

# Adaptivní (získaná) imunitní reakce závislé na protilátkách

Jiří Litzman

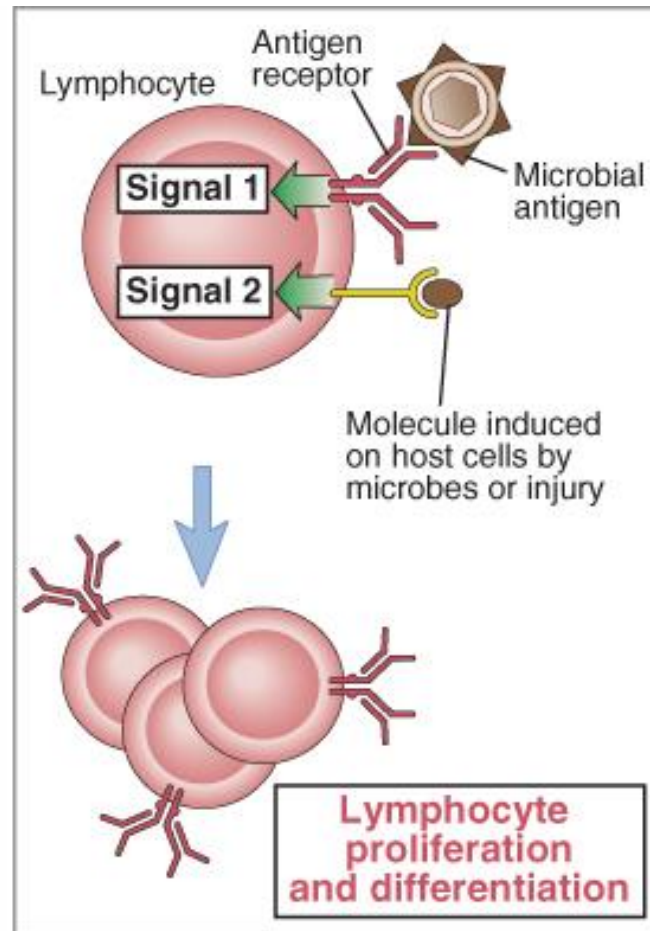
# ADAPTIVNÍ SYSTÉM:

- Je založen na obrovském repertoáru klonů B- and T-lymfocytů, z nichž každý nese poněkud odlišné receptory (BCR resp. TCR)
- “Rozpustné receptory” adaptivního systému jsou protilátky (= rozpustné BCR)
- Systém je “anticipační”, klonální, “marnotratný”
- Klonální receptory vznikají hlavně přeskupováním genových fragmentů a somatickými mutacemi.

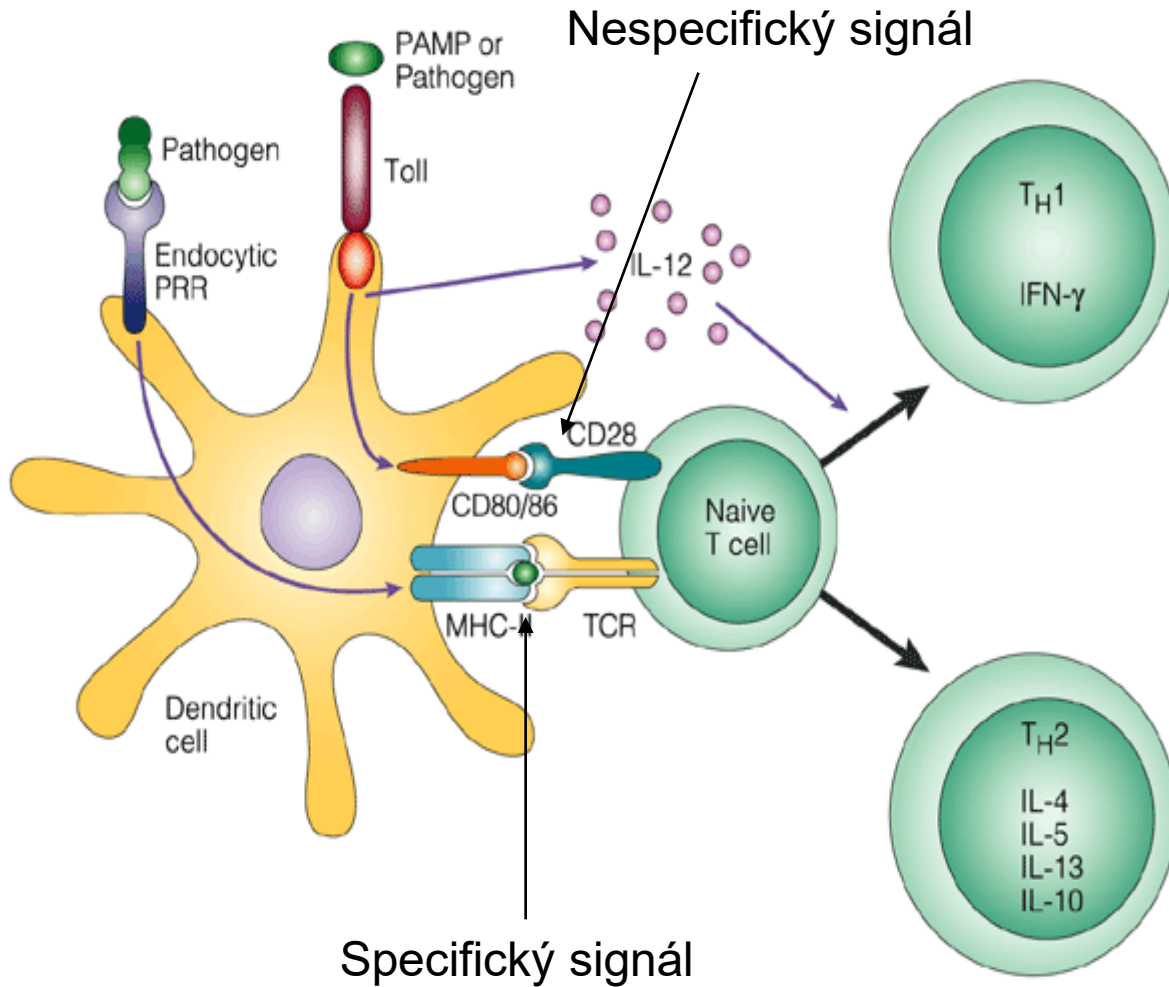
## IMUNITA VROZENÁ A ZÍSKANÁ

<b>Vlastnost</b>	<b>Imunita vrozená</b>	<b>Imunita získaná</b>
Specifičnost	struktury společné pro různá agens (molekulární znaky patogenů – „PAMP“ – dsRNA, CpG, LPS, manany, glykany, fosforylcholin...)	strukturální detaily antigenů (antigenní determinanty, epitopy)
Receptory	zakódované v genomu buněk zárodečné linie, není nutné přeskupování genů	vytvářejí se během vývoje somatickými rekombinacemi, přeskupování genů nutné
Distribuce receptorů	neklonální: všechny buňky dané skupiny jsou identické	klonální: klony buněk odlišné specifičnosti mají odlišné receptory
Odlišení vlastního od cizorodého	perfektní vyselektováno v evoluci	ano, ale není perfektní (autoimunizace)
Nástup reakce	bezprostřední (0-4-96 hod)	s latencí (> 96 hod)
Paměť	nevzniká	vzniká

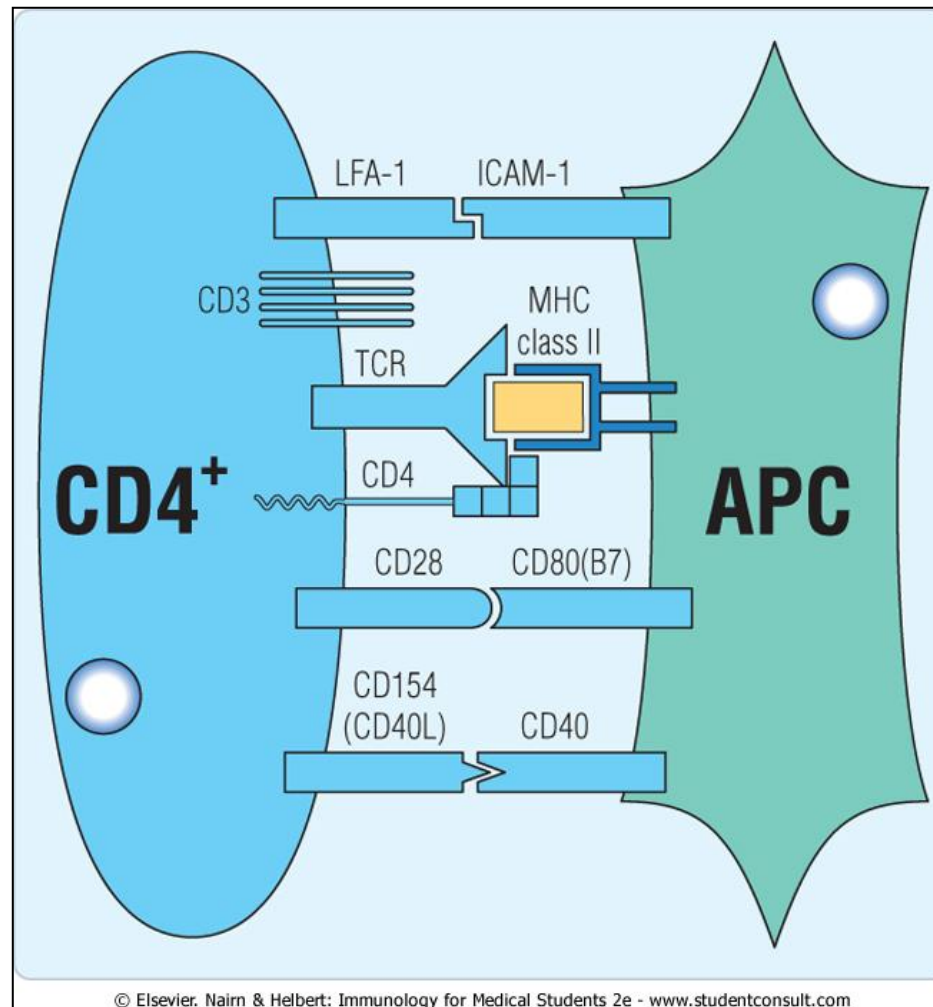
# Pro stimulaci lymfocytů jsou vždy nutné nejméně 2 signály



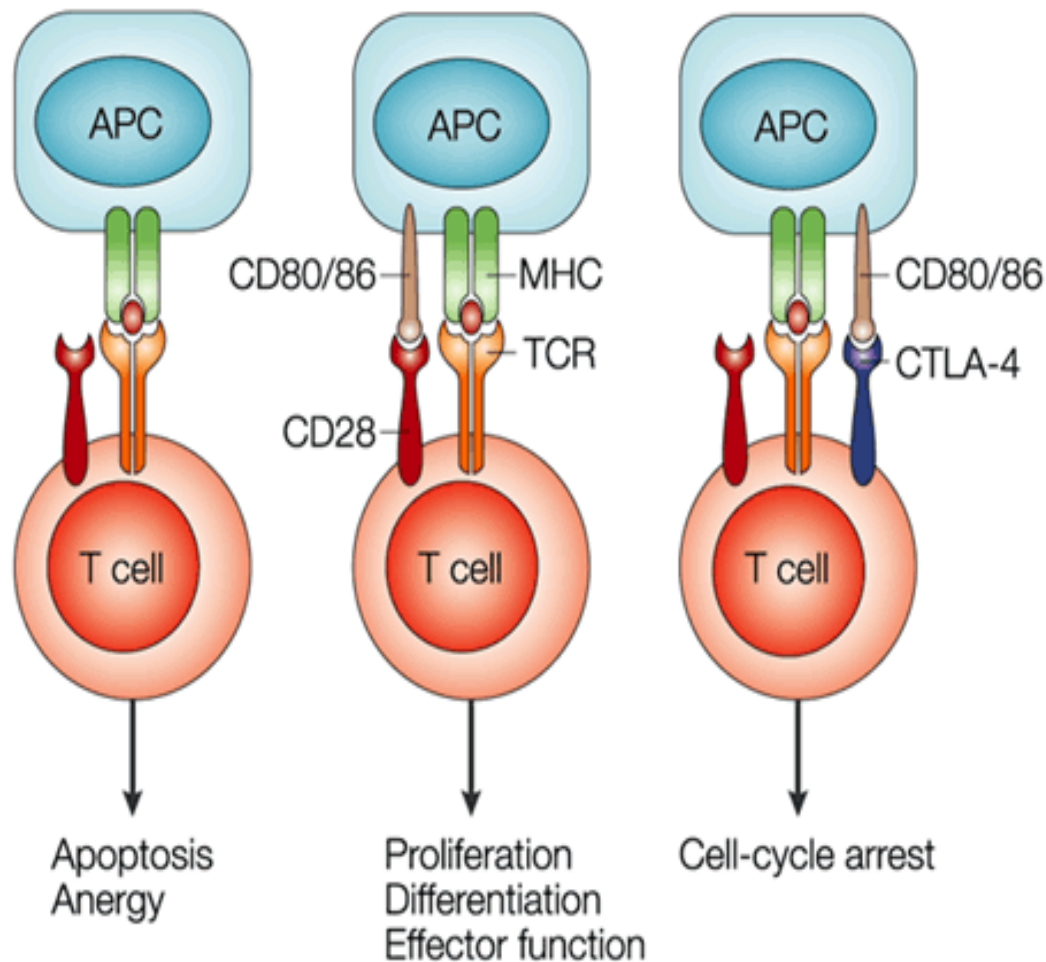
# PAMP jsou důležité v aktivaci dendritických buněk



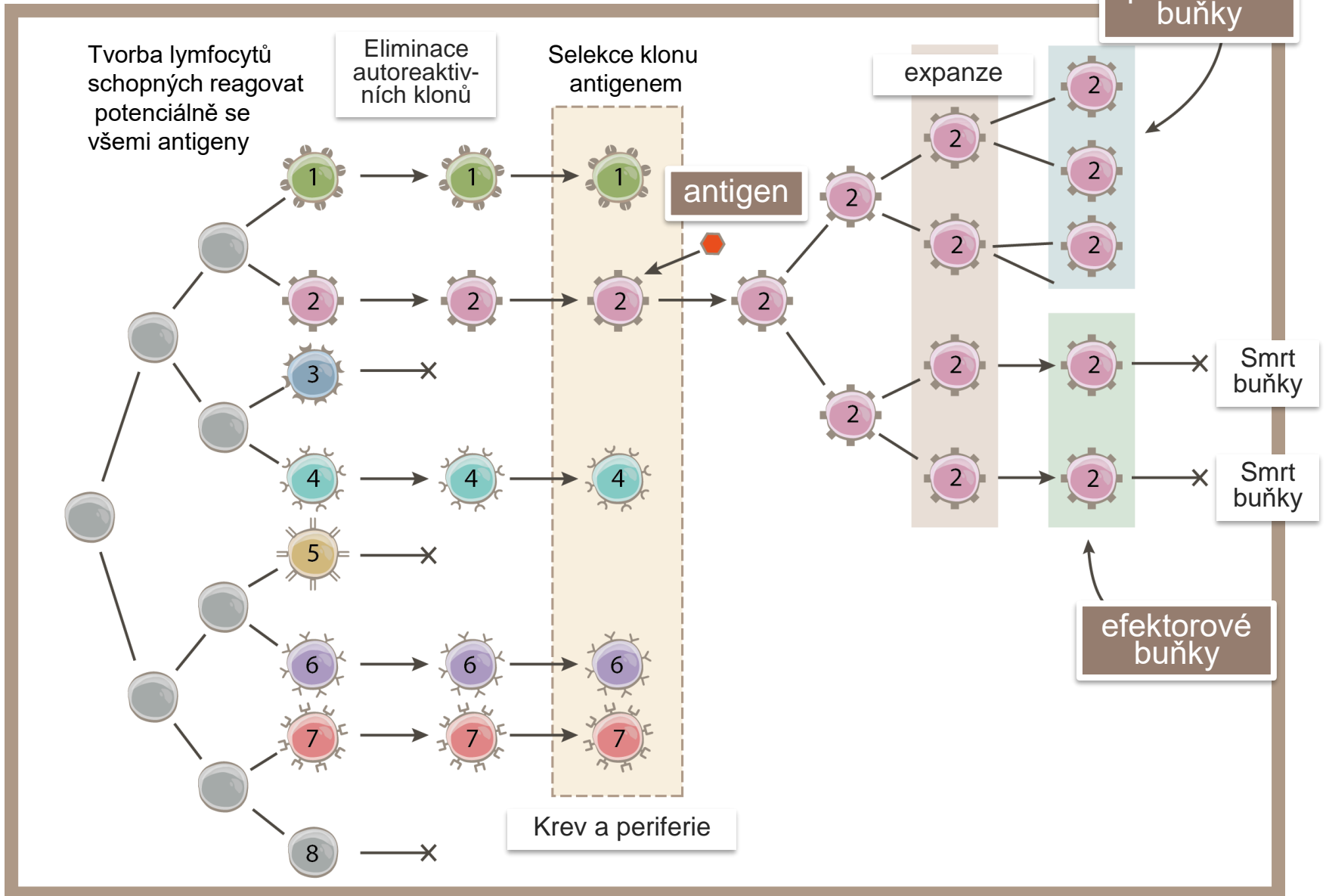
## Kostimulační molekuly při aktivaci T-lymfocyту antigen prezentující buňkou



Pouze některé signály vedou k stimulaci T-lymfocytů a následné aktivaci a proliferaci



# Klonálně selekční teorie



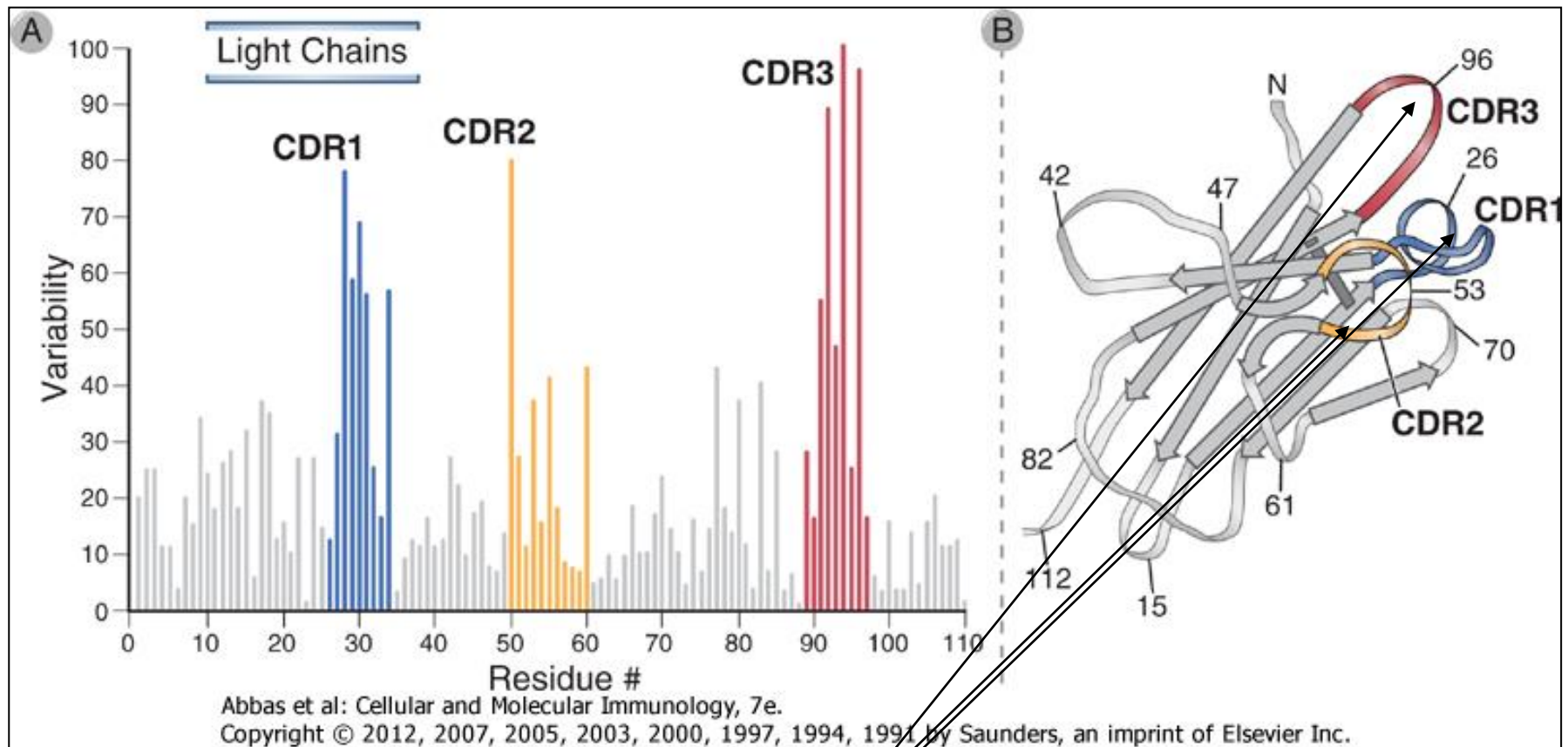


# Klonálně selekční teorie

F.M. Burnet, 1957

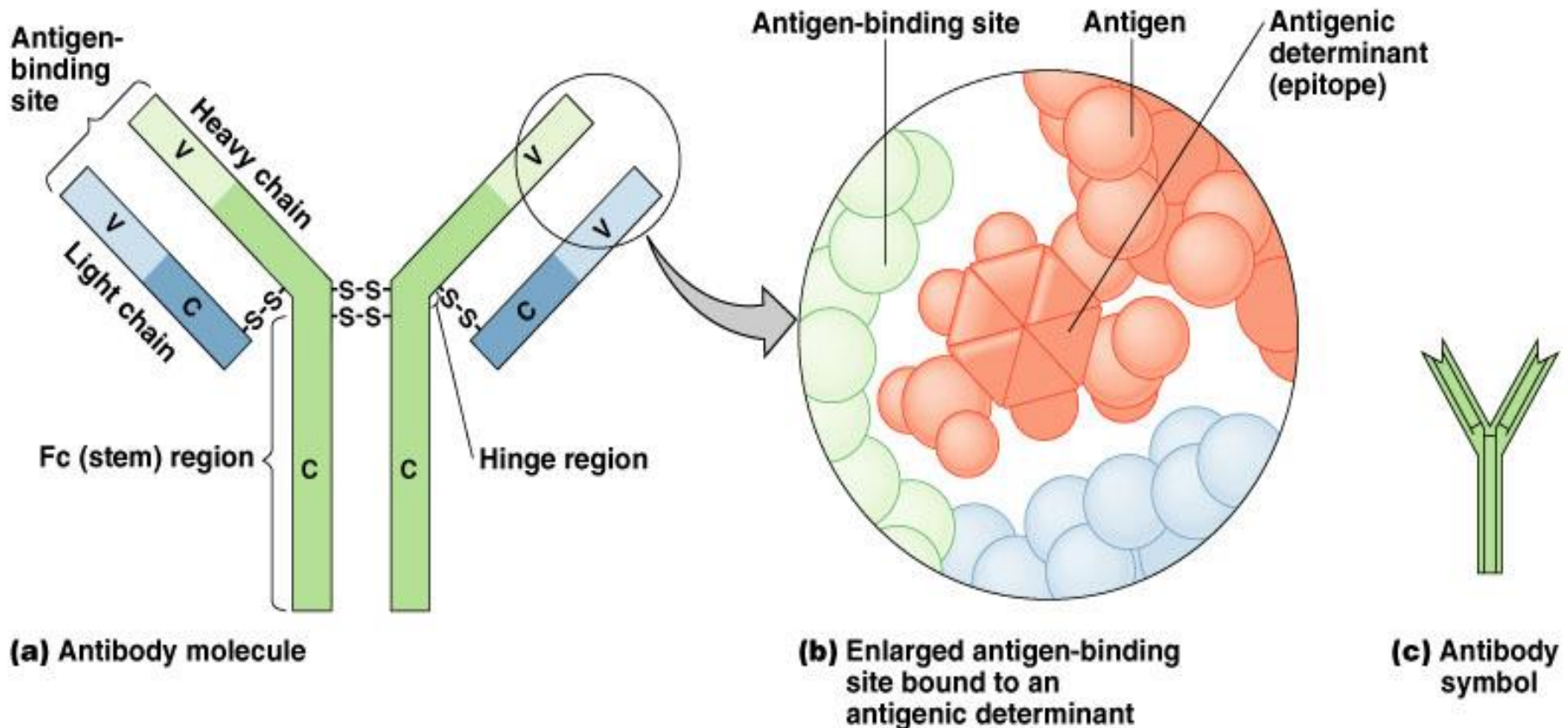
- V průběhu vývoje každého jedince dochází k vývoji buněk se specifickými vazebnými místy pro různé epitopy, přičemž každá buňka reaguje pouze s jedním epitopem.
- Během vývoje (zejména intrauterinního) dochází k eliminaci autoreaktivních lymfocytů (zakázané klony, „forbidden clones“), čímž vzniká pool buněk schopných reagovat na cizorodé antigeny.
- Dojde-li k reakci epitopu s příslušným receptorem, dochází k proliferaci daného buněčného klonu. (tj k **selekcí klonu**)
- Po opakovaném dělení dosáhnou buňky stadia terminálně diferencovaných buněk (např. plazmatická buňka), ty se již dále nedělí.
- U části stimulovaných a proliferujících buněk k terminální diferenciaci nedojde, přetrvávají v těle jako buňky paměťové.

# Variabilní oblast imunoglobulinové molekuly

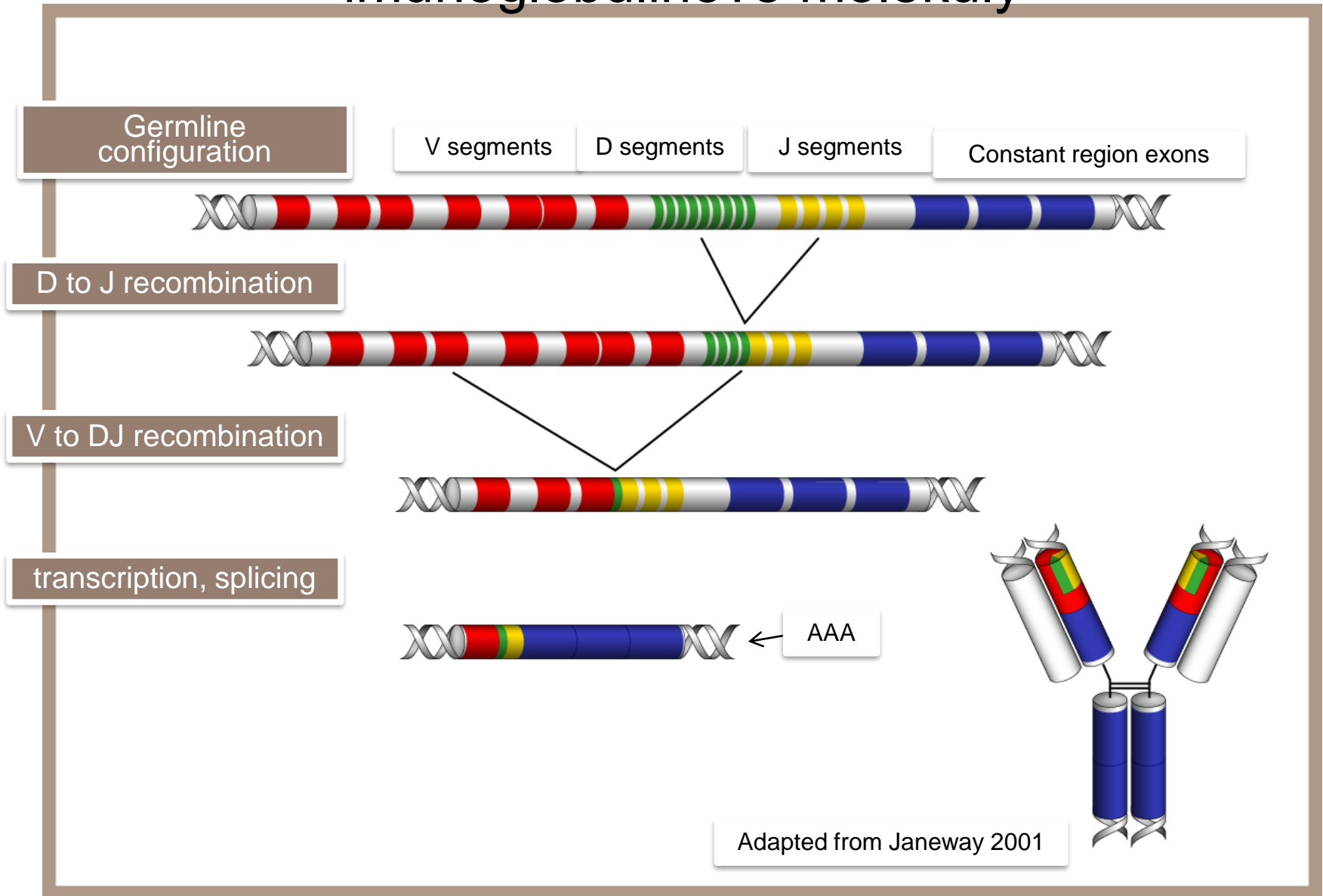


Hypervariabilní oblasti imunoglobulinové molekuly  
– přímo na sebe váží epitop

# Variabilní oblast Ig molekuly váže antigenní epitop



# VDJ rekombinace při vzniku variabilního místa imunoglobulinové molekuly



# Variabilní část imunoglobulinové molekuly

## teoretický počet variant

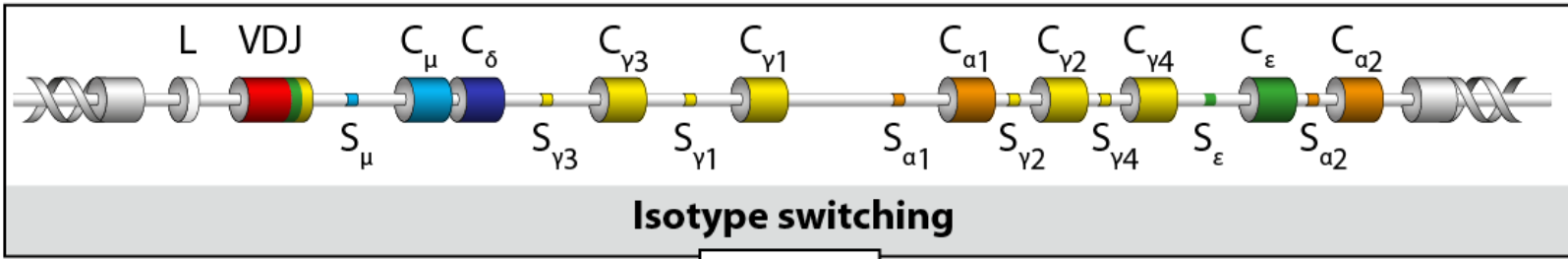
Segment (počet genů)	IgH	IgK	Igλ
V	~ 100	~ 70	~ 30
D	~ 50	—	—
J	9	5	9

Variabilita pro těžký řetězec:  $100 \times 50 \times 9 = 45\,000$  variant,

Lehký řetězec (IgK a Igλ):  $70 \times 5 + 30 \times 9 = 620$  variant;

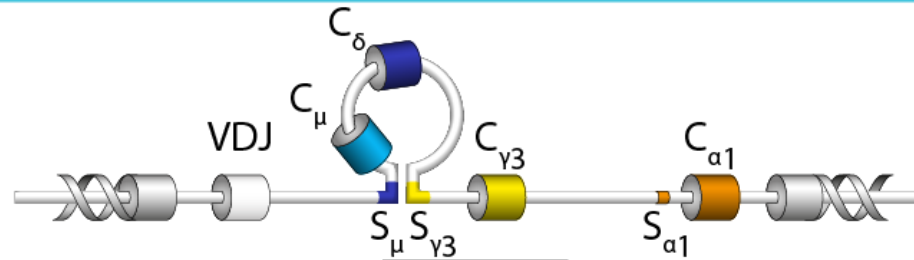
Protože tyto lze mezi sebou libovolně kombinovat, výsledný teoretický možných kvartérních struktur variabilní části molekuly imunoglobulinu je  $45\,000 \times 620 = 27\,900\,000$ .

# Izotypový přesmyk

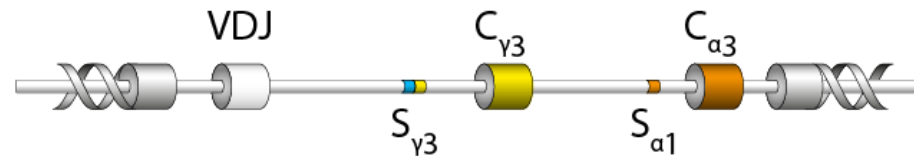


**Isotype switching**

**Looping out**

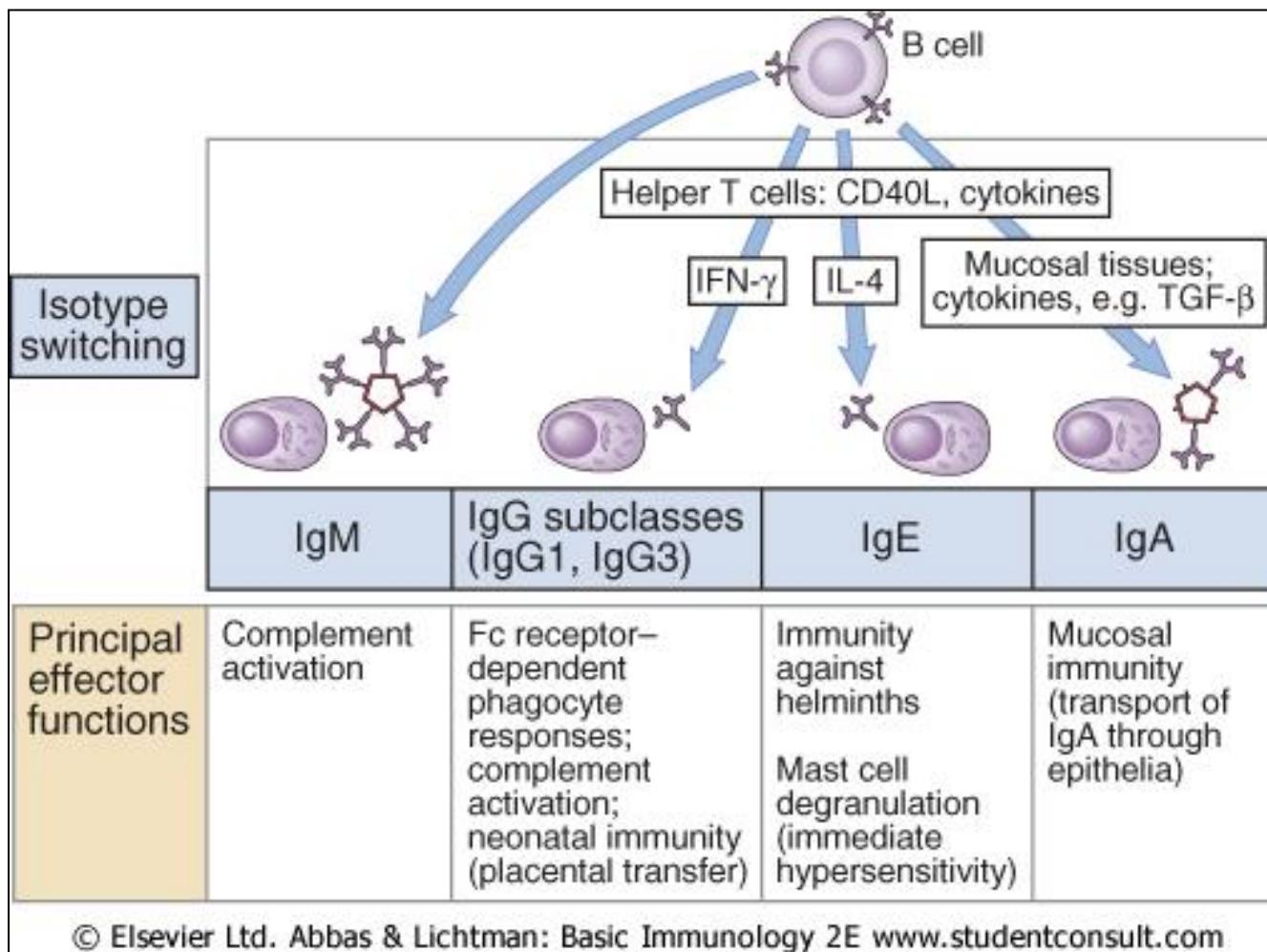


**Switch region recombination**



IgG3 produced

# Izotypový přesmyk závisí na cytokinovém prostředí a stimulaci Th lymfocyty



# IMUNOGLOBULIN = PROTI LÁT KA

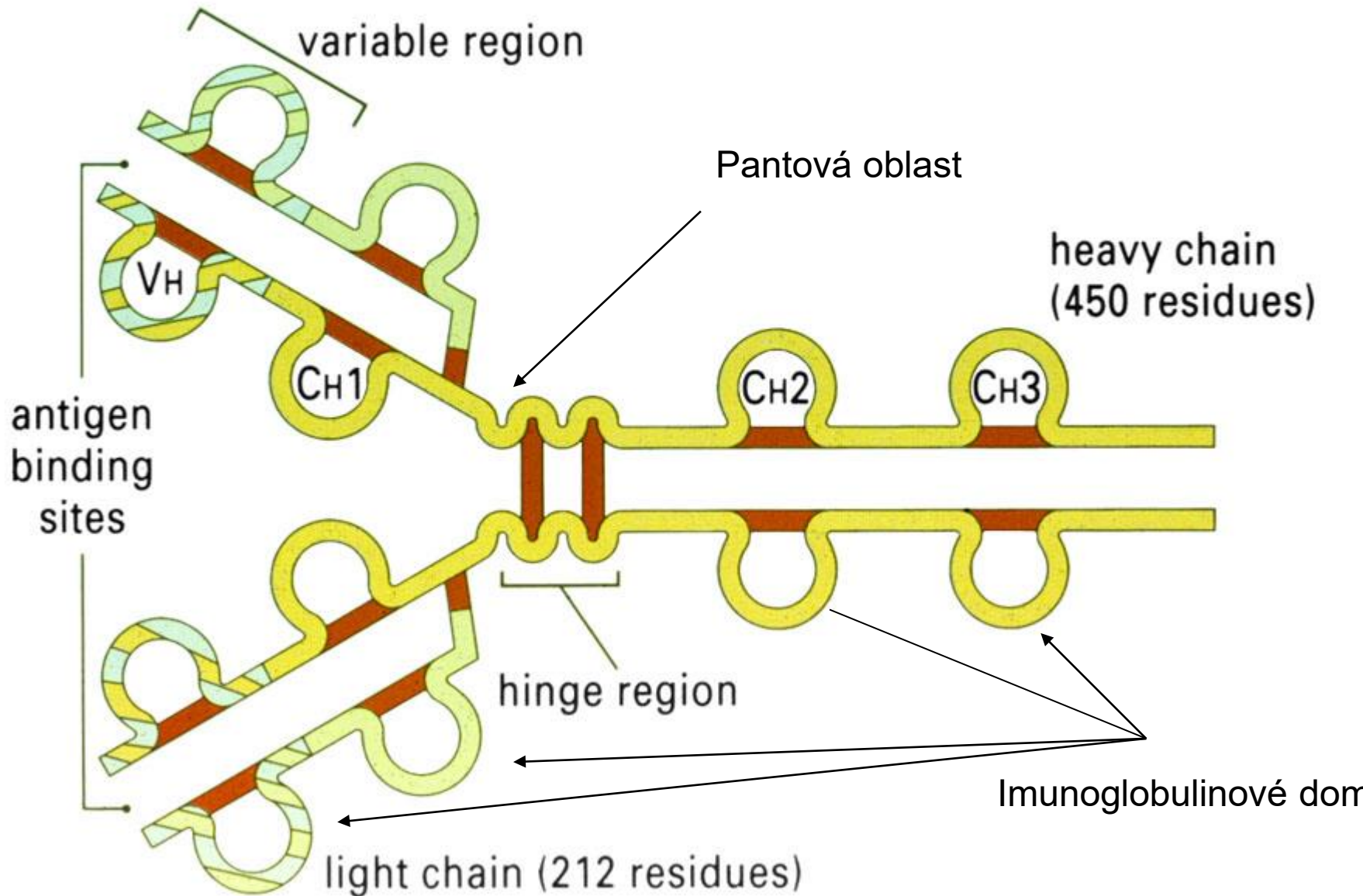
- strukturálně příbuzné glykoproteiny produkované B lymfocyty
- vázané na membránu B lymfocytu – receptory zprostředkující aktivaci B lymfocytu
- sekretované (rozpustné) – mediátory specifické humorální imunity



# Struktura molekuly protilátky

- 2 identické těžké řetězce (H) a 2 identické lehké řetězce (L) spojené disulfidickými můstky
- strukturně podobné domény (110-120 AK): 2 u lehkých řetězců, 4-5 domén u těžkých řetězců
- lehký i těžký řetězec
  - **variabilní oblast** (VH a VL); N-konec
    - každá oblast obsahuje 3 hypervariabilní úseky (6-10 AK)
    - **vazba antigenu**
  - **konstantní oblast** (CL, CH1-CH3/CH4); C-konec
    - CL - izotyp kappa, lambda
    - CH - izotyp (třída) protilátky (IgG, M, A, E, D), podtřídy
      - membránově vázaná nebo sekretovaná forma
      - **biologické (efektorové) funkce** protilátky
- flexibilita vazebné části – pantová oblast mezi CH1 a CH2

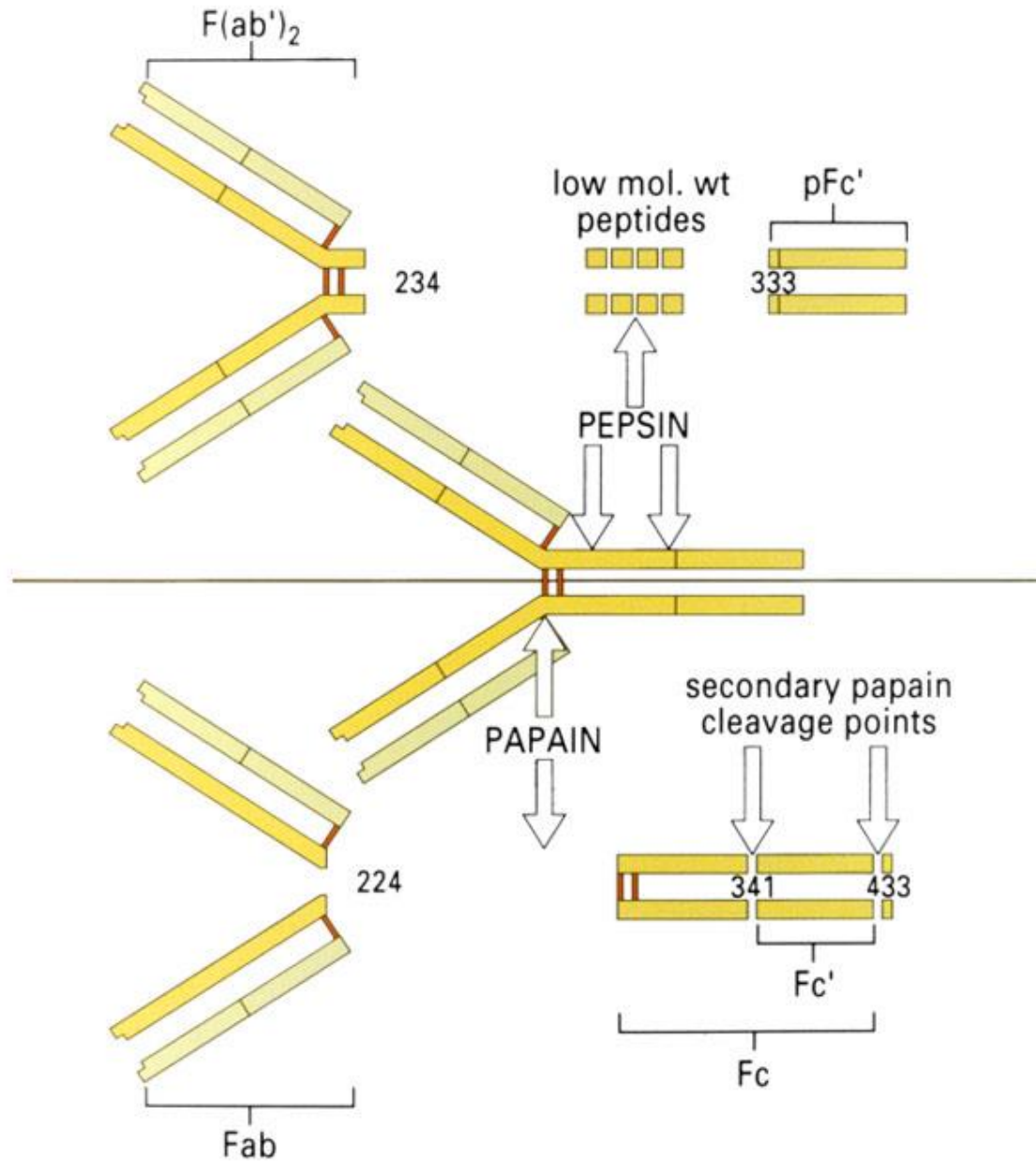
# The basic structure of IgG1



# Proteinová doména

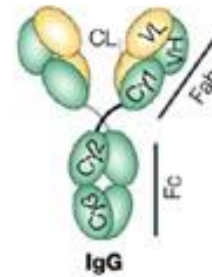
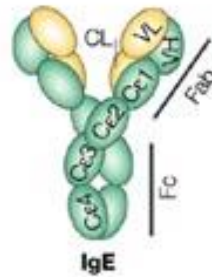
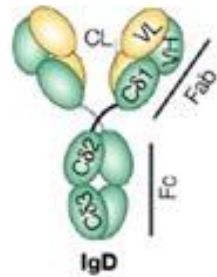
- Úsek na polypeptidovém řetězci s určenou stabilizovanou strukturou oddělenou od zbylých částí řetězce. Obvykle se jedná globulární útvary držené dohromady disulfidickými můstky.

# Enzymic cleavage of human IgG1

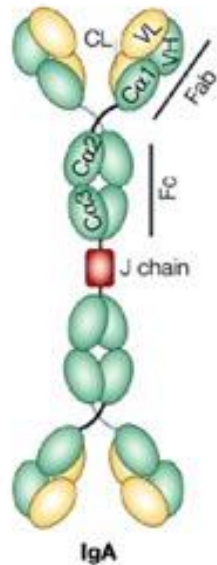


- Proteolytickým štěpením (trypsinem, papainem) můžeme rozdělit molekulu IgG na 2 fragmenty:
  - Fab (antigen binding) – je zodpovědný především za specifickou vazbu na antigen
  - Fc (krystalizabilní) . Je na něj vázána řada funkcí imunoglobuliné molekuly (třeba vazba na Fc receptory)

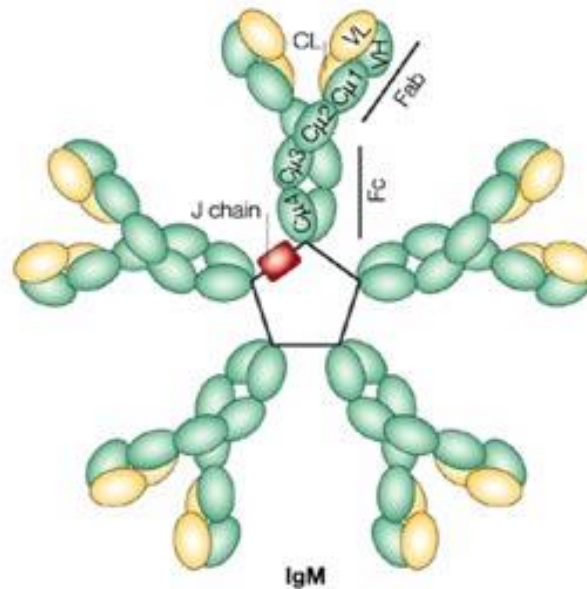
# Třídy imunoglobulinů, formy výskytu



IgG, IgE, IgD  
monomery



IgA dimer  
(monomer,  
trimer)



IgM pentamer  
(hexamer)

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Oligomery jsou spojeny J řetězcem.  
Membránové formy vždy jako monomer.

# Třídy a podtřídy imunoglobulinů

Izotyp	Podtřídy	Koncentrace v séru	Biol. poločas	Funkce
IgM	-	0,9-2,5 g/l	6 d	Receptor pro antigen (naivní B lymfocyty); primární odpověď; aktivace komplementu
IgD	-	Stopa	3 d	Receptor pro antigen (naivní B lymfocyty)
IgG	IgG1-4	8-18 g/l (převaha IgG1)	21 d	Sekundární odpověď; neonatální imunita; aktivace komplementu; opsonizace; neutralizace
IgA	IgA1,2	0,9-3,5 g/l	6 d	Slizniční imunita; opsonizace
IgE	-	0,0003 g/l	2 d	Obrana proti parazitům; reakce časně přecitlivělosti

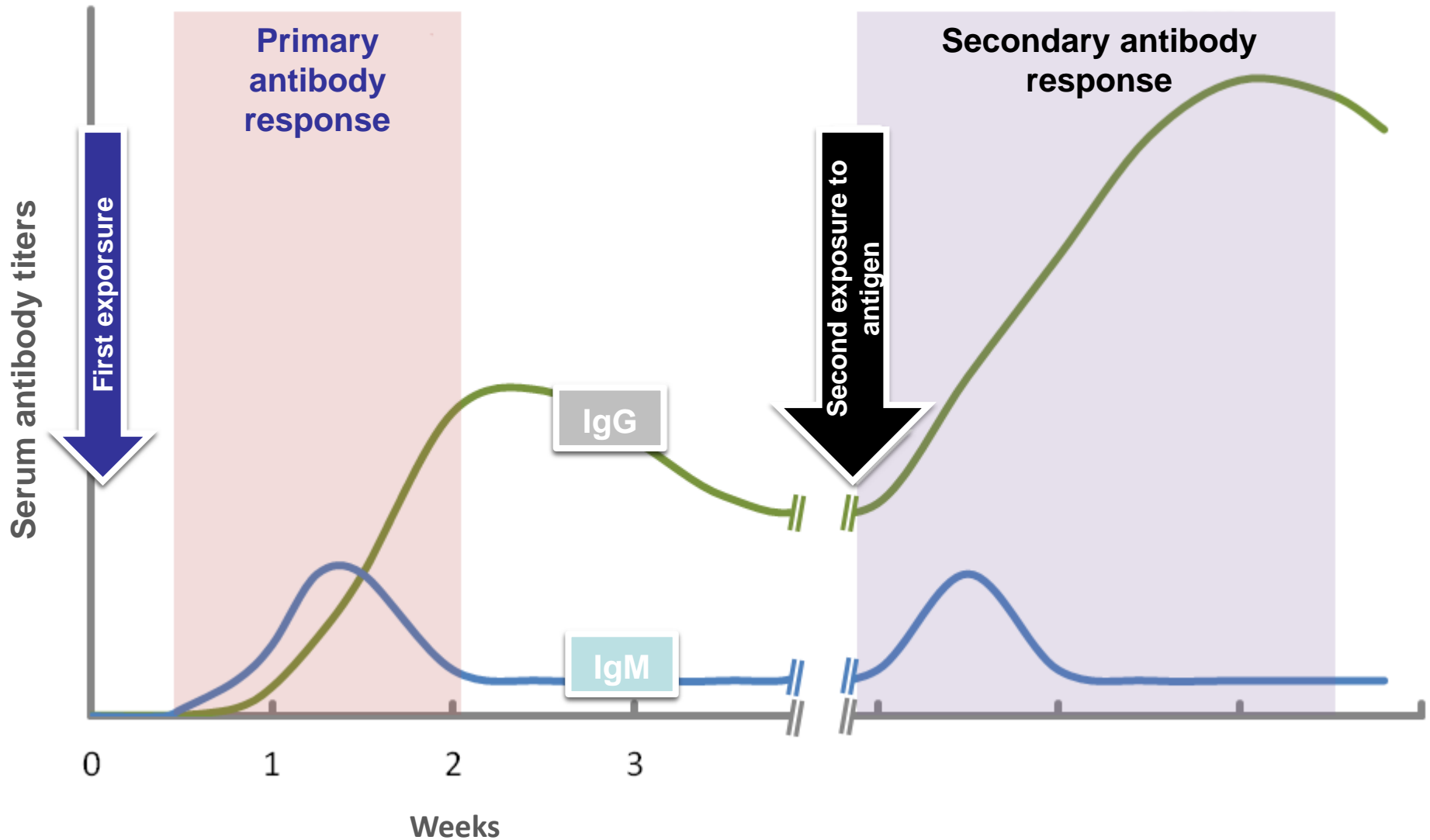
# IgM

- vázaný na membránu ve formě monomeru – receptor na B lymfocytech – po navázání antigenu zprostředkuje aktivaci B lymfocytů, důležitý pro **vývoj B lymfocytů**
- rozpustný ve formě pentameru (hexameru) – 10 (12) vazebných míst
- Neprochází placentou
- Je prvním imunoglobulinem tvořícím se při imunitní odpovědi, stejně jako prvním imunoglobulinem, který si aktivně novorozenec nebo i plod.
- zajišťuje **primární imunitní odpověď**
- **účinná aktivace komplementu**





# Imunitní odpověď po prvním a opakovaném setkání se s antigenem ("primární a sekundární protilátková odpověď")



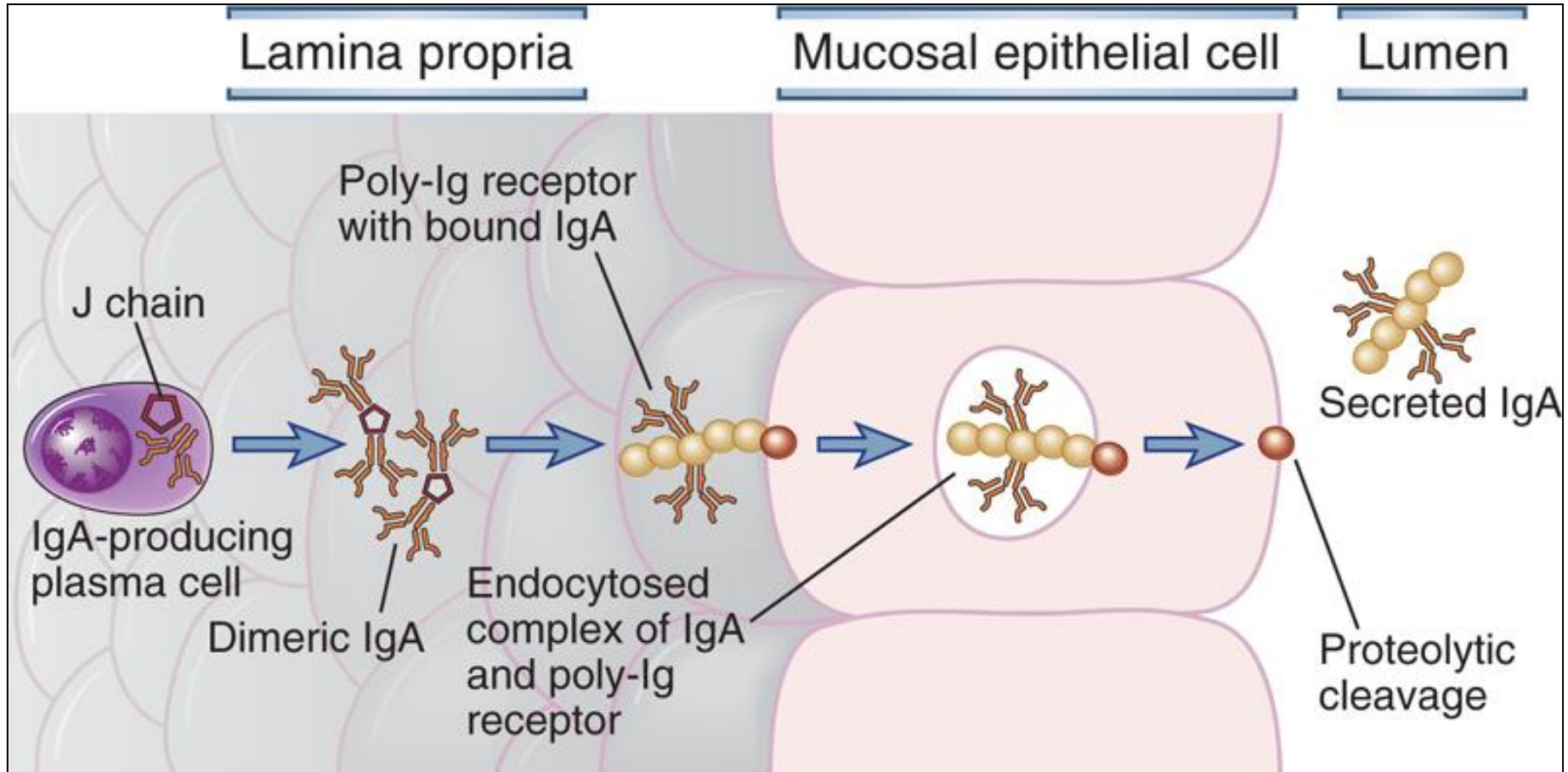
# IgG1-4

- nejhojnější protilátka v séru, intersticiální tekutině
- největší zastoupení má podtřída IgG1
- výskyt ve formě monomeru
- nejdelší poločas (21 d)
- sérové hladiny bývají kolem 10 g/l
- přestup přes placentu
  
- klíčová úloha v sekundární imunitní odpovědi
- aktivace komplementu, opsonizace, neutralizace

# IgA1,2

- slizniční forma (dimer) – významná úloha ve **slizniční imunitě** (neutralizace, opsonizace; neaktivuje C)
  - produkován plazmatickými buňkami a B lymfocyty v submukóze
  - transportován na slizniční povrch pomocí transportního Fc receptoru (poly-Ig-receptor)
  - transport přes epitel transcytózou: endocytóza – přeprava v transportním váčku – fúze s luminální membránou – odštěpení z receptoru proteolýzou
  - část poly-Ig-receptoru zůstává po uvolnění na slizniční povrch součástí dimeru IgA = sekreční komponenta – zajišťuje rezistenci vůči proteázám
- sérová forma (monomer, dimer, trimer) – opsonizace

# Transcytózsa IgA



Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology, 7e.

Copyright © 2012, 2007, 2005, 2003, 2000, 1997, 1994, 1991 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

# IgE

- Sérové hladiny jsou velmi nízké, udávají se v UI/ml ( $10^{-3}$  g/l).
- Váže se na receptor pro IgE (  $Fc\epsilon R$  ) na žírných buňkách a bazofilech.
- Vazba antigenu na takto navázaný IgE žírnou buňku aktivuje, dojde k uvolnění granulí.
- Z patologického hlediska známe tuto reakci především při alergických chorobách,
- Fyziologicky se uplatňuje v reakci na mnohobuněčné parazity.

# IgD

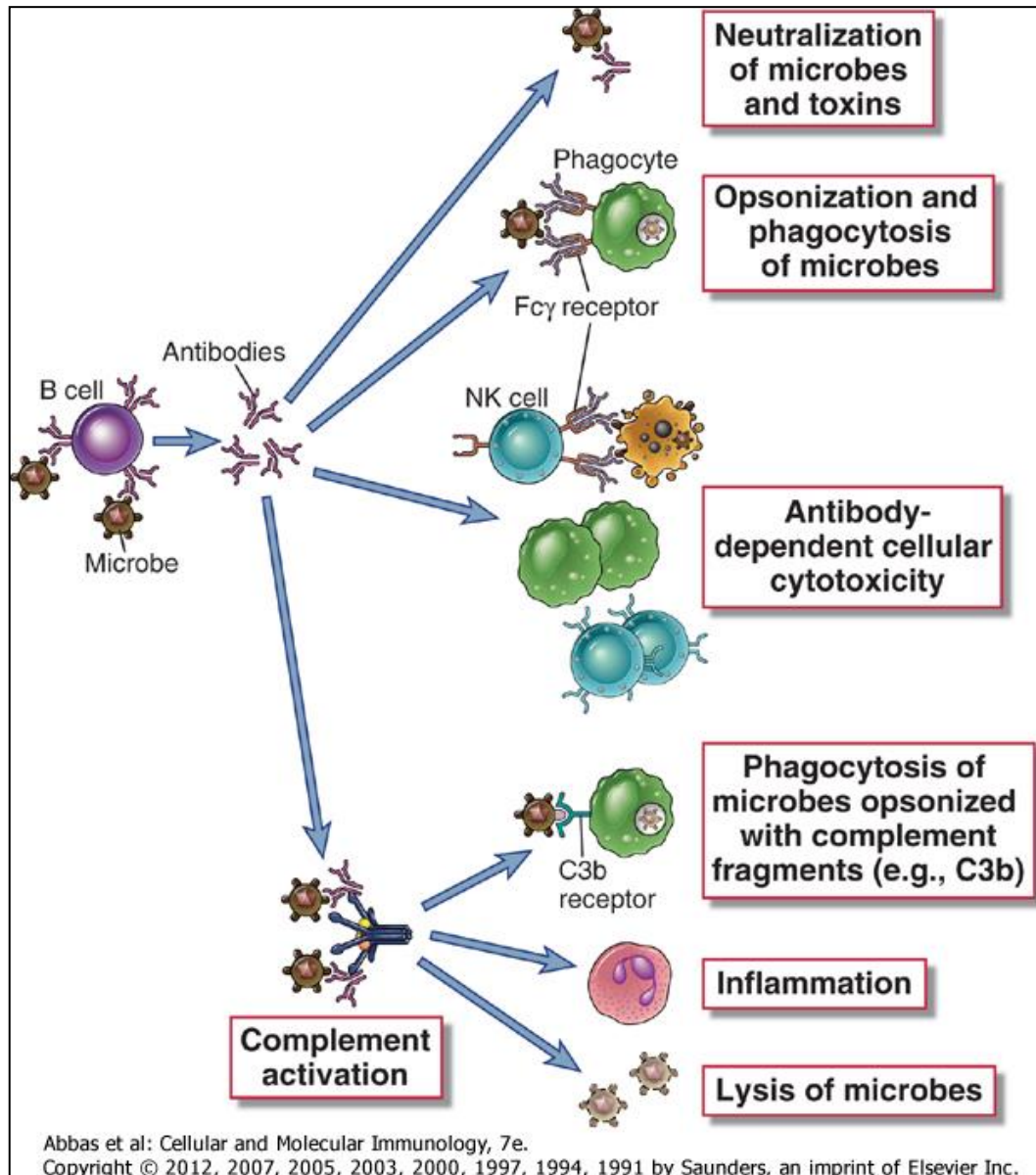
- Sérové hladiny jsou velmi nízké, o fyziologických funkcích sérového IgD víme velmi málo.
- IgD je přítomen na B-lymfocytech, kde tvoří B-buněčný receptor ( BCR) (obdobně jako monomerní IgM).

# Biologické funkce imunoglobulinových molekul

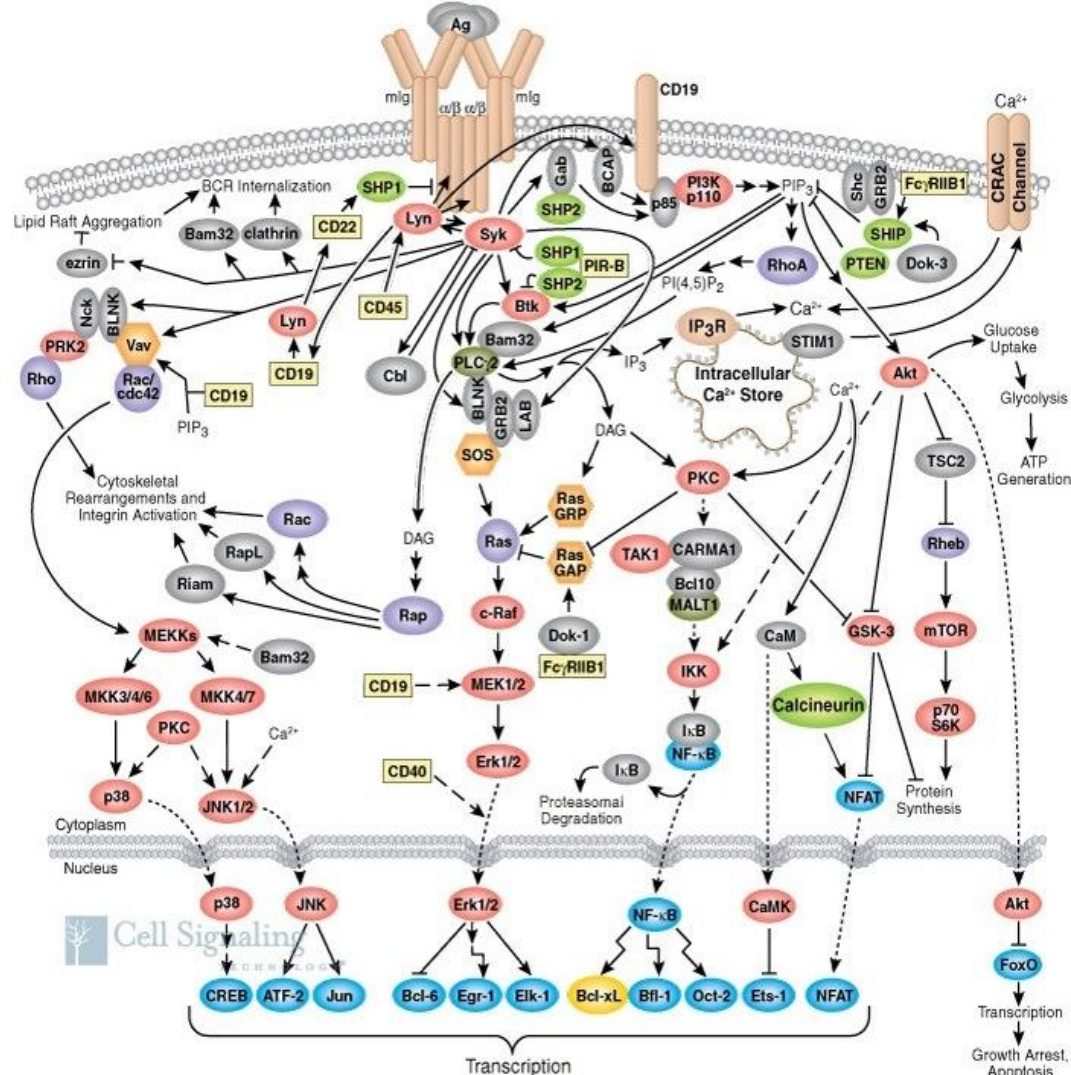
- Aktivace komplementového systému (IgG, IgM)
- Opsonizace (zejména IgG, též IgA)
- Neutralizace antigenů (IgG, IgA, IgM)
- Zábřana adherence (IgA, IgG)
- Aglutinace, precipitace (IgG, IgM)
- Degranulace žírných buněk (IgE)
- Přechod placentou (IgG)
- Imunoregulace (zejména IgG)
- Fenomén ADCC ( IgG)



# Biologické funkce imunoglobulinových molekul



# Přenos aktivačního signálu v B-lymfocytech



# Dva typy B-lymfocytární odpovědi na antigen

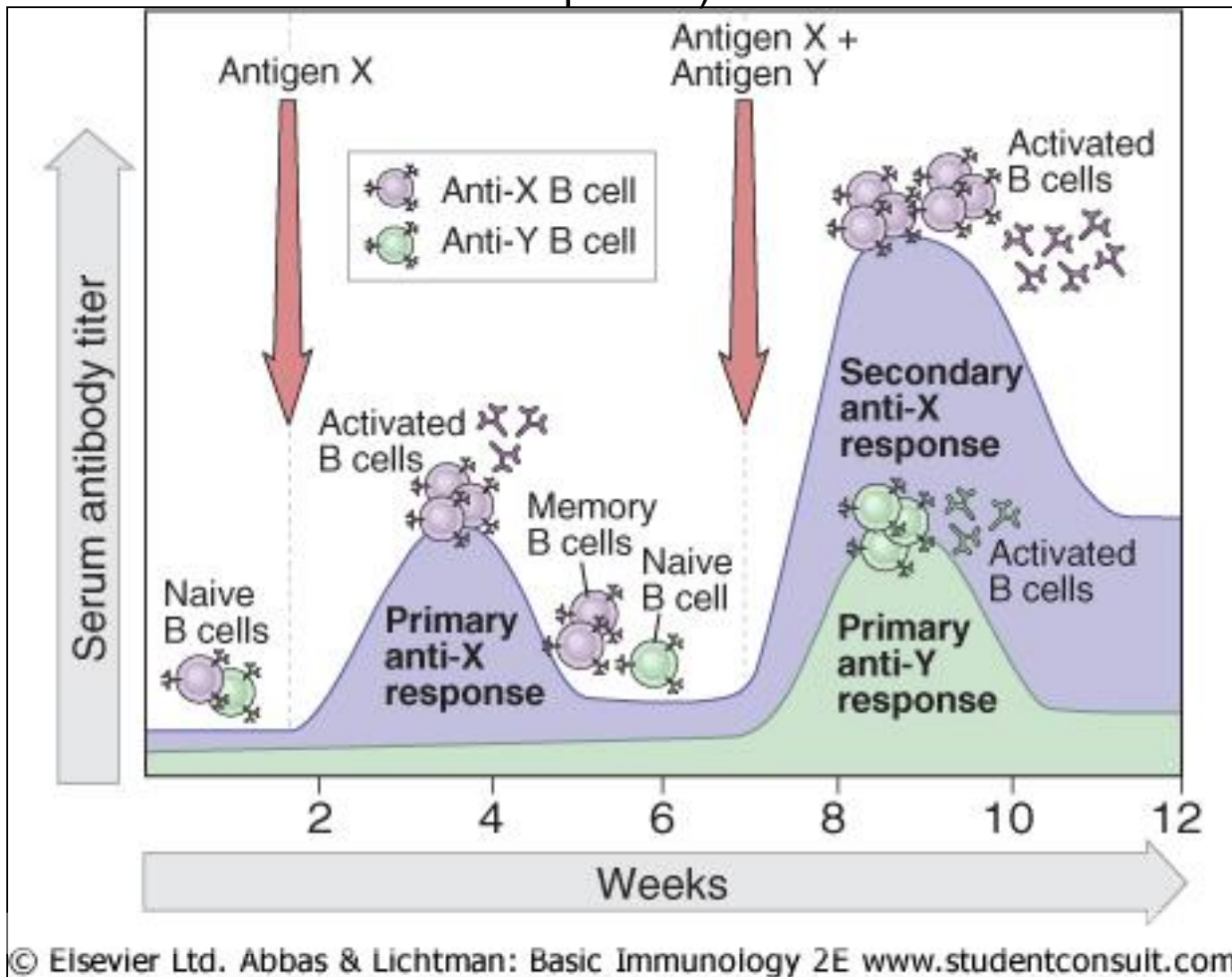
- **T dependentní odpověď**

- Jedná se o nejčastější formu protilátkové odpovědi
- Vyžaduje souhru B-lymfocytů, antigen prezentujících buněk (mohou jimi být i B-lymfocyty) a T-lymfocytů.
- Dochází k isotypovému přesmyku, afinitní maturaci, vzniku paměťových buněk.
- Tj. proběhne primární i sekundární fáze protilátkové odpovědi.

- **T-independentní odpověď**

- Odpověď na antigeny s řadou stejných epitopů – typicky polysacharidové antigeny.
- Nahromadění B-buněčných receptorů (BCR) do jednoho místa vede k vzájemné aktivaci tyrozinkináz a následné aktivaci buňky.
- Tento proces nevyžaduje pomoc T-lymfocytů.
- Vytváří se pouze protilátky třídy IgM (nedochází k izotypovému přesmyku), nedojde k afinitní maturaci, nevytváří se imunitní paměť.
- Tj. proběhne pouze primární fáze protilátkové odpovědi.

Imunitní odpověď po prvním a opakovaném setkání se s antigenem (“primární a sekundární imunitní odpověď”)



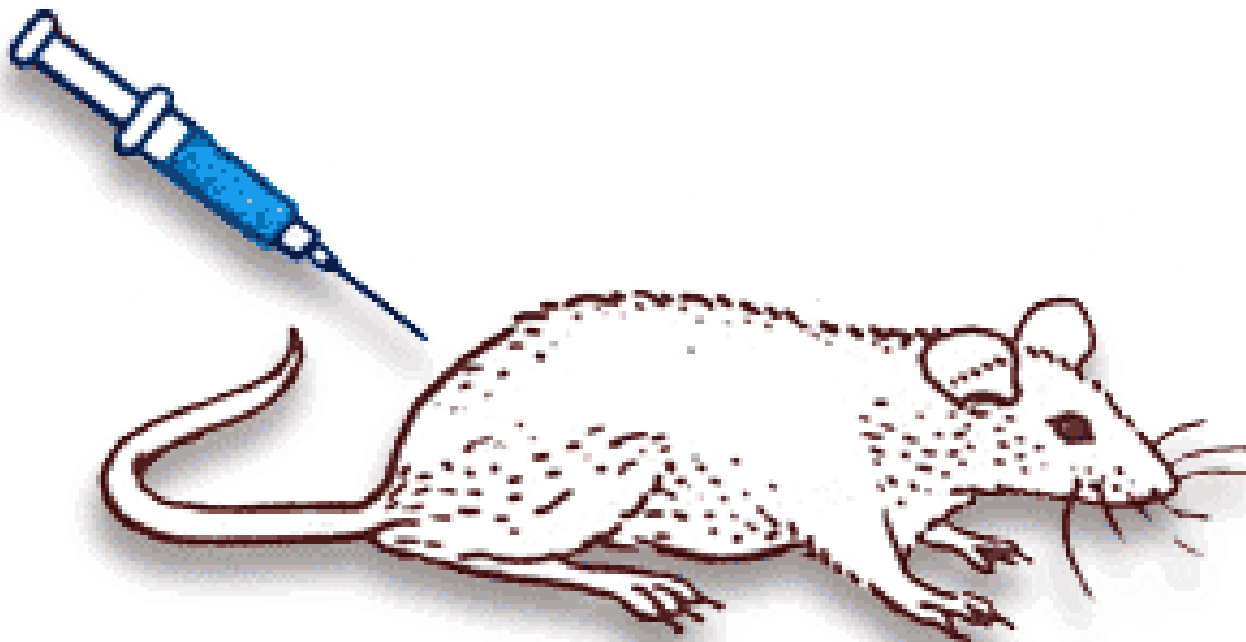
# Imunologická paměť

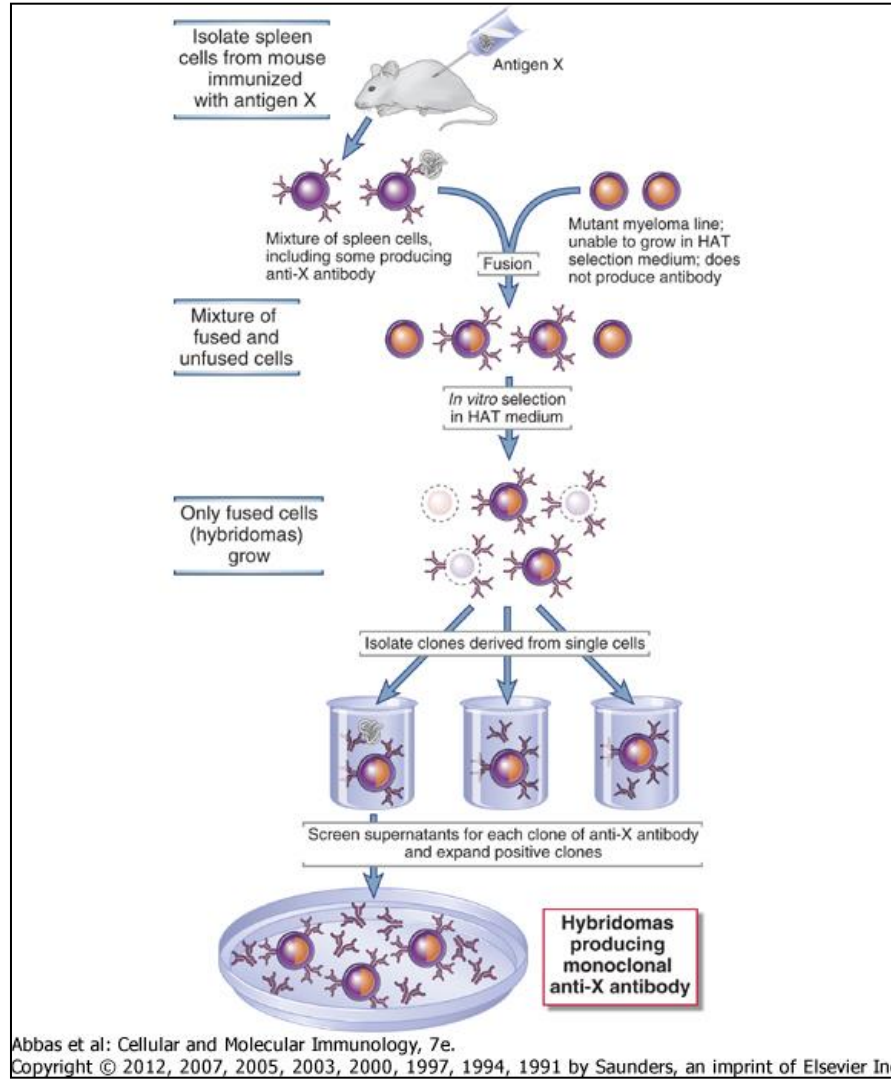
- Je jedním z charakteristických rysů adaptivní imunity.
- Je založena na existenci dlouho žijících, antigen-specifických paměťových T- a B-lymfocytů.
- Tyto buňky jsou v případě opakované antigenní stimulace schopny rychlé proliferace a terminální diferenciaci v efektorové buněčné formy.
- Výsledkem je rychlejší, rozsáhlejší a efektivnější odpověď po opakovaném setkání se s antigenem.

# POLYKLONÁLNÍ a MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

- **POLYKLONÁLNÍ PROTILÁTKY**
  - *Směs imunoglobulinových molekul, jejichž vazebná místa nesou specificitu vůči různým epitopům na celé molekule antigenu*
  - **Získávají se obvykle imunizací zvířat**
  
- **MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY**
  - *Produkt jednoho klonu B-lymfocytů, vykazují jedinečnou specificitu proti jednomu epitopu na molekule antigenu*
  - **Získávají se obvykle metodikami in vitro**

## Příprava monoklonálních protilátek



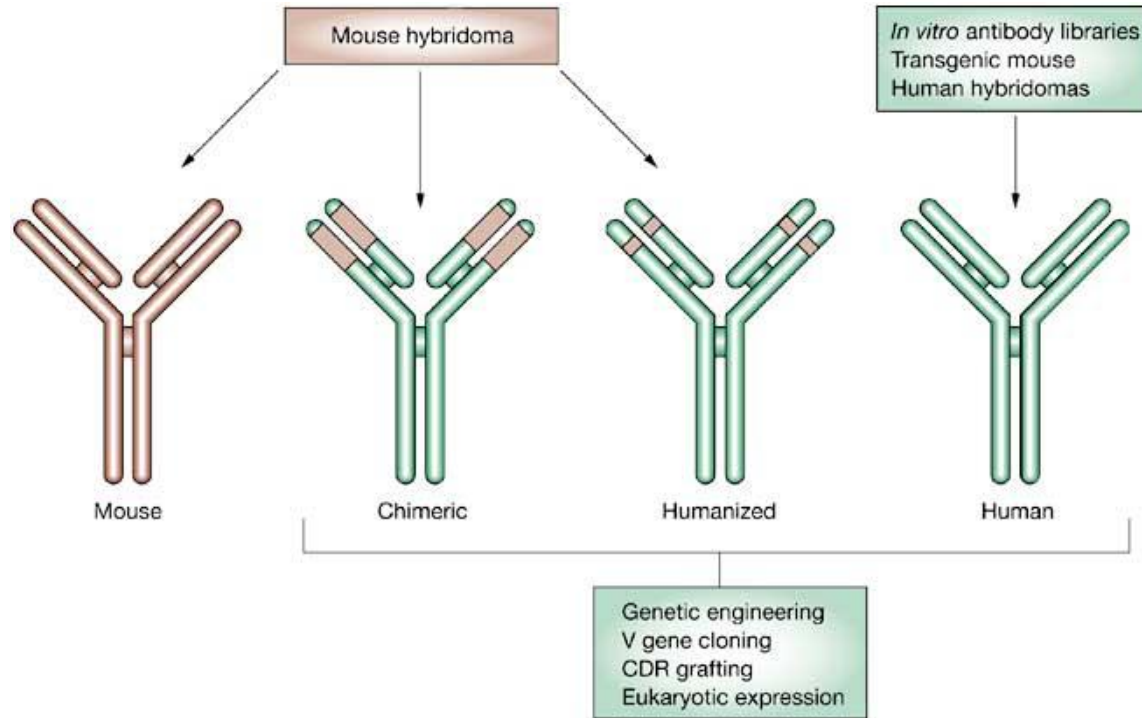




# Využití monoklonálních protilátek

- V diagnostice, jedná se o vysoce specifická diagnostická agens používaná v různých oblastech především imunologie a mikrobiologie.
- V terapii, k zacílení buněk a molekul důležitých v patogenezi nemocí. Tvoří velkou část tzv. biologických terapií.
- Ve výzkumu

# Typy monoklonálních protilátek používaných k terapii



Hohlfeld R *et al.* (2005) Drug Insight: using monoclonal antibodies to treat multiple sclerosis; *Nat Clin Pract Neurol* 1 34-44 [doi: 10.1038/ncpneuro0016]

nature  
CLINICAL  
PRACTICE

NEUROLOGY

## Příklady klinického využití monoklonálních protilátek v léčbě imunopatologických chorob

- **Imunosuprese:** anti-CD3 (OKT3),
  - anti CD20 (rituximab)
- **Blokáda prozánětlivých cytokinů:**
  - anti –TNF- $\alpha$  (infliximab, adalimumab)
    - revmatoidní aritida, Crohnova choroba,
- **Blokáda adhezivních molekul:**
  - anti integrin  $\alpha$ 4b1 (natalizumab) – roztroušená mozkomíšňní skleróza
  - Anti-CD11a (efalizumab) - psoriáza
- **Protialergická léčba:**
  - anti-IgE (omalizumab): těžké formy astmatu

## Příklady využití monoklonálních protilátek v léčbě zhoubných nádorů

- Protilátky proti anigenům bílých krvinek:
  - anti CD-20 (rituximab) léčba lymfomů,
  - anti-CD52 (Alemtuzumab) – léčba lymfomů
- Anti-receptorové protilátky:
  - anti-epidermal growth factor (receptor HER-2) (trastuzumab) – mamární karcinom
  - anti-epidermal growth factor (receptor EGFR) (cetuximab) – kolorektální karcinom

# Další příklady využití monoklonálních protilátek v medicíně

- Antiagregační léčba:
  - trombocytární receptor gpIIb/IIIa (abciximab)
- Antivirová léčba:
  - RS virus (palivizumab),
  - SAR-Cov2
- Osteoporóza
  - RANKL (Denosumab)
- Hyperlipidémie
  - protein PCSK9 (alirocumab, evolocumab)
- Migréna
  - CGRP nebo jeho receptor (Eptinezumab Erenumab Fremanezumab Galcanezumab)