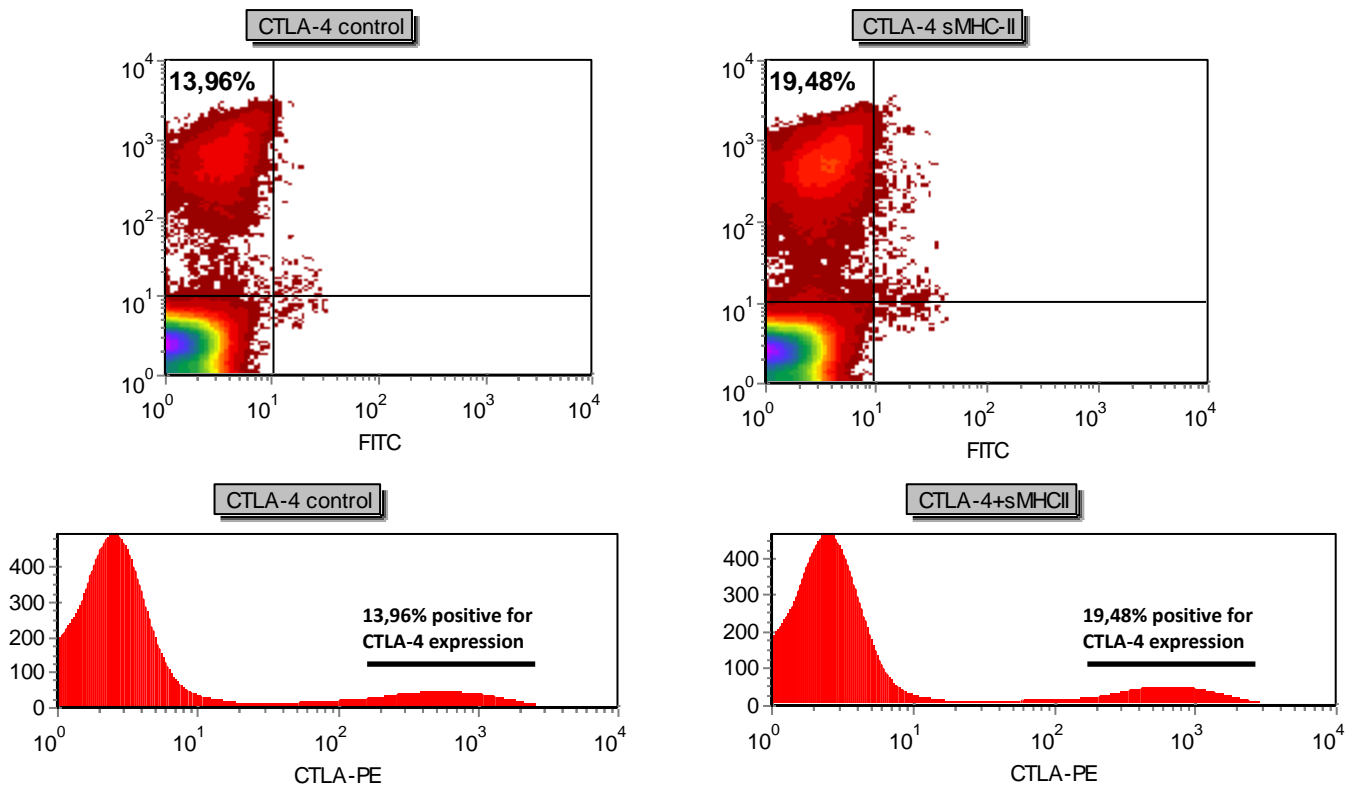
Τα αποτελέσματα της Κυτταρομετρία Ροής έδειξαν αύξηση της έκφρασης του μεμβρανικού υποδοχέα CTLA-4 κατά 40% ( $p < 0,05$ ) με ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης του CD28 κατά 27% ( $p < 0,05$ ) στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα που είχαν επωαστεί με διαλυτά μόρια επιβεβαιώνοντας την κατασταλτική τους ικανότητα.

Στην Εικ. 3.6.2.1, παρουσιάζονται ενδεικτικά, τα κοκκιογράμματα και τα ιστογράμματα των 2 ειδών κυττάρων, που αποτυπώνουν την επιφανειακή παρουσία του CD28 και του CTLA-4 (φθορισμός στο κόκκινο-PE) καθώς και τα μη σημασμένα κύτταρα (unstained cells) στα οποία βασιστήκαμε για να καθορίσουμε τον πληθυσμό που θα χρησιμοποιήσουμε για τις μετρήσεις του φθορισμού των κυττάρων. (Εικ. 3.6.2.2). Τα ποσοστά της έκφρασης καθώς και η τυπική απόκλιση υπολογίστηκαν με βάση τα δεδομένα 4 πειραμάτων. (Εικ. 3.6.2.3).

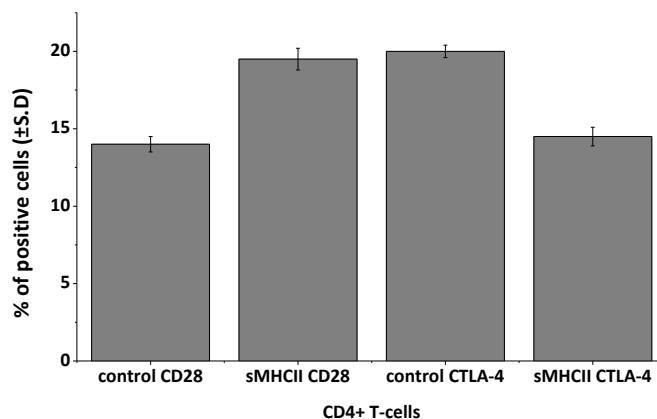


**Εικ. 3.6.2.1:** Διαγραμματική παρουσίαση (κοκκιογράμμα) των CD4+ T-λεμφοκυττάρων που δεν έχουν σημανθεί με το φθορίζον (PE) αντίσωμα anti-CD25 (unstained cells). Στον άξονα x απεικονίζεται ο φθορισμός στο πράσινο (FITC) και στον άξονα y απεικονίζεται ο φθορισμός στο κόκκινο (PE). Στο εσωτερικό διάγραμμα παρουσιάζεται ο συνολικός πληθυσμός ο οποίος μετρήσαμε με βάση το μέγεθος (FSC-H) και την κοκκιότητα (SSC-H). Ο πληθυσμός ο οποίος επελέχθηκε για τις μετρήσεις με βάση την ομοιογένεια του αλλά και και άλλους παράγοντες π.χ αποκλείστηκαν τα νεκρά κτλ απεικονίζεται με την gate 1. Η διαμερισματοποίηση πραγματοποιείται θεωρώντας πως κάτω από 10<sup>1</sup> τα κύτταρα δεν φθορίζουν.





**Εικ. 3.6.2.2:** Διαγραμματική παρουσίαση (κοκκιογράμματα και ιστογράμματα) των CD4+ T-λεμφοκυττάρων που έχουν συνκαλλιερηθεί μαζί με μακροφάγα, τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί μετά από επαφή με HSA, και επωαστεί παρουσία (sMHCII) και απουσία (control) των διαλυτών τάξης II MHC μορίων και ελέγχθηκαν για την έκφραση των επιφανειακών δεικτών CD28 και CTLA-4. Στο κοκκιογράμμα στον άξονα x απεικονίζεται ο φθορισμός στο πράσινο (FITC) και στον άξονα y απεικονίζεται ο φθορισμός στο κόκκινο (CD28-PE και CTLA-4-PE). Στο ιστογράμμα στον άξονα x απεικονίζεται ο φθορισμός στο κόκκινο (PE) και στον άξονα y απεικονίζεται ο αριθμός των κυττάρων (events). Οι μετρήσεις του φθορισμού πραγματοποιήθηκαν στον πληθυσμό που είχε επιλεγεί με βάση τα unstained κύτταρα (gate 1). Με βάση αυτό το πληθυσμό, παρατηρούμε πως φυσιολογικά τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα εκφράζουν σε ποσοστό 20,05% τον επιφανειακό δείκτη CD28 και τον CTLA-4 13,96% αντίστοιχα στο σύνολο του πληθυσμού. Η παρουσία όμως του διαλυτού αντιγόνου προκαλεί αύξηση της έκφρασης του επιφανειακού δείκτη CTLA-4 στο συνολικό πληθυσμό (% αύξηση 33%, από 13,96% σε 19,48%) ενώ αντίθετα ο CD28 παρουσιάζει μείωση κατά 28% (από 20,05% σε 14,66%). Η διαμερισματοποίηση πραγματοποιείται θεωρώντας πως κάτω από  $10^1$  τα κύτταρα δεν φθορίζουν.

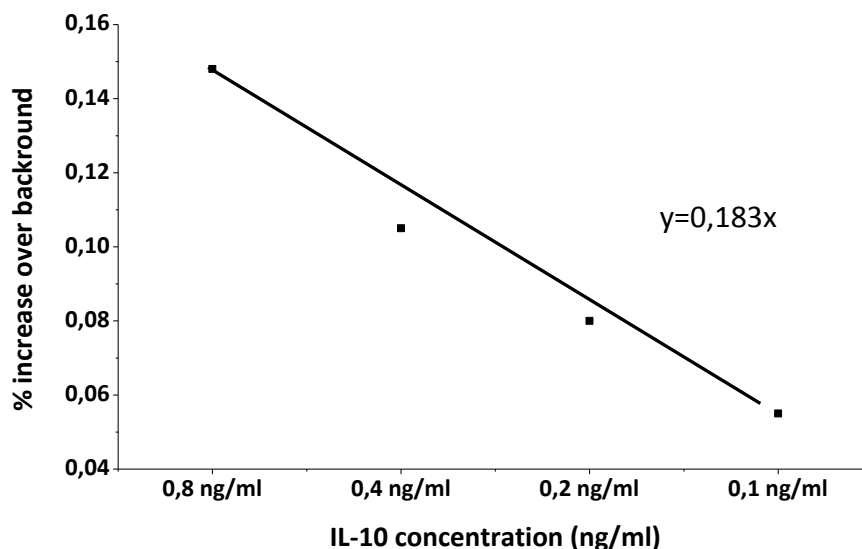


**Εικ. 3.6.2.3:** Παρουσίαση του Μ.Ο και της τυπικής απόκλισης (S.D) 4 πειραμάτων των ποσοστών των θετικών στην έκφραση του CD28 και του CTLA-4 κυττάρων παρουσία (sMHCII) και απουσία (control) των διαλυτών τάξης II MHC μορίων. ( $p < 0,05$ ).

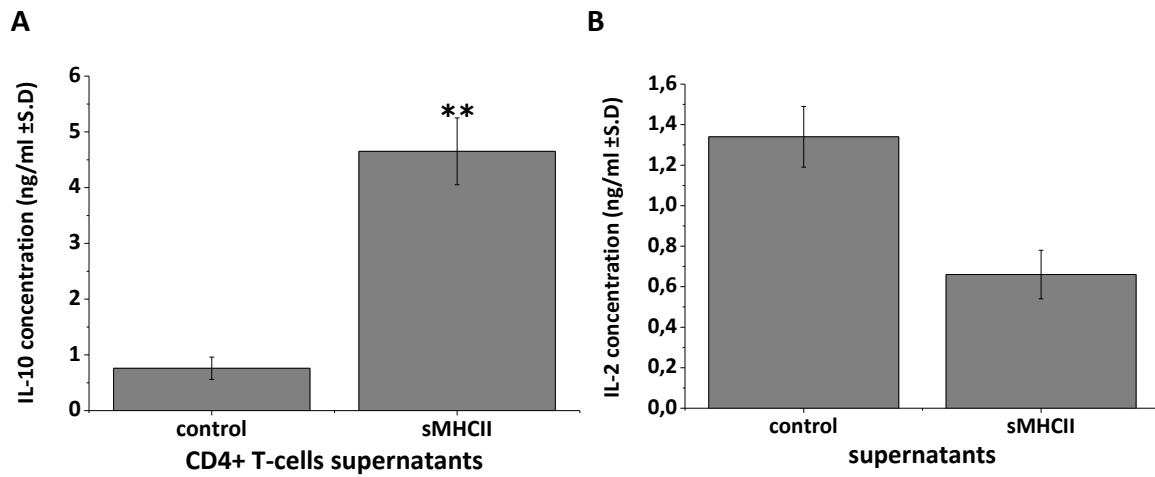
### 3.6.3. Μελέτη της έκκρισης κυτοκινών

Σε παράλληλα πειράματα ελέγχθηκε η συγκέντρωση των ιντερλευκινών 2 και 10 καθώς η παραγωγή και η έκκριση τους αποτελούν δείκτες της αντίδρασης του CD4+ T-λεμφοκυττάρου. Η IL-2 συνδέεται με την επαγωγή της ανοσολογικής απόκρισης ενώ η IL-10 με την καταστολή αυτής. Η μελέτη των ιντερλευκινών θα μας παρέχει περισσότερες πληροφορίες για την δράση των διαλυτών τάξης II μορίων καθώς η αλλαγή στην συγκέντρωσή τους θα αποδείξει πως τα διαλυτά μόρια εκτός από την επαγωγή της έκφρασης μεμβρανικών δεικτών με κατασταλτικό ρόλο είναι ικανά να επηρεάσουν και την σηματοδότηση ενδοκυττατικών μονοπατιών που απαιτούνται για την παραγωγή ή μη των διαφόρων ιντερλευκινών. Τα υπερκείμενα των καλλιεργειών που περιγράφηκαν στην παράγραφο 3.6.3 απομονώθηκαν και ελέγχθηκαν μέσω πειραμάτων ELISA για την συγκέντρωση των 2 ιντερλευκινών. Για τον καθορισμό των συγκεντρώσεων χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες καμπύλες διαβάθμισης συγκέντρωσης. Τα 2 μονοκλωνικά αντισώματα (mouse anti-IL-10, mouse anti-IL-2) χρησιμοποιήθηκαν στην συγκέντρωση των 0,1μg/ml. (Εικ. 3.6.1).

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως στα υπερκείμενα των καλλιεργειών όπου ήταν παρόντα τα διαλυτά τάξης II μόρια η ιντερλευκίνη 10 (IL-10) αυξήθηκε 6 φορές σε σχέση με τα υπερκείμενα ελέγχου ( $p < 0,01$ ) ενώ αντίθετα η ιντερλευκίνη 2 (IL-2) μειώθηκε κατά 50% ( $p < 0,05$ ). (Εικ. 3.6.3.2<sup>A,B</sup>). Αυτό επιβεβαιώνει το γεγονός πως τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια μπορούν να επάγουν την παραγωγή εκτός από επιφανειακών δεικτών και κατασταλτικών μεσολαβητών (mediators).



**Εικ. 3.6.3.1:** Πρότυπη καμπύλη ( $y=0,183x$ ) για την συγκέντρωση της ιντερλευκίνης 10 (IL-10) με βάση την απορρόφηση (OD-450nm) των διαδοχικών συγκεντρώσεων. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλυτή των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου.



**Εικ. 3.6.3.2:** Συγκέντρωση των ιντερλευκινών 10 (A) και 2 (B) στα υπερκείμενα καλλιεργείων CD4+ T-λεμφοκυττάρων που έχουν επωαστεί με μακροφάγα ενεργοποιημένα με HSA παρουσία ή απουσία διαλυτών μορίων ταξης II MHC μορίων. Ο άξονας γ παρουσιάζει την συγκέντρωση των ιντερλευκινών (IL-10, IL-2) με βάση τις πρότυπες καμπύλες των διαδοχικών συγκεντρώσεων. Παρατηρούμε 6 φορές αύξηση της συγκέντρωσης της IL-10 παρουσία των διαλυτών μορίων ενώ ταυτόχρονα μείωση της IL-2 κατά 50%. (\*\*  $p < 0,01$ ). Η τυπική απόκλιση (S.D) προκύπτει από τα αποτελέσματα 4 πειραμάτων.

### 3.7. Μελέτη σηματοδοτικών μονοπατιών των CD4+ T-λεμφοκυττάρων

Έχοντας αξιόπιστα αποτελέσματα για την ανοσοκατασταλτική δράση των διαλυτών τάξης II MHC μορίων αποφασίσαμε να μελετήσουμε τους μηχανισμούς που εμπλέκονται σε αυτή. Έτσι, μελέτησαμε τα γεγονότα τα οποία λαμβάνουν χώρα μετά την αλληλεπίδραση του υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων (TCR) με τα διαλυτά μόρια. Αυτό περιελάμβανε τις φωσφορυλίσεις των κινασών Lck, ZAP-70 και LAT, οι οποίες αποτελούν τα πρώτα στάδια ενεργοποίησης μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα.

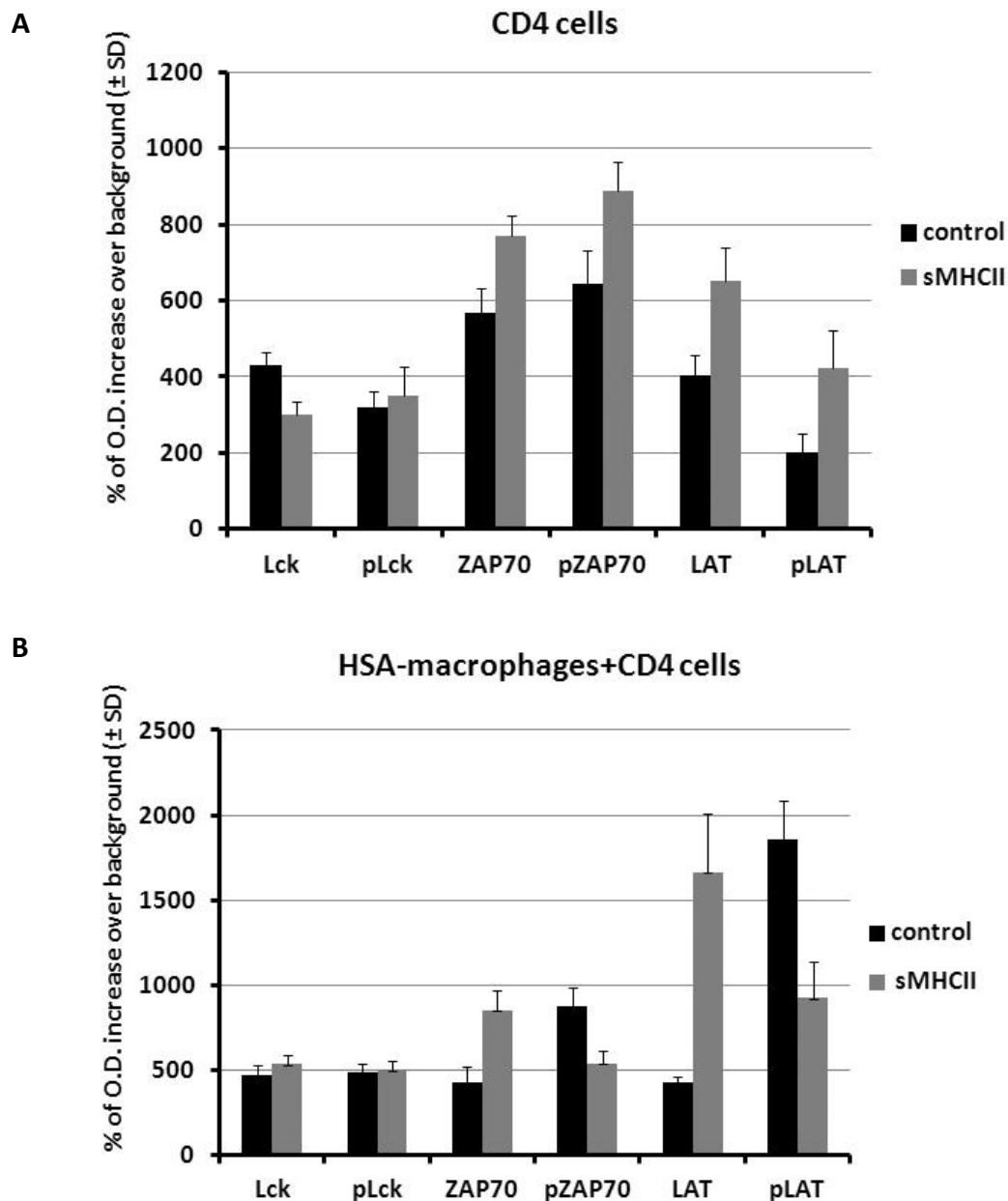
Τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα (απομόνωση όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.5) επώαστηκαν παρουσία ή μη των διαλυτών τάξης II MHC μορίων. Επιπλέον, τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα συνκαλλιιεργήθηκαν με μακροφάγα, τα οποία προήλθαν από σπληνοκύτταρα τα οποία δεν είχαν υποστεί κάποια ενεργοποίηση *in vivo* αλλά επώαστηκαν *in vitro* με HSA, για 24h, ώστε να επάγουν ανοσολογική απόκριση η οποία θα μεταφερθεί στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα, παρουσία ή μη των διαλυτών μορίων. Οι 4 αυτοί πληθυσμοί μετά από 24h επώασης με τα διαλυτά μόρια συλλέχθηκαν και μετά την διαδικασία επεξεργασίας ως whole cell extracts ελέγχθηκαν με πειράματα ELISA ως προς την φωσφορυλίωση των κινασών Lck, ZAP-70 και LAT. Τα διαλυτά μόρια προστέθηκαν σε συγκέντρωση 30ng/ml. Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν αφορούσαν τόσο τη φωσφορυλιωμένη όσο και τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή των κινασών (mouse anti-ZAP-70, mouse anti-phospho-ZAP-70 (Tyr319)/Syk (Tyr352), mouse anti-LAT, mouse anti-phospho-LAT (Tyr191), mouse anti-Lck, mouse anti-phospho Lck (Tyr505). Χρησιμοποιήθηκαν όλα στην συγκέντρωση των 0,1μg/ml.

Η συλλογή των κυττάρων στην συγκεκριμένη χρονική στιγμή επελέχθηκε ως η βέλτιστη για την ολοκλήρωση των πρώτων σταδίων της σηματοδότησης μετά την πρόσδεση των διαλυτών μορίων στον TCR.

Στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο ελέγχου τα ανώριμα CD4+ T-λεμφοκύτταρα δεν έδειξαν κάποια σημαντική διαφοροποίηση στην έκφρασή τους όσον αφορά τις φωσφορυλιωμένες ή μη μορφές των πρωτεϊνών Lck και ZAP-70 ενώ η μειωμένη έκφραση της φωσφορυλιωμένης μορφής της LAT σε σχέση με την μη φωσφορυλιωμένη, αποδεικνύει την απουσία ενεργοποίησης των κυττάρων. Η παρουσία των διαλυτών μορίων, αν και παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση των ZAP-70 και LAT καθώς και των φωσφορυλιωμένων τους μορφών, όμως μη στατιστικά σημαντική, δεν άλλαξε γενικά τα πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών. (Εικ. 3.7.1<sup>A</sup>).

Αντίθετα, όταν τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα συνκαλλιιεργήθηκαν με τα ενεργοποιημένα με HSA μακροφάγα παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση της φωσφορυλιωμένης μορφής των ZAP-70 και LAT, κάτι που υποδεικνύει μία κατάσταση ενεργοποίησης των CD4+ T-λεμφοκυττάρων. Σε αυτή την περίπτωση, η παρουσία των διαλυτών μορίων εμπόδισε την φωσφορυλίωση των ZAP-70 και LAT καθώς παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική μείωση της μορφής αυτής. Όσον αφορά την Lck, γενικά δεν υπήρξαν αξιοσημείωτες αλλαγές στην έκφρασή της στις παραπάνω συνθήκες. Πιθανά αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ενεργοποίησή της πραγματοποιείται νωρίτερα από τον χρόνο που εμείς συλλέξαμε τα κύτταρα. (Εικ. 3.7.1<sup>B</sup>).

Αυτά τα αποτελέσματα μας δείχνουν έναν μηχανισμό δράσης των διαλυτών τάξης II MHC μορίων που μπορεί να εξηγήσει την επαγωγή των κατασταλτικών σημάτων μεμβρανικών και διαλυτών καθώς φαίνεται πως τα διαλυτά μόρια μπορούν να εμποδίσουν νωρίς το μονοπάτι σηματοδότησης των CD4+ T-λεμφοκυττάρων που θα οδηγούσε σε ενεργοποίηση, αφού εμπόδισαν την ενεργοποίηση της ZAP-70.



**Εικ. 3.7.1.:** Η επίδραση των διαλυτών τάξης II MHC μορίων στα πρώτα στάδια της ενεργοποίησης των CD4+ T-λεμφοκυττάρων. Τα cell extracts προήλθαν από CD4+ T-λεμφοκύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί απουσία (A)/ παρουσία (B) ενεργοποιημένων με HSA μακροφάγων, με ή χωρίς διαλυτά μόρια. Ο έλεγχος των φωσφορυλιωμένων ή μη πρωτεϊνών έγινε με τεχνικές ELISA. Ο άξονας γ παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλυτή των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου. Η τυπική απόκλιση (S.D) προκύπτει από τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.

### 3.8. Οι ρυθμιστικοί δείκτες σε διαφορετικά πρωτόκολλα ανοχοποίησης

Έχοντας μελετήσει την επίδραση των διαλυτών τάξης II σε βασικούς επιφανειακούς ρυθμιστικούς δείκτες των πληθυσμών CD4+ T-λεμφοκυττάρων, αποφασίσαμε να συγκρίνουμε αυτήν την επίδραση με την φυσιολογική έκφραση των επιφανειακών μαρτύρων CD28, CTLA-4 και CD25 κατά την *in vivo* ανοχοποίηση ποντικών χρησιμοποιώντας πρωτόκολλα ανοχοποίησης 6, 14 και 30 ημερών. Σκοπός των διαφορετικών πρωτοκόλλων ήταν να διευρενήσουμε το αν διαφοροποιείται η έκφραση των επιφανειακών παραγόντων, που καθορίζουν και την δράση του συγκεκριμένου κυττάρου κατά την σταδιακή ανοχοποίηση του οργανισμού.

Η ανοχοποίηση των αρσενικών Balb/c ποντικών πραγματοποιήθηκε πάλι με την HSA πρωτεΐνη σε συγκέντρωση 100μg/ποντίκι. Στα πρωτόκολλα των 14 και 30 ημερών τα ζώα έλαβαν μία επαναληπτική δόση HSA στις 7 και 15 ημέρες αντίστοιχα. Στην επιλεγμένη ημέρα συλλέγονταν τα σπληνοκύτταρα. Στην συνέχεια υποβάλλονταν σε εξωτερικό ανοσοφθορισμό για τον CD4 επιφανειακό δείκτη και FACS Sorting όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.5. Αφού τα απομονωμένα CD4+ T-λεμφοκύτταρα επώάζονταν για 24h, υπόκειντο εκ νέου σε εξωτερικό ανοσοφθορισμό για τους μεμβρανικούς υποδοχείς CD28, CTLA-4 και CD25. Ο έλεγχος της έκφρασης πραγματοποιήθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής (FACS). Ως πληθυσμός ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν CD4+ T-λεμφοκύτταρα από ποντίκι ελέγχου (control).

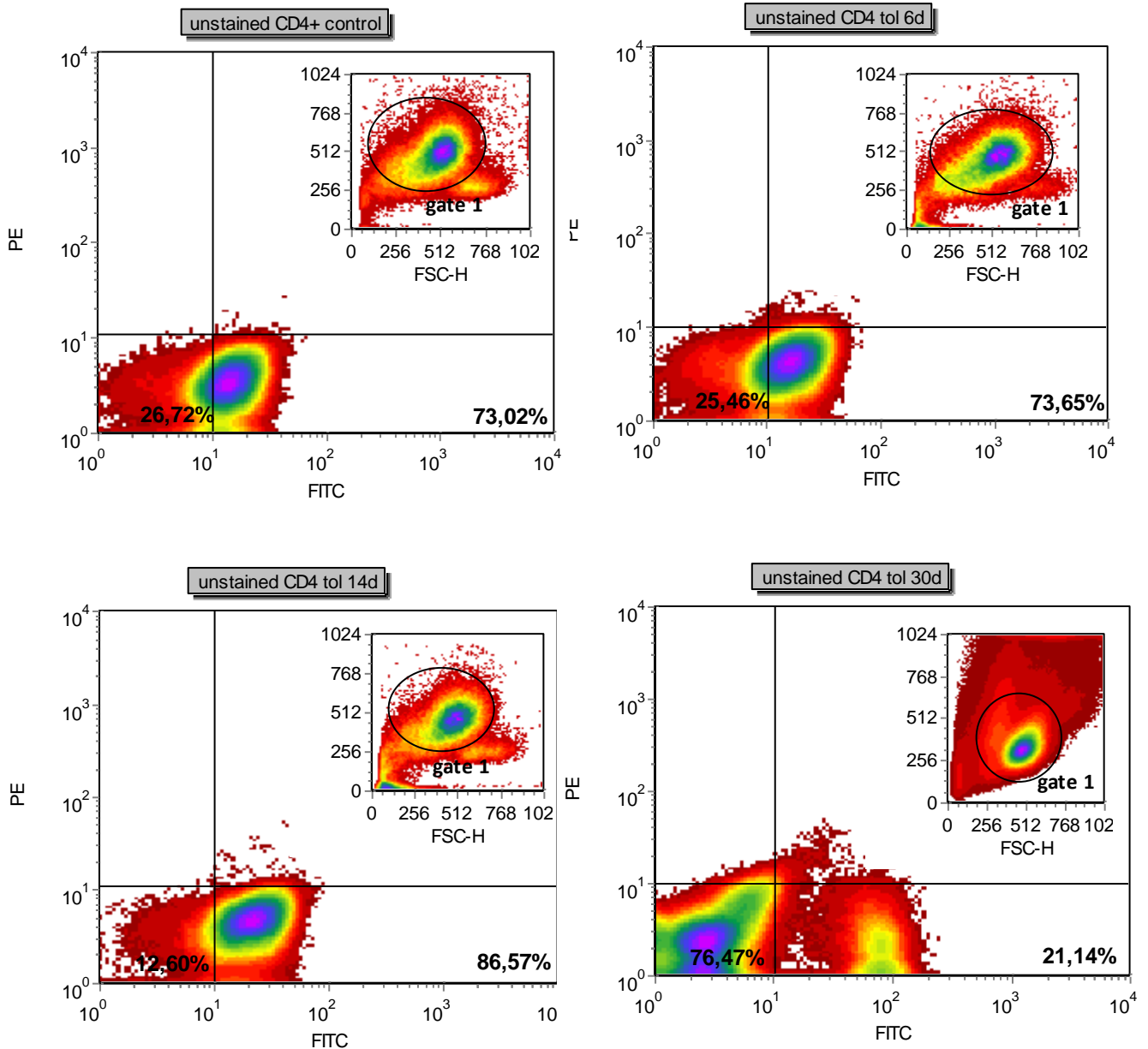
Η έκφραση των επιφανειακών δεικτών CD28, CTLA-4 και CD25 στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα ελέγχου ήταν αναμενόμενη και σε ποσοστό, 87%, 11,2% και 6,64% αντίστοιχα. Το CD28 εκφράζεται φυσιολογικά στο 90% περίπου των CD4+ T-λεμφοκυττάρων ενώ στα υπόλοιπα εκφράζεται το CTLA-4. Το CD25 εκφράζεται στο ποσοστό εκείνο των κυττάρων που μπορούν να χαρακτηριστούν ως ρυθμιστικά. Επιπλέον, κατά την ανοχοποίηση των 6 ημερών παρατηρούμε πως δεν υπάρχει αξιοσημείωτη διαφορά στην επιφανειακή έκφραση με το CD28 να εκφράζεται στο 82,03%, το CTLA-4 στο 9,4% και το CD25 στο 6,5% των CD4+ T-λεμφοκυττάρων.

Αντίθετα, στην ανοχοποίηση των 14 και 30 ημερών παρατηρούμε μείωση των CD28, με ταυτόχρονη αύξηση των CTLA-4 ενώ μικρή αύξηση παρουσιάζει η έκφραση του CD25. Έτσι, κατά την ανοχοποίηση των 14 ημερών παρατηρούμε μείωση του CD28 23% ενώ στις 30 ημέρες παρατηρούμε μείωση 54% σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Αντίστοιχα, παρατηρούμε αύξηση σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου της έκφρασης του CTLA-4 κατά 60% στις 14 μέρες και 100% στις 30 ημέρες. Τέλος, το CD25 εμφανίζει 25% αύξηση στις 14 ημέρες και 90% στις 30 ημέρες ( $p < 0,05$ ). Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν πως κατά την ανοχοποίηση ενός οργανισμού οι κυτταρικές αποκρίσεις που οδηγούν σε επιφανειακή έκφραση ρυθμιστικών/κατασταλτικών παραγόντων είναι σχετικά αργές και πιθανά στα αρχικά στάδια να εμπλέκονται διαλυτοί παράγοντες όπως τα διαλυτά MHC μόρια, κυτοκίνες με κατασταλτικό ρόλο κ.α

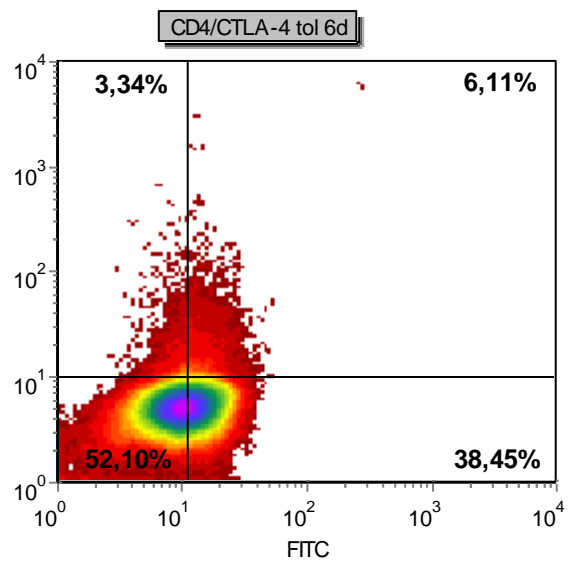
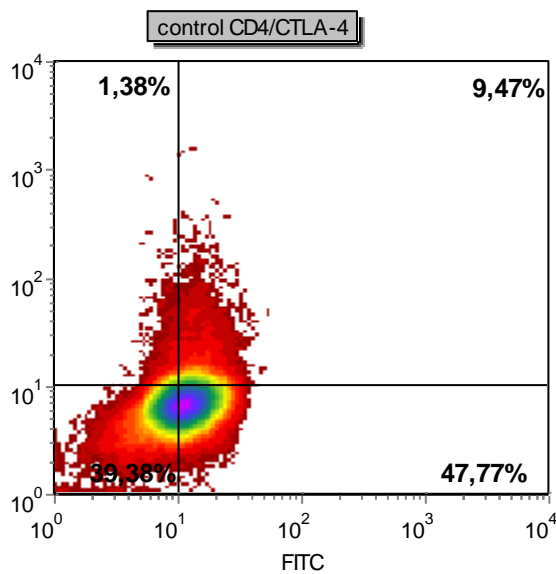
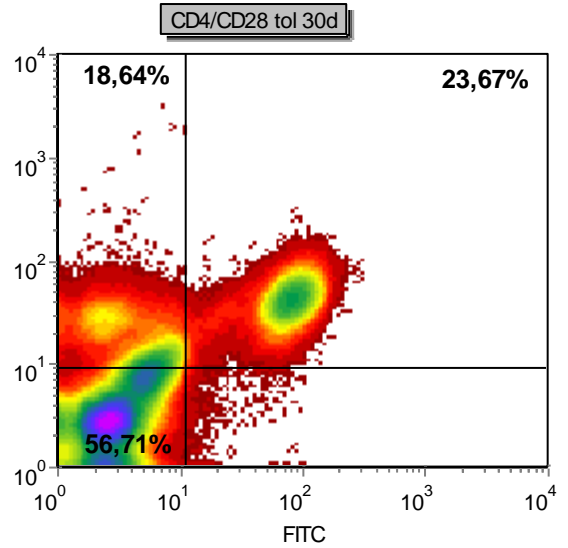
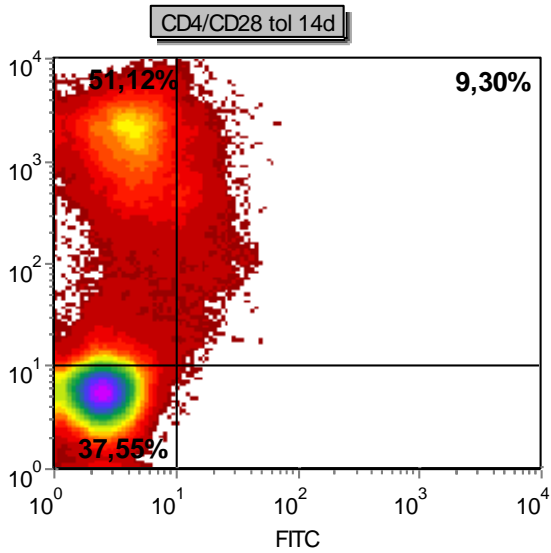
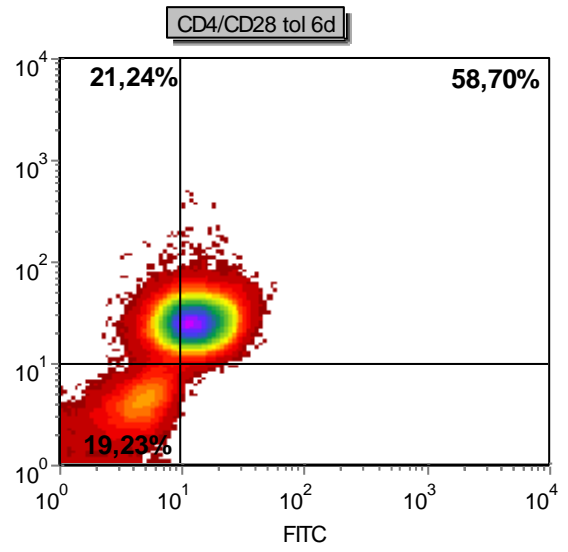
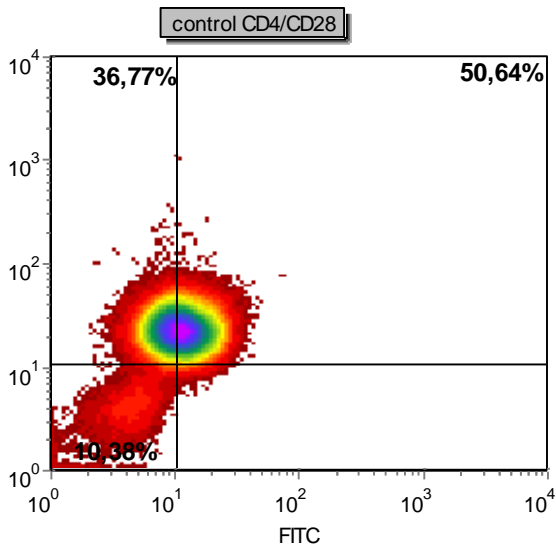
Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά, τα κοκκιογράμματα και τα ιστογράμματα των 4 ειδών κυττάρων, που αποτυπώνουν την επιφανειακή παρουσία των CD28 και CTLA-4, (Εικ. 3.8.2) και του CD25, (Εικ. 3.8.3), (σε όλα ο φθορισμός είναι στο κόκκινο-PE). Στην αρχή παρουσιάζονται τα μη σημασμένα κύτταρα (unstained cells) σε κάθε είδος κυττάρων στα οποία βασιστήκαμε για να καθορίσουμε τον πληθυσμό που θα

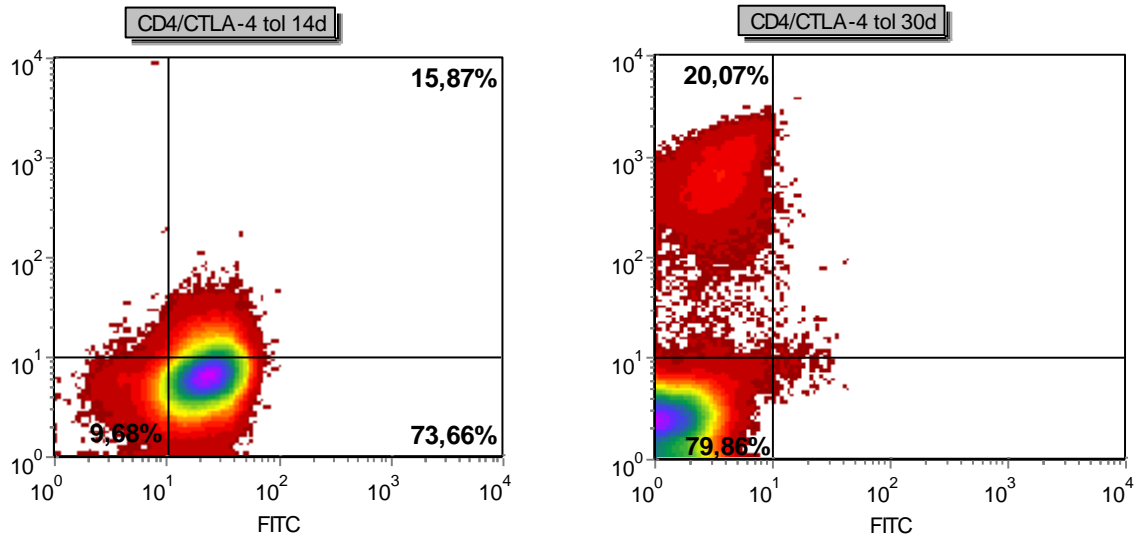


χρησιμοποιήσουμε για τις μετρήσεις του φθορισμού των κυττάρων. (Εικ. 3.8.1). Ο φθορισμός που εμφανίζεται στο πράσινο (FITC) οφείλεται στον ανοσοφθορισμό για το CD4. Τέλος, τα ποσοστά της έκφρασης καθώς και η τυπική απόκλιση υπολογίστηκαν με βάση τα δεδομένα 3 πειραμάτων. (Εικ. 3.8.4).

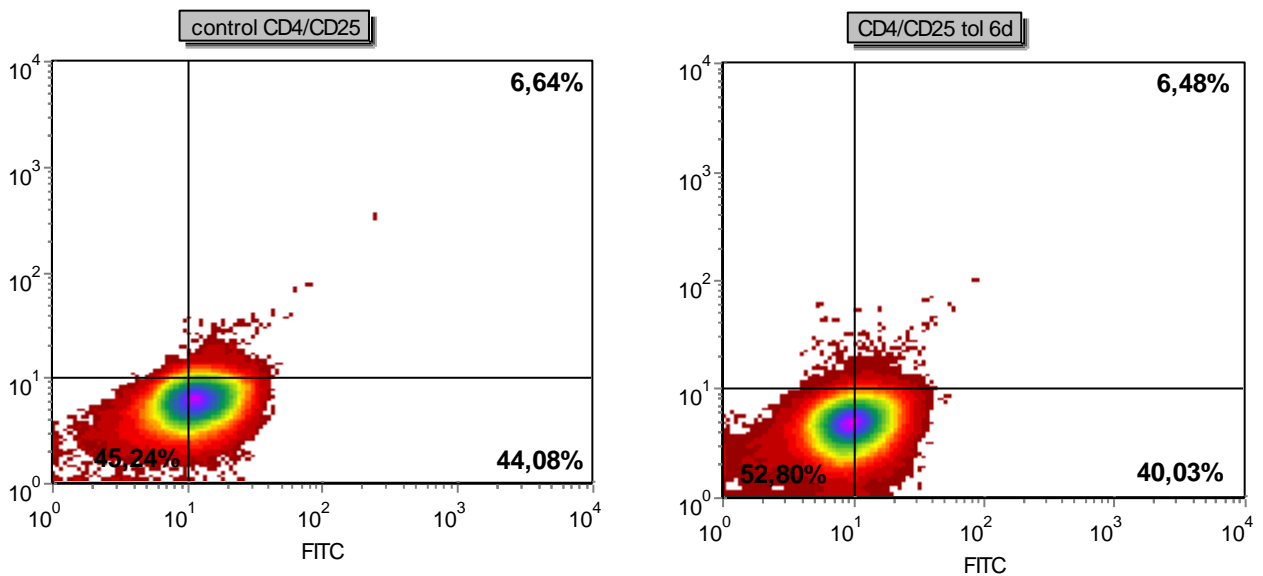


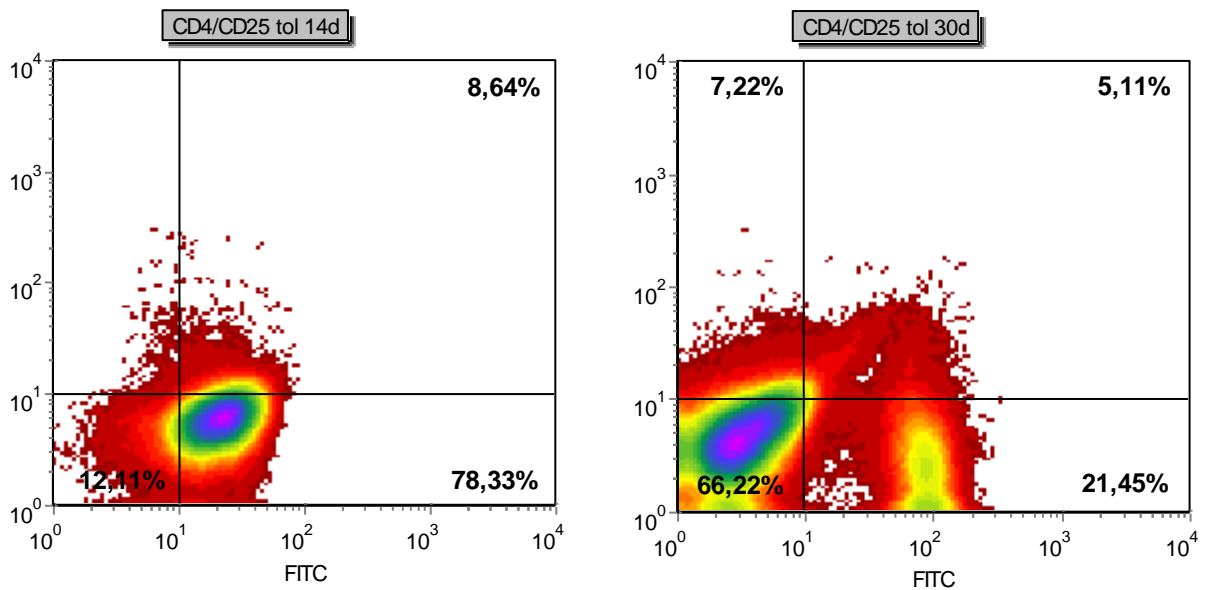
**Εικ. 3.8.1:** Διαγραμματική παρουσίαση (κοκκιόγραμμα) των 4 ειδών (κύτταρα ελέγχου-control, ανοχοποιημένα με HSA με πρωτόκολλο 6 ημερών-6d, 14 ημερών-14d και 30 ημερών-30d) CD4+ T-λεμφοκυττάρων που δεν έχουν σημανθεί με το φθορίζον (PE) αντίσωμα anti-CD25 (unstained cells). Στον άξονα x απεικονίζεται ο φθορισμός στο πράσινο (FITC) και στον άξονα γ απεικονίζεται ο φθορισμός στο κόκκινο (PE). Στο εσωτερικό διάγραμμα παρουσιάζεται ο συνολικός πληθυσμός ο οποίος μετρήσαμε με βάση το μέγεθος (FSC-H) και την κοκκιότητα (SSC-H). Ο πληθυσμός ο οποίος επελέχθηκε για τις μετρήσεις με βάση την ομοιογένεια του αλλά και άλλους παράγοντες π.χ αποκλείστηκαν τα νεκρά κτλ απεικονίζεται με την gate 1. Η διαμερισματοποίηση πραγματοποιείται θεωρώντας πως κάτω από  $10^1$  τα κύτταρα δεν φθορίζουν.



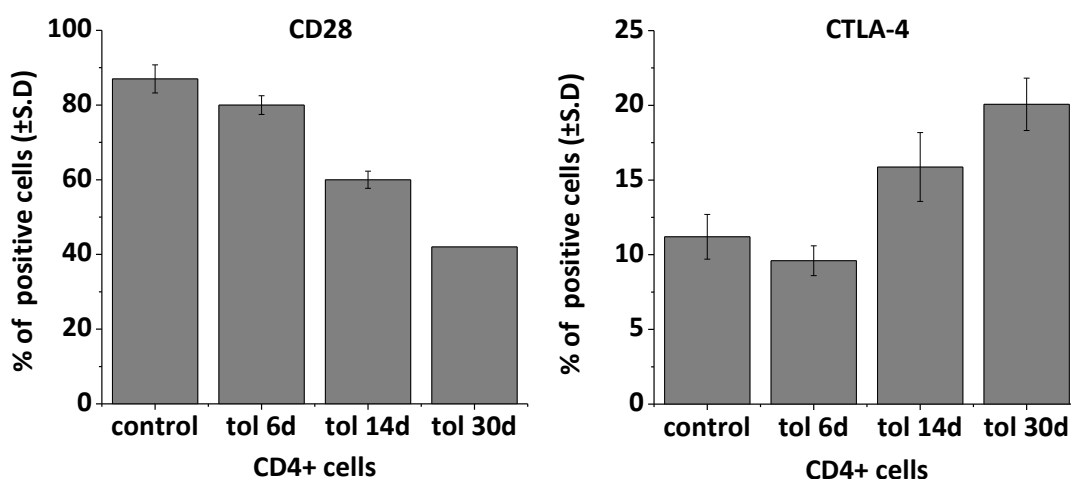


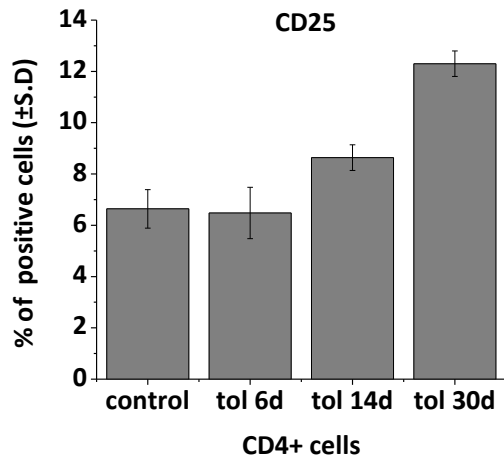
**Εικ. 3.8.2:** Διαγραμματική παρουσίαση (κοκκιογράμματα) των 4 ειδών CD4+ T-λεμφοκυττάρων τα οποία ελέγχθηκαν για την έκφραση των επιφανειακών δεικτών CD28 και CTLA-4. Στον άξονα x απεικονίζεται ο φθορισμός στο πράσινο (FITC) και στον άξονα y απεικονίζεται ο φθορισμός στο κόκκινο (CD28-PE και CTLA-4-PE). Οι μετρήσεις του φθορισμού πραγματοποιήθηκαν στον πληθυσμό που είχε επιλεγεί με βάση τα unstained κύτταρα (gate 1). Με βάση αυτό το πληθυσμό, παρατηρούμε πως φυσιολογικά τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα εκφράζουν σε ποσοστό 87% τον επιφανειακό δείκτη CD28 και τον CTLA-4 10% αντίστοιχα στο σύνολο του πληθυσμού. Παρατηρούμε πως όσο αυξάνονται οι ημέρες ανοχοποίησης μειώνεται η έκφραση του CD28 ενώ αυξάνεται του CTLA-4, δείχνοντας την επαγωγή της καταστολής μέσω κυττάρων. Η διαμερισματοποίηση πραγματοποιείται θεωρώντας πως κάτω από  $10^1$  τα κύτταρα δεν φθορίζουν.





**Εικ. 3.8.3:** Διαγραμματική παρουσίαση (κοκκιογράμματα) των 4 ειδών CD4+ Τ-λεμφοκυττάρων τα οποία ελέγχθηκαν για την έκφραση του επιφανειακού δείκτη CD25. Στον άξονα x απεικονίζεται ο φθορισμός στο πράσινο (FITC) και στον άξονα γ απεικονίζεται ο φθορισμός στο κόκκινο (CD25-PE). Οι μετρήσεις του φθορισμού πραγματοποιήθηκαν στον πληθυσμό που είχε επιλεγεί με βάση τα unstained κύτταρα (gate 1). Με βάση αυτό το πληθυσμό, παρατηρούμε πως φυσιολογικά τα CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα εκφράζουν σε ποσοστό 6,64% τον επιφανειακό δείκτη CD25 ενώ όσο αυξάνονται οι ημέρες ανοχοποίησης αυξάνεται και η έκφραση του δείχνοντας την επαγωγή των ρυθμιστικών κυττάρων. Η διαμερισματοποίηση πραγματοποιείται θεωρώντας πως κάτω από  $10^1$  τα κύτταρα δεν φθορίζουν.





**Εικ. 3.8.4:** Τα ποσοστά έκφρασης των CD28, CTLA-4 και CD25 στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα σε κύτταρα ελέγχου (control) και στα πρωτόκολλα ανοχοποίησης με HSA 6 ημερών-6d, 14 ημερών-14d και 30 ημερών-30d. Παρατηρούμε την αύξηση της έκφρασης όσο αυξάνονται οι ημέρες ανοχοποίησης. ( $p < 0,05$ ). Η τυπική απόκλιση (S.D) προκύπτει από τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.

## Κεφάλαιο 4-Συζήτηση

---

## Κεφάλαιο 4-Συζήτηση

Τα τάξης II μόρια του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας έχουν χαρακτηριστεί ως μεμβρανικά ετεροδιμερή αποτελούμενα από 2 γλυκοζυλιωμένες αλυσίδες α και β των 30-32kDa και 27-29kDa αντίστοιχα.

Το 1967, ο Calne παρατήρησε πως μερικοί χοίροι οι οποίοι είχαν δεχτεί αλλομόσχευμα ήπατος, μπορούσαν να επιζήσουν για αρκετούς μήνες μετά την μεταμόσχευση, χωρίς κάποια ανοσοκατασταλτική θεραπεία.<sup>124</sup> Αυτό το γεγονός αργότερα αποδείχθηκε πως οφειλόταν σε διαλυτούς παράγοντες, οι οποίοι εκκρίνονταν από το ίδιο το αλλομόσχευμα και ήταν υπεύθυνοι για την ανοχή του δέκτη. Αυτοί χαρακτηρίστηκαν ως διαλυτά MHC μόρια.<sup>126</sup>

Τις επόμενες δεκαετίες, υπήρξαν πολλές μελέτες οι οποίες προσπάθησαν να ξεκαθαρίσουν τα ανοσορυθμιστικά χαρακτηριστικά των διαφόρων μορφών των MHC μορίων. Σήμερα, είναι γενικά αποδεκτό πως τα σωματικά υγρά υγιών ατόμων περιέχουν σε διάφορες συγκεντρώσεις τάξης I MHC (sMHC I) και τάξης II MHC (sMHC II) μόρια.<sup>128-150</sup> Παρά το γεγονός πως τα διαλυτά τάξης I μόρια του ορού έχουν ανιχνευτεί σε διάφορες ισομορφές<sup>143</sup>, τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια φαίνεται να έχουν μοριακό βάρος ~60kDa, το οποίο είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο του μεμβρανικού μορίου.<sup>147</sup> Η προέλευση αυτών των μορίων πιθανολογείται πως είναι αποτέλεσμα διάχυσης, εναλλακτικού ματίσματος ή ενεργής έκκρισης.

Επιπλέον, παρόλο που τα μόρια τα οποία κυκλοφορούν στον ορό δεν είναι προσδεδεμένα σε εξωσώματα (exosomes)<sup>156</sup>, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν πως τα εξωσώματα τα οποία εκκρίνονται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα περιέχουν μεγάλες ποσότητες MHC μορίων<sup>156</sup>. Επίσης, οι τροφοβλάστες μπορούν να εκκρίνουν διαλυτά HLA-DR μόρια στο υγρό καλλιέργειας όταν ενεργοποιηθούν μέσω ιντερφερόνης-γ (INF-γ)<sup>160,161</sup>, ενώ τα Β-λεμφοκύτταρα και τα CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα μέσω ενεργοποίησης με ιντερλευκίνη 2 (IL-2).

Μερικοί από τους ρόλους οι οποίοι αποδίδονται στα διαλυτά τάξης I και II MHC μόρια περιλαμβάνουν την διατήρηση της ανοχής σε αντιγόνα του εαυτού,<sup>50,228</sup> την καλή λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος<sup>197</sup> αλλά και την επιλογή ταιριού ζευγαρώματος<sup>199</sup>. Η επιλογή ταιριού ζευγαρώματος είναι ένα σημαντικό εξελικτικό ζήτημα καθώς έχει γίνει η υπόθεση πως η επιλογή ταιριού βασίζεται στην διαφορά ιστοσυμβατότητας ώστε να εξασφαλιστεί η συνέχεια του πολυμορφισμού των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας και κατ' επέκταση της επιβίωσης του είδους. Αυτή η ιδιότητα αποδίδεται στους λεγόμενους οσμώτυπους, οι οποίοι θεωρούνται πως στην ουσία είναι τα διαλυτά MHC μόρια παρόντα στα ούρα.<sup>204</sup>

Οι αλλαγές στις φυσιολογικές συγκεντρώσεις των διαλυτών μορίων έχουν παρατηρηθεί σε μία σειρά παθολογικών καταστάσεων όπως ιικές εγκεφαλίτιδες<sup>148</sup>, παρουσία των HLA-DR διαλυτών μορίων καθώς και των HLA-I μορίων σε παθολογικές εγκυμοσύνες,<sup>151,161-163,169</sup> κακοήθειες,<sup>164-168</sup> άσθμα.<sup>170</sup> Τα διαλυτά HLA-I έχουν αναφερθεί να είναι σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, συστηματικό ερυθηματώδη λύκο και σύνδρομο Sjogren's.<sup>188-191</sup> Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως τα διαλυτά HLA-II έχουν βρεθεί στο αρθρικό υγρό των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα.<sup>193</sup> Διαφοροποιήσεις έχουν παρατηρηθεί επίσης στα HLA-I και II, οι οποίες εντοπίζονται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση.<sup>196</sup> Από τις μελέτες προκύπτει ότι τα διαλυτά μόρια έχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των ασθενειών, αλλά δεν έχει ξεκαθαριστεί αν αποτελούν προϊόντα της πάθησης ή αν συνεισφέρουν κάπως στην εξέλιξή της.

Η εμπλοκή των διαλυτών τάξης II MHC μορίων στην διατήρηση της ανοχής μπορεί να σχετίζεται με κατασταλτικούς μηχανισμούς. Μελέτες της δεκαετίας του 1980, έδειχναν πως T-κατασταλτικά κύτταρα μπορεί να όφειλαν την δράση τους σε κατασταλτικούς παράγοντες οι οποίοι έφεραν τάξης II MHC καθοριστές.<sup>212</sup> Επιπλέον, ανοχοποιημένα CD4+ T-λεμφοκύτταρα φαίνεται να εκκρίνουν *tolerosomes* τα οποία είναι MHC εξαρτώμενα,<sup>224</sup> ενώ άλλη μελέτη δείχνει πως η ανοχή μεσολαβείται από εξωσώματα που είναι MHC τάξης II-εξαρτώμενα.<sup>225</sup>

Τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια σε κυτταρικό επίπεδο μπορούν να ανταγωνιστούν τα αντίστοιχα μεμβρανικά για την πρόσδεση στον υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων (TCR) και να επάγουν τόσο χυμικές όσο και κυτταρικές αποκρίσεις,<sup>223</sup> να οδηγήσουν σε απόπτωση τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα,<sup>216</sup> και να ρυθμίσουν αρνητικά τους φυσικούς φονιάδες.<sup>163</sup> Τέλος, τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια του ορού που είναι φορτωμένα με αντιγονικά πεπτίδια του εαυτού εμφανίζονται να διατηρούν την ανοχή<sup>50,228</sup> ενώ η αντιγονοειδική ανοχογόνα ενεργοποίηση φαίνεται να αυξάνει την συγκέντρωση των διαλυτών μορίων κατά την σύγκριση με την αντίστοιχη ανοσογόνα ενεργοποίηση σε ποντίκια *in vitro* και *in vivo*.<sup>232</sup>

Οι πρόσφατες μελέτες στα διαλυτά τάξης II μόρια του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC) ήταν αποκαλυπτικές για την πολύπλοκη ρυθμιστική παρέμβασή τους στην ανάπτυξη, διατήρηση και καταστολή μιας ανοσολογικής απόκρισης. Εφόσον τα διαλυτά τάξης II μόρια φαίνεται να είναι προσδεδεμένα με ένα αντιγονικό πεπτίδιο, καταλήγουμε εύκολα στο συμπέρασμα πως τα μόρια αυτά μπορούν να δράσουν σε διαφορετικά επίπεδα αλλά και να ρυθμίσουν μία ποικιλία αντιδράσεων.

Η παρούσα εργασία εστίασε στην μελέτη των διαλυτών τάξης II μορίων που απομονώθηκαν από αρσενικά Balb/c ποντίκια ανοχοποιημένα με ανθρώπινη αλβουμίνη του ορού (HSA). Η επιλογή αυτού του πρωτοκόλλου βασίστηκε σε 3 βασικούς λόγους: 1. πρακτικοί λόγοι, επειδή τα ανοχοποιημένα ζώα είχαν αυξημένα επίπεδα συγκέντρωσης των διαλυτών τάξης II μορίων της κυκλοφορίας,<sup>232</sup> που επέτρεψε την διεξαγωγή αρκετών πειραμάτων *in vitro* αλλά και *in vivo*, 2. η μελέτη ενός συστήματος ανοχοποίησης προσφέρει την δυνατότητα να κατανοηθεί η δράση των διαλυτών τάξης II μορίων που είναι συνδεδεμένα με πεπτίδια του εαυτού, για τα οποία η υπόθεση είναι πως εμπλέκονται στο μηχανισμό διατήρησης της ανοχής και 3. χρησιμοποιώντας στην μελέτη



ένα συγκεκριμένο αντιγόνο κάνει δυνατή την διαχείριση της ανοσίας ενάντια στην ανοχή αλλά και των γεγονότων που οδηγούν στην καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης.

Όντως, το επιλεγμένο πειραματικό μοντέλο επέτρεψε την μελέτη των διαλυτών τάξης II μορίων σε βιοχημικό επίπεδο αλλά και την μελέτη του τρόπου δράσης τους. Αποδείχθηκε πως τα διαλυτά τάξης II μόρια, τα οποία απομονώθηκαν με τεχνικές ανοσοσυγγένειας και είναι φορτωμένα με ανοχογόνα πεπτίδια, είναι ανθεκτικά σε αποδιατακτικές διαδικασίες στις οποίες υποβλήθηκαν, διαπιστώθηκε πως αποτελούν υψηλά γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες και δείχνουν αξιοσημείωτη σταθερότητα. Επιπλέον, στο επίπεδο της φυσιολογίας τα μόρια αυτά ήταν ικανά να καταστρίλλουν όχι μόνο αντιγονοειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις αλλά και μη αντιγονοειδικές. Τα διαλυτά τάξης II μόρια επήγαγαν την έκφραση επιφανειακών μαρτύρων σε CD4+ T-λεμφοκύτταρα, την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτοκινών καθώς και την αρνητική ρύθμιση στην σηματοδότηση που ακολουθεί την πρόσδεση στον TCR των T-λεμφοκυττάρων.

Ακολουθώντας τα πρωτόκολλα που περιγράφηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, τα διαλυτά τάξης II μόρια απομονώθηκαν από ορό αίματος ποντικού, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει μία μονομορφική περιοχή (αντιγονικό καθοριστή) στις I-A και I-E περιοχές του μορίου. Η ειδική αλληλεπίδραση του απομονωμένου διαλυτού τάξης II μορίου με το anti-mouse IA/IE (HB-225TM hybridoma) μονοκλωνικό αντίσωμα εξετάστηκε και επιβεβαιώθηκε με ανάλυση κατά Western, την μέθοδο ELISA καθώς και με την τεχνολογία των βιοαισθητήρων. Το σημαντικότερο ίσως πλεονέκτημα της συγκεκριμένης τεχνικής, η οποία δεν είχε χρησιμοποιηθεί ποτέ στο παρελθόν για ταυτοποίηση των διαλυτών τάξης II MHC μορίων ήταν η δυνατότητα να παρακολουθήσουμε σε πραγματικό χρόνο την αλληλεπίδραση του αντισώματος και του διαλυτού μορίου με μετρήσιμα αποτελέσματα. Ως επιβεβαίωση, στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με την τεχνολογία των βιοαισθητήρων στα οποία χρησιμοποιήθηκε ως αντίσωμα ελέγχου το anti-human IL-2, δεν υπήρξε καμία αλληλεπίδραση με τα διαλυτά τάξης II μόρια.

Τα απομονωμένα μόρια μπορούσαν επίσης να προσδεθούν ειδικά σε άλλα μονοκλωνικά αντισώματα, συμπεριλαμβανομένων των anti-mouse I-A<sup>d</sup>/I-E<sup>d</sup> (IgG2a, 0,5mg/ml, BD Pharmigen, San Diego, CA), FITC-labeled anti-mouse I-A<sup>d</sup> (IgG2b, 0,5mg/ml, BD Pharmigen, San Diego, CA), anti-mouse I-A<sup>d</sup> (MK-D6 ATCC® HB-3™, IgG2a) τα οποία παράχθηκαν σε ποντίκι και έχουν χρησιμοποιηθεί σε παλαιότερες δημοσιεύσεις του εργαστηρίου,<sup>223</sup> αποδεικνύοντας πως τα απομονωμένα μόρια είναι όντως τάξης II μόρια του MHC.

Τέλος, η απομόνωση των μορίων αποκάλυψε πως τα μόρια αυτά δεν φαίνεται να αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες στην κυκλοφορία και αυτό γιατί η διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης επιτρέπει την συνκατακρήμνιση πρωτεϊνών αν υπάρχει αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη προς εξέταση (επειδή χρησιμοποιείται αντίσωμα και όχι κολώνες ή άλλες επεμβατικές μέθοδοι).

Επιπλέον, η ανάλυση της φασματομετρίας μάζας (MS-MS analysis) ανίχνευσε πεπτίδια αλβουμίνης του ορού, καθώς επίσης και πεπτίδια της Αβ αλυσίδας του Η-2 τάξης ΙΙ μορίου. Προς αυτήν την κατεύθυνση χρειάζεται περισσότερη μελέτη ώστε να ξεκαθαριστεί ο βαθμός δομικής και αλληλουχικής ομολογίας με το μεμβρανικό τάξης ΙΙ μόριο. Μία κρυσταλλογραφική θα μπορούσε να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες προς την παραπάνω κατεύθυνση.

Όσον αφορά τον ανοσορυθμιστικό τους ρόλο, όταν τα διαλυτά τάξης ΙΙ μόρια, απομονωμένα από ανοχοποιημένα με HSA ποντίκια, επώαστηκαν με σπληνοκύτταρα τα οποία ήταν ενεργοποιημένα είτε με HSA ή MBP (myelin basic protein) που χρησιμοποιήθηκε ως αντιπροσωπευτικό δείγμα αυτοαντιγόνου, ο πολλαπλασιασμός τους καταστέλλθηκε. Παρόλο που η καταστολή έφτασε σε μεγαλύτερα επίπεδα όταν η HSA χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο, η απόκριση στην περίπτωση της MBP επίσης ανεστάλη. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν πως τα διαλυτά τάξης ΙΙ μόρια μπορούν να προκαλέσουν μία μη αντιγονοειδική καταστολή ή πως η προετοιμασία/απομόνωση των μορίων να περιέχει επίσης και μόρια συνδεδεμένα με πεπτίδια MBP, δεδομένου πως προέρχονται από τον ορό του αίματος. Πράγματι, από τα 35128 πεπτίδια που αντιστοιχούν σε 532 πρωτείνες του εαυτού, οι οποίες αναγνωρίστηκαν από την ανάλυση της φασματομετρίας μάζας, τα 59 πεπτίδια αντιστοιχούσαν στη αλβουμίνη του ορού ενώ ταυτοποιήθηκαν και πεπτίδια MBP, τα οποία κάλυπταν σε μεγάλο βαθμό την πρωτεΐνη.

Εντούτοις, λαμβάνοντας υπόψη την πληθώρα αλληλεπιδράσεων του TCR με το σύμπλοκο τάξης ΙΙ/πεπτιδίου, η αναγνώριση histotope-resitope είναι ανεξάρτητη του αντιγονικού πεπτιδίου, η οποία πραγματοποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης eritope-*paratope*. (Εικ. 4.1). Έτσι, όσον αφορά τον MHC περιορισμό, η αλληλεπίδραση histotope-resitope θα λάβει χώρα ανεξαρτήτως του αντιγονικού πεπτιδίου. Άρα, μπορεί να γίνει η υπόθεση πως ανεξαρτήτως του αντιγονικού φορτίου του διαλυτού τάξης ΙΙ μορίου, θα μπορεί να πραγματοποιηθεί αλληλεπίδραση με τον TCR με μικρότερο βαθμό συγγένειας.

Η παραπάνω υπόθεση θα μπορούσε να ταυτοποιηθεί από μία άλλη σειρά πειραμάτων, όπου τα διαλυτά τάξης ΙΙ μόρια επώαστηκαν *in vitro* με σπληνοκύτταρα τα οποία είχαν απομονωθεί από ποντίκια ανοσοποιημένα *in vivo* με HSA ή SecA, η οποία αντιπροσωπεύει ένα αντιγόνο πραγματικά ξένο για το ποντίκι. Έτσι, τα διαλυτά τάξης ΙΙ ήταν ικανά να καταστείλουν τον πολλαπλασιασμό τόσο των σπληνοκυττάρων ανοσοποιημένων με HSA όσο και των ανοσοποιημένων με SecA. Αυτά τα αποτελέσματα, δείχνουν πως παρόλο που τα διαλυτά τάξης ΙΙ δεν θα μπορούσαν να είναι συνδεδεμένα με αντιγονικούς επιτόπους της SecA, η αλληλεπίδραση histotope-resitope μπορεί να είναι αρκετή για την καταστολή.

Ο εμφανής κυτταρικός στόχος των διαλυτών τάξης ΙΙ μορίων είναι τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα. Πράγματι, όπως έχει δειχθεί σε πρόσφατη δημοσίευση, τα μόρια αυτά είναι ικανά να ανταγωνιστούν τα κλασικά μεμβρανικά τάξης ΙΙ μόρια για την πρόσδεση στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα.<sup>223</sup> Η ικανότητα ειδικής αλληλεπίδρασης των διαλυτών μορίων με τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα, σε σχέση με τα CD8+ ή άλλα κύτταρα ελέγχου, επιβεβαιώθηκε και μετρήσιμα με την τεχνολογία των βιοαισθητήρων. Όμως, ένα CD4+ T-λεμφοκύτταρο είναι ικανό να ενισχύσει ή να μπλοκάρει μία ανοσολογική απόκριση, και αυτό εξαρτάται από την φάση της απόκρισης αλλά και τους συνυποδοχείς που εκφράζονται στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη έδειξαν πως τα διαλυτά τάξης II μόρια μπορούν να αυξήσουν στην έκφραση του μεμβρανικού υποδοχέα CD25 σε ανώριμα CD4+ T-λεμφοκύτταρα. Όμως, τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα τα οποία προέρχονται από ποντίκια τα οποία δεν έχουν ανοσοποιηθεί πρώτα για κάποιο συγκεκριμένο αντιγόνο, μπορούν να παρουσιάζουν οποιαδήποτε αντιγονική ειδικότητα. Για να μπορέσουμε να ελέγξουμε τις συνθήκες του πειράματος, τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα συνκαλλιεργήθηκαν με μακροφάγα τα οποία ενεργοποιήθηκαν *in vitro* με HSA, παρουσία ή όχι διαλυτών τάξης II μορίων. Αυτή η πειραματική προσέγγιση αποκάλυψε πως τα διαλυτά τάξης II μόρια μπορούν να μειώσουν την έκφραση του CD28 επιφανειακού δείκτη ενώ την ίδια στιγμή να αυξήσει αυτή του CTLA-4. Επιπλέον, όταν μελετήθηκε το προφίλ έκκρισης των κυτοκινών φάνηκε πως η παρουσία των διαλυτών μορίων κατέστειλε την έκκριση της IL-2 και αύξανε την συγκέντρωση της IL-10 στο υπερκείμενο. Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να αποτελεί έναν άλλο μηχανισμό που συνάδει με την μη αντιγονοειδική καταστολή.

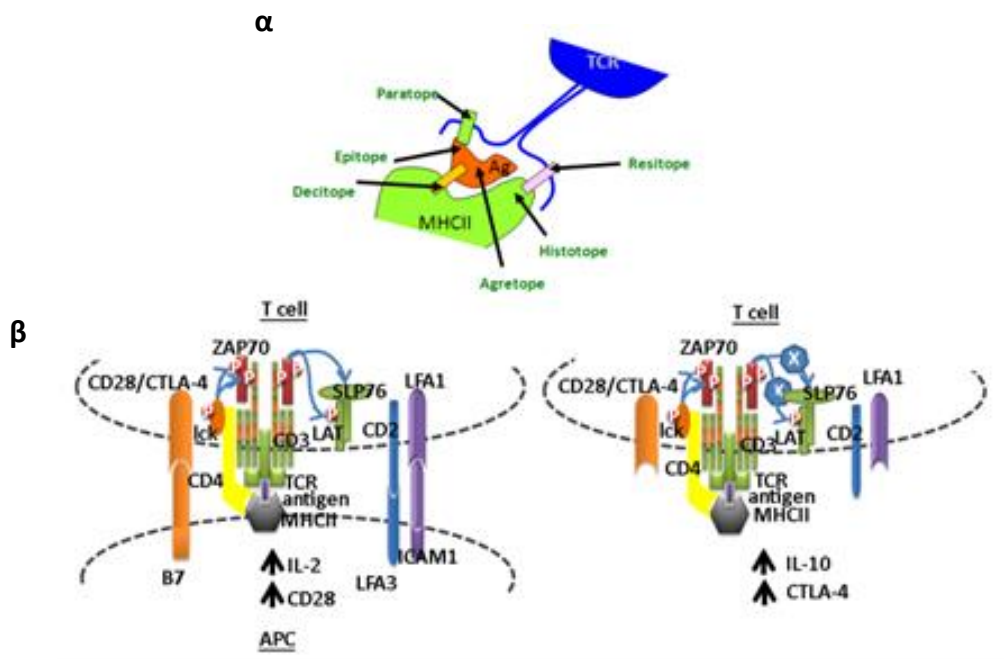
Στην συνέχεια σε μία προσπάθεια να μελετήσουμε το αποτέλεσμα που μπορούν να επιφέρουν τα διαλυτά τάξης II μόρια στα αρχικά στάδια της σηματοδότησης μετά την πρόσδεση στον TCR, σχεδιαστηκε ένα πρωτόκολλο στο οποίο ανώριμα CD4+T-λεμφοκύτταρα επώαστηκαν με ή χωρίς ενεργοποιημένα με HSA μακροφάγα, παρουσία/απουσία διαλυτών μορίων. Σε όλες τις περιπτώσεις η Lck μπόρεσε να φωσφορυλιωθεί, αποδεικνύοντας πως η πρόσδεση του διαλυτού μορίου στον TCR μπορεί να προσελκύσει το CD4 ώστε να επαχθεί η φωσφορυλίωση της Lck. Πράγματι, σε προηγούμενη δημοσίευση είχε αποδειχθεί πως ένα αντίσωμα που μπλοκάρει τον CD4 υποδοχέα, εμποδίζει την δράση των διαλυτών τάξης II μορίων στην απόκριση των T-λεμφοκυττάρων.<sup>223</sup> Εκτός από την ενεργοποίηση της Lck, τα διαλυτά τάξης II μόρια κατέστειλλαν την φωσφορυλίωση της ZAP-70 και κυρίως της LAT, πρωτεΐνες στο μονοπάτι ενεργοποίησης που ακολουθεί την πρόσδεση στον TCR.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη απέδειξε πως οι διαλυτές τάξης II πρωτεΐνες απομονωμένες από τον ορό ποντικού ανοχοποιημένου για την HSA πρωτεΐνη μπορούν να επάγουν τόσο ειδικά όσο και μη ειδικά κατασταλτικά γεγονότα στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα τα οποία μεσολαβούνται όχι μόνο από την έκφραση επιφανειακών κατασταλτικών δεικτών αλλά και με την παραγωγή κατασταλτικών διαλυτών προϊόντων όπως της IL-10.

Ερμηνεύοντας αυτές τις παρατηρήσεις, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρέχουν αποδείξεις όσον αφορά τους μηχανισμούς της διατήρησης της αυτοανοχής από τα διαλυτά τάξης II όπως παρουσιάζονται από τους Pentcheva-Hoang<sup>50</sup> και Fischer.<sup>228</sup> Παρουσία αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, η αλληλεπίδραση των μεμβρανικών τάξης II μορίων με τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα επάγει την κυτταρική ενεργοποίηση που αποκαλύπτεται από την αύξηση στην έκφραση του CD28 και της παραγωγής της IL-2. Απουσία αυτών των κυττάρων όμως, τα διαλυτά τάξης II μόρια αλληλεπιδρούν με τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα για να επάγουν την έκφραση του CTLA-4 και την παραγωγή της IL-10. (Εικ. 4.1β). Επιπλέον, η μελέτη της έκφρασης των επιφανειακών/ρυθμιστικών δεικτών CD28 CTLA-4 και CD25 σε πρωτόκολλα ανοχοποίησης διαφορετικών ημερών απέδειξε πως η επαγωγή της καταστολής μέσω κυττάρων κατά την ανοχοποίηση του οργανισμού είναι μια διαδικασία η οποία αργεί και

πιθανά στα αρχικά στάδια να μεσολαβείται από διαλυτούς παράγοντες όπως οι κυτοκίνες και τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια.

Όπως προκύπτει, τα διαλυτά τάξης II αντιγόνα μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανοί ρυθμιστές της ανοσολογικής απόκρισης. Πρόσφατα αποτελέσματα έχουν δείξει πως η παροχή τέτοιων μορίων *in vivo* μπορούν να μειώσουν την αντιγονοειδική παραγωγή αντισώματος, παρέχοντας έτσι καινούρια εργαλεία για την ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και την θεραπεία.



**Εικ. 4.1:** α. Η αλληλεπίδραση μεταξύ τάξης II MHC μορίου και του υποδοχέα των Τ-λεμφοκυττάρων (TCR). Ο TCR αλληλεπιδρά με το τάξης II MHC μόριο καθώς και με τον αντιγονικό επίτοπο (Ag). Είναι δυνατόν τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια να προκαλούν ενεργοποίηση διαφορετικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος σε σχέση με τα μεμβρανικά τάξης II MHC μόρια. β. Παρουσία αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, η μεμβρανική αλληλεπίδραση του MHC τάξης II μορίου με τα CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα ενισχύεται από CD4, CD28/CTLA-4/B7, CD2/LFA3 or LFA1/ICAM1 αλληλεπιδράσεις και επάγει την αύξηση της έκφρασης του CD28 και την παραγωγή της ιντερλευκίνης 2 (IL-2), ενώ απουσία αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και κατά συνέπεια την έλλειψη ανοσολογικής σύναψης, τα διαλυτά τάξης II MHC μόρια αλληλεπιδρούν με τα CD4+ Τ-λεμφοκύτταρα και επάγουν την έκφραση του CTLA-4 και την παραγωγή της ιντερλευκίνης 10 (IL-10).

## Κεφάλαιο 5-Βιβλιογραφία

---

## Κεφάλαιο 5-Βιβλιογραφία

1. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kubly J. Immunology, 2007; 5<sup>th</sup> Edition.
2. Aultman D, Adamashvili I, Yaturu K, Langford M, Gelder F, Gautreaux M, Ghali GE, McDonald J. Soluble HLA in Human Body Fluids. *Hum Immunol* 1999; 60: 239–244.
3. Jon J. van Rood and Aad van Leeuwen, Soluble HLA Antigens: How It All Started. *Hum Immunol*. 1999; 60:412–413.
4. Maenaka K & Jones E.Y. MHC superfamily structure and the immune system. *Cur in Struct Biol*. 1999; 9:745–753.
5. Geuze Hans J. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol. Today*. 1998; 19:282-287.
6. Amy CY & Mellman I. Old lysosomes, new tricks: MHC II dynamics in DCs. *Trends Immunol*. 2005; 26:72-78.
7. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:139–176.
8. Bonds RS, Midoro-Horiuti T, Goldblum RA. Structural basis for food allergy: the role of cross-reactivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008; 8:82-86.
9. Borowski C, Martin C, Gounari F, Haughn L, Aifantis I, Grassi F & von Boehmer H. On the brink of becoming a T cell. *Curr Opin Immunol*. 2002; 14:200–206
10. Koch U, Lacombe TA, Holland D, Bowman JL, Cohen BL, Egan SE, Guidos CJ. Subversion of the T/B lineage decision in the thymus by lunatic fringe-mediated inhibition of Notch-1. *Immunity*. 2001; 15:225-236.
11. Lind EF, Prockop SE, Porritt HE, Petrie HT. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J. Exp. Med*. 2001; 194:127–134.
12. Hogquist KA, Starr TK, Jameson SC. Receptor sensitivity: when T cells lose their sense of self. *Curr Biol*. 2003; 13:239-41.
13. Abbas AK & Lichtman AH. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. W.B. Saunders Company. 2001.
14. Cruse MJ & Lewis ER. Atlas of Immunology. 2010; 3<sup>rd</sup> Edition.
15. Luft FC. Staphylococcus aureus, Toll-like receptors, superantigens, and their derivatives. *J Mol Med (Berl)* 90, 1091-1093 (2012).
16. Kohler PL, et al. Staphylococcus aureus isolates encode variant staphylococcal enterotoxin B proteins that are diverse in superantigenicity and lethality. *PLoS One* 7, e41157 (2012).
17. McCormick JK, Yarwood JM & Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol* 55, 77-104 (2001).
18. Reth M, Brummer T. Feedback regulation of lymphocyte signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4 (4):269-77.

19. Pitcher LA, Young JA, Mathis MA, Wrage PC, Bartók B, van Oers NS. The formation and functions of the 21- and 23-kDa tyrosine-phosphorylated TCR zeta subunits. *Immunol Rev.* 2003; 191:47-61.
20. Love PE, Shores EW. ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go? *Immunity.* 2000; 12(6):591-7.
21. Mustelin T & Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem J.* 2003; 371: 15-27
22. Chu DH, Morita CT, Weiss A. The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol Rev.* 1998; 165:167-180.
23. Iwashima M, Irving BA, van Oers NS, Chan AC, Weiss A. Sequential Interactions of the TCR with Two Distinct Cytoplasmic Tyrosine kinases. *Science.* 1994; 263: 1136-1139.
24. Neumeister EN, Zhu Y, Richard S, Terhorst C, Chan AC, Shaw AS. Binding of ZAP-70 to phosphorylated T-cell receptor zeta and zeta enhances its autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins. *Mol Cell Biol.* 1995; 15:3171-1178.
25. Chan AC, Dalton M, Johnson R, Kong GH, Wang T, Thoma R, Kurosaki T. Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* 1995; 14:2499-2508.
26. Williams BL, Irvin BJ, Sutor SL, Chini CC, Yacyshyn E, Bubeck Wardenburg J, Dalton M, Chan AC, Abraham RT. Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma1 and Ras activation. *EMBO J.* 1999; 18: 1832-1844.
27. Di Bartolo V, Mège D, Germain V, Pelosi M, Dufour E, Michel F, Magistrelli G, Isacchi A, Acuto O. Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem.* 1999; 274:6285-6294.
28. Wonerow P & Watson SP. The transmembrane adapter LAT plays a central role in immune receptor signalling. *Oncogene.* 2001; 20:6273-6283.
29. Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Tribble RP, Samelson LE. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell.* 1998; 92:83-92.
30. Paz PE, Wang S, Clarke H, Lu X, Stokoe D, Abo A. Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochem J.* 2001; 356: 461-471.
31. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* 2003; 19 (5):641-644.
32. Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, O'Shea JJ. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2001; 98:15137-15142.
33. Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. T-bet is a STAT1-induced regulator for IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 2002; 3(6): 549-557.

34. Lugo-Villarín G, Maldonado-Lopez R, Possemato R, Penaranda C, Glimcher LH. T-bet is required for optimal production of IFN- $\gamma$  and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100(13):7749–7754.
35. Zhu J & Paul WE. Peripheral CD4 T cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev.* 2010; 238(1): 247–262.
36. Glimcher LH & Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes and Develop.* 2000; 14(14):1693–1711.
37. Zhu J, Guo L, Watson CJ, Hu-Li J, Paul WE. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in TH2 differentiation and cell expansion, *J. of Immunol.* 2001; 166 (12):7276–7281.
38. Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 2006; 36 (11):1357-66.
39. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Dev Immunol.* 2012; 4:925-935.
40. 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. *J. Exp Med.* 2007; 204(8): 1849–1861.
41. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank RB, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM, O'shea JJ. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity.* 2007; 26: 371–381.
42. Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, and Noelle RJ. 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.
43. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:683–765.
44. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science.* 1990; 248: 1349–1356.
45. Acuto O & Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3:939–951.
46. Brunen JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan MJ, Mattei MG, and Golstein P. A new member of immunoglobulin superfamily-CTLA-4. *Nat.* 1987; 328: 267–270.
47. Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ, Laboni A, Manso-Sancho R, Walse B, Stuart DI, van der Merwe PA, and Davis SJ. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity.* 2002; 17: 201–210.
48. Egen JG, Kuhns MS, & Allison JP. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat. Immunol.* 2002; 3: 611–618.
49. Egen JG & Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity.* 2002; 16: 23–35.
50. Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity.* 2004; 21(3): 401-413.



51. Sansom DM, Manzotti CN & Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol.* 2003; 24: 314–319.
52. Palmer E. Negative selection—clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:383–391.
53. Alferink J, Aigner S, Reibke R, Hammerling GJ, Arnold B. Peripheral T-cell tolerance: the contribution of permissive T-cell migration into parenchymal tissues of the neonate. *Immunol Rev.* 1999; 169: 255–261.
54. Walker LS, Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:11–19.
55. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:389–400.
56. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic selftolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:531–562.
57. Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology.* 1971; 21:903–914.
58. Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y. Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. *J Exp Med.* 1982;156:1565–1576.
59. 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.
60. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:253– 7.
61. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S *et al.* Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol.* 2013;14:307–308.
62. Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol.* 2010; 32:95–106
63. Kuczma M, Pawlikowska I, Kopij M, Podolsky R, Rempala A, Kraj P. TCR repertoire and Foxp3 expression define functionally distinct subsets of CD4+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2009; 183:3118–3129.
64. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med (Berl.)* 1996;74:589–607.
65. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, *et al.* FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell.* 2006;126:375–387.
66. Haque R, Lei F, Xiong X, Wu Y, Song J. FoxP3 and Bcl-xL cooperatively promote regulatory T cell persistence and prevention of arthritis development. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12:R66.
67. Sharabi A, Mozes E. Bcl-xL affects the development of functional CD4 Tregs. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12:405.
68. Sharabi A, Lapter S, Mozes E. Bcl-xL is required for the development of functional regulatory CD4 cells in lupus-afflicted mice following treatment with a tolerogenic peptide. *J Autoimmun.* 2010; 34:87–95.

69. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, *et al.* Disruption of a new forkhead/ winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2010;27:68–73.
70. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, *et al.* JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest.* 2000;106:R75–81.
71. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1008;188:287–296.
72. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD4+CD25+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 1998;10:1969–1980.
73. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, *et al.* Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 2004;21:503–513.
74. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, *et al.* The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol.* 2006;176:6752–6761.
75. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 1993; 75:263–274.
76. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schaffer AA, Noyan F. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med.* 2009; 361:2033–2045.
77. Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood.* 2001; 98:2736–2744.
78. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001;167:1245–1253.
79. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med.* 2001;193:1285–1294.
80. Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN. Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol.* 2001;31:1122–1131.
81. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med.* 2001;193:1303–1310.
82. Smith K, Seddon B, Purbhoo MA, Zamoyska R, Fisher AG, Merkenschlager M. Sensory adaptation in naive peripheral CD4 T cells. *J Exp Med.* 2001; 194:1253–1261.
83. Polic B, Kunkel D, Scheffold A, Rajewsky K. How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:8744– 8749.

84. Bhandoola A, Tai X, Eckhaus M, Auchincloss H, Mason K, Rubin SA, Carbone KM, Grossman Z, Rosenberg AS, Singer A. Peripheral expression of self-MHC-II influences the reactivity and self-tolerance of mature CD4(+) T cells: evidence from a lymphopenic T cell model. *Immunity*. 2002; 17:425–436.
85. Grossman Z, Paul WE. Adaptive cellular interactions in the immune system: the tunable activation threshold and the significance of subthreshold responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:10365–10369.
86. Grossman Z, Paul WE. Autoreactivity, dynamic tuning and selectivity. *Curr Opin Immunol*. 2001; 13:687–698.
87. Grossman Z, Paul WE. Self-tolerance: context dependent tuning of T cell antigen recognition. *Semin Immunol*. 2000; 12:197–203, discussion 257–344.
88. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003; 4:330–336.
89. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003; 299:1057–1061.
90. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, *et al.* Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*. 2007; 445:771–775.
91. Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, *et al.* Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol*. 2007; 8:359–368.
92. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, *et al.* Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*. 2004;16:1643–1656.
93. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*. 2007; 445:936–940.
94. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:5138–5143.
95. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson P J, Whitesell L, *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001;27:20–21.
96. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, *et al.* JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest*. 2000;106:R75–81.
97. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, *et al.* Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*. 2007;5:e38.
98. Janson PC, Winerdal ME, Marits P, Thorn M, Ohlsson R, Winqvist O. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS ONE*. 2008; 3:e1612.
99. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:83–89.
100. Liu J, Lluís A, Illi S, Layland L, Olek S, von Mutius E, *et al.* T regulatory cells in cord blood—FOXP3 demethylation as reliable quantitative marker. *PLoS ONE*. 2010; 5:13267-13274.

101. Sakaguchi SS, 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.
102. Nelson BH, Willerford DM. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol.* 1998; 70: 1–81.
103. Green D R, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol. Rev.* 2003; 193: 70–81.
104. Thornton AM. & Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* 2000; 164: 182–190.
105. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 303–309.
106. Suri-Payer E. & Cantor H. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4+CD25+ T cells. *J. Autoimmun.* 2001; 16: 115–123.
107. Grande JP. Role of transforming growth factor- $\beta$  in tissue injury and repair. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997; 214: 27–40.
108. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T-cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004; 199:971–979.
109. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, *et al.* Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF $\alpha$  therapy. *J Exp Med.* 2004; 200:277–285.
110. Lindley S, Dayan SM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4+CD25+ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005;54:92–99.
111. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, *et al.* Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in psoriasis: Mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol.* 2005;174:164–173.
112. Boyer O, Saadoun D, Abriol J, Dodille M, Piette JC, Cacoub P, *et al.* CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood.* 2004; 103:3428–3430.
113. Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D, *et al.* Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol.* 2006; 176:4484–4491.
114. Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4+CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2005; 140:360–367.
115. Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, Walker NM, Smyth DJ. Large scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet.* 2007; 39: 1074–1082.

116. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genome wide study. *N Engl J Med.* 2007; 357: 851–862.
117. Brand OJ, Lowe CE, Heward JM, Franklyn JA, Cooper JD. Association of the interleukin-2 receptor alpha (IL-2R alpha)/CD25 gene region with Graves' disease using a multilocus test and tag SNPs. *Clin Endocrinol.* 2007; 66: 508–512.
118. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J. *et al.* Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet.* 2004;363:608–615.
119. Grindebacke H, Wing K, Andersson AC, Suri-Payer E, Rak S, Rudin A. Defective suppression of Th2 cytokines by CD4+CD25+ regulatory T cells in birch allergies during birch pollen season. *Clin Exp Allergy.* 2004; 34:1364–1372.
120. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, *et al.* Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med.* 2004; 199:1567–1575.
121. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5; 271–283.
122. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards DF, *et al.* Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest.* 2006;116:146–155.
123. Robinson DS, Larche M, Durham SR. Tregs and allergic disease. *J Clin Invest.* 2004;114:1389–1397.
124. Calne RY, White HJ, Yoffa DE, Maginn RR, Binns RM, Samuel JR, Molina VP. Observations of orthotopic liver transplantation in the pig. *Br Med J.* 1967; 2:478-480.
125. Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM, Binns RM, Davies DA. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature.* 1969; 223: 472-476.
126. Van Rood JJ, van Leeuwen A, van Santen MCT. Anti HLA-A2 inhibitor in normal human sera. 1970; *Nature* 226: 366-367.
127. van Rood JJ & van Leeuwen A. Soluble HLA Antigens: How It All Started *Hum Immunol.* 1999; 60: 412–413.
128. Bernier I, Dautigny A, Colombani J, Jolles P. Purification of HLA antigens from the urine of diseased and healthy individuals. *FEBS Lett.* 1974; 45: 308-311.
129. Lucas ZJ: An assay for antibodies to histocompatibility antigens based on inhibition of radioiodine-labeled antibody binding. *Transplantation.* 1970; 10: 512-521.
130. Miyakawa Y, Tanigaki N, Kreiter VP, Moore GE, Pressman D. Characterization of soluble substances in plasma carrying HLA alloantigenic activity and HLA common antigenic activity. *Transplantation.* 1973; 15:312-319.
131. Ferreira A, Revilla Y, Bootello A, Gonzalez-Porque P. Use of the ELISA to detect and quantify histocompatibility antigens and their subunits. *J Immunol Methods.* 1983; 65:373-381.
132. Russo C, Pellegrino MA, Ferrone S. A Double-determinant immunoassay with monoclonal antibodies to the HLA-A,B,C complex. *Transplant Proc.* 1983; 15:66-70.

133. Comuzio S, Puppo F, Ruzzenenti R, Orlandini A, Grillo F, Brenci S, Lanza L, Scudeletti M, Indiveri F: Simple ELISA method for the evaluation of soluble HLA class I antigens in human serum. *J Clin Lab Anal.* 1991; 5:278-283.
134. Doxiadis I, Westhoff U, Grosse-Wilde H. Quantification of soluble HLA class I gene products by an enzyme linked immunosorbent assay. *Blut.* 1989; 59:449-54.
135. Gelder FB, McDonald JC, Landreneau MD, McMillan RM, Aultman DF. Identification, characterization, and quantitation of soluble HLA antigens in the circulation and peritoneal dialysate of renal patients. *Ann Surg.* 1991; 213:591-599.
136. Davies HS, Pollard SG, Calne RY. Soluble HLA antigens in the circulation of liver graft recipients. *Transplantation.* 1989; 47:524-527.
137. McDonald JC, Gelder FB, Aultman DF, Landreneau MD, McMillan RW, Singh I, Sorrells D, Liou WH. HLA in human serum: quantitation of class I by enzyme immunoassay. *Transplantation.* 1992; 53:445-453.
138. Stevenson FK, George AJ, Walters MT, Hamblin TJ. Analysis of soluble HLA class II antigenic material in patients with immunological diseases using monoclonal antibodies. *J Immunol Methods.* 1986; 86:187-190.
139. Kubens BS, Passler M, Grosse-Wilde H. Segregation study of the soluble 39-kD HLA class I heavy chain. *Hum Immunol.* 1994; 40:247-253.
140. Reisfeld RA, Allison JP, Ferrone S, Pellegrino MA, Poulik MD. HL-A antigens in serum and urine: isolation, characterization, and immunogenic properties. *Transplant Proc.* 1976; 8:173-179.
141. Vincent C, Revillard JP, Betuel H. Purification of HLA antigens from urine. *Transplantation.* 1976; 22:500-508.
142. Allison JP, Pellegrino MA, Ferrone S, Callahan GN, Reisfeld RA. Biological and chemical characterization of HLA antigens in human serum. *J Immunol.* 1977; 118: 1004-1011.
143. Dobbe LM, Stam NJ, Neefjes JJ, Giphart MJ. Biochemical complexity of serum HLA class I molecules. *Immunogenetics.* 1988; 27:203-212.
144. Krangel MS. Secretion of HLA-A and -B antigens via an alternative RNA splicing pathway. *J Exp Med.* 1986; 163: 1173-1180.
145. Krangel MS. Two forms of HLA class I molecules in human plasma. *Hum Immunol.* 1987; 20:155-160.
146. Haga JA, She JX, Kao KJ. Biochemical characterization of 39-kDa class I histocompatibility antigen in plasma. A secretable membrane protein derived from transmembrane domain deletion. *J Biol Chem.* 1991; 266:3695-3702.
147. Jendro M, Goronzy JJ, Weyand CM. Structural and functional characterization of HLA-DR molecules circulating in the serum. *Autoimmunity.* 1991; 8:289-296
148. Aultman D, Adamashvili I, Yaturu K, Langford M, Gelder F, Gautreaux M, Ghali GE, McDonald J. Soluble HLA in human body fluids. *Hum Immunol.* 1999; 60:239-244.
149. Indiveri F, Wilson BS, Natali PG, Pellegrino MA, Ferrone S. Immunogenicity of DR antigens isolated from body fluids. *Transplant Proc.* 1980; 12:121-129.
150. Westhoff U, Thinnes FP, Gotz H, Grosse-Wilde H. Quantitation of soluble HLA class II molecules by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vox Sang.* 1991; 61:106-111.

151. Pfeiffer KA, 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, *Hum Immunol.* 2000; 61: 559–564.
152. Puppo F, Indiveri F, Scudeletti M, Femme S. Soluble HLA antigens: new roles and uses, *Trends in Immunol Today.* 1997; 18: 154-155.
153. Hagihara M, Shimura T, Yamamoto K, Takebe K, Munkhbat B, Tsuji K. Soluble HLA Class I and Class II in Japanese, *Human Immunology.* 1994; 40: 171-173.
154. Zavazava N, Wobst B, Ferstl R, Muller-Ruchholtz W. Soluble MHC class I molecules in human body fluids. *J Clin Lab Anal.* 1994; 8:432-440.
155. McDonald JC, Adamashvili I, Hayes JM, Aultman DF, Rhynes VK, Gelder FB. Soluble HLA class II concentrations in normal individuals and transplant recipients. Comparison with soluble HLA class I concentrations. *Transplantation.* 1994; 58:1268-1277.
156. MacKay PA., LeibundGut-Landmann S, Koch N, Dunn AC, Reith W, Jack RW, McLellan AD. Circulating, soluble forms of major histocompatibility complex antigens are not exosome-associated. *Eur J Immunol.* 2006; 36: 2875–2884.
157. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 1996; 183: 1161–1172.
158. Inostroza J, Ferrada J, Navarrete C, Sorensen RU. Soluble histocompatibility class I antigens and beta 2-microglobulin in pregnant females and cord blood samples. *Hum Immunol.* 1997; 54:63-72.
159. Vassiliadis S, Pafliis 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 Fertl Dev* 2001; 13:427–433.
160. Athanassakis I, Ranella A, Vassiliadis S. IFN-g facilitates release of classII-loaded intracellular pools in trophoblast cells: a novel property in dependent of protein synthesis. *J Interferon Cytokine Res.* 2000; 20: 823–830.
161. Ranella A, Vassiliadis S, Mastora C, Valentina M, Dionyssopoulou E, Athanassakis I. Constitutive intracellular expression of human leukocyte antigen (HLA)-DO and HLA-DR but not HLA-DM in trophoblast cells. *Hum Immunol.* 2005; 66: 43-55.
162. Reed E, Beer AE, Hutcherson H, King DW, Suciu-Foca N. The alloantibody response of pregnant women and its suppression by soluble HLA antigens and anti-idiotypic antibodies. *J Reprod Immunol.* 1991; 20: 115-123.
163. Webb BJ, Bochan MR, Montel A, Padilla LM, 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; 159:246-254.
164. Sandrin MS, Henning MM, Vaughan HA, McKenzie IF, Parish CR. Serum Ia levels during tumor growth in mice and humans. *J Natl Cancer Inst.* 1981; 66:279-288.
165. Shimura T, Hagihara M, Yamamoto K, Takebe K, Munkhbat B, Ogoshi K, Mitomi T, Nagamachi Y, Tsuji K. Quantification of serum-soluble HLA class I antigens in patients with gastric cancer. *Hum Immunol.* 1994; 40: 183-191.
166. Hagihara M, Shimura T, Takebe K, Munkhbat B, Hosoi K, Kagawa T, Watanabe N, Matsuzaki S, Yamamoto K, Sato K, Tsuji K. Serum concentrations of soluble HLA-class I and CD8 forms in patients with viral hepatic disorders. *J Gastroenterol.* 1997; 32:338–343.

167. Herlyn M, Lange B, Bennicelli J, Blaszczyk M, Guerry D 4th, Koprowski H. Increased levels of circulating HLA-DR antigen in sera of patients with acute lymphoblastoid leukemia. *Leuk Res.* 1984; 8(3):323-333.
168. Rebmann V, Ugurel S, Tlilgen W, Reinhold U, Grosse-Wild H. Soluble HLA-DR is a potent predictive indicator of disease progression in serum from early-stage melanoma patients. *Int. J. Cancer.* 2002; 100: 580–585.
169. Steinborn A, Rebmann V, Scharf A, Sohn C, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-DR levels in the maternal circulation of normal and pathologic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 188:473-479.
170. Rizzo R, Mapp CE, Melchiorri L, Maestrelli P, Visentin A, Ferretti S, Bononi I, Miotto D, Baricordi OR. Defective production of soluble HLA-G molecules by peripheral blood monocytes in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 115: 508-513.
171. Heiligenhaus A, et al. Soluble HLA class I and HLA-DR plasma levels in patients with anterior uveitis. *Tissue Antigens.* 2004; 63:369-375.
172. Sakaguchi K, Koide N, Takenami T, Matsushima H, Takabatake H, Ferrone S, Tsuji T. Soluble HLA class I antigens in sera of patients with chronic hepatitis. *Gastroenterol Jpn.* 1992; 27:206-213.
173. Puppo F, Picciotto A, Brenci S, Varagona G, Scudeletti M, Ghio M, Balestra V, Celle G, Indiveri F. Behavior of soluble HLA class I antigens in patients with chronic hepatitis C during interferon therapy: an early predictor marker of response? *J Clin Immunol.* 1995; 15:179-188.
174. Inostroza J, Munoz P, Espinoza R, Millaqueo L, Diaz P, Leiva L, Sorensen R. Quantitation of soluble HLA class I heterodimers and beta 2-microglobulin in patients with active pulmonary tuberculosis. *Hum Immunol.* 1994; 40:179-189.
175. Park CW, Yun SN, Yang CW, Kim TG, Han H, Choi EJ, Chang YS, Bang BK. Serum and urine soluble HLA class I antigen concentrations are increased in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Korean J Inter Med.* 1997; 12:52-60.
176. Moore C, Ehlayel M, Inostroza J, Leiva LE, Sorensen RU. Elevated levels of soluble HLA class I (sHLA-I) in children with severe atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1997; 79:113-119.
177. Alvarez-Cermeno J, Echevarria JM, Villar LM, Lazaro I, Bootello A, Gonzalez-Porque P. Soluble class I antigens in serum and CSF of patients with varicella-zoster virus meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1989; 52:1194-2001.
178. 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.* 1999; 93:1770–1777.
179. Filaci G, Contini P, Brenci S, Lanza L, Scudeletti M, Indiveri F, Puppo F. Increased serum concentration of soluble HLA-DR antigens in HIV infection and following transplantation. *Tissue Antigens.* 1995; 46:117-126.
180. Ferreira A, Villar ML, Alvarez Cermeno JC, Revilla Y, Garcia Rodriguez MC, Fontan G, Gonzalez-Porque P. Quantification of soluble serum HLA class I antigens in healthy volunteers and AIDS patients. *Clin Chim Acta.* 1988; 174:207-215.



181. Alvarez-Cermeno JC, Casado C, Villar LM, Ferreira A, Varela JM, Dominguez M, Bootello A, Najera R, Gonzalez- Porque P: Soluble class 1 antigens (sHLA) in CSF and serum of patients with HIV infection. *Acta Neurol Scand* 82(1):14, 1990.
182. Puppo F, Orlandini A, Ruzzenenti R, Comuzio S, Salamito A, Farinelli A, Stagnaro R, Indiveri F. HLA class I soluble antigen serum levels in HIV-positive subjects- correlation with cellular and serological parameters. *Cancer Detect Prevent.* 1990; 14:321-329.
183. Puppo F, Brenci S, Lanza L, Bosco O, Imro MA, Scudeletti M, Indiveri F, Ferrone S. Increased level of serum HLA class I antigens in HIV infection. Correlation with disease progression. *Hum Immunol.* 1994; 40:259-265.
184. Puppo F, Ruzzenenti R, Brenci S, Lanza L, Scudeletti M, Indiveri F. Major histocompatibility gene products and human immunodeficiency virus infection. *J Lab Clin Med.* 1991; 117:91-99.
185. Capobianchi MR, Ameglio F, Tosi R, Dolei A. Differences in the expression and release of DR, BR, and DQ molecules in human cells treated with recombinant interferon gamma: comparison to other interferons. *Hum Immunol.* 1985; 13:1-12.
186. Le J, Hua JC. Production of soluble HLA-class-I molecules by IFN-gamma-induced colon-adenocarcinoma cells. *Int J Cancer.* 1995; 60:576-583.
187. Zavazava N, Muller-Ruchholtz W. Quantitative and biochemical characterization of soluble HLA class I antigens shed by cultured human cells. *Hum Immunol.* 1994; 40:174-181.
188. Adamashvili IM, McDonald JC, Fraser PA, Milford EL, Pressly TA, Gelder FB. Soluble class I HLA antigens in patients with rheumatoid arthritis and their families. *J Rheumatol.* 1995; 22:1025-1034.
189. Tsuchiya N, Shiota M, Yamaguchi A, Ito K. Elevated serum level of soluble HLA class I antigens in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996; 39:792-800.
190. Adamashvili I, Wolf R, Aultman D, Milford EL, Jaffe S, Hall V, Pressly T, Minagar A, Kelley R. Soluble HLA-I (s-HLA-I) synthesis in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2003; 23:294-303.
191. Adamashvili I, Pressly T, Gebel H, Milford E, Wolf R, Mancini M, Sittg K, Ghali GE, Hall V, McDonald JC. Soluble HLA in saliva of patients with autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatol Int.* 2002; 22:71-76.
192. Hagihara M, Shimura T, Yamamoto K, Sujirachato K, Tsuji S, Yamamura M, Tsuji K. Clinical significance of serum soluble HLA class I antigens in systemic lupus erythematosus. *Tokai J Exp Clin Med.* 1993; 18:61-72.
193. Stevenson FK, Douglass WA, Spellerberg MB, Walters MT, Cawley MI. Soluble histocompatibility antigens in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 1990; 80:32-41.
194. Verbruggen LA, Versaen H, Rebmann V, Duquet W, De Cock S, Grosse-Wilde H, Demanet C. Soluble. HLA-DR Levels in Serum are Associated With Therapy and Genetic Factors in Rheumatoid Arthritis, *Human Immunology.* 2002; 63:758-764.
195. Verbruggen LA, 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.

196. Filaci G, Contini P, Brenci S, Gazzola P, Lanza L, Scudeletti M, Indiveri F, Mancardi GL, Puppo F. Soluble HLA class I and class II molecule levels in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Hum Immunol.* 1997; 54:54-62.
197. Schwartz M, Ziv Y. Immunity to self and self-maintenance: a unified theory of brain pathologies. *Trends Immunol.* 2008; 29: 211-219.
198. Kalmus H. The discrimination by the nose of the dog of individual human odors and in particular the odors of twins. *Br J Animal Behavi.* 1955; 3:25-32.
199. Restrepo D, Lin W, Salcedo E, Yamazaki K, Beauchamp G. Odortypes and MHC peptides: Complementary chemosignals of MHC haplotype? *Trends Neurosci.* 2006; 29:604-609.
200. Yamazaki K, Boyse EA, Mike V, Thaler HT, Mathieson BJ, Abbott J, Boyse J, Zayas ZA, Thomas L. Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *J Exp Med.* 1976; 144:1324-1330.
201. Yamazaki K, Yamaguchi M, Baranoski L, Bard J, Boyse EA, Thomas. Recognition among mice. Evidence from the use of a Y-maze differentially scented by congenic mice of different major histocompatibility types. *J Exper Medi.* 1979; 150:755-761.
202. Yamaguchi M, Yamazaki K, Beauchamp GK, Bard J, Thomas L, Boyse EA. Distinctive urinary odors governed by the major histocompatibility locus of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1981; 78:5817-5824.
203. Yamazaki K, Beauchamp GK, Thomas L, Boyse EA: The hematopoietic system is a source of odorants that distinguish major histocompatibility types. *J Exp Med.* 1985; 162:1377-1385.
204. Vassiliadis MA, et al. Emotion transfer through transmission of vocal messages in mice. 4th International Conference on Bio-Acoustics. 2007; 29 Pt.3
205. Brown RE, Roser B, Singh PB. Class I and class II regions of the major histocompatibility complex both contribute to individual odors in congenic inbred strains of rats. *Behav Genet.* 1989; 19:659-667.
206. Kamada N, Davies HS, Roser B. Reversal of transplantation immunity by liver grafting. *Nature.* 1981; 292: 840-850.
207. Sumimoto R, Kamada N. Specific suppression of allograft rejection by soluble class I antigen and complexes with monoclonal antibody. *Transplantation.* 1990; 50:678-685.
208. Law LW, Appella E, Strober S, Wright PW, Fischetti T. Soluble transplantation antigens. Further studies of their tolerogenic properties. *Transplantation.* 1974; 18:487-496.
209. Priestley CA, Dalchau R, Sawyer GJ, Fabre JW. A detailed analysis of the potential of water-soluble classical class I MHC molecules for the suppression of kidney allograft rejection and in vitro cytotoxic T cell responses. *Transplantation.* 1989; 48:1031-1041.
210. Krensky AM. T cells in autoimmune and allograft rejection. *Kidney Int Suppl.* 1994; 44:50-65.
211. Nimelstein SH, Hotti AR, Holman HR. Transformation of histocompatibility immunogen into a tolerogen. *J Exp Med.* 1973; 138:723-734.

212. Athanassakis I, Vassiliadis S. T-regulatory cells: are we re-discovering T suppressors?. *Immunology Letters*. 2002; 84:179-188.
213. Krensky AM, Clayberger C. HLA-derived peptides as novel immunotherapeutics. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995; 75:112-119.
214. Krensky AM, Clayberger C. Human leukocyte antigen derived peptides as novel immunosuppressives. *Proc Assoc Am Physicians*. 1995.107:81-90.
215. Carbone E, Terrazzano G, Colonna M, Tuosto L, Piccolella E, Franksson L, Palazzolo G, Perez-Villar JJ, Fontana S, Karre K, Zappacosta S. Natural killer clones recognize specific soluble HLA class I molecules. *Eur J Immunol*. 1996; 26:683-692.
216. Nag B, Kendrick T, Arimilli S, Yu SCT, Sriram S. Soluble MHC II–Peptide Complexes Induce Antigen-Specific Apoptosis in T Cells. *Cellular Immunology*. 1996; 170:25-33.
217. 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<sup>+</sup> T cells through transfer of the peptide to T cell MHC molecules. *PNAS*. 2002; 99:13729-13734.
218. Zavazava N, Kronke M. Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nat Med*. 1996; 2:1005-1012.
219. Kress M, Cosman D, Khoury G, Jay G. Secretion of a transplantation-related antigen. *Cell*. 1983; 34:189-197.
220. Weyand CM, Jendro M, Goronzy JJ. Soluble HLA-DR molecules in patients with HLA class II versus class I associated disorders. *Autoimmunity*. 1991; 8:281-290.
221. Nicolle MW, Nag B, Sharma SD, Willcox N, Vincent A, Ferguson DJ, Newsom-Davis J. Specific tolerance to an acetylcholine receptor epitope induced in vitro in myasthenia gravis CD41 lymphocytes by soluble major histocompatibility complex class II-peptide complexes. *J Clin Invest*. 1994; 93:1361-1369.
222. Sharma DS, Nag B, Xiao-Min S, Green D, Spack E, Clark RB, Srirman S. Antigen-specific therapy of experimental allergic encephalomyelitis by soluble class II major histocompatibility complex-peptide complexes. *Immunology*. 1991; 88:34-46
223. Sardis M, Miltiadou P, Bakela K, Athanassakis I. Serum-derived MHC class II molecules: Potent regulators of the cellular and humoral immune response. *Immunobiology*. 2010; 215:194-205.
224. Ostman S, Taube M, Telemo E. Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent. *Immunology*. 2005; 116:464–476.
225. 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.
226. 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 *Scandinavian Journal of Immunology*. 2009; 70:584–595.
227. Loke P, Allison JP. Emerging mechanisms of immune regulation: the extended B7 family and regulatory T cells. *Arth Res Therapy*. 2004;6:208–14.
228. Fischer UB, Jacovetty EL, Medeiros RB et al. MHC class II deprivation impairs CD4 T cell motility and responsiveness to antigenbearing dendritic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:7181–7186.

229. 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*. 2008; 24: 836-843
230. Ballantine DS, White RM, Martin SJ, Ricco AJ, Zellers ET, Frye GC, Wohltjen H. *Acoustic Wave Sensors*. Academic Press San Diego, CA. 1997.
231. Tsortos A, Papadakis G, Mitsakakis K, Melzak AK, Gizeli E. Quantitative Determination of Size and Shape of Surface-Bound DNA Using an Acoustic Wave Sensor. *Biophysical Journal*. 2008; 94:2706-2715.
232. Vevis K, Matheakakis A, Kyvelidou C, Bakela K, Athanassakis I. Characterization of antigen-binding and MHC class II-bearing T cells with suppressive activity in response to tolerogenic stimulus. *Immunobiology*. 2012; 217:100-110.
233. Candiano G, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 2004; 25:1327-1333.
234. Huynh ML, Russell P, Walsh B. Tryptic digestion of in-gel proteins for mass spectrometry analysis. *Methods Mol Biol*. 2009; 5:507-513.
235. 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. *Biophysics Letter*. 2008; 4963-4971.

Πίνακας των πεπτιδίων ταυτοποιημένων από την ανάλυση nLC-MS/MS

M= Mascot S= Sequest	Probability Based Scores						Coverage						Peptides					
	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
Serum albumin	1630,72	253,55	1265,82	205,40	61,09	3,67	68,59	73,03	67,27	69,24	2,14	14,05	46	51	42	47	1	9
Hemopexin	75,67	14,60		0,00			18,26	27,17		6,52		2,21	7	11		1		1
Serine protease inhibitor A3K	49,34	8,99					10,29	14,83					2	3				
Serotransferrin	37,84	3,49		4,74			2,01	8,75		5,45			1	5		3		
Neurofilament heavy polypeptide	35,11	1,87	34,82	2,57	28,06	1,97	6,88	11,10	0,83	16,42	0,83	6,93	2	5	2	9	1	4
Fc fragment of IgG binding protein	34,56	2,06	0,00	2,08	0,00	1,83	0,35	1,97	0,35	0,35	0,35	6,15	1	3	1	1	1	3
Antithrombin-III	30,38	4,52					3,66	6,02					2	3				
Ras-responsive element-binding protein 1	27,94						1,88					2,43	1					1
Isoform 2 of Fibroblast growth factor receptor 4	27,67						0,93						1					
zinc finger and BTB domain-containing protein 43 isoform a	26,92	2,11	0,00	2,09	0,00	0,00	1,98	1,98	1,98	3,77		3,62	1	1	2	3		2
solute carrier family 26, member 10	0,00	1,90	33,67	1,86	0,00	2,33	1,17	1,17	1,17	1,17	1,17	10,06	1	1	1	1	1	6
Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 5	0,00	0,00	0,00	1,85	29,12	1,63	0,86	4,39	0,86	3,32	0,86	4,31	1	4	1	4	1	2
Fumarylacetoacetase		0,00				105,37		5,25				100,00		1				30
Isoform 1 of EH domain-binding protein 1						20,64						30,97						25
Isoform 1 of T-cell surface glycoprotein CD4				0,00		17,21				1,75		26,90				1		21
Putative uncharacterized protein						13,54						26,87						18
Isoform 1 of Pleckstrin homology-like domain family B member 1						10,66						23,53						15
39S ribosomal protein L50, mitochondrial				0,00		10,12					10,69	23,40				1		14
Uncharacterized protein						9,94						23,15						14
Putative uncharacterized protein						9,15						21,14						14
Isoform 1 of Sugar phosphate exchanger 2						8,18						20,53						13
MKIAA0857 protein (Fragment) OS=Mus musculus GN=Rab11fip5 PE=1 SV=1 - [Q6ZQ33_MOUSE]						7,69						20,11						13
Isoform 1 of BEN domain-containing protein 6				1,73		7,44				26,33		19,69				4		13
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 16		0,00				7,06		15,39				19,53		6				13
centrosomal protein of 290 kDa				0,00		5,56				6,82		19,35				14		13
Isoform 1 of Collagen alpha-1(XIII) chain				0,00		5,43				9,99		19,21				4		12
Zinc finger and BTB domain containing 26, isoform CRA_b		0,00		0,00		4,99		13,64		8,64		18,80		3		2		12
Putative uncharacterized protein (Fragment)						4,46						18,55						12
UPF0562 protein C7orf55 homolog						4,45						17,73						12
Protein NPAT						4,30						16,81						11
Isoform 1 of Metastasis suppressor protein 1						4,19						16,34						11

M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides					
	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S		
S= Sequest	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
Zinc finger homeobox protein 4		2,02		3,53		4,07		4,08		1,63		15,89		8		5		11
Endonuclease/exonuclease/ phosphatase family domain- containing protein 1						3,99						15,65						11
Polypeptide N- acetylgalactosaminyl transferase 6		2,18		1,92		3,95		7,88		9,49		15,57		3		4		11
RNA binding motif protein 12						3,93						14,89						11
Myosin-7B		0,00		0,00		3,90		3,66		3,86		14,86		5		7		11
BTB/POZ domain-containing protein KCTD4						3,78						14,57						11
B-cell CLL/lymphoma 9 protein				0,00		3,75				4,14		14,48				2		10
Isoform 3 of Serine/threonine- protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit gamma isof						3,71						14,24						10
Isoform 1 of Cytoskeleton- associated protein 5		0,00				3,61		4,23				13,91		5				9
Isoform 1 of FH1/FH2 domain- containing protein 3		0,00				3,60		4,63				13,90		4				8
Peroxisome proliferator- activated receptor alpha						3,56						13,70						8
Coiled-coil domain-containing protein 39						3,43						13,67						8
Tyrosyl-tRNA synthetase				0,00		3,43				10,99		13,49				3		8
hypothetical protein LOC546849						3,41						12,94						8
Isoform 1 of Rho-associated protein kinase 1		0,00				3,40		11,74				12,63		9				8
IgLON family member 5						3,40						12,42						8
Zinc finger protein 518A						3,39						12,38						8
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 9c isoform 2						3,30						12,28						8
Putative uncharacterized protein OS=Mus musculus GN=Slc3a2 PE=2 SV=1 - [Q8BTJ9_MOUSE]						3,24						12,10						8
Isoform 1 of Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1						3,23						11,98						8
Uncharacterized protein						3,11						11,87						8
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6						2,89						11,82						7
serine/threonine-protein kinase MARK2 isoform 4						2,86						11,81						7
Isoform 1 of Ras and EF-hand domain-containing protein homolog			0,00	1,90		2,82		1,75	5,26			11,46			1	2		7
Isoform 1 of Acyl-CoA synthetase family member 4						2,81						11,31						7
Putative uncharacterized protein						2,81						11,07						7
Histamine N-methyltransferase						2,66						10,80						7
HERV-H LTR-associating protein 1 homolog						2,62						10,69						7
Isoform 1 of Stromal membrane- associated protein 2				0,00		2,58				5,61		10,57				1		7

M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides					
S= Sequest	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S		
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
Isoform 1 of TRAF-interacting protein		1,75		2,06		2,53		15,96		5,96		10,54		6		3		7
Isoform 1 of Solute carrier family 22 member 23						2,50						10,54						7
Nardilysin, N-arginine dibasic convertase, NRD convertase 1						2,50						10,51						7
vomeronasal receptor Vmn2r113						2,49						10,45						6
Breast cancer type 1 susceptibility protein homolog						2,47						10,32						6
Isoform 1 of Fanconi anemia group D2 protein homolog		0,00				2,42		3,52				10,19		3				6
Flotillin-1		4,40				2,40		17,76				10,13		4				6
Chloride intracellular channel protein 6						2,39						10,13						6
ornithine decarboxylase antizyme 3						2,35						10,07						6
Rho GTPase-activating protein18		1,62		1,75		2,30		4,07		11,01		10,06		2		5		6
Isoform 1 of Ankyrin repeat domain-containing protein 13C		0,00		2,55		2,29		3,88		3,88		10,03		1		1		6
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U				0,00		2,29				7,75		9,96				4		6
Isoform 1 of Coiled-coil domain-containing protein 130		0,00				2,29		2,60				9,88		2				6
Coiled-coil domain-containing protein 73		0,00		2,27		2,29		6,94		7,13		9,75		5		5		6
T-complex protein 1 subunit epsilon						2,25						9,73						6
B-cell receptor-associated protein 29						2,22						9,46						6
Uncharacterized protein						2,22						9,44						5
Isoform 1 of Dual specificity protein phosphatase CDC14B						2,22						9,41						5
NLR family, pyrin domain containing 1A		0,00				2,21		3,54				9,36		2				5
Isoform 1 of DmX-like protein 2				0,00		2,21				0,89		9,30				2		5
Predicted		3,79		3,56		2,21		12,45		7,94		9,13		4		3		5
Dynein, axonemal, heavy chain 7B		0,00		0,00		2,21		5,31		4,82		9,06		15		14		5
Zinc finger protein 454						2,20						8,97						5
Leucine-rich repeat and transmembrane domain-containing protein 2						2,19						8,96						5
Isoform 1 of X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein 1		0,00				2,19		4,81				8,94		4				5
Ras-related protein Rab-1B						2,19						8,77						5
Coatomer subunit delta				0,00		2,18				3,52		8,71				1		5
Isoform 1 of E3 ubiquitin-protein ligase TRIM23						2,17						8,65						5
Nucleoporin GLE1						2,16						8,61						5
Nepilysin						2,15						8,58						5
Isoform 1 of Protein PTHB1				0,00		2,15				2,82		8,54				1		5
Putative uncharacterized protein (Fragment) OS=Mus musculus PE=2 SV=1						2,14						8,53						5

M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides					
S= Sequest	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S		
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
Stress-70 protein, mitochondrial		1,63		0,00		2,11		3,83		4,71		8,38		2		2		4
Putative uncharacterized protein		2,12		2,29		2,11		6,05		15,31		8,36		3		4		4
Uncharacterized protein						2,11						8,27						4
ninein isoform 1		2,11		0,00		2,11		6,44		3,60		8,26		9		6		4
Serine/threonine-protein kinase MRCK gamma		0,00		2,04		2,10		2,97		2,13		8,18		3		2		4
Numb-like protein						2,10						8,18						4
Killer cell lectin-like receptor family I member 2						2,10						8,15						4
Uncharacterized protein CXorf21 homolog						2,07						8,03						4
radixin isoform b						2,07						7,98						4
Serine (Or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (Alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 9 OS=Mus musculus GN=Serpina9 PE=2 SV=1 - [A2RSX5_MOUSE]						2,07						7,97						4
DNA-binding protein SATB1						2,07						7,96						4
Putative uncharacterized protein (Fragment)						2,06						7,87						4
Isoform 1 of E3 ubiquitin-protein ligase FANCL						2,06						7,81						4
L-fucose kinase		0,00				2,06		1,93				7,71		2				4
Isoform 2 of Uncharacterized protein KIAA1751 homolog				0,00		2,05				11,98		7,69				4		4
Isoform 1 of Kinesin-like protein KIF24						2,05						7,67						4
Isoform A of Bromodomain and WD repeat-containing protein 1		0,00		0,00		2,05		5,99		7,60		7,57		8		12		4
Gm766 protein						2,05						7,53						4
Opioid receptor-like 1						2,04						7,50						4
disabled homolog 2-interacting protein isoform 3				2,05		2,03				5,52		7,46				5		4
thyroid hormone receptor interactor 11				1,60		2,03				6,68		7,46				6		4
Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1, isoform CRA_b						2,02						7,42						4
Uncharacterized protein						2,02						7,41						4
Putative uncharacterized protein						2,02						7,33						4
Isoform 6 of Protein FAM65B				2,24		2,02				2,86		7,32				2		4
Tuftelin-interacting protein 11		1,61				2,02		7,40				7,29		4				4
Isoform 1 of E3 ubiquitin-protein ligase UBR4						2,01						7,25						4
Growth factor receptor-bound protein 14		0,00				2,01		6,69				7,20		2				4
Zinc finger, FYVE domain containing 9				0,00		2,00				3,14		7,12				2		4
Isoform 1 of Trinucleotide repeat-containing gene 18 protein						2,00						7,11						4
Brain-specific angiogenesis inhibitor 2				0,00		1,99				2,11		7,07				3		4



M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides						
S= Sequest	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S			
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	
Isoform PLEC-1H of Plectin						1,99						7,03							4
Isoform 2 of Ribosomal protein S6 kinase delta-1						1,98						6,99							4
Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 3		0,00		0,00		1,97		4,62		2,27		6,89		4		3			3
Putative uncharacterized protein OS=Mus musculus GN=Hspa5 PE=2 SV=1 - [Q3U6V3_MOUSE]						1,97						6,82							3
A-kinase anchor protein 17B						1,95						6,76							3
Uncharacterized protein						1,94						6,75							3
Proenkephalin-B						1,92						6,75							3
Isoform 1 of Nipped-B-like protein		0,00				1,92		5,40				6,69		9					3
Isoform 1 of WASH complex subunit strumpellin		0,00		0,00		1,91		8,80		4,31		6,67		5		3			3
DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC2				0,00		1,90				5,03		6,66				3			3
Uncharacterized protein						1,90						6,66							3
MKIAA0567 protein (Fragment) OS=Mus musculus GN=Opa1 PE=3 SV=1 - [Q80TX7_MOUSE]						1,90						6,63							3
Isoform 1 of Centriolin		0,00		0,00		1,90		6,00		4,93		6,62		11		7			3
Transcription elongation factor SPT6						1,90						6,61							3
Probable alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase ABH5						1,89						6,56							3
Enkurin						1,89						6,55							3
Bile salt sulfotransferase 2						1,89						6,53							3
Leucine-rich repeat-containing protein 41						1,86						6,44							3
Isoform 1 of Pericentriolar material 1 protein		0,00				1,86		4,25				6,40		7					3
Brpf1 protein				2,09		1,86				5,91		6,29				4			3
Isoform 1 of Rapamycin-insensitive companion of mTOR						1,86						6,25							3
Isoform 4 of Sodium/hydrogen exchanger-like domain-containing protein 1						1,85						6,21							3
leucine, glutamate and lysine rich 1 isoform 1						1,82						6,13							3
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 2		0,00				1,81		1,21				6,04		1					3
EG620155 protein						1,80						6,02							3
ubiquitin specific protease 32				0,00		1,80				1,25		5,96				2			3
GRIP and coiled-coil domain-containing protein 1		0,00				1,79		11,44				5,93		3					3
Isoform 1 of Fibroblast growth factor receptor-like 1						1,79						5,92							3
Uncharacterized protein						1,79						5,82							3
Vimentin		0,00	30,84	0,00		1,78		15,02	1,50	14,16		5,79		4	1	4			3
Isoform 1 of Protein SIX6OS1		0,00				1,78		19,69				5,79		6					3

M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides					
S= Sequest	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S		
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
growth arrest-specific protein 7 isoform b		1,62		1,70		1,78		6,97		5,29		5,69		2		2		3
Rab5 GDP/GTP exchange factor		0,00		0,00		1,78		9,78		5,09		5,68		4		2		3
Sphingomyelin phosphodiesterase 3		0,00				1,77		5,65				5,67		1				3
RAB14 protein variant OS=Mus musculus GN=Rab14 PE=2 SV=1 - [Q50HX1_MOUSE]						1,77						5,65						3
Dynein, axonemal, heavy chain 9		0,00				1,77		4,79				5,63		13				3
Dynein, axonemal, heavy chain 9 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Dnahc9 PE=4 SV=1 - [B1AR52_MOUSE]						1,77						5,59						3
myosin-IIlb		0,00				1,76		6,45				5,54		4				3
E3 ubiquitin-protein ligase BRE1B		0,00		0,00		1,76		9,79		2,70		5,54		7		2		3
protein piccolo isoform 1		0,00				1,74		3,79				5,53		12				3
Predicted						1,73						5,51						3
2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase						1,73						5,48						3
Madh5 protein						1,73						5,47						3
Putative uncharacterized protein						1,73						5,41						3
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B						1,72						5,41						3
Phosphate cytidyltransferase 2, ethanolamine						1,72						5,40						3
Isoform 1 of Calpain-8						1,72						5,37						3
Isoform 1 of Rho-guanine nucleotide exchange factor						1,72						5,37						3
Putative uncharacterized protein						1,72						5,37						3
Golgin subfamily A member 4		2,15		3,76		1,71		6,79		7,46		5,34		11		12		3
myosin-IXa						1,71						5,31						3
Isoform 1 of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 45				1,72		1,70				5,54		5,30				4		3
Myosin-Ia		0,00		2,02		1,70		5,08		3,74		5,30		4		3		3
Homeobox protein GBX-2						1,69						5,19						3
Ctca1 protein						1,69						5,10						3
Nogo-B receptor						1,69						5,07						2
Kinetochore-associated protein 1				0,00		1,68				1,81		5,07				2		2
Putative uncharacterized protein OS=Mus musculus GN=Ctsc PE=2 SV=1 - [Q3TIF1_MOUSE]						1,68						5,06						2
myosin-11 isoform 1		0,00		0,00		1,68		8,20		6,81		5,00		11		9		2
Laminin subunit alpha-1						1,68						4,98						2
NHL repeat-containing protein 2						1,68						4,95						2
Transforming acidic coiled-coil containing protein 3b						1,68						4,93						2
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 14						1,68						4,88						2

M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides						
S= Sequest	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S			
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	
Transmembrane protein 183						1,68						4,84							2
Isoform 1 of Calcium uptake protein 1, mitochondrial						1,67						4,83							2
Centromere protein J				0,00		1,67				6,70		4,80					9		2
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial				1,72		1,66				8,21		4,76					2		2
Isoform 1 of Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 3						1,66						4,76							2
Inactive phospholipase C-like protein 2		0,00				1,66		4,26				4,75		3					2
Mast cell protease 9						1,65						4,71							2
Isoform 1 of Probable E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2		0,00		0,00		1,65		4,37		4,10		4,69		13		11			2
Uncharacterized protein						1,65						4,69							2
5-hydroxytryptamine receptor 3A isoform 2						1,65						4,67							2
Fermitin family homolog 1		0,00				1,64		13,29				4,65		4					2
Isoform 1 of Spectrin alpha chain, brain		0,00		1,74		1,64		5,78		3,40		4,61		10		7			2
Putative uncharacterized protein OS=Mus musculus GN=Atad2b PE=2 SV=1 - [Q8C3P6_MOUSE]						1,64						4,55							2
Isoform 2 of Nuclear receptor corepressor 1		0,00				1,64		4,52				4,53		9					2
Isoform 1 of RNA polymerase-associated protein LEO1						1,64						4,52							2
Isoform 1 of AFG3-like protein 1		0,00		0,00		1,64		13,69		3,17		4,52		4		2			2
Isoform 1 of G patch domain-containing protein 4		0,00		0,00		1,64		3,37		13,01		4,51		1		3			2
Four and a half LIM domains protein 3						1,64						4,50							2
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16		5,07		9,20		1,64		10,54		12,26		4,46		8		9			2
kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 7				0,00		1,64				5,94		4,44				4			2
RRP12-like protein						1,64						4,41							2
Siglec-F variant						1,64						4,40							2
fibronectin type III domain containing 1						1,63						4,40							2
Fibroblast growth factor (Acidic) intracellular binding protein, isoform CRA_d						1,63						4,39							2
Isoform 1 of General transcription factor 3C polypeptide 1		0,00		0,00		1,63		4,95		5,71		4,39		5		8			2
programmed cell death protein 7				1,75		1,63				8,06		4,38				4			2
TBC1 domain family member 1						1,63						4,36							2
Isoform 1 of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit		2,08		0,00		1,63		4,60		4,77		4,35		13		16			2
Novel protein similar to arylacetamide deacetylase-like 4 Aadacl4				0,00		1,63				7,12		4,33				1			2

M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides						
S= Sequest	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S			
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	
Putative uncharacterized protein		0,00				1,63		8,19				4,27		7					2
Zinc finger BED domain-containing protein 4				0,00		1,63				5,82		4,26				5			2
Transcriptional regulator ATRX		0,00				1,63		8,52				4,24		15					2
Fibrous sheath-interacting protein 2		0,00		2,07		1,62		3,69		3,89		4,14		17		19			2
Putative uncharacterized protein						1,62						4,11							2
Thyroid peroxidase						1,62						4,11							2
Dedicator of cytokinesis protein 2						1,62						4,08							2
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2						1,62						4,06							2
Uncharacterized protein						1,62						4,05							2
Serum paraoxonase/arylesterase 1						1,62						4,04							2
Isoform 1 of Bromodomain-containing protein 3				0,00		1,62				6,06		4,03				5			2
MKL/myocardin-like protein 2 isoform 1						1,62						4,02							2
Isoform 1 of Glycosyltransferase 8 domain-containing protein 1						1,62						3,99							2
Sperm-associated antigen 17		1,91				1,61		6,57				3,98		8					2
Collagen alpha-1(XIX) chain						1,61						3,97							2
Zinc finger protein 451, isoform CRA_a						1,61						3,92							2
E3 ubiquitin-protein ligase RNF168 OS=Mus musculus GN=Rnf168 PE=2 SV=3 - [RN168_MOUSE]						1,61						3,92							2
Phospholipase A-2-activating protein						1,61						3,92							2
Ig heavy chain V region MOPC 141						1,61						3,88							2
Uncharacterized protein		1,81				1,60		7,12				3,87		3					2
Putative uncharacterized protein				0,00		1,60				16,44		3,85				1			2
Isoform 1 of Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats				0,00		1,60				5,32		3,82				7			2
Isoform 1 of Dedicator of cytokinesis protein 9		0,00		0,00		1,60		7,69		4,28		3,80		8		5			2
Protocadherin 1						1,60						3,79							2
Isoform 8 of Myelin basic protein						1,53						3,77							2
Histone-lysine N-methyltransferase setd3		15,23		11,89		0,00		26,45		26,45		3,76		2		2			2
Switch-associated protein 70		3,80		2,17		0,00		14,70		10,09		3,76		7		5			2
AHNAK nucleoprotein isoform 1		7,30		1,73		0,00		10,24		5,02		3,74		20		13			2
Centrosomal protein 152		1,61		1,64		0,00		11,00		9,62		3,72		10		9			2
Protein Wnt-3a		2,18				0,00		8,24				3,72		1					2
Tripartite motif-containing protein 43C		1,79		0,00		0,00		2,24		2,24		3,72		1		1			2

M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides					
S= Sequest	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S		
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
Vigilin		0,00		2,47	20,85	0,00		6,70		4,73	1,18	3,71		4		4	1	2
nasopharyngeal epithelium specific protein 1		2,11		0,00		0,00		14,70		12,16		3,66		5		4		2
Myosin-6				3,39		0,00				7,53		3,63				9		2
Isoform 1 of EF-hand calcium-binding domain-containing protein 6				1,70		0,00				4,49		3,58				6		2
Synaptonemal complex protein 1		1,75		1,67		0,00		3,63		7,05		3,57		3		4		2
SH2B adaptor protein 2		0,00		2,02		0,00		9,34		6,60		3,55		2		2		2
Isoform 1 of Cytosol aminopeptidase		0,00		9,18		0,00		4,43		8,67		3,54		1		3		2
Putative uncharacterized protein		0,00		2,67		0,00		3,56		8,91		3,53		1		1		2
Oxysterol-binding protein		10,97		8,62		0,00		7,28		4,23		3,52		4		3		2
Breast cancer type 2 susceptibility protein homolog		0,00		3,69		0,00		3,18		2,82		3,52		7		7		2
Bloom syndrome protein homolog		0,00		2,08		0,00		5,58		5,01		3,49		6		6		2
Guanylyl cyclase GC-E		0,00		1,61		0,00		6,23		1,26		3,49		4		1		2
Cullin-3		1,62		3,60		0,00		13,93		7,94		3,48		7		5		2
Isoform 1 of Carboxypeptidase M		2,27		2,08		0,00		4,97		2,71		3,47		2		1		2
Centrosome-associated protein CEP250		1,66				0,00		2,73				3,47		6				2
Murinoglobulin-1		1,88		1,66		0,00		3,25		4,00		3,46		3		4		2
Pyruvate kinase isozymes R/L		2,21		0,00		0,00		6,79		4,53		3,43		2		1		2
Isoform 1 of Nesprin-1		0,00		4,31		0,00		6,89		3,95		3,43		37		23		2
DNA repair protein REV1				1,84		0,00				7,61		3,40				7		2
Eml5 protein				1,72		0,00				9,07		3,39				7		2
Retinal guanylyl cyclase 2		0,00		3,83		0,00		4,60		6,50		3,39		4		6		1
nuclear mitotic apparatus protein 1		1,84		0,00		0,00		10,27		6,64		3,39		12		9		1
Nxf2 protein				2,15		0,00				10,71		3,37				3		1
Isoform 1 of Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1		3,47		3,30		0,00		1,88		1,76		3,37		6		6		1
Leucine-rich repeat-containing protein 14B		1,91		0,00		0,00		6,86		6,86		3,35		2		2		1
Isoform 2 of Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein		0,00		1,60		0,00		8,71		2,68		3,35		2		2		1
Isoform 1 of Protein unc-80 homolog		2,17	38,74	2,26		0,00		2,94	0,34	3,07		3,31		7	1	9		1
Isoform 1 of WD repeat-containing protein 16		2,09		2,06		0,00		6,13		3,87		3,29		3		2		1
Scavenger receptor class A member 3		0,00		2,24		0,00		5,61		14,19		3,29		3		5		1
Isoform 1 of Janus kinase and microtubule-interacting protein 3		2,12		1,85		0,00		4,38		2,61		3,28		3		3		1
Aff4 protein		0,00		1,81		0,00		10,88		8,31		3,27		8		7		1
nucleolar protein 8		0,00		3,33		0,00		8,15		9,27		3,21		6		7		1

M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides						
S= Sequest	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S			
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase MLK4		2,01				0,00		8,08				3,11		5					1
Isoform 1 of Bcl-2-associated transcription factor 1		4,39		4,51		0,00		6,31		11,21		3,07		4			7		1
BAH and coiled-coil domain-containing protein 1		3,40		0,00		0,00		3,21		4,84		3,07		6			8		1
Isoform 1 of Leucine-rich repeat-containing protein KIAA1731		0,00		2,08		0,00		3,65		2,99		3,05		5			4		1
Tubulin polyglutamylase TTL4		1,66		0,00		0,00		6,45		4,36		3,05		4			4		1
Treslin		2,07				0,00		5,19				3,04		7					1
hect domain and RCC1-like domain 1		1,82		1,71		0,00		5,78		2,80		3,03		15			10		1
Isoform 4 of Centrosome and spindle pole associated protein 1		2,25		2,22		0,00		7,44		5,43		2,96		6			5		1
Dynein heavy chain 5, axonemal		0,00		2,57		0,00		5,43		3,85		2,90		13			12		1
DNA topoisomerase 1		1,60				0,00		8,74				2,88		5					1
papilin precursor		1,98		1,83		0,00		5,78		1,25		2,86		4			1		1
Isoform 1 of Sal-like protein 3		1,86		2,13		0,00		2,65		0,98		2,81		2			1		1
Roquin		0,00		2,18		0,00		7,08		10,53		2,79		4			7		1
WD repeat domain 52		0,00		0,00	24,64	0,00		5,05		5,97	0,38	2,78		8			8	1	1
TBP-associated factor 170				1,71		0,00				2,54		2,78					3		1
N-terminal kinase-like protein		2,13		0,00		0,00		1,24		2,36		2,70		1			2		1
Dedicator of cytokinesis 7		18,17	0,00	9,50		0,00		5,12	0,75	4,75		2,63		7	1		5		1
plexin B2		1,76				0,00		2,61				2,62		4					1
Coiled-coil domain-containing protein 81		1,79		6,97				16,21		20,64		2,61		5			8		1
Isoform 1 of Phospholipase B1, membrane-associated		1,75		0,00				3,72		1,49		2,58		4			2		1
ATPase, class VI, type 11B		2,01		1,70				4,51		5,45		2,57		4			4		1
Isoform 1 of Microtubule-associated tumor suppressor candidate 2 homolog		1,93						1,92				2,55		2					1
CDK5 regulatory subunit-associated protein 3		2,10		1,94				4,37		9,34		2,49		2			4		1
Plastin-3		1,63						3,65				2,48		2					1
Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2		0,00		2,08				5,25		2,55		2,44		3			1		1
Leukemia-associated protein MLLT1		1,74						9,69				2,42		4					1
Zinc finger protein 623		0,00		2,74				6,01		10,22		2,40		1			2		1
Uncharacterized protein		1,81		1,76				12,03		11,39		2,40		2			1		1
Serine/threonine-protein kinase D1		1,63						5,77				2,39		4					1
Putative E3 ubiquitin-protein ligase UBR7		2,22		0,00				13,41		5,88		2,35		5			3		1
CDK5 regulatory subunit-associated protein 1				2,01						5,95		2,32					2		1
Cystatin-8		1,64		1,70				7,75		7,75		2,27		1			1		1
Isoform 1 of Heat shock 70 kDa protein 4L		5,66		3,58				6,80		3,70		2,27			3		2		1

M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides					
S= Sequest	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
Isoform 1 of A-kinase anchor protein 9		0,00	0,00	1,92				8,24	0,37	7,45		2,27		19	1	22		1
Isoform 1 of Coiled-coil domain-containing protein 18		1,68						10,24				2,27		10				1
Nuclear RNA export factor 1		1,71						10,03				2,18		4				1
Nucleolar protein 14		9,21		0,00				3,26		11,98		2,17		2		6		1
Isoform 1 of Lysine-specific demethylase 3A		0,00		2,07				5,82		3,63		2,15		5		4		1
arginine/serine-rich coiled-coil protein 2 isoform 1		1,97		2,14				15,44		24,19		2,14		3		5		1
Cathepsin R		1,61		1,75				7,46		4,18		2,13		2		1		1
Putative uncharacterized protein (Fragment)		4,35		6,47				13,81		4,45		2,11		3		2		1
Poly A binding protein, cytoplasmic 5		2,05		0,00				9,19		11,55		2,10		3		4		1
Telomerase protein component 1		2,42		0,00				1,90		4,75		2,09		3		6		1
Sodium channel protein type 11 subunit alpha		2,27						6,12				2,06		7				1
Adipogenin		2,22		0,00				26,79		26,79		2,05		1		1		1
E3 ubiquitin-protein ligase TRIM41				1,61						21,12		2,02				3		1
Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein homolog		21,14		14,39				5,70		4,36		1,98		12		11		1
Coagulation factor V		2,23		0,00				5,36		5,73		1,97		9		10		1
Isoform 1 of Obscurin		1,63		0,00				8,92		7,00		1,97		23		14		1
Myomesin-3		2,06		0,00				7,78		4,79		1,95		6		4		1
Isoform 1 of Histone-lysine N-methyltransferase MLL		1,63						5,70				1,95		17				
Isoform 1 of Nesprin-2		0,00		4,73				3,64		4,50		1,94		19		18		
Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein		0,00		2,03				4,32		6,38		1,93		5		6		
Isoform 1 of Transcription initiation factor TFIIID subunit 1		1,67		1,63				8,36		6,66		1,93		8		7		
Peroxisome proliferator-activated receptor delta		1,62						5,45				1,90		2				
conserved oligomeric Golgi complex subunit 3				1,88						6,88		1,89				3		
Receptor-transporting protein 3				1,93						3,59		1,85				1		
Delta-like protein 1		1,82						5,54				1,79		3				
Macrophage receptor MARCO		1,67						11,00				1,75		3				
Putative uncharacterized protein		1,70		1,66				75,00		75,00		1,75		1		1		
Isoform 1 of Msx2-interacting protein		1,61		0,00				5,93		3,90		1,75		14		11		
N-alpha-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit		1,68						2,20				1,74		2				
Putative uncharacterized protein		2,17		2,41				6,99		3,00		1,72		3		1		
U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 35 kDa subunit-related protein 1		1,63		1,65				4,91		5,84		1,68		3		2		
microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2 isoform 2		1,69						3,85				1,66		6				

M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides						
	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S			
S= Sequest	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	
Plasminogen activator inhibitor 1		2,33						5,72					1,62		3				
potassium channel tetramerisation domain containing 14 isoform b		1,92		2,04				14,96			8,55		1,58		2			1	
Mucin-13				3,48							6,81		1,58					2	
Isoform 1 of Tetratricopeptide repeat protein 29		0,00		2,25				14,65			9,55		1,54		3			3	
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11				1,60							6,94		1,53					3	
RuvB-like 2		3,40		1,70				3,24			3,24		1,43		1			1	
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10-like		0,00		4,17				5,29			3,85		1,42		4			3	
Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2		1,86		0,00				2,73			3,92		1,36		5			7	
Isoform 3 of Sacsin		1,82		1,61				3,93			2,49		1,32		11			9	
Usher syndrome type-1C protein-binding protein 1		1,84		1,83				2,21			8,38		1,31		2			5	
V(D)J recombination-activating protein 1		0,00		2,93				3,85			4,90		1,23		1			2	
Alpha-protein kinase 1		0,00		1,63				6,66			6,82		1,22		6			6	
Max dimerization protein 3		0,00		1,66				9,22			9,22		1,17		1			1	
Leucine-rich repeat-containing protein 16B				1,65							5,59		1,04					4	
Poly [ADP-ribose] polymerase 2		1,63		0,00				6,26			5,55		0,95		2			2	
Isoform 1 of Rab GTPase-activating protein 1		2,41						6,02					0,86		4				
Cyclin-dependent kinase 12		1,64						5,80					0,65		5				
GTPase IMAP family member 3		0,00		2,01				15,28			15,28		0,57		2			2	
Isoform 1 of Leucine-rich repeat-containing protein 9		3,79		2,28				3,02			3,23				5			5	
Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]		2,33		0,00				2,67			4,63				1			2	
WD repeat and FYVE domain containing 1 isoform 1			26,99					7,80										1	
hydrocephalus-inducing protein		5,79	22,27	3,44				6,01	0,21	4,11					17	1	14		
filamin A-interacting protein 1-like isoform 1		4,72	0,00	4,43				7,60	1,41	7,34					6	1	8		
Amine sulfotransferase		1,93	0,00	1,77				19,11	4,10	12,63					4	1	3		
V-type proton ATPase subunit E 1		1,76	0,00	0,00				8,85	3,10	10,18					2	1	3		
Isoform 2 of Magnesium transporter protein 1		1,70	0,00					2,61	2,61						1	1			
Isoform 2 of Cullin-4B		1,67	0,00	1,63				5,31	0,85	8,40					4	1	6		
multimerin-1 isoform b		0,00	0,00	1,94				5,29	0,74	2,65					5	1	3		
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX10			0,00	1,90					1,26	4,00							1	3	
Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1		6,77		1,88				6,48		6,48					2			2	
Uncharacterized protein		6,70		2,16				24,72		24,72					1			1	
Isoform 3 of Lipase maturation factor 1		6,62		4,20				6,16		8,40					2			3	
Exocyst complex component 5		6,17		7,80				4,35		8,71					2			4	
Isoform 1 of Fibrocystin-L		5,46		0,00				0,92		1,34					3			4	



M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides					
S= Sequest	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S		
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1		3,90		0,00				5,34		4,71				5		5		
Histamine H1 receptor		3,77						54,29						1				
Isoform 1 of Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C		3,74		2,06				12,24		16,07				3		6		
Serine/threonine-protein kinase MRCK alpha		3,64		2,18				6,50		6,81				4		5		
C-C chemokine receptor type 10		3,53		1,60				3,87		3,87				1		1		
Glutathione S-transferase Mu 1		3,36						29,82						3				
Isoform 2 of SCY1-like protein 2		3,36		0,00				4,94		7,71				2		3		
Lipopolysaccharide-binding protein		3,23		1,73				3,12		6,03				1		2		
solute carrier family 12 member 2		2,91						5,97						4				
TatD DNase domain containing 2		2,83						2,63						1				
Solute carrier organic anion transporter family member 1A4		2,59		2,70				6,57		7,61				3		3		
Putative uncharacterized protein		2,57						6,95						4				
Protein FAM81A		2,52		2,12				28,30		7,69				6		2		
Phosphate carrier protein, mitochondrial		2,52						9,80						2				
ATP-binding cassette sub-family A member 3		2,45						8,70						6				
Isoform 2 of snRNA-activating protein complex subunit 4		2,35		0,00				1,89		4,53				2		4		
Protein lin-7 homolog A		2,34		0,00				20,17		20,17				3		3		
Phosducin-like		2,32		0,00				13,47		13,47				1		1		
Isoform 5 of RNA-binding protein 26		2,29						8,29						9				
Protamine-2		2,20						20,56						1				
Isoform 1 of Protein Jumonji		2,20		2,10				8,91		6,89				7		7		
Kinesin-like protein KIF19		2,17		2,82				6,22		8,43				4		4		
Tetratricopeptide repeat domain 17		2,16		4,90				4,38		2,63				3		3		
Dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6		2,13		0,00				4,62		5,24				3		3		
Isoform 2 of Amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal		2,13		0,00				11,72		8,70				3		2		
Isoform 2 of Integrator complex subunit 6		2,12		0,00				6,06		6,64				3		3		
Isoform 2 of Acetyl-CoA carboxylase 1		2,11		4,35				2,64		5,25				4		8		
Isoform 3 of Disks large-associated protein 5		2,10		0,00				16,59		5,26				5		2		
RUN and FYVE domain-containing protein 1		2,09		2,08				4,92		7,16				3		5		
Myelin expression factor 2		2,05		0,00				8,30		12,83				3		5		
Isoform 2 of Receptor-type tyrosine-protein phosphatase U		2,05						7,52						7				
Serine/threonine-protein kinase PLK2		2,03		2,12				10,70		12,61				5		5		

M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides					
	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S		
S= Sequest	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
Serine/threonine-protein kinase A-Raf		2,03						14,07						5				
Zinc finger protein 54		2,03		2,01				3,31		4,66				1		2		
EF-hand calcium-binding domain-containing protein 8		2,03		2,11				28,57		34,98				4		5		
M-phase phosphoprotein 6		2,02		2,07				38,51		26,71				4		2		
Plakophilin-1		2,02						9,34						5				
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10		2,01						6,38						4				
Retinoic acid receptor responder protein 2		2,01		2,08				7,41		7,41				1		1		
Isoform 2 of Elongator complex protein 2		2,01						1,35						1				
misshapen-like kinase 1 isoform 1		2,00		2,02				1,00		2,62				1		3		
Bone morphogenetic protein receptor type-1A		2,00		0,00				10,34		6,77				5		2		
Asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic		1,98		2,81				7,87		16,82				3		5		
Coiled-coil domain-containing protein 150		1,95		1,74				8,65		12,79				8		10		
Isoform 1 of Trafficking kinesin-binding protein 1		1,88		0,00				5,64		5,86				5		4		
Mucolipin-3		1,87		0,00				6,51		6,51				3		3		
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1		1,85						3,90						12				
Isoform 1 of Zinc finger CCCH domain-containing protein 15		1,84		0,00				15,26		17,61				5		5		
Desmoyokin (Fragment)		1,84						9,10						8				
GRB2-associated-binding protein 2 isoform 2		1,83		1,87				5,71		5,71				3		3		
transforming acidic coiled-coil-containing protein 1 long isoform		1,83						11,47						5				
Isoform 3 of AT-rich interactive domain-containing protein 3B		1,81		1,60				14,63		4,53				3		1		
Ficolin-1		1,81						8,68						2				
CDC45-related protein isoform 2		1,79						5,19						2				
Putative uncharacterized protein		1,77		1,77				5,41		5,41				2		3		
Sex comb on midleg-like 2		1,77		3,36				14,70		11,27				4		3		
Isoform 2 of CCR4-NOT transcription complex subunit 2		1,77		0,00				5,65		11,49				3		3		
AKNA domain containing 1		1,77						11,11						4				
14-3-3 protein sigma		1,74						12,50						2				
ubiquitin specific peptidase 9, Y chromosome		1,74		0,00				4,07		3,79				6		6		
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13		1,73						3,19						1				
Ig heavy chain V-III region E109		1,73						13,27						1				
Isoform 2 of Formin-binding protein 4		1,72						3,38						3				
Spermine synthase		1,70						9,29						2				

M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides					
S= Sequest	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S		
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
Isoform 1 of 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-1		1,69						2,79						4				
Isoform 1 of Alstrom syndrome protein 1 homolog		1,69						2,58						5				
Isoform 1 of Rho guanine nucleotide exchange factor 3		1,68		1,64				3,24		4,77				1		2		
Uncharacterized protein		1,68						6,06						1				
Isoform 1 of Coatomer subunit gamma-2		1,68		0,00				8,27		5,86				6		2		
Isoform 1 of Serine/threonine-protein kinase VRK2		1,67						12,72						3				
Erythroid transcription factor		1,66		0,00				22,58		22,58				2		2		
EH domain-binding protein 1-like protein 1 isoform a		1,66						2,27						4				
Isoform 1 of MAP7 domain-containing protein 3		1,66		0,00				5,82		5,94				5		5		
Isoform 2 of XIAP-associated factor 1		1,66						24,72						3				
Isoform 2 of Leucine-rich repeat and coiled-coil domain-containing protein 1		1,66						6,14						6				
Isoform 1 of Phosphatidylinositide phosphatase SAC2		1,65		3,41				7,69		4,86				6		4		
Lamin-B1		1,64		1,80				8,50		10,71				3		3		
MORC family CW-type zinc finger protein 1		1,64						7,58						5				
Isoform 2 of Myosin-14		1,64						7,38						10				
Interleukin-1 receptor-associated kinase 4		1,64		1,66				11,70		5,52				5		2		
Isoform 3 of Transmembrane protein 41B		1,63						7,28						2				
Protein polybromo-1		1,63		0,00				10,54		6,64				10		7		
Coronin-2B		1,62		1,66				10,21		10,21				3		3		
Netrin-3		1,62						4,48						2				
Putative uncharacterized protein		1,62		0,00				12,80		11,89				3		3		
Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 10		1,62						2,20						1				
Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mitochondrial		1,62		1,68				1,17		4,11				1		2		
Isoform 3 of Denticleless protein homolog		1,61						4,19						1				
Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1		1,61		1,63				2,92		1,46				2		1		
Isoform 2 of Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial		1,60						12,85						3				
leucine rich repeat protein 2, neuronal		1,60						7,53						4				
mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 isoform 1		0,00		1,61				4,72		1,79				2		1		
DNA repair protein complementing XP-C cells homolog		0,00		2,11				6,34		4,62				4		4		

M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides					
S= Sequest	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4
Ki-67 protein		0,00		3,54				9,90		5,48				12		10		
Multidrug resistance-associated protein 1		0,00		1,86				1,31		4,91				2		5		
Isoform 2 of Adseverin		0,00		1,61				9,11		11,38				4		6		
Coiled-coil domain-containing protein 158		0,00		3,54				8,98		7,55				8		6		
Isoform 1 of Inner centromere protein		0,00		1,65				9,89		10,80				9		8		
Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit C		0,00		2,76				5,30		3,90				3		2		
Ribosome biogenesis regulatory protein homolog		0,00		1,60				7,95		11,51				2		3		
FERM domain-containing protein 4B		0,00		1,64				6,01		7,95				4		6		
zinc finger CCCH-type containing 7A		0,00		1,61				11,86		8,14				7		5		
Isoform 2 of Calcium-dependent secretion activator 1		0,00		1,78				8,96		4,41				7		5		
F-box only protein 41		0,00		1,86				3,09		1,60				2		1		
Tonsoku-like protein		0,00		1,65				7,19		3,52				5		3		
Isoform 2 of Protein MON2 homolog		0,00		2,15				3,04		4,68				3		5		
M-phase phosphoprotein 9		0,00		2,55				5,12		4,40				3		3		
Maestro heat-like repeat-containing protein family member 7		0,00		2,27				9,46		5,63				6		5		
Eukaryotic translation initiation factor 5B		0,00		1,63				4,28		3,04				4		3		
ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1		0,00		1,75				3,11		4,55				2		3		
Isoform 1 of Kelch-like protein 22		0,00		2,04				12,93		8,20				3		2		
3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7		0,00		2,15				3,85		3,85				2		2		
Isoform 1 of 39S ribosomal protein L15, mitochondrial		0,00		3,37				12,88		5,42				2		1		
Apurinic/apyrimidinic endonuclease 2, isoform CRA_a		0,00		2,04				4,26		4,26				1		1		
Diap1 protein		0,00		2,00				8,07		3,56				8		4		
Isoform Alpha-7X1B of Integrin alpha-7		0,00		1,62				3,51		3,07				2		2		
Isoform 3 of TRIO and F-actin-binding protein		0,00		1,64				2,93		2,28				3		4		
Guanylate-binding protein 4				3,24						7,90						2		
Isoform Erythrocyte of Band 3 anion transport protein				2,47						4,84						3		
Myotubularin-related protein 6				2,21						4,54						2		
Ornithine aminotransferase, mitochondrial				2,03						3,19						2		
Protocadherin gamma B5				1,64						1,62						2		
Isoform 1 of Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4				1,72						3,96						5		
Seryl-aminoacyl-tRNA synthetase, isoform CRA_b				1,78						7,28						3		
Isoform Delta-X of Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 3				1,75						0,77						1		

M= Mascot	Probability Based Scores						Coverage						Peptides						
S= Sequest	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	
Description	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	1	1	3	3	4	4	
Centrosomal protein of 104 kDa				1,65								4,54						4	
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 38				1,76								4,72						5	
huntingtin				1,70								3,65						9	
Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10				2,45								3,98						2	
DnaJ homolog subfamily B member 7				1,63								10,26						3	
Serine/threonine-protein kinase RIO1				1,60								4,76						3	
DNA polymerase epsilon catalytic subunit A				1,71								4,86						8	
DNA-binding protein RFX8				3,34								2,85						2	
pericentrin				1,62								5,66						10	
Isoform 1 of RUN and FYVE domain-containing protein 4				1,89								6,22						3	
Ubiquitin-like protein 4A				1,90								10,83						2	
serine/arginine repetitive matrix protein 1 isoform 2				1,69								12,09						9	
Exocyst complex component 7				1,70								7,31						5	
Isoform 2 of HHIP-like protein 1				1,71								2,48						1	
putative methyltransferase NSUN6 isoform c				1,60								4,94						2	
Isoform 2 of SLAIN motif-containing protein 2				1,65								5,44						2	
Dynein, axonemal, heavy chain 17				1,61								7,23						3	
sodium channel, voltage-gated, type II, alpha 1				1,63								2,64						6	
Down syndrome cell adhesion molecule-like 1				2,14								3,69						5	
proto-oncogene vav isoform 3				2,13								7,44						3	
Isoform 2 of Vitrin				1,60								3,50						1	
protein RD3 isoform 2				2,41								14,61						1	
Dystrophin-related protein 2				1,61								2,51						3	
Isoform 2 of tRNA (cytosine-5)-methyltransferase NSUN2				2,19								5,79						3	
Isoform 1 of Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B				1,85								4,82						3	
Coiled-coil and C2 domain containing 1B				1,72								12,34						6	
Myosin Va				2,45								8,15						11	