

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού
συστήματος
Λεμφοποίηση
Επιλογή των κλώνων
Διαφοροποίηση λεμφοκυττάρων

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

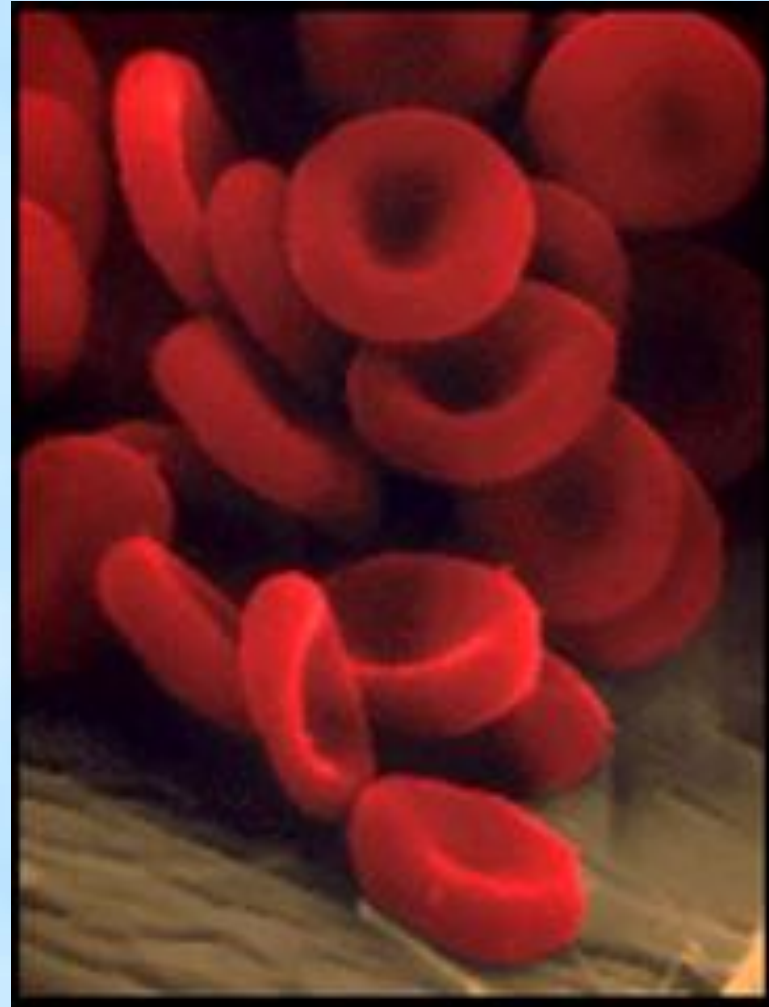
Blood & tissues

- Erythrocytes
- Platelets

- White blood cells (WBC):
- Polymorphonuclear leukocytes
- Agranular leukocytes
- Lymphocytes

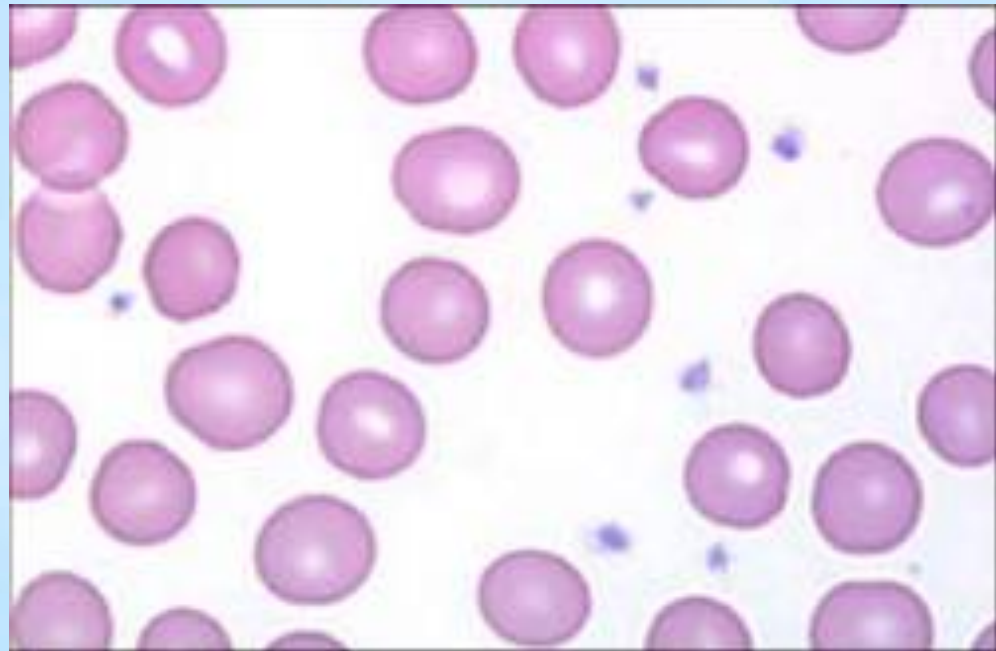
Erythrocytes

- Anuclear sacs of hemoglobin
- Play no role in the immune response
- But
- Can be **immunogenic**



Platelets

- Megakaryocytic fragments in blood
- Involved in clotting and inflammation
- Can be **immunogenic**



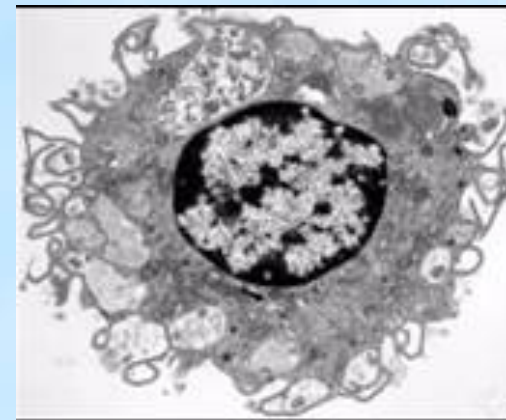
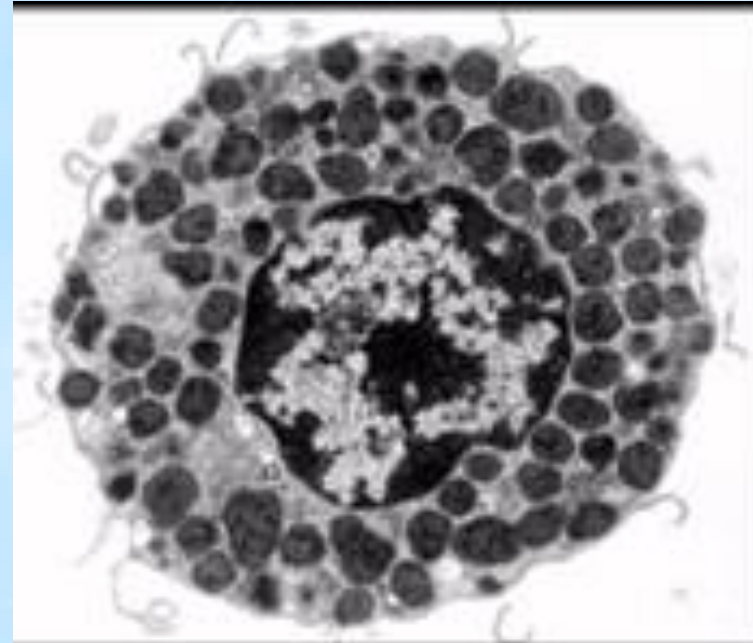
Polymorphonuclear leukocytes

- Basophils
- Eosinophils
- Neutrophils

- Contain granules and are termed «granulocytes»

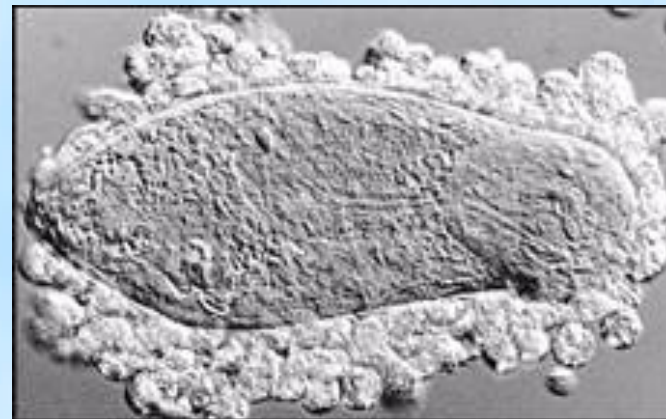
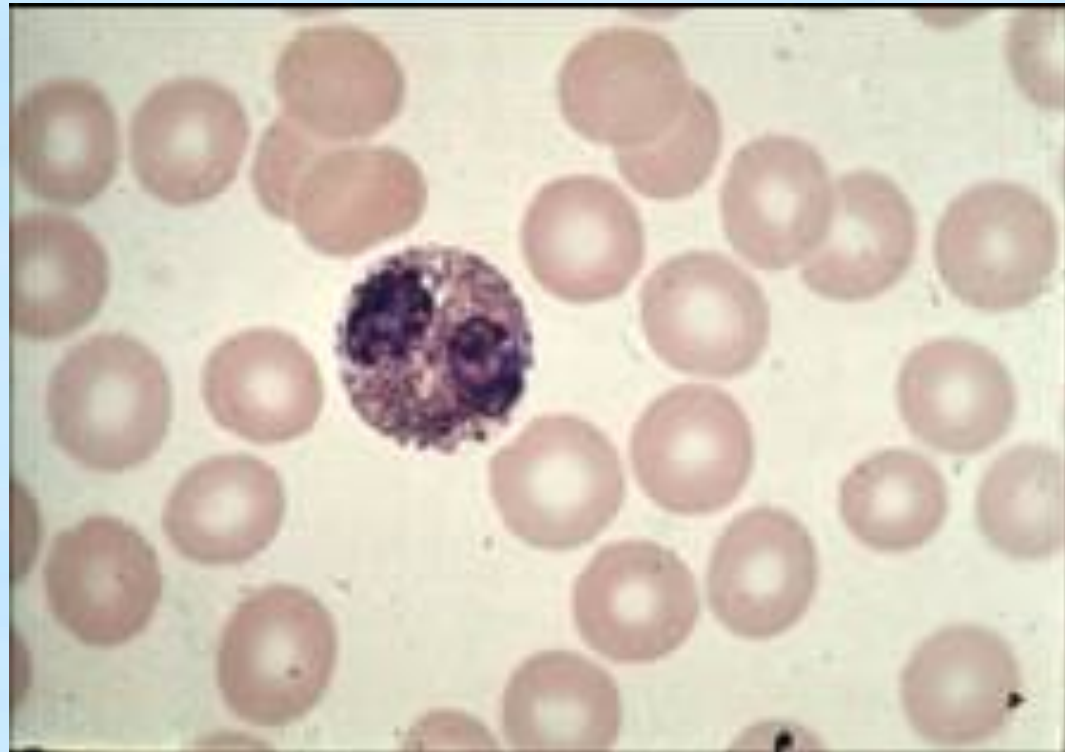
Basophils & tissue mast cells

- Stain with basic dyes
- **Help mediate allergy and inflammatory response**
- Release histamine and other inflammatory mediators from granules
- Make up only about 0.5% of circulating WBC



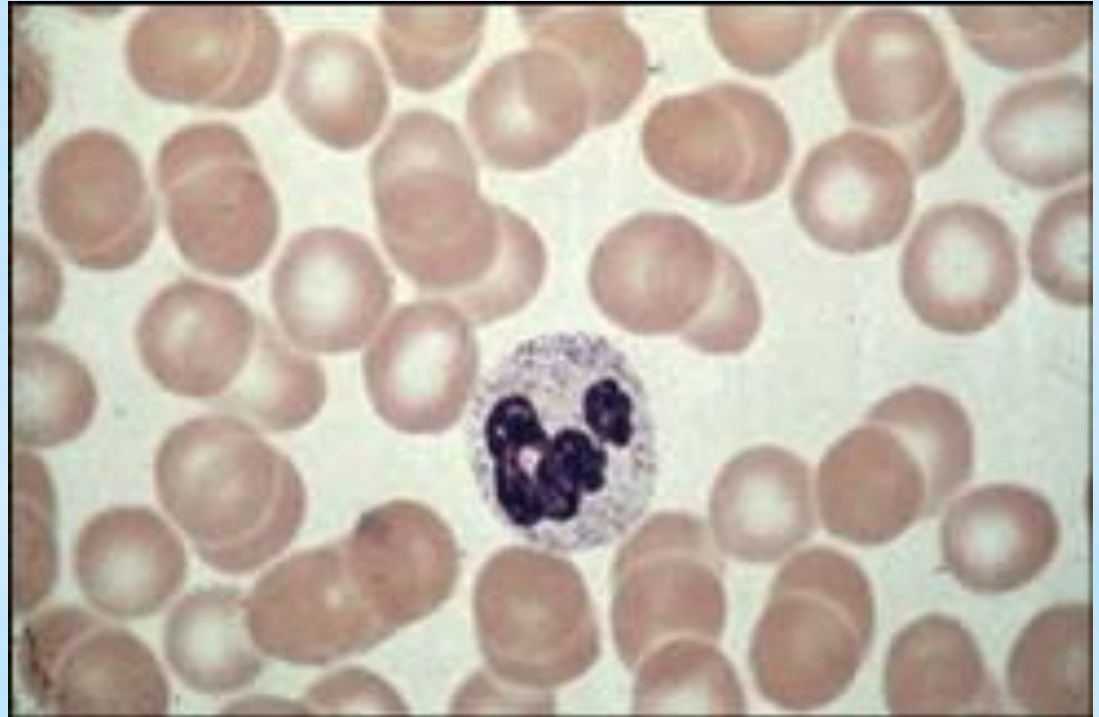
Eosinophils

- Stain with acidic dye eosin
- Function in parasitic diseases and allergy
- Phagocytic
- 1-3% of circulating WBC



Neutrophils

- Stain with both acidic and basic dyes
- Professional phagocytes of innate immunity
- First to arrive at inflammatory site
- Destruction of phagocytosed material by granules
- 50-70% of circulating WBC



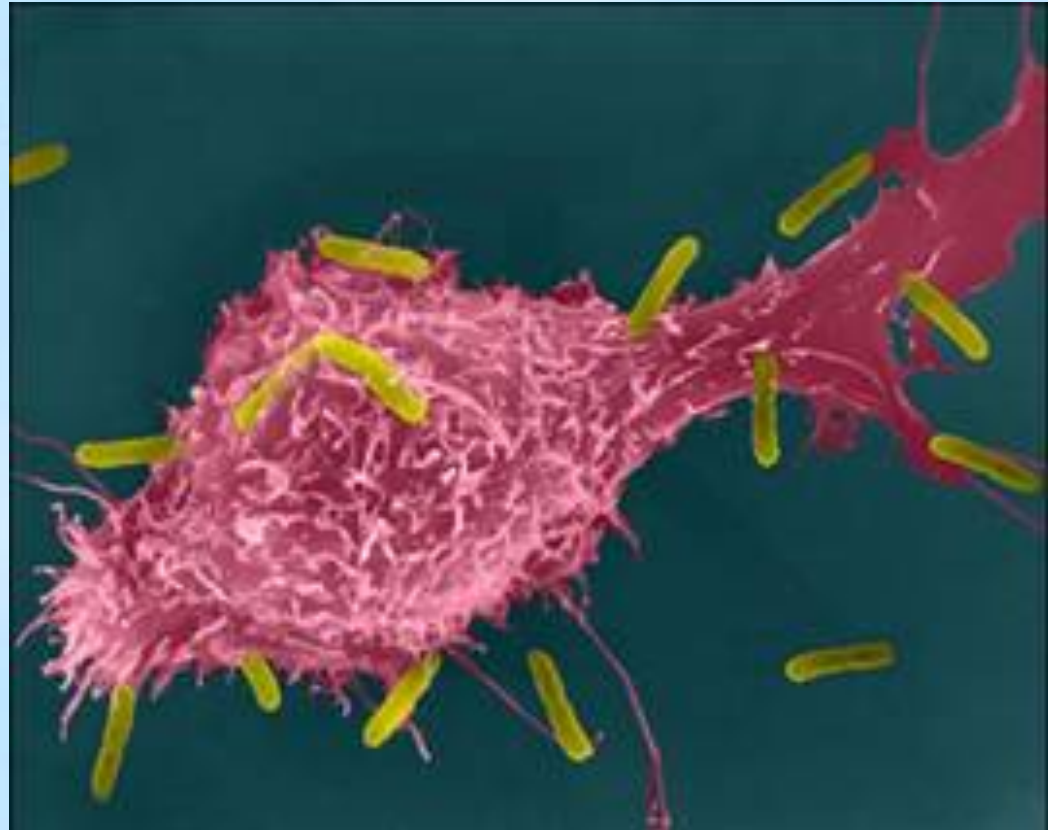
Agranular leukocytes - monocytes

- **Phagocytic**
- Short life-span in blood
- Move to tissues where they differentiate into macrophages
- 3-7% of circulating WBC

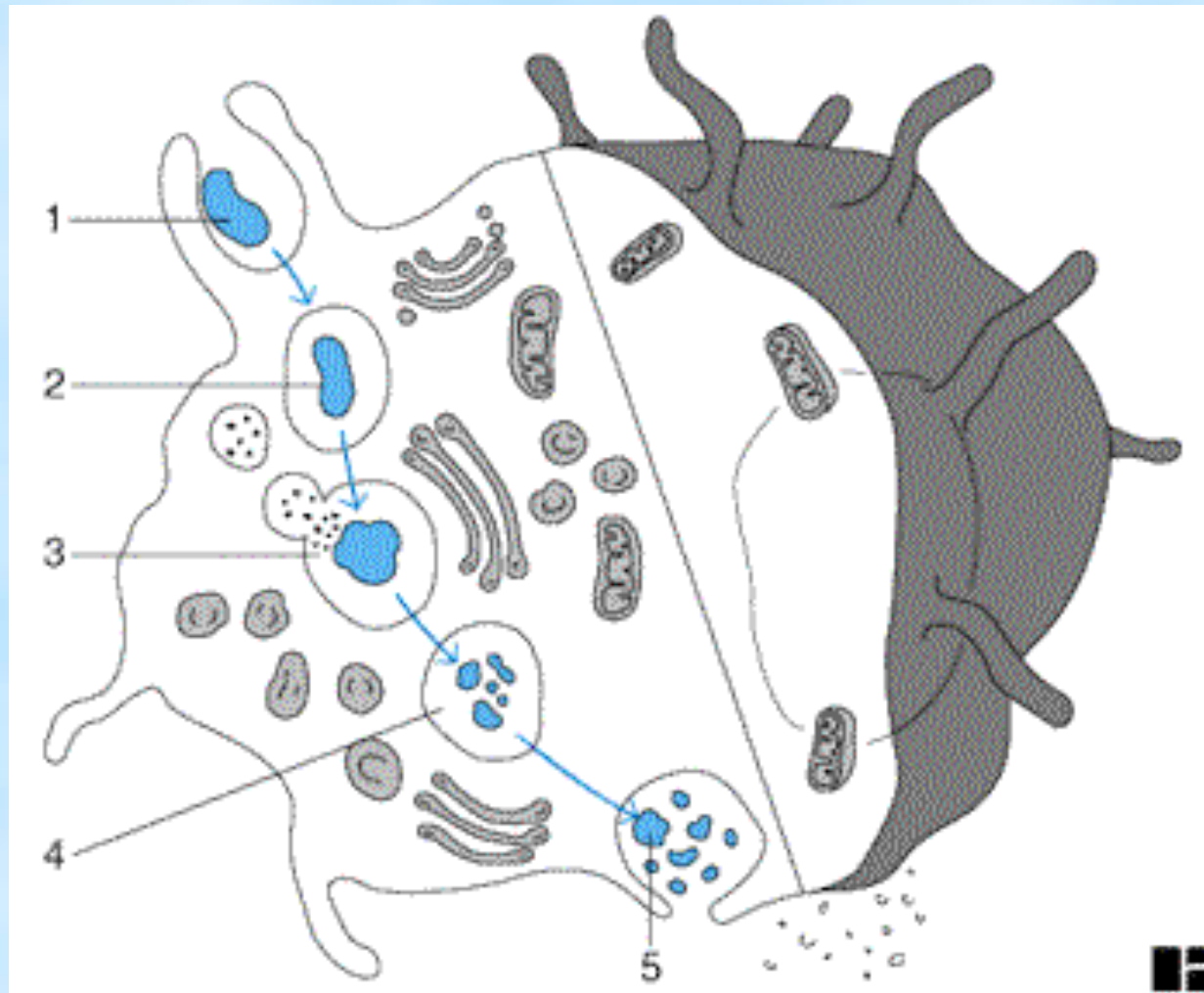


Macrophages (MF)

- Typically differentiate from blood monocytes
- Exist as free or fixed MF
- Exist as resting OR induced (primed) OR activated
- **Are activated by Th cells and bacterial cell walls**
- Tissue-dependent terminology

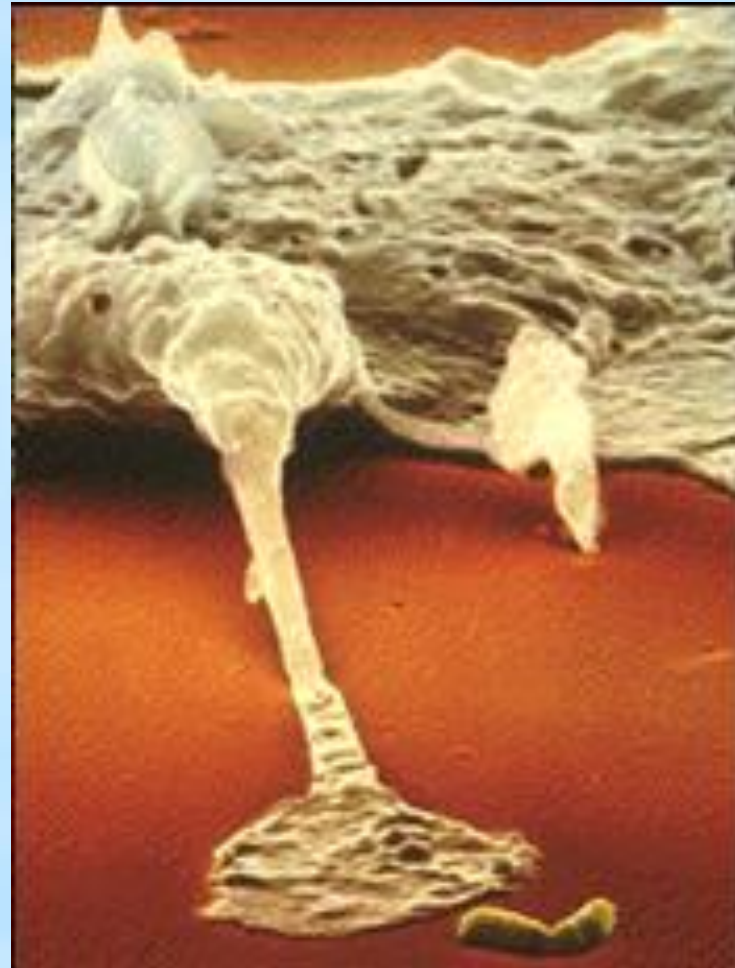


Phagocytosis

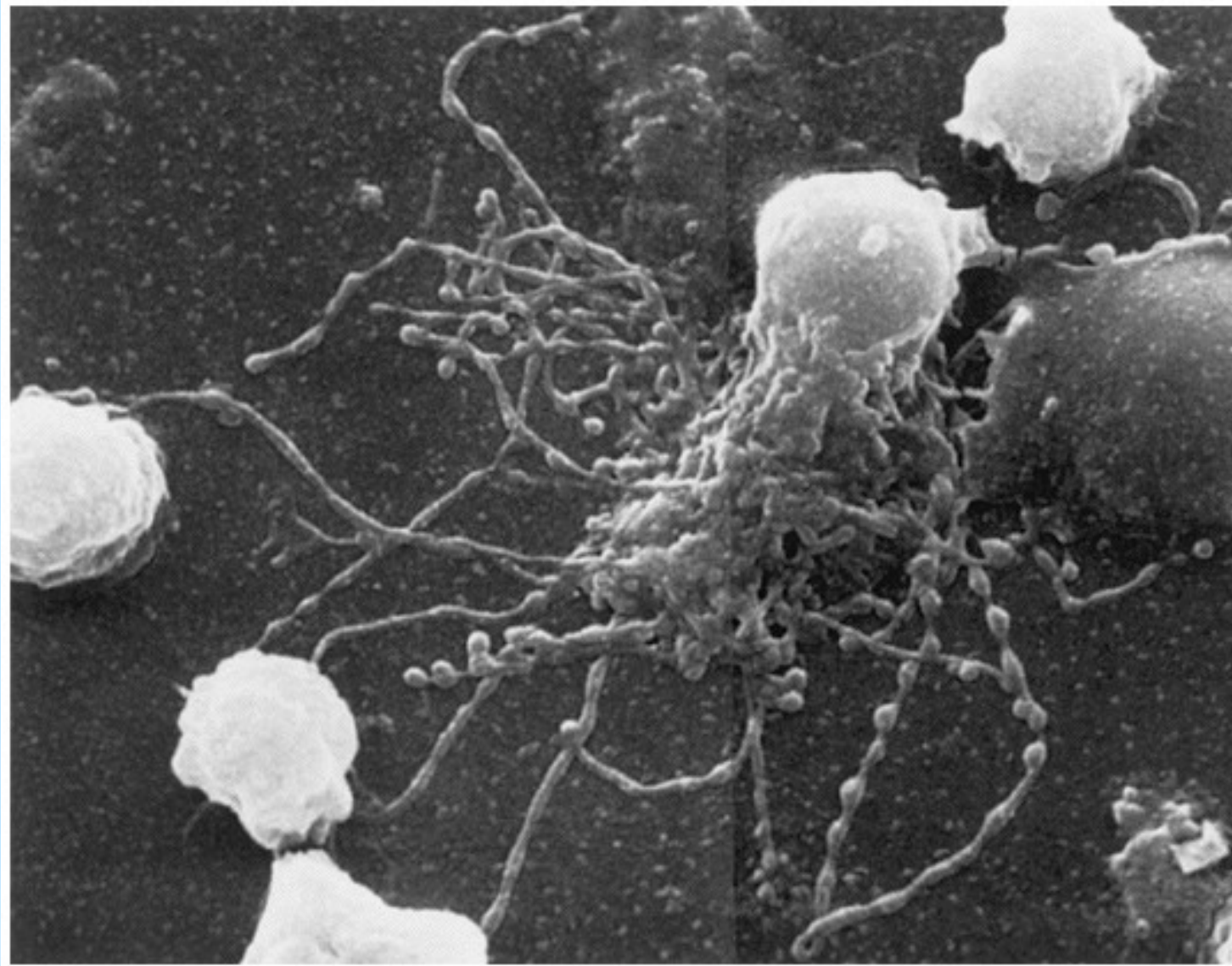


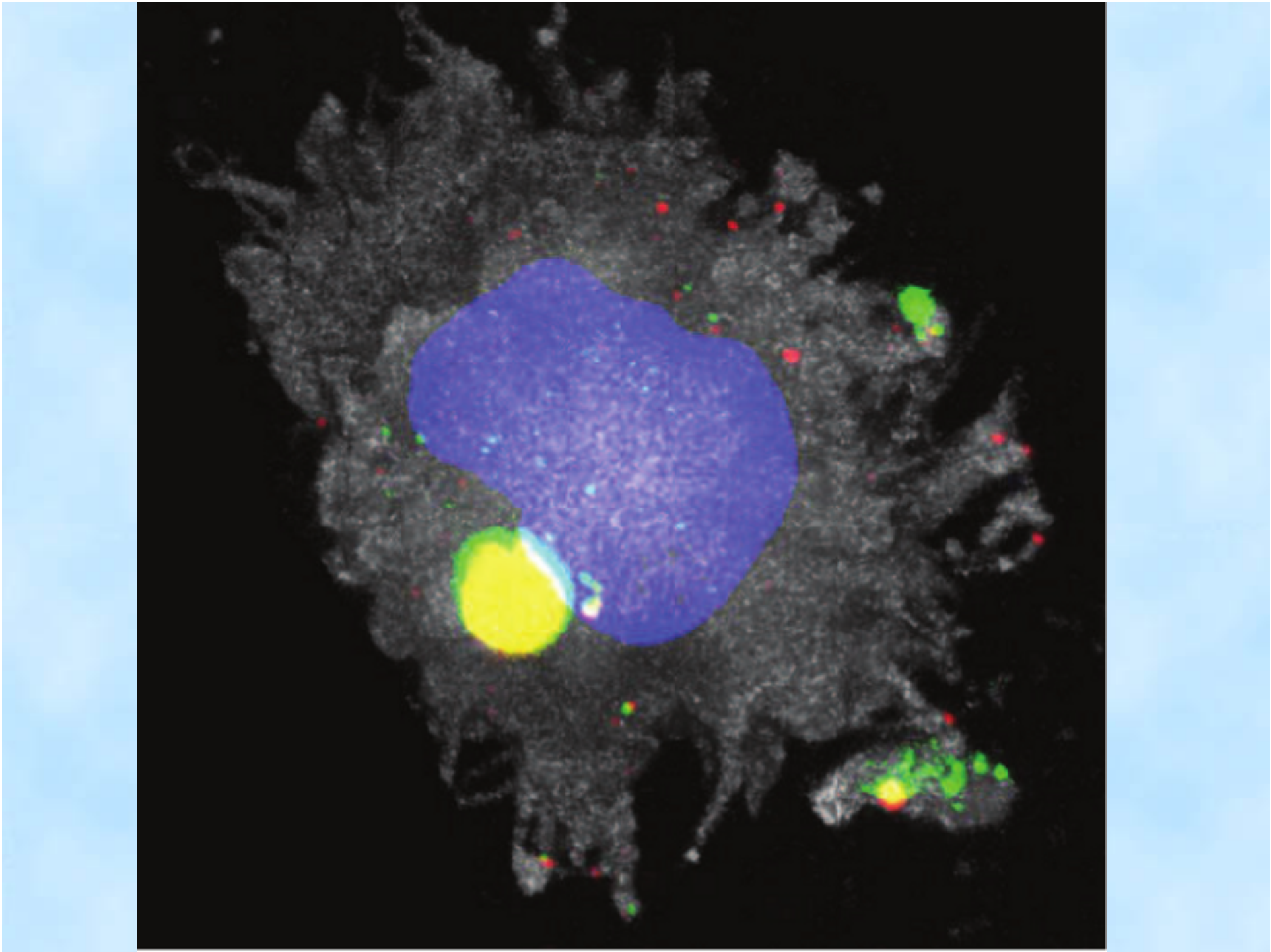
Tissue-specific MF

- Lungs -> alveolar MF
- Liver -> Kupffer cells
- Kidney -> mesangial cells
- Brain -> microglial cells
- Bone -> osteoclasts
- Connective tissue -> histiocytes



Tissue dendritic cells





- Professional antigen presenting cells (APC)
- After capturing Ag, they move into blood or lymph for eventual deposition into 2ry lymphoid organs

- Classified by their location:

- Langerhans cells - epidermis + mucous membranes
- Interstitial DC - organs
- Interdigitating DC - T-cell areas of 2ry lymphoid organs
- Circulating DC
- Follicular DC - in B-cell-rich areas (not APC)

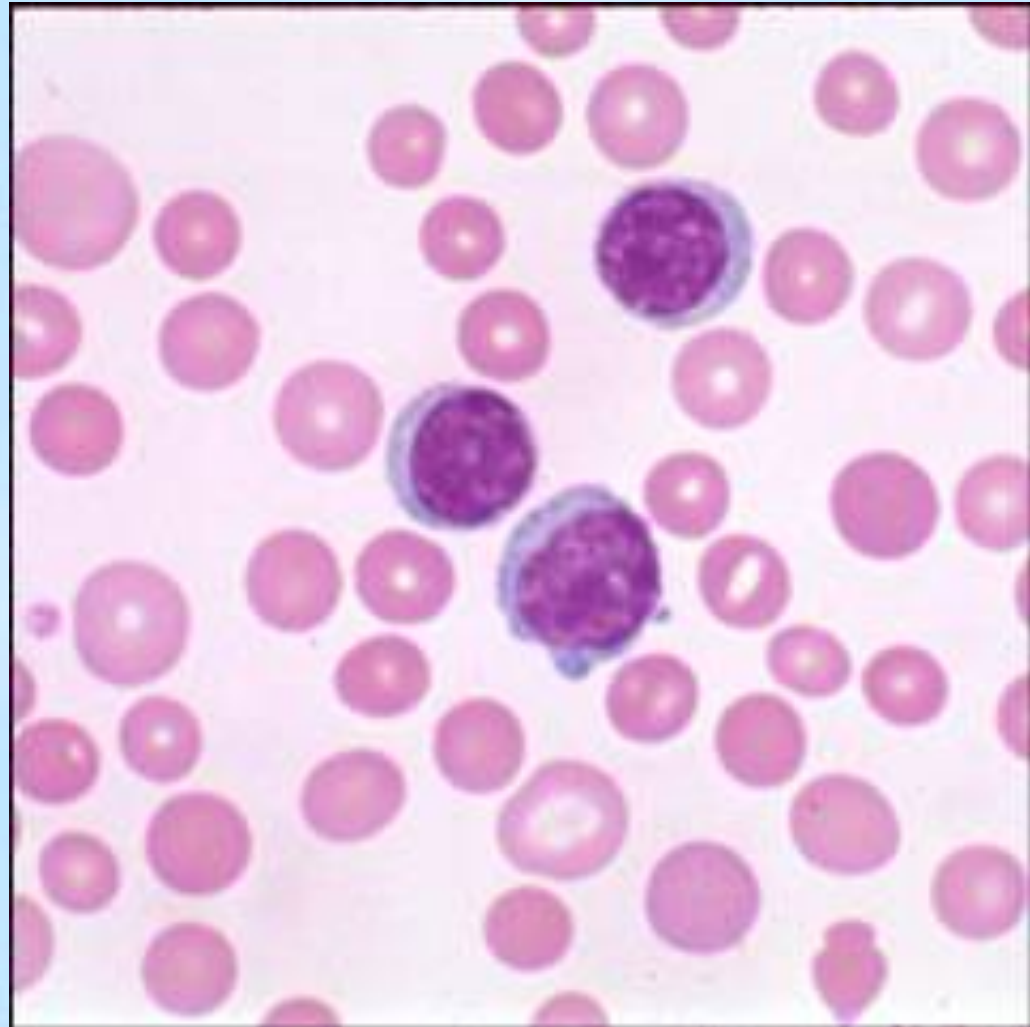
Natural killer cells (NK cells)

- Type of large granular lymphocyte (LGL) or null cell
- Important in tumor or viral immunity
- Recognize cells that have a reduction in MHC class I

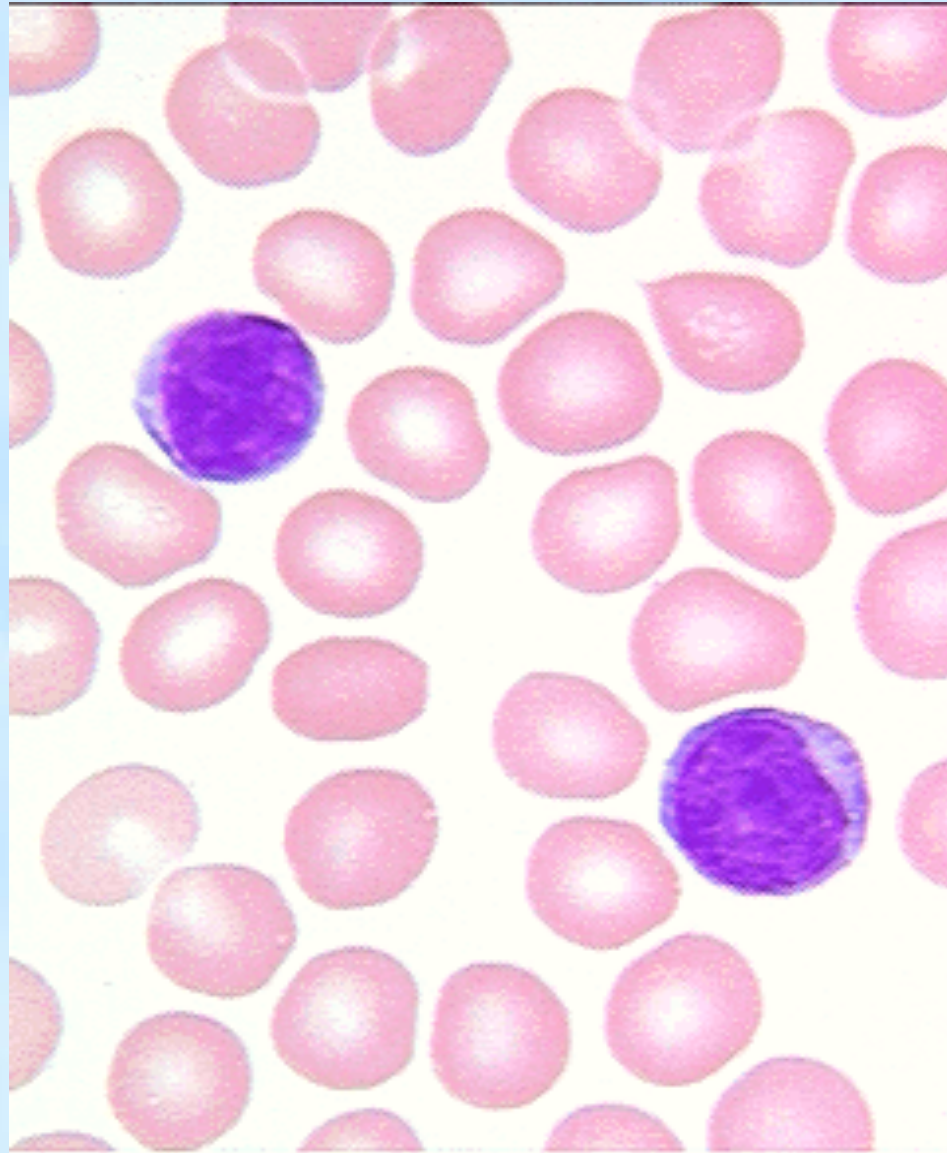


Lymphocytes

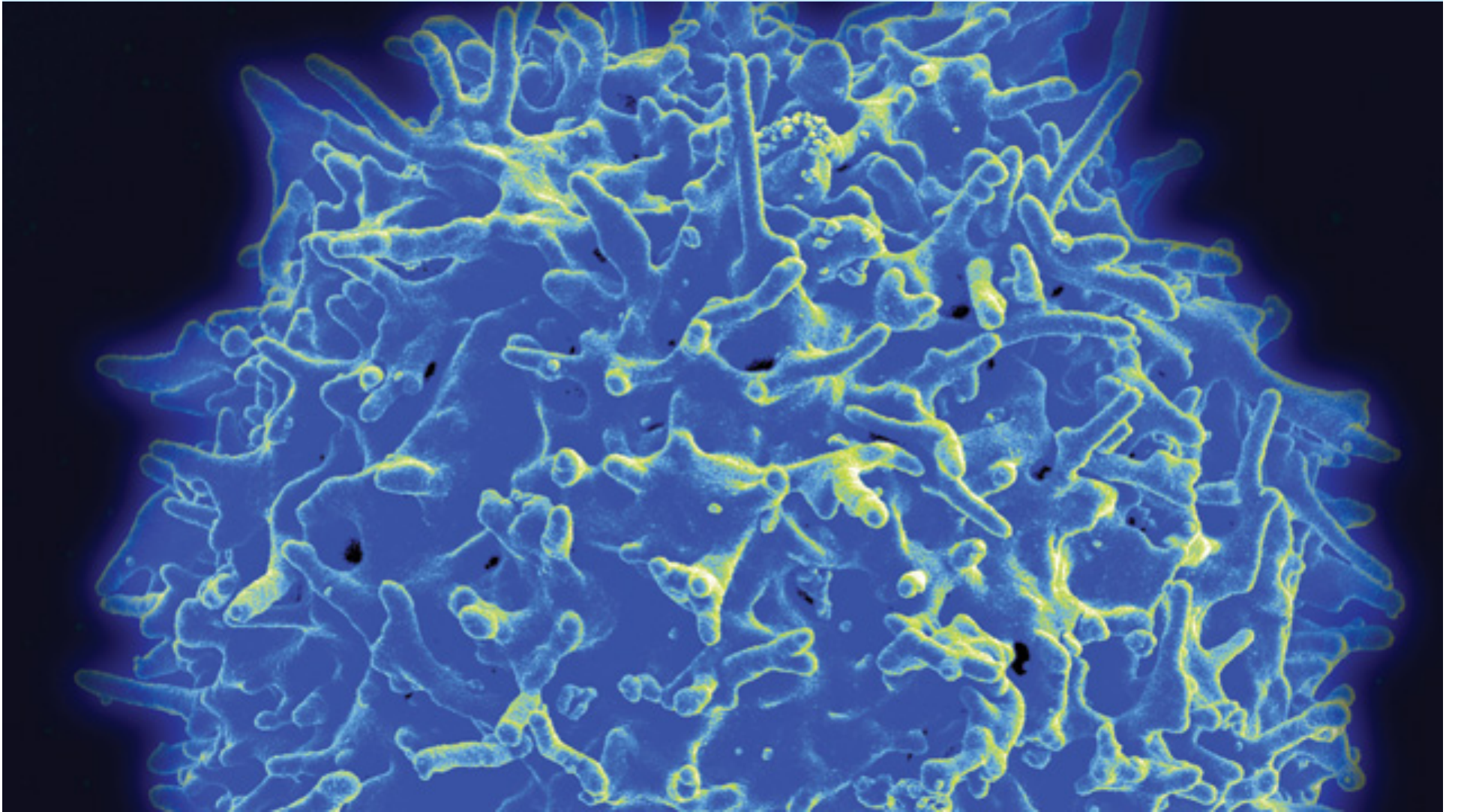
- T or B
- Function in acquired immunity
- 20-35% of circulating WBC



Λεμφοκύτταρα



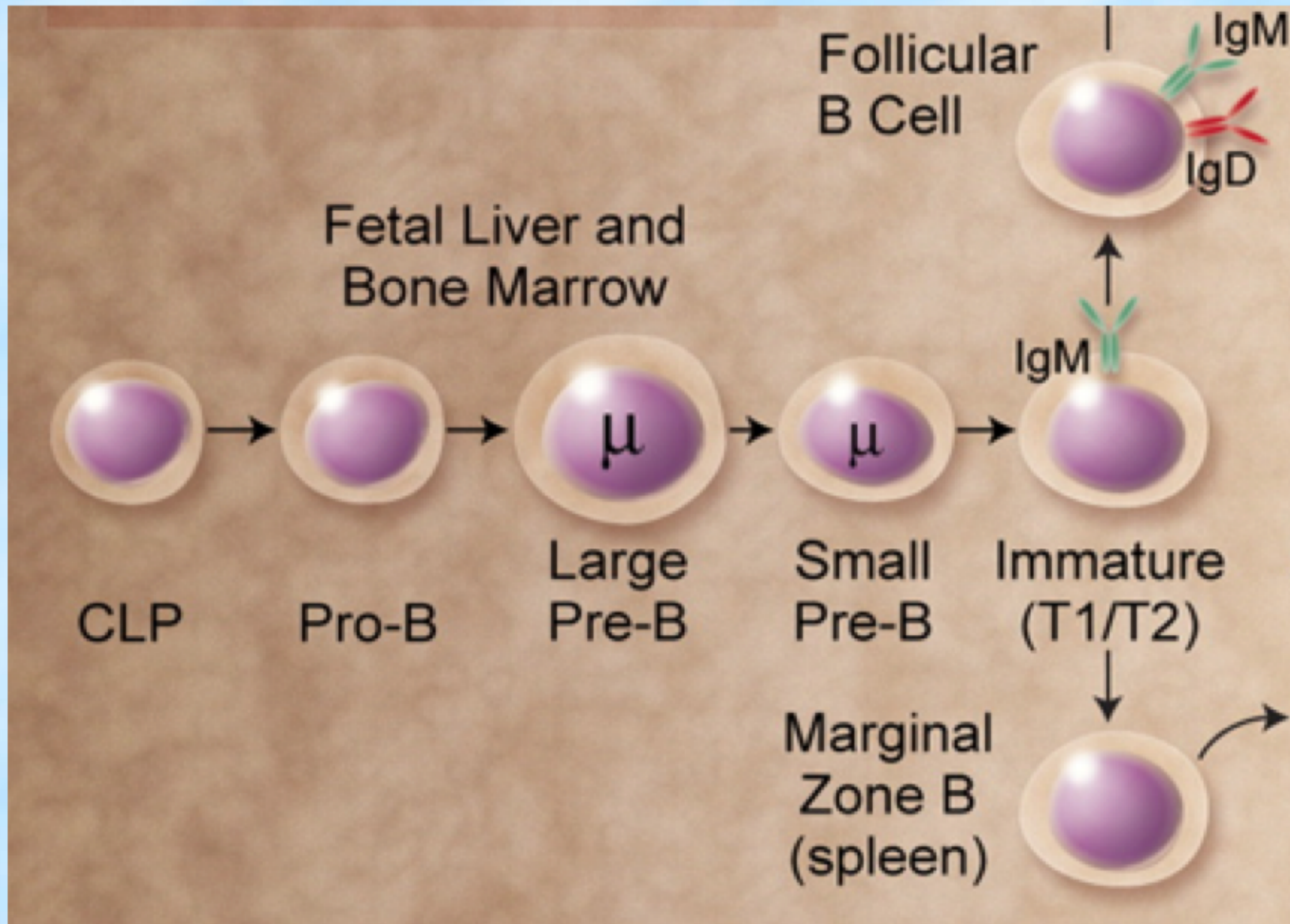




B-κύτταρα

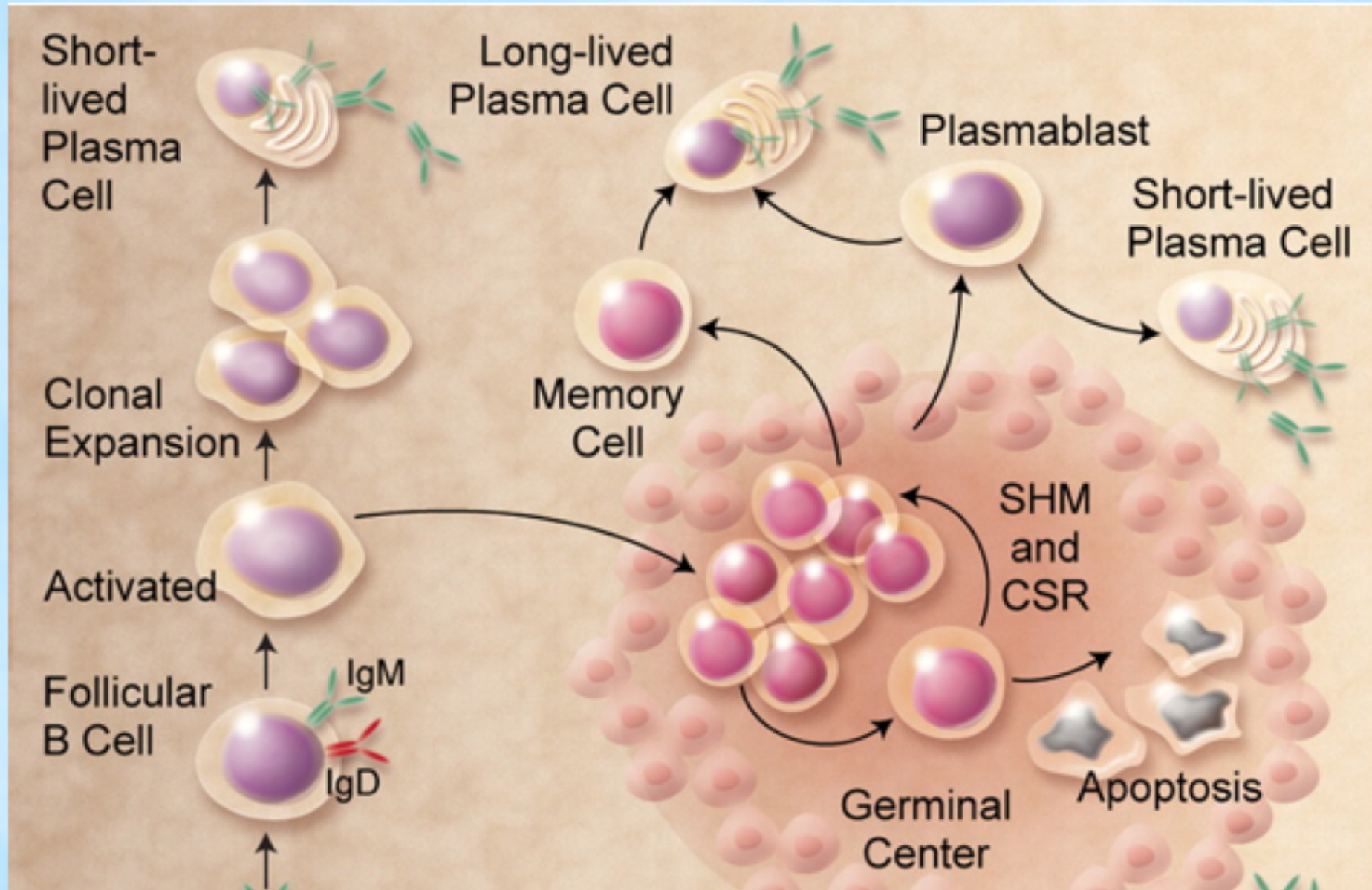
Δημιουργία Β κυττάρων

CLP=common lymphoid progenitor

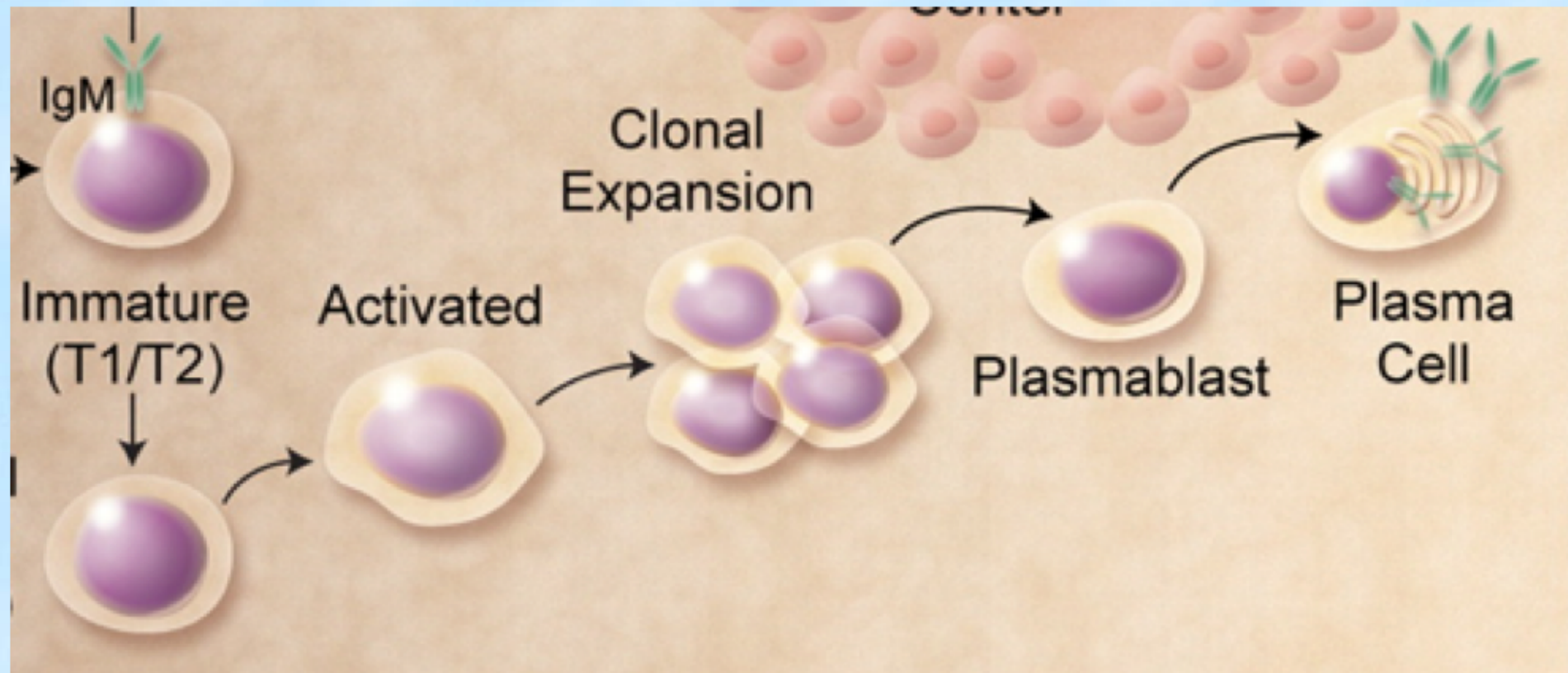


SHM, somatic hypermutation
CSR, class switch recombination

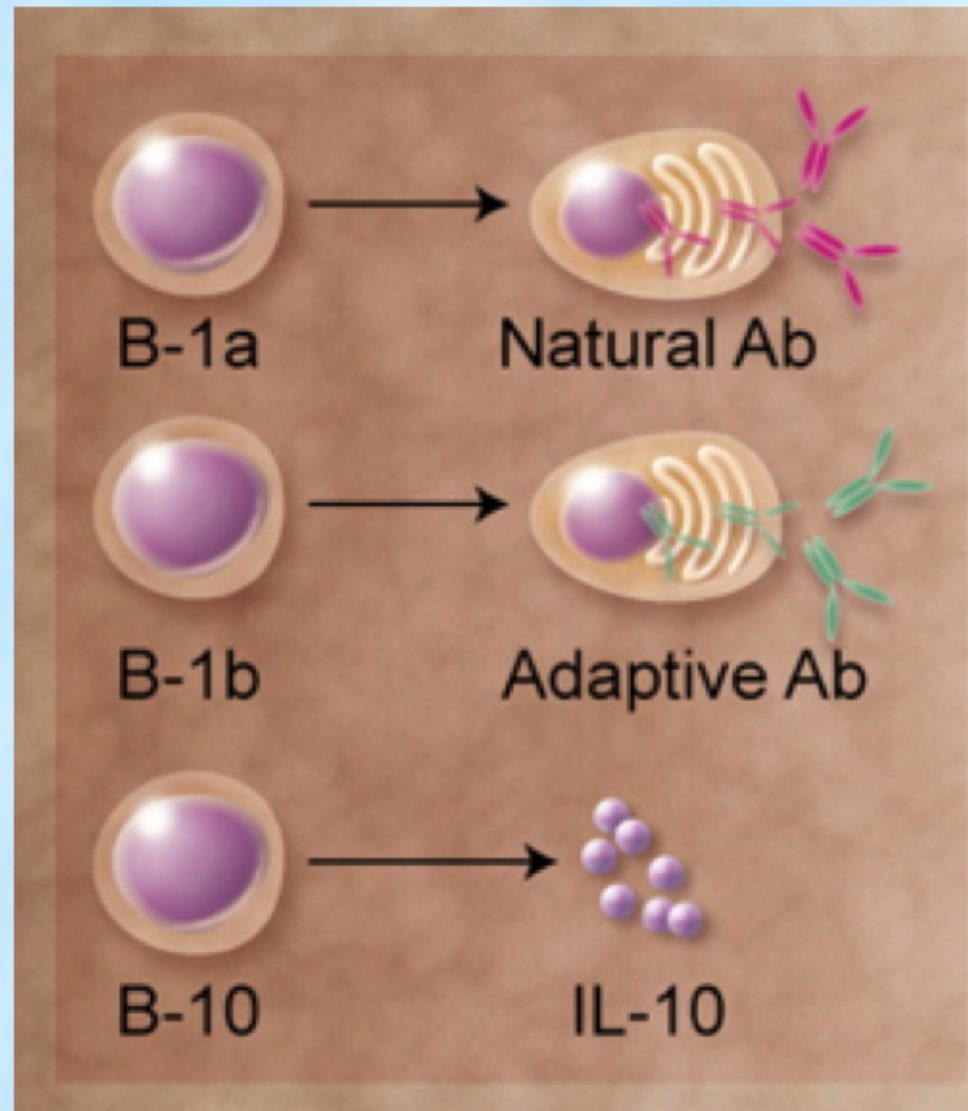
Περιφέρεια & λεμφαδένες



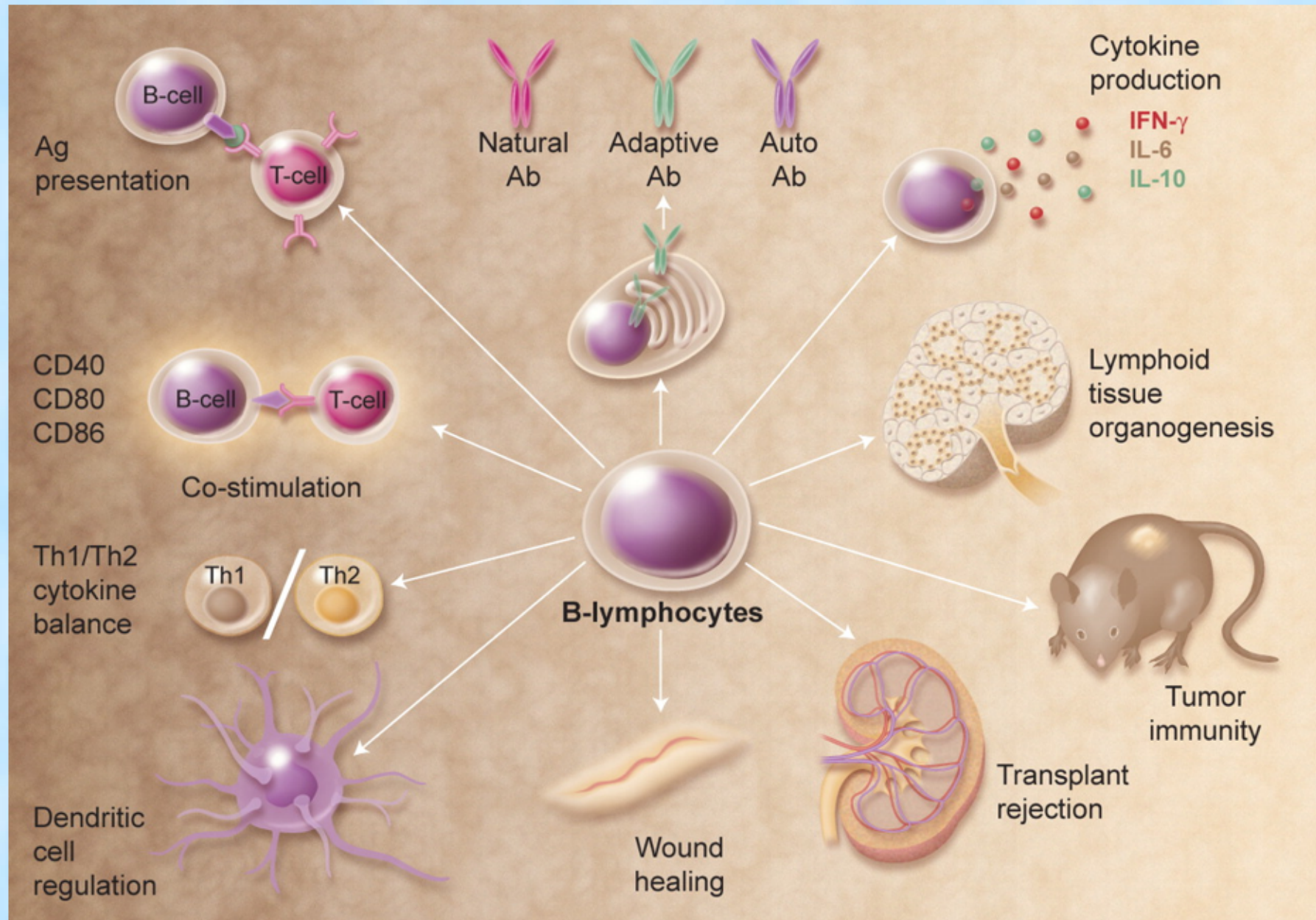
Σπλήνας



Είδη Β κυττάρων



Λειτουργίες Β κυττάρων



Δημιουργία του ρεπερτορίου των Β-κυττάρων

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

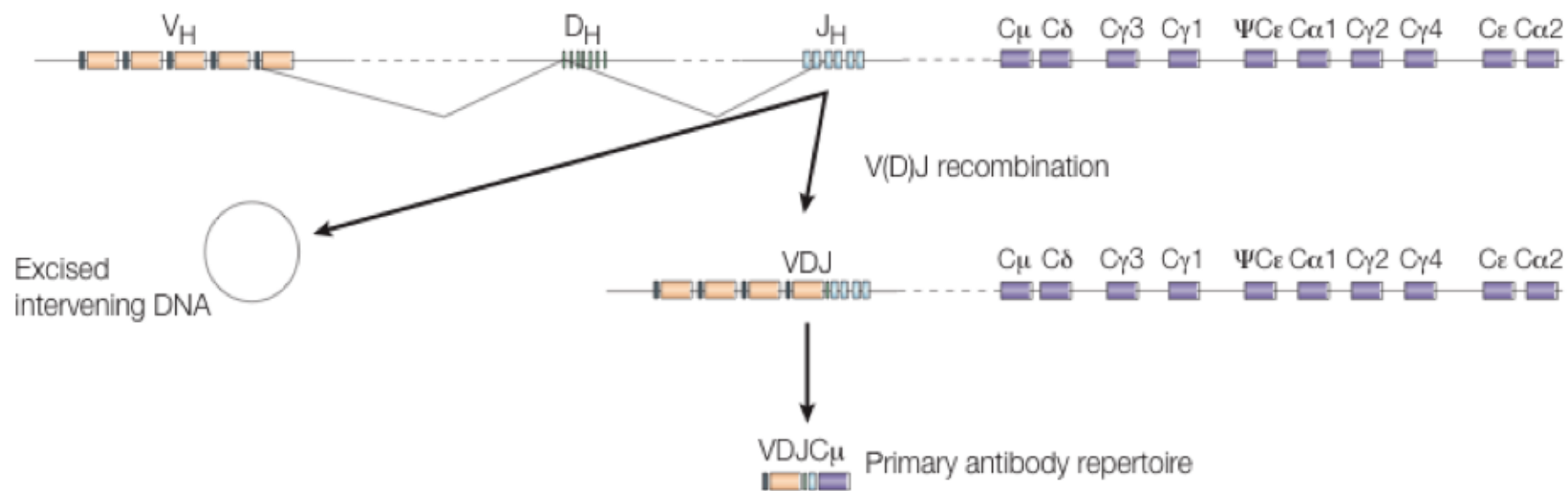
IGH (Ig heavy), στο χρωμόσωμα 14 (14q32.33)

IGK (Ig κ), στο χρωμόσωμα 2 (2p12)

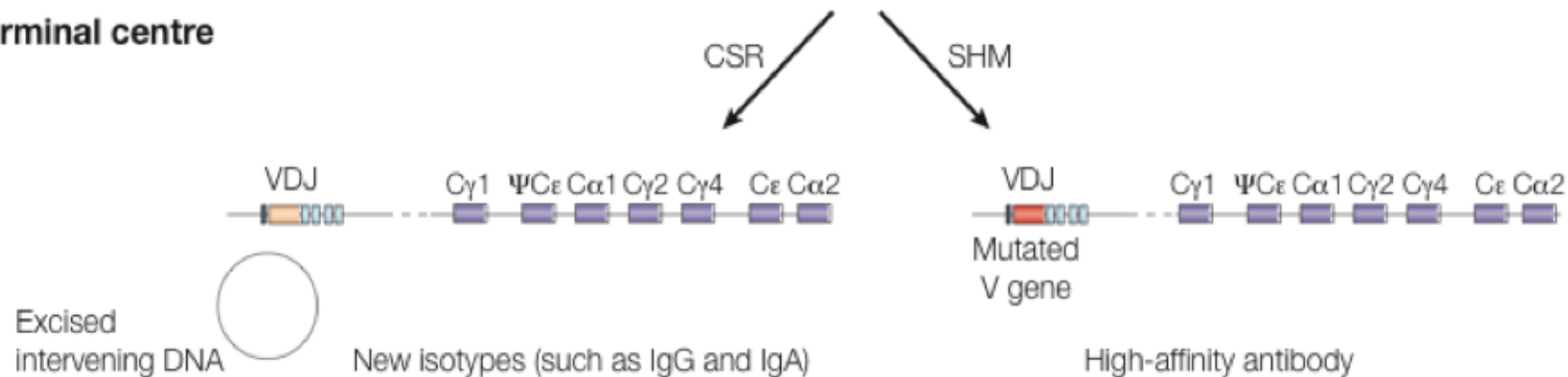
IGL (Ig λ), στο χρωμόσωμα 22 (22q11.2)

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

Bone marrow

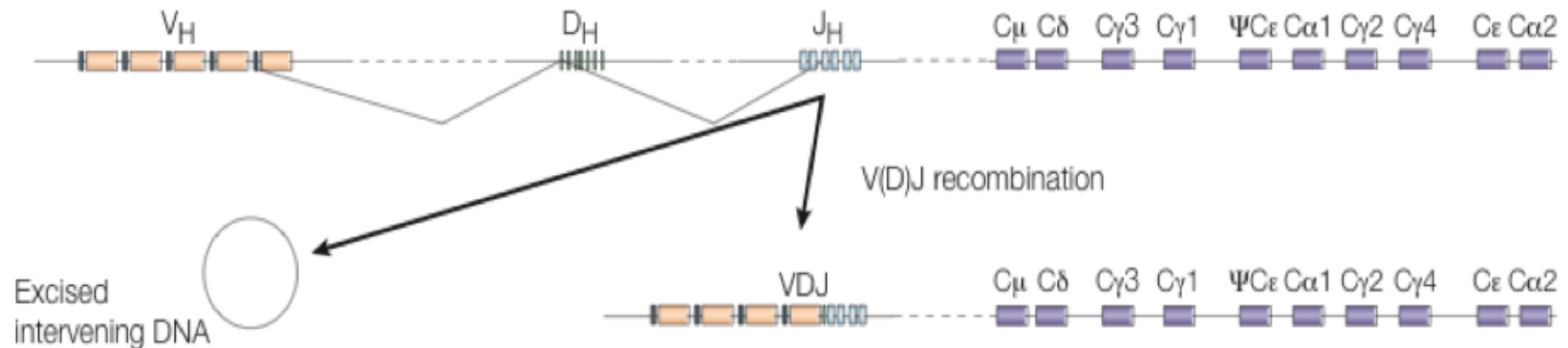


Germinal centre

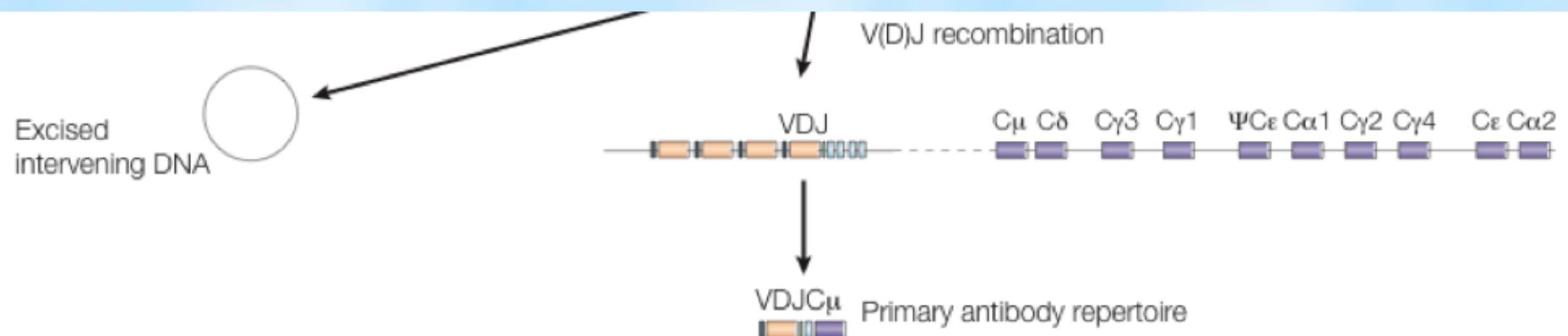


Αρχικά, το μεταβλητό τμήμα της βαριάς αλυσίδας IgH, αποτελείται από συστοιχίες τμημάτων γονιδίων που αντιστοιχούν σε εξώνια που κωδικοποιούν για μεταβλητά (V [for variable]), ποικιλόμορφα (D [for diversity]) και συνδετικά (J [for joint]) τμήματα. Ο ανασυνδυασμός V(D)J οδηγεί στην δημιουργία ενός επαναδιαταγμένου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

Bone marrow

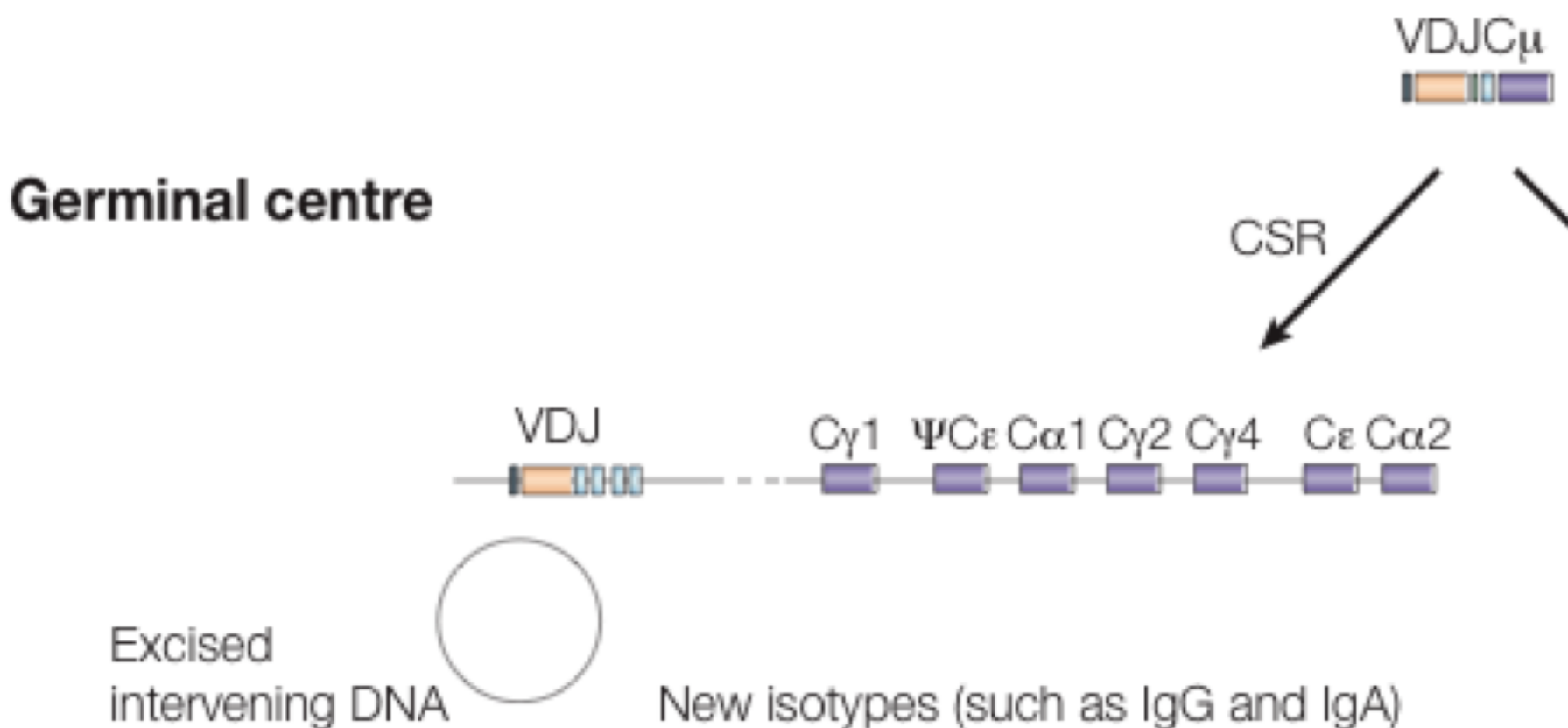


Το ενδιάμεσο DNA αφαιρείται με την μορφή κυκλικού DNA.
Τα VDJ τμήματα ενώνονται με τα C μ για να φτιάξουν τα
γονίδια των πρώτων αντισωμάτων (IgM).

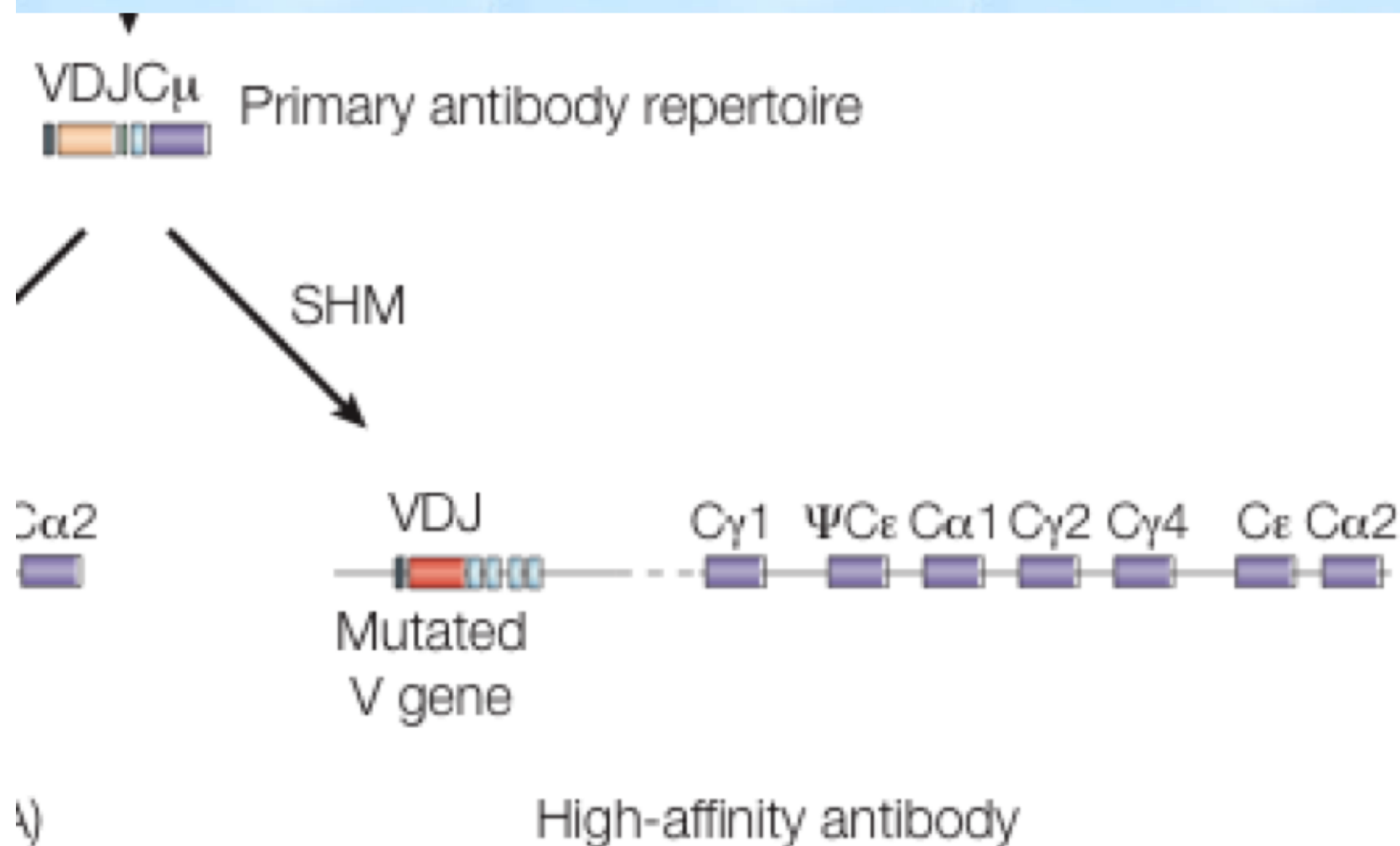


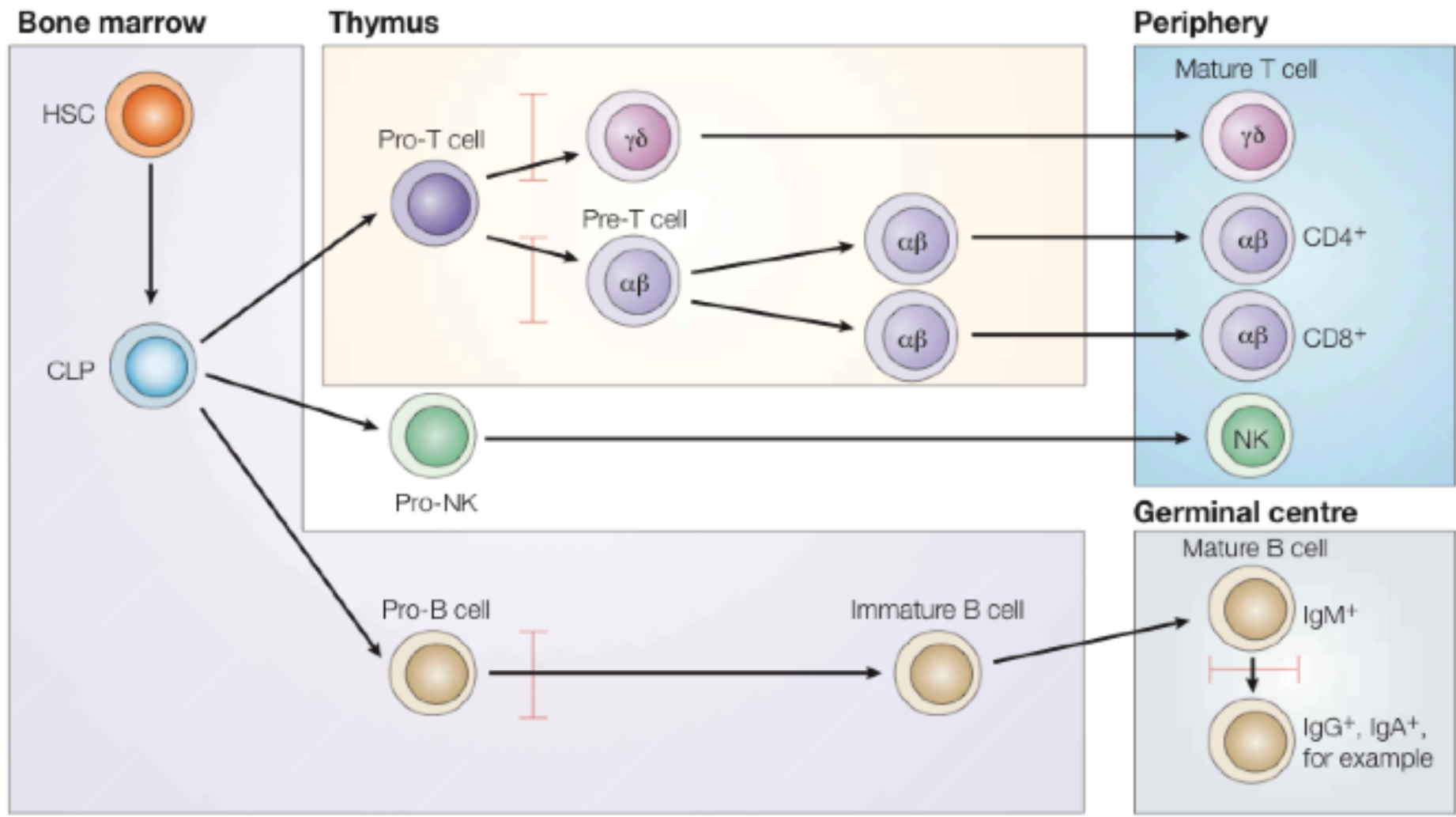
Κατά την διάρκεια του ανασυνδιασμού (CSR, class-switch recombination), μια νέα επαναδιάταξη φέρνει σε συνάφεια το γονιδιακό τμήμα VDJ με αυτό του εξωνίου που κωδικοποιεί για την σταθερή περιοχή C.

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).





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
H chain genes	germline	D-J joining	V-DJ joining	VDJ rearranged	VDJ rearranged	VDJ rearranged	VDJ rearranged
L chain genes	germline	germline	germline	germline	V-J joining	VJ rearranged	VJ rearranged
Surface Ig	none	none	none	μ chain in pre-B receptor	μ chain in cytoplasm and on surface	membrane IgM	membrane IgM and IgD
RAG, TdT expression	no	yes	yes	no	yes	yes	no
Surrogate L chain expression	no	yes	yes	yes	no	no	no

* Bruton's tyrosine kinase

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

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



D-J

VDJ

V-J light

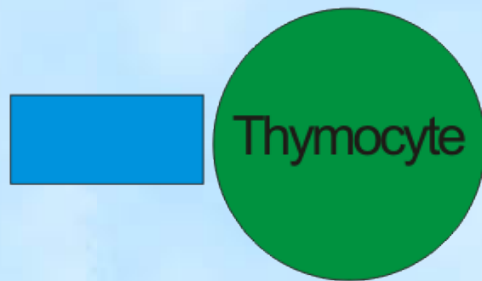
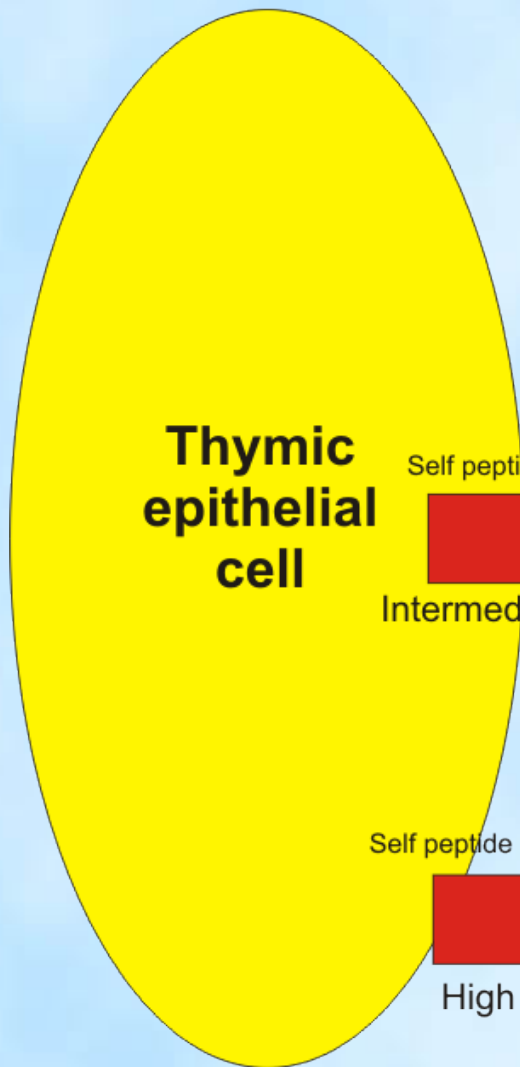
T-κύτταρα

- Εκπαίδευση στον θύμο
- Επιλογή κλώνων
- Διαφοροποίηση

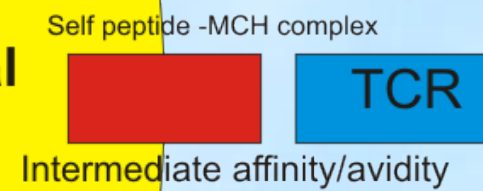
Η εκπαίδευση των θυμοκυττάρων
γίνεται για να

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

(2) με τη σωστή χημική συγγένεια.



Die by neglect



Positive selection

Cell survives
And exits
Thymus for
Periphery



Negative selection

Cell is deleted

- Οι ιντερλευκίνες (βλ. πιο κάτω) 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.

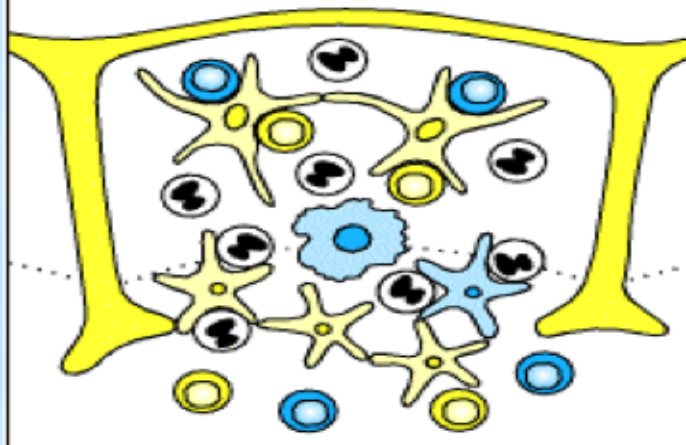
- Η αναδιάταξη των γονιδίων VDJ, θα επιφέρει τη δημιουργία μεγάλου αριθμού θυμοκυττάρων τα οποία, όταν ώριμα πιά βγουν στη περιφέρεια, θα έχουν μία τεράστια γκάμα T αντιγονικών υποδοχέων (TCR) (1/κύτταρο) που θα τους επιτρέπει να αναγνωρίσουν ένα τεράστιο αριθμό ξένων αντιγόνων.
- Η διαδικασία αναγνώρισης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

Medawar & Burnet

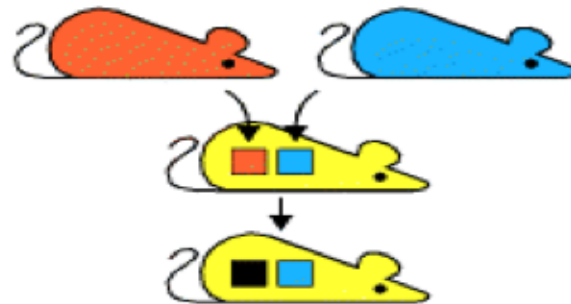
Neonatal mouse injected with
allogeneic bone marrow cells

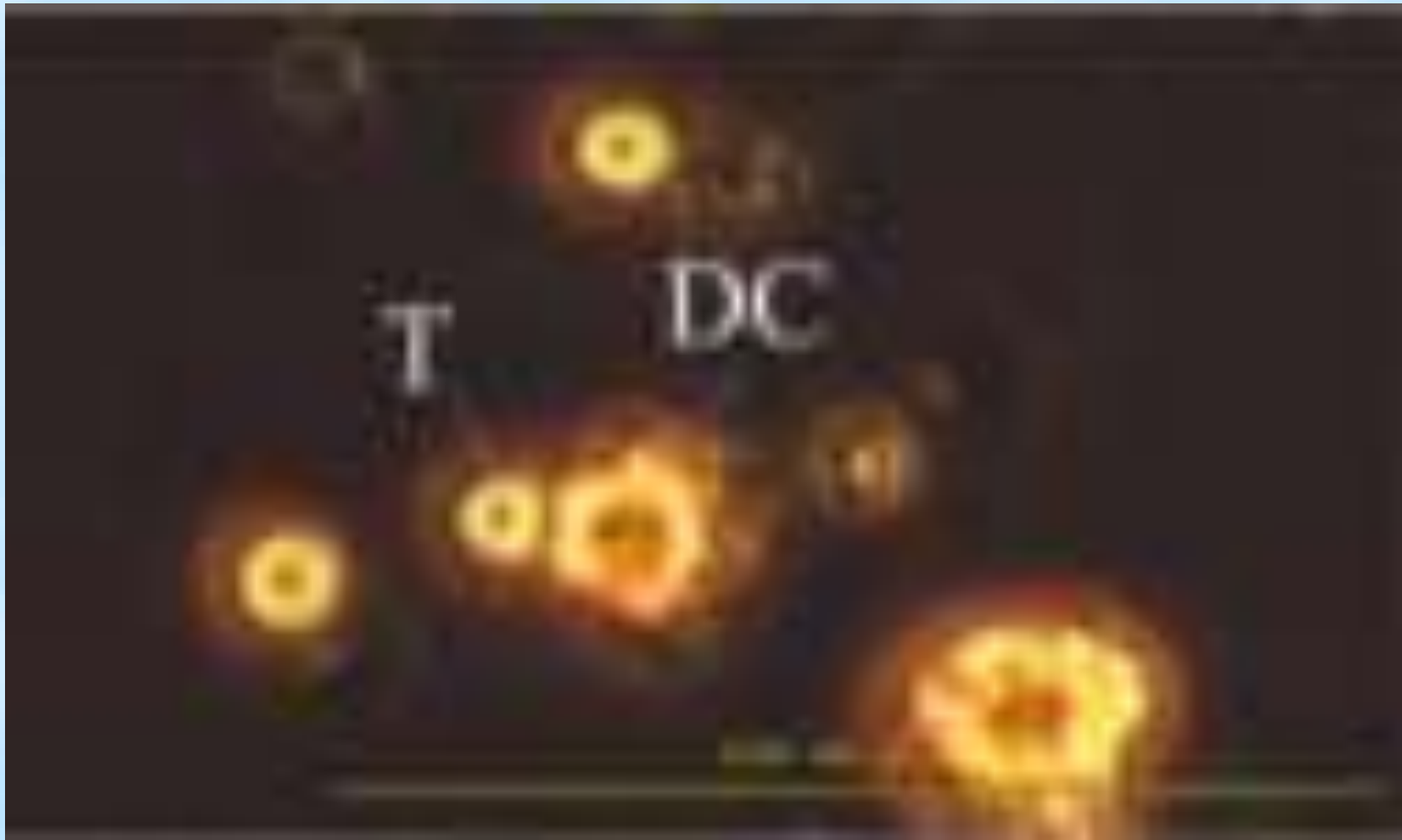


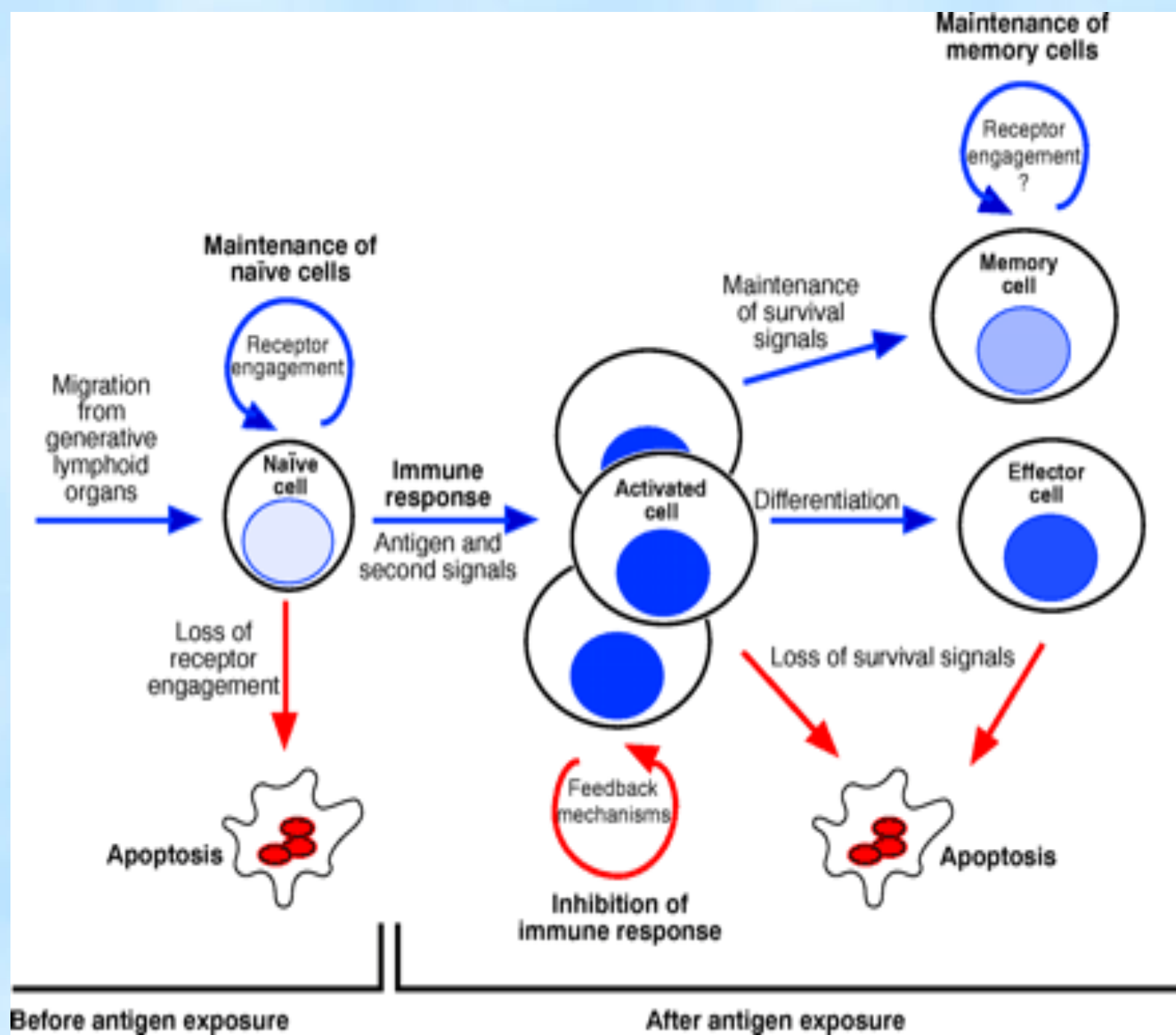
Both donor and recipient T cells
are selected in the recipient thymus.
T cells are negatively selected
on both donor and recipient APC



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

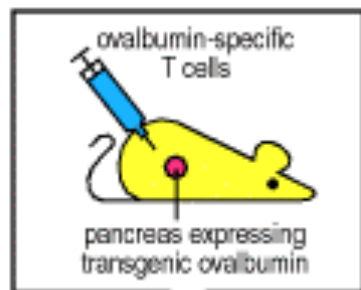






Περιφερική ανοχή:

- 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**).



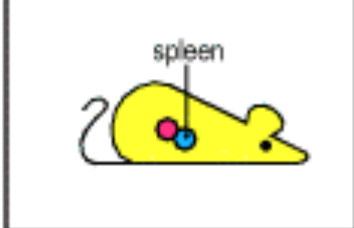
3 days

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

-	-
---	---

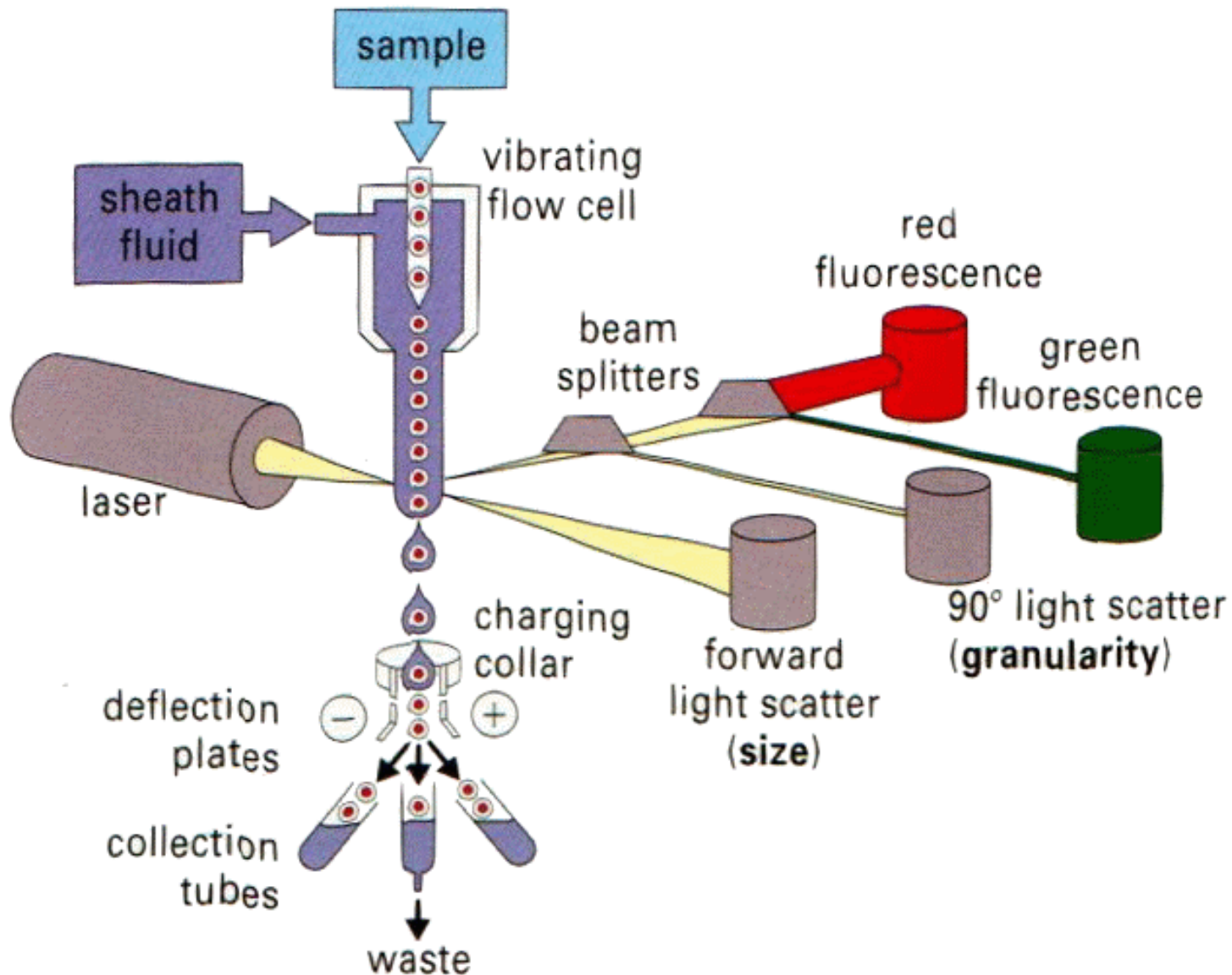
Response of ovalbumin-specific T cells to ovalbumin *in vitro*

-	++
---	----

Mechanism of peripheral tolerance

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

Fluorescence-activated cell sorter (FACS)

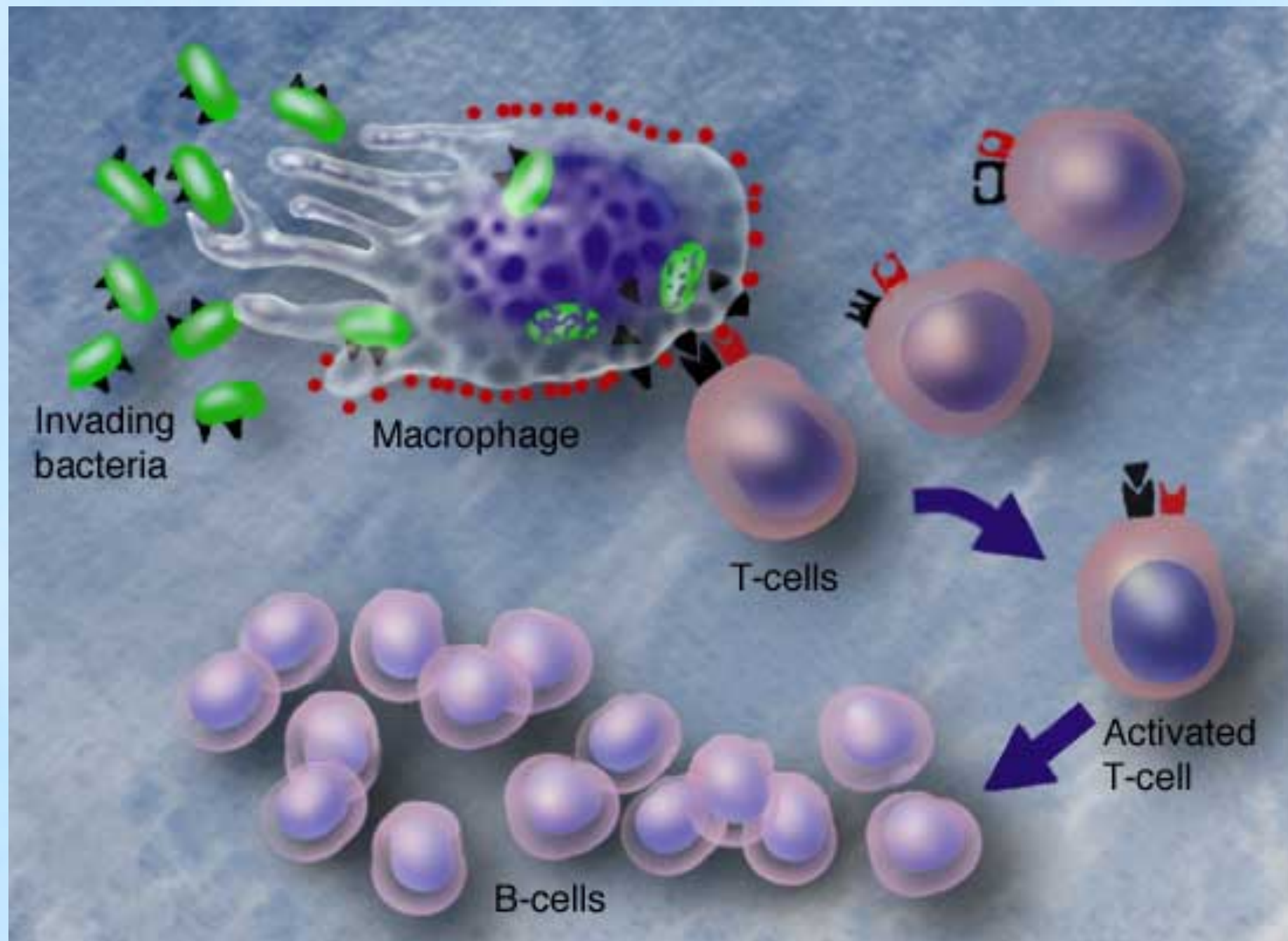


Κοινοί φαινοτυπικοί δείκτες μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος

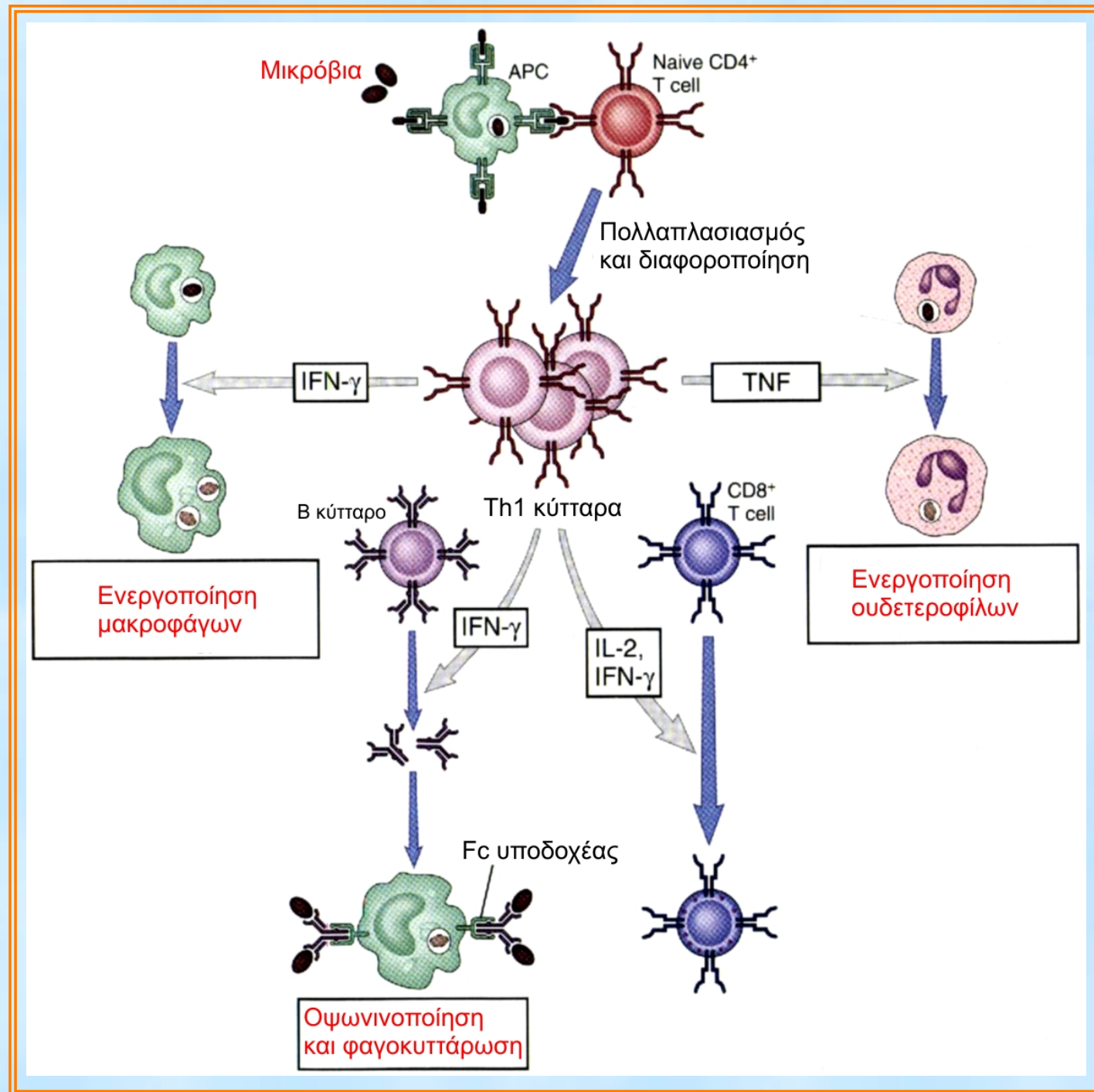
T-cells	Natural killer cells (NK)	B-cells	Monocytes
CD2	CD16	CD19	CD14
CD3	CD56	CD20	CD31
CD4		CD21	CD32
CD8		CD40	CD36
CD4-CD8-			
CD25			
CD69			
CD45RO			
CD45RA			

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

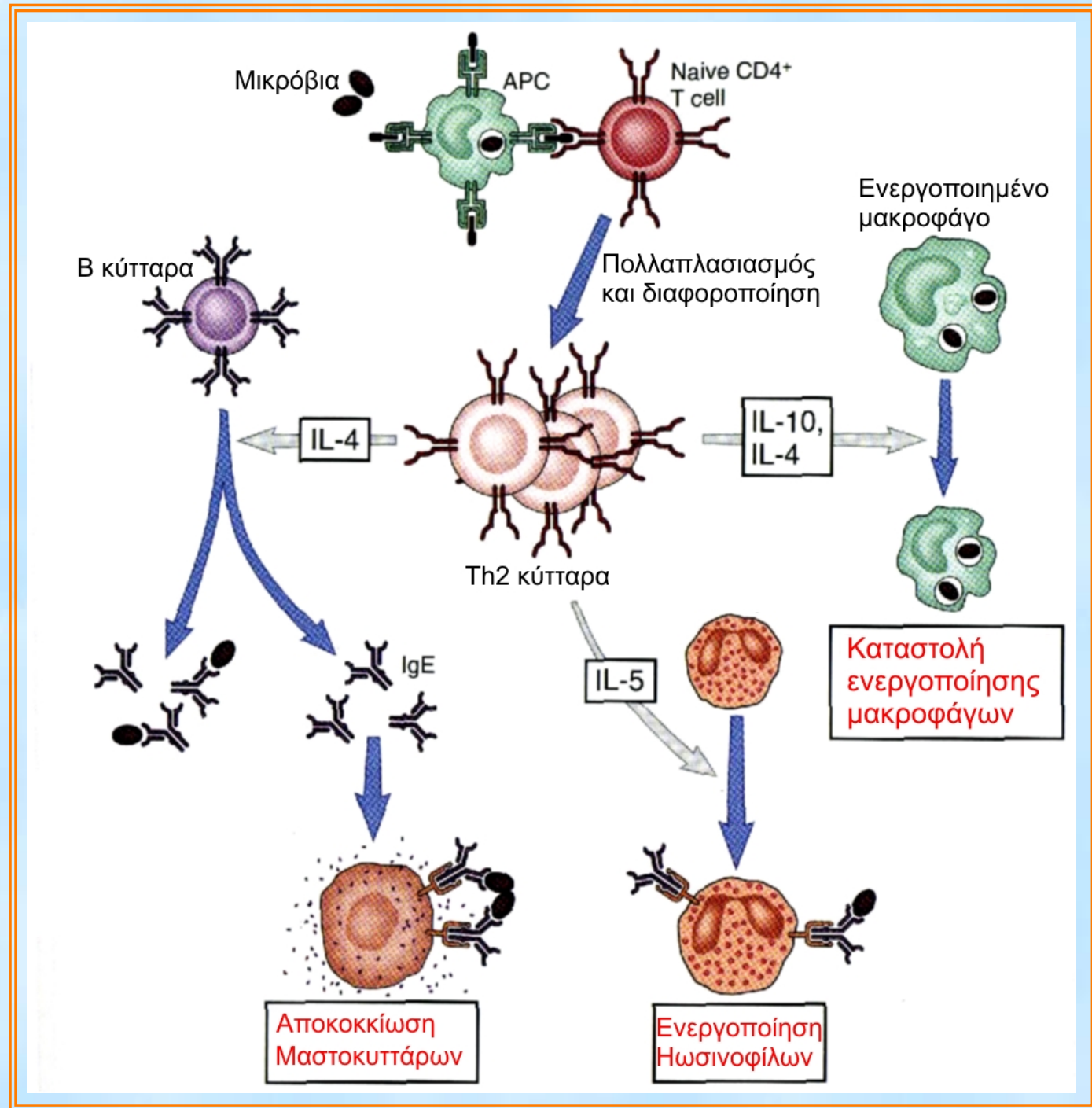
Οι κυτοκίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους (~15 kD)



Th1 ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ



Th2 ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ



Cytokine secretion by T helper cells

Cytokine	Th1	Th2
IL-2	+++	-
IFN- γ	+++	-
TNF- α	+++	-
GM-CSF	++	++
IL-3	++	++
IL-4	-	+++
IL-5	-	+++
IL-13	-	+++
IL-10	\pm	+

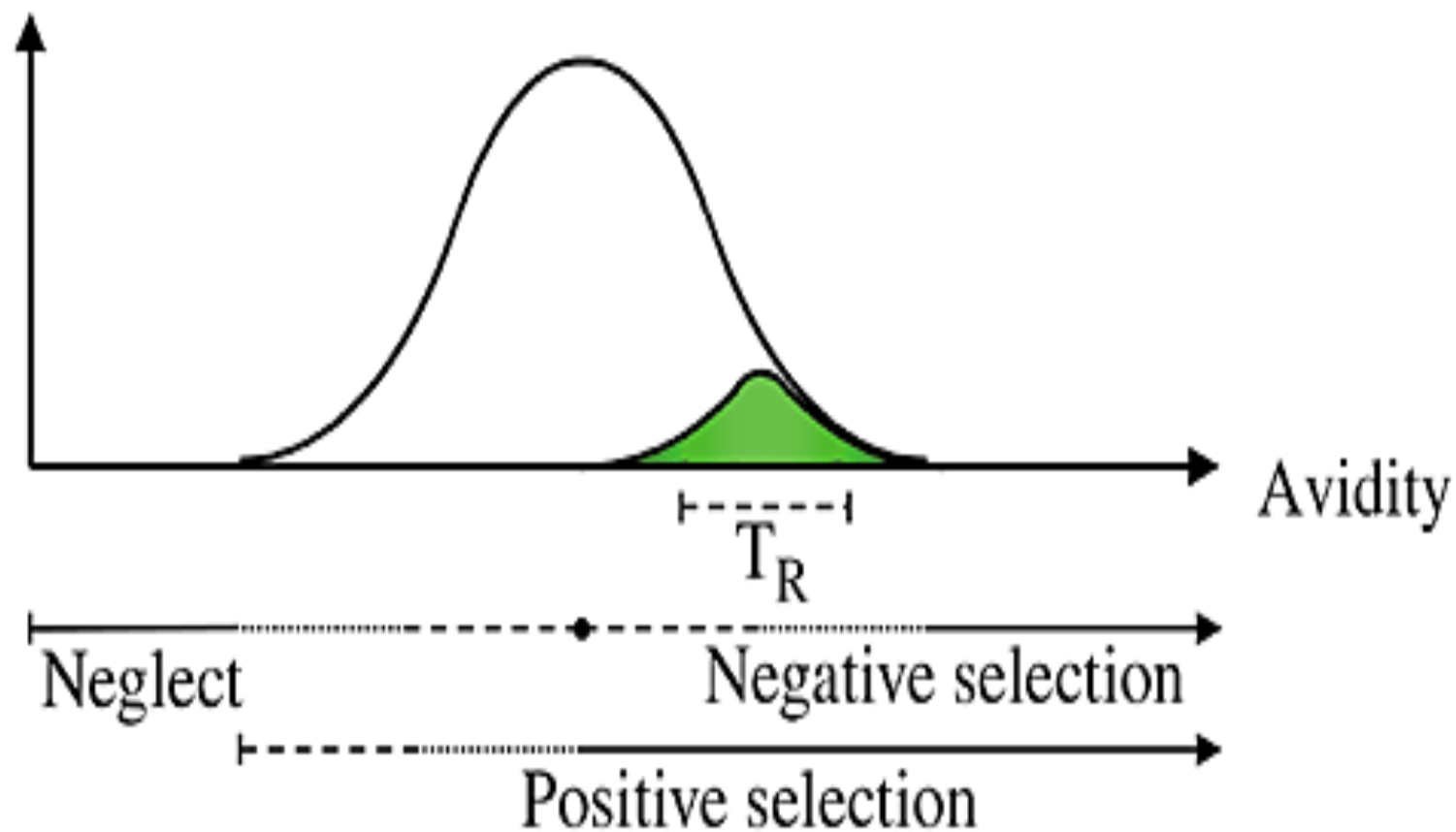
Ρυθμιστικά/κατασταλτικά
T-κύτταρα

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

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

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

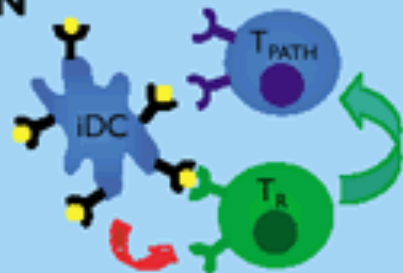
Probability
of selection



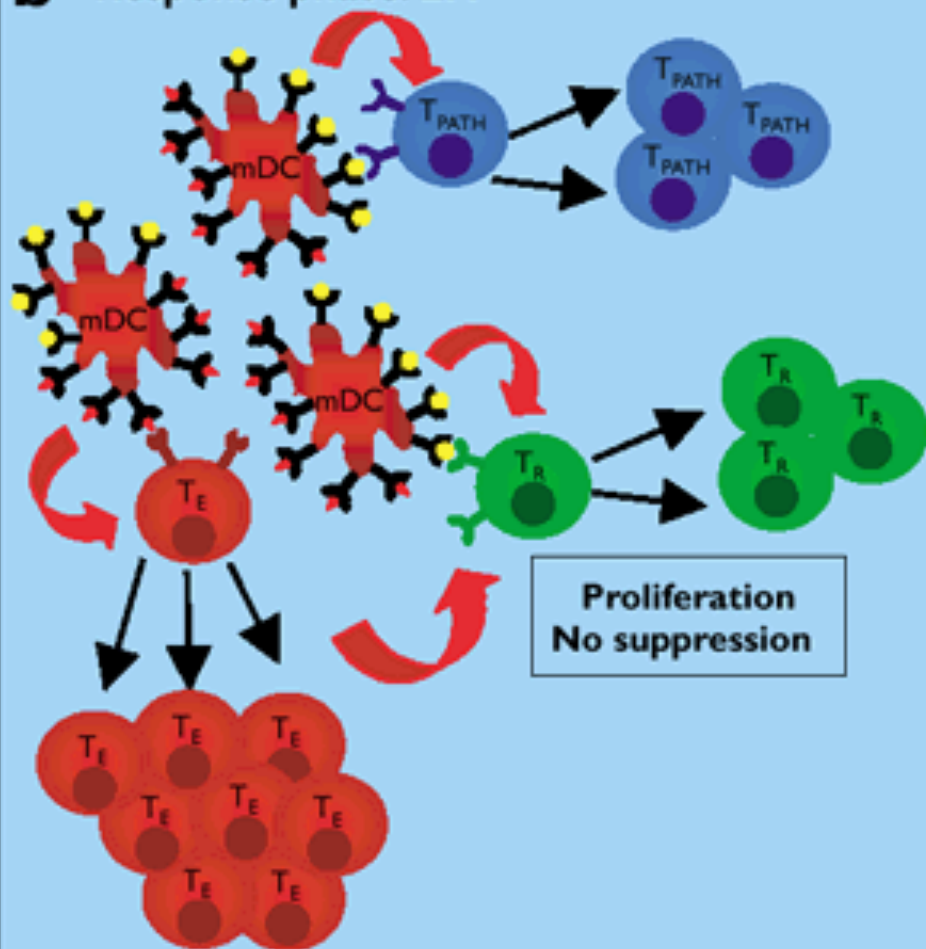
Αυτά τα κύτταρα καταστέλλουν την ενεργοποίηση των CD4 και CD8 T-κυττάρων *in vitro* μέσω έκκρισης κατασταλτικών κυτταροκινών και ενός αγνώστου μηχανισμού που (μάλλον) εξαρτάται από τη φυσική επαφή μεταξύ κυττάρων.

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.

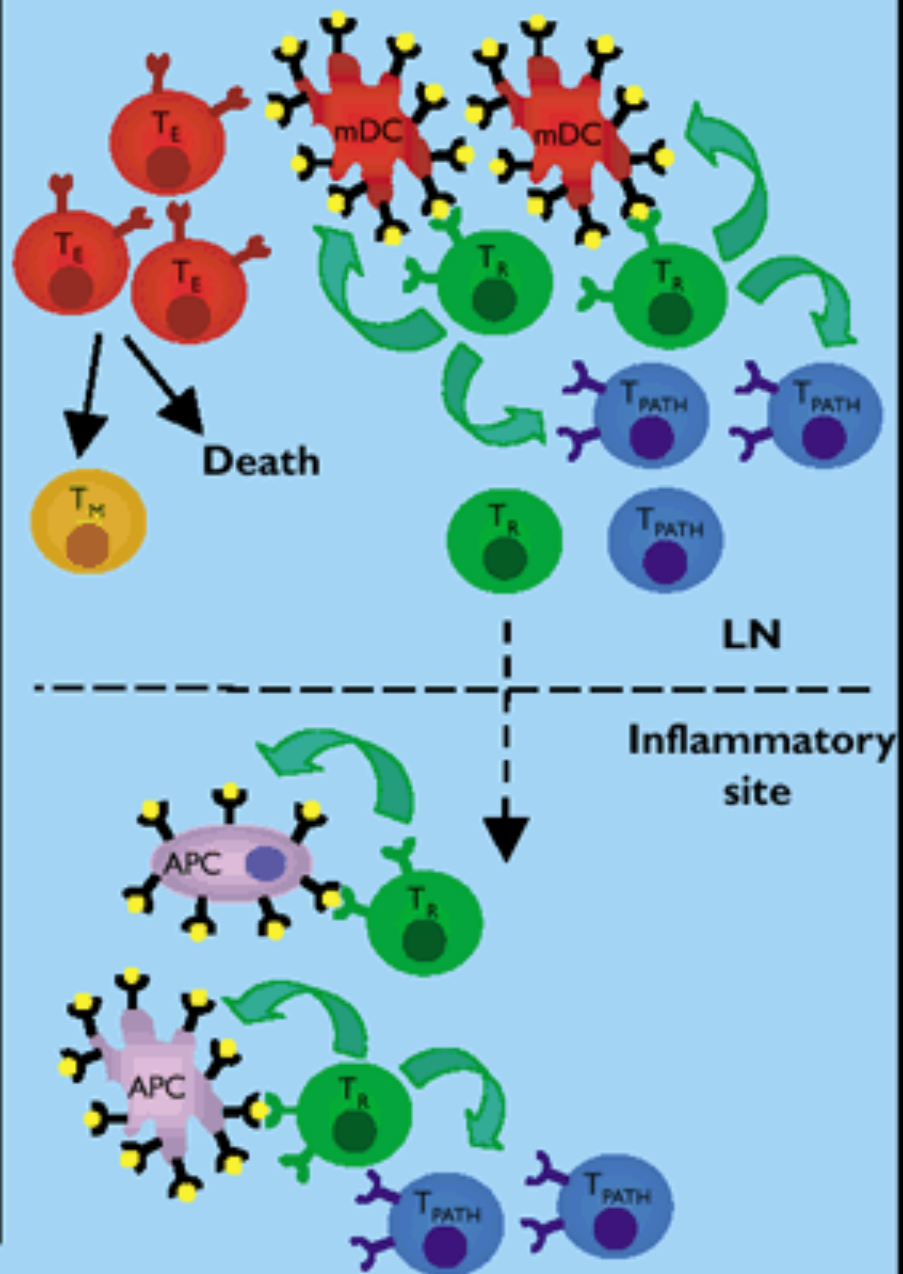
a Steady state: LN

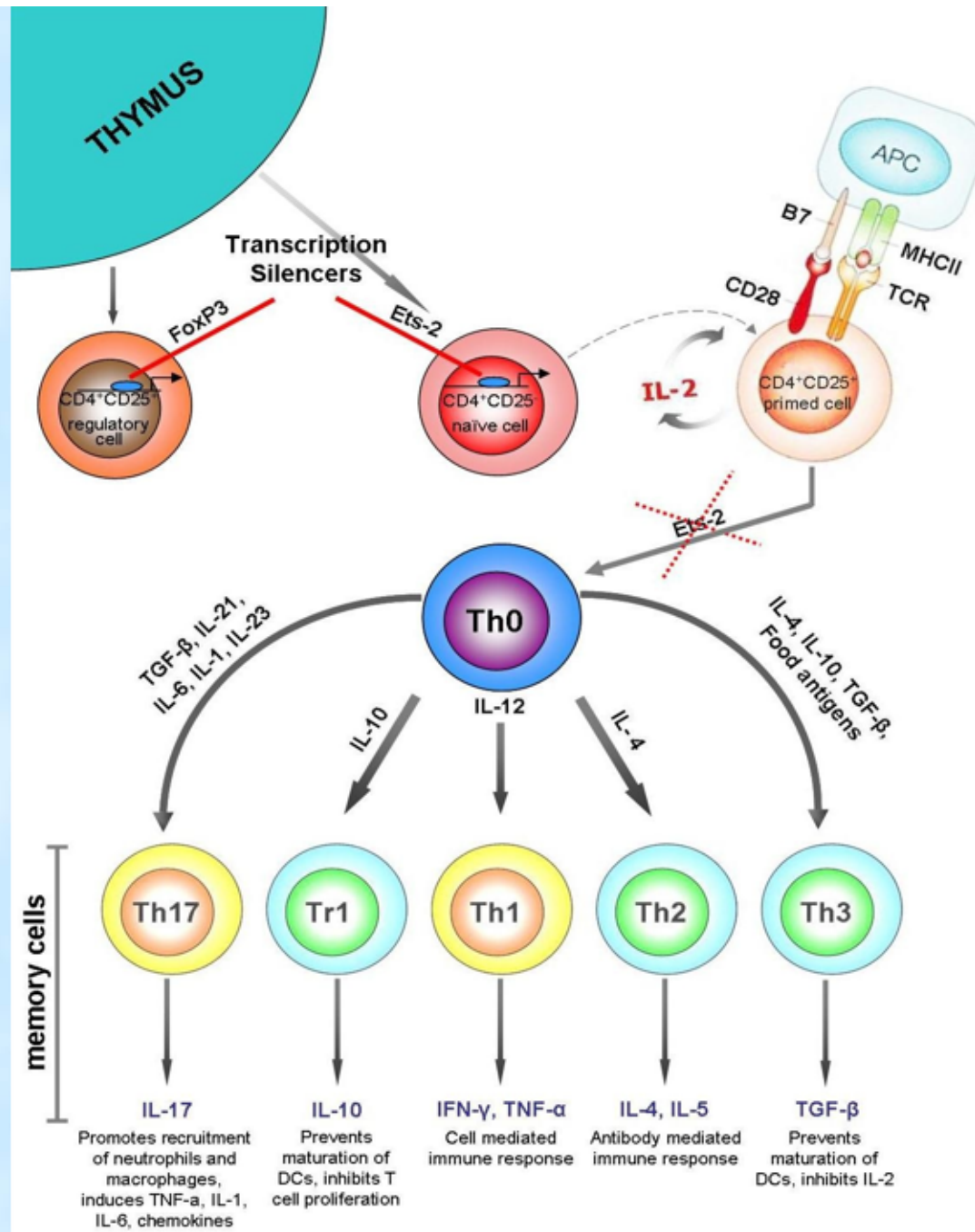


b Response phase: LN



c Regulatory phase

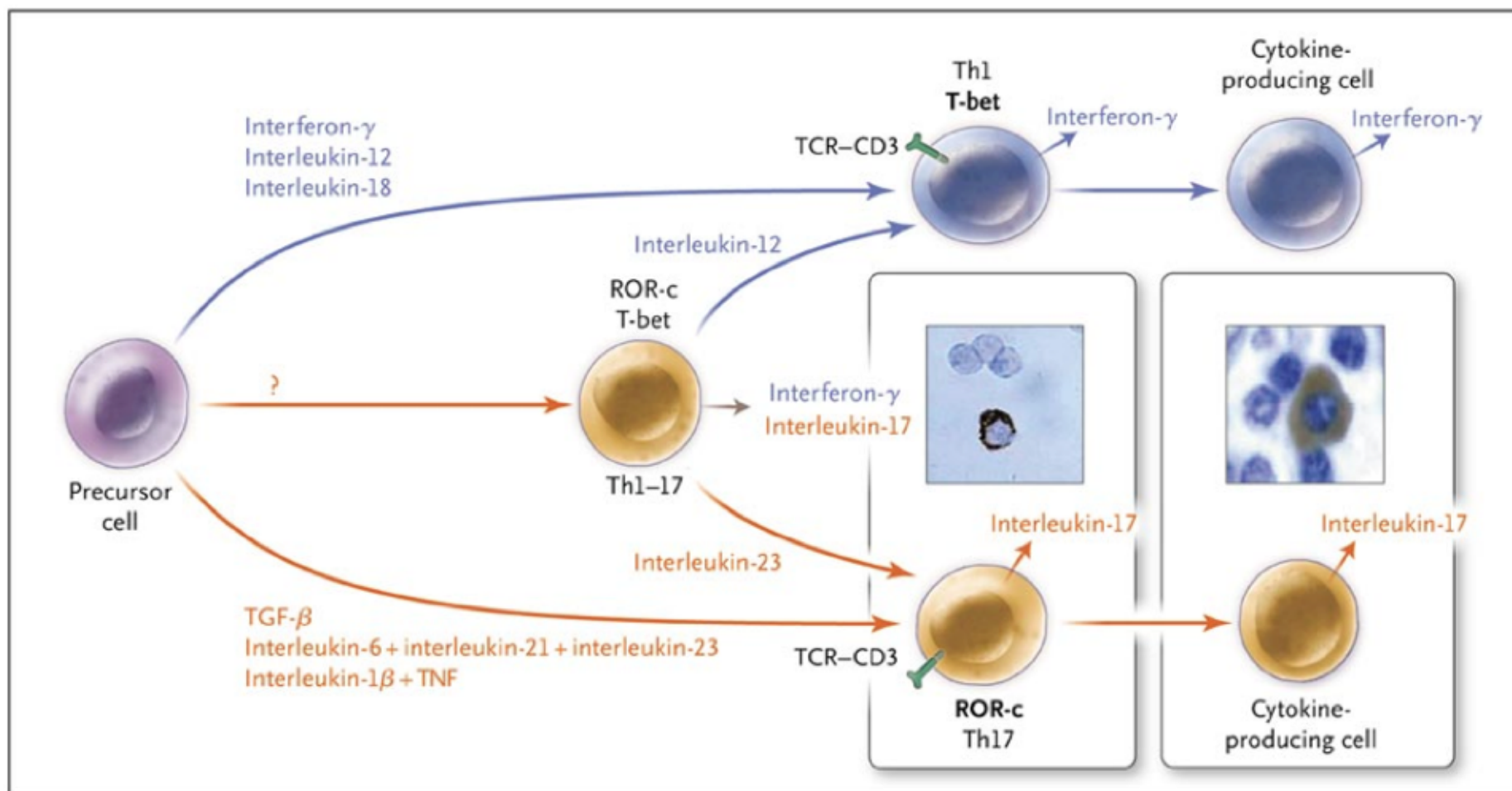


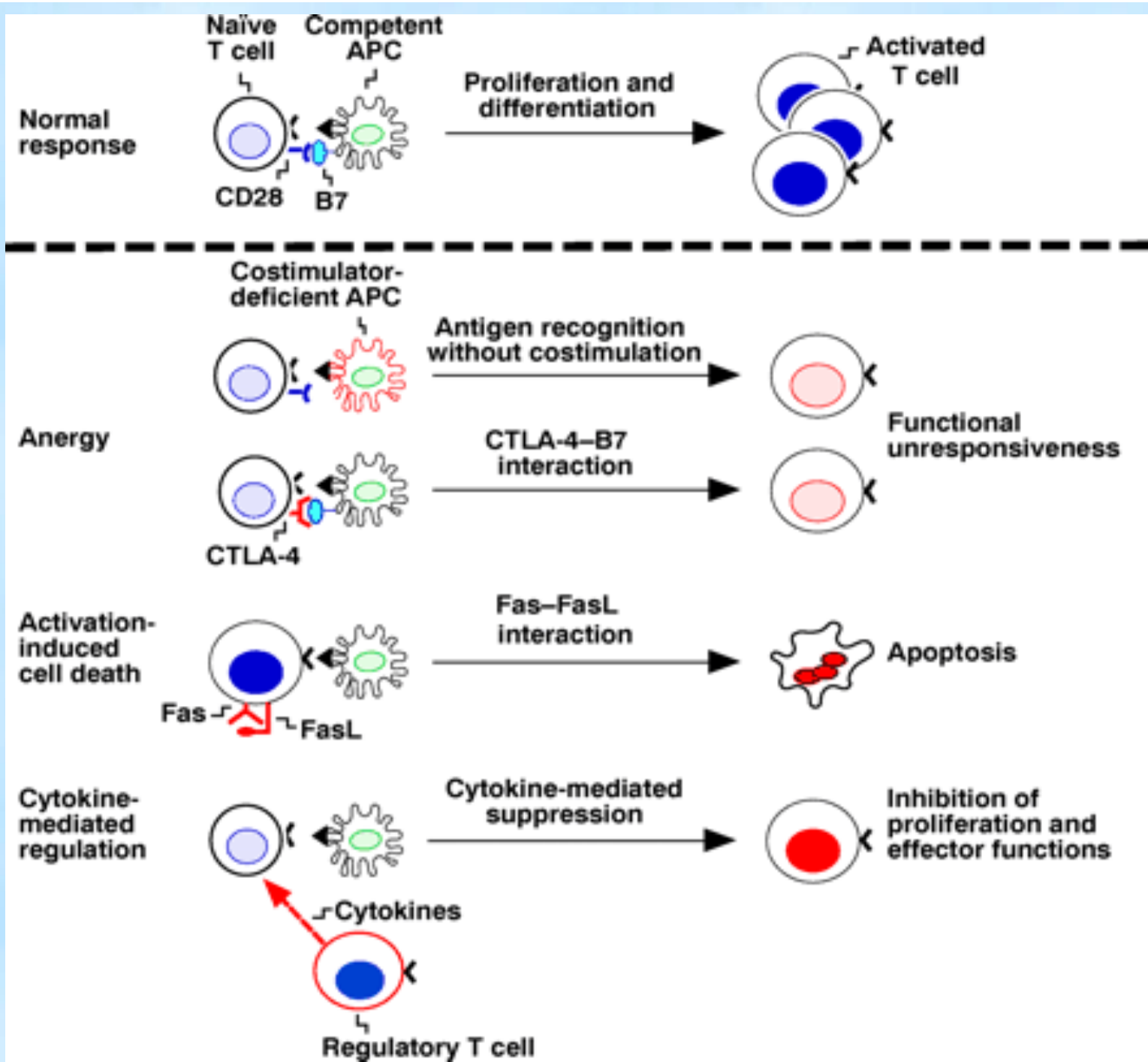


IL-17 & Th17 λεμφοκύτταρα

- 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- 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.



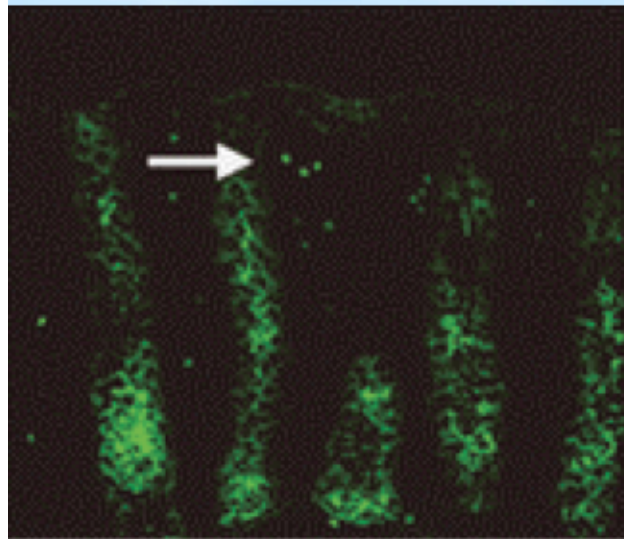


- Τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα (T regulatory cells, Tregs) παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη διατήρηση της ισοροπίας του ανοσοποιητικού συστήματος στη περιφέρεια.

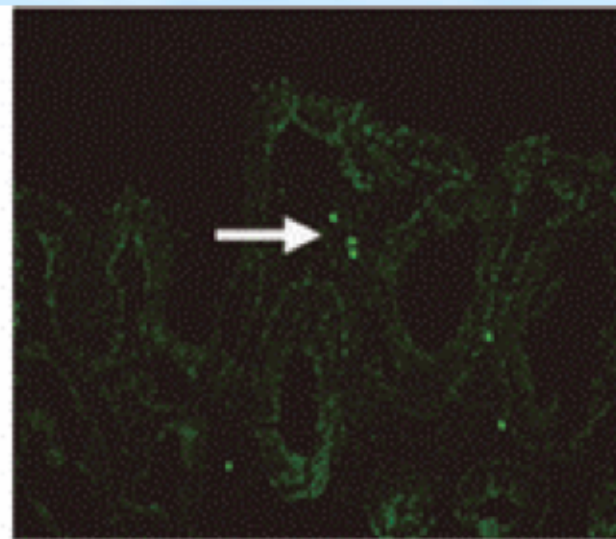
- Χαμηλοί αριθμοί Tregs ± μειωμένη λειτουργία τους ----> αυτοάνοσα νοσήματα (κυρίως αυτών που επιδουκνείουν μια πόλωση τύπου Th1 ή Th17).
- Αυξημένοι αριθμοί Tregs ± αυξημένη λειτουργία τους ----> νεοπλασίες

- Στον άνθρωπο, σίγουρα Tregs θεωρούνται αυτά που εκφράζουν τα μόρια επιφανείας **CD4⁺CD25^{high/medium} CD127^{low}** 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⁺ Treg cells. Liu et al., J. Exp. Med. 2006;203(7):1701-1711.

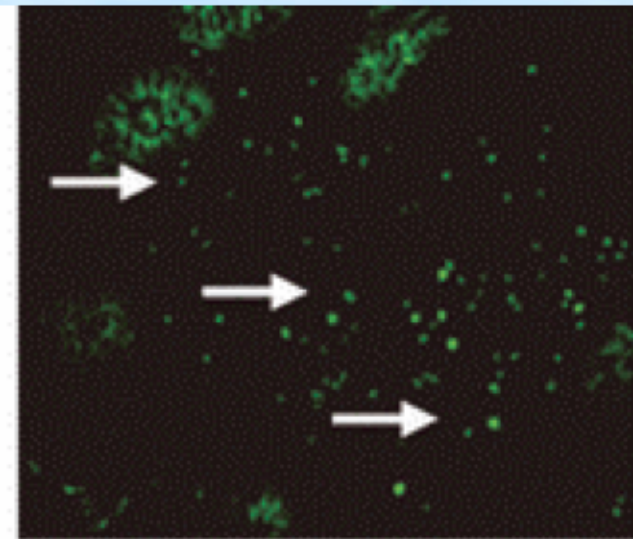
Foxp3 θετικά κύτταρα σε ασθενή με νόσο του Crohn πριν + μετά θεραπείας με το anti-TNF- α αντίσωμα Infliximab



Control



Active Crohn's



Infliximab

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-β 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 $\gamma\delta$ +

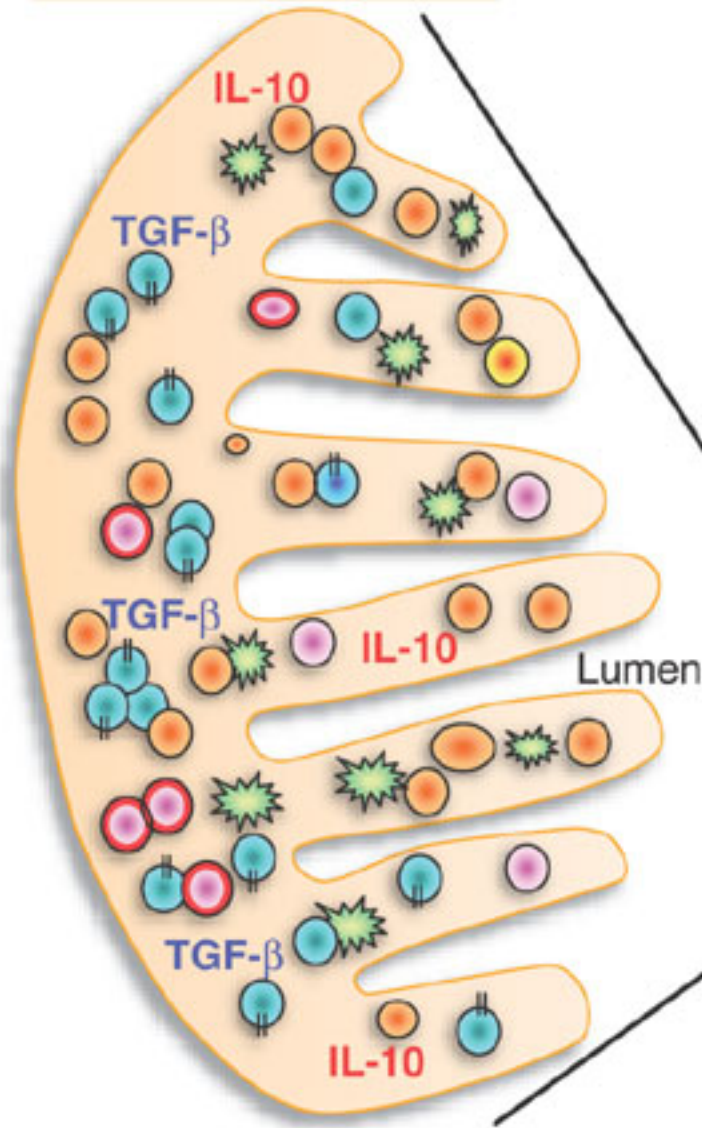
HLA-G

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

NKTr --> IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β

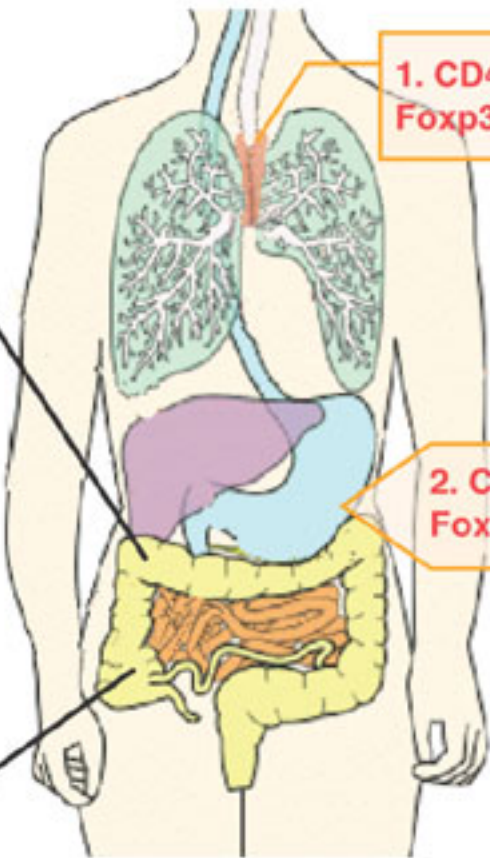
Και βρίσκονται κυρίως....

3. CD4+CD25+TGF-β+T_{regs}
and IL-10-secreting T_H1



1. CD4+CD25+
Foxp3+ T_{regs}

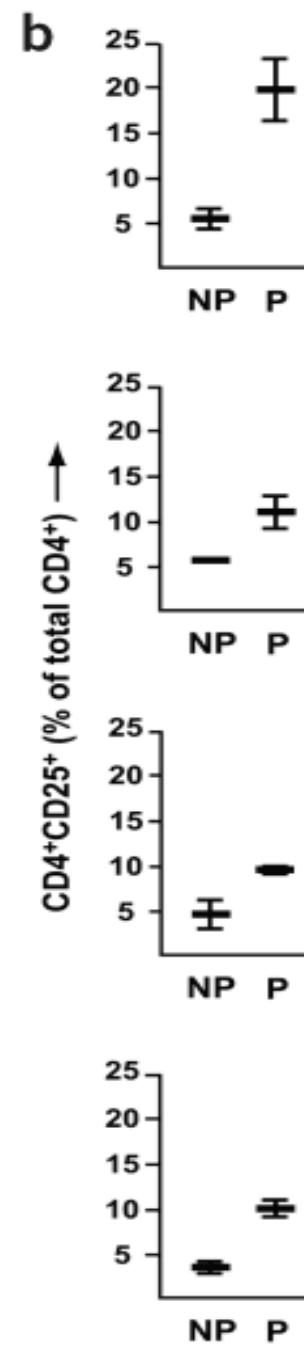
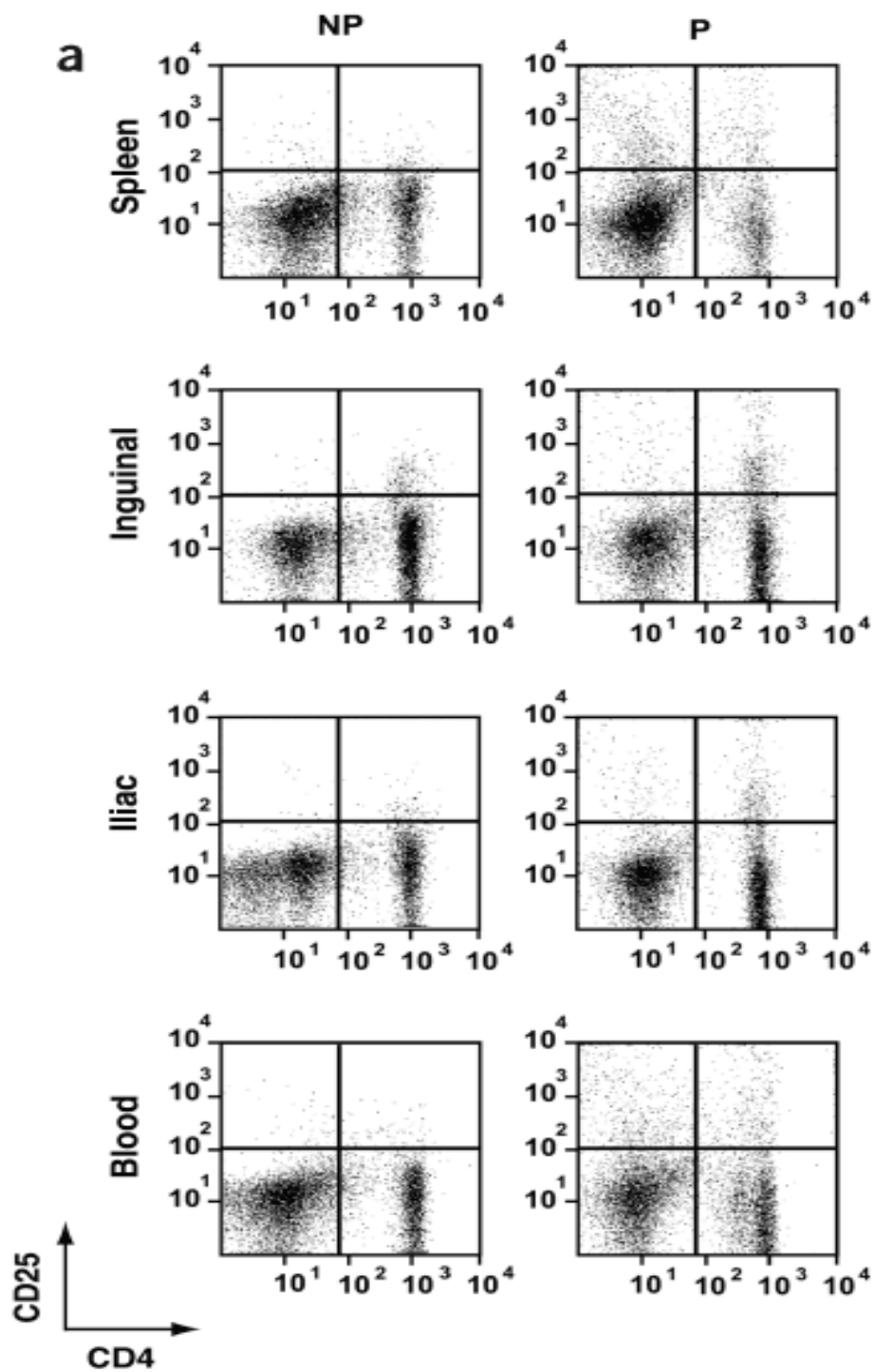
2. CD4+CD25+
Foxp3+ T_{regs}



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- 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

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.
- Η φύση του μορίου που προσδένεται στους υποδοχείς αυτών των κυττάρων είναι ακόμα άγνωστη.

- Ο προσδιορισμός των κυττάρων στόχων και η μοριακή βάση της CD4+CD25+ καταστολής είναι ένα πεδίο εντατικής έρευνας στις μέρες μας.

Nature Immunology 5, 1149 - 1156 (2004).

Induction of T helper type 1–like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity.

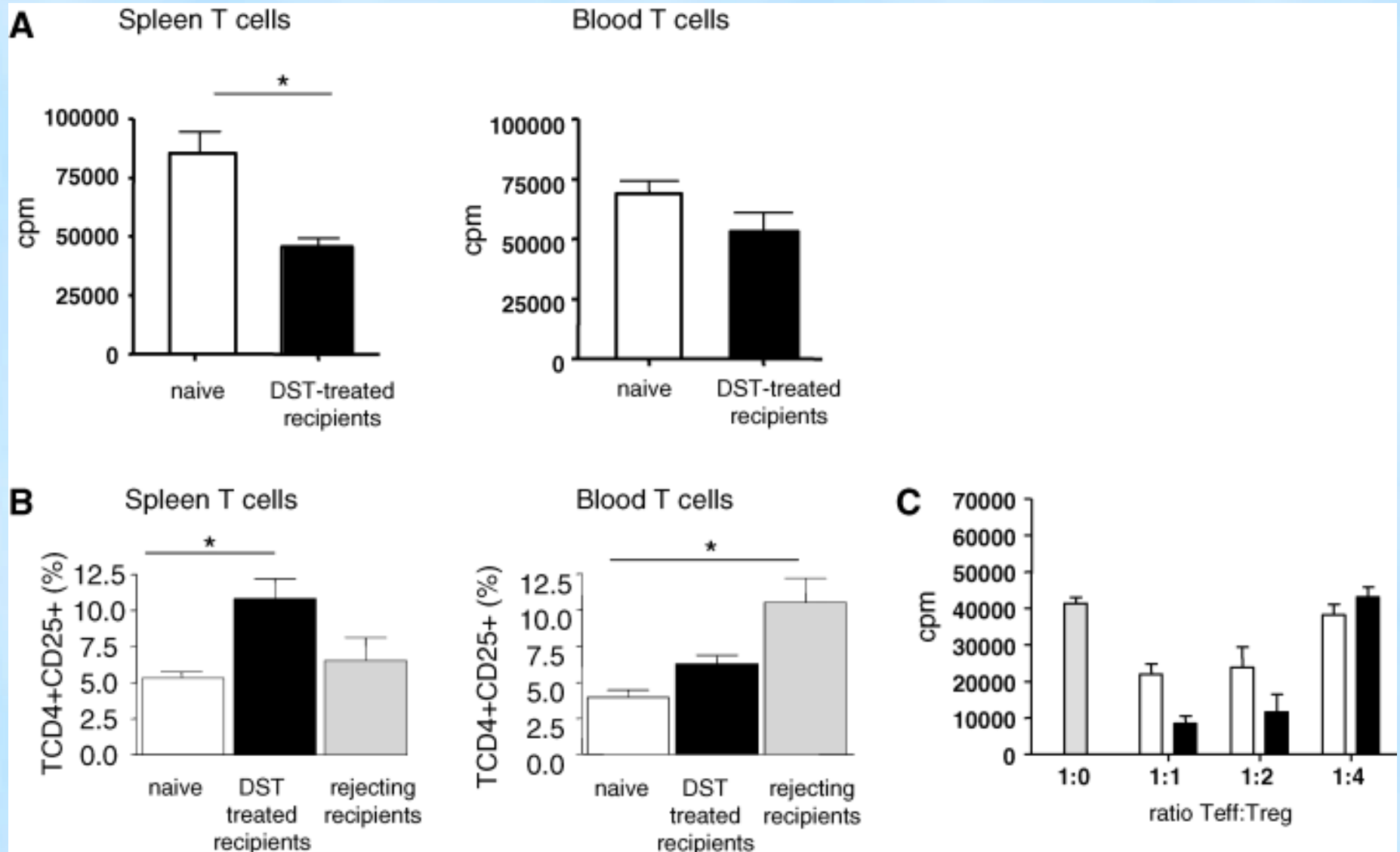
Stock et al.

Σημαντική ερευνητική εργασία που έδειξε ότι σε περιβάλλον αλλεργικού άσθματος τα T ρυθμιστικά κύτταρα εκκρίνουν IFN-γ

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

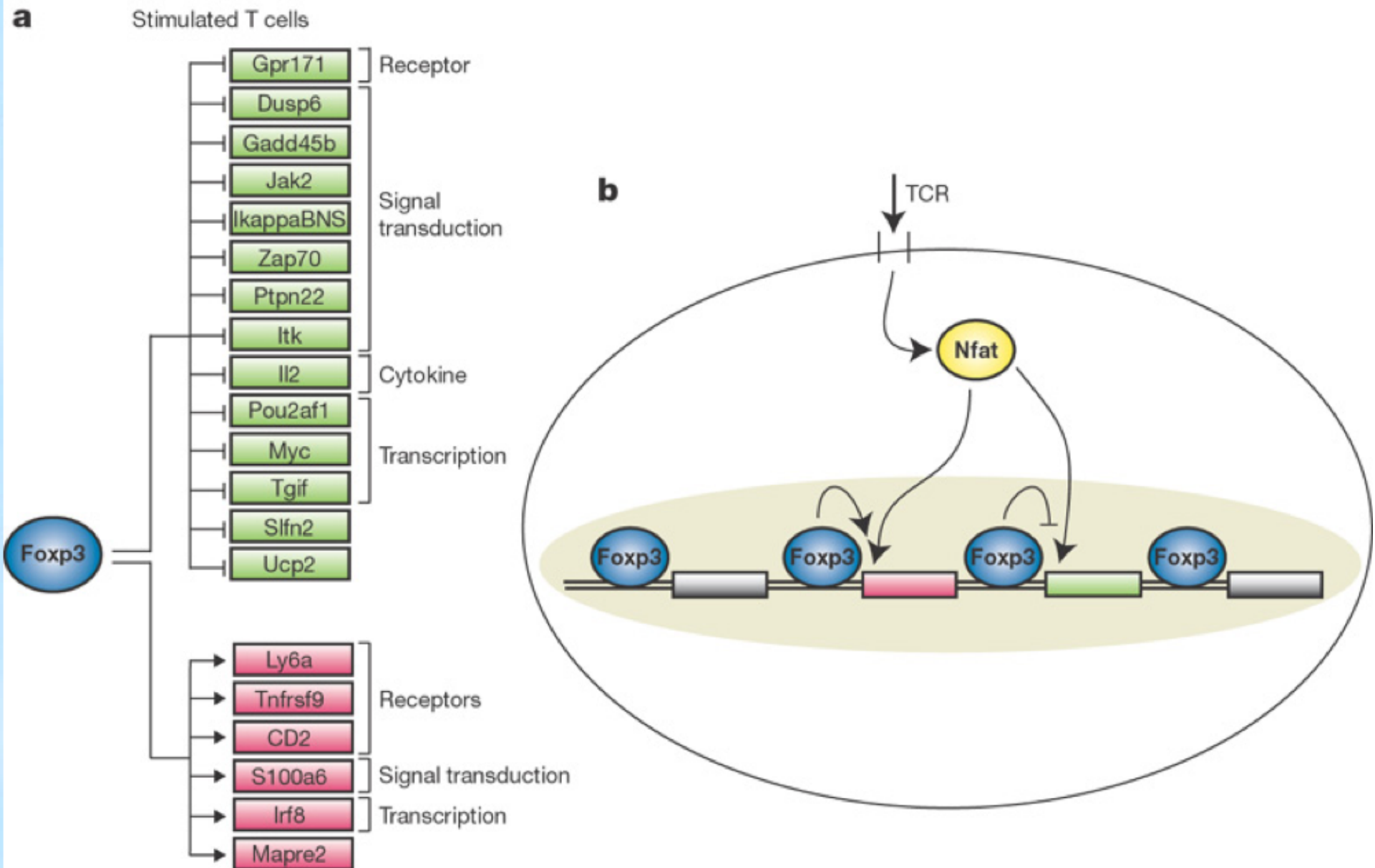
In this rat heart transplant model, long-term survival is achieved in rat recipients by pre-graft donor-specific blood transfusion.

- Splenocytes and spleen T-cells from treated recipients transferred long-term graft survival to naive recipients (but blood T-cells did not).
- Spleen T-cells were not able to prevent chronic rejection in naive recipients.



- 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