

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

FAGOSİTİK DENDRİTİK HÜCRELERİN ANALİZİ VE EBV ENFEKSİYONU OLAN
HASTALARDAN ALINAN, IL-2 İLE ÇOĞALTILAN T VE NK HÜCRELERİNİN
KONTROLLERLE KARŞILAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şafak Ceren AKAN

TRABZON-2008

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	IV
GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
1 GENEL BİLGİLER.....	2
1.1 Epstein-Barr Virüsü Hakkında Genel Bilgi.....	2
1.1.1. Hastalıklarla İlişkileri.....	2
1.1.1.1 Enfeksiyöz Mononükleaz.....	2
1.1.1.2 Posttransplant lenfoproliferativ hastalık(PTLD).....	2
1.1.1.3 AIDS de birincil merkezi sinir sistemi lenfoması (PCNSL)	2
1.1.1.4 Hodgkin's Hastalığı.....	3
1.1.1.5 Burkitt's lenfoma.....	3
1.1.1.6 Nazofarinks Kanseri.....	3
1.1.1.7 AIDS de Oral Hairy Lökoplaki.....	3
1.1.1.8 <i>Torque Teno Virus</i> (TTV) ile İlişkisi.....	4
1.1.1.9 Hemofagositik Lenfhistiyositozis (HLH).....	4
1.1.1.10 Diğer Tümörler.....	5
1.1.2 EBV antijenleri.....	5
1.2 Dendritik Hücre Hakkında Genel Bilgi.....	7
1.2.1 Dendritik Hücrelerin Kökeni ve Fonksiyonu.....	7
1.2.1.1 İmmatür Dendritik Hücreler	8
1.2.1.2 Matür Dendritik Hücreler.....	9
1.2.2 Dendritik Hücrelerin Farklılaşması.....	10
1.2.3 Antijen Sunumu.....	12
1.2.4 Viral Patogenezde Dendritik Hücrelerin Rolü.....	13
1.3 Lenfositler.....	14
1.3.1 T hücreleri Hakkında Genel Bilgi.....	14
1.3.1.1 Yardımcı T hücreleri (effektör T hücreleri veya T _h hücreleri)	15
1.3.1.1.1 T Yardımcı Hücreler Tip 1.....	15
1.3.1.1.2 T Yardımcı Hücreler Tip 2.....	16
1.3.1.1.3 T Yardımcı Hücreler Tip 17.....	16
1.3.1.2 Naive T Hücreleri.....	17
1.3.1.3 Sitotoksik T Hücreleri (T _c hücreleri veya CTL).....	18
1.3.1.3.1 Öldürme Mekanizması.....	19

1.3.1.3.1.1 Perforin/Granzyme Kullanılması.....	19
1.3.1.3.1.2 FasL/Fas Kullanılması.....	19
1.3.1.4 Regulatory T Hücreler (T _{reg} hücreler).....	20
1.3.1.5 Memory T hücresi.....	21
1.3.2 Natural Killer Hücreleri Hakkında Genel Bilgi.....	21
1.3.2.1 Natural Killer Hücrelerinin Rollerini.....	22
1.3.2.2 Natural Killer Hücrelerin Sitotoksitesi.....	23
1.3.3 B Hücreler Hakkında Genel Bilgi.....	23
1.3.4 B Hücrelerin Gelişimi.....	23
1.3.5 B Hücre Tipleri.....	24
1.3.5.1 Plazma B Hücreleri.....	24
1.3.5.2 Memory B Hücreler.....	25
1.3.5.3 B-1 Hücreler.....	25
1.3.5.4 B-2 Hücreler.....	25
1.3.5.5 B Hücrelerin İmmunolojik Fonksiyonu ve Antikor Üretimi.....	26
2 MATERYAL.....	27
2.1 Araç-Gereçler.....	27
2.2 Kimyasallar.....	27
2.3 Hücre Kültür Mediumu.....	28
2.3.1 RPMI 1640 Invitrogen.....	28
2.4 Tamponlar ve Solisyonlar.....	28
2.4.1 FACS buffer.....	28
2.5 Fiks ve Perm.....	29
2.5.1 Perm wash buffer.....	29
2.5.2 FACS Lizis Buffer.....	29
2.5.3 Propidium Iodide Stok Solisyon.....	29
2.5.4 Cellfix Buffer.....	29
2.6 Monoklonal antijenler.....	30
2.7 Sitokin antijenler.....	31
2.8 Kan örnekleri.....	31
3 METOD.....	32
3.1 Tam kandan Buffy coat Hazırlama ve MoDH'lerin Üretimi.....	32
3.2 T hücre line Üretimi.....	33
3.3 Akım Sitometrisi (FACS).....	34
3.3.1 FACS Hakkında Genel Bilgi.....	34
3.3.2 Hücre Yüzey Antijenlerinin Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi.....	34
3.3.3 Sitoplazmik Antijenlerin Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi.....	35
3.3.4 Ölü Hücrelerin Propidium Iodide ile Tesbit Edilmesi.....	36
3.4 Plazma proteinlerinin Immulite ile belirlenmesi (Siemens-DPC).....	36
3.4.1 Immulite Hakkında Genel Bilgi.....	36

3.4.2 Immulite Protokol.....	36
4 BULGULAR.....	37
4.1 Hedef 1.....	37
4.1.1 Immatür and Matür Dendritik Hücrelerin Fenotipik Analizi.....	37
4.2 Hedef 2.....	51
4.2.1 EBV hastalarından alınmış ve IL-2 de üretilmiş T lenfositler ile sağlıklı vericilerden alınan T lenfositlerin identifikasyonu.....	51
4.2.2 PBMC den alınan B lenfosit ve NK hücrelerinin identifikasyonu.....	59
4.2.3 IL-2 ile yapılan Primer Lenfoid Hücre Kültüründe Sitokin Üretimi (IL-10).....	62
5 TARTIŞMA.....	63
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
6 ÖZET.....	67
7 İNGİLİZCE ÖZET.....	68
8 KAYNAKLAR.....	69

ÖNSÖZ

Öncelikle, Almanya Ulm Üniversitesi Experimentelle Anesthesiologie A.B.D. başkanı Sayın Prof.Dr. E. Marion Schneider’e bana laboratuvarında çalışma ve tezimi hazırlama imkanı verip, eşsiz bilgileriyle büyüttiği için çok teşekkür ederim.

Ayrıca verdiği destek, bilgi ve referanstan ötürü K.T.Ü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.B.D. başkanı Sayın Prof.Dr. Murat Ertürk’e minnettarım.

Ulm Üniversitesi Anestezi Kliniğinde çalışan tüm arkadaşlarıma yardımlarından ve sağladıkları güzel atmosferden dolayı teşekkür ederim.

EDI GmbH ve özellikle Gerburg Steine’a maddi ve manevi desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Son olarak, tüm eğitimim boyunca yanımda olan, desteklerini esirgemeyen aileme, anlayışı ve sabrı için nişanlıma sonsuz teşekkürler ederim.

Ulm,Almanya,Ağustos 2008
Trabzon,Türkiye,Ekim 2008

Şafak Ceren Akan

1 GİRİŞ ve AMAÇ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında hazırlanan bu tezin klinik çalışmaları Almanya Ulm Üniversitesinde yapılmıştır.

Hazırladığımız bu çalışmanın üç farklı amacı bulunmaktadır. Bunlardan ilki, immatür dendritik hücre ve matür dendritik hücre arasındaki reseptör farklılıklarının ve benzerliklerinin araştırılmasıdır bunu da sağlıklı vericilerden alınan hemofogozitik hücrelerin (buffy coats) ficoll ile izole edilmesi ve in vitro da kültür edilmesi, akım sitometrisi ile analiz edilmesi yöntemi ile araştırdık. İkinci amacımız, T hücre reseptörlerinin araştırılmasıdır. EBV hastalarından alınmış ve IL-2 de üretilmiş lenfositler ile sağlıklı vericilerden alınan lenfositler arasındaki reseptör farkları akım sitometrisi ile analiz edildi. Üçüncüsü ise B hücrelerinin ve Natural Killer hücrelerinin yüzey reseptörlerinin araştırılmasıdır. B ve NK hücrelerinin reseptörlerini araştırmak bir literatür taraması olarak yapılmıştır.

Bu çalışmanın hücre tedavisi için kullanılan dendritik hücre aşısı üretimi konusunda faydalı olacağı ve ileriki çalışmalar için zemin oluşturacağı kanaatindeyiz.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Epstein-Barr Virüsü Hakkında Genel Bilgi

Epstein-Barr virüsü, Burkitt tarafından 1958 yılında tanımlanmıştır. EBV, Herpes virinae ailesinin alt familyasına ait olan lenfokriptovirüs'dür. EBV, diameterde 180 µm'dir ve bir dış hücre zarı, bir protein kordonundan ve bir DNA'dan oluşmaktadır. Viral membran, dış yüzeyinde yüksek moleküler ağırlıklı glikoproteinlerin bir veya iki türünden oluşan çivi benzeri projeksiyonlara sahiptir. Membranın diğer protein kısımları, bir nonglikozit membran matrix proteini (140 kilo Dalton), bir minör glikoprotein (120 glikoprotein) ve majör iç membran proteini (85 kilo Dalton) içermektedir. Nükleokapsit ve kor, 20'den 120 Dalton ölçüleri arasında değişen en az 15 polipeptitten ibarettir (1).

Genom, yaklaşık 80 proteini kodlamaktadır. Viral replikasyonlarda ihtiva olunan genlerden bir çoğunun fonksiyonu, herpes simpleks virüs genleri ile türdeşlik göstermektedir fakat B hücrelerinin latent enfeksiyonunda salınan genlerin, diğer insan herpes virüslerindeki gibi tanınmış kopyaları yoktur (2).

2.1.1 Hastalıklarla İlişkileri

2.1.1.1 Enfeksiyöz Mononükleaz

Enfeksiyöz mononükleaz (Mono), lenfatik sistemin Epstein-Barr virüsü ile enfekte olmasıdır. Bu hastalık, genellikle hassas kişilere enfekte salya ile geçmektedir. Çoğu insan hayatlarında Epstein- Bar virüsüne maruz kalır, çok azında IM semptomları gelişir. Semptomlar arasında, ateş, boğazda lezyonlar,

bezelerde şişiklik ve yorgunluk bulunmaktadır. Bazen, akciğer ve dalak etkilenmektedir. Bir haftadan birkaç haftaya kadar deva eden rahatsızlık, çok nadir ölümcüldür (3).

2.1.1.2 Posttransplant lenfoproliferatif hastalık (PTLD)

PTLD, bütün organ veya T-hücreleri azaltılmış allojenik kemik iliği transplantasyonlarıyla ilişkili immunospresif terapilerde iyi bilinen bir tehlikedir. PTLD agresif hareket eder. Organ transplantasyonlarında, immunosupresyonun azaltılması, artan immuno gözetim ve tümör gerilemesine yol açabilir. EBV spesifik sitotoksik T-hücreleri ile gerçekleştirilen adoptif immunoterapi, kemik iliği transplantasyonlarında profilaksis gibi etkili olabilmektedir (4).

2.1.1.3 AIDS de birincil merkezi sinir sistemi lenfoması (PCNSL)

Bu tümörler neredeyse 100% EBV ile ilişkilidir. Hastalık genellikle belirtilerin ortaya çıkışından sonraki iki ay içerisinde ölümcül olmaktadır. Uygun bir tedavisi mümkün değildir (5).

2.1.1.4 Hodgkin's Hastalığı

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki vakaların 40-60%'ının Reed-Stenberg kanser hücrelerinde, en sıklıkla karma selularite alttip EBV'nin DNA, RNA ve proteini teşhis edilmiştir (6).

2.1.1.5 Burkitt's lenfoma

BL, çocukluk çağı kanserlerinin 80%'ini oluşturan Afrikanın Ekvator bölgesinde endemiktir. Karakteristik anatomik çene (72%) ve abdomen (56%) bozuklukları bulunmaktadır. Malarya ile sürekli enfekte olmanın sebep olduğu poliklonal B-Hücresi uyarımı ile birlikte malnutrasyon, T hücresi yanıtlarını baskılamaktadır. Yaygın olarak EBV ile enfekte B-hücrelerinin çoğalması, yüksek sitogenetik abnormalitelerin gelişme olasılığını endemik (Afrika) ve sporadik (A.B.D) olarak artırmaktadır (7).

2.1.1.6 Nazofarinks Kanseri

NPC, 50-54 yaş aralığındaki pik insidansı ile, güney Çin'deki en yaygın kanserlerden biridir. Güney Çin'deki yüksek risk gruplarındaki NPC deteksiyonu için, populasyon tabanlı tarama yöntemi olarak EBV serolojisi yapılmaktadır (8).

2.1.1.7 AIDS de Oral Hairy Lökoplaki

Bu lezyonlar, esasen HIV- pozitif hastaların dillerinin lateral yüzlerinde oluşmaktadır. Bu, EBV replikasyonunun epitel-tabanlı fokusudur. Bol viral replikasyonlar, OHL'yi diğer EBV'lerin klinik manifestasyonları arasında eşsiz kılmaktadır. Lezyonlar Asiklovir'e iyi yanıt vermekte, fakat terapi durdurulduğunda sıklıkla nüksetmektedir (9).

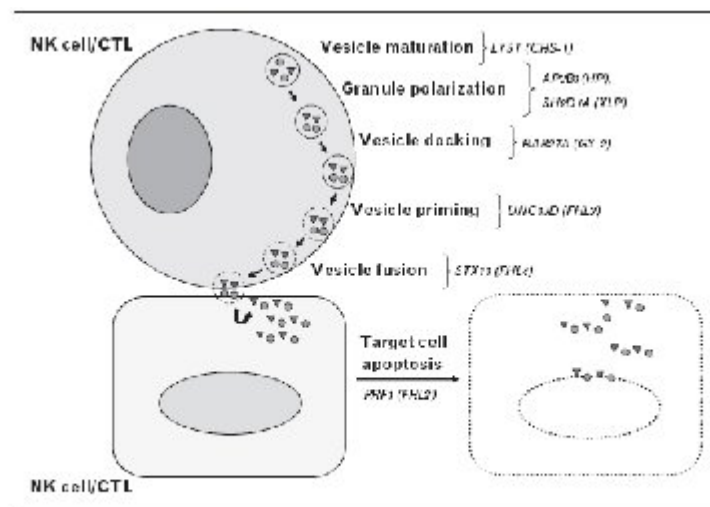
2.1.1.8 Torque Teno Virus (TTV) ile İlişkisi

TT-virüsü (TTV), 1997 yılında Japonya’da etiolojisi bilinmeyen geç transfüzyon hepatiti olan bir hastada bulunmuştur. Bu hastalığın EBV ile ilişkisi B-hücresi lenfoması ve Hodgkin’s hastalığına benzemektedir (10).

2.1.1.9 Hemofagositik Lenfohistiyositozis (HLH)

Hemofagosit lenfohistiyositoziz (HLH), ateş, splenomegali, safrasız sarılık ve kemik iliği ve diğer dokulardaki hemofagositozla (eritrosit, lökosit, platelet ve diğer öncülerin makrofajlar tarafından fagosit edilmesi) karakterize nadir bir sendromdur. HLH, görünür bir şekilde Epstein-Barr (EBV) virüsü ile ilişkilidir (11).

Genel açıklama, EBV ile enfekte olmuş B hücrelerinin, sırasıyla histiyosit ve makrofajları uyaran sitotoksik T hücrelerinin poliklonal çoğalmasını tetiklediğidir (12). Fakat, EBV-HLH’de EBV, T hücrelerini direk olarak hedef alabilmektedir (12,13). EBV ile en çok enfekte olan hücreler, EBV-HLH’de CD8+ T hücreleri, kronik aktif EBV enfeksiyonunda CD4+ T hücreleri veya NK hücreleridir (14).



The small circles and triangles represent cytolytic granules found within cytoplasmic vesicles. CHS-1, Chôdai-Higashi syndrome; GS-2, Giesel syndrome 2; XLP, Xlinked proliferative syndrome. Adapted with permission [12** 59].

Şekil 1 Hemofagositik lenfhistiyositozis (HLH) hastalığının moleküler sebeplerinin şematik gösterimi.

2.1.1.10 Diğer Tümörler

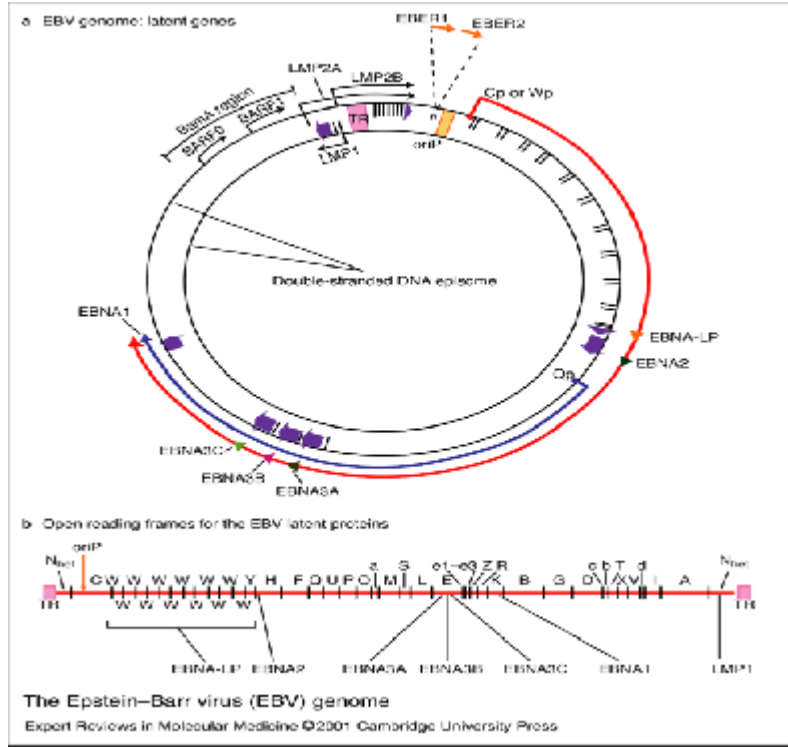
EBV, gastrik lenfoepitelyal kanserlerde ve lenfoepitelyal akciğer ve tükürük bezi kanserlerinin büyük çoğunluğunda tespit edilmiştir. Gastrik adenokarsinomların küçük kısmı da EBV ile ilişkilidir. EBV bazen, yaygın çeşitlilikteki diğer anatomik bölgelerin epitelyal tümörlerinde tespit edilmiştir. EBV'nin lenfoepitelyal ve adenokarsinomlardaki etyolojik rolü henüz bulunamamıştır (15).

2.1.2 EBV antijenleri

EBV genomu, 80 genden 100'e kadar kodlanmış en geniş parçalı ökaryotik DNA'larından biridir; latent enfeksiyonda tümör hücrelerinde bunlardan sadece 11'i salınmaktadır. Bu 11 genin kodladığı proteinler çekirdekte veya hücre yüzeyinde bulunmaktadır. Bunlar, EBNA 1-6; üç latent membran proteini (LMP1, 2A ve 2B); ve latency III diye anılan abundant EBV kodlu RNA'yı içermektedir. Latent enfeksiyon durumu EBNA-1 proteini tarafından sürdürülür; Bu protein, DNA replikasyonunun viral kaynağının bir kısmı olan ORIP isimli bir nükleotid serisine bağlanır. EBNA-1'in ORIP'e bağlanması, viral genomun B hücresi çekirdeğinde muhafaza edilmesini sağlar.

EBNA-2 hücrenin büyümesini ve B hücresinin transformasyonunu sağlar.

EBNA-3B ve EBNA-3C, tandem sıralanmış uzaktan homolog olan üç gen tarafından kodlanırlar. İki latent gen ürünü, EBV tarafından kodlanmış RNA'lar (EBERs), in vitro'da en fazla salınan RNA'lardır; bu RNA'lar proteinleri kodlamazlar ve in vitro transformasyon için gerekli değildirler. LMP-1, transformasyon deneylerinde bir onkojen gibi hareket etmektedir (16-17).



Şekil 2 EBV Antijenleri

2.2 Dendritik Hücre Hakkında Genel Bilgi

Dendritik hücreler profesyonel antijen sunan hücreler sistemini oluşturan, kemik iliği türevli hücrelerdir. Dendritik hücreler, derideki langerhans hücreleri ve mukus membranlarında, dermal denritik hücreler, dokularda intestinal dendritik hücreler, timik medulladaki interdigitating dendritik hücreler ve ikincil lenfoid dokularda, kanda ve lenfte bulunan gizlenmiş dendritik hücreler olarak bir çok dokuda bulunmaktadır. Dendritik hücreler uyarılır ve periferde antijen salınımını gerçekleştirir ve inflamatuvar sinyaller sonucu, lenf organlarının, bu dendritik hücrelerin uyarıcı moleküllerle birlikte MHC- Peptid kompleksleri gösterdiği, T-hücrelerinin bol bulunduğu alanlarına göç ederler. Bu tecrübesiz ve istirahatteki antijen- spesifik T hücrelerinin uyarılmasıyla sonuçlanır. T hücrelerinin uyarımındaki eşsiz özellikleri nedeniyle, Dendritik hücrelerin

enfekte eden ajanlara karşı adaptif immun cevabı oluşturmada başrolü oynadığına inanılmaktadır (18).

2.2.1 Dendritik Hücrelerin Kökeni ve Fonksiyonu

Dendritik hücre yaşam siklusu çok karışıktır ve birçok olgunlaşma aşaması içermektedir(19). Langerhans hücreler, dermal dendritik hücreler ve interstitial dendritik hücreler periferel dokuda bulunurlar (20). Lenfoid orjinli dendritik hücreler birincil ve ikincil lenfoid organlarda bulunur ve birincil periferel T hücre cevabının gelişiminde rol oynar (21). Dendritik hücreler direkt deriden yada periferel kandan izole edilir. Alternatif olarak, dendritik hücreler *in vitro* da CD14+ periferel kan monositlerinden ya da CD34+ kordon kanı kök hücrelerinden GM-CSF, IL-4 ve TNF- α gibi sitokinler kullanılarak üretilir.

Dendritik hücreler immatür ya da matür şekillerde bulunurlar (22-23-24).

2.2.1.1 İmmatür Dendritik Hücreler

İmmatür dendritik hücreler, vücut yüzeyinde ve çoğu dokunun intertisyel alanlarında bulunurlar.

Dendritik hücreler, antijenleri tutmak için makropinositoz ve reseptörlerin aracılık ettiği endositoz ile donatılmışlardır (24). İmmatür dendritik hücreler, MHC sınıf II moleküllerinin orta düzeyleri, CD80 ve CD86 gibi ko-stimulator moleküllerin düşük düzeyleri, CD1a'nın orta düzeyleri ve sadece matür dendritik hücreler ve olgunlaşmamış B hücreleri tarafından salınan CD83'ün yokluğu ile karakterizedir.

İmmatür dendritik hücreler, T hücre bağışıklığının zayıf stimulatörlerindendir. Bu hücrelerin karmaşık lenfosit reaksiyonunda allojenik T hücrelerinin proliferatif

cevabını uyarmadaki düşük kapasitesi, in vitro çalışma ile yansıtılmıştır (MLR) (25-26).

Daha farklı bir safha olarak ifade edilen immatür DH'ler, stratejik olarak vücudun tamamına dağıtılırlar ve antijenleri ele geçiren, kapsayan ve işleme tabi tutan bir karaktere sahiptirler.

Örnek olarak, Langerhans hücreleri, epidermiste bulunan immatür mieloid DH'lerin bir alt tipidir. Lokal patojenik materyal içselleştirildikten sonra, LC, kazanılan antijen materyali işleme tabi tutarak ve olgunluk kazanarak proksimal lenf düğümüne doğru göç etmeye başlar (27-28).

Enfeksiyon veya enflamasyondan sonra, immatür dendritik hücrelerin tam olgunlaşma ve mobilize durumlarına ulaşmalarını sağlayan sinyaller dağıtılmaya başlanır (29). Özellikle deri, akciğerler ve sindirim sistemi genital mukosada bulunan periferik dendritik hücreler, antijenleri, T- hücresi bağımlı alanlarda ortaya çıkan olgun interdijite dendritik hücrelerin bulunduğu lenf düğümlerine taşırlar (30). Birçok intraselüler MHC sınıf II bölümü, MHC sınıf I peptid kompleksini, hücre yüzeyine salarlar (31).

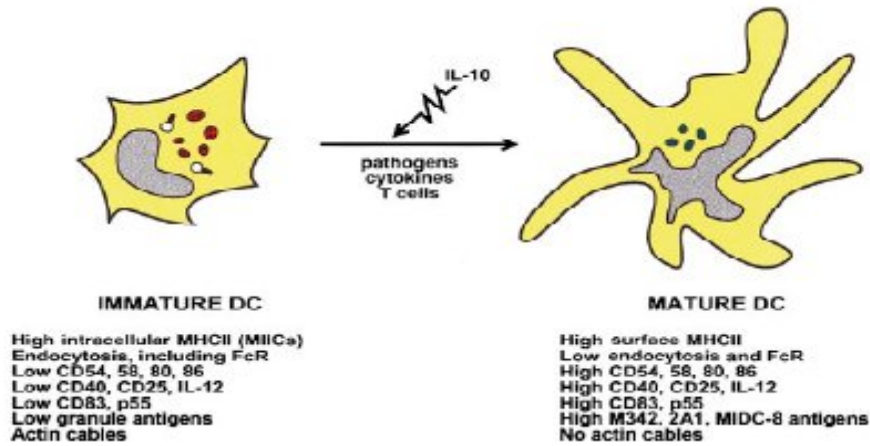
İnterdijitalize dendritik hücreler antijenleri işleme tabi tutmaz fakat onların T- hücresi uyarım kapasitesini, adhezyon ve uyaran molekülleri regüle ederek artırır (32).

2.2.1.2 Matür Dendritik Hücreler

İkincil lenfoid dokularda bulunan matur dendritik hücreler, antijenleri yakalama kapasitelerini kaybederler ve onun yerine majör histocompatibility kompleks sınıf I ve II moleküllerinin kontekstinde bulunan işlenmiş peptidleri lenfositlere sunma üzerine uzmanlaşmışlardır. Matür dendritik hücreler, antijeni tanıdığı anda onu kaydeder ve sinyaller yayarak, lenfositlerin aktivasyonunu ve

prolifikasyonunu sağlar. Karmaşık hücresel ağ ve sitokinlerin yoğun etkileşiminden sonra efektör lenfositler üreyen antijenleri hedef alır.

Matür dendritik hücreler, kemokinlerin bir cinsini üreterek, saf T hücrelerini çekmek ve toplamak gibi eşsiz bir kabiliyete sahiplerdir. Bununla birlikte böylece birincil T hücreleri yanıtlarını uyarma kabiliyetine sahip olurlar (33). Morfolojik olarak geniş tabakalar halinde işlenmesi ile karakterize, matür CD83+ dendritik hücreler, adhezyon ve sinyali çoğaltmak için T hücreleri üzerindeki reseptörler ile etkileşime giren kositimulatör molekülleri de ekspres ederler. Bununla birlikte, matür dendritik hücreler, LPS aktivasyonu sırasında veya CD40 ligasyonu sonrası yüksek miktarda IL-12 üretirler (34).



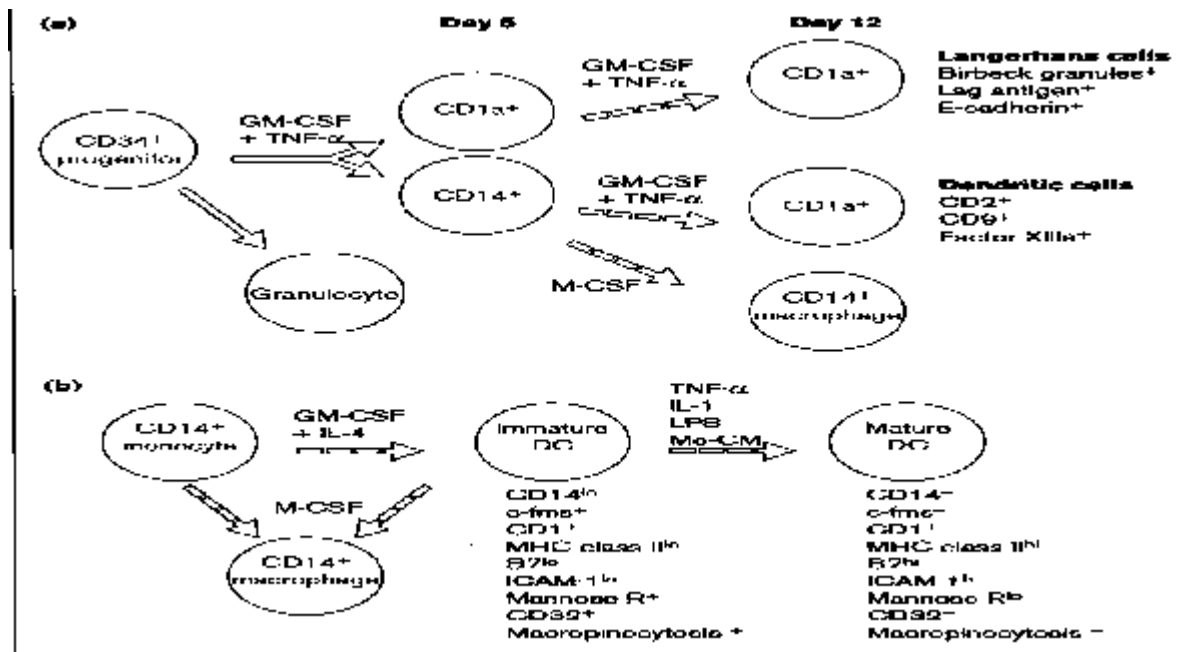
Şekil 3 Şekilde DH matürasyonu esnasındaki değişim gösterilmiştir. İmmatür DH lerde fagositoz, makropinositoz ve pinositoz vardır. Matür DH de ise düşük endositoz kabiliyeti mevcuttur.

1.2.2 Dendritik Hücrelerin Farklılaşması

İnsan kordon hücresi CD34+ hematopoetik progenitörleri GM-CSF ile kültürlenir ve TNF- α , dendritik hücrelerin değişik tiplerini içeren karma hücre popülasyonları üretir.(Fig. 1-2a) (35,36,37) Erken zaman dilimlerinde (kültürün beşinci günü) CD1a ve CD14'ün karşılıklı olarak ekspresyonu ile, dendritik hücrelerin öncüleri tespit edilebilir. Her iki alt set, kültürün 12. gününde olgunlaşarak tipik Dendritik hücelere dönüşürler. CD1a+ öncüleri, epidermal

Langerhans hücrelerinde karakteristik olarak bulunan Birbeck granülleri, Lag antijeni ve E-cadhein markırlarını ekprese eden hücreleri üretirler. Buna karşılık, CD14 öncüleri olgunlaşarak CD14, CD1a dendritik hücrelerine, eksik Birbeck granüllerini, E-cadhein ve Lag antijenini oluşturur, fakat CD2, CD9, CD68 ve dermal dendritik hücrelerin karakteristik markırı olan XIIIa faktörünü ekspres eder. Enterasan bir şekilde, CD14⁺ öncüleri, fakat CD1a⁺ öncüleri değil, hala bipotenttirler çünkü M-CSF'ye cevap sırasında makrofajlara farklılaşabilmektedirler (38-39).

Ayrıca dendritik hücreler, GM-CSF ve IL-4 ile kültürlenmiş CD14⁺ periferel kan monositlerinden de gelişebilmektedir (Fig. 1-2b). Bu hücreler immatür karakteristiğe sahiptir ve daha ileride TNF- α , IL-2 veya LPS (40) gibi inflamatuvar uyarıcılar tarafından veya monositler tarafından uyarılarak matür duruma getirilebilirler (41). Monositlerden üretilen immatür dendritik hücrelerin, bir sonraki olgunlaşma indüksiyonunda kaybettikleri halde, hala M-CSF reseptörü bulundurmaları ilginçtir. Böylece, ortaya çıkan kavram, monositlerin, dış uyarılara dayalı olarak dendritik hücrelere veya makrofajlara polarize olabilen, zengin öncü kaynakları olmalarıdır. Bu polarizasyon, uygun sitokinin, in vitro olarak eklenmesi ile gerçekleştirilebilir. (GM-CSF + IL-4 veya M-CSF) (43).



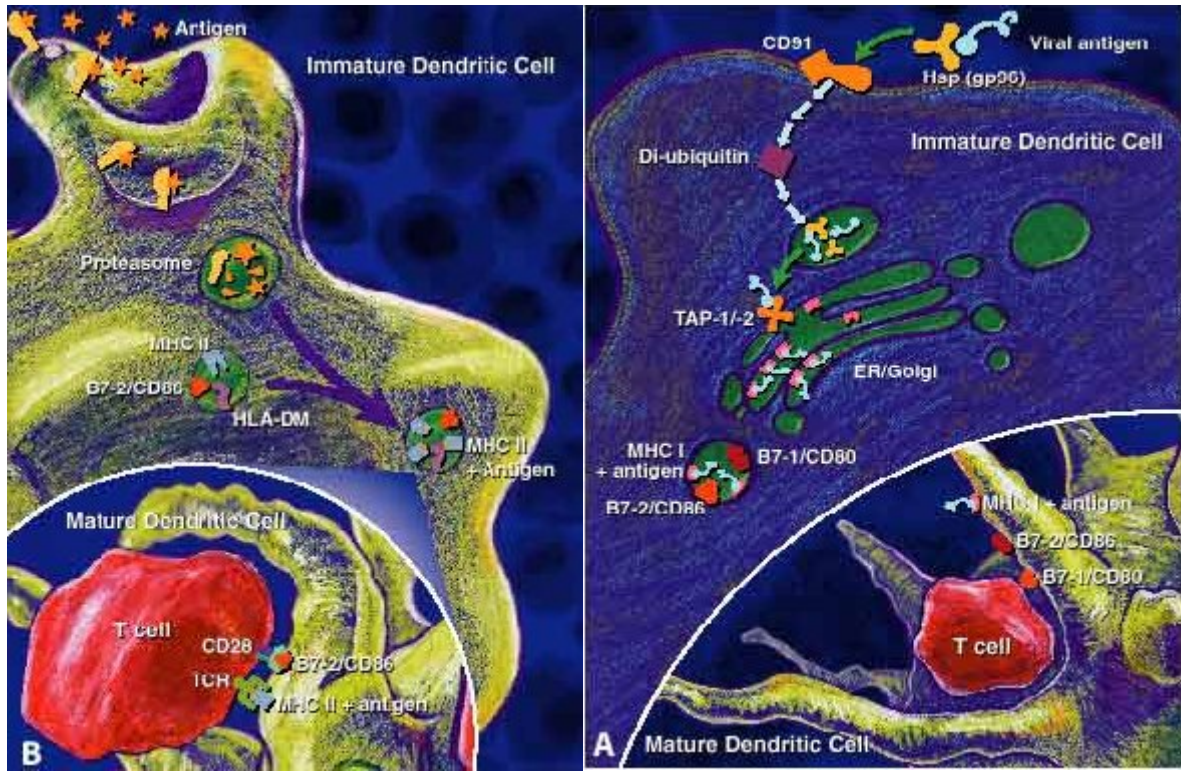
Şekil 4 DH lerin kökeni ve olgunlaşması.

2.2.3. Antijen Sunumu

Dendritik hücreler, eksojenik ve endojenik antijenlerin her iki türünü de işleme ve diğer MHC sınıf I veya II moleküllerinden herhangi birinin konteksine peptid sunma kabiliyetine sahiptirler (Bkz. Şekil 1-3, panel A ve B). Dendritik hücreler olgunlaştığında, peptid yüklü MHC sınıf I ve II komplekslerinin oluşturulması ve hücre yüzeyine taşınması için gerekli özelliklere sahip olurlar (44). Antijen hücre yüzeyine taşındığında, B7-1/CD80 ve B7-2/CD86 gibi uyarıcı moleküllerin artırılmış ekspresyonu ile karşılaşılır. Bu moleküller T hücre reseptör iletişim gücünü artırır (TCR) ve T hücre aktivasyonunu teşvik eder.

Lizozomal-birleşik glikoprotein olan DH-LAMP, belirli bir biçimde lizozomal MHC II kompartmanına ekspres edilir ve dendritik hücreler üzerine CD40 ligasyonunun ardından upregüle olurlar. Bu antijenlerin işlenmesinin uyarılması veya antijen yüklü MHC II komplekslerinin hücre yüzeyine taşınmasına yardımcı olmasında görev yapıyor olabilir (45). Kathepsin S gibi proteazların, dendritik hücreler içindeki MHC II komplekslerin hücre içi trafiğinin düzenlenmesine dahil olduğu da gösterilmiştir (46). İmmatür dendritik hücreler, hücre yüzeyine, matürasyon sırasında kaybolan boş MHC II ve HLA-DM ekspresyonu yapabilirler (47). Salgılanmış dendritik hücre proteazları antijenik peptidleri işleme tabi tutabilirler ve hücre yüzeyi HLA-DM ve boş MHC II molekülleri ile birlikte, antijen işleme ve yükleme işlemleri, immatür dendritik hücrelerdeki hücre içine ek olarak, hücre dışı gerçekleşebilmektedir. Dendritik hücreler, sitotoksik hücreler üretmek için, MHC sınıf I molekülleri ile karıştırılmış antijenik peptidleri, CD8 ekspres eden T hücrelerine sunarlar. Dendritik hücrelerin kendilerinin virüsle enfekte olduğu durumda, proteazomlar (proteasomes) basitçe viral proteinlerin yapısını bozarak onları sitozoldan endoplasmik retikulumla

taşırlar (48). Protein işleme ile ilişkilendirilmiş taşıyıcı, sitosolik peptidlerin, MHC sınıf I moleküllerine bağlanabildiği endoplasmik retikuluma transferini kolaylaştıran bağlı peptid taşıyıcısıdır (Bkz. Şekil 1-3, panel A). İmmatür dendritik hücreler tarafından ekprese edilen hücre yüzeyi reseptörlerinin bir çeşidi, antijen çekimininde ve MHC I ile birlikte antijen sunumunda görev alabilmektedir. Dendritik hücreler, örneğin fagositoz apoptotik hücrelere, av- içeren integrins ve CD36 kullanır (49). Hsp/antijen (örneğin bakteriyel, viral veya tümörden türetilmiş) kompleksleri dendritik hücreler üzerindeki CD91'i tutabilir ve MHC I antijen sunumu için TAP-1 ve 2 aracılığı ile endoplazmik retikuluma bırakılabilirler (50-51-52).



Şekil 5 Panel A ve B. Antijen Sunumu

2.2.4 Viral Patogenezde Dendritik Hücrelerin Rolü

Virüsler direkt veya indirekt şekilde dendritik hücreleri değiştirirler ve böylelikle immün cevapla karşılaşır. Dendritik hücreler CTL cevapların birincil APC'si olduktan ve CD4+ T hücreleri uzun dönem CD8+ CTL aktivitesine yardım sağladıktan sonra, dendritik hücreler veya CD4+ hücre tiplerinden biri ile interferansı, virüslerin immün cevabı geçersiz kılmak için kullandığı bir mekanizma oluşturur. Dendritik neslin hücrelerinin, mukozal maruzdan sonra enfekte olan ilk hücreler olduğu düşünülmektedir (53,54). Diğer taraftan, viral proteinlerin işlenmesi ve viral antijenlerin sunumu, virüs spesifik CD4+ ve CD8+'ın her ikisini birden tetiklerken, aynı zamanda, dendritik hücreler canlı virüsü lenf düğümüne taşıyan araçlar gibi görev yaparlar ve böylece virüsün T hücrelerine ve hastalığın patogenezinde iletiminde katkıda bulunurlar (19).

2.3 Lenfositler

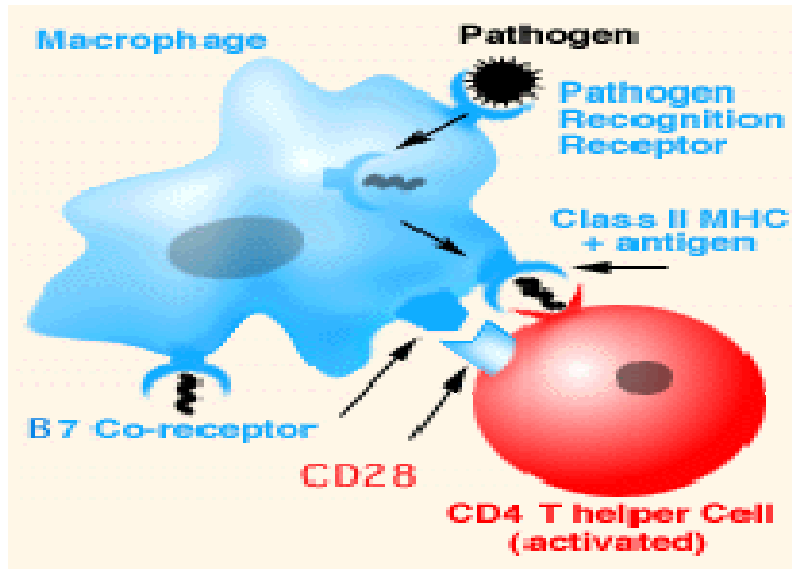
Lenfosit omurgalı immün sisteminde bulunan bir beyaz kan hücresidir. Lenfositler ışık mikroskobu altındaki görünüşlerine göre, büyük granüler lenfosit ve küçük lenfositler şeklinde iki kategoride isimlendirilirler. Fonksiyonel olarak farkları bulunan lenfositlerin türleri arasında ilişki görünüşleriyle kurulur (55,56). Hepsi olmamakla birlikte, çoğu büyük granüler lenfositler, yaygın olarak naturel killer hücreler olarak bilinirler (NK hücreleri). Küçük hücreler T ve B hücreleridir. Lenfositler, vücut savunmasında önemli ve tamamlayıcı rol oynarlar (57).

2.3.1 T hücreleri Hakkında Genel Bilgi

Herbirinin farklı fonksiyonu bulunan çeşitli T hücreleri tanımlanmıştır.

2.3.1.1 Yardımcı T hücreleri (effektör T hücreleri veya T_h hücreleri)

Bir kez aktive olduğunda, hızlıca bölünerek, immun cevabı regüle veya immun cevaba yardım eden, sitokin olarak adlandırılan küçük proteinleri salgırlar. Alınan sitokin sinyallerine bağlı olarak, bu hücreler TH1, TH2, TH17 veya değişik sitokin salgılayan diğer alt tiplere farklılaşırlar. CD4⁺ hücreleri MHC sınıf II ile birleşiktir (58).



Şekil 6 CD4 T helper hücrelerin aktivasyonu

1.3.1.1.1 T Yardımcı Hücreler Tip 1

Th1 hücreleri, dendritik ve pre-Th hücrelerden, dendritik hücrelerin T hücrelerin antijen reseptörlerine (TCR) antijen sunması sonucu oluşan immunolojik sinaps sırasında üretilirler ve interlokin 18 (IL-18) ve IFN- γ kadar interlokin 12 (IL-12) salgırlar.

Bu sitokinlerin parakrini uyarması sonucu, Th1 hücreleri kendi lenfokinleri olan: tümör nekrozis faktör-beta (TNF- β) ve interferon-gamma (IFN- γ) salgırlar. Bu durum makrofajların, yuttukları bakterileri yoketmelerini; diğler lökositlerin, bölgede inflamasyon üretmelerini uyarır (59).

2.3.1.1.2 T Yardımcı Hücreler Tip 2

Th2 hücreleri, T hücrelerinin antijen reseptörlerine (TCR) ve tahminen IL-12'den farklı bir veya daha fazla parakrin uyarana, dendritik hücreler tarafından antijen sunulması sonucu üretilirler.

Sitokinlerin kimlikleri hala belirlenememiştir. TH2 tarafından salgılanan önemli lenfokinler (60) ;

- İnterlokin 4 (IL-4)

1. Bu sitokin B hücrelerindeki sınıf-değişimini uyarır ve bu hücrelerin IgE sentezlerini teşvik eder.
2. Pozitif-feedback gibi davranarak, daha fazla pre-Th hücrelerinin Th2 pathway ine girişini teşvik eder.
3. IFN- γ reseptörlerin Th hücreleri üzerinde immunolojik sinapsa girmelerini önleyerek bu reseptörlerin Th1 pathwayine girişini engeller.

- İnterlokin 13 (IL-13):

1. Bu sitokinler bazofilleri çalıştırdığı ve aktive ettiği kadar, IgE antikorlerin sentezini de teşvik eder.

- İnterlokin 5 (IL-5):

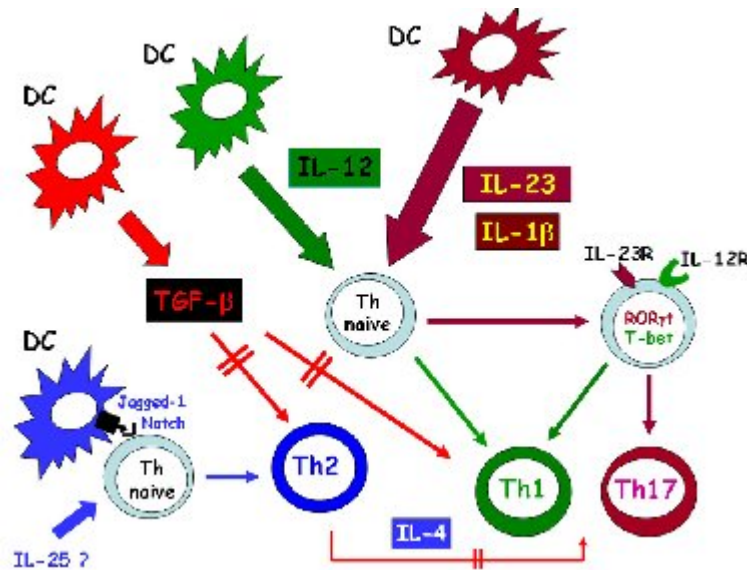
1. Eozinofilleri çeker ve aktive eder.

2.3.1.1.3 T Yardımcı Hücreler Tip 17

Th17 hücreleri CD4+ T yardımcı hücrelerinin yakın zamanda tanımlanmış alt birimidir. Bu hücreler eksternal ortam ve internal ortam arasındaki arayüzde bulunurlar, örneğin deri ve GI alanının astarı arasında bulunurlar.

Büyük olasılıkla diğer “naive” Th hücreleri gibi başlarlar, fakat antijen sunan hücrelerle karşılaştıkları zaman, Th1 ve Th2 hücrelerinden farklı bir pathway e girerler (61).

Deride ve GI alanın astarında bulunan Th17, bu alanlarda bakterilere saldırmak için konumlandırılmışlardır. Bu hücreler saldırıyı, özellikle nötrofil gibi hücreleri görevlendirerek ve defensins salgılayarak gerçekleştirirler.



Şekil 7 İnsan Th17 hücrelerinin farklılaşma yolu.

2.3.1.2 Naive T Hücreleri

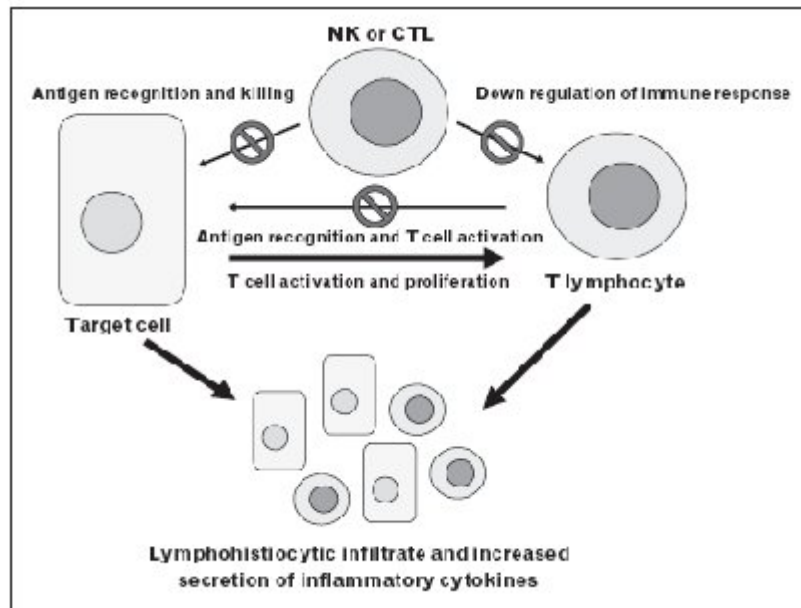
Naive T hücreleri daha önce antijenlerle hiç karşılaşmamışlardır. Sadece dendritik hücreler tarafından aktive edilirler. Naive T hücreleri timustan ayrılarak tüm vücuda, lenf düğümleri de dahil olmak üzere yayılırlar. Diğer T hücreleri

gibi, TCR/CD3 kompleksi ekspres ederler. T hücre reseptörü (TcR), daha sonra T hücrenin cevap vereceği antijenin belirlediği sabit veya değişken bölgelerden oluşur. CD4⁺ T hücreleri, MHC sınıf II ile afinitesi bulunan TcR'lere sahiptir ve MHC ile afinitenin, timüsteki olgunlaşma sırasında CD4 tarafından belirlendiğine inanılmaktadır. Sınıf II MHC proteinleri, genellikle profesyonel antijen-sunan hücrelerin yüzeylerinde bulunurlar (62).

2.3.1.3 Sitotoksik T Hücreleri (T_c hücreleri veya CTL'ler)

Sitotoksik T lenfositleri (CTL) vücutta bulunan diğer hücreler üzerindeki, bu hücreleri yıkım için işaretleyen yüzey markırlarını tanırlar. Bu yolla CTL'ler, virüs ile enfekte olmuş veya malignan hücreleri kontrol altında tutarlar.

CTL'ler, virüsle enfekte olmuş hücreleri veya tümör hücrelerini yok ederler ve ayrıca transplant reddi ile ilişkileri bulunmaktadır. Bu hücreler, yüzeylerine CD8 glikoprotein ekspres ettikleri için aynı zamanda CD8⁺ T hücreleri olarak bilinirler (MHC sınıf I ile birleşik) (63).



Şekil 8 Hemofagositik lenfohistiyoizis (HLH) hastalığının moleküler sebeplerinin şematik gösterimi.

2.3.1.3.1 Öldürme Mekanizması

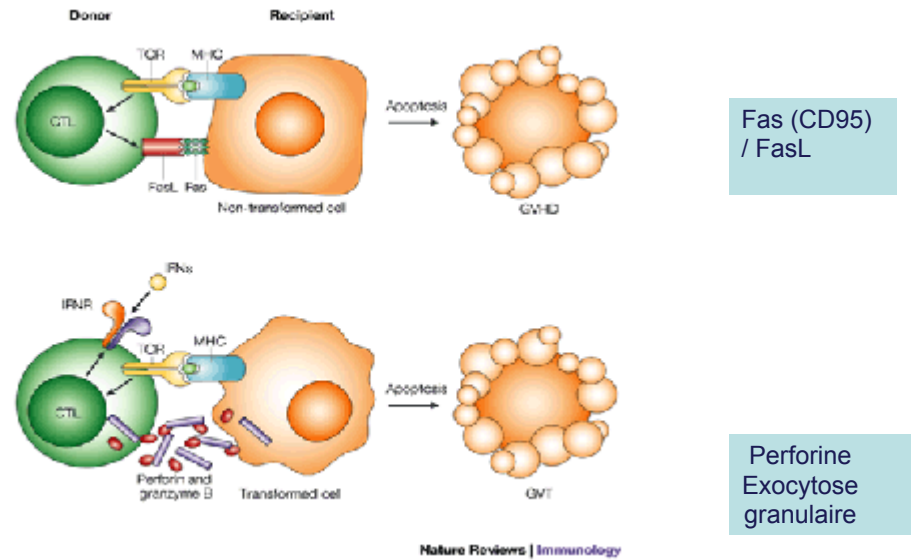
2.3.1.3.1.1 Perforin/Granzyme Kullanılması

CTL'ler, perforin ve granzyme ler proteinlerini içeren sitoplasmik granüllere sahiptir (64). CTL hedefe bağlandığı zaman, granül içeriği eksositoz ile boşaltılır. Bir düzine veya daha fazla perforin molekülü plasma membranına girip, granzyme'lerin hücreye girebilmeleri için bir bir por oluştururlar. Granzyme'ler, serin proteaz'lardır. En çok bulunan iki türü;

- Granzyme A (65-66). Hücrenin içinde mitokondri'ye girer ve hücreyi yok etmek için reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek elektron taşıma zincirinin kompleks I alt ünitesini (NADC dehidrogenaz) böler.
- Granzyme B (67). Hücre kapsid'inin öncülerini bölmek için ilerler ve böylelikle hücrenin kendini apoptozis ile yoketmesi için aktive eder.

2.3.1.3.1.2 FasL/Fas Kullanılması

CTL'ler yüzeylerine, yıkım aktivatörü olarak isimlendirilen, transmembran proteininin moleküllerinden Fas ligand'ı salgırlar (FasL). En potensiyel CTL hedefleri, Fas olarak belirtilen Fas-L reseptörünü salgırlar. Sitotoksik T hücreleri hedeflerini tanıdıklarında (bağlandıklarında), yüzeylerinde daha fazla Fas-L üretirler. Üretilen Fas-L molekülleri, hedefi yüzeyindeki Fas reseptörlerine bağlanarak, hedefin kendini apoptozis ile yok etmesine sebep olurlar (68).



2.3.1.4 Regulatory T Hücreler (T_{reg} hücreler)

Treg hücreler önceden suppressor T hücreler olarak bilinirlerdi. İmmunolojik toleransta kritik rol oynadıkları bilinmektedir. Bunların en önemli görevleri ise, immun reaksiyonlarda T hücrelerine dur demek ve timustaki oto-reaktif T hücreleri baskılamaktır. $CD4^+$ regulatory T hücrelerin iki temel sınıfı tanımlanmaktadır. Bunlar naturally occurring T_{reg} hücreler ve adaptive T_{reg} hücreler. Naturally occurring T_{reg} hücreler (ayrıca $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T_{reg} hücreler olarak da bilinirler) timusta bulunurken, adaptive T_{reg} hücreler (ayrıca Tr1 hücreler ya da Th3 hücreler olarak da bilinirler) immun cevap esnasında ortaya çıkar. Naturally occurring T_{reg} hücreleri diğer hücrelerden ayıran bir özellikte intraselüler molekülde hazır bulunmasıdır. Bu intraselüler moleküle FoxP3 adı verilmektedir (69,70). *FOXP3* gen mutasyonun da regulatory T hücrelerinin gelişimi engellenir bunun sebebi de bir fetal otoimmun hastalık olan IPEX dir.

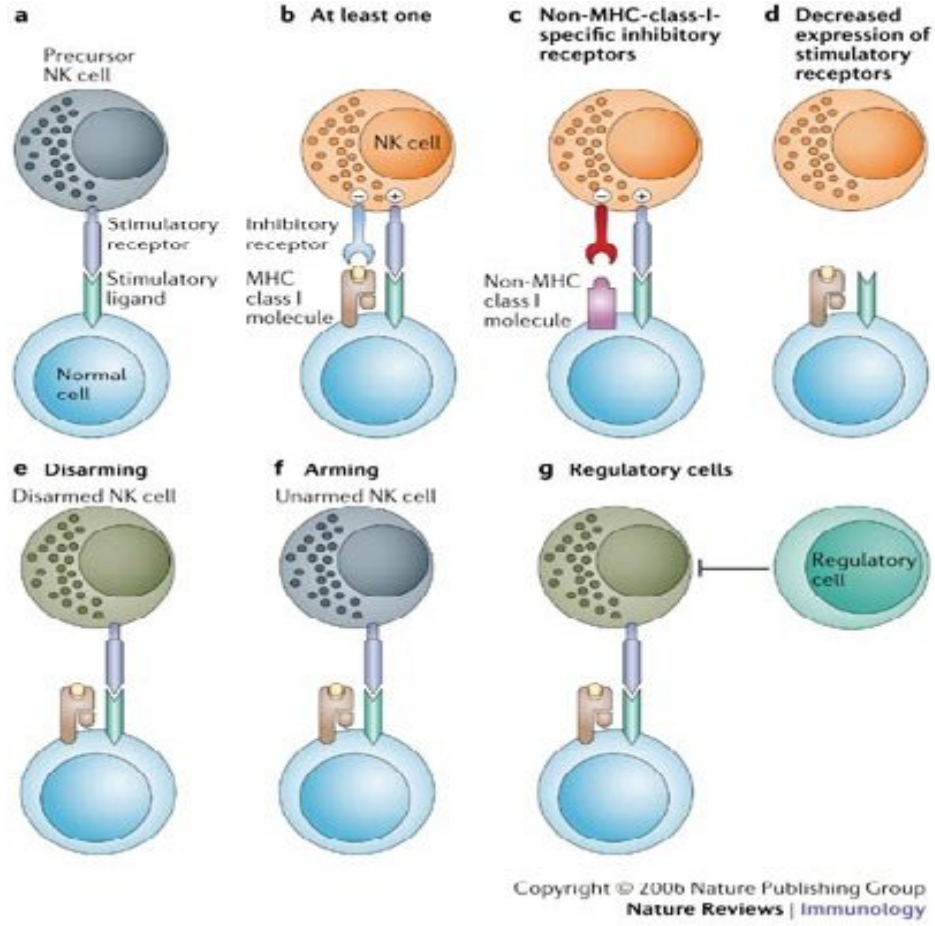
2.3.1.5 Memory T hücresi

Memory T hücreleri antijen spesifik T hücrelerin düzenlenmesini ve enfeksiyondan sonra çözüme ulaşmak için inatla çalışırlar. Geçirilmiş hastalıklara karşı hafızaları çok güçlüdür. Memory T hücreler iki alt tipten oluşur; central memory T hücreler (T_{CM} hücre) (71-72) ve effector memory T hücreler (T_{EM} hücre) (72). Memory hücreler ya $CD4+$ yada $CD8+$ dirler.

2.3.2 Natural Killer Hücreleri Hakkında Genel Bilgi

Natural killer hücreler lenfositler arasındadır. NK hücreler kendiliğinden hedef hücreyi öldürme mekanizmasına sahiptir. NK hücreler lenfosit ağacında B ve T hücrelerden ayrıdır. Kanda Geniş Granüler Lenfositler (LGL) olarak tanınırlar ayrıca ikincil lenfoid organlarda tümer hücrelerini tanıma ve yok etme özelliğine de sahiptirler ve bu özellik natural citotoksiti olarak adlandırılır. NK hücreleri üzerinde tıpkı diğer lenfositlerde olduğu gibi spesifik markırlar vardır. NK hücrelerde $CD56$, B hücrelerde $CD19$ ve T hücrelerde TCR dır (73).

Lenfositlerin bilinen özelliklerinden biri de perforin ve Granzyme ekspresyonudur. NK hücreler kemik iliği orjinlidir ve gelişimini yaklaşık 5 günde tamamlarlar ve fenotip olarak agranüler NK hücrelerine dönüşürler. NK hücreler kanda ve dalakta dolaşır, granüler ve citolitik aktiviteler gelişir fakat normal lenf nodlarında ve periferik dokuda az bulunurlar. NK aktivitesini baskılayan faktörler ise ameliyatlar, ilaçlar, östrojen ve progesteron hormonu, stres, sigara ve diğer faktörlerdir (74).



Şekil 10 Natural Killer Hücreleri

2.3.2.1 Natural Killer Hücrelerinin Roller

Natural killer hücreler tümör hücrelerini acil öldürmek için programlanmıştır. Ayrıca NK hücreler endogenus cevap artışının düzenlemede rol oynar (75).

Natural killer hücrelerde interferon- γ üretimi fazladır buda Th1 cevabını artırır ve viral patojeniteye karşı verilen immune cevabın da artışını sağlar. Natural killer hücreler interferons- α , IFN- γ , TNF α , IL-4 ve IL-1 gibi sitokin üretirler. Bu sitokinler immun cevabın verilmesin de rol oynar (76).

2.3.2.2 Natural Killer Hücrelerin Sitotoksitesi

NK hücrelerinin birincil efektör fonksiyonu viral enfeksiyonlarla savaşabilmek için interferon-gamma (IFN- γ) nın üretimidir. Diğer viral karşıtı efektör fonksiyonu ise virüsün enfekte ettiği hücelere karşı antibody zorunlu citotoksitedir (ADHC). Bundan dolayı IgG enfekte olan hücrenin yüzeyindeki viral proteinlere bağlanır. Antibody nin Fc kısmı NK hücrelerinin yüzeyindeki Fc γ reseptörü (CD16) ne bağlanır. Ardından hedef hücre üzerinden citotoksik granüller, perforin ve granzymeler salınır. Öldürme mekanizması citotoksik T hücelerine çok benzemektedir. NK hücreler tümör hücrelerini öldürme konusunda ‘doğal’ bir kabiliyete sahiptirler (77).

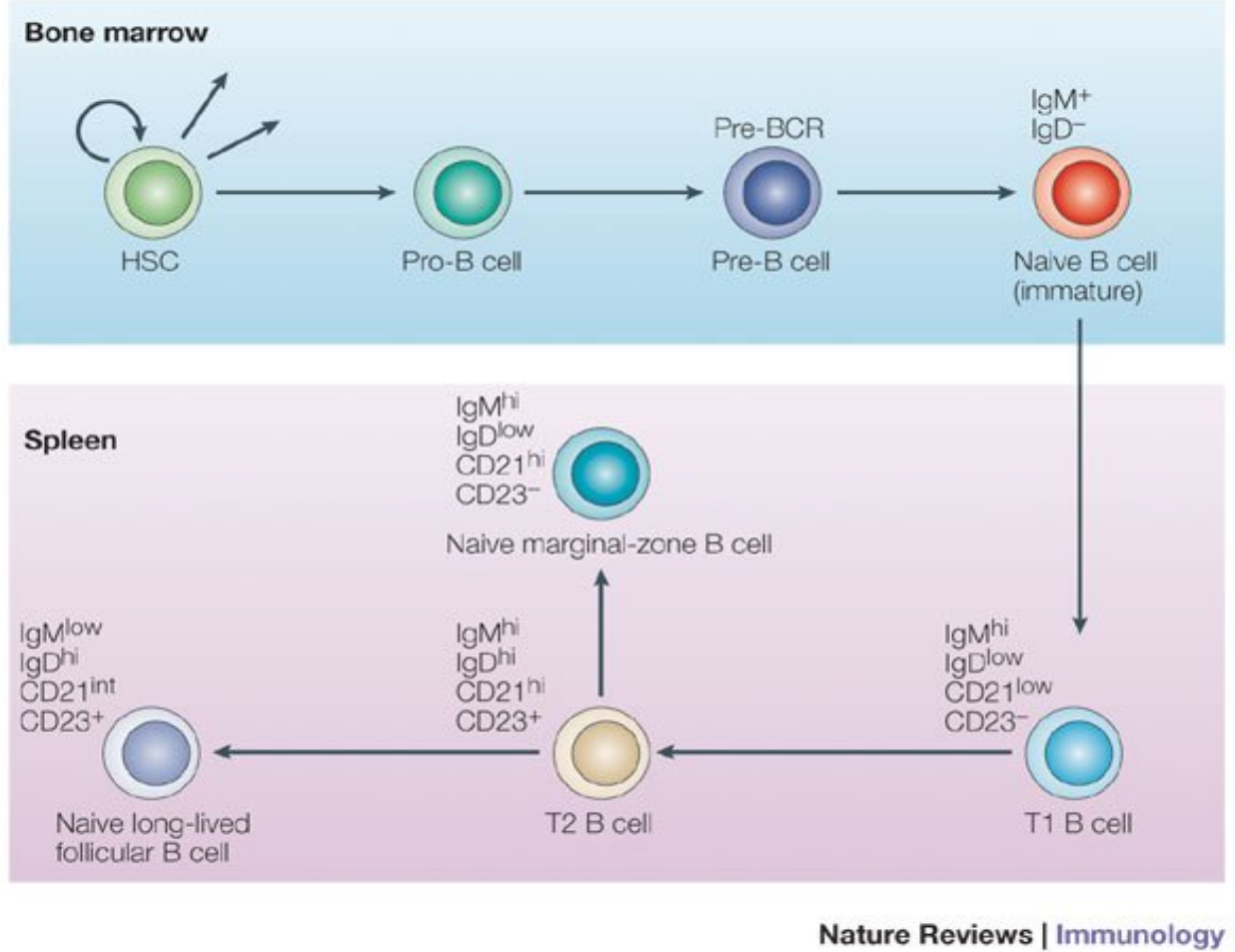
2.3.3 B Hücreler Hakkında Genel Bilgi

Humoral bağışıklık yanıtında büyük bir rol oynayan lenfositlerdir. İnsan vücudu her gün milyonlarca farklı B hücresi tipi üretir ve her tipin zarında belirli bir antijene bağlanabilecek özel bir reseptör proteini vardır. B hücreler immun cevabın düzenlenmesinde, antikor üretilmesinde ve antijen sunan hücrelerin görevini yapmasında büyük rol üstlenirler. Fakat genetik mutasyonlarda ve otoimmun hastalıklarda B hücreler immun cevapta fonksiyonunu kaybederler (78).

2.3.4 B Hücrelerin Gelişimi

Memelilerin çoğunda immatur B hücreler kemik iliğinde üretilir. Araştırmalarda, B lenfositlerin IgM⁺ immatur safhada kemik iliğinde, matür olduktan sonra dalağa göç ettikleri anlaşılmıştır (79). Immungloblinlerde (Ig) ağır

(H) ve hafif (L) gen locileri vardır, B hücrelerin projenitör ve haberci olarak şekillenmesinde yüzey Ig-ekspresyonun (sIg+) rolü vardır (80).



Şekil 11 B hücresinin gelişimi

2.3.5 B Hücre Tipleri

2.3.5.1 Plazma B Hücreleri

Plazma B hücreleri (*plazma hücreleri* olarakta bilinir) B hücrelerinin geniş bir kısmını oluşturur ve yine antikorlarında büyük bir kısmını bu hücreler oluşturur ve hedef hücrenin yok olması için fagositozu ve aktivasyonu tetikler. Bu hücrelerin stoplazmasının elektron mikrografında endoplazmik reticulumun

geniş miktarlarında antikor sentezinden sorumlu olduğu görülmüştür. Bu hücrelerin yaşam süresi kısadır ve az bir zaman sonra apoptozise uğrarlar (81).

2.3.5.2 Memory B Hücreler

Memory B hücreler de immune sistemde rol oynar ve yaşamı boyunca uzun bir period geçirir. Tıpkı diğer hücreler gibi ki özellikle T helper hücreler, T killer hücreler ve plazma hücrelerin olduğu gibi immune cevapta direct bulunmaz. Eğer vucut bir patojenle karşılaşır, memory B hücreler patojeni tanır ve onu böler (82).

2.3.5.3 B-1 Hücreler

B-1 hücrelerde IgM ekspresyonunun miktarı IgG den fazladır ve bunların reseptörleri polispesifite gösterirler bunun anlamı birçok farklı antijene karşı düşük affiniteye sahip oluşlarıdır fakat diğer immünoglobulinler için üstünlüğe sahiptir. B-1 hücreler lenf nodlarında ve dalakta düşük oranda bulunur fakat periton ve plerel çukurda baskındır (83).

2.3.5.4 B-2 Hücreler

Bu hücreler küçük ve uzun süre yaşayan hücrelerdir ve düşük oranda IgM ile yüksek oranda IgD ve değişik yüzey markırlarını ekspres ederler. Bu hücreler CD5 antijenini ekspres etmezler fakat bütün T lenfositlerin üzerinde bulunurlar (84).

2.3.5.5 B Hücrelerin İmmunolojik Fonksiyonu ve Antikor Üretimi

Antikor üretiminde rol oynayan B hücreler T hücrelerin (78) uyarılmasında da rol oynar ve CD4⁺ T-hücre popülasyonunun hafızasının gelişimine de izin verir (85). Spesifik olmayan ve profesyonel APC lerin karşılaştırılmasında da antijen spesifik B hücreler kullanılır (86). İmmun kompleksde, her bir B hücresi için spesifik antijen reseptörleri vardır. Antijenler lizozomda peptidlerine parçalanır ve sonra major histocompatibility complex sınıf II molekülüne bağlanır. Peptid/major histocompatibility complex sınıf II molekülü CD4⁺ helper T hücrelerine sunulmak için B hücre yüzeyine transfer edilir. Sonuçta, antijen konsantrasyonu düşükse T hücrelerine sunulacak antijenin belirlenmesinde B hücreler görev alır. Ayrıca, B hücreler sitokin üretirler özellikle IL-4, IL-6, IL-10 ve TNF ve bunlar antijen sunan dendritik hücreler üzerinde düzenleyici yada baskılayıcı etkiye sahiptirler. Hayvan modelinde ise, sitokinler (IL-4, IL-10, ve interferon-gama) T hücrelerinin farklılaşması ve regülasyonuna yardım eder (87). Görüldüğü gibi, B hücreler antikorların üretiminde, APC lerin fonksiyonlarını yerine getirmesinde çok önemli rol oynar (88). Bütün bu aktiviteleri coordine eden, immün cevapta rol alan bu hücreler çeşitli otoimmün hastalıklarda da düzenleyici fonksiyona sahiptirler.

3 MATERYAL ve METOD

3.1 Araç-Gereçler

Mikroskop	Will Wetzlar
Biyolojik Güvenlik Kabineti	ThermoElectron Corporation
Hücre Kültür İnkübatörü	ThermoElectron Corporation
Santrifuj	Beckman Coulter
Akım Sitometrisi <i>FACSCalibur</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
Dondurucu -20 °C	Bosch
Dondurucu -80 °C	Revco
İmmulite	DPC Biermann GmbH , Bad Nauheim
Pipetler (2 – 1000 µL)	Eppendorf, Hamburg
Hücre Kültür flaskları (25, 75 and 125 cm ²)	Nunclon Surface
Hücre Kültür pleytleri (6, 12, 24 and 48 well)	Greiner Bio-one
Santrifuj tüpleri (15 and 50 mL)	BD Falcon

3.2 Kimyasallar

DMSO , Sigma
 Ficoll Paque , Biochrom
 PBS , Invitrogen
 DPBS , Invitrogen
 Propidium iodide , Sigma
 Sodium azide , Fluka
 Citofix , BD Biosciences
 FCS , Biochrom. Endotoxin-free

N_3Na (Sodium Azid) , Fluka

Immulite Reagents , Siemens Lianberis, UK

RPMI 1640 , Invitrogen

Normal Rabbit Serum , DakoCytomation

3.3 Hücre Kültür Mediumu

3.3.1 RPMI 1640 Invitrogen

RPMI 1640 'a 25mM Hepes, gentamisin ve 10% fetal calf serum (FCS) eklenir.

3.4 Tamponlar ve Solisyonlar

3.4.1 FACS buffer

1x PBS

20 % (v/v) BSA

0.1 % (w/v) NaN_3

saklama 4 °C

3.5 Fiks ve Perm

3.5.1 Perm wash buffer

50 ml BD Perm Wash

500 ml dH_2O eklenir

Saklama 4 °C

3.5.2 FACS Lizis Buffer

50 ml FACS Lysing solisyonu

500 ml dH₂O eklenir.

3.5.3 Propidium Iodide Stok Solisyon

250 µg/ml PI

1 ml dH₂O

PH 7.2

saklama 4 °C

ışıktan uzak tutulur.

3.5.4 Cellfix Buffer

1ml BD hücre fiks solisyon

10 ml dH₂O eklenir.

3.6 Monoklonal antijenler

CD Antijenler	Fluorokrom	Kaynak	Klon
1.CD 1a	FITC	Dako	NA1/34
2.CD 4	FITC	Becton Dickinson	13B8.2
3.CD16	FITC	Caltag Laboratories	3G8
4.CD 25	FITC / PE	Becton Dickinson	2A3
5.CD 45	FITC	Becton Dickinson	R22.32
6.CD 80	FITC	Immunotech	2331(FUN-1)
7.CD 86	FITC	BD Biosciences	92O14
8.HLA-DR	FITC / PE	BD Biosciences / Becton Dickinson	L243
9.HLA-sınıf 1	FITC	Immunotech	IOT2

10. TLR-2	FITC	eBioscience	TLR2.1
11. TLR-3	FITC	Imgenex	40C1285.6
12. CD 95-L	FITC	Anhücre	Alf-2.1a
13. Ig G1	FITC	Becton Dickinson	MOPC-21
14. TCR α/β	FITC	BD Biosciences	WT31
15. CD 2	PE	Beckman Coulter	39C1.5
16. CD 3	FITC	Dako	UCHT1
17. CD 8	PE	Immunotech	B9.11
18. CD 11c	PE	Becton Dickinson	Apr 94
19. CD14	PE	Becton Dickinson	R22.32
20. CD 19	PE	Becton Dickinson	SJ25C1
21. CD 56	PE	Becton Dickinson	NCAM16.2
22. CD 83	PE	Immunotech	ET240
23. CD 209	FITC	eBioscience	eB-h209
24. PDL 2	PE	eBioscience	MIH18
25. TRAIL	PE	eBioscience	RIK-2
26. Ig G2	PE	Becton Dickinson	MOPC-21
27. Perforin	FITC	BD Pharmingen	65994X
28. Granzyme B	PE/FITC	PeliCluster/Alexis	CLB-GB11/B18.1.
29. CD 40	FITC	Immunotech	mAb89
30. CD 39	FITC	AbD Serotec	A1
31. CD 23	FITC	DakoCytomation	MHM6

3.7 Sitokin antijenler

Antijenler	Fluorokrom	Kaynak	Klon
1. IL-2	FITC	Caltag Laboratories	
2. IL-10	PE	BD Biosciences	
3. TNF alpha	PE	Caltag Laboratories	W95115110
4. IFN gamma	FITC	BD Pharmingen	4S.B3

3.8 Kan örnekleri

Kan örnekleri Deutsche Rote Kreuz (Alman Kızıl Haçı)'dan temin edilmiştir.

Hasta kanları numaralandırılarak çalışmaya alınmıştır.

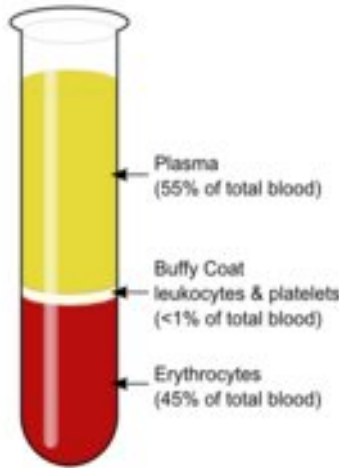
Sağlıklı vericiler; #8287, #9078, #9077, #8758, #8757, #9080.

EBV hastaları; #9076, #8926, #6428, #9081

3.9 Tam kandan Buffy coat Hazırlama ve MoDH'lerin Üretimi

Periferal kan mononükleer hücreleri (PBMCs) Ficoll-separating solution (Biochrom) ile izole edilir. Santrifuj ve 2 defa DPBS (Invitrogen) ile yıkanır.

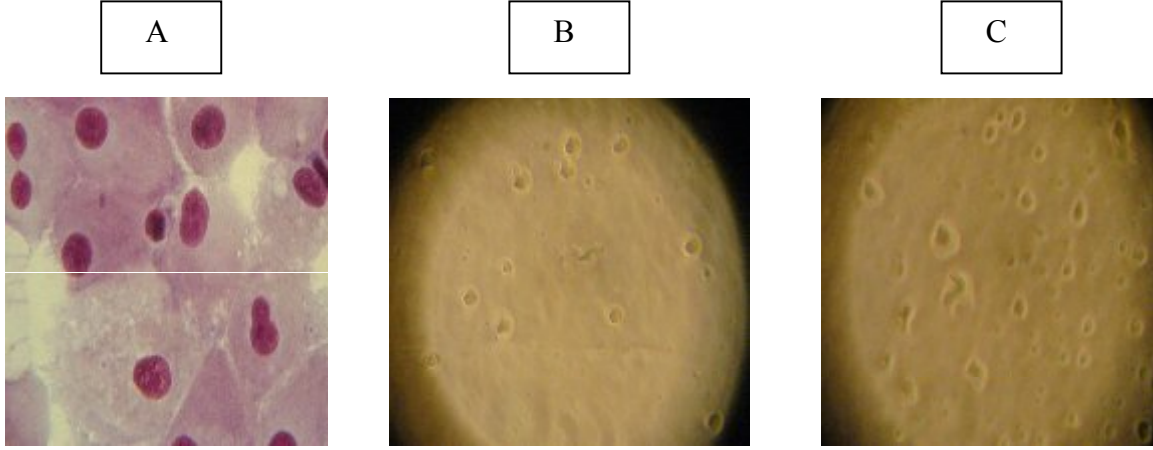
Ficoll-separation tanımlama:



Pıhtılaşmamış kan 1+1 oranında DPBS ile diluye edilir ve Ficoll (Biochrom) ilave edilir. 250xg 20 dk. santrifujdan sonra, beyaz hücreler izole edilir ve DPBS ile yıkanır 100xg. 5 dk. santrifuj edilir. Sonra hücre pelleti T175 kültür flaskına (2×10^7 to 8×10^7 hücre in total) transfer edilir. İçine RPMI1640 medium (Invitrogen) ve 25mM HEPES ayrıca antibiyotikler eklenir.

Monositler 1 saat içinde yapışır , yapışmayanlar ortamdan temizlenir ve kültüre devam edilir. 28 gün sonra dendritik hücreler active olur.

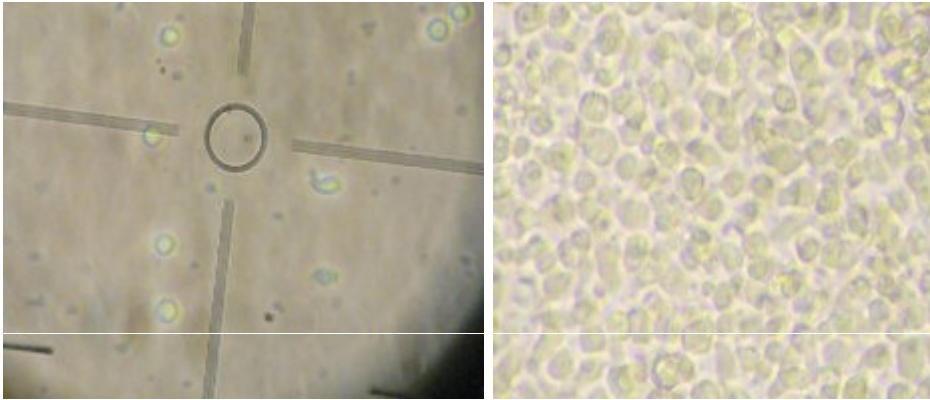
MoDH üretmede, monositler 10 gün RPMI 1640 medium (Invitrogen), 10% FCS (Biochrom), 1000 IU/ml IL-4 (BD) ve 100 ng/ml granülösit makrofaj-kolon uyarılma faktörü (GM-CSF) içinde inkube edilir.



Fotoğraf 1 A- Periferel kandan zenginleřtirilmiř aktif DH, d+31 of invitro kültür
 B- Immatür Dendritik hücre, d+3 of invitro kültür
 C- Matür Dendritik Hücre, d+5 of invitro kültür

3.10 T hücre line retimi

İnsan periferel kan mononükleer hücreleri Ficoll-density gradient (Biochrom) ile elde edilir ve santrifuj edilir. Hücreler RPMI 1640 (Invitrogen) medium içinde kültür edilir ve 10% FCS (Biochrom) ile 103 IU/ml of rhIL-2 (Proleukin, Cetus corporation) ilave edilir. 7 gün kültürde bırakılır.



Fotoğraf 2 Aktif olmayan Lenfositler ve IL-2 ile in vitro kültür edilmiş aktif Lenfositler. (d+42)

3.11 Akım Sitometrisi (FACS)

3.11.1 FACS Hakkında Genel Bilgi

Akım sitometrisi ya da FACS hücreleri büyüklüklerine, yüzey özelliklerine ve yapısal bileşenlerine göre tanımlar. Hücreler antibodyler kullanılarak işaretlenir ve bunlar hücresel yapılara bağlanırlar. Bu antibodyler heriki florasanla boyanmıştır. Bununla beraber hücreler ölü hücrelerle de işaretlenebilir. Akım sitometrisinde hücreler tabakadan geçerler ve laser tarafından tesbit edilir. Işığın kırılımı sonucu hücreler büyüklüklüğü, floresanı ve granületisine göre belirlenir.

3.11.2 Hücre Yüzey Antijenlerinin Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi

Hücreler PBS (Gibco) ile yıkanır ve 850 rpm de 5 dk. santrifuj edilir. Supernatant alındıktan sonra 20 µl normal rabbit serum (NRS) (DakoCytomotion) eklenir. Her tüpe 20 µl hücre süspansiyonu ve 5 µl florokrom konjugat reagent eklenir (Tablo 1, Tablo 2). Hücreler buzda ve karanlık ortamda 30 dk. inkübe edilir. Hücreler iki defa Perm Wash Buffer ya da FACS buffer ile yıkanır ve 50 µl hücrefix ile fix eklenir ve 4 °C de saklanır.

Tablo 1 (Dendritik hücre)

FITC	PE
Mause Ig ₂ G2a	Mause IgG ₁
CD14	CD45
CD1a	CD2
HLA-sınıf 1	HL-DR
TLR-3	PDL-2
CD80	CD209
CD86	CD11c
CD95-L	CD123
CD23	CD25
CD3	CD56
CD40	CD83
TLR-2	TRAIL
CD39	CD19

Tablo 2 (Lenfosit)

FITC	PE
Mause Ig ₂ G2a	Mause IgG ₁
CD14	CD45
CD4	CD8
CD16	CD56
CD80	CD2
CD86	CD25
Perforin	Granzyme B
CD95-L	TRAIL
TCR α/β	CD3

3.11.3 Sitoplazmik Antijenlerin Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi

Hücreler PBS (Gibco) ile yıkanır ve 850 rpm de 5 dk. santrifuj edilir. Supernatant alındıktan sonra 150 μ l Citofix eklenir ve 20 dk. buz üzerinde inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra 2 defa 10 μ l Perm Wash Buffer ile yıkanır ve 850 rpm de 5 dk. santrifuj edilir. Supernatant alındıktan sonra 20 μ l normal rabbit serum (NRS) (DakoCytomotion) eklenir. Her tüpe 20 μ l hücre süspansiyonu ve 5 μ l florokrom konjugat reagent eklenir (Tablo 3.1, Tablo 3.2). Hücreler buzda ve karanlık ortamda 30 dk. inkübe edilir. Hücreler iki defa Perm Wash Buffer ya da FACS buffer ile yıkanır ve 50 μ l hücrefix ile fix eklenir ve 4 °C de saklanır.

3.11.4 Ölü Hücrelerin Propidium Iodide ile Tesbit Edilmesi

Propidium iodide (Sigma) ölü ve yaşayan hücrelerin akım sitometrisi ile belirlenmesini sağlar.Ölü hücrelerin nüklear zarında açılma olur ve propidium iodide (PI) (Sigma) DNA ya rahatlıkla girer. Ölü hücreler floresans işareti verir FACS analizinde görülür.Yaşayan hücreler ise PI içermez ve floresans vermez.

3.12 Plazma proteinlerinin Immulite ile belirlenmesi (Siemens-DPC)

3.12.1 Immulite Hakkında Genel Bilgi

Sitokin proteinlerinden IL-6 , IL-1 β , IL-10 ve TNF α (Siemens) nicel olarak analiz edilir. Bütün proteinler pikogram şeklinde plazmadan tesbit edilir.

3.12.2 Immulite Protokol

- 1.100 μ l Plazma and 300 μ l DPBS tüp içerisinde karıştırılır.
- 2.Tüp cihaza yerleştirilir ardından sitokinler yüklenir (IL-10,IL-6...)
- 3.Cihaz çalıştırılır (DPC Biermann GmbH , Bad Nauheim).

4 BULGULAR

4.1 Hedef 1

Eğer sağlıklı vericilerden alınan hemofogozitik hücreler (buffy coats) in vitro da kültür edilirse iDH ve mDH arasında ne gibi farklılıklar ve benzerlikler olur diye araştırdık.

Sonra DH ürettik;

Sağlıklı vericilerden alınan periferel kan monositlerinden DH elde edilir. Sonra Ficoll-Hypaque (Biochrom) ile kan santrifuj edilir. Pellet, RPMI 1640, FCS ve antibiyotiklerle kültür kabına transfer edilir.

Monositler 1 saat içinde yapışır , yapışmayanlar ortamdan temizlenir ve kültüre devam edilir. MoDH üretmede, monositler 10 gün RPMI 1640 medium (Invitrogen), 10% FCS (Biochrom), 1000 IU/ml IL-4 (BD) ve 100 ng/ml granülösit makrofaj-kolon uyarılma faktörü (GM-CSF) içinde inkübe edilir.

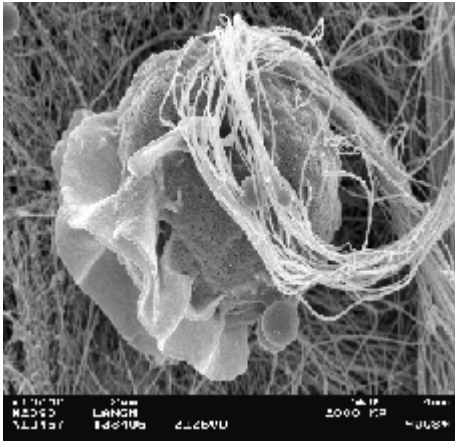
4.1.1 İmmatür and Matür Dendritik Hücrelerin Fenotipik Analizi

İmmatür DHler hücre yüzey reseptörlerine göre identifiye edilebilir ayrıca bu reseptörler T hücrelerine antijen sunumu için de MHC sınıf I, MHC sınıf II ve costimulatori proteinlere (v.s. CD40, CD80, ve CD86) sahiptirler. Antijen yakalanmasından sonara DH lenf nodlarında olgunlaşır, MHC ve costimulatory reseptörler yükselir, CD83 ekspresyonu başlar ve matür DH immune sistemde çok önemli rol oynar.

İnsan **immatür DH** (iDH) sağlıklı vericilerden alınan kandan monositlerin izole edilmesiyle üretilir. Akım sitometrisin de herbir hücre tipine göre

ayarlamalar yapılır. Fenotip analizi sonucu iDH in yüksek oranda CD1a, HLA-DR, HLA-sınıf I ürettiği anlaşılmıştır. iDH de CD83 ekspresyonu bulunmamış ve düşük oranda CD23, CD80, CD86, and MHC sınıf II ye rastlanmıştır (Şekil 4-1). iDH ve mDH arasındaki en önemli farklar hücre yüzey markırları olan CD83, MHC sınıf II, MHC sınıf I, CD80 ve CD86 dır. Bütün hücreler CD40, CD123,CD178 (CD95-L), TLR-3, CD209, TLR-2, CD19 ve CD45 ekspres ederken CD25, CD2, PDL-2 ve TRAIL ekspres etmezler fakat iDH de CD1a + ve CD39 + dir (Şekil 12).

(a)



(b)



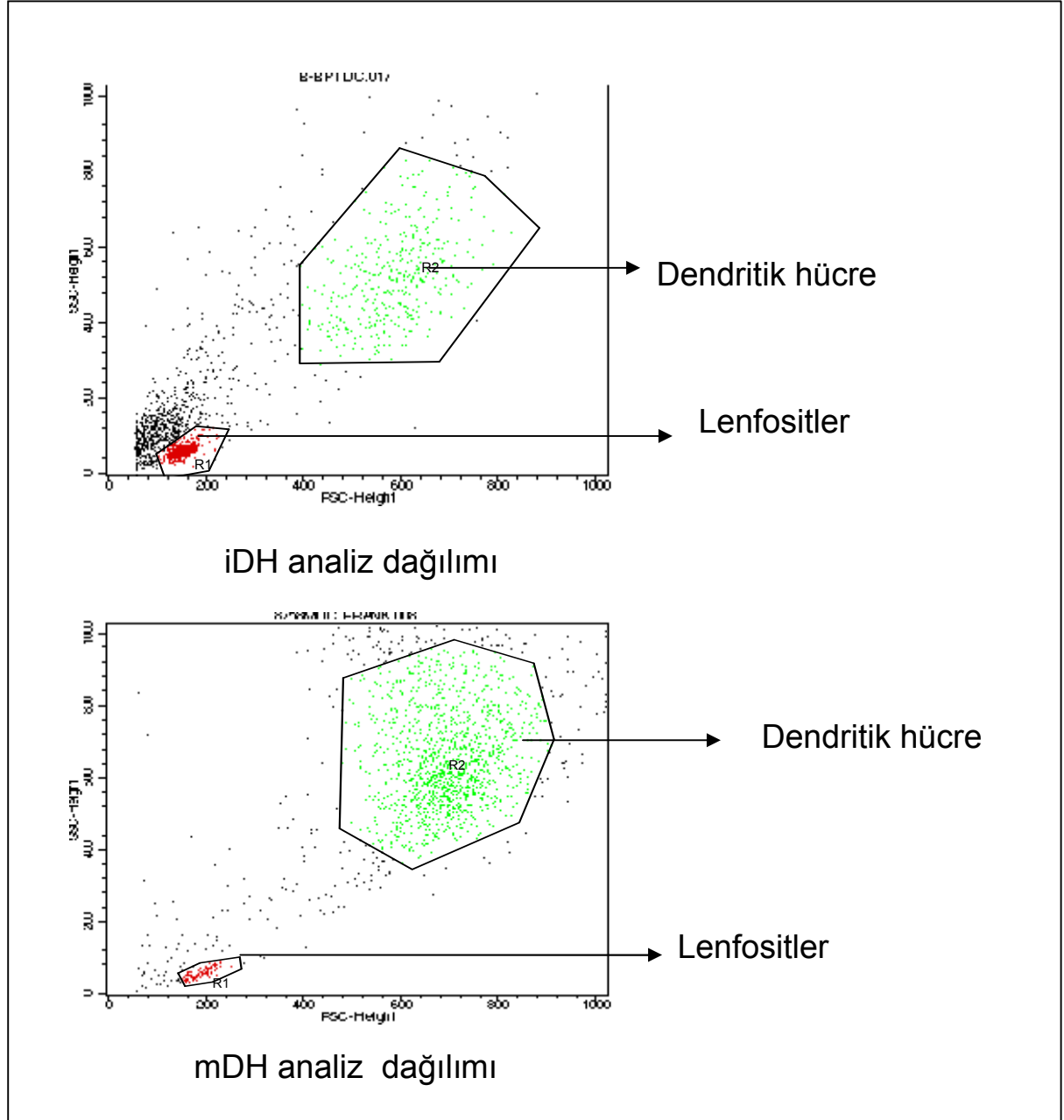
Ref-34 (a) İmmatur dendritik hücre (b) matür dendritik hücre

Diğer yandan **matür dendritik hücreler** T lenfositlerin aktivasyonunda ve antiviral immün defansta önemli rol oynar. Bütün bu özellikler MHC sınıf I ve II proteinlerinin yardımı ile kazanılır.

Hücre yüzey reseptörlerinden MHC sınıf I, MHC sınıf II, CD80, CD86, CD83 ve CD40 ekspresyonu yükseldiği zaman HLA-DR ekspresyonu da artar fakat bu esnada CD1a ekspresyonu düşer ve CD83+, CD80+ ve CD86+ olduğu da görülür (Şekil 12).

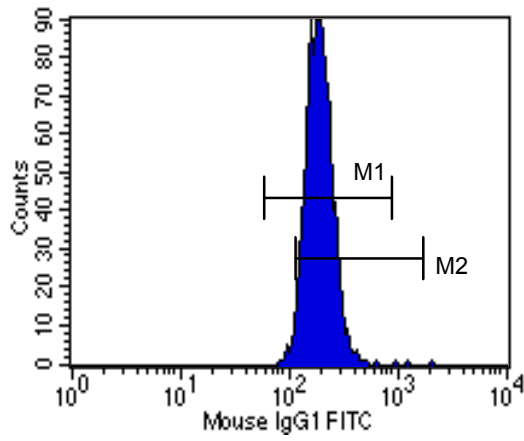
CD80+, CD83+ ve CD86+ fenotipi, matur/aktiv dendritik hücrelerde görülür. Monositik dendritik hücreler de CD23 -, CD2 -, CD25 + dir ve CD19, TLR-2 ya hiç üretilmez ya da çok az ekspres edilir. Ekspres ettikleri ise , CD45 düşük +,

CD209 ve DH40 düşük + dir fakat PDL-2+, CD39+, TLR-3+, HLA-DR + ve HLA-sınıf I pozitifdir, tam tersine CD178 (CD 95-L) ve TRAIL negatiftir. Ayrıca CD14 yoktur fakat düşük oranda CD1a ekspresyonu vardır (Şekil 12).

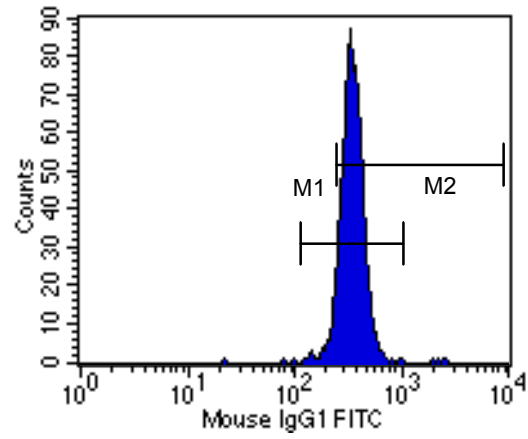


immatür Dendritik Hücre

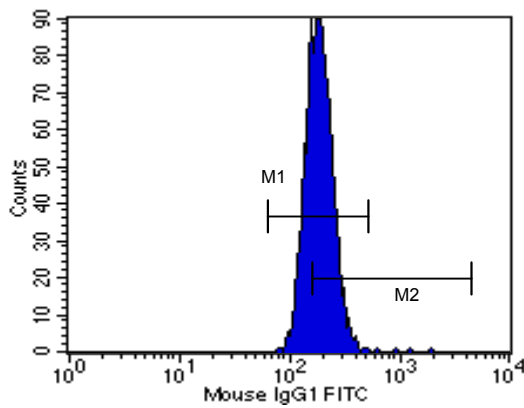
matür Dendritik Hücre



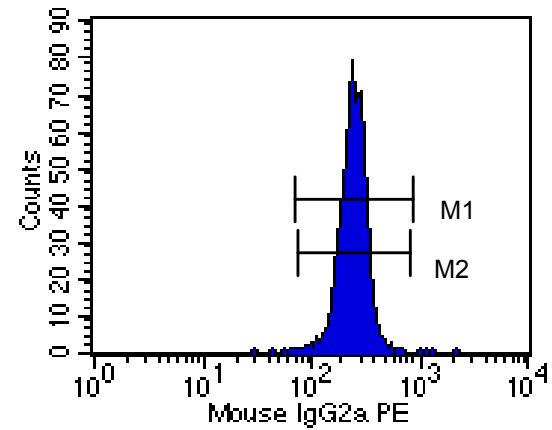
CD80- (düşük) 8758 iDH (d+10)



CD80+ 9081 mDH (d+11)



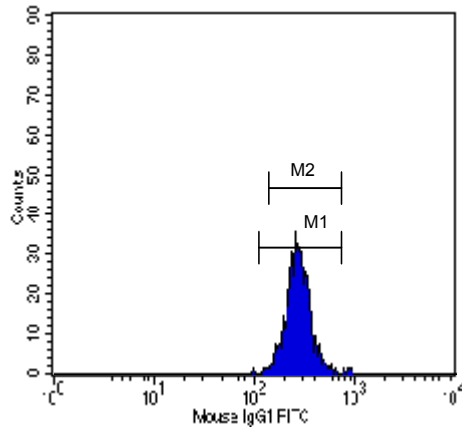
CD1a+ 8758 iDH (d+10)



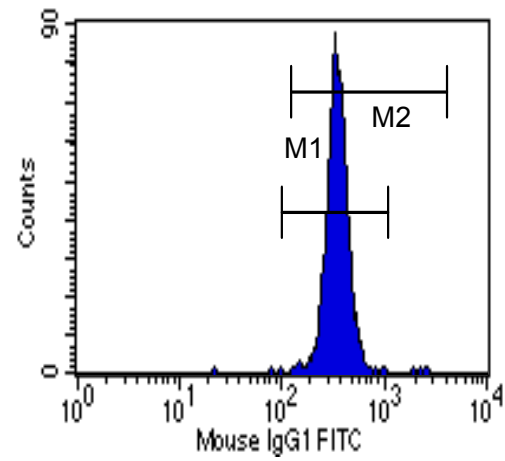
CD1a- 9081 mDH (d+11)

immatür Dendritik Hüre

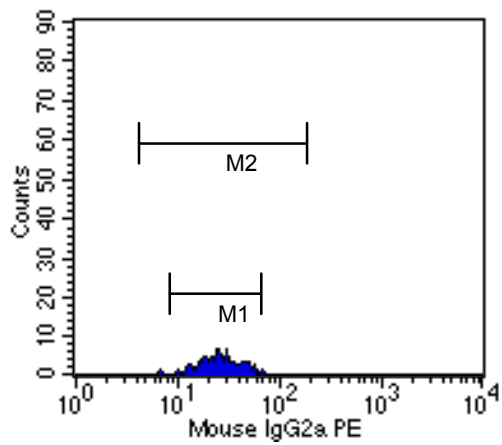
matür Dendritik Hüre



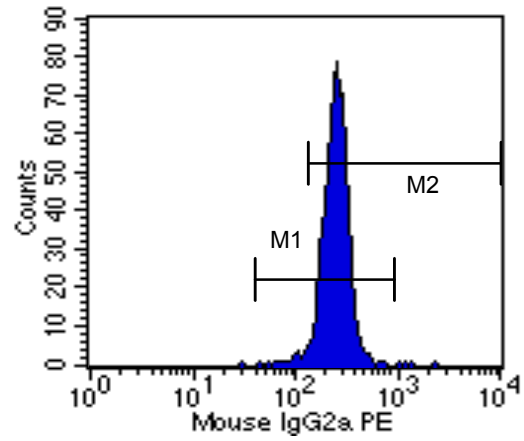
CD25- 8757 iDH (d+10)



CD25+ 9081 mDH (d+11)



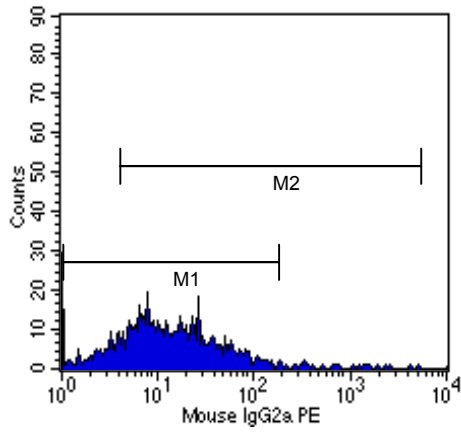
CD83- 9080 iDH (d+11)



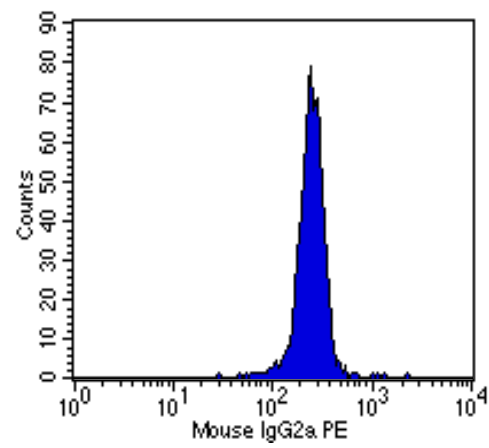
CD83+ 9081 mDH(d+11)

immatur Dendritik Hcre

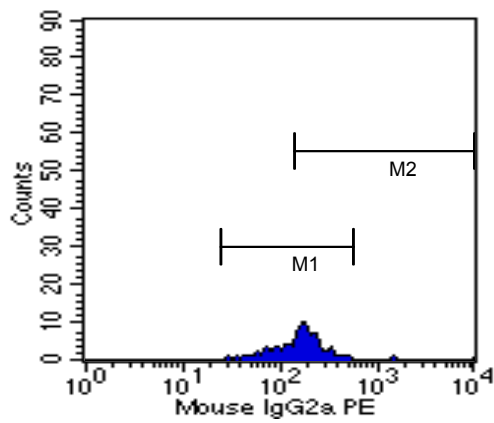
matr Dendritik Hcre



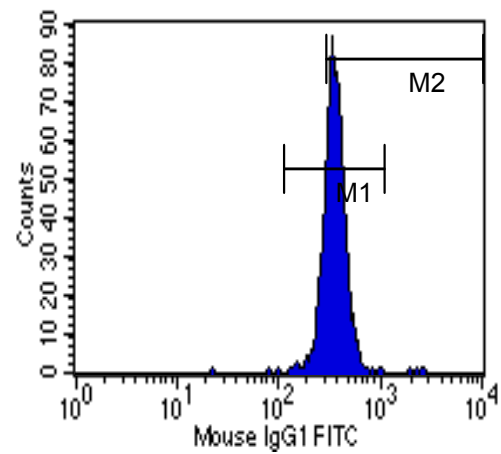
CD2+ 9080 iDH (d+11)



CD2- 9081 mDH (d+11)



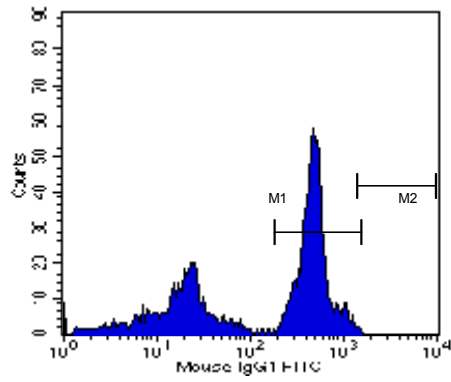
HLA-DR+ 8757 iDH (d+10)



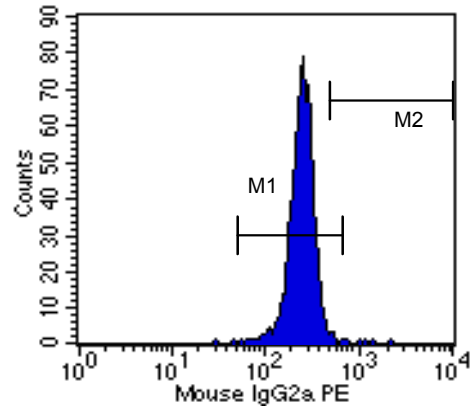
HLA-DR+ 9081 mDH (d+11)

immatür Dendritik Hücre

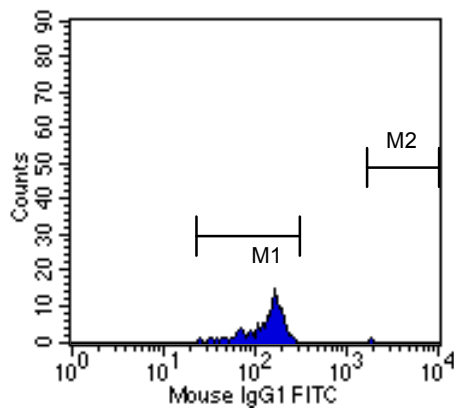
matür Dendritik Hücre



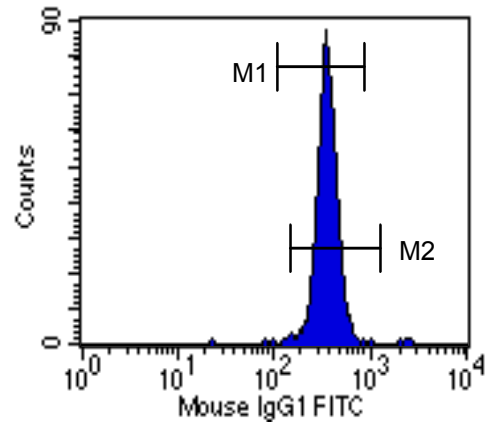
HLA-sınıf I+ 9080 iDH (d+11)



HLA-sınıf I+ 9081 mDH(d+11)



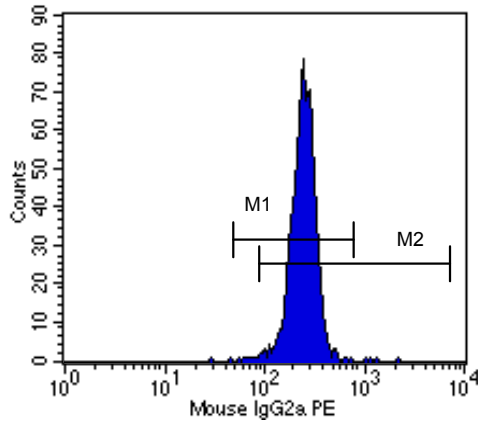
CD178+ 8757 iDH (d+10)



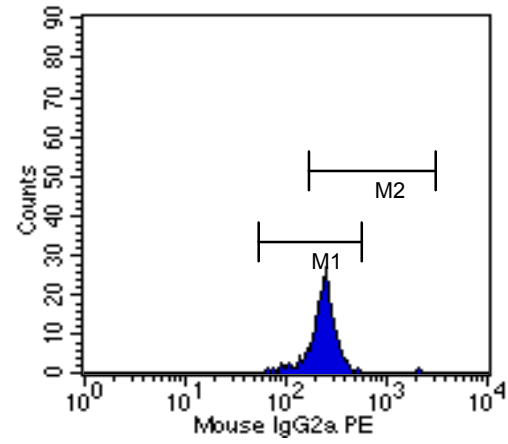
CD178- 9081 mDH (d+11)

immatür Dendritik Hücre

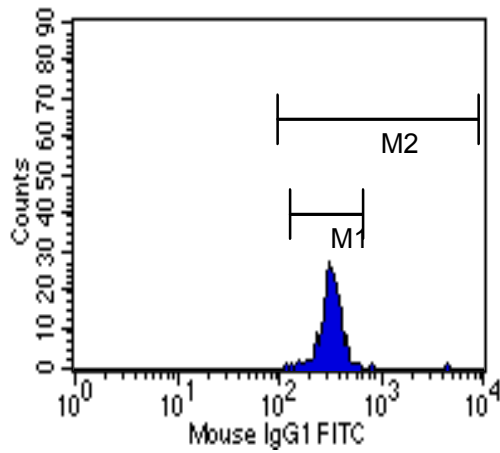
matür Dendritik Hücre



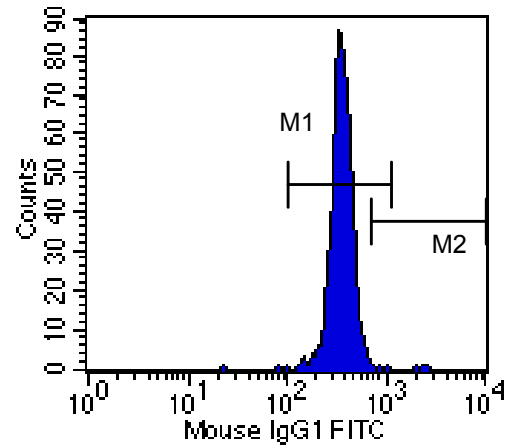
CD123+ 9080 iDH (d+11)



CD123+ 9081 mDH(d+11)



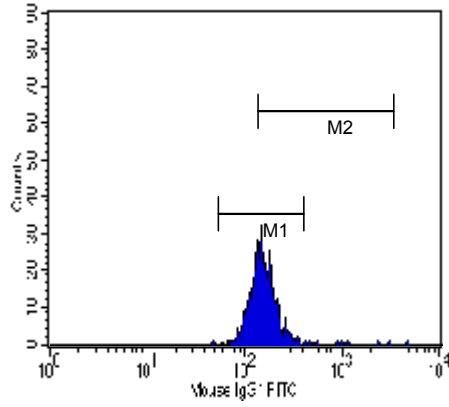
CD86+(düşük) 9081 iDH (d+11)



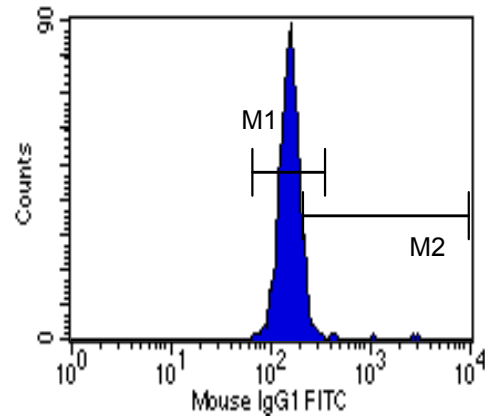
CD86+ 9081 mDH(d+11)

immatür Dendritik Hücre

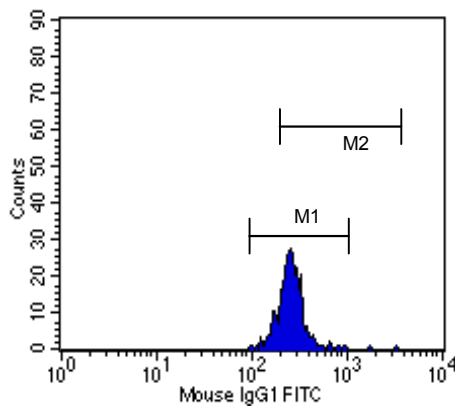
matür Dendritik Hücre



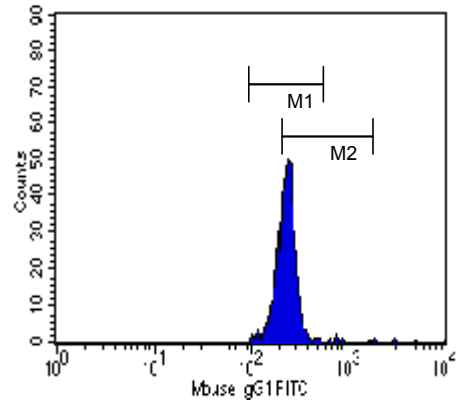
TLR-3+ 8758 iDH (d+10)



TLR-3+ 8757 mDH (d+10)



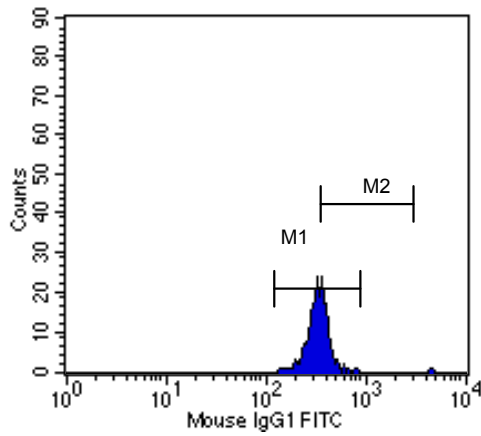
CD209+ 8758 iDH (d+10)



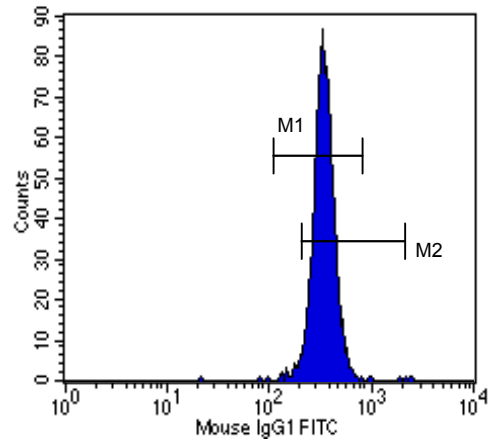
CD209+ (düşük) 8757 mDH (d+10)

immatür Dendritik Hücre

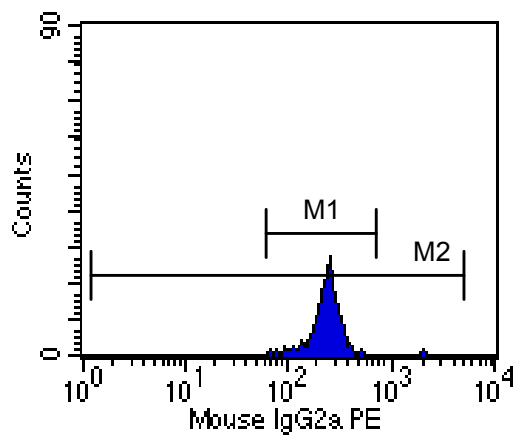
matür Dendritik Hücre



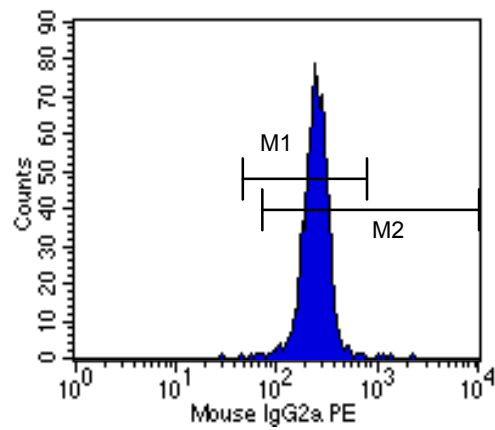
TLR-2+ 9080 iDH (d+11)



TLR-2+ (düşük) 9081 mDH(d+11)



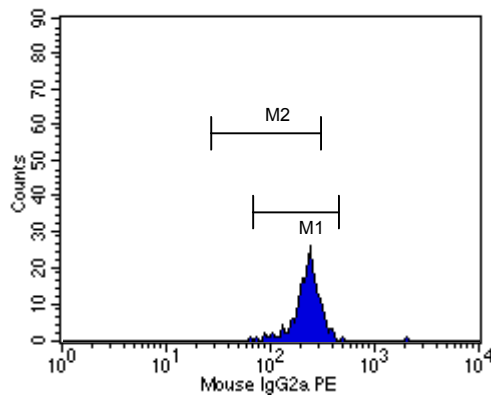
PDL-2- 9080 iDH (d+11)



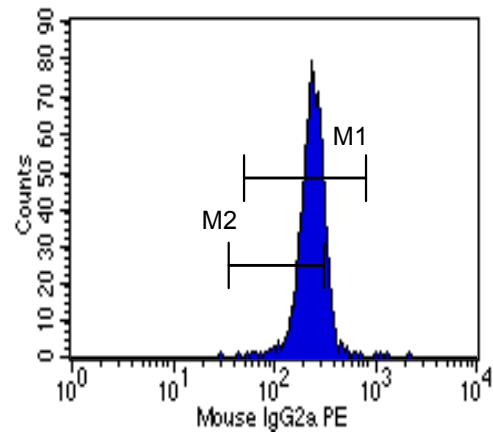
PDL-2+ 9081 mDH (d+11)

immatür Dendritik Hücre

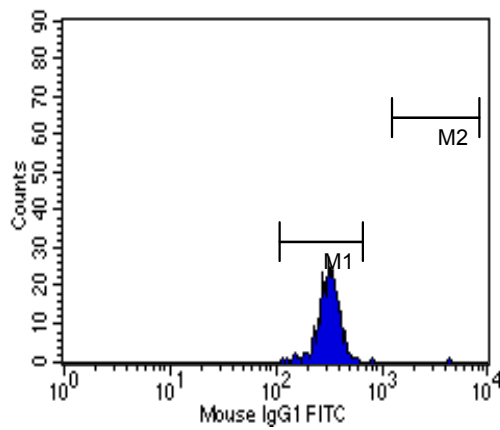
matür Dendritik Hücre



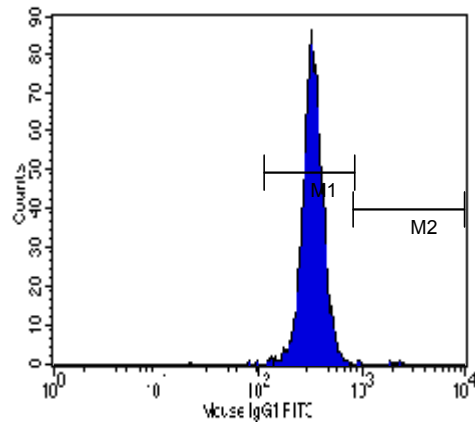
TRAIL- 9081 iDH (d+11)



TRAIL- 9081 mDH (d+11)



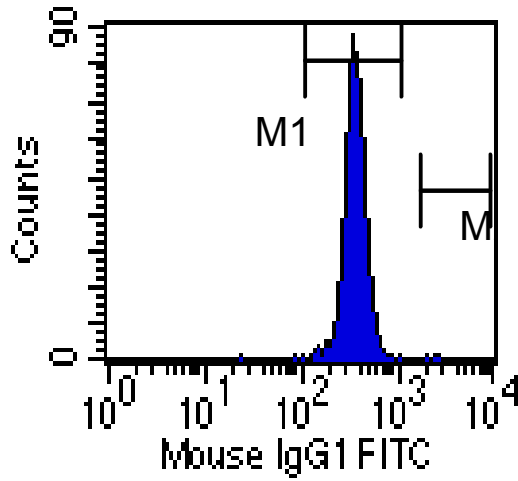
CD39+ 9081 iDH (d+11)



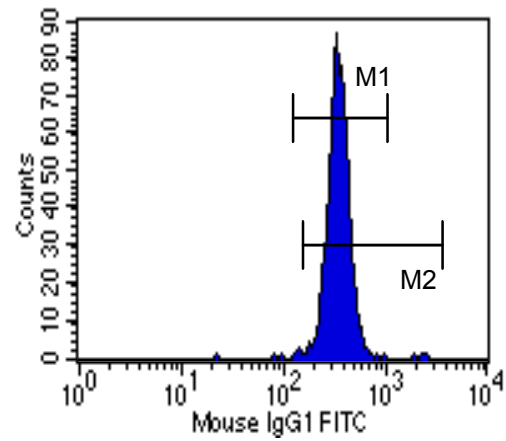
CD39+ 9081 mDH (d+11)

immatür Dendritik Hücre

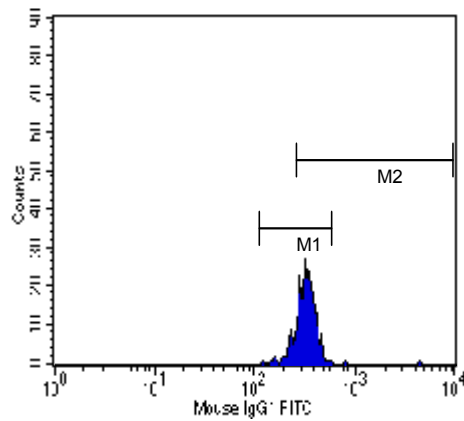
matür Dendritik Hücre



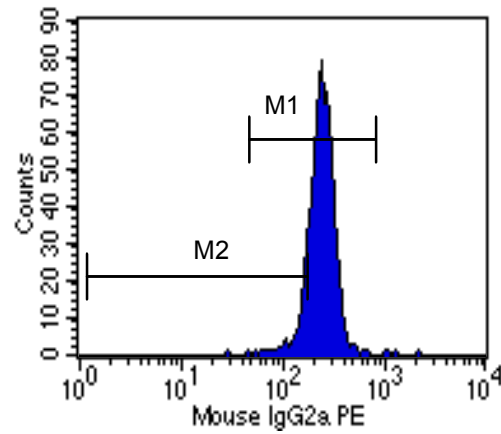
CD19+ 9081 iDH (d+11)



CD19+ (düşük) 9081 mDH (d+11)



CD23+ 9081 iDH (d+11)



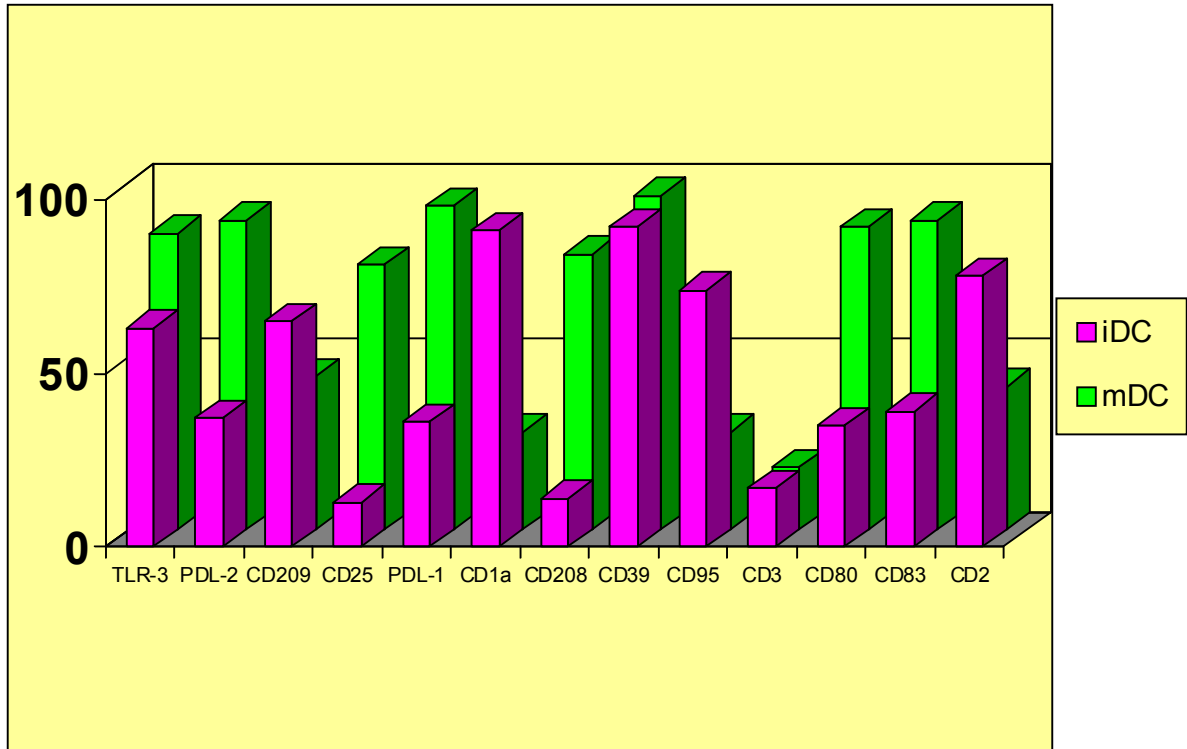
CD23- 9081 mDH (d+11)

Şekil 12 immatür ve matür DH Fenotipi Matür ve immatür DH'lerin morfolojik görüntüsü ve Flow Cytometrik profillerinde iDH ve mDH yüzeyinde CD83, CD86, CD80, CD1a, CD23, CD25, CD2, HLA-DR, HLA-sınıf 1, CD178 (CD 95-L), CD123, TLR-3, CD209, TRAIL, PDL-2, CD39 ve CD19 olduğu görülmüştür. Her panalde isotype control olarak kullanılmıştır.

mDH üzerindeki CD80, CD25, CD83 ve PDL-2 (Şekil 12) gibi markırların ekspresyonu çalışmamızda tesbit edilmiştir. Bu markırlar iDH üzerinde bulunmaz ve iDH özellikle CD1a, CD2, CD178 ve CD23 ekspres ederler fakat bu markırlarda mDH üzerinde bulunmaz. Ayrıca CD209, TLR-2 ve CD19 mDH üzerinde düşük pozitifler CD86 ise iDH de düşük pozitifdir. Herikisinde de HLA-DR, HLA sınıf I, TLR-3, CD39, CD123 ekspresyonu vardır fakat TRAIL ekspresyonu yoktur (Şekil 12).

Grafik 1'in gösterdiği gibi immatür dendritik hücre (iDH) ve matür dendritik hücre (mDH) arasında reseptör farklılıkları bulunur ve bu farklılıklar FACS ile belirlenmiştir.

Grafik 1 immatür Dendritik Hücre (iDH) ve matür Dendritik Hücre (mDH) arasındaki reseptör farkları



Tablo 3 Pozitif hücre popülasyonu ortalaması iDH (n=7) ve mDH (n=4)

Antijenler	Immatür DH		Matür DH	
	DH %	x / y Mean	DH %	x / y Mean
CD1 a	49.54	1470.14	11.58.	871.06
HLA-sınıf 1	97.80	4726.31	98.64	9797.81
HLA-DR	96.80	9535.86	97.64	9213.76
TLR3	68.23	4187.21	80.61	9901.43
PDL2	55.77	1548.38	91.61	5988.66
CD80	28.35	1106.71	72.71	4512.32
CD83	38.63	867.28	99.47	5389.61
CD86	42.15	3725.28	91.83	9591.66
CD11 c	78.15	2683.18	89.83	2082.42
CD95-L	65.77	490.74	42.57	469.47
CD209	66.50	768.20	48.83	970.60
CD25	10.35.	512.90	66.67	1569.97
CD3	26.78	176.18	21.76	142.94
PDL1	45.27	577.96	92.05	2149.19
CD23	44.09	1075.94	77.64	716.47
CD2	52.17.	320.12	10.77.	525.22
TLR2	88.54	725.65	49.46	826.09
TRAIL	0.55	243.76	0.41	310.74
CD39	92.97	3327.19	96.83	3600.41
CD123	90.57	809.25	97.53	622.09
CD19	63.82.	780.29	44.76	8530.70
CD208	13.11.	1661.53	80.58	8720.98
CD95	77.99	2381.36	27.81.	1524.83

mDH üzerindeki CD80, CD25, CD83 ve PDL-2 (Şekil 4-1) gibi markırların ekspresyonu çalışmamızda tesbit edilmiştir. Bu markırlar iDH üzerinde bulunmaz ve iDH özellikle CD1a, CD2, CD178 ve CD23 ekspres ederler fakat bu markırlarda mDH üzerinde bulunmaz. Ayrıca CD209, TLR-2 ve CD19 mDH üzerinde düşük pozitifler CD86 ise iDH de düşük pozitifdir. Herikisinde de

HLA-DR, HLA sınıf I, TLR-3, CD39, CD123 ekspresyonu vardır fakat TRAIL ve CD3 ekspresyonu yoktur (Şekil 12).

4.2 Hedef 2

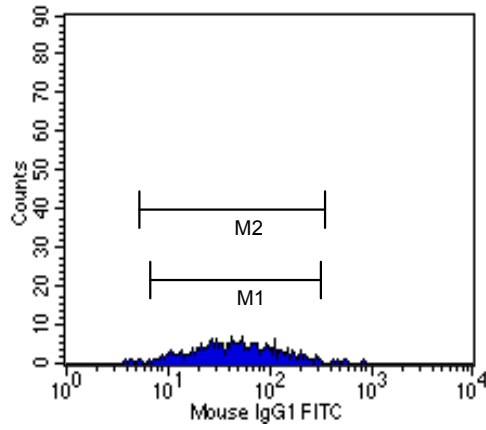
EBV hastalarından alınmış ve IL-2 de üretilmiş lenfositler ile sağlıklı vericilerden alınan lenfositler arasındaki farkların araştırılması.

4.2.1 EBV hastalarından alınmış ve IL-2 de üretilmiş T lenfositler ile sağlıklı vericilerden alınan T lenfositlerin identifikasyonu

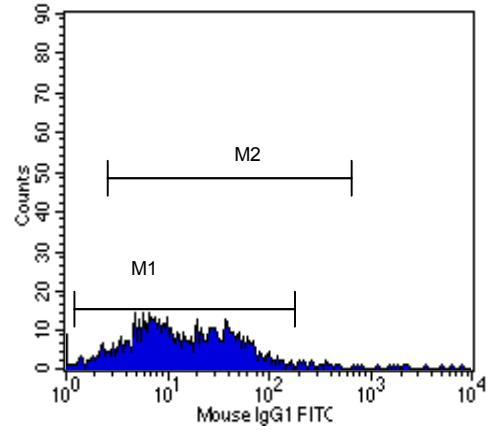
Öncelikle EBV hastaları PCR ile belirledi (90) sonra lenfositlerin fenotiplendirilmesi akım sitometrisi ile yapıldı. Toplam 11 farklı lenfosit antijeni kullanıldı ve T lenfositlerin TCRA/b, Granzyme B, CD2, CD86 ve CD3 ekspres ettikleri fakat CD56, CD25 ve TRAIL ekspres etmedikleri görülmüştür. Özellikle EBV PCR pozitif T lenfositlerde CD16 ve CD95-L ekspres edilmez (Şekil 13). Diğer yandan sağlıklı vericilerden alınan T lenfositlerde CD16 ve CD 95-L ekspresyonunun fazla olduğu, CD80 ekspresyonunun ise olmadığı görülmüştür (Şekil 13).

Kontrol (EBV PCR -)

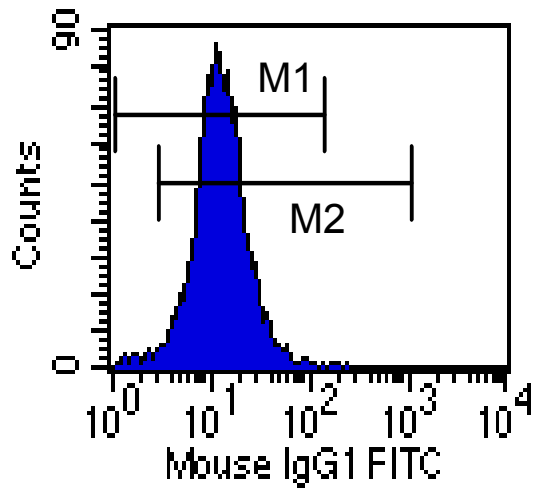
EBV hastası (EBV PCR +)



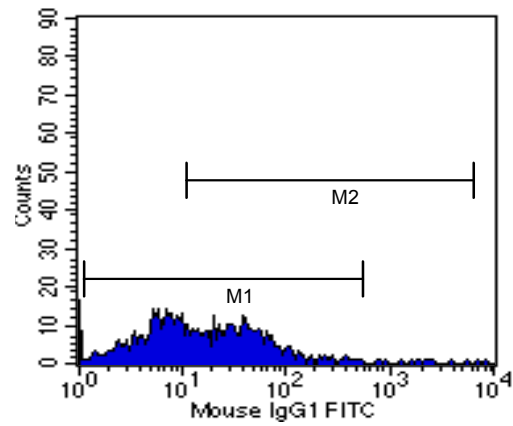
CD80- 9078 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR -



CD80+ 6428 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR +



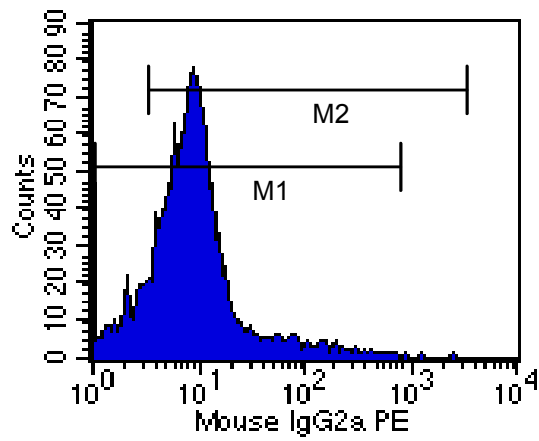
CD86+ (düşük) 9078 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR -



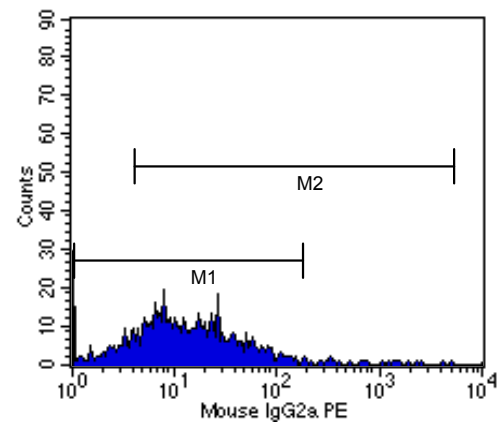
CD86+ 6428 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR +

Kontrol (EBV PCR -)

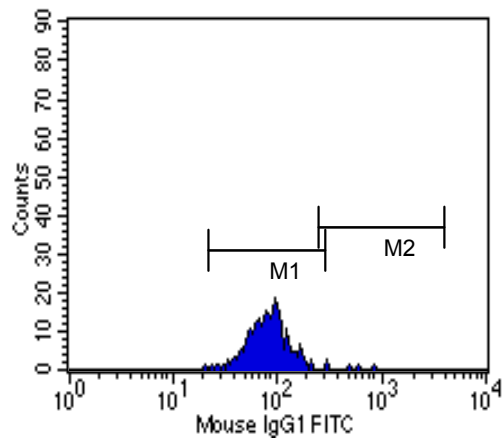
EBV hastası (EBV PCR +)



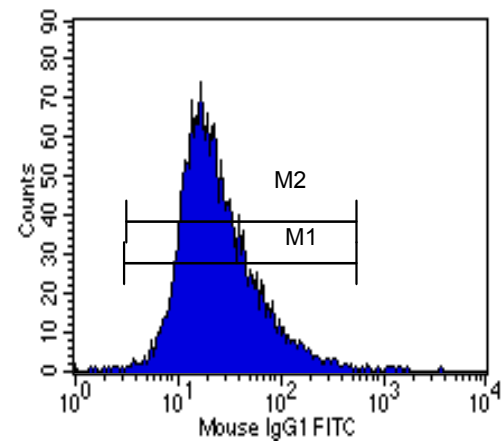
CD2+ 9078 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR -



CD2+ 6428 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR +



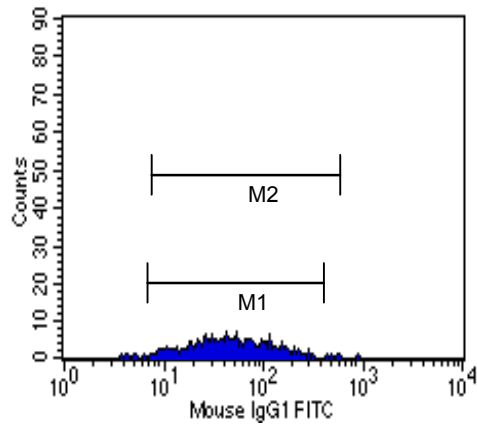
CD178 + 8287 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR -



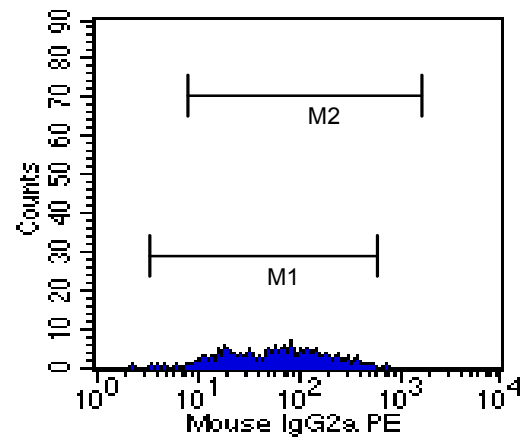
CD178 - 8926 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR +

Kontrol (EBV PCR -)

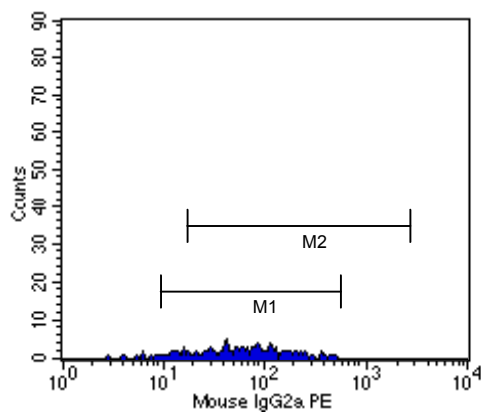
EBV hastası (EBV PCR +)



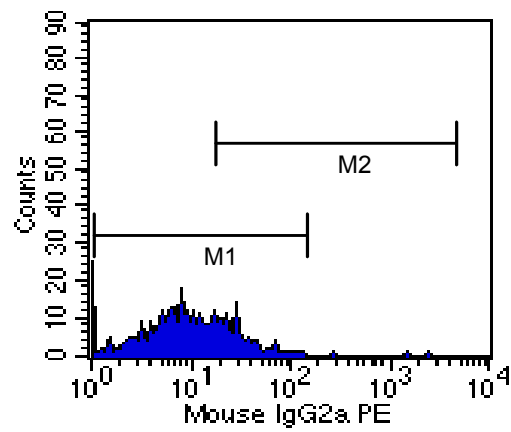
CD25- 9078 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR -



CD25- 9076 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR +



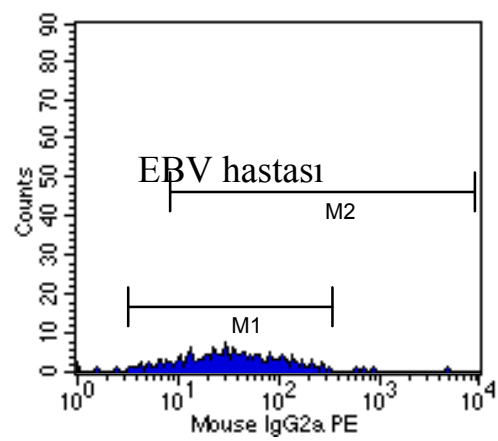
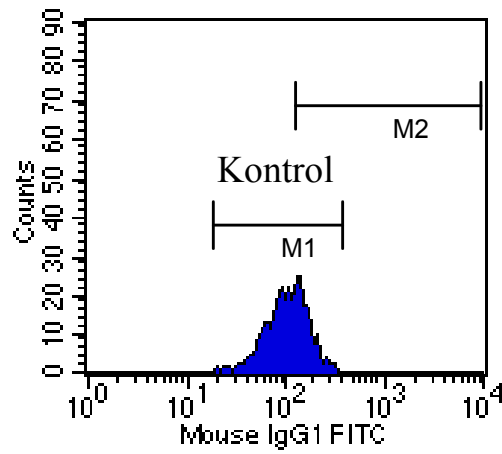
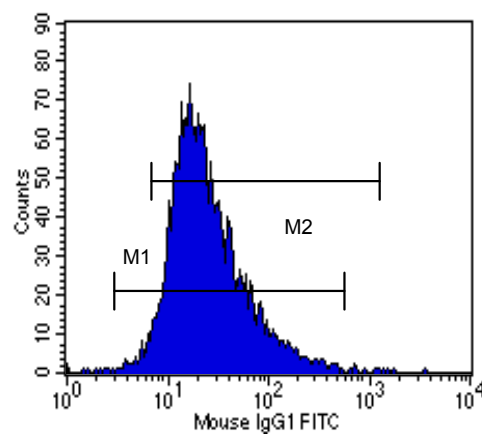
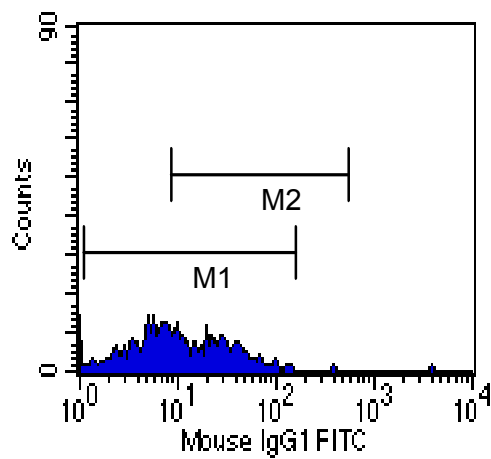
CD3 + 9077 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR -



CD3+ 6428 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR +

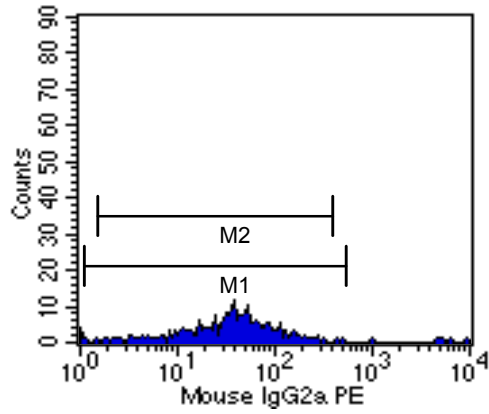
Kontrol (EBV PCR -)

EBV hastası (EBV PCR +)

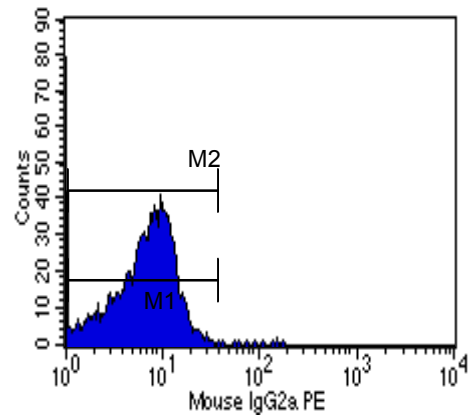
GranzymeB + 8287 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR -Granzyme B + 9076 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR +TCR α/β + 8287 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR -TCR α/β + 8926 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR +

Kontrol (EBV PCR -)

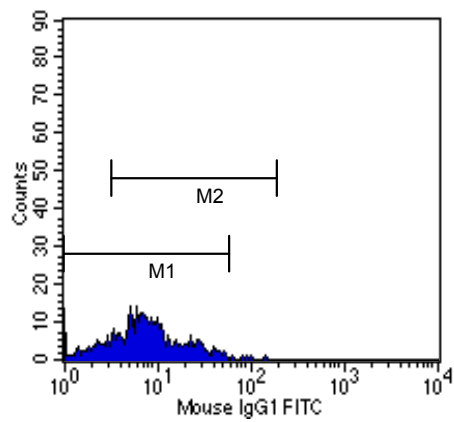
EBV hastası (EBV PCR +)



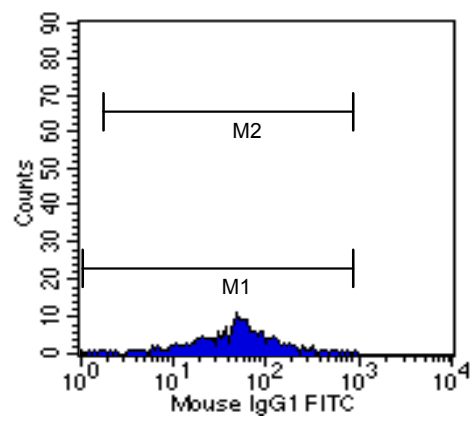
TRAIL- 8287 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR -



TRAIL- 9076 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR +



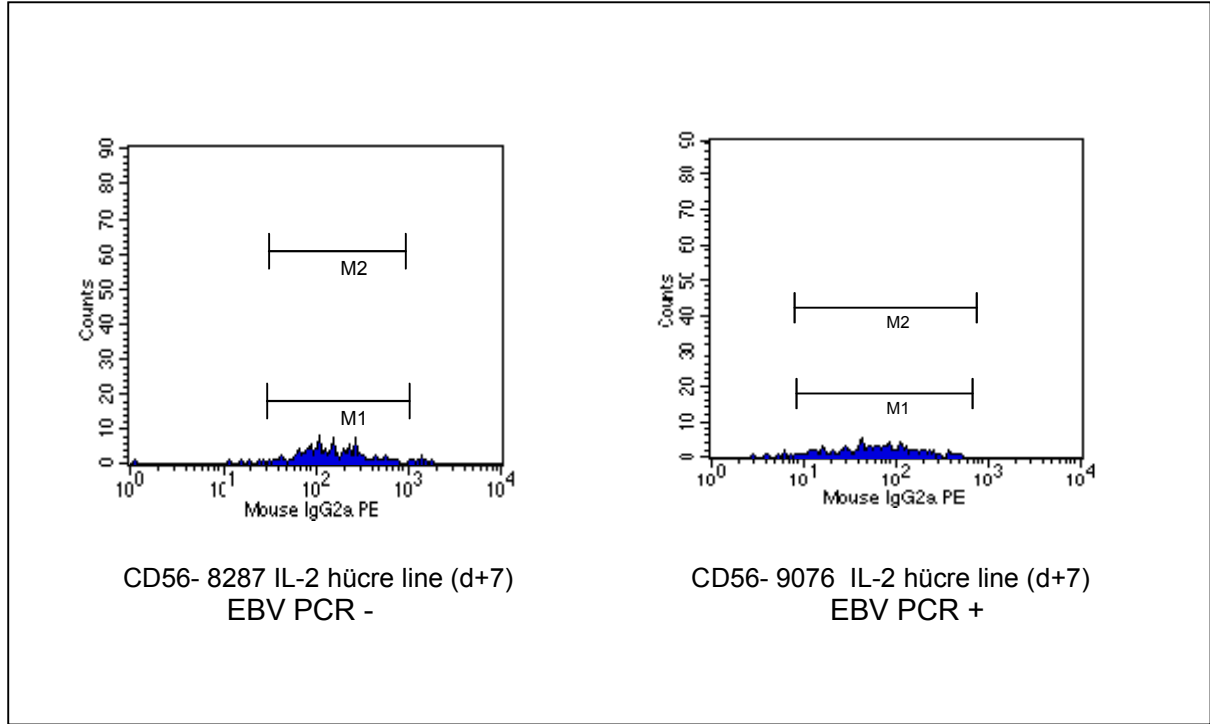
CD16 + 8287 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR -



CD16- 8926 IL-2 hücre line (d+7)
EBV PCR +

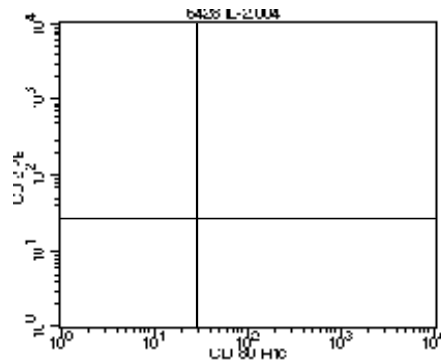
Kontrol (EBV PCR -)

EBV hastası (EBV PCR +)



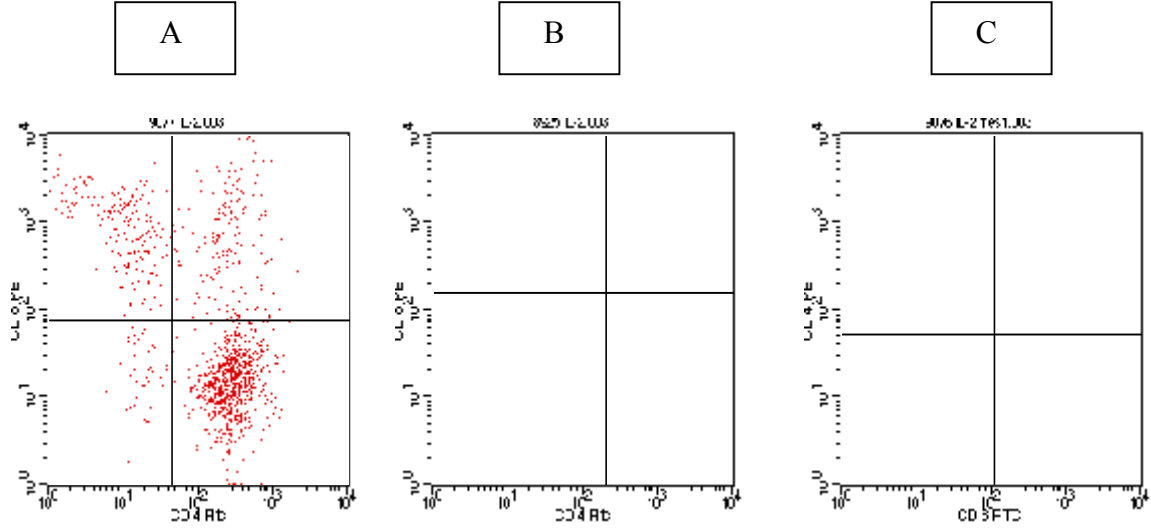
Şekil 13 İşaretlenmiş T hüresinin Flow cytometrik analizi. Bu şemada IL-2 de üretilmiş T hücrelerinin sağlıklı donörlerle karşılaştırılması yapılmıştır. EBV PCR – cell line larında CD25, CD56 ve TRAIL ekspresyonu yoktur, EBV PCR + lerde ise CD16 ve CD95-L ekspresyonu yoktur. Diğer yandan sağlıklı donörlardan alınan T lenfositler CD16 ve CD95-L ekspres ederken CD80 i ekspres etmezler.

EBV hastalarından alınan ve IL-2 de üretilmiş T hücre kültüründen yapılan analizlerde CD80 ve CD2 antijenlerinin birbirleri ile orantılı oldukları Şekil 4-3 de görülmektedir (#6428/EBV PCR+/IL-2 hücre line d+7). Fakat bütün hücreler CD2 eksprese etmezler.

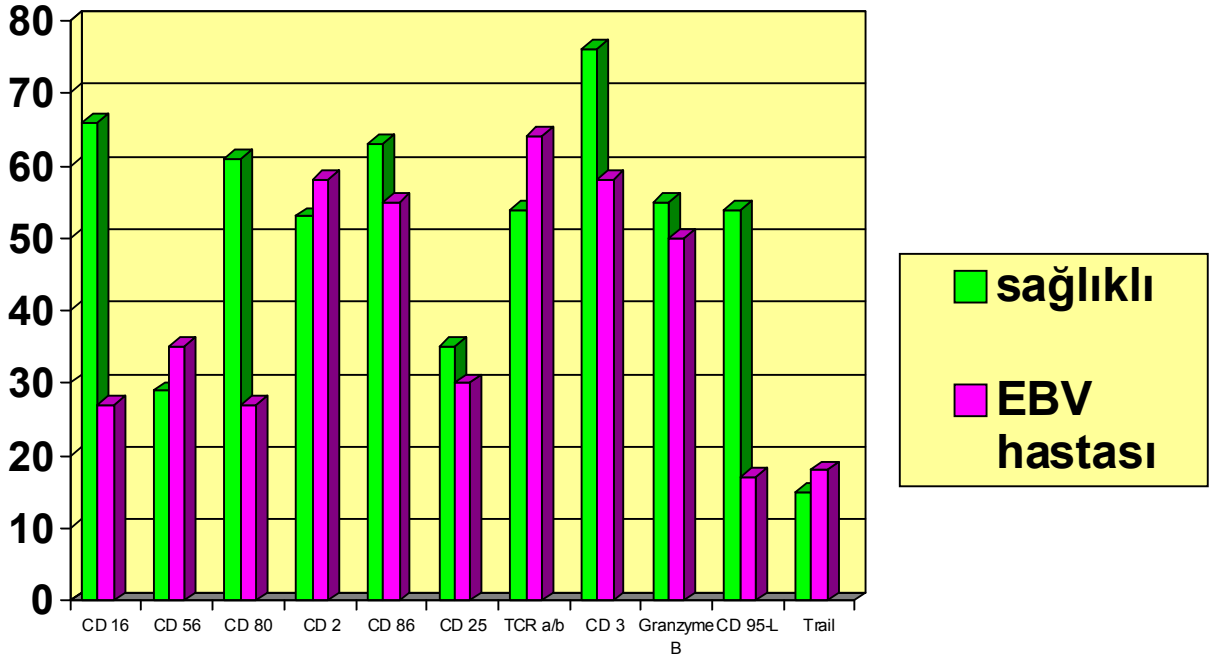


Şekil 14 CD80 FITC ve C2 PE (#6428/EBV PCR+/IL-2 hücre line d+7)

Matür T hücreler de CD4 ya da CD8 ekspres edilebilir. Ayrıca CD4 ve CD8 birlikte ekspres edilebilirken, herikisinin de ekspres edilmediği hücreler de mevcuttur (çoğunlukla TCR α/β ekspres eden hücrelerde) (Şekil 15).



Şekil 15 A- CD4⁺ >> CD8⁺, B- CD4⁺ << CD8, C- CD4⁺ = CD8⁺

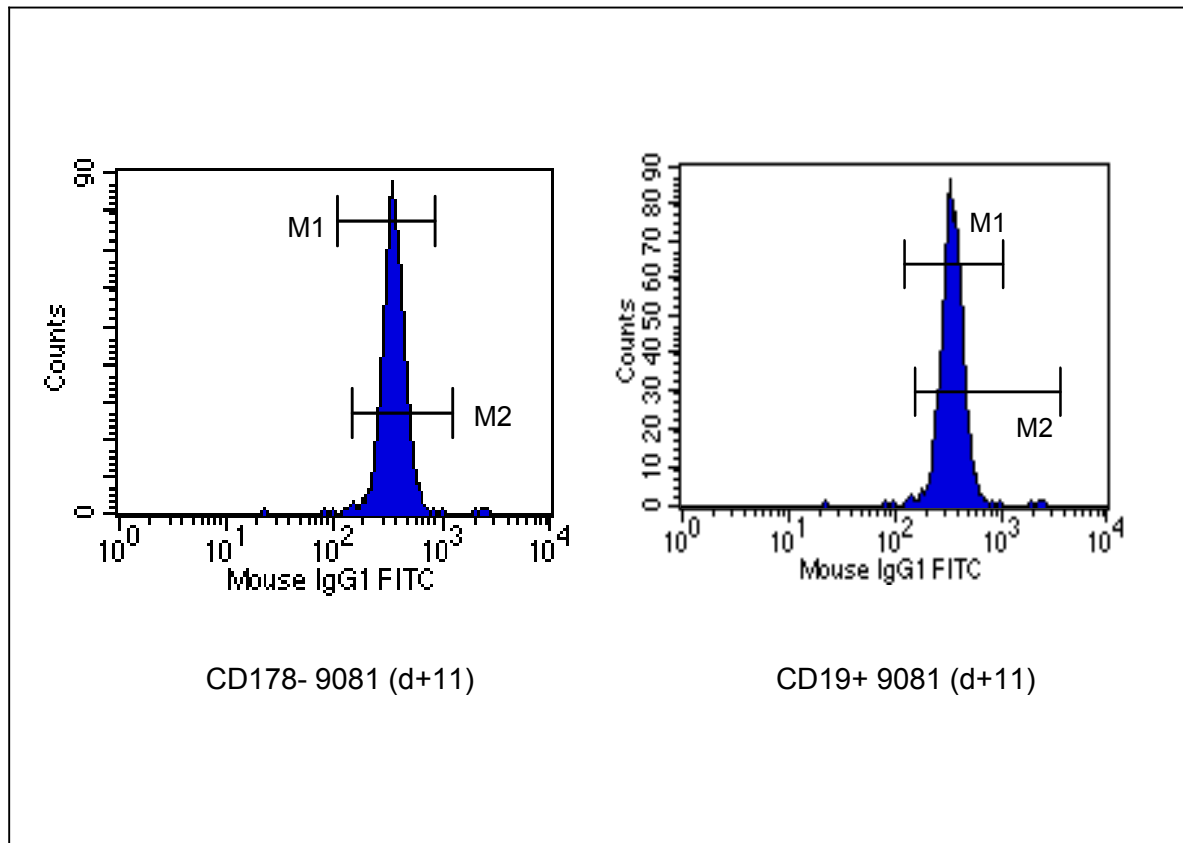


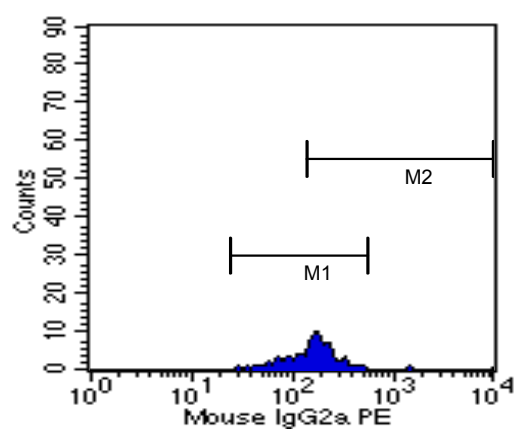
Grafik 2 Sağlıklı vericiler ile (#8287, #9078, #9077) EBV hastaları (#9076, #8926, #6428) arasındaki reseptör farklılıkları.

4.2 2 PBMC den alınan B lenfosit ve NK hücrelerinin identifikasyonu

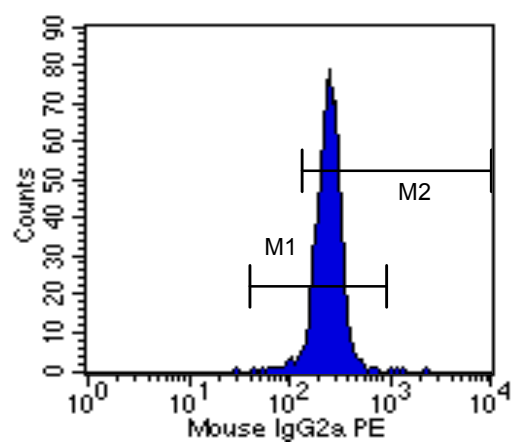
CD10-FITC/ CD20-PE/ CD19-PE kombinasyonu B hücrelerin belirlenmesinde önemlidir. B hücrelerinde CD19 ekspresyonunun olması maturasyon yolunda belirleyici özelliktir. Immatur omasında CD10++/ CD20- ile belirlenebilir., tam aktivasyona sahip B hücrelerin de CD10+/ CD20+ ve matür hücrelerde ise CD10-/ CD20+ kombinasyonu görülür. Ayrıca aktif B hücrelerinde CD2 ve CD95-L ekspresyonu görülmez ancak HLA-DR, CD83, CD80, CD86 ve CD 19 ekspres ederler. (Şekil 16)

CD3FITC/ CD16FITC/ CD56PE/ CD244FITC (Cytotoxic)/ ise NK hücrelerde belirleyicidir. Hücre membranlarında CD3 ekspres etmezken, CD16, CD56 , Perforin, CD244 ve Granzyme B ekspres ederler (Şekil 16).

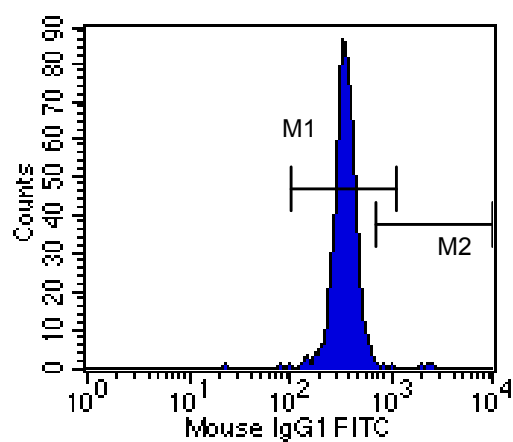




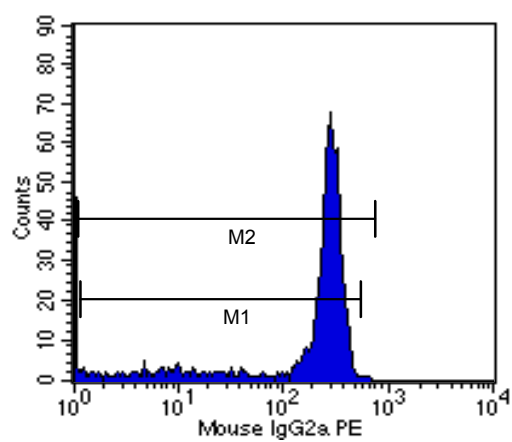
CD86+ 9081 (d+11)



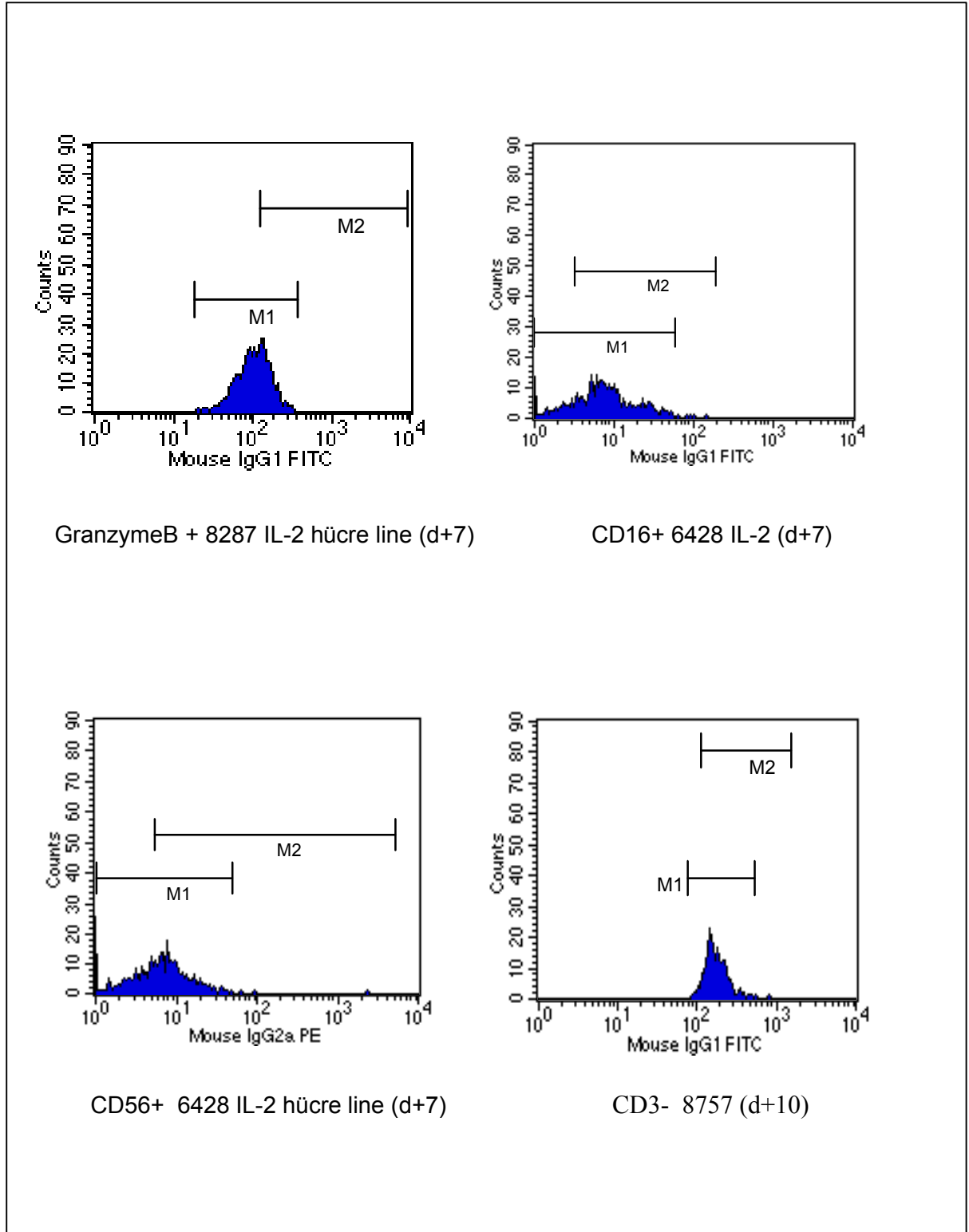
CD83+ 9081 (d+11)



HLA-DR+ 8757 (d+10)



CD2- 9080 (d+11)



Şekil 16 Aktif B hücreler CD95-L (CD178) ve CD2 ekspres etmezken, HLA-DR, CD83, CD86 ve CD19 ekspres ederler. Ayrıca NK hücreler CD3 ekspres etmezken, CD16, CD56 ve Granzyme B ekspres ederler.

4.2.3 IL-2 ile yapılan Primer Lenfoid Hücre Kültüründe Sitokin Üretimi (IL-10)

IL-2 ile üretilmiş hücre kültürlerinde IL-10 ve IFN- γ gibi sitokinlerin üretimini Immulite ile belirledik. İlginç bir şekilde EBV hastalarının süpernatantlarında yüksek oranda IL-10 olduğu tesbit edilmiştir. Ayrıca yine hastalarda IFN- γ üretiminin az olması, EBV peptid uyarılmasının artışından kaynaklıdır.

5 TARTIŞMA

DH'ler fagositoz sisteminin önemli bir parçasıdır ayrıca virüsleri ve enfekte hücre kalıntılarını periferden lenf nodlarına taşırlar ve olgunlaşarak T hücre immün yanıtını oluştururlar (89-92). İmmatür DH'ler başlangıçta nonproduktif iken virüsle enfekte olduğunda olgunlaşıp produktif hale gelirler. mDH'ler EBV ile enfekte olduğunda enfeksiyona bağlı olarak fonksiyonlarında bir takım değişiklikler olur buda enfeksiyonun yayılmasını kolaylaştırır ve antiviral T hücre cevabı gerçekleşir. Bunun sonucunda virüs replikasyonu daha uzun zaman alır (91).

DH tipleri yüzey markırlarına ve fonksiyonlarına göre ayırt edilebilir. Örneğin periferik kan DH'leri IL-10 üretir ve naife B hücrelerini aktive eder ve humoral immünitede büyük bir rol oynar, halbuki LH'leri daha az IL-10 üretir ve T hücre CD8+'nin tetiklenmesinde büyük rol oynar. EBV hastalıklarıyla ilgili yapılan çalışmalarda da gösterildiği gibi DH'ler doğal enfeksiyonlar sırasında önemli bir rol oynamaktadır (93-94-95).

Bulgularımız, aktive olmuş makrofajların EBV'nin konağı olduğunu fakat uyarılmamış monositleri konak olarak kullanmadığını gösterir.

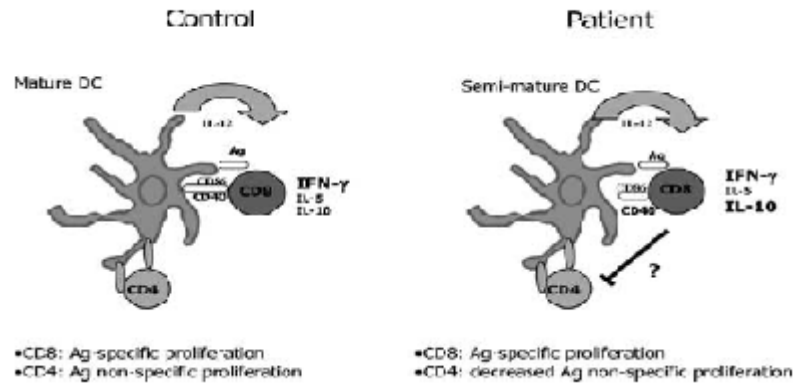
mDH'lerin insan EBV enfeksiyonları, T hücrelerin hızlı çoğalmasını ve uyarılma yeteneğini bozar. Bu aktiviteden sorumlu enfekte DH kültürlerinin subpopulasyonunda bu durum gözlenmiştir.

Sağlıklı donörlerden ve EBV enfeksiyonu olan hastalardan alınmış EBV spesifik T hücrelerde matür ve immatür DH'lerin farklılıklarını analiz ettik. Bulgularımız matür DH'lerin antijen sunan hücre fonksiyonunu virüsün bozduğunu ve EBV'ye karşı primer cevabın yavaş olmasını sağladığını ayrıca

diğer virüs enfeksiyonlarından farklı olarak primer enfeksiyonun uzun süre olması bunun kanıtıdır. Bununla beraber, CD4+ ve CD8+ effector ve memory hücrelerinin her ikisinin de büyük oranda EBV seropozitif sağlıklı kişilerde eninde sonunda harekete geçtiği anlaşılmıştır (96-97). EBV ile enfekte hücrelerde sunulan proteinlerin değişimine ek olarak diğer DH yüzey makırlarının da immün fonksiyona göre değişiklikler gösterdiğini gözlemledik. İmmatür DH'lerdeki bulgulara göre; kostimülatör molekülünde azalma gözlemlendi ve CD86'ya göre CD80 in daha fazla etkilendiği görüldü. Enfekte matür DH'lerde ise CD83'ün down modülasyonu en baskın göstergedir. EBV enfekte hücrelerden elde matür DH'lerin CD80 ve CD83 ekspresyonlarında artış gözlemlenmiştir. Eğer bu fonksiyonel bir sonuç ise, matür DH'lerdeki CD80 ve CD83'ün dramatik değişimini altında yatan mekanizmalar fonksiyonlarını açıklama ve tanımlamada yol gösterici olacaktır (98-99-100-101).

NK ve B hücre analizlerinde ise, CD2, CD3, CD16 ve CD56 ile birlikte CD8 ekspresyonu da değişkenlik gösterir (102-103-104-105). Gentile ve arkadaşları bu konuda bazı araştırmalar yapmıştır fakat raporlarına göre B hücre lenfomasında CD56+, CD3+ ilişkisini kanıtlamak için ek çalışmalara ihtiyaç duyduklarını belirtmişlerdir(106-107-108-112).

İmmatür timositler hem CD4 hem de CD8 ekspresyonu yapabilirler. NK ve T hücrelerindeki gibi viral enfeksiyonların (CMV ya da EBV gibi) tetiklediği ve malignant olmayan reaktif T hücre populasyonunda CD3+ popilasyon bulunur. Ayrıca CD4/CD8 oranı da anormallik gösterir (109-110-111-112).



Şekil 17

Diğer taraftan CD123 ve HLA-DR yardımı ile değişik araştırmacılar (113-114-115) tarafından bu zamana kadar bildirilmiş tipik matür popülasyona ek olarak buffy coat içinde yeni immatür DH popülasyonunu tanımladık. CD4+, CD1a+ immatür popülasyonun aksine bu popülasyon son zamanlarda gösterildiği gibi T hücrelerde farklılaşmamaktadır (T hücrede maturasyon olmamaktadır) (116). Çoğu CD123 monosit DH'si immatürdür, bu popülasyon CD11c miyeloid markırlarını bulundurmamaktadır.

Buna karşı olarak matür DH'lerde CD11c ekspresyonu olması fakat CD2, CD5 ve CD7 (117) ekspresyonunun olmamasına bağlı olarak miyeloid DH'den ayrılırlar. Son zamanlarda insan monositik DH alt tiplerini tanımlamaya yardımcı olabilecek değişik markırlar tanımlanmıştır (118-119). Bunlar IL-4 ve GM-CSF (120-121) gibi DH büyüme ve farklılaşma ayrıca CD83 (122) gibi fonksiyonu bilinmeyen faktörler için reseptörleri içerir. Yeni markırlarla DH'lerin durumu yeniden ve daha iyi değerlendirilebilir. Bu zamana kadar DH'ler HLA-DR+ (120-121) olarak karakterize edilmiştir. Bizim sonuçlarımız, DH'lerin %40'sinin özellikle de immatür DH'lerin bu yargıyı elemine edebileceğini işaret etmektedir. Sonuç olarak sadece HLA-DR+ net olan hücrelere yoğunlaşmak orta seviyede HLA-DR ekspresyonu yapan CD123+ alt

tipleri kaçırmaya sebep olabilir ve ileriki çalışmalarda da yanlış yönlendirmeye sebebiyet verebilir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada dendritik hücrelerin ve lökositlerin yüzey ve sitoplazmik reseptörleri analiz edilmiş ve şu sonuçlara varılmıştır.

Matür dendritik hücre üzerindeki CD80, CD25, CD83 ve PDL-2 gibi markırların ekspresyonu immatür dendritik hücre üzerinde bulunmaz fakat iDH ler özellikle CD1a, CD2, CD178 ve CD23 ekspres ederken, mDH ler bu markırları ekspres etmezler. Ayrıca CD209, TLR-2 ve CD19 mDH üzerinde düşük pozitifirken, CD86 ise iDH de düşük pozitifdir. Herikisinde de HLA sınıf I, TLR-3, CD39, CD123 ekspresyonu vardır fakat TRAIL ve CD3 ekspresyonu yoktur.

Bu zamana kadar DH'ler HLA-DR+ (120-121) olarak karakterize edilmiştir. Fakat bizim sonuçlarımız, DH'lerin %40'ının bu yargıyı elemine edebileceğini işaret etmektedir.

T lenfositlerin hücre reseptörleri analizinde ise, TCRa/b, Granzyme B, CD2, CD86 ve CD3 ekspres ettikleri fakat CD56, CD25 ve TRAIL ekspres etmedikleri görülmüştür. Özellikle EBV PCR pozitif T lenfositlerde CD16 ve CD95-L ekspres edilmez. Diğer yandan sağlıklı vericilerden alınan T lenfositlerde CD16 ve CD 95-L ekspresyonunun fazla olduğu, CD80 ekspresyonunun ise olmadığı görülmüştür.

Bu sonuç, EBV PCR pozitif vericilerin T hücre reseptörleri ile mature dendritik hücre yüzey reseptörlerinin uyum gösterdiğini, ayrıca sağlıklı vericilerin T hücre reseptörleri ile immatür dendritik hücre yüzey reseptörlerinin eşleştiğini göstermektedir.

7 ÖZET

FAGOSİTİK DENDRİTİK HÜCRELERİN ANALİZİ VE EBV ENFEKSİYONU OLAN HASTALARDAN ALINAN, IL-2 İLE ÇOĞALTILAN T ve NK HÜCRELERİNİN KONTROLLERLE KARŞILAŞTIRILMASI

Epstein-Barr virüs (EBV), *Herpesviridae* ailesinin, *Gamaherpesvirinae* ait ailesindendir ve cinsi *lenfokriptovirüs*'dür. Yüksek dozda immün sistemi baskılayıcı terapi ya da fonksiyonel eksiklik, oksidatif stres ya da transplant EBV gibi virüslerin aktivasyonunu sağlayabilir. EBV aktivasyonunda lenfoprolif hastalıklara (PTLD) ve hemofagositik lenfohistiyozis'e sebep olabilir.

Dendritik hücreler (DH) immün sistemin profesyonel antijen sunan ve sistemin düzenini sağlayan hücrelerdir. Dendritik hücreler immatür ya da matür şekillerde bulunurlar.

İmmatür dendritik hücreler, vücut yüzeyinde ve çoğu dokunun intertisyel alanlarında bulunurlar. İmmatur dendritik hücreler, antijenleri tutmak için makropinositoz ve reseptörlerin aracılık ettiği endositoz ile donatılmışlardır.

İkincil lenfoid dokularda bulunan matur dendritik hücreler ise, antijenleri yakalama kapasitelerini kaybederler ve onun yerine majör histocompatibility kompleks sınıf I ve II moleküllerinin kontekstinde bulunan işlenmiş peptidleri lenfositlere sunma üzerine uzmanlaşmışlardır.

Eğer sağlıklı vericilerden alınan hemofogozitik hücreler (buffy coats) in vitro da kültür edilirse iDH ve mDH arasında ne gibi farklılıklar ve benzerlikler olur diye düşündük ve çalışmamızda mDH üzerindeki CD80, CD25, CD83 ve PDL-2 gibi markırların ekspresyonunu tesbit ettik. Bu markırlar iDH üzerinde bulunmazlar. iDH ise özellikle CD1a, CD2, CD178 ve CD23 ekspres ederler fakat bu markırlar da mDH üzerinde bulunmazlar. Ayrıca CD209, TLR-2 ve CD19 mDH üzerinde düşük pozitifken, CD86 ise iDH de düşük pozitifdir. Herikisinde de HLA sınıf I, TLR-3, CD39, CD123 ekspresyonu vardır fakat TRAIL ve CD3 ekspresyonu yoktur. Diğer yandan, bu zamana kadar DH'ler HLA-DR+ olarak karakterize edilmiştir. Bizim sonuçlarımız, DH'lerin % 40'ının bu yargıyı elemine edebileceğini işaret etmektedir. Sonuç olarak sadece HLA-DR+ net olan hücrelere yoğunlaşmak orta seviyede HLA-DR ekspresyonu yapan CD123+ alt tipleri kaçırmaya sebep olabilir ve ileriki çalışmalarda da yanlış yönlendirmeye sebebiyet verebilir.

Ayrıca, T lenfositler omurgalı immün sisteminde bulunan beyaz kan hücreleridir. Lenfositler, vücut savunmasında önemli ve tamamlayıcı rol oynarlar.

EBV hastalarından alınmış ve IL-2 de üretilmiş lenfositler ile sağlıklı vericilerden alınan lenfositler arasındaki farkların araştırılmasını hedef alan ikinci çalışmamızda ise T lenfositlerin TCRA/b, Granzyme B, CD2, CD86 ve CD3 ekspres ettikleri fakat CD56, CD25 ve TRAIL ekspres etmedikleri görülmüştür. Özellikle EBV PCR pozitif T lenfositlerde CD16 ve CD95-L ekspres edilmez. Diğer yandan sağlıklı vericilerden alınan T lenfositlerde CD16 ve CD 95-L ekspresyonunun fazla olduğu, CD80 ekspresyonunun ise olmadığı görülmüştür.

Bu çalışmanın hücre tedavisi için kullanılan dendritik hücre aşısı üretimi konusunda faydalı olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Epstein-Barr virüs (EBV), Dendritik hücre, CD markır, T hücre

8 ABSTRACT

ANALYSIS OF PHAGOCYTIC DENDRITIC CELLS AND IL-2 PROPAGATED T AND NK CELLS OF PATIENTS WITH EBV INFECTION AS COMPARED TO CONTROLS

Epstein-Barr virus (EBV) is a member of *Herpesviridae* family, *Gamaherpesvirinae* subfamily and *lenfokriptovirus* genus.

High-dose immunosuppressive therapy or functional deficiencies, oxidative stress, or transplant-related complications may lead to virus reactivation such as Epstein-Barr virus (EBV). EBV reactivation, lymphoproliferative disorder (PTLD) and hemophagocytic lymphohistiocytosis.

Dendritic cells (DC) are antigen-presenting cells that are critical for the initiation and regulation of the immune response. Dendritic cells exist in an immature or mature state.

Immature dendritic cells are equipped to capture antigens by macropinocytosis and receptor-mediated endocytosis.

Mature DCs, lose the capacity to capture antigenic material and are instead specialized to present processed peptides to lymphocytes in the context of self major histocompatibility complex (MHC) class I and II molecules.

We then asked whether hemophagocytic cells cultured from healthy donors (buffy coats) in vitro are similar or different iDC or mDC. The following markers have been found expressed on mDCs CD80, CD25, CD83 and PDL-2. These are not on iDC, contrast iDC express CD1a, CD2, CD178 and CD23 but these are not on mDC. Also CD209, TLR-2 and CD19 are low+ on mDC and CD86 is low+ on iDC. Both of them express HLA class I, TLR-3, CD39, CD123 but not express TRAIL and CD3. On the other hand, until now DC have been characterized as HLA-DR +. Our results point to the fact that this method may eliminate some 40% of DC. Finally, focusing only on the brightest HLA-DR+ cells would miss the CD123 + subset that express intermediate levels of HLA-DR.

Besides, T cells belong to a group of white blood cells known as lymphocytes, and play a central role in cell-mediated immunity.

Second, we asked whether IL-2 propagated lymphocytes from patients with EBV disease are different from IL-2 propagated cells of healthy donors. Then we determined all T lymphocytes expressed TCRA/b, Granzyme B, CD2, CD86 and

CD3 but were not expressed CD56, CD25 and TRAIL. Especially T lymphocytes that EBV PCR positive were not expressed CD16 and CD95-L. On the other hand T lymphocytes from healthy donors expressed CD16 and CD 95-L but not expressed CD80.

Our study comes through helping about dendritic cell vaccine produce that use for cell therapy.

Key words: Epstein-Barr virus (EBV), Dendritic cell, CD marker, T cell

9 KAYNAKLAR

1. Kieff, E., Dambaugh, T., Heller : The biology and chemistry of Epstein Barr virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 146: 506- 517, 1982.
2. Stephen, E., Straus, M., Jefry, I. : Epstein Barr virus infection: biology, pathology, and management. *Annals of Internal Medicine*, 118:45-58, 1993.
3. Bailey RE. Diagnosis and treatment of infectious mononucleosis. *Am Fam Physician*, 1994, 49:879-88.
4. Starzl, TE. : Discussion of Murray JE, Wilson RE, Tilney NL, et al. Five years' experience in renal transplantation with immunosuppressive drugs: survival, function, complications and the role of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula. *Ann Surg*, 1968, 168: 416.
5. Fine, H. A. and Mayer, R. J. : Primary central nervous system lymphoma. *Ann. Intern. Med.*, 1993, 119:1093.
6. Sauter, C. and Blum, S. : Regression of lung lesions in Hodgkin's disease by antibiotics: case report and hypothesis on the etiology of Hodgkin's disease. *Am J. Clin. Oncol.*, 2002; in press.
7. Pagano, J. S., Huang, C. H., Levine, P. : Absence of Epstein-Barr Viral DNA in American Burkitt's Lymphoma. *New England J. Med.*, 289: 1395-1399, 1973.
8. Sham, JST and Choy, D. : Prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma: a review of 759 patients. *Br. J. Radiol*, 1990; 63: 51-8.
9. Epstein, J.B., Fatahzadeh, M., Matisic, J., Anderson, G. : Exfoliative cytology and electron microscopy in the diagnosis of hairy leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1995, 79(5): 564-9.
10. Garbuglia, A.R., Iezzi, T., Capobianchi, M.R., Pignoloni, P., Pulsoni, A., Sourdis, J., Pescarmona, E., Vitolo, D., Mandelli, F. : Detection of TT virus in lymph node biopsies of B-cell lymphoma and Hodgkin's disease, and its association with EBV infection. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2003 May-Aug, 16(2):109-118.
11. Henter, J., Ehrnst, A., Andersson, J., Elinder, G.: Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and viral infections. *Acta Paediatr*, 1993, 82:369-72.
12. Imashuku, S., Hibi, S., Ohara, T., Iwai, A., Sako, M., Kato, M., Arakawa, H., Sotomatsu, M., Kataoka, S., Asami, K., Hasegawa, D., Kosaka, Y., Sano, K., Igarashi, N., Maruhashi, K., Ichimi, R., Kawasaki, H., Maeda, N., Tanizawa, A., Arai, K., Abe, T., Hisakawa, H., Miyashita, H., Henter, J.I. : Effective control of Epstein-Barr virus-related hemophagocytic lymphohistiocytosis with immunochemotherapy. *Blood*, 1999, 93: 1869-74.

13. Kawaguchi, H., Miyashita, T., Herbst, H., Niedobitek, G., Asada, M., Tsuchida, M., Hanada, R., Kinoshita, A., Sakurai, M., Kobayashi, N., Mizutani, S. : Epstein-Barr virus-infected T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic syndrome. *J. Clin. Invest.*, 1993, 92: 1444-50.
14. Kasahara, Y., Yachie, A. : Cell type specific infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and chronic active EBV infection. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2002, 44: 283-94.
15. World Health Organization International Agency For Research On Cancer, Volume 70, Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8.
16. Lisa, P., Clare, S., Elliott, K. : Subnuclear localization and phosphorylation of Epstein Barr virus latent infection nuclear proteins. *Virology*, 176:563-574, 1990.
17. Eitan, Y., Bakacs, T., Einhorn, L. : Epstein barr virus (EBV) receptors complement receptors, and EBV infectibility of different lymphocyte fractions of human peripheral blood. *Cellular Immunology*. 35:34-42, 1978.
18. Lehrer, R.I., Ganz, T. : Biochemistry and Function of Monocytes and Macrophages. In: Beutler, E., Lichtman, M.A., Coller, B.S., Kipps, T.J., Seligsohn, U., eds. *Williams Hematology*, 6th edn. New York: Mc Graw Hill. 2001:865-869.
19. Knight, S. C. and Patterson, S. : Bone marrow-derived dendritic cells, infection with human deficiency virus, and immunopathology. *Annual Review of Immunology* 15, 1997, p. 593-615.
20. Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, S., Imamura, S., Schmitt, D. & Banchereau, J.: CD34-hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF-TNF- α . *Journal of Experimental Medicine* 184, p.695-706, 1996.
21. Suess, G. and Shortman, K. : A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/FasL-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 183, 1789-1796, 1996.
22. Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Durand, I., Cella, M., Lanzavecchia, A. & Banchereau, J. : CD34- hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF-TNF- α II. Functional analysis. *Blood* 90, 1458-1470, 1997.
23. Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, R. M. & Bhardwaj, N. : Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. 1996, *Journal of Immunological Methods*, 196: 121-135.
24. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. : Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by

cytokines and bacterial products. 1995, *Journal of Experimental Medicine*, 182: 389-400.

25. Zhou, L. J. and Tedder, F. T. : Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. 1995, *Journal of Immunology*, 154:3821-3835.

26. Zhou, L. J. and Tedder, T. F. : CD14- blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83- dendritic cells. 1996, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 1993, p. 2588-2592.

27. Hart, D. N. J. : Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. 1997, *Blood*, 90:3245–3287. 1a. Zarling, A. L., Johnson, J. G., Hoffman, R. W., Lee, D. R. : Induction of primary human CD81 T lymphocyte responses in vitro using dendritic cells. 1999, *J. Immunol.* , 162:5197–5204.

28. Reid, C. D. L. : The dendritic cell lineage in haemopoiesis. 1997, *Br. J. Haematol.* , 96:217–223.

29. Henderson, R. A., Watkins, S. C. , Flynn, J. L. : Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. 1997, *Journal of Immunology*, 159:635-643.

30. Ingutti, E., Mondino, A., Khotuts, A. & Jenkins, M. K. : In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4-T cells. 1997, *Journal of Experimental Medicine*, 185:2133-2141.

31. McLellan, A. D., Starling, G. C., Williams, L. A., Hock, B. D. , Hart, D. N. J. : Activation of human blood dendritic cells induces the CD86 costimulatory molecule. 1995, *European Journal of Immunology*, 25: 2064-2068.

32. Pierre, P., Turley, S. J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R. M., Mellman, I. : Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. 1997, *Nature* 388:787-792.

33. Ghanekar, S., Zheng, L., Logar, A., Navratil, J., Borowski, L., Gupta, P. , Rinaldo, C. : Cytokine expression in human peripheral blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and herpes simplex virus. *Journal of Immunology*, 157:4028-4036.

34. Théry, C., Duban, L., Segura, E., Véron, P., Lantzand, O., Amigoren, S. : Indirect activation of naïve CD4+T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature Immunology*, vol 3,no.12, December 2002

35. Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Banchereau, J. : GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature*, 1992, 360:258-261.

36. Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter Dambuyant, C., De Saint Vis. B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D., Banchereau, J. : CD34 + hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF. *x. J Exp Med*, 1996, 184:695-706.

37. Szabolcs, P., Avigan, D., Gezelter, S., Ciocon, D.H., Moore, M.A., Steinman, R.M., Young, J.W. : Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-colony-forming unit intermediate. *Blood*, 1996, 87:4520-4530.
38. Sallusto, F., Lanzavecchia, A. : Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, 1994, 179:1109-1118.
39. Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D., Schuler, G. : Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immuno/Methods*, 1996, 196:137-151.
40. Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, R.M., Bhardwaj, N. : Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J. Immunol. Methods*, 1996, 196:121-135.
41. Palucka, K.A., Taquet, N., Sanchez-Chapuis, F., Gluckman, J.C. : Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J. Immunol.*, 1998, 160:4587-4595.
42. Fischer, H.G., Opel, B., Reske, K., Reske-Kunz, A.B. : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-cultured bonemarrow-derived macrophages reveal accessory function and synthesis of MHC class II determinants in the absence of external stimuli. *Eur. J. Immunol.*, 1988, 18:1151-1158.
43. Caracciolo, D., Shirsat, N., Wong, G.G., Lange, B., Clark, S., Rovera, G. : Recombinant human macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) requires subliminal concentrations of granulocyte/macrophage (GM)-CSF for optimal stimulation of human macrophage colony formation in vitro. *J. Exp. Med.*, 1987, 166:1851-1860.
44. Cella, M. et al., 1997, *Curr. Opin. Immunol.*, 9:10.
45. De Saint-Vis, B. et al., 1998, *Immunity*, 9:325.
46. Driessen, C. et al., 1999, *J. Cell Biol.*, 147:775.
47. Santambrogio, L. et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96:15050
48. Yewdell, J.W. et al., 1999, *Adv. Immunol.*, 73:1.
49. Albert, M.L. et al., 1998, *J. Exp. Med.*, 188:1359.
50. Basu, S. et al., 2001, *Immunity*, 14:303.
51. Regnault, A. et al., 1999, *J. Exp. Med.*, 189:371.
52. Caux, C. et al.: CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF α : II Functional analysis. *Blood*, 90: 1458–1470, 1997.
53. Matsumoto, M. et al. : Distinct roles of lymphotoxin-a and type 1 TNF receptor in the establishment of follicular dendritic cells from non-bone marrow-derived cells. *J. Exp. Med.*, 186:1997–2004, 1997.

54. Brocker, T. and Karjalainen, K. : Targeted expression of MHC class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but no positive selection of thymocytes in vivo. *J. Exp. Med.*, 185:541–550, 1997.
55. Laufer, T. M., DeKoning, J., Markowitz, J. S., Lo, D., Glimcher, L. H. : Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature*, 383:81–85, 1996.
56. Zal, T., Volkman, A. and Stockinger, B.: Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J. Exp. Med.*, 180:2089–2099, 1994.
57. Loughran, T.P. Jr. : Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood*, 1993, 82:1-14.
58. Harrington, L.E., Hatton R.D., Mangan P.R. et al. : Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages, 2005, *Nature Immunology*, 6(11): 1023-32.
59. Szabo, S.J., Dighe, A.S., Gubler, U., Murphy, K.M. : Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. 1997, *J. Exp. Med.*, 185:817–824.
60. Aversa, F., Tabilio, A., Velardi, A. et al.: Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N. Engl. J. Med.*, 1998, 339:1186-1193.
61. Afzali, B., Lombardi, G., Lechler, R. I., Lord G. M. : The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clinical & Experimental Immunology*, Volume 148(1):32-46, 2007.
62. Croft, M. and Swain, S.L. : Recently activated naive CD4 T cells can help resting B cells, and can produce sufficient autocrine IL-4 to drive differentiation to secretion of T helper 2-type cytokines. *J. Immunol.*, 154:4269–4282.
63. Ogg, G.S., Jin X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P.R., Nowak, M.A., Monard, S., Segal, J.P., Cao, Y., Rowland-Jones, S.L., Cerundolo, V. et al. : Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. 1998, *Science*, 279:2103–2106.
64. Vaesen, M., Barnikol-Watanabe, S., Gotz, H., Awni, L. A., Cole, T., Zimmermann, B., Kratzin, H. D., Hilschmann, N. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1994, 375:113–126.
65. Li, M., Makkinje, A., Damuni, Z., 1996, *Biochemistry*, 35:6998–7002.
66. Graubert, T.A., DiPersio, J.F., Russell. J.H., Ley. T.J.: Perforin /granzyme-dependent and Independent Mechanisms are Both Important for the Development of Graft-versus-host Disease After Murine Bone Marrow Transplantation. 1997, *J. Clin. Invest.*
67. Trapani, J.A. and Sutton, V.R. : Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. 2003, *Curr. Opin. Immunol.*, 15(5):533-43.

68. Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S.I., Sameshima, M., Hase, A. Seto, Y., Nagata, S.: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. 1991, *Cell*, 66: 233–243.
69. Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y.: Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature Immunol.*, 2003, 4:330-6.
70. Wan, Y.Y., Flavell, R.A.: Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2005, 102:5126–31.
71. Wherry, E. J., Teichgraber, V., Becker, T. C., Masopust, D., Kaech, S. M., Antia, R., Von Andrian, U. H., Ahmed, R. : Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. 2003, *Nat. Immunol.*, 4:225.
72. Tuma, R. A., and Pamer, E. G.: Homeostasis of naive, effector and memory CD8 T cells. 2002, *Curr. Opin. Immunol.*, 14:348.
73. Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A.: The biology of human natural killer cell subsets. *Trends Immunol.*, 2001, 22:633-640.
74. Bancroft, G. J.: The role of natural killer cells in innate resistance to infection. 1993, *Curr. Opin. Immunol.*, 5:503–510.
75. Sullivan, K.E., Delaat, C.A., Douglas, S.D., Filipovich, A.H.: Defective natural killer cell function in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis and in first degree relatives. *Pediatr Res.*, 1998, 44:465-468.
76. Perussia, B. et al : The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 133:180–189, 1984.
77. Lanier, L.L.: Turning on natural killer cells. *J Exp Med*, 2000, 191:1259-62.
78. Hodgkin, P.D., Basten, A.: B cell activation, tolerance and antigen-presenting function. *Curr Opin Immunol.*, 1995, 7:121-129.
79. Parham, P., *The Immune System*, Garland Science Publishing, New York, NY, 2005.
80. Palacios, R., and M. Steinmetz . 1985 . IL-3 dependent bone marrow clones that Express B-220 surface antigen, contain Ig' genes in germline configuration and generate B lymphocytes in vivo. *Cell*. 41:727.
81. Geffroy-Luseau, A., Jegou, G., Bataille, R., Campion, L., Pellat-Deceunynck, C.: Osteoclasts support the survival of human plasma cells in vitro. 2008, *Int. Immunol.*, 20:775-782
82. Bernasconi, N. L., Traggiai, E., Lanzavecchia, A.: Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. 2002, *Science*, 298:2199.
83. Herzenberg, T., Herzenberg, J., Herzenberg, L.A.: Unraveling B-1 progenitors. 2007, *Current Opinion in Immunology*, 19(2):150-155.
84. Lajaunias, F., Nitschke, L., Moll, T., Martinez-Soria, E., Semac, I., Chicheportiche, Y., Parkhouse, R. M. E., Izui, S.: Differentially Regulated

Expression and Function of CD22 in Activated B-1 and B-2 Lymphocytes. 2002, *J. Immunol.*, 168:6078-6083.

85. Linton, P.J., Harbertson, J., Bradley, L.M. : A critical role for B cells in the development of memory CD4 cells. *J Immunol.*, 2000, 165:5558-5565.

86. Lanzavecchia, A. : Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.*, 1990, 8:773-793.

87. Harris, D.P., Haynes, L., Sayles, P.C. et al : Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol.*, 2000, 1:475-482.

88. Silverman, G.J., Carson, D.A.: Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.*, 2003, 5:1-6.

89. Joannes, F.M., Jacobs, M.D., Peter, M., Hoogerbrugge, M.D., Mandy W.M.M. van de Rakt, BSc, Erik, H.J.G. Aarntzen, MD, Carl G. Figdor, PhD, Gosse J. Adema, PhD and I. Jolanda M. de Vries, PhD. Phenotypic and Functional Characterization of Mature Dendritic Cells From Pediatric Cancer Patients *Pediatr Blood Cancer* 2007;49:924–927

90. Zanghellini, F., Boppana, S. B., Emery, V. C., Griffiths, P. D., Pass, R. F. : Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. 1999, *J. Infect. Dis.*, 180:702–707.

91. Liu, Y. J. : Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. 2001, *Cell*, 106:259–262.

92. Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, B. de Saint-Vis, C. Dezutter-Dambuyant, C. Jacquet, D. Schmitt, and J. Banchereau. 1997. CD34₊ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF α . *Adv. Exp. Med. Biol.* 417:21–25.

93. Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Durand, I., Cella, M., Lanzavecchia, A., Banchereau, J. : CD34₊ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor α . II. Functional analysis. 1997, *Blood*, 90:1458–1470.

94. Mortarini, R., Anichini, A., Di Nicola, M., Siena, S., Bregni, M., Belli, F., Molla, A., Gianni, A. M., Parmiani, G.: Autologous dendritic cells derived from CD34₊ progenitors and from monocytes are not functionally equivalent antigen-presenting cells in the induction of melan-A/Mart-1(27–35)-specific CTLs from peripheral blood lymphocytes of melanoma patients with low frequency of CTL precursors. 1997, *Cancer Res.*, 57:5534–5541.

95. Ibanez, C. E., Schrier, R., Ghazal, P., Wiley, C., Nelson, J. A.: Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. 1991, *J. Virol.*, 65:6581–6588.

96. Lathey, J. L. and Spector S. A.: Unrestricted replication of human

- cytomegalovirus in hydrocortisone-treated macrophages. 1991, *J. Virol.*, 65:6371–6375.
97. Soderberg-Naucler, C., Streblow, D. N., Fish, K. N., Allan-Yorke, J. Smith, P. P., Nelson, J. A.: Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14₊ monocytes is differentiation dependent. 2001, *J. Virol.*, 75:7543–7554
98. Rochford, R., Cannon, M. J., Sabbe, R. E., Adusumilli, K., Picchio, G., Glynn, J., Noonan, D. J., Mosier, D. E., Hobbs, M. V.: Common and idiosyncratic patterns of cytokine gene expression by Epstein-Barr virus transformed human B cell lines. 1997, *Viral Immunol.*, 10:183.
9. Khanna, R., Burrows, S. R., Moss, D. J.: Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. 1995, *Microbiol. Rev.*, 59:387.
100. Rickinson, A. B., Lee, S. P., Steven, N. M.: Cytotoxic T lymphocyte response to Epstein-Barr virus. 1996 *Curr. Opin. Immunol.*, 8:492.
101. Kern, F., Khatamzas, E., Surel, I., Frimmel, C., Reinke, P., Waldrop, S. L., Picker, L. J., Volk, H. D.: Distribution of human CMV-specific memory T cells among the CD8₊ subsets defined by CD57, CD27, and CD45 isoforms. 1999, *Eur. J. Immunol.*, 29:2908–2915.
102. Suni, M. A., Picker, L. J., Maino, V. C.: Detection of antigen-specific T-cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry *J. Immunol. Methods*, 212:89–98.
103. Waldrop, S. L., Davis, K. A., Maino, V. C., Picker, L. J. : Normal human CD4₊ memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis. 1998, *J. Immunol.*, 161:5284–5295.
104. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., Palucka, K.: Immunobiology of dendritic cells. 2000, *Annu. Rev. Immunol.*, 18:767–811.
105. Arrode, G., Boccaccio, C., Abastado, J. P., Davrinche, C.: Crosspresentation of human cytomegalovirus pp65 (UL83) to CD8₊ T cells. 2002.
106. Tabi, Z., Moutafsi, M., Borysiewicz, L. K.: Human cytomegalovirus pp65- and immediate-early 1 antigen-specific HLA class I-restricted cytotoxic T-cell responses induced by cross-presentation of viral antigens. 2001, *J. Immunol.*, 166:5695–5703.
107. Lechmann, M., Krooshoop, D. J., Dudziak, D., Kremmer, E., Kuhnt, C., Figdor, C. G., Schuler, G., Steinkasserer, A.: The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T-cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. 2001, *J. Exp. Med.*, 194:1813–1821.
108. Rochford, R., Hobbs, M. V., Garnier, J. L., Cooper, N. R., Cannon, M. J.: Plasmacytoid differentiation of Epstein-Barr virus-transformed B cells in vivo is associated with reduced expression of viral latent genes. 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:352.
109. Kruse, M., Rosorius, O., Kratzer, F., Stelz, G., Kuhnt, C., Schuler, G.,

Hauber, J., Steinkasserer, A.: Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. 2000, *J. Virol.*, 74:7127–7136.

110. Farcet, J.P., Gauland, P., Marolleau, J.P., Le Couedic, J.P., Henni, T., Gourdin, M.F., Divine, M., Haïoun, C., Zafrani, S., Goossens, M., Hercend, T., Reyes, F. : Hepatosplenic T-cell lymphoma: Sinusoidal localization of malignant cells expressing the $\gamma\delta$ T-cell receptor. *Blood*, 75:2213, 1990

111. Sotzik, F., Rosenberg, Y., Boyd, A. W., Honeyman, M., Metcalf, D., Scollay, R., Wu, L., Shortman, K.: Assessment of CD4 expression by early T precursor cells and by dendritic cells in the human thymus. 1994, *J. Immunol.*, 152:3370–3377.

112. Beaulieu, S., Landry, D., Bergeron, D., Cohen, E. A., Montplaisir, S.: An improved method for purifying human thymic dendritic cells. 1995, *J. Immunol. Meth.*, 180:225–236.

113. Lafontaine, M., Landry, D., Montplaisir, S.: The human thymic dendritic cell phenotype and its modifications in culture. 1992, *Cell. Immunol.*, 142:238–246.

114. Res, P. C. M., Couwenberg, F., Vryth-Dreese, F. A., Spits, H.: Expression of pTa mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus. 1999, *Blood*, 94:2647–2657.

115. Hart, D. N. J. : Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. 1997, *Blood*, 90:3245–3287.

116. Banchereau, J., Steinman, R. M.: Dendritic cells and the control of immunity. 1998, *Nature*, 392:245–252.

117. Grouard, G., Rissoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., Liu, Y.J.: The enigmatic plasmacytoid T cell develop into dendritic cells with interleukin-3 and CD40-ligand. 1997, *J. Exp. Med.*, 185:1101–1111.

118. Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P. A., Carballido, J., Picker, L. J., Lund-Johansen, F.: Dendritic cell ontogeny: A human dendritic lineage of myeloid origin. 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94:12551–12556.

119. Zhou, L.J. and Tedder, T.F. : CD141 blood monocytes can differentiate into functionally mature CD831 dendritic cells. 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93:2588–2592.

120. Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., Liu, Y.J. : Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. 1999, *Science*, 283:1183–1186.

121. Cella, M., Jarossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., Colonna, M.: Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. 1999, *Nature Med.*, 5:919–923.

122. Ren, X.: States of EBV infection in patients with acute and recurrent hemophagocytosis, PhD thesis, Ulm-Germany, 2008