

## 제 13 강좌: Cell-mediated effector responses

- Humoral immune responses: 항원에 특이적인 항체를 분비하여 항원의 표면에 binding 하여 neutralization 시키는 등의 다양한 effector로서 역할을 한다.
- Cell-mediated immune responses: intracellular pathogen을 포함하고 있는 cell이나 tumor cell 등을 제거시킨다.
- Antigen specific cells과 nonspecific cells 둘 다 CMI에 관계를 한다.  
 ( Ag specific cell- CD4+ T<sub>H</sub> cell, CD8+ cytotoxic T lymphocytes  
 \ nonspecific cell- NK cells, Mφ, neutrophils, eosinophiles

### *Effector responses:*

- 2가지의 categories로 나눈다.
  - i) Effector cell for cytotoxic activity; foreign cell 이나 altered-self cell을 lysis시키는 cytotoxic reaction을 진행시킨다.
    - Cell types: Ag specific CTL, Ag nonspecific NK, Mφ
  - ii) Effector CD4+ T<sub>H</sub> cell: mediates delayed-type hypersensitivity reaction을 일으킨다.

### *General properties of effector T cells*

#### A) Activation requirements

- Naive T cell은 effector T cell로 proliferation되고 differentiation되기 위해 primary signal 이나 co-stimulatory signal을 요구하나 effector T cell들은 TCR-mediated signal만으로도 (co-stimulation 없이) 반응한다.
- Naive T cell과 effector T cell은 서로 다른 CD45 isoform을 발현한다: CD45RA (naive T cell), CD45RO (effector T cell)
- CD45RO가 TCR complex와 coreceptor인 CD4나 CD8과 더욱 잘 association되므로 memory나 effector T cell은 co-stimulatory signal이 필요가 없이도 민감하게 반응한다.

#### B) Cell-adhesion molecules

- Cell-adhesion molecules (CD2 and LFA-1)
  - Naive T cells: Low
  - Effector T cells: High

#### C) Effector molecules

**TABLE 14-2 EFFECTOR MOLECULES PRODUCED BY EFFECTOR T CELLS**

| Cell type        | Soluble effectors                                                       | Membrane-bound effectors                      |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| CTL              | Cytotoxins (perforins and granzymes),<br>IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , | Fas ligand (FAS)                              |
| T <sub>H</sub> 1 | IL-2, IL-3, TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ,<br>GM-CSF (high)             | Tumor necrosis factor $\beta$ (TNF- $\beta$ ) |
| T <sub>H</sub> 2 | IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10,<br>IL-13, GM-CSF (low)                   | CD40 ligand                                   |

## Cytotoxic T cells

- CD8+ Class I MHC restricted T cell.
- 이 cytotoxic T cell은 lytic activity를 가지며 또한 virus infection이 된 cell이나 tumor cell 등과 같이 altered self-cell들을 인지하여 제거하는데 중요한 기능을 한다. 거의 대부분의 nucleated cell들은 Class I MHC를 만들므로 CTL은 온 몸에 있는 altered cell들을 인지하여 제거시킬 수 있다.
- Two phase; i) Naive T cell을 activation 시키고 differentiation시켜 functional effector CTL로 전환시키는 단계  
ii) CTL이 특별한 target cell의 membrane에 존재하는 Ag-class I MHC complex를 인지하여 최종적으로 그 target cell을 파괴시킨다.

### A) Generation of CTLs

- 기능적으로 Naive T cell은 target cell을 죽이지 못하므로 이를 CTL precursor (CTL-P)라 한다. CTL-P가 완전히 activation되고 나면 cytotoxicity 기능을 가진 CTL로 된다. CTL-P가 CTL로 전환되는데는 최소가 3개 연속된 signal을 필요로 한다.
- Antigen specific signal by TCR-Ag-Class I MHC complex
- co-stimulatory signal; CD28-B7 interaction
- A signal by IL-2 and high-affinity IL-2 receptor

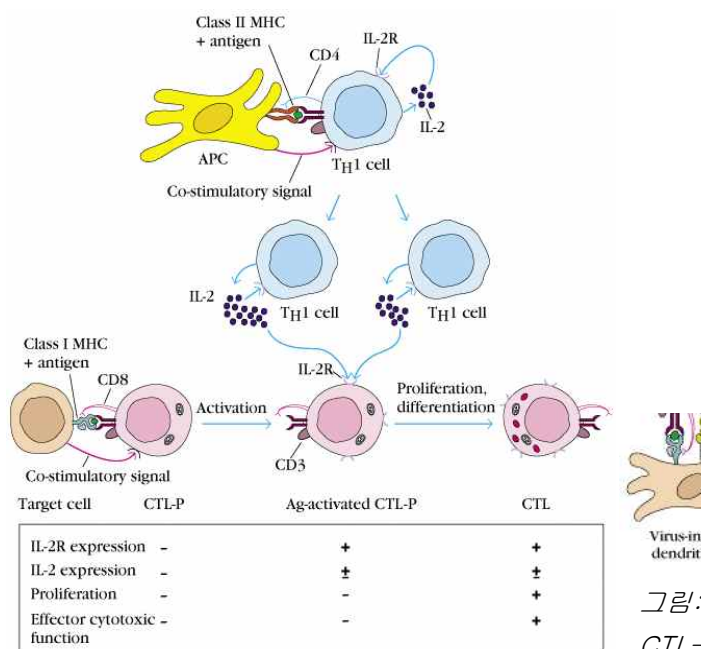


그림: Proliferation of memory CTL-Ps may not require help from  $T_H$  cells.

그림: Generation of effector CTLs.

## B) Destruction of target cells by CTLs

- CTL-mediated death의 events; conjugate formation, membrane attacks, CTL dissociation (and recycling), target cell destruction

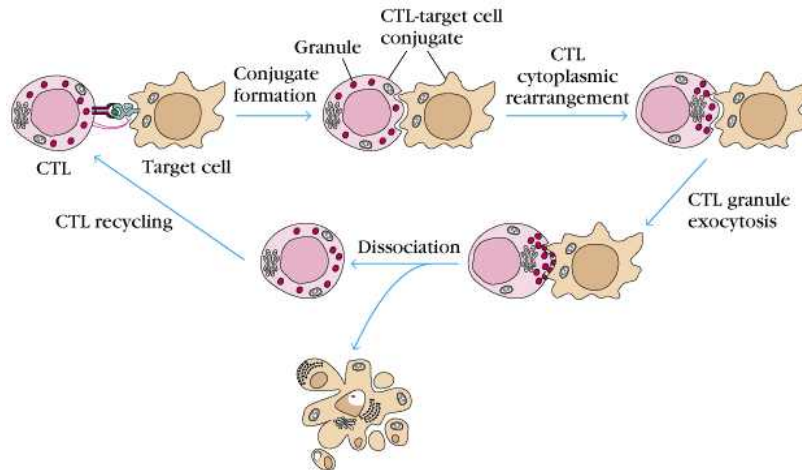


그림: Stages in CTL-mediated killing of target cells.

- CTL이 target cell로부터 분리되어 떨어져 나오면 target cell은 apoptosis에 의해 죽고 CTL은 다시 recycle되어 다른 target cell에 작용을 한다.
- Conjugation: TCR-CD3 complex가 target cell에 있는 Ag-Class I MHC molecules을 인지하고 CTL membrane에 있는 receptor인 LFA-1이 target cell의 adhesion molecule인 ICAMs과 binding하여 conjugation형성한다.
- Ag-mediated CTL activation은 LFA-1을 low-activity상태에서 high-activity상태로 전환하여 5~10분 정도 유지하고 난 후 다시 low-activity상태로 돌아간다. 이로 인해 CTL이 target cell로부터 dissociation하게 된다 (나중에 일어남).
- Effector CTL은 storage granules들을 형성하는데 이 granules속에는 65kDa의 "perforin"이라는 membrane에 pore를 만드는 protein과 "granzyme"이라는 몇 종류의 serine protease를 포함하고 있다.
- CTL과 target cell의 conjugation를 형성하고 나면 perforin과 granzyme protease를 exocytosis에 의해 유리 한다. 이 perforin이 target cell membrane과 접촉하면 conformational change를 일으켜 target-cell membrane에 삽입시키고 그 후  $Ca^{2+}$ 가 있으면 monomer들이 polymerize되어 원통형의 pores를 만든다.

그림: CTL-mediated pore formation in target-cell membrane.

- Perforin에 의해 생긴 membrane의 pore는 complement-mediated lysis와 비슷하다.
- Perforin에 의해 형성된 pore를 통해 granzyme protease들이 target cell로 들어가게 되고 그 과정에서 CTL에 있는 Fas ligand와 target cell의 Fas receptor가 interaction을 하게 되어 granzyme과 함께 caspase (cystein aspartate protease)라는 protease cascade를 활성화시켜 apoptosis를 유도한다.

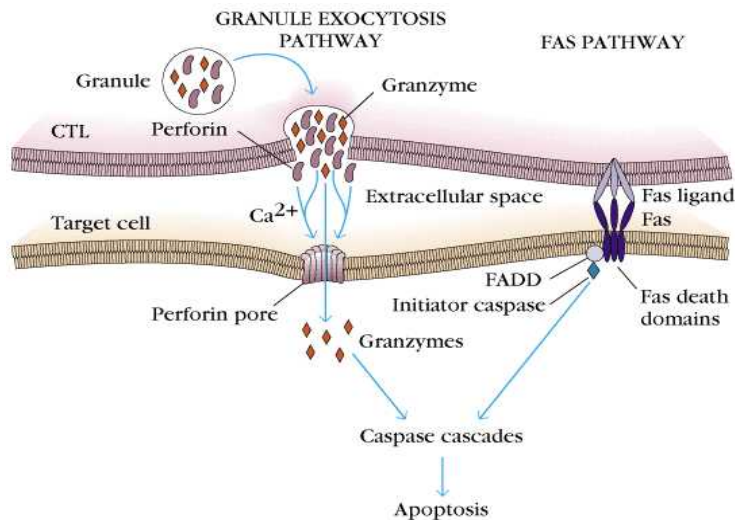


그림: Proposed model of target-cell apoptosis stimulated by CTLs.

### Natural killer cells

- NK cell은 우연한 기회에 발견하게 되었다. 보통 immunology 실험을 할 때 unimmunized mice를 negative control로 사용하여 실험을 한다. 하나, negative control sample도 non-specific하게 일정부분 tumor cell을 lysis 시키는 것을 발견하였고 그 cell을 관찰해보니 large granular lymphocytes있으며 이를 natural killer (NK) cell이라 한다.
- Virus나 intracellular bacteria 감염이 일어났을 경우 NK cell은 초기 방어에 관여한다 (innate immunity).
- NK cell activity는 IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  와 IL-12에 의해 stimulation된다.

#### A) NK-cell lineage

- Bone marrow derived lymphoid cells, T cell과 membrane 부분은 비슷한 점이 많으나 이는 thymus에서 maturation되지 않는다.

#### B) Mechanism of NK-cell killing

- CTL과 마찬가지로 NK-cell의 cytoplasm에 많은 perforin이나 granzyme들을 함유하는 granule들을 가지고 있다. NK-cell이 target cell을 죽이는 mechanism은 이들 perforin이나 granzyme들에 의한 apoptosis로서 CTL mechanism과 유사하다.

☆ CTL cell들은 activation되고 난 후 granule이 생기나 NK cell은 항상 granule을 가지고 있다 따라서 NK cell은 초기 대응에 아주 유리한 요소를 가지고 있다.

### ***Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)***

- 많은 cytotoxic 기능을 가진 cell들은 membrane 표면에 항체의 Fc 부분을 인지할 수 있는 receptor를 가지고 있다. 어떤 항체가 target cell의 특정 부분을 인지하여 binding하면 그 항체의 Fc 부분이 cytotoxic cell의 Fc receptor와 binding함으로서 cytotoxic cell이 target cell을 파괴시킨다. 이러한 형태의 cytotoxicity를 antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)라 한다.

- NK-cell, Mφ, neutrophils, eosinophiles 등이 ADCC type 반응을 한다.

ex, i) measles virus infected cell + anti-measles antibody + Mφ → lysis of measles virus

ii) helminths (schistosomes)+ Ab + eosinophiles → cytotoxic lysis

- ADCC에 의한 target cell lysis는 complement lysis와는 별개이지만 다른 여러 mechanism들이 복합적으로 작용하는 것 같다.

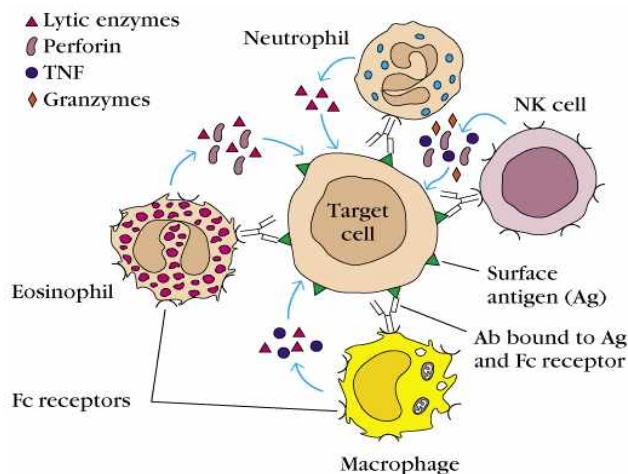


그림: *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC).*

- Release of lytic enzyme (granzyme)
- Secretion of tumor necrosis factor (TNF)
- Release of perforin

### ***Experimental assessment of cell-mediated cytotoxicity***

#### **A) Mixed-lymphocyte reaction (MLR)**

- TH cell의 proliferation을 측정. allogenic strain으로부터 lymphocytes들을 분리하여 한쪽 strain으로부터 유래한 lymphocyte들을 irradiation시키거나 mitomycin C를 처리하여 더 이상 proliferation을 못하게 하고 stimulator로서의 기능만을 하게 한 후 3H thymidine을 처리하면 lymphocytes들이 proliferation (divide) 되면서 [<sup>3</sup>H]thymidine을 DNA에 많이 incooperate시킨다. <sup>3</sup>H level을 측정해서 MLR 정도를 관찰한다.

#### **B) Cell-mediated lympholysis (CML)**

- Target cell 내의 cytoplasmic protein을 labeling시킨 후 <sup>51</sup>Cr을 이용하여 test하고자 하는 lymphocytes를 <sup>51</sup>Cr labeling된 cell과 섞으면 cytotoxic lysis가 일어나 <sup>51</sup>Cr만 바깥으로 유출시키므로 이것을 측정한다.

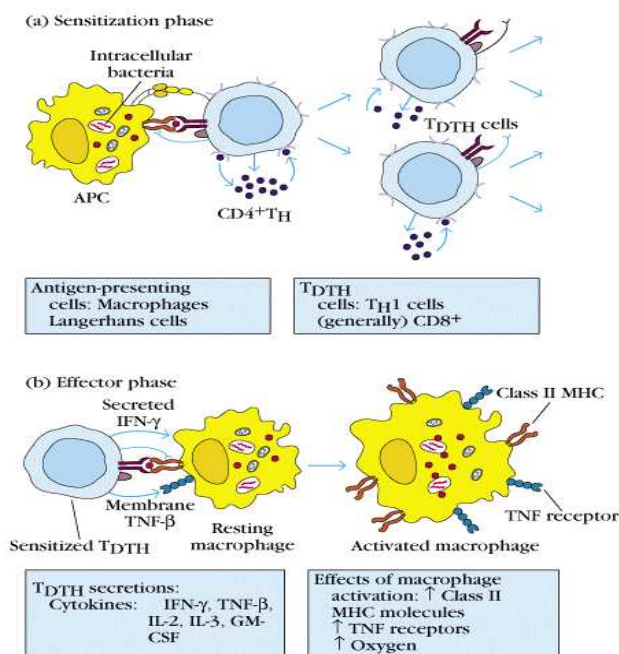
## Delayed-Type hypersensitivity

- Activated TH cell이 어떤 항원을 만나면 cytokine을 분비하고 이들이 localized inflammatory reaction을 일으키는데 이를 **Delayed-Type hypersensitivity (DTH)**라 한다. 이는 nonspecific inflammatory 때문에 생기는데 대표적인 것이 macrophage 때문이다. 이 현상의 최초 발견자는 Robert Koch (1890)로서 그는 *M. tuberculosis*에 감염된 환자에게 mycobacterium 유래의 물질을 피하주사하면 국부 염증반응이 생긴다는 것을 알았다. 이를 “tuberculin reaction”이라 한다.

### A) Phases of the DTH response

- Sensitization phase (1~2 weeks after primary contact)
  - T cell이 activation된다.
  - 다양한 APC가 관계한다; Mφ and Langerhans (Langerhans cell이 피부를 통해 들어오는 항원을 pick up하여 lymph node로 보낸다.)
  - sensitized 된 cell은 대부분이 CD4+ (TH1 subtype) 이고 activated 된 T cell을 종종 T<sub>DTH</sub>로 표시하기도 한다. 이 T<sub>DTH</sub>도 여전히 TH cell이다.
- Effector phase (starts 24hr after secondary contact)
  - secretes a variety of cytokines. 이들 cytokine들이 cell을 모으거나 Mφ나 다른 nonspecific inflammatory cell들을 activation 시키는 역할을 한다.
  - 반응의 peak는 48~72hr after secondary contact
  - 반응하는 시간이 늦어지므로 이를 “ Delayed-Type hypersensitivity”라 한다.
  - Macrophage가 DTH response의 major 기능을 한다.
- Mφ에 의한 DTH의 활성화는 intracellular pathogen의 제거에 아주 효과적이다. 그러나

때로는 antigen이 쉽게 cleared out 되지 않아 아주 오랫동안 DTH 반응을 유발할 때도 있다. 이런 경우는 심각한 염증 현상유도로 인해 정상 조직의 damage가 크다. 아주 심해지면 “granuloma” 를 만든다. 계속되는 Mφ의 activation으로 인해 Mφ끼리 서로 붙고 때로는 fusion을 이루어 multinucleated giant cell을 형성하기도 하고 이 giant cell이 정상 tissue cell의 위치에 자리를 함으로서 “palpable” nodules를 만들고 lytic enzyme을 많이 분비하여 정상 tissue를 파괴시킨다.





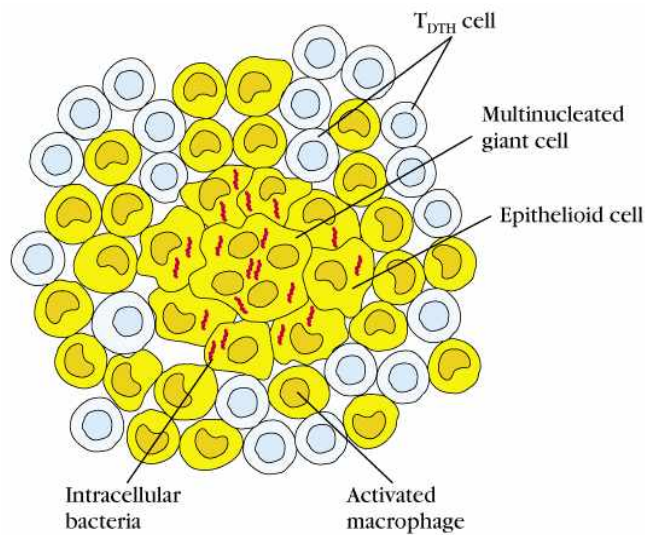


그림: A prolonged DTH response can lead to formation of a granuloma, a nodule-like mass.

## B) Cytokines involved in the DTH reaction

### - TDMH secretions

- cytokines: IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , IL-2, IL-3, GM-CSF
- chemokines: IL-8, monocyte chemotactic and activating factor (MCAF), migration-inhibiting factor (MIF)

## C) Protective role of the DTH response

- 많은 intracellular pathogen과 contact antigen들이 DTH response를 일으킨다.
- DTH reaction이 일어난 site에서 accumulated된 activated macrophage들은 intracellular pathogen을 가지고 있는 cell들을 빨리 lysis시킨다. 그러나 초기 반응은 매우 nonspecific이므로 상당한 정도의 healthy tissue damage를 주는 과정이다.

## D) Detection of the DTH reaction

- 항원을 피하로 주사했을 때 전형적인 특징을 지닌 피부 lesion을 전개시키느냐의 여부에 따라 판단 → **skin-test**: reaction이 test antigen에 대한 sensitized TDMH cell이 있느냐의 여부를 나타낸다.

ex) *M. tuberculosis*의 감염여부를 검사할 때 *M. tuberculosis* 유래의 cell wall 단백질인 PPD를 피하 주사하면 48~72시간 후 그 부위에 Red, swollen, firm lesion이 생기면 *M. tuberculosis*에 exposure되었다는 것을 뜻한다. Positive means *M. tb* infection or immunization을 뜻한다.