

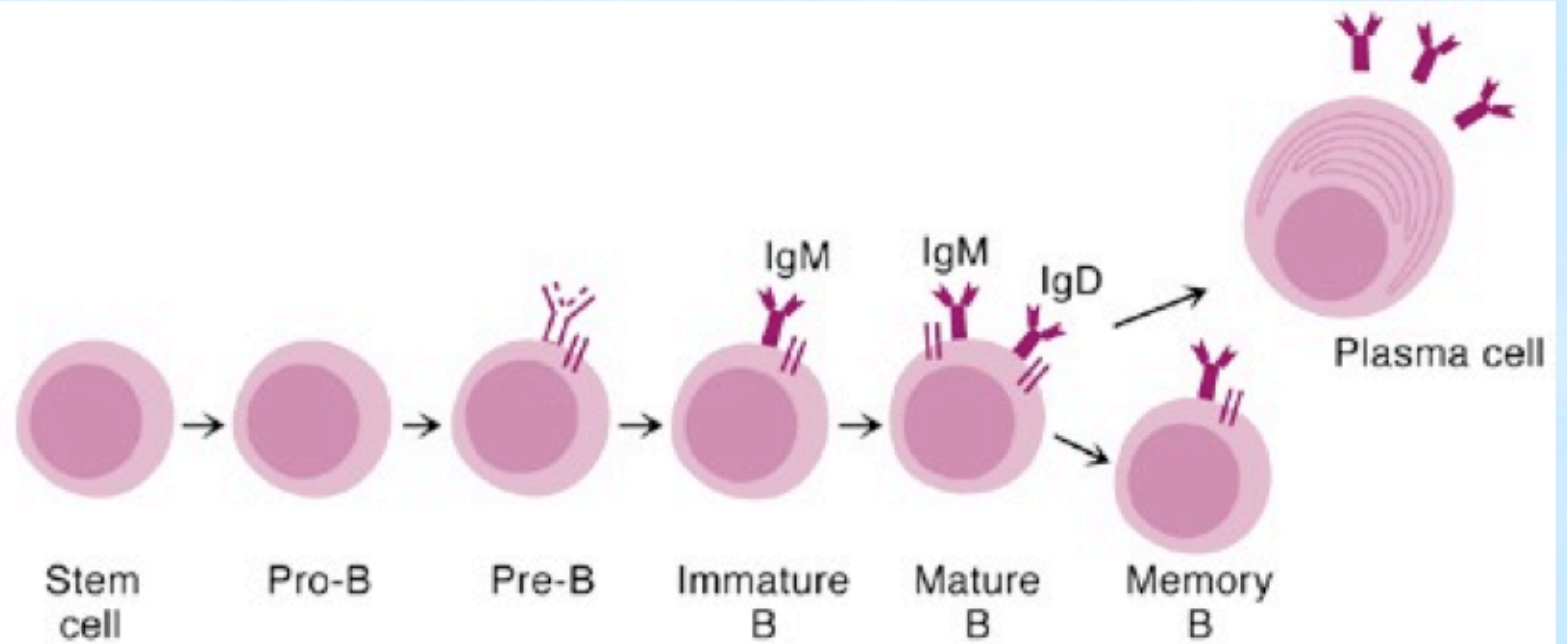
# ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΑΠΑΡΤΙΩΣΗ

Λεμφοποίηση

Επιλογή των κλώνων

Διαφοροποίηση λεμφοκυττάρων

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



V(D)J gene rearrangement

Stem cell

Pro-B

Pre-B

Immature B

Mature B

Memory B

Plasma cell

$D_H - J_H$

$V_H - D_H J_H$

$V_L$   
( $\kappa$  or  $\lambda$ )

Membrane Ig expression

—

—

$\mu$  + surrogate light chains

IgM

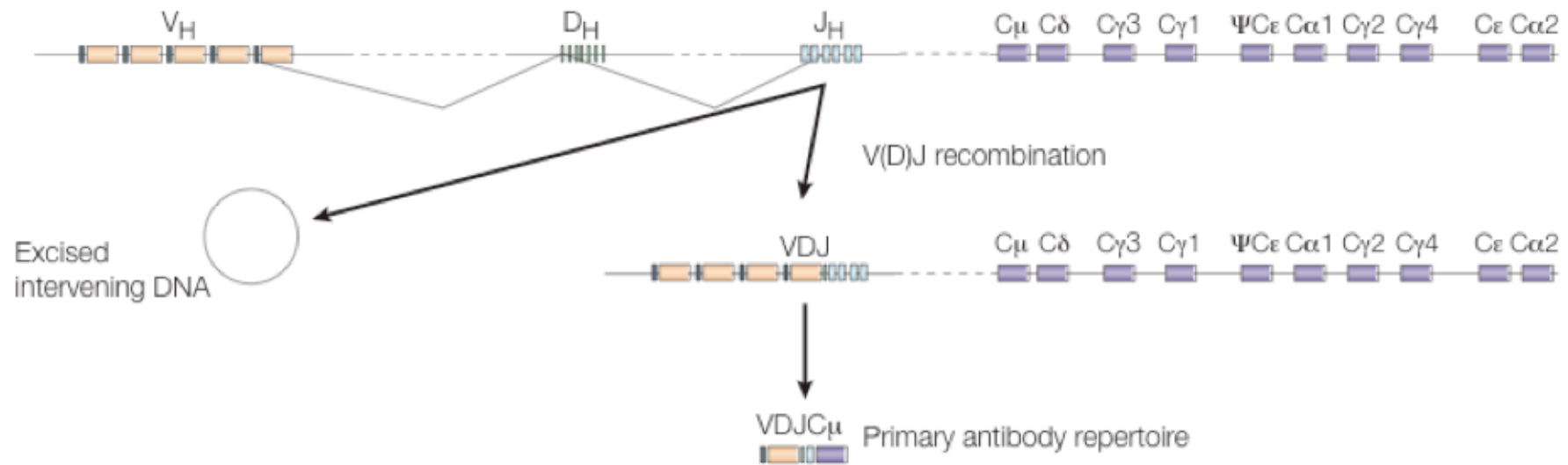
IgM + IgD

Isotype switch to IgG, IgA or IgE

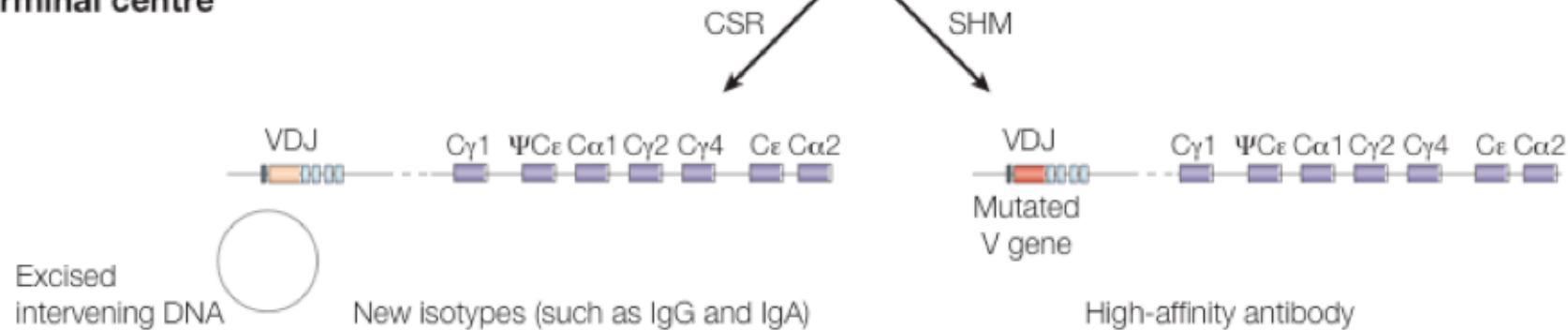
No membrane expression—secretes IgM, IgG, IgA or IgE

# Organization of the human immunoglobulin IgH locus and its somatic modifications to generate a primary and secondary B-cell repertoire (βλ. σημειώσεις [1])

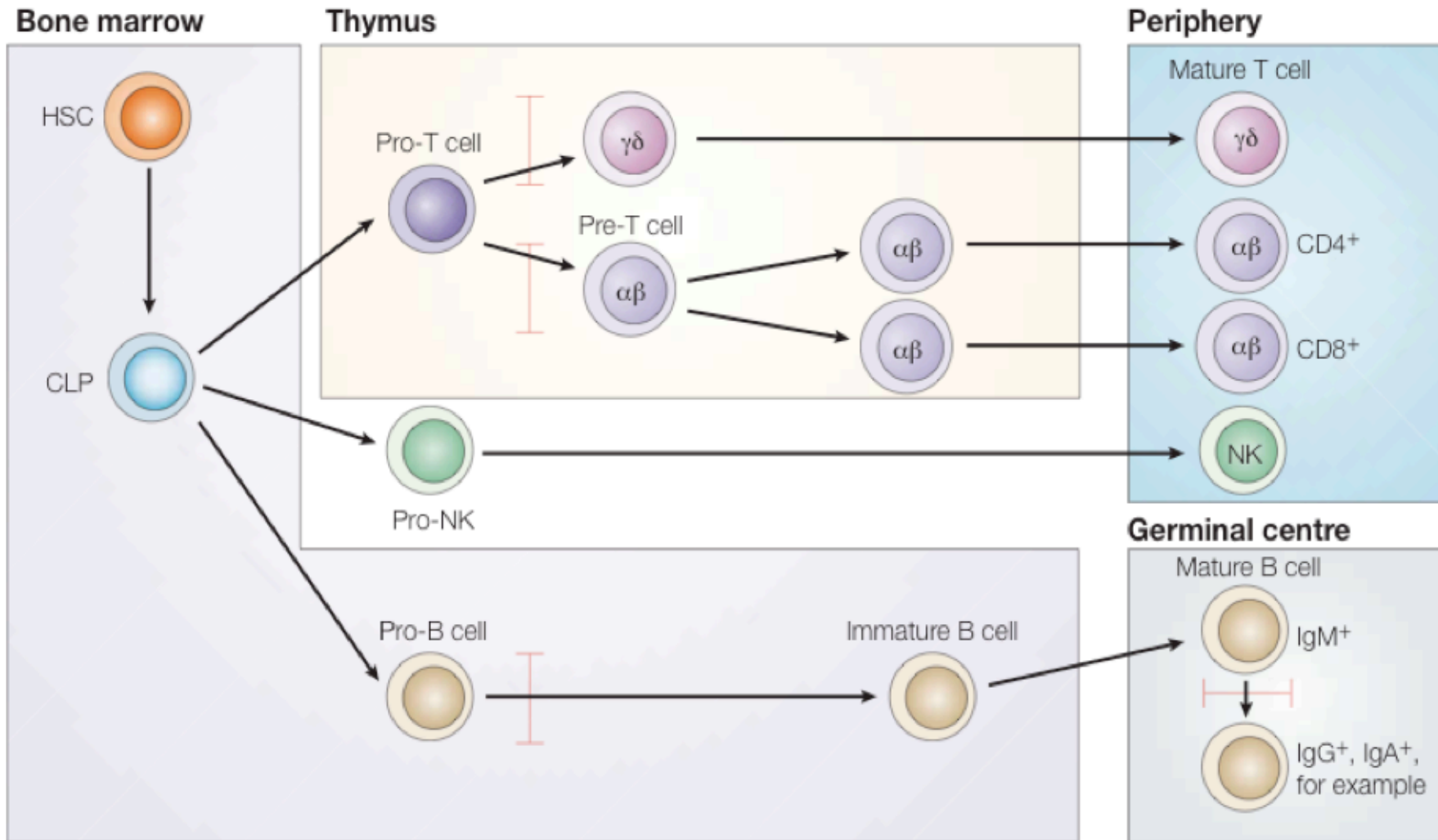
## Bone marrow



## Germinal centre



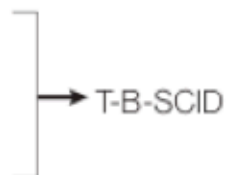
[2]



**V(D)J recombination deficiency**

Mutations in:

- *Rag1*
- *Rag2*
- Artemis (RS-SCID)
- Other genes

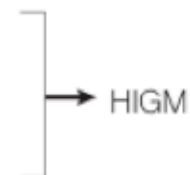


T-B-SCID

**CSR/SHM deficiency**

Mutations in:

- CD40/CD40L
- AID
- UNG
- Other genes



HIGM



## 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

\* Bruton's tyrosine kinase

	<b>stem cell</b>	<b>early pro-B cell</b>	<b>late pro-B cell</b>	<b>large pre-B cell</b>	<b>small pre-B cell</b>	<b>immature B cell</b>	<b>mature B cell</b>
<b>Ig <math>\alpha\beta</math> expression</b>	<b>no</b>	<b>yes</b>	<b>yes</b>	<b>yes</b>	<b>yes</b>	<b>yes</b>	<b>yes</b>
<b>btk*</b>	<b>no</b>	<b>little</b>	<b>yes</b>	<b>yes</b>	<b>yes</b>	<b>yes</b>	<b>yes</b>
<b>Membrane markers</b>	<b>CD34</b>	<b>CD34 CD45 (B220) Class II</b>	<b>CD45R Class II CD19 CD40</b>	<b>CD45R Class II pre-B-R CD19 CD40</b>	<b>CD45R Class II pre-B-R CD19 CD40</b>	<b>CD45R Class II IgM CD19 CD40</b>	<b>CD45R Class II IgM IgD CD19 CD21 CD40</b>

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



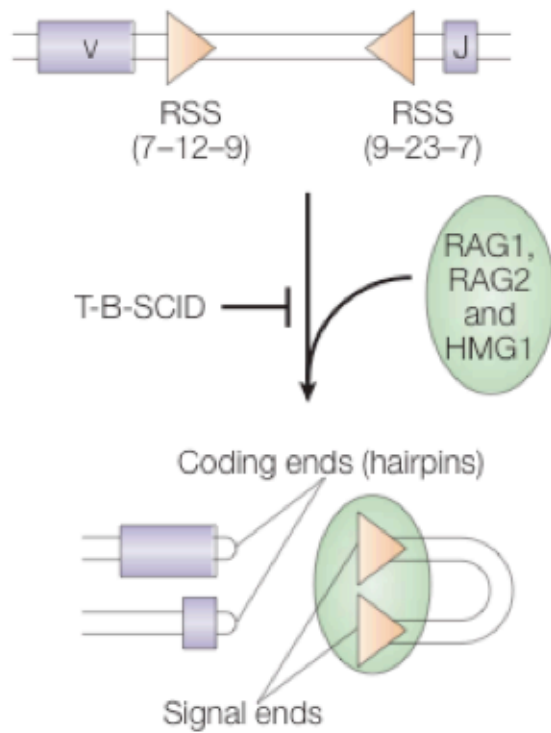
D-J

VDJ

V-J light

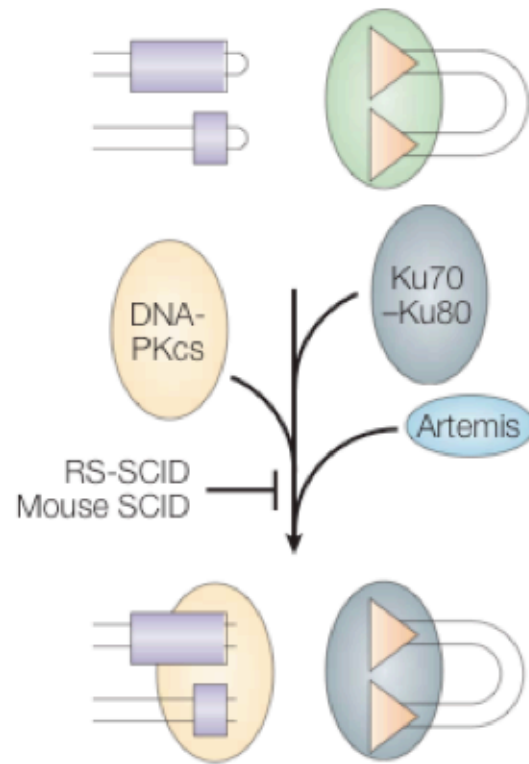
[3]

**a Initiation**



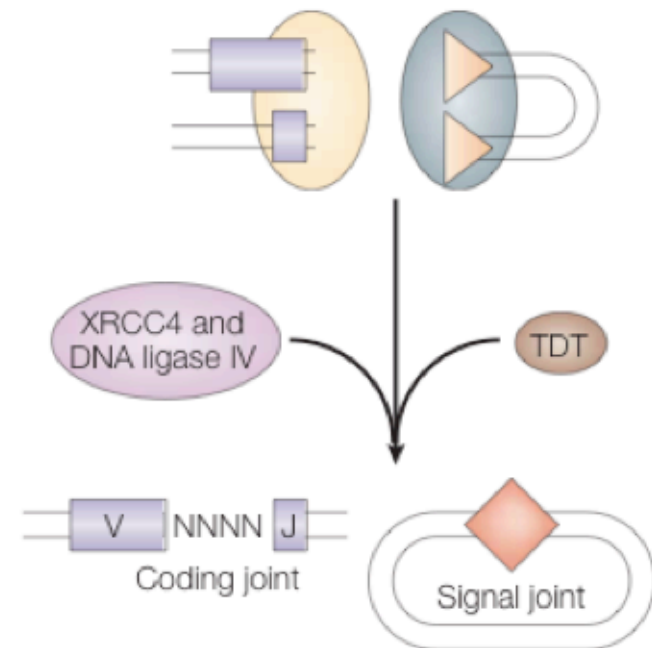
**Lymphoid specific**

**b DNA-damage recognition and hairpin opening**



**Ubiquitous DNA-repair machinery**  
(non-homologous end joining)

**c DNA repair**

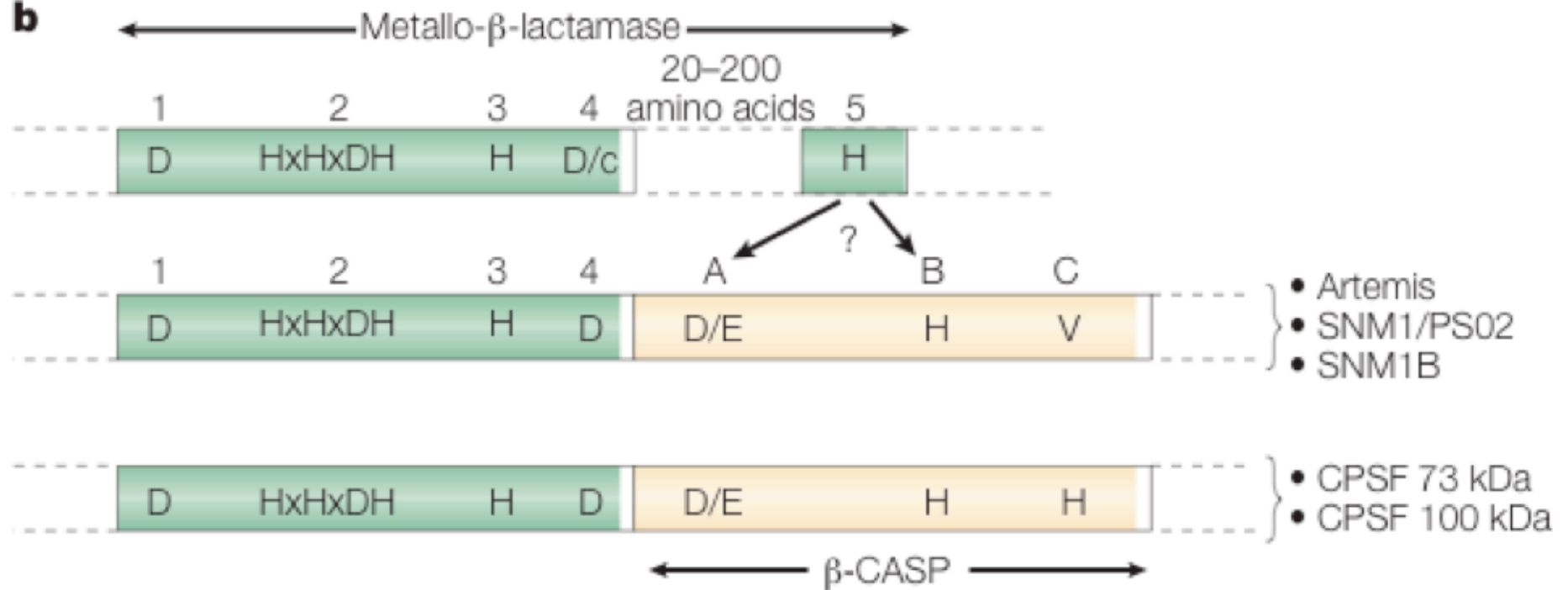


[4]

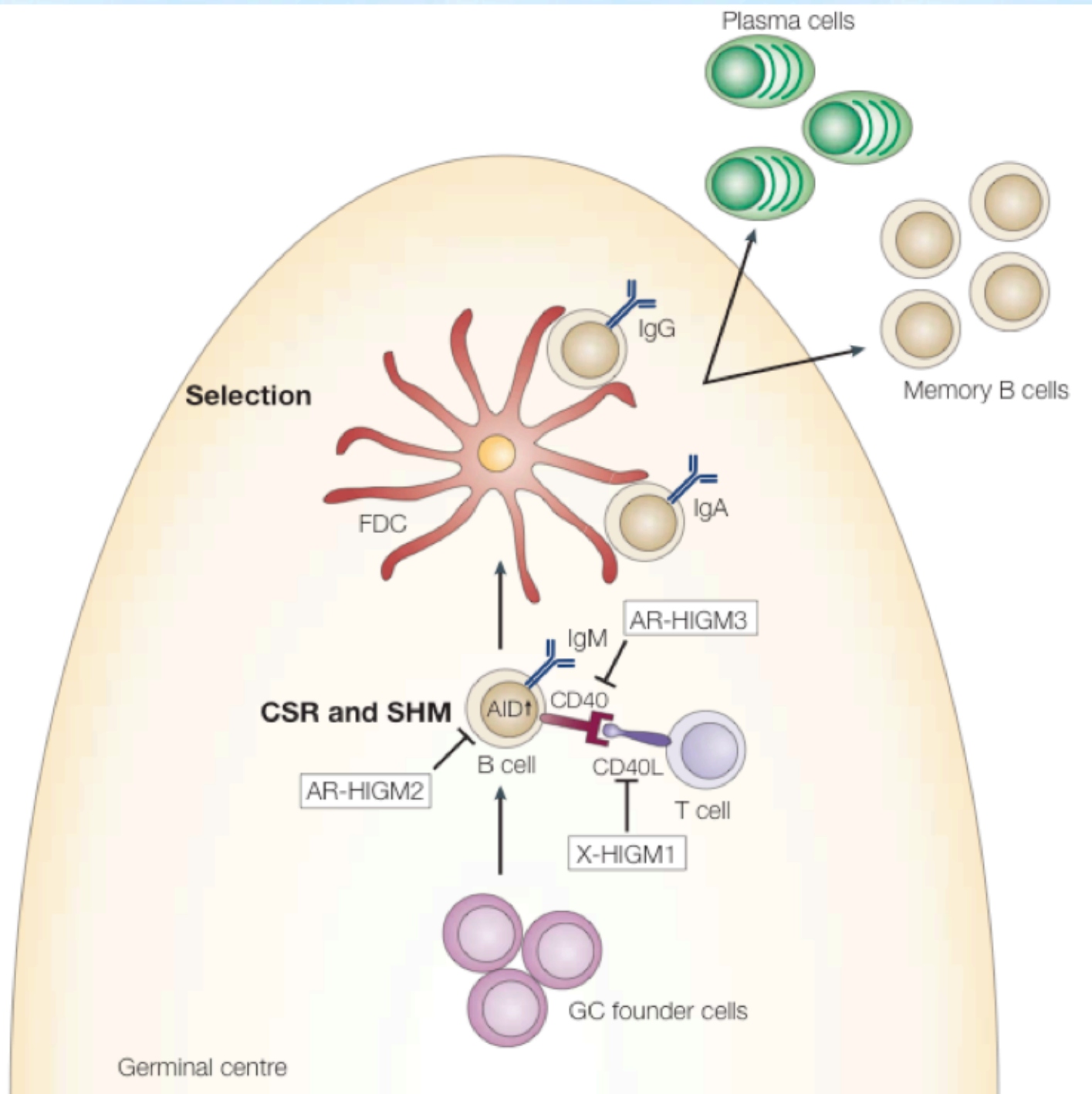
**a**



**b**



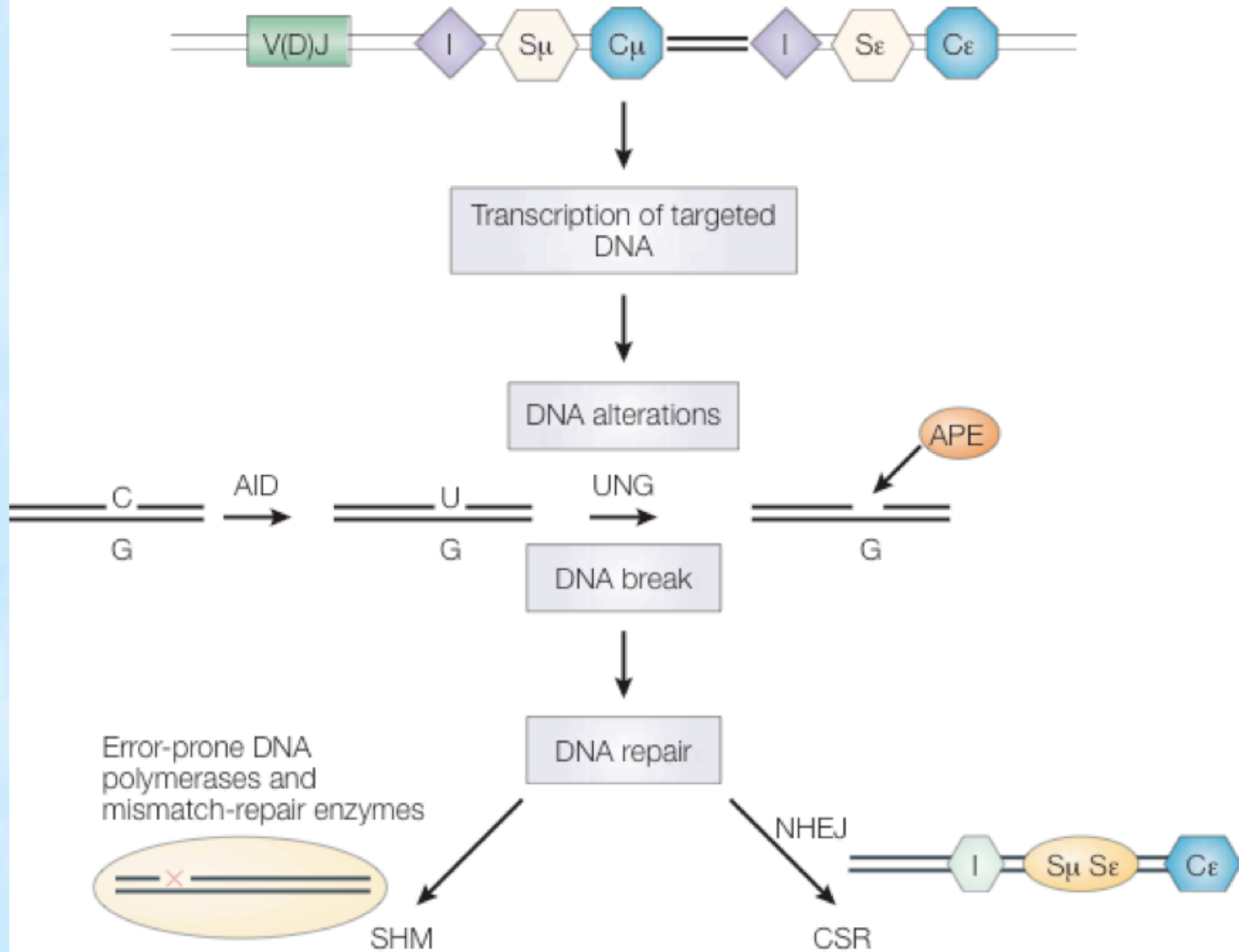
[5]



Germinal centre



[6]



[7]

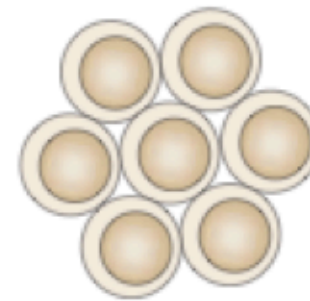


Mice with mutations in genes encoding DNA-PKcs (SCID mice), Ku80, XRCC4 or DNA ligase IV

×



*Trp53*<sup>-/-</sup> mice



Pro-B-cell lymphoma (with chromosome translocations)

Mutations in caretaker genes



Mutations in gatekeeper genes



Neoplasia

T-κύτταρα:

Εκπαίδευση στον θύμο

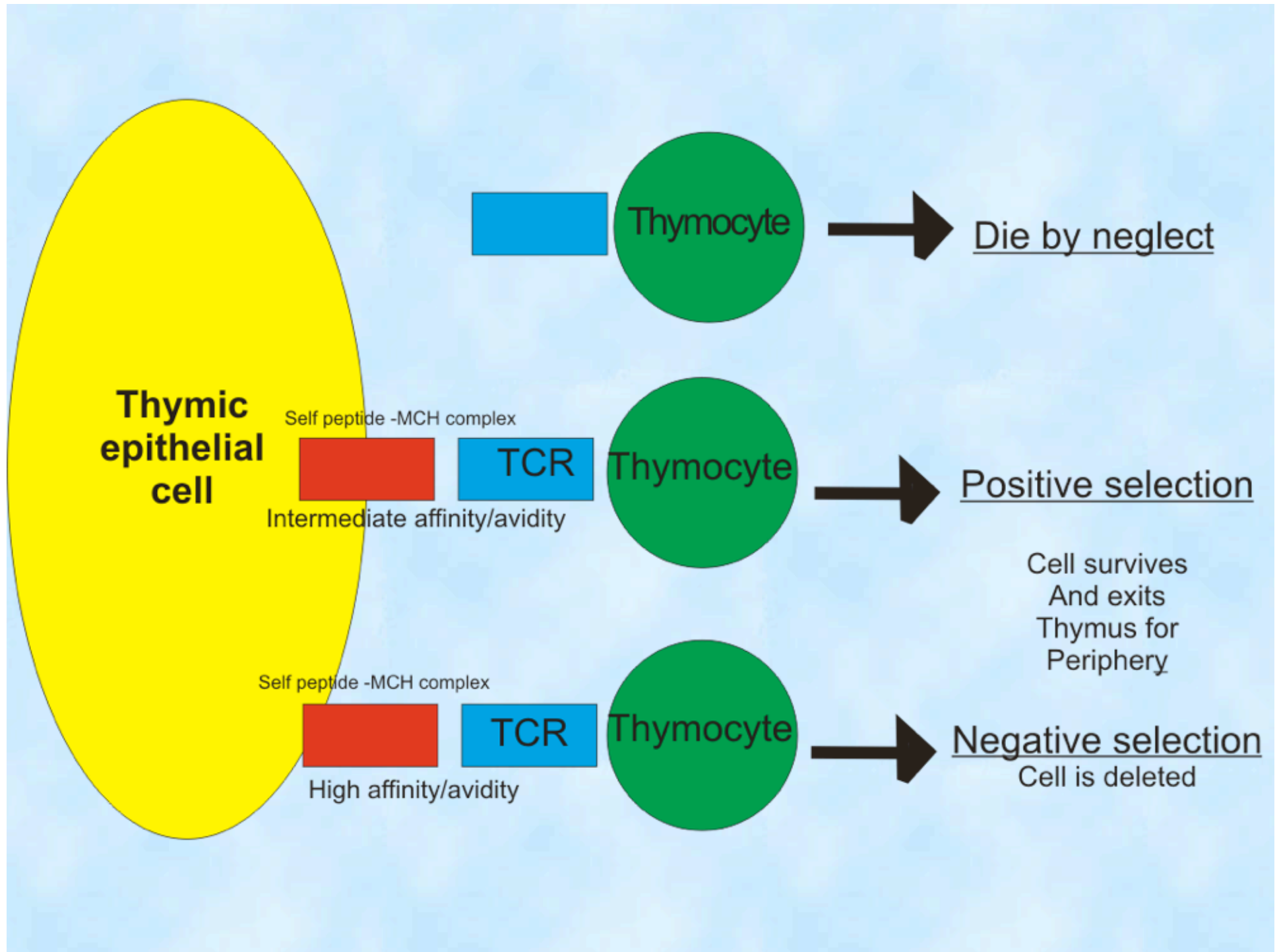
Επιλογή κλώνων

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.



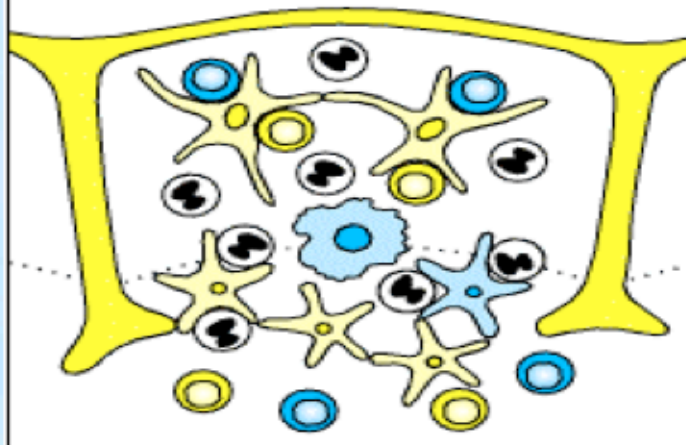
- Η αναδιάταξη των γονιδίων VDJ, θα επιφέρει τη δημιουργία μεγάλου αριθμού θυμοκυττάρων τα οποία, όταν ώριμα πιά βγουν στη περιφέρεια, θα έχουν μία τεράστια γκάμα T αντιγονικών υποδοχέων (TCR) (1/κύτταρο) που θα τους επιτρέπει να αναγνωρίσουν ένα τεράστιο αριθμό ξένων αντιγόνων.
- Η διαδικασία αναγνώρισης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

# Medawar & Burnet

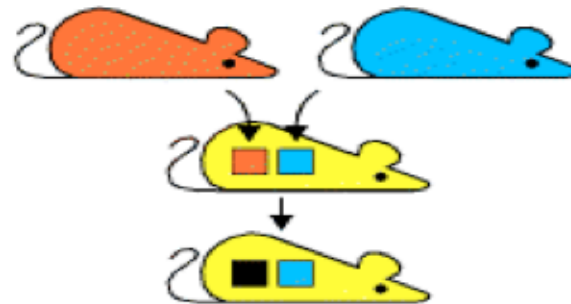
Neonatal mouse injected with  
allogeneic bone marrow cells

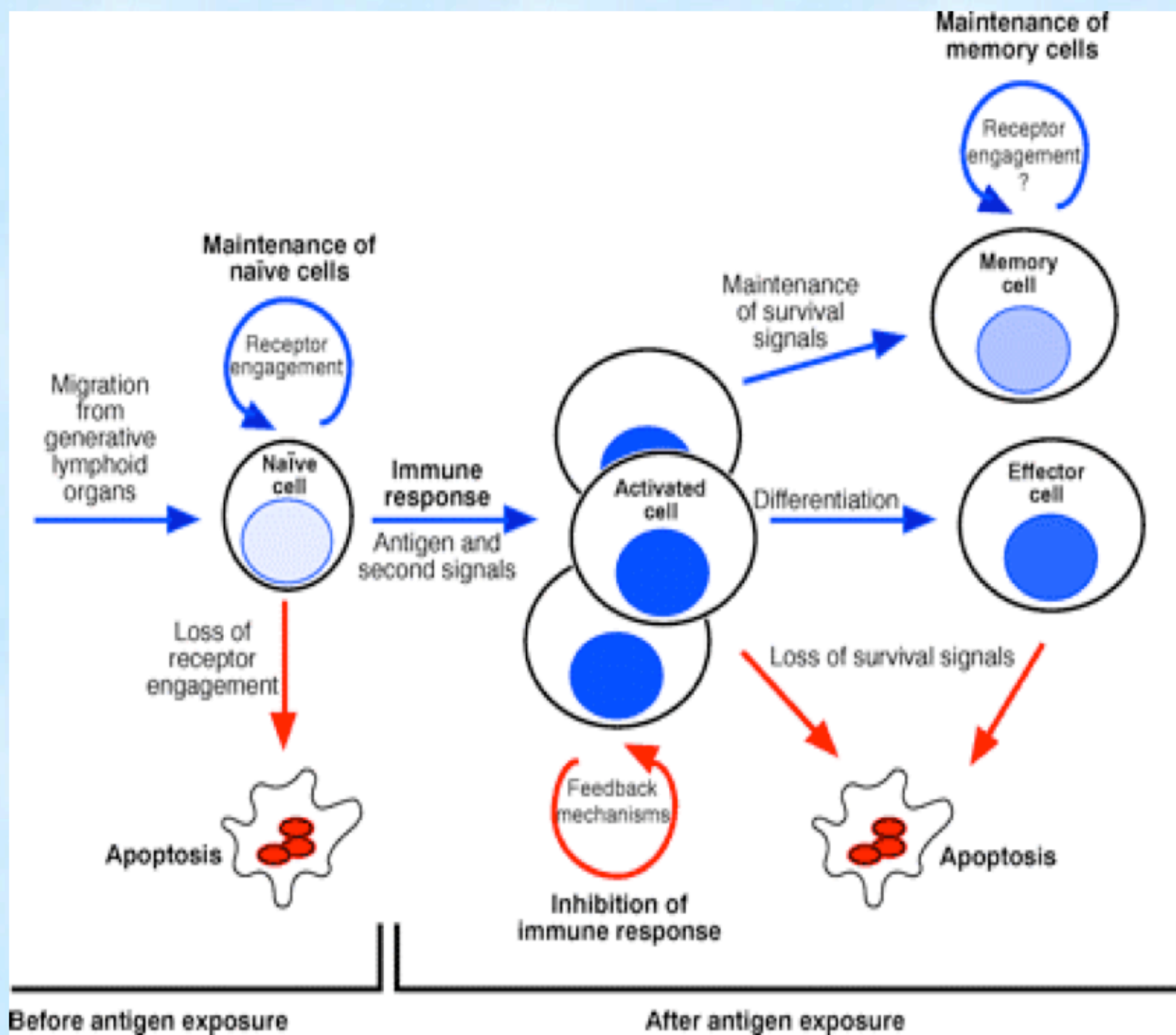


Both donor and recipient T cells  
are selected in the recipient thymus.  
T cells are negatively selected  
on both donor and recipient APC



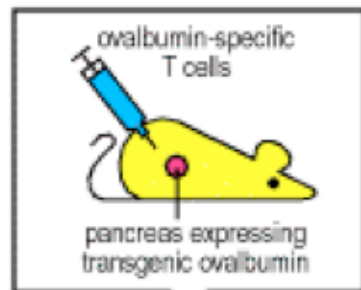
Chimeric animals accept a donor-type  
skin graft but reject an unrelated graft





## 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**).



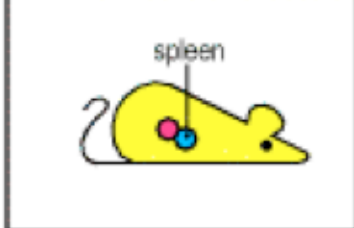
3 days

Cells taken from regional lymph node



4 weeks

Cells taken from spleen



Transgenic mouse pancreatic expression of ovalbumin

High	Low
------	-----

Proliferation of ovalbumin-specific CD8 T cells

+	-
---	---

Recovery of ovalbumin-specific T cells from spleen

-	++
---	----

Spontaneous proliferation of ovalbumin-specific T cells

-	-
---	---

Response of ovalbumin-specific T cells to ovalbumin *in vitro*

-	++
---	----

Mechanism of peripheral tolerance

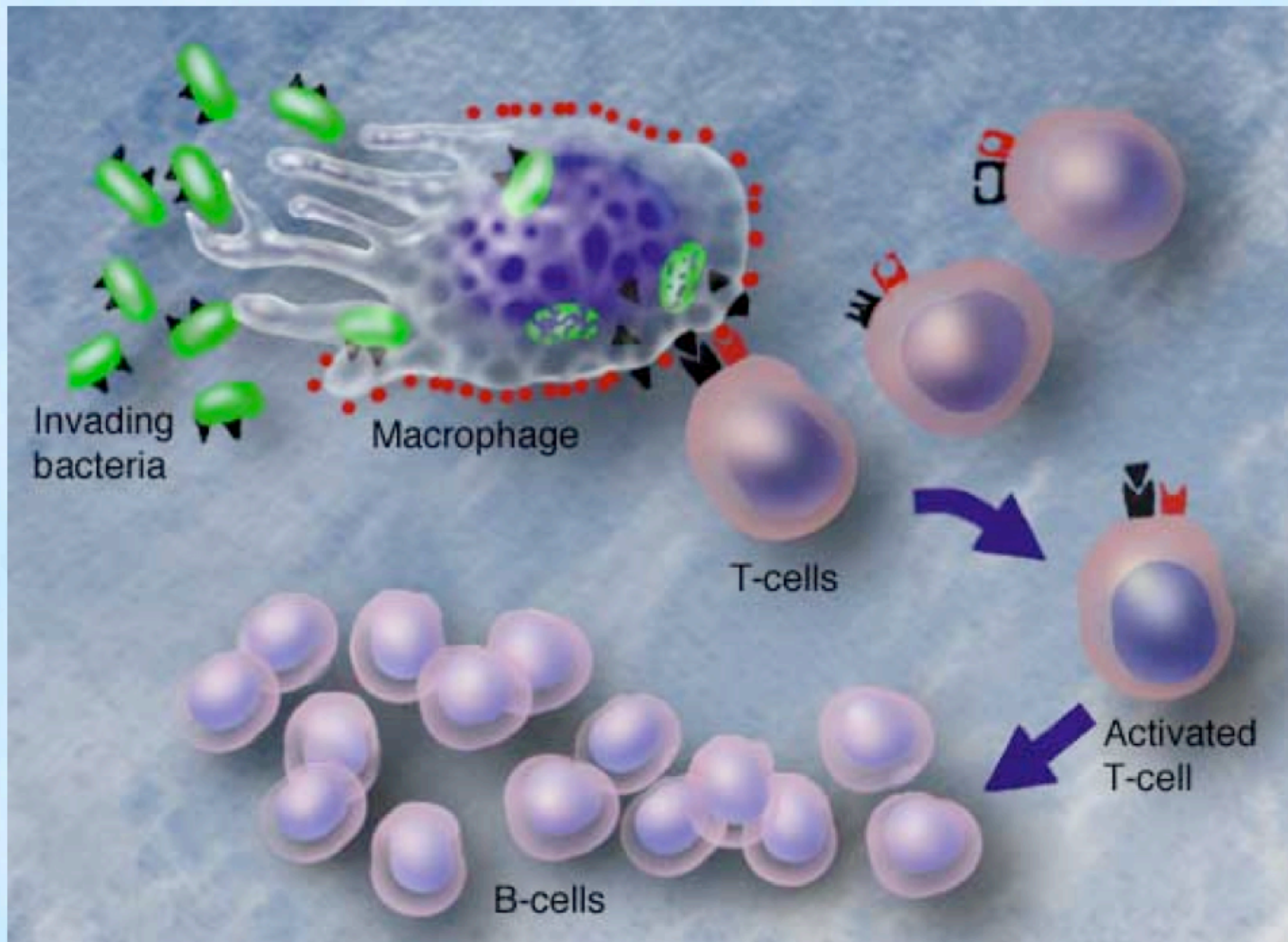
Deletion	Ignorance
----------	-----------



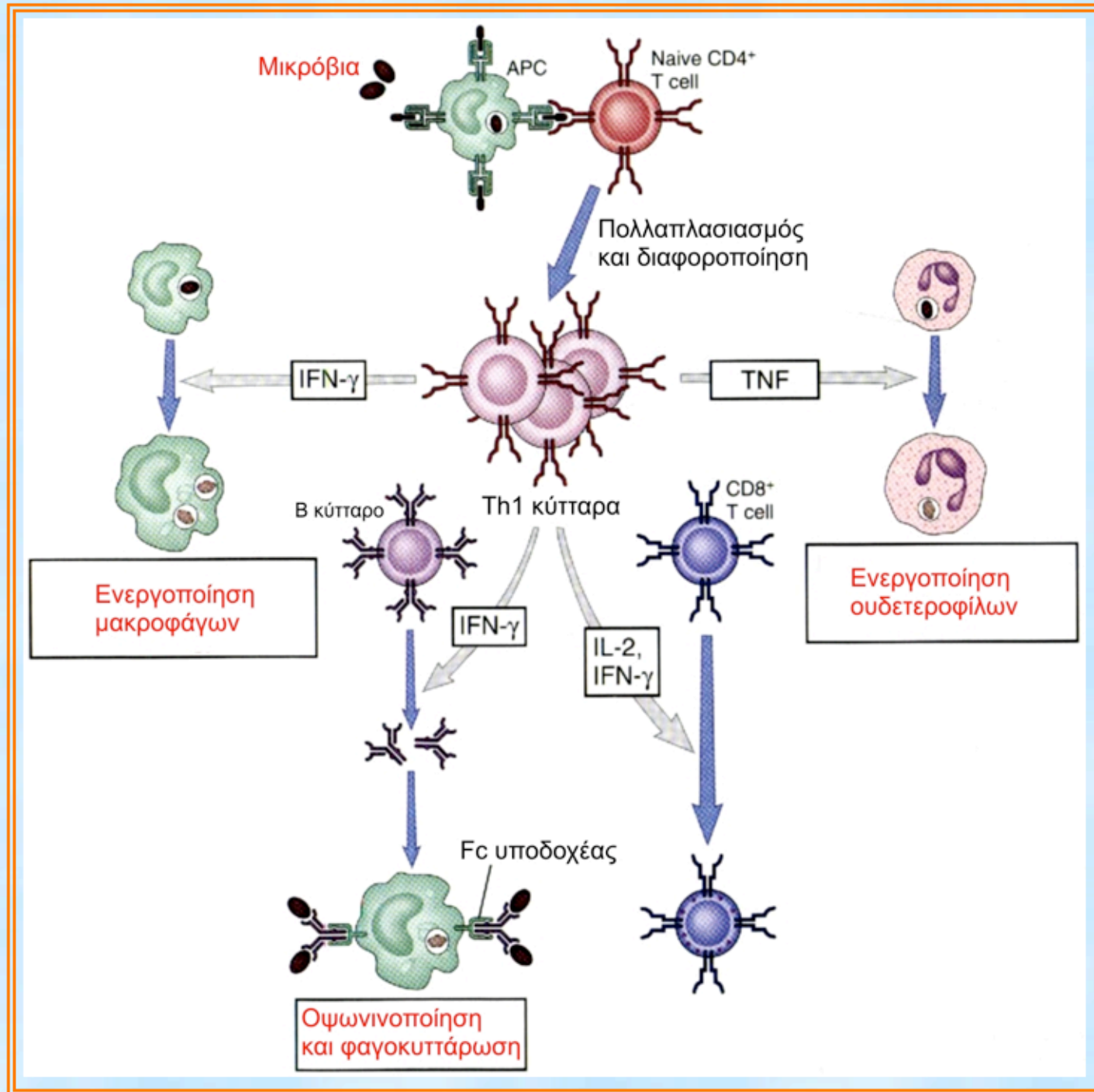
Τα λεμφοκύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους, όπως και με άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω των κυτοκινών ή κυτταροκινών.

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

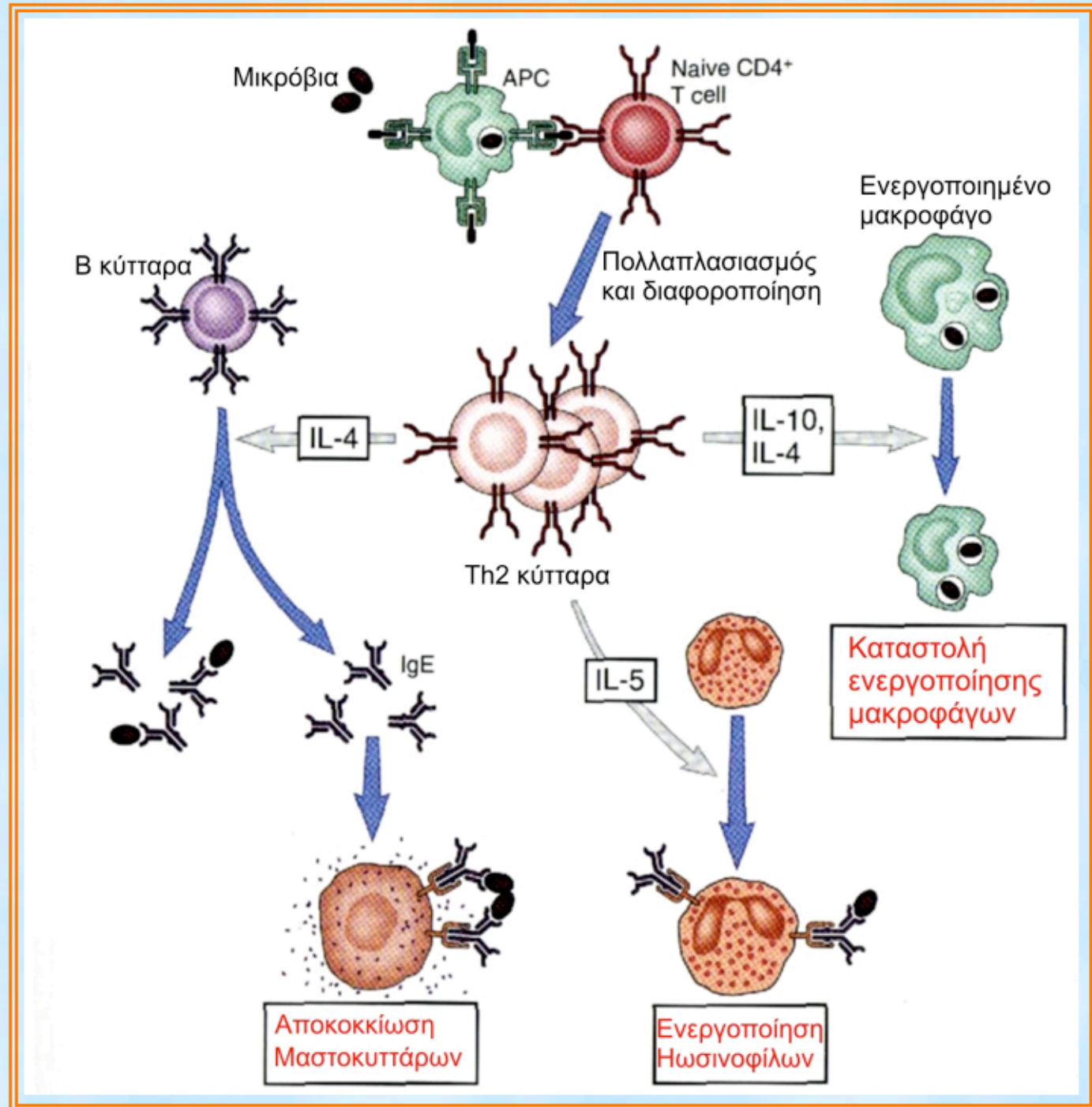




# Th1 ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ



# Th2 ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ





## Cytokine secretion by T helper cells

<b>Cytokine</b>	<b>Th1</b>	<b>Th2</b>
IL-2	+++	-
IFN- $\gamma$	+++	-
TNF- $\alpha$	+++	-
GM-CSF	++	++
IL-3	++	++
IL-4	-	+++
IL-5	-	+++
IL-13	-	+++
IL-10	$\pm$	+

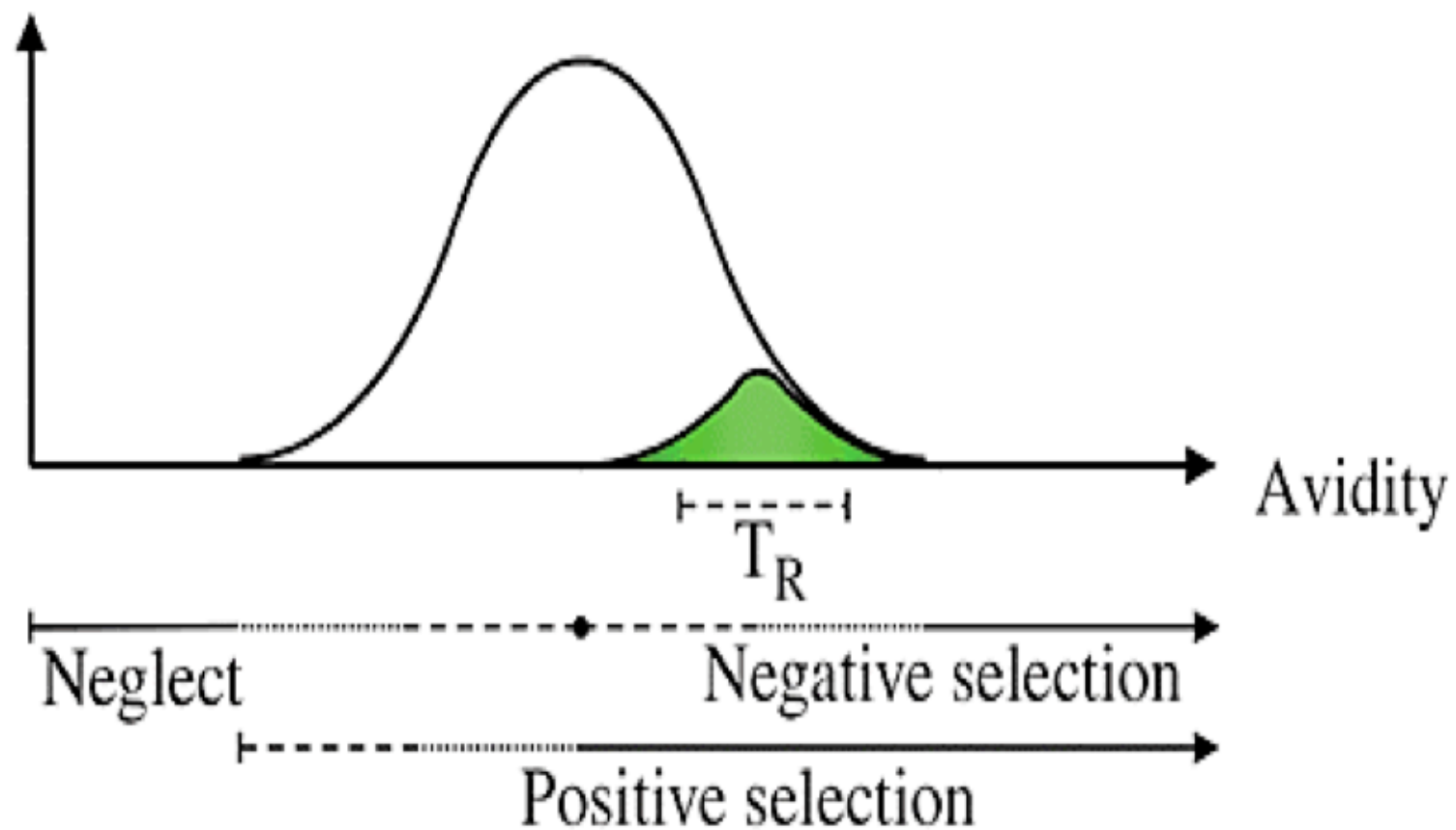
Ρυθμιστικά/κατασταλτικά  
T-κύτταρα

Πρόσφατα (>2000) ανακαλύφθηκε  
υποπληθυσμός T κυττάρων με  
κατασταλτικές / ρυθμιστικές ικανότητες

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



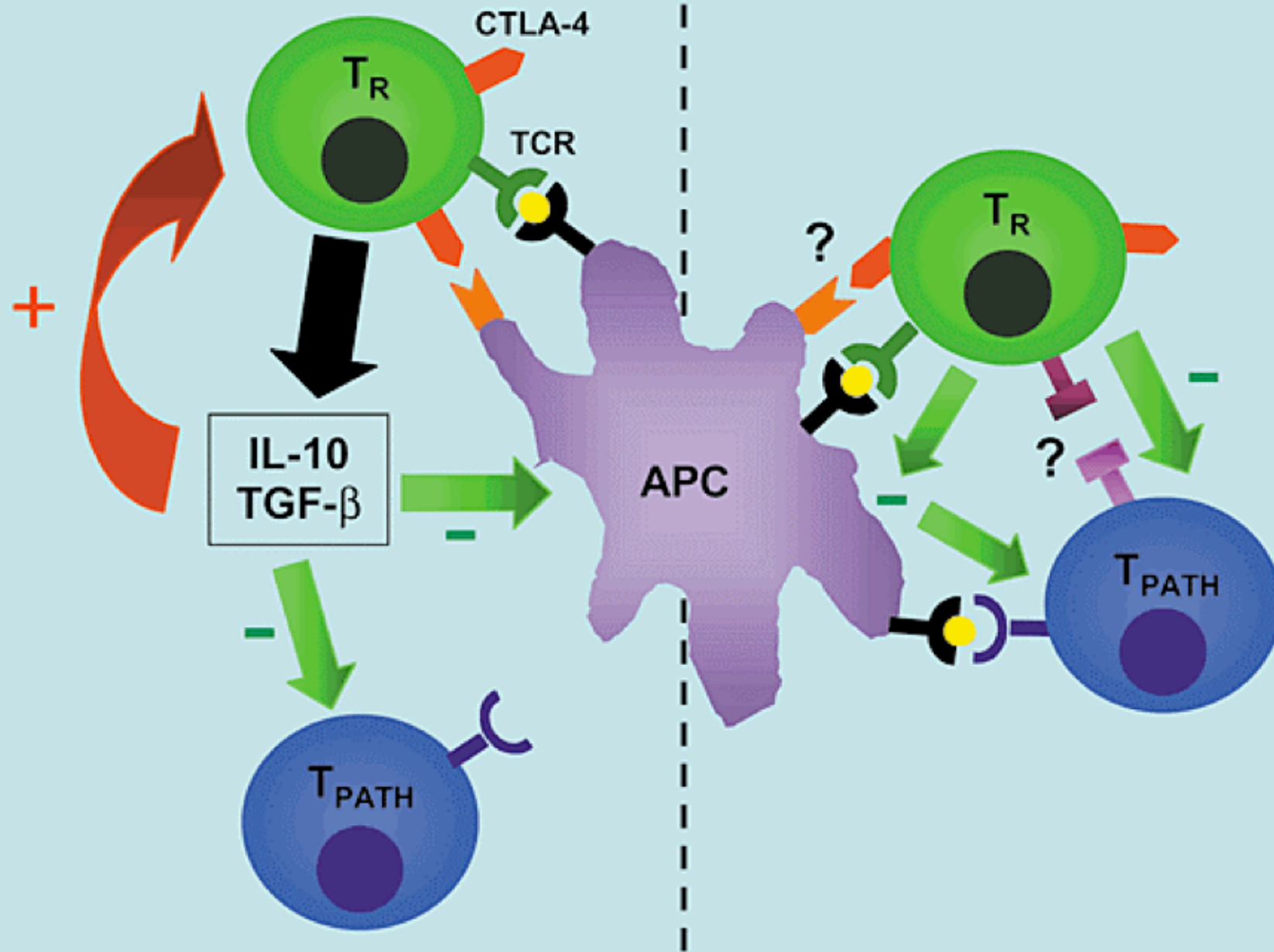
Probability  
of selection



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

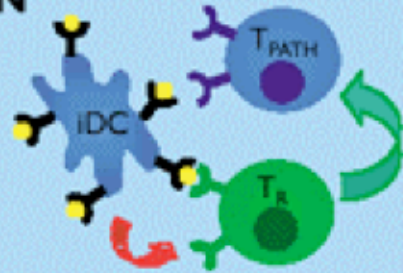
## Cell contact



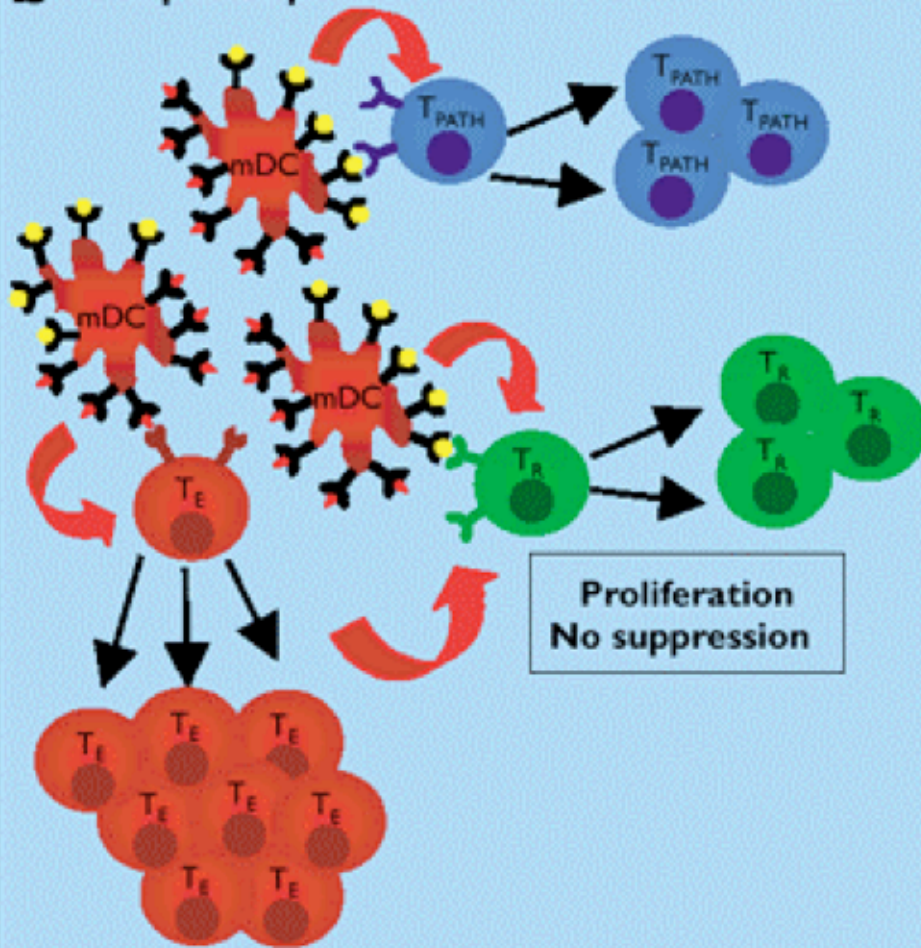
*In vivo*, αυτά τα κύτταρα καταστέλλουν τις αυτοάνοσες ασθένειες μέσω μονοπατιών που ενεργοποιούνται από την επαφή κυττάρων ή/και από μονοπάτια που πυροδοτούνται από κυτοκίνες.



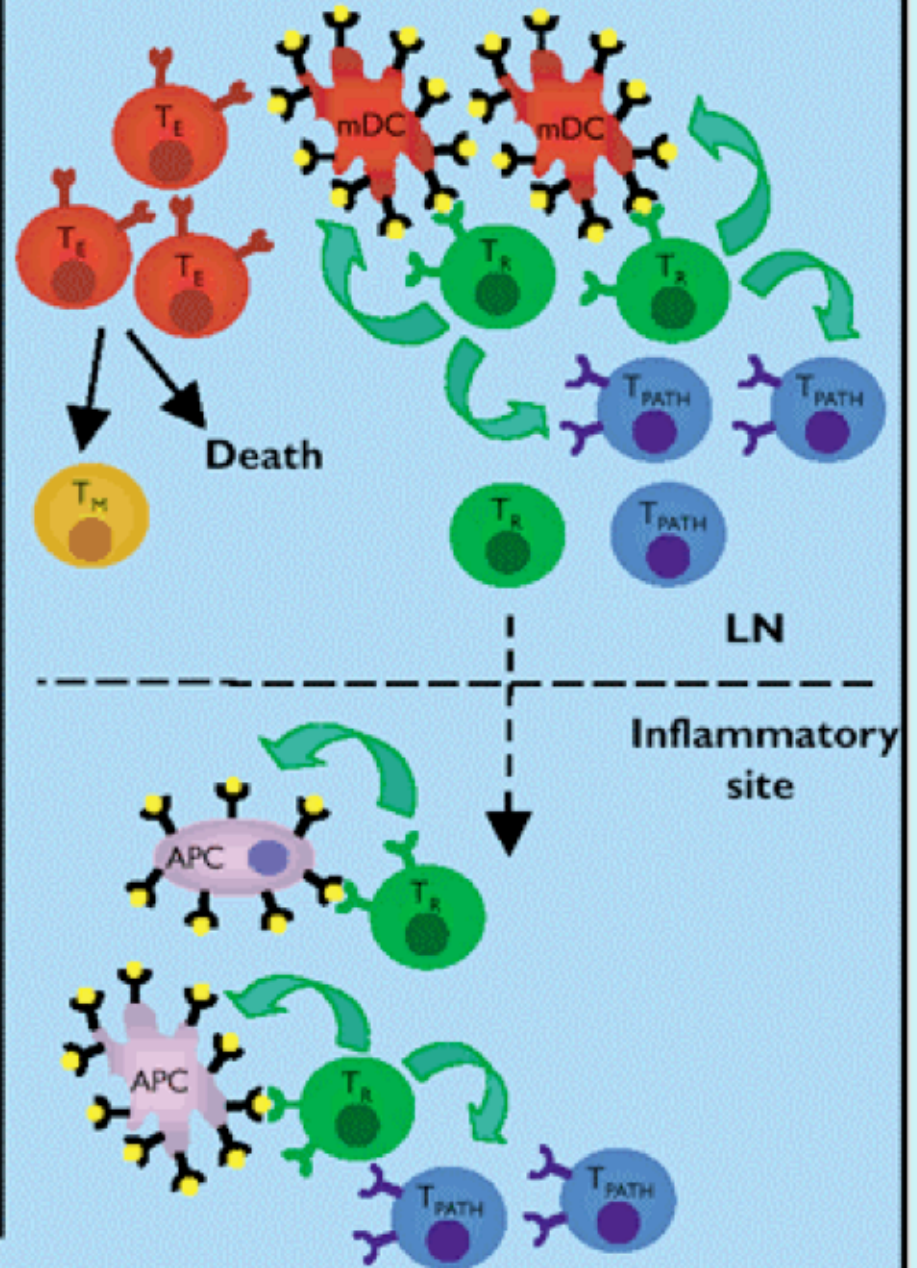
**a** Steady state: LN

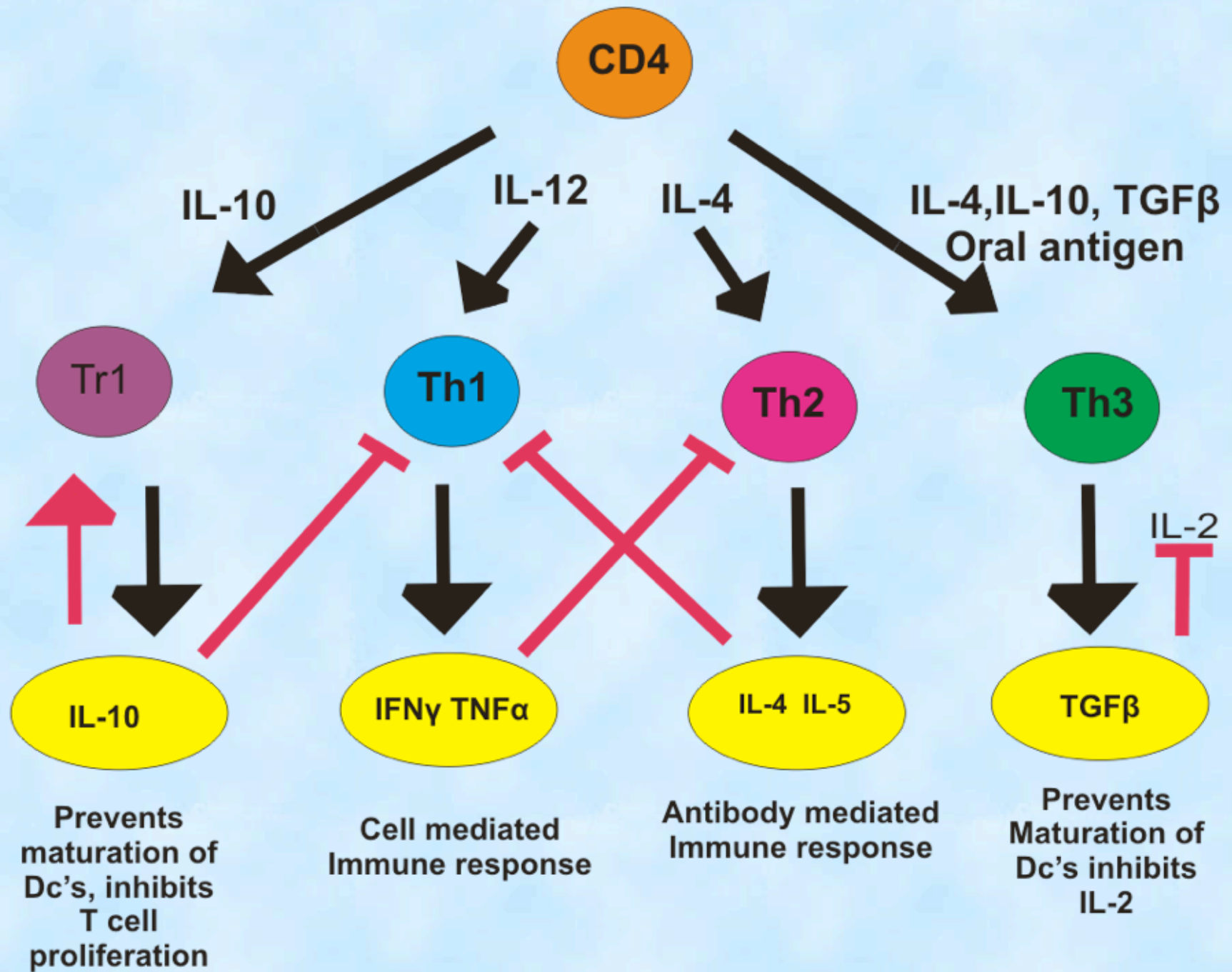


**b** Response phase: LN

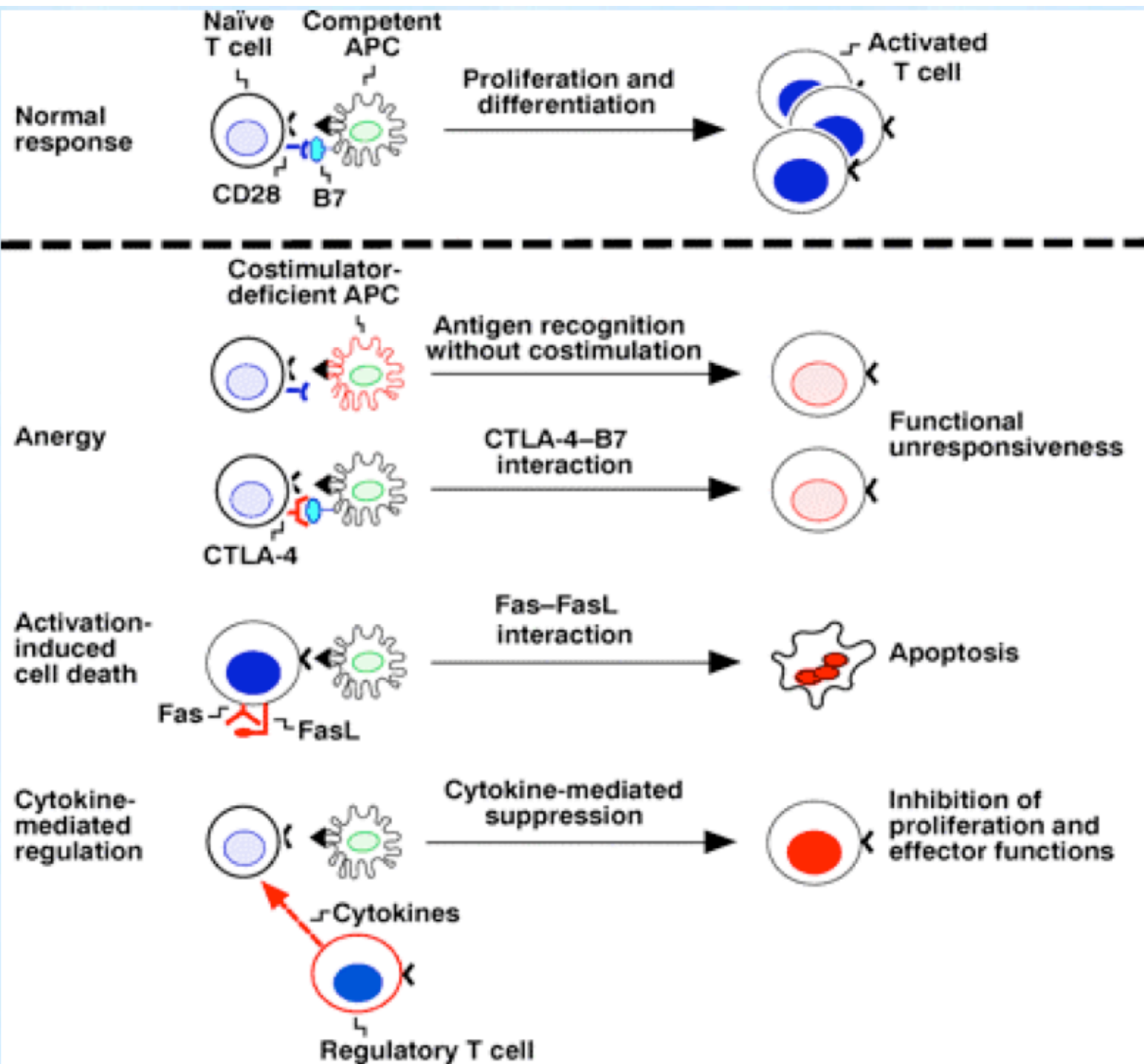


**c** Regulatory phase









- Τα T 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 επιδυσκνεύουν μια πόλωση τύπου Th1 ή Th17).
- Αυξημένοι αριθμοί Tregs ± αυξημένη λειτουργία τους ----> **νεοπλασίες**

Τα ανθρώπινα Τ ρυθμιστικά κύτταρα έχουν τους ακόλουθους φαινοτύπους:

CD4+CD25+

CD4+CD45RO+

CD8+

CD28+

CTLA-4

CD8+CD28-

TCR  $\gamma\delta$ +

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

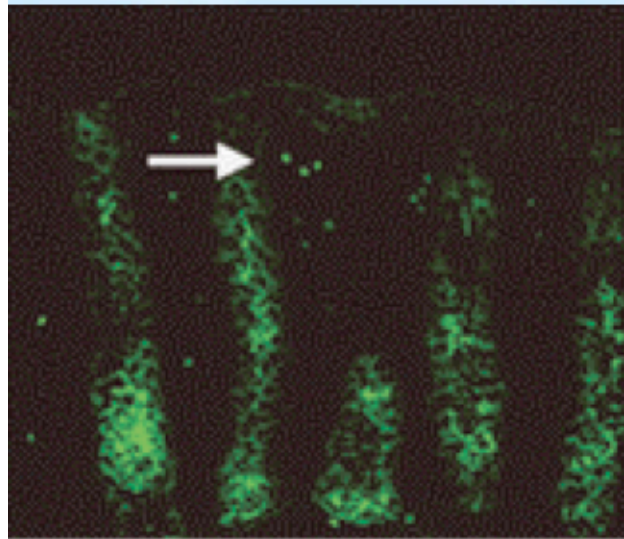
HLA-G

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

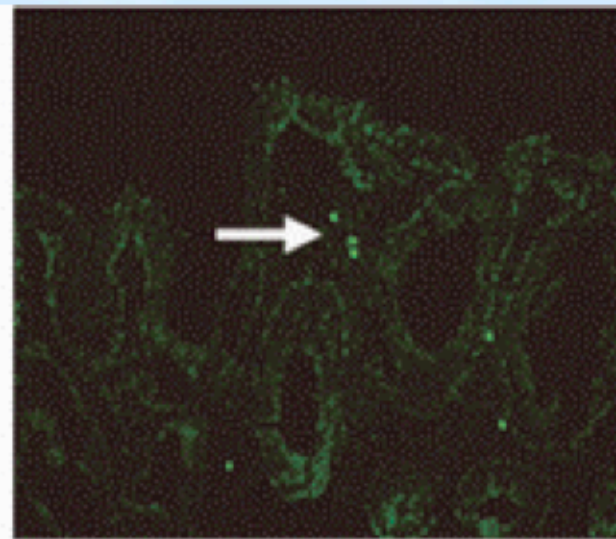
- Στον άνθρωπο, σίγουρα Tregs θεωρούνται αυτά που εκφράζουν τα μόρια επιφανείας **CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high/medium</sup> CD127<sup>low</sup>** και τον μεταγραφικό παράγοντα **FoxP3** στον πυρήνα.
- Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated 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.



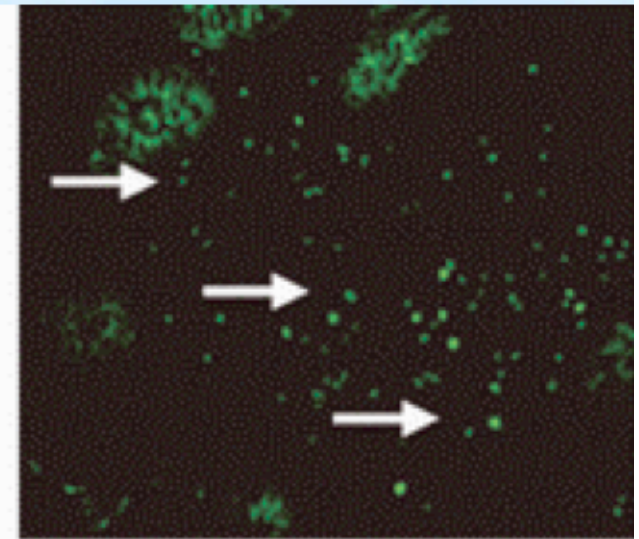
Foxp3 θετικά κύτταρα σε ασθενή με νόσο του Crohn πριν + μετά θεραπείας με το anti-TNF- $\alpha$  αντίσωμα Infliximab



Control



Active Crohn's



Infliximab



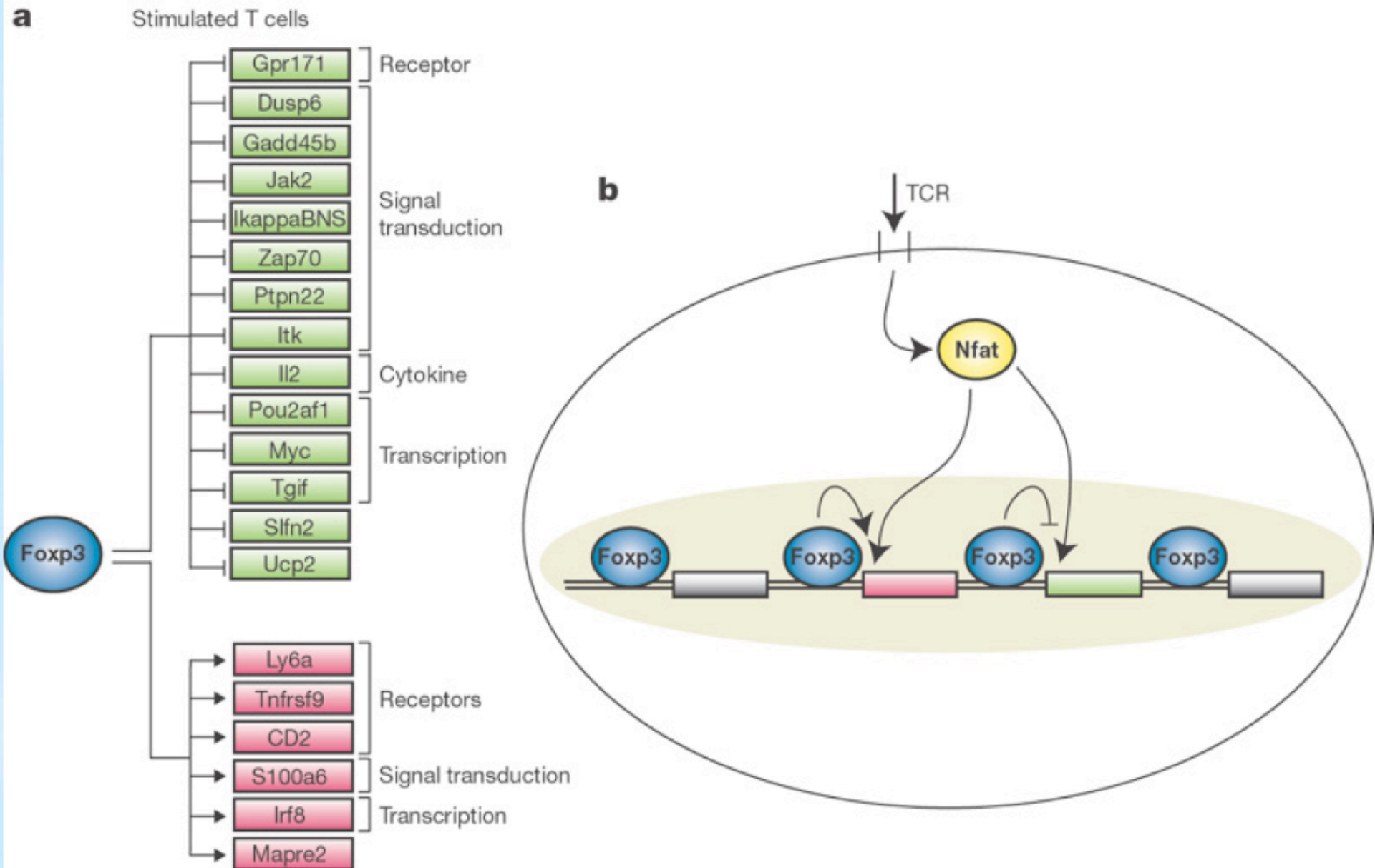
- Μία δεύτερη ομάδα T ρυθμιστικών κυττάρων/καταστολέων μπορούν να επαχθούν *in vivo* με:
  - 1. Στοματική έκθεση στο αντιγόνο,
  - 2. Καλλιέργεια των T λεμφοκυττάρων με κυτοκίνες (κυρίως IL-10),
  - 3. Αλλαγή της λειτουργίας των δενδριτικών κυττάρων με φάρμακα

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.

- 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

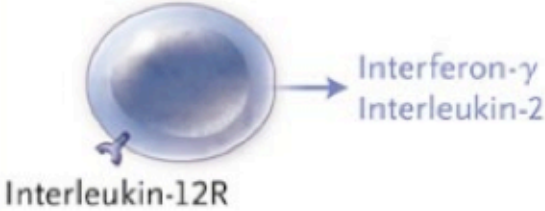
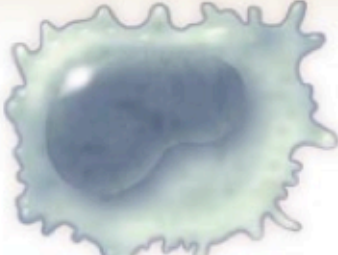


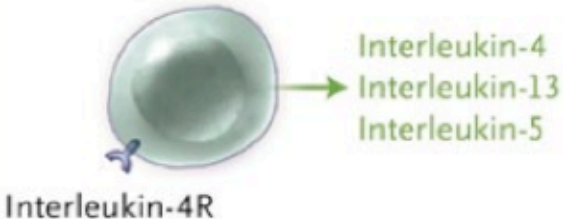

- Μαζικός πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων
- Μαζική λεμφοκυτταρική διήθηση πολλών οργάνων
- Υπεργαμμασφαιρινοπάθεια
- Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία
- Ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα
- Αλλεργίες
- Έκζεμα



# Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells

NEJM, 361(9):888-898, 2009

**Helper T-Cell (Th) Subgroups and Effector Functions.** The cytokine profile (including key cytokine receptors as denoted by R), the effector cell type that is activated, and the corresponding types of infections are shown for each Th subgroup.

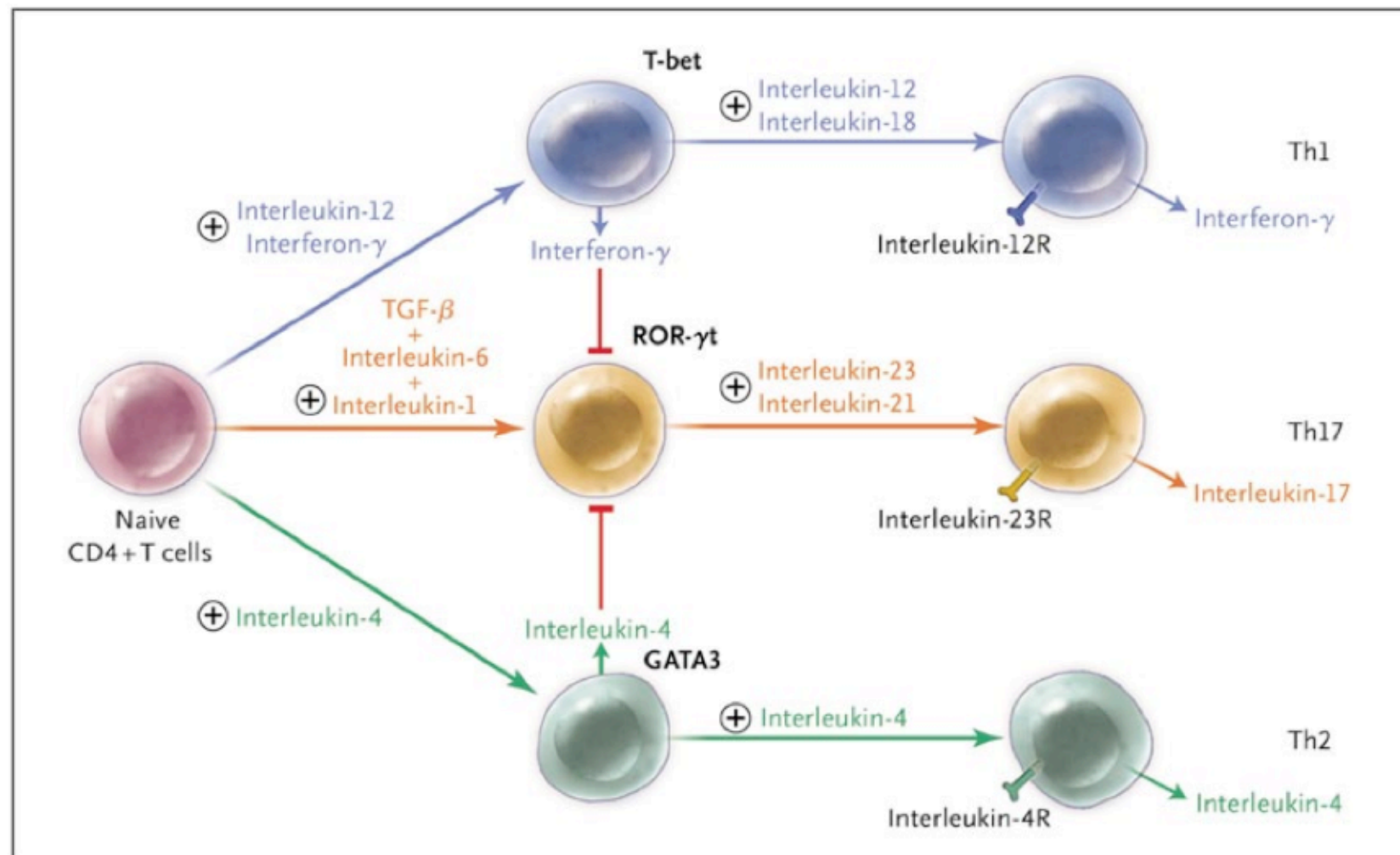
Th Group	Cell Products	Cell Target	Infectious Agents
Th1	 <p>Interleukin-12R</p> <p>Interferon-<math>\gamma</math> Interleukin-2</p>	 <p>Macrophages Dendritic cells</p>	<p>Intracellular bacteria Fungi Viruses</p>
Th17	 <p>Interleukin-23R</p> <p>Interleukin-17A Interleukin-17F Interleukin-21 Interleukin-22</p>	 <p>Neutrophils</p>	<p>Extracellular bacteria Fungi</p>
Th2	 <p>Interleukin-4R</p> <p>Interleukin-4 Interleukin-13 Interleukin-5</p>	 <p>Eosinophils Basophils</p>	<p>Parasites</p>

**Table 1. Sources and Functions of Key Cytokines.\***

<b>Cytokine</b>	<b>Main Cell Source</b>	<b>Function</b>
Interferon- $\gamma$	Th1 cells, natural killer cells, natural killer T cells	Cell-mediated immunity; control of intracellular pathogens; inhibition of Th17 pathway
Interleukin-1	Monocytes, other cells	Proinflammatory cytokine; induction of Th17 cells
Interleukin-4	Th2 cells, natural killer T cells	Antibody-mediated immunity; control of parasitic infections; antiinflammatory effect by inhibition of interleukin-1, TNF, and interleukin-6 production by monocytes; inhibition of Th17 pathway
Interleukin-6	Monocytes, other cells	Induction of acute-phase proteins; effects on B cells; induction of Th17 cells
Interleukin-8	Monocytes, other cells	Major chemokine for neutrophils
Interleukin-12	Monocytes, dendritic cells	Induction of Th1 pathway; acts in synergy with interleukin-18
Interleukin-17	Th17 cells, natural killer cells, natural killer T cells	Proinflammatory cytokine; control of extracellular pathogens; induction of matrix destruction; synergy with TNF and interleukin-1
Interleukin-18	Monocytes, dendritic cells	Induction of Th1 pathway; acts in synergy with interleukin-12
Interleukin-21	Th17 cells	Amplification of Th17 pathway in autocrine fashion
Interleukin-22	Th17 cells	Induction of epithelial-cell proliferation and of antimicrobial proteins in keratinocytes
Interleukin-23	Monocytes, dendritic cells	Th17 expansion and stabilization
Interleukin-25	Th2 cells	Interleukin-17 family member; induction of Th2-associated cytokines; inhibition of interleukin-1 and interleukin-23
TGF- $\beta$	Many cells	Induction of Foxp3 <sup>+</sup> regulatory T cells in the absence of interleukin-6; together with interleukin-6, interleukin-21, and interleukin-1 $\beta$ , induction of Th17 cells
TNF	Monocytes, dendritic cells	Proinflammatory cytokine; acts synergistically with interleukin-17

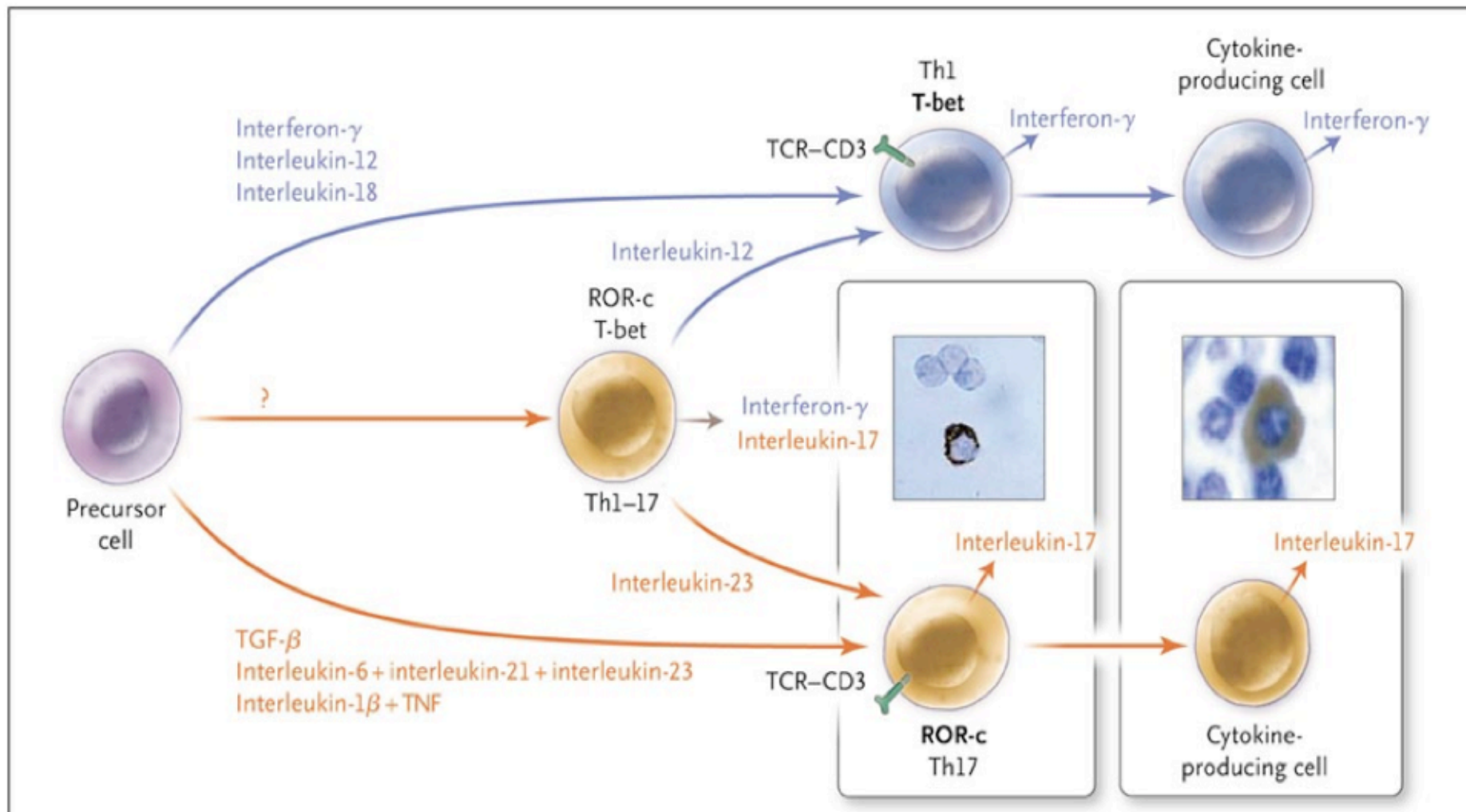
\* TGF- $\beta$  denotes transforming growth factor  $\beta$ , and TNF tumor necrosis factor.

**Differentiation of Mouse Th17 Cells.** Naive mouse T cells can differentiate into one of three effector helper T-cell (Th) subgroups. Each pathway is under the control of a different set of cytokines. The Th17 pathway is under the control of TGF- $\beta$  + IL-6 + IL-1 or TGF- $\beta$  + IL-21 followed by IL-23. This pathway is inhibited by IFN- $\gamma$  and IL-4. The transcription factor (T-bet, ROR- $\gamma$ t, or GATA3) characteristic of each pathway is shown.



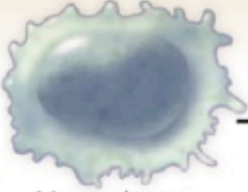






**Differentiation of Human Th17 Cells.** Key cytokines for the development of human Th17 cells are TGF- $\beta$  plus IL-6, IL-21, and the inflammatory cytokine IL-1, followed by IL-23. In addition to the classic Th1 and Th17 subgroups, a mixed Th1-Th17 subgroup has been identified, which expresses both T-bet and ROR-c. In inflammatory tissues, fully differentiated cytokine-producing cells have been observed. The micrographs show immunohistochemical staining of the cytoplasm for antibodies against IL-17 (brown) in human blood CD4<sup>+</sup> T cells activated in vitro for 24h and a plasma-cell-like cell in a section of rheumatoid synovium. These cell have lost their TCR and the CD3 complex.





**Effects of IL-17 on Cell Functions and Its Role in the Pathophysiology of Diseases.** For each key effect of IL-17, the target-cell type involved and the products released in response to IL-17 are shown. Each biologic effect is linked to examples of conditions in which an association with the presence of IL-17 has been observed. CRP=C-reactive protein, MMP=matrix metalloproteinase, RANKL=receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand.

Target-Cell Type	Products Released	Biologic Effect	Condition
 Macrophage, dendritic cell	Interleukin-1 TNF Interleukin-6 CRP	Inflammation	Infections Psoriasis Graft rejection
 Endothelial cell	Interleukin-6 Coagulation MMP	Vessel activation	Reperfusion injury Thrombosis Atherosclerosis
 Fibroblast	Interleukin-6 Chemokines Growth factors MMP	Matrix destruction	Multiple sclerosis Crohn's disease
 Osteoblast	RANKL MMP Osteoclastogenesis	Bone erosion	Prosthesis loosening Periodontal disease Rheumatoid arthritis
 Chondrocyte	MMP	Cartilage damage	