

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Μεταπτυχιακό πρόγραμμα:
Μοριακής Βιολογίας και Βιοιατρικής



Μεταπτυχιακή διατριβή

Μοριακή ανάλυση των διαλυτών ΜΗC τάξης II μορίων και ο ρόλος τους στην ρύθμιση των T-λεμφοκυττάρων

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Μπακέλα Κατερίνα
Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Αθανασάκη Ειρήνη

Εργαστήριο Ανοσοβιολογίας

Ηράκλειο, Ιούνης 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Ανοσοβιολογίας κ. Αθανασάκη που μου έδωσε τη ευκαιρία να πραγματοποιήσω αυτήν την διατριβή στο εργαστήριο της. Εκφράζω τις θερμότερες ευχαριστίες για την καθοδήγηση της καθ' όλη την διάρκεια της και για τις συμβουλές της όσον αφορά στην εργασία μου αλλά και γενικά οι οποίες ήταν πάντοτε στην διάθεση μου. Την ευχαριστώ επίσης για όλες εκείνες τις φορές που άκουσε τις διάφορες ανησυχίες μου χωρίς να είναι υποχρεωμένη.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, καθηγητές κ. Κοκκινίδη Μιχάλη και κ. Ηλιόπουλο Αριστείδη για την τιμή που μου έκαναν. Επίσης το προσωπικό του εργαστηρίου Κρυσταλλογραφίας II και τον καθηγητή κ. Πετράτο Κυριάκο για την πολύτιμη βοήθεια τους.

Ειδική αναφορά στις μεταπτυχιακές φοιτήτριες και συνοδοιπόρους μου σε αυτήν την διατριβή 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 όλο το χρόνο αλλά και τις γόνιμες συζητήσεις για ποικίλα θέματα. Επίσης ευχαριστώ και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Βαρδάκη Κατερίνα και Καραλή Δεβόρα για το πολύ ευχάριστο κλίμα που δημιουργούσαν στο εργαστήριο και την άψογη συνεργασία.

Φυσικά δε θα μπορούσα να ξεχάσω τους μικρότερους: Αθηνά, Μαρία, Μαρία, Αμαλία. Η ενασχόληση με τα πειράματα τους υπήρξε πολύτιμη πείρα αλλά και η παρέα μαζί τους ευχάριστο διάλειμμα από την καθημερινότητα.

Τέλος, ευχαριστώ την μητέρα μου για την στήριξη όλων των επιλογών μου καθώς και τους συντρόφους και φίλους μου που διατηρούν την ισορροπία στην ζωή μου.

○	Περίληψη/Abstract.....σελ. 3
○	Εισαγωγή.....σελ. 4
•	Ανοσοποιητικό σύστημα.....σελ. 4
•	Σπλήνας και κυτταρικοί πληθυσμοί.....σελ. 4
•	MHC μόρια.....σελ. 5
•	T- λεμφοκύτταρα.....σελ. 7
•	Ενεργοποίηση T-λεμφοκυττάρων.....σελ. 9
•	Κυτοκίνες.....σελ. 9
•	Διαλυτά MHC μόρια.....σελ. 10
○	Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής.....σελ. 12
○	Υλικά και Μέθοδοι.....σελ. 13
•	Ποντίκια και συλλογή ορού.....σελ. 13
•	Ανοσοκατακρήμνιση.....σελ. 13
•	Επεξεργασία με N-glycozylase.....σελ. 14
•	ELISA.....σελ. 14
•	Ανοσοφθορισμός.....σελ. 15
•	Απομόνωση T-λεμφοκυττάρων.....σελ. 16
•	Έλεγχος πολ/μου με ραδ. θυμιδίνη.....σελ. 16
•	SDS-PAGE.....σελ. 17
•	Χρώση αργύρου (Silver staining).....σελ. 18
•	Στύπωμα κατά Western.....σελ. 18
•	Μέθοδος LOWRY.....σελ. 19
○	Αποτελέσματα.....σελ. 20
1.	Απομόνωση και ταυτοποίηση των διαλυτών MHC class II.....σελ. 20
2.	Επίδραση των διαλυτών MHC-II μορίων σε συνολικό πληθυσμό σπληνοκυττάρων.....σελ. 21
3.	Επίδραση των διαλυτών MHC-II μορίων στα T-λεμφοκύτταρα.....σελ. 23
4.	Επίδραση διαλυτών MHC-II μορίων σε υποπληθυσμούς των T-λεμφοκυττάρων.....σελ. 24
○	Συζήτηση.....σελ. 29
○	Βιβλιογραφία.....σελ. 31

Περίληψη

Τα διαλυτά MHC-II μόρια είναι παρόντα στα σωματικά υγρά υγιών ατόμων αλλά συνδέονται και έχουν μελετηθεί σε ποικίλες ασθένειες, ενώ εμπλέκονται στην διαδικασία της ανοχής. Τα μόρια απομονώθηκαν από ορό ποντικών, ανοχοποιημένων με HSA και μελετήθηκαν ως προς την επίδραση τους σε συνολικά σπληνοκύτταρα και T-λεμφοκύτταρα.

Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι τα διαλυτά MHC-II μόρια μπορούν να προκαλούν αναστολή της ανοσολογικής απόκρισης ενάντια σε ένα αντιγόνο, προκαλώντας μείωση του πολλαπλασιασμού των ενεργοποιημένων κυττάρων. Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να προκαλούν έκκριση της IL-10 κυτοκίνης ενώ ταυτόχρονα να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των CTLA-4+ κυττάρων, που συνδέονται με την καταστολή και ρυθμίζουν αρνητικά τα CD4+ και CD28+ κύτταρα.

Προτείνουμε πως αυτά τα μόρια παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της αντιγονοειδικής ανοχής του οργανισμού, γνωστή ως clonal anergy.

Abstract

Soluble MHC-II molecules are present in body fluids of healthy individuals but are also connected and studied in various diseases, whereas are involved in immune tolerance. Soluble MHC-II were isolated from the serum of mice, tolerized with HSA and were examined for their ability to affect responsiveness of total spleencells and T-cells.

In this present study, we have shown that the soluble molecules are capable to suppress an immune reaction, mounted against an antigenic stimulus by reducing the number of active cells. Furthermore, these molecules have the ability to induce the secretion of the cytokine IL-10 while stimulating the proliferation of CTLA-4+ cells that are related to suppression, through the negative regulation of CD4+ and CD28+ cells.

We propose that these molecules play a very important role in antigen-specific tolerance, also known as clonal anergy.

Το ανοσοποιητικό σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα αξιόλογο προσαρμοστικό σύστημα που αναπτύχθηκε στα σπονδυλωτά ώστε να τους εξασφαλίζει σταθερό εσωτερικό περιβάλλον σε σχέση με ουσίες που αναγνωρίζει σαν «ξένες», οι οποίες παράγονται είτε μέσα στον ίδιο τον οργανισμό είτε εισάγονται από το εξωτερικό περιβάλλον.

Το ανοσοποιητικό σύστημα περιλαμβάνει συστατικά της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας

Το μη ειδικό συστατικό, 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, το ειδικό συστατικό, 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» ειδικά ευαισθητοποιημένα λεμφοκύτταρα (T-κυτταροτοξικά και NK), που συλλογικά αποτελούν την κυτταρομεσολαβητική ανοσία.

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 κύτταρα. Τα T κύτταρα 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 (Goldsby et al, 2007).

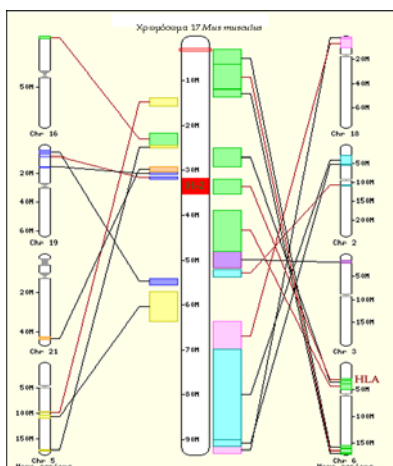
Μόρια του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC)

Κάθε είδος θηλαστικού που έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα διαθέτει στο γονιδίωμά του ένα στενά συνδεδεμένο σύμπλεγμα γονιδίων, το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας, 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 μόνα τους, τα T κύτταρα αναγνωρίζουν ένα αντιγόνο μόνο όταν αυτό συνδέεται με ένα μόριο MHC (Goldsby et al, 2007).

Επιπλέον, επειδή τα μόρια MHC λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικές δομές, το συγκεκριμένο σύνολο των μορίων MHC που εκφράζονται σε ένα άτομο επηρεάζει το ρεπερτόριο των αντιγόνων στα οποία τα Tc και τα Th κύτταρα 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 (Goldsby et al, 2007).

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, ομαδοποιούνται σε 3 τάξεις γονιδίων, τα τάξης I, II και III. Οι τάξεις των γονιδίων διαφοροποιούνται με βάση διάφορα δομικά αλλά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των προϊόντων τους:

- Τα γονίδια **MHC τάξης I (MHC-I)**: Κωδικοποιούν γλυκοπρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια όλων σχεδόν των εμπύρηνων κυττάρων. Η κύρια λειτουργία των προϊόντων των γονιδίων MHC-I είναι η παρουσίαση πεπτιδικών αντιγόνων στα Tc κύτταρα.
- Τα γονίδια **MHC τάξης II (MHC-II)**: Κωδικοποιούν γλυκοπρωτεΐνες που εκφράζονται κυρίως στα αντιγ/κά κύτταρα (μακροφάγα, δενδριτικά, B κύτταρα), όπου παρουσιάζουν επεξεργασμένα αντιγονικά πεπτίδια στα Th κύτταρα.
- Τα γονίδια **MHC τάξης III (MHC-III)**: Κωδικοποιούν εκτός των άλλων προϊόντων, διαφορετικές εκκριτικές πρωτεΐνες με ανοσολογικές λειτουργίες ανάμεσα στις οποίες και συστατικά του συστήματος του συμπληρώματος που σχετίζονται με την φλεγμονή.



Εικόνα 1. Συνταϊναικότητα μεταξύ των γενετικών τόπων του MHC στον *Mus musculus* και στον άνθρωπο. Η περιοχή που κωδικοποιεί το ΜΣΙ στον *Mus musculus* είναι η H-2 και στον άνθρωπο η HLA (Human Leukocyte Antigen). [http://www.ensembl.org]

Εκτός από τα κλασικά μόρια MHC, υπάρχουν και μη κλασικά μόρια MHC που εντοπίστηκαν με μοριακή χαρτογράφηση στους ίδιους γονιδιακούς τόπους με τα κλασικά MHC τάξης I και τάξης II. Τα μη κλασικά MHC τάξης I στο ποντίκι εδράζονται σε 3 περιοχές (H-2Q,T,M) και στον άνθρωπο εμπεριέχονται στους γενετικούς τόπους HLA-E, F, G, X, J. Μερικά από αυτά είναι ψευδογονίδια αλλά οι λειτουργίες των μη κλασικών MHC τάξης I παραμένουν

ως επί τω πλείστον άγνωστες (Goldsby et al, 2007). Αντίστοιχα τα μη κλασσικά MHC τάξης II στο ποντίκι κωδικοποιούνται από τα γονίδια *Oa*, *Oβ*, *Ma*, *Mβ* που έχουν περιορισμένο πολυμορφισμό ενώ στον άνθρωπο από τους τόπους *DM* και *DO*.

➤ MHC ΤΑΞΗΣ I

Τα μόρια MHC τάξης I που κωδικοποιούνται από τις περιοχές K και D 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 (Niederhorn, 2006). 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 (Jon et al, 1999; Aultman et al, 1999; van Rood et al, 1970).

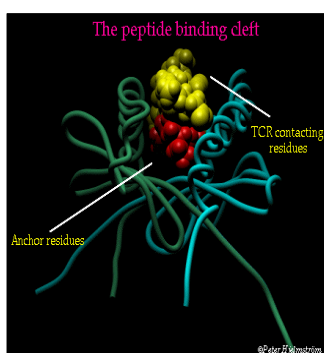
Οι αλυσίδες συνδυάζονται με τέτοιο τρόπο, ώστε να δημιουργηθεί μια θήκη μέσα στην οποία τοποθετούνται πεπτίδια του εαυτού (ρύθμιση ανοχής) ή πεπτίδια που είναι ξένα για τον οργανισμό (ιικές πρωτεΐνες, μη φυσιολογικές πρωτεΐνες του εαυτού) και οι οποίες αναγνωρίζονται από άλλους πληθυσμούς κυττάρων (Goldsby et al, 2007), 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, φέρουν στην επιφάνεια τους τον υποδοχέα CD8 και παρουσιάζουν έντονη κυτταροτοξική δράση.

➤ MHC τάξης II

Τα 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 α/β.**

Η α αλυσίδα έχει μέγεθος 33KD και η β αλυσίδα 28 KD. Η διαφορά συνδέεται με το βαθμό γλυκοζυλίωσης. Κάθε αλυσίδα έχει δυο ερικράτειες α1/α2 και β1/β2. Οι περιοχές α1 και β1 (χαρακτηριστικές δομές μορίων MHC τάξης II-πολυμορφικές), σχηματίζουν μια θήκη, στην οποία προσδένονται πεπτίδια μήκους 10-15 καταλοίπων (Katsumi & Jones, 1999) και είναι απομακρυσμένες από την μεμβράνη. Επιπλέον, κάθε αλυσίδα διαθέτει ένα τμήμα που διαπερνά την κυτταροπλασματική μεμβράνη, δένοντας έτσι το σύμπλοκο στην επιφάνεια του κυττάρου.

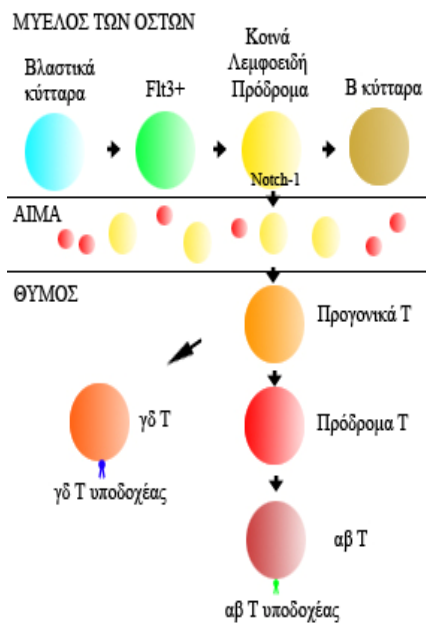
Τα μόρια MHC τάξης II προσδένουν πεπτίδια και τα παρουσιάζουν στα CD4+ κύτταρα. Γενικά τα πεπτίδια αυτά προέρχονται από εξωγενείς πρωτεΐνες (είτε εαυτές, είτε μη εαυτές), που αποικοδομούνται μέσω της ενδοκυτταρικής οδού επεξεργασίας (φαγοκυττάρωση, λυσοσώματα κτλ) (Geuze, 1998; Chow & Mellman, 2005).



Εικόνα 2. Η αύλακα πρόσδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου που σχηματίζεται ανάμεσα στις α και β αλυσίδες του ετεροδιμερούς MHC τάξης II. Peter Hjelmstrom

T-λεμφοκύτταρα

Όλα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος προέρχονται από βλαστικά κύτταρα που εντοπίζονται στον μυελό των οστών.

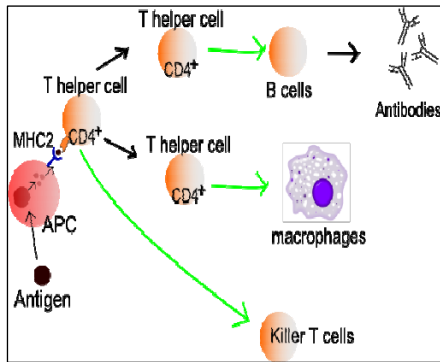


Εικόνα 3. Σχεδιάγραμμα που απεικονίζει τα βασικά στάδια στην ωρίμανση των T κυττάρων. Τα T κύτταρα προέρχονται από τα βλαστικά κύτταρα και διαφοροποιούνται δημιουργώντας όλα τα ώριμα λεμφοκύτταρα του οργανισμού.

Τα αρχέγονα κύτταρα που προκύπτουν μεταναστεύουν μέσω του κυκλοφορικού και εγκαθίστανται σε ιστούς, οι οποίοι παρέχουν το κατάλληλο περιβάλλον για την ωρίμανσή τους. Η διαφοροποίηση των T κυττάρων ξεκινάει στον μυελό των οστών όπου τα βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται, μέσω των $Flt3^+$ κυττάρων, στα Κοινά Λεμφοειδή Πρόδρομα (Common Lymphoid Precursor) κύτταρα, από τα οποία στην συνέχεια προκύπτουν όλα τα λεμφοκύτταρα (Borowski et al, 2002.) Αρκετά ΚΛΠ μεταφέρονται με το αίμα στον θύμο (από όπου τα T πήραν το όνομά τους), όπου και διαφοροποιούνται σε προγονικά-T, τα οποία δεν εκφράζουν τους συνυποδοχείς CD4 και CD8. Σε αυτό το στάδιο οι αναδιατάξεις που επιτελούνται στον γενετικό τόπο του TCR (T κυτταρικός υποδοχέας), οδηγούν στην εμφάνιση των κυττάρων που εκφράζουν τον γδ T υποδοχέα ή των προδρόμων T κυττάρων που εκφράζουν τον πρόδρομο T υποδοχέα. Στην πρώτη περίπτωση, τα κύτταρα καθορίζονται ως γδ T κύτταρα και στην δεύτερη ως αβ T κύτταρα (Borowski et al, 2002).

Όλοι οι υποπληθυσμοί των T κυττάρων 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. Η σηματοδότηση *Notch-1* φαίνεται πως παίζει κρίσιμο ρόλο στον καθορισμό των λεμφοκυττάρων (Koch et al, 2001). Στον θύμο επιτελείται και η επιλογή των κατάλληλων T κυττάρων, στα οποία θα επιτραπεί να ωριμάσουν (Cahalan et al, 2006; Ladi et al, 2006). Όσα κύτταρα φέρουν T υποδοχείς που αναγνωρίζουν μόρια του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC) του εαυτού, επιλέγονται θετικά και επιβιώνουν. Τα κύτταρα που φέρουν T υποδοχείς, οι οποίοι προσδέονται ισχυρά με μόρια MHC του εαυτού ή με μόρια MHC στα οποία βρίσκονται προσδεμένα αντιγόνα του εαυτού, επιλέγονται αρνητικά και οδηγούνται σε απόπτωση.

Κατά την ωρίμανση, τα T κύτταρα μετατρέπονται σε κύτταρα που αναγνωρίζουν μόρια MHC-I (που εκφράζουν τον CD8 συνυποδοχέα)-T κυτταροτοξικά (Tc), ή σε κύτταρα που αναγνωρίζουν μόρια MHC-II (T βοηθοί που στην επιφάνεια τους εκφράζουν τον CD4 συνυποδοχέα)-T βοηθοί (Th) (Goldsby et al, 2007). Οι $CD4^+$ βοηθοί συντονίζουν την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού με την έκκριση διαφόρων κυτοκινών, οι οποίες πολώνουν την λειτουργία των κυττάρων στα οποία επιδρούν. Τα ανώριμα $CD4^+$ T κύτταρα 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.



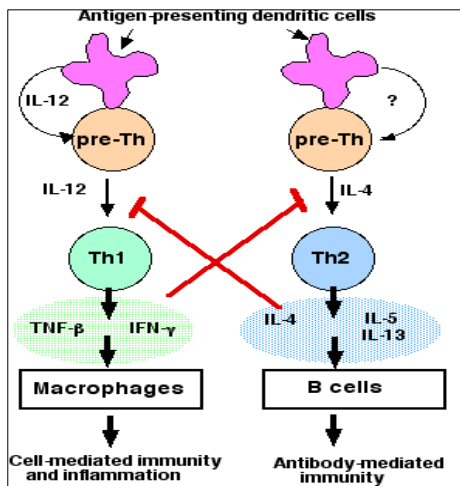
Εικόνα 4. Ενεργοποίηση κυττάρων στόχων από CD4⁺ κύτταρα (T-βοηθοί)

Όταν ένα CD4⁺ T κύτταρο ενεργοποιηθεί αρχίζει να διαιρείται και να εκκρίνει κυτοκίνες οι οποίες με την σειρά τους ενεργοποιούν άλλα κύτταρα στόχους. Η ταξινόμηση των CD4⁺ κυττάρων που αναγνωρίζουν μόρια MHC-II ως Th και των CD8⁺ κυττάρων που αναγνωρίζουν μόρια MHC-I ως Tc δεν είναι πάντα απόλυτη. Μερικά CD4⁺ κύτταρα δρουν και ως κυτταροτοξικά. Επίσης μερικά Tc κύτταρα μπορούν και αλληλεπιδρούν με άλλα κύτταρα, όπως και τα Th (Goldsby et al, 2007).

Πολλές μελέτες, δείχνουν ότι τα CD4⁺ T κύτταρα μπορούν να χωριστούν σε 2 μεγάλες κατηγορίες, τα Th1 και τα Th2 (Larppin & Campbell, 2000, 1996; Mosmann & Sad, 1996; McGhee, 2005; Mosmann et al, 1986). Ο διαχωρισμός τους γίνεται με βάση τις κυτοκίνες που εκκρίνουν. Στην απόκριση τύπου Th1 εκκρίνονται IFN-γ, IL-2 και άλλες κυτοκίνες όπως η IL-12, IL-15, TNFβ (Larppin & Campbell, 2000), οι οποίες προωθούν την ανάπτυξη φλεγμονής και ενεργοποιούν κυρίως συγκεκριμένα T κύτταρα και μακροφάγα, ενώ στην απόκριση τύπου Th2 εκκρίνονται κυρίως IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 και IL-13 (McGhee, 2005) που προάγουν την ενεργοποίηση των B κυττάρων αλλά και ανοσοαποκρίσεις που εξαρτώνται από αντισώματα.

Τα Tc κύτταρα ενεργοποιούνται όταν αλληλεπιδράσουν με ένα σύμπλεγμα αντιγόνου-μορίου MHC-I, που βρίσκεται στην επιφάνεια ενός «αλλαγμένου» κυττάρου του οργανισμού (π.χ μολυσμένο με ιό κύτταρο ή καρκινικό κύτταρο), παρουσία κατάλληλων κυτοκινών (Goldsby et al, 2007). Η ενεργοποίηση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό, ενώ επάγει την διαφοροποίηση του κυττάρου Tc στην δραστική μορφή του T κυτταροτοξικού. Αντίθετα με τα Th, εκκρίνουν λίγες κυτοκίνες, ενώ διαθέτουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να καταστρέφουν «αλλαγμένα» κύτταρα του εαυτού.

Τέλος, τα περισσότερα ώριμα T κύτταρα εκφράζουν τον μεμβρανικό υποδοχέα CD28. Αποτελεί ligand για την οικογένεια των συνδιεγερτικών μορίων B7, που υπάρχουν στα B και σε άλλα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.



Εικόνα 5. Δράση κυτοκινών για την επαγωγή των Th1 και Th2 αποκρίσεων.

🚩 Ενεργοποίηση T βοηθητικών κυττάρων

Το κομβικό σημείο στην έναρξη της ενεργοποίησης του T κυττάρου είναι η αναγνώριση από τον TCR συμπλέγματος μορίου MHC τάξης II-πεπτιδίου πάνω στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Ο TCR αποτελείται από μια κυρίως εξωκυτταρική υπομονάδα ένωσης με τον προσδέτη, το σύμπλεγμα CD3 και το ομοδιμερές των αλυσίδων ζ.

- **Έναρξη.** Η σύνδεση του συμπλέγματος μορίου MHC- πεπτιδίου με τον TCR οδηγεί στην συνάθροιση των συνυποδοχέων CD4 ή CD8, καθώς οι συνυποδοχείς αυτοί συνδέονται με σταθερές περιοχές του μορίου MHC (*van der Merwe, 2002*). Η *Lck*, μια πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης που είναι συνδεδεμένη με τις κυτταροπλασματικές ουρές των συνυποδοχέων, πλησιάζει τις κυτταροπλασματικές ουρές του συμπλέγματος του TCR και φωσφορυλιώνει τυροσίνες σε μοτίβα ενεργοποίησης του υποδοχέα (*ITAMs*) (*Pitcher et al, 2003; Love & Shores, 2000*). Οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες των ITAM της ζ αλυσίδας αποτελούν σημεία πρόσδεσης της πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης *ZAP-70*, η οποία ενεργοποιείται. Στην συνέχεια, η *ZAP-70* καταλύει την φωσφορυλίωση πολλών μεμβρανικών μορίων επαφής, τα οποία αποτελούν σημεία ενεργοποίησης πολλών ενδοκυτταρικών οδών μεταγωγής μηνυμάτων.
- **Δημιουργία πολλαπλών ενδοκυτταρικών σημάτων.** Πολλές από τις οδούς μεταγωγής μηνυμάτων ενεργοποιούνται μέσω των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά το στάδιο της έναρξης π.χ οδοί PKC, Ca, Ras κτλ.

🚩 Κυτοκίνες

Οι κυτοκίνες είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες 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.

Οι κυτοκίνες δεσμεύονται 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. Οι κυτοκίνες ρυθμίζουν την ένταση και την διάρκεια μιας ανοσολογικής απόκρισης, μέσω διέγερσης ή αναστολής της ενεργοποίησης του πολλαπλασιασμού και/ή της διαφοροποίησης της διάφορων κυττάρων, καθώς και μέσω του ελέγχου έκκρισης αντισωμάτων ή άλλων κυτοκινών.

ΚΥΤΟΚΙΝΗ	ΚΥΤΤΑΡΟ-ΣΤΟΧΟΣ	ΔΡΑΣΗ
IL-2	T κύτταρα	Πολ/μός T
IL-4	T κύτταρα	Διαφοροποίηση B
IL-10	T κύτταρα	Παρεμπόδιση Th1
IL-15	T κύτταρα	Όμοια με IL-2
IFN-γ	T, NK κύτταρα	Ενεργοποίηση μακροφάγων
TGF-α	Μακροφάγα, λεμφοκύτταρα	Αντιμετώπιση όγκων

Εικόνα 6. Βασικές κυτοκίνες και η δράση τους

Διαλυτά MHC τάξης I και MHC τάξης II

Στις αρχές του 1967, ο Calne και οι συνεργάτες του παρατήρησαν κατά την διάρκεια πειραμάτων μεταμόσχευσης ήπατος σε χοίρους πως τα ζώα επιζούσαν για αρκετούς μήνες και χωρίς θεραπεία ανοσοκαταστολής (Calne, 1967). Αυτό το αποτέλεσμα, αποδείχτηκε αργότερα ότι οφειλόταν σε διαλυτούς παράγοντες, οι οποίοι εκκρίνονταν από το αλλομόσχευμα και ήταν υπεύθυνοι για την ανάπτυξη ανοχής στον ξενιστή. Στην συνέχεια ταυτοποιήθηκαν ως **διαλυτά μόρια MHC** (van Rood et al, 1970; Jon et al, 1999). 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.

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 (van Rood et al. 1970; Purpo et al. 1997; Hagihara et al. 1994; Aultman et al. 1999; Pfeiffer et al. 2000). Στον τομέα της βιοχημείας τους, γνωρίζουμε πως τα μοριακά βάρη διαφέρουν σε σχέση με τα μεμβρανικά. Όσον αφορά τα sHLA-I γνωρίζουμε πως διαφορετικές ισομορφές κυκλοφορούν στον ορό: ένα intact μόριο που αποκόπτεται με πρωτεόλυση από την μεμβράνη (44 kDa), ένα μόριο που προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα και του λείπει το διαμεμβρανικό κομμάτι (39kDa), και άλλες αλυσίδες που προκύπτουν από διάφορα πρωτεολυτικά προϊόντα των παραπάνω (Dobbe et al., 1988). Αντίστοιχα τα sMHC-II εμφανίζονται να έχουν ένα μοριακό βάρος ~60kDa που είναι αυξημένο σε σχέση με το μεμβρανικό μόριο. (Jendro et al., 1991)

Τα μόρια που βρίσκονται στην κυκλοφορία (ορός ή πλάσμα) δεν εκκρίνονται με εξωσώματα (MacKay et al, 2006). Η προέλευση αυτών των μορίων είναι ακόμα άγνωστη αν και υποθέτεται πως είναι αποτέλεσμα αναδίπλωσης ή εναλλακτικού splicing ή ενεργής έκκρισης. Όμως, υπάρχουν μελέτες που παρουσιάζουν κυτταρικές σειρές, όπως τα APCs, να εκκρίνουν εξωσώματα που περιέχουν μεγάλες ποσότητες MHC μορίων (MacKay et al, 2006). Επιπλέον, έχει δείχθει πως T-cells, B-cells, CD4+ T-cells μετά από ενεργοποίηση με IL-2 εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες HLA-DR ενώ παρουσία μακροφάγων τα T-cells εκκρίνουν 4 φορές περισσότερη ποσότητα HLA-DR (Jendro et al., 1991). Η ίδια ομάδα επέδειξε πως τα διαλυτά HLA-DR που δεν έχουν ενσωματώσει κάποιο αντιγονικό πεπτίδιο αδυνατούν να ενεργοποιήσουν τα T-cells.

Τα διαλυτά MHC μόρια έχουν συνδεθεί με την διαδικασία της ανοχής. Τα sMHC-I αν μεταμοσχευθούν στον δότη μαζί με το μόσχευμα έχουν ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες κατά την διαδικασία απόρριψης του (Kamada et al.). Επιπλέον, τα CD4+ T-cells που προκύπτουν από ανοχοποίηση με κάποιο αντιγόνο εκκρίνουν tolerosomes (εξωσώματα στον ορό) τα οποία είναι MHC-εξαρτώμενα (Ostman et al., 2005). Η θέση αυτή ενισχύθηκε αργότερα όταν αποδείχθηκε πως η μεσολαβούμενη από εξωσώματα ανοχή είναι εξαρτώμενη από MHC-II (Almqvist et al., 2008). Επίσης, σε μοντέλα πειραματικής αλλεργικής εγκεφαλομυελίτιδας (EAE) σε ποντίκια αποδείχθηκε η δυνατότητα απενεργοποίηση αυτοδραστικών T-cells για την MBP όταν επώαστηκαν με sMHC-II/MBP πεπτίδιο (Sharma et al., 1991). Αυτή η αντιγονοειδική ανοχή που οδηγεί σε έλλειψη απόκρισης του ανοσοποιητικού (και όχι καταστροφή των αυτοδραστικών κλώνων) ονομάζεται **clonal anergy**.

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. Μία φυσιολογική εγκυμοσύνη απαιτεί αύξηση των επιπέδων των μορίων MHC τάξης I, με ταυτόχρονη μείωση

των επιπέδων των MHC τάξης II. (Vassiliadis et al, 2001). 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. Επιπλέον έχει αποδειχθεί in vitro και in vivo πως οι τροφοβλάστες (στην ζώνη του πλακούντα) απελευθερώνουν στο θεραπευτικό μέσο της καλλιέργειας τους διαλυτά MHC τάξης II (sHLA-DR) μετά από ενεργοποίηση με IFN-γ (πιθανώς σε αυτό οφείλεται η αύξηση στην συγκέντρωση των διαλυτών MHC τάξης II κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης) (Athanasakis et al. 2000; Ranella et al. 2005). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη της διαδικασίας αποβολή των εμβρύων.

Στο παρελθόν υπήρχε η πεποίθηση πως η δράση τους συμβαδίζει με το γενικό πλαίσιο δράσης των μεμβρανικών (Jendro et al, 1991). 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 (Sardis et al, 2009). 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 (Sardis et al, 2009). 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, CD25+, B κύτταρα και τα μακροφάγα (Sardis et al, 2009). Επιπλέον έρευνες έχουν επιβεβαιώσει ότι οι διαλυτές μορφές των MHC μορίων μπορούν να έχουν ποικίλα ανοσορρυθμιστικά αποτελέσματα στα κύτταρα-στόχους τους. Για παράδειγμα, τα sMHC-I προκαλούν απόπτωση στα CD4+ (Nag et al. 1996), ενεργοποίηση στα CD8+ (Ge et al. 2002) και αρνητική ρύθμιση στην ενεργότητα των NK κυττάρων (Webb et al. 1994). Τέλος, κατά την διάρκεια των δεκαετιών του '70 και του '80 που κορυφώθηκαν οι έρευνες για τους T suppressors, είχε προταθεί πως οφείλουν τις κατασταλτικές τους ιδιότητες σε διαλυτούς παράγοντες που περιείχαν ενεργότητα MHC τάξης II μορίων (Athanasakis & Vassiliadis, 2002)

Τέλος, 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. Υπάρχουν καταγραφές σε ιικές εγκεφαλίτιδες (Aultman et al. 1999), ρευματοειδή αρθρίτιδα (Verbruggen et al. 2000, 2002; Wolf et al. 1998), παθολογικές εγκυμοσύνες (Pfeiffer et al. 2000; Steinborn et al. 2003), άσθμα (Rizzo et al. 2004) και AIDS (Aultman et al. 1999). Για παράδειγμα στην ρευματοειδή αρθρίτιδα έχει αποδειχθεί πως τα sMHC-DR μόρια αυξάνονται με την πρόοδο της ασθένειας και μειώνονται με την θεραπεία αυτής. Ο συνδυασμός της μεθοδρεξάτης και του predisolone εκτός από μείωση της ενεργότητας της ασθένειας προκαλεί μείωση των sMHC-DR μορίων, πιθανά μπλοκάροντας τους μηχανισμούς έκκρισης τους (Verbruggen et al., 2002). Αντίστοιχα, ασθενείς με μελανώματα σε αναπτυσσόμενο στάδιο εμφανίζουν μειωμένη συγκέντρωση sMHC-DR, που πιθανά συνδέεται με την μειωμένη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος σε αυτούς τους ασθενείς. (Rebmann et al, 2002). 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 εξέλιξη της. Ενδεχομένως, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν διαγνωστικά. Ακόμα, έχει παρατηρηθεί πως τα sMHC μόρια παίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο κατά την διάρκεια μετάγγισης αίματος από αλλογενετικό δότη (Ghio et al. 1999).

Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής

Σκοπός της εργασίας αρχικά ήταν να μελετήσουμε τις φυσικοχημικές ιδιότητες των διαλυτών MHC-II μορίων τα οποία απομονώνονταν από ορό αρσενικών Balb/c τα οποία έχουν πρώτα ανοχοποιηθεί με HSA αντιγόνο. Βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου θέλαμε να δούμε τις διαφορές των διαλυτών μορίων σε σχέση με τα αντίστοιχα μεμβρανικά συγκρίνοντας τα MB των αλυσίδων καθώς και τις γλυκοζυλιώσεις αυτών, πιθανά και την αμινοξική αλληλουχία με *mass spectrometry (MS-MS)*. Στην συνέχεια, γνωρίζοντας για το ανοσορρυθμιστικό τους ρόλο, και θέλοντας να παρέχουμε αποδείξεις πως τα διαλυτά μόρια εμπλέκονται στον μηχανισμό της ανοχής, τα μόρια αυτά θα εξετάζονταν σε αντιγονοειδικά ή μη-κυτταρικά συστήματα. Έτσι, στόχος ήταν να ελεγχθεί η δυνατότητα τους να ρυθμίζουν θετικά ή αρνητικά πληθυσμούς συνολικών ανοσοποιημένων σπληνοκυττάρων *in vitro* και *in vivo*, όπως και T-λεμφοκυττάρων ανώριμων και μη. Τέλος, μας ενδιέφερε η τροποποίηση του ρυθμού έκκρισης των κυτοκινών IL-2 και IL-10, παρουσία ή όχι των διαλυτών μορίων, έτσι ώστε να ελεγχθεί η πιθανότητα ύπαρξης δευτερογενών διεγερτικών ή κατασταλτικών παραγόντων.

Υλικά και μέθοδοι

Ποντίκια και συλλογή ορού

Τα αρσενικά ποντίκια Balb/c που χρησιμοποιήθηκαν στεγάζονταν στο ζωοτροφείο του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, σε δωμάτια με ελεγχόμενο κύκλο φωτός 12h. Η συλλογή του αίματος γίνονταν με ολική αφαίμαξη. Για τις κυτταροκαλλιέργειες αφαιρούνταν επίσης και ο σπλήνας, με την χρήση αποστειρωμένων εργαλείων. 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. Το υπερκείμενο-ορός φυλάσσεται σε erpedorf στους -20° C έως ότου να χρησιμοποιηθεί.

Ανοσοκατακρίμνηση

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

- Ακινητοποίηση αντισώματος στα σφαιρίδια

Υλικά

- Υπερπαραμαγνητικά σφαιρίδια (Dynal Biotech)-διαμέτρου M-280, a-IgG
- Αποστειρωμένο PBS 1X (pH 7,4)
- 3-φαινολαμίνη 0,2M σε dH₂O , pH 8,2
- Διάλυμα DMP/3-φαινολαμίνης (0,2M) 20Mm, pH 8.2
- Tris buffer 50mM σε dH₂O , pH 7,5
- Διάλυμα PBS 1X-BSA 0,1%

Διαδικασία

(Δουλεύουμε σε στείρες συνθήκες)

1. Ξεπλύνουμε 10⁸ 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 για τα παραπάνω beads 250μg. Συμπληρώνουμε με dH₂O για τελικό όγκο 1ml. Επωάζουμε για 1h στους 4° C με ήπια ανάδευση.
3. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και πλένουμε 2X με αποστειρωμένο PBS.
4. Προσθέτουμε 1ml 3-φαινολαμίνης και επαναλαμβάνουμε 2 φορές ακόμα. Η φαινολαμίνη δημιουργεί τους ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των 2 αντισωμάτων.
5. Επαναδιαλυτοποιούμε σε διάλυμα DMP/3-φαινολαμίνης 1ml και επωάζουμε για 30' σε rt με ήπια ανάδευση.
6. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και σταματάμε την αντίδραση με διάλυμα Tris 1ml. Επωάζουμε για 15' σε rt και ήπια ανάδευση.
7. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και πλένουμε 2X με διάλυμα PBS 1X-BSA 0,1%.
8. Διατηρούμε στους 4° C σε PBS 1X-BSA 0,1% 1ml.

- Ανοσοκατακρήμνιση διαλυτών μορίων από ορό ποντικού

Υλικά

- Μαγνητικά σφαιρίδια συνδεδεμένα με ειδικό για την πρωτεΐνη Ab.
- *Washing buffer*: PBS 1X -Tween 20, 0.05%
- CH₃COOH 0,1M, pH 4
- Tris-HCl 0,2M σε dH₂O , pH 8,2

Διαδικασία

1. Πλένουμε 2X τα σφαιρίδια με 2ml washing buffer για 10' με ήπια ανάδευση, χρησιμοποιώντας μαγνήτη. Ξεπλένουμε 2X με 2 ml PBS 1X.
2. Προσθέτουμε 1ml ορού στα σφαιρίδια. Τον αραιώνουμε αν χρειάζεται. Επωάζουμε για 2h στους 4° C με ήπια ανάδευση.
3. Πλένουμε 2X τα σφαιρίδια με 2 ml washing buffer, χρησιμοποιώντας μαγνήτη, για να απομακρυνθούν τα μη ειδικά προσδεμένα μόρια.
4. Πλένουμε 2X τα σφαιρίδια με 2ml PBS 1X, χρησιμοποιώντας μαγνήτη.
5. Για την έκλυση της πρωτεΐνης μας προσθέτουμε CH₃COOH 0,1M στον επιθυμητό όγκο και επωάζουμε για 20' σε rt με ήπια ανάδευση.
6. 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° C ή σε aliquots των 500λ στους -20° C.
7. Ξεπλένουμε 2X με 2ml washing buffer τα σφαιρίδια και 2X με PBS 1X.
8. Διατηρούμε τα σφαιρίδια στους 4° C σε PBS 1X-BSA 0,1% 1ml.

- ✚ Επεξεργασία πρωτεϊνών με ένζυμο N-glycozylase

Διαδικασία

1. Σε 1-20 μg πρωτεΐνης προσθέτουμε 1μl 10X Denaturation buffer και dH₂O ως τα 10μl.
2. Επωάζουμε για 10' στους 100° C.
3. Προσθέτουμε 2μl 10X G7 Reaction Buffer, 1-2μl PNGaseF, 2μl NP40 1-% και dH₂O ως τα 20μl.
4. Επωάζουμε για 1h στους 37° C.

- ✚ Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσοφητική Δοκιμή (ELISA)

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

Υλικά

- Coating buffer: 0.05M NaHCO₃, 0.05 Na₂CO₃ pH 9.6
- Washing buffer: PBS 1X -tween 20%, 0.05%
- Blocking buffer: PBS 1X-BSA (Bovine Serum Albumin) 2%
- Ab buffer: PBS 1X-BSA 0.1%

- Υπόστρωμα-χρωμογόνο: TMB substrate-Peroxidase solution H₂O₂
- H₂SO₄, 1M
- 96-flat bottom plate

Διαδικασία

1. Στρώνουμε τα δείγματα στην plate σε αντίστοιχη αραιώση (π.χ ορός σε 1/1000) σε coating buffer και όσες επαναλήψεις επιθυμούμε. Τελικός όγκος 100λ/well. Επωάζουμε στους 4° C για 14-18h.
2. Πλένουμε 3X με το washing buffer. 200λ/well.
3. Στρώνουμε το blocking buffer, 200λ/well για να παρεμποδίσουμε την μη-ειδική σύνδεση των πρωτεϊνών στα αντισώματα. Επωάζουμε σε rt για 2h.
4. Πλένουμε 3X με το washing buffer. 200λ/well.
5. Στρώνουμε το 1^ο αντίσωμα (το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει) σε κατάλληλη C (συνήθως 1/1000) σε Ab buffer. Τελικός όγκος 100λ/well. Επωάζουμε σε rt για 2h.
6. Πλένουμε 3X με το washing buffer. 200λ/well.
7. Στρώνουμε το 2^ο αντίσωμα (a-IgG peroxidase) σε κατάλληλη C (συνήθως 1/5000) σε Ab buffer. Τελικός όγκος 100λ/well. Επωάζουμε σε rt για 1h στο σκοτάδι.
8. Πλένουμε 3X με το washing buffer. 200λ/well.
9. Προσθέτουμε το διάλυμα χρωμογόνου-υποστρώματος σε αραιώση 1:1. Τελικός όγκος 100λ/well. Περιμένουμε μέχρις ότου τα πηγαδάκια εμφανίσουν το χαρακτηριστικό χρώμα της αντίδρασης.
10. Ολοκληρώνουμε την αντίδραση με H₂SO₄. Τελικός όγκος 50λ/well.
11. Μετράμε σε ELISA reader στα 450nm.

Εξωτερικός ανοσοφθορισμός

Υλικά

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

Διαδικασία

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

Απομόνωση Τ-λεμφοκυττάρων από σπληνοκύτταρα

Υλικά

- Θρεπτικά μέσα RPMI (10% FBS) και HBSS
- Αντίσωμα α-CD45R
- *Ab solution*: PBS-BSA 0,1%
- Υπερπαραμαγνητικά σφαιρίδια (Dynal Biotech)-διαμέτρου M-280
- Lysing RC: Ammonium chloride 0,83g, Sodium hydrogen Carbonate 0,1g
EDTA 0,032g, dH₂O 100ml, pH 7,4 (4° C)
- PBS 1X, pH 7,4

Διαδικασία

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° C ο/ν. **Απομάκρυνση μακροφάγων.**
3. Μάζεμα του υπερκειμένου και πλύσιμο 2X με RPMI του τρυβλίου. Ανάμεσα 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 1X. **Απομάκρυνση ερυθροκυττάρων.** Μέτρηση κυττάρων.
6. Επώαση με α-CD45R 1/500 σε PBS-BSA 0,1% για 45'.
7. Προσθήκη 20μl σφαιριδίων και επώαση για 30' με ήπια ανάδευση.
8. Τοποθέτηση στον μαγνήτη και μάζεμα του υπερκειμένου (**Τ-λεμφοκύτταρα**). Μέτρηση κυττάρων. Επώαση με RPMI στους 37° C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Έλεγχος πολλαπλασιασμού κυττάρων με ραδιενεργή θυμιδίνη

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

Υλικά

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

Διαδικασία

1. Συλλέγουμε τα σπληνοκύτταρα από τον σπλήνα με τον τρόπο που έχουμε περιγράψει.

2. Πλένουμε 2X με RPMI. Ανάμεσα η φυγοκέντρηση γίνεται στις 1200rpm, στους 4° C για 6'. Μετράμε τα κύτταρα.
3. Ετοιμάζουμε και στρώνουμε σε τριπλές τα δείγματα και τα control. Τελικός όγκος 100λ/well και 10⁶ κύτταρα/well.
4. Επωάζουμε σε επωαστήρα για 72h στους 37° C.
5. Με το πέρας των 72h προσθέτουμε 1μCi ραδιενεργής θυμιδίνης σε κάθε πηγαδάκι και τοποθετούμε στον επωαστήρα για άλλες 18 ώρες.
6. Μεταφέρουμε τα κύτταρα στα φίλτρα με την χρήση του συλλέκτη κυττάρων και τα τοποθετούμε σε δοχεία που περιείχαν 2ml σπινθηριστικό υγρό και οι κρούσεις καταγράφονται στον μετρητή.

Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση ακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Η διαδικασία αυτή μας βοηθά να πιστοποιήσουμε πρωτεΐνες με βάση το MB τους. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε ένα δείγμα που υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση, κινούνται ανάμεσα στους πόρους του πηκτώματος ανάλογα με το μέγεθος τους. Οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται εδώ είναι αποδιατακτικές για να μην διατηρούνται τυχών σύμπλοκα.

Υλικά

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

Διαδικασία

1. Τοποθετούμε στην συσκευή το gel ανάλυσης (running gel) και καλύπτουμε με αιθανόλη για να προκύψει ενιαίο το gel. Στην συνέχεια προσθέτουμε το gel πακεταρίσματος (staking gel) και βάζουμε το ειδικό χτενάκι για να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια για τα δείγματα.
2. Ετοιμάζουμε τα δείγματα στον επιθυμητό όγκο και προσθέτουμε αντίστοιχη ποσότητα 5X loading buffer (ώστε να αποτελεί το 1/5 του συνολικού όγκου). Τα βράζουμε στους 95° C για 5' ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες.
3. Φορτώνουμε τα δείγματα στα πηγαδάκια μαζί με κατάλληλο marker και πραγματοποιούμε την ηλεκτροφόρηση σε τάση 120 V.
4. Μετά το τέλος της διαδικασίας προχωρούμε σε χρώση του running gel.

Χρώση αργύρου (Silver staining)

Υλικά

- Methanol
- 5%, 1% CH₃COOH
- Sodium Trisulfate (Na₂S₂O₃•5H₂O) 0,02%
- AgNO₃ 0,1%
- Διάλυμα εμφάνισης (Na₂CO₃ 2%, 0,04% φορμαλδεΐδη)
(όλα τα διαλύματα γίνονται σε V=50ml)

Διαδικασία

1. Φιξάρουμε το gel σε 50% methanol, 5% CH₃COOH για τουλάχιστον 20' με ανάδευση.
2. Ξεπλένουμε με 50% methanol για 10' με ανάδευση.
3. Ενυδατώνουμε με H₂O 2x για 10' με ανάδευση.
4. Ευαισθητοποιούμε το gel σε Sodium Trisulfate για 1' με ανάδευση.
5. Ξεπλένουμε με H₂O 2x για 1' με ανάδευση.
6. Βάφουμε με AgNO₃ (pre-chilled) για 20' στους 4° C με ανάδευση.
7. Ξεπλένουμε με H₂O 2x για 1' με ανάδευση.
8. Εμφανίζουμε με το διάλυμα εμφάνισης, ανακίνηση
9. Σταματάμε την διαδικασία με 5% CH₃COOH.
10. Διατηρούμε σε 1% CH₃COOH.

Στύπωμα κατά Western

Η μέθοδος αυτή για την ταυτοποίηση παρουσίας πρωτεϊνών είναι πιο εμπιστεύσιμη καθώς στηρίζεται στην ειδικότητα ενός αντισώματος για την πρωτεΐνη που μελετάμε. Πραγματοποιείται σε 2 στάδια, το transfer όπου μεταφέρονται οι πρωτεΐνες σε μεμβράνη κατάλληλη για την εμφάνιση και στην συνεχεία επώαση με το ειδικό αντίσωμα.

A) Transfer

Υλικά

- Whatman χαρτιά (3mm,Chr)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Gelman Science)
- *Transfer buffer*: 25mM Tris, 98mM Glycine, 20% Methanol, pH 8,3

Διαδικασία

1. Τοποθετούμε το gel 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 m² του gel. Αφήνουμε σε rt για 1,5h.

B) Western

Υλικά

- *TBS solution*: 20mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,2-7,4
- *Wash solution*: TBS/Tween 20 0,05%
- *Blocking 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 της Pierce)

Διαδικασία

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^ο αντίσωμα (ειδικό για την πρωτεΐνη μας) σε Ab solution για 11/2h 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^ο 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 1:1 1ml για 3' στον σκοτεινό θάλαμο.
9. Έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας

LOWRY method

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

Υλικά

- TCA 20%
- *A reagent*: 2gr NaOH, 10gr Na₂CO₃, 0,1gr Na-K-tartarate (V=500ml)
- *B reagent*: 0,5gr CuSO₄·5H₂O
- *C reagent*: 10ml A, 0,2ml B
- *D reagent*: 1,5ml Follin-Ciocalteau 2N + 1,5ml H₂O

Διαδικασία

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. Επώαζουμε σε rt για 30'
 8. Φωτομετρούμε στα 625nm
 9. Η συγκέντρωση του δείγματος υπολογίζεται με τον τύπο: ODx8= mg/ml
- Το "τυφλό" δείγμα ξεκινά από το βήμα 4.

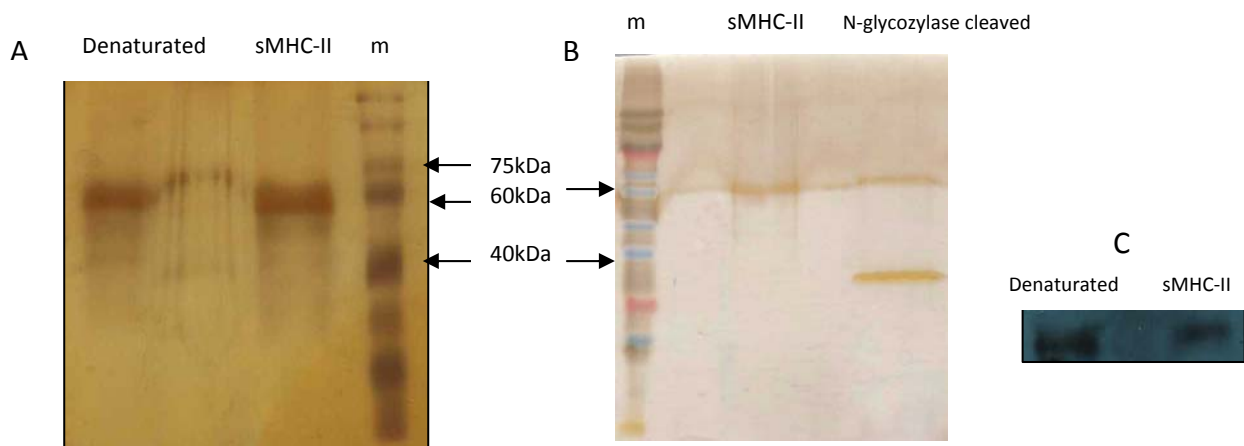
Αποτελέσματα

1. Απομόνωση και ταυτοποίηση των διαλυτών MHC class II

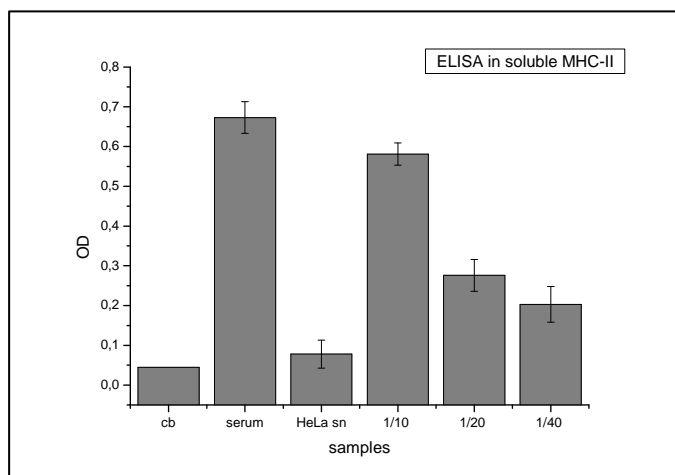
Τα διαλυτά MHC class II (sMHC-II) απομονώθηκαν από ορό αρσενικών Balb/c ποντικών. Το εργαστήριο μας σε προηγούμενες μελέτες είχε δείξει πως τα μόρια αυτά αυξάνονται σε συγκέντρωση στον ορό του αίματος σε κατάσταση ανοχοποίησης των ζώων. (Ματθαιακάκης και άλλοι, μη δημοσιευμένα δεδομένα). Ανοχοποίηση ενός οργανισμού ονομάζουμε την διαδικασία στην οποία ο οργανισμός αποκτά ανοχή προς ένα συγκεκριμένο αντιγόνο και δεν αναπτύσσει ανοσολογική απόκριση προς αυτό. Πραγματοποιείται εισάγοντας στην κυκλοφορία ανοσογόνο δόση ενός αντιγόνου, απουσία ανοσοενισχυτικού.

Ανοχοποιήσαμε αρσενικά Balb/c ποντίκια με HSA (Human Serum Albumin) εισάγοντας 100mg αντιγόνου/ποντίκι και 6 ημέρες μετά συλλέξαμε τον ορό.

Η απομόνωση των μορίων έγινε με ανοσοκατακρήμνιση με μαγνητικά σφαιρίδια ομοιοπολικά συνδεδεμένα με N22 αντίσωμα (α-mouse MHC class II). Ελέγχθησαν με ELISA, SDS-PAGE και Western ενώ η συγκέντρωσή τους υπολογίστηκε με την μέθοδο LOWRY.



Εικόνες 1A, 1B και 1C. SDS-PAGE και Western των απομονωμένων διαλυτών MHC –II μορίων. Το μοριακό βάρος προσδιορίζεται στα 60kDa ενώ η denaturated μορφή έχει υποστεί επεξεργασία με μεγάλη συγκέντρωση αλάτων. Από την επεξεργασία με N-glycozylase προκύπτει μία band περίπου 35kDa. Το Western έγινε με N22.



Εικόνα 2: Ταυτοποίηση των απομονωμένων διαλυτών MHC-II με την μέθοδο ELISA. Χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα N22 και οι 3 αραιώσεις δείχνουν αυξημένη παρουσία μορίων. Ως θετικό control χρησιμοποιήσαμε ορό ανοχοποιημένων ποντικών και ως αρνητικό υπερκείμενα HeLa cells. Cb= coating buffer. Οι μπάρες εκφράζουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

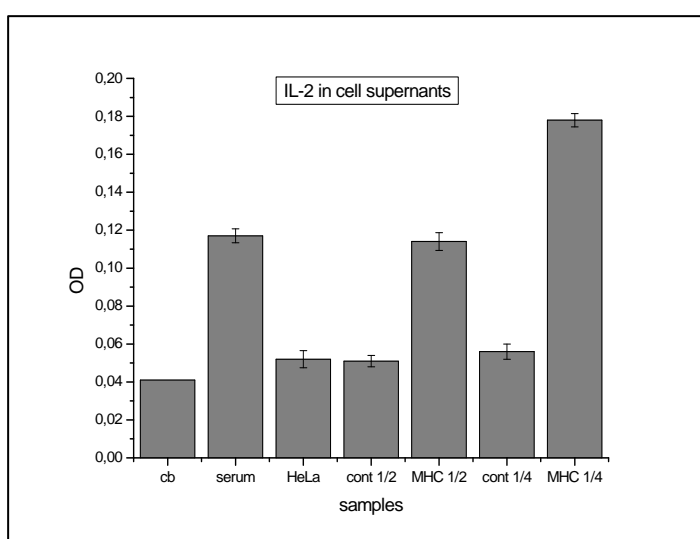
Η συγκέντρωση των διαλυτών MHC-II μορίων ταυτοποιήθηκε με την μέθοδο ELISA (εικόνα 2) και προσδιορίστηκε με την μέθοδο LOWRY στα **0,43mg/ml**.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει πως τα διαλυτά MHC-II μόρια όντως αυξάνονται σε κατάσταση ανοχοποίησης του οργανισμού ως και 4 φορές σε σχέση με τα control ποντίκια (Μπακέλα Κ., πτυχιακή εργασία, 2009-τα στοιχεία δεν παρουσιάζονται). Επιπλέον, η απομόνωση τους αποκαλύπτει πως δεν αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες της κυκλοφορίας αφού η μοναδική band που προκύπτει συνάδει και με προηγούμενες μελέτες (60kDa) (Εικόνα 1A, 1C) ενώ δεν καταφέραμε ούτε με τις αποδιατακτικές συνθήκες αλλά ούτε και με επεξεργασία με άλατα να διαχωρίσουμε τις 2 αλυσίδες (Εικόνα 1A).. Τέλος, η επεξεργασία με το ένζυμο N-glycozylase αποκάλυψε πόσο βαριά γλυκοζυλιωμένα είναι αυτά τα μόρια αφού «χάνεται» περίπου το 1/3 του μοριακού τους βάρους (Εικόνα 1B).

2. Επίδραση των διαλυτών MHC-II μορίων σε συνολικό πληθυσμό σπληνοκυττάρων

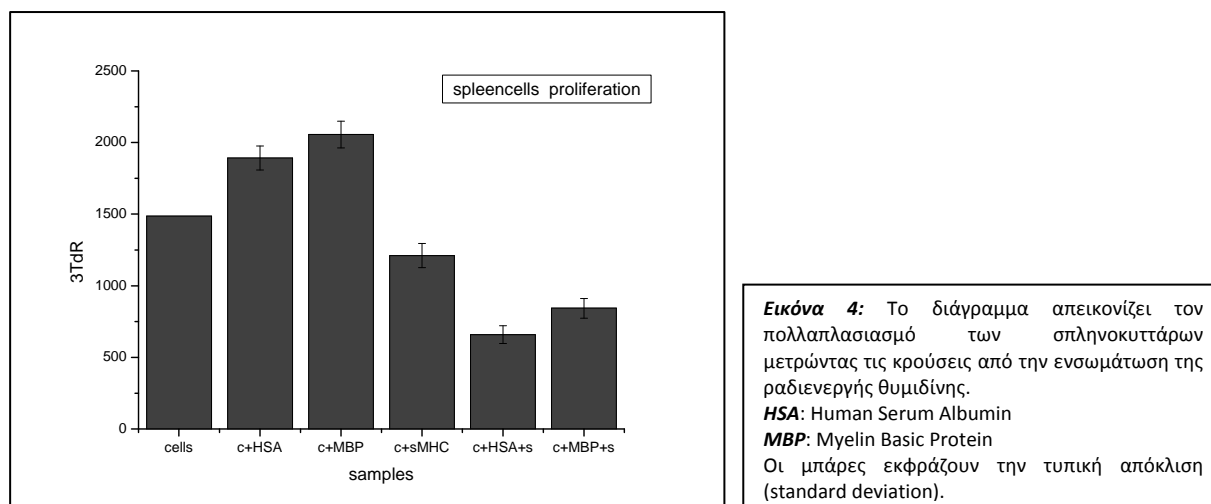
Σε προηγούμενα ερευνητικά αποτελέσματα του εργαστηρίου αλλά και από την βιβλιογραφία (Sardis et al, 2009) προκύπτει πως τα μόρια αυτά έχουν ανοσορρυθμιστικό ρόλο στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Αρχικά θέλαμε να εξετάσουμε τι προκαλούν τα μόρια αυτά σε συνολικό αριθμό λεμφοκυττάρων που εξήχθησαν από σπλήνα αρσενικών Balb/c.

Αρχικά μελετήσαμε την ενεργοποίηση των κυττάρων παρουσία και μη των διαλυτών MHC-II μορίων. Αυτό προσεγγίστηκε με τον υπολογισμό της IL-2 στα υπερκείμενα καλλιέργειών των σπληνοκυττάρων παρουσία και μη των μορίων. Η IL-2 επιλέχτηκε καθώς η έκκριση της έχει ταυτιστεί με την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Η βέλτιστη συγκέντρωση των μορίων στις καλλιέργειες έχει προσδιοριστεί στα 30ng/ml. (Sardis et al, 2009) και ο χρόνος επώασης στην καλλιέργεια στις 24h (Μπακέλα, πτυχιακή εργασία, 2009.) Όπως προκύπτει και από την εικόνα 3 υπάρχει αυξημένη έκκριση IL-2 στις καλλιέργειες των σπληνοκυττάρων που έχουν επωαστεί με διαλυτά MHC-II μόρια. Η αύξηση σε σχέση με τα control κύτταρα ξεπερνά το 50% και στις 2 αραιώσεις των υπερκειμένων. Αυτό αποδεικνύει την ενεργοποίηση κυρίως των T- λεμφοκυττάρων παρουσία των διαλυτών MHC-II μορίων.



Εικόνα 3: Εντοπισμός της κυτοκίνης IL-2 στα υπερκείμενα (αραιώσεις 1/2 και 1/4) καλλιέργειών σπληνοκυττάρων παρουσία (MHC) και μη (control) sMHC-II. Η IL-2 αυξάνεται στα κύτταρα που έχουν επωαστεί με τα διαλυτά μόρια. Οι μπάρες εκφράζουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

Στην συνέχεια, μελετήσαμε τι προκαλεί στον συνολικό αριθμό των σπληνοκυττάρων τα διαλυτά μόρια MHC-II μετρώντας τον πολλαπλασιασμό τους μέσω της ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης. Ταυτόχρονα πραγματοποιήσαμε *in vitro* ανοσοποίηση χρησιμοποιώντας 2 αντιγόνα (HSA και MBP, C=1μg/ml) τα οποία προστέθηκαν την πρώτη ημέρα της καλλιέργειας.



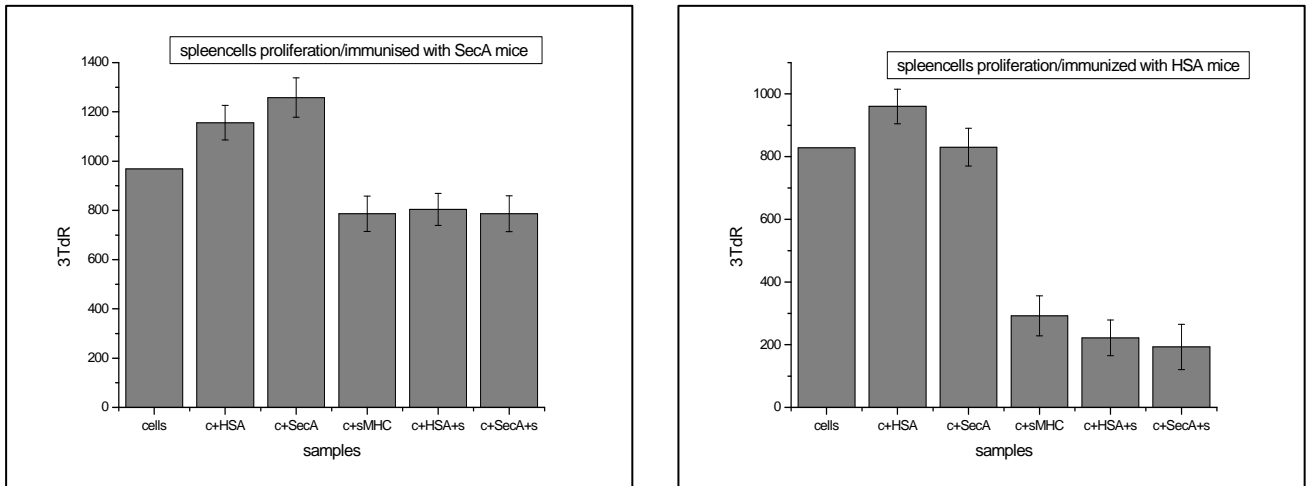
Από τα αποτελέσματα (εικόνα 4) προκύπτει πως τα διαλυτά μόρια MHC-II προκαλούν αρνητική ρύθμιση στον πληθυσμό των σπληνοκυττάρων καθώς παρουσία τους δεν επάγεται ο πολλαπλασιασμός τους αλλά αντίθετα προκαλείται στασιμότητα και πιθανά μείωση του πληθυσμού. Το μοντέλο της *in vitro* ανοσοποίησης χρησιμοποιήθηκε ώστε τα κύτταρα να είναι ενεργοποιημένα. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρούμε πως τα διαλυτά MHC-II μόρια προκαλούν καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης που προκαλείται από την παρουσία του αντιγόνου. Το ίδιο αλλά σε μικρότερο βαθμό παρατηρείται απουσία αντιγόνου, όπου η διαφορά σε σχέση με τα control cells είναι μικρότερη.

Επιπλέον, υπάρχει η υπόθεση πως τα μόρια μας, δεδομένου πως ο οργανισμός ανοχοποιήθηκε με HSA αντιγόνο, θα είναι φορτωμένα στο μεγαλύτερο ποσοστό τους με κάποιο πεπτίδιο HSA (Almqvist et al., 2008). Έτσι, θέλαμε να μελετήσουμε τι συμβαίνει στην περίπτωση που τα σπληνοκύτταρα έχουν ανοσοποιηθεί με κάποιο άλλο αντιγόνο. Παρατηρήσαμε πως τα μόρια μας είναι ικανά να προκαλέσουν καταστολή της ενεργοποίησης των σπληνοκυττάρων παρουσία του MBP αντιγόνου, σε μικρότερο όμως βαθμό σε σχέση με τα HSA κύτταρα

Για να ενισχύσουμε την υπόθεση πραγματοποιήσαμε *In vivo* ανοσοποίηση (για να είμαστε σίγουροι για την ενεργοποίηση των κυττάρων) με HSA και ως δεύτερο αντιγόνο την SecA, πρωτεΐνη του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*. Τα 2 αντιγόνα ενέθηκαν (100mg/ποντίκι) σε αρσενικά Balb/c ποντίκια μαζί με πλήρες ανοσοενισχυτικό Freud's και 7 ημέρες αργότερα τα ποντίκια ενέθηκαν ξανά με μη-πλήρες (incomplete) ανοσοενισχυτικό και τα αντιγόνα. 7 ημέρες αργότερα συλλέχτηκαν τα σπληνοκύτταρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 5.

Τα αποτελέσματα συμβαδίζουν με αυτά της *in vitro* ανοσοποίησης καθώς παρατηρούμε την ίδια καταστολή της ενεργοποίησης των σπληνοκυττάρων παρουσία διαλυτών MHC-II μορίων. Για να καλυφθούν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί, κάθε είδος κυττάρου επώαστηκε *in vitro* και με το δεύτερο αντιγόνο κατά περίπτωση. Προκύπτει πως η καταστολή είναι πολύ μεγαλύτερη στα ποντίκια που ανοσοποιήθηκαν με HSA κάτι που αποδίδουμε στο γεγονός πως τα το μεγαλύτερο ποσοστό των μορίων μας έχουν προσδέσει αυτό το αντιγόνο σε σχέση

με την SecA (από την ανοχοποίηση). Όμως, το γεγονός πως υπάρχει καταστολή πιθανά οφείλεται στα διαλυτά μόρια που δεν έχουν προσδέσει κάποιο πεπτίδιο HSA ή στο γεγονός πως τα μόρια μας να μην χρειάζονται μεγάλη συγγένεια για να καταστείλουν την ανοσολογική αντίδραση.

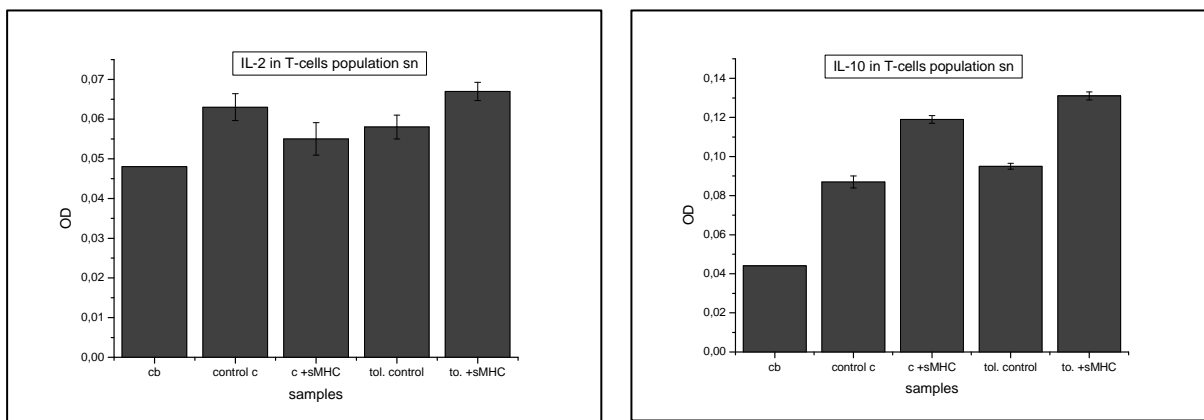


Εικόνα 5: Τα διαγράμματα απεικονίζουν τον πολλαπλασιασμό των σπληνοκυττάρων μετρώντας τις κρούσεις από την ενσωμάτωση της ραδιενεργής θυμιδίνης. Τα σπληνοκύτταρα είναι *In vivo* ανοσοποιημένα για κάθε αντιγόνο και στην συνέχεια ανοσοποιήθηκαν *In vitro* και με τα 2 αντιγόνα. Τα διαλυτά μόρια είναι σε συγκέντρωση 30ng./ml. Η καταστολή είναι μεγαλύτερη στην ανοσοποίηση με HSA. Οι μπάρες εκφράζουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

3. Επίδραση των διαλυτών MHC-II μορίων στα T-λεμφοκύτταρα

Στην συνέχεια επικεντρωθήκαμε στα T-λεμφοκύτταρα καθώς, με βάση την βιβλιογραφία σε αυτά φαίνεται να επιδρούν τα διαλυτά MHC μόρια, μέσω του υποδοχέα τους (*Jendro et al., 1991, Sharma et al., 1991, Sardis et al., 2009*). Περισσότερο μας ενδιέφερε να ενισχύσουμε την υπόθεση της καταστολής και πιθανά να αποδείξουμε πως αποτελούν κομμάτι της περιφερειακής ανοχής, εντοπίζοντας το πληθυσμό των T-λεμφοκυττάρων που επηρεάζεται παρουσία των διαλυτών MHC-II μορίων.

Τα T-λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν από συνολικό αριθμό σπληνοκυττάρων από control και ανοχοποιημένα ποντίκια ώστε να έχουμε μία control κατάσταση ανοχής προς σύγκριση. Αφού τα 2 είδη κυττάρων επώαζονταν 24h με τα μόρια (30ng/ml) τα υπερκείμενα συλλέγονταν και ελέγχονταν για παρουσία κυτοκινών με ELISA. *Εικόνα 6.*



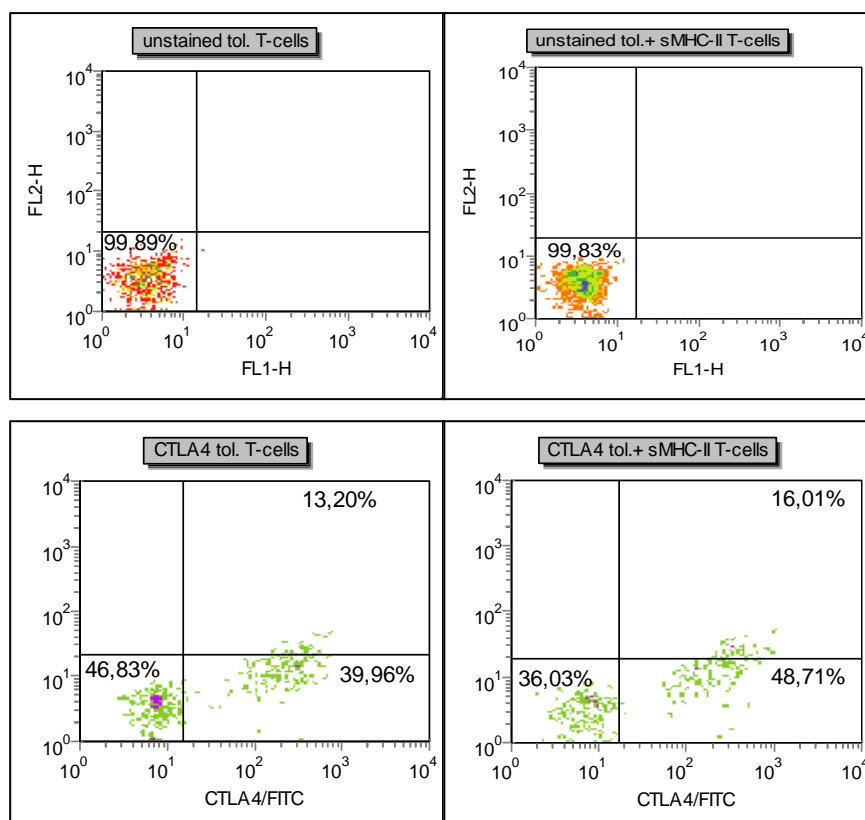
Εικόνα 6: Τα διαγράμματα παρουσιάζουν την συγκέντρωση των κυτοκινών IL-2 και IL-10 στα υπερκείμενα καλλιεργειών T-λεμφοκυττάρων ανοχοποιημένων (tol.) και control ποντικών παρουσία ή μη διαλυτών MHC-II μορίων. Ο έλεγχος έγινε με ELISA. **Cb:** coating buffer. Οι μπάρες εκφράζουν την τυπική απόκλιση (standard deviation).

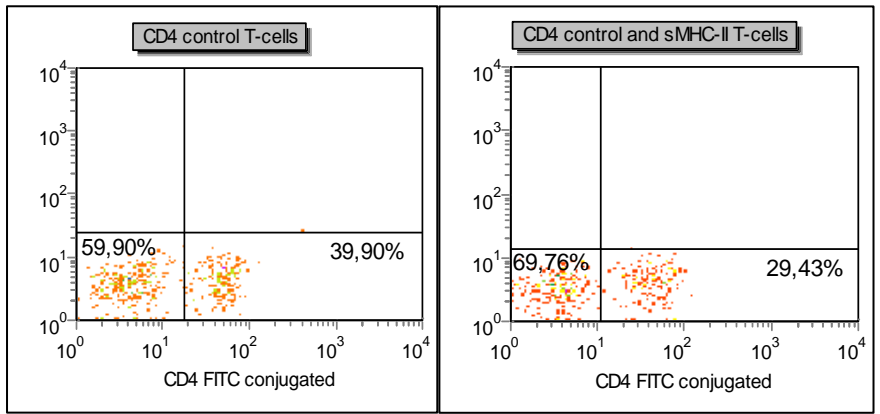
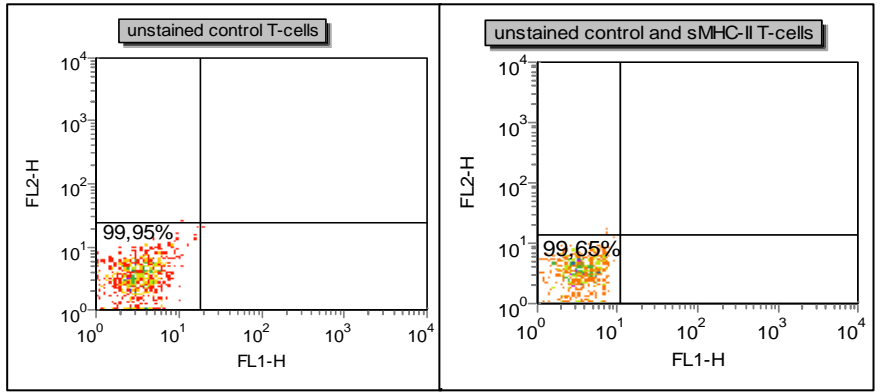
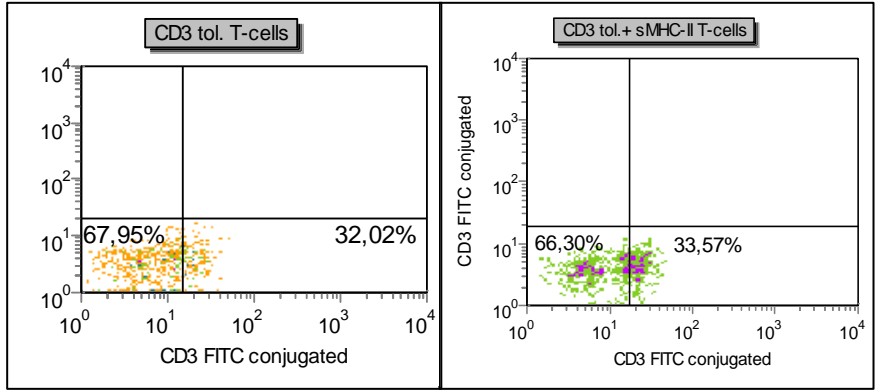
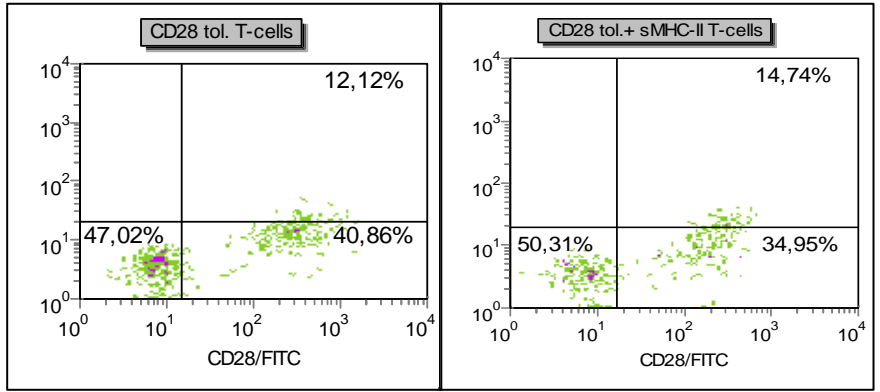
Επιλέξαμε για τον έλεγχο των υπερκειμένων τις κυτοκίνες IL-2 και IL-10. Την πρώτη γιατί είναι χαρακτηριστικός δείκτης ενεργοποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων και την δεύτερη γιατί έχει συνδεθεί με την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος.

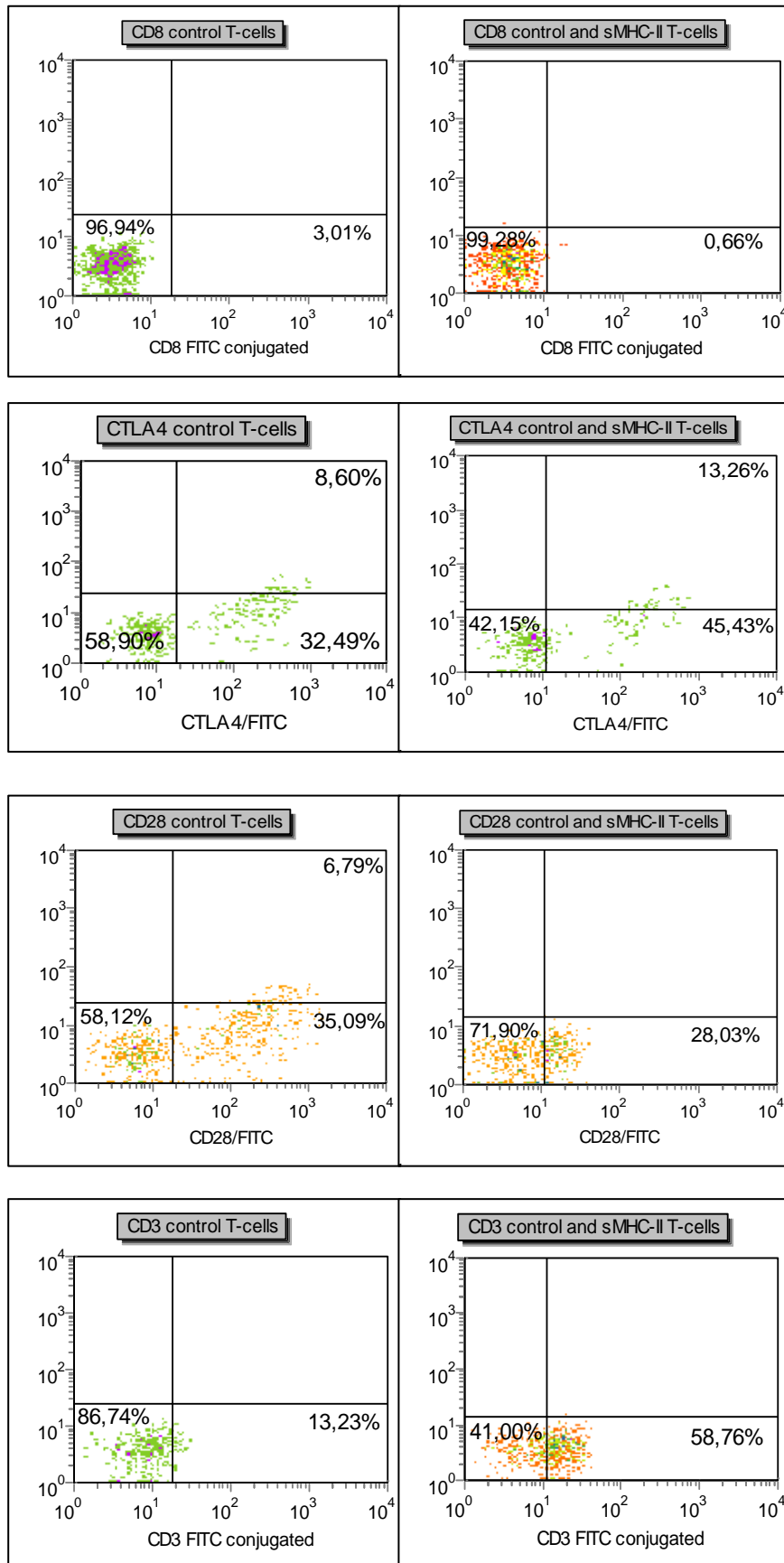
Όσον αφορά την IL-2 δεν φαίνεται σε καμία από τις 2 καταστάσεις (ανοχοποιημένα και control) να αυξάνεται σημαντικά η έκκριση της. Επιπλέον, τα διαλυτά μόρια φαίνεται να προκαλούν μία μικρή μείωση στην έκκριση της IL-2. Η αύξηση της στην ανοχοποιημένη κατάσταση πιθανά να οφείλεται στην αύξηση και ενεργοποίηση των ρυθμιστικών κυττάρων. Αντίθετα η IL-10 έχει σοβαρή αύξηση παρουσία διαλυτών MHC-II μορίων, ακόμα μεγαλύτερη και από την ανοχοποιημένη κατάσταση ενώ η παρουσία τους αυξάνει την έκκριση ακόμα και όταν επωαστούν με ήδη ανοχοποιημένα κύτταρα. Αυτό ενισχύει την υπόθεση πως τα διαλυτά μόρια (που έχουν προκύψει από ανοχοποιημένο οργανισμό) έχουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και ειδικά όσον αφορά τους μηχανισμούς ανοχής.

4. Επίδραση διαλυτών MHC-II μορίων σε υποπληθυσμούς των Τ-λεμφοκυττάρων

Θέλοντας να μελετήσουμε συγκεκριμένα την επίδραση που έχουν τα διαλυτά μόρια MHC-II σε διαφορετικούς πληθυσμούς Τ-λεμφοκυττάρων, προχωρήσαμε σε ανοσοφθορισμό για διαφορετικούς επιφανειακούς markers. Τα Τ-λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν από σπληνοκύτταρα (ανοχοποιημένων-τοΙ με HSA και control ποντικών) και στην συνέχεια επώαστηκαν για 24h με διαλυτά MHC-II μόρια. Οι επιφανειακοί markers που ελέγχθηκαν ήταν οι: CD4, CD8, CD3, CTLA-4, CD28. Ο CTLA-4 (CD152) είναι μία επιφανειακή πρωτεΐνη που συναντάται στα Τ-λεμφοκύτταρα και μεταδίδει παρεμποδιστικά σήματα ενώ αντίθετα ο CD28 μεταδίδει σήματα ενεργοποίησης στα Τ-λεμφοκύτταρα στην οποία την μεμβράνη εκφράζεται. Ο CD3 αποτελεί χαρακτηριστικό marker των Τ-λεμφοκυττάρων. Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού μετρήθηκαν σε FACS και παρουσιάζονται στην *εικ. 7*.

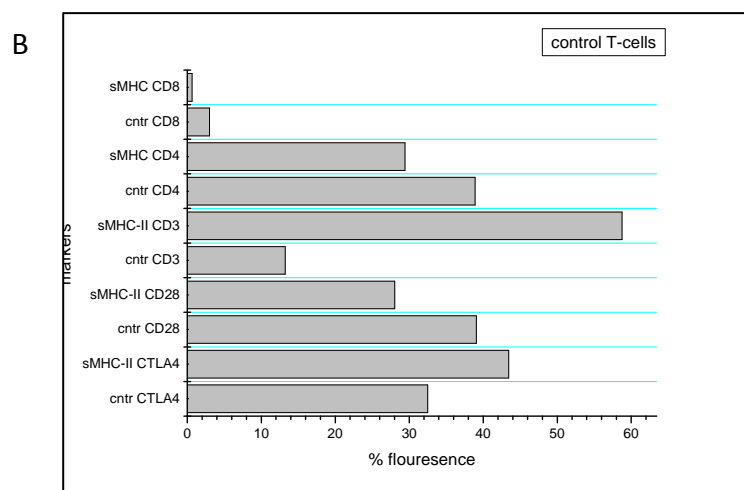
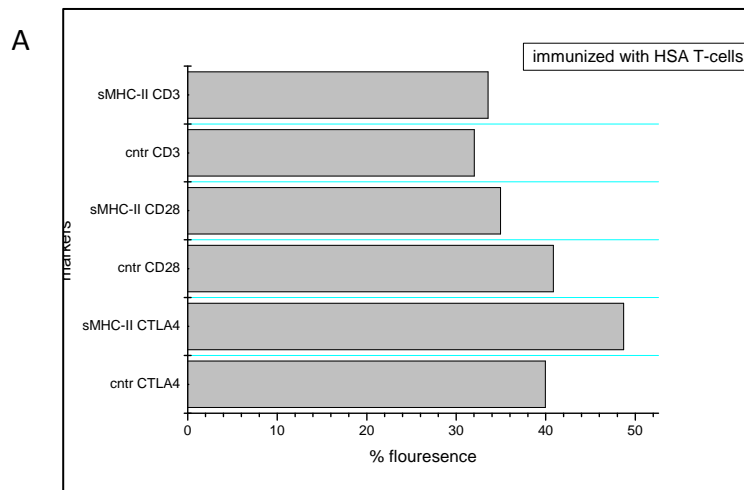




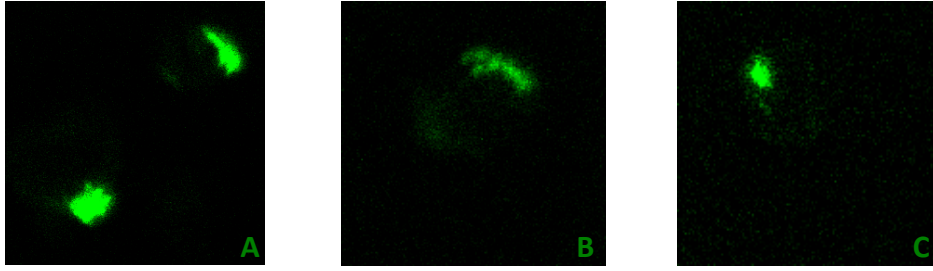


Εικόνα 7: Κυτταρομετρία ροής (FACS) για έλεγχο επιφανειακών markers σε ανοχοποιημένα (tol.) ή control T-λεμφοκύτταρα παρουσία ή μη διαλυτών MHC-II. Τα CTLA-4 κύτταρα αυξάνονται παρουσία των διαλυτών MHC-II ενώ αντίθετα τα CD28 και τα CD4 κύτταρα μειώνονται. Ταυτόχρονα τα διαλυτά MHC-II φαίνεται να ρυθμίζουν αρνητικά τα CD8 κύτταρα.

Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού ενισχύουν την υπόθεση πως τα διαλυτά MHC-II προκαλούν αρνητική ρύθμιση στην ανοσολογική απόκριση επάγοντας την διαφοροποίηση των T- λεμφοκυττάρων που συνδέονται με την καταστολή. Το φαινόμενο είναι πιο έντονο στα control T-λεμφοκύτταρα που επώαστηκαν με διαλυτά MHC-II καθώς υπάρχει αύξηση των CTLA-4 κυττάρων με ταυτόχρονη μείωση των κυττάρων που εκφράζουν CD28 επιφανειακό marker. Επιπλέον, η ταυτόχρονη μείωση και των CD4 κυττάρων μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα μόρια αυτά είναι ικανά να προκαλέσουν αναστολή της ενεργοποίησης της ανοσολογικής απόκρισης. Το γεγονός πως η μείωση των CD4 είναι μικρότερη μπορεί να συνδεθεί με το γεγονός πως αρκετά από τα ρυθμιστικά κύτταρα είναι CD4 θετικά και άρα πιθανά να παραμένουν στην κυκλοφορία παρουσία των διαλυτών μορίων. Παρόμοια εικόνα, έχουμε και με τα αρχικά ανοχοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, με σχετικά μειωμένη διαφορά μεταξύ των κυττάρων που επώαστηκαν ή όχι με τα διαλυτά MHC-II. Τέλος, τα διαλυτά MHC-II μόρια δεν φαίνεται να έχουν μεγάλη επίδραση στα CD8 κύτταρα που πιθανώς συνδέεται πως κατά κανόνα αυτά τα κύτταρα είναι MHC-I restricted. Ακολουθούν πίνακες με συγκεντρωτικά αποτελέσματα και εικόνες των κυττάρων από *Confocal microscopy*.



Εικόνες 8A και 8B. Συγκεντρωτικοί πίνακες με το ποσοστό κυττάρων που εκφράζουν επιφανειακούς markers CD3, CD4, CD8, CTLA-4 και CD28. Ο πρώτος αφορά τα κύτταρα που έχουν πρώτα ανοχοποιηθεί με HSA και ο δεύτερος αφορά τα control κύτταρα. Και τα 2 είδη κυττάρων επώαστηκαν με διαλυτά MHC-II μόρια. Τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά μίας σειράς 3 πειραμάτων που εμφανίζουν επαναληψιμότητα εξ' ου και η απουσία τυπικής απόκλισης.



Εικόνα 9. Εικόνες από Confocal microscopy. **A:** κύτταρο CTLA-4+, **B:** κύτταρο CD28+, **C:** κύτταρο CD4+

Συμπεράσματα-Συζήτηση

Τα διαλυτά MHC-II μόρια εντοπίζονται φυσιολογικά στα σωματικά υγρά (αίμα, σάλιο, σπέρμα, ιδρώτας, δάκρυα, ούρα) υγιών ατόμων σε ποικίλες συγκεντρώσεις (*van Rood et al. 1970; Purro et al. 1997; Hagihara et al. 1994; Aultman et al. 1999; Pfeiffer et al. 2000*) ενώ έχουν μελετηθεί σε διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες, κακοήθειες και παθολογικές εγκυμοσύνες (*Aultman et al., Verbruggen et al. 2000, 2002, Wolf et al. 1998, Pfeiffer et al. 2000, Rebmann et al, 2002*). Επιπλέον, έχουν συνδεθεί με την ανοσολογική διαδικασία της ανοχής. Ανοχή ονομάζεται η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος κατά την οποία δεν αναπτύσσεται απόκριση προς ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

Προηγούμενα ερευνητικά αποτελέσματα του εργαστηρίου είχαν δείξει αύξηση των διαλυτών MHC-II μορίων στον ορό ποντικών που προηγούμενα είχαν ανοχοποιηθεί με αντιγόνο HSA (Human Serum Albumin) (Ματθαιακάκης, Μπακέλα-μη δημοσιευμένα δεδομένα). Τα μόρια αυτά απομονώθηκαν από τον ορό και ταυτοποιήθηκαν με SDS-PAGE και Western Blot ενώ διαπιστώθηκε πως αποτελούν βαριά γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες (εικόνες 1A και 1B). Επιπλέον, η απομόνωση των μορίων αποκάλυψε πως τα μόρια αυτά δεν φαίνεται να αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες στην κυκλοφορία (εικόνα 1A και B). Η διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης επιτρέπει την συνκατακρήμνιση πρωτεϊνών αν υπάρχει αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη προς εξέταση (επειδή χρησιμοποιείται αντίσωμα και όχι κλώνες ή άλλες επεμβατικές μέθοδοι).

Σκοπός αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής ήταν να συνδέσει περισσότερο αυτά τα μόρια με την διαδικασία της ανοχής επικεντρώνοντας στην *in vivo* κατάσταση.

Αρχικά, μελετήθηκε η έκκριση της IL-2 κυτοκίνης που συνδέεται κατά κανόνα με την ενεργοποίηση παρά με την καταστολή που απαιτείται για την ανοχή. Η αύξηση της IL-2 που παρατηρήθηκε παρουσία των διαλυτών MHC-II μορίων εξηγείται από την παρουσία των μεμβρανικών MHC-II μορίων που βρίσκονται στην επιφάνεια των μακροφάγων που είναι παρόντα στα συνολικά σπληνοκύτταρα. Παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου είχαν δείξει πως τα διαλυτά μόρια MHC-II λειτουργούν ανταγωνιστικά προς τα αντίστοιχα μεμβρανικά. (*Sardis et al, 2009*). Η παρουσία των μακροφάγων στην καλλιέργεια και η αλληλεπίδραση τους με τα T-λεμφοκύτταρα δικαιολογεί την έκκριση της IL-2.

Στην συνέχεια, εξετάστηκε η δυνατότητα τα διαλυτά μόρια να προκαλούν αρνητική ρύθμιση σε ενεργοποιημένα κύτταρα μετά από ανοσολογική απόκριση σε αντιγόνο. Χρησιμοποιήθηκαν 2 αντιγόνα, η HSA και η MBP. Και στα 2 είδη κυττάρων τα διαλυτά μόρια προκάλεσαν μείωση του πληθυσμού των σπληνοκυττάρων, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό τους. Επιπλέον, πρόσφατα μη δημοσιευμένα δεδομένα από mass spectrometry (MS-MS) που πραγματοποιήθηκαν σε μόρια τα οποία απομονώθηκαν από ποντίκι το οποίο ανοχοποιήθηκε με HSA, αποκάλυψαν υψηλή παρουσία πεπτιδίων της HSA, αποδεικνύοντας πως τα διαλυτά μόρια τα είχαν προσδέσει και ενισχύοντας και την υπόθεση πως εμπλέκονται στον μηχανισμό της ανοχής. Έτσι, αναμενόμενο ήταν να προκαλούν καταστολή μόνο στα κύτταρα που ανοσοποιήθηκαν με HSA. Η μείωση στα κύτταρα ανοσοποιημένα με MBP, αν και μικρότερη, οφείλεται πιθανά στο γεγονός πως τα μόρια μας δεν είναι πλήρως ομοιογενή ως προς τα πεπτίδια που έχουν προσδέσει. Επιπλέον, μία υπόθεση που όμως χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση είναι η όποια καταστολή να μην είναι πλήρως αντιγονοειδική αλλά με μικρότερη συγγένεια.

Τέλος, η μελέτη συγκεκριμένα των T-λεμφοκυττάρων αποκάλυψε την ικανότητα των μορίων να προκαλούν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων που σχετίζονται με την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος (CTLA-4+) ενώ την ίδια στιγμή να ρυθμίζουν αρνητικά όσων επάγουν την ενεργοποίηση (CD28+, μέρος των CD4+). Ταυτόχρονα προκαλούν την έκκριση της IL-10 κυτοκίνης που συνδέεται με την καταστολή. Μια υπόθεση ακόμη θα ήταν να έχουν

αντιγονοειδική επίδραση σε άλλο υποπληθυσμό Τ λεμφοκυττάρων ο οποίος με τη σειρά του να ασκεί αρνητική ρύθμιση μέσω παραγωγής IL-10.

Τα διαλυτά MHC-II μόρια, με βάση και τα αποτελέσματα, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της ανοχής και συγκεκριμένα στο κομμάτι που περιγράφηκε ως ***clonal anergy***, ρόλος ο οποίος μόλις έχει αρχίσει να διαλευκαίνεται. Η επαναληψιμότητα των πειραμάτων που περιγράψαμε παραπάνω μας επιτρέπει να είμαστε σίγουροι για τον ανοσορυθμιστικό τους ρόλο. Βασική πληροφορία θα αποτελέσει η ταυτοποίηση του πληθυσμού από τον οποίο εκκρίνονται. Ήδη αρχικές πληροφορίες (αυξημένη έκκριση από CD25+/CD4+ κύτταρα, μη δημοσιευμένα δεδομένα) αποκαλύπτουν το πολύπλοκο δίκτυο στο οποίο εμπλέκονται.

Βιβλιογραφία

- *Almqvist N., Lonnqvist A., Hultkrantz S., Rask C. and Telemo E., Serum-derived exosomes from antigen-fed mice prevent allergic sensitization in a model of allergic asthma.* Immunology, (2008) 125, 21–27
- *Athanassakis I., Ranella, A., Vassiliadis S., 2000. IFN-g facilitates release of classII-loaded intracellular pools in trophoblast cells: a novel property in dependent of protein synthesis.* J.Interferon Cytokine Res. 20,823–830.
- *Athanassakis I, Vassiliadis S., T-regulatory cells: are we re-discovering T suppressors?,* Immunology Letters (2002) Vol.84:179-18
- *Aultman D, Adamashvili I, Yaturu K, Langford M, Gelder F, Gautreaux M, Ghali GE, McDonald J, Soluble HLA in Human Body Fluids,* Human Immunology(1999) Vol. 60: 239–244
- *Borowski C, Martin C, Gounari F, Haughn L, Aifantis I, Grassi F and von Boehmer H, On the brink of becoming a T cell,* Current Opinion in Immunology (2002), Vol.14:200–206
- *Cahalan M D, Gutman G A, The sense of place in the immune system,* Nature Immunology(2006) Vol.7:329-332
- *Calne, R.Y., White, H.J., Yoffa, D.E., Binns, R.M., Maginn, R.R., Herbertson, R.M., Millard, P.R., Molina, V.P., Davis, D.R., 1967. Prolonged survival of liver transplants in the pig.* Br. Med. J. 4, 645–648.
- *Chow Amy Y. and Ira Mellman, Old lysosomes, new tricks: MHC II dynamics in DCs,* Trends in Immunology(2005) Vol.26:72-78
- *Dobbe LM, Stam NJ, Neefjes JJ, Giphart MJ, Biochemical complexity of serum HLA class I molecules.* Immunogenetics 27(3):203, 1988.
- *Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A., Kuby J.: Immunology, 2007. 5th Edition*
- *Ge Q, Stone J D, Thompson M T, Cochran J R, Rushe M, Eisen H N, Chen J, Stern J L, Soluble peptide-MHC monomers cause activation of CD8⁺ T cells through transfer of the peptide to T cell MHC molecules, PNAS (2002) Vol.99:13729-13734*
- *Geuze Hans J., The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning,* Immunology Today(1998) Vol.19:282-287
- *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) Vol.15:225-236.
- *Ghio, M., Contini, P., Mazzei, C., Brenci, S., Barberis, G., Filaci, G., Indiveri, F., Puppo, F., 1999. Soluble HLA class I, HLA class II, and Fas ligand in blood components: a possible key to explain the immunomodulatory effects of allogeneic blood transfusions.* Blood 93, 1770–1777
- *Hagihara M, Shimura T, Yamamoto K, Takebe K, Munkhbat B, Tsuji K, Soluble HLA Class I and Class II in Japanese,* Human Immunology(1994) Vol. 40:171-173
- *Jendro M., Goronzy J. & Weyand C.: Structural and functional characterization of HLA-DR molecules circulating in the serum.* Clinical Immunology and Immunopathology 1991, 70:91-98
- *Jon J. van Rood and Aad van Leeuwen, Soluble HLA Antigens: How It All Started,* Human Immunology (1999) Vol. 60:412–413
- *Jerry Y. Niederkorn, See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege,* Nature Immunology (2006) Vol.7:354-359
- *Katsumi Maenaka and E Yvonne Jones, MHC superfamily structure and the immune system,* Current Opinion in Structural Biology (1999) Vol.9:745–753

- *Kamada N, Davies HS, Roser B., Reversal of transplantation immunity by liver grafting.* Nature 292(5826): 840, 1981
- *Love P.E., Shores E.W., ITAM multiplicity and thymocyte selection: how long can you go,* Immunity (2000) Vol.12:591-597
- *Ladi E, Yin X, Chtanova T, Robey E A, Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection,* Nature Immunology(2006) Vol 7.338-343
- *Lappin M B, Campbell J D M, The Th1-Th2 classification of cellular immune responses: concepts, current thinking and applications in haematological malignancy,* Blood Reviews (2000) Vol.14:228–239
- *MacKay Philippa A., Salome LeibundGut-Landmann, Norbert Koch, Amy C. Dunn, Walter Reith, Ralph W. Jack and Alexander D. McLellan: Circulating, soluble forms of major histocompatibility complex antigens are not exosome-associated.* Eur. J. Immunol. 2006. 36: 2875–2884
- *Mosmann T R, Sad S, The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more,* Immunol Today (1996) Mar;17:138-46
- *McGhee J R, The world of TH1/TH2 subsets: first proof,* J Immunol. (2005) Vol.175:3-4
- *Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman, Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins,* J. Immunol.(1986) Vol.136:2348–2357
- *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) Vol.170: 25 – 33
- *Nicholson L B, Kuchroo V K, Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease.* Curr Opin Immunol. (1996) Vol.8:837-42
- *Ostman S., Taube M. and Telford E., Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent.* Immunology, (2005) 116, 464–476
- *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,* Human Immunology (2000) Vol. 61:559–564
- *Puppo F, Indiveri F, Scudeletti M, Femme S, Soluble HLA antigens: new roles and uses,* Trends in Immunol Today (1997) Vol.18:154-155
- *Pitcher L.A., van Oers N.S.C., T cell receptor signal transmission: who gives an ITAM?,* Trends in Immunology (2003), Vol.24:554-559
- *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) Vol.66:43-55
- *Rebmann V., Ugurel S., Tilgen W., Reinhold U. and Grosse-Wild H., Soluble HLA-DR is a potent predictive indicator of disease progression in serum from early-stage melanoma patients.* Int. J. Cancer: **100**, (2002) 580–585.
- *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) Vol.115: 508-513
- *Sardis M., Miltiadou P., Bakela K., Athanassakis I.: Serum-derived MHC class II molecules: Potent regulators of the cellular and humoral immune response.* Immunobiology 215 (2010), 194-205.
- *Sharma D. S., Nag B., XIAO-MIN Sut, Green D., Spack E., Clark R. B., and Sriraman S., Antigen-specific therapy of experimental allergic encephalomyelitis by soluble class II major histocompatibility complex-peptide complexes,* Immunology Vol. 88, (1991)

- 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) Vol.188:473-479
- Wolf RE, Adamashvili IM, Gelder FB, Hall VC, Fraser PA, McDonald JC., **Soluble HLA-I in Rheumatic Diseases** *Human Immunology* (1998) Vol.59: 644–649
- Webb BJ, Bochan MR, Montel A, Padilla LM, Brahmī Z., **The lack of NK cytotoxicity associated with fresh HUCB may be due to the presence of soluble HLA in the serum**, *Cellular Immunology* (1994) Vol.159: 246-261.
- Van der Merwe PA, **Do T cell receptors do it alone?**, *Nature Immunology* (2002) Vol.3:1122:1123
- Vassiliadis S., Pafilis M. & Athanassakis I. (2001): **Serum-soluble HLA class I and class II levels as an alternative diagnostic test for determining immune indexes required for normal pregnancies.** *Reprod. Fertil. Dev.* 13, 427–433.
- van Rood, J.J., van Leeuwen, A., van Santen, M.C.T., 1970. **Anti-HL-A2 inhibitor in normal human serum.** *Nature* 226, 366–367.
- Verbruggen LA, Versaen H, Rebmann V, Duquet W, De Cock S, Grosse-Wilde H, Demanet C, **Soluble HLADR Levels in Serum are Associated With Therapy and Genetic Factors in Rheumatoid Arthritis**, *Human Immunology* (2002) Vol. 63: 758–764
- 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) Vol. 56: 436–440