

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*

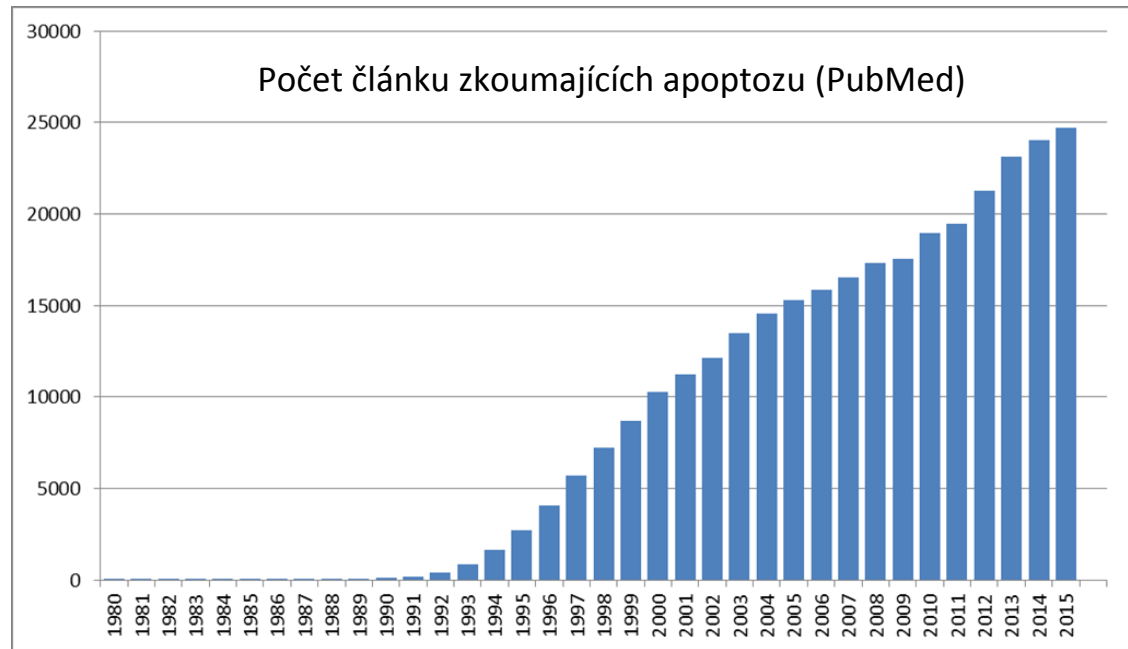
<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>

Apoptóza

programovaná buněčná smrt

Apoptóza

- koncept apoptózy od 1950
- intenzivně zkoumána od 1990
- poruchy apoptózy 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 – nefyziologické faktory)
- buněčný stres nebo signalizace od jiných buněk stimuluje pro-apoptotické signální dráhy
- tyto dráhy kaskádovitě aktivují proteázy zvané "kaspázy,, = efekторы apoptózy
- apoptotická buňka vykazuje charakteristické změny morfologie

Buněčný stres/
Signalizace



pro-apoptotické
signální dráhy

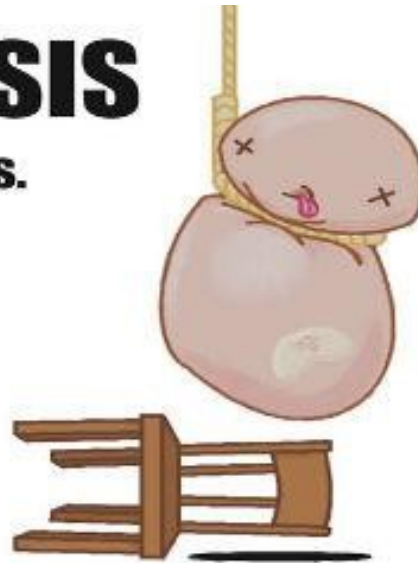


Kaspázy



APOPTOZA

APOPTOSIS
Know the signs.



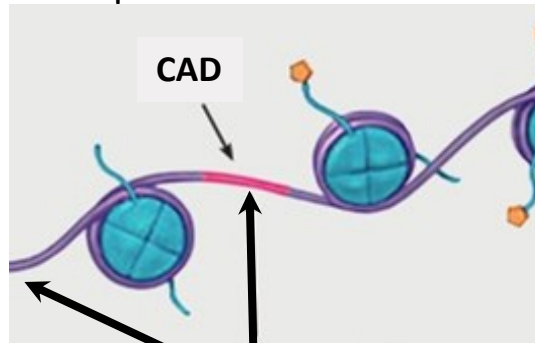
Charakteristické morfologické znaky apoptózy

1. Blebbing

- nepravidelné záhyby cytoplazmatické membrány
- smršťování buňky (shrinkage)
- vznikají odpojení cytoskeletu od membrány
- degradace vnitřní struktury buňky (membrána neztrácí svou integritu)
- 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

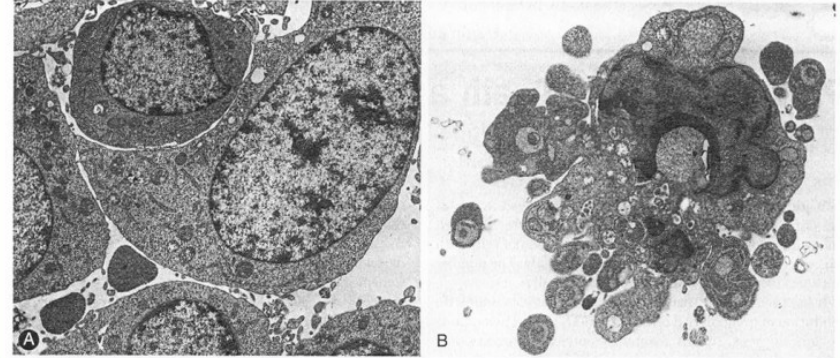


místa štěpení CAD endonukleázou

myší fibroblast

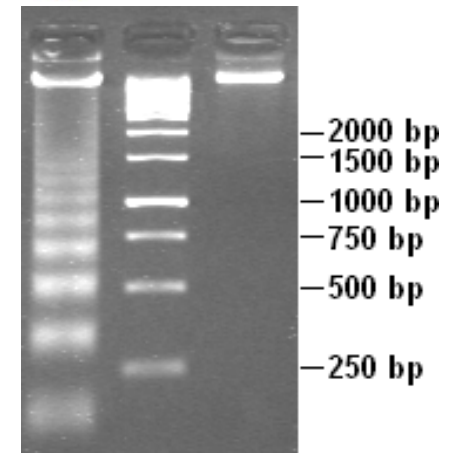
A. v přítomnosti séra

B. v nepřítomnosti séra



Zornig M, Baum W, et al. (2000) 19-40

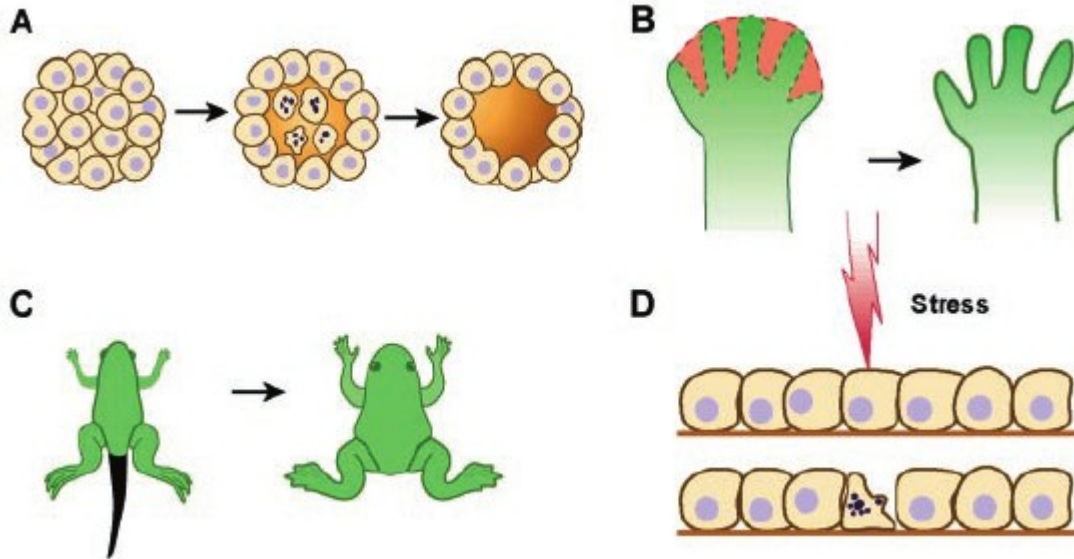
☹️ žebříček 😊



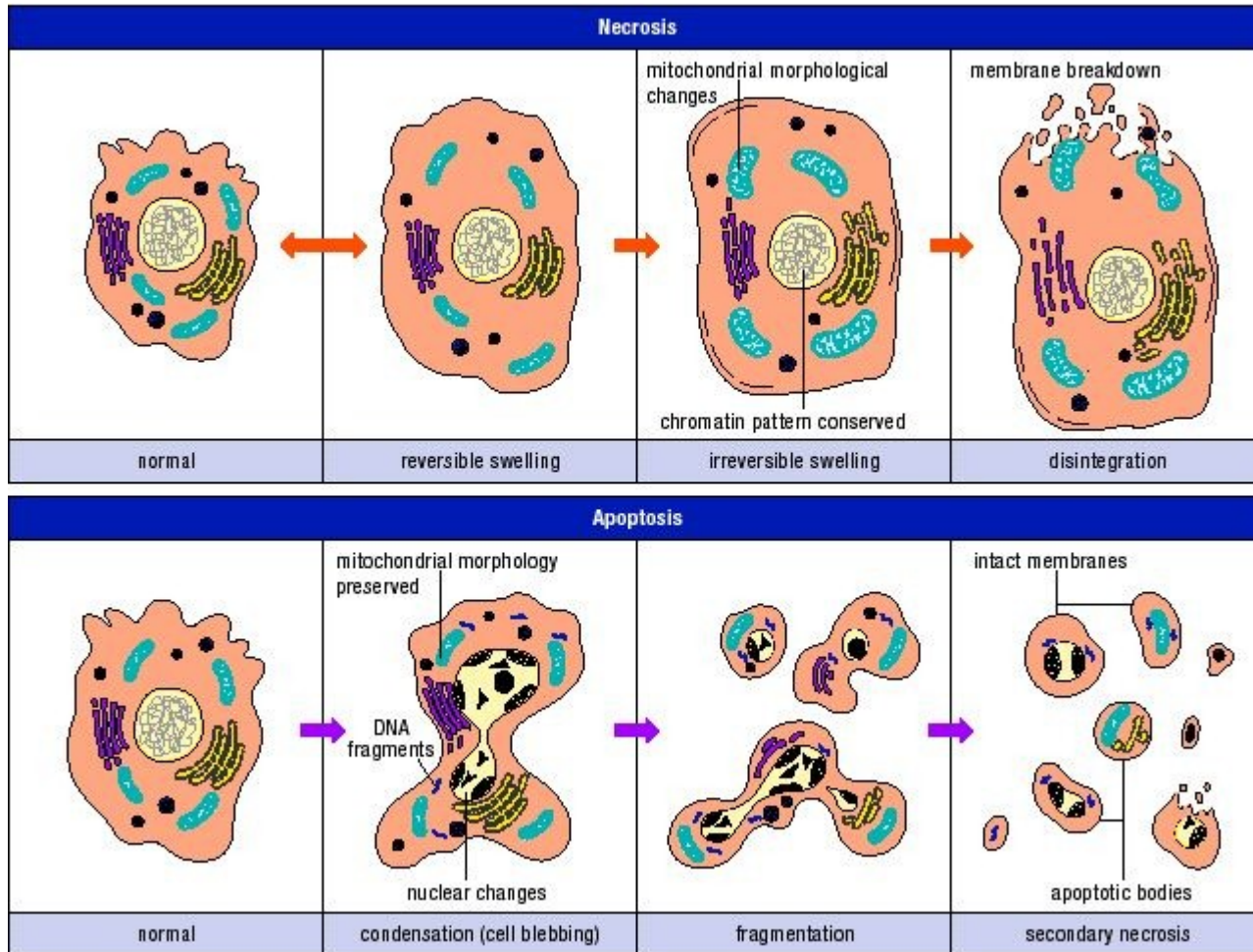
Kdy probíhá apoptóza?

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)
- buňka ztratí kontakt s extracelulární matrix, tzv. anoikis (z řečtiny - bezdomovectví)
- buňka, která dostává signály smrti
- poškození DNA, které již neumí buňka opravit (D)



Apoptóza vs. Nekróza



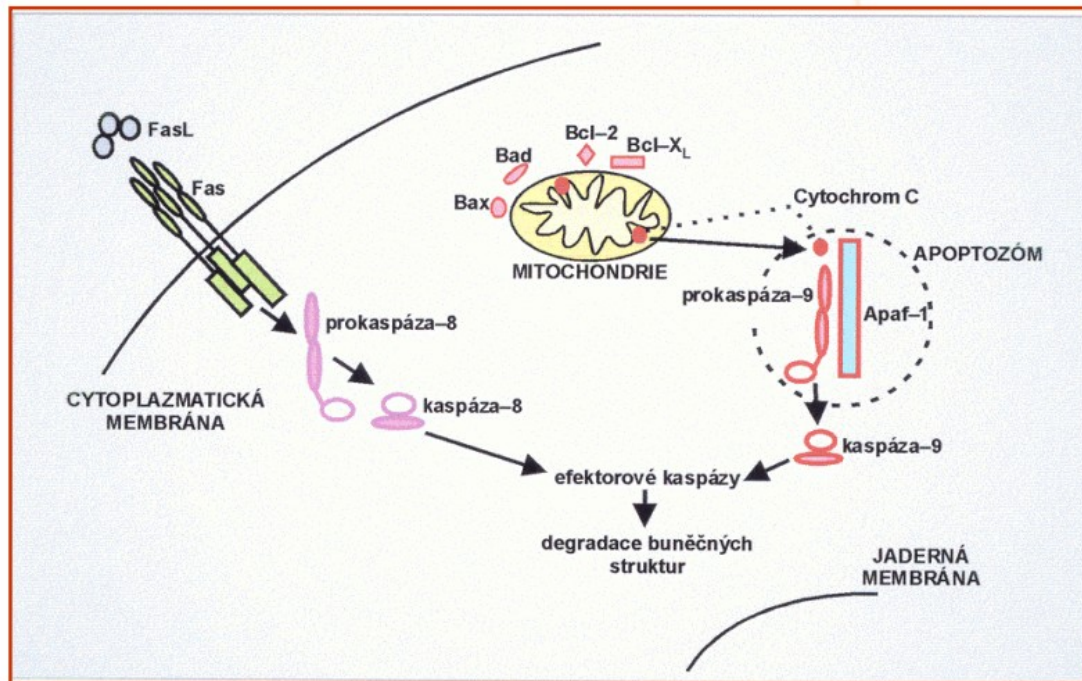
Apoptóza může být indukována dvěma drahami

1. Vnitřní dráha (intrinsic pathway) - mitochondriální

- z důvodu buněčného stresu nebo DNA poškození
- uvolnění proteinů (hl. Cytochrom C) z prostoru na membráně mitochondrií
- tvorba apoptozómu → proteolytické štěpní prokaspázy 9 na iniciační kaspázu 9





2. Vnější dráha (extrinsic pathway) - receptorová

- z důvodu vnější signalizace od ostatních buněk
- extracelulární ligandy (hl. TNF- α a Fas) se váží na tzv. death-receptory na povrchu buněk
- vzniká proapoptický signál → proteolytické štěpní prokaspázy 8 na iniciační kaspázu 8



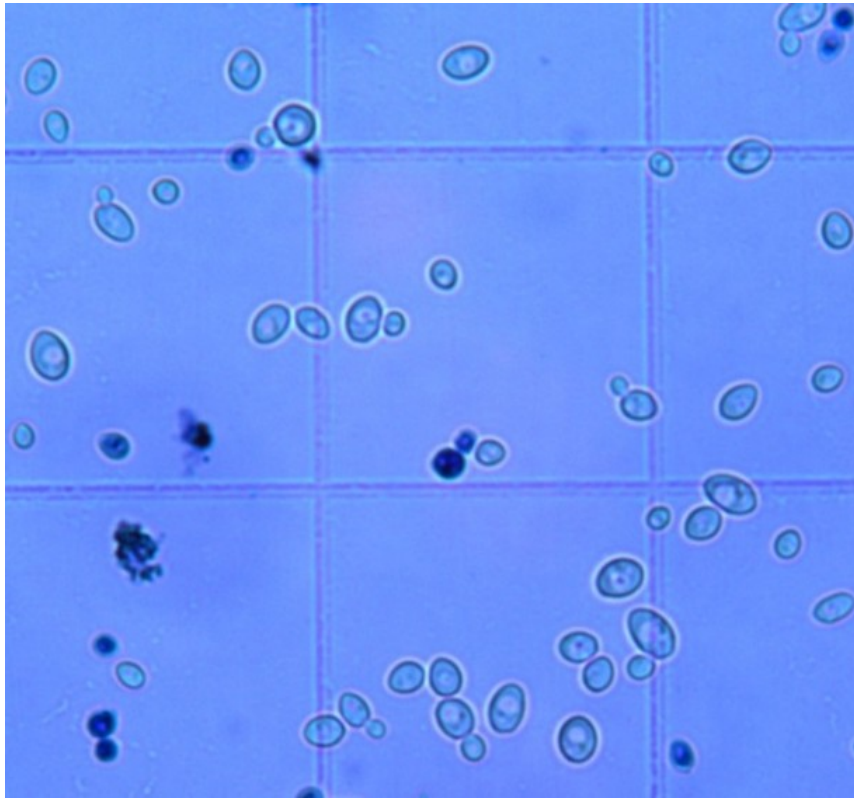
Metody detekce apoptózy

např. při testování léčiv in vitro pomocí světelné mikroskopie – morfologické změny

	Nic	Lék na leukemii
Zdravé erytrocyty		
Leukemické erytrocyty		

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

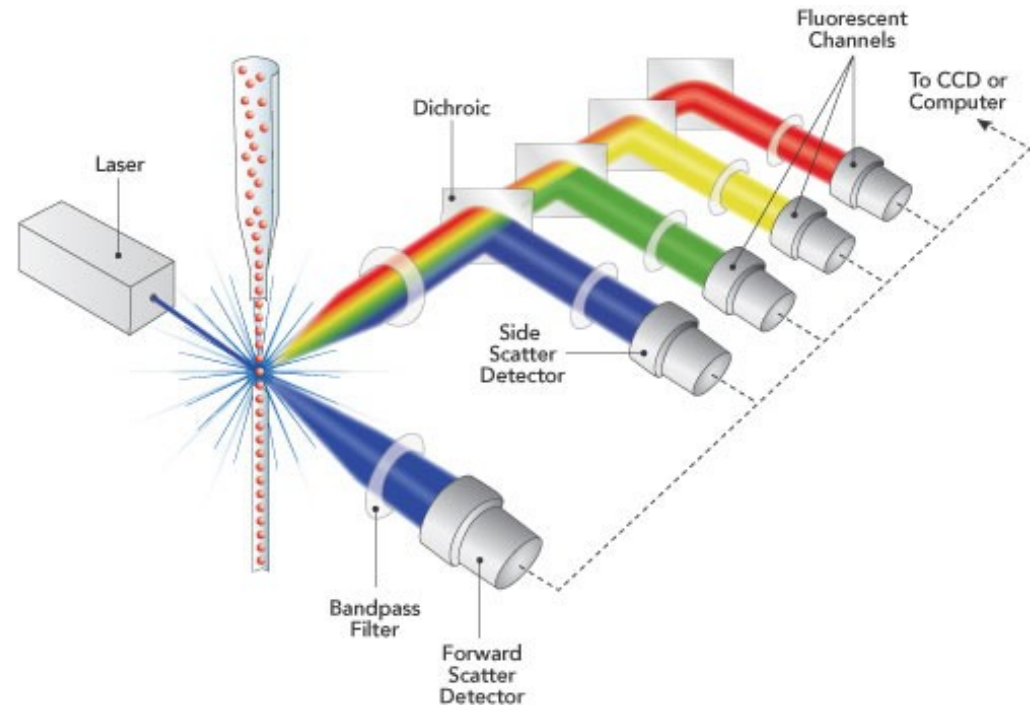
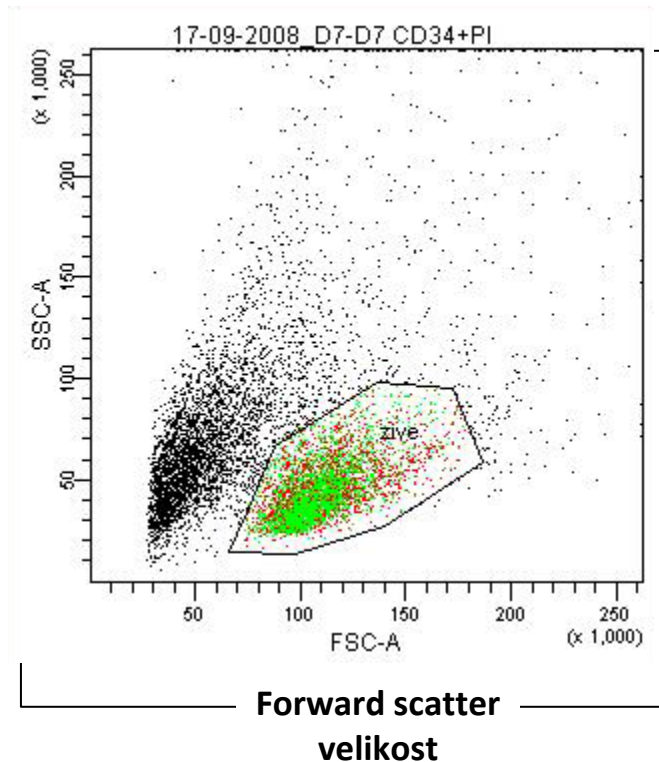


2. Průtoková cytometrie

Technika pro analýzu velkého množství buněk.

Na buňkách je možné analyzovat:

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

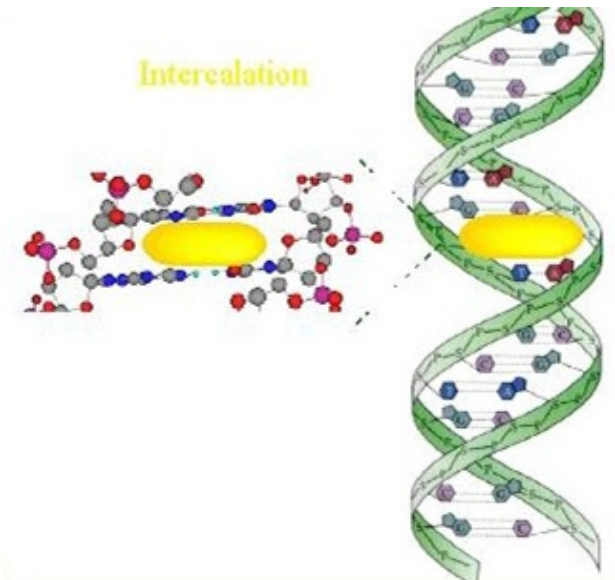
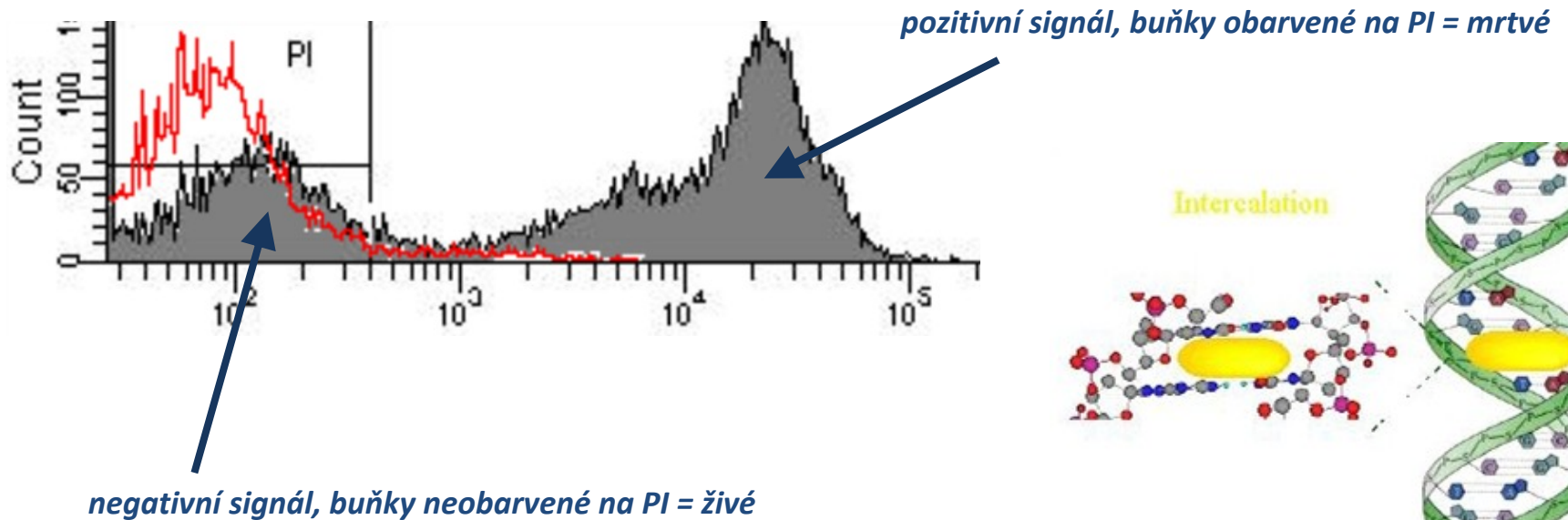


2. Flow cytometrie

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

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

Histogram barvení propidium jodidem



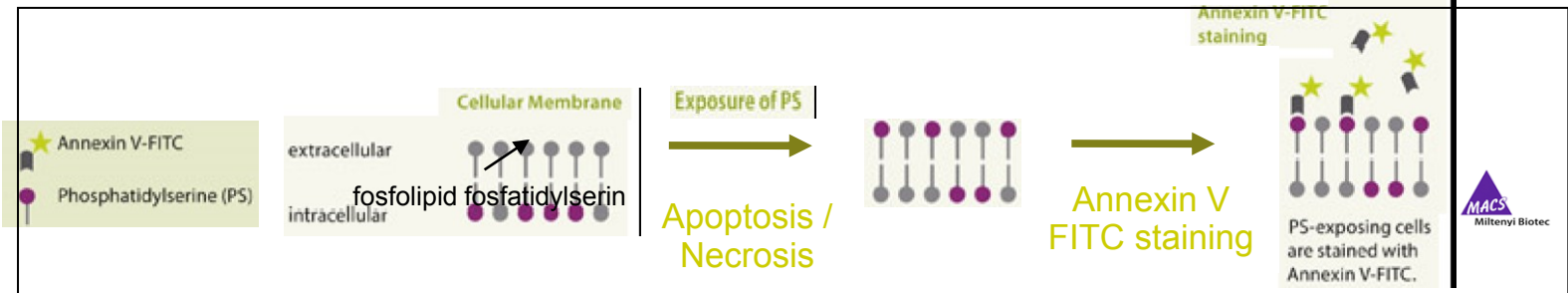
interkalace – vmezeření. I. do DNA – vmezeření určité látky mezi obě vlákna DNA

2. Flow cytometrie – translokace fosfatidylserinu

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)

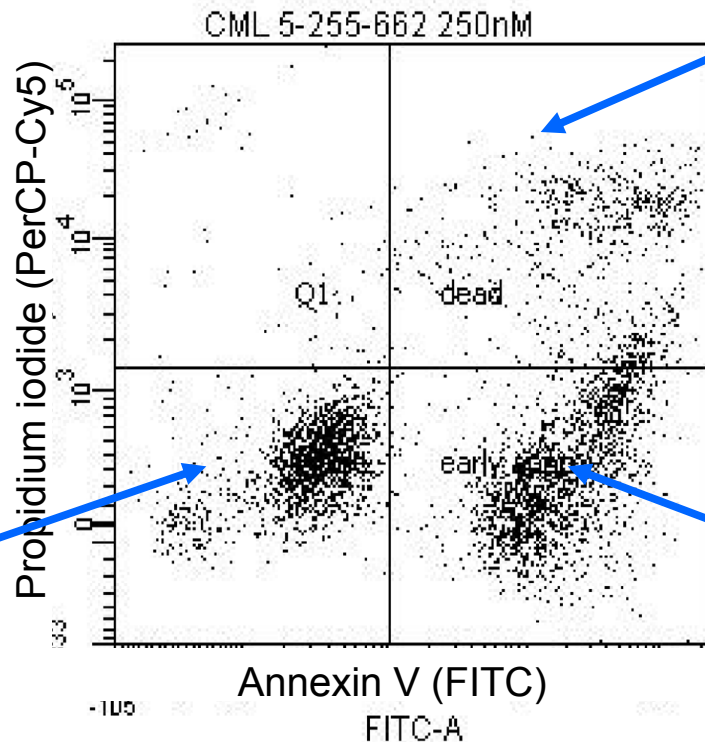
Annexin – protein s vysokou afinitou k fosfatidylserinu, který je translokován na povrch apoptických buněk, u nekrotických buněk se váže na fosfatidylserin z vnitřní strany



Annexin+PI-... časná apoptoza

Annexin+PI+... pozdní apoptoza/nekroza

Viable cells



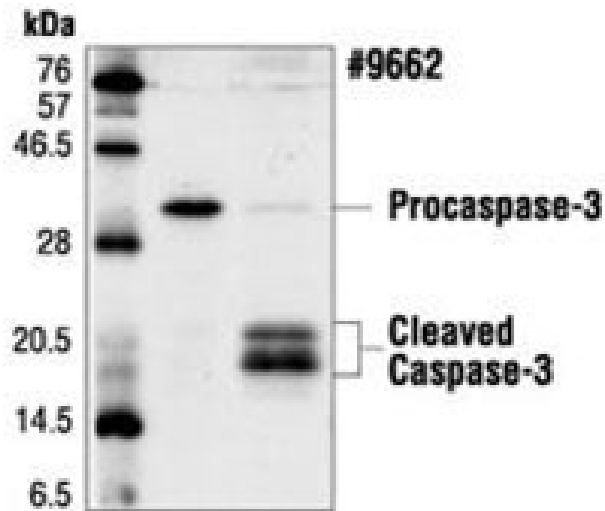
Late apoptotic or necrotic cells

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

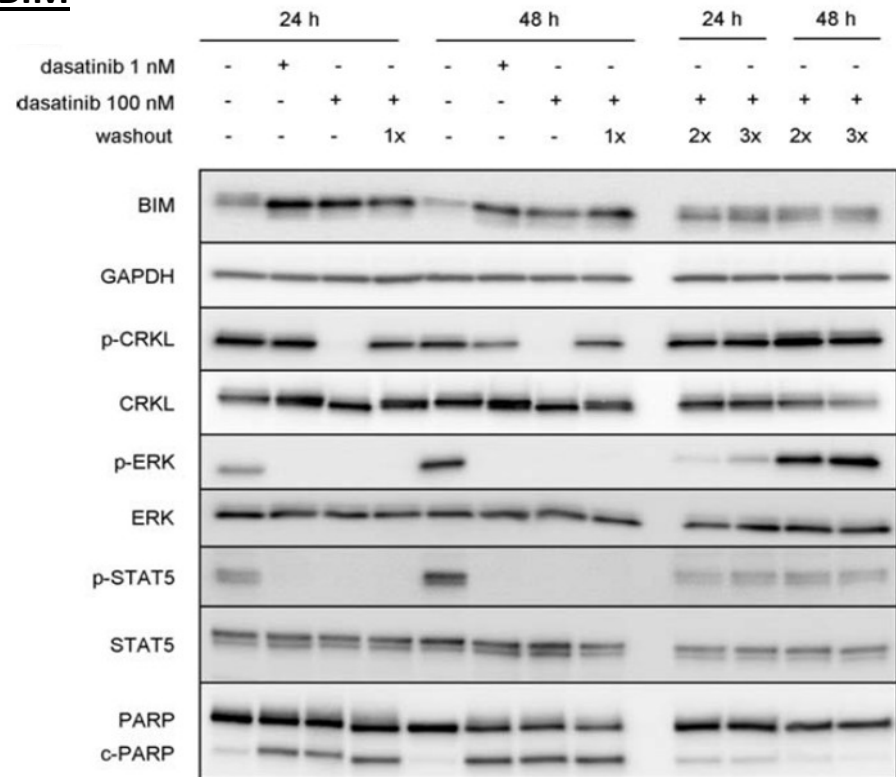


Figure 2. Effect of intermittent high-dose TKI treatment on signaling pathways in the K562 cell line. The cells were exposed to imatinib (A) or dasatinib (B) at a low dose continuously (2.5 μ M imatinib or 1 nM dasatinib), a high dose continuously (32.5 μ M imatinib or 100 nM dasatinib) or a high dose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

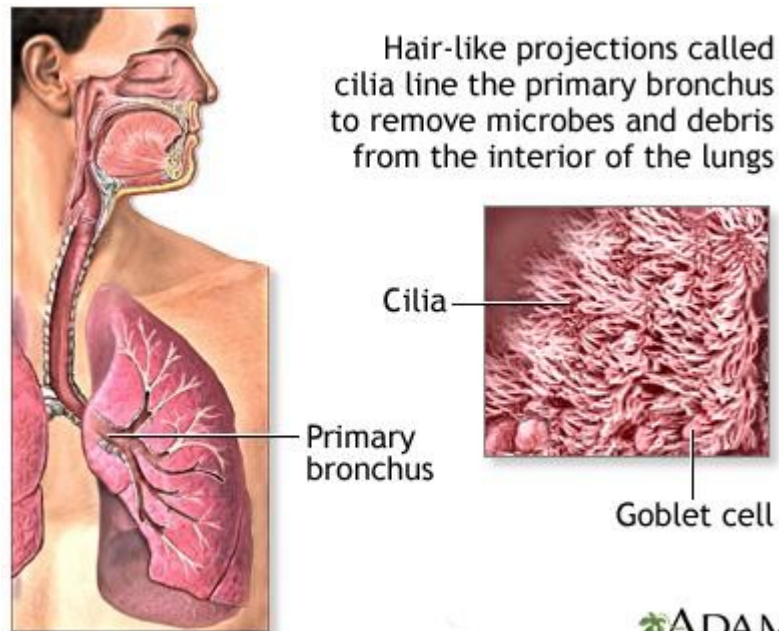
Imunitní systém

Imunitní systém

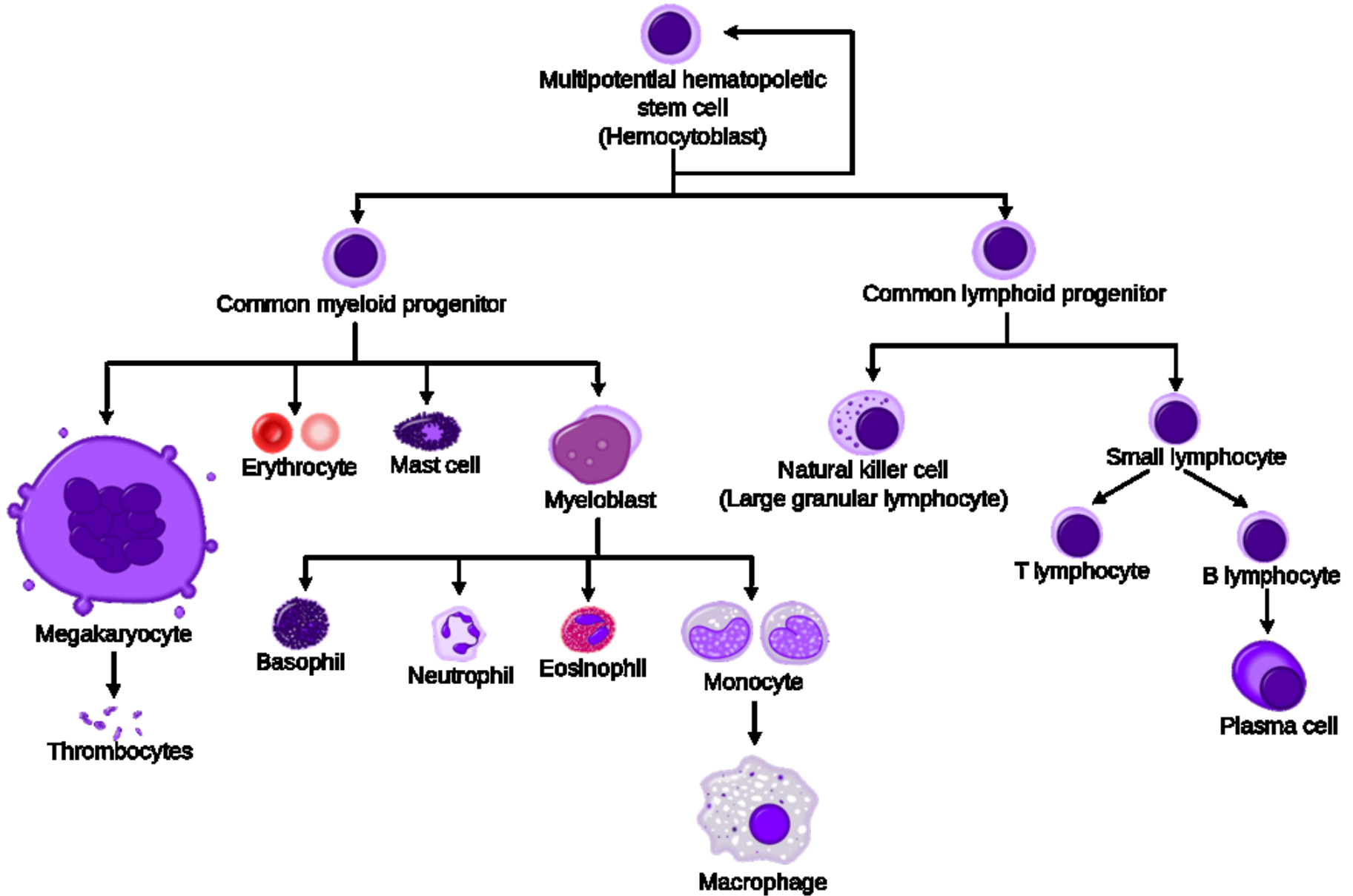
Existuje fyzická, chemická a buněčná obrana proti invazi bakterií a virů

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

- Vrozená imunitní odpověď, obecná odpověď na infekci patogenem
- Rychlá reakce pomocí které je vyvolán zánět

Granulocyty

a) **Neutrofil** - **nejběžnější granulocyt (30-85%)**, 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)

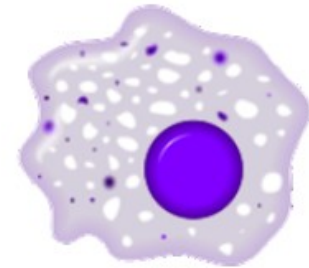
- vylučuje signály pro snížení průtoku krve v místě poranění a histamin
- signály pro zvýšení průtoku krve a propustnosti kapilár v okolí poranění, aby se fagocyty dostaly do místa poranění

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

- obsahují MHC (major histocompatibility complex) , který vystavuje antigen
- sekrece cytokinů, které přitahují další makrofágy a neutrofilly
- 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), velká individuální genetická variabilita
- 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 (antigen prezentující buňkou)
- prezentovaný antigen je rozeznáván TCR-receptorem T-lymfocytů

Typy MHC

1. MHC I (první třídy)

- prezentace **endogenních** peptidů: virový antigenní peptid či jinak vadní tělní buňky
- nacházejí se na většině jaderných buněk
- jsou rozeznávány T_C-lymfocyty (cytotoxické), které se aktivují k usmrcení podobných buněk

2. MHC II (druhé třídy)

- prezentace **exogenních** peptidů: peptidové fragmenty z **patogenů** fagocytovaných APC buňkou
- omezená exprese: dendritické buňky, B-lymfocyty, aktivované T-lymfocyty, makrofágy, endotelové buňky, epteliálne buňky.
- jsou rozeznávány pouze T_H-lymfocyty (pomocné)

Zánět

-faktory způsobující zánět: patogeny, trauma, teplota, toxiny...

-makroskopické projevy zápalu: calor (teplo), rubor (zrudnutí), tumor (otok), dolor (bolest), functio laesa (porucha funkce)

- **krevní destičky** vylučují srážlivé faktory

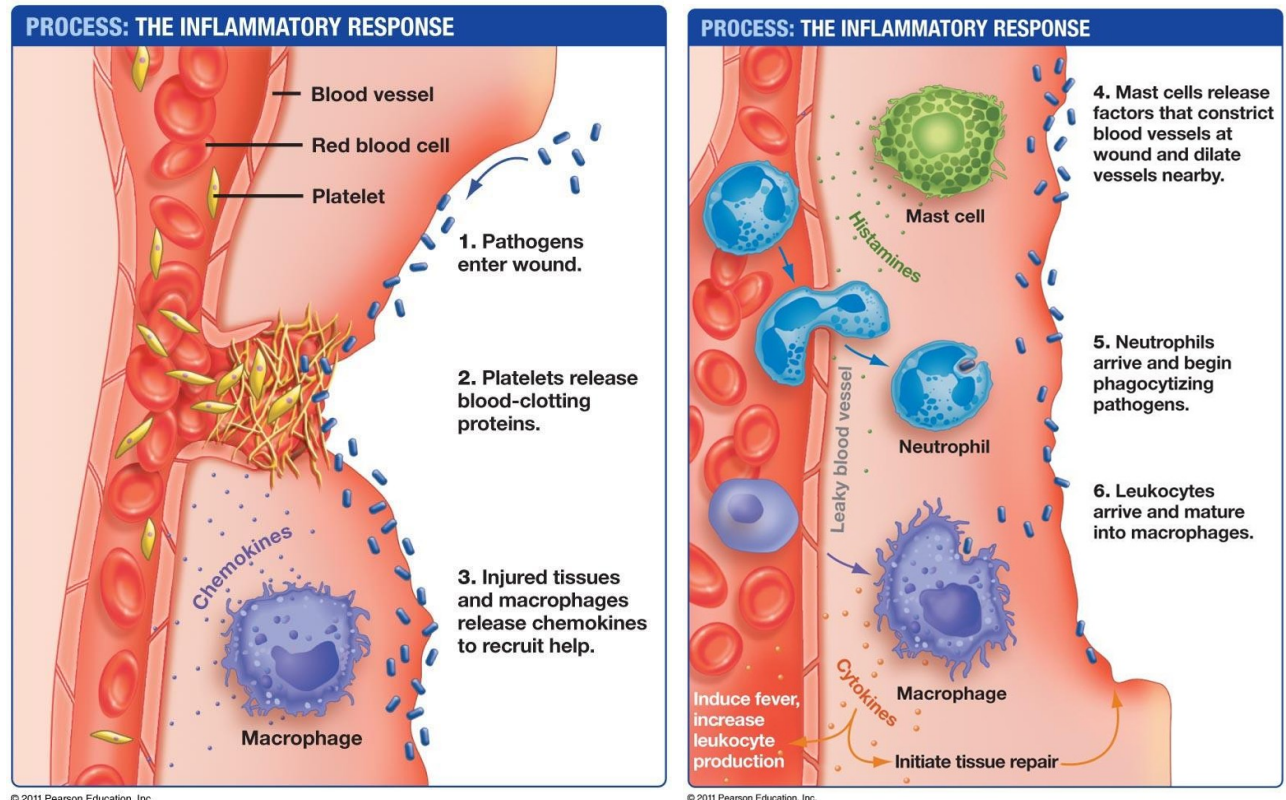
(1) Makrofágy, (2) Neutrofil, (3) Mastocyty

- makrofágy a buňky poraněné tkáně vylučují cytokiny, které přivolávají pomoc

- změny ve stěnách kapilár umožňují průchod velkého množství leukocytů

- **mastocyty** indukují vazokonstrikci poraněných cév a vazodilataci okolních cév

- zvýšení teploty



Imunitní systém

3. linie obrany - specifická imunitní odpověď

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

-adaptivní imunitní reakce – zúčastňují se humorální komponenty: protilátky a buněčné komponenty:

lymfocyty (patří mezi **agranulocyty** spolu s **monocyty**)

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

T-lymfocyty jsou tímto informovány o typu patogenu

- **Pomocné (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:

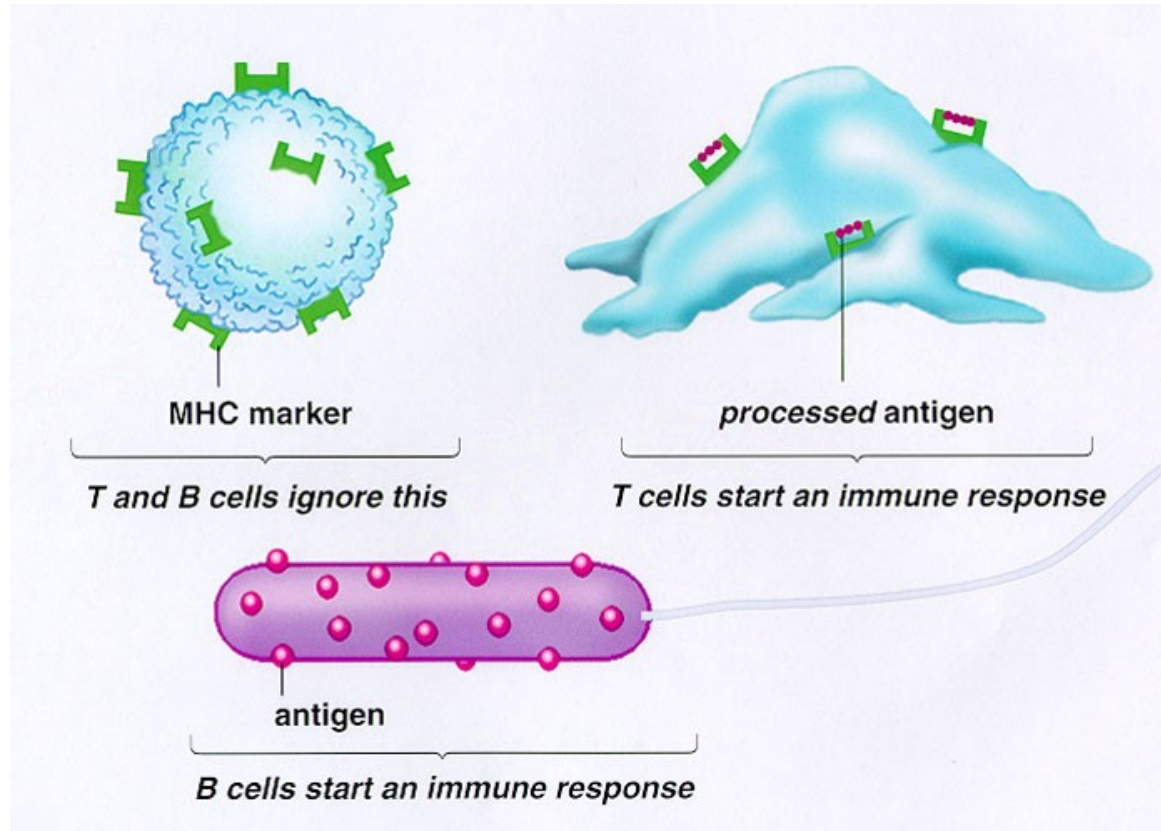
1. Rozeznání specifické cizí částice
2. Opakované buněčné dělení a vytvoření obrovské populace klonů lymfocytů
3. Diferenciace do subpopulací efektorových a paměťových buněk

Imunitní systém

3. linie obrany - specifická imunitní odpověď

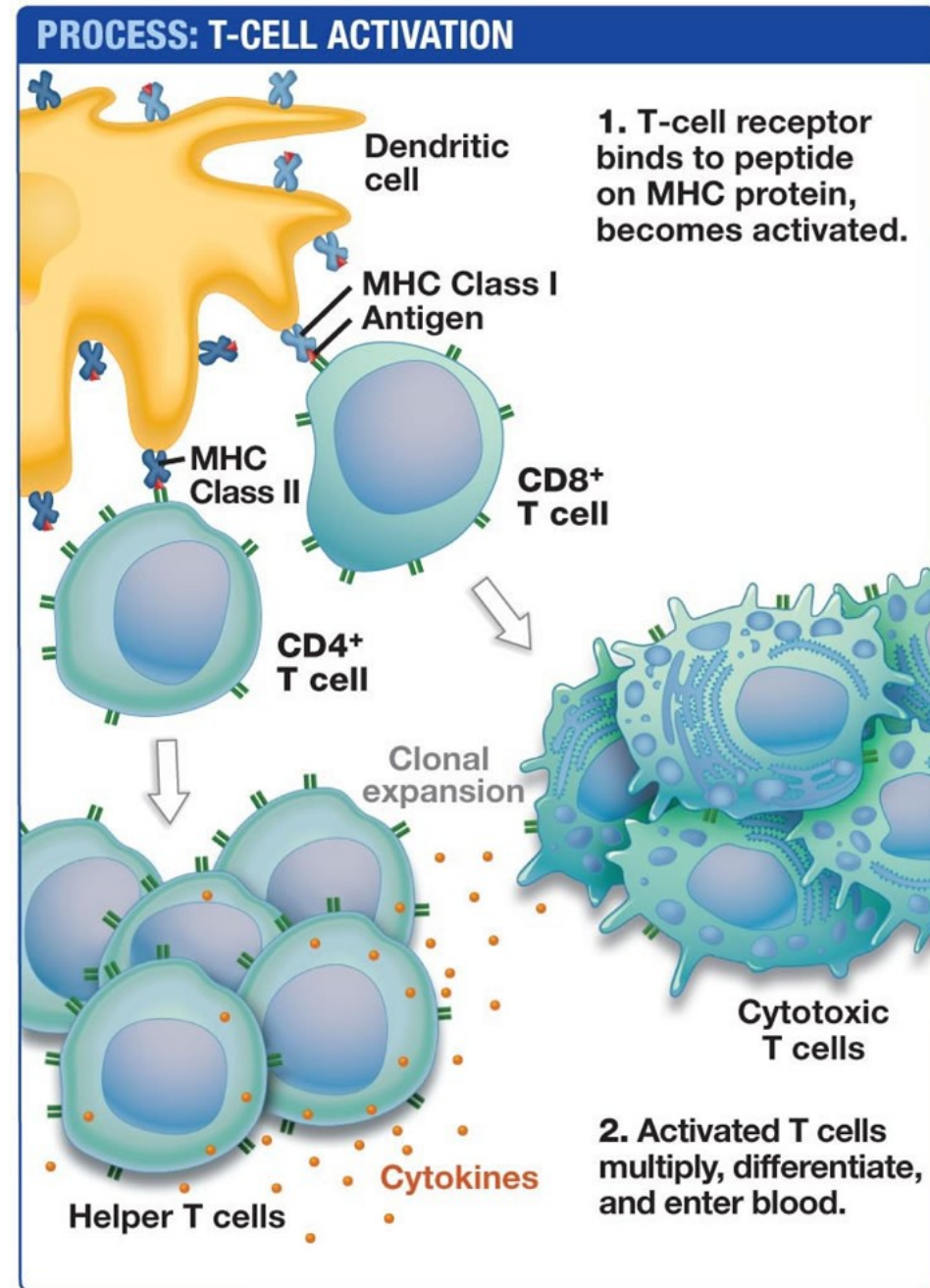
Antigen-prezentující buňka

- 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)

- tvorba 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 antigenně specifické receptory
- T lymfocyty ignorují buňky s prázdnými MHC antigeny, stejně jako volně plovoucí antigeny
- váží se však na antigeny, vystavené na povrchu APC v MHC komplexu
- vazba indukuje rapidní proliferaci do **efektorových** a **paměťových** buněk s receptorem pro daný antigen



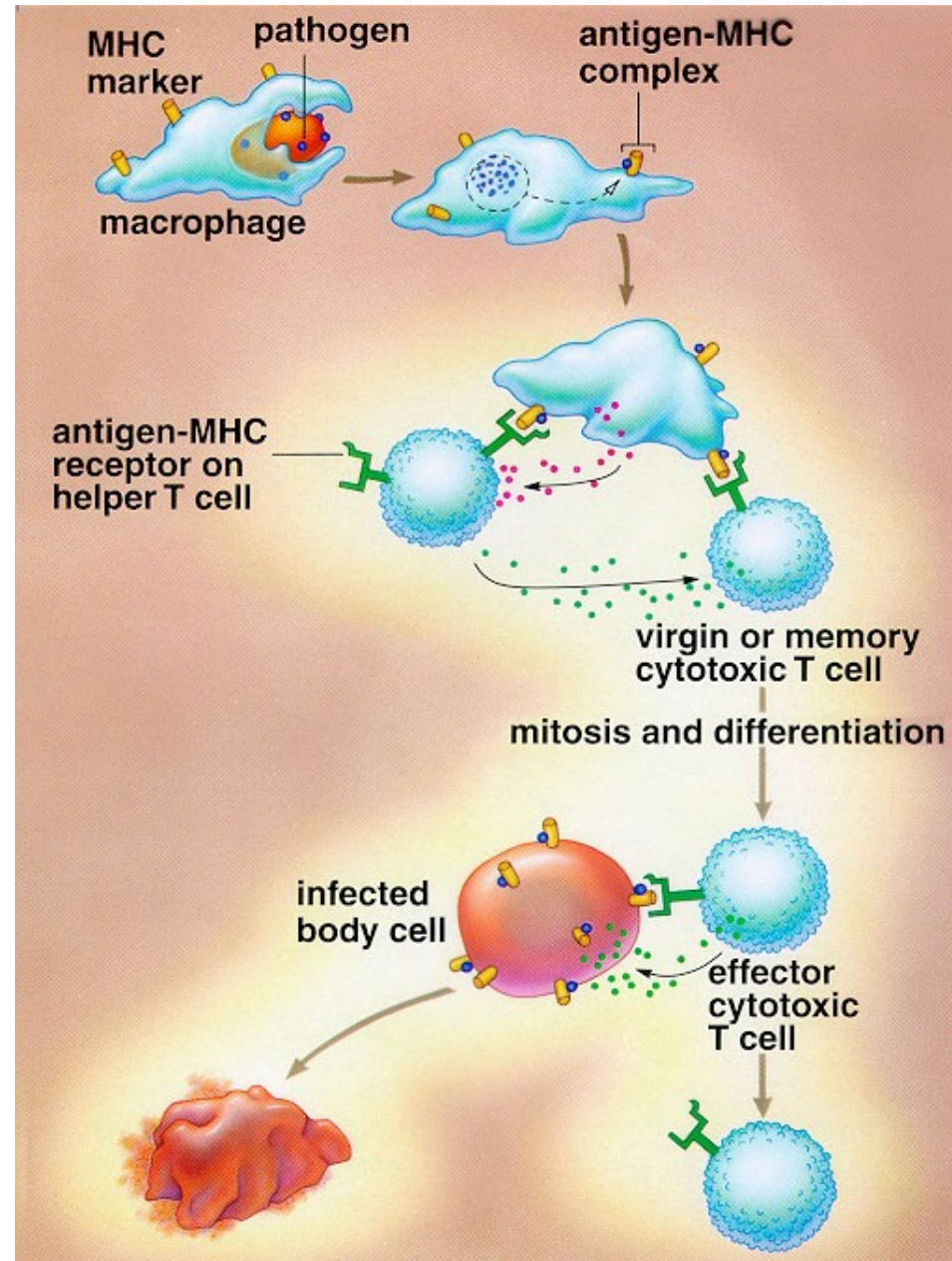
T-lymfocyty (Thymocytes)

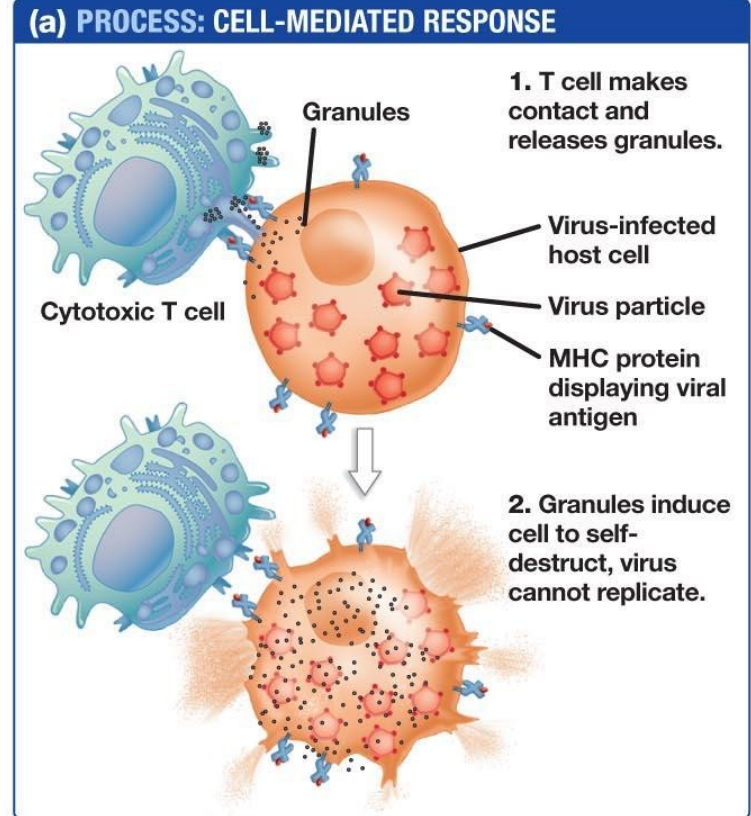
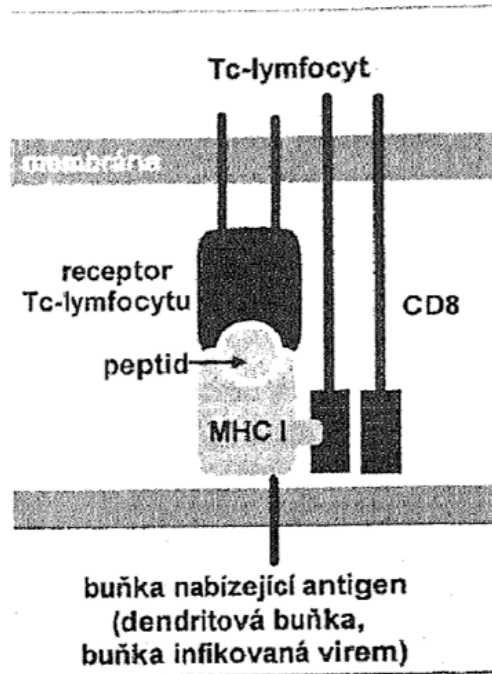
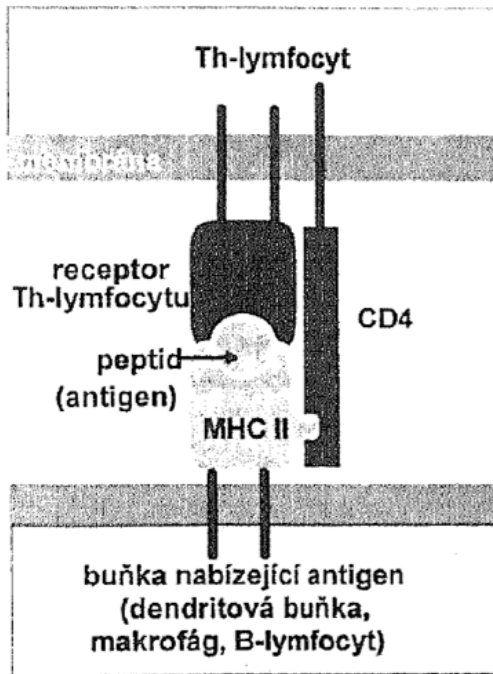
1. Efektorové T-helper lymfocyty (CD4)

- sekretují interleukiny → stimulace dalších buněk
- na povrchu mají protein CD4, který se váže na MHC II molekuly

2. Efektorové cytotoxické T lymfocyty (CD8)

- rozpoznávají infikované či jinak vadné buňky a vyvolávají u nich APOPTOZU:
 - uvolnění cytotoxických látek (perforiny+gramzomy), které pronikají do cytoplasmy a spouští kaspázovou kaskádu
 - exprese povrchového proteinu Fas-ligand, který se váže na Fas-receptor
- na povrchu mají protein CD8, který se váže na MHC I molekuly



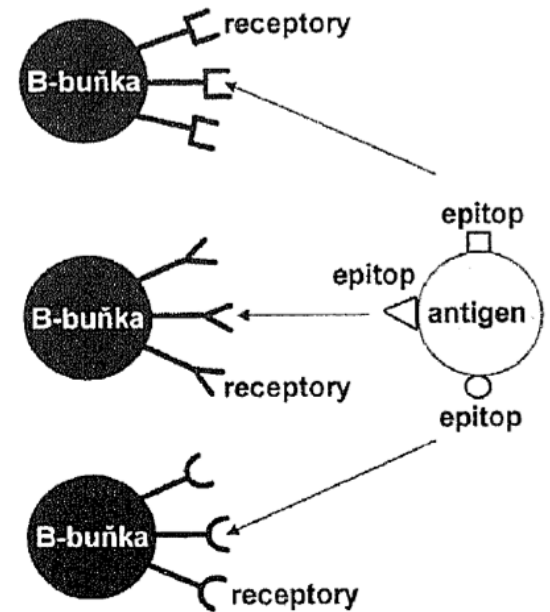


B-lymfocyty

- prekurzory se tvoří v kostní dřeni u dospělých a játrech plodu
- B-lymfocyt produkuje jeden typ protilátky (imunoglobulin), které se uchytí na povrchu
- 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 determinanta** neboli **epitop**

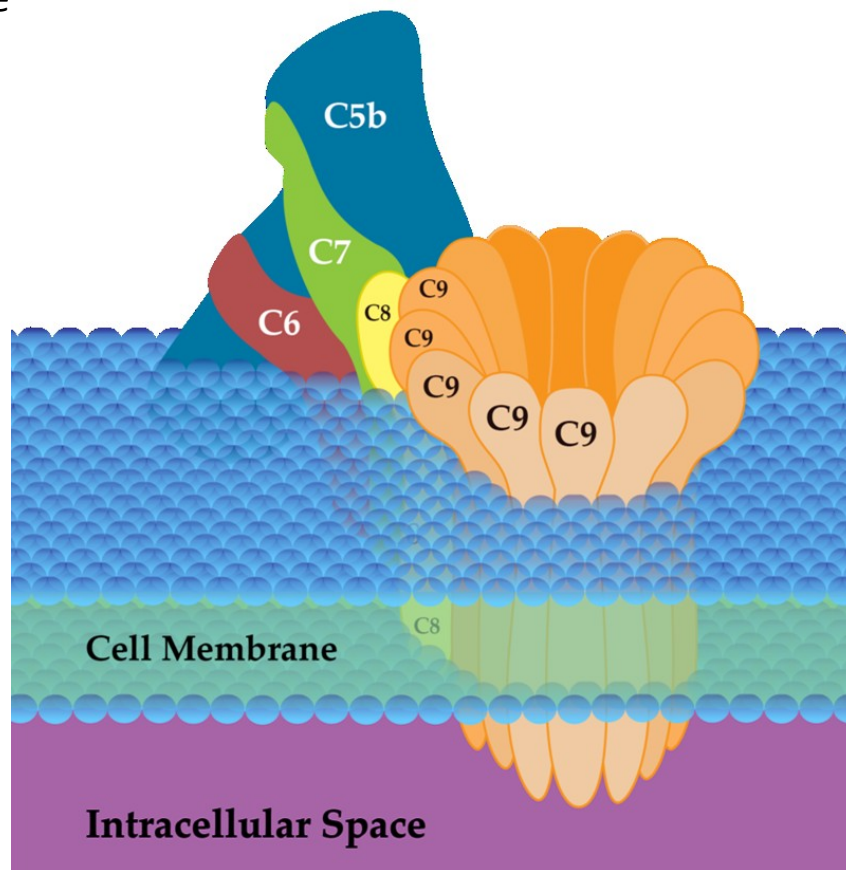


Obr. 320
Vztah antigenních determinantů k jejich receptorům

Komplement

Imunitní mechanismus zvyšující (doplňující, komplementující) účinnost protilátek

- Nespecifický (vrozený) a neadaptibilní
- soubor malých glykoproteinů (inaktivně prekurzory), tvořených v játrech a cirkulujících v krvi
- aktivace: imunokomplex (Ag+Ab), povrchy virů (lipopolysacharid G- bakterií, kyselina teichoová G+ bakterií), navázání MBP na manózu bakterií...
- po aktivaci dochází k proteolytickému štěpení jednotlivých složek komplementu (tzv. faktorů) atakuje membrány patogenů, ve kterých způsobuje póry (kanály) → lyze buňky



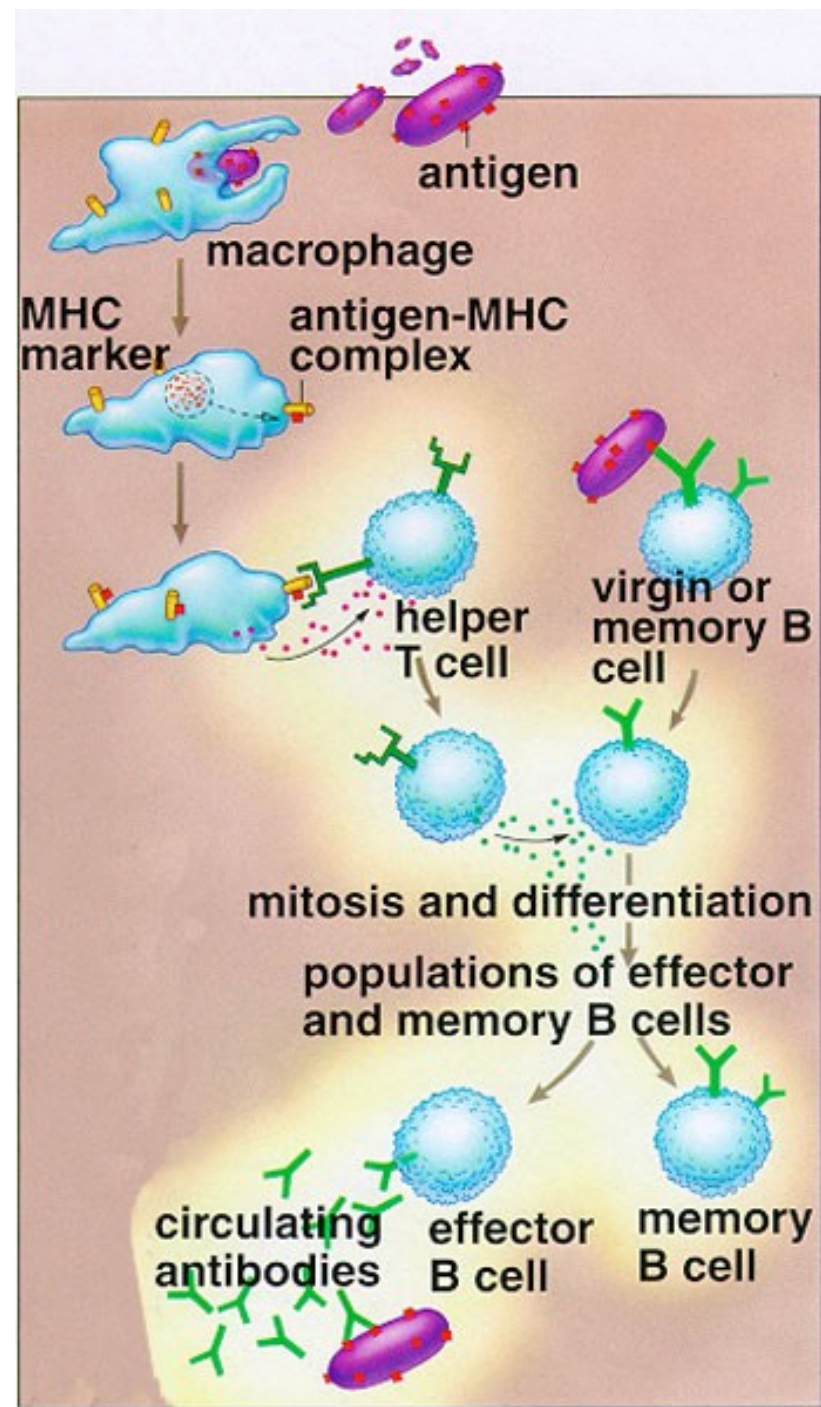
Vlastnosti B-lymfocytů

1. Mají na 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. Nutno též potvrzení od TH

Navíc B-cell fungují jako APC. antigen je nabízen T_H -lymfocytům.

Neaktivuje se dokud nedostane "potvrzení" od T helper

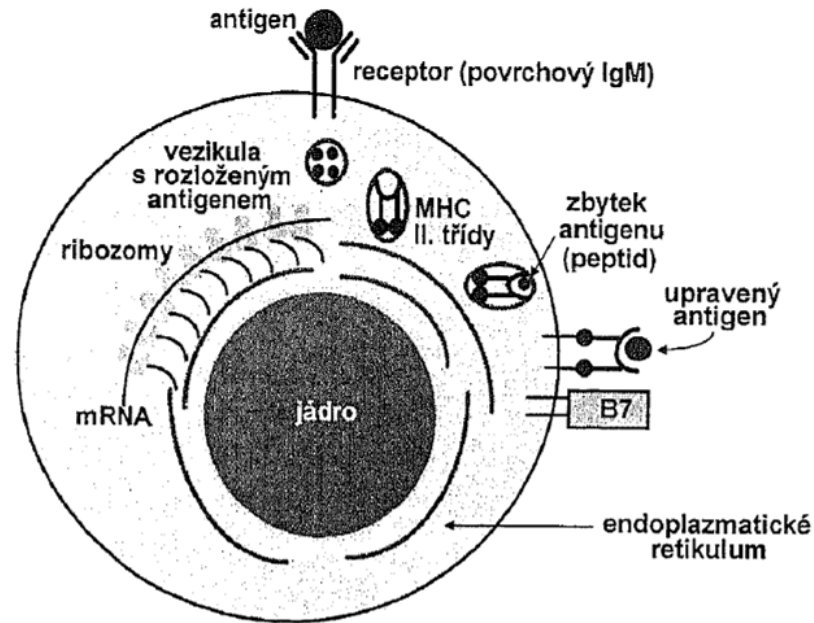


Antigen-presenting cells (APC; buňky prezentující antigen)
na povrchu vystavují antigen, který je rozeznáván T-lymfocyty

Existují 3+1 typy APC buněk:

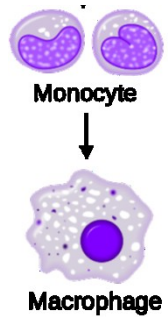
1. B-lymfocyty

- 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 lymfoideálních 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 produkuje 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

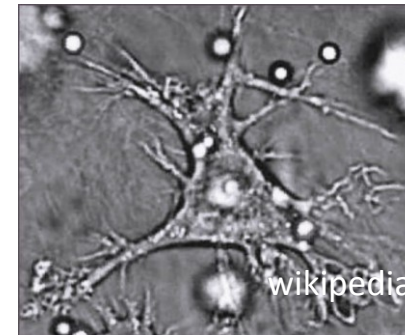
b) Intersticiální dendritické buňky

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

c) Proplétající se dendritické buňky

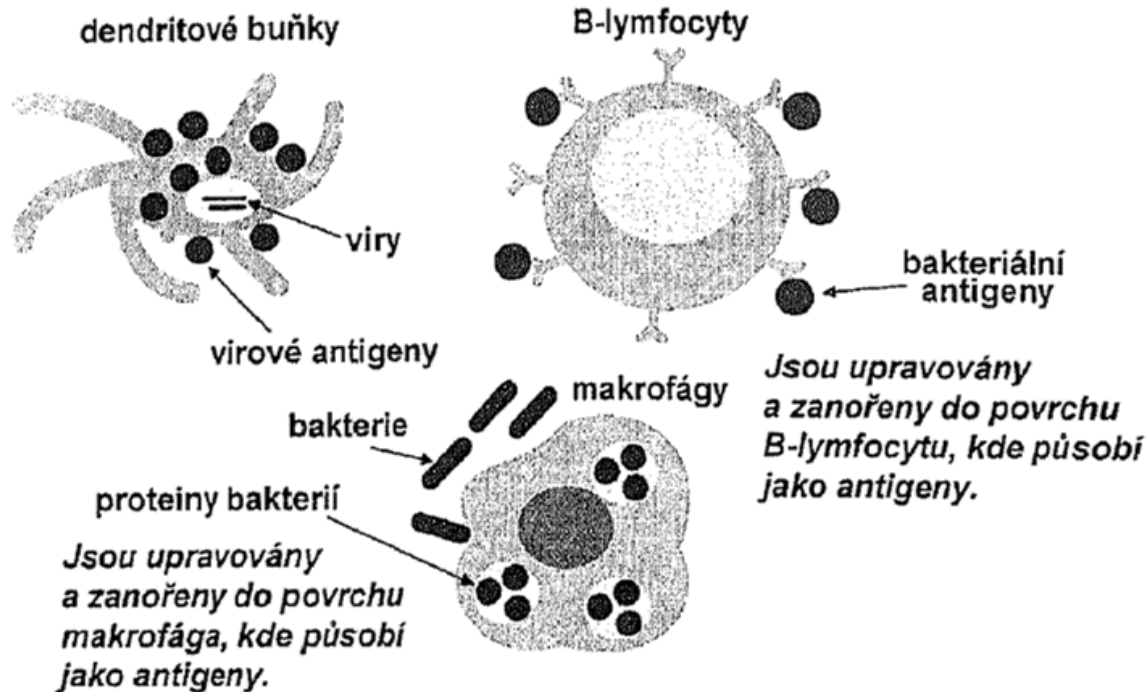
- v sekundárních lymfoidních orgánech spolu s T-lymfocyty

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



(4). Buňky infikované 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_C-lymfocyty** a infikovaná buňka je zničena **apoptozou**

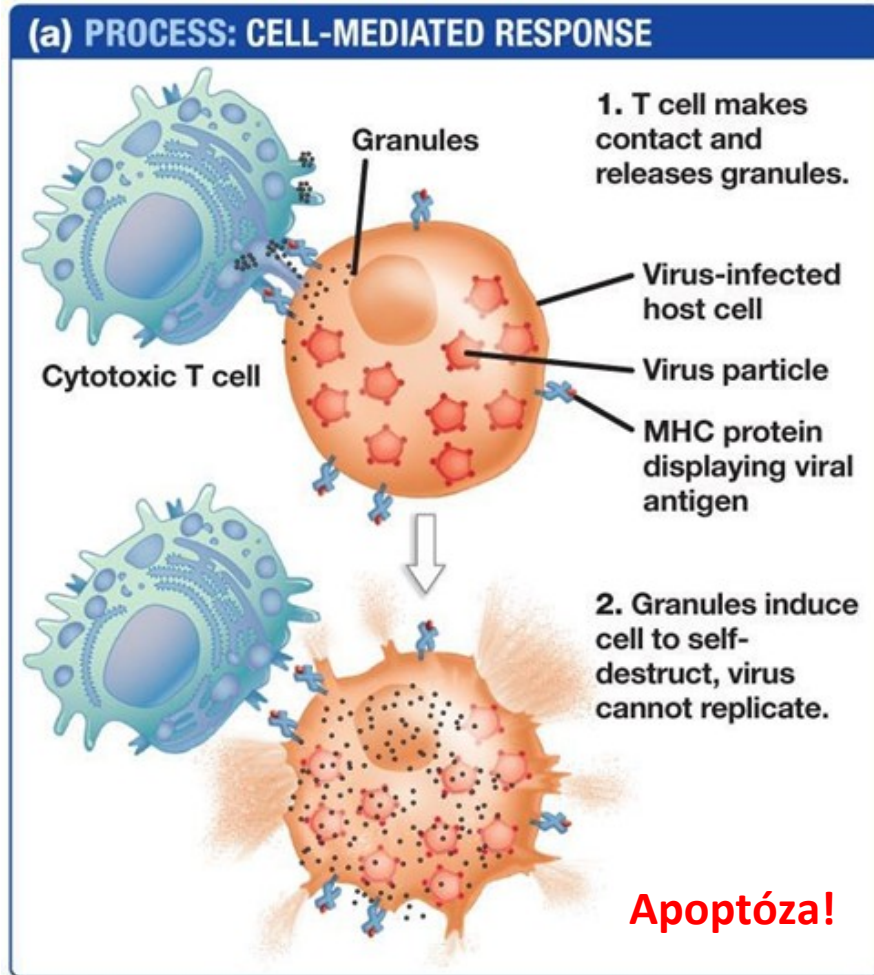


Obr. 322
Buňky nabízející antigen

a) Buněčná imunita

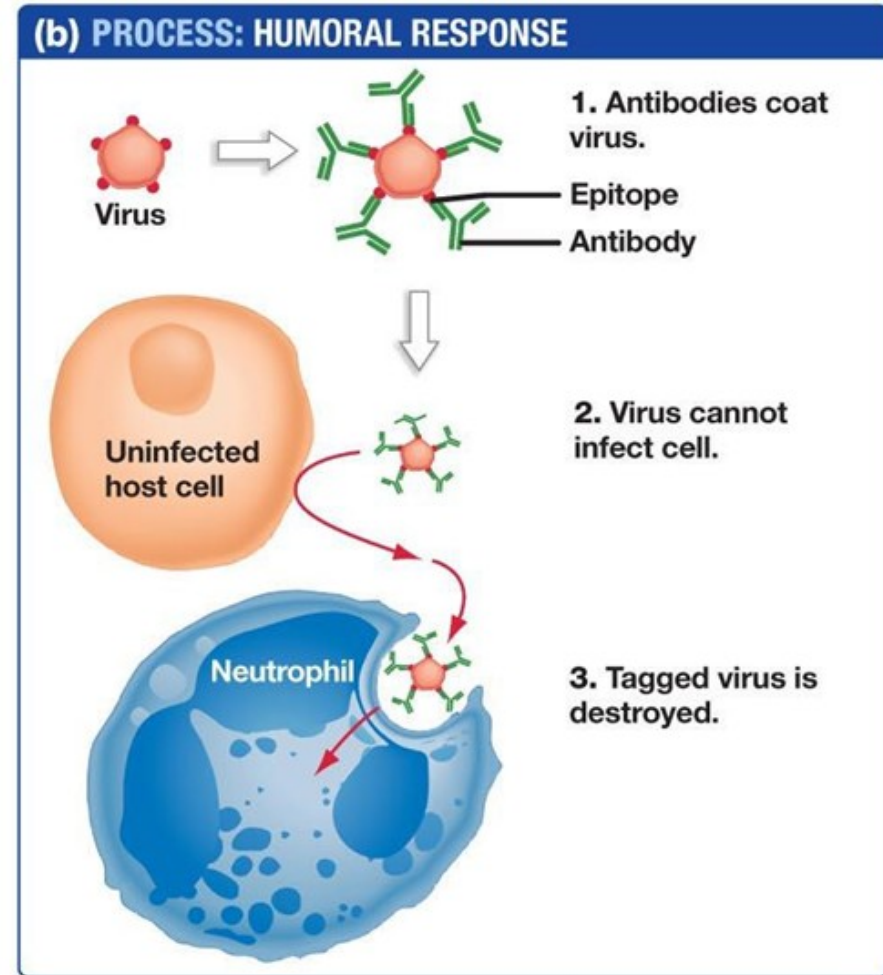
zprostředkovaná T-lymfocyty

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



b) Humorální imunita

zprostředkovaná specifickými protilátkami produkovanými B-lymfocyty do tělních tekutin



Imunoglobuliny (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 N-koncové části (antigen-binding site), která je extrémně variabilní (V oblast)
- Variabilní úseky těžkého a lehkého řetězce vytvářejí vazebné místo → existence milionů jemně odlišných verzí protilátek
- klasifikace protilátek je založena na typu Fc fragmentu (těžkého řetězce)

Imunoglobulinové třídy:

1. IgA (2 typy)

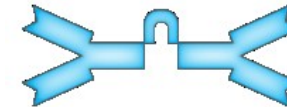
- hlavně na sliznicích (trávicí, dýchací..) a ve slinách, mléku...
- zabraňuje kolonizaci patogeny - vysoká denní produkce



Monomer
IgD, IgE, IgG

2. IgD (1 typ)

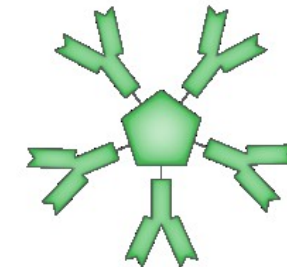
- antigenní receptor na B-lymfocytech - BCR (spolu s IgM)
- aktivuje bazofily a mastocyty k produkci antimikrobiálních faktorů



Dimer
IgA

3. IgE (1 typ)

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



Pentamer
IgM

4. IgG (4 typy)

- v krevním séru tvoří až 80% všech imunoglobulinů

5. IgM (1 typ)

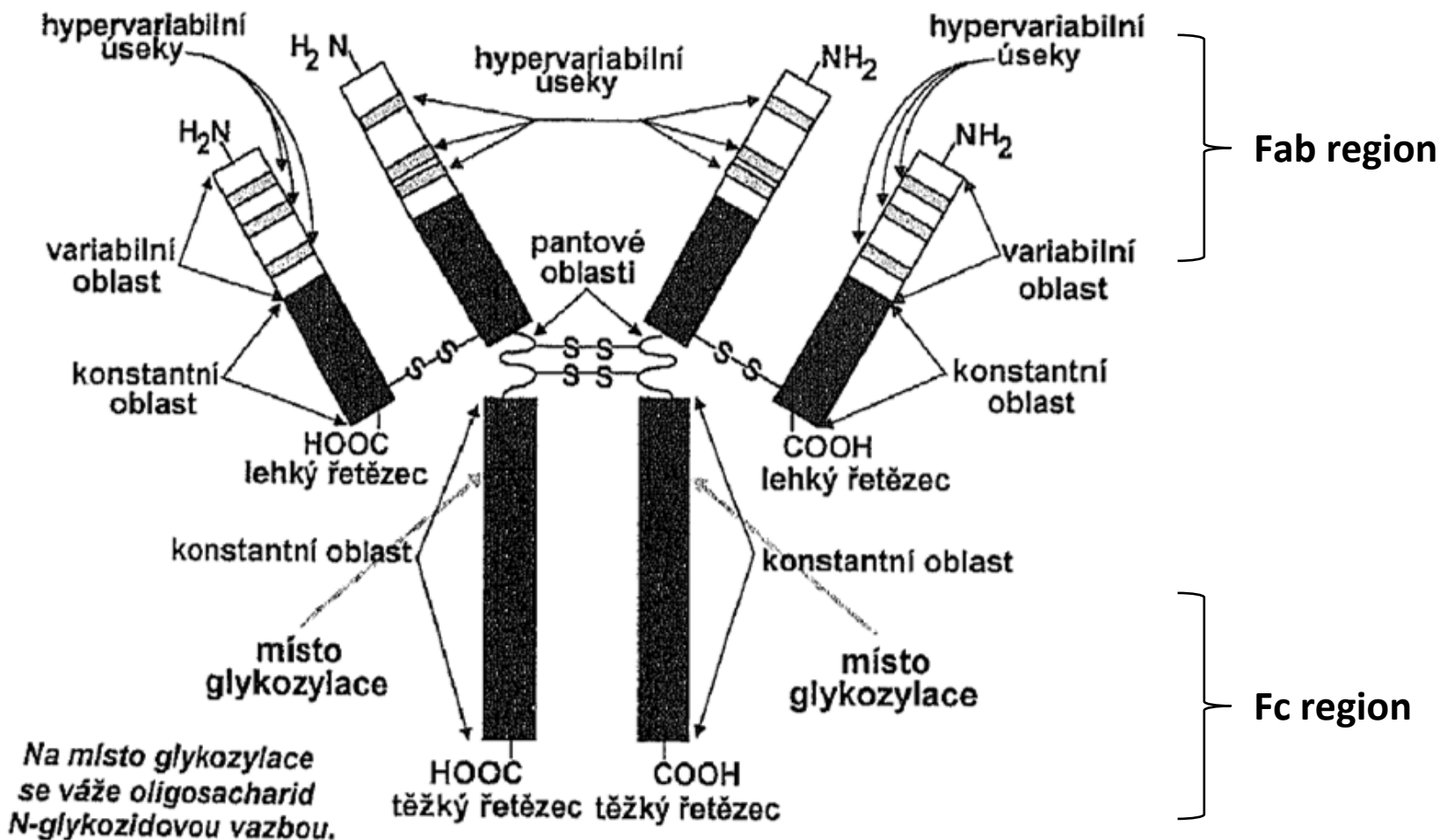
- vázán na membránu B-lymfocytů, kde působí jako receptor pro antigen - BCR
- nejúčinnější ve vazbě virových částic

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

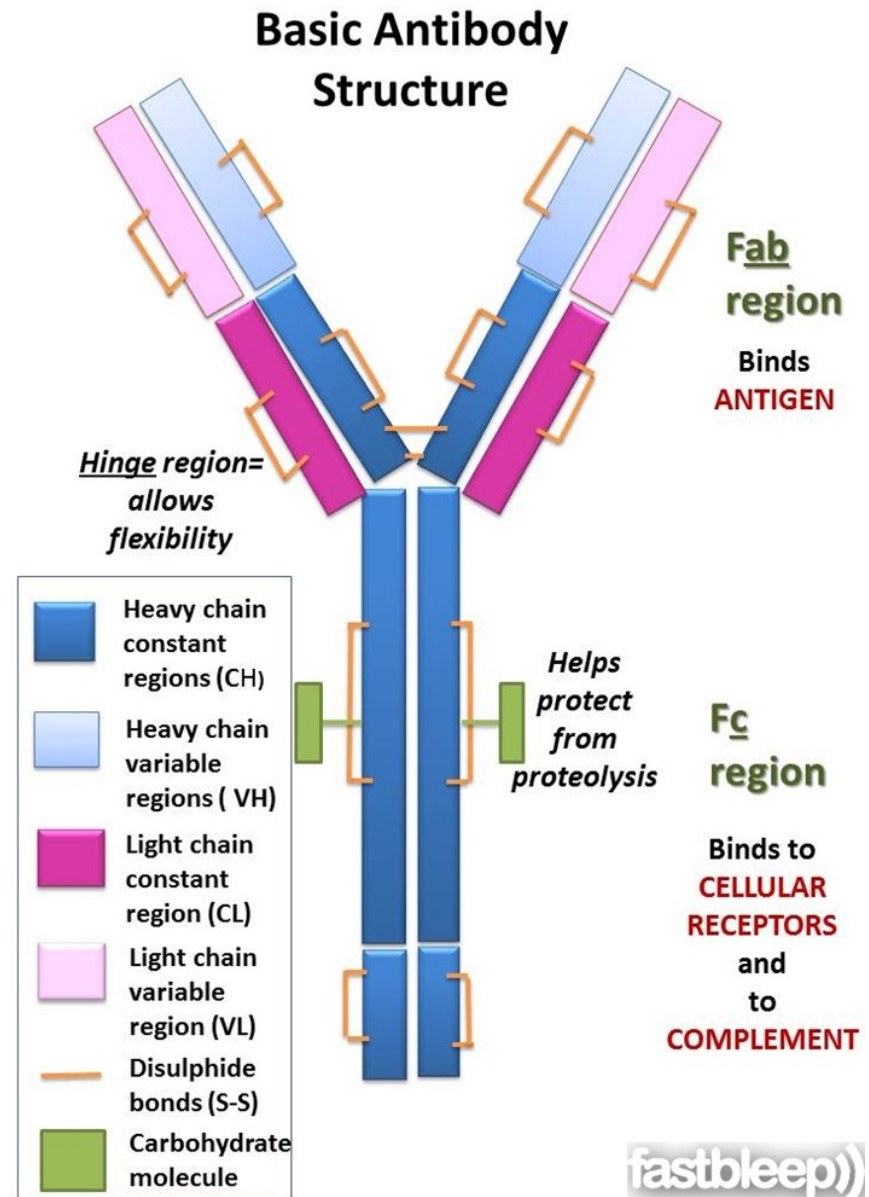
- ohebnost usnadňuje vazbu na antigen

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)

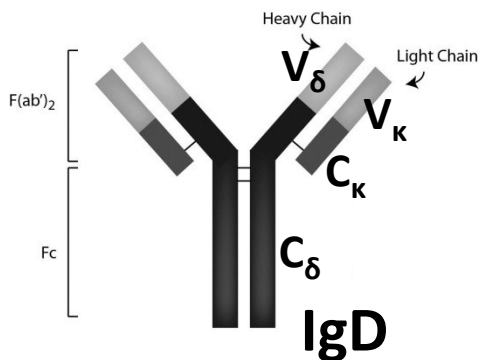
Těžké řetězce

- 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:

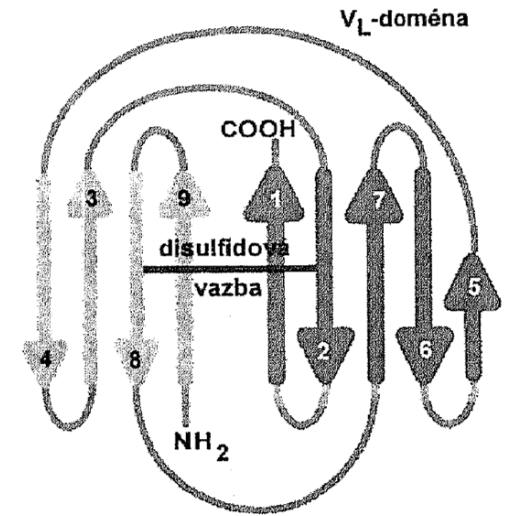


Klasifikace lidských imunoglobulinů

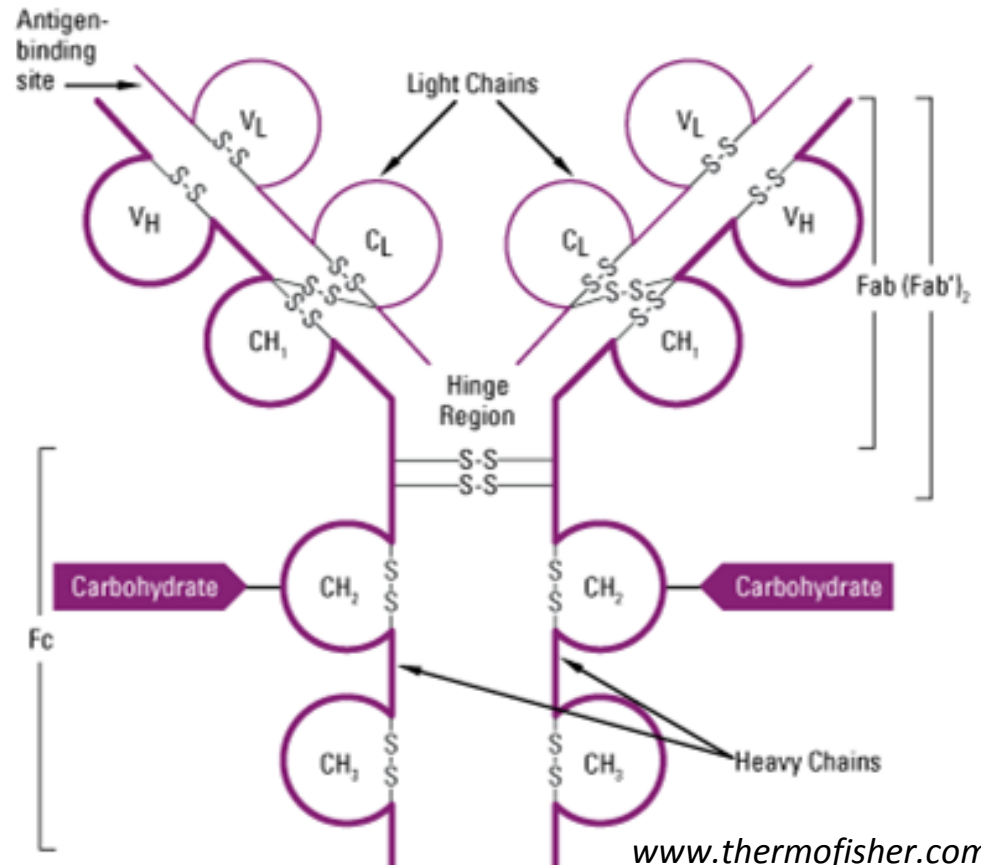
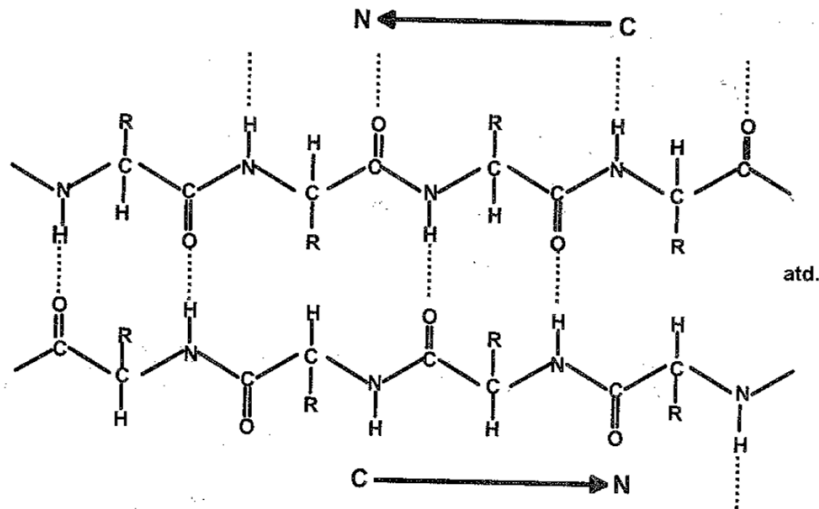
Třída	Podtřída	Lehký řetězec (L)	Těžký řetězec (H)	Celková molekulární hmotnost	Počet lehkých a těžkých řetězců v molekule
IgG	IgG1	κ nebo λ	$\gamma 1$	146 000	L_2H_2
	IgG2		$\gamma 2$	146 000	
	IgG3		$\gamma 3$	165 000	
	IgG4		$\gamma 4$	146 000	
IgA	IgGA1		$\alpha 1$	160 000	L_2H_2 nebo $(L_2H_2)_2$
	IgGA2		$\alpha 2$	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 (přeskupování genových segmentů)

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

(V) ... variable

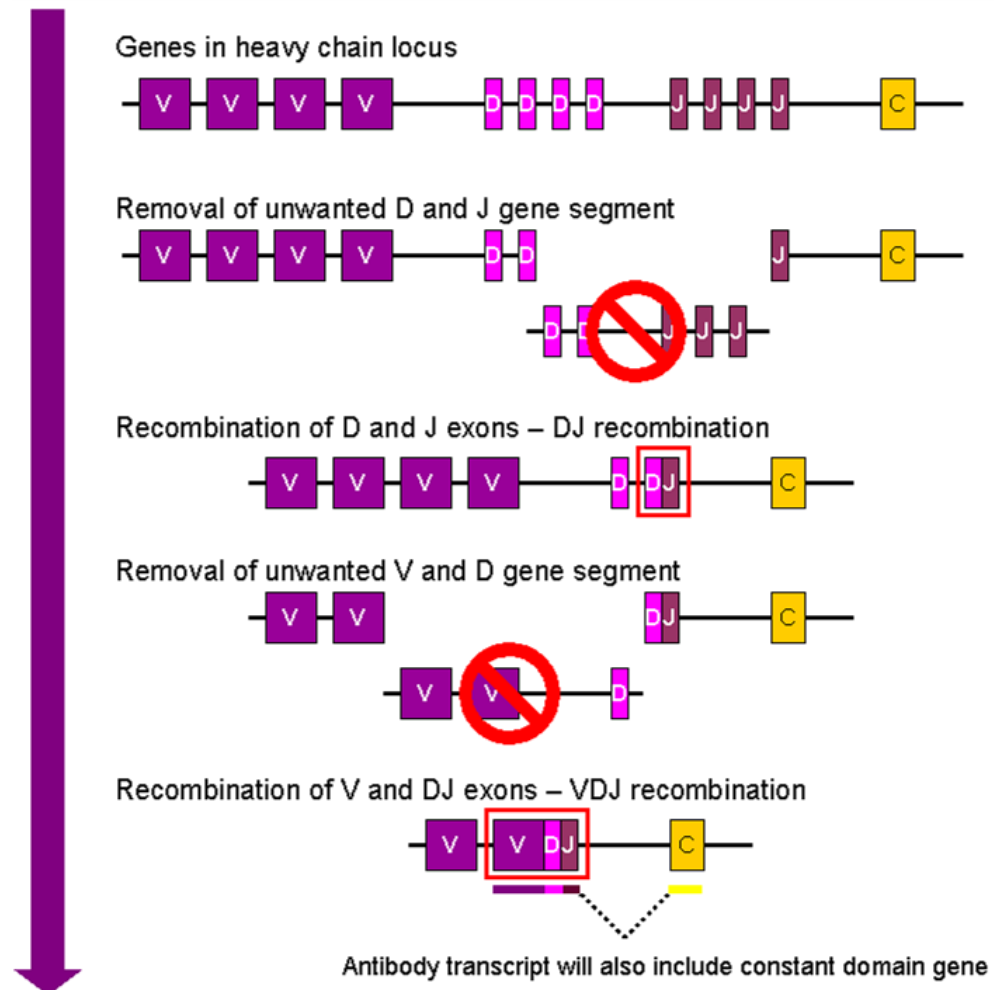
(D) ... diversity

(J) ... joining

**Cíl: vytvářet jedinečné protilátky,
které společně dokážou 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



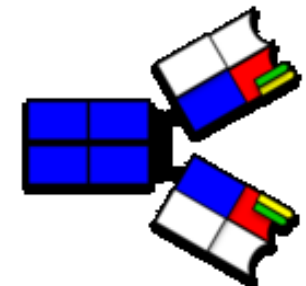
(2) V to DJ recombination



(3) Transcription & splicing

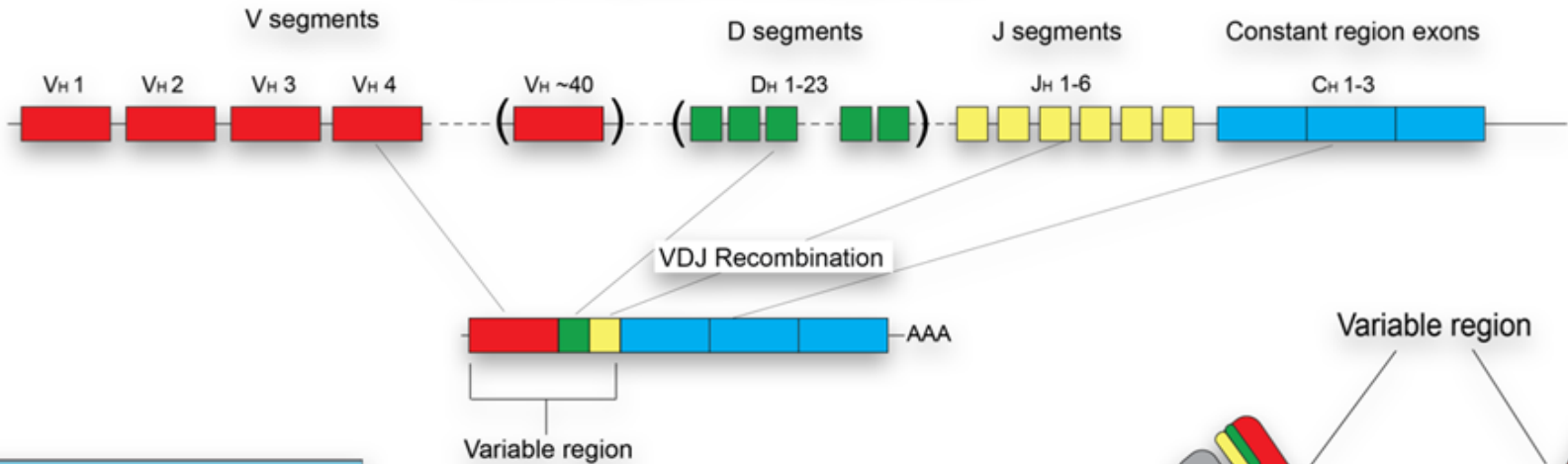


(4) Translation & assembly

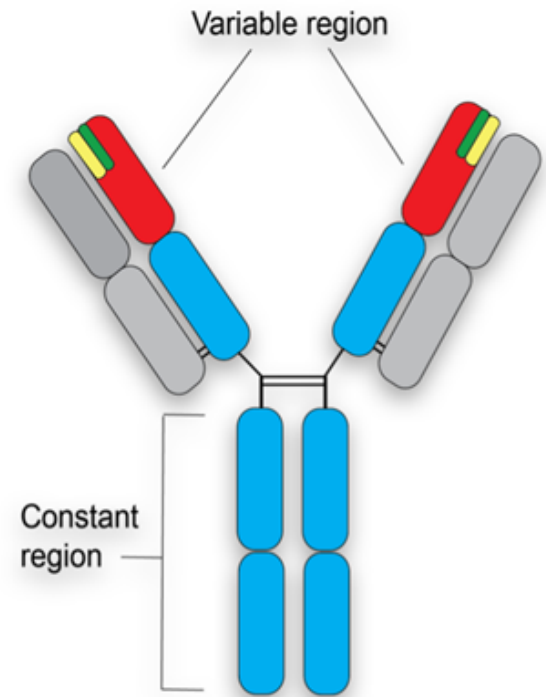
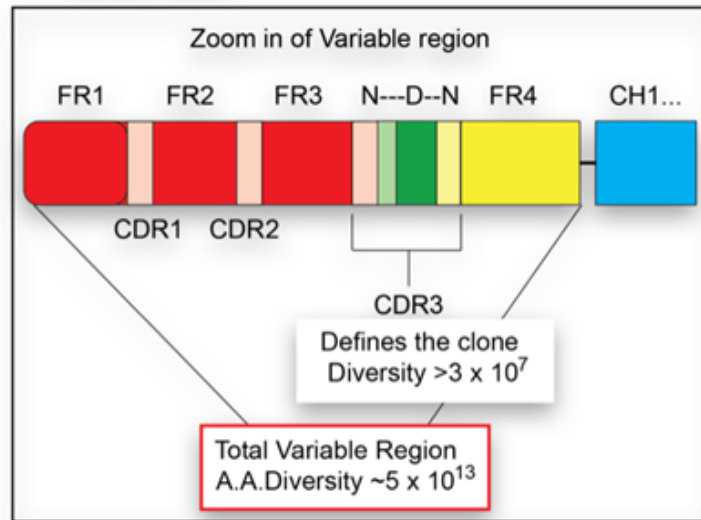


VDJ recombination

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)

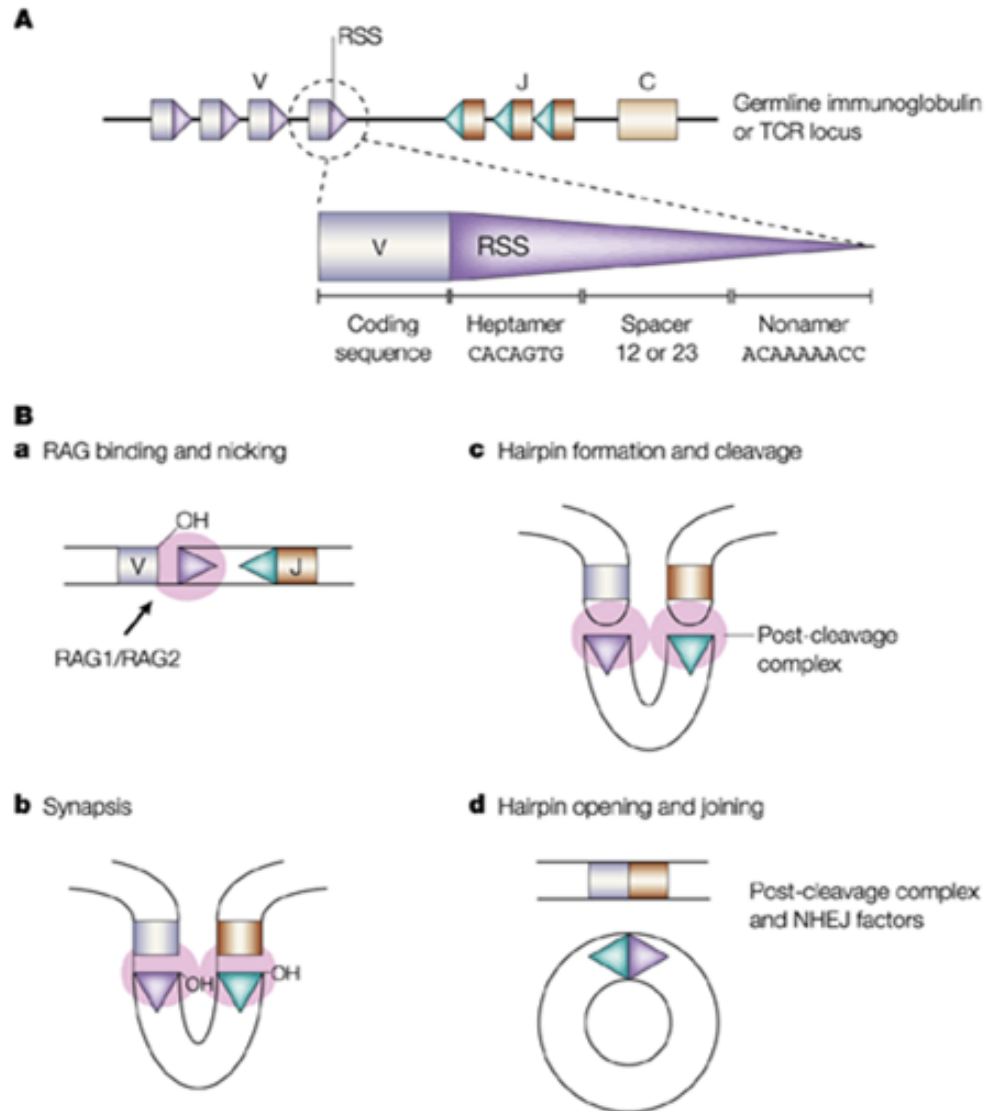
- označuje místo sestřihu (vazba RAG)

RAG1/RAG2 (recombination-activating genes)

- enzymy katalyzující VDJ rekombinaci

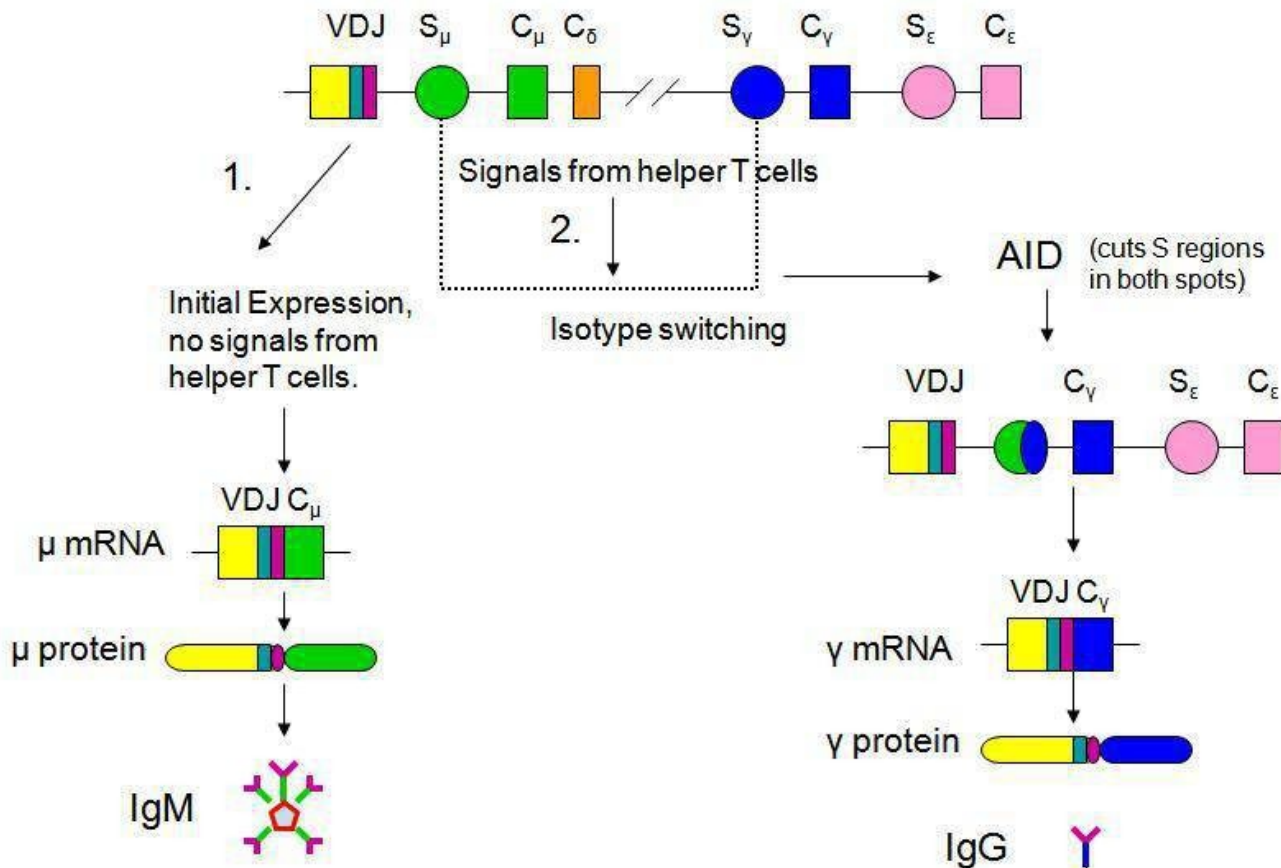
- vazba na RSS

- U dětí s funkční poruchou RAG1 a RAG2 → těžká imunodeficeience, nepřítomnost zralých T- a B-lymfocytů (nevytvoří se ani BCR a TCR)



Přesmyk imunoglobulinových tříd (izotypový přesmyk)

- **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"

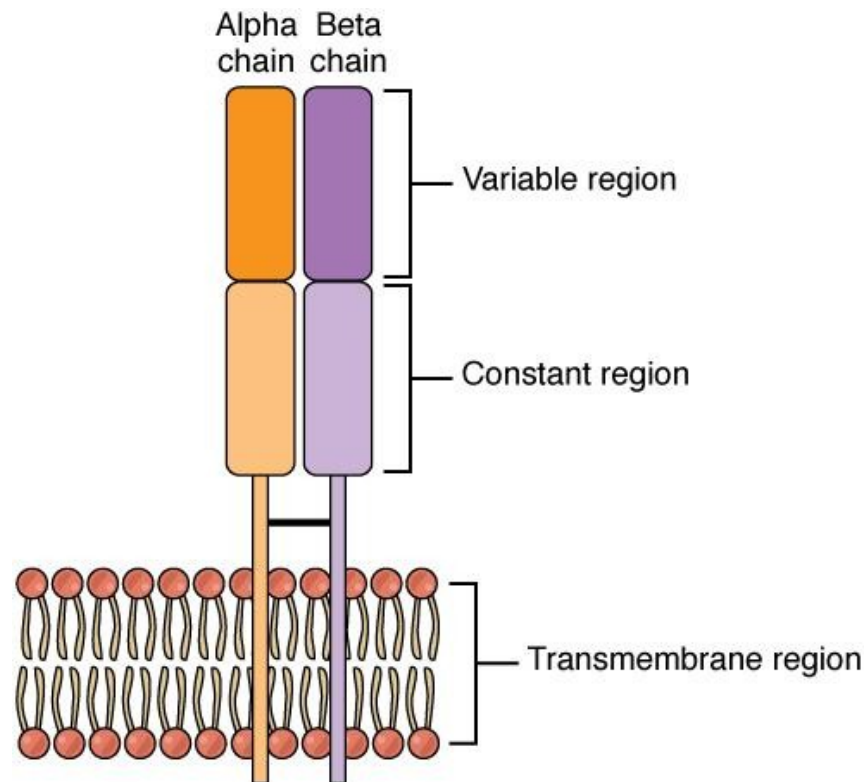


Receptory T lymfocytů (TCR)

- 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

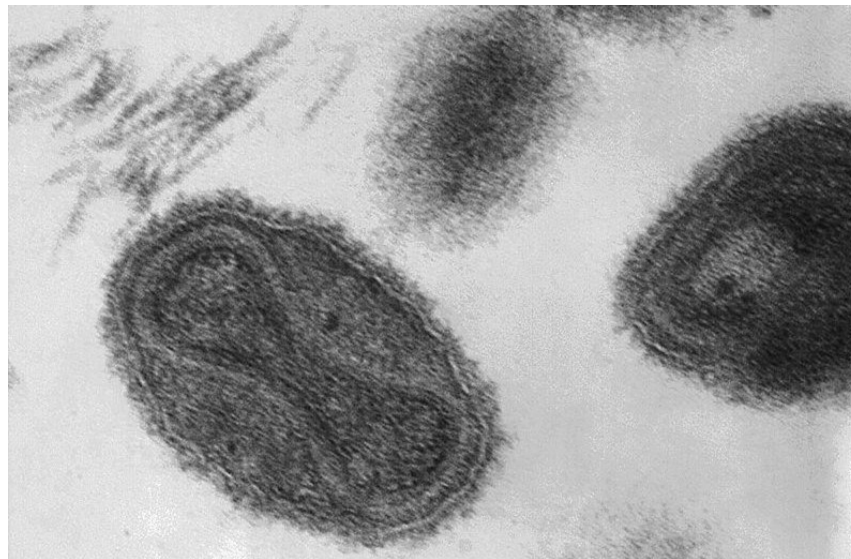
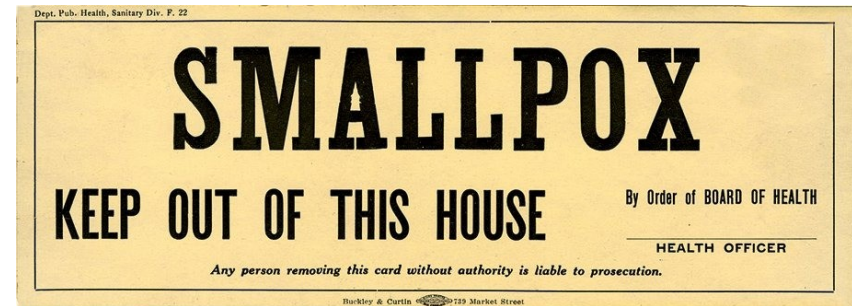


Vakcinace (očkování)

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

