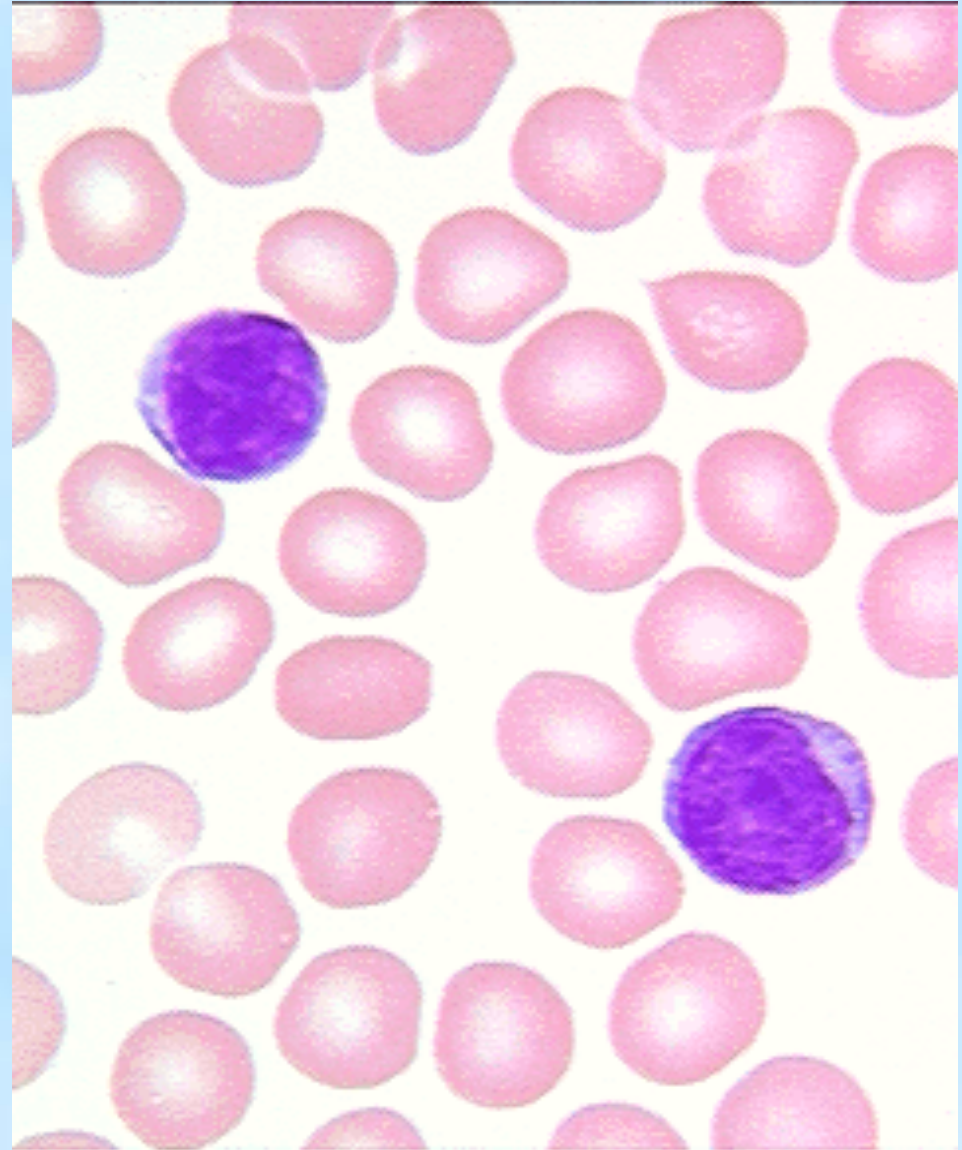


# Λεμφοποίηση Επιλογή των κλώνων Διαφοροποίηση λεμφοκυττάρων

Αθανασία Μουζάκη, Καθηγήτρια Εργαστηριακής  
Αιματολογίας-Αιμοδοσίας,  
Αιματολογικό Τμήμα, Παθολογική Κλινική,  
Τμήμα Ιατρικής, Παν/ο Πατρών

# Λεμφοκύτταρα

- Τ ή Β
- Λειτουργούν στην επίκτητη ανοσία
- Αποτελούν το 20-35% των κυκλοφορούντων λευκών κυττάρων του αίματος
- Ο μεγαλύτερος αριθμός τους βρίσκεται στους λεμφαδένες, μυελό των οστών, σπλήνα

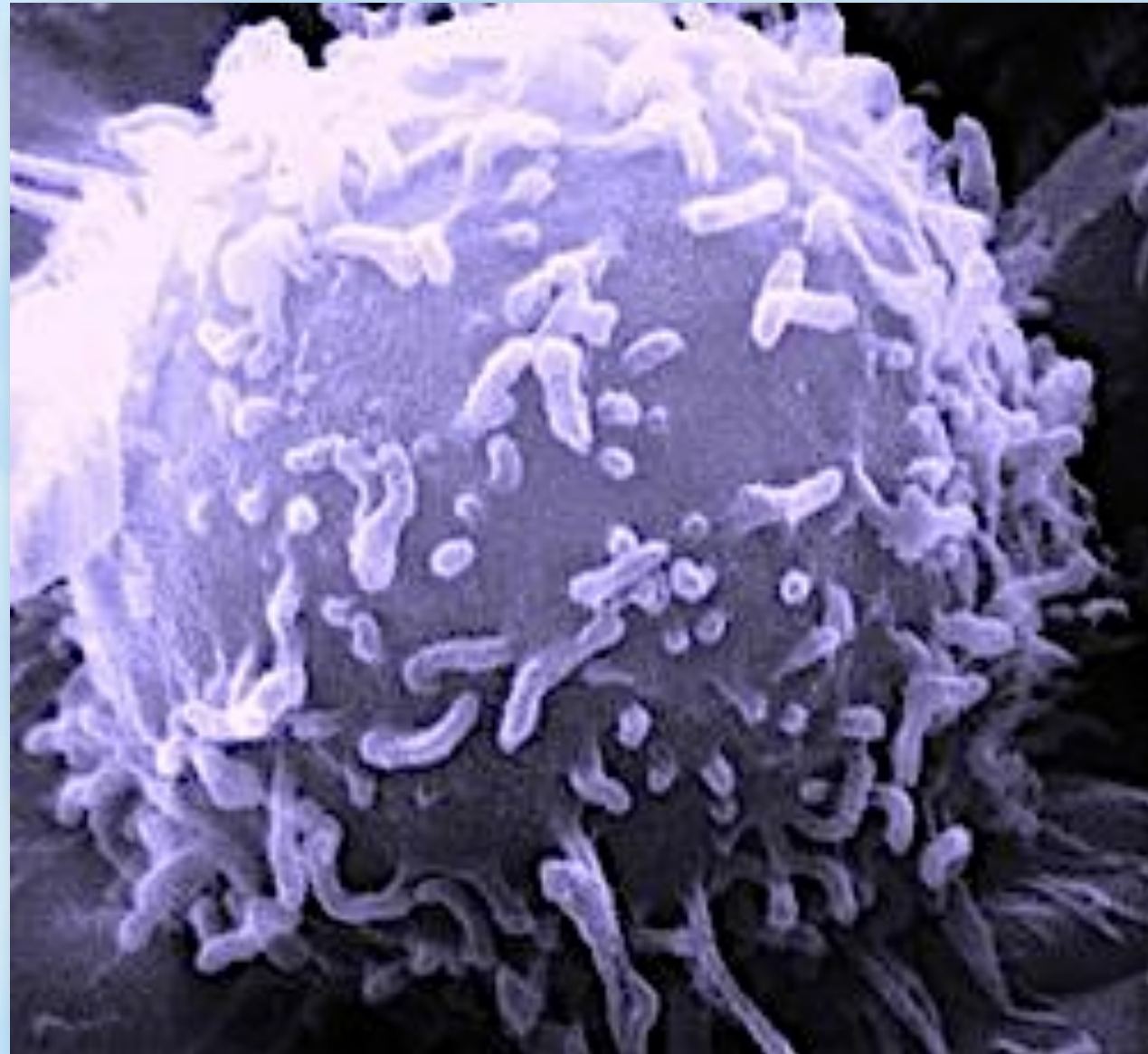


Όταν ενεργοποιούνται διαφοροποιούνται σε βλάστες και μετά από 2-3 μέρες διαιρούνται σε 2 νέα λεμφοκύτταρα, ίδια με το μητρικό κύτταρο



- Στην επιφάνειά τους έχουν πολλά πρωτεϊνικά μόρια τα οποία λέγονται CD (=cluster of differentiation) αντιγόνα που σχετίζονται με διαφορετικές λειτουργίες τους και χρησιμοποιούνται για τη φαινοτυπική τους ταυτοποίηση

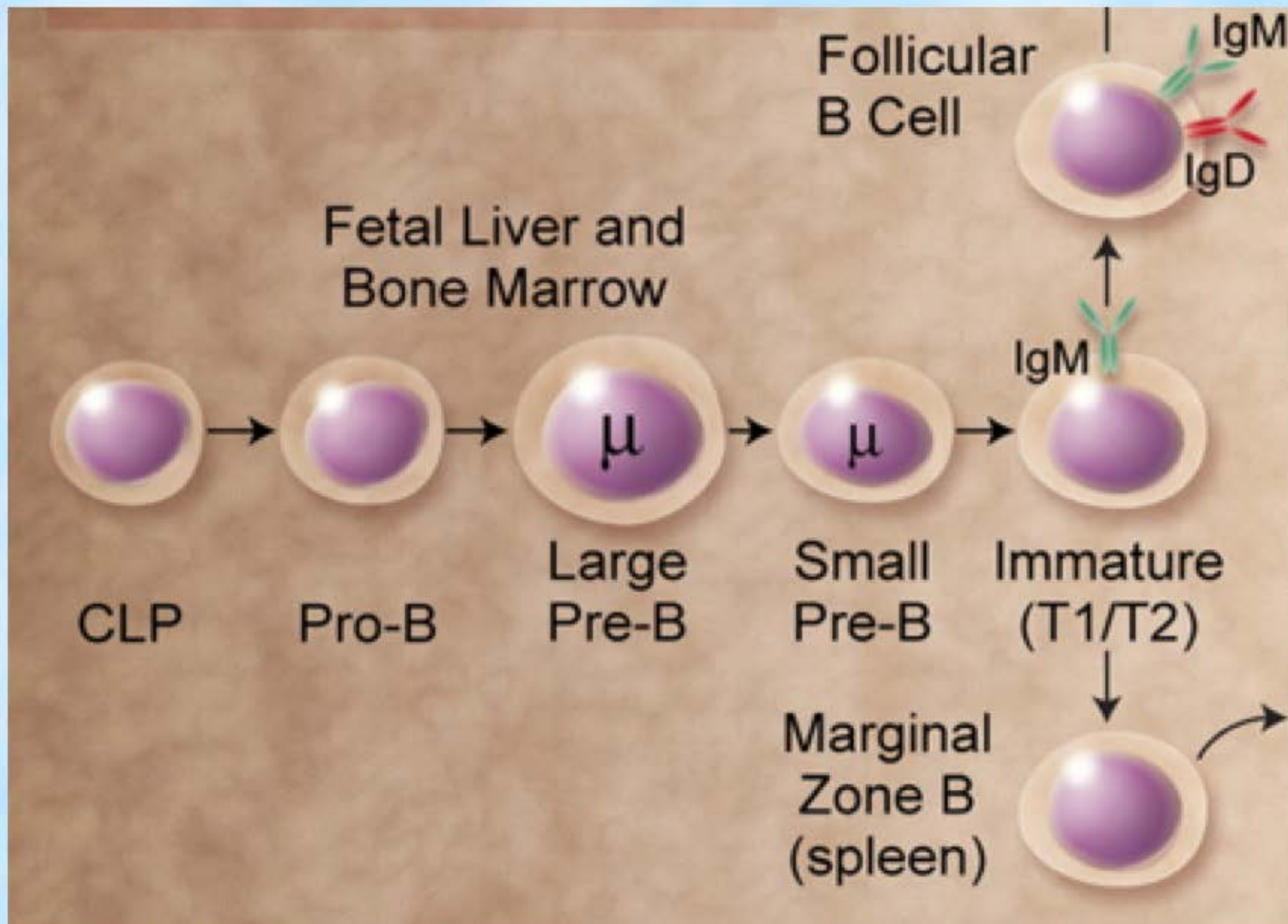
# Τα CD αντιγόνα στην επιφάνεια Τ-κυττάρου (ηλεκτρονικό μικροσκόπιο)



# B-κύτταρα

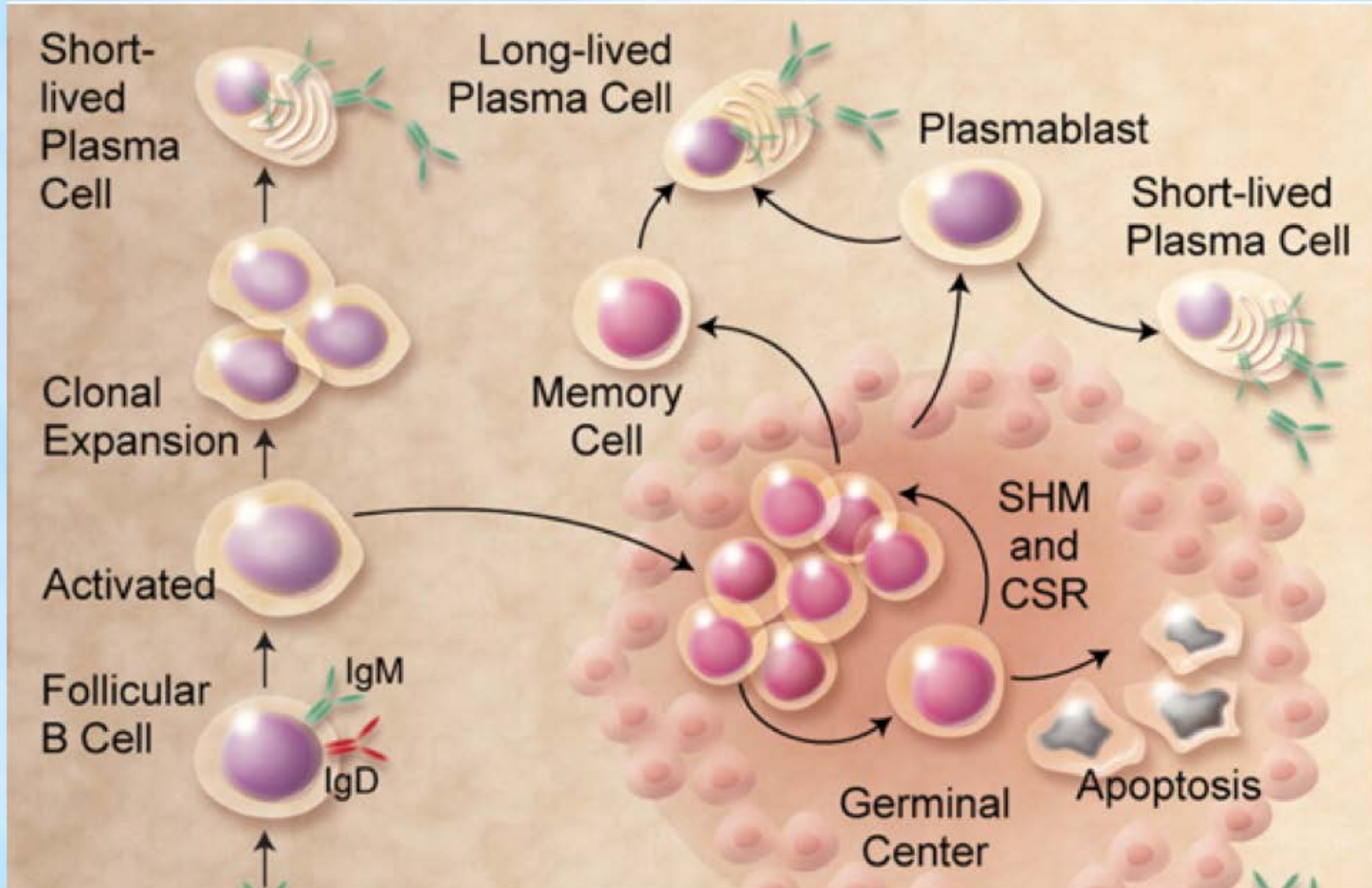
# Δημιουργία Β κυττάρων

CLP=common lymphoid progenitor



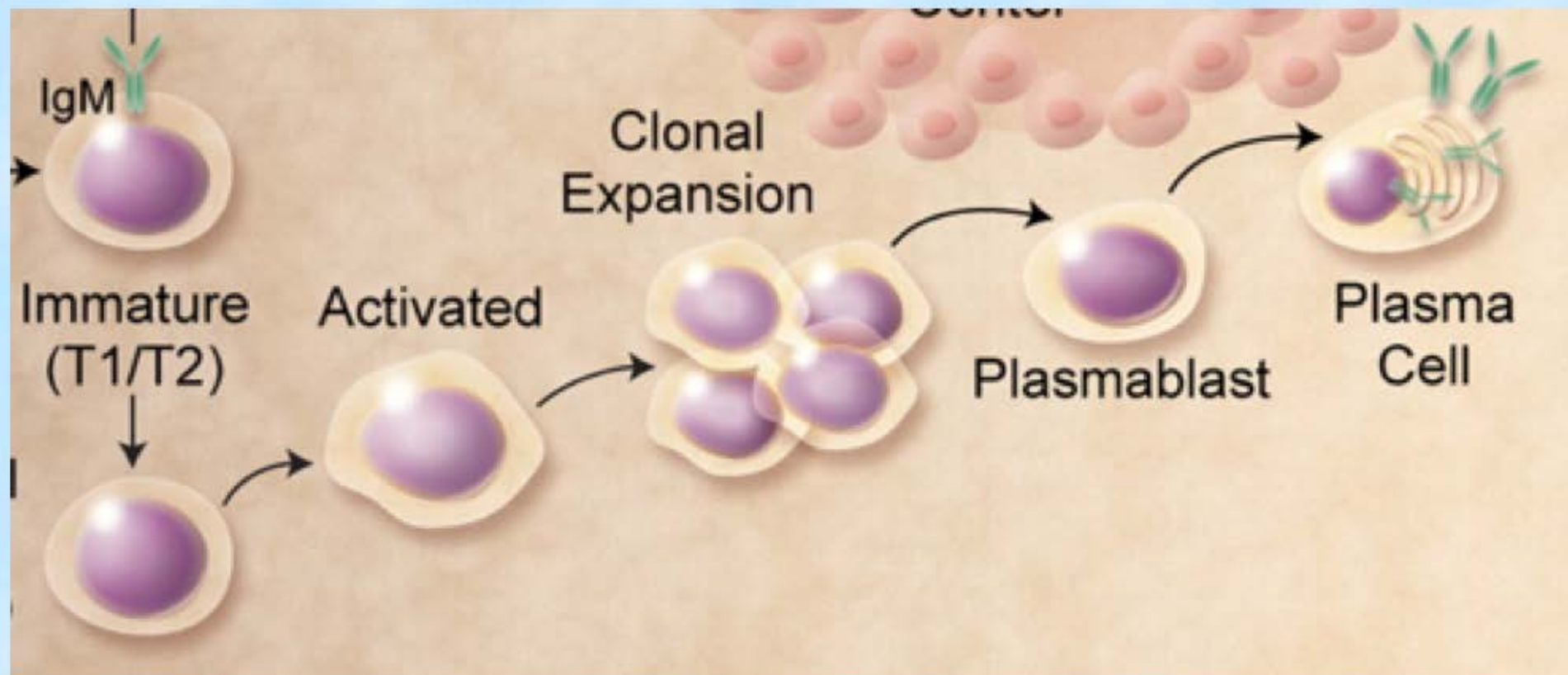
SHM, somatic hypermutation  
CSR, class switch recombination

# Περιφέρεια & λεμφαδένες

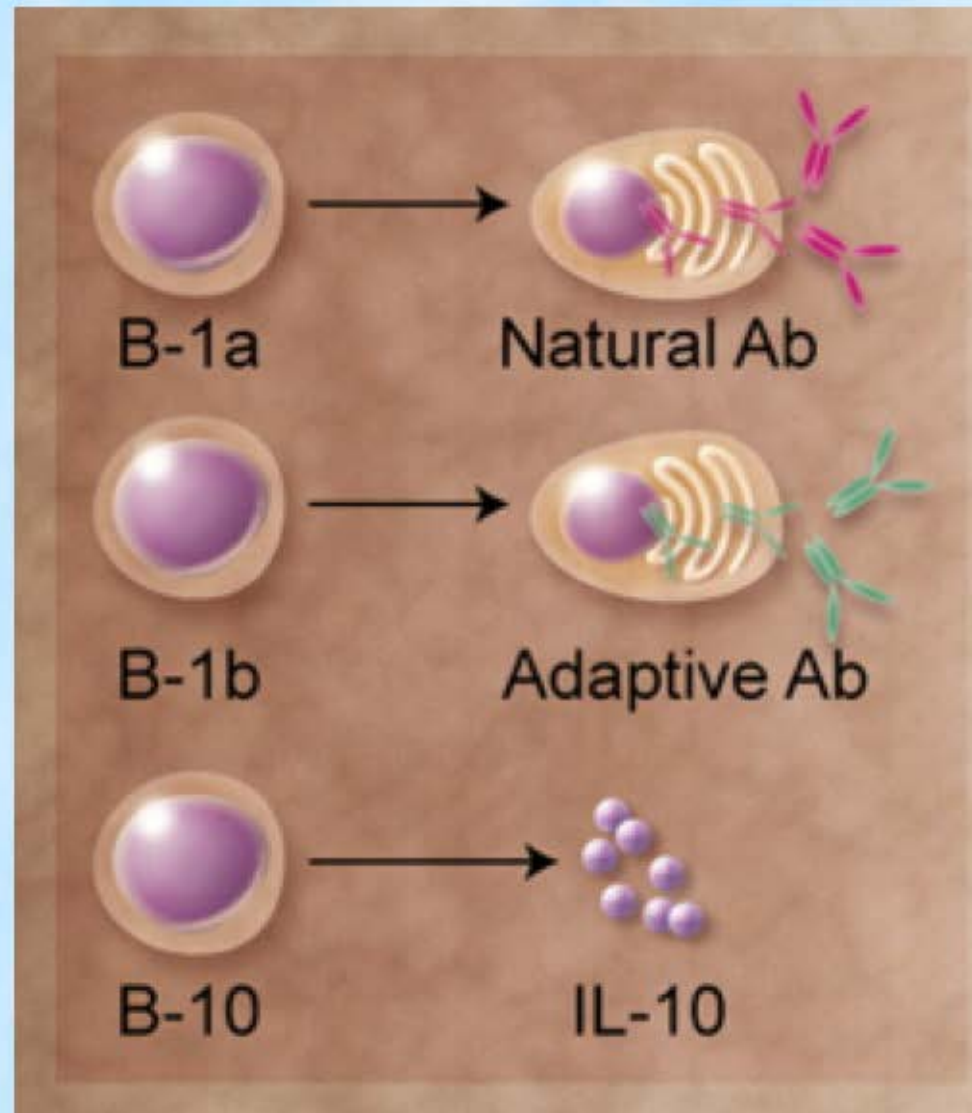




# Σπλήνας



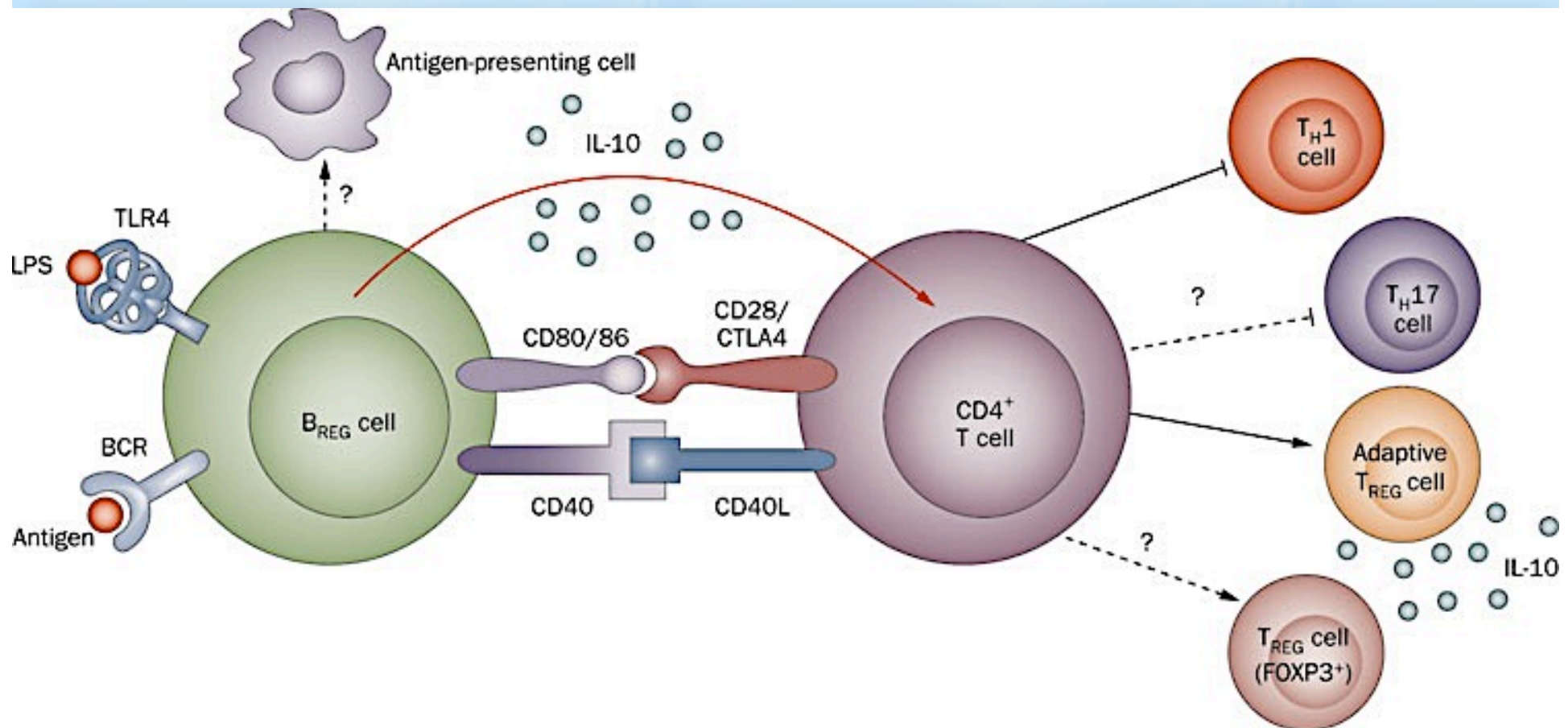
# Είδη Β κυττάρων



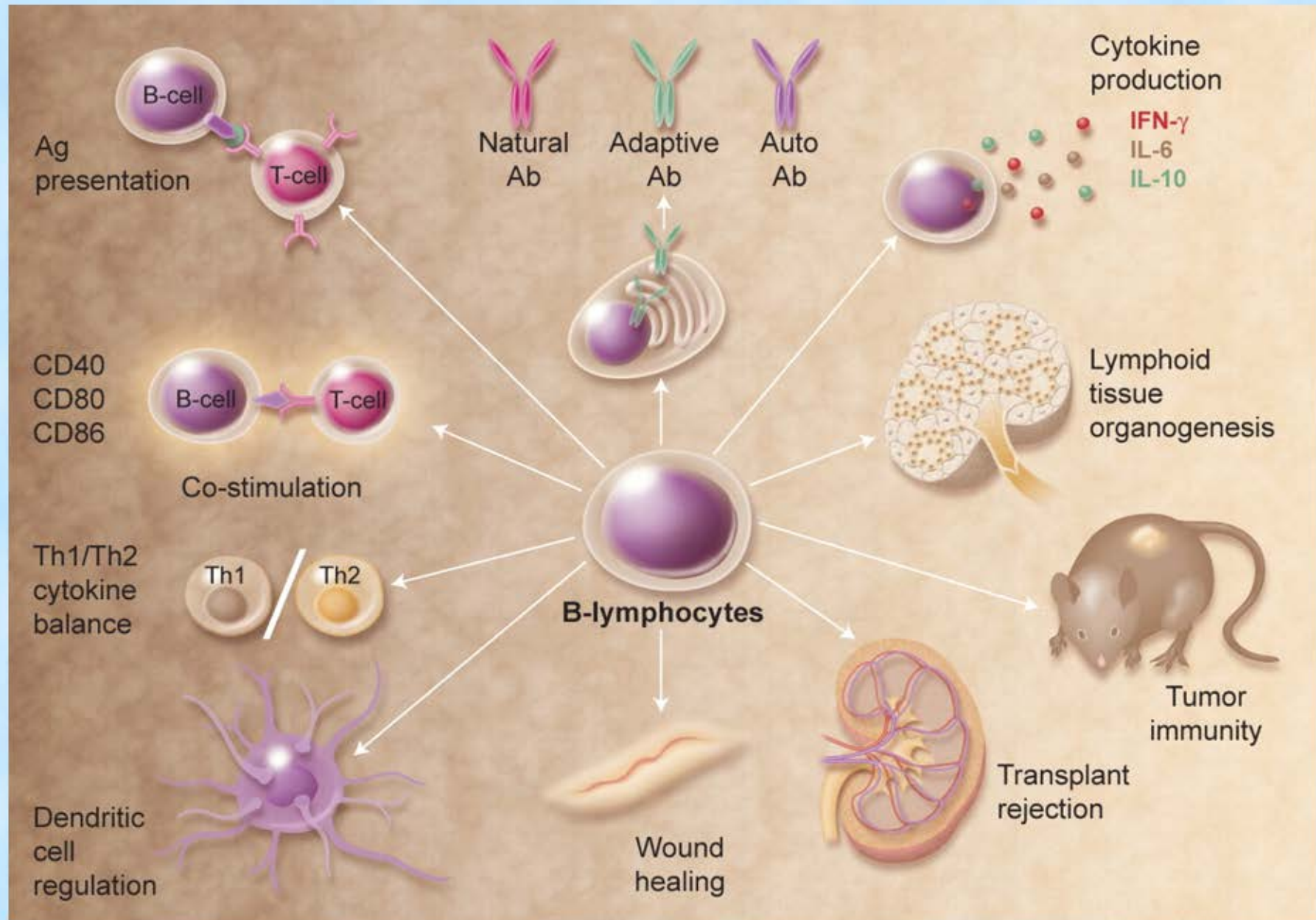
# Ρυθμιστικά B-κύτταρα (B-10)

B κύτταρα που παράγουν IL-10 (+ IL-35)-  
ρυθμίζουν την φλεγμονή στα αυτοάνοσα και  
λοιμώδη νοσήματα

[Shen et al, Nature 2014, 507:366-370]



# Λειτουργίες Β κυττάρων



## Δημιουργία του ρεπερτορίου των Β-κυττάρων

Τα ανθρώπινα αντισώματα (antibodies, Abs) ή ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulins, Ig) είναι προϊόντα 3 ασύνδετων ομάδων γονιδίων:

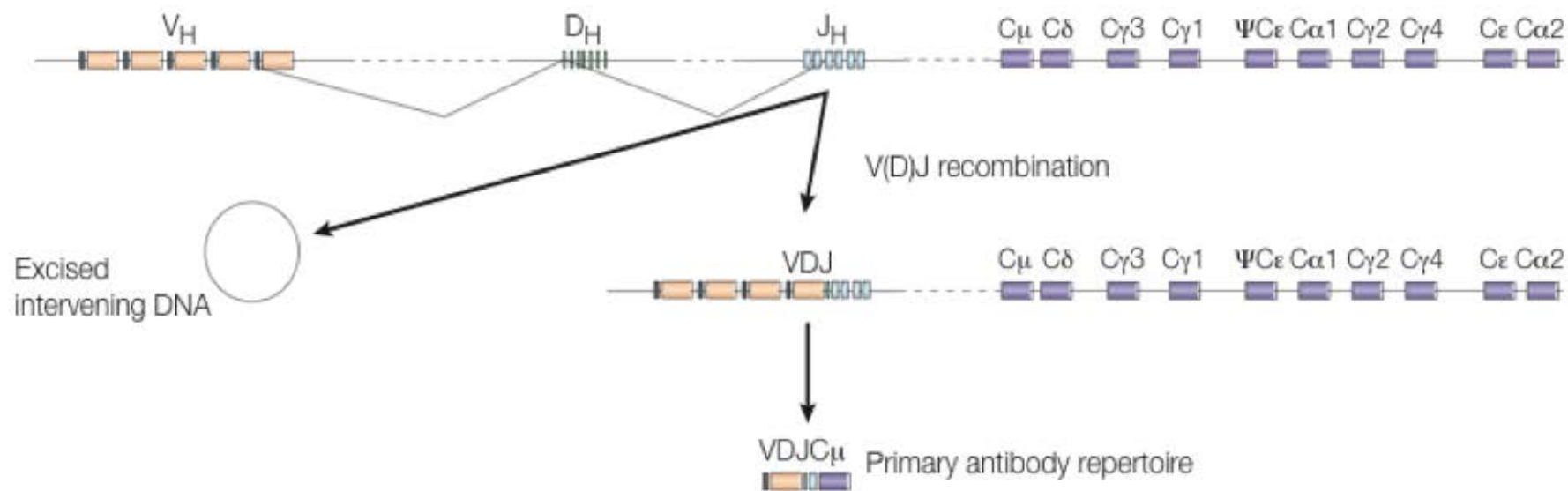
IGH (Ig heavy), στο χρωμόσωμα 14 (14q32.33)

IGK (Ig κ), στο χρωμόσωμα 2 (2p12)

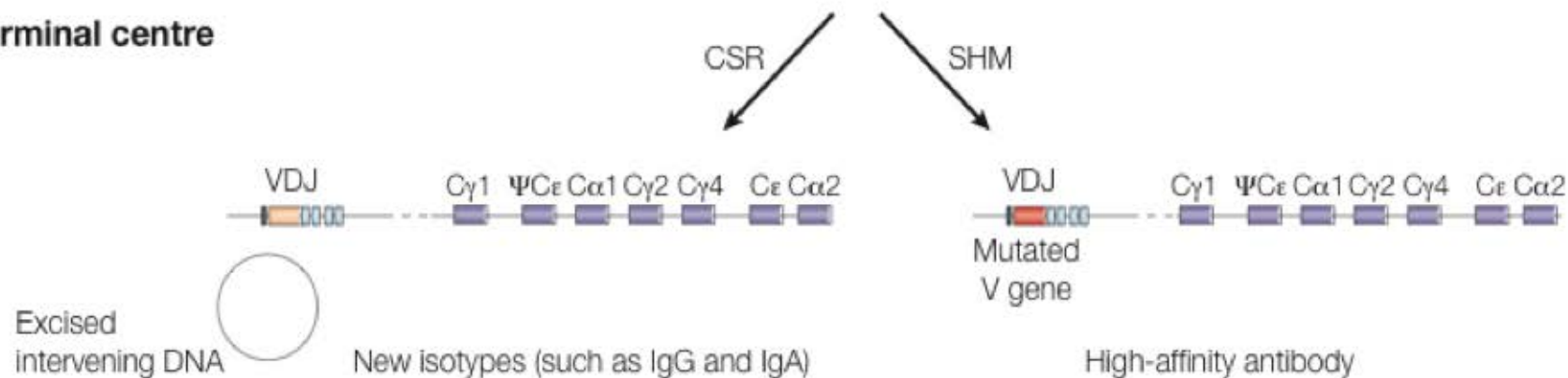
IGL (Ig λ), στο χρωμόσωμα 22 (22q11.2)

# Οργάνωση του γενετικού τόπου IgH στον άνθρωπο και οι σωματικές τροποποιήσεις του για την δημιουργία του ρεπερτορίου των Β-κυττάρων

## Bone marrow

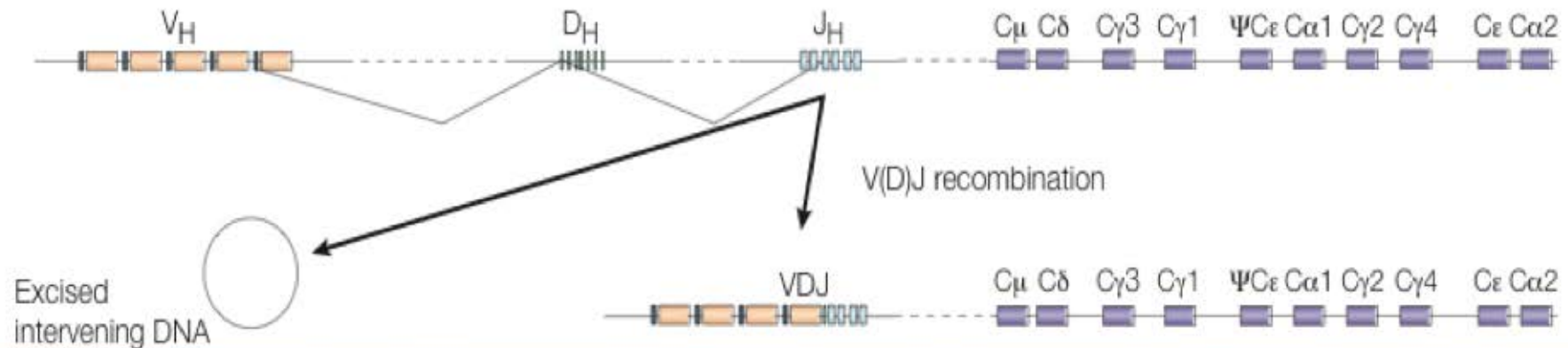


## Germinal centre

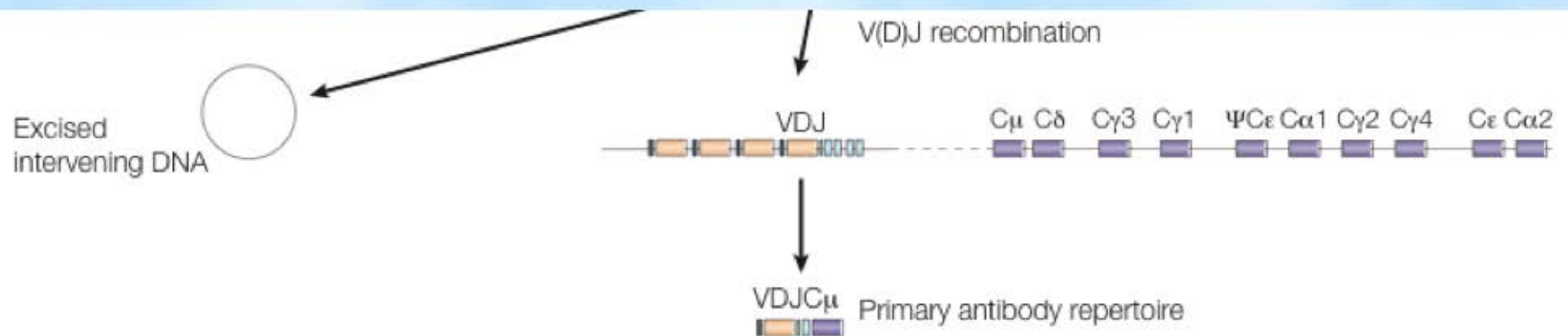


Αρχικά, το μεταβλητό τμήμα της βαριάς αλυσίδας IgH, αποτελείται από συστοιχίες τμημάτων γονιδίων που αντιστοιχούν σε εξώνια που κωδικοποιούν για μεταβλητά (V [for variable]), ποικιλόμορφα (D [for diversity]) και συνδετικά (J [for joint]) τμήματα. Ο ανασυνδυασμός V(D)J οδηγεί στην δημιουργία ενός επαναδιαταγμένου VDJ παραγωγικού γονιδίου το οποίο και σχηματίζεται από την φυσική συνένωση των τριών αυτών εξωνίων.

#### Bone marrow



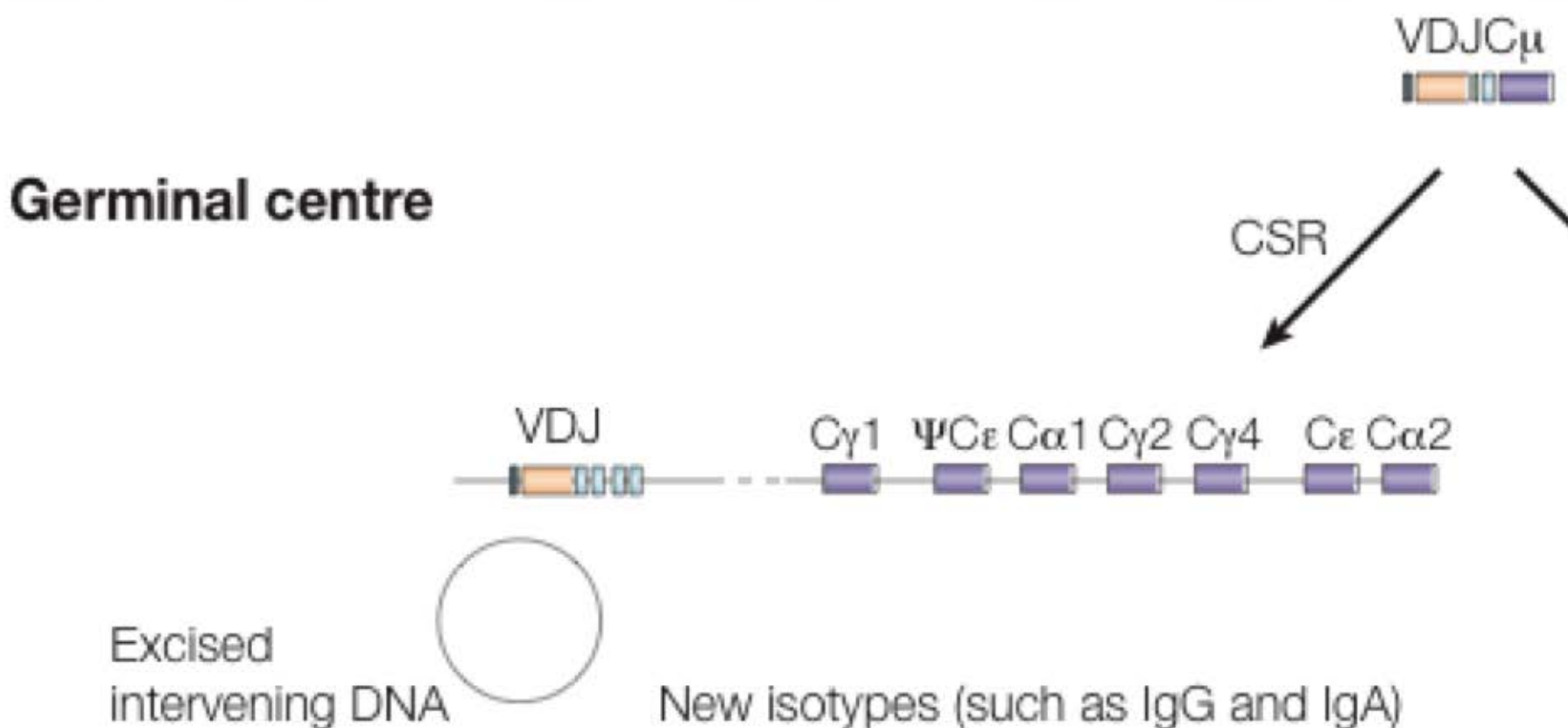
Το ενδιάμεσο DNA αφαιρείται με την μορφή κυκλικού DNA.  
Τα VDJ τμήματα ενώνονται με τα C $\mu$  για να φτιάξουν τα  
γονίδια των πρώτων αντισωμάτων (IgM).



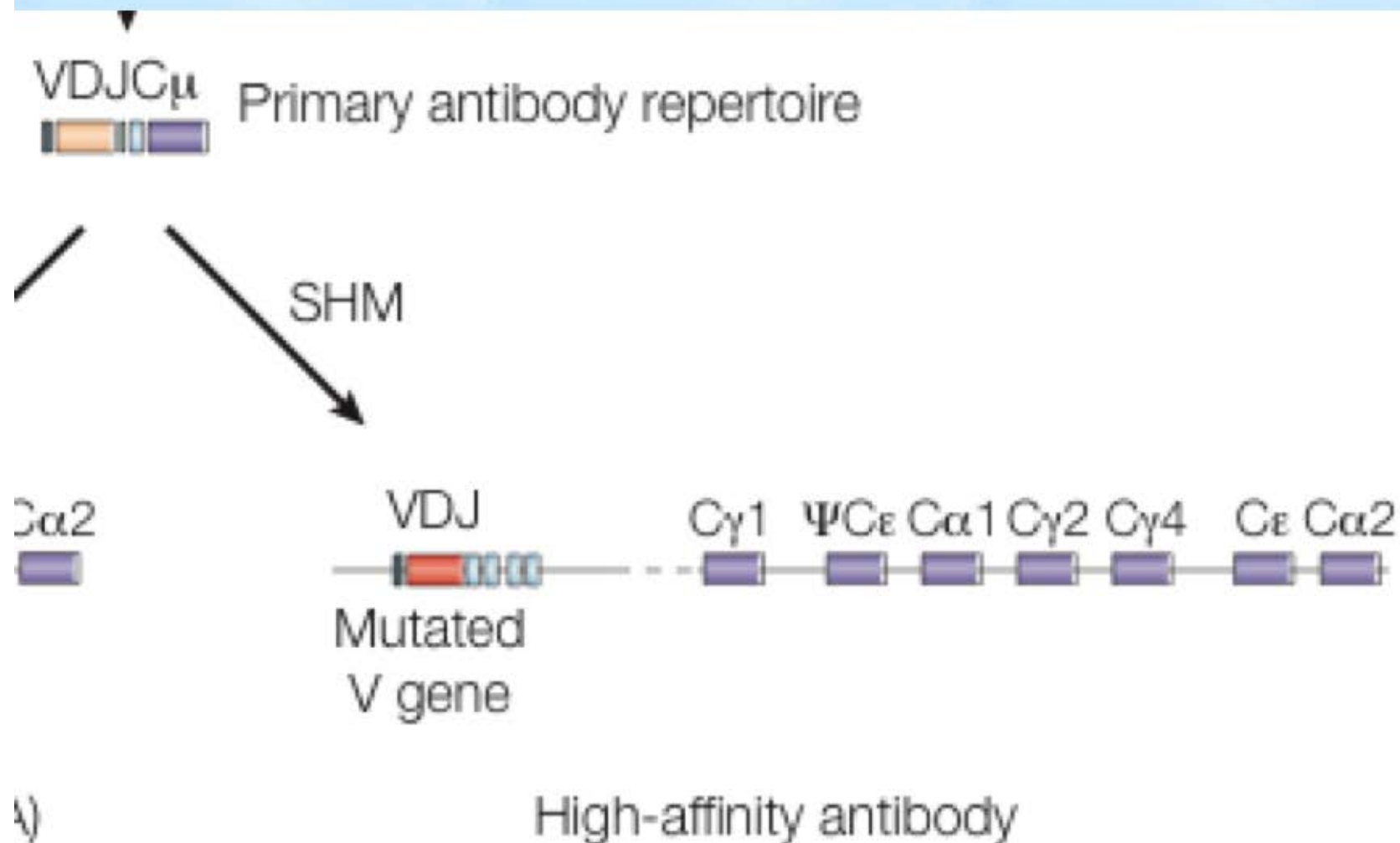


Κατά την διάρκεια του ανασυνδιασμού (CSR, class-switch recombination), μια νέα επαναδιάταξη φέρνει σε συνάφεια το γονιδιακό τμήμα VDJ με αυτό του εξωνίου που κωδικοποιεί για την σταθερή περιοχή C.

Το ενδιάμεσο DNA και πάλι αφαιρείται με την μορφή κυκλικού DNA.



Αντισώματα υψηλής συνάφειας δημιουργούνται μέσω της συσώρευσης σωματικών πολλαπλών υπερμεταλλαγών (SHMs, somatic hypermutations) στα γονίδια V (κόκκινο κουτί).



## Στάδια στην διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων

	stem cell	early pro-B cell	late pro-B cell	large pre-B cell	small pre-B cell	immature B cell	mature B cell
<b>H chain genes</b>	germline	D-J joining	V-DJ joining	VDJ rearranged	VDJ rearranged	VDJ rearranged	VDJ rearranged
<b>L chain genes</b>	germline	germline	germline	germline	V-J joining	VJ rearranged	VJ rearranged
<b>Surface Ig</b>	none	none	none	μ chain in pre-B receptor	μ chain in cytoplasm and on surface	membrane IgM	membrane IgM and IgD
<b>RAG, TdT expression</b>	no	yes	yes	no	yes	yes	no
<b>Surrogate L chain expression</b>	no	yes	yes	yes	no	no	no

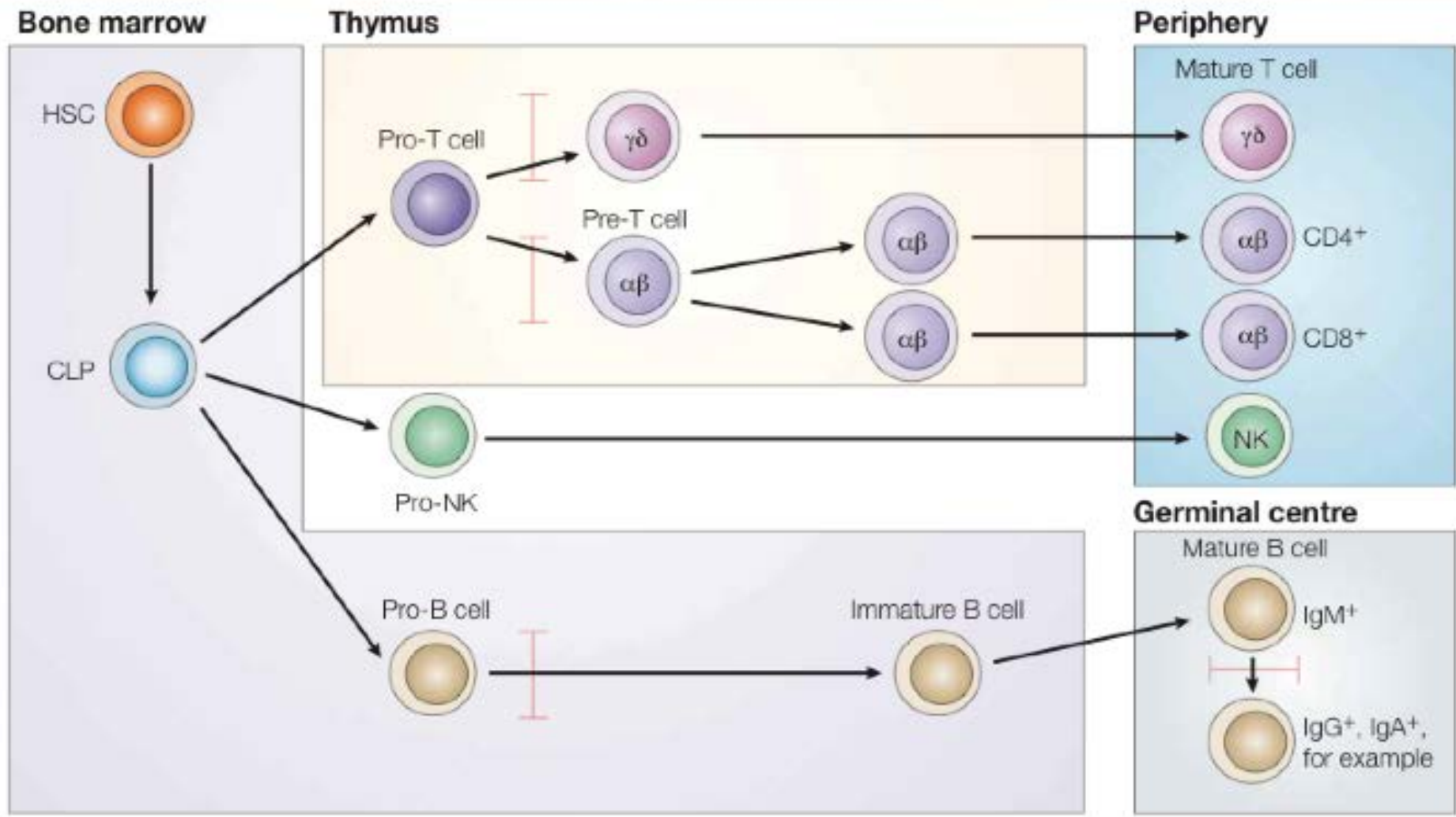
Pro-B   Pre-B1   Pre-B2   Immature B   Mature B   Plasma



D-J

VDJ

V-J light



**V(D)J recombination deficiency**

- Mutations in:
- *Rag1*
  - *Rag2*
  - Artemis (RS-SCID)
  - Other genes
- T-B-SCID

**CSR/SHM deficiency**

- Mutations in:
- CD40/CD40L
  - AID
  - UNG
  - Other genes
- HIGM

# T-κύτταρα

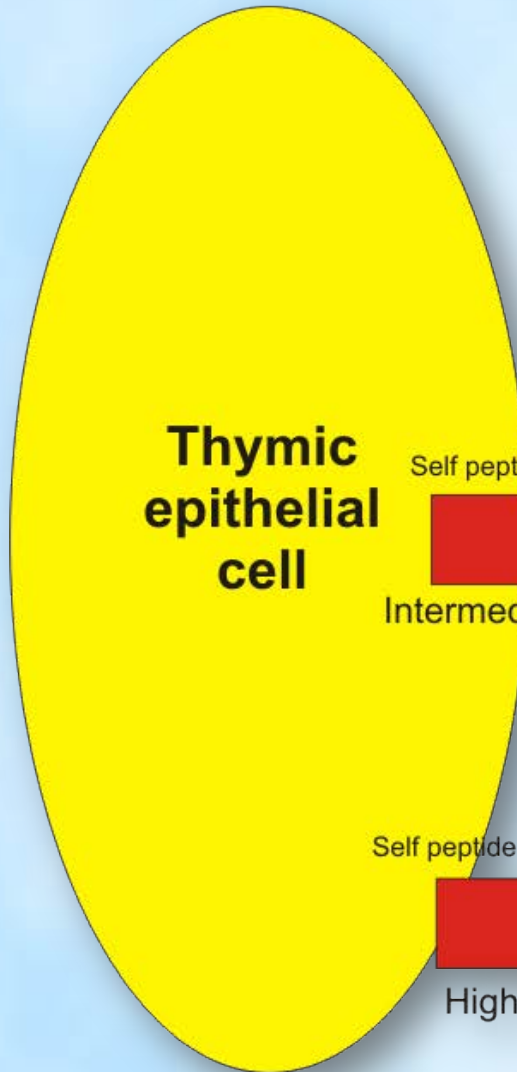
- Εκπαίδευση στον θύμο
- Επιλογή κλώνων
- Διαφοροποίηση

Η εκπαίδευση των θυμοκυττάρων  
γίνεται για να

(1) αναγνωρίζουν ίδια αντιγόνα, που  
τους παρουσιάζονται από τα  
αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του  
θύμου,

(2) με τη σωστή χημική συγγένεια.





Self peptide -MCH complex



Intermediate affinity/avidity



Positive selection

Cell survives  
And exits  
Thymus for  
Periphery

Self peptide -MCH complex



High affinity/avidity



Negative selection

Cell is deleted



Die by neglect

- Οι ιντερλευκίνες IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15, όπως και η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη MCL-1, επηρεάζουν σημαντικά την επιβίωση των θυμοκυττάρων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, διαφοροποίησης και εκπαίδευσής τους στο θύμο, που συντελούνται με παράλληλη αναδιάταξη των γονιδίων VDJ.

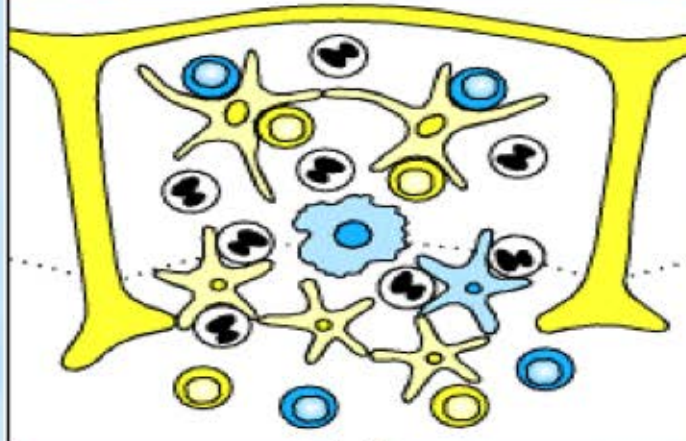
- Η αναδιάταξη των γονιδίων VDJ, θα επιφέρει τη δημιουργία μεγάλου αριθμού θυμοκυττάρων τα οποία, όταν ώριμα πιά βγουν στη περιφέρεια, θα έχουν μία τεράστια γκάμα T αντιγονικών υποδοχέων (TCR) (1/κύτταρο) που θα τους επιτρέπει να αναγνωρίσουν ένα τεράστιο αριθμό ξένων αντιγόνων.
- Η διαδικασία αναγνώρισης στη περιφέρεια συντελείται όπως και στον θύμο.

# Medawar & Burnet

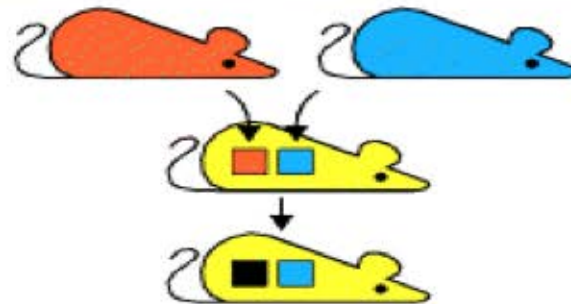
Neonatal mouse injected with  
allogeneic bone marrow cells

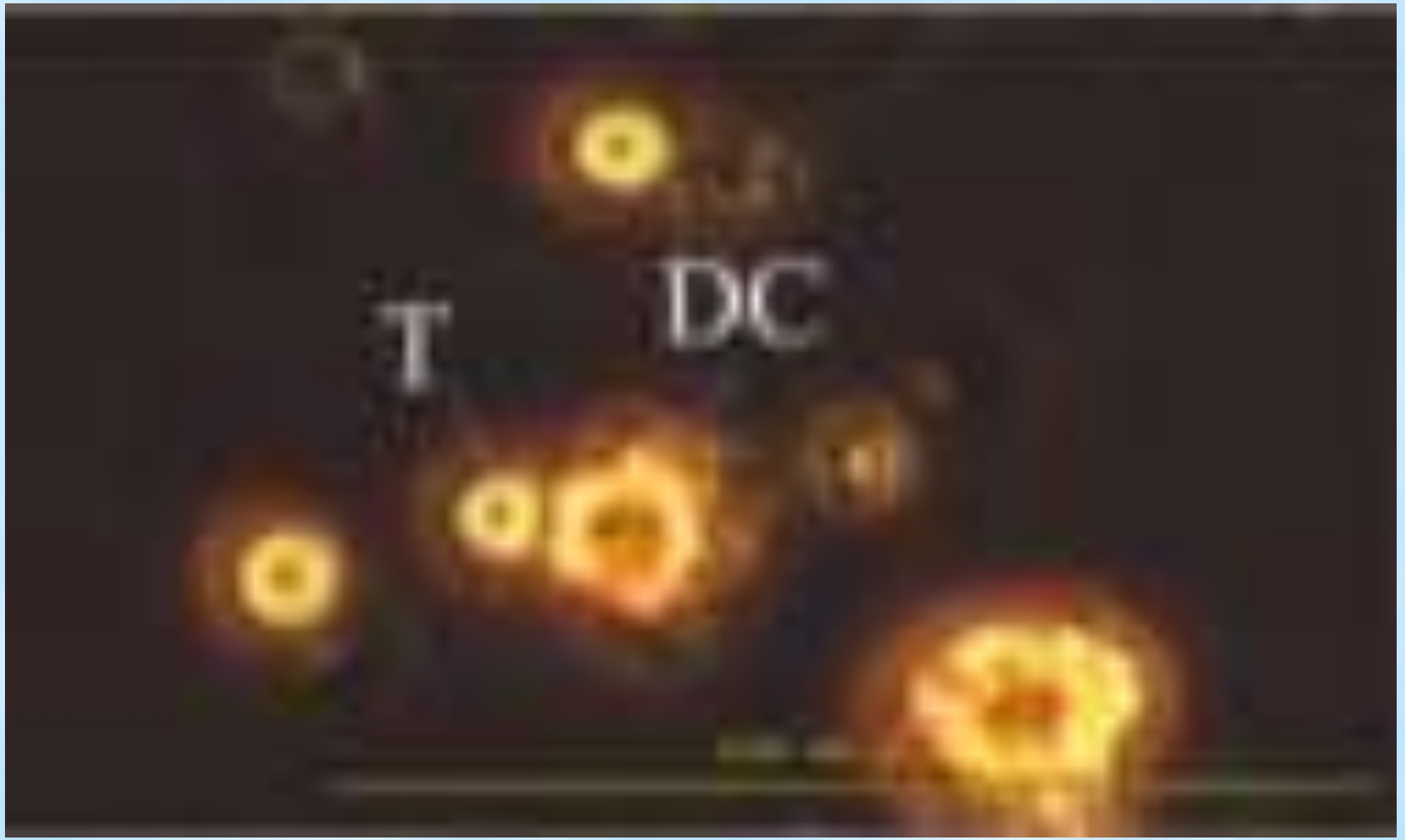


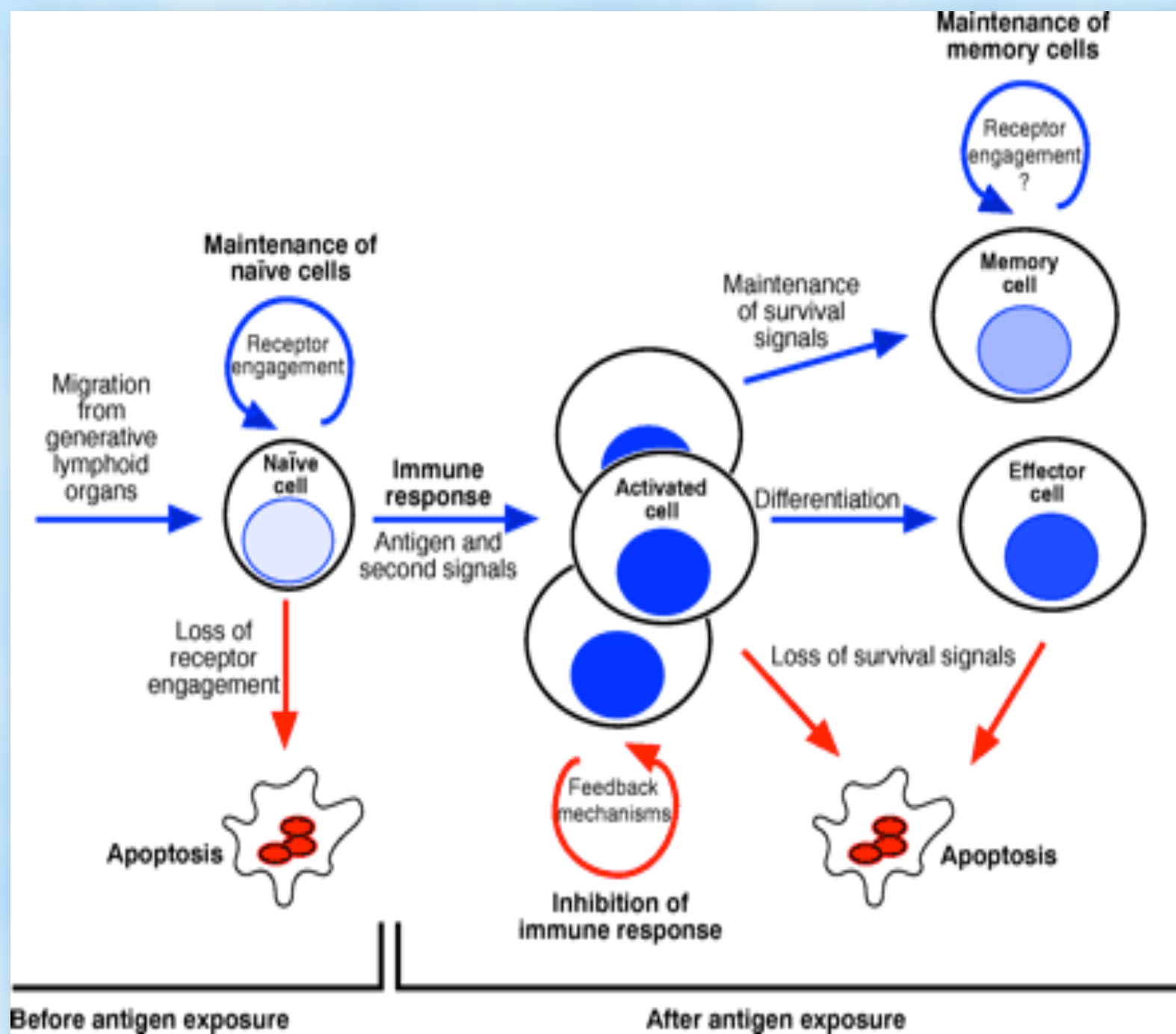
Both donor and recipient T cells  
are selected in the recipient thymus.  
T cells are negatively selected  
on both donor and recipient APC



Chimeric animals accept a donor-type  
skin graft but reject an unrelated graft







# Περιφερική ανοχή:

- Αν τα ίδια ή ξένα αντιγόνα είναι πολύ σπάνια, τότε τα Τ-κύτταρα δεν τα βλέπουν.  
Το φαινόμενο αυτό λέγεται ανοσολογική άγνοια (= **immunological ignorance**)
- Αν τα ίδια ή ξένα αντιγόνα είναι πάρα πολλά, τα Τ-κύτταρα που τα αναγνωρίζουν γίνονται ανεργικά ή πεθαίνουν (= **anergy or clonal deletion**).

Κοινοί φαινοτυπικοί δείκτες μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος

<b>T-cells</b>	<b>Natural killer cells (NK)</b>	<b>B-cells</b>	<b>Monocytes</b>
<b>CD2</b>	<b>CD16</b>	<b>CD19</b>	<b>CD14</b>
<b>CD3</b>	<b>CD56</b>	<b>CD20</b>	<b>CD31</b>
<b>CD4</b>		<b>CD21</b>	<b>CD32</b>
<b>CD8</b>		<b>CD40</b>	<b>CD36</b>
<b>CD4-CD8-</b>			
<b>CD25</b>			
<b>CD69</b>			
<b>CD45RO</b>			
<b>CD45RA</b>			



Τα λεμφοκύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους, όπως και με άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω των κυτοκινών ή κυτταροκινών.

Οι κυτοκίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους (~15 kD)

# Κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα Τ βοηθητικά κύτταρα

Cytokine	Th1	Th2
IL-2	+++	-
IFN-g	+++	-
TNF-a	+++	-
GM-CSF	++	++
IL-3	++	++
IL-4	-	+++
IL-5	-	+++
IL-13	-	+++
IL-10	±	+

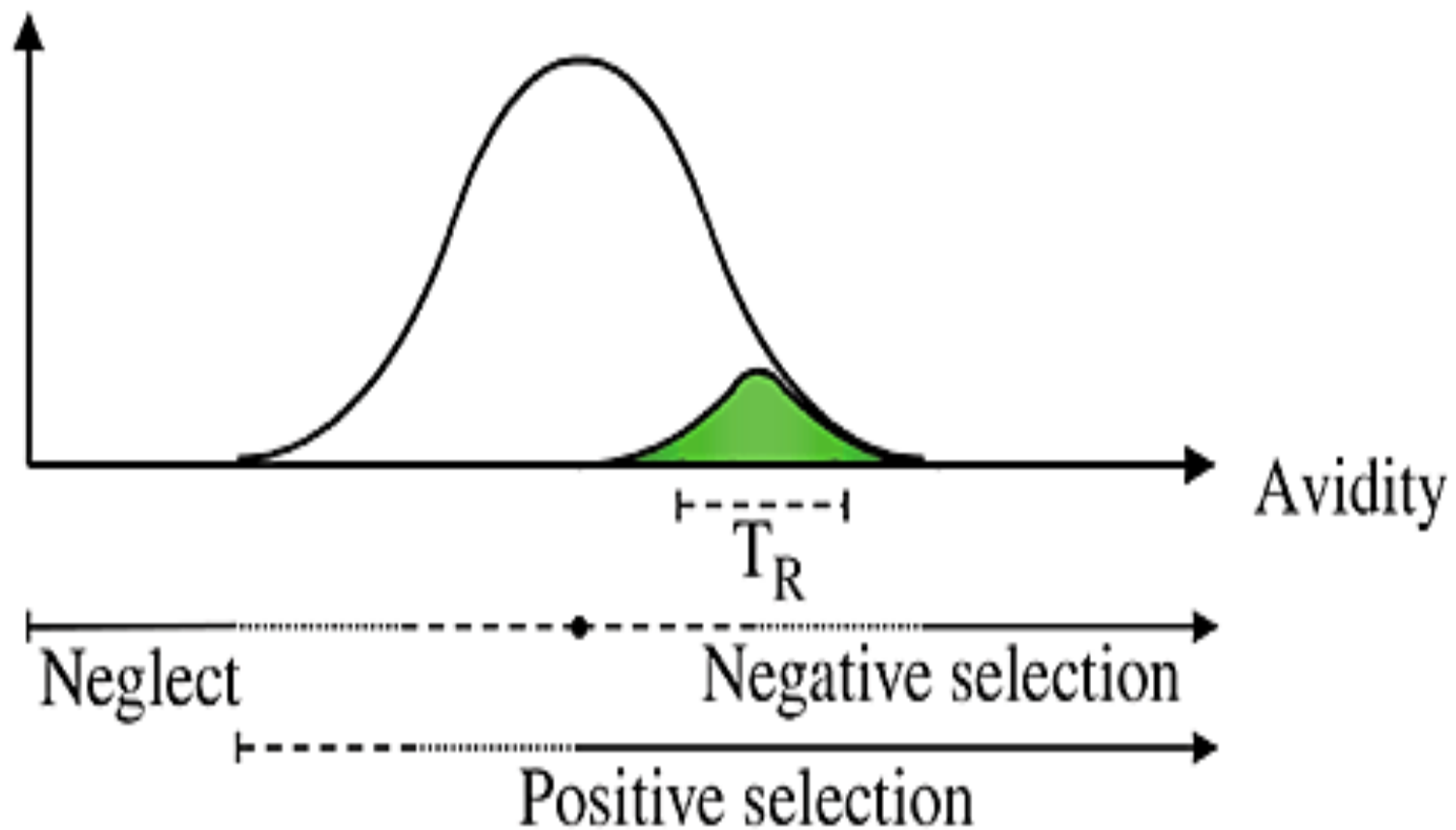
Ρυθμιστικά/κατασταλτικά  
T-κύτταρα

Υποπληθυσμός T κυττάρων με  
κατασταλτικές / ρυθμιστικές ικανότητες

- Regulatory T-cells. 2005. Nature Immunol, 6(4):327-361.

Ένας τέτοιος υποπληθυσμός Τ-κυττάρων  
μπορούν να ταυτοποιηθούν από την συν-  
έκφραση των αντιγόνων CD4 και CD25.

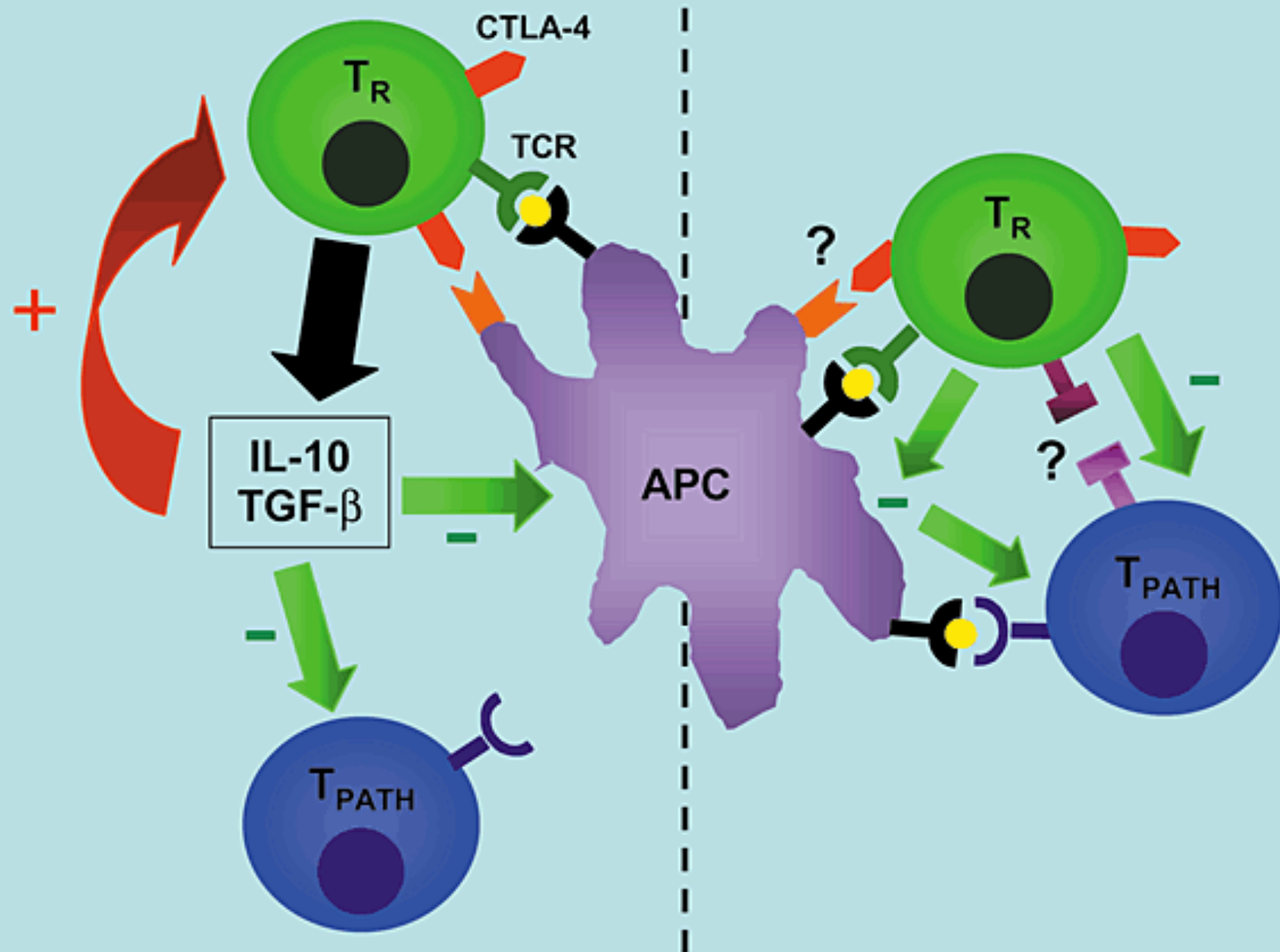
Probability  
of selection



Αυτά τα κύτταρα καταστέλλουν την ενεργοποίηση των CD4 και CD8 T-κυττάρων *in vitro* μέσω έκκρισης κατασταλτικών κυτταροκινών και ενός αγνώστου μηχανισμού που (μάλλον) εξαρτάται από τη φυσική επαφή μεταξύ κυττάρων.

## Cytokines

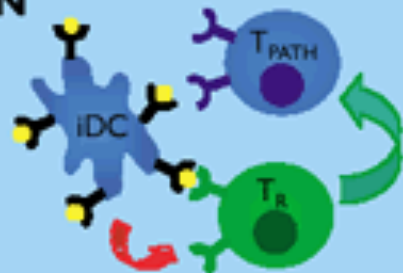
## Cell contact



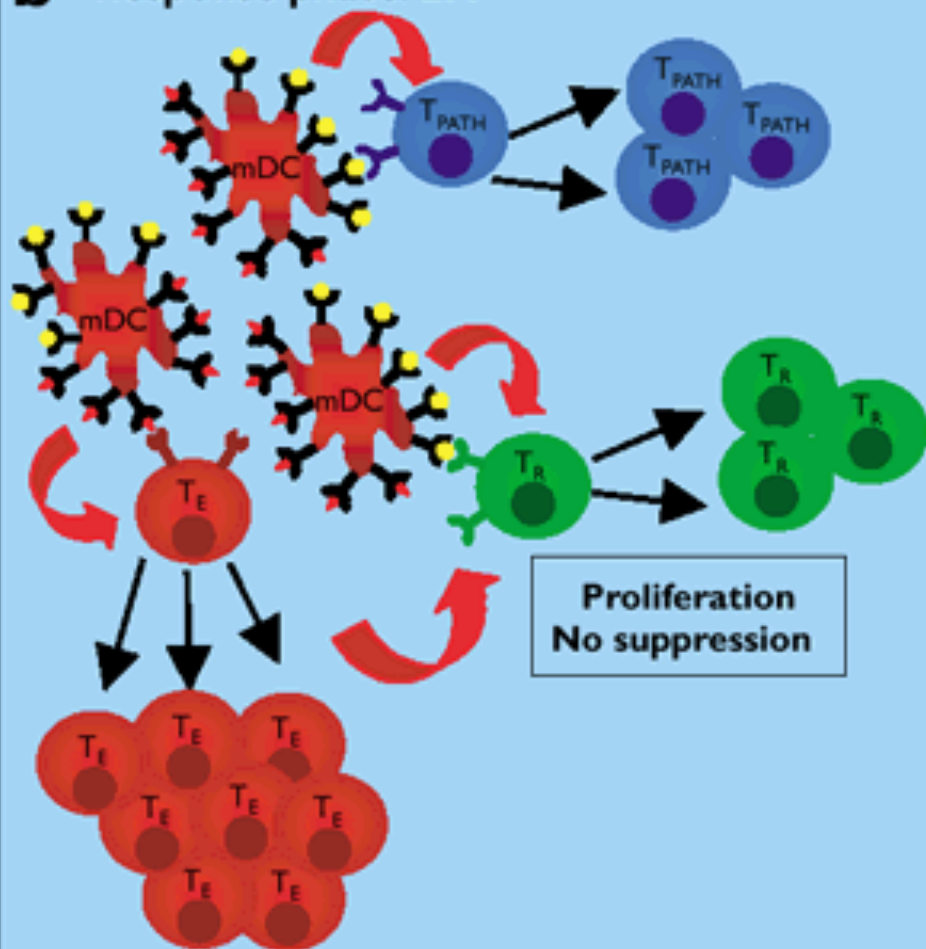


*In vivo*, αυτά τα κύτταρα καταστέλλουν τις αυτοάνοσες ασθένειες μέσω μονοπατιών που ενεργοποιούνται από την επαφή κυττάρων ή/ και από μονοπάτια που πυροδοτούνται από κυτοκίνες.

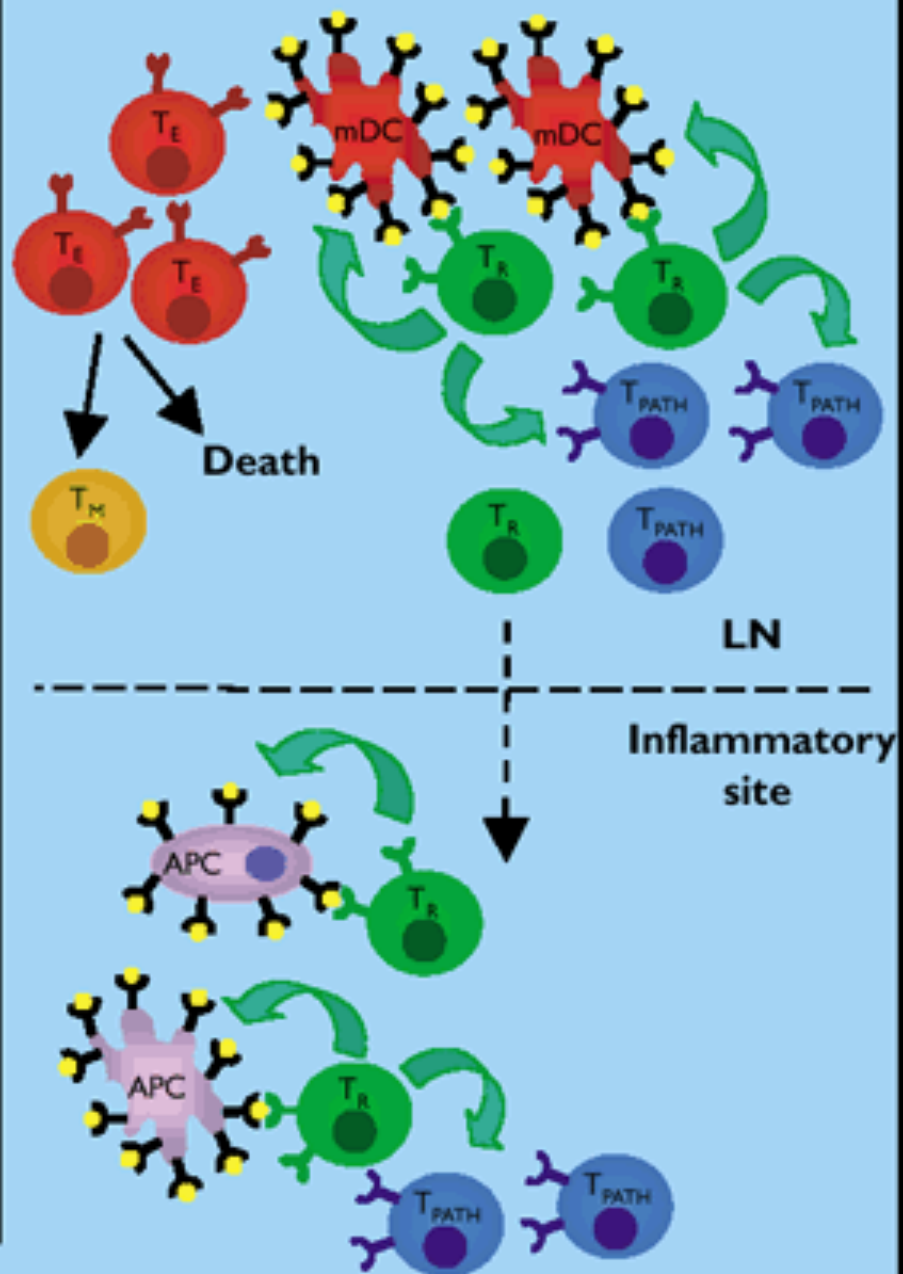
**a** Steady state: LN

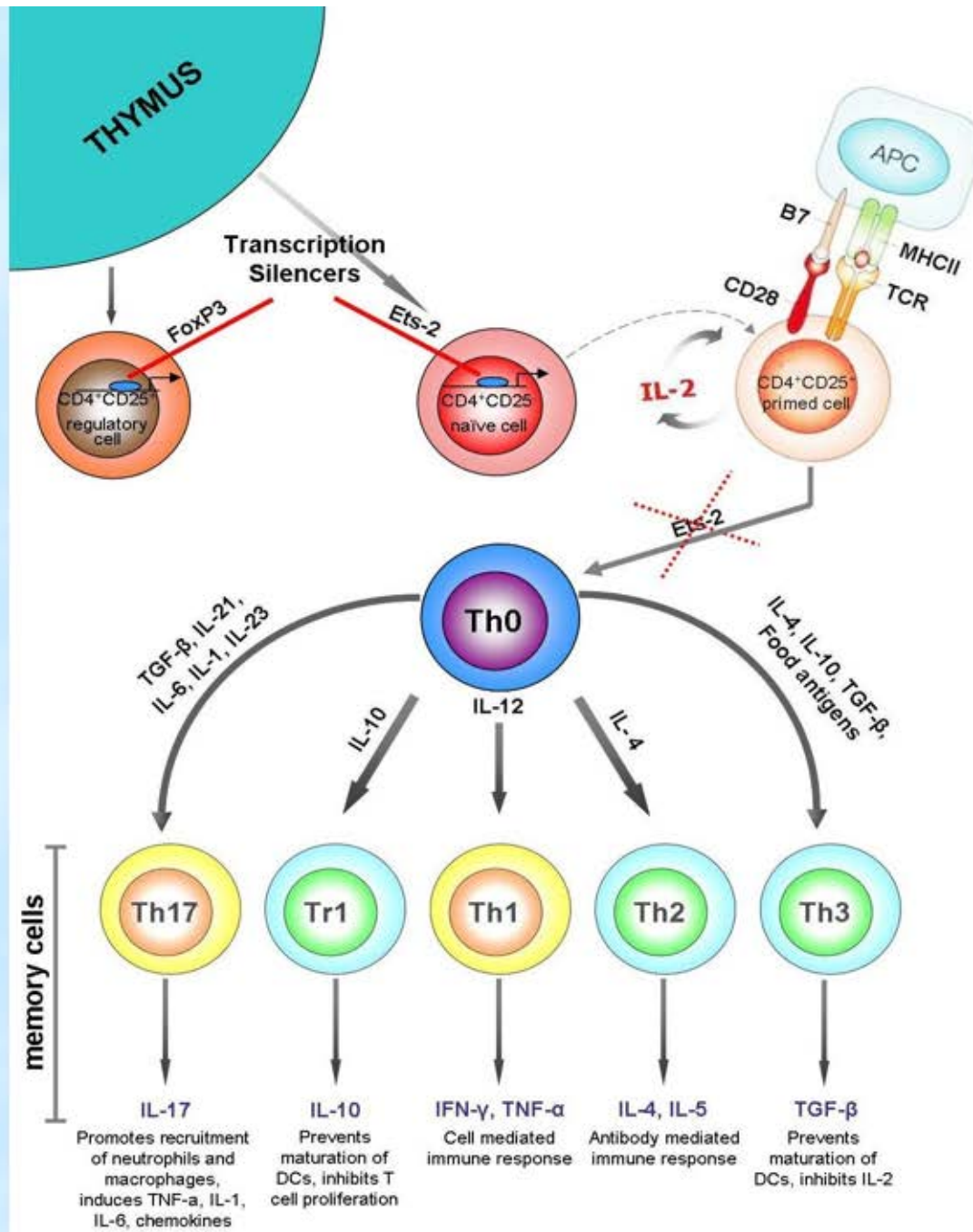


**b** Response phase: LN



**c** Regulatory phase

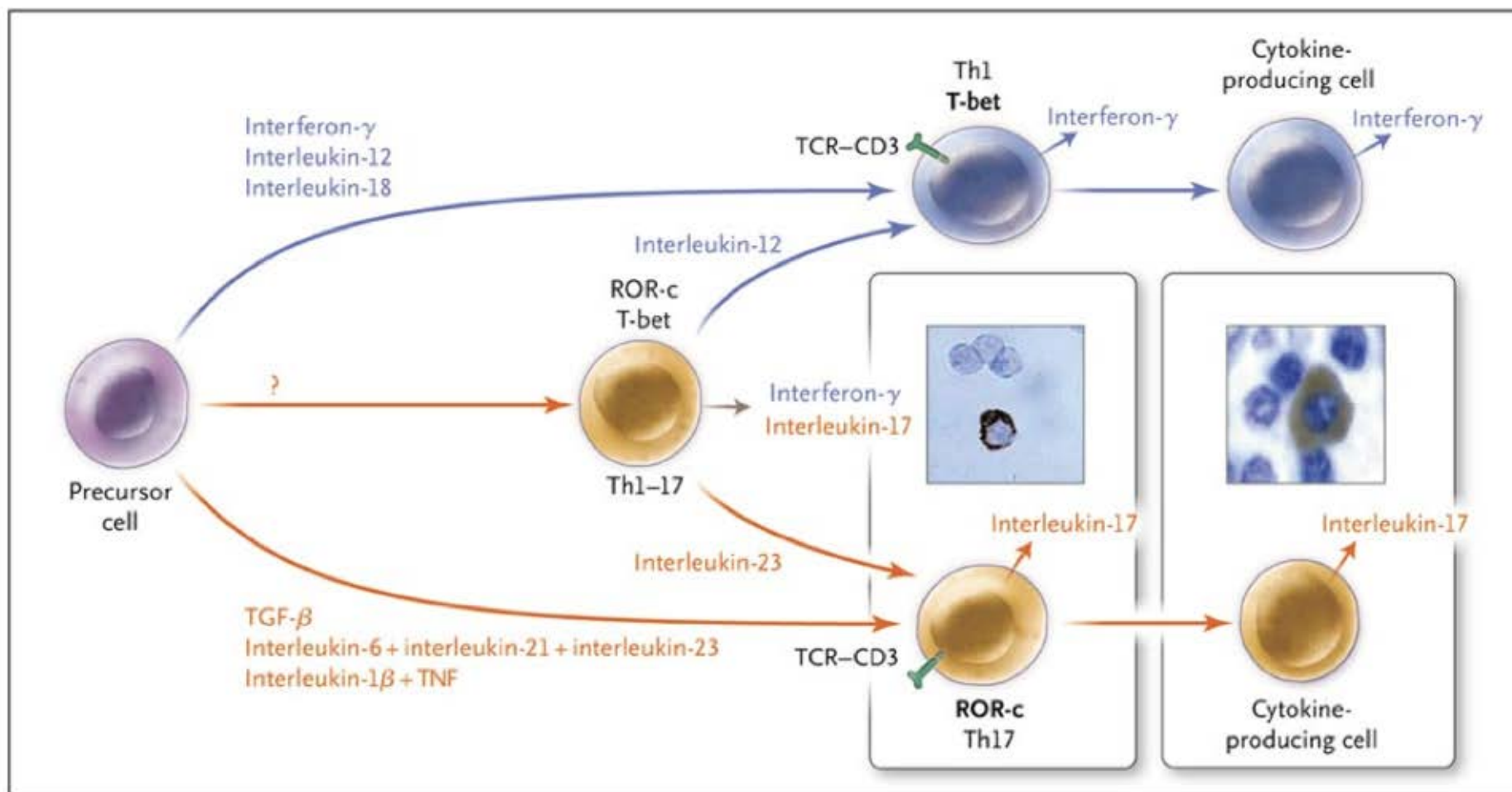




# IL-17 & Th17 λεμφοκύτταρα

- Πρόσφατα ανακαλύφθηκε μία νέα κυτταροκίνη με Th1 δράση (κυρίως) η οποία (κυρίως σε ζωικά μοντέλα ) εμπλέκεται στη παθολογία πολλών τύπου-1 αυτοανόσων νοσημάτων. Αντίθετα είναι ευεργετική στις λοιμώξεις.
- NEJM, 261(9):888-898, 2009

**Διαφοροποίηση των κυττάρων Th17 ανθρώπου.** Κυτταροκίνες κλειδιά για την διαφοροποίηση των ανθρώπινων Th17 κυττάρων είναι οι TGF- $\beta$  + IL-6, IL-21, η αντιφλεγμονώδης κυτοκίνη IL-1, και η IL-23. Πέραν των κλασικών υποομάδων Th1 και Th17, μια μικτή υποομάδα Th1-Th17 έχει ταυτοποιηθεί και η οποία εκφράζει ταυτόχρονα τους μεταγραφικούς παράγοντες T-bet και ROR-c.



- Τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα (T regulatory cells, Tregs) παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη διατήρηση της ισοροπίας του ανοσοποιητικού συστήματος στη περιφέρεια.

- Χαμηλοί αριθμοί Tregs ± μειωμένη λειτουργία τους ----> αυτοάνοσα νοσήματα (κυρίως αυτών που επιδουκνείουν μια πόλωση τύπου Th1 ή Th17).
- Αυξημένοι αριθμοί Tregs ± αυξημένη λειτουργία τους ----> νεοπλασίες

- Στον άνθρωπο, σίγουρα Tregs θεωρούνται αυτά που εκφράζουν τα μόρια επιφανείας **CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high/medium</sup> CD127<sup>low</sup>** και τον μεταγραφικό παράγοντα **FoxP3** στον πυρήνα.
- Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. Seddiki et al., J. Exp. Med . 2006; 203(7):1693-1700.2.
- CD127 expression inversely correlates with FOXP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> Treg cells. Liu et al., J. Exp. Med. 2006;203(7):1701-1711.



Αν και αυτά τα κύτταρα αρχικά ανακαλύφθηκαν σε ποντίκια, ένας κυτταρικός πληθυσμός με τον ίδιο φαινότυπο και τις ίδιες λειτουργικές ιδιότητες περιγράφηκαν και στον άνθρωπο.

Τα Τ ρυθμιστικά στον άνθρωπο αποτελούνται από διαφορετικούς κυτταρικούς υποπληθυσμούς που εκκρίνουν πολλούς διαφορετικούς συνδυασμούς αντιφλεγμονώδων κυτοκινών, αλλά κυρίως TGF- $\beta$  ή/και IL-10

Τα ανθρώπινα Τ ρυθμιστικά κύτταρα έχουν τους ακόλουθους φαινοτύπους:

CD4+CD25+

CD4+CD25+FoxP3+

CD4+CD45RO+

CD8+

CD28+

CTLA-4

CD8+CD28-

TCR  $\gamma\delta$ +

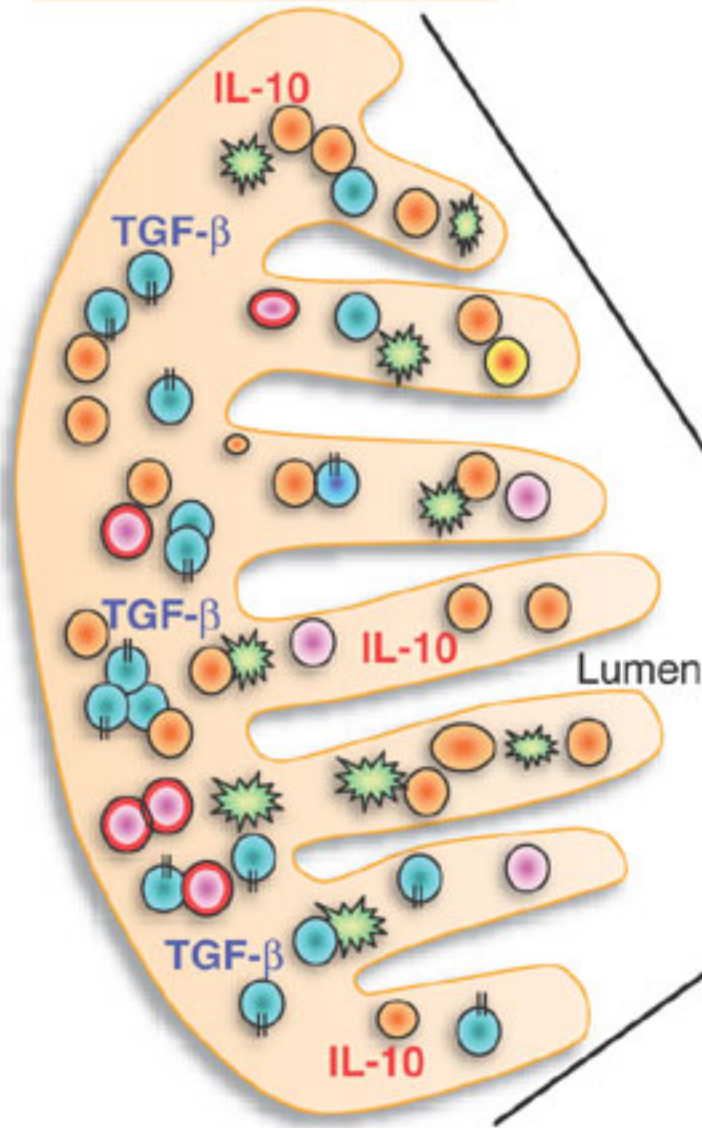
HLA-G

CD4-CD8-TCR  $\alpha\beta$ +

NKTr --> IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, TGF- $\beta$

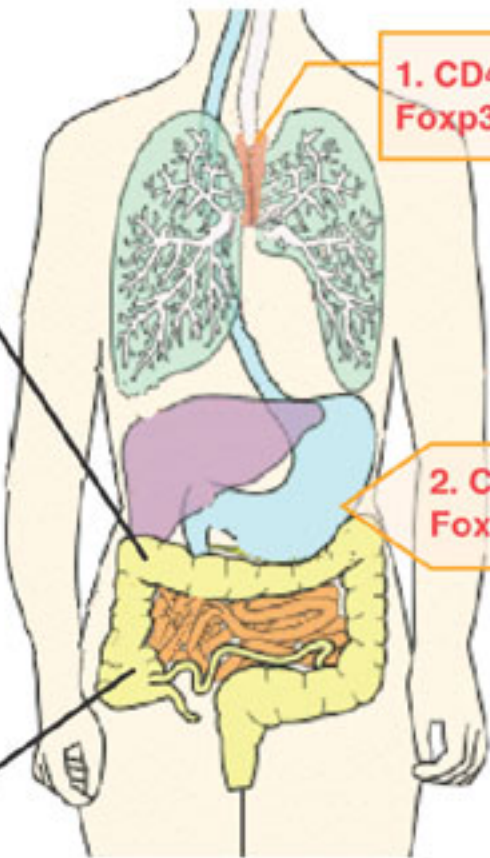
Και βρίσκονται κυρίως....

3. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>TGF-β<sup>+</sup>T<sub>regs</sub>  
and IL-10-secreting T<sub>H</sub>1



1. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>  
Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub>

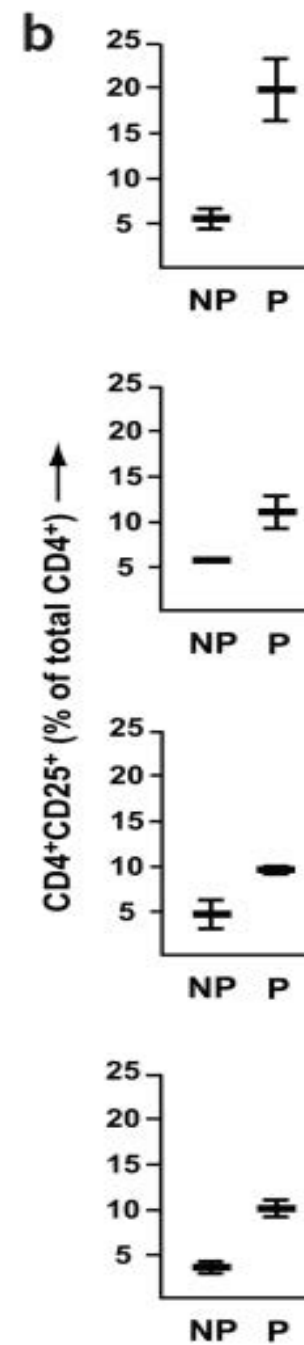
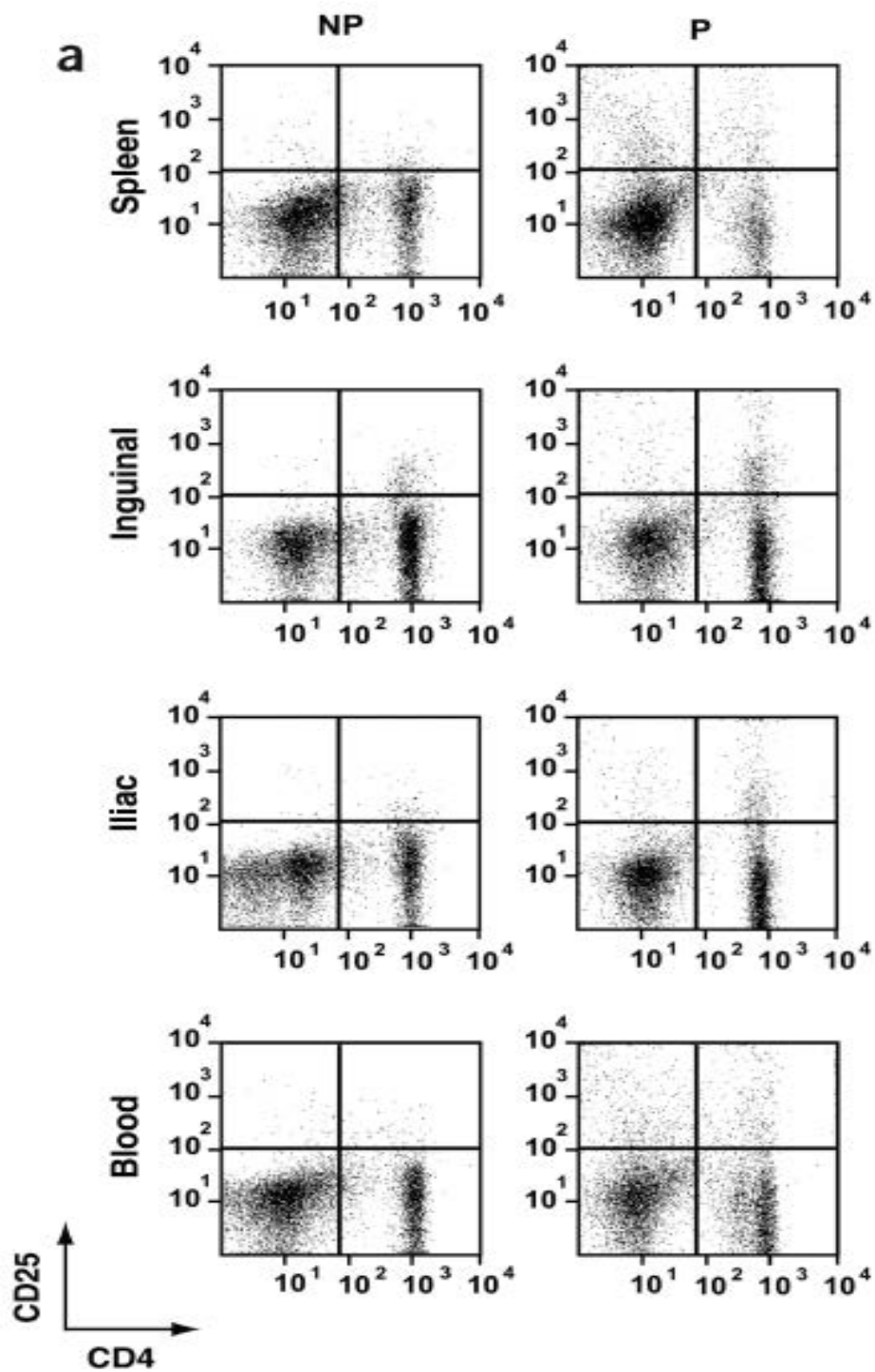
2. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>  
Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub>



Αλλά και σε άλλους ιστούς  
όπως...

Aluvihare et al., Nature Immunology, 5:266 - 271 (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus.

- Σημαντική ερευνητική εργασία που απέδειξε ότι για να είναι επιτυχής μία εγκυμοσύνη ο αριθμός των T ρυθμιστικών κυττάρων αυξάνεται σημαντικά στο περιβάλλον της μήτρας, λεμφαδένες και περιφερικό αίμα.
- (στο σχήμα που ακολουθεί, P=pregnant; NP=non-pregnant)





Ο συνδυασμός κυτοκινών που εκκρίνουν τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, καταστέλλουν την Th1 απόκριση. Επαγωγή της έκφρασης ή έκκριση κυτοκινών όπως η IFN- $\gamma$  και IL-12 (που επάγουν Th1 απόκριση σε ζώα), υποκινούν την απορρόφηση του εμβρύου, το ανάλογο της αποβολής στον άνθρωπο.

- Μία δεύτερη ομάδα T ρυθμιστικών κυττάρων/ καταστολέων μπορούν να επαχθούν *in vivo* με:
  - 1. Στοματική έκθεση στο αντιγόνο,
  - 2. Καλλιέργεια των T λεμφοκυττάρων με κυτοκίνες (κυρίως IL-10),
  - 3. Αλλαγή της λειτουργίας των δενδριτικών κυττάρων με φάρμακα και vit. D

Πρόσφατες μελέτες, έδειξαν συμμετοχή των T  
ρυθμιστικών κυττάρων σε πιο πολλούς τομείς όπως:

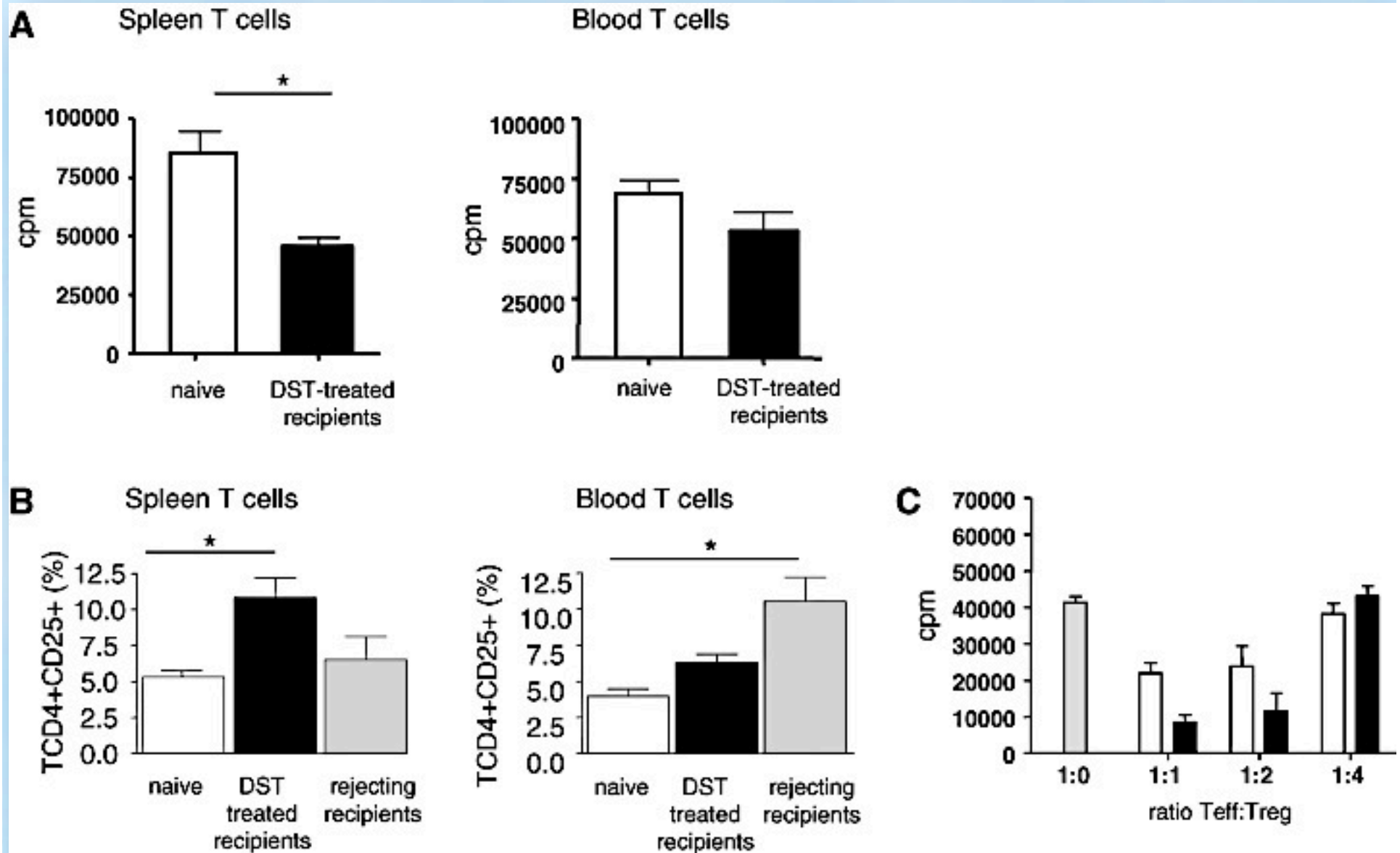
1. Αναστολή της ανοσοαπόκρισης σε όγκους,
2. Αποβολή μοσχευμάτων,
3. Αλλεργίες ,
4. Ασθένεια μοσχεύματος κατά ξενιστή,
5. Οξείες και χρόνιες ασθένειες.

- Κατασταλτικά/ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα έχει δείξει ότι αναστέλλουν αυτοάνοσες ασθένειες σε πειραματικά μοντέλα των ασθενειών.
- Σε περιβάλλον αλλεργικού άσθματος τα T ρυθμιστικά κύτταρα εκκρίνουν IFN- $\gamma$

Lair et al. 2007. Functional Compartmentalization Following Induction of Long-Term Graft Survival with Pregraft Donor-Specific Transfusion. Am. J. Transplant., 7: 538–549.

Σε αυτό το μοντέλλο μεταμόσχευσης καρδιάς σε αρουραίους, μακροχρόνια επιβίωση του μοσχεύματος επιτυγχάνεται μετά απο μετάγγιση αίματος στους λήπτες με αίμα από τους δότες του οργάνου.

- Σπληνοκύτταρα και T κύτταρα σπληνός από μεταγγισμένα και μεταμοσχευμένα ζώα (αλλά όχι T κύτταρα περιφερικού αίματος) μετέφεραν την ανοχή στο μόσχευμα σε άλλα ζώα.

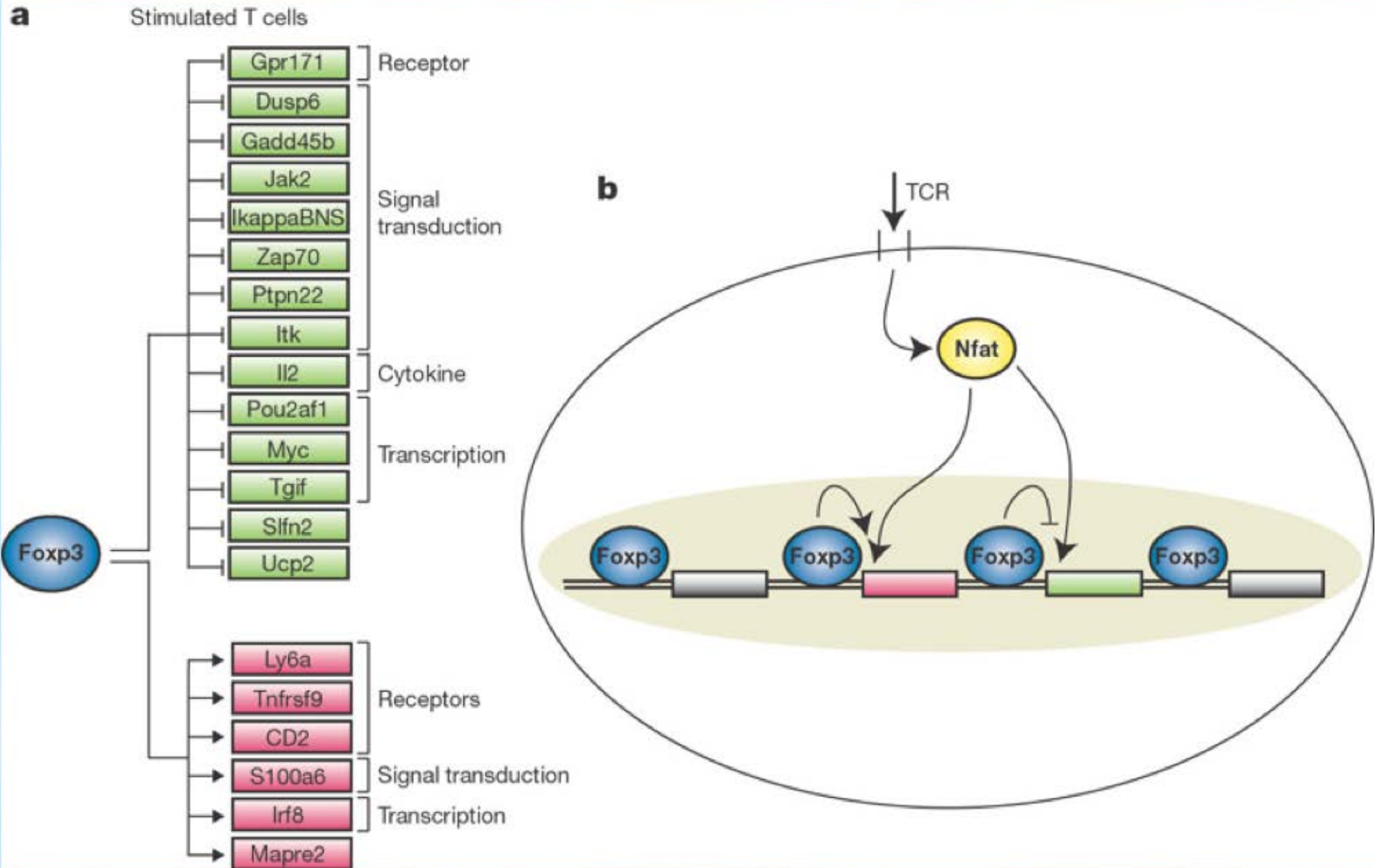


DST=donor-specific transfusion

- Τα Tregs εκφράζουν τον (αρνητικό) μεταγραφικό παράγοντα foxp3 που ανταγωνίζεται με τον (θετικό) μεταγραφικό παράγοντα NFAT για την ίδια θέση πρόσδεσης στον υποκινητή γονιδίων κυτταροκινών εμποδίζοντας έτσι την ενεργοποίησή τους.



Marson et al. 2007. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. Nature, 445:931-935.



## Γενετική έλλειψη του Foxp3 (Foxp3 deficiency):

- ΑΝΘΡΩΠΟΣ)

Θανατηφόρο αυτοάνοσο σύνδρομο IPEX (=immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked // κυρίως στους άρρενες, στους οποίους εκδηλώνεται 3-4 βδομάδες μετά τη γέννηση)

- ΠΟΝΤΙΚΙ)

Scurfy (θανατηφόρα πολυκλωνική ενεργοποίηση με μαζικό πολλαπλασιασμό των T κυττάρων, που εκδηλώνεται 7 μέρες μετά τη γέννηση)

# IPEX

- Μαζικός πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων
- Μαζική λεμφοκυτταρική διήθηση πολλών οργάνων
- Υπεργαμμασφαιρινοπάθεια
- Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία
- Ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα
- Αλλεργίες
- Έκζεμα