

Araştırma makalesi / Research article

Epstein-Barr virüs enfeksiyonu olan hastalardan alınan, IL-2 ile üretilen T hücrelerinin kontrollele karşılaştırılması

IL-2 propagated T cells of patients with Epstein-Barr virus infection as compared to controls

Şafak Ceren Uçak¹, Mustafa Torun²

¹İstanbul Şişli Meslek Yüksek Okulu, İstanbul, Türkiye

²Özel Medigün Hastanesi, Manisa, Türkiye

ÖZ

Amaç: Epstein-Barr virüs (EBV) ile enfekte hastalarından alınmış ve IL-2 ile üretilmiş lenfositler ile sağlıklı vericilerden alınan lenfositler arasındaki farkların araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: EBV ile enfekte hastalardan gelen kan örnekleri alındı. Öncelikle EBV hastaları PCR ile belirledi daha sonra lenfositlerin fenotiplendirilmesi akım sitometrisi ile yapıldı.

Bulgular: T lenfositlerin TCRA/b, Granzyme B, CD2, CD86 ve CD3 ekspresyon ettikleri fakat CD56, CD25 ve TRAIL ekspresyon etmedikleri görülmüştür. Özellikle EBV PCR pozitif T lenfositlerde CD16 ve CD95-L ekspresyon edilmezken, sağlıklı vericilerden alınan T lenfositlerde CD16 ve CD 95-L (CD178) ekspresyonunun fazla olduğu, CD80 ekspresyonunun ise olmadığı görülmüştür.

Sonuç: EBV enfeksiyonu sonucu T hücre reseptörlerinde farklılaşmalar olmaktadır. Bu moleküler düzeydeki değişimlerin saptanması, ileriye dönük araştırma ve tedavi geliştirmeleri için faydalı olabilir.

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

ABSTRACT

Aim: We asked whether IL-2 propagated lymphocytes from patients with Epstein-Barr virus (EBV) disease are different from IL-2 propagated cells of healthy donors and our study comes through helping about vaccine produce that use for cell therapy.

Material and Method: We took blood samples from patients in polyclinic or clinic. First we determined patient with EBV disease by PCR and then we phenotyped of lymphocytes by Flow cytometry.

Results : 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.

Conclusion: As a result of infections such as EBV, CMV, there are differences in T cell receptors.

Keywords: Epstein-Barr virus (EBV), CD marker, T cell

Sorumlu Yazar: Şafak Ceren Uçak, İstanbul Şişli Meslek Yüksek Okulu, İstanbul, Türkiye

E-posta: safakceren.ucak@sisli.edu.tr

Geliş Tarihi: 08.01.2019 **Kabul tarihi:** 22.03.2019 **Makale ID:** 510413

Cite this article as: Uçak ŞC, Torun M. Epstein-Barr virüs enfeksiyonu olan hastalardan alınan, IL-2 ile üretilen T hücrelerinin kontrollele karşılaştırılması. Anadolu Güncel Tıp Derg 2019; 1(2): 26-32.

GİRİŞ

Epstein-Barr virüs (EBV), Burkitt tarafından 1958 yılında tanımlanmıştır. EBV, Herpesviridae ailesinin alt familyasına ait olan lenfokriptovirüstür. Yüksek dozda immün sistemi baskılayıcı terapi ya da fonksiyonel eksiklik, oksidatif stres ya da transplant, EBV gibi virüslerin aktivasyonunu sağlayabilir. Akut enfeksiyon ile enfeksiyöz mononükleoz, aktivasyonu ile lenfoproliferatif hastalıklara (posttransplant lenfoproliferatif hastalık gibi) ve hemofagositik lenfositozise sebep olabilir (1).

T lenfositler omurgalı immün sisteminde bulunan beyaz kan hücreleridir. Lenfositler, vücut savunmasında önemli ve tamamlayıcı rol oynarlar (2). T lenfositler, hücrel immün sistemin ana hücreleridir. Bu hücreler, fetusta karaciğer, dalak gibi organlarda bulunan pluripotent hematopoetik ana hücrelerden oluşmaktadır. Embriyonik hayatta ana hücrelerden kaynaklanan büyük lenfoblastik hücreler, timusa doğru hareket ederler. Timusta matürasyona uğrayan lenfositler, periferik kana ve lenfoid sisteme katılırlar (3). Bu çalışmada EBV ile enfekte hastalarından alınmış ve IL-2 ile üretilmiş lenfositler ile sağlıklı vericilerden alınan lenfositler arasındaki farkların araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

Kullanılan materyal Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Monoklonal antijenler

CD Antijenler	Florokrom	Kaynak	Klon
1. CD16	FITC	Caltag Laboratories	3G8
2. CD 80	FITC	Immunotech	2331 (FUN-1)
3. CD 95-L (CD178)	FITC	Anhücre	Alf-2.1a
4. CD 56	PE	Becton Dickinson	NCAM 16.2
5. CD 2	PE	Beckman Coulter	39C1.5
6. TRAIL	PE	eBioscience	RIK-2
7. TCR α/β	FITC	BD Biosciences	WT31
8. Gyanzyme B	PE/FITC	PeliCluster/Alexis	CLB-GB11/B18.1.
9. CD86	FITC	BD Biosciences	92014
10. CD3	FITC	Dako	UCHT1
11. CD25	FITC/PE	Becton Dickinson	2A3
Sitokin antijenler			
Antijen	Florokrom	Kaynak	
1. IL-2	FITC	Caltag Laboratories	



Şekil 1. Yaş-cinsiyet tablosu

Kan örnekleri

Kan örnekleri Almanya Ulm Üniversitesi’nde izlenen hastalardan alındı. Hasta kanları numaralandırılarak çalışmaya alınmıştır. Örnekler için kurum onayı alınmıştır.

Sağlıklı vericiler; #8287, #9078, #9077 EBV hastaları; #9076, #8926, #6428 olarak kodlandı. Yaş ve cinsiyete göre; #8287 kadın, 52; #9078 kadın, 40; #9077 erkek, 25; #9076 erkek, 61; #8926 erkek, 63; #6428 kadın, 74 olarak belirlendi (Şekil 1).

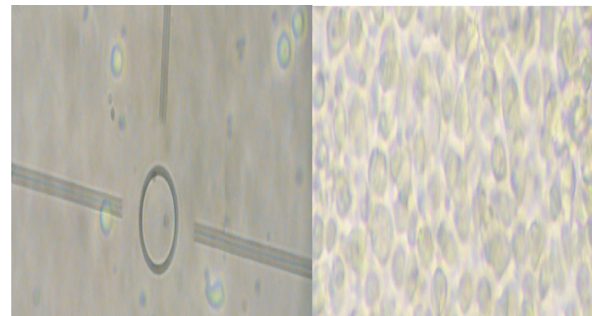
Yöntem

1. T hücre kültüründe üretim

İnsan periferik kan mononükleer hücreleri Ficoll-density gradient ile elde edilir ve santrifuj edilir. Hücreler RPMI 1640 medium içinde kültür edilir ve 10% FCS ile 103 IU/ml of rhIL-2 ilave edilir. 7 gün kültürde bırakılır.

2.1. Akım Sitometrisi (FACS)

Akım sitometrisi ya da FACS hücreleri büyüklüklerine, yüzey özelliklerine ve yapısal bileşenlerine göre tanımlar. Hücreler antikor kullanılarak işaretlenir ve bunlar hücrel yapıya bağlanırlar. Bu antikor her iki florasanla da boyanmıştır. Bununla beraber hücreler ölü hücrelerle de işaretlenebilir. Akım sitometrisinde hücreler tabakadan geçerler ve lazer tarafından tespit edilir. Işığın kırılımı sonucu hücreler büyüklüklüğü, floresanı ve granületisine göre belirlenir.



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

Tablo 2. T lenfosit

FITC	PE
Mause Ig2G2a	Mause IgG1
CD16	CD56
CD80	CD2
CD86	CD25
Perforin	Granzyme B
CD95-L	TRAIL
TCR α/β	CD3

2.1. Hücre Yüzey Antijenlerinin Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi

Hücreler PBS ile yıkanır ve 850 rpm de 5 dk. santrifuj edilir. Supernatant alındıktan sonra 20 μ l normal rabbit serum (NRS) eklenir. Her tüpe 20 μ l hücre süspansiyonu ve 5 μ l florokrom konjugat reagent eklenir (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 μ l hücrefix ile fikse edilir ve 4 °C de saklanır.

2.2. 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 inkübasyon

na 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) eklenir. Her tüpe 20 μ l hücre süspansiyonu ve 5 μ l florokrom konjugat reagent eklenir (Tablo 1). 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 fikse edilir ve 4 °C de saklanır.

2.3. Etik Durum

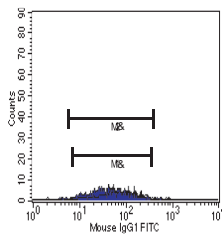
Kurum izni alınmıştır.

BULGULAR

Öncelikle EBV hastaları PCR ile belirlendi, daha sonra lenfositlerin fenotiplendirilmesi akım sitometrisi ile yapıldı. EBV PCR pozitif T lenfositlerde CD16 ve CD95-L eksprese edilmezken (Şekil 1), diğer yandan sağlıklı vericilerden alınan T lenfositlerde CD16 ve CD 95-L (CD178) ekspresyonunun fazla olduğu, CD80 ekspresyonunun ise olmadığı görülmüştür (Şekil 3).

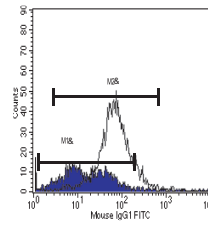
EBV PCR – hücre kültürlerinde CD25, CD56 ve TRAIL ekspresyonu yoktur, EBV PCR + lerde ise CD16 ve CD95L ekspresyonu yoktur. Diğer yandan sağlıklı donörlerden alınan T lenfositler CD16 ve CD95L eksprese ederken CD80 eksprese etmezler.

Kontrol (EBV PCR -)

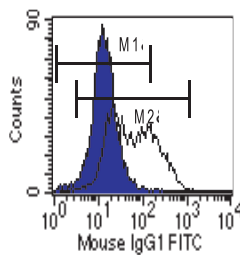


CD80- 9078 IL-2 hücre line (d+7) EBV PCR -

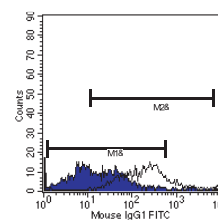
EBV hastası (EBV PCR +)



CD80+ 6428 IL-2 hücre line EBV PCR +



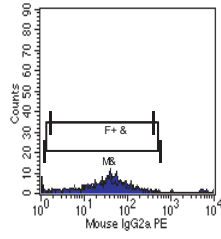
CD86+ (düşük) 9078 IL-2 hücre line (d+7) EBV PCR -



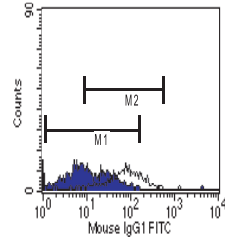
CD86+ 6428 IL-2 hücre line EBV PCR +

Şekil 3. İşaretlenmiş T hücrelerinin flow sitometrik analizi. Bu şemada IL-2 de üretilmiş T hücrelerinin sağlıklı donörlerle karşılaştırılması yapılmıştır.

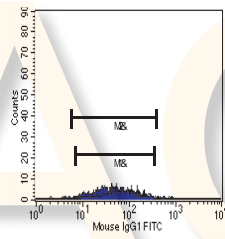
Kontrol (EBV PCR -)



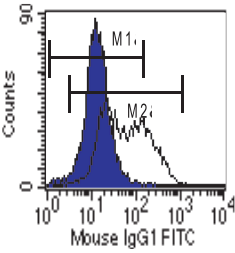
TRAIL- 8287 IL-2 hücre line (d+7)
(d+7) EBV PCR -



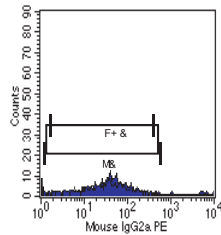
TCR α/β + 8287 IL-2 hücre line (d+7)
hücre line (d+7)



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

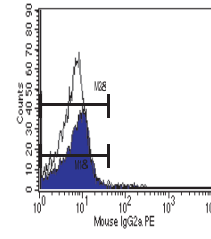


CD86+ (düşük) 9078 IL-2 hücre line (d+7)
(d+7) EBV PCR -

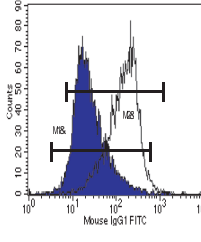


TRAIL- 8287 IL-2 hücre line (d+7)
(d+7) EBV PCR -

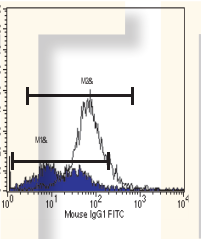
EBV hastası (EBV PCR +)



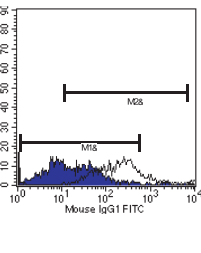
TRAIL- 9076 IL-2 hücre line
EBV PCR +



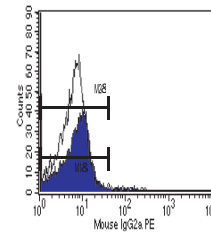
TCR α/β + 8926 IL-2
EBV PCR - EBV PCR +



CD80+ 6428 IL-2 hücre line
EBV PCR +



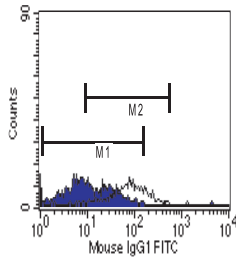
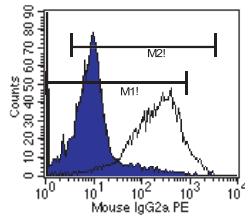
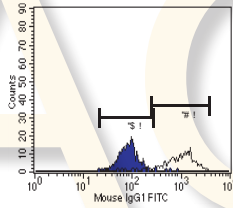
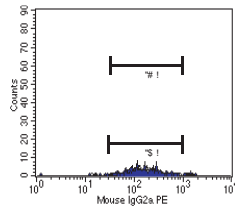
CD86+ 6428 IL-2 hücre line
EBV PCR +



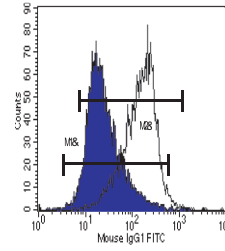
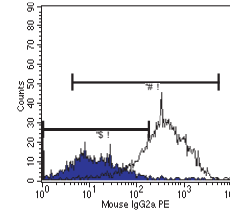
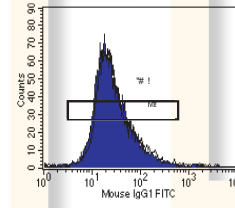
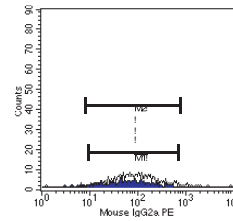
TRAIL- 9076 IL-2 hücre line
EBV PCR +

Şekil 3. (devamı)

Kontrol (EBV PCR -)

TCR α/β + 8287 IL-2 hücre line (d+7)
hücre line (d+7)CD2+ 9078 IL-2 hücre line (d+7)
(d+7) EBV PCR -CD 95-L + 8287 IL-2 hücre line (d+7)
(d+7) EBV PCR -CD56- 8287 IL-2 hücre line (d+7)
(d+7) EBV PCR -

EBV hastası (EBV PCR +)

TCR α/β + 8926 IL-2
EBV PCR - EBV PCR +CD2+ 6428 IL-2 hücre line
EBV PCR +CD 95-L - 8926 IL-2 hücre line
EBV PCR +CD56- 9076 IL-2 hücre line
EBV PCR +

Şekil 3. (devamı)

TARTIŞMA

Çalışmamızın ana bulgusu, T lenfositlerin TCRA/b, Granzyme B, CD2, CD86 ve CD3 ekspresye ettikleri fakat CD56, CD25 ve TRAIL ekspresye etmedikleri görülmüştür. Özellikle EBV PCR pozitif T lenfositlerde CD16 ve CD95L ekspresye edilmezken, sağlıklı vericilerden alınan T lenfositlerde CD16 ve CD 95L (CD178) ekspresyonunun fazla olduğu, CD80 ekspresyonunun ise olmadığı görülmüştür.

Literatüre bakıldığında EBV ile genetik değişimler içerisinde CD95 önemli araştırma alanı bulmuştur. Özellikle primer EBV enfeksiyonunun erken evrelerinde virüse karşı spesifik CD8 sitotoksik T hücrelerinde dramatik oligoklonal artış dikkati çekmektedir (4,5). T hücrelerinde iki temel moleküler mekanizma dikkati çekmektedir. Bunlar perforin temelli ve Fas temelli mekanizmalardır (6). CD95 geni (FAS) NF-kB, STAT-1 ve/veya p53 genlerince kodlanmaktadır. CD95'in konağın immun yanıtında temel rolü oynadığı uzun vadede B hücre üzerinde hücre ölümünü engelleyerek lenforproliferatif hastalıklara neden olduğu düşünülmektedir (7). Yapılan bir çalışmada CD80 ve CD86 kostimulatörlerinin EBV tarafından indüklendiği, Fas/FasL yolağıyla EBV'nin transforme ettiği lenfoblastoid hücrelerin apoptozuna neden olduğu gösterilmiştir (8). Bu moleküler yolların incelenmesi ileri araştırma ve tedaviler için yol gösterici olabilir.

Çalışmamızın kısıtlı yanları bulunmaktadır. Öncelikle örneklem sayımız düşüktür. Bu konuda daha geniş kapsamlı, büyük örneklemler, invitro ve in vivo çalışmaların yapılmasının katkısının büyük olacağını düşünüyoruz.

SONUÇ

EBV enfeksiyonu sonucu T hücre reseptörlerinde farklılaşmalar olmaktadır. Bu moleküler düzeydeki değişimlerin saptanması, ileriye dönük araştırma ve tedavi geliştirmeleri için faydalı olabilir.

MADDİ DESTEK VE ÇIKAR İLİŞKİSİ

Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların herhangi bir çıkar dayalı ilişkisi yoktur.

KAYNAKLAR

1. Kieff E, Dambaugh TH. The biology and chemistry of Epstein Barr virus. *J Infect Dis* 1982; 146: 506- 17.
2. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunol* 2005; 6: 1023-32.
3. Imashuku S, Hibi S, Ohara T, et al. Effective control of Epstein-Barr virus-related hemophagocytic

lymphohistiocytosis with immunochemotherapy. *Blood* 1999; 93: 1869-74.

4. Callan MF. The evolution of antigen-specific CD8_ T cell responses after natural primary infection of humans with Epstein-Barr virus. *Viral Immunol* 2003; 16: 3-16.
5. Callan MF, Steven N, Krausa P, et al. Large clonal expansions of CD8 T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat Med* 1996; 2: 906-11.
6. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994; 265: 528-30.
7. Le Clorennec C, Youlyouz-Marfak I, Adriaenssens E, Coll J, Bornkamm GW, Feuillard G. EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kB, STAT1, and p53. *Blood* 2006; 107: 2070-8.
8. Park GB, Kim YS, Lee HK, Cho DH, Kim D, Hur DY. CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) induce EBV-transformed B cell apoptosis through the Fas/FasL pathway. *Int J Oncol* 2013; 43: 1531-40.