

Molekulární biologie

11. Apoptóza a imunita

Osnova

1. Apoptoza
2. Vývoj a aktivace T- 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*

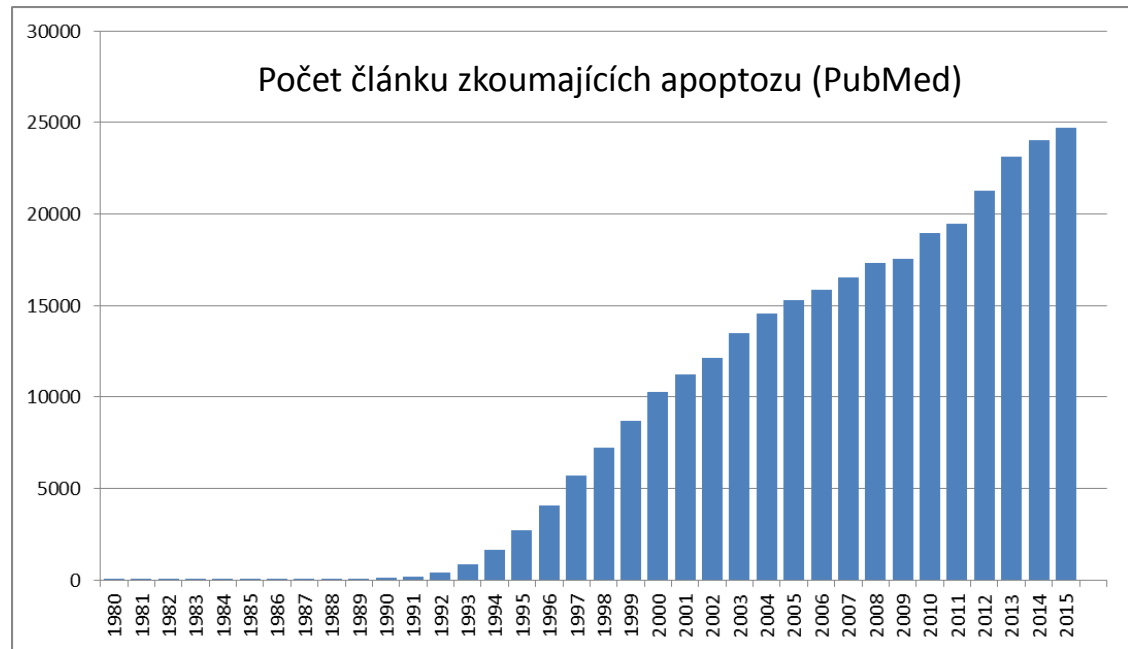
<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>

Apoptóza

programovaná buněčná smrt

Apoptóza

- koncept apoptozy od 1950s
- intenzivně zkoumána od 1990s
- poruchy apoptozy hrají roli v různých nemocech, zejm. rakovině



Excesivní apoptóza
např. dystrofie



Omezená apoptóza
např. rakovina

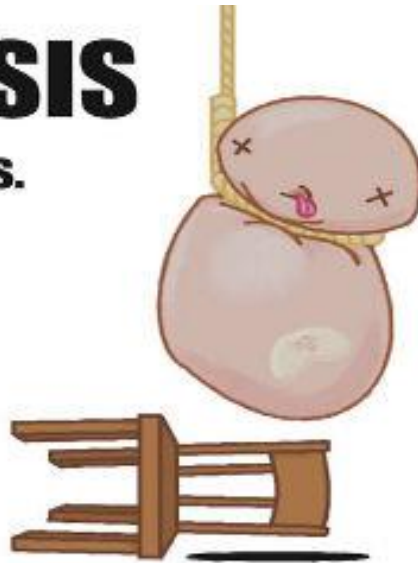
Dystrofie - degenerace tkáně z důvodu nemoci nebo špatné výživy

Apoptóza - buněčná sebevražda

- nezbytná pro vývoj a homeostázi organismu
- pouze u mnohobuněčných organismů
- přísně regulovaný proces (na rozdíl od nekrózy)

- buněčný stres nebo signalizace od jiných buněk stimuluje pro-apoptotické signální dráhy
- tyto dráhy kaskádovitě aktivují proteázy zvané "kaspázy"
- kaspázy způsobují mitochondriální dysfunkci
- apoptotická buňka vykazuje charakteristické změny morfologie

APOPTOSIS
Know the signs.



Buněčný stres/
Signalizace



pro-apoptotické
signální dráhy



Kaspázy

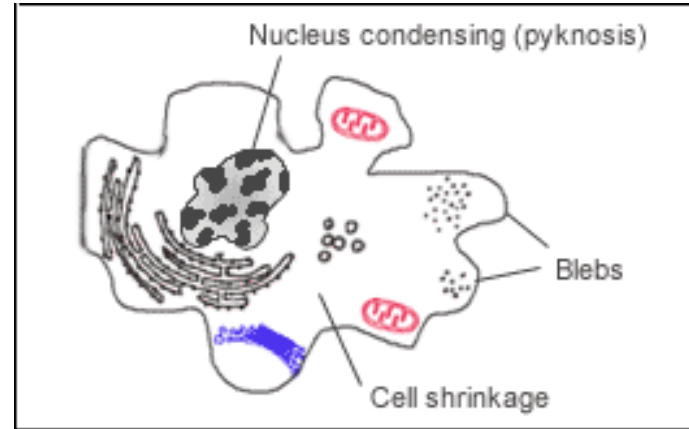


APOPTOZA

Charakteristické morfologické znaky apoptozy

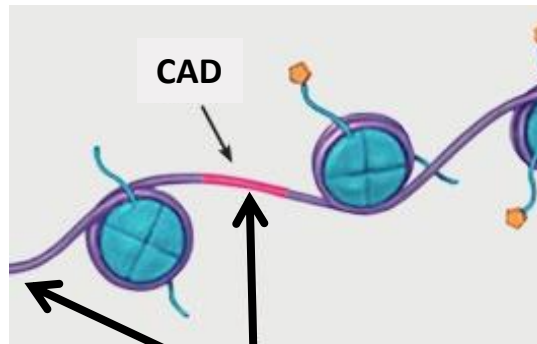
1. Blebbing

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



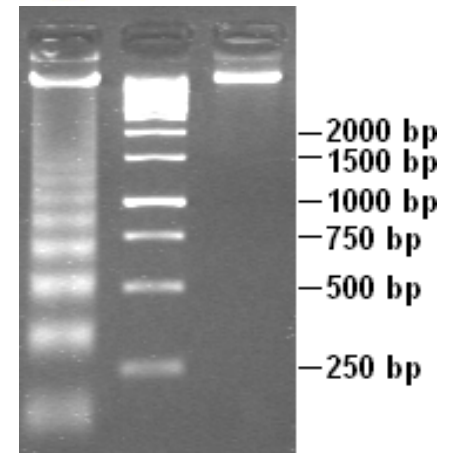
2. Fragmentace jádra

- 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

☹️ žebříček 😊

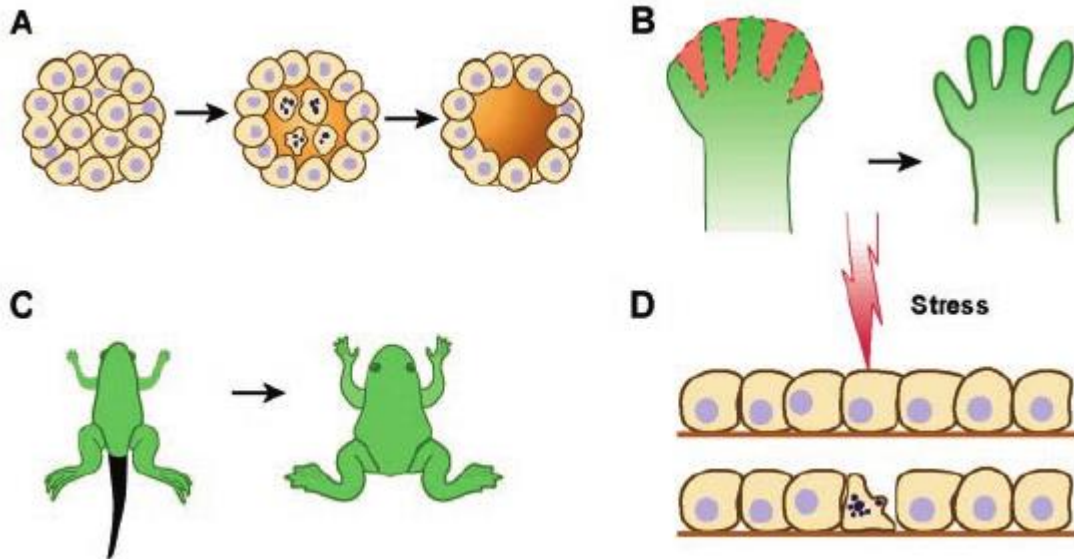


Pyknóza - ireverzibilní kondenzace chromatinu

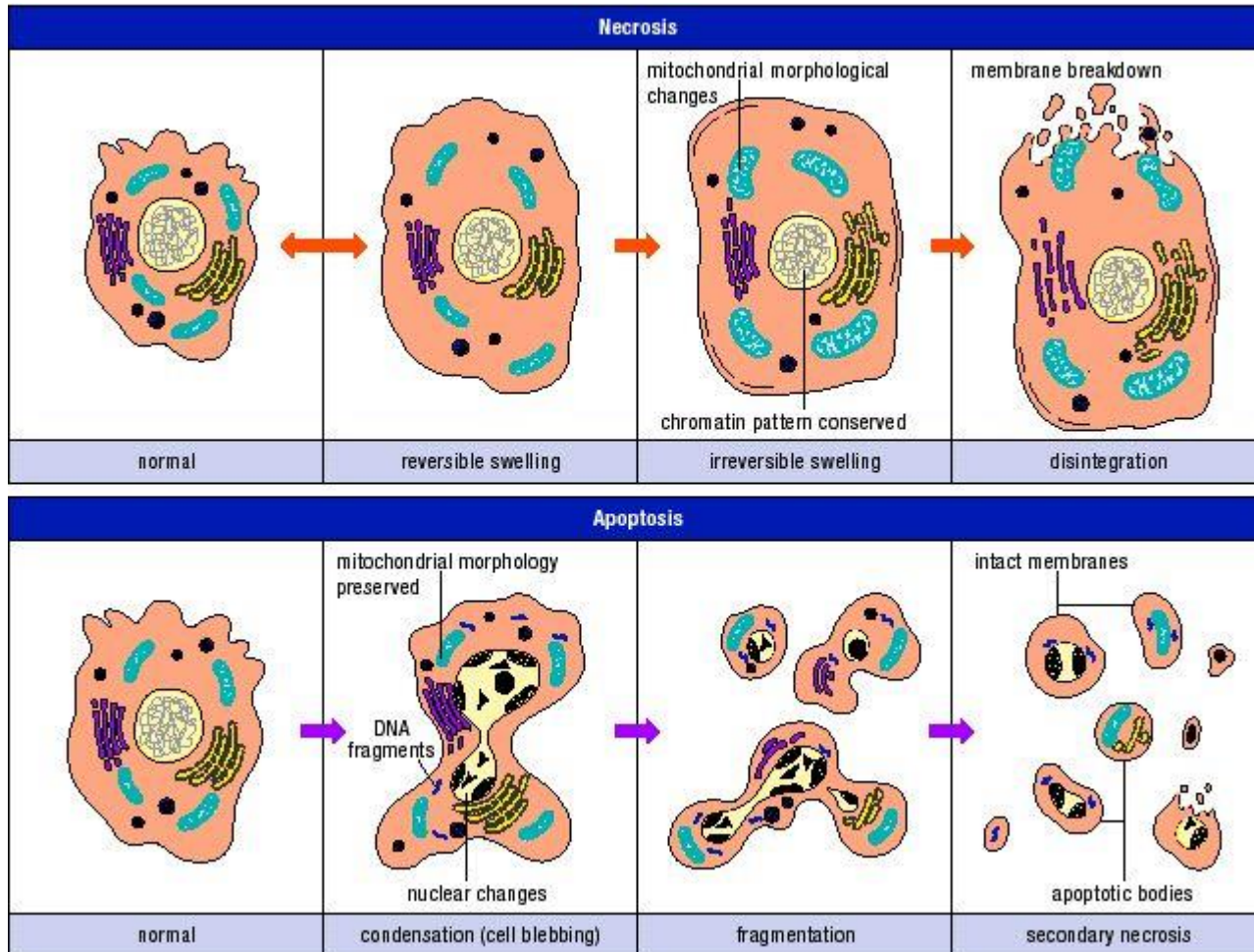
Kdy probíhá apoptóza

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



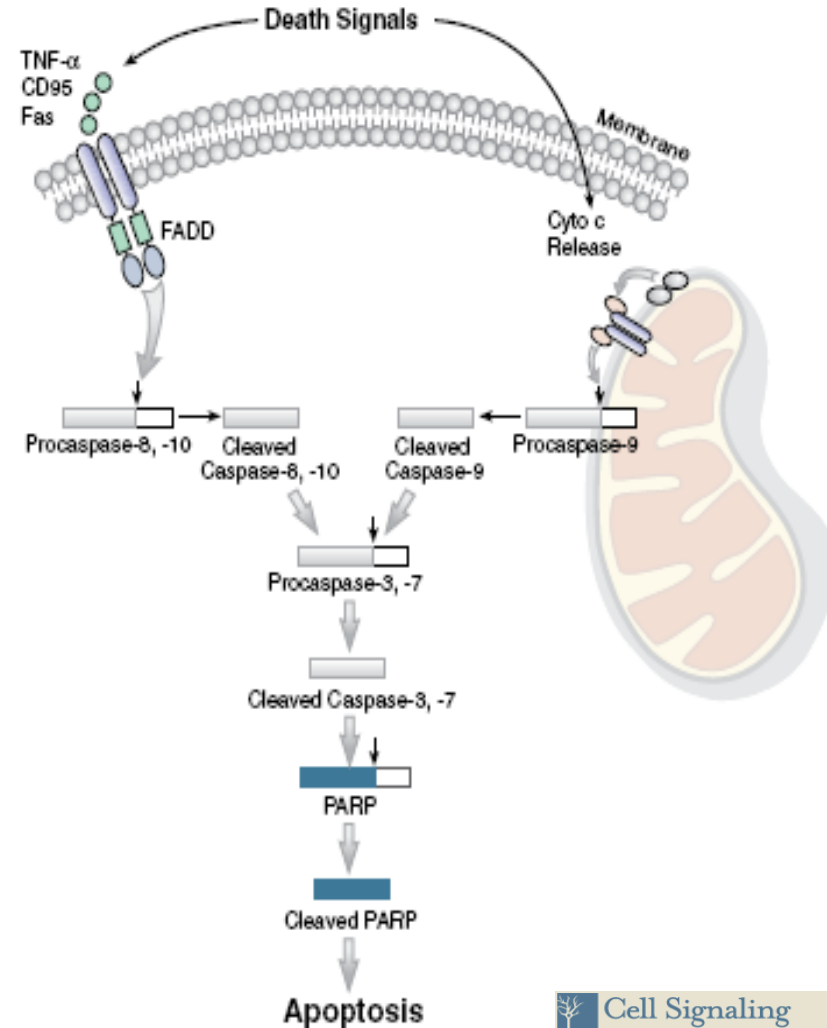
Apoptóza může být indukována dvěma drahami

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- α a Fas) se váží na tzv. death-receptory na povrchu buněk
 - TNF- α produkují aktivované makrofágy
 - Fas ligand produkují T_C lymfocyty



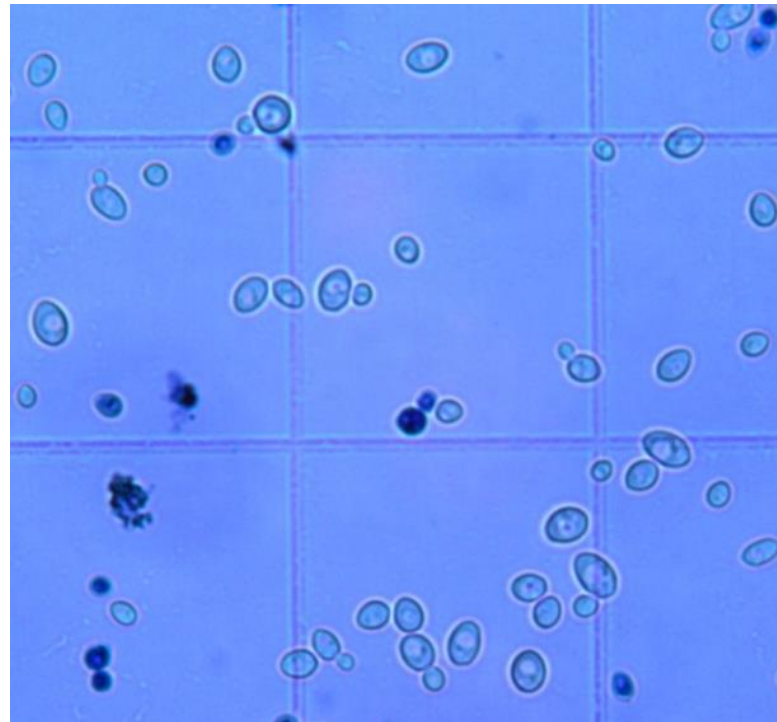
Metody detekce apoptózy

např. při testování léčiv in vitro

	Nic	Lék na leukemii
Zdravé krvinky		
Leukemické krvinky		

1. Barvení buněk trypanovou modří

- proniká a barví pouze mrtvé buňky
- počítání ve světelném mikroskopu na sklíčku s mřížkou
- nerozliší mezi apoptotickou a nekrotickou buňkou

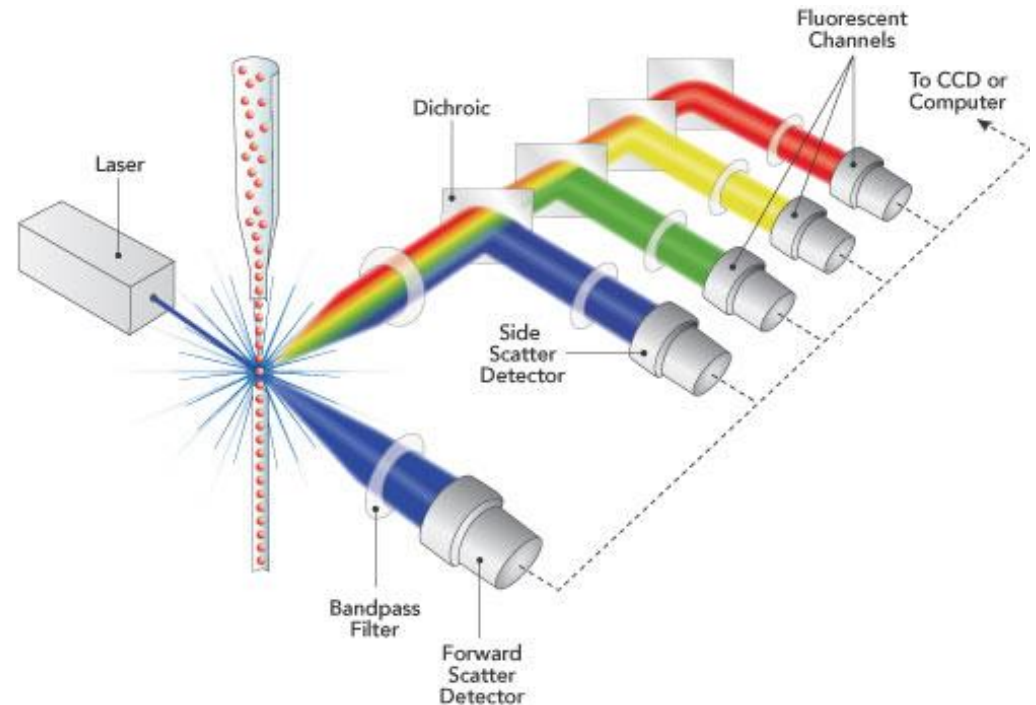
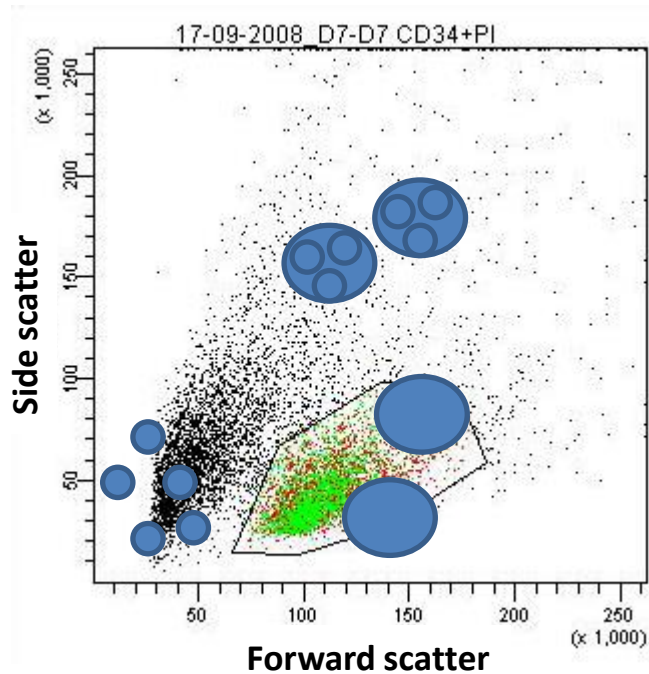


2. Flow cytometrie

Technika pro analýzu velkého množství buněk.

Na buňkách je možné rozlišit

- **velikost** (forward scatter)
- **tvar** (granularitu; side scatter)
- **fluorescenční barvičku** (DNA interkalátor; obdoba trypanové modři)
- expresi **povrchových proteinů** (protilátka proti povrchovým antigenům konjugovaná fluochromem)
- expresi **intracelulárních proteinů** (buňky nutno usmrtit a permeabilizovat membránu)

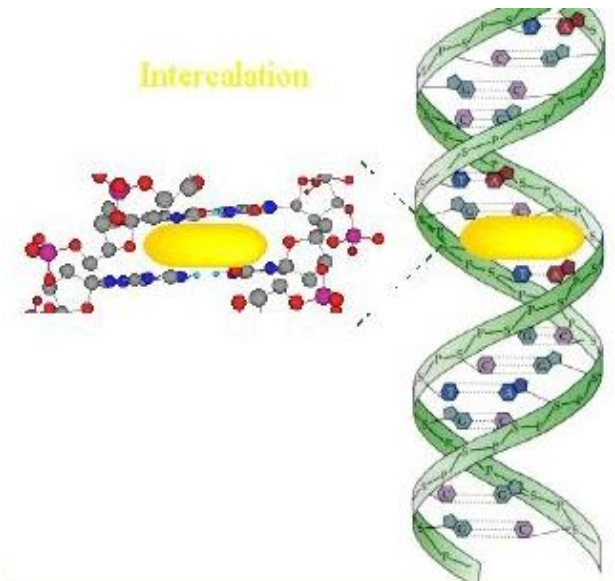
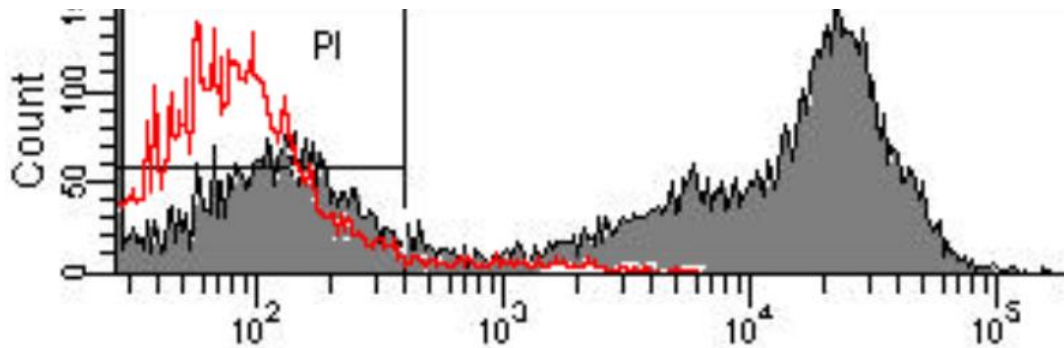


2. Flow cytometrie

Detekce buněčné smrti pomocí DNA interkalátoru (např. propidium jodid; PI)

- PI je fluorescenční barvička, vážící se na DNA
- podobně jako trypanová modř proniká a barví pouze mrtvé buňky

Histogram barvení propidium jodidem

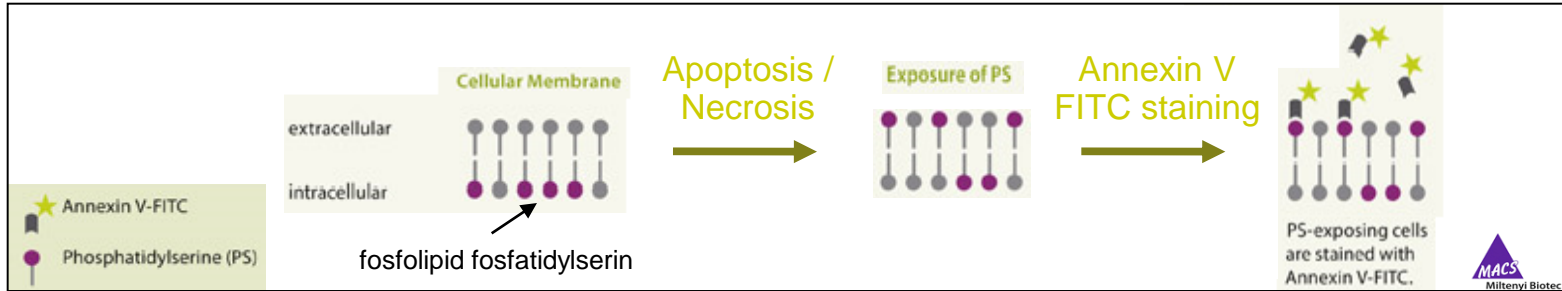


interkalace – vmezeření. I. do DNA – vmezeření určité látky mezi obě vlákna DNA

2. Flow cytometrie

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

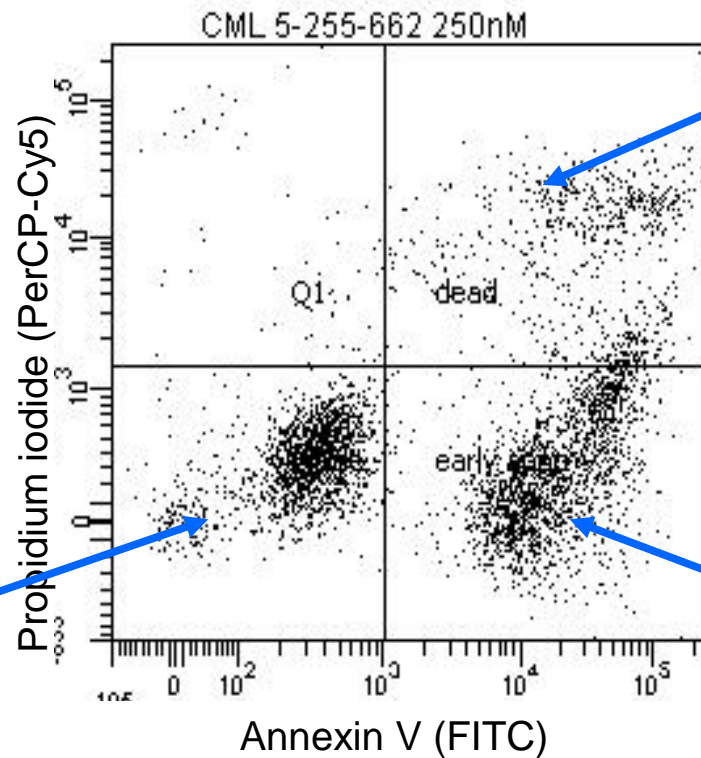
osa y: intenzita fluorescenčního signálu v kanálu PerCP-Cy5 (buňky pozitivní na Propidium jodid)



Annexin+... časná apoptoza

PI+... pozdní apoptoza

Viable cells



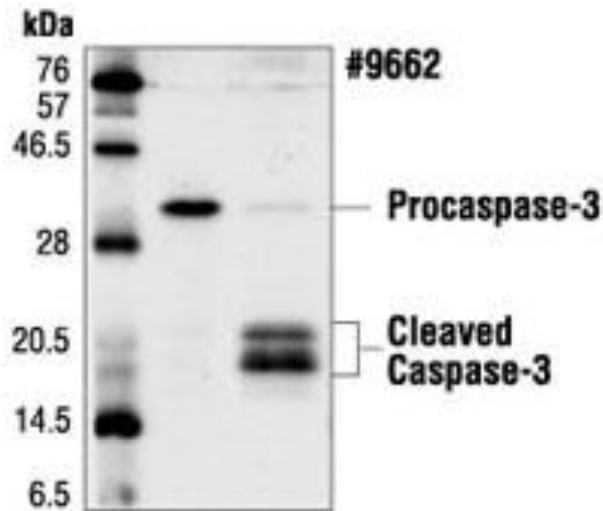
Late apoptotic or necrotic cells

Early apoptotic cells

3. Western blotting

- izolace celkového proteinu z buněk a rozdělení proteinů na polyakrylamidové gelu podle své velikosti.
- inkubace s protilátkou umožní zjistit, 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**
- štěpení (**pro**)kaspázy
- štěpený protein **PARP**



Živé buňky

Apoptotické buňky

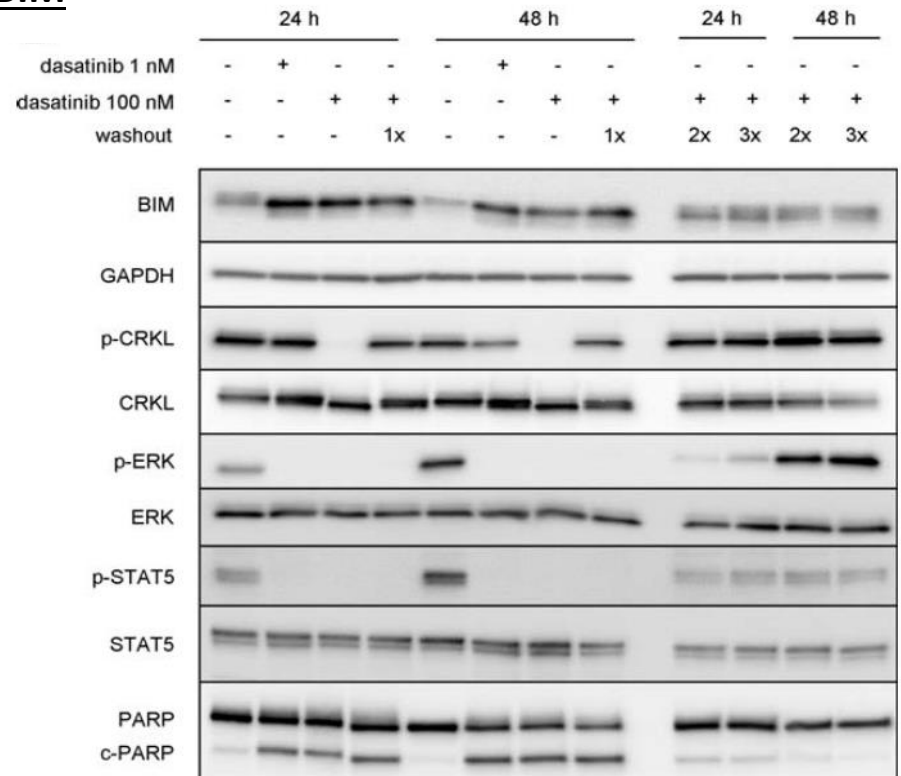


Figure 2. Effect of intermittent high-dose TKI treatment on signaling pathways in the K562 cell line. The cells were exposed to imatinib (A) or dasatinib (B) at a low dose continuously (2.5 μ M imatinib or 1 nM dasatinib), a high dose continuously (32.5 μ M imatinib or 100 nM dasatinib) or a high dose 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.

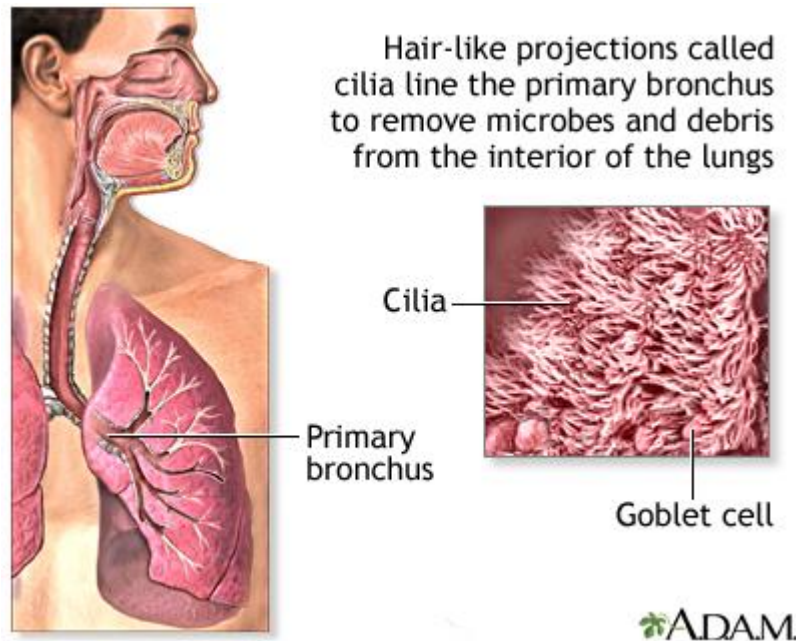
Imunitní systém

Imunitní systém

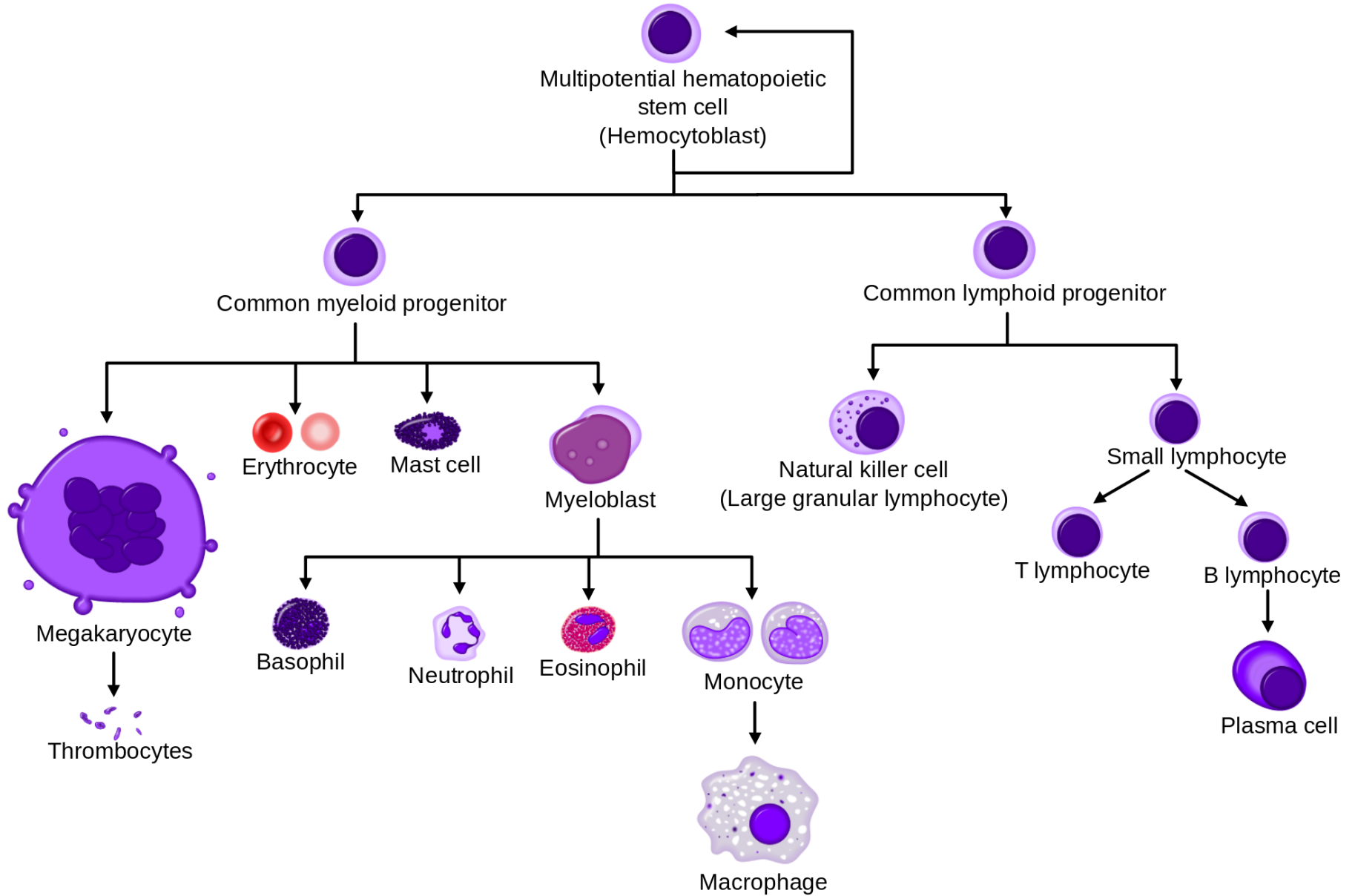
Existuje fyzická, chemická a buněčná obrana proti invazi bakterií a virů

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



Hematopoéza (krvetvorba)



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

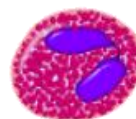
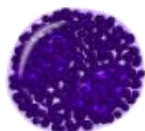
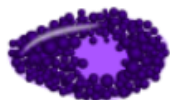
b) **Eosinofil** - vylučuje enzymy, které zabíjí parazitické červy

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



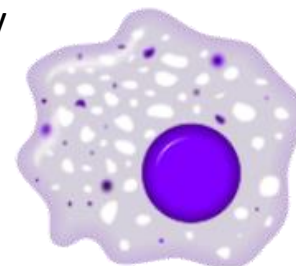
d) **Mastocyt** (mast cell; žírná buňka)

- vylučuje signály pro snížení průtoku krve v místě poranění a histamin
- 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
- v krvi kolují ve formě monocytů



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

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

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 získané po zničení virem infikované či jinak vadné **tělní buňky**
- jsou rozeznávány T_C-lymfocyty, které se aktivují k usmrcení podobných buněk

2. MHC II (druhé třídy)

- vážou peptidové fragmenty z **patogenů** fagocytovaných APC buňkou
- jsou rozeznávány pouze T_H-lymfocyty

Záněť

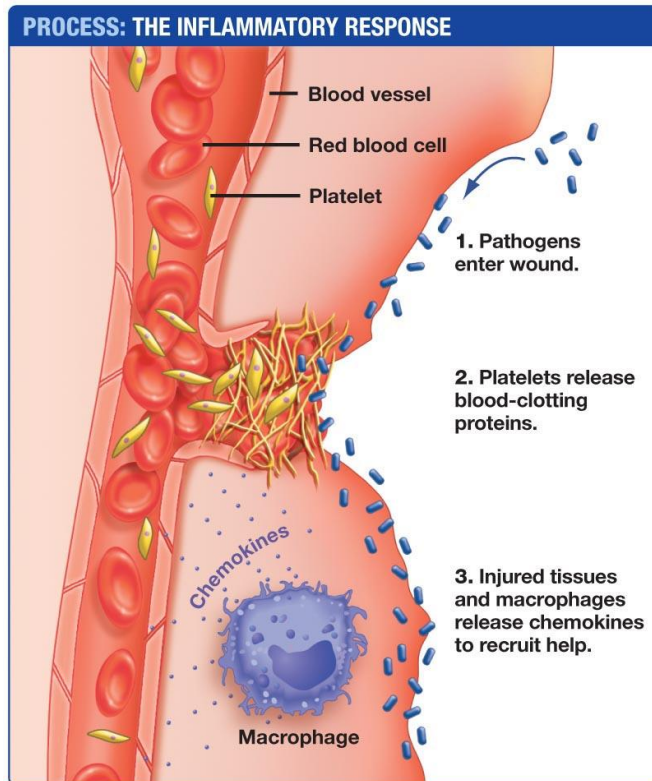
- patogeny vstupují do místa poranění
- **krevní destičky** vylučují srážlivé faktory



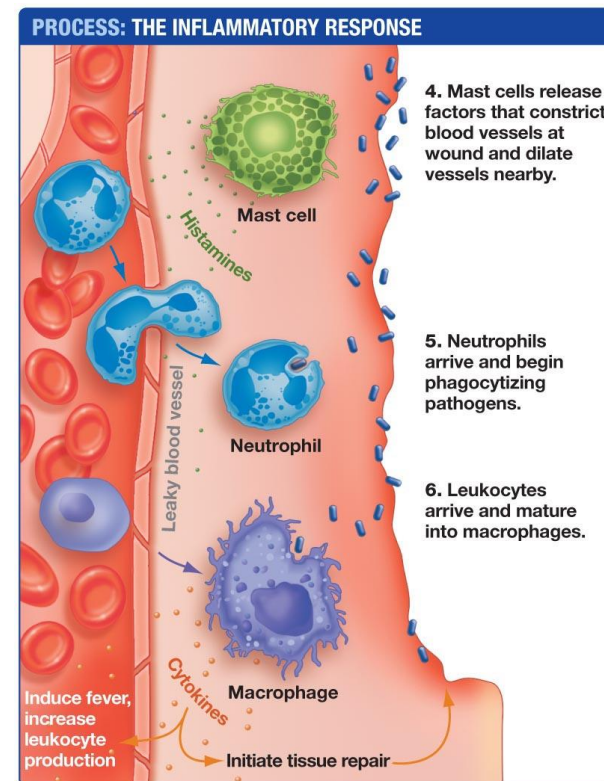
[Video: Záněť](#)

(1) Makrofágy, (2) Neutrofil, (3) Mastocyty

- 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
 - zvýšení teploty



© 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

APC buňky (např. makrofágy) vystavují na povrchu cizí antigeny (Antigen Presenting)

T-lymfocyty jsou tímto informovány o typu patogenu

- **Helper T lymfocyty (T_H)** aktivují jiné buňky

- **Cytotoxické T lymfocyty (T_C)** 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 a očkování

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:

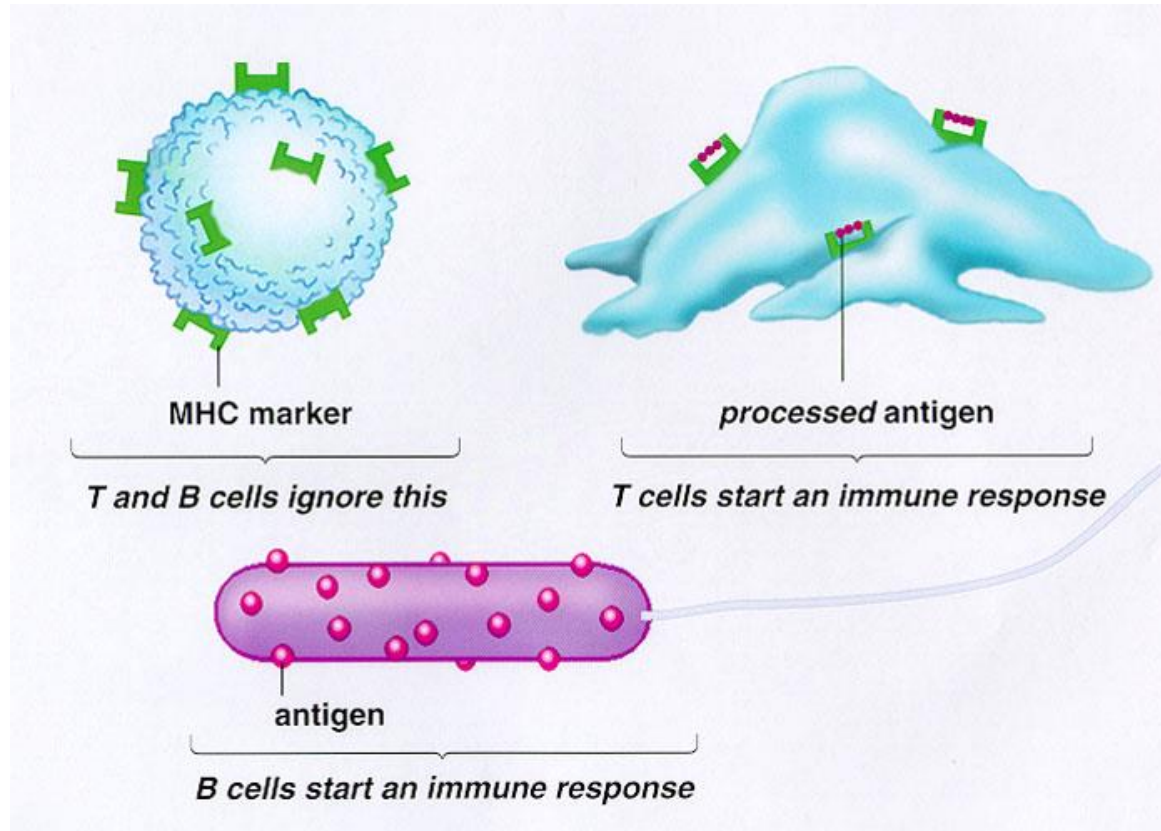
1. Rozeznání specifické cizí částice
2. Opakované buněčné dělení a vytvoření obrovské populace klonů lymfocytů
3. Diferenciace do subpopulací efektorových a paměťových buněk

Imunitní systém

3. linie obrany - specifická imunitní odpověď

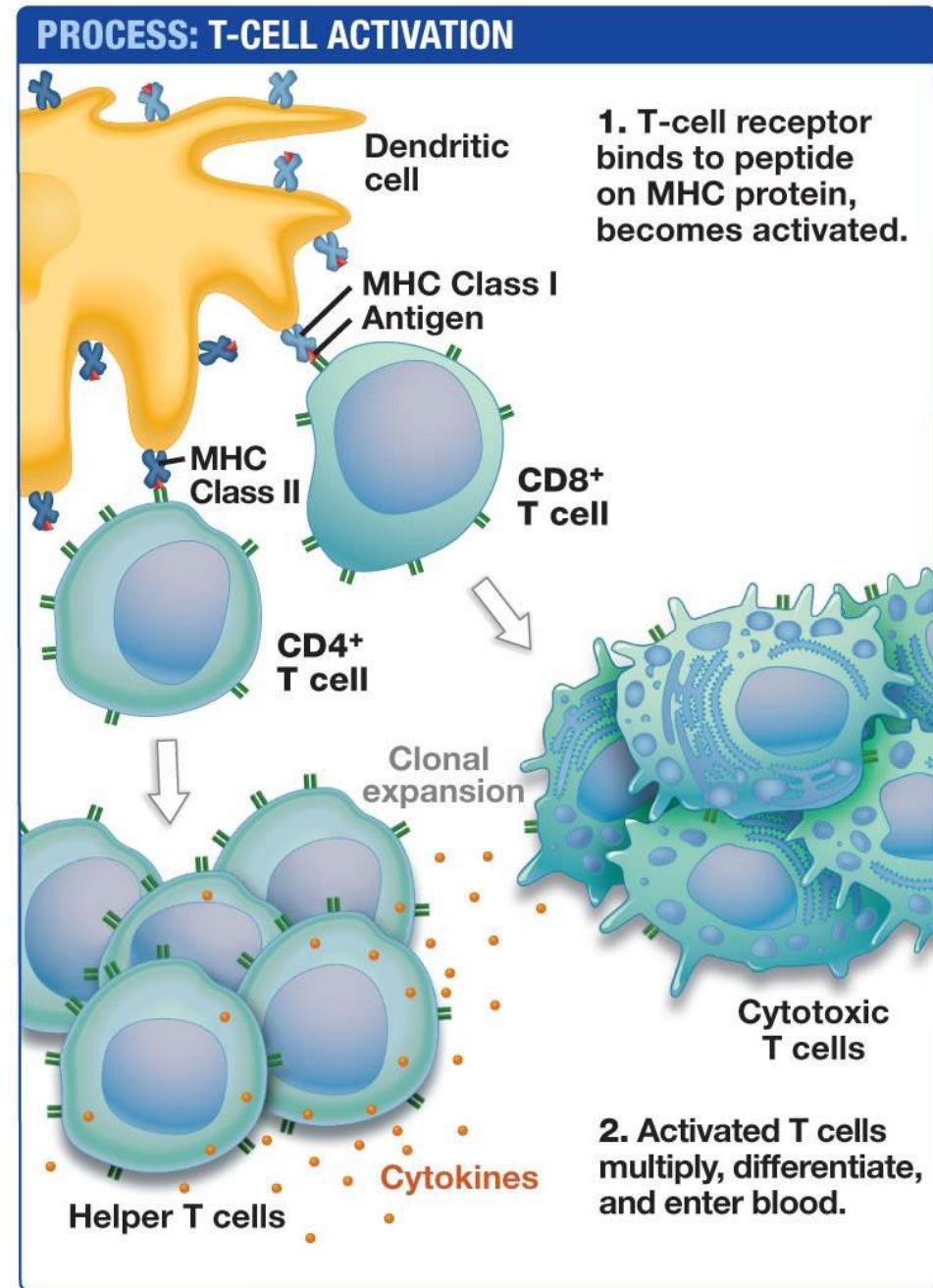
Antigen-prezentující buňka

- známe 3+1 typ APC: **makrofág, B-lymfocyt, dendritická buňka + buňka infikovaná virem**
- vystavují na svém povrchu antigeny
- např. makrofág pohltí bakterii a na svém povrchu vystaví její antigeny
- tyto antigeny jsou ve vazbě s MHC
- antigeny jsou rozeznávány lymfocyty



T-lymfocyty (Thymocytes; T-cells)

- líhnou se v kostní dřeni
- putují nezralé do brzlíku (thymus) kde diferencují a zrají
- v procesu zrání získávají markery CD4 (T-helper cells T_H) a CD8 (Cytotoxic T-cell T_C) a antigeně 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 buněk
- na povrchu mají protein CD4, který se váže na MHC II molekuly

-T_H-lymfocyty dělíme na

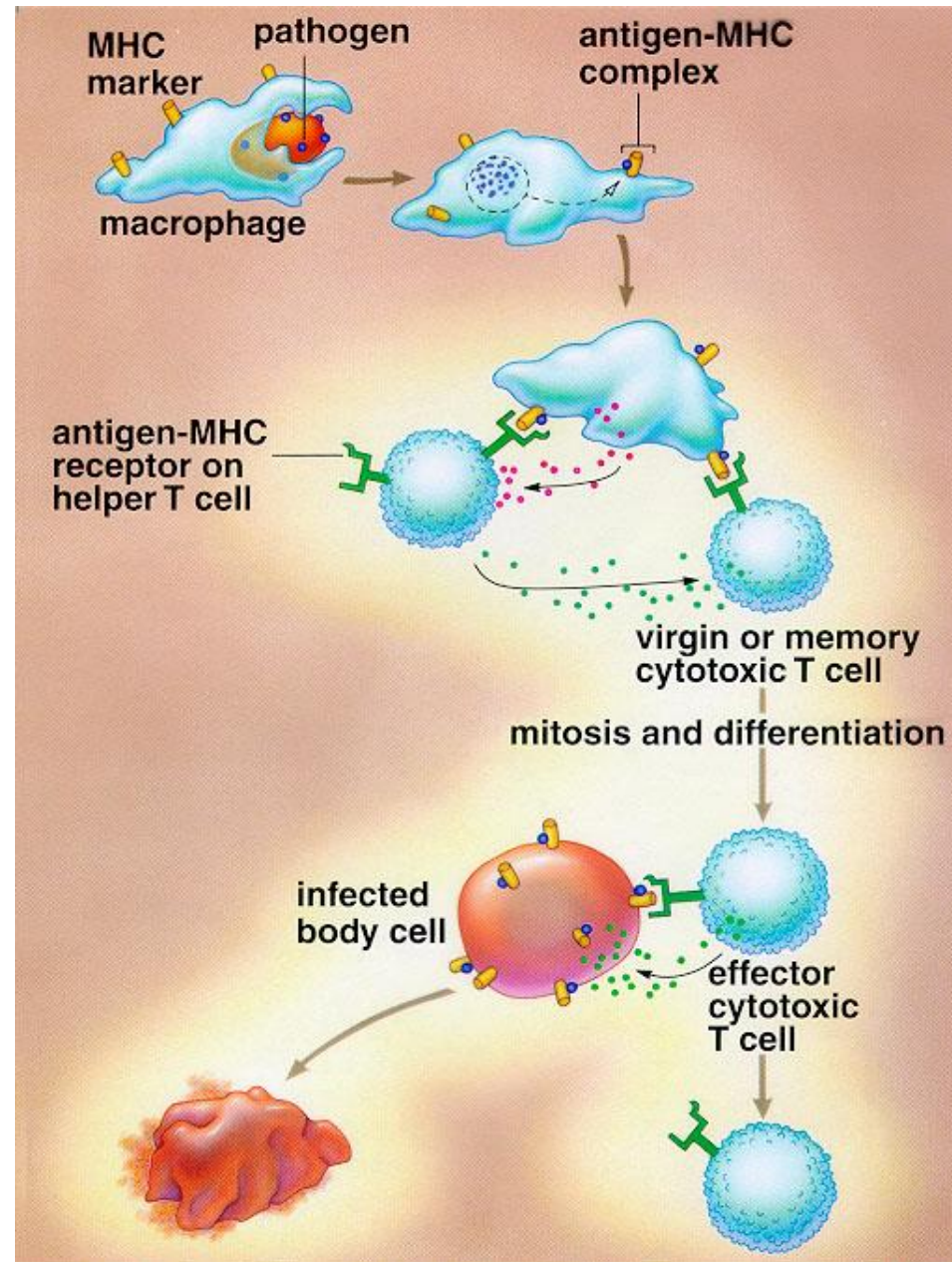
- a) T_H1 - aktivující makrofágy
- b) T_H2 - aktivující B-lymfocyty

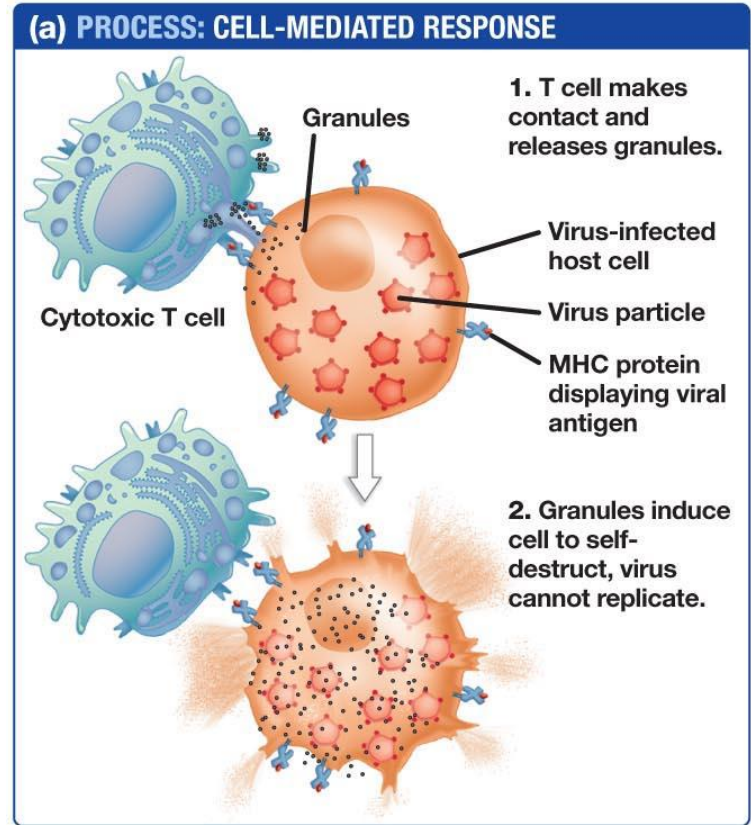
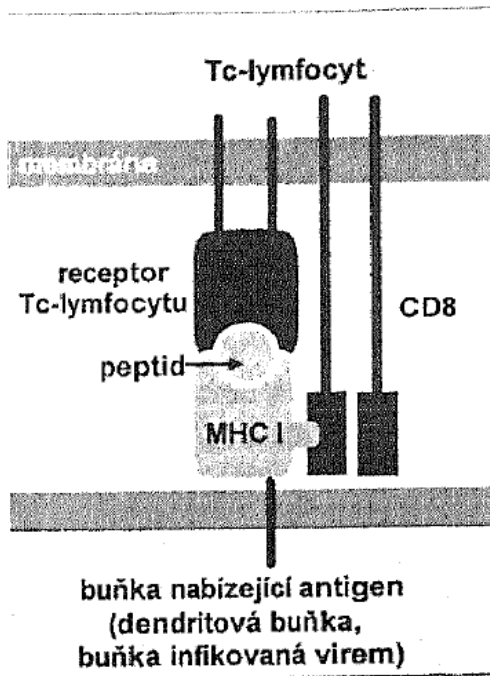
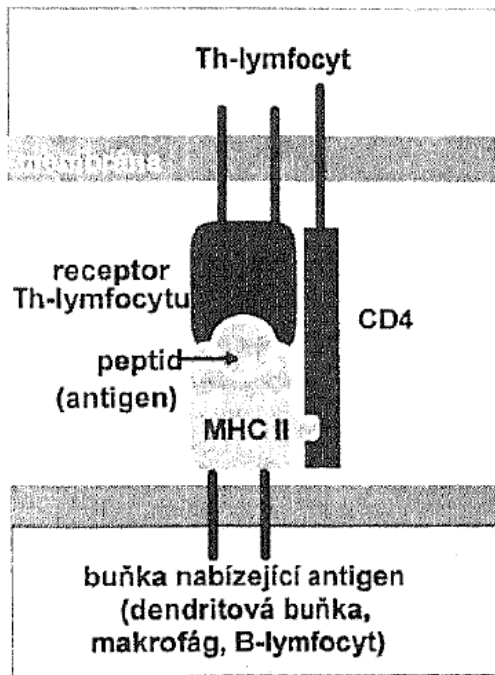
2. Efektorové cytotoxické T lymfocyty (CD8)

- rozpoznávají infikované či jinak vadné buňky a vyvolávají u nich APOPTOZU:

- a) uvolnění cytotoxických látek (perforiny+gramzomy), které pronikají do cytoplasmy a spouští kaspázovou kaskádu
- b) exprese povrchového proteinu Fas-ligand, který se váže na Fas-receptor

- na povrchu mají protein CD8, který se váže na MHC I molekuly





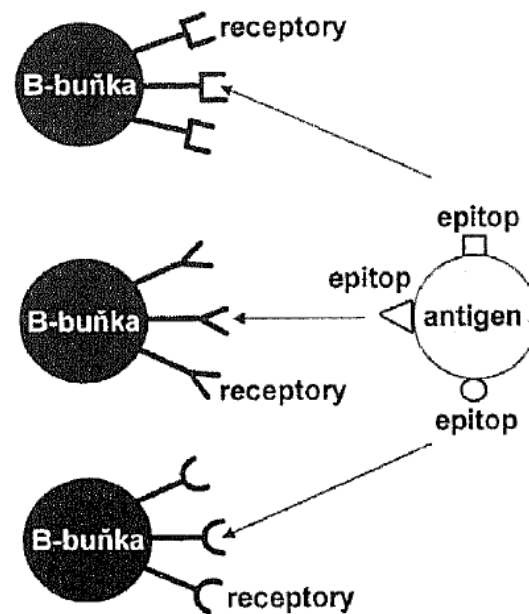
B-lymfocyty

- prekurzory se tvoří v kostní dřeni u dospělých a játrech plodu
- 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
- paměťové 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**

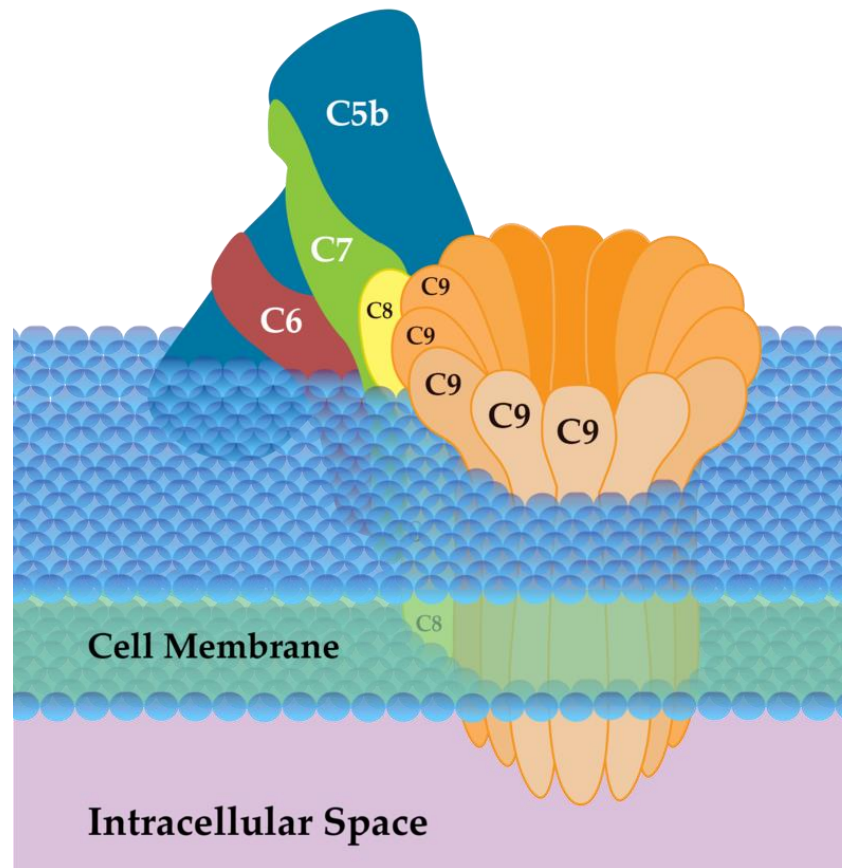


Obr. 320
Vztah antigenních determinantů k jejich receptorům

Komplement

Imunitní mechanismus zvyšující (doplňující, komplementující) účinnost protilátek

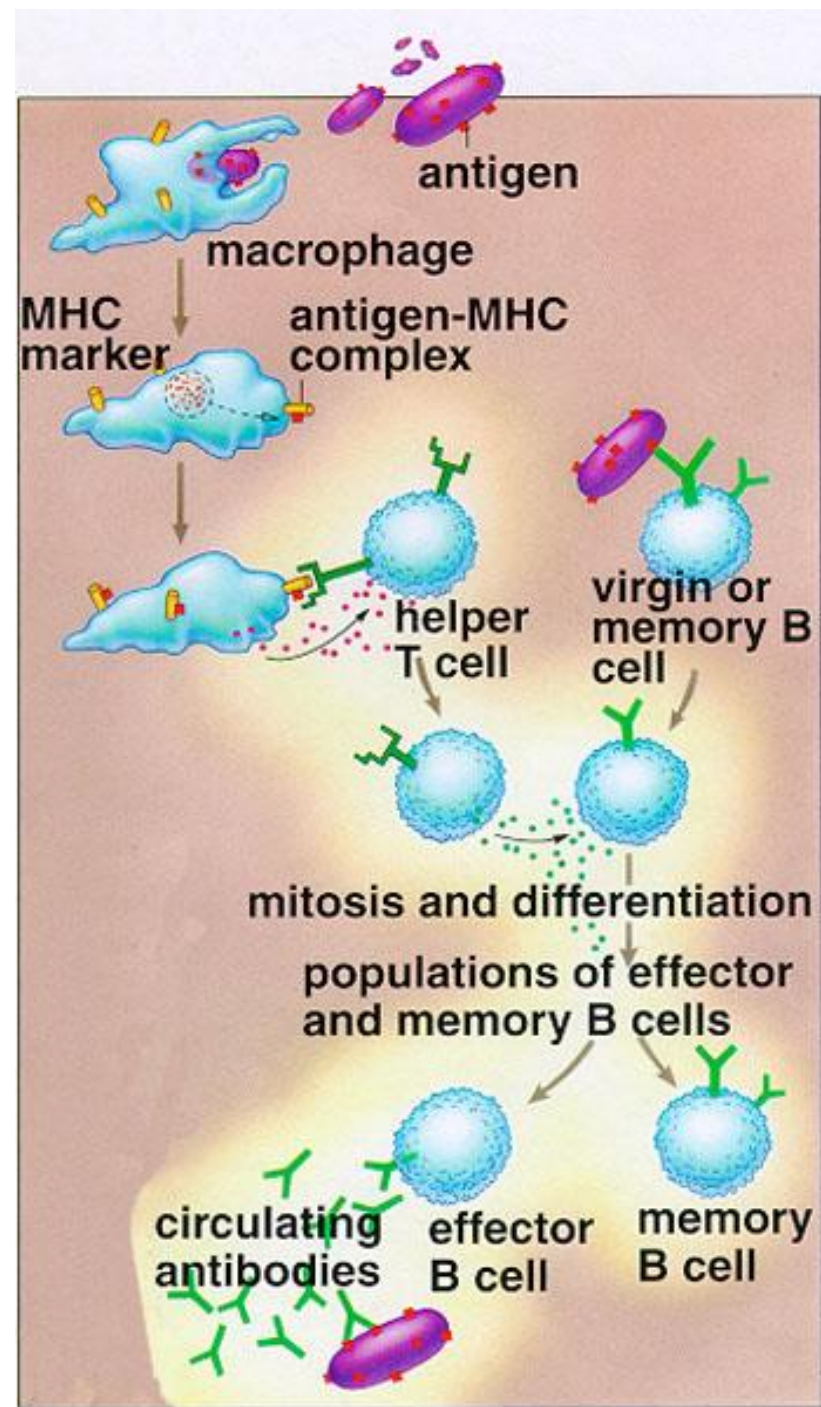
- nespecifický a neadaptibilní
- soubor malých proteinů, tvořených v játrech a cirkulujících v krvi
- po aktivaci atakuje membrány patogenů, ve kterých způsobuje póry



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. Fungují jako APC. Po vazbě antigenu se tento sdružuje s MHC II a je nabízen T_H-lymfocytům.

Neaktivuje se dokud nedostane "potvrzení" od T helper



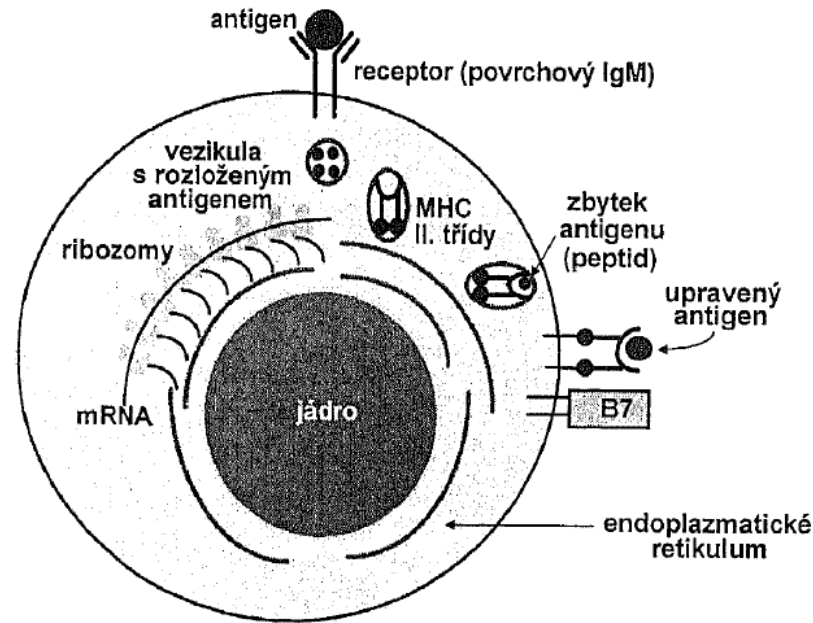
Antigen-presenting cells (APC; buňky nabízející antigen)

na povrchu vystavují antigen, který je rozeznáván T-lymfocyty

Existují 3+1 typy APC buněk:

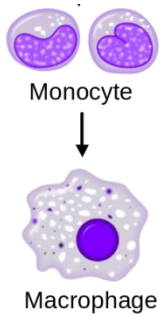
1. B-lymfocyty

- detekuje **volný antigen** pomocí receptoru (povrchový IgM)
- 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_H-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_H-lymfocyt** navíc produkuje interferon gamma (INF- γ) a tím se ještě víc aktivuje k pohlcování virů a bakterií
- makrofágy též produkují cytotoxické proteiny
- v krvi se vyskytuje ve formě monocytu



3. Dendritické buňky

- schopné fagocytozy
- komplexy antigenů a **MHC I i MHC II**
- aktivují tedy jak **T_H**- tak i **T_C-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

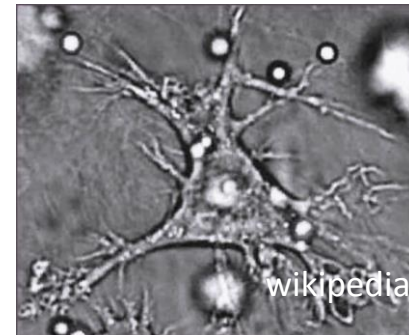
b) Intersticiální dendritické buňky

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

c) Proplétající se dendritické buňky

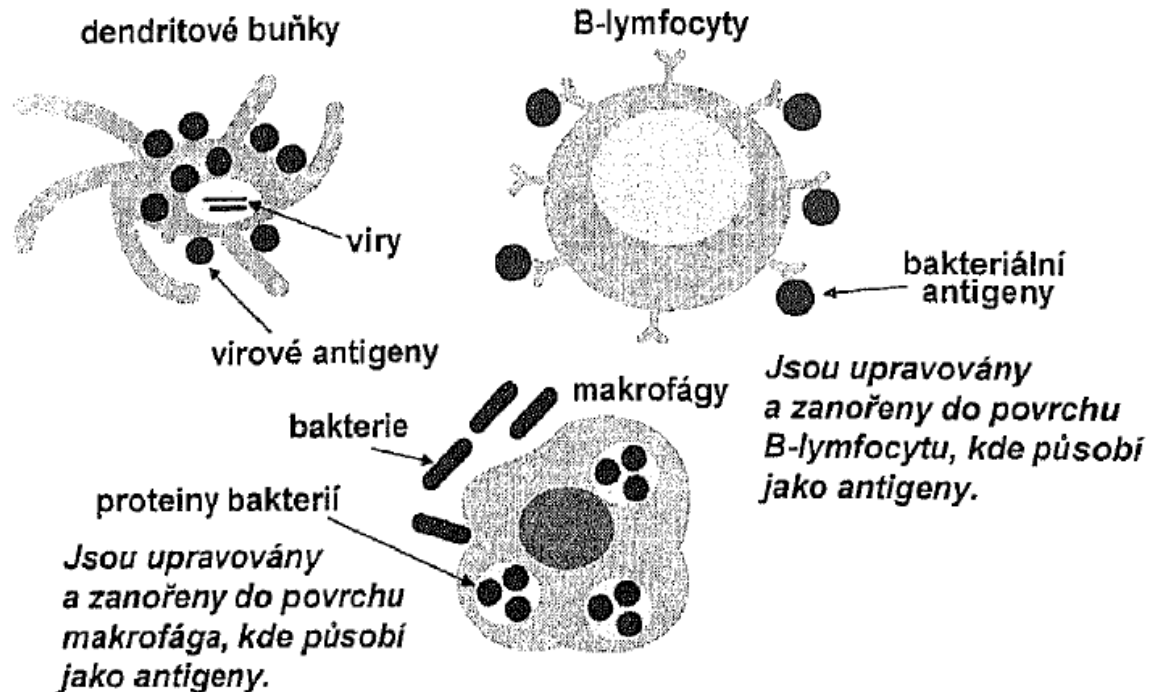
- v sekundárních lymfoidních orgánech spolu s T-lymfocyty

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



(4). Buňky infikované viry

- 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_C-lymfocyty** a infikovaná buňka je zničena **apoptozou**



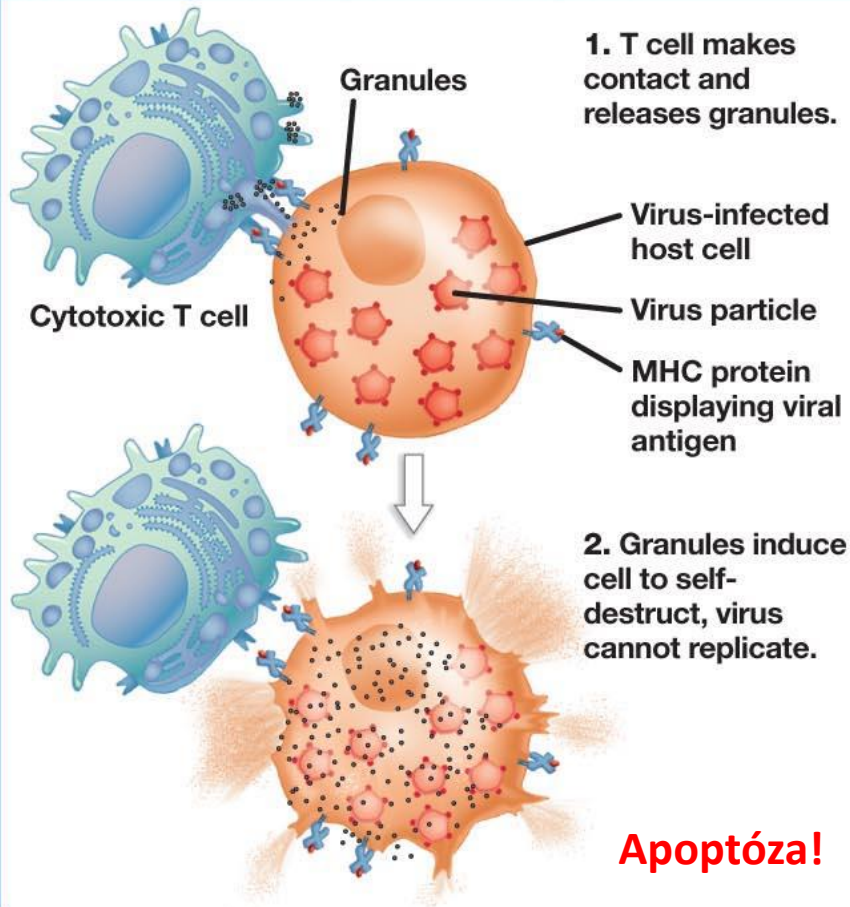
Obr. 322
Buňky nabízející antigen

a) Buněčná imunita

zprostředkovaná T-lymfocyty

- T_C lymfocyty produkují Fas ligand a perforiny + granzymy → APOPTOZA

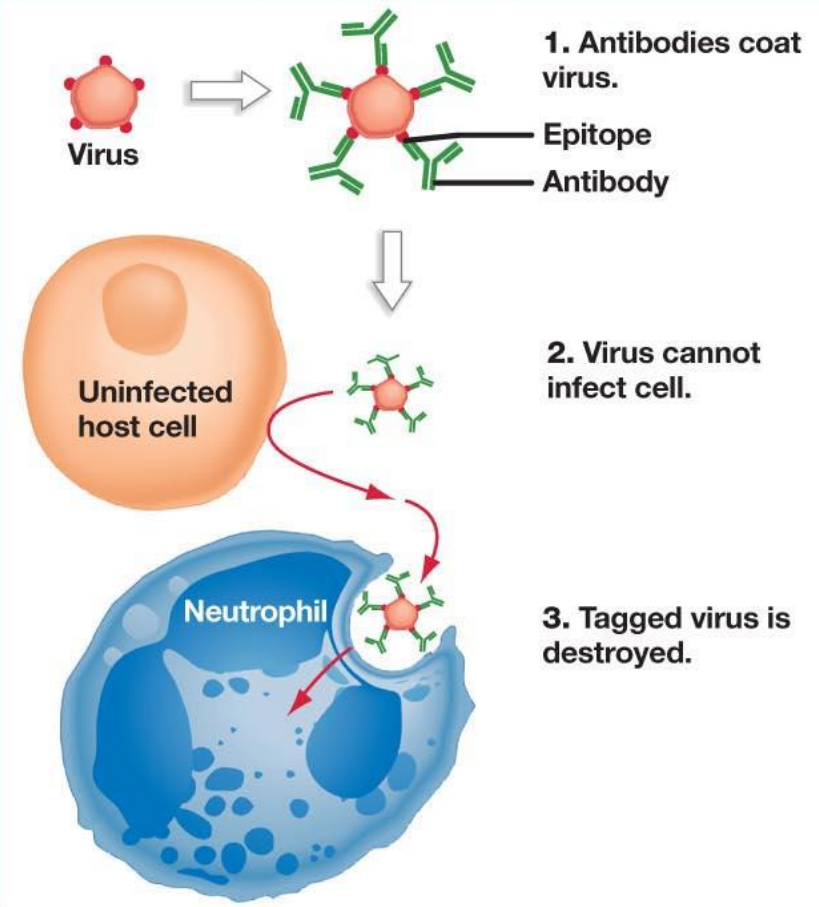
(a) PROCESS: CELL-MEDIATED RESPONSE



b) Humorální imunita

zprostředkovaná specifickými protilátkami
produkovanými B-lymfocyty do tělních tekutin

(b) PROCESS: HUMORAL RESPONSE



Imunoglobuliny (lidské protilátky)

- vyskytují se **vázané** na povrchu B-lymfocytů nebo **volné** (IgM a IgD slouží jako receptor)
- 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)

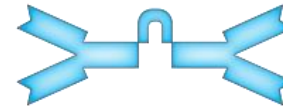
- v krevním séru tvoří až 80% všech imunoglobulinů

5. IgM (1 typ)

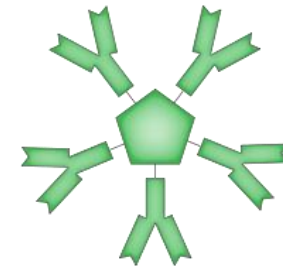
- vázán na membránu B-lymfocytů, kde působí jako receptor pro antigen - BCR
- nejúčinnější ve vazbě virových částic



Monomer
IgD, IgE, IgG



Dimer
IgA



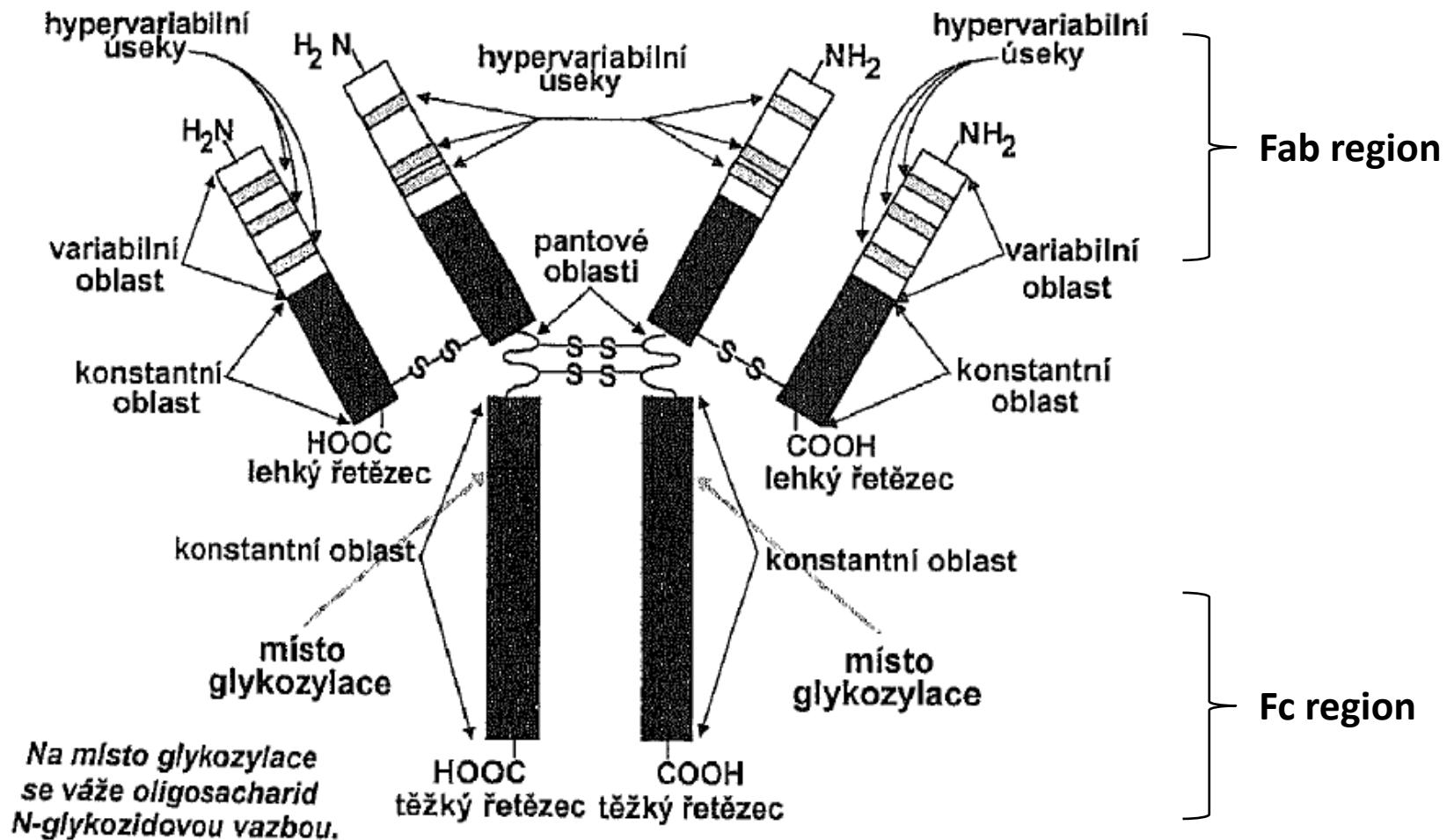
Pentamer
IgM

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_H pro těžký a C_L pro lehký řetězec

Variabilní oblast (V)

- úsek, v němž se imunoglobuliny příslušného typu liší
- V_H pro těžký a V_L pro lehký řetězec

Hypervariabilní oblasti

- váží antigen
- značně proměnlivá primární struktura

Pantová (hinge) oblast

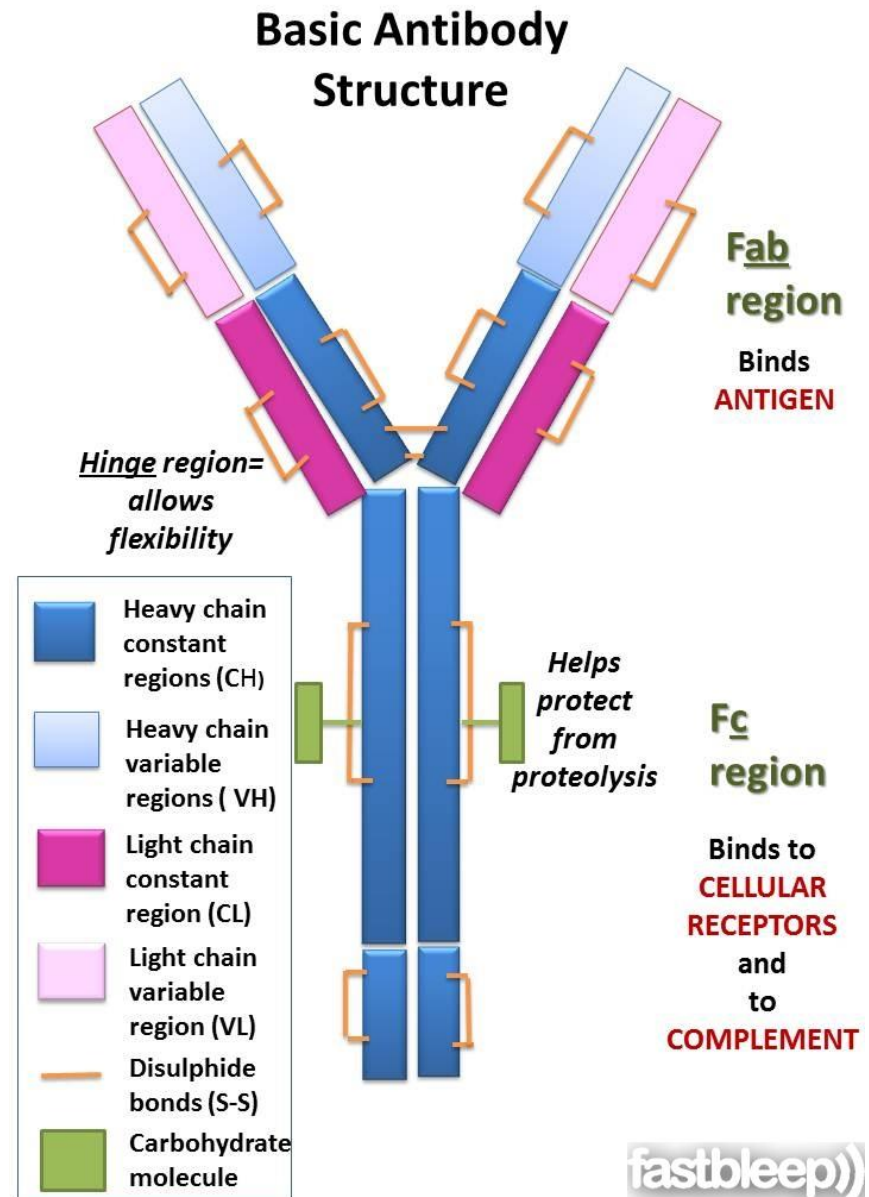
- ohebnost usnadňuje vazbu na antigen

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: κ (kappa) a λ (lambda)

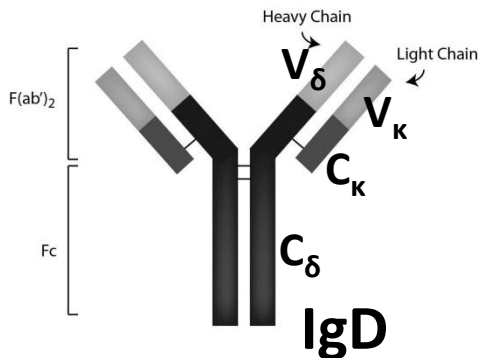
Těžké řetězce

- 5 typů: γ (gamma), α (alfa), μ (mí), δ (delta), ϵ (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:

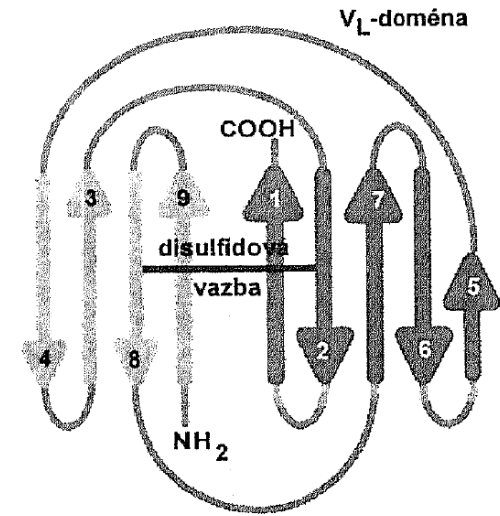


Klasifikace lidských imunoglobulinů

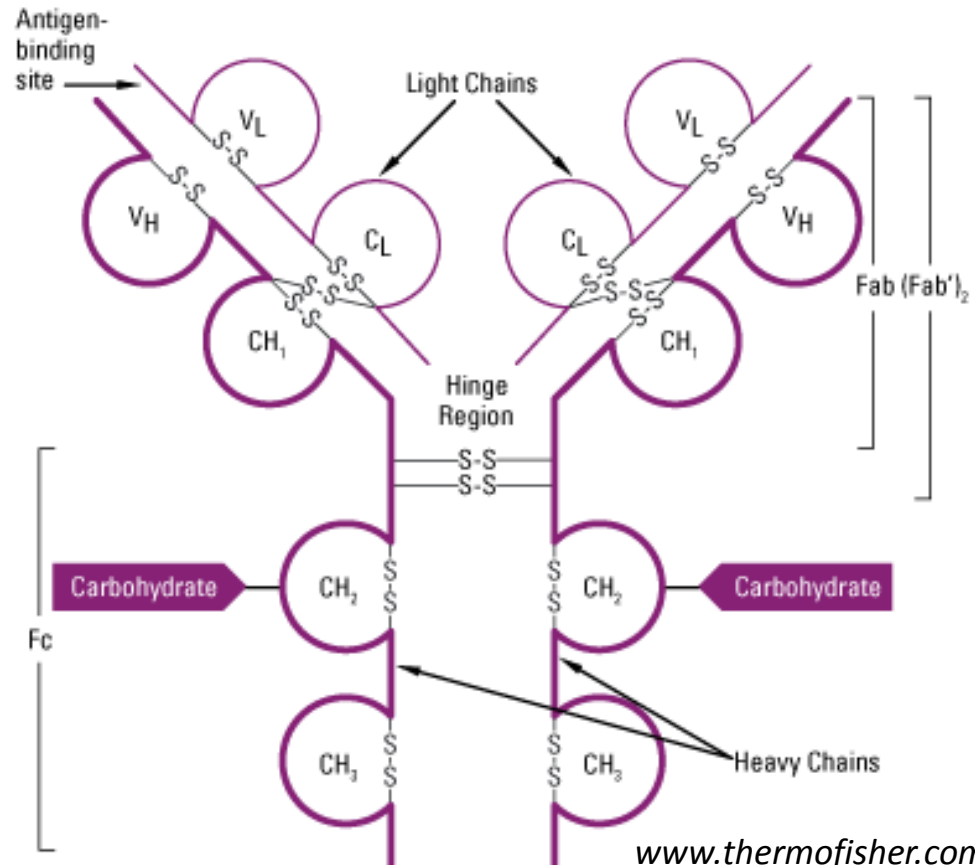
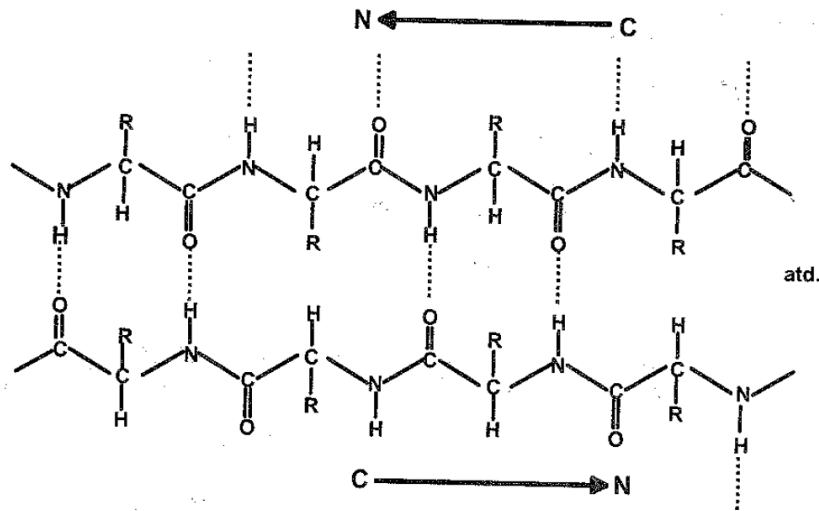
Třída	Podtřída	Lehký řetězec (L)	Těžký řetězec (H)	Celková molekul. hmotnost	Počet lehkých a těžkých řetězců v molekule
IgG	IgG1	κ nebo λ	γ 1	146 000	L_2H_2
	IgG2		γ 2	146 000	
	IgG3		γ 3	165 000	
	IgG4		γ 4	146 000	
IgA	IgGA1		α 1	160 000	L_2H_2 nebo $(L_2H_2)_2$
	IgGA2		α 2	160 000	
IgM	IgGM		μ	970 000	$(L_2H_2)_5$
IgD	-		δ	184 000	L_2H_2
IgE	-		ϵ	188 000	L_2H_2

Imunoglobulinové domény

- skládají se z antiparalelních β -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 β -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

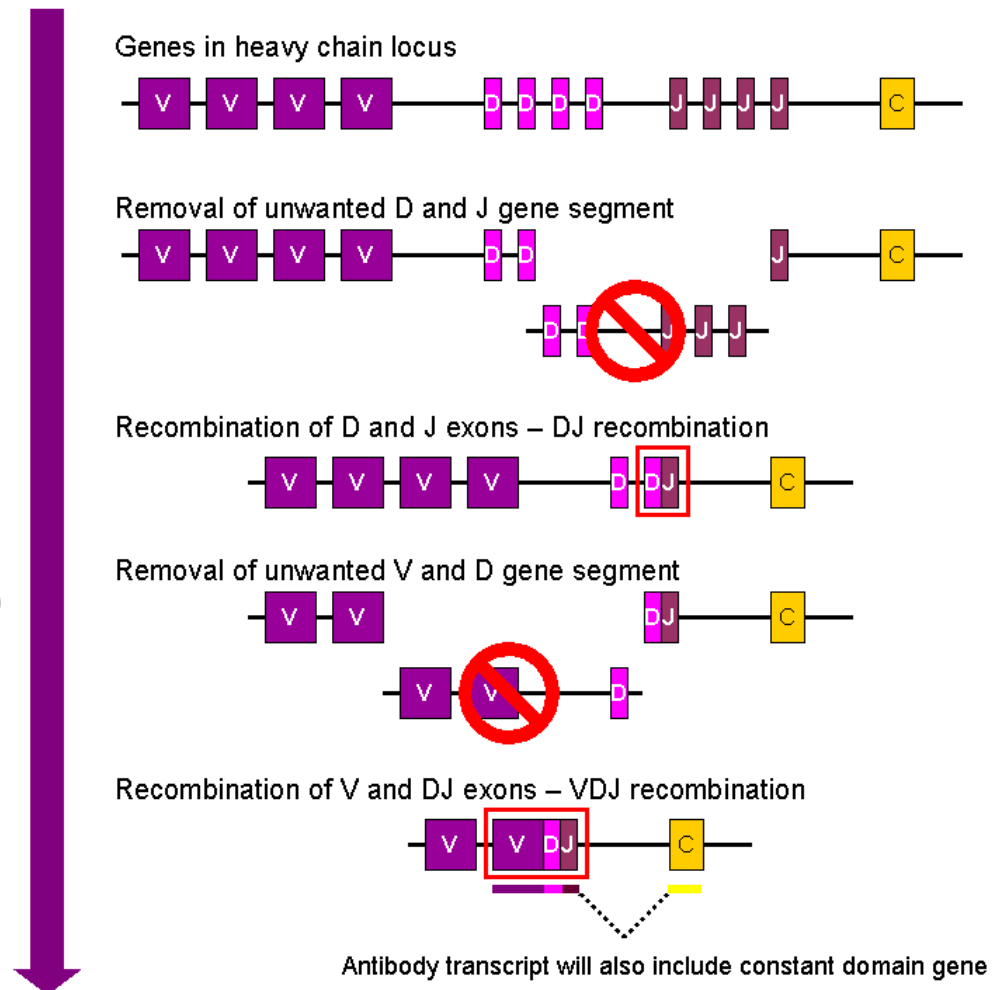
(D) ... diversity

(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 (5 subtypů za sebou)
2. pro lehký řetězec kappa (κ): 2. chromosom
3. pro lehký řetězec lambda (λ): 22. chromosom

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

Germline configuration:



(1) D to J recombination



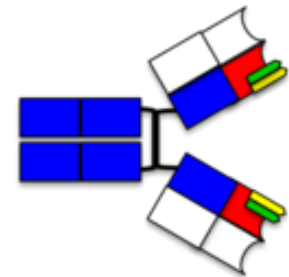
(2) V to DJ recombination



(3) Transcription & splicing

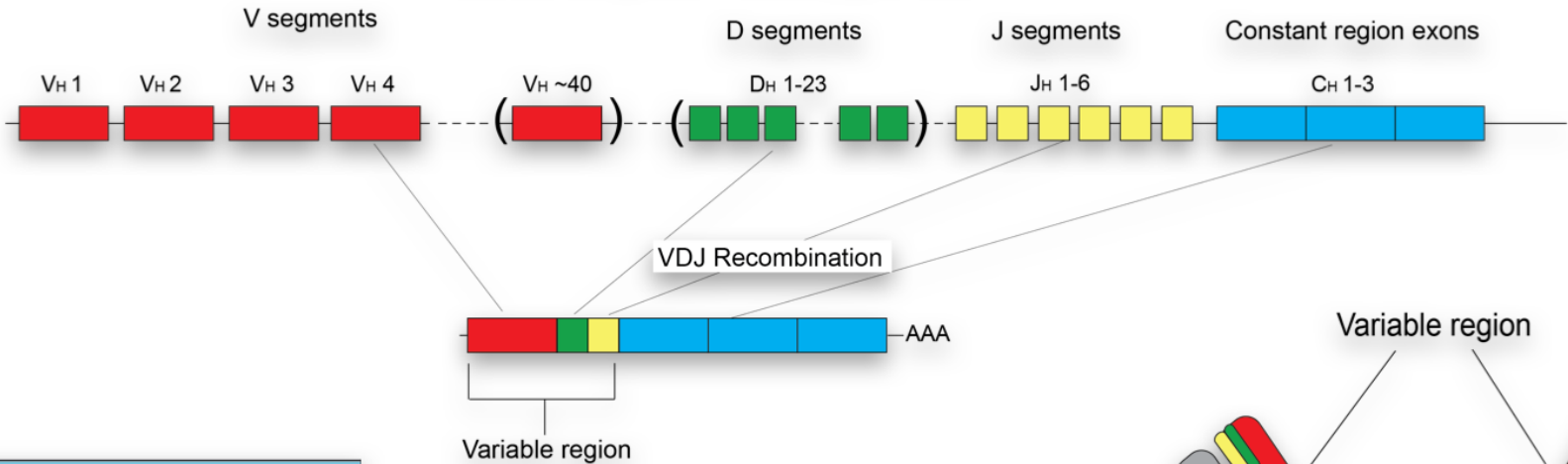


(4) Translation & assembly

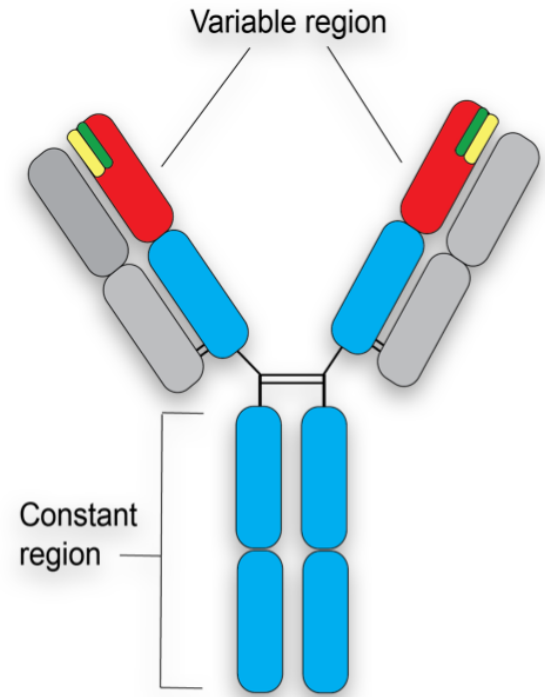
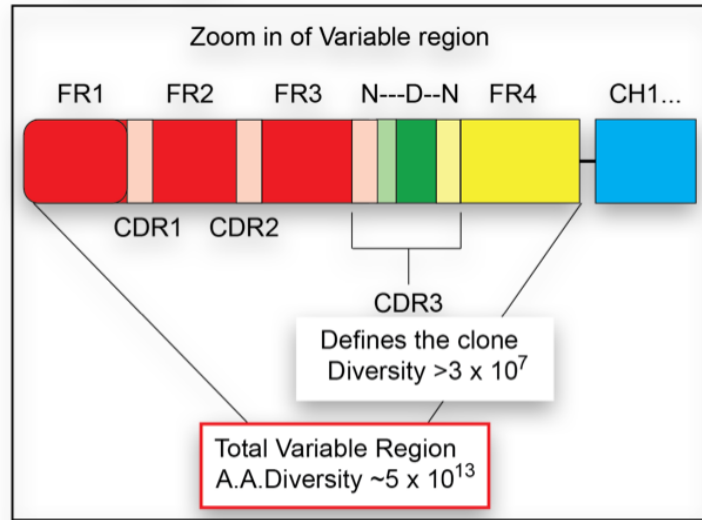


VDJ recombination

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

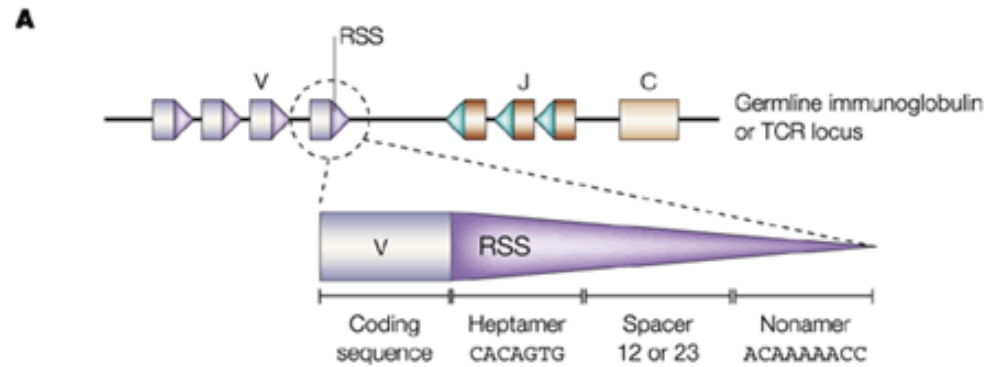
RSS (recombination signal sequence)

- označuje místo sestřihu (vazba RAG)

RAG1/RAG2 (recombination-activating genes)

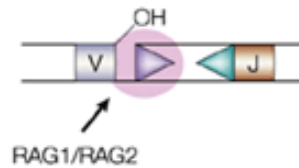
- enzymy katalyzující rekombinaci

- vazba na RSS

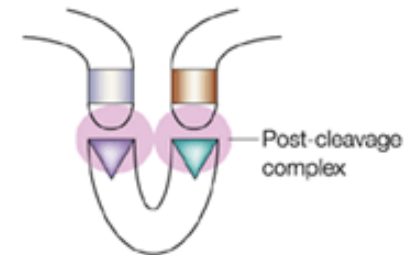


B

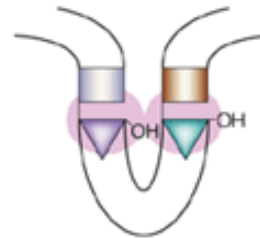
a RAG binding and nicking



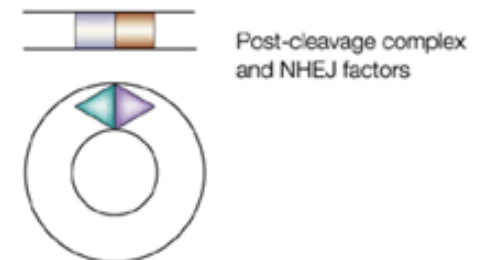
c Hairpin formation and cleavage



b Synapsis

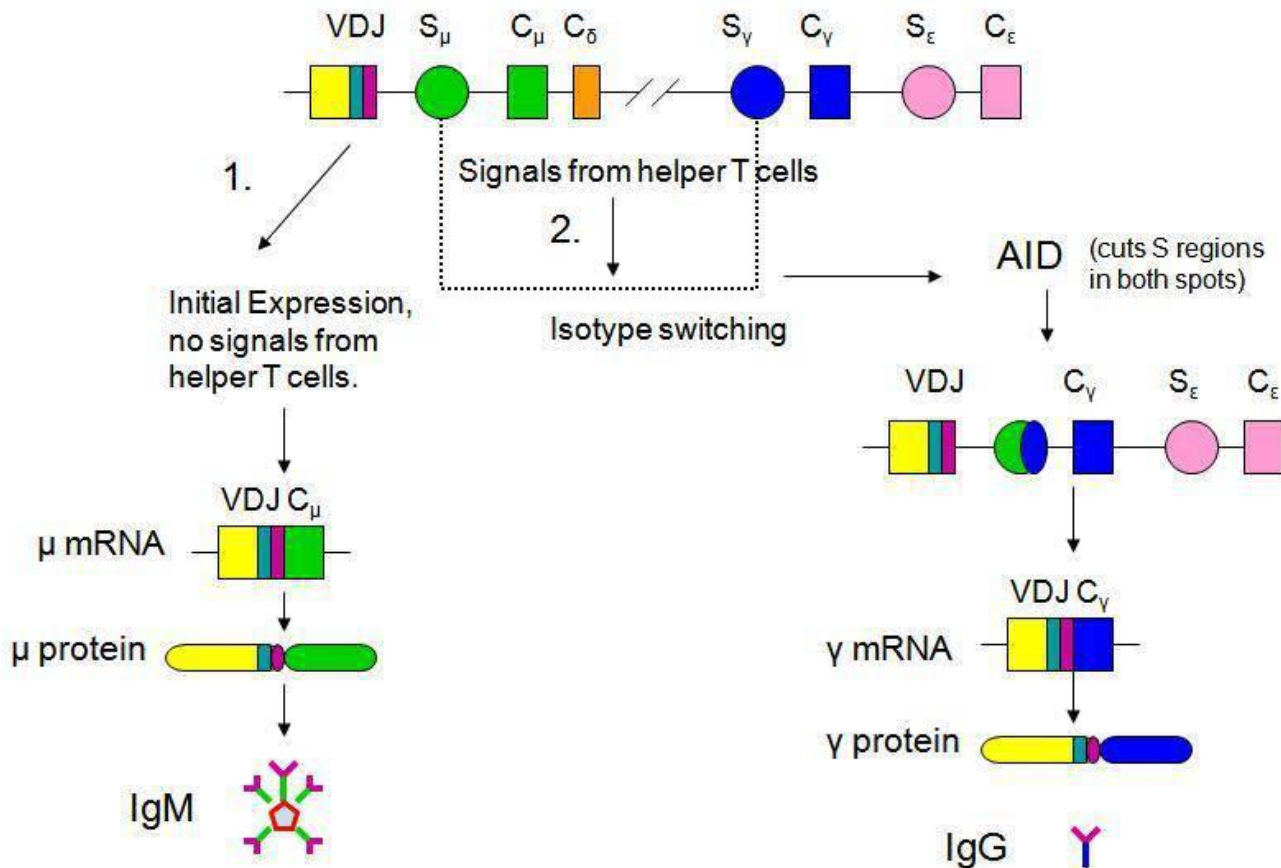


d Hairpin opening and joining



Přesmyk imunoglobulinových tříd

- **IgM a IgD** se tvoří jako první, protože C_μ a C_δ následují na DNA hned za VDJ subgeny
- po VDJ rekombinaci následuje přesmyk tříd z **IgM do IgG, IgE nebo IgA**
- až po stimulaci antigenem v sekundárních lymfoidních orgánech za podpory T_H lymfocytů
- stejný úsek VDJ_H se připojí k subgenu C_γ , C_α nebo C_ϵ za **delece** C_μ a C_δ
- přesmyk tříd je řízen "signály přesmyku - S"

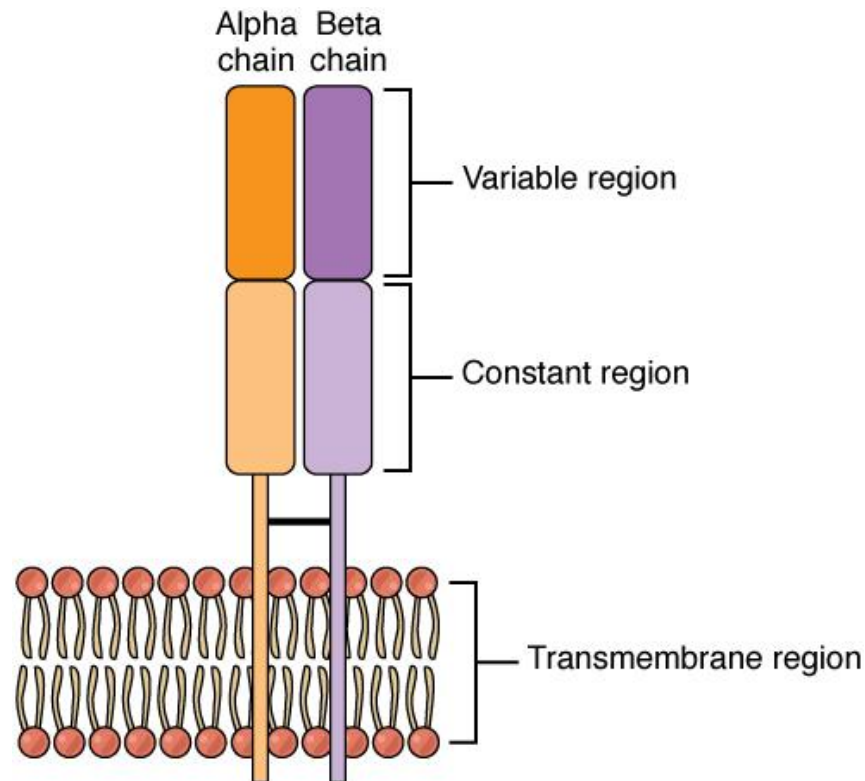


Receptory T lymfocytů (TCR)

- u člověka má 95% T lymfocytů TCR receptor složený z α (alfa) a β (beta) řetězce (cca 5% TCR je z řetězců gama a delta - γ/δ)

- V, D a J segmenty v β řetězcích
- V a J segmenty v α řetězcích

- přeskupování probíhá stejně jako u imunoglobulinů - vznik jedinečných receptorů

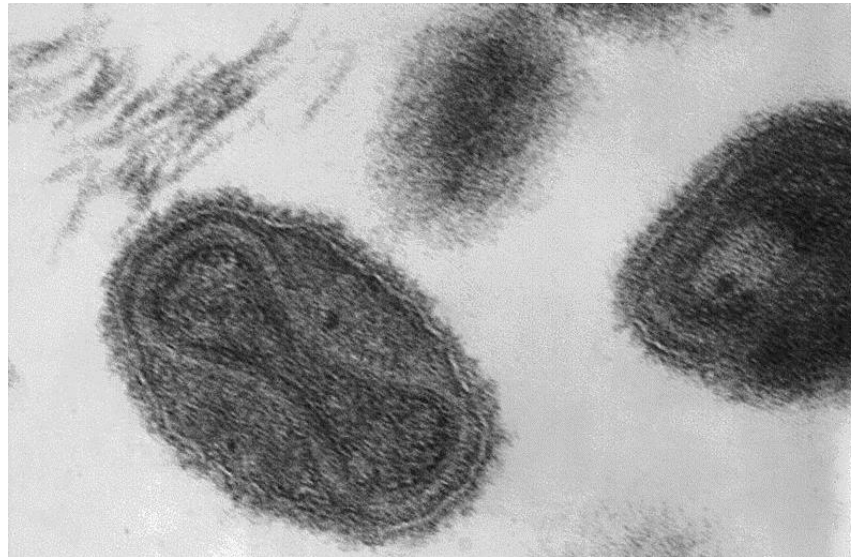
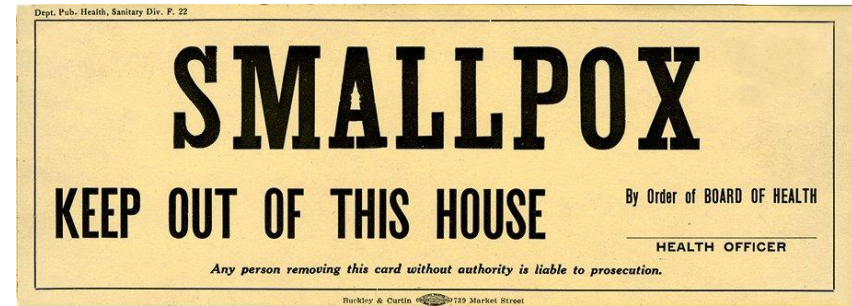


Vakcinace (očkování)

*tvorba paměťových lymfocytů po setkání s antigenem
(větš. oslabený kmen nebo jeho část)*

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

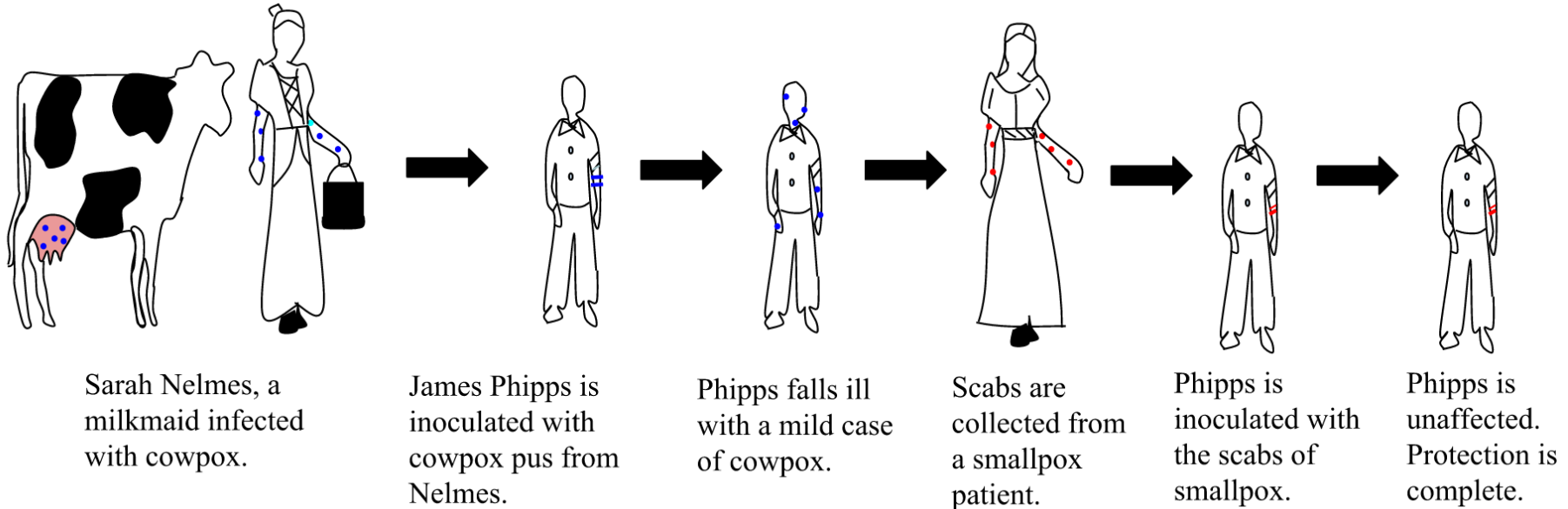


Snímek viru z elektronového mikroskopu (wikipedia)

Vakcinace (očkování)

Edward Jenner (1749 - 1823)

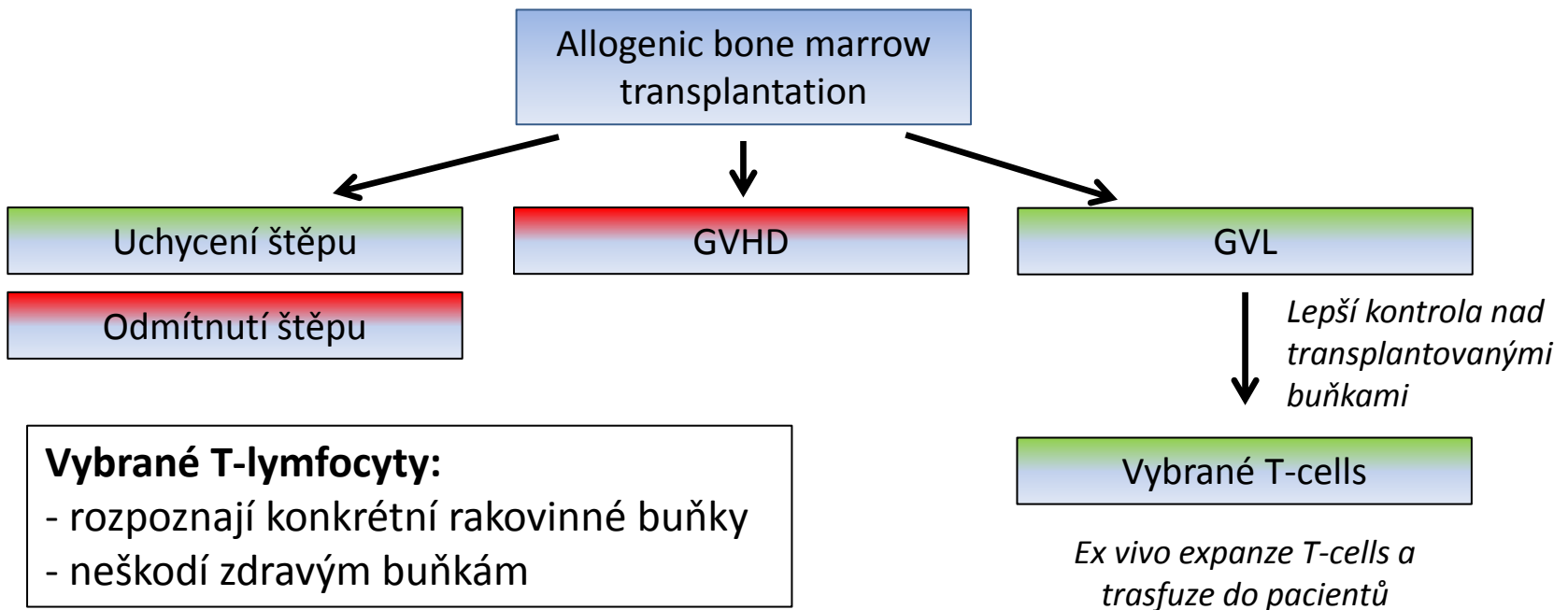
- doktor z Gloucestershire
- při epidemii pravých neštovic si všiml, že dojičky, které prodělali kravské neštovice neonemocní
- provedl experiment:
 - odebral vzorek kravské neštovice z pacientky Sarah Nelmesové
 - nakazil tímto 8-letého chlapce Jamese Phippse
 - po zotavení nakazil Jamese pravými neštovicemi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



Imunoterapie

Vychází ze dvou základních principů (pozorování):

1. Buňky imunitního systému jsou schopny infiltrovat a ničit solidní tumory.
2. Při allogenních transplantacích kostní dřeně docházelo k život ohrožujícímu GVHD, ale též občas k vyléčení leukémie pomocí efektu GVL (graft versus leukemia).



CAR-T

Vybrané T-cells

přirozené klony

Izolace a expanze T-cell klonu se specifickou přestavbou TCR proti danému antigenu (TCR-CD3 komplex)

umělý receptor

Nevyžaduje MHC (HLA) ko-signalizaci

Neobsahuje celý CD3, ale jen jeho část CD3ζ (zeta) řetězec

Genetická manipulace T-cells - umělý receptor, který dokáže aktivovat T-cell po rozeznání Ag

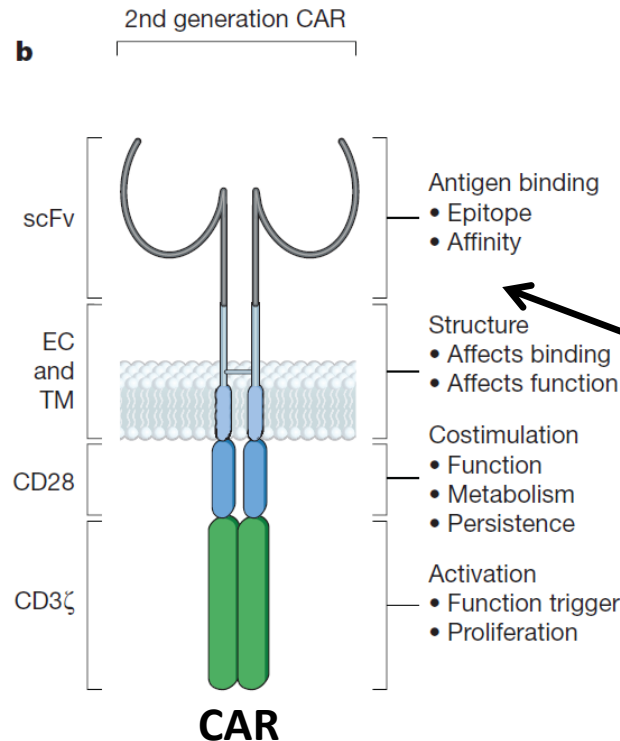
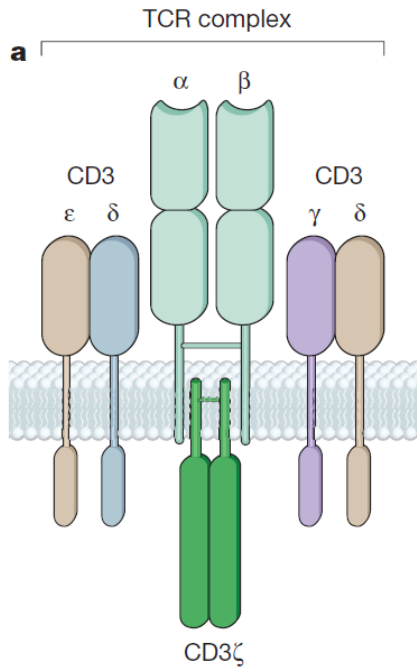
CAR 1st generation

Přidána ko-stimulační komponenta receptoru (CD28 nebo 4-1BB)

CAR 2nd generation

Plná aktivace a expanze Sekrece Interleukinu-2

Pro CAR-T se využívá směs CD4 a CD8, tzn. jak cytotoxické (T_C) tak helper (T_H) lymfocyty. Izolace pomocí CD3.



Chimeric Antigen Receptor

Milníky ve vývoji CAR-T

C. Rossig, Clin. Immunol. 2017

1989 Zelig Eshhar

- první CAR
- T cells lze pomocí CAR aktivovat proti vybraným antigenům bez nutnosti MHC-I

2011 Carl June

- CAR proti B cell antigenu CD19 a retransfuze pacientům
- 3 pacienti s CLL
- CART expandovaly 1000x po retransfuzi
- eliminace lymphomu a indukce kompletní a trvalé remise (toho data 5 let)

CAR-T field would not exist as it does today without CD19

Michel Sadelain

- CAR-T druhé generace: přidání ko-stimulační molekuly CD28
- umožnilo přežití CAR-T v těle v řádu měsíců

CAR-T skepticism

"You can't put genes into T cells"

"These modified T cells won't kill cancer in a mouse"

"You can't bring it to the clinic"

Komerzializace CAR-T



28.8.2017 - firma **Gilead** koupila firmu **Kite** za 12 miliard dolarů (oba California)

- **huCAR-19** - evaluace phase 1 trial pro B-cell malignancies (2nd generation)
- **KITE-585** - klinické testy pro mnohočetný myelom (2nd generation)

30.8.2017 - FDA schválila první CAR-T produkt:



- **Kymriah** (tisagenlecleucel) pro autologní CD19 terapii (**Novartis**; Basilej)

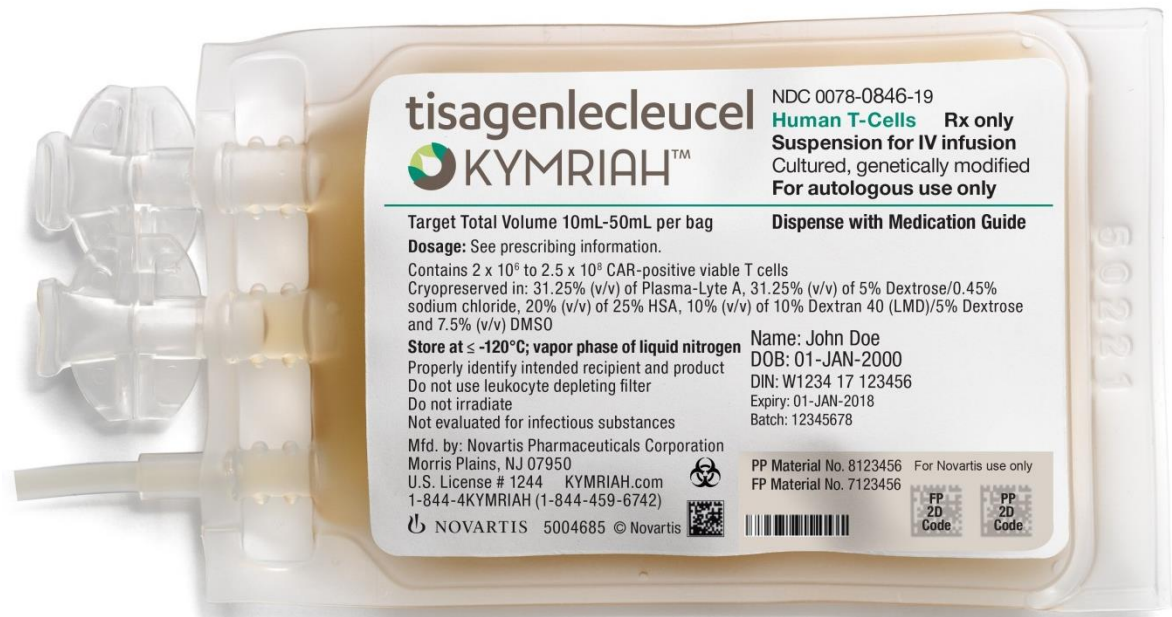
- FDA schválila použití monoklonální protilátky proti IL-6R



- **Actemra** (tocilizumab) proti life-threatening side-effect CRS (**Roche**; Basilej)

Approvals for use in other cancers and of other companies' products are expected soon.

"This approval is only the beginning. Just like a new model of an automobile comes out each year, there's going to be new models of CAR T cells that come out too." **K. Curran, pediatric oncologist**



Aplikace CAR terapie - A) lymfoidní onemocnění

Velké množství clinical trials (cca 200)

Cílové antigeny se nachází na přechodně postradatelných buňkách (např. B-cells)

CART19 (CD19-directed CAR T)

- B cell malignancies, zejm. ALL
- kompletní remise u relabujících pacientů

CD22

- inhibiční receptor B-cell v ALL (pre-B)

**B-cell malignancies: ALL, CLL, lymfomy Hodgkin a non-Hodgkin
Multiple myeloma**

Multiple myeloma - porucha plasmatické buňky

B cell malignancies - hlavně Hodgkin a non-Hodgkin lymphoma

Aplikace CAR terapie - B) solidní tumory

Větší problémy s nalezením cílového antigenu (nachází se též na normálních nepostradatelných b.)

Ideálně modifikovaná verze normálního proteinu

Terapeutické okno - účinek proti buňkám s vysokou expresí (rakovinné) a ušetření buněk s nízkou expresí

Sarkom, glioblastom, pankreas...

Aplikace CAR terapie - B) solidní tumory

- HER2**
- transmembránový tyrozinkinázový receptor
 - normálně exprimován na různých tkáních (gastrointestinální, respirační, prsní...)
 - **overexprese na solidních tumorech**
 - monoklonální protilátka anti-HER2 úspěšná v léčbě **rakoviny prsu** (Herceptin = Trastuzumab)
 - HER2-targeted T cells
 - + aktivněji infiltrují nádor
 - + cílí i na maligní buňky s nižší expresí
 - ničí i zdravé tkáně s nízkou expresí HER2 (plicní tkáň u pacienta s colon cancer)
 - toto nebylo pozorováno s monoklonální Ab

Ganglioside GD2

- silně exprimován na
 - **neuroektodermálních tumorech (neuroblastom, melanom, gliom)**
 - **sarkomech**
 - **nádorech mozku**
 - **small-cell lung cancer**
- mírně exprimován na benigních nádorech kůže a nervů
- monoklonální protilátky efektivní při minimal residual disease, ale výrazné vedlejší účinky
- GD2-CART phase I - dobře tolerovány, trvanlivá remise

Living drug safety

mortalita léčby relapsujících rakovin CAR-T je nižší než u konvenčních metod

Side effects

1. Cytokine Release Syndrom (CRS*)

- horečky, orgánová selhání
- příčina: aktivace T-cells
- **je zvýšen zejména IL-6 - snižuje se pomocí Tocilizumabu***

2. Neurotoxická

- příčina: neznámá

3. Ztráta účinnosti

- příčiny: a) CAR-Ts přestanou expandovat
- b) rakovinné buňky přestanou exprimovat cílový antigen
- c) inhibiční efekt nádorového microenvironmentu

4. On-target, off-tumour aktivace T cells

- útočí na zdravé tkáně, nař. plicní

***CRS - Cytokine release syndrome (cytokinová bouře).** A serious and in some cases potentially life-threatening toxicity that has been observed after administration of natural and bispecific antibodies and, more recently, following adoptive T cell therapies for cancer. CRS is associated with elevated circulating levels of several cytokines including interleukin-6 (IL-6) and interferon- γ (IFN γ).

*** Tocilizumab (Actemra)** je původně lék na artrózu