تحسين تفعيل اللمفاويات التّائيّة البشريّة في الزّجاج وفي الحيّ بواسطة طلاء الخلايا بالبروتين الخيمري المأشوب B7-1:Fcγ1

لمى يوسف*

الملخص

خلفيّة البحث وهدفه: تعبّر الخلايا اللمفاويّة التّائيّة عن جزيئات محرّضة، مثل B7-1 في بعض الحالات الفيزيزلوجيّة والمرضيّة، ولكن لم يتمّ حتّى تاريخه تقصي قدرة هذه الخلايا على تفعيل ذاتها.

هدفت هذه الدّراسة إلى اختبار إمكانيّة تعزيز تفعيل الخلايا التّائيّة وتحسين تكاثرها في الزّجاج وفي الحيّ، وذلك باعتماد تقنيّة لا جينّية تعتمد الطلاء الخارجيّ لسطوح اللمفاويات التائيّة بالبروتينB7-1 المأشوب بعد اقترانه بالبروتين A المنغرز في الغشاء الخلوي بذيلٍ من البالميتات/النخلات.

أجريت هذه الدّراسة في مخابر كليّة الطّب بجامعة بنسلفانيا في الولايات المتحّدة الأمريكيّة ومخابر الهيئة العامّة للتقانة الحيويّة في دمشق في المدة الواقعة بين 2010-2012.

مواد البحث وطرائقه: هندس وصمِّم بروتين خيمري مأشوب B7-1:Fcγ1 بحيث يكتنف النطاق خارج الخلوي للبروتين البشري B7-1 المحرّض للخلايا التّائية ملتحماً مع الشدفة المتبلورة Fcγ للضد IgG1، وأنتج في الخط الخلوي الكلويّ البشريّ293. حوّر البروتين المأشوب A بإضافة ذيلٍ شحمي من النخلات/البالميتات كيميائيّاً، مماسمح بانغرازه في الغشاء الخلوي للمفاويات تائيّة بشريّة عالية النقاوة محضّرة بطريقة الانتقاء السّلبي. حضنت الخلايا لاحقاً مع البروتين المؤشّب B7-1:Fcγ1ممّا سمحبارتباطه عن طريق الـــFc بالبروتين A في الغشاء الخلوي. قيم النقل الكمّي للبروتينB7-1 إلى سطوح الخلايا بطريقة الجريان الخلوي، وقيست قدرة التائيات المطليّة على التكاثر وإنتاج السيتوكين 2 (IL-2) في الزّجاج، كما تقصيت قدرتها على الاغتراس في الحي باستعمال النموذج الفأري منعدم المناعة NOD/SCID/B2M K/O.

النتائج: بيّنت نتائج هذه الدّراسة إمكانية نقل كميات محدّدة من البروتين A ذي الذيل الشحمي والبروتين المأشوب B7-1:Fcγ1 إلى الخلايا التائيّة بطريقة "الطلاء الخلوي". أبدت اللمفاويات التّائيّة المطليّة بالبروتين B7-1 قدرة كبيرة على التّكاثر في الزجاج، وزيادة كبيرة في إنتاج IL-2، وقدرةً فائقة على الاغتراس في نموذج لفئران معدومة المناعة.

الاستنتاج: مكّنت تقنية طلاء الخلايا بالبروتينات من "تسليح" الخلايا اللمفاويّة التّائيّة بجزيئات محفّزة تؤمّن لها الشارة الثانية اللازمة لتفعيلها وتكاثرها وإنتاجها للسيتوكين IL2. يمكن البناء على هذه النتائج لإكثار اللمفاويات التّائيّة واستعمالها في تطبيقات مستقبليّة قد تشمل المعالجة المناعيّة المستهدفة للسرطانات أو لدى مرضى أعواز المناعة الخلقيّة أو المكتسبة.

كلمات مفتاحيّة: خلايا تائيّة، بروتينات محرّضة خيمريّة مأشوبة، B7-1·Fcγ1، نقل البروتينات.

* قسم الصيدلانيّات والتكنولوجيا الصيدليّة- كليّة الصّيدلة- جامعة دمشق.

Enhancement of *in-vitro* and *in-vivo* Human T Lymphocyte Activation via Cell Painting with Recombinant Chimeric Co-stimulatory B7-1:Fcγ1 Protein

Lama A. Youssef*

Abstract

Background& Objective: T cells express co-stimulatory molecules on their surfaces in both normal and pathologic settings; however, the possibility that expression of these co-stimulators may enable individual T cells to co-stimulate themselves has not been investigated.

This study aims at assessing the possible potentiation of T cells activation and proliferation both in vitro and in vivo via enforced B7-1 expression on T lymphocytes using a non-genetic approach, i.e. cell painting, that comprises binding of recombinant B7-1 to plasma membrane-anchored palmitoylated protein A.

Materials & Methods: A recombinant chimeric human co-stimulatory B7-1 protein that encompasses the extracellular domain of CD80 (B7-1) fused to the crystal fragment Fcγ of human IgG antibody was engineered and produced in human kidney cell line 293. Recombinant protein A was chemically palmitoylated and inserted into cell membranes of T lymphocytes highly purified using negative selection. Subsequently, B7-1·Fcγ1 was added to protein A-decorated cells allowing its binding via the Fc portion. Quantitative transfer of B7-1 was assessed using flow cytometry, and in vitro proliferation and IL-2 production were measured. Moreover, in vivo engraftment of painted cells was evaluated using the immune deficient mouse model NOD/SCID/B2M K/O.

Results: Results from this study demonstrate the feasibility of "cell painting" using a two-step approach to quantitatively transfer palmitoylated protein A and B7-1·Fcγ to T cells. B7-1 painted T lymphocytes exhibited augmented in vitroproliferation, enhanced IL-2 production, and superior in vivo engraftment.

Conclusions: Cell painting technique enables arming T lymphocytes with co-stimulatory proteins that provide second signal inevitable for activation, proliferation, and production of IL-2. These results may pave the way for future applications that include but is not limited to cancer targeted immunotherapy and congenital and/or acquiredimmunodeficiency.

This study was conducted in the laboratories of The School of Medicine, University of Pennsylvania, USA, and The National Commission for Biotechnology, Damascus between 2010 and 2012.

Keywords: T lymphocytes; Recombinant chimeric co-stimulatory proteins, B7-1·Fcγ1, Protein transfer

* Dept. Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Damascus University.

مقدّمة:

يتطلّب تفعيل الخلايا التّائيّة انخراط شارتين خلويتين؛ تتأتّى الشّارة الأولى منتفعيل معقّد المستقبل المناعي للخلايا التّائيّة CD3/TCR، في حين تنجم شارة التّفعيل الثانية نتيجة التآثر بين المثنوي المتماثل للمستقبلCD28 على سطح اللمفاويات التّائيّة ولجينه المحفّز المشارك co-stimulatory ligand المعروف بـــ CD80 (البروتين B7-1) أو CD86 (B7-2) [1-3] الذي تعبّر عنه الخلايا المقدّمة للمستضد antigen presenting cells (APC) مثل البلاعم والخلايا المتغصّنة واللمفاويات البائيّة [4-6]. لدى تلقيها كلتا الشارتين، تبدأ الخلايا التائيّة بالتكاثر واصطناع الإنترلوكين (IL-2)[2] الذي يؤدّي ارتباطه بمستقبله IL-2R (CD25) على سطح الخلايا التّائيّة ذاتها إلى تفعيلها ذاتيّاً autocrine أو وتفعيل خلايا تائيّة مجاورة بآلية paracrine[2].

تعدّ المعالجة المناعيّة التلاؤميّة adoptive immunotherapy باستعمال الخلايا التّائيّة المتفاعلة مع الورم واحدةً من العلاجات البازغة الفعّالة لمعالجة السرطانات وعلى الأخص السرطانات الناكسة وكبيرة الحجم [7]. غير أنّ القدرة على توليد أعدادٍ ضخمة من الخلايا اللمفاوية اللازمة للمعالجة لا يزال يشكّل تحدياً وعقبةً تعيق إحراز التّقدم المرجو، كما أنّ تكثير الخلايا يتطلب عمليات معقدة تقنياً وزرعاً مديداً للمفاويات في الزجاج in vitroوبوجود العوامل المحفّزة المناسبة.

شهد العقدان الماضيان تطوير عددٍ من الطرائق لتكثير اللمفاويات التائيّة، واستندت الاستراتيجيات المتّبعة إلى توفير الشارتين الخلويتين الأولى والثانية باستعمال خلايا صنعيّة مقدّمة للمستضد artificial antigenpresentingcells (aAPCs) مثل الحبيبات المغناطيسيّة المكسيّة بأضداد وحيدة النّسيلة موجهة لـــ CD3 وCD28، أو الخلايا المهندسة جينيّاً لتعبّر على سطحها عن لجين ligand نوعيّ بمستقبل الخليّة التّائيّة، وكذلك عن جزيئات محرّضة مشاركة[8-13].

قمنا في هذا البحث باصطناع جزيئات بروتينيّة محرّضة B7-1 مؤشّبة ومهندسة بحيث تكتنف الشدفة المتبلورة Fc للأضداد البشريّة (B7-1•Fcγ1)، واستعمالها لتعزيز تفعيل الخلايا التّائيّة البشريّة وإكثارها خارج الحيّex vivo وفي الحيّin vivo بطريقة مبتكرة غير جينيّة اعتماداً على تقنيّة نقل البروتينات إلى سطح الخلايا التّائيّة (طلاء الخلايا cell painting)، وذلك وفق تكنيك طور من قبل الباحث مارك تيكوسينسكيومكوّنٍ من خطوتين؛ تشتمل الأولى غرز البروتين A المرتبط بذيلٍ من النخلات/البالميتات palmitate في الغشاء الخلوي للخلايا التّائيّة، متبوعة بإضافة البروتين المؤشّب B7-1•Fcγ1 بما يتيح ارتباطه عن طريق الشدفة المتبلورة Fc بالبروتين A المنغرز في الغشاء الخلوي [14-15].

المواد والطرائق:

تمّ الحصول على البروتين *A* المأشوب للعنقوديات المذهّبة *Staphylococcus aureus* وعلى وجه التّحديد للجدار الخلوي لسلالة *Cowan*من شركة سيغما *(Sigma, St. Louis, MO)*. استعملت أضداد وحيدة النّسيلة نوعيّة مقرونة بإحدى المواد الومضانيّة *FITC, PE, APC, CY* للمستضدات الآتية: *CD45, CD3, CD4*. اشتريت الأضداد الأولية والثانويّة من شركةBD Biosciences (San Diego, CA)بما في ذلك الأضداد وحيدة النسيلة الفأريّة الموجهة الخالية من الأزيد النوعيّة للمستضد البشريCD3(OKT3)والأضداد المستعملة في الجريان الخلوي.

اصطناع البروتين المؤشّب وتنقيته [B7-1•Fcγ1[15]]

عبر عن البلاسميد pCDM8/B7Ig المرمّز للنطاق خارج الخلوي الكامل لـــ B7-1 والمرتبط إلى Fcγ1 ضمن الإطار الذي تمّ الحصول عليه من American Type Culture Collection. قصّ التسلسل المرمّز لـــB7-1•Fcγ1 من البلاسميد pCDM8/B7Ig بهضمه بالأنزيم XbaI، وجرى الملء بالشدفة كلينو Klenow، ومن ثمّ أخضع للهضمبالأنزيم HindIII. نسلت الشدفة ضمن الناقل EBV المخصّص للتعبير خارج الصبغي pREP7 (Invitrogen) باستعمال HindIII وملء مواقع BamHI. أعد transfection البلاسميد إلى خلايا الخط الخلوي الكلوي البشري293 (American Type Culture Collection)، وتمّ وانتقيت مستعمرات الخلايا المقاومة للهايغرومايسينب (hygromycin B)، وذلك في وسط UltrCulture الخالي من المصل والمضاف إليه 10 ممول (mM10) من الغلوتامين، والبنسلين / الستريبتومايسين، و200 مكغ هايغرومايسين B. نقي الـــ B7-1·Fcγ1 المفرز في وسط الزرع المكيّف اعتماداً على تقنيّة التفريق اللوني بالألفة وذلك باستعمال آغاروز البروتين A (Life Technologies) وجرى التحقّق من وزنه الجزيئي باستعمال الرحلان الكهربائي على هلامة SDS-PAGE. حفظت الخلايا بالتّجميد في الآزوت السّائل وأعيد زرعها عند الحاجة فيالوسط المغذيDMEM الحاوي على مصل الجنين البقري FBS بنسبة 10% والمضاف إليه الصادان الحيويان بنسلين وستربتومايسين.

عزل الخلايا التّائيّة وتنقيتها T cell purification

عزلت الخلايا البشريّة التائيّة بتقنيّة الانتقاء السلبي؛ وذلك باستعمال عتيدةPan T CellIsolationKit IIمن شركةMiltenyiوأعمدة فصل ملائمة (MS أوLS)؛ إذْ عزلت أولاً الكريات البيض بطريقة الفصد الأبيضleukapheresis من الدّم المحيطي لمتبرعين أصحاء بعد الحصول على موافقتهم المستنيرة، تلا ذلك حضن مجمل الخلايا مع كوكتيل مكوّنٍ من أضداد وحيدة النسيلة monoclonal مقرونة بالبيوتين وموجهة للخلايا اللاتائيّة جميعها (CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/delta, CD235a)، تلا هذه الخطوة حضن المزيج مع حبيبات حديديّة ملبسة بأضداد ثانويّة موجهة ضد البيوتين، وجرى إمرار المزيج ضمن أعمدة MACS، حيث استنفدت الخلايا اللاتائيّة (الخلايا البائيّة، والخلايا القاتلة الطبيعيّةNK، والخلايا التّغصنيّة/ المتغصّنة dendritic، والوحيدات، والمحببات، وكريات الدّم الحمر) باحتجازها في العمود بتطبيق حقلٍ مغناطيسي واستعمالMACS Separator، في حين جمعت الخلايا التائيّة غير الموسومة العابرة للعمود. نقيت جمهرتا الخلايا التّائيّة من النمطين CD4+ وCD8+ باستعمال عتائد العزل الملائمة وبطريقة الانتقاء السّلبي الموصوفة أعلاه. جرى التّحقّق من نقاوة المحضّرات بطريقة الجريان/التّدفق الخلوي واستعمال أضداد موسومة موجهة لـــ CD3و/أوCD45 و/أوCD4.

تحضير البروتين A المرتبط بالنخلات

بعثر بروتين A بتركيز قدره 1.5 مغ/مل وبدرجة حرارة 4 مئويّة في محلول PBS ذي باهاء pH يساوي 7.8 ويحتوي 0.3% حمض ديوكسيكوليك Deoxycholic Acid وبيكاربونات الصوديوم 0.1%، وآزيد الصوديوم 0.1%. أذيب إستر N -هيدروكسي سوكسينات N-hydroxysuccinate ester (شركة سيغما) في الإيتانول بتركيزٍ قدره 10 مغ/مل بدرجة حرارة 50 درجة مئويّة. أضيف 10 مكل من الإستر إلى البروتين A بتركيز نهائي قدره 0.1 مغ/مل وخضع المزيج للهز بدرجة حرارة الغرفة مدّة 19 ساعة. في اليوم التّالي، حمل البروتين A الذي خضع لإضافة ذيل شحمي على عمود30 مل من نوع سيفاديكس G25 (PD-10) (شركة سيغما) لإزالة

الملوحة؛ وذلك بعد غسل العمود بـــ 50 مل من محلول DOC/PBS0.1% في pH يساوي 7.8، وجمعت الأجزاء بصورة مباشرة على النحو الآتي: 4 x1 مل، 17x 0.5 مل، و11x 1مل. قيست تراكيز البروتين A باستعمال معايرة البروتين BCA، وحددت الأجزاء الحاوية على التّراكيز الأعظميّة من البروتين A في الأجزاء F9-F4. جرى تعقيم بفلترة/ترشيح بروتين A المقرون بالنخلات وحفظ بدرجة حرارة 4 درجات مئويّة إلى حين استعماله.

طلاء الخلايا

مزجت الخلايا التّائيّة البشريّة الأوليّة أو خلايا الخط الخلوي Jurkat E6-1 (American TypeCulture Collection)، مع البروتين A المقرون بالنخلات بتراكيز مختلفة راوحت بين 0.05 إلى 30 مكغ لكلّ 106 خلية في وسط الـــ DMEM ؛ وذلك في درجة حرارة 37 درجة مئويّة ومدّة ساعة. في الخطوة التالية، غسلت الخلايا وحضنت مع البروتين المأشوب B7-1•Fcγ1 بتراكيز 0.03إلى 30 مكغ لكلّ 106 خلية في وسط الـــ DMEMوفي درجة حرارة 4 درجة مئويّة ومدّة 30 دقيقة.

الجريان/ التّدفق الخلويFlow Cytometry

أجريت تجارب التّدفق الخلوي أحادي أو ثنائي اللون على جهاز الجريان الخلوي FACScan من شركة بيكتون ديكينسون (Becton Dickinson). وزّعت الخلايا على الأنابيب المخصّصة للجريان الخلوي (2 x 105/الأنبوب)، وغسلت بوقاء PBS مزوّد بـــ 2% FBS + EDTA، وبعثرت الخلايا في 100 مكل من الوقاء، وحضنت مع أضداد وحيدة النسيلة مفلورة أو شدفها (IgG أو IgM أو Fab) مدّة نصف ساعة في الظلام، وأزيل الفائض من الأضداد غير المرتبطة بالغسل بـــ 3 مل من الوقاء. أمرت الخلايا المصونة عبر بوابة الانتثار الأمامي والجانبي forward andside scatter، وجرى تحرّي التعبير عن B7-1•Fcγ1 أو معقّدات التمايز السّطحي CD3 وCD4 وCD45، وذلك بالمقارنة بأضداد شاهدة سلبيّة.

تكثير الخلايا ومقايسة الإنترلوكين-2 في الزجاج

وزّعت الخلايا التّائيّة المطليّة بالبروتين المأشوب B7-1أو الخلايا غير المطليّة بتراكيز قدرها 105 خلية في البئر، وذلك ضمن أطباق ذات 96 بئراً مسطحة القاع غلفت مسبقاً بأضداد فأرية خاليةٍ من الآزيد وموجهة ضد CD3 البشري (OKT3) بتراكيز بلغت 0.3 مكغ/مل. حضنت الخلايا في الوسط الزّرعي DMEM المزوّد بـــ 10% من مصل الجنين البقري FBS وبدرجة حرارة 37 درجة مئويّة. بعد انقضاء 48 ساعة، أضيف ثيميدين موسوم بـــ 3H بتركيز يبلغ 1 ميكرو كوري µCi في البئر، ومن ثمّ حصدت الخلايا بعد 64 ساعة. قمنا بقياس اندخال الـــ 3H-thymidine وتحليله باستعمال العدّادة Betaplate liquid scintillation counter (من شركة WallacOy, Turku, Finland). أمّا خلايا Jurkat التّائيّة البشريّة المطليّة أو غيرالمطليّة بـــB7-1، فوزعت في أطباق زرع مسطحة القعر بوجود PHA كمحرّضٍ على الانقسام، وقيس الإنترلوكين 2 (IL-2) في الوسط الزرعي المكيّف لتقصي تراكيز الـــ IL-2 بعد 24 ساعة، وذلك باستعمال عتيدة ELISA (R&D systems) وتبعاً لتعليمات المصنّع.

اغتراس الخلايا في الحي in-vivo cell engraftment

أجريت تجارب اغتراس الخلايا التّائيّة البشرية المطليّة وغير المطليّة في سلالة الفئران المعوزة مناعيّاً NOD/SCID/B2M-k/o التي تعاني عوزاً مطلقاً في الخلايا التّائيّة والبائيّة والخلايا القاتلة الطبيعيّة NK والوحيدات. حقنت7.5106 x من الخلايا التائيّة عالية النقاوة (< 99%) المطليّة بـــB7:Fcγ1 أو غير المطليّة ضمن الصفاق في الفئران NOD/SCID/B2M-/-، وبعد مضي 27 يوماً، قتلت الفئران وعزل الطحال وكامل الدّم المحيطي. بعد حلّ الكريات الحمر، تمّ وسمت الخلايا بأضداد موسومة

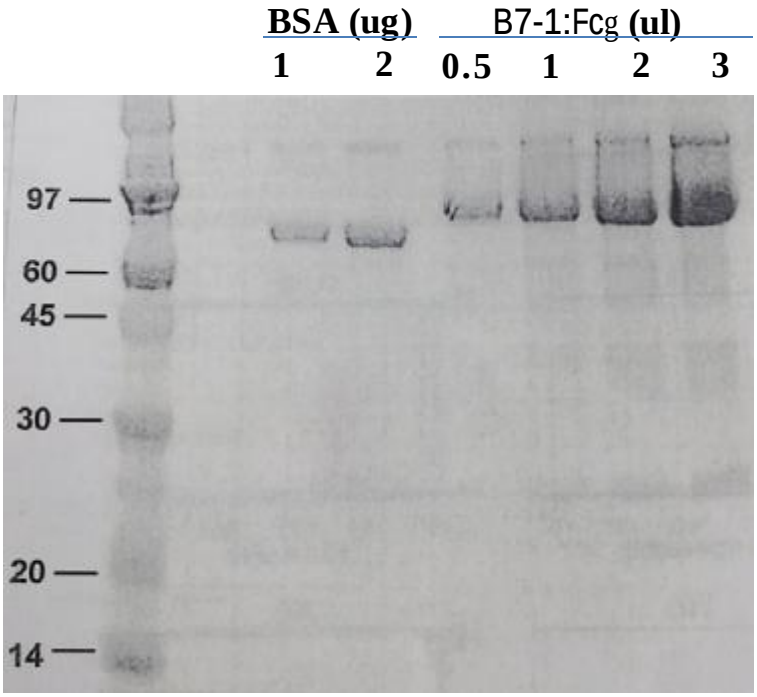
موجهة للمستضدات السّطحيّة البشريّةCD45، وCD3، وCD4، وأخضع مجموع الخلايا لتحليل تفريقي باستعمال التّدفق الخلوي متعدّد الألوان لتقييم الاغتراس.

أجريت هذه الدّراسة بمعظم تجاربها (التّعبير عن البلاسميد وتكاثر الخلايا في الزّجاج والاغتراس في الفئران منعدمة المناعة) في مخابر شعبة المناعة بقسم علم الأمراض والطّب المخبري في كليّة الطّب –في جامعة بنسلفانيا- الولايات المتحّدة الأمريكيّة في العام 2010، وجرى متابعة العمل في مخابر الهيئة العامّة للتقانة الحيويّة في دمشق في العامين 2011 و2012.

النّتائج:

تحضير البروتين المؤشّب وتنقيته B7-1•Fcγ1

حددت نقاوة البروتين المأشوب المنقى B7-1•Fcγ1 ووزنه الجزيئي بصورة تقريبيّة باستعمال الجريان على هلامة الأكريلاميد (SDS-PAGE) بشروط مرجعة وبالتلوين بزرقة كومازي، وذلك بالمقارنة بعياري من مزيج بروتينات بأوزان جزيئيّة معروفة ومع عياري كمّي من ألبومين المصل البقري (BSA). يبيّن الشكل1 موضع عصابة البروتين B7-1•Fcγ1 المنقّى على هلامة الأكريلاميد والوزن الجزيئي الذي يمكن تقديره تقريبيّاً بـــ 80-90 كيلودالتون.

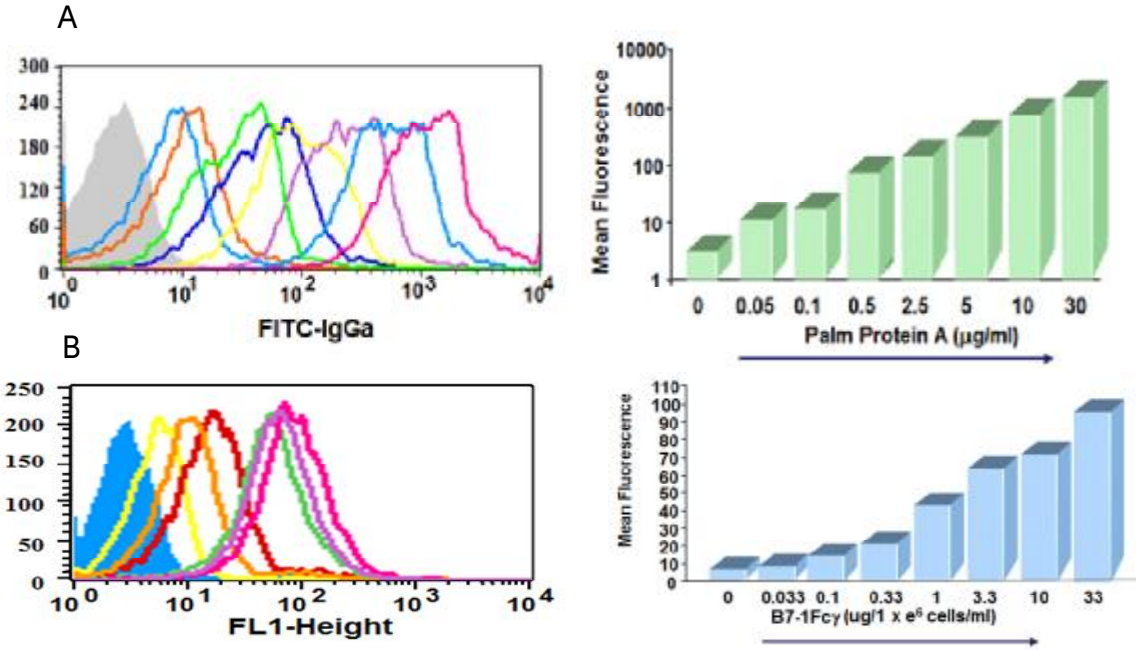


الشّكل 1. تقييم نقاوة البروتين الخيمري المأشوب B7-1:Fcγ ووزنه الجزيئي باستعمال الجريان الكهربائي على هلامة الأكريلاميد (SDS-PAGE) في شروط مرجعة وبالتلوين بزرقة كومازي.

النّقل الكمي للبروتين A المقترن بالنخلات وB7-1•Fcγ1 إلى سطح الخلايا التّائيّة

قمنا أولاً بتحري إمكانية نقل البروتين المأشوب A المقرون بذيلٍ شحمي من النّخلات بصورةٍ كميّة إلى سطح الخلايا التّائيّة؛ وذلك بمزجه مع اللمفاويات التّائيّة بتراكيز متزايدة [0.05 صعوداً إلى 30 مكغ/مليون خليّة/مل]، وتلا ذلك تحديد التّركيز الأقصى القابل للنقل من البروتين A لاستعماله في تقصي نقل البروتين المأشوب B7-1•Fcγ1 وفق كميّات متزايدة [0.003 إلى 30 مكغ/مليون خليّة/مل]. يبيّن الشكل A.2نتائج الجريان الخلوي التي

تثبت تمكننا من نقل البروتين A المقرون بالنخلات بصورة كميّة، إذْ ازداد وسطي الومضان/الفلورة لدى استعمال FITC-IgG1 بصورة لوغاريتميّة مع تزايد التّراكيز المستعملة دون الوصول إلى حدود الإشباع حتّى عند استعمالنا تركيزاً أعظميّاًقدره30 مكغ/مليون خلية/مل. أمكن الحصول على انزياح قابلٍ للكشف باتجاه النّطاق الإيجابي للفلورة بتراكيز زهيدة لم تتجاوز الـــ 0.05 مكغ/مليون خليّة/مل وذلك بالمقارنة بالعينة الشّاهدة (خلايا حضنت مع بروتين A غير مقرون بالنخلات). كما يظهر الشكل2.B تزايد وسطي الفلورة الصادرة عن ضدٍّ جرذيموسوم بـــ FITC وموجّهٍ إلى B7-1 البشري بصورة متناسبة مع نقلٍ متدرّجٍ للبروتين الخيمري المأشوب B7-1•Fcγ1 إلى الخلايا.

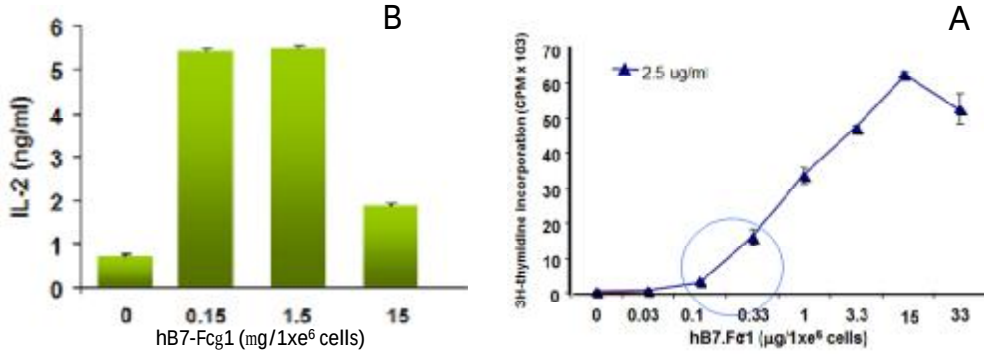


الشّكل 2. نتائج الجريان/التّدفق الخلوي التي تبيّن إمكانيّة النّقل الكمي للبروتين A المقترن بالنخلات/البالميتات (A) والبروتين المأشوب B7-1:Fcγ1 إلى سطح الخلايا التّائيّة(B)

تحسين تفعيل اللمفاويات التّائيّة المطليّة بـــ B7-1•Fcγ1 في الزّجاج

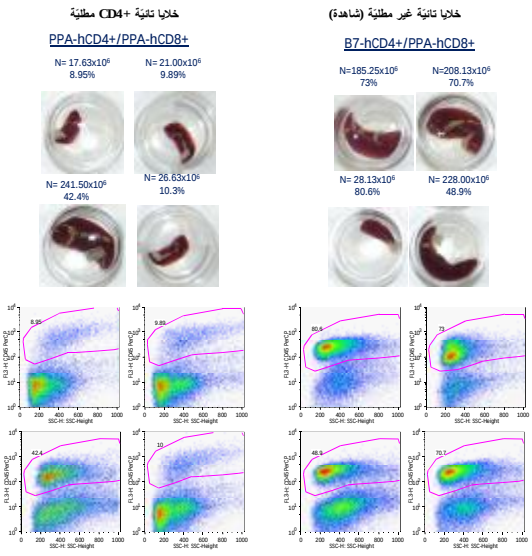
قمنا في المرحلة الثانية من الدّراسة بتقييم الاستجابات الانقسامية للخلايا التّائيّة المطليّة بـــالبروتين A + B7-1 (B7-1•Fcγ1) وذلك بالمقارنة بخلايا تائيّة غير مطليّة. لتحقيق هذا الهدف، حضنت الخلايا في أطباق زرع خلوي تحتوي على كميّات دون مثاليّة suboptimal من الضدّ الموجه نوعيّاً لـــ CD3 والمرتبط بقاع آبار الأطباق بغياب أيّة إضافة لخلايا مساعدة خارجيّة المنشأ. ضمن هذه الظروف، يكون تكاثر الخلايا محكوماً بالتّفعيل المشارك costimulation وذلك وفق آليةٍ معتمدةٍ على anti-CD3. يظهر الشّكل 3 أنّ الخلايا المطليّة بـــ B7-1 البشري قد تكاثرت بفعّالية شديدة بعكس الخلايا غير المطليّة (أو المطليّة بالبروتين A المقترن بالنخلات فحسب) التي أبدت استجابة تكاثريّة أصغريّة تجاه anti-CD3. تثبت هذه النّتائج بأنّ طلاء الخلايا التّائيّة بالعامل المحرّض المشارك

B7-1•Fcγ1 يزيد وبصورة ملحوظة من انقسام الخلايا التائيّة في الشروط دون المثلى من تراكيز شارة التّفعيل الأولى لمستقبل الخلايا التّائيّة TCR التي يوفّرها الضد النّوعي anti-CD3.



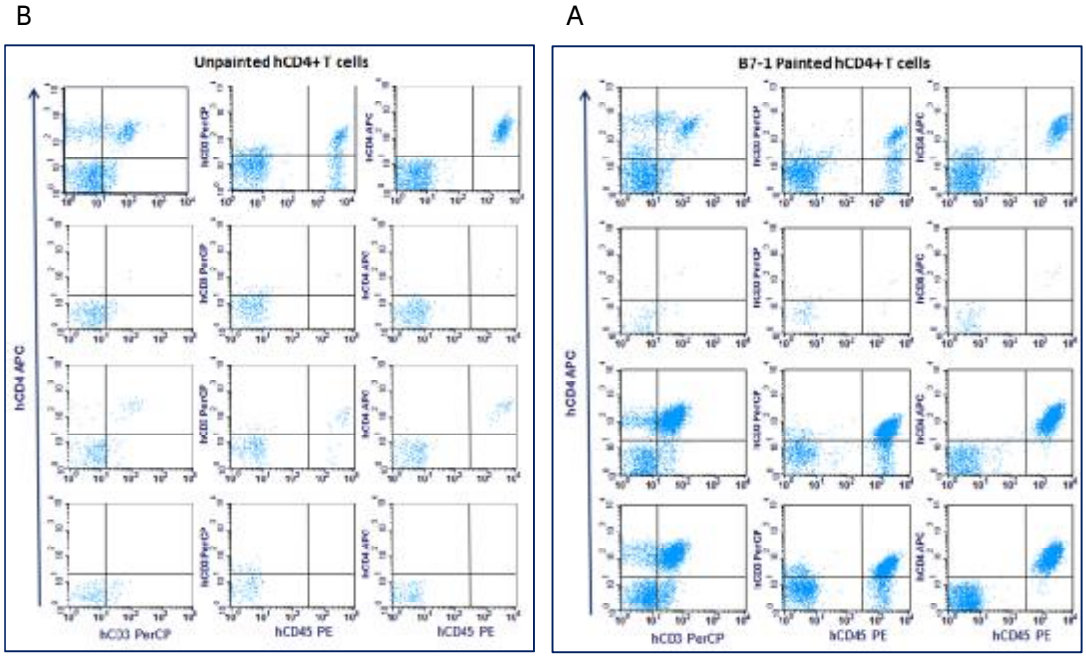
الشّكل 3. تحسّن تكاثر اللمفاويات التّائيّة الأوليّة (A) المطليّة بكميات متزايدة من B7-1:Fcγ1 وتزايد إنتاج الخط الخلوي التّائي Jurkat المطلي للإنترلوكين 2 (B) (IL-2) بالمقارنة باللمفاويات التأئيّة غير المطليّة (الشّاهدة) استجابةً لتركيز دون مثالي قدره 2.5 مكغ/مل من (anti-CD3 OKT3) أو 0.5 مكغ/مل من PHA.

ولنفي إمكانيّة وجود خلايا مقدّمة للمستضد قد تكون ملوّثةً للمحضرات عالية النّقاوة من الخلايا التّائيّة التي قد تسهم في تعزيز تفعيلها وتكاثرها، قمنا باختبار الخطّ الخلوي التائي Jurkat. ونظراً إلى التكاثر التّلقائي لهذا الخطّ الخلوي في شروط الزرع الخلوي، استعضنا عن قياس التكاثر بقراءة محّصلةٍ بديلةٍ للتّفعيل مقيسة بإنتاج وإفراز السيتوكين IL-2. ولهذا الغرض، وزّعت الخلايا Jurkat المطليّة بـــالبروتين A وB7-Fcγ1 أو غير المطليّة (الشّاهد) في آبارٍ لأطباق الزّرع الخلوي الحاوية على كميّات متزايدة من PHA كمحرّضٍ على الانقسام الفتيلي.



الشّكل 4. تحسّن اغتراس اللمفاويات التّائيّة البشريّة المطليّة بـــ B7-1:Fcγ1 في طحال الفئران منعدمة المناعة NOD/SCID/B2Mk/o.

جمعت الأوساط الزرعيّة بعد 24 ساعة وقيمت مستويات IL-2 باستعمال طريقة الـــ ELISA. تظهر نتائج مقايسة IL-2وبوضوح أنّ خلايا Jurkat قد أفرزت كميّاتٍ أكبر من IL-2 بالمقارنة بالخلايا غير المطليّة استجابةً لتحريضها/تفعيلها بتراكيز دون المثاليّة من PHA. تثبت هذه النتائج المستقاة من الخط الخلوي Jurkat التأثير المحرّض للجزيئات البروتينيّة المطليّة والمشاهدة باستعمال الخلايا التّائيّة المنقّاة.



الشّكل 5. نتائج الجريان الخلوي التي تبيّن تحسّن اغتراس اللمفاويات التّائيّة البشريّة +CD4 المطليّة بـــ B7-1:Fc□1 (A) وغير المطليّة (B) في الدّم المحيطي لفئران منعدمة المناعة NOD/SCID/B2Mk/o.

اغتراس الخلايا التّائيّة +CD4 في الحي in-vivo cell engraftment

لدى حقن الفئران منعدمة المناعة [NOD/SCID/B2Mk/o] بمزيج من اللمفاويات التّائيّة من النمطين +CD4 (المطليّة أو غير المطليّة) و+CD8(غير المطليّة)، وتقصّي اغتراس الخلايا التّائيّة في ذراعي التّجربة بعد 27 يوماً، تبيّن أنّ نسبة الاغتراس في الفئران التي تلقت التّائيّات المطليّة بـــ B7-1•Fcγ1 قد راوحت بين 75-100%مقابل نسبةٍ لم تتجاوز الـــ 25% في مجموعة الفئران التي تلقت عدداً مساوياً من الخلايا غير المطليّة. بلغ الوسطي الحسابي لعدد اللمفاويات التّائيّة البشريّة الكليّة المطليّة بـــ B7-1•Fcγ1 المغترسة في طحال الفئران منعدمة المناعة 162.4 ± 91.2 x 106 (وسطي حسابي ± انحراف معياري) خليّة/الطحال وبنسبة مئويّة قدرها 68.3% مقابل 76.7 ±106x109.9 (وسطي حسابي ± انحراف معياري) لمفاوية غير مطليّة/الطحال في مجموعة الفئران التي تلقت خلايا غير مطليّة، وبنسبةٍ مئويّة لم تتجاوز الـــ 17.9%. يبيّن الشكل (A.4) حجوم الطحالات المستأصلة من 8 فئران في إحدى التّجارب الممثّلة التي أجريت في إطار هذه الدّراسة. كما تثبت نتائج التّدفق الخلوي المبيّنة في (الشّكلB4) وبوضوح قدرة الخلايا المطليّة بالجزيئات

المحرّضة على التّكاثر وضمن الحي in vivo، وتبرهن على أفضليتها في القدرة على إعادة تشكيل جمهرات كبيرة العدد من الخلايا التّائيّة البشريّة في نموذج حيواني فأريٍّ مضعف/منعدم المناعة.

وبهدف تقصينا لتأثير طلاء الخلايا التّائيّة المنقاة من النّمط CD4+ في اغتراسها في النموذج الفأري المدروس، طليت هذه الخلايا بـــ 30 مكغ/مليون خليّة من البروتين المأشوب B7:Fcγ. تظهر نتائج التّدفق الخلوي حدوث اغتراسٍ أفضليٍّ للمفاويات البشريّة التائيّة من النّمط CD4+المطليّة بـــ B7-1•Fcγ1 بالمقارنة باللمفاويات CD4+hغير المطليّة، إذْ أظهرت نسبةُ وسطيّة قدرها75% من الفئران التي تلقت عدداً ثابتاً قدره 7.5106 x من الخلايا البشريّة التائيّة المطليّة بجزيئة الـــ B7:Fcγ اغتراساً جليّاً مقدّراً بالخلايا إيجابيّة عناقيد التمايز البشري CD45، CD4،CD3 وذلك في الأعضاء والأنّسجة جميعها (مثل الدّم المحيطي والطحال ونقي العظام) التي خضعت للتقصي (الشّكل A5)، مقابل نسبة لم تتجاوز الـــ 25% من الفئران التي تلقت عدداً مساوياً مناللمفاويات لا تحمل على سطحها البروتين B7:Fcγ1 (الشّكلB5). تجدر الإشارة إلى أنّه لم يبدِ أيّ من الفئران ما يشير إلى تطوّر داء الطعم ضد المضيف graft versus host disease (GVHD).

Libya

المناقشة:

ينظر إلى الخلايا المقدمّة للمستضد بوصفها الخلايا المفتاحيّة في تفعيل اللمفاويات التّائيّة بنمطيها المساعدة CD4+ والقاتلة CD8+، وذلك من خلال تقديمها ليس للمستضد فحسب بل وللجزيئات المحرّضة المشاركة co-stimulatory molecules، التي يتصدّرها البروتين B7 بنمطيه؛ B7-1 (CD80) وB7-2 (CD86) [1-6]. يرتبط B7 بمستقبله CD28 الذي يوجد بشكل مثنوي جنيس على سطح الخلايا التّائيّة، ويعدُّ هذا التآثر بين اللجين B7 والمستقبِل CD28 شرطاً لازماً لتفعيل اللمفاويات التّائيّة وانخراطها في الانقسام وتصنيع السيتوكينات (مثل الـــ IL-2 الذي تنتجه الخلايا التّائيّة المساعدة T helper) [2].

غير أنّ التّعبير عن B7 لا يقتصر على الخلايا الاحترافية المقدّمة للمستضد بل يتعداه إلى الخلايا التّائيّة ذاتها دون أن يعرف إن كانت الجزيئة B7 قادرة على تفعيل التّائيات المجاورة (activationparacrine) أو حتى تفعيل ذاتها (autocrine-activation) عن طريق ارتباطها وتآثرها مع المستقبلات الموافقة على سطوح هذه الخلايا ذاتها أو سطوح الخلايا المجاورة [16-21].

يمكن تلخيص محصلات هذه الدّراسة في سياق إجابتها عن هذا السؤال البحثي في نقاط ثلاث: 1) تبدي الخلايا التّائيّة البشريّة المعزولة من الدّم المحيطي قدراتٍ تكاثريّة تفوق بصورة كبيرة نظيراتها غير المعدّلة/المطليّة، وذلك استجابةً للعوامل المحرّضة على الانقسام في الزجاج، 2) يمكن لطلاء الخلايا بالمحفّزات المشاركة أن يعزّز استجابات وظيفيّة أخرى للخلايا التّائيّة من قبيل تضخيم إنتاجها من الـــ IL-2، وهو ما أثبتناه من خلال طلاء الخط الخلوي للخلايا التّائيّة البشرية المعروف بـــ Jurkat، 3) تبدي الخلايا التّائيّة المطليّة قدرة فائقةً على الاغتراس في الحي وتمّت البرهنة على ذلك باستعمال النموذج الفأري عديم المناعة NOD/SCID/B2M k/o.

يمكن للمحرضات المشاركة التي تظهر على سطوح الخلايا التّائيّة أن تكون نتيجة التّعبير ذاتي المصدر (أي من الخلايا التّائيّة ذاتها) [16-28]، أو أن تكون مكتسبةً من خلايا أخرى [29-30]. إذ أمكن الكشف عن كلٍّ من B7-1 وB7-2 على الخلايا التّائيّة الجائلة في دوران المرضى المخموجين بـــ [HIV[23]]. كما دعمت دراسةٌ أخرى هذه النتائج إذ أثبتت وجود مستويات مرتفعة من B7-1 على سطوح الخلايا التّائيّة من النمطين CD4+ وCD8+ في

مرضى مصابين بـــ HIV وأنّ هذه الخلايا التّائيّة التي تعبّر عن co-stimulators قادرةٌ على المشاركة في تفعيل انقسام خلايا تائيّة مستجيبة منقّاة من أفراد أصحاء وتكاثرها، وذلك وفق تآثر من النمط [trans[25]]. كما تبدي اللمفاويات (بما في ذلك التّائيات) المعزولة من الدّم المحيطي لمرضى الذئبة مستويات أعلى من [B7-1[22]].

بالتوازي مع هذه الدّراسات، بيّنت البحوث التي أجريت في نماذج حيوانيّة لفئران نموذج المناعة الذّاتيّة B6/gld وB6/lpr أنّ الخلايا التّائيّة المعزولة من الطحال تعبّر عن مستويات عالية من B7-1، في حين كانت الخلايا التّائيّة المعزولة من فئران B6 طبيعيّة سلبيّة [B7-1[27-28]].

والجدير بالملاحظة أنّ ظهور الخلايا التّائيّة إيجابيّة B7-1 في هذه الفئران كان مرتبطاً بالعمر، وربما كان وراء تكاثر اللمفاويات وتظاهرات المناعة الذّاتيّة لديهم [27-28].

كان الاعتقاد السّائد حتّى تاريخه بأنّ بروتينات المحرّضات المشاركة الراسية على سطوح اللمفاويات التّائيّة، سواء في الحالات المرضيّة أم الطبيعيّة، تقوم بتفعيل خلايا تائيّة أخرى بآلية *trans*، ولكن نتائجنا الحاليّة تستدعي تحري هل كان التعبير القسري عن محرّضات مشاركة على سطح الخلايا التّائيّة يقدّم تفسيراً مغايراً يقوم على التّفعيل الذّاتي وفق آلية *cis*؟

هناك عددٌ من الأمثلة على آلية تفعيل ذاتي للخلايا التّائيّة بين أزواجٍ من المستقبلات واللجائن التي يعبّر عنها على سطح الخلايا ذاتها. إذ لاحقاً لبدء تفعيل الخلايا التّائيّة، يتزايد التّعبير عن المستقبل التثبيطي Fas (CD95) أولاً وتليه زيادة في التعبير عن لجين الـــ Fas (CD95L) على سطوح الخلايا التّائيّة. اقترح بعض الباحثين أنّ هذا التّعبير المتواقت والقرب المكاني للمستقبل ولجينه سيؤدي إلى آلية خلويّة انتحاريّة نتيجة التآثر بين Fas وFasL على سطح الخليّة ذاته [29-30]. غير أنّ الدّليل على هذا "الانتحار" الخلوي محدود بالتعبير عن البروتينات داخليّة المنشأ ومثبتٌ بتحليل نتائج تجارب التمديد المقيّد ولكنّه يفتقر للدعم من تجارب يجري فيها التعبير قسريّاً عن أزواج المستقبل: اللجين. كما تشمل الأمثلة الأخرى كلاً من CD58 (LFA-3) ومستقبله CD2اللذين يعبّر عنهما معاً بصورة طبيعيّة[31]، وكذلك ICAM-1 ومستقبله[LFA-1[32]].

لا تقتصر الحاجة لجزيئات التفعيل المشاركة molecules co-stimulatory على المرحلة المبكرة من تفعيل الخلايا التّائيّة، وإنّما تمتدّ أيضاً إلى المرحلة التالية أي مرحلة الاستدامة واللازمة للمحافظة على الفعّالية العلاجيّة للخلايا التّائيّة. وفي هذا السياق، يؤدي الإنترلوكين دوراً محوريّاً وهذا ما استدعى إعطاء IL-2 جهازيّاً للمرضى الذين يتلقون الخلايا التّائيّة العلاجيّة، على الرّغم من سميّته وفوائده العلاجيّة المحدودة.

تدلّ نتائجنا، وعلى الأخص تحسّن الاستجابة التّكاثريّة لخلايا تائيّة مطليّة بالبروتين الملتحم للمفعّل المشارك B7-1 والمنقولة إلى فئران معوزة مناعيّاً، على إمكانيّة توليد خلايا تائيّة علاجيّة قادرةٍ على تفعيل ذاتها. كما تقدّم تقنيّة طلاء الخلايا بالبروتينات وسيلةً ملائمةً للوصول إلى نقل كميّاتٍ محدّدةٍ من المفعلات المشاركة إلى سطوح هذه الخلايا. كما أنّ التناقص المتوقّع في كميّات المفعّلات المشاركة المطليّة على سطح الخلايا نتيجة لانقسامها قد يحمل إيجابيّة في السياق السّريري إذْ يكون الفعل قصير الأمد مطلوباً ومفضّلاً (على سبيل المثال التّخلّص من الخلايا الورميّة المتبقيّة).

ومن هنا تنبثق الحاجة لدراسات مستقبليّة لتحرّي الإمكانيات العلاجيّة للخلايا المناعيّة المطليّة بجزيئات بروتينيّة مفعّلة والإفادة منها في المعالجة المناعيّة المستهدفة للسرطانات أو لدى مرضى أعواز المناعة الخلقيّة أو المكتسبة.

شكر وعرفان ACKNOWLEDGMENTS

الشّكر الجزيل للأستاذ الدّكتور مارك تيكوسينسكي في جامعة بنسلفانيا (حاليّاً كليّة الطّب في جامعة توماس جيفرسون) لاستضافتي في مخابر شعبة المناعة بقسم علم الأمراض والطّب المخبري في كليّة الطّب -جامعة بنسلفانيا، ولكلّ الدّعم المادّي والمعنوي الذي قدّمه لإنجاح هذا البحث. كما أتقدّم بوافر الشكر للأستاذ الدّكتور كارل جون وفريقه البحثي لما قدّموه من مساعدةٍ تقنيّة في التّجارب التي أجريت على النموذج الفأري منعدم المناعة NOD/SCID/B2MKk/o.

References

1. Ledbetter JA, Imboden JB, Schieven GL, Grosmaire LS, Rabinovitch PS, Lindsten T, Thompson CB, June CH.CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways.Blood. 1990;75(7):1531-1539.
2. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA.Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation.J Exp Med. 1991;173(3):721-30.
3. Linsley PS, Ledbetter JA., The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen, Annu Rev Immunol 11 (1993) 191-212.
4. Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1.ProcNatlAcadSci U S A. 1990;87(13):5031-5.
5. Freedman AS, Freeman GJ, Rhynhart K, Nadler LM., Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway, Cell Immunol 137 (1991) 429-437.
6. Larsen CP, Ritchie SC, Pearson TC, Linsley PS, Lowry RP. Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. J Exp Med. 1992;176 (4):1215-20.
7. Gattinoni L, Powell DJ Jr, Rosenberg SA, Restifo NP: Adoptiveimmunotherapy for cancer: building on success. Nat Rev Immunol 2006,6:383-393.
8. Latouche JB, Sadelain M: Induction of human cytotoxic T lymphocytes byartificial antigen-presenting cells. Nat Biotechnol 2000, 18:405-409.
9. Maus MV, Thomas AK, Leonard DG, Allman D, Addya K, Schlienger K,Riley JL, June CH: Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specificcytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the Tcellreceptor, CD28 and 4-1BB. Nat Biotechnol 2002; 20:143-148.
10. Oelke M, Maus MV, Didiano D, June CH, Mackensen A, Schneck JP: Ex vivoinduction and expansion of antigen-specific cytotoxic T cells by HLA-Igcoatedartificial antigen-presenting cells. Nat Med 2003; 9:619-624.
11. Thomas AK, Maus MV, Shalaby WS, June CH, Riley JL: A cell-based artificialantigen-presenting cell coated with anti-CD3 and CD28 antibodiesenables rapid expansion and long-term growth of CD4 T lymphocytes.ClinImmunol 2002; 105:259-272.
12. Hirano N, Butler MO, Xia Z, Berezovskaya A, Murray AP, Ansen S, Nadler LM:Efficient presentation of naturally processed HLA class I peptides byartificial antigen-presenting cells for the generation of effectiveantitumor responses. Clin Cancer Res 2006; 12:2967-2975.
13. Suhoski MM, Golovina TN, Aqui NA, Tai VC, Varela-Rohena A, Milone MC,Carroll RG, Riley JL, June CH: Engineering artificial antigen-presenting cellsto express a diverse array of co-stimulatory molecules. MolTher 2007;15:981-988.
14. Chen A, Zheng G, Tykocinski ML, Hierarchical costimulator thresholds for distinct immune responses: application of a novel two-step Fc fusion protein transfer method, J Immunol2000;164:705-711.
15. Zheng G, Chen A, Sterner RE, Zhang PJ, Pan T, Kiyatkin N, Tykocinski ML, Induction of antitumor immunity via intratumoral tetra-costimulator protein transfer, Cancer Res 2001; 61: 8127-8134.
16. Azuma M, Yssel H, Phillips JH, Spits H, Lanier LL, Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes, J Exp Med 1993; 177: 845-850.
17. Sansom DM, Hall ND, B7/BB1, the ligand for CD28, is expressed on repeatedly activated human T cells in vitro, Eur J Immunol1993; 23:295-298.
18. Wyss-Coray T, Mauri-Hellweg D, Baumann K, Bettens F, Grunow R, Pichler WJ, The B7 adhesion molecule is expressed on activated human T cells: functional involvement in T-T cell interactions, Eur J Immunol 1993; 23:2175-2180.

19. Hakamada-Taguchi R, Kato T, Ushijima H, Murakami M, Uede T, Nariuchi H, Expression and co-stimulatory function of B7-2 on murine CD4+ T cells, Eur J Immunol 1998; 28:865-873.
20. Prabhu Das MR, Zamvil SS, Borriello F, Weiner HL, Sharpe AH, Kuchroo VK, Reciprocal expression of co-stimulatory molecules, B7-1 and B7-2, on murine T cells following activation, Eur J Immunol 25 (1995) 207-211.
21. Jeannin P, Herbault N, Delneste Y, Magistrelli G, Lecoanet-Henchoz S, Caron G, Aubry JP, Bonnefoy JY, Human effector memory T cells express CD86: a functional role in naive T cell priming, J Immunol 1999; 162:2044-2048.
22. Abe K, Takasaki Y, Ushiyama C, Asakawa J, Fukazawa T, Seki M, Hirashima M, Ogaki M, Hashimoto H, Expression of CD80 and CD86 on peripheral blood T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus, J ClinImmunol 1999; 19:58-66.
23. Köchli C, Wendland T, Frutig K, Grunow R, Merlin S, Pichler WJ, CD80 and CD86 costimulatory molecules on circulating T cells of HIV infected individuals, ImmunolLett 1999; 65:197-201.
24. Imagawa A, Hanafusa T, Itoh N, Miyagawa J, Nakajima H, Namba M, Kuwajima M, Tamura S, Kawata S, Matsuzawa Y, Harlan DM, Islet-infiltrating t lymphocytes in insulin-dependent diabetic patients express CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2), J Autoimmun 1996; 9:391-396.
25. Wolthers KC, Otto SA, Lens SM, Kolbach DN, van Lier RA, Miedema F, Meyaard L, Increased expression of CD80, CD86 and CD70 on T cells from HIV- infected individuals upon activation in vitro: regulation by CD4+ T cells, Eur J Immunol 1996; 26:1700-1706.
26. Takasaki Y, Abe K, Tokano Y, Hashimoto H, The expression of LFA-1, ICAM-1, CD80 and CD86 molecules in lupus patients: implication for immunotherapy, Intern Med 1999; 38:175-177.
27. Weintraub JP, Eisenberg RA, Cohen PL, Up-regulation of Fas and the costimulatory molecules B7-1 and B7-2 on peripheral lymphocytes in autoimmune B6/gld mice, J Immunol 1997; 159:4117-4126.
28. Weintraub JP, Cohen PL, Ectopic expression of B7-1 (CD80) on T lymphocytes in autoimmune lpr and gld mice, ClinImmunol 1999; 91:302-309.
29. Russell JH, Activation-induced death of mature T cells in the regulation of immune responses, CurrOpinImmunol 1995; 7:382-388.
30. Lenardo MJ, Boehme S, Chen L, Combadiere B, Fisher G, Freedman M, McFarland H, Pelfrey C, Zheng L, Autocrine feedback death and the regulation of mature T lymphocyte antigen responses, Int Rev Immunol 1995; 13:115-134.
31. Davis SJ, Ikemizu S, Wild MK, van der Merwe PA, CD2 and the nature of protein interactions mediating cell-cell recognition, Immunol Rev 1998; 163:217-236.
32. Wingren AG, Parra E, Varga M, Kalland T, Sjögren HO, Hedlund G, Dohlsten M, T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles, Crit Rev Immunol 1995; 15:235-253.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2012/5/2.
تاريخ قبوله للنشر 2012/8/16.