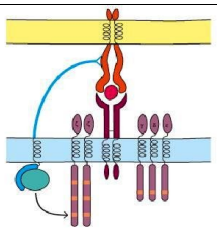
فصل دهم

بلوغ، فعال شدن و تمایز سلول T

- بلوغ سلول‌های T و تیموس
- گزینش تیموس و گنجینه سلول T
- فعال شدن سلول T
- تمایز سلول T
- جمعیت‌های سلول T و مرگ سلولی



- تیموس و بلوغ سلول T

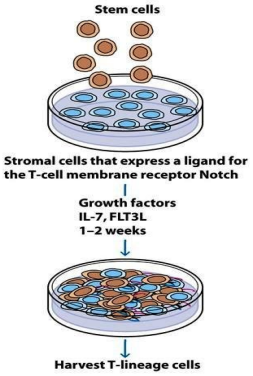
پیش‌ساز سلول‌های T در مراحل اولیه خونسازی، در حدود روز یازدهم حاملگی در موش و هفته هشتم یا نهم حاملگی در انسان، شروع به مهاجرت به تیموس می‌کنند. مشابه بلوغ سلول B در مغز استخوان، بلوغ سلولT مستلزم بازآرایی ژن‌های TCR رده زایا و عرضه شاخص‌های غشایی مختلف می‌باشد. در تیموس، سلول‌های T(**تیموسیت‌ها**[1]) در طول مسیرهای تکوین، تکثیر و تمایز می‌یابند و در نهایت دو زیر جمعیت عملکردی مجزا از سلول‌های T بالغ را به وجود می‌آورند.

همان‌طور که در فصل ۲ نشان داده شده، تیموس، نقش اساسی در زیست شناختی سلول T دارد. علاوه بر این که تیموس منبع اصلی تمام سلول‌های T می‌باشد. تنوع سلول‌هایT و تشکیل گنجینه سلول‌های T اجرایی نیز در آنجا صورت می‌گیرد. **گزینش مثبت**[2]، تنها به سلول‌های T که TCR آنها قادر به شناسایی مولکول‌هایMHC خودی می‌باشند، امکان بقا می‌دهد. بنابراین، این مرحله مسئول ایجاد گنجینه سلول‌های Tمحدود به MHCخودی می‌باشد. مرحله دیگر گزینش، یعنی **گزینش منفی**[3]، سلول‌های T که با قدرت بالا به MHC خودی واکنش می‌دهند را حذف می‌کند. گزینش منفی، یکی از عوامل مهم در ایجاد یک گنجینه سلول‌های T اولیه است که به خودی تحمل دارند.

تکوین سلول T، با رسیدن شمار اندکی از پیش‌سازهای لنفوئیدی مهاجر از خون به تیموس آغاز می‌شود. این سلول‌ها در تیموس تکثیر و تمایز یافته و تحت مراحل گزینش، به

1- thymocytes
2- positive selection
3- negative selection

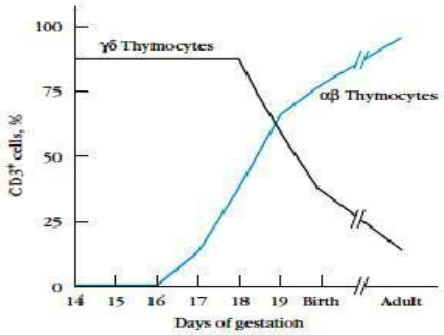
سلول‌های T بالغ تکوین می‌یابند. در سال ۲۰۰۲ زونیگاپفلوکر[1] و همکارانش نشان دادند که تکوین سلول‌های T را می‌توان با کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان روی روده سلول‌های استرومایی دارای لیگاند ویژه پذیرنده‌های غشایی Notch القا نمود. تکوین سلول‌های T نیازمند انتقال پیام با واسطه Notch می‌باشد و عدم بلوغ سلول‌های T اولیه که ژن‌های Notch آنها تخریب شده بود، شاهدی براین مدعاست. رشد سلول‌های بنیادی خونساز (HSC) روی سلول‌های استرومایی که لیگاند Notch را عرضه می‌کنند، منجر به تکوین این سلول‌های بنیادی به رده T می‌شود (شکل ۱-۱۰).



شکل ۱-۱۰: تکوین سلول های T از سلول های بنیادی خونساز و سلول های استرومایی مغز استخوان که لیگاند Notch را عرضه می کنند.

همان‌طور که شکل ۲-۱۰ نشان می‌دهد، هنگام رسیدن پیش‌سازهای سلول T به تیموس، شاخص‌های سطحی همچون TCR، مجموعه CD3 یا کمک‌پذیرنده‌های CD4 و CD8را عرضه نمی‌کنند.

1- J.C.Zuniga-Pfluker



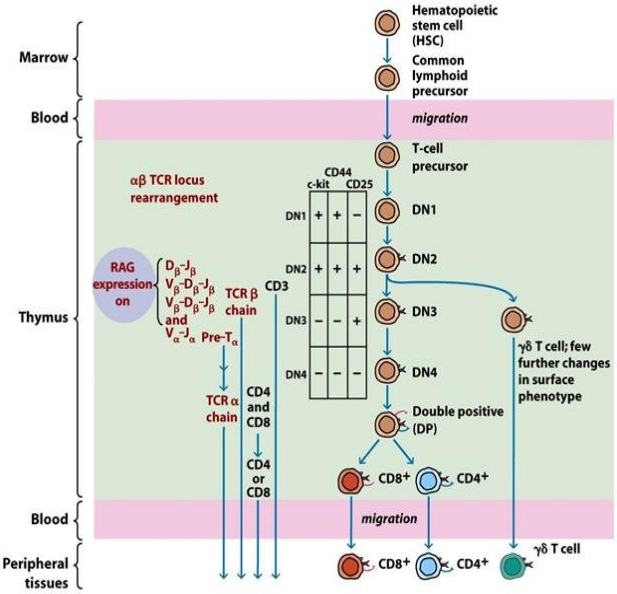
شکل مروری ۲-۱۰: تکوین سلول های T در موش.

در حقیقت هنوز این سلول‌های پیش‌ساز، ژن‌های TCR خود را بازآرایی نکرده و پروتئین‌هایی مانند RAG-1 و RAG-2 که برای این بازآرایی ضروری می‌باشند را عرضه نمی‌کنند. پس از رسیدن به تیموس، پیش‌سازهای T وارد کورتکس خارجی شده و به کندی تکثیر می‌یابند. در طی تکوین سه‌هفته‌ای آنها در تیموس، سلول‌های T با عبور از یک‌سری مراحل که با تغییر خصوصیات ظاهری آنها مشخص‌می‌شود،تمایز می‌یابند. به دلیل این که این سلول‌ها $CD8^-$ $CD4^-$ می‌باشند، به آنها **سلول‌های دوگانه منفی**[1] (DN) می‌گویند. در حقیقت، سلول‌های DN T را می‌توان براساس حضور یا عدم حضور مولکول‌های سطحی c-Kit، CD44 و CD25 به چهار زیر مجموعه (DN1-4) تقسیم نمود.

سلول‌هایی که وارد تیموس می‌شوند (DN1) قادرند به همه زیر مجموعه‌های سلول T تمایز یافته و از نظر ظاهری، $c\text{-}Kit^+$، CD44high و -CD25 می‌باشند. زمانی که سلول‌های DN1 وارد تیموس می‌شوند، شروع به تکثیر و عرضه cD25 کرده و تبدیل به $c\text{-}Kit^+$، CD44low، $CD25^+$ (DN2) می‌گردند. در این مرحله، سلول‌های Tبازآرایی ژن‌های زنجیره‌های γ، β و $TCR\alpha$ آغاز می‌شود. با این حال، احتمالاً به دلیل تراکم DNA حاوی ژن‌های α، این جایگاه برای تشکیلات نوترکیبی قابل دسترس نبوده و بازآرایی نمی‌شود.

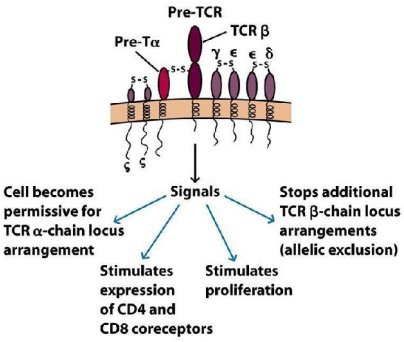
1- double negative (DN)

عرضه c-Kit و CD44 در مرحلـه DN3 متوقـف شـده و بـازآرایی γ، β، TCRα افـزایش می‌یابد. درصد کمی از سلول‌ها، جهت ساخت سلول‌های γδT از حالـت گـذر میـان DN2 و DN3 مشتق شده و به سلول‌های γδT بالغ تبدیل می‌شوند(شکل ۳-۱۰).



شکل ۳-۱۰: محدوده زمانی پیدایش تیموسیت های γδ و تیموسیت های αβ در طی تکوین جنین موش. این گراف نشان می دهد که درصدی از سلول های $CD3^+$ در تیموس، دوگانه منفی می باشند و γδTCR را حمل می کنند و یا دوگانه مثبت می باشند که αβTCR را حمل می کنند.

بیشتر سلول‌های DN2، متعهد به تولید سلول‌های αβT مـی‌شـوند و فنوتیـپ DN3 (c-Kit^-، $CD25^+$ و $CD44^-$) را کسب می‌کنند؛ تکثیر آنها متوقف شده و پروتیئن‌های حاصل از بازآرایی βTCR در سیتوپلاسم آنها قابل شناسایی است. زنجیـره‌هـای β بـا گلیکـوپروتئین ۳۳KDa تحت عنوان زنجیره Pre-Tα ترکیـب شـده و بـا مجموعـه CD3 بـرای تشـکیل مجموعه Pre-TCR ترکیب می‌شوند (شکل ۴-۱۰).



شکل ۴-۱۰: ساختار و فعالیت پذیرنده pre-T.

پروتئین Notch در این مرحله از تکامل، نقش مهمی برعهده دارد. سلول‌هایی که Notch را عرضه نمی‌کنند، از این مرحله بلوغ عبور نخواهند کرد.

تشکیل Pre-TCR، مسیرهای انتقال پیامی را فعال می‌کند که چندین پیامد دارد:

- نشان‌دهنده بازآرایی موفق زنجیره TCRβ و پیامی جهت تکثیر و بلوغ می‌باشد.
- مهار بازآرایی بیشتر ژن‌های زنجیره TCRβ، که منجر به حذف آللی می‌شود.
- امکان بازآرایی زنجیره TCRα را برای سلول فراهم می‌نماید.
- سبب تحریک تکوین بیشتر به سمت حالت دوگانه مثبت[1] ($CD4^+CD8^+$) می‌شود.

در موش‌ها، ژن‌های زنجیره TCRα تا قبل از روز شانزدهم یا هفدهم حاملگی عرضه نمی‌شوند؛ سلول‌های دوگانه مثبت عرضه کننده CD3 و پذیرنده αβ در روز هفدهم شروع به ظاهر شدن می‌کنند و در زمان تولد به حداکثر تعداد خود می‌رسند(شکل ۳-۱۰).

تیموسیت‌های DP، دارای TCR کامل بوده و تحت گزینش مثبت و منفی قرار می‌گیرند.

تکوین سلول T یک فرآیند پرهزینه برای میزان می‌باشد. در حدود ۹۸ درصد تیموسیت‌ها به بلوغ نمی‌رسند؛ این سلول‌ها در تیموس به دلیل شکست در تولید ژن TCR بازآرایی شده کارآمد و یا به دلیل شکست در گزینش‌های تیموس بواسطه مرگ

1- double positive (DP)

برنامه‌ریزی شده می‌میرند. تیموسیت‌های DP که مجموعه αβTCR-CD3 را عرضه کرده و در نتیجه گزینش تیموس زنده می‌مانند. به تیموسیت‌های یگانه مثبت $CD4^+$[1] یا تیموسیت‌های یگانه مثبت $CD8^+$[2] نابالغ، تکوین می‌یابند.

- گزینش تیموس و گنجینه سلول T

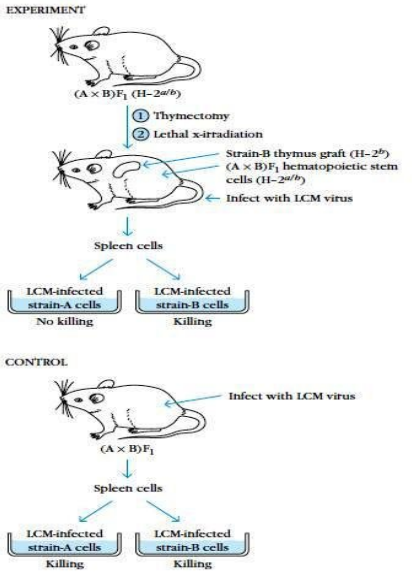
بازآرایی تصادفی ژن‌ها در DNA رده زایای TCR، با تنوع اتصالی می‌تواند گنجینه بزرگی از TCRها (با تنوع بیش از 10^{15} برای پذیرنده αβ و 10^{18} نوع برای پذیرنده γδ) تولید کند. محصولات ژنی حاصل از ژن‌های بازآرایی شده TCR، به صورت تئوری بایستی قادر به شناخت آنتی‌ژن‌های محلول، مولکوهای MHC خودی یا مولکول MHC غیر خودی همراه با آنتی‌ژن باشند. با این حال، خصوصیت بارز سلول‌های T بالغ این است که تنها آنتی‌ژن‌های بیگانه همراه با مولکول‌های MHC خودی را شناسایی میکنند.

- **گزینش مثبت**: پذیرنده‌های با قابلیت اتصال به مولکول‌های MHC خودی را انتخاب می‌کند که پیامد آن محدودیت به MHC خودی[3] می‌باشد. سلول‌هایی که گزینش نمی‌شوند طی مرگ برنامه‌ریزی شده، در تیموس حذف می‌شوند.
- **گزینش منفی**: تیموسیت‌های دارای پذیرنده با میل پیوندی بالا برای مولکول‌های MHC خودی به تنهایی یا MHC خودی همراه با آنتی‌ژن خودی را حذف می‌کند که پیامد آن، **تحمل به خود**[4] می‌باشد.

هر دو فرآیند برای تولید سلول‌های T بالغ محدود به MHC خودی و تحمل به خود ضروری می‌باشند. ۹۸درصد تیموسیت‌ها در تیموس به دلیل مرگ برنامه‌ریزی شده می‌میرند. درصد بسیاری از این نرخ بالای مرگ مربوط به تیموسیت‌هایی است که به دلیل

1- single positive CD4+
2- single positive CD8+
3- MHC restriction
4- self- tolerance

عدم شناخت اختصاصی مولکول‌های MHC خودی، در گزینش مثبت می‌میرند. این سلول‌ها، تحریک‌های رشد را دریافت نکرده و طی فرآیندی با نام مرگ در اثر بی‌توجهی[1] می‌میرنـد. شواهد اولیه مبنی بر نقش تیموس در گزینش گنجینـه سـلول‌هـای T از آزمـایش بـر روی موش‌های کایمرک که توسط زینکرناگال و همکارانش انجام شد، بدست آمد (شکل ۵-۱۰).



شکل ۵-۱۰: اثبات آزمایشگاهی این که تیموس جهت بلوغ سلول های T ضروری می باشد و پذیرنده های این سلول ها آنتی ژن عرضه شده بر روی سلول های هدف با هاپلوتایپ تیموس را شناسایی می کنند.

این محققان، تیموس نوع B را به موش‌های نسل اول (A×B) فاقد تیموس و اشعه دیـده، پیوند زدند و سپس سیستم ایمنی این حیوانات را با تزریق داخل وریـدی سـلول‌هـای مغـز استخوان نسل اول دوباره بازسازی کردند. برای اطمینان از این که تیموس پیوند شده حاوی سلول‌های T بالغ نباشند، قبل از پیوند آن را تحت تأثیر اشعه قـرار دارنـد. در یـک چنـین سیستم تجربی، پیش‌سازهای سـلول T مغـز اسـتخوان پیونـدی نسـل اول در تیمـوس بـالغ

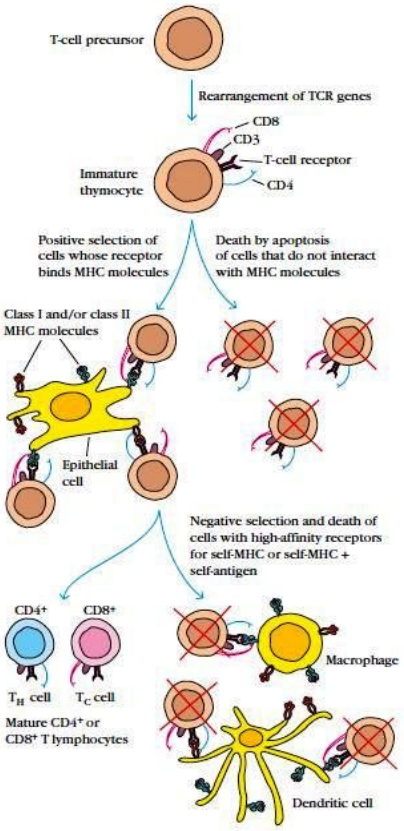
1- death by neglect

می‌شوند. آیا این سلول‌های T نسل اول، محدود به MHCهای هاپلوتایپ تیموس می‌باشند؟ برای پاسخ به این سئوال، موش‌های کایمریک با ویروس LCM آلوده شده و سلول‌های T طحال آنها به منظور توانایی کشتار سلول‌های هدف آلوده به LCMV موش‌های سویه A یا B مورد بررسی قرار گرفت. وقتی سلول‌های Tc موش‌های کایمریک روی سلول‌های هدف موش‌های سویه A یا B آزموده شدند، آنها توانستند سلول‌های هدف آلوده به LCMV موش‌های سویه B را بکشند. این موش‌ها هاپلوتایپ مشابه با تیموس پیوند شده (B) داشتند (شکل ۵-۱۰) بنابراین، هاپلوتایپ MHC تیموس، تعیین کننده محدودیت به MHC در طول تکوین سلول‌های T می‌باشد.

- گزینش مثبت، تضمین کننده محدودیت به MHC می‌باشد

گزینش مثبت، در ناحیه کورتکس تیموس صورت می‌گیرد و شامل واکنش تیموسیت‌های نابالغ با سلول‌های اپی‌تلیال کورتکس می‌باشد (شکل ۶-۱۰). شواهد نشان می‌دهد که TCR روی تیموسیت‌ها، در محل اتصال (سلول- سلول) تمایل به تجمع با مولکول‌های MHC روی سلول‌های ناحیه کورتکس را دارند. برخی محققان پیشنهاد کرده‌اند که این واکنش‌ها به تیموسیت‌های نابالغ امکان می‌دهند تا یک پیام محافظت‌کننده را که مانع از مرگ سلولی می‌شود، دریافت کنند. سلول‌هایی که پذیرنده‌های آنها قادر به اتصال به مولکول‌های MHC نباشند، نمی‌توانند با سلول‌های اپی‌تلیال تیموس واکنش دهند و در نتیجه پیام محافظت کننده را دریافت نکرده و متحمل مرگ توسط آپوپتوز می‌شوند. در طی گزینش مثبت، بیان پروتئین‌های RAG-1، RAG-2 و TdT که برای بازآرایی مورد نیازند، از سرگرفته می‌شوند (شکل ۷-۵). بنابراین هر کدام از تیموسیت‌های نابالغ یک کلون، با زنجیره β معین، برای بازآرایی متفاوت ژن‌های زنجیره TCRα فرصت دارند و سپس TCRهای حاصله برای تشخیص MHC خودی گزینش می‌شوند، تنها سلول‌های حاوی هترودایمرαβTCR درمیان اعضای یک کلون بسیار مهم است زیرا سبب افزایش احتمال این امر می‌شود که برخی

اعضا بتوانند گزینش مثبت را پشت‌سر بگذراند. سلولی کـه زنجیـره α را بـازآرایی نمایـد و سبب تولید αβTCR شود که MHC خودی را بشناسد، زنده مانده و سایر اعضای کلون که در این امر شکست بخورند از طریق مرگ برنامه‌ریزی شده طی ۳ تا ۴ روز می‌میرند.



شکل ۶-۱۰: گزینش مثبت و منفی تیموسیت ها در تیموس.

- گزینش منفی، تضمین کننده تحمل به خود می‌باشد

جمعیتی از تیموسیت‌های محدود به MHC که طی گزینش مثبت زنده مانـده‌انـد، دارای پذیرنده‌هایی با محدوده میل پیوندی کم تا زیاد برای آنتی‌ژن خـودی عرضـه شـده توسـط مولکول‌های MHC می‌باشند. تیموسیت‌های دارای پذیرنده‌های بـا میـل پیونـدی بـالا طـی گزینش منفی‌حذف می‌شوند. در طی گزینش منفی، سـلول‌هـای دنـدریتیک و ماکروفاژهـای حاوی مولکول‌های MHC کلاس I و II با تیموسیت حاوی پذیرنده با میل پیوندی بالا بـرای آنتی‌ژن‌های خودی همراه با مولکول‌های MHC خودی یا تنها با مولکول‌های MHC خـودی واکنش می‌دهند (شکل ۶-۱۰).

عناصر اساسی در گزینش مثبت و منفی، توسط چندین آزمایش آشکار شد. شواهد مبنـی براین که گزینش مثبت در تیموس نیازمند اتصال تیموسیت‌ها به مولکول‌های MHC کلاس I و II می‌باشد، طی بررسی‌های تجربی بر روی موش‌های ژن تخریب شده که قادر به تولیـد مولکول‌های MHC کلاس I و II عملکردی نبودند بدست آمده است(جدول ۱-۱۰).

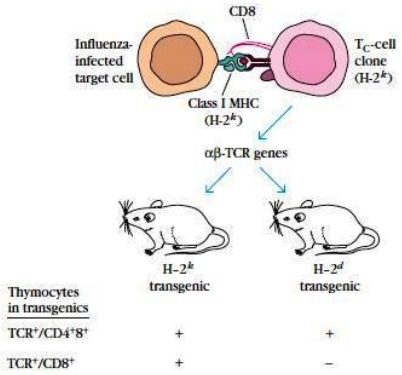
TABLE 10-1 Effect of class I or II MHC deficiency on thymocyte populations*

Cell type	Control mice	KNOCKOUT MICE: Class I deficient	KNOCKOUT MICE: Class II deficient
$CD4^-CD8^-$	+	+	+
$CD4^+CD8^+$	+	+	+
$CD4^+$	+	+	−
$CD8^+$	+	−	+

*Plus sign indicates normal distribution of indicated cell types in thymus. Minus sign indicates absence of cell type.

عدم حضور مولکول‌های MHC کلاس I یا II به ترتیب مانع از گزینش مثبت سلول‌هـای $CD8^+T$ و $CD4^+$ می‌شوند. آزمایش با موش‌های ترانس ژنیک، شواهد بیشـتری در مـورد نقش مولکول‌های MHC در گزینش مثبت آشکار نمود. دراین آزمایش‌ها، ژن‌های بازآرایی شـده αβTCR مشـتق از کلـون‌هـای سـلول $CD8^+T$ ویـژه آنتـی‌ژن آنفـولانزا همـراه بـا

مولکول‌های MHC-I ($H\text{-}2^k$) به داخل تخم بارور دوسویه متفاوت موش (یکی دارای هاپلوتایپ $H\text{-}2^k$ و دیگری $H\text{-}2^d$) تزریق شدند (شکل ۷-۱۰).

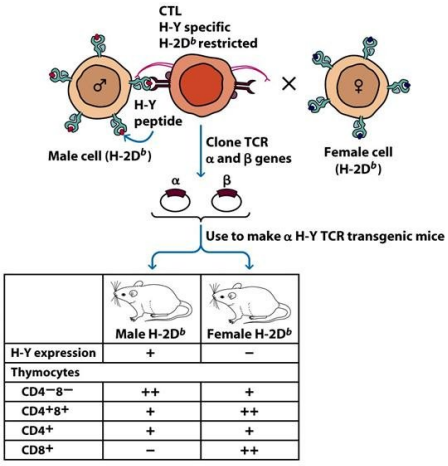


شکل ۷-۱۰: اثر هاپلوتایپ میزبان بر روی بلوغ سلول T در موش های حامل ترانس ژن های کدکننده یک TCR محدود به $H\text{-}2^b$ MHC-I ویژه ویروس آنفولانزا.

از آنجایی که ژن پذیرنده انتقال یافته قبلاً بازآرایی شده‌بود، بازآرایی سایر ژن‌های TCR در این موش‌های ترانس ژنیک مهار شده بود. بنابراین درصد بالایی از تیموسیت‌های این موش‌های ترانس ژنیک، پذیرنده‌های T کد شده توسط ژن انتقال یافته را عرضه می‌کردند.

شواهد مبنی بر حذف تیموسیت‌های واکنش‌دهنده با آنتی‌ژن‌های خودی همراه مولکول‌های MHC، از بررسی چند سیستم تجربی به دست آمده است. در یک سیستم، بلوغ تیموسیت‌ها در موش‌های ترانس ژنیک دارای ژن انتقال یافته αβTCR اختصاصی مولکول MHC-I (D^d) به همراه آنتی‌ژن H-Y (پروتئین کوچکی که توسط کروموزوم Y کد می‌شود) بررسی شده بود. در این آزمایش، هاپلوتایپ موش‌های ترانس ژنیک، از نوع $H\text{-}2^d$ بود، بنابراین تفاوت میان گزینش تیموسیت‌ها در موش‌های ترانس ژنیک نرو ماده متناسب با حضور یا عدم حضور آنتی‌ژن H-Y خواهد بود.

آنالیز تیموسیت‌ها در موش‌های ترانس ژنیک آشکار نمود که موش‌های ماده دارای تیموسیت‌های عرضه کننده TCR ویژه H-Y می‌باشند، در صورتی که نرها فاقد این گونه تیموسیت‌ها هستند (شکل ۸-۱۰).



	Male H-2D^b	Female H-2D^b
H-Y expression	+	−
Thymocytes		
CD4$^-$8$^-$	++	+
CD4$^+$8$^+$	+	++
CD4$^+$	+	+
CD8$^+$	−	++

شکل ۸-۱۰: اثبات آزمایشگاهی این که گزینش منفی تیموسیت ها مستلزم آنتی ژن و MHC خودی می باشد. در این آزمایش ترانس ژن های ماده و نر H-2^b تولید می شوند که حامل ترانس ژن های TCR ویژه آنتی ژن H-Y به علاوه مولکول D^b می باشند. این آنتی ژن تنها در موش های نر عرضه می شود. آنالیز FACS این موش های ترانس ژن نشان می دهد که سلول های CD8$^+$T بالغ ترانس ژنی را که در موش های نر وجود ندارد را عرضه می کنند. این حاکی از آن می باشد که تیموسیت ها با یک آنتی ژن خودی واکنش داده و طی گزینش تیموسی حذف می شوند.

به عبارت دیگر، تیموسیت‌های واکنشگر با H-Y در موش‌های نر، خود واکنشگر محسوب شده و حذف می‌گردند. با این حال، درموش‌های ترانس ژنیک ماده، که آنتی‌ژن H-Y را عرضه نمی‌کردند، این سلول‌ها، خود واکنشگر نبوده و بنابراین حذف نشده بودند. وقتی تیموسیت‌های این موش‌های نر ترانس ژنیک در آزمایشگاه در مجاورت سلول‌های عرضه کننده H-Y کشت داده شوند، تیموسیت‌ها تحت مرگ برنامه‌ریزی شده قرار گرفتند که شاهد قوی مبنی بر گزینش منفی می‌باشد.

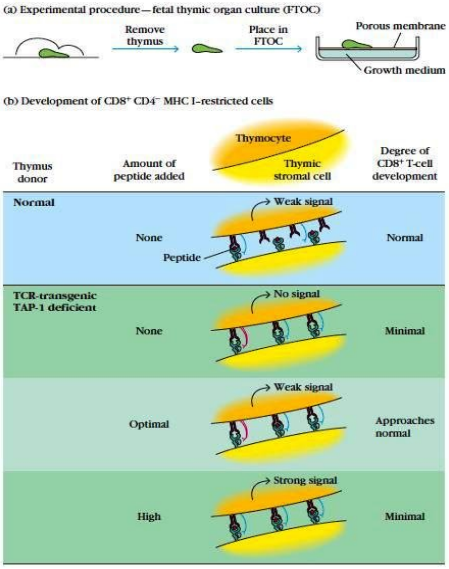
- مباحث بسیاری در گزینش تیموس، حل نشده باقی مانده‌اند

اگر چه مباحث بسیاری درمورد مراحل تکوین سلول‌های $CD4^+$ و $CD8^+$ شناخته شده است ولی مباحث حل‌نشده‌ای باقی مانده‌است. یکی از مشهورترین آنها تناقض زیر می‌باشد: اگر گزینش مثبت تنها به تیموسیت‌هایی اجازه به زنده‌ماندن دهد که با مولکول‌های MHC خودی واکنش می‌دهند و گزینش منفی نیز تیموسیت‌های خودواکنشگر را حذف کند، پس به هیچ سلولی اجازه بلوغ داده نخواهد شد. از آنجایی که نتیجه تکوین سلول Tبه اینجا ختم نمی‌شود، واضح است که عوامل دیگری مانع از حذف کل گنجینه سلول‌های T محدود به MHC می‌شوند.

شواهد تجربی به دست آمده از کشت اندام تیموس جنینی (FTOC) در حل این مسئله بسیار مفید بوده است. در این سیستم، لوب‌های تیموس موش را در روز شانزدهم حاملگی بریده و در محیط کشت قرار می‌دهند. در این زمان، لوب‌ها به طور غالب حاوی تیموسیت‌های نابالغ دوگانه منفی در کشت اندام به تکوین خود ادامه داده و می‌توان مراحل گزینش آنها را بررسی نمود. این روش به طور اختصاصی در موش‌های فاقد ژن TAP-1 به کار گرفته شد. در غیاب TAP-1 تنها میزان اندکی از MHC-I روی سلول‌های تیموس عرضه می‌شود و تکوین تیموسیت‌های $CD8^+$ مهار می‌گردد. با این حال، وقتی که پپتیدهای خارجی به کشت اندام اضافه می‌شوند، مولکول‌های MHC-I حامل پپتید، روی سطح سلول‌های تیموس نمایان می‌شوند و تکوین سلول‌های $CD8^+T$ از سرگرفته می‌شود.

دو نظریه برای توضیح تناقض گزینش‌های مثبت و منفی وابسته به MHC وجود دارد. نظریه میل پیوندی تام و نظریه پیام تمایزی.

فرضیه میل پیوندی تام، با موش‌های فاقد ژن TAP-1 که حاوی ترانس ژن‌های $\alpha\beta$TCR ویژه مجموعه پپتید-MHC (ویروس LCM) بودند، آزمون شدند. از این موش‌ها برای آماده‌سازی کشت اندام تیموس جنینی استفاده شد (شکل ۹-۱۰).

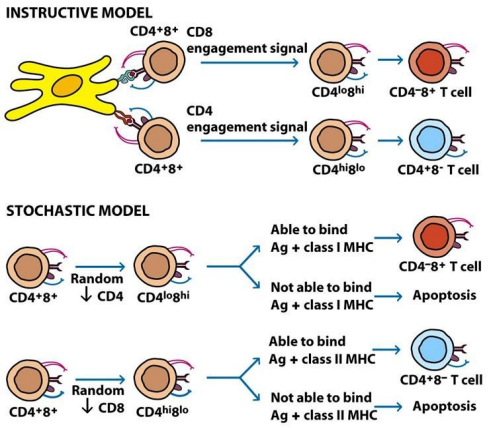


شکل ۹-۱۰: نقش پپتیدها در روند گزینش.

میل پیوندی تام واکنش MHC-TCR با استفاده از غلظت‌های متفاوت پپتید، متنوع گردید. در غلظت‌های کم پپتید، مولکول‌های MHC متصل به پپتید اندک بودند و میل پیوندی تام واکنش TCR-MHC پایین بود. همان‌طور که غلظت پپتید -MHC افزایش می‌یافت، تعداد مجموعه‌های پپتید -MHC نیز افزایش می‌یافت و در نتیجه آن میل پیوندی تام واکنش نیز بیشتر می‌شد. مدل پیام تمایزی، تعریف دیگری را برای تعیین گزینش مثبت و منفی سلول T بیان می‌کند. این مدل بیشتر کیفی است تا کمی و بیشتر روی ماهیت پیام منتقل شده توسط TCR تأکید دارد تا قدرت پیام. اساس این مدل، از مشاهده مجموعه‌های ایمنی به دست آمده است که برخی می‌توانند یک پیام فعال‌سازی ضعیف را منتقل کنند، در حالی که سایرین می‌توانند پیام‌های کامل را منتقل کنند. در این مدل، گزینش مثبت زمانی صورت می‌گیرد که TCRتیموسیت‌ها، در برخورد با مجموعه‌های MHC- پپتید، پیام‌های ضعیفی را انتقال دهند و گزینش منفی زمانی اتفاق می‌افتد که پیام کامل انتقال یابد.

میزان عرضه کمک پذیرنده CD8 نیز می‌تواند روی گزینش تیموس تأثیر بگذارد. در یک آزمایش که میزان عرضه CD8 به طور مصنوعی به دو برابر حالت طبیعی افزایش یافته بود، شمار سلول‌های $CD8^{+}T$ بالغ در تیموس به $\frac{1}{13}$ مقدار طبیعی کاهش یافت،که ممکن است به دلیل افزایش عرضهCD8، میزان میل پیوندی تام تیموسیت‌ها به MHC-I نیز افزایش یافته باشد و امکان گزینش منفی آنها بیشتر شده باشد.

سئوال بدون جواب دیگر در گزینش تیموس، این است که چطور تیموسیت‌های DP مستقیماً به سلول‌های $CD4^{-}$ $CD8^{+}T$ یا $CD4^{+}$ $CD8^{-}$ تبدیل می‌شوند. گزینش تیموسیت‌های DP، منجر به تولید سلول‌های $CD8^{+}T$ محدود به MHC-I و سلول‌های $CD4^{+}T$ محدود به MHC-II می‌شود. دو مدل برای توضیح تغییر شکل پیش‌سازهای DP به یکی از دو جمعیت DP پیشنهاد شده است (شکل ۱۰-۱۰).



شکل ۱۰-۱۰: مدل های پیشنهادی از نقش کمک پذیرنده های CD4 و CD8 در گزینش تیموسیت های دوگانه مثبت که موجب ایجاد سلول های T یگانه مثبت می شوند. طبق این مدل فرضی، واکنش یک کمک پذیرنده با مولکول های MHC بر روی سلول های استرومایی موجب تنظیم کاهشی کمک پذیرنده دیگر می شود.

مدل آموزشی، تصور می‌شود که واکنش های متعدد میان TCR، CD8، CD4 و مولکول‌های MHC کلاس I و II به سلول‌های می‌آموزد که به سلول‌های یگانه مثبت $CD4^+$ یا $CD8^+$ تمایز یابند. مدل تصادفی، پیشنهاد می‌کند که عرضه CD4 یا CD8 به طور تصادفی بدون ارتباط با TCR اختصاصی متوقف می‌شود.

- فعال شدن سلول T

فعال شدن سلولT با واکنش میان مجموعه TCR-CD3 و پپتید پردازش شده و متصل به یکی از مولکول‌های MHC-I (سلول‌های $CD8^+$) یا کلاس II (سلول‌های $CD4^+$)آغاز می‌شود. این فرآیند نیازمند حضور مولکول‌های کمکی مختلف روی غشای سلول‌های T و APC می‌باشد. بسیاری از محصولات ژنی که در اثر واکنش با Ag ایجاد می‌شوند را می‌توان در یکی از سه گروه زیر طبقه‌بندی کرد(جدول ۲-۱۰):

TABLE 10-2 Time course of gene expression by T_H cells following interaction with antigen

Gene product	Function	Time mRNA expression begins	Location	Ratio of activated to nonactivated cells
		IMMEDIATE		
c-Fos	Protooncogene; nuclear-binding protein	15 min	Nucleus	> 100
c-Jun	Cellular oncogene; transcription factor	15–20 min	Nucleus	?
NFAT	Transcription factor	20 min	Nucleus	50
c-Myc	Cellular oncogene	30 min	Nucleus	20
NF-κB	Transcription factor	30 min	Nucleus	> 10
		EARLY		
IFN-γ	Cytokine	30 min	Secreted	> 100
IL-2	Cytokine	45 min	Secreted	> 1000
Insulin receptor	Hormone receptor	1 h	Cell membrane	3
IL-3	Cytokine	1–2 h	Secreted	> 100
TGF-β	Cytokine	< 2 h	Secreted	> 10
IL-2 receptor (p55)	Cytokine receptor	2 h	Cell membrane	> 50
TNF-β	Cytokine	1–3 h	Secreted	> 100
Cyclin	Cell-cycle protein	4–6 h	Cytoplasmic	> 10
IL-4	Cytokine	< 6 h	Secreted	> 100
IL-5	Cytokine	< 6 h	Secreted	> 100
IL-6	Cytokine	< 6 h	Secreted	> 100
c-Myb	Protooncogene	16 h	Nucleus	100
GM-CSF	Cytokine	20 h	Secreted	?
		LATE		
HLA-DR	Class II MHC molecule	3–5 days	Cell membrane	10
VLA-4	Adhesion molecule	4 days	Cell membrane	> 100
VLA-1, VLA-2, VLA-3, VLA-5	Adhesion molecules	7–14 days	Cell membrane	> 100, ?, ?, ?

SOURCE: Adapted from G. Crabtree, *Science* **243**:357.

- **ژن‌های فوری**، طی نیم‌ساعت پس از شناسایی آنتی‌ژن بیان می‌شوند و تعدادی از عوامل رونویسی مثل c-Fos، c-Myc، NFAT -c-Jun و NF-KB را کد می‌کنند.
- **ژن‌های ابتدایی**، در طی ۱ تا ۲ ساعت پس از شناسایی Ag بیان می‌شوند و IL-2، IL-2R، IL-3، IL-6، IFN-γ را کد می‌کنند.
- **ژن‌های تأخیری**، در طی بیش از ۲ روز پس از شناسایی آنتی‌ژن بیان شده و مولکول‌های چسبان مختلفی را کد می‌کنند.

- با درگیری TCR، مسیرهای متعدد انتقال پیام به راه می‌افتد

- انتقال پیام با واکنش بین لیگاند و پذیرنده آغاز می‌شود.
- بسیاری از مسیرهای انتقال پیام با تجمع برخی از اجزای مسیر همراه می‌باشد که توسط لیگاند تحریک می‌شود. این امر توسط پروتئین‌های تطابقی صورت می‌گیرد.
- دریافت پیام، معمولاً منجر به ایجاد پیامبر ثانویه[1] داخل سلولی می‌شود.
- پروتئین کنیازها و پروتئین فسفاتازها، فعال یا مهار می‌شوند.
- پیام‌ها توسط آبشارهای آنزیمی تقویت می‌شوند.

وقایعی که شناسایی آنتی‌ژن را به فعال شدن ژن‌ها مرتبط می‌سازد، بازتابی از عملکرد این روندها می‌باشد. عنصر کلیدی در آغاز فعالیت سلول‌های T، شناخت مجموعه پپتید-MHC توسط TCR می‌باشد. این رویداد منجر به تسهیل یک‌سری از وقایع داخل سلولی می‌شود که از سطح داخلی غشای پلاسمایی شروع شده و به هسته می‌رسند و در آنجا منجر به نسخه‌برداری از ژن‌هایی می‌شوند که موجب تمایز سلول T می‌گردند.

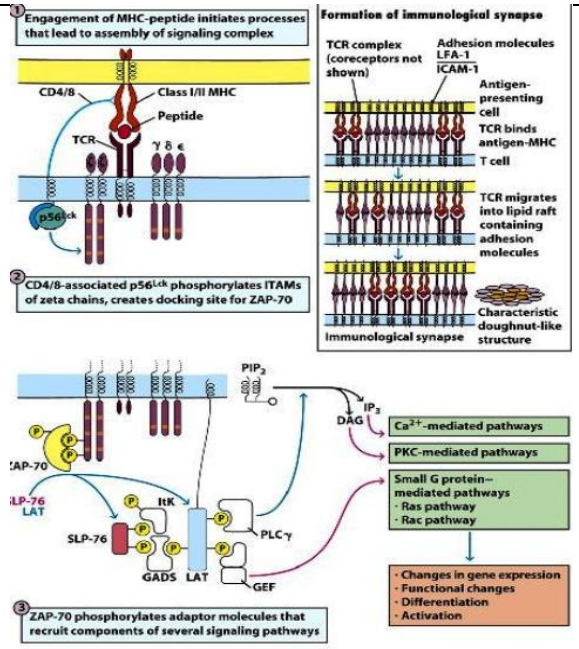
TCR از یک واحد متصل شونده به لیگاند، یک واحد انتقال دهنده پیام داخل سلولی، مجموعه CD3 و همودایمری از زنجیره‌های ζ (zeta) تشکیل شده و تمام این اجزا جهت

1- second massenger

انتقال پیام ضروری می‌باشند. در پاسخ سلول T دو مرحله آغاز و ایجاد پیام قابل شناسایی است.

- **مرحله آغاز**: در سلول T در حالت استراحت، $p56^{LCK}$ یک پروتئین تیروزین کیناز ضروری برای آغاز انتقال پیام TCR بوده و جدا از مجموعه TCR می‌باشد. معمولاً $p56^{LCK}$کیناز در لیپید raft یافت می‌شود. لیپید raft ناحیه‌ای از غشا می‌باشد که غنی از اسنفگومیلین، گلیکواسفنگولیپید و کلسترول می‌باشد. مجموعه TCR که به آنتی‌ژن اتصال نیافته، خارج از این حوزه نگه داشته می‌شود. درگیری TCR با MHC-پپتید، منجر به تجمع مجموعه TCR با لیپید raft شده و به دنبال آن، پذیرنده‌های CD4 و CD8 به ناحیه نامتغیر مولکول MHC متصل می‌شوند (شکل ۱۱-۱۰). تیروزین کیناز $p56^{LCK}$ که در حالت استراحت سلول به دنباله‌های سیتوپلاسمی کمک پذیرنده‌ها متصل می‌باشد، به دنباله‌های سیتوپلاسمی مجموعه TCR نزدیک شده و تیروزین‌های موجود در پلی‌لیپیدهای CD3 را فسفریله می‌کند. تیروزین‌های فسفریله شده در ITAM زنجیره زتا، تکیه‌گاهی را برای پروتئین تیروزین کیناز دیگری به نام ZAP-70 فراهم می‌کنند (شکل ۱۱-۱۰) که پس از اتصال، فعال می‌شود.

ZAP-70 فسفریلاسیون پروتئین‌های تطابقی همراه غشای Van-1، Shc، LAT و SLP-76 (شکل ۱۱-۱۰) را کاتالیز می‌کند. این پروتئین‌ها داربستی برای فراخوانی مولکول‌های واسطه فراهم می‌آورند. یکی از این مسیرها، با واسطه PLCγ صورت می‌گیرد که به یک مولکول تطابقی متصل می‌باشد. این مولکول با فسفریلاسیون، فعال شده و فسفولیپیدهای غشایی را جهت تولید پیامبرهای ثانویه هیدرولیز می‌کند.

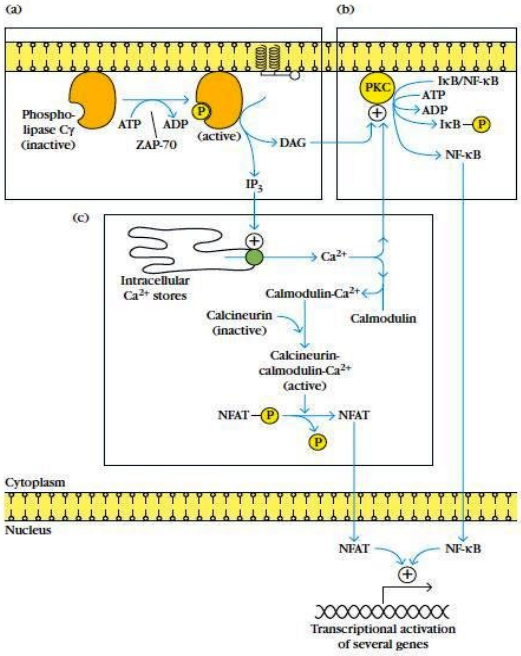


شکل مروری ۱۱-۱۰: پیام رسانی از طریق TCR

- **ایجاد پیام‌های داخل سلولی متعدد**: بسیاری از مسیرهای انتقال پیام به دنبال مرحله آغازین، فعال می‌شوند. یکی از جنبه‌های برجسته فارآغازین انتقال پیام TCR، تشکیل ساختمان فرامولکولی با نام سیناپس ایمنی[1] (IS) می‌باشد. تصور می‌شود که ورود TCR به لیپید raft برای تشکیل IS ضروری باشد. ناحیه مرکزی IS غنی از مجموعه‌های TCR/CD3 و پروتئین‌های انتقال پیام داخل سلولی می‌باشد. در حالی که قسمت خارجی به صورت حلقه، دور قسمت مرکزی را فراگرفته و حاوی مولکول‌هایی همچون LFA-1 می‌باشد (شکل ۱۱-۱۰).

1- immunological synapse

فسفولیپاز C (PLCγ)؛ این آنزیم با فسفریلاسیون فعال شده و با اتصال به پروتئین تطابقی همراه غشای LAT که متصل به کیناز قابل القای سلول T(ItK) می‌باشد، به سوبسترای خود دسترسی پیدا می‌کند (شکل ۱۲-۱۰).



شکل ۱۲-۱۰: مسیرهای انتقال پیام مربوط به فعال شدن سلول T. (a) فسفولیپاز C_γ با فسفریلاسیون فعال می شود. PLCγ فعال یک جزء فسفولیپید غشای سلولی را هیدرولیز کرده و دو پیامبر ثانویه دیگر (DAG و IP_3) را به وجود می آورد. (b) پروتئین کیناز C با DAG و Ca^{2+} فعال می شود. از جمله فعالیت های PKC فعالسازی IKK می باشد که IKB را فسفریله می کند. فسفریلاسیون IKB موجب رها شدن NFκB و انتقال آن به هسته می شود. (c) فعال شدن وابسته به کلسیم کلسی نورین. کلسی نورین یک فسفاتاز وابسته به Ca^{2+}/ کالمودولین می باشد. کلسی نورین فعال موجب حذف یک گروه فسفات از NFAT می شود که امکان انتقال این عامل رونویسی به هسته را فراهم می کند.

PLCγ، فسفواینوزیتول بیس فسفات که یکی از فسفولیپیدهای غشایی می‌باشد را هیدرولیز کرده و IP_3 و دی‌آسیل‌گلیسرول (DAG) را تولید می‌کند. IP_3 باعث رهایی سریع Ca^{2+}

از شبکه اندوپلاسمی شده و کانال‌های Ca^{2+} غشایی را باز می‌کند (شکل ۱۲-۱۰). DAG، پروتئین کنیاز C را فعال می‌کند.

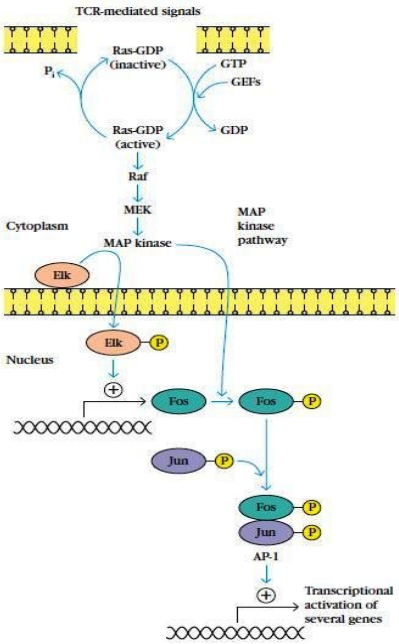
Ca^2: یون کلسیم در محدوده وسیعی از مراحل زیستی مانند بینایی، انقباض عضلات و غیره دخالت دارد. Ca^{2+} یکی از عناصر ضروری در پاسخ‌های سلول T بوده و در نهایت منجر به فسفریلاسیون عوامل نسخه‌برداری مهمی مانند NFAT می‌شود؛ NFAT موجب نسخه‌برداری از ژن سایتوکاین‌های افزایش دهنده رشد سلول T (IL-4, IL-2) می‌شود.

پروتئین کیناز C (PKC): DAG ایجاد شده توسط PLCγ منجر به فعال شدن PKC می‌گردد. فعال شدن PKC منجر به انتقال آن به داخل لیپید raft می‌شود و در آنجا این آنزیم، آبشاری از وقایع که منجر به فعال‌سازی NF-KB می‌شود را، به راه می‌اندازد(شکل ۱۲-۱۰).

فاکتور هسته‌ای کاپا B (NF-κB): یکی از عوامل نسخه‌برداری می‌باشد که توسط پیام‌های مختلف در انواع بسیاری از سلول‌ها القا می‌گردد. فعال شدن PKC توسط PLCγ منجر به اجتماع مجموعه‌ای از پروتئین‌های متصل شونده به غشا مثل CARMA-1، BCL-10 و MALT-1 می‌شود. این مجموعه سبب فعال شدن آنزیم چند پروتئینی به نام IKK می‌گردد. IKK، مهار کننده κB را فسفریله می‌کند(شکل ۱۲-۱۰). IκB به طور طبیعی به NF-κB متصل بوده و آن را در سیتو پلاسم نگه‌می‌دارد، اما فسفوریلاسیون IκB توسط IKK منجر به رها شدن NF-κB و مهاجرت آن به هسته می‌گردد. یکی از اهداف اصلی NF-κB، ژن IL-2 می‌باشد.

مسیر Ras/MAP کیناز: Ras یکی از اجزای مهم مسیرهای انتقال پیام بوده و طی تکامل یوکاربوت‌ها از مخمرتا انسان به صورت حفاظت شده باقی مانده است. Ras، پروتئین G کوچکی است که فعال شدن آن توسط GTP، سبب به راه‌افتادن آبشاری از پروتئین کینازها تحت عنوان مسیر پروتئین کیناز فعال شونده توسط میتوژن (MAPکیناز) می‌شود.

فسفوریلاسیون محصول نهایی این آبشار (MAP کیناز یا ERK) موجب فعال شدن آن به ELK می‌شود (شکل ۱۳-۱۰).

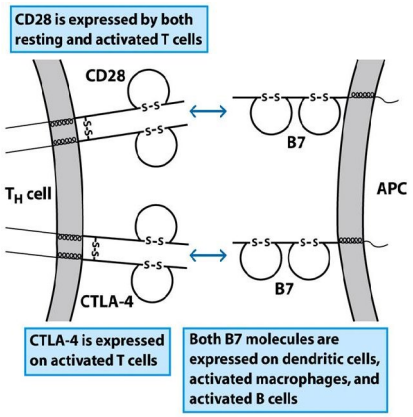


شکل ۱۳-۱۰: فعال شدن G پروتئین ک.چک Ras. پیام رسانی ناشی از TCR ها، از طریق عوامل تبادلی گوانین (GEFs) موجب فعال شدن Ras و کاتالیز تبادل GDP به GTP می گردد. Ras فعال موجب راه اندازی آبشاری از واکنش ها و افزایش تولید عامل رونویسی Fos می شود. به دنبال فسفریلاسیون Fos و Jun، این عوامل دایمریزه شده و عامل رونویسی AP-1 حاصل می شود.

- پیام‌های کمک تحریکی، جهت فعال شدن کامل سلول T ضروری می‌باشند

فعال شدن سلول T نیازمند واکنشی پویا بین چندین مولکول همراه غشا می‌باشد، اما این واکنش‌ها به خودی خود برای فعال شدن کامل سلول‌های Tدست نخورده کافی نمی‌باشند. سلول‌های T دست‌نخورده به بیش از یک پیام نیاز دارند تا فعال شده، تکثیر یابند و سپس به سلول‌های اجرایی تبدیل شوند:

پیام ۱ (آغازین) که توسط واکنش میان پپتید آنتی‌ژنی با مجموعه TCR-CD3 ایجاد می‌شود. متعاقب آن، پیام ۲ که عمدتاً بوسیله واکنش میان CD28 سلول Tو اعضای خانواده B7 سلول عرضه کننده آنتی‌ژن صورت می‌گیرد (شکل ۱۴-۱۰).



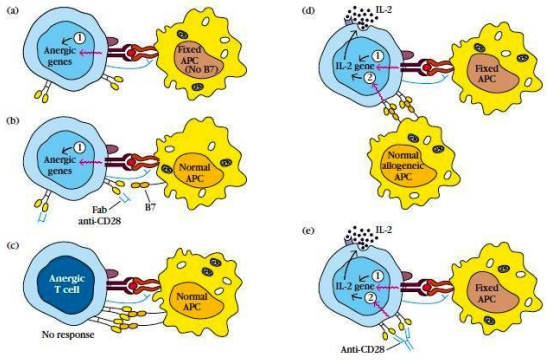
شکل ۱۴-۱۰: فعال شدن سلول های T_H مستلزم یک پیام کمک تحریکی می باشد که توسط سلول های عرضه کننده آنتی ژن ایجاد می گردد.

CD28 و CTLA-4 لیگاندهای مولکول‌های B7 می‌باشند که هر دو، روی غشای سلول T عرضه می‌شوند. اگرچه CD28 و CTLA-4 از لحاظ ساختاری گلیکوپروتئین‌های شبیه هم می‌باشند ولی عملکرد آنتاگونیستی دارند. پیام حاصل از CTLA-4 مهاری بوده و سبب کاهش تنظیمی فعالیت سلول T می‌شود. CD28روی سلول‌های T در حال استراحت و سلول‌های T فعال عرضه می‌شود، اما CTLA-4 روی سلول‌های درحال استراحت قابل شناسایی نمی‌باشد. معمولاً درگیری TCR سبب القای عرضه CTLA-4 می‌شود و CTLA-4 به سرعت پس ازگذشت ۲۴ ساعت از زمان تحریک، قابل شناسایی شده و عرضه آن طی ۲ تا ۳ روز پس از تحریک، به حداکثر میزان خود می‌رسد. با وجودی که حداکثر میزان CTLA-4 غشایی از CD28 کمتر است، هنوز هم می‌تواند به طور مطلوبی در اتصال به B7 رقابت کند و این امر به دلیل میل پیوندی بالاتر این مولکول نسبت به CD28 می‌باشد.

- در غیاب پیام‌های کمک تحریکی، آنرژی کلونال صورت می گیرد

شناسایی مجموعه پپتید -MHC توسط سلول T، اغلب منجر به عدم پاسخ‌دهی یا آنـرژی کلونی می‌گردد که از خصوصیات آن، عدم تکثیر سلول می‌باشـد. آیـا گسـترش کلـونی یـا آنرژی کلونی، به حضور یا عدم حضور پیام‌های کمک تحریکی بستگی دارد؟

آزمایش کشت سلول‌ها نشان می‌دهد که اگر یک سلول T در حال استراحت پیـامی را بـا واسطه TCR دریافت کند و این پیام در غیاب پیام کمک تحریکی مناسب باشـد، سـلول T آنرژیک خواهد شد؛ به خصوص اگـر سـلول‌هـای T بـه همـراه APCهـای ثابـت شـده بـا گلوتارآلدئید کشت داده شوند(شکل ۱۵-۱۰). APCهای ثابـت شـده قادرنـد پپتیـد را بـه همراه مولکول‌های MHC-II عرضه کنند. در نتیجه، پیام ۱ را تولید می‌کنند ولی آنهـا قـادر به تولید پیام ۲ نمی‌باشند. در غیاب پیام کمک تحریکـی، میـزان تولیـد سـایتوکاین‌هـا (بـه خصوص IL-2) بسیار ناچیز خواهد بود. همچنین، مجاورت سلول‌های T با APCهای طبیعی در حضور بخش Fab آنتی‌بادی ضد CD28 نیز می‌تواند سبب ایجاد آنـرژی گـردد (شـکل ۱۵-۱۰).



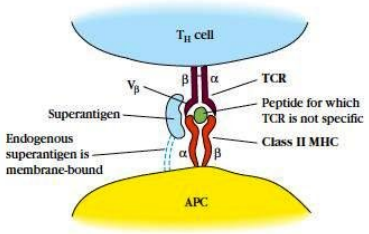
شکل ۱۵-۱۰: اثبات آزمایشگاهی آنرژی کلونی در مقابل گسترش کلونی.

دو آزمایش کنترل مختلف نیز اثبات نمود که APCهای ثابت شده حامل مجموعـه‌هـای پپتید-MHC مناسب، می‌تواننـد پیـام مـؤثری را بـه واسـطه TCR انتقـال دهنـد. در یـک

آزمایش، سلول‌های Tهمزمان با هر دو APCهای ثابت شده حاوی مجموعه‌های MHC-پپتید ویژه TCR و همچنین با APCهای طبیعی عرضه کننده B7 انکوبه شدند(شکل ۱۵-۱۰). APCهای ثابت شده موجب درگیری TCR سلول‌های T شده و مولکول‌های B7 عرضه شده روی سطح APCهای طبیعی نیز سبب اتصال متقاطع CD28 سلول T شدند. بنابراین این سلول‌هایTهر دو پیام را دریافت کرده و در نتیجه فعال شدند. اضافه کردن آنتی‌بادی دو ظرفیتی ضد CD28 به مخلوط APCهای ثابت شده و سلول‌های T نیز پیام کمک تحریکی مؤثری را به وجود می‌آورد (شکل ۱۵-۱۰).

- اتصال همزمان TCR و MHC-II توسط سوپرآنتی‌ژن‌هاموجب فعال شدن سلول T می‌گردد

سوپر آنتی‌ژن‌ها، پروتئین‌های ویروسی یا باکتریایی هستند که همزمان به دومن V_β پذیرنده سلول T و زنجیره α مولکول MHC-II متصل می‌شوند. سوپر آنتی‌ژن‌ها با منشأ خارجی[1] و داخلی[2] شناسایی شده‌اند (شکل ۱۶-۱۰).



شکل ۱۶-۱۰: اتصال متقاطع وابسته به سوپر آنتی ژن پذیرنده سلول T و مولکول های MHC-II.

سوپرآنتی‌ژن‌های اگزوژن: پروتئین‌های محلولی می‌باشند که توسط باکتری‌ها ترشح می‌شوند. از میان آنها می‌توان به انواع مختلف اگزوتوکسین‌های ترشح شده توسط

1- exogenous
2- endogenous

باکتری‌های گرم مثبت مثل انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی، توکسین سندرم شوک توکسیک و توکسین اگزوفولیاتیو اشاره نمود (جدول ۳-۱۰).

TABLE 10-3 Exogenous superantigens and their V_β specificity

Superantigen	Disease*	V_β SPECIFICITY: Mouse	V_β SPECIFICITY: Human
Staphylococcal enterotoxins			
SEA	Food poisoning	1, 3, 10, 11, 12, 17	nd
SEB	Food poisoning	3, 8.1, 8.2, 8.3	3, 12, 14, 15, 17, 20
SEC1	Food poisoning	7, 8.2, 8.3, 11	12
SEC2	Food poisoning	8.2, 10	12, 13, 14, 15, 17, 20
SEC3	Food poisoning	7, 8.2	5, 12
SED	Food poisoning	3, 7, 8.3, 11, 17	5, 12
SEE	Food poisoning	11, 15, 17	5.1, 6.1–6.3, 8, 18
Toxic-shock-syndrome toxin (TSST1)	Toxic-shock syndrome	15, 16	2
Exfoliative-dermatitis toxin (ExFT)	Scalded-skin syndrome	10, 11, 15	2
Mycoplasma-arthritidis supernatant (MAS)	Arthritis, shock	6, 8.1–8.3	nd
Streptococcal pyrogenic exotoxins (SPE-A, B, C, D)	Rheumatic fever, shock	nd	nd

*Disease results from infection by bacteria that produce the indicated superantigens.

سوپر آنتی‌ژن‌های اندوژن: پروتئین‌های غشایی هستند که توسط ویروس‌های خاصی که سلول‌های پستانداران را آلوده می‌کنند کد می‌شوند. یک گروه، توسط ویروس‌های تومورپستان موش (MTV) کد شده و می‌توانند وارد DNA سویه‌های مشخصی از موش‌های درون‌زا گردند؛ پس از ورود به DNA، پروتئین‌های رتروویروس روی غشای سلول‌های آلوده عرضه می‌شوند. این پروتئین‌های ویروسی با نام **شاخص‌های تحریک لنفوستی فرعی (MIs)**[1] به توالی‌های V_β خاصی در TCRها اتصال یافته و سبب اتصال متقاطع TCR به MHC-II می‌شوند.

از آنجایی که سوپرآنتی‌ژن‌ها به خارج از شیار اتصال به پپتید متصل می‌شوند. هر سلول T دارای توالی V_β خاص، توسط سوپرآنتی‌ژن مرتبط با خود فعال خواهد شد. فعال‌سازی، پلی‌کلونال بوده و می‌تواند روی درصد قابل توجهی (۵٪) از کل جمعیت‌های T_H اثر بگذارد. فعال‌سازی گسترده، منجر به تولید بیش از حد سایتوکاین‌های سلول T_H شده و سبب توکسیسیتی سیستمیک می‌گردد.

1- minor lymphocyte-stimulating determinants

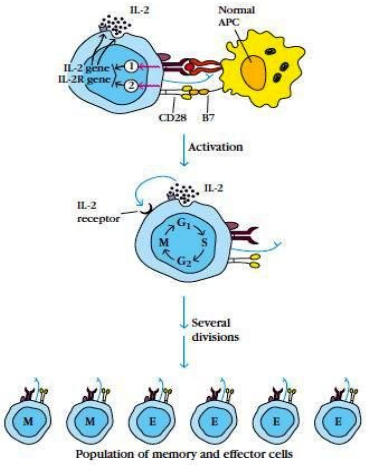
تمایز سلول T

سلول‌های T $CD4^+$، $CD8^+$ تیموس را ترک کرده و به عنوان سلول‌های درحال استراحت (مرحله G0) وارد گردش خون می‌شوند. حدوداً تعداد سلول‌های $CD4^+$ دو برابر تعداد سلول‌های $CD8^+$ در حال گردش می‌باشد. سلول‌های T که تا به حال با آنتی‌ژن مواجه نشده‌اند (دست نخورده) با کروماتین متراکم، سیتوپلاسم بسیار کم و فعالیت نسخه‌برداری پایین مشخص می‌شوند. سلول‌های T دست‌نخورده، پیوسته بین خون و سیستم لنفاوی در حال بازگردش می‌باشند. اگر یک سلول T دست نخورده در غده لنفی با آنتی‌ژن برخورد نکند، از طریق رگ لنفاوی وابران خارج شده و در نهایت به مجرای توراسیک و از آنجا دوباره به گردش خون باز می‌گردد. تخمین زده می‌شود که هر سلول T دست‌نخورده طی ۱۲ تا ۲۴ ساعت از خون به گره لنفی رفته و دوباره به جریان خون باز می‌گردد. به دلیل این که تنها یکی از 10^5 سلول‌T دست نخورده ویژه آنتی‌ژن می‌باشد، بازگردش با چنین میزان بالایی، شانس برخورد سلول‌T دست‌نخورده با آنتی‌ژن مناسب را افزایش می‌دهد.

- سلول‌های Tفعال شده، سلول‌های اجرایی و خاطره‌ای را ایجاد می‌کنند

اگر سلول T دست نخورده مجموعه پپتید -MHC سطح APC یا سلول هدف را شناسایی کند (پاسخ اولیه) فعال خواهد شد حدود ۴۸ ساعت پس از فعال‌شدن، سلول T بزرگ شده و به بلاست تبدیل می‌شود و شروع به تقسیمات متوالی می‌کند (شکل ۱۶-۱۰).

پیام کمک تحریکی موجب ورود سلول T به فاز G1 چرخه سلولی و نسخه‌برداری از ژن IL-2 و CD25 نیز آغاز می‌شود. به علاوه، پیام‌های کمک تحریکی سبب افزایش نیمه عمر IL-2 mRNA می‌شوند. افزایش نسخه‌برداری از IL-2 همراه با پایداری mRNA آن، میزان تولید IL-2 در سلول T فعال را ۱۰۰ برابر بیشتر می‌کند. ترشح IL-2 و اتصال آن به پذیرنده با میل پیوندی بالا موجب فعال‌شدن، تکثیر و تمایز سلول Tدست‌نخورده می‌شود (شکل ۱۷-۱۰).



شکل ۱۷-۱۰: فعال سازی سلول T_H به کمک پیام های ۱ و کمک تحریکی ۲ موجب تنظیم افزایشی بیان IL-2 و پذیرنده با میل پیوندی بالای IL-2 شده که منجر به ورود سلول T به چرخه سلولی می گردد.

سلول‌های T فعال شده از این طریق، روزی ۲ تا ۳ بـار و بـه مـدت ۴ تـا ۵ روز تقسـیم می‌شوند و پیش‌سازهای جمعیت T اجرایی و خاطره‌ای تمایز می‌یابند.

سلول‌های T اجرایی مختلف، عملکردهای متفاوتی همچون ترشـح سـایتوکاین، کمـک بـه سلول B (سلول‌های T_Hفعال) و فعالیت سلول‌کشی (CTLهای $CD8^+$) دارند.

سلول‌های T اجرایی $CD4^+$ از دو زیر مجموعه تشکیل شده‌اند که براساس الگوی متفاوت ترشح سایتوکاین از یکدیگر متمایز می‌شوند. یک جمعیت T_H1 کـه IL-2 ، IFN-γ و TNF-α را ترشح می‌کند و مسئول عملکردهای سلولی مثل ازدیـاد حساسیت تأخیری و فعال‌سازی سلول‌های Tc می‌باشند. زیرمجموعه دیگـر T_H2 بـوده کـه IL-4، IL-5 ، IL-6 و IL-10 را ترشح کرده و به فعال شدن سلول‌های B کمک می‌کند.

جمعیت سلول‌های Tخاطره‌ای، از سلول‌های Tدست نخورده و از سلول‌های اجرایی حاصل می‌شوند. سلول‌های Tخاطره‌ای، در مواجهـه بـا آنتـی‌ژن تولیـد مـی‌شـوند و معمـولاً طـول

عمرزیادی دارند. آنها سلول‌های خاموش بوده که در صورت مواجهه با همان آنتی‌ژن، پاسخ قوی‌تری ایجاد می‌کنند. جمعیت سلول‌های Tخاطره‌ای مدت زمان بیشتری پس از کاهش جمعیت سلول‌های T اجرایی باقی می‌مانند. به طور معمول، بسیاری از شاخص‌های سطحی سلول‌های Tخاطره‌ای شبیه سلول‌های T اجرایی بوده و هیچ شاخص سطحی که به طور قطع مشخصه سلول‌های خاطره‌ای باشد، شناخته نشده است.

اغلب سلول‌های T خاطره‌ای، سلول‌های در حال استراحت و در مرحله G0 چرخه سلولی می‌باشند، اما نیازمندی آنها برای فعال‌شدن، به سخت‌گیری نیازمندی‌های سلول‌های دست‌نخورده نمی‌باشد.

- تنظیم منفی پاسخ ایمنی، توسط زیر جمعیت $CD4^+CD25^+$ سلول‌های T صورت می‌گیرد

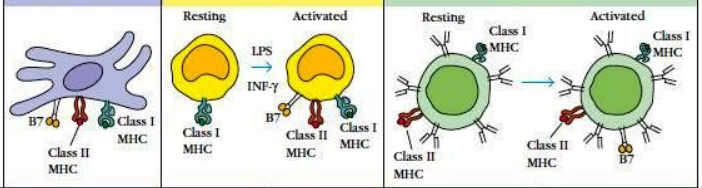
در اوایل سال ۱۹۷۰ محققان برای اولین بار جمعیت‌هایی از سلول T را توصیف کردند که می‌توانستند پاسخ‌های ایمنی را سرکوب کنند. این سلول‌ها، سلول‌های سرکوبگر (Ts) نامیده شدند و اعتقاد براین بود که این سلول‌ها،$CD8^+T$ می‌باشند. با این حال، اساس ملکولی و سلولی این‌گونه سرکوب‌ها مبهم ماند و در نهایت منجر به این امر شد که نسبت به حضور سلول‌های $CD8^+T$ سرکوبگر تردید ایجاد شود. تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که سلول‌هایTسرکوبگر پاسخ ایمنی وجود دارند ولی به طور غیرقابل انتظاری، این سلول‌ها $CD4^+$ هستند. در میان جمعیت سلول‌های $CD4^+CD25^+$، سلول های T تنظیمی (Treg) بودند که می‌توانستند مانع از تکثیر سایر جمعیت‌های سلول T در in vitro شوند. سرکوب با واسطه این سلول‌های تنظیمی، ویژگی آنتی‌ژنی از خود نشان می‌دهد، زیرا وابسته به فعال شدن TCR است. تماس مستقیم سلولی بین سلول‌های سرکوبگر و هدف ضروری می‌باشد. اگر سلول‌های تنظیمی بوسیله آنتی‌ژن فعال شوند ولی توسط یک سد نفوذناپذیر از هدف‌های خود جدا بمانند، سرکوبی صورت نخواهد گرفت. وجود سلول‌های T تنظیمی که

به طور اختصاصی پاسخ‌های ایمنی را سرکوب می‌کنند،کاربردهای بالینی دارند. حذف یا مهار سلول‌هایT تنظیمی به دنبال ایمن‌سازی، می‌تواند پاسخ ایمنی به واکسن‌های متداول را افزایش دهد. با توجه به این امر، برخی پیشنهاد می‌کنند که حذف سلول‌های T سرکوبگر می‌تواند ایجاد ایمنی ضدتوموری را تسهیل نماید. برعکس، افزایش فعالیت سرکوب‌کنندگی جمعیت‌های سلولT تنظیمی می‌تواند در درمان بیماری‌های خود ایمن و آلرژیک مفید باشد.

- APCها خصوصیت کمک تحریکی دارند

تنها سلول‌های حرفه‌ای عرضه کننده آنتی‌ژن قادر به عرضه آنتی‌ژن‌ها همراه با مولکول‌های MHC-II و انتقال پیام کمک تحریکی ضروری برای فعال‌سازی، تکثیر و تمایز کامل سلول‌های T می‌باشند.

گلیکوپروتئین‌های B7-1(CD80)، B7-2(CD86) مولکول‌های کمک تحریکی اصلی APCها می‌باشند (شکل ۱۸-۱۰). سلول‌های دندریتیک به طور ساختاری مقادیر بالایی از مولکول‌های MHC-I، MHC-II، B7-1 و B7-2 را عرضه می‌کنند و به همین دلیل قدرت بالایی در فعال‌سازی سلول‌های Tدست نخورده، اجرایی و خاطره‌ای دارند. ماکروفاژهای درحال استراحت، قادر به فعال‌سازی سلول‌هایT دست نخورده نبوده و فعال‌کننده‌های ضعیفی برای سلول‌های T خاطره‌ای و اجرایی می‌باشند. ماکروفاژها با بیگانه‌خواری باکتری‌ها یا محصولات باکتریایی مانند LPS و یا توسط IFN-γ می‌توانند فعال شوند. ماکروفاژهای فعال شده به صورت تنظیمی، عرضه مولکول‌های MHC-II و B7 را افزایش می‌دهند. بنابراین، ماکروفاژهای فعال شده، فعال‌کننده سلول‌های T خاطره‌ای و اجرایی می‌باشند اما در فعال‌سازی سلول‌های T دست نخورده به طور قابل توجهی ضعیف می‌باشند.

	Dendritic cell	Macrophage		B Lymphocyte	
					
Antigen uptake	Endocytosis phagocytosis (by Langerhans cells)	Phagocytosis	Phagocytosis	Receptor-mediated endocytosis	Receptor-mediated endocytosis
Class II MHC expression	Constitutive (+++)	Inducible (–)	Inducible (++)	Constitutive (++)	Constitutive (+++)
Co-stimulatory activity	Constitutive B7 (+++)	Inducible B7 (–)	Inducible B7 (++)	Inducible B7 (–)	Inducible B7 (++)
T-cell activation	Naive T cells Effector T cells Memory T cells	(–)	Effector T cells Memory T cells	Effector T cells Memory T cells	Naive T cells Effector T cells Memory T cells

شکل ۱۸-۱۰: تفاوت خصوصیات APC های حرفه ای و توانایی آنها در عرضه آنتی ژن و فعال سازی سلول T.

سلول‌های B نیز به عنوان سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن در فعال‌سازی سلول T عمل می‌کنند. سلول‌های B در حال استراحت، MHC-II را عرضه می‌کنند ولی توانایی عرضه مولکول‌های B7 را ندارند. در نتیجه، سلول‌های B در حال استراحت، نمی‌توانند سلول‌های T را فعال کنند.

- جمعیت‌های سلولT و مرگ سلولی

مرگ سلولی یکی از مهمترین جنبه‌های تکوین ارگانیسم‌های پرسلولی می‌باشد. در طی دوره جنینی، مرگ سلولی با حذف سلول‌های غیرضروری، امکان شکل‌گیری جنین را فراهم می‌آورد. همچنین مرگ سلولی یکی از جنبه‌های مهم هومئوستاز لنفوسیت‌ها می‌باشد، به طوری که جمعیت سلول‌های T و B را پس از تکثیر انفجاری، به میزان طبیعی باز می‌گرداند. آپوپتوز در حذف تیموسیت‌های خودواکنشگر در طول گزینش منفی، نقش

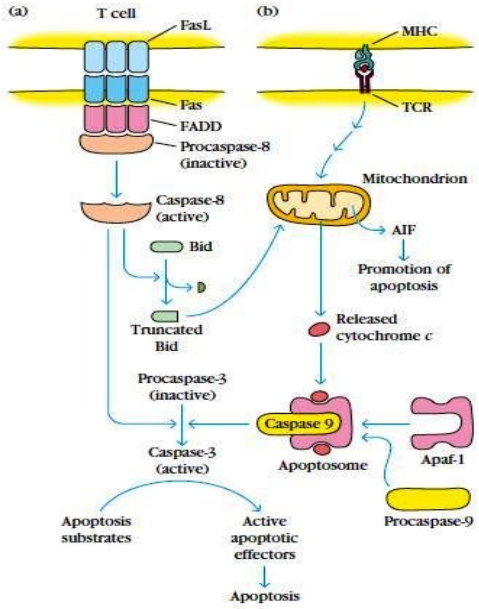
حساسی بر عهده دارد و همچنین برداشت سلول‌های T در حال تکوین که قادر به شناسایی مولکول‌های MHC خودی نمی‌باشند.

اگر چه تحریک آپوپتوز با پیام‌های مختلف صورت می‌گیرد ولی مرگ سلولی، فرآیندی است که در میان مهره‌داران و بی‌مهره‌ها حفاظت شده می‌باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که مرگ سلولی، وابسته به فعالیت ژنی است که سیستیئن پروتئازی را کد می‌کند که فعالیت آن برای زیرواحدهای اسیدآسپارتیک اختصاصی می‌باشد. امروزه می‌دانیم که پستانداران حداقل ۱۴ نوع سیستئین‌پروتئاز (کاسپاز) دارند و تمام مرگ‌های سلولی، نیازمند فعالیت حداقل یک زیرمجموعه از این مولکول‌ها می‌باشد. همچنین می‌دانیم که تمام سلول‌های بدن به طور ذاتی پروتئین‌های کاسپاز را تولید می‌کنند و این امر، نشان دهنده این است که هر سلول، بالقوه توان آغاز مرگ خود را دارد.

در شرایط طبیعی، سلول‌ها با نگه‌داشتن کاسپازها به فرم غیر فعال، از خودشان در برابر مرگ آپوپتوزی محافظت می‌کنند. در صورت دریافت پیام مرگ، برخی کاسپازها با هضم پروتئولیتیکی فعال شده و سپس سایر کاسپازها را فعال می‌کنند، که این امر منجر به فعال شدن کاسپازهای اجرایی می‌گردد.

این آبشارکاتالیتیکی در نهایت سبب مرگ سلولی می‌شود. اگر چه هنوز مشخص نشده است که چه‌طور فعالیت کاسپازها مستقیماً منجر به مرگ آپوپتوزی سلولی می‌شود، اما به احتمال زیاد این عمل را از طریق تخریب مولکول‌های حیاتی برای بقای سلول انجام می‌دهد.

سلول‌های T از دو مسیر مختلف برای فعال‌سازی کاسپازها استفاده می‌کنند (شکل ۱۹-۱۰).



شکل ۱۹-۱۰: دو مسیر آپوپتوز در سلول های T. (a) سلول های T محیطی فعال مقادیر بالایی از Fas و FasL را عرضه می کنند. (b) پیام های دیگر نظیر درگیری TCR با مجموعه پپتید – MHC بر روی APCها که موجب فعال شدن مسیر مرگ میتوکندریایی می شود.

در سلول‌های Tمحیطی تحریک آنتی‌ژنی منجر به تکثیر سلول T تحریک شده و تولید سایتوکاین‌هایی مثل IL-2 می‌شود. سلول‌های T فعال‌شده، عرضه دو پروتئین سطحی Fas و FasL که نقش اساسی در مرگ سلول T دارند را افزایش می‌دهند. زمانی که Fas به FasL اتصال می‌یابد، FADD فراخوانده شده و به Fas متصل می‌شود و به دنبال آن پروکاسپاز ۸ فراخوانده می‌شود. تجمع FADD با پروکاسپاز ۸ منجر به هضم پروتئولیتیک پروکاسپاز ۸ شده و آن را به شکل فعال کاسپاز ۸ تبدیل می‌کند.

علاوه بر این، در تیموس نیز بیشتر مرگ‌های آپوپتوزی از مسیر Fas صورت می‌گیرد. تحریک پیوسته و پایدار سلول‌های T محیطی منجر به عرضه همزمان Fas، FasL می‌شود و

این موجب مرگ آپوپتوزی سلول‌ها می‌گردد. مرگ سلول‌های T با واسطه Fas/FasL در نتیجه فعال‌شدن، **مرگ سلولی ناشی از فعالیت[1] (AICD)** نامیده می‌شود.

Fas و FasL اعضای خانواده مرتبط با گیرنده / لیگاند TNF و TNFR می‌باشند. شبیه Fas و FasL، واکنش TNFR غشایی با TNF سبب تحریک آپوپتوز می‌شود. TNF/TNFR نیز مرگ را از طریق فعال‌سازی کاسپاز ۸ و به دنبال آن فعال‌شدن کاسپازهای اجرایی(مثل کاسپاز ۳) تحریک می‌کند.

علاوه بر فعال‌شدن آپوپتوز از طریق پروتئین‌های پذیرنده مرگ (مانند Fas و TNFR) سلول‌های T از سایر مسیرهای مستقل از کاسپاز ۸ نیز می‌توانند از بین بروند. برای مثال، مسیرهای انتقال پیامی که از TCR منشأ می‌گیرند (گزینش منفی تیموس) سبب مرگ آپوپتوزی سلول‌های T در حال تکوین می‌شوند.

با این که هنوز به طور کامل نمی‌دانیم که چرا برخی از پیام‌های TCR منجر به گزینش مثبت و برخی منجر به گزینش منفی می‌شوند، اما می‌دانیم که قدرت این پیام‌ها نقش مهمی در این امر برعهده دارند. یک پیام قوی سبب گزینش منفی و در نهایت آپوپتوز می‌شود. در این مسیرهای آپوپتوزی(وابسته به میتوکندری) سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوپلاسم نفوذ می‌یابد. سیتوکروم C به پروتئینی با نام Apaf-1 (عامل فعال‌کننده آپوپتوز-۱) اتصال می‌یابد و تحت یک تغییر آرایش وابسته به ATP قرار گرفته و اولیگومریزه می‌گردد. اتصال شکل اولیگومریزه Apaf-1 به پروکاسپاز ۹ منجر به تغییر شکل آن به کاسپاز ۹ فعال می‌شود. مجموعه سیتوکروم Apaf-1/c کاسپاز ۹ (آپوپتوزوم[2]) با هضم پروتئولیتیکی پروکاسپاز ۳ آن را به کاسپاز ۳ فعال تبدیل کرده و آبشاری از واکنش‌ها را به راه می‌اندازد که منجر به مرگ سلولی می‌شود (شکل ۱۹-۱۰). سرانجام میتوکندری، عامل القا کننده آپوپتوز(AIF) که در القای مرگ سلول نقش دارند را نیز ترشح می‌کند.

1- activation induced cell death (AICD)
2- apoptosome

یکی از جنبه‌های مهم مسیرهای مرگ سلولی تحریک شده توسط میتوکندری، نقش تنظیمی اعضای خانواده Bcl-2 می‌باشد. Bcl-2 و Bcl-xl هر دو درغشای میتوکندری حضور دارند. این پروتئین‌ها مهار کننده‌های قوی آپوپتوز می‌باشند و یک فرضیه برای چگونگی عمل آنها این است که آنها به طریقی رهایی سیتوکروم C از میتوکندری را تنظیم می‌کنند.

حداقل سه گروه از اعضای خانواده Bcl-2 وجود دارند. گروه I، ضد آپوپتوزی بوده و شامل Bcl-2 و Bcl-xl می‌باشند. اعضای گروه II و III پیش آپوپتوزی بوده و شامل Bax و Bak در گروه II و Bid و Bim در گروه III می‌باشند. شواهد آشکاری وجود دارد که مقدار اعضای خانواده ضد آپوپتوزی Bcl-2 نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز لنفوسیت‌ها بازی می‌کنند. این اعضا دایمر بوده و با اعضای پیش آپوپتوزی در کنترل آپوپتوز نقش داشته و سبب مهار فعالیت آنها می‌شوند. همان‌طور که شکل ۱۹-۱۰ نشان می‌دهد، شکست Bid می‌تواند مسیر مرگ میتوکندریایی را روشن کند. بنابراین، پیام‌هایی که توسط Fas آغاز شده‌اند، می‌توانند در مسیر میتوکندریایی نیز شرکت کنند. هر چند که یک لنفوسیت پیام مرگ را می‌تواند از چندین طریق دریافت کند، اما تمام این مسیرها مقصد مشترک (فعال‌شدن کاسپازها) دارند.

- خلاصه

- پیش‌ساز سلول‌های T از مغز استخوان به تیموس وارد شده و ژن‌های TCR خود را بازآرایی می‌کنند. در بیشتر موارد، این تیموسیت‌ها ژن‌های αβTCR را بازآرایی می‌کنند. شمار اندکی از آنها نیز ژن‌های γδTCR را بازآرایی کرده و به سلول‌های T γδ تبدیل می‌شوند. تیموسیت‌های اولیه فاقد CD4 و CD8 قابل تشخیص بوده و به آنها سلول‌های دوگانه منفی (DN) اتلاق می‌شود. در طول تکامل، اکثر تیموسیت‌های DN به سلول‌های αβT $CD4^+CD8^-$ یا $CD4^-CD8^+$ تبدیل می‌شوند.

- گزینش مثبت در تیموس، سلول‌های T ناتوان در شناخت MHC خودی را حذف کرده و اساس محدودیت به MHC خودی را تشکیل می‌دهد. گزینش منفی، تیموسیت‌هایی که پذیرنده با میل پیوندی بالا برای مولکول‌های MHC خودی به تنهایی یا آنتی‌ژن‌های خودی همراه با MHC خودی دارند را حذف کرده و اساس تحمل به خود می‌باشد.
- با واکنش میان مجموعه TCR/CD3 با مجموعه پپتید MHC- سطح APC، فعال‌سازی سلول T شروع می‌شود. فعال‌سازی نیازمند فعالیت مولکول‌های کمکی مثل CD4 و CD8 نیز می‌باشد. با درگیری TCR، مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی فراوانی فعال می‌شوند.
- سلول‌های T عرضه کننده CD4، آنتی‌ژن همراه MHC-II را شناسایی کرده و عملکرد آنها همانند سلول‌های T_H می‌باشد. سلول‌های T عرضه کننده CD8 آنتی‌ژن را همراه MHC-I شناسایی کرده و معمولاً عملکرد آنها مانند سلول‌های Tc می‌باشد.
- علاوه بر پیام‌های انتقال یافته از TCR و مولکول‌های کمکی (پیام ۱) فعال‌سازی سلول T_H نیازمند پیام کمک‌تحریکی (پیام۲) ایجاد شده توسط APCها نیز می‌باشد. پیام کمک تحریکی به طور عادی توسط واکنش میان مولکول های خانواده B7 روی غشای APC با CD28 سطح سلول T_H ایجاد می‌شود. درگیری CTLA-4، B7 فعال شدن سلول T را مهار می‌کند.
- سلول‌های Tدست نخورده، سلول‌های درحال استراحت (G0) می‌باشند که با آنتی‌ژن مواجه نشده‌اند. فعال‌شدن این سلول‌ها منجر به تولید سلول‌های T اجرایی و خاطره‌ای می‌شود. سلول‌های Tخاطره‌ای که بسیار ساده‌تر از سلول‌های دست‌نخورده فعال می‌شوند، مسئول پاسخ‌های ثانویه می‌باشند. سلول‌های اجرایی طول عمر کوتاهی داشته و شامل سلول‌های T کمک کننده و سیتوتوکسیک می‌باشند.
- گنجینه سلول‌های T، با آپوپتوز در تیموس و بافت‌های محیطی شکل می‌گیرد.

- سئوالات درسی

۱- شما کلون $CD8^+CTL$ از یک موش $H\text{-}2^K$ که پذیرنده ویژه آنتی‌ژن H-Y دارد. در اختیار دارد. ژن‌های αβTCR این رده سلولی را کلون کرده و از آنها برای تهیه موش‌های ترانس ژنیک با هاپلوتایپ $H\text{-}2^d$ یا $H\text{-}2^k$ استفاده می‌کنید.

Transgenic mouse	Immature thymocytes	Mature $CD8^+$ thymocytes
$H\text{-}2^k$ female		
$H\text{-}2^k$ male		
$H\text{-}2^d$ female		
$H\text{-}2^d$ male		

الف) شما چطور تیموسیت‌های بالغ $CD8^+$ را از تیموسیت‌های نابالغ موش‌های ترانس ژنیک متمایز می‌کنید؟

ب)برای هر موش ترانس ژنیک فهرست شده در جدول، نشان دهید (+) یا (-)، آیا موش‌ها حاوی تیموسیت‌های دوگانه مثبت بالغ و $CD8^+$ بالغ، پذیرنده ترانس ژنیک را عرضه می‌کنند یا خیر.

پ) پاسخ خود را در مورد ترانس ژنیک‌های $H\text{-}2^K$ توضیح دهید.

ت) پاسخ خود را در مورد ترانس ژنیک‌های $H\text{-}2^d$ توضیح دهید.

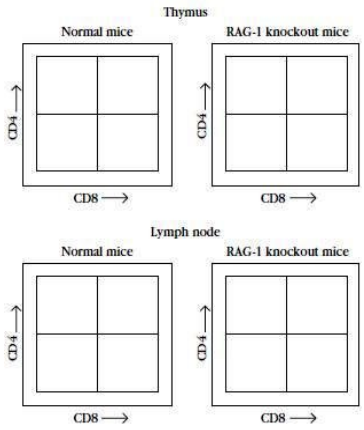
۲- سایکلوسپورین و FK506 داروهای سرکوب کننده ایمنی قدرتمندی می‌باشند که برای گیرندگان پیوند تجویز می‌شوند. هر دو دارو مانع از تشکیل کمپلکس کلسی‌نورین و کالمودولین /Ca^{2+} می‌شوند. باتوجه به شکل ۱۲-۱۰ توضیح دهید که چرا این ترکیبات مانع از رد پیوند با واسطه سلول Tمی‌شوند.

۳- فعال‌شدن با واسطه آنتی‌ژن سلول‌های T، منجر به رهایی یاتحریک عوامل هسته‌ای مختلفی می‌شود که نسخه‌برداری از ژن‌ها را تحریک می‌کنند.

الف) کدام عوامل نسخه‌برداری تکثیر سلول‌های Tفعال، در سیتوپلاسم سلول‌های در حال استراحت و به شکل غیر فعال حضور دارند؟

ب) این عوامل زمانی که به هسته می‌رسند چه عملی را انجام می‌دهند؟

۴- شما آنتی‌بادی ضد CD4 نشاندار با فلورسئین و آنتی‌بادی ضد CD8 نشاندار با فایکواریترین در اختیاردارید. از این آنتی‌بادی‌ها برای رنگ‌آمیزی تیموسیت‌ها و سلول‌های غدد لنفاوی موش‌های طبیعی و موش‌های ژن تخریب شده RAG-1 استفاده می‌کنید. در اشکال زیر، طرح FACS مورد انتظار را رسم کنید.



۵- به منظور اثبات تجربی گزینش مثبت تیموس، محققان تیموسیت‌های موش‌های طبیعی $H\text{-}2^d$ که فاقد ژن IE کلاس II می‌باشند و موش‌های $H\text{-}2^d$ که ژن IA کلاس II آنها تخریب شده بود ۱ مورد تحلیل قرار دادند.

الف) چه مولکول‌های MHC روی APCهای موش طبیعی $H\text{-}2^d$ خواهید یافت؟

ب) چه مولکول‌های MHC روی APCهای موش‌های ژن تخریب شده $H\text{-}2^d$ خواهید یافت؟

پ) انتظار دارید کدام یک از سلول‌های $CD4^+T$، $CD8^+$ یا هر دو را در این موش‌ها ملاحظه کنید؟ چرا؟

۶- زینکرناگال برای انجام آزمایشات با موش‌های کایمریک، مغز استخوان موش۱ و تیموس موش ۲ را به موش ۳ که فاقد تیموس شده وتحت پرتو قرار گرفته بود، پیوند

زد. سیستم خونساز موش بازسازی شد و سپس موش را در معرض LCMV قرار داده و سلول‌های طحال آن را خارج نمود. او سلول‌های طحال را با سلول‌های هدف آلوده به LCMV با هاپلوتایپ‌های متفاوت MHC مجاور کرد و لیز سلول‌های هدف را مورد بررسی قرار داد. نتایج دو آزمایش با استفاده از موش‌های $H\text{-}2^d$ سویه C57BL/6 و موش‌های $H\text{-}2^d$ سویه BALB/c در جدول نشان داده شده است.

Experiment	Bone-marrow donor	Thymectomized, x-irradiated recipient	Lysis of LCM-infected target cells		
			$H\text{-}2^d$	$H\text{-}2^k$	$H\text{-}2^b$
A	C57BL/6 × BALB/c	C57BL/6 × BALB/c	+	−	−
B	C57BL/6 × BALB/c	C57BL/6 × BALB/c	−	−	+

الف) هاپلوتایپ سویه دهنده تیموس در آزمایش A و آزمایش B چه بوده است؟

ب) چرا سلول‌های هدف $H\text{-}2^d$ در آزمایش A لیز نشدند ولی در آزمایش B لیز شدند؟

پ) چرا سلول‌های هدف $H\text{-}2^k$ در هیچ کدام از آزمایشات لیز نشده بودند؟

۷- جاهای خالی را با یکی از واژه‌های مناسب جدول زیر پر کنید. واژه‌ها ممکن است یک بار، چند بار یا اصلاً استفاده نشوند.

protein phosphatase(s)	CD8	Class I MHC	CD45
protein kinase(s)	CD4	Class II MHC	B7
CD28	IL-2	IL-6	CTLA-4

الف) p56LCK و ZAP-70 ..... می‌باشند.

ب) ..... یک پروتئین غشایی سلول T می‌باشد که دومن سیتوپلاسمی آن فعالیت فسفاتازی دارد.

پ) سلول‌های دندریتیک ..... را پیوسته عرضه می‌کنند، در صورتی که سلول‌های B پیش از عرضه این مولکول‌ها بایستی فعال شوند.

ت) فعال شدن سلول‌های T_H منجر به ترشح ..... می‌شود که سبب تکثیر و تمایز آنها می‌شود.

ث) پیام‌های کمک تحریکی مورد نیاز برای فعال‌سازی کامل سلول T در اثر واکنش ..... روی سلول T و ..... روی APC ایجاد می‌شوند.

ج) موش‌های ژن تخریب شده مولکول‌های MHC-I در تولید تیموسیت‌های حامل ..... با شکست مواجه می‌شوند.

چ) ماکروفاژها پیش از عرضه ..... و ..... بایستی فعال شوند.

ح) سلول‌های T عرضه کننده ..... در موش‌های ژن تخریب شده MAC-II حضور ندارند.

خ) PIP2 توسط ..... شکسته شده و DAG و IP3 را تولید می‌کند.

د) در سلول‌های T فعال، DAG سبب فعال شدن ..... می‌شود که موجب تولید NF-κB می‌شود.

ذ) ..... سبب تحریک و ..... سبب مهار فعالیت سلول T در اثر درگیری با واسطه ..... یا APCها می‌شوند.

۸- شما می‌خواهید درصد تیموسیت‌های مختلف را در نمونه تیموس موش با استفاده از روش IF غیر مستقیم تعیین کنید.

الف) شما ابتدا نمونه را با آنتی‌بادی بزی ضد CD3و سپس با آنتی‌بادی خرگوشی ضد Ig بز و نشاندار شده با FITC که رنگ سبز ساطع می‌کند، رنگ‌آمیزی می‌کنید. آنالیز نمونه توسط فلوسایتومتری نشان می‌دهد که ۷۰٪ سلول‌ها رنگ شده‌اند. براساس این نتایج، چه تعداد سلول تیموس موجود در نمونه، در سطح خود، TCR را عرضه می‌کنند؟ آیا تمام آنها یک نوع پذیرنده را عرضه می‌کنند؟ توضیح دهید.

ب) شما سلول‌های $CD3^+$ را توسط FACS جدا می‌کنید و آنها را دوباره رنگ‌آمیزی می‌کنید. این بار آنتی‌بادی اولیه آنتی‌بادی همستر ضد CD4 و آنتی‌بادی ثانویه، آنتی‌بادی خرگوش ضد Ig همستر نشاندار شده با PE می‌باشد که قرمز را ساطع می‌کند. تحلیل سلول‌های $CD3^+$ نشان می‌دهد که ۸۰٪ آنها رنگ شده‌اند. آیا

می‌توانید تعداد سلول‌های Tc را در نمونه تعیین کنید؟ تعداد این سلول‌های T چقدر است؟ اگر جواب شما منفی است، چه آزمایش دیگری بایستی برای تعیین تعداد سلول‌های Tc انجام دهید؟

۹- بسیاری از آثار واکنش MHC-TCR می‌تواند توسط تزریق یونومایسین به اضافه فوربول استر دو برابر شود. یونومایسین یک یونوفر Ca^{2+} است و فوربول استر آنالوگ DAG می‌باشد. چرا این تزریق بسیاری از آثار درگیری TCR را تقلید می‌کند؟

۱۰- در موش‌هایی که تغییرات ژنتیکی زیر در آنها ایجاد شده انتظار دارید چه تأثیری روی مرگ سلولی آنها مشاهده کنید؟ پاسخ خود را توضیح دهید.

الف) موش‌هایی که برای Bcl-2 ترانس ژنیک بوده و این پروتئین را به میزان بالایی بیان می‌کنند.

ب) موش‌هایی که ژن کاسپاز ۸ آنها تخریب شده است.

پ) موش‌هایی که ژن کاسپاز ۳ آنها تخریب شده است.

۱۱- در این فصل، اساس چندین روند انتقال پیام تعریف و توضیح داده شده این روند کدامند؟ با توجه به فرآیندهای انتقال پیام در فعال‌شده سلول T، مثالی از هر کدام از این پنج روند، ذکر کنید.

۱۲-اگر چه بیشتر سلول‌های T بدن، αβTCR را عرضه می‌کنند، اما شمار محدودی از آنها (۵٪) نیز γδTCR را عرضه می‌کنند. تفاوت شناسایی Ag توسط این دو نوع سلول را توضیح دهید.

سلول‌های Tوجود دارند که با عرضه آنتی‌ژن ویژه خود تحریک نمی‌شوند، در حالی که سلول‌های T دیگری نیز وجود دارند که بدون عرضه آنتی‌ژن‌های ویژه خود، به عنوان سلول‌های اجرایی عمل می‌کنند. توضیح دهید که چگونه بدون فعال‌سازی، فعال شدن سلول T صورت می‌گیرد؟ وقایع انتقال پیامی که منجر به این پاسخ می‌شوند را مقایسه کنید.