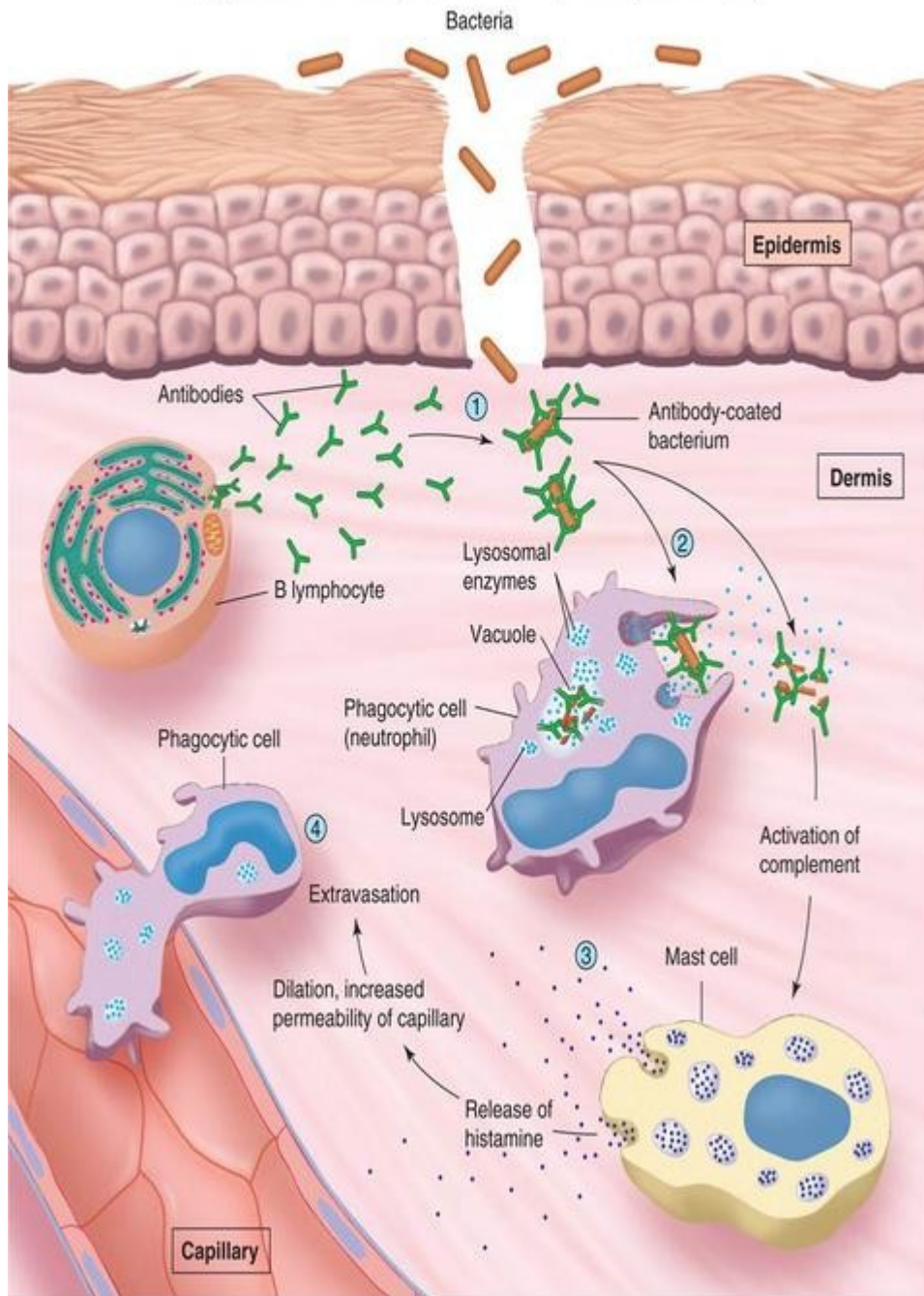
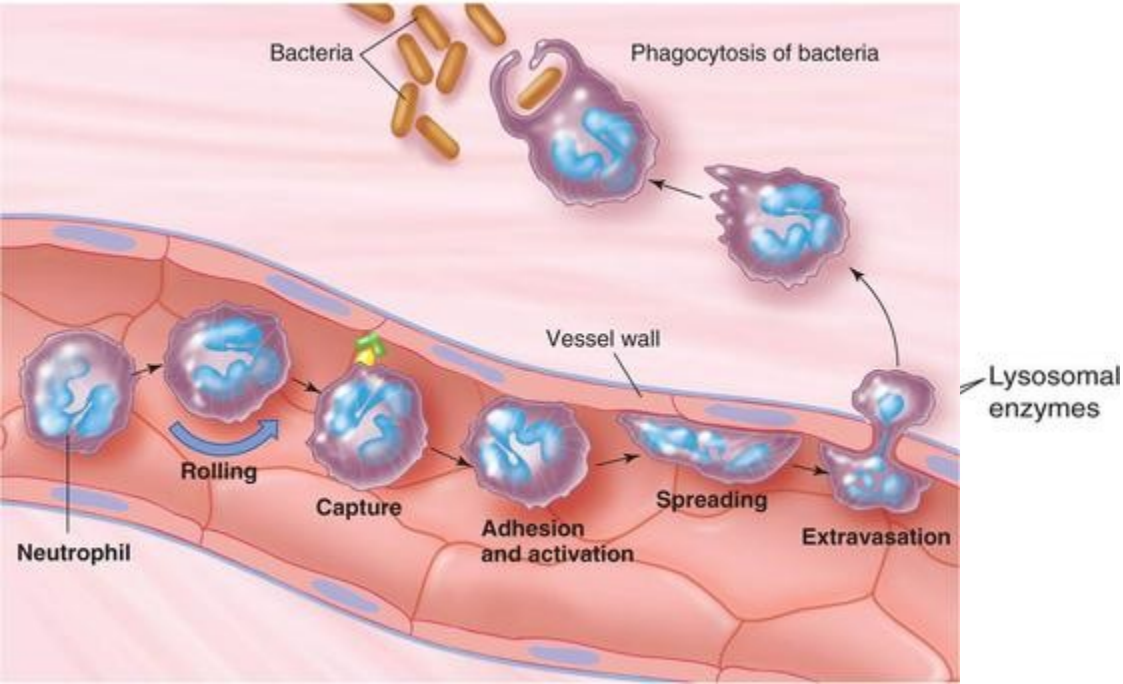


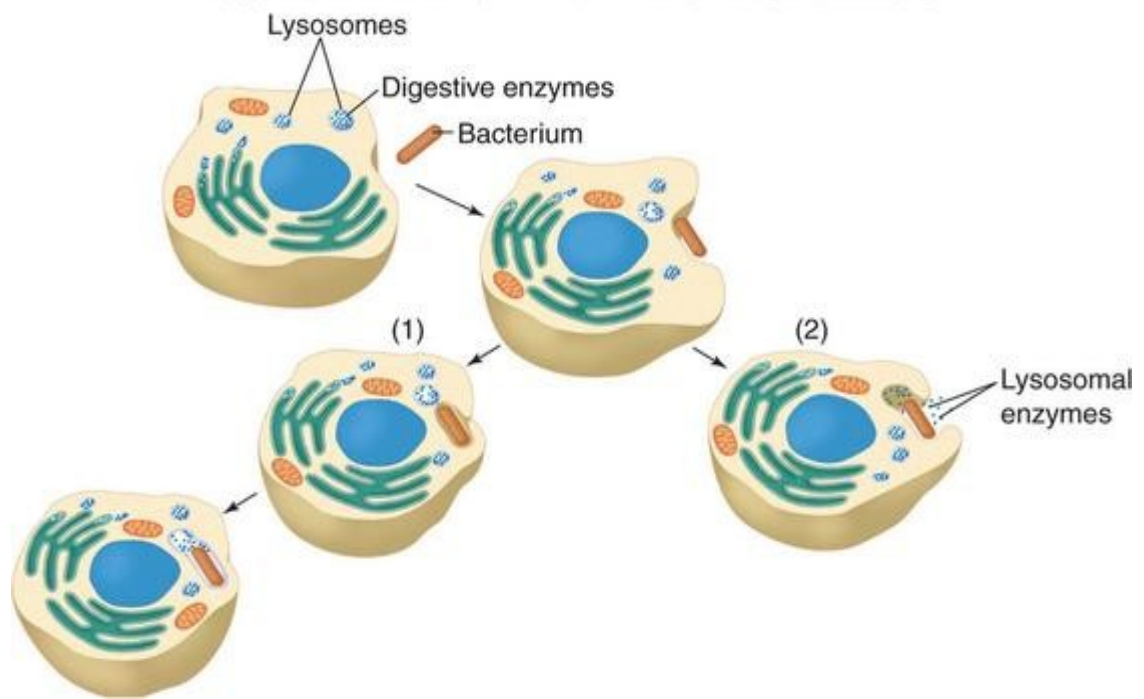
IMUNITA ADAPTIVNÍ

Marcela Vlková



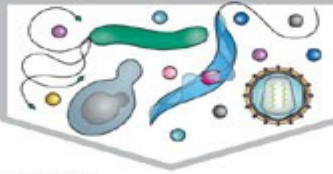


Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display

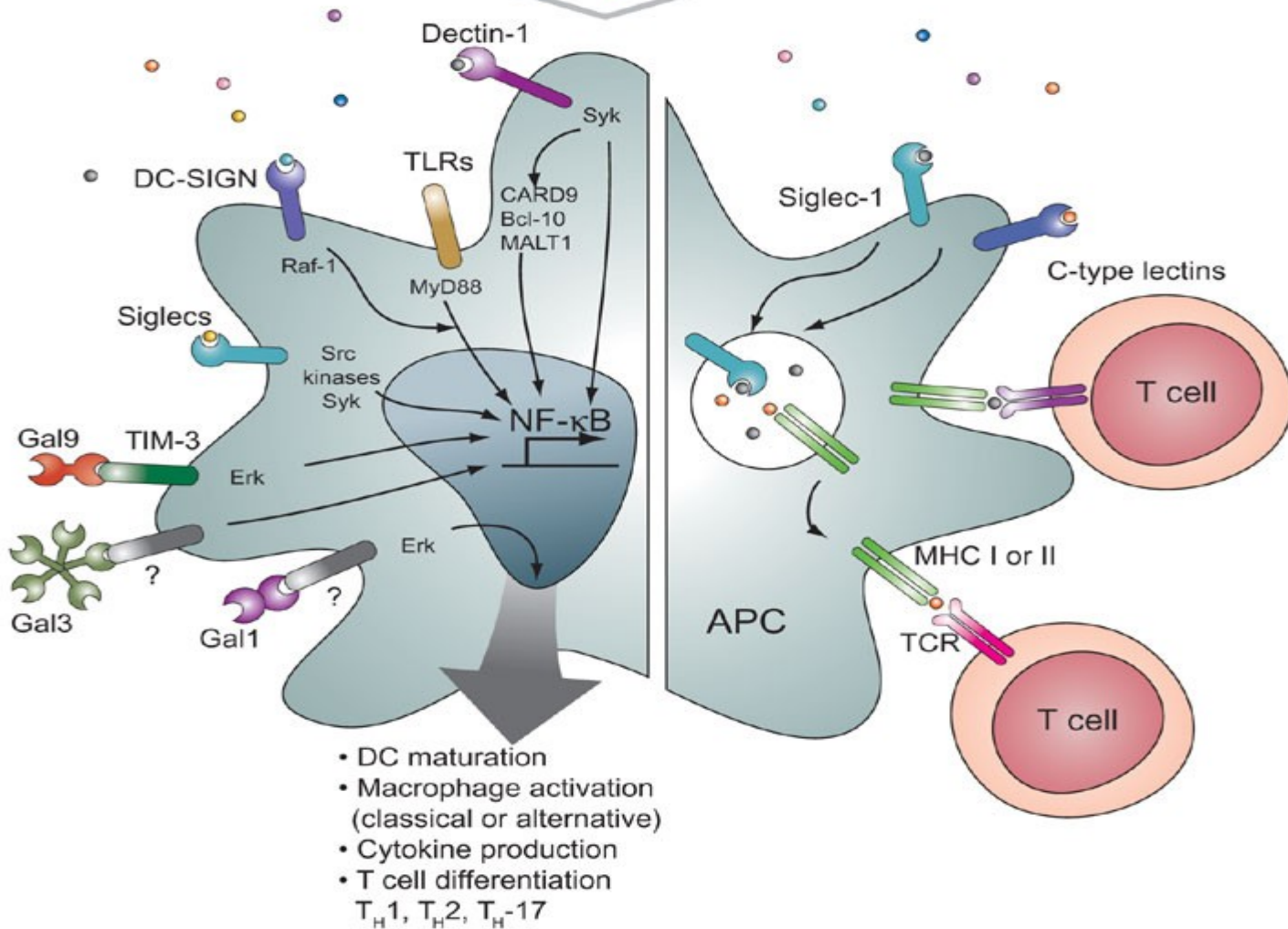


Pathogenic interaction

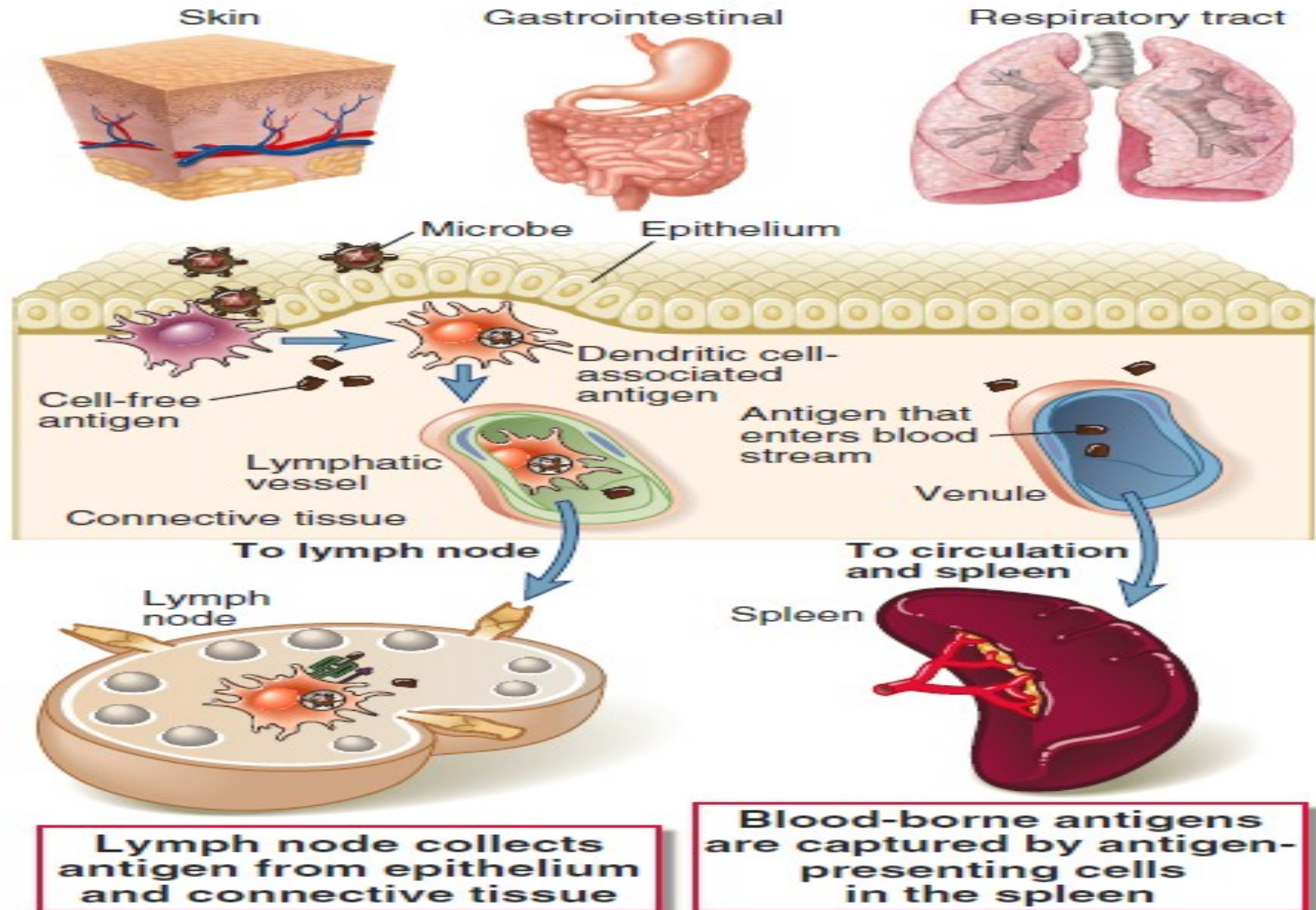
Signaling in APCs



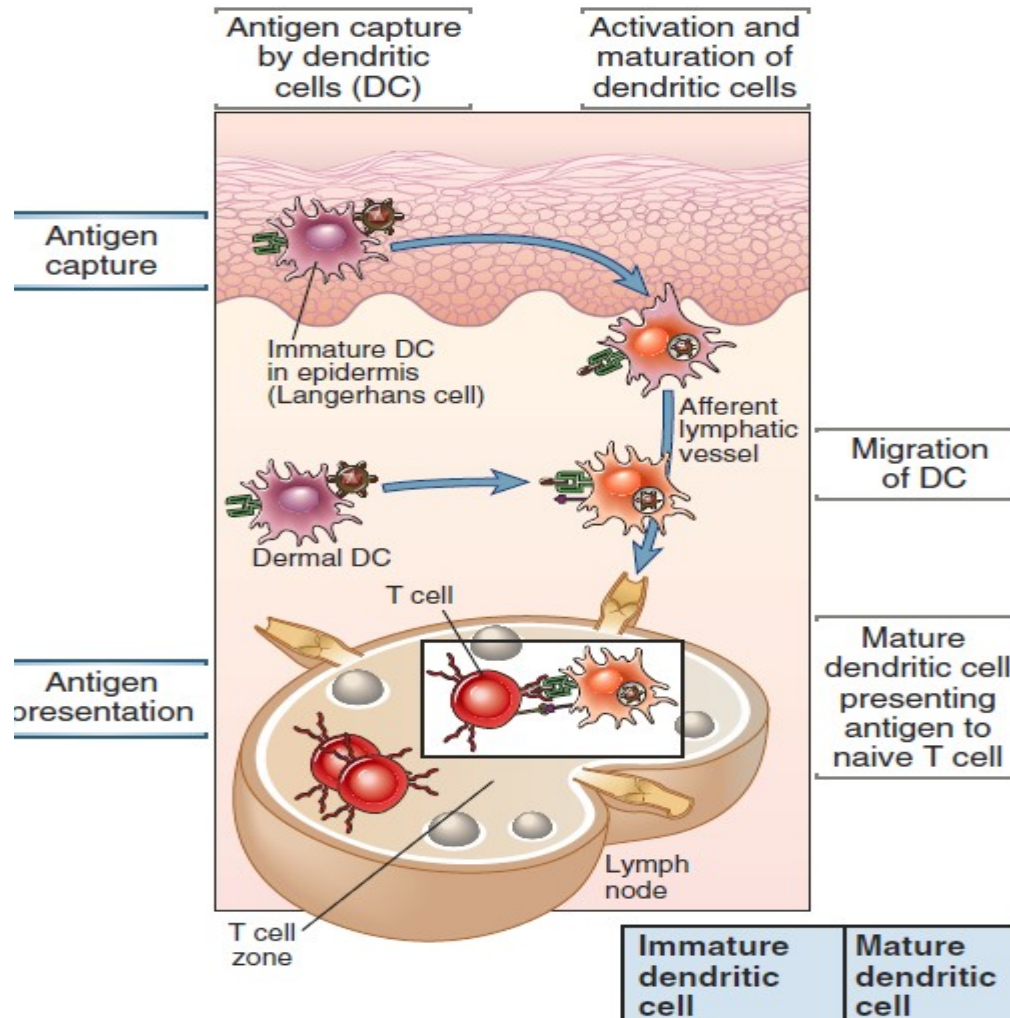
Antigen presentation



Cesty antigenů



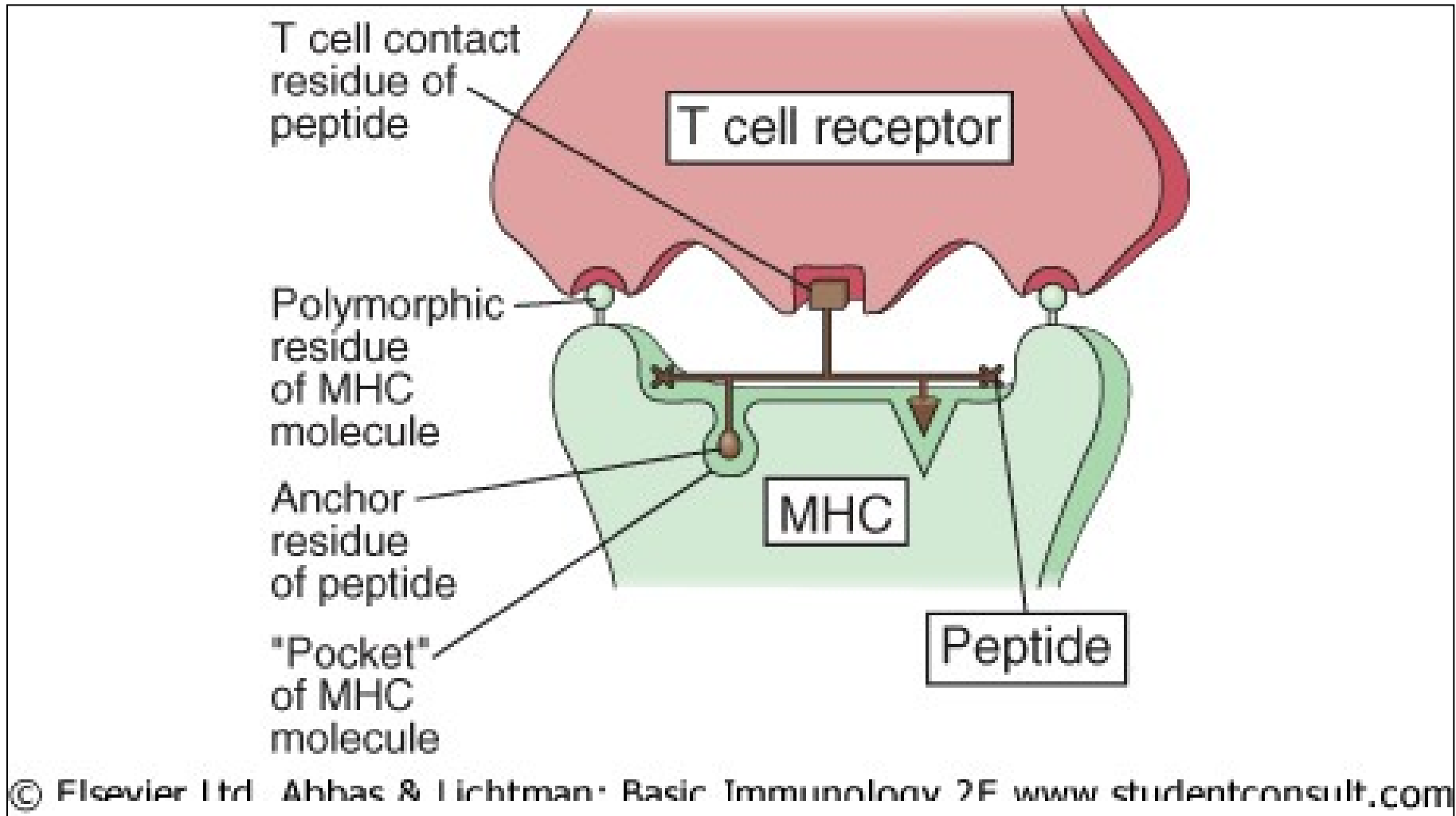
Cesty antigenů



Presentace antigenů lymfocytům T

- T-lymfocyty poznávají antigeny pouze ve formě peptidových fragmentů vázaných na MHC I nebo II.
- HLA antigeny musí být stejné, jako má příslušný konkrétní jedinec (Fenomen MHC-restrikce).
- Antigen musí být nejdříve v buňkách „zpracován“ (processing)- nativní protein je proteolyticky degradován na peptidy, které se (intracelulárně) váží na molekuly MHC. Tento komplex se dostává na buněčnou membránu, kde je schopen reagovat s TCR.
- T-lymfocyty jsou schopny poznávat i lipidové a glykolipidové struktury: je to populace NK-T, která poznává tyto antigeny „neklasickými molekulami MHC“ – CD1
- Imunogennost proteinových antigenů je určena schopností buněk předkládajících antigen vytvořit peptidy, které se budou vázat na vlastní molekuly MHC.

Interakce TCR-polypeptid-HLA molekula



Lymfocyty T a B jsou základními operačními jednotkami adaptivní imunity

- T-lymfocyty jsou zaměřeny na intracelulární antigeny
- B-lymfocyty na extracelulární antigeny
- B-lymfocyty produkují imunoglobuliny
- T-lymfocyty neprodukují imunoglobuliny, produkují cytokiny

Charakteristika adaptivní imunity

Specifičnost

Repertoár

Autotolerance

Paměť

Přiléhavé efektorové mechanismy

ANTIGEN – adaptivní imunita

(*Antibody generating substance*)

- Struktury, na něž reaguje adaptivní imunitní systém.
- Receptory lymfocytů B a T poznávají epitopy antigenů (epitopy B, epitopy T).
- Antigenní molekuly jsou proteiny, cukry, nukleové kyseliny a jejich komplexy, původu exogenního (mikroorganismy, alergeny, transplantované tkáně) i endogenního (krevně-skupinové substance, nádorové antigeny, „autoantigeny“).

Antigennost vs. imunogennost

Adaptivní imunita: charakteristické rysy

Specifičnost:

Přirozená imunita: jsou rozeznávány struktury, které jsou **stejné** u řady cizorodých agens (PAMP)

Adaptivní imunitní systém naproti tomu poznává a odlišuje **různé** epitopy antigenů (T-, B-)

Adaptivní imunita: specifičnost

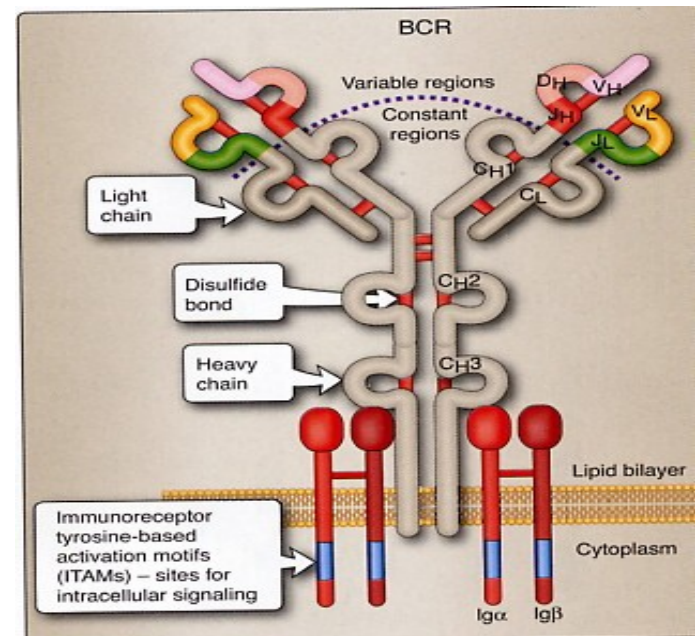
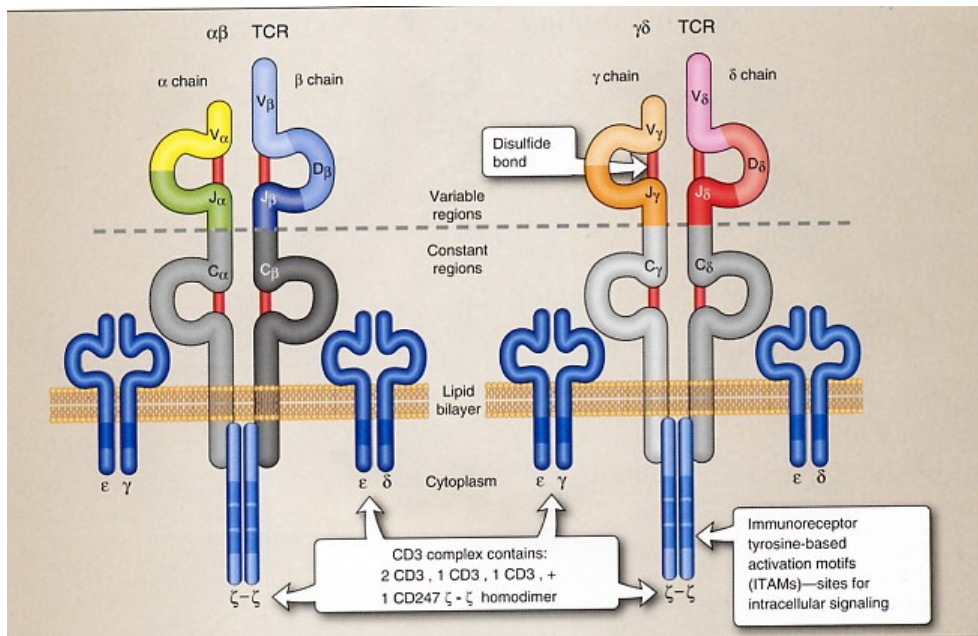
Všechny fáze adaptivní imunitní reakce (poznání antigenu, aktivace lymfocytu, efektorové mechanismy) jsou zaměřeny na konkrétní antigenní determinantu (epitop).

Lymfocyt má genetickou informaci pro jeden „antigenní receptor“ zajišťující tvorbu tisíce identických kopií tohoto receptoru.

Adaptivní imunita: charakteristické rysy

Receptory:

U adaptivní imunity receptory lymfocytů T a B vznikají somatickým přeskupováním genů.



Adaptivní imunita: charakteristické rysy

Rozsah repertoáru:

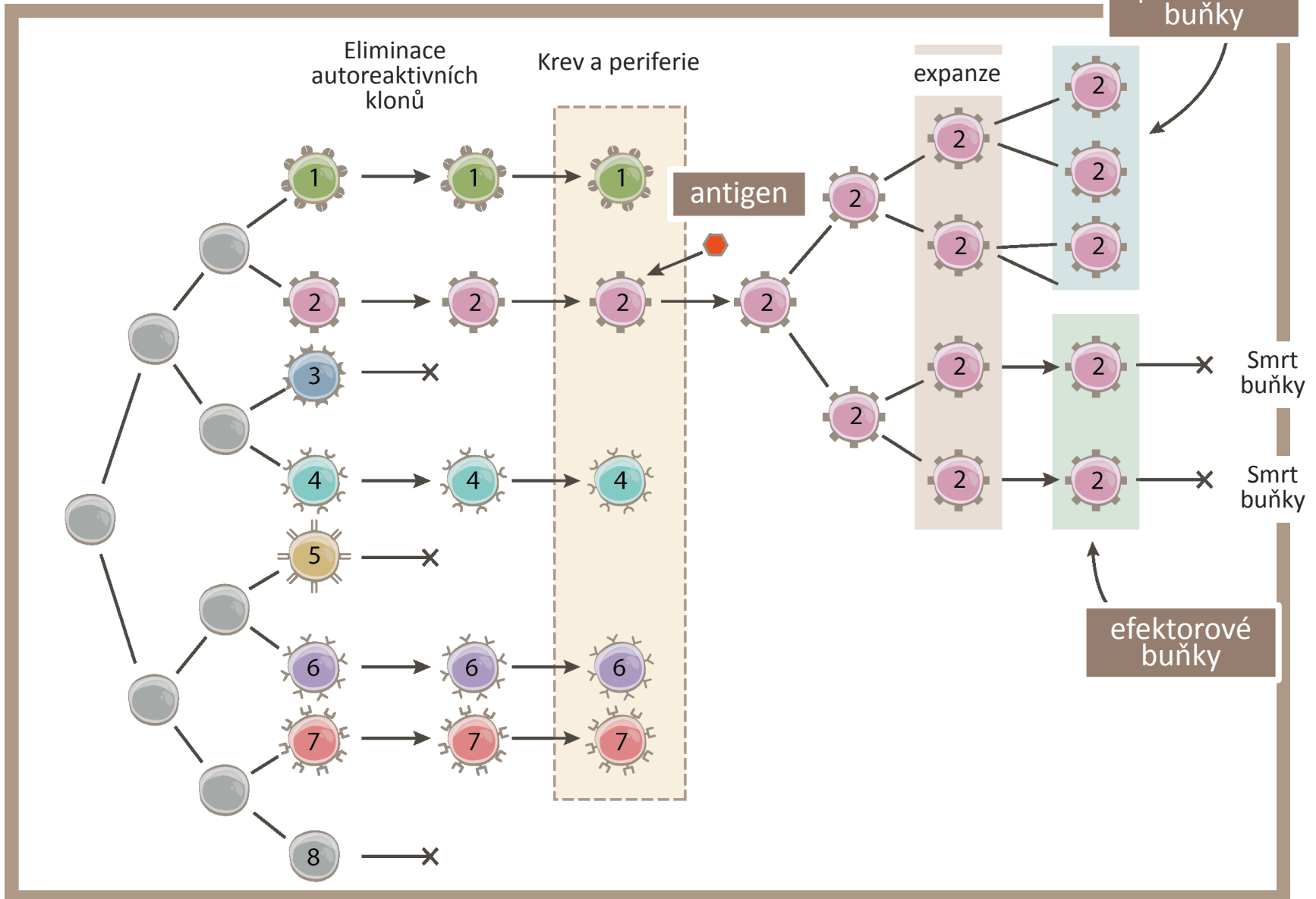
Adaptivní imunitní systém je schopen odlišit (TCR, BCR lymfocytů) více než 10^{7-8} epitopů antigenů.

- Schopnost poznat různé antigeny je takřka neomezená. Odhaduje se, že adaptivní imunitní systém dokáže odlišit cca 10^{12-15} epitopů.
- Příčiny diverzity:
 - Somatické rekombinace (somatické přeskupování genů)
 - Mutační mechanismy

Postuláty klonální selekční teorie (Macfarlane Burnet)

- Každý lymfocyt má jeden typ receptoru s jedinečnou specificitou.
- Interakce mezi epitopem antigenu a receptorem schopným ji vázat vede k aktivaci lymfocytu.
- Buňky, které vznikly z aktivovaných lymfocytů proliferací a diferenciací mají receptory stejné specificity.
- Lymfocyty, které mají receptory pro tělu vlastní antigeny jsou v časném stadiu vývoje lymfoidních buněk odstraněny a tudíž v repertoáru zralých lymfocytů chybí („forbidden clones“).

Klonálně selekční teorie



Vrozená imunita: charakteristické rysy

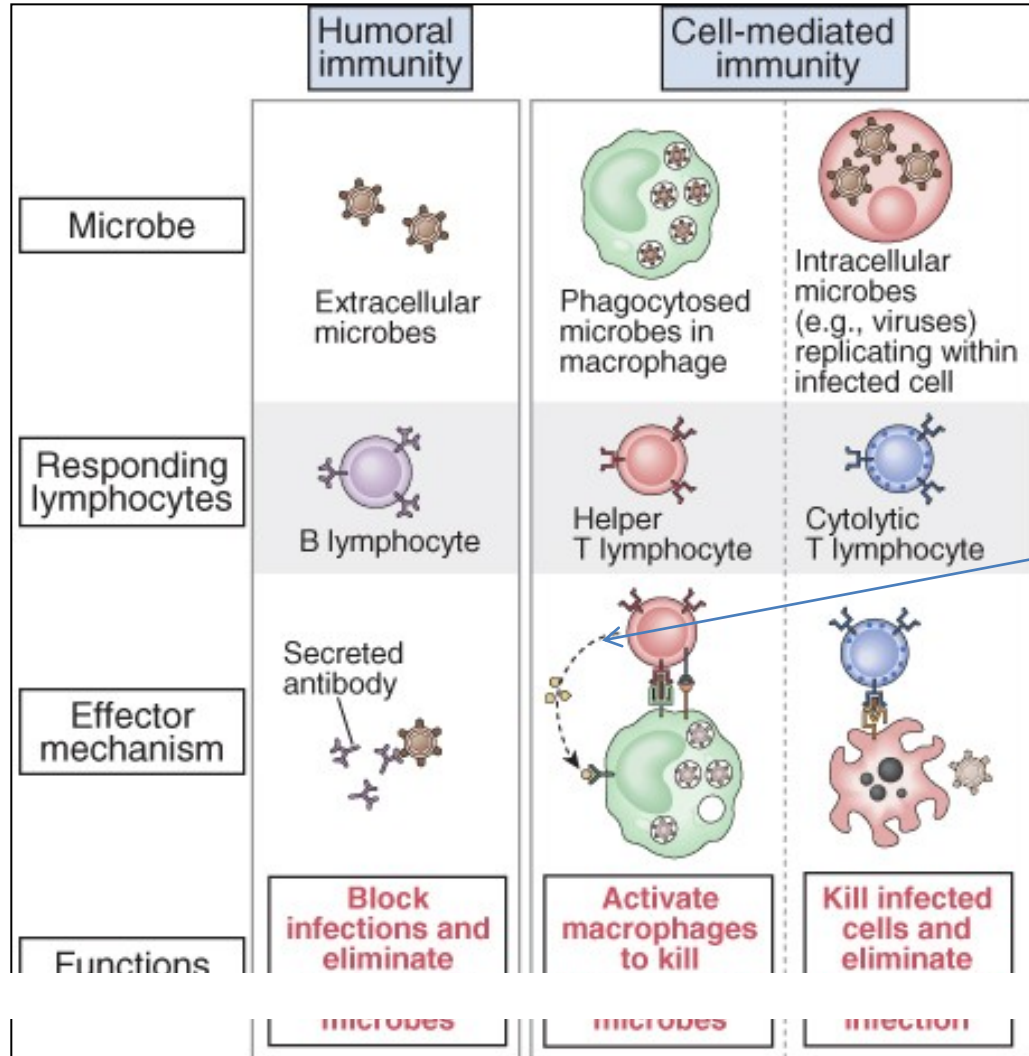
Autoreaktivita:

Adaptivní imunita se vytvořila k poznávání „cizích“, mikroorganismů, ale také vlastních molekul.

Paměť:

Vytvoření imunologické paměti je pro adaptivní imunitu příznačné – primární a sekundární reakce, „booster“.

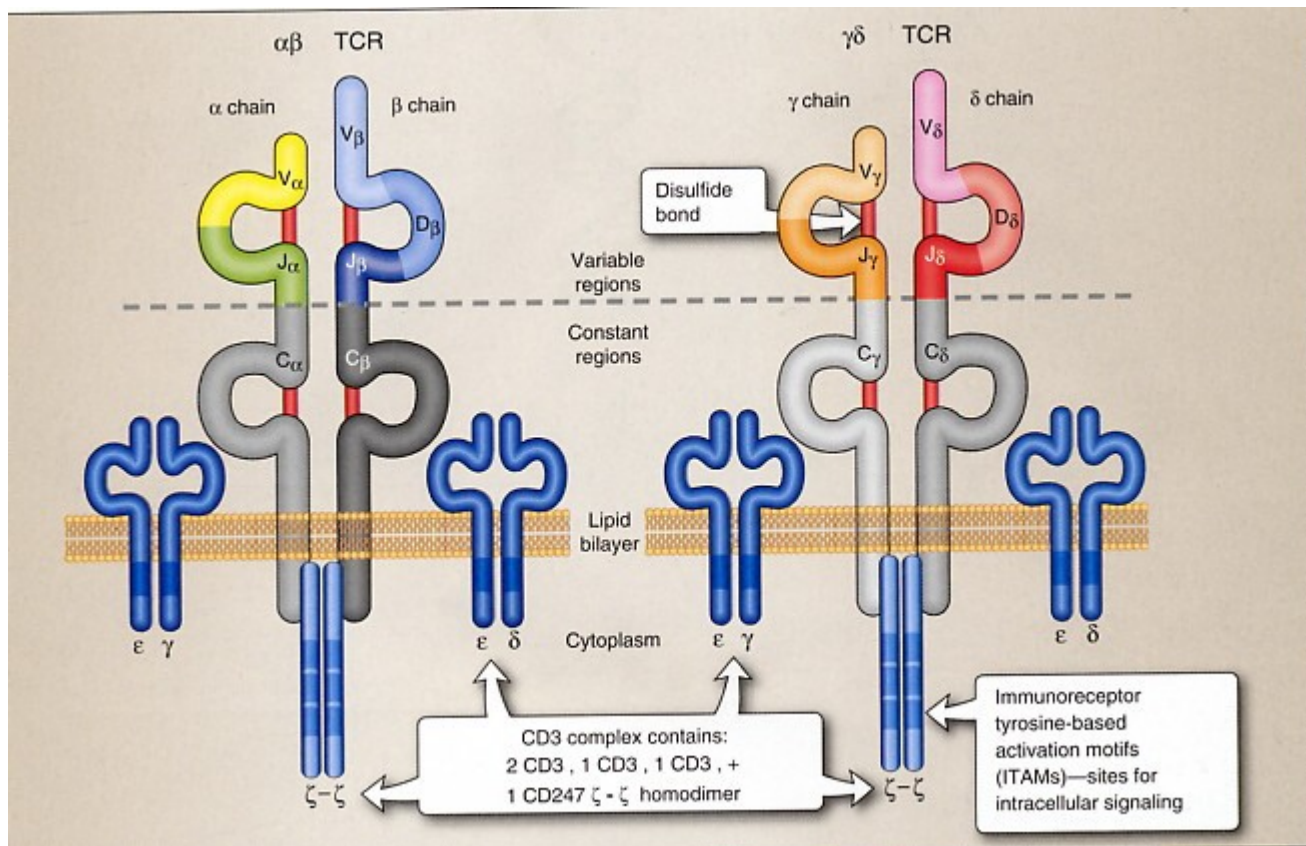
Dvě větve adaptivní imunity



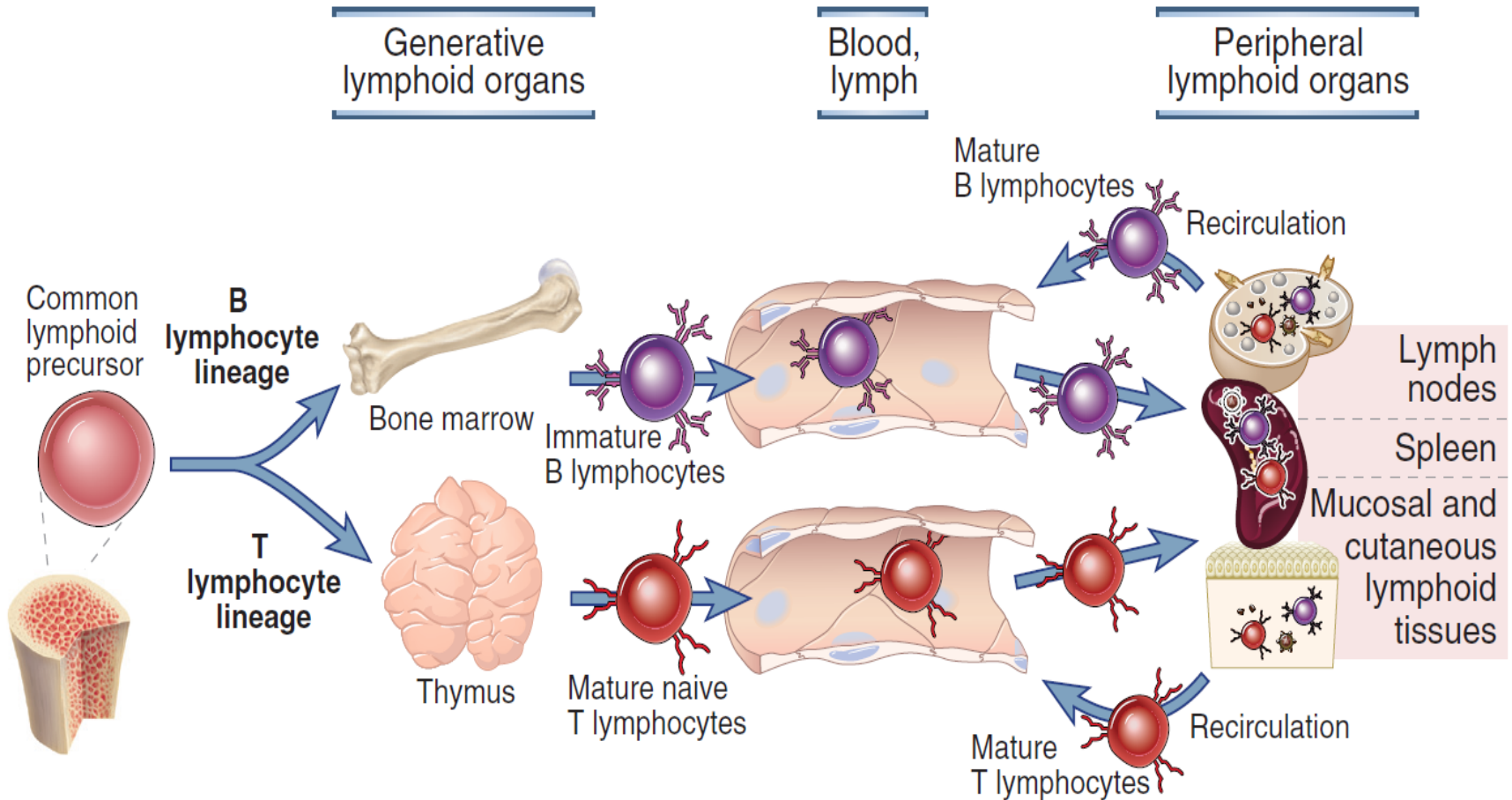
Produkce cytokinů

T-lymfocyty

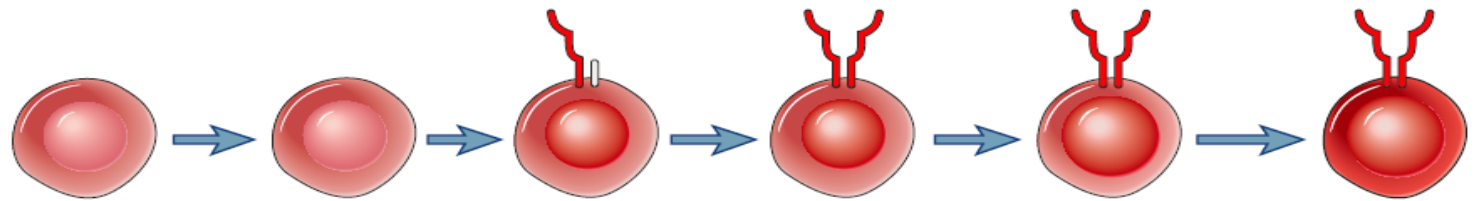
Receptor lymfocytů T (TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$)



Vývoj T a B lymfocytů



Vývoj T-lymfocytů



Stage of maturation	Stem cell	Pro-T	Pre-T	Double positive	Single positive (immature T cell)	Naive mature T cell
Proliferation	[Grey bar]		[Grey bar]			
RAG expression			[Grey bar]	[Grey bar]		
TdT expression		[Grey bar]				
TCR DNA, RNA	Unrecombined (germline) DNA	Unrecombined (germline) DNA	Recombined β chain gene [V(D)J-C]; β chain mRNA	Recombined β , α chain genes [V(D)J-C]; β and α chain mRNA	Recombined β , α chain genes [V(D)J-C]; β and α chain mRNA	Recombined β , α chain genes [V(D)J-C]; β and α chain mRNA
TCR expression	None	None	Pre-T receptor (β chain/pre-T α)	Membrane $\alpha\beta$ TCR	Membrane $\alpha\beta$ TCR	Membrane $\alpha\beta$ TCR
Surface markers	$c\text{-kit}^+$ CD44^+ CD25^-	$c\text{-kit}^+$ CD44^+ CD25^+	$c\text{-kit}^+$ CD44^- CD25^+	$\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ $\text{TCR}/\text{CD3}^{\text{lo}}$	$\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ or $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ $\text{TCR}/\text{CD3}^{\text{hi}}$	$\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ or $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ $\text{TCR}/\text{CD3}^{\text{hi}}$
Anatomic site	Bone marrow	Thymus				Periphery
Response to antigen	None	None	None	Positive and negative selection		Activation (proliferation and differentiation)

Vývoj lymfocytů v thymu

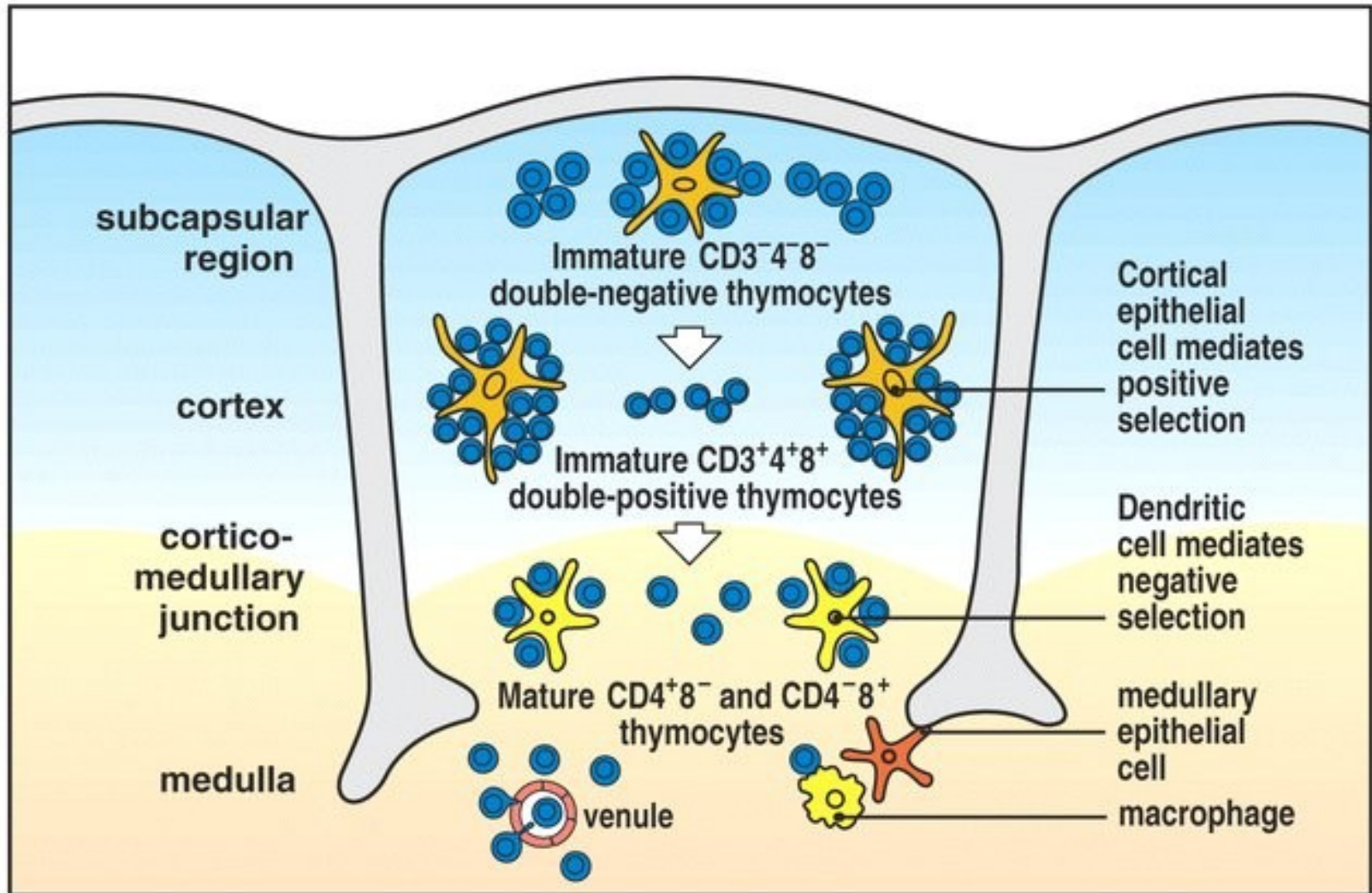


Figure 5-13 The Immune System, 2/e (© Garland Science 2005)

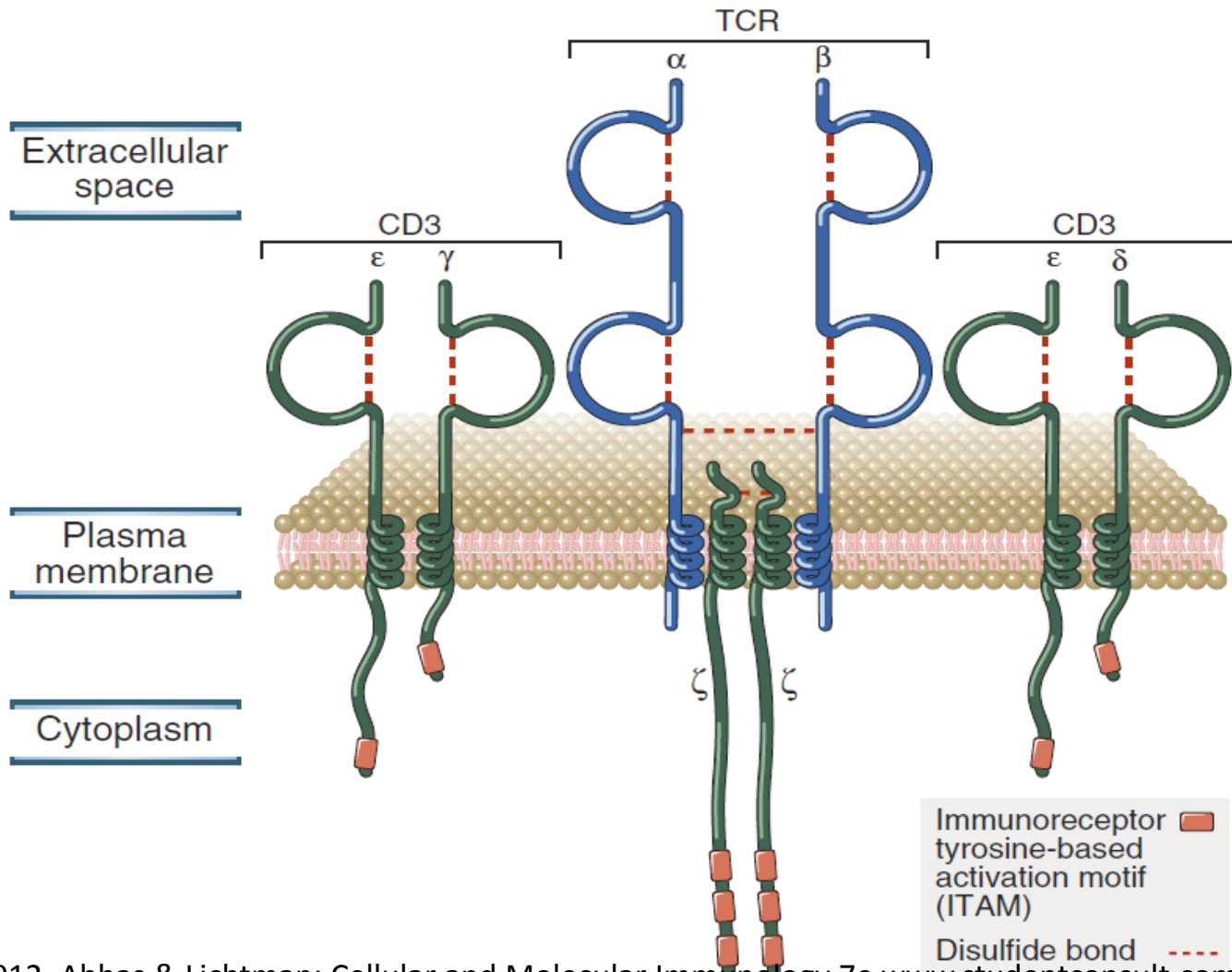
Thymová výchova T-lymfocytů

- **Pozitivní selekce** buněk reagujících s nízkou afinitou s HLA antigeny na povrchu antigen- prezentujících buněk. Probíhá v kortikální oblasti. Zajišťuje přežití jen těch thymocytů, které později rozpoznají komplex antigen-HLA.
- **Negativní selekce** – apoptózou hynou thymocyty reagující s vysokou afinitou s komplexem HLA-autoantigeny. Probíhá zejména v subkortikální oblasti thymu. Zajišťuje odstranění autoreaktivních klonů.
- V průběhu obou procesů hyne více než 85% thymocytů.

Vývoj T lymfocytů v thymu $\alpha\beta$

- Dvojitě pozitivní pre-T lymfocyty (CD4+CD8+)
- Pozitivní selekce – interakce s HLA kortikálních buněk thymu.
- Negativní selekce – rozpoznání komplexů Ag-HLA I.třídy (nebo II) prezentovaných dendr. b., makrofágy.
- Pre -T lymfocyty, které reagují s molekulami HLA I.třídy postupně snižují expresi CD4 a ponechávají si CD8+ se stávají CD8+ T lymfocyty.
- Pre -T lymfocyty, které reagují s molekulami HLA II.třídy postupně snižují expresi CD8 a ponechávají si CD4+ se stávají CD4+ T lymfocyty.

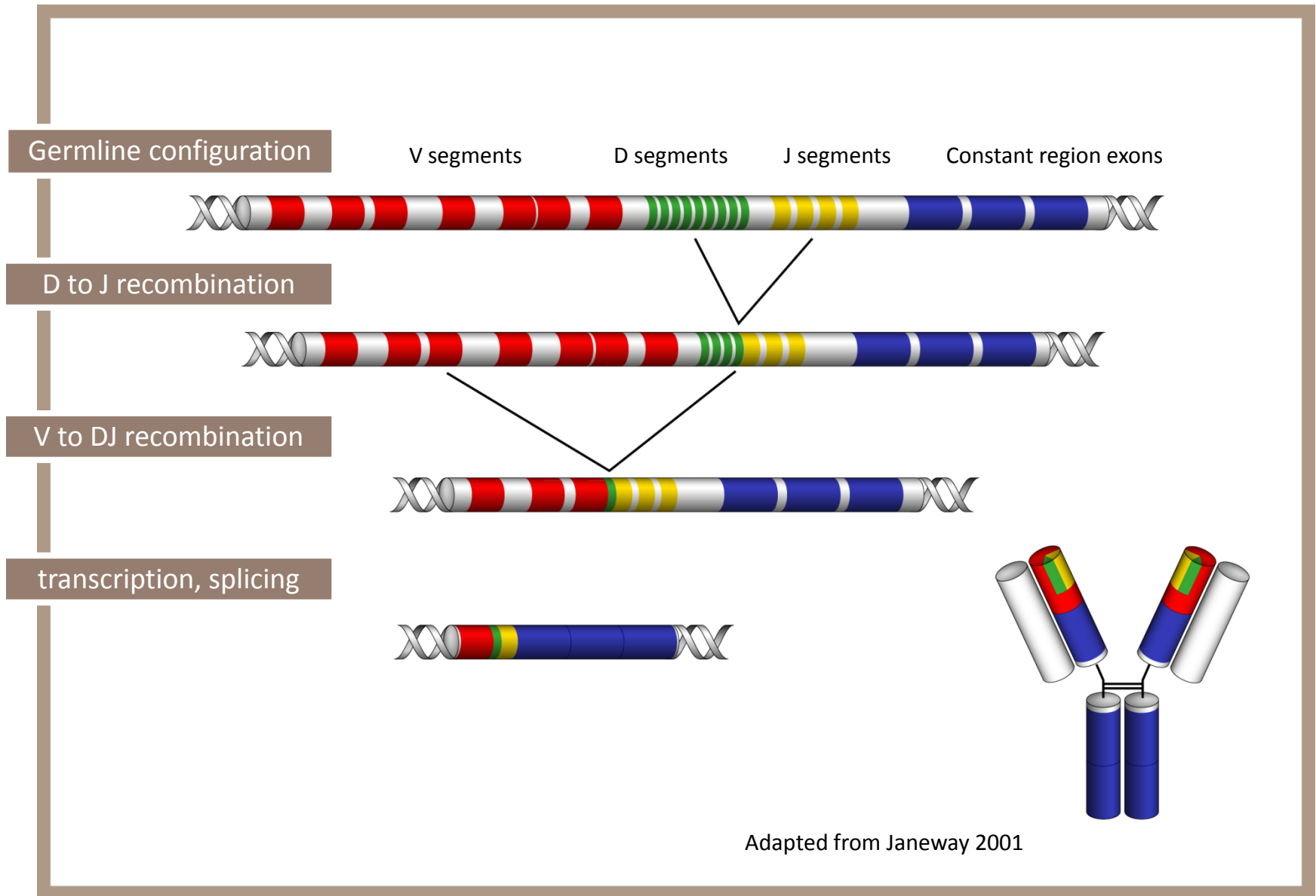
TCR receptor



Molekulárně genetická podstata specifičnosti

- Geny pro TCR (BCR) větší počet genových segmentů, které se při vývoji T- nebo B-lymfocytů přeskupují.
- Jsou složeny z Varibilních segmentů, Diversitních segmentů a Konstantních segmentů.
- Na koncích V, D a J jsou krátké sekvence nukleotidů, které jsou rozeznávány Rekombinázami RAG1 a RAG2, probíhá vyštěpení segmentů mezi vybranými D a J segmenty a poté dochází ke spojení odstřižených konců D a J nově syntetizovaným úsekem N působením terminální transferázy a dalších enzymů.
- Nejprve dochází k D-J přeskupení, poté následuje V-D přeskupení.

VDJ rekombinace při vzniku variabilního místa



Co zvyšuje variabilitu specifických vazebných míst

- Pro jednotlivé řetězce TcR je různý počet kombinací VDJ genových segmentů.
- Spojovací variabilita: po vyštěpení genových úseků během DJ a VD přeskupení – zbývající konce nejsou odstřiženy přesně a spojují se nově syntetizovaným úsekem N s náhodnou sekvencí nukleotidů.
- Vznik TcR řetězců s odlišnou sekvencí aminokyselin ve vazebném místě pro antigenní fragment prezentovaný v kontextu HLA molekul.

Alelická exkluze

- T lymfocyt, který prodělal přeskupení - všechny TcR na jeho povrchu rozpoznává jediný Ag fragment.
- U heterozygotních jedinců přeskupení genových segmentů pouze na 1 chromosomu, na druhém se přeskupovat nemůže.

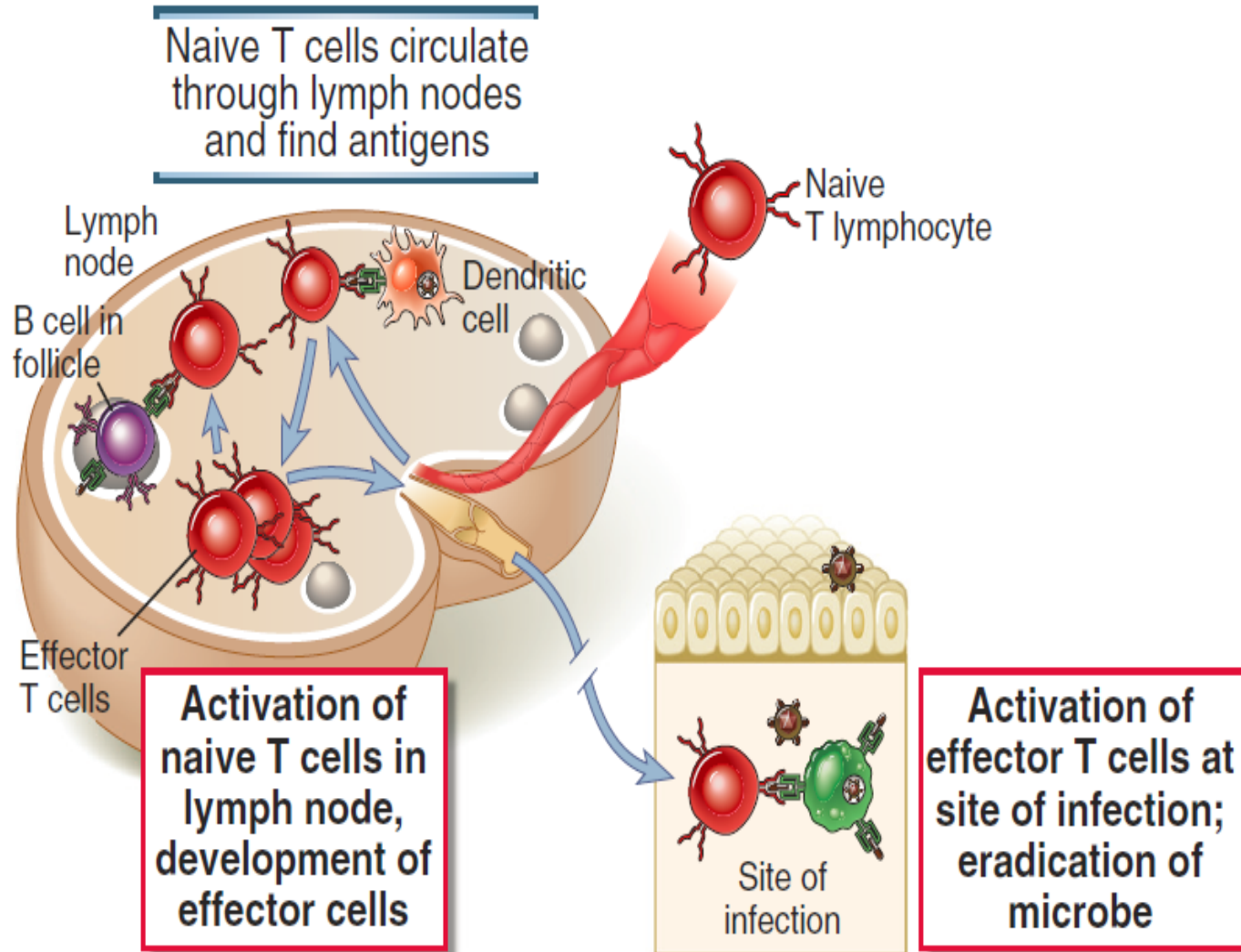
Aktivace T lymfocytů

- Naivní T lymfocyt putuje krevním řečištěm do sekundárních lymfatických orgánů.
- Reakce TCR s HLA Antigen prezentující buňky.
- + další kostimulační signály – vedou k aktivaci T lymfocytu, k jeho proliferaci a vzniku efektorových buněk.
- Efektorové T lymfocyty putují do místa infekce kde pak reagují s dalšími APC prezentujícími Ag, kterým byly aktivovány.

Presentace antigenů lymfocytům T

- T-lymfocyty poznávají antigeny pouze ve formě peptidových fragmentů vázaných na MHC I nebo II. (Fenomen MHC-restrikce).
- Antigen musí být nejdříve v buňkách „zpracován“ (processing)- nativní protein je proteolyticky degradován na peptidy, které se (intracelulárně) váží na molekuly MHC. Tento komplex se dostává na buněčnou membránu, kde je schopen reagovat s TCR.
- T-lymfocyty jsou schopny poznávat i lipidové a glykolipidové struktury: je to populace NK-T, která poznává tyto antigeny „neklasickými molekulami MHC“ – CD1
- Imunogennost proteinových antigenů je určena schopností buněk předkládajících antigen vytvořit peptidy, které se budou vázat na vlastní molekuly MHC.

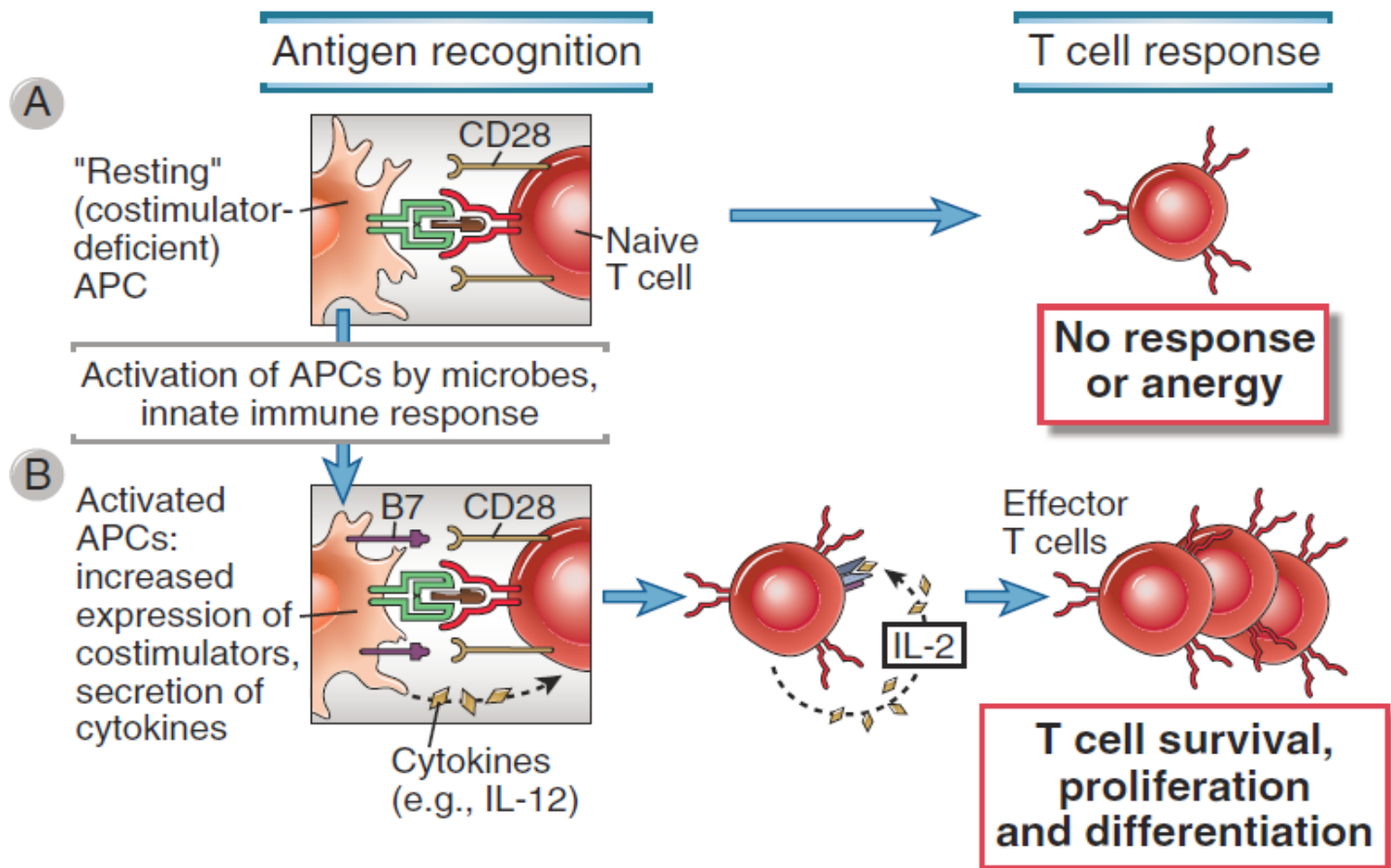
Aktivace T lymfocytů



Aktivace T-lymfocytů

- T-lymfocyty mohou být stimulován pouze komplexy antigen-HLA.
- HLA antigeny musí být stejné, jaké má příslušný konkrétní jedinec = fenomén HLA restrikce (syngenní preference).

Kostimulační signály nutné pro aktivaci T lymfocytu

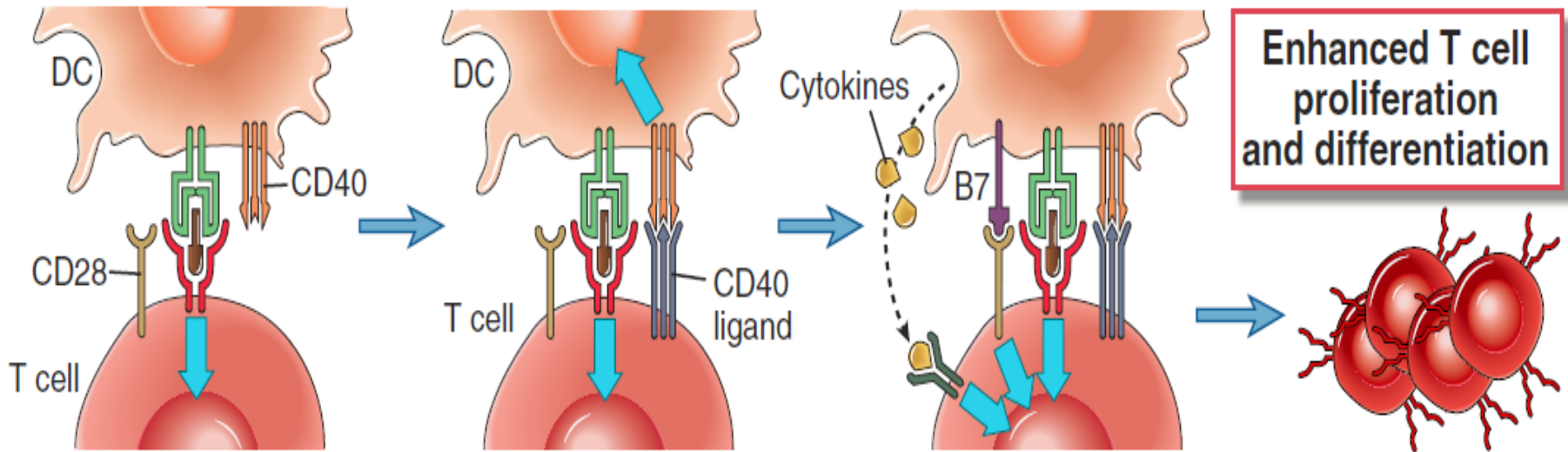


Vazba CD40 – CD40L

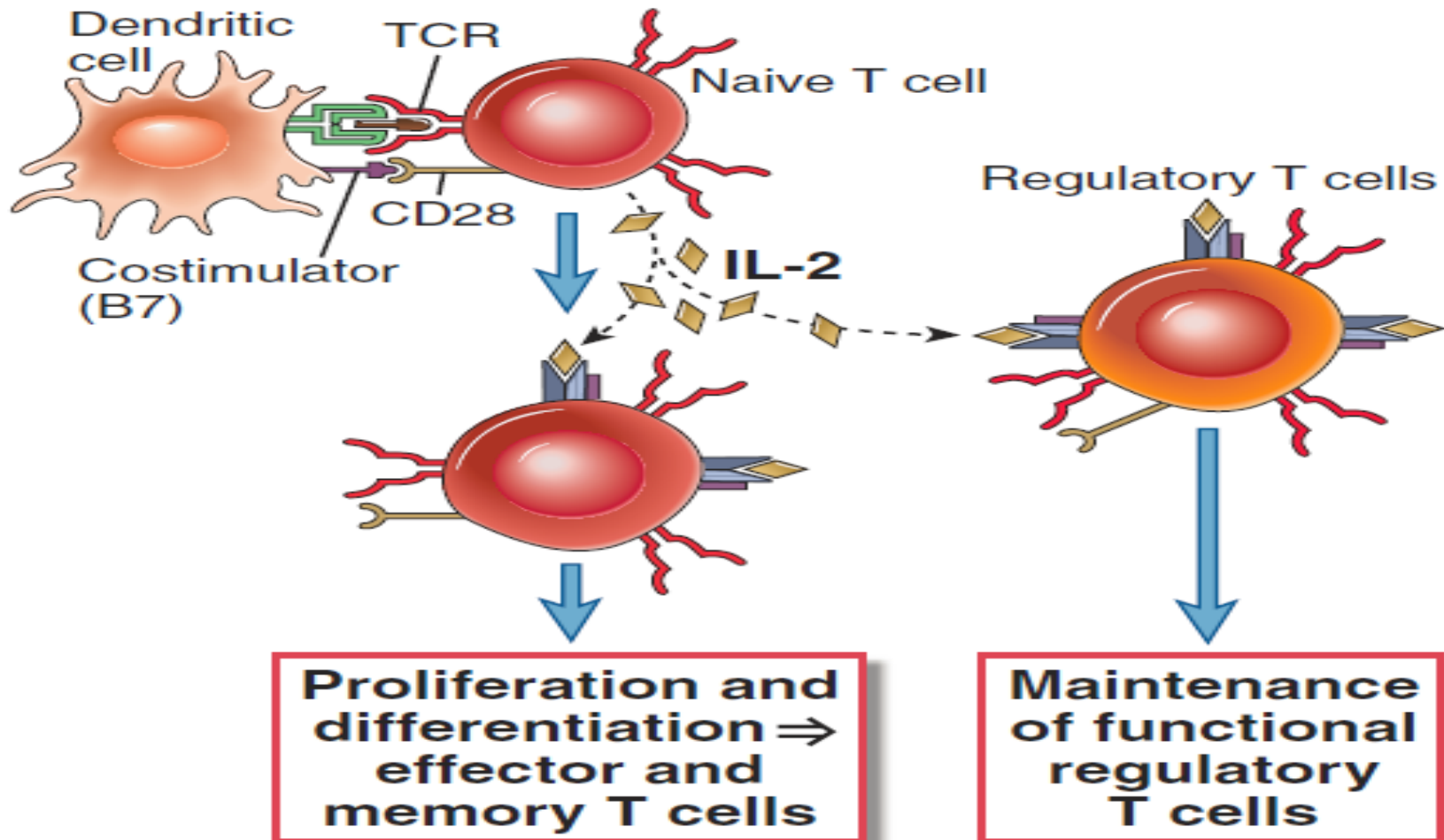
T cells recognize antigen (with or without B7 costimulators), causing expression of CD40L on T cells

CD40L binds to CD40 on DC; leads to DC expression of B7; secretion of cytokines

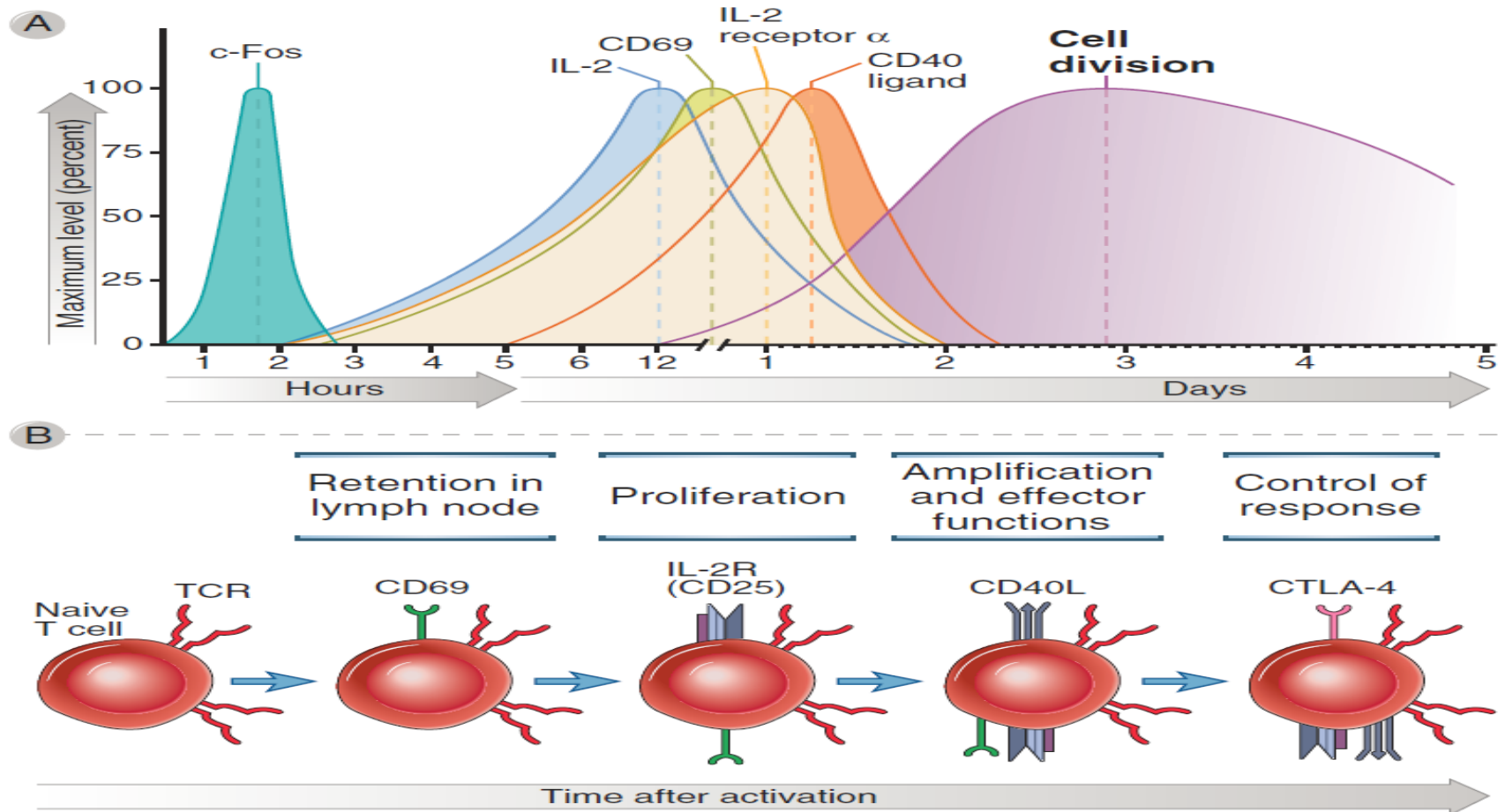
Activated DCs stimulate T cell proliferation and differentiation

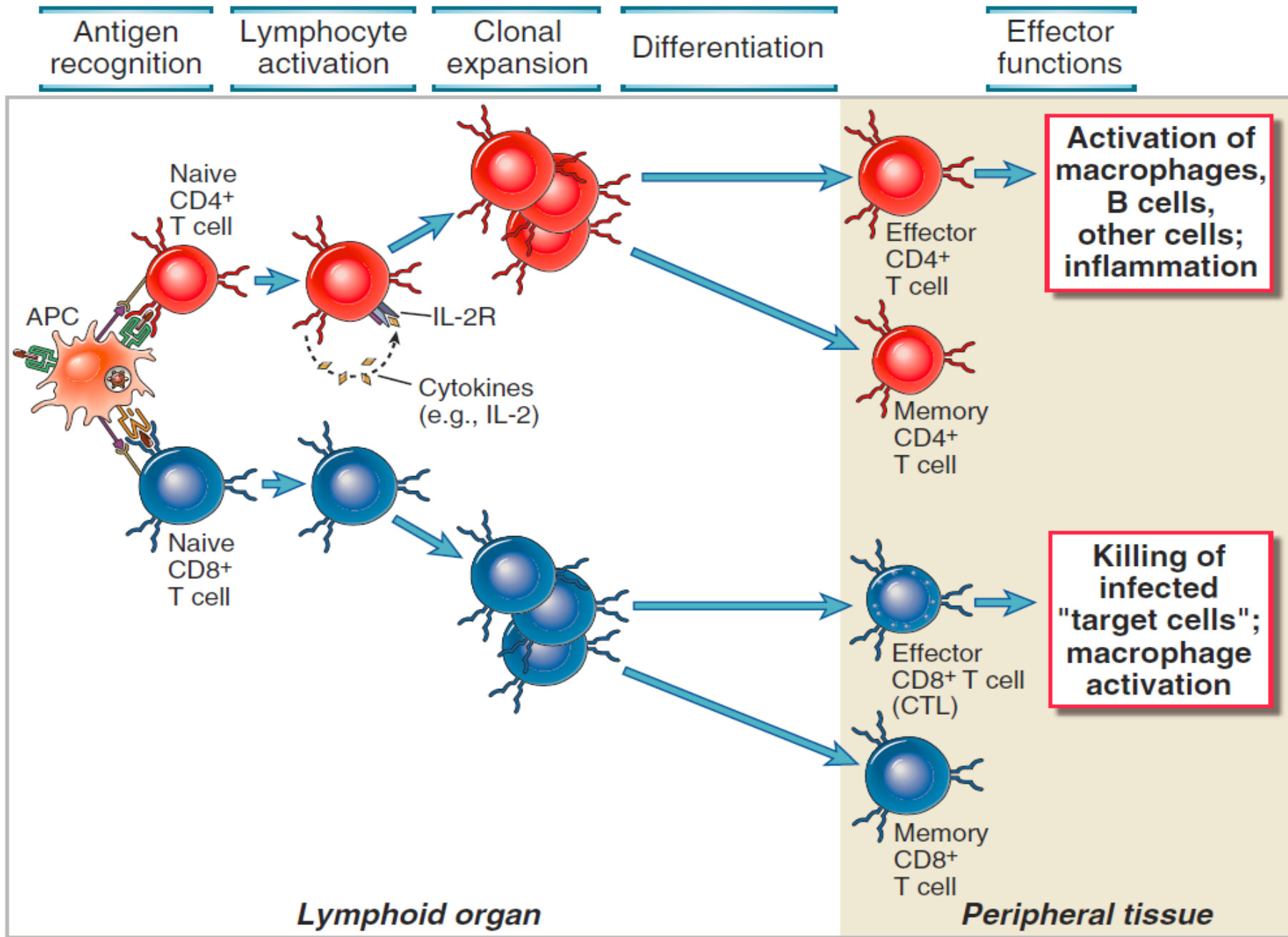


Role IL-2

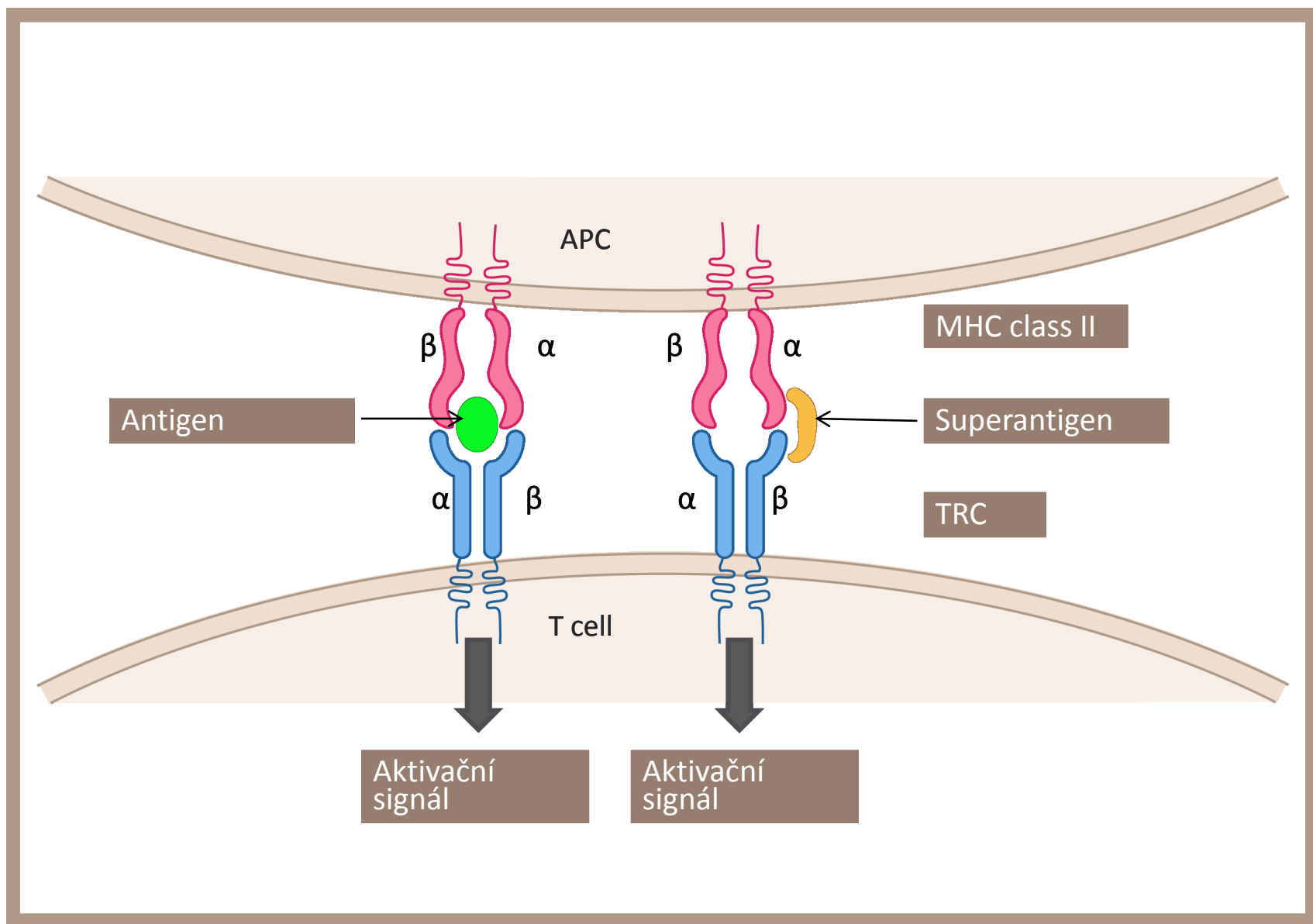


Změny povrchových molekul během aktivace





Aktivace TCR antigenem a superantigenem



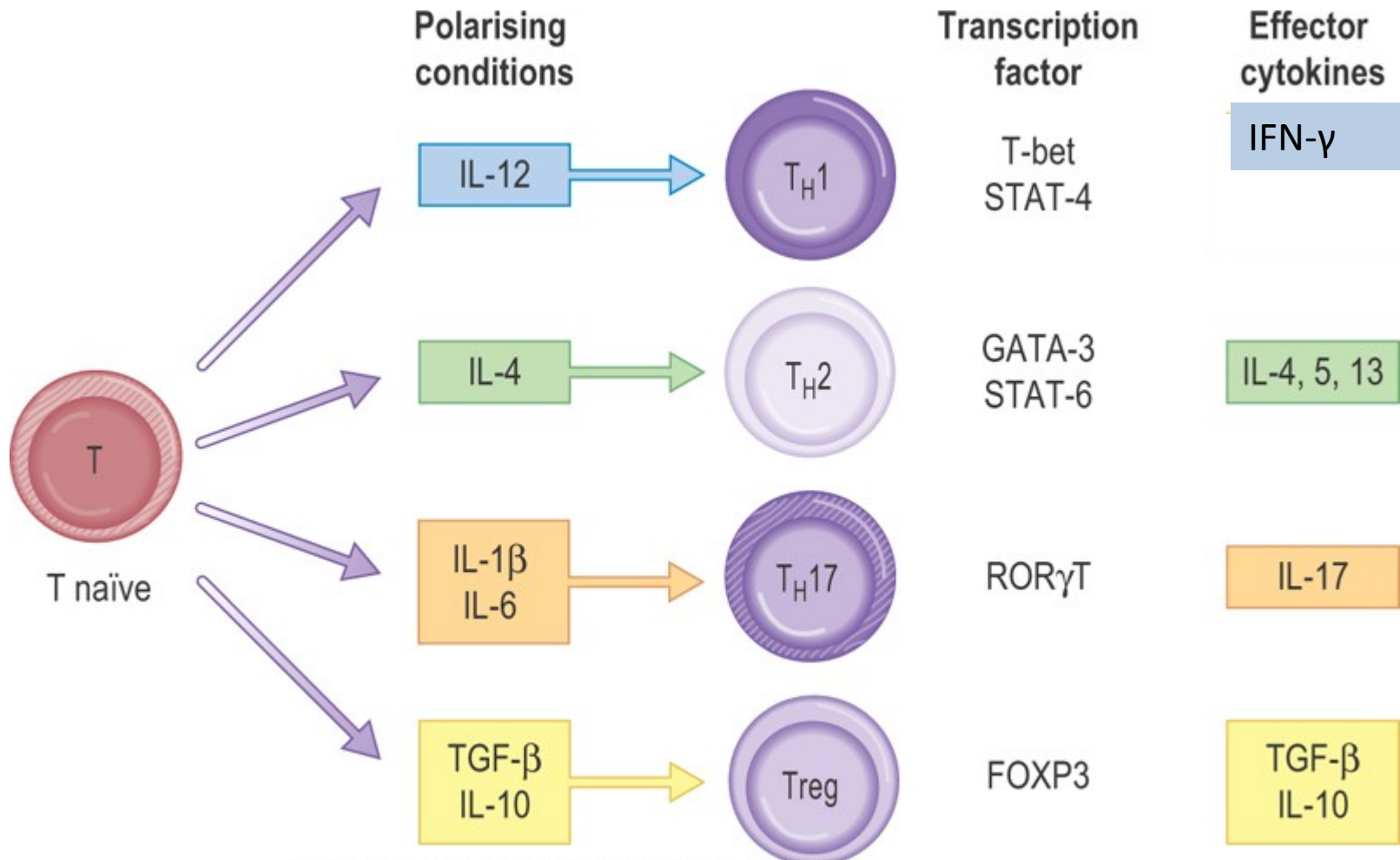
Vývoj CD4+ lymfocytárních populací

- Dendritické buňky (DB) předkládají Ag a zároveň produkují cytokiny.
- Různé mikroorganismy mohou stimulovat DB k produkci různých cytokinů.
- Další cytokiny produkují NK buňky a žírné buňky.

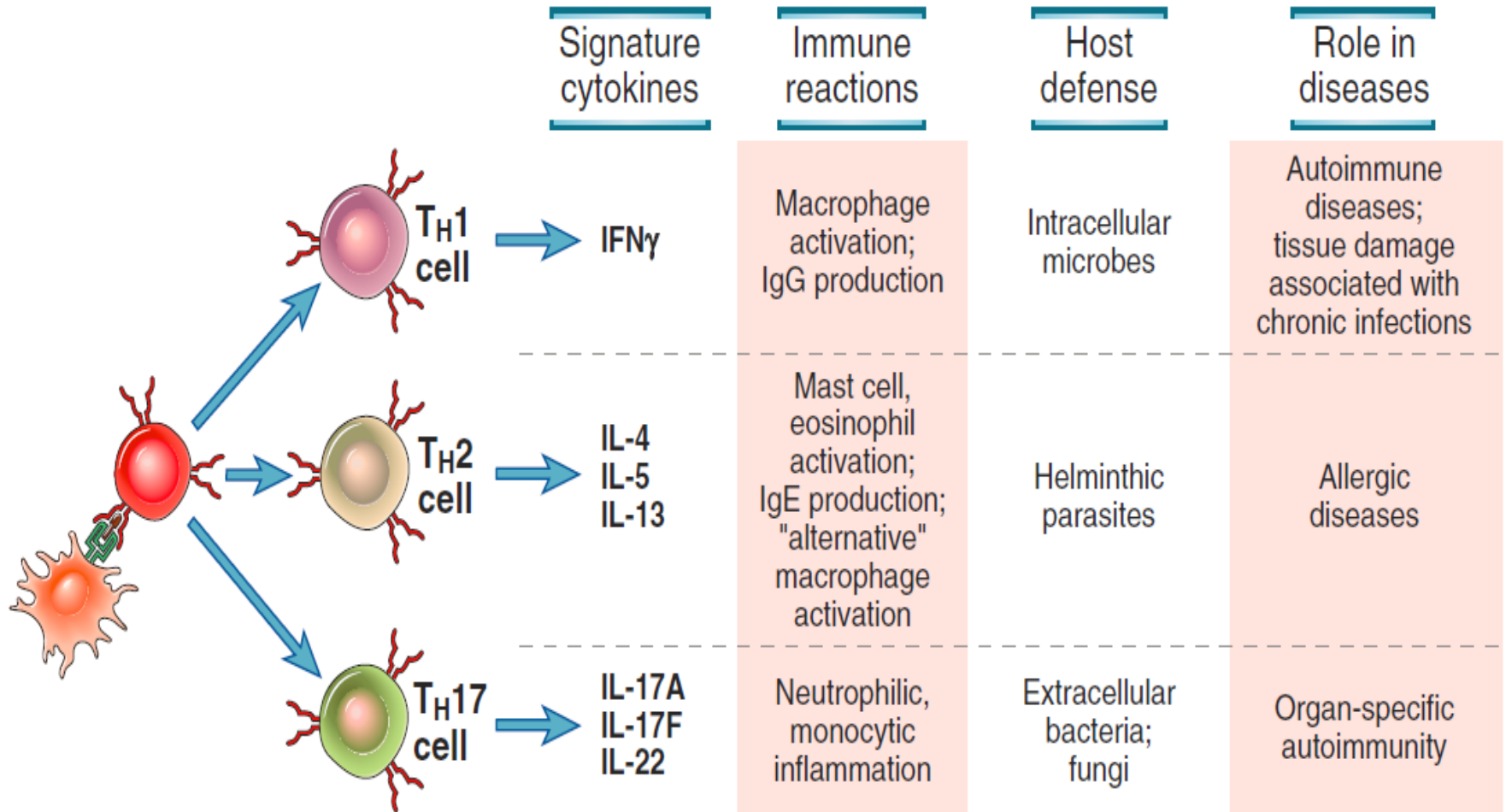
Efektorové CD4+ T lymfocyty

- Efektorové CD4+ Th lymfocyty jsou rozděleny do několika subpopulací na základě svého cytokinového profilu a funkcí.

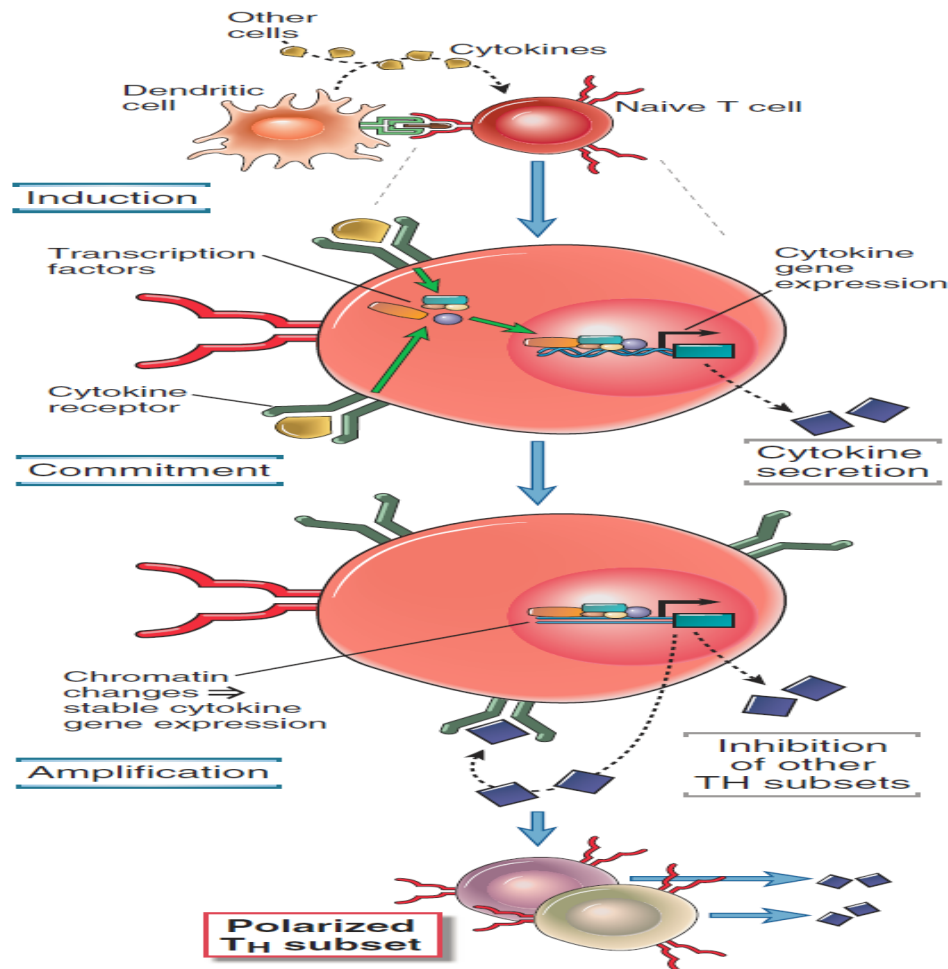
O vývoji efektorových Th.. lymfocytů rozhoduje cytokinové prostředí



Th1, Th2 a Th17 lymfocyty

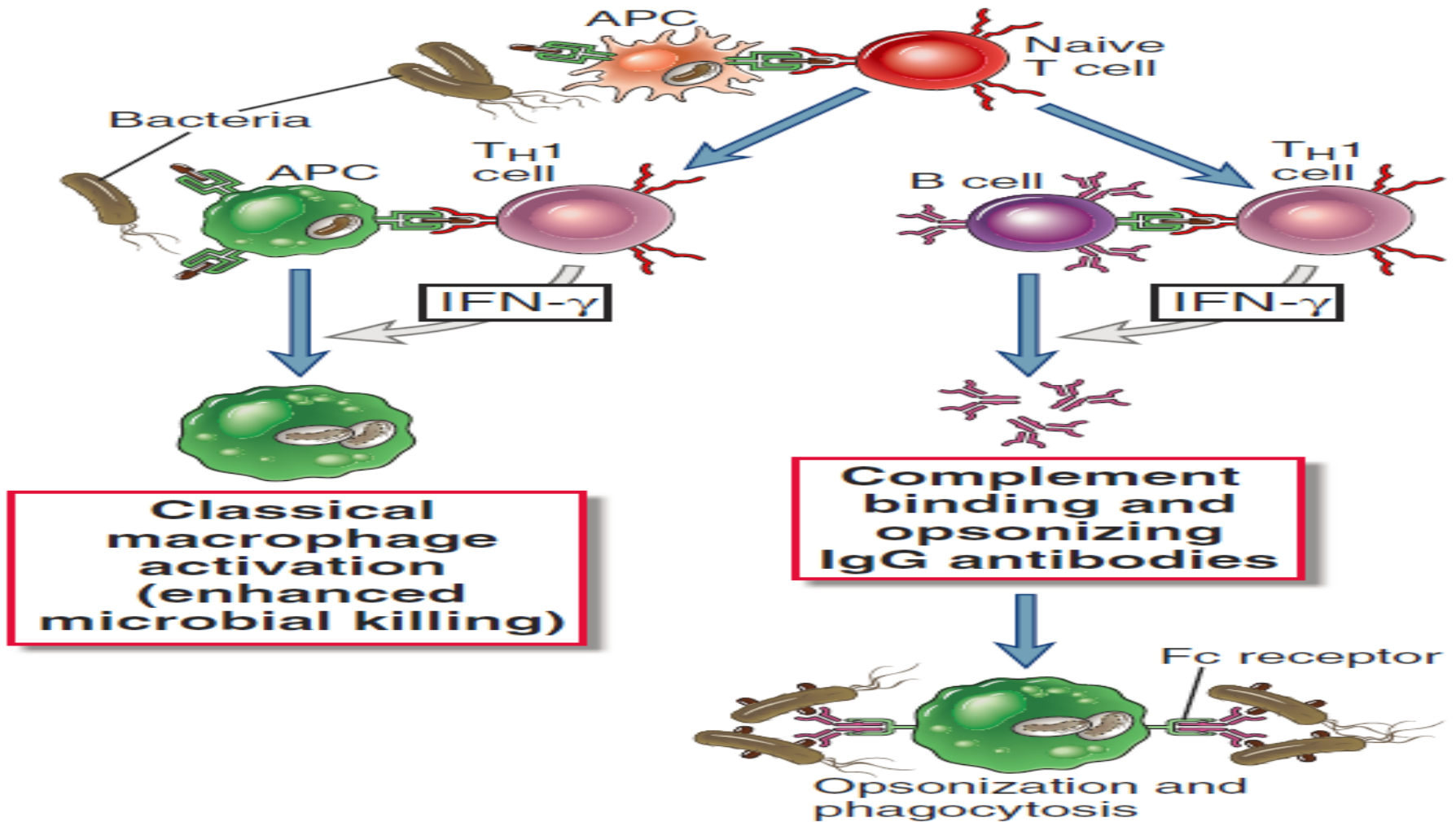


Vývoj Th1, Th2 a Th 17 lymfocytů



- Aktivace transkripčních faktorů stimulujících produkci cytokinů pro daný subset
- Tyto produkované cytokiny pak ovlivňují další produkci cytokinů stejného druhu a podporují vývoj pouze těchto buněk
- Ostatní Th subpopulace lymfocyty jsou suprimovány

Th1 odpověď



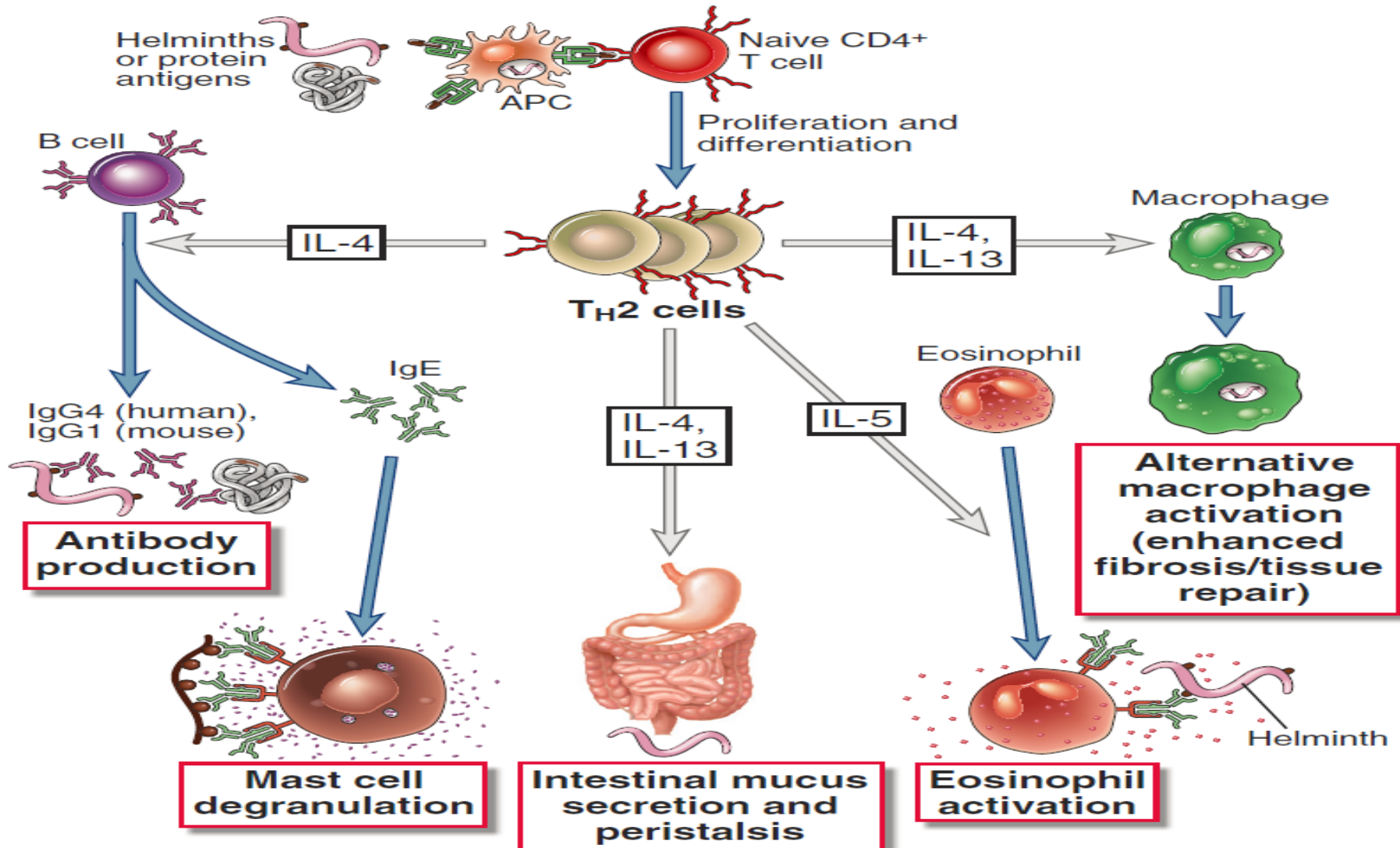
Th1 lymfocyty

- CD4+ Th1 lymfocyty rozeznávají Ag zpracované fagocytujícími buňkami.
- Aktivují makrofágy k zabití mikrobů.
- Aktivace makrofágů je zprostředkována IFN- γ a CD40L – CD40 interakcí.
- Aktivované makrofágy
 - zabíjejí fagocytované mikroby za pomoci reaktivního kyslíku, dusíku a enzymů
 - stimulují zánět a mohou poškozovat tkáně.

T_h1 lymfocyty

- Produkují zejména IFN- γ , IL-2, IL-3.
- Diferencují se pod vlivem IL-12, IL-18, IFN- γ .
- Působí prozánětlivě, stimulují funkci makrofágů.
- Snad se spolupodílejí se na patogenezi autoimunitní thyreoiditidy, roztroušené mozkomíšní sklerózy.
- Produkci IFN- γ , tlumí funkci T_h2 lymfocytů.
- Hrají důležitou roli v akutní rejekci štěpu.

Th2 odpověď



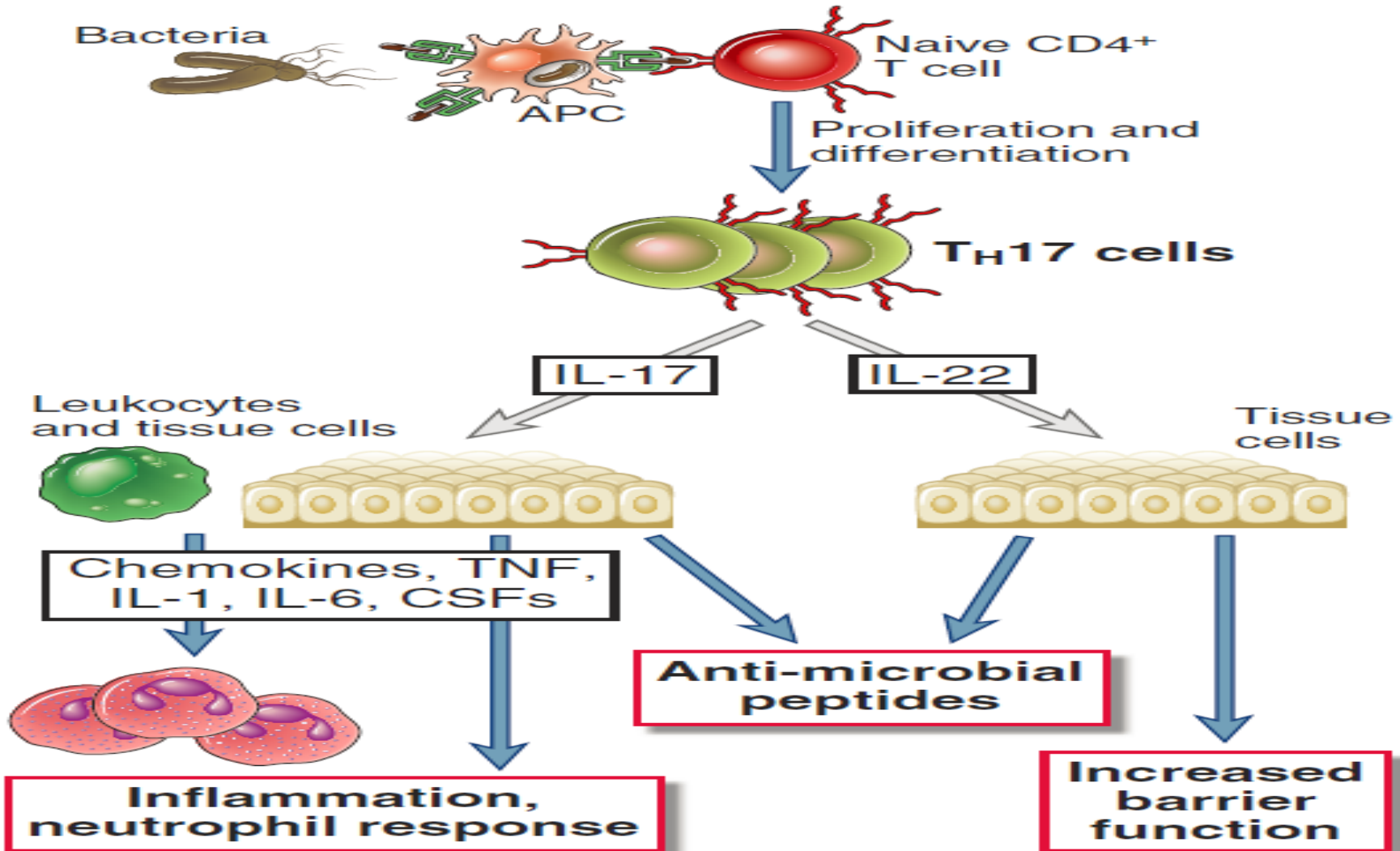
Th2 lymfocyty

- Rozeznávají antigeny produkované parazity a další mikroby a alergeny
- IL-4 sekretovaný aktivovanými Th2 lymfocyty
 - podporují Izotypové přepnutí B-lymfocytů a produkci IgE, které může pokrýt parazity
 - Ovlivňuje degranulaci žírných buněk a zánět
- IL-5 aktivuje eosinofily k uvolnění obsahu granulí ke zničení parazitů
- IL-4 a IL-13 stimulují ochranu epitelové bariery

T_h2 lymfocyty

- Produkují zejména IL-3, IL-4, IL-5, IL-10.
- Diferencují se pod vlivem IL-4
- Stimulují tvorbu protilátek.
- Spolupodílejí se na patogenezi atopických chorob.
- Jejich predominance se objevuje během těhotenství.
- Produkci IL-10 a IL-4 tlumí funkci T_h1 lymfocytů.

Th17 odpověď



T_h 17 lymfocyty

- Vznikají z antigenem-stimulovaných T-lymfocytů v prostředí TGF- β a IL-6.
- Produkuji IL-17A , IL-17F a IL-23.
- Mají význam v obraně proti extracelulárním patogenům.
- Patogeneticky se uplatňují při chronických zánětlivých procesech a vzniku některých autoimunitních chorob (?Crohnova choroba, ?RA).

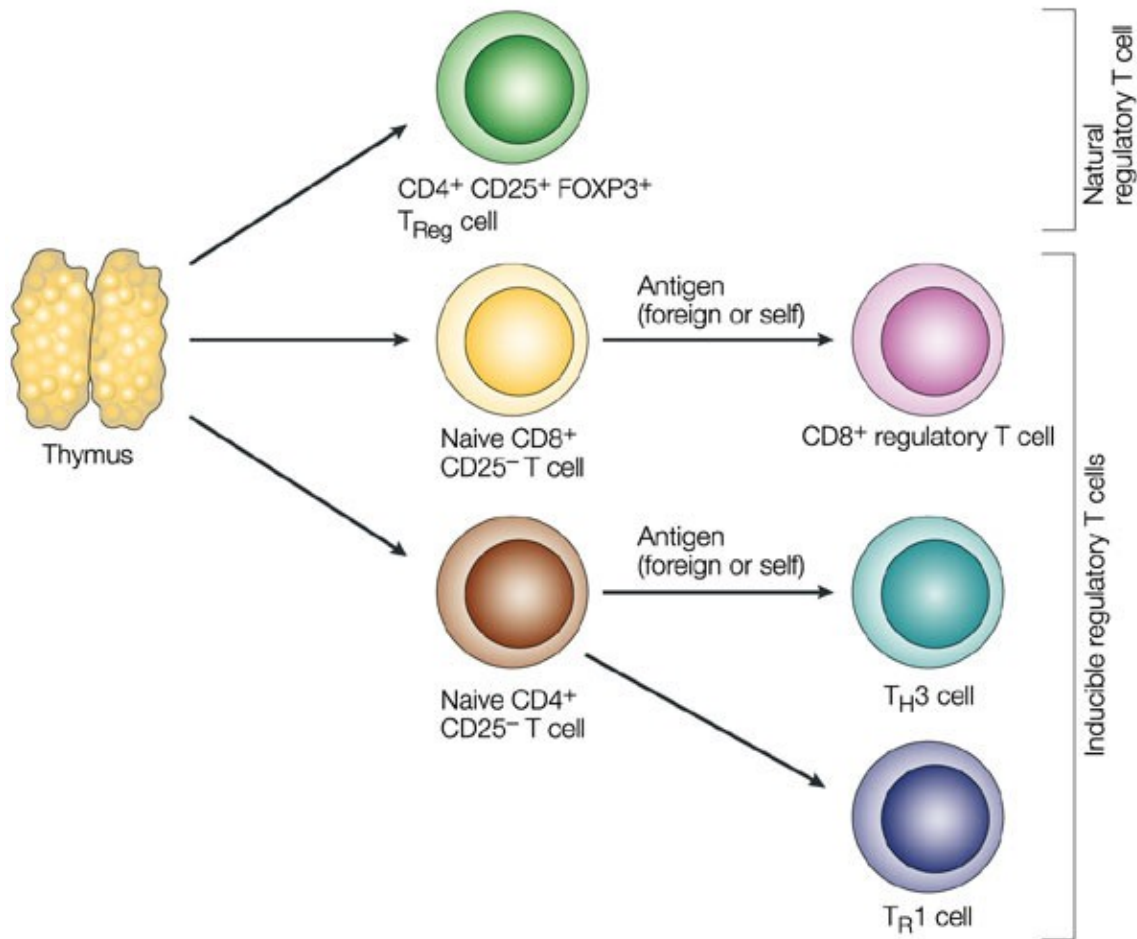
Th17 T lymfocyty

- Stimulují zánětlivou odpověď bohatou na neutrofily ničící extracelulární bakterie a houby.
- Může být důležitá u poškození tkání u autoimunitních chorob.

T_{reg} lymfocyty

- Samostatná subpopulace přirozeně regulačních buněk.
- Vývoj v thymu.
- Jsou CD4+CD25+.
- Přímě působí na jiné T-lymfocyty prostřednictvím molekuly CTLA-4 a snad i membránovou formou TGF- β .
- Tvoří asi 5-10% CD4+ lymfocytů.
- Je možná i indukce těchto buněk na periferii.

Základní typy regulačních T-lymfocytů



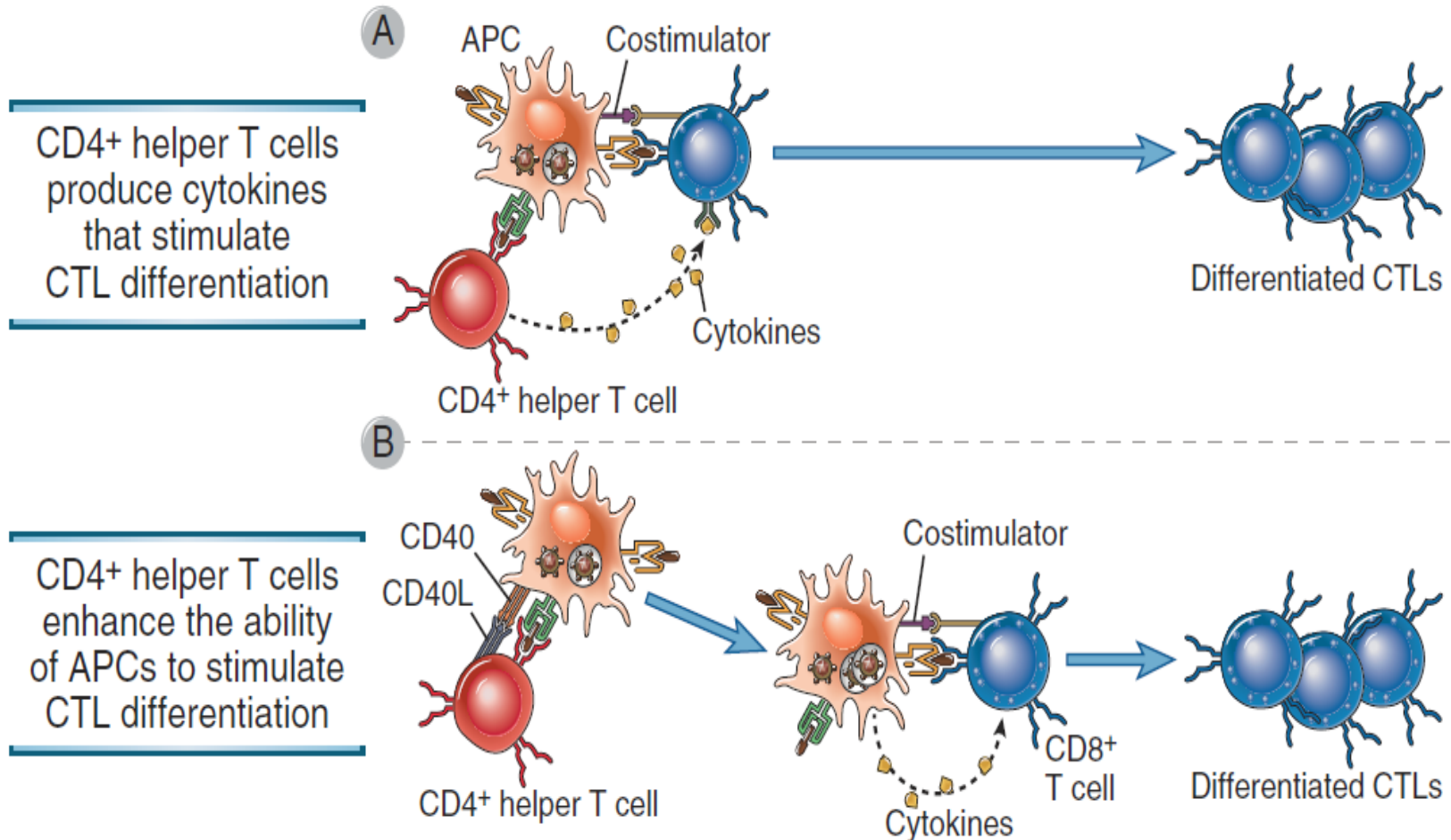
TR-1 lymfocyty

- Jedná se o indukované regulační CD4+ buňky.
- Vznikají z aktivovaných T-lymfocytů působením IL-10.
- Produkuje vysoké hladiny IL-10, IFN- γ , TGF- β , ne však IL-2.
- Není jasný vztah k obdobným tzv. Th3 buňkám.

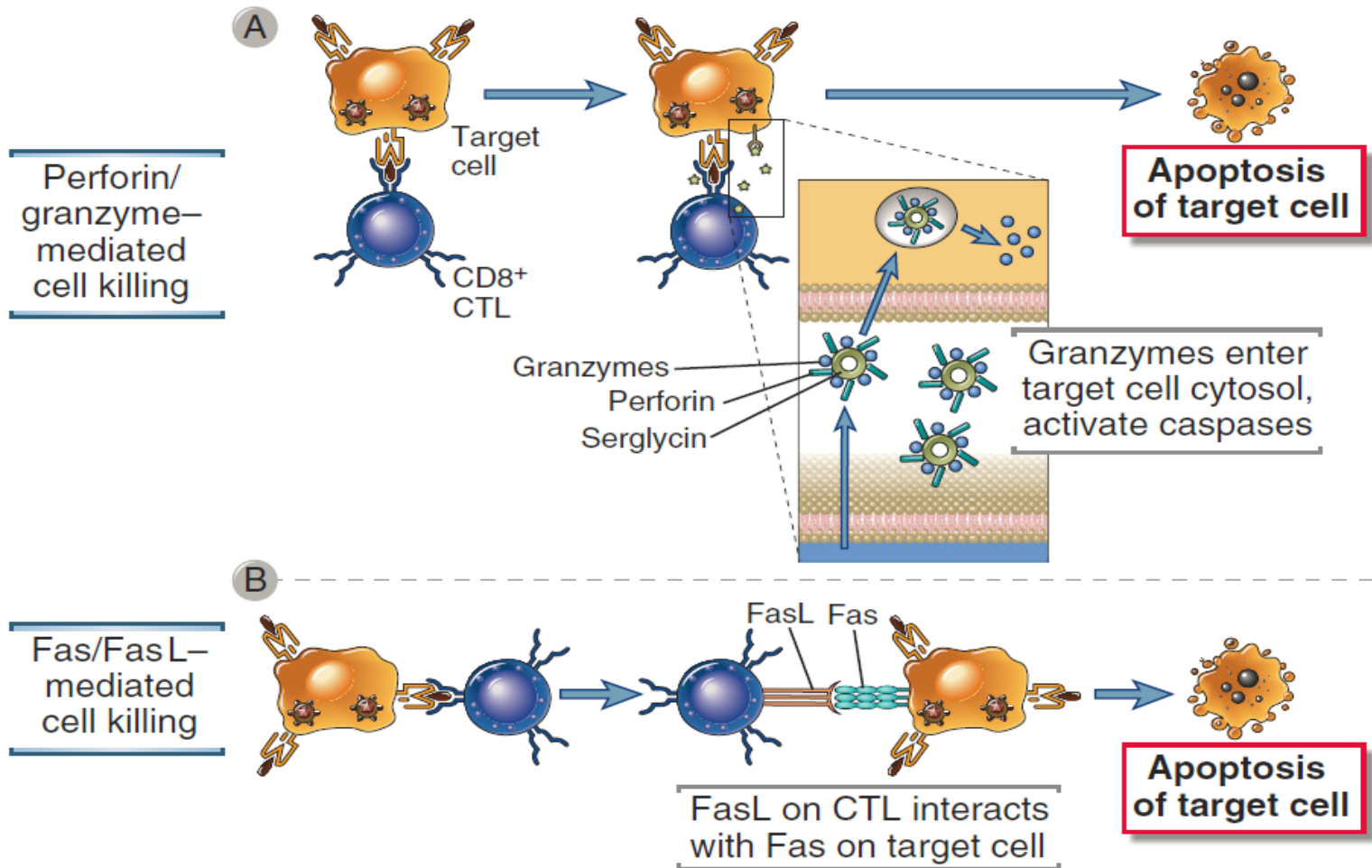
Cytotoxické T-lymfocyty

- Jsou CD8+
- Rozeznávají cizorodý antigen prezentovaný na HLA-I antigenech.
- Cytotoxicky působí perforin, dále různé mechanismy indukující apoptózu cílové buňky (granzymy, FasL, lymfotoxin).
- Jsou i důležitými producenty cytokinů (Tc1 a Tc2 buňky).

Diferenciace efektorových cytotoxických T lymfocytů



Mechanismy „zabíjení“ cytotoxických T lymfocytů



Cytotoxické CD8+ T lymfocyty

- Zabíjejí buňky exprimující peptidy virových antigenů, které jsou asociovány s molekulami MHC I. Třídy.
- Zabíjeno je pomocí granulí, které obsahují granzym a perforin.
- Perforin usnadňuje granzymu vstup do cytoplasmy cílové buňky a granzym iniciuje několik cest apoptózy.
- CD8+ dále sekretuje IFN gama.

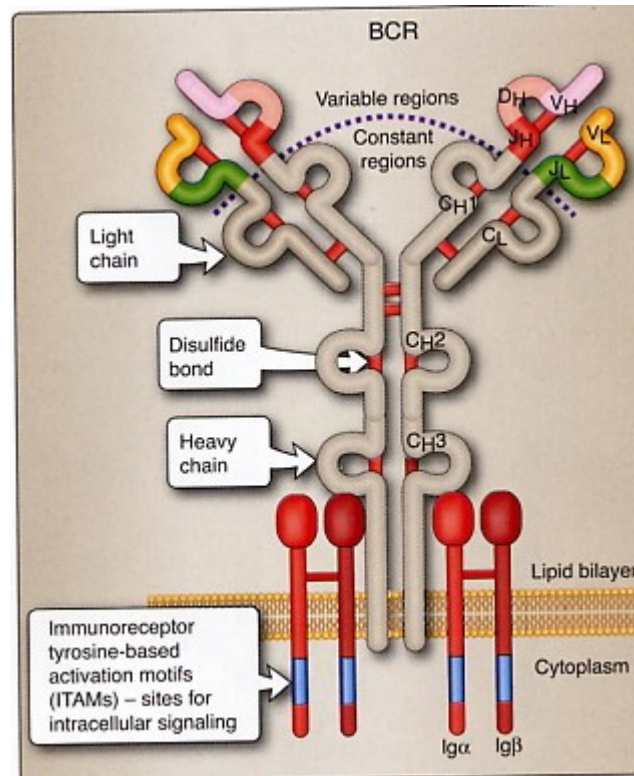
Gama delta T lymfocyty a NKT buňky

- Malé populace lymfocytů (5% periferní krev), častější výskyt mezi epteliemi.
- Nerozeznávají MHC asociované peptidové Ag.
- Rozeznávají širokou škálu Ag zahrnující peptidy i nebílkovinné antigeny: malé fosforylované molekuly, alkyl aminy, stresové proteiny a lipidy.
- Část těchto buněk je přítomno v kůži a ve sliznicích.
- Určeny k obraně proti konzervovaným Ag strukturám (např. u mykobakterií).

Buňky NKT

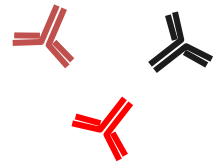
- Imunofenotypově i funkčně podobné NK a T.
- Přítomny v periferní krvi, slezině, játrech, lymfatických uzlinách, kostní dřeni, thymu.
- Aktivované migrují do míst infekce nebo zánětu
- Receptor má charakter „semi-invariantního“ $\alpha\beta$ TCR (Va24/Ja18 – Vb11).
- Svým TCR receptorem poznávají glykolipidové nebo lipidové struktury presentované na nepolymorfní CD1 molekule (lysofostatidylcholin je autoantigenem pro lidské NKT).

Receptor lymfocytů B (BCR) (IgM, IgD)

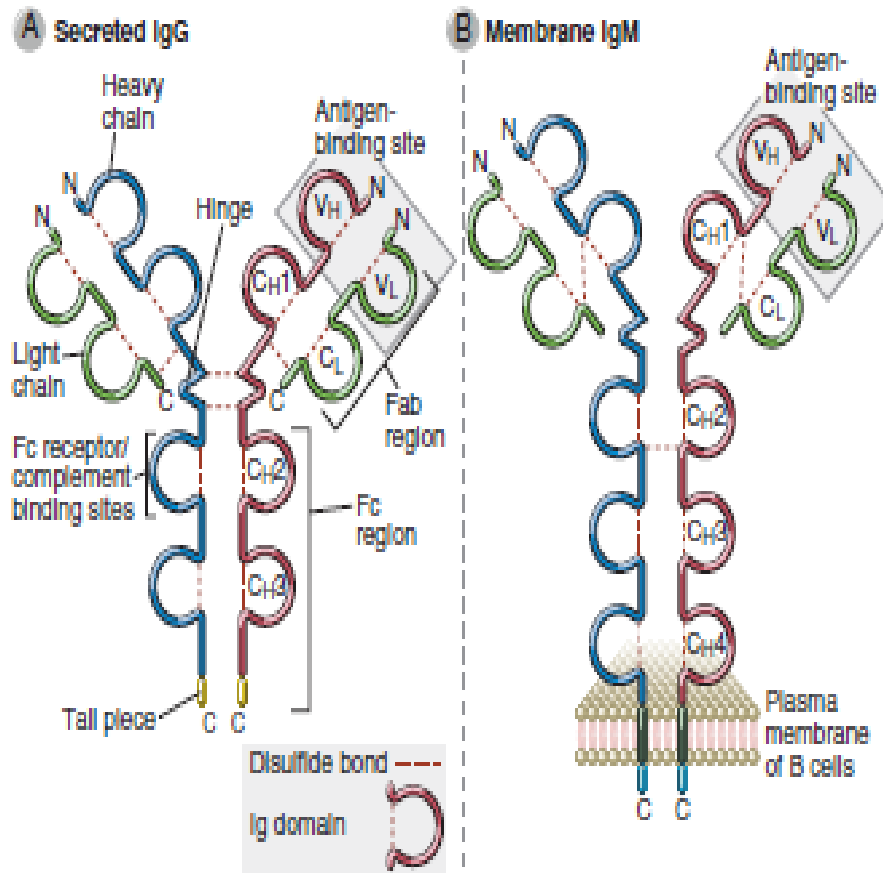


B lymfocyty

- jsou základními buňkami specifické humorální imunity
- primární funkce - produkce protilátek – imunoglobulinů (Ig)
- Ig- zaměřeny proti mikroorganismům nebo jejich toxinům působících v tělních tekutinách či dutinách tj. mimo buňky



BCR receptor

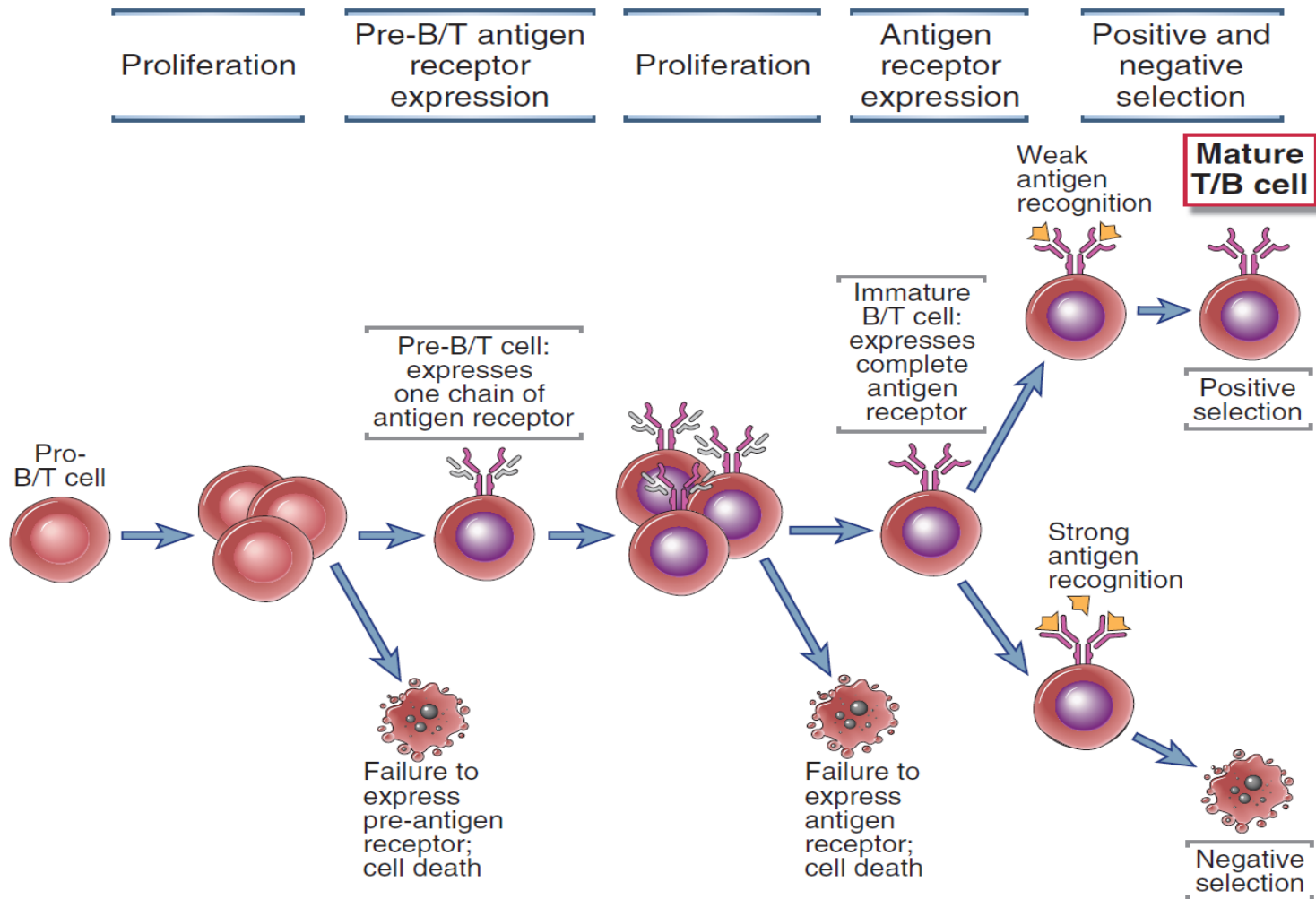


- Skládá se ze dvou identických těžkých řetězců a dvou identických lehkých řetězců
- Na každém řetězci jsou variabilní a konstantní oblasti

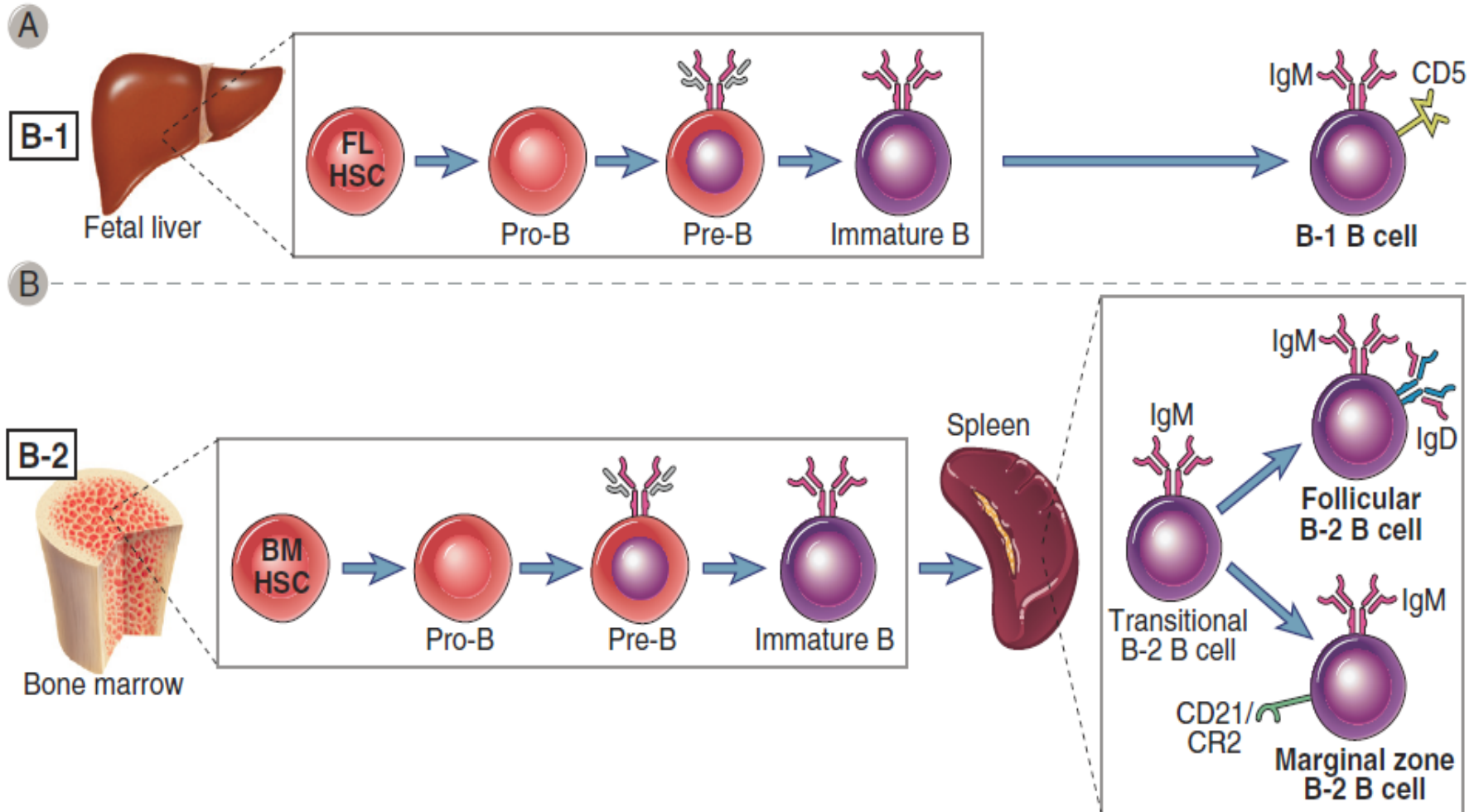
Protilátky

- Ig existují ve dvou formách:
 - membránově vázané na povrchu B-lymfocytu , kde fungují jako receptor pro antigen
 - sekretované , které jsou v cirkulaci, tkáních, mukóze
 - jsou sekretovány plazmatickými buňkami, které vznikají z B-lymfocytu po jeho aktivaci a další diferenciaci
 - vážou se na Ag a aktivují efektorové mechanismy vedoucí k eliminaci Ag

Vývoj B lymfocytů



Diferenciace subpopulací B lymfocytů



Antigeny aktivující lymfocyty B

Thymus-independentní, typ 1 a 2

Typ 1: polyklonální aktivátory, mitogeny, stimulují B-bb nespecificky

Typ 2: polysacharidy bakterií, aktivace je specifická

(především IgM, nízká afinita, krátká paměť)

Thymus-dependentní

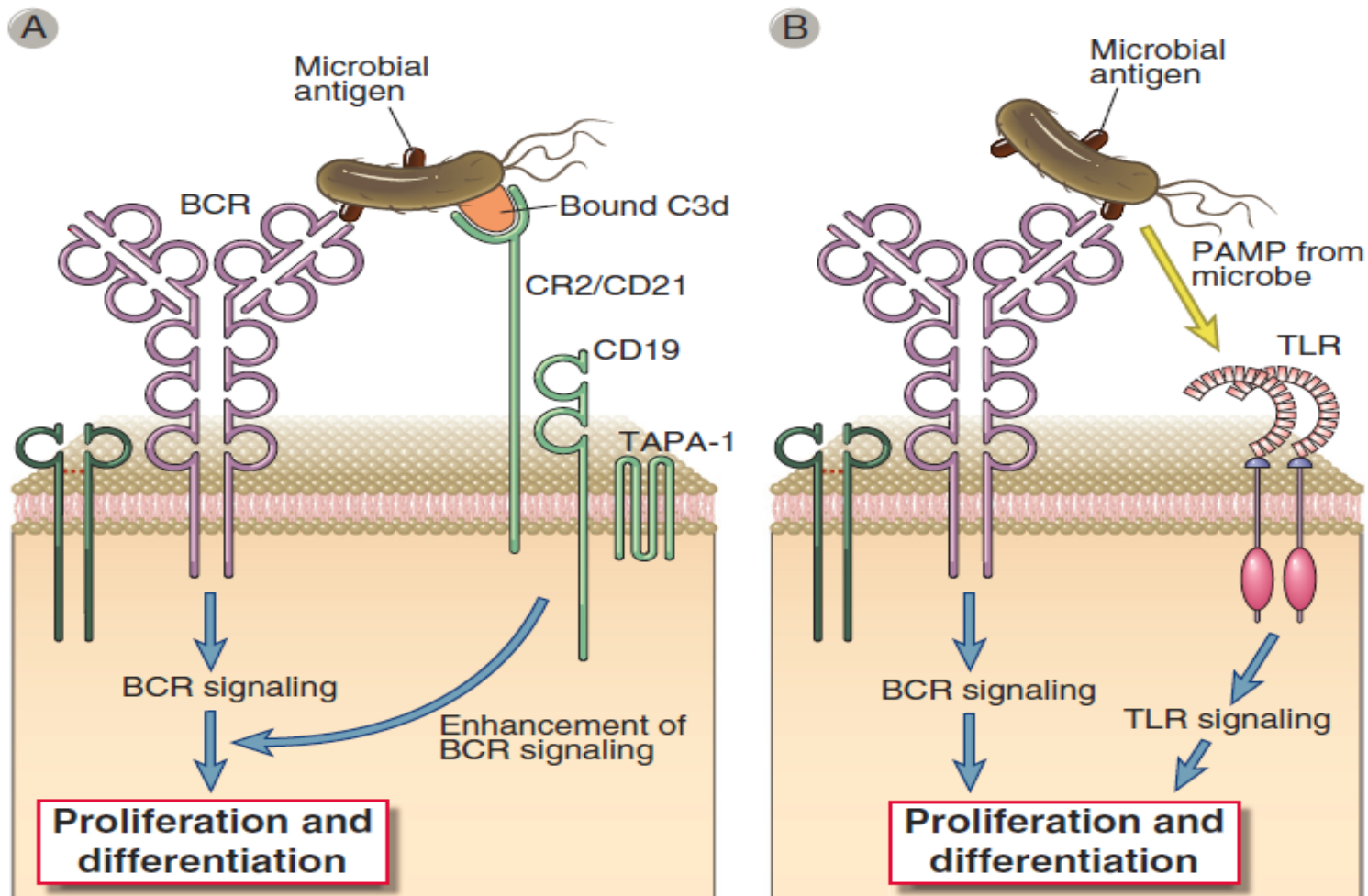
Proteiny, glykoproteiny. Vyžadují kooperaci T-B.

(IgM, IgG, IgA, vysoká afinita, dlouhodobá paměť)

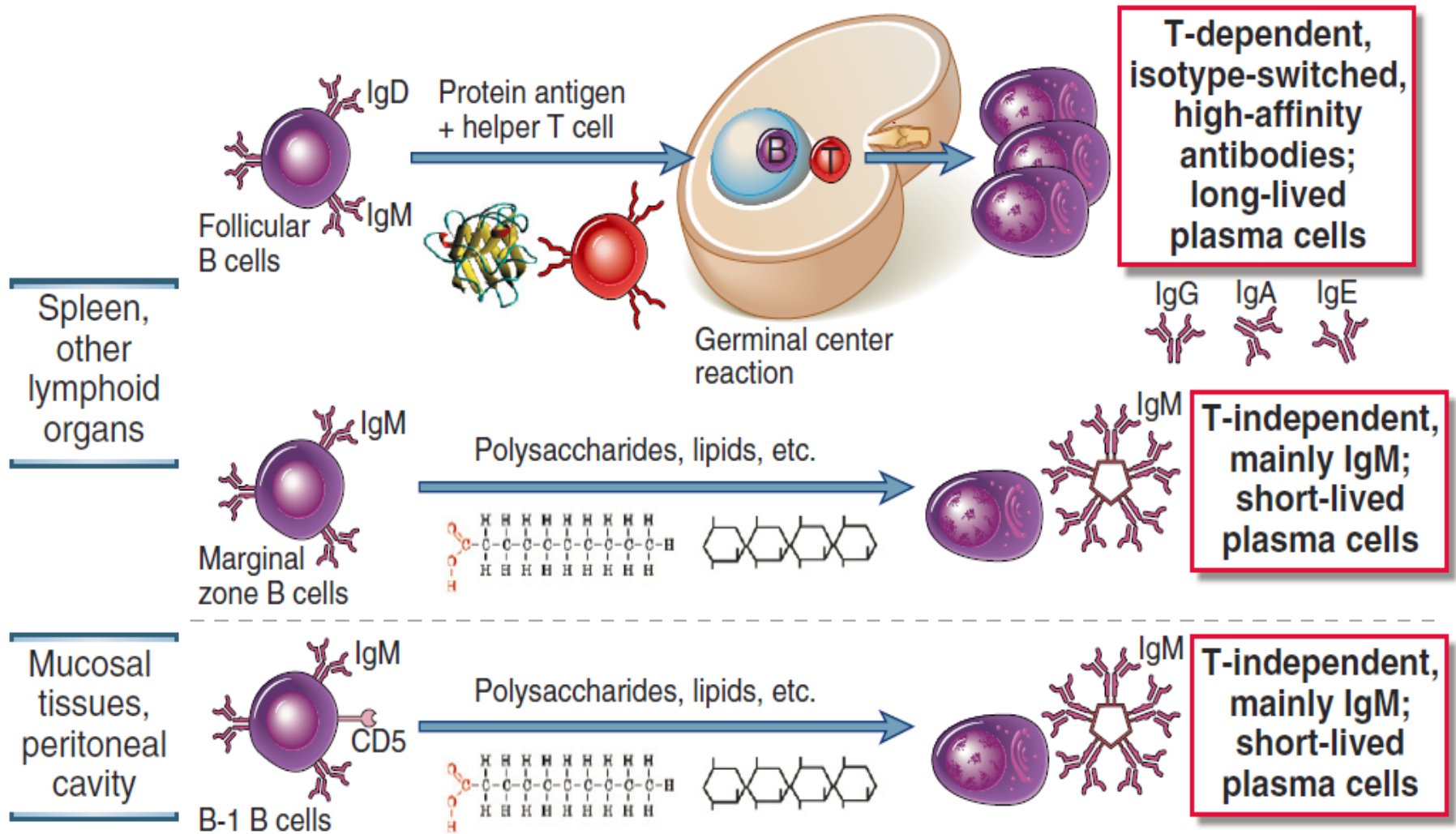
Aktivace B lymfocytů a produkce Ig

- Ag se váže na membránový IgM a IgD receptor zralého naivního B-lymfocytu – aktivaci buňky.
- Aktivace vede k proliferaci Ag specifických B-lymfocytů, k jejich diferenciaci a vzniku paměťových a plazmatických buněk.
- Jediná buňka během jednoho týdne může vyprodukovat více než 5000 plazmatických buněk, které sekretují více než 10^{12} molekul Ig za den.

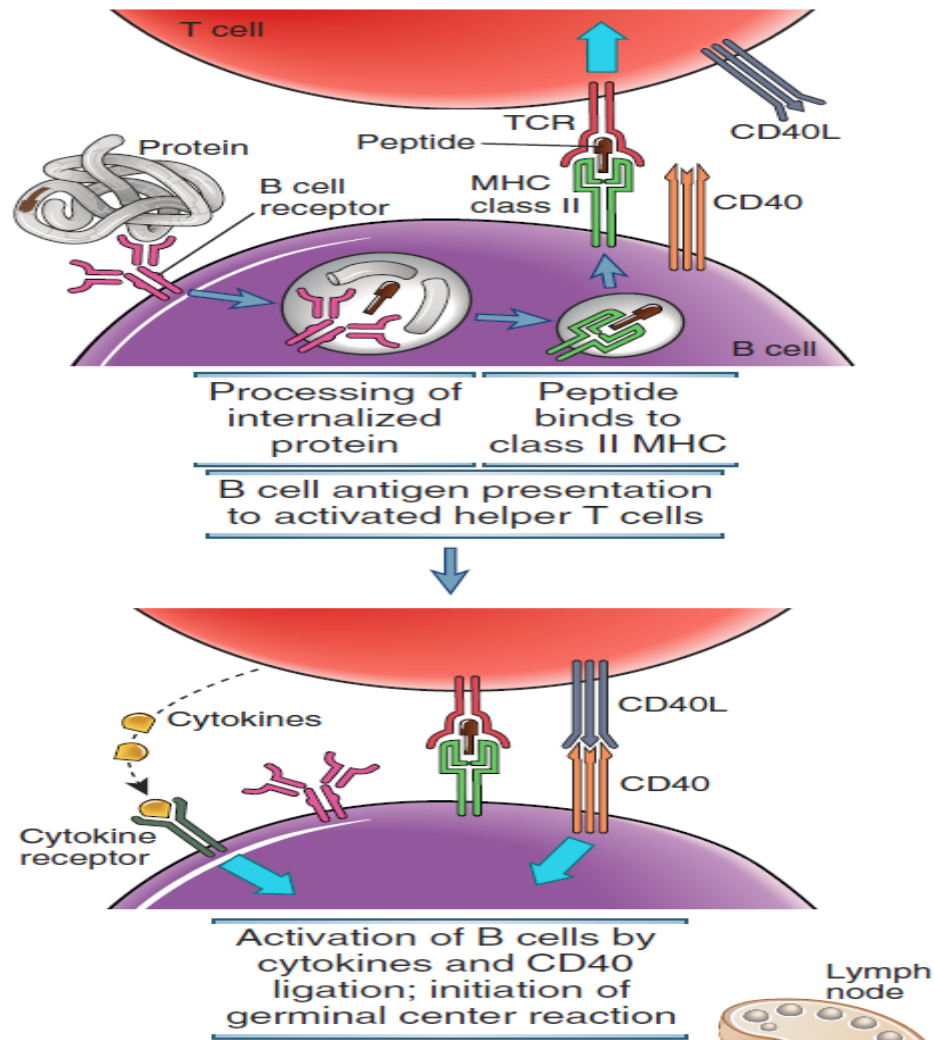
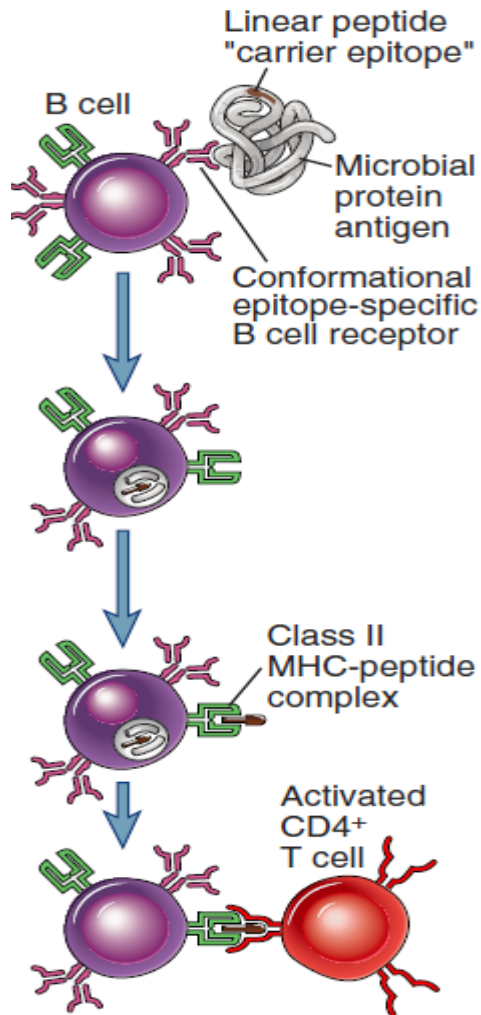
Aktivace B lymfocytu



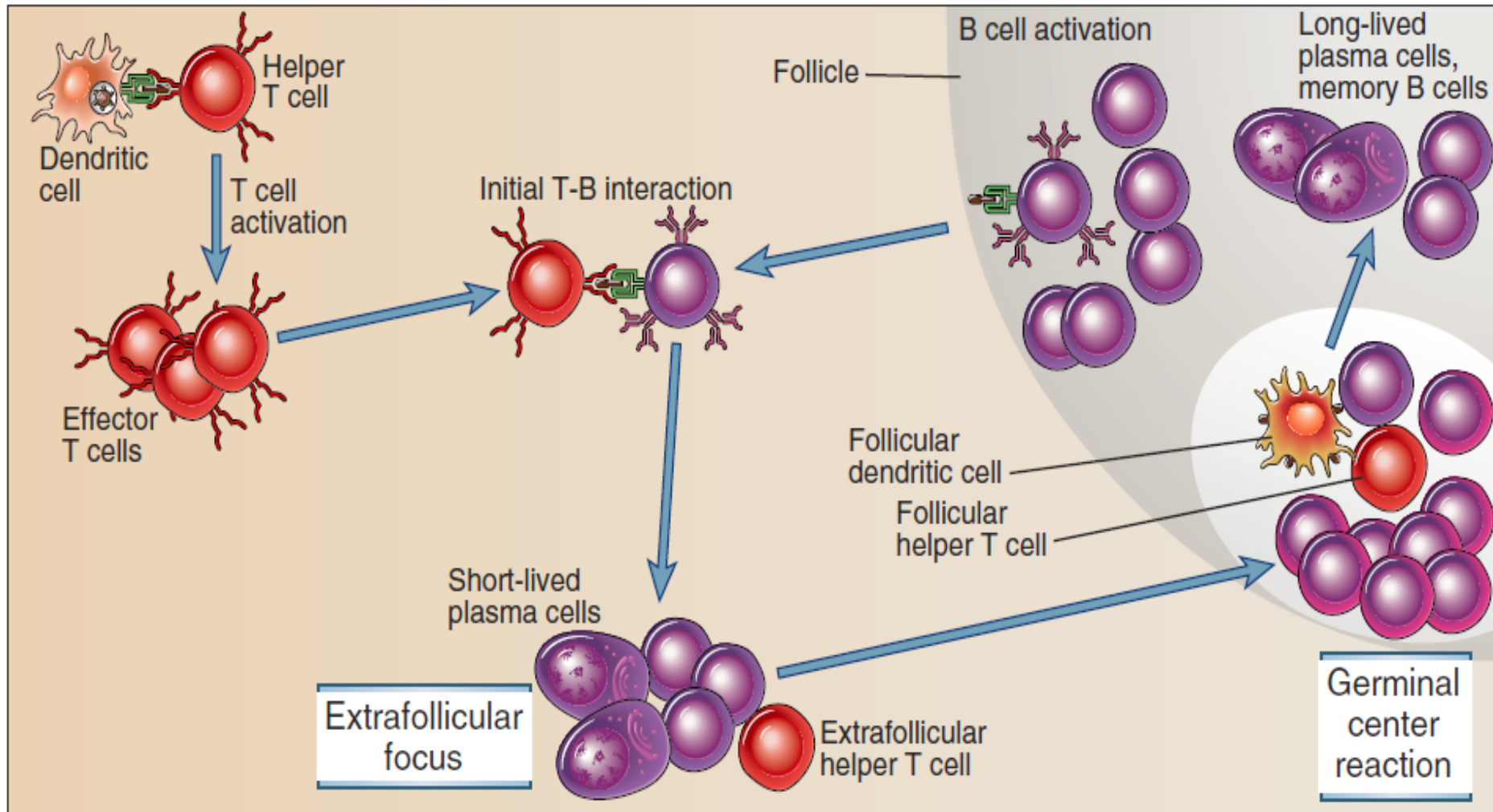
B-lymfocytární subpopulace

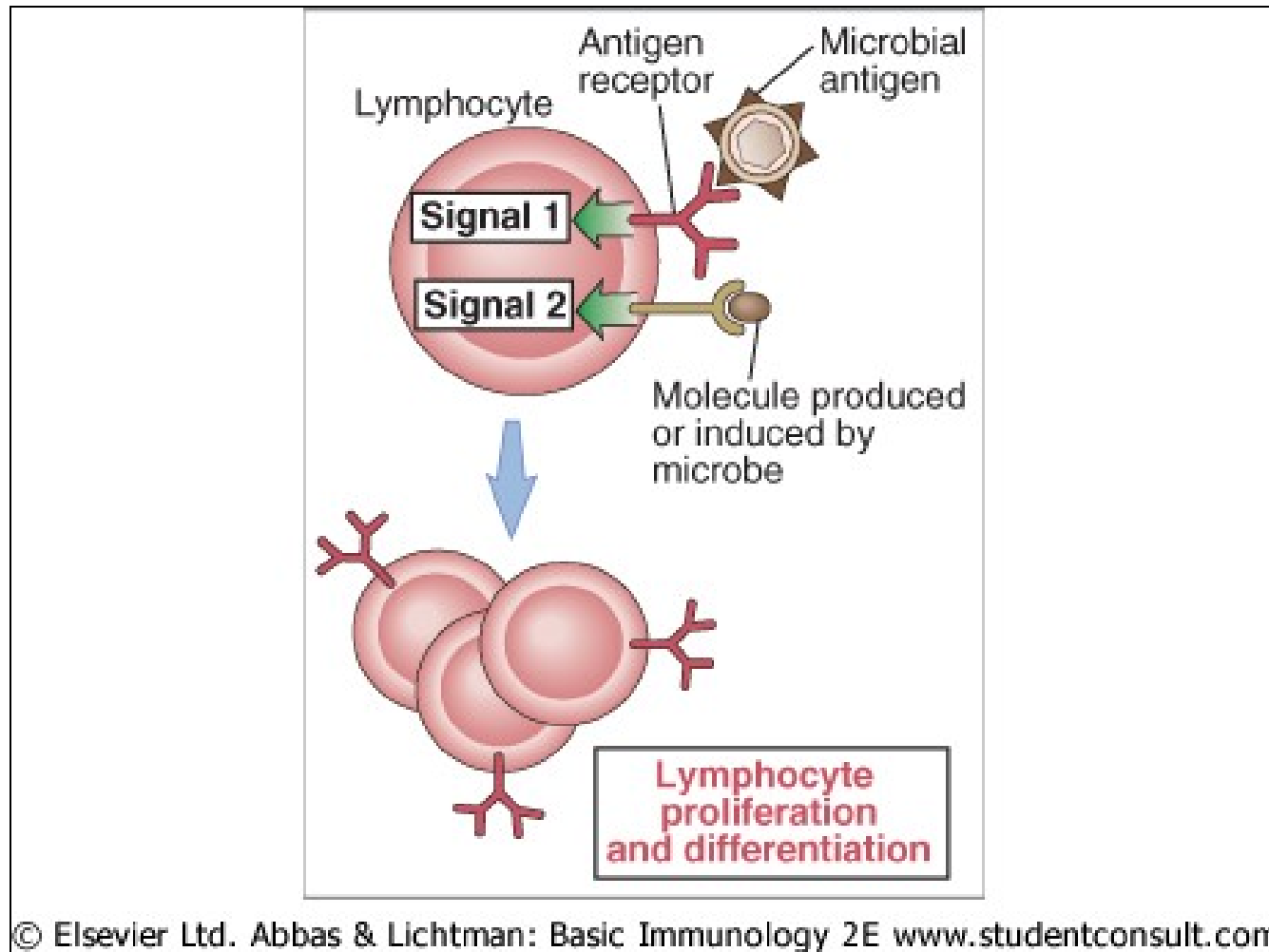


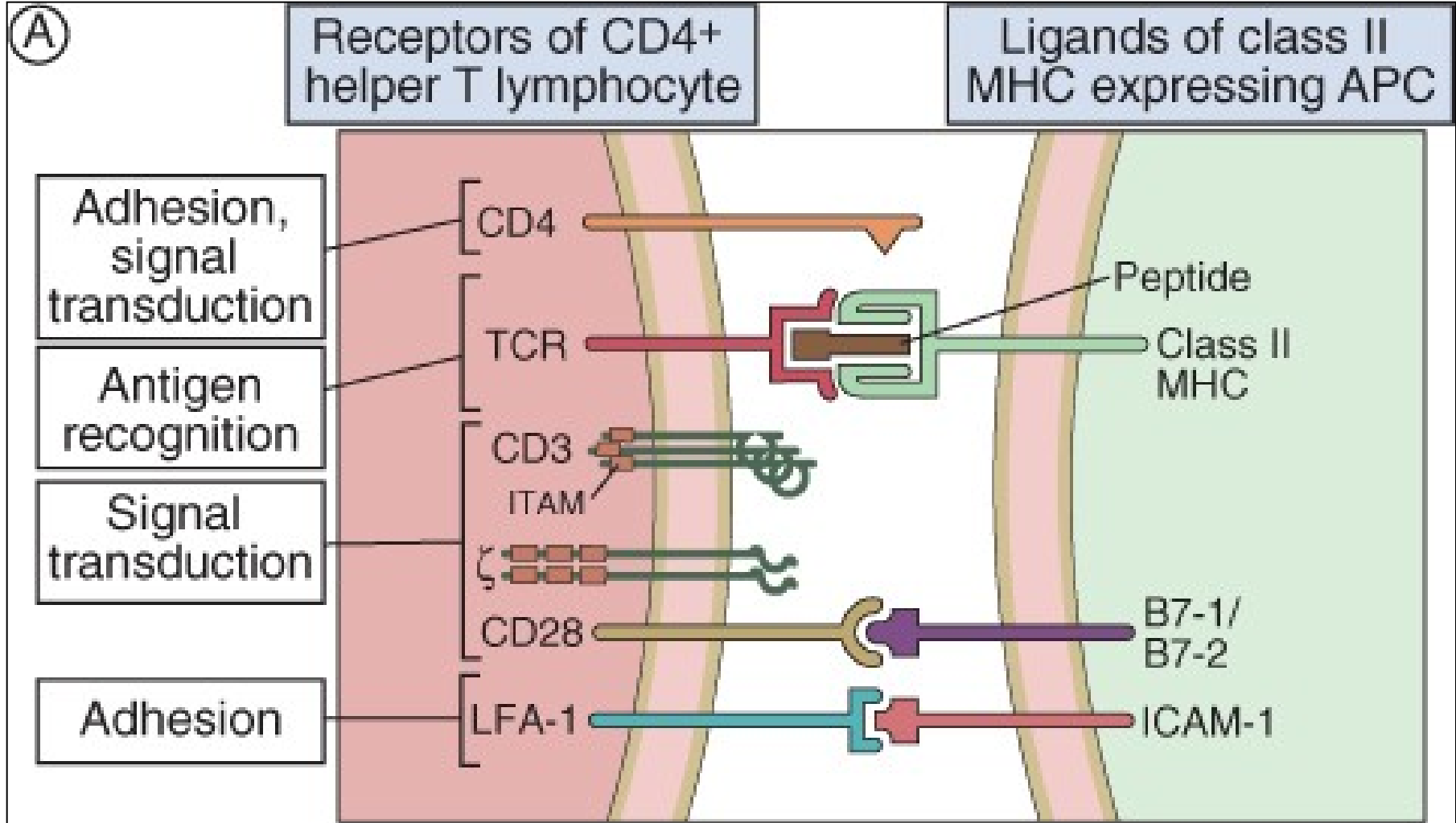
B lymphocyte as APC and its stimulation by T lymphocytes



Protilátková odpověď – T dependentní



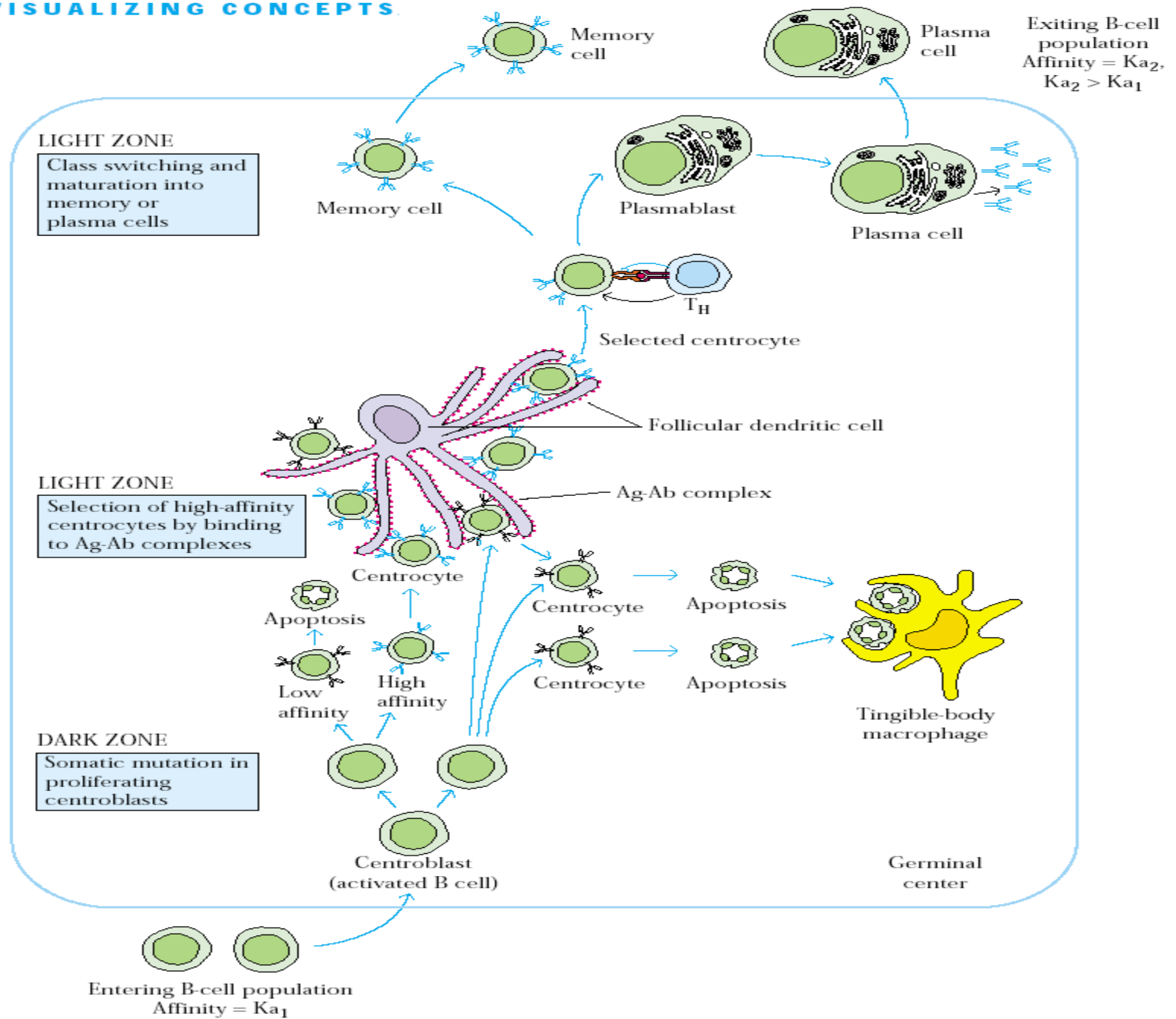




© 2005 Elsevier



VISUALIZING CONCEPTS



Somatic hypermutation

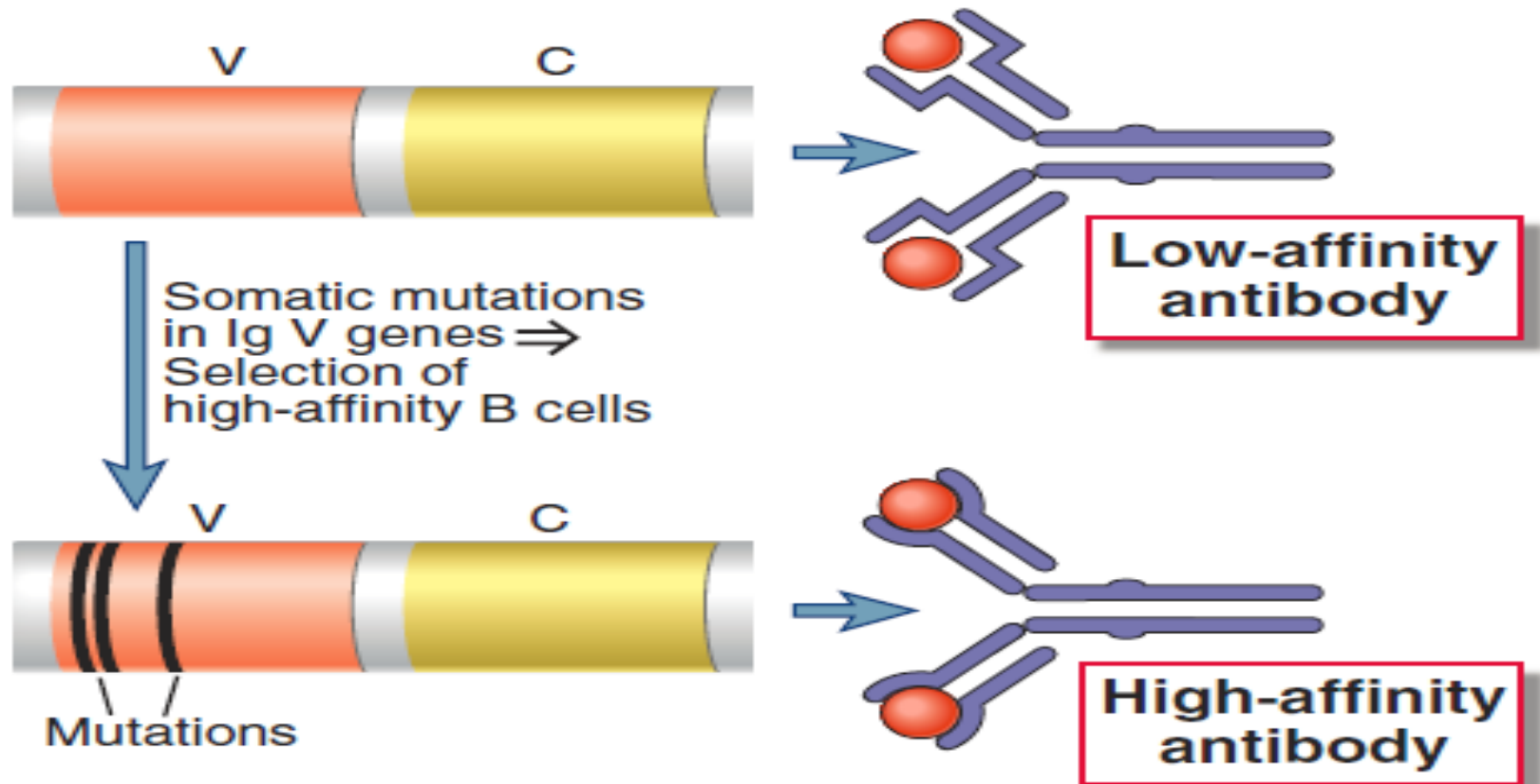
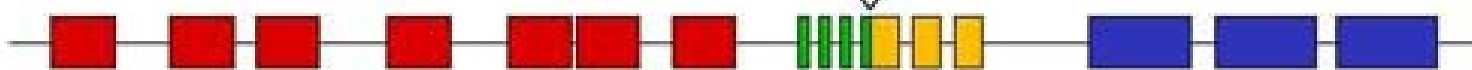


Figure 5: V(D)J Recombination

Germline configuration



D to J recombination



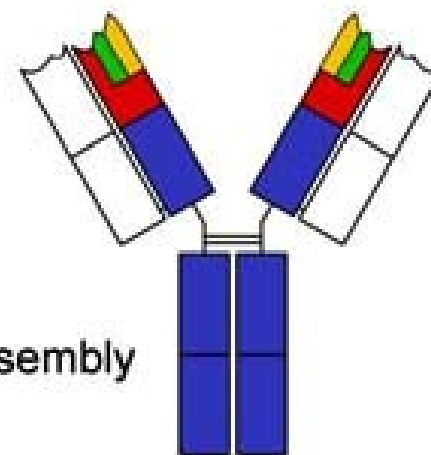
V to DJ recombination



transcription, splicing

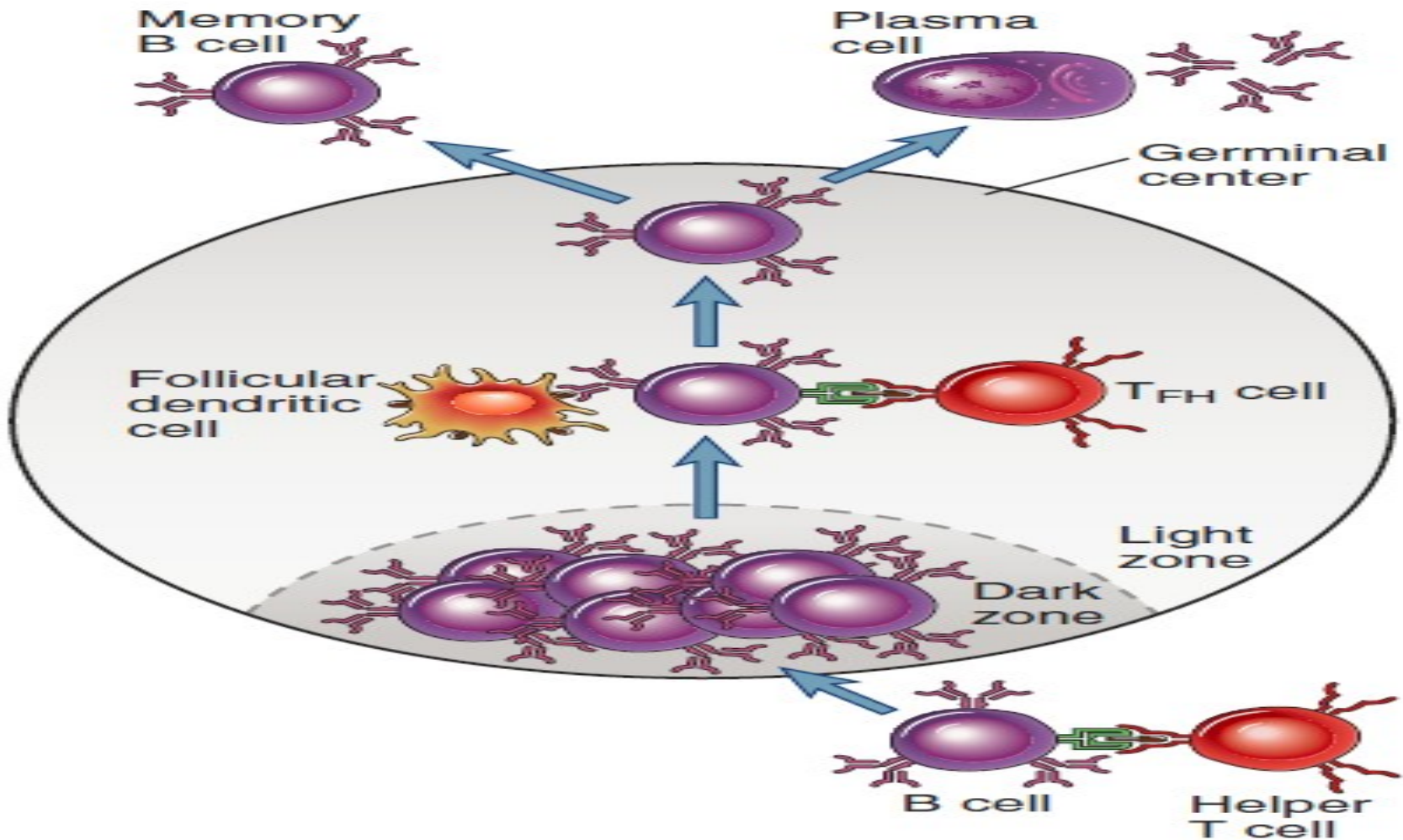


translation, assembly

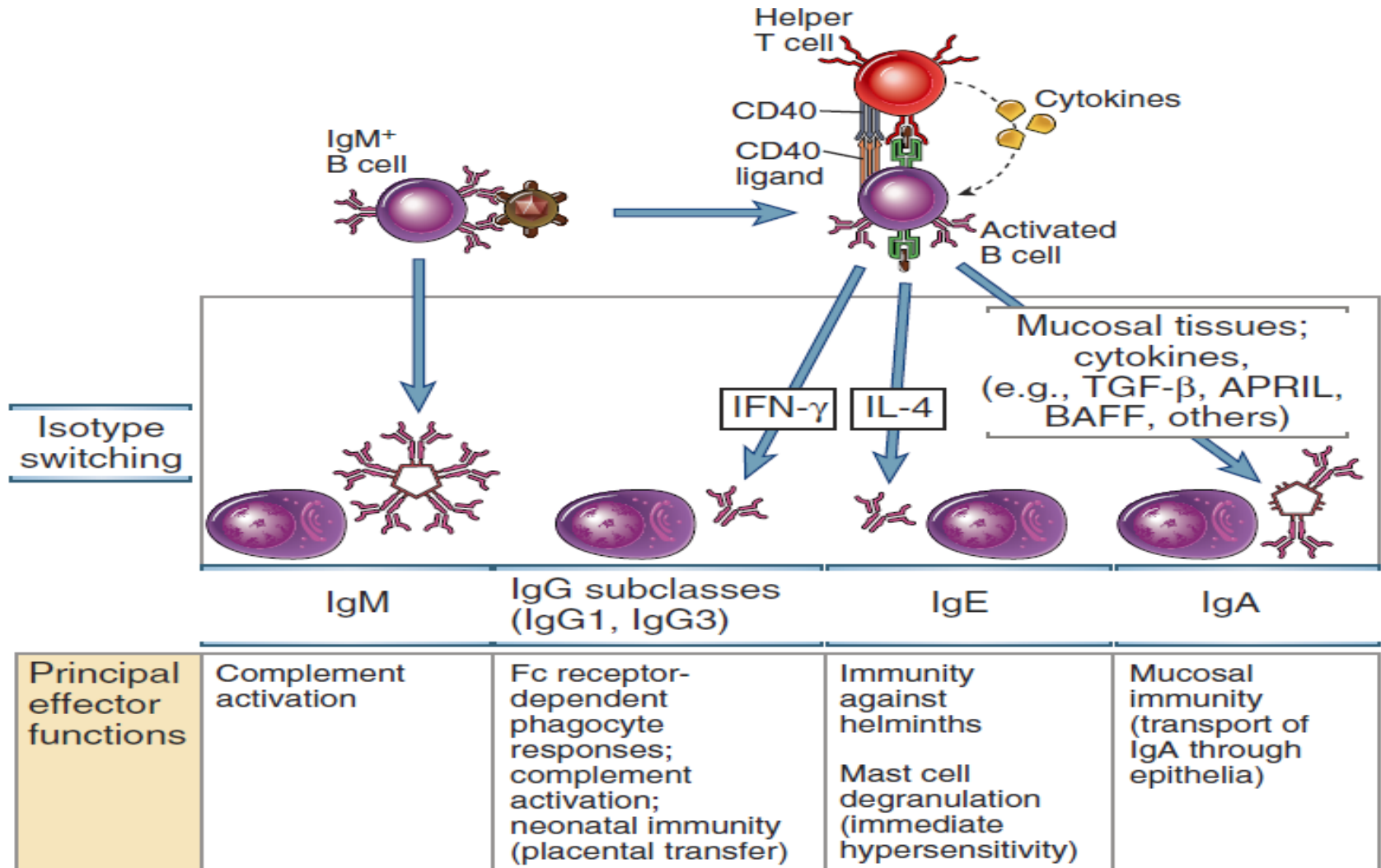


(adapted from Janeway 2001)

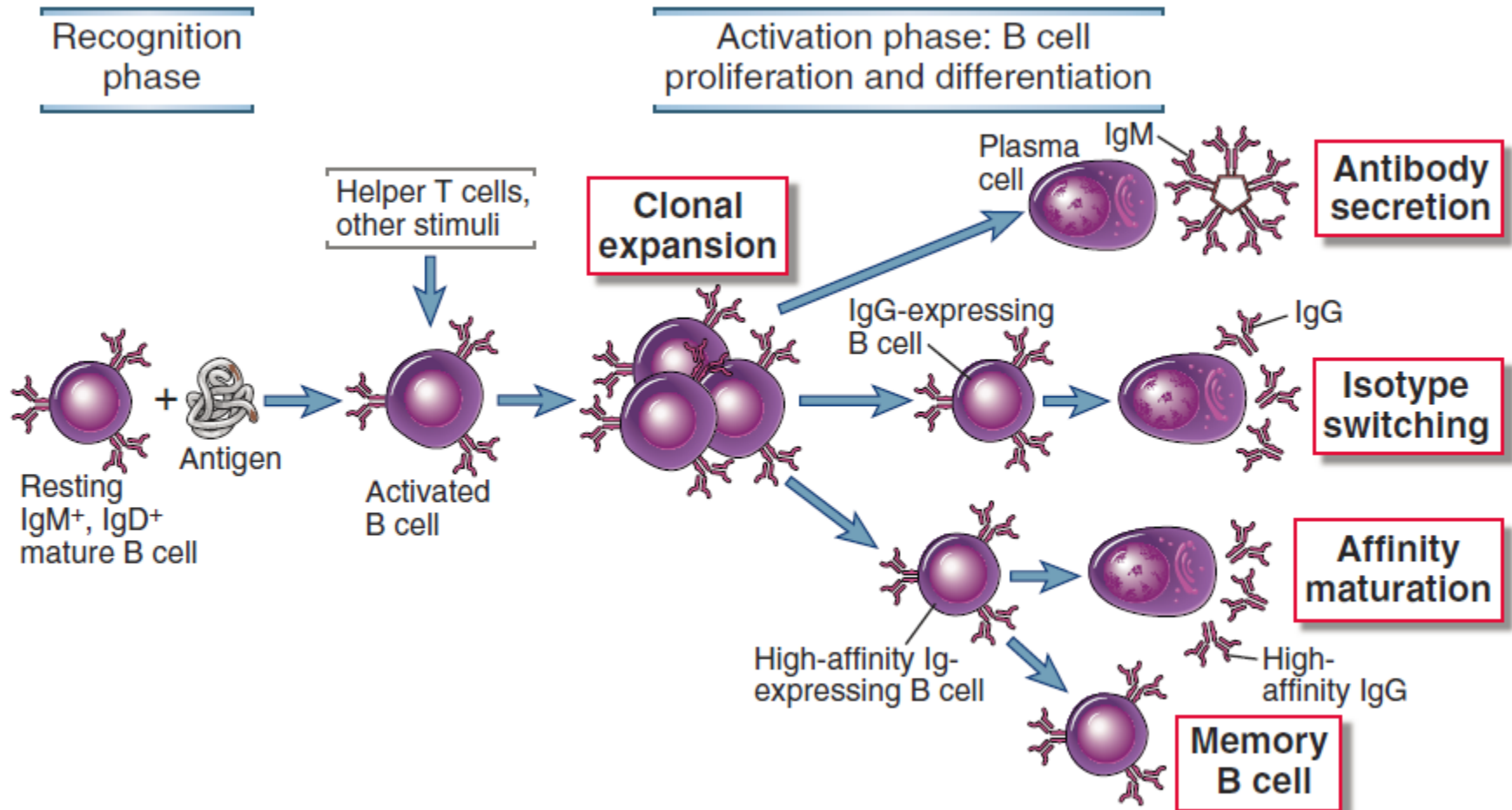
Germinální centrum



Izotypový přesmyk a funkce jednotlivých Ig

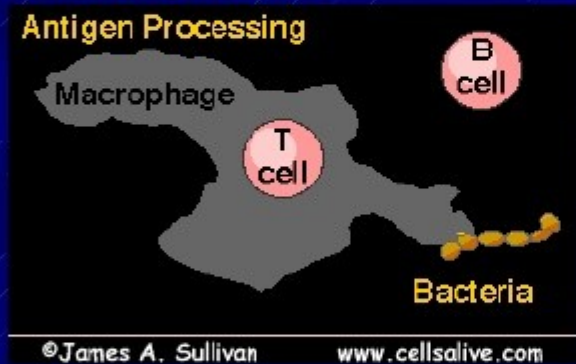


B-buněčná aktivace a produkce Ig u B2 lymfocytů

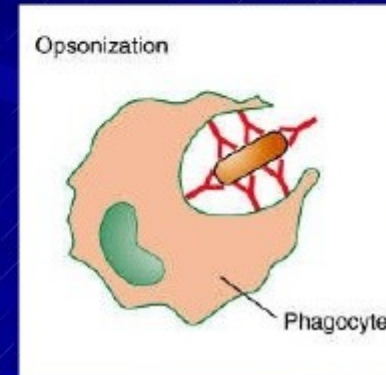
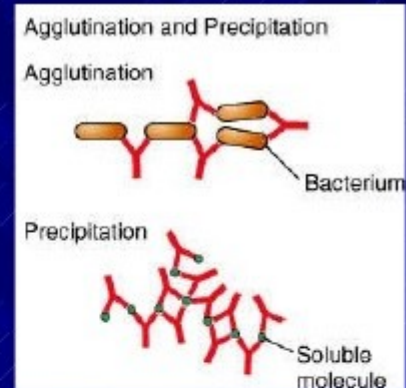


Antibodies

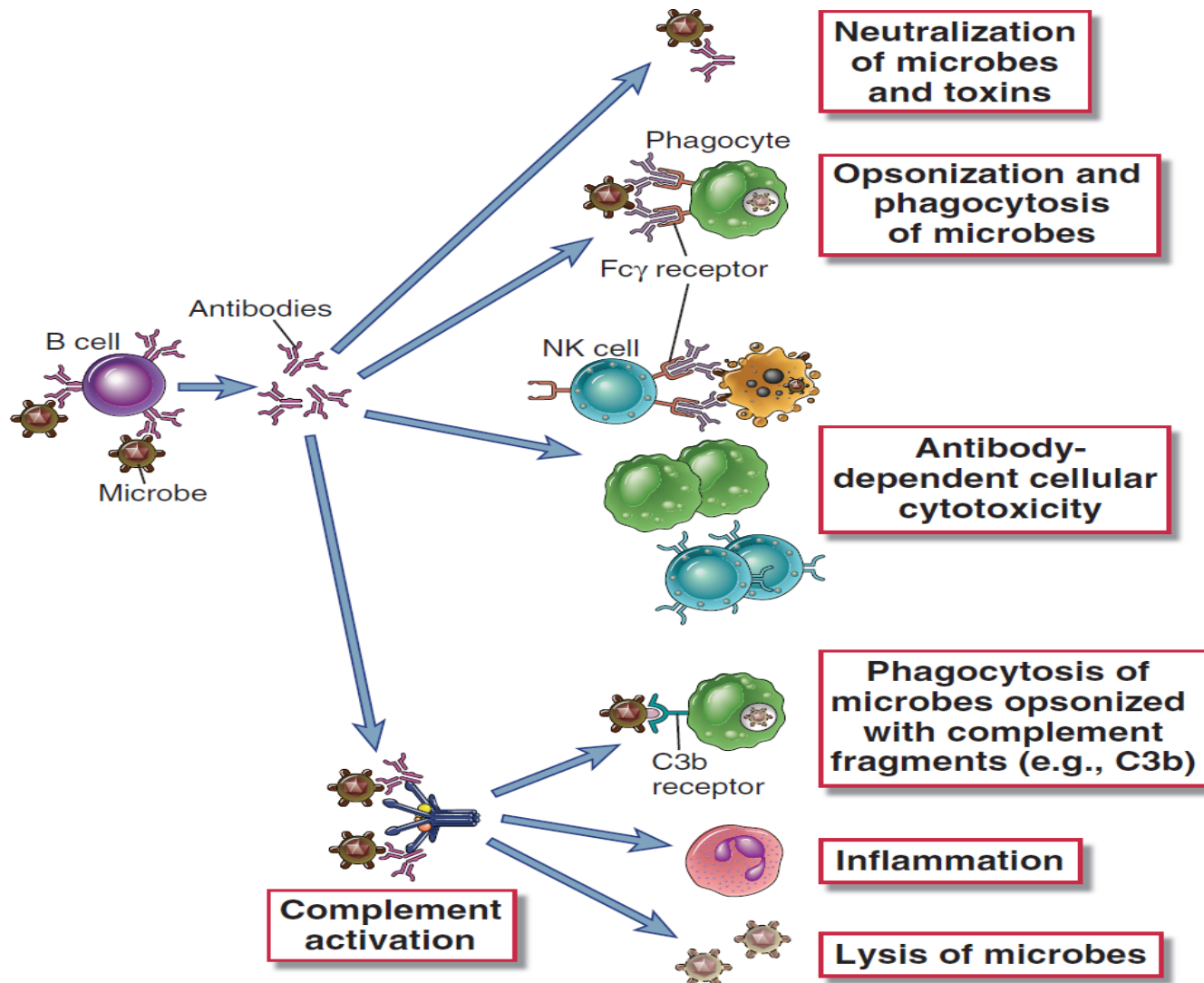
- agglutination and precipitation
 - enhances phagocytosis by gathering antigens into clumps

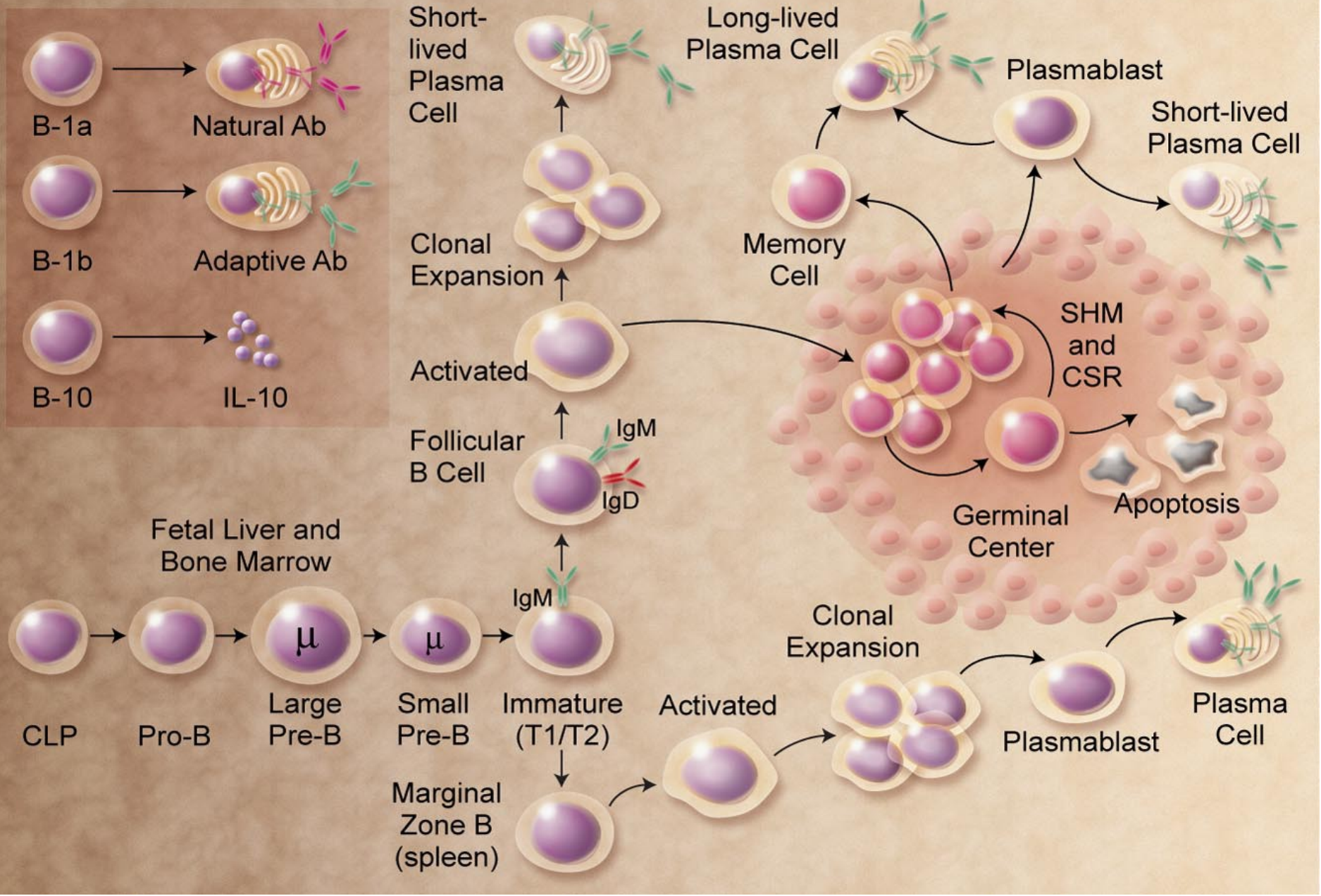


- opsonization
 - coating an antigen with antibody enhances phagocytosis

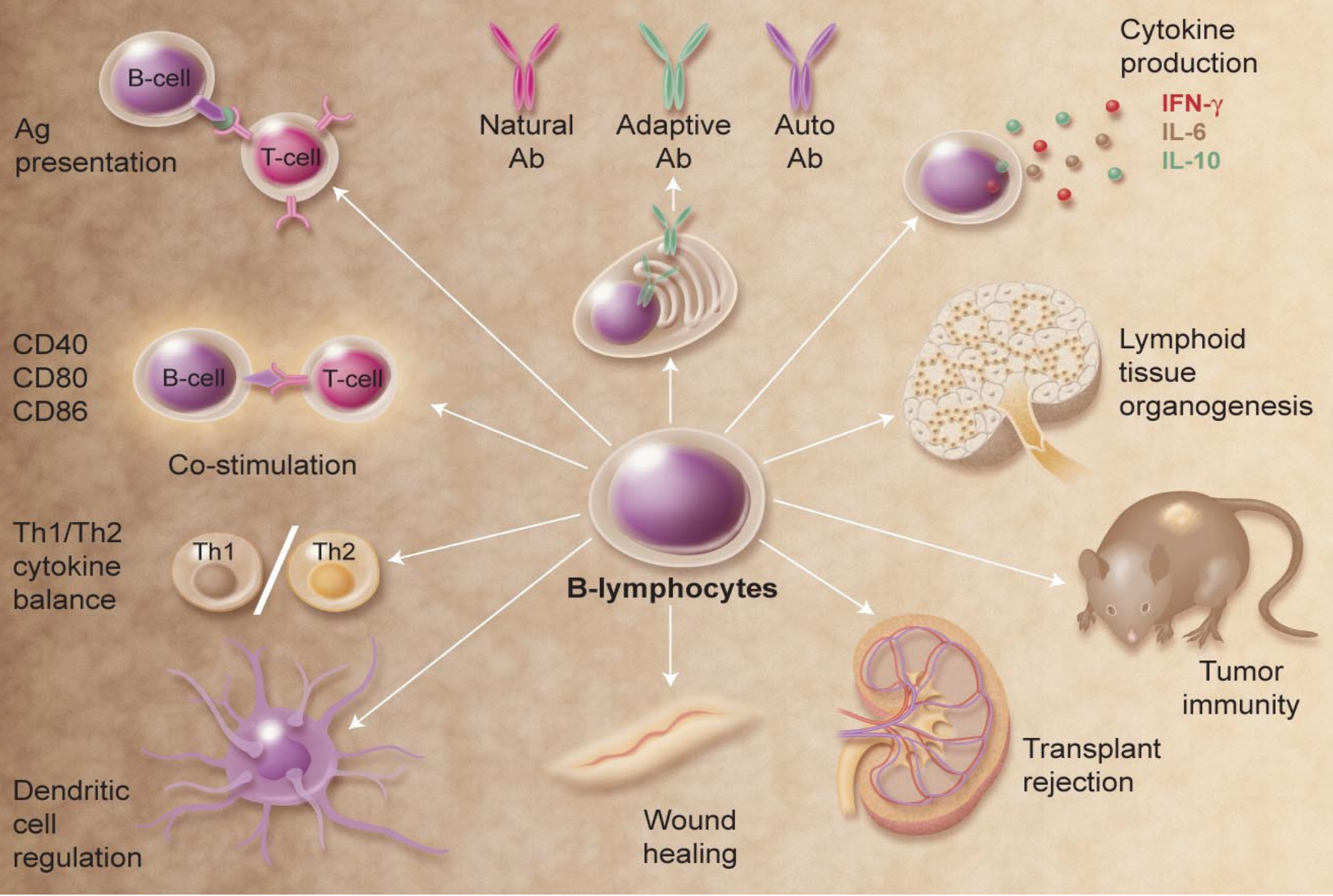


Efektorové funkce protilátek





Tucker W. LeBien and Thomas F. Tedder. Blood 2008; 112: 1570-1580



Tucker W. LeBien and Thomas F. Tedder. Blood 2008; 112: 1570-1580

Adaptivní imunita: paměť

Zvýšení imunitní reakce po opakovaném setkání s původním antigenem.

Klonální selekce – klonální expanze

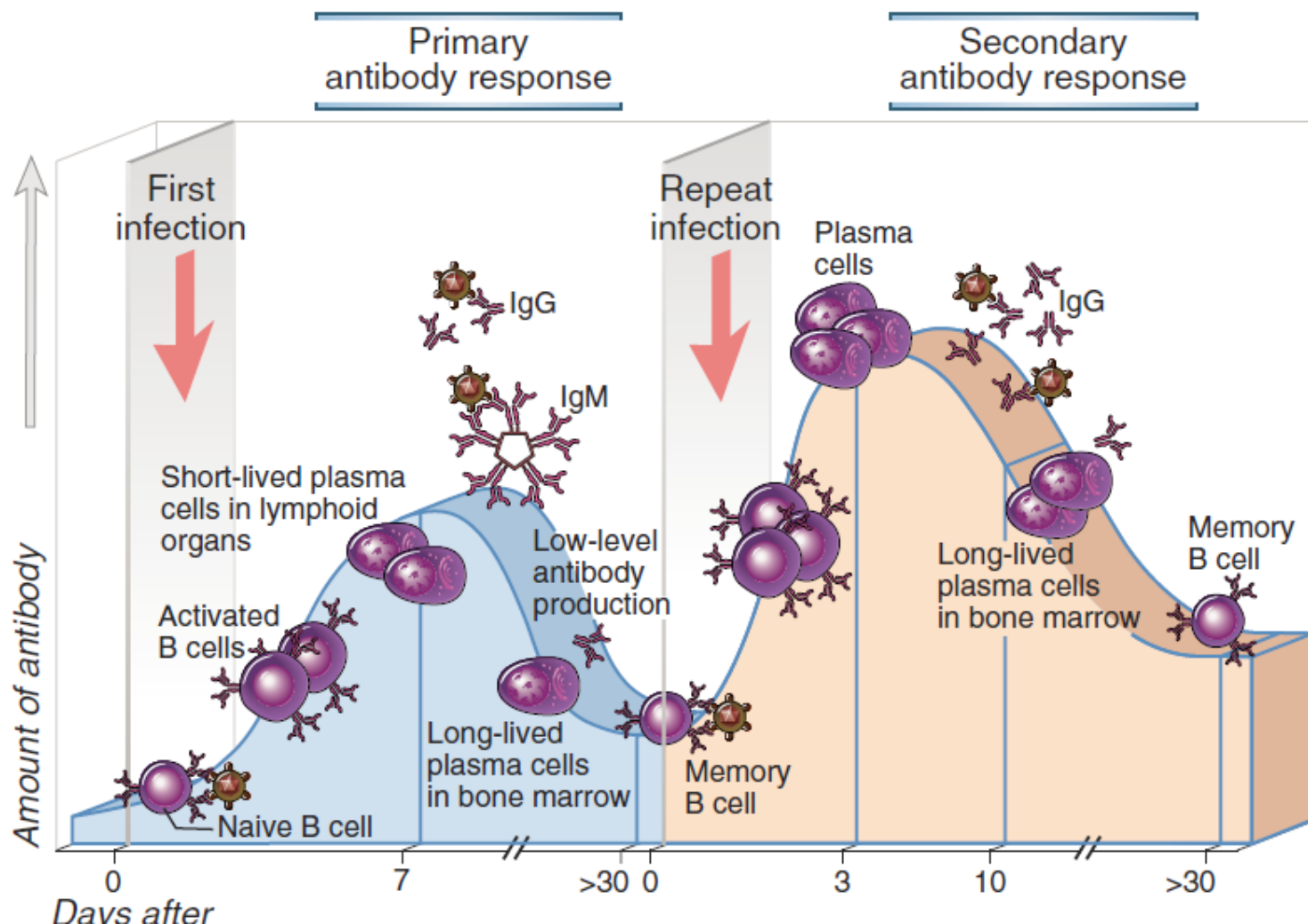
Diferenciace: terminální efektorové buňky
dlouze žijící paměťové buňky

Imunitní reakce:

primární

sekundární (anamnestická, “booster“)

Imunitní protilátková odpověď



Paměťové lymfocyty

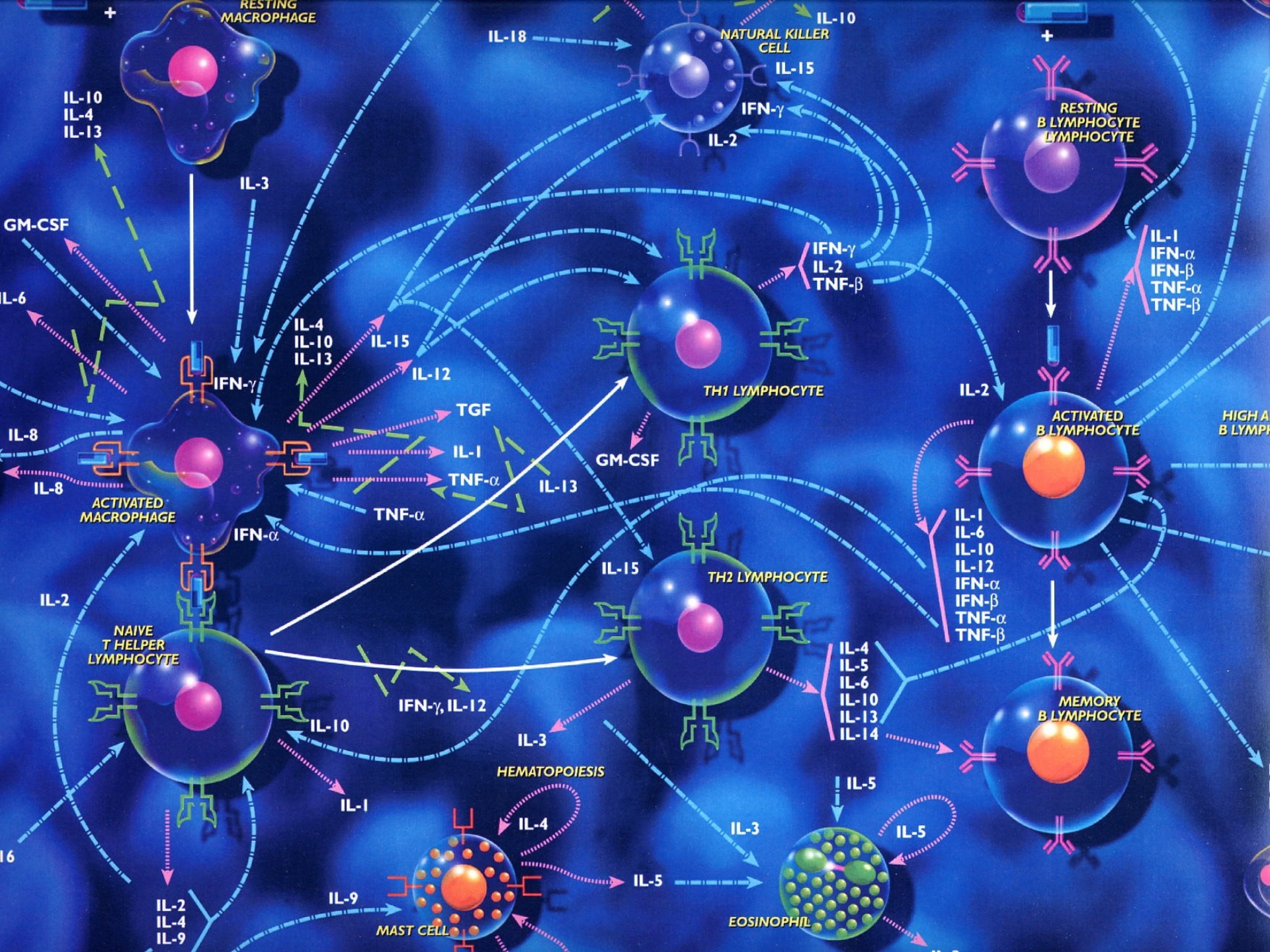
Centrální paměťové buňky (CCR7+, CD62L+)

jsou v sekundárních lymfatických orgánech, vykazují nízkou cytolytickou aktivitu a omezenou schopnost migrace; jsou neúčinnější při systémových infekcích

Periferní (efektorové) paměťové buňky (CCR7-, CD62-)

jsou v nelymfoidních tkáních (plíce, kůže, tuková tkáň), jsou cytolytické a mají výrazný cirkulační potenciál; jejich lokalizace umožňuje bezprostřední reakci na infekce v periferních tkáních

Regulace v imunitním systému



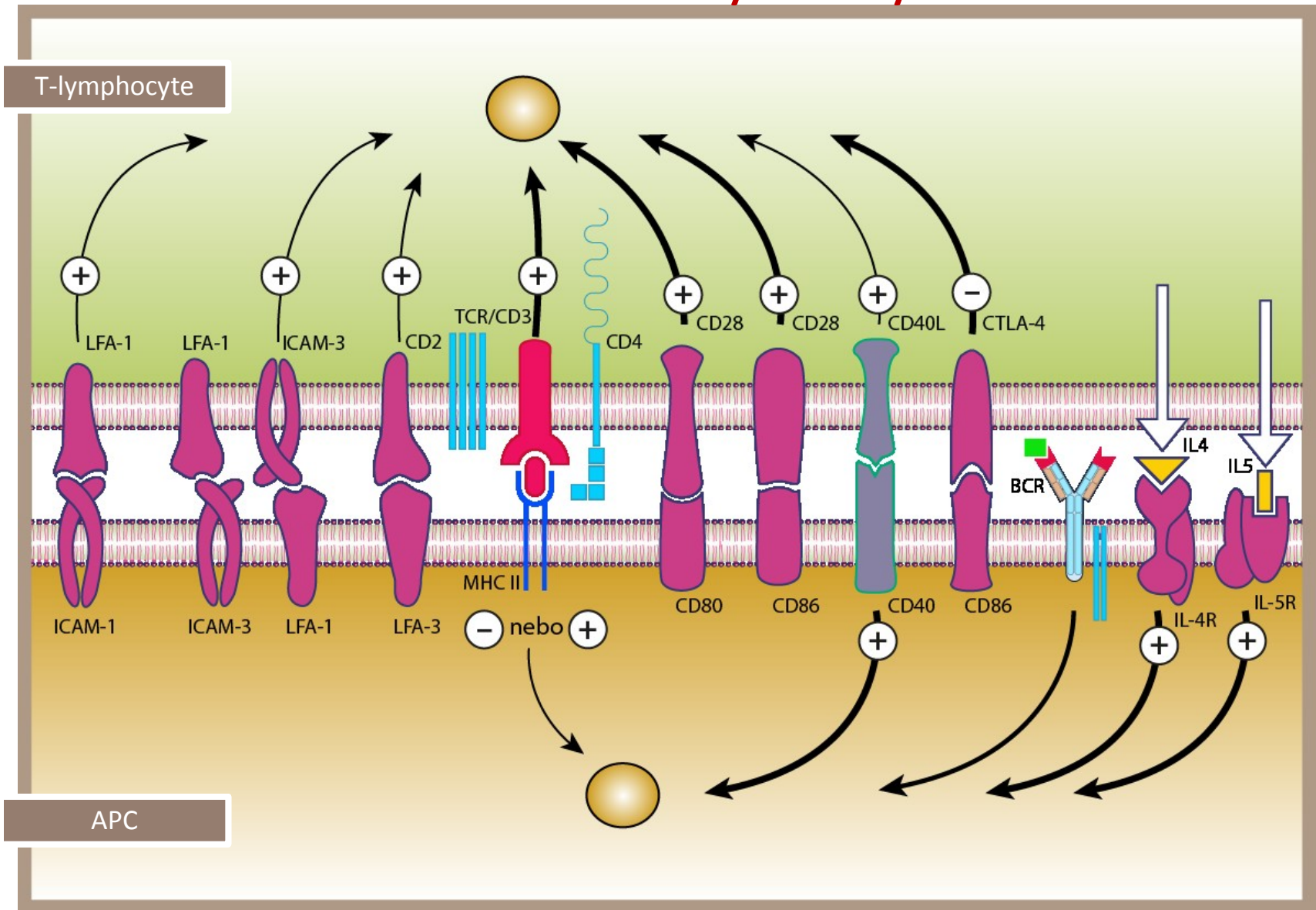
Regulace imunitní odpovědi

- Uskutečňuje se:
 - interakcí složek imunitního systému.
 - vlastnostmi a kvantitou antigenu a dalších vnějších aktivačních signálů (PAMP).
 - prostřednictvím neuroendokrinních vlivů: inervace orgánů imunitního systému, vlivem hormonů na funkci imunitního systému.

Regulace uvnitř imunitního systému

- Uskutečňuje se především:
 - fyzikálními mezibuněčnými interakcemi – účastní se řada aktivačních povrchových molekul přenášejících pozitivní nebo negativní signál.
 - prostřednictvím produkce řady cytokinů.

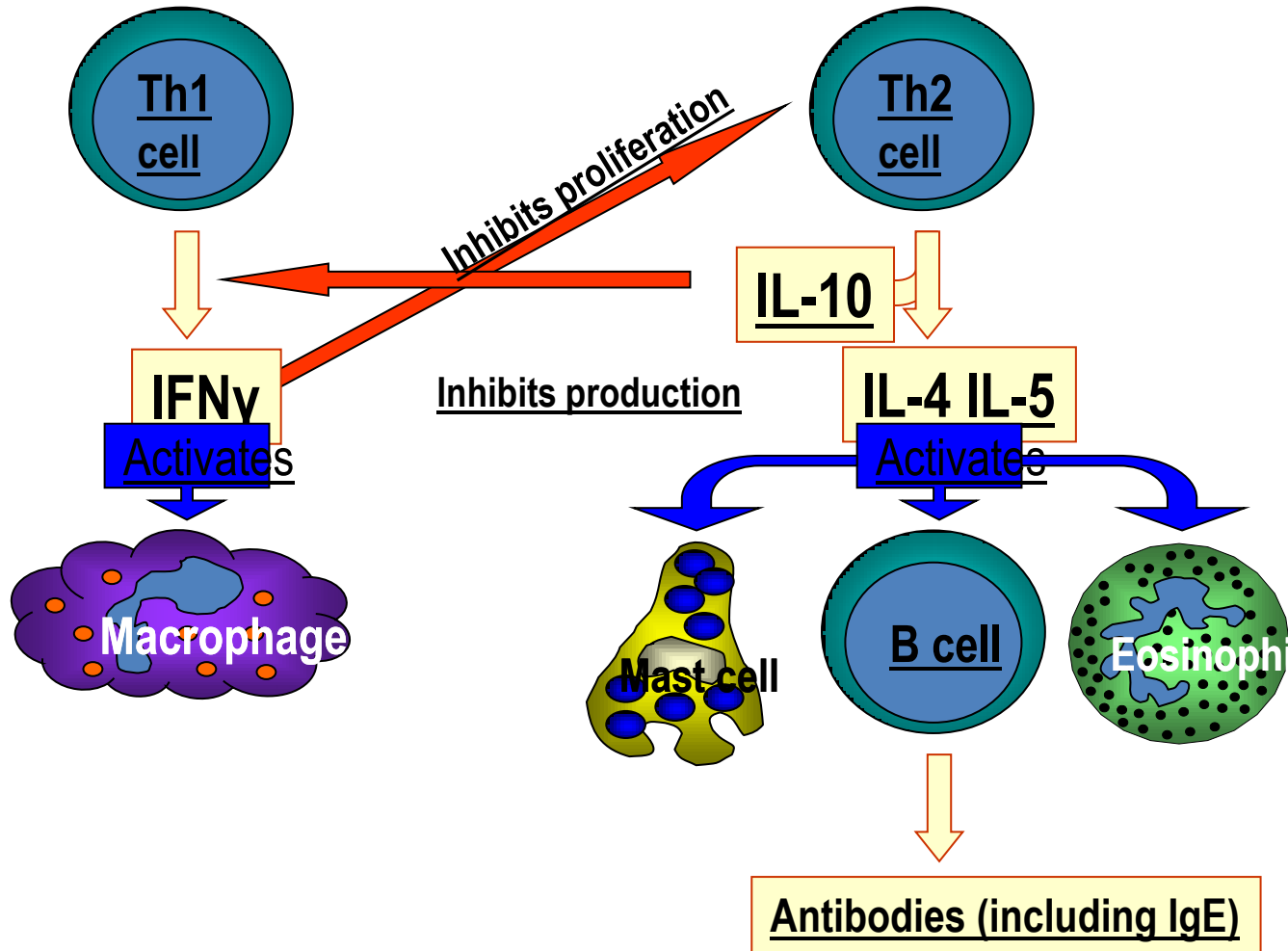
Kostimulační molekuly při aktivaci a inhibici T-lymfocytů



Regulace T-lymfocyty

- Antagonistický vztah Th1 a Th2 lymfocytů
- Různé typy regulačních T-lymfocytů inhibují imunitní reakci, jsou zodpovědné za vrozenou i získanou toleranci.

Funkce Th1 and Th2 lymfocytů



Regulační T-lymfocyty

Konstituční Treg (CD4+CD25+)

neproliferují při polyklonální stimulaci, tlumí reakce T-buněk přímým kontaktem

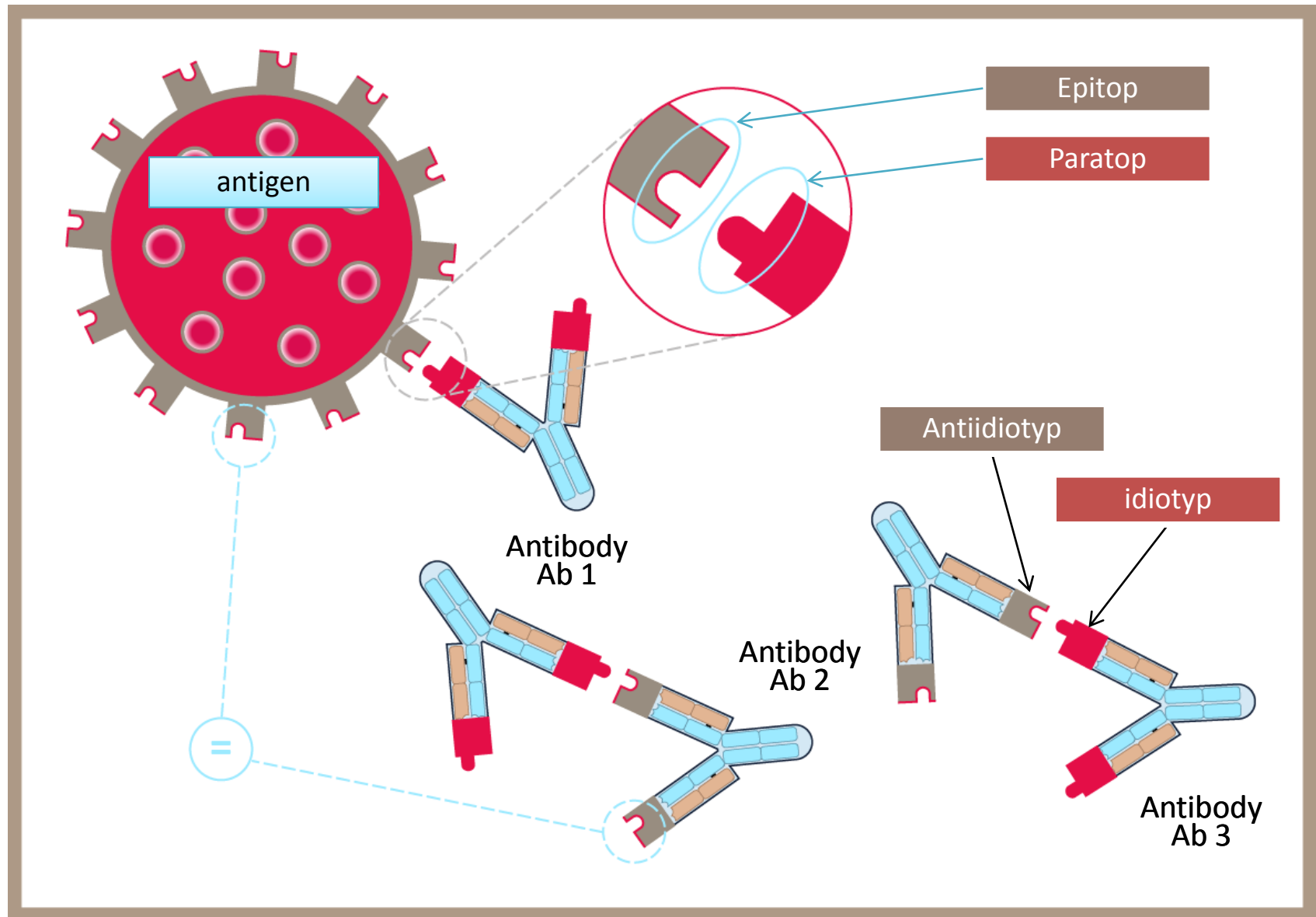
Indukované Tr1 a Th3 (CD4+, IL-10, TGF- β)

tlumí buňky Th1, Th2, ale i jiné buňky prostřednictvím cytokinů

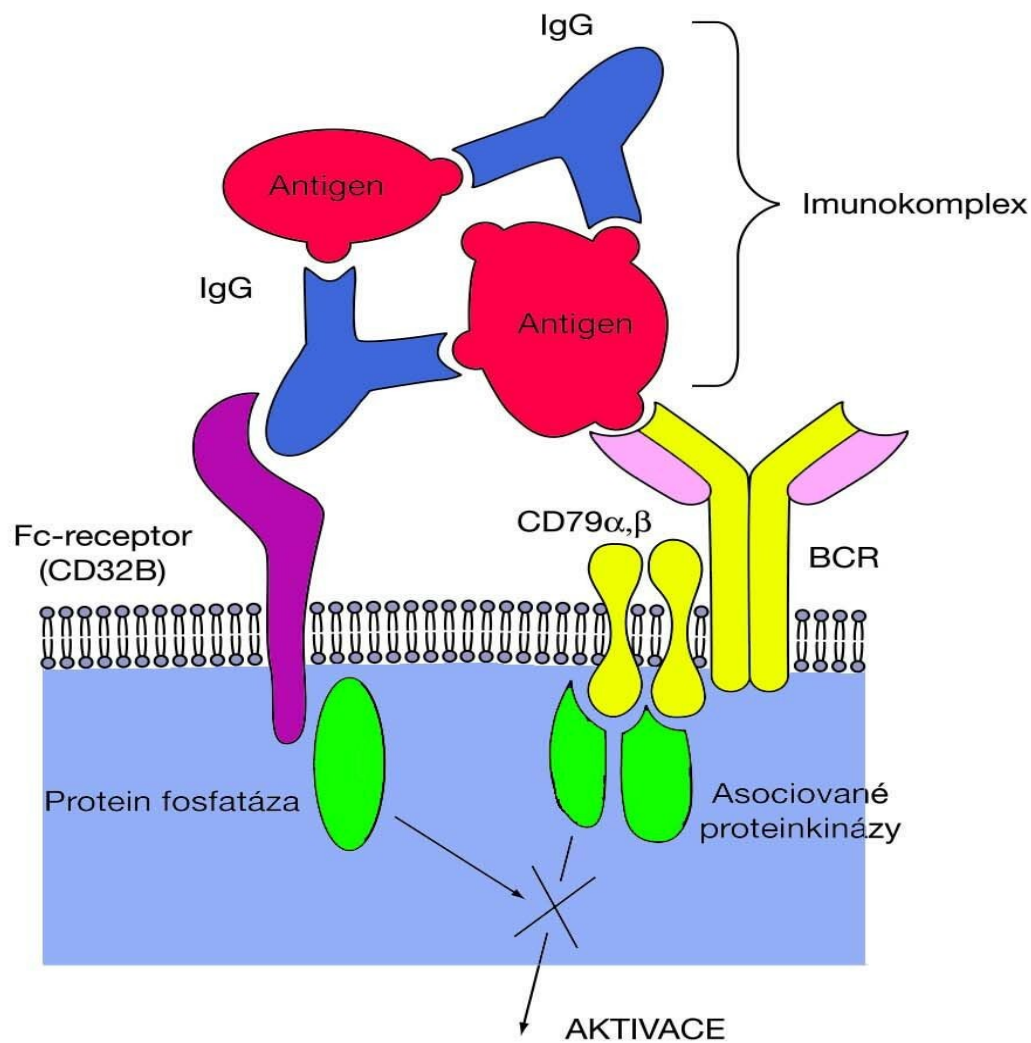
Regulace protilátkami

- Idiotyp-antiidiotypové interakce.
- Negativní regulace po vazbě protilátky na Fc γ RII.
- Vazba imunitního komplexu při prezentaci antigenů dendritickými folikulárními buňkami v zárodečných centrech výrazně zvyšuje imunogenicitu.
- C3dg (štěpný produkt C3) vázaný na antigen vazbou na receptor CD21 má pozitivní stimulační efekt na B-lymfocyty.

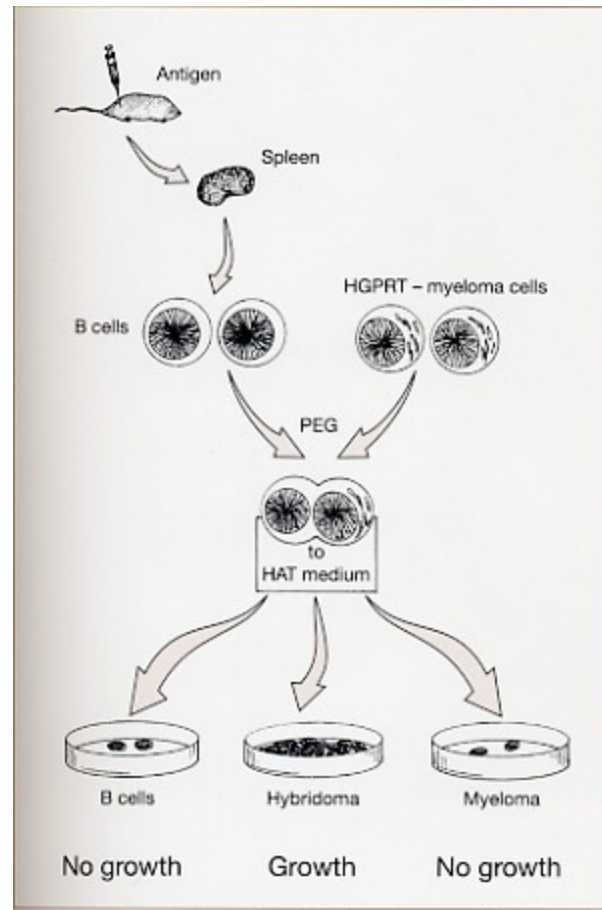
Interakce idiotyp-antiidiotyp



Inhibiční vliv IgG na aktivaci B-lymfocytů



Příprava monoklonálních protilátek



Hybridomy – monoklonální protilátky

- Linie myelomových buněk, které jsou metabolicky defektní (HGPRT-hypoxanthin-guanin phosphoribosyltransferase) – nerostou v mediu HAT (hypoxanthin, aminopterin, thymidin) a nesekretují imunoglobuliny. Jsou „nesmrtelné“.
- Normální buňky B (imunizovaných myší) přinášejí těmto myelomovým buňkám enzymy, které jsou nezbytné pro syntézu DNA a umožňují růst v mediu HAT – „hybridom“. Hybridomy produkují monoklonální protilátky.

Monoklonální protilátky

nemodifikované: (muronomab-CD3; Orthoclone, OKT3)

modifikované:

chimerické (V-domény myší)

humanizované (CDR oblasti myší)

lidské

radioimunokonjugáty, onkotoxiny

Nomenklatura monoklonálních protilátek

- **-mab** (přípona pro monoklonální protilátky nebo jejich fragmenty)
- **-umab** (lidské) **-omab** (myší)
- **-ximab** (chimerické) **-zumab** (humanizované)

(další složky názvu mají vyjadřovat „terče“ :

např. virové-**vir**, nádorové –**tum**, imunologické –**lim**,

kardiovaskulární – **cir**, neurologické –**ner** apod.)

CD klasifikační systém (Paříž 1982)

CD= cluster of differentiation (CD1 – CD339)

Molekuly buněčných membrán prokazované monoklonálními protilátkami (metodikou průtokové cytometrie), charakteristické pro linii, vývojové stadium, stupeň aktivace buněk.

Odběr nesrážlivé krve (EDTA)

Lymfocyty T: CD3+(58-85% ze všech lymfocytů)

Th: CD3+CD4+ (30-60% z CD3+)

Tc: CD3+CD8+ (15-35% z CD3+)

Lymfocyty B: CD19+ (7-23% ze všech lymfocytů)

Buňky NK: CD16+CD56+ (6-20% ze všech lymfocytů)

Monocyty: CD14+DR+ (99% všech monocytů)

Diferenciální krevní obraz

Odběr krve do EDTA (nesrážlivá krev)

Leukocyty

dospělí: $4,0 - 9,0 \times 10^9/L$

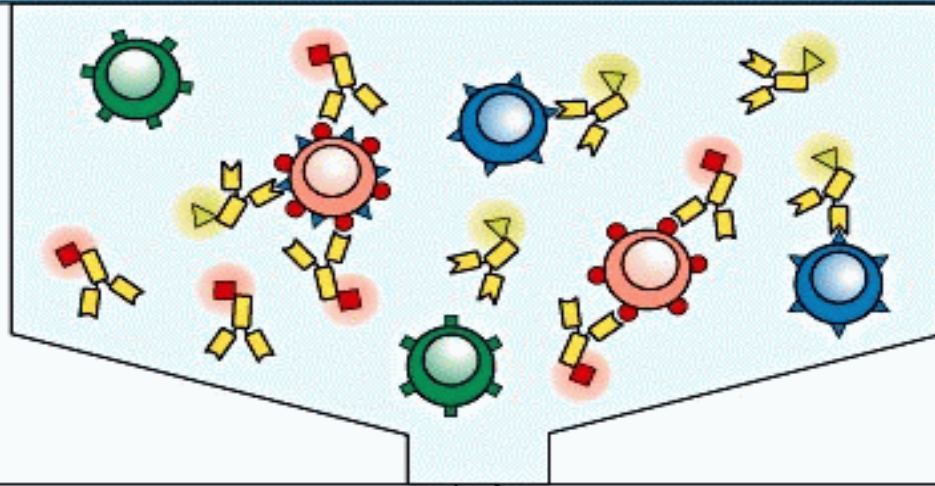
4-7 let: $5,5 - 15,5 \times 10^9/L$

novorozenci: $9,0 - 30,0 \times 10^9/L$

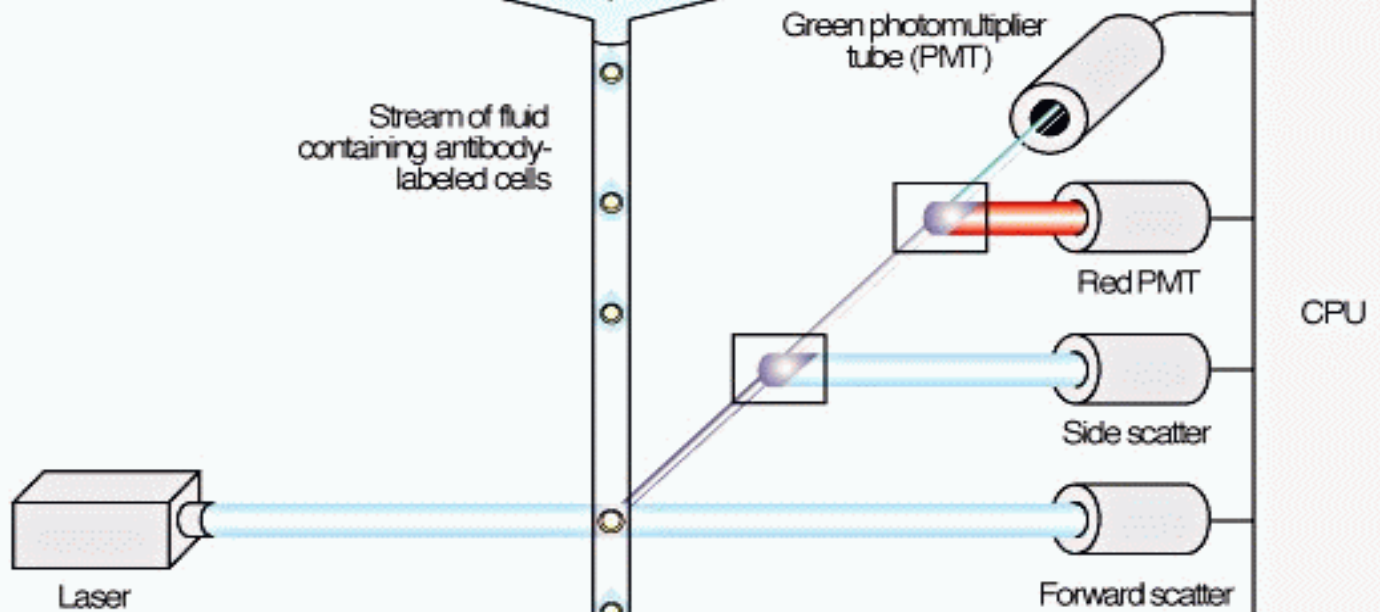
Průtokový cytometr („flow-cytometry“)



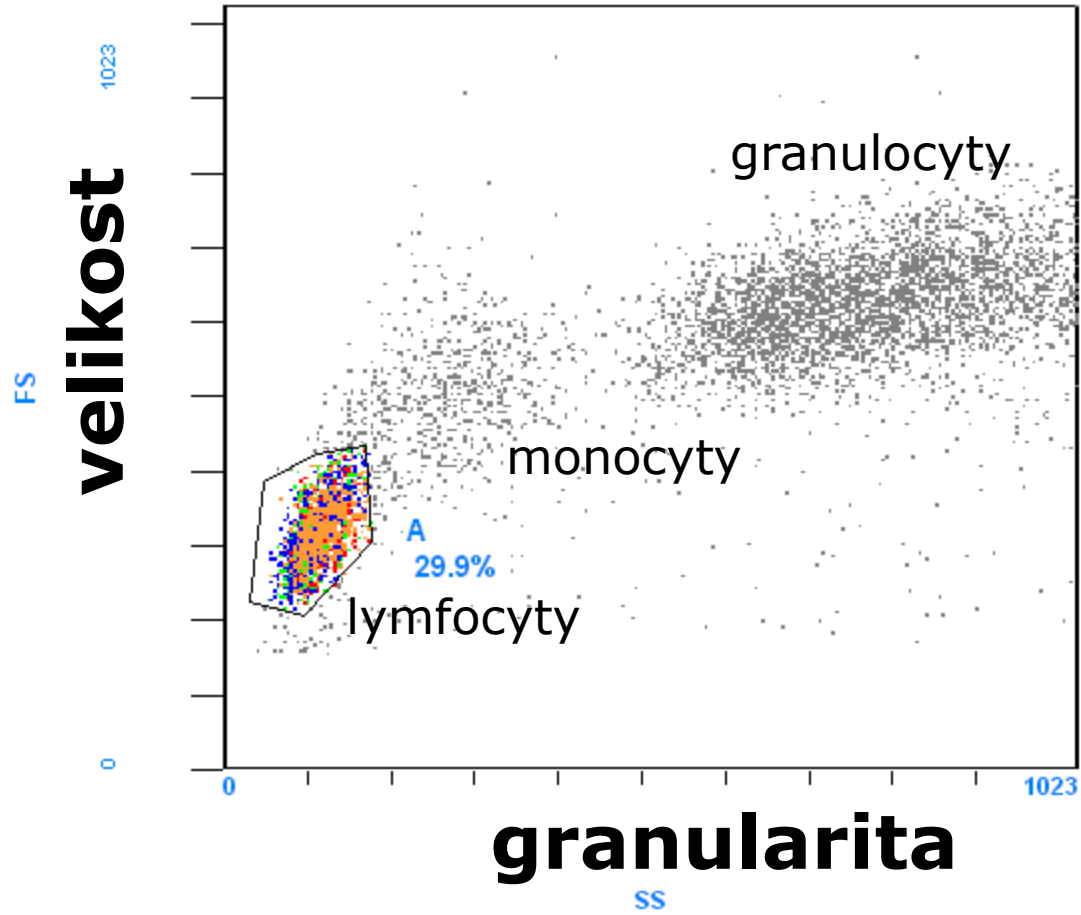
Mixture of cells is labeled with fluorescent antibody



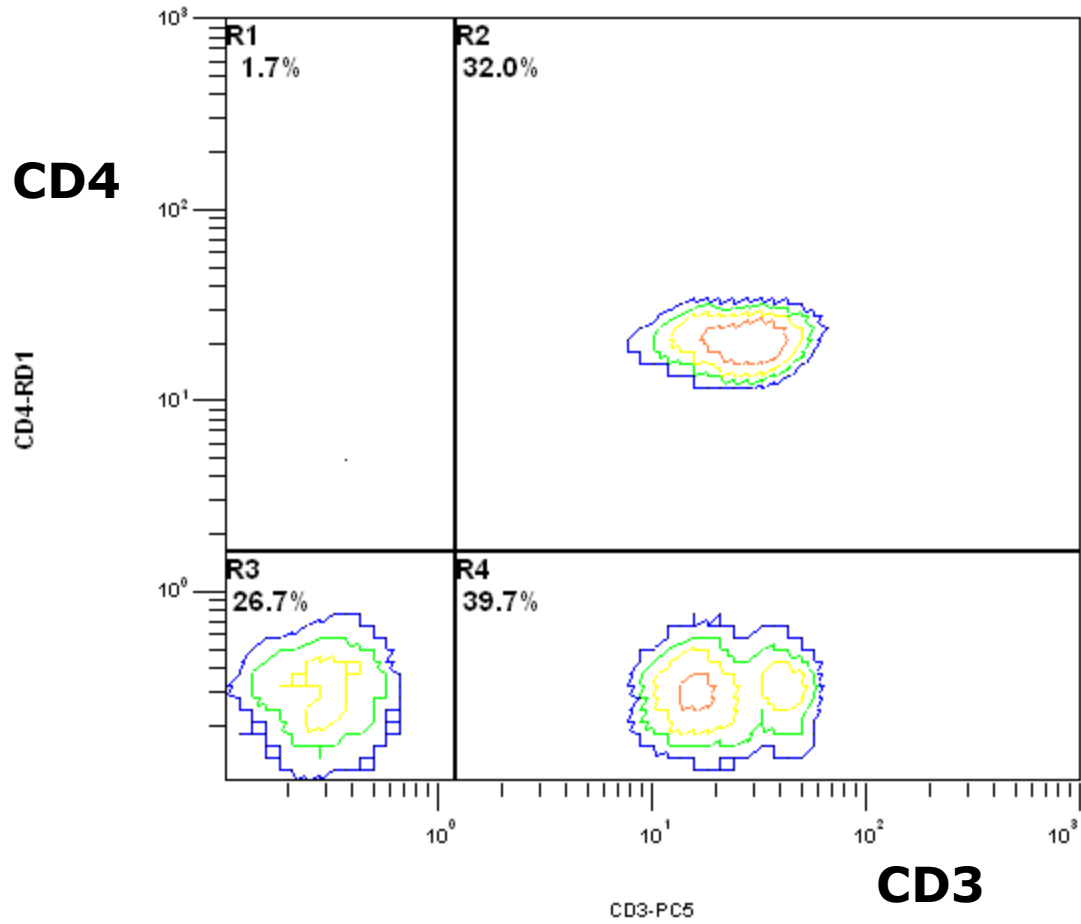
Stream of fluid containing antibody-labeled cells



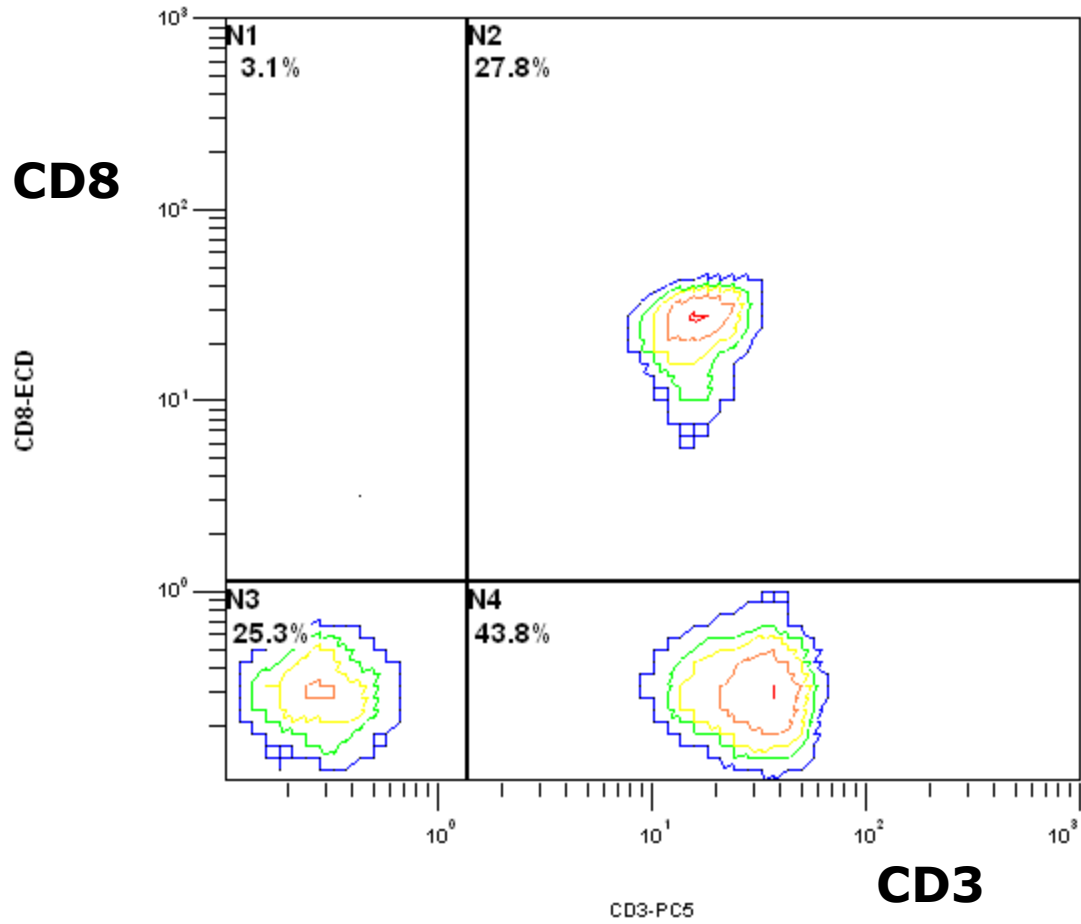
(F1)[Ungated] Z0051674.LMD : SS/FS

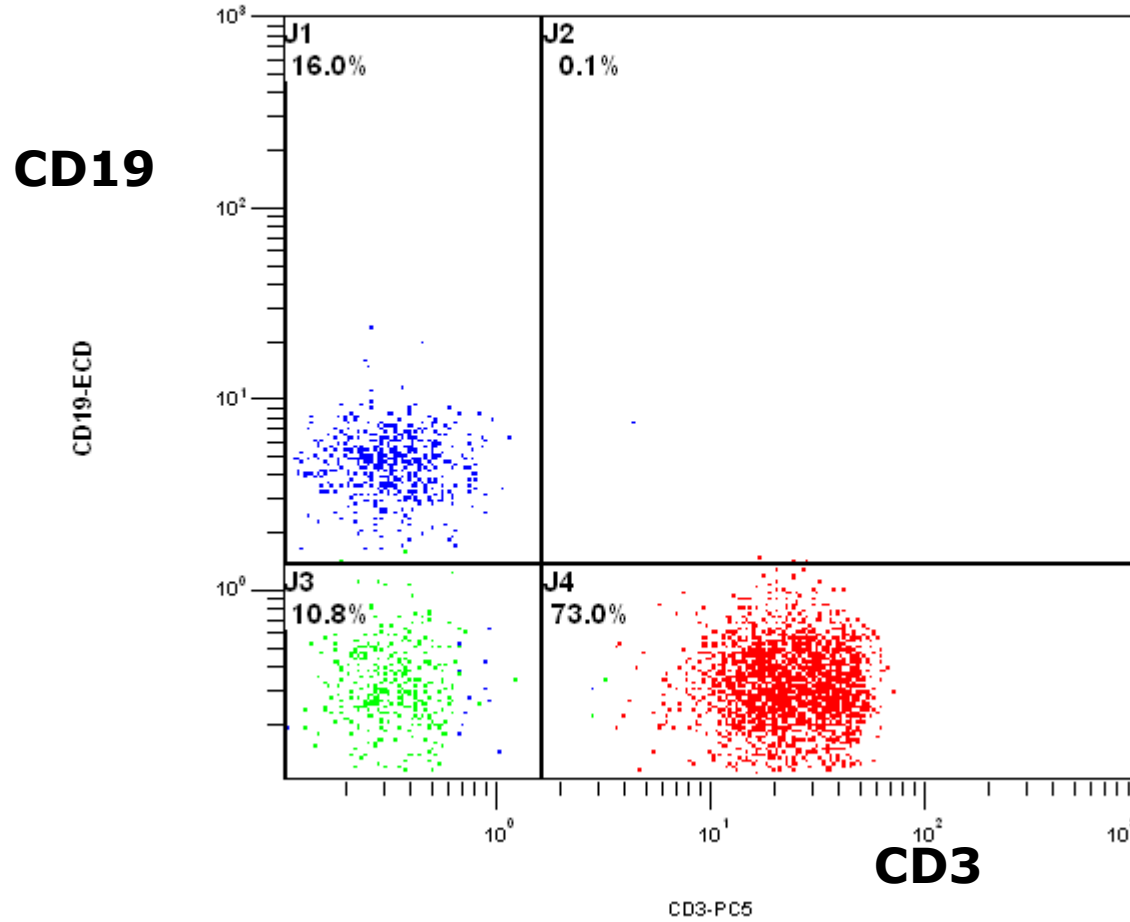


(F1)[A] 20051674.LMD : FL4 LOG/FL2 LOG

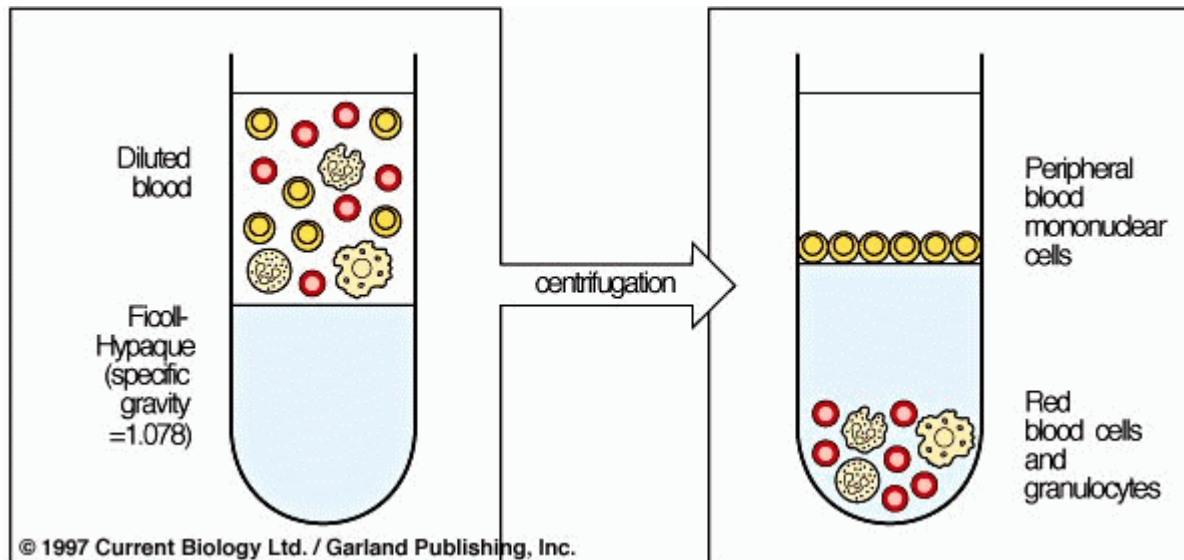


(F1)[A] 20051674.LMD : FL4 LOG/FL3 LOG





Isolace mononukleárních buněk z krve



Proliferace lymfocytů in vitro (polyklonální mitogeny, specifické antigeny)

Mitogen	Abbreviation	Source	Responding cells
Phytohemagglutinin	PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i> (red kidney beans)	T cells
Concanavalin A	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i> (Jack bean)	T cells
Pokeweed mitogen	PWM	<i>Phytolacca americana</i> (pokeweed)	T and B cells
Lipopolysaccharide	LPS	<i>Escherichia coli</i>	B cells (mouse)

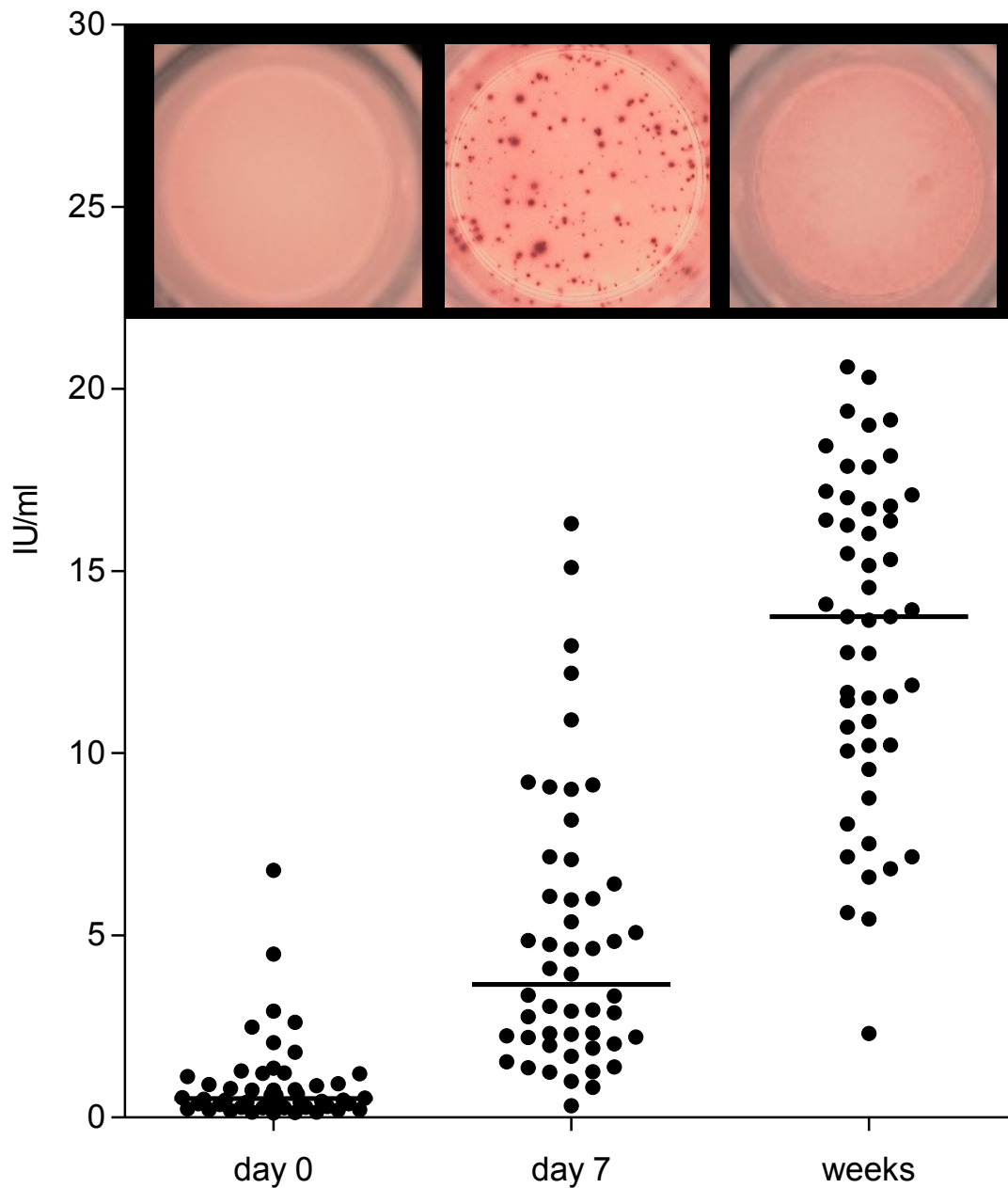
© 1997 Current Biology Ltd. / Garland Publishing, Inc.

Inkorporace ^3H thymidinu do DNA (beta-counter)

Tvorba imunoglobulinů in vitro

Stimulace: polyklonálními mitogeny
antigeny

Detekce: průkaz Ig v kultivační tekutině
průkaz Ig na buněčné úrovni
(ELISPOT)



ELISPOT

IgG anti-TET antibodies
in 1 healthy donor

ELISA

versus

ELISPOT

as regard a peripheral
blood

ELISA

IgG anti-TET antibodies
in 50 healthy donors

Adaptivní imunita: autotolerance

Lymfocyty, které by poznávaly „vlastní“ antigeny jsou buď odstraněny nebo inaktivovány.

Imunologická tolerance centrální.

Imunologická tolerance periferní.

Prolomení tolerance – autoimunizace.

Imunologická tolerance

Destrukce nebo inaktivace lymfocytů s BCR nebo TCR, které poznávají a váží epitopy vlastních antigenů

Centrální

T lymfocyty

- thymus
 - negativní selekce

B lymfocyty

- kostní dřeň
 - negativní selekce

Periferní (T- i B-)

Anergie

k úplné aktivaci lymfocytů chybí druhé, kostimulační signály

Suprese

reaktivita lymfocytů je tlumena tzv. Treg

Lymfocyty T i B primárně neodlišují vlastní a cizí



thymus



kostní dřeň

lymfocyty namířené proti vlastním antigenům jsou odstraněny při „negativní selekci“ apoptózou



centrální tolerance

lymfocyty namířené proti vlastním antigenům proniknuvší do periferie jsou utlumeny (anergie, suprese)



periferní tolerance



prolomení tolerance



nevhodné geny

determinující specifickou
reaktivitu na autoantigeny
i obecnou vnímavost
k autoimunitním reakcím



nevhodné prostředí

zevní i vnitřní



AUTOIMUNITNÍ CHOROBA