



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE-  
NORTE**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS**

**Mestrado em Terapias Moleculares**

**Expressão e rearranjo do gene TCR $\beta$  em linfócitos NK**

Renata Minas



**Renata Minas**

**Expressão e rearranjo do gene TCR $\beta$  em linfócitos NK**

**Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Terapias  
Moleculares pelo Instituto Superior de Ciências da Saúde-Norte**

Trabalho de tese realizado sob a orientação de  
Prof<sup>a</sup> Doutora Elsa M. Cardoso

e co-orientação de  
Prof. Doutor Fernando Arosa

**Instituto Superior de Ciências da Saúde-Norte  
Departamento de Ciências  
2010**

---

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar o meu sincero agradecimento à Prof. Doutora Elsa Cardoso pelo imprescindível apoio, orientação e disponibilidade dispensada ao longo de todo o trabalho.

Ao Prof. Doutor Fernando Arosa o meu muito obrigado pela sua importante colaboração.

Gostaria de agradecer ao Departamento de Ciências e CICS do ISCSN por terem permitido a utilização das instalações e reagentes e ao Instituto Português de sangue, por fornecer as amostras de sangue.

À Fresenius Medical Care agradeço a generosa contribuição para a realização do Mestrado e em particular à Dr<sup>a</sup> Esperanza Garagarza pela confiança e por ter concedido esta oportunidade.

Por último, gostaria de salientar todos aqueles que possibilitaram que finalizasse este trabalho, em especial à Méri e Marco pela ajuda, paciência e sobretudo enorme compreensão.

---

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	VI
<b>RESUMO</b> .....	VIII
<b>ABSTRACT</b> .....	X
<b>CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO</b> .....	1
Hematopoiese .....	1
Linfócitos T .....	2
Receptor dos linfócitos T.....	2
Estrutura bioquímica .....	2
Genes do TCR .....	3
Receptor CD3 .....	5
Estrutura dos genes CD3 .....	6
Complexo TCR $\beta$ -CD3.....	6
Internalização, reciclagem e degradação do complexo TCR-CD3.....	8
Diferenciação dos Linfócitos T .....	10
Rearranjo do gene TCR: exemplo TCR $\beta$ .....	12
Linfócitos T maduros .....	14
Linfócitos NK.....	16
Receptores de NK.....	16
Identificação fenotípica linfócitos NK .....	20
Estrutura CD56 .....	21
Gene CD56 .....	22
Função do receptor CD56.....	23
CD16.....	24
Linfócitos NK: imunidade inata ou adaptativa? .....	24
Subunidades $\gamma$ , $\epsilon$ e $\delta$ do complexo TCR-CD3 .....	26
Rearranjos do gene TCR $\gamma$ .....	27
Receptores NK em linfócitos T .....	28
Desenvolvimento dos linfócitos NK .....	29
Função dos linfócitos NK.....	31
Linfócitos NKT .....	32
Linfócitos NKT CD1d-dependentes.....	33
Linfócitos NKT CD1d-independentes ( <i>NKT-like</i> ).....	34
<b>CAPÍTULO II. OBJECTIVO</b> .....	37
<b>CAPÍTULO III. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
Preparação das amostras.....	38
Isolamento de linfócitos NK.....	38
1. Selecção negativa de linfócitos NK através da depleção de CD3 .....	38
Marcação magnética .....	38
Separação magnética .....	39
2. Selecção positiva CD56.....	39
Marcação magnética .....	39
Separação magnética .....	39
Isolamento de linfócitos T .....	40
Marcação magnética.....	40
Separação magnética .....	40
Citometria de fluxo.....	40
Marcação Extracelular.....	41
Marcação Intracelular .....	41

---

Extracção do RNA total.....	41
Quantificação por espectrofotometria .....	42
Síntese de cDNA .....	43
Determinação da expressão de mRNA de GAPDH, TCR $\beta$ e CD56 por PCR .....	43
Sequenciação da região amplificada do cDNA TCR $\beta$ .....	44
Isolamento do DNA dos linfócitos NK .....	45
Determinação dos rearranjos do gene TCR $\beta$ .....	45
PCR.....	46
<i>Differential Fluorescence Detection</i> .....	47
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS</b> .....	48
Avaliação da pureza dos linfócitos NK isolados por técnicas magnéticas.....	48
Os anticorpos anti-CD3 utilizados na marcação para citometria reconhecem um epitopo diferente do anticorpo anti-CD3 acoplado às esferas magnéticas. ....	49
Expressão de TCR $\beta$ e CD3 em linfócitos NK após purificação imunomagnética.....	50
Expressão de mRNA do CD56, TCR $\beta$ e GAPDH por PCR.....	51
Sequenciação da região TCR $\beta$ amplificada nos linfócitos NK .....	53
Rearranjos do gene TCR $\beta$ .....	54
<b>CAPÍTULO V. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b> .....	56
<b>CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFIA</b> .....	60

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- ADCC- Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
- APC- Célula apresentadora de antígenos
- CDR- Regiões determinantes de complementaridade
- CMEP- Progenitor mielóide-eritróide comum
- CLP- Progenitor linfóide comum
- CMLP- Progenitor mielóide-linfóide comum
- CMV- Citomegalovírus
- CMVM- Citomegalovírus murino
- DAP- *DNA-Activating protein*
- GalCer- *Glycosphingolipid  $\alpha$ -galactosyl ceramide*
- GM-CSF- *Granulocyte- macrophage colony-stimulating factor*
- GPI- Fosfatidilinositol glicano
- HLA- Antígeno leucocitário humano
- HSC- Células estaminais hematopoiéticas
- IEL- Linfócitos intestinais intraepiteliais
- IFN- Interferão
- iGb3- Isoglobotrihexocilceramida endógena
- Ig- Imunoglobulina
- IgSF- Superfamília das imunoglobulinas
- ITAM- *Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*
- ITIM- *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*
- IL- Interleucina
- ILT- *Immunoglobulin-like transcript*
- KIR- *Immunoglobulin-like receptors*
- LCR- *Leucocyte receptor complex*
- LILR- *Leucocyte immunoglobulin-like receptor*
- LRF- *Leukaemia/lymphoma-related factor*
- MHC- Complexo major histocompatibilidade
- MIP- *Macrophage inflammatory protein*
- NCR- Receptor de citotoxicidade NK
- NCAM- *Neural cell adhesion molecule*
- NK- *Natural Killer*

NKC- *Natural killer cell gene complex*  
PI3K- Fosfatidilinositol 3-cinase  
PBL- Linfócitos do sangue periférico  
PBMC- Células mononucleares do sangue periférico  
PTK- Proteína tirosina cinase  
PSA- Ácido polissialico  
RAG- *Recombination activating gene*  
RSS- *Recombination signal sequences*  
TCR- Receptor da célula T  
TLS- Tecidos linfóides secundários  
TM- Transmembranar  
TNF- Factor de necrose tumoral  
VASE- *Variable Alternatively Spliced Exon*

## RESUMO

Os linfócitos NK são linfócitos grandes granulares, de curta duração originados a partir da linhagem linfóide, actualmente considera-se que não apresentam rearranjos do gene do receptor dos linfócitos T (TCR) ou o complexo TCR-CD3 completamente formado e expressam os receptores CD16 e CD56 (1, 2). Estes linfócitos medeiam funções essenciais na imunidade inata através da destruição directa, sem estimulação prévia, de células infectadas por vírus e células malignas. Adicionalmente, também introduzem a destruição indirecta, após estimulação, através do recrutamento de outros elementos do sistema imunológico e da libertação de factores solúveis, como as citocinas e quimiocinas. Assim, os linfócitos NK participam tanto no sistema imunológico inato como no adaptativo e são considerados como a interface entre os dois sistemas (3, 4).

Ao contrário dos linfócitos T, os linfócitos NK não apresentam um gene único que permita a sua definição. No entanto, apesar dos genes do TCR não serem expressos produtivamente, existem diversos antigénios e semelhanças funcionais partilhadas com os linfócitos T, sugerindo que poderão estar relacionados e mediar funções comuns. Em particular, foi demonstrado que para além do  $Fc\epsilon R1\gamma$  e  $CD3\zeta$ , os linfócitos NK humanos poderão expressar outras subunidades do complexo TCR-CD3, como  $CD3\epsilon$ ,  $CD3\gamma$ , e  $CD3\delta$  (5).

Estas semelhanças levaram a formular a hipótese de que os linfócitos T e NK poderão estar relacionados e que poderão partilhar um progenitor comum.

No seguimento destes estudos e da evidência de que, *in vitro*, a IL-15 induz a sobrevivência e diferenciação dos linfócitos T, verificada através da percentagem de linfócitos T  $CD8^+$  que adquiriram marcadores dos linfócitos NK (6), este trabalho teve como objectivo investigar a expressão do gene  $TCR\beta$  e os rearranjos deste gene a nível de DNA, em linfócitos NK isolados *ex vivo*, de dadores saudáveis.

Após a obtenção de linfócitos NK de elevada pureza isolados *ex vivo*, por técnicas imunomagnéticas, os resultados demonstraram a expressão de mRNA do gene  $TCR\beta$ , visualizando-se, após PCR, uma banda com tamanho igual (139 pb) ao segmento do gene  $TCR\beta$ , em todas as experiências realizadas (n=5). Através da sequenciação do segmento do gene amplificado, confirmou-se que correspondia ao segmento do cDNA do gene  $TCR\beta$ .



Adicionalmente, a partir da determinação dos rearranjos do gene TCR $\beta$  verificou-se que a população de linfócitos NK isolados numa das experiências realizadas, aparentemente correspondia a uma população oligoclonal.

Apesar de serem necessários mais estudos, estes resultados poderão sugerir, ao contrário do que é actualmente aceite, a existência do gene TCR $\beta$  rearranjado em linfócitos NK.

**ABSTRACT**

NK cells are short-lived large, granular lymphocytes from the lymphocyte lineage, currently it is considered with absence of T-cell receptor (TCR) gene rearrangements or a fully assembled TCR-CD3 complex, and expression of receptors CD16 and CD56 (1, 2). They mediate critical functions in innate immunity by directly destroying virally infected and malignantly transformed cells without prior stimulation. In addition, they also induce indirect elimination via recruitment of other elements of the immune system by releasing soluble factors, such as cytokines and chemokines upon stimulation. Thus, NK cells take part in both innate and adaptive immunity, and regarded as interfaces between these two branches of systems (3, 4).

Unlike T cells, NK cells lack a known specific gene that may allow its definition. Although NK cells do not express functional TCR genes, there are several antigenic and functional similarities to T-cells suggesting that may be related and mediate common functions. In particular, it has been shown that besides FcεRIγ and CD3ζ, human NK cells may express other components of the CD3-TCR complex, such as CD3ε, CD3γ, and CD3δ (5).

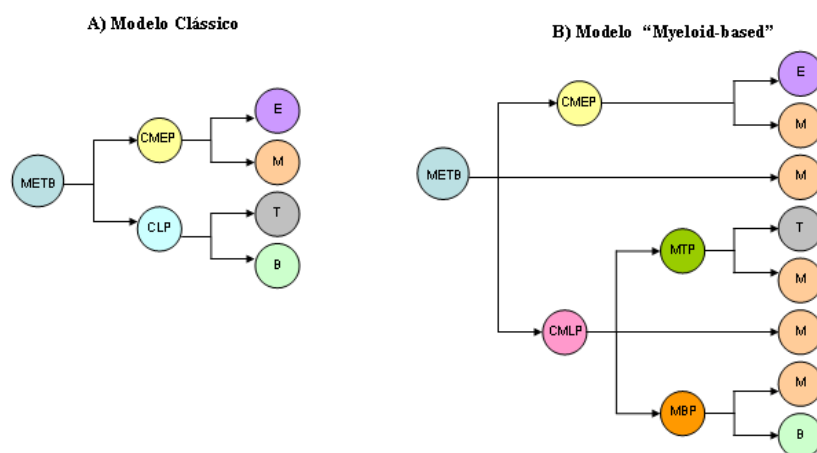
These similarities have led to the hypothesis that NK cells may be related to T cells and thus may share a common progenitor. Following these studies and the evidence that, *in vitro*, IL-15 induce T cell survival and differentiation seen as a percentage of CD8<sup>+</sup> T cells that acquire NK markers (6), in this study we aimed to investigate TCRβ gene expression and its rearrangements in NK cells *ex vivo* isolated from healthy controls.

By using immunomagnetic techniques we obtained highly pure *ex vivo* NK cells. Following PCR, using TCRβ specific primers, we observed in five independent experiments that these NK cells expressed a band of 139 bp, which was the expected size for the constant region of the TCRβ. By sequencing the amplified PCR product we confirmed that the band corresponded to the cDNA fragment of the TCRβ gene. In addition, the DNA TCRβ gene rearrangement analysis of one experiment suggested an oligoclonal population of isolated NK cells. Although further studies are necessary, these findings challenge the current concept and suggests that the TCRβ gene could be rearranged in a fraction of NK cells.

## CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

### Hematopoiese

Os diferentes tipos de células sanguíneas são formadas a partir das células estaminais hematopoiéticas (HSC). Ao longo do último século, a classificação baseou-se sobretudo em critérios morfológicos, originando o conceito dicotômico clássico (Modelo Clássico), segundo o qual a família das células sanguíneas é subdividida em duas linhagens: a linhagem mielo-eritróide e linfóide. Assim, é geralmente aceite que as HSC originam progenitores para estas duas linhagens e segundo este modelo originam um progenitor mielóide-eritróide comum (CMEP) que produz eritrócitos, megacariócitos, granulócitos e monócitos/macrófagos (7) e um progenitor linfóide comum (CLP), que produz linfócitos T, B e NK (8). As células dendríticas são também de origem hematopoiética, no entanto a linhagem a que pertencem permanece controversa e pouco clara (9). Em 2001, Kawamoto *et al* propuseram um modelo alternativo, o modelo “myeloid-based”, em que as HSC primeiro divergem para um progenitor mielóide-eritróide comum (CMEP) ou para um progenitor mielóide-linfóide comum (CMLP), não fazendo parte deste modelo o progenitor linfóide comum (CLP). O CMLP origina progenitores dos linfócitos T e B através do progenitor mielóide-T e progenitor mielóide-B, respectivamente. Estes dois modelos são muito diferentes, uma vez que no modelo clássico, os progenitores dos linfócitos T e B no ponto de ramificação não têm qualquer potencial mielóide, enquanto no modelo “myeloid-based”, o potencial para originar células mielóides é mantido em todos os ramos das linhagens eritróide, T e B (10, 11) (Figura I. 1).



**Figura I. 1** - Modelos representativos da hematopoiese. A) O modelo clássico propõe que as HSC primeiro divergem em CMEP e CLP (CMEPs são muitas vezes referidos como progenitor mielóide comum (CMPs)). E, M, T e B representam os progenitores das células eritróides, mielóides, T e B, respectivamente. B) Modelo “myeloid-based” na primeira ramificação são formadas CMEPs e CMLPs e o potencial mielóide persiste nas ramificações para os linfócitos B e T, mesmo após estas linhagens terem divergido. Adaptado de Kawamoto *et al*, 2010 (11).

## **Linfócitos T**

Os precursores dos linfócitos T são originados na medula óssea e migram através da corrente sanguínea para o órgão linfóide primário, o timo, onde ocorrem diferentes fases de maturação (12).

Os linfócitos T apresentam um receptor específico, o receptor das células T (TCR) que permite a diversidade de reconhecimento aos antígenos, podendo ser subdivididos em duas sub-populações, denominadas linfócitos  $T\alpha\beta$  ( $TCR\alpha\beta$ ), que correspondem a 90-95% dos linfócitos T do sangue periférico e linfócitos  $T\gamma\delta$  ( $TCR\gamma\delta$ ), que correspondem aos restantes 5-10% (12). O reconhecimento pelo TCR de moléculas MHC classe-I e de MHC classe-II resulta no desenvolvimento de dois principais tipos de linfócitos T com diferentes características funcionais, classificados pela expressão dos co-receptores CD8 e CD4: os linfócitos T CD8+ (linfócitos T citotóxicos) e linfócitos T CD4+ (linfócitos T auxiliares) (12). Os linfócitos T auxiliares ajudam outras células a responder a infecções extracelulares e a desempenharem as suas funções, enquanto os linfócitos T citotóxicos desempenham funções efectoras mais directas destruindo as células infectadas por vírus ou células neoplásicas (13).

### ***Receptor dos linfócitos T***

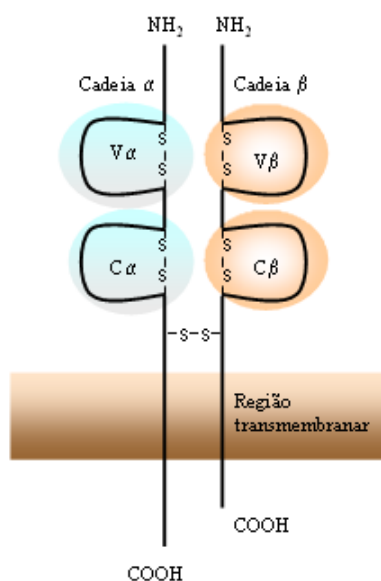
#### *Estrutura bioquímica*

O TCR é um heterodímero formado por uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$  ou uma cadeia  $\gamma$  e  $\delta$ . Cada cadeia contém um domínio N-terminal, variável (V), um domínio constante (C) e também uma região transmembranar (14, 15) (Figura I. 2).

No topo da região variável de ambas as cadeias existem três ansas (regiões hipervariáveis) que constituem as regiões determinantes de complementaridade ou CDR. A região variável da cadeia  $\beta$  apresenta uma ansa hipervariável adicional (HV4) que normalmente não contacta com o antígeno, não sendo considerada CDR. As regiões CDR1 e 2 fazem o contacto com a molécula do MHC, CDR1 da cadeia  $\alpha$  também interage com a região N-terminal do péptido antígeno, enquanto CDR1 da cadeia  $\beta$  interage com a região C-terminal. A região CDR2 reconhece o MHC (14, 15) e a região CDR3, que apresenta maior grau de diversidade é a principal responsável pelo reconhecimento do antígeno, esta região é formada pela junção dos segmentos V, D e J. As modificações nesta região afectam o reconhecimento do complexo péptido antígeno-molécula HLA.

O domínio constante consiste em curtas sequências de conexão em que os resíduos de cisteína das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  formam pontes dissulfureto, ligando as duas cadeias.

Ambas as cadeias apresentam uma região transmembranar com 21-22 aminoácidos e carregada positivamente constituída por aminoácidos hidrofóbicos através dos quais a molécula está ancorada à membrana celular e promove a interacção TCR-CD3. Por último apresentam uma curta cauda citoplasmática (terminal carboxilo) com 5-12 aminoácidos.



**Figura I. 2** - Esquema representativo das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do TCR, composto por uma cadeia  $\alpha$  e uma  $\beta$ . Cada cadeia apresenta uma região extracelular com dois domínios, um variável (V) e um constante (C), uma região transmembranar e uma cauda citoplasmática. Adaptado de Garcia *et al*, 1996 (16).

### *Genes do TCR*

Nos Humanos os genes do TCR estão localizados nos cromossomas 7 e 14. Os genes que codificam a cadeia TCR $\delta$  (TCRD) estão localizados no *locus* TCR $\alpha$  (TCRA) no cromossoma 14q11–12, enquanto os genes TCR $\beta$  (TCRB) e TCR $\gamma$  (TCRG) estão localizados nas posições cromossómicas 7q32–35 e 7p15, respectivamente (17, 18) (Figura I. 3). Os quatro genes são constituídos pelas regiões C e V, que são unidos durante a ontogenia tímica através de recombinação somática (19). Assim, os domínios V das cadeias TCR $\alpha$  e TCR $\gamma$  são formados a partir dos segmentos dos genes V e J enquanto as cadeias TCR $\beta$  e TCR $\delta$  são formadas a partir dos segmentos V, diversidade (D) e J (Figura I. 3). Os múltiplos segmentos não contíguos V, D e J sofrem rearranjo

durante o desenvolvimento dos linfócitos T, para formar exões domínio V completos, que são responsáveis pelo reconhecimento do antígeno.

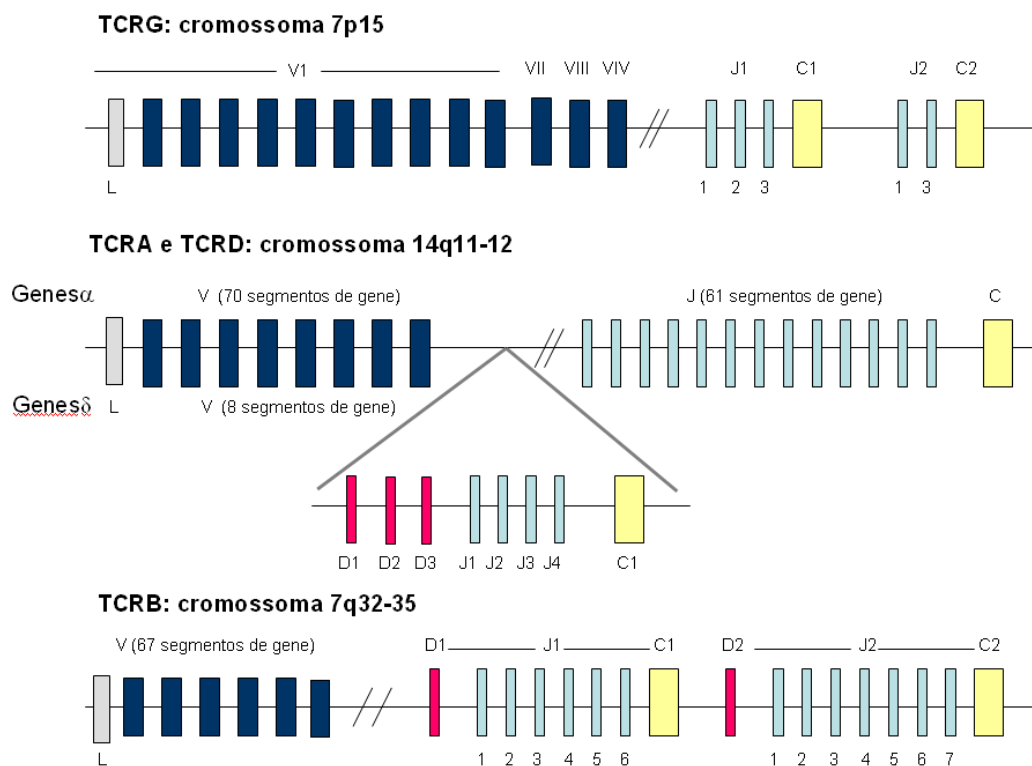
O **gene TCRA** são formados por 70 segmentos V do gene, divididos por 41 famílias e por, pelo menos 61 segmentos J não agrupados, dos quais 50 são genes funcionais, distribuídos por 800 kb a montante de apenas um único segmento C (20) (Figura I. 3).

O **gene TCRB** é formado por aproximadamente 67 segmentos V em que 47 são funcionais e 19 são pseudogenes (21). As famílias TCRBV funcionais estão agrupadas em 23 famílias baseado em mais de 75% de sequências de nucleótidos idênticas (22).

Os genes dos segmentos V estão separados de 2 grupos de segmentos genes, cada um com: um segmento C associado com conjuntos dos segmentos J e um único segmento D (D1 ou D2), são conhecidos pelos agrupamentos D-J-C (Figura I. 3). Existem 13 genes J, designados J1S1 a J1S6 e J2S1 a J2S7 (23).

O **gene TCRG** é constituído por cerca de 14 segmentos V e dois conjuntos J-C formados por 3 segmentos J (J1S1, J1S2 e J1S3) e 1 segmento C; e 2 segmentos J (J2S1 e J2S3) e 1 segmento C, respectivamente (Figura I. 3). Os 14 segmentos V pertencem a quatro famílias, a família TCRGVI é formada por 9 membros, 5 dos quais são funcionais e 4 dos quais são pseudogenes e as restantes 3 famílias (II, III e IV) cada uma é formada por um único segmento. A diversidade das combinações geradas é muito limitada. A união imprecisa de V-J, juntamente com inserções nos pontos de junção são importantes na formação de uma maior diversidade (24, 25).

O **gene TCRD** está localizado no *locus* do TCRA entre os segmentos dos AV e AJ. É rodeado por elementos de deleção TCRD, os rearranjos dos elementos de deleção ou rearranjos do segmento do gene AV para AJ provocam a deleção do *locus* do gene TCRD. A linhagem germinal codificada pelo *locus* TCRD é formada por 8 segmentos V, 3 segmentos D, 4 segmentos J e um único segmento C (14). TCRDV2 está localizado imediatamente a montante dos segmentos D e J, enquanto TCRDV3 está a seguir ao TCRDJ numa orientação invertida (Figura I. 3). TCRDV1 está localizado entre TCRAV a montante 360 kb do conjunto TCRDC, enquanto os restantes 5 genes TCRDV (descritos como TCRAV/DV) são também encontrados entre os genes TCRAV (20).



**Figura I. 3** - Organização da linhagem germlinal dos genes do TCR. Os *loci* TCRA, TCRB e TCRG estão localizados nas posições dos cromossomas 14q11–12, 7q32–35, e 7p15, respectivamente. O *locus* TCRD também está situado no cromossoma 14, no *locus* TCRA. As diferentes cores indicam o tipo do segmento do gene V, variável (azul escuro); D, diversidade (rosa); J, junção (azul claro); C, constante (amarelo). Adaptado de Hodges *et al*, 2003 (26).

### Receptor CD3

O CD3 é a porção invariante do complexo TCR e é formado por quatro cadeias  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  e  $\zeta$  diferentes, as quais se associam formando diferentes combinações de dímeros:  $\gamma\epsilon$ ,  $\delta\epsilon$  e  $\zeta\zeta$ . Estas subunidades são proteínas de membrana formadas por um domínio N-terminal extracelular, um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático C-terminal. Os domínios extracelulares dos heterodímeros CD3 $\delta\epsilon$  e CD3 $\gamma\epsilon$  têm uma conformação típica de domínios das imunoglobulinas (Ig), enquanto que os homodímeros CD3 $\zeta\zeta$  são nove resíduos de aminoácidos (27, 28, 29). Os domínios intracelulares de cada cadeia CD3 contêm sequências de tirosina conservadas denominadas ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), que são importantes na transdução do sinal (30). As cadeias CD3 $\delta$ ,  $\gamma$ , e  $\epsilon$  contêm cada uma um ITAM, a cadeia CD3 $\zeta$  contém três ITAMs. As regiões transmembranares das cadeias de CD3 contêm aminoácidos carregados negativamente, permitindo a ligação às cadeias do TCR. Apresenta 6 tirosinas no domínio intracelular, que são fosforiladas quando o TCR é activado. O segmento transmembranar é necessário tanto para expressão como para a

transdução do sinal. A subunidade  $\zeta$  encontra-se associada a TCR, em forma de homodímero  $\zeta\zeta$  e com menor frequência ligado a outra proteína, designada h, que é codificada pelo mesmo gene do que  $\zeta$ , por *splicing* alternativo (28, 29).

### *Estrutura dos genes CD3*

Nos Humanos, ambos os genes CD3 $\gamma$  e CD3 $\delta$  estão localizados no braço longo do cromossoma 11 e estão separados por cerca de 1,5 kb. O gene CD3 $\delta$  é constituído por 5 exões e o gene CD3 $\gamma$  por 7 exões. As ligações exão-intrão estão localizadas em posições homólogas dos dois genes, com excepção do gene CD3 $\gamma$  que contém dois genes adicionais. Uma característica do gene CD3 $\delta$  é o elevado nível de conservação da sequência de nucleótidos situada 1000 bases à frente do codão de iniciação (31, 32). O gene CD3 $\epsilon$  é constituído por 9 exões, três dos quais são muito pequenos. Através de um estudo comparativo de sequência foi possível confirmar a relação destes genes com a superfamília das imunoglobulinas (33).

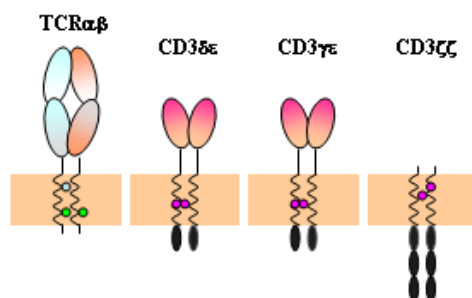
### *Complexo TCR $\beta$ -CD3*

O complexo receptor dos linfócitos T TCR-CD3 é um dos receptores transmembranares mais complexos que foram identificados e desempenha funções importantes no sistema imunológico. Os sinais enviados por este receptor são necessários para o desenvolvimento dos linfócitos T no timo, para a indução das respostas imunológicas mediadas pelos linfócitos T contra agentes infecciosos e para a diferenciação em populações efectoras e de memória (34).

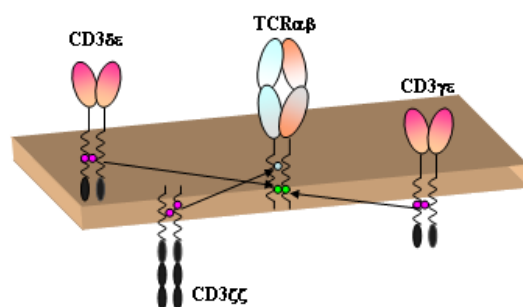
Este complexo é formado no retículo endoplasmático através de um processo ordenado, impulsionado pelas interacções entre as regiões extracelulares e transmembranares das subunidades (35, 36), é composto pelo heterodímero TCR $\alpha\beta$  (ou  $\gamma\delta$ ) e pelos dímeros CD3 $\gamma\epsilon$ , CD3 $\delta\epsilon$  e CD3 $\zeta\zeta$ , que estão envolvidos na transdução do sinal (37) (Figura I. 4). Os domínios Ig do TCR $\alpha$  e TCR $\beta$  são responsáveis pelo reconhecimento de antígenos e superantígenos (38), a região transmembranar liga o TCR $\alpha\beta$  aos dímeros CD3 (39). Os resíduos altamente conservados nas hélices transmembranares das cadeias TCR e CD3 foram considerados importantes para a formação do complexo TCR $\alpha\beta$ -CD3 (40). Tentativas recentes para elucidar as funções destas interacções revelaram a estequiometria do complexo nascente (36). A cadeia TCR $\alpha$  tem dois resíduos transmembranares básicos, um interactua com os resíduos



ácidos transmembranares de um heterodímero CD3 $\delta\epsilon$  e o outro com os resíduos ácidos do homodímero CD3 $\zeta\zeta$  (Figuras I. 4 e 5). Esta relação espacial é importante na função e proporciona uma indicação acerca da orientação dos domínios transmembranares. A cadeia TCR $\beta$  também apresenta resíduos transmembranares básicos altamente conservados, que interactuam com os resíduos ácidos nas hélices transmembranares de um heterodímero CD3 $\gamma\epsilon$  mas a relação entre estes resíduos com os da cadeia TCR $\alpha$  do heterodímero TCR $\alpha\beta$  é desconhecida. A composição do complexo nascente TCR $\gamma\delta$ -CD3 difere do complexo TCR $\alpha\beta$ -CD3. Os resíduos básicos transmembranares descritos para o TCR $\alpha\beta$  são conservados nos domínios transmembranares das cadeias homólogas TCR $\delta$  e  $\gamma$ , respectivamente. Apesar de se prever uma composição da subunidade idêntica ao complexo, CD3 $\delta\epsilon$  está ausente no complexo TCR $\gamma\delta$ -CD3 enquanto o CD3 $\delta$  citoplasmático está presente (41), 2 subunidades CD3 $\gamma\epsilon$  estão associadas com TCR $\gamma\delta$  (42). Curiosamente, a composição da subunidade do complexo TCR $\gamma\delta$ -CD3 dos linfócitos T  $\gamma\delta$  *naive* é diferente das células activadas. Nos linfócitos T $\gamma\delta$ , o TCR está associado a pelo menos duas diferentes formas glicosiladas de TCR de CD3 $\gamma\epsilon$  e FcR $\gamma$  está incorporado no complexo como homodímero ou heterodímero com CD3 $\zeta$  (43).



**Figura I. 4** - Carga dos resíduos transmembranares (TM) do TCR e dímeros associados. Nos domínios TM do TCR estão presentes 3 resíduos básicos conservados (arginina e lisina no TCR $\alpha$  a azul claro e verde, respectivamente e lisina TCR $\beta$ ), enquanto nos dímeros CD3 $\delta\epsilon$ , CD3 $\gamma\epsilon$  e CD3 $\zeta\zeta$  estão presentes 6 resíduos ácidos (rosa). A arginina do TCR $\alpha$  e dois resíduos ácidos do CD3 $\zeta\zeta$  estão localizados na parte superior do domínio TM, enquanto os resíduos de lisina do TCR $\alpha$  e  $\beta$  assim como os resíduos do CD3 $\delta\epsilon$  e CD3 $\gamma\epsilon$  estão no centro. Adaptado de Call *et al*, 2002 (39).



**Figura I. 5** - Interações entre o complexo TCR-CD3: cada um dos 3 resíduos básicos das regiões transmembranares interactua com os 3 dímeros de sinalização que se associam com o TCR $\alpha\beta$ . Adaptado de Call *et al*, 2002 (39).

***Internalização, reciclagem e degradação do complexo TCR-CD3***

O número de complexos TCR-CD3 é mantido em equilíbrio através da síntese, secreção de novos polipéptidos e da internalização, reciclagem e degradação (44).

A activação dos linfócitos T por antígenos, anticorpos anti-TCR-CD3 ou activadores farmacológicos da proteína cinase C resultam num aumento da internalização de TCR-CD3, seguido da diminuição dos níveis de TCR-CD3 da superfície (44, 45).

Em repouso o TCR é continuamente internalizado e reciclado, na superfície dos linfócitos T, um ciclo que é dependente dos motivos de endocitose dileucina e o motivo baseado em tirosina, presentes principalmente nas regiões citosólicas (46, 47, 48), que medeiam as interacções dos receptores com os componentes moleculares da maquinaria endocítica celular. O processo de internalização-reciclagem pode facilitar o rápido transporte dos TCR para as sinapses imunológicas via endossoma de reciclagem quando é encontrada a APC adequada (49). Estudos sugerem que a diminuição do TCR é mediada por um aumento da degradação e internalização (50, 51), enquanto outros indicam que é resultado do impedimento da reciclagem (52). Assim, investigadores defendem que após a activação dos linfócitos T a endocitose do TCR é aumentada e a reciclagem do TCR é reduzida, levando à diminuição do TCR na superfície da célula, o que ocorre, em parte devido à fosforilação de um resíduo de serina acima do motivo dileucina no CD3 $\gamma$ . O motivo dileucina liga-se a AP-2, que por sua vez recruta maquinaria de endocitose dependente da clatrina levando à internalização do TCR (53). Apesar, do motivo dileucina dependente da serina do CD3 $\gamma$  ser necessário para a diminuição do TCR induzida por forbol-éster, não é necessário para a diminuição do TCR induzida por anticorpos anti-CD3 ou por APCs com o pMHC apropriado. Nestes casos, parecem estar envolvidos outros sinais endocíticos (54). Adicionalmente Borrot *et al*, demonstraram que o CD3 $\epsilon$  também contém sinais de endocitose, podendo a internalização do complexo TCR-CD3 ser originada por uma ou mais cadeias de CD3, dependendo do tipo de estímulo de indução de internalização (55). Outros investigadores descreveram que a ligação TCR induz a separação física da cadeia CD3 $\zeta$  do restante complexo TCR-CD3. Enquanto CD3 $\zeta$  permanece na superfície da célula, o complexo TCR $\alpha\beta$ CD3 $\epsilon\gamma\delta$  é internalizado. Tendo sido demonstrado que o CD3 $\zeta$  é necessário para a manutenção da expressão do TCR estável na superfície (56). Segundo alguns estudos, existe uma relação dinâmica entre esta subunidade e o restante complexo TCR-CD3, podendo apenas o CD3 $\zeta$  ser transportado para o complexo de

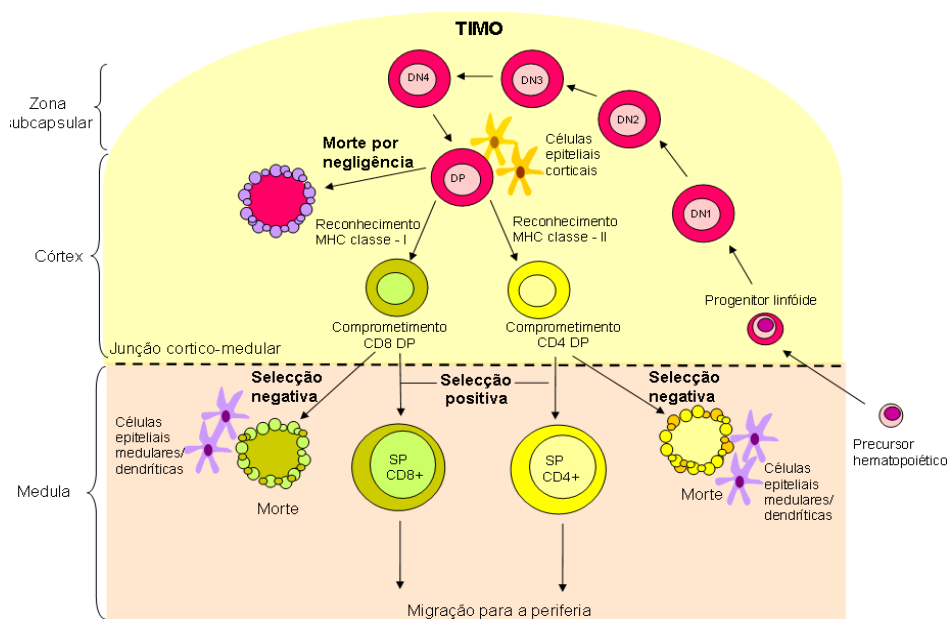
Golgi e ser substituído na superfície por outros recém formados (57). Assim foi proposto um mecanismo molecular de diminuição que ocorre em dois estádios: primeiro a ligação do TCR induz a separação do CD3 $\zeta$  do restante complexo, e segundo, parte deste complexo revela motivos que são reconhecidos pela maquinaria vesicular intracelular e são retidos e/ou redireccionados para degradação. A ligação origina uma prevenção intracelular da reciclagem do TCR e não a indução da internalização do TCR. A contribuição destes motivos para a reciclagem e diminuição ainda não foi determinada. Mantêm-se pouco claros os mecanismos subjacentes à diminuição do TCR, assim como se é necessária para a activação dos linfócitos T, uma vez que segundo alguns investigadores a internalização é praticamente igual com e sem ligação do complexo ao pMHC, no entanto elevadas doses de pMHC demonstraram um pequeno aumento da internalização, mas que não explica a perda substancial do TCR da superfície. Parece pouco provável que a internalização seja um pré-requisito para a transdução de sinal e activação dos linfócitos T (58), sugerindo que a rápida internalização é requerida para direccionar uma série de sinais que facilitam a libertação do pMHC dos complexos TCR (59). Acreditando-se que a função da diminuição é proteger os linfócitos T da sobre-estimulação (60). Seja qual for o caso, a degradação do TCR parece ocorrer através de mecanismos dependentes dos lisossomas e do proteossoma (59, 61). A contribuição da sinalização do TCR para a internalização e diminuição também ainda não é conhecido, alguns estudos sugerem é dependente da proteína tirosina cinase (PTK), que em última instância, resulta na degradação do TCR (59, 62). No entanto, noutros estudos, inibidores de PTK não afectam a diminuição (63, 64). Estudando linfócitos T que expressam dois TCR distintos, investigadores concluíram que apenas ocorre diminuição dos TCR activados pelo pMHC apropriado (65, 66). Por outro lado, estudos demonstraram que os TCR ligados a antigénios, superantigénios ou anticorpos anti-TCR não originaram apenas a diminuição dos TCR directamente activados, como também provocaram a co-modulação de parte dos TCR não ligados (67, 68). Alárcon *et al* demonstraram que TCR não ligados são modulados por um mecanismo que necessita da activação da proteína cinase C pelo TCR ligado (69). Mais recentemente, estudos sugerem que a modulação de um TCR não ligado é altamente dependente da proteína cinase C e do motivo dileucina endocitose do CD3 $\gamma$ , ao contrário da internalização do TCR ligado que é PTK-independente (67). Alarcon *et al* investigaram os mecanismos que medeiam a internalização dos TCR ligados e co-modulados e descobriram que apesar de TCR não ligados serem internalizados por um

processo dependente de clatrina, a internalização do TCR ligado é dependente de lípidos (68). A diminuição do TCR é um processo muito complexo que envolve tanto os TCR que estão directamente envolvidos na ligação como os que não estão, sendo aparentemente internalizados através de vias endocíticas distintas.

### ***Diferenciação dos Linfócitos T***

A diferenciação e maturação dos linfócitos T no timo é um processo complexo e muito controlado que se inicia com a migração das células progenitoras derivadas da medula óssea e termina com a formação de linfócitos T capazes de reconhecer antígenos no contexto de moléculas codificadas por genes do complexo MHC (63). Para manutenção da produção e desenvolvimento dos linfócitos T é necessária a entrada contínua no timo de progenitores hematopoiéticos, através da junção corticomedular (69, 70). Alguns dos descendentes dessas células ocupam a zona cortical perimedular durante um prolongado período de tempo, antes de migrarem para a zona subcapsular (71) onde ocorre a proliferação substancial (72, 73). À medida que ocorre a maturação procedem do córtex para a medula. As células epiteliais, células dendríticas, fibroblastos e outros tipos celulares proporcionam diversos factores de crescimento e outras moléculas essenciais para o desenvolvimento dos linfócitos T, incluindo IL-7 (Figura I. 6). A sinalização de Notch também é essencial durante o desenvolvimento intratímico, nomeadamente diferenciação das linhagens B e T. Estudos demonstraram que a inibição de Notch1 em progenitores hematopoiéticos resulta no desenvolvimento de linfócitos B no timo (74). Recentemente foi demonstrado que o protooncogene LRF reprime a expressão de Notch1. A supressão de LRF resultou no desenvolvimento na medula óssea de linfócitos T aberrantes e diminuição dos progenitores iniciais de linfócitos B (75). Notch e IL-7 cooperam na proliferação das células e supressão da linhagem não-T, que permitirá a progressão dos linfócitos T após interacção com o microambiente estromal (76). Diversos estudos também associam a via de sinalização Notch a eventos de diferenciação ocorridos após o comprometimento da linhagem T, incluindo a regulação do rearranjo do gene TCR $\beta$  e decisões de linhagem  $\alpha\beta$  *versus*  $\gamma\delta$ , ou CD4 *versus* CD8 (77). A diferenciação dos linfócitos T no timo é fenotipicamente distinguida pela expressão dos co-receptores CD4 e CD8, podendo ser duplos negativos (DN, CD4-CD8-), duplos positivos (DP, CD4+CD8+) ou simples positivos (SP, CD4+CD8- ou CD4-CD8+). Os timócitos DN podem originar linfócitos T que expressam  $\alpha\beta$  ou  $\delta\gamma$  (78) (Figura I. 6). Os timócitos DP são as primeiras células na via de desenvolvimento a

expressar o TCR na superfície. A sinalização mediada pela interacção do TCR com péptido-MHC determina o destino do seu desenvolvimento. Quatro processos diferentes caracterizam esta selecção: apoptose (morte por negligência), selecção negativa, selecção positiva e desenvolvimento linhagem específica (78,79). Maioria dos timócitos DP (~90%) expressam TCR mas a interacção entre os complexos MHC-péptido próprio é tão fraca que os sinais intracelulares necessários para a manutenção da viabilidade não são gerados, levando à morte por negligência. Numa pequena fracção de linfócitos T imaturos (~5%) os TCR ligam-se muito bem aos ligandos-próprios, se deixarem o timo, estes linfócitos podem provocar doenças autoimunes. A sinalização da ligação destes TCR com ligandos MHC-péptidos promove a morte rápida por apoptose (selecção negativa). As células que expressam TCR, reconhecem ligandos-próprios e geram sinais que têm intensidade intermédia relativamente aos que resultam em negligência ou selecção negativa, iniciam um processo conhecido como selecção positiva, que resulta na diferenciação em linfócitos maduros CD4+ ou CD8+ (figura I. 6) (13).



**Figura I. 6** - Progenitores linfóides comprometidos surgem na medula óssea e migram para o timo. Inicialmente não expressam TCR, nem CD4 e CD8 (DN; duplos negativos). Os timócitos DN diferenciam-se na região subcapsular do timo e podem ser subdivididos em 4 estádios: DN1,  $CD44^+CD25^-$ ; DN2,  $CD44^+CD25^+$ ; DN3,  $CD44^-CD25^+$  e DN4,  $CD44^-CD25^-$ . No estágio DP (duplo positivo) interagem com células epiteliais corticais que expressam uma elevada densidade de moléculas MHC classe-I e -II associadas a péptidos-próprios. O destino dos timócitos DP depende da sinalização mediada pela interacção do TCR com estes ligandos MHC-péptidos próprios. Uma fraca sinalização resulta em apoptose. Sinalização muito forte promove apoptose aguda (selecção negativa). O nível intermediário de sinalização inicia a maturação efectiva (selecção positiva). Os timócitos que expressam TCR que se ligam a complexos péptidos-MHC classe-I tornam-se linfócitos T CD8+, enquanto os que expressam TCR e que se ligam péptidos-MHC-II tornam-se linfócitos T CD4+; estas células estão prontas para migrarem da medula para os órgãos linfóides periféricos. Adaptado de Germain *et al*, 2002 (13).

Os timócitos DP são os únicos na linhagem de linfócitos T que expressam ambos os co-receptores CD4 e CD8. Estas proteínas transmembranares apresentam domínios extracelulares que promovem a ligação do TCR aos ligandos do MHC (ligam-se especificamente a determinantes invariantes nas moléculas MHC classe-II e classe-I, respectivamente) e domínios intracelulares a que aumentam a transdução do sinal TCR, estes domínios intracelulares associam-se à proteína não receptora tirosina cinase LCK, que inicia a transdução do sinal TCR quando enzimaticamente activada (80, 81, 82).

A especificidade de TCR para MHC durante a selecção positiva está associada, entre outros factores, à diferenciação selectiva para linhagem CD4 ou CD8, nomeadamente o reconhecimento de moléculas MHC classe-I ou classe-II, que promovem o comprometimento para a linhagem CD8 ou CD4, tornando-se linfócitos T CD4+ ou CD8+ simples positivos (SP) (68).

Os 1% de timócitos que transitam com sucesso a selecção positiva e negativa sofrem maturação adicional que promove a saída regulada do timo. Após a maturação na periferia linfóide, estes juntam-se aos linfócitos T maduros. A indução da tolerância própria entre quaisquer linfócitos T reactivos continua na periferia linfóide por vários meios, inclusive através da actividade dos linfócitos T reguladores (83).

A população de linfócitos T maduros periféricos recircula do sangue para a linfa e volta novamente, para o baço e nódulos linfáticos, procurando invasores. Este é um processo cuidadosamente controlado, regulado pela expressão de receptores nos linfócitos e pela expressão ou formação de adressinas pelos elementos estromais (84, 85).

### ***Rearranjo do gene TCR: exemplo TCR $\beta$***

Os linfócitos T maduros são caracterizados pela capacidade do TCR reconhecer péptidos específicos apresentados pelas moléculas MHC classe-I ou classe-II. Para responder a qualquer antígeno particular, a população de linfócitos T periféricos deve ser muito diversa. Esta heterogeneidade é originada durante a diferenciação dos linfócitos T no timo (86).

Durante a maturação das cadeias  $\alpha\beta$  (e  $\gamma\delta$ ) dos linfócitos T, a justaposição de vários segmentos de genes origina a formação das cadeias TCR $\alpha$  e TCR $\beta$  ou TCR $\gamma$  e TCR $\delta$ .

A recombinação dos segmentos V(D)J do TCR é iniciada pelo reconhecimento das sequências sinal de recombinação (RSSs) que flaqueiam os segmentos codificantes. As RSSs consistem em sequências de heptâmeros (CACAGTG) e nonâmeros (ACAAAACC ou GGTTTTGT) separados por sequências menos conservadas de 12 ou 23 pb. Durante a maturação, os linfócitos pré-T expressam transitoriamente os genes RAG1 e RAG2 para fundir os segmentos V, (D) e J (122). As RAG-1 e RAG-2 cooperam no reconhecimento de RSSs, que actuam como local de reconhecimento para a recombinação VDJ e marcam os pontos onde ocorre a recombinação somática. A recombinação apenas ocorre nos segmentos de gene flanqueados pelos diferentes espaçadores (regra 12-23) (87). Assim, os segmentos do gene V flanqueados a 3' por um espaçador de 23 pb pode recombinar com segmentos D ou directamente com segmentos J, cada um deles flanqueado a 5' por um espaçador de 12 pb. O rearranjo do TCRB e TCRD é um processo em dois passos, em que o segmento D primeiro recombina-se com o segmento J e depois o segmento V recombina-se com D-J (Figura I. 7). Como os genes TCRA e TCRG não apresentam o segmento D, nestas duas cadeias apenas ocorre a recombinação V-J.

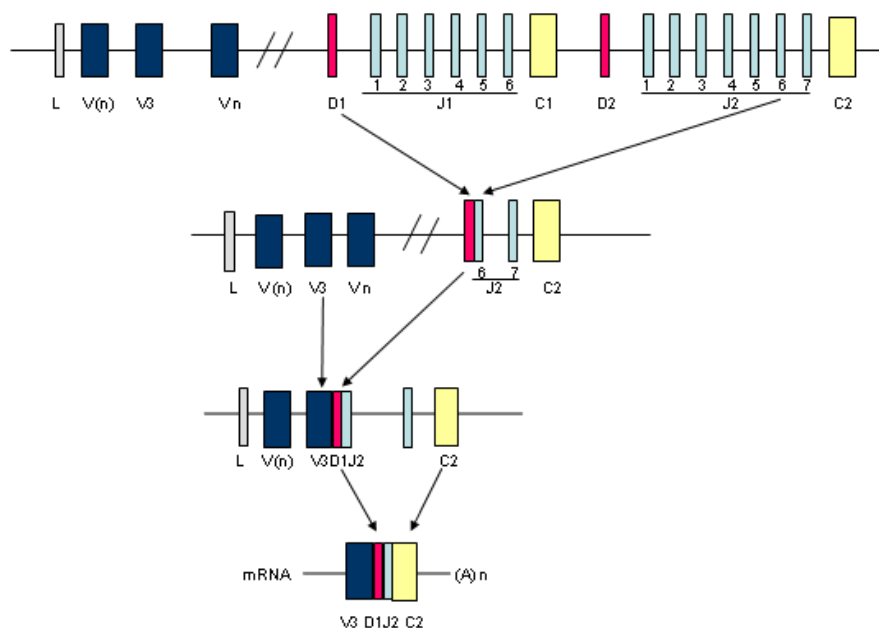
A fusão entre segmentos distintos V, (D) e J, assim como as diferentes combinações de junção dos segmentos, originam uma vasta variedade de sequências de nucleótidos da cadeia TCR $\beta$ . A presença de polimorfismos nos segmentos génicos da linhagem germinal que codificam o domínio variável do TCR também contribui para a elevada diversidade.

A recombinação entre os segmentos pode ser feita com deleção ou inversão, com formação da “junção codificante” e “junção sinal”. Uma maior diversidade também é conseguida pela adição de nucleótidos N e P não codificados na linhagem germinal, na região de junção durante o desenvolvimento dos linfócitos T. A deoxinucleotido transferase terminal incorpora aleatoriamente deoxinucleótidos na junção codificante dos segmentos durante o rearranjo (nucleótidos N) (88). Além disso, a estrutura em laço resultante do início da quebra da dsDNA será clivado, levando a formação de extremidades coesivas, que resultarão na inserção de sequências palindrómicas (nucleótidos P) entre os segmentos rearranjados.

A junção das regiões V(D)J codificam o CDR3 hipervariável (84). Os CDRs (CDR1 e CDR2 nos genes V e CDR3 na junção V(D)J) são regiões com elevada variabilidade, são o local de ligação do antigénio, com o CDR3 posicionado no centro do local de ligação do antigénio para o contacto directo com o MHC-péptido.

A diversidade é também originada pela combinação das cadeias individuais TCR $\alpha$  e TCR $\beta$  ou TCR $\gamma$  e TCR $\delta$ , estimando que desta forma poderão ser produzidos  $10^{15}$  diferentes TCR (87).

Quando ocorre a recombinação dos segmentos V(D)J, ou seja, um rearranjo produtivo, há a expressão de uma cadeia  $\beta$  na superfície da célula. Isto resulta em sinais de regulação negativos para o interior da célula que previnem outros rearranjos V(D)J, por um mecanismo chamado de exclusão alélica, o qual garante que um clone de linfócitos T expresse uma única cadeia  $\beta$  na superfície celular (89). Acredita-se que a exclusão alélica ocorra devido a mudanças na acessibilidade dos segmentos génicos V $\beta$ . No rearranjo da cadeia  $\alpha$  não há a participação de mecanismos de exclusão alélica, ou seja, pode haver a expressão de mais de uma cadeia  $\alpha$  na superfície celular, devido, provavelmente, ao grande número de segmentos génicos V $\alpha$  e J $\alpha$  e também devido à ausência de segmentos de diversidade (D).



**Figura I. 7** - Rearranjo do gene TCRB. A RAG medeia a recombinação do *locus* TCRB, num processo de 2 passos, em que o segmento diversidade (D) primeiro recombina-se com o segmento junção (J), seguido da recombinação do segmento variável (V) com o bloco DJ. Adaptado de Hodges *et al*, 2003 (26).

### ***Linfócitos T maduros***

Como consequência da selecção tímica, mais de 98% dos timócitos morrem durante a maturação. Os linfócitos T que sobrevivem deixam o timo e formam o reportório de linfócitos T periférico, caracterizado pela expressão de diversos receptores na superfície (13, 90, 91). O receptor dos linfócitos T, conforme referido, confere ao



linfócito especificidade no reconhecimento dos antígenos (92). Um pequeno grupo de linfócitos T periféricos apresenta um TCR alternativo que é composto por cadeias  $\gamma$  e  $\delta$ , os linfócitos  $T\gamma\delta$ . Estes linfócitos aparentemente reconhecem antígenos directamente, não necessitam da apresentação pelas MHC ou outras moléculas e não dependem do processamento dos antígenos. A diversidade do  $TCR\gamma\delta$  é limitada, sugerindo que os ligandos para o  $TCR\gamma\delta$  são conservados e invariantes.

A expressão dos co-receptores CD4 e CD8 é exclusiva de linfócitos T pós-tímicos maduros, os quais ligam-se, respectivamente, a locais invariantes de MHC classe-II ou -I das células apresentadoras de antígenos (APCs), estabilizando o complexo MHC-peptido-TCR durante a activação dos linfócitos T (91). Os domínios citoplasmáticos de CD4 e CD8 estão constitutivamente associados à cinase tirosina p56lck da família src a qual fosforila os motivos de reconhecimento no complexo CD3 (ITAM), promovendo a activação de linfócitos T.

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> funcionam como reguladores de outras células do sistema imunitário através da secreção de citocinas ou através do contacto directo célula-célula, pelo que, são denominados T *helper* (Th). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> eliminam células-alvo infectadas, sendo por isso denominados linfócitos T citotóxicos. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> recirculam do sangue periféricos para os órgãos linfóides secundários à procura de antígenos.

Os linfócitos T que emergem do timo são *naive*, ou seja, nunca estiveram em contacto com antígenos-específicos. Em Humanos, estes linfócitos são caracterizadas fenotipicamente pela expressão da isoforma CD45, denominada CD45RA (93), normalmente a recirculação é limitada ao sangue e aos tecidos linfóides secundários, no entanto, em algumas doenças autoimunes poderão acumular-se cronicamente nos tecidos inflamados. Quando activados, proliferam e diferenciam-se em células efectoras especializadas. A diferenciação é caracterizada por diversas alterações fenotípicas e funcionais, como alterações na capacidade migratória, na sobrevivência, e na secreção de citocinas efectoras (ex. IL-4 e IFN- $\gamma$ ). A maioria dos linfócitos T *naive* activados tornam-se células efectoras de curta duração, no entanto alguns poderão fazer parte dos linfócitos T de memória de longa duração. Estes linfócitos podem ser caracterizados pela expressão da isoforma, CD45, denominada CD45RO, respondem rapidamente a antígenos e apresentam diversas funções efectoras (93).

Durante a estimulação dos linfócitos T, o reconhecimento do complexo péptido-MHC pelo TCR induz o agrupamento do TCR e de outros receptores da superfície, é activada uma cascata de sinalização que resulta em alterações transcripcionais dos linfócitos T.

A activação dos linfócitos T *naive* depende de um segundo sinal, que geralmente é fornecido pelas APCs nos órgãos linfóides secundários. Diversos trabalhos demonstraram que a glicoproteína CD28 de 44 kDa é a principal molécula coestimulatória envolvida na activação (94).

Ao contrário dos linfócitos T *naive*, os linfócitos T de memória não necessitam da coestimulação para a activação e o antígeno específico pode ser apresentado por APCs não profissionais (94).

### **Linfócitos NK**

Os linfócitos “natural killers” (NK) são células linfóides que não necessitam de imunização ou pré-activação, reconhecem e eliminam células-alvo através da produção de quimiocinas e citocinas.

Apesar de serem tradicionalmente classificados como células do sistema imunitário inato, são funcional, morfológica e fenotipicamente similares aos linfócitos T e são frequentemente descritos como linfócitos grandes granulares (95).

A actividade dos linfócitos NK ocorre de forma antígeno não-específica, mediada por diferentes receptores de superfície inibidores e activadores.

Através de citometria, os investigadores estabeleceram que os linfócitos humanos NK, no sangue periférico, podem ser identificados pela inexistência da expressão na superfície de antígenos específicos de outras linhagens, incluindo CD3 (linfócitos T), CD14 (monócitos e macrófagos) e CD19 (linfócitos B) e pela expressão positiva de CD56 (96).

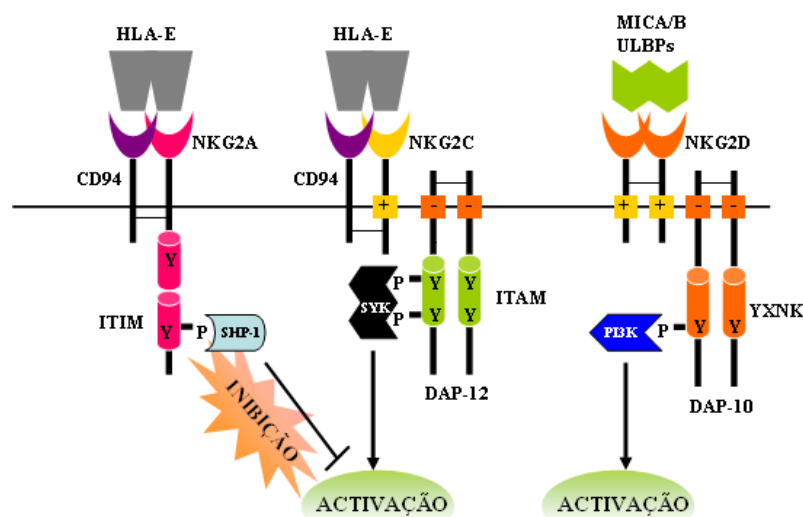
Actualmente, a função de CD56 ainda é desconhecida e a maioria, senão todos, os linfócitos NK no sangue periférico, expressam CD56. Assim, os linfócitos NK humanos, são geralmente identificados pelo fenótipo CD3- CD56+.

### **Receptores de NK**

A reactividade dos linfócitos NK é controlada pelo balanço da activação regulatória e moléculas de superfície inibidoras que interagem com moléculas HLA específicas, na superfície das células-alvo.

Os genes que codificam os receptores NK podem ser divididos em complexo de receptores de leucócitos (LCR) e complexo natural killer (NKC). O LCR está localizado no cromossoma 19q13.4 e codifica os membros da superfamília imunoglobulina (IgSF), enquanto NKC encontra-se no cromossoma 12p13.1 e codifica as proteínas transmembranares tipo II, moléculas aparentadas à lectina tipo-C (família CD94 e NKG2) (97).

Os receptores da família aparentada à lectina tipo-C encontram-se no cromossoma 12, são heterodímeros formados por uma subunidade CD94 covalentemente ligada a diferentes cadeias codificadas pelo gene da família da NKG2 aparentada à lectina tipo-C (98, 99, 100). O CD94 é produto de um gene não polimórfico e não apresenta domínio citoplasmático, para a transdução de sinais (101). Os domínios extracelulares e citoplasmáticos das moléculas NKG2 são estruturalmente diversos, apresentando diferenças no reconhecimento do ligando e na transdução do sinal (102, 103). Actualmente estão bem caracterizados os membros da família NKG2/CD94 inibitórios (NKG2A, NKG2B) e activadores (NKG2C, NKG2E) (104). O complexo CD94/NKG2A liga-se a moléculas não clássicas MHC classe-I HLA-E (105). Esta molécula liga-se a péptidos líder derivados de HLA-A, HLA-B, HLA-C, e HLA-G, assim, CD94/NKG2A monitoriza a expressão das moléculas HLA classe-I na superfície das células (106). As moléculas NKG2A e B apresentam grupos de ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) que actuam como inibidores (107, 108, 109), enquanto NKG2C, NKG2D, e NKG2E não apresentam ITIMs e transmitem sinais de activação (110, 111) (Figura I. 8). A molécula NKG2C está associado à DAP-12 (*DNA-activating protein*) e a ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activating motif*) que fornece sinais de activação celular (110) (Figura I. 8). A molécula NKG2D não se associa a CD94, o domínio intracelular não tem motivos de sinalização e requer a associação à subunidade DAP-10, que apesar de não apresentar ITAMs contém um local de ligação para recrutamento da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), necessária para a transdução do sinal (107, 108) (Figura I. 8). A molécula NKG2E é semelhante a NKG2C, no domínio citoplasmático (112), que permite a associação com proteína DAP-12 (113). Aparentemente, NKG2F pode regular a activação através da competição com os outros receptores como NKG2C e NKG2E pela DPA-12. No entanto a exacta função ainda não é conhecida (113).

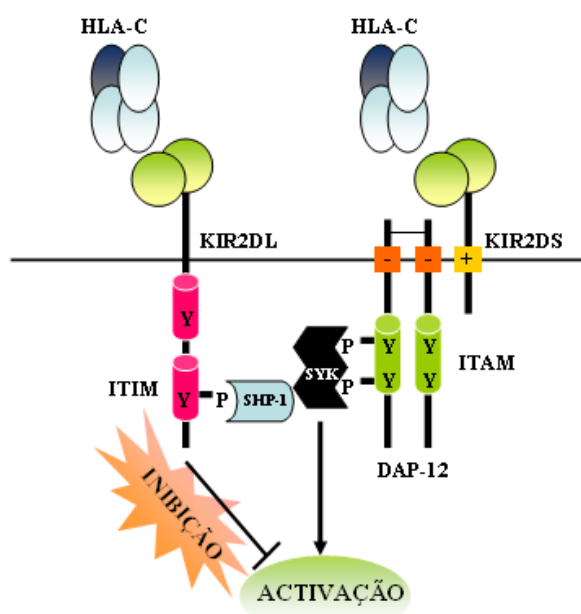


**Figura I. 8** - Receptores ativadores e inibidores da família aparentada à lectina tipo-C. Os receptores da família aparentada à lectina tipo-C são formados por heterodímeros das famílias CD94 e membros da família NKG2 inibitórios (NKG2A) e ativadores (NKG2C), ligados por pontes dissulfeto e que reconhecem a molécula MHC classe-I não clássicas HLA-E. NKG2A contém ITIMs que transmitem sinais através de SHP-1/2 e medeiam sinais inibitórios. O NKG2C apresenta um domínio transmembranar carregado positivamente que interage com DAP-12 e transmite sinais ativadores através de membros da família Syk. O NKG2D é o único membro da família NKG2 que não se associa a CD94, liga-se a ligandos MHC-like como da família MICA, MICB e ULBP, através do seu domínio transmembranar carregado positivamente. NKG2D associa-se à molécula DAP-10 que contém motivos YXNK para ligar-se à cinase PI3-k e enviar sinais ativadores. Adaptado de Farag *et al.*, 2002 (114).

Os receptores KIRs estão localizados na região complexo de receptores de leucócitos no cromossoma 19p13.4 e pertencem à IgSF. Estes receptores reconhecem especificamente HLA-A, HLA-B, e HLA-C e produzem sinais estimuladores e inibidores, dependendo da sequência do seu domínio intracelular. Os KIRs inibitórios e ativadores têm domínios extracelulares semelhantes, consequentemente, ligam-se a ligandos semelhantes. Estes receptores apresentam uma cadeia simples com dois ou três domínios semelhantes às imunoglobulinas (KIR2D ou KIR3D, respectivamente), e podem ser subdivididos KIR com caudas citoplasmáticas longas (i.e., KIR2DL e KIR3DL) ou com caudas citoplasmáticas curtas (KIR2DS and KIR3DS). KIRs com caudas citoplasmáticas longas geram um sinal inibitório, enquanto com caudas citoplasmáticas curtas geram um sinal de ativação. Os receptores inibitórios apresentam ITIMs no domínio citoplasmático. Após a ligação, estes ITIMs tornam-se fosforilados nos resíduos de tirosina, através da família das cinases src, permitindo o recrutamento das tirosinas fosfatases SHP-1 (e possivelmente SHP-2). A SHP-1 é capaz de desfosforilar múltiplos alvos na via de ativação ITAM, mediando o sinal negativo. Ao contrário dos receptores inibitórios, os receptores ativadores apresentam cauda curta e emitem sinais ativadores, através da associação com proteínas adaptadoras.

Quando activados os KIRs estão ligados, a família cinase src fosforila o ITAM que contém a molécula adaptadora que, por sua vez, liga-se e activa a família das tirosinas cinases Syk que desencadeia uma cascata de activação (Figura I. 9). Os KIRs inibitórios têm maior afinidade para os ligandos MHC classe-I e a co-ligação de ambos os receptores activadores e inibidores resultam numa rede de sinais negativos seguido da não-activação dos programas funcionais dos linfócitos NK (ex: citotoxicidade) (108, 115).

Outro grupo de receptores inibitórios que pertence à IgSF é constituído pelos receptores ILTs, também conhecido por LILRs. As moléculas de superfície ILT são codificadas por genes localizados no cromossoma 19 e constituem uma família de receptores de activação e inibição, são principalmente expressas em células mielóides, dendríticas e linfócitos B. O ILT1 (LIR7) é um receptor expresso em células mielóides e linfóides mas que não apresenta ITIMs, ILT2 é expresso em linfócitos NK e interage directamente com um largo espectro de moléculas HLA classe-I (117, 118).



**Figura I. 9** - Receptores KIR inibição e activação. Os receptores KIR apresentam 2 ou 3 domínios imunoglobulina (2D ou 3D) e uma longa cauda citoplasmática (L), com motivos ITIM ou uma curta cauda citoplasmática (s) e um domínio transmembranar carregado positivamente que interage com ITAM que contém a molécula adaptadora DAP-12. Quando o KIR inibitório se liga ao seu ligando HLA, as cinases da família Src fosforilam o ITIM, permitindo a ligação das fosfatases de tirosina SHP-1 (e possivelmente SHP-2) através dos domínios SH2. SHP-1 pode desfosforilar múltiplos alvos através da via activadora ITAM, mediando os sinais negativos. Pelo contrário, quando os KIR activadores estão ligados, as família das cinases src fosforila os ITAM que contém a molécula adaptadora DAP-12, que por sua vez se liga e activa as cinases da família da tirosina Syk, desencadeando a cascata de activação. Dado que os KIRs inibitórios apresentam elevada afinidade para os ligandos MHC classe-I, a coligação entre receptores de activação e de inibição resulta numa rede de sinais negativos e não há activação dos linfócitos NK (não há citotoxicidade, nem secreção de citocinas). Adaptado de Farag *et al*, 2002 (114).

Apesar dos receptores KIRs e CD94/NKG2 serem importantes na mediação da citotoxicidade dos linfócitos NK contra péptidos apresentados por MHC classe-I, foram reportados receptores de activação sem especificidade aparente para estas moléculas (apesar de muitos actuarem como co-activadores e não como estimuladores directos).

Nos Humanos, um grupo de receptores denominados receptor de citotoxicidade NK (NCR) (119, 120) e o NKG2D foram descritos como sendo importantes no reconhecimento de células tumorais MHC-independentes. Foram identificados 3 NCRs: NKp46, NKp44 e NKp30. Os NKp46 e NKp30 são expressos constitutivamente em todos os linfócitos NK do sangue periférico e apesar de inicialmente serem descritos como restritos dos linfócitos NK, foi demonstrado também podem ser expressos em linfócitos NKT após estimulação com IL-15 (6, 119, 120). O NKp44 pode ser detectado em linfócitos  $T\gamma\delta$  e não é expresso em linfócitos NK não activados mas a expressão aumenta após estimulação com IL-12 (121), podendo ser importante para a citotoxicidade (122). Estes receptores transmitem sinais através da ligação a ITAMs que contêm CD3 $\zeta$  e/ou Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  e estão envolvidos no reconhecimento de diversas células tumorais, apesar dos ligandos ainda não serem totalmente conhecidos.

### ***Identificação fenotípica linfócitos NK***

Os linfócitos NK podem ser subdivididos em 2 populações, baseado nos níveis de expressão de CD56: os que expressam elevados níveis, os CD56*bright* e os que expressam níveis reduzidos, os CD56*dim* (123).

Os linfócitos NK CD56*dim* expressam elevados níveis de CD16. Esta população representa cerca de 90% dos linfócitos NK do sangue periférico e são potentes células efectoras citolíticas. Os linfócitos NK CD56*dim* CD16*bright*, não activados expressam receptores com afinidade intermédia para a IL-2 e IL-15 e a proliferação *in vitro* é fraca, mesmo com elevadas doses de IL-2. Estas citocinas aumentam a capacidade dos linfócitos destruírem células-alvo dependentes de anticorpos. Pelo contrário, linfócitos NK CD56*bright*, que representam a população minoritária no sangue, não expressam CD16 e não são células com potencial citolítico. No entanto, quando activadas, estas células secretam grandes quantidades de diversas citocinas, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  e IL-10, apresentando citotoxicidade igual ou superior aos linfócitos NK CD56*dim*. Ao contrário dos linfócitos NK CD56*dim*, os CD56*bright* expressam receptores com elevada afinidade para IL-2 e expandem-se em resposta a baixas doses de IL-2, *in vitro* e *in vivo* (124, 125). As diferentes características fenotípicas sugerem que estas duas

populações apresentam diferentes funções *in vivo*. Enquanto os linfócitos NK CD56*dim* aparentemente são células efectoras citolíticas, CD56*bright* parecem ter funções reguladoras, estas funções reguladoras são mediadas pela secreção de citocinas, como resposta a diversos estímulos (126).

A citotoxicidade e a expressão dos antígenos CD16 e CD56 são características adquiridas pelos linfócitos NK, no seu último estágio de diferenciação. Enquanto que o antígeno CD16 nem sempre está presente nos linfócitos NK diferenciados, o antígeno CD56 constitui um marcador imunológico importante destas células.

Os linfócitos NK CD56*bright* não activados são grandes células agranulares, que expressam elevados níveis de CD94/NKG2 da família aparentada à lectina tipo-C e apenas uma pequena fracção expressa receptores KIR (18). Por outro lado, os linfócitos NK CD56*dim* apresentam abundância de grânulos citolíticos no citoplasma e elevada expressão de ambos os receptores da família aparentada à lectina tipo-C e KIR (127).

#### *Estrutura CD56*

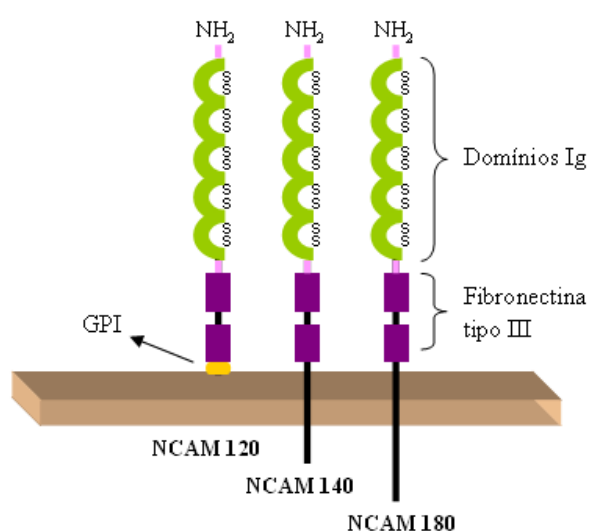
A molécula de CD56 humana, também conhecida como NCAM-1 (*neural cell adhesion molecule – 1*), pode surgir sob três formas, com diferentes pesos moleculares: 180 kDa, 140 kDa e 120 kDa. Cada uma destas proteínas é expressa preferencialmente em determinados tecidos e estádios do desenvolvimento embrionário (128). No tecido neural são expressas as isoformas de 180 e 140 kDa, no tecido muscular apenas é expressa a isoforma de 120 kDa e no tecido hematopoiético é expressa exclusivamente a isoforma de 140 kDa (129).

Nos tecidos hematopoiéticos normais, a NCAM-1 é expressa predominantemente nos linfócitos NK, mas também em cerca de 5% dos linfócitos T do sangue periférico (130).

As diversas isoformas diferem também nos domínios intracelulares e na associação à membrana (Figura I. 10). A isoforma transmembranar NCAM-A apresenta um peso molecular de aproximadamente 180 kDa, tem uma longa cauda citoplasmática, é uma proteína integral e por isso relativamente móvel na membrana citoplasmática. A NCAM-B tem o peso molecular de cerca de 140 kDa, apresenta pequena cauda citoplasmática, é também uma proteína integral e móvel na membrana. A parte citoplasmática destas duas proteínas (180 kDa e 140 kDa) permite a interacção com moléculas do citoplasma e a modulação por fosforilação de serinas e treoninas (130). A isoforma NCAM-C apresenta um peso molecular de aproximadamente 120 kDa e está

ancorada à membrana apenas através de fosfatidilinositol glicano, sendo a mais móvel de todas as isoformas (130) (Figura I. 10).

A porção extracelular de todas as isoformas contém cinco segmentos contíguos e apresentam uma sequência homóloga entre si, que é também comum aos membros pertencentes à família das imunoglobulinas e dois segmentos homólogos à fibronectina tipo III (F3) (Figura I. 10). O domínio extracelular contém ainda seis locais onde pode ocorrer a N-glicosilação (o grau de glicosilação depende do tipo de célula a que pertence a NCAM-1) e um local de ligação ao ácido polissialico (PSA), localizado no último domínio homólogo (Ig5) (128, 129).



**Figura I. 10** - A NCAM-1 apresenta três isoformas: NCAM120, NCAM140, NCAM180. NCAM-A tem um peso molecular de cerca 180 kDa, apresenta uma longa cauda citoplasmática. A NCAM-B com peso molecular de cerca de 140 kDa tem pequena cauda citoplasmática. A isoforma NCAM-C apresenta um peso molecular de aproximadamente 120 kDa e está ancorada à membrana apenas através de fosfatidilinositol glicano (GPI). As três isoformas apresentam uma região extracelular com cinco segmentos contíguos, com sequências homóloga entre si, comum aos membros pertencentes à família das imunoglobulinas e dois segmentos homólogos à fibronectina tipo III.

### Gene CD56

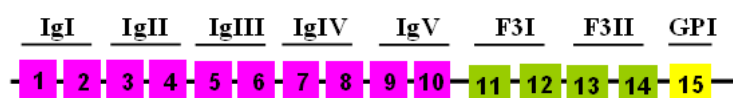
No mínimo o gene do CD56 pode originar três mRNAs de 6,8 a 7,2 kb, de 6,2 kb e 4,2 kb que codificam respectivamente os polipéptidos de 180 kDa, 140 kDa e 120 kDa. Este gene está localizado na porção distal do braço longo do cromossoma 11, na banda q23.1, apresenta 19 exões major e 6 exões mais pequenos (131, 132). As porções Ig e G3 são codificadas pelos exões 1-14. As isoformas transmembranares, NCAM-A e NCAM-B são, adicionalmente codificadas pelos exões 16-19 e exões 16, 17 e 19, respectivamente, que correspondem às regiões transmembranares e às caudas citoplasmáticas, com diferentes comprimentos. A isoforma NCAM-C é apenas codificada pelo exão 15 que corresponde ao GPI (Figura I. 11). As três isoformas major



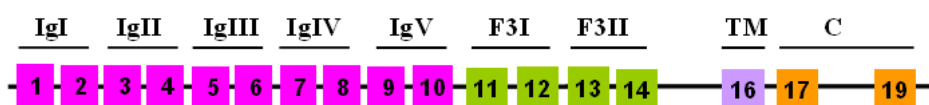
podem apresentar sequências codificadas por um exão de 30 pares de bases, VASE (*Variable Alternatively Spliced Exon*).

O NCAM apresenta modificações pós-tradução, sendo que, a mais significativa é a adição de cadeias longas de PSA na porção 5 de Ig (128, 129).

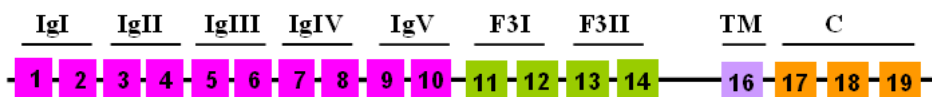
**CD56 120 Kd: exões 1-15**



**CD56 140 Kd: exões 1-14, 16-17, 19**



**CD56 180 Kd: exões 1-14, 16-19**



**Figura I. 11** - Representação esquemática do gene CD56 humano que codifica as três isoformas: 120 kDa, 140 kDa e 160 kDa. Ig I-V representa os domínios com homólogos às imunoglobulinas, F3-I e F3-II correspondem aos domínios homólogos à fibronectina tipo III, TM são os domínios transmembranares e C representa os genes que codificam as caudas citoplasmáticas. Adaptado de Gattenlöhner *et al*, 2009 (133).

### *Função do receptor CD56*

Originalmente o receptor CD56 foi caracterizado como mediador de adesão célula-célula e célula-matriz, de natureza homofílica ou heterofílica, regulando o contacto membrana-membrana necessário para iniciar interações específicas entre moléculas, actualmente também é considerado um receptor de sinalização com influência na adesão celular, migração, proliferação, apoptose, diferenciação, sobrevivência e plasticidade sináptica (133).

Fisiologicamente, é expresso abundantemente durante o desenvolvimento embrionário, sendo importante na formação de estruturas celulares e na fixação a locais morfológicos específicos. Em fases mais tardias desempenha importantes funções na neurogenese, na migração neural, tanto nos linfócitos NK, como num subconjunto de linfócitos T e em células neuroendócrinas. Em doenças humanas, o CD56 é um marcador imunohistológico específico para diagnóstico de tumores malignos do sistema

nervoso (ex: meduloblastoma e astrocitoma), linfomas malignos de linfócitos NKT e carcinomas neuroendócrinos (133).

### *CD16*

Os linfócitos NK também são caracterizados pela expressão do antígeno CD16 (FcγRIII). Este antígeno é uma glicoproteína com baixa afinidade para a IgG livre, está envolvido num dos mecanismos de activação dos linfócitos NK e é expresso na forma transmembranar. É uma molécula de adesão homofílica pertencente à IgSF, associa-se de modo não covalente a homodímeros e a heterodímeros da família de moléculas de sinalização, formando o complexo oligomérico do receptor dos linfócitos NK que medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Em Humanos o CD16 pode-se associar a FcεRIγ e/ou CD3ζ (134, 135, 136).

Cerca de 90% dos linfócitos NK do sangue periférico exprimem elevados níveis de CD16, correspondendo à sub-população *CD56<sup>dim</sup>*, os restantes 10% exprimem pouco ou não exprimem o antígeno CD16 e correspondem à população *CD56<sup>bright</sup>* (137). Como tal, a ausência de CD3 e a presença de CD56 e/ou de CD16 são critérios usados na identificação dos linfócitos NK no Homem, embora nem o CD16, nem o CD56 identifiquem todos linfócitos NK humanos (138, 139).

### ***Linfócitos NK: imunidade inata ou adaptativa?***

Nos mamíferos a resposta imunitária contra a infecção é mediada através dos sistemas inato e adaptativo. Tipicamente as células do sistema imunológico inato são a primeira linha de defesa contra agentes patogénicos e estão aptas para responder de forma consistente à infecção, independentemente de uma exposição prévia, ou seja, não apresentam memória de activação prévia, respondendo rapidamente, desaparecendo após poucas horas ou dias. Pelo contrário, as células do sistema imunológico adaptativo têm memória imunológica e apresentam duas características básicas: a especificidade para o antígeno e a resposta amplificada numa exposição subsequente. As células deste sistema imunológico apresentam os genes do receptor rearranjado para o reconhecimento dos diferentes antígenos. Pelo contrário os linfócitos NK apresentam um repertório limitado da linhagem germinal que codifica receptores para o reconhecimento do alvo (140).

Estudos descrevem que os receptores NK têm a capacidade de reconhecer antígenos específicos. O receptor Ly49H expresso num subconjunto de linfócitos NK

de murinos reconhece o ligando viral m157 do citomegalovírus murino (CMVM), aparentemente não reconhece ligandos virais codificados por outros vírus e nenhuma glicoproteína relacionada com m157 foi identificada noutra vírus, apesar de não ser possível excluir completamente que Ly49H reconhecerá ligandos codificados por outros patogêneos além do CMVM. A especificidade deste receptor para m157 foi demonstrada utilizando uma estirpe mutante CMVM, com o gene m157 deletado, verificando-se que não houve resposta dos linfócitos NK Ly49H+, nestes Ratinhos infectados (141, 142).

Em Humanos, também foram descritos subconjuntos específicos de linfócitos NK que aumentam preferencialmente durante a infecção por CMV (143, 144, 145). Perante estes estudos e uma vez que a especificidade é descrita como o reconhecimento de um receptor imunitário para um único ligando codificado por um agente patogénico específico, que não é partilhado por outros agentes patogénicos, alguns investigadores consideram que os linfócitos NK também demonstram especificidade imunitária, pelo menos para o Ly49H, e que partilham desta característica das células do sistema imunológico adaptativo (140).

Sun *et al*, utilizaram um modelo de ratinhos infectados com CMVM, para demonstrar que assim, como os linfócitos T, os linfócitos NK tendo o receptor Ly49H proliferam 100 vezes mais no baço e 1000 vezes mais no fígado após a infecção e que estes linfócitos NK permaneceram no hospedeiro vários meses após a infecção (141). Os linfócitos NK de memória apresentam a capacidade de serem reactivados e de produzirem citocinas, apresentando desgranulação mais robusta que os linfócitos NK não activados de ratinhos *naive*. A transferência adoptiva destes linfócitos NK para animais *naive*, seguido de exposição viral resultou num vigoroso aumento destes NK de memória e maior protecção imunitária. Assim, os linfócitos NK demonstraram residirem em múltiplos órgãos como células de memória de longa duração (141), prontas para desenvolver respostas secundárias robustas contra invasores patogénicos.

Outro estudo realizado recentemente suporta a ideia de que quando há uma activação prévia os linfócitos NK exibem a capacidade intrínseca de responder mais vigorosamente após reactivação por citocinas ou via ligação a receptores NK de activação, sugerindo a capacidade de reterem memória de activação prévia (146).

Os linfócitos NK produzem citocinas como IFN- $\gamma$  durante a inflamação para proteger o hospedeiro devido aos elevados níveis de IFN tipo-I ou IL-12 e IL-18 (147, 148). Esta característica é partilhada pelos linfócitos T CD8+ de memória, que

apresentam a mesma capacidade para secretar citocinas na ausência de antígeno cognato (149, 150). Além do mais, pode ser estabelecido um paralelismo funcional entre os linfócitos NK e T CD8+, quando um linfócito NK reconhece um ligando cognato na superfície da célula-alvo, medeia a citotoxicidade (normalmente, pela libertação direccionada de perforina e granzima) e secreta citocinas efectoras (como IFN- $\gamma$ ) de uma forma idêntica aos linfócitos T CD8+ efectores e de memória (151).

Com base nestes estudos, que sugerem que os linfócitos NK apresentam características dos sistemas imunológicos inato e adaptativo, mediando respostas específicas semelhantes ao sistema adaptativo assim como não-específicas semelhantes ao sistema inato, investigadores consideram que estes linfócitos representam uma ponte funcional e evolutiva entre os dois sistemas. Uma diferença fundamental entre os linfócitos NK *versus* linfócitos T e B é a capacidade destas células gerarem um reportório quase infinito de receptores antígeno-específicos, enquanto os linfócitos NK estão limitados aos receptores que são codificados pelos genes pré-existentes no genoma (140).

#### ***Subunidades $\gamma$ , $\epsilon$ e $\delta$ do complexo TCR-CD3***

Apesar dos rearranjos do TCR distinguirem os linfócitos NK dos linfócitos T, várias similaridades foram observadas entre estes dois tipos de linfócitos, verificando-se que, para além da expressão de Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  e CD3 $\zeta$ , os linfócitos NK podem também expressar as subunidades  $\gamma$ ,  $\epsilon$  e  $\delta$  do complexo TCR-CD3 (5, 152, 153).

Os linfócitos NK maduros de Ratinhos e Humanos foram inicialmente descritos como não expressando CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  ou CD3 $\epsilon$  (154, 155), apenas CD3 $\zeta$  em associação com Fc $\gamma$ RIII (CD16) (5). A subunidade CD3 $\zeta$  é fosforilada após ligação a Fc $\gamma$ RIII e pensa-se que está envolvida na transdução do sinal de Fc $\gamma$ RIII em linfócitos NK humanos (156, 157). Análises da sequência de DNA de linfócitos NK maduros comparados com linfócitos T maduros demonstraram que as subunidades CD3 $\zeta$  são estruturalmente idênticas (158).

Philips *et al* reportaram que linfócitos NK fetais/embrionários e uma pequena percentagem de linfócitos NK do sangue do cordão umbilical de Humanos expressam níveis substanciais de CD3 $\delta$  e CD3 $\epsilon$  que se associam e formam complexos no citoplasma mas aparentemente não são transportados para a superfície. No entanto, apesar de terem sido detectados baixos níveis de mRNA de CD3 $\epsilon$  em clones de

linfócitos NK humanos maduros não foram encontradas evidências da expressão da proteína CD3 $\epsilon$  nestas células (5). Os linfócitos NK do sangue adulto periférico de humanos expressam níveis intracitoplasmáticos de CD3 $\epsilon$  após activação mas apresentaram níveis praticamente indetectáveis de CD3 $\epsilon$  em linfócitos não activados (5). Adicionalmente linfócitos NK aviários activados também expressam polipéptidos CD3 $\epsilon$  intracitoplasmáticos (159).

Estes resultados suportam o conceito que os linfócitos NK e T são originados de um precursor comum que expressa componentes do complexo CD3, podendo ocorrer diminuição durante a maturação. Em alternativa, poderá sugerir que linfócitos NK fetais CD3 $\delta^+$  e CD3 $\epsilon^+$  representam um subpopulação distinta que é predominante no feto mas substituída por uma população de linfócitos NK adultos CD3 $\delta^-$  e CD3 $\epsilon^-$ , após a embriogenese (154).

### ***Rearranjos do gene TCR $\gamma$***

Em 2006, foi reportado que os genes do TCR $\gamma$  estão rearranjados em aproximadamente 5% e 1% dos linfócitos NK isolados do baço de ratinhos neonatais e adultos, respectivamente. Os rearranjos TCR $\gamma$  dos linfócitos NK aparentemente são timo-dependentes, uma vez que não foram detectados em ratos *nude* (160).

Na tentativa de detectarem diferenças sugestivas entre as vias de comprometimento da linhagem NK, compararam a expressão dos genes TCR $\gamma$ , verificando que os linfócitos NK de ratinhos neonatais apresentam uma expressão maior, relativamente a linfócitos NK adultos. Estes resultados poderão sugerir que um subconjunto de linfócitos NK desenvolve-se no timo a partir de timócitos imaturos que apresentam genes TCR $\gamma$  rearranjados (160).

Após ter sido detectada a recombinase V(D)J em precursores NK murinos, investigadores foram verificar se os linfócitos NK humanos também poderiam apresentar o TCR rearranjado, encontrando evidências que o TCRD estava rearranjado em 3.2–36% de linfócitos NK da periferia mas não noutros leucócitos não-linfóides, sugerindo que os linfócitos podem apresentar um passo na diferenciação com a V(D)J recombinase activa, semelhante aos linfócitos T e B. Os rearranjos do TCRG nos linfócitos NK humanos, no entanto, foram muito reduzidos comparativamente aos linfócitos T, sugerindo um controle mais apertado neste gene. Estas observações não poderão ser atribuídas a contaminações de linfócitos T e NKT uma vez que estes

rearranjos foram detectados em linfócitos NK de ratinhos TCR $\beta\delta$  -/- (160, 161), assim como num paciente atímico, com síndrome Di George (162). Nas linhagens T e B os erros na recombinação V(D)J estão associados a leucemias fatais, nos linfócitos NK continuam a desconhecer-se as implicações para a sua biologia tanto em circunstâncias normais como na doença (163).

### ***Receptores NK em linfócitos T***

Diversas glicoproteínas têm sido referidas como receptores NK tanto por serem predominantemente expressas, como por inicialmente terem sido descobertas na superfície destes linfócitos, nomeadamente Ly49, KIR, CD94, NKG2, 2B4 (CD244), DX5 (CD49b), CD16, CD56, NKR-P1 (CD161) e a família do receptor de citotoxicidade NK (NCR) (151). No entanto, estes receptores NK podem ser expressos em subpopulações de linfócitos T, assim como noutras células. Apesar destes não serem expressos em linfócitos não activados (linfócitos T TCR $\alpha\beta$  *naive*) são frequentemente adquiridos após activação, predominantemente nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> mas também nos linfócitos TCD4<sup>+</sup>. Por outro lado, receptores NK são frequentemente detectados em linfócitos T TCR $\gamma\delta$ , mesmo sem activação. Num estudo realizado por Stewart *et al.* (164) foi detectada a expressão de NK1.1, 2B4, NKG2D, NKG2A, e Ly49 em linfócitos T TCR $\gamma\delta$ , de ratos. Adicionalmente, NKp46, que é considerado um dos receptores mais selectivos expressos nos linfócitos NK, foi detectado na superfície de cerca de 60% destes linfócitos NK1.1<sup>+</sup> $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup>T. Estes investigadores reportaram uma correlação inversa entre a expressão na superfície do complexo CD3-TCR $\gamma\delta$  e NK1.1 (assim como outros receptores NK). Assim, se não forem utilizados métodos muito sensíveis de detecção para analisar a expressão de CD3 e TCR, estas células podem inapropriadamente ser identificadas como linfócitos NK em vez de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ .

O estudo de linfócitos intraperitoneais isolados do intestino delgado de pacientes com doença celíaca revelou populações oligoclonais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$  que apresentavam menor expressão de TCR-CD3 na superfície e abundância de receptores NK, sugerindo que os linfócitos foram re-programados para adquirir receptores impossibilitando que desempenhem funções normalmente mediadas pelos linfócitos NK (165).

A partilha de receptores expressos por linfócitos NK e T dificulta a distinção entre estas duas populações celulares. Uma diferença é o rearranjo do *loci* TCR, este

rearranjo genómico é irreversível, sendo um marcador clonal de todos os progenitores dos linfócitos T, mesmo para os que adquirem receptores NK após activação, sem este processo torna-se praticamente impossível a distinção entre estes dois tipos de células (166).

### ***Desenvolvimento dos linfócitos NK***

Assim como os linfócitos T, os linfócitos NK são originados a partir de células estaminais hematopoiéticas. Os precursores hematopoiéticos foram identificados em diversos locais como timo, baço e nódulos linfáticos, durante as fases intra-uterina ou fase adulta.

Alguns estudos sugerem que, em adultos, a medula óssea é o principal local onde os linfócitos NK são originados. O microambiente da medula óssea proporciona uma fonte rica em citocinas e factores de crescimento capazes de suportar o crescimento *in vitro* e contém células estromais que são importantes para a sua completa maturação. Adicionalmente, foram encontrados precursores dos linfócitos NK (pNKs) na medula óssea (167). Os mecanismos detalhados pelos quais os pNKs se desenvolvem em NK maduros ainda não foram completamente elucidados. Os linfócitos NK adquirem um fenótipo de superfície característico assim como funções efectoras citolíticas durante o processo de diferenciação. A caracterização dos intermediários durante a diferenciação depende principalmente dos marcadores na superfície, NK1.1, DX5 e Ly49 em Ratinhos e CD161, CD56, CD16 e KIRs em Humanos. Em geral, a diferenciação dos linfócitos NK a partir das células estaminais hematopoiéticas pode ser dividido em pNK e NK maduros (mNK), dependendo dos marcadores de superfície (167).

Em Ratinhos, os pNKs são uma linhagem negativa e são determinados pela expressão de CD122, a subunidade  $\beta$  comum do receptor IL-2/IL-15. Através deste receptor, a IL-15 envia sinais para a maturação dos linfócitos NK, que depois adquirem NK1.1, DX5 e vários receptores funcionais como CD94-NKG2 e Ly49. Uma vez maduros apresentam elevada expressão de CD11b e CD43 (167).

Em Humanos, os pNKs são produzidos através de factores de crescimento de células estromais como o ligando c-kit e Flt3 e são caracterizados pelo fenótipo CD34<sup>bright</sup>CD122<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>. Estes precursores respondem à IL-15 tornando-se NK maduros que contêm diversos receptores inibitórios e activadores.

Tanto em Humanos como em Ratinhos, o microambiente da medula óssea é uma fonte de citocinas que facilita a diferenciação e contém células que permitem a

maturação (168). Ratinhos *nude* (congenitamente atímicos), pacientes com Síndrome Di George ou homens timectomizados ou ratinhos e homens esplectomizados, aparentemente apresentaram valores normais de linfócitos NK funcionais, sugerindo que nem o timo, nem o baço são essenciais para a formação dos linfócitos NK. Os linfócitos NK também estão presentes no fígado, local de produção de pNKs na vida fetal, mas desconhece-se se é o local de desenvolvimento na vida adulta. É possível que o timo, o fígado e/ou baço tenham influência na diversificação dos linfócitos NK, resultando na heterogeneidade (167).

Assim, nas últimas décadas, tornou-se geralmente aceite que o desenvolvimento dos linfócitos NK ocorria no microambiente da medula óssea (167, 169). No entanto, esta possibilidade dos linfócitos NK serem derivados da medula óssea e os intermediários deslocarem-se para os tecidos periféricos onde ocorreria a maturação, nunca foi totalmente comprovada (167). Uma completa e contínua via de diferenciação na medula óssea, que definitivamente, demonstraria a diferenciação *in situ*, nunca foi descrita.

A detecção de *CD56bright* nos nódulos linfáticos e amígdalas (i.e. tecidos linfóides secundários ou TLS), poderão apoiar a ideia de que o desenvolvimento dos linfócitos NK não ocorre na medula óssea. Os linfócitos NK *CD56bright* são mais abundantes nos TLS comparativamente aos NK *CD56dim* encontrados na medula óssea, sangue e baço (169). Segundo Lanier *et al* os linfócitos *CD56bright* são menos maduros que os linfócitos *CD56dim* (170) e um estudo recente descreve que *CD56bright*, em contacto com fibroblastos poderão diferenciar-se em *CD56dim* (171). A activação dos linfócitos *CD56bright* nos TLS aumenta a expressão dos receptores NK, que são característicos do subconjunto *CD56dim* (172).

Enquanto que na medula óssea e sangue foram encontradas baixas quantidades de linfócitos pré-NK *CD34+CD45RA+*, nos TLS foram detectados elevadas concentrações, tornando-se o primeiro subconjunto *CD34+* descrito nestes tecidos.

As elevadas quantidades de linfócitos pré-NK *CD34+CD45RA+*, os linfócitos NK *CD56bright* detectados nos TLS comparativamente com as quantidades detectadas na medula óssea e sangue, assim como a abundância de células dendríticas e outras APCs que expressam a IL-15 (174), necessária para a maturação dos linfócitos NK (175, 176, 177), sugerem que poderão ser o local de desenvolvimento *in vivo* dos linfócitos.



A pesquisa nos TLS de populações de células fenotípica e funcionalmente distintas, que representam estádios do desenvolvimento dos linfócitos NK via CD34+CD45RA+HPCs até CD3-CD56*bright in situ* foi um sucesso (178).

Utilizando um sistema de cultura *in vitro*, consistindo em linfócitos CD56*bright* purificados e fibroblastos humanos, Chang *et al* demonstraram que anticorpos que bloqueiam a interacção entre CD56 e o receptor do factor de crescimento do fibroblasto-1 originaram uma diminuição significativa na formação de linfócitos NK CD56*dim*, sugerindo que CD56 desempenhar funções importantes na promoção da fase final da maturação (179).

### ***Função dos linfócitos NK***

A função da citotoxicidade dos linfócitos NK no controlo de agentes patogénicos intracelulares é bem conhecida, e é demonstrada por infecções víricas muito graves ou fatais em casos reportados de deficiência de linfócitos NK (180, 181, 182). Existem também diversas evidências que os linfócitos NK matam células malignas (183). Existem dois mecanismos de citotoxicidade dos linfócitos NK: a deposição de grânulos líticos nas células-alvo e a expressão de ligandos como TNF e ligando Fas (184, 185).

Os linfócitos NK também contribuem para a resposta imunológica inata através da produção de citocinas, incluindo IFN- $\gamma$  que apresenta diversas funções, incluindo acções anti-virais e anti-bacterianas, promoção de respostas Th1, supressão da proliferação de células infectadas ou transformadas, estimulação da expressão de MHC classe-I e maturação de células dendríticas (186, 187). Outra citocina importante libertada pelos linfócitos NK é a TNF- $\alpha$  (188, 189). Dependendo da situação, também podem expressar citocinas anti-inflamatórias, como TGF- $\beta$  e IL-10, e factores hematopoiéticos GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) e IL-3, e promover respostas Th2 através da produção de IL-5 e IL-13 (188, 190). Adicionalmente, os linfócitos NK também podem produzir diversas quimiocinas, incluindo MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$* ), MIP- $\beta$  e RANTES (191). A estimulação com diferentes citocinas induz respostas específicas.

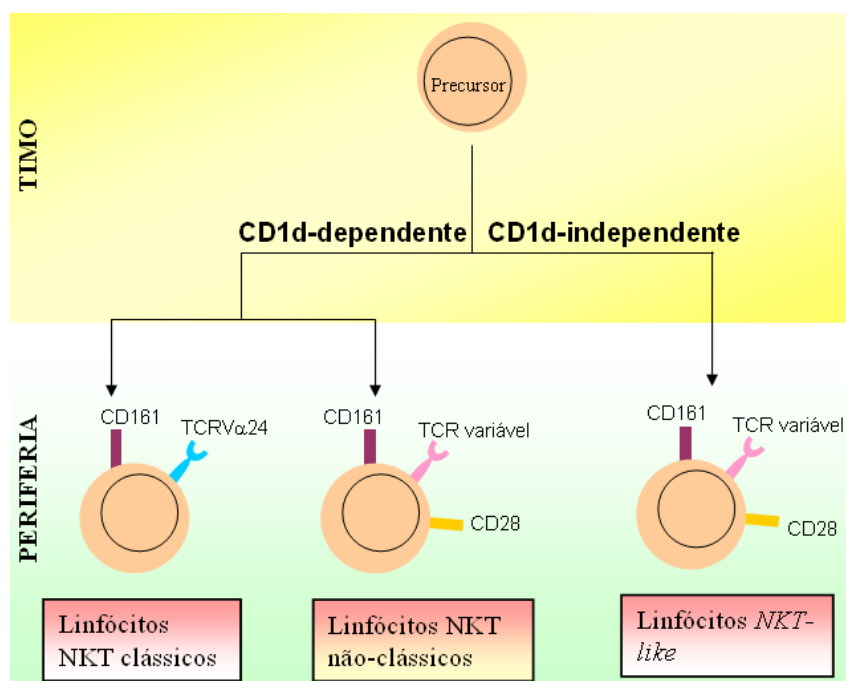
Apesar de inicialmente se pensar que as funções citotóxicas e a produção de citocinas ocorriam sem sensibilização inicial, um estudo recente demonstrou que as respostas dos linfócitos NK contra agentes patogénicos bacterianos ou víricos requer a

acção das células dendríticas, envolvendo a apresentação cruzada da IL-15 ligada à membrana, nos órgãos linfóides secundários (192).

### Linfócitos NKT

Os linfócitos NKT são uma subpopulação de linfócitos que desempenham funções regulatórias importantes e que apresentam receptores característicos dos linfócitos T (TCR) e NK (NK1.1 marcador de Ratinhos ou CD161 marcador de Humanos). No entanto alguns linfócitos NKT poderão não expressar NK1.1 (193). A expressão poderá depender da maturação, do estado de activação, da localização nos tecidos e da expressão de outros receptores.

Esta população de linfócitos é heterogénea e a definição precisa ainda permanece problemática. Actualmente é subdividida em três populações, designadas: 1) linfócitos NKT clássicos que são CD1d-dependentes e apresentam uma resposta forte a  $\alpha$ -GalCer (*glycosphingolipid  $\alpha$ -galactosyl ceramide*), 2) linfócitos NKT não-clássicos que também são CD1d-dependentes, no entanto apresentam TCR semi-diversos e 3) linfócitos NKT-like que são CD1d-independentes e cuja maioria depende do MHC classe-I clássico (Figura I.12).



**Figura I. 12** - Subpopulações de linfócitos NKT. Os linfócitos NKT podem ser divididos em CD1d-dependentes, podendo ser clássicos e não-clássicos e os CD1d-independentes. Adaptado de *Fundamentos de Imunologia*, 2007 (194).

### ***Linfócitos NKT CD1d-dependentes***

As proteínas CD1 são moléculas que apresentam antígenos lipídicos aos linfócitos T. A estrutura é semelhante ao MHC classe-I, com uma cadeia pesada que se associa à  $\beta$ 2-microglobulina para formar um heterodímero, expresso na superfície das APC (195).

O locus CD1 está localizado no cromossoma 1 e contém cinco genes distintos: CD1A, -B, -C, -D, and -E. As proteínas codificadas por estes genes podem ser divididas em três grupos: grupo 1 onde estão incluídos CD1a, CD1b, e CD1c; grupo 2 que consiste em CD1d e o grupo 3 que é constituído por CD1e. Nos Humanos e noutros mamíferos todas as isoformas podem ser expressas (CD1a-e), enquanto os Ratinhos apenas expressam CD1d. Curiosamente, o CD1d é altamente conservado nas várias espécies e entre Humanos e Ratinhos sendo um excelente modelo para o estudo de CD1d humanos nos linfócitos NKT (196).

Os linfócitos NKT CD1d-dependentes podem ser classificados como: NKT clássicos ou invariantes tipo I e NKT não-clássicos ou variantes tipo II.

Em Ratinhos, a subpopulação de linfócitos NKT invariantes apresenta rearranjos da região variável  $V\alpha 14$  com a região junção  $J\alpha 18$ , formando uma região invariante determinante de complementaridade  $3\alpha$  ( $CDR3\alpha$ ) — que é referida como  $V\alpha 14i$  TCR (NKT-invariantes). Estes linfócitos co-expressam preferencialmente  $V\beta 8.2$ ,  $V\beta 7$  ou  $V\beta 2$  com  $V\alpha 14i$ , são autoreactivos para os MHC classe-I não-clássicos CD1d, apresentam uma forte resposta a  $\alpha$ -GalCer. Estes linfócitos T  $V\alpha 14i$  não expressam CD8, são CD4<sup>+</sup> ou duplamente negativos DN (197).

Crowe *et al.*, através de resultados de ensaios *in vivo* evidenciaram que os linfócitos NKT NK1.1 que expressam TCR  $V\alpha 14$  invariantes quando activados diminuem a expressão do complexo CD3-TCR, podendo tornar-se praticamente indistinguíveis dos linfócitos NK (198).

Nos Humanos, existe uma população semelhante de linfócitos T CD161<sup>+</sup> que também reconhece antígenos glicolípidos, como isoglobotrihexocilceramida endógena (iGb3) e  $\alpha$ -GalCer, em associação com a MHC classe-I CD1d, são autoreactivos e produzem ambas as citocinas Th1 e Th2. Expressam regiões V que são homólogas às que são expressas pelos linfócitos T  $V\alpha 14i$  de Ratinhos, incluindo  $V\beta 11$  (semelhante a  $V\beta 8.2$  de Ratinhos) e apresentam rearranjo de  $V\alpha 24$  a  $J\alpha 15$ , que forma  $CDR3\alpha$ , sendo também muito similar a  $V\alpha 14i$ . Estes linfócitos são menos frequentes em Humanos do que em Ratinhos e podem ser CD8<sup>+</sup> (197). Quando activados produzem interferão IFN-

$\gamma$  e IL-4. Além da produção de citocinas, também apresentam actividade citolítica (Tabela I. 1).

Os linfócitos NKT não-clássicos, reconhecem lípidos apresentados por CD1d mas não reconhecem  $\alpha$ -GalCer, os TCR que estas células expressam são mais variáveis (oligoclonais), os linfócitos não são verdadeiramente policlonais, no entanto, incluem populações que expressam V $\alpha$ 3.2-J $\alpha$ 9/V $\beta$ 8 ou V $\alpha$ 8/V $\beta$ 8 TCR (197) (Tabela I. 1).

Assim como linfócitos V $\alpha$ 14i, também são linfócitos T CD1d autoreactivos mas expressam TCR mais diversos e podem ser CD4+ ou DN (197).

### ***Linfócitos NKT CD1d-independentes (NKT-like)***

Uma terceira categoria de linfócitos NKT, os linfócitos *NKT-like*, incluem linfócitos que não são dependentes de CD1d, apresentam TCR diversos e podem ser CD8+, CD4+ ou DN (Tabela I. 1).

A expressão de NK1.1 pode ser um marcador para activação dos linfócitos T convencionais, em Ratinhos. Em Humanos, a frequência de linfócitos T CD161+TCR $\beta$ + é mais elevada do que a frequência dos linfócitos T V $\alpha$ 24i. Alguns linfócitos T CD161+ que expressam TCR mais diversos também são CD1d reactivos, mas muitos poderão pertencer a subpopulações de linfócitos T de memória convencionais (197).

Os linfócitos NKT CD8+ apresentam uma actividade *NK-like* citotóxica contra múltiplos tumores e são CD1-d independentes (199, 200).

Estudos demonstraram que a citotoxicidade é aumentada por moléculas co-estimulatórias, podendo ser muito importantes na resposta contra células cancerígenas, regulando o sistema imunitário inato para o desenvolvimento de uma resposta adaptativa anti-tumoral. Assim, representam uma população única com elementos de restrição desconhecidos, com produção de elevadas quantidades de IFN- $\gamma$ , sendo a actividade citotóxica aumentada pela molécula co-estimuladora B7 presente nas células tumorais (200).

Em Ratinhos, a maioria destes linfócitos expressa TCR $\alpha\beta$  e são abundantes no fígado, escassos no timo e praticamente indetectáveis nos restantes órgãos linfóides, incluindo medula óssea. No entanto também foram identificados entre os linfócitos intestinais intraepiteliais (IELs). Apesar da maioria expressar TCR $\alpha\beta$  alguns expressam

TCR $\gamma\delta$  mas a maioria não expressa CD4 ou CD8 (DN) e uma minoria expressa apenas CD8 (201).

Virtualmente todos os linfócitos NKT CD8<sup>+</sup> presentes no fígado, tanto os que expressam TCR $\alpha\beta$  como TCR $\gamma\delta$  apresentam receptores de activação, sugerindo um estado de activação. Os linfócitos T activados que são submetidos a processos de apoptose acumulam-se no fígado (202) e é possível que estes linfócitos NKT apoptóticos também se acumulem neste órgão.

Um estudo recente sugere que a elevada percentagem de linfócitos NKT não-clássicos intrahepáticos (CD1d-independentes), poderá dever-se em parte, à diferenciação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, evidenciando que os linfócitos CD8<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> em cultura com IL-15 desenvolveram expressão de CD56 e NKp46, marcador de linfócitos NK (6).

Eberl *et al* identificaram uma população de linfócitos NKT CD8<sup>+</sup> em Ratinhos, mais elevada no baço e medula óssea (esta evidência foi também demonstrada por outros grupos) (202, 203, 204) e mais reduzida no fígado e timo e descreveram um fenótipo *naive* para os linfócitos NKT CD8<sup>+</sup> do baço. Sugerindo a possível existência de pelo menos dois subtipos de linfócitos NKT CD8<sup>+</sup>: os NKT CD8<sup>+</sup> com fenótipo *naive*, detectados preferencialmente no baço (203, 204, 205) e os NKT CD8<sup>+</sup> com um fenótipo activado, que se acumulam maioritariamente no fígado.

Em concordância com estes dados está o facto de terem sido identificados no fígado em Humanos, linfócitos NKT-like CD8<sup>+</sup> sem TCRV $\alpha$ 24 e que expressam marcadores de activação, como CD69, exibindo uma forte citotoxicidade contra várias linhagens celulares tumorais (206).

Assim, apesar de menos conhecida, hoje sabe-se que esta população heterogénea de linfócitos NKT CD8<sup>+</sup> expressam um repertório diverso de TCR e após estimulação produzem IFN- $\gamma$  e não IL-4, apesar das diferenças, apresentam receptores dos linfócitos NK clássicos e dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> convencionais.

A grande maioria destes linfócitos NKT CD8<sup>+</sup> não apresenta CD8 $\beta$  e expressa o homodímero CD8 $\alpha\alpha$ .

**Tabela I.1 Classificação dos linfócitos NKT**

<b>Categoria</b>	<b>Linfócitos NKT CD1d- dependentes</b>		<b>CD1d- independentes</b>
<b>Tipo</b>	<b>Tipo I: Linfócitos NKT clássicos</b>	<b>Tipo II: Linfócitos NKT não clássicos</b>	<b>Linfócitos <i>NKT-like</i></b>
Molécula apresentadora de antígenos	CD1d	CD1d	MHC classe-I, outras
Reactividade	$\alpha$ GalCer	ND	ND
Cadeia TCR $\alpha$	V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 (Ratinhos) V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 (Humanos)	Semi-diverso mas alguns V $\alpha$ 3.2-J $\alpha$ 9 (ratinhos)	Diverso
Cadeia TCR $\beta$	V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7 e V $\beta$ 2 (Ratinhos) V $\beta$ 11 (Humanos)	Semi-diverso mas alguns V $\beta$ 8 (Ratinhos)	Diverso
Subconjuntos	CD4+ e DN (Ratinhos) CD4+, CD8+ e DN (Humanos) IL17RB+/- (Ratinhos)	CD4+ e DN (Ratinhos)	CD4+ ou CD8+ CD49B
Produção IL-4	Sim	Sim	Não
Produção IFN $\gamma$	Sim	Sim	Sim
Receptores NK1.1 (CD161)	+ (linfócitos maduros não activados) -/low (linfócitos imaturos ou pós-activação)	+/-	+

## CAPÍTULO II. OBJECTIVO

O objectivo deste trabalho foi estudar a expressão e rearranjo do gene TCR $\beta$  em linfócitos NK *ex vivo* isolados do sangue de doadores saudáveis.

Objectivos específicos:

- Testar a pureza dos linfócitos NK purificados por separação imunomagnética através da marcação extracelular e intracelular, com o anticorpo anti-CD3 ou anti-TCR $\beta$  conjugado com PE e anti-CD56 Alexa 488.

- Isolar o mRNA a partir dos linfócitos NK purificados obtidos por separação imunomagnética e verificar a expressão do mRNA do CD56 (marcador dos linfócitos NK) e do TCR $\beta$  (receptor dos linfócitos T), por PCR.

- Isolar o DNA dos linfócitos NK isolados e determinar os rearranjos do gene TCR $\beta$ , para determinar se a população é monoclonal, oligoclonal ou policlonal.

## CAPÍTULO III. MATERIAIS E MÉTODOS

### Preparação das amostras

As células foram isoladas de *buffy-coats* (sacos de colheita de sangue enriquecidos em leucócitos), processadas no Instituto Português de Sangue, a partir de sangue de doadores saudáveis. Isolou-se as células mononucleares do sangue periférico (PBMC), por centrifugação em gradientes de densidade. Assim, primeiro diluiu-se em PBS (1:1) (13 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 100 mM NaCl – pH 7.1) e após adição em *Lymphoprep* (Nycomed, Norway), centrifugou-se a 2200 rpm durante 30 minutos à temperatura ambiente. As células mononucleares foram recolhidas do anel da interface, lavadas com solução PBS e centrifugadas a 1500 rpm, 10 minutos.

A lise dos glóbulos vermelhos contaminantes foi efectuada através da adição de solução de lise (10 mM Tris, 150 mM NH<sub>4</sub>Cl – pH 7.4) pré-aquecida a 37 °C e incubada à mesma temperatura durante 10 minutos.

As células foram novamente lavadas com PBS e centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos.

Para isolar PBL incubou-se em placas de petri 50x10<sup>6</sup> PBMC durante a noite e adicionou-se 10 ml de RPMI (5% FBSi + 1% antibiótico/antimicótico, Gibco Invitrogen, UK). Após a incubação, os PBL foram recolhidas, lavados com solução salina PBS e contados numa câmara de Neubauer.

### Isolamento de linfócitos NK

#### *1. Selecção negativa de linfócitos NK através da depleção de CD3*

##### *Marcação magnética*

Após centrifugar os PBL durante 10 minutos a 1500 rpm, ressuspendeu-se em 80 µl de *Wash Buffer* (WB: PBS pH 7.2, 0.5% BSA e 2 mM EDTA) por cada 10<sup>7</sup> células e adicionou-se 20 µl de microesferas com anticorpo anti-CD3 humanos (Cat. #130-050-101, Miltenyi Biotec, Germany), incubou-se a 4 °C durante 15 minutos com agitação 2-3 vezes, lavou-se com 1-2 ml de WB por 10<sup>8</sup> células e centrifugou-se novamente 10 minutos a 1500 rpm. Pipetou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em WB (500 µl por 10<sup>8</sup> células).



### *Separação magnética*

Para a separação magnética utilizou-se o separador MACS (MidiMACS separator) e uma coluna LD, ambos de Miltenyi Biotec.

Adicionou-se 2 ml de WB na coluna, para lavar e aplicou-se a suspensão de células. Lavou-se a coluna com 2x1ml de WB, recolhendo-se para novo tubo as células não marcadas e contou-se o número de células.

Para se obter maior pureza repetiu-se a depleção de CD3 e aplicou-se numa nova coluna de depleção. No fim, passou-se por uma 3ª coluna lavada.

## **2. Selecção positiva CD56**

### *Marcação magnética*

Para a selecção positiva dos linfócitos CD56+ primeiro centrifugou-se as células durante 10 minutos a 1500 rpm e ressuspendeu-se em WB. Posteriormente foram adicionados 60 µl de microesferas com anticorpo anti-CD56 (Cat. #130-050-401, Miltenyi Biotec) por 10<sup>8</sup> células, incubou-se a 4 °C durante 15 minutos, com agitação 2-3 vezes. Lavou-se com 5 ml WB por 10<sup>8</sup> células e centrifugou-se 10 minutos a 1500 rpm.

### *Separação magnética*

Para a separação magnética utilizou-se o separador MACS (MidiMACS separator) e uma coluna LS.

Primeiro lavou-se a coluna com 3 ml de WB e aplicou-se a suspensão de células, seguido de lavagem com 3x3ml de WB. As células não marcadas recolhidas foram rejeitadas. Pipetou-se 5 ml de WB para a coluna e efectuou-se imediatamente o *flush-out* recolhendo as células marcadas para um novo tubo.

Para aumentar a pureza preparou-se uma nova coluna LS, lavando-a com 3 ml de WB, à qual foi aplicada a suspensão de células. Após lavagem com 3x3ml de WB, rejeitou-se o efluente. Adicionou-se mais 5 ml de WB na coluna e efectuou-se o *flush-out* recolhendo as células marcadas para um novo tubo.

Procedeu-se à contagem das células.

## **Isolamento de linfócitos T**

### *Marcação magnética*

Centrifugou-se os PBL durante 10 minutos a 1500 rpm e ressuspendeu-se em 80  $\mu$ l de *Wash Buffer* (WB: PBS pH 7.2, 0.5% BSA e 2 mM EDTA) por cada  $10^7$  células. Adicionou-se 20  $\mu$ l de microesferas com anticorpo anti-CD3 humanos (Cat. #130-050-101, Miltenyi Biotec, Germany) e incubou-se a 4 °C durante 15 minutos com agitação 2-3 vezes, lavou-se com 1-2 ml de WB por  $10^8$  células e centrifugou-se novamente 10 minutos a 1500 rpm. Pipetou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em WB (500  $\mu$ l por  $10^8$  células).

### *Separação magnética*

Para a separação magnética utilizou-se o separador MACS (MidiMACS *separator*) e uma coluna LD (Miltenyi Biotec).

Adicionou-se 2 ml de WB na coluna, para lavar e aplicou-se a suspensão de células. Lavou-se a coluna com 2x1ml de WB, recolhendo-se para novo tubo as células não marcadas. Efectuou-se o *flush-out* para recuperação dos linfócitos CD3+ e contou-se o número de células.

Repetiu-se a depleção de CD3 e aplicou-se numa nova coluna de depleção. No fim, passou-se por uma 3ª coluna lavada.

## **Citometria de fluxo**

A avaliação da pureza foi realizada por citometria de fluxo, utilizando-se o citómetro de fluxo Epics XL (Beckman Coulter) e o software WinMDI2.8. O sistema foi definido para a avaliação de 10.000 mil células na região dos linfócitos (R1) (ver Figura IV.1 B) em cada determinação.

Para determinação do grau de pureza dos linfócitos NK efectuou-se marcação dupla, com anticorpos primários conjugados com os fluorocromos Alexa 488 (FL1) e ficoeritrina (PE) (FL2), conforme está indicado na Tabela III.1. O anticorpo irrelevante foi usado como controlo negativo e o anticorpo anti-Bcl<sub>2</sub> como controlo positivo na marcação intracelular.

Os resultados foram analisados através do gráfico de tamanho/granulosidade (FSC/SSC) e gráfico de fluorescência: FL1/FL2: para avaliação das características das células.

**Tabela III.1- Anticorpos utilizados na marcação para análise por citometria de fluxo.**

Anticorpo específico	Clone	Fluorocromo	Fabricante	Diluição
CD56	MOPC-21	Alexa 488	BD Pharmingen	1:20
CD3	UCHT-1	RPECy5	DAKO	1:10
CD3	BW265/56	PE	Miltenyi Biotec	1:10
Irrelevante	S43.10	PE	Miltenyi Biotec	1:10
TCR $\beta$	BW242/412	PE	Miltenyi Biotec	1:10
Bcl <sub>2</sub>	100	PE	Invitrogen	1:10

***Marcação Extracelular***

Efectuou-se a marcação extracelular de  $0.1-1 \times 10^6$  células com 50  $\mu$ l anticorpos dissolvidos em PBS+0.2%BSA+0.1%NaN<sub>3</sub>, após centrifugação durante 2 minutos a 1100 rpm, em placas de 96 poços. Incubou-se com os anticorpos durante 30 minutos a 4 °C. Centrifugou-se durante 2 minutos a 1100 rpm e lavou-se adicionando-se PBS+0.2%BSA+0.1%NaN<sub>3</sub>. Centrifugou-se novamente (2 minutos a 1100 rpm). Por fim adicionou-se PBS 200  $\mu$ l e transferiu-se para um tubo FACS, contendo 200  $\mu$ l de PBS.

***Marcação Intracelular***

Para fixar as células adicionou-se formaldeído 4% em PBS durante 10 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Lavou-se as células duas vezes com PBS+0.2%BSA+0.1%NaN<sub>3</sub>, adicionou-se a solução de permeabilização (PBS+0.2%BSA+0.1%NaN<sub>3</sub> com 0.2% saponina) e incubou-se durante 30 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Centrifugou-se durante 3 minutos a 1100 rpm.

Adicionou-se 50  $\mu$ l de anticorpo em solução de permeabilização (PBS+0.2%BSA+0.1%NaN<sub>3</sub> com 0.2% saponina) e incubou-se 30 minutos no escuro. Lavou-se 3 vezes, a primeira com 150  $\mu$ l e as restantes seguintes com 200  $\mu$ l de solução de permeabilização e lavou-se uma vez com 200  $\mu$ l PBS+0.2%BSA+0.1%NaN<sub>3</sub>, adicionou-se 200  $\mu$ l de PBS e transferiu-se para um tubo FACS, contendo 100  $\mu$ l de PBS.

**Extracção do RNA total**

A extracção de RNA total foi efectuada para os linfócitos NK isolados, os linfócitos do sangue periférico (PBL), a linha celular de gliomablastomas (U251)

(gentilmente cedido pelo Prof. Doutor Hassan Bousbaa), a linha celular de hepatoma humano (HepG2), através do Kit RNeasy Mini-Qiagen (Qiagen, Germany).

Isolou-se o RNA total dos linfócitos NK obtidos de cada amostra utilizando o Kit RNeasy Mini-Qiagen. Centrifugou-se as células durante 5 minutos a 2500 rpm. Adicionou-se 350  $\mu$ l de RTL (para  $\leq 5 \times 10^6$ ) de células (antes de utilizar a solução RTL adicionou-se  $\beta$ -mercaptoetanol), agitou-se durante 2 minutos e homogeneizou-se. Para o isolamento do RNA adicionou-se de 350  $\mu$ l de etanol a 70%, homogeneizou-se e transferiu-se 700  $\mu$ l para uma coluna RNeasy spin. Centrifugou-se durante 15 segundos a 13.000 rpm (rejeitou-se o resíduo recolhido no tubo). Adicionou-se 700  $\mu$ l Buffer RW1 à coluna RNeasy spin, centrifugou-se durante 15 segundos a 13.000 rpm (rejeitou-se novamente o resíduo recolhido no tubo). Juntou-se 2 vezes 500  $\mu$ l de RPE à coluna RNeasy spin tendo-se centrifugado primeiro durante 15 segundos a 13.000 rpm e depois 2 minutos a 13.000 rpm (rejeitando-se o fluxo recolhido no tubo). Por fim, para a eluição do RNA adicionou-se entre 30  $\mu$ l de RNase *free water* à coluna RNeasy spin e centrifugou-se durante 1 minuto a 13.000 rpm.

O RNA foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$

#### *Quantificação por espectrofotometria*

O grau de pureza do RNA foi calculado através da razão da absorvância 260nm/280nm, sendo a obtenção dos valores ideais entre 1.9-2.0, que reflectem a reduzida contaminação de proteínas.

A quantificação da concentração de RNA foi efectuada por espectrofotometria através da determinação da absorvância a 260 nm e calculou-se a concentração através da fórmula  $[\text{RNA}] \text{ ng}/\mu\text{l} = A_{260} \times \text{factor diluição} \times 40$ .

A quantificação também foi realizada através do aparelho Nanodrop. Neste caso aplicou-se 1  $\mu$ l da amostra (não diluída) directamente no pedestal do Nanodrop, obtendo-se directamente a informação da concentração de RNA e do grau de pureza (260 nm/280 nm).

A integridade do RNA foi verificada por electroforese em gel de agarose 1.2 %, utilizando-se TAE 1x (Tris-acetato-EDTA) e 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de brometo de etídeo. O marcador de peso molecular utilizado foi *MassRuler DNA™ ladder* (#SM0403, Fermentas). Aplicou-se 200 ng de amostra e para visualização do RNA no gel de

agarose o utilizou-se 2 µl de 6x *MassRuler™ DNA Loading Dye* (#R0621, Fermentas), e o restante de água para um volume total de 12 µl.

A qualidade das amostras de RNA foi determinada através da visualização de duas bandas, indicando a preservação do RNA ribossômico (rRNA 28 S e rRNA 18S).

### Síntese de cDNA

A partir do RNA total extraído das amostras sintetizou-se o cDNA, utilizando o Kit *iScript cDNA Synthesis* (BioRad) Em cada tubo de microcentrifuga foram adicionados 4 µl de *5x iScript Reaction Mix*, 1 µl *iScript Reverse Transcriptase*, 1000 ng da amostra de RNA e o restante de RNase *free water* para completar os 20 µl. A solução foi incubada: 3 minutos a 25 °C, 30 minutos a 42 °C e 5 minutos a 85 °C, no termociclador MJ Mini (Biorad).

### Determinação da expressão de mRNA de GAPDH, TCRβ e CD56 por PCR

A partir da síntese do cDNA determinou-se a expressão de CD56 (marcador dos linfócitos NK), TCRβ (marcador dos linfócitos Tαβ) e como controlo positivo o GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase), para os linfócitos NK isolados e para os linfócitos do sangue periférico (PBL) usados como controlo positivo. Como controlos negativos foram utilizadas a linha celular de gliomablastomas (U251), a linha celular de hepatoma humano (HepG2) e um branco, onde se adicionou água em vez de cDNA.

Para a amplificação foram utilizados os *primers* indicados na Tabela III.2.

**Tabela III.2- Primers utilizados para amplificação dos genes de interesse.**

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Produto (pb)
CD56	5'TTGTGAATGTGCCACCTACC 3'	5'TCCTTCGCTGCTGATGTTCC 3'	437
TCRBC	5'CTTACCTCGGTGTCCTACC 3'	5'TCAGAAATCCTTTCTCTTGACC 3'	139
GAPDH	5'TGATGACATCAAGAAGGTGG 3'	5'CACTGAGTACCTAATCACAG 3'	101

Num tubo de microcentrifuga de 200 µl, foram adicionados 2.5 µl Buffer 10xs (Citomed, Portugal), 2 µl de MgSO<sub>4</sub> 20 mM (Citomed), 0.5 µl de dNTP 10 mM cada um (Citomed), 0.2 µl de Taq DNA polimerase 50 U/10 µl (Citomed), 16.8 µl de água RNase *free*, 0.5 µl de *primer Reverse* 10 µM e 0.5 µl de *primer Forward* 10 µM, 2 µl de

cDNA. O tubo foi transferido para o termociclador MJ Mini (BioRad) e submetido ao seguinte programa:

- Passo 1: 94 °C - 3 minutos
- Passo 2: 94 °C - 20 segundos
- Passo 3: 55 °C - 30 segundos
- Passo 4: 72 °C - 30 segundos
- Passo 5: repetição 34 vezes a partir do passo 2
- Passo 6: 72 °C – 2 minutos
- Passo 7: 15 °C - 30 minutos.

Os produtos da amplificação foram corados e analisados por electroforese em gel de agarose 1.2 % em TAE 1x (Tris-acetato-EDTA) com 20 µg/µl de brometo de etídeo. Aplicou-se 20 µl de cada amostra, com 4 µl de 6x *MassRuler™ DNA Loading Dye* (#R0621, Fermentas) e utilizou-se como marcador de peso molecular o *MassRuler DNA™ ladder* (#SM0403, Fermentas).

### Sequenciação da região amplificada do cDNA TCRβ

O produto de PCR com 139 pb correspondendo à região amplificada do cDNA do TCRβ foi enviado à empresa Stabvida para ser sequenciado, com o objectivo de confirmar se corresponde ao segmento do gene TCRβ, da região C1 (constante) (Figura III. 1). Os *primers Forward* e *Reverse* foram também enviados, para que fosse efectuada a sequenciação de ambas as cadeias

```
Ctttacctcgggtaagtaagcccttccttttctctcctctctcatggttcttgacctagaaccaaggc
atgaagaactcacagacactggaggggtggaggggtgggagagaccagagctacctgtgcacaggtaccac
ctgtccttctccgtgccaacagtgtcctaccagcaaggggtctgtctgccaccatcctctatgagatc
ctgctaggggaaggccaccctgtatgctgtgctggtcagcgcccttggtgtgatggccatgtaagcagga
gggcaggatggggccagcaggctggaggtgacacactgacaccaagcaccagaagtatagagtccttgc
caggattggagctgggcagtagggagggaagagatttcattcaggtgcctcagaagataacttgcacctc
tgtaggatcacagtggaagggatcatgctggaaggagaagctggagtcaccagaaaacccaatggatgtt
gtgatgagccttactatttggtggtcaatgggcccctactactttctctcaatcctcacaactcctggct
cttaataacccccaaaactttctcttctgcaggtaagagaaaggattttctga
```

**Figura III. 1** – Sequência de parte da região constante (C1) do TCRβ, retirada da base de dados NCBI: a verde estão representados dois intrões, a azul está representada a região do gene amplificada com 139 pb e a amarelo os *primers* utilizados.

Os resultados da sequenciação foram analisados através da utilização do programa *Chromas version 1.43*. A partir do programa BLAST efectuou-se o alinhamento do segmento sequenciado, com o segmento do gene do TCRβ.

### Isolamento do DNA dos linfócitos NK

Para isolamento do DNA utilizou-se o Kit Citogene (Citomed). As células foram primeiro centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e removeu-se o sobrenadante. Depois adicionou-se 300 µl solução *cell lysis* e ressuspendeu-se. Juntou-se 1.5 µl de solução RNase A ao lisado celular, misturou-se e incubou-se a 37 °C durante 15 segundos. Após arrefecer adicionou-se solução 100 µl de *Protein Precipitation* e agitou-se no vortex, centrifugou-se durante 3 minutos a 13.000 rpm e decantou-se o sobrenadante para um novo *ependorf* contendo 300 µl isopropanol a 100 %, misturou-se e centrifugou-se novamente durante 1 minuto a 13.000 rpm. Rejeitou-se o sobrenadante e adicionou-se 300 µl de etanol a 70 %. Depois de misturar centrifugou-se 1 minuto a 13.000 rpm. Novamente rejeitou-se o sobrenadante e depois de deixar secar ao ar durante 15 minutos, adicionou-se 50 µl a solução *DNA Hydratation*, por fim incubou-se a 65 °C durante 1 hora.

A razão entre as leituras a 260 nm e 280 nm foi utilizada como indicativo do grau de pureza. A quantificação da concentração de DNA foi efectuada por espectrofotometria através da determinação da absorvância a 260 nm e calculou-se a concentração através da fórmula  $[RNA] \text{ ng}/\mu\text{l} = A_{260} \times \text{factor diluição} \times 50$ . Através do aparelho Nanodrop também foi possível efectuar-se a quantificação. Neste caso, aplicou-se 1µl da amostra (não diluída) directamente no pedestal, obtendo-se os valores concentração de DNA e o grau de pureza (260 nm/280 nm).

A integridade do DNA foi verificada por electroforese em gel de agarose 1.2 %, utilizando-se TAE 1x (Tris-acetato-EDTA) e 20 µg/µl de brometo de etídeo.

Aplicou-se 200 ng de amostra, 2µl de 6X *MassRuler™ DNA Loading Dye* (#R0621, Fermentas) e o restante de água, até completar 12µl.. O marcador de peso molecular utilizado foi *MassRuler DNA™ ladder* (#SM0403, Fermentas). Armazenou-se o DNA a -20 °C.

### Determinação dos rearranjos do gene TCRβ

Para determinação dos rearranjos do TCRβ foi utilizado o *IdentiClone™ TCRB Gene Clonality Assay* (*InVivoScribe* Technologies, USA), em que primeiro é efectuada o PCR, através de 4 mater mixes, incluídas no Kit, em que cada uma contém múltiplos *primers* que têm como alvo regiões conservadas do gene TCRB. Posteriormente é

efectuada a detecção e análise dos segmentos amplificados através da *Differential Fluorescence Detection*.

### PCR

Foram utilizados quatro *multiplex* (tubo A, B, C e *Specimen Control Size Ladder*) de *master mixes*, tendo como alvo a região VDJ do gene TCR $\beta$ .

Os *primers* utilizados nos tubos A e B têm como alvo a região variável (V) e a região junção (J); os *primers* do tubo C têm como alvo as regiões diversidade (D) e junção (J) (Tabela III. 3 e Figura III. 2). A *master mix Specimen Control Size Ladder* tem como alvo múltiplos genes e originam produtos de diversos tamanhos: aproximadamente 100, 200, 300, 400, e 600 pares de bases. Esta *master mix* é utilizada para assegurar que a qualidade e a quantidade de DNA utilizado são adequadas para a obtenção de resultados válidos (Tabela III. 3).

Para cada um dos tubos A, B, C utilizaram-se amostras diferentes de DNA isolado dos linfócitos NK, em duplicado (sendo a concentração indicada entre 100-400  $\mu\text{g/ml}$ ). Utilizou-se um controlo monoclonal (IVS-0004), um controlo policlonal (IVS-0000) e um controlo negativo (água). Para o tubo do *Specimen Control Size Ladder* utilizaram-se amostras diferentes de DNA isolado das células NK, um controlo monoclonal (IVS-0004), um controlo policlonal (IVS-0000) e um controlo negativo (água).

Nos tubos A e B foram adicionados 0.45  $\mu\text{l}$  de *AmpliTaq Gold* DNA polimerase (Applied Biosystems) por reacção a cada *master mix*, ao tubo C e *Specimen Control Size Ladder* foram adicionadas 0.25  $\mu\text{l}$  de *AmpliTaq Gold* DNA polimerase por reacção a cada *master mix*. As amostras foram amplificadas num termociclador Biorad CFX manager e o programa utilizado foi o seguinte:

Passo 1: 95°C - 7 minutos

Passo 2: 95°C - 45 segundos

Passo 3: 60°C - 45 segundos

Passo 4: 72°C - 90 segundos

Passo 5: repetição 34 vezes a partir do passo 2

Passo 6: 72°C - 10 minutos

Passo 7: 15°C sempre

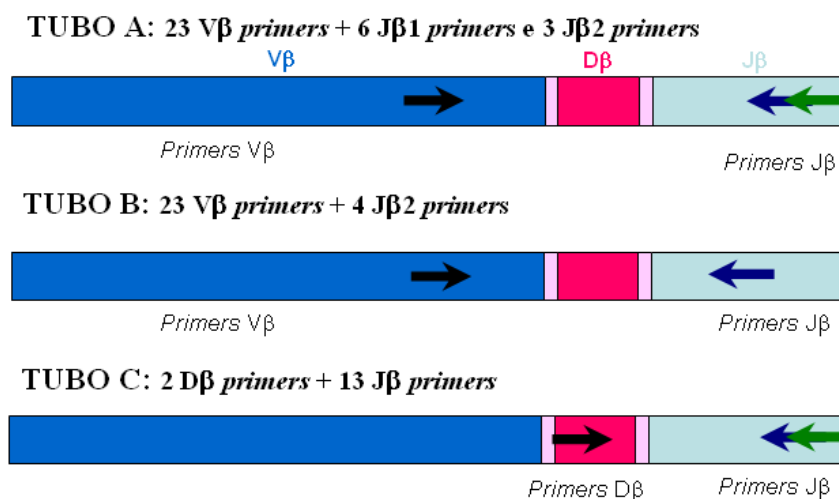


**Differential Fluorescence Detection**

Os *primers* utilizados estavam conjugados com fluorocromos (Tabela III. 3) que produzem diferentes espectros de emissão após excitação por um laser, no aparelho de electroforese capilar. Diferentes cores de fluorescência correspondem a diferentes regiões alvo. Para a detecção de fluorescência diferencial enviaram-se as amostras para a empresa Stabvida. Os resultados foram analisados através do software *Peak Scanner version 1.0* (Applied Biosystems, USA).

**Tabela III.3- Região alvo dos *primers*, cor e tamanho dos produtos esperados cada *master mix***

Master Mix	Região Alvo	Cor	Controlo	Tamanho produto (nucleótidos)
Tubo A	V $\beta$ + J $\beta$ 1/2	Azul (J $\beta$ 2) Verde (J $\beta$ 1)	Policlonal Monoclonal	240-285 295
Tubo B	V $\beta$ + J $\beta$ 2	Azul (J $\beta$ 2)	Policlonal Monoclonal	240-285 253
Tubo C	D $\beta$ + J $\beta$ 1/2	Azul (J $\beta$ 2) Verde (J $\beta$ 1)	Policlonal Monoclonal	170-210 (D $\beta$ 2), 285 (D $\beta$ 1) 295
<i>Specimen Control Size Ladder</i>	Múltiplos genes	Azul	Policlonal	100, 200, 300, 400, 600



**Figura III. 2** - Representação simplificada do gene do TCR $\beta$  rearranjado, com os *primers* utilizados nas *master mixes* dos tubos A, B e C e as fluorescências emitidas (*primer Reverse*: azul e verde).

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS

### Avaliação da pureza dos linfócitos NK isolados por técnicas magnéticas

Após o processo de separação imunomagnética dos linfócitos NK, foi determinado o nível de pureza por citometria de fluxo.

Primeiro avaliou-se a pureza no total de células isoladas (Figura IV. 1A).

Como controlo negativo foi utilizado um anticorpo irrelevante, que não apresenta especificidade para nenhuma proteína humana e permite determinar a fluorescência basal emitida, padronizando o limite acima do qual os sinais de fluorescência são interpretados como positivos ou verdadeiros e não apenas ligações não específicas.

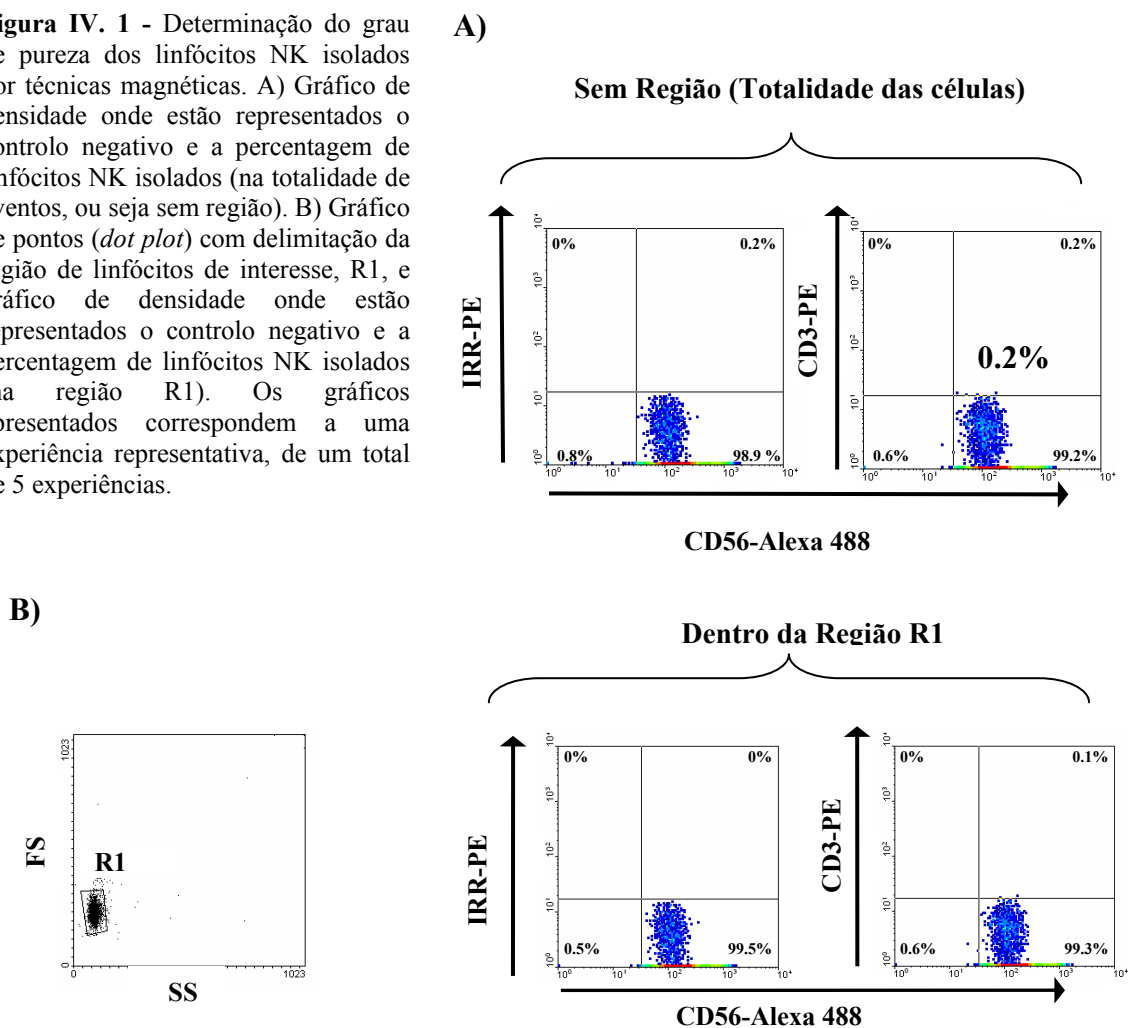
Para determinação da percentagem de pureza dos linfócitos NK na totalidade dos eventos definiram-se os quadrantes, tendo-se verificado valores de pureza (CD56+CD3-) 94.7%±7.5% (média ±SD, n=5). Em média obteve-se 4.7%±7.7% de linfócitos CD56-CD3- e apenas 0.5%±0.6% de linfócitos CD3+ (Figura IV.1 A).

Posteriormente analisaram-se os mesmos parâmetros de pureza dentro da região dos linfócitos. Assim, os linfócitos isolados foram avaliados através de um gráfico de pontos (*dot plot*), relativamente ao seu tamanho FS (*Forward Scatter*) e à complexidade citoplasmática e granulosidade SS (*Side Scatter*), delimitando uma região denominada R1 com as células de interesse, conforme ilustrado na Figura IV.1 B.

Para determinação da percentagem de pureza dos linfócitos NK na região dos linfócitos (R1) definiram-se os quadrantes, tendo-se verificado que em média se obteve 98.9%±0.7% (média ± SD, n=5) de linfócitos CD56+CD3-, enquanto a percentagem de linfócitos CD56-CD3- foi 0.9% ±0.6% e de linfócitos CD3+ foi apenas 0.1%± 0.2% (Figura IV.1 B).

Na Tabela IV.1. estão representadas as percentagens de linfócitos CD3+ contaminantes, obtidos nas diferentes experiências.

**Figura IV. 1** - Determinação do grau de pureza dos linfócitos NK isolados por técnicas magnéticas. A) Gráfico de densidade onde estão representados o controlo negativo e a percentagem de linfócitos NK isolados (na totalidade de eventos, ou seja sem região). B) Gráfico de pontos (*dot plot*) com delimitação da região de linfócitos de interesse, R1, e gráfico de densidade onde estão representados o controlo negativo e a percentagem de linfócitos NK isolados (na região R1). Os gráficos apresentados correspondem a uma experiência representativa, de um total de 5 experiências.



**Tabela IV.1** Percentagem de linfócitos CD3+ (marcação extracelular) após isolamento dos linfócitos NK.

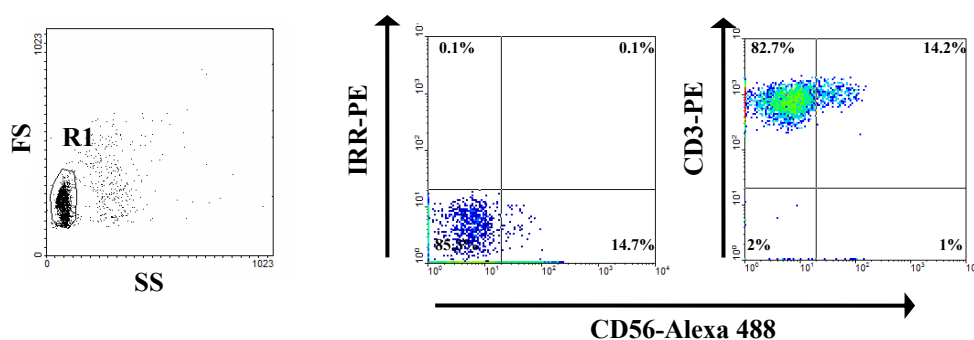
Experiências	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp. 4	Exp.5
% Linfócitos CD3+ (na R1)	0.6	0	0	0.1	0.1

Nota: Na Exp. 1 foi realizada apenas uma selecção negativa CD3+; nas restantes experiências dupla depleção CD3+.

### Os anticorpos anti-CD3 utilizados na marcação para citometria reconhecem um epitopo diferente do anticorpo anti-CD3 acoplado às esferas magnéticas.

Para averiguar a capacidade dos clones de anticorpos anti-CD3 humanos utilizados (UCHT-1 e BW265/56) em detectar linfócitos CD3+ isolados após marcação das células com esferas imunomagnéticas, procedemos à marcação extracelular de linfócitos CD3+ recuperados da coluna LD.

Na Figura IV. 2 podemos observar que o clone BW256/56 marca a população de linfócitos CD3+ com elevada intensidade e perfeitamente separada do controlo negativo. O mesmo foi observado para o clone UCHT-1 (não mostrado), indicando que ambos os anticorpos utilizados detectam um epitopo CD3 diferente do epitopo reconhecido pelo anticorpo utilizado nas esferas magnéticas (Figura IV.2).



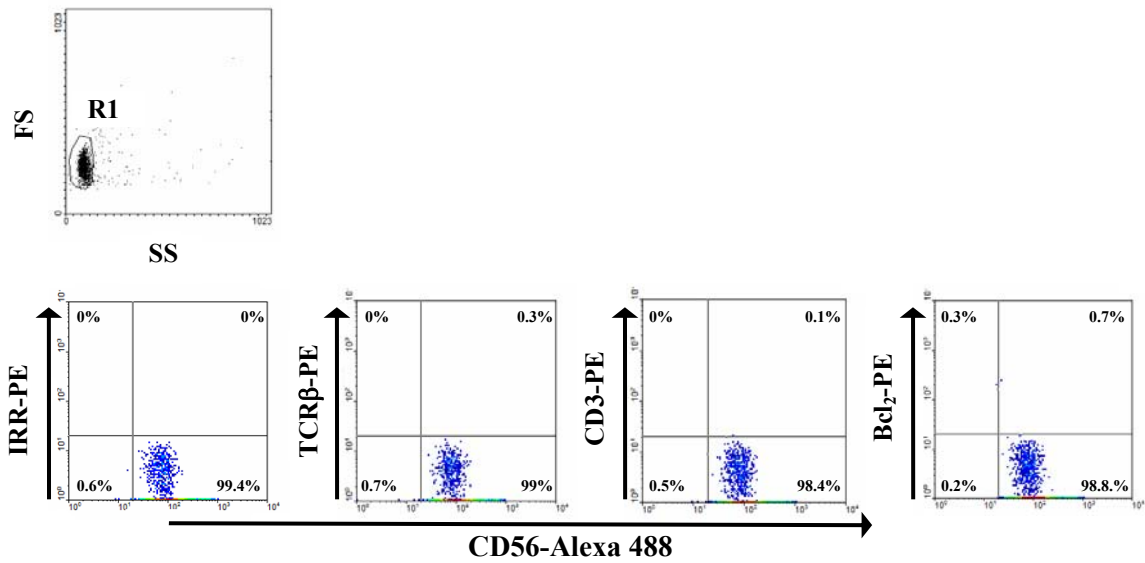
**Figura IV. 2** - Análise da capacidade do clone de anticorpos anti-CD3 humano BW265/56 em detectar linfócitos CD3+ isolados após marcação das células com esferas imunomagnéticas (marcação extracelular). Gráfico de pontos (*dot plot*) com delimitação da região de linfócitos de interesse, R1, e gráfico de densidade onde estão representados o controlo negativo e a percentagem de linfócitos CD3+ isolados (na região R1).

### Expressão de TCR $\beta$ e CD3 em linfócitos NK após purificação imunomagnética

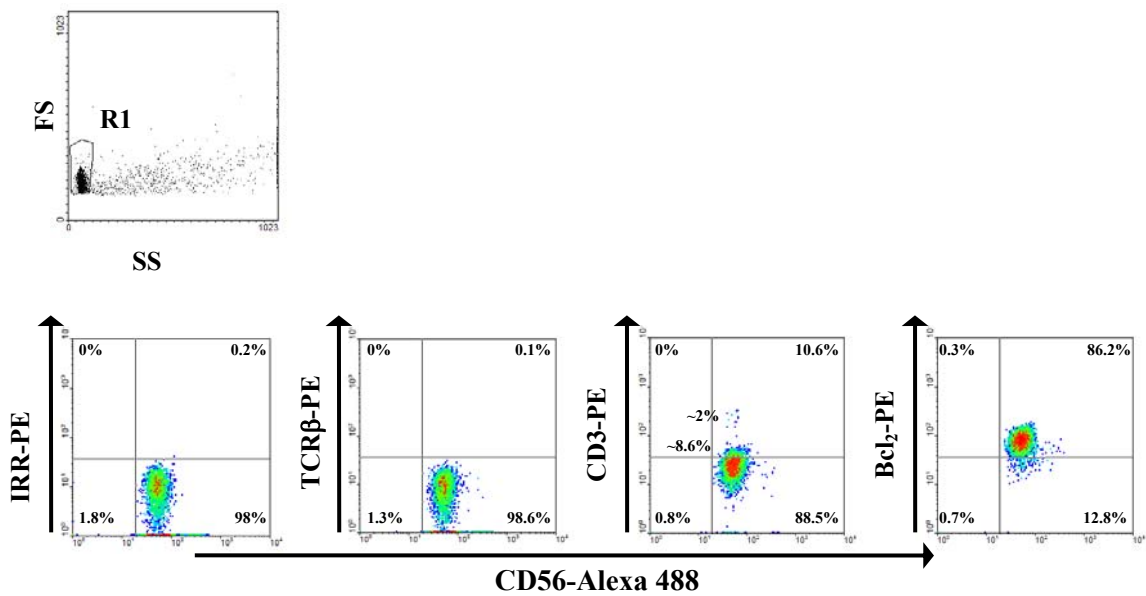
A pureza dos linfócitos NK foi também determinada após marcação dupla TCR $\beta$ /CD56 e CD3/CD56 quer a nível extracelular quer a nível intracelular. Como controlo positivo da permeabilização (na marcação intracelular) utilizou-se o anticorpo anti-Bcl2, e como controlo negativo o anticorpo irrelevante.

Para a marcação extracelular, após delimitação da região dos linfócitos de interesse (R1) verificou-se que a percentagem de linfócitos TCR $\beta$ + foi de 0.3%, de CD3+ foi de 0.1% e de Bcl2 foi de 1% (Figura IV. 3).

Para a marcação intracelular definiu-se também a região dos linfócitos a analisar, região R1 (Figura IV. 4). A percentagem de marcação da proteína intracelular Bcl2 (controlo positivo) foi de aproximadamente 86.5%, enquanto que a percentagem de TCR $\beta$  intracelular foi 0.1%. A percentagem de CD3 intracelular foi de aproximadamente 10.6%, sendo cerca de 2% de CD3 $_{high}$  e de 8.6% CD3 $_{low}$  (Figura IV.4).



**Figura IV. 3** - Expressão extracelular de TCRβ e CD3 em linfócitos NK purificados. Os linfócitos NK foram isolados por separação imunomagnética e marcados para citometria de fluxo – marcação extracelular (ver Material e Métodos). Os gráficos de densidade estão todos analisados na região R1.



**Figura IV. 4** - Expressão intracelular de TCRβ e CD3 em linfócitos NK purificados. Os linfócitos NK foram isolados por separação imunomagnética e marcados para citometria de fluxo – marcação intracelular (ver Material e Métodos). Os gráficos de densidade estão todos analisados na região R1.

### Expressão de mRNA do CD56, TCRβ e GAPDH por PCR

Após a obtenção de linfócitos NK isolou-se o RNA Total. O rendimento obtido foi de  $1.5 \pm 0.1 \mu\text{g}/10^6$  linfócitos NK (média±DP, n=4).

Por PCR determinou-se a expressão do mRNA do gene CD56, dos linfócitos NK isolados e dos PBL (controlo positivo), comprovando-se que ambos os tipos celulares expressam o gene CD56, através da visualização de uma banda com aproximadamente 437 pb (Figura IV. 5). A banda obtida a partir do mRNA amplificado dos PBL apresentou uma intensidade inferior relativamente à dos linfócitos NK.

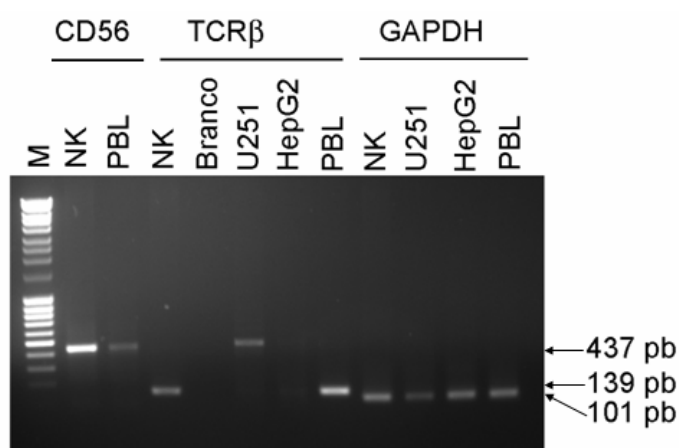
Conforme esperado, constatou-se a expressão TCR $\beta$  nos PBL (controlo positivo) verificando-se uma banda com cerca de 139 pb, correspondente ao tamanho do segmento do cDNA do TCR $\beta$  amplificado.

No branco (sem cDNA) e no controlo negativo HepG2 não se verificou qualquer amplificação. No controlo negativo U251 observou-se uma banda mas com cerca de 450 pb, que corresponde à amplificação do DNA (uma vez que o RNA utilizado apresentava contaminação com DNA).

Nos linfócitos NK isolados, contrariamente ao esperado, verificou que expressavam mRNA do gene TCR $\beta$ , visualizando-se uma banda de 139 pb, com tamanho igual ao segmento do gene TCR $\beta$  (Figura IV. 5 e Figura III-1).

Conforme expectável constatou-se a expressão de GAPDH, obtendo-se uma banda com cerca de 101 pb, para todos os tipos celulares (Figura IV. 5).

Estes resultados obtidos foram concordantes em todas as experiências efectuadas, tendo-se sempre constatado a expressão do mRNA do TCR $\beta$  dos linfócitos NK isolados (Tabela IV.2).



**Figura IV. 5** – Expressão de mRNA de CD56, TCR $\beta$  e GAPDH, nos diferentes tipos celulares. As linhas celulares HepG2 e U251 foram utilizadas como controlos negativos, e os PBL como controlo positivo.

**Tabela IV.2 - Amplificação do segmento do mRNA do TCR $\beta$  e CD56 dos linfócitos NK isolados.**

Experiências	Exp.1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
Expressão de mRNA CD56	+	+	+	+
Expressão de mRNA TCR $\beta$	+	+	+	+

### Sequenciação da região TCR $\beta$ amplificada nos linfócitos NK

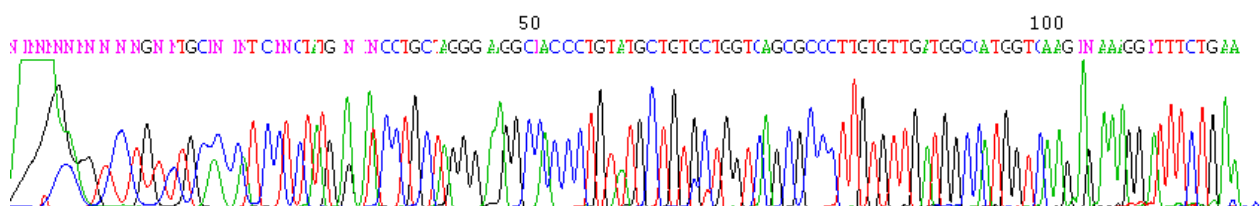
Através da sequenciação da região do TCR $\beta$  amplificada a partir do cDNA dos linfócitos NK, pretendia-se confirmar se a banda com 139 bp obtida, correspondia de facto ao segmento da região constante (C1) do gene TCR $\beta$ .

Os resultados da sequenciação efectuada em ambas as cadeias encontram-se representados na Figura IV. 6.

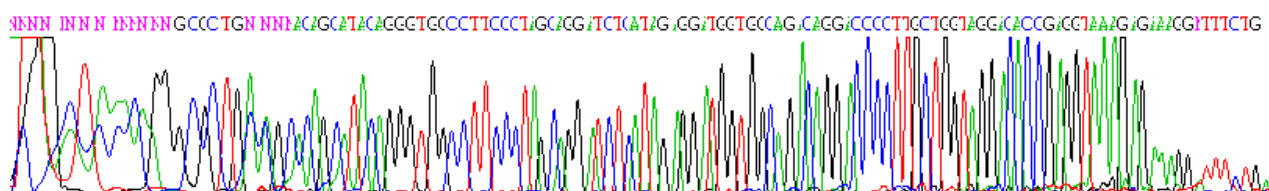
Os nucleótidos não identificados “N” foram determinados a partir da cadeia complementar. Após a obtenção da sequência completa, comparou-se com a sequência da região constante retirada da base de dados do NCBI e através do programa BLAST efectuou-se o alinhamento das sequências.

Os resultados da sequenciação comprovaram a totalidade de concordância nas sequências, i.e. 139/139 pb (ou seja 100%), confirmando-se que o segmento amplificado com 139 pb a partir dos linfócitos NK isolados, corresponde ao segmento do cDNA do gene TCR $\beta$  (Figura IV. 7).

#### Cadeia *Forward*



#### Cadeia *Reverse*



**Figura IV. 6** - Sequenciação do produto TCR $\beta$  amplificado a partir de cDNA de linfócitos NK isolados. Resultados obtidos através do *software* Chromas relativos à sequenciação das cadeias *Forward* e *Reverse* do segmento amplificado (com 139 pb) dos linfócitos NK (ver Material e Métodos).

```

>lcl|16485
Length=139
Score = 257 bits (139), Expect = 4e-74
Identities = 139/139 (100%), Gaps = 0/139 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 CTTTACCTCGGTGTCCTACCAGCAAGGGGTCCTGTCTGCCACCATCCTCTATGAGATCCT 60
      |||
Sbjct 1 CTTTACCTCGGTGTCCTACCAGCAAGGGGTCCTGTCTGCCACCATCCTCTATGAGATCCT 60

Query 61 GCTAGGGAAGGCCACCCTGTATGCTGTGCTGGTCAGCGCCCTTGTGTTGATGGCCATGGT 120
      |||
Sbjct 61 GCTAGGGAAGGCCACCCTGTATGCTGTGCTGGTCAGCGCCCTTGTGTTGATGGCCATGGT 120

Query 121 CAAGAGAAAGGATTTCTGA 139
      |||
Sbjct 121 CAAGAGAAAGGATTTCTGA 139

```

**Figura IV. 7** - Alinhamento entre o segmento de 139 pb amplificado dos linfócitos NK isolados e do segmento da região constante do gene TCR $\beta$ , obtida através do banco de dados do NCBI.

### Rearranjos do gene TCR $\beta$

A determinação dos rearranjos do TCR $\beta$  foi realizada com o intuito de se verificar a as células pertenciam a uma população monoclonal, oligoclonal ou policlonal.

Nas experiências realizadas obtiveram-se diferentes concentrações de DNA, conforme referido na Tabela IV. 3. A quantidade de linfócitos NK isolados em duas experiências (Exp. 3 e 5) não foi suficiente para efectuar-se o isolamento de DNA.

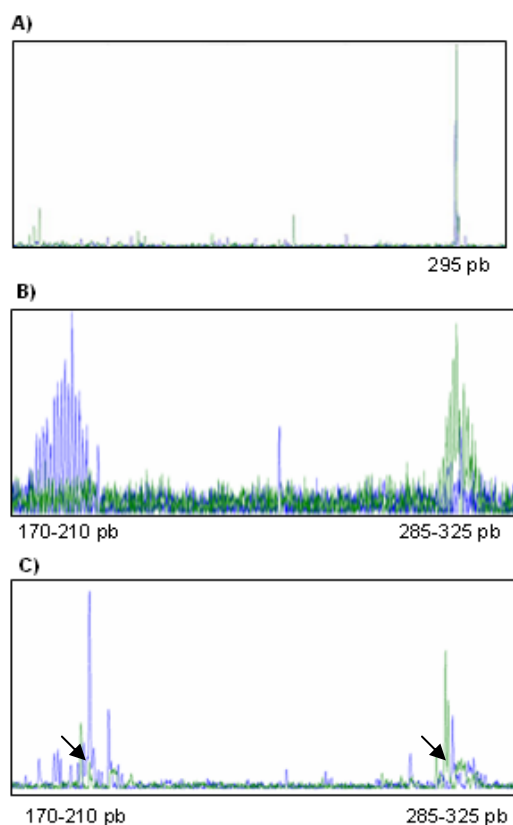
**Tabela IV. 3** Concentração de DNA extraído dos linfócitos NK, nas diferentes experiências realizadas.

Experiências	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5
<b>Concentração de DNA</b>	98 ng/ $\mu$ l	114 ng/ $\mu$ l	-	400 ng/ $\mu$ l	-

Os resultados obtidos para o tubo *Specimen Control Size Ladder* permitiram assegurar que a quantidade e qualidade do DNA era suficiente para obtenção de resultados válidos, tendo-se verificando picos com aproximadamente 100, 200, 300 e 400 pb (não mostrado). Contudo, apenas a partir de uma das experiências realizadas (Exp. 4) foi possível verificar-se que, a população de linfócitos NK isolados parecia corresponder a uma população oligoclonal (Figura IV. 8C), observando-se diversos picos com 170-210 pb e 285-385 pb mas que, não apresentavam uma distribuição gaussiana, conforme observado no controlo positivo policlonal (Figura IV. 7 B).



Os resultados obtidos em duas das experiências (Exp. 1 e 2) realizadas não foram conclusivos, relativamente ao tipo de população (monoclonal, oligoclonal ou policlonal) a que pertenciam os linfócitos NK isolados (Tabela IV. 4). O que poderá ter sido devido a um problema de sensibilidade, uma vez que a quantidade de DNA isolado nestas duas experiências foi bastante inferior à concentração obtida na Exp. 4 (Tabela IV. 3), correspondendo praticamente à concentração mínima recomendada para realização do experiência (100 ng/μl).



**Figura IV. 8** Rearranjos do gene TCR $\beta$ , ilustrando a distribuição dos diferentes comprimentos CDR3. Padrão de picos obtido após amplificação de DNA utilizando a *master mix C* (ver Materiais e Métodos). No gráfico A) está representado o controlo positivo monoclonal (verificando-se apenas um pico nos 295 pb), no gráfico B) o controlo positivo policlonal (curva gaussiana 170-210 pb e 285-385 pb) e no gráfico C) está representado o resultado dos rearranjos obtidos dos linfócitos NK isolados (Exp. 4). As setas indicam determinadas populações que estão mais representadas.

**Tabela IV. 4** Rearranjos do gene TCR $\beta$  nos linfócitos NK

Experiências	Exp.1	Exp.2	Exp.4
Rearranjos do TCR $\beta$	Não detectados	Não detectados	+, oligoclonal?

## CAPÍTULO V. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os linfócitos NK são tradicionalmente caracterizados por expressarem CD56 e/ou CD16 e não expressarem o complexo TCR-CD3 ou apresentarem rearranjos do gene TCR. O mecanismo de citotoxicidade destes linfócitos é semelhante aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTL) (i.e. através da utilização de perforina e granzima) e, assim como os CTL e linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1, secretam interferão  $\gamma$  (151). Para além destas características funcionais partilham com os linfócitos T, em particular com os linfócitos T TCR $\gamma\delta$  e linfócitos T CD8<sup>+</sup> activados, diversos antígenios de superfície. As semelhanças fenotípicas entre as duas populações originaram a hipótese de que o desenvolvimento destes linfócitos poderia estar relacionado e que poderiam partilhar um precursor comum (5, 217).

No entanto, os rearranjos do gene TCR $\beta$  têm sido descritos como o passo de comprometimento irreversível com a linhagem T e nunca foram detectados rearranjos deste gene em linfócitos NK. Pelo contrário, foram descritos rearranjos do TCR $\gamma$  (160), assim como transcrição da linhagem germinal do TCR  $\beta$  e  $\delta$  em linfócitos NK de Ratos e Humanos (208-210).

No seguimento destes estudos o objectivo deste trabalho foi estudar os rearranjos do TCR $\beta$  e a expressão em linfócitos NK de dadores saudáveis.

Após o isolamento dos linfócitos NK e marcação extracelular obteve-se uma elevada percentagem de pureza de linfócitos NK, e uma percentagem de linfócitos T CD3<sup>+</sup> contaminantes muito baixa ou nula. Esta baixa percentagem não se deve a um hipotético “encobrimento” do epítipo da molécula CD3 uma vez que, através da marcação extracelular com anticorpos anti-CD3 verificou-se que os clones BW256/56 e UCHT-1 (não mostrado) marcam a população de linfócitos CD3<sup>+</sup> com elevada intensidade e separada do controlo negativo, indicando que ambos detectam um epítipo CD3 diferente do epítipo reconhecido pelo anticorpo utilizado nas esferas magnéticas.

A determinação da pureza dos linfócitos NK isolados, por marcação extracelular TCR $\beta$ /CD56 também revelou uma baixa percentagem de células TCR $\beta$ <sup>+</sup> (0.3%). Após marcação intracelular a percentagem de células TCR $\beta$ <sup>+</sup> obtida foi também muito baixa (0.1%). No entanto para os linfócitos CD3<sup>+</sup> obteve-se aproximadamente 10.6%, sendo cerca de 2% CD3<sup>high</sup> e 8.6% CD3<sup>low</sup>. Esta diferença entre a percentagem de proteína CD3 extracelular e intracelular poderá dever-se à presença de subunidades CD3 $\epsilon$

intracelulares em linfócitos NK, conforme descrito em diversos estudos, tendo sido inicialmente demonstrado que CD3 $\zeta$  e Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  estavam presentes nos linfócitos NK humanos (211, 212, 157) e mais tarde foi descrita a expressão das subunidades  $\gamma$ ,  $\epsilon$  e  $\delta$  do CD3. No entanto, ao contrário dos linfócitos T, a expressão de CD3 é restrita ao citoplasma e regulada durante o desenvolvimento. Em Humanos, as subunidades CD3 $\gamma\epsilon\delta$  foram detectadas em clones de linfócitos NK derivados do fígado fetal e timo, e linfócitos NK do sangue periférico aparentemente apenas expressam CD3 $\epsilon$  à superfície, após activação (152, 213). Em Ratinhos a expressão de CD3 $\epsilon$  também parece estar limitada a linfócitos NK activados *in vitro* (214). Adicionalmente foi também demonstrado que os linfócitos NK aviários expressam CD3 $\epsilon$  intracitoplasmático. Assim, de acordo com estes resultados concluíram que os linfócitos T e NK humanos derivam de um precursor bipotente comum que expressa CD3 $\epsilon$  intracitoplasmático durante o desenvolvimento (213).

Recentemente Smedt *et al* também reportaram a detecção de cerca de 3-5% de linfócitos NK com CD3 citoplasmático, isolados do sangue periférico e demonstraram que linfócitos NK com CD3<sup>+</sup> citoplasmático poderão ser originados de células progenitoras que recebem sinalização Notch/DL (Delta-like) nos estádios iniciais do seu desenvolvimento (215). Adicionalmente estudos sugerem que os linfócitos NK que expressam CD3 $\epsilon$  + citoplasmático são característicos de diversos linfomas (216).

Assim, a presença de linfócitos NK que expressam CD3 citoplasmático, nomeadamente isolados do sangue periférico de Humanos, está descrita em diversos estudos e poderá explicar as diferenças entre as percentagens de CD3 obtidas após marcação intracelular e extracelular que obtivemos (215).

Depois de isolados os linfócitos NK, comprovou-se, conforme esperado, a expressão de mRNA do CD56 por PCR. No entanto, contrariamente ao expectável, também foi detectada a expressão de mRNA do TCR $\beta$  nos linfócitos NK, confirmando-se após sequenciação que correspondia ao segmento do gene TCR $\beta$ , verificando 100% de similaridades. Em todas as experiências realizadas a expressão de mRNA do TCR $\beta$  foi detectada, nos linfócitos NK isolados. Estes resultados sugerem que nestes linfócitos NK, o gene TCR $\beta$  encontra-se rearranjado, pois só assim seria possível a sua transcrição para RNA.

O rearranjo do TCR $\beta$  em linfócitos NK até ao momento ainda não foi confirmado por nenhum estudo. No entanto Veinotte *et al* demonstraram que

aproximadamente 5% dos linfócitos NK do baço de Ratinhos neonatais e 1% em adultos, apresentam o gene  $TCR\gamma$  rearranjado, sendo detectados níveis semelhantes em Ratinhos  $TCR\beta\delta$  duplos *knockout* (excluindo a possibilidade de contaminações), este grupo concluiu que o mais provável é que estes linfócitos NK  $TCR\gamma^+$  sejam originados de precursores de linfócitos T DN2 uma vez que é neste estágio que se inicia o rearranjo do gene  $TCR\gamma$  (160, 217). Os rearranjos dos genes  $TCR\gamma$  e  $\delta$  ocorrem pelo menos um estágio antes do gene  $TCR\beta$  e de acordo com o estudo de Veinotte *et al* não foram detectados rearranjos do gene  $TCR\beta$  em linfócitos NK, sendo geralmente aceite que uma vez rearranjados ambos os genes  $TCR\gamma$  e  $\delta$  ou o gene  $TCR\beta$  dos timócitos, estes tornem-se comprometidos para a linhagem T e perdem o potencial NK. Estes resultados também contestam a suposição comum, que os rearranjos do gene TCR marcam o comprometimento irreversível dos linfócitos com a linhagem T, uma vez que poderão ser originados linfócitos NK após a recombinação VJ (160).

No seguimento da observação de que o gene do  $TCR\beta$  se encontra rearranjado nos linfócitos NK isolados, pretendeu-se através da determinação dos rearranjos, identificar se pertenciam a populações policlonais, oligoclonais ou monoclonais, uma vez que cada rearranjo VDJ é único e os rearranjos do gene do TCR originam produtos com sequência e tamanhos únicos. Quando o DNA de uma população policlonal é amplificado utilizando *primers* que amplificam na região V-J, é originada uma curva de distribuição Gaussiana de produtos de amplificação com tamanhos esperados, esta curva reflecte uma população heterogénea de rearranjos V-J. Para uma população monoclonal o resultado é a amplificação de um ou dois produtos. A utilização de diversos *primers*, tendo como alvo diferentes regiões da região VDJ, possibilita a identificação da maioria dos rearranjos clonais, uma vez que os genes dos TCR são polimórficos, utilizando uma única sequência de *primers* seria difícil amplificar todos os segmentos conservados da região VDJ. Através da verificação dos rearranjos foi possível constatar que, em pelo menos uma das experiências, os linfócitos NK pertenciam a uma população oligoclonal, visualizando-se alguns picos com 170-210 pb e 285-385 pb mas estes não representavam uma curva gaussiana. Provavelmente devido a um problema de sensibilidade não foi possível determinar o tipo de população a que pertenciam os linfócitos NK isolados em duas das experiências, nas quais a quantidade de DNA isolado foi correspondente à quantidade mínima recomendada para a realização da experiência.

O reportório de receptores expressos pelos linfócitos T e NK dificulta a distinção entre os dois tipos celulares. No entanto, actualmente os rearranjos do gene TCR $\beta$  são considerados a marca hereditária, irreversível e o marcador clonal em todos os descendentes dos linfócitos T, mesmo daqueles que adquirem receptores NK após activação, sendo para muitos investigadores a única distinção entre as populações celulares (166).

Estudos recentes referem que os linfócitos T do sangue do cordão umbilical e dos hepatócitos após estimulados com IL-15 poderão expressar os receptores NCRs, como NKp46 que se pensava inicialmente serem restritos dos linfócitos NK (6, 199).

Apesar de serem necessários mais estudos, a detecção da expressão de mRNA do TCR $\beta$  em linfócitos NK poderá desafiar a convicção de que os rearranjos do gene TCR $\beta$  representam a verdadeira distinção entre os linfócitos T e NK.

**CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFIA**

1. Lotzova E., Ades E.W.. Natural killer cells: definition, heterogeneity, lytic mechanism, functions and clinical application. *Nat Immun Cell Growth Regul.* 1989; 8: 1-9.
2. Lanier L.L., Phillips J.H., Hackett J. Jr., Tutt M, Kumar V.. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J. Immunol.*1986; 137: 2735-2739.
- 3- Di Santo J.P.. Natural Killer Cell Developmental Pathways: A Question of Balance. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24: 257-286.
- 4- Farag S.S., Caligiuri M.A.. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* 2006; 20: 123-137.
- 5- Phillips J.H., Hori T., Nagler A., Bhat N., Spits H., Lanier L.L.. Ontogeny of human natural killer cells: Fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 $\epsilon$  $\delta$  proteins. *J Exp Med.* 1992; 175: 1055-1066.
- 6- Correia M.P., Cardoso E.M., Pereira C.F., Neves R., Uhrberg M., and Arosa F.A.. Hepatocytes and IL-15: A Favorable Microenvironment for T Cell Survival and CD8+ T Cell Differentiation. *J. Immunol.* 2009; 182: 6149-6159.
- 7- Akashi K., Traver D., Miyamoto T., Weissman I.L.. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature.* 2000; 404: 193-197.
- 8- Kondo M., Weissman I.L., Akashi K.. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 1997; 91: 661–672.
- 9- Wu L., Vandenabeele S., Georgopoulos K.. Derivation of dendritic cells from myeloid and lymphoid precursors. *International Reviews of Immunology.* 2001; 20: 117–135.

- 10- Kawamoto H. & Katsura Y. A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. *Trends Immunol.* 2009; 30: 193–200.
- 11- Kawamoto H., Wada H. and Katsura Y.. A revised scheme for developmental pathways of hematopoietic cells: the myeloid-based model. *Int Immunol.* 2010; 22: 65-70.
- 12- Lydyard P.M., Grossi C.E.. Cells, tissues and organs of the immune system. In: Roitt M, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology*. 6th ed. Edinburgh: Mosby. 2001; 15-45.
- 13- Germain, R.N.. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 309-322.
- 14- Adams E.J., Chien Y.H. and Garcia K.C.. Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22. *Science.* 2005; 308: 227-231.
- 15- Chien Y.H., Jores R., and Crowley M.P. Recognition by gamma/delta T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 511-532.
- 16- Garcia K.C., Degano M., Stanfield R.L., Brunmark A., Jackson M.R., Peterson P.A., Teyton L. and Wilson I.A.. An alpha-beta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR/MHC complex. *Science.* 1996; 274: 209-219.
- 17- Isobe M., Erikson J., Emanuel B.S., Nowell P., and Croceet C.. Location of gene for beta subunit of human T-cell receptor at band 7q35, a region prone to rearrangements in T cells. *Science.* 1985; 228: 580–582.
- 18- Wilson R.K., Lai E., Concannon P., et al. Structure, organization and polymorphism of murine and human T-cell receptor alpha and beta chain gene families. *Immunol Rev.* 1988; 101:149–172.

- 19- Alt F.W., Oltz E.M., Young F., Gorman J., Taccioli G., and Chen J.. VDJ recombination. *Immunol. Today*. 1992; 13: 306-314.
- 20- Lefranc M.P.. Locus maps and genomic repertoire of the human T cell repertoire. *The Immunologist*. 2000; 8: 72–78.
- 21- Rowen L., Koop B.F., Hood L.. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science*. 1996; 272: 1755–1762.
- 22- Toyonaga B., Mak T.W.. Genes of the T-cell antigen receptor in normal and malignant T cells. *Annu Rev Immunol*. 1987; 5: 585–620.
- 23- Arden B., Clarke S.P., Kabelitz D.. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics*. 1995; 42: 455–500.
- 24- Lefranc M.P., Forster A., Baer R., Stinson, MA, Rabbins, TH.. Diversity and rearrangement of the human T cell rearranging gamma genes: nine germ-line variable genes belonging to two subgroups. *Cell*. 1986; 45: 237–246.
- 25- Forster A., Huck S., Ghanem N., et al. New subgroups in the human T cell rearranging V gamma gene locus. *EMBO J*. 1987; 6: 1945–1950.
- 26- Hodges E., Krishna M.T., Pickard C., Smith J.L.. Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes. *J Clin Pathol*. 2003; 56: 1-11.
- 27- Arnett K.L., Harrison S.C. and Wiley D.C.. Crystal structure of a human CD3-epsilon/delta dimer in complex with a UCHT1 single-chain antibody fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101: 16268–16273.
- 28- Kjer-Nielsen L., Dunstone M.A., Kostenko L., Ely L.K., Beddoe T., Mifsud N.A., Purcell A.W., Brooks A.G., McCluskey J. and Rossjohn J.. Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101: 7675–7680.



- 29- Sun Z.J., Kim K.S., Wagner G. and Reinherz E.L.. Mechanisms contributing to T cell receptor signaling and assembly revealed by the solution structure of an ectodomain fragment of the CD3 epsilon gamma heterodimer. *Cell*. 2001; 105: 913–923.
- 30- Kane L.P., Lin J. and Weiss A.. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* 2000; 12: 242–249.
- 31- Alarcon B., Ley S. C., Sanchez-Madrid F., Blumberg R. S., Ju S. T., Fresno M. and Terhorst C.. The CD3-gamma and CD3-delta subunits of the T cell antigen receptor can be expressed within distinct functional TCR–CD3 complexes. *EMBO J.* 1991; 10: 903-912.
- 32- Saito H., Koyama T., Georgopoulos K., Clevers H., Haser W.G., LeBien T., Tonegawa S., Terhorst C.. Close linkage of the mouse and human CD3 gamma- and delta-chain genes suggests that their transcription is controlled by common regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84: 9131–9134.
- 33- Clevers H.C., Dunlap S., Wileman T.E., Terhorst C.. Human CD3-epsilon gene contains three miniexons and is transcribed from a non-TATA promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85: 8156–8160.
- 34- Call M.E., Pyrdol J., Wucherpfennig K.W.. Stoichiometry of the T-cell receptor–CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 2004; 23: 2348–2357.
- 35- Wileman T., Kane L.P., Young J., Carson G.R., Terhorst C.. Associations between subunit ectodomains promote T cell antigen receptor assembly and protect against degradation in the ER. *J Cell Biol.* 1993; 122: 67–78.
- 36- Alcover A., Mariuzza R.A., Ermonval M., Acuto O.. Lysine 271 the transmembrane domain of the T-cell antigen receptor beta chain is necessary for its assembly with the CD3 complex but not for alpha/beta dimerization. *J Biol Chem.* 1990; 265: 4131–4135.

- 37- Cantrell D.. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 259-274.
- 38- Bjorkman P. J.. MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell.* 1997; 89: 167-170.
- 39- Call M.E., Pyrdol J., Wiedmann M., Wucherpfennig K.W.. The organizing principle in the formation of the T cell receptor– CD3 complex. *Cell.* 2002; 111: 967–979.
- 40- Manolios N., Bonifacino J.S. and Klausner R.D.. Transmembrane helical interactions and the assembly of the T cell receptor complex. *Science.* 1990; 249: 274–277.
- 41- Hayes S.M. and Love P.E.. Distinct structure and signalling potential of the gamma delta TCR complex. *Immunity.* 2002; 16: 827–838.
- 42- Hayes S.M., and Love P.E.. Stoichiometry of the murine {gamma} {delta} T cell receptor. *J. Exp. Med.* 2006; 203: 47–52.
- 43- Hayes S.M., Laky K., El-Khoury D., Kappes D.J., Fowlkes B.J. and Love P.E.. Activation-induced modification in the CD3 complex of the gammadelta T cell receptor. *J. Exp. Med.* 2002; 196: 1355–1361.
- 44- Krangel M. S.. Endocytosis and recycling of the T3-T cell receptor complex. *J. Exp. Med.* 1987; 165: 1141-1159.
- 45- Boyer C., Auphan N., Luton F., Malburet J.M., Barad M., Bizozzero J., Reggio H., and Schmitt-Verhulst A.M.. T cell receptor/CD3 complex internalization following activation of a cytolytic T cell clone: evidence for a protein kinase C-independent staurosporine-sensitive step. *Eur. J. Immunol.* 1991; 21: 1623-1634.
- 46- Minami Y., Samelson L.R., Klausner R.D.. Internalization and cycling of the T cell antigen receptor: role of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 13342-13347.

- 47- Dietrich J., Menne C., Lauritsen J. P., von Essen M., Rasmussen A. B., Odum N., and Geisler C. J.. *Immunol.* 2002; 168: 5434–5440.
- 48- Alcover A. y Alarcón B. Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit. Rev. Immunol.* 2000; 20: 325-346.
- 49- Das V., Nal B., Dujeancourt A., Thoulouze M. I., Galli T., Roux P., Dautry-Varsat, A. and Alcover A.. *Immunity.* 2004; 20: 577–588.
- 50- Niedergang F., San Jose E., Rubin B., Alarcon B., Dautry-Varsat A., Alcover A.. Differential cytosolic tail dependence and intracellular fate of T-cell receptors internalized upon activation with superantigen or phorbol ester. *Res Immunol.* 1997; 148: 231-245.
- 51- Niedergang F., Hémar A., Hewitt C.R., Owen M.J., Dautry-Varsat A., Alcover A.. The *Staphylococcus aureus* enterotoxin B superantigen induces specific T cell receptor downregulation by increasing its internalization. *J Biol Chem.* 1995; 270: 12839–12845.
- 52- Liu H., Rhodes M., Wiest D.L., Vignali D.A.. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity.* 2000; 13: 665-675.
- 53- Dietrich, J., Kastrup, J., Nielsen, B.L., Odum, N., and Geisler, C. Regulation and function of the CD3 $\gamma$  DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J. Cell Biol.* 1997; 138: 271-281
- 54- Torres, P. S., Alcover, A., Zapata, D. A., Arnaud, J., Pacheco, A., Martin-Fernandez, J. M., Villasevil, E. M., Sanal, O., and Regueiro, J. R. *J. Immunol.* 2003; 170: 5947–5955.
- 55- Borroto, L., Niedergang F., Dautry-Varsat A., Alarcon B. and Alcover A., The CD3 epsilon subunit of the TCR contains endocytosis signals, *J. Immunol.* 1999; 163: 25–31.
- 56- Dietrich J. and Geisler C.. T cell receptor zeta allows stable expression of receptors containing the CD3 $\gamma$  leucine-based receptor-sorting motif, *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 26281–26284.

- 57- Ono S., Ohno H. and Saito T.. Rapid turnover of the CD3 zeta chain independent of the TCR-CD3 complex in normal T cells, *Immunity*. 1995; 2: 639–644.
- 58- Blichfeldt E., Munthe L.A., Rotnes J.S. and Bogen B.. Dual T cell receptor T cells have a decreased sensitivity to physiological ligands due to reduced density of each T cell receptor, *Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 2876–2884.
- 59- Valitutti S., Muller S., Salio M., and Lanzavecchia, A. Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med.* 1997; 185: 1859-1864.
- 60- Cai Z., Kishimoto H., Brunmark A., Jackson M.R., Peterson P.A. and Sprent J.. Requirements for peptide-induced T cell receptor downregulation on naïve CD8+ T cells, *J. Exp. Med.* 1997; 185: 641–651.
- 61- Liu H., Rhodes M., Wiest D.L., Vignali D.A.. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity*. 2000; 13: 665-675.
- 62- Martin S., M.J. Bevan.. Transient alteration of T cell fine specificity by a strong primary stimulus correlates with T cell receptor downregulation. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 2991–3002.
- 63- Salio M., Valitutti S., lanzavecchia A.. Agonist-induced TCR downregulation: molecular requirements and dissociation from T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 1769–1773.
- 64- Cai Z., Kishimoto H., Brunmark A., Jackson M. R., Peterson P. A. and Sprent J. J.. Requirements for peptide-induced T cell receptor downregulation on naïve CD8+ T cells. *Exp. Med.* 1997; 185: 641–651.
- 65- Valitutti S., Muller S., Cella M., Padovan E., Alanzavecchia. Serial triggering of many T cell receptors by a few peptide–MHC complexes. *Nature*. 1995; 375: 148–151.
- 66- Hou X., Dietrich J., Kuhlmann J., Wegener A.M., Geisler C.. Structure of the T cell receptor in a T<sub>H</sub>1  $\alpha$ V $\beta$ 2,  $\alpha$ V $\beta$ 8-positive T cell line. *Eur J Immunol.* 1994; 24: 1228–1233.

- 67- Bonefeld, C. M., Rasmussen, A. B., Lauritsen, J. P., von Essen, M., Odum, N., Andersen, P. S., and Geisler, C. TCR Comodulation of Nonengaged TCR Takes Place by a Protein Kinase C and CD3{gamma} Di-Leucine-Based Motif-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* 2003; 171: 3003–3009.
- 68- San José E., Borroto A., Niedergang F., Alcover A. and Alarcón B.. Triggering the TCR complex causes the downregulation of nonengaged receptors by a signal transduction-dependent mechanism. *Immunity.* 2000; 12: 161-170.
- 69- Schwarz B.A., Bhandoola A.. Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis. *Immunological Reviews.* 2006; 209: 47–57.
- 70- Lind E.F., Prockop S.E., Porritt H.E. and Petrie H.T.. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 127–134.
- 71- Porritt H.E., Gordon K., and Petrie H.T.. Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J. Exp. Med.* 2003; 198: 957–962.
- 72- Penit C.. Localization and phenotype of cycling and postcycling murine thymocytes studied by simultaneous detection of bromodeoxyuridine and surface antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 1988; 36: 473–478.
- 73- Ciofani M., and Zuniga-Pflucker J.C.. Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nat. Immunol.* 2005; 6: 881–888.
- 74- Wilson A., MacDonald H.R., Radtke F.. Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *Journal of Experimental Medicine.* 2001; 194: 1003–1012.

- 75- Maeda T., Merghoub T., Hobbs R.M., Dong L., Maeda M., Zakrzewski J., van den Brink M.R., Zelent A., Shigematsu H., Akashi K., Teruya-Feldstein J., Cattoretti G., Pandolfi P.P.. Regulation of B versus T lymphoid lineage fate decision by the proto-oncogene LRF. *Science*. 2007; 316: 860–866.
- 76- Fry T.J., Mackall C.L.. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood*. 2002; 99: 3892-3904.
- 77- M. De Smedt, Hoebeke I., Reynvoet K, Leclercq G., and Plum J.. Different thresholds of Notch signaling bias human precursor cells toward B-, NK-, monocytic/dendritic-, or T-cell lineage in thymus microenvironment. *Blood*. 2005; 106: 3498-3506.
- 78- Robey, E. & Fowlkes, B. J.. Selective events in T-cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12: 675–705.
- 79- von Boehmer, H., Teh, H.S., Kisielow, P.. The Thymus Selects the Useful, Neglects the Useless and Destroys the Harmful, *Immunology Today*. 1989; 10: 57-61.
- 80- Norment A.M., Salter R.D., Parham P., Engelhard V.H., Littman D.R.. Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature*. 1988; 336: 79–81.
- 81- Shaw A.S., et al. The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell*. 1989; 59: 627–636.
- 82- Turner J.M., et al. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell*. 1990; 60: 755–765.
- 83- Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M.. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008; 133: 775–787.

- 84- Cyster J.G.. Specifying the patterns of immune cell migration. *Nov Found Symp.* 2007; 281: 54–61.
- 85- Sigmundsdottir H., Butcher E.C.. Environmental cues, dendritic cells, and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nat Immunol.* 2008; 9: 981–987.
- 86- Geenen V., Poulin J.F., Dion M.L., Martens H., Castermans E., Hansenne I., Moutschen M., Sekaly R.P., Cheynier R.. Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. *J Endocrinol.* 2003; 176: 305-311.
- 87- Davis M.M., Bjorkman P.J.. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature.* 1988; 334: 395–402.
- 88- Lieber M. R.. The mechanism of V(D)J recombination: a balance of diversity, specificity, and stability. *Cell.* 1992; 70: 873 –876.
- 89- Jung D. and Alt F.W.. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation, *Cell.* 2004; 116: 299–311.
- 90- Spits H.. Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 760-772.
- 91- Weiss A. T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell.* 1993; 73: 209-212.
- 92- Chan A.C., Iwashima M., Turck C.W., Weiss A.. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell.* 1992; 71: 649-662.
- 93- Skapenko, A., Leipe J., Lipsky P.E. and Schulze-Koops, H.. The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Research and Therapy.* 2005; 7 S2: 4-14.

- 94- June C.H., Bluestone J.A., Nadler L.M., Thompson C.B.. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today*. 1994; 15: 321-331.
- 95- Chávez-Galán L., Arenas-Del Angel M.C., Zenteno E., Chávez R. and Lascurain R.. Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. *Cellular & Molecular Immunology*. 2009; 6: 15-25.
- 96- Trinchieri G.. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*. 1989; 47:187-376.
- 97- Trowsdale J., Barten R., Haude A., Stewart C.A., Beck S., et al. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev*. 2001; 181: 20–38.
- 98- Lanier L.L.. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16: 359-393.
- 99- Lazetic S., Chang C., Houchins J.P., Lanier L.L., Phillips J.H.. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol*. 1996; 157: 4741-4745.
- 100- Carretero M., Cantoni C., Bellon T., et al. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur J Immunol*. 1997; 27: 563-567.
- 101- Chang C., Rodriguez A., Carretero M., Lopez-Botet M., Phillips JH., Lanier L.L.. Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. *Eur J Immunol*. 1995; 25: 2433-2437.
- 102- Adamkiewicz T.V., McSherry C., Bach F.H., Houchins J.P.. Natural killer lectin-like receptors have divergent carboxy-termini, distinct from C-type lectins. *Immunogenetics*. 1994; 39: 218.
- 103- Plougastel B., Jones T., Trowsdale J.. Genomic structure, chromosome location, and alternative splicing of the human NKG2A gene. *Immunogenetics*. 1996; 44: 286-291.



- 104- Sobanov Y., Glienke J., Brostjan C., Lehrach H., Francis F., Hofer E.. Linkage of the NKG2 and CD94 receptor genes to D12S77 in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics*. 1999; 49: 99-105.
- 105- Liano M., Lee N., Navarro F.. HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential responses to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol*. 1998; 28: 2854–2863.
- 106- Bauer S., Groh V., Wu J. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999; 285: 727–729.
- 107- Le Dréan E., Vély F., Olcese L., et al. Inhibition of antigeninduced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur J Immunol*. 1998; 28: 264-276.
- 108- Masilamani M., Nguyen C., Kabat J., Borrego F., Coligan J.E.. CD94/NKG2A inhibits NK cell activation by disrupting the actin network at the immunological synapse. *J Immunol*. 2006; 177: 3590-3596.
- 109- Lieto L.D., Maasho K., West D., Borrego F., Coligan J.E.. The human CD94 gene encodes multiple, expressible transcripts including a new partner of NKG2A/B. *Genes Immun*. 2006; 7: 36-43.
- 110- Lanier L.L., Corliss B., Wu J., Phillips J.H.. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity*. 1998; 8: 693-701.
- 111- Billadeau D.D., Upshaw J.L., Schoon R.A., Dick C.J., Leibson P.J.. NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing *via* a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol*. 2003; 4: 557-564.
- 112- Vance R.E., Jamieson A.M., Raulet D.H.. Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/ NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells. *J Exp Med*. 1999; 190: 1801-1812.

113- Kim D.K., Kabat J., Borrego F., Sanni T.B., You C.H., Coligan J.E.. Human NKG2F is expressed and can associate with DAP12. *Mol Immunol.* 2004; 41: 53-62.

114- Farag S.S., Fehniger T.A., Ruggeri L., Velardi A., Caligiuri M.A.. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood.* 2002; 100: 1935-1947.

115- Papamichail M., Perez S.A., Gritzapis A.D., Baxevanis C.N.. Natural killer lymphocytes: biology, development, and function *Cancer Immunol Immunother.* 2003; 53: 176-186.

116- Colonna M., Navarro F., Bellon T., et al. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med.* 1997; 186: 1809-1818.

117- Cosman D., Fanger N., Borges L., et al. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity.* 1997; 7: 273-282.

118- Navarro F., Llano M., Bellon T., Colonna M., Geraghty D.E., Lopez-Botet M.. The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol.* 1999; 29: 277-283.

119- Tang Q, Grzywacz B, Wang H, Kataria N, Cao Q, Wagner JE, Blazar BR, Miller JS, Verneris MR. Umbilical cord blood T cells express multiple natural cytotoxicity receptors after IL-15 stimulation, but only NKp30 is functional. *J Immunol.* 2008; 181: 4507-4515.

120- Pende D., Parolini S., Pessino A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. and Moretta, A. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med.* 1999; 190: 1505-1516.

- 121- Vitale M., Bottino C., Sivori S., et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med.* 1998; 187: 2065-2072.
- 122- Moretta A., Biassoni R., Bottino C., Moretta L.. Surface receptors delivering opposite signals regulate the function of human NK cells. *Semin Immunol.* 2000; 12: 129-138.
- 123- Cooper M.A., Fehniger T.A., Turner S.C., et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. *Blood.* 2001; 97: 3146-3151
- 124- Caligiuri M.A., Murray C., Robertson M.J., et al. Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. *J Clin Invest.* 1993; 91: 123-132.
- 125- Caligiuri M.A., Zmuidzinas A., Manley T.J., Levine H., Smith K.A., Ritz J.. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med.* 1990; 171: 1509-1526.
- 126- Fehniger T.A., Cooper M.A., Nuovo G.J., et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by Tcell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood.* 2003; 101: 3052-3057.
- 127- Nagler A., Lanier L.L., Cwirla S., Phillips J.H.. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol.* 1989; 143: 3183-3191.
- 128- Cunningham B., Hcmperly J., Murray B., Prediger E., Brackenbury R. and Edelman G.. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science.* 1987; 236: 799-806.
- 129- Warren H.S.. CD56. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2000; 14: 317-321.

130- Lanier L.L., Chang C., Azuma M., Ruitenberg J.J., Hemperly J.J., Phillips J.H.. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol.* 1991; 12: 4421-4426.

131- Nguyen C., Mattei M.G., Mattei J.F., Santoni M.J., Goridis C., Jordan B.R.. Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11. *J Cell Biol.* 1986; 102: 711-715.

132- Walmod P.S., Kolkova K., Berezin V., Bock E.: Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res.* 2004; 29: 2015-2035.

133- S. Gattenlohner, T. Stuhmer, E. Leich, M. Reinhard, B. Etschmann, H.-U. Volker, A. Rosenwald, E. Serfling, R. C. Bargou, G. Ertl, *et al.* Specific Detection of CD56 (NCAM) Isoforms for the Identification of Aggressive Malignant Neoplasms with Progressive Development *Am. J. Pathol.* 2009; 174: 1160-1171.

134- Brümmendorf T., Lemmon V.. Immunoglobulin superfamily receptors: cis-interactions, intracellular adapters and alternative splicing regulate adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 2001; 13: 611-618.

135- Imod P.S., Kolkova K., Berezin V., Bock E.. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res.* 2004; 29: 2015-2035.

136- Walsh F.S., Putt W., Dickson J.G., Quinn C.A., Cox R.D., Webb M., Spurr N., Goodfellow P.N.. Human N-CAM gene: mapping to chromosome 11 by analysis of somatic cell hybrids with mouse and human cDNA probes. *Brain Res.* 1986; 387: 197-200.

- 137- Amoureux M.C., Cunningham B.A., Edelman G.M., Crossin K.L.. N-CAM binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype. *J Neurosci.* 2000; 20: 3631-3640.
- 138- Lydyard P.M., Grossi C.E.. Cells, tissues and organs of the immune system. *Immunology.* 2001; 6: 15-45.
- 139- Kishimoto T., Kikutani H., von der Borne A., Goyert S.N., Mason D.Y., Miyasaka M, et al. Leukocyte typing VI- white cell differentiation antigens. New York: Garland Publishing, Inc. 1998; 327-329.
- 140- Sun J.C., Lanier L.L.. Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *Eur J Immunol.* 2009; 39: 2059–2064.
- 141- Sun J. C., Beilke J. N. and Lanier L. L.. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature.* 2009; 457: 557-561.
- 142- Bubic I., Wagner M., Krmpotic A., Saulig T., Kim S., Yokoyama W. M., Jonjic S. and Koszinowski U. H.. Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 2004; 78: 7536-7544.
- 143- Guma M., Cabrera C., Erkizia I., Bofill M., Clotet B., Ruiz L. and Lopez-Botet, M.. Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients. *J. Infect. Dis.* 2006; 194: 38-41.
- 144- Guma M., Budt M., Saez A., Brckalo T., Hengel H., Angulo A. and Lopez-Botet, M.. Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood.* 2006; 107: 3624-3631.
- 145- Kuijpers T. W., Baars P.A., Dantin C., van den Burg M., van Lier R. A. and Roosnek E.. Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood.* 2008; 112: 914-915.

146- Cooper M.A., Elliott J.M., Keyel P.A., Yang L., Carrero J.A., and Yokoyama W.M.. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 1915-1919.

147- Cousens L. P., Orange J. S., Su H. C. and Biron C. A.. Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production *in vitro* and endogenously during viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94: 634-639.

148- Orange J. S. and Biron C. A.. Characterization of early IL-12, IFN- $\alpha$ , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol*. 1996; 156: 4746-4756.

149- Berg R. E., Crossley E., Murray S. and Forman J., Memory CD8<sup>+</sup>T cells provide innate immune protection against *Listeria monocytogenes* in the absence of cognate antigen. *J. Exp. Med*. 2003; 198: 1583-1593.

150- Lertmemongkolchai G., Cai G., Hunter C. A. and Bancroft G. J.. Bystander activation of CD8<sup>+</sup>T cells contributes to the rapid production of IFN- $\gamma$  in response to bacterial pathogens. *J Immunol*. 2001; 166: 1097-1105.

151- Lanier, L. L., NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol*. 2005; 23: 225-274.

152- Lanier L.L., Chang C., Spits H., Phillips J.H.. Expression of cytoplasmic CD3 $\epsilon$  proteins in activated human adult natural killer (NK) cells and CD3 $\epsilon\gamma\delta$  complexes in fetal NK cells. *J Immunol*. 1992; 149: 1876–1880.

153- Biassoni R., Ferrini S., Prigione I., Moretta A., Long E.O.. CD3-negative lymphokine-activated cytotoxic cells express the CD3 epsilon-gene. *J Immunol*. 1988; 140: 1685–1689.

154- Kumar, and Terhorst C.. 1987. Murine natural killer cells stimulated *in vivo* do not express the T cell receptor alpha, beta, gamma, T3 delta, or T3 epsilon genes. *J Immunol*. 1987; 139: 1704-1710.

- 155- Biassoni, K., Ferrini S., Prigione I., Moretta A., and Long E.O.. CD3-negative lymphokine-activated cytotoxic cells express the CD3e gene. *J Immunol.* 1988; 140: 1685-1689.
- 156- O'Shea, J. J., Weissman A.M., Kennedy I.C., Ortaldo J.R.. Engagement of the natural killer cell IgG Fc receptor results in tyrosine phosphorylation of the  $\zeta$  chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 350-354.
- 157- Vivier, E., Morin P., O'Brien C., Druker B., Schlossman S.F., Anderson P.. Tyrosine phosphorylation of the Fc $\gamma$ RIII (CD16):  $\zeta$  complex in human natural killer cells: induction by antibody-dependent cytotoxicity but not by natural killing. *J. Immunol.* 1991; 146: 206-210.
- 158- Moingeon P., Stebbins C.C., D'Adamio L., Lucich J., Reinherz E.L.. Human natural killer cells and mature T lymphocytes express identical CD3 zeta subunits as defined by cDNA cloning and sequence analysis. *Eur J Immunol.* 1990; 20: 1741-1745.
- 159- Göbel, T.W.F., Chen, C.L.C., Shrimpf, J., Grossi, C.E., Bernot, A., Bucy, R.P., Auffray, C. and Cooper, M.D. Characterization of avian natural killer cells and their intracellular CD3 protein complex. *Eur J Immunol.* 1994; 24: 1685-1691.
- 160- Veinotte, L. L., Greenwood C.P., Mohammadi N., Parachoniak C.A., Takei F.. Expression of rearranged TCR $\gamma$  genes in natural killer cells suggests a minor thymus-dependent pathway of lineage commitment. *Blood.* 2006; 107: 2673-2679.
161. Borghesi, L., L. Y. Hsu, J. P. Miller, M. Anderson, L. Herzenberg, M. S. Schlissel, D. Allman, R. M. Gerstein. B lineage-specific regulation of V(D)J recombinase activity is established in common lymphoid progenitors. *J. Exp. Med.* 2004; 199: 491-502.
- 162- Fronkova, E., O. Krejci, T. Kalina, O. Horvath, J. Trka, O. Hrusak. Lymphoid differentiation pathways can be traced by TCR  $\delta$  rearrangements. *J Immunol.* 2005; 175: 2495-2500.

163- Borghesi, L., C. Milcarek. Innate versus adaptive immunity: a paradigm past its prime? *Cancer Res.* 2007; 67: 3989-3993.

164- Stewart, C. A., Walzer, T., Robbins, S. H., Malissen, B., Vivier, E. and Prinz, I., Germline and rearranged TCR $\alpha$  transcription distinguish bona fide NK cells and NK-like gd T cells. *Eur. J Immunol.* 2007; 37: 1442–1452.

165- Meresse, B., Curran, S. A., Ciszewski, C., Orbelyan, G., Setty, M., Bhagat, G., Lee, L. *et al.*, Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J. Exp. Med.* 2006; 203: 1343-1355.

166- Lanier, L. L., Back to the future - defining NK cells and T cells. *Eur. J Immunol.* 2007; 37: 1424-1426.

167- Colucci F., Caligiuri M.A., Di Santo J.P.. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 413-425.

168- Ran Y.S.; Chung J.W.; Choi I.; Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells. *Molecules and cells.* 2007; 24: 1-8.

169- Fehniger T.A., Cooper M.A., Nuovo G.J., et al. CD56<sup>bright</sup> natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood.* 2003; 101: 3052-3057.

170- Lanier L.L., Le A.M., Civin C.I., Loken M.R., Phillips J.H.. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1986; 136: 4480-4486.

171- Chan A., Hong D.L., Atzberger A., Kollnberger S., Filer A.D., Buckley C.D., McMichael A., Enver T. and Bowness P.. CD56<sup>bright</sup> human NK cells differentiate into CD56<sup>dim</sup> cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol.* 2007; 179: 89-94.



172- Ferlazzo G., Thomas D., Lin S.L.. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol.* 2004; 172: 1455-1462.

173- Freud AG, Becknell B, Roychowdhury S. A human CD34+ subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity.* 2005; 22: 295-304.

174- Mattei F., Schiavoni G., Belardelli F., Tough D.F.. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J Immunol.* 2001; 167: 1179-1187.

175- Kennedy, M. K., M. Glaccum, S. N. Brown, E. A. Butz, J. L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C. R. Willis, K. Brasel, P. J. Morrissey, K. Stocking, J. C. Schuh, S. Joyce, and J. J. Peschon. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med.* 2000; 191: 771-780.

176- Koka R., Burkett P.R., Chien M., Chai S., Chan F., Lodolce J., Boone D., Ma A., Interleukin (IL)-15R[alpha]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R[alpha]-deficient mice. *J Exp Med.* 2003; 197: 977-984.

177- Mrozek E., Anderson P., Caligiuri M.A.. Role of interleukin- 15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1996; 87: 2632-2640.

178- Freud A.G., Yokohama A., Becknell B.. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med.* 2006; 203: 1033-1043.

179- Chan A., Hong D.L., Atzberger A., CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol.* 2007; 179: 89-94.

- 180- Eidenschenk C., Dunne J., Jouanguy E., Fourlinnie C., Gineau L., Bacq D.. A novel primary immunodeficiency with specific natural-killer cell deficiency maps to the centromeric region of chromosome 8. *Am J Hum Genet.* 2006; 78: 721–727.
- 181- Etzioni A., Eidenschenk C., Katz R., Beck R., Casanova J.L., Pollack S. Fatal varicella associated with selective natural killer cell deficiency. *J Pediatr.* 2005; 146: 423–425.
- 182- Biron C.A., Byron K.S., Sullivan J.L.. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med.* 1989; 320: 1731–1735.
- 183- Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G.. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 715–727.
- 184- Hayakawa Y., Screpanti V., Yagita H., Grandien A., Ljunggren H.G., Smyth M.J., and Chambers B.J.. NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol.* 2004; 172: 123–129.
- 185- Kashii Y., Giorda R., Herberman R.B., Whiteside T.L., Vujanovic N.L.. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J Immunol.* 1999; 163: 5358–5366.
- 186- Wallach D., Fellous M., Revel M. Preferential effect of interferon-gamma on the synthesis of HLA antigens and their mRNAs in human cells. *Nature.* 1982; 299: 833–836.
- 187- Schoenborn J.R., Wilson C.B., Frederick W.A.. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* 2007; 96: 41–101.
- 188- Cooper M.A., Fehniger T.A., Turner S.C., Chen K.S., Ghaheri B.A., Ghayur T., Carson W.E., Caligiuri M.A.. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood.* 2001; 97: 3146–3151.

- 189- Aste-Amezaga M., D'Andrea A., Kubin M., Trinchieri G. Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells. *Cell Immunol.* 1994; 156: 480-492.
- 190- Loza M.J., Zamai L., Azzoni L., Rosati E., Perussia B. Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells. *Blood.* 2002; 99: 1273–1281.
- 191- Roda J.M., Parihar R., Magro C., Nuovo G.J., Tridandapani S., Carson III W.E. Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Res.* 2006; 66: 517–526.
- 192- Lucas M., Schachterle W., Oberle K., Aichele P., Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity.* 2007; 26: 503–517.
- 193- Pellicci D.G., Hammond K.J., Uldrich A.P., Baxter A.G., Smyth M.J., Godfrey D.I. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(–) CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J. Exp. Med.* 2002; 195: 835–844.
- 194- Arosa F.A., Cardoso E.M., Pacheco F.C., *Fundamentos de Imunologia Lidel*, 1ª edição. 2007; Lisboa.
- 195- Porcelli, S. A. The CD1 family: a third lineage of antigen presenting molecules. *Adv. Immunol.* 1995; 59: 1-98.
- 196- Arrenberg, P., Halder, R., Kumar, V. Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J. Cell. Physiol.* 2009; 218: 246-250.
- 197- Kronenberg M., Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 557–568.

- 198- Crowe, N. Y., Uldrich, A. P., Kyparissoudis, K., Hammond, K. J., Hayakawa, Y., Sidobre, S., Keating, R. *et al.*, Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells. *J Immunol.* 2003; 171: 4020-4027.
- 199- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Sato, H., Kondo, E., Harada, M., Koseki, H., Nakayama, T., Tanak, Y. and Taniguchi, M., Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated V $\alpha$ 14 NKT cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998.. 95: 5690 - 5693
- 200- Stremmel, C., M. Exley, S. Balk, W. Hohenberger, V. K. Kuchroo. Characterization of the phenotype and function of CD8<sup>+</sup>,  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> NKT cells from tumor-bearing mice that show a natural killer cell activity and lyse multiple tumor targets. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31: 2818-2828.
- 201- Emoto, M., Kaufmann, S.H.E. Liver NKT cells: an account of heterogeneity. *Trends Immunol.* 2003; 24: 364-369.
- 202- Huang, L., Soldevila, G., Leeker, M., Flavell, R. and Crispe, I. N., The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo. *Immunity.* 1994; 1: 741-749.
- 203- Eberl, G., Lees, R., Smiley, S. T., Taniguchi, M., Grusby, M. J. and MacDonald, H. R., Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J. Immunol* 1999; 162: 6410-6419.
- 204- Sykes, M., Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> and  $\alpha\beta$ TCR<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> cells. *J. Immunol.* 1990; 145: 3209-3215.
- 205- Levitsky, H. I., Golumbek, P. T. and Pardoll, D. M., The fate of CD4-8- T cell receptor- $\alpha\beta$ <sup>+</sup> thymocytes. *J. Immunol.* 1991; 146: 1113-1117.

- 206- Ishihara, S., Nieda, M., Kitayama, J., Osada, T., Yabe, T., Ishikawa, Y., Nagawa, H., Muto, T. and Juji, T., CD8<sup>+</sup>NKR-P1A<sup>+</sup> T cells preferentially accumulate in human liver. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 2406-2413.
- 207- Rodewald, H. R., Moingeon P., Lucich J.L., Dosiou C., Lopez P., Reinherz E. L.. A population of early fetal thymocytes expressing FcγRII/III contains precursors of T lymphocytes and natural killer cells. *Cell.*1992; 69:139-150.
- 208- Biassoni, R., Verdiani, S., Cambiaggi, A., Romeo, P.-H., Ferrini, S. and Moretta, L.. Human CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> natural killer cells express the hGATA-3 T cell transcription factor and an unrearranged 2.3 kb TCR β transcript. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 1083-1087.
- 209- Loh, E. Y., Cwirla, S., Serafini, A. T., Phillips, J. H. and Lanier, L. L.. Human T cell receptor δ chain: Genomic organization, diversity, and expression in populations of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 9714-9718.
- 210- Young, H. A., Ortaldo, J. R., Herberman, R. B. and Reynolds, C. W., Analysis of T cell receptors in highly purified rat and human large granular lymphocytes (LGL): lack of functional 1.3 kb beta-chain mRNA. *J. Immunol.* 1986; 136: 2701-2704.
- 211- Anderson P., Caligiuri M., O'Brien C., Manley T., Ritz J., Schlossman S.F.. Fc gamma receptor type III (CD16) is included in the zeta NK receptor complex expressed by human natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 2274–2278.
- 212- Ravetch J.V., Kinet J.P.. Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 1991; 9: 457-492.
- 213- Sanchez, M. J., M. O. Muench, M. G. Roncarolo, L. L. Lanier, J. H. Phillips.. Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 569-576.
- 214- Wang, B., Biron, C., She, J., Higgins, K., Sunshine, M.J., Lacy, E., Lonberg, N., Terhorst, C.. A block in both early T lymphocyte and natural killer cell development in transgenic mice with high-copy numbers of the human CD3E gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 9402 - 9406.

215- De Smedt M., Taghon T., Van de Walle I., De Smet G., Leclercq G., and Plum J.. Notch signaling induces cytoplasmic CD3{epsilon} expression in human differentiating NK cells. *Blood*. 2007; 110: 2696-2703.

216- Kwong YL. Natural killer-cell malignancies: diagnosis and treatment. *Leukemia*. 2005;19: 2186- 2194.

217- Livak F, Tourigny M, Schatz DG, Petrie HT. Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. *J Immunol*. 1999;162: 2575-2580.