

**Эволюционная иммунология**  
**лекция 3 «Защитные системы**  
**эукариот»**

**Е.С. Шилов**

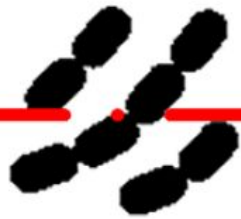
**26 февраля 2018 г.**



# АДАПТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ

(узнавание патогена высокоспецифично, существует иммунная память)

Археи и эубактерии  
локус CRISPR, cas-белки



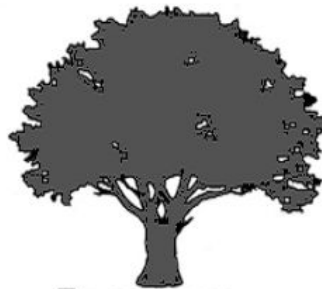
Круглоротые  
лимфоциты,  
VLR



Челюстноротые позвоночные  
Т- и В-лимфоциты, антитела,  
TCR, MHC



Археи и эубактерии:  
рестриктазы, системы  
токсин-антитоксин,  
рецепторы фаговых  
белков



Растения  
PRR, фитонциды,  
элиситоры, реакция  
сверхчувствительности



Грибы  
вегетативная  
несовместимость,  
РНК-интерференция

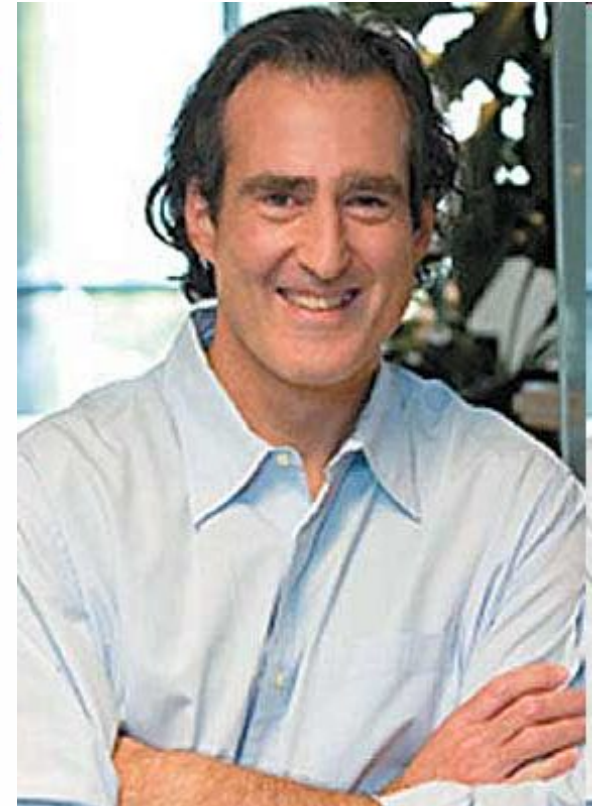
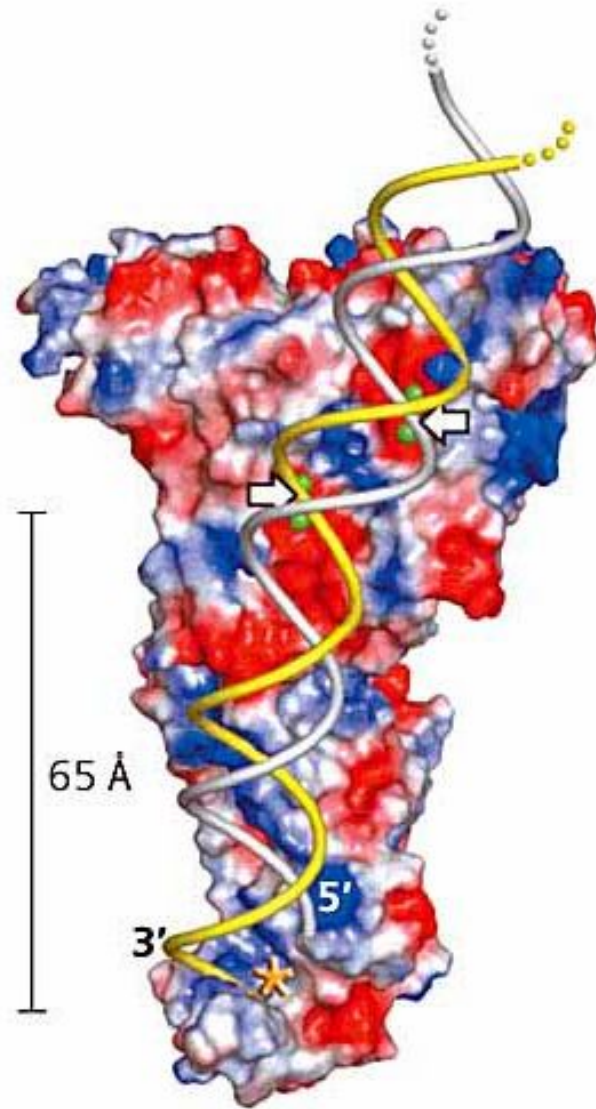


Многочлетные животные  
Фагоцитоз, иммуноциты,  
PRR, РНК-интерференция

# ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ

(узнавание патогена на основе PAMP, быстрый иммунный ответ)

# РНК-интерференция у эукариот



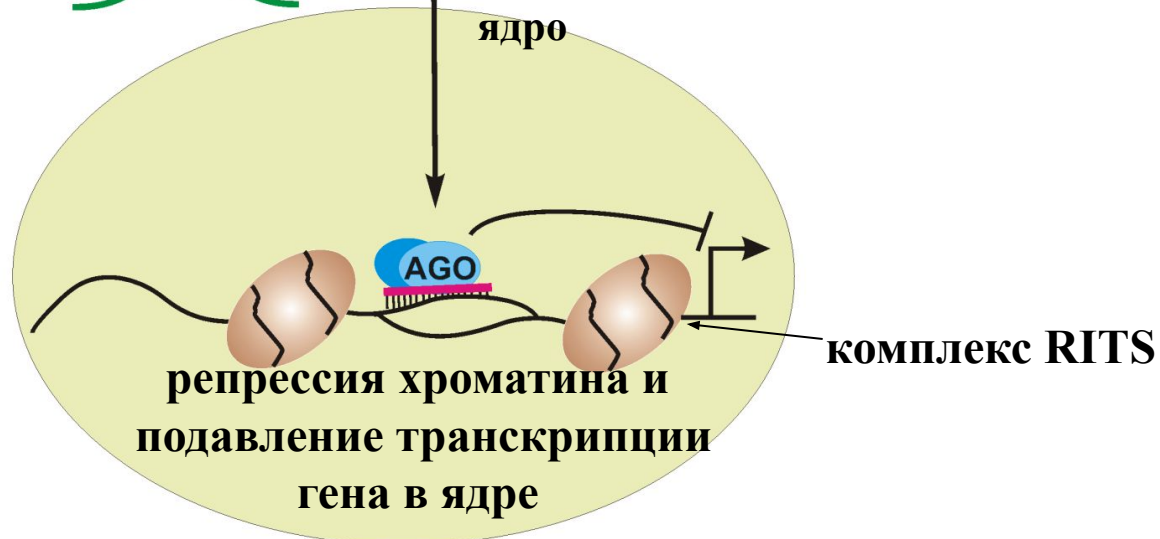
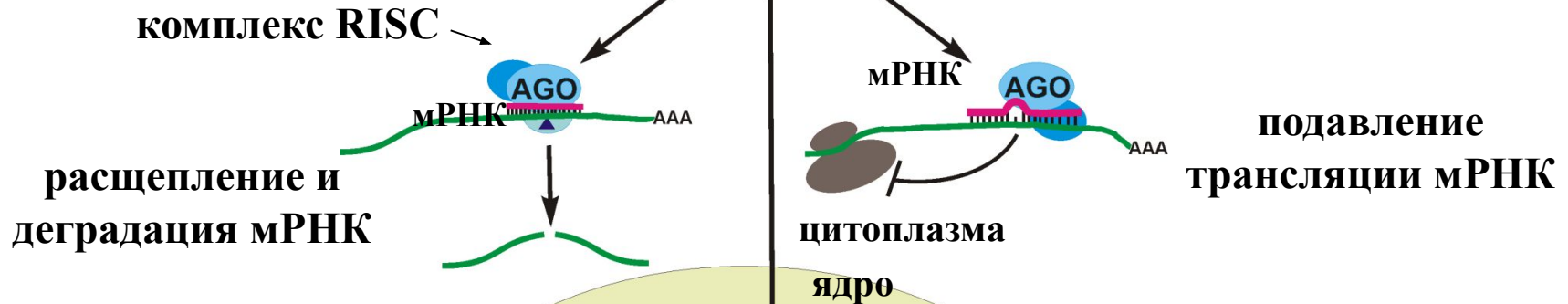
**Эндрю Файер и Крейг Мелло, открыли явление в 1998 году, получили Нобелевскую премию в 2006**

# Механизмы подавления экспрессии генов с помощью двуцепочечной РНК (РНК интерференция)



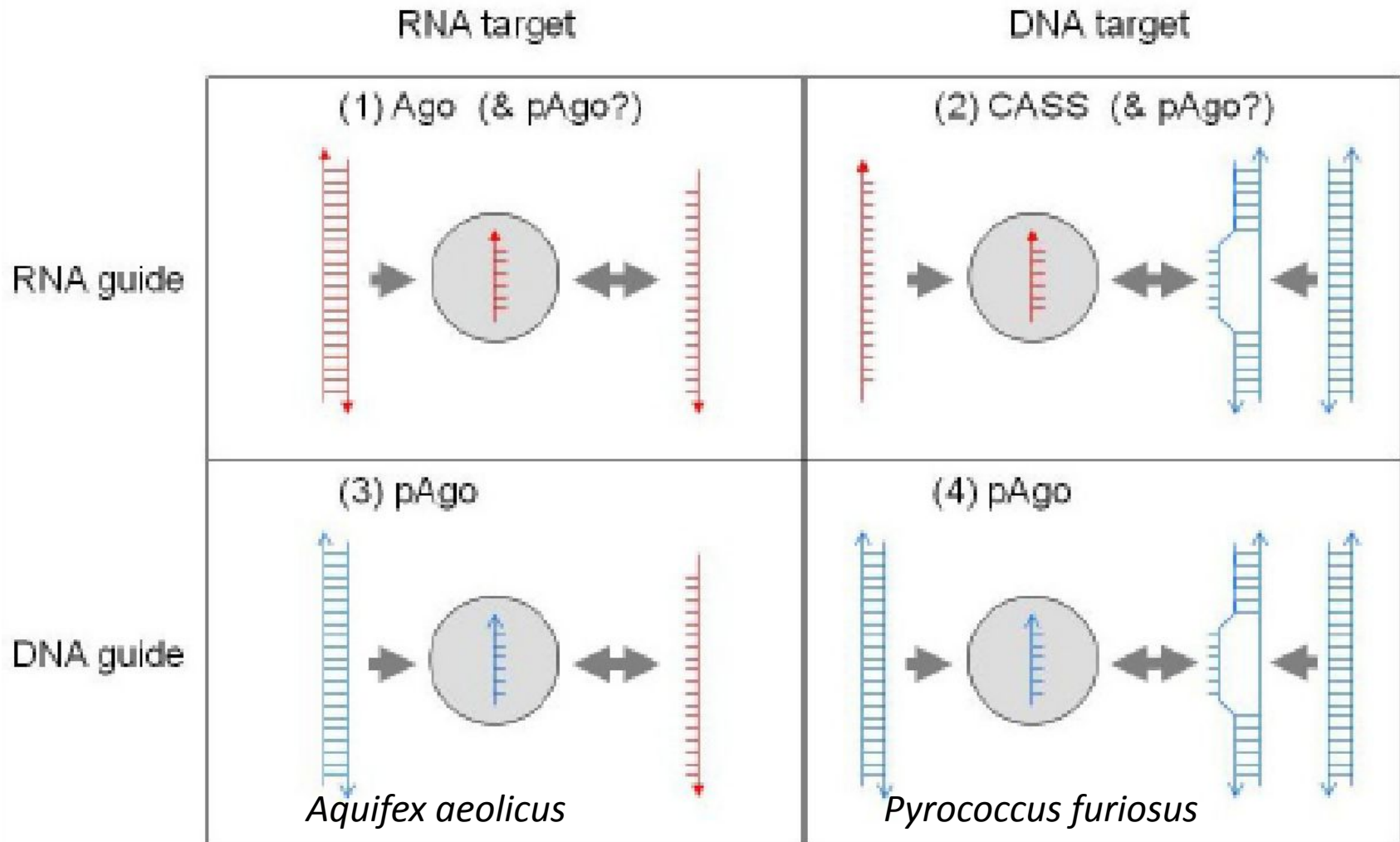
short interfering RNA (siRNA)  
– короткие РНК 20-25 нт.

в комплексе с короткими РНК  
входят белки Argonaute (AGO)





# Гидом для pAgo является однонитевая ДНК, мишенью – иногда РНК, иногда ДНК



А вот у *Rhodobacter sphaeroides* pAgo есть, но вообще не

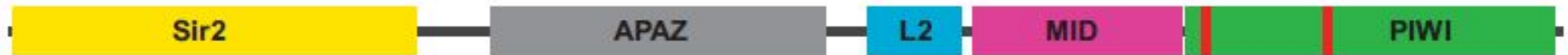
# Домены в составе pAgo



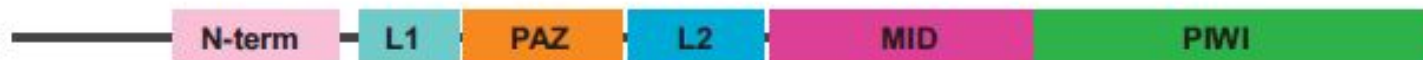
GI: 15606619, *Aquifex aeolicus* VF5, **pdb:1YVU**



GI: 11498916, *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304, **pdb:1W9H**



GI: 91783256, *Burkholderia xenovorans* LB400



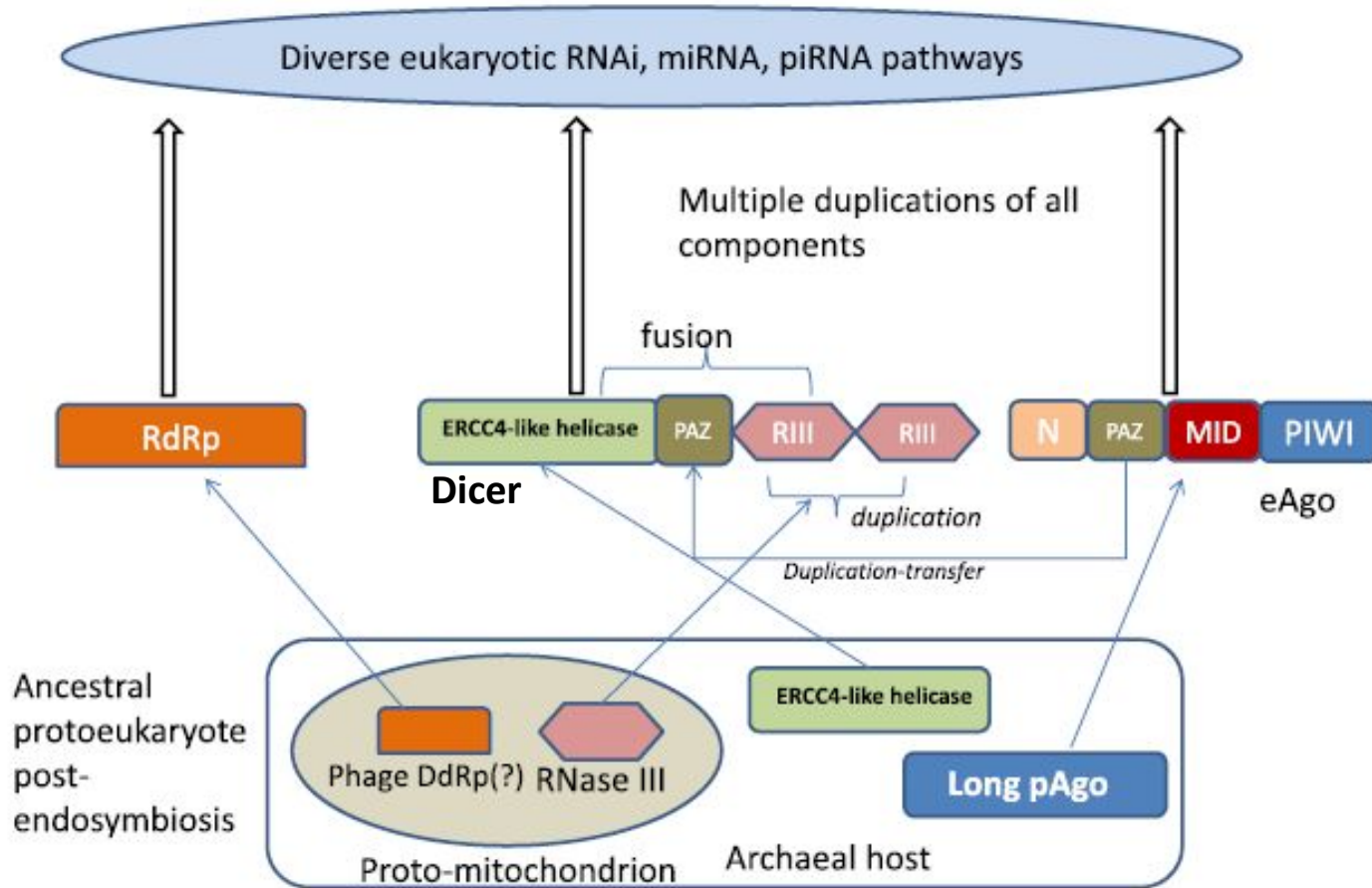
GI: 17136736, *piwi*, *Drosophila melanogaster*

## Figure 1

**Domain architecture variation in homologs of Argonaute from prokaryotes (pAgos) and eukaryotes (Ago).** Structural domains (N-term, L1, PAZ, L2, Mid, PIWI) are projected from the tertiary structure of AaAgo (pdb: [1YVU](#)[35]). Red bars show the inactivated catalytic sites of PIWI domain. Sir2, predicted Sir2 family nuclease domain. APAZ, a domain identified in this work that is associated with pAgos. The domains are shown roughly to scale.

pAgo есть у 30% архей и 10% эубактерий,

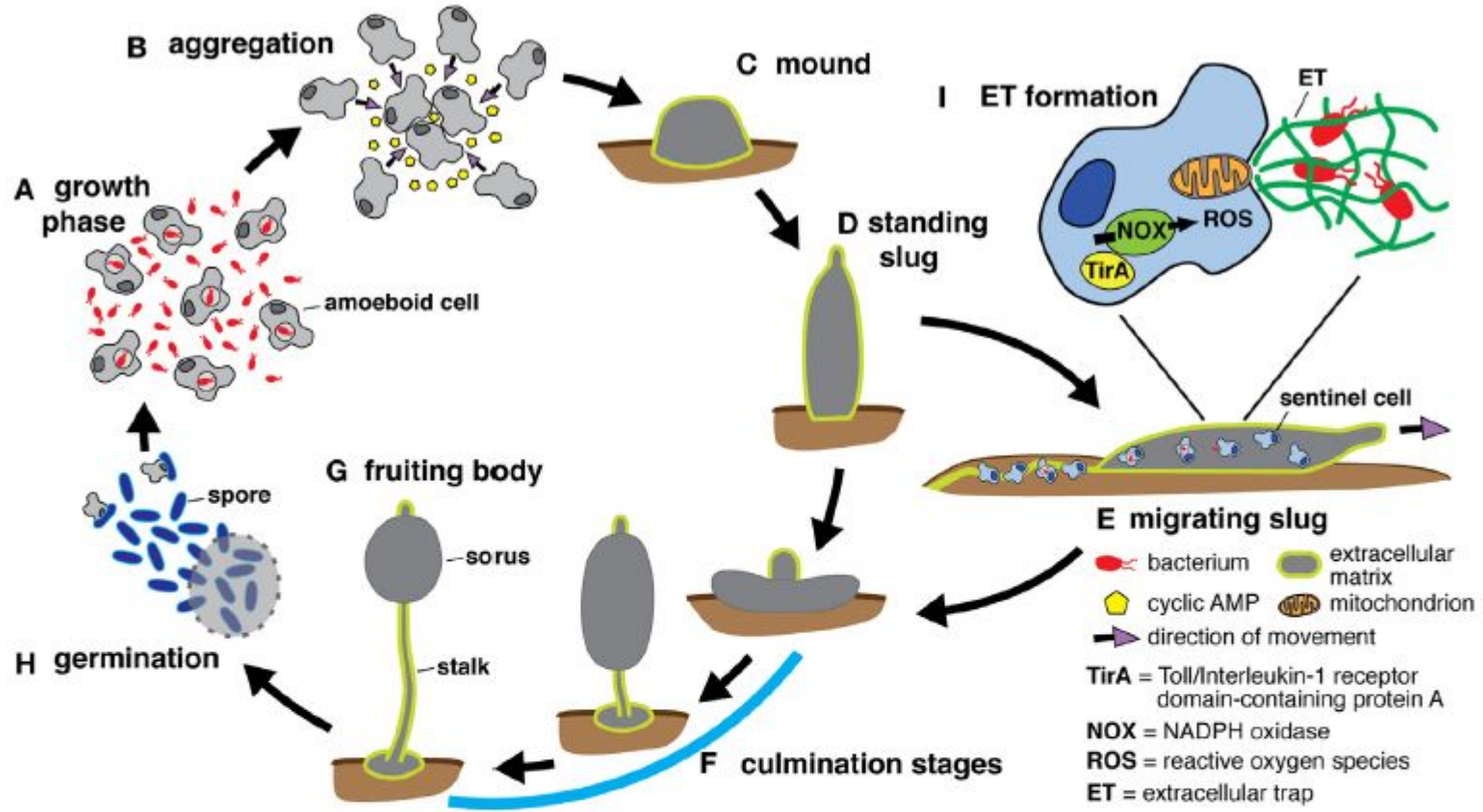
# РНК-интерференция возникла за счёт объединения эубактериальных и архейных компонентов



**Fig. 1** The evolutionary history of eukaryotic RNAi: assembly from diverse archaeal and bacterial ancestors. The “bacterial” and “archaeal” components of the RNAi protein machinery are assumed to have evolved from the proto-mitochondrial endosymbiont and its archaeal host, respectively. This scenario rests on the fact that RNase III is a protein that is nearly ubiquitous in bacteria but rare in archaea, and the (DNA-dependent) RNA polymerase that is thought to be the ancestor of the RNAi RdRp so far has been identified only in bacteriophages (not in archaeal viruses). However, it cannot be ruled out that these genes have been acquired by the mesophilic archaeal ancestor of eukaryotes (presumably, a member of the Lokiarchaeota) prior to endosymbiosis. RIII, RNase III



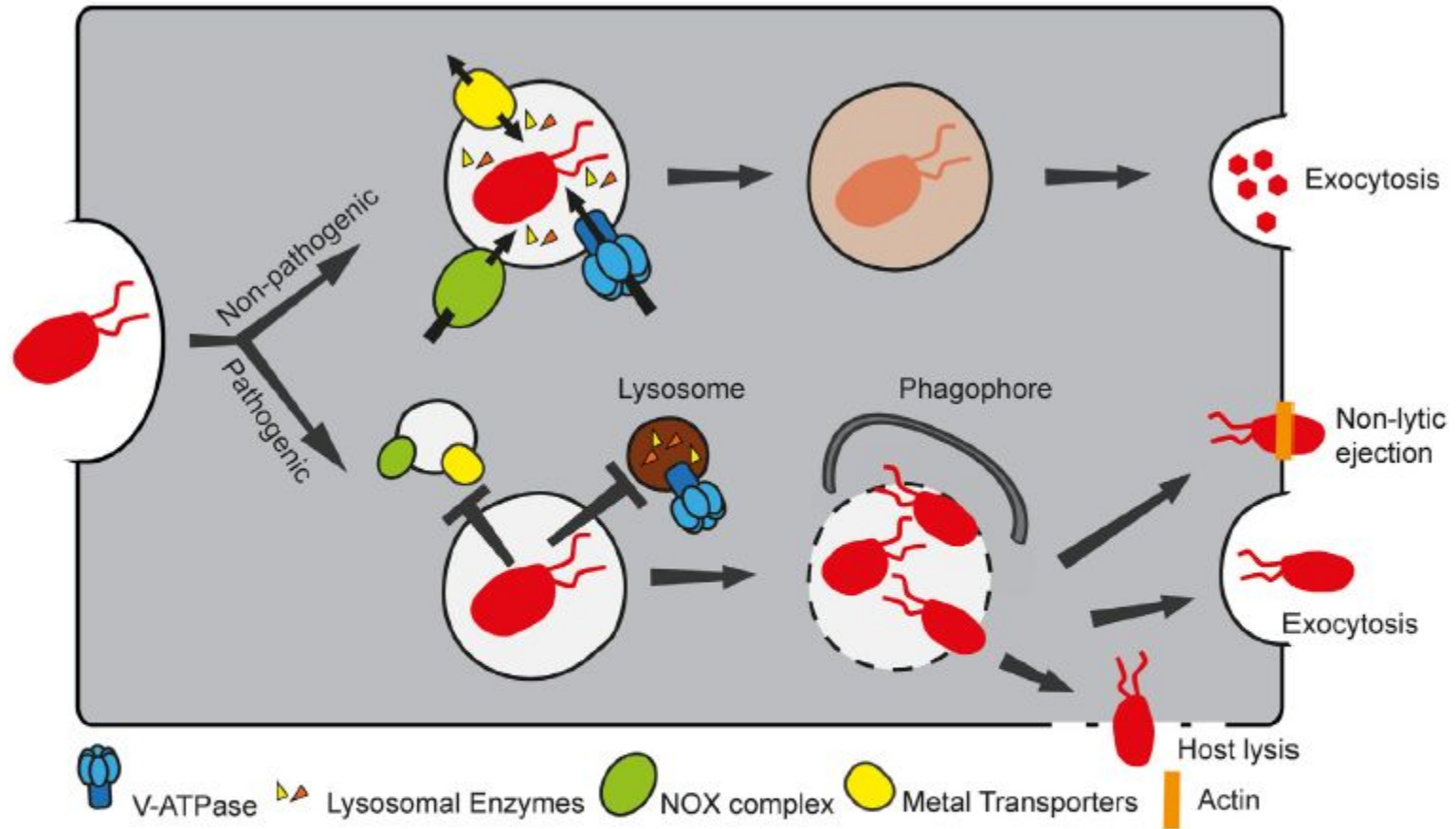
# Жизненный цикл амебозойного протиста *Dictyostelium*



**FIGURE 1** | The *Dictyostelium discoideum* life cycle includes multicellular stages. **(A)** During the growth phase of development, amoeboid cells feed on bacteria and replicate by binary fission. The development cycle is initiated upon resource depletion, and aggregation occurs when starving cells secrete cyclic AMP to recruit additional cells **(B)**. The aggregating cells organize to form the mound stage enclosed within an extracellular matrix composed of cellulose and mucopolysaccharide (26) **(C)** and continue to develop into the standing slug **(D)**. Depending on its environment, the standing slug either falls over to become a migrating slug that moves toward heat and light **(E)** or proceeds directly to the culmination stages **(F)** that ultimately produce the fruiting body, which consists of a spore-containing structure, the sorus, held aloft by a stalk of dead cells **(G)**. Spores are released from the sorus and germinate into growing cells **(H)**. Under optimal conditions, the developmental cycle takes around 24 h. If the slug forms underground, it migrates toward the surface to maximize spore dissemination. To protect itself from infection during migration, the slug possesses a rudimentary immune system comprising phagocytic sentinel cells. These cells move throughout the slug, take up bacteria and toxins, and are shed along with extracellular matrix as the slug moves **(E)**. In response to bacteria, sentinel cells release extracellular traps, derived from mitochondrial DNA, via an unknown mechanism involving NADPH oxidase (NOX)-generated reactive oxygen species (ROS) and TirA, a soluble protein containing a toll/interleukin 1 receptor domain **(I)**.

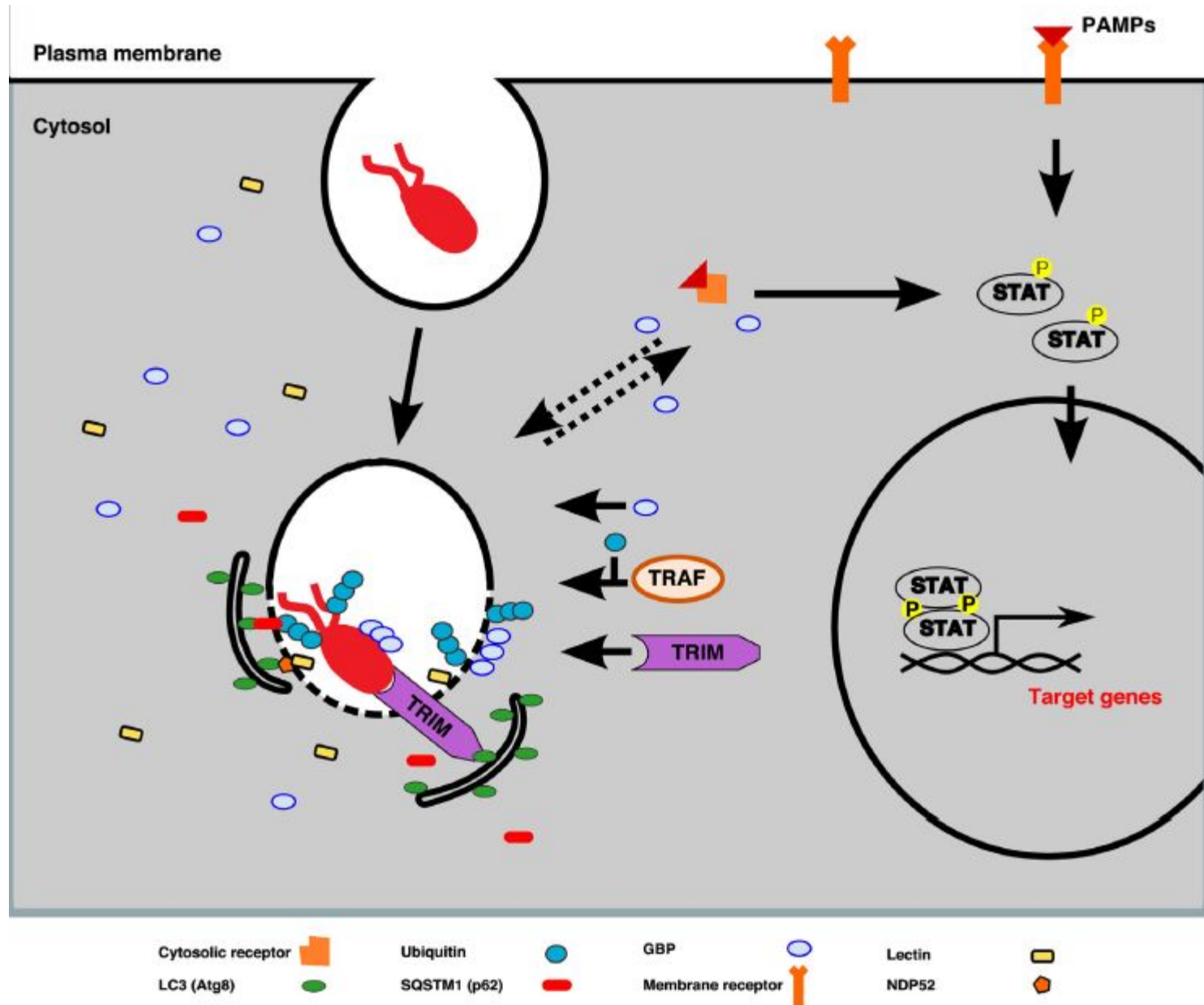


# Не все бактерии одинаково полезны (и питательны)



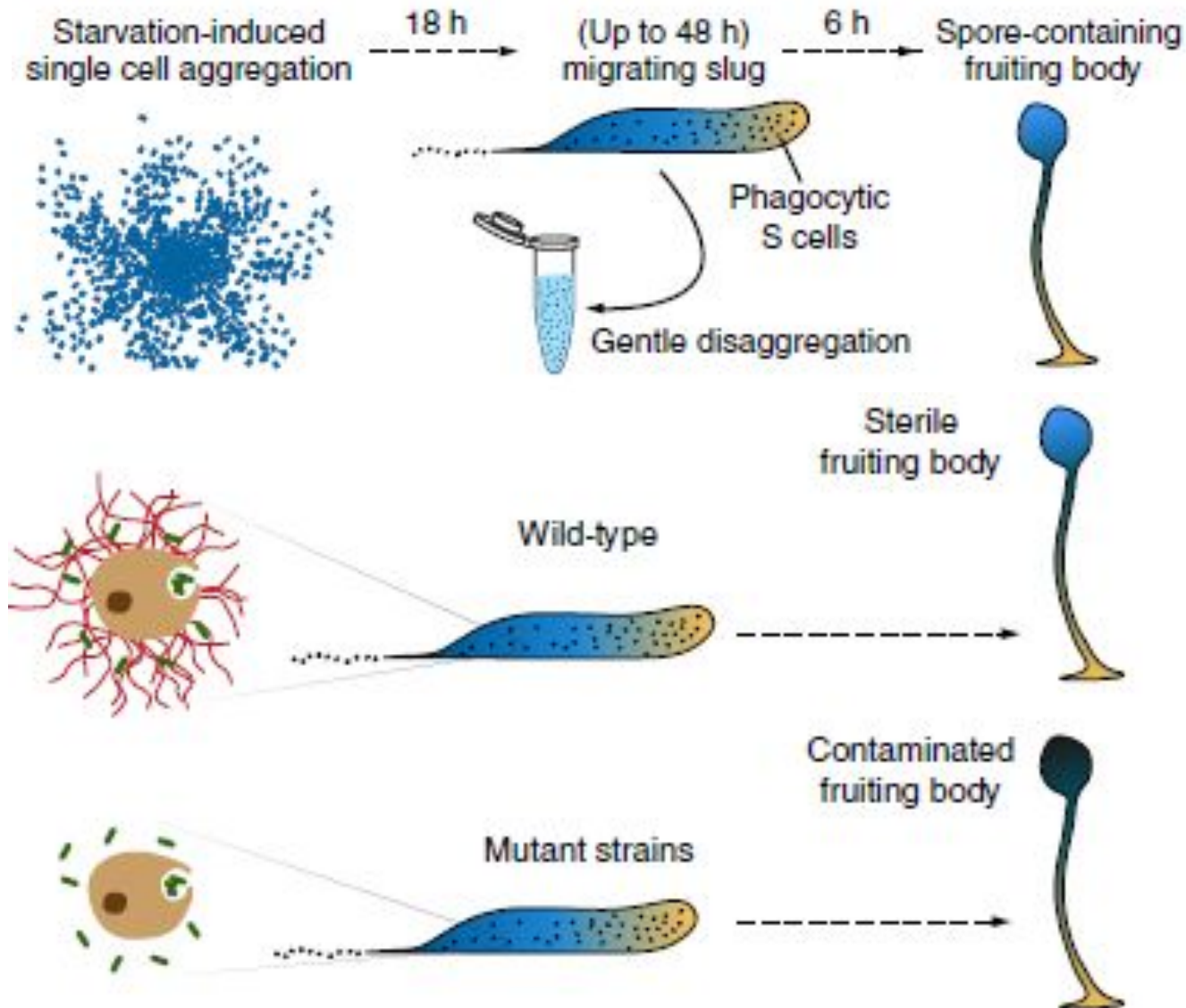
**FIGURE 2** | Non-pathogenic and pathogenic bacteria follow different fates in *Dictyostelium discoideum*. *D. discoideum* takes up bacteria by phagocytosis. Non-pathogenic food bacteria follow the normal phagosomal maturation pathway, whereby the phagosome acquires several components, including the vacuolar ATPase (V-ATPase), lysosomal enzymes, the NADPH oxidase (NOX) complex, and several metal transporters to create a microbicidal compartment that digests and kills bacteria. Intracellular pathogens, however, are able to manipulate the maturation program, by preventing the phagosome from becoming bactericidal, thus ensuring proliferation in a "friendly" compartment. In addition, certain pathogens can eventually escape the compartment. In this case, they can either be recaptured by autophagy, or exit the host cell by exocytosis, or by lytic or non-lytic processes.

# Механизмы передачи сигнала у слизевика

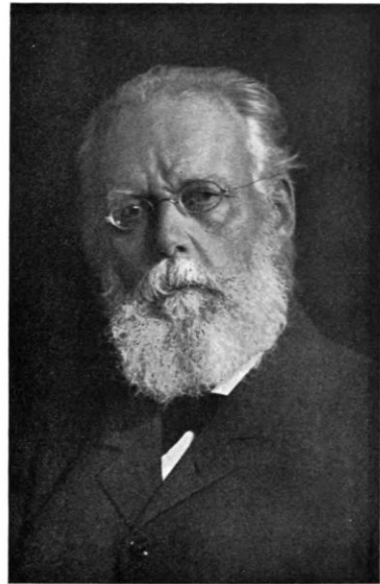




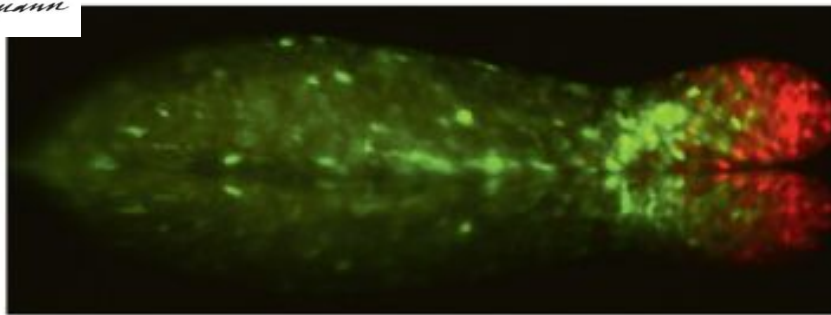
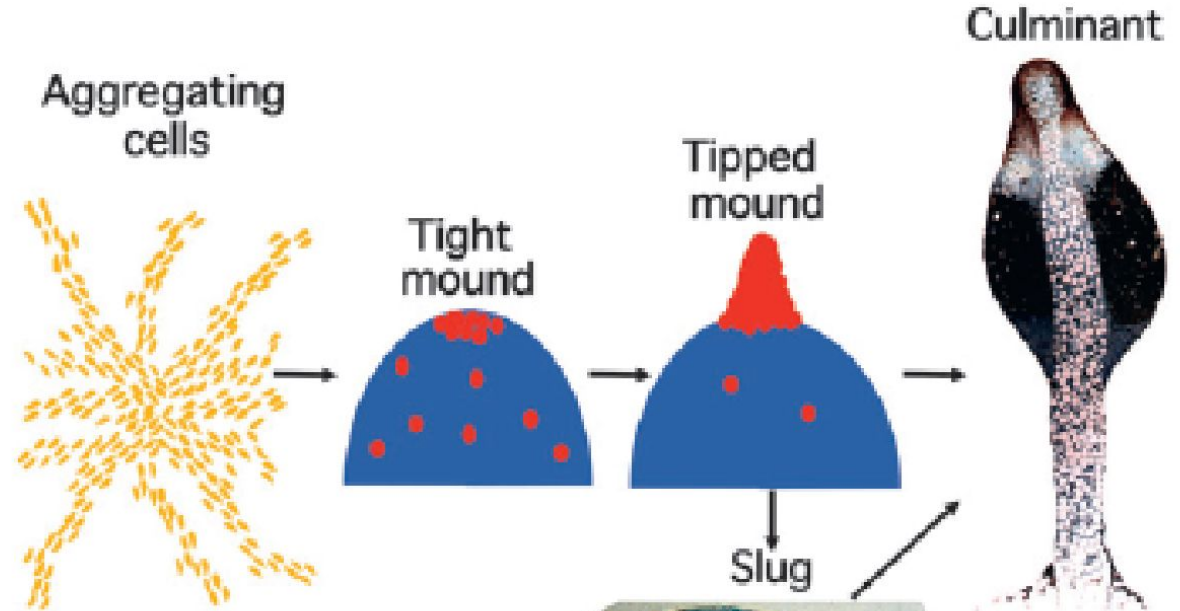
# S-клетки (sentinel cells) отвечают за фагоцитоз бактерий в плодовом теле



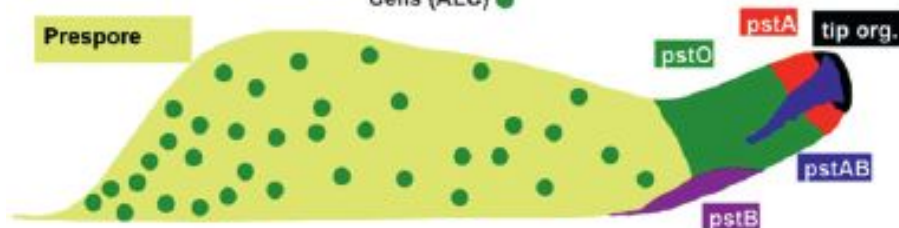
# Наличие «барьера Вейсмана» создает эволюционные предпосылки для его нарушения



*August Weismann*

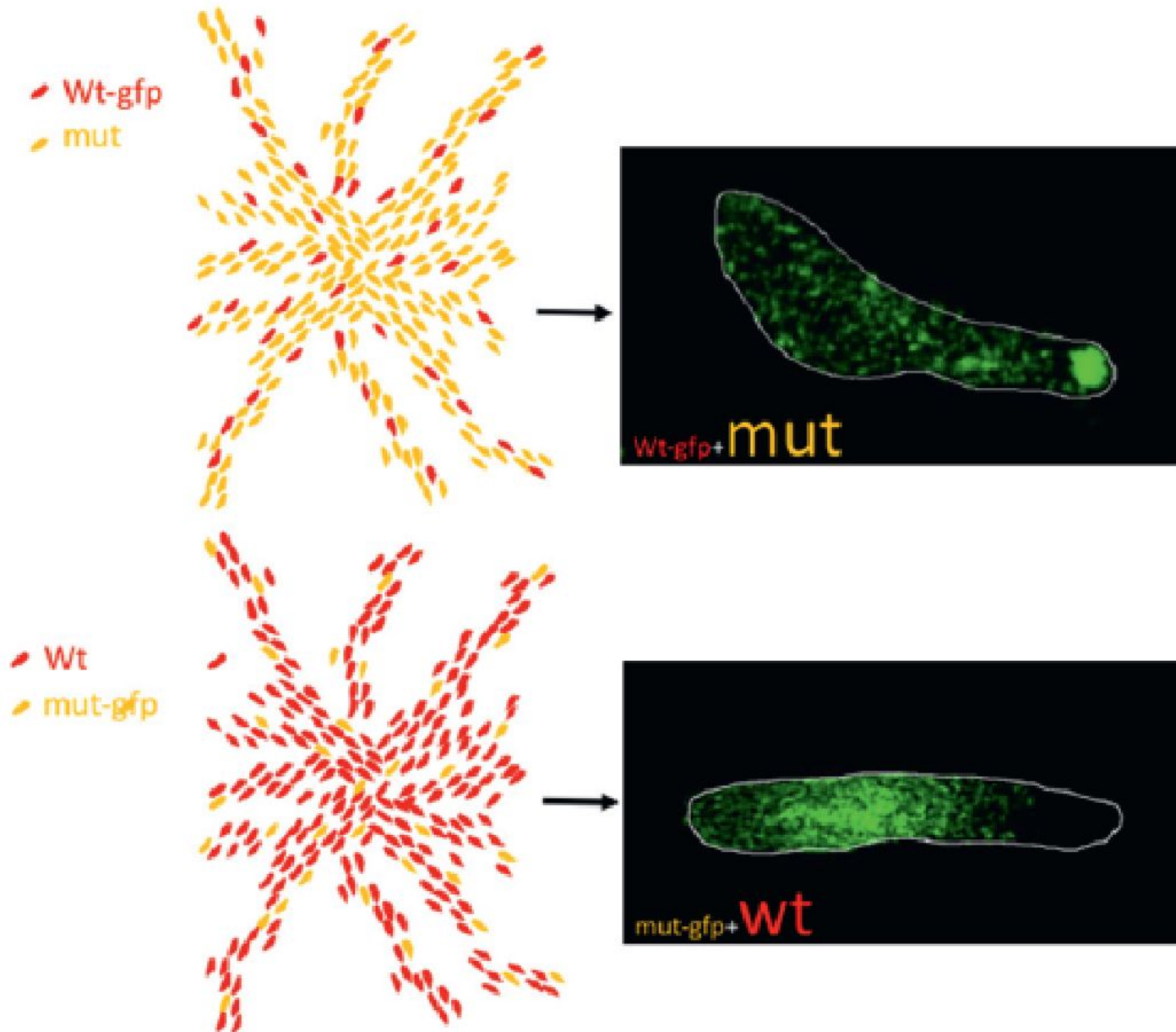


Anterior Like Cells (ALC) ●



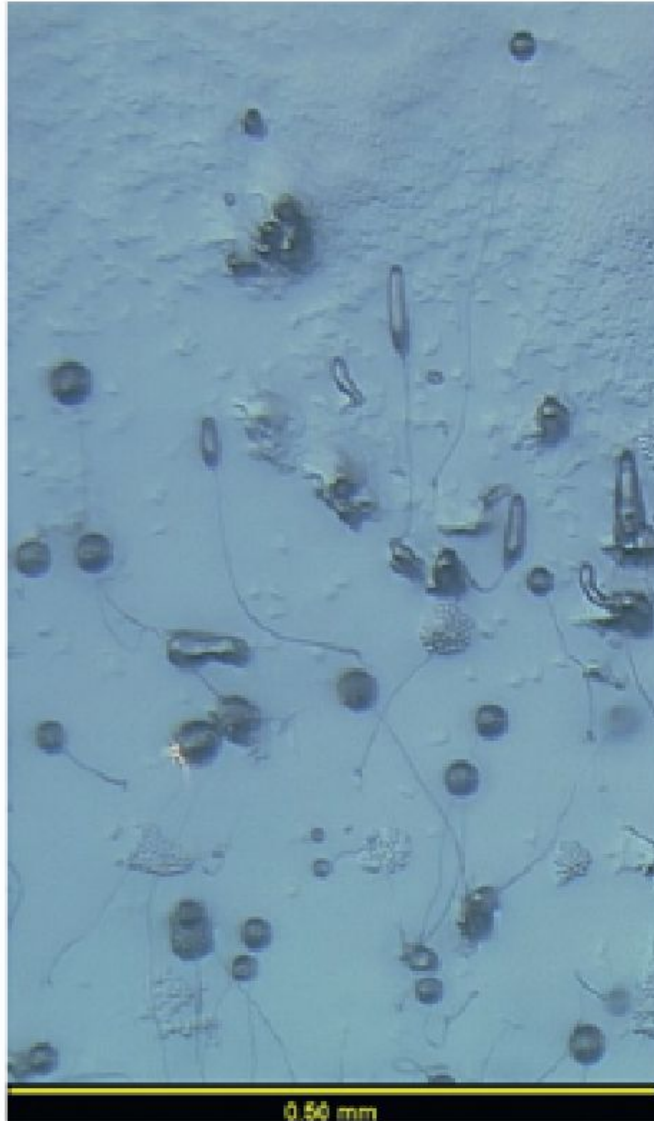


# Амебы – обманщики в химерных колониях не хотят образовывать ножку, и избегают ее



# Плодовые тела диктиостелиума сильно структурированы и видоспецифичны, межвидовая агрегация отсутствует

*A. subglobosum*



*P. Pallidum*

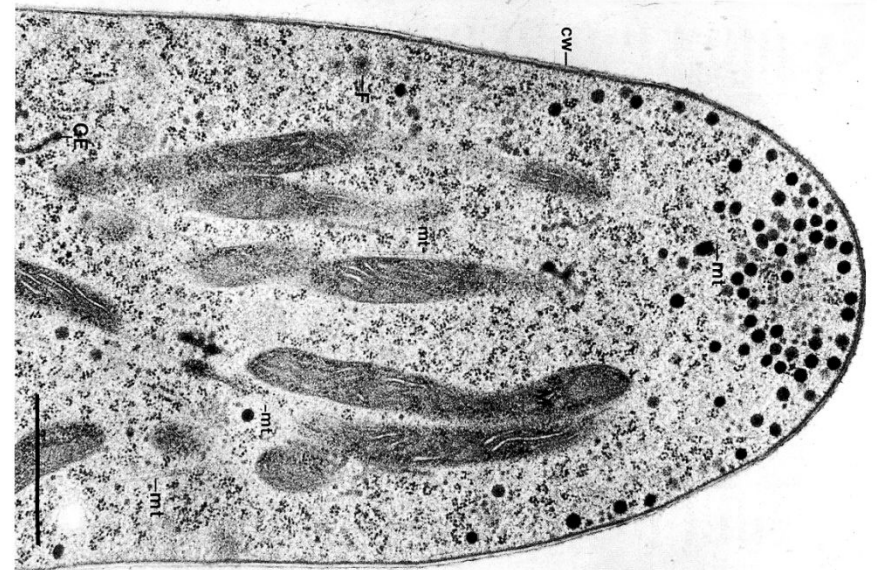
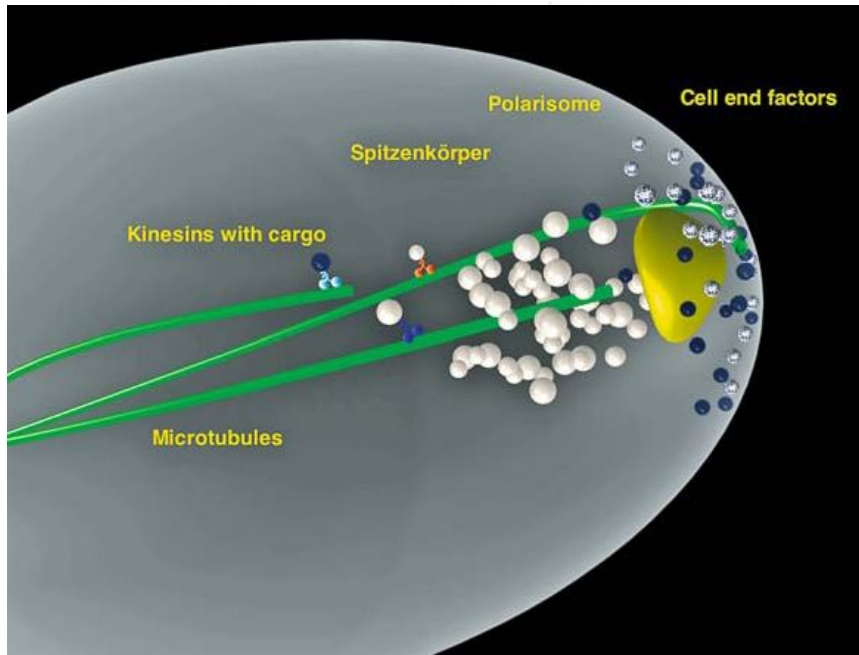
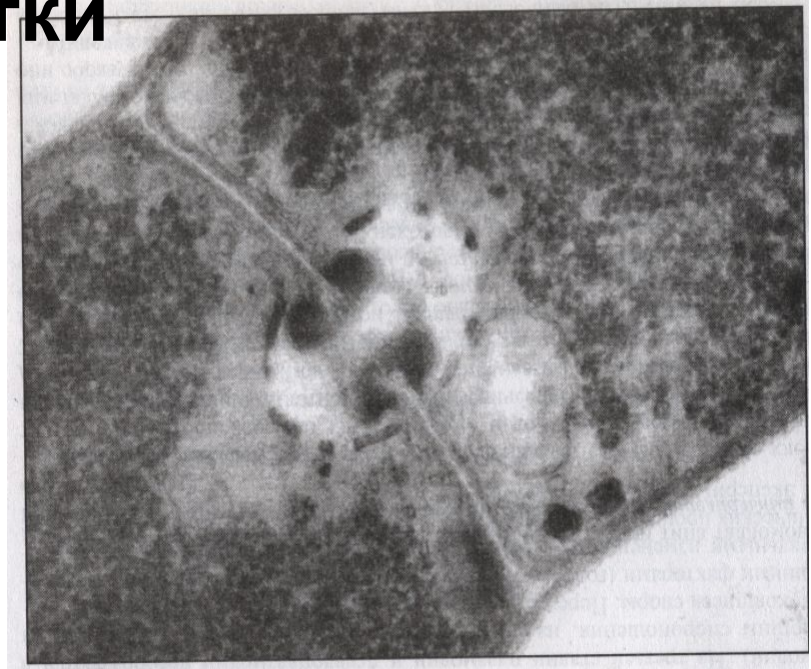
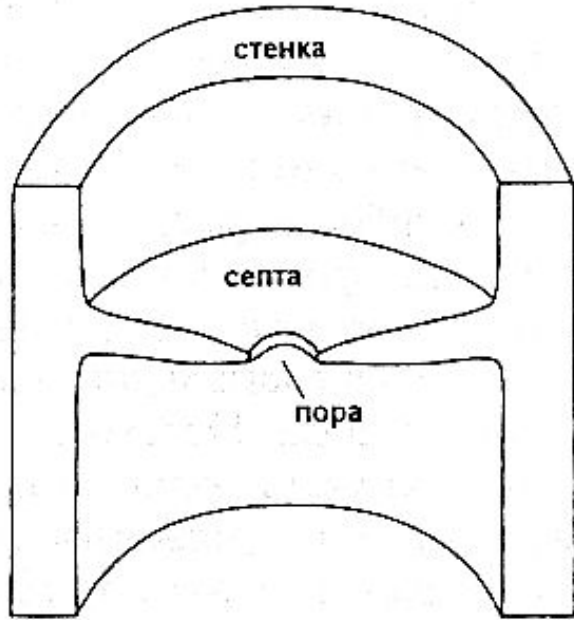


*D. discoideum*

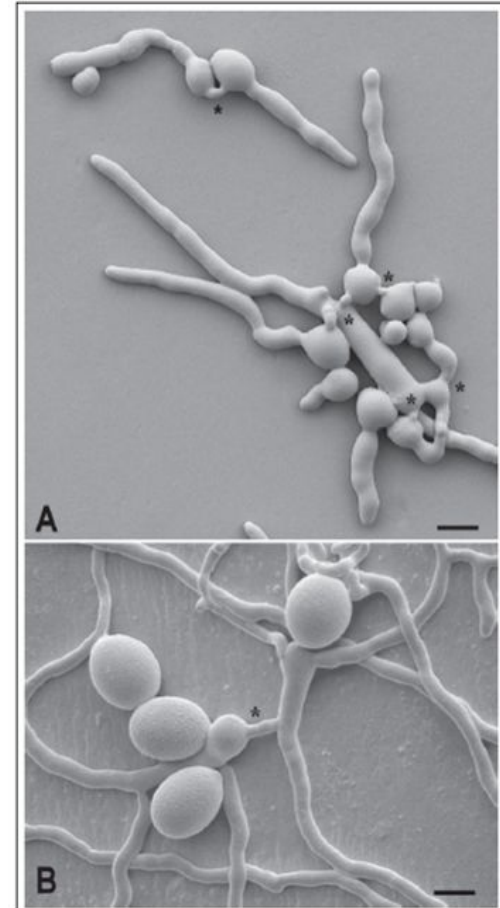
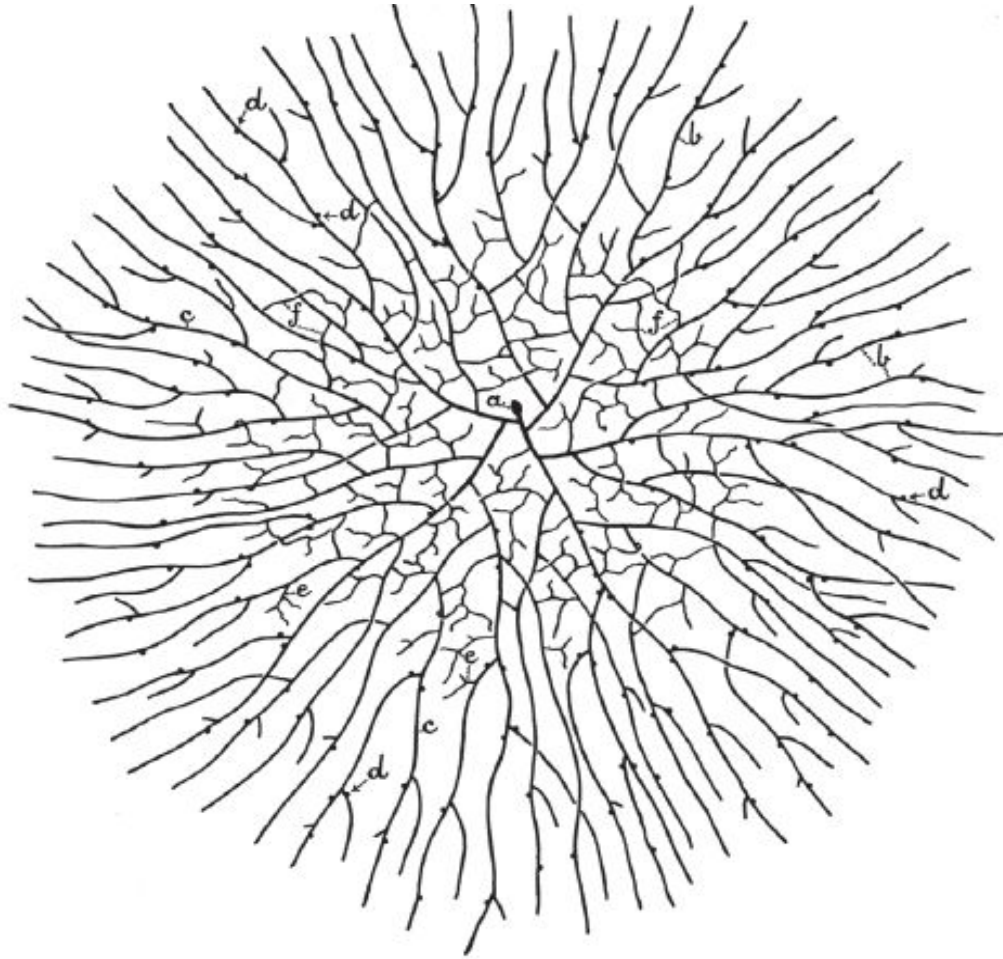




# Задача гифы – обеспечить рост апикальной клетки



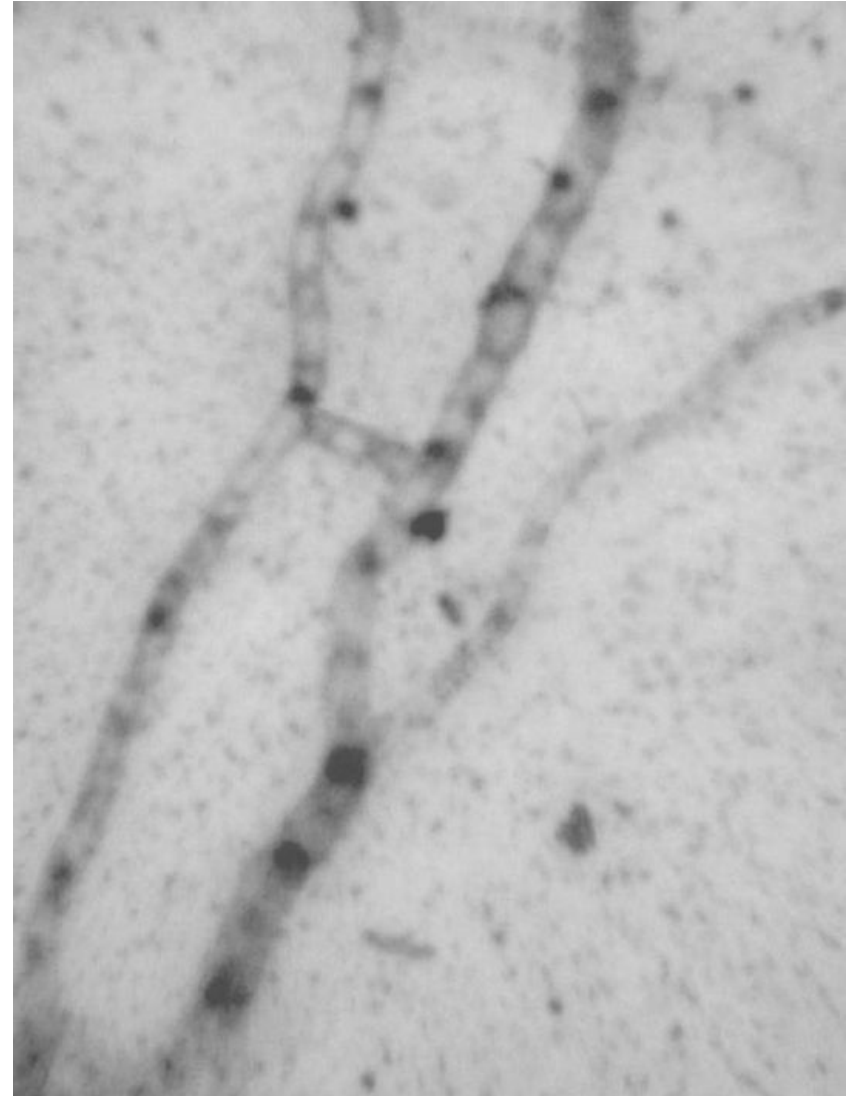
**Мицелиальные грибы – поскольку в мицелии делятся только апикальные клетки, но возможны анастомозы между гифами – тоже имеют барьер Вейсмана**



**Анастомозы, происходящие между соседними гифами внутри колонии, армируют ее делают более прочной, сохраняют ее единство при распространении в пространстве**

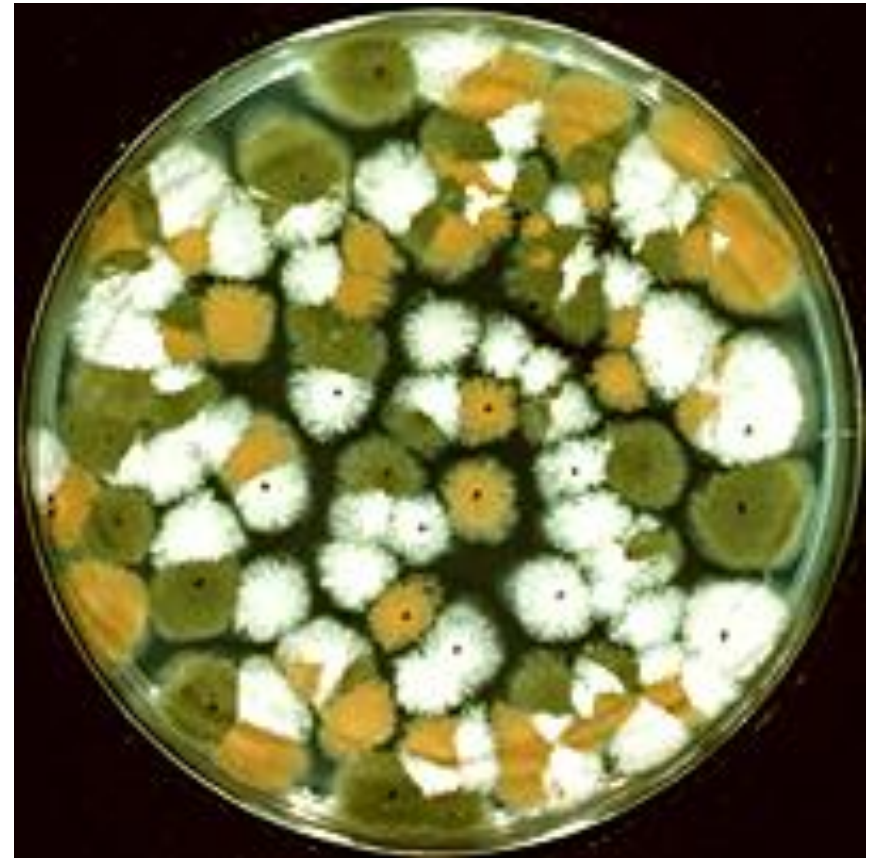
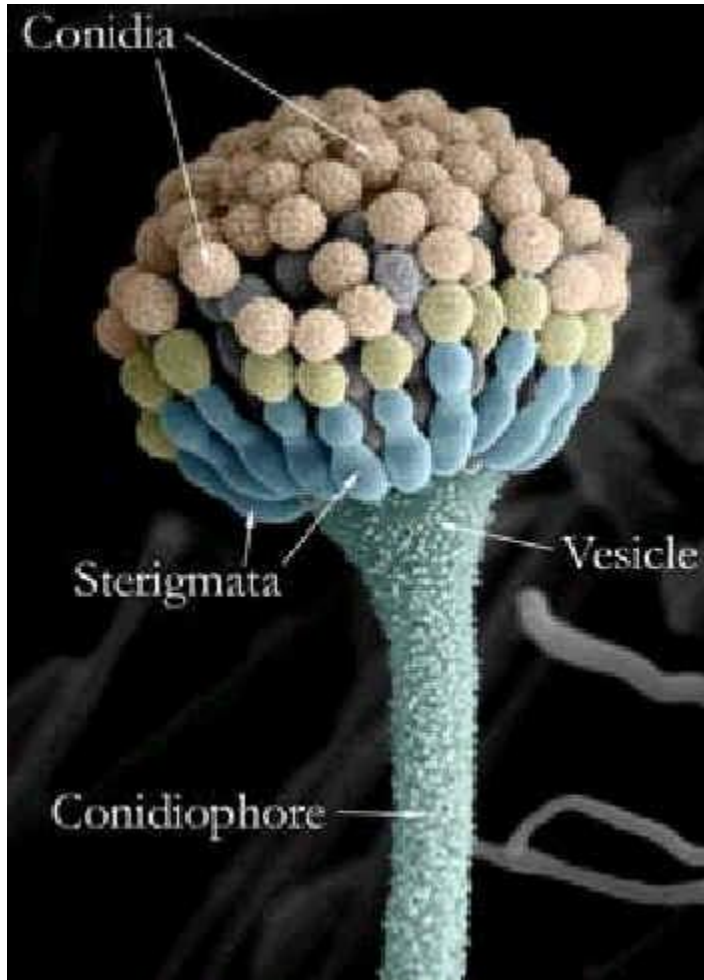
# Гетерокариоз не тождественен диплоидности

При слиянии гиф двух или более контактирующих колоний происходит объединение в одной клетке нескольких генетически различных ядер, что обеспечивает состояние гетерокариоза, который у гаплоидных грибов заменяет диплоидность и является начальной стадией парасексуальной рекомбинации. При этом у большинства грибов число ядер в клетках не фиксировано, поэтому соотношение аллелей может отклоняться от 1:1. Это может приводить к широкой вариации фенотипов, обусловленной

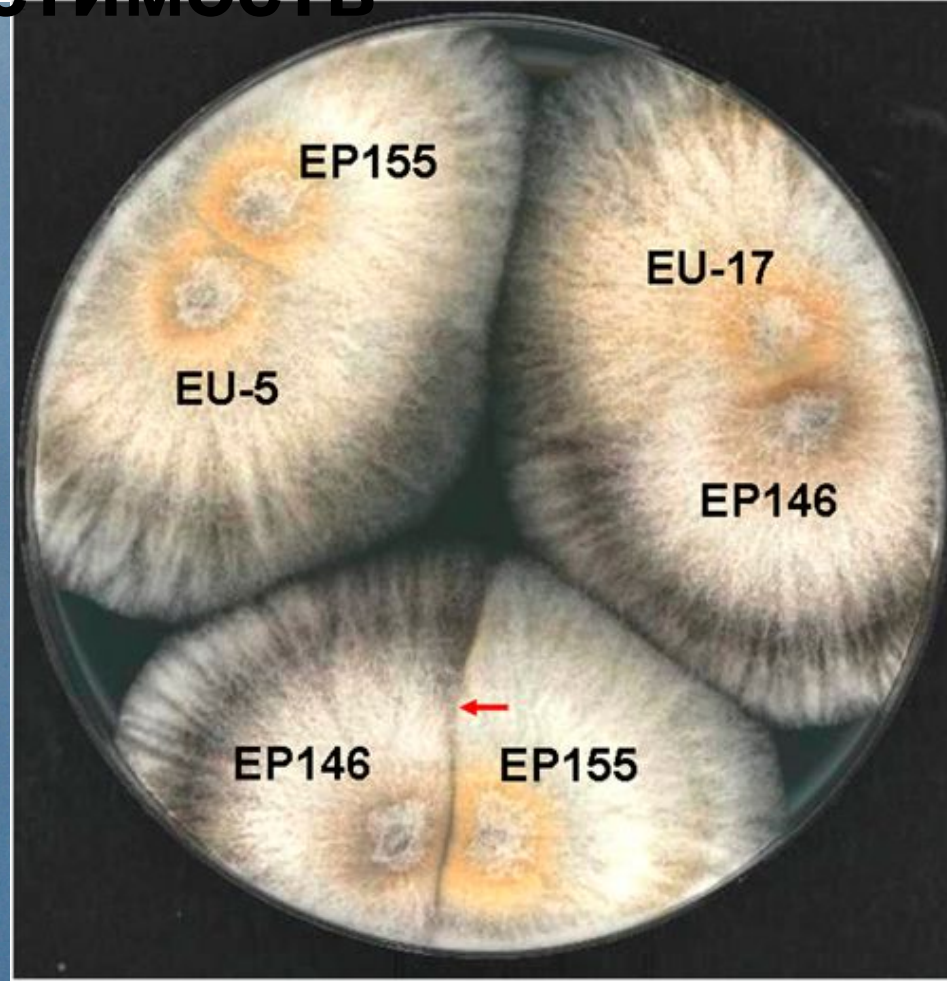
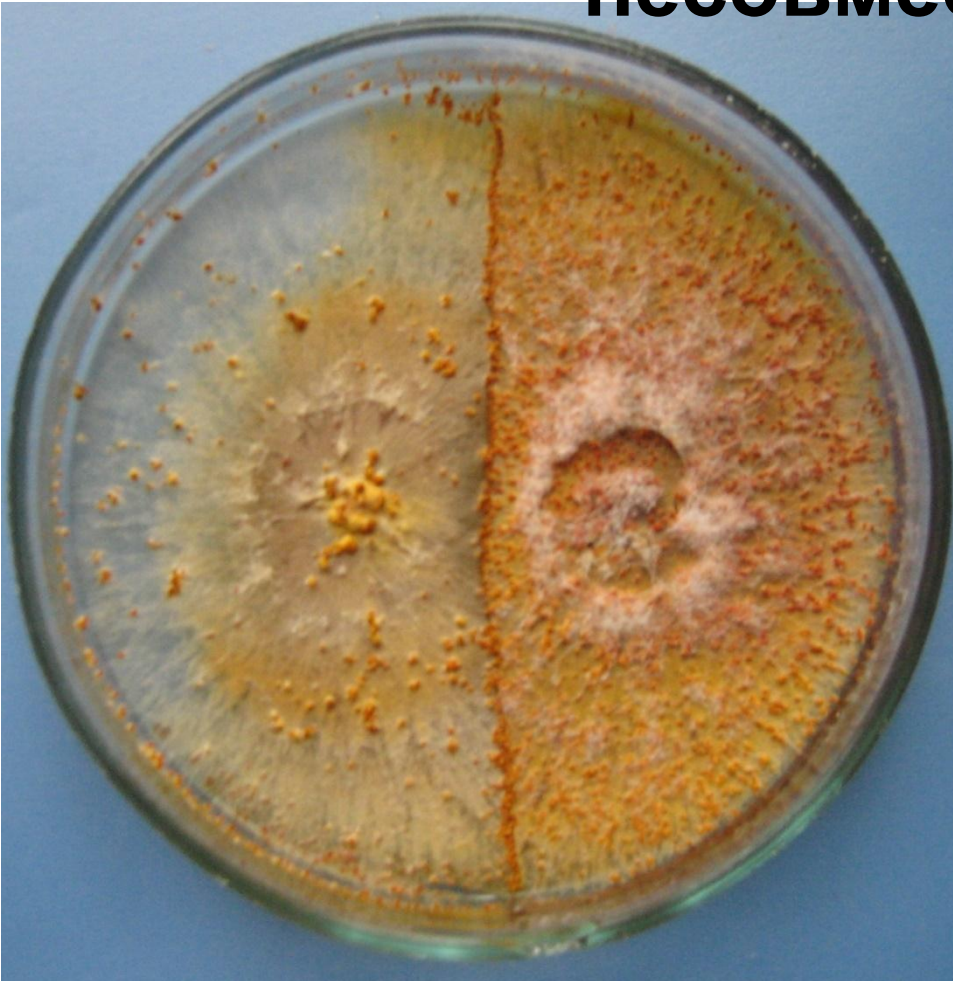




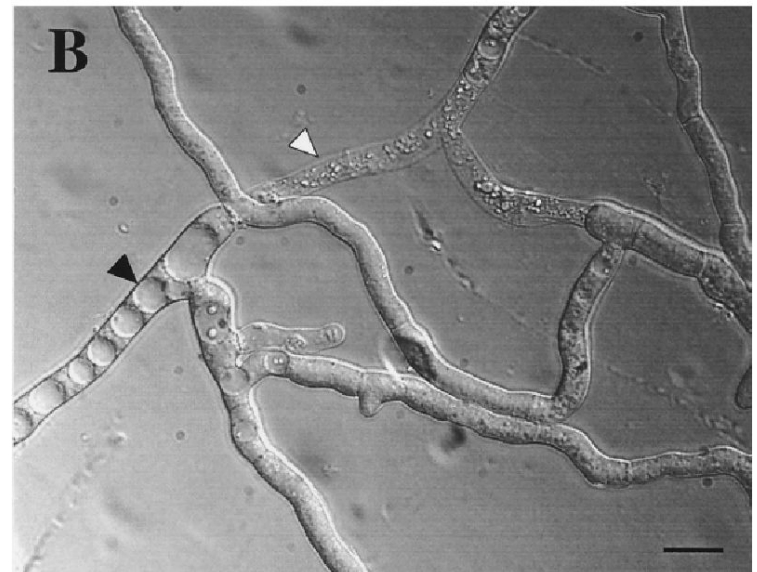
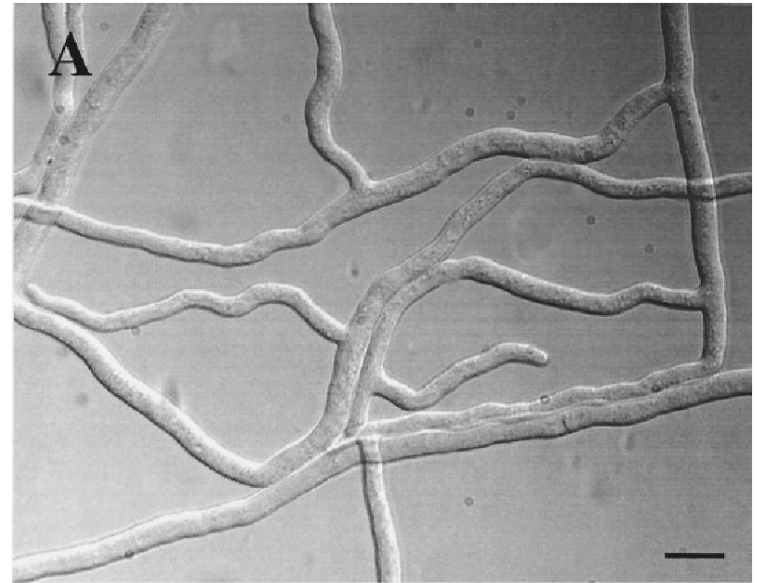
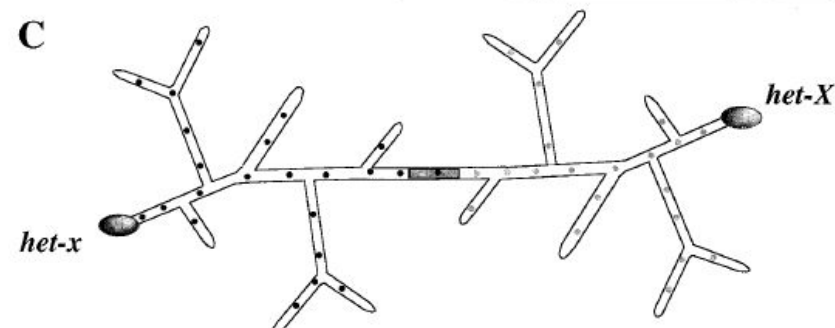
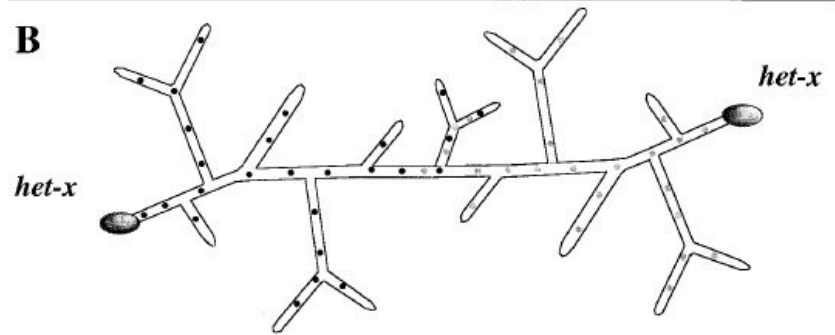
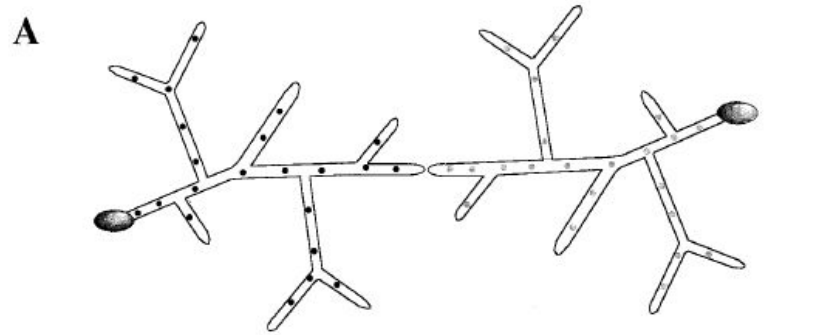
Гетерокариоз – основа парасексуального процесса, т. е. рекомбинации без полового процесса.



# Иногда мицелии принципиально не срастаются – происходит вегетативная несовместимость



# Вегетативная несовместимость грибов





# Барраж – гибель клеток в зоне контакта двух несовместимых мицелиев

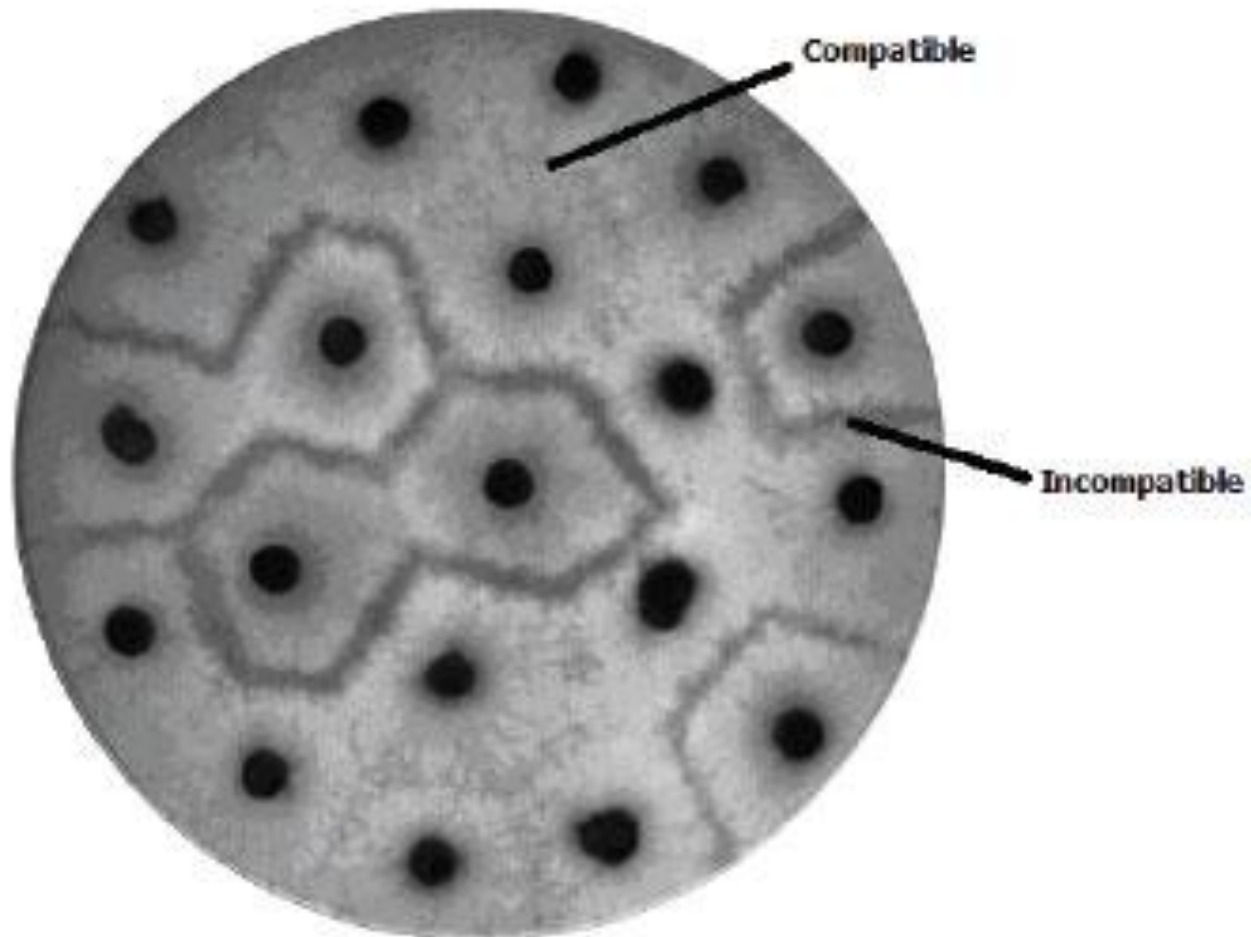
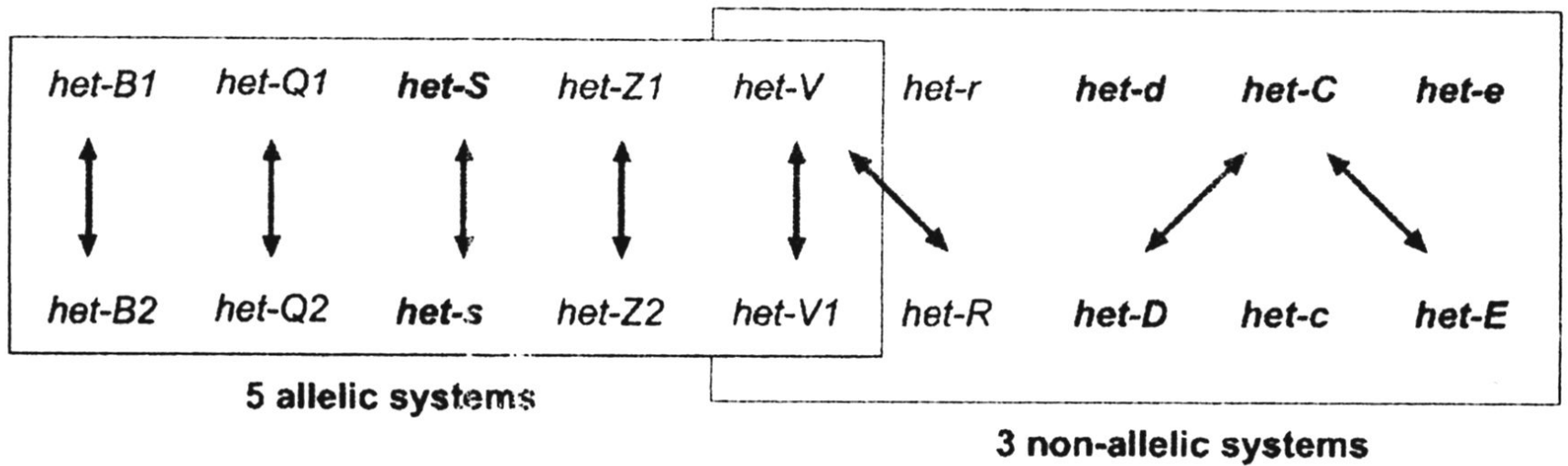


Figure 1. Mycelial compatible and incompatible reactions among *Monosporascus cannonballus* isolates in PDA culture media.



Гетероаллельность по любому из Het генов вызывает острую реакцию гибели слившихся и прилегающих к ним клеток (барраж). Эта система генетического контроля несовместимости наиболее полно исследована у двух аскомицетов – *N. crassa* и *Podospora anserina*. У *N. crassa* несовместимость вызывает, в большинстве случаев, взаимодействие продуктов аллельных генов, а у *P. anserina* наряду с аллельной распространена и неаллельная несовместимость, при которой несовместимы штаммы, имеющие определенные аллели в двух несцепленных локусах. Последняя система усложнена наличием многих аллелей в нескольких *mod*-локусах, подавляющих проявление неаллельной несовместимости. Неаллельные взаимодействия проявляются не только в вегетативной, но и в половой несовместимости: если 2 штамма различаются одной парой неаллельных генов, то перитеции развиваются только с одной стороны вдоль демаркационной линии между колониями, а с другой отсутствуют. При различиях по двум парам генов перитеции не развиваются вовсе. Стерильность обусловлена деструкцией трихогины при ее слиянии с микроконидиями, т.е. сходна по физиологическому механизму с гаметофитной несовместимостью высших растений.

# Вегетативная несовместимость основана на системе нескольких взаимодействующих генов

TABLE 1. Cloned *het* genes of *N. crassa* and *P. anserina*

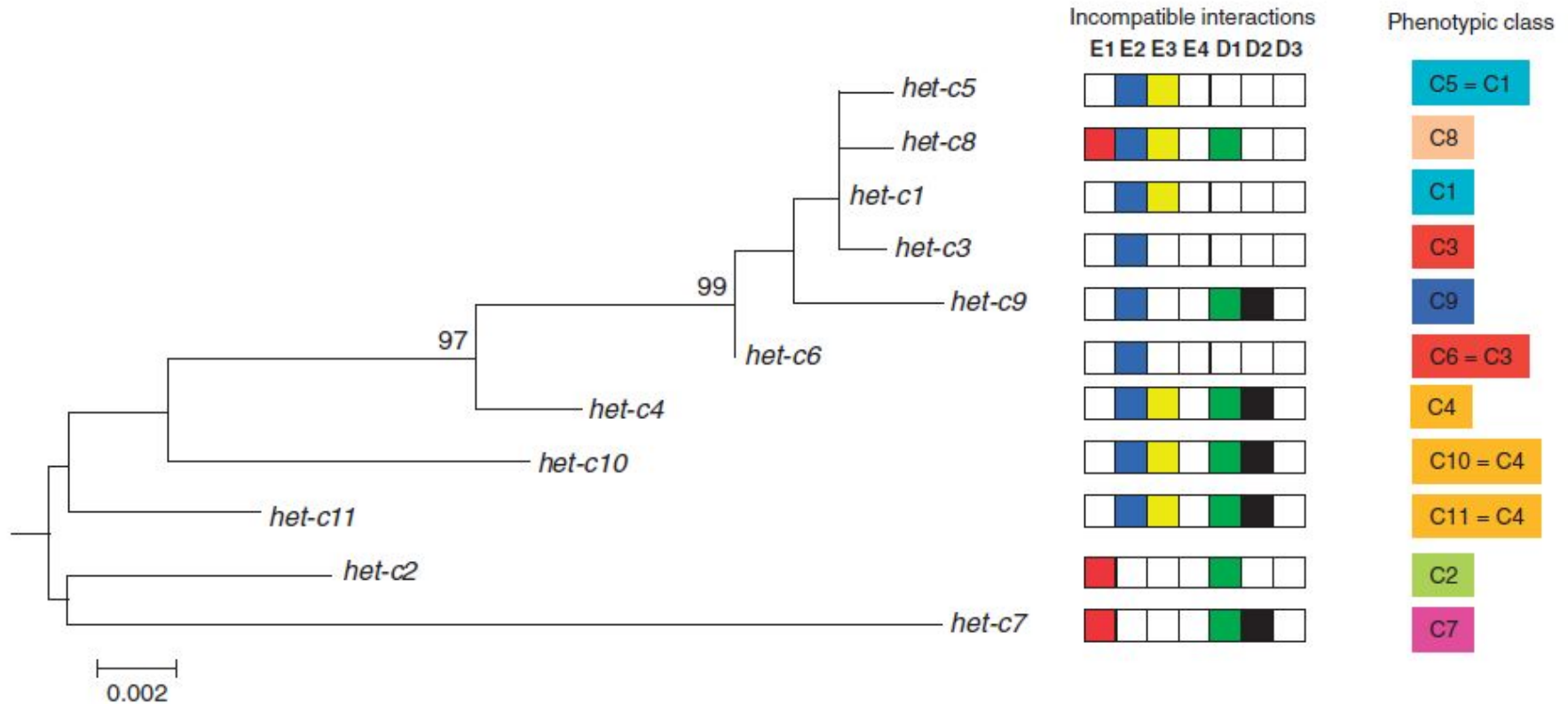
Species and gene	No. of alleles	Size of encoded polypeptide (amino acids)	Protein feature
<i>N. crassa</i>			
<i>mat A-1</i>		293	$\alpha$ -Box
<i>mat a-1</i>		381	HMG box
<i>het-C</i>	3	966	Signal peptide, glycine-rich repeats
<i>het-6</i>	2	680	Similarity to TOL and HET-E
<i>un-24</i>	2	929	Ribonucleotide reductase
<i>P. anserina</i>			
<i>het-s</i>	3	289	Prion protein
<i>het-c</i>	4	208	Similarity to GLTPs
<i>het-e</i>	4	1,056	WD-40 repeats, GTP-binding site

TABLE 2. Suppressors of heterokaryon incompatibility and induced genes

Type	Gene	Connection with incompatibility	Size of encoded polypeptide (amino acids)	Protein features
Suppressors	<i>N. crassa tol</i>	Suppressor of mating type-associated incompatibility	1,011	Leucine-rich repeats
	<i>P. anserina</i>			
	<i>mod-A</i>	Suppressor of nonallelic incompatibility	687	SH3-binding domain
	<i>mod-D</i>	Partial suppressor of <i>het-C het-E</i>	354	G $\alpha$ subunit
	<i>mod-E</i>	Partial suppressor of <i>het-R het-V</i>	701	HSP90
Induced genes	<i>idi-1</i>	Induced by nonallelic incompatibility	201	Signal peptide
	<i>idi-2</i>	Induced in <i>het-R het-V</i>	157	Signal peptide, cysteine rich
	<i>idi-3</i>	Induced by nonallelic incompatibility	196	Signal peptide
	<i>pspA</i>	Induced by nonallelic incompatibility	532	Serine protease

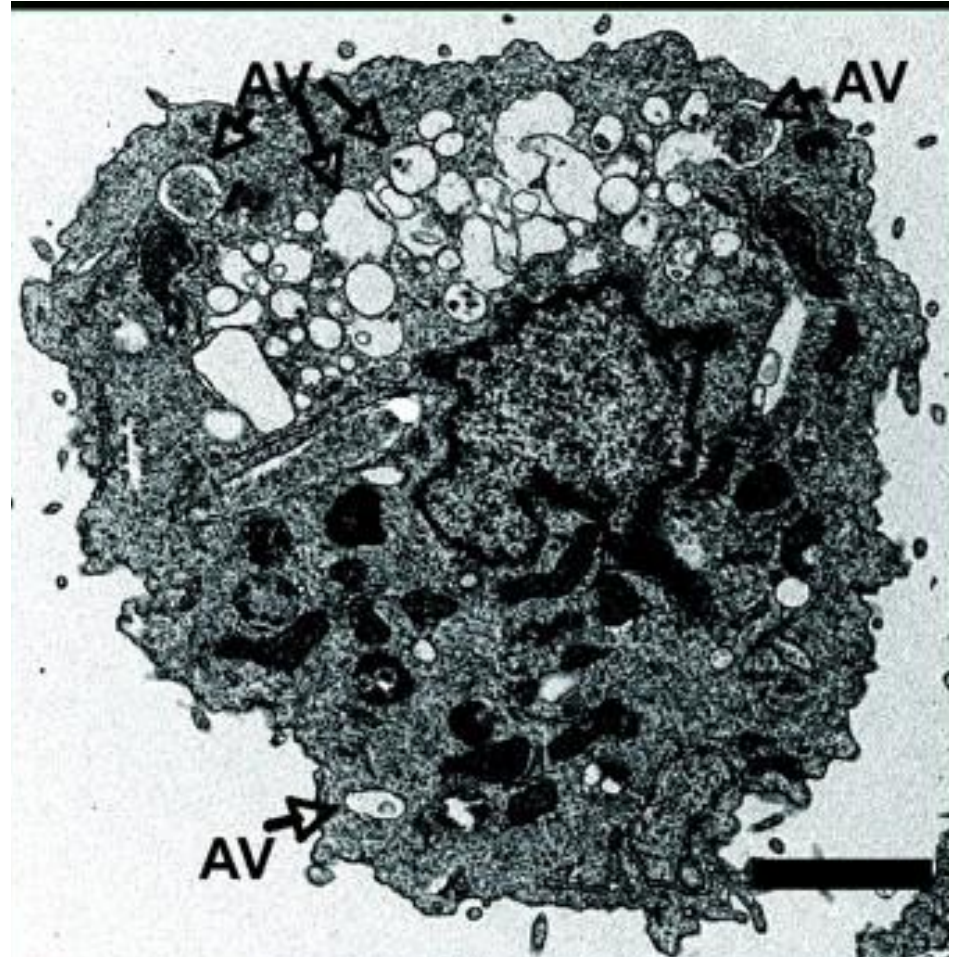
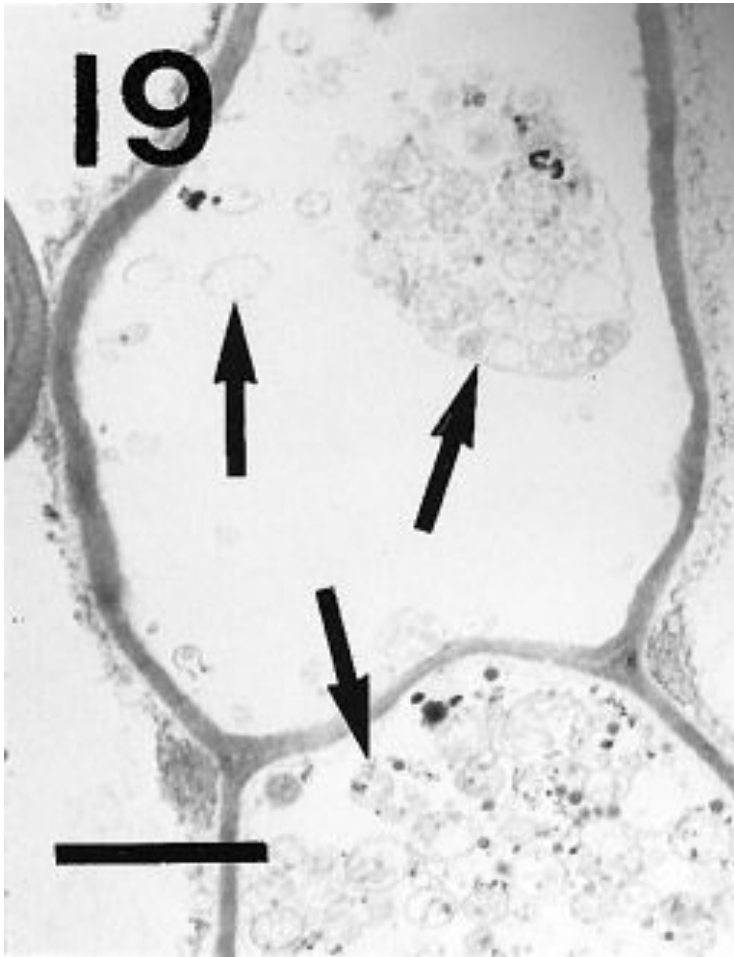


# Аллели одного и того же гена несовместимости дают комплексный характер сочетаемости



**Fig. 1.** Phylogenetic relationship of the eleven *het-c* alleles identified in *Podospora anserina* in a Neighbor-Joining tree. Only bootstrap values above 95 are indicated. Branch lengths are drawn to scale according to evolutionary distances calculated as substitutions per site. In the middle panel, the incompatible interactions of each *het-c* allele with the different *het-d* and *het-e* alleles are indicated by colored boxes, white boxes indicating compatible reactions. The right panel indicates phenotypic classes as a combination of all incompatible reactions in reference to previously characterized *het-c1* to *het-c4* alleles.

# Гибель клеток в зоне барража связана с избыточной аутофагией

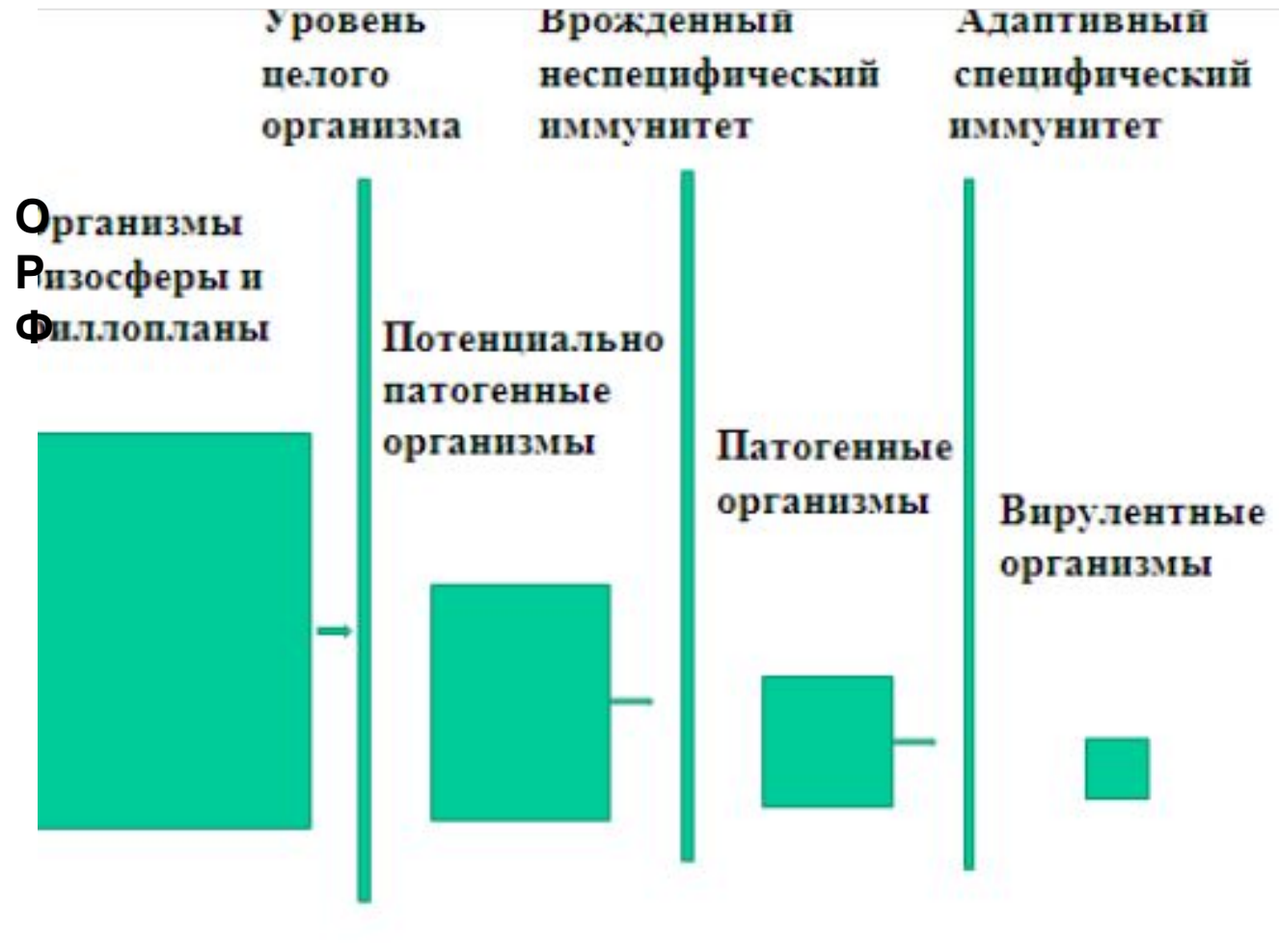


# Преимущества от вегетативной несовместимости грибов

- Защита от эгоистичных паразитов, преодолевающих барьер Вейсмана
- Защита от вирусов, передаваемых при слиянии мицелиев.
- Защита территории и ресурсов от конкурентов с другим генотипом
- Повышение генетического разнообразия популяций
- Генетическая изоляция, приводящая к разделению экологических ниш и видообразованию



# Уровни иммунитета растения



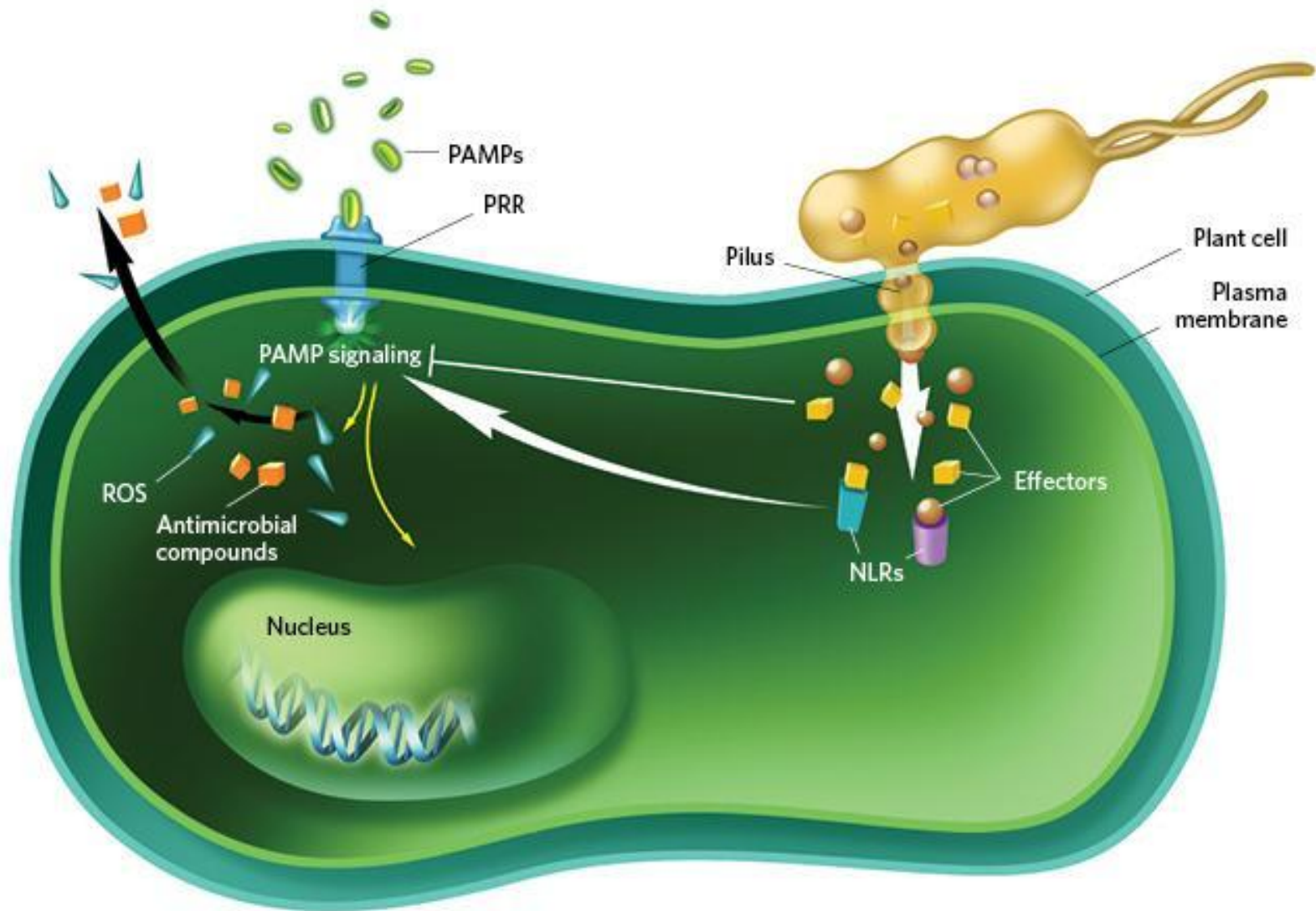
# ИММУНИТЕТ НА УРОВНЕ ЦЕЛОГО ОРГАНИЗМА

## (первая линия обороны)

**Цель** – не допустить патогенных организмов к чувствительным органам, тканям и клеткам

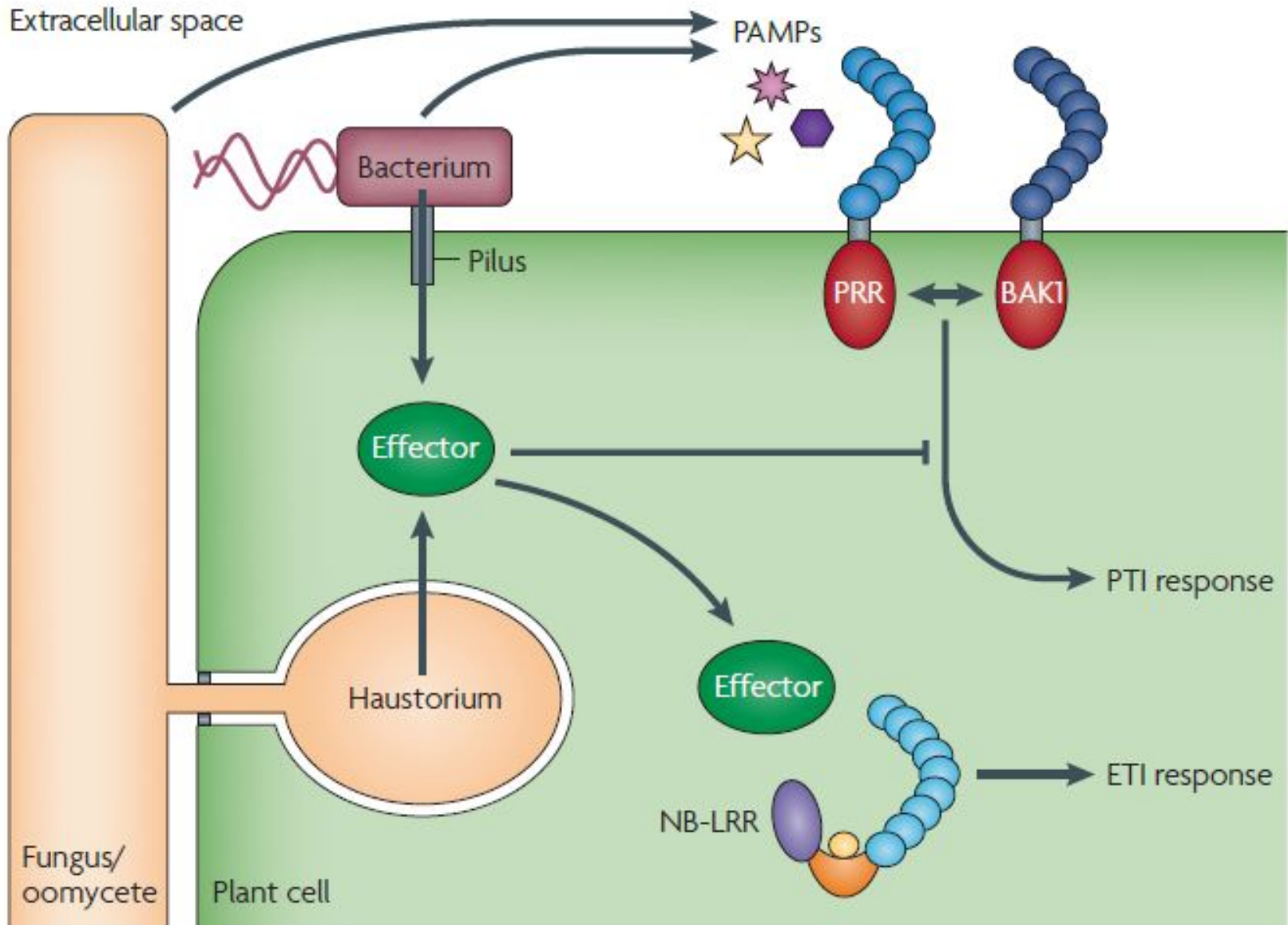
<b>Факторы</b>	<b>Животные</b>	<b>Растения</b>
<b>Физические барьеры</b>	<b>Плотное соединение эпителиальных клеток</b>	<b>Кутикулярный покров, полисахаридные стенки</b>
<b>Химические барьеры</b>	<b>Жирные кислоты (кожа), лизоцим (слюна, слезы), пепсин (кишечник), дефензины (кишечник)</b>	<b>Летучие антимикробные вещества (фитонциды), фенолы, терпены, депонированные в листовых волосках и мертвых клетках покровных тканей</b>
<b>Микробиологические барьеры</b>	<b>Конкурентная микрофлора эпителия, антибиотические вещества</b>	<b>Микроорганизмы филло- и ризопланы, их антибиотики, хитинолитические ферменты и др.</b>

# Фитоиммунитет: распознавание элиситоров





# Фитоиммунитет – распознавание PAMP (PTI) и эффекторных белков (ETI)



# РАМР = неспецифические элиситоры

Соединения	Продуценты
Липополисахариды	Грам (-) бактерии
Пептидогликаны	Грам (-) и Грам (+) бактерии
Флагеллин	Грам (-) бактерии
Фактор элонгации (EF-Tu)	Грам (-) бактерии
Харпин (HrpZ)	Грам (-) бактерии
Белки холодового шока	Грам (-) и Грам (+) бактерии
Некрозо-индуцируемые протеины (NIP)	Бактерии, грибы, оомицеты
Трансглутаминазы	Оомицеты
Лектин, связывающий целлюлозу (CBEL)	Оомицеты
Белки, переносчики липидов (элиситины)	Оомицеты
Ксиланазы	Грибы
Инвертазы	Грибы (дрожжи)
$\beta$ -глюканы	Бурые водоросли, грибы, оомицеты
Сульфатированные фуканы	Бурые водоросли
Хитин	Грибы
Эргостерин	Грибы
Цереброзиды	Грибы
Олигогалактурониды	Растения (пектин)
Целлодекстрины	Растения (целлюлоза)
Мономеры кутина	Растения (кутикула)
Сидерофоры	(бактерии) <i>Pseudomonas fluorescens</i>

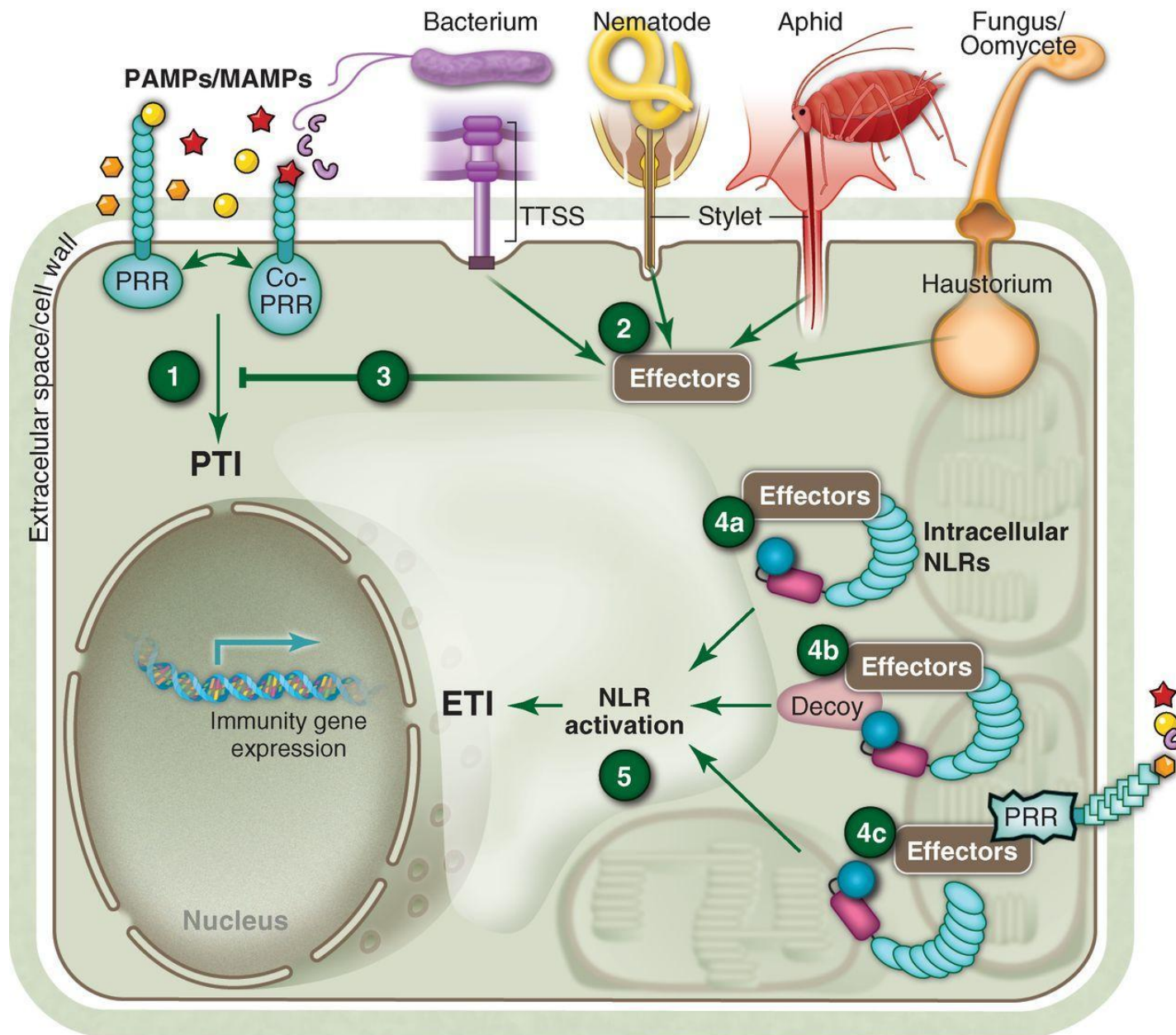
**Иммуномодулирующие полисахариды грибного происхождения**

Полисахарид	Источник выделения	Структура	Молекулярная масса
Аубазпдае	Внеклеточный <i>Aureobasidium pullulans</i>	$\beta$ -1,6-, $\alpha$ -1,4-, $\beta$ -1,3-глюкан (разветвленный)	$5-9 \times 10^6$
Глюкан корпускулярный	Клеточная стенка <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\beta$ -1,3-, $\beta$ -1,6-глюкан (разветвленный)	—
Глюкан растворимый	Клетки <i>S. cerevisiae</i>	$\beta$ -1,3-глюкан	$1 \times 10^4$
Зимозан	Клеточная стенка <i>S. cerevisiae</i>	$\beta$ -1,3-, $\beta$ -1,6-глюкан (разветвленный)	—
Крестин или кориолан (протеогликан)	Клетки <i>Coriolus versicolor</i>	$\beta$ -1,4-, $\beta$ -1,3-, $\beta$ -1,6-глюкан (протеин 25—38%)	$1 \times 10^6$
Криптококковые гетерополисахариды	Внеклеточные <i>Cryptococcus laurentii</i> , <i>C. luteolus</i> , <i>C. ellnovii</i> , <i>C. neoformans</i>	Полиурониды (разветвленные)	$5 \times 10^6$
Лентинан	Плодовые тела <i>Lentinus edodes</i>	$\beta$ -1,3-, $\beta$ -1,6-глюкан (разветвленный)	$5 \times 10^6$
Маннан	Внеклеточный <i>Sporobolomyces</i> sp.	$\beta$ -1,3-, $\beta$ -1,4-маннан (линейный)	$5 \times 10^6$
Маннозан	Клетки <i>S. cerevisiae</i>	$\beta$ -1,3-маннан, $\beta$ -1,6-глюкан (разветвленный)	—
Пахьяман	Плодовые тела <i>Portia cocos</i>	$\beta$ -1,3-, $\beta$ -1,6-глюкан (линейный)	$37 \times 10^4$
Родаксман (маннан)	Внеклеточный <i>Rhodotorula rubra</i>	$\beta$ -1,3-, $\beta$ -1,4-маннан (линейный)	$5 \times 10^6$
Хитин	Клеточные стенки патогенных грибов	$\beta$ -1,4-N-Ас-глюкозамин (линейный)	$1.5-2 \times 10^6$
Шизофиллан	Внеклеточный <i>Schizophyllum commune</i>	$\beta$ -1,3-, $\beta$ -1,6-глюкан (разветвленный)	$10^4-10^6$ ( $4.5 \times 10^6$ )



# Важно детектировать не только грибы и бактерии, но и

## фитофагов

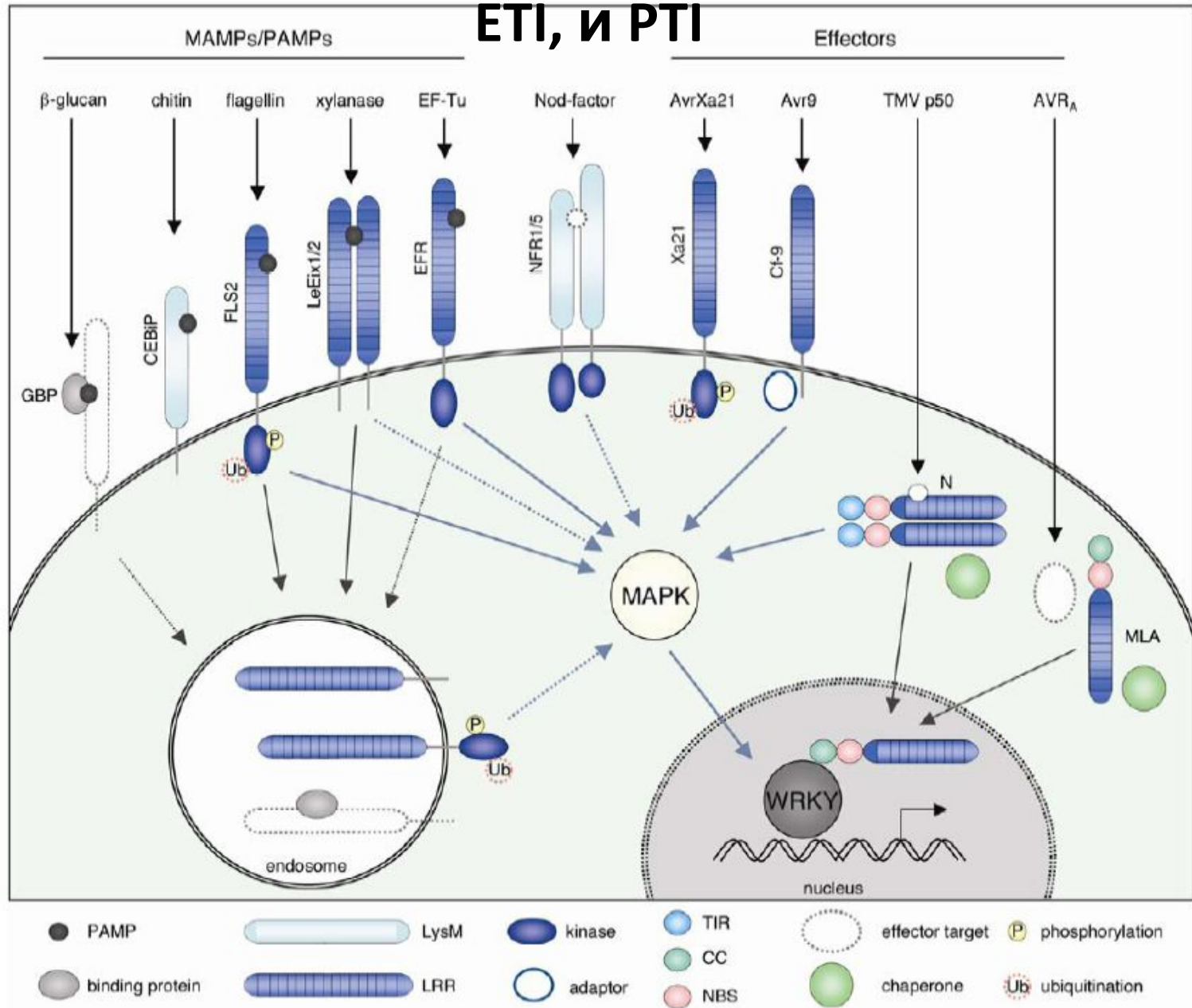


# КАК РАСТЕНИЯ СПРАВЛЯЮТСЯ С ВИРУЛЕНТНЫМИ ПАРАЗИТАМИ (ТРЕТЬЯ ЛИНИЯ ОБОРОНЫ)

У растений возникла система ген-на ген, в которой супрессорные молекулы паразита узнаются как продукты avr-генов – эффекторы иммунного ответа. Рецепторами для эффекторов служат непосредственно или после взаимодействия avr-белка с определенным белком растения R-белки. Поэтому такие эффекторы, узнающиеся только определенными генотипами растений называют специфическими элиситорами.

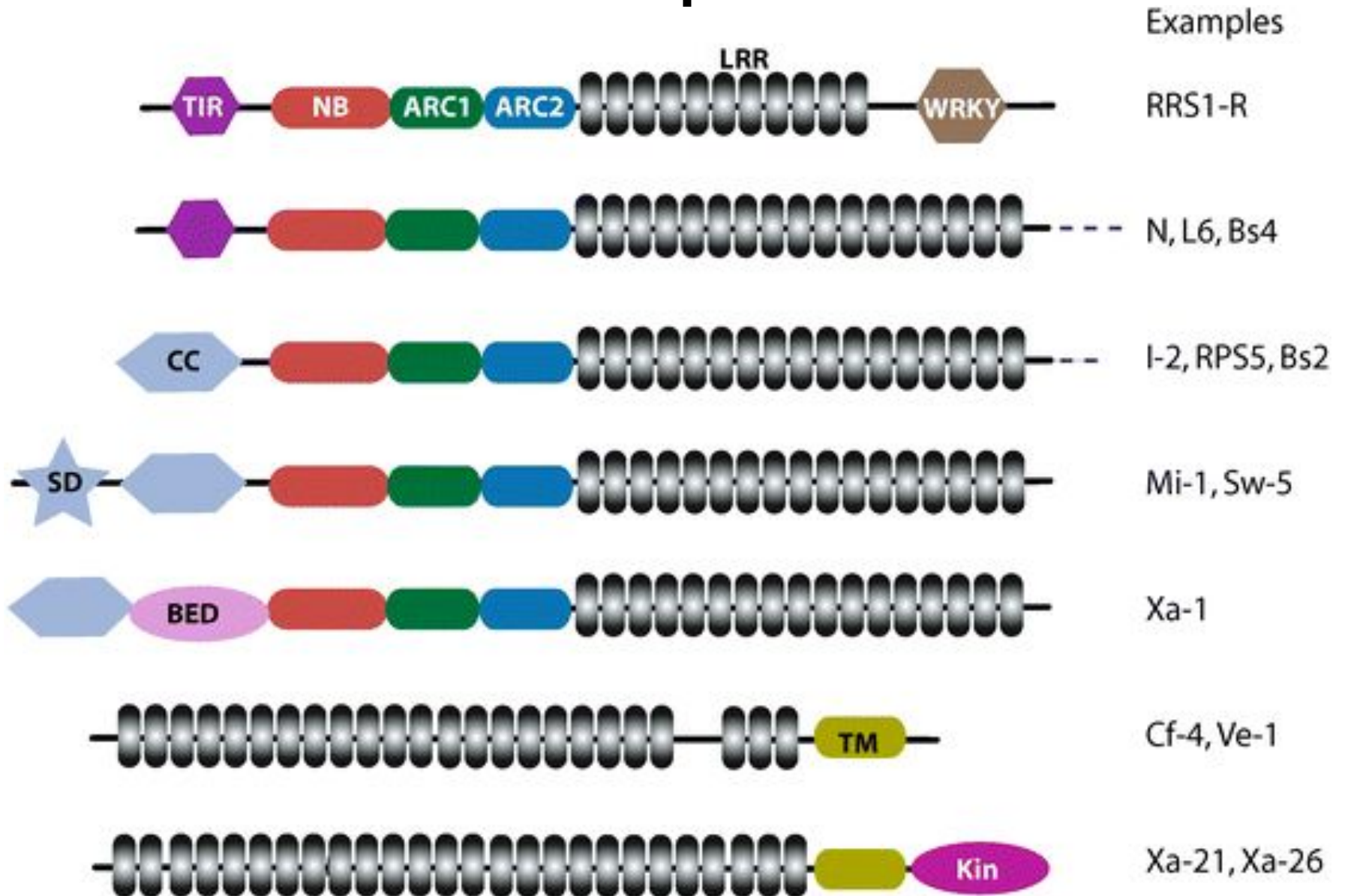
Например, фузонизин является фитотоксином для ряда растений и элиситором защитных реакций для *Arabidopsis*; бактериальный токсин коронатин в разных растениях может выступать как токсин, фитогормон и элиситор. Специфические элиситоры – эффекторы, которые паразит выделяет в зараженное растение для подавления его защитного потенциала и улучшения условий питания (супрессоры). Поскольку структура многих таких соединений может меняться без потери жизнеспособности, возможны мутации, изменяющие домены, которые узнаются специфическими клеточными рецепторами растения. Однако, часто это сопровождается снижением патогенности (“сильные гены устойчивости” Вандерпланка, “цена вирулентности” Леонарда).

# Белки с лейцин-богатыми повторами – основа и

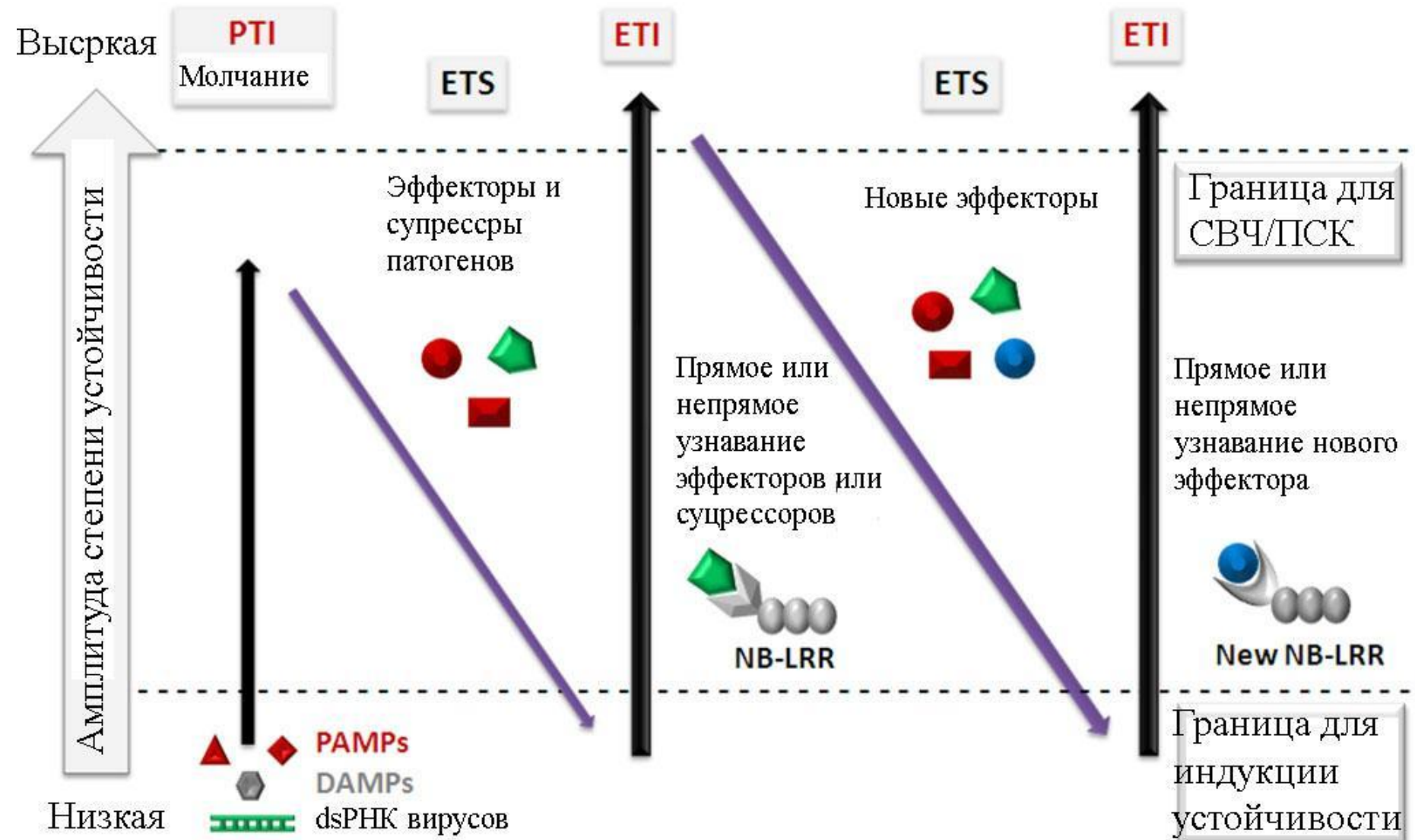




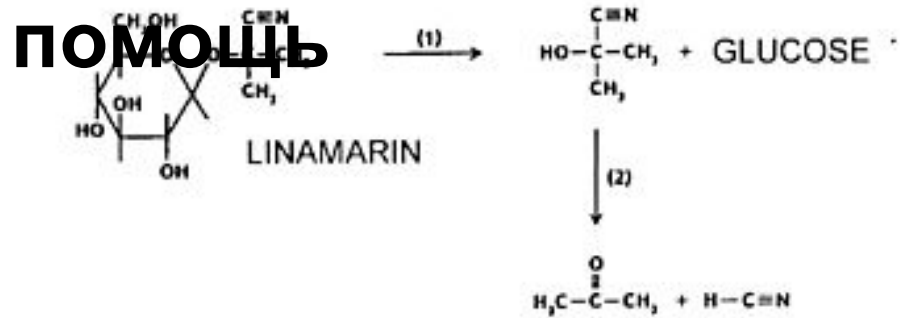
# R-белки – рецепторы с лейцин-богатыми повторами



# «Игра в пятнашки» между патогеном и растением

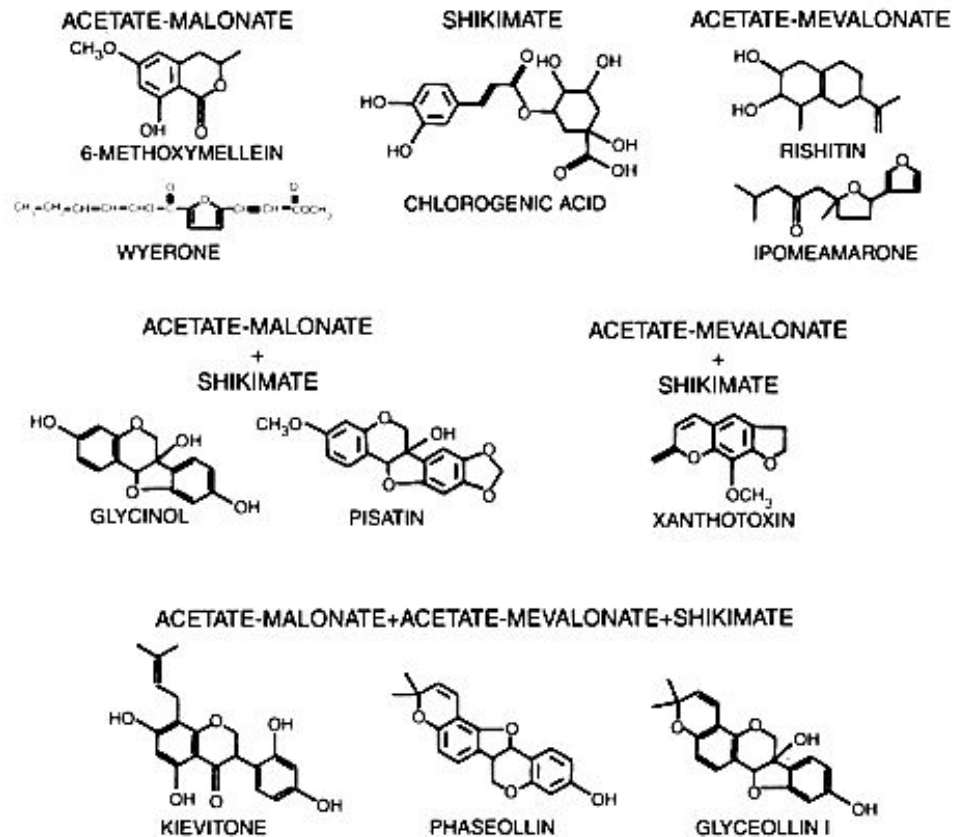


# Низкомолекулярные соединения летят на



Pathways of linamarin degradation with formation of hydrocyanic acid.

(1)  $\beta$ -glycosidase; (2) oxynitrilase.



**Фитоантиципины –  
выделяются  
конститутивно (то есть  
постоянно)**

**Фитоалексины –  
выделяются в ответ на  
появление фитофага или  
патогена**



# Эффекторные белки фитоиммунитета

Дефензины – низкомолекулярные (45-54 аминокислот) белки, богатые цистеином. Продуцируются млекопитающими, грибами, насекомыми и растениями.

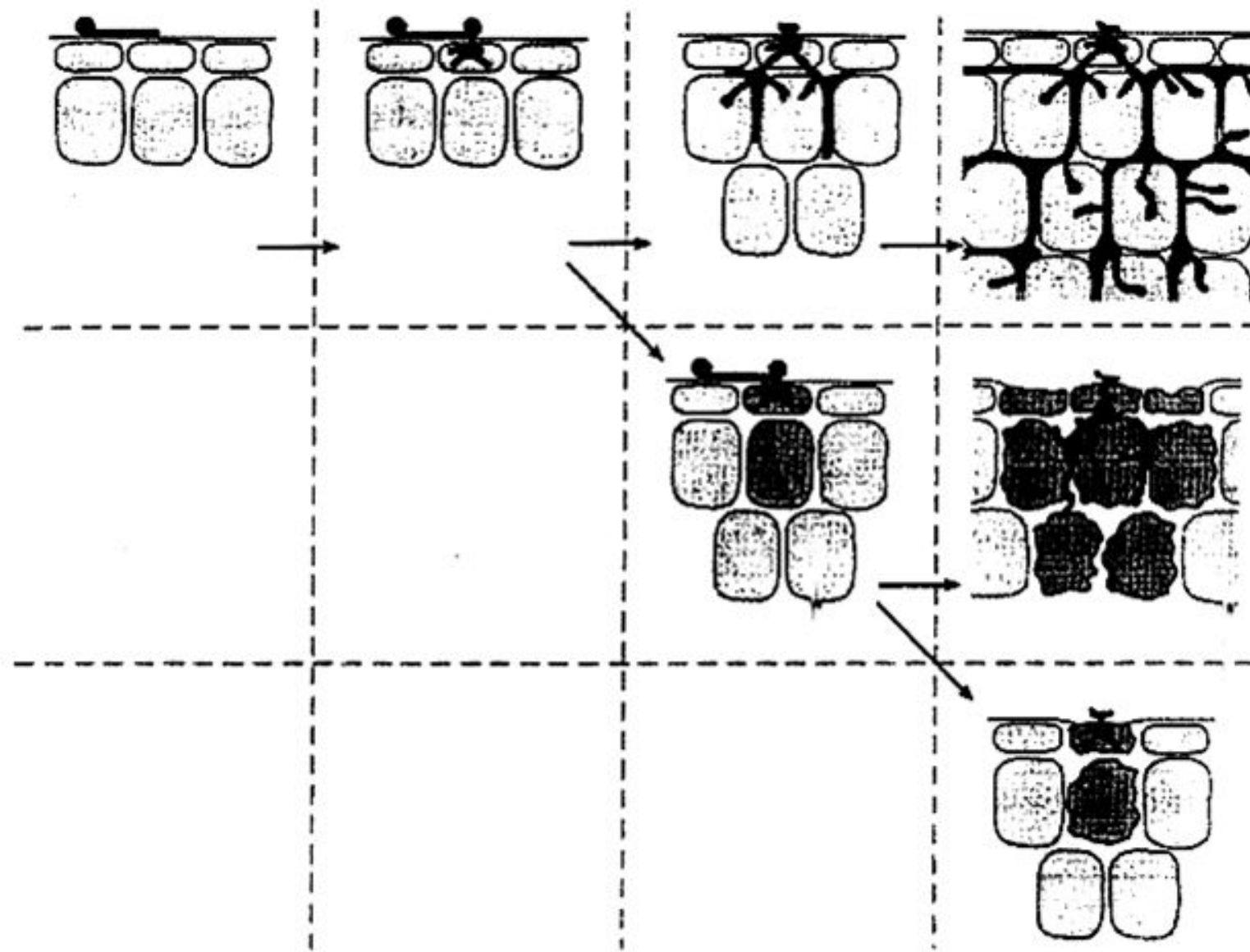
Растительные дефензины делятся на: 1) морфогенные (вызывают морфологические изменения у восприимчивых видов грибов) 2) неморфогенные (ингибируют рост без морфозов), ингибируют альфа-амилазу.

Связываются с рецепторами на мембранах грибов, усиливают потерю  $K^+$  и поступление  $Ca^{2+}$ .

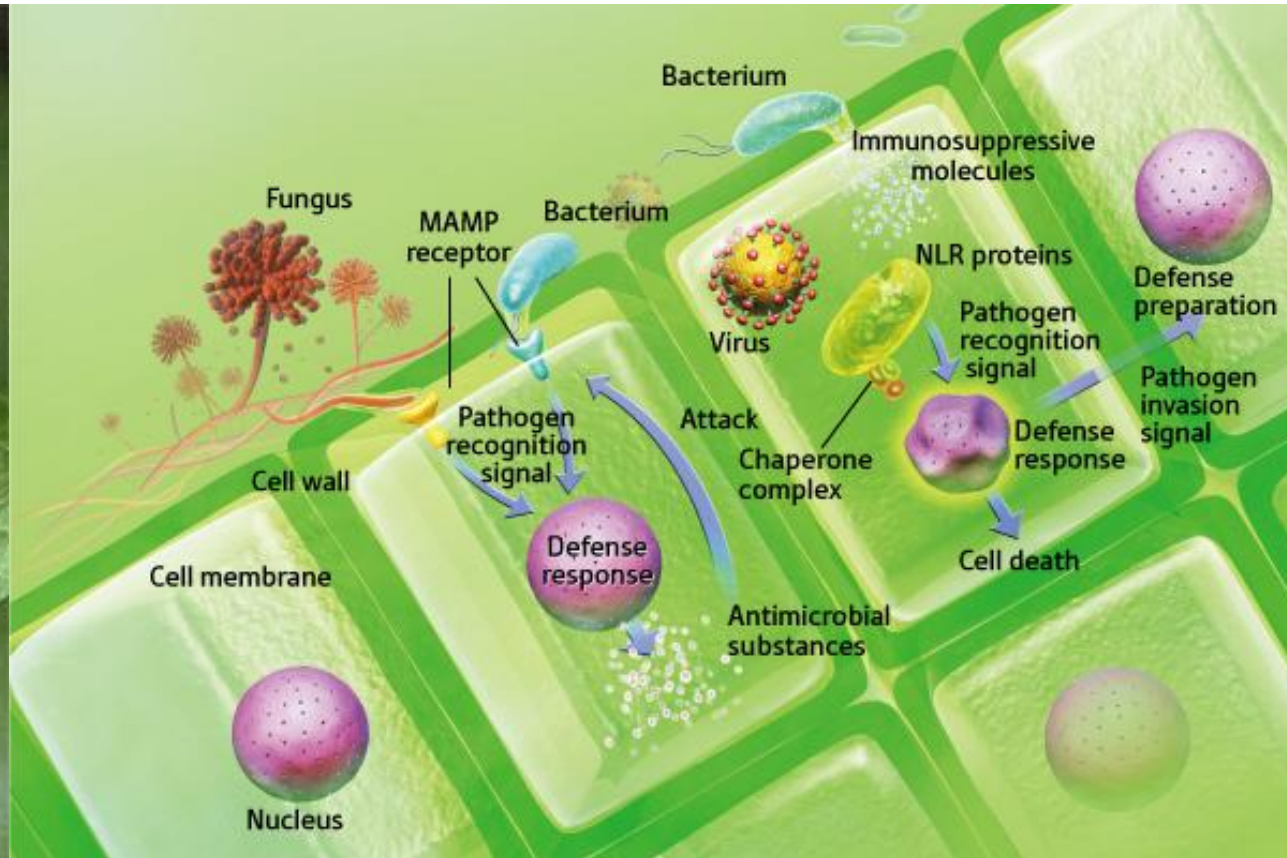
Тионины – богатые серой белки, накапливающиеся в семенах и проростках растений. Взаимодействуют с мембранными фосфолипидами и вызывают образование пор в мембранах.

RIP-белки – подавляют синтез белка на чужеродных рибосомах на стадии элонгации

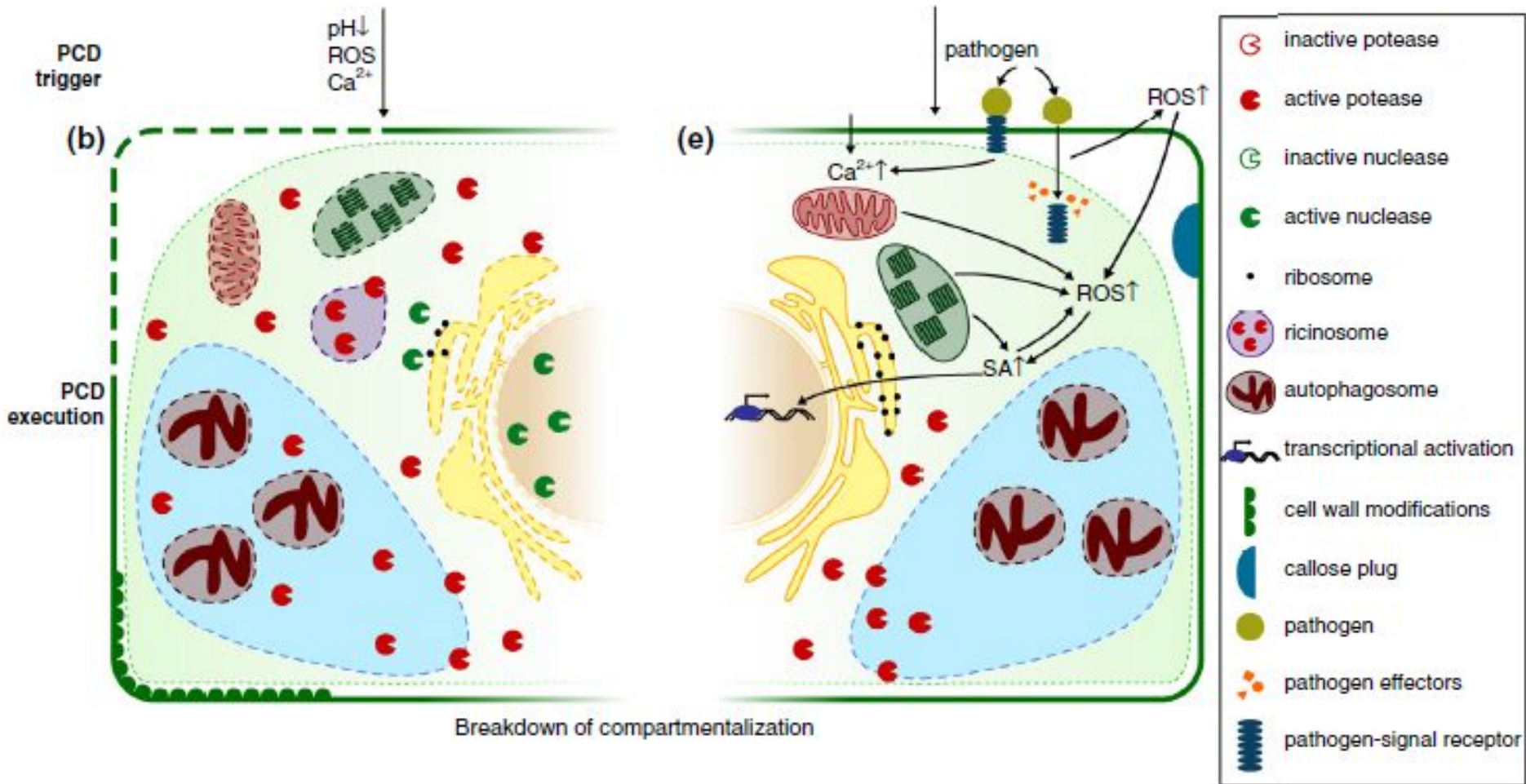
# Реакция сверхчувствительности растений



# Реакция сверхчувствительности и клеточная гибель

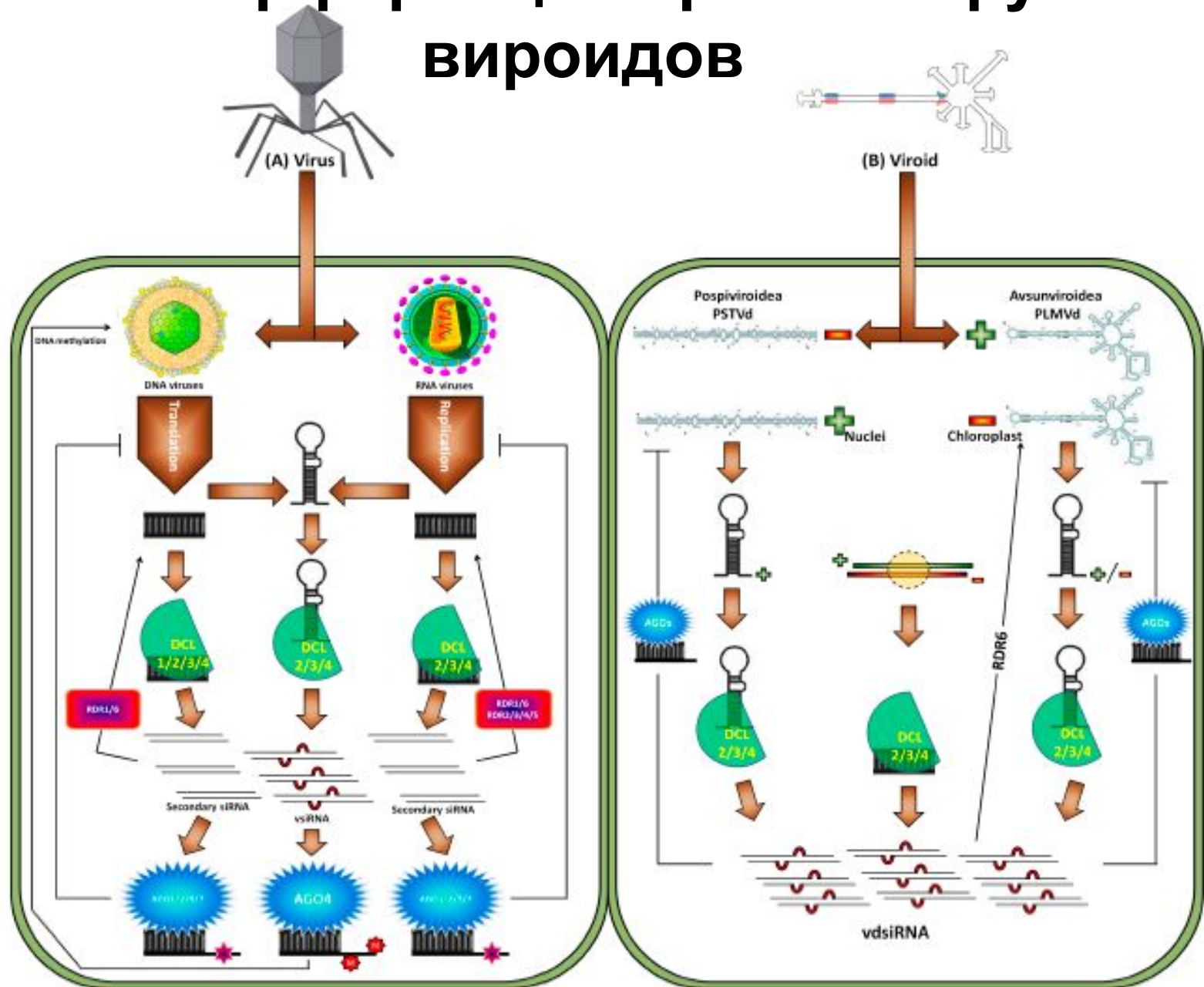


# Механизмы реакции сверхчувствительности

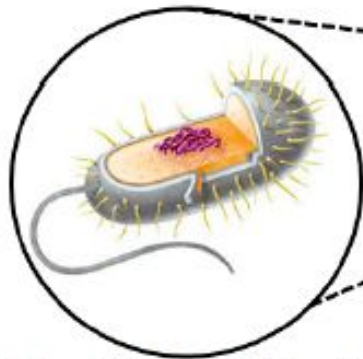




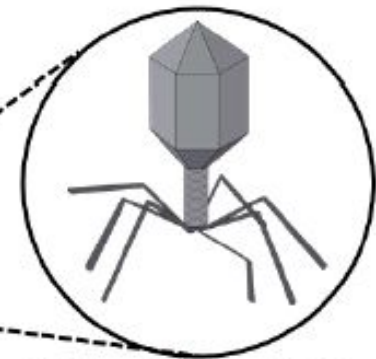
# РНК-интерференция против вирусов и виридов



# микроРНК как переключатель типов иммунного ответа у растений



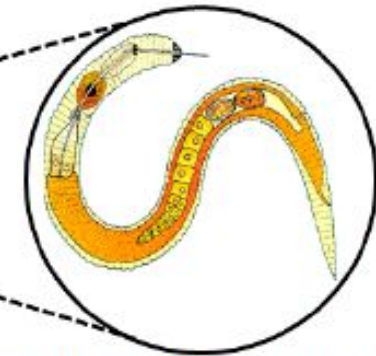
miR159, miR160, miR167, miR390,  
miR393, miR398, miR399, miR408,  
miR472, miR773



miR158, miR159, miR162, miR167, miR168, miR169,  
miR171, miR319, miR395, miR398, miR482, miR528,  
miR1885, miR3623, miR6019, miR6020



miR160, miR396, miR482, miR1447,  
miR1448, miR1450, miR2118, miR5300,  
Pbe-SR3, Pbe-SR23, Pbe-SR25



miR161, miR164, miR167, miR172, miR396, miR398



- Следующая лекция 5 марта – об иммунной системе дрозофилы