



ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России
Медико-биологический факультет
Кафедра иммунологии

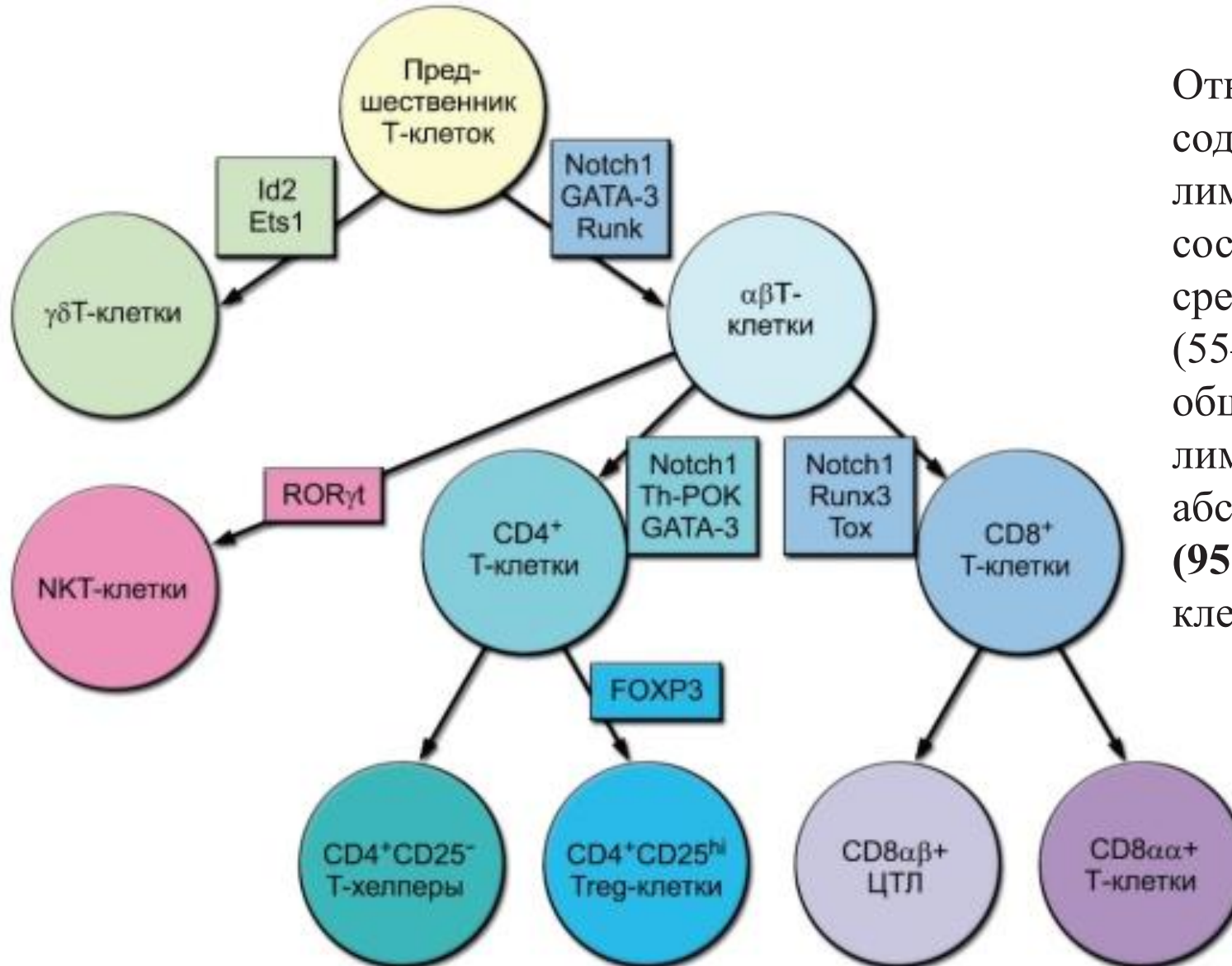
Дифференцировка Т-лимфоцитов

Подготовил: студент медико-биологического факультета

гр.3.4.01

Куликов Филипп

Основные субпопуляции Т-лимфоцитов



Относительное содержание Т-лимфоцитов в крови составляет в среднем около **73%** (55–85%) от общего числа лимфоцитов; абсолютное — **(950–2100)×10⁹** клеток в литре.

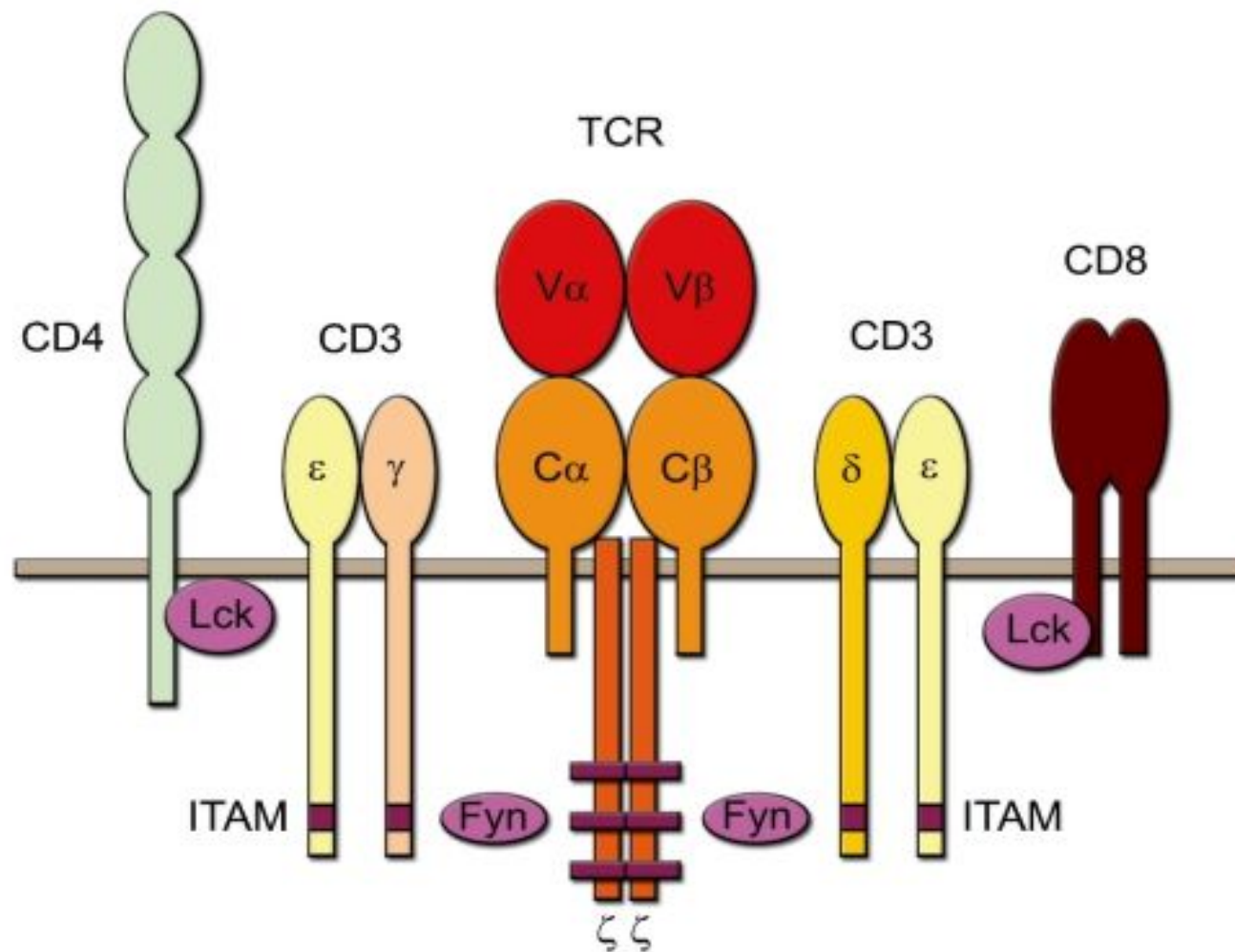
Характеристика «классических» $\alpha\beta$ T-клеток

- На поверхности $\alpha\beta$ T-клеток экспрессируется примерно в 5 раз меньше молекул TCR, чем BCR на поверхности В-лимфоцитов (30 000—40 000 TCR на клетку). Содержание комплексов CD3 примерно в 10 раз больше, чем TCR — около 300 000 молекул на клетку, что свидетельствует о присутствии на мембране молекул CD3, не связанных с TCR;
- Помимо TCR—CD3 зрелые T-клетки экспрессируют молекулы CD2, CD5, CD7;
- Наиболее важные в функциональном отношении мембранные молекулы T-клеток — корцепторы CD4 и CD8, служащие маркерами основных субпопуляций $\alpha\beta$ T-клеток, а также костимулирующая молекула CD28, экспрессируемая на большинстве (около 80%) T-клеток;
- Для наивных (не контактировавших с антигеном) $\alpha\beta$ T-клеток характерен высокий уровень экспрессии селектина L (CD62L) и хемокинового рецептора CCR7. Эти молекулы определяют пути миграции T-клеток;
- На T-клетках содержатся также β 1- и β 2-интегрины (особенно LFA-1 и VLA-4) и рецепторы для цитокинов (для IL-7, IL-1, IL-2, IL-4, IL-15 и др.).
- Маркером наивных T-клеток, отличающим их от клеток памяти, служит полноразмерная форма молекулы CD45 — CD45RA.

Характеристика «классических» $\alpha\beta$ T-клеток

- Т-лимфоциты относят к долгоживущим клеткам. Срок жизни различных субпопуляций наивных $\alpha\beta$ T-лимфоцитов составляет месяцы и годы;
- Основное место локализации Т-лимфоцитов в лимфоидных органах — тимусзависимые зоны. К ним относят паракортикальные зоны лимфатических узлов и параартериальные муфты селезенки. Вне Т-зон Т-лимфоциты непосредственно соседствуют с В-клетками. Содержатся в барьерных тканях – слизистых и эпидермисе. Также они активно рециркулирующие клетки.
- Для выживания Т-лимфоцитов необходим IL-7, а также сигналы от TCR, при распознавании ими молекул МНС и аутологичных пептидов.

Структура TCR-CD3 комплекса $\alpha\beta$ Т-клеток



Стадии дифференцировки

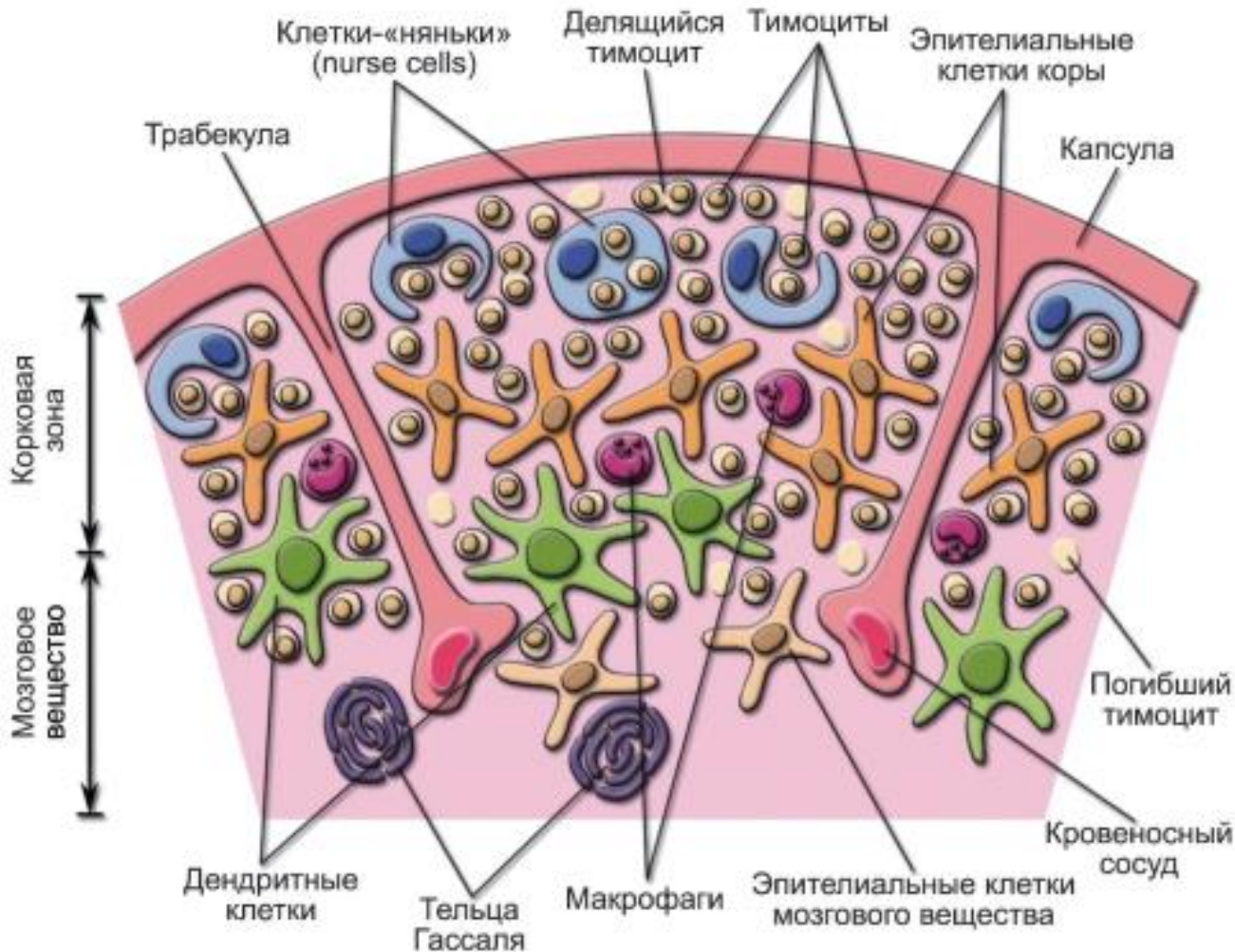
Таблица 3.13. Стадии развития и субпопуляции тимоцитов человека

Стадия развития	Фенотип	Содержание, %	Локализация	Функция, процессы
Дважды отрицательные (DN)	Стадия DN1: CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD3 ⁻ ; CD44 ⁺ CD25 ⁻	4–5	Кортикомедуллярная и перимедуллярная зона	Полипотентные предшественники
	Стадия DN2 (про-Т-клетки): CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD3 ⁻ ; CD44 ⁺ CD25 ⁺		Субкапсулярная зона	Подготовка перестройки генов
	Стадия DN3 (пре-Т-клетки): CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD3 ⁻ ; CD44 ⁻ CD25 ⁺		То же	Перестройка V β -гена
Незрелые моноположительные (iSP)	CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD3 ⁻	0,5–0,7	Наружные слои коры	Нет данных
Дважды положительные (DP) TCR $\alpha\beta$ ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD3 ⁻ TCR $\alpha\beta$ ^{lo} CD69 ⁻ CD5 ^{lo}	70–75	Кора	Перестройка V α -гена. Незрелые Т-клетки; положительная селекция
	CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD3 ⁻ TCR $\alpha\beta$ ^{hi} CD69 ⁻ CD5 ⁺		Глубокие слои коры	Отрицательная селекция. Дифференцировка CD4/CD8
Моно-положительные (SP) TCR $\alpha\beta$ ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD3 ⁻ TCR $\alpha\beta$ ^{hi} CD25 ⁻	6–7	Мозговой и кортикомедуллярный слой	Предшественники Т-хелперов
	CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD3 ⁻ TCR $\alpha\beta$ ^{hi}	4–5	То же	Предшественники цитотоксических Т-лимфоцитов
	CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD3 ⁻ TCR $\alpha\beta$ ^{hi} CD25 ^{hi}	2–3	– «–	Естественные регуляторные Т-клетки
Дважды отрицательные (DN) TCR $\gamma\delta$ ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD3 ⁻ TCR $\gamma\delta$ ⁺	1	Наружные слои коры	Предшественники Т-клеток барьерных тканей

Миграция в тимус клеток-предшественников

- Из кроветворных органов в тимус мигрируют ранние лимфоидные предшественники ELP (от *Early lymphoid progenitors*)
- ФЕНОТИП: $CD34^+ SCA-1^+ CD117(c\text{-Kit})^+ Flt-3^+ CCR9^+ CD4^{lo}$
 - Sca-1 — антиген стволовых клеток (*Stem cell antigen*);
 - c-Kit — лиганд фактора стволовых клеток SCF (Stem cell factor)
 - CD34 — используется в качестве идентификационного для выявления стволовых клеток и их ближайших потомков.
- У человека: $CD34^+ CD38^{lo} CD45RA^+ CD7^+$ (у В-лимфоцитов CD10 вместо CD7)

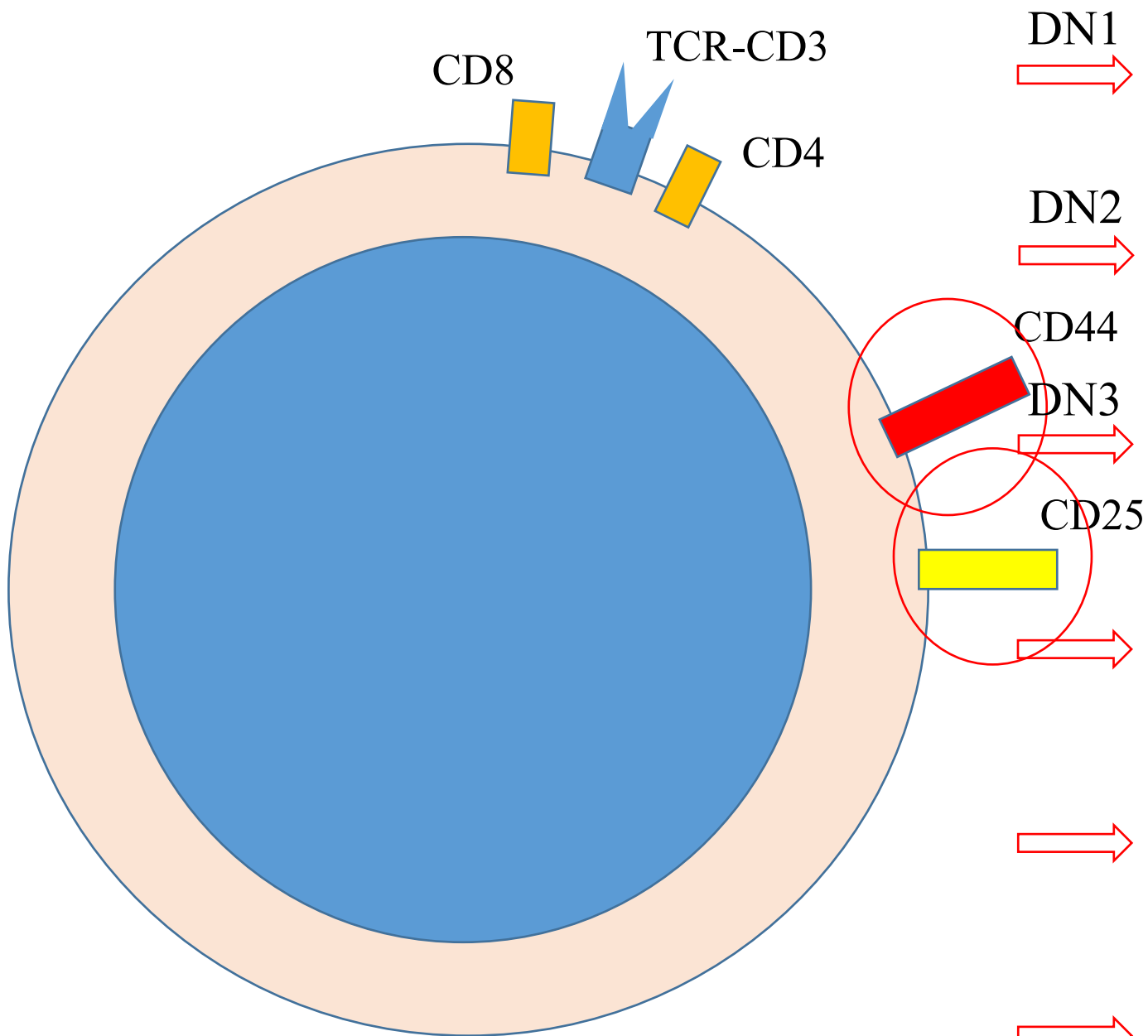
Миграция в тимус клеток-предшественников



В ходе этих перемещений происходит созревание Т-клеток. На этом отрезке миграции проходят первые этапы развития самих Т-лимфоцитов.

Основные события при Т-лимфопоэзе

- Перестройка рецепторных V-генов и формирование TCR с последующей селекцией клонов Т-лимфоцитов, обеспечивающей формирование антигенраспознающего репертуара.
- Перестройка V-генов TCR и другие события, приводящие к экспрессии рецептора, происходят на стадии дважды отрицательных тимоцитов (DN: CD4⁻, CD8⁻, CD3⁻) в поверхностных слоях коры тимуса (субкапсулярной зоне).



Гены реаранжировки V(D)J

Локализации

• *T-клеточный тип* (*TCR α*)

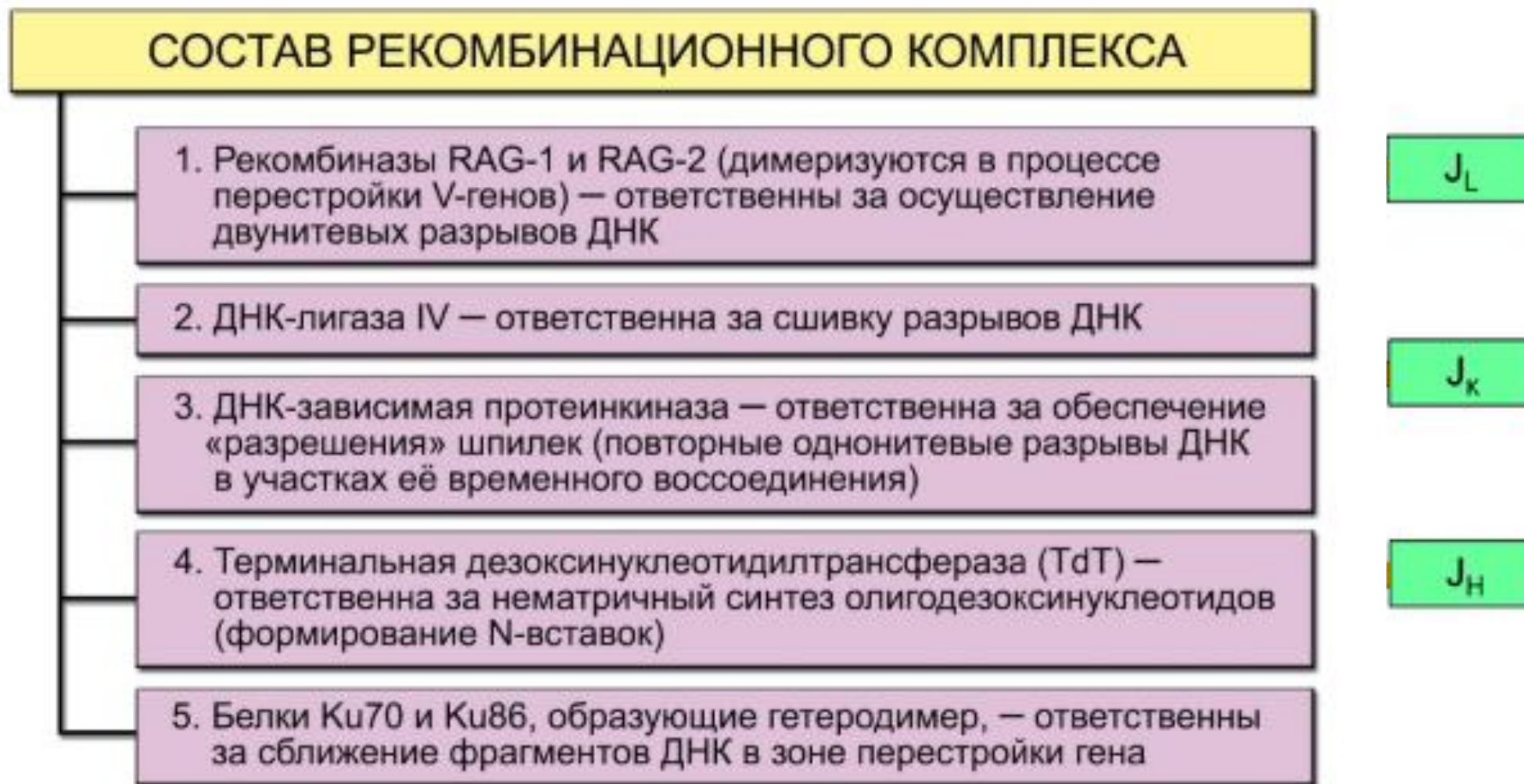
• TCRA
(14 хр)

• TCRB
хромо

• *T-клеточный тип* (*TCR γ*)

• TCRG
хромо

• TCRD
(14 хромосома)



DN1-стадия

- Клетки пролиферируют (до 10 делений), что приводит к 1000-кратному увеличению их числа.
- Основной ростовой фактор на этом этапе — **SCF** (С-Kit лиганд).
- В это время рецептор для **IL-7** экспрессирован слабо или вообще не экспрессирован.
- Факторами дифференцировки на этом этапе развития служат **Wnt** и **Hedgehog**, а также **Notch**, коммиттирующий клетки-предшественники к дифференцировке в Т-лимфоциты.
- **V-гены** имеют зародышевую, т.е. *неперестроенную* конфигурацию

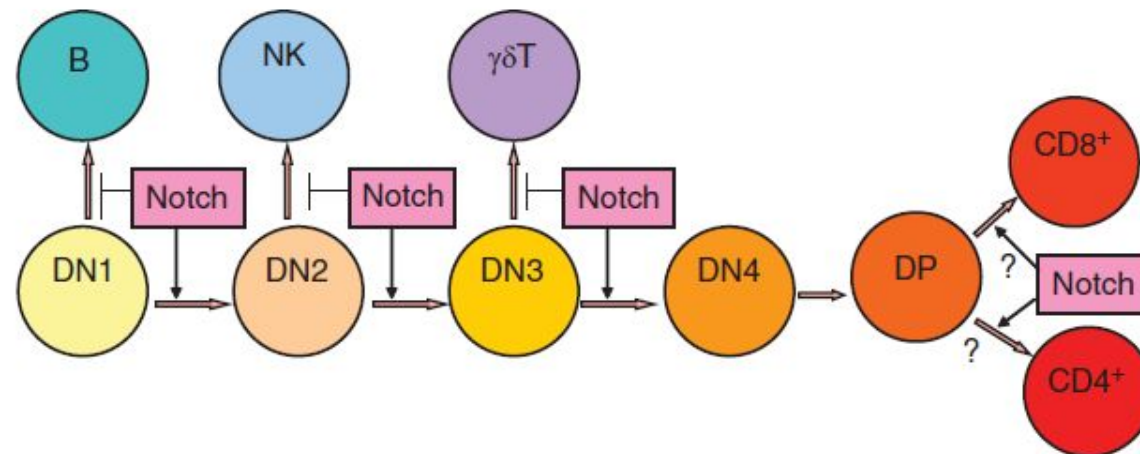
DN2-стадия

- Тимоциты перемещаются в сторону наружных слоев коры по градиенту **CXCL12**, секретируемого эпителиальными клетками наружной коры;
- Длительность стадии — 2 сут;
- Клетки продолжают пролиферировать уже преимущественно под действием **IL-7** и в меньшей степени — **SCF**;
- Сигналы от Notch коммиттируют Т-клетки к дифференцировке в различные линии ($\gamma\delta$ или $\alpha\beta$) и экспрессируется ген, кодирующий **pTCR α** , — знак выбора $\alpha\beta$ -направления развития клетки.

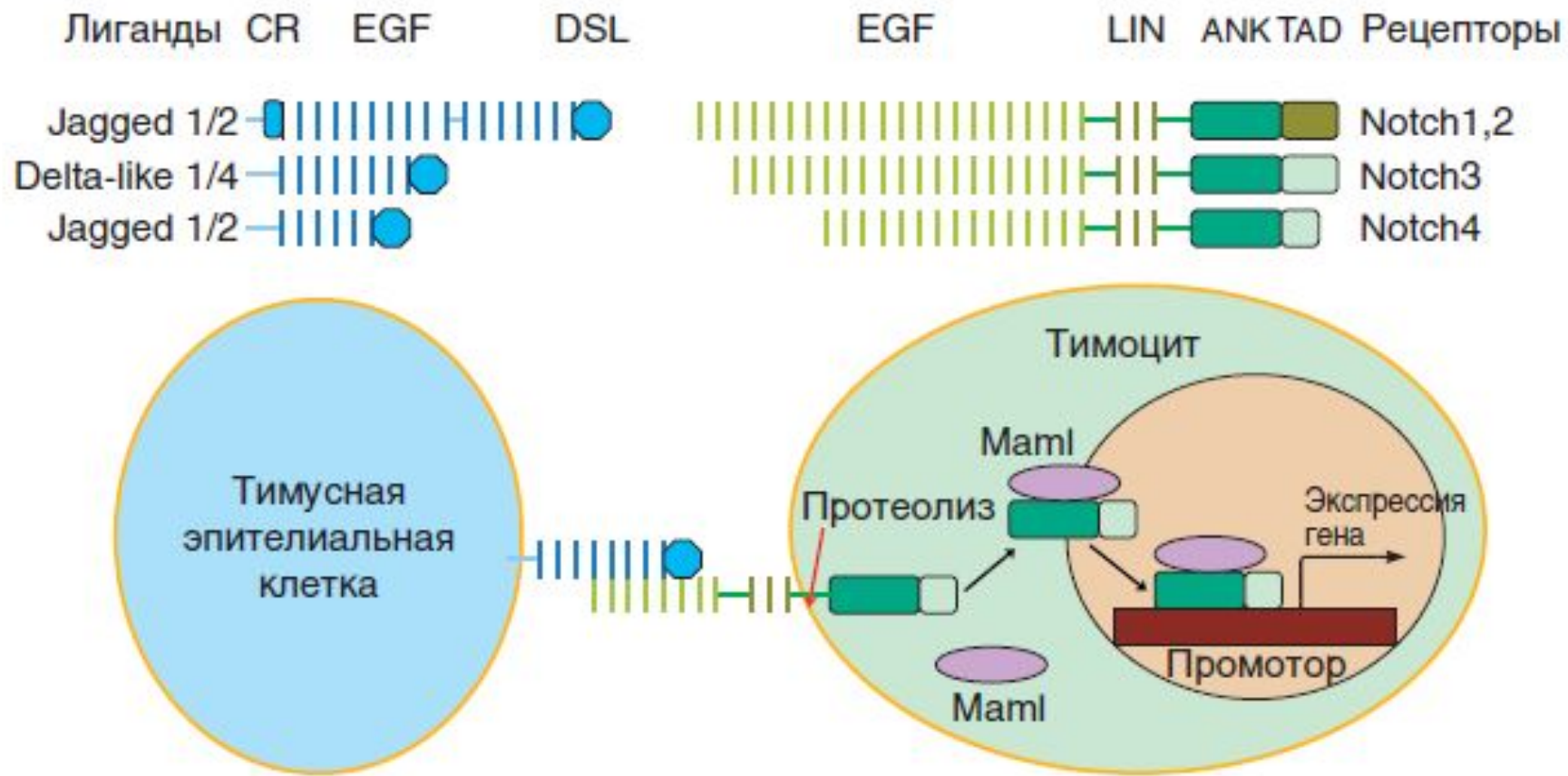
DN3-стадия

- Запускается основное событие дифференцировки Т-лимфоцитов — перестройка V-генов TCR (β , γ , δ).
- Рearанжировка V-генов TCR делает невозможной дифференцировку про-Т-клеток в направлении NK- и дендритных клеток.
- Включение этого процесса является следствием экспрессии в тимоцитах группы дифференцировочных факторов под влиянием эпителиального микроокружения.
- Экспрессия генов:

Notch (особенно Notch1 и Notch3), Runx-1, GATA-3, Ikaros, Gfil, c-Myb, PU.1, E2A/HEB, TCF-1



DN3-стадия

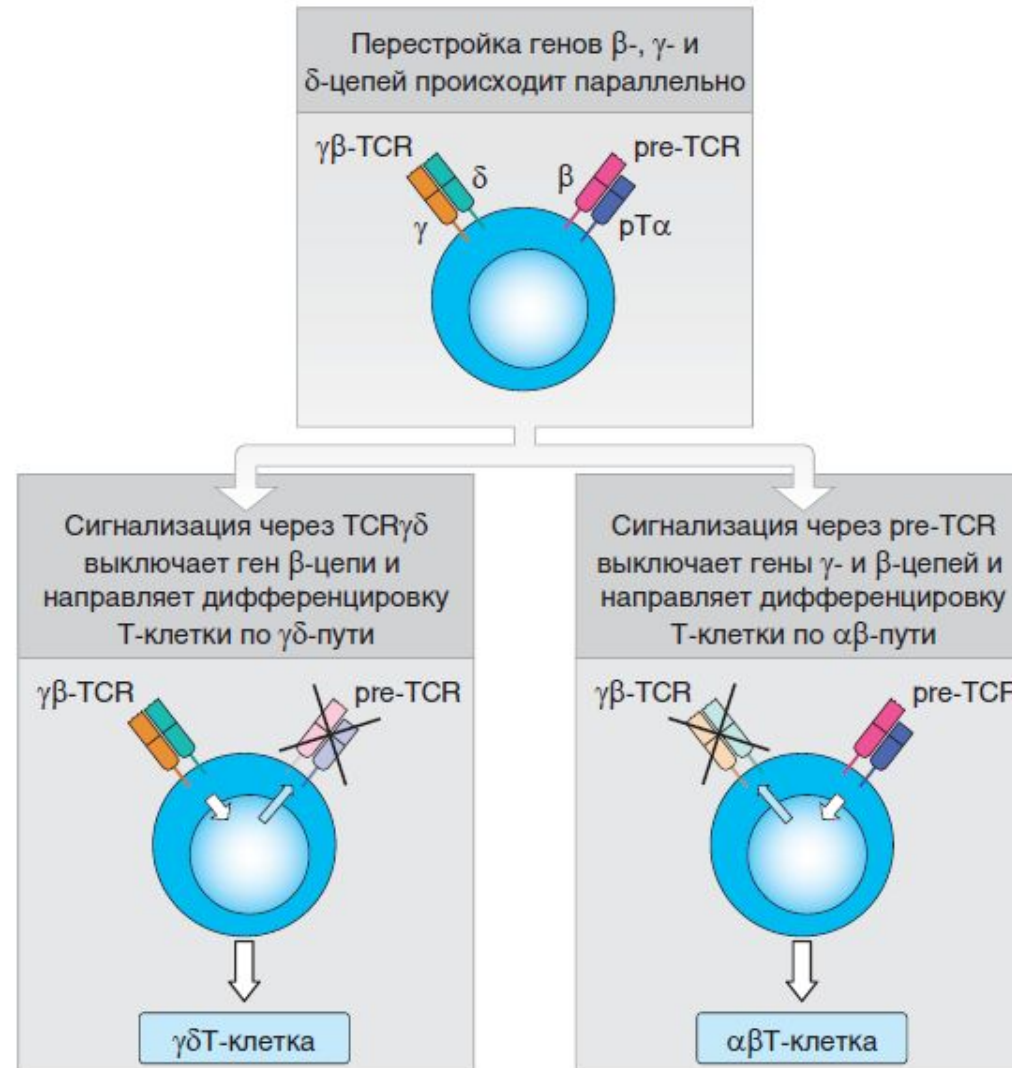


Внутриклеточный механизм Notch-опосредованной регуляции

DN3-стадия

- Определенную роль в индукции перестройки V-генов играют цитокины, в частности **IL-7**, который особенно важен для запуска перестройки V-гена γ -цепи.
- Еще более существенна роль IL-7 в качестве фактора выживания, индуцирующего экспрессию антиапоптотического фактора **Bcl-2**.
- **β -селекция** - отбор тимоцитов, успешно перестроивших V-ген β -цепи, путем подавления их апоптоза и индукции пролиферации (временно прекращается экспрессия генов *RAG1* и *RAG2* и приостанавливается процесс перестройки генов).
- Происходит формирование **pre-TCR = β -цепи + пре-TCR α** (пре-TCR α – инвариантная цепь, лишена варибельного участка). *Экспрессия пре-T-рецептора и передача сигнала с этой молекулы служит 1-й контрольной точкой перестройки TCR!*

$\alpha\beta$ T или $\gamma\delta$ T?



DN3-стадия

- ФЕНОТИП: CD44⁻CD25⁺ ,
- 2 суток до β-селекции, β-селекция – 1 сутки
- На заключительном этапе фазы DN3 на клетках экспрессируется корецептор CD4 (стадия **ISP** — от *Immature single-positive*, т.е. незрелых моноположительных тимоцитов).

DP-стадия

- Продолжительность: 1,5-2 сут
- Перестройка V-гена α -цепи – завершающий этап формирования $\alpha\beta$ TCR.
- Все это время не прекращаются экспрессии генов, кодирующих **RAG-1**, **RAG-2** и TdT, тем самым обеспечивая низкую вероятность неудачи.
- Сборка и экспрессия «зрелого» TCR. Зрелый TCR экспрессируется в комплексе с CD3 и ζ -цепями.
- Вероятно, появление на поверхности тимоцита зрелого рецептора служит сигналом, необходимым для прекращения экспрессии T-клеткой генов *RAG1* и *RAG2* и для поддержания ее жизнеспособности. *В этом состоит суть второй «контрольной точки» при формировании TCR!*
- Плотность экспрессии рецептора невысока.

Селекция ТИМОЦИТОВ

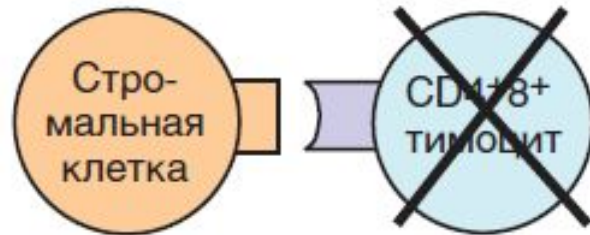
- **Положительная селекция** - обеспечивает отбор только тех тимоцитов, которые экспрессируют TCR, обладающие сродством к молекулам МНС.
- Положительной селекции подвергаются дважды положительные тимоциты фенотипа CD4⁺ CD8⁺ CD3^{lo} CD27⁻.
- Если TCR обладает сродством к молекуле МНС, тимоцит получает поддерживающий сигнал, основными результатами которого служат повышение экспрессии антиапоптотического фактора Bcl-2 и продвижение тимоцита по клеточному циклу.
- Внешний признак успешного прохождения тимоцитом положительной селекции — экспрессия маркера активации клетки CD69, а также молекул CD5, CD27 и костимулирующей молекулы CD28, сопровождающаяся повышением плотности экспрессии рецепторного комплекса TCR–CD3 на поверхности клетки.

Селекция ТИМОЦИТОВ

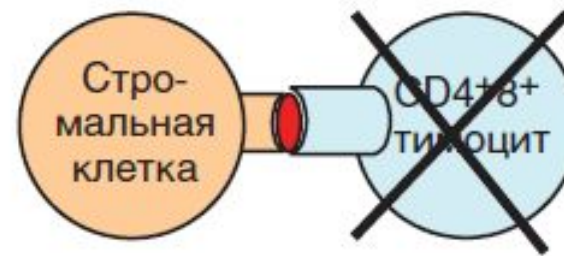
- **Отрицательная селекция** - ограничивает степень агрессивности Т-клеток в отношении собственных молекул.
- На этом этапе тимоциты представлены дважды положительными клетками или «полузрелыми» моноположительными клетками фенотипа CD4⁺/CD8⁺ CD24^{hi}.
- На этом этапе происходит дискриминация тимоцитов по степени сродства к комплексу МНС–пептид. Клетки, обладающие высоким сродством, подвергаются апоптозу как потенциально опасные
- В результате жизнеспособность сохраняют только тимоциты, рецепторы которых обладают умеренным (промежуточным) сродством к аутологичным комплексам МНС–пептид.

Селекция тимоцитов

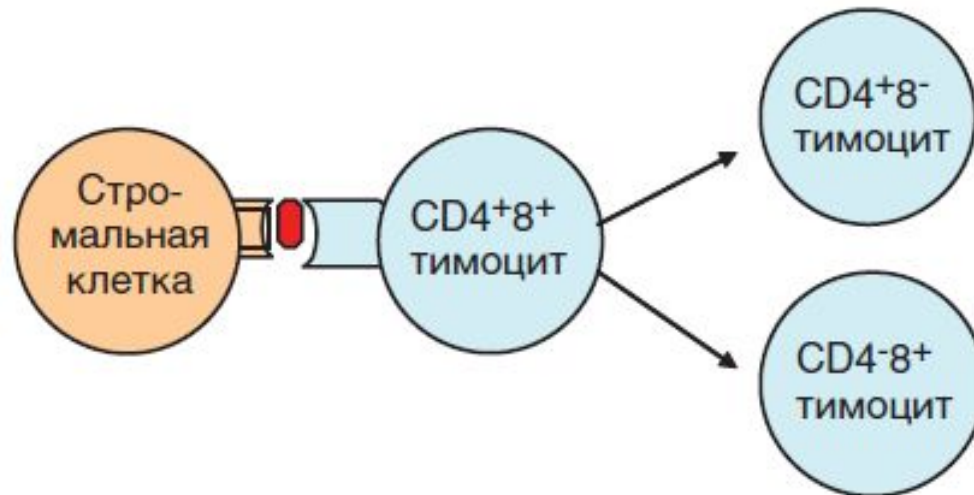
Отсутствие распознавания
или распознавание со слабым
средством — апоптоз по умолчанию



Распознавание
с высоким средством —
отрицательная селекция



Распознавание с промежуточным средством — положительная селекция



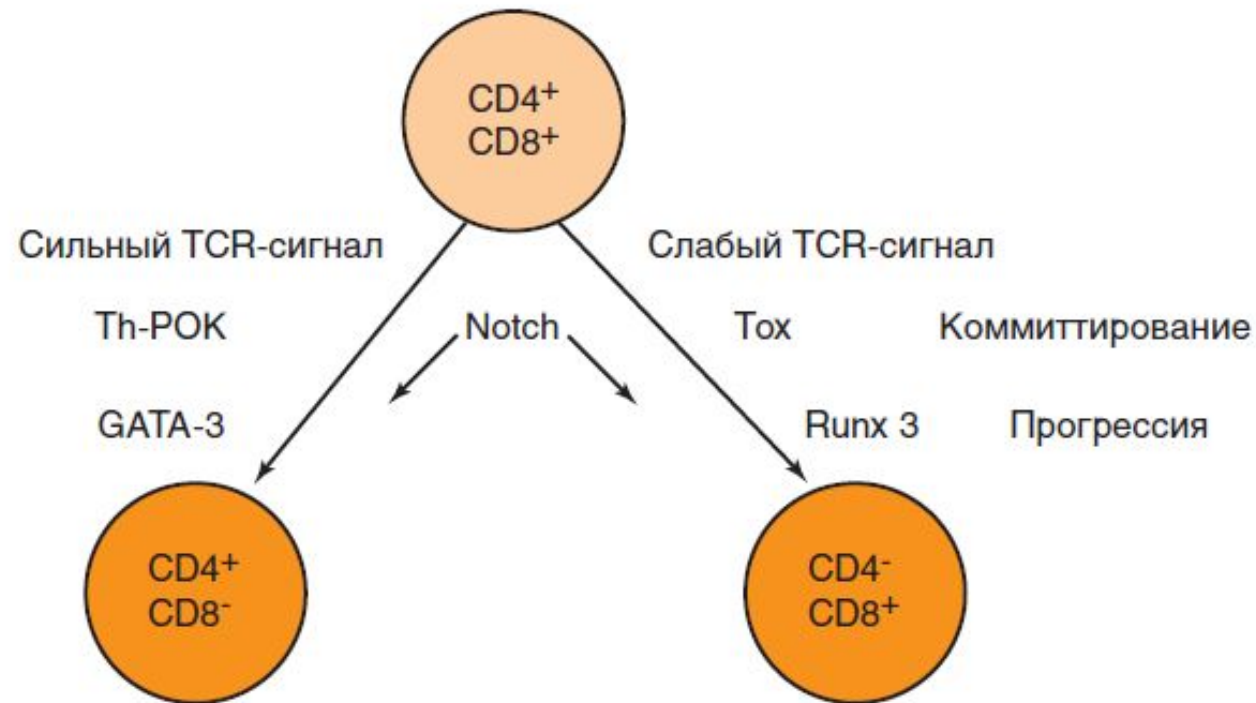
Селекция ТИМОЦИТОВ

- Т-клетки как бы «натаскиваются» на распознавание собственных антигенов, а не чужеродных молекул, но степень агрессивности Т-клеток в отношении собственных молекул ограничивается отрицательной селекцией.
- Белок гена **AIRE** (21q223) отвечает за экспрессию генов органоспецифических антигенов различных органов в клетках мозговой зоны тимуса – эпителиальных, в меньшей степени – дендритных.
- На этапе отрицательной селекции гибнет почти 50% тимоцитов, прошедших положительную селекцию (около 5% от числа незрелых дважды положительных тимоцитов).

Дифференцировка CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов

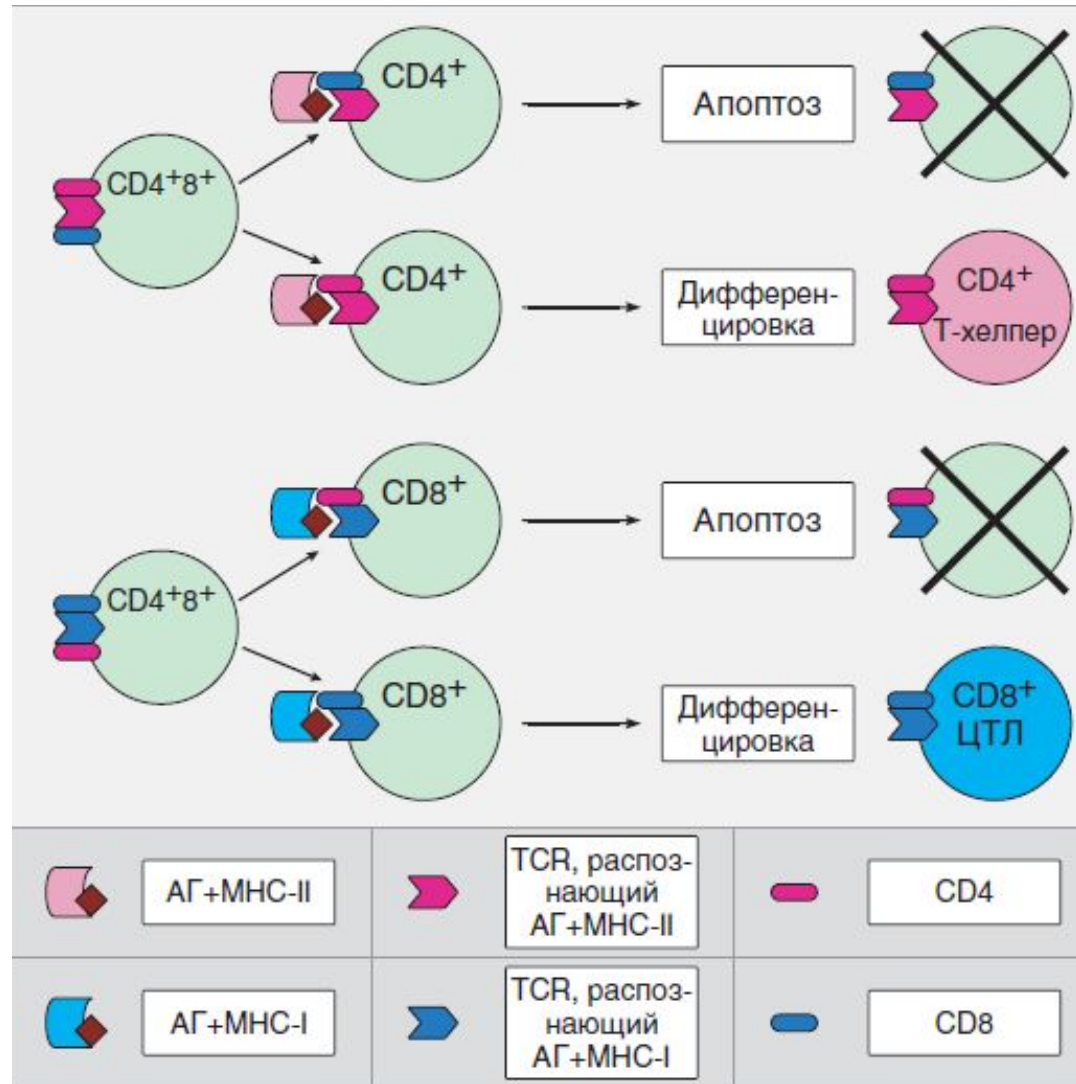
- Дифференцировка Т-клеток регулируется как внутренними (дифференцировочные факторы), так и внешними (сигналы, генерируемые при контактах между клетками) стимулами;
- Факторы Notch не оказывают решающего влияния на выбор пути дифференцировки;
- Для дифференцировки Т-лимфоцитов в CD8⁺ клетки нужен сигнал большей интенсивности, чем для дифференцировки CD4⁺ Т-клетки;
- Сочетанная экспрессия в клетках факторов Th-POK и GATA-3 направляет Т-клетку по CD4⁺-пути;
- Экспрессия факторов Tbx и Runx3 направляет Т-клетку по CD8⁺ пути.

Дифференцировка CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов



Факторы, контролирующие дифференцировку αβТ-клеток

Дифференцировка $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов



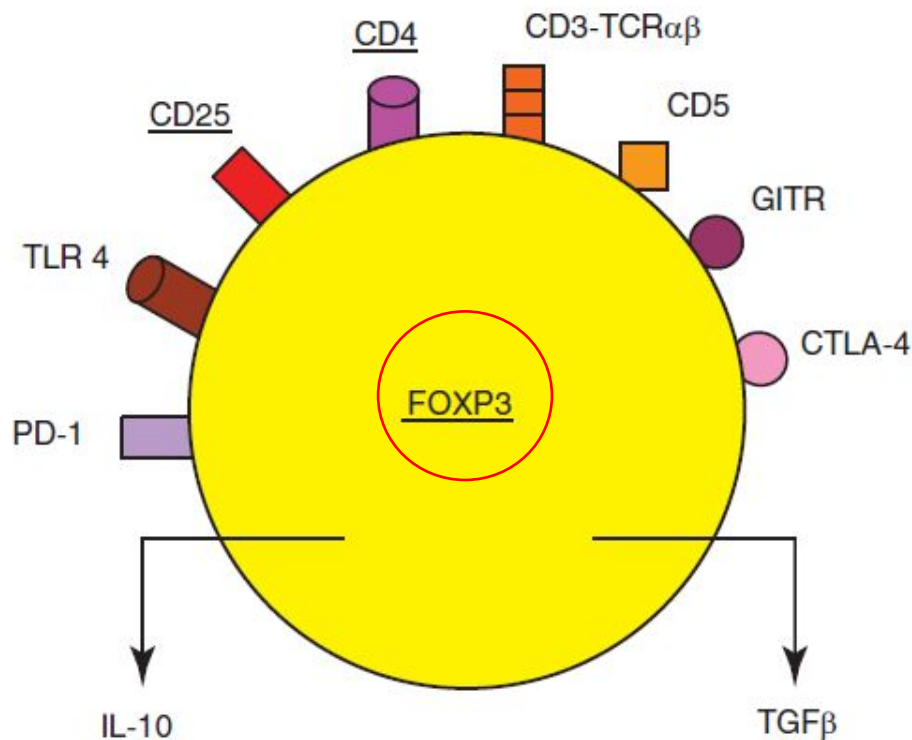
Проверка специфичности корецептора при дифференцировке

Дифференцировка CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов

- Созревшие тимоциты довольно долго (7—14 сут) не покидают тимус, пребывая преимущественно в наружных слоях мозгового слоя;
- Завершается формирование аутоотолерантности и Т-клетки приобретают свойства, важные для поддержания их жизнеспособности вне тимуса:
- Вследствие активации *сиалилтрансфераз* происходит сиамирование мембранных гликопротеинов, защищающее лимфоциты от поглощения макрофагами;
- Созревшие Т-лимфоциты начинают экспрессировать набор мембранных молекул адгезии и рецепторов для хемокинов, необходимые для направленной миграции клеток в специализированные участки иммунной системы и для последующей рециркуляции;
- Под влиянием фактора **KLF2** (Kruppel-like factor 2) на тимоцитах экспрессируются *селектин L* (CD62L), *β7-интегрины*, *хемокиновый рецептор CCR7* и *рецептор SIP-1* для сфингозин-1-фосфата (играет основную роль в эмиграции зрелых Т-клеток из тимуса в кровяное русло.)

Регуляторные Т-лимфоциты (T_{reg})

- Выполняют супрессорные функции, и их главная задача — предотвращение развития аутоиммунных процессов.

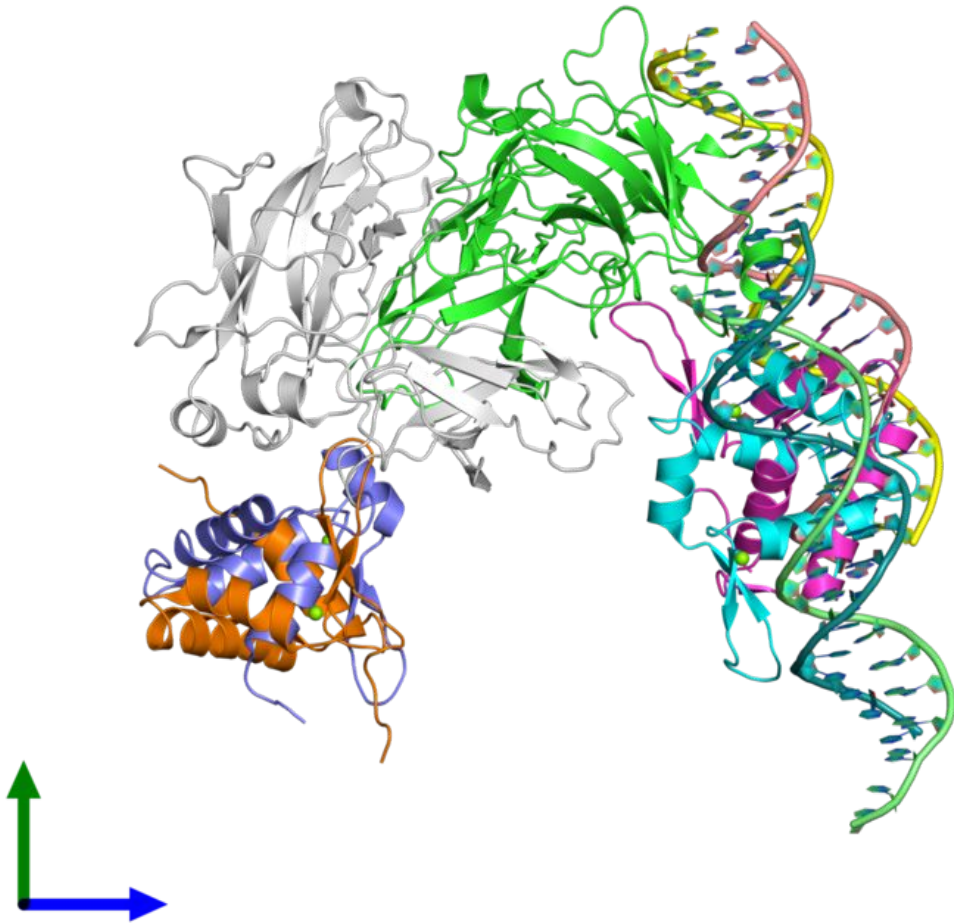


- Мембранный фенотип:
 $CD4^+CD25_{hi}CTLA-4^+GITR^+PD-1^+$
- Приобретают способность вырабатывать супрессорные цитокины (**IL-10**, **трансформирующий фактор роста β**)
- Сохраняют способность распознавать аутоантигены с высокой степенью сродства (не проходят отрицательную селекцию)

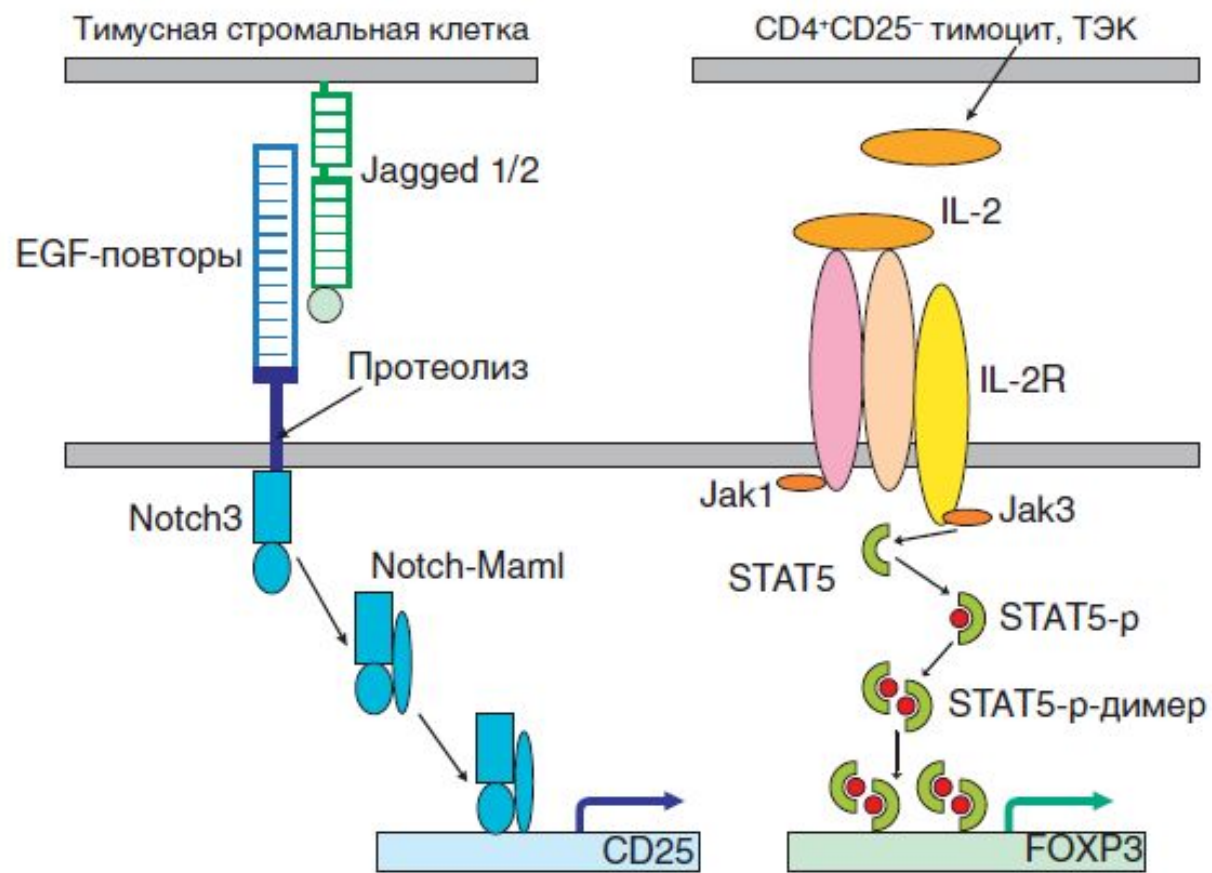
Регуляторные Т-лимфоциты (T_{reg})

FOXP3 (скурфин):

- Скурфин содержит 4 домена, из которых С-концевой — *forkhead*-домен — определяет функционирование этого белка в качестве транскрипционного фактора.
- Экспрессия FOXP3 делает клетки устойчивыми к апоптозу, в результате чего при контакте с дендритными и эпителиальными клетками медуллярной зоны выживают даже клетки, распознающие аутологичные пептиды с высокой степенью сродства.

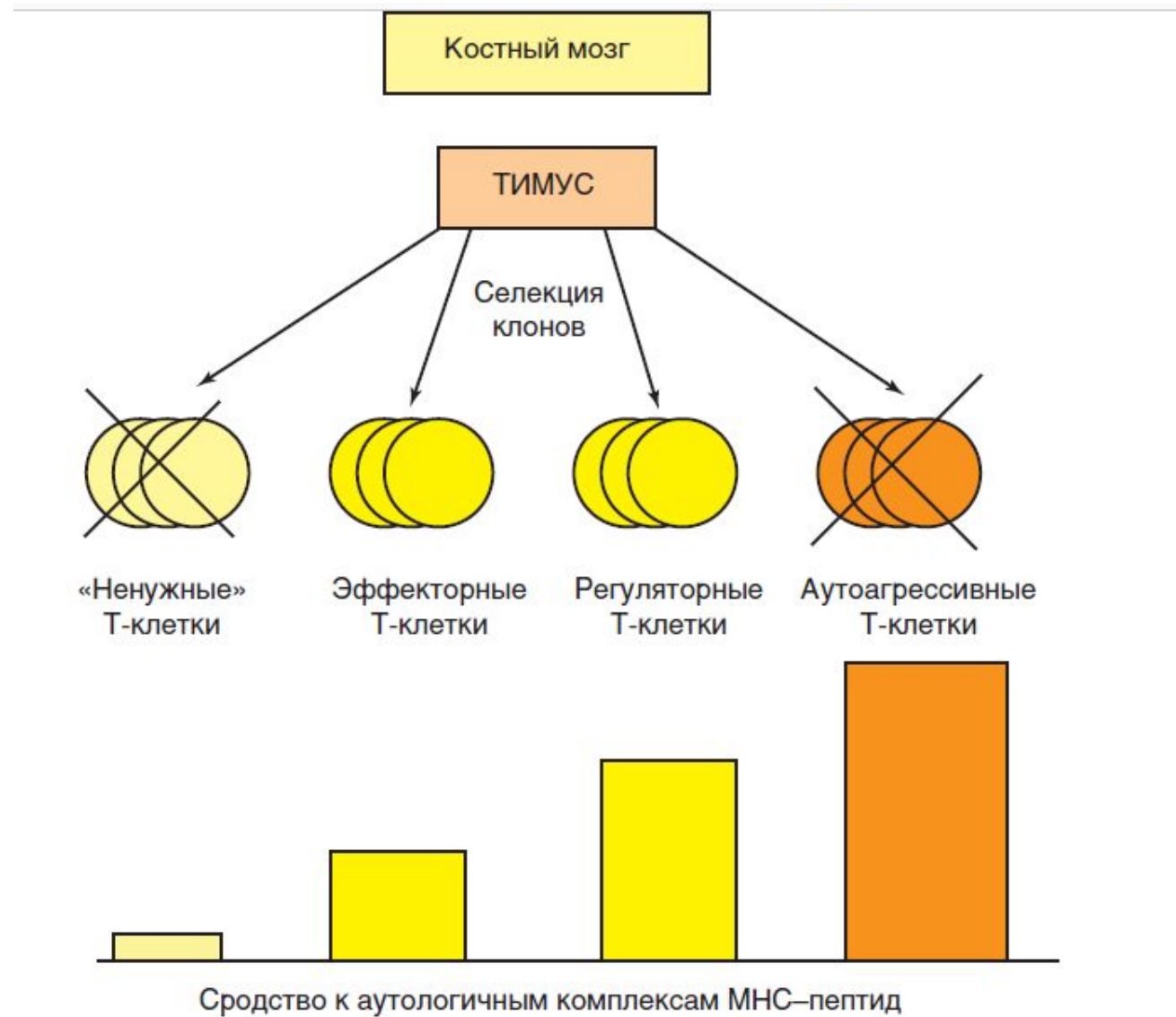


Регуляторные Т-лимфоциты (T_{reg})



Экспрессия генов CD25 и FOXP3 как ключевые события в дифференцировке T_{reg} .

Регуляторные Т-лимфоциты (T_{reg})



НКТ-клетки

- Фенотип: на их поверхности коэкспрессированы антигенраспознающие рецепторы TCR–CD3 и типичные молекулы NK-клеток — NK1.1, NKRP1(CD161), CD56, а также ингибирующие (KIR, NKRG2/CD94) и активирующие (NKG2D) рецепторы.
- НКТ-лимфоциты относят к клеткам врожденного иммунитета. Помимо цитотоксической функции они выполняют роль практически единственного источника цитокинов (в первую очередь IFN γ) на первом этапе реакции на внедрение патогенов. Кроме того, как уже было отмечено, НКТ-клетки могут выполнять регуляторную функцию, ограничивая интенсивность иммунного ответа, а также аутоагрессию.
- Популяция НКТ-лимфоцитов содержит клетки с нормальной гетерогенностью TCR, однако в ней преобладают так называемые инвариантные НКТ-клетки (iNKT).

NKT-клетки

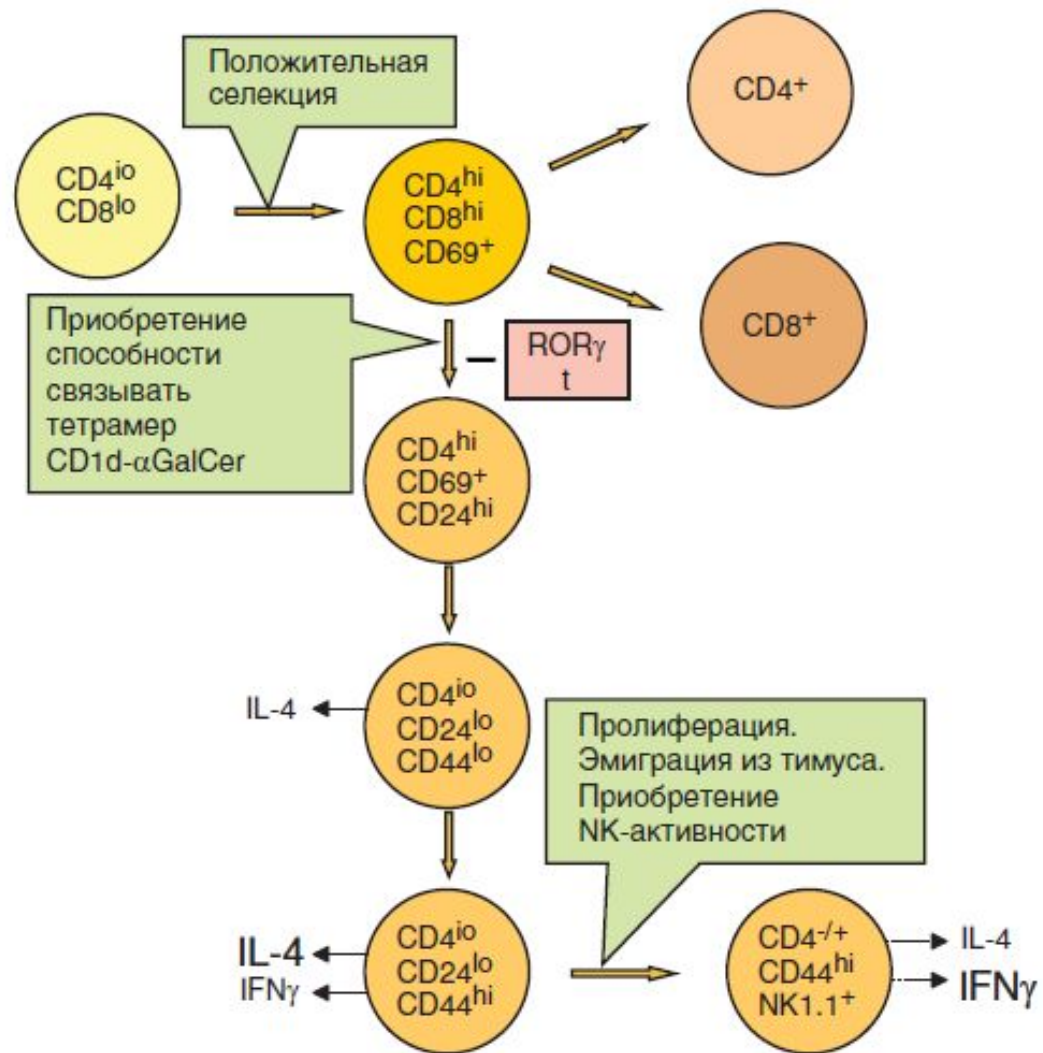


Рис. 3.55. Развитие естественных киллерных Т-клеток (NKT). Признаки Т-клеток

$\gamma\delta$ T-клетки

- Показано, что $\gamma\delta$ T-клетки выполняют по крайней мере 4 функции:
 - участвуют в формировании 1-й линии иммунной защиты, играя роль цитотоксических клеток;
 - ограничивают чрезмерно интенсивный иммунный ответ и аутоагрессию, выступая в качестве регуляторных T-клеток;
 - мигрируя в лимфатические узлы, играют роль АПК (их антигенпре-зентирующая способность, по полученным *in vitro* данным, сопоставима с таковой дендритных клеток);
 - в барьерных тканях активно взаимодействуют с эпителиальными клетками, поддерживая выживаемость и функциональную активность последних и способствуя регенерации эпителия при его повреждениях.

γδТ-клетки

- γδТ-клетки составляют основную популяцию Т-лимфоцитов до конца эмбрионального развития. На начальных этапах лимфопоэза в тимусе при формировании γδТСR избирательно используются определенные зародышевые V-гены, а также сегменты D и J.
- К моменту рождения и особенно после рождения γδТ-клетки перестают доминировать в тимусе — они составляют около 1% от общего числа развивающихся тимоцитов. Это лишь отчасти связано с тем, что γδТ-клетки не подвергаются селекции и быстро покидают тимус.
- Преобладающее место локализации γδТ-клеток — барьерные ткани: слизистая оболочка кишечника и респираторного тракта, эпидермис кожи.

$\gamma\delta$ Т-клетки

- $\gamma\delta$ Т-клетки не экспрессируют корецепторы CD4 и гетеродимерную форму CD8 $\alpha\beta$. Однако 20–30% $\gamma\delta$ Т-клеток тонкого кишечника несет на поверхности гомодимер CD8 $\alpha\alpha$.
- В настоящее время более склонны считать, что клетки-предшественники CD8 $\alpha\alpha$ Т-клеток на некоторое время все-таки поступают в тимус и покидают его, возможно, на стадии DN3, т.е. после перестройки генов TCR.
- Фенотип: CD3+CD8 $\alpha\alpha$ +CD2-CD5-CD28-CD4+/-
- В составе TCR вместо димера $\zeta 2$ они содержат гомодимер Fc ϵ RI γ /Fc ϵ RI γ или гетеродимер ζ /Fc ϵ RI γ .
- Ответ клеток на антиген рестриктирован по неклассическим молекулам MHC-I. Это свидетельствует о том, что гомодимер CD8 $\alpha\alpha$ не функционирует в качестве корецептора

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!