

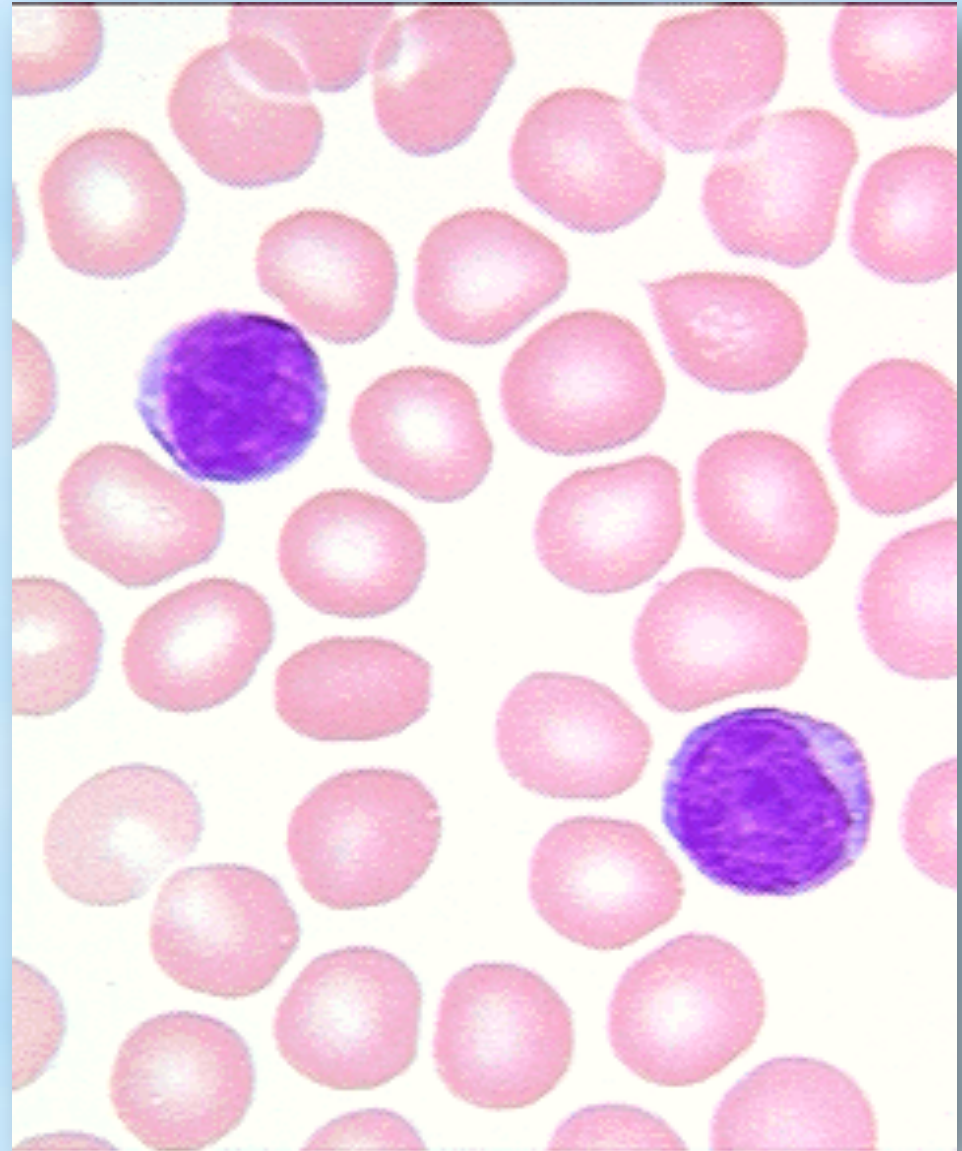
Λεμφοποίηση

Διαφοροποίηση λεμφοκυττάρων Επιλογή των κλώνων

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

Λεμφοκύτταρα

- Τ και Β
- Λειτουργούν στην επίκτητη ανοσία, τα μόνα που αποκτούν μνήμη για το αντιγόνο.
- Αποτελούν το 20-35% των κυκλοφορούντων λευκών κυττάρων του αίματος.
- Ο μεγαλύτερος αριθμός τους βρίσκεται στους λεμφαδένες, μυελό των οστών, σπλήνα.

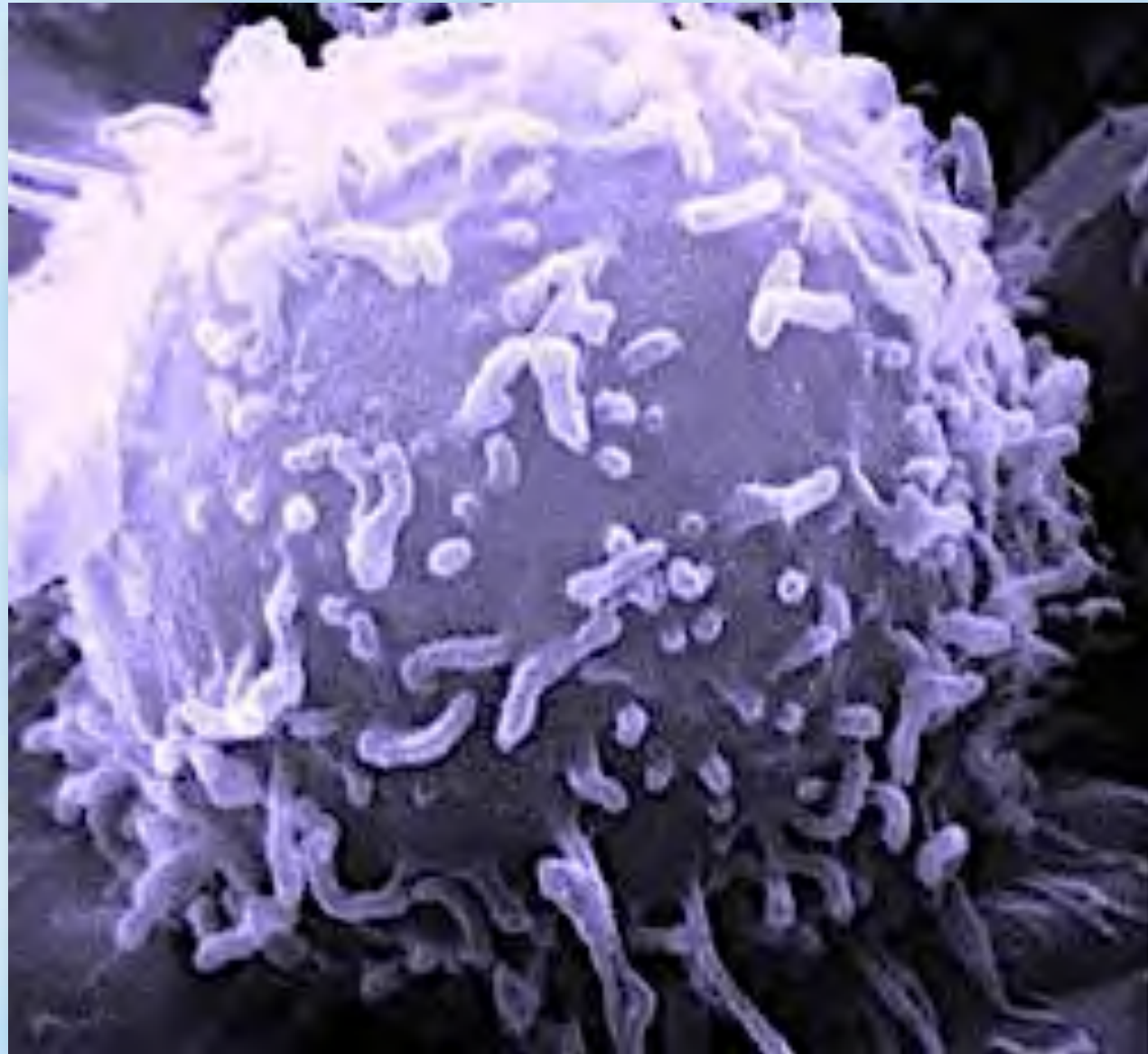


Όταν ενεργοποιούνται διαφοροποιούνται σε βλάστες και μετά από 2-3 μέρες διαιρούνται σε 2 νέα λεμφοκύτταρα, ίδια με το μητρικό κύτταρο



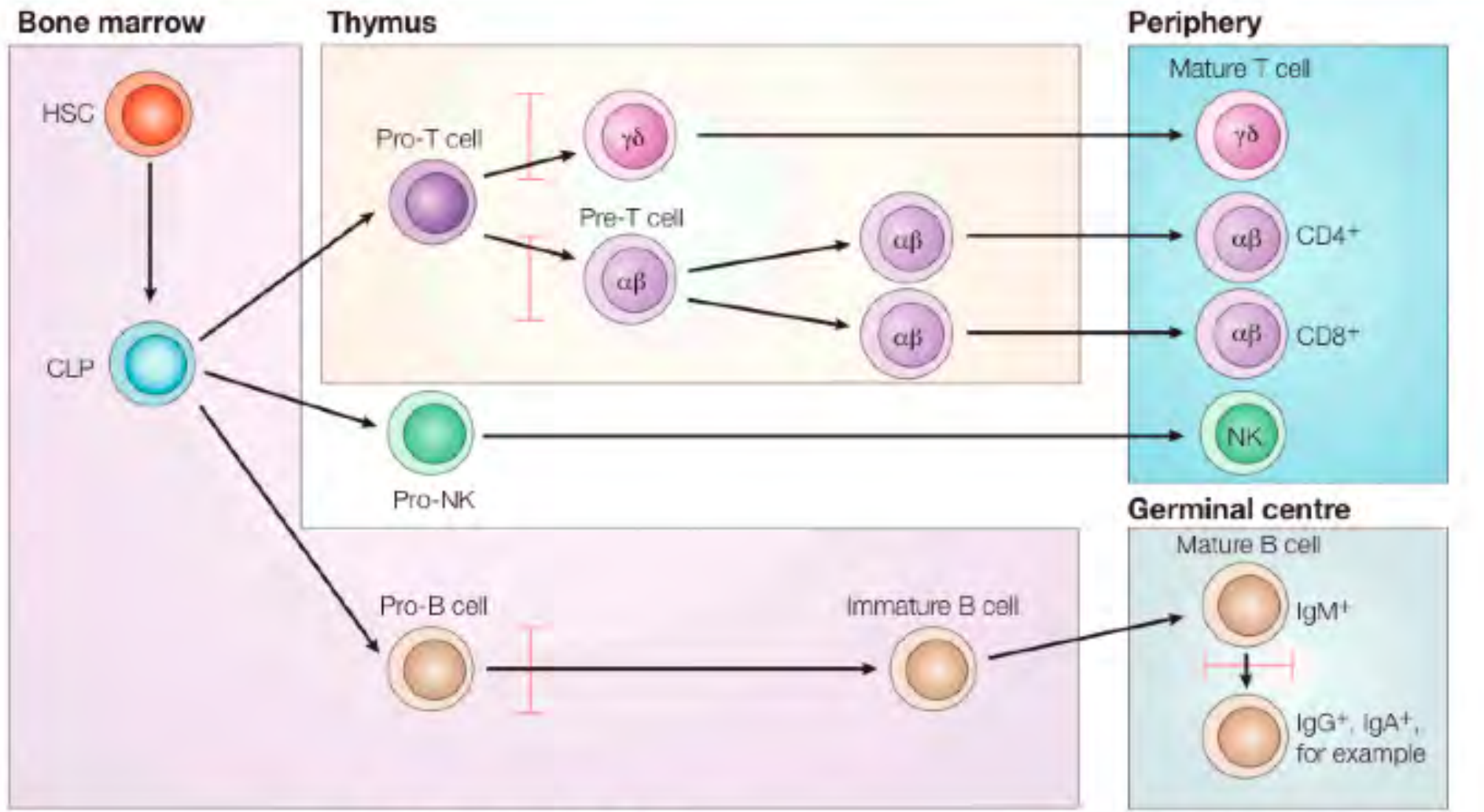
- Στην επιφάνειά τους έχουν πολλά πρωτεϊνικά μόρια τα οποία λέγονται CD (=cluster of differentiation) αντιγόνα που ταυτοποιούν τα κύτταρα.
- Τα CD αντιγόνα σχετίζονται με διαφορετικές λειτουργίες των κυττάρων και χρησιμοποιούνται για τη φαινοτυπική τους ταυτοποίηση.

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



Κοινοί φαινοτυπικοί δείκτες μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος:

Τ κύτταρα	Φυσικά φονικά κύτταρα (natural killer cells, NK)	B κύτταρα	Μονοκύτταρα
CD2	CD16	CD19	CD14
CD3	CD56	CD20	CD31
CD4	CD2	CD21	CD32
CD8a,b	CD8a	CD22	CD36
CD25	CD20	CD40	CD4
CD69	CD69	CD2	CD40
CD45RA		CD32	CD45RA, RO
CD45RO		CD25	
CD21		CD45RA, RO	



V(D)J recombination deficiency

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

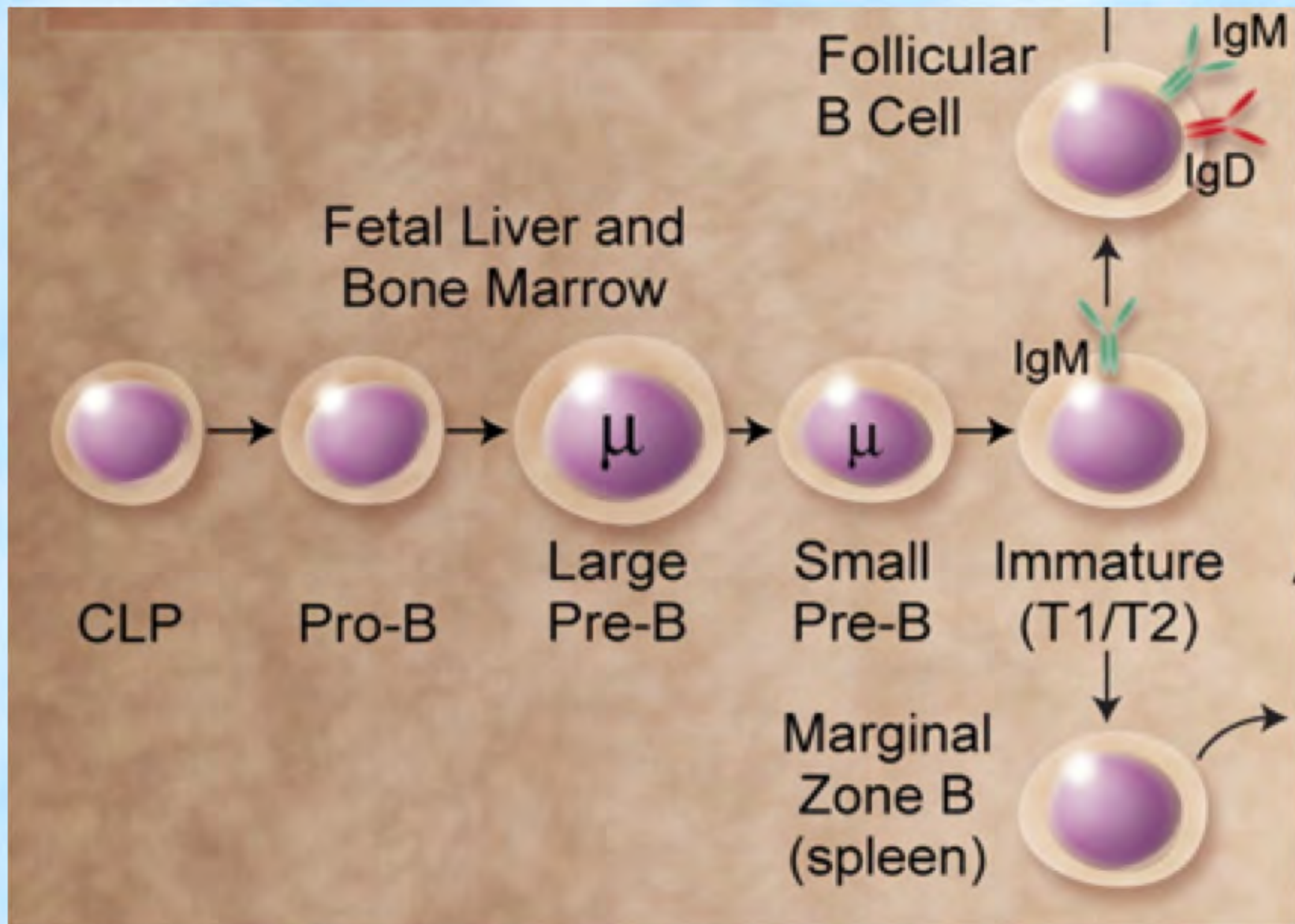
CSR/SHM deficiency

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

B κύτταρα

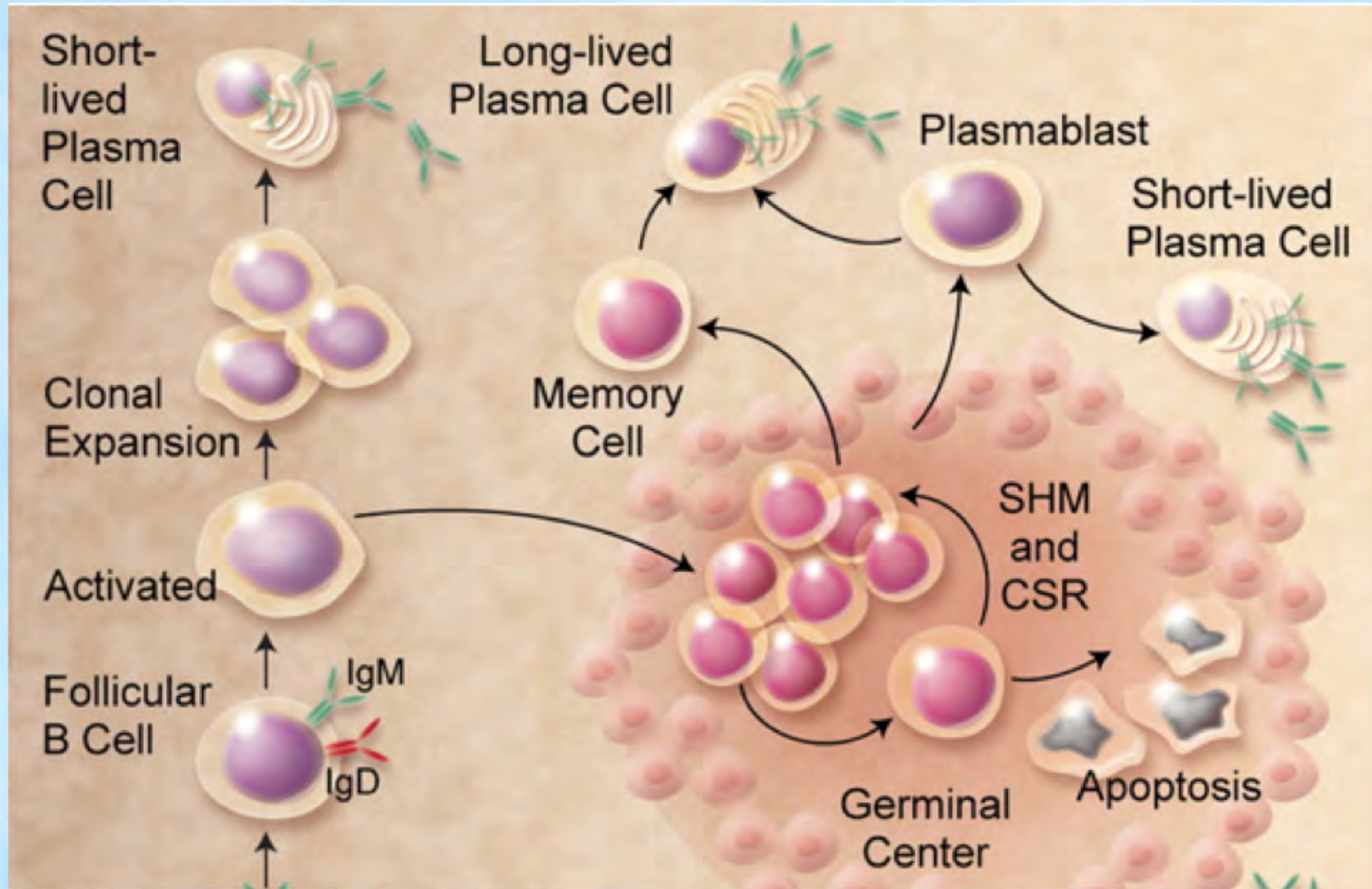
Δημιουργία Β κυττάρων

CLP=common lymphoid progenitor

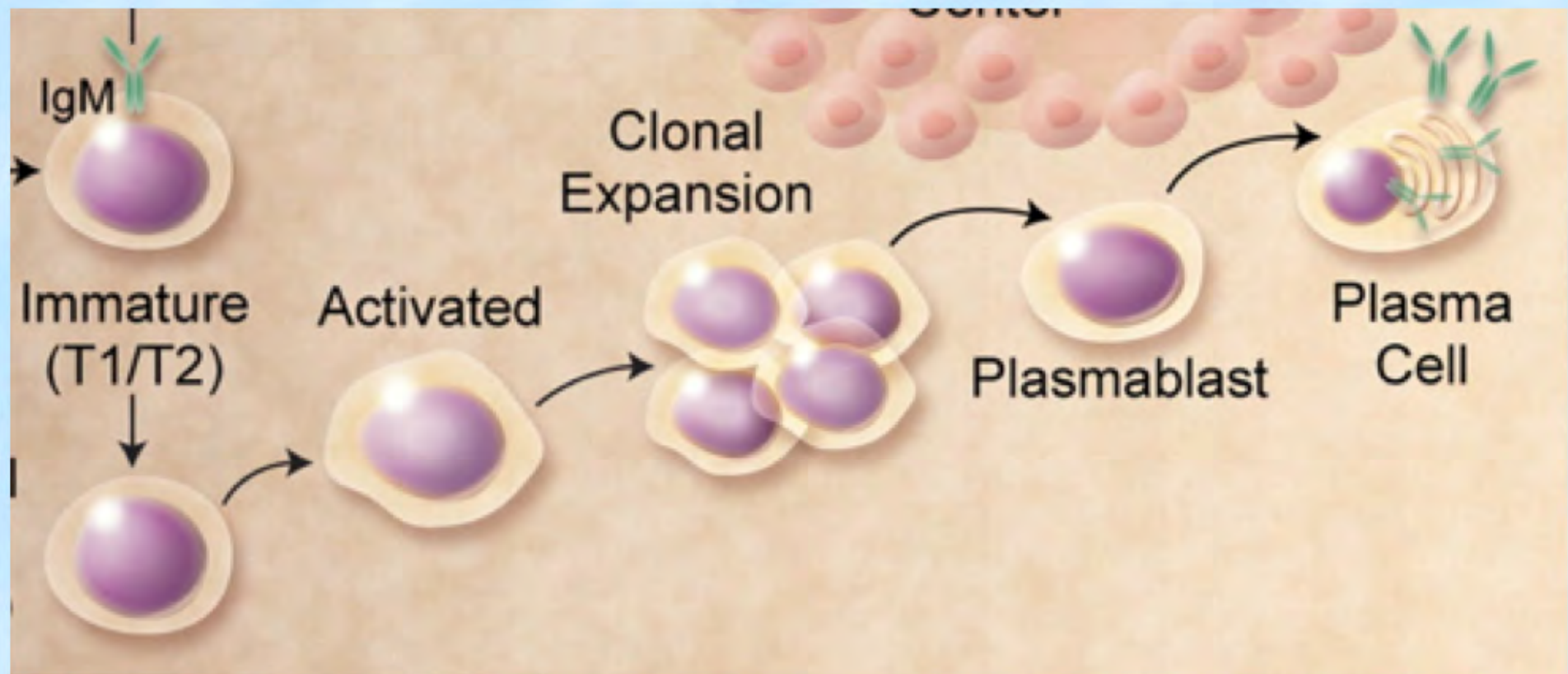


SHM, somatic hypermutation
CSR, class switch recombination

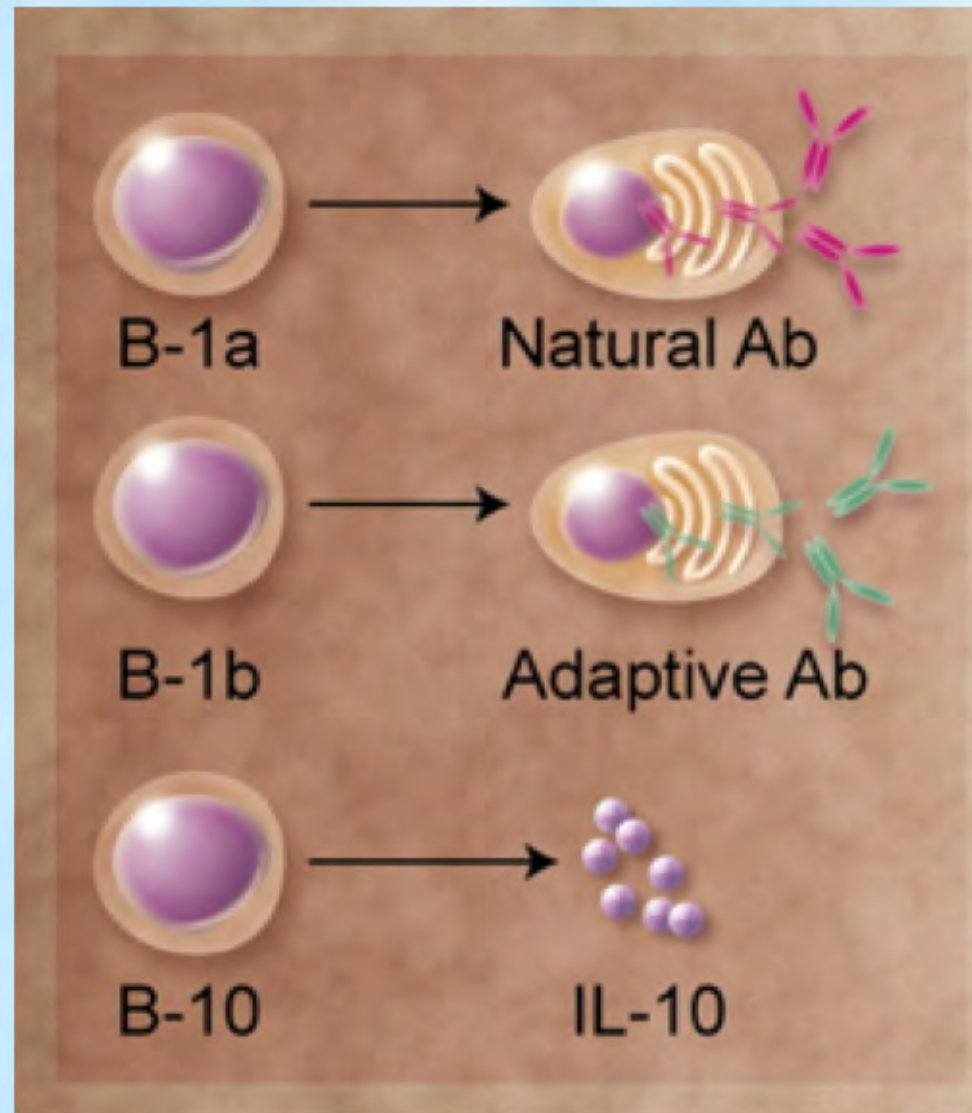
Περιφέρεια & λεμφαδένες



Σπλήνας



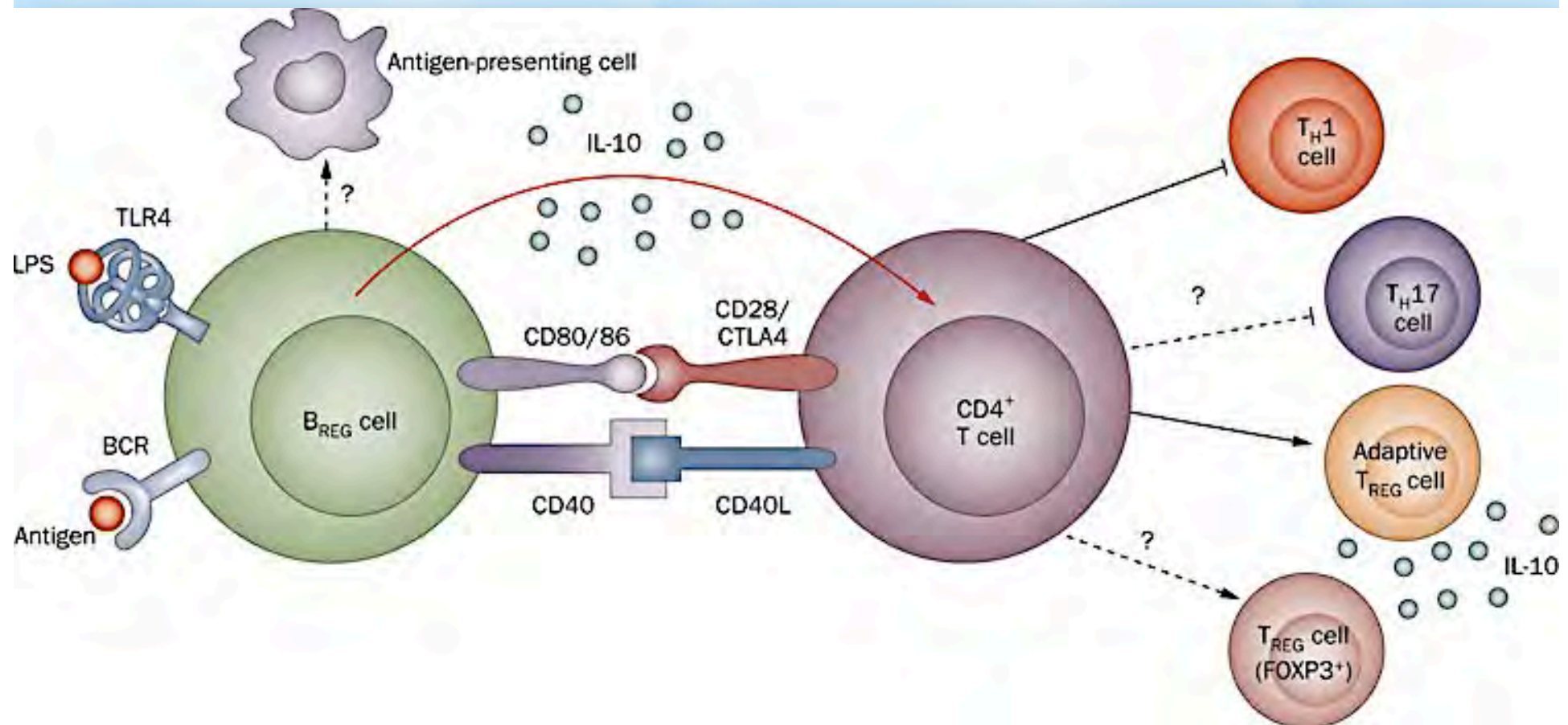
Είδη Β κυττάρων



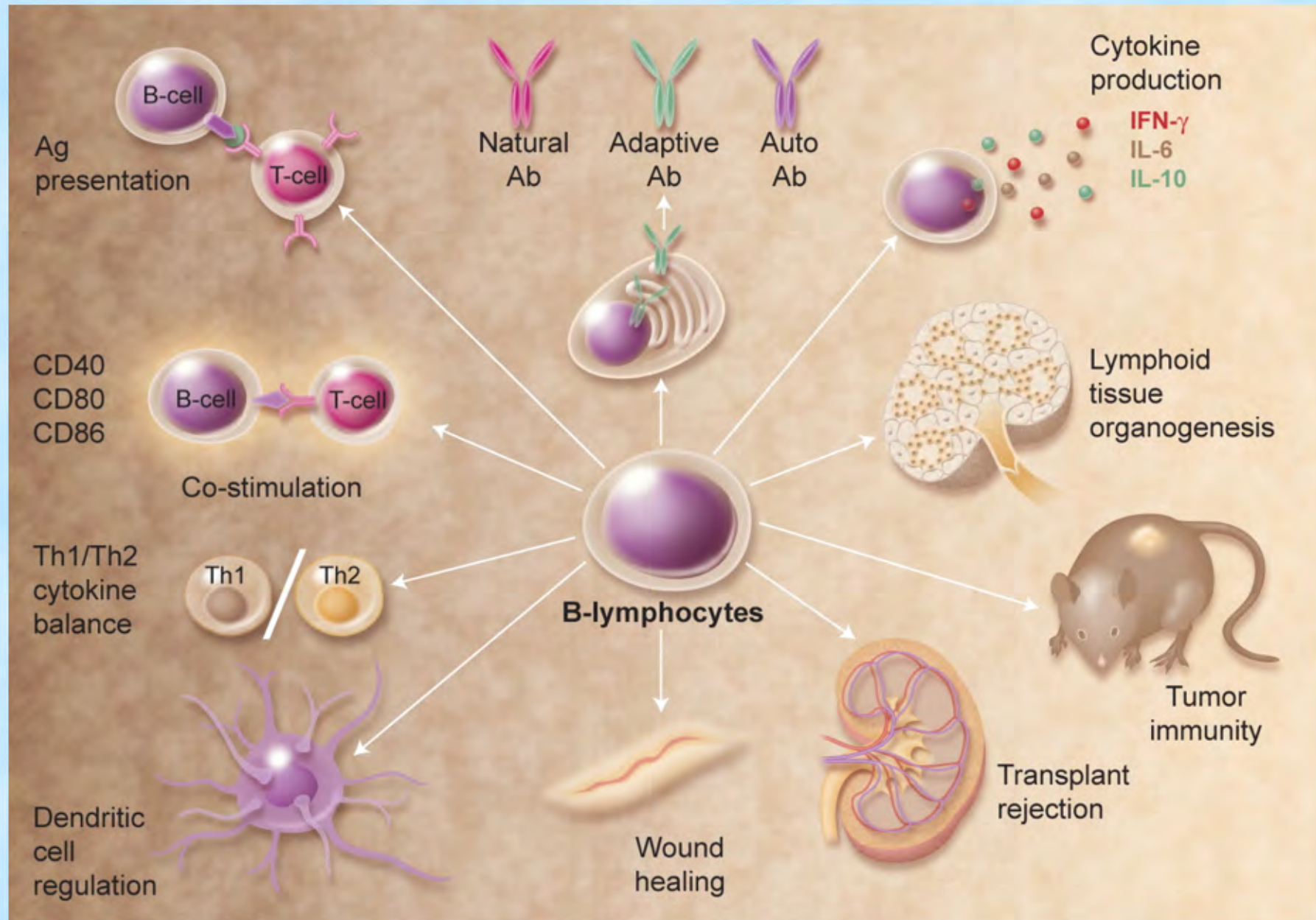
Ρυθμιστικά B-κύτταρα (B-10)

B κύτταρα που παράγουν IL-10 (\pm 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:

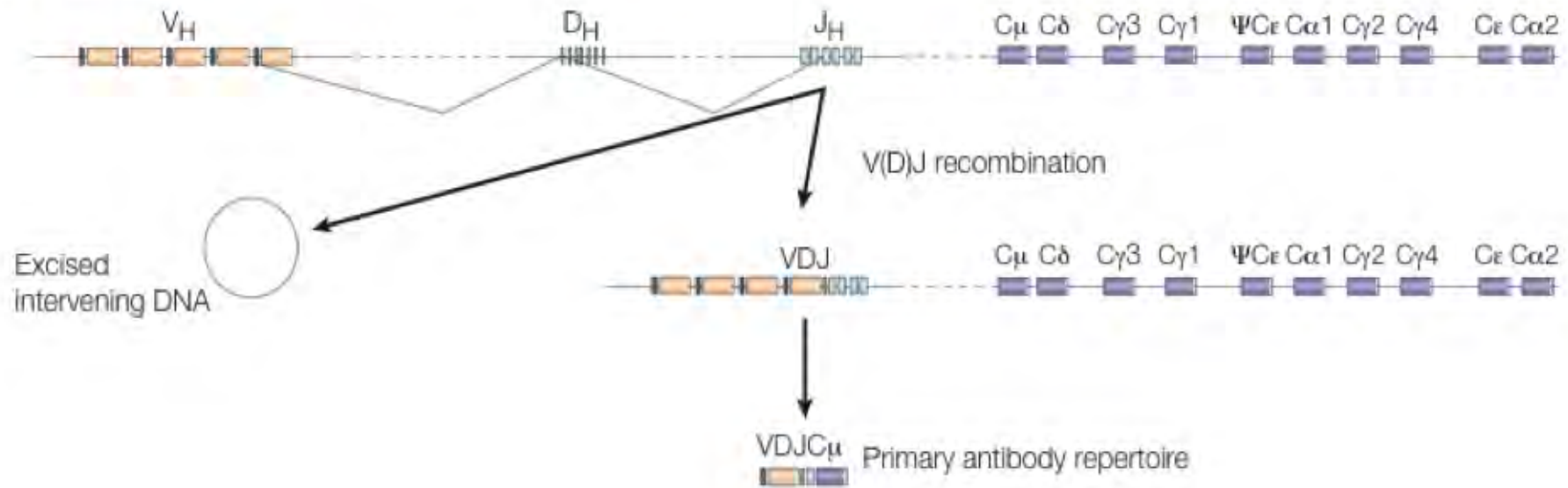
IGH (Ig heavy), στο χρωμόσωμα 14 (14q32.33)

IGK (Ig κ), στο χρωμόσωμα 2 (2p12)

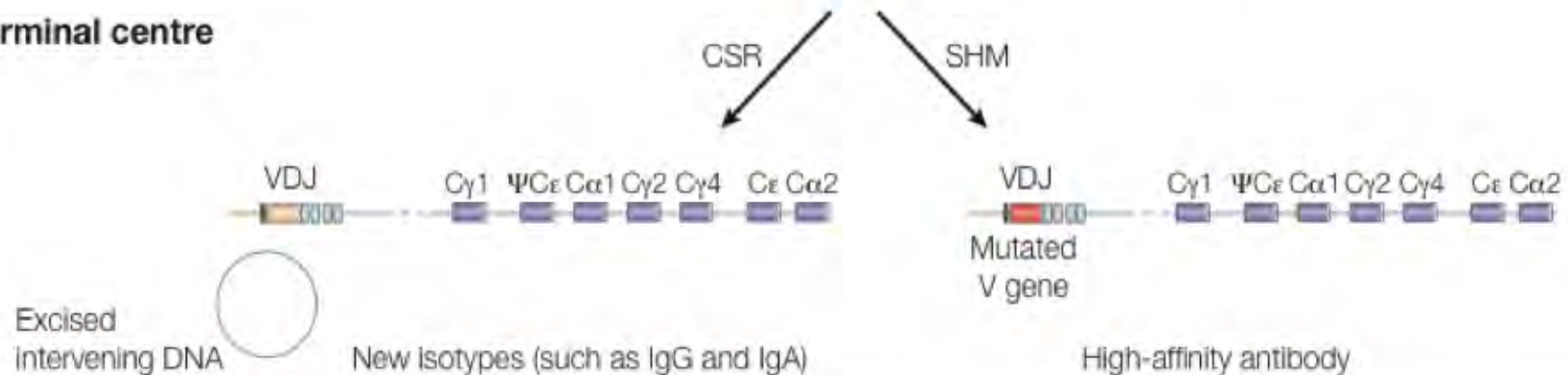
IGL (Ig λ), στο χρωμόσωμα 22 (22q11.2)

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

Bone marrow

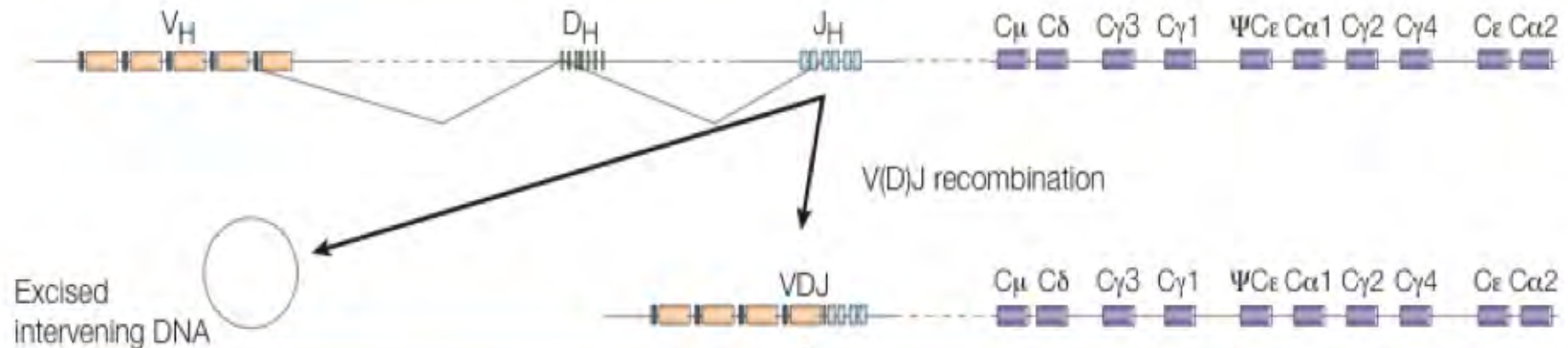


Germinal centre

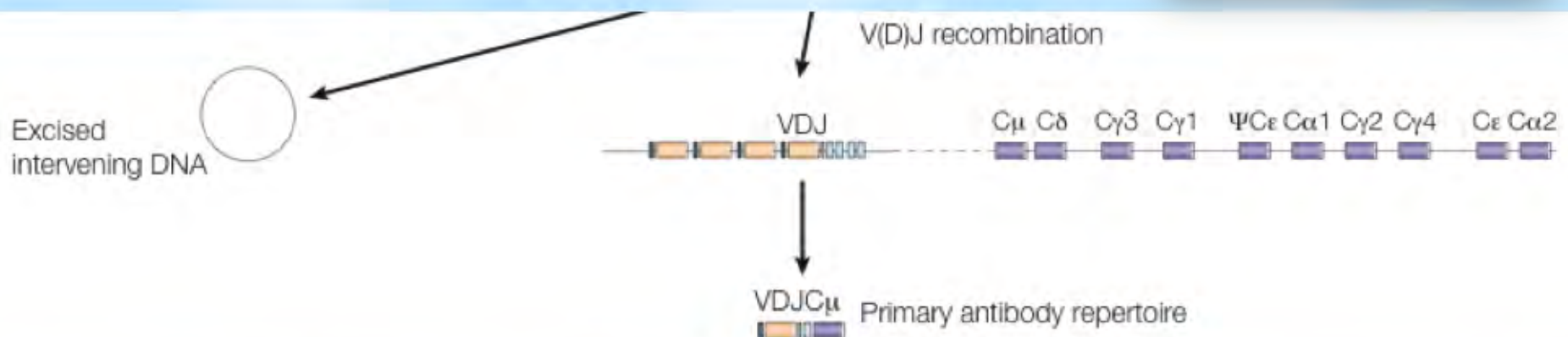
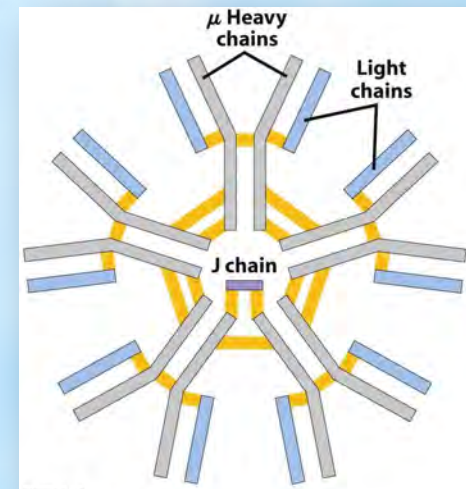


Αρχικά, το μεταβλητό τμήμα της βαριάς αλυσίδας IgH, αποτελείται από συστοιχίες τμημάτων γονιδίων που αντιστοιχούν σε εξώνια που κωδικοποιούν για μεταβλητά (V [for variable]), ποικιλόμορφα (D [for diversity]) και συνδετικά (J [for joint]) τμήματα. Ο ανασυνδυασμός V(D)J οδηγεί στην δημιουργία ενός επαναδιαταγμένου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

Bone marrow

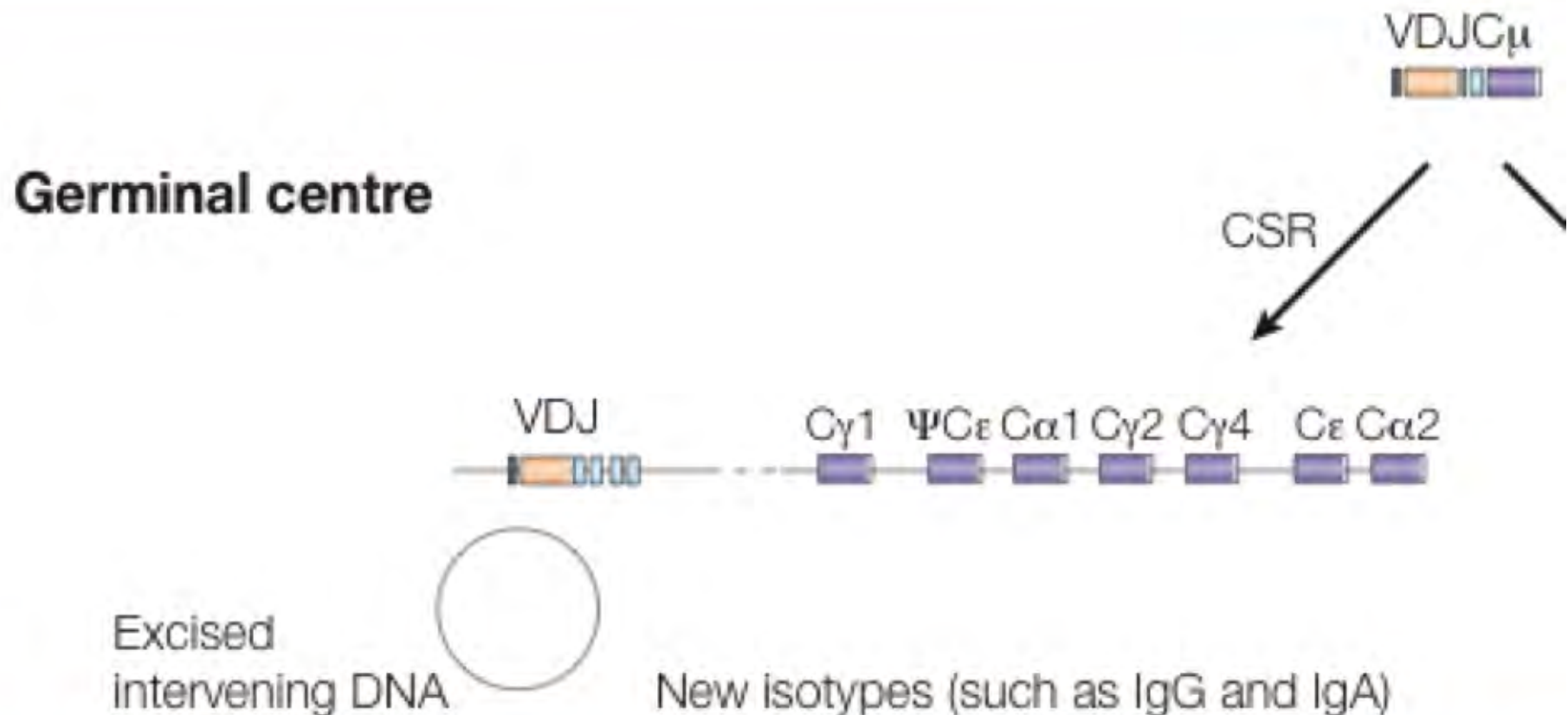


Το ενδιάμεσο DNA αφαιρείται με την μορφή κυκλικού DNA.
Τα VDJ τμήματα ενώνονται με τα C μ για να φτιάξουν τα
γονίδια των πρώτων αντισωμάτων (IgM).

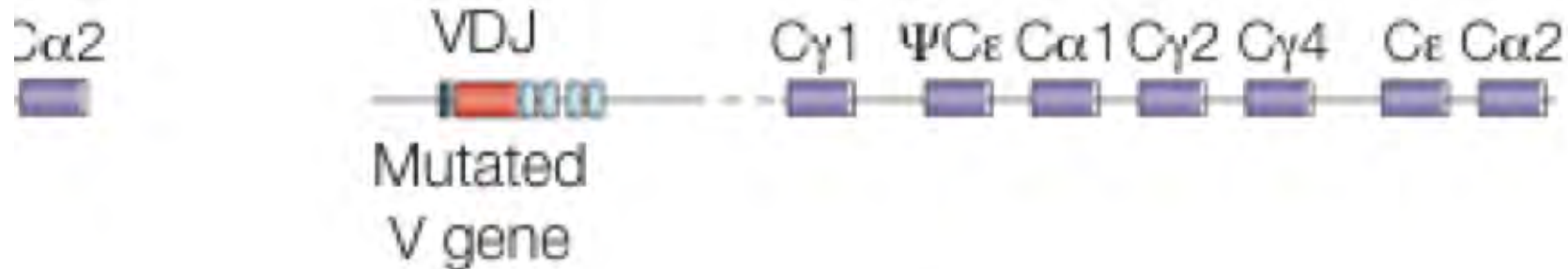
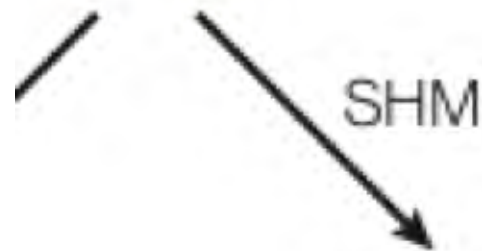
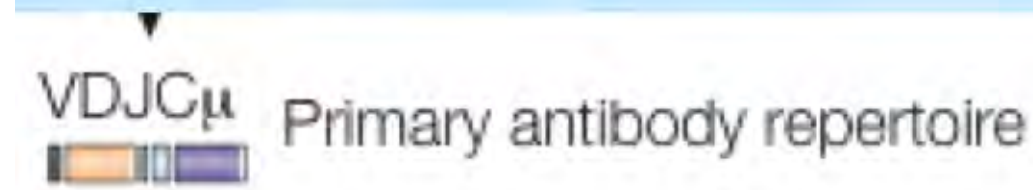
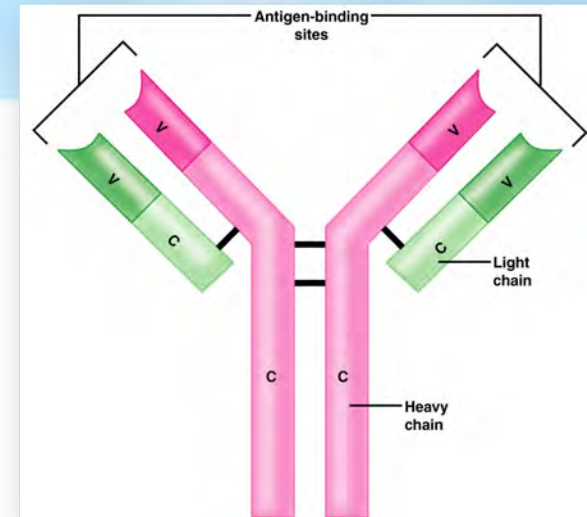


Κατά την διάρκεια του ανασυνδιασμού (CSR, class-switch recombination), μια νέα επαναδιάταξη φέρνει σε συνάφεια το γονιδιακό τμήμα VDJ με αυτό του εξωνίου που κωδικοποιεί για την σταθερή περιοχή C.

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).



High-affinity antibody

T κύτταρα

Εκπαίδευση στον θύμο

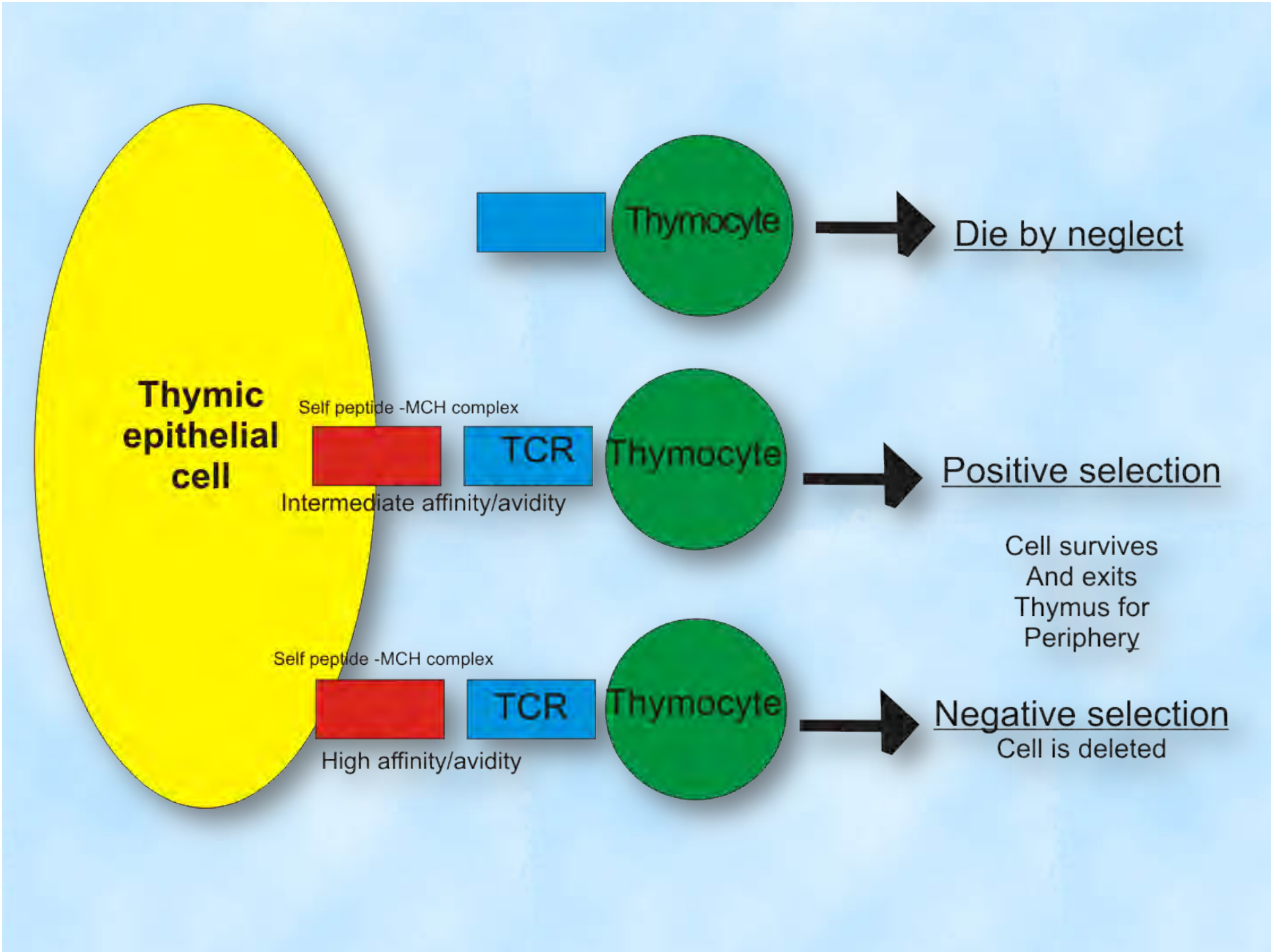
Επιλογή κλώνων

Διαφοροποίηση

Η εκπαίδευση των θυμοκυττάρων
γίνεται για να

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

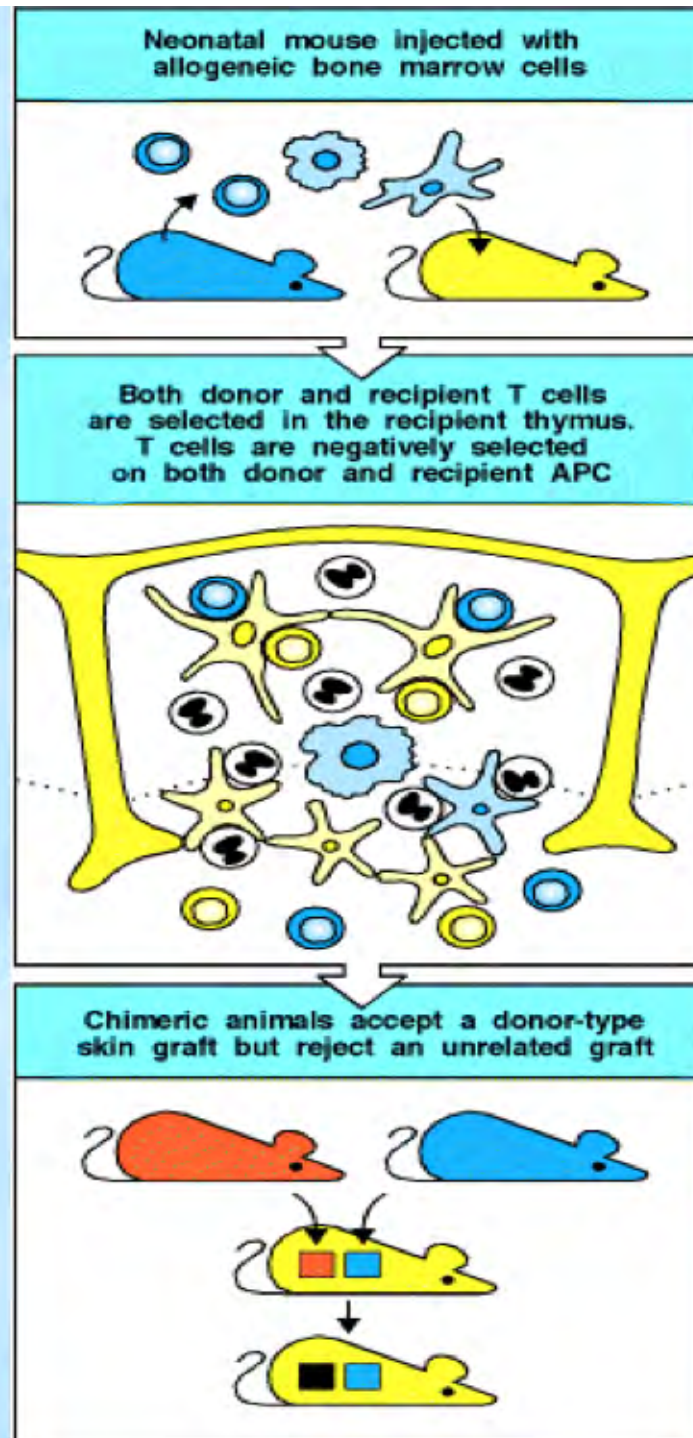
(2) με τη σωστή χημική συγγένεια.

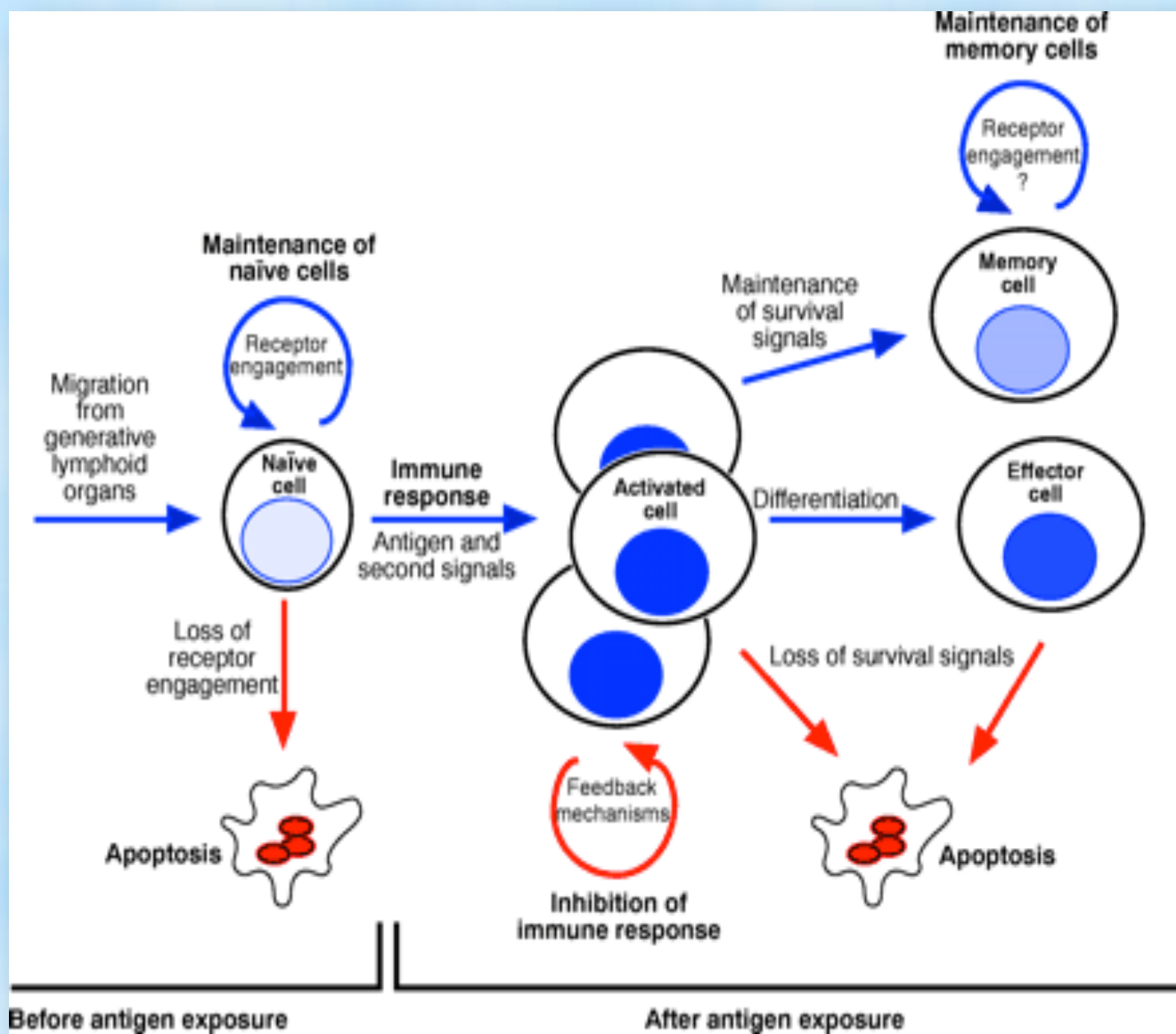


- Οι ιντερλευκίνες IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15, όπως και η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη MCL-1, επηρεάζουν σημαντικά την επιβίωση των θυμοκυττάρων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, διαφοροποίησης και εκπαίδευσής τους στο θύμο, που συντελούνται με παράλληλη αναδιάταξη των γονιδίων VDJ.

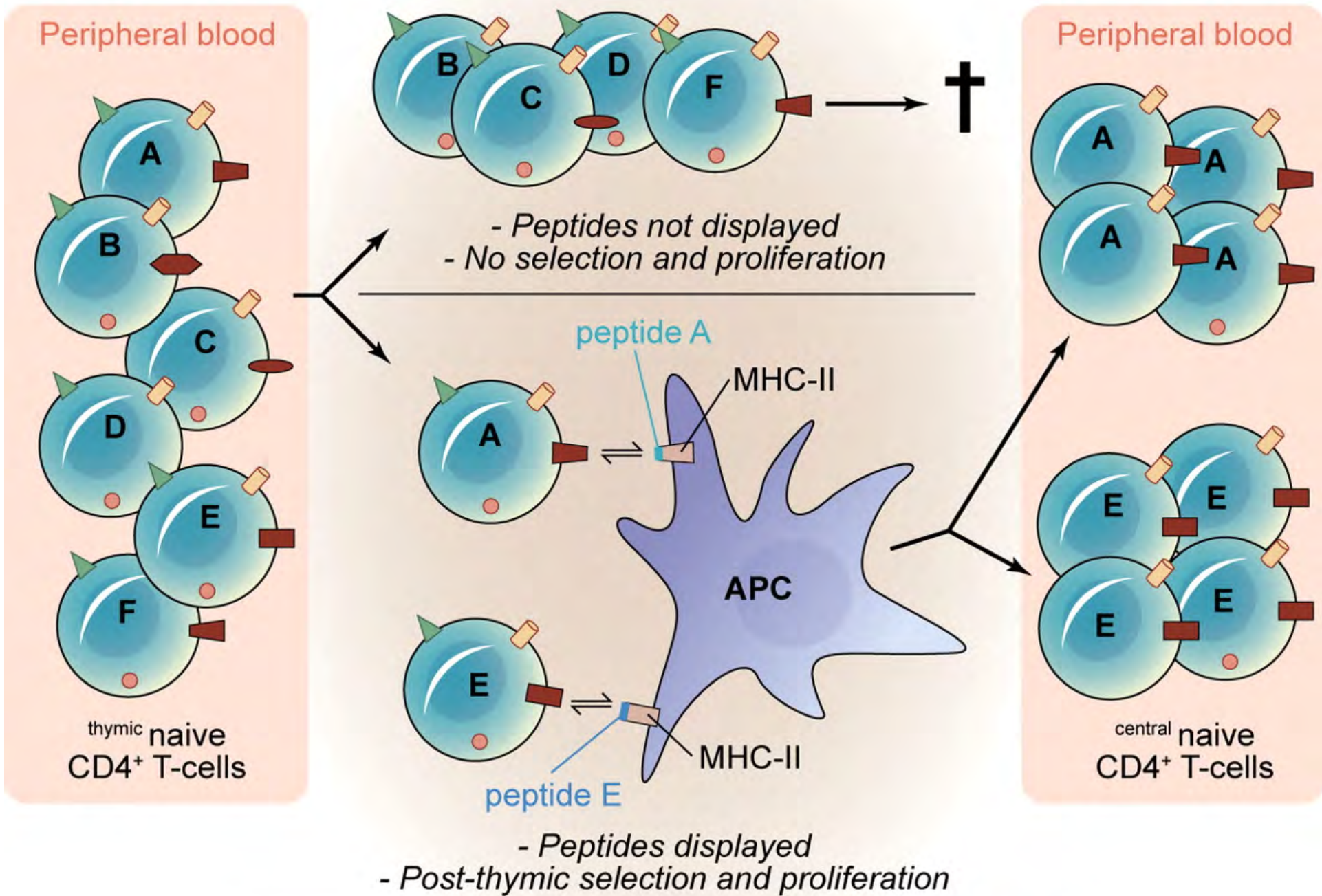
- Η αναδιάταξη των γονιδίων VDJ, θα επιφέρει τη δημιουργία μεγάλου αριθμού θυμοκυττάρων τα οποία, όταν ώριμα πιά βγουν στη περιφέρεια, θα έχουν μία τεράστια γκάμα T αντιγονικών υποδοχέων (TCR) (1/κύτταρο) που θα τους επιτρέπει να αναγνωρίσουν ένα τεράστιο αριθμό ξένων αντιγόνων.
- Η διαδικασία αναγνώρισης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

Medawar & Burnet





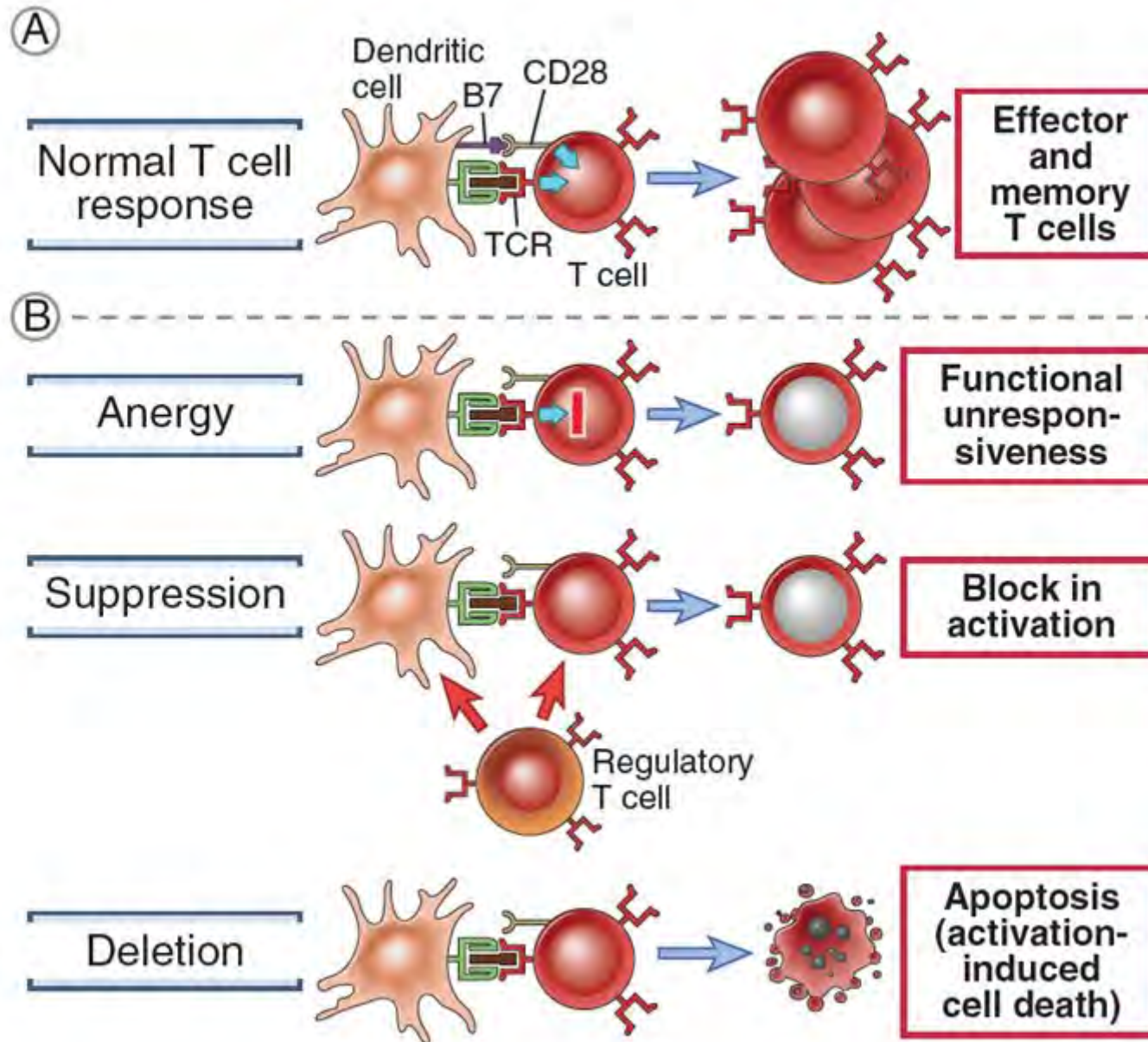
Secondary lymphoid organs



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**).

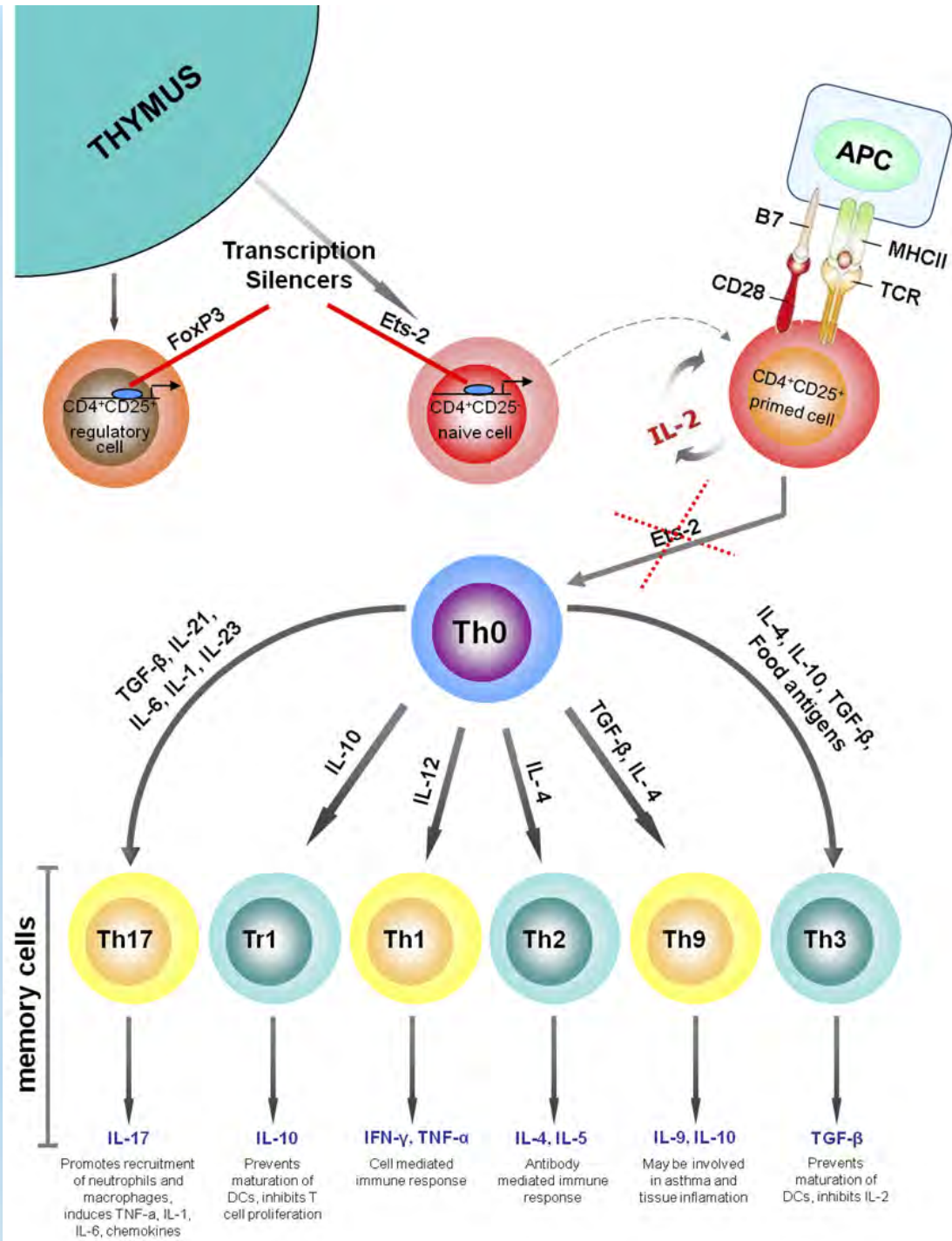
Peripheral tolerance



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

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

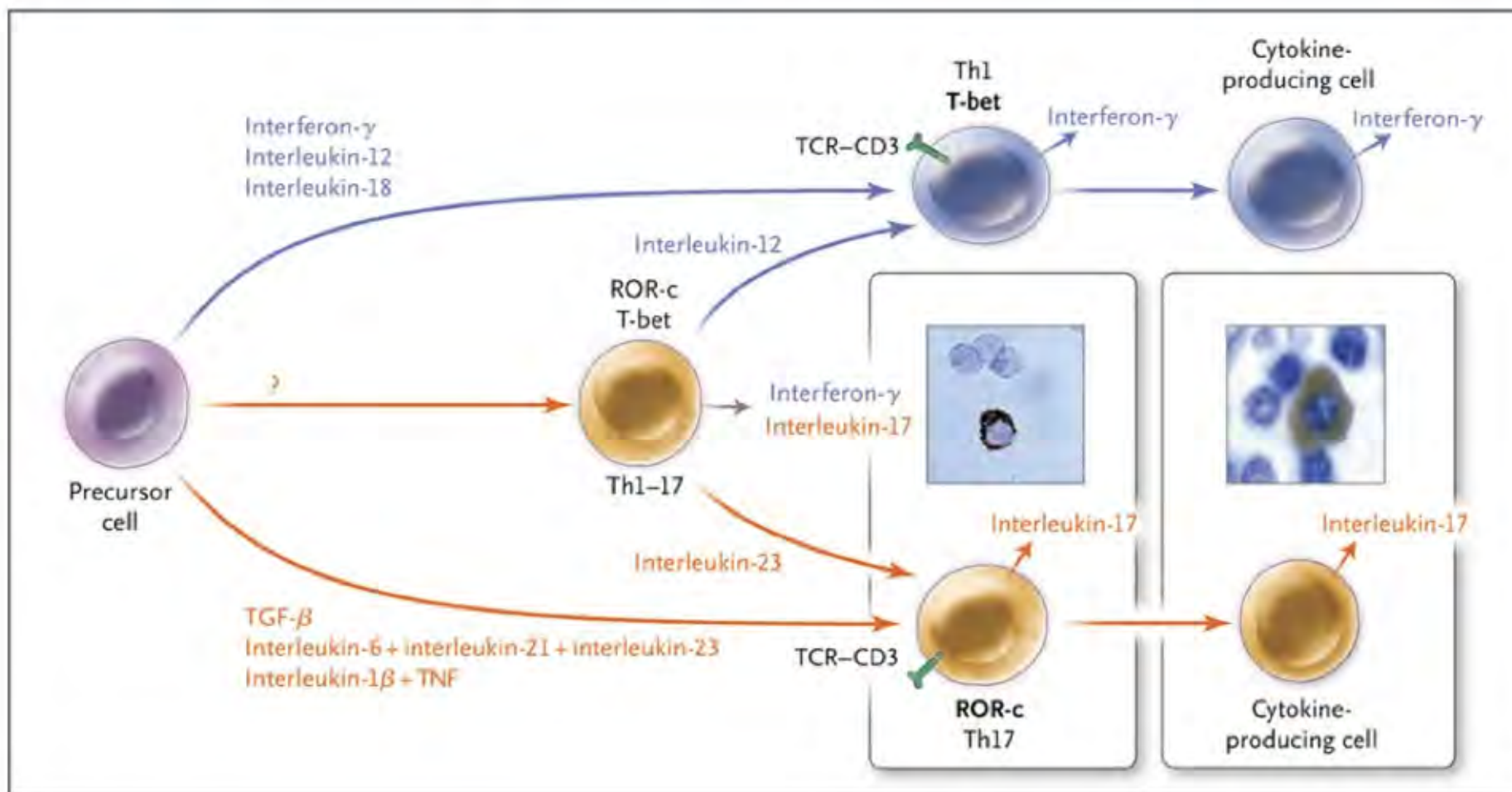
Στάδια διαφοροποίησης των Τ βοηθητικών κυττάρων:



IL-17 & Th17 λεμφοκύτταρα

- 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

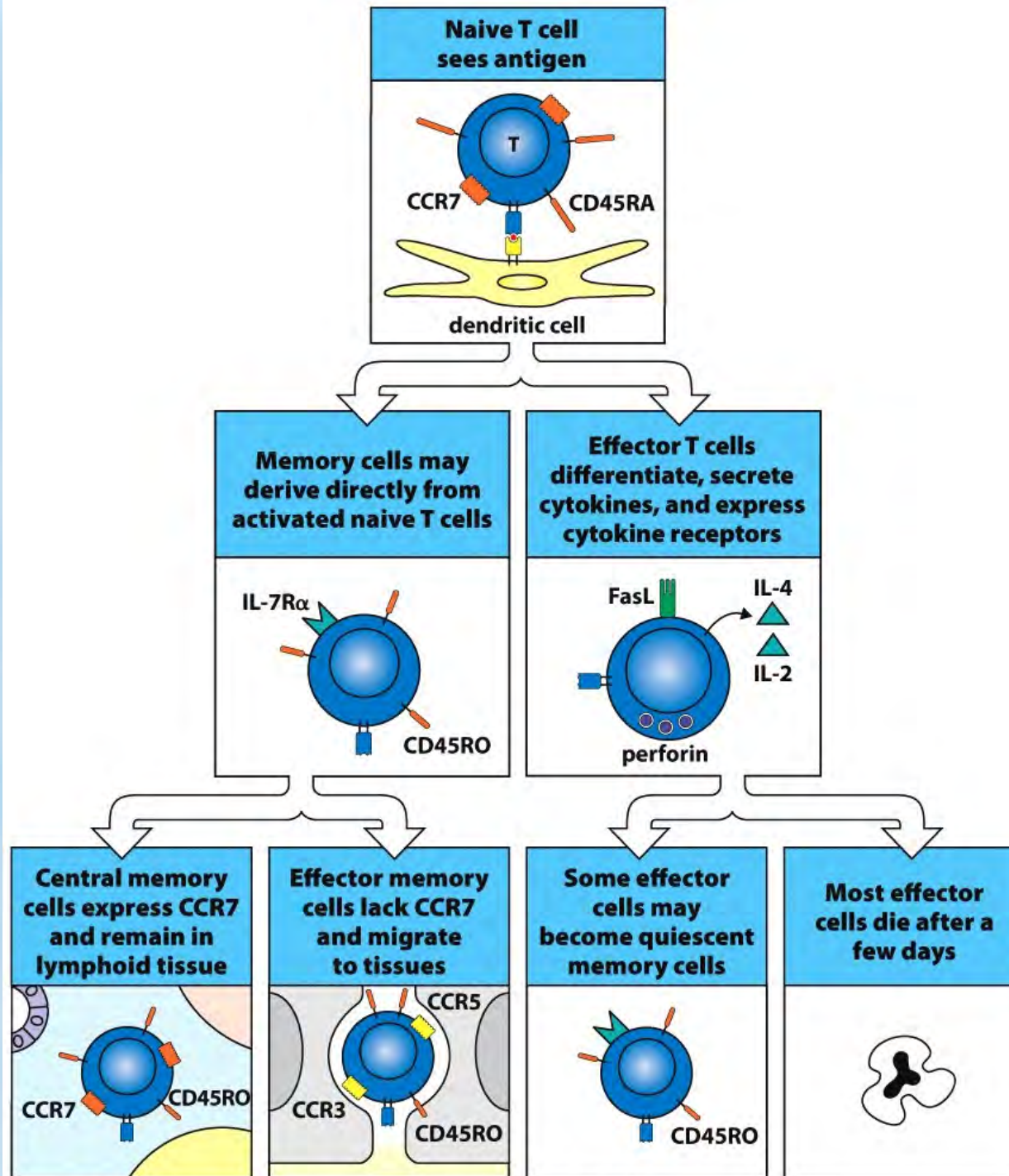
Διαφοροποίηση των κυττάρων Th17 ανθρώπου. Κυτταροκίνες κλειδιά για την διαφοροποίηση των ανθρώπινων Th17 κυττάρων είναι οι TGF- β + IL-6, IL-21, η αντιφλεγμονώδης κυτοκίνη IL-1, και η IL-23. Πέραν των κλασικών υποομάδων Th1 και Th17, μια μικτή υποομάδα Th1-Th17 έχει ταυτοποιηθεί και η οποία εκφράζει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



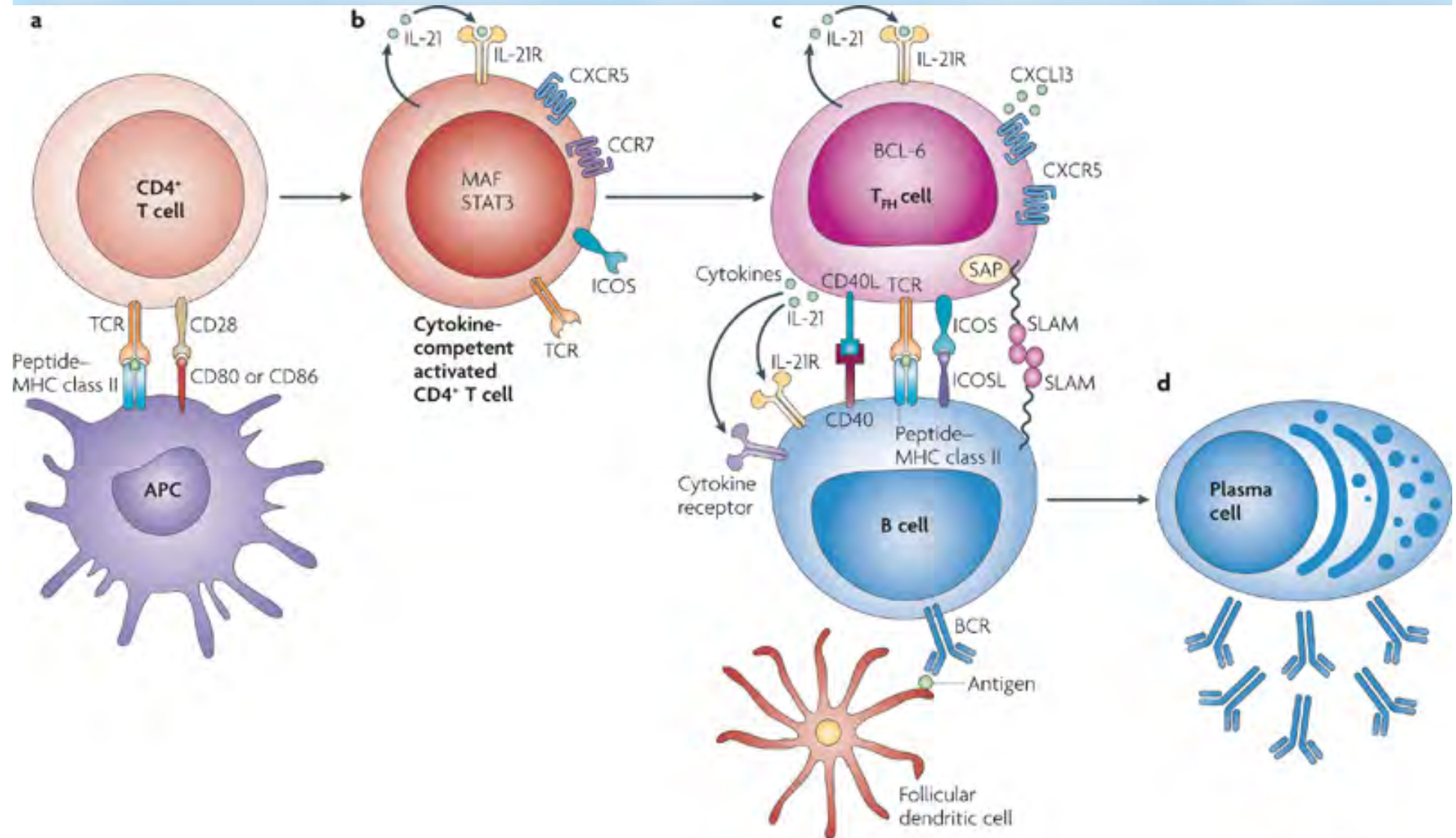
Διατήρηση της μνήμης από τα T κύτταρα

- Η μνήμη μακράς διάρκειας των T κυττάρων ωφείλεται στους πλήθυσμούς των T_{FH} κυττάρων (T follicular helper cells) και T_{CM} κυττάρων (central memory T cells).
- Τα T_{FH} βοηθούν τα B κύτταρα να παράγουν αντισώματα που εξουδετερώνουν παθογόνα.
- Τα T_{CM} «ψάχνουν» για αντιγόνα και συμβάλουν στη κυτταρική ανοσία.

T_{CM}

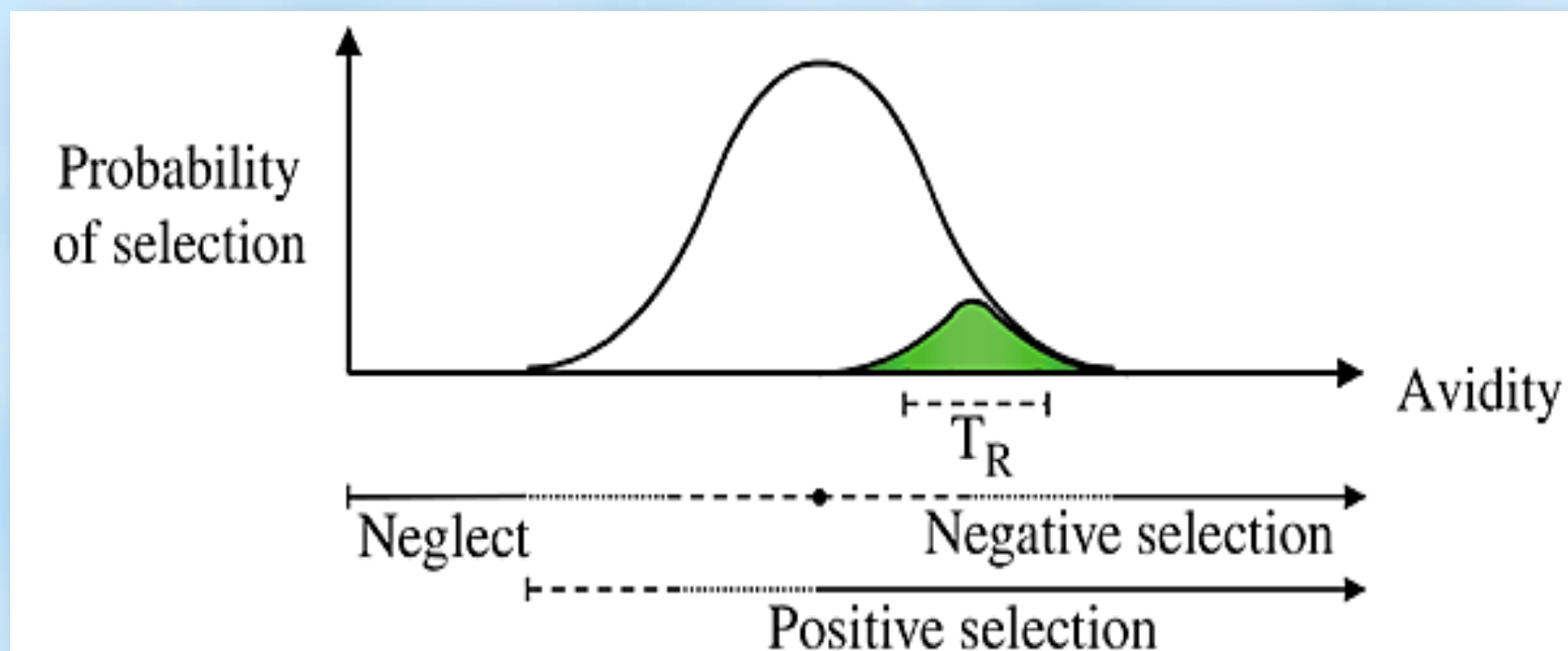


T_{FH}

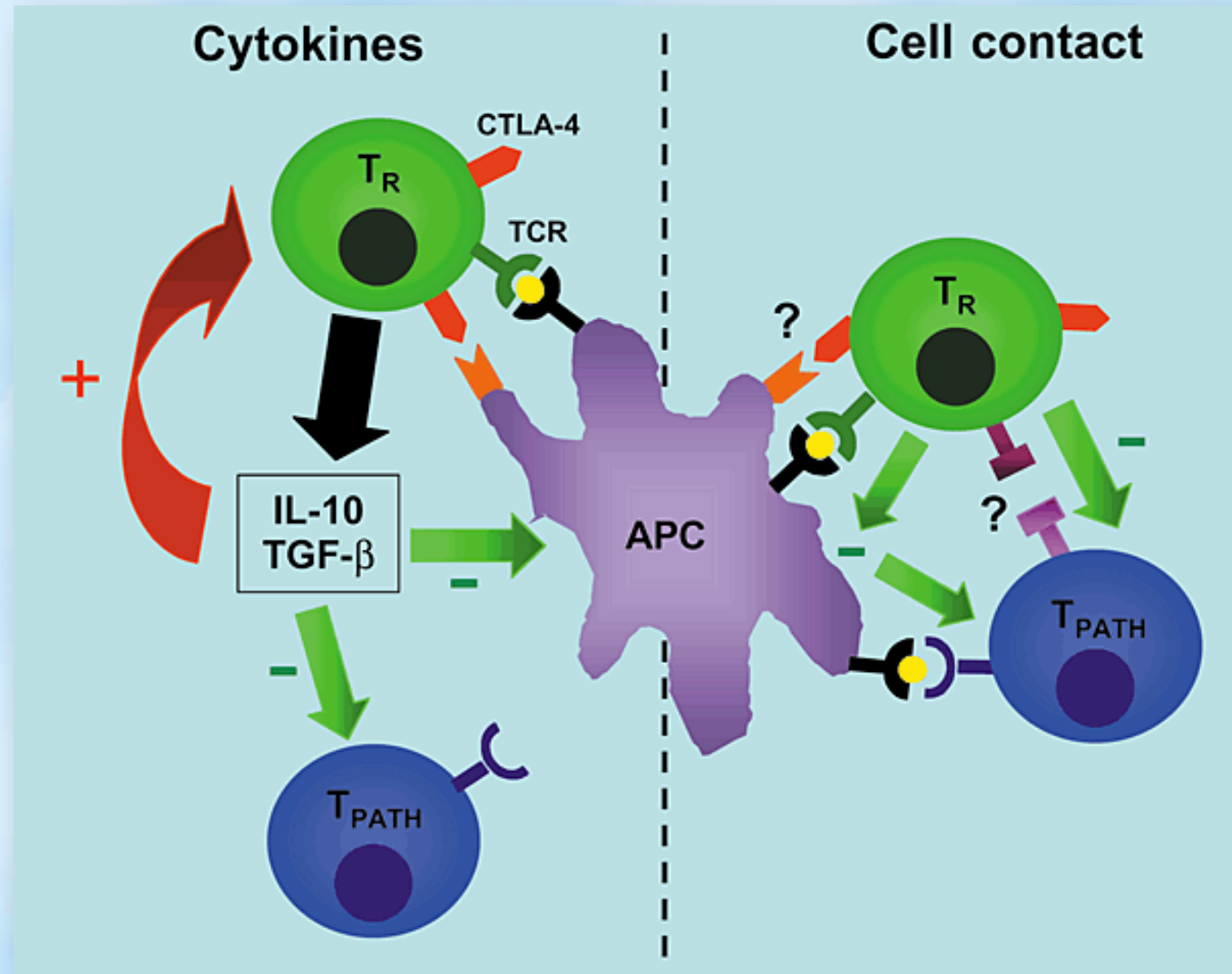


Ρυθμιστικά/κατασταλτικά Τ-κύτταρα (regulatory T cells, Tregs): Υποπληθυσμοί Τ κυττάρων με κατασταλτικές / ρυθμιστικές ικανότητες.

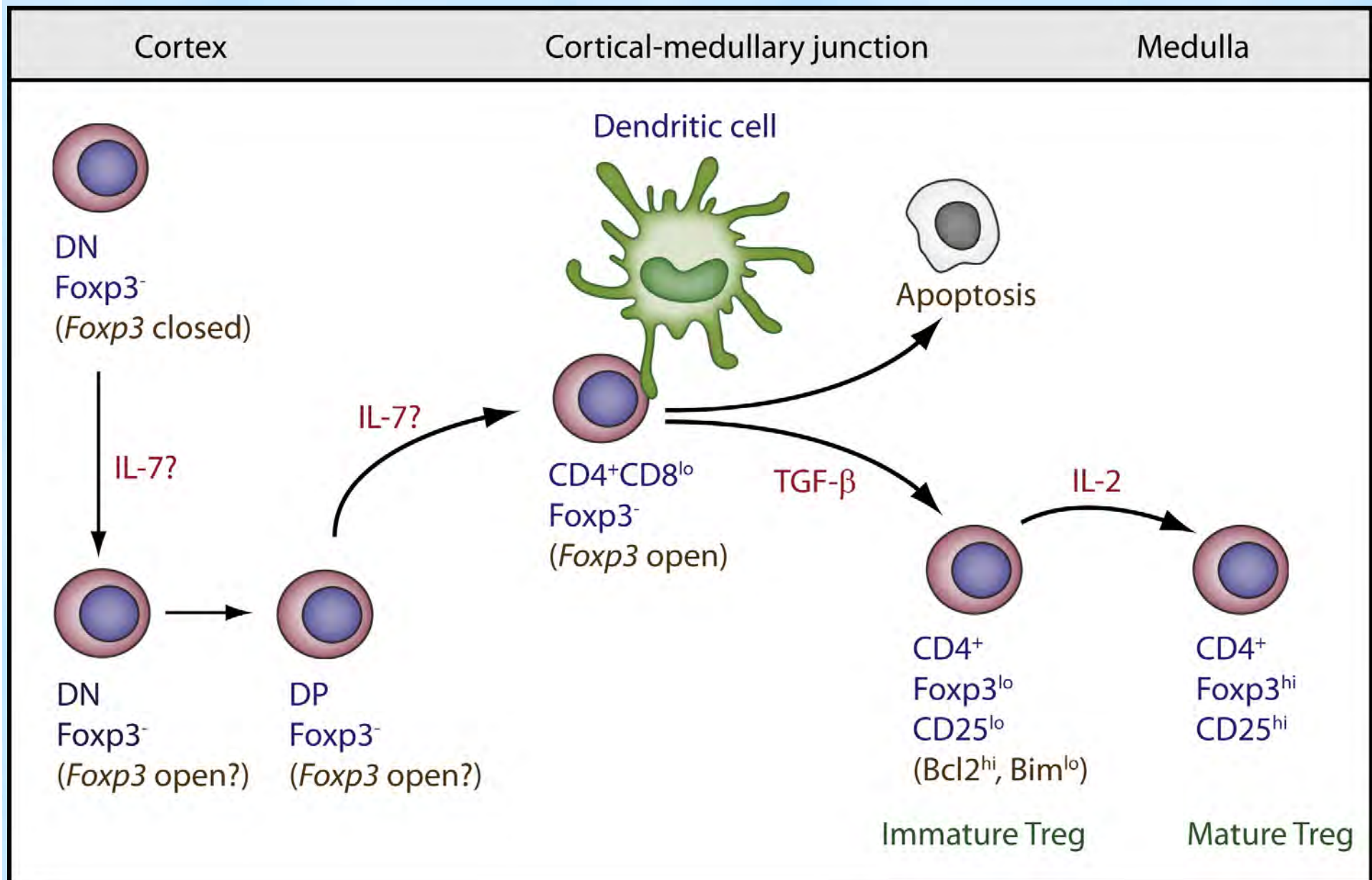
nTregs: Δημιουργούνται στον θύμο, στο τελευταίο στάδιο πριν βγούν τα Τ κύτταρα στη περιφέρεια.



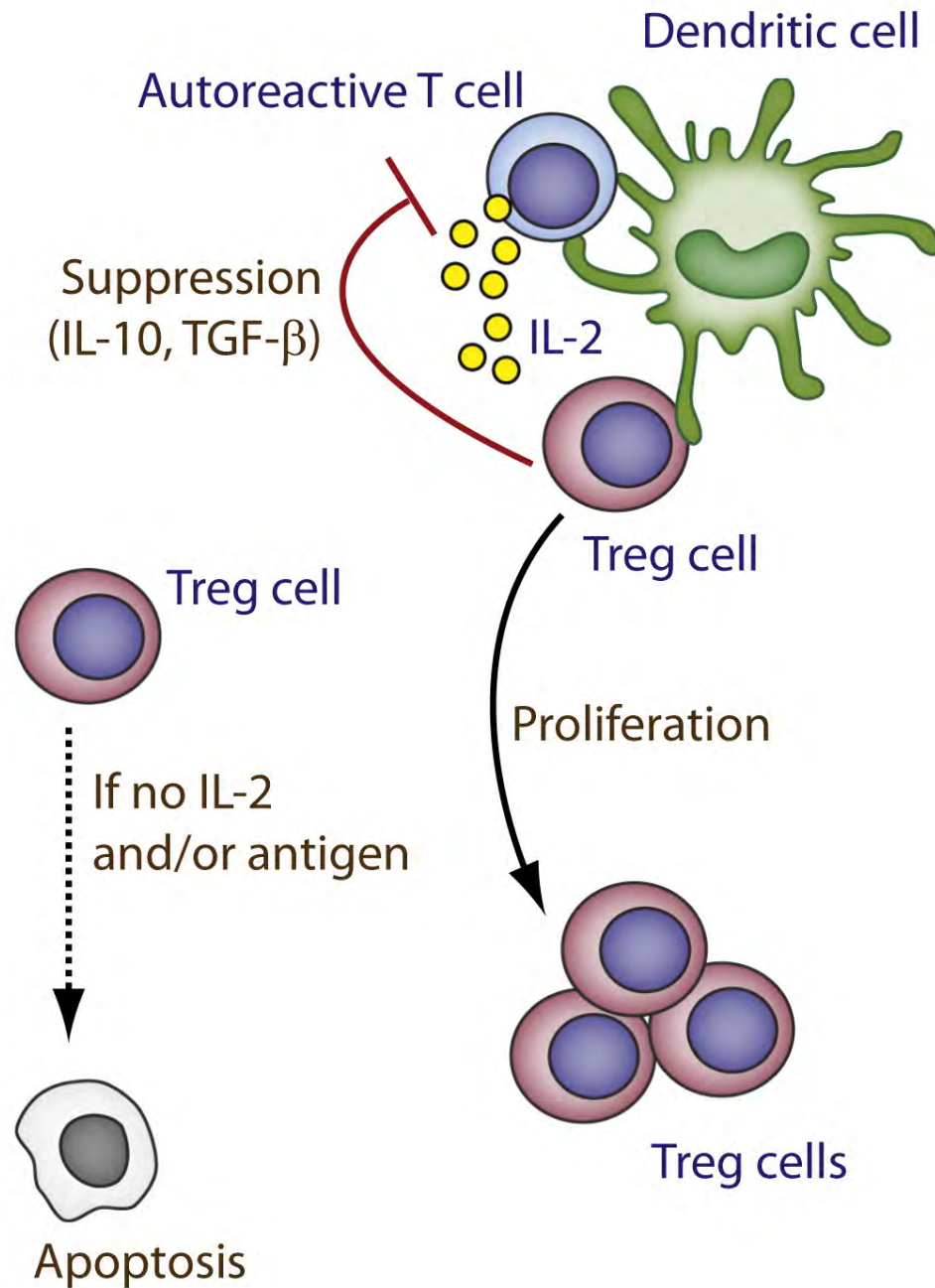
Τα Tregs καταστέλλουν την ενεργοποίηση των CD4 και CD8 T-κυττάρων *in vitro* μέσω έκκρισης κατασταλτικών κυτταροκινών ± ενός μηχανισμού που εξαρτάται από την φυσική επαφή μεταξύ κυττάρων.



Δημιουργία των nTregs στον θύμο



Διατήρηση της
ομοιόστασης των
nTregs στη
περιφέρεια

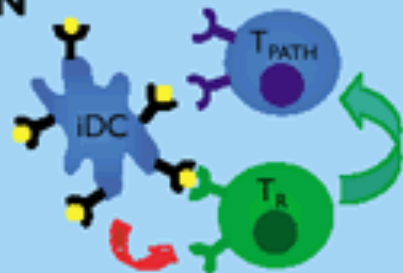


In vivo, τα Tregs παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη διατήρηση της ισοροπίας του ανοσοποιητικού συστήματος στη περιφέρεια, και τη καταστολή των αυτοανόσων νοσημάτων.

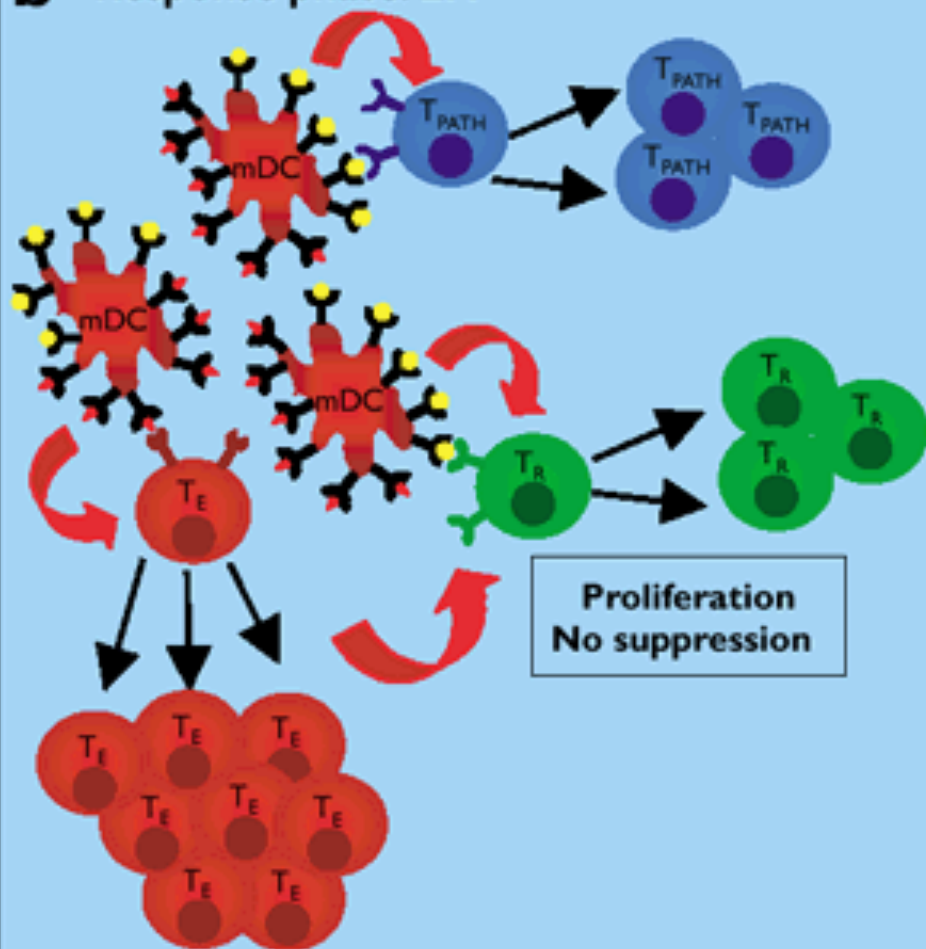
Χαμηλοί αριθμοί Tregs \pm μειωμένη λειτουργία τους \rightarrow αυτοάνοσα νοσήματα (κυρίως αυτών που επιδουκνείουν μια πόλωση τύπου Th1 ή Th17).

Αυξημένοι αριθμοί Tregs \pm αυξημένη λειτουργία τους \rightarrow νεοπλασίες.

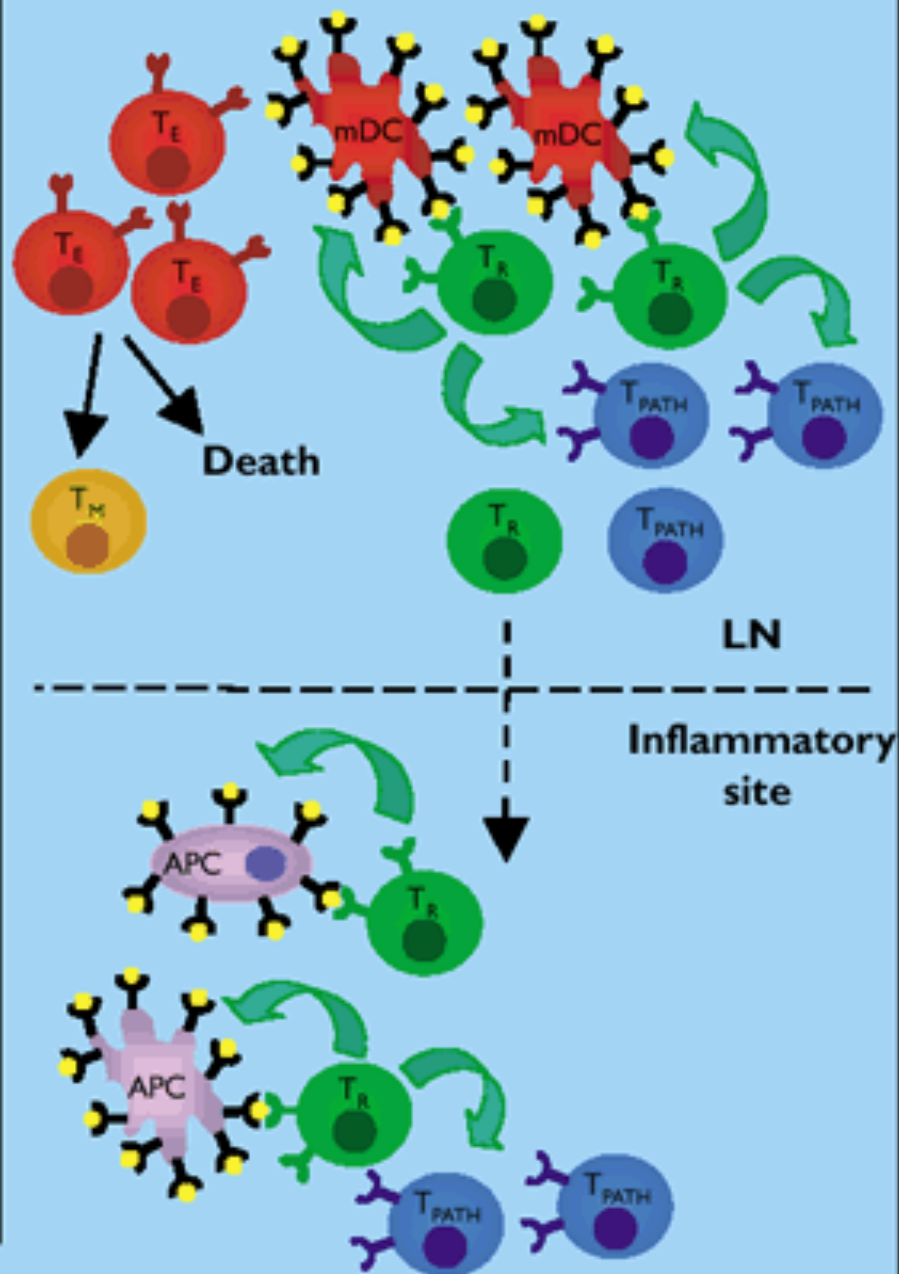
a Steady state: LN



b Response phase: LN



c Regulatory phase



Τα Τ ρυθμιστικά στον άνθρωπο αποτελούνται από διαφορετικούς κυτταρικούς υπο-πληθυσμούς που εκκρίνουν πολλούς διαφορετικούς συνδυασμούς αντιφλεγμονώδων κυτοκινών, αλλά κυρίως TGF-β ή/και IL-10.

Τα ανθρώπινα Τ ρυθμιστικά κύτταρα έχουν τους ακόλουθους φαινοτύπους:

CD4+CD25+

CD4+CD25+FoxP3+

CD4+CD25+CD127^{-/low}

CD4+CD45RO+

CD8+

CD28+

CTLA-4

CD8+CD28-

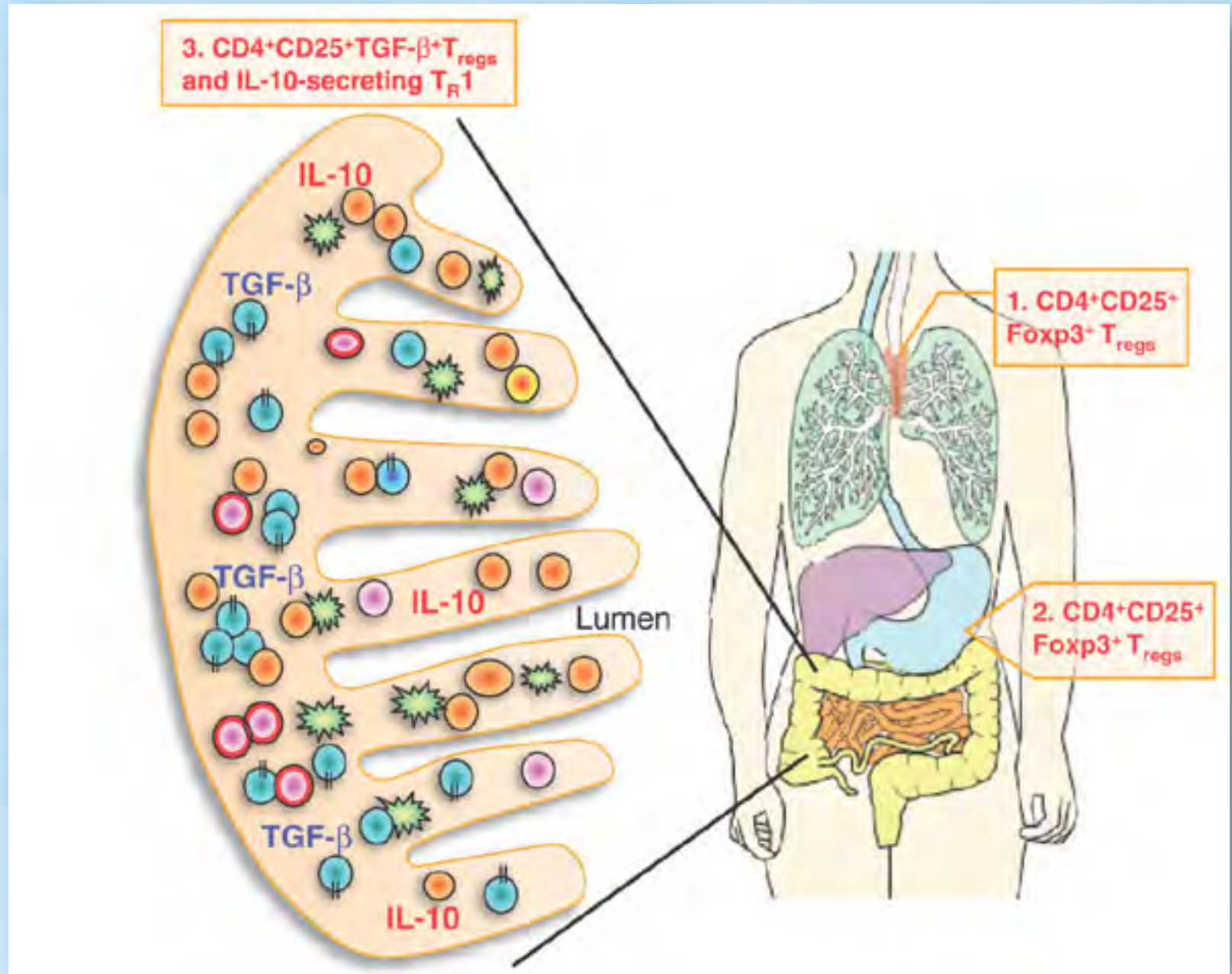
TCR γδ+

HLA-G

CD4-CD8-TCR αβ+

NKTr --> IFN-γ, IL-4, IL-10, TGF-β

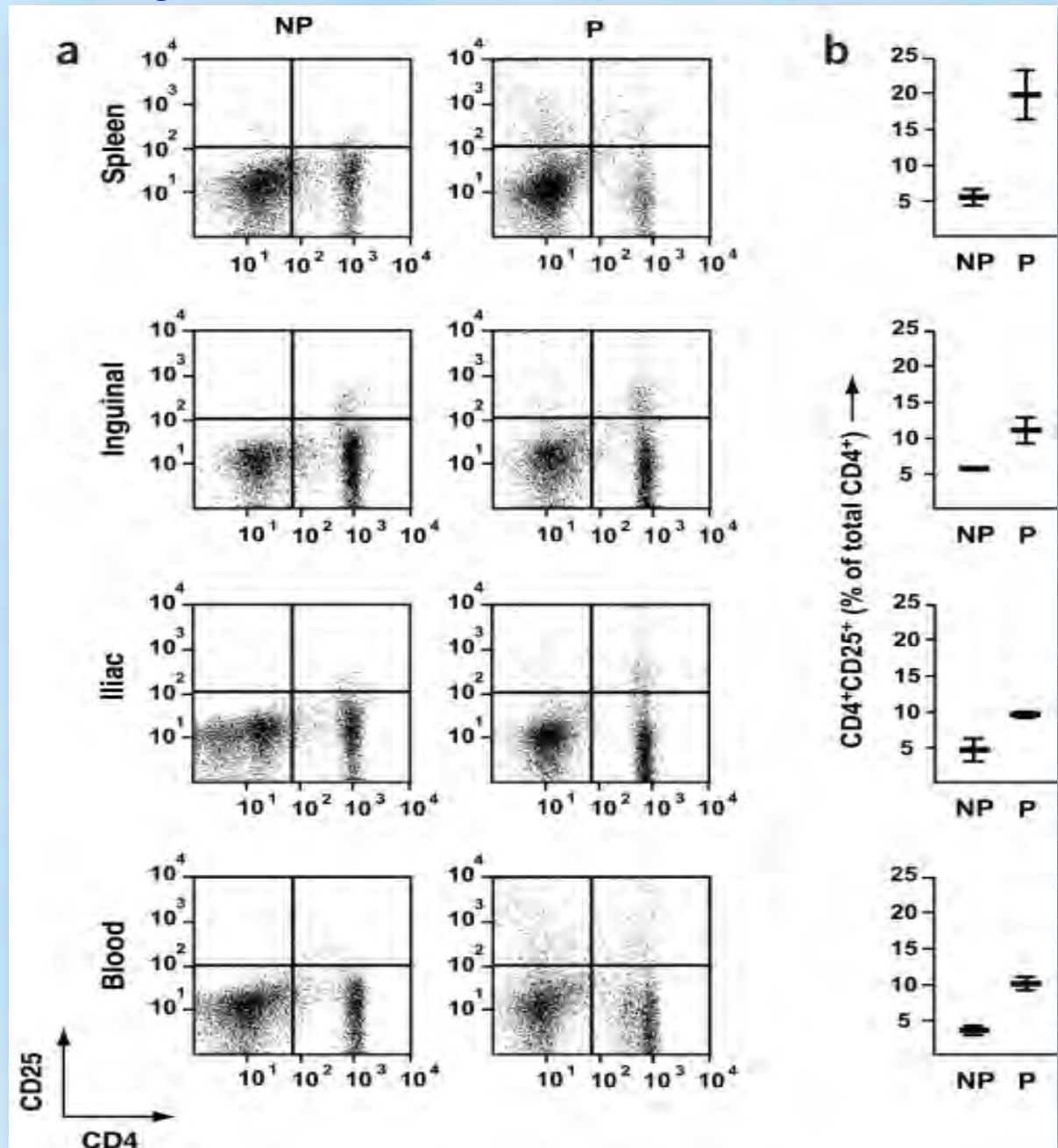
Και βρίσκονται κυρίως....



Αλλά και σε άλλους ιστούς. Για παράδειγμα,

- Σημαντική ερευνητική εργασία απέδειξε ότι για να είναι επιτυχής μία εγκυμοσύνη ο αριθμός των Tregs αυξάνεται σημαντικά στο περιβάλλον της μήτρας, λεμφαδένες και περιφερικό αίμα.

(στο σχήμα,
P=pregnant;
NP=non-
pregnant)



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

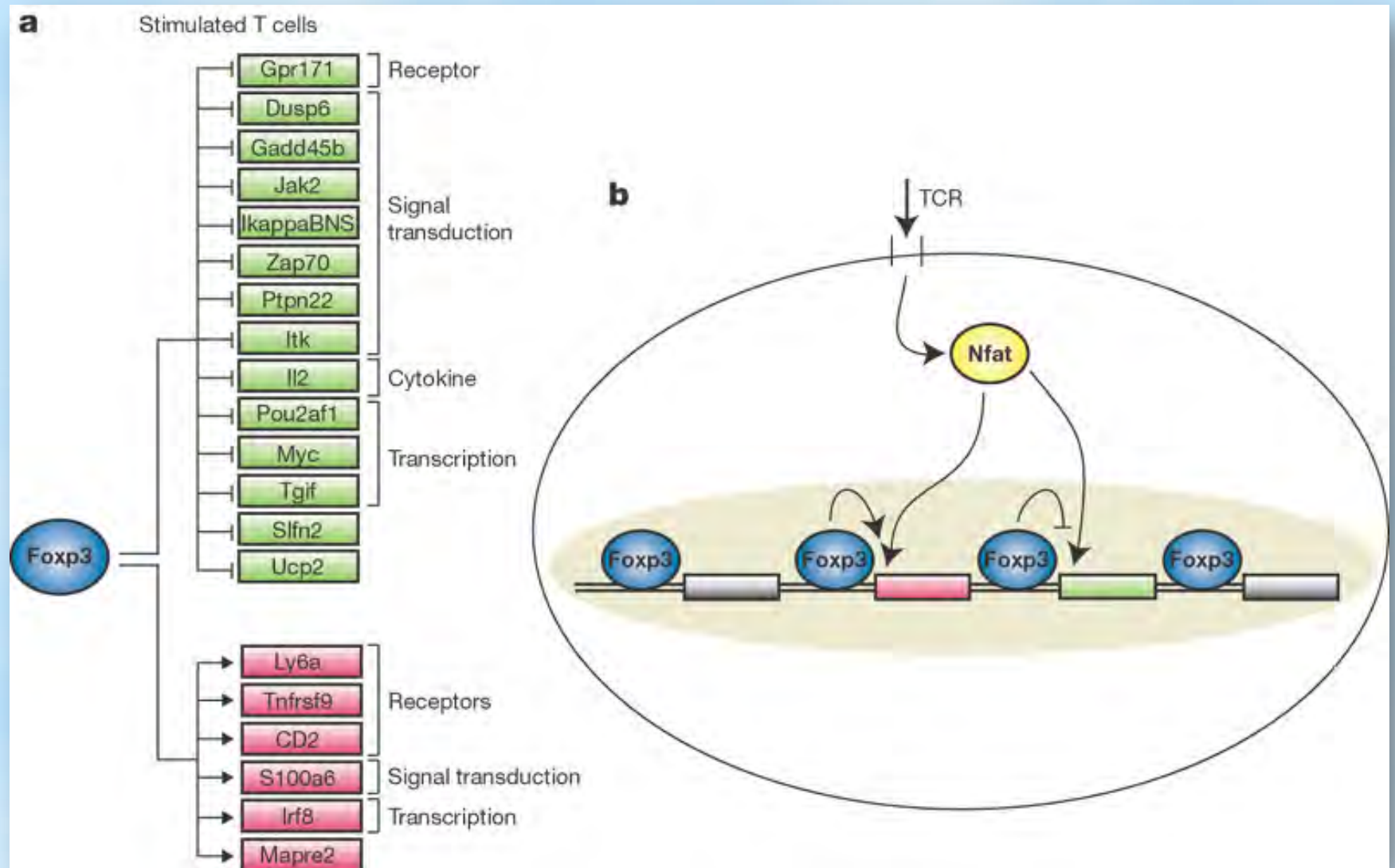
- Μία δεύτερη ομάδα T ρυθμιστικών κυττάρων/ καταστολέων μπορούν να επαχθούν *in vivo* με:
 - 1. Στοματική έκθεση στο αντιγόνο,
 - 2. Καλλιέργεια των T λεμφοκυττάρων με κυτοκίνες (κυρίως IL-10),
 - 3. Αλλαγή της λειτουργίας των δενδριτικών κυττάρων με φάρμακα και vit. D

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 Τ λεμφοκύτταρα έχει δείξει ότι αναστέλλουν αυτοάνοσες ασθένειες σε πειραματικά μοντέλα των ασθενειών.
- Σε περιβάλλον αλλεργικού άσθματος τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα εκκρίνουν IFN- γ .

Τα nTregs εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα Foxp3 που ανταγωνίζεται τον ΜΠ NFAT για τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης και εμποδίζει την ενεργοποίηση των γονιδίων που ελέγχονται από τον NFAT, π.χ. IL-2.



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