

Molekulární imunologie

Termínem „**imunita**“ označujeme všechny mechanismy, které tělo používá při své ochraně proti cizorodým činidlům (mikroorganismům, chemikáliím, alergenům) – tj. antigenům.

Historické členění imunitních reakcí:

- vrozené
- získané

Vrozená imunita

- nespecifická
- nevyužívá paměti

Využívá přirozených bariér organismu

- fyzikální – kůže, mukózní membrány, kašlový reflex
- chemické – pH, trávicí enzymy, vylučované mastné kyseliny
- biologické – mikroflóra (zabránění kolonizace vnitřních a vnějších povrchů patogeny)

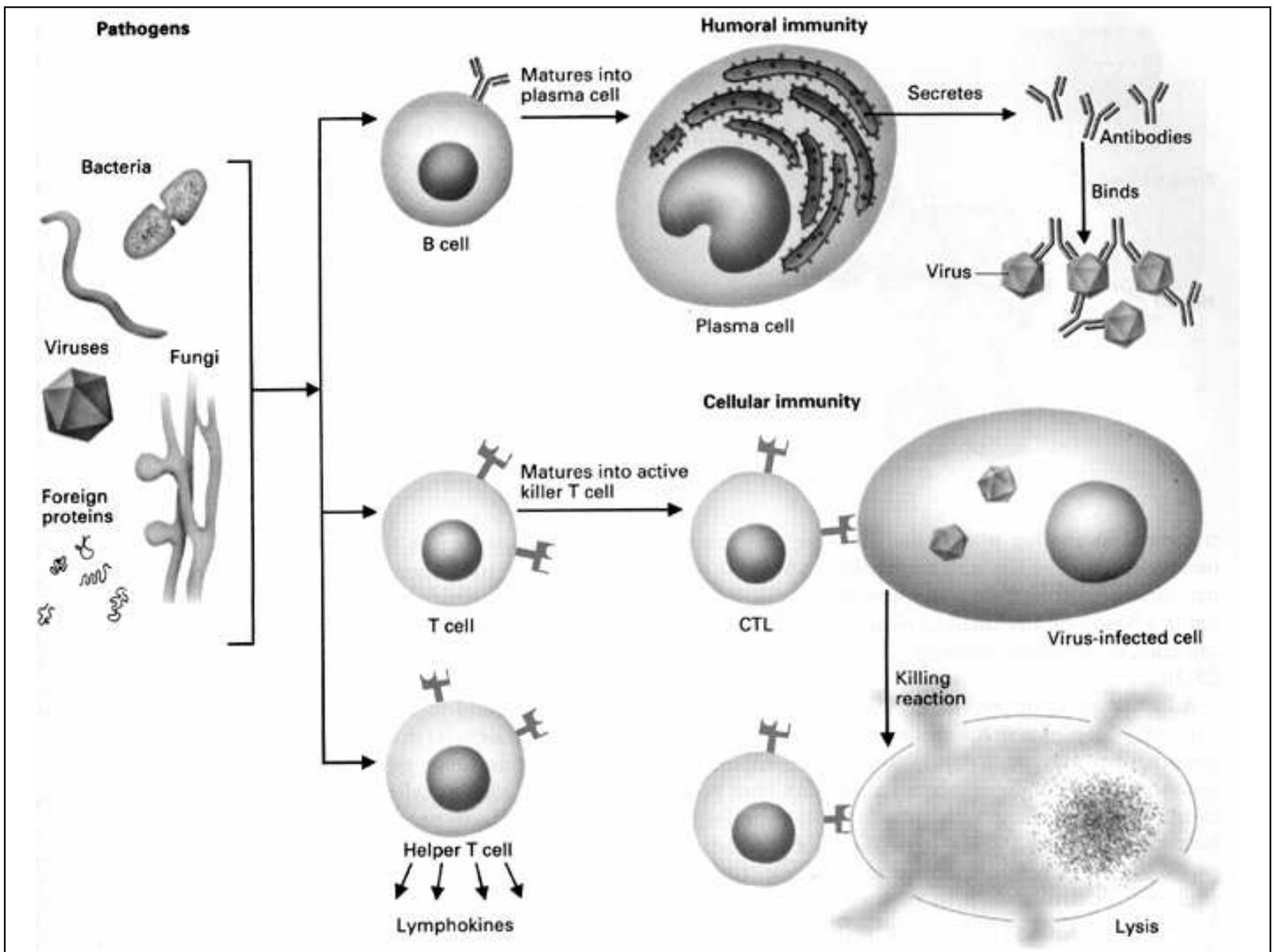
• Přílišné dávky antibiotik poškozuje mikroflóru – zvýšené nebezpečí infekce některými kvasinkami a bakteriemi.

Získaná (adaptivní) imunita

- specifická
- využívá paměti

Využívá specifických ochranných systémů organismu

- B-lymfocyty a plasmatické buňky (sekrece protilátek)
- T-lymfocyty (sekrece cytokinů, cytotoxicita pro infikované buňky, nádory, cizí tkáně)



Humorální a buněčná imunita

Na přítomnost patogenu reaguje imunitní systém třemi typy reakcí:

- buňky humorálního systému (B buňky) vylučují protilátky, které se vážou na patogen
- buňky buněčného systému (T buňky) mají dvě funkce:
 - vyvíjejí se v zabíječské buňky a likvidují infikované buňky
 - pomocné T buňky vylučují lymfokiny a celkově tak stimulují imunitní systém

Buněčná imunita - klasifikace leukocytů

A. Fagocyty

B. Granulocyty

C. Lymfocyty

D. Cytotoxické buňky

A. Fagocyty

Funkce: Pohlcují a rozkládají cizorodé částice

Hlavní typy fagocytujících buněk:

1. Monocyty (mononukleární fagocyty)
2. Neutrofilní granulocyty (polymorfonukleární neutrofily)
3. Eosinofilní granulocyty

A1. Monocyty

- volně cirkulují v krvi
- Schopny přechodu z krevního řečiště do tkání (změna na makrofágy)
- Fagocytující buňky fixované ve tkáních tvoří síť zvanou mononukleární fagocytový systém (dříve zvaný retikuloendoteliální systém)

A2. Neutrofilly

- Laločnaté jádro
- Přítomnost granulí
- Tvoří 70% všech leukocytů
- Důležité pro eliminaci bakteriálních infekcí
- Pohybují se krví, v tkáních se rychle rozpadají

A3. Eosinofily

- Likvidace parazitických červů
- Účast na zánětlivých reakcích

B. Granulocyty

- Neutrofilní, eosinofilní, bazofilní
- Zprostředkovávají zánětlivé procesy tím, že uvolňují obsah svých granulí

C. Lymfocyty

- B-lymfocyty (dozrávají v kostní dřeni)
- T-lymfocyty (dozrávají v brzlíku)

- Každý lymfocyt má na svém povrchu receptory specifické pro jediný antigen

C1. B-lymfocyty

- Povrchové receptory mají povahu membránově vázaných protilátek (imunoglobulinů)
- Interakce antigenu s receptorem na povrchu B-lymfocytu indukuje jeho dělení a diferenciaci do plasmatických buněk
- Plasmatické buňky vylučují velká množství protilátek do krve a tkáňových tekutin
- Po navázání protilátky je antigen neutralizován

C2. T-lymfocyty

- Nesou povrchové receptory zvané TCR
- Dělí se do dvou skupin:
 - Pomocné T buňky (TH)
 - Cytotoxické T buňky (Tc)

TH: - stimulace B buněk k produkci protilátek
- stimulace mononukleárních fagocytů k eliminaci patogenu

Tc: - eliminace nádorových buněk
- eliminace infikovaných buněk

D. Cytotoxické buňky

- Zabíjejí buňky tím, že produkují lytické enzymy a reaktivní metabolity kyslíku
- Cytotoxické schopnosti mají:
- Monocyty, makrofágy, neutrofily, eosinofily, Tc buňky
- Zabíječské buňky („natural killer cells“):
 - nemají antigen-specifické receptory
 - zabíjejí buňky infikované viry a buňky nádorové

Rozpustné imunitní faktory – humorální imunita

- Dříve pojem humorální imunita zahrnoval imunitu zajištěnou pouze protilátkami
- Dnes zahrnuje i další rozpustné faktory, které přispívají k ochraně organismu
- Klasifikace rozpustných imunitních faktorů:
 - A. Proteiny akutní fáze
 - B. Cytokiny
 - C. Protilátky

A. Proteiny akutní fáze

Skupina proteinů plasmy, jejichž koncentrace se během zánětlivého procesu několikanásobně zvyšuje

- Globuliny α , β , γ
- Protein CRP (C-reactive protein)
- komplement

- Zvýšení hladiny globulinu α_2 v plazmě signalizuje akutní zánět
- Zvýšení globulinu γ signalizuje chronické infekce nebo autoimunitní choroby
- CRP váže C-protein pneumokoků
- Komplement= heterogenní skupina proteinů séra, které přitahují fagocyty (chemotaxe) a lyzují bakterie

B. Cytokiny

- proteiny, které se uplatňují jako signální molekuly při imunitních reakcích

Klasifikace dle producenta:

- Lymfokiny – produkovány T-lymfocyty
- Monokiny – produkovány mononukleárními fagocyty

3 významé skupiny interferonů:

- Interferony
- Interleukiny
- TNF- α a TGF- β

B1. Interferony

- Produkovány během prvních fází virové infekce
- Představují první významnou ochranu proti mnoha virům
- objeveny v r. 1957 na pokusných zvířatech, která po infekci jedním typem viru získala rezistenci k jinému viru (Alick Isaacs, Jean Lindenmann)

Účinky interferonů

1. protivirový účinek

- interferon indukuje enzymy, které narušují metabolismus virových nukleových kyselin a tím tvorbu virových proteinů

a) protein kináza – inhibice syntézy DNA

b) 2-5 oligoadenylátsyntetáza – aktivace endoribonukleázy
– degradace virové RNA

Účinky interferonů

2. Inhibice růstu buněk

- interferon inhibuje přechod buněk z klidového stádia do aktivní proliferace
- interferon zpomaluje průchod S-fází cyklu
- nejvýraznější antiproliferativní účinek má interferon α
- inhibice růstu buněk vyvolaná interferonem je důsledkem jeho negativního vlivu na expresi určitých genů, jejichž produkty růst stimulují
- význam pro protinádorové terapie (inhibice exprese určitých onkogenů a rozklad nádorových buněk zabíječskými buňkami)
- terapeutické využití interferonů limitují nežádoucí vedlejší účinky

Účinky interferonů

3. Imunomodulační účinek

- interferon γ indukuje zvýšení exprese genů, jejichž produkty se podílejí na sestavování MHC II na povrchu lymfocytů a makrofágů a tím zvýrazňuje jejich cytotoxickou aktivitu
- interferony třídy I mají pozitivní vliv na schopnost B buněk syntetizovat protilátky

Klasifikace interferonů

- Tři typy: α , β , γ
- klasifikace založena na strukturní příbuznosti
- typ α je nejpočetnější (více než 20 členů)
- typy β a γ mají jen po jednom členu
- IFN α a β se shrnují do třídy I (produkovány buňkami infikovanými viry - dominantní je protivirový účinek)
- IFN γ je jediným zástupcem třídy II (produkován T-lymfocyty a NK buňkami - dominantní je imunomodulační účinek)

Interferon γ

- aktivuje zabíječské buňky
- aktivuje fagocytickou schopnost makrofágů
- stimuluje makrofágy k sekreci IL-1 (IL-1 indukuje tvorbu IL-2 u pomocných T buněk)

Molekulární mechanismus působení interferonů

- vazba interferonu na specifický povrchový receptor
- signál o vazbě interferonu na extracelulární doménu receptoru se přenese do domény orientované dovnitř buňky – vyslán signál, jehož konečným příjemcem jsou transkripční faktory – aktivace transkripce takových genů, které svými produkty potlačují replikaci viru
- interferonová signální dráha je přímočará (žádné proteiny G, žádné sekundární messengery) – místo toho speciální druh kináz – Janusovy kinázy

Signalizace interferony typu I

- interferony I rozeznávají stejné nebo obdobné receptory
- vazba interferonu na receptor vede k aktivaci dvou enzymů tyrosin kinázy 2 – Tyk2 a Janus kinázy 1 – JAK1
- tyto kinázy fosforylují tři proteiny: Stat1 13, Stat 91, Stat 84 (*signal transducers and transcription activators*)
- fosforylace těchto proteinů způsobuje jejich vzájemnou asociaci a spojení s jedním dalším proteinem – tvorba komplexu, který přímo aktivuje transkripci určitých genů které mají ve svých promotorech „interferon-stimulated response element“

Signalizace interferonem třídy II

- interferon γ se váže na receptor – aktivace dvou Janusových kináz – JAK1 a JAK2
- tyto kinázy fosforylují stejný protein Stat 91, který je napojen na signální dráhu IFN I
- fosforylovaný Stat 91 se spojuje s dalším proteinem a s další kopií sebe sama
- vzniklý komplex se váže na promotory obsahující “IFN γ -activation site”

B2. Interleukiny a faktory stimulující tvorbu kolonií

- Řídí dělení a diferenciaci mnoha buněčných typů
- IL jsou většinou produkovány T-buňkami
- CSF jsou obvykle produkovány monocyty a makrofágy

CSF = faktor stimulující tvorbu kolonií

- stimuluje tvorbu kolonií progenitorových buněk *in vitro*
- jeden faktor obvykle ovlivňuje tvorbu několika typů krevních buněk, ale pro jeden typ je hlavní (např. G-CSF pro kolonie granulocytů)

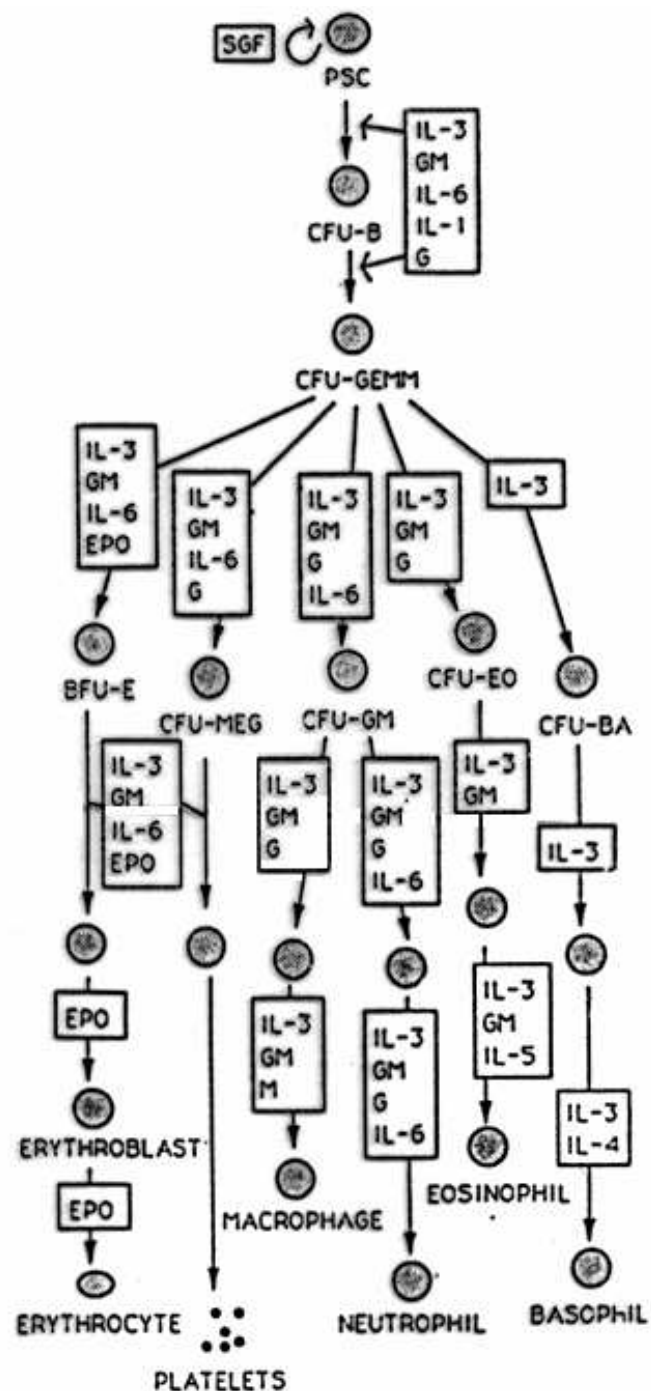


Fig. 3. Sites of action of GFs in hematopoietic differentiation. The abbreviations for stem and progenitor cells are identical to those indicated in Fig. 1. Several growth factors (indicated *within boxes*) synergize at various stages to induce optimal proliferation and differentiation of target cells. *IL* interleukin; *SGF* stem cell growth factor; *GM* GM-CSF; *G* G-CSF; *M* M-CSF; *EPO* erythropoietin

Some Colony-stimulating Factors (CSFs) That Influence Blood Cell

Formation

Factor	Size (in mouse)	Target Cells	Producing Cells
Erythropoietin	51,000 daltons	CFC-E	kidney cells
Interleukin 3 (IL-3)	25,000 daltons	pluripotent stem cell, most progenitor cells, many terminally differentiated cells	T lymphocytes, epidermal cells
Granulocyte/ macrophage CSF (GM-CSF)	23,000 daltons	GM progenitor cells	T lymphocytes, endothelial cells, fibroblasts
Granulocyte CSF (G-CSF)	25,000 daltons	GM progenitor cells and neutrophils	macrophages, fibroblasts
Macrophage CSF (M-CSF)	70,000 daltons (dimer)	GM progenitor cells and macrophages	fibroblasts, macrophages, endothelial cells

Klinické využití G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-3

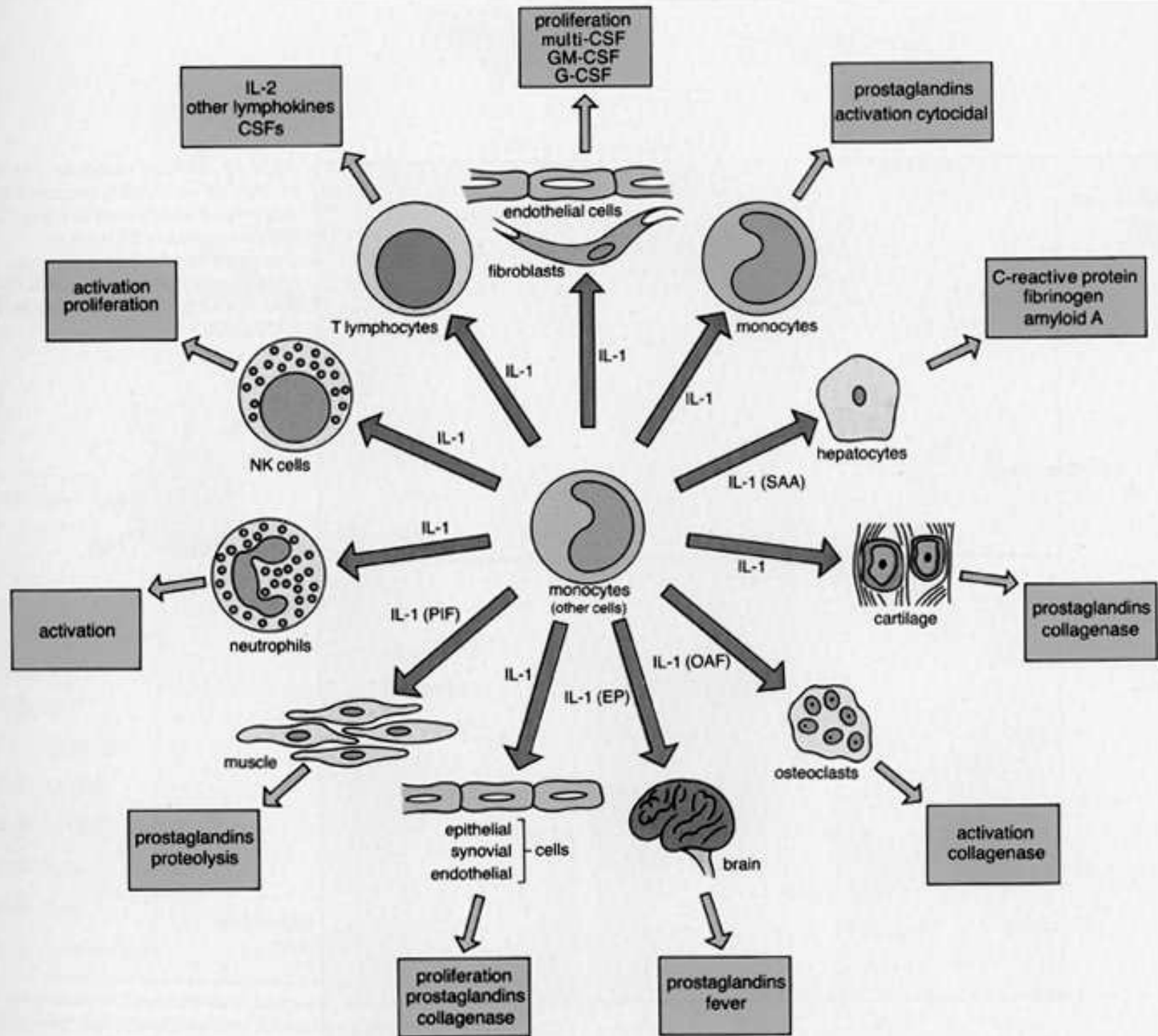
- pro stimulaci tvorby bílých krvinek
- obnova krvetvorby po chemoterapii
- při transplantacích kostní dřeně
- při léčbě AIDS
- při léčbě myelodysplazie, anemie, neutropenie, agranulocytózy

Interleukin-1

- produkt aktivovaných makrofágů, endoteliálních buněk, fibroblastů a T-buněk
- existuje ve dvou formách: α a β
- obě formy jsou biologicky aktivní
- podíl na aktivaci buněk při zánětlivých reakcích, při hojení, při imunitních reakcích a na řízení raných fází krvetvorby

Interleukin-1 - příklady účinků

- aktivace lymfocytů, neutrofilů, makrofágů, zabíječských buněk
- indukce proliferace osteoklastů, fibroblastů, epiteliálních, endoteliálních buněk
- indukce exprese antigenu MHC II
- indukce syntézy prostaglandinu a kolagenázy
- stimulace buněk kostní dřeně k produkci CSF



Interleukin-2

- stimulace proliferace T-lymfocytů a v menší míře také B buněk a monocytů
- indukce cytotoxické funkce stimulací proliferace a aktivity zabíječských buněk

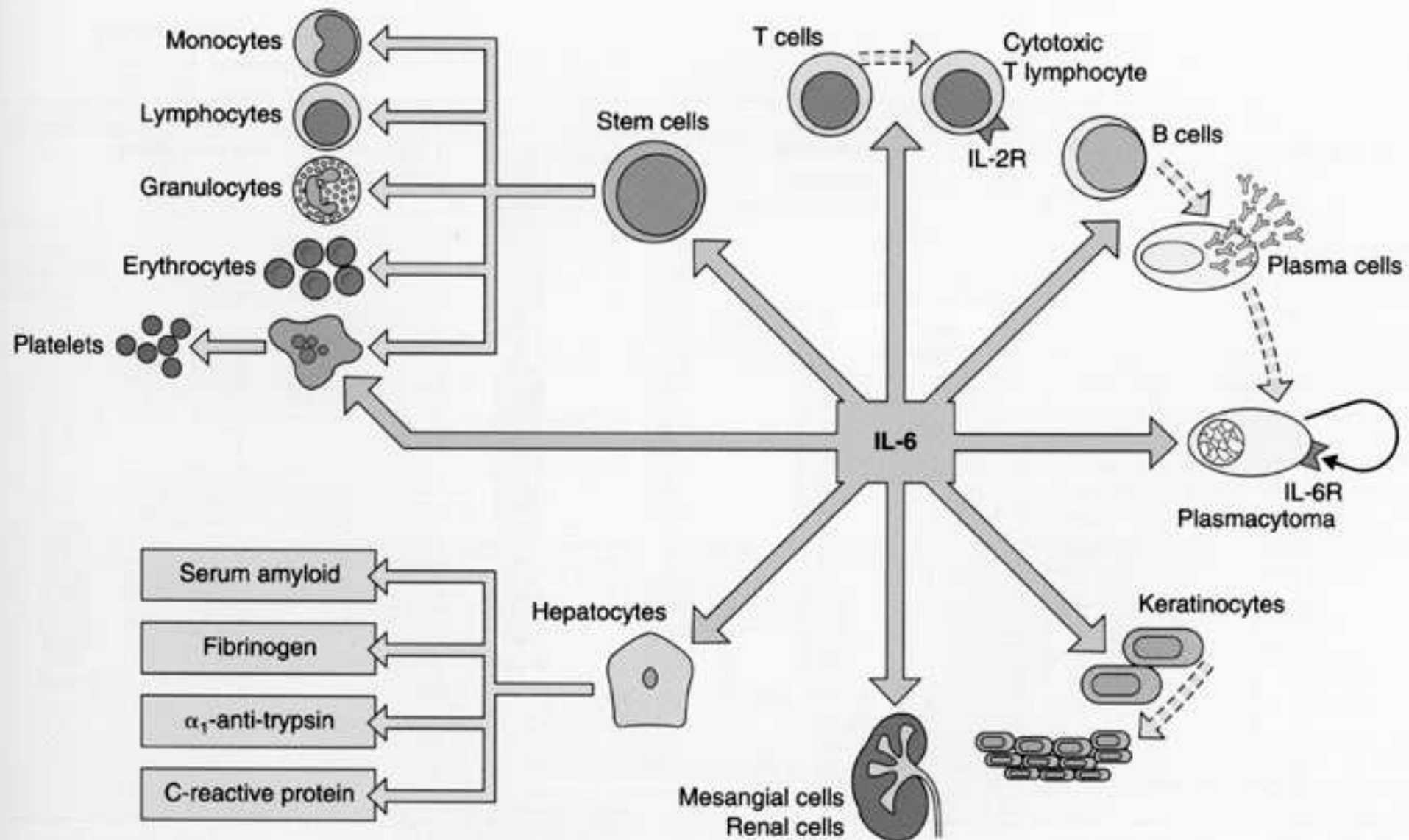
Interleukin-4

- účinky na krvetvorbu a vývoj B a T buněk
- nutný pro přepínání exprese imunoglobulinových tříd u vyvíjejících se B buněk

Interleukin-6

- rozmanité účinky na krvetvorbu a imunitní systém
- zvláště důležitý pro tvorbu krevních destiček

Rozmanité účinky IL-6



B3. TNF- α a TGF- β

- „Tumor necrosis factor“ podporuje zánětlivé a cytotoxické reakce
- „Transforming growth factor“ potlačuje zánětlivé a cytotoxické reakce

C. Protilátky

- Glykoproteiny produkované B buňkami a plasmatickými buňkami, které se specificky vážou k jedinému antigenu
- Důležité při eliminaci mimobuněčných patogenů (intracelulární patogeny jsou buňkou chráněny před protilátkami)

Zánět

Význam: nasměrování imunitního systému na poškozenou tkáň:

- zvýšení prokrvení infikované oblasti
- zvýšení permeability kapilár (umožnění průchodu cév pro větší molekuly)

Typy poškození, která vyvolávají zánět:

- nekróza tkáně
- zlomenina kosti
- spáleniny
- infekce
- alergie

Projevy zánětu

- hromadění tekutin (otok)
- zčervenání
- zvýšená teplota
- bolest

Úloha cytokinů při zánětu

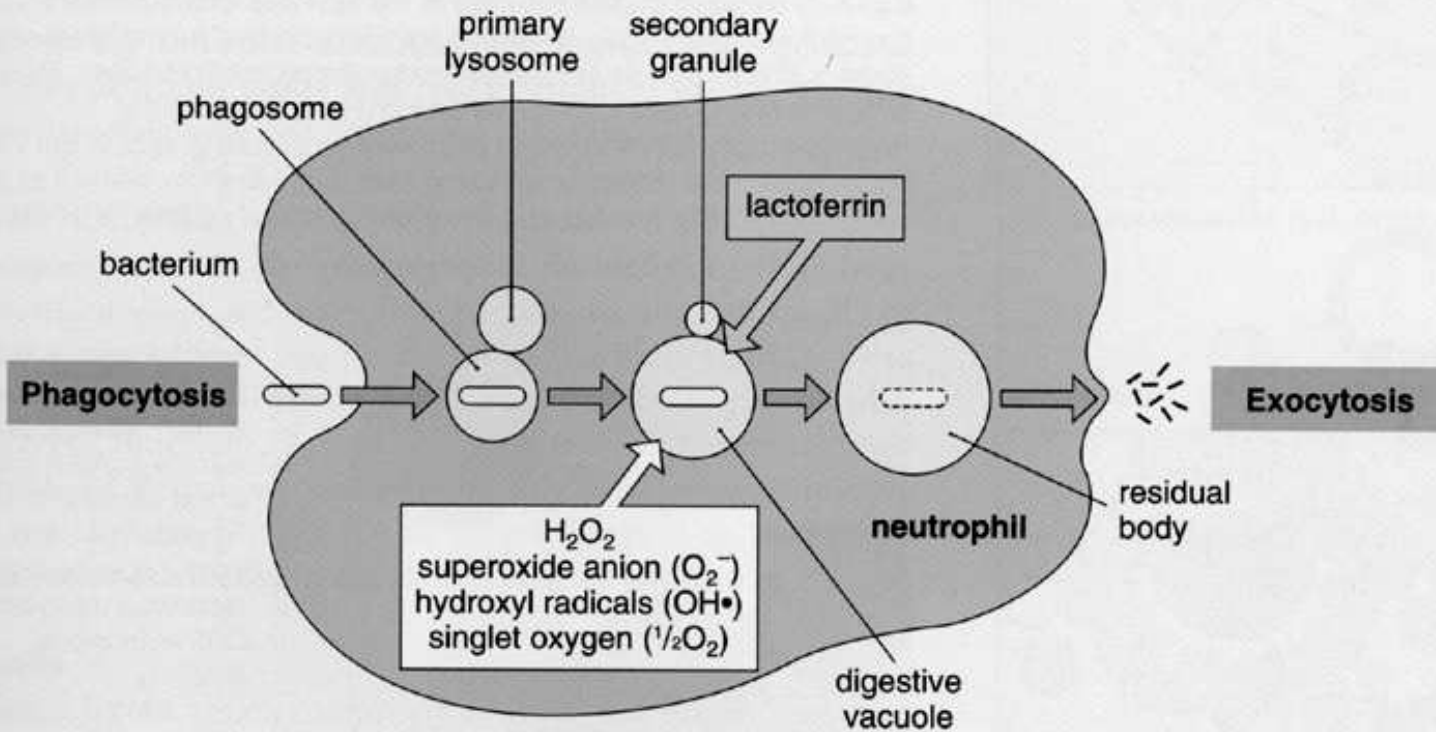
- IL-1 a IL-6: stimulace uvolnění proteinu akutní fáze
- TNF- α : indukce exprese adhesivních molekul
(stimulace adherence leukocytů k endoteliálním buňkám cév)
- adherující leukocyty migrují proti koncentračnímu gradientu chemotaktických molekul (IL-8)
- IL-8 je produkován leukocyty v místě poranění

Fagocytóza a zánět

Buňky zapojené do zánětlivých reakcí jsou často schopny fagocytózy

Průběh fagocytózy:

1. Proteiny akutní fáze, CRP a komplement obalují povrch mikrobů (opsonizace)
2. fagocytické buňky se kontaktují s mikroby buď nespecificky nebo prostřednictvím receptorů pro komplement, CRP, pokud byl mikrob opsonizován
3. mikroby jsou obklopeny výběžky fagocytické buňky, které posléze fúzí (vzniká fagozom)
4. Fagozom fúzuje s lysozomem za vzniku fagolysozomu



Primary granules (lysosomes) contain:

- acid phosphatase
- myeloperoxidase
- esterase

Secondary (specific) granules contain:

- aminopeptidase
- lysozyme
- collagenase

Imunitní odpověď závisí na povaze antigenu a jeho způsobu průniku do těla

- pro **parazity mimobuněčných tělních prostorů** – rozpustné receptory pro antigeny – **protilátky**
- pro **parazity samotných buněk**, které nemohou být eliminovány protilátkami – **cytotoxické (zabíječské) T lymfocyty** rozeznají a zlikvidují infikované buňky
- kritické je odlišení infikované buňky od neinfikované, na kterém se významně podílí **hlavní histokompatibilní systém (MHC)**

Funkce MHC

- vazba a „prezentace“ antigenních peptidů na povrchu buněk, aby mohly být rozeznány specifickými receptory T buněk

Molekuly MHC třídy I a třídy II

- Odlišnosti ve struktuře MHC I a II: odlišnosti v úloze při aktivaci odlišných populací T lymfocytů
- **MHC I** prezentuje cizorodé peptidy pro **cytotoxické T_C lymfocyty**
- **MHC II** prezentuje cizorodé peptidy na antigen prezentujících buňkách pro **pomocné T_H lymfocyty**
-signál pro zahájení tvorby lymfokinů, které řídí diferenciaci buněk imunitního systému

MHC I a II vážou odlišné adhezivní molekuly

Molekuly MHC I
specificky vážou
proteiny CD8, které
jsou nesený
cytotoxickými T_C
lymfocyty

Molekuly MHC II
specificky vážou
proteiny CD4, které
jsou nesený
pomocnými T_H
lymfocyty

MHC I a II vážou peptidy o odlišné velikosti

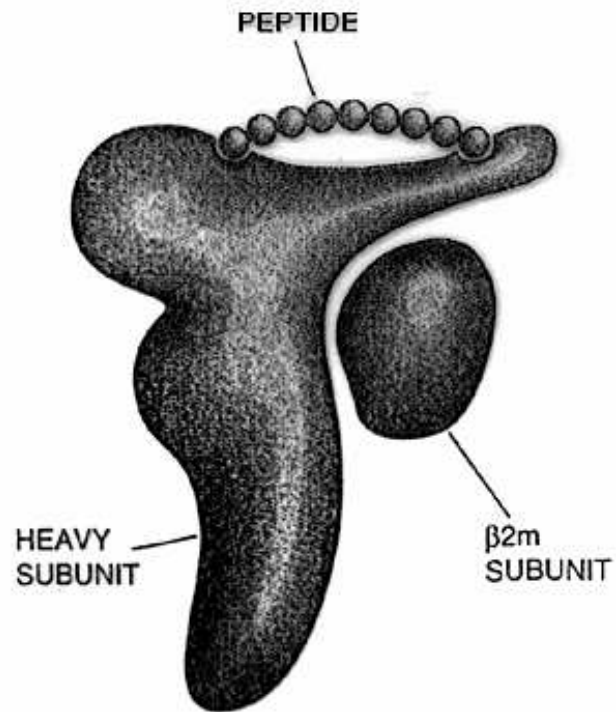
Molekuly MHC I
vážou menší antigenní
peptidy o velikosti 8 -
10 aminokyselinových
zbytků

Molekuly MHC II
vážou větší antigenní
peptidy o velikosti 13-
18 aminokyselinových
zbytků

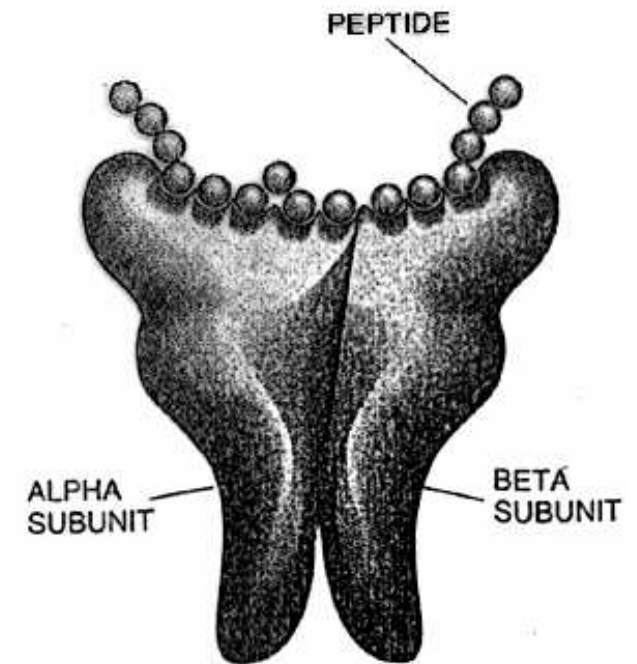
Rozlišujeme MHC třídy I a MHC třídy II

- základní struktura obou typů je obdobná – složeny ze dvou proteinových jednotek
- MHC I obsahují jeden těžký a jeden lehký aminokyselinový řetězec $\beta 2m$
- MHC II obsahují dva řetězce podobné velikosti
- Oba typy proteinových komplexů mají na svém vrcholu štěrbinu, do které se vážou peptidy
- Na MHC I se peptidy vážou především svými koncovými aminokyselinami
- Na MHC II se peptidy vážou prostřednictvím aminokyselin ve střední části peptidu – délka peptidu je variabilní
- Spojení s peptidy nastává během biosyntézy a sestavování molekul MHC I i II.

MHC I



MHC II



Odlišnost v buněčných typech exprimujících MHC I a II souvisí se specializací různých typů imunitních buněk

- Exprese MHC I je běžná ve všech buněčných typech
- to odpovídá funkci T_C lymfocytů (průběžná kontrola povrchů buněk a eliminace buněk nesoucích aktivní mikroorganismy)
- Exprese MHC II je omezena na antigen-prezentující buňky
- to odpovídá funkci T_H lymfocytů (lokální aktivace kdykoliv tyto buňky zaznamenají makrofágy nebo B lymfocyty, které pohltily a zpracovaly antigeny odvozené z patogenů)

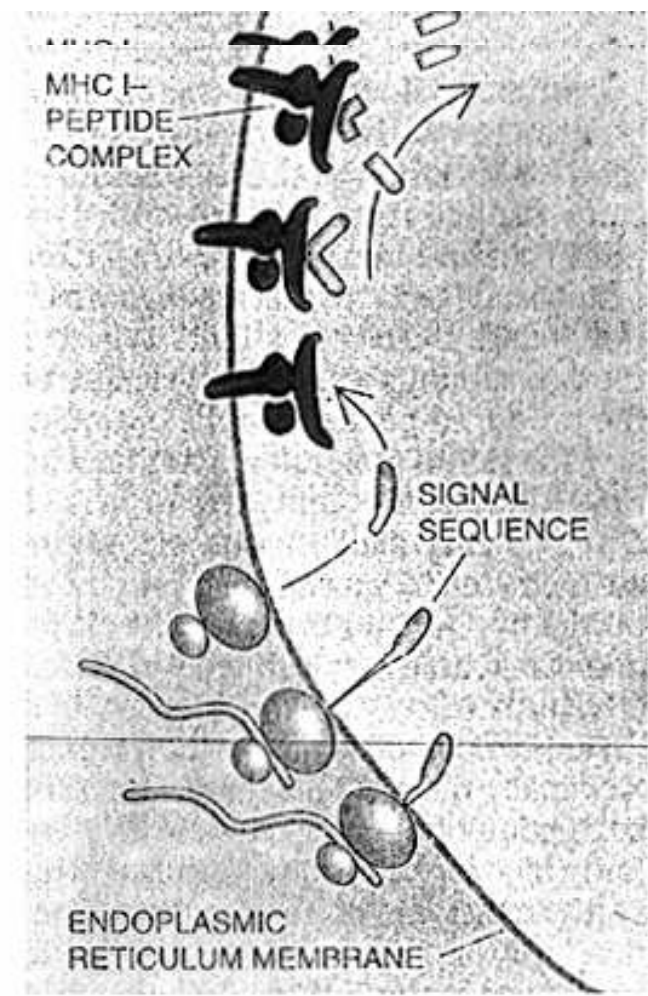
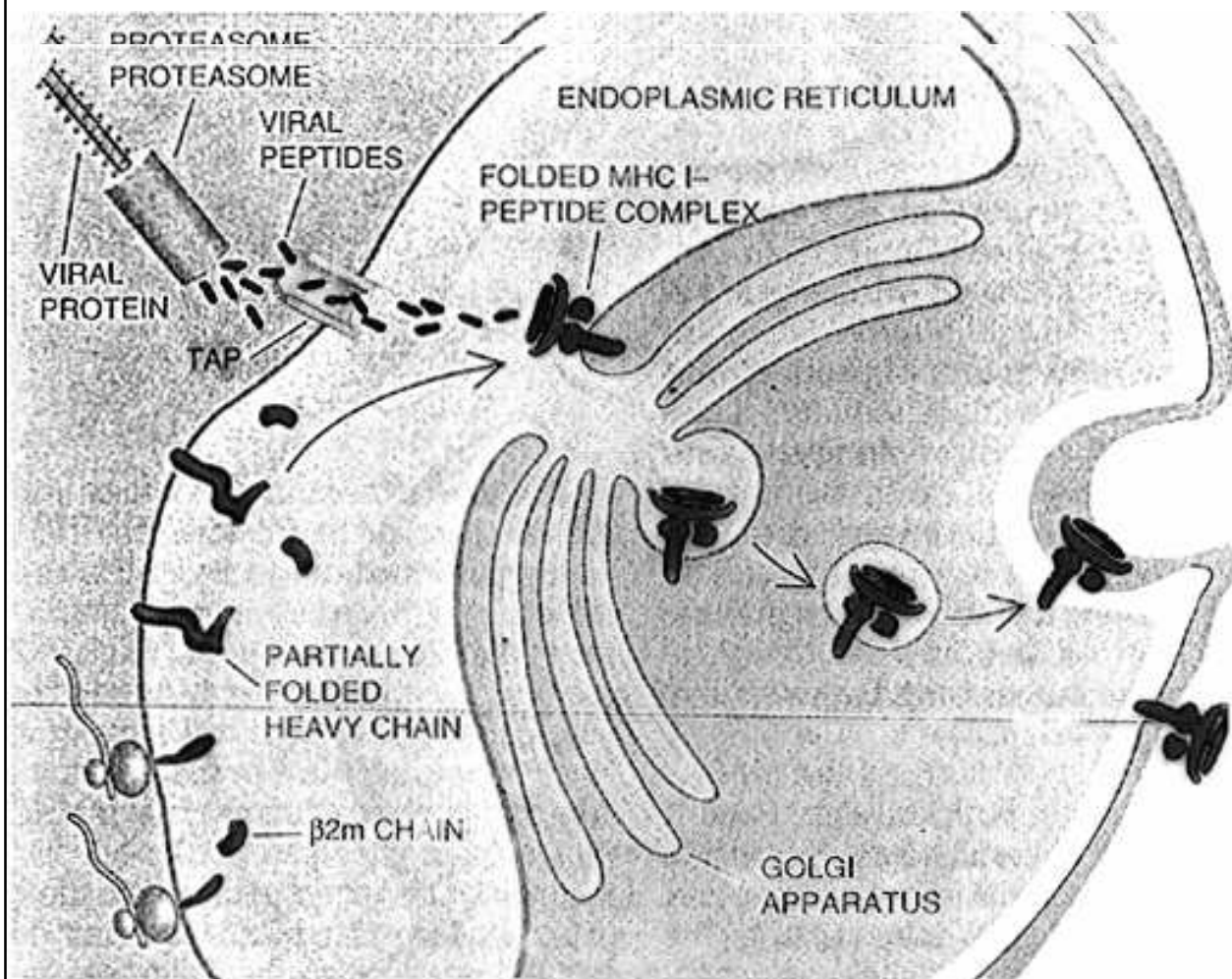
Odlišnost ve způsobu degradace antigenu a jeho zpracování u molekul MHC I a MHC II

- MHC I váže peptidové fragmenty odvozené z proteolyticky degradovaných proteinů, které byly syntetizovány samotnou buňkou (propagace viru)
- peptidy jsou transportovány do ER, kde se spojují se vznikajícími molekulami MHC I a následně putují Golgiho aparátem k povrchu buňky
- MHC II váže peptidové fragmenty odvozené z proteolyticky degradovaných proteinů, které byly pohlceny antigen-prezentujícími buňkami
- peptidy se dostávají do endozomů, kde se spojují s molekulami MHC II a následně putují k povrchu buňky

Schopnost vázat specifické peptidy infikujících elementů a prezentovat je cytotoxickým T lymfocytům vyplývá ze struktury a způsobu syntézy molekul MHC I

Sestavování MHC I:

- nejprve se spojí těžký řetězec s podjednotkou $\beta 2m$ lehkého řetězce uvnitř ER
- za nepřítomnosti řetězce $\beta 2m$ se nemůže těžký řetězec poskládat do správné konformace
- pro pohyb komplexu těžký řetězec- $\beta 2m$ z ER Golgiho aparátem na buněčný povrch je nutné připojení peptidu
- známy alespoň dva geny, které pro MHC kódují transportní proteiny TAP (transporter associated with antigen processing)

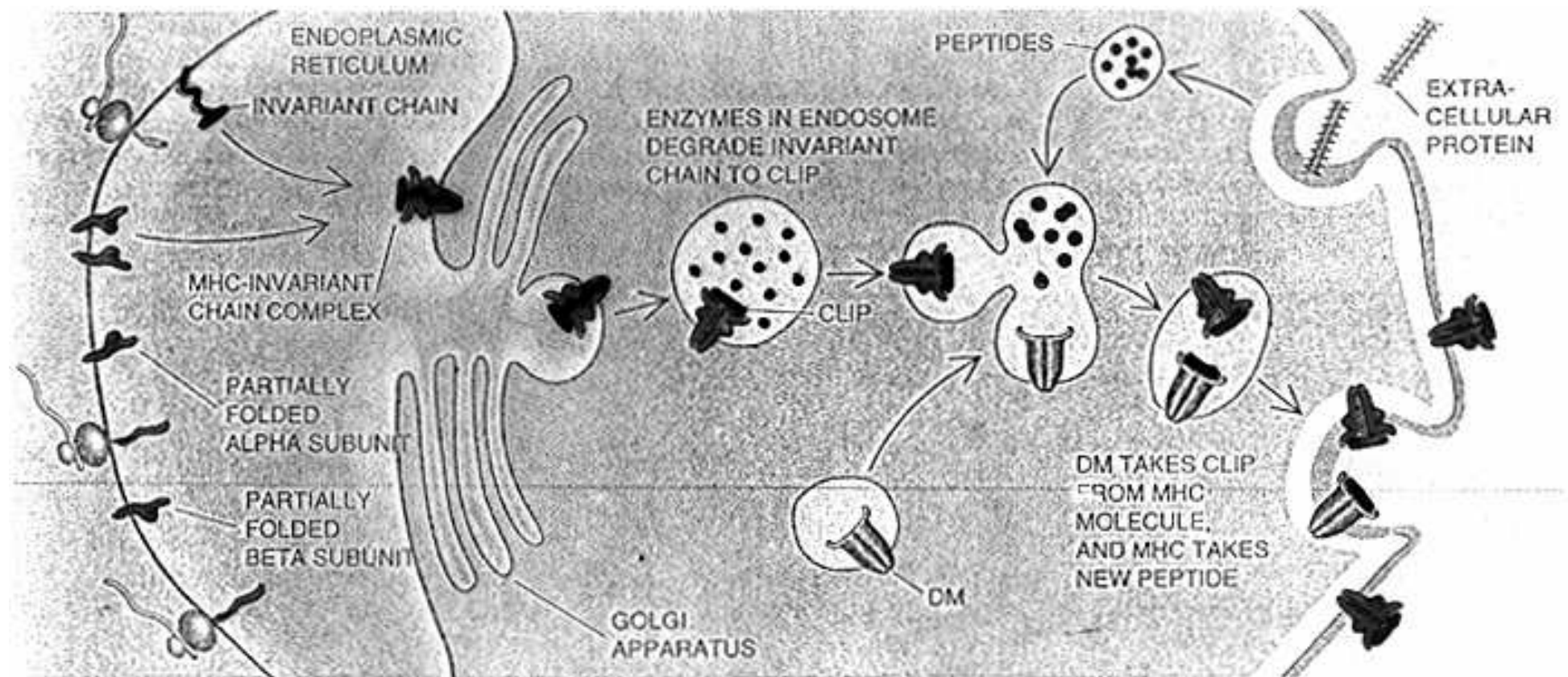


CLASS I ANTIGEN PATHWAY (*left*) typically begins with intracellular proteins, such as those from viral infections, being reduced to peptides by proteasomes. These peptides are then carried into the endoplasmic reticulum by a transporter protein, TAP. Inside the endoplasmic reticulum, the peptides and the partially folded class I subunits associate into a folded

MHC-peptide complex. This complex is routed through the Golgi complex and carried to the cell surface. In a variation on this pathway discovered by the author and his colleagues (*right*), the peptides can originate with the signal sequences that are clipped from the beginnings of cellular proteins being assembled in the endoplasmic reticulum.

MHC II

- do antigen prezentujících buněk musí být extracelulární protein nejprve přenesen **endocytózou a pak degradován na peptidy**
- MHC II zajistí přenos peptidů na buněčný povrch tak, aby je pomocné T lymfocyty mohly rozeznat



CLASS II ANTIGEN PATHWAY begins with the binding of the MHC subunits to an invariant chain molecule. After this complex passes through the Golgi complex, the invariant chain is reduced to a smaller peptide, CLIP. It is thought that inside

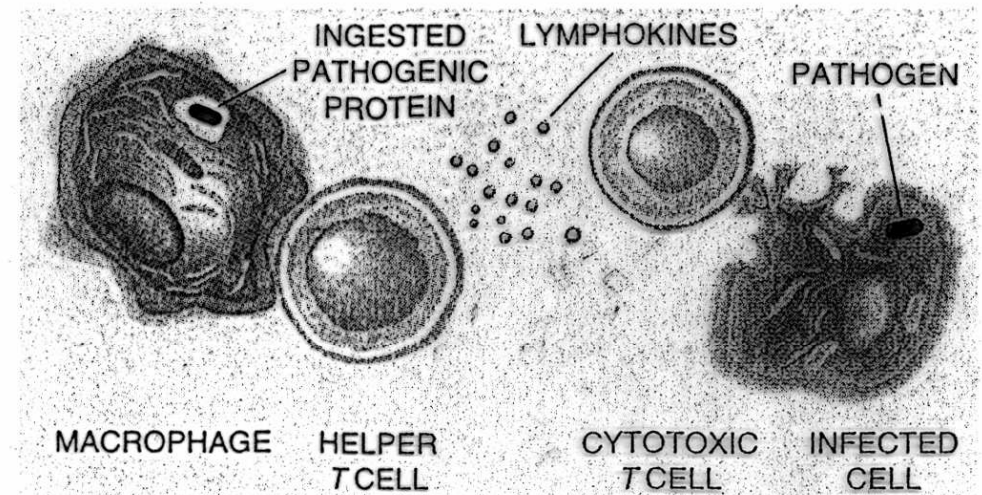
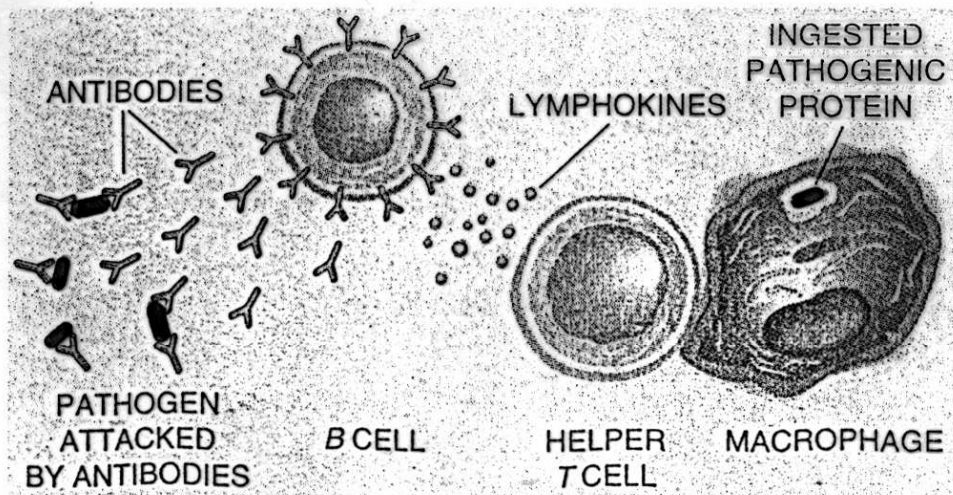
endosome vesicles, a molecule called DM steals the CLIP from the MHC complex, which frees the MHC molecule to bind with peptides derived from extracellular proteins. This final class II-peptide complex then travels to the cell surface.

Rozeznání antigenu a imunitní odpověď

Antigen prezentující buňky

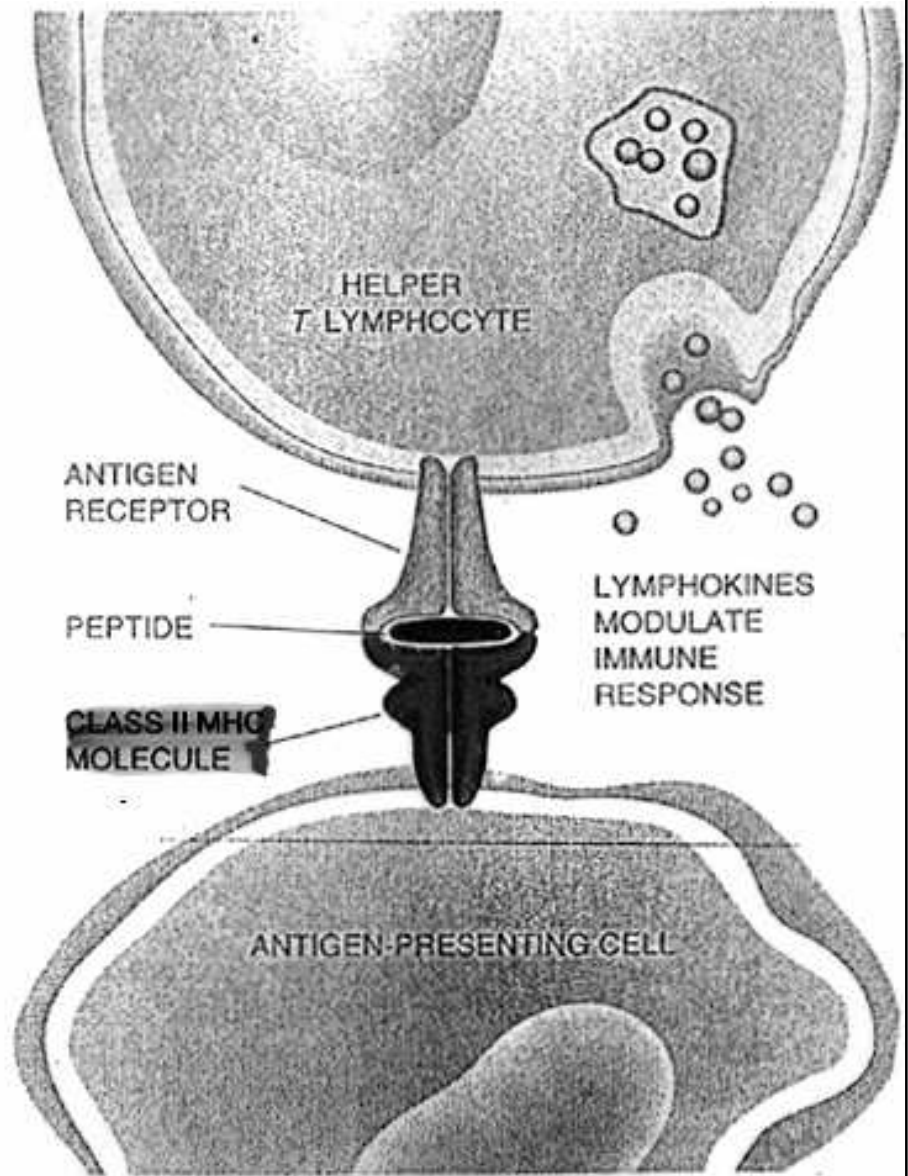
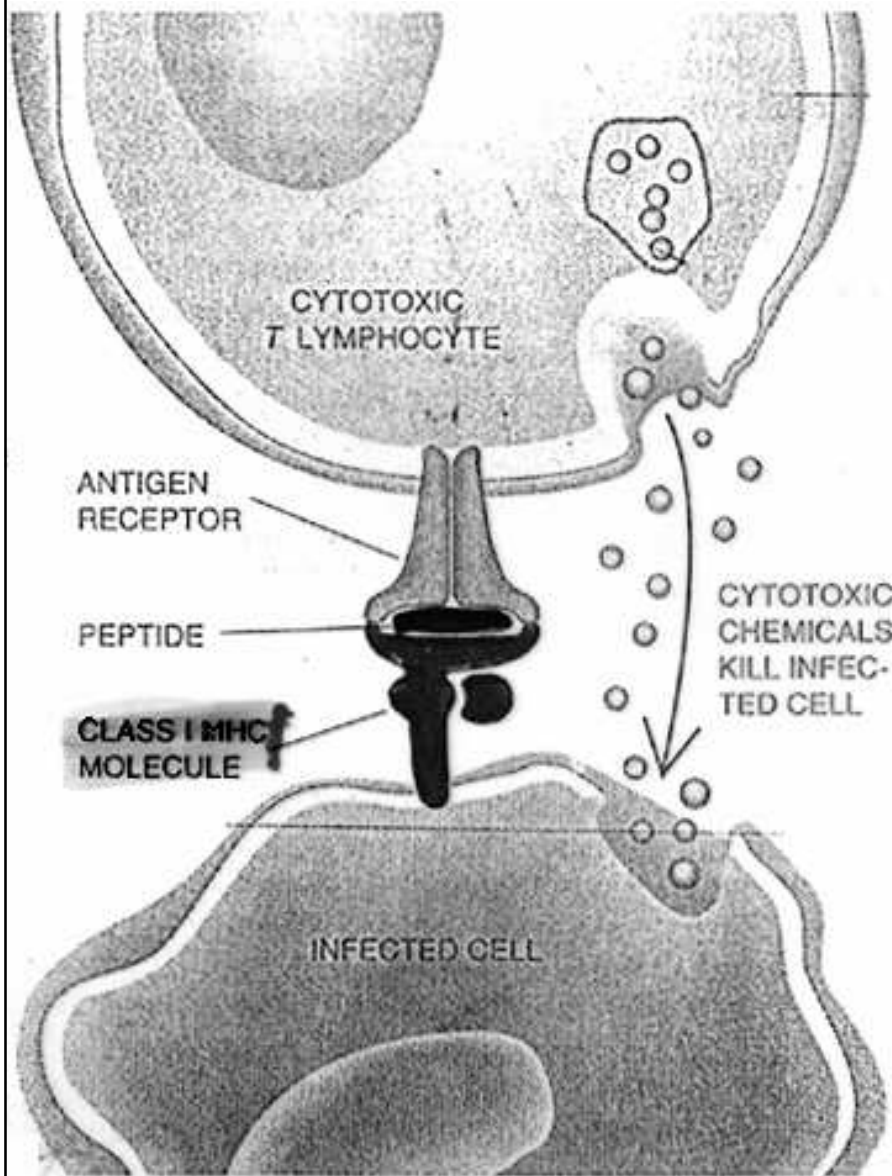
- pohybují se tělem, „požírají“ mimobuněčné materiály, rozkládají je na peptidy, prezentují je jako antigeny
- z místa infekce se přesunují do lymfatických uzlin
- pomocný T lymfocyt rozezná komplex MHC II-peptid a zahájí tvorbu lymfokinů, které usměrňují imunitní systém proti patogenu

Rozeznání antigenu a imunitní odpověď



RECOGNITION OF ANTIGENS regulates immune responses. When helper T cells recognize an antigen complex on a macrophage or other specialized presenting cell, the T cells release chemical signals called lymphokines. Those signals can

direct B cells to release antibodies against extracellular bacteria (*left*) or cytotoxic T lymphocytes to attack cells infected with viruses (*right*). Antigen complexes also allow the cytotoxic T cells to identify their targets.



ANTIGEN COMPLEXES of major histocompatibility complex (MHC) molecules and peptides can be recognized by T lymphocytes. Class I MHC molecules, found on all nucleated body cells, can present peptides from viruses. T cells respond to

such complexes by killing the infected cell (*left*). Class II MHC molecules, found only on antigen-presenting cells, present peptides scavenged from extracellular proteins. These complexes trigger the release of lymphokines (*right*).

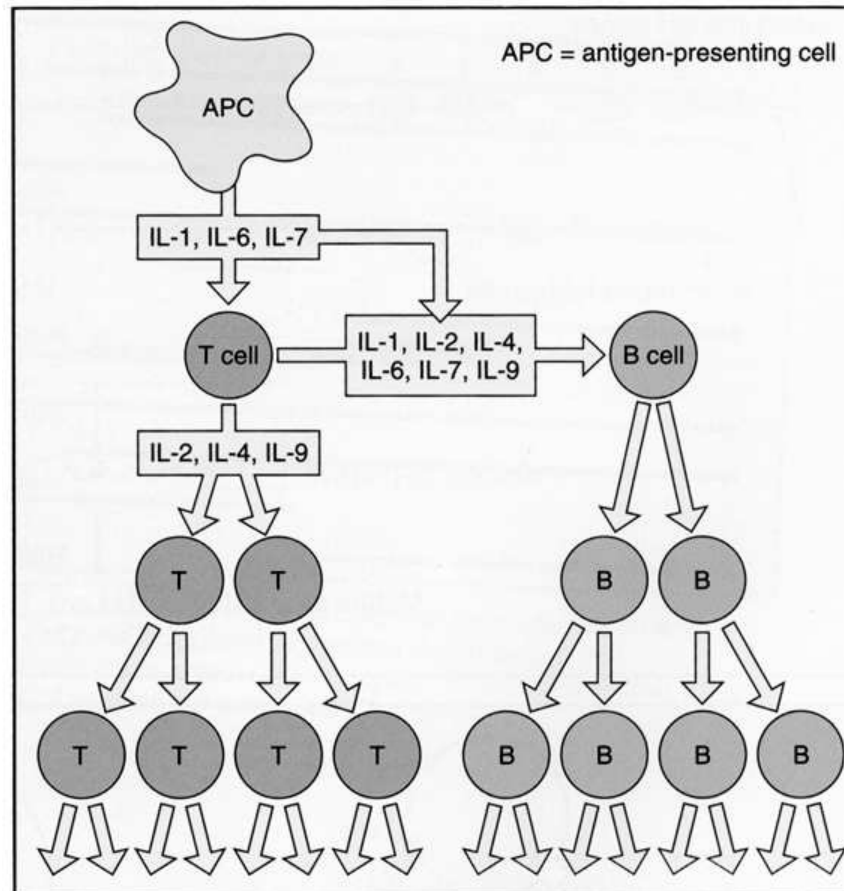


Fig. 1.87 Roles of interleukins 1 and 2 and B-cell growth, stimulating and differentiation factors in the immune response: reaction between an APC and a T cell leads to secretion by the APC of IL-1, IL-6 and IL-7, which stimulate the T cell to secrete IL-2 and other cytokines, thus stimulating T cells to undergo cell division. The T cell secretes IL-1, IL-4, IL-6, IL-7 and IL-9 which, with IL-2, stimulate interacting B cells to proliferate, and which switch off the proliferative response and stimulate the B cells to terminal differentiation and antibody secretion. A proportion of the B cells become memory cells which react with an accelerated response if rechallenged with the same antigen.

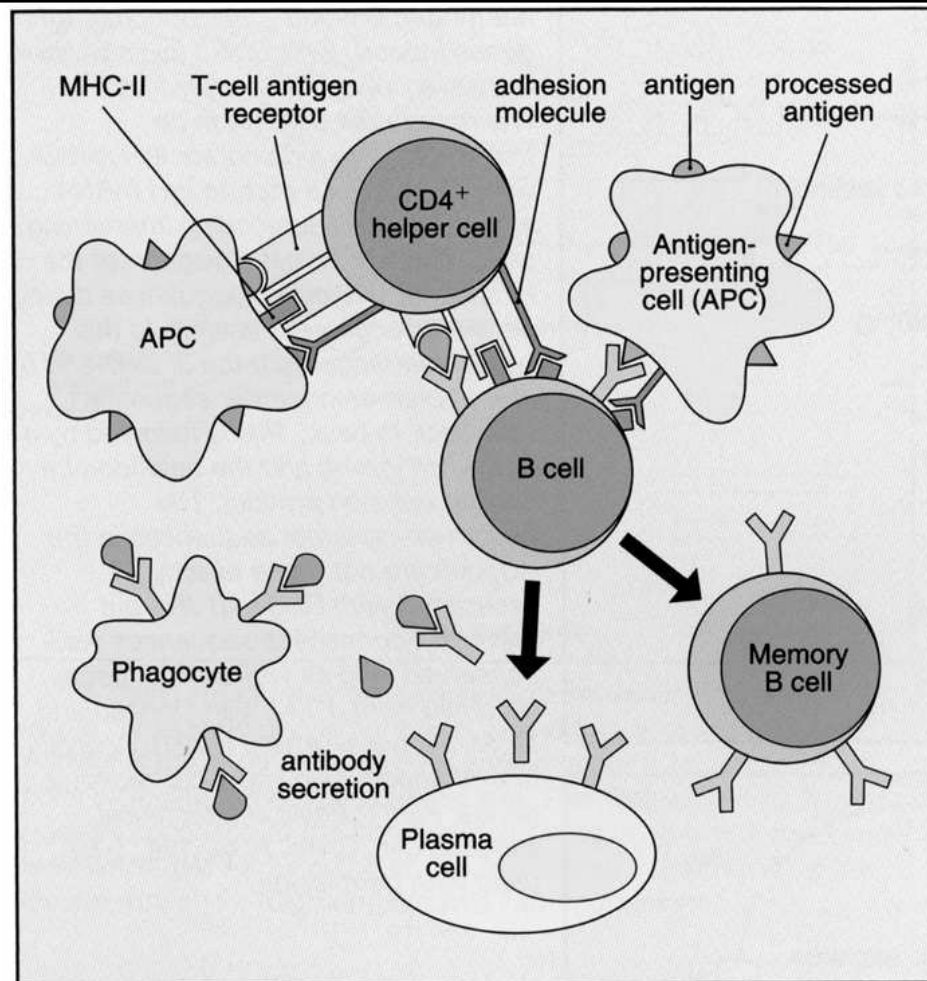


Fig. 1.86 The immune response: there is interaction between an APC and a CD4⁺ (helper) T cell, with MHC-II and antigen–T-cell receptor recognition, and both cells interact with a B cell, with recognition between its surface immunoglobulin and the antigen. T cells and B cells interact with different epitopes of the antigen. As a result, clones of T cells and B cells are stimulated to proliferate (see Fig. 1.87) the B cells becoming either plasma cells, secreting antibody to the antigen, or memory B cells. A phagocyte takes up the antigen–antibody complex.

Tumor necrosis factor (TNF)

- účast na regresi nádorů vyvolaných bakteriální infekcí
- určitý lipopolysacharid – LPS přítomný v buněčné stěně bakterií představuje endotoxin, který prostřednictvím endogenního mediátoru TNF indukuje nekrózu nádoru
- produkován aktivovanými makrofágy (zvýšení transkripce genu pro $\text{TNF}\alpha$, snížení úrovně degradace transkriptů $\text{TNF}\alpha$)
- protein $\text{TNF}\alpha$ se tvoří na ribozomech drsného ER, vzniká transmembránový pro- $\text{TNF}\alpha$ (pravděpodobně zodpovídá za schopnost aktivovaných makrofágů ničit rakovinné buňky)
- biologicky aktivní část molekuly se uvolní proteolytickými enzymy volněnými z makrofágových lysozomů. Tato forma se spontánně sestavuje do trimeru – zodpovídá za cytokinetické a nekrotické účinky na nádory

Funkce TNF α

- spolu s IL-1 – hlavní monokiny zodpovídající za aktivaci protinádorových a protibakteriálních funkcí makrofágů
- zabíjí nebo omezuje růst většiny nádorových buněk tím, že ničí krevní cévy, které nádory vyživují a aktivuje buňky zajišťující imunitní odpověď