

# Molekulární biologie

## 10. Programovaná buněčná smrt a molekulární podstata získané imunity

### Osnova

1. Apoptóza
2. Vývoj a aktivace T-buněk a B-lymfocytů
3. Imunoglobuliny, exprese BCR a TCR

### *Hlavní zdroje:*

*S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4  
Masarykova Universita Brno  
ISBN 80-902562*

*M. Muller, Biology of Cells and Organisms  
University of Illinois, Chicago*

*<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>*

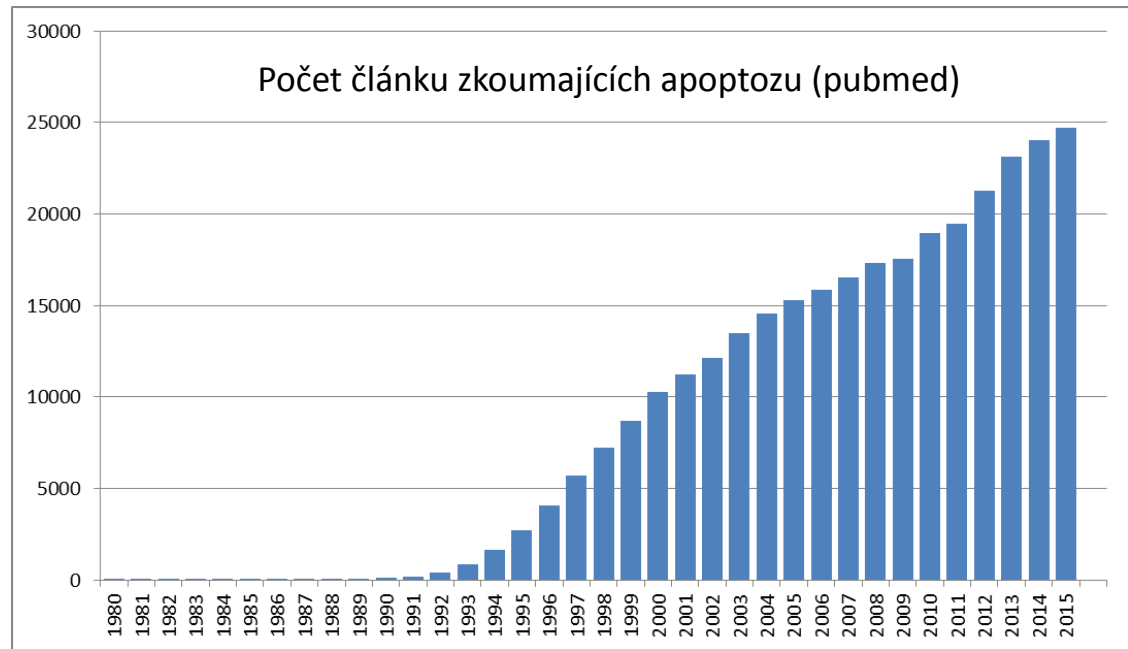
# **Apoptóza**

*programovaná buněčná smrt*

# Apoptóza

*programovaná buněčná smrt*

- intenzivně zkoumána od 1990s
- poruchy apoptozy hrají roli v různých nemocech



**Excesivní apoptóza**  
*např. dystrofie*



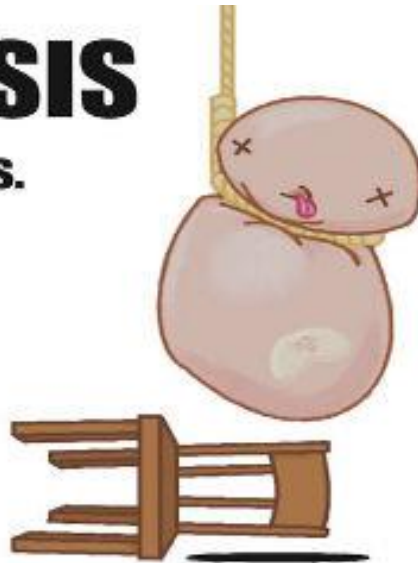
**Omezená apoptóza**  
*např. rakovina*

**Dystrofie** - degenerace tkáně z důvodu nemoci nebo špatné výživy

# Apoptóza - programovaná buněčná smrt

- nezbytná pro vývoj a homeostázi organismu
- pouze u mnohobuněčných organismů
- přísně regulovaný proces (na rozdíl od nekrózy)
  
- buněčný stres stimuluje pro-apoptotické signální dráhy
- tyto dráhy aktivují proteázy zvané "kaspázy"
- kaspázy způsobují mitochondriální dysfunkci
- apoptotická buňka vykazuje charakteristické změny morfologie

**APOPTOSIS**  
Know the signs.



Buněčný stres



pro-apoptotické  
signální dráhy



Kaspázy



mitochondriální  
dysfunkce

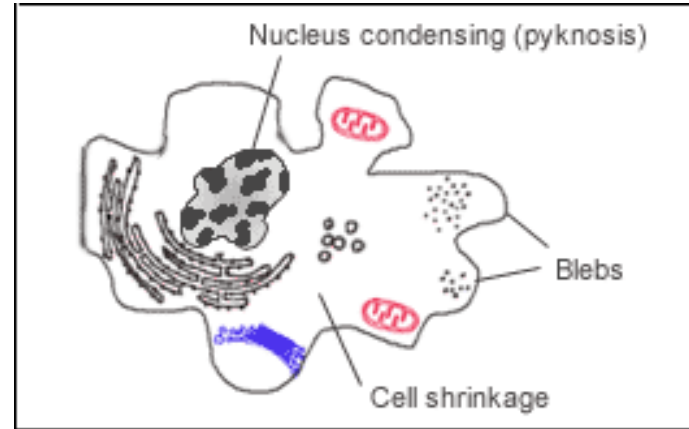


APOPTOZA

# Charakteristické morfologické znaky apoptozy

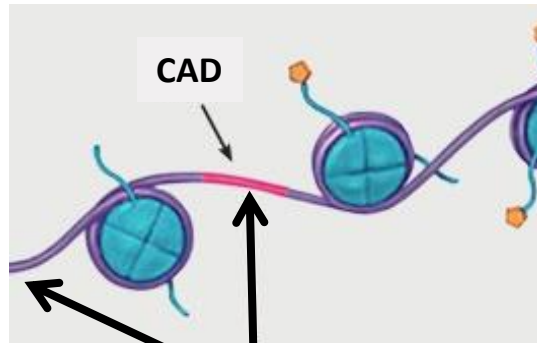
## 1. Blebbing

- nepravidelné záhyby cytoplazmatické membrány
- smršťování buňky (shrinkage)
- vznikají odpojení cytoskeletu od membrány
- degradace vnitřní struktury buňky
- vznik apoptotických tělísek

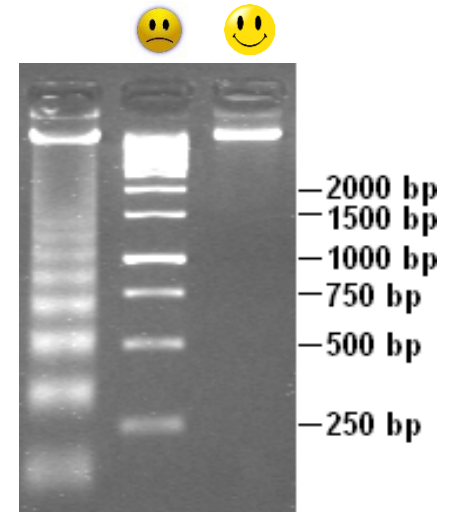


## 2. Fragmentace jádra

- Kaspáza 3 aktivuje endogenní endonukleázu - enzym CAD (Caspase-Activated DNase)
- štěpí chromatinovou DNA na fragmenty o délce cca 180bp
- na elektroforetickém gelu lze pozorovat 180bp fragmenty DNA a jejich násobky (360, 540...)
- 180bp je zhruba délka rozestupu histonů na DNA



místa štěpení CAD endonukleázou

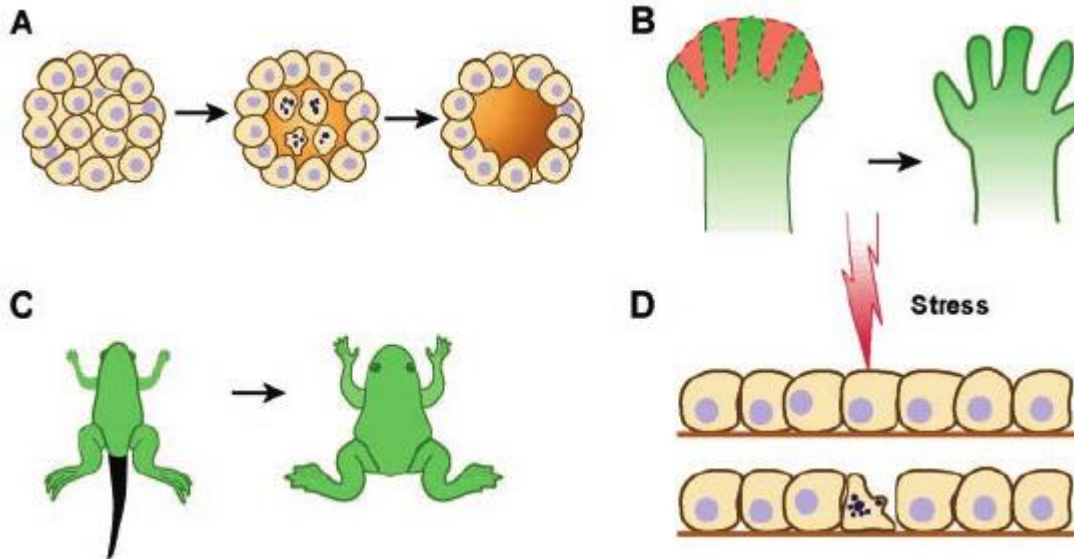


**Pyknóza** - ireverzibilní kondenzace chromatinu

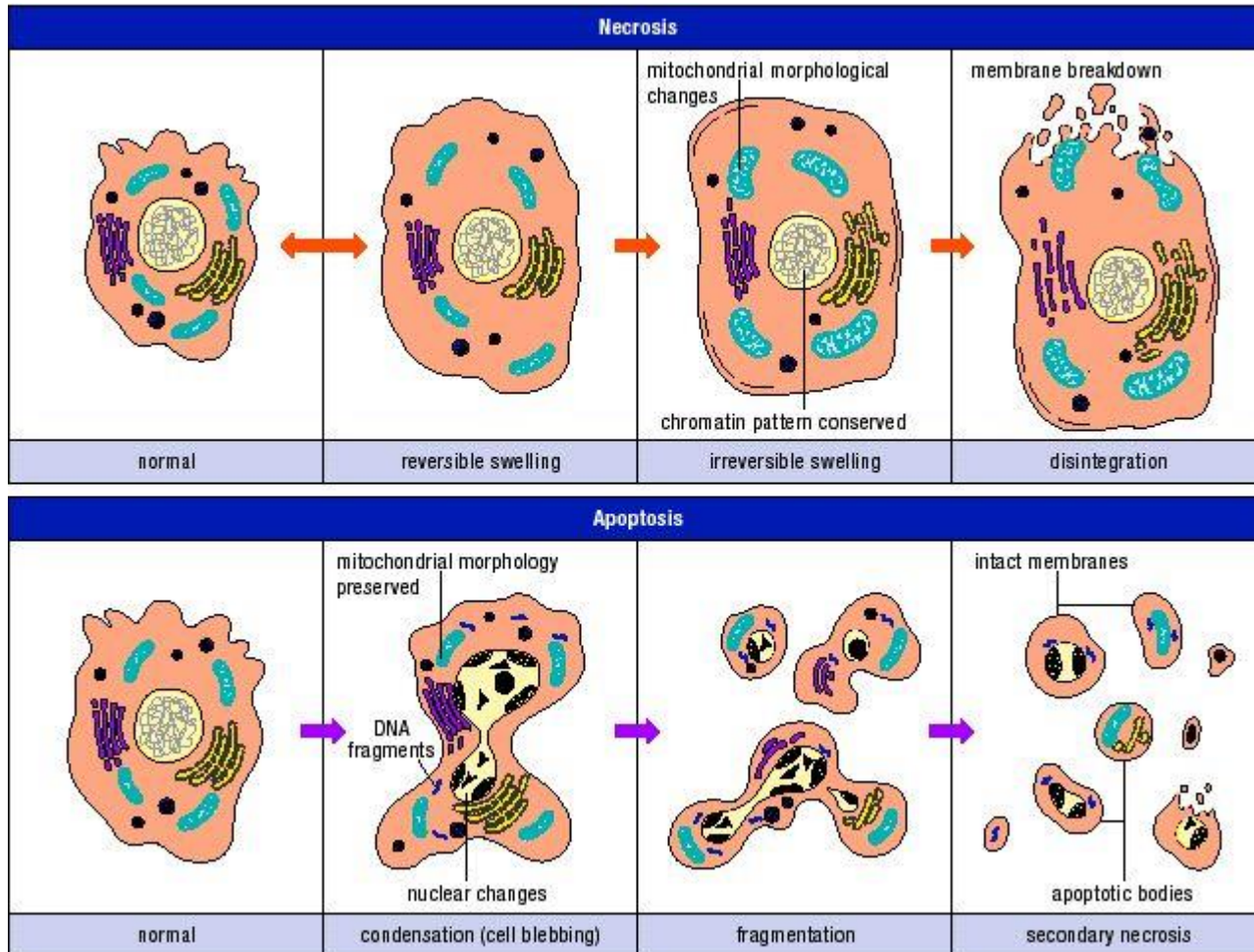
# Kdy probíhá apoptóza

## Příklady:

- zánik nadbytečných buněk v prenatálním období (u embrya, u plodu)
  - orgány se zakládají jako shluky buněk
  - duté orgány vznikají tak, že vnitřní buňky zaniknou apoptózou (A)
  - diferenciaci lidských prstů (B)
- zánik buněk ve tkáních - např. zánik **červených krvinek** po přibližně 80 dnech
- poškození DNA, které již neumí buňka opravit (D)



# Apoptóza vs. Nekróza



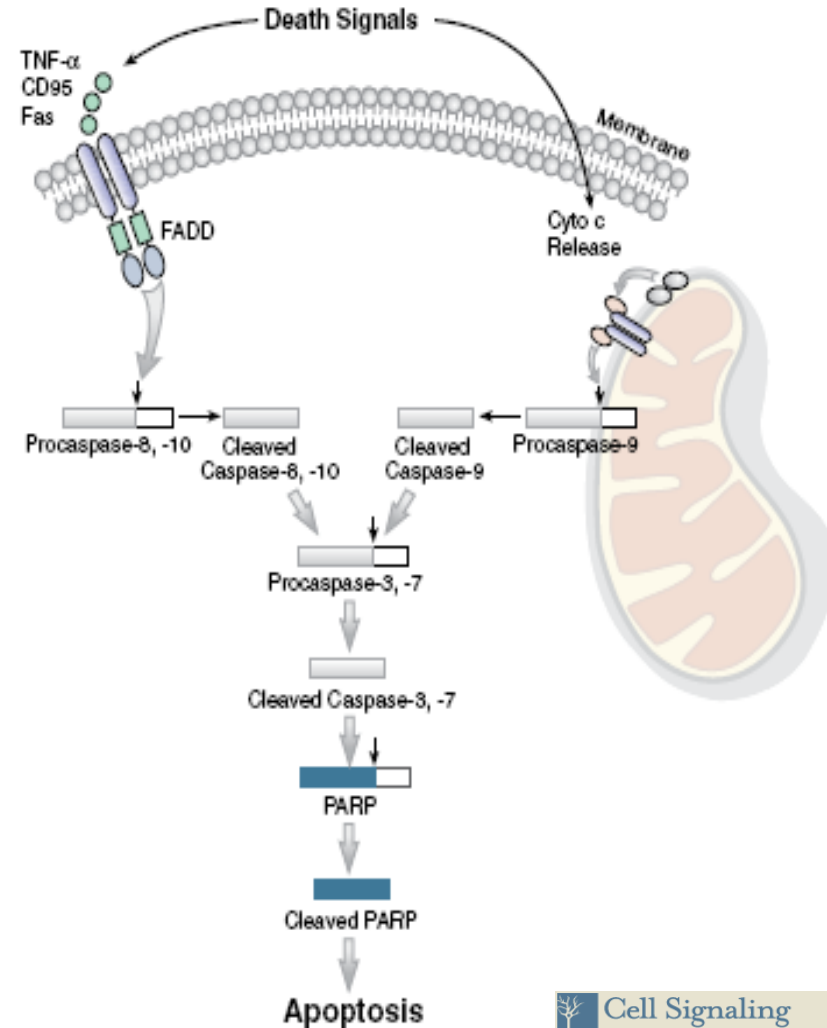
# Apoptóza může být indukována dvěma drahami

## 1. Vnitřní dráha (intrinsic pathway; mitochondriální)

- z důvodu buněčného stresu nebo DNA damage
- uvolnění proteinů (hl. Cytochrom C) z prostoru na membráně mitochondrií

## 2. Vnější dráha (extrinsic pathway)

- z důvodu vnější signalizace od ostatních buněk
- extracelulární ligandy (hl. TNF- $\alpha$  a Fas) se váží na tzv. death-receptory na povrchu buněk
  - TNF- $\alpha$  produkují aktivované makrofágy
  - Fas ligand produkují T<sub>C</sub> lymfocyty



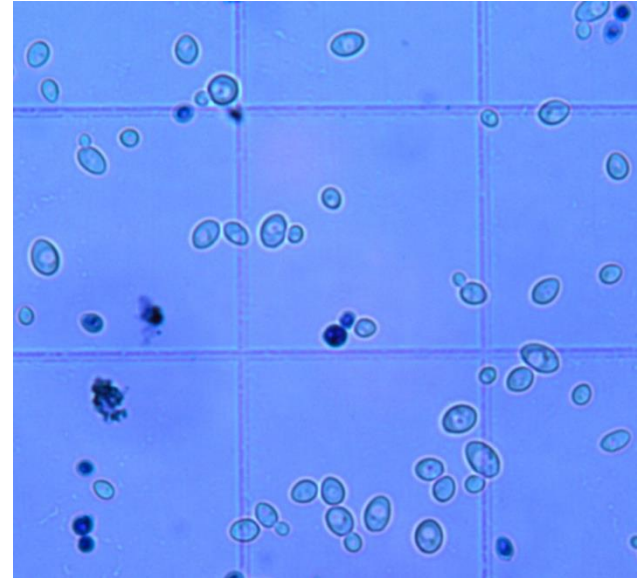


# Metody detekce apoptózy

*např. při testování léčiv in vitro*

## 1. Barvení buněk trypanovou modří

- počítání ve světelném mikroskopu



## 2. Flow cytometrie

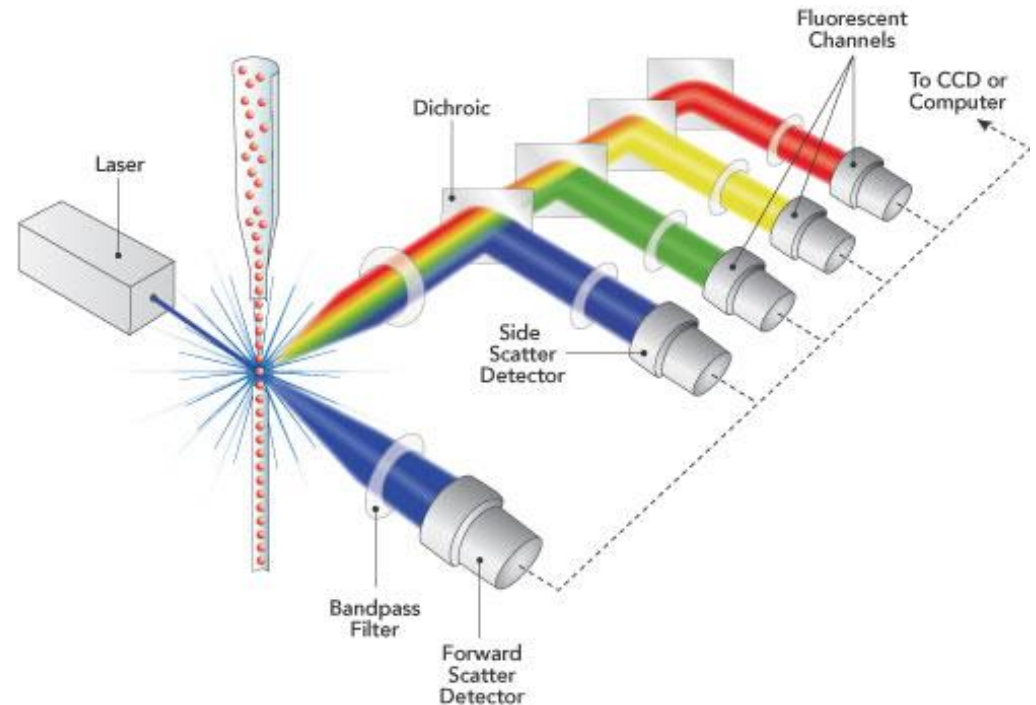
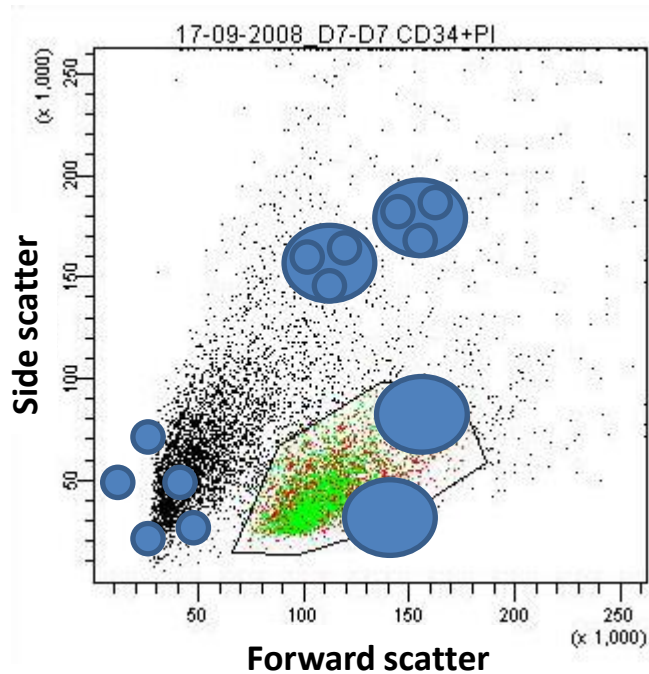
## 3. Western blotting

## 2. Flow cytometrie

*Technika pro analýzu velkého množství buněk.*

Na buňkách je možné rozlišit

- **velikost** (forward scatter)
- **tvar** (granularitu; side scatter)
- expresi **povrchových proteinů** (protilátka proti povrchovým antigenům konjugovaná fluochromem)
- expresi **intracelulárních proteinů** (buňky nutno usmrtit a permeabilizovat membránu)

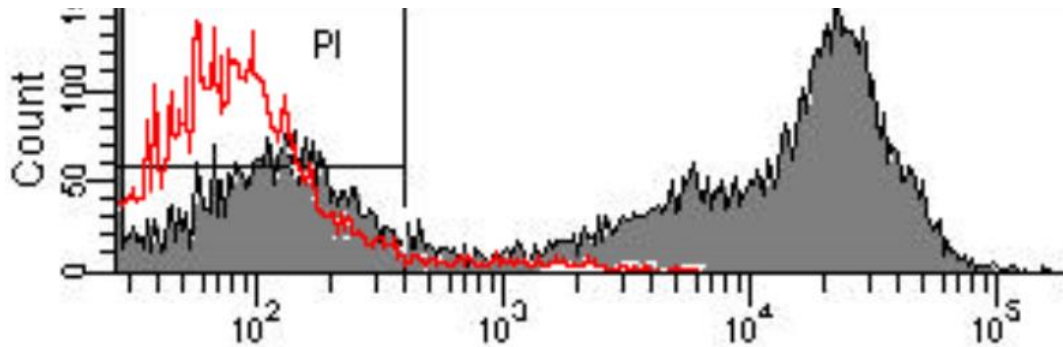


## 2. Flow cytometrie

### Detekce buněčné smrti pomocí propidium jodidu (PI)

- PI- fluorescenční barvička, váží se na DNA
- podobně jako Trypanová modř proniká a barví pouze mrtvé buňky

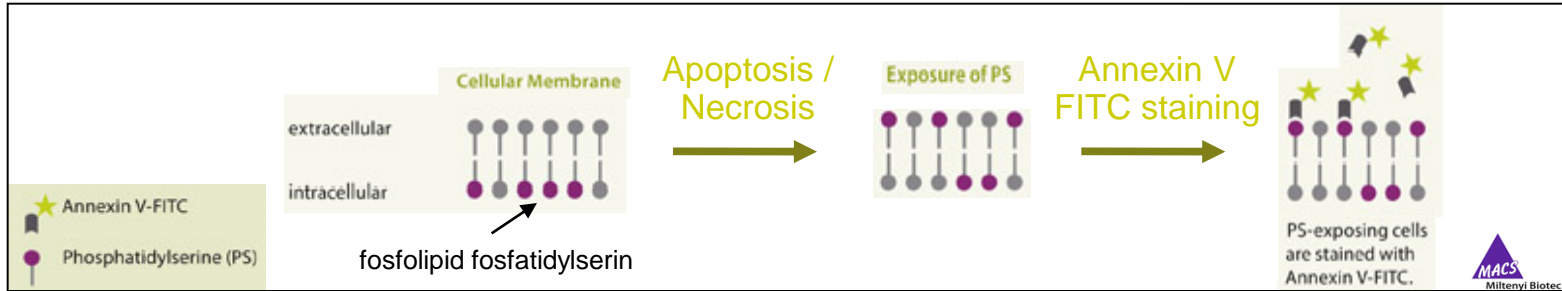
Histogram barvení propidium jodidem



## 2. Flow cytometrie

osa x: intenzita fluorescenčního signálu v kanálu FITC (buňky pozitivní na Annexin)

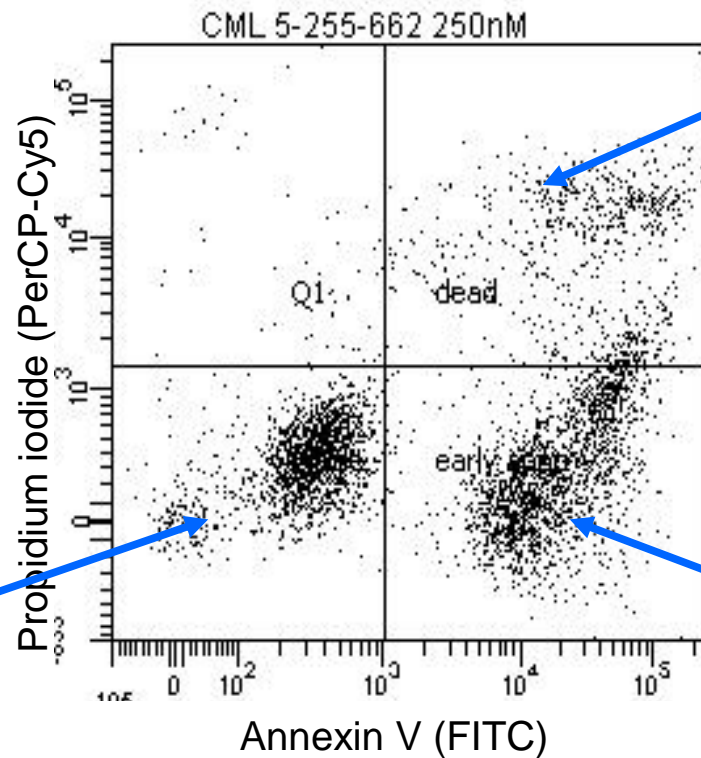
osa y: intenzita fluorescenčního signálu v kanálu PerCP-Cy5 (buňky pozitivní na Propidium jodid)



Annexin+... časná apoptoza

PI+... pozdní apoptoza

Viable cells



Late apoptotic or necrotic cells

Early apoptotic cells

### 3. Western blotting

- izolace celkového proteinu z buněk a rozdělení proteinů na polyakrylamidové gelu podle své velikosti.
- inkubace s protilátkou umožní, zda je daný protein ve vzorku přítomen a v jakém množství (oproti jinému vzorku na téže membráně - semikvantitativní metoda)
- příklady markerů apoptózy:
  - proapoptotický protein z rodiny Bcl-2: **BIM**
  - štěpený protein **PARP**

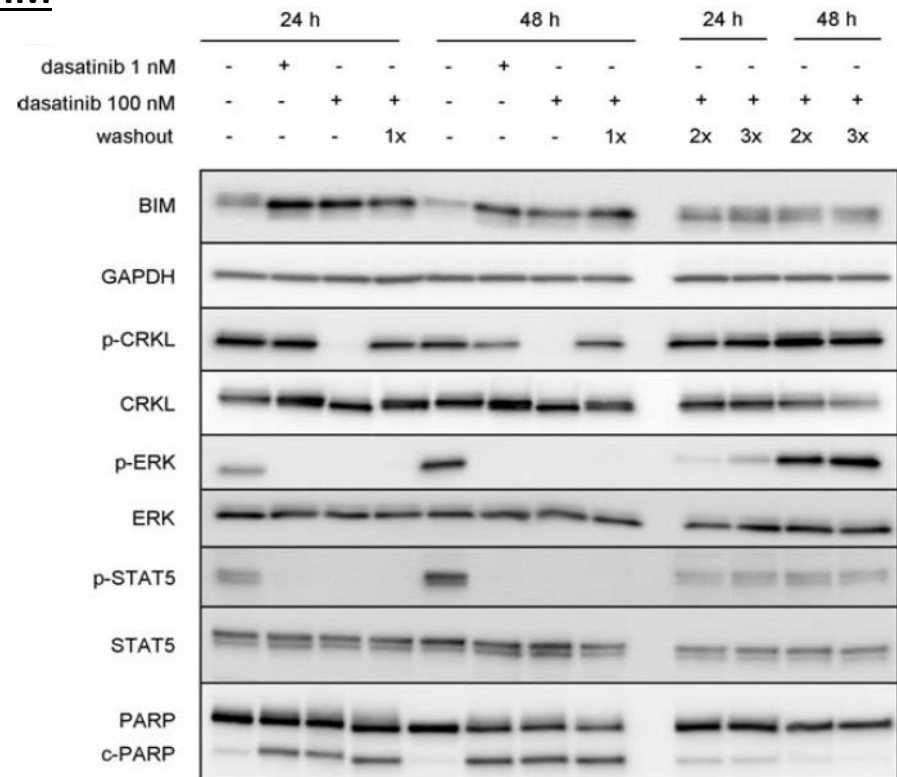


Figure 2. Effect of intermittent high-dose TKI treatment on signaling pathways in the K562 cell line. The cells were exposed to imatinib (A) or dasatinib (B) at a low dose continuously (2.5  $\mu$ M imatinib or 1 nM dasatinib), a high dose continuously (32.5  $\mu$ M imatinib or 100 nM dasatinib) or a high dose transiently (washout 1 $\times$ , 2 $\times$ , or 3 $\times$ ). The cells were then lysed and analyzed by Western blotting. The incubation time was 24 and 48 hr.

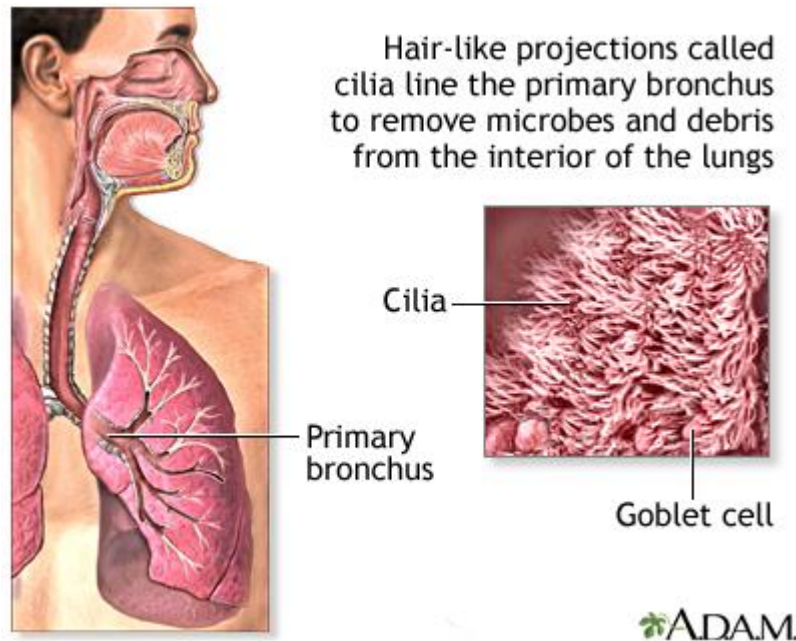
# Imunitní systém

# Imunitní systém

*Existuje fyzická, chemická a buněčná obrana proti invazi bakterií a virů*

## 1. linie obrany - fyzická a chemická

- a) kůže: vrstva mrtvých buněk - suchá a s nízkým pH
- b) sliznice: pokryty lysozymem - chemický rozklad bakterií
- c) cilie (řasinky): výběžky buněk, působí jako filtr a aktivně odstraňují patogeny



# Imunitní systém

## 2. linie obrany - nespecifická imunitní odpověď

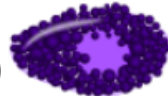
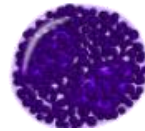
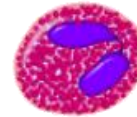
- obecná odpověď na infekci patogenem
- je vyvolán zánět

### Granulocyty

a) **Neutrofil** - fagocytuje bakterie a sekretuje lysozym který degraduje bakteriální stěny

b) **Eosinofil** - vylučuje enzymy, které zabíjí parazitické červy

c) **Bazofil** - vylučuje histamin pro podporu zánětu

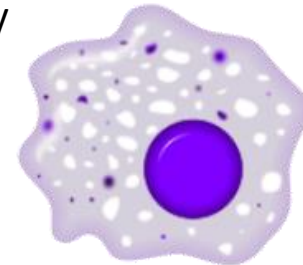


d) **Mastocyt** (mast cell; žírná buňka)

- vylučuje signály pro snížení průtoku krve v místě poranění
- signály pro zvýšení průtoku krve a propustnosti kapilár v okolí poranění, aby se fagocyty dostaly do místa poranění

e) **Makrofágy** - fagocyty (big eaters) - fagocytují vše

- obsahují MHC (major histocompatibility complex) , který vystavuje antigen
- sekrece cytokinů, které přitahují další makrofágy a neutrofilů
- zvyšují teplotu

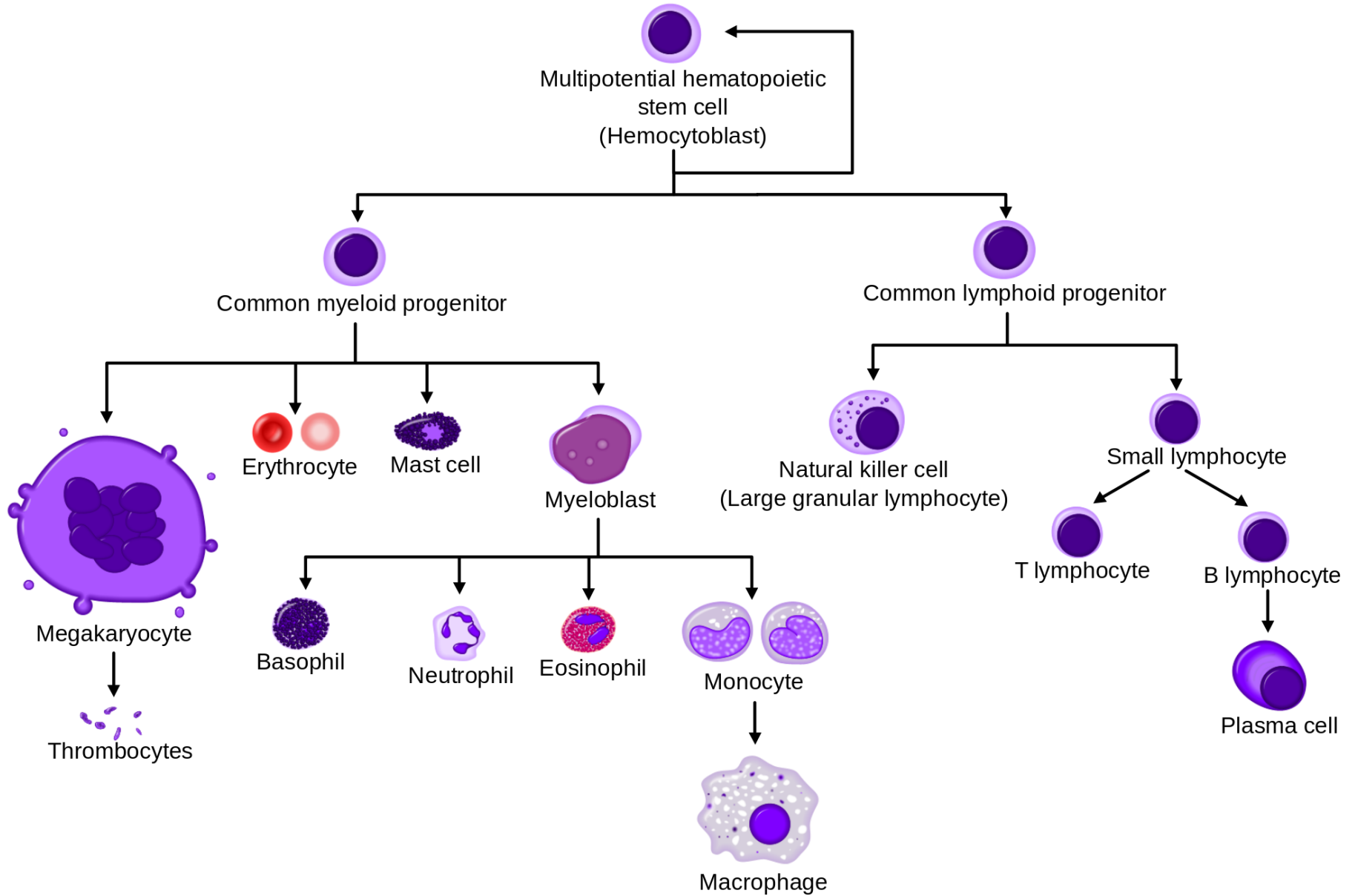


*Antigen: částice rozeznávaná protilátkou, v imunologii se jedná o cizí patogen*

*Protilátka: částice, která specificky rozeznává antigen a je rozeznávána lymfocyty*



# Hematopoéza (krvetvorba)



## MHC-molekuly (proteiny)

- Major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)
- u lidí zvaný též HLA-komplex (human leukocyte antigen)
- soubor povrchových proteinů - posttranslačně glykozylované proteiny

### Syntéza MHC

- během syntézy zachycují peptidy a fragmenty vzniklé odbouráváním cizorodých proteinů (antigenů) a zanořují je do povrchu buňky
- buňka se stává APC (buňkou nabízející antigen)
- antigen je rozeznáván TCR-receptorem T-lymfocytů

### Typy MHC

#### 1. MHC I (první třídy)

- vážou peptidy vznikající odbouráváním virových a bakteriálních peptidů
- tyto peptidy byly získány po zničení již infikované tělní buňky
- jsou rozeznávány T<sub>C</sub>-lymfocyty, které se aktivují k usmrcení podobně infikovaných buněk

#### 2. MHC II (druhé třídy)

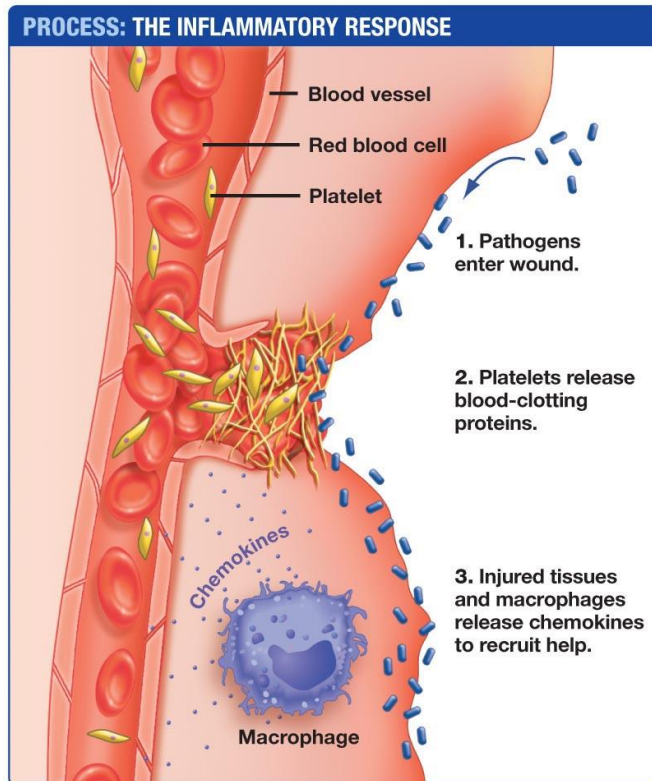
- vážou peptidové fragmenty z patogenů přímo fagocytovaných APC buňkou
- tyto peptidy se odbouraly v intracelulárních vezikulách makrofágů, nebo byly zachyceny receptory B-lymfocytů
- jsou rozeznávány pouze T<sub>H</sub>-lymfocyty

# Záněť

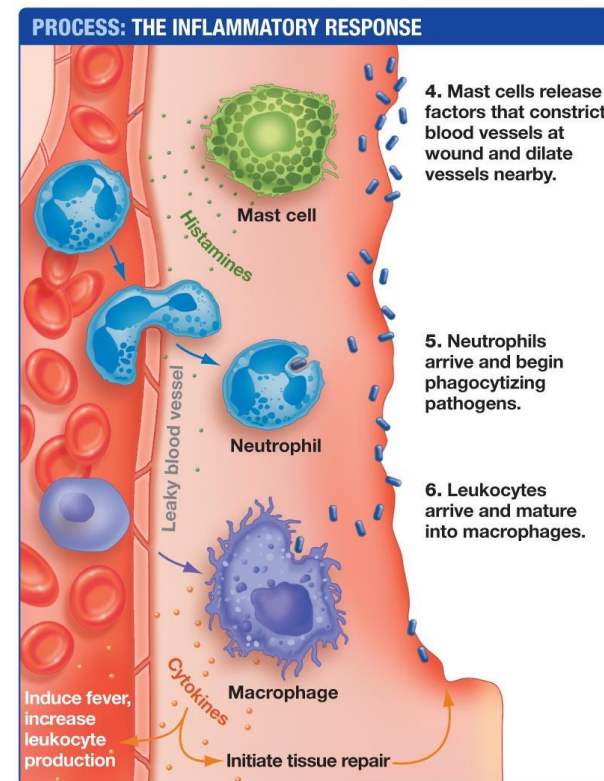
- patogeny vstupují do místa poranění
- **krevní destičky** vylučují srážlivé faktory
- makrofágy a buňky poraněné tkáně vylučují cytokiny, které přivolávají pomoc
  - změny ve stěnách kapilár umožňují průchod bílých krvinek a tkáňového moku
  - mastocyty indukují vazokonstrikci poraněných cév a vazodilataci okolních cév
  - stimulace kostní dřeně k produkci dalších neutrofilů a makrofágů
  - přilákání dalších imunitních buněk do místa poranění
  - zvýšení teploty



[Video: Záněť](#)



© 2011 Pearson Education, Inc.



© 2011 Pearson Education, Inc.

*Tkáňový mok (interstitial fluid): mezibuněčná tekutina v těle mnohobuněčných živočichů. Hlavní složka mimobuněčné tekutiny, do níž se také řadí krevní plazma a míza (lymfa), která se z moku tvoří.*

# Imunitní systém

## 3. linie obrany - specifická imunitní odpověď

- v případě, že první dvě linie obrany nestačí a infekce se šíří

Makrofágy fagocytují patogen a vystavují na povrchu jejich antigeny (Antigen Presenting)

T-lymfocyty jsou tímto informovány o typu patogenu

Helper T lymfocyty indukují množství efektorových a paměťových buněk

Cytotoxické T lymfocyty eliminují infikované a nádorové buňky

B lymfocyty a plasmatické buňky produkují protilátky (sekretují do krve nebo umísťují na buňky)

## Aktivace T a B lymfocytů

Při styku s antigenem se lymfocyt zmnožuje a vzniká množství klonů se stejným antigenním receptorem

- nazýváme **klonální selekce** - základní koncept imunologie

Klonální selekcí lymfocytů vznikají dva typy buněk:

**a) efektorové:** krátká životnost, najdou a zničí patogen

- z B buněk → plasmatické - sekretují protilátky

- z T buněk →

- cytotoxické T lymfocyty

- helper T lymfocyty

**b) paměťové:** vznikají při primární infekci, nejsou aktivní, ale přetrvávají v těle a při další infekci stejným patogenem jsou rychle reaktivovány k mitóze (imunologická paměť)

# Imunitní systém

## 3. linie obrany - specifická imunitní odpověď

- každý virus a bakterie má unikátní molekulární markery, které jej identifikují
- lymfocyty v těle rozeznávají:
  - vlastní antigeny - ty je nechávají klidnými
  - cizí antigeny - spouští mitotickou aktivitu (dělení)

### Fáze:

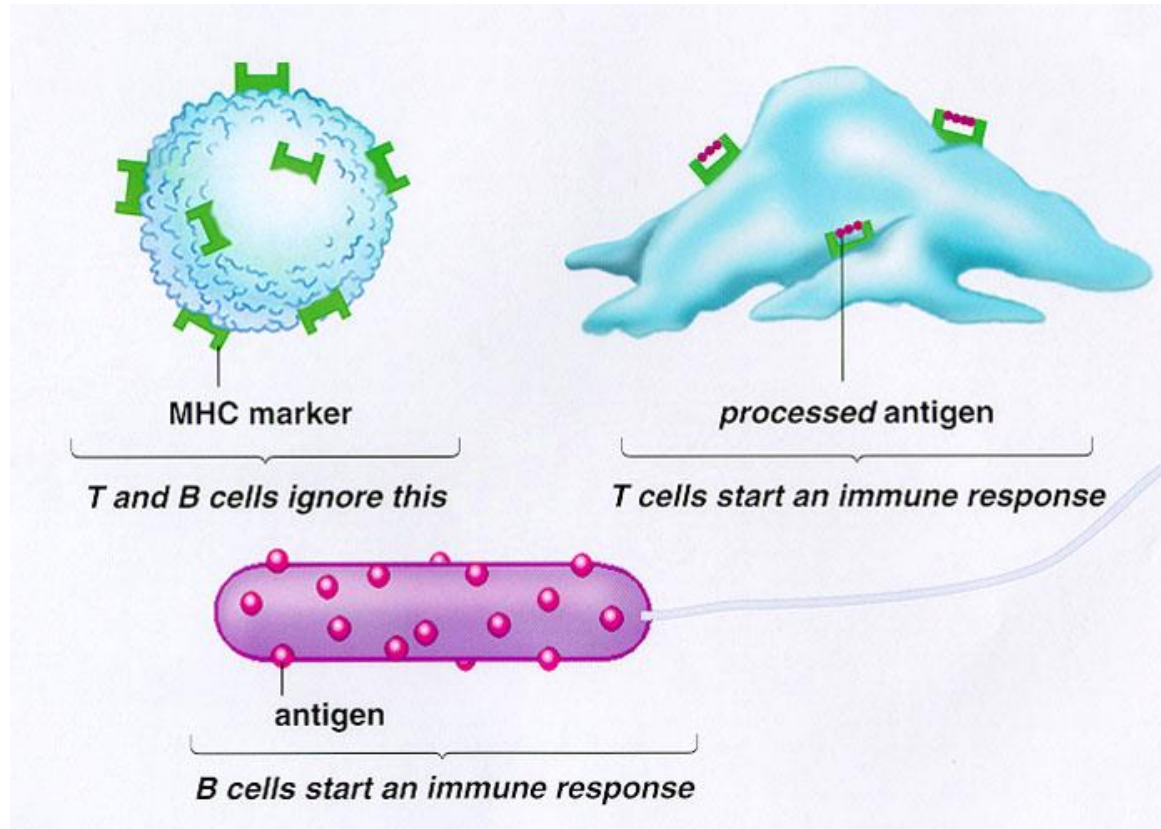
1. Rozeznání specifické cizí částice
2. Opakované buněčné dělení a vytvoření obrovské populace klonů lymfocytů
3. Diferenciace do subpopulací efektorových a paměťových buněk

# Imunitní systém

## 3. linie obrany - specifická imunitní odpověď

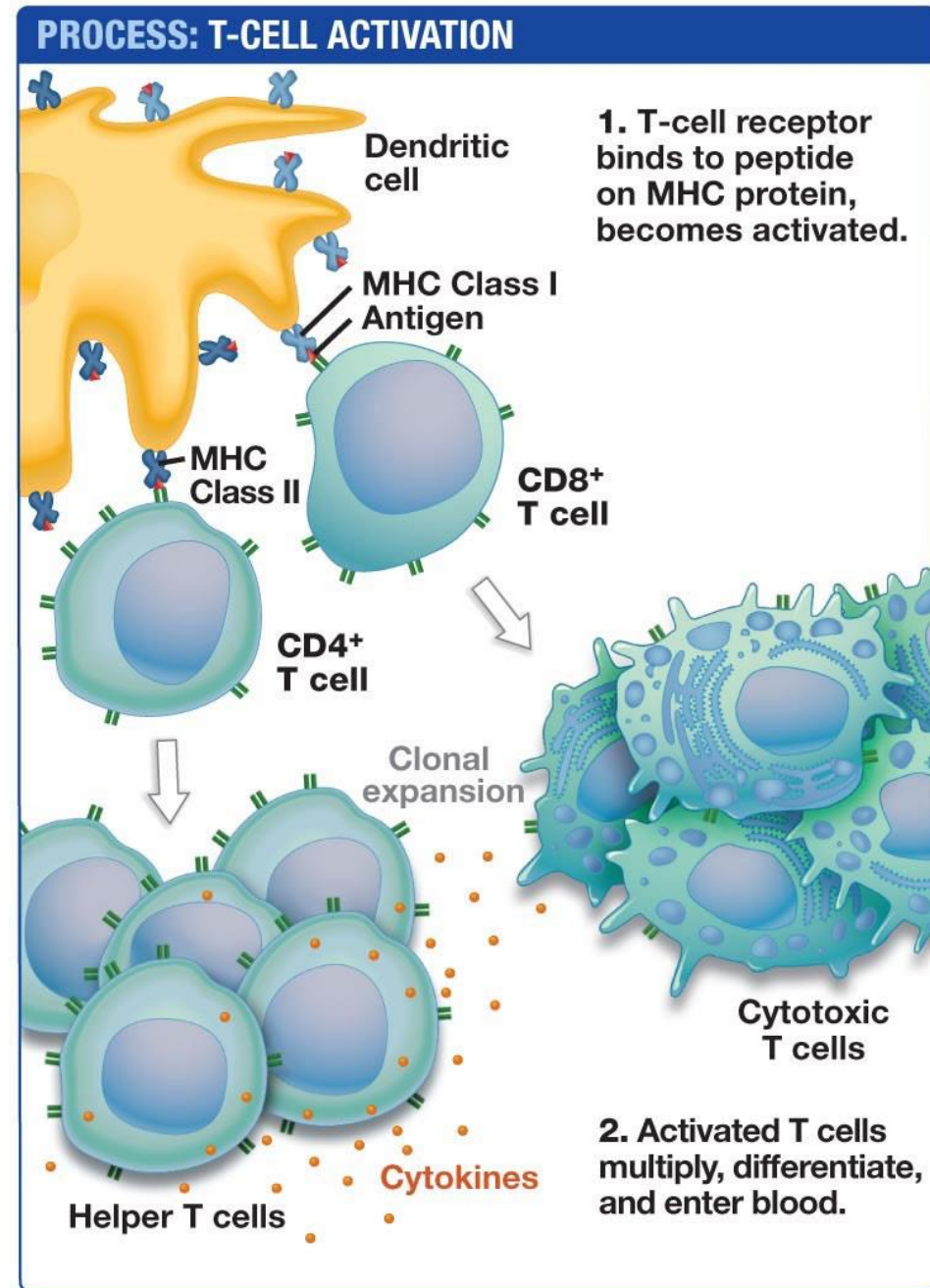
### Antigen-prezentující buňka

- vystavují na svém povrchu antigeny
- např. makrofág pohltí bakterii a na svém povrchu vystaví její antigeny
- makrofág, dendritická buňka, B lymfocyt
- tyto antigeny jsou ve vazbě s MHC
- antigeny jsou rozeznávány lymfocyty



## T-lymfocyty (Thymocytes)

- líhnou se v kostní dřeni
- putují nezralé do brzlíky (thymus) kde diferencují a zrají
- v procesu zrání získávají markery CD4 (T-helper cells  $T_H$ ) a CD8 (Cytotoxic T-cell  $T_C$ ) a antigenně specifické receptory
- do krevního oběhu jsou uvolněny jako "virgin" T cells
- T lymfocyty ignorují buňky s prázdnými MHC antigeny, stejně jako volně plovoucí antigeny
- váží se však na antigeny, vystavené na povrchu makrofágů v MHC komplexu
- vazba indukuje rapidní proliferaci do **efektorových** a **paměťových** buněk s receptorem pro daný antigen





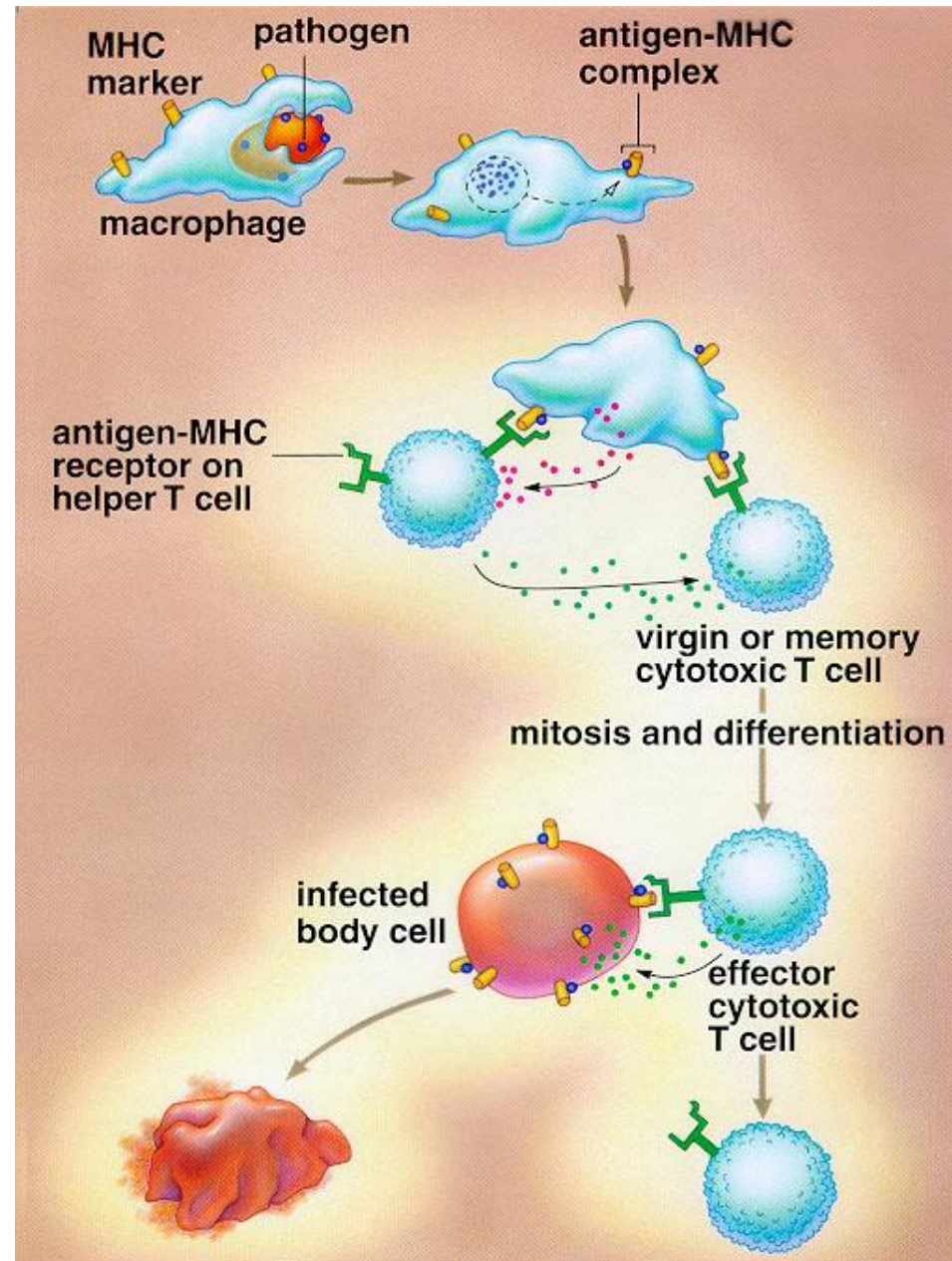
## T-lymfocyty (Thymocytes)

### 1. Efektorové T-helper lymfocyty (CD4)

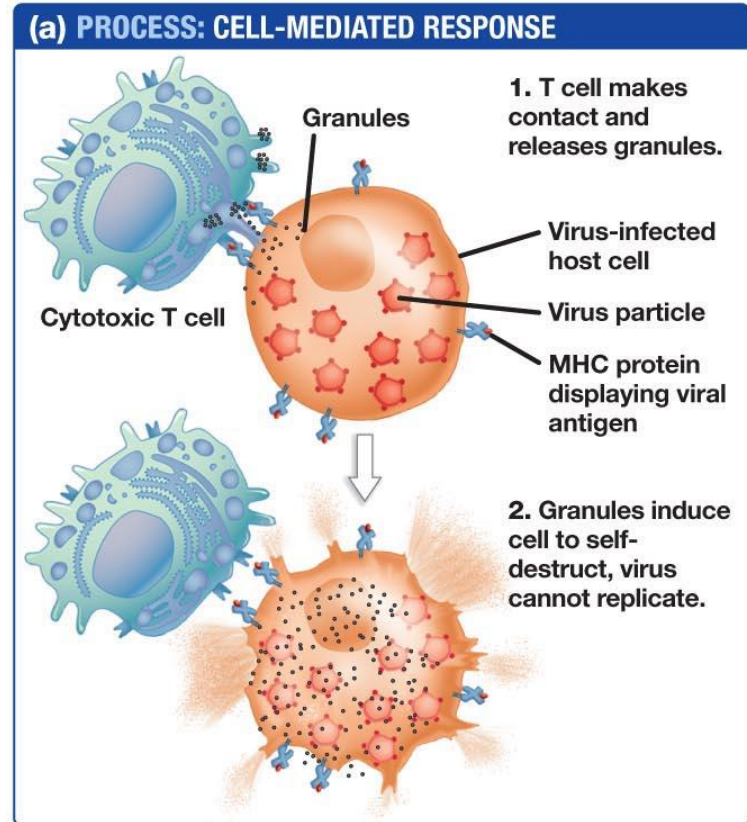
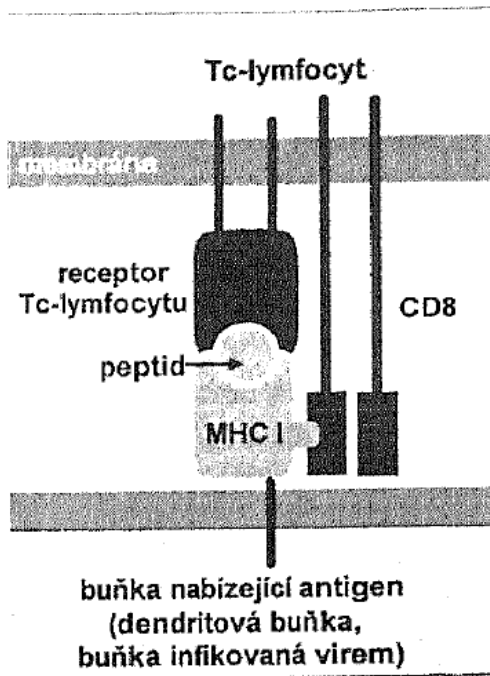
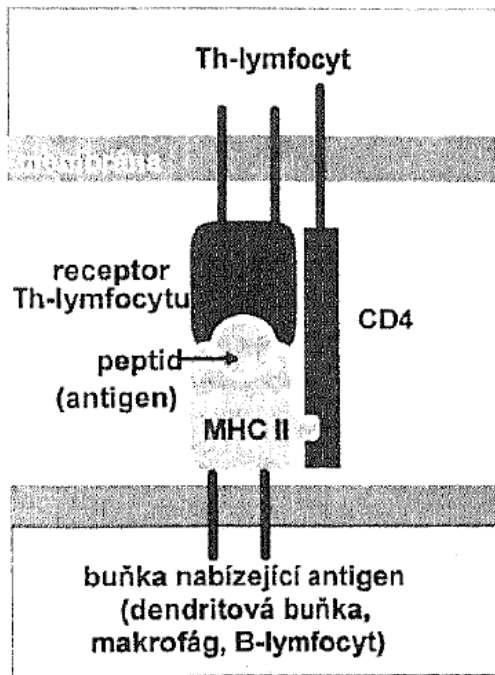
- sekretují interleukiny → stimulace dalších T a B buněk
- na povrchu mají protein CD4, který se váže na MHC II molekuly
- T<sub>H</sub>-lymfocyty dělíme na
  - a) T<sub>H</sub>1 - aktivující makrofágy
  - b) T<sub>H</sub>2 - aktivující B-lymfocyty

### 2. Efektorové cytotoxické T lymfocyty (CD8)

- rozpoznávají infikované buňky a ničí je pomocí Fas ligandu, perforinů+granzymů → APOPTÓZA
- na povrchu mají protein CD8, který se váže na MHC I molekuly





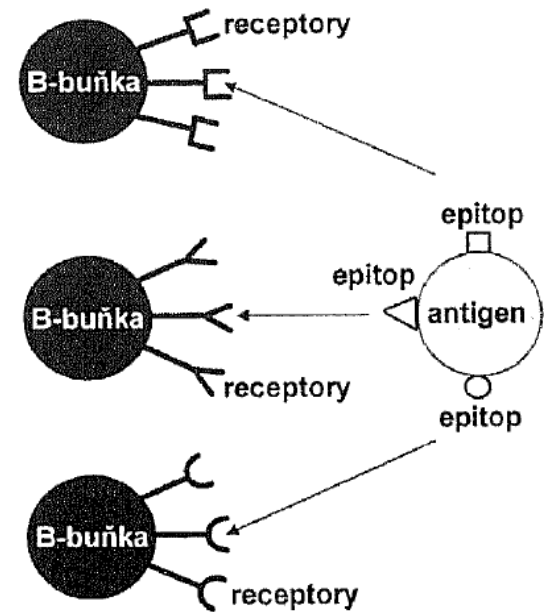


## B-lymfocyty

- prekurzory se tvoří v kostní dřeni u dospělých a játrech fétu
- po dozrání syntetizují jeden typ protilátky
- "virgin" B cell produkuje protilátku (imunoglobulin), která se uchytil v membráně
  
- aby se B-lymfocyt začal dělit potřebuje:
  - kontakt se specifickým antigenem
  - aktivaci od T-helper lymfocytu, který už se s daným antigenem setkal na APC buňce (např. makrofágu)

- Po aktivaci diferencuje B-lymfocyt do efektorové buňky (= **plazmatická buňka**) a **paměťového B-lymfocytu**

- Plazmatická buňka produkuje masivní množství volných protilátek
- volné protilátky označují patogen pro zničení fagocyty a komplementem
- paměťová buňky zůstávají inaktivní během první infekce, ale při druhé infekci se aktivují mnohem rychleji než "virgin" B-lymfocyty
- nejmenší část antigenu schopná reakce s protilátkou nebo receptorem T-lymfocytu se nazývá **antigenní detriminanta** neboli **epitop**

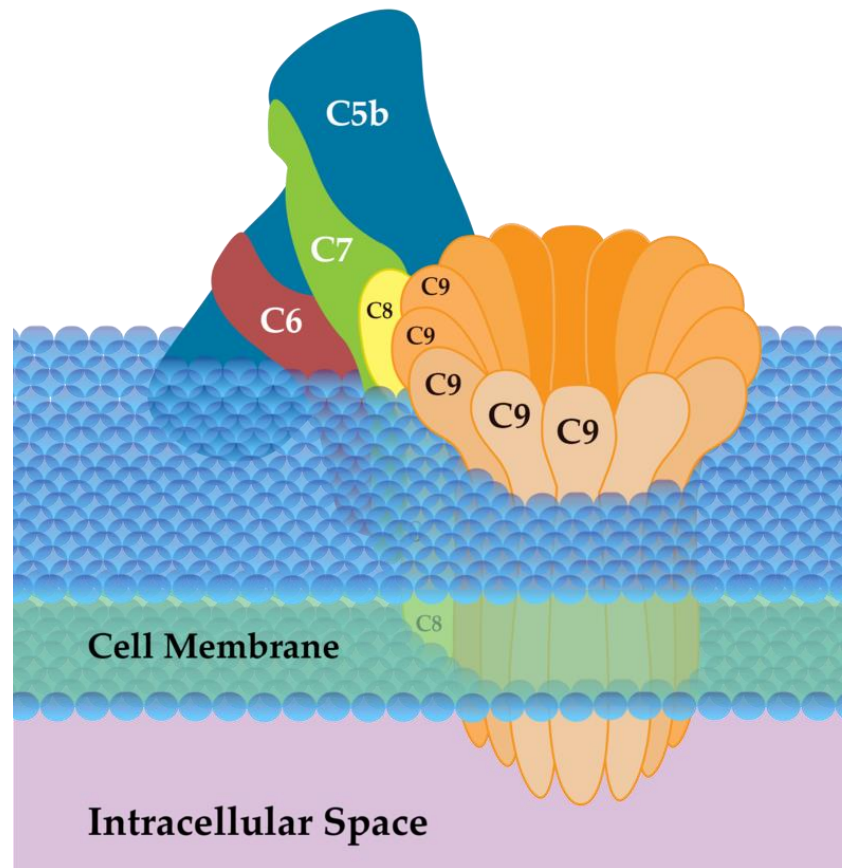


Obr. 320  
Vztah antigenních determinantů k jejich receptorům

## Komplement

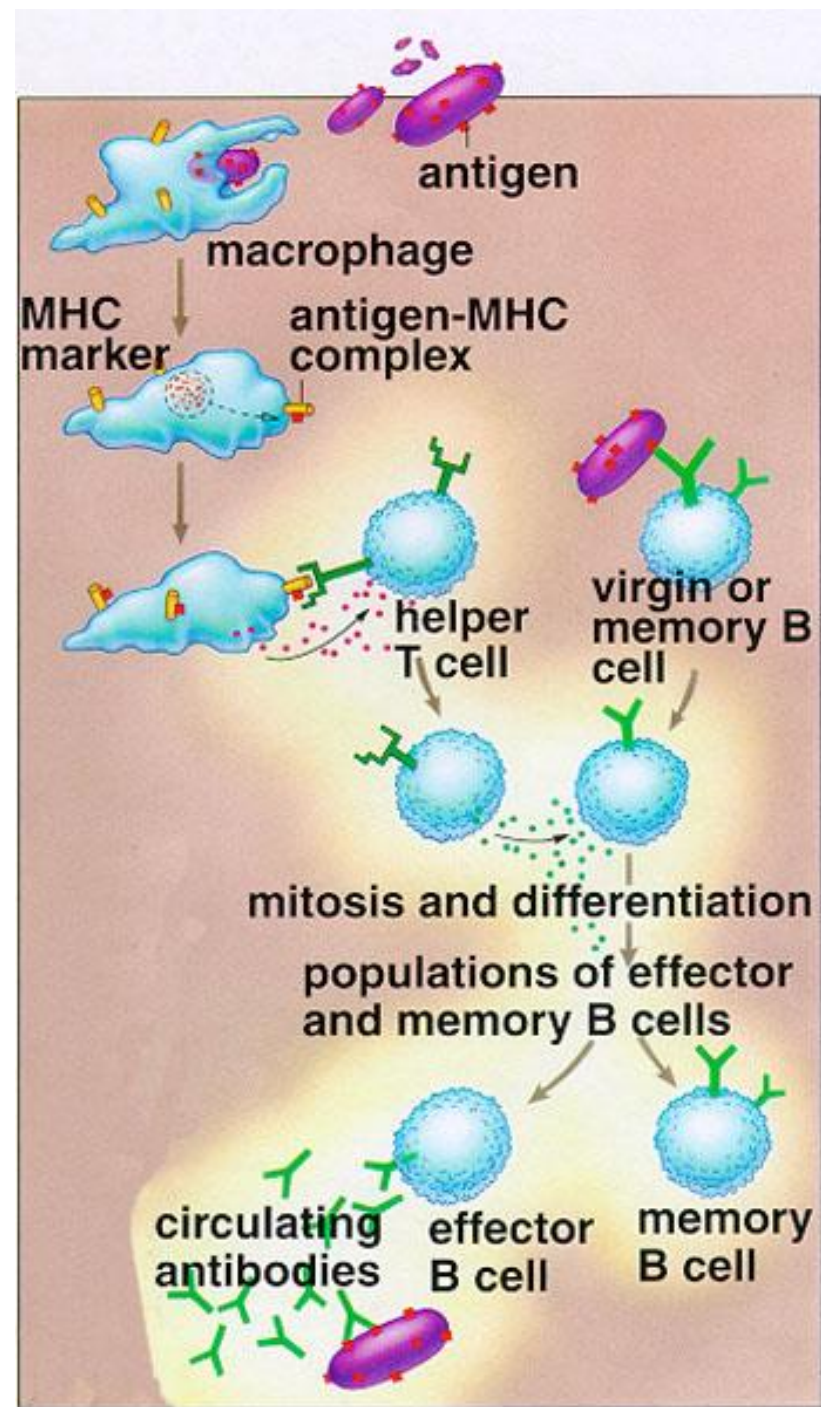
*Imunitní mechanismus zvyšující (doplňující, komplementující) účinnost protilátek*

- nespecifický a neadaptibilní
- soubor malých proteinů, tvořených v játrech a cirkulujících v krvi
- po aktivaci atakuje membrány patogenů, ve kterých způsobuje póry



## Vlastnosti B-lymfocytů

1. Mají v povrchu receptor zachycující volný antigen. Molekula protilátky (imunoglobulin) vázaná na membránu
2. B-lymfocyt se aktivuje k dělení a diferenciaci na plazmatickou buňku teprve po kontaktu s antigenem. Do té doby je v klidu v G0 fázi.
3. Po vazbě antigenu se tento sdružuje s MHC II a je nabízen T<sub>H</sub>-lymfocytům.



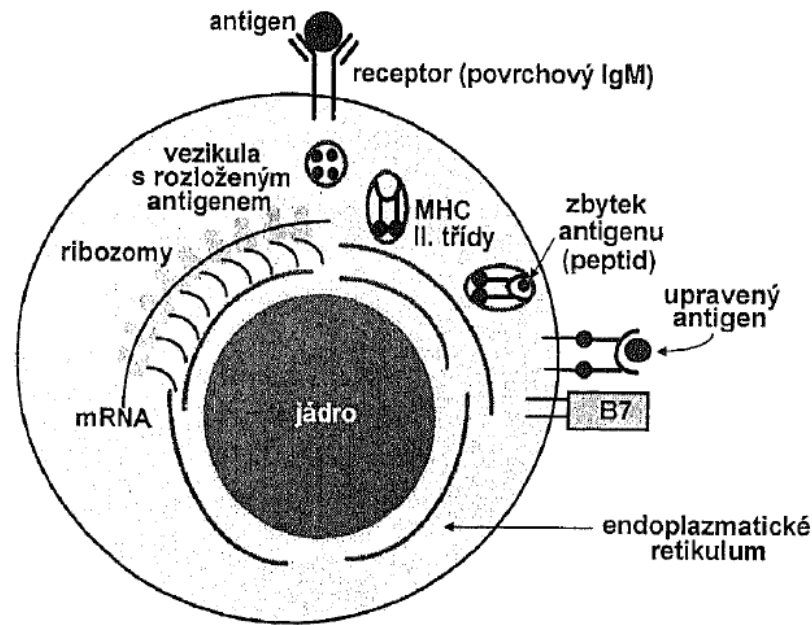
## Antigen-presenting cells (APC; buňky nabízející antigen)

na povrchu vystavují antigen, který je rozeznáván T-lymfocyty

Existují 3+1 typy APC buněk:

### 1. B-lymfocyty

- volný antigen se váže na receptor B-lymfocytu
- endocytozou se antigen dostává do vezikuly, kde se rozkládá na peptidy
- na ribozomech se syntetizují **MHC II-molekuly**, které migrují do vezikuly a spojí se s peptidy
- komplex MHC II+peptid putuje k povrchu buňky, kde se vystavuje **T<sub>H</sub>-lymfocytům**
- B-lymfocyty s antigeny se vyskytují v lymfoidních folikulách lymfatických uzlin



## 2. Makrofágy

- pohlcují bakterie a odbourávají jejich proteiny a vystavují v komplexu s **MHC II**
- vrozená (nespecifická) imunita
- na povrchu receptory pro různé složky mikrobiálních buněk
- rozptýleny po celém těle
  - lymfatické uzliny, plíce, játra, mozek...
  - mohou být i pohyblivé a přecházet mezi tkáněmi (amébovitý pohyb)
- po vazbě **T<sub>H</sub>-lymfocyt** navíc produkuje interferon gamma (INF- $\gamma$ ) a tím se ještě víc aktivuje k pohlcování virů a bakterií
- makrofágy též produkují cytotoxické proteiny

## 3. Dendritické buňky

- komplexy antigenů a MHC I i MHC II
  - aktivují tedy jak **T<sub>H</sub>**- tak i **T<sub>C</sub>-lymfocyty**
- Podle místa výskytu dělíme:

### a) Langerhansovy buňky

- v pokožce a mukózních tkáních
- přijmou antigen a putují do lymfatických uzlin, kde diferencují na dendritické buňky a stimulují T-lymfocyty

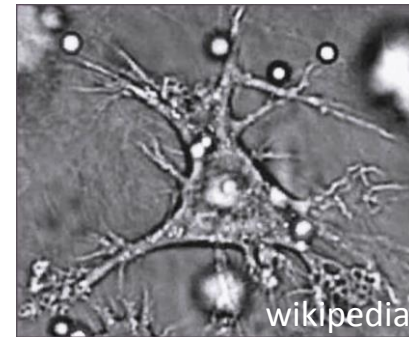
### b) Intersticiální dendritické buňky

- osidlují většinu orgánů (srdce, játra, ledviny...)

### c) Proplétající se dendritické buňky

- v sekundárních lymfoidních orgánech spolu s T-lymfocyty

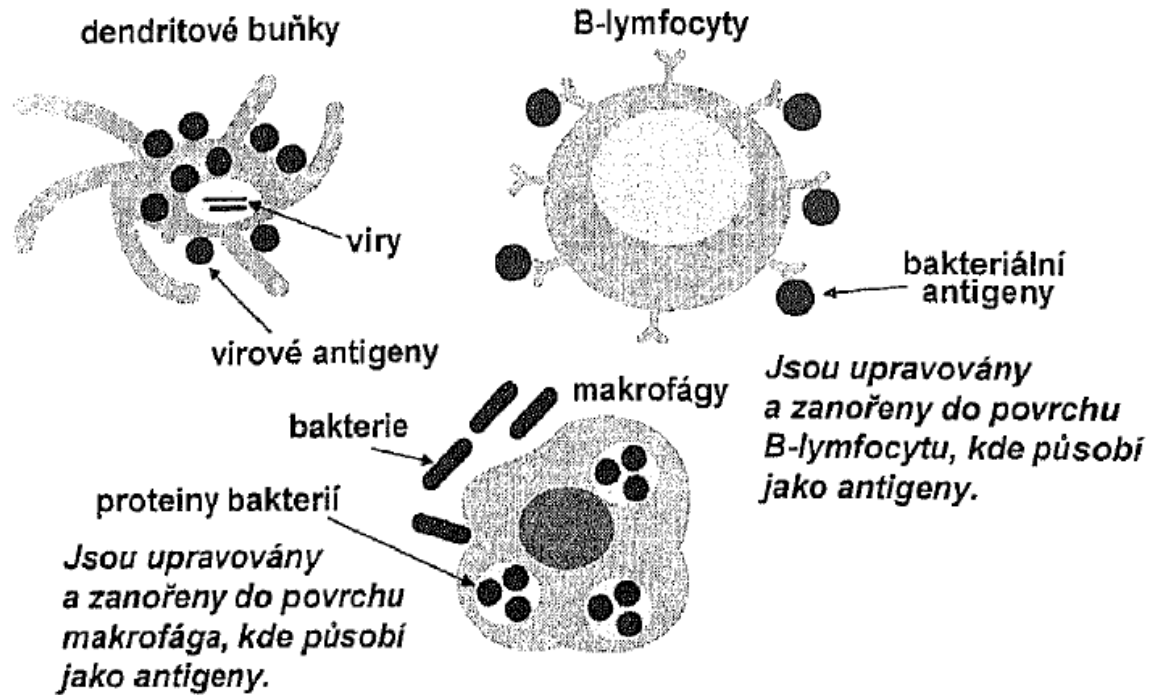
### d) Cirkulující dendritické buňky - v krvi (0,1% krevních leukocytů)



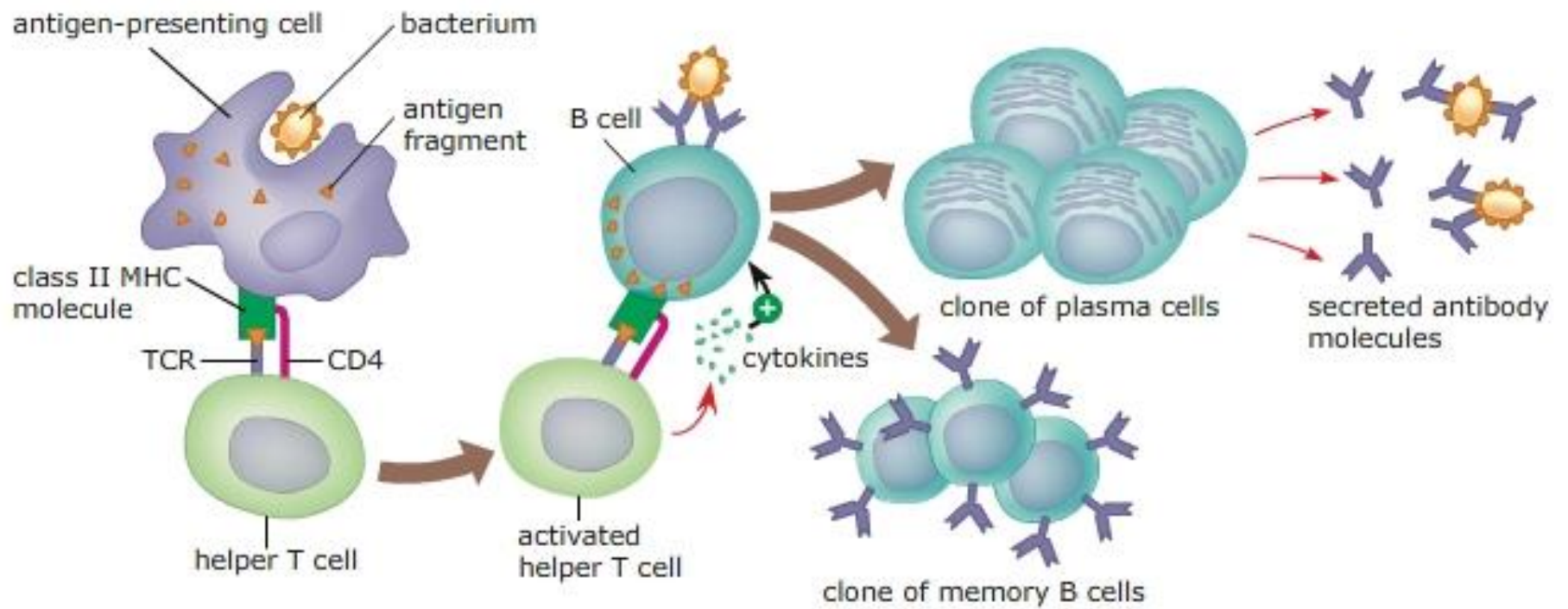


#### (4). Buňky infikované virem

- virus napadne tělní buňku a spustí svou replikaci a transkripci svých proteinů
- virové proteiny mohou být buňkou odbourány a vystaveny na povrchu v komplexu s **MHC I**
- **MHC I + virový antigen** je rozpoznáván **T<sub>C</sub>-lymfocyty** a infikovaná buňka je zničena **apoptozou**



Obr. 322  
Buňky nabízející antigen



From *Biology* by Campbell and Reece © 2008 Pearson Education, Inc.

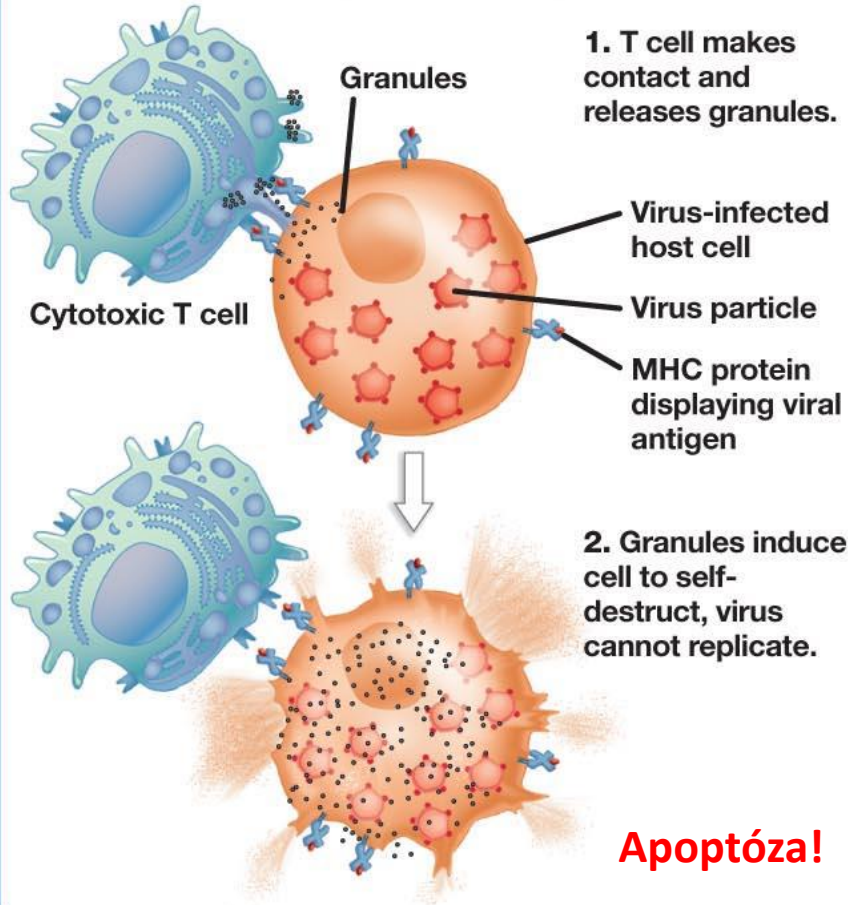


## a) Buněčná imunita

zprostředkovaná T-lymfocyty

- T<sub>C</sub> lymfocyty produkují Fas ligand a perforiny + granzymy → APOPTOZA

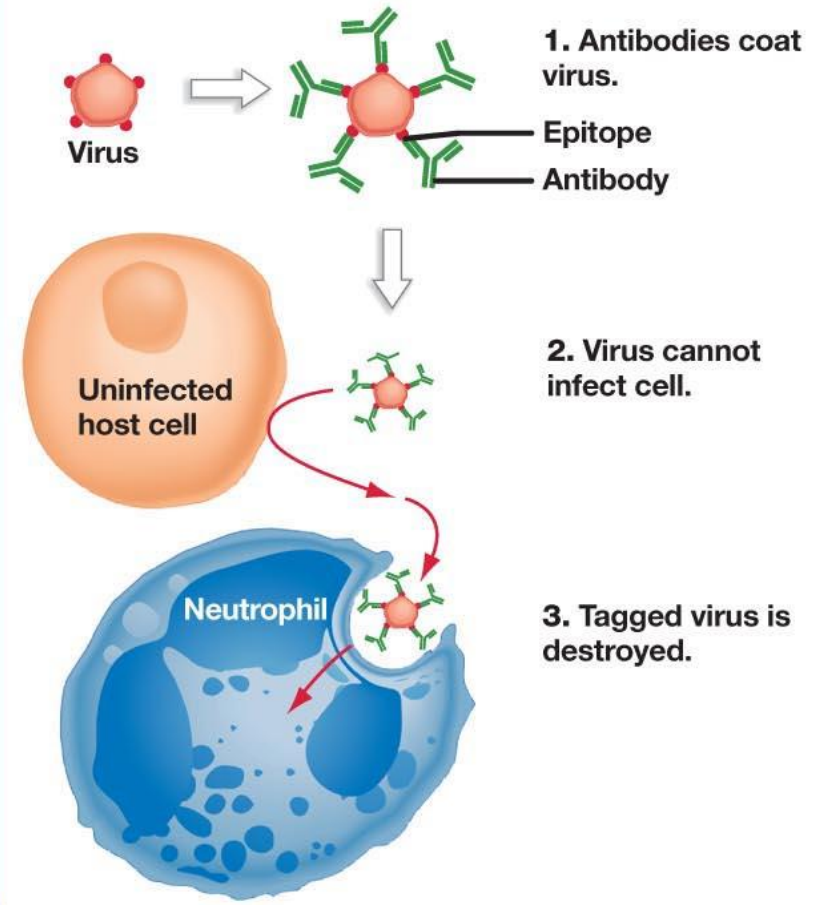
### (a) PROCESS: CELL-MEDIATED RESPONSE



## b) Humorální imunita

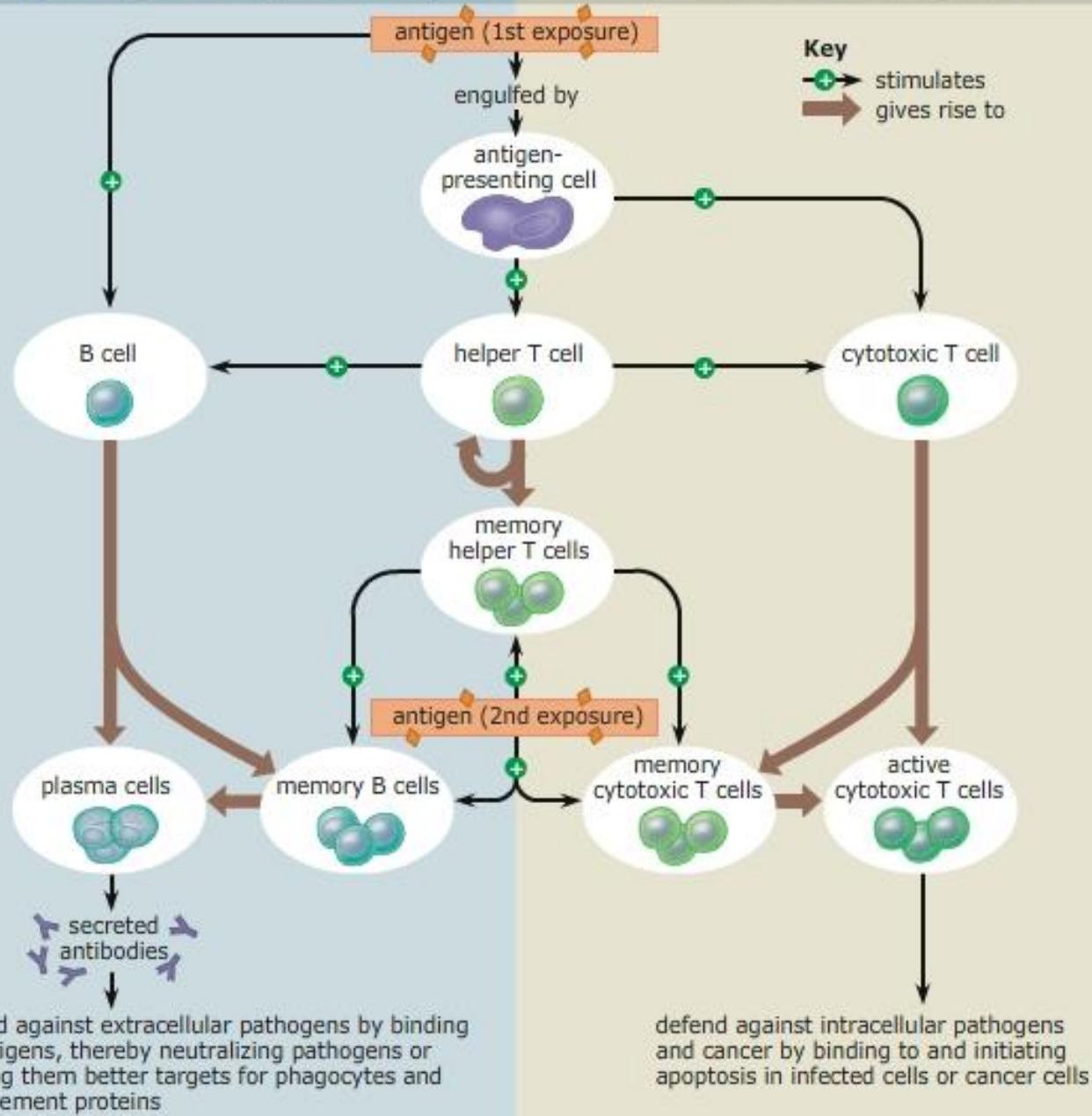
zprostředkovaná specifickými protilátkami  
produkovanými B-lymfocyty do tělních tekutin

### (b) PROCESS: HUMORAL RESPONSE



Humoral (antibody-mediated) immune response

Cell-mediated immune response



# Imunoglobuliny (lidské protilátky)

- vyskytují se vázané na povrchu B-lymfocytů nebo volné
- volné protilátky označují patogen pro zničení fagocyty a komplementem
- obecná struktura protilátek je velmi podobná
- největší rozdíly jsou na špičce Fab regionu (antigen-binding site), která je extrémně variabilní
- to umožňuje existenci milionů jemně odlišných verzí protilátek
- klasifikace protilátek je založena na typu Fc fragmentu (těžkého řetězce)

## Imunoglobulinové třídy:

### 1. IgA (2 typy)

- hlavně na sliznicích (trávicí, dýchací..) a ve slinách, mléku...
- zabraňuje kolonizaci patogeny - vysoká denní produkce

### 2. IgD (1 typ)

- antigenní receptor na B-lymfocytech - BCR (spolu s IgM)
- aktivuje bazofily a mastocyty k produkci antimikrobiálních faktorů

### 3. IgE (1 typ)

- váže se na alergeny
- aktivuje bazofily a mastocyty k produkci histaminu
- chrání před parazitickými červy

### 4. IgG (4 typy)

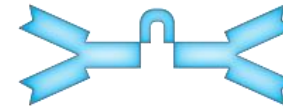
- v krevním séru tvoří až 80% všech imunoglobulinů

### 5. IgM (1 typ)

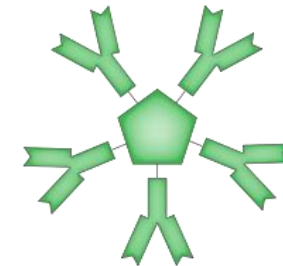
- vázán na membránu B-lymfocytů, kde působí jako receptor pro antigen - BCR
- nejúčinnější ve vazbě virových částic



Monomer  
IgD, IgE, IgG



Dimer  
IgA



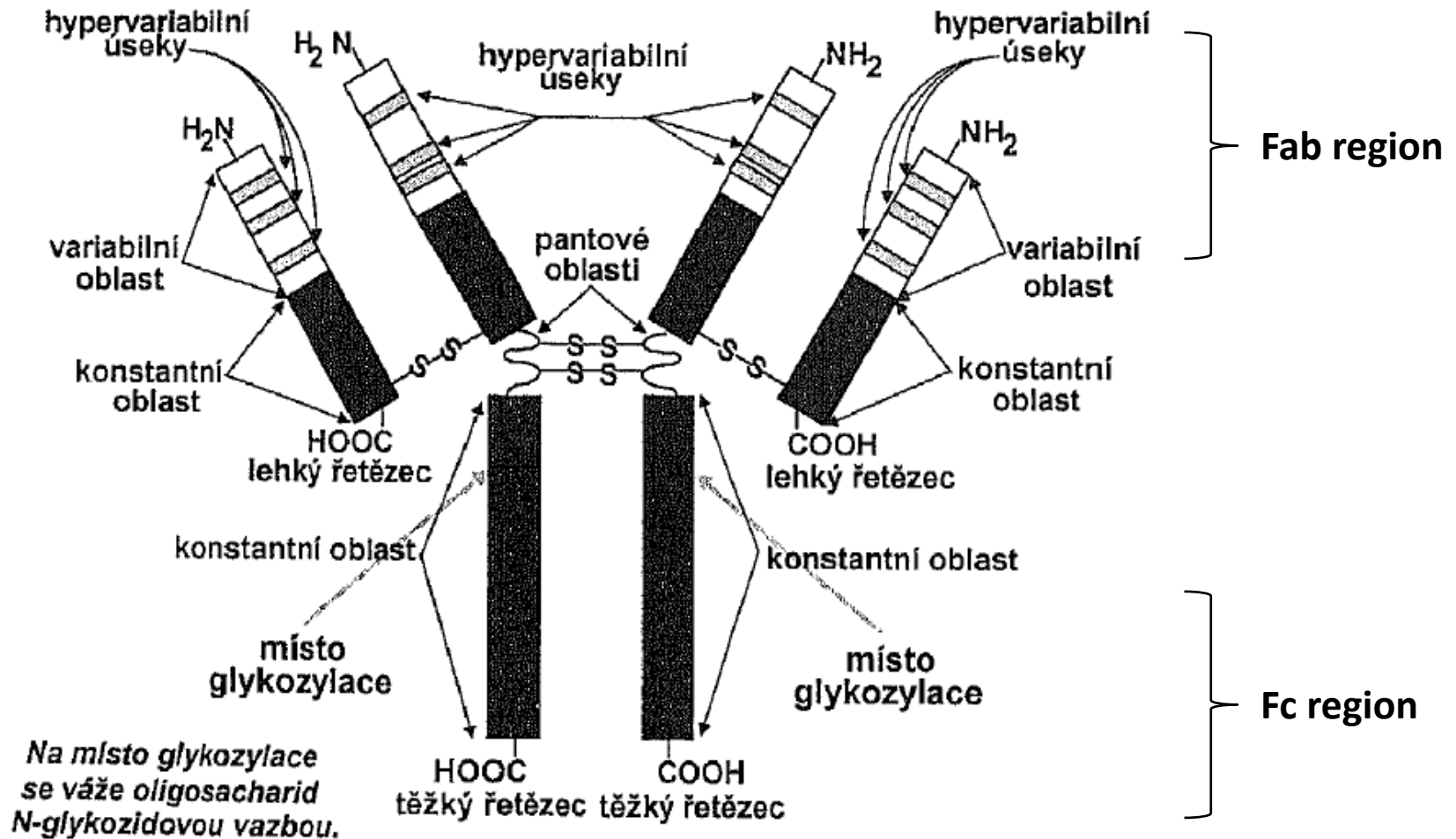
Pentamer  
IgM

# Imunoglobuliny (produkovány B-lymfocyty)

*Protilátky patří do skupiny glykoproteinů, označovaných jako imunoglobuliny*

Molekula imunoglobulinu je složena min. ze 4 polypeptidových řetězců

- 2x těžký (H) řetězec (cca 430 aminokyselin)
- 2x lehký (L) řetězec (cca 214 aminokyselin)



# Imunoglobuliny

## Konstantní oblast (C)

- relativně neměnná sekvence aminokyselin
- C<sub>H</sub> pro těžký a C<sub>L</sub> pro lehký řetězec

## Variabilní oblast (V)

- úsek, v němž se imunoglobuliny příslušného typu liší
- V<sub>H</sub> pro těžký a V<sub>L</sub> pro lehký řetězec

## Hypervariabilní oblasti

- váží antigen
- značně proměnlivá primární struktura

## Pantová (hinge) oblast

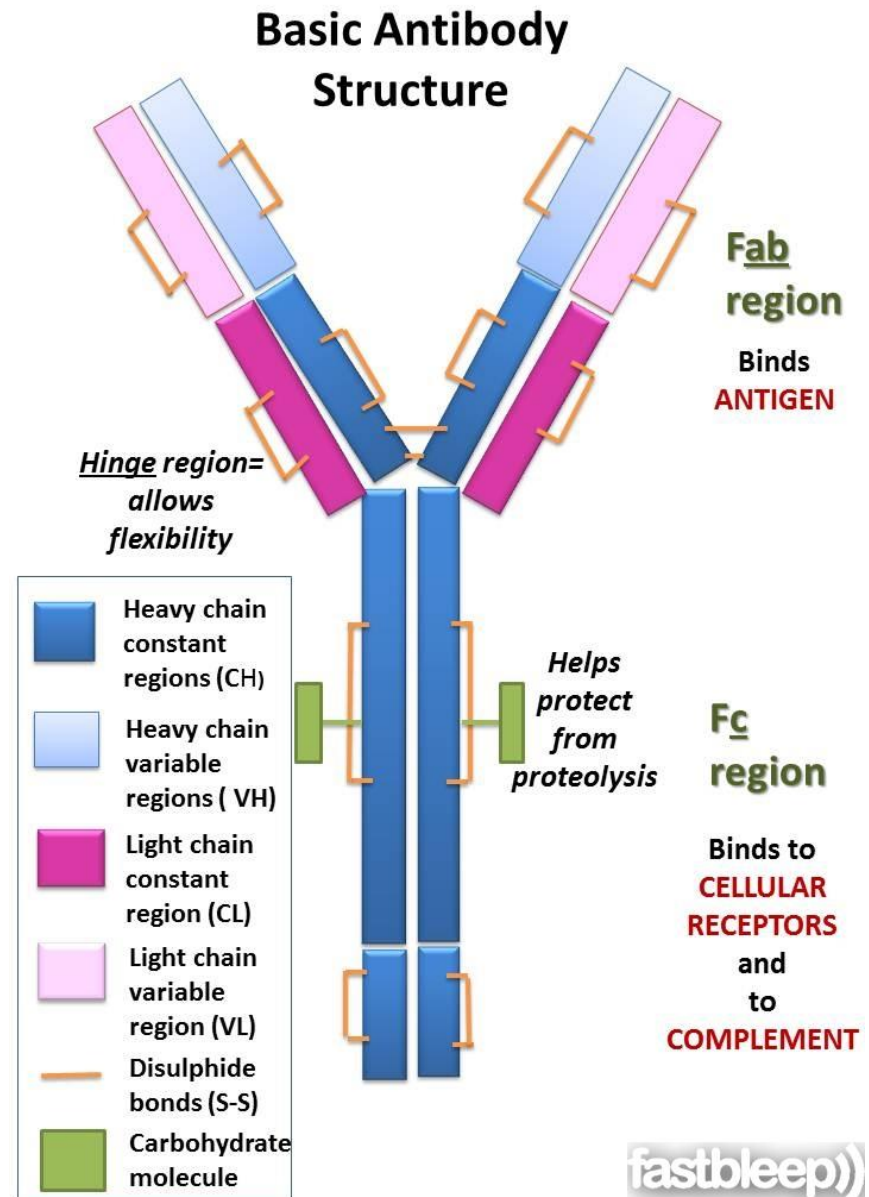
- ohebnost usnadňuje vazbu na antigen

## Glykozylace

- připojení sacharidů N-glykozidovou vazbou
- na různých místech těžkého řetězce
- slouží k ochraně před proteolýzou

## Domény

- lehký řetězec má 2 domény (C a V)
- těžký řetězec má jednu V a tři nebo čtyři C domény



# Klasifikace lehkých a těžkých řetězců

## Lehké řetězce

- 2 typy:  $\kappa$  (kappa) a  $\lambda$  (lambda)

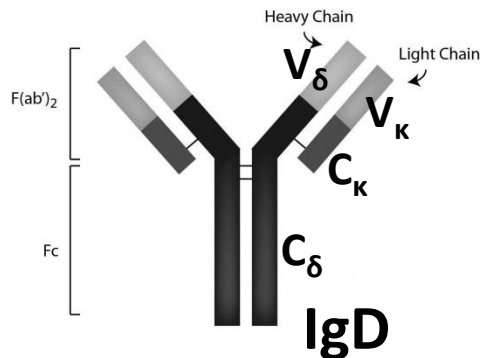
## Těžké řetězce

- 5 typů:  $\gamma$  (gamma),  $\alpha$  (alfa),  $\mu$  (mí),  $\delta$  (delta),  $\epsilon$  (epsilon)  
 - gamma má 4 podtypy a alfa má 2 podtypy

Klasifikace protilátek je založena na typu Fc fragmentu (těžkého řetězce)



indexy lze specifikovat, např. pro IgD:



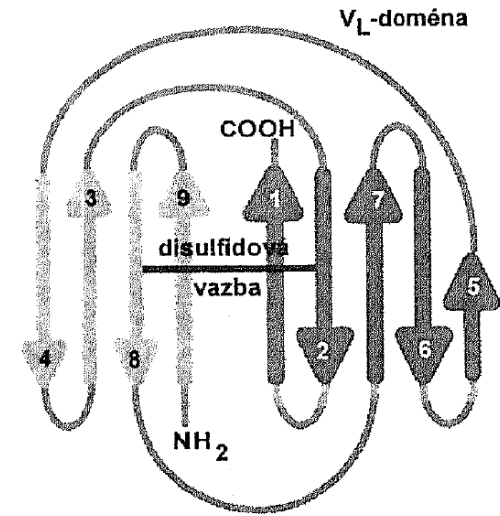
Klasifikace lidských imunoglobulinů

Třída	Podtřída	Lehký řetězec (L)	Těžký řetězec (H)	Celková molekul. hmotnost	Počet lehkých a těžkých řetězců v molekule	
IgG	IgG1	$\kappa$ nebo $\lambda$	$\gamma 1$	146 000	$L_2H_2$	
	IgG2		$\gamma 2$	146 000		
	IgG3		$\gamma 3$	165 000		
	IgG4		$\gamma 4$	146 000		
IgA	IgGA1		$\alpha 1$	160 000	160 000	$L_2H_2$ nebo $(L_2H_2)_2$
	IgGA2		$\alpha 2$			
IgM	IgGM		$\mu$	$\mu$	970 000	$(L_2H_2)_5$
IgD	-		$\delta$	$\delta$	184 000	$L_2H_2$
IgE	-		$\epsilon$	$\epsilon$	188 000	$L_2H_2$

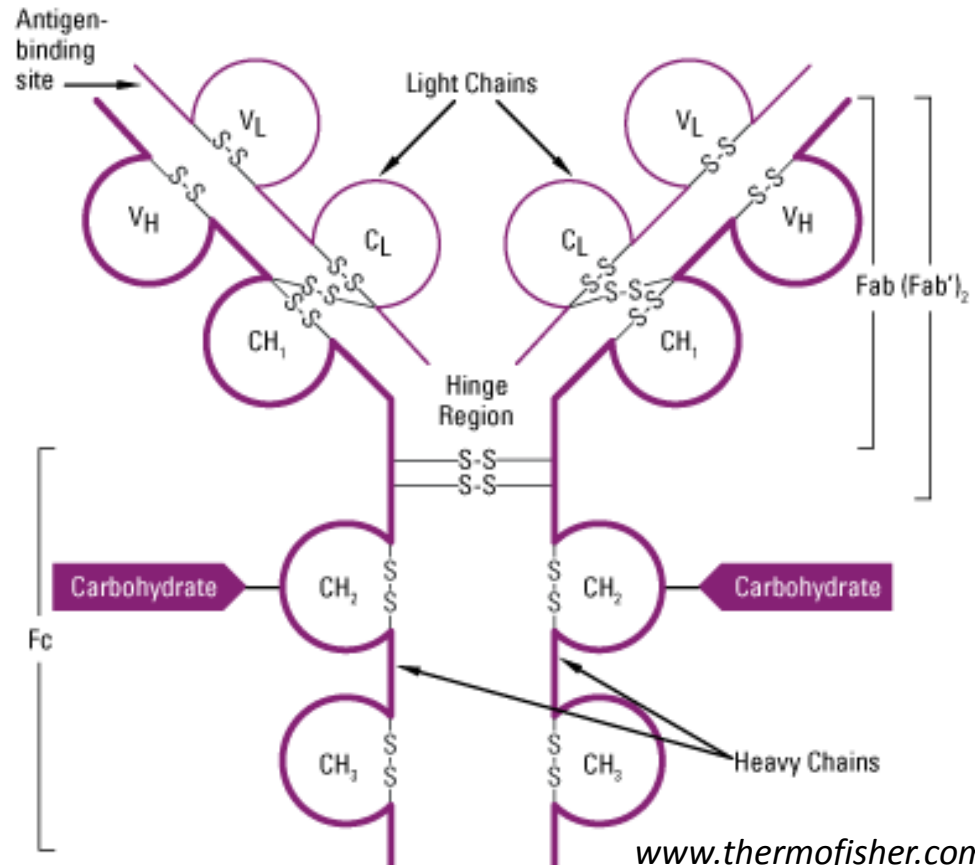
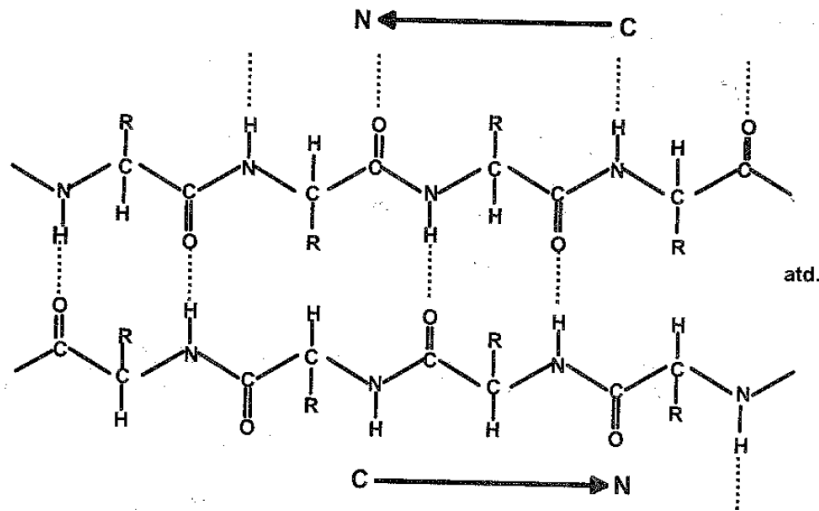


# Imunoglobulinové domény

- skládají se z antiparalelních  $\beta$ -skládaných listů spojených smyčkou
- struktura domény stabilizována vodíkovými vazbami (mezi  $-NH$  a  $-CO$ )
- každá doména je navíc stabilizována disulfidovou vazbou
- antigen se váže na aminokyselinové zbytky (antigen binding site) v hypervariabilních úsecích
- při vazbě antigenu dochází ke změně konformace domény



Antiparalelní uspořádání polypeptidových řetězců v  $\beta$ -skládaném listu.



# Molekulární podstata tvorby protilátek

*dědí se pouze subgeny (genové segmenty) pro tvorbu imunoglobulinů*

## VDJ rekombinace (překupování genových segmentů)

- proces při kterém T a B lymfocyty náhodně sestavují různé genové segmenty
- k VDJ rekombinaci dochází na DNA buněk v průběhu jejich vývoje, před kontaktem s antigenem
- genové segmenty:

(V) ... variable

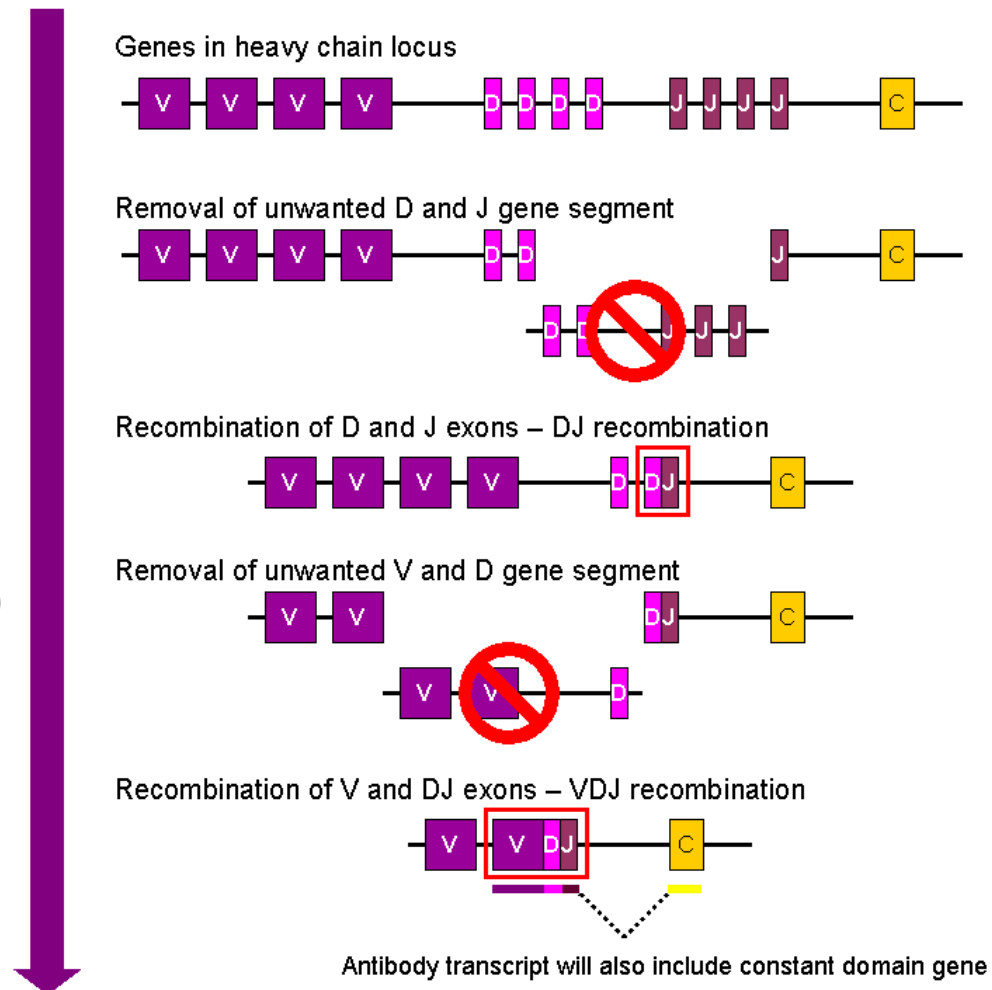
(D) ... diversity

(J) ... joining

**Cíl:** vytvářet jedinečné antigenní receptory, které společně dokáží rozeznat mnoho druhů antigenních molekul

U B-lymfocytů vznikají VDJ rekombinací imunoglobuliny (membránová - BCR - nebo volná forma)

U T-lymfocytů vznikají VDJ rekombinací T-cell receptory (TCR)





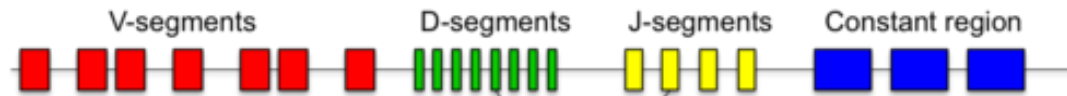
# VDJ rekombinace

## 3 typy genů:

1. pro těžký řetězec: 14. chromosom
2. pro lehký řetězec kappa ( $\kappa$ ): 2. chromosom
3. pro lehký řetězec lambda ( $\lambda$ ): 22. chromosom

- kombinací vzniklých VDJ přesmykem může být u člověka až  $10^{13}$
- u genů pro lehké řetězce kappa a lambda chybí D segment

## Germline configuration:



### (1) D to J recombination



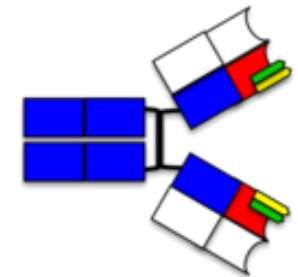
### (2) V to DJ recombination



### (3) Transcription & splicing

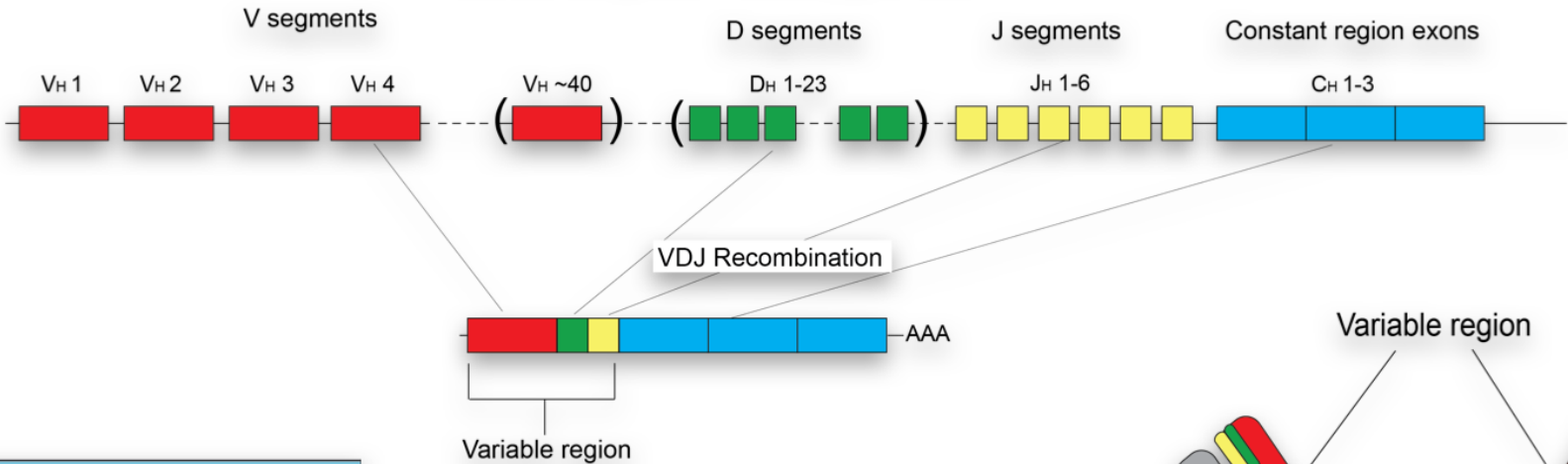


### (4) Translation & assembly

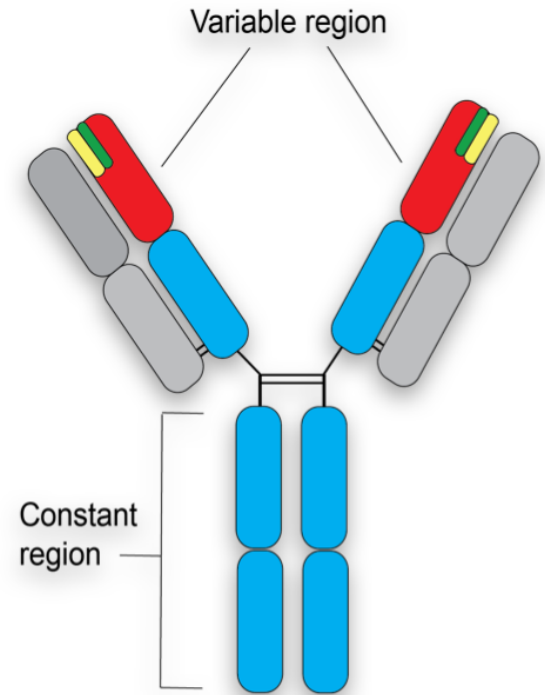
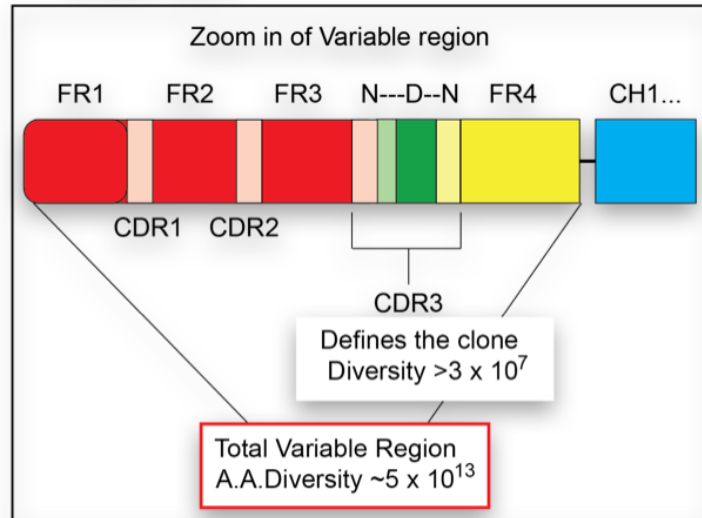


# VDJ recombination

Germline configuration of antibody gene locus



Number of functional gene segments in human immunoglobulin loci			
Segment	Light chains		Heavy chain
	κ	λ	H
Variable (V)	34-38	29-33	38-46
Diversity (D)	0	0	23
Joining (J)	5	4-5	6
Constant (C)	1	4-5	9



# Mechanismus VDJ rekombinace

*probíhá pouze na DNA nezralých lymfocytů*

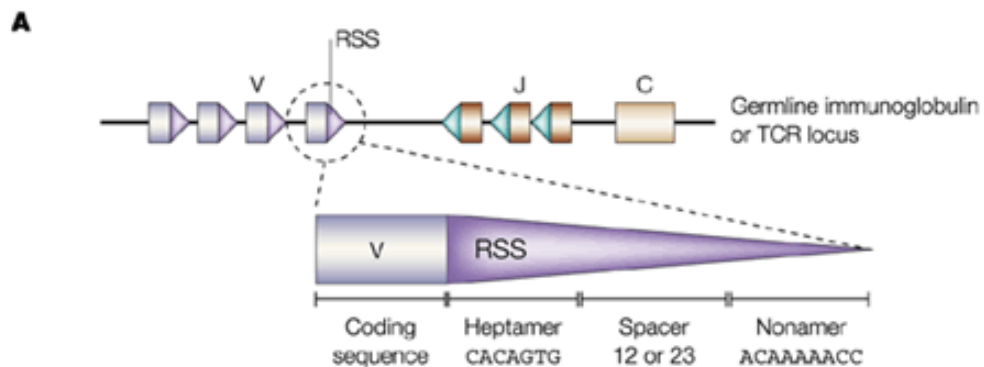
**RSS** (recombination signal sequence)

- označuje místo sestřihu (vazba RAG)

**RAG1/RAG2** (recombination-activating genes)

- enzymy katalyzující rekombinaci

- vazba na RSS

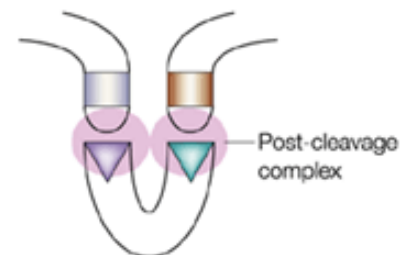


**B**

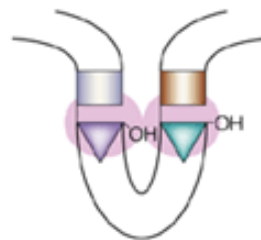
**a** RAG binding and nicking



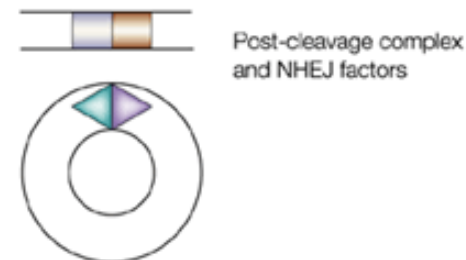
**c** Hairpin formation and cleavage



**b** Synapsis



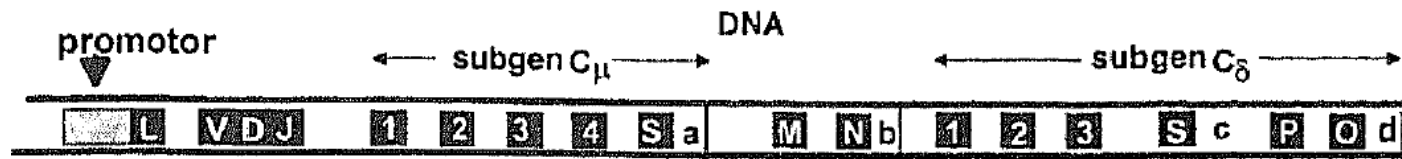
**d** Hairpin opening and joining



# VDJ rekombinace ve vývoji B-lymfocyty



- subgeny  $V_H$ ,  $D$  a  $J_H$  se přeskupují s  $C_\mu$
- v kombinaci s lehkým řetězcem ( $\kappa$  nebo  $\lambda$ ) vzniká povrchový IgM
- stejným způsobem pak vzniká IgD (s  $C_\delta$ )
- oba reagují na stejný (hypotetický) antigen
- obrovské kvanta typů protilátek se tvoří před kontaktem s antigeny
- IgM a IgD se tvoří jako první, protože  $C_\mu$  a  $C_\delta$  následují na DNA hned za VDJ subgeny

	Typ B-lymfocyty	Subgeny H-řetězců	Subgeny L-řetězců
Vývoj nezávislý na antigenu	Kmenová buňka		Přeskupování ještě neprobíhá.
	Raný proB-lymfocyt		Přeskupování D-J.
	Pozdní proB-lymfocyt		Přeskupování V-DJ.
	Velký preB-lymfocyt		VDJ přeskupeno.
	Malý preB-lymfocyt		VDJ přeskupeno.
	Nezralý B-lymfocyt		VDJ přeskupeno. Tvoří se povrchový IgM.
	Zralý B-lymfocyt (panenská B-buňka)		VDJ přeskupeno. Tvoří se povrchový IgM a IgD.
			Vývoj v kostní dřeni



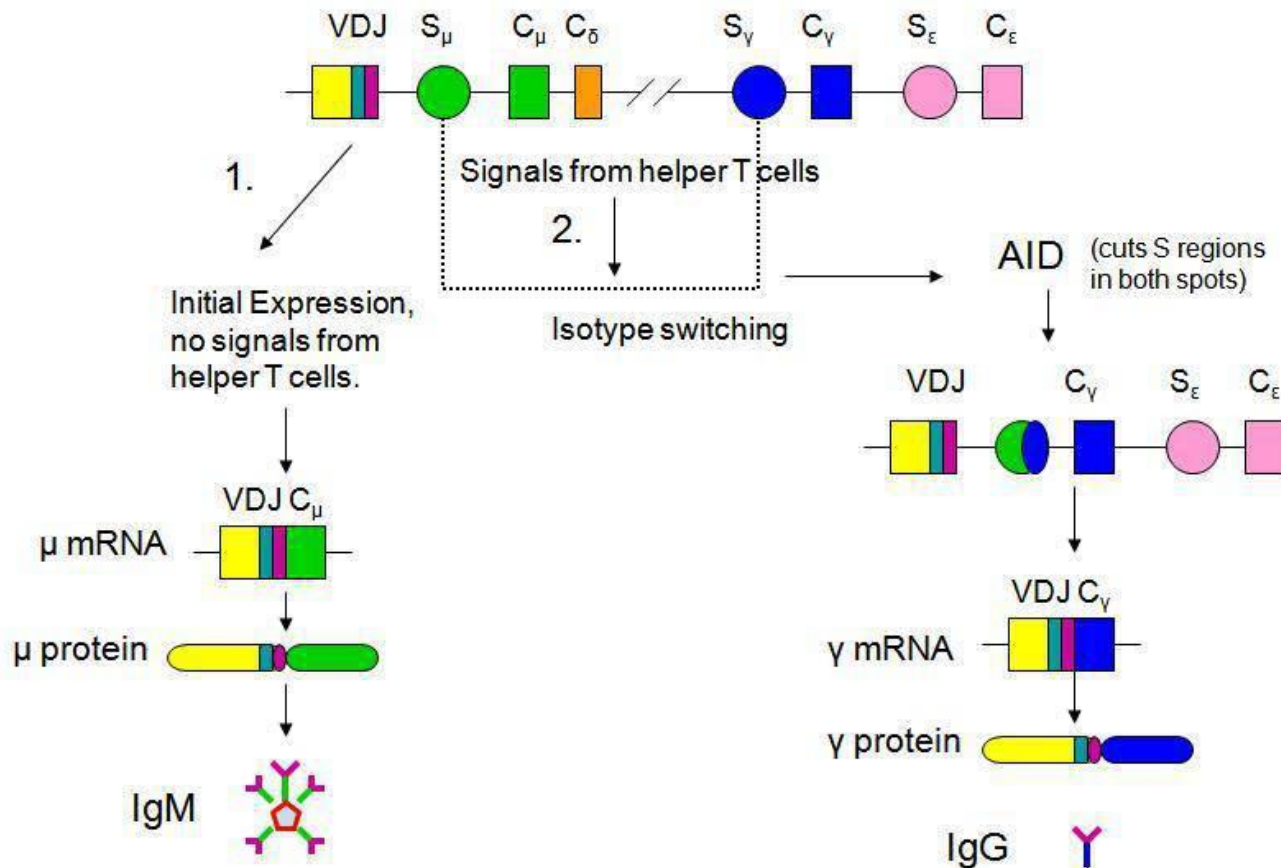
## Přesmyk imunoglobulinových tříd

- po přeskupení subgenů může následovat přesmyk tříd z **IgM** do **IgG, IgE nebo IgA**
- až po stimulaci antigenem v sekundárních lymfoidních orgánech za podpory T<sub>H</sub> lymfocytů

	Typ B-lymfocytu	Subgeny H-řetězcu	Subgeny L-řetězcu		
Vývoj závislý na antigenu	Paměťová B-buňka	IgD IgM 	Přesmyk na C <sub>γ</sub> , C <sub>α</sub> nebo C <sub>ε</sub> Proto se mohou tvořit i receptory tříd IgG, IgA a IgE.	VJ přeskupeno. Somatická hypermutace.	Vývoj v sekundárních lymfoidních orgánech
	Plazmatická buňka	 IgG	Produkuje protilátky tříd IgM, IgD, IgG, IgA nebo IgE.	VJ přeskupeno. Přesmyk a alternativní sestřih vedou k sekretovaným řetězcům δ, γ, α nebo ε.	

# Přesmyk imunoglobulinových tříd

- stejný úsek VDJ<sub>H</sub> se připojí k subgenu C<sub>γ</sub>, C<sub>α</sub> nebo C<sub>ε</sub> za delece C<sub>μ</sub> a C<sub>δ</sub>
- přesmyk tříd je řízen "signály přesmyku - S", regulační oblasti na koncích C-subgenů s výjimkou C<sub>δ</sub>
- na S místa na DNA se váží enzymy katalyzující přesmyk

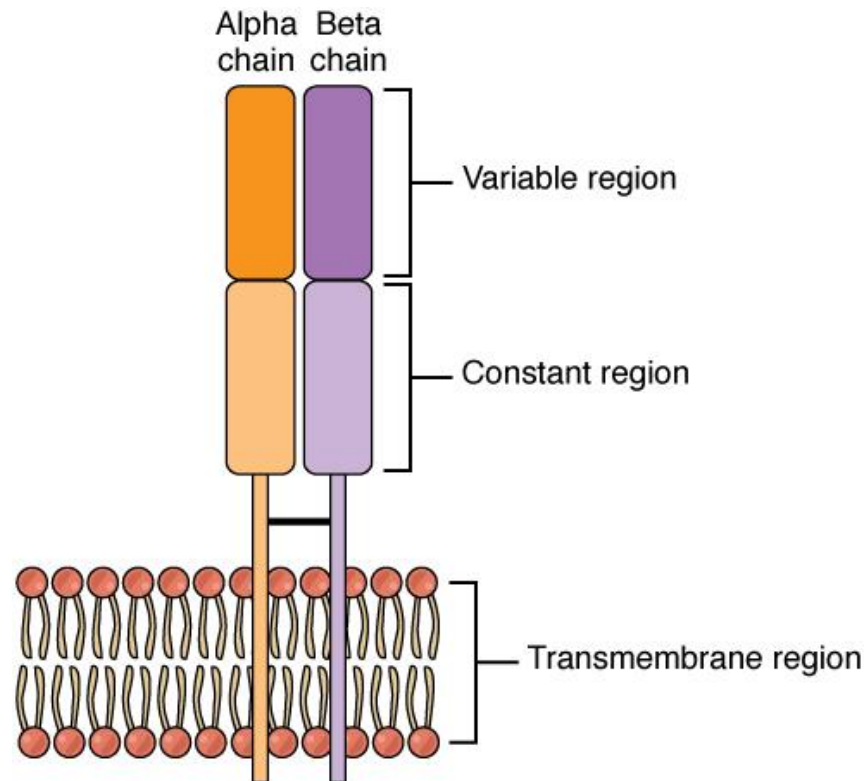


## Receptory T lymfocytů (TCR)

- u člověka má 95% T lymfocytů TCR receptor složený z  $\alpha$  (alfa) a  $\beta$  (beta) řetězce (cca 5% TCR je z řetězců gama a delta -  $\gamma/\delta$ )

- V, D a J segmenty v  $\beta$  řetězcích
- V a J segmenty v  $\alpha$  řetězcích

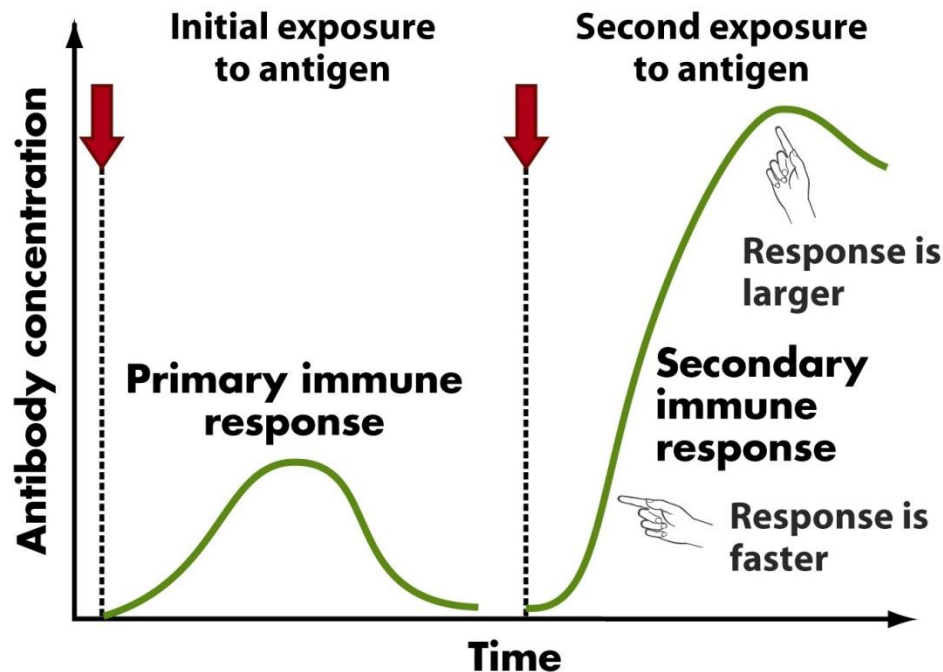
- přeskupování probíhá stejně jako u imunoglobulinů - vznik jedinečných receptorů





## Souhrn imunitní reakce

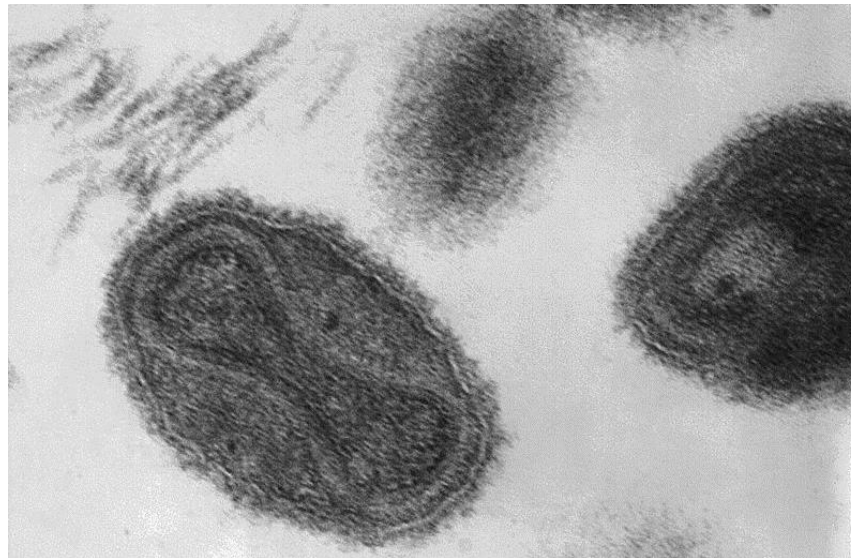
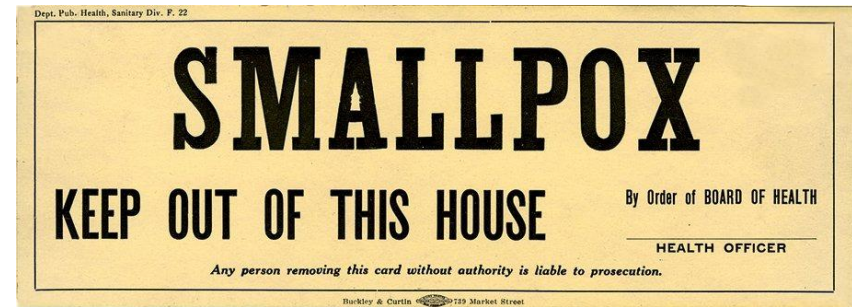
- Plazmatické buňky produkují téměř neomezené množství typů protilátek
  - Každá protilátka je specifická pro svůj antigen
  - imunitní odpověď se zintenzivňuje v průběhu infekce
  - imunitní odpověď se "zapamatuje" - při druhém kontaktu se stejným antigenem člověk neonemocní nebo se rychle zotaví - podstata očkování
- 
- antigeny jsou rozpoznávány receptory na B a T buňkách
  - lymfocyty jsou aktivovány vazbou antigenu na receptor
  - Aktivované lymfocyty jsou klonovány - rychlé buněčné dělení
  - Lymfocyty přetrvávají ve formě paměťových buněk



# Vakcinace (očkování)

## Pravé neštovice (small pox)

- infekční nemoc způsobená virem *Variola major*
- mortalita 30-35%
- u lidí se pravděpodobně objevila 10 000 let před našim letopočtem
- má na svědomí přibližně 300-500 milionů mrtvých v 20. století
- bývala zodpovědná za asi 1/3 oslepnutí
- v roce **1979** ohlásila WHO úplné **vymýcení pravých neštovic** díky celosvětovému programu očkování
- v 80. letech bylo zastaveno rutinní očkování dětí ve všech zemích (70. léta v Evropě a USA)
- jediné známé vzorky viru zůstávají v laboratořích v Atlantě a v Moskvě



Snímek viru z elektronového mikroskopu (wikipedia)

## Vakcinace (očkování)

### Edward Jenner (1749 - 1823)

- doktor z Gloucestershire
- při epidemii pravých neštovic si všiml, že dojičky, které prodělali kravské neštovice ne onemocní
- provedl experiment:
  - odebral vzorek kravské neštovice z pacientky Sarah Nemesové
  - nakazil tímto 8-letého chlapce Jamese Phippse
  - po zotavení nakazil Jamese pravými neštovicemi - ne onemocněl
- očkování nepatentoval, aby mohli být léčeni bohatí i chudí

