



БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

ИММУНОЛОГИЯ

НЕДОСПАСОВ СЕРГЕЙ АРТУРОВИЧ
КУПРАШ ДМИТРИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

БИОФАК МГУ

КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН
СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ
ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ
СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ.
СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ
НА [VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ
ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ,
ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ,
НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ
[VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).



БЛАГОДАРИМ ЗА ПОДГОТОВКУ КОНСПЕКТА
СТУДЕНТА БИОФАКА МГУ
ВЕКО ЕГОРА НИКОЛАЕВИЧА

Оглавление

Лекция №1. ИММУНИТЕТ	7
Главные парадигмы иммунологии	7
Соображения Ч.Дженуэйя про врожденный иммунитет.....	8
Принципы распознавания врождённого иммунитета	9
Особенности рецепторов врождённого иммунитета	9
Особенности рецепторов адаптивного иммунитета	9
Распознавание «чужого» в контексте своего Т лимфоцитами.....	10
Принципы иммунологического распознавания.....	10
Рецепторы, участвующие во врожденном иммунологическом распознавании	10
Сигналлинг.....	12
Лекция №2. КЛЕТочная СТРУКТУРА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ	13
Клональная селекция лимфоцитов	14
Антигенраспознающие рецепторы лимфоцитов	14
Схема строения антитела.....	14
Классы антител.....	15
Распознавание антигенов Т-клетками	15
Ко-рецепторы Т-лимфоцитов.....	15
МНС презентация.....	16
Комплекс TCR/МНС/пептид.....	16
Молекулы МНС	16
Расположение генов TCR и BCR в геноме человека	17
Перестройка генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов	17
Перестройка генов иммуноглобулинов человека и мыши	18
Структура рекомбинационных сигналов	19
Переключение изотипов антител.....	20
Лекция №3. ПЕРЕДАЧА СИГНАЛОВ ОТ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА. 22	22
Принципы передачи сигнала:.....	22
Аналогии в сигнальных каскадах Toll-TLR дрозофилы и млекопитающих. Передача сигнала от рецепторов TLR/IL1/IL18	23
Передача сигнала.....	24
Инфламмасомма	25
Цитокины	25
Сигналы, индуцируемые цитокинами.....	25
Таблица основных цитокинов (классификация по типу рецептора)	26
Устройство рецепторов.....	27
Ключевые медиаторы передачи сигналов от рецепторов цитокинов: JAK (киназы) и STAT (транскрипционные факторы).....	28
Использование комбинаций Jak/STAT рецепторами.....	29
Схема запуска апоптоза.	29
RIG-подобные рецепторы (RLR).	30
Лекция №4. ЛИМФАТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА	31
Некоторые поверхностные маркёры Т-клеток	31

Антигенные рецепторы лимфоцитов.....	31
Взаимодействие В-лимфоцитов в герминальных центрах	32
Антигенные рецепторы лимфоцитов.....	33
Рецепторы комплемента CR2/CD21 и CR1	33
Белковые домены, часто используемые для передачи сигнала в иммунной системе	34
Передача сигнала с TCR	34
Сигнальные события при костимуляции.	36
Активация NK-клеток	37
Лекция №5. Молекулярно-клеточные аспекты врождённого иммунитета	38
Клетки врожденного иммунитета	38
Фагоцитоз.....	38
Антимикробные факторы при фагоцитозе:	38
Механизм цитолиза NK-клетками	39
Строение иницирующих комплексов C1qrs и MBL-MASP	40
Ранние стадии активации комплемента по классическому пути.....	41
Начальные фазы активации комплемента по лектиновому пути	41
Спонтанная активации C3: центральная роль тиозэфирной связи.....	41
Терминальные стадии активации комплемента (литический каскад).....	42
Рецепторы для малых фрагментов компонентов комплемента	42
Резюме по системе комплемента	42
Практическое применение: фиксация комплемента	43
Гуморальные факторы врождённого иммунитета	43
Лекция №6. Дифференцировка и селекция лимфоцитов	45
Иммунологические методы.....	45
Схема развития лимфоцитов в первичных лимфоидных органах.....	46
Селекция В-лимфоцитов в костном мозге	46
Дифференцировка В-лимфоцитов на периферии.....	47
Кинетика типичного В-клеточного ответа.....	47
Тимус	48
Основные стадии развития и поверхностные маркёры α , β -тимоцитов	48
Позитивная селекция CD4 ⁺ и CD8 ⁺ T-клеток в тимусе	49
Развитие тимоцитов зависит от МНС.....	49
AIRE - autoimmune regulator	49
Механизмы толерантности на периферии	50
Селекция основных популяций Т-лимфоцитов.....	51
Выбор пути дифференцировки в направлении $\gamma\delta$ - или $\alpha\beta$ Т-клеток	52
Функциональная дифференцировка Т-хелперов.....	52
Цитокины и ТФ в дифференцировке Т-хелперов.....	53
Роль адекватной дифференцировки Т-хелперов в обеспечении успешной иммунной защиты (человек).....	53
Механизм действия регуляторных Т-клеток	53
FoxP3	54
Лекция №7. Онтогенез иммунной системы	55

Селекция Т-лимфоцитов в тимусе	55
Группы крови - пример аутоотолерантности	55
Механизмы аутоотолерантности	56
Правила отторжения трансплантатов. МНС-рестрикция	58
Непрямое аллогенное распознавание	59
Прямое аллогенное распознавание	59
Активация аллореактивных Т-клеток реципиента	59
Механизмы действия иммуносупрессоров. Основные классы иммуносупрессантов	59
Признаки (критерии) рака	60
Примеры опухолевых антигенов, не ассоциированных с вирусами	62
Некоторые аргументы в пользу существования иммунного надзора у человека	63
Лекция №8. ИММУНОТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ	65
Иммуноterapia опухолей мочевого пузыря	65
Противоопухолевая вакцинация на основе дендритных клеток	65
Иммуногенная клеточная гибель при химиотерапии	66
Иммуногенная клеточная гибель при радиотерапии	66
Адоптивный перенос специфических лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, после лимфодеплеции	67
Регрессия меланомы в результате селективного удаления Трег	67
Варианты генетической модификации лимфоцитов	68
Химерные антигенные рецепторы	68
Индукцируемые химерные антигенные рецепторы. «Интеллектуальные» геномодифицированные Т-лимфоциты	69
Механизмы противоопухолевого действия антител	69
Поражение органов при аутоиммунных процессах	70
Роль инфекций в развитии аутоиммунных процессов	71
Некоторые применяемые в клинике иммуносупрессанты	73
Некоторые антитела – иммуносупрессанты	73
Рекомбинантные белки - ингибиторы ФНО	73
Реакции гиперчувствительности (аллергические реакции) (по классификациям 1947 и 1963 г.)	74
Способы подавления аллергических реакций	74
Лекция №9. Вторичные лимфоидные органы	76
Функции вторичных лимфоидных органов	76
Селезенка	76
Маргинальная зона	76
Расположение, строение и функция лимфатических узлов	76
Пути миграции Т-клеток и ДК в лимфатический узел	77
Молекулы адгезии	77
Функции молекул адгезии в транссосудистой миграции лейкоцитов при воспалительном ответе	78
Селектины и их взаимодействия	78
Фазы иммунного ответа	78
Развитие различных видов Т-хелперов под влиянием цитокиновых сигналов от ДК	79
Молекулярные детали помощи	79

Особенности иммунного ответа в кишечнике.....	80
Филогенез иммунитета	80
Лекция №10. Иммунодефициты	82
Иммунная системы и микробиота	82
Первичные и вторичные иммунодефициты.....	83
Механизм X-сцепленной формы гипер-IgM-синдрома	84
Основные клинические проявления первичных иммунодефицитов.....	84
Основные факторы иммунодефицита при СПИДе	84
Нерешенные проблемы иммунологии:	85

ЛЕКЦИЯ №1. ИММУНИТЕТ

Слово «иммунитет» всем знакомо из обыденной жизни. Оно происходит от латинского *immunitas*, что означает освобождение, избавление и т.д. Определение иммунитета, которое наиболее нам близко, это способность организма распознавать и удалять «чужое». В некоторых случаях, также запоминать эту встречу с «чужим». Оказалось, что у бактерий есть адаптивный иммунитет, ранее об этом никто не знал. Это привело к теоретическому переосмыслению некоторых догм иммунологии. Иммунологическая память – это способность запомнить встречу с «чужим». Иммунная система, как считалось до недавнего времени, возникла в эволюции для защиты от инфекций, тем самым она присуща всем живым организмам, в т.ч. и бактериям. Свойство иммунной защиты характерно не только для высших организмов, но и для бактерий и растений. У растений, бактерий и нас с вами механизмы, с которыми иммунная система достигает того же самого результата, разные, но есть молекулярные блоки, которые используются растениями в одном контексте, а нами – в другом. Последние годы появляются убедительные свидетельства того, что другая функция иммунной системы связана с поддержанием гомеостаза тканей. Это сейчас новая область, неотраженная в учебниках.

Иммунная защита активна. Все микроорганизмы взаимодействуют с нашей иммунной системой, они её настраивают в определённые периоды онтогенеза. Иммунная система держит под контролем микромир внутри нас.

Главные парадигмы иммунологии

Первое - это противопоставление врожденного иммунитета, который закодирован генами, существующего в нас вне зависимости от нашего иммунологического опыта, приобретенному (адаптивному), который развивается в онтогенезе. Второе противопоставление – это гуморальный и клеточный иммунитет.

Гуморальный иммунитет – защита, опосредованная растворимыми молекулами, т.е. находящимися в биологических жидкостях организма (растворимые молекулы – это антитела). Клеточный иммунитет – это то, что находится на клетках, что связано с фагоцитозом и цитотоксичностью, когда в иммунной защите участвуют клетки иммунной системы и межклеточные взаимодействия.

К отцам иммунологии относят Эдварда Дженнера (британский врач) и Луи Пастера (французский микробиолог), но в действительности их вклад связан с первыми успехами в вакцинации - осмысленного и направленного воздействия на иммунную систему человеку, чтобы та получила свойства защиты от конкретных инфекций.

Первым лауреатом Нобелевской премии по иммунологии был Эмиль фон Беринг – это военный врач, который работал в германской армии. Он был озабочен защитой солдат от инфекций. Беринг обобщил, что переболевшие тяжелыми инфекциями солдаты развивают внутри себя (в сыворотке крови) какие-то субстанции, относящиеся к гуморальному иммунитету. Если эти субстанции перенести в других солдат, то они могут быть защищены от соответствующей инфекции. Переболевший солдат развивает

у себя факторы, помогающие выжить. В его экспериментах по серотерапии (переносе сыворотки крови) ему помогали Пауль Эрлих и японец Сибасабуро Китасато, которые не получили Нобелевскую премию. Эрлих всё-таки потом ее получил, а японец дважды мог получить премию, но так и не был удостоен.

Илья Мечников утверждал, что все связано с воспалением – это некая врождённая реакция, обусловленная клетками (он открыл фагоциты). Эти клетки в ответ на инфекцию активируются и что-то пожирают. Конечно, он не знал никаких молекулярных деталей, но явление он описал правильно. В противовес этому, Эрлих утверждал, что все защитные факторы находятся в крови и других жидких субстанциях организма, то есть могут быть отделены от клеток. В экспериментах *in vitro* бактерии могут быть убиты только гуморальными факторами, то есть в отсутствии клеток. В 1908 году Эрлиху и Мечникову одновременно была присуждена Нобелевская премия за противоположные точки зрения. К этому времени доминировала германская школа иммунология, Мечников был разбит. Возрождение клеточной теории иммунитета произошло в 90-е годы XX века, благодаря работам Чарльза Дженуэйя.

Главная проблема иммунология - проблема иммунологического распознавания. Чтобы удалить чужое, его сначала надо распознать. Системы врожденного и адаптивного иммунитет принципиально по-разному решают общую проблему распознавания «чужого».

Соображения Ч.Дженуэйя про врожденный иммунитет

1. Врожденный иммунитет защищает все виды живых существ, включая растения, в то время как адаптивный иммунитет есть только у высших позвоночных.
2. Не зная никаких молекулярных механизмов он сказал, что существуют некие сенсоры, которые распознают чужое. Он ввел в иммунологию термин «распознавание паттернов». Рецепторы, которые распознают микробы, назывались PAMP (pathogen-associated molecular pattern).
3. Молекулярными объектами распознавания бактерий могут быть компоненты их клеточных стенок. Молекулы, которые образуют бактериальные стенки, отсутствуют в нас с вами. Таким образом, есть поверхностные химические вещества, которые отличают нас от бактерий потому, что у нас нет биосинтетических путей и таких молекул. Если будет сенсор, который узнает такую молекулу, то это прямое распознавание «чужого». Рецептор не может узнать свое, он узнает «чужое».
4. У нас 10^4 генов, а микроорганизмов потенциально патогенных намного больше. Врожденное распознавание пошло по такому пути, когда один рецептор распознает целый класс патогенов. Один рецептор может распознавать все грам-положительные бактерии, а другой – все грам-отрицательные. В адаптивном иммунитете рецептор собирается из кусочков генов, которые комбинаторно дадут огромное их разнообразие. Комбинаторная перестройка происходит в лимфоцитах. Это позволяет им узнать практически все, что угодно.

Принципы распознавания врождённого иммунитета

Распознавание (подозрительных) «паттернов» - это прямое распознавание микробного чужого. Есть рецепторы, который по химическому паттерну распознают молекулу, которая не своя, а «чужая». Далее запускаются сигнальные механизмы. Фагоциты и дендритные клетки напрямую своими рецепторами распознают химический паттерн на поверхности бактериальной клетки.

Распознавание по принципу «отсутствие своего». Иммунная система распознает отсутствие какой-то молекулы. В нашем геноме на 6 хромосоме есть локус, в котором несколько десятков генов. Этот локус высокополиморфен, в нём расположен комплекс гистосовместимости.

Активация NK-клеток. Есть лимфоидные клетки врождённого иммунитета, которые в литературе называются натуральными киллерами (NK). Эти клетки играют важную роль в защите от клеток, зараженных вирусами, и трансформированных клеток (будущих раковых). Таким образом, ранние опухолевые клетки могут быть элиминированы NK-клетками. Тут работает принцип «отсутствия своего». Клетки, зараженные вирусами или трансформированные, теряют экспрессию генов главного комплекса гистосовместимости. У нормальной клетки есть этот ген, значит, есть рецептор MHC1, а на них у NK-клеток есть рецептор. Он посылает ингибирующий сигнал. Таким образом, если рецептор есть, и он узнал молекулу MHC, то NK-клетка неактивна. У NK-клетки есть цитотоксические гранулы, которыми она убивает клетки. Она готова убить всегда. Только если получает сигнал о наличии MHC, то она не убивает. В случае вирус-зараженной клетки или трансформированной, экспрессии молекул не происходит, тогда NK-клетка убивает клетку-мишень.

Особенности рецепторов врождённого иммунитета

Эти рецепторы напрямую узнают «микробные паттерны», могут узнавать «отсутствие» собственных молекул MHC класса I. Какие молекулы могут быть объектами распознавания по принципу «микробного чужого»? Эти молекулы находятся на клеточных стенках. Есть молекулы, которые отличают грамположительные и грамотрицательные бактерии. Грамотрицательные бактерии отличаются тем, что в их клеточной стенке есть липополисахарид (LPS). У грамположительных есть другой компонент – липотейхоевая кислота (ЛТХ), которой нет на поверхности грамотрицательных. К каждому из этих компонентов есть рецептор. Есть система рецепторов, которая распознает ЛПС, тем самым распознает все грамотрицательные бактерии, и есть рецептор, распознающий ЛТХ, он узнает все грамположительные. На микобактериях есть липоарабиноманнан.

Особенности рецепторов адаптивного иммунитета

За счет уникальных генетических механизмов лимфоциты могут узнавать «все, что угодно», в т.ч. и свое. Врожденный иммунитет узнаёт чужое, а адаптивный может узнавать свое, тогда должна быть защита от такого распознавания.

Следующий принцип иммунологического распознавания, который действует в адаптивном иммунитете - это принцип распознавания Т-клетками чужого в контексте своего. Т-клетки распознают клетки, зараженные вирусом на основании этого принципа. Контекст своего – это опять же молекулы МНС I класса и II класса.

Распознавание «чужого» в контексте своего Т лимфоцитами

Внутри клеток нашего организма есть «нарезалка», которая нарезает все внутриклеточные белки на пептиды. Далее они образуют комплексы с молекулами МНС и высвобождаются на поверхность клетки. Далее пептид будет вложен в молекулу МНС и в виде рецептора высунут на поверхность. Если в нас попал вирус, то его белки будут нарезаны точно также и окажутся на поверхности клетки. Т-клеточный рецептор и узнает пептид вируса («чужое») в контексте МНС («своего»).

Принципы иммунологического распознавания

1. «Микробное чужое» - врожденный иммунитет. Реакция происходит очень быстро, так как рецепторы есть в нас, уже экспрессированы на поверхности клеток. Нет памяти.
2. «Отсутствие своего» (молекулярный пароль) – НК клетки, врожденный иммунитет (убивают «по умолчанию», в них есть цитотоксические гранулы, но при выполнении некоторых дополнительных условий). Нет памяти.
3. «Чужое в контексте своего» - приобретенный (адаптивный) иммунитет. Работают рецепторы Т-лимфоцитов. Клональность. Реакция требует недель, т.к. должны перестроиться гены, должен накопиться клон клеток для иммунной защиты. Есть память. Почему? Если за счет перестроек отобрался полезный клон, то он может остаться в нас в небольшом количестве. Если заражение происходит повторно, то иммунный ответ стартует быстрее, так как клетки-помощники сохранились.
4. Распознавание антигена рецепторами В лимфоцитов – приобретенный иммунитет. Клональность. Реакция требует недель. Есть память. Антиген и антитела - белки. Антитела – это заякоренные рецепторы В-лимфоцитов. Они могут отщепляться и находиться в виде растворимых рецепторов. Белковые молекулы с высокой афинностью распознают друг на друге некие специальные поверхности, образуются высокоафинные комплексы. В этом смысл этого принципа, которым руководят В-клетки.

Рецепторы, участвующие во врожденном иммунологическом распознавании

1. Toll-подобные рецепторы (TLP).
2. NOD-подобные рецепторы (NLR).
3. RIG-подобные рецепторы (RLR)
4. Рецепторы НК-клеток
5. Прочие рецепторы.

TLR получили свое название по рецептору дрозофилы Toll, который был открыт в лаборатории Кристины Фолхард. Она обнаружила ген, мутация по которому была летальна. Мутация получила названия Toll. Оказалось, что именно этот ген, кроме функции по эмбриональному развитию, имеет важную функцию во врожденном иммунитете. Главными молекулами врожденного иммунитета дрозофилы, которыми она борется с патогенами, являются небольшие белки – дефензины. Они есть и у нас, но их намного меньше. Оказалось, что синтез дефензинов находится под контролем Toll-рецептора. Потеря функциональности приводит к потере чувствительности дрозофилы к определенному виду патогенов – грибковых инфекций. Мухе прокалывали зубочисткой брюшко, смоченной в растворе патогенов. Если были грибковые патогены, то она умирала, а если какие-то иные, то иммунная система с ними справлялась. Жуль Хофман за это получил Нобелевскую премию в 2011 году. У нас десять TLR. Что они распознают? Оказалось, что молекулярный паттерн, который распознает TLR – это липид А липополисахарида. Он спрятан, не торчит наружу, но есть определенные белки, которые могут его «выдрать». TLR, который распознает ЛПС, - это TLR4. Строго говорят, что лигандом для TLR4 является ЛПС в комплекс с адаптерным белком MD2. У всех у нас на поверхности клеток сидят димеры TLR.

TLR5 распознает бактериальный жгутик.

TLR2/TLR6 узнает липотейховую кислоту.

TLR2/TLR1 распознают липопептиды бактерий.

TLR11 узнаёт урогенитальные бактерии. У людей этот рецептор получил мутацию и не функционален. У дрозофилы все TLR участвуют в программах эмбрионального развития, а у нас в программах защиты.

Некоторые рецепторы находятся в специальных органеллах – эндосомах. Так, TLR4 может быть на поверхности клетки и в эндосоме. TLR3, TLR7,8 и TLR9 находятся только в эндосомах. Эти рецепторы узнают нуклеиновые кислоты именно в эндосомальных. Собственная нуклеиновая кислота никогда туда не попадёт, а вирусные могут там оказаться

TLR3 узнает двухспиральную РНК.

TLR7,8 – односпиральную РНК.

TLR9 – двухспиральную ДНК с особой концентрацией Cp/G мотивов, свойственной бактериальной. Это создано для распознавания вирусов.

Когда была установлена структура рецепторов, был вопрос – насколько рецепторные «рожки» важны для узнавания лиганда? Каркас в виде рожек образован лейцин-богатыми повторами. Это альтернативный каркас (скэффолд), на который могут быть нанизаны другие молекулы. «Рожки» создают структуру, а распознавание осуществляют другие молекулы, находящиеся на них.

Сигналинг

После распознавание рецептором происходит передача сигнала. В случае рецепторов врожденного иммунитета важную роль играют адаптерные белки, которые сидят на внутриклеточной части рецепторов. Эти белки далее рекрутируют белки-киназы. Эти сигнальные киназы передают сигнал фосфорилирования. Что является мишенями этих сигналов? Транскрипционные факторы. В цитоплазме есть предшественники транскрипционных факторов, которые потом будут работать в ядре. Чтобы их активировать, нужно фосфорилирование. Самый главный транскрипционный фактор – это NFκB. Затем эти факторы идут в ядро, включают гены, продукты которых обеспечат иммунную защиту. В случае дрозодилы – это гены, которые кодируют дефензины. У нас запускается широкий класс генов – это интерфероны 1 типа, которые могут разрушать вирусную РНК и вредить её трансляции. ИЛ-1, TNF – это представители цитокинов. Это тоже защитные белки, которые выйдут из клетки, прореагируют со своими рецепторами и обеспечат иммунологическую защиту.

ЛЕКЦИЯ №2. КЛЕТОЧНАЯ СТРУКТУРА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Иммунная система основана на иерархии постоянно обновляемых популяций специализированных клеток.

Иммунные клетки очень быстро делятся и обновляются. Эритроциты отвечают за перенос кислорода по крови, а тромбоциты отвечают за то, чтобы она не вытекала из места повреждения. Тучные клетки, макрофаги и ДК находятся только в тканях, а моноцит путешествует по крови. Т- и В- лимфоциты в микроскопе не отличить, только если В-клетка не станет плазматической.

Дендритная клетка осуществляет связь между врожденным и адаптивным иммунитетом. Она приспособлена для улавливания сигналов от патогенов, миграции в лимфоузлы и взаимодействия с Т-клетками. Она посылает несколько информационных сигналов: об обнаружении чужеродного антигена, о воспалительной реакции и дополнительный цитокиновый сигнал. Эти клетки открыл Ральф Штайнман, получивший Нобелевскую премию в 2011 году. Под микроскоп эритроцитов на 3 порядка в крови больше, чем лимфоцитов. Лимфоциты имеют большое ядро и маленький ободок цитоплазмы. Это основные клетки адаптивного иммунитета.

В лимфатическую систему входит тимус – это орган, в котором развиваются Т-лимфоциты, а В-лимфоциты у млекопитающих развиваются в костном мозге. Основное кроветворения в ребрах и других пористых костях. У птиц развитие В-лимфоцитов происходит в Фабрициевой сумке. Костный мозг и тимус – это первичные лимфоидные органы. Их покидают наивные лимфоциты – это зрелые, готовые к функционированию лимфоциты, но не встретившиеся с антигеном. Большинство наивных лимфоцитов выйдут в кровяное русло, но никогда не встретятся с антигеном и погибнут.

Лимфоцит встречается с дендритной клеткой, мигрировавшей из участка воспаления в лимфоузел, которая несет ту молекулярную структуру, которую лимфоцит должен распознать. Происходит активация –распознавание рецепторов (сигнал 1), костимуляция (сигнал 2) сообщает о том, что сработал врождённый иммунитет. Далее лимфоцит делится, получается целая популяция эффекторных лимфоцитов с одинаковой антигенной специфичностью. В процессе иммунного ответа формируются клетки памяти, которые могут существовать всю жизнь. Они мигрируют в костный мозг и ждут встречи с той же самой молекулярной структурой.

Т-лимфоциты делятся на Т-киллеры (цитотоксические Т-лимфоциты, CTL) и Т-хелперы, которые могут быть нескольких типов (Th1, Th2, Th17, Tfh, Treg).

В-лимфоциты распознают антигены и производят антитела. В-лимфоцит, производящий антитела, называется плазматической клеткой. Клетки памяти могут формироваться, по-видимому, из всех основных популяций лимфоцитов. Есть лимфоциты, напоминающие клетки врожденного иммунитета. Это название для нескольких различных популяций, например, для естественных киллеров и других. Они не многочисленны и на анализе крови их не видно. Это звено связывает врожденный и адаптивный иммунитет. Выполняют более «врожденные» функции, обеспечивают реакцию на изменение гомеостаза тканей и стресс.

Клональная селекция лимфоцитов

Как обеспечивается необходимый репертуар рецепторов лимфоцитов, распознающих молекулярные структуры патогенов и не реагирующих на свое? Это называется клональная селекция. Из клетки-предшественника развивается большое количество лимфоцитов, которые несут рецептор определенной специфичностью. Для некоторых случайно появившихся рецепторов не найдется лиганда, а для некоторых найдутся собственные лиганды, вот они должны быть уничтожены. В идеале должна остаться популяция лимфоцитов, не распознающих собственные антигены, иначе будет атака против собственных тканей. При взаимодействии с чужеродным антигеном происходит активация, пролиферация, и в итоге получается целая популяция эффекторных лимфоцитов. Франк Бёрнет вместе с Питером Медавара придумали эту теорию, не зная никаких молекулярных деталей. Получили Нобелевскую премию за открытие приобретенной иммунологической толерантности.

Антигенраспознающие рецепторы лимфоцитов

Как рецепторы выглядят структурно? На поверхности В-лимфоцитов имеется комплекс из четырех полипептидов – две тяжелых (H) и две легких цепи (L), сшитых S-S-мостиками. Та же самая молекула без трансмембранного домена – это антитело, которое производит плазматическая клетка. Имеется вариабельный домен, на торце его поверхности есть уникальная молекулярная структура. Эта часть называется Fab (antigen-binding). Есть Fc – константный фрагмент, который у антител одинаковый. На нем располагаются различные молекулярные группы, обеспечивающие различные эффекторные функции.

Рецептор Т-лимфоцитов похож на Fab-фрагмент – это два полипептида, связанных S-S-мостиком. В растворимом виде они не встречаются, всегда закорены на мембране.

Антиген – это вещество, способное вызывать образование антител. Эпитоп – участок, который находится в контакте с вариабельным фрагментом антитела. В связывании антигена и антитела участвуют все молекулярные взаимодействия: водородные связи, силы Ван-дер-Ваальса, гидрофобные взаимодействия и электростатические.

Схема строения антитела

Тяжелая цепь бывает разной длины от 50-75 кДа. Имеются S-S-связи внутри иммуноглобулиновых доменов. Эдельман и Портер за установление этой структуры получили Нобелевскую премию. Каждый лимфоцит производит единственную тяжелую и единственную легкую цепь. Таким образом, в антителе имеется две одинаковых тяжелых и две одинаковых легкой цепи.

Взяв много антител, определив их аминокислотную последовательность, то в тяжелых цепях обнаружим три пика повышенной вариабельности – это гипервариабельные регионы. Поверхность антиген-связывающего центра образована

тремя участками гипервариабельных регионов. Значит, они и определяют комплементарность антигена и антиген-связывающего участка.

Классы антител

У людей и мышей пять классов антител.

IgM (иммуноглобулин M) - это эволюционно древний класс антител. Этот тот рецептор, с которым наивный лимфоцит выходит из первичного лимфоидного органа. Зачем нужны разные антитела?

IgG – основные иммуноглобулины, отвечают за большинство основных функций.

IgM – первая линия защиты.

IgA – секретируемое антитело, обеспечивают защиту на слизистых.

IgE – нейтрализация паразитов, аллергические реакции.

IgD экспрессируется вместе с IgM. За что отвечает – неизвестно.

IgM существует в виде пентамера и это связано с тем, что аффинность связывания IgM ниже, чем у остальных. Таким образом, у молекулы десять антиген-связывающих центров. IgA имеет секреторный компонент, позволяющий осуществлять секрецию антител на слизистой.

Распознавание антигенов Т-клетками

α и β Т-клетки – это основные клетки, обеспечивающие иммунную защиту, распознают фрагменты пептидов, которые могут быть где угодно. Требуется, чтобы эпитоп хорошо связывался с МНС (у человека МНС называется HLA). Молекула МНС представляет на поверхности клеток любые фрагменты клеточных белков. Эта комбинация МНС/пептид распознается Т-клеточным рецептором.

Ко-рецепторы Т-лимфоцитов

Это CD8 и CD4. Это дополнительные молекулы, которые находятся рядом с Т-клеточным рецептором и распознают только МНС. Молекулы МНС бывают двух классов. На всех клетках организма есть МНСI класса. Ко-рецептор к нему – это CD8. Молекулы МНСII находятся на поверхности антиген-презентирующих клеток (это дендритные клетки). Именно дендритная клетка, активированная в участке воспаления, будет нести много МНСII, на которой будет много элементов чужеродных пептидов. Такая клетка будет представлять этот комплекс Т-хелперам. Ко-рецептор на его поверхности – это молекула CD4.

Исключение, при котором не требуется распознавание пептидов – это суперантигены. Это белки вирусного или бактериального происхождения, которые взаимодействуют с Т-клеточным рецептором и МНС, обеспечивая прочный контакт вне зависимости от того какой пептид там находится. Они активируют до 20% всех Т-клеток, что приводит к чрезмерной продукции цитокинов и подавлению адаптивного иммунитета. Пример – стафилококковый энтеротоксин.

МНС презентация

МНС показывает на поверхности фрагменты всего того, что плавает в цитоплазме. Протеосома постоянно нарезает неправильно свёрнутые белки. Очищает клетку от вирусов и прочего хлама. Часть материала утилизируется, а часть транспортируется в эндоплазматический ретикулум. Туда попадают и новосинтезированные молекулы МНСI, которые белки-шапероны держат в приоткрытом виде до того, когда подходящий пептид попадёт в пептид-связывающую бороздку. Затем комплекс МНС:пептид отправляется на мембрану путём экзоцитоза.

В случае МНСII источником пептида является белок/вирус/фрагмент бактерии, захваченный извне. Антигены, попавшие в эндосомы, деградируют до пептидов. Такие эндосомы сливаются с везикулами, в которых находится МНСII в комплексе со специальным белком - CLIP. Специальные белки раскрывают МНСII и позволяют пептиду связаться с комплексом, далее он отправляется на мембрану путём экзоцитоза.

Важным исключением является кросс-презентация. АПК умеют представлять антигенные пептиды в комплексе с молекулами МНСI, а не МНСII. Это явление называется **кросс-презентацией**, оно необходимо для эффективного цитотоксического ответа на вирусы, не заражающие АПК, а также на злокачественные опухоли. АПК заглатывает снаружи, переправляет пептид на МНСI. Без этого процесса невозможно понять, как происходит ответ на злокачественные опухоли и вирусы, не заражающие АПК.

Комплекс TCR/МНС/пептид

Дно бороздки состоит из β -слоев, а бортиками из α -спиралей. Пептид лежит в этой щели, контактируя с бортиками и дном этого связывающего канала. Бороздки МНСI и II похожи, но есть и отличия. Бороздка МНСI более закрыта с обоих концов и в нее помещается пептид из 8-10 аминокислот. В МНСII помещаются более длинные пептиды, так как щель в комплексе открыта с торцов.

Ярким свойством генов МНС является высокая полиморфность. Если картировать мутации, которые встречаются в генах МНС, то большая часть из них в антиген-связывающих карманах. Наиболее полиморфные аминокислоты непосредственно влияют на взаимодействие с пептидом, в результате каждый аллель МНС связывает свой репертуар пептидов.

Известно 1000 аллелей МНС. Если пептид не связался ни с одной из молекул МНС, то с точки зрения Т-клеточного звена иммунной системы данная инфекция/опухоль невидима. Одну и ту же инфекцию переносим по-разному, т.к. один и тот же вирус наша иммунная система воспринимает по-разному.

Молекулы МНС

Молекулы МНС распознаются Т-клетками, представляя им фрагменты пептидов (это МНС-рестрикция). Исключение – это суперантигены. Молекулы МНС полиморфны,

поэтому репертуар Т-клеточных эпитопов фактически уникален для каждого индивидуума. Несовпадение гаплотипов МНС создает большие сложности при трансплантации.

Расположение генов TCR и BCR в геноме человека

Гены, кодирующие антигенные рецепторы Т- и В-лимфоцитов, расположены в нескольких компактных локусах на нескольких разных хромосомах. Все гены TCR и BCR имеют сходное устройство и содержат несколько вариабельных генных сегментов, кодирующие константные части белковых цепей.

Мы имеем огромный репертуар рецепторов лимфоцитов в иммунной системе. Антитела можно получить практически на всё, что угодно. Рецепторов миллионы, все закодировать в геноме невозможно. Из 3 млрд пар оснований только несколько миллионов заняты кодированием рецепторов Т и В-лимфоцитов.

Перестройка генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов

В геноме хранится набор заготовок, из которых при VDJ-рекомбинации формируется комбинаторный ген, с которым происходят обычные события - сплайсинг, трансляция.

Синтез начинается с вариабельного домена, далее синтезируется домен, кодирующий константный участок. Последовательности заготовок родственны, но разные. У каждого лимфоцита уникальный набор заготовок. Сначала формируется репертуар возможных рецепторов, потом под них подбираются антигены.

Переключение синтез антител с мембранного на секреторный тип происходит при помощи альтернативного сплайсинга. Позади константной части гена имеются экзоны, которые входят в состав РНК на альтернативной основе. Либо красный (получаем растворимое антитело), либо зеленый (мембранный Ig). Клетка может иметь на поверхности мембран-связывающий рецептор и реагировать на антигены, а может ещё производить растворимые Ig. Управляя альтернативным сплайсингом можно регулировать соотношение мембранного и растворимого антител.

Промежуточные формы BCR и TCR необходимы для выживания лимфоцитов после экспрессии H и β -цепей.

Синтез тяжёлой и лёгкой цепи происходит одновременно. На одной из стадий развития В-лимфоцита перестроился ген тяжёлой цепи и на поверхности клетки появился рецептор. Пока лёгкая цепь в процессе созревания нужно обеспечить суррогатный рецептор на поверхности, т.к. с этого момент лимфоцит становится зависимым от любого сигнала от рецептора. Дальше происходит полное созревание, выход наивного лимфоцита, дифференцировка в селезёнке.

В тимусе с Т-клеткой происходят аналогичные процессы. Перестроилась β -цепь, но не готова α -цепь.

Существуют суррогатные цепи BCR и TCR. Два полипептида, каждый из которых кодируют по иммуноглобулиновому домену встраиваются вместо легкой цепи и образуются суррогатные Т-клеточные рецепторы. Такой рецептор не взаимодействует с реальными антигенами, но преВ-рецептор может взаимодействовать сам с собой, а преТ-рецептор может с собой образовывать кластеры. Этого достаточно развивающемуся лимфоциту, чтобы он думал, что что-то такое происходит. Смысл в том, чтобы подать внутрь клетки сигнал, что сформирована полноценная цепь, из которой получилась нормальная молекула, которая сумела сформировать правильную структуру, выйти на мембрану и принять форму, соответствующую форме BCR. Его присутствие на мембране показывает, что клетки способны синтезировать нормальные тяжёлые цепи иммуноглобулинов, и только такие клетки могут продолжать своё развитие, в противном случае они погибают апоптозом. Часто в процессе комбинирования VDJ-фрагментов получается нефункциональная цепь. Отсутствие преВ-рецептора на мембране приводит к отсутствию сигнала внутри клетки и это сообщает о том, что перестройка прошла непродуктивно. Это промежуточная аттестация. Аттестация на успешную сборку тяжелой цепи BCR или β -цепи Т-клеточного рецептора. Если аттестация не пройдена, то в клетке есть вторая копия такого же локуса, происходит переключение на нее. Пока перестраивается одна копия иммуноглобулинового локуса, то вторая копия молчит, с ней ничего не происходит. Если аттестация не пройдена, то включается вторая копия. Такой контроль гарантирует, что если производится полноценная тяжёлая цепь, то она одна. В случае Т-клеток, если производится полноценная β -цепь, то она только одна.

Перестройка генов иммуноглобулинов человека и мыши

В случае легкой цепи всё то же самое, только отсутствует D-сегмент. V - variable, D - diversity. В случае тяжелой цепи этот сегмент вносит дополнительное разнообразие в получающиеся рецепторы. Сусуму Тонегава в одиночку открыл соматическую перестройку рецепторов лимфоцитов. Штайнман в одиночку один открыл ДК.

В случае TCR β -цепь является аналогом тяжелой. В случае лёгкой цепи нет D-сегмента.

Ферменты, участвующие в VDJ-рекомбинации:

1. Рекомбиназа RAG-1 димеризуется с RAG-2 в процессе перестройки V-генов и формирует RAG-эндонуклеазу, ответственную за осуществление двунитевых разрывов ДНК.
2. Белки Ku70 и Ku86, образующие гетеродимер отвечают за удержание фрагментов ДНК в зоне перестройки гена.

3. ДНК-зависимая протеинкиназа и нуклеаза Artemis отвечают за «разрешение шпилек» (повторные одонитевые разрывы ДНК в участках её временного воссоединения).
4. Терминальная дезонуклеотидилтрансфераза - ответственна за нематричный синтез олигодезоксинуклеотидов (формирование N-вставок).
5. ДНК-лигаза IV отвечает за сшивку разрывов ДНК.

После завершения всех ферментативных реакция возникает готовый – перестроенный – вариант гена иммуноглобулина. Дополнительные контрольные механизмы (аллельное исключение) следят за тем, чтобы в клетке не появилось второго или третьего варианта каждой из цепей, составляющей антигенный рецептор. В результате возникает единственная антигенная специфичность, которую экспрессируют все потомки данного лимфоцита.

Структура рекомбинационных сигналов

Рядом с кодирующими участками сегмента в интронах расположены специфические последовательности нуклеотидов (RSS), которые представляют собой палиндромы, разорванные спейсером разной длины.

Существует правило 12/23, по которому сегменты могут соединяться только если у одной последовательности спейсер 23, а другой 12, и наоборот.

Это позволяет избежать пропусков D-сегментов в тяжёлых и β -цепях. Соединением по правилу 12/23 занят RAG-фермент.

Правило 12/23: ориентация сигналов в генах тяжёлых цепей иммуноглобулинов, а также β и γ цепей TCR делает невозможной VJ-рекомбинацию в этих локусах.

Два белка RAG1 и RAG2 образуют тетрамер. За узнавание и расщепление ДНК отвечает RAG1, а RAG2 стабилизирует тетрамер и следит, чтобы взаимодействие происходило с компонентами транскрипционно активного хроматина. Эти два гена - обломки от некоторого предка современного транспозона, который попал в наши клетки 500 млн лет назад.

RAG1 соединяет вместе V- и J-сегменты. Отрезает интрон, оставляя замкнутые шпильки.

Далее белки Ku70 и Ku80 держат их рядом. Шпильку раскрывает протеинкиназа.

Терминальная дезонуклеотидилтрансфераза осуществляет нематричный синтез, случайно навешивая нуклеотиды на свободные концы ДНК. Это увеличивает разнообразие, но и создаёт риск сбоя рамки считывания, что приведет к дефектному пептиду и провалу теста на стадии преВ-рецептора.

Два случайно сгенерированных конца слипаются. Лигаза сшивает. Отрезанный интрон зашивается и образуется сигнальное кольцо, которое можно использовать для детекции клеток, недавно вышедших из первичных лимфоидных органов.

В итоге V- и J-гены соединяются, при этом содержат случайно сгенерированные нуклеотиды, которые кодируют случайные аминокислоты.

Мало того, что случайно выбрали заготовки генов, но еще на каждый стык наставляли случайных генов.

Для Т-клеточного рецептора VDJ-рекомбинацией заканчивается генерирование разнообразия, а В-клетки проходят через ещё один раунд мутагенеза и селекции. Соматический мутагенез и одновременное переключение изотипов антител происходит во вторичных лимфоидных органах, а именно во временно образующейся структуре - герминальном центре.

В-клетки, несущие разные варианты рецептора, вступают во взаимодействие с фолликулярными дендритными клетками. Они держат на поверхности антигены, представляют их В-клеткам, которые будут за них конкурировать. Запуская мутагенез вариабельного фрагмента. Те клетки, которые имеют более высокое сродство, получают через свой рецептор сигнал и выживают, некоторые из них превращаются в клетки памяти, другие превращаются в плазматические клетки, которые производят антитела. На выходе получаем улучшение аффинности связывания на 3 порядка.

Переключение изотипов антител

Одновременная экспрессия IgM (константная часть C μ) и IgD (C δ) не требует переключения классов и регулируется альтернативным сплайсингом. Переключение на другие классы запускается белком AID, который привлекается в участки с активной транскрипцией и превращает цитидин в уридин.

Система репарации превращают эти модификации в двухцепочечные разрывы, которые соединяются вместе с одновременным выбрасыванием петли, кодирующей "ненужные" S-области.

Точное соединение не требуется, так как все S-участки находятся в интронах. Перестроенный VDJ-ген в виде готового экзона, кодирующего вариабельный домен. Есть все экзоны, кодирующие константные части M, D, G и A классов. Всё находится в виде заготовок в одном локусе. На стадии первично активированной В-клетки происходит экспрессия IgM и IgG, это регулируется за счет альтернативного сплайсинга. В герминальном центре включается AID, его активность сопряжена с транскрипцией. Транскрипция M-константной части уже идёт, а транскрипция с других промоторов начинается в зависимости от того, какие цитокиновые сигналы получает В-клетка.

Разные комбинации цитокинов будут включать разные промоторы. В данной ситуации некий набор цитокинов включил промотор перед экзонами, кодирующими константную часть G3-изотипа.

Имеются специфические S-последовательности (G-rich), которые являются мишенью для AID'а. Два разрыва S-последовательностей собираются вместе, система репарации сшивает вместе, петля удаляется.

Последовательность, кодирующая новую константную часть, подставляется существующему В-гену.

ЛЕКЦИЯ №3. ПЕРЕДАЧА СИГНАЛОВ ОТ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА

После того, как рецептор распознал соответствующие структуры, внутрь клетки передается сигнал, который связан с действием адаптерных белков, далее задействованы сигнальные киназы, активируются ТФ (главный NF-κB - семейство из нескольких белков, которые могут образовывать гомо- и гетеродимеры; IRF - ТФ, которые регулируют интерферонную систему).

Все наши клетки имеют врожденную сложную систему против вирусной системы. Она активируется, когда на клетку подействовали интерфероны 1 типа. Они сами по себе являются частью врождённого иммунитета. Существует внутриклеточный механизм, который в ответ на интерферон 1 типа запустит механизм, мешающий репликации вируса. Далее под влиянием ТФ находятся гены-мишени (ИЛ1, ТНФ, интерфероны первого типа (α и β), защитные пептиды). У дрозофилы нет цитокинов, вся защита осуществляется с помощью дефензинов - защитных пептидов.

Принципы передачи сигнала:

1. Гомотипические взаимодействия в системах внутриклеточной сигнализации.

- TIR домен ("Toll and IL-1 Receptor") – важен для пристыковки адаптера MyD88 к TLR и ИЛ-1/18 семейства рецепторов.
- DD – «домен смерти» (death domain) участвует в передаче сигнала в системе рецепторов TLR, IL-1/18, Fas, TNF (ФНО).
- DED (death effector domain) – то же.
- CARD (caspase recruitment and activation domain) – то же, плюс сборка инфламмосомы.
- PYD (pyrin domain) – сборка инфламмосомы.

У всех Toll-рецепторов во внутренней (цитоплазматической) части находится TIR-домен. Биоинформатики распознали, что есть гомология между внутренней частью Toll-рецептора и внутренней частью рецептора для IL-1 (цитокина). Этот цитоплазматический домен представляет собой платформу, на которую будет собираться сигнальный комплекс. Первый белок, который сядет, Myd88. Этот адаптор может пристыковываться ко всем рецепторам, относящимся к Toll-семейству, также к рецептору IL-1. Оказалось, что у них во внутриклеточной части рецепторов есть несколько типов белковых доменов. Один из них DD (death domain), т.к. он первоначально был открыт у рецепторов, которые сигнализируют на апоптоз. Это универсальный белковый модуль, который используется во многих системах.

DD – «домен смерти» (death domain) участвует в передаче сигнала в системе рецепторов TLR, IL-1/18, Fas, TNF (ФНО).

Домен DED. Примерно то же самое. Это некий белковый модуль, не обладающий энзиматической активностью. Единственное (главное) свойство модулей,

использующихся во внутриклеточной сигнализации во врожденном – это способность участвовать в гомотипическом взаимодействии. Если два белка имеют DD, то они за DD и соединятся. Если белок с DD, а второй с DED, то никак не поженятся.

DED домен и CARD домены не похожи по первичной структуре, но по третичной есть определенное сходство (6 или 7 α -спиралей).

Как происходит передача сигнала?

Активация, индуцированная близостью.

Происходит сборка мультибелковых комплексов в частности за счёт гомотипического в/д доменов, далее за счёт того, что некоторые части белка оказались близки друг другу, в них активируется энзиматическая активность (киназная или протеазная). Изначально активность была «молчащей», потом стала протеазой или киназой, передающей сигнал. В Myd88 нет активности, но в том белке, который прилип к нему, может существовать спящая ферментативная активность.

Аналогии в сигнальных каскадах Toll-TLR дрозофилы и млекопитающих. Передача сигнала от рецепторов TLR/IL1/IL18

Есть прямое соответствие между дрозофилой и нашим врожденным иммунитетом. У дрозофилы говорим про Toll-pathway, в т.ч. связанный с сигналом эмбрионального развития.

Дрозофила. TR, дрозофилиный dMyd88, который за DD пристыковался к TIR-домену, т.к. в нём есть этот домен. Образуется гомотипическое в/д. Но у этого адапторного белка есть другой домен гомотипического в/д, за этот домен может пристыковаться другая молекула, у которой есть второй домен (DED). За него пристыковывается белок Pelle, у человека пристыковывается заготовка киназы IRAK. Существуют вспомогательные факторы. Есть некий сигнальный комплекс, в который входит Cactus-киназа, у людей IKK. Эта киназа фосфорилирует Cactus белок, у человека - I κ B. Это ингибитор NF- κ B.

Этот ТФ неактивен, т.к. в комплексе с белковым ингибитором (I κ B). Если по специфическим сериновым основаниям профосфорилировать I κ B, то он полиубиквитинируется и отправится в протеасому. Тогда NF- κ B освобождается от ингибитора, который закрывал сигнал ядерной локализации. Ингибитор закрывал НЛС, не давал заготовке ТФ перейти в ядро, где должен включить ген, поэтому плавает в цитоплазме.

Подытожим, лиганд связался с рецептором, произошли конформационные изменения, открылся DD, на него налип адапторный белок, на него киназа, прокиназила киназу, прокиназила ингибитор, он отвалился, стал субстратом для убиквитинирования. NF- κ B перешёл в ядро. Стал распознавать те промоторы, на которые был заточен.

Суть слайда в важности модификации белков из-за добавления убиквитинов. Раньше считали, что полиубиквитинирование - сигнал для деградации. Теперь

выяснилось, что есть разные способы полиубиквитинирования. В зависимости от того, какой лизин в молекулу убиквитина используется для построения полимерной цепи, это может быть сигнал на деградацию (IκB деградировал, так как был полиубиквитинирован). Полиубиквитинирование по Lys63 позволяет построить на белке некую новую молекулярную платформу, на которую могут сесть другие белки.

ПолиУ по Lys48 – сигнал на отправку в протеасому. Многие сигнальные комплексы собираются за счет того, что какой-то белок был модифицирован убиквитинированием.

Передача сигнала от тех рецепторов, которые смотрят внутрь эндосомы, а сигналият в цитоплазму. Рецепторы, которые должны запустить противовирусный ответ. Белок TRIF пристыковался к рецептору за счёт гомотипического взаимодействия. Активируются транскрипционные факторы IRF3 or IRF7. Они запустят транскрипцию генов либо интерферона β, либо интерферона α и β. Далее интерфероны, произведенные в клетке в ответ на распознавание вируса, выйдут из неё и провзаимодействуют с клетками, у которых есть интерфероновый рецептор. Именно в них запустится противовирусная защита. Все клетки, которые имеют рецепторы к интерферонам первого типа, получают сигнал, и в них включится противовирусная программа.

2) NOD-подобные рецепторы (NLR).

Семейство рецепторов. NACHT – домен, объединяющий все рецепторы.

10 таких рецепторов.

Их тоже отличает наличие некоторых доменов, которые участвуют в гомотипическом в/д. Смысл такой же: помощь в сборке мультибелковых комплексов, которые представляют собой структуры, необходимые для инициации сигналинга.

Лиганды для NLR берутся из клеточной стенки бактерий. Это внутриклеточные (цитоплазматические) инфекции! Источником лигандов являются пептидогликаны. Две цепи, которых сшиты пептидными мостиками. Различные куски этой системы и являются лигандами, паттерном чужого.

NOD1 – короткий пептидный мостик. NOD2 - мурамилдипептид.

Передача сигнала

В цитоплазме плавает NOD рецептор. LRR repeats - каркас Toll-рецепторов. У NOD-рецептора есть домен гомотипической агрегации – CARD, за который рекрутируется киназа RIPK2. Образуется димер рецептора. Киназа фосфорилирует еще одну киназу TAK1, она фосфорилирует ингибитор NF-κB. Ингибитор полиубиквитинируется по Lys48, отправляется в протеасому. NF-κB высвобождается, готов к транскрипционной активности, т.к. открыт NLS, м.б. перенес в ядро, запустить транскрипцию тех генов, у которых в промоторах есть участки, с которыми может связаться.

Инфламмасомма

Это сигнальная структура, которая образуется в результате сигналинга NLR в цитоплазме. Поступает некий сигнал на внутриклеточную инфекцию. За счет доменов, которые участвуют в гомотипических в/д, образуется мультибелковый комплекс, в который за счет принципа активации, индуцируемой близостью, вовлекаются неактивные заготовки каспаз (1 и 5). В этом комплексе они сами себя активируют за счёт активации, индуцируемой близостью. Прокаспаза 1 превращается в каспазу 1 (сама себя активирует, надрезает). Каспазы разрезают заготовки для ИЛ-1 β и IL-18 (цитокины), необходимые для эффекторной фазы распознавания. В цитоплазме плавают заготовки ИЛ-1 β (проинтерлейкин-1). Каспаза находит заготовку, она становится активным цитокином, выходит из клетки, действует на те клетки, у которых есть рецептор к ИЛ-1.

Toll-рецепторы располагаются на поверхности клетки и внутри эндосом. Активация именно интерферонов первого типа.

NOD-рецепторы в цитоплазме. Нет активации транскрипционной программы. *Какие программы запускает ИЛ-1 через рецепторы?* Те же самые программы, что запускает Toll-рецептор, т.к. внутриклеточная часть рецептора ИЛ-1 такая же, как и у Toll-рецептора. Опять будет NF- κ B и IRF.

Toll-рецепторная программа запускается напрямую, а в случае инфламмасы запускается с помощью дополнительного этапа. Исход один.

Цитокины

- Секретируемые* полипептиды, участвующие в передаче сигналов между клетками. Некоторые цитокины заякорены на мембране через трансмембранный домен. Передача сигналов такая же, как и у растворимых.
- Действуют локально (паракринно или аутокринно), во многом аналогичны гормонам (действующим дистально).
- Могут продуцироваться многими видами клеток, в т.ч. после иммунного распознавания.
- Действуют и сигнализируют через высокоаффинные рецепторы.
- Участвуют в регуляции гемопоэза (эритропоэтин участвует в терминальной дифференцировке эритроцита), воспаления и всех ветвей иммунитета.

Сигналы, индуцируемые цитокинами

- Пролиферация, дифференцировка, активация, выживание – в значительной степени, через каскады, приводящие к активации транскрипционных факторов, далее к

транскрипции генов. ТФ включают те гены, которые нужны для осуществления той или иной функции.

- Программируемая клеточная гибель (апоптоз, некроз, некроптоз, аутофагия), в т.ч. при отсутствии сигналов выживания, – через специальные сигнальные каскады, связанные с активацией протеаз. Это не транскрипция, а последовательный запуск специальных протеолитических ферментов - каспаз.
- Миграция – через специальные сигнальные каскады. В очаге воспаления образуются хемотактические факторы, которые привлекают клетки иммунной системы. Часть хемотактический сигналов осуществляется цитокинами, которые называются хемокины.
- (Цитокинов намного больше, чем каскадов!).

Пострецепторная передача сигнала некоторых семейств цитокинов напоминает такую, как у рецепторов клеток врожденного иммунитета

Это связано с тем, что есть адаптерные белки, которые имеют свойство образовывать гомодимеры/олигомеры за счет того, что у них есть домены гомотипического взаимодействия.

У TLR и рецептора к ИЛ-1 есть белковый TIR-домен, который приводит к тому, что в этот рецепторный комплекс рекрутируются адаптерная молекула MyD88. У неё есть второй домен гомотипического взаимодействия DD, он участвует в том, что на MyD88 налипнут другие молекулы. В какой-то момент в комплекс будет рекрутирована киназа. Дальнейшая передача сигнала будет каскадно происходить с помощью последовательного фосфорилирования белков (одна киназа фосфорилирует неактивную заготовку другой киназы, последняя становится активной и сигнализирует на кого-то ещё). В конце активируются ТФ.

Есть явление гомотипической агрегации доменов. Белки разные, но есть сходные домены (структурно по третичной структуре). После того, как белки пришли в контакт, то по принципу активации, индуцируемой близостью, происходят конформационные изменения, далее активация ферментативной активности (киназная, протеазная).

Таблица основных цитокинов (классификация по типу рецептора)

Классифицируют по типу передачи сигнала от рецептора. Именно тип передачи сигнала от рецептора определяет, что делает эта группа цитокинов.

I группа - цитокины семейства ИЛ-1. Сигнализируют, как TLR. ИЛ-1 самый древний цитокин.

II группа - цитокины семейства интерферона/интерлейкина 10. К этому семейству относятся интерфероны первого типа (α и β), интерфероны второго типа (γ). Функции разные, но принцип передачи сигнала похож.

Интерферон первого типа через собственные рецепторы в любых клетках способен запустить некую внутреннюю программу против вирусной защиты.

Включаются гены, продукты которых интерферируют с некоторыми критическими стадиями самопроизводства вирусов (репликация, трансляция и т.д.).

III группа - цитокины ФНО запускают транскрипционные сигналы, так и апоптоз. Их около 20 (это много).

Гемопоэтины. Большинство цитокинов участвуют на конкретных стадиях гемопоэза.

XII группа – 7 трансмембранных доменов. Это рецепторы хемокинов. Древние рецепторы, связанные с хемотаксисом. Хемотактические цитокины, которые подразделяются на 4 подгруппы – CC и CXC - две главные из них, есть ещё C и CX3C. Хемокинов примерно 100 (хемотактических цитокинов, которые действуют через родопсиноподобные рецепторы). Примерно 100 цитокинов не хемокинов.

Передача сигнала определяется тем, что у рецептора во внутриклеточной части (киназный каскад или налипание молекул, которые что-то запускают).

Один ген INF- β ,

INF- α кодирует больше 20 генов, сколько-то из них работает.

Устройство рецепторов

1. Есть гомодимерные рецепторы для эритропоэтина и гормона роста. Связывание лиганда □□сшивку мономеров. Из-за этого

- либо сблизилась внутриклеточные части рецептора, и образовалась новая молекулярная платформа;

-либо произошли конформационные изменения во внутренней части рецептора из-за связывания снаружи. Далее налипание, активации киназы и т.д.

2. Гетеродимерные рецепторы. Некоторые ИЛ рецепторы можно объединить в большую группу, т.к. одна из гетеродимерных цепей одинакова, а вторая, которая определяет высокую аффинность связывания, разная.

Выделяют группу рецепторов для некоторых цитокинов (ИЛ3, ИЛ5, GM-SCF), у которых есть общая β -цепь.

Выделяют группу рецепторов для некоторых цитокинов (ИЛ2, ИЛ4, ИЛ7, ИЛ9, ИЛ15), у которых есть общая γ -цепь. Мутация в этой цепи приводит к отсутствию сигналинга от всех цитокинов (ИЛ2,4,7,9,15). Эти факторы, в частности ИЛ27 необходимы для лимфопоэза. Значит, у людей этих не будет развита лимфоидная система и со врождённым иммунитетом также будут проблемы.

3. Семейство TNF рецепторов – это гомотримерные рецепторы. Каждая молекула цитокина в/д с бороздкой между двумя субъединицами (Fas, CD27, 30, 40).

4. Семейство хемокинов - 4 группы, две большие и в двух по одному. Всего около 100 находятся на поверхности клетки. Они определяют её способность поляризоваться, менять каркас, определять перед и зад и ползти в направлении градиента хемокина.

Классификация цитокинов и хемокинов: по типу рецептора и передаваемого сигнала

- **EGF, PDGF, VEGF, M-CSF, SCF** – «встроенные» тирозиновые киназы □□MAPK каскады. Рецепторы на эти в своей внутриклеточной части содержат тирозиновую киназу. Активация рецептора приводит к активации ферментативной активности, которая дальше с помощью последовательного фосфорилирования запускает MAPK-каскад.
- **TGF-β (1-3)** – димер димеров, «встроенные» серин-треониновые киназы □□SMAD-coSMAD транскр.факторы. Идёт сигнал на ТФ, который не используются другими семействами.
- **Гемопоэтины** (кроме M-CSF, SCF) и **большинство интерлейкинов** (кроме IL1, 8, 17, 18, 33) □□JAK-STAT. Рецепторы гемопоэтинов сигналият через JAK-STAT pathway.
- **Интерфероны и IL10** □□JAK-STAT.
JAK - тирозиновая киназа, STAT - заготовка ТФ. Пример сигналинга рецептора на транскрипцию генов. Последствия сигналинга будут определяться теми генами и продуктами, которые включились.
- **Семейство IL1** (IL1α,β, IL1Ra, IL18, IL33) – адаптерные молекулы MyD88 (как в TLR), TRAF, IRAK □□NFκB (класс.) Сигналият через адаптерные молекулы, это напоминает сигналинг TLR. Результат - активация NFκB.
- **Семейство TNF** (2 подсемейства) адаптерные молекулы TRAF, RIP □□NFκB (классический и альтернативный)
одно из подсемейств сигналиит на NFκB, может подавать
+ сигнал инструктивного апоптоза через другой белковый модуль - FADD, TRADD, каспазы 8/10.
- **Хемокины** - 7-трансмембранные домены, сигналият через G-белки.

Ключевые медиаторы передачи сигналов от рецепторов цитокинов: JAK (киназы) и STAT (транскрипционные факторы)

JAK- тирозиновые киназы: JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2.

Есть 7 генов (белков), которые представляют собой заготовки ТФ - STAT.

Они запускают белок-киназный каскад, который приводит к фосфорилированию заготовок ТФ, после чего они становятся активны, перемещаются в ядро, включает нужные гены.

JAK-киназы не являются частью рецептора, но они сидят на нем (предассоциированы с ним). Связался лиганд, рецепторы сшили, киназы сблизилась. В результате близости они активировали друг друга, перекрёстно профосфорилировали. Фосфатные группы пришили и к другим участкам рецептора

- на нём возникло несколько новых фосфатных групп
- изменилась молекулярная поверхность
- к рецептору прилипает неактивная заготовка STAT. После создания платформы для посадки, он туда сел и его профосфорилировали по тирозину.

□□снижение сродства к рецептору, появление сродства друг к другу, □□образование активного димера. Есть сигнал ядерной локализации, в ядре запускает транскрипцию тех генов, которые содержат соответствующую нуклеотидную последовательность (~10 нуклелидов).

Использование комбинаций Jak/STAT рецепторами

Нет прямого соответствия, что эта комбинация запустит эти гены.

ИЛ13 использует 3 киназы (JAK 1,2, Tyk2), но активирует STAT6.

ИЛ12 активирует STAT4. Все рецепторы могут активировать более, чем 1 JAK-киназу и более, чем 1 STAT-фактор.

Схема запуска апоптоза.

Эффекторные каспазы (3, 6 и 7) ответственны за расщепление многих белков, чтобы осуществить апоптоз. Они присутствуют в клетках в виде зимогенов, представляющих собой неактивные димеры. Активация эффекторных каспаз происходит при расщеплении зимогенов по специфическим сайтам, содержащим остатки аспартата. Одна из протеаз, способных к активирующему расщеплению эффекторных каспаз, называется гранзим В.

В отличие от эффекторных, инициаторные каспазы (2, 8, 9, 10 у млекопитающих) находятся в клетках в форме неактивных мономеров. Активация происходит при объединении двух мономеров в димер.

Рецепторы клеточной гибели представляют собой подгруппу относящихся к семейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNF) позвоночных. Они включают TNFR1, Fas (=CD95 or APO-1) and TRAIL (TRAIL-R1, -R2 у человека называются DR4 и DR5). Эти тримерные рецепторы связываются со специфическими лигандами (TNF, Fas-лиганд или TRAIL) и могут быстро запускать апоптоз.

Образование тримера рецептора □□рекрутирование ФАДД в рецепторный комплекс за счет гомотипического взаимодействия через DD. У ФАДД есть второй компонент гомотипического взаимодействия - DED, на него рекрутировалась молекула, которая является предшественником каспазы 8.

Прокаспазы, находясь в рецепторном комплексе, сближаются, друг друга активируют, образуется активная каспаза 8, которая запустит сигнальный каскад апоптоза через активацию каспазы 3 и 7.

Хемокины 4 семейств выглядят сходным образом.

C chemokines, CC chemokines, CXC chemokines, CX3C chemokines.

Хемотактические цитокины (хемокины)

- Взаимодействуют с родопсин-подобными рецепторами.

- Сигналят - через G белки, ГТФазы $\square\square$ на цитоскелет (позволяет клеткам поляризоваться),
PLC $\square$ IP3 $\square$ Ca $^{++}$ $\square$ MAPK;
PLC $\square$ DAG $\square$ PKC
- В частности, из-за этого клетка поляризуется и может двигаться по градиенту концентрации хемокина.
- Гомеостатические - связаны с поддержанием числа лейкоцитов в лимфоидных органах.
- Индуцируемые – например, провоспалительные, привлекают нейтрофилы в очаг воспаления.

Есть 2 типа хемокинов: индуцируемые и гомеостатические.

- **Индуцируемые** (более распространенные) образуются в очагах воспаления (в частности при активации системы комплемента), привлекают в очаг воспаления клетки, которые должны что-то делать (фагоцитировать, осуществлять реакции адаптивного иммунитета).
- **Гомеостатические** отвечают за правильное заполнение лимфоидных органов клетками иммунной системы. Стромальные клетки лимфоидных органов сигналият, чтобы туда пришли и заселились определенные клетки иммунной системы для дальнейшего взаимодействия, без которого невозможно развитие иммунного ответа.

RIG-подобные рецепторы (RLR).

Три рецептора участвуют в противовирусной защите.

Врожденное распознавание вирусов

1. В отличие от бактерий, у вирусов нет собственных метаболических путей, они реплицируются в клетке хозяина.
2. Вирусная нуклеиновая кислота внутри клетки едва ли может быть «паттерном» чужого. Нужен дополнительный критерий! TLR3,7,8,9 распознают вирусы не на клеточной мембране, а на мембране эндосомы – везикуле, в которую попадает вирус. Вирусная НК внутри клетки не может стать паттерном чужого. Если она внутри везикул, то может им стать.
3. Узнают одноцепочечную РНК (RIG-I) или двуцепочечную РНК (MDA5) в цитоплазме.
4. RLR (в цитоплазме) распознают «неэкспированный» 5'-конец РНК вируса, который по структуре отличается от хозяйской мРНК.
5. Содержат CARD домен, который после активации и конформационного изменения становится доступным и рекрутирует каспазы.
6. Конечным результатом является активация системы интерферонов первого типа.
7. Coronaviruses использует 2'-О-метилтрансферазы для построения структур, которые напоминают кэпы эукариотической мРНК.

ЛЕКЦИЯ №4. ЛИМФАТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА

Когда происходит встреча со специфическим антигеном, лимфоцит активируется, начинает делиться, клон покидает лимфоузлы и отправляется в участок инфекции.

Некоторые поверхностные маркёры Т-клеток

CD (cluster of differentiation, cluster designation) - номенклатура поверхностных мембранных белков лейкоцитов. Она предложена для упорядочивания большого количества моноклональных антител, узнающих антигены на поверхности лейкоцитов человека. Не все CD - белки, не все поверхностные, не все встречаются на лейкоцитах. Главный критерий - существование более одного клона антител, способных узнавать именно эту молекулу. На конференции ученые сравнивают полученные антитела. Когда антитело из двух разных лабораторий начинают узнавать одну и ту же популяцию клеток, то антитело и узнаваемой молекуле приписывается номер CD.

CD3 - компонент мембранного комплекса Т-клеточного рецептора. На всех стадиях развития Т-клетки эта молекула есть. Всегда есть и молекула CD28, которая отвечает за прием костимуляторного сигнала. Этот сигнал говорит о том, что произошло срабатывание врожденного иммунитета. Зелёным цветом обозначены молекулы адгезии, рецепторы хемокинов и цитокинов, которые встречаются на наивных и клетках памяти. Они отвечают за клеточную адгезию, что бы лимфоцит прилипал туда, куда надо. Это те молекулы, которые нужны и наивным клеткам, и клеткам памяти, чтобы находиться в одних и тех же местах, чтобы «патрулировать» организм.

Красного цвета молекулы встречаются на эффекторных клетках, которые борются с инфекцией. Среди них есть и молекулы адгезии. CD25 – это часть высокоаффинного рецептора ИЛ-2. Клетка памяти имеет общие черты с наивными и эффекторными клетками. Она, с одной стороны, уже прошла эффекторную стадию и знает, как бороться с антигеном, с другой стороны, ведет себя, как наивная клетка, циркулируя по лимфатической системе и костному мозгу. Соответственно, ей нужны молекулы, характерные для тех и других типов клеток. Для эффекторных клеток характерны молекулы, которые отвечают за движение и атаку на клетки-мишени.

Лимфоцит, который неспособен протиснуться в ткань, является бесполезным, поэтому нужны молекулы адгезии, помогающие ему прикрепиться к эндотелию. На всех лейкоцитах есть CD11a (другое название – LFA-1).

Антигенные рецепторы лимфоцитов

У рецепторов В-лимфоцитов практически отсутствуют внутриклеточный домен, значит, не может передать никакого внутриклеточного сигнала. Передача происходит при помощи дополнительных белков, которые ассоциированы с BCR, но ковалентно не связаны. Это Ig α и Ig β - маленькие иммуноглобулиновые домены, ковалентно связанные между собой, имеющие внутриклеточный домен, в котором присутствует белковый мотив - ITAM. Это белковая последовательность, содержащая тирозин, фосфорилирование которой является сигнальным событием. Фосфорилирование происходит в результате активации рецепторов.

С Т-клеточным рецептором ассоциированы субъединицы ϵ , δ и γ , которые объединяются одной молекулой CD3.

Наиболее используемые антитела - это против CD3 ϵ . Особенностью всех белков в составе Т-клеточного рецептора является наличие заряженных аминокислот в составе трансмембранного домена. *Не тривиально* $\square$. У большинства рецепторов трансмембранные домены гидрофобны. Из разноименных зарядов собирается хороший кластер; в/д между заряженными а/к внутри липидного слоя играет важную роль в сборке этого комплекса.

Во всех цитоплазматических участках имеется ITAM мотив. Все содержат тирозины, фосфорилирование которых инициирует передачу сигнала.

Кластеризация антигенных рецепторов лимфоцитов необходима для передачи сигнала.

Для запуска сигнала необходимо собрать рецептор в кластер. Один трансмембранный участок никакого усилия не передаст. Нужно собрать всё в кучу, при этом соберутся внутриклеточные домены. Кластеризацию молекул BCR обеспечивает связывание с мультивалентным лигандом. Важную роль в кластеризации играют корецепторы. Эффективной кластеризации можно добиться при помощи антител. Для BCR ключевым моментом является взаимодействие с антигеном. Связывание антигенов, в котором много одинаковых эпитопов, вызывает эффективную активацию В-клеток без дополнительной клеточной помощи.

В случае TCR то же самое. В кластеризации молекул TCR важную роль играют заряженные аминокислоты в составе трансмембранной части. В лаборатории можно добиться эффективной кластеризации при помощи антител. Антитело (а не антиген) узнает рецептор, сводит их вместе. С точки зрения В-клетки будет то же самое - соберутся вместе рецепторы, запустят сигнал.

Взаимодействие В-лимфоцитов в герминальных центрах

В герминальном центре делящиеся В-клетки конкурируют за антиген на фолликулярных дендритных клетках (ФДК) и получают сигналы ко-стимуляции от Т-лимфоцитов. В-клетки при гипермутагенезе и переключении изотипов взаимодействуют с ФДК и с Т-клетками. Tfh - Т-клетка, пришедшая в герминальный центр,

экспрессирует дополнительные рецепторы на поверхности. При том и другом взаимодействии, В-клеточному рецептору помогают дополнительные корецепторные молекулы.

Антигенные рецепторы лимфоцитов

Т-клетки. Корецепторы на Т-клетках - CD4 и CD8 помогают узнавать МНСI/II. Корецептор CD28 - костимуляторный рецептор, который узнаёт комплекс В7 на ДК, а комплекс В7 на ДК появляется в ответ на активацию врожденного иммунитета.

В-клетки. Корецепторы на В-клетках – CD21-CD19-CD81 взаимодействуют с комплементом. Именно он взаимодействует с ФДК.

Костимуляция (сигнал системы врождённого иммунитета) от CD40 на В-клетках, CD40L на Т-клетках. Эта пара, без которой не будет Т-клеточной помощи.

Нас интересует молекула С3 комплемента. Есть организмы, у которых кроме С3 компонента комплемента ничего нет. Этот «сенсор» способен осложнять жизнь микробам. Если вокруг нет никаких нуклеофильных групп, то тиоэфирная связь молекулы С3 нейтрализуется при взаимодействии с водой.

Если нуклеофильные группы есть (обычно на поверхности бактерий), происходит ковалентная сшивка. С3 расщепляется на С3b и С3а. Собственные клетки защищены от этого экспрессией специальных молекул (ингибиторов). Молекула С3b, присоединенная к поверхности патогена, маркирует патоген, стимулирует В-клетки, является молекулярным сигналом для специальных рецепторов.

Рецепторы комплемента CR2/CD21 и CR1

На В-клетках, кроме BCR, узнающего антигены, есть специализированный рецептор CR2, который взаимодействует с С3b компонентом комплемента.

CR2(CD21) на зрелых В-клетках образует комплекс с двумя другими мембранными белками - CD19 и CD81. За способность дополнительно узнавать компоненты патогенов, которые находятся на поверхности ФДК, эти молекулы называются корецепторами В-клеток.

Комплекс CR2-CD19-CD81 часто называется корецепторным комплексом В-клеток, потому что CR2 связывается с компонентом комплемента С3b/С3dg/С3d, когда мембранносвязанный IgM связывается с антигеном. Это в/д значительно повышает способность В-клеток отвечать на антиген.

Родственный рецептор CR1 экспрессируется на ФДК и участвует в связывании антигенных комплексов, необходимых для селекции В-лимфоцитов в процессе созревания аффинитета в результате соматического гипермутагенеза.

Fc-рецепторы узнают антитела, которыми опсонизирована бактерия. Есть еще молекулы адгезии, которые имеются на поверхности ФДК и экспрессируются на поверхности В-клеток в момент развития.

Т-клетка с клеткой-мишенью (здесь с В-клеткой) образует плотный комплекс - иммунологический синапс. Происходит массивная перестройка цитоскелета и активация многочисленных сигнальных молекул. Вся Т-клетка поляризуется и направляет своё внимание на взаимодействие в случае Т-киллера с клеткой-мишенью, а в случае Т-хелпера с В-клеткой). Это плотный контакт.

Белковые домены, часто используемые для передачи сигнала в иммунной системе

Эти домены наиболее ярко себя проявляют в передаче сигнала от рецепторов лимфоцитов. SH2-домен встречается во многих белках, которые задействованы в передаче сигнала. Он отвечает за узнавание фосфотирозина в составе активационных мотивов.

Активационные (ITAM) и ингибирующие (ITIM) мотивы. Фосфотирозин встречается в составе активирующих и ингибирующих рецепторов. Для каждого ITAM существует в белках SH2-домен, который с ним связывается. После связывания происходит фосфорилирование участка по тирозину, что превращает его в участок связывания для других белков. Они присоединяются, активируются и передаётся сигнал.

У ингибирующих рецепторов всё похоже. Присоединяется фосфатаза, которая удаляет фосфатную группу с тирозина, что приводит к отключению активации.

Передача сигнала с TCR

После кластеризации есть несколько ключевых событий. Ключевое, это активирование Lck-киназы. Она имеет SH2-домен, используемый для сворачивания в неактивную трансформацию. На конце белка есть ингибирующий тирозин. Если он фосфорилирован, связывает SH2-домен, и белок сворачивается таким образом, что киназа домен не активирует. Имеется киназа, которая следит за тем, чтобы фосфат был на месте. При кластеризации рецепторов, сюда привлекается фосфатаза CD45, которая удаляет фосфат. Киназа Lck активируется и фосфорилирует ITAM мотивы в составе ζ-цепи.

Мотивы превращаются в сайт посадки доп.киназ, привлекаются Src киназы (ZAP-70) к фосфорилированным ITAM. Они активируют что-то еще. ZAP-70 – киназа, которая находится в неактивной трансформации, если не рекрутирована на ITAM → не может никого фосфорилировать.

Неактивная Lck-киназа, т.к. её фосфорилированный тирозин удерживает SH2-домен → кластеризация рецепторов → CD45 дефосфорилирует тирозин → Lck-киназа становится активной → фосфорилирует ITAM-мотивы в составе ζ-субъединицы CD3.

Фосфаты, которые сидят на тирозинах ITAM-мотива - это платформа, скэффолд для других белков. На ITAM рекрутируется Syk-киназа (ZAP-70) через собственный SH2-домен.

У молекулы CD45 большая внеклеточная часть, для неё неизвестны лиганды. Возможно, нужно для того, чтобы активация Т-клеток не продолжалась долго. После того, как начинается передача сигнала, формируется иммунный синапс, все молекулы, входящие в его состав, короче, чем CD45. Она вытесняется на периферию синапса и физически отделяется от АПК, позволяет Lck-киназе вернуться в ингибированное состояние.

Пара CD молекул, которые участвуют в формировании Т-клеточного синапса (молекулы адгезии – CD2/LFA-2 и CD58/LFA-3).

После активирования киназ (имеют общее название Src-киназы) и фосфорилирования ITAM, они фосфорилируют новые белки-платформы (scaffold). Они сами не имеют ферментативной активности, а служат платформой для привлечения дополнительных белков. Белок LAT заякорен на мембране.

К нему привлекается белок фосфолипаза C γ , которая расщепляет PIP₂ (фосфатидилинозитол бифосфат) на IP₃ (инозитол трифосфат) и DAG (диацилглицерол).

IP₃ открывает кальциевые каналы в ЭПР. DAG остается сидеть на мембране и является платформой для привлечения дополнительных сигнальных белков.

В результате этого активируется несколько семейств ТФ:

- NFAT через Ca²⁺ и кальциневрин
- NF κ B через PKC θ (она рекрутовалась на DAG)
- AP1 через RasGRP и каскады MAP-киназ.

Три основных транскрипционных факторов . NFAT - первый ТФ, который нашли, когда занялись этим вопросом AP1 (не только в лимфоцитах), первый эукариотический фактор транскрипции.

NFAT является мишенью для иммуносупрессора циклоспорина А, который совершил революцию в трансплантологии. Поскольку позволил безопасным образом угнетать иммунный ответ, специфически подавляя Т-клетки.

В норме NFAT, плавая в цитоплазме, в нескольких местах фосфорилирован (по серину и треонину). В такой конформации фосфаты скрыт сигнал ядерной локализации. При активации (поступлении кальция в цитоплазму), образуется ферментативный комплекс, дефосфорилированный NFAT, меняет конформацию, транслоцируется в ядро и активирует транскрипцию.

Циклоспорин А блокирует стадию, следовательно, блокирует активацию Т-клеток, которые являются основным агентом отторжения трансплантата.

AP1 активируется продуктами RAS/MAPK-пути.

AP1 состоит из двух компонентов JNK и Fos. JNK активируется в результате фосфорилирования и транспортируется в ядро. FOS синтезируется заново. Активация является результатом киназного каскада. Киназы активируются, получая фосфат, затем фосфорилируют следующую.

В случае AP1 сигнал происходит от активации киназы Ras, которая собирается на DAG. Рекрутирование Ras на DAG → MAPK-каскад → активация Jnk и FOS.

NFκB.

На DAG рекрутируется PCθ □□фосфорилирование CARMA. На CARMA собирается комплекс адаптеров, который рекрутирует TRAF6. На него навешивается активирующая убиквитиновая цепочка (через Lys63), на которую привлекаются киназы, которые активируют следующие киназы.

В случае NFAT сигнал ядерной локализации был скрыт конформацией самого белка. Здесь сигнал ядерной локализации скрыт дополнительным белком - IκB. Он фосфорилируется, убиквитинилируется по лизину-48. Это сигнал для деградации в протеасоме. Сам транскрипционный фактор идёт в ядро, активирует транскрипцию.

Сигнальные события при костимуляции.

- 1) Взаимодействие TCR с комплексом МНС/пептид, а
- 2) Молекула костимуляции B7, которая сидит на АПК/ДК (в ответ на активацию врождённого иммунитета) и взаимодействует с CD28 на поверхности Т-клетки.
- 3) Все в одном кластере. Происходит фосфорилирование внутриклеточной части CD28, через SH2-домен рекрутируется киназа PI3K, которая активируется и генерирует фосфорилированные PIP3 (фосфатидилинозит трифосфат).
- 4) Рекрутирование на PIP3 нескольких важных киназ (Itk), которые фосфорилируют, значит, активируют фосфолипазу Cγ.
- 5) Она расщепляет PIP2 (фосфатидилинозитол бифосфат) с образованием DAG, IP3, активацией внутриклеточного кальция и NFAT. Всего того, что потом приводит к активации транскрипционных программ.

Костимуляция через CD28 и PI3K генерирует PIP3, необходимый для активации PLCγ.

В отсутствии костимуляции включается программа анергии. CTLA-4 - это молекула негативной костимуляции, родственница CD28, подавляет Т-клетка. Причина: CD28 взаимодействует с B7 один в один, а CTLA-4 образует кластеры. При сравнимой активности аффинность намного выше. Соответственно, CD28 есть всегда, готова активировать лимфоцит. CTLA-4 появляется на тех популяциях лимфоцитов, которым нужно подавлять иммунный ответ, в частности на Treg.

Костимуляция Т-хелперов и Т-киллеров требует наличия трёх сигналов: антигенного, костимуляционного и цитокинового.

Активация Т-киллера. Требуется одновременное взаимодействие киллера и хелпера с одной и той же дендритной клеткой. Пептиды из одного и того же патогена находятся на МНСI и МНСII. В ответ на взаимодействие с Т-хелпером, в АПК происходит экспрессия дополнительных молекул костимуляции, которые находят себе лиганды на поверхности Т-киллера и передают сигнал.

Т-хелпер производит ИЛ-2, который действует на Т-киллер. ИЛ-2 очень нужен Т-киллерам на стадии активной пролиферации.

Происходит экспрессия дополнительной цепи ИЛ-2 рецептора, получаем IL2-R α (CD25). Она временно активируется на размножающихся Т-киллерах, одновременно активирует гены ИЛ-2. Клетка получает ИЛ-2 от хелперов, она еще и сама их производит, активно делится.

Эффекторная клетка становится способной уничтожать клетку-мишень, даже если на ней нет молекул костимуляции, т.к. мишень не обязана быть АПК и представлять костимуляторную молекулу.

Ген ИЛ-2 является ярким примером того, как эволюция сигнальных последовательностей добилась компактной и эффективной конвергенции сигналов. После активации Т-лимфоцитов запускают синтез цитокина, который работает как дополнительный ростовой фактор.

Активация НК-клеток

НК-клетки – это тоже лимфоциты. В рецепторе НК-клеток задействованы ITAM и ITIM.

Молодая НК-клетка проходит период обучения. Она имеет уже активирующий и ингибирующий рецептор, но не умеет убивать. В период обучения вокруг себя всё считает за своё. Настраивает баланс внутриклеточных сигнальных путей и уровни экспрессии рецепторов так, чтобы не реагировать на своё, но быть не далеко от того, как кого-нибудь убить. В процессе созревания НК-клетка настраивает уровень ответа на толерантность к собственным клеткам, имеющим на поверхности определенный набор молекул MHC I и других NKR лигандов.

Дальше либо пропадает экспрессия MHC I, что случается на раковых клетках, вирусных клетках, либо клетка экспрессирует дополнительные лиганды для активирующего рецептора, т.е. различные стрессорные молекулы, что умеют делать раковые клетки.

В том и в другом случае баланс внутриклеточных сигналов сместится в сторону цитотоксической активности, и НК-клетка будет атаковать клетку мишень. Механизм лизиса активируется в ответ на потерю экспрессии MHC I (потеря своего).

Активирующий Т-клеточный синапс начинается со взаимодействия молекул адгезии, а потом плотные антиген-специфические контакты собираются в центре, а молекулы адгезии вытесняются на периферию.

ЛЕКЦИЯ №5. МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ АСПЕКТЫ ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА

Клетки врожденного иммунитета

Раньше считалось, что клеточный врождённый иммунитет осуществляют только миелоидные клетки, но сейчас говорят, что есть лимфоидные клетки врождённого иммунитета. НК-клетки оказались одной из подгрупп таких клеток. Существуют В1-клетки. В-лимфоциты, продуцирующие антитела, осуществляющие перестройку цепей, это В2-клетки. В1-клетки - примитивные В-клетки, синтезирующие антитела, они существуют еще до заражения. Они врождённым образом осуществляют первую линию защиты. В-клетки маргинальной зоны в селезенке. НКТ-клетки сочетают функции Т- и НК-клеток. Цитокины участвуют в дифференциации кроветворных клеток. Все клетки происходят от единой гемопоэтической стволовой клетки.

Фагоцитоз

Это процесс поглощения частиц определенного размера. Патоген попадает внутрь везикулы (фагосомы), которая затем сливается с гранулами, содержащими химические вещества, которые переваривают патоген внутри фагосомы. Главные фагоциты - макрофаги и нейтрофилы. Фагоцитоз участвует в удалении клеток, гибнущих через апоптотические пути.

Антимикробные факторы при фагоцитозе:

- закисление способствует тому, что бактерии перестают делиться. Имеет бактериостатический и бактерицидный эффекты. Это наблюдается и у макрофагов, и у нейтрофилов, т.е. общий механизм.
- АФК и АФА - общий механизм для нейтрофилов и макрофагов.
- антимикробные пептиды - общий механизм, но их состав варьирует у макрофагов и нейтрофилов. У нейтрофилов больше разнообразие (эти пептиды участвуют в NETS).
- ферменты, которые расщепляют клеточную стенку бактерий.
- у нейтрофилов есть дополнительный механизм. В их гранулах находится лактоферрин, который изымает ионы Fe^{2+} из бактерии, которые важны для метаболизма.

Для фагоцитоза нужны вспомогательные факторы. Бактериальные клетки должны быть облеплены белками, которые будут способствовать фагоцитозу.

Опсонизация – это обволакивание частицы (бакт.клетки) молекулами, которые облегчают её распознавание (значит, есть рецепторы) и поглощение фагоцитом.

Главные опсонизирующие факторы – антитела и C3b-компонент комплемента.

Если антитела узнают антиген на поверхности патогена, то патоген, облепленный антителами, будет эффективнее поглощён фагоцитом. Почему? После связывания антител с антигенами на поверхности патогена, в Fc-части антител открывается участок (до этого он скрыт), распознаваемый рецепторами фагоцитов FcγRI, FcγRII и FcγRIII. В Fc-части антител открывается участок только после связывания с патогеном, который может распознать специфический рецептор фагоцита. Частица (бактериальная клетка), облепленная антителами, может быть привлечена к фагоциту и поглощена.

Фрагменты C3-компонента комплемента C3b, откладывающиеся на поверхности патогена, распознаются рецепторами фагоцитов CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) и CR4 (CD11c/CD18). C3b-компонент обволакивает клеточную стенку бактерий, соединяясь с ней ковалентно. На этот компонент есть специальный рецептор на фагоцитах. Клетка, декорированная антителами или C3b, будет поглощена фагоцитами.

У нейтрофилов есть три вида гранул: первичные, вторичные и третичные. Они отличаются по составу, но функции примерно одинаковые. Он может выбрасывать собственную ДНК, которая имеет на своей поверхности протеазы, различные гранулы, которые убивают микроорганизмы. Базофилы и тучные клетки также имеют в своём составе большое количество разных гранул.

Механизм цитолиза NK-клетками

Клетки активируются в случае отсутствия молекул MHC I класса. Ингибирующий рецептор, который должен с ним взаимодействовать, не посылает внутрь клетки сигнал, они активируются и убивают клетку-мишень.

В клетках есть гранулы с перфорином и гранзимами. Гранулы сливаются с мембраной и выходят в синапс между NK-клеткой и клеткой-мишенью. Из перфорины образуется пора в мембране, гранзим В - протеаза, попав в клетку-мишень, запустит каспазный каскад. Это альтернативный способ запуска программируемой клеточной гибели - протеазным каскадом. Когда первая протеаза активируется **НЕ** по принципу активации, индуцируемой близостью, а просто тем, что в клетке есть протеаза, которая расщепляет предшественник каспаз и других протеаз, тем самым запускается апоптоз. Поры, которые образуют NK-клетки, напоминают поры, которые образуются в результате действия системы комплемента.

Система комплемента - часть системы врождённого иммунитета, конечной фазой действия которой является образования поры, которая сформирована молекулами C9. Молекула C9 - гомолог перфорины в NK-клетках. Один и тот же принцип используются двумя компонентами врождённого иммунитета (NK-клетками и системой комплемента). Комплемент - гуморальный фактор! Есть еще C8, C7, C6 и

C5b. После образования молекулы C5b, к ней присоединились C6, C7, C8, далее к комплексу присоединился C9, и он делает пору.

Комплемент – система белковых факторов (в т.ч. протеаз, и зимогенов), последовательно активируемых по каскадному принципу с реализацией антимикробных и воспалительных эффектов на разных стадиях активации.

Зимоген - неактивный предшественник фермента, активирующийся после расщепления. Они есть в каспазном каскаде + в механизмах свертываемости крови, где запускается каскад протеаз, который приводит к формированию сгустка → избеганию кровопотери. Цель: сделать в клеточной стенке дырку, из которой всё вытечет и что-то проникнет, в результате она погибнет. Некоторые отщепляемые компоненты комплемента одновременно запускают воспалительные реакции, которые связаны привлечением дополнительных клеток врождённого/адаптивного иммунитета. Комплемент нажимает сразу на несколько кнопок.

Пути активации комплемента:

1. Классический – с участием факторов, активируемых иммунными комплексами (комплекс антитела с антигеном). За его открытие дали Нобелевскую премию. Одна из особенностей комплекса в том, что после его образования в антителе происходят конформационные изменения. Какие-то участки полипептидной цепи в Fc-фрагменте становятся доступны для дополнительных белок-белковых взаимодействий.
2. Лектиновый – активация на основе распознавания микробных углеводов на поверхности потенциального патогена.
3. Альтернативный – активация путём спонтанного гидролиза C3 с последующей амплификацией. Из него образуется C3b - главный опсонизирующий компонент, а C3a - важный фактор запуска воспаления.

Строение иницирующих комплексов C1qrs и MBL-MASP

C1qrs - классический путь активации.

MBL-MASP - лектиновый путь активации.

В крови уже есть большая молекула C1q. Если он связался с иммунным комплексом, то на него рекрутируются белки C1r и C1s.

В лектиновом пути аналогом C1q является молекула MBL (лектин, связывающий маннозу). В этой молекуле не шесть, а четыре ветви. Когда пучок связался с поверхностью патогена, то в комплексе происходят конформационные изменения и рекрутируются белки MASP-1 и MASP-2.

Иммунный комплекс, скорее всего, находится на поверхности клетки, потому что эти антитела распознают структуры на поверхности бактерии. Комплекс уже направлен на мембрану клетки. Все происходит на поверхности или вблизи поверхности бактериальной клетки, на этой поверхности и образуется дырка. Комплекс со вспомогательными белками - протеазами начинают каскад, приводящий к образованию поры.

Ранние стадии активации комплемента по классическому пути

□□ В комплекс C1qrs рекрутируется фактор комплемента C4 (он уже плавает в крови). Эта протеаза расщепляет его на две части - C4a и C4b. C4b (большой фрагмент) остается в комплексе с C1qrs.

□ Далее в этот комплекс рекрутируется фактор C2. Протеаза расщепляет на C2a (остается в комплексе) и C2b. Комплекс C4bC2a приобретает свойства новой протеазы, которая называется C3-конвертаза. Эта та протеаза, которая расщепит C3 (один из центральных компонентов комплемента).

□□□ C3-Конвертаза расщепляет C3 на C3a и C3b.

Комплекс C4bC2aC3b называется C5-конвертазой, он расщепляет фактор C5. После его расщепления образовался C5b, который является первым фактором для сборки поры. К нему уже присоединяются без расщепления C6, C7, C8, C9 → образование поры.

Начальные фазы активации комплемента по лектиновому пути

□□□ Произошло прямое распознавание маннозных остатков,

□□□ Образовался комплекс MBL-MASP,

□□□ Он расщепил C4,

□□□ Расщепление C2, в комплекс входит большой фрагмент C2a (образовалась C3-конвертаза);

□□□ Расщепление C5, C5b - первый фактор сборки пор.

Спонтанная активации C3: центральная роль тиоэфирной связи

Молекула C3 исходно синтезируется, как один предшественник, который потом расщепляется на две половины (т.е. это ковалентно связанный димер C3a и C3b).

В α-цепи есть домен, который содержит тиоэфирную связь (-CH₂-S-CO). В пространстве остатки глутамин и цистеин сближены, между ними образуется связь. В свёрнутой молекуле C3 домен с тиоэфирной связью спрятан, она недоступна для гидролиза водой, поэтому молекула неактивна.

Но молекула может спонтанно открыть эту связь и тогда есть шанс, что карбоксильная часть образует связь с некоторыми реакционными группами на поверхности патогена. Молекула C3 пришьётся к поверхности патогена.

На поверхности патогена у молекулы C4aC2b тоже есть тиоэфирная связь, т.е. молекула C4aC2b может быть ковалентно пришта к поверхности патогена, а это ведь C3-конвертаза пришта к поверхности патогена (второй сценарий активации C3; в обоих случаях на поверхности патогена образуется конвертаза).

Есть фактор В и D. Со спонтанно активированной молекулой C3 может связаться фактор В. Фактор В является протеазой, которая расщепит его на фрагмент

Bb и a. Из молекулы C3 другим способом (другая здесь C3-конвертаза) образуется молекула C3b.

При участии фактора В образуется комплекс C3Bb. Протеазная активность фактора D расщепила В, стало C3bBb (это C3-конвертаза).

В альтернативном пути образуется C3-конвертаза иного состава: не C4bC2a, а C3bBb.

Терминальные стадии активации комплемента (литический каскад)

После образования C5b на него рекрутируются факторы C6, C7, C8, C9 (это уже без расщепления). C9 образует пору. У альтернативного пути альтернативные конвертазы C3 и C5. У лектинового и классического пути есть различия на стадии распознавания, дальше образуются одинаковые конвертазы C5 и C3.

Рецепторы для малых фрагментов компонентов комплемента

Есть рецепторы, распознающие фрагмент C3a и C5a. Они на клетках врождённого иммунитета. Распознавание малых молекул приводит к высвобождению медиаторов, которые приводят к дилатации сосудов, высвобождению хемотактических факторов.

Если комплемент работает на клеточной стенке, то одновременно во внешнюю среду посылаются сигналы, которые эквивалентны запуску воспалительной реакции. Привлекаются дополнительные клетки, увеличивается проницаемость сосудов, чтобы клеткам было легче выходить из кровяного русла и хемотаксис тех клеток, которые нужны в очаге воспаления.

Резюме по системе комплемента

1. Главные функции системы комплемента: опсонизация и лизис патогена, а также привлечение клеток врожденного иммунитета.
2. Компоненты комплемента есть уже у беспозвоночных и иглокожих. Древнейшие компоненты – C3 и фактор В. Таким образом, эта система – древнее антител, и по-видимому классический путь активации был добавлен в эволюции последним. Альтернативный путь существовал задолго до того, как эволюционно образовались лимфоциты. Классический путь был создан последним в эволюции, он новый.
3. Активация по альтернативному пути происходит спонтанно и непрерывно. Однако в отсутствии фиксации на поверхности патогена реакция быстро гасится, есть большое количество ингибиторов на клетках хозяина.

4. На поверхности клеток хозяина находится большое количество ингибиторов комплемента. Их отсутствие на патогенах и поврежденных (в т.ч. апоптотических) клетках можно рассматривать как сигнал «отсутствия своего».
 5. Парадигма протеолитических каскадов и зимогенов используется в системе свертывания крови (2 пути с одним финалом) и при запуске программ клеточной смерти (каспазы).
 6. Хотя система комплемента традиционно относится к гуморальным факторам врожденного иммунитета, недавно были установлены новые функции компонентов комплементов, внутриклеточно экспрессируемых в лимфоцитах! Получается, что комплемент напрямую участвует в регуляции адаптивного иммунитета. Белки комплемента синтезируют гепатоциты.
 7. Генетический дефицит в системе комплемента приводит только к частичному ослаблению иммунитета.
- Все-таки роль каскада не такая большая, несравнима с последствиями инактивации существенного цитокина или компонента адаптивного иммунитета. Без комплемента можно жить.

Практическое применение: фиксация комплемента

Фиксация комплемента - тест, который используется для детекции в сыворотке антител к конкретным патогенам потенциально зараженных людей.

1. Классический способ определить наличие антител к патогену в крови.
2. Сыворотка пациента прогревается – так что собственный комплемент пациента инактивируется (а антитела – нет).
3. Добавляется антиген и стандартное разведение компонентов комплемента.
4. Если специфические антитела в сыворотке были, то комплемент активируется по классическому пути и деплецируется из смеси.
5. Это проверяют реакцией на эритроциты, облепленные антителами, - если комплемент не был деплецирован (т.е. у пациента не было антител к анализируемому антигену), то эритроциты будут лизированы.

Гуморальные факторы врождённого иммунитета

Цитокины активируют фагоцитоз и другие проявления врождённого иммунитета (интерфероны I и II типа). Ещё регулируют местные и общие воспалительные реакции (ИЛ-1, ФНО, ИЛ-6 и хемокины).

Система комплемента способствует осуществлению фагоцитоза (опсонизация). Вызывает лизис клеток-мишеней. Служат источником дополнительных провоспалительных факторов.

Пентраксины способствуют осуществлению фагоцитоза (опсонизация). Активируют систему комплемента. Усиливают образование провоспалительных

цитокинов. Пентраксины синтезируются гепатоцитами. До того, как лимфоциты производили нормальные антитела, исходно были примитивные рецепторы врожденного иммунитета - это пентраксины.

К основным эффекторным механизмам врожденного иммунитета относятся внутриклеточный киллинг (фагоцитоз), внеклеточный киллинг (нейтрофилы, эозинофилы), контактный киллинг (NK-клетки) и нарушение репликации вирусов (это делают интерфероны типа I).

ЛЕКЦИЯ №6. ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И СЕЛЕКЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ

Иммунологические методы

Гибридомная технология позволяет получить моноклональные антитела, с высокой аффинностью узнающие определенный антиген. После иммунизации забираем плазматические клетки, производящие антитела. Сливаем их с раковыми клетками, которые происходят из плазматических клеток, но не производят антител. Такой гибрид может расти в культуре, будет производить антитела моно-специфичности. У мыши плазматических клеток много, не все производят то, что надо. Приходится клонировать, проводить скрининг.

Слияние плазматических клеток, производящих специфические антитела, с бессмертными раковыми клетками, позволяет получить культуру клеток, производящих моноклональные антитела к нужному антигену.

Иммуноглобулин-связывающие белки, блокирующие нормальную опсонизацию. При нормальной опсонизации антитела связывают эпитопы на поверхности бактерий и распознаются Fc-рецепторами фагоцитов. Белок А золотистого стафилококка связывает антитела "задом наперед" и препятствует в/д с Fc-рецепторами. Фагоцитоза не происходит. Способность белков А и G взаимодействовать с широким спектром Fc-фрагментов антител делает их ценными реагентами, которые будут доставать антитела из любой смеси.

Иммунопреципитация хроматина. На клетки наливаем формальдегид, который сшивает amino- и imino-группы в радиусе 0,2 нм (2 Ангстрем).

Все белки, нуклеиновые кислоты, которые рядом, будут ковалентно сшиты. Выделяем ДНК, дробим, проводим манипуляции, на выходе, после секвенирования, узнаём, на каких участках генома сидели какие ТФ, модифицированные гистоны, РНК-полимераза 2. Далее с помощью биоинформатических методов изучаем/предсказываем, где находятся регуляторные элементы, транскрибируемые гены и т.п. Ключевой момент - шарики с белком А, которые захватывают антитела из смеси. Антитела моноклональные, которые узнают нужный белок. На выходе обогащаемся голубым белком, к которому были антитела.

Проточная цитофлуориметрия и сортировка клеток. Берем моноклональные антитела к нескольким интересующим молекулам. Каждый моноклон метится своей молекулой, которая при облучении лазером будет испускать свет определённой длины волны. Осветив каждую клетку, можем измерить силу флуоресценции, это будет соответствовать количеству антител, которое связалось, т.е. с количеством молекул, которое нас интересовало. Добавление к клеткам смеси моноклональных антител с флуорофорами позволяет количественно "пометить" одновременно несколько поверхностных молекул. Специальные приемы, не совместимые с жизнеспособностью клеток, позволяют пометить внутриклеточные белки и цитокины. Параметры лазеров и

детекторов подбираются так, чтобы разные метки определялись независимо. Компьютер онлайн управляет электризацией капель, содержащих отдельные клетки, для их сортировки по выбранным параметрам.

Схема развития лимфоцитов в первичных лимфоидных органах

У про-лимфоцита начинается перестройка генов рецепторов (в случае В-клеток - тяжёлых цепей; в случае Т-клеток - β -цепей), если перестройка неудачная, то на этой стадии происходит гибель клетки, т.к. с этого момента лимфоцит становится зависимым от сигнала через свой рецептор.

Пре-В-клетка – это клетка, в которой уже произошла перестройка тяжёлой цепи, она экспрессируется, а суррогатные цепи формируют преВ-клеточный рецептор. На стадии перестройки второй цепи тоже может произойти гибель.

Рецептор должен обладать некой разумной функциональностью, т.е. с каким-то небольшим сродством в/д с антигенами. После экспрессии рецептора на поверхности он должен получать какой-то сигнальчик, блядь, от антигенов извне. В случае Т-клеток – это сигнал от комплекса МНС/пептид, в случае В-клеток - это собственные антигены, с которыми у рецепторов есть слабое сродство. Такой созревший лимфоцит выходит из первичного лимфоидного органа.

Если распознавание слишком сильное, то это потенциально аутореактивный лимфоцит, он подвергается негативной селекции.

Селекция В-лимфоцитов в костном мозге

- 1) Нормальное развитие: незрелая В-клетка слабо реагирует с аутоантигеном, нормально экспрессируются IgM (их больше) и IgD.
- 2) Если в костном мозге (на периферии такое тоже возможно) происходит сильная реакция с растворимым антигеном, то вместо активации начнётся толеризация организма, а конкретный лимфоцит станет анергичным (он не погибнет). Это происходит, когда большое количество растворимого АГ не подкреплено дополнительными сигналами костимуляции. У В-клетки изменяется репертуар рецепторов (IgD становится больше), она будет способна узнавать антиген, но не будет реагировать на него. Такая клетка выходит на периферию, при достаточно сильной костимуляции в нужный момент в нужном месте она может вернуться в пул реактивных лимфоцитов. Клетка сохраняется на будущее.
- 3) В случае очень сильной реакции с собственными поливалентными антигенами клон должен подвергнуться негативной селекции, но прежде чем погибнуть, может попробовать изменить структуру рецепторов (редактирование генов рецепторов) с заменой специфичности на другую. Если после этого аутореактивность утрачивается, то получается нормальная В-клетка. Раундов может быть несколько, но если аутореактивность сохраняется, то клетка погибнет.

Очень важно: собрание рецепторов в кластер - это важный момент активации. Индукция анергии в отсутствии костимуляции - пример механизма иммунологической толерантности (толерантность, значит, что мы видим это, оно неприятно, но не реагируем).

Дифференцировка В-лимфоцитов на периферии

Показано превращение преВ-клетки в зрелую В-клетку и выход из костного мозга на периферию. Наивная клетка несёт на поверхности IgM. Она может превратиться в В-клетку маргинальной зоны (в селезёнке). Эти В-клетки иногда относят к клеткам адаптивного иммунитета, иногда к клеткам врождённого иммунитета. Они происходят из наивных В-клеток, проходят через весь цикл перестройки генов BCR, умеют формировать клетки памяти, но репертуар и специфичность ограничена, используют только некоторые V-гены тяжёлых цепей. Они настроены на реакцию патогенов в кровотоке (через селезёнку ведь всё фильтруется). При активации из них получаются короткоживущие плазматические клетки, которые в ответ на активацию производят антитела, затем погибают.

IgD играют важную роль во вторичных лимфоидных органах в получении костимуляционных сигналов. Здесь происходит взаимодействие с Т-клетками, ФДК, переключение изотипов. Образуются короткоживущие плазматические клетки, которые после стадии иммунного ответа погибают.

Часть клеток превращается в клетки памяти, для этого нужна дополнительная стимуляция антигеном. Часть плазматических клеток мигрирует в участок воспаления и там производят антитела. Некоторые превращаются в долгоживущие плазматические клетки, которые мигрируют в костный мозг.

Плазматическая клетка не приспособлена к самостоятельной жизни, поэтому для её выживания необходимы сигналы от окружающих клеток (микроокружения). Везде, где встречаются плазматические клетки, и где они производят антитела, там для них создаётся ниша. Это окружение из клеток, производящих молекулы (в частности набор хемокинов), рецепторы на которые есть на поверхности плазматических клеток. Клетки посылают сигнал, что здесь уютно, можно сесть и производить антитела. В костном мозге эти ниши долгоживущие, поэтому клетки живут долго, а в селезёнке, лимфоузлах, сайтах воспаления - короткоживущие.

Активация клеток, производящих хемокины, зависит от активации врождённого иммунитета, и продолжается то время, в течение которого продолжается инфекция. Когда инфекция закончилась, то ниша разрушается, плазматические клетки гибнут апоптозом, прекращается продукция антител. Если воспаление патологическое, то в такой обстановке плазматические клетки могут жить долго, могут долг производить антитела.

Кинетика типичного В-клеточного ответа

Искусственная иммунизация антигенами с адъювантом.

В ответ на первую встречу с антигеном происходит активация и пролиферация В-клеток, увеличивается количество антител, которые производят получившиеся плазматические клетки.

При первичном ответе больше растворимых IgM и меньше IgG, т.к. IgM достаточно для нормальной защиты. К тому времени, когда пройдут все реакции взаимодействия клеток в герминальном центре, произойдет переключение изотипов, патоген нейтрализуется IgM, переварится фагоцитами, и иммунный ответ пойдёт на спад.

У клеток памяти после встречи уже изотип переключен, поэтому при повторной встрече с АГ продуцируются IgG и их больше! Вторичный ответ быстрее и сильнее первичного. Это характерная черта иммунологической памяти. Аффинность IgG на 3-4 порядка выше, чем IgM.

Тимус

Ранние предшественники Т-лимфоцитов мигрируют в тимус из костного мозга. Находящаяся в тимусе незрелая Т-клетка - тимоцит - перемещается внутри органа, постоянно взаимодействует с тимусной стромой - "выстилающими" тимус эпителиальными клетками и АПК. Взаимодействие со стромой обеспечивает сигналы, необходимые для созревания и клональной селекции. Более 95% тимоцитов погибает, не пройдя какую-либо из стадий отбора.

Выделяют плотный кортекс и медуллярную зону. Кортекс набит делящимися тимоцитами, которые мигрируют в медуллу, там происходит проверка на интенсивное в/д с собственными антигенами. В тимусе клетки проводят 1-2 недели. Основное время находятся в медуллярной зоне, чтобы убедиться в отсутствии аутореактивности.

Из медуллярной зоны на периферию поступают Т-киллеры, активирующие Т-хелперы или регуляторные Т-клетки.

Основные стадии развития и поверхностные маркёры α , β -timoцитов

CD44 - рецептор гиалуроновой кислоты, который является компонентом внеклеточного матрикса тимуса. CD25 - рецептор ИЛ-2, который является ростовым фактором. В зависимости от того, что нужно клетке - делиться или мигрировать, вкл/выкл комбинация молекул.

Суррогатная цепь TCR нужна пока не перестроилась α -цепь. В случае антител здесь будут суррогатные цепи Ig. Когда рецептор готов, то суррогатная цепь не нужна.

Когда появляется суррогатный рецептор, то начинается экспрессия сигнальных компонентов - CD3 (ассоциирован с TCR на мембране, отвечает за передачу сигнала).

CD4 и CD8 запускаются одновременно на стадии двойных позитивных и отвечают за решение стать Т-хелпером или Т-киллером.

Позитивная селекция CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в тимусе

Суспензию из тимуса красим смесью антител (CD4 и CD8), потом прогоняем через проточный цитофлуориметр, регистрирующий два цвета, соответствующие одному и другому. Данные отображаем на двумерной диаграмме (точка – это одна клетка, на которой прибор измерил интенсивность флуоресценции той и другой молекулы).

По осям - интенсивность флуоресценции в логарифмической шкале. На диаграмме видим распределение клеток по популяциям. Стрелками нарисованы направления движения клеток в процессе развития.

Т-клетки начинают развиваться, не имея ни CD4, ни CD8. После того, как рецептор готов, и надо решать, кем становиться, клетка экспрессирует оба корецептора, в зависимости от того МНСI или МНСII узнал TCR, она превращается либо в хелпер, либо в киллер.

Развитие тимоцитов зависит от МНС

Зависимость от МНС1 и МНС2 можно изучить на мышах. В мыши в виде трансгена экспрессируются гены готового TCR. Гемопоэтические клетки, дойдя до стадии Т-клеточных предшественников, увидят, что TCR готов. Собственные локусы перестраиваться не будут. Все Т-клетки будут иметь одну специфичность. Если подсадили рецептор, узнающий МНСI, то на выходе из тимуса обнаружим только CTL, так как у развивающихся тимоцитов не будет шансов экспрессировать рецептор, узнающий МНСII. Все DP превратятся в CD8⁺. То же самое с рецептором МНС2, на выходе получим CD4⁺ клетки

Зависимость Т-клеточного распознавания от МНС называется МНС-рестрикцией. Оно подразумевает, что МНС играет определяющую роль.

Трансгенная экспрессия TCR подавляет перестройку генов TCR в α и β локусах (за счет аллельного исключения), в результате у таких мышей большинство лимфоцитов имеет одну и ту же специфичность. В зависимости от того, какую молекулу МНС этот TCR узнает, все эти клетки становятся либо хелперами, либо киллерами.

AIRE - autoimmune regulator

AIRE – транскрипционный фактор, индуцирующий экспрессию органо- или тканеспецифических генов в тимусе: insuline (поджелудочная железа), vomeromodulin (лёгкие).

Нарушение функции AIRE вызывает аутоиммунный полигландулярный синдром 1-го типа (**APCED**). Заболевание, характеризующееся аутоиммунным ответом на ткани разных органов, преимущественно эндокринных желёз.

AIRE-зависимая экспрессия тканеспецифических антигенов в клетках тимусного эпителия - один из механизмов центральной толерантности.

Каким образом развивающимся тимоцитам удастся показать все собственные антигены, опасные с точки зрения аутореактивности, в т.ч. фрагменты белков из разных органов? Время от времени в некоторых клетках тимусного эпителия запускается экспрессия генов. Если запустить в одной клетке экспрессию сразу 100 генов, то она превратится непонятно во что, т.к. клетка фенотипически зависит от того, какие белки экспрессирует.

Если на какое-то время запустить часть генов, то экспрессирующиеся белки попадут в цитоплазму → в процессирующий аппарат → представятся на МНС. Тимусная клетка по кругу экспрессирует гены. Сейчас в мышинном тимусе любой ген из конкретной группы экспрессируется в нескольких тысячах эпителиальных клеток тимуса, что гарантирует встречу с Т-клеткой. В случае встречи с аутореактивным лимфоцитом, он погибает.

Если AIRE сломан, то представления белков/пептидов не происходит, значительное количество аутореактивных Т-лимфоцитов выходит на периферию. Возникает синдром APCED.

Кто занят показом необходимого спектра собственных антигенов? Стромальные клетки медуллярной зоны тимуса, ДК, макрофаги сами многое могут показать. Но есть много тканеспецифических белков, которые экспрессируются только в определенных органах.

Существует транскрипционный фактор, который связывается в промоторах эволюционно отобранной группы генов, в которую ходят тканеспецифические гены, например, инсулина и вомеромодулина и т.п. Такие гены неким мозаичным образом (в клетках медуллярного эпителия) запускаются, производят белок. Задача - процессировать белок через протеасому и представить на МНСI. TRAs – выброшенные наружу белки, которые могут процессироваться на АПК и представляться на МНСII. И CD4+, и CD8+ клетки имеют шанс обнаружить в первичном лимфоидном органе тканеспецифический белок, на который не нужно реагировать.

ТФ не работает, пептиды не представляются, лимфоциты выходят на периферию и получают возможность атаковать собственные белки, которые кажутся им чужеродными. Необходим второй сигнал от врождённого иммунитета. Его легко запустить каким-нибудь воспалительным процессом/вирусной инфекцией. Это может привести к аутоиммунному процессу.

Механизмы толерантности на периферии

Потенциально аутореактивные Т-клетки тоже могут выйти на периферию. Нужны механизмы включения толерантности. В отсутствии костимуляции точно так

же, как и при в/д В-клеток с антигеном, Т-клетка становится функционально неспособной к ответу.

Зависит от силы сигнала:

либо может остаться живой и анергичной,

либо при более сильном сигнале погибнуть.

Возможно активное подавление иммунного ответа со стороны регуляторных Т-клеток, т.е. блокировка активации при помощи доп. механизмов.

Редактирование рецепторов лимфоцитов: способ снизить непродуктивные потери. Редактирование рецептора - процесс дальнейших перестроек

либо в случае В-клеток - лёгких цепей иммуноглобулинов

либо в случае Т-клеток – α -цепей TCR.

При получении сильного сигнала лимфоцит поддерживает экспрессию RAG-рекомбиназ, продолжает перестройку, пытается изменить ген лёгкой цепи (В-клетка) или α -цепи (Т-клетка) так, чтобы изменилась специфичность, и клетка перестала быть аутореактивной.

Почему возможна дополнительная перестройка лёгких цепей, а не тяжёлых?

После первого раунда перестройки легкой цепи произошла VJ-рекомбинация. Осталось много запасных V- и J-сегментов. Значит, по точно такому же механизму следующая пара может соединиться, образовав новую специфичность. Так может происходить несколько раз. В случае тяжёлой цепи уже при первом раунде рекомбинация из кассеты D- сегментов выбирается один, а все остальные удаляются → перестраивать нечего.

В случае неудачной рецепторной специфичности, клетка может отредактировать ген легкой/ α цепи. Такой половинной замены достаточно, чтобы изменить специфичность. Клетка, которая не смогла это сделать, умирает апоптозом.

Случайно выбираются V- и J-сегменты, формируется ген, который кодирует переменный фрагмент лёгкой цепи. В случае если обнаруживается повышенная реактивность и распознавание собственного антигена, сигнал* от стромальной может включить RAG-рекомбиназы, тогда из оставшихся V- и J-сегментов можно сделать другую пару и сформировать новый переменный участок.

У β -цепей и тяжёлых цепей есть D-сегмент. С ними этого сделать невозможно, т.к. при первом акте рекомбинации все D-сегменты удаляются, повторная рекомбинация с получением тяжёлой цепи невозможна. Fas-FasL - цитокин и рецептор, обеспечивающие индуктивный апоптоз. Эта пара обязательна для обеспечения центральной толерантности! Основная черта мышей, нокаутных по одному или другому гену, это гиперпролиферация лимфоцитов и аутоиммунное поражение, потому что лимфоциты не уничтожаются, а они могут быть аутореактивными.

Селекция основных популяций Т-лимфоцитов

На ранней стадии происходит ответвление, в котором развиваются $\gamma\delta$ клетки. Их клеточный рецептор аналогичен $\alpha\beta$, но другая специфичность. Клетки не требуют представления антигена на МНС, а распознают лиганды напрямую. Обнаружено, что они в/д с семейством белков бутирофилинов. Это дальние гомологи молекул МНС.

$\gamma\delta$ клетки отправляются на место постоянной дислокации в различные органы, в основном в покровные ткани и слизистые. Отобравшись на молекулы Btl1 в тимусе, там они ждут аналогичного стрессового сигнала от эпителиальных клеток. Заставят Т-клетки активироваться и производить необходимые действия для коррекции проблемы (производить цитокины, индуцировать воспаление). Для многих $\gamma\delta$ неизвестен лиганд, но для некоторых известен, тогда это некоторые фосфолипиды, которые образуют комплекс с членами семейства бутирофилинов. Взаимодействует напрямую с лигандом, а не с комплексом МНС:пептид.

НКТ-клетки похожи на НК-клетки по набору рецепторов, но есть TCR, который использует ограниченный репертуар V-сегментов и имеет ограниченную специфичность. Взаимодействуют с CD1d.

Выбор пути дифференцировки в направлении $\gamma\delta$ - или $\alpha\beta$ Т-клеток

Основанием для решения становится той или иной клеткой является собственный сигнал через рецептор. Перестройка генов β -, γ - и δ -цепей происходит параллельно. На стадии преTCR существует перестроенный $\gamma\delta$ -рецептор и функциональный, но неготовый TCR.

В случае сигнала через преTCR происходит перестройка α -цепи, прекращается экспрессия $\gamma\delta$.

В случае сигнала через $\gamma\delta$, выключается ген β -цепи, клетка становится $\gamma\delta$ Т-клеткой. Через какой рецептор пришёл сигнал, под то и подстроены клеточные сигнальные пути.

Функциональная дифференцировка Т-хелперов

Имеются разнообразные антигены, они перевариваются АПК (в первую очередь дендритными клетками). ДК - единственная АПК, которая способна активировать наивную Т-клетку. Чтобы Т-лимфоциты были в культуре их надо праймировать, а это делают ДК, презентующие АГ наивным Т-хелперам. После в/д с ДК, клетка слегка активировалась, может получать доп.сигналы стимуляции от В-клеток. Дифференцируются в зависимости от цитокинового фона.

Если удалить популяцию, заблокировав цитокины, то будут страдать соответствующие компоненты иммунного ответа.

Цитокины и ТФ в дифференцировке Т-хелперов

CD4-клетка взаимодействует с ДК, распознает АГ, взаимодействует с молекулами костимуляции, получает набор цитокинов. Далее цитокины после в/д с рецептором, передают сигнал через ТФ. Для разных цитокинов работают разные факторы СТАТ-семейства.

Появляется доп.популяция (более лабильная) фолликулярных Т-хелперов. В-клетка в герминальном центре делится, взаимодействует с фолликулярной ДК, происходит гипермутагенез. Взаимодействие происходит с Tfh.

Для него характерны свои ТФ и цитокины, но это не терминальный вариант дифференцировки. В каждой клетке есть ТФ (мастер-регулятор).

Роль адекватной дифференцировки Т-хелперов в обеспечении успешной иммунной защиты (человек)

Будет излечимая форма заболевания или нет - зависит от того, в какую сторону пойдет дифференцировка Т-хелперов. Для излечения от внутриклеточных бактерий нужен Th1. Будет Th1 или Th2 зависит от того, какие аллели МНСII присутствуют в данном организме, соответственно, хорошо или плохо представляются пептиды из бактерий.

Мышь. ВJ-линия имеет тенденцию развивать Th1 ответ, а BALB предрасположены к Th2 ответу. Если нужно получить антитела в ответ на иммунизацию, то берут BALB, так как Th2 обеспечивают Т-клеточный хелп и продукцию антител. С лейшманиозом справятся ВJ, так как Th1 позволяет бороться с внутриклеточными бактериями, а Th2 для такого бесполезен.

Механизм действия регуляторных Т-клеток

Он множественный; происходит несколько разных вещей для подавления иммунного ответа.

Трег в/д с АПК, экспрессирует молекулы CTLA4, которые являются конкурентом CD28 и подавляет костимуляцию через комплекс В7. В направлении АПК поступает сигнал, который приводит к повышению экспрессии IDO. Это маркёр локальной иммуносупрессии.

Его экспрессия приводит к недостатку триптофана, без которого Т-клетки не могут эффективно делиться. Фермент метаболизирует триптофан, приводит к его недостатку. Кинуренин, который является продуктом действия ИДО, сам по себе обладает иммуносупрессивным действием.

- Трег могут модифицировать фенотип АПК, вызывая подавление экспрессии молекул костимуляции и повышении ИДО.

- Трег могут напрямую подавлять эффекторные Т-клетки при помощи иммуносупрессивных цитокинов, и при помощи прямого цитотоксического действия.

Трег - единственная популяция клеток, на которых высокоаффинный рецептор постоянно экспрессируется на высоком уровне. Зависят от ИЛ2. Присутствие Трег вызывает связывание ИЛ2 и эффекторным клеткам его не хватает.

Если взять все Т-клетки на периферии и покрасить на CD25, то увидим популяцию клеток с особо высокой экспрессией, это регуляторные Т-клетки. ИЛ-2 связывается с ними. Эффекторным клеткам, которые хотели бы находиться в фазе активного деления, не хватает ростового фактора, триптофана и иммунный ответ не формируется.

FoxP3

Ген FoxP3 экспрессируется и в "естественных" (центральных), и в "индуцируемых" (периферических) Трег клетках.

Сложно устроенный ген FoxP3 содержит несколько регуляторных участков, интегрирующих сигналы от TCR + CD28 (сигнал костимуляции), рецептора TGFβ (иммуносупрессорный цитокин), и рецептора IL-2 (Трег зависят от него абсолютно).

PI3K – киназа, суммирующая сигналы. В случае Трег она суммирует три разных сигнала. В ядре много транскрипционных, которые связываются с разными участками гена. Сделали нокаутных мышей по регуляторным участкам. Удаление FoxP3 приводит к IPHX. Это синдром дисрегуляции иммунитета, полиэндокринопатии, энтеропатии, сцепленный с X-хромосомой. Рецессивная тяжелая мультиорганный патология, вызванная мутациями гена FOXP3.

При изучении нокаутных мышей показали, что каждый регуляторный участок отвечает за одно свойство транскрипционного фактора.

Консервативные некодирующие участки ДНК, контролирующие экспрессию гена FoxP3. Три участка, каждый из которых связывает определенный набор факторов транскрипции, которые активируются набором сигналов от TCR+CD28 (костимуляция).

Если удалить CNS3, то экспрессия вообще не запускается.

CNS2 необходим для поддержания экспрессии при делении клеток.

Клетка получает сильный сигнал через TCR, решает стать регуляторной, дальше делится. Без участка CNS2 экспрессия этого ТФ начинает падать, клон плохо делится.

CNS1 участок необходим для запуска периферической экспрессии FoxP3, например при беременности. Плод - аллогенный организм. Для предотвращения иммунных реакция задействовано много механизмов иммунной толерантности, один из них - индукция в Т-клетках FoxP3, чтобы появились доп.регуляторные клетки, которые будут подавлять иммунный ответ.

ЛЕКЦИЯ №7. ОНТОГЕНЕЗ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Иммунологическая толерантность – отсутствие специфической продуктивной иммунной реакции на конкретный антиген. Это не означает, что антиген не распознается.

Селекция Т-лимфоцитов в тимусе

1) Отсутствие сигнала, т.е. клетка вообще ничего не узнает, даже собственные МНС. Не проходит позитивную селекцию, погибает. Кортикальная зона.

2) Максимальная сила сигнала соответствует потенциально аутореактивному лимфоциту, не проходит негативную селекцию и погибает. Медуллярная зона.

Клетки с промежуточным сродством TCR к МНС делятся на две категории:

- клетки со сродством ниже превращаются в наивную Т-клетку
- клетки со сродством выше превращаются в регуляторную Т-клетку

Изображён поверхностный фенотип.

CD62Leucocyte - молекулы адгезии.

CCR7 - рецептор Т-клеточных хемокинов (CCL19 и CCL21). Все вместе обеспечивает миграцию Т-клеток во вторичные лимфоидные органы, куда и должны отправиться из тимуса.

FoxP3 - ТФ, мастер-регулятор развития Трег.

Таким образом, субпопуляция Т-хелперов определяется не только цитокинами, но и теми ТФ, которые экспрессируются в ядре. FoxP3 достаточно, чтобы клетка была регуляторной. Можно его удалить из Трег, они перестанут оказывать супрессирующее действие на иммунитет.

CD25 - высокоафинная цепь (α) рецептора ИЛ-2, который является ростовым фактором. Он включается на стадии пролиферации цитотоксических Т-клеток во время иммунного ответа (прошлая лекция), от него зависят регуляторные Т-клетки.

Трег - единственная популяция Т-лимфоцитов, на которых высокоафинный рецептор ИЛ-2 экспрессируется не транзитивно на стадии пролиферации, а постоянно, они от него зависят.

Группы крови - пример ауто толерантности

Гликан на поверхности эритроцитов может модифицироваться (без, один сахар, другой). Совместимость групп крови проверяют при сливании: происходит ли агглютинирование или нет.

Агглютинины α и β (естественные антитела к антигенам А и В) закодированы в зародышевом геноме и производятся В1 клетками (предполагаемая физиологическая роль таких антител - иммунитет к пищевым антигенам). Используются конкретные V-

сегменты для создания рецептора => заданная специфичность. Появление на периферии В1 клеток, производящих антитела против А или В антигенов у данного индивидуума возможно только при отсутствии у него соответствующего антигена, т.к. иначе такая В клетка не пройдет отрицательную селекцию и не сможет покинуть костный мозг.

Если у индивида присутствует антиген А на поверхности эритроцитов, то клон В-1 клеток, производящих антитела к антигену А, будет уничтожен через негативную селекцию в костном мозге, он не выйдет на периферию, никаких антител против АГ А в системе не будет.

Агглютинины и агглютиногены являются взаимоисключающими. Если в крови есть агглютиногены А и В, то не будет агглютининов α и β . При встрече в организме антител к антигену А и антигена А происходит реакция против эритроцитов. Может вызывать токсичность или смерть.

На поверхности эритроцитов отсутствует МНСI, поэтому Т-клеточный ответ при переливании крови не является проблемой. От нападения НК-клеток эритроциты защищены молекулой CD47. Недавно показано, что по мере старения эритроцита CD47 меняет конформацию и превращается в сигнал "съешь меня" для макрофагов.

Механизмы аутоотолерантности

В очаге воспаления нужна аутоотолерантность, чтобы вовремя убрать воспаление, чтобы оно не стало хроническим. В барьерной ткани постоянно, т.к. не нужен иммунный ответ на нормальную микробиоту.

Иммунопривилегированные органы - участки, которые отделены физически от иммунной системы. В волосяном фолликуле есть стволовые клетки. Мозг, глаз, семенники, защёчные мешки, плацента (полиморфные отцовские белки являются чужеродными).

ГЭБ - барьер между кровью и мозгом.

Механизмы защиты от Т-лимфоцитов:

1. Плотные физические контакты на границе
2. Экспрессия FasL на астроцитах.
3. Различные механизмы иммуносупрессии (через цитокины и CTLA-4).

В случае нарушения барьерного режима случаются ярко выраженные иммунные реакции.

Подсаживали разные субстанции во внешнюю камеру глаза. Если всё прошло аккуратно и трансплантат прижился, не прорастает кровеносные сосудами, то возникает иммунная девиация - вся система становится толерантной к тем антигенам, которые содержатся в трансплантате. Толерантность к забарьерным антигенам распространяется и на чужеродные антигены - феномен ACAID (anterior chamber associated immune deviation).

Если произошло повреждение и проросли кровеносные сосуды, то такого не происходит. Пример иммунной реакции - офтальмопатия. При физ.травме глаза возникает иммунная реакция на здоровый глаз. Травмированный надо удалить, чтобы сберечь второй. Нарушение целостности барьера (травма; васкуляризация трансплантата в передней камере глаза) провоцирует системную иммунную реакцию.

Плод при беременности не отторгается, потому что задействованы многочисленные механизмы толерантности. В случае сбоев возможен иммунный конфликт. Плацентарные млекопитающие рождаются с незрелым иммунитетом.

Защита от болезнетворных микроорганизмов достигается через скоординированные действия врожденного и адаптивного иммунитета. Новорожденные в значительной степени полагаются на свою врожденную иммунную защиту, поскольку адаптивный иммунитет полностью развивается позднее, в первые годы жизни.

Младенцы, рожденные в срок, получают дополнительную защиту благодаря материнским антителам, которые передаются через плаценту.

У экстремально недоношенных новорожденных отсутствует трансплацентарный перенос материнских антител, что в основном происходит во время третьего триместра беременности. Передача материнских антител (IgG) происходит главным образом в конце беременности, с последующим приобретением IgA через грудное молоко после рождения. Собственный ответ антител становится полностью зрелым в раннем детстве.

В частности, у недоношенных новорожденных значительно снижены ответы провоспалительных цитокинов (т.е. IL-1 β , IL-6, TNF- α). Недоношенные также продуцируют ограниченное количество противовирусного INF- α , хотя его количество в плазме крови (дендритных клетках, являющихся основным источником этого цитокина), сравнимо с количеством у нормальных новорожденных или взрослых. Напротив, противовоспалительные реакции (т.е. IL-10 или TGF- β) высоки у недоношенных новорожденных.

Т-клетки в значительной степени предрасположены к дифференцировке во II тип, у людей при рождении наблюдаются высокие уровни Т-регуляторных клеток и НК.

Провоспалительные (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IL-23) и противовирусные (INF- α) ответы в основном **ослаблены у недоношенных детей**, тогда как продуцирование **противовоспалительного IL -10** относительно высоко на поздних сроках беременности и при рождении.

Низкая экспрессия молекул, отвечающих за **активацию иммунного ответа**, INF- α , IL-12. Мало клеточного компонента, отвечающего за иммунные реакции, антител мало. Это сделано, чтобы плод не реагировал на организм матери.

Высокая экспрессия иммуносупрессирующих молекул – IL10 и IL23. Т-клеточный ответ у эмбрионов появляется достаточно рано, но он начинается с T α 2, T α 1 ответ *появляется гораздо позже*. Трег и НК клетки появляются позже.

Собственных антител нет. Имеются антитела матери: IgG могут проникать

через плаценту, детектируются еще долго. Потом АТ (IgA) матери поступают с молоком. Зависимый от Т-клеток В-клеточный ответ возникает после рождения.

Укрепляется через несколько месяцев/лет (early childhood). Иммунная память отсутствует.

Продукция провоспалительных цитокинов понижена.

Очень мало цитокинов (ИНФγ и ИЛ-12), отвечающих за Th1 дифференцировку.

Зато много ИЛ-10 - цитокина, обеспечивающего иммуносупрессию.

Дефицит IgG – наиболее ярко проявляющийся дефицит у новорожденных.

Из матери крови поступают все IgG из крови, поэтому плод защищен от всего.

Время жизни этих иммуноглобулинов несколько месяцев, поэтому в течение первых месяцев жизни защищают материнские IgG, но к третьему месяцу его становится меньше.

Собственные первые иммуноглобулины - это IgM, которые производятся В-1 клетками. Полноценное развитие вторичных лимфоидных органов и способность производить IgA и IgG возникает позже. Во втором полугодии наблюдается дефицит, в это время ребенок подвержен вирусным заболеваниям.

IgA существует в виде димера, связанного специальным полипептидом.

Взаимодействие с Poly-Ig рецептором через секреторный компонент иммуноглобулина приводит к слиянию с клеткой эпителия и трансцитозу. Считается, что IgA обеспечивают защиту на слизистых, есть гипотеза, что кроме защиты, основная функция - коммуникация с микробиотой.

Правила отторжения трансплантатов. МНС-рестрикция

Инбредные мышинные линии - мыши, которые в течение многих поколений скрещиваются брат с сестрой. При таком скрещивании будут появляться вредные для выживания рецессивные аллели, большинство мышей погибнет, но среди выживших произойдет отбор неких гомозиготных вариантов, линия станет чистой.

В частности, набор аллелей МНС упростится, из 6 вариантов МНСI, которые есть в обычной популяции, останется 1 или 2. Линия А гомогенна по некому аллелю МНС.

Линия В гомогенна по другому аллелю МНС.

- Они будут отторгать трансплантат друг от друга.

- Кожа, пересаженная мышью той же линии, будет спокойно приживаться.

- Если мышь гибридная, то у нее будет оба варианта молекул МНС, она примет трансплантаты от линии А и линии В.

- Но в другую сторону не работает - ни линия А, ни линия В не примет трансплантат от гибридов.

Это происходит из прямого и непрямого аллогенного распознавания клеток донора Т-клетками реципиента.

Отличие по белкам МНС будет делать ответ на МНС доминантным по сравнению со всеми остальными.

Непрямое аллогенное распознавание

Свои клетки распознают те пептиды, по которым МНС донора отличаются от реципиента и возникает иммунный ответ.

АПК реципиента процессируют чужеродный антиген донора. Поскольку основное отличие между донором и реципиентом находится в МНС, то именно пептиды, происходящие из молекул МНС донора (которые не совпадают с МНС реципиента), будут вызывать реакцию. МНС, отличающееся по большому количеству аминокислот, даст большое количество антигенных пептидов, которые будут распознаны.

Трансплантат является источником чужеродных антигенов. Материал из трансплантата становится доступен антиген-презентирующим клетками реципиента в результате неизбежных процессов клеточной гибели, в виде экзосом и т.п. Неизбежное же воспаление дает необходимую коstimуляцию и цитокины. Активированные АПК активируют лимфоциты, те атакуют клетки трансплантата. Важным моментом (как и при ответе на опухоли и некоторые вирусы) является кросс-презентация, позволяющая АПК представлять антигенные пептиды не только на МНСII, но и на МНСI.

Прямое аллогенное распознавание

Т-клетки донора, когда были тимоцитами, проходили положительную и негативную селекцию в тимусе. В репертуаре был 1% TCR, которые будут узнавать донорское МНС с высокой аффинностью. Если бы имели возможность в тимусе провзаимодействовать, то они бы там погибли. Поскольку никакого донорского МНС в тимусе реципиента не было, то считали себя нормальными, НЕ аутореактивными Т-клетками, вышли на периферию. Ответ происходит очень быстро.

Активация аллореактивных Т-клеток реципиента

Для активации требуется стандартный путь, как и при любой иммунизации. В почке ДК донора и реципиента, они отправляются в лимфоидный узел, будут взаимодействовать с Т-клетками. $CD8^+CD4^+$ отправятся обратно в почку, там будут оказывать эффекторное действие.

Механизмы действия иммуносупрессоров. Основные классы иммуносупрессантов

На мембране АПК на МНСII находится пептид, который распознается TCR Th. Пролиферирующая способность клетки зависит от ИЛ-2, обязательно нужен сигнал

костимуляции B7-CD28. Активация приводит, в частности, к продукции ИЛ-2. Через ряд сигнальных путей (в т.ч. и кальциневрин) происходит продукция ИЛ-2.

Киназа mTOR играет важную роль в активации транскрипционных программ клеточного деления.

Самый примитивный способ иммуносупрессии - цитостатики. Циклоспорин блокирует кальциневрин. Это приводит к не дефосфорилированию NFAT, без которого разваливается система активация ИЛ-2 и других генов. Соответственно, активация Т-клеток отключается более специфически.

Можно отключить костимуляцию, приделав CTLA4 к константой части Ig, чтобы эта молекула дольше была в кровотоке (вообще, если надо сделать что-нибудь растворимое, то «что-то» приделывают к константной части Ig). Такая молекула будет делать то же, что и мембраносвязанный CTLA4, т.е. блокировать костимуляцию.

Антителами к ИЛ-2Р можно блокировать связывание ИЛ-2.

Антителами к TCR можно блокировать АГ сигнал.

Признаки (критерии) рака

Нет ни одного признака, связанного с иммунитетом! Это всё внутренние свойства клеток. Были добавлены четыре признака, два из которых напрямую относятся к иммунитету

- воспалительный процесс
- устойчивость к атакам со стороны иммунной системы.

На основании чего говорим, что воспаление способствует развитию опухолей?
Есть статистическая связь между хроническим воспалением при ряде инфекций и возникновением рака.

1) Хроническое воспаление и некоторые инфекции увеличивают риск развития рака (IBD Inflammatory bowel disease - колоректальный рак; HBV, HCV, алкоголь - гепатоцеллюлярная карцинома; *H.pylori* - рак желудка) - 15-20% всех случаев рака.

2) Различные типы иммунных клеток всегда обнаруживаются в солидных опухолях. В опухолевой ткани также повышена продукция многих медиаторов воспаления, в т.ч. цитокинов.

3) Воспаление дополнительно индуцируется в ходе опухолевой прогрессии за счет гипоксии, изменения обмена веществ в ткани, а также вследствие гибели клеток в результате терапии.

4) Нестероидные противовоспалительные препараты (например, аспирин) уменьшают риск развития метастаз для многих типов рака (особенно для опухолей ЖКТ, легких, груди, предстательной железы).

Аспирин использовали в качестве кардиопротектора. В течение многих лет люди из групп риска принимали аспирин, либо плацебо. *Будет ли эффект на кровеносную систему?* В ходе исследования значительная часть заболела раком, но так как канцер не был целью изучения, то параллельно с лечением онкологии больные принимали аспирин. Оказалось, что для некоторых типов рака была показана эффективность

(опухоль лёгких). Значительно уменьшалась вероятность возникновения метастаз после первичного облучения.

Большинство опухолей ускользает от иммунного надзора

Изображен жизненный цикл опухоли, которая не погибла, а превратилась в болезнь с симптомами.

Вначале, когда происходит злокачественная трансформация клеток, ранние раковые клетки высоко иммуногенны. Это связано с хорошей организацией контроля клеточного деления. Чтобы его сломать, нужно многое изменить в клетке.

Трансформированная раковая клетка обязательно экспрессирует опухоль-ассоциированные АГ. Они распознаются цитотоксическими Т-клетками, ещё в распознавании участвуют и Т-хелперы. Большинство клеток погибает, но так как они постоянно делятся, то появляются клетки без признаков иммуногенности. В частности, они могут снижать презентацию АГ, повышают собственную устойчивость к апоптозу □ их становится непросто убить.

Модифицируют свое микроокружение. В частности, появляются клетки, которые оказывают супрессивное действие. MDSC представляют собой АПК (миелоидные клетки), не получившие стимуляции через систему врожденного иммунитета и поэтому оказывающие не активирующее, а супрессорное действие. Это один из ключевых механизмов нормальной иммунологической толерантности.

Участвуют в распознавании АГ, но вместо активации, производят иммуносупрессорные цитокины (TGF- β , ИЛ-10). производят цитокины, которые индуцируют дифференцировку Тх в Трег.

Трег производят негативные молекулы костимуляции CTLA4. Это конкурент позитивной костимуляции, а PD-L1 - специализированная негативная костимуляторная пара.

Опухоль-ассоциированные макрофаги дифференцируются в M2-макрофаги. Оказывает иммуносупрессорное действие. В растворимом виде производится активирующий лиганд для НК-клеток.

По идее, клетки с низкой экспрессией МНС должны быть убиты НК-клетками по признаку «отсутствия своего». Если активирующий лиганд для НК-клеток произвести в растворимом виде, то он заблокирует рецепторы, клетка никого не убьёт. Такие растворимые лиганды можно встретить в плаценте. В итоге происходит иммуноредактирование опухоли.

Опухоль превращается в популяцию клеток, устойчивую саму по себе, мало даёт мишеней для атаки, активно трансформирует окружение в иммуносупрессорном направлении. Примером такого процесса является трансмиссивная опухоль собак.

Половым путем передаются клетки, которые уже иммуноредактированы. Примерно 11к лет назад возникла опухоль, выбросила гены, необходимые для уничтожения клеток, либо иммунного распознавания. В течение 11к лет клетка живет, стала невосприимчивой к иммунной системе собак.

Примеры опухолевых антигенов, не ассоциированных с вирусами

1) Сверхэкспрессированные или аномально экспрессированные клеточные гены (HER-2 - рак молочной железы). Human epidermal growth factor receptor-2. Этот рецептор есть на нормальных клетках молочной железы, но на раковых клетках его намного больше. Этого может быть достаточно для попыток/подходов к иммунотерапии. Особенность рецептора в том, что раковые клетки от него зависят. Они через него получают пролиферативный сигнал, а лекарство его блокирует.

2) Онкофетальные антигены (α -фетопротеин - гепатоцеллюлярная карцинома, раково-эмбриональный антиген - опухоли кишечника). Эти белки функционируют в течение эмбрионального развития, а во взрослом состоянии не экспрессируются. Поскольку на стадии эмбриона иммунная система незрелая, она их не видит. Когда опухоль индуцирует экспрессию белков, то может возникать иммунный ответ.

Фетопротеин экспрессируется в опухолях печени, РЭА - в опухолях кишечника. Используются, как диагностические/прогностические маркеры. Тест на РЭА - стандартный тест после удаления опухоли кишечника. Если она возвращается, то появляется РЭА, антитела на него. Иммунная система отвечает, но победить не может. Для врача хороший диагностический признак.

3) Дифференцировочные антигены (тирозиназа - меланома), характерные для какой-то ткани. Тирозиназа экспрессируется в меланоме и в нормальных меланоцитах. Это хорошая мишень для иммунотерапии, т.к. клетки, экспрессирующие этот белок, не являются жизненно важными. Признак хорошего ответа на меланому - витилиго (появление бесцветных пятен на коже). Уничтожение меланоцитов приводит к дефекту, но параллельно приводит к уничтожению опухолевых клеток. Это хорошо.

4) Раково-гаметные антигены (MAGE-1, NY-ESO-1 - меланома).

Это белки, экспрессирующиеся в семенниках и яичниках, участвуют в гаметогенезе.

Органы размножения являются иммунопривилегированные, поэтому для иммунной системы некоторые АГ невидимы. Появление такого белка в опухоли воспринимается, как чужеродное.

Пауль Эрлих выдвинул гипотезу иммунного надзора над опухолями.

В 1910 году *открыли первый онкогенный вирус* - вирус саркомы Рауса. Опухоль можно переносить от одного животному к другому, но не работает для млекопитающих.

Лев Зильбер сформулировал концепцию того, что «рак - заболевание генома». Зильбер догадался, что вирус может присутствовать в опухолях только на ранних стадиях – он лишь запускает процесс болезни, а затем исчезает. Главный принцип его гипотезы – вирус не противостоит хозяйской клетке, не размножается в ней – он взаимодействует с ней, меняет ее наследственные свойства, превращая в опухолевую, а затем исчезает.

Классические вирусы, способные передавать заболевания, не обнаруживаются в человеческих опухолях из-за длительного инкубационного периода, в течение которого активная продукция вируса прекращается, а онкогенные элементы вируса прячутся в геном.

Начали появляться группы пациентов с иммуносупрессией. Оказалось, что ослабление иммунитета приводит к увеличению частоты раковых заболеваний, ассоциированных с онкогенными вирусами.

Три группы иммуносупрессированных пациентов

- наследственное снижение иммунитета. Проблемы с опухолями при врожденном снижении иммунитета были известны к 1980-х годам.

Две группы новые. Осознали, что онкогенные вирусы находятся под контролем здорового иммунитета, в случае ослабления дают всплеск конкретных видов опухолей вирусного происхождения.

- снижение иммунитета вследствие иммуносупрессии после трансплантации почки.
- гомосексуалисты

Вирусы, проявляющие себя, это гепатит В, вирус Эпштейна-Барра, вирус папилломы человека.

История успеха борьбы с раком вирусного происхождения - иммунизация против вируса папилломы человека. Вирус папилломы человека (ВПЧ, HPV) - ДНК-вирус. Известно более 100 его типов, из них два наиболее иммуногенны и вызывают рак шейки матки. После заражения половым путем происходит стандартная вирусная инфекция. Большинство девушек выздоравливает. Реже вирус может интегрироваться в геном и через десятки лет приводить к гиперплазии и злокачественному перерождению тканей.

Иммунизация против вируса. Это НЕ противораковая вакцина, а превентивная, предотвращает заражение. В России - Гардасил и Церварикс.

Обе вакцины сделаны на основе вирусоподобных частиц, построенных из белков оболочки HPV. Обе вакцины защищают от самых опасных типов ВПЧ. Согласно имеющимся на настоящий момент данным, профилактическая вакцинация против HPV сокращает риск развития рака шейки матки примерно на 70%. Это те 70%, за которые отвечают 16 и 18 типы. Эффективность действия близка к 100%. Показано, что 9-валентная вакцина против 16 и 18 типов защищает не хуже, даёт защиту против дополнительных онкогенных типов HPV, повышая защиту до 90%.

Некоторые аргументы в пользу существования иммунного надзора у человека

* Инфильтрация в опухоль специфических Т-лимфоцитов.

Есть TCR, способные узнавать нечто, что представлено на опухоли, но не уничтожают ее вследствие иммуносупрессорного окружения.

* Паранеопластические аутоиммунные синдромы.

«Паранеопластические» означает, что симптомы проявляются не в том органе, в котором есть опухоль. Пример - неврология при мелкоклеточном раке лёгкого. Рак происходит из клеток, которые играют важную роль в иннервации лёгких. Имеется семейство белков Нu, которое занято трансдукцией сигналов в ЦНС. В мелкоклеточном раке лёгкого начинают экспрессироваться. Поскольку ЦНС - это иммунопривилегированный орган, то для иммунной системы это новый белок, на который начинается иммунная реакция. Активированные Т-клетки могут проходить через ГЭБ. Атакуют нейроны, начинается нейродегенерация. Пациент погибает от неврологии, а опухоль растёт медленно и не причиняет неудобств, т.к. есть хороший иммунный ответ.

* Существование предраковых состояний произвольно большой длительности (моноклональная гаммапатия неустановленной значимости / множественная миелома). Множественная миелома происходит из плазматических клеток - терминально дифференцированных В-клеток. Клон растёт, вспоминает, что ему нужно расположиться в костном мозге. Делится. Костный мозг разрушается, кости с дырками. Предшествующим состоянием является размножение плазматического клона, продукция моноклонального иммуноглобулина, который можно редактировать. Клон не отправляется в костный мозг, не пролиферирует. Такое состояние может длиться долго, умирает своей смертью.

* Спонтанная регрессия меланомы.

Редкое событие. Был показан специфический Т-клеточный ответ.

* Пересадка опухолевых клеток иммунодефицитным пациентам вместе с трансплантатами. Пример - бабл-бой. Жил с иммунодефицитом. Пересадили костный мозг сестры. У неё вирус Эпштейн-Барра в спящем состоянии. У Дэвида выросли сотни опухолей, они его убили.

ЛЕКЦИЯ №8. ИММУНОТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ

Воспаление может быть вредным для опухоли, следовательно, □ полезным для пациента. Врачи отметили, что пациент, если не умирал от бактериальной инфекции, мог излечиться от онкологии.

Вильям Коли (William Coley). Неоперабельная опухоль на шее полностью исчезла после операционного удаления и приступа рожистого воспаления. Пациент жил без проблем. Неспецифической стимуляции иммунитета при остром воспалении может быть достаточно для лечения рака. Начал экспериментировать с воспалением, вызываемым бактериями.

Результатом было открытие цитокина ФНО - ключевой провоспалительный цитокин. Был открыт Ллойдом Олдом.

У мышей различными способами вызывали ответ на бактерии.

Далее в прививаемую опухоль кололи сыворотку крови, содержащую растворимые факторы, которые появлялись после ответа на патогены. Опухоль рассасывалась в течение суток. Эффект объяснялся действием повышенных доз ФНО на сосудистый эндотелий. При нормальном воспалении провоспалительные цитокины активируют эндотелий сосудов, делая его более проницаемым для иммунных клеток, факторов и т.д. Ударная доза провоспалительных цитокинов приводит к перегрузке эндотелия кровеносных сосудов, которые прорастают в опухоль. Они забиваются клетками, становятся непроходимыми для эритроцитов, опухоль погибает от гипоксии. Прямого цитотоксического действия на клетки опухолей нет, но эффект есть!

На людях не применяют из-за высокой системы токсичности. Но можно использовать в ситуации изолированной перфузии конечностей. Если у пациента неоперабельная опухоль конечности, которую можно нейтрализовать, изолировав кровообращение, то ткани конечностей выдержат большую дозу ФНО, чем внутренние органы. В комбинации с цитостатиком такая терапия может привести к удалению опухоли.

Иммунотерапия опухолей мочевого пузыря

Возможно лечение на ранней стадии, пока опухоль не проросла в капсулу. Инъекция вакцины БЦЖ в мочевой пузырь вызывает воспаление, которое приводит к излечению от опухоли. Другой пример неспецифической стимуляции иммунного ответа - Лайфферон, интерферон α. Тогда речь будет идти об антивирусной инфекции, а не антибактериальной.

Противоопухолевая вакцинация на основе дендритных клеток

Дендритноклеточные вакцины наиболее распространены. Лучше получить АПК, обработать *in vitro*, ввести пациенту.

Из крови получают моноциты (предшественник ДК), далее при помощи культивирования с ростовыми факторами (GM-CSF, IL-4) они превращаются в незрелые ДК.

Разными способами клетку нагружают антигенами: экстракт из раковых/аллогенных/собственных клеток + стимуляторы врождённого иммунитета (например, провоспалительные цитокины). В результате получаются зрелые активированные ДК, которые находят опухоль и за счёт своей массовости переключают иммунный ответ с иммуносупрессии на уничтожение опухолевых клеток.

Иммуногенная клеточная гибель при химиотерапии

Активирующими сигналами для иммунной системы являются такие молекулы, как

- кальретикулин - Ca^{2+} -связывающий шаперон ЭПС, который экспонируется при клеточной гибели.

- HMGB1 - негистоновый белок хроматина

- АТФ появляется во внешней среде после клеточной гибели.

Оказалось, что для кальретикулина/АТФ есть специфический рецептор на фагоцитах. Рецептором для HMGB1 является TLR4. Каждое из этих в/д вызывает специфические процессы в фагоцитах, которые либо повышают поглощение обломков клеток, погибших в результате иммунотерапии либо улучшают презентацию АГ либо стимулируют острое воспаление.

Всё вместе приводит к тому, что разные химиотерапевтические препараты имеют один смысл - цитостатический, т.е. блокируют пролиферацию. Механизм действия разный! В результате этого продукты гибели клеток в разной степени индуцируют иммунную систему.

Иммуногенная клеточная гибель при радиотерапии

В результате радиотерапии происходит локальная активация комплемента.

C3a и C5a (в норме провоспалительные медиаторы) накапливаются в опухолях и способствуют противоопухолевому иммунитету. Дексаметазон подавляет активацию комплемента и уменьшает эффективность терапии.

Важную роль в активации иммунного ответа играет комплемент. Нормальные клетки защищены от комплемента. Клетки, гибнущие в результате облучения, теряют такую защиту. В плаценте в норме присутствуют T_H2 и T_{reg}. Комплемент воспринимает их фрагменты, как патогены, в итоге происходит активация и продукция C3a и C5a.

Работают, как воспалительные медиаторы, вызывают активацию ДК, далее активацию цитотоксических Т-клеток.

Адоптивный перенос специфических лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, после лимфодеплеции

В большинстве случаев в опухолях уже обнаруживается инфильтрация Т-клеток. Посмотрев на специфичность их рецепторов, можно обнаружить, что они что-то узнают на опухолевых клетках.

Из биопсии опухоли получают суспензию клеток, разбивают её на фрагменты, культивируют с ИЛ-2 (на ранних стадиях ничего, кроме ИЛ-2, не добавляли; не знали, что таким образом вызывали индукцию Трег).

Потом добавляют стимуляцию антигенных рецепторов и стимуляцию опухолевых антигенов. + ячейки – это отбор клонов, реагирующих на лизаты опухолевых клеток или на какой-то специфический АГ. В результате размножают Т-лимфоциты в культуре и вводят в пациента. Не знали, что наша система хорошо поддерживает иммунный гомеостаз. Если уже есть какое-то количество лимфоцитов, то добавленные не очень хорошо приживаются. Для того чтобы пересаживаемые лимфоциты прижились, были приняты (adoption) организмом, проводят частичную лимфодеплецию при помощи химиотерапии или радиации, или их комбинации. Пациента не убивают, но количество лимфоцитов уменьшается.

Предварительное "кондиционирование" реципиентов приводит к существенному улучшению выживания при адоптивной терапии злокачественной меланомы. Кривые выживания пациентов в течение 5 лет в зависимости от режима лимфодеплеции. Если не удаляли собственные лимфоциты, то выживание очень низкое. NMA (химия уничтожает периферические клетки, но не трогает костный мозг) в комбинации с радиацией (ТБИ) освобождает место в костном мозге, куда могут прийти клетки памяти. При более агрессивном режиме полного излечения не наблюдалось, но получалось 40% выживших. Для меланомы это хорошо.

Регрессия меланомы в результате селективного удаления Трег

Один из возможных режимов лимфодеплеции – это использование специфического иммунотоксина, убивающего Т-лимфоциты. Химию/радиацию не применяют.

Использовалась химерная молекула из ИЛ-2 и дифтерийного токсина. ИЛ-2 нужен для того, чтобы связаться с рецептором. Так как это ИЛ-2, то присутствует единственная популяция клеток - это Трег. Они страдали в первую очередь. После поглощения этой конструкции работал механизм токсичности токсина. Он блокирует трансляцию, нет белка, погибают Трег. Вследствие этого Т-клеточный ответ на меланому сместился в

Tx1, стал активным и цитотоксическим. Иммунитет был в состоянии держать опухоль под контролем из-за снятия иммуносупрессии.

Варианты генетической модификации лимфоцитов

Что можно делать с Т-клетками? У них небольшая специфичность, сложно выращивать, Т-клетки быстро истощают свой пролиферативный потенциал. Не так много жизненных сил остается на борьбу с опухолью. Популяцию Т-клеток трансфецируют при помощи ретровируса. Вставить в их геном заранее клонированные α - и β -цепи TCR, узнающие конкретный пептид, экспрессирующийся в опухоли у пациента. Получаем популяцию Т-лимфоцитов с двумя рецепторами. *Что происходит с исходным?* Неизвестно. Показано, что сильная экспрессия одного рецептора подавляет экспрессию второго. Возможен вариант, когда одновременно экспрессируются оба рецептора, но тогда может произойти аутоиммунное осложнение. Тем не менее, можно получить популяцию клеток с хорошим пролиферативным потенциалом и со специфичностью к тому пептиду, который нам нужен. Ключевой момент - наличие специфического антигена, который будет узнавать такой рецептор.

Химерные антигенные рецепторы

От TCR и молекул коstimуляции берут внутриклеточные фрагменты, к ним пришивают вариabельный домен антитела, узнающий нечто на поверхности Т-клеток. Используют фрагменты молекул коstimуляции, содержащие ITAM мотивы, т.е. способные привлекать Src-киназы. Домен легкой и тяжелой цепи сшиты линкером, получается единый полипептид.

Ген, кодирующий единый полипептид, можно поместить в ретровирусный вектор, ввести в Т-клетки, которые будут экспрессировать нечто, похожее BCR, а внутри содержать нормальный Т-клеточный и коstimуляторный сигналинг. Такие рецепторы вызывают нормальный цитотоксический ответ, позволяют придать Т-клетке специфичность к чему угодно, а не только к определенному пептиду, способному связаться с аллелем MHC. Химерные антигенные рецепторы позволяют придать Т-клеткам специфичность теоретически к любому известному антигену

В первом поколении рецепторов присутствовал снаружи связывающий домен, а внутри – один или несколько ITAM мотивов.

Во втором поколении во внутриклеточной части есть фрагменты из коstimуляторных молекул (CD28 или Fc-рецепторов) + ITAM мотивы.

В третьем поколении рецепторов научились комбинировать мотивы в разных сочетаниях, достигая оптимальной комбинации киназ, которые активируются в ответ.

Индукцируемые химерные антигенные рецепторы. «Интеллектуальные» геномодифицированные Т-лимфоциты

- ☐ ☐ Т-клетки активируются только распознаванием двух антигенов
- ☐ Рецептор synNotch (реагирует на антиген 1) индуцирует CAR (реагирует на антиген 2)
- ☐ Такие Т-клетки убивают только раковые клетки, экспрессирующие оба антигена
- ☐ Расширяется набор антигенов, которые могут быть мишенью иммунотерапии.

Можно сделать Т-клетку, которая будет убивать мишень в случае одновременной экспрессии антигенов А и В. В ответ на стимуляцию антигеном А запускается ТФ, который активирует ген, кодирующий химерный антигенный рецептор, он появляется на поверхности, приобретает способность активировать Т-клетку в ответ на антиген В.

Если на клетке-мишени нет А или В, то реакции не будет. На раковую клетку, которая экспрессирует оба антигена, реакция будет.

Механизмы противоопухолевого действия антител

- 1) Прямое действие на раковые клетки («таргетирование»). Блокировка пролиферативных сигналов. Антитела будут блокировать ростовой рецептор на опухолевой клетке. Соответственно, подавлять рост опухоли или индуцировать апоптоз. Это таргетные препараты.
- 2) Иммунологическая цитотоксичность. АТ может активировать комплемент и НК.
- 3) Блокировка ангиогенеза опухоли. АТ может блокировать ангиогенез опухоли. Опухоль, которая не снабжает себя кислородом, не вырастет до опасного размера. В данной ситуации блокируют VEGF-R (фактор роста эндотелия сосудов).
- 4) Блокировка лигандов и рецепторов негативной костимуляции («иммунологических чекпоинтов»).

На опухолевых клетках экспрессируются молекулы, которые подавляют костимуляцию, это PD-L1, экспрессия CTLA4 на Трег.

Это механизмы иммунологической толерантности, которые задействует опухоль для подавления иммунного ответа. Эти механизмы можно блокировать при помощи АТ. В результате баланс иммунного ответа смещается в сторону продуктивной реакции. Anti-PD-L1 и anti-CTLA4 препараты прошли отбор на возможность терапевтического использования.

Использование моноклональных АТ для вторичного таргетинга раковых клеток. Можно использовать специфичность связывания АТ с какой-то структурой для привлечения к опухоли вредоносного агента. Это может быть лекарство, токсин, радиоизотоп, TCR.

Мишени терапевтических антител на раковых клетках. Антител, которые применяются в клинике, не очень много.

CD19 - компонент В-клеточного корцептора. Эти молекулы используются для уничтожения В-клеточных лимфом. Добавление подходящего антитела к такому маркеру вызывает активацию цитотоксичности. Оказалось, что уничтожение всех периферических В-клеток приводит к не очень серьёзным проблемам. Популяция В-клеток восстанавливается, а опухоль подавляется. Популярная мишень - рецепторы факторов роста. Их блокировка двух мембранных рецепторов, участвующих в клеточной адгезии, позволяет бороться с гемопоэтическими опухолями.

UCART19 – готовые аллогенные Т-лимфоциты, несущие CAR, для лечение В-клеточных лимфом

CD19-CAR обеспечивает распознавание и уничтожение В-клеток. Нокаут TCR и CD52 при помощи TALEN нуклеаз обеспечивает отсутствие аллореактивности и нечувствительность к алемтузумабу (моноклональное антитело к CD52, используемое для лимфодеплеции).

RXR8 - искусственный suicide gene на основе CD8αα, обеспечивающий (если нужно) селекцию на анти-CD34 и чувствительность к ритуксимабу (анти-CD20).

Девочку вылечили от лейкемии при помощи Т-клеток. Ключевой компонент – химерный антигенный рецептор (CAR) к CD19 на поверхности В-клеток.

TCR уничтожен при помощи геномного редактирования TCR, чтобы не вызывать аллореактивности против чужого МНС. Уничтожен ген, кодирующий CD52. Это цитокин, который можно использовать для лимфодеплеции. Если одновременно с препаратом будут применяться anti-CD52, то Т-клетки будут иммуночувствительны. Чтобы клетки не задерживались в организме, вводят искусственный ген RXR8. Позволяют убить клетки при помощи anti-CD20, либо отобрать их из смеси при помощи anti-CD34. Получили Т-клетку, направленную против CD19, но этот реагент живой, месяцами гоняется за раковыми клетками. Есть инструмент для собственного удаления из системы.

Побочные эффекты иммунотерапии рака. Большинство токсичных эффектов иммунотерапии опухолей связаны с аутоиммунными реакциями.

Аутоиммунные реакции даже полезны: при лечении меланомы, витилиго аутоиммунной природы является хорошим прогностическим признаком. Если наблюдается, то лечение идёт успешно.

Поражение органов при аутоиммунных процессах

Аутоиммунные заболевания - группа разнородных патологий, возникающих вследствие выработки аутореактивных антител и/или размножения аутоагрессивных

клонов Т-лимфоцитов, что приводит к повреждению нормальных тканей и к развитию аутоиммунного воспаления.

Разделение на органоспецифические и системные является достаточно условным. Органоспецифические рано или поздно переходят в системные.

Яркая черта аутоиммунных заболеваний - женщины болеют чаще, чем мужчины.

Возможные объяснения «гендерного сдвига»:

- гормональный фон
- повышенная экспрессия Х-сцепленных генов, связанных с иммунитетом
- микрохимеризм.

Причины развития аутоиммунных процессов.

- Неправильная экспрессия МНСII на клетках, которые не должны экспрессировать и презентировать АГ.

- Повреждение тканевых барьеров. Офтальмопатия - атака на второй глаз при повреждении первого.

Роль инфекций в развитии аутоиммунных процессов

Механизм — к чему приводят с точки зрения иммунных систем. Нет такого, что ревматоидный артрит возникает не только из-за действия суперантигена. У каждого заболевания множество разных причин. При нейродегенеративном заболевании **высвобождаются тканевые антигены**.

- Щитовидная железа отчасти является иммунопривилегированным органом.
- Клетки печени легко погибают. Много продуктов тканевого распада поступает в циркуляцию и активно воспринимаются иммунной системой.

Сахарный диабет I типа - аутоиммунная атака на β -клетки поджелудочной железы □□прекращение выработки инсулина.

Показано, что вирусная инфекция с выработкой $INF\alpha$ приводит

- к атаке на зараженные вирусом β -клетки
- к расширению специфичности атаки с постепенной атакой собственных антигенов.

Вируса нет, а β -клетки продолжают уничтожаться.

Волчанка. Пример ситуации, когда на патоген налипают собственные аутоантигены. Волчанка провоцируется антителами. Считается, что иммунный ответ возникает на комбинацию микробов с компонентами хроматина □□появляются антитела против собственных ядерных генов. Далее постепенно развивается аутоиммунный процесс.

Сахарный диабет II типа, который связан с нечувствительностью к инсулину, тоже бывает аутоиммунной природы. Он может возникать вследствие образования антител против инсулина/инсулиновых рецепторов. Выработка инсулина нормальная, но он не будет доходить до клеток.

Ревматоидный артрит может возникать из-за поликлональной активации Т-клеток при помощи суперантигена.

Из всего многообразия причин развития аутоиммунных заболеваний, самой понятной является нарушение аутоотолерантности, т.е. патология отрицательной селекции в тимусе.

При развитии тимоцитов в тимусе, те клетки, которые в/д с собственными пептидами, уничтожаются в ходе отрицательной селекции.

Транскрипционный фактор AIRE следит за тем, чтобы на клетках эпителия тимуса в нужном количестве и в нужной последовательности экспрессировались фрагменты различных органоспецифичных белков. В случае его мутации выпадает целый репертуар пептидов, Т-клетки выходят на периферию и причиняют аутоиммунные повреждения. Синдром APECED (аутоиммунная полиэндокринопатия с кандидозом и эктодермальной дистрофией).

Другая важная вещь - сигнал индуктивного апоптоза через пару Fas-FasL. Она заточена на подачу клеткам сигнала о самоубийстве.

FasL является структурным родственником ФНО. Т-клетка несет на поверхности Fas, клетка эпителия при необходимости может экспрессировать FasL.

Мутация обоих компонентов пары даёт идентичный фенотип: нарушается апоптоз развивающихся лимфоцитов, наблюдается лимфопролиферативный синдром, - вторичные лимфоидные органы гипертрофированы, на периферию выходит много Т- и В-клеток. Многие из них это аутореактивные Т-клетки, аутоантитела, происходит реакция на почки, сосуды.

Такая мутация, с одной стороны, приводит к аутоиммунным поражениям, но и нормальный иммунитет против инфекций тоже не вырабатывается (к иммунодефициту). У человека – аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (синдром Canale-Smith).

Аутоиммунные процессы, вызванные мутацией гена FOXP3, приводят к нарушению развития Трег. В норме FOXP3 следит за тем, чтобы Т-клеточный ответ не был слишком сильный. В случае развития опухоли это мешает, в случае физиологических иммунных реакций - помогает. При мутации FOXP3 не развиваются Трег. Наблюдается чрезмерная аутоиммунная реактивность с полиэндокринопатией. Мутация Scurfy гена *foxp3* блокирует развитие регуляторных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток, что приводит к развитию Х-сцепленного синдрома иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии (IPEX).

Иммунопатогенез ревматоидного артрита. С этим заболеванием связаны успехи антицитокиновой терапии. Артрит - это реакция против хряща сустава, приводящая к воспалению, потом к деформации.

- Повышенный риск развития у носителей некоторых аллелей МНСII (HLA-DR4). Это связано с тем, что в них хорошо располагаются некоторые собственные пептиды из клеток-мишеней.

- Связь с воспалением сосудов - вероятно, причинно-следственная.

- Это заболевание восприимчиво к блокаде провоспалительных цитокинов (ФНО) и к деплеции В-лимфоцитов (но не Т-лимфоцитов).

Некоторые применяемые в клинике иммуносупрессанты

Кортикостероиды (классика) - естественные ингибиторы воспаления.

Цитостатики применяются в терапии рака для выборочного блокирования деления наиболее быстро пролиферирующих клеток, они же пригодны для борьбы с аутоиммунными реакциями, потому что активно реагирующий клон лимфоцитов тоже относится к быстро делящимся клеткам.

Циклоспорин А, который используется для борьбы с отторжением трансплантата, также подходит для таких целей. Может подавлять пролиферацию Т-клеток, действуя на NFAT через кальциневрин.

Финголимод подавляет миграцию клеток за счет ингибирования рецептора сфингозин-1-фосфата, а это та самая молекула, которая обеспечивает выход лимфоцитов из вторичных лимфоидных органов в циркуляцию. На Т-клетках есть специальный рецептор для него. Можно его блокировать, не давая клеткам, участвующим в аутоиммунной реакции, правильно перемещаться.

Некоторые антитела – иммуносупрессанты

Анти-CD20 уничтожает все В-клетки. Уничтожение всех зрелых В-клеток не является проблемой. На плазматических клетках нет ни CD19, ни CD20. РС, сидящие в костном мозге, продолжают производить защитные антитела. Из ранних предшественников в костном мозге, в которых пока нет CD19 и CD20, через несколько недель дифференцируются новые В-клетки. В случае В-клеточной опухоли можно убить опухоль вместе со здоровыми клетками. В случае аутоиммунной реакции, в которой участвуют В-клетки, можно убить аутореактивные В-лимфоциты и вместе с ними все остальные.

Можно удалять зрелые лимфоциты при помощи анти-CD52.

Можно подавлять активацию Т-клеток при помощи анти-CD3.

Можно подавлять пролиферацию при помощи анти-ИЛ2Р. Одновременно можно подавить Трег.

Много антител, которые подавляют ФНО.

Анти-ИЛ6Р и ант-ИЛ1Р используются для лечения ревматоидного артрита.

Рекомбинантные белки - ингибиторы ФНО

Исходные моноклональные антитела получают из мышей. От однократного введения такого антитела плохого ничего не будет. Оно живет в кровотоке N недель. После нескольких уколов начнется иммунный ответ на чужеродный белок.

Чтобы с этим бороться, делают химерные антитела, у которых к человеческой константой части приделывают вариабельную мышиную. Делают мышей, которые производят человеческие антитела за счет замены мышинных генов, делающие антитела, на человеческие. МНС заменен на человеческий, чтобы подбирался правильный репертуар. Можно делать антитела на основании растворимого рецептора.

Рецептор для ФНО, а к нему приделана Счасть от антитела, чтобы дольше в кровотоке быть, такая конструкция связывается с лигандом и блокирует антитело.

Реакции гиперчувствительности (аллергические реакции) (по классификациям 1947 и 1963 г.)

Аллергические реакции - это чрезмерные реакции иммунной системы на то, на что в норме не надо реагировать. Старая классификация выделяет реакции немедленного и замедленного типа. Реакции немедленного типа (на пыльцу): вдохнул, прошел, начать чихать. Реакции замедленного типа (кожные реакции) могут появиться на следующий день или через день, или через сто лет.

Современная классификация делит аллергические реакции по эффекторным механизмам.

Способы подавления аллергических реакций

Самый простой способ - блокировка действия тучных клеток (антигистаминовые).

При хроническом воспалении (когда аллергическая реакция в бронхах переходит в астму) применяют кортикостероиды.

Когда реакция идет через T_H2 ответ можно попытаться сдвинуть ответ в сторону Трег или T_H1 . Для чего проводится многократная иммунизация аллергеном.

В случае классической IgE аллергии - это блокада анти-IgE антителами. Необходимо выяснить молекулярную природу аллергена, подобрать соответствующие антитела.

Аллергические реакции - побочный эффект улучшения качества жизни:

"Гигиеническая гипотеза": в цивилизованных странах уровень инфекционной нагрузки существенно снижен. В частности, мало инфекций, вызывающих сильные $Th1$ ответы, в результате Т-клеточный баланс сдвинут в сторону $Th2$ и продукции антител, в частности, IgE.

Первичная реакция проходят на стадии IgM, когда аффинность не очень высокая, а спектр реакций широкий. В ходе соматического гипермутагенеза превращается в высокоспецифичный IgE.

"Вакцинная гипотеза": массовые вакцинации, которые специально разрабатываются так, чтобы стимулировать продукцию антител, еще сдвигают баланс Т-хелперов в сторону $Th2$.

"Экологическая гипотеза": мы контактируем с большим количеством неприродных химических соединений и лекарств, некоторые из которых оказываются аллергенами и при повторном воздействии "сенситизируют" иммунную систему.

Аллергические реакции - важный компонент иммунитета:

"Гипотеза охранной системы": большинство аллергических реакций направлены на удаление раздражающего агента (выделение жидкостей, чихание, кашель), т.е. могут иметь непосредственный защитный эффект. Неприятные ощущения также могут указывать на местоположение паразита и стимулировать его механическое удаление (вычесывание, выкусывание), или стимулировать смену места проживания.

ЛЕКЦИЯ №9. ВТОРИЧНЫЕ ЛИМФОИДНЫЕ ОРГАНЫ

Функции вторичных лимфоидных органов

- Захватывать патогены «на входе» и тем самым ограничивать их распространение (врожденный иммунитет/селезенка). Селезенка работает с патогенами, которые попали в кровь. Клетки врожденного иммунитета их распознают и уничтожают фагоцитозом.
- Способствовать контакту антиген-презентирующих клеток (в первую очередь ДК) и лимфоцитов.
- Способствовать контакту Т- и В-лимфоцитов. В-клеточный антителы ответ не возможен без помощи Т-клеток. Т-хелперы функционируют в ЛУ, «молекулярно» обеспечивают помощь Т-клетке.
- Обеспечивать ниши для дифференцировки эффекторных клеток (после распознавания).

У лимфатической системы нет органа, который бы качал лимфу, но есть система клапанов. Лимфа из тканей собирает жидкость, по ЛУ движется в определенном направлении, в обратную сторону тока нет. Активного прокачивания не происходит. ЛУ в пахе, в подмышечной зоне и шее. Все обеспечивают иммунный ответ.

Селезенка

Белая пульпа селезенки является собственно вторичным ЛО. Если сделать продольный срез, то будет распределение лимфоцитов по Т- и В-клеточной зоне (тоже в лимфатическом узле).

Маргинальная зона

Из крови поступили потенциальные зараженные клетки/патогены. Есть несколько слоёв макрофагов, которые различаются по функциям и маркерам. Система из нескольких типов макрофагов обеспечивает распознавание патогенов и, с некоторым ограничением, элиминацию этих патогенов, поступивших из крови.

Расположение, строение и функция лимфатических узлов

- ЛУ находятся на стыке лимфатических и кровеносных сосудов: по лимфатике из тканей поступают клетки, готовые к презентации антигена, а также свободный антиген.
- Из кровотока, из кровеносных сосудов вглубь органа поступают лимфоциты: Т клетки для возможной встречи с антигеном, презентуемым дендритными клетками (ДК), и В клетки – для возможной встречи со свободным антигеном.

- Т клетки, которые не нашли партнёра в виде ДК, несущей правильный эпитоп, выходят с лимфой и возвращаются в кровь через грудной проток (рециркуляция). Лимфоцит гуляет и проходит через все ЛУ. Если в каком-то из них есть ДК, которая презентует тот самый эпитоп, на который направлен рецептор Т-клетки, то эта клетка вступает в плотный контакт и остается в ЛО.

Это называется иммунное улавливание. Получается, что ЛУ уловил из пула Т-лимфоцитов только определенные типы, которые получили сигнал, что нужны, активируются, дифференцируются и превращаются в клетки правильной специфичности.

Пути миграции Т-клеток и ДК в лимфатический узел

Сосуды с высоким эндотелием. Лимфоциты должны пройти через стенки сосудов, чтобы оказаться внутри самого ЛО. «Рельсы» образованы фибробластами, по ним ездят Т-лимфоциты и встречают ДК, которые стоят на пересечениях и ждут своего шанса представить антиген правильной Т-клетке.

Молекулы адгезии

- Интегрины, селектины и адрессины.

- Важнейший аспект для иммунного ответа – участие во в/д лейкоцитов с эндотелием.

Как в случае воспаления удаётся иммуноциту, который плавает по кровеносным сосудам, начать экспрессировать молекулы, позволяющие затормозиться, начать катиться по внутренней стороне сосуда, плотно прилипнуть, начать раздвигать стенки эндотелия и выйти в ткань, не нарушая целостности кровеносного сосуда?

Клетки, активированные в очаге воспаления (повреждения), действуют цитокинами на ближайшие кровеносные сосуды. Также хемокинами определяется движение ДК с периферии, где произошли встреча и распознавание патогена, по лимфе в ЛУ.

Ранее говорили, что источником хемокинов является место повреждения и распознавание патогена клетками врождённого иммунитета.

Второй важный пример. ЛУ посылают сигналы (доходят очень далеко). ДК, когда получили сигнал от патогена, знают, в каком направлении надо ползти, ориентируются, где находится ЛУ. Двигаются по градиенту хемокинов.

Третий пример. Внутри ЛУ (фолликула) происходит перемещение В-клеток между светлой и темной зонами герминального центра. Это нужно, чтобы В-лимфоцит перестроился и получил рецептор, максимально высокоаффинный. Миграция обеспечивается градиентом хемокинов.

Важным является экспрессия хемокинового рецептора.

Градиент хемокинов, можно сказать, конститутивен, но на клетке может не быть рецептора.

В некоторый момент (в момент на инфекции/активации) на клетках возникает новый хемокиновый рецептор, в результате этого лейкоцит начинает улавливать «запах», и пойдёт туда, откуда он доносится.

Функции молекул адгезии в транссосудистой миграции лейкоцитов при воспалительном ответе

Экспрессия молекул приводит к тому, что лейкоциты начинают цепляться за эндотелий. В роллинге участвуют селектины и их партнеры на клетках эндотелия. Интегрины (на лейкоцитах) в/д с молекулами адгезии (на клетках эндотелия).

«Лейкоцитарные» интегрины были в неактивной конформации. После действия молекулярных факторов, произошло изменение конформации, и лейкоцит намертво прилип к эндотелию.

Началась трансмиграция. Лейкоцит выходит из кровеносного сосуда и попадает в очаг воспаления или места, где произошло подтверждение барьерной ткани или попал патоген. Оттуда на всю иммунную систему начинает распространяться «запах воспаления». Молекулярная природа «запаха» - хемокины, привлекающие клетки, которые нужны для обеспечения первого уровня иммунной защиты. Нейтрофилы - первые клетки в очаге воспаления.

Клетки, которые подают сигнал, это макрофаги и ДК, которые активированы микробными паттернами.

Селектины и их взаимодействия

L-селектин (лейкоцит) экспрессируется на поверхности иммуноцитов. P- и E-селектины экспрессируются на поверхности эндотелиальных клеток. Их лиганд находится на поверхности лейкоцитов. Сиалил-Льюисх появляется при воспалении, т.е. возникает дополнительная пара для взаимодействия.

В норме на нейтрофиле есть L-селектин, который в/д с CD34. Это не очень высокоаффинное в/д, оно позволяет катиться, но не закрепляет клетку на эндотелии.

В случае воспаления появляется другой партнёр с высокоаффинным в/д. На нейтрофиле экспрессируются Льюис молекулы, которые являются партнёрами P- и E-селектинов на эндотелии. Происходит другой тип роллинга, который приводит к замедлению качения по эндотелию.

Фазы иммунного ответа

Рецепция хемокинов - экспрессия рецептора CCR7 □□Миграция наивных Т-клеток в ЛУ □□в/д с представленным пептидом в контексте своего.

Если Т-клетка не распознала тот эпитоп, на который настроен её рецептор, выходит из ЛУ. Для этого опять идёт игра на экспрессии хемокинов. На Т-клетке перестаёт экспрессироваться рецептор для хемокинов, а начинает экспрессироваться рецептор, который направляет в сосудистое русло (S1P).

Улавливание. Может начаться клональная пролиферация тех клеток, которые собрали необходимые сигналы.

Развитие различных видов Т-хелперов под влиянием цитокиновых сигналов от ДК

В ходе иммунного ответа в зависимости от цитокиновых сигналов и экспрессии ТФ в наивной клетке могут запускаться различные варианты дифференцировки.

ДК принесла с периферии эпитоп и возможность с помощью цитокинов послать Т-клетке сигнал, в каком направлении ей дифференцироваться. В ответ на гельминты/микробы/вирусы будут разные популяции клеток. Эту информацию Т-клетка получает в виде цитокинов.

Должны быть три сигнала

- распознавание TCR пептида в контексте МНС
- правильный костимуляторный сигнал (если его нет, то клетка в состоянии анергии)
- цитокиновый сигнал поможет клетке дифференцироваться в тот вариант Т-хелпера, который необходим при данном виде иммунного ответа на данный патоген.

Под влиянием цитокинов находятся определенные ТФ, которые запускают какую-то иную комбинацию генов.

Tfh.

Эти клетки входят в контакт с В-клетками, обеспечивают помощь и позволяют В-клеткам дифференцироваться и производить антитела правильной специфичности.

Цитокин для дифф-ки - ИЛ6. Ключевой ТФ для дифференцировки - Bcl-6. Синтезируемый цитокин - ИЛ-21.

Хемокиновый рецептор у Tfh CXCR5. Это рецептор для В-клеток!

У единственной субпопуляции Т-хелперов экспрессируется рецептор хемокинов, которые совпадают с таковым у В-клеток. Это обеспечивает то, что Tfh пойдут

либо в В-клеточную зону для встречи с В-клетками,

либо подойдут к границе В-клеточной зоны, чтобы встретиться с В-клетками.

Это зависит от баланс между Т- и В-клеточным хемокиновым рецепторами (CCR7 и CXCR5, соответственно).

Молекулярные детали помощи

В-клетка является АПК. Антиген, схваченный поверхностным иммуноглобулиновым рецептором, будет нейтрализован, переварен и представлен на МНСII.

Т-клетка будет помогать только той В-клетке, которая переварила тот же самый эпитоп, который принесла ДК. Эта Т-клетка получила сигнал от ДК. Главная пара молекул помощи - это молекула CD40 на В-клетке и CD40L. CD40 - рецептор семейства TNF. Освежающий В-клетку цитокин - ИЛ21, который производит Tfh.

Характеристические цитокины CXCL13 и рецептор CXCR5.

После помощи в зависимости от уровня экспрессии ТФ, В-клетка может стать

либо клеткой герминального центра,

либо стать плазматической клеткой, производящей антитела.

Баланс между двумя субпопуляциями связан балансом экспрессии двух ТФ.

Стромальные клетки организуют фолликул за счет хемокинов, которые привлекают лейкоциты с характерным рецептором.

ФДК. Это клетки не миелоидного происхождения. Они принесли с периферии целый белковый антиген в виде иммунных комплексов (комплекс антиген - антитело). ФДК, не переваривая его, а как целое, притащила в ЛО.

В светлой зоне находятся: ФДК, GC B cells, наивные В-клетки.

В темной зоне происходит пролиферация и гипермутагенез. GC B cells

При подгонке BCR к распознаванию АГ, который находится на отростках ФДК светлой зоны, В-клетка будет многократно ходить туда и проверять, хорошо ли настроен её рецептор или нет. Будет постепенно подгонять рецептор под АГ.

Исходно был хороший рецептор, но гипермутагенез помогает сделать отличный высокоаффинный.

Особенности иммунного ответа в кишечнике

Т-клеточный ответ в кишечнике развивается с помощью Пейровых бляшек. Кроме них могут возникать изолированные лимфоидные фолликулы - криптобляшки. Напоминают ЛО, но у них нет капсулы, а у Пб есть. Иммунный ответ реализуется через Пейровы бляшки, изолированные лимфоидные фолликулы и криптобляшки.

- В отличие от «обычного» иммунного ответа активационные процессы идут постоянно за счет взаимодействия с микрофлорой кишечника.
- Защита происходит с помощью IgA антител (у человека – 2 субтипа!).
- TGF- β обеспечивает переключение на IgA (AID-зависимый, RAG-независимый механизм).
- Толерантность обеспечивается IL-10 и TGF- β .

Филогенез иммунитета

Животный мир разделен на тех, у кого ярко выражен врожденный или адаптивный иммунитет. У круглоротых все похоже, но построено из других блоков. У круглоротых альтернативно возник комбинаторный адаптивный иммунитет. У челюстноротых появляются RAG-рекомбиназы, TCR и иммуноглобулины.

ЛЕКЦИЯ №10. ИММУНОДЕФИЦИТЫ

Иммунная системы и микробиота

Эти новые знания возникли в связи с развитием новых геномных технологий и биоинформатики.

- 90% клеток «в нас» - микробиота, только 10% - собственно наши. Работает около 20 тыс «своих» генов и более 1 млн генов микробиоты.
- Анаэробов в 1000 раз больше аэробов – большинство бактерий некультивируемы!
- На разных слизистых и на разных барьерах – разная микробиота.
- Нормальная микробиота участвует в «настройке» иммунной системы, определяя предрасположенность к некоторым заболеваниям и даже ответы на терапию!
- Закладывается в процессе родов и грудном вскармливании.
- При нарушении состава микробиоты могут развиваться предрасположенности к различным заболеваниям.

О большинстве симбиотических бактерий не знаем.

Если отсутствует правильный контакт с микробиотой, то обречены на дефекты врождённой системы иммунитета. Состав микробиоты формируется в первые годы жизни. Заселение микробиотой происходит во время родов. В зависимости от того, каким способом младенец появился на свет, новорожденный по-разному заселится микробиотой.

Разные отделы кишечника заселены разными видами бактерий.

Употребление антибиотиков - опасное дело. Вряд ли микробиота быстро восстановится.

Что происходит в организме без вторичных лимфоидных органов? Оказалось, что они гораздо важнее для В-клеточной ветви иммунитета, чем для Т- клеточной.

* Т-клеточный ответ может быть эффективно запущен и без вторичных лимфоидных органов (у мышей без ЛУ, ПБ, ИЛФ центр тяжести перемещается в селезенку, т.к. белая пульпа - ЛО, заменяющий ЛУ, в ней будут развиваться компенсаторные формы иммунного ответа, которые будут компенсировать отсутствие ЛУ).

* Если нет селезенки, то развиваются эктопические ЛО, в частности, в печени или лёгких. Их достаточно для нормального Т-клеточного ответа.

* Эффективный В-клеточный ответ зависит от зародышевых центров, ФДК, помощи Т-клеток - все это без организованной структуры ЛО не развивается.

* В случае развития эктопических ЛО В-клеточный ответ может быть.

Внутри ЛО есть герминальные центры, в которых происходит гипермутагенез. Нужны ФДК, удерживающие иммунные комплексы, которые в/д с В-лимфоцитом.

Помощь со стороны Т-клеток происходит в ЛУ. Отсутствие зародышевых центров, отсутствие ФДК, которые позволяют В-клеткам формировать высокоаффинный рецептор, помощь – всё это невозможно, если нет ЛО.

Первичные иммунодефициты - это нарушения, при которых часть иммунной системы организма отсутствует или не функционирует нормально. Чтобы считаться первичным, иммунодефицит не должен быть вторичным по своей природе:

- не вызванные другими заболеваниями (ВИЧ / СПИД)
- не вызванные медикаментозной терапией (нейтропения, вызванная химиотерапией)
- не является результатом воздействия на окружающую среду токсинов (холерный токсин)

Частые случаи иммунодефицитов связаны с дефектом продукции антител. Неправильно образующиеся антитела - легко диагностируемые и часто встречающиеся первичные иммунодефициты.

Первичные и вторичные иммунодефициты

Критерий	Первичный иммунодеф.	Вторичный иммунодеф.
Наличие генетического дефекта с известным типом наследования	+	-
Роль индуцирующего фактора	-	+
Срок проявления недостаточности иммунитета	Сразу после рождения	Определяется действием индуцирующего фактора
Оппортунистические реакции	Развиваются первично	Развиваются после действия индуцирующего
Лечение	Генотерапия. Пересадка костного мозга. Противοинфекционная терапия.	Заместительная, противοинфекционная терапия. Устранение индуцирующего фактора.

Примеры первичных иммунодефицитов

- Генетические дефекты в системе комплемента
- Дефекты в сигнальных каскадах рецепторов врожденного иммунитета (IRAK).
- Дефекты в сигналинге или костимуляции В клеток (CD40, CD40L).
- Дефекты в системе регуляции апоптоза лимфоцитов (Fas, FasL).
- Дефекты в дифференцировке регуляторных Т клеток (FoxP3).
- Дефекты в $\gamma\epsilon$ или Jak3 (combined severe immunodeficiency, SCID или ТКИД).

При системных нарушениях развития лимфоцитов.

- Дефекты в гене аденозиндезаминазы (SCID).

Механизм X-сцепленной формы гипер-IgM-синдрома

Пример дефекта продукции антител - мутация CD40L.
У Т-клеток отсутствует CD40L □□В-клетки не получают соответствующий сигнал, не могут активировать транскрипцию возле соответствующей константной части иммуноглобулина □□не происходит переключения изотипов. Синтезируется много IgM, а других классов мало.

Наследственный ангиотек - недостаточность одного из белков, которые ингибируют комплемент. Когда недостаточно C1-ингибитора, то освобождаются факторы проницаемости сосудов, появляется отек многих органов.

Основные клинические проявления первичных иммунодефицитов

- Инфекционные процессы, особенно в респираторном, пищеварительном, урогенитальном трактах и коже
- Гипоплазия (реже гиперплазия) лимфоидных органов
- Аутоиммунные процессы
- Злокачественные опухоли
- Сопутствующая соматическая патология

Вторичный иммунодефицит – СПИД возникает вследствие инфекции ВИЧ.

Для заражения клеток вирус использует рецептор CD4 и рецептор CCR5.

Клетки без рецептора CCR5 могут жить, они становятся устойчивыми к заражению ВИЧ. Генотерапия направлена на уничтожение гена CCR5.

CD4 - центральный компонент иммунной системы, без него не будет Т-хелперов. Без Т-хелперов не будет работать адаптивный иммунитет.

Особенности HIV-1 (ВИЧ-1)

- Интегрируется в геном
- Главный клеточный рецептор – CD4.
- Клеточные корецепторы: CCR5 (рецептор для RANTES, MIP1a и MIP1b) и CXCR4
- Кроме CD4+ Т лимфоцитов заражаются макрофаги, FDC, микроглия и клетки Лангерганса.
- Есть геномные полиморфизмы с делецией CCR5, гомозиготные носители значительно более устойчивы к ВИЧ.

Основные факторы иммунодефицита при СПИДе

- Снижение содержания CD4+ Т клеток (которые есть, начинают хуже работать)
- Ослабление функции CD4+ Т клеток

- Дисбаланс субпопуляций CD4+ Т клеток (сдвиг в сторону Th2-клеток)
 - Усиление роли регуляторных Т клеток (хотя они заражаются!).
- Ослабляется иммунитет против внутриклеточных патогенов, в т.ч. вирусов.
Больной чувствителен к вирусным инфекциям.

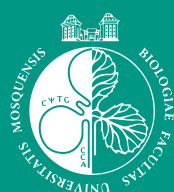
Нерешенные проблемы иммунологии:

ВИЧ 3 главных причины особой «зловредности» ВИЧ:

- Поражает центральное звено адаптивного иммунитета – CD4+ Т клетки (хелперы).
- Высокоизменчив, так как его главный фермент – обратная транскриптаза – делает ошибки при синтезе. У 1го пациента разнообразные варианты вируса, которые легко уходят от иммунного контроля.
- Встраивается в геном клетки хозяина. Тем не менее - главные достижения последних лет:
- Высокоэффективная лекарственная терапия. Блокируется ревертаза, интеграза и протеаза - три лекарства используется (это важные ферменты для ж/ц вируса).
- Получение нейтрализующих антител широкой специфичности (а с ними возможна серотерапия). Действуют на оболочку вируса.

В результате вакцинации их получить не получится. Вакцинация вообще не эффективна, т.к. при ней должны активироваться CD4-клетки, а их активация приводит к активации продукция вируса.

Комбинация этих двух подходов сможет долгие годы удерживать вирус на минимальном уровне, но без Т-клеточной вакцины полностью удалить вирус из организма не удастся.



БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
Л Е К Ц И И У Ч Е Н Ы Х М Г У

