

Abstrakt

V rámci projektu podporovaného grantem IGA MZ ČR NKT11414-3 byly pomocí polychromatické průtokové cytometrie charakterizovány v periferní krvi u pacientů s běžnou variabilní imunodeficiencí a u zdravých kontrol byly objeveny dvě nové B buněčné populace. Tyto populace byly definovány jako $CD19^+CD27^-CD21^+CD38^{low}CD24^+IgM^+$ FO I a $CD19^+CD27^-CD21^+CD38^{low}CD24^{++}IgM^{++}$ FO II B buněčné populace. Protože žádná z nalezených populací nebyla dosud popsána ani studována, cílem této práce bylo charakterizovat tyto populace se zaměřením na analýzu variabilních oblastí těžkých řetězců imunoglobulinů a genů kódujících proteiny, které se účastní procesu formování $V_HD_HJ_H$ přeskupení (Rag 1, Rag 2 a TdT) produkované buňkami těchto populací.

K provedení molekulární analýzy jednotlivých B lymfocytů byla použita průtoková cytometrie, třídění jednotlivých buněk s využitím průtokového cytometru se sortovacím modulem; RT-PCR na úrovni jedné buňky; IgVH, Rag 1, Rag 2 a TdT specifické PCR a sekvenování. Obě populace byly analyzovány u dvou pacientů s běžnou variabilní imunodeficiencí, dvou zdravých kontrol, a dvou pacientů s autoimunitním onemocněním – 1 s revmatoidní artritidou a 1 systémovým lupus erythematosus (jako tzv. „disease control“). K vyhodnocení rozdílů v expresi variabilních oblastí těžkých řetězců imunoglobulinů a Rag 1 a 2, a TdT byla použita statistická analýza.

Ve všech analyzovaných B buňkách bylo identifikováno velmi zúžené spektrum V_H , D_H a J_H genů v produkovaných imunoglobulinových mRNA a nulové nebo velmi nízké mutační frekvence. Kromě toho, u FO I a FO II B buňkách pacientů s RA byla zjištěna predominance VH1-69 genu s autoprotilátkovým potenciálem. Nález produkce mRNA pro izotyp IgG a TdT svědčí pro právě probíhající proces $V_HD_HJ_H$ přeskupování.

Vzhledem k tomu, že obě studované populace nenesou na svém povrchu molekulu CD27, byly původně považovány za naivní B buňky. V tomto kontextu absence mutací, delší CDR3 oblasti, $V_HD_HJ_H$ přeskupování (zejména u kontrol) nasvědčují spíše pro to, že se jedná B lymfocyty antigenně nezkušené a blízké se spíše naivním B buňkám. Další možností je, že tato populace by mohla představovat transientní antigenně nezkušená B buněčná stádia anebo buňky, které jsou prekursori B buněk marginální zóny. V případě pacientů s revmatoidní artritidou, populace FO I a II B buněk by mohla být populací, která unikla negativní selekci a stala se základem autoreaktivních B buněk.

Získané nálezy podporují hypotézu, že studované B buněčné populace mohou hrát určitou roli v regulaci homeostázy v imunitním systému u zdravých lidí, která může být narušena u pacientů s imunodeficiencí (deprivovaný imunitní systém) a s autoimunitními chorobami (hyperaktivovaný imunitní systém).

Tato zjištění se zdají být velmi zajímavá a bude zapotřebí další výzkum, aby tento typ FO B lymfocytů byl detailněji charakterizován s cílem porozumět jejich fyziologické roli během obrany organismu a jejich příspěvku ke vzniku a rozvoji patologických stavů.

Klíčová slova:

B lymfocyty, FO I B buňky, FO II B buňky, revmatoidní artritida, systémový lupus erythematosus, běžný variabilní imunodeficit, CD antigeny, průtoková cytometrie, single-cell RT-PCR, VDJ přestavba, TdT, Rag1, Rag 2