**18.04.2020**

**Тема №3. Клетки иммунной системы. Т- и В-лимфоциты, стадии их дифференцировки.**

Лимфоциты — ключевые клетки адаптивного иммунитета. Они несут антигенраспознающие рецепторы и выполняют основные эффекторные и регуляторные функции. Лишь естественные киллеры, или NK-клетки, не способны распознавать индивидуальные антигены и относятся к клеткам врожденного иммунитета, занимая в нем обособленное место. К клеткам «промежуточной зоны», занимающим промежуточное место между врожденными адаптивным иммунитетом относят также γδТ-, NKT-, В1- клетки, а также В-лимфоциты маргинальной зоны селезенки.

Специфическим признаком Т- и В-лимфоцитов является наличие на их поверхности антигенраспознающих рецепторов.

Популяции Т- и В-клеток имеют клональную структуру: в процессе дифференцировки каждая клетка приобретает рецептор уникальной специфичности. При встрече с антигеном и активации лимфоциты пролиферируют, образуя клон, каждая клетка которого несет рецептор точно такой же специфичности, что и «материнская» клетка. Клетки разных клонов отличаются по структуре и специфичности антигенраспознающих рецепторов.

Т-лимфоциты дифференцируются в тимусе, а В-лимфоциты - в костном мозге.

**В-лимфоциты**

Молекула иммуноглобулина (Ig) способна связывать антиген (АГ), как в растворе, так и в иммобилизированном на клетке состоянии, но для формирования полноценного антигенраспознающего рецептора, BCR, необходимо еще 2 полипептида, называемые Igα (CD79a) и Igβ (CD79b). Igα и Igβ имеют по 1 внеклеточному домену, которым они связаны с тяжелыми цепями иммуноглобулинового компонента BCR.

Обе полипептидные цепи встроены вмембрану В-лимфоцита. Их цитоплазматическая часть контактирует с тирозинкиназами Fyn, Lck, Blk, что позволяет им участвовать в передаче сигнала освязывании антигена внутрь клетки.

**Активация В-лимфоцита.** Пролиферация и дифференцировка лимфоцита может запускаться непосредственно связыванием АГ с В-клеточным рецептором (BCR). Но для эффективной активации только через BCR необходима перекрестная сшивка антигеном нескольких BCR. Для этого молекула АГ должна иметь повторяющиеся эпитопы на своей поверхности. Однако в большинстве случаев требуется второй сигнал, поставляемый активированным Т-хелпером через корецепторы.

**Корецепторный комплекс.** С BCR ассоциировано еще несколько мембранных молекул — **CD19,** CD21 (рецептор для компонентов комплемента (CR2) С3) и CD81 (ТАРА-1). Они не являются интегральной частью рецептора, но при взаимодействии с антигеном между ними и В-клеточным рецептором устанавливается связь, и они вносят существенный вклад в усиление активационного сигнала, поступающего в клетку от рецептора.

На поверхности В-лимфоцитов конститутивно или под влиянием активации экспрессируются также молекулы, необходимые для выполнения функций, не связанных с распознаванием антигена и выработкой антител.

Так В-клетки несут на поверхности молекулы гистосовместимости (**МНС) I и II класса**, **костимулирующие молекулы CD40, CD86**, а при активации — также **CD80**. Благодаря экспрессии этих молекул В-лимфоциты могут выполнять роль «профессиональных» АПК.

В-клетки экспрессируют **молекулы адгезии** (β1-интегрины VLA-2 и VLA-4, β2-интегрин LFA-1, L-селектин CD62L и др.), позволяющие им мигрировать из сосудов и перемещаться в тканях.

Присутствие на их поверхности **Fc-рецепторов** (FcγRIIB — CD32) и **рецепторов для комплемента (CR2)** в регуляции активности В-клеток играет большую роль, чем для выполнения ими эффекторных функций.

В-клетки экспрессируют многочисленные **рецепторы для цитокинов**, из которых наиболее важны рецепторы для IL-4, IL-5, IL-6, IL-2, IL-1, IL-10, для цитокинов семейства TNF (защищают В-клетки от развития апоптоза и выполняют гомеостатическую функцию, поддерживая численность этих клеток на постоянном уровне) и некоторых других.

На В-лимфоцитах представлены **рецепторы для хемокинов**: например, CXCR4 (для SDF-1), CXCR5 (для BLC, служащего основным хемоаттрактантом для наивных В-клеток), CCR3 (для эотаксинов), CCR6 (для LARC).

**Дифференцировка В-лимфоцитов** происходит из общей лимфоидной клетки-предшественника, включая несколько этапов и процессов:

-перестройку генов иммуноглобулинов и интеграцию их продуктов в клеточный метаболизм;

-экспрессию генов молекул, обеспечивающих проведение сигнала с BCR внутрь клетки;

-экспрессию генов мембранных молекул, необходимых для взаимодействия с другими клетками (Т-лимфоцитами и фолликулярными дендритными клетками (ФДК));

-экспрессию на мембране корецепторных комплексов.

**6 этапов лимфопоэза В2-лимфоцитов**

*-общая лимфоидная клетка-предшественник* (экспрессируются несколько молекул адгезии, удерживающих ее в костном мозге)

-*ранняя проВ-клетка* (экспрессируются также рецептор для первого фактора роста стволовой кроветворной клетки (СКК)),

-*поздняя проВ-клетка* (происходит трансляция полипептида тяжелой цепи, он экспрессируется на мембране в составе пре-В-рецептора, экспрессирует рецепторы для цитокинов ИЛ-7, SDF-1, вызывающих пролиферацию и накопление «полуклонов» В-лимфоцитов с уже известной специфичностью по тяжелой цепи, но еще не известной по легкой),

-*преВ-клетка* (большая преВ-клетка I и малая преВ-клетка II, происходит перестройка V-J-генов иммуноглобулинов легких цепей),

-*незрелый В-лимфоцит* (уже экспрессируется определенный BCR, содержащий L-цепь, μ-цепь, Igα и Igβ). На этой стадии начинается развитие толерантности к собственным тканям.

3 механизма толерантности:

-делеция аутореактивных клонов и негативная селекция (связывание мембранного АГ с незрелой В-клеткой (экспрессирует IgM-BCR, без IgD-BCR) служит сигналом для ее апоптоза, таким образом, удаляются В-лимфоциты, несущие АГ-распознающие рецепторы, способные связывать белки собственных тканей),

-анергия (ареактивность, проведение сигнала от BCR блокируется и лимфоцит не активируется; в периферических тканях лимфоциты, реактивные к аутоантигенам также вступают в состояние ареактивности),

-редактирование рецептора по антигенной специфичности (происходит в небольшой части незрелых В-клеток; связывание IgM-BCR с АГ служит сигналом для запуска повторной рекомбинации VDJ/VJ, образующаяся комбинации может не быть аутореактивной).

Маркер завершения В-лимфопоэза-образование *зрелого наивного В-лимфоцита*, готового к входу из костного мозга в кровь-одновременная экспрессия 2 типов BCR – IgM и IgD (причем IgD больше, чем IgM).

После распознавания антигена В-лимфоцитом, в фолликулах лимфоидных органов проходит еще 2 стадии додифференцировки, называемых иммуногенезом:

1. в зародышевых центрах фолликулов (называемых центробластами) В-лимфоциты пролиферируют, происходит возрастание афинности АТ. Выживают те В-лимфоциты, у которых афинность BCR к АГ на поверхности ФДК выше (этот процесс называется положительной селекцией).
2. Выбор дальнейшего пути: в клетку памяти и плазматическую клетку.

**Выделяют** **3 субпопуляции В-клеток**:

B1-, B2-, В-клетки маргинальной зоны (MZB).

Основная популяция - В2-лимфоциты, они относятся к подсистеме адаптивного иммунитета, являются основными клетками гуморального иммунного ответа.

В1-клетки разделяют на подклассы: B1a (CD5+) и D1b (CD5-), сходные по своим свойствам.

В1-клетки и В-клетки маргинальной зоны участвуют в формировании первой линии иммунной защиты и служат переходным звеном от врожденного к адаптивному иммунитету.

**В1-лимфоциты**

В эмбриональном периоде мигрируют в брюшную и плевральную полости, где существуют как самоподдерживающаяся популяция, немного их есть в селезенке и ЛУ. Роль: быстрый ответ на проникающие в организм АГ (приемущ.бактерии). принадлежат к IgM изотипу и распознают наиболее распространенные соединения клеточных стенок бактерий. Преобладающая часть IgM сыворотки синтезируется ими, существуют до встречи с АГ (конститутивные Ig).

Функция В1-лимфоцитов:

- первая линия обороны,

-удаление из организма продуктов погибших клеток и продуктов катаболизма, -поддержание гомеостаза аутоиммунной реактивности,

-противовоспалительное действие (нейтрализация суперантигенов, индукция синтеза противовоспалительных цитокинов и др.)

**В-лимфоциты маргинальной зоны**

Находятся в маргинальных синусах селезенки.

Функция:

-ответ на Т-независимые АГ в крови (экспрессируют IgM специфичные к полисахаридам и фосфолипидам бактерий),

-ответ на эти АГ развивается очень быстро (в первые 2 суток),

-быстро дифференцируются в плазматические клетки.

**Регуляторные В-клетки**

Синтезируют ИЛ-10.

Их недостаточность или дефект играют важную роль в развитии аутоиммунных заболеваний и отторжении трансплантата.

**Т-лимфоциты**

Основная задача Т-лимфоцитов - распознавание чужеродных или изменённых собственных антигенов в составе комплекса с молекулами гистосовместимости (MHC). Если на поверхности своих клеток будут представлены чужеродные или изменённые свои молекулы, Т-лимфоцит запускает их уничтожение.

В отличие от B-лимфоцитов, не продуцируют растворимых форм антигенраспознающих молекул. И большинство Т-лимфоцитов не способны распознавать и связывать растворимые антигены.

**Антигенраспознающий рецептор Т-лимфоцитов**

Т-клеточный рецептор (TCR) состоят из цепей, принадлежащих к суперсемейству иммуноглобулинов. Выступающий над поверхностью клетки антигенраспознающий участок TCR - гетеродимер, т.е. состоит из двух разных полипептидных цепей.

Известны два варианта TCR, обозначаемые как **αβTCR** и **γδTCR**. Они различаются составом полипептидных цепей антигенраспознающего участка. Каждый Т-лимфоцит экспрессирует только 1 вариант рецептора.

**Строение TCR на примере αβTCR-клеток.**

Трансмембранно расположенный комплекс TCR состоит из 8 полипептидных цепей (гетеродимера α- и β-цепей собственно TCR, двух вспомогательных цепей ζ, а также по одному гетеродимеру ε/δ- и ε/γ-цепей молекулы СD3)

 Трансмембранные цепи α и β TCR - это 2 примерно одинаковые по размеру полипептидные цепи – α (молекулярная масса 40-60 кДа, кислый гликопротеин) и β (молекулярная масса 40-50 кДа, нейтральный или основный гликопротеин). Каждая из этих цепей содержит по 2 гликозилированных домена во внеклеточной части рецептора, гидрофобную трансмембранную часть и короткий (из 5-12 остатков аминокислот) цитоплаз-матический участок. Внеклеточные части обеих цепей соединены одной дисульфидной связью.

**- V-область**. Наружные внеклеточные (дистальные) домены обеих цепей имеют вариабельный аминокислотный состав. Они гомологичны V-области молекул иммуноглобулинов и составляют V-область TCR. Именно V-области α- и β-цепей вступают в связь с комплексом MHC-пептид.

**- C-область**. Проксимальные домены обеих цепей гомологичны константным областям иммуноглобулинов; это C-области TCR.

- Короткий цитоплазматический участок (как α-, так и β-цепи) не может самостоятельно обеспечить проведение сигнала внутрь клетки. Для этого служат 6 дополнительных полипептидных цепей: γ, δ, 2ε и 2ζ.

**Комплекс CD3.** Цепи γ, δ, ε между собой образуют гетеродимеры γε и δε (вместе их называют комплекс CD3). Этот комплекс необходим для экспрессии α- и β-цепей, их стабилизации и проведения сигнала внутрь клетки. Этот комплекс состоит из внеклеточной, трансмембранной и цитоплазматической частей. Важно не путать цепи CD3 комплекса с γδ-цепями димера TCR.

 ζ-Цепи  расположены в цитоплазме, осуществляют проведение сигнала внутрь клетки.

**ITAM-последовательности** (иммунотирозиновые активационные последовательности). Цитоплазматические участки: γ, δ, ε и ζ содержат 10 последовательностей ITAM, взаимодействующих с тирозинкиназой цитозоля, активация которой ведет к проведению сигнала.

В связывании АГ участвуют ионные, водородные, ванн-дер-вавальсовы и гидрофобные связи.

**Корецепторные молекулы CD4 и CD8.**

Зрелый Т-лимфоцит экспрессирует одну из корецепторных молекул:CD4 или CD8, которые также взаимодействуют с молекулами МНС на АПК или клетках-мишенях. Каждая имеет цитоплазматический участок, связанный с тирозинкиназой и вносит вклад к проведению сигнала внутрь клетки.

CD4 - инвариантная часть (β2-домен) молекулы МНС-II. При активации Т-лимфоцита одну молекулу ТCR «обслуживают» 2 молекулы CD4, при том они димеризуются.

CD8 - инвариантная часть (α3 -домен) молекулы МНС-I. Это гетеродимер, состоящий из цепей α и β, соединенных дисульфидной связью.

**Проведение сигнала с АГ-распознающих рецепторов лимфоцитов.**

Для активации лимфоцита необходима кластеризация АГ-распознающих рецепторов и корецепторов, т.е. «сшивка» нескольких рецепторов одним антигеном. В проведении сигнала большую роль играют процессы активации тирозинкиназ и тирозинфосфатаз (фосфорелирование/дефосфорелирование белков по остатку тирозина) и других киназ. Активационный сигнал включается при связывании TCR с комплексом МНС-пептид при участии корецептора CD28.

**Дифференцировка Т-лимфоцитов.**

Аналогична схеме развития В-лимфоцитов.

- Тимоциты дифференцируются из клетки-предшественника, которая еще вне тимуса экспрессирует CD7, CD2, CD34 и цитоплазматическую форму CD3.

- Коммитированные к дифференцировке в Т-лимфоциты клетки-предшественники мигрируют из костного мозга в субкапсулярную зону коры тимуса, где пролиферируют. На них появляются мембранные молекулы CD44 и CD25.

- Затем клетки перемещаются вглубь коры тимуса, молекулы CD44 и CD25 исчезают с мембраны. Начинается перестройка генов β-, γ-, δ-цепей TCR.

Если гены γ-, δ-цепей успевают продуктивно, т.е. без сдвига рамки считывания, перестроиться раньше, т.е.чем гены β-цепи, то лимфоцит дифференцируется как γδТ. В противном случае происходит экспрессия β-цепи на мембране. Клетки начинают пролиферировать и экспрессировать одновременно CD4 и CD8 – дважды позитивные тимоциты. Затем клетки перестают делиться и начинают перестраиваться гены α-цепи. После чего происходит экспрессия TCR с каждым новым вариантом α-цепи и отбор (селекция) тимоцитов по силе связывания с комплексом МНС-пептид на мембранах эпителиальных клеток тимуса:

- позитивная селекция: погибают тимоциты, не связавшие ни одного из доступных комплексов МНС-пептид (погибает до 90% клонов).

- негативная селекция уничтожает клоны тимоцитов, связывающие комплексы МНС-аутопептид со слишком высокой афинностью (элиминация 10-70% клеток, прошедших позитивную селекцию).

- тимоциты, связавшие какой-либо из комплексов МНС-пептид с правильной, т.е. средней по силе афинностью, выживают и продолжают дифференцировку.

На короткое время с мембраны тимоцитов исчезают обе корецепторные молекулы CD4 и CD8, а затем экспрессируется она из них. Тимоциты, распознавшие пептид а комплексе с МНС-I экспрессируют корецептор CD8, а МНС-II-корецептор CD4. На периферию выходят CD4:CD8=2:1.

CD8+Т-клетки играют роль цитотоксических Т-лимфоцитов - распознают и непосредственно убивают клетки, модифицированные вирусом, опухолевые или другие измененные.

функциональная специализация CD4+Т-клеток разнообразна. Значительная часть становится хелперами (помощниками), взаимодействующими с В-, Т-лимфоцитами и другими клетками при прямом контакте или через растворимые факторы (цитокины). В определенных случаях могут развиваться CD4+ЦТЛ (таких много у больных с синдромом Лайела).

**Субпопуляции Т-хелперов**

С конца 80-х годов было принято выделять 2 субпопуляции Т-хелперов, Th1 и Th2, в зависимости от профиля секретируемых цитокинов.

**Th0** – CD4+-лимфоциты на ранних стадиях развития иммунного ответа. Продуцируют ИЛ-2.

**Th1** – продуцируют ИФНγ, ИЛ-2, ФНОβ. Регулирует клеточный иммунитет, включая реакции ГЗТ и активацию цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), стимулируют продукцию В-лимфоцитами опсонизирующих АТ IgG, запускающих каскад активации комплемента, могут вызывать избыточное воспаление с последующим повреждением тканей.

**Th2** – продуцируют ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13. Участвует в активации В-лимфоцитов и способствует секреции ими АТ разных классов, особенно IgE. Участвует в активации эозинофилов и развитии аллергических реакций, также воспалением, вызванным патологической ролью гуморального иммунитета (СКВ). Обладают противовоспалительным действием за счет подавления Th1. Дифференцировка и функционирование проходит преимущественно в близости к эпителиальным барьерам ЖКТ и легких и регулируется клетками врожденного иммунитета.

**Th9** – продуцируют ИЛ-9. Вызывает пролиферацию Т-хелперов при отсутствии антигенной стимуляции, усиливает секрецию В-лимфоцитами IgM, IgG, IgE. Оказывает поддерживающее действие на Т-регуляторы, усиливая их иммуносупрессивные свойства. При некоторых аутоиммунных заболеваниях (АИЗ) приводит к накоплению тучных клеток.

**Th17**– продуцируют ИЛ-17. Осуществляют противогрибковую и антимикробную и защиту эпителиальных и слизистых барьеров, играет ключевую роль в патологии АИЗ. Вызывает рекрутирование и активацию клеток врожденного иммунитета. Индукцию секреции других провоспалительных цитокинов (ФНО, GM-CSF, ИЛ-1β), хемокинов, противомикробных пептидов, простагландинов.

**Th22** – продуцируют ИЛ-22. Играет роль в АИЗ (псориаз, СКВ, РА). В норме поддерживает гомеостаз микробиоты кишечника. При остром воспалении защищает гепатоциты.

**Т-регуляторы** - подавляющие активность других клеток иммунной системы посредством секреции иммуносупресорных цитокинов - ИЛ-10 (ингибитор активности макрофагов и Th1-клеток) и TGFβ-ингибитор пролиферации лимфоцитов.

Популяции: Treg (СD4+СD25**+**) - естесственные регуляторные, созревающие в тимусе,

индуцированные - локализованные преимущественно в слизистых оболочках ЖКТ и продуцирующие TGFβ (Th3) и ИЛ-10 (Tr1).

**Tfh**-расположена в лимфоидных фолликулах. Осуществляет хелперную функцию для В-лимфоцитов зародышевых центров, продуцируя ИЛ-21, вызывая их созревание и терминальную дифференцировку в плазматические клетки. Могут продуцировать ИЛ-4, ИЛ-10 для регуляции В-лимфоцитов. Нарушение этой функции ведет к развитию АИЗ и вторичным иммунодефицитам (ВИД).

**γδТ-клетки.**

Составляют менее 1%. Преимущественно дифференцируются вне тимуса, в слизистых ЖКТ. В коже, легких, ЖКТ и генитального тракта являются доминирующей субпопуляцией внутриэпителиальных лимфоцитов (более 50%). В эмбриогенезе появляются раньше αβТ-клеток. Являются связующим компонентом между врожденным и приобретенным иммунитетом и одним из первых барьеров на пути патогенов. Секретируют цитокины, способны дифференцироваться в ЦТЛ. Не экспрессируют СD4. СD8 только на части γδТ-клеток, но не в виде αβ-гетеромера, а в виде гомодимера 2 α-цепей. Как Ig способны связывать нативные антигены независимо от классических молекул МНС, для них не нужен процессинг антигена антиген-презентирующей клеткой. Разнообразие γδТCR меньше, хотя они способны распознавать широкий спектр антигенов (преимущественно фосфолипидные антигены микобактерий, углеводы, белки теплового шока). Могут распознавать разнообразные бактерии (туберкулеза, бруцеллеза, сальмонеллеза) и презентировать их αβТ-клеткам. Экспрессируют некоторые маркеры, свойственные NK-клеткам и АПК.

**NKT-клетки.**

Естественные киллерные Т-клетки-промежуточное положение между клетками врожденного и приобретенного иммунитета. Составляют 0,01% всех Т-лимфоцитов крови.

Имеют черты NК- и Т-клеток. Экспрессируют αβТCR. TCR может взаимодействовать не с единственным, а с широким спектром чужеродных и собственных антигенов. Для них не требуется МНС-распознавание, распознают липиды и гликолипиды в комплексе с CD1d.

Выделяют 2 субпопуляции:

NKT-клетки I типа (iNKT)– TCR является инвариантным.

NKT-клетки II типа – TCR не является инвариантным, не распознает α-галактозилцерамид, но распознает спектр гликолипидов, отличных от iNKT рестриктирован по CD1d .

Обладают как имуностумулирующими, так и иммуносупрессорными свойствами, секретируя как цитокины Th1, так и Th2. Контролируют АИЗ и аллергические заболевания, участвуют в иммунном надзоре, вызывая отторжение опухолей. Большая роль в противомикробной защите, особенно на ранних этапах развития инфекционного процесса. Играют роль при вирусных поражениях печени.