

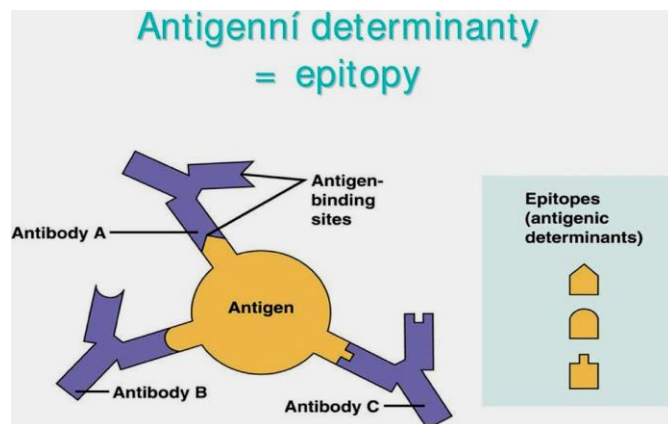
Imunitní systém

Imunitní systém (IS) - mechanismy zajišťující homeostázi organismu

- obranyschopnost - rozpoznání cizích složek a škodlivin (patogeny a jejich toxiny)
- autotolerance - poznání vlastních složek
- imunitní dohled - vnitřní škodliviny - odstraňuje staré, poškozené nebo nádorové buňky

Antigen = jakákoliv substance vyvolávající imunitní odpověď

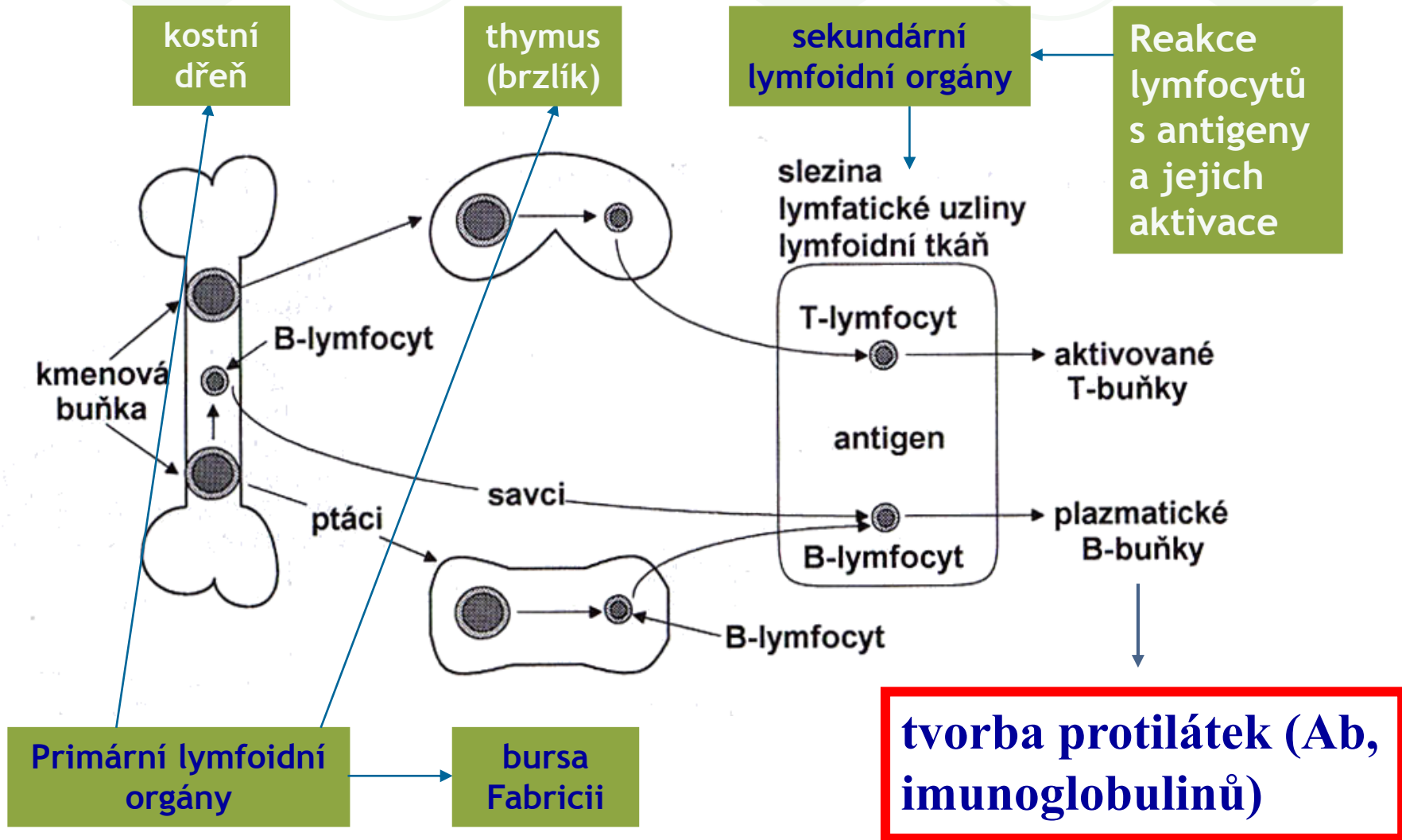
Epitop = část antigenu rozpoznávaná imunitními receptory



Druhy imunity (obratlovci)

- a) **nespecifická, přirozená (neadaptivní)** = vrozená, evolučně starší.
Nemá imunologickou paměť.
- buněčná složka: fagocyty a cytotoxické látky
 - humorální - komplement, interferony, lektiny, sér. proteiny
- + mechanické zábrany (kůže sliznice), pohyb řasinek, proudy vzduchu a tekutin
- + chemické - mastné kyseliny, pH, enzymy lysozym, pepsin, defensiny
- + mikrobiální - přirozená mikroflora, kompetice (mikrobiom)
- b) **specifická (adaptivní)** - antigenně specifická, má imunologickou paměť, prostřednictvím protilátek a receptorů specifických pro Ag
- **humorální - protilátky, B-buňky (BCR)**
 - buněčná - T-buňky

Vznik B-lymfocytů



Klonální selekce - diferenciaci B-lymfocytů

probíhají změny v genech pro tvorbu protilátek

Kmenová buňka



Pre-B-lymfocyt - přeskupení subgenů pro H-řetězec, vznik IgM-cytoplazm.



Nezralé B-lymfocyty - přeskupení subgenů pro L-řetězec, vznik IgM-membr.



Zralé B-lymfocyty - první přesmyk tříd IgM -IgD (membr.)



+ Ag

Plazmatické b. + paměťové b. = primární odpověď

IgM, IgD

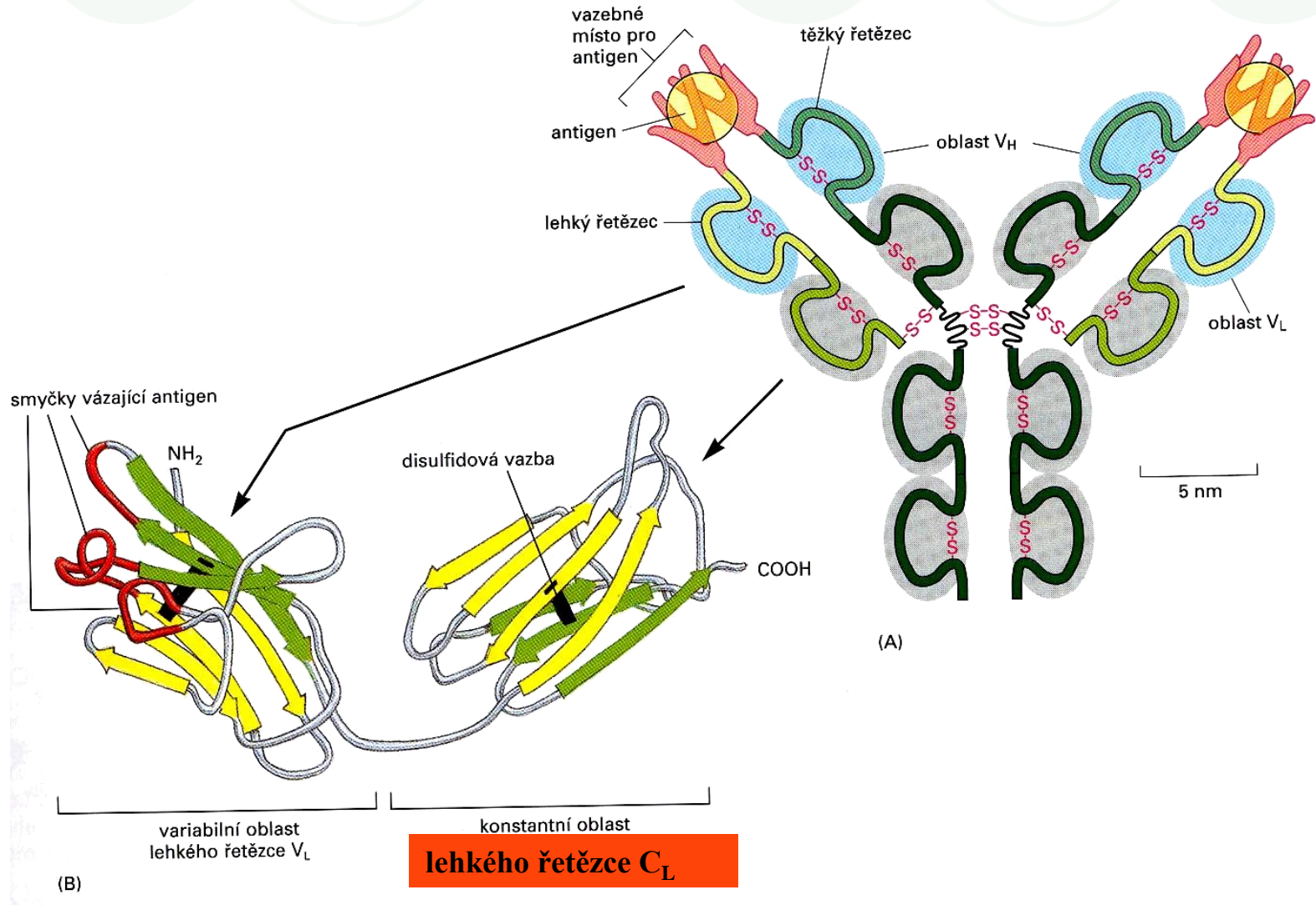
sekretované
(krátkodobě)

+ **antigen**

= sekundární odpověď

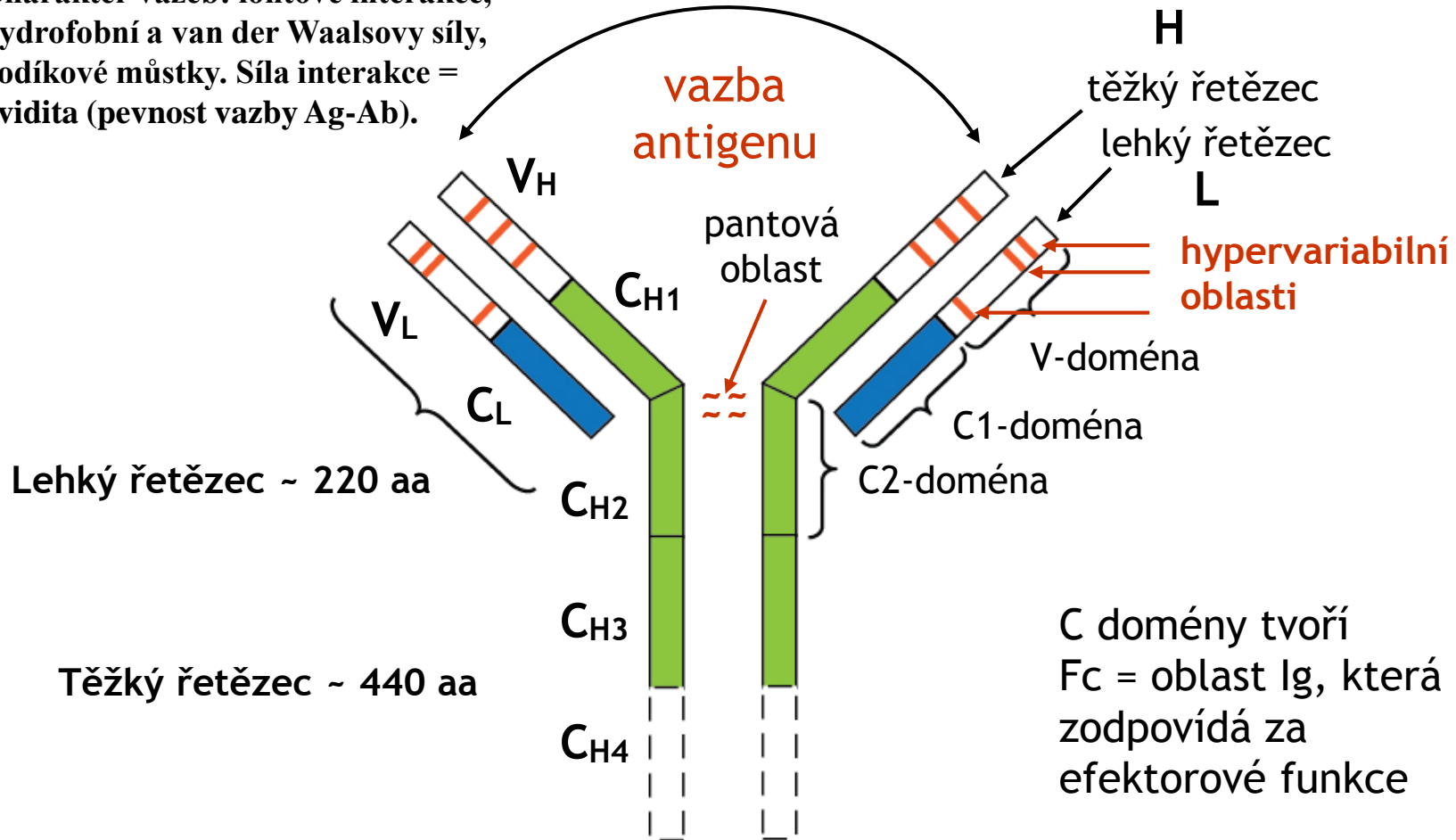
vysoká tvorba IgA, IgE, IgG

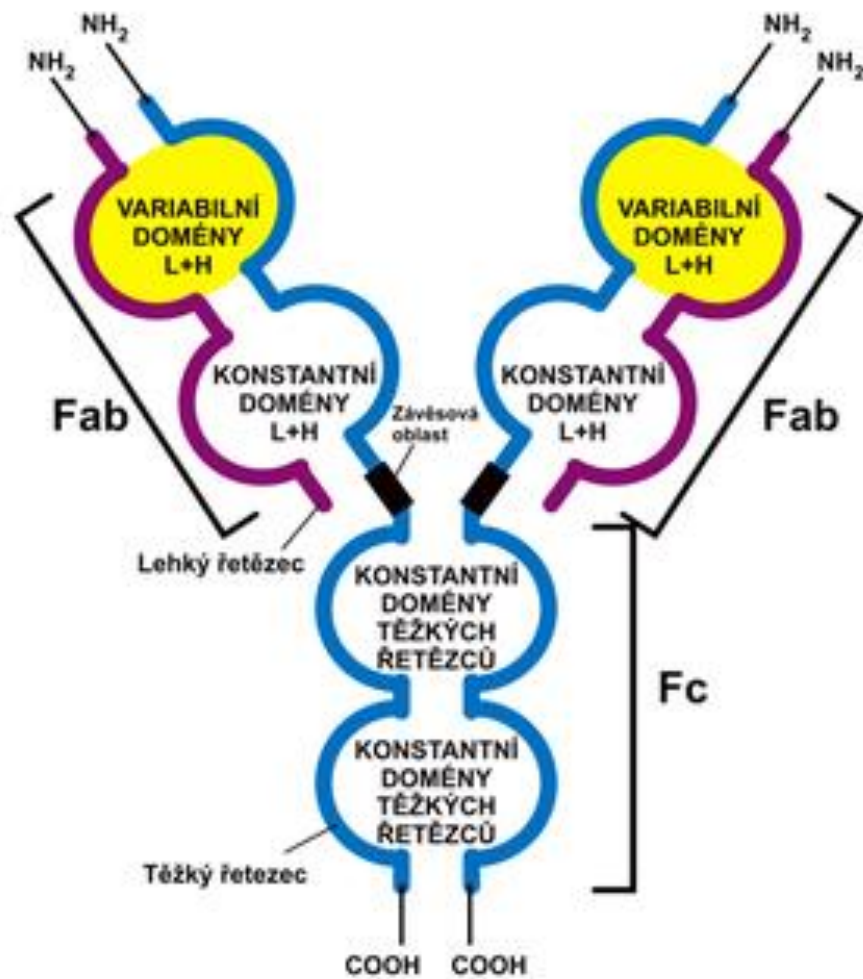
Struktura imunoglobulinů



Struktura protilátky

Charakter vazeb: iontové interakce, hydrofobní a van der Waalsovy síly, vodíkové můstky. Síla interakce = avidita (pevnost vazby Ag-Ab).

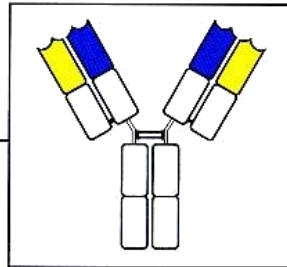




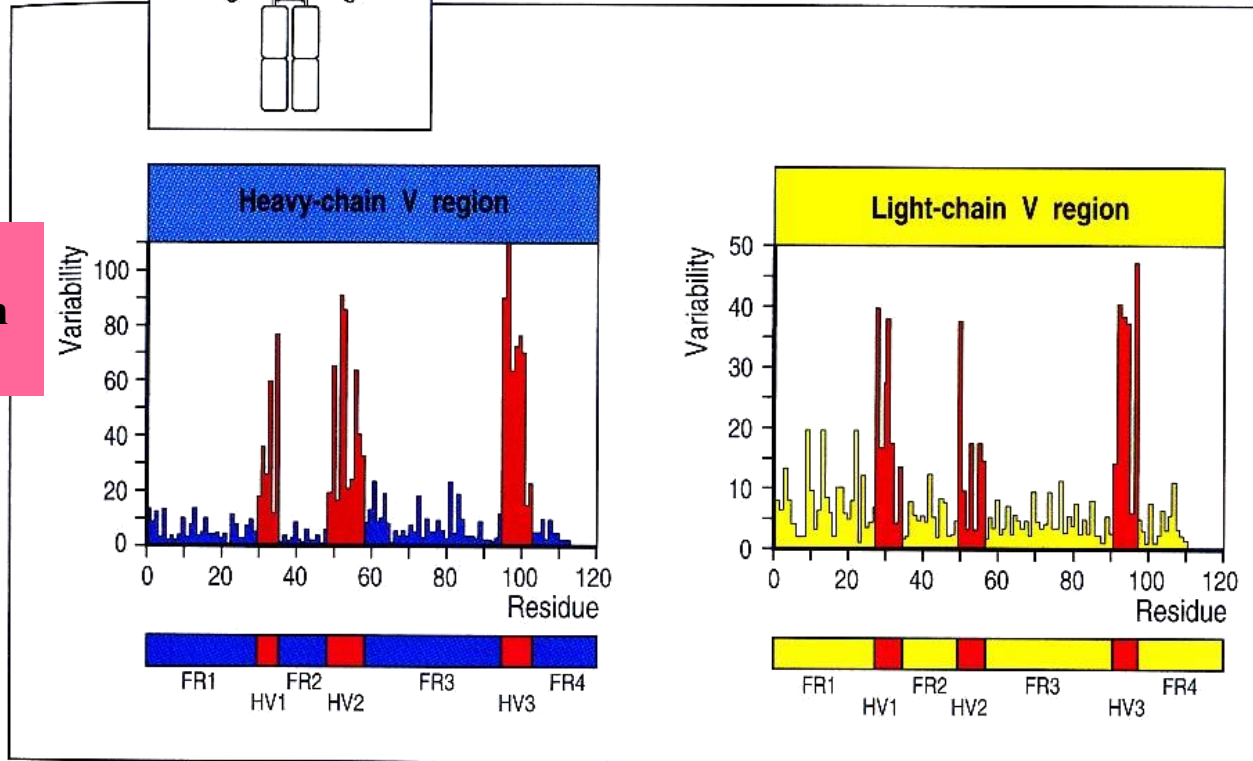
STRUKTURA MONOMERU IMUNOGLOBULINU

Oblasti hypervariability ve variabilních doménách

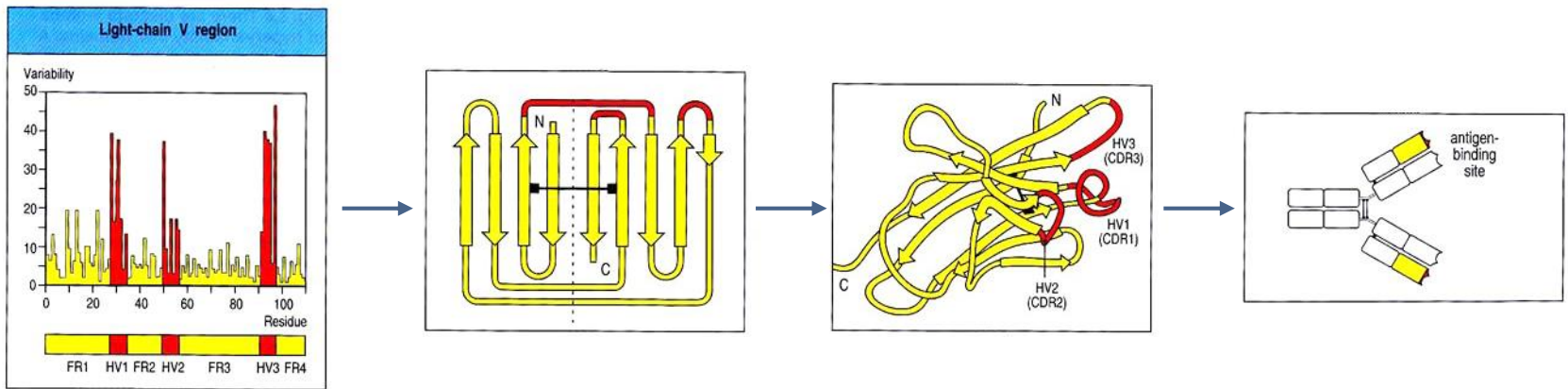
HV = hypervariabilní oblast;
FR = „framework regions“



Frekvence
výskytu různých
aminokyselin

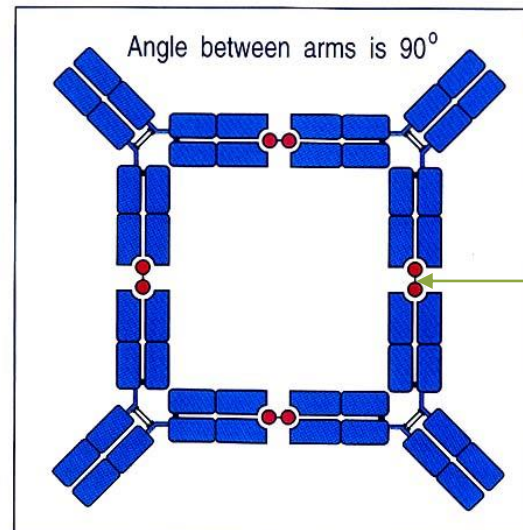
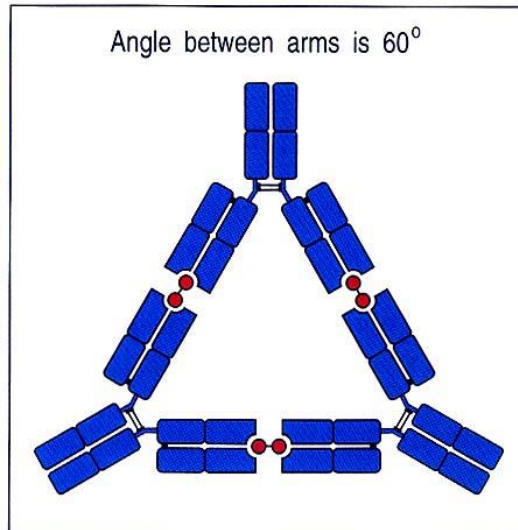
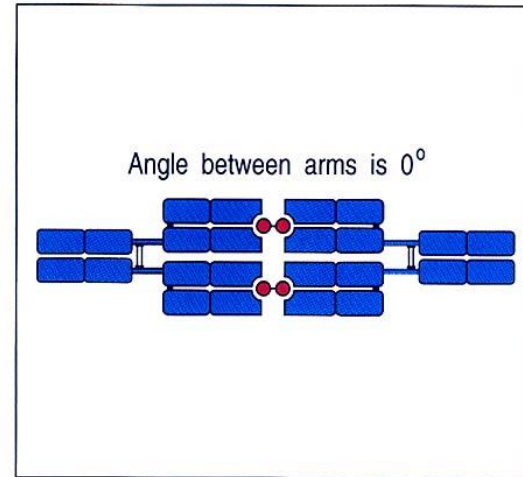


Lokalizace hypervariabilních oblastí na lehkém řetězci Ig



Každá hypervariabilní oblast má jen 5 až 10 aa, které se účastní vazby antigenu.

Interakce imunoglobulinů s antigeny



Antigen
(dva hapteny)

Typy imunoglobulinů a jejich funkce v organismu

klasifikace podle typu těžkých řetězců

Typy imunoglobulinů	Těžký řetězec	Funkce	Proporce
IgM	μ	aktivuje komplement*	5%
IgD	δ	Uvolňování histaminu, podíl na alergiích	1%
IgG	γ	aktivuje komplement	80%
IgA	α	součást slin a sekretů	14%
IgE	ϵ	alergické reakce	<1%

***Komplement** - systém sérových proteinů aktivovaných komplexem protilátka-antigen nebo mikroorganismy. Pomáhá eliminovat patogenní mikroorganismy navozením jejich lyze nebo fagocytózy

Klasifikace imunoglobulinových řetězců

V = variabilní oblast , C = konstantní oblast

Lehké řetězce (light)

$V_L C_L$ $V_K C_K$ nebo $V_\lambda C_\lambda$ (tj. 2 typy lehkých řetězců: kappa nebo lambda)

Těžké řetězce (heavy)

$V_H C_H$ $V_H C_\mu$ $V_H C_\gamma$ $V_H C_\alpha$ $V_H C_\delta$ $V_H C_\epsilon$ (tj. 5 typů těžkých

řetězců)



IgM



IgG



IgA



IgD



IgE

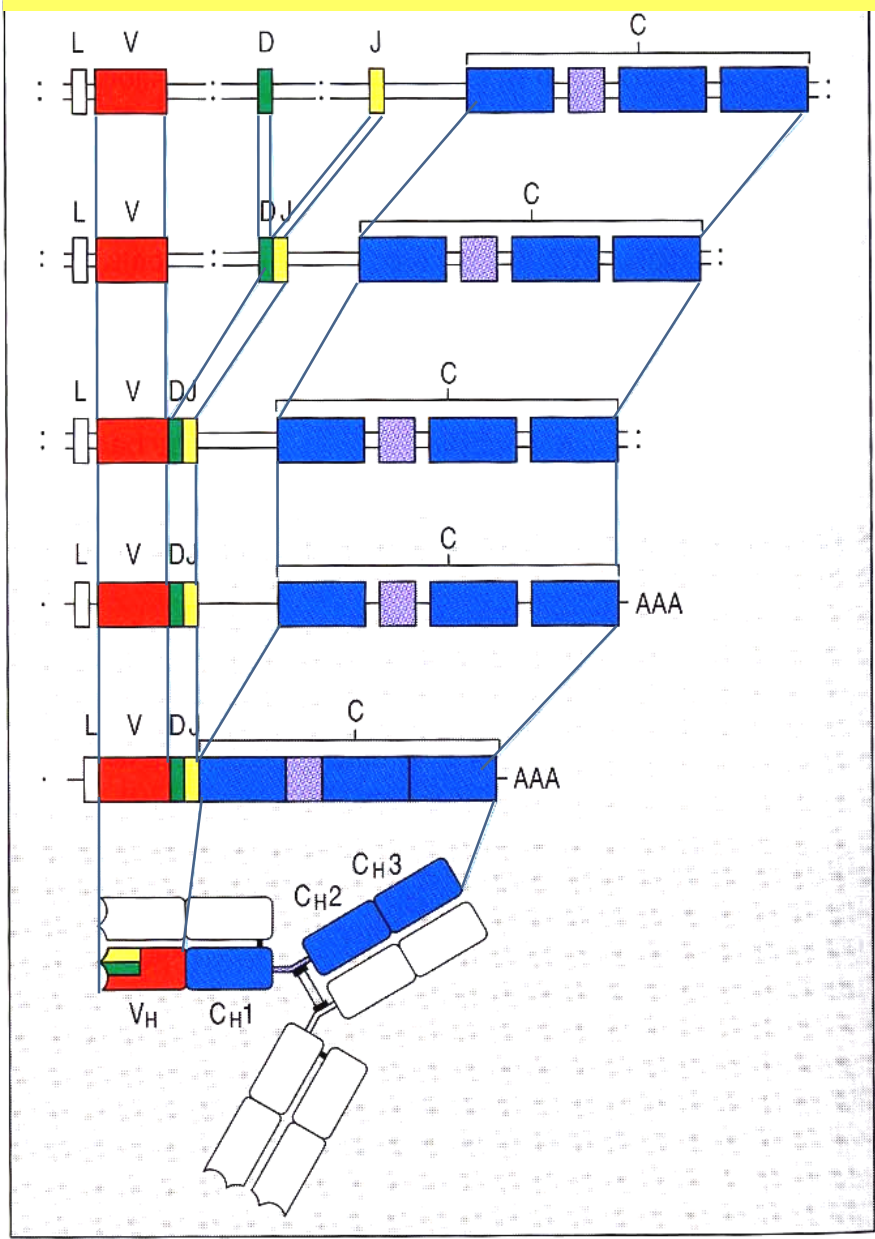
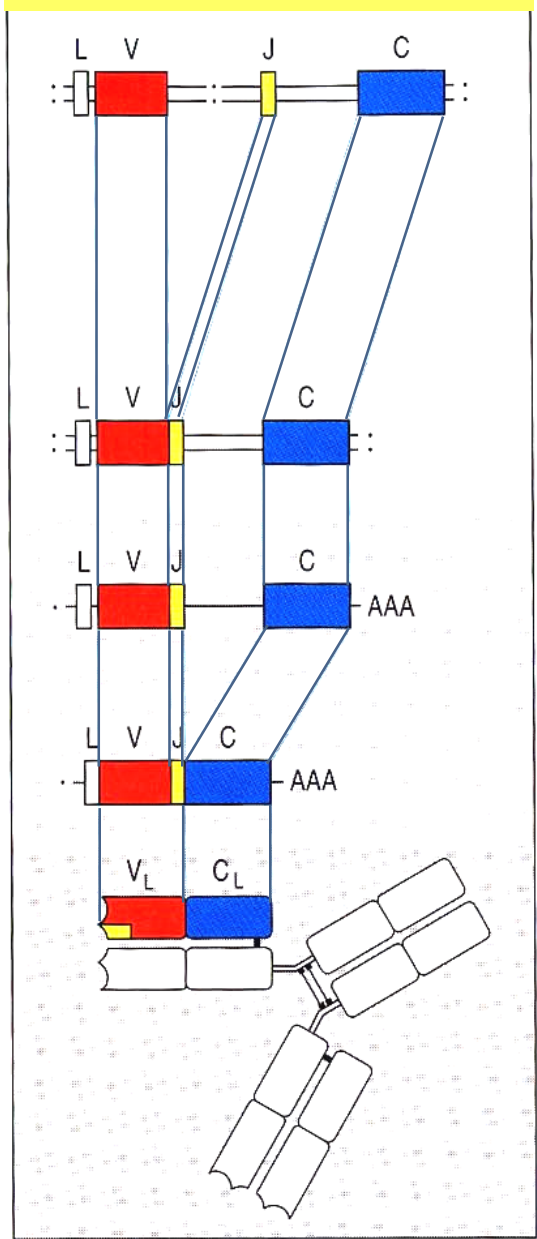
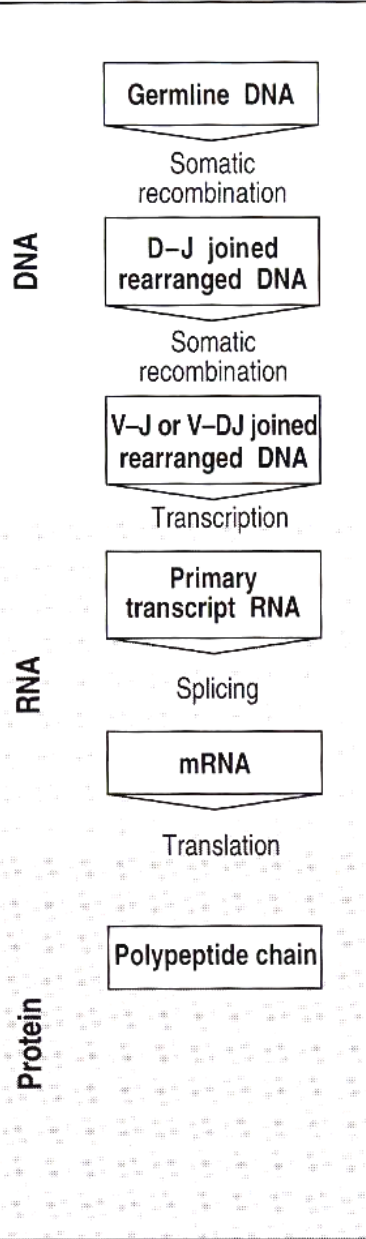
(5 Ig tříd)

(μ , γ , α , δ , ϵ)

Skupina imunoglobulinů stejného typu těžkého řetězce tvoří imunoglobulinovou třídu

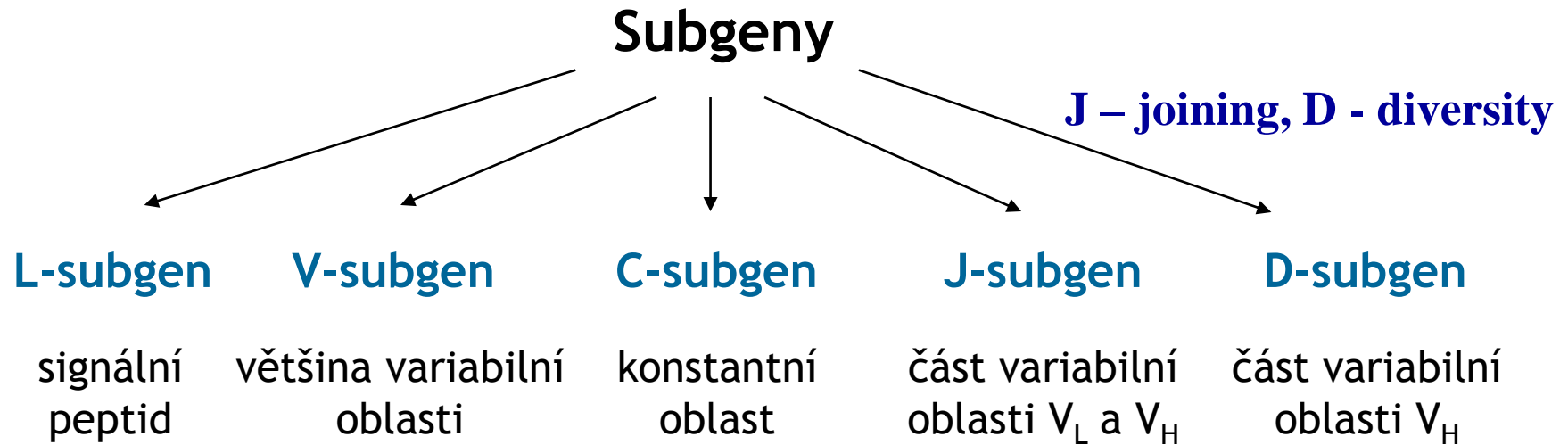
Lehký řetězec

Těžký řetězec



Subgeny = úseky genů pro imunoglobuliny

Genové segmenty

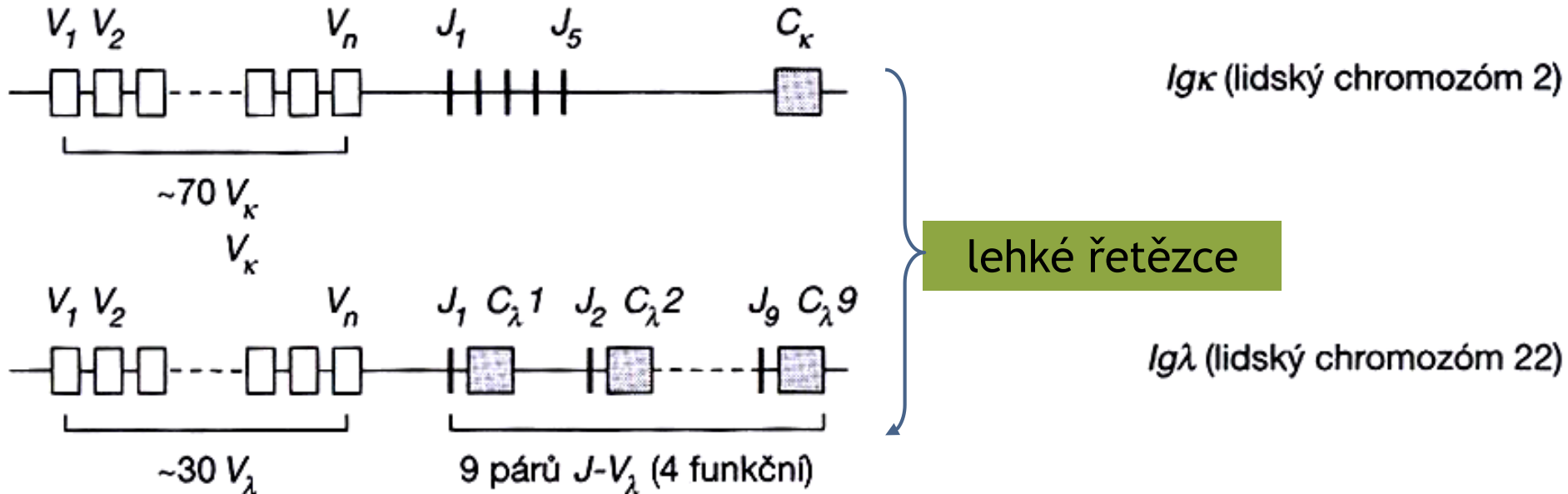
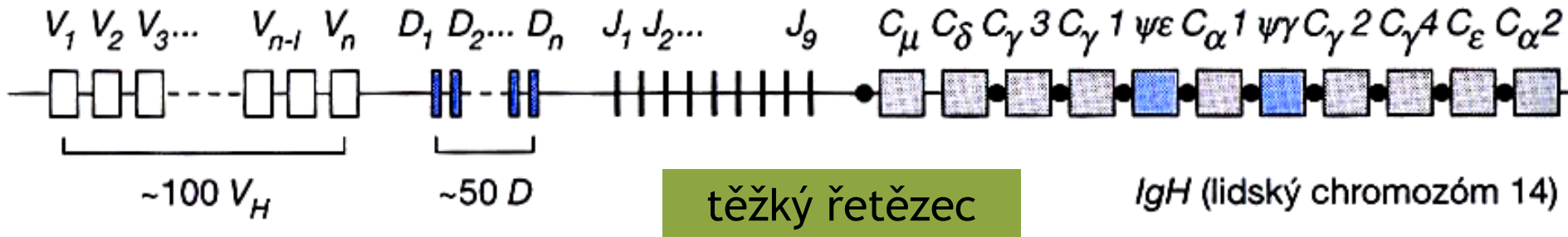


Obecná sestava genů

Geny pro lehké řetězce: L-VJC

Geny pro těžké řetězce: L-VDJC

Organizace lidských genů kódujících imunoglobulinové řetězce



Přeskupování subgenů a kombinace řetězců jako zdroj variability Ig

Lehký řetězec kappa: 250 V-subgenů + 4 J-subgeny + 1 C-subgen
 $250 \times 4 \times 1 = 1\,000$ kombinací (lehkých řetězců)

Těžký řetězec: 1000 V-subgenů + 15 D-subgenů + 4 J-subgeny +
+ 8 C-subgenů
 $1\,000 \times 15 \times 4 \times 8 = 480\,000$ kombinací (těžkých řetězců)

Celkem možných kombinací obou typů řetězců:
 $1\,000 \times 480\,000 = 480\,000\,000$ kombinací (kompletních řetězců)

nahodilost kombinací - dvojčata

Procesy upravující geny pro tvorbu protilátek

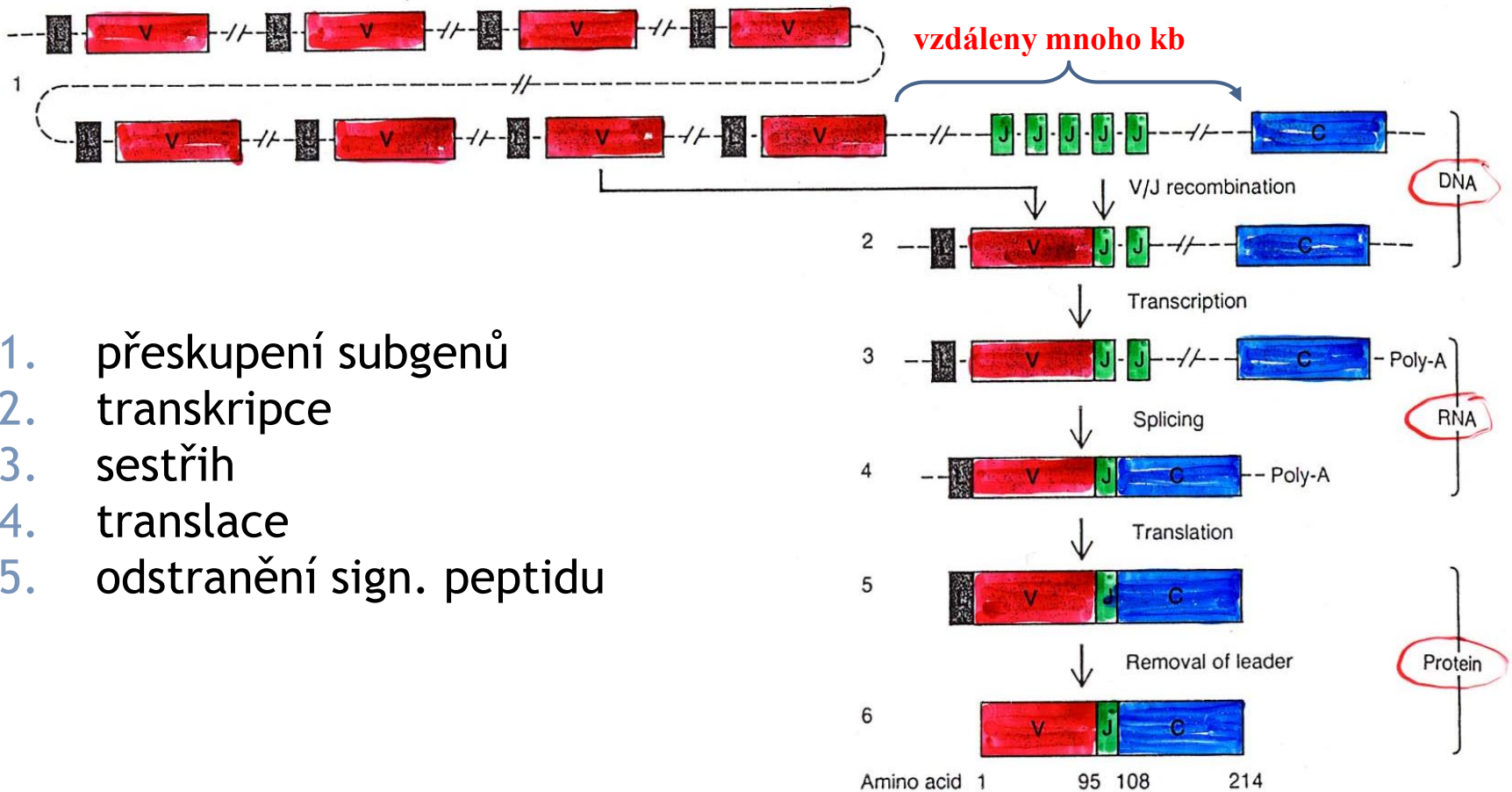
Změny na úrovni DNA: přeskupování subgenů

- a) kódujících variabilní oblasti (**V-J; V-D-J**) – dosažení vysoké vazebné specificity protilátky vůči antigenu
- b) kódujících konstantní oblasti (výběr C subgenů) – optimalizace efektorových funkcí

2. **Změny na úrovni transkripce: alternativní sestřih, alternativní zakončení transkripce:** přechod membránově vázané formy protilátky na sekretovanou, přechod IgM na IgG

3. **Aktivace rodičovských genů: alelická a izotypová exkluze**

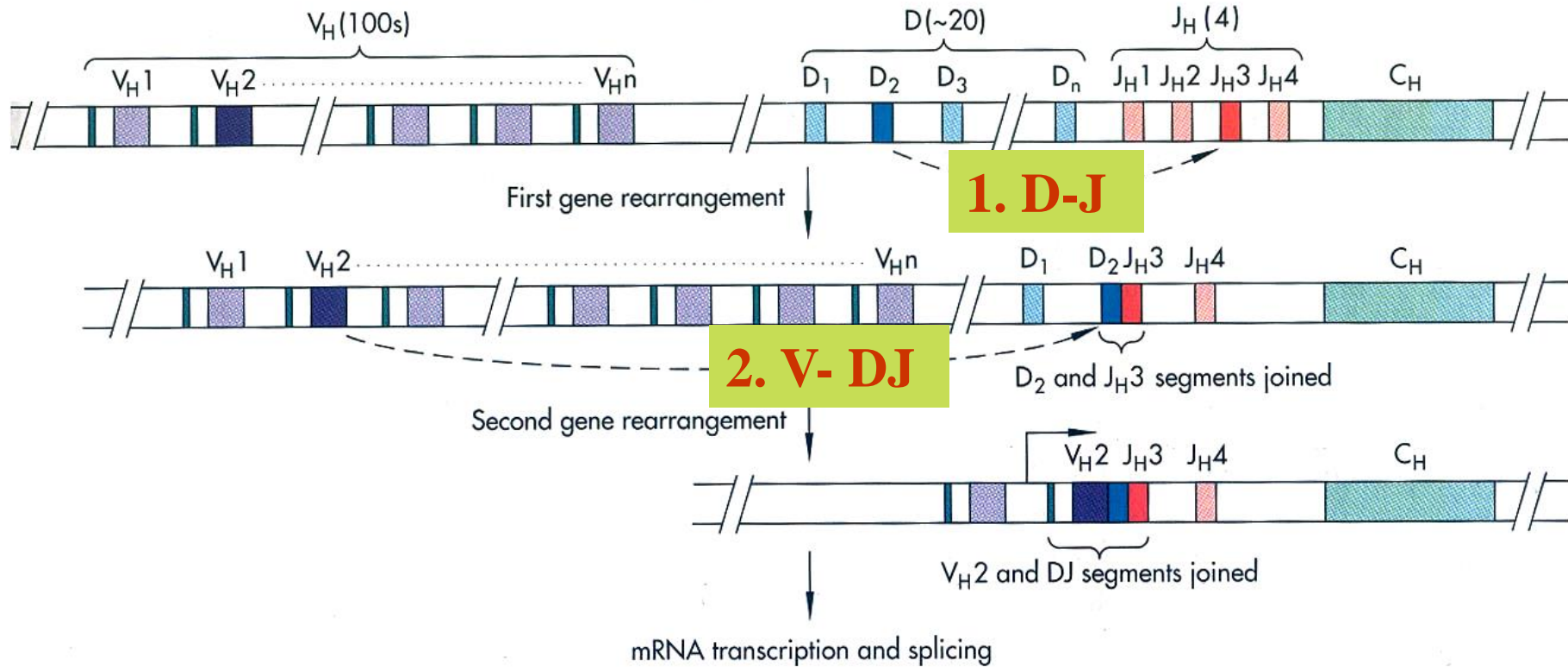
Expresce genu pro lehký imunoglobulinový řetězec



1. přeskupení subgenů
2. transkripce
3. sestřih
4. translace
5. odstranění sign. peptidu

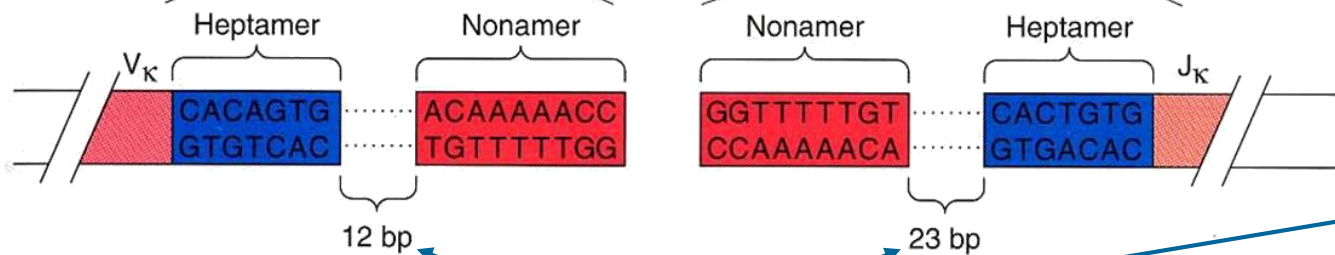
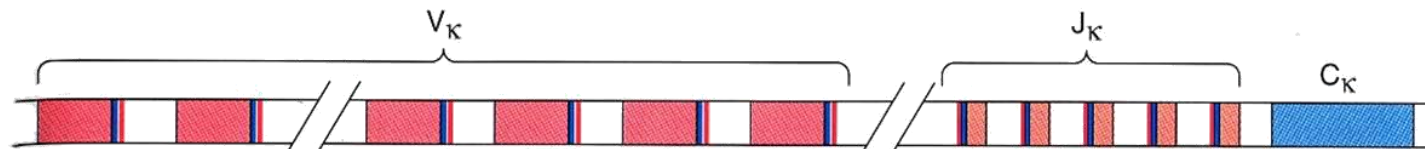
Přeskupování subgenů pro těžký imunoglobulinový řetězec

Mouse heavy-chain locus (chromosome 12)



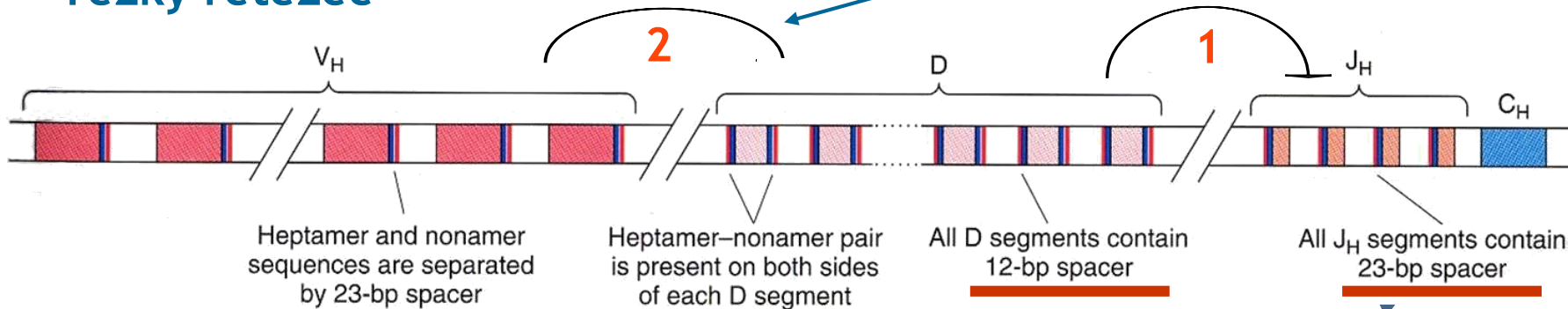
Molekulární mechanismus přeskupování subgenů

Lehký řetězec kappa v zárodečné linii



Platí pravidlo 12/23

Těžký řetězec



Heptamer and nonamer sequences are separated by 23-bp spacer

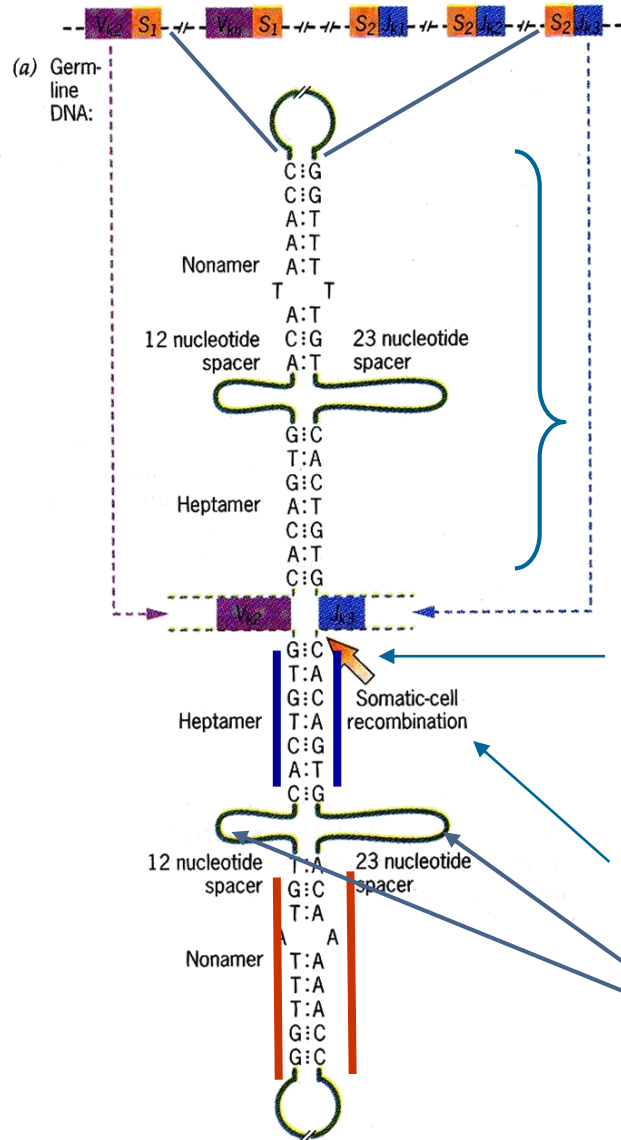
Heptamer–nonamer pair is present on both sides of each D segment

All D segments contain 12-bp spacer

All J_H segments contain 23-bp spacer

nemohou se přímo spojit V-J – oba mají 23 bp

Přeskupení subgenů procesem V-J somatické rekombinace



(b) Hypothetical "stem-and-loop" intermediate with known heptameric and nonameric signal sequences:



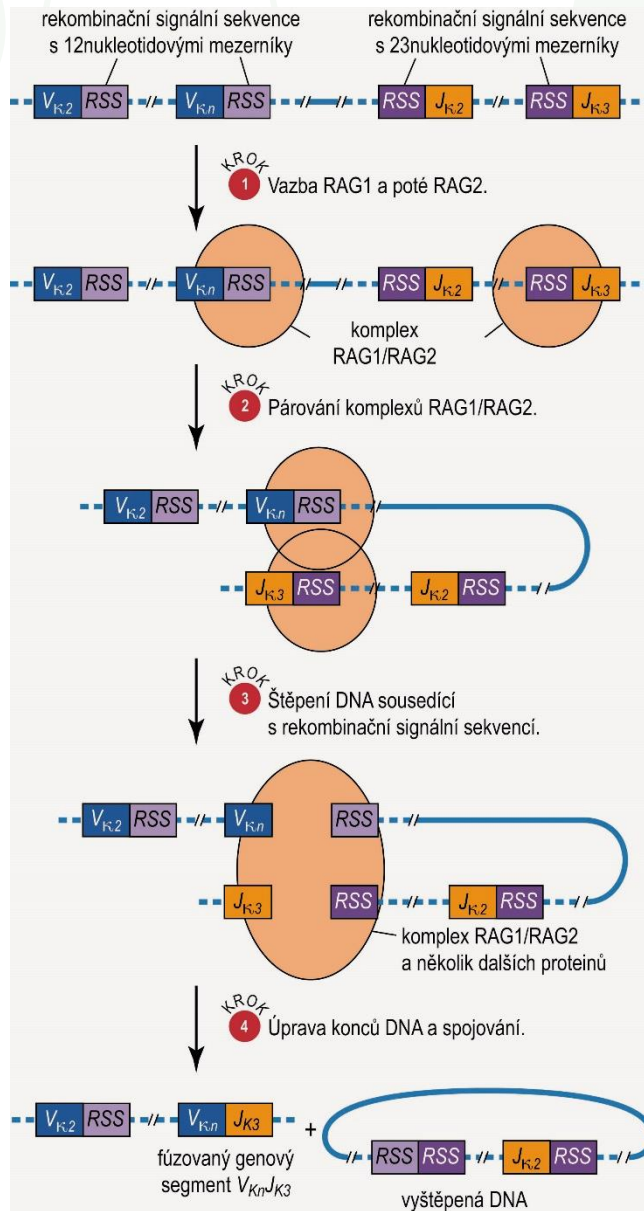
heptamer-mezerník-nonamer
= **recombination signal sequence (RSS)**

RAG1 a RAG2 proteiny = **V(D)J rekombináza**
(recombination-activating gene)

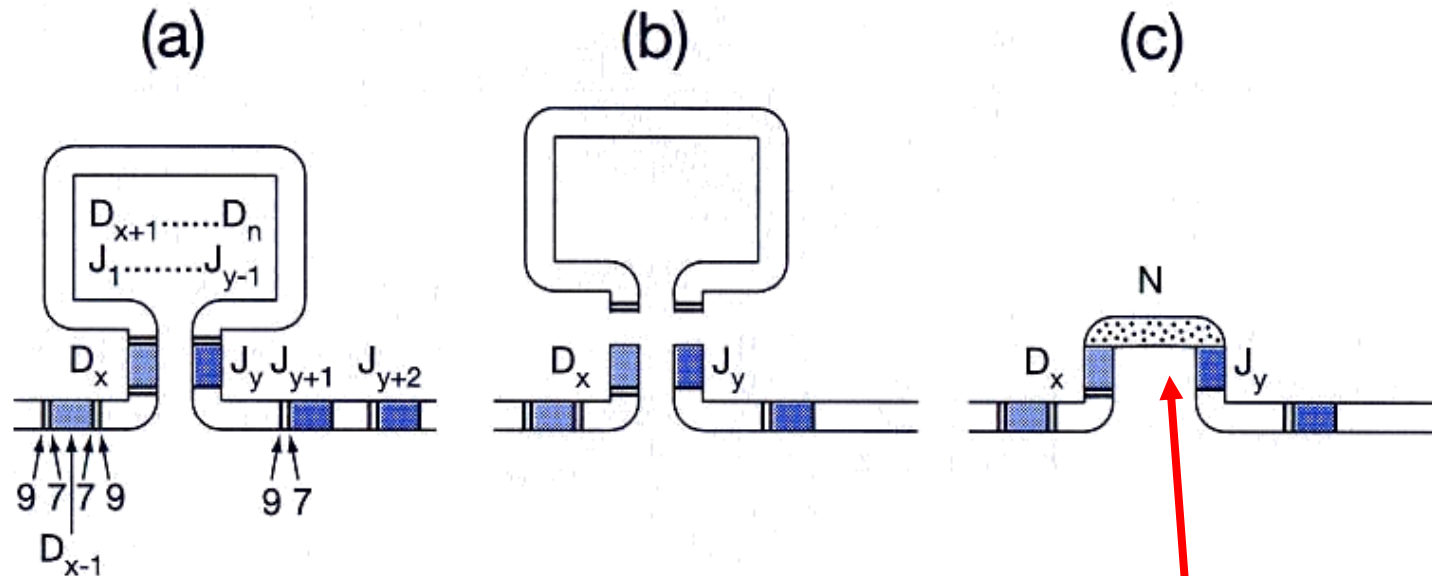
vznik nepřesných spojení

12 a 23 bp mezerníky

Spojování genových segmentů J a V

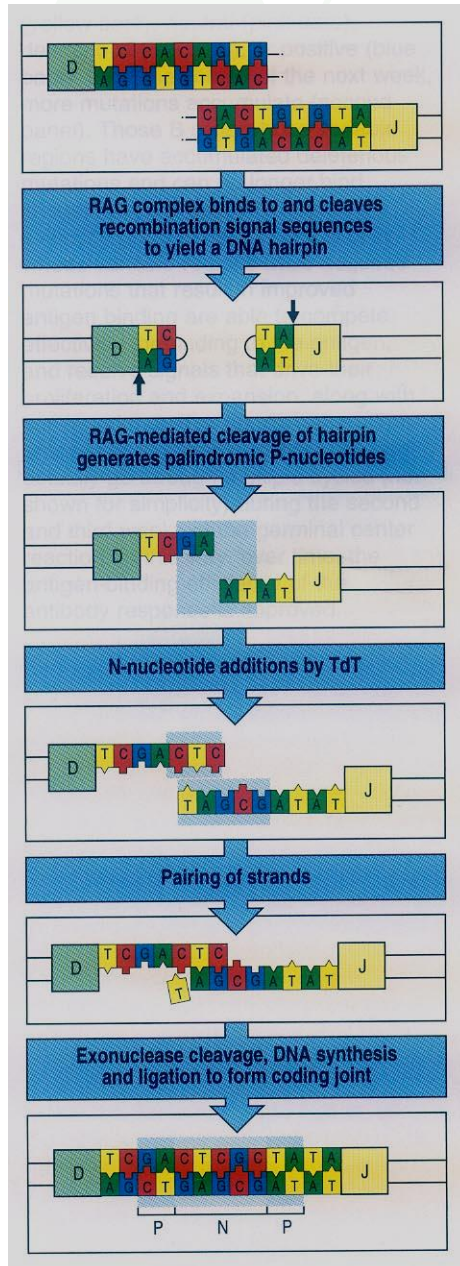


Schematické znázornění vzniku nepřesných spojení mezi D a J



- vytvoření smyčky po spárování nonamerů a heptamerů
- vyštěpení smyčky rekombinázou
- působením **terminální transferázy, DNA-polymerázy a ligázy** se konce D a J spojí - v místě spojení je krátká náhodná (nově vytvořená) sekvence

Průběh spojování subgenů D a J – vznik variabilních spojení



komplex rekombinázy RAG vytváří na heptamerových sekvencích vlásenky, které následně štěpí

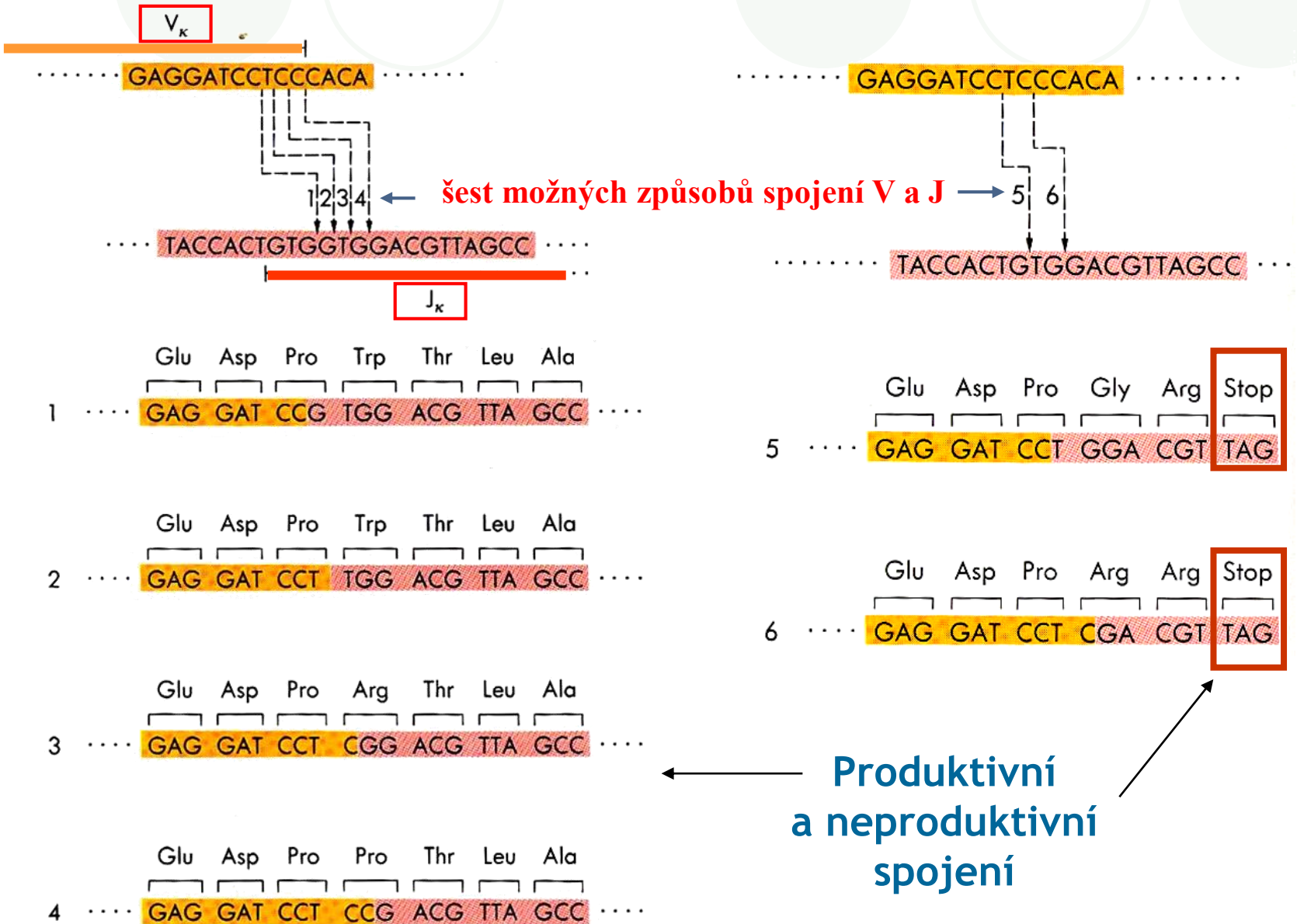
Terminální deoxynukleotidyl transferáza (TdT) připojuje náhodně nukleotidy (N) na konce jednořetězců

Nespárované nukleotidy jsou odstraněny exonukleázou a jsou nahrazeny reparační syntézou

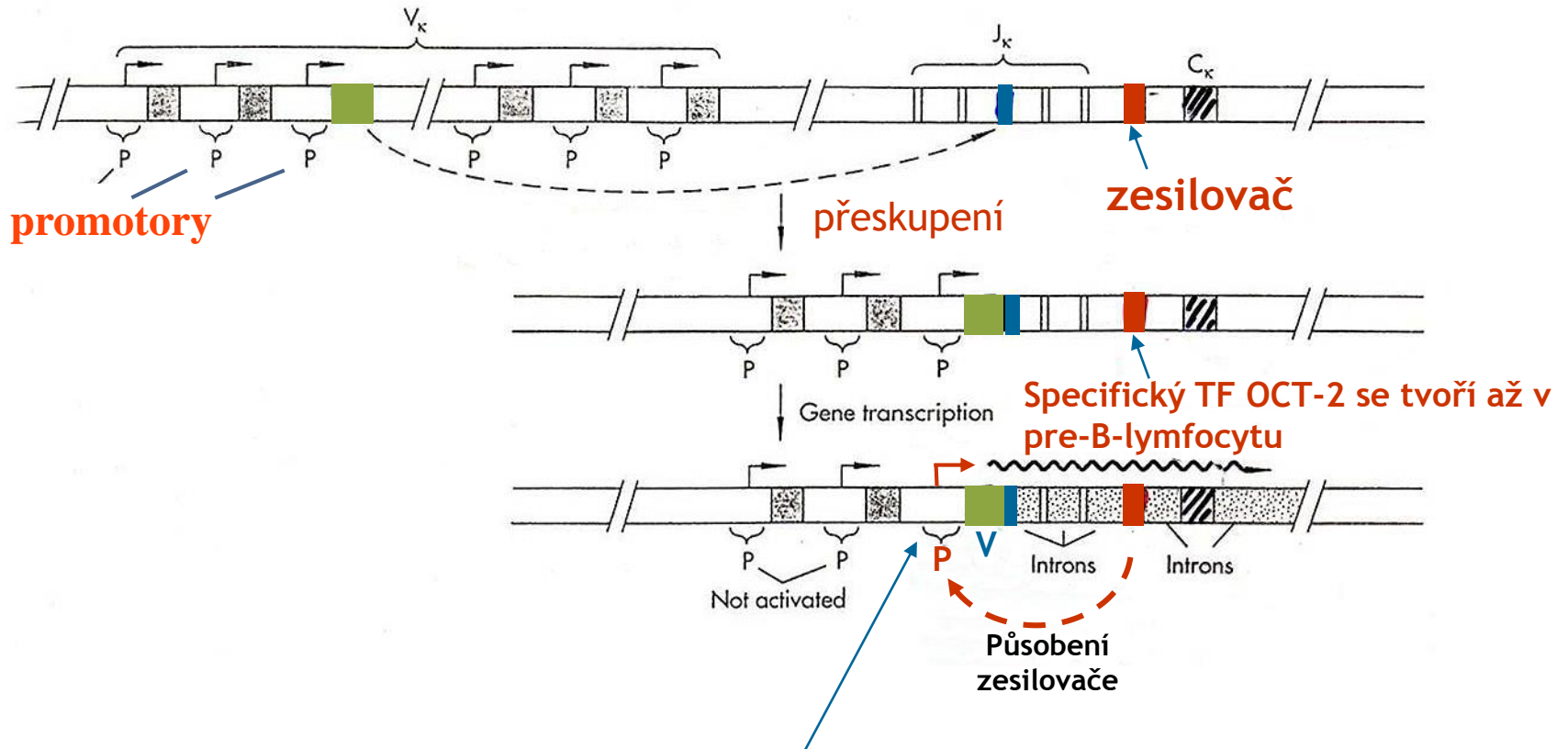
P = palindromové nukleotidy tvořící vlásenku,

N = „netemplátové“ nukleotidy

Nepřesná spojení mezi V a J subgeny vytvářejí další zdroj rozmanitosti protilátek



Aktivace transkripce po přeskupení subgenů



Transkripce probíhá jen z promotoru toho V subgenu, který je nejbližší zesilovači

Izotypový přesmyk

Přesmyk tříd = přechod Ig z jedné třídy do jiné

Probíhá na úrovni těžkých řetězců

Variabilní oblast těžkého řetězce zůstává zachována, mění se konstantní oblast, zodpovědná za efektorové funkce

A. Přesmyk na úrovni transkripce (úprava mRNA)

- přechod z IgM z membránového na sekretovaný
- přechod z IgM na IgD

přepis překrývajících se transkripčních jednotek ze stejného promotoru, končících různými polyadenylačními signály (terminátory)

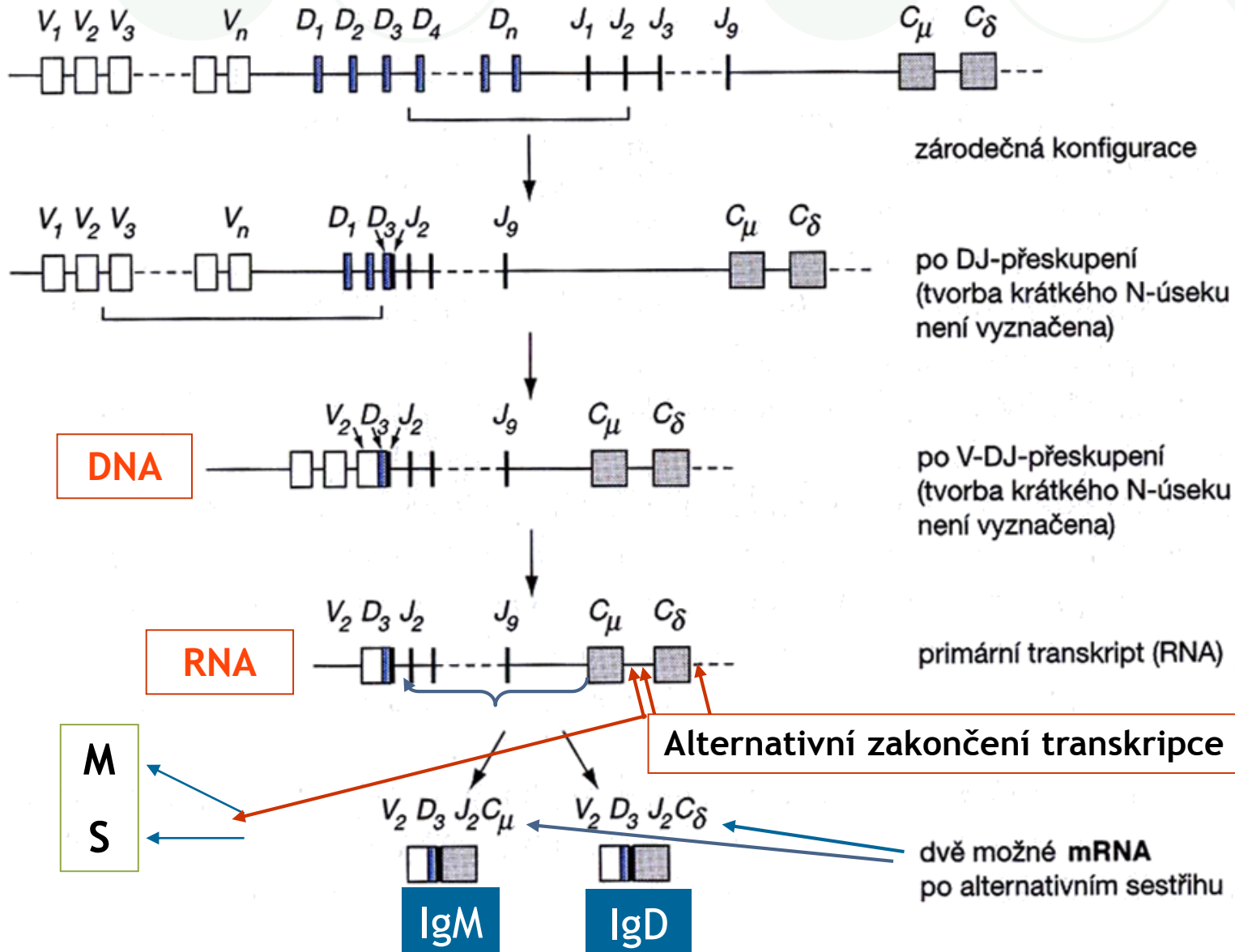
B. Přesmyk na úrovni DNA

- vytvořený exon L-VDJ_H se připojuje k různým subgenům C po deleci sekvence mezi J a některými C
- přesmyk je řízen signály přesmyku (S) = sekvence na 5' konci C_H subgenů za účasti enzymů

Charakteristika izotypů lidských imunoglobulinů

Izotyp	M.h. (kDa)	Obsah v séru (g/l)	Lokalizace	Biologický poločas (dny)	Funkce
IgG	155	8–18	sérum, intersticiální tekutina	21	opsonizace; neutralizace; přestupuje placentu; sekundární odpověď
IgA	160–1000	0,9–3,5	sérum, slzy, sliny, povrch sliznic, mléko	6	ochrana sliznic, opsonizace
IgM	900	0,9–2,5	sérum, povrch B-buněk	6	aktivace komplementu; primární odpověď; receptor pro antigen
IgD	180	0,1	sérum, povrch B-buněk	3	receptor pro antigen
IgE	190	3×10^{-4}	sérum, intersticiální tekutina	2	ochrana proti parazitům

Průběh přeskupování subgenů a alternativní sestřih hnRNA u těžkých řetězců - **změny na úrovni transkripce**



Formy protilátek (imunoglobulinů)

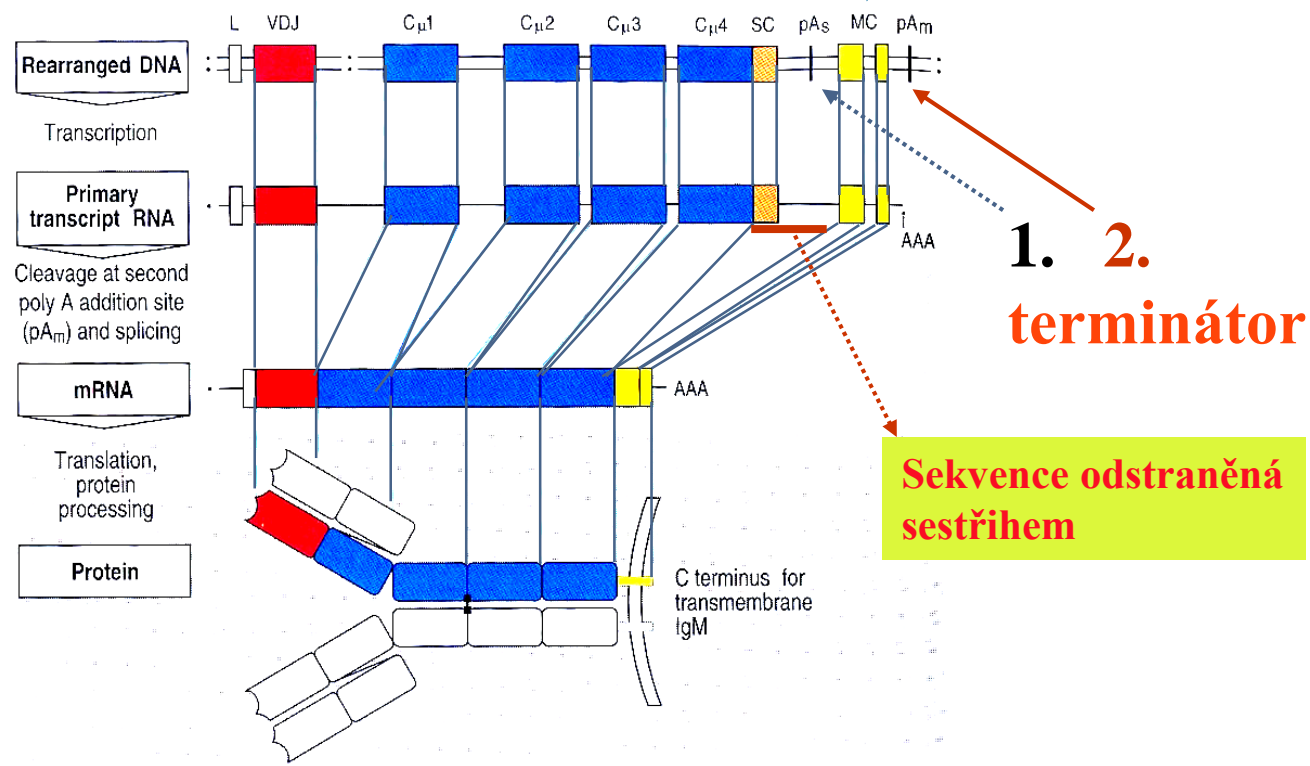
Dvě formy protilátek (imunoglobulinů)

- **Povrchové n. transmembránové** = BCR-receptor (B-lymfocytový receptor) = receptor pro antigeny, zajišťuje přenos signálu do buňky
- **Sekretované** = uvolňované do prostředí

Vznik membránové formy IgM

mebránová forma

Membrane-coding sequence MC -
sekvence určující zakotvení v
membráně

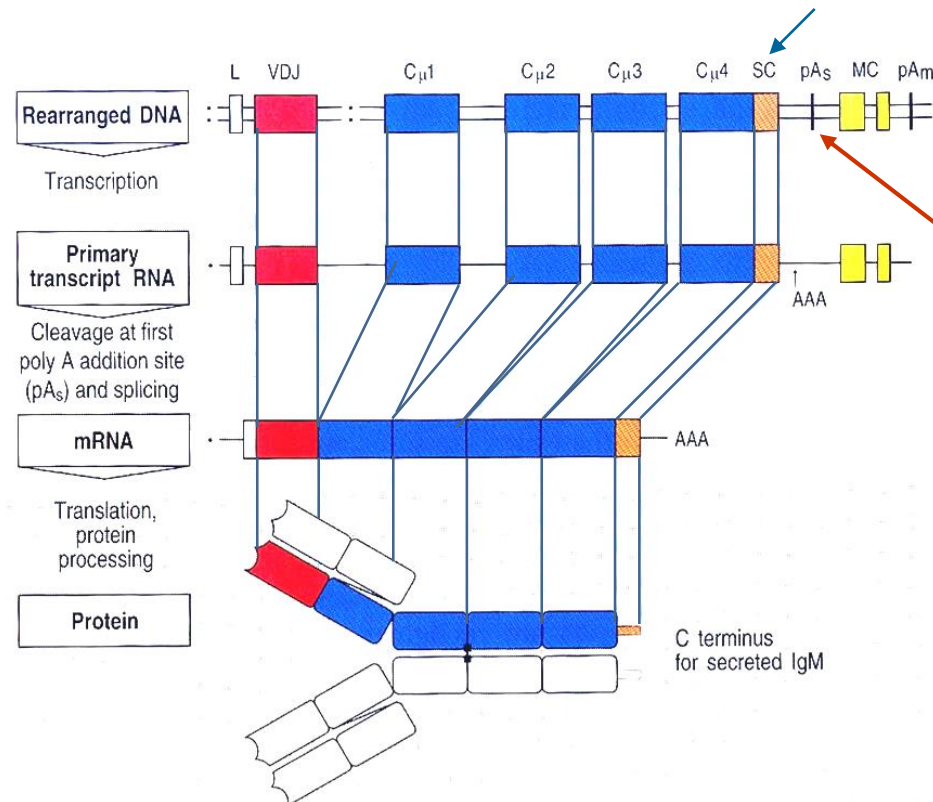


Transkripce končí na druhém (vzdálenějším) terminátoru a sestřihem je odstraněn úsek RNA kódující hydrofilní aminokyseliny (SC). Vytváří se protilátka IgM, která je ukotvena v membráně.

Vznik sekretované formy IgM

sekretovaná forma

Secretion-coding sequence SC
Sekvence určující uvolnění
protilátky z buňky

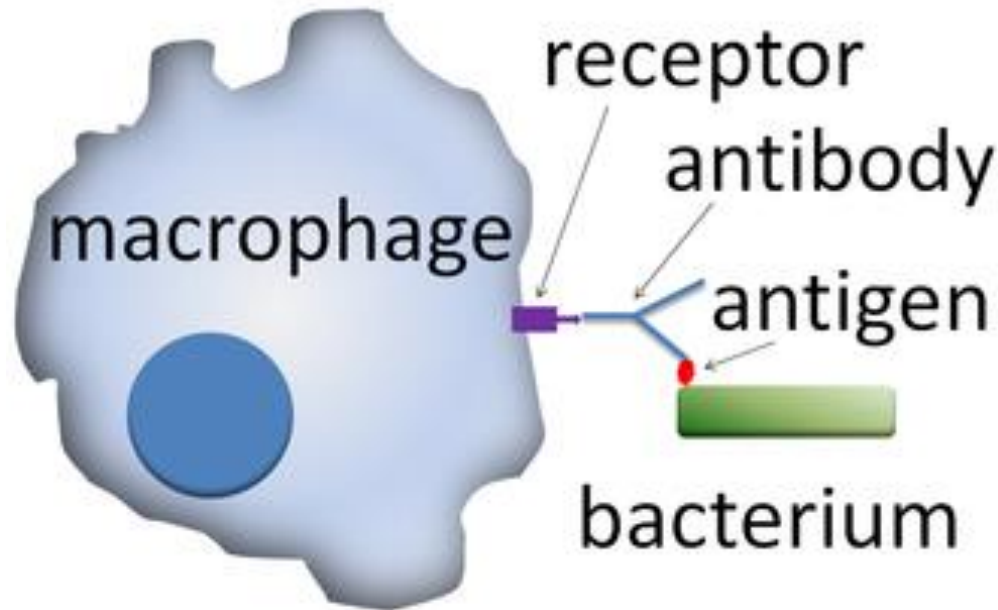


1. terminátor

Transkripce končí na prvním terminátoru, vzniklý transkript neobsahuje část kódující hydrofobní aminokyseliny (MC) a vzniká protilátka, která se uvolňuje z buňky

Změnu v RNA transkriptu H-řetězce indukuje aktivace B buňky antigenem

Makrofág, který se pomocí svého Fc receptoru váže na protilátky, které opsonizují povrch bakterie

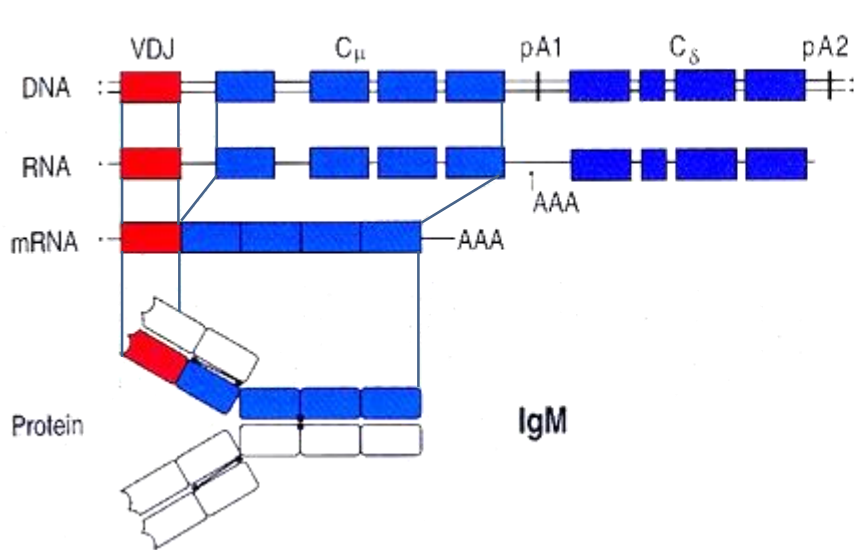


Opsonizace = navázání určitých látek na povrch antigenu, které navozuje jeho fagocytózu imunitními buňkami.

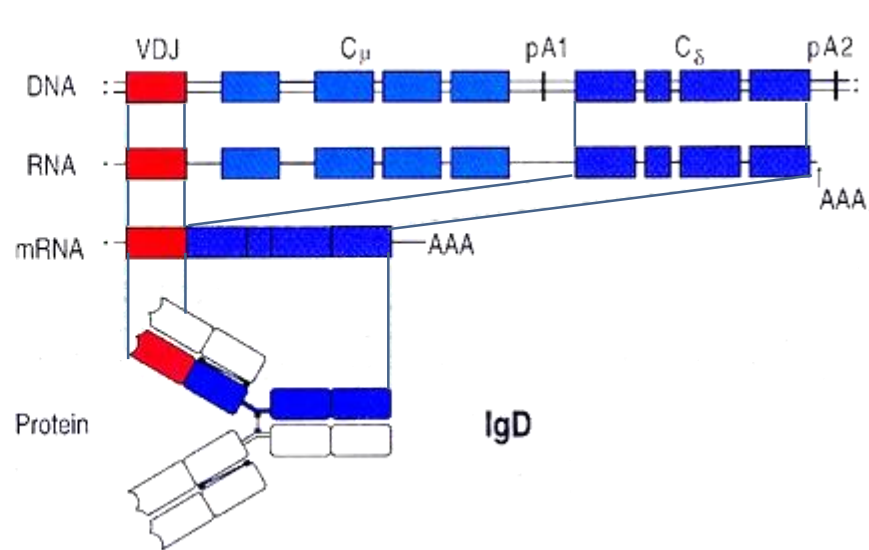
Opsoniny = látky, jež se vážou na povrch antigenů. Mezi nejčastější opsoniny patří protilátky a složky komplementu C

Koexprese IgM a IgD regulovaná úpravou transkriptu

Exprese IgM



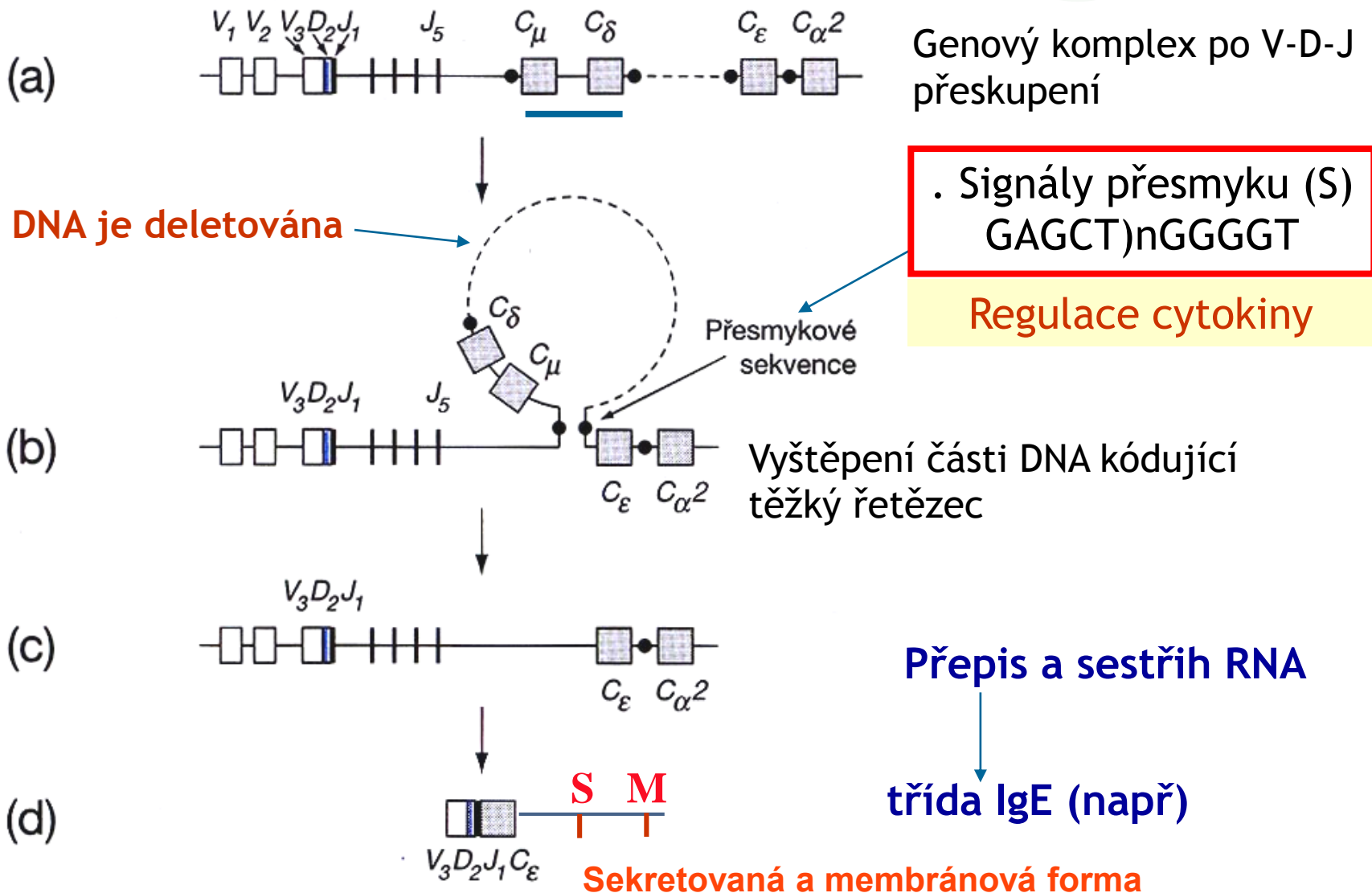
Exprese IgD



Ve zralých B-buňkách začíná transkripce na promotoru V_H a pokračuje přes exony C_μ a C_δ . Ukončení transkripce v pA1 a následný sestřih vede k tvorbě mRNA kódující těžký řetězec μ , zatímco ukončení transkripce v pA2 a následný odlišný způsob sestřihu odstraní exony C_μ a vzniklá mRNA pak kóduje těžký řetězec δ .

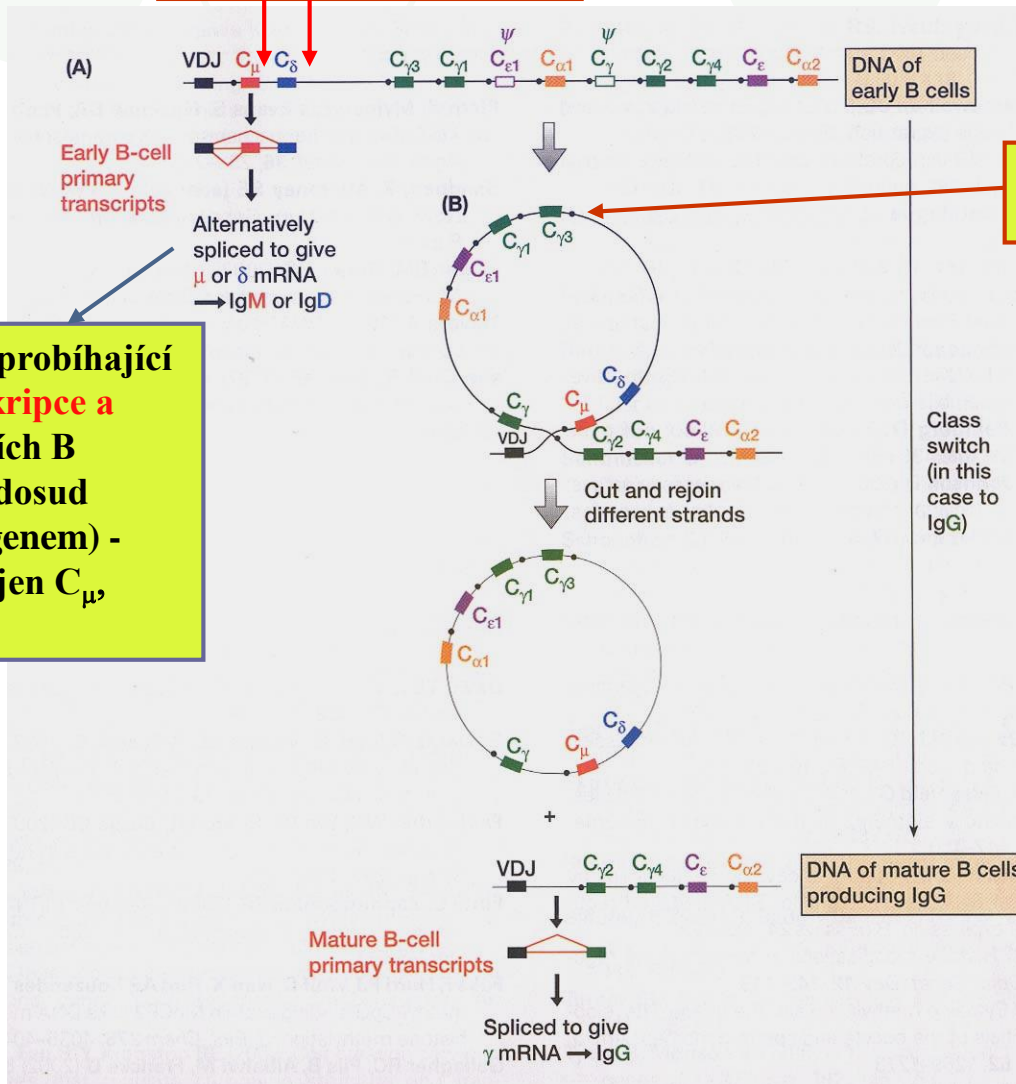
Oba způsoby transkripce mohou probíhat paralelně, takže v buňkách dochází k současné produkci IgM a IgD

Přesmyk tříd (izotypový přesmyk) při diferenciaci B lymfocytů



Přesmyky tříd probíhající u těžkých řetězců

chybí signál přesmyku

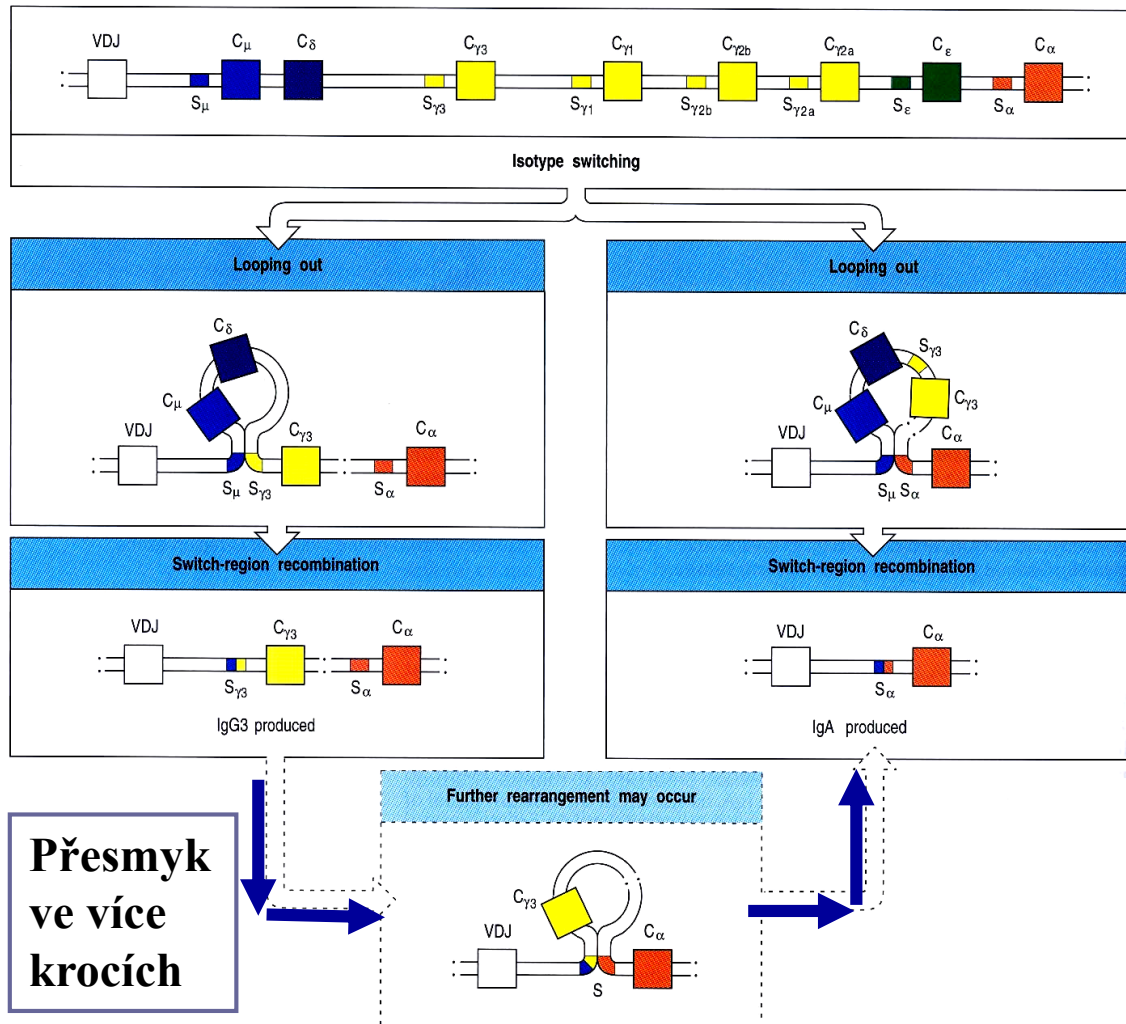


• signály přesmyku

Časný přesmyk probíhající na úrovni transkripce a sestřihu u naivních B buněk (které se dosud nesetkaly s antigenem) - nejdříve vzniká jen C_μ, později též C_δ.

Pozdní přesmyk probíhající intrachromatidovou rekombinací během zrání B buněk (v jednom nebo více krocích)

Izotypové přesmyky mohou probíhat sekvenčně, dokud je možné zatím nevyštěpené C subgeny eliminovat



Alelická a izotypová exkluze

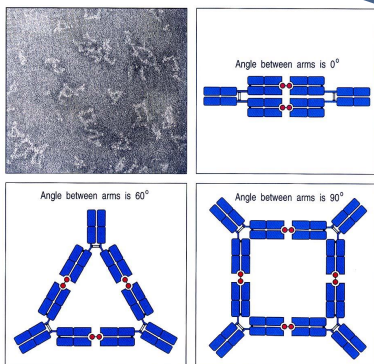
Alelická exkluze

Během vývoje B-buňky jsou aktivovány pouze geny jednoho z rodičů (nejasný mechanismus)

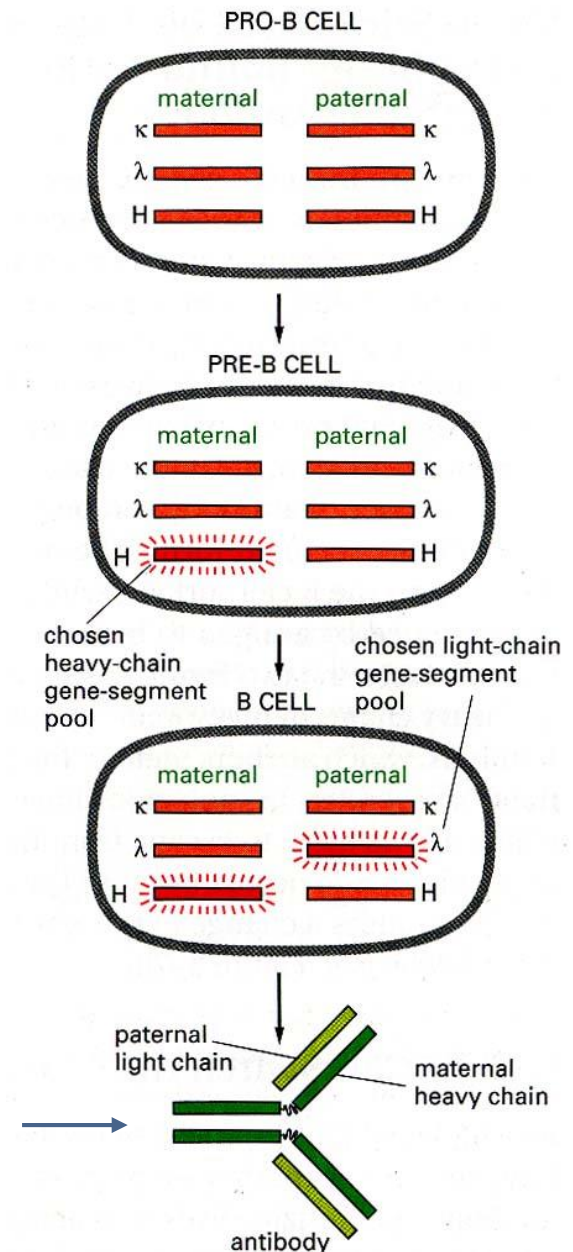
Izotypická exkluze

Z lehkých řetězců je aktivován pouze jeden z možných typů: lambda nebo kappa

Výsledná buňka tvoří protilátku obsahující jedinečné vazebné místo pro antigen



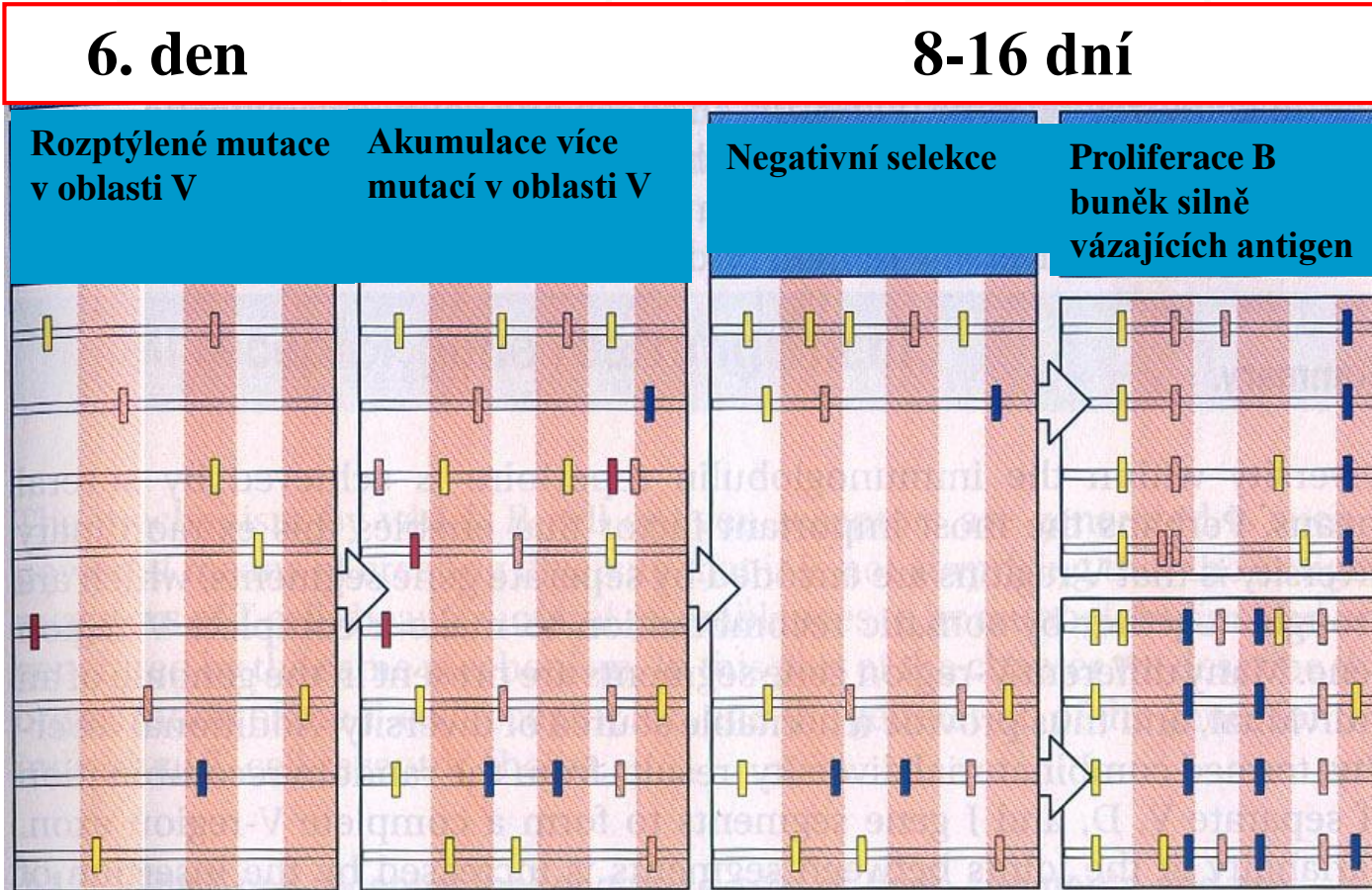
Monospecifická protilátka



Časový průběh vytváření H- a L-řetězců protilátek

1. Nejříve se v pre-B lymfocytu vytvoří těžký řetězec typu μ – probíhají pokusy o přeskupení u obou alel – jakmile se to u jedné podaří, přeskupování u druhé alely se zastaví.
2. Zatím však není vytvořen lehký řetězec a těžký řetězec se páruje s „náhradním“ L- řetězcem (ψ L), složeným ze dvou malých proteinů. Vzniká pre-B receptor.
3. Po obdržení signálu (??) z jiných buněk začne přeskupování subgenů pro L- řetězec.
4. Nejříve se začnou přeskupovat subgeny pro L řetězec typu κ . Pokud vznikne funkční L řetězec, zastaví se přeskupování druhé alely κ . Pokud ne, začnou se obdobně přeskupovat alely λ . Pokud se to nepodaří a nebo se **vytvoří L řetězec, který se nemůže spojit s H řetězcem**, pre-B lymfocyt zaniká.

Vznik somatických hypermutací v přeskupené variabilní oblasti imunoglobulinového řetězce (**afinitní maturace**)



Vznikají různé typy mutací, z nichž některé vedou k zesílení vazby antigenu protilátkou; buňky, které takové protilátky tvoří, proliferují.

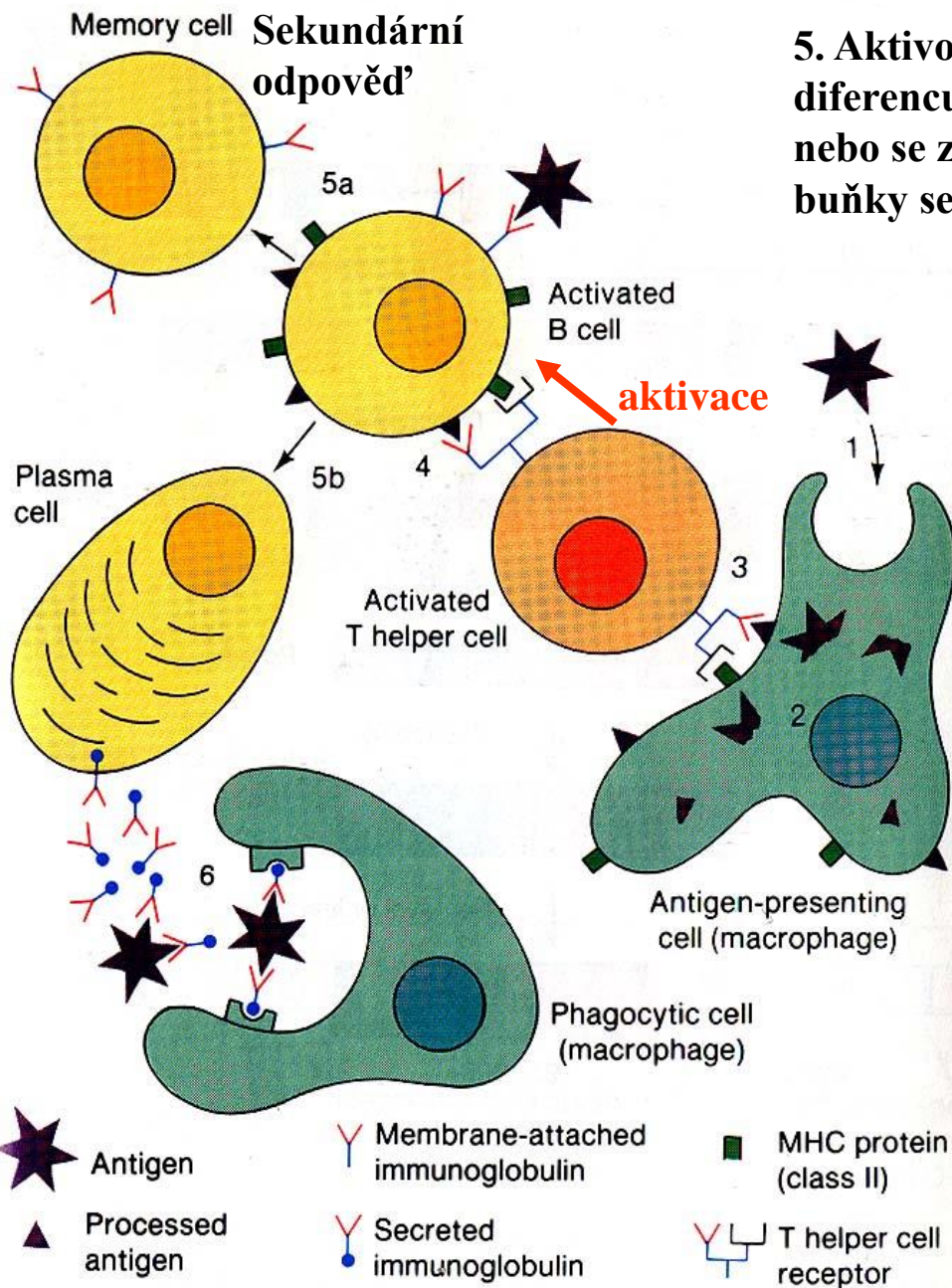
Příklad mutace: Deaminace cytozinu na uracil, pak reparace

Příčiny rozmanitosti protilátek **(specifita vazby antigenů)**

- 1. Přeskupování V-D-J-subgenů** - somatická rekombinace, náhodné spojování V, D a J
- 2. Nepřesná spojení V-J (V-D-J)** - delece, inserce, reparace v místech spojování subgenů
- 3. Kombinace lehkých a těžkých řetězců** - náhodný proces
- 4. Somatické hypermutace v okolí V** - vysoká frekvence mutací po styku zralého B-lymfocyту s antigenem

Humorální imunitní odpověď k infekci zprostředkovaná B-buňkami

Vysoká frekvence mutací



5. Aktivované B buňky se buď diferencují na paměťové buňky (5a), nebo se z nich stávají plazmatické buňky sekretující antigen (5b)

1. Makrofág pojme antigen

2. Makrofág antigen zpracuje a jeho složky vystaví na povrchu prostřednictvím MHC II

3. Antigen je rozpoznán pomocnou T buňkou, která (4) aktivuje B-buňky, které rovněž nesou části antigenu

6. Protilátky vážou antigen, tím vytvářejí komplex, který je zničen makrofágem

MHC-molekuly (glykoproteiny)

hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex) - lidské MHC: HLA (human leucocyte antigens)

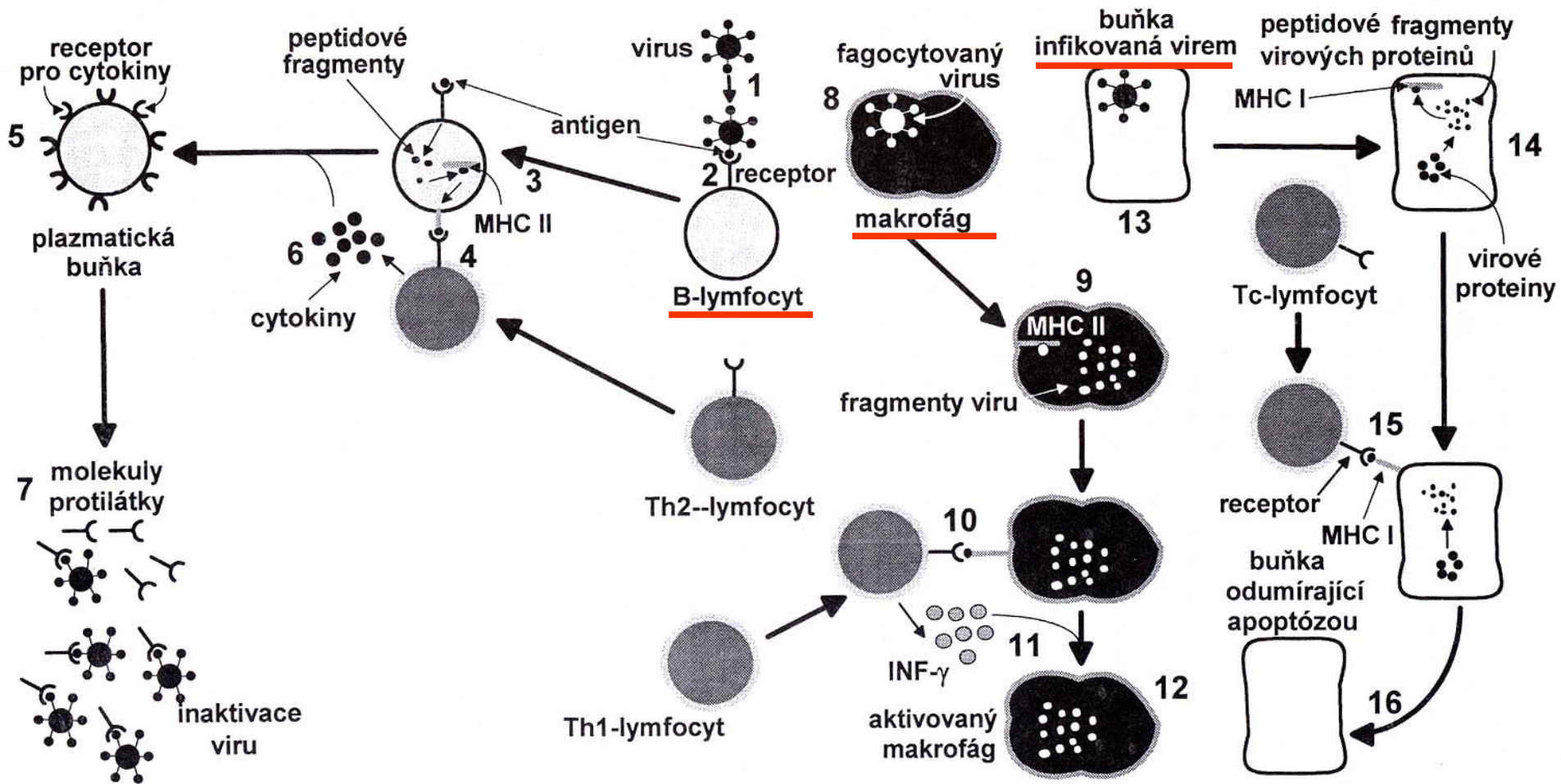
Funkce MHC glykoproteinů

vazba peptidových fragmentů cizorodých proteinů (antigenů) a vystavovat je na buněčném povrchu tak, aby byly potenciálně rozpoznatelné T lymfocyty.

MHC gp I - jsou na všech buňkách organismu: vazba peptidů produkovaných buňkou po odbourání struktur patogena (bakterie, viry)

MHC gp II - jsou na buňkách prezentujících antigen: vazba peptidů pohlcených buňkou a odbouraných makrofágy a B-lymfocyty

Globální schema humorální a buněčné imunitní odpovědi

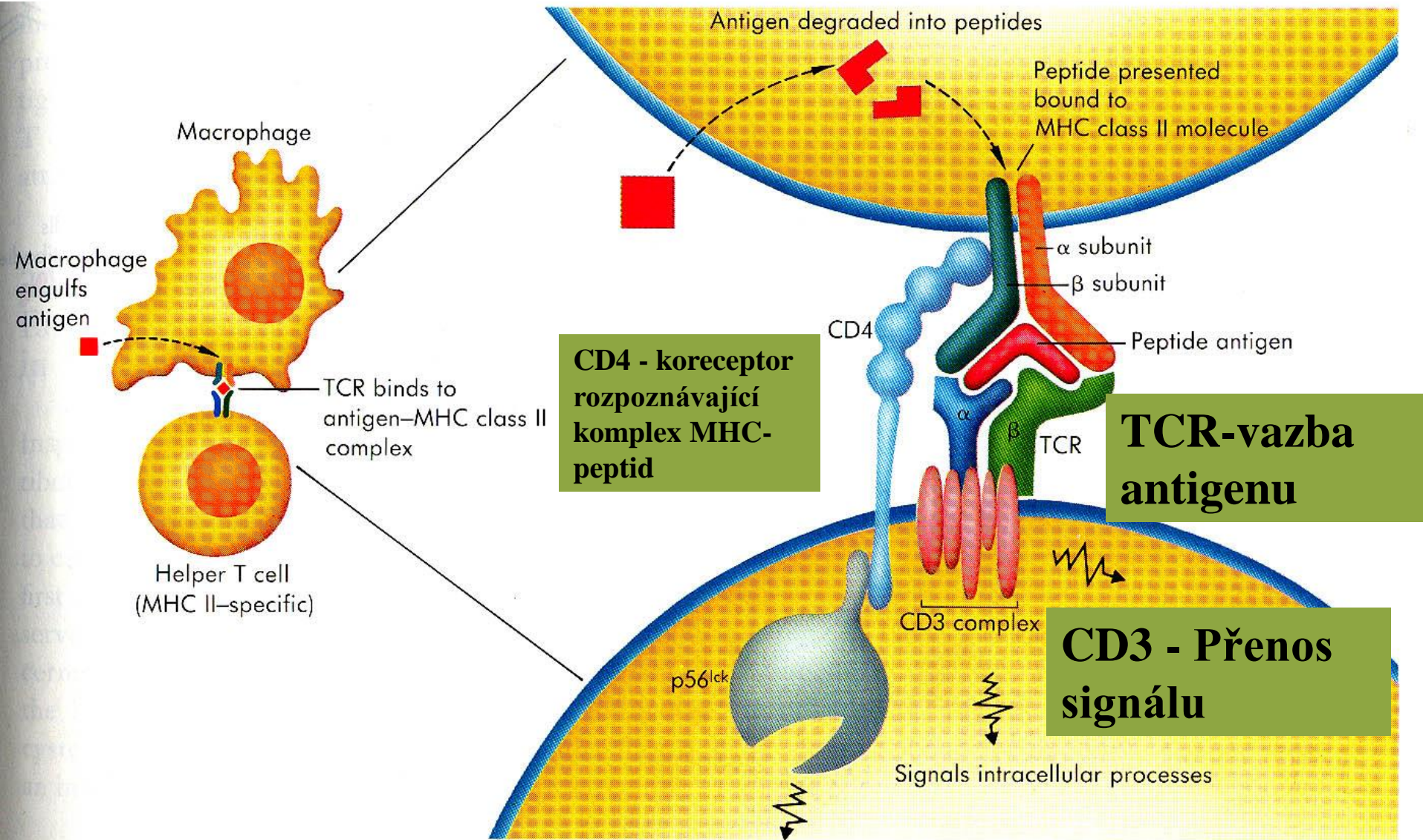


Humorální imunita - zprostředkovaná B-lymfocyty (3,5,7)

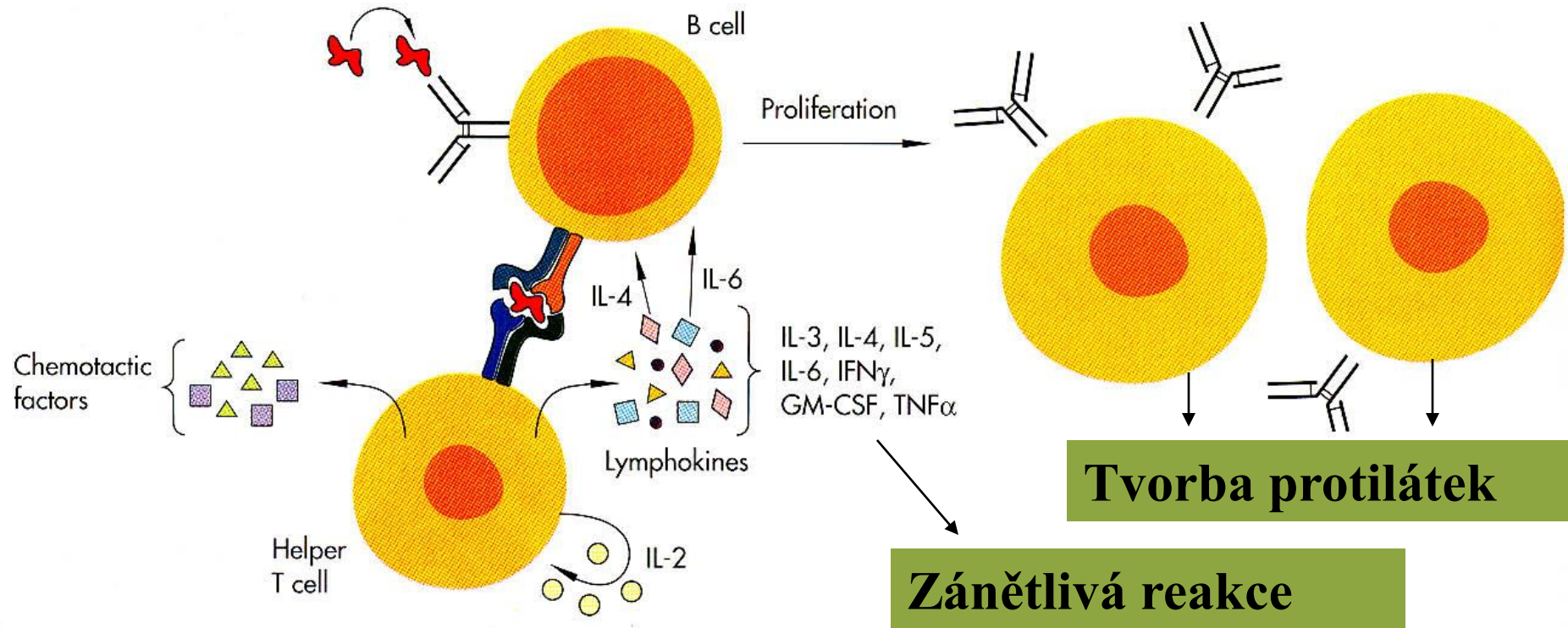
Buněčná imunita - zprostředkovaná T-lymfocyty

Rozpoznání buněk infikovaných virem T-lymfocyty

komplex MHC gpI-peptid je rozpoznán TCR, signál navodí v T-buňce tvorbu enzymů degradujících infikovanou buňku



Po navázání T-buňky na B-lymfocyt prezentující antigen začíná T-buňky syntetizovat lymfokiny, které pak stimulují proliferaci jak T-buněk tak i B-lymfocytů, které se pak mění na plazmatické buňky vytvářejí velká množství protilátek



IL = interleukin, TNF = tumor nekrotizující faktóir, IFN- interferon

Antigen (virus) je zachycen receptorem (protilátkou) na povrchu B-lymfocytu, který je tím aktivován, proliferuje a diferencuje se na plazmatické buňky, které pak uvolňují protilátky do prostředí. Uvnitř B-lymfocytu je antigen rozložen na peptidy, které jsou prostřednictvím MHC zanořeny do povrchu, kde je rozeznávají T-lymfocyty. T-lymfocyty tvoří cytokiny, které stimulují proliferaci plazmatických buněk tvořících protilátky.

V lymfatických uzlinách se vytvářejí makrofágy pohlcující antigeny, které jsou v nich rozloženy na peptidy a pomocí HMC vystaveny na povrch, kde jsou rozpoznány T-lymfocyty – ty zvyšují aktivitu makrofágů tvorbou cytokinů (interferon).

Somatické buňky infikované viry (bakteriemi) je rozloží na peptidy, které pomocí MHC vystaví na povrch, kde jsou rozpoznány T-lymfocyty a dochází k indukci apoptózy.

