

# Курс лекций «Молекулярная Иммунология»

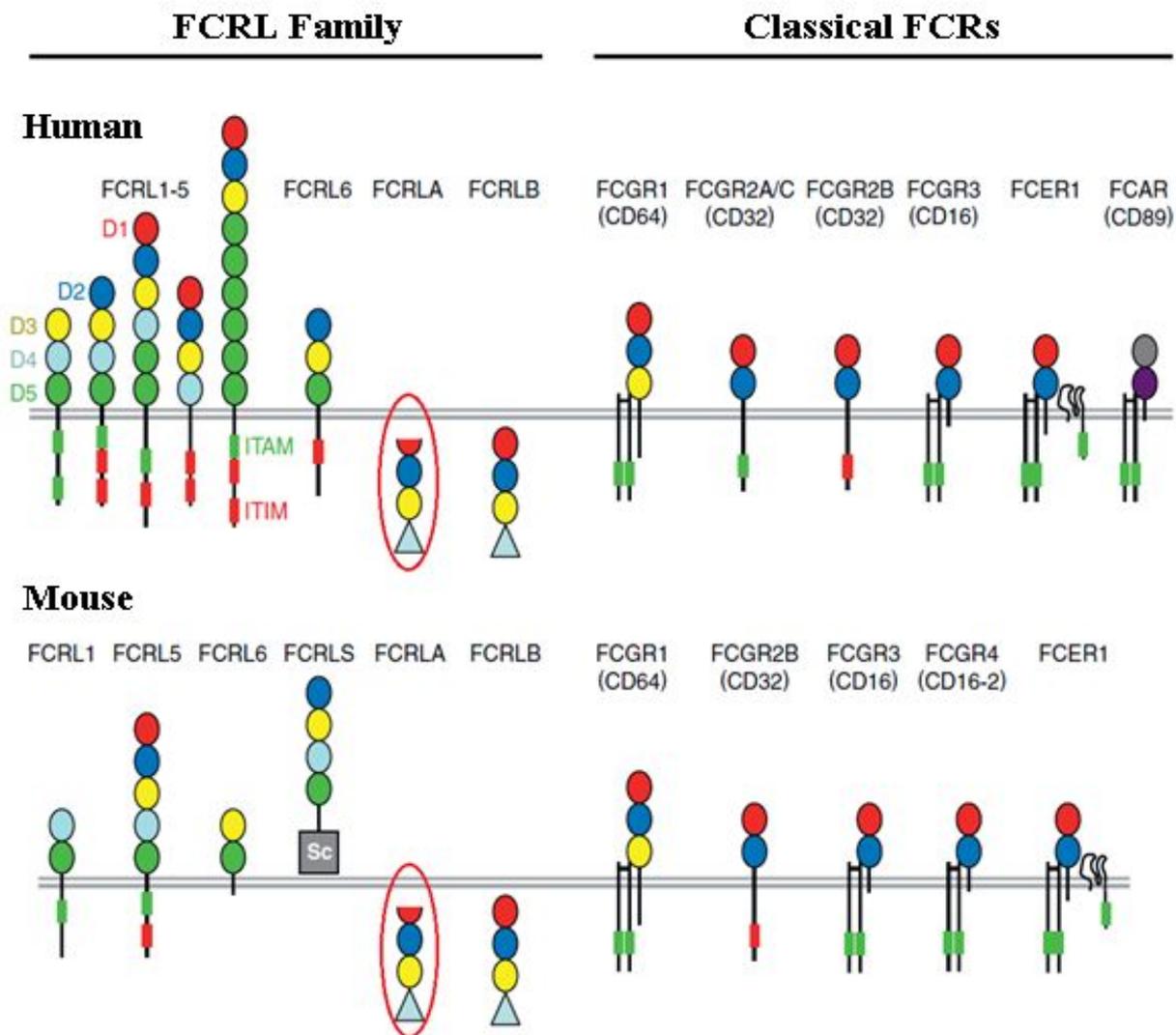
Мечетина Людмила Васильевна,

К.б.н., с.н.с. Лаб. Иммуногенетики, Институт Молекулярной и  
Клеточной Биологии

Специализация – рецепторы иммунокомпетентных клеток человека  
и мыши

Методы: получение моноклональных антител, методы  
иммуноферментный анализ, иммуноцито- и –гистохимия, методы  
культуры клеток, Flow Cytometry

# 1. Функциональный анализ белков FCRL-семейства человека



**Семейство FcR-like (FCRL) структурно родственно семейству Fc-рецепторов, принадлежащего к суперсемейству иммуноглобулинов.**

- FCRLA:**
- экспрессируется исключительно в В-лимфоцитах
  - интраклеточно
  - является резидентным белком ЭПР
  - способен к связыванию с IgM, IgG, IgA

Mechetina et al., Eur. J. Immunol., 2002

Randall S. Davis, Annu. Rev. Immunol. 2007

## 2. Создание средств молекулярной диагностики и терапии заболеваний человека:

- Создание средств адресной противоопухолевой терапии на основе цитотоксических Т-клеток и НК-клеток и химерных антигенных рецепторов
- Создание невирусных белковых иммуногенов для индукции ВИЧ-специфичных нейтрализующих антител широкого спектра действия

## 3. Реконструкция молекулярной эволюции иммунной системы

Зачем нужна  
«Молекулярная иммунология»?

# Зачем нужна «Молекулярная иммунология»?

- Чтобы понимать механизмы иммунологических реакций и стать хорошим специалистом -физиологом.
- Чтобы стать профессиональным экспериментатором и осознанно использовать в своей работе методы иммуноанализа – ELISA, Western blot, Immunohistochemical staining, Flow Cytometry.
- Чтобы иметь представление о своем собственном организме и осознанно относиться к врачебным назначениям.

# **Задачи иммунной системы:**

**Распознавание «чужого» и защита многоклеточного организма от патогенных микробов (вирусов, грибов, бактерий, простейших)**

**Защита от опухолевых клеток**

**Нераспознавание «своего»**

## Ключевые принципы иммунного ответа:

1. **Врожденный** иммунный ответ – наиболее быстрый, первая линия защиты. Средство – паттерн-распознающие молекулы, **широкая специфичность**
2. **Приобретенный** (адаптивный иммунный ответ): первичный антиген-специфичный ответ, вторичный ответ, **иммунологическая память** – уникальное свойство адаптивного иммунного ответа.
3. **Приобретенный** иммунный ответ **высоко специфичен** к антигену. Иммунная система различает огромное количество антигенных специфичностей. Средство – антиген-специфичные рецепторы на В- и Т-клетках (BCR и TCR)
4. Иммунологическая регуляция: иммунная система **толерантна** к «своим» антигенам.

## Стадии/функции иммунного ответа

1. Иммунологическое **распознавание** присутствия «чужого», т.е. «не своего». Кто осуществляет - клетки врожденного и адаптивного иммунного ответа.
2. Сдерживание и элиминация инфекции – **эффektorные** функции. Кто осуществляет – система комплемента белков крови, антитела, **эффektorные** клетки – лимфоциты и лейкоциты, обладающие деструктивными способностями.
3. **Саморегуляция** иммунной системы – не разрушить собственный организм.
4. **Иммунологическая память** – уникальная способность адаптивного иммунного ответа отвечать на повторное попадание антигена (вторичный иммунный ответ) быстрее и сильнее, чем в первый раз.

Нарушение одной из функций  заболевание

Недостаточность иммунологической регуляции



аллергия, аутоиммунные заболевания



# Лейкоцитарная формула крови человека

Таблица 1  
ПРЕДЕЛЫ НОРМАЛЬНЫХ КОЛЕБАНИЙ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ЛЕЙКОЦИТОВ  
В КРОВИ

Содержание лейкоцитов	Виды лейкоцитов								
	эози- нофи- лы	базо- филы	нейтрофилы				лимфо- циты	моно- циты	плаз- мочи- ты
			миело- циты	юные	палоч- ко- ядер- ные	сег- менто- ядер- ные			
В процентах . . .	2—4	0—1	0	0	2—5	55—67	20—35	4—8	0—0,5
В абсолютных числах . . . . .	100— 320	0—80	0	0	100— 400	2750— 5360	1000— 2800	200— 640	0—40

Идентификация типов лейкоцитов на основе морфологии при окрашивании мазков крови

## Идентификация типов лейкоцитов человека на основе **линия-специфичных маркеров**

Метод Flow Cytometry (проточная цитометрия) – окрашивание клеток крови с помощью антител к маркеру (антитела мечены флуоресцентной меткой), анализ результата с помощью автоматического анализатора - цитометра

**CD** – Clusters of Differentiation – группа моноклональных антител, которая выявляет один и тот же рецептор лейкоцитов

Лейкоциты – CD45+

Т-лимфоциты – CD3+

Цитотоксические Т-лимфоциты (Cytotoxic T lymphocytes, CTL) – CD8+

Т-хелперы (Th1 and Th2) – CD4+

В-лимфоциты – CD19+ (или CD20+)

НК клетки – CD3-CD56+/(CD16+)

Моноциты /макрофаги – CD14+

		Key Markers - Human	Key Markers - Mouse
<b>T Cell</b>		CD3 CD4 CD8	CD3 CD4 CD8
<b>B Cell</b>		CD19 CD20	CD45R/B220 CD19 CD22 (B cell activation marker)
<b>Dendritic Cell</b>		CD11c CD123	CD11c CD123
<b>NK Cell</b>		CD56	CD335 (NKp46)
<b>Stem Cell/ Precursor</b>		CD34 <i>hematopoietic stem cell only</i>	CD34 <i>hematopoietic stem cell only</i>
<b>Macrophage/ Monocyte</b>		CD14 CD33	CD11b/ Mac-1 Ly-71 (F4/80)
<b>Granulocyte</b>		CD66b	CD66b Gr-1/Ly6G Ly6C
<b>Platelet</b>		CD41 CD61 CD62	CD41 CD61 (Integrin $\beta$ 3) CD9 CD62P (activated platelets)
<b>Erythrocyte</b>		CD235a	CD235a Ter-119
<b>Endothelial Cell</b>		CD146	CD146 MECA-32 CD106 CD31 CD62E (activated endothelial cells)
<b>Epithelial Cell</b>		CD326	CD326 (EPCAM1)

CD (cluster of differentiation) molecules are cell surface markers useful for the identification and characterization of leukocytes. The CD nomenclature was developed and is maintained through the HLDA (Human Leukocyte Differentiation Antigens) workshop started in 1982. The goal is to provide standardization of monoclonal antibodies to human antigens across laboratories. To characterize or “workshop” the antibodies, multiple laboratories carry out blind analyses of antibodies. These results independently validate antibody specificity.

While the CD nomenclature has been developed for use with human antigens, it is applied to corresponding mouse antigens as well as antigens from other species. However, the mouse and other species antibodies are not tested by HLDA.

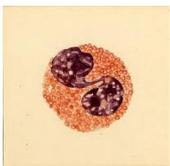
Human CD markers were reviewed by the HLDA. New CD markers were established at the HLDA9 meeting held in Barcelona in 2010. For additional information and CD markers please visit [www.hcdm.org](http://www.hcdm.org).

**BD BIOSCIENCES**

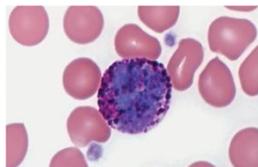
## Миелоидные клетки и их роль во врожденном и приобретенном иммунном ответе



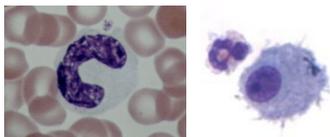
**Нейтрофил** – фагоцитоз, захват и разрушение микроорганизмов во внутриклеточных везикулах, преимущественно врожденный иммунный ответ, **первая линия** защиты, действуют быстро, но недолго



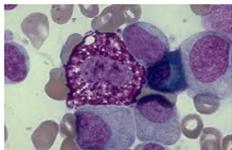
**Эозинофил** - фагоцитоз, разрушают больших паразитов, покрытых антителами, освобождая наружу содержимое гранул



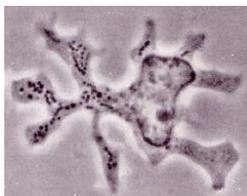
**Базофил** – фагоцитоз, разрушение больших паразитов, содержат гранулы гистамина и других медиаторов воспаления и аллергии



**Моноцит/Макрофаг** - захват и разрушение микроорганизмов во внутриклеточных везикулах, **представление** антигена Т-клеткам (**APC #2**), связь врожденного и адаптивного иммунитета

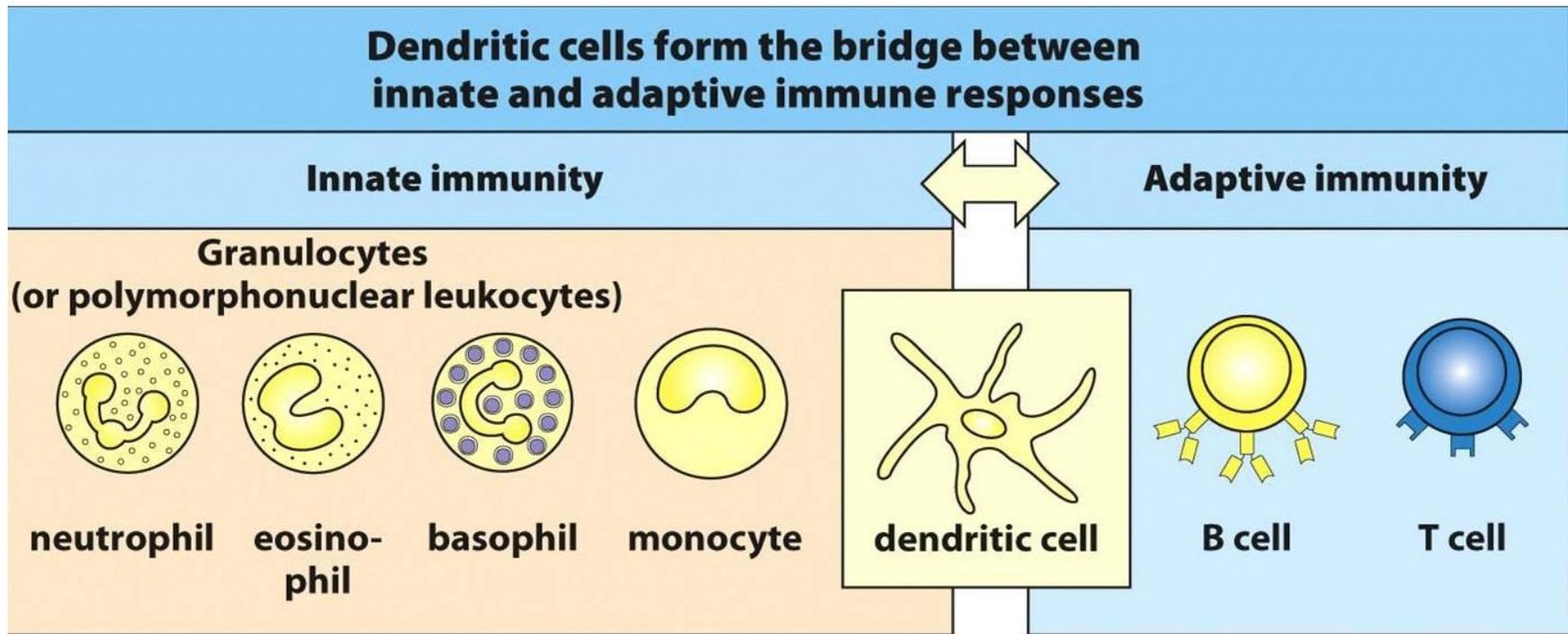


**Тучная клетка (Mast cell)** – тканевой аналог базофила, разрушение паразитов, гранулы гистамина и гепарина, реакции аллергии и воспаления



**Дендритная клетка** – захват антигена (фаго- и пиноцитоз) на периферии и **представление** антигена Т-лимфоцитам во вторичных лимфоидных органах, **APC #1**, связь врожденного и адаптивного иммунитета

Дендритная клетка (врожденный иммунитет) распознает патоген с помощью своих паттерн-распознающих рецепторов, захватывает его, активируется, расщепляет и представляет антиген Т-лимфоцитам (адаптивный иммунитет)

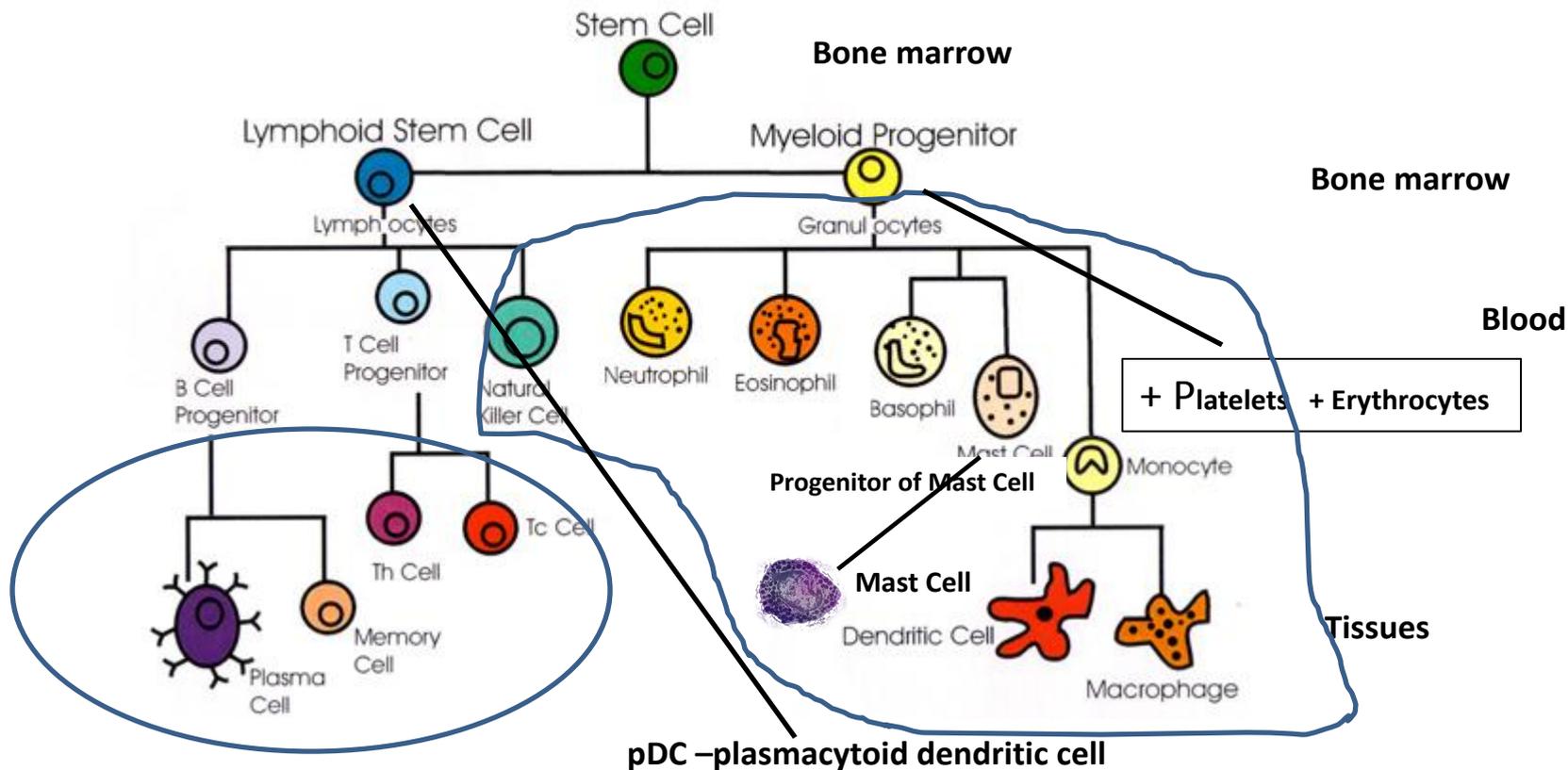


**Представление антигена** – расщепление патогена и выставление получившихся антигенов на поверхности клетки в форме, адекватной для узнавания антигенными рецепторами Т-лимфоцитов

Клетки **врожденного иммунитета** отличают «свое» от «чужое» с помощью **pattern-распознающих** рецепторов на своей поверхности.

С помощью этих рецепторов они распознают регулярные рисунки молекулярной структуры клеточной стенки микроорганизмов – т.н. патоген-ассоциированные молекулярные рисунки

# Cells of the Immune System



## Приобретенный иммунитет

На клетках-  
Антиген-специфичные рецепторы

**Врожденный иммунитет** (фагоцитоз) +  
Приобретенный иммунитет (представление АГ).

Фагоциты – макрофаги, гранулоциты (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы) дендритные клетки  
Паттерн-распознающие рецепторы

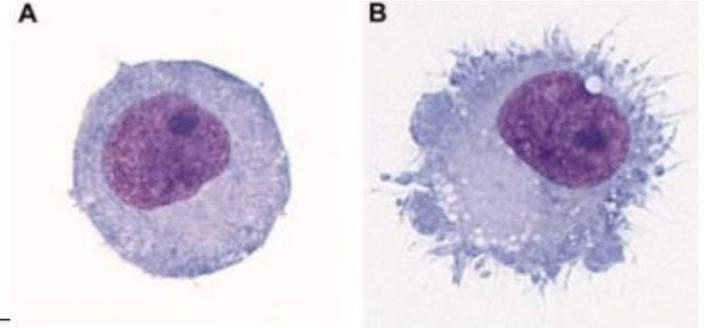
## Клетки лимфоидного происхождения

### Врожденный иммунитет

**pDC – плазмацитоподобные дендритные клетки**

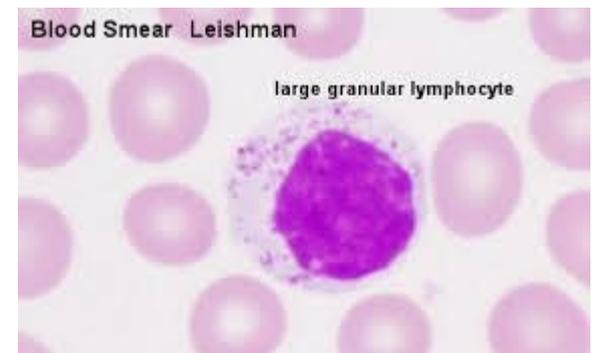
Клетки **врожденного иммунитета**, < 0.4% от лейкоцитов крови

Имеют хорошо развитый ЭПР, активируются через паттерн-распознающие Toll-like рецепторы TLR7 и TLR9, продуцируют большое количество интерферонов IFN- $\alpha$  и IFN- $\beta$  (противовирусный иммунный ответ)



**НК клетки** (Natural Killer cells) – естественные киллеры, большие лимфоциты, имеют цитотоксические гранулы в цитоплазме, не имеют АГ-специфичных рецепторов, клетки **врожденного иммунитета**, распознают и убивают **клетки** с внутриклеточными инфекциями, особенно важны в противоопухолевом и противовирусном иммунном ответа.

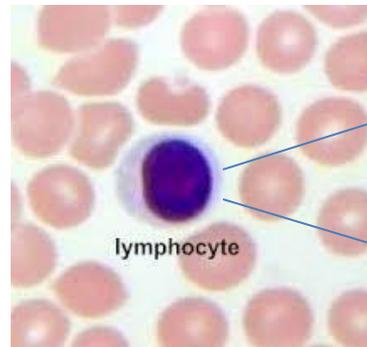
**Обладают иммунологической памятью?**



## Клетки лимфоидного происхождения

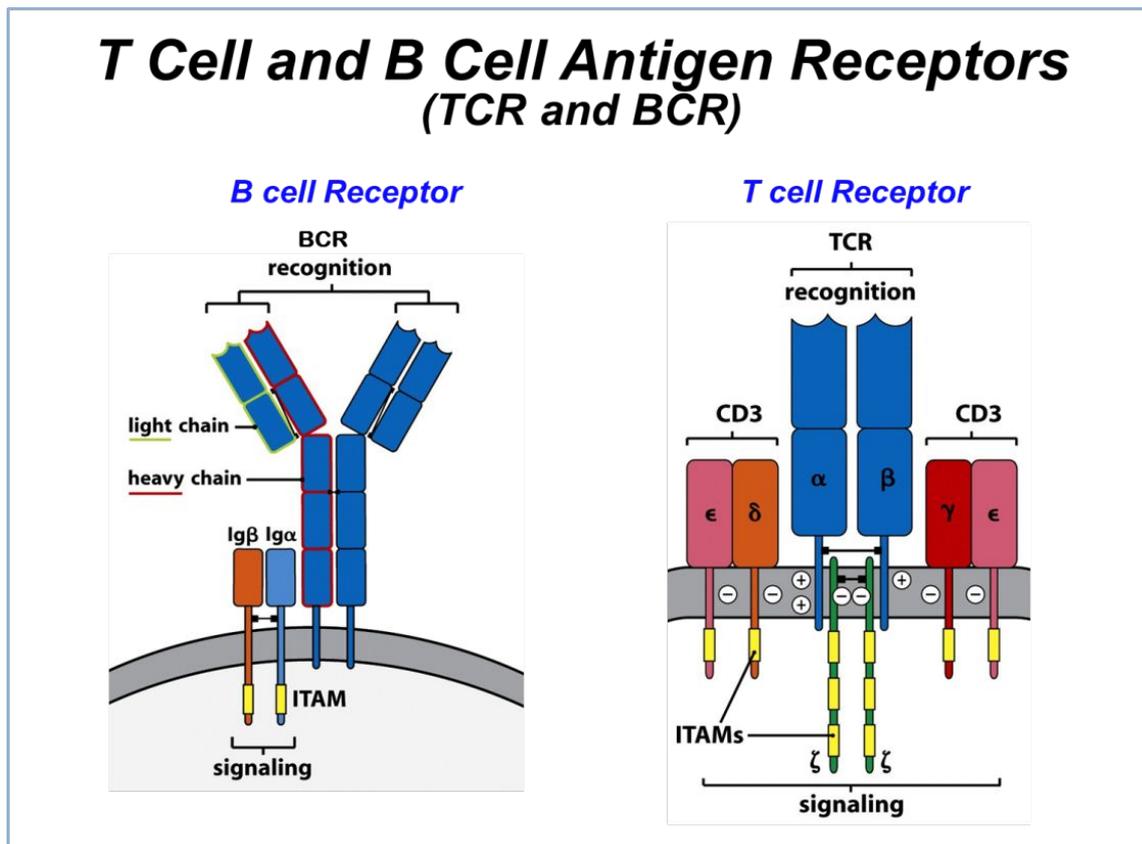
### Адаптивный иммунный ответ

**В- и Т-лимфоциты** – морфологически не отличаются (но отличаются по поверхностным маркерам), клетки **адаптивного иммунного ответа**, имеют на своей поверхности антиген-специфичные рецепторы B cell receptor/T cell receptor (**BCR/TCR**).



В отличие от клеток врожденного иммунитета В- и Т-лимфоциты отличаются сложным процессом созревания и дифференцировки.

В- и Т-лимфоциты – ключевые элементы адаптивного иммунного ответа  
В- и Т-лимфоциты несут на своей поверхности антиген-специфичные рецепторы. Каждая лимфоцит имеет В-(или Т)-рецептор только **ОДНОЙ** специфичности. BCR- мембранная форма иммуноглобулина (**антитела**).



- Каждый организм имеет клетки с АГ-рецепторами, распознающими практически любой чужеродный АГ
- При размножении В- и Т-клеток специфичность их АГ-рецептора **НЕ** меняется

Антиген - макромолекула (белки, гликопротеины, полисахариды), состоит из эпитопов. **Эпитоп** – это участок антигена, который распознается иммунной системой (антителами, Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами). Каждое антитело специфично в отношении одного эпитопа. Антигены и эпитопы – как правило, чужеродные, но бывают антитела к собственным антигенам (аутоиммунные заболевания).

**Паратоп** - часть молекулы антитела, распознающая эпитоп.

Большинство эпитопов, распознаваемых антителами или В-клетками – **конформационные**, трёхмерные структуры на поверхности молекул антигенов, которые точно совпадают по форме с соответствующими паратопами антител. Существуют также **линейные эпитопы**, которые определяются характерной последовательностью **аминокислот (первичной структурой)**, а не **пространственной организацией**.

Протяжённость эпитопа, который способен распознать В-лимфоцит - до 22 аминокислотных остатков.

Т-клетки «узнают» эпитопы только в «связанном» состоянии - на поверхности **антиген-представляющих клеток**, где они «выставлены» в комплексе с молекулами МНС. Эпитопы, связанные с МНС I - пептиды, состоящие из 8—11 аминокислот, МНС II представляют более длинные пептиды.

Эпитопы c-мус, HA, FLAG – для маркирования и

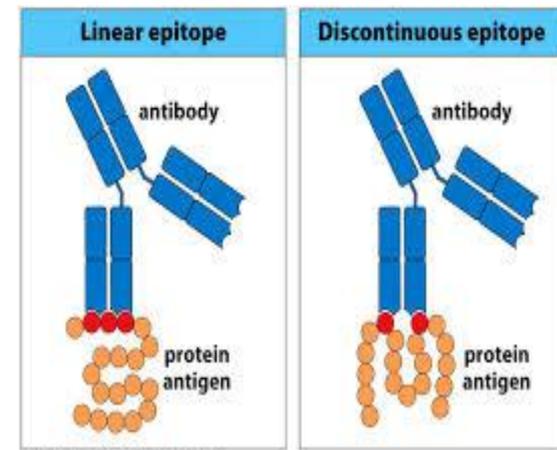
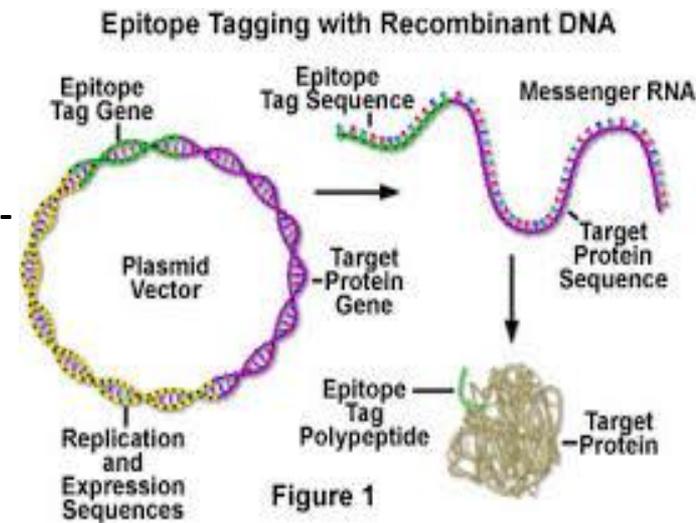
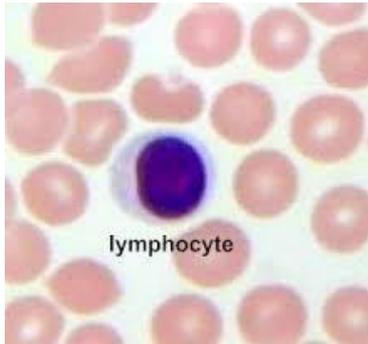


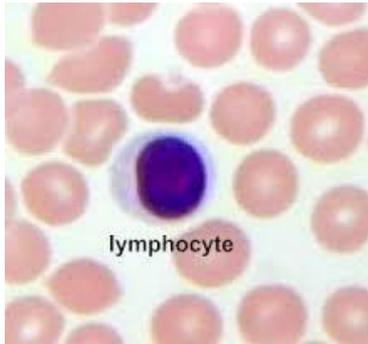
Figure 4.12 The Immune System, 3rd Edition © Garland Science 2008





Лимфоциты крови (В- и Т-) – неактивные naive или small resting лимфоциты (до 1960 г. считалось, что у них нет никакой функции), активируются во вторичных лимфоидных органах после взаимодействия своего **BCR/TCR** с антигеном соответствующей специфичности. После активации всегда – 1) пролиферация и 2) дифференцировка в **эффекторные клетки и клетки памяти**.

Зачем необходима пролиферация активированного лимфоцита?



Лимфоциты крови (В- и Т-) – неактивные naive или small resting лимфоциты (до 1960 г. считалось, что у них нет никакой функции), активируются во вторичных лимфоидных органах после взаимодействия своего **BCR/TCR** с антигеном соответствующей специфичности. После активации всегда – 1) пролиферация и 2) дифференцировка в **эффektorные клетки и клетки памяти**.

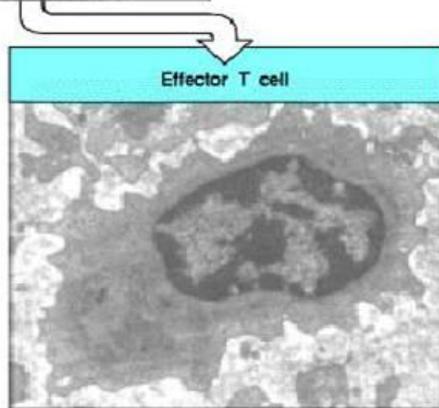
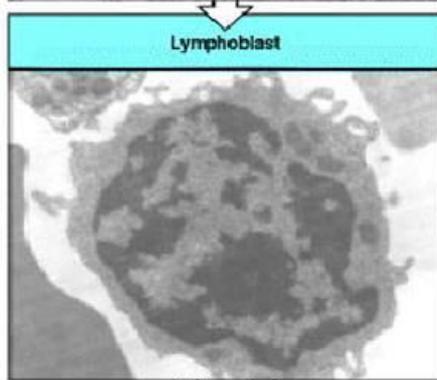
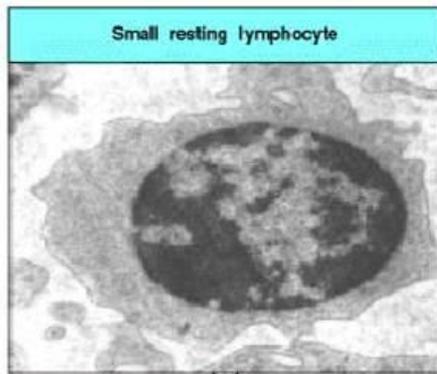
Зачем необходима пролиферация активированного лимфоцита?

- Для создания пула клеток с необходимой (выбранной антигеном) в данный момент специфичностью

Эффекторная В-клетка = **плазматическая клетка**, секретирующая антитела (иммуноглобулины, ИГ) той же специфичности, что и ее ВСР. Антитело = секретируемая форма ВСР (ИГ), ВСР – мембранная форма ИГ.

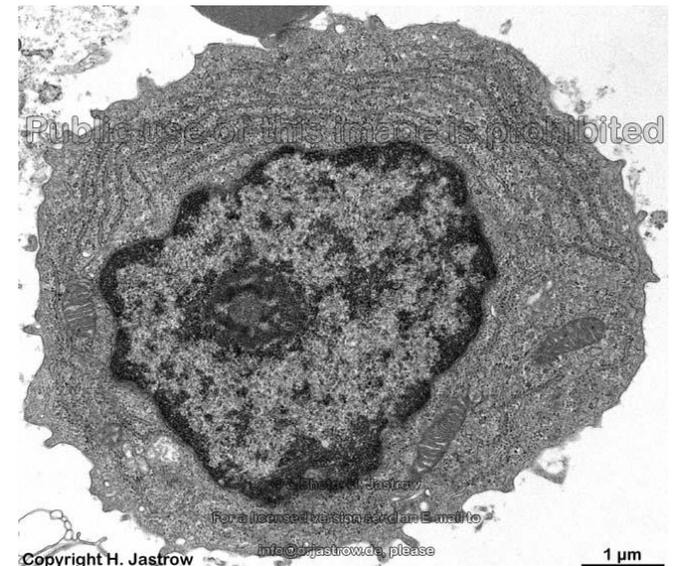
Эффекторные Т-клетки:

1. Цитотоксические Т-клетки или Т-киллеры (killing of infected cells)
2. Т-хелперы (activation) – активация макрофагов и В-клеток после их встречи с антигеном
3. Регуляторные Т-клетки (регуляция = suppression активности других лимфоцитов)



Наивные лимфоциты в ответ на антиген сначала пролиферируют 4-5 дней (clonal expansion) и затем дифференцируются во вторичных лимфоидных органах, генерируя эффекторные клетки (конечная стадия дифференцировки лимфоцита) и клетки памяти. При этом изменяется морфология клеток и паттерн экспрессируемых ими белков.

Plasma cell (CD138+)/bone marrow



# Эффекторные В- и Т-клетки обеспечивают два вида адаптивного иммунного ответа

Гуморальный humor (жидкость)

Клеточный



## Антитела

- элиминируют  
внеклеточные  
формы  
патогена

## Т-лимфоциты:

-элиминируют внутриклеточные патогены, убивая инфицированные клетки (CD8+ T cells) или активируя макрофаги и помогая им «переварить» внутриклеточные бактерии (CD4+ Th1 cells)

-активируют В-клеточный ответ (CD4+ Th2 cells)

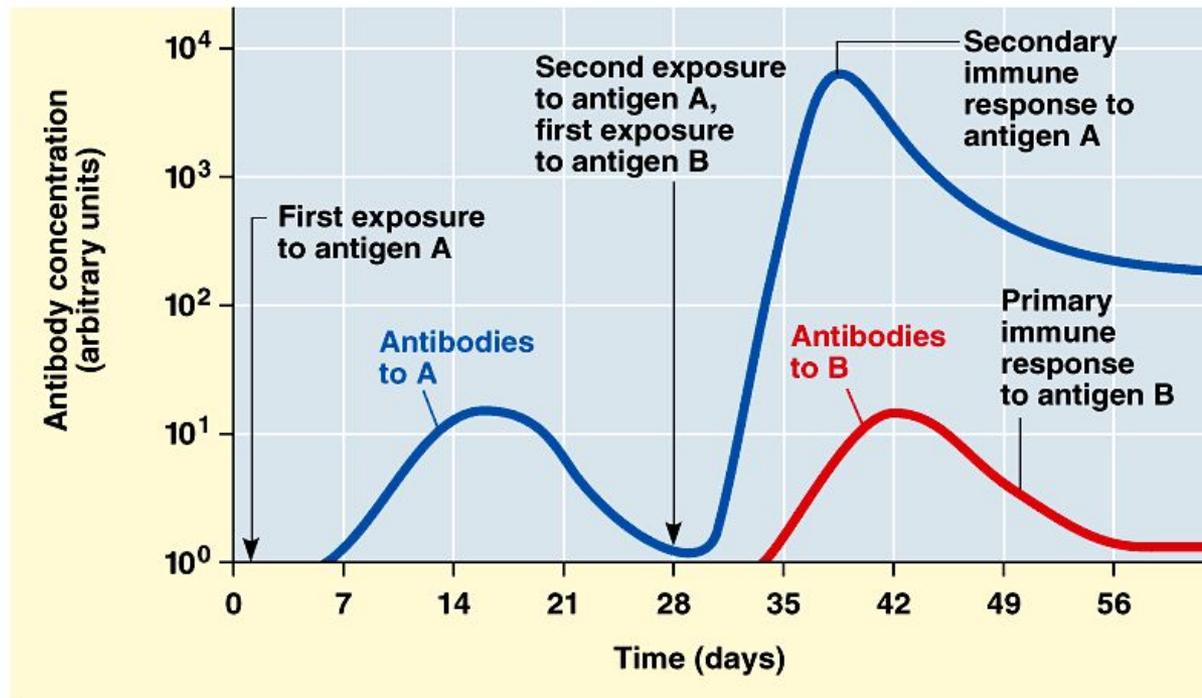
## В- и Т-клетки памяти

Память – отличительный признак адаптивного иммунного ответа и основа для вакцинологии.

Материальная основа иммунологической памяти – долгоживущие Т-клетки памяти, В-клетки памяти и долгоживущие плазматические клетки. В отличие от эффекторных клеток не умирают после элиминации АГ, а персистируют долгое время.

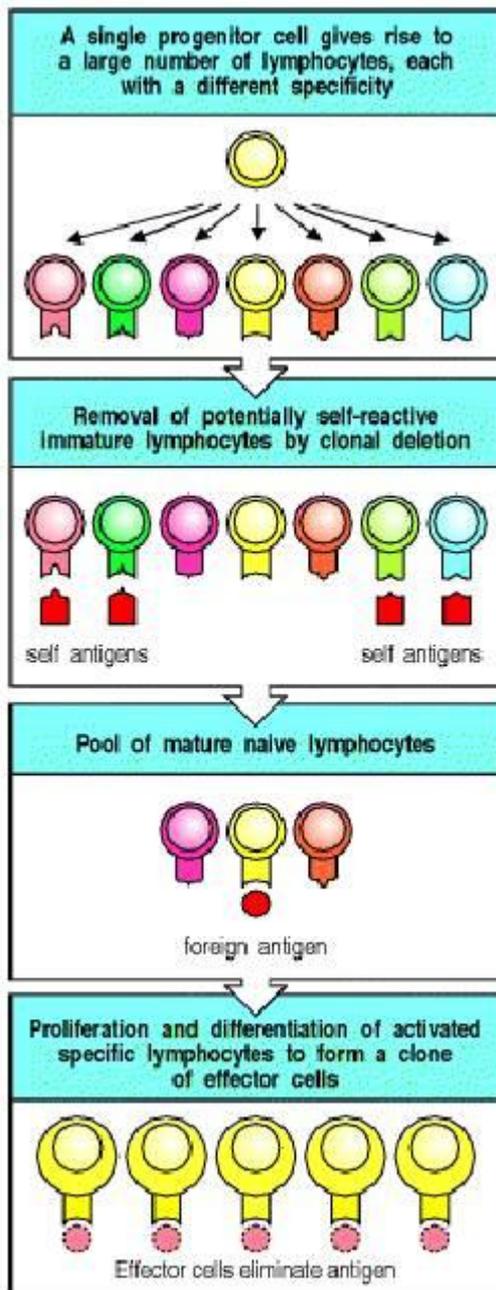
При повторной встрече с АГ клетки памяти активируются быстрее, чем наивные

КГ



Первичный и вторичный иммунный ответ как доказательство существования иммунологической памяти

## Адаптивный иммунный ответ работает по принципу **клональной селекции**.



- Предшественник В- и Т-лимфоцитов дает начало огромному разнообразию АГ-специфичностей

- Клетки с BCR или TCR, направленные против собственных антигенов, элиминируются на ранних стадиях развития В- и Т-клеток. Процесс – **клональная делеция**.

- «Наивные» лимфоциты, активированные антигеном, дают начало **клонам** АГ-специфичных клеток (эффекторным и клеткам памяти), которые опосредуют **адаптивный иммунитет**. Каждый клон специфичен и однороден в отношении отдельного антигенного эпитопа (клетки врожденного иммунитета имеют одновременно несколько разных паттерн-распознающих рецепторов).

Четыре основных принципа клональной селекции:

1. Каждый лимфоцит несет единственный тип рецептора с уникальной специфичностью.
2. Взаимодействие рецептора «наивного» лимфоцита с чужеродной молекулой приводит к активации лимфоцита, несущего данный рецептор, и к его дифференцировке в эффекторную клетку или клетку памяти.
3. Эффекторные клетки и клетки памяти, получившиеся в результате дифференцировки будут нести АГ-рецепторы той же самой специфичности, что и их «наивный» предшественник.
4. Лимфоциты, несущие рецепторы к своим собственным антигенам, элиминируются на ранних стадиях развития лимфоцитов

## Органы иммунной системы человека.

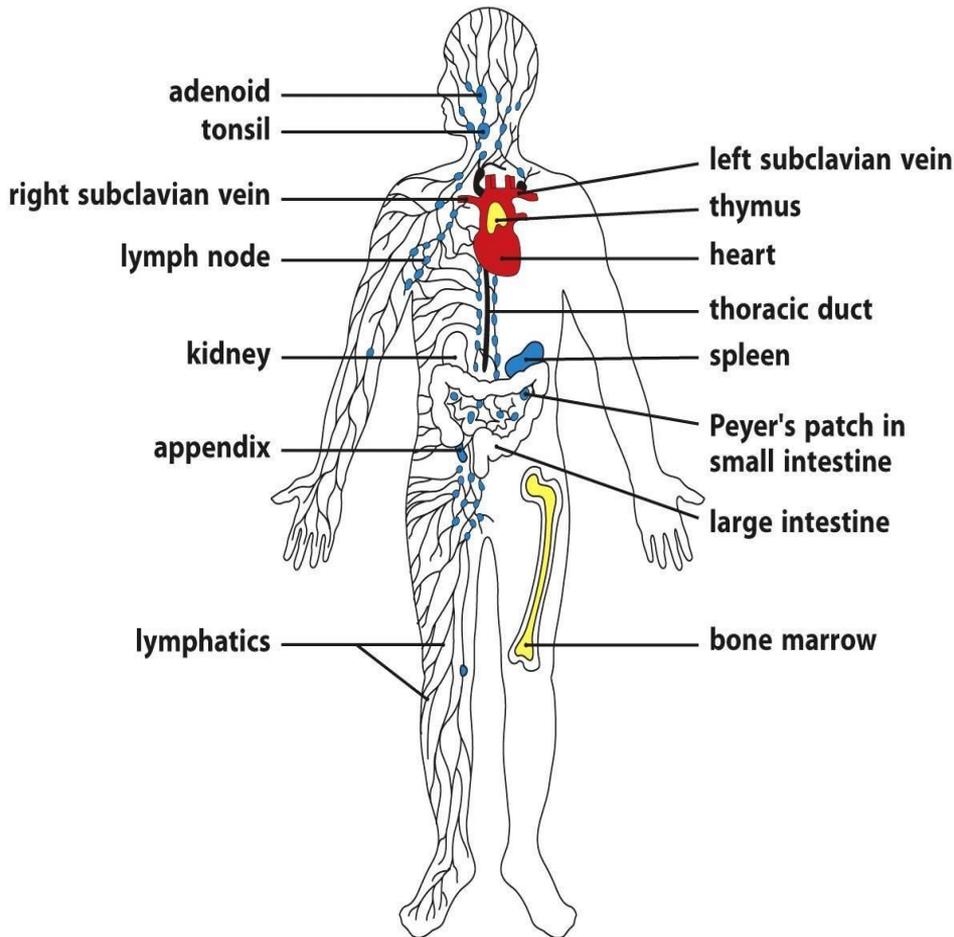


Figure 1.8 Janeway's Immunobiology, 8ed. (© Garland Science 2012)

**Первичные** - костный мозг, тимус, печень плода. Место созревания Т-лимфоцитов - тимус) и В-лимфоцитов - костный мозг и печень плода, где **формируется репертуар** специфичностей антиген-связывающих рецепторов лимфоцитов.

**Вторичные** - встреча лимфоцита с АГ, начало адаптивного ответа - селезенка, лимфоузлы, лимфоидная ткань слизистых оболочек (MALT, Mucosus-Associated Lymphoid Tissues, включает миндалину и аденоиды глоточного кольца, Пейеровы бляшки кишечника), скопления лимфоидной ткани в коже

SALT (Skin-Associated-Lymphoid Tissues), мочеполовых и дыхательных путях, в желудке - GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissues).

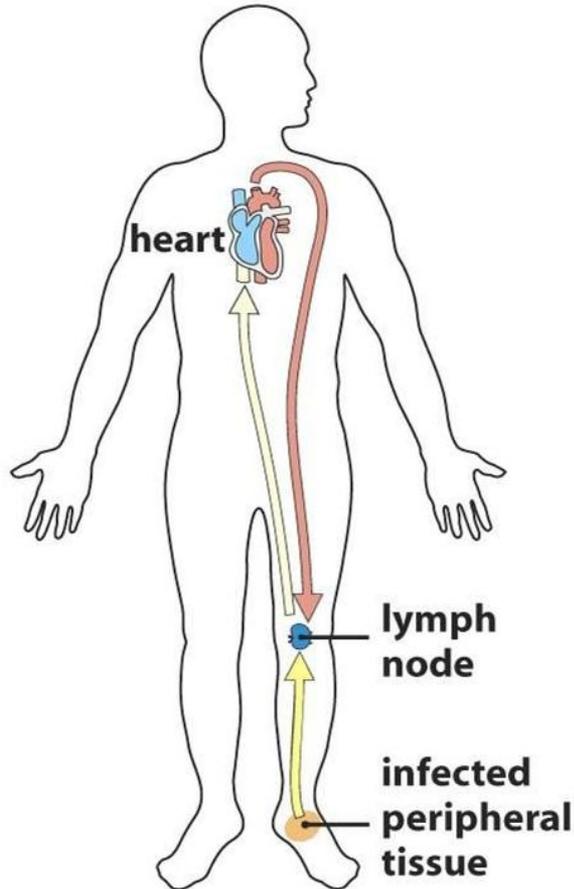
Кровь – транспортная система.

Лимфатические протоки.

**Вторичные лимфоидные органы** (лимфоузлы, селезенка, MALT) предназначены для захвата антигена и активации адаптивного иммунного ответа, а также для поддержания рециркуляции лимфоцитов. Это место встречи лимфоцитов и антигена, который доставляют туда **дендритные клетки**. Т-лимфоциты после встречи с антигеном размножаются и дифференцируются в антиген-специфичные эффекторные клетки. В-лимфоциты после встречи с АГ размножаются и дифференцируются в плазматические клетки, секретирующую антитела. Т.о. **вторичные лимфоидные органы** - это место, где начинается адаптивный иммунный ответ.

**Lymphocytes and lymph return to blood via the thoracic duct**

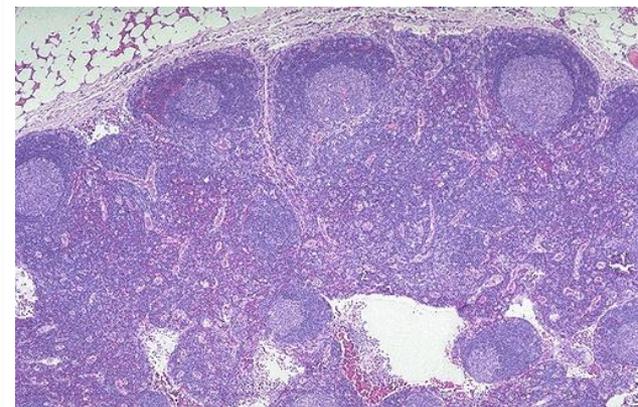
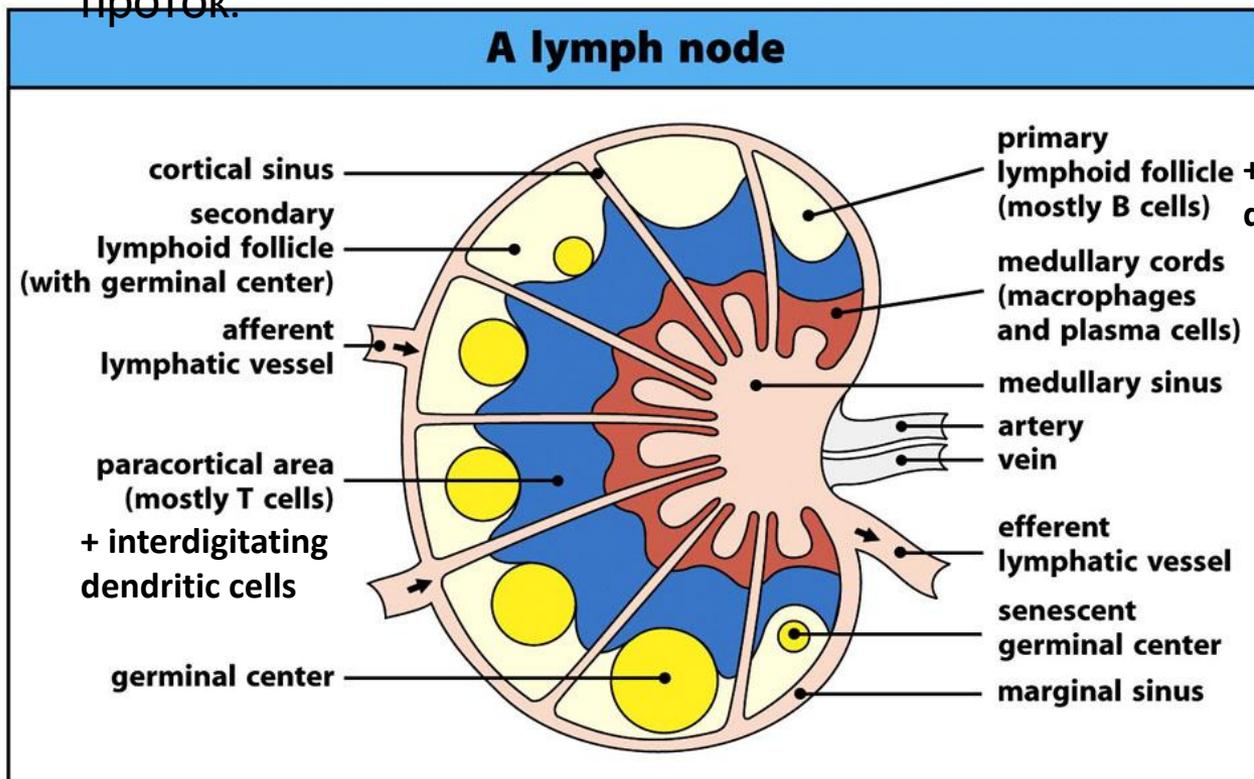
**Naive lymphocytes enter lymph nodes from blood**



**Antigens from sites of infection reach lymph nodes via lymphatics**

Лимфоузлы находятся в местах, где сходятся лимфатические протоки - система сосудов для сбора внеклеточной жидкости из тканей и возвращения ее в кровь. Т.е. лимфоузлы собирают антиген из мест инфекции в тканях.

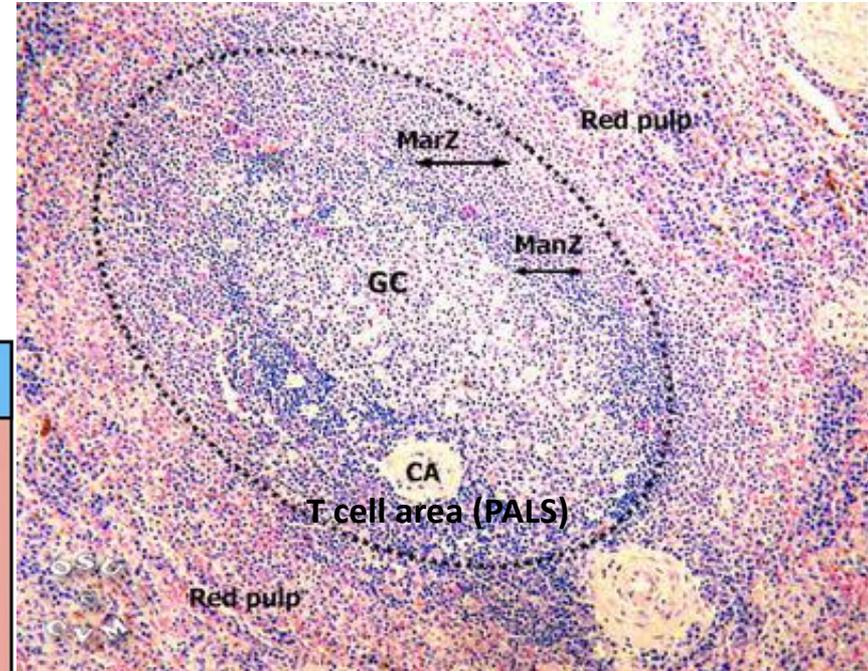
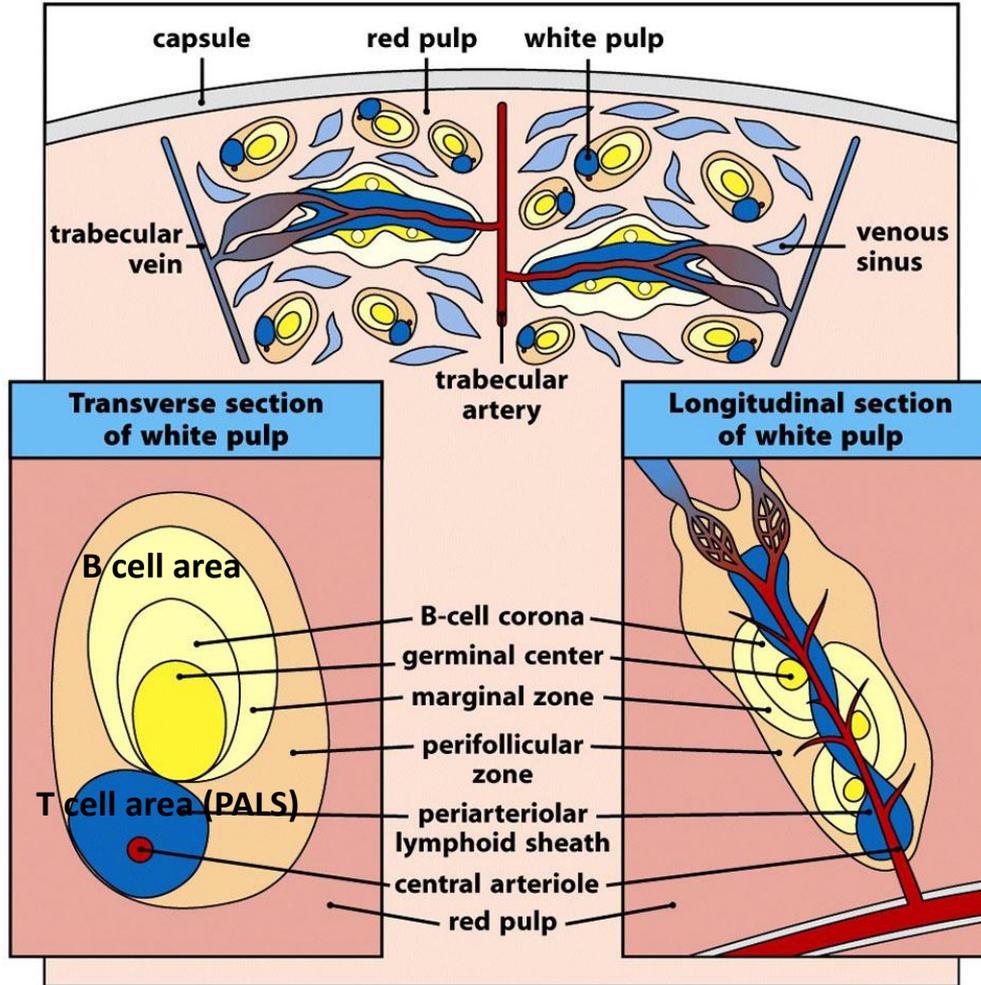
Из мест инфекции в тканях патогены и антиген-несущие дендритные клетки попадают в лимфоузел через афферентный лимфатический проток. Наивные Т- и В-клетки приходят в лимфоузел через high endothelial venules. Эффекторныe Т- и В-клетки уходят через эфферентный лимфатический проток.



Реактивный лимфоузел

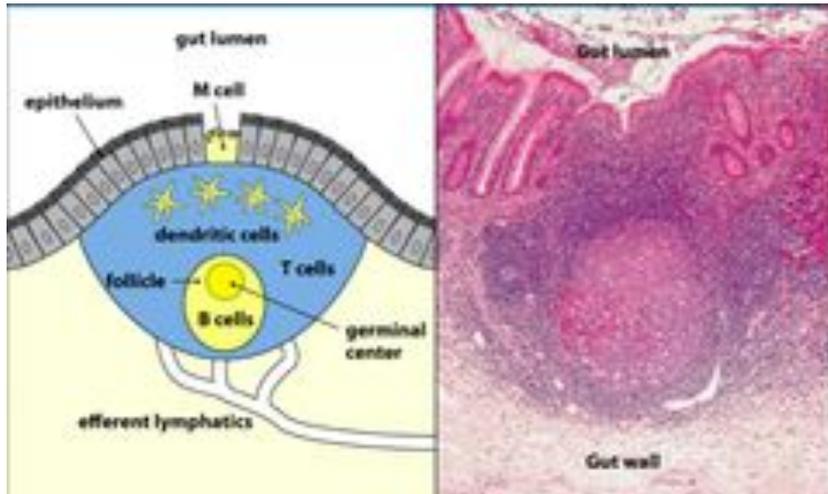
Т- и В-лимфоциты занимают в лимфоузле определенные компартменты. Зародышевые центры – места активации, размножения и дифференцировки В-клеток

Селезенка собирает антиген из крови.



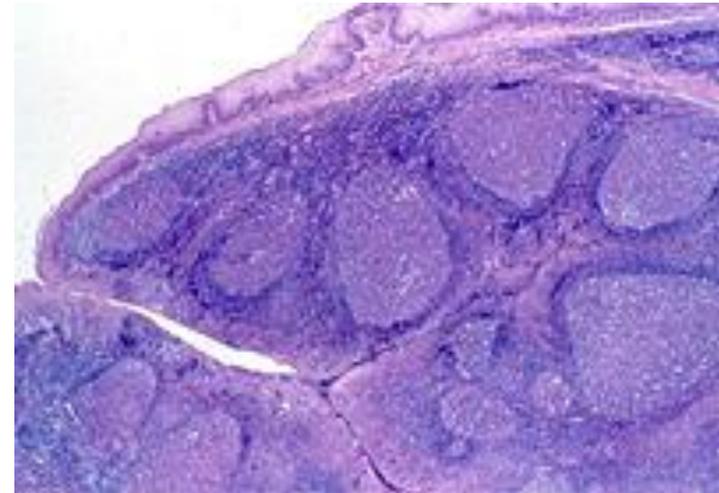
MALT (Mucosal-associated lymphoid tissue) собирает антиген с эпителиальных поверхностей тела.

Большая часть патогенов попадает в организм через слизистые.



Organization of gut-associated lymphoid tissue

**Специализированные эпителиальные М-клетки доставляют АГ из просвета кишечника**



Организация лимфоидной ткани в миндалине человека.

# Иммунитет:

## Врожденный иммунный ответ

- Наиболее быстрый
- Отсутствие высокой специфичности (Pattern-specific receptors)
- Отсутствие памяти

Клетки – фагоцитирующие клетки (моноциты, макрофаги, гранулоциты, дендритные клетки), лимфоидные клетки – NK cells (natural killer cells)

## Приобретенный иммунный ответ

- Требуется времени для своего развития
- Высокая специфичность (Antigen-specific receptors)
- Иммунологическая память

Клетки – В-лимфоциты, Т-лимфоциты



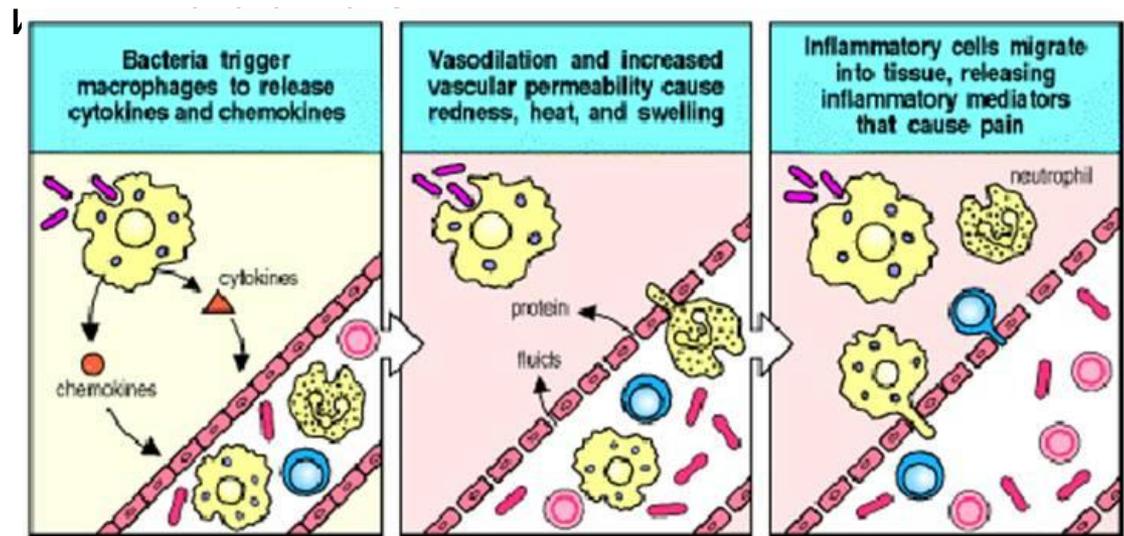
Гуморальные факторы – белки системы комплемента, антитела, цитокины, хемокины







**Макрофаги и нейтрофилы**, основные элементы **врожденного иммунитета**, представляют собой первую линию защиты организма против бактериальных инфекций. Они: а) сдерживают распространение инфекции первые несколько дней, б) инициируют более сильный и разнообразный адаптивный иммунный ответ, в) участвуют в элиминации патогенов, атакованных элементами адаптивного



**Бактериальная инфекция запускает процесс воспаления**

Активированные макрофаги секретируют целый ряд **цитокинов**. действующих локально или на удалении **Цитокины** – белки, секретируемые одними клетками, и изменяющие активность других клеток, имеющих для них рецепторы. для передачи сигналов между клетками иммунной системы. **Хемокины** – класс цитокинов со свойствами хемоаттрактантов, после взаимодействия со своим рецептором индуцируют движение клетки по направлению к источнику хемокина – **хемотаксис**. Белки **системы комплемента** – активируют каскад протеолитических реакций на поверхности патогена, медиаторы фагоцитоза, регулируют воспалительную реакцию

Адаптивный иммунный ответ начинается с презентации антигена.

Основной тип АГ-представляющих клеток (**АРС**, antigen-presenting cells) – **дендритные клетки**. Другие типы АРС- макрофаги и В-лимфоциты. Для презентация антигена необходим захват дендритной клеткой АГ (несет паттерн-распознающие рецепторы), ее активация и превращение в АРС, миграция из места инфекции в периферический лимфоидный орган и встреча и взаимодействие с наивным антиген-специфичным Т-лимфоцитом. Дендритная клетка не только расщепляет патоген, но и представляет его наивному Т-лимфоциту в комплексе с молекулой МНС I или МНС II (презентация антигена). Пептиды от внутриклеточных патогенов, содержащихся в цитоплазме (вирусы) – с МНС I. Пептиды патогенов, размножающихся во внутриклеточных везикулах, а также переваренные бактерии – с МНС II. АРС секретируют цитокины, которые воздействуют на оба типа, врожд

