

**Προσυνεδριακή Ημερίδα
«Η Κυτταρομετρία στην Ανοσολογία»,
Δελφοί, Παρασκευή 27 Μαΐου 2016**

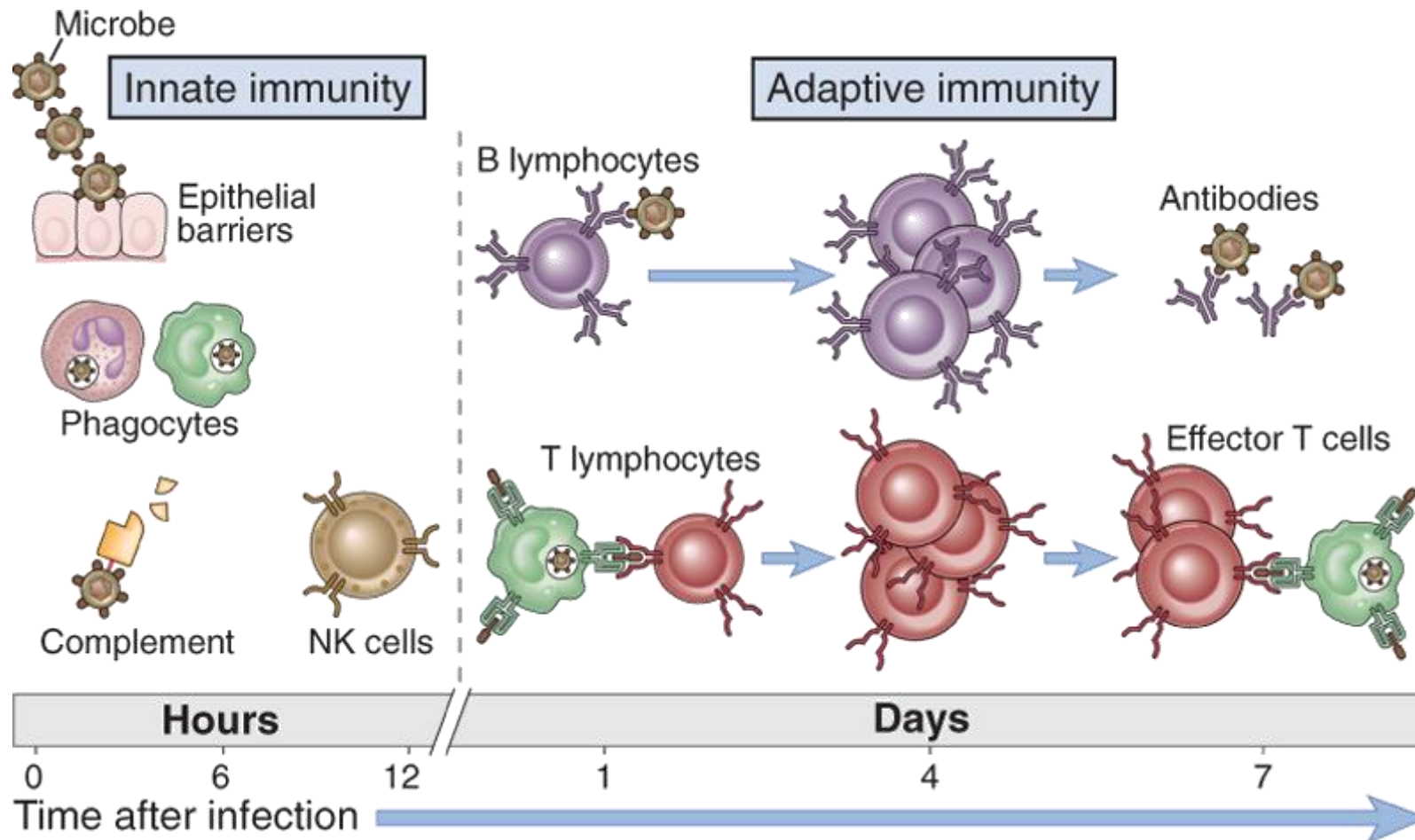
ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Μ. Βικεντίου,

Χημικός, PhD, MSc «Κλινική Βιοχημεία – Μοριακή
Διαγνωστική»

Κυτταροτοξικότητα:

Βαθμός στον οποίο ένας παράγοντας εμφανίζει καταστροφική δράση σε συγκεκριμένα κύτταρα (the degree to which an agent has specific destructive action on certain cells)



Κυτταρο-μεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα

- Σημασία Κυτταροτοξικότητας
 - Εξουδετέρωση ενδοκυττάρων παθογόνων
 - Εξουδετέρωση Καρκινικών κυττάρων
- Συμμετοχή Ag-ειδικών και Μη-ειδικών δραστικών κυττάρων
 - Ag-ειδικά: CD8+ Κυτταροτοξικά κύτταρα (CTLs)
 - Μη ειδικά: ΜΦ, Ουδετερόφιλα, NK και NKT κύτταρα
- Απαιτείται παρουσία κυτταροκινών
- Συνεργασία χυμικής και κυτταρο-μεσολαβούμενης ανοσίας

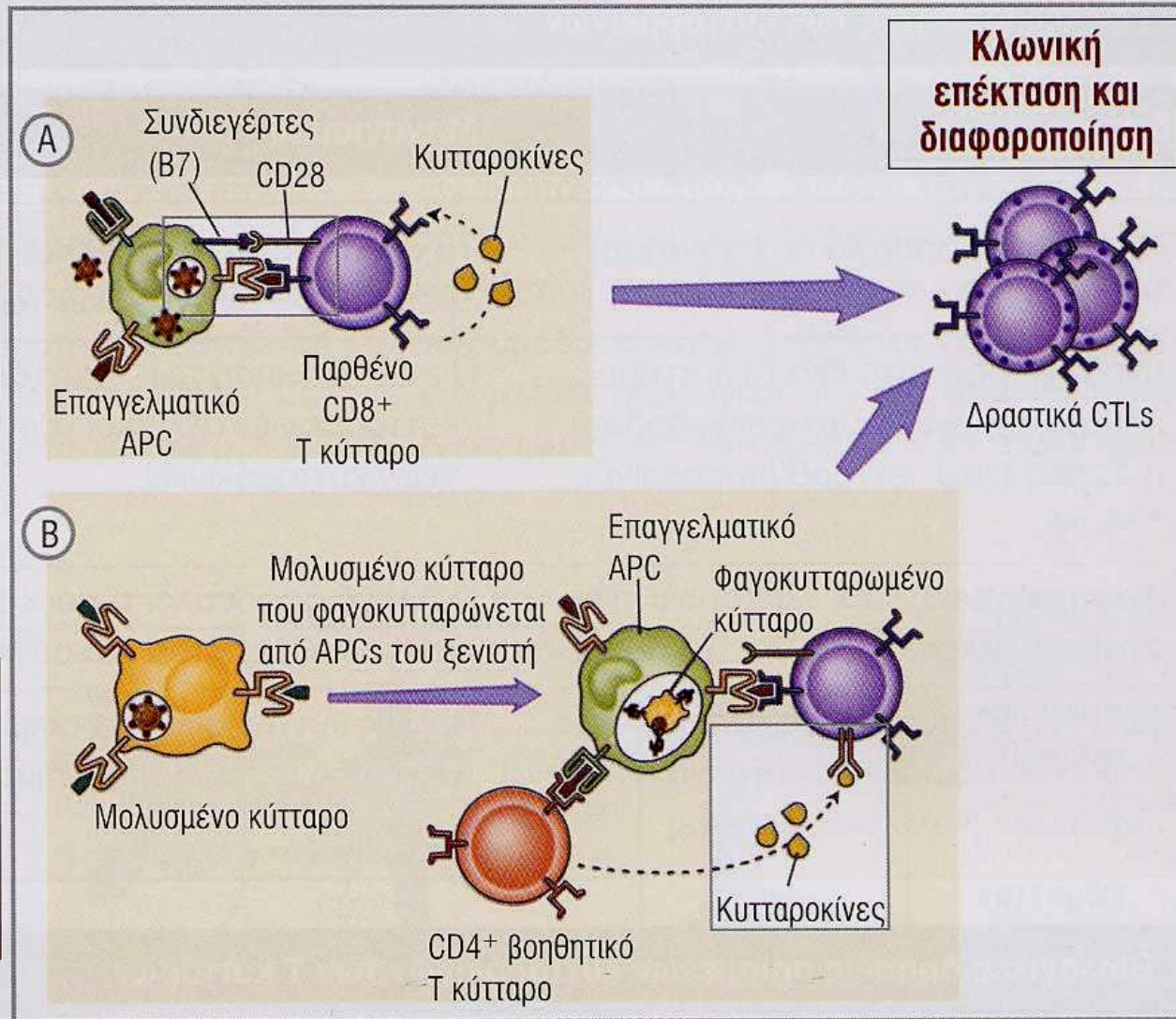
Κυτταροτοξικά Τ κύτταρα (CTLs) I

- Τα CTLs αναγνωρίζουν κύτταρα
 - Μολυσμένα από ιούς
 - Καρκινικά κύτταρα
- Ενεργοποίηση CTL με 2 τρόπους
 - Ενεργοποίηση και διαφοροποίηση παρθένου CTL
Απαιτούνται 3 σήματα για την ενεργοποίηση
 - Ag -ειδικό σήμα διαμέσου TCR/MHC I+Ag
 - Συν-διεγερτικό σήμα CD28(CTL)/B7 (APC)
 - Σηματοδότηση μέσω IL-2 προάγει πολλαπλασιασμό
 - IL-2 παρέχεται από την T_{H1} απόκριση ή από το παρθένο CTL
 - IL-2R εκφράζεται μόνο μετά την ενεργοποίηση

Ενεργοποίηση CTLs με 2 τρόπους

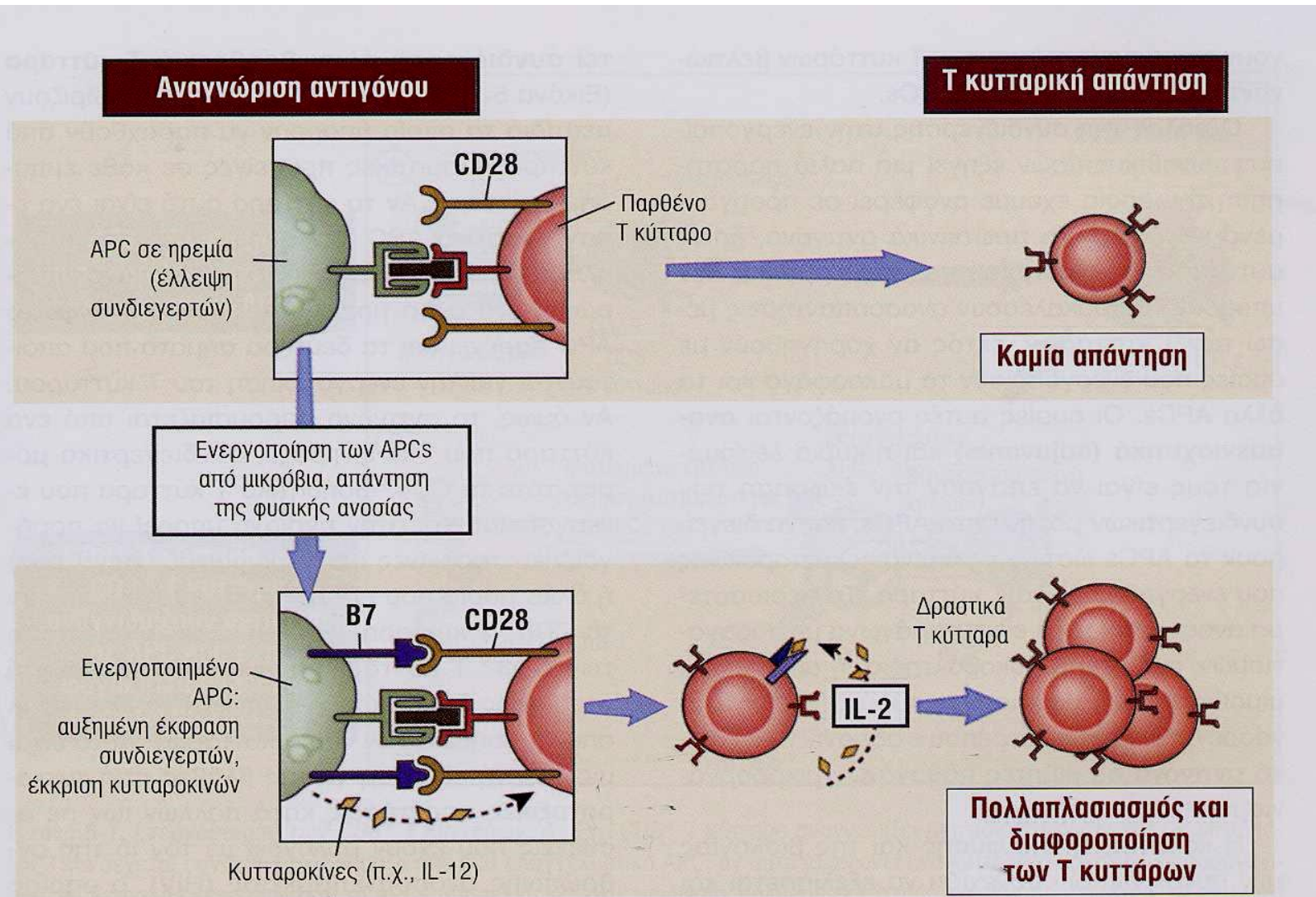
CD8⁺ T κύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνο σε μολυσμένα APCs

CD8⁺ T κύτταρα και CD4⁺ T κύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνο σε APC που έχει φαγοκυτταρώσει ένα μολυσμένο κύτταρο



Κυτταροτοξικά Τ κύτταρα II

Απαιτούνται 3 σήματα για την ενεργοποίηση



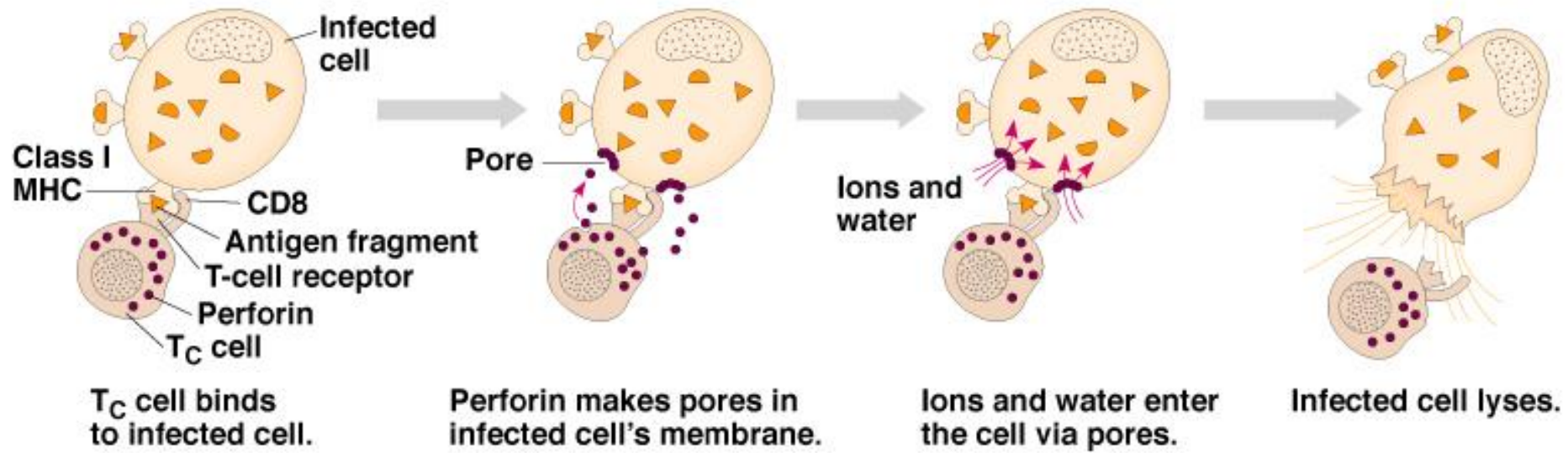
1. Ag -ειδικό σήμα διαμέσου TCR/MHC I+Ag
2. Συν-διεγερτικό σήμα CD28(CTL)/B7 (APC)
3. Σηματοδότηση μέσω IL-2 προάγει πολλαπλασιασμό
 - IL-2 παρέχεται από την T_{H1} απόκριση ή από το παρθένο CTL
 - IL-2R εκφράζεται μόνο μετά την ενεργοποίηση

Κυτταροτοξικά Τ κύτταρα (CTLs) III

- Αναγνωρίζουν τα αντιγόνα επιφανείας από όλα τα κύτταρα:
 - Σκοτώνουν τα κύτταρα-ξενιστές που μολύνονται από ιούς ή βακτήρια
 - Αναγνωρίζουν και σκοτώνουν καρκινικά κύτταρα
 - Αναγνωρίζουν και καταστρέφουν αλλογενή ιστικά μοσχεύματα
- 2 Μηχανισμοί Κυτταροτοξικότητας των CTLs...

Κυτταροτοξικότητα μέσω ενζύμων

Τα κοκκία του CTL απελευθερώνουν την πρωτεΐνης περφορίνη που πολυμερίζεται δημιουργώντας πόρους στο κύτταρο-στόχο από τους οποίους εισέρχονται πρωτεάσες σερίνης (θρυμματίνες-granzymes) προκαλώντας κυτταρικό θάνατο μέσω μηχανισμού απόπτωσης εντός μερικών ωρών (παρουσία Ca^{2+} και ενέργειας)



(a)

Κυτταροτοξικότητα μέσω FasL II

FasL - CTLs

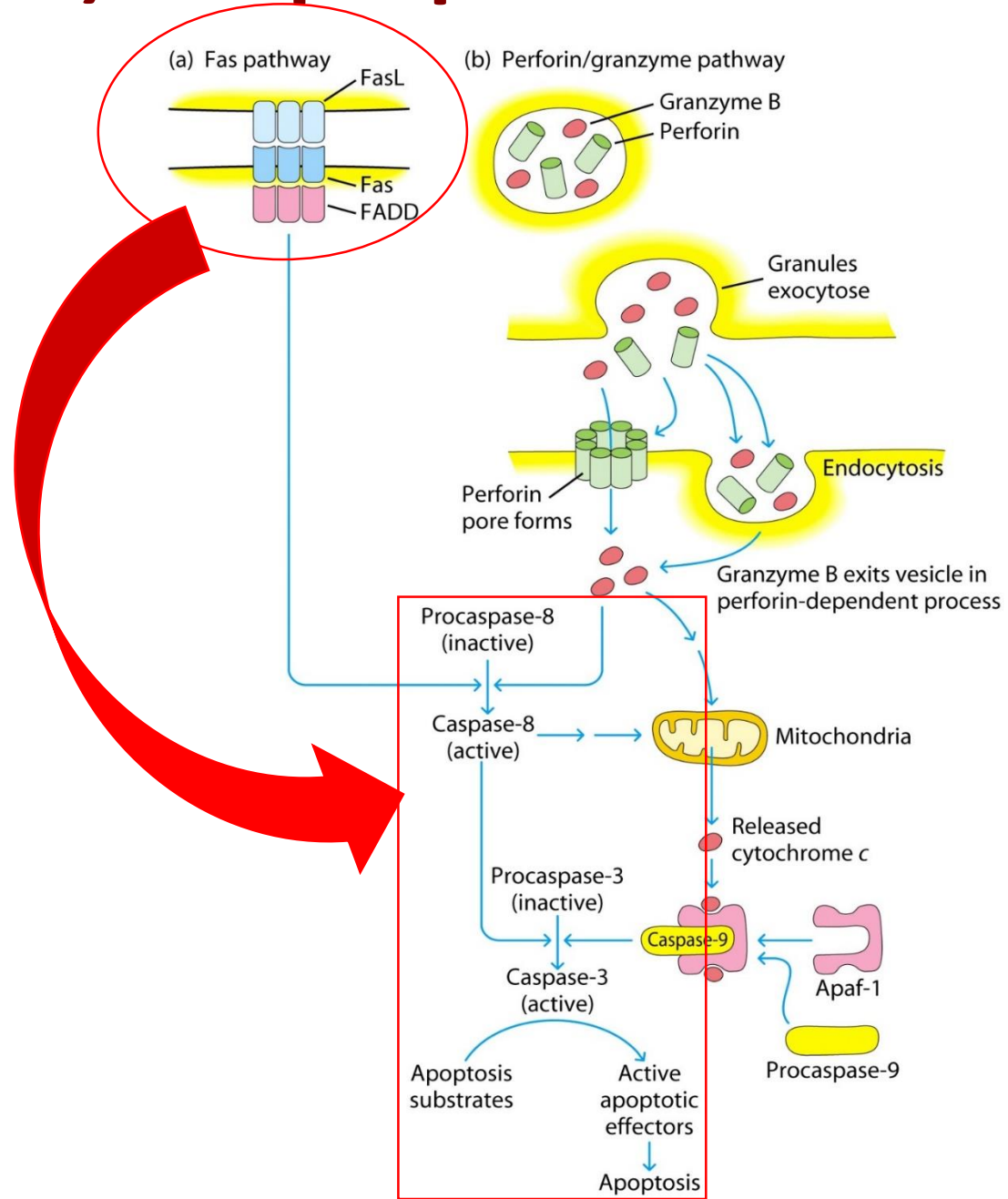
Fas - κύτταρα-στόχους

FasL-Fas* αλληλεπίδραση προάγει τον μηχανισμό της απόπτωσης

Ενεργοποίηση FADD οδηγεί στην ενεργοποίηση της προ-κασπάσης

Ενεργοποίηση οικογένειας κασπασών κατά τη διάρκεια της απόπτωσης

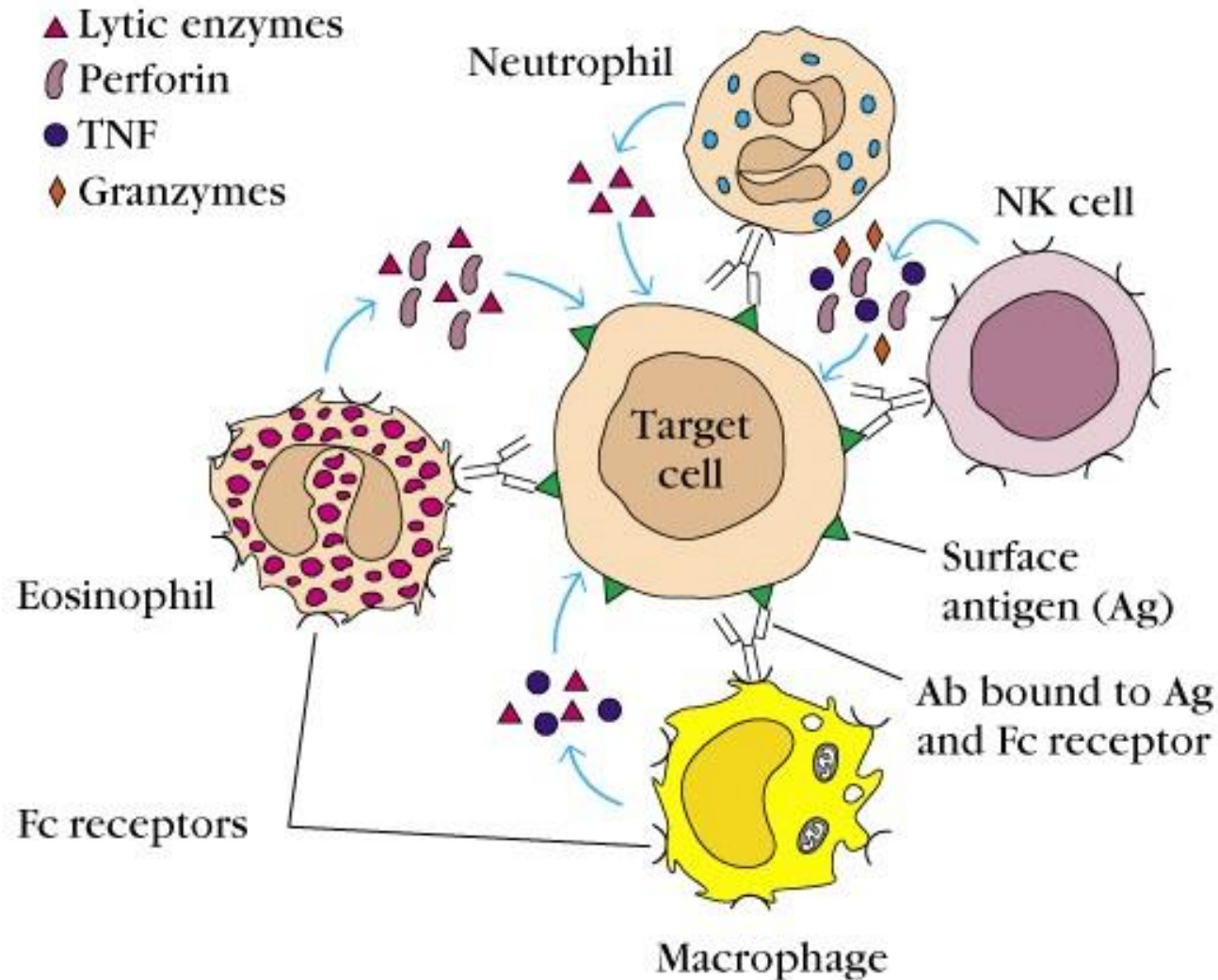
* στην ΚΡ: Fas=CD95 και FasL=CD178



Κυτταροτοξικότητα που εξαρτάται από αντισώματα (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC*)

- Τα κύτταρα-στόχοι καλύπτονται με αντισώματα, με τμήμα Fc στην εξωτερική επιφάνεια να στρέφεται προς τα έξω
- Κύτταρα Φυσικοί Φονείς (Natural killer, NK) και άλλα μη ειδικά κύτταρα που έχουν υποδοχείς για την περιοχή Fc διεγείρονται και σκοτώνουν τα κύτταρα-στόχους (ΜΦ, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα)
- Προκαλείται λύση του στόχου από ουσίες που εκκρίνονται από τα δραστικά κύτταρα
 - Περφορίνη και granzyme (NK και ηωσινόφιλα)
 - TNF (ΜΦ, NK)
 - Λυτικά ένζυμα (ΜΦ, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, NK)

Κυτταροτοξικότητα που εξαρτάται από αντισώματα (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC) II

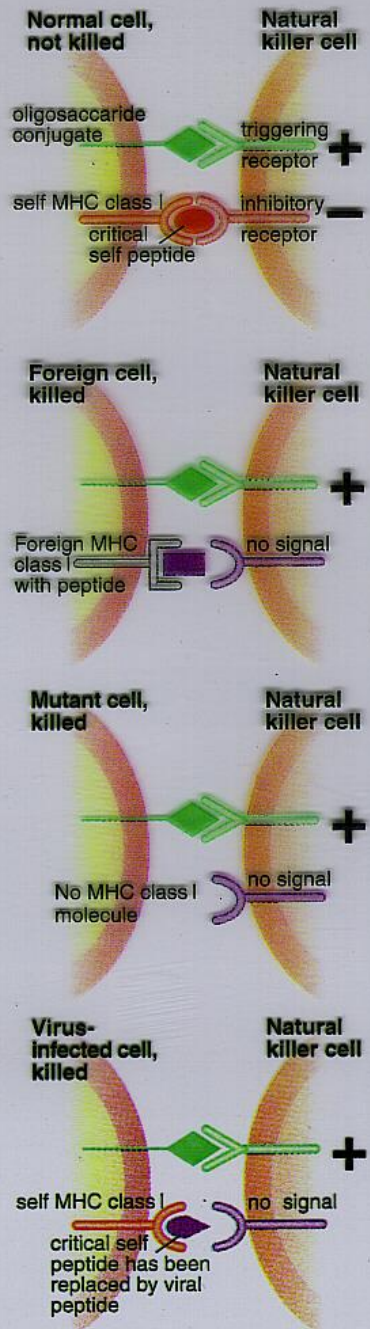


Χαρακτηριστικά ADCC

- στόχοι καλυμμένοι από ειδική IgG
- αναγνώριση από πολλά κύτταρα
- απελευθέρωση λυτικών ενζύμων + +

Κύτταρα Φυσικοί Φονείς (NK)

- Τα NK κύτταρα αναγνωρίζουν καρκινικά κύτταρα και μολυσμένα κύτταρα από ιούς **χωρίς τη μεσολάβηση των μορίων MHC**
- Διαθέτουν υποδοχείς που επάγουν (*Killer Activating Receptors*) ή παρεμποδίζουν την ανάπτυξη κυτταροτοξικής δράσης (*Killer Inhibitory Receptors*)
- Η κυτταροτοξική δράση τους εκδηλώνεται μέσω του μονοπατιού έκκρισης περφορίνης και granzymes, Fas-FasL, καθώς και TNFα
- Αναγνωρίζουν κύτταρα στόχους που έχουν επικαλυφθεί με αντισώματα (IgG), μέσω του υποδοχέα για το Fc τμήμα (*ADCC*)



Υποδοχείς NK κυττάρων

Υποδοχείς Ενεργοποίησης:

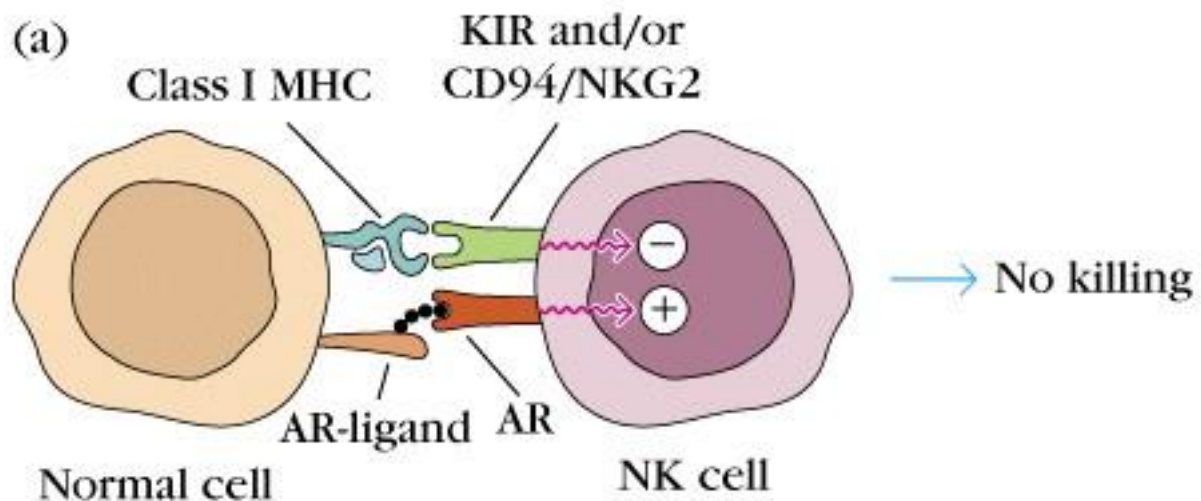
- π.χ. NKG2D, CD94/NKG2C (C-type lectins) και CD2, CD16, CD244, NKp30, NKp44, NKp46
- αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες MIC-A και MIC-B που παράγονται μετά από κυτταρικό «stress» λόγω λοίμωξης, υψηλής θερμοκρασίας ή τραύματος

Υποδοχείς Αναστολής:

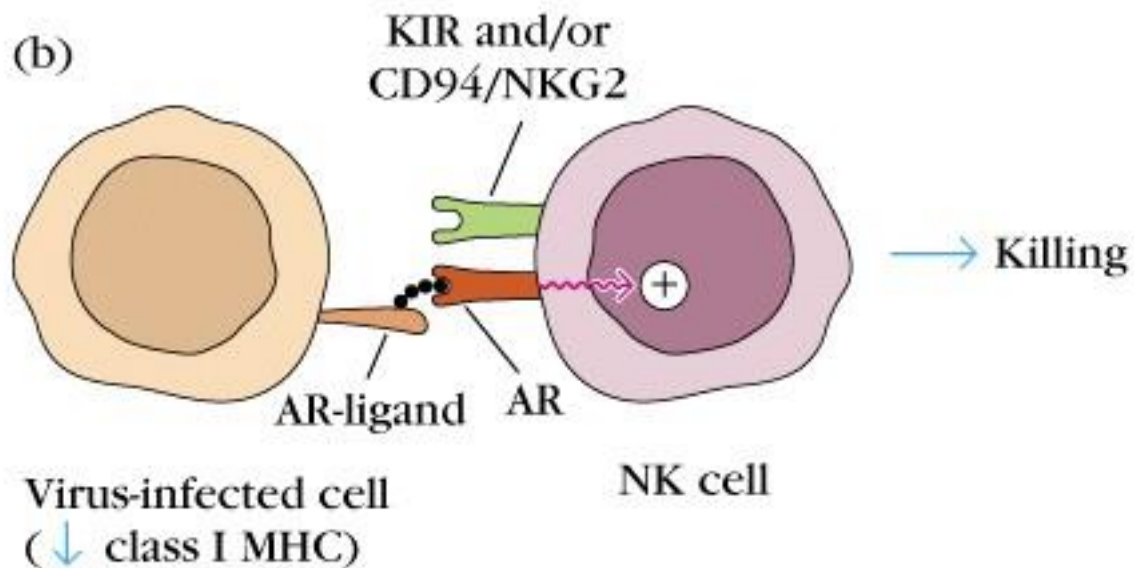
- C-type-lectin-inhibitory receptors (CLIR)
 - π.χ. CD94/NKG2A στους ανθρώπους (αναγνωρίζει HLA-E με πεπτίδια HLA)
- Killer-cell Ig-like receptors (KIR)
 - (> 50 μόρια, ειδικά για ένα ή περιορισμένο αριθμό πολυμορφικών παραγώγων ειδικού τύπου HLA)

Τα NK χρησιμοποιούν τους υποδοχείς KIR και lectin-like receptor για αναγνώριση Ag

NK κυτταροτοξικότητα



Τα NK κύτταρα μέσω των KIR υποδοχέων αναγνωρίζουν τα μόρια του MHC I που εκφράζουν τα φυσιολογικά κύτταρα και δεν εκδηλώνουν κυτταροτοξική δράση

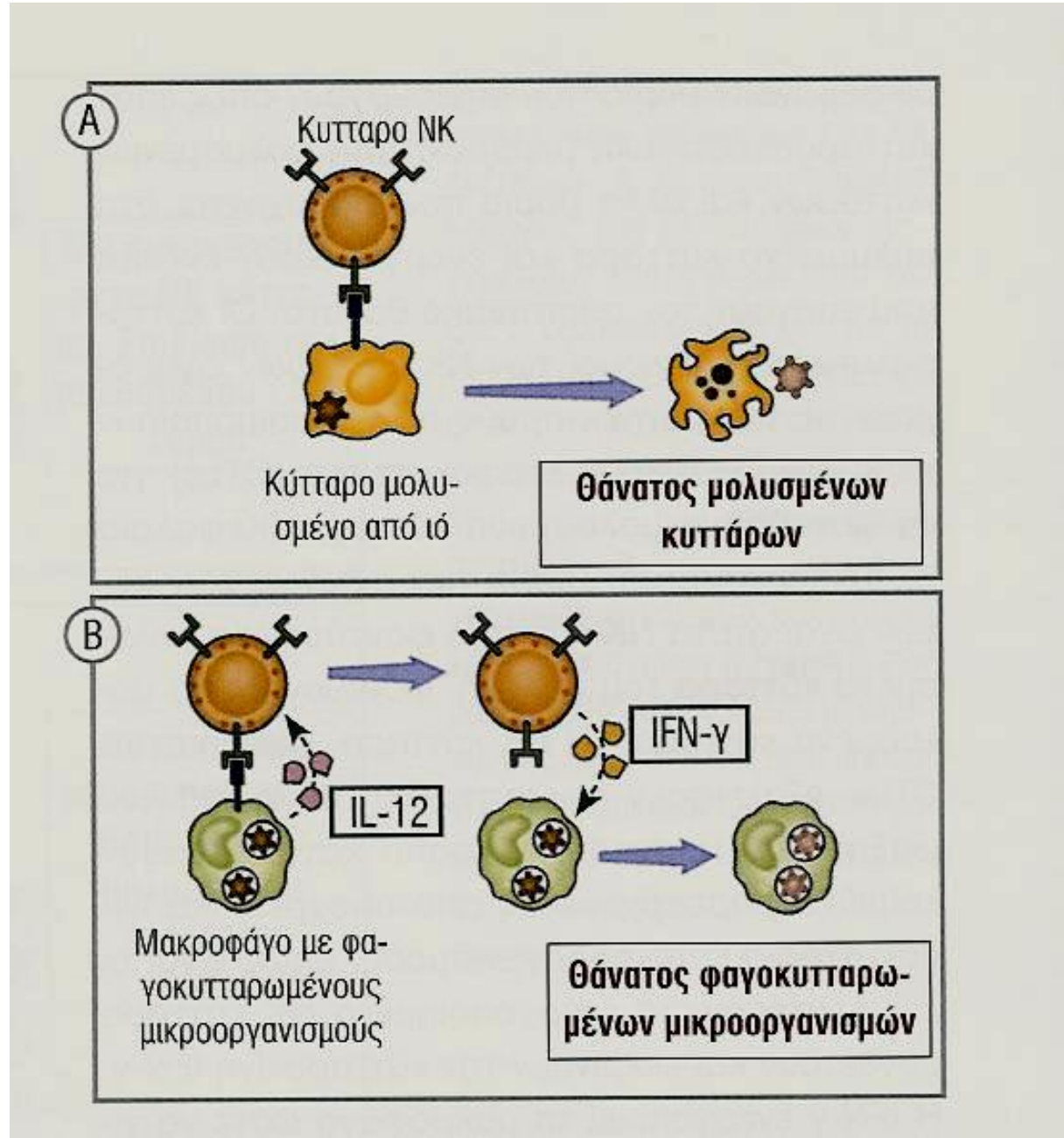


Η έλλειψη μορίων MHC I επάγει την ανάπτυξη κυτταροτοξικής δράσης

NK κυτταροτοξικότητα II

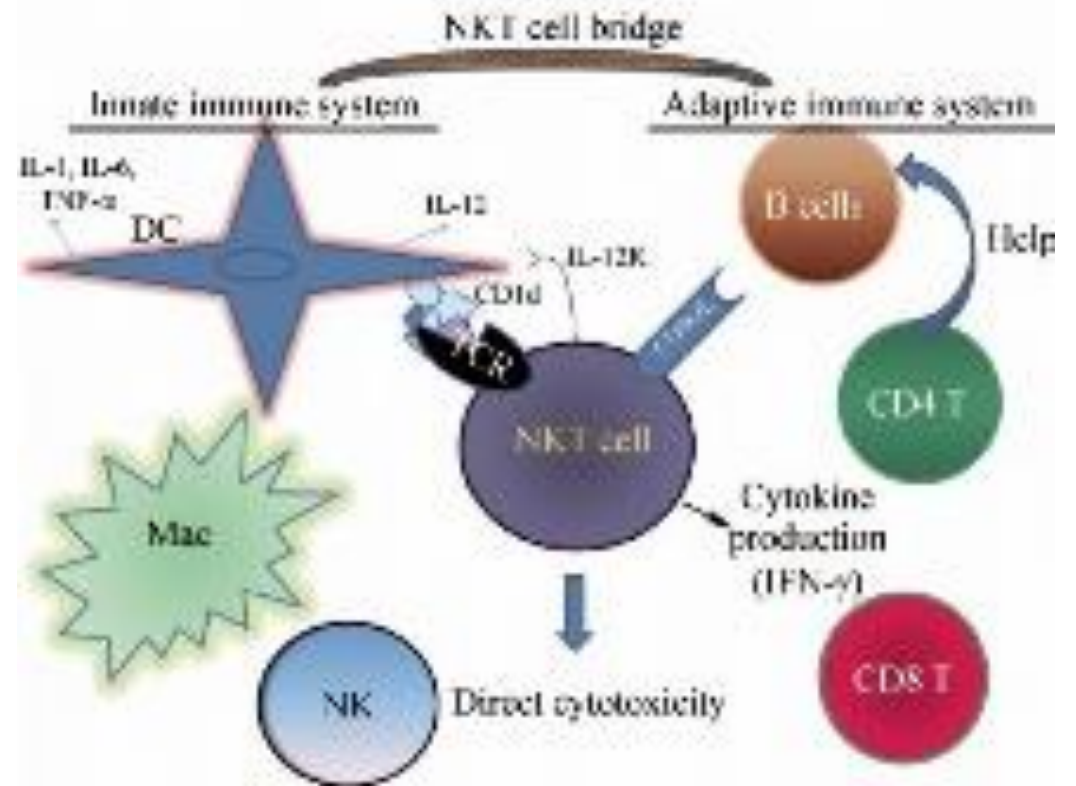
NK κύτταρα λύουν
κατευθείαν κύτταρα-στόχους

NK κύτταρα απαντούν στην
IL-12 των μακροφάγων,
εκκρίνουν IFN- γ , η IFN- γ
ενεργοποιεί τα μακροφάγα
και αυτά φαγοκυτταρώνουν
το κύτταρο-στόχο



Κύτταρα NKT

- τα NKT διαθέτουν υποδοχείς που χαρακτηρίζουν τα NK, αλλά και T κυτταρικό υποδοχέα (*TCR*)
- αναγνωρίζουν αντιγόνα στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων με τη βοήθεια του *TCR*, ενεργοποιούνται και παράγουν περφορίνη, granzymes και *IFN-γ* (ενεργοποίηση NK)
- αναγνωρίζουν αντιγόνα στην επιφάνεια APCs, ενεργοποιούνται και παράγουν *IFN-γ*, που με τη σειρά της ενεργοποιεί τα NK ώστε να εκδηλώσουν κυτταροτοξική δράση



Μακροφάγα

- απελευθερώνουν λυσοσωμικά ένζυμα, ROI (*Reactive Oxygen Intermediates*) και RNI (*Reactive Nitrogen Intermediates*)
- παράγουν κυτταροτοξικά πεπτίδια όπως οι defensins
- φαγοκυτταρώνουν καρκινικά κύτταρα που έχουν επικαλυφθεί με IgG, μέσω αναγνώρισης του Fc τμήματος
- ενεργοποιούνται από IFN- γ που παράγουν τα CTL και εκκρίνουν TNF- α
- παρουσιάζουν το Ag

Κυτταροτοξικές δοκιμασίες με Κυτταρομετρία Ροής

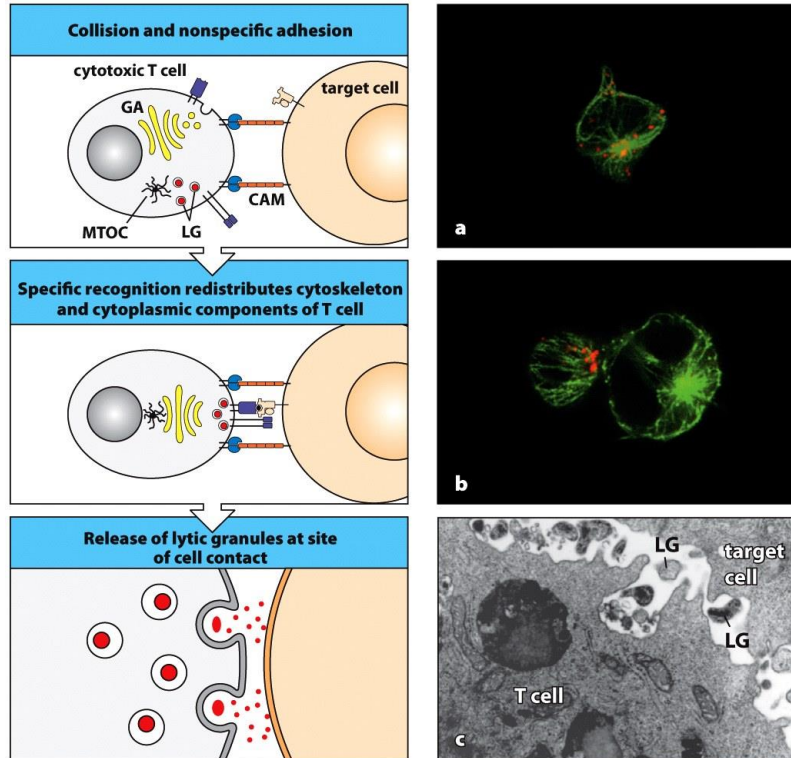
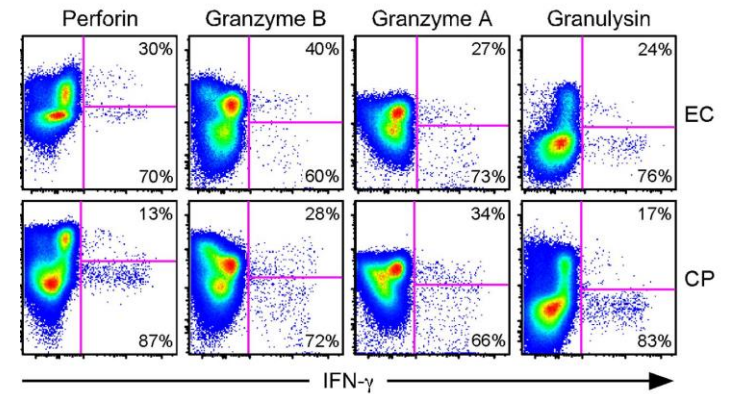
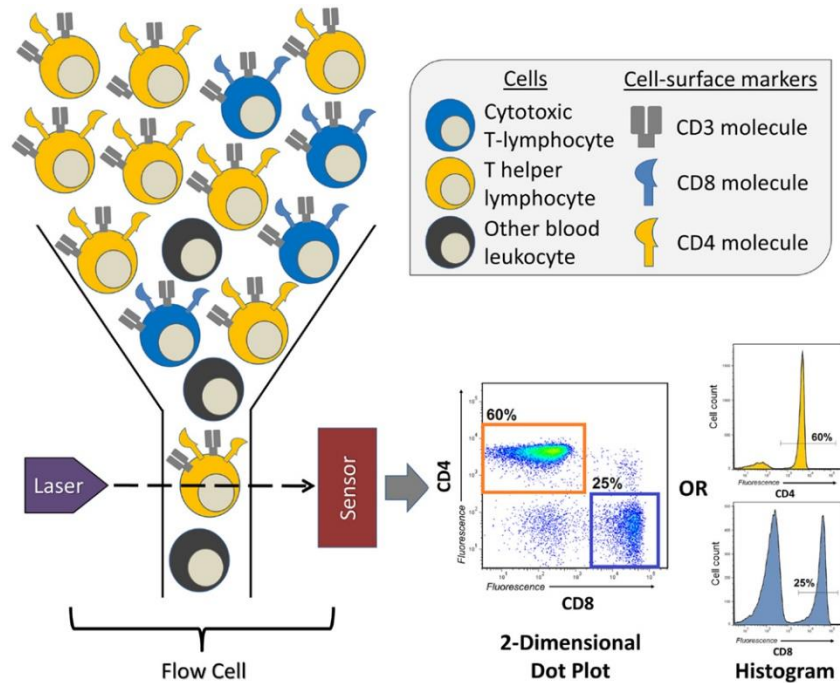


Figure 8.29 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)



‘gold standard’ μέθοδος για τη μέτρηση της κυτταρο-μεσολαβούμενης κυτταροτοξικότητας

Απελευθέρωση του ραδιενεργού χρωμίου (^{51}Cr) (Brunner *et al.* 1968)

[the radioactive chromium (^{51}Cr)-release assay]

- Η πιο ειδική δοκιμασία κυτταροτοξικότητας (*most specific assay of its kind*).
- Είσοδος και δέσμευση του ^{51}Cr από το χρωμιούχο νάτριο από τα κύτταρα-στόχους
- Η λύση των κυττάρων-στόχων από τα δραστικά κύτταρα οδηγεί στην απελευθέρωση του ραδιενεργού ιχνηλάτη στο εναιώρημα της κυτταρικής καλλιέργειας
- Μέτρηση ^{51}Cr με μετρητή γ-ακτινοβολίας

Πλεονεκτήματα:

Επαναλήψιμη κ Εύκολη

Μειονεκτήματα:

Παρέχει μόνο ημιποσοτικές μετρήσεις

Χαμηλή Ευαισθησία

Χρειάζεται να διεγερθούν πολλές φορές τα κυτταροτοξικά κύτταρα πριν από τον έλεγχο της λυτικής τους δραστηριότητας

Καμία πληροφορία για τη συμπεριφορά μεμονωμένων κυττάρων

Χαμηλά επίπεδα σήμανσης σε κάποιες κυτταρικές σειρές -στόχους

Υψηλά επίπεδα αυθόρμητης (*spontaneous*) απελευθέρωσης από κύτταρα-στόχους μερικών σειρών

Προκύπτουν θέματα βιολογικού κινδύνου και αποκομιδής λόγω χρήσης ραδιοϊσοτόπων

Μελέτη άλλων μεθόδων κυτταροτοξικότητας για την αντικατάσταση της Δοκιμασίας Απελευθέρωσης ^{51}Cr

Ανάλυση των Ag-ειδικών T κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

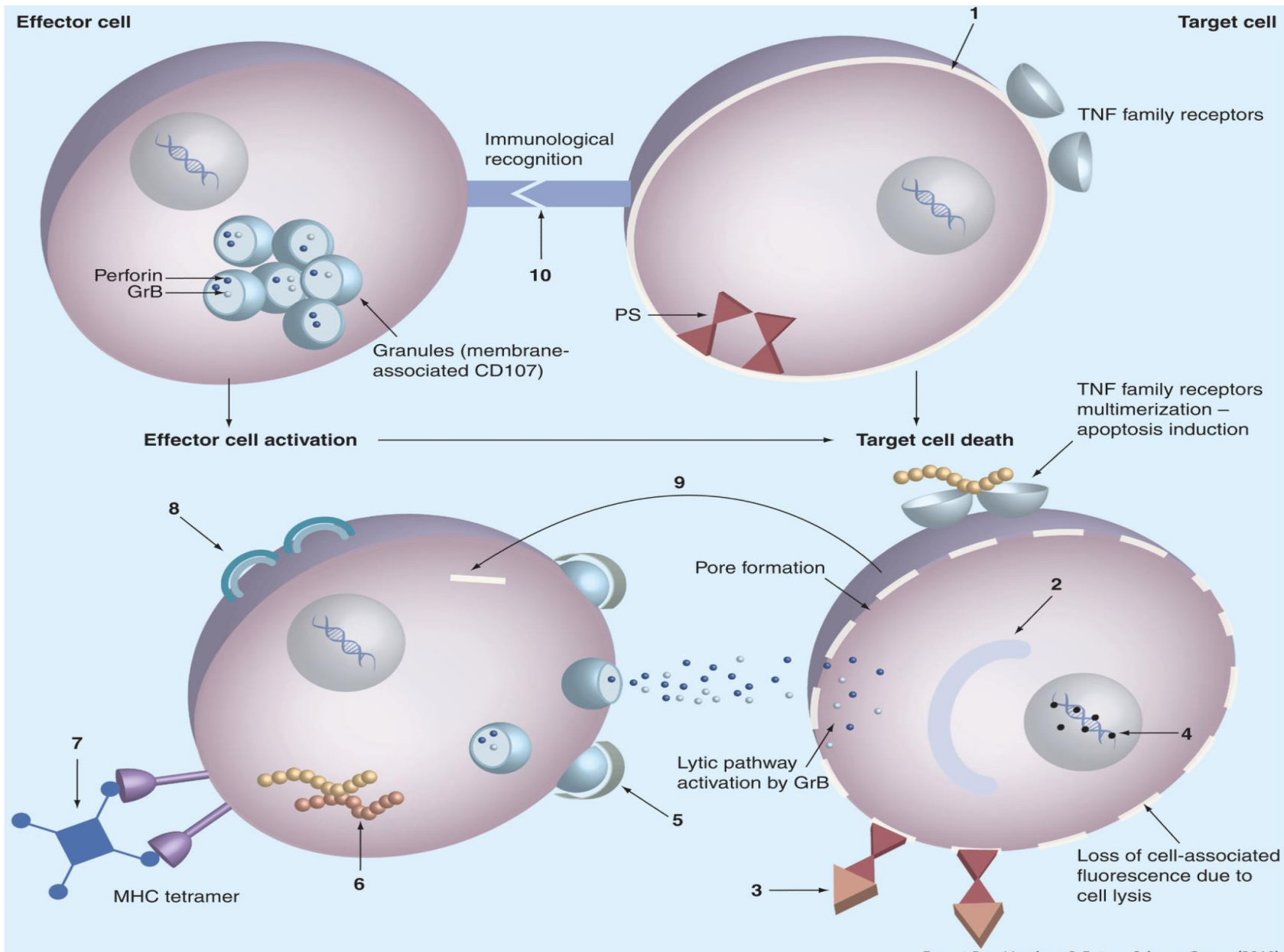
ΚΡ-Δυναμικό εργαλείο για την ανάλυση Ag-ειδικών T κυτταρικών αποκρίσεων με:

- Ποσοτικά αποτελέσματα
- Μέτρηση/ Χαρακτηρισμός κυττάρων
- Χρήση κυτταρικού αναιωρήματος
- Ταυτόχρονη πολυπαραμετρική μέτρηση
- Εύκολη απόδοση πληροφορίας φαινοτύπου-λειτουργικότητας κυττάρων υψηλής-ποιότητας
- Μέσω κυτταροδιαχωριστή ανακτώνται ειδικά κύτταρα μετά από τη μέτρησή τους για κυτταρική καλλιέργεια και βιοχημική ανάλυση
- Συνδυασμός πολυπαραμετρικής και υψηλής ταχύτητας ανάλυση
- Χρήση πολλών φθορίζουσών ουσιών

Πλεονεκτήματα δοκιμασιών κυτταροτοξικότητας με ΚΡ:

- Αποφυγή ραδιενεργών ουσιών
- Ανίχνευση κυτταροτοξικότητας ανά κύτταρο
- Εκτίμηση όλων των σταδίων των κυτταροτοξικών μηχανισμών (κυτταροτοξικής διαδικασίας)
- Πιθανότητα χαρακτηρισμού του φαινοτύπου των υπό μελέτη κυττάρων (που συμμετέχουν στην κυτταροτοξική διαδικασία)

Παρακολούθηση κυτταρο-μεσολαβούμενου θανάτου του κυττάρου-στόχου με ΚΡ



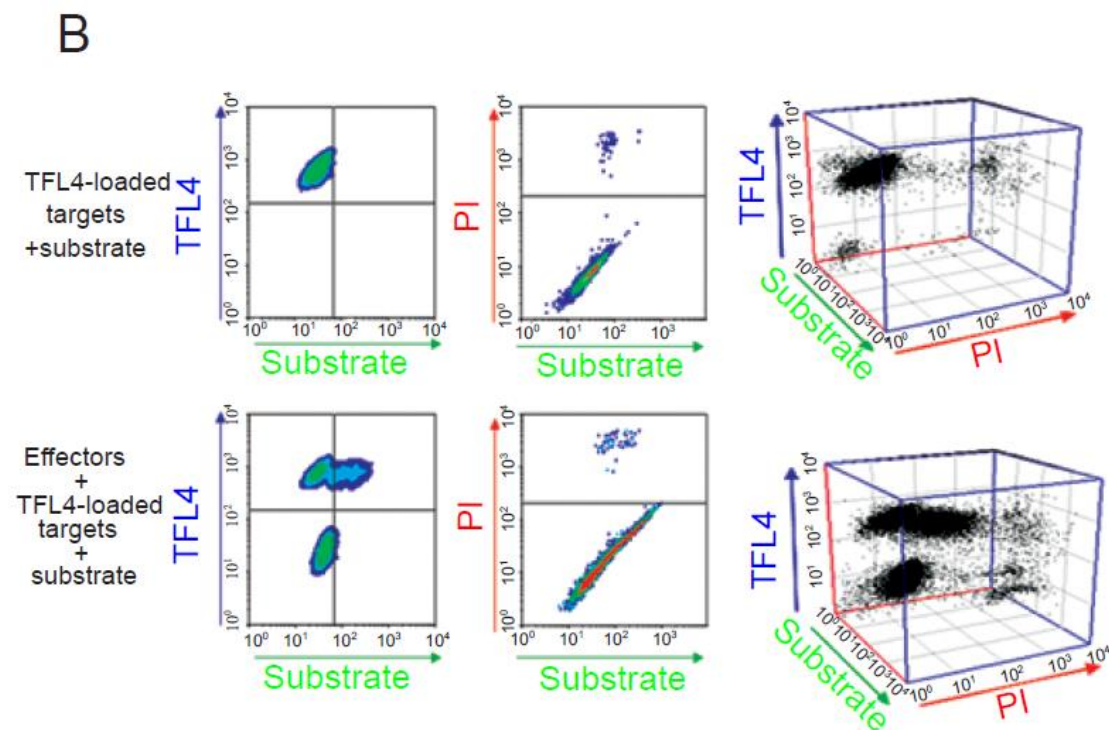
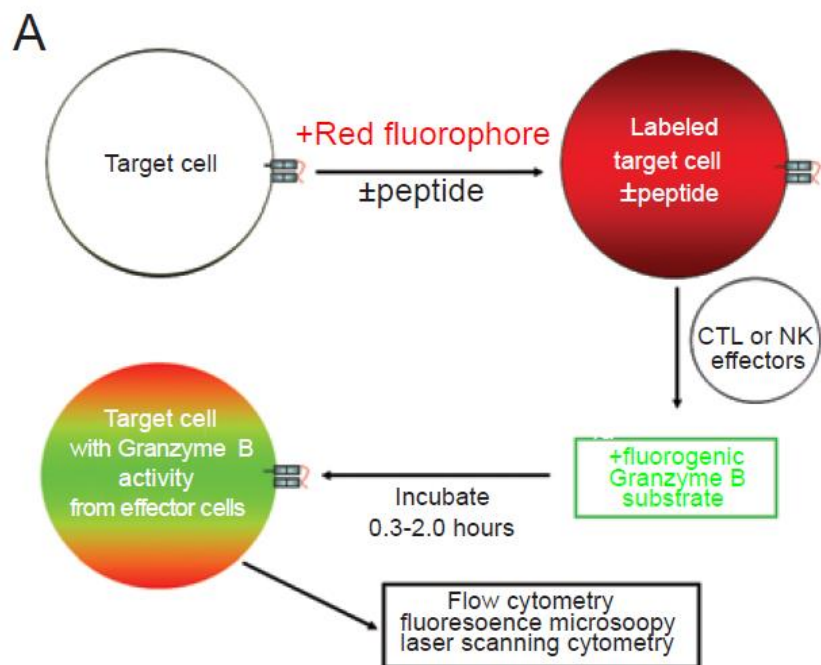
• Μελέτη κυτταροτοξικότητας:

- Λυτικών Ενζύμων
- FasL-Fas μονοπατιού
- της κυτταρικής απόπτωσης που επάγουν
- της αποκοκκίωσης των δραστικών κυττάρων

Granzyme B activity in target cells detects attack by cytotoxic lymphocytes

(Packard BZ, Telford WG, Komoriya A, Henkart PA. J Immunol 2007;179:3812–3820)

- Χρήση του φθορίζοντος υποστρώματος GrB στα ζώντα κύτταρα
- Δραστηριότητα GrB στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-στόχων ανά κύτταρο
- Ποσοτικά αποτελέσματα και εικόνες κυτταρικής επίθεσης από τα δραστικά κύτταρα
- Συνδυασμός υποστρώματος GrB με δεύτερο φθορίζον υπόστρωμα ειδικό για την κασπάση 3 για τη μελέτη κυτταροτοξικότητας με KP και συνεστιακή μικροσκοπία



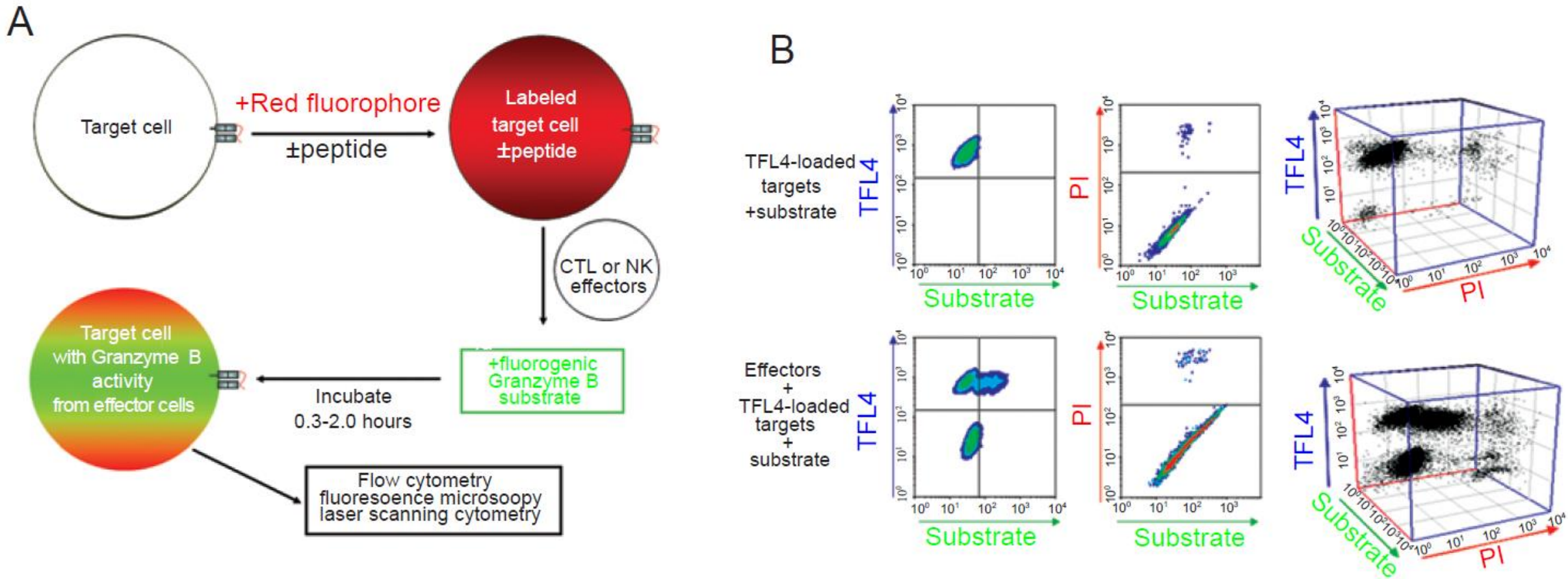


Figure 7 Cell-mediated cytotoxicity measured at the single cell level using a cell-permeable GzB substrate. **(A)** Measurement of GzB activity exclusively in target cells is carried out after coincubation of pre-labeled targets with effectors (NK or CTL) in the presence of a cell permeable GzB substrate. **(B)** GzB⁺ target cells have intact permeability as indicated by exclusion of propidium iodide (PI) (in contrast to ⁵¹Cr release and other flow cytometry-based cytotoxicity assays).

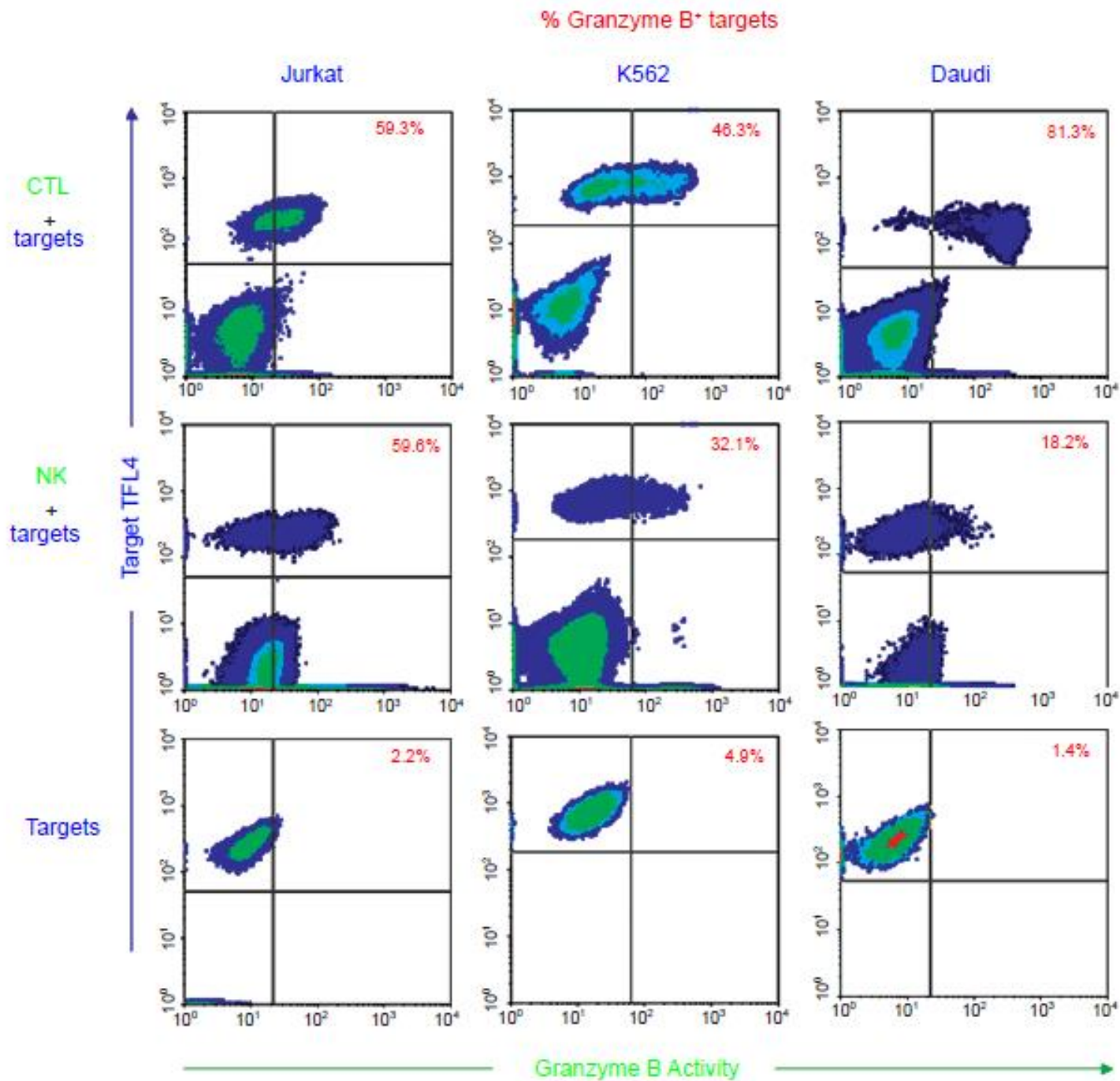


Figure 8 Live single cell-mediated cytotoxicity assays with multiple targets and effectors. Jurkat (right column), K562 (middle column), Daudi (right column) cell lines served as targets for both CTL (top row) and NK (middle row) cells. Targets alone are shown in the bottom row.

Measuring T cell-mediated cytotoxicity using fluorogenic caspase substrates

(Chahroudi A, Silvestri G, Feinberg MB. Methods 2003;31:120–126)

Δοκιμασία με ΚΡ βασιζόμενη στην ενεργοποίηση της κασπάσης -3 των κυττάρων-στόχων που προκαλείται από τα CTL μέσω της ανίχνευσης ειδικών φθορίζοντων υποστρωμάτων κασπάσης

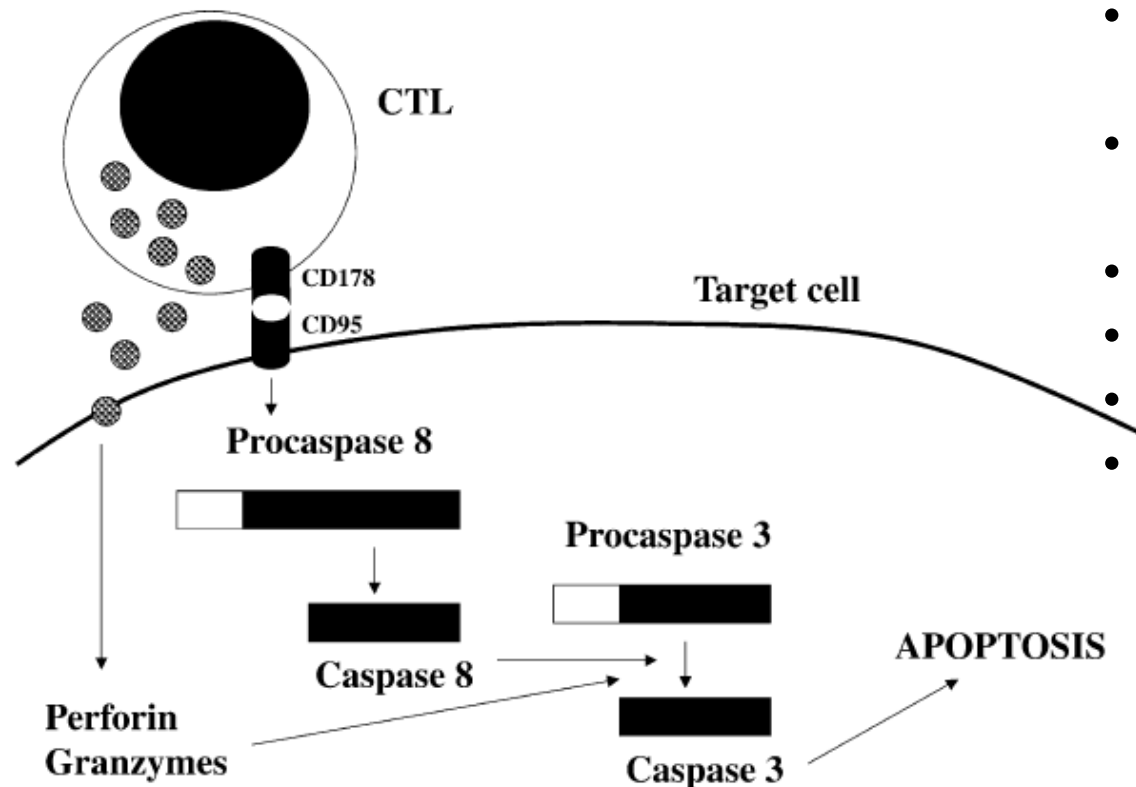


Fig. 1. Molecular pathways of CTL activity.

- Ανιχνεύονται αξιόπιστα τα νεκρά κύτταρα-στόχοι από τα Ag-ειδικά CTL
- Περισσότερο πληροφοριακή και ασφαλέστερη μέθοδος
- Μεγαλύτερη ευαισθησία
- Επιτρέπει τον χαρακτηρισμό ανά κύτταρο
- Εκτίμηση των αρχικών κυττάρων-στόχων
- Πειράματα με κυτταροδιαχωρισμό

Label target cells with 3 μ m CellTracker Orange (CTO) and peptide pulse, 1h at 37 $^{\circ}$ C.

wash

Plate targets at 1x10⁵/well in a 96-well round bottom plate.

Add effectors at different E:T ratios (i.e. 50:1, 16.5:1, 5.5:1). Incubate 3h at 37 $^{\circ}$ C.

spin plate and flick

Resuspend cells in 75 μ l caspase substrate (10 μ M), 30min at 37 $^{\circ}$ C.

wash

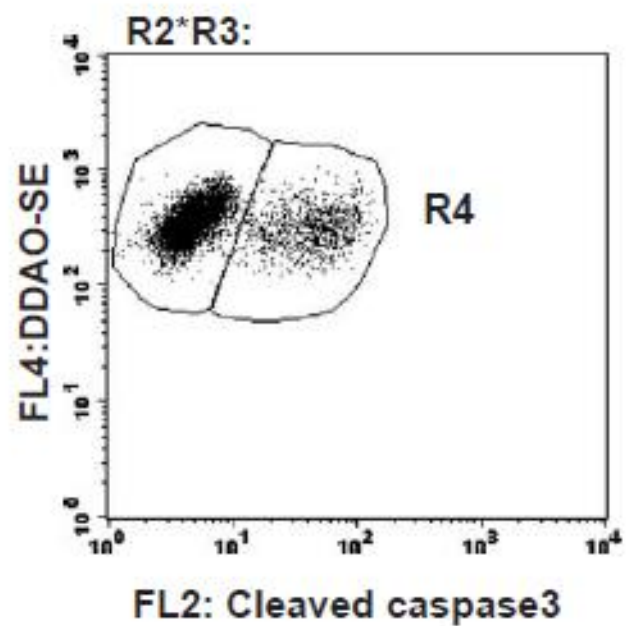
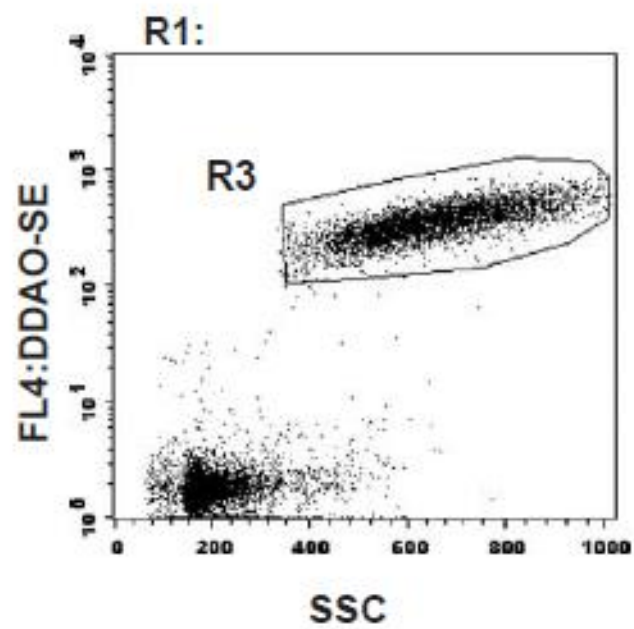
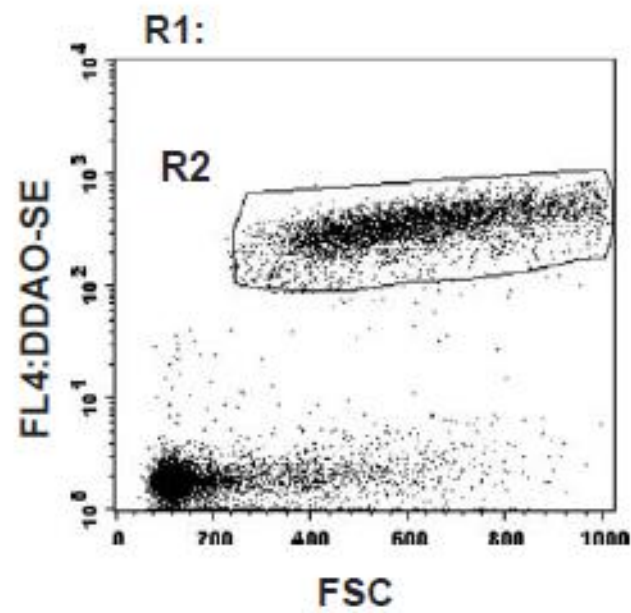
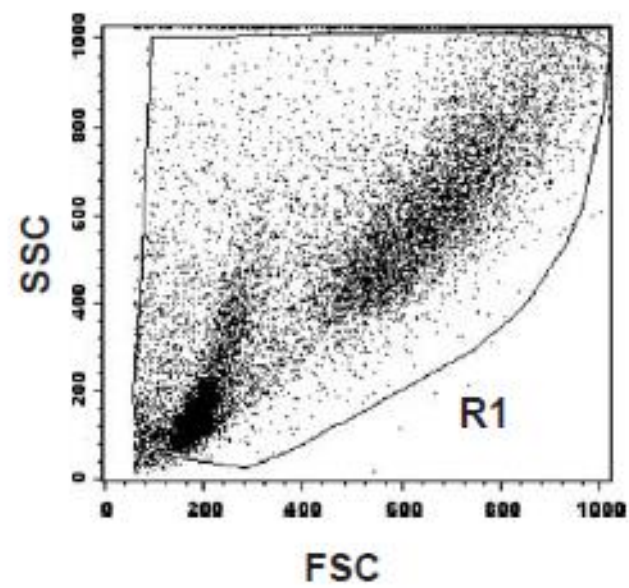
Stain targets and/or effectors with monoclonal antibodies (if immunophenotypic analysis is needed).

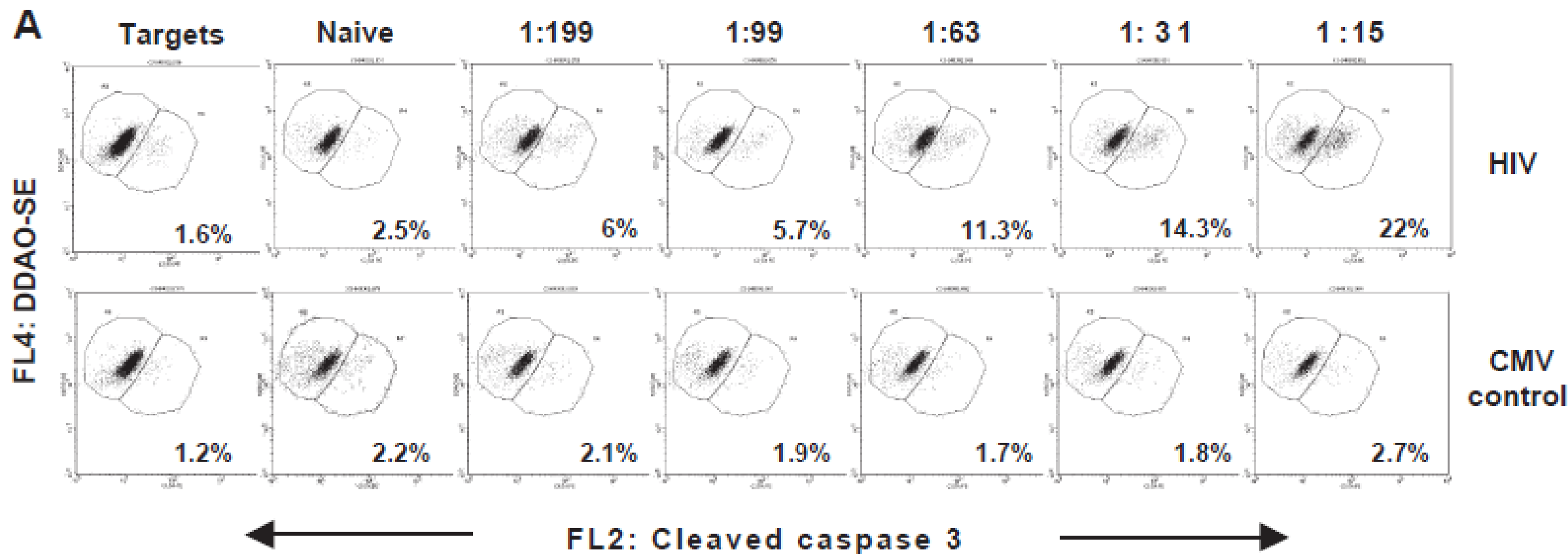
wash, but do not fix

Acquire at least 5000 events gated on the CTO⁺ target cell population.

Determine % specific lysis with the following equation:

$$\frac{(\% \text{ CTO}^+ \text{caspase}^+ [\text{peptide-pulsed targets}] - \% \text{ CTO}^+ \text{caspase}^+ [\text{targets pulsed with irrelevant peptide}])}{100 - \% \text{ CTO}^+ \text{caspase}^+ [\text{targets pulsed with irrelevant peptide}]} \times 100\%$$

B



Προσδιορίζοντας τα νεκρά κύτταρα:

A novel method for measuring CTL and NK cell-mediated cytotoxicity using annexin V and two-color flow cytometry (Goldberg JE, Sherwood SW, Clayberger C. J Immunol Methods 1999;224:1–9)

- Επώαση δραστικών κυττάρων (effector, E) με κύτταρα-στόχους (target, T)
- Χρώση CTL ή NK κυττάρων με ειδική φθορίζουσα ουσία
- Ειδικό Effector-Ab (PE) και μόριο **αννεξίνης V (FITC)** για την ανίχνευση κυττάρων με PS στην επιφάνεια
- Κύτταρα-στόχοι: PE(-)

Karawajev <i>et al.</i>	membranes of target cells (FITC)	PI
Mattis <i>et al.</i> and Piriou <i>et al.</i>	DiOC18(3) target cell	PI
Flieger <i>et al.</i>	PKH2 (targets) and PKH26 (effectors)	PI
Hatam <i>et al.</i>	PKH26 (K562 target cells) [%percentage of target cells killed by effector NK cells]	PI

Ozdemir et al. Flow cytometric cell-mediated cytotoxicity assay. J Immunol Methods 2007;318:158–159

Συνδυασμός annexin V/PI was για την εκτίμηση αποπτωτικών/νεκρών κυττάρων.

Προσδιορίζοντας τα ζώντα κύτταρα:

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΝΚ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΡΙΧΡΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

[ΔΔ Ε. Κώνστα «ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΝΚ ΚΑΙ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ», Αθήνα 2009]

• Δείγματα περιφερικού αίματος (PB):

1. φυσιολογικών μαρτύρων (N=25)
2. ασθενούς με DC2-ΟΛ (N=1)
3. ασθενούς με ΟΜΛ (N=4)
4. ασθενούς με Β-ΟΛΛ (N=2)
5. ασθενούς με Τ-ΟΛΛ (N=1)

• Καρκινική σειρά K562

Διαδικασία

- Απομόνωση λεμφοκυττάρων / κυττάρων λευχαιμίας
- Απομόνωση και χρώση ΝΚ κυττάρων (δραστικά κύτταρα)

Μέθοδος κυτταροτοξικότητας:

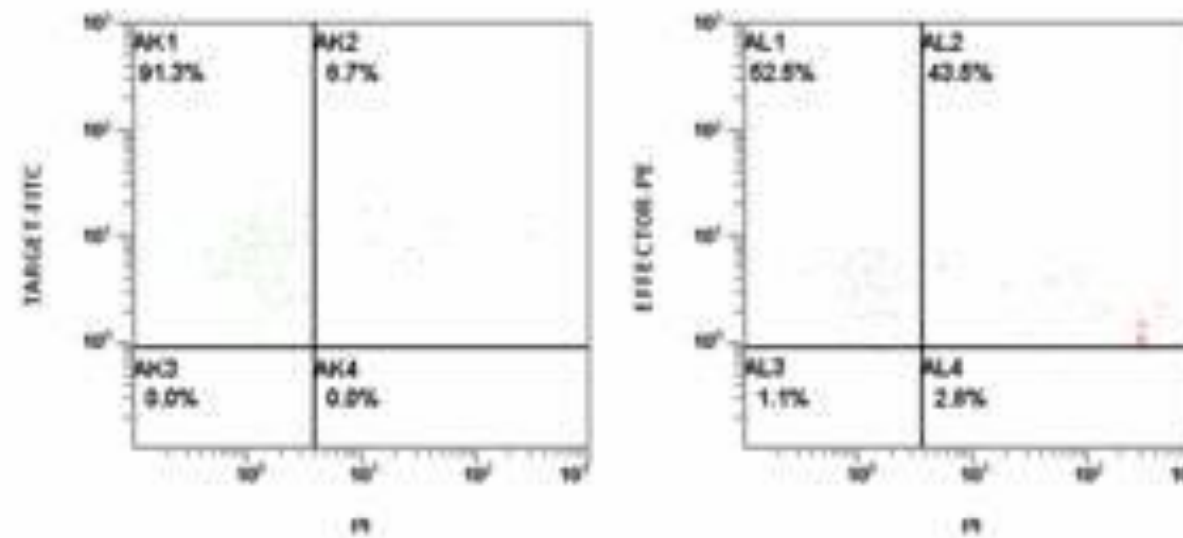
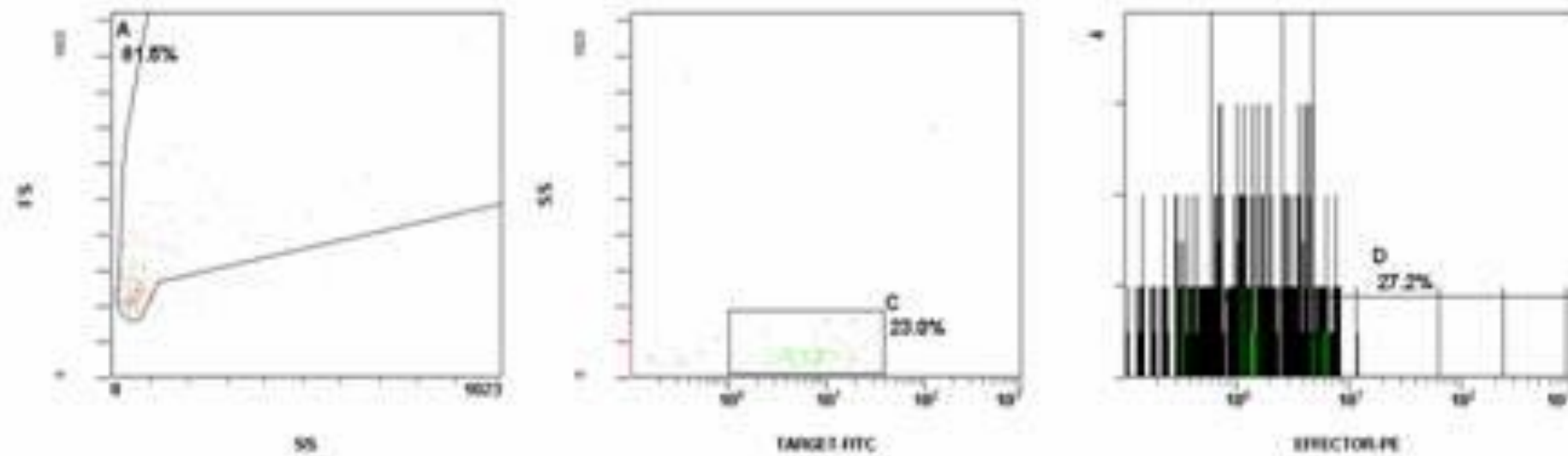
Ανάμιξη δραστικών κυττάρων (ΔΚ) και κυττάρων στόχων (ΚΣ) σε διαφορετικές αναλογίες (ΔΚ:ΚΣ) 5:1, 10:1, 20:1

Ανάδευση των σωληναρίων

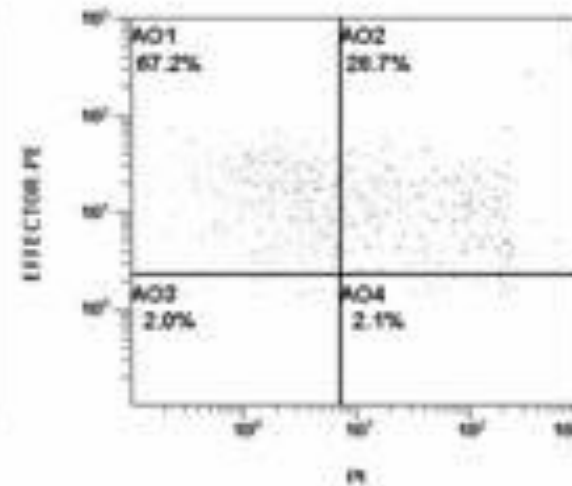
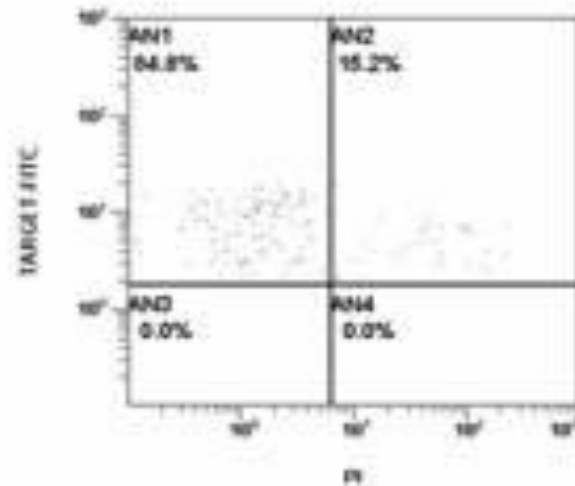
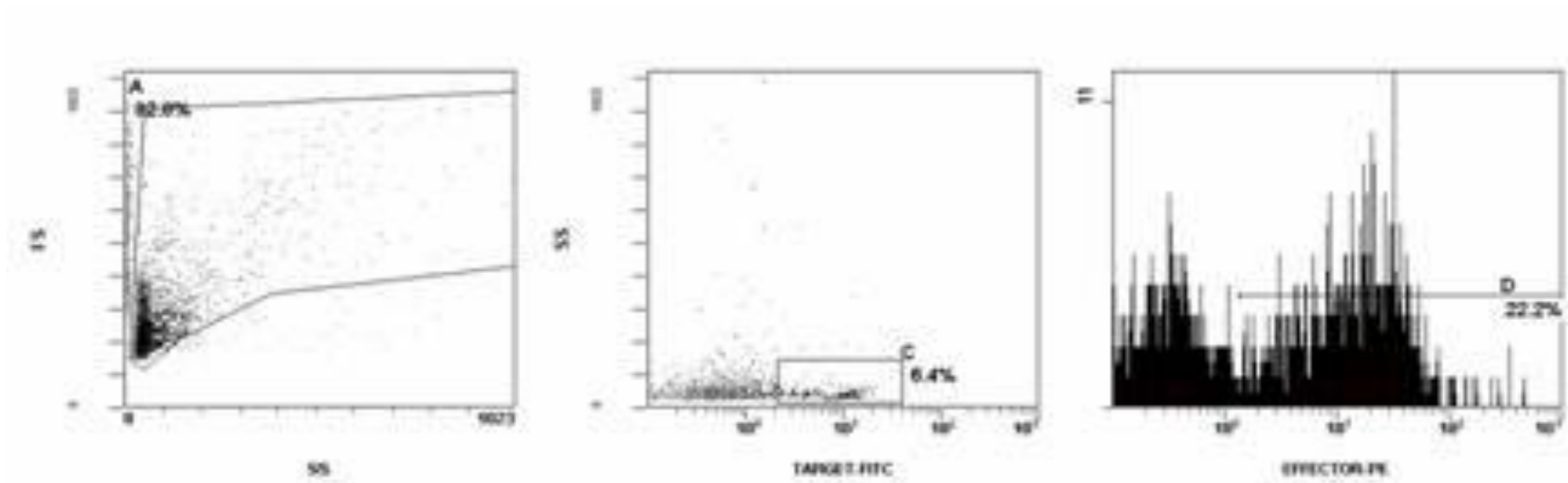
Επώαση 3 h σε θερμοκρασία 37 °C σε υδατόλουτρο

Προσθήκη 500 μl PI

ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

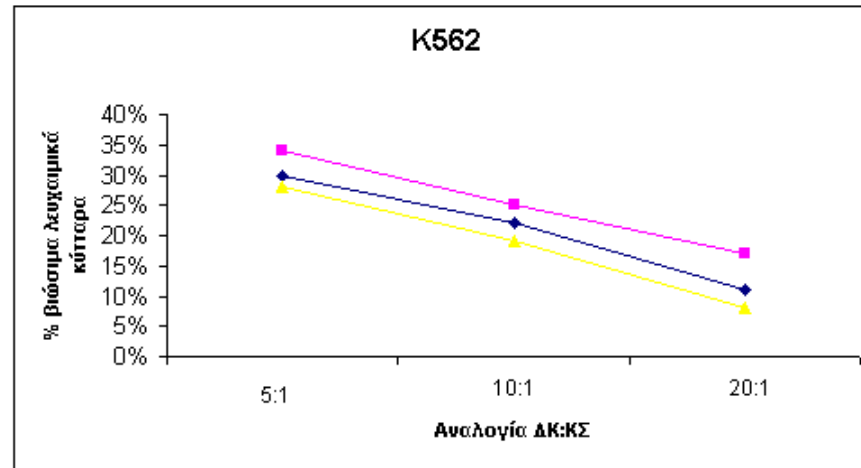


ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΚ ΚΥΤΤΑΡΩΝ



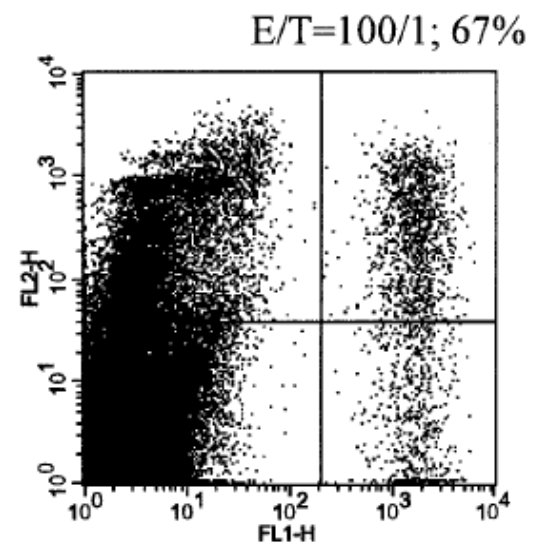
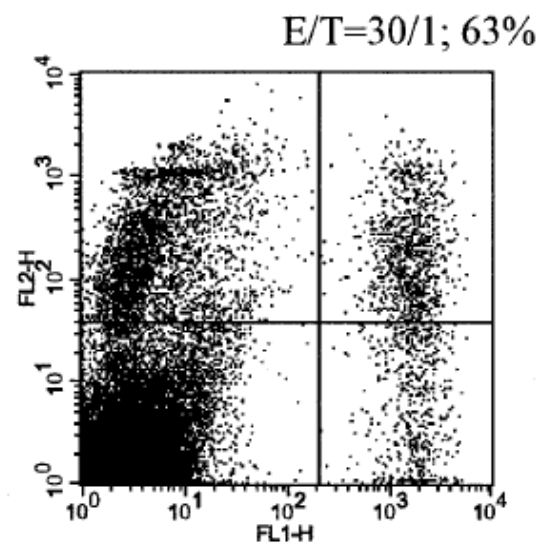
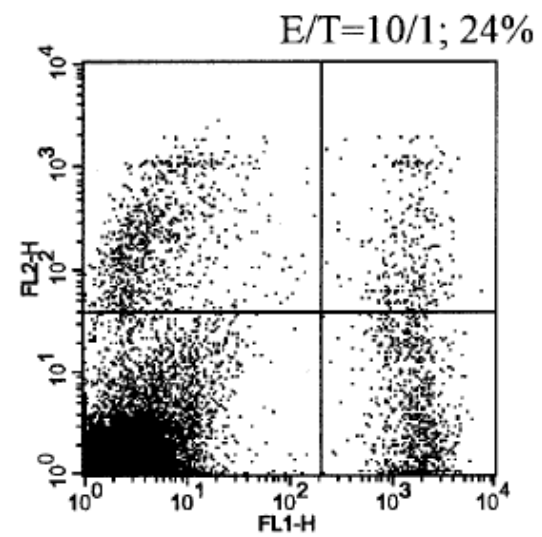
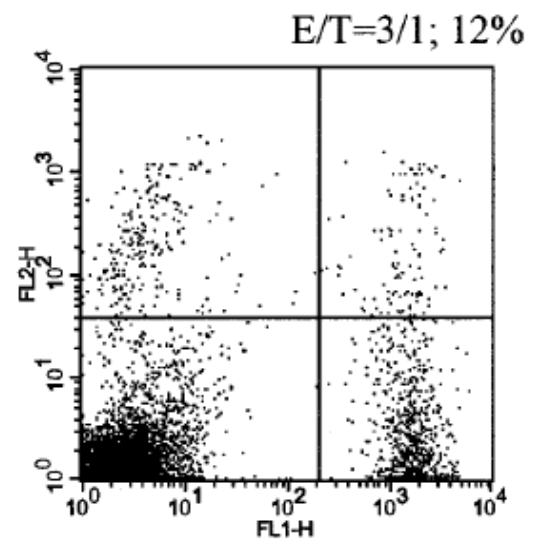
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

- *Καρκινική σειρά K562*: αύξηση της αναλογίας ΔΚ:ΚΣ - μείωση του βιώσιμου ποσοστού λευχαιμικών κυττάρων

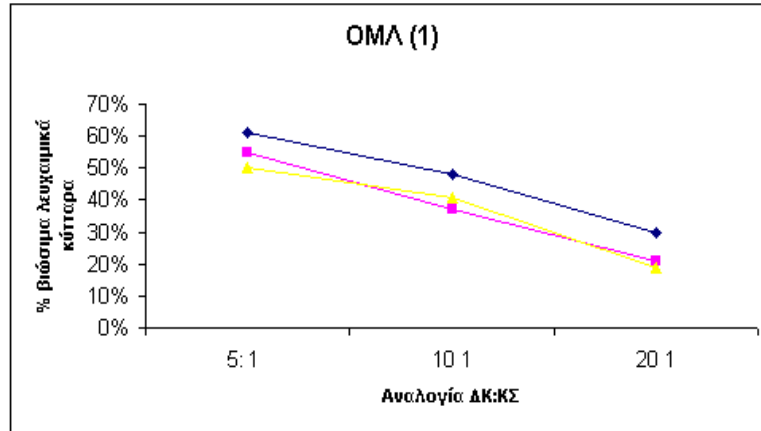


- *Λευχαιμίες*: αύξηση της αναλογίας ΔΚ:ΚΣ - μείωση του βιώσιμου ποσοστού λευχαιμικών κυττάρων, αλλά έφθασε σε ένα διαφορετικό “plateau” για κάθε ασθενή και κάθε φυσιολογικό μάρτυρα

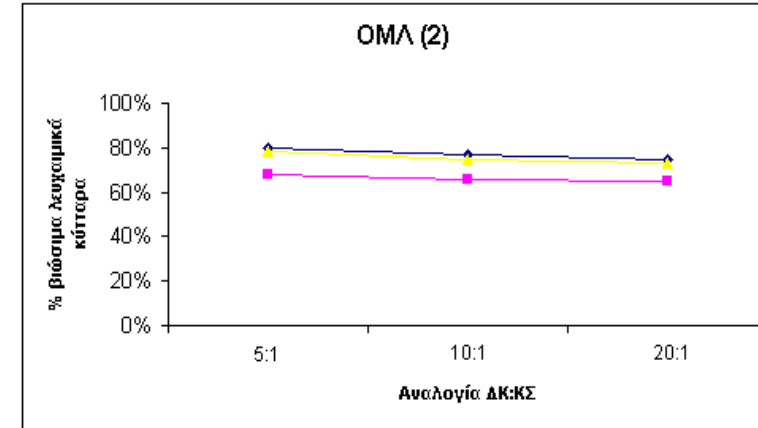
FL2 (propidium iodide)



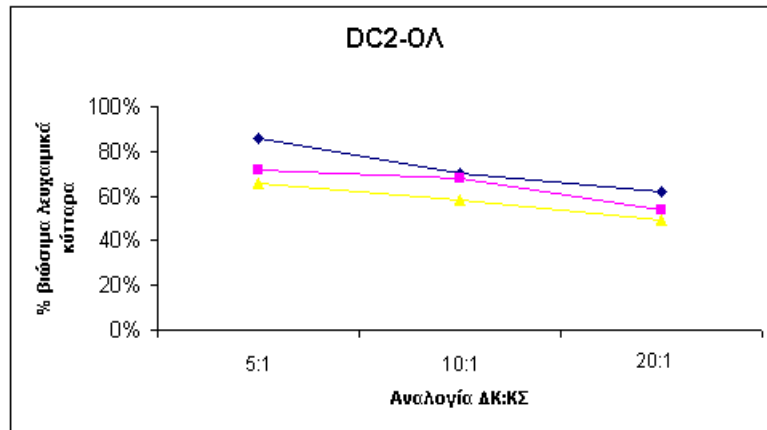
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ (2)



- Σε αναλογία (ΔΚ:ΚΣ) 20:1 (20-30% βιώσιμα λευχαιμικά κύτταρα)



- Σε αναλογία (ΔΚ:ΚΣ) 5:1 (65-75% βιώσιμα λευχαιμικά κύτταρα)

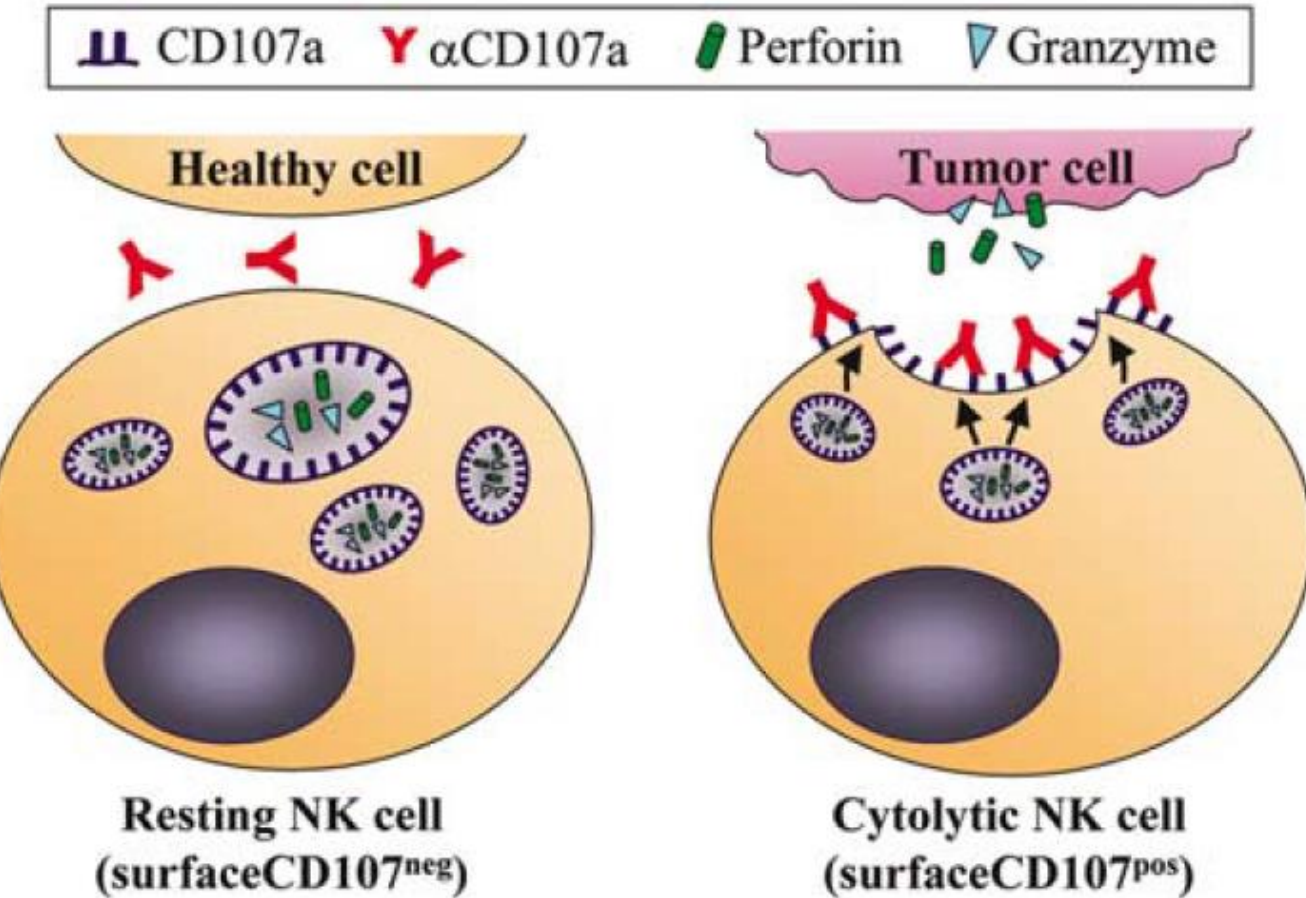


- Σε αναλογία (ΔΚ:ΚΣ) 20:1 (49-67% βιώσιμα λευχαιμικά κύτταρα)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΝΚ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΡΙΧΡΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

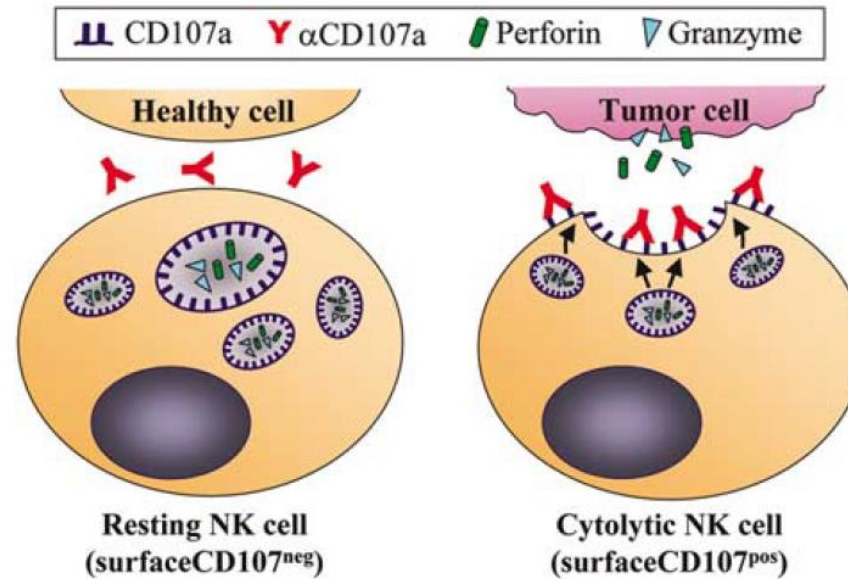
- Τα ΝΚ κύτταρα είναι περισσότερο κυτταροτοξικά έναντι των κυττάρων της ΟΜΛ παρά έναντι των κυττάρων της Β-ΟΛΛ σε σχέση με τα Τ λεμφοκύτταρα
- Τα κύτταρα της Τ-ΟΛΛ είναι ανθεκτικά τόσο στα Τ όσο και στα ΝΚ κύτταρα
- Τα δραστικά κύτταρα παρουσίασαν διαφορετική κυτταροτοξική δραστηριότητα έναντι των λευχαιμικών κυττάρων (τυχαία επιλογή των δοτών)
- Μελέτη έκφρασης υποδοχέων ΝΚ κυττάρων: *όταν κάθε υποδοχέας εκφράζεται στο ίδιο περίπου ποσοστό στον φυσιολογικό μάρτυρα και σε κάθε ασθενή με λευχαιμία*
Μέγιστη κυτταροτοξικότητα ΝΚ κυττάρων έναντι λευχαιμικών κυττάρων
- Μελλοντική εφαρμογή της μεθόδου:
 1. σε μεγαλύτερο αριθμό λευχαιμιών
 2. σε ασθενείς με λευχαιμία χρησιμοποιώντας τα δραστικά κύτταρα των πιθανών δοτών
- ❖ Επιτυχής μελέτη της κυτταροτοξικότητας των λεμφοκυττάρων - πιθανώς θα έχει άμεση εφαρμογή στο κλινικό εργαστήριο στον τομέα των μεταμοσχεύσεων για την επιλογή του καταλληλότερου δότη

Μελέτη αποκοκκίωσης των δραστικών κυττάρων με λυσόσωμα με κοκκία



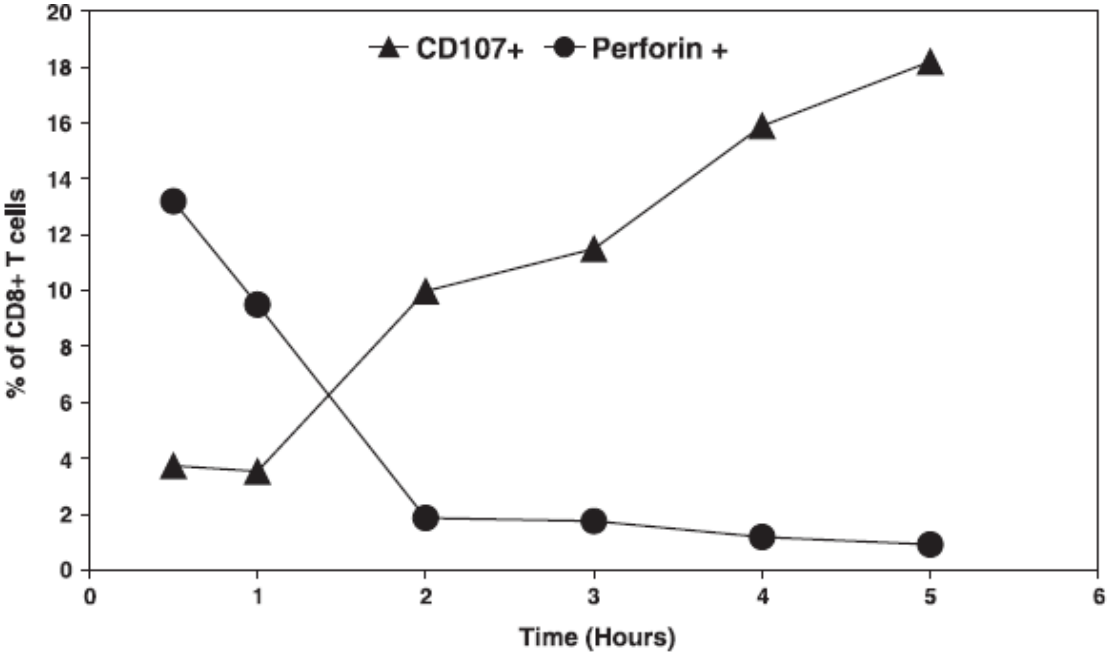
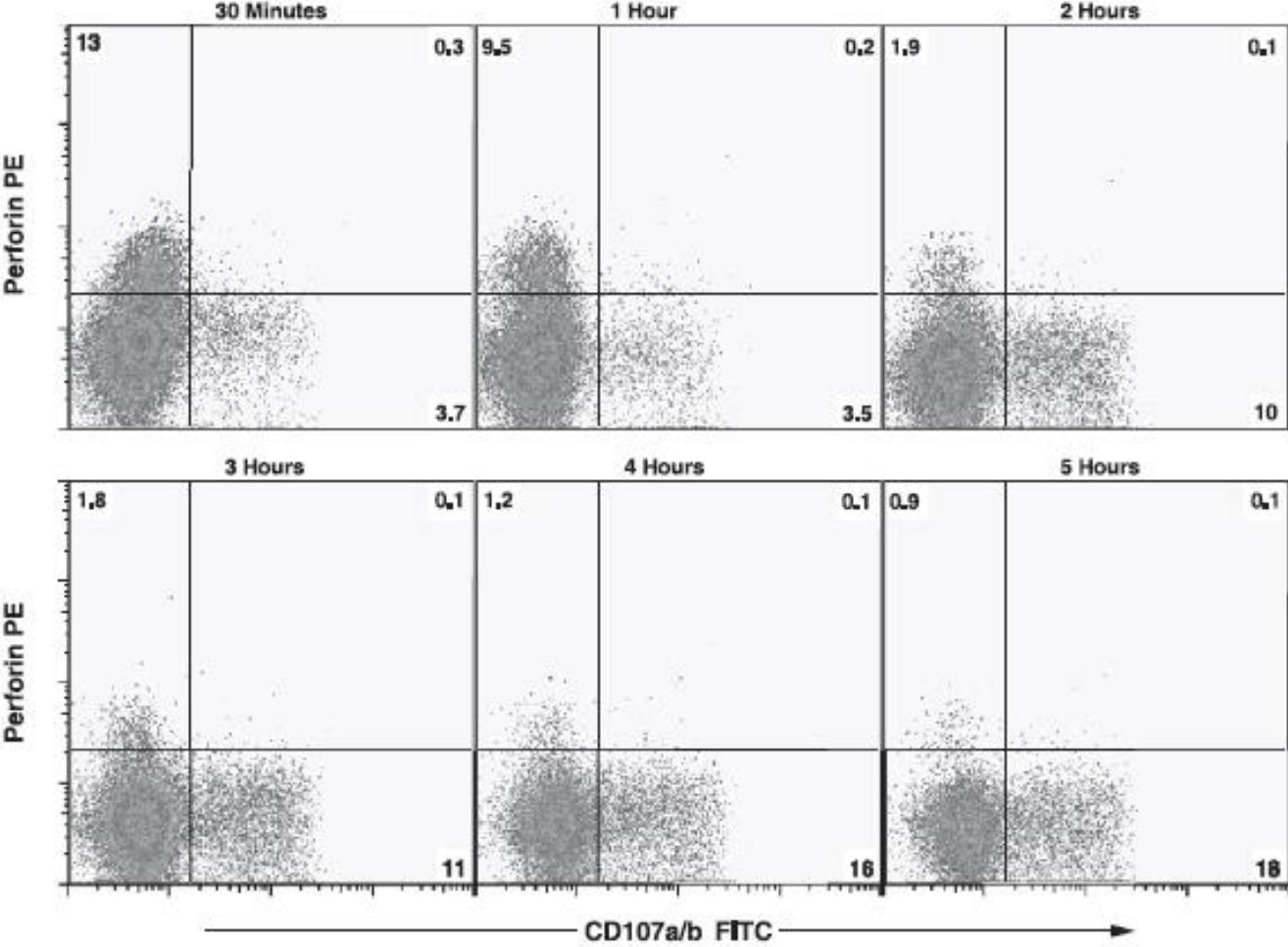
Η λιπιδική διπλοστιβάδα περί των κυτταροτοξικών κοκκίων (που περιέχουν περφορίνη και θρυμματίνες) περιέχει γλυκοπρωτεΐνες στη μεμβράνη που συνδέονται με το λυσόσωμα [lysosomal-associated membrane glycoproteins (LAMPs)] όπως:
CD107a (LAMP-1),
CD107b (LAMP-2),
and **CD63 (LAMP-3)**

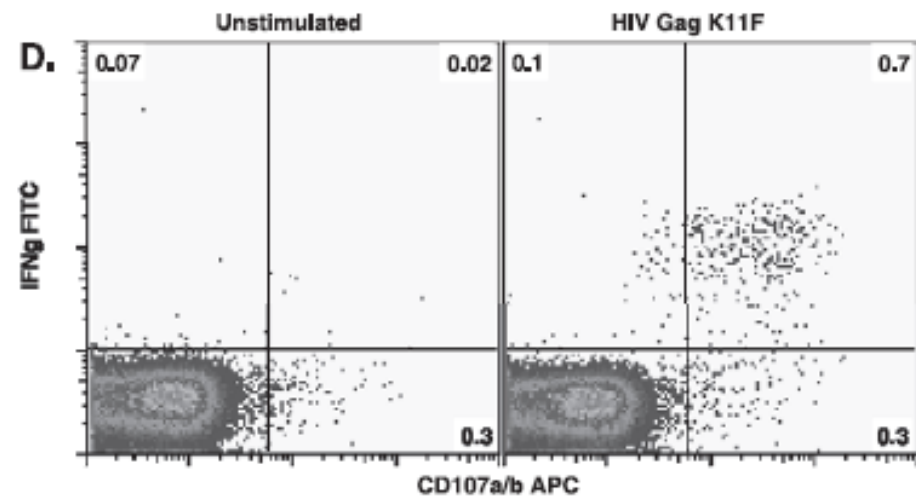
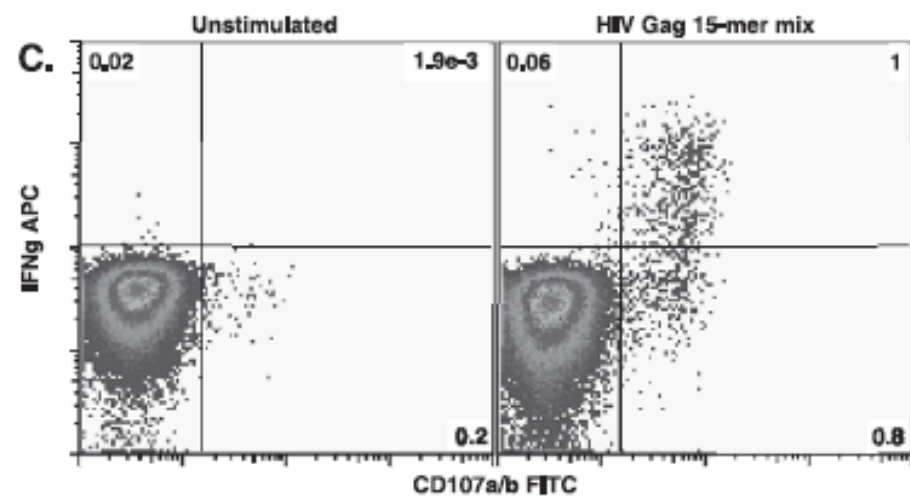
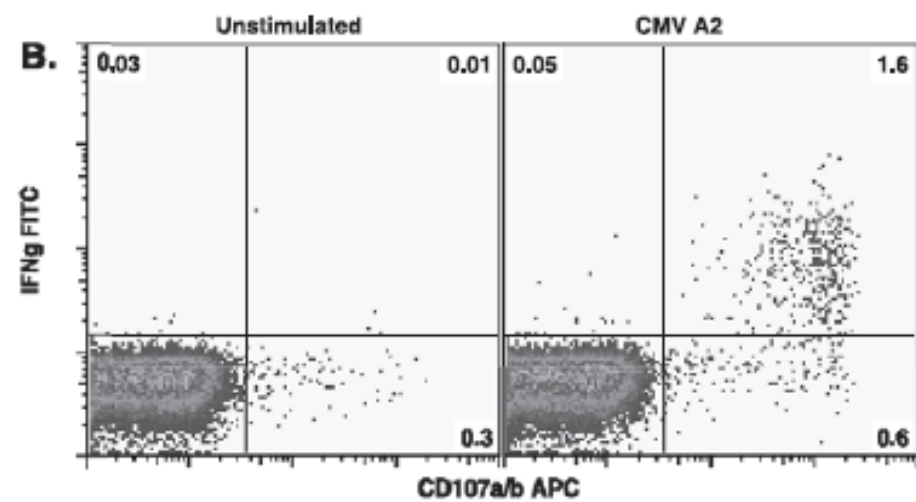
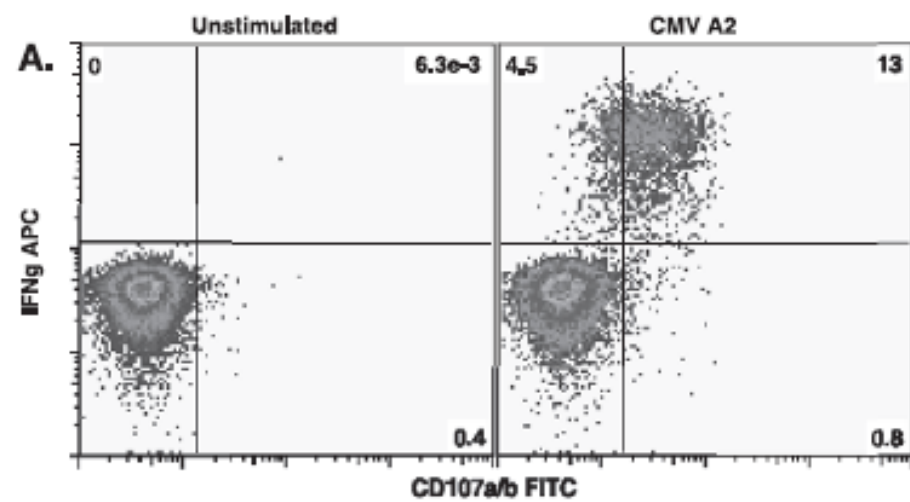
Μελέτη αποκοκκίωσης των δραστικών κυττάρων με λυσόσωμα με κοκκία II

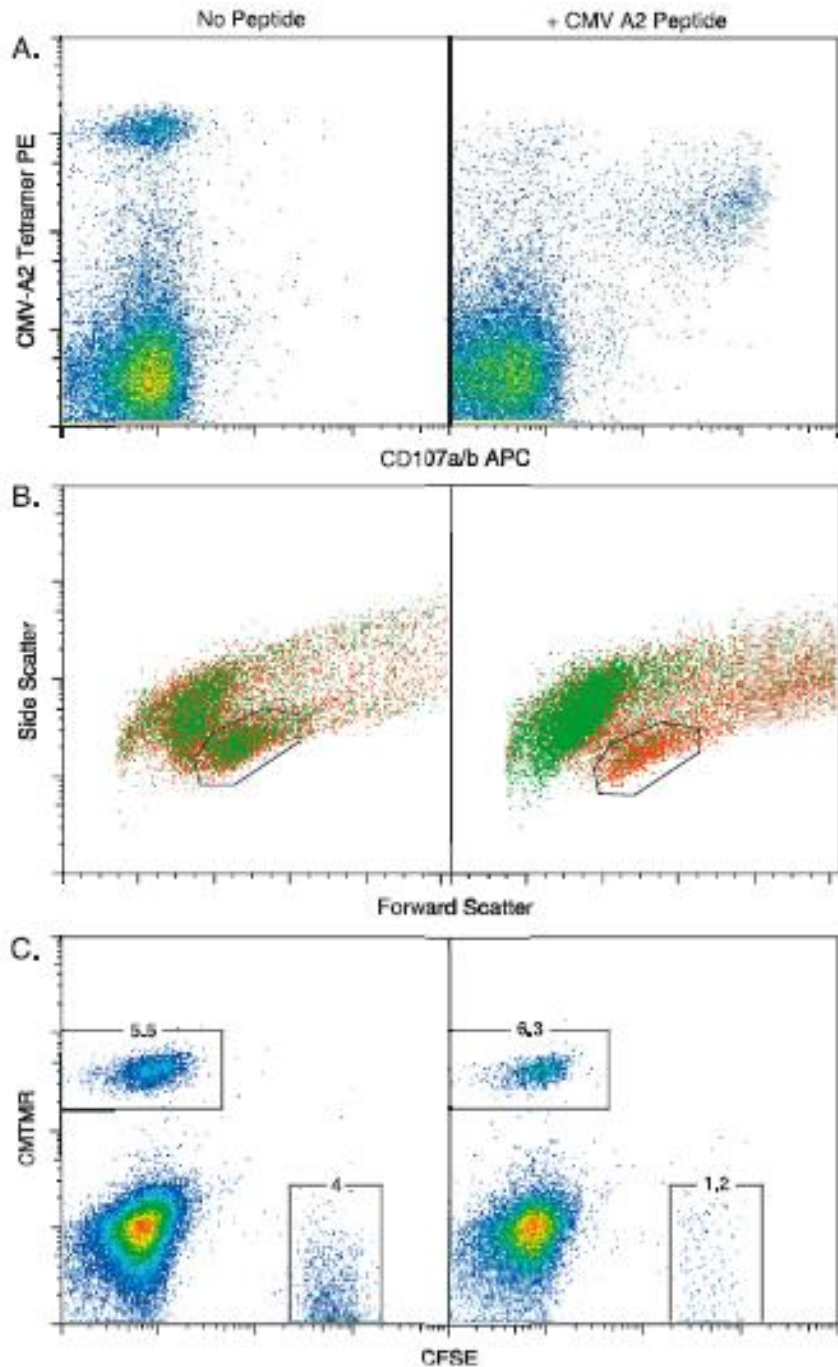


Μετά από διέγερση του δραστικού κυττάρου παρατηρείται αποκοκκίωση μεταφέρονται τα κοκκία μεταξύ του δραστικού κυττάρου και του κυττάρου-στόχου
Όταν τα κοκκία προσεγγίσουν την κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυτταροτοξικού κυττάρου η μεμβράνη συντήκεται επιτρέποντας στο λυσόσωμα την απελευθέρωση του περιεχομένου του (granzymes και perforin) στη σύναψη
Κατά τη σύντηξη-συγχώνευση της μεμβράνης λυσοσώματος με την κυτταροπλασματική μεμβράνη του δραστικού κυττάρου οι γλυκοπρωτεΐνες της μεμβράνης του λυσοσώματος (CD107a, CD107b, CD63) εκφράζονται στην επιφάνεια του κυττάρου
Μέτρηση των CD107a και CD107b με

Betts *et al.* presented a novel technique to enumerate antigen-specific CD8+ T cells based on visualization of exposure of CD107a and CD107b onto the cell surface as a result of degranulation







Our CD107 assay can provide an assessment of the capacity, frequency and phenotype of CD8+ T cells that kill in conditions similar to those used in a standard ⁵¹Cr release assay

CD107a and b expression after stimulation provides a more complete assessment of the total frequency of responding CD8+ T cells than does monitoring production of any one cytokine alone

fixation or permeabilization of the responding cells is not necessary, thus making this a suitable procedure for sorting of live cells

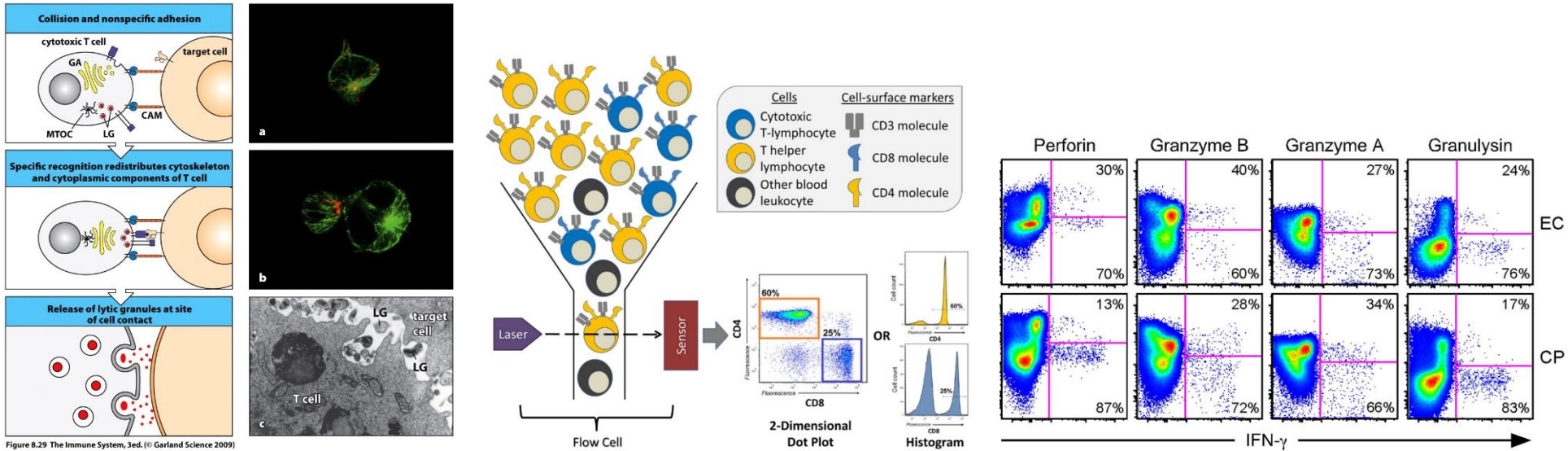
ΣΥΝΟΨΙΖΟΝΤΑΣ

- Το ανοσιακό σύστημα αποτελεί το βασικό αμυντικό σύστημα του ανθρώπου
- Η Κυτταροτοξικότητα είναι μια «κατηγορία» μηχανισμών άμυνας του ανοσιακού συστήματος
- Συμμετοχή φυσικής και επίκτητης ανοσίας για την εξουδετέρωση ενδοκυττάρων παθογόνων και καρκινικών κυττάρων

Ανάπτυξη δοκιμασιών μελέτης της κυτταροτοξικότητας με κυτταρομετρία ροής λόγω:

- Αποφυγής χρήσης ραδιενεργών μορίων
- Ανίχνευση και εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας ανά κύτταρο και ανά κυτταρικό πληθυσμό
- Εκτιμώνται όλα τα στάδια της κυτταρολυτικής διαδικασίας
- Η ΚΡ συνδυάζει την ταχεία και ταυτόχρονη μέτρηση πολλών παραμέτρων σε ένα κύτταρο επιτρέποντας την ανάλυση σημαντικών χαρακτηριστικών (φαινότυπος και λειτουργική δραστηριότητα) σπάνιων κυτταρικών πληθυσμών που συμμετέχουν στο μηχανισμό της κυτταροτοξικότητας
- Τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας με ΚΡ θεωρούνται αξιόπιστα, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα

Κυτταροτοξικές δοκιμασίες με Κυτταρομετρία Ροής



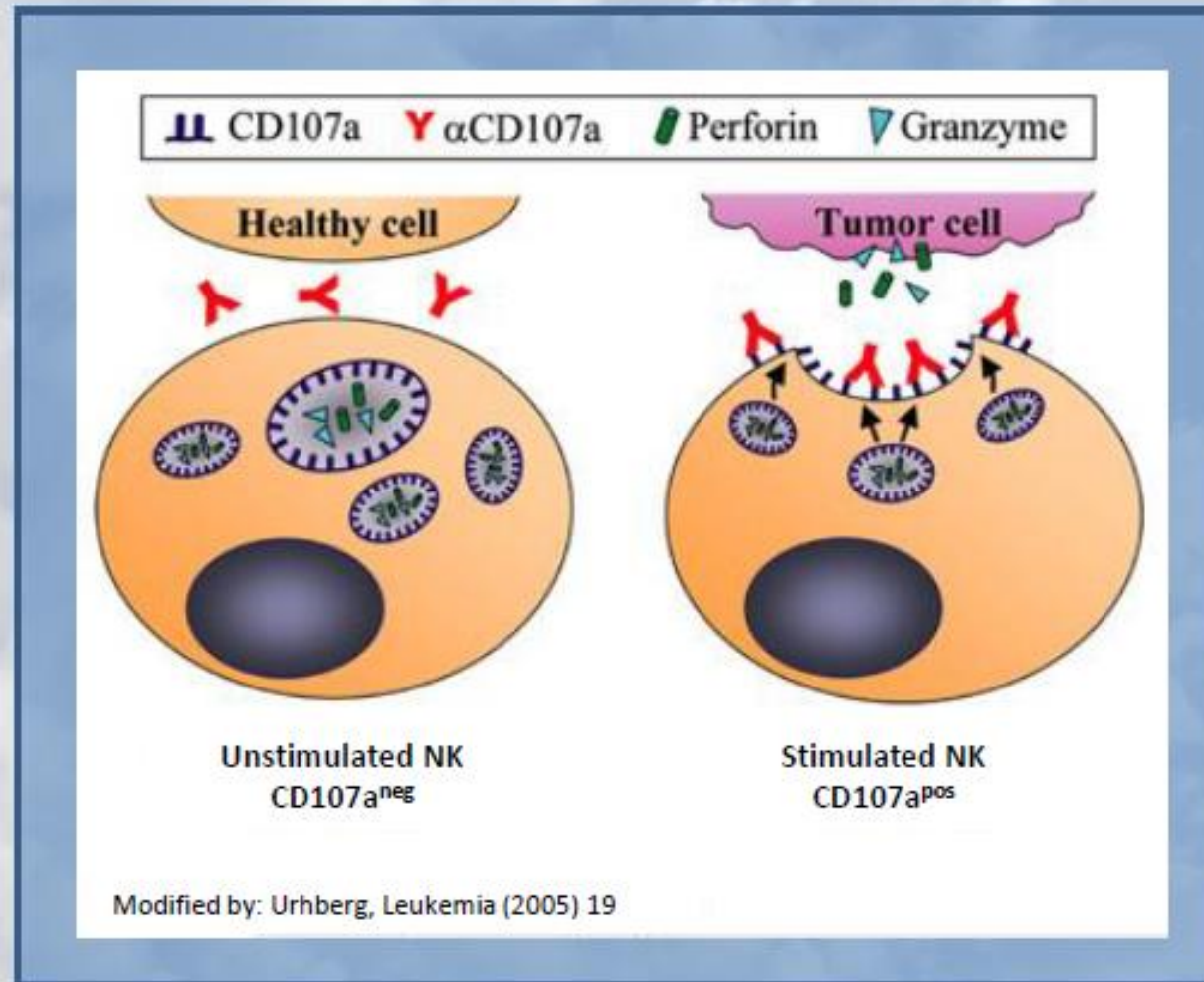
- Μελέτη του κυτταροτοξικού μηχανισμού Λυτικών Ενζύμων perforine-granzyme
- FasL-Fas μονοπατιού (ενεργοποίηση οικογένειας κασπασών)
- της κυτταρικής απόπτωσης που επάγουν (Annexin V/7AAD or PI)
- της αποκοκκίωσης των δραστικών κυττάρων (CD107a, CD107b)
- Με ταυτόχρονη μέτρηση κυτταροκινών και ειδικών αντισωμάτων δραστικών κυττάρων ή/και κυττάρων-στόχων

Ευχαριστώ πολύ!

B. Flow Cytometry in the study of degranulation

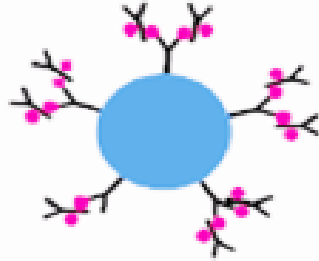
[Del Zotto, ESCCA, Sicily, September 2015]

CD107a expression evaluation

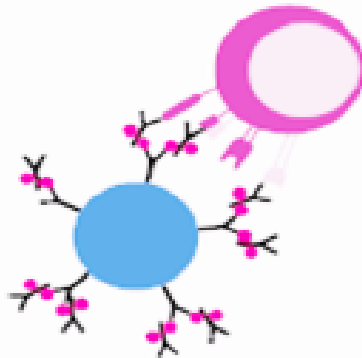




Anti-Biotin MACSi Bead™ Particles have Anti-Biotin antibodies conjugated to their surface.



MACSi Bead™ Particles are loaded with various biotinylated antibodies (i.e. CD16, NCRs, NKG2D, DNAM-1, CD18 etc) under slow continuous rotation.



NK cells bind to the loaded MACSi Bead™ Particles and get activated by the stimulation of anti-CD16 antibodies or a cocktail of many other Ab (i.e. CD16, NCRs, NKG2D, DNAM-1, CD18 etc). The loaded MACSi Bead™ Particles mimic the effect of the natural ligand activating the NK cytotoxicity.



Anti-biotin antibody conjugated to a MACSi Bead™ Particle



Biotinylated antibodies (CD16, NCRs, NKG2D, DNAM-1, CD18, etc)



NK activatory molecules

ATTENTION

Ratio \rightarrow target : effector

In cytotoxicity tests

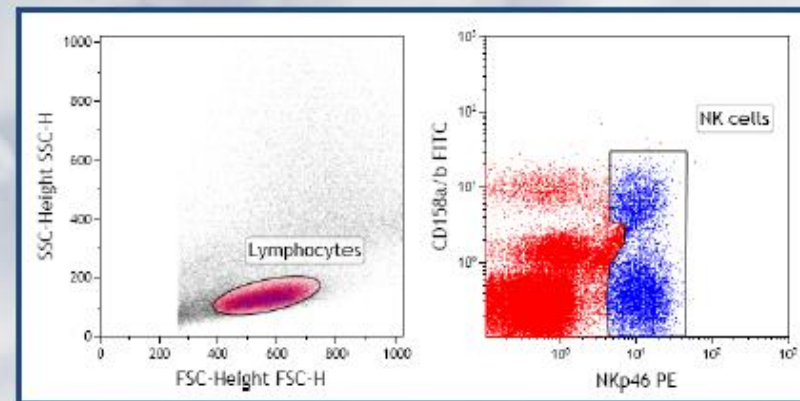
(i.e. Chromium release)

Increase effector concentration

In degranulation tests

(i.e. K562:effector or beads:effector)

Increase target concentration

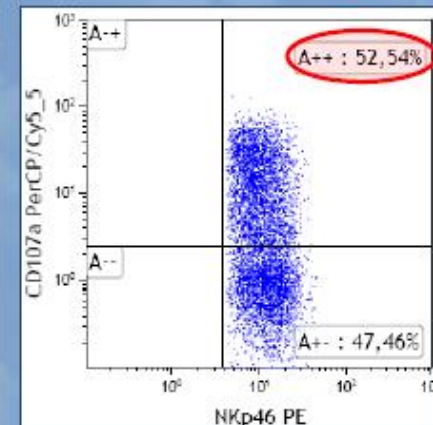
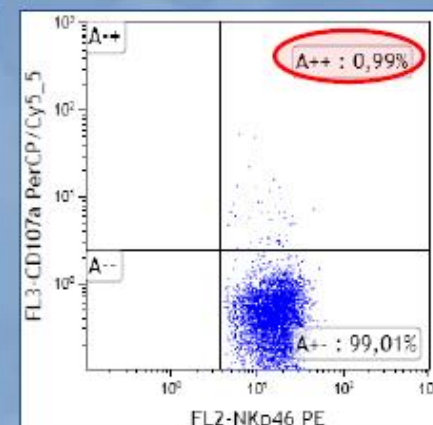
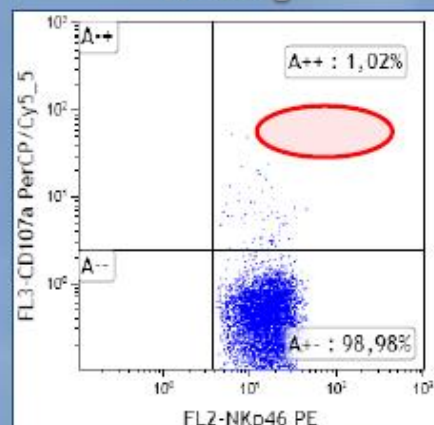


Beads coated with:

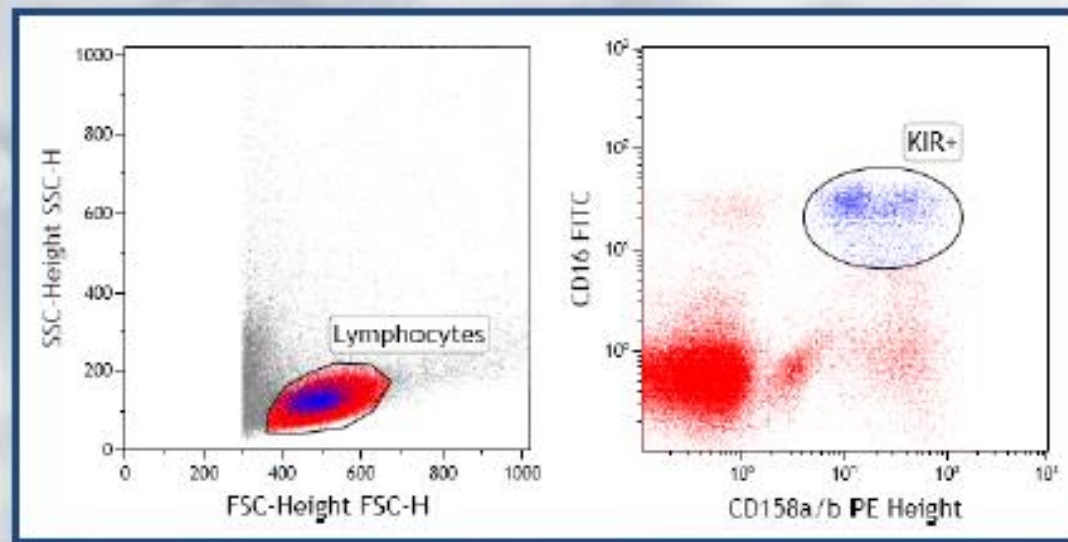
Nothing

CD56

α CD16

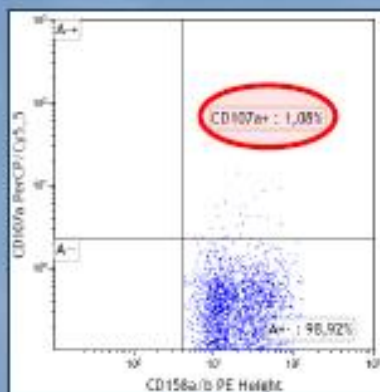


2 days of culture
No cytokine stimulation

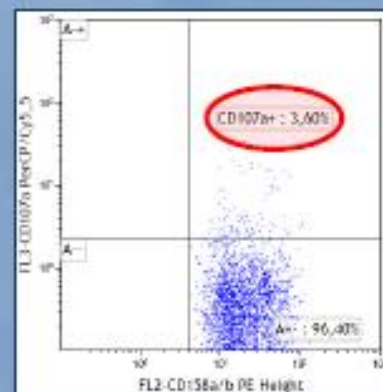


Beads coated with:

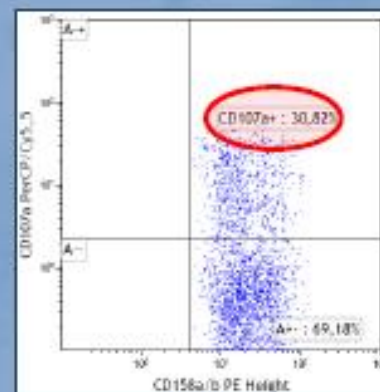
CD56



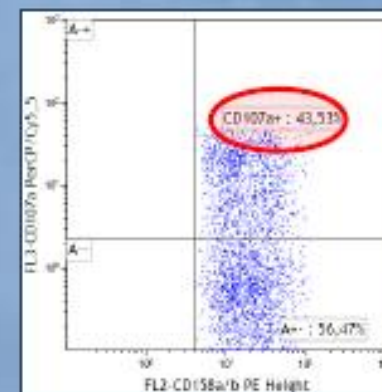
DNAM1



NKp46

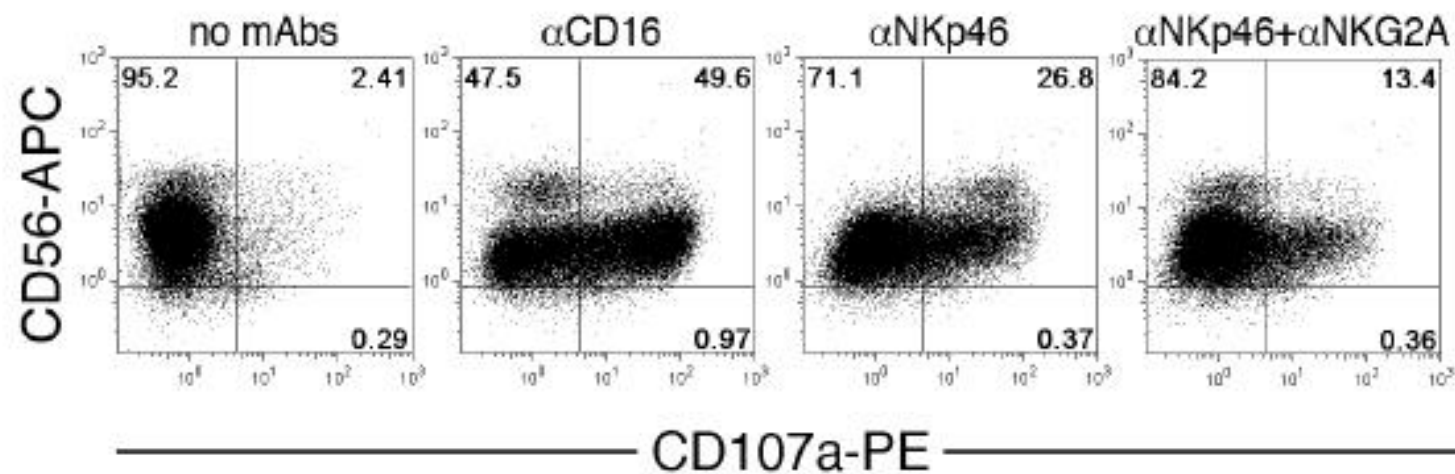


NKP46 + DNAM1



2 days of culture
No cytokine stimulation

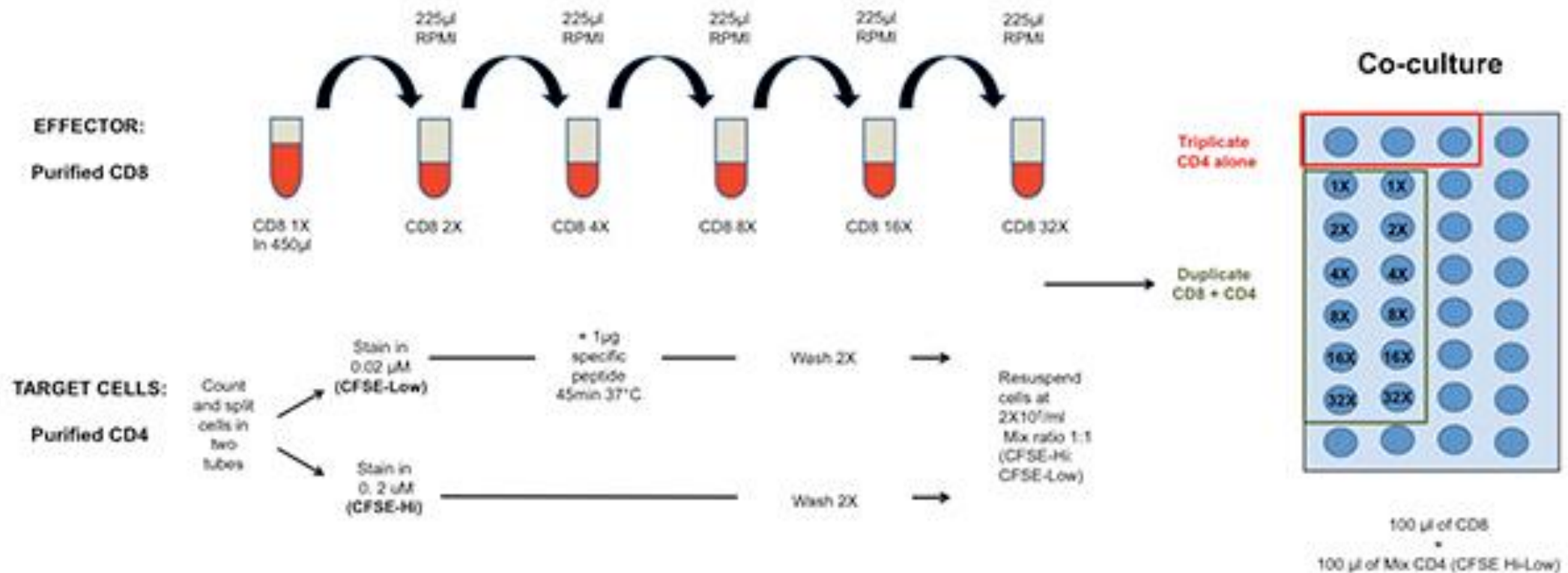
- REDIRECTED KILLING ASSAY -

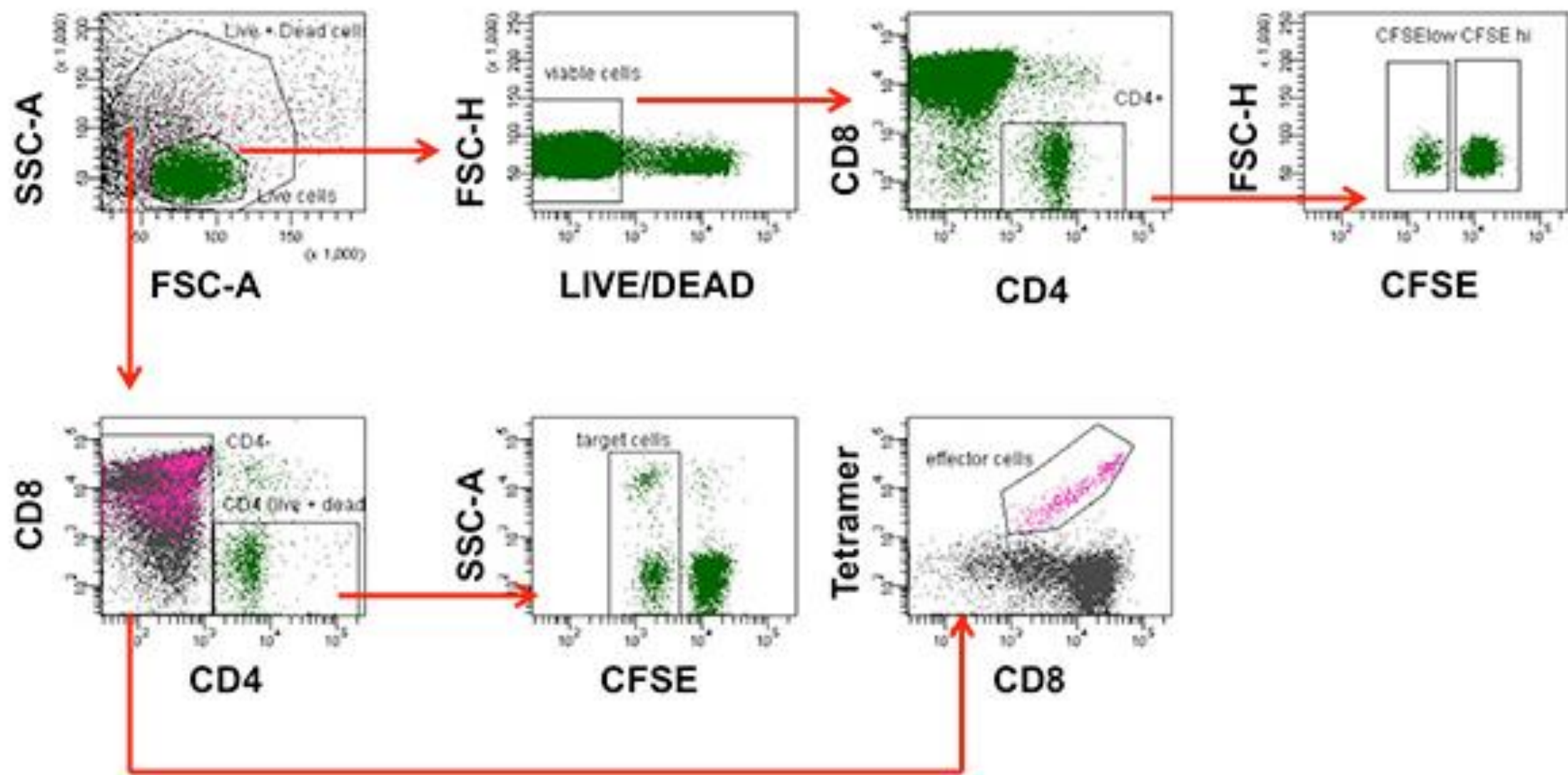


EFFECTOR: o.n. IL-2 activated NK
TARGET: Fc γ R⁺ P815 (murine mastocytoma)

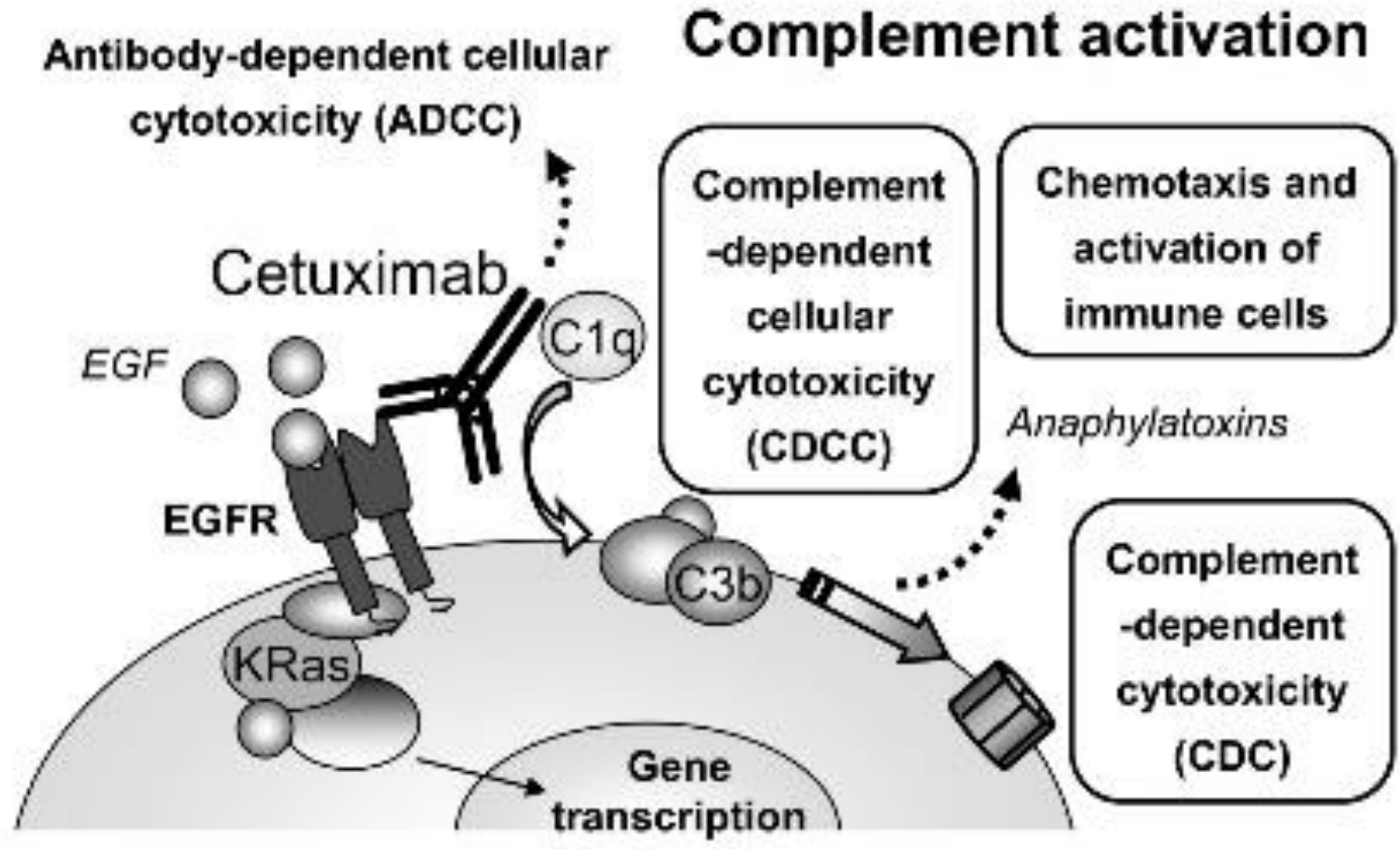
Γ. Cell-based Flow Cytometry Assay to Measure Cytotoxic Activity

Noto A. et al. journal of visualized experiments, 2013, doi:10.3791/51105





Κυτταροτοξικότητα μέσω ενεργοποίησης του συμπληρώματος, (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)



*Yi-Fan Hsu et al. Research Complement activation mediates cetuximab inhibition of non-small cell lung cancer tumor growth in vivo. Molecular Cancer 2010, 9:139