



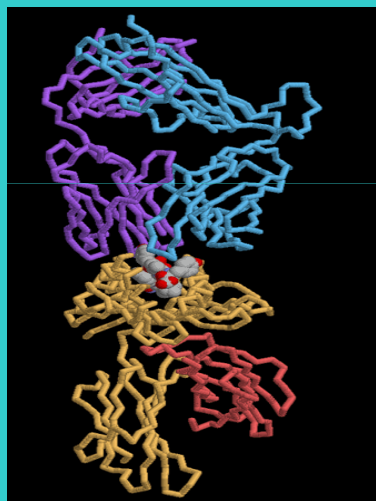
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА

"РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ"

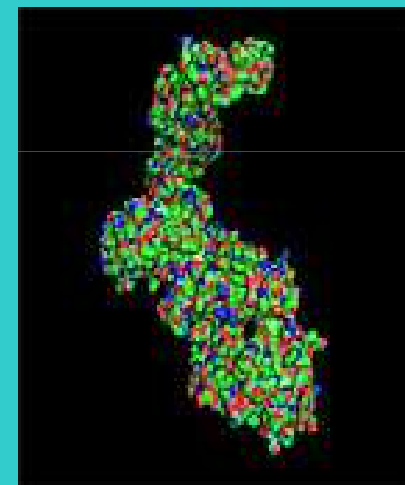
"Подкрепа за развитието на докторанти, пост-докторанти, специализанти и млади учени",

ДОГОВОР BG051PO001-3.3.04/58 от 2009

Молекулярно-генетични основи на клетъчния имунен отговор



Доц. Д-р Мария Николова



Лекционен курс "Молекулярна имунология и инфектология",
9 – 11.11.2010



Механизми за генериране на разнообразие и адаптивност

Генетични рекомбинации

- антиген-специфичен рецептор на В-лимфоцитите и антитела

- антиген-специфичен рецептор на Т-лимфоцитите

Генетичен полиморфизъм

- HLA система

Други полиморфни молекули с имунна функция:

- HLA-специфични NK рецептори (NKR)

Цитокини и цитокинови рецептори...

T- и NK-клетъчни рецептори

- **Фази и ефекторни механизми на клетъчния имунен отговор**
- **Молекулярна структура на TCR**
- **Генетика на TCR: генериране на разнообразието от специфичности**
- **Взаимодействието TCR /HLA: формиране на репертоара и насочване на адаптивния имунен отговор**
- **NK клетките в естествения и адаптивен имунен отговор**
- **NKR: генетика, полиморфизъм и клинично значение. CD160.**
- **Други полиморфни молекули с имунна функция. CD39**

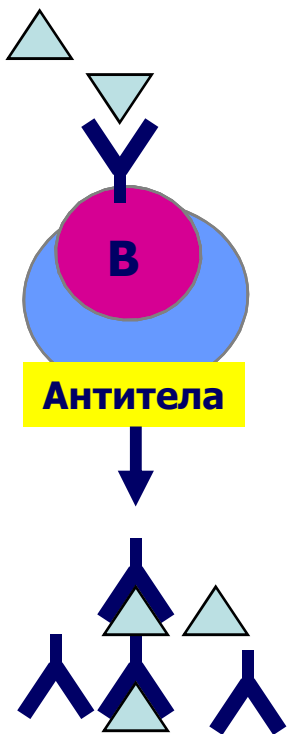
Фази и ефекторни механизми на имунния отговор



Т-лимфоцити и клетъчен имунен отговор

Хуморален ИО

Разтворими
антигени

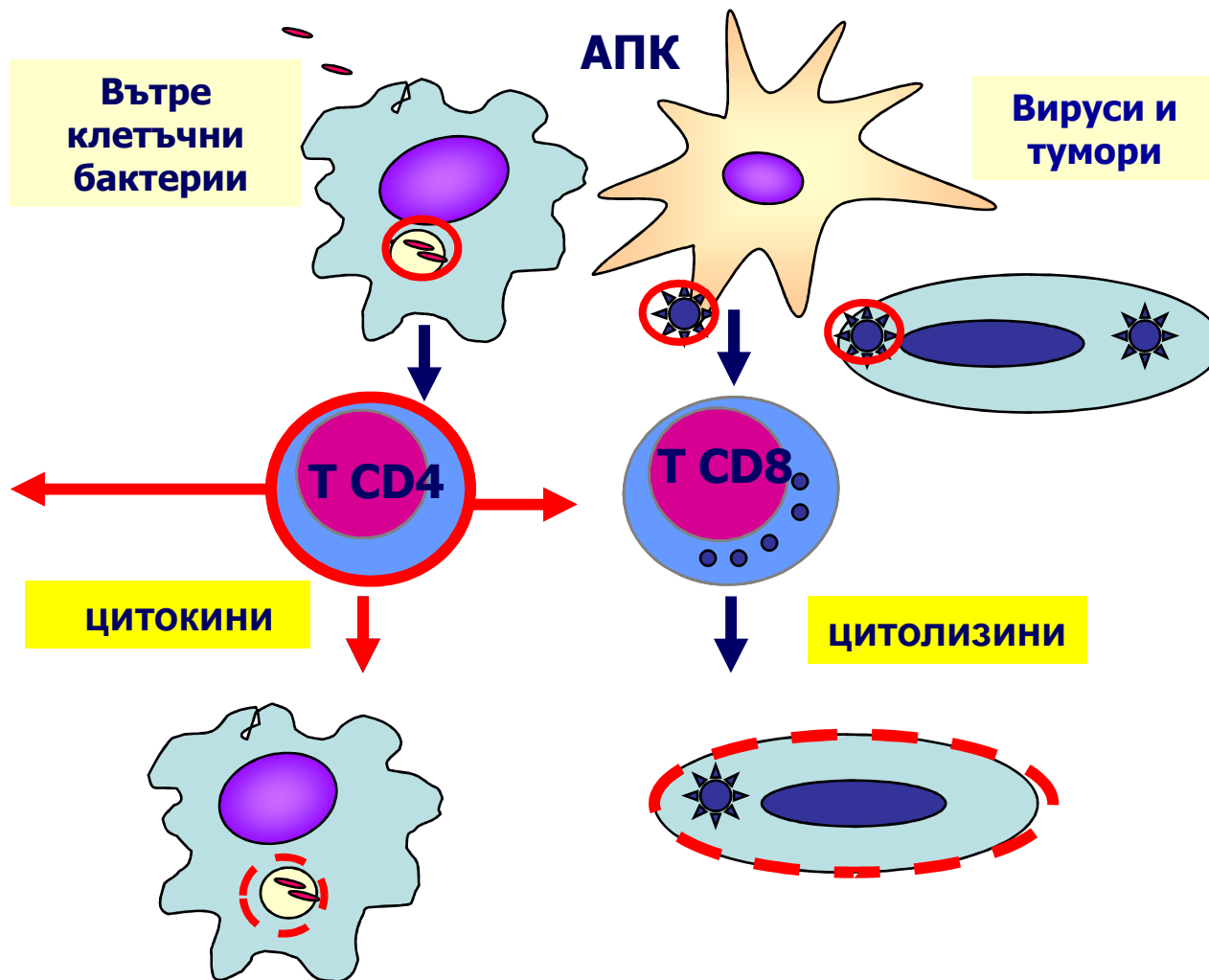


Клетъчен ИО

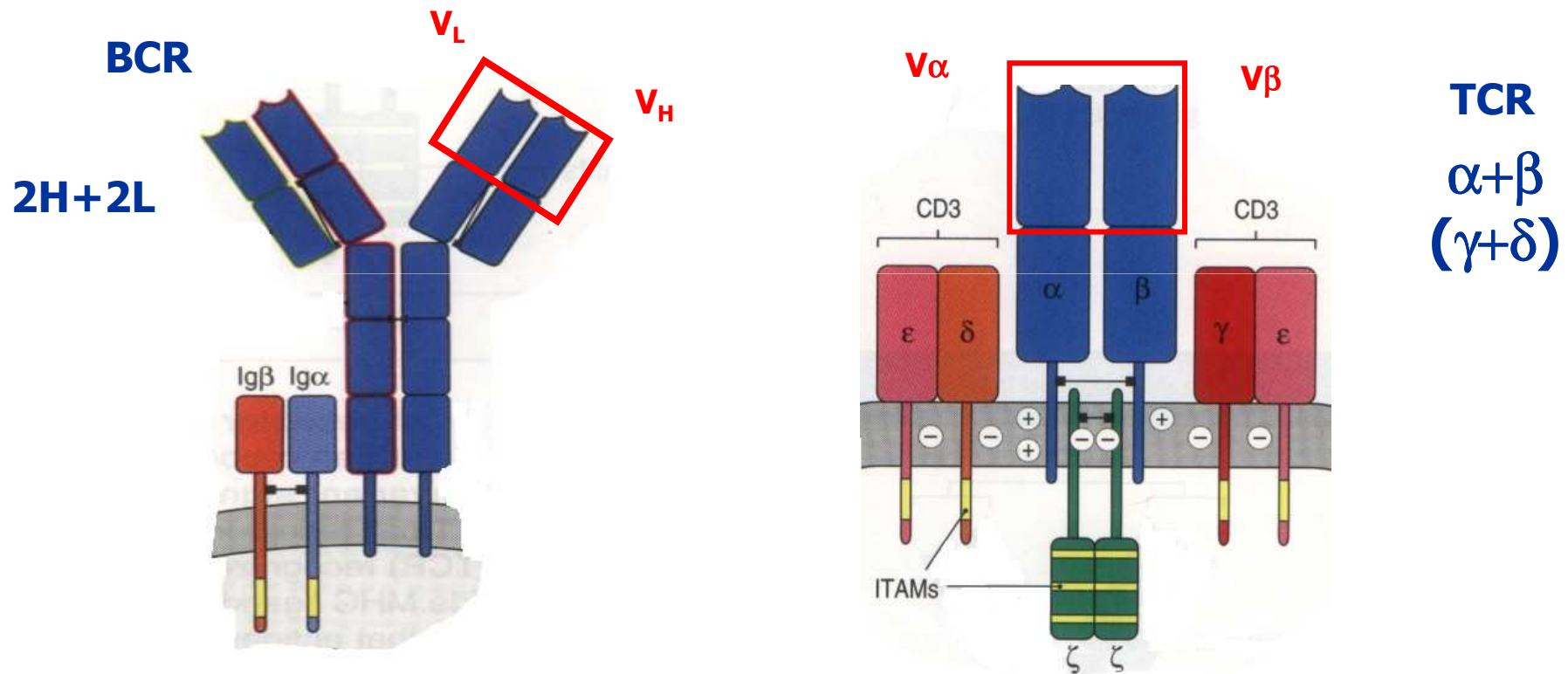
Вътре
клетъчни
бактерии

АПК

Вируси и
тумори



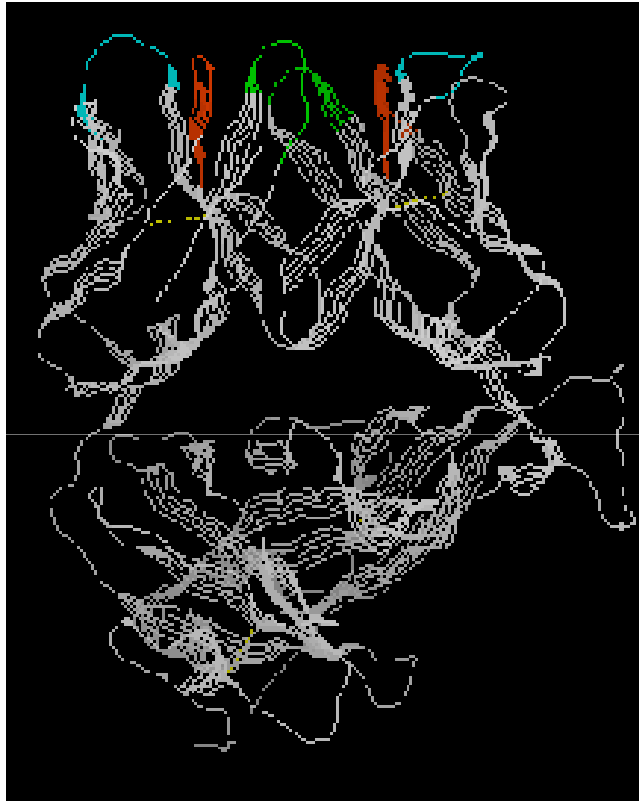
Антиген – специфичен рецептор на Т лимфоцитите: молекулярна структура



Разпознаващ комплекс с вариабелен антиген-свързващ участък,
комбиниран с инвариантен сигнализиращ комплекс

Антиген – специфичен рецептор на Т лимфоцитите: молекулярна структура

V α

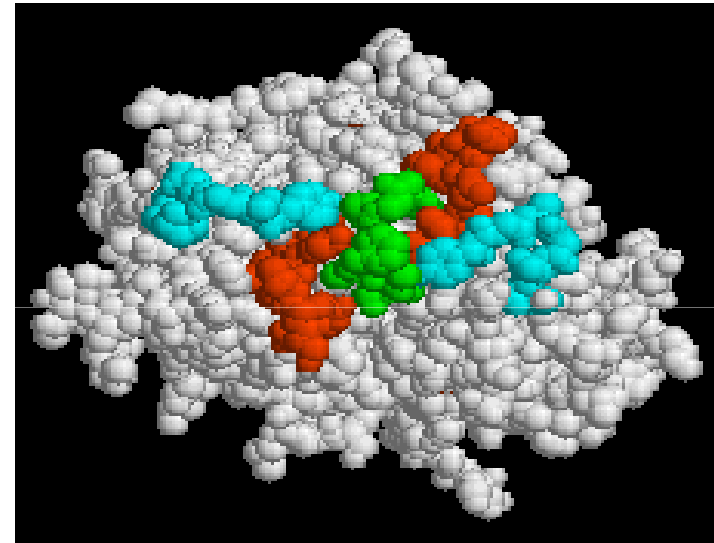


C α

V β

CDR1
CDR2
CDR3

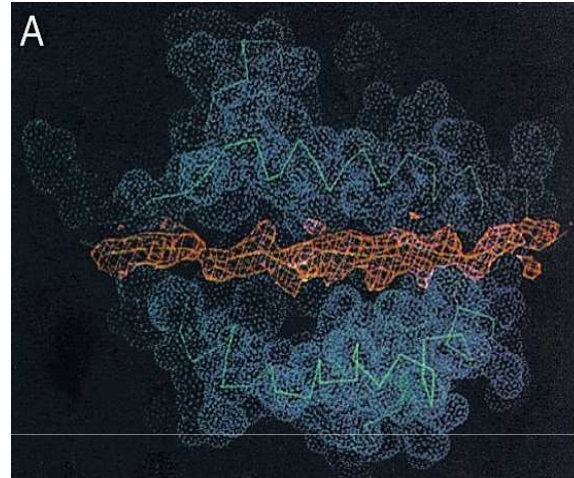
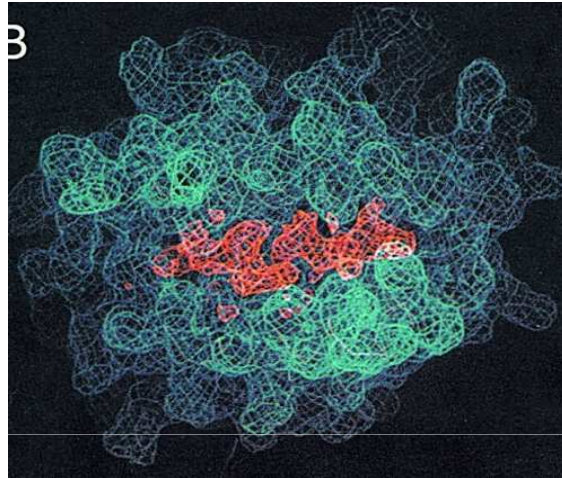
C β



Пространствена структура на TCR

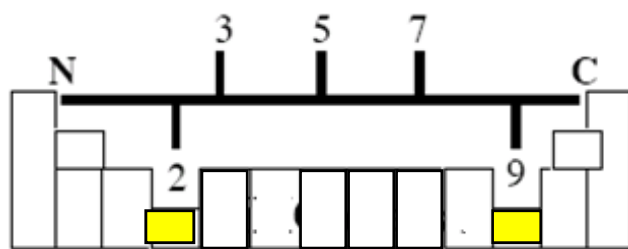
Т лимфоцитите разпознават антигена в комплекс с HLA молекули

HLA-I



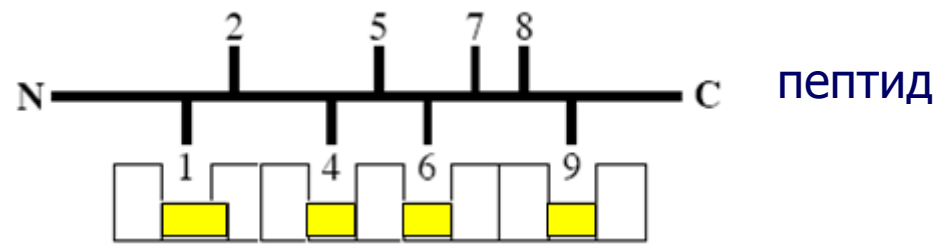
HLA-II

TCR



HLA-I

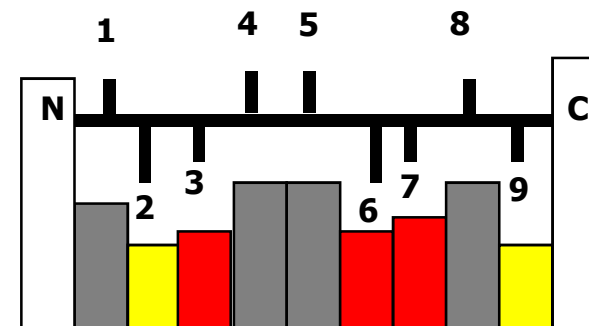
TCR



HLA-II

Т лимфоцитите разпознават антигена в комплекс с HLA молекули

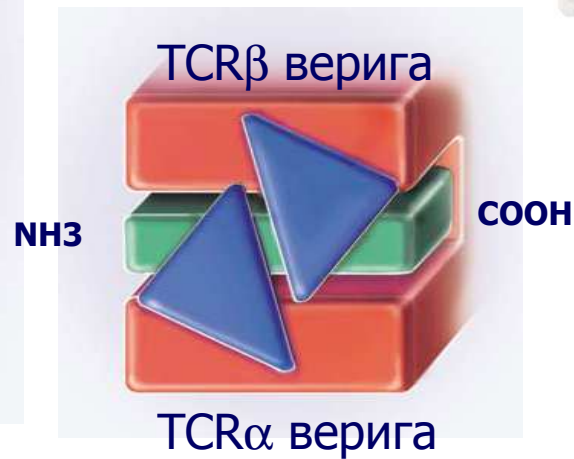
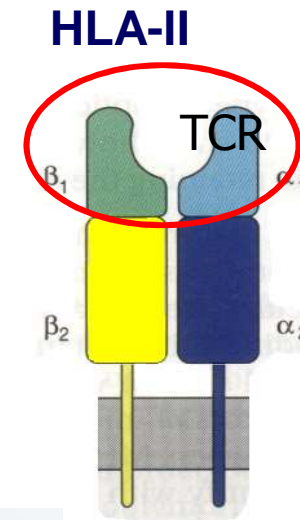
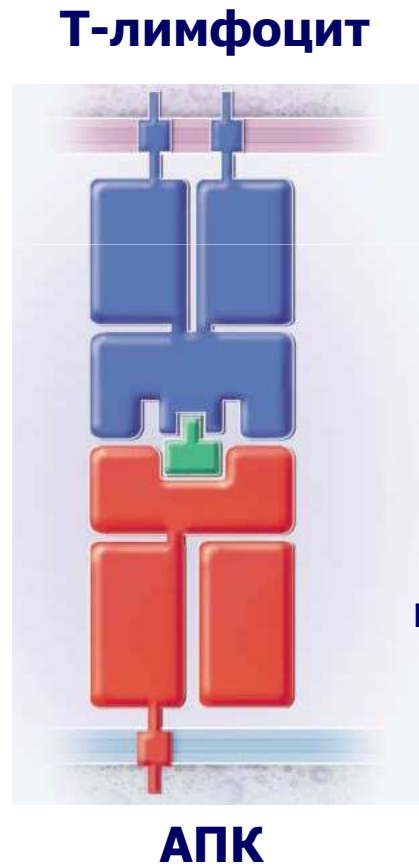
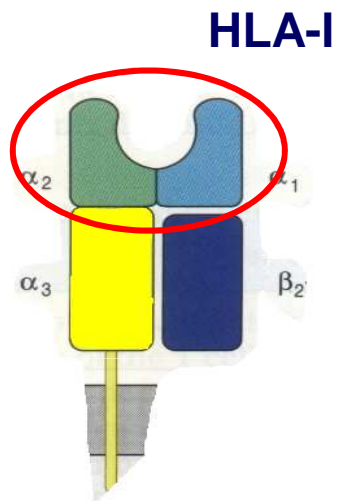
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
HLA-A*0201	W	L	S	L	L	V	P	F	V
	L	L	F	G	V	P	V	Y	V
	I	L	K	E	P	V	H	G	Y
HLA-A*6801	R	L	R	P	G	G	K	K	K
	I	L	R	G	S	V	A	H	K
	R	L	R	A	E	A	G	V	K
HLA-A3	K	T	G	G	P	I	Y	K	R
	E	V	A	P	P	E	Y	H	R
	A	V	A	A	V	A	A	R	R
HLA-B7	G	P	G	P	Q	P	G	P	L
	I	P	Q	C	R	L	T	P	L
	P	P	P	I	F	I	R	R	L
HLA-B27	R	R	V	K	E	V	V	K	K
	G	R	I	D	K	P	I	L	K
	R	R	I	K	E	I	V	K	K



Пептид - свързващи мотиви за някои MHC-I алотипове

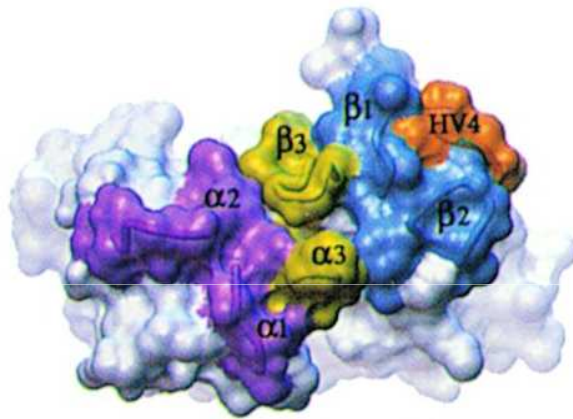
Антиген – специфичен рецептор на Т-лимфоцитите: молекулярна структура

Т лимфоцитите разпознават антигена в комплекс с HLA молекули

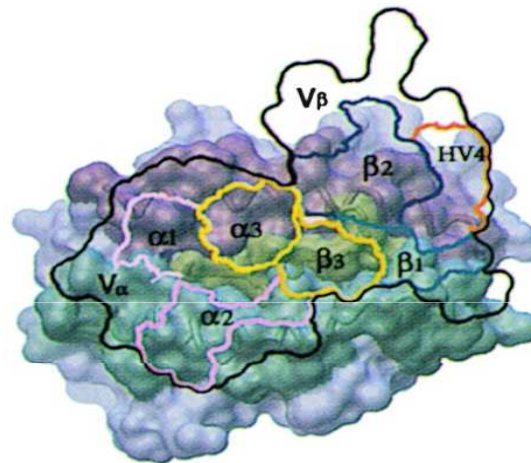


Антиген – специфичен рецептор на Т-лимфоцитите: молекулярна структура

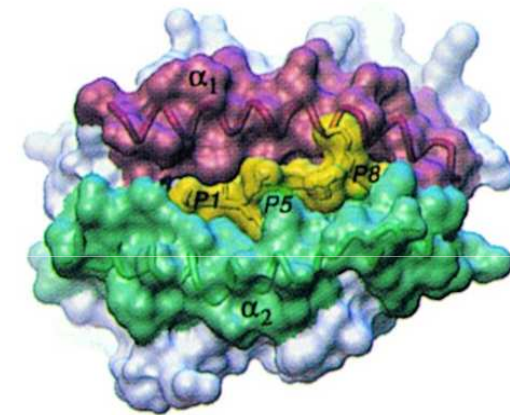
комплекс TCR/ HLA молекула/пептид



TCR: Означени са CDR 1-3 върху α и β веригите на TCR и HV4 –мястото за свързване на суперантиген



Очертанията на TCR са проектирани върху MHC-I/пептидния комплекс

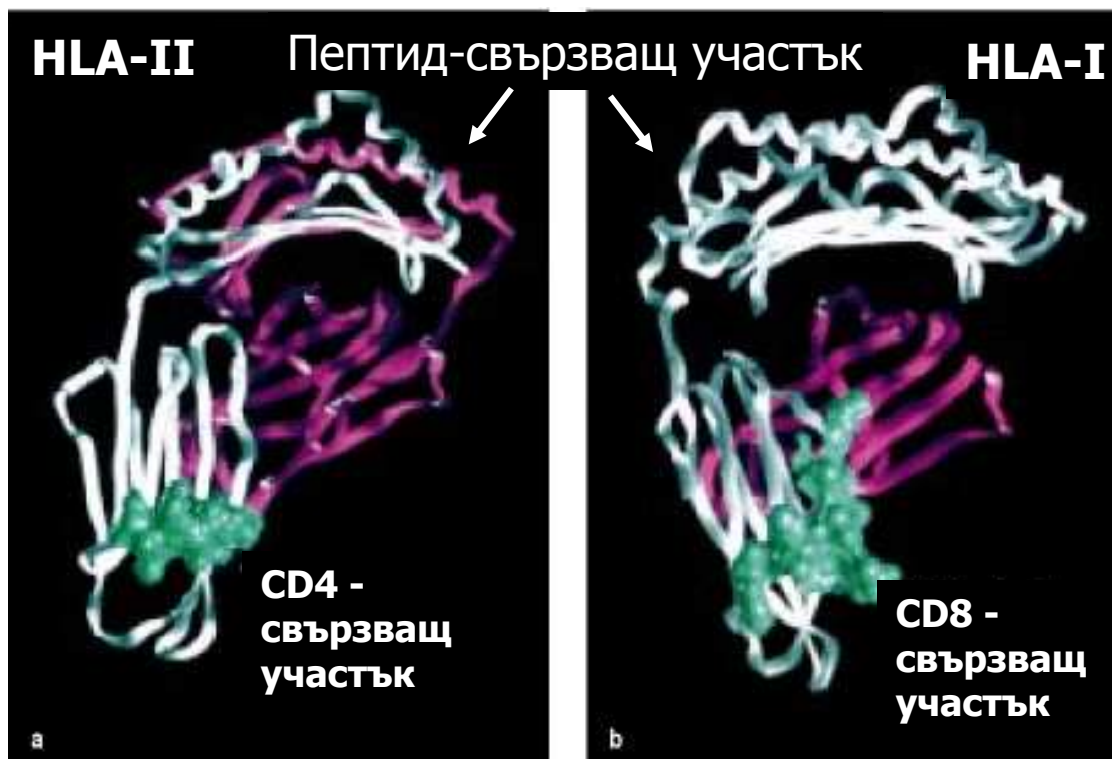


MHC-I: означени са α_1 и α_2 домените, образуващи антиген-свързващия участък, в който има пептид

Кристална структура на комплекса TCR, пептид /MHC-I молекула (Garcia et al.)

Молекулярна структура на TCR

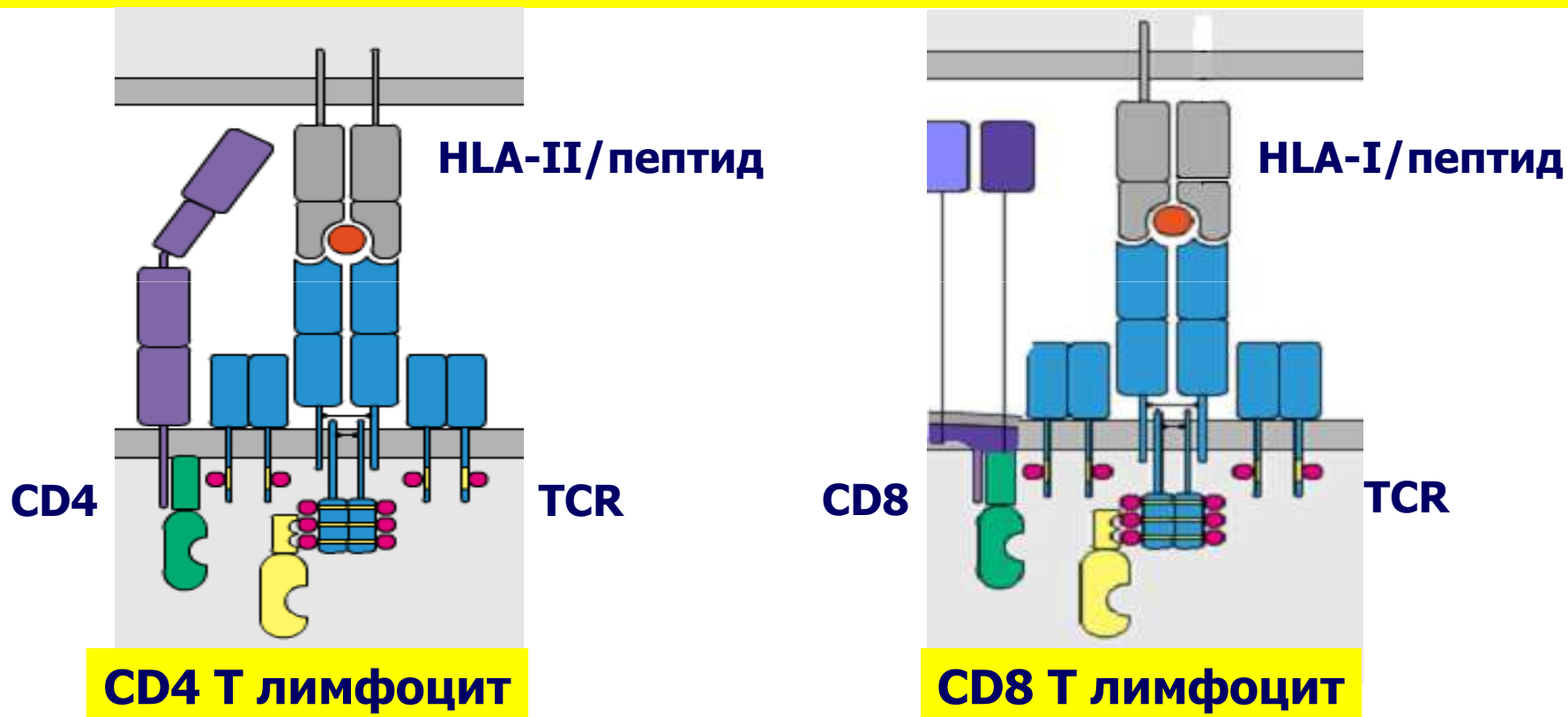
Участие на молекулите CD4 и CD8



CD4 и CD8 се свързват на специфични места, съответно – с HLA-II и HLA-I молекулите

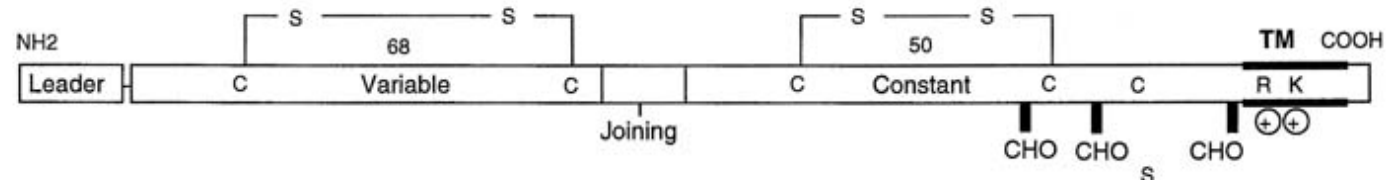
Молекулярна структура на TCR

Участие на молекулите CD4 и CD8

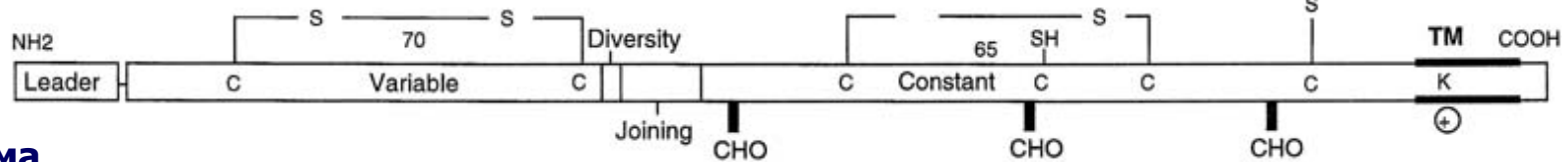


Генетична структура и разнообразие на TCR

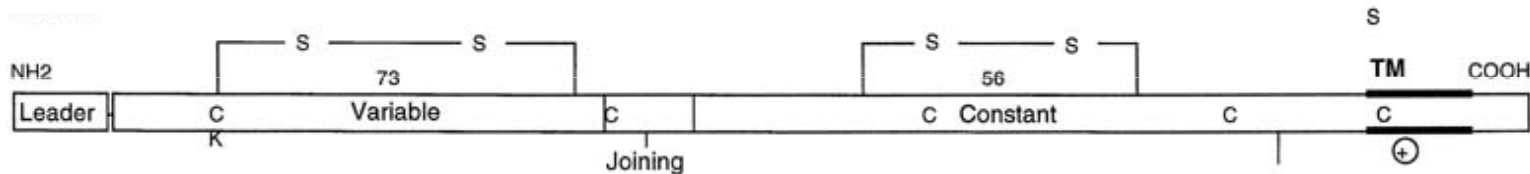
алфа



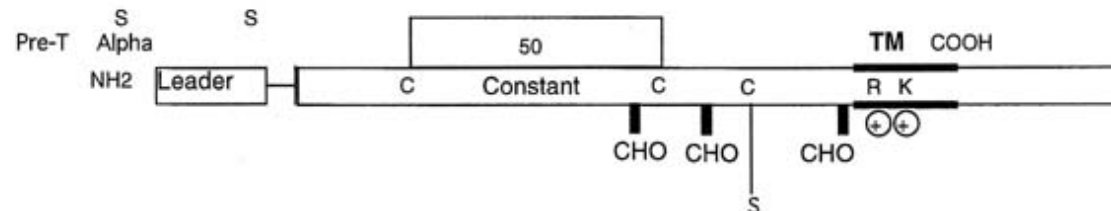
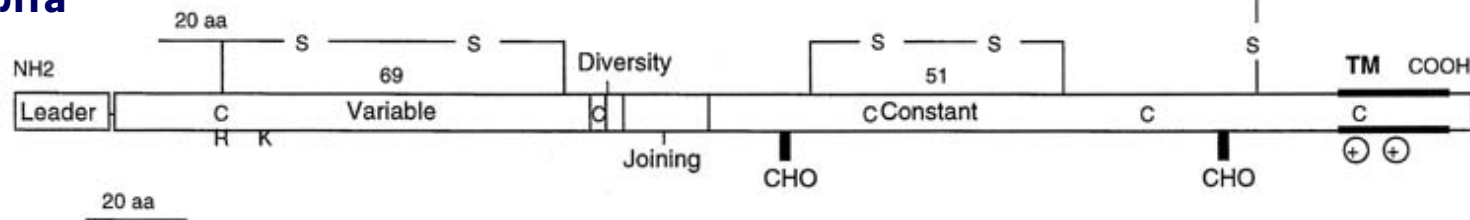
бета



гама

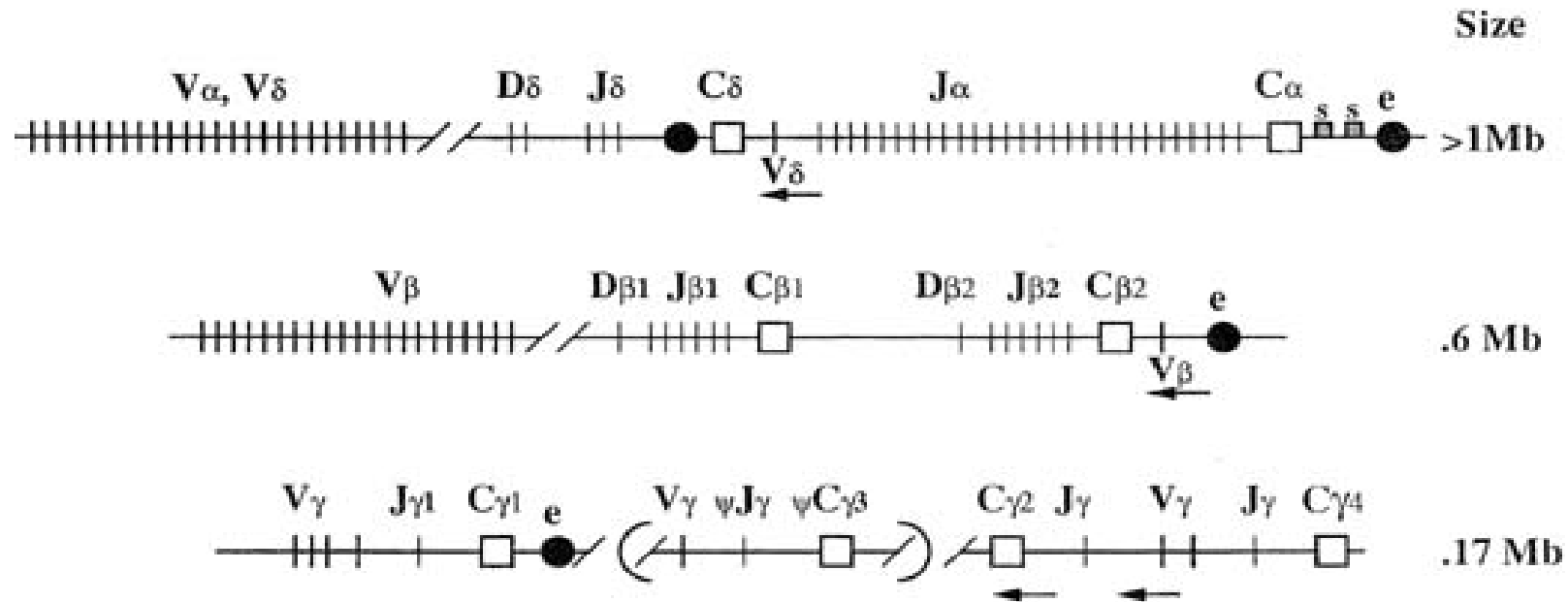


делта



V-(D)-J-C

Генетична структура и разнообразие на TCR

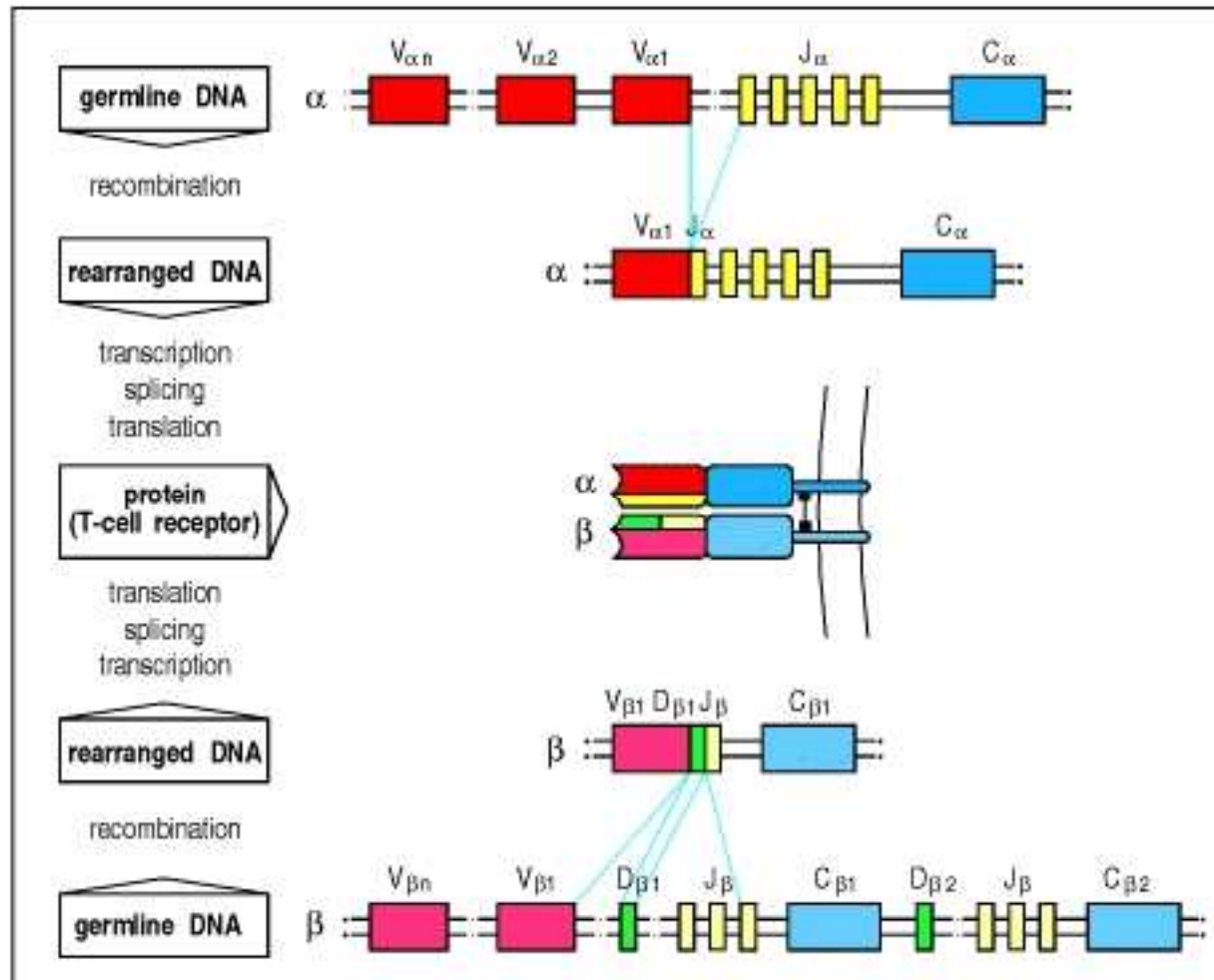


TCR се кодира в 3 локуса

Хромозомна локализация: 14 (α, δ), 7(β), 11(γ)

Всеки локус се състои от C-екзони и множество V, J (и D) сегменти

Генетична структура и разнообразие на TCR



Последователно пегрупиране на гените за TCR:
Dβ-Jβ; Vβ-DJ; VDJ-Cβ
Vα-Jα; VJ-Cα

Генетична структура и разнообразие на TCR

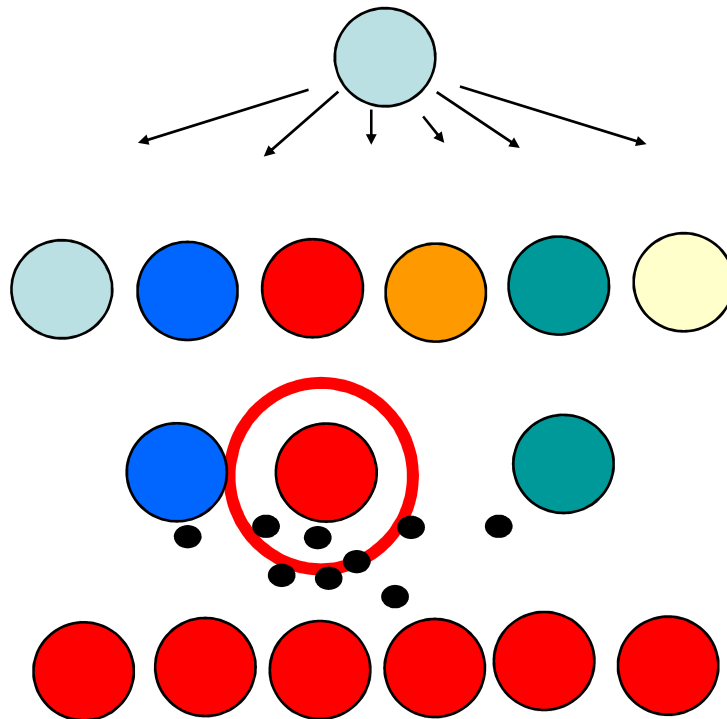
верига сегмент	α (x_2)	β (x_{22})
V	70	52
D	0	2
J	61	13
комбинаторно разнообразие	5.8×10^6	
свързващо разнообразие (рамка, N, P)	2×10^{11}	
общо	10^{18}	

Генериране на разнообразието от специфичности на TCR

Взаимодействието TCR/HLA: формиране на репертоара и насочване на адаптивния имунен отговор

ЛИМФОЦИТНА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ И КЛОНАЛНА СЕЛЕКЦИЯ

ТИМУС



Л.ВЪЗЕЛ

Антиген-независим етап:

генериране на наивни лимфоцити с разнообразни специфичности

клонална делеция на потенциално автореактивни лимфоцити

зрели наивни лимфоцити: среща с антиген

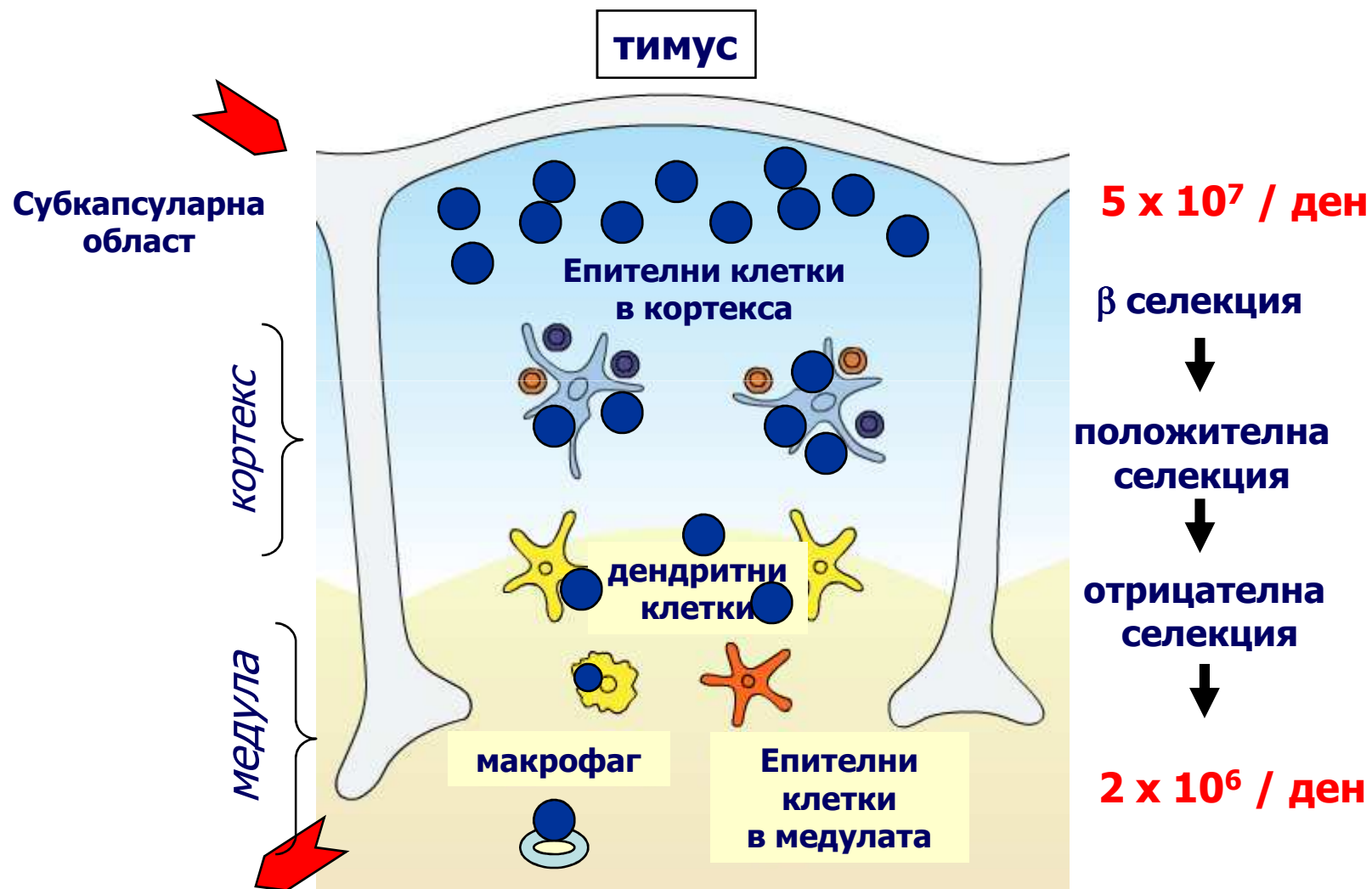
Антиген-зависим етап

пролиферация и диференциация на специфичния клон:

ефекторни лимфоцити - елиминират антигена

Паметови лимфоцити – анамнестичен отговор

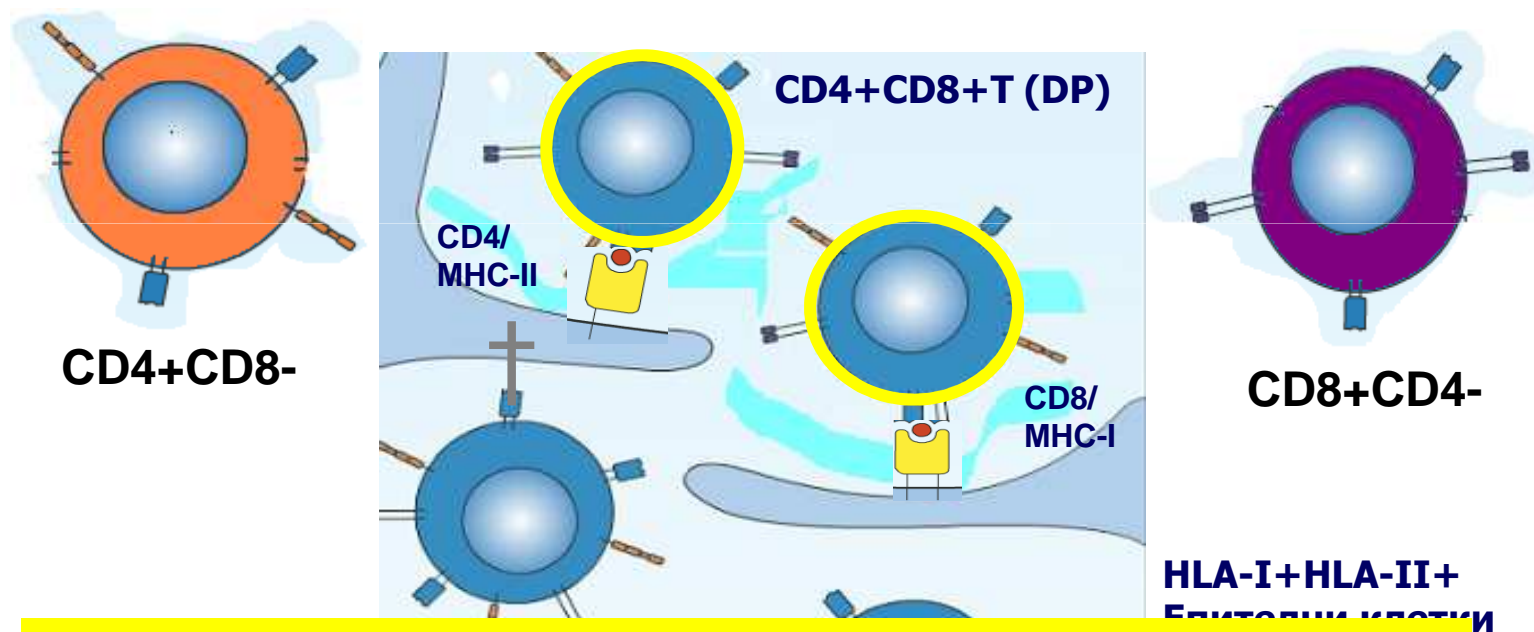
Взаимодействието TCR /HLA: формиране на репертоара



Взаимодействието TCR /HLA: формиране на репертоара

Позитивна селекция

Сигнал: нискоафинитетно взаимодействие с HLA/пептид

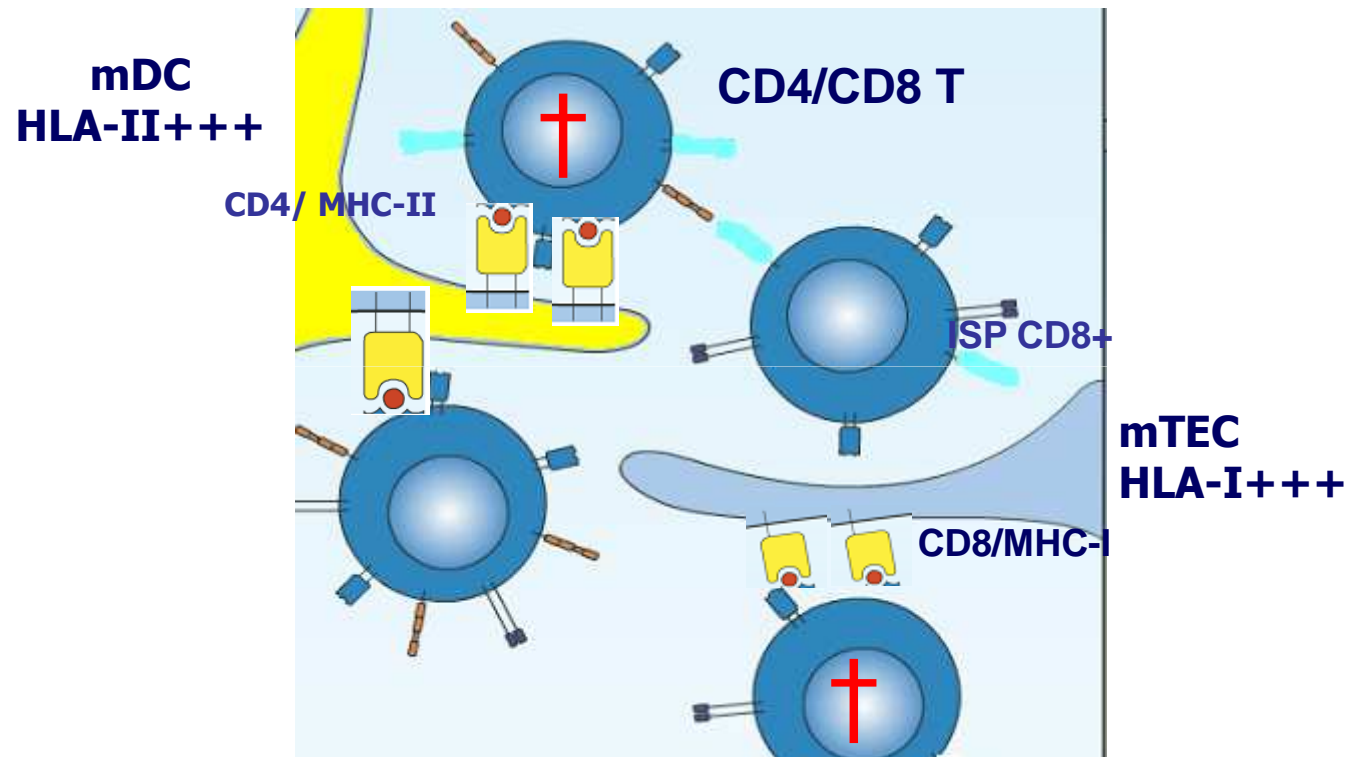


подбират се тимоцити с нисък афинитет към комплекса HLA/ собствен пептид специфичността на TCR се координира с експресията на CD4/CD8 молекулите

Взаимодействието TCR /HLA: формиране на репертоара

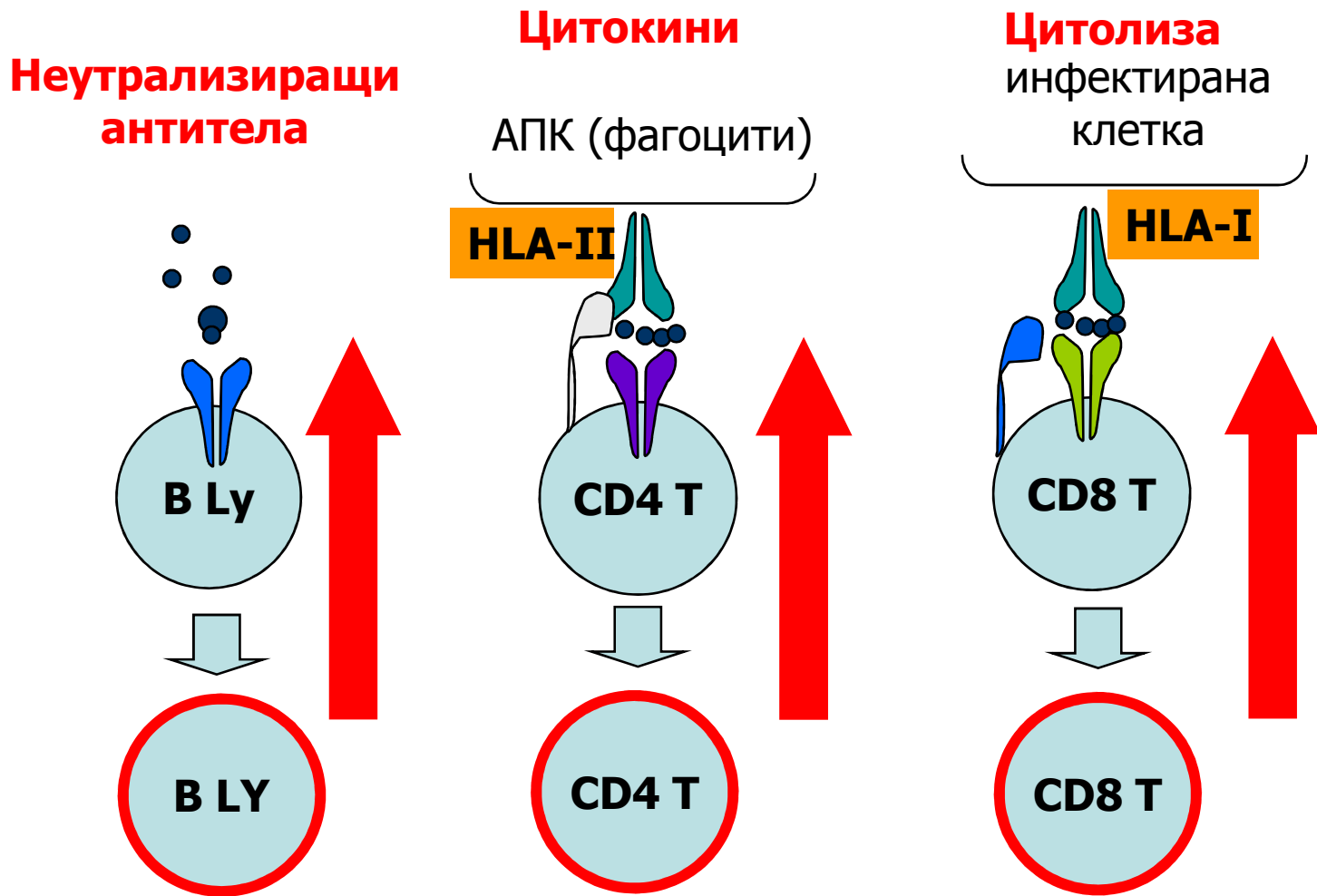
Негативна селекция

Сигнал: високоафинитетно взаимодействие с HLA/пептид



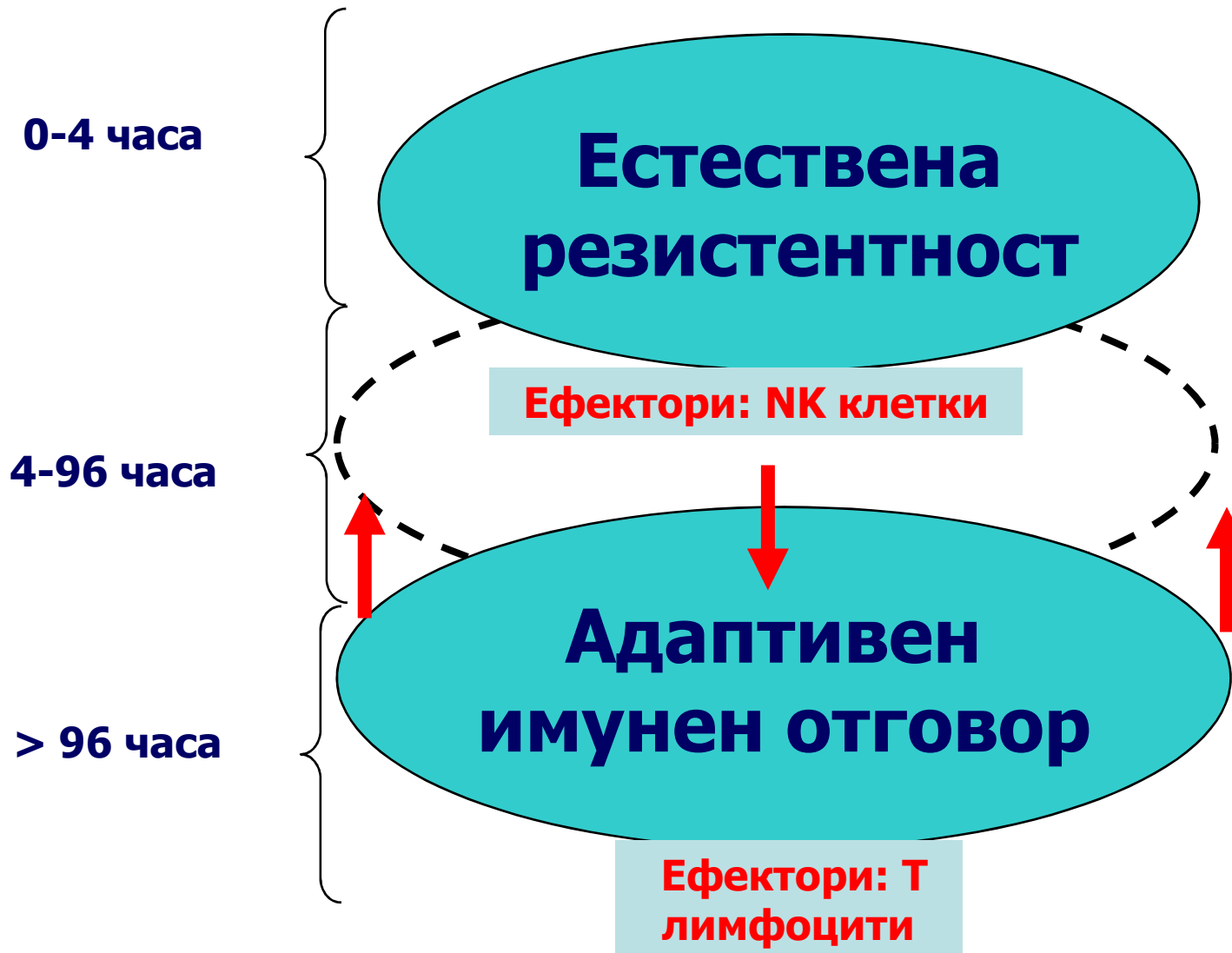
При негативната селекция се елиминират потенциално автореактивните Т-лимфоцити

Взаимодействието TCR / HLA: насочване на имунния отговор



съответствие антиген - ефекторен механизъм

Фази и ефекторни механизми на имунния отговор



НК клетките в естествения и адаптивен имунен отговор

- **НК клетките, LGL, (CD56+CD16+CD3-) са основен ефектор на естествената резистентност**
- **Проявяват широка специфичност към променени собствени клетки: туморни, инфектирани**
- **Осъществяват спонтанна цитотоксичност (без предварителна активация и диференциация)**

**АКТИВИРАЩ РЕЦЕПТОР?
РАЗГРАНИЧАВАНЕ СВОЕ / НЕ СВОЕ?**

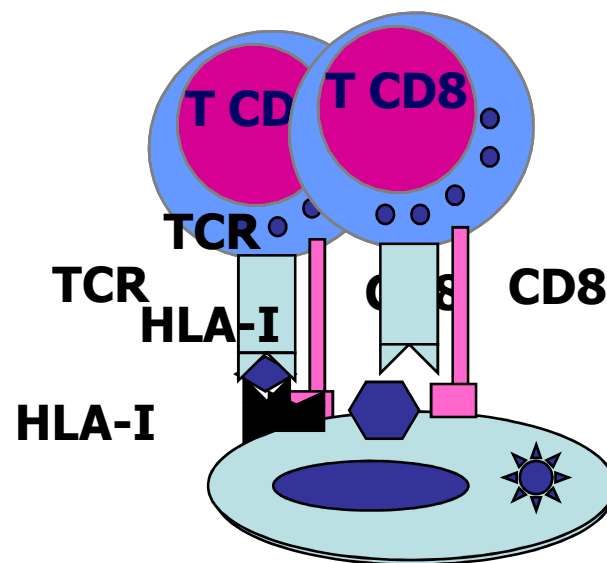
NK клетъчни рецептори. Парадигмата NK клетъчна специфичност

“Хипотеза за липсващото свое”,

Ljunggren H-G, Karre K. 1990. *Immunol. Today* 11:237–44



**HLA-не рестриктирана
цитотоксичност**



**HLA-рестриктирана
цитотоксичност**

НК клетъчни рецептори. Парадигмата НК клетъчна специфичност

НК рецепторите се активират от **ЛИПСВАЩО** свое (МНС),
ИНДУЦИРАНО свое (stress signals) или **МОДИФИЦИРАНО** свое
(stress signals)

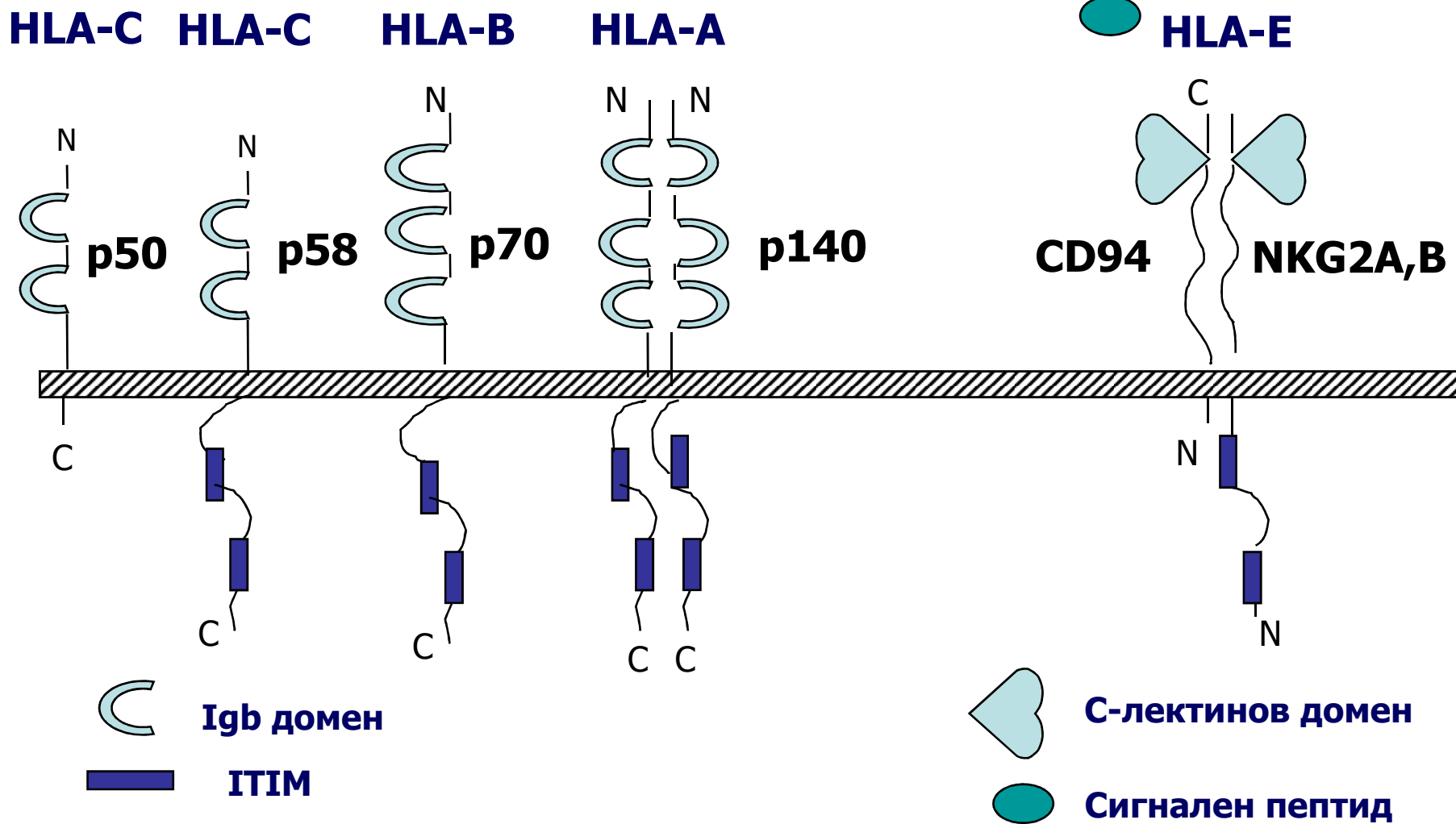
Семейство	Молекулярна структура	Генетичен комплекс	Лиганди	Съответствие при мишки
KIR	Ig-superfamily	LRC (19q13.4)	HLA-A, -B, -Cw, -G	gp49
ILT/LIR	Ig-superfamily	LRC	HLA Class Ia (-G)	LRC
CD94/NKG2 (KLR)	C-тип lectin-like	NKC (12p12.3 - 13.2)	HLA Class Ib (-E)	NKC / Ly49
NKG2D (KLRK1)	C-type lectin-like	NKC	МНС-Ib, MIC	NKG2D
NCR (NKp30,44,46)	Ig-superfamily	различни, вкл. МНС (NCR3), LRC	Вирусни хемаглутиници	NCR

LRC = leucocyte receptor cluster

NK клетъчни рецептори: структура

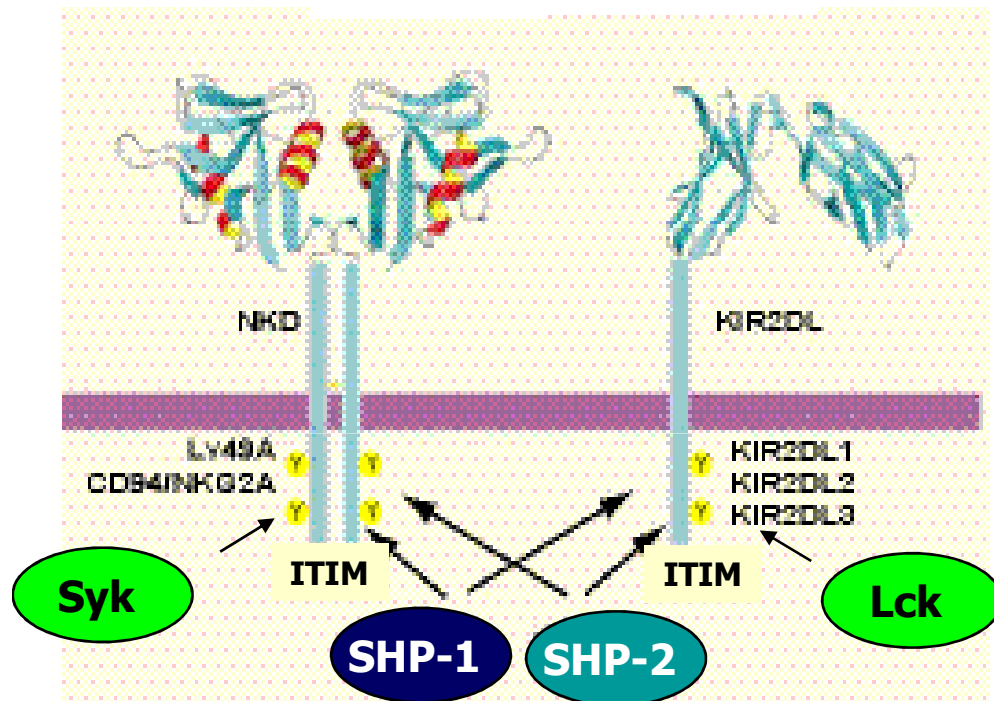
Ig γ -подобни

Лектинови



НК клетъчни рецептори: структура

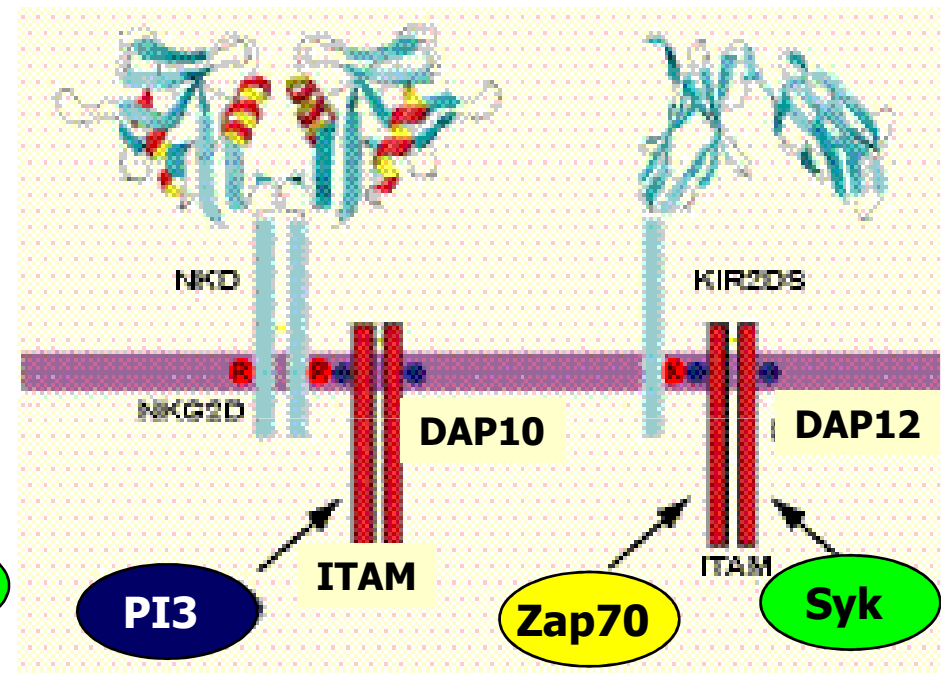
Инхибиращи рецептори



дефосфорилиране

ITIM: Immunoreceptor Tyr-based Inhibitory Motive

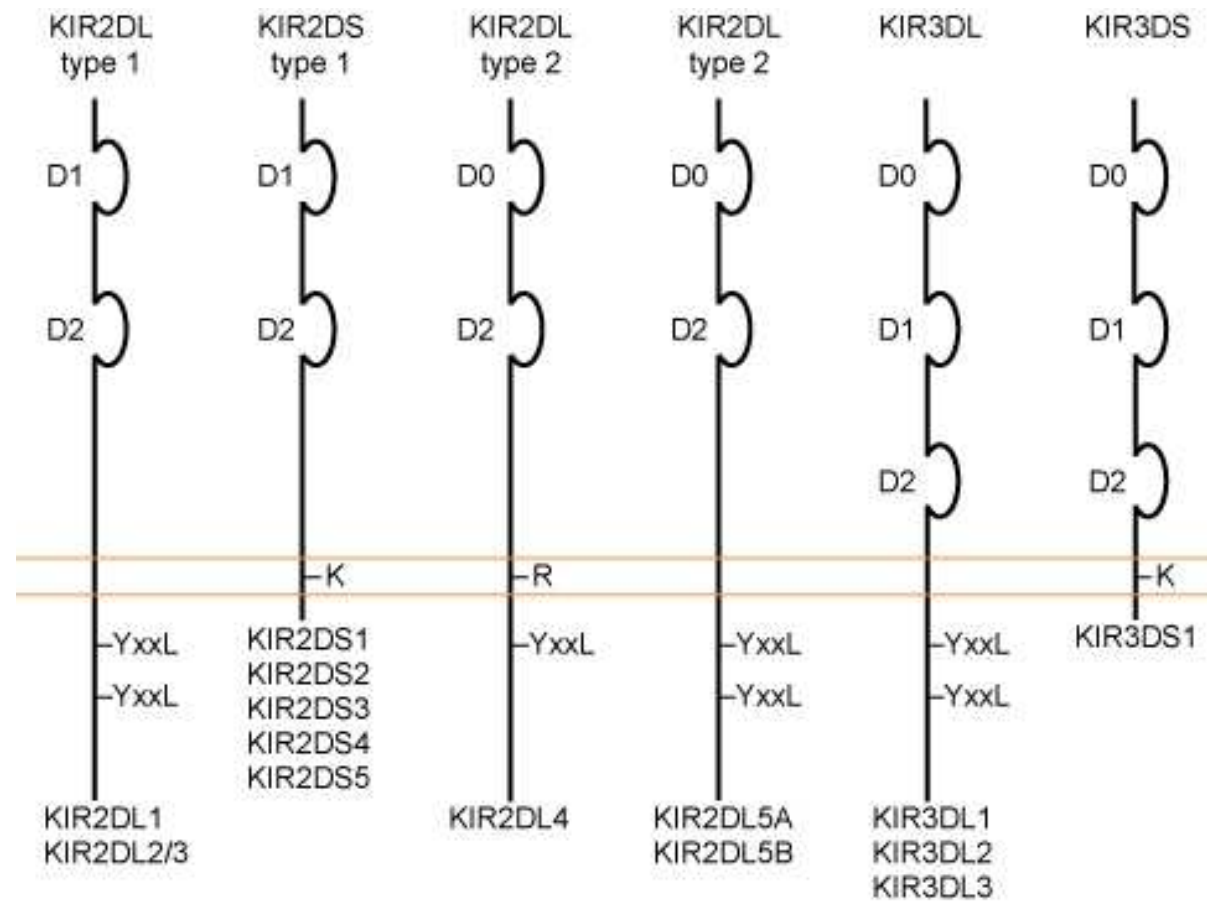
Активиращи рецептори



фосфорилиране

ITAM: Immunoreceptor Tyr-based Activation Motive

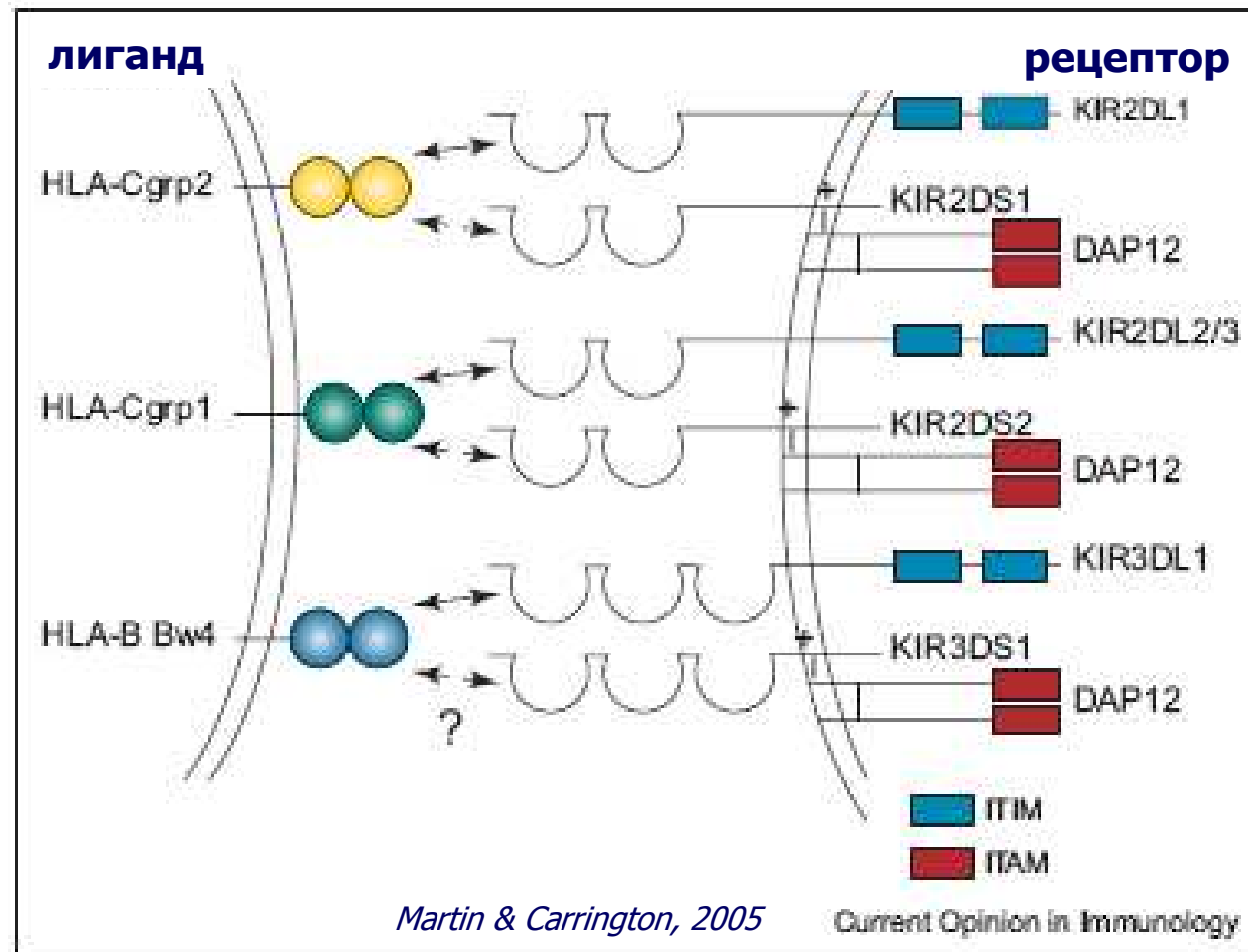
NK клетъчни рецептори: структура и номенклатура



NK клетъчни рецептори (KIR):лиганди

Asn77/Lys80

Ser77/Asn80



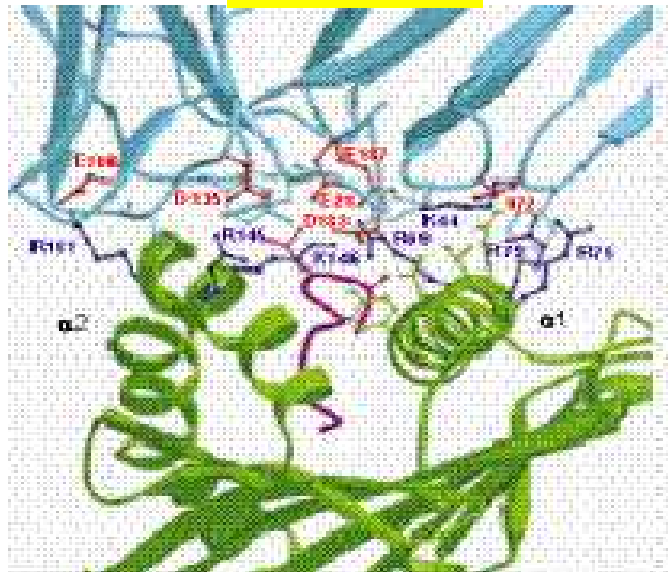
NK клетъчни рецептори (KIR):лиганди

Специфичност на KIR

2DL1, 2DS1	2DL2/3, 2DS2	3DL1/S1	3DL2	2DL4	2DS4
HLA-C grp 2	HLA-C grp 1	HLA-B Bw4	HLA-A	HLA-G	
C*02	C*01	B*08	A*03		C*04
C*04	C*03	B*13	A*11		
C*05	C*07	B*27			
C*06	C*08	B*44			
		B*51			
		B*52			
		B*53			
		B*57			
		B*58			

NK клетъчни рецептори (KIR):лиганди

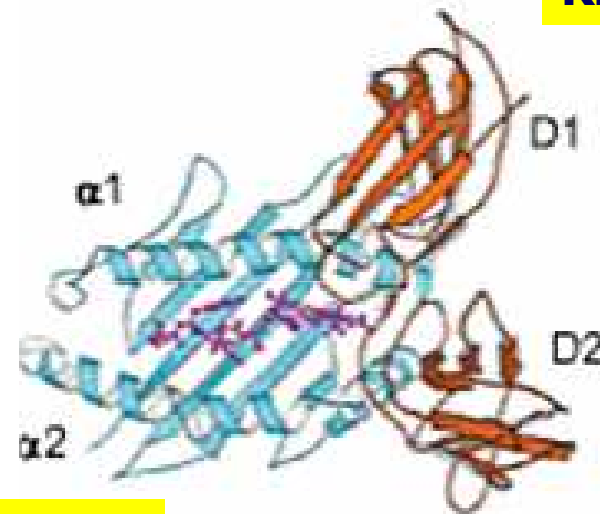
KIR2DL2



HLA-Cw3

*with permission from Dr. Peter Sun
and Nature Publishing
Group [<http://www.nature.com>]*

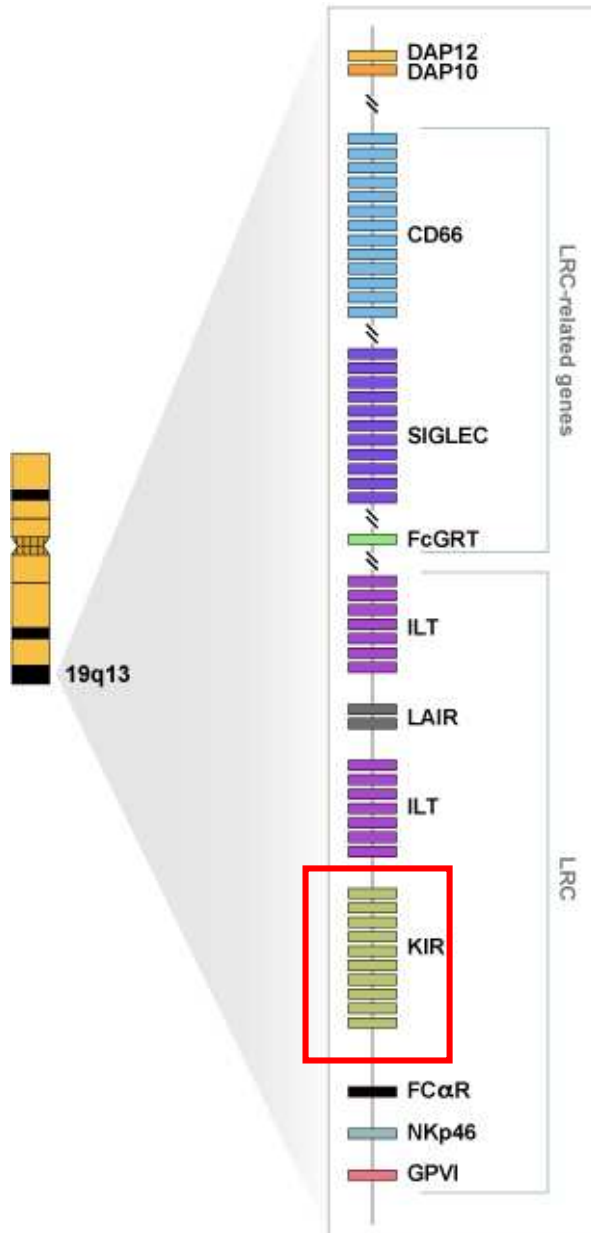
KIR2DL1



HLA-Cw4.1

*Boyington JC, Motyka SA, Schuck P, Brooks AG,
Sun PD.. Nature 405:537; 2000.*

KIR: Генетика и полиморфизъм



LRC: Leucocyte receptor complex

Вероятността двама случайно избрани индивиди да имат еднакъв KIR фенотип е минимална

Комплексът KIR:

- Полигенен (15 гена + 2 псевдогена)
- Полиалелен
- Клонална вариация на експресията

KIR: Генетика и полиморфизъм

Последователност и хаплотипна вариабилност на гените за KIR

Haplotype A



Haplotype B

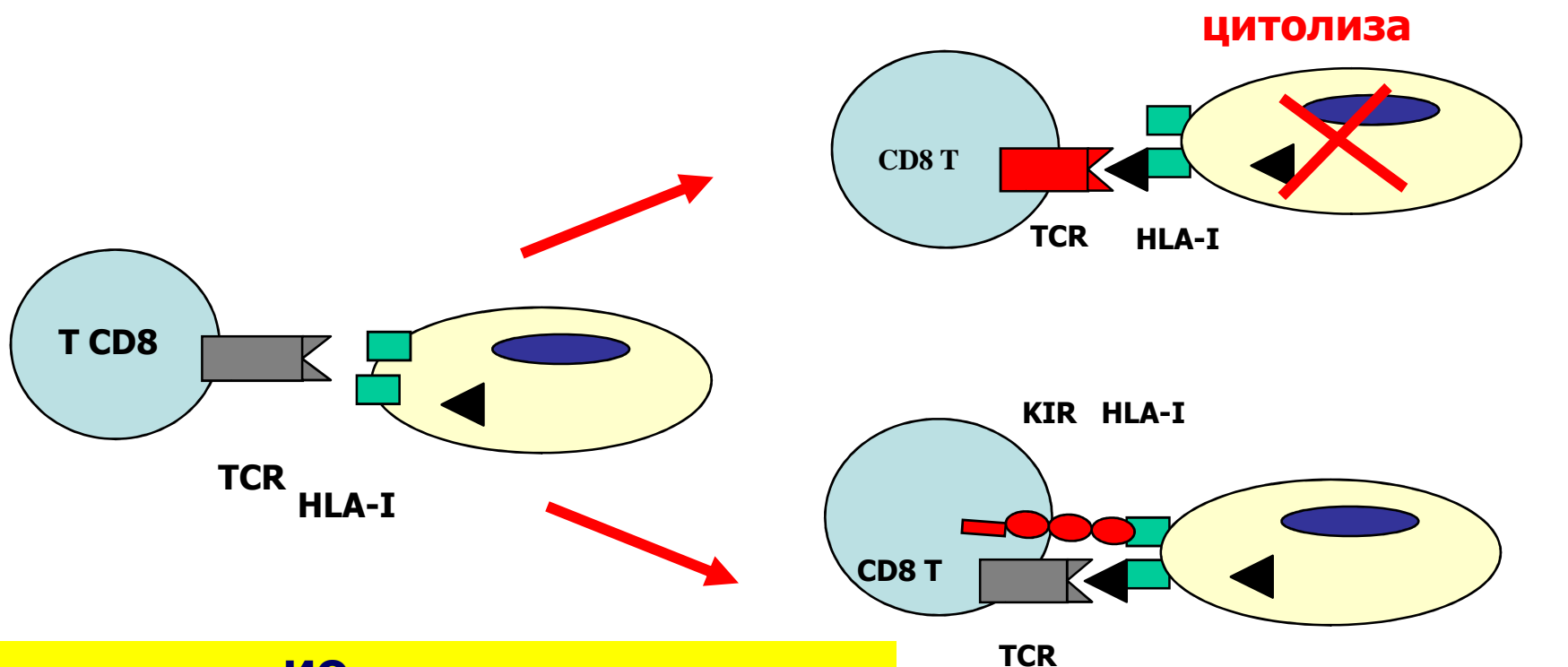


KIR: особености на експресията

- всяка NK клетка експресира 2 – 9 различни KIR в стохастични комбинации
- по правило всяка NK клетка експресира поне един инхибиращ KIR
- около 10% of популацията не носи ген за HLA-C2 специфичен инхибиращ KIR
- по-често се наблюдава пълна липса на активиращи KIR рецептори
- единствено KIR2DL4 се експресира от всички NK клетки
- липсата на инхибиращ KIR се компенсира от експресията на CD94/NKG2A
- във всички случаи сумарните инхибиращи сигнали преобладават над активиращите
- малки T лимфоцитни субпопулации също експресират KIR

KIR в адаптивния имунен отговор

Експресия на KIR от T лимфоцитите



Регулиране на ИО:
Предотвратява
екстремна стимулация
терминална диференциация
Регулиране на анамнестичния отговор
избягване на слаб/неспецифичен сигнал
Предотвратява автореактивност?

инхибиция на цитолізата

KIR: физиология и патология

- Естествена резистентност (инфекциозни патогени и тумори)
- Имунна толерантност (бременност)
- Регулиране на адаптивния клетъчен имунитет

Асоциации между експресията на гените за *KIR* и определени заболявания?

- KIR locus еволюира изключително бързо (селекционен натиск)
- Огромното разнообразие от хаплотипове предполага плейотропни ефекти: гените, осигуряващи защита срещу едно заболяване увеличават предиспозицията към друго, макар и не смъртоносно

KIR: физиология и патология

Инфекции и инфекциозен имунитет

- Осигуряват непосредствена защита срещу вирусни инфекции: стимулиращи KIR
- Допълват и усилват T клетъчния отговор: различна стратегия за разпознаване на HLA-I антигените
- Регулират T клетъчния отговор: KIR+ T
- **Установени са асоциации KIR/HLA генотип / протичане на инфекцията (HIV, HCV, HPV)**

HIV

3DS1 в комбинация с *HLA-B Bw4-80Ile*: по-бавна прогресия на ХИВ инфекция (***Martin MP et al. Nat Genet 31:429; 2002***)

HLA-Cw-рестриктиран HIV-специфичен отговор при LTNP (най-консервативните HIV пептиди се представят в рамките на HLA-Cw молекули) ***Nehete PN et al. . Viral Immunol. 1998;11***).

HIV-специфични CTL експресират инхибиращи KIR (***De Maria A, et al. Hum Immunol. 2000; 61***)

HIV потиска експресията на HLA-A и -B, но не на HLA-Cw и -E: основни лиганди за KIR (***Cohen GB et al. Immunity. 1999;10:661-671***)

CMV

потиска експресията на MHC-I и кодира хомоложни гр M144 и UL18

KIR: физиология и патология

Имунна толерантност и аутоимунитет

Инхибиращите KIR

- контролират реактивността на зрелите NK клетки
- контролират узряването: NK с поне един KIR срещу собствени MHC-I имат по-нисък праг на активация и са по-функционални от NK без KIR или с KIR срещу чужди MHC-I
- експресията на KIR от автореактивни CD8+ T лимфоцити в периферията: механизъм за поддържане на T-клетъчната имунотолерантност

Небалансираната експресия на гени за активиращи *KIR*: повишен риск от АИБ:

***2DS2* - при пациенти с RA**

***2DS2* и/или *2D52*, при псориазис, но само в случай че HLA лигандите за хомоложните инхибиращи рецептори липсват.**

Стимулирането на cells през TCR поддържа

Противотуморен имунитет

Експресия на инхибиращи KIR от тумор-специфични клонове (меланома)

Експресията на активиращи NKR корелира обратно с риска от развитие на малигнено заболяване (корелация между NKG2D хаплотип и NK цитотоксичната активност)

Терапевтични аспекти: комбиниране на IFN- γ потиска NK клетъчната цитотоксичност, поради повишаване експресията на HLA антигени, с IL2-активация на NK

KIR: физиология и патология

Бременност

- Предотвратяват NK/T клетъчна реакция на отхвърляне на трофобласта: 2DL4/ HLA-G
- успешната плацентация зависи от баланса на инхибиращи/активиращи NKR

Генотипни асоциации KIR/HLA с патогенетично значение:

HLA-C2 (баща) и липса на KIR2DS1 (майка): рецидивиращи спонтанни аборти, (*Hiby SE, et al. Hum Reprod. 2008*)

2DL1, малко 2DS (майка) HLA-C2 (плод):пreekлампися (*Hiby SE, et al. JEM, 2004*)

Трансплантации (HSCT)

Несъвместимост по лигандите за KIR : Реципиентът не експресира HLA-I лиганди за инхибиращите KIR на донора (3DL1, 2DL2 /3, 2DL1 и 3DL2): NK алореактивност от страна на донора и GVL ефект

HLA-C съответствието: важен фактор за прогнозиране на рецидиви

“Модел на липсващия KIR лиганд” - стратегия за усилване на GVL ефекта при алогенна HSCT (*Leung W, et al. J Immunol. 2004;172*)

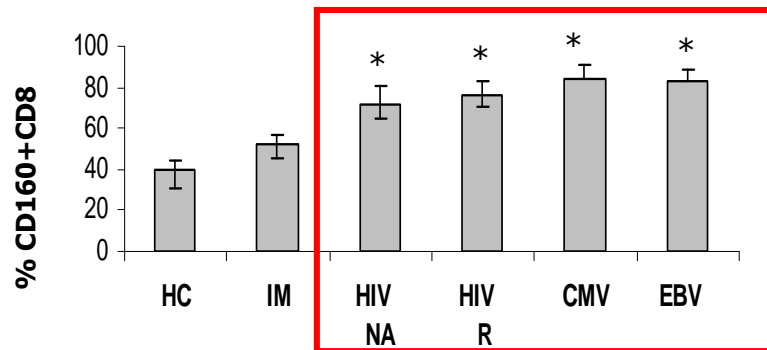
KIR: физиология и патология

KIR/HLA-I комбинации асоциирани със заболявания

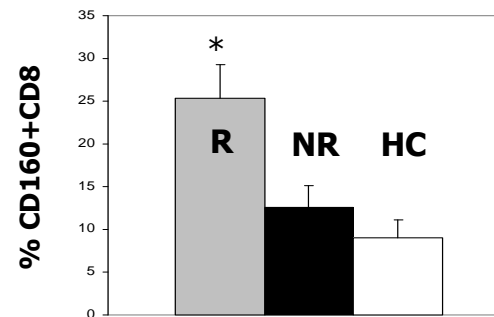
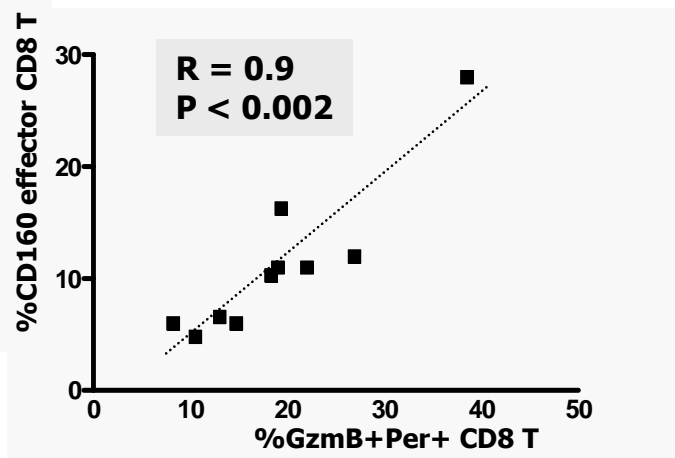
Заболяване	KIR	HLA	Прогресия	Ефект на KIR
AIDS	<i>3DS1</i>	<i>Bw4 Ile80</i>	забавена	по-малко инхибиция
	<i>3DS1</i> homoz	<i>HLA-Bw4 Ile80 отр.</i>	по-бърза	повече инхибиция
HCV	<i>2DL3</i> homoz	<i>HLA-C1</i> homoz	забавена	по-малко инхибиция
HPV цервикална дисплазия	<i>3DS1</i>	<i>HLA-C1</i> homoz <i>HLA-Bw4 отр.</i>	по-бърза	по-малко инхибиция
	Но <i>3DS1</i>	<i>HLA-C2</i> и/или <i>HLA-Bw4</i>	забавена	повече инхибиция
меланом	<i>2DL2</i> и/или <i>2DL3</i>	<i>HLA-C1</i>	по-бърза	повече инхибиция
Псориазис	<i>2DS1</i> и/или <i>2DS2</i>	<i>HLA-C1</i> Hz или <i>HLA-C2</i> homoz	по-бърза	по-малко инхибиция
Диабет I тип	<i>2DS2</i>	<i>HLA-C1</i> , по <i>HLA-C2</i> , по <i>HLA-Bw4</i>	по-бърза	по-малко инхибиция
Преeklampсия	<i>2DL1</i> , малко <i>2DS</i> (майка)	<i>HLA-C2</i> (плод)	по-бърза	повече инхибиция

Рецепторът CD160 (NK1)

Експресията на CD160 корелира с ефективен CD8 T имунен отговор



- Ig-подобен, хомология с KIR2DL4
- 27 kD, GPI-свързан, хромозома 1
- Експресия: NK и T субпопулации (CD8, $\gamma\delta$ T, IEL) с изразена цитотоксичност
- Лиганди: MHC Ia и Ib
- Ефект: ко-стимулиращ
- Увеличена експресия при хронични инфекции (HIV, EBV, CMV)
- Експресията му корелира с цитотоксичната функция на антиген-специфичните CTL
- Костимулиращият ефект се модулира от HLA-C специфични инхибиращи KIR
- Високата експресия корелира с по-добра прогноза при HIV инфекция



R – full responders to ART
NR – Non responders to ART
HC - Healthy controls

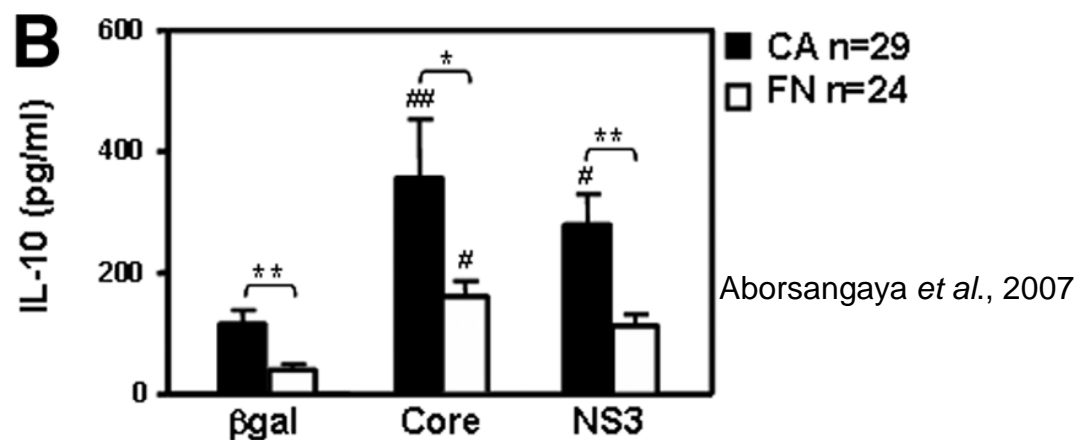
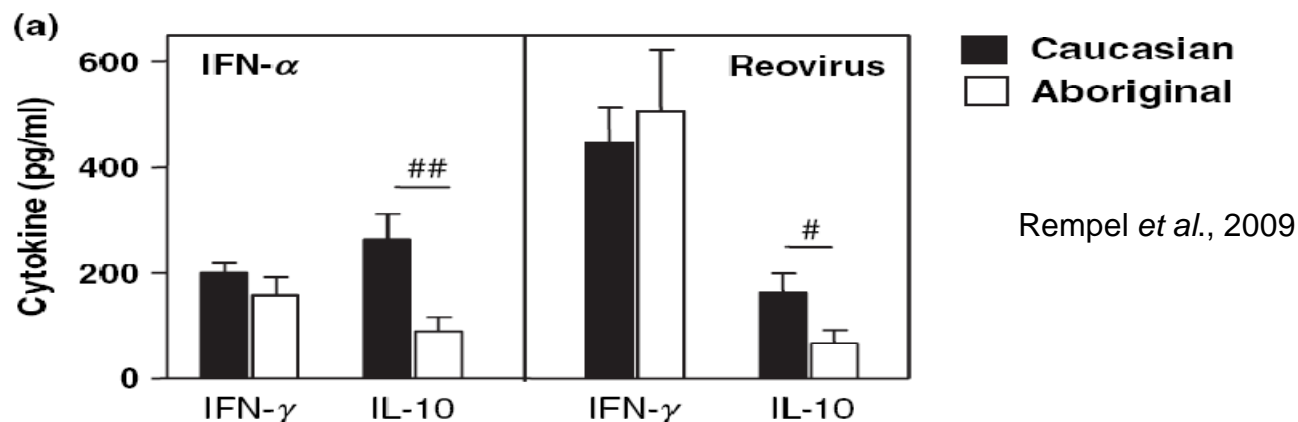
Nikolova, M. M. Muhtarova, H. Taskov, et al. *Cell Immunol*, 2005, 237:96.
M. Muhtarova, M. Nikolova, S. Magaev, et al. *Problems of Infectious and Parasitic Diseases*, 2006, 34 (2): 7

Други полиморфни молекули с имунна функция: citoкени и техните рецептори

- **Протеини с ниско молекулно тегло, секретирани от имунните клетки (интерлевкини, лимфокини, хемокини)**
- **Функции**
 - ефекторна
 - имуномодулация
 - реципрочна регулация
 - “трети сигнал” за адаптивния имуен отговор
- **Полиморфизъм на гените за citoкени и техните рецептори**
 - Повлиява нивото на транскрипция и експресия
 - Проявява се като различна податливост към и клинично протичане на определени заболявания – инфекциозни, автоимунни, туморни в различни популации
 - HIV (CCR5R), HCV (IL-10), хламидиоза (IL-10), CoV SARS, TBC (IFNg-R), шизофрения (IL-2,IL-4), псориазис (IL-2,IL-4), проказа (TNFa, IL-10), HTLV-HAM (TNFa,IL-10)....

Други полиморфни молекули с имунна функция: citoкени и техните рецептори

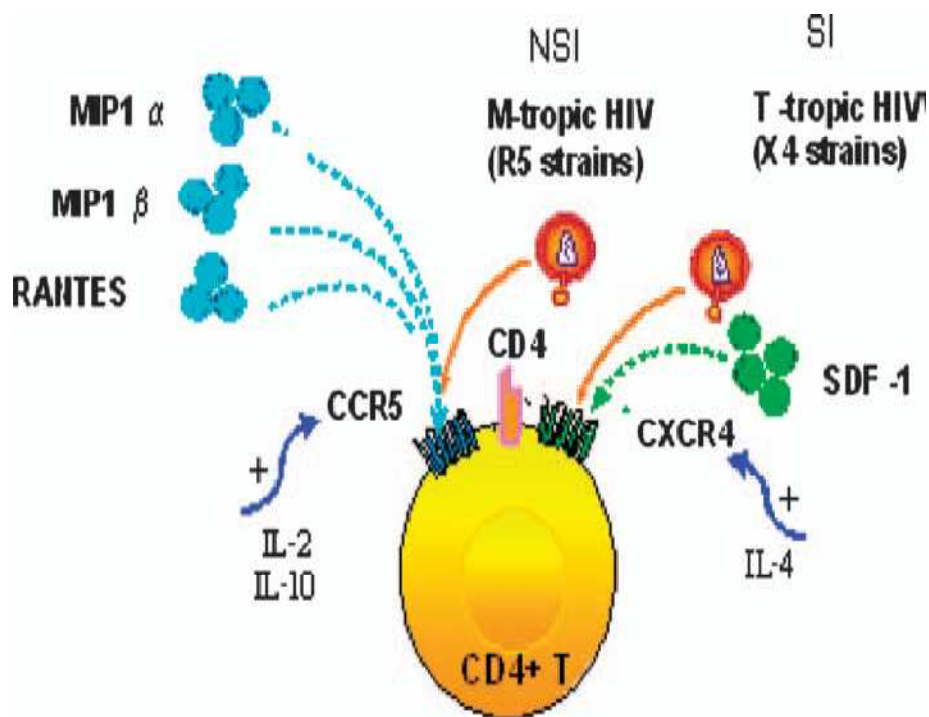
Етническата принадлежност влияе на силата на имунния отговор и на ефекта от имунобазираната терапия



HCV пептиди индуцират по-висока секреция на IL-10 от клетки на CA в сравнение с FN лица

Други полиморфни молекули с имунна функция: citoкени и техните рецептори

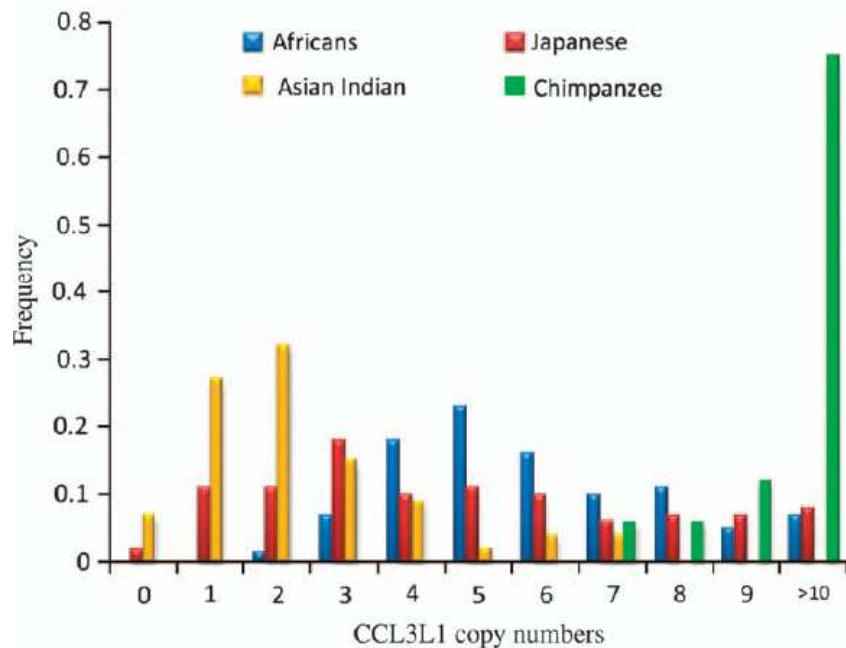
Рецептори за хемокини и техните лиганди,
повлияващи навлизането на HIV в клетките:
CCR5 и CCL3/L1, CCL4/L1, CCL5
CXCR4 и CCR2,



Индивидите с делеция на гена за CCR5 ($\Delta 32$), 10%–16%, са резистентни към М-тропните варианти на ХИВ

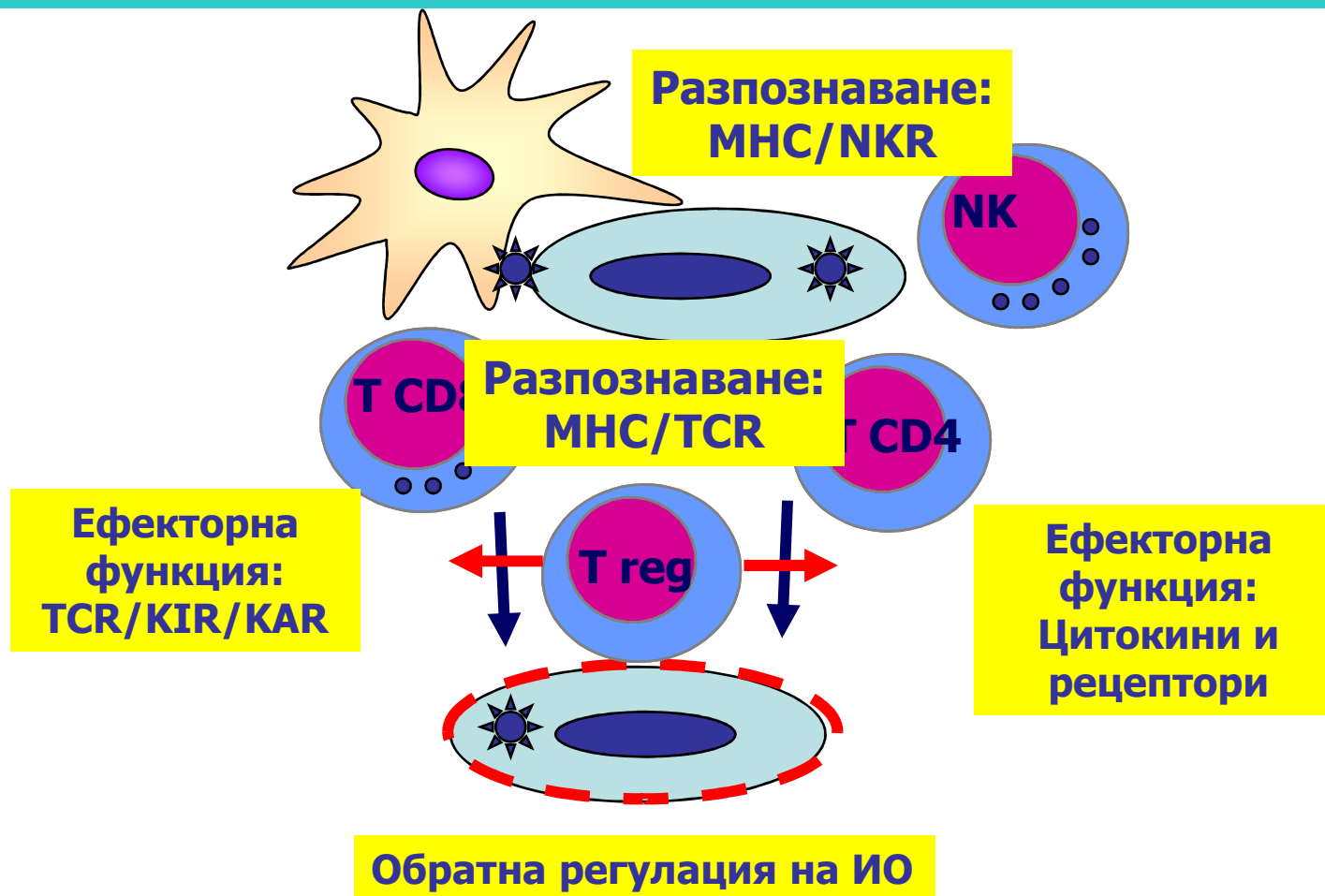
Други полиморфни молекули с имунна функция: Хемокини

Етнически полиморфизъм: брой
копия за CCL3L1



Индивидите с нисък брой копия, свързан с етническия им произход, се отличават със значително по-голяма чувствителност към HIV-1 инфекция

Полиморфизмът засяга всички нива на имунния отговор



Молекулата CD39 (Treg)

CD39 експресията върху Treg е значително повишена при хронична ХИВ инфекция

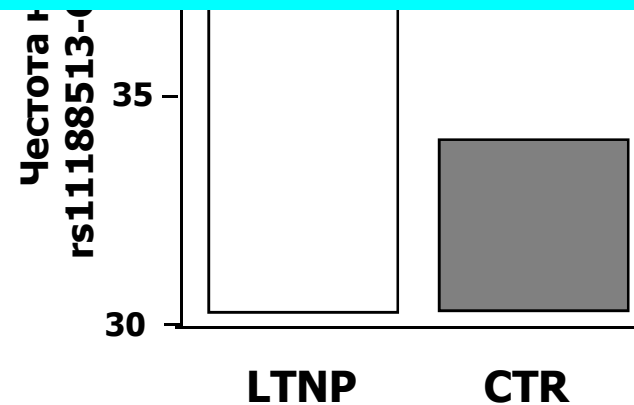
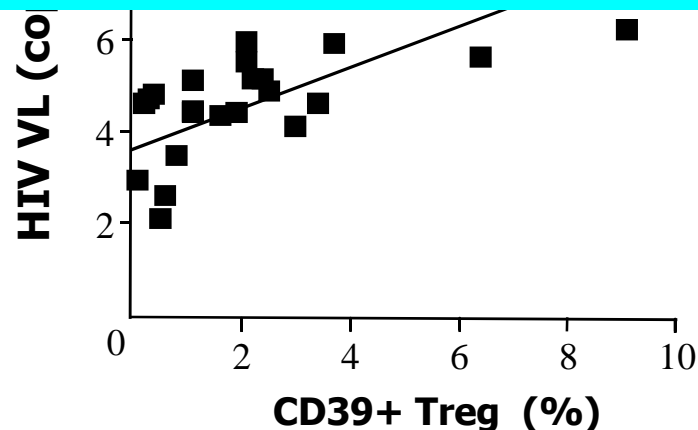
Корелира директно с вирусния товар и - обратно с CD4AC

Съществува полиморфизъм на гена за *CD39*, асоцииран с намалена експресия на *CD39* и по-бавна прогресия на инфекцията

Превръща АТФ в аденозин:инхибира Т клетъчните функции

Обратна регулация на имунното възпаление

Потиска антиген-специфичния отговор при хронична вирусна инфекция



M. Nikolova, M. Carriere, M Jenabian, M Younas, O Delaneau, M Muhtarova, J F Zagury, JD Lelievre, and Yves Lévy, CD39/adenosine pathway is involved in AIDS progression, 2010, submitted

Най-важното...

- **Имунният отговор е сложна последователност от взаимодействия между клетъчни и разтворими молекули;**
- **Специфичността и многообразието на имунния отговор са свързани с полиморфизма на ключови молекули;**
- **Генетичният полиморфизъм влияе върху възникването, осъществяването и обратната регулация на имунния отговор;**
- **Генетичният полиморфизъм е възникнал и продължава да се развива в непрекъснато взаимодействие с околната среда;**
- **Изучаването на имунния полиморфизъм има съществено значение за прогнозата, имунопрофилактиката и имунобазираната терапия на редица заболявания с инфекциозна и не инфекциозна етиология**

Благодаря за вниманието !

