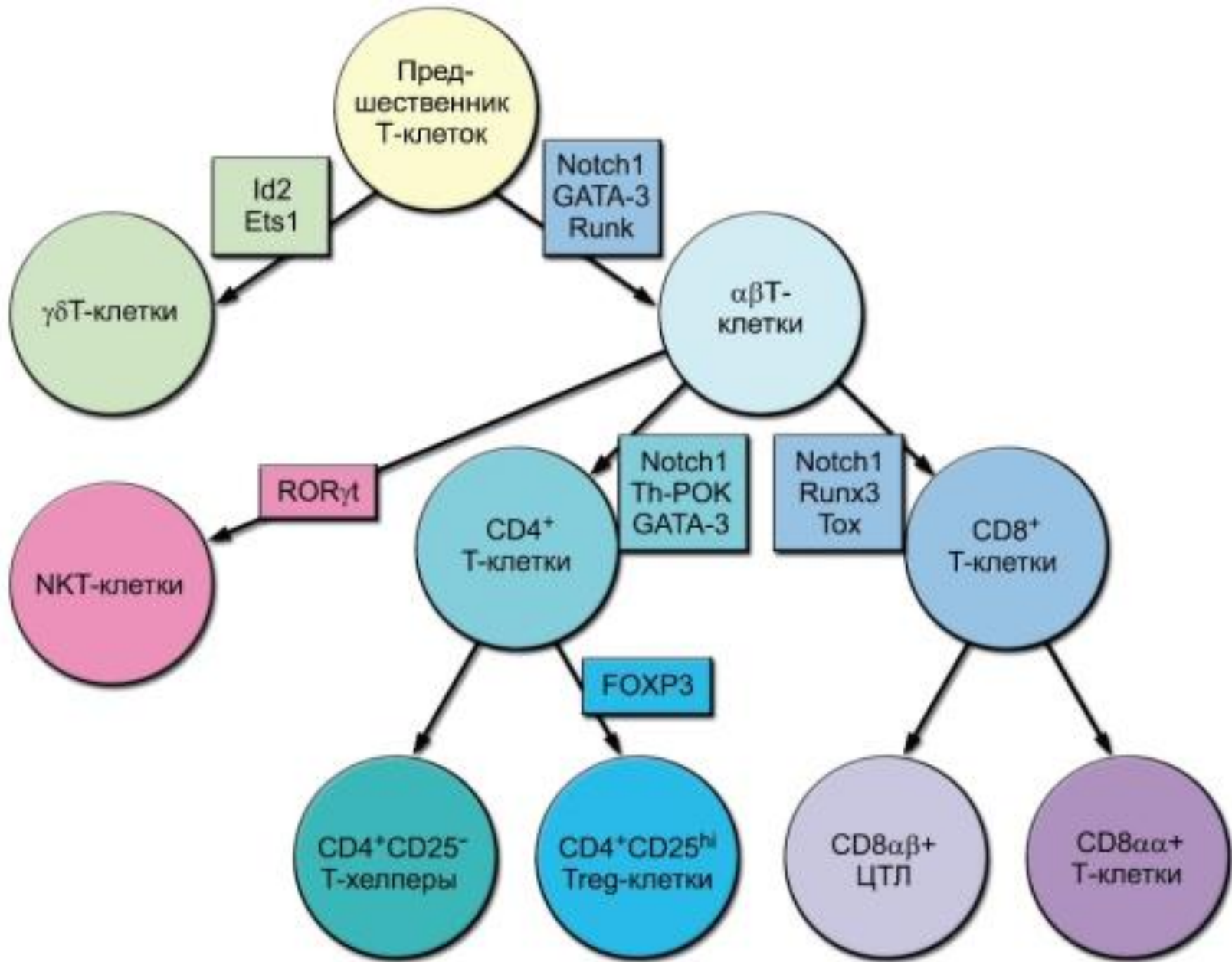


# Дифференцировка а Т-лимфоцитов

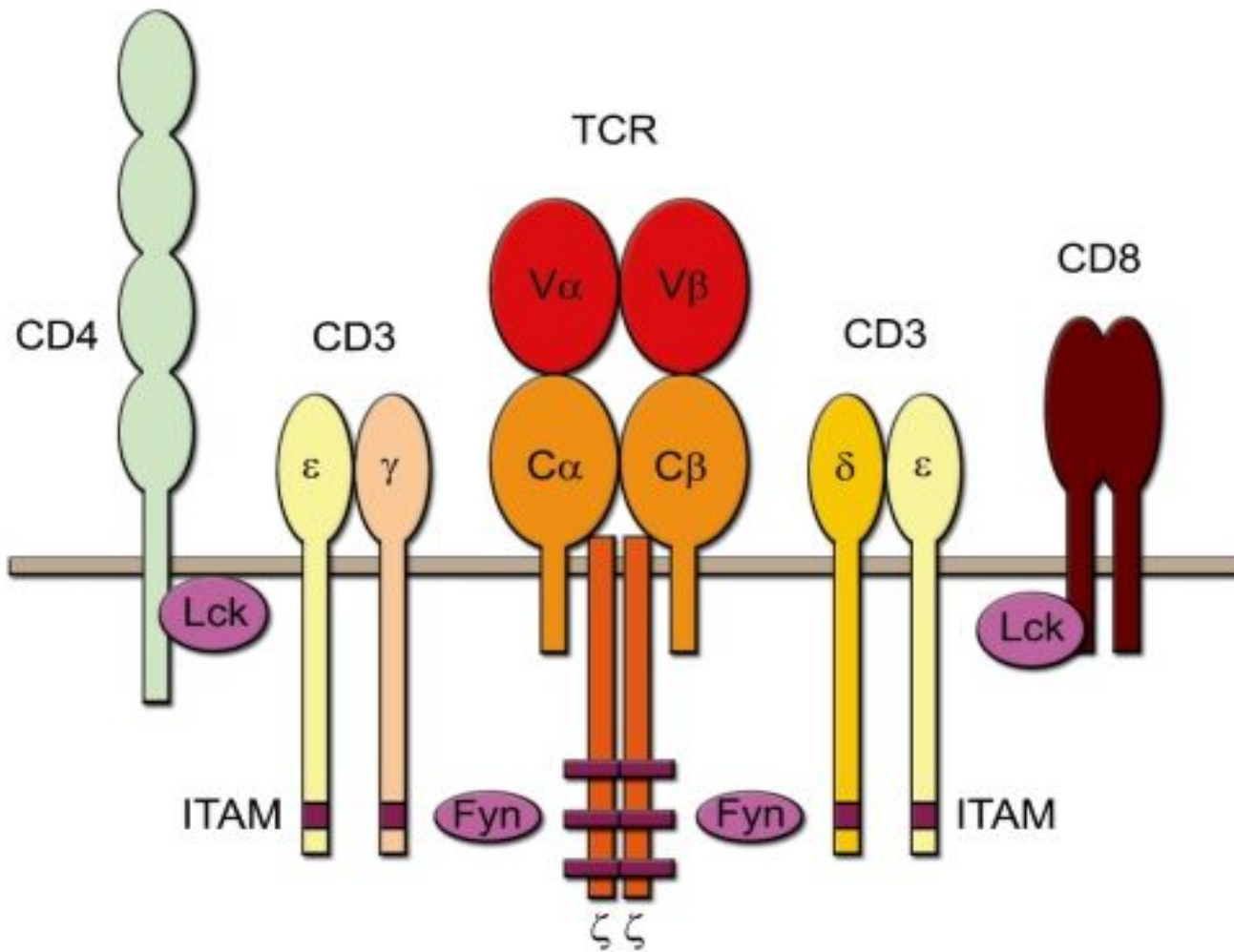
Выполнила  
Казьмина Н.А  
3.4.126



- Относительное содержание Т-лимфоцитов в крови составляет в среднем около 73% (55-85%) от общего числа лимфоцитов; абсолютное —  $(950—2100) \times 10^9$  клеток в литре;
- На поверхности  $\alpha\beta$ Т-клеток экспрессируется примерно в 5 раз меньше молекул ТСR, чем ВСR на поверхности В-лимфоцитов (30 000—40 000 ТСR на клетку). Содержание комплексов CD3 примерно в 10 раз больше, чем ТСR — около 300 000 молекул на клетку, что свидетельствует о присутствии на мембране молекул CD3, не связанных с ТСR;
- Помимо ТСR—CD3 зрелые Т-клетки экспрессируют молекулы CD2, CD5, CD7;
- Наиболее важные в функциональном отношении мембранные молекулы Т-клеток — корецепторы CD4 и CD8, служащие маркерами основных субпопуляций  $\alpha\beta$ Т-клеток, а также костимулирующая молекула CD28, экспрессируемая на большинстве (около 80%) Т-клеток;
- Для наивных (не контактировавших с антигеном)  $\alpha\beta$ Т-клеток характерен высокий уровень экспрессии селектина L (CD62L) и хемокинового рецептора CCR7. Эти молекулы определяют пути миграции Т-клеток;
- На Т-клетках содержатся также  $\beta$ 1- и  $\beta$ 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 Т-клеток, отличающим их от клеток памяти, служит полноразмерная форма молекулы CD45 — CD45RA.

- Т-лимфоциты — активно рециркулирующие клетки;
- Основное место локализации Т-лимфоцитов в лимфоидных органах — тимусзависимые зоны (паракортикальные зоны лимфатических узлов и параартериальные муфты селезенки.) Вне Т-зон Т-лимфоциты непосредственно соседствуют с В-клетками;
- $\alpha\beta$ Т-лимфоциты диффузно распределены в эпителиальных пластах барьерных тканей (где они численно преобладают над  $\gamma\delta$ Т-клетками) — слизистых оболочках и эпидермисе. Их выявляют также в соединительнотканых отделах барьерных тканей — субмукозе и дерме;
- Т-лимфоциты относят к долгоживущим клеткам. Срок жизни различных субпопуляций наивных  $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов составляет месяцы и годы;
- Для выживания Т-лимфоцитов необходим ИЛ-7, а также сигналы от TCR, при распознавании ими молекул МНС и аутологичных пептидов.

# $\alpha\beta$ T-лимфоциты



## *CD8<sup>+</sup> T-лимфоциты (ЦТЛ)*

- Имеют цитотоксическую направленность против изменённых клеток собственного организма (инфицированные вирусом клетки, опухолевые клетки-мишени);
- Распознают антиген в ассоциации с молекулами МНС I класса (феномен двойного распознавания.)

## *CD4<sup>+</sup> T-лимфоциты (Th)*

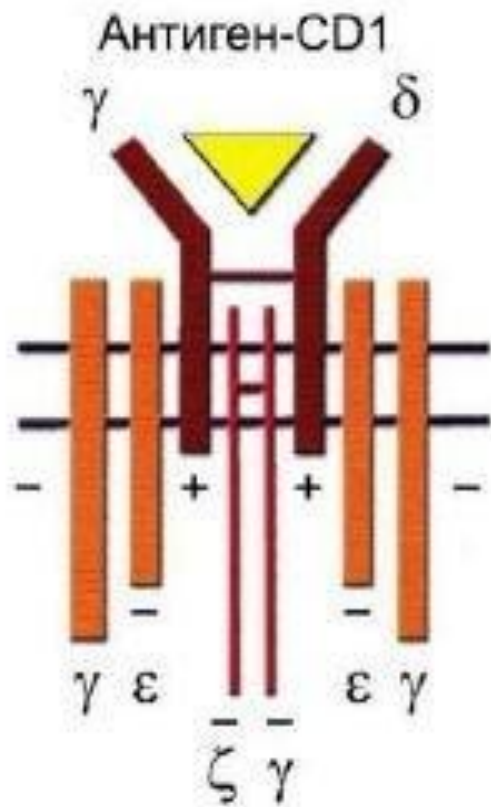
- Поставляют вспомогательные сигналы при активации В-лимфоцитов и макрофагов;
- Взаимодействие Т-хелперов с дендритными клетками служит пусковым событием Т-зависимого иммунного ответа;
- Вступают в связь с инвариантной частью молекулы МНС II.

# Регуляторные Т-клетки ( $T_{reg}$ ) ( $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ )

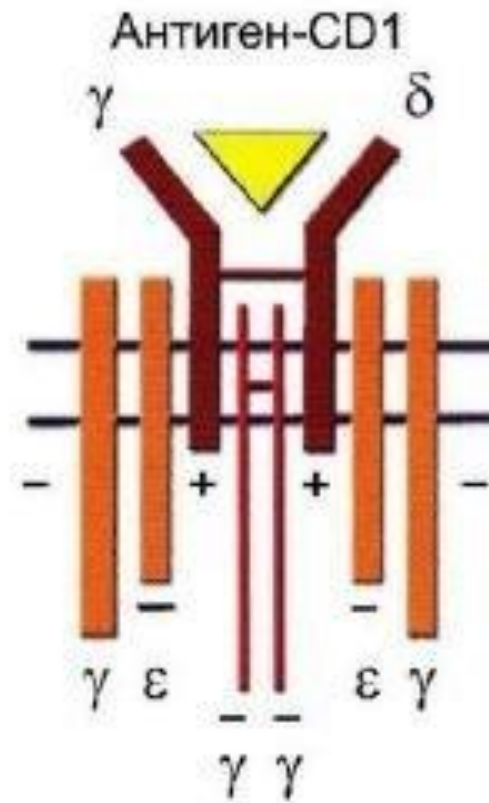
- Некоторые  $CD4^+$  Т-клетки, экспрессирующие внутриклеточный фактор FoxP3 и мембранные молекулы CD25 и CTLA-4 (CD152), образуют самостоятельную субпопуляцию естественных регуляторных Т-клеток ( $T_{reg}$ ). Их основная функция — предотвращение реакции других Т-клеток на аутоантигены, а также ограничение (супрессия) любых форм иммунного ответа.



# γδT-лимфоциты



или



# *$\gamma\delta$ Т-лимфоциты*

- Вариабельность  $\gamma\delta$ ТСР ограничена и спектр антигенов, распознаваемых  $\gamma\delta$ Т-клетками, узок.
- $\gamma\delta$ Т-клетки распознают антиген независимо от молекул МНС. Поэтому корецепторы CD4 и CD8 не обязательно присутствуют на их поверхности.
- Сосредоточены преимущественно в барьерных тканях.
- Среди  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов выделяют субпопуляцию клеток, экспрессирующих гомодимерный вариант молекулы CD8 — CD8 $\alpha\alpha$  (CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$ Т-клетки.)

# Этапы дифференцировки Т-лимфоцитов



Гены V $\beta$	Не перестроены	Перестройка D-J	Перестройка V-DJ	Перестроены $\beta$ -селекция			
Гены V $\alpha$	Не перестроены	Не перестроены	Не перестроены	Перестройка	Перестроены		
RAG1/2 TdT		+/-	+	+			
Рецептор				mPreTCR	TCR-CD3 <sup>lo</sup>	TCR-CD3 <sup>hi</sup>	TCR-CD3 <sup>hi</sup>
Корецепторы	CD4 <sup>lo/-</sup>	-	-	-	CD4, CD8	CD4	CD8
CD44/CD25- фенотип	CD44 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	CD44 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD44 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD44 <sup>-</sup> CD25 <sup>-</sup>	CD44 <sup>-</sup> CD25 <sup>-</sup>	CD44 <sup>+/-</sup> CD25 <sup>+/-</sup>	CD44 <sup>+/-</sup> CD25 <sup>+/-</sup>
Ростовые факторы	SCF, IL-7	IL-7, SCF	IL-7	IL-7	?	IL-2, IL-7	IL-2, IL-7

# Этапы дифференцировки Т-лимфоцитов

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



## ELP: $CD34^+ Sca-1^+ CD117(c-Kit)^+ Flt-3^+ CCR9^+ CD4^{lo}$

- Sca-1 — антиген стволовых клеток
- c-Kit — лиганд фактора стволовых клеток
- CD34 — используется в качестве маркера для идентификации стволовых клеток и их ближайших предшественников



# DN1

- Тимоциты интенсивно пролиферируют (до 10 делений), что приводит к 1000-кратному увеличению их числа;
- Длительность периода — 10 сут;
- Основной ростовой фактор на этом этапе — SCF (C-Kit лиганд);
- Рецептор для IL-7 экспрессирован слабо или вообще не экспрессирован;
- Факторами дифференцировки на этом этапе развития служат Wnt и Hedgehog, а также Notch, коммутирующий клетки-предшественники к дифференцировке в Т-лимфоциты.

## DN2

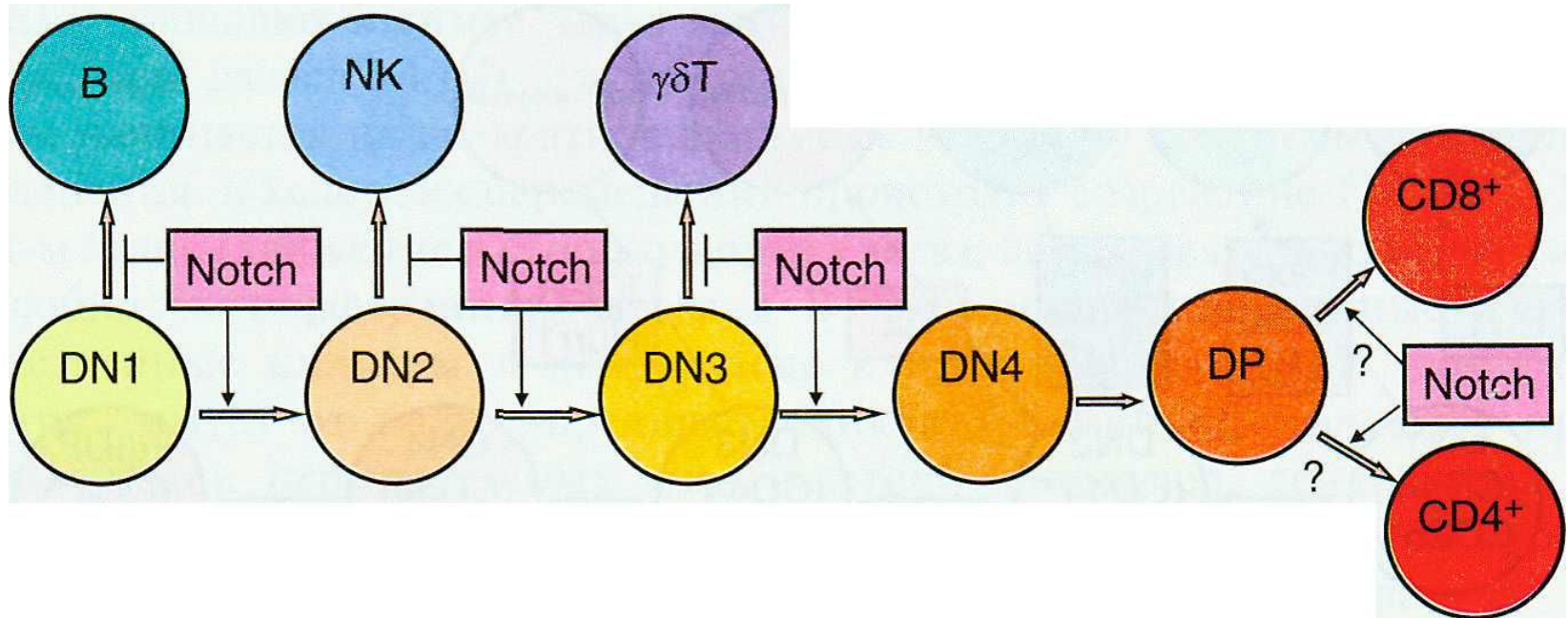
- Тимоциты перемещаются в сторону наружных слоев коры по градиенту CXCL12, секретируемого эпителиальными клетками наружной коры;
- Длительность стадии — 2 сут;
- Клетки продолжают пролиферировать уже преимущественно под действием IL-7 и в меньшей степени — SCF;
- Сигналы от Notch коммиттируют T-клетки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

# DN3

- Запускается перестройка V-генов TCR;
- Для раннего развития T-клеток необходима экспрессия генов Notch, Runx-1, GATA-3, Ikaros, Gfi1, c-Myb, PU1, E2A/HEB, TCF-1;
- Для запуска перестройки V-генов TCR наиболее важна передача сигнала, осуществляемая Notch-1 на стадиях DN2 и DN3. Рецептор для этого фактора экспрессируется тимоцитами на указанных стадиях развития. Лиганды Notch-рецептора — молекулы Delta и Jagged — находятся на поверхности эпителиальных клеток тимуса.
- Цитокины играют определенную роль в индукции перестройки V-генов, особенно IL-7, который особенно важен для запуска перестройки V-гена  $\gamma$ -цепи. Еще более существенна роль IL-7 в качестве фактора выживания, индуцирующего экспрессию антиапоптотического фактора Bcl-2;
- На заключительном этапе фазы DN3 на клетках экспрессируется корецептор CD4 (стадия ISP.)



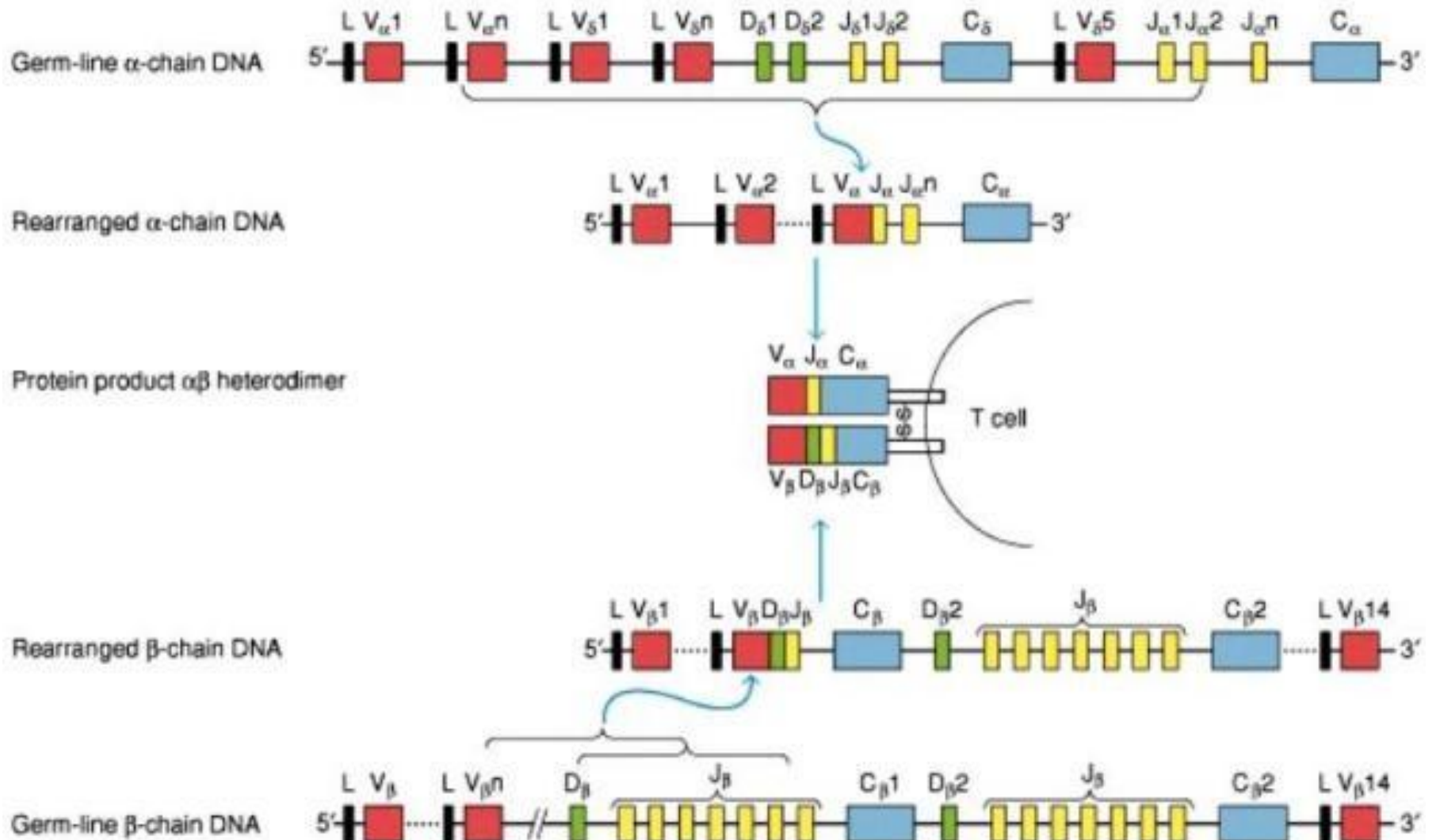
# Роль Notch-рецепторов в развитии T-клеток в тимусе



# Реаранжировка V-генов TCR

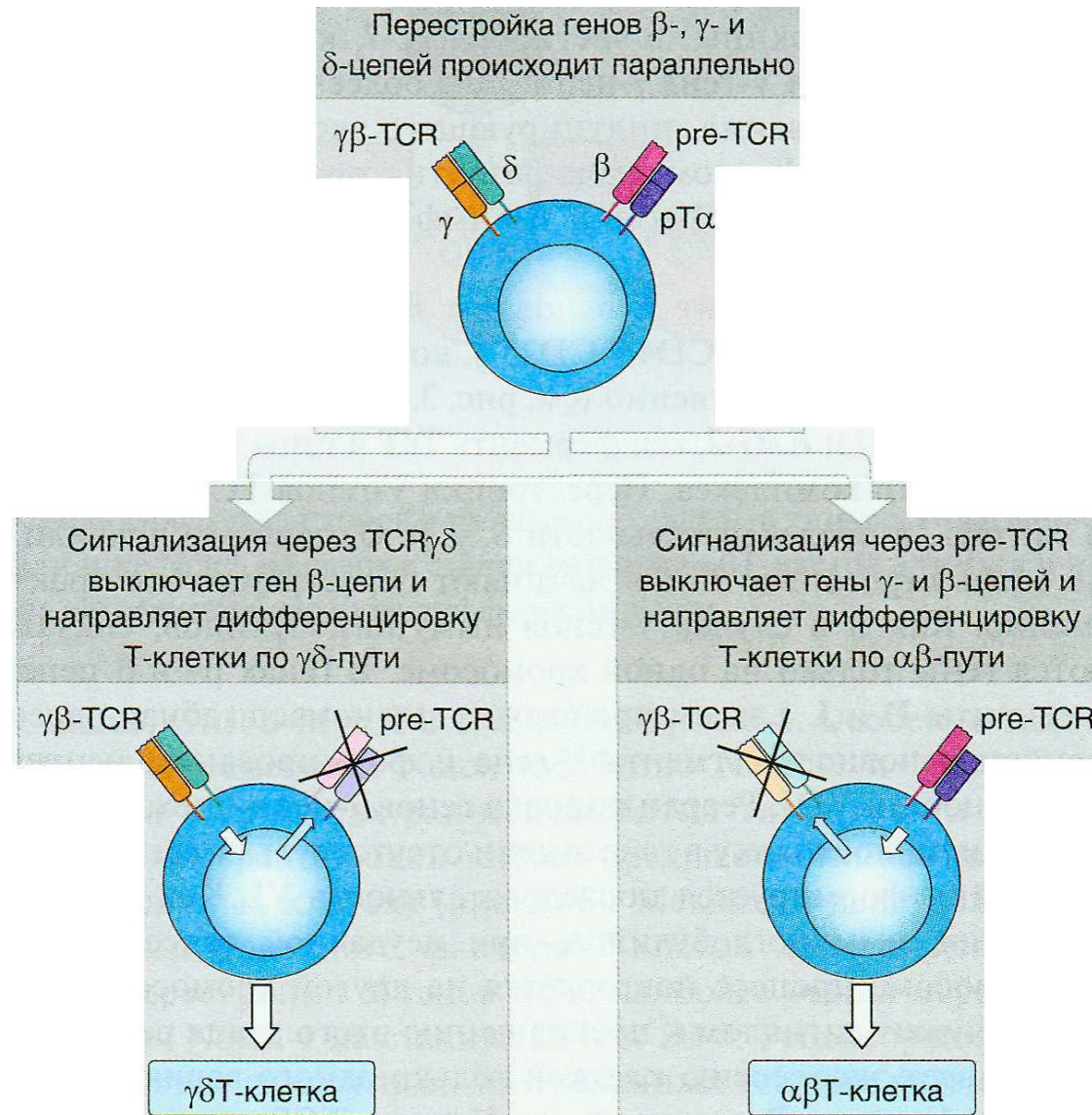
## СОСТАВ РЕКОМБИНАЦИОННОГО КОМПЛЕКСА

1. Рекомбиназы RAG-1 и RAG-2 (димеризуются в процессе перестройки V-генов) – ответственны за осуществление двуниевых разрывов ДНК
2. ДНК-лигаза IV – ответственна за сшивку разрывов ДНК
3. ДНК-зависимая протеинкиназа – ответственна за обеспечение «разрешения» шпилек (повторные однонитевые разрывы ДНК в участках её временного воссоединения)
4. Терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (TdT) – ответственна за нематричный синтез олигодезоксирибонуклеотидов (формирование N-вставок)
5. Белки Ku70 и Ku86, образующие гетеродимер, – ответственны за сближение фрагментов ДНК в зоне перестройки гена





# Выбор пути $\alpha\beta/\gamma\delta$ -дифференцировки T-клеток



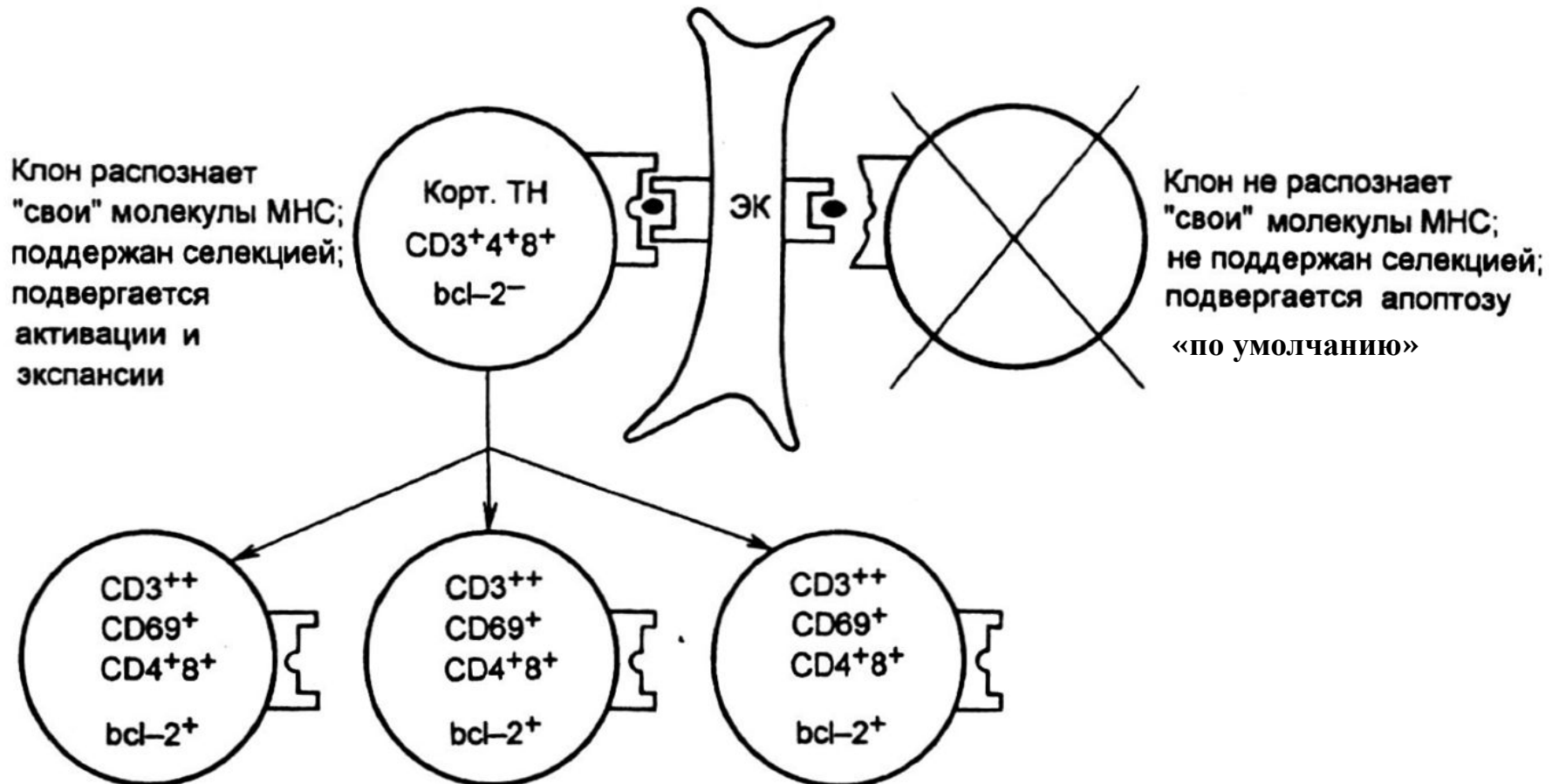
# DP

- Тимоциты приобретают фенотип CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> одновременно с экспрессией корецепторов CD4 и CD8 (точнее, экспрессией молекулы CD8 в дополнение к уже присутствующей на мембране молекулы CD4).
- Продолжительность стадии 1,5—2 сут;
- Перестройка V-гена α-цепи;
- Все это время не прекращаются экспрессии генов, кодирующих RAG-1, RAG-2 и TdT;
- После перестройки V-генов обеих цепей происходит сборка их продуктов и экспрессия «зрелого» TCR на поверхности клетки;
- Зрелый TCR экспрессируется в комплексе с CD3 и ζ-цепями;
- Появление на поверхности тимоцита зрелого рецептора служит сигналом, необходимым для прекращения экспрессии T-клеткой генов RAG-1 и RAG-2 и для поддержания ее жизнеспособности;
- Плотность экспрессии TCR на поверхности тимоцитов сначала невелика;
- Выживаемость клеток в этот период обеспечивается взаимодействием молекулы семейства TNF — CD70 тимоцита и молекулы семейства TNFR — CD27 эпителиальной клетки.

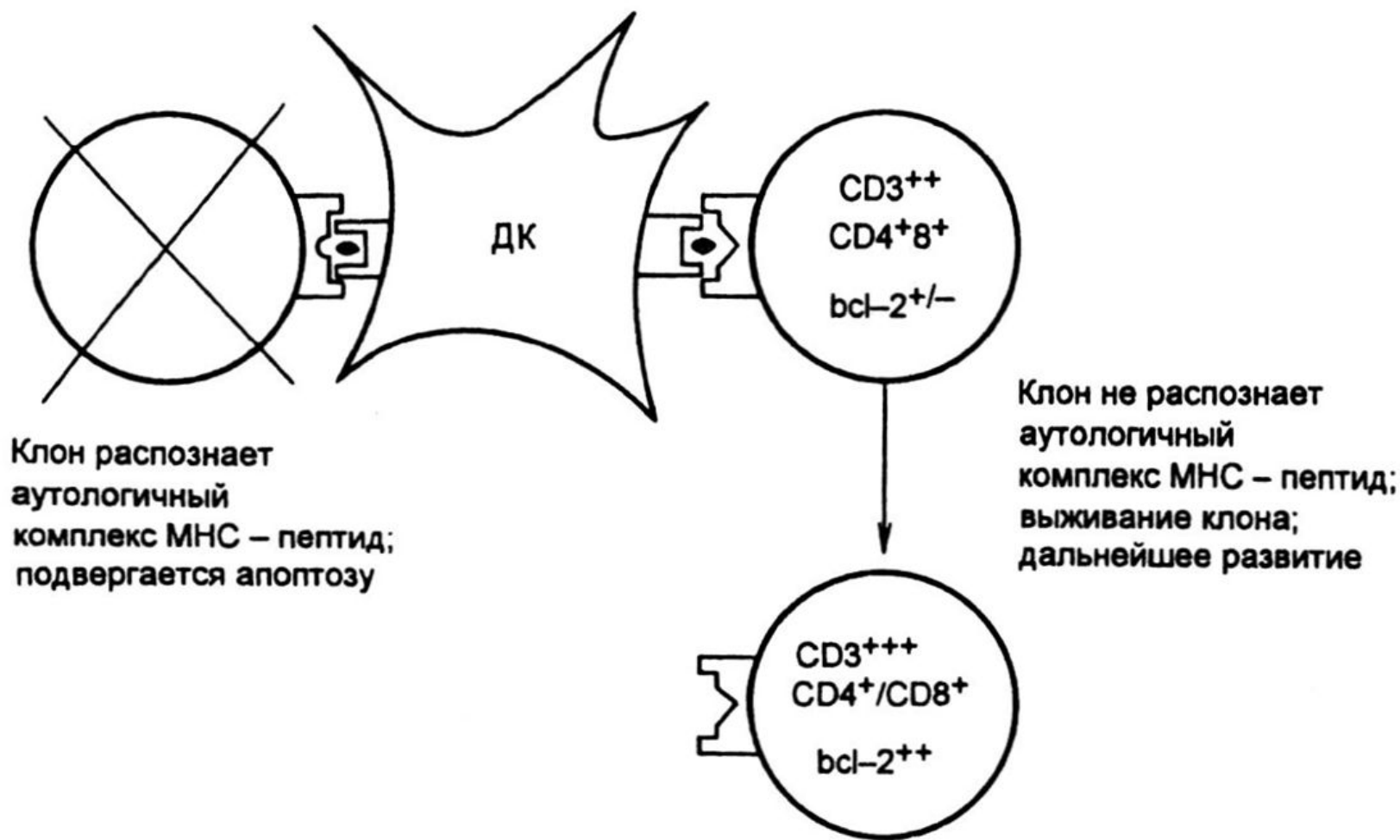
## *Селекция тимоцитов и формирование субпопуляций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток*

- Положительная селекция – обеспечивает отбор только тех тимоцитов, которые экспрессируют TCR, обладающие сродством к молекулам МНС. Положительной селекции подвергаются дважды положительные тимоциты фенотипа CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>lo</sup>CD27<sup>-</sup>;
- Отрицательная селекция – ограничивает степень агрессивности Т-клеток в отношении собственных молекул. Тимоциты представлены дважды положительными клетками или «полузрелыми» моноположительными клетками фенотипа CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> CD24<sup>hi</sup>.

# Положительная селекция



# Отрицательная селекция

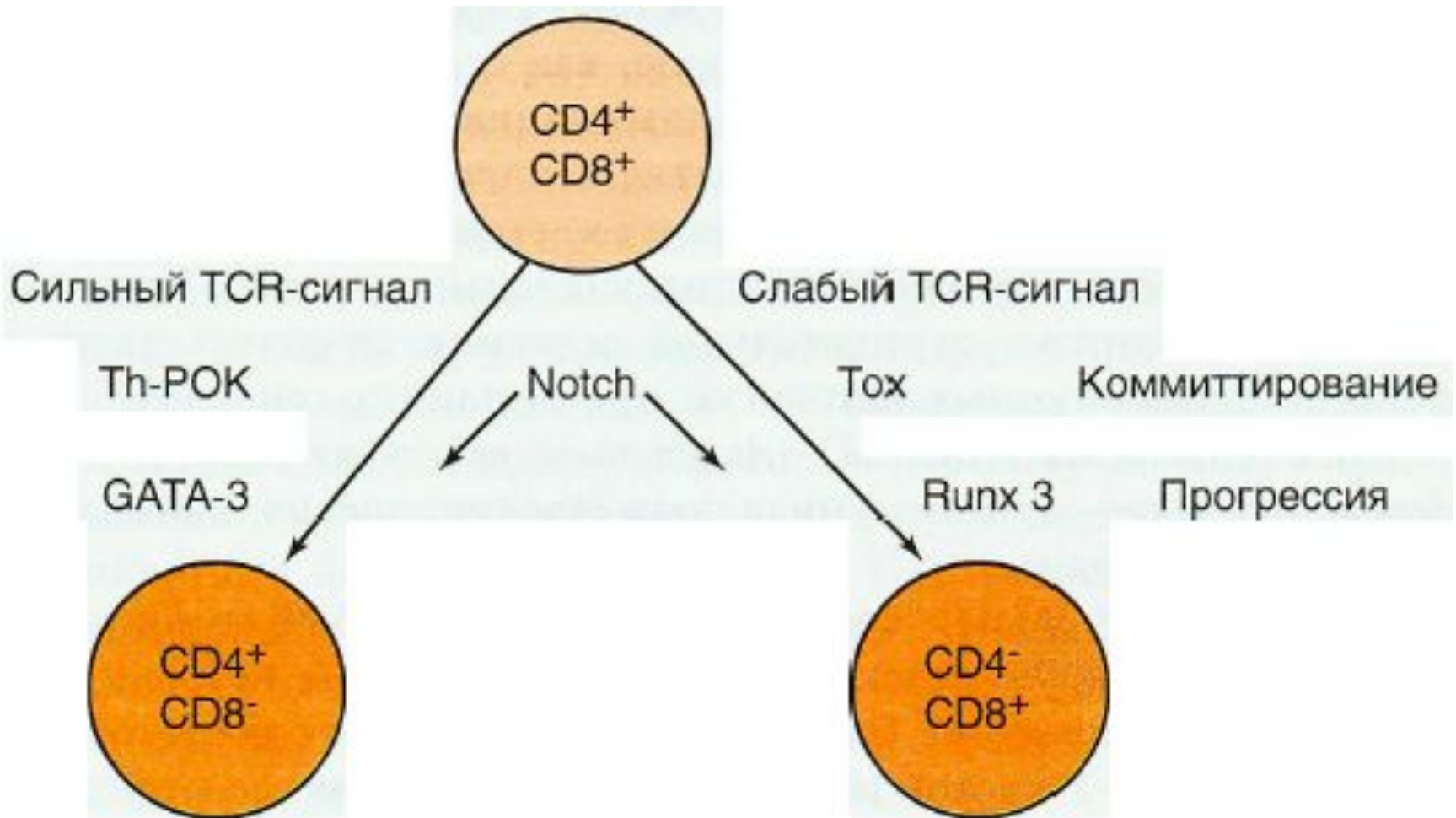




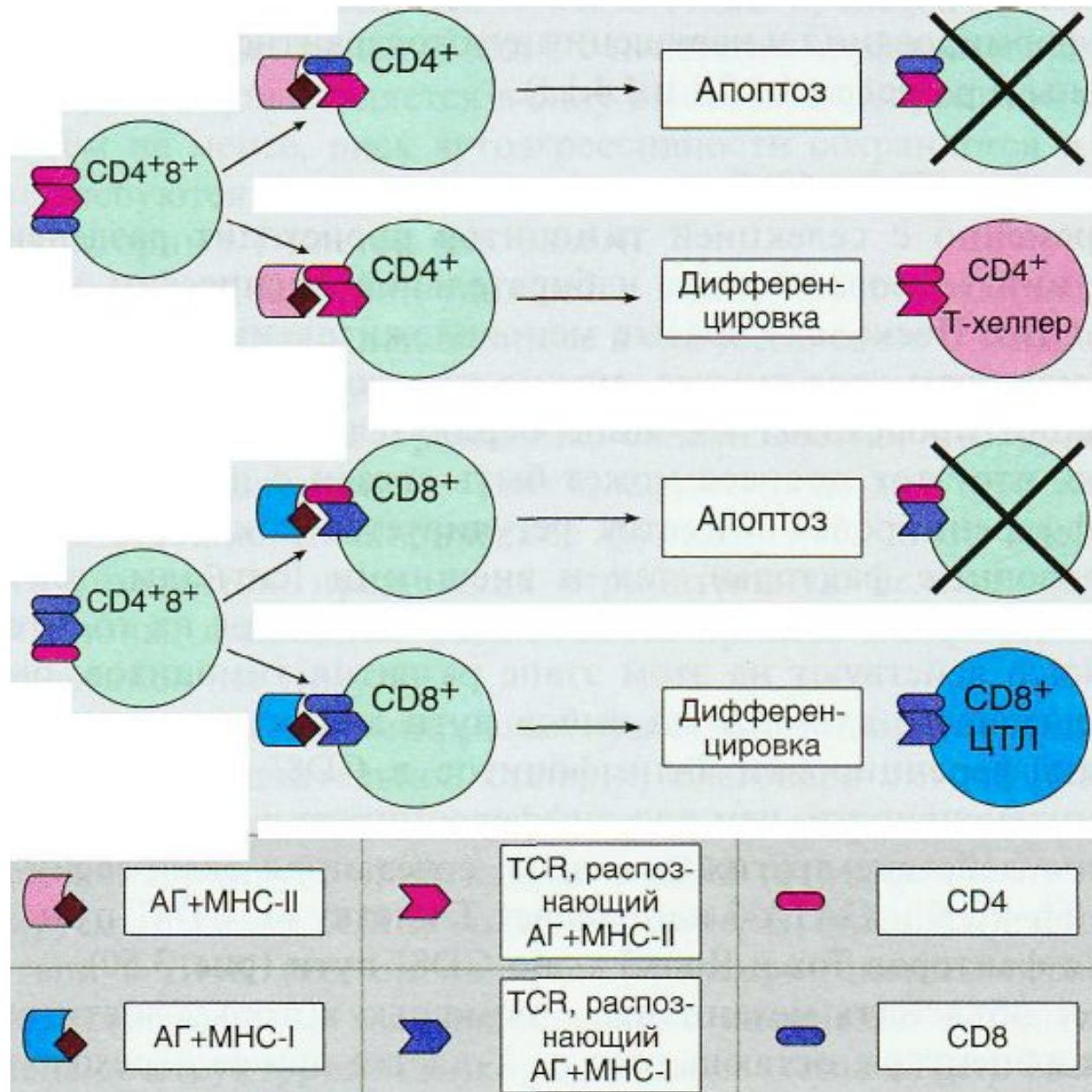
# Дифференцировка $CD4^+$ и $CD8^+$ тимоцитов

- 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<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> тимоцитов



Проверка специфичности корцептора при дифференцировке CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов (селекционная модель).

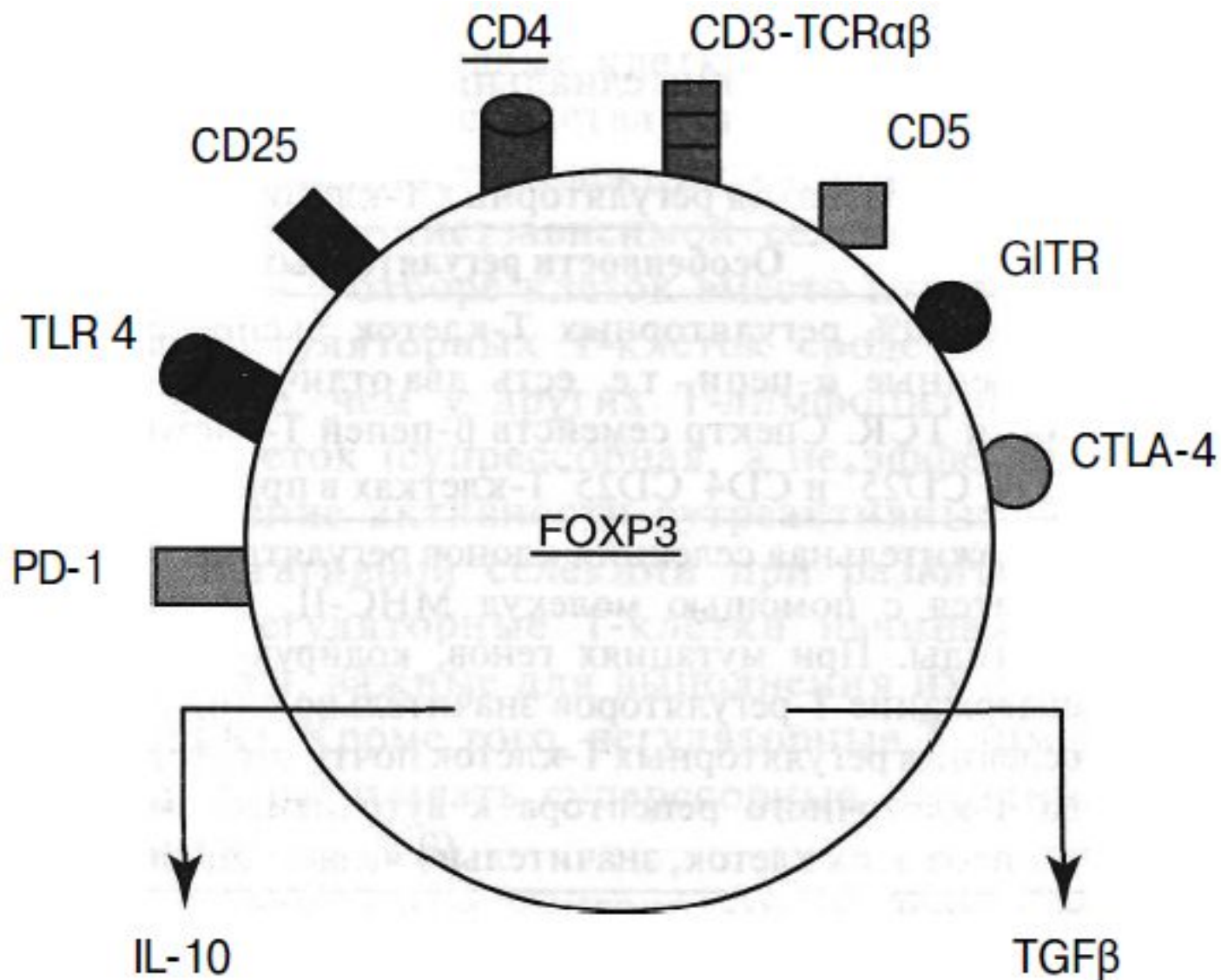


- Созревшие тимоциты довольно долго (7—14 сут) не покидают тимус, пребывая преимущественно в наружных слоях мозгового слоя;
- Завершается формирование аутоотолерантности и Т-клетки приобретают свойства, важные для поддержания их жизнеспособности вне тимуса:
- Вследствие активации сиалилтрансфераз происходит сиалирование 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),  $\beta$ 7-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 T-клетки ( $T_{reg}$ )

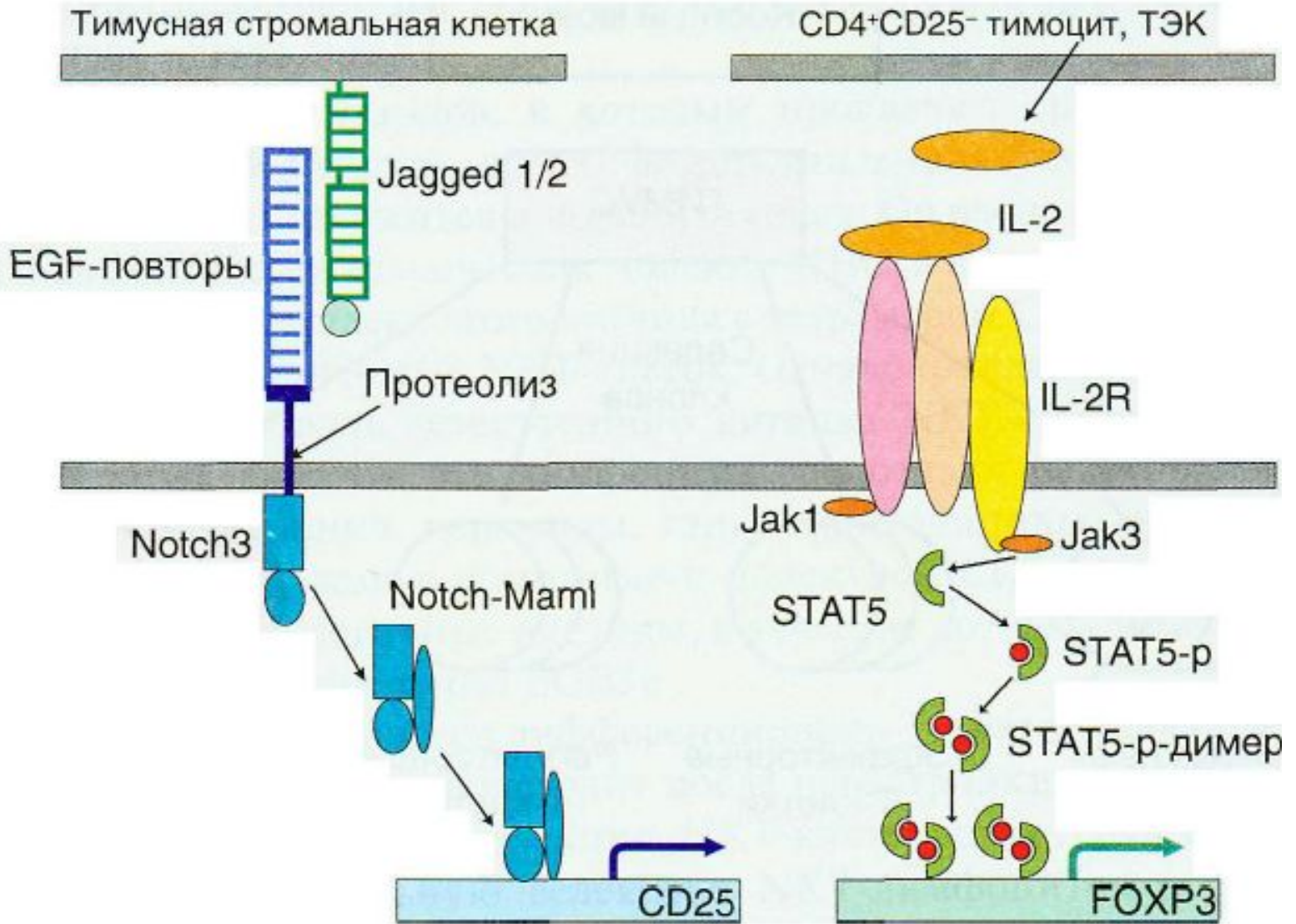
- Имеют мембранный фенотип  $CD4^+CD25_{hi}CTLA-4^+GITR^+PD-1^+$
- Сильно экспрессируют  $\alpha$ -цепь рецептора для IL-2 (CD25);
- На их поверхности присутствуют супрессорные аналоги костимулирующих молекул CTLA-4 и PD-1 и представитель семейства TNFR — GITR (Glucocorticoid-induced TNFR-related);
- Супрессорная активность  $CD4^+$  регуляторных T-клеток связана с транскрипционным фактором FOXP3 (скурфин)
- Сохраняют способность распознавать аутоантигены с высокой степенью сродства (не проходят отрицательную селекцию);
- Устойчивы к апоптозу;
- Приобретают способность вырабатывать супрессорные цитокины (IL-10, трансформирующий фактор роста  $\beta$ ).

# Регуляторные Т-клетки ( $T_{reg}$ )





# Экспрессия генов CD25 и FOXP3 как ключевые события дифференцировки Treg



Спасибо за внимание.