

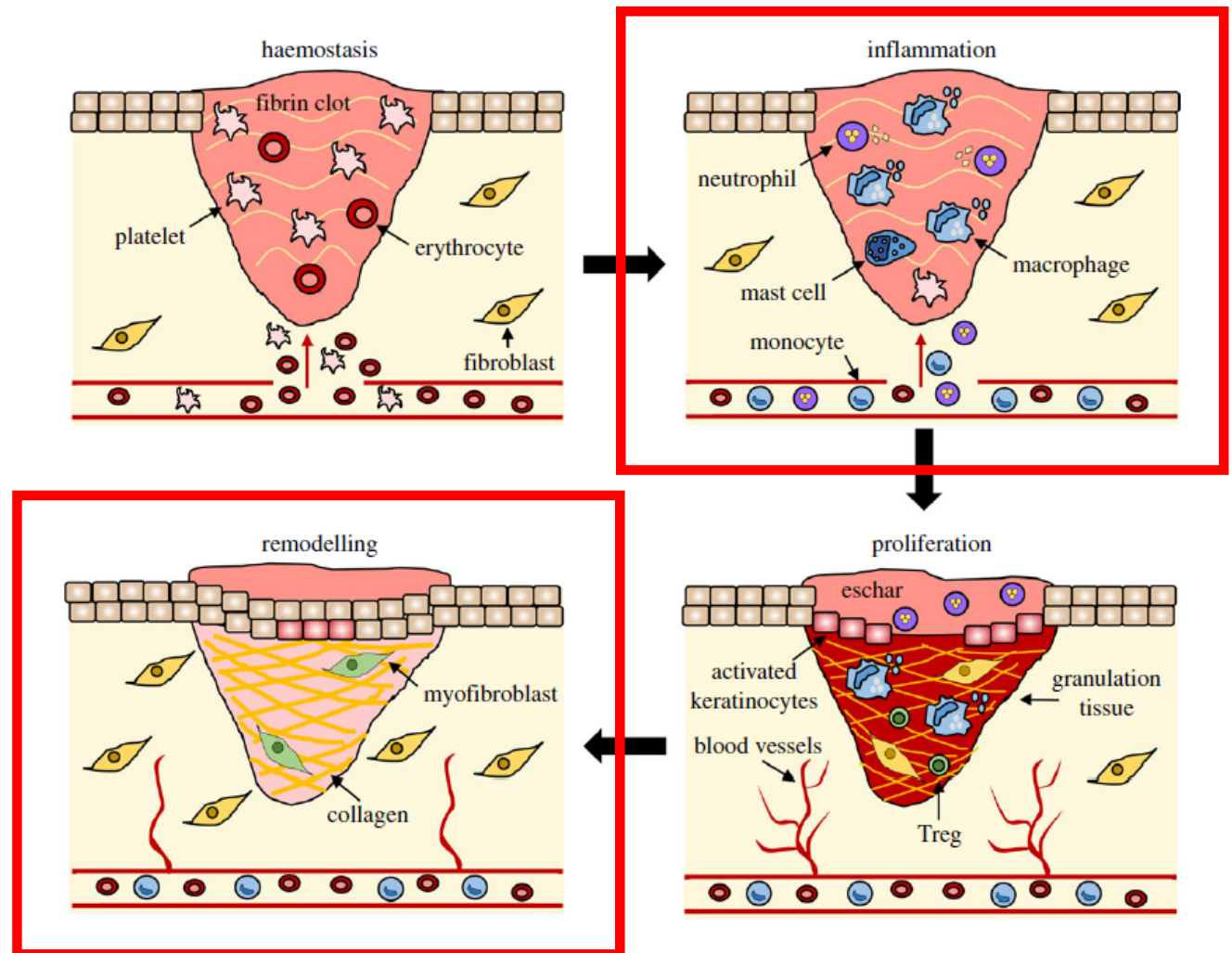
11 Buněčné regulace při hojení a imunitní reakci

prof. Mgr. Vítězslav Bryja, Ph.D.
Ústav experimentální biologie PřF MU



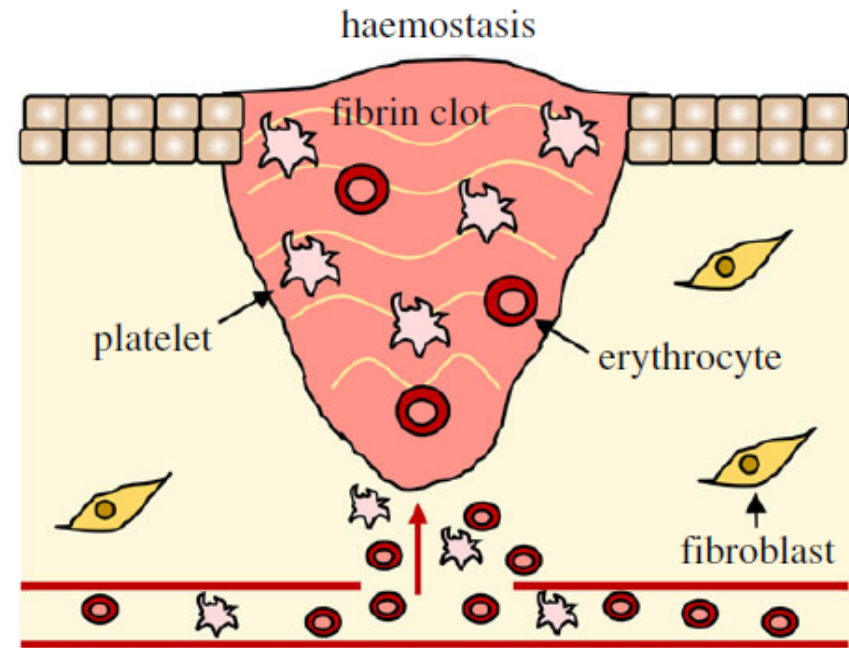
1. Hemostáza
2. Záněť
3. Proliferace
4. Remodelace

STÁDIA HOJENÍ



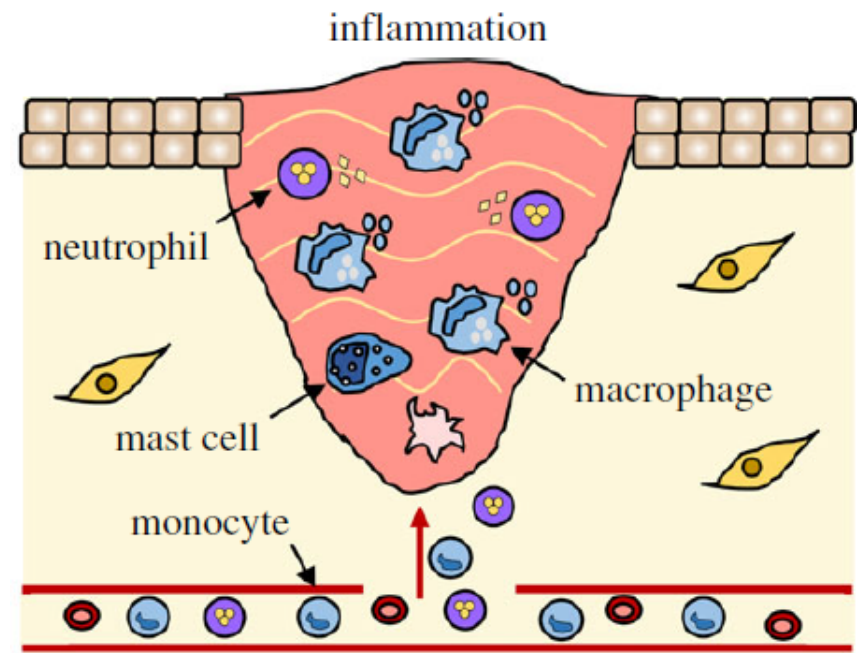
HEMOSTÁZA

- Zastavení krvácení
- Tvorba lešení pro molekuly a buňky dalších fází
- Vazokonstrikce a srážení krve
- Hlavní buněčný typ: **krevní destičky**
- Hlavní nebuněčná komponenta: **fibrinogen/fibrin**

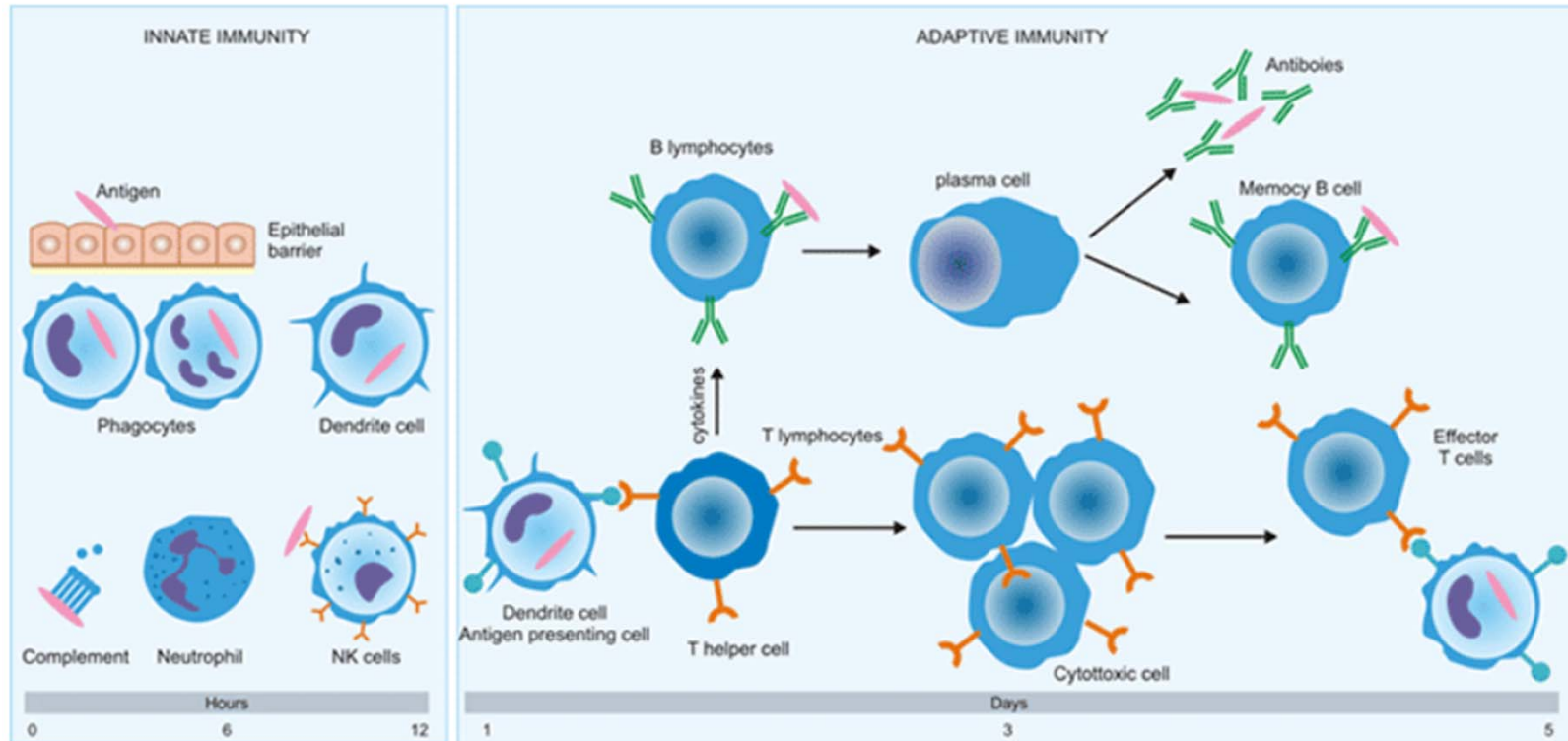


ZÁNĚT

- Ochrana před infekcí
- Hlavní buněčné typy: **neutrofil**, **makrofágy**
- Hlavní nebuněčná komponenta: **komplementový systém**



NESPECIFICKÁ VS. SPECIFICKÁ IMUNITA

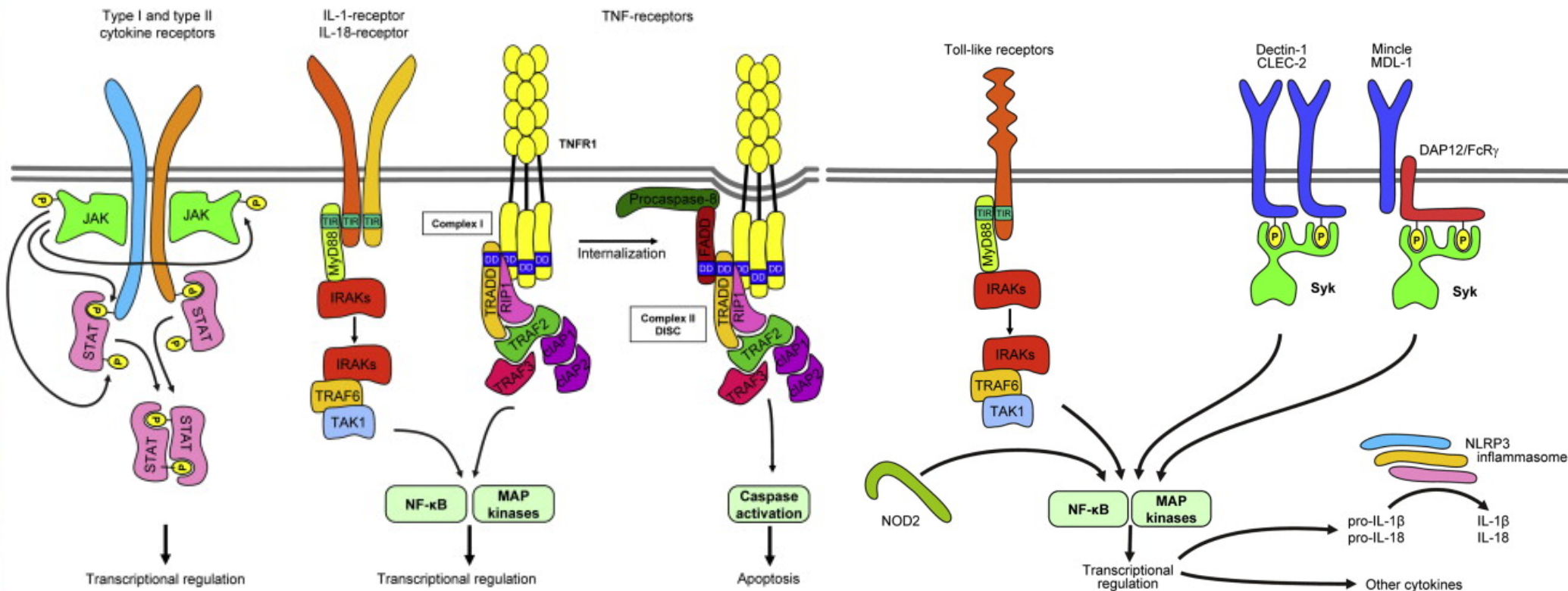


<https://www.cusabio.com/Immunology/Innate-and-Adaptive-Immunity.html>

NEUTROFILY

- Přitahovány – DAMPs (damage-associated molecular patterns), PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), cytokiny, proteiny komplementu
- Diapedézou vystupují z cév do místa poranění
- Fagocytóza nekrotické tkáně a patogenů
- Oxidační vzplanutí (reaktivní formy kyslíku)
- Uvolnění toxických granulí (hlavní náplní proteázy, dále antimikrobiální peptidy)
- Tvorba mimobuněčných sítí (tzv. NETs - neutrophils extracellular traps) - NETóza
- Apoptóza a fagocytóza makrofágy – tranzice do proliferační fáze

NEUTROFILY



MAKROFÁGY

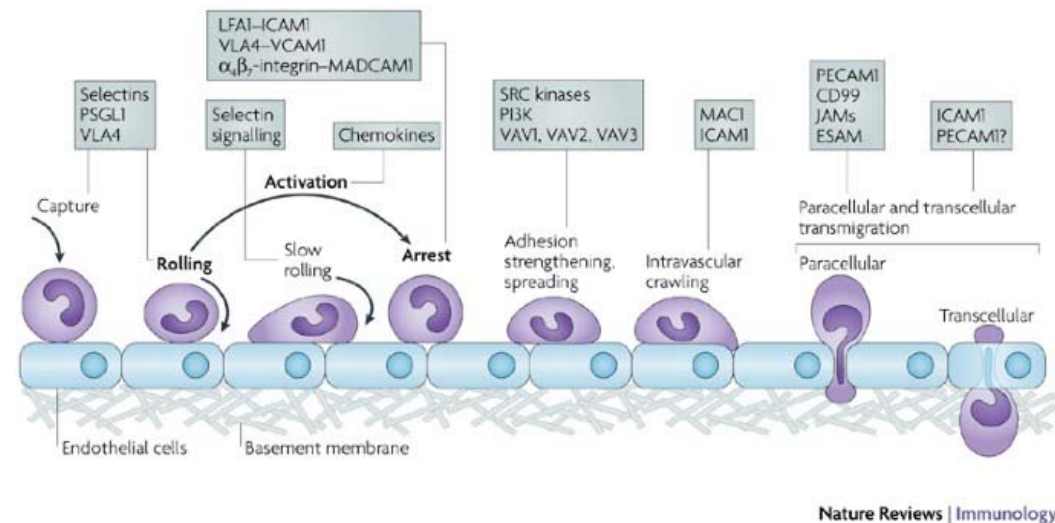
- Z krevních monocytů se v místě zranění stávají makrofágy
- Přitahovány DAMPs, cytokiny, proteiny komplementu
- Fagocytóza
- Produkce růstových faktorů pro proliferační fázi (TGF- β)
- V proliferační fázi produkují matrix metaloproteinázy (MMP)
– odstranění fibrinových polymerů

HOMING IMUNITNÍCH BUNĚK

- proces založený na interakcích buňka-matrix a buňka-buňka, který (prostřednictvím adhezních molekul) zabezpečuje ukotvení cirkulujících buněk na specifických místech v poškozené tkáni
- dělí se na 5 hlavních kroků:
 1. rolování (rolling)
 2. zpomalení (slow-rolling)
 3. zastavení (arrest)
 4. hledání místa pro transmigraci (crawling)
 5. transmigrace (transmigration) – paracelulární nebo transcelulární cestou

MOLEKULY PŘECHODNÝCH ADHEZÍ

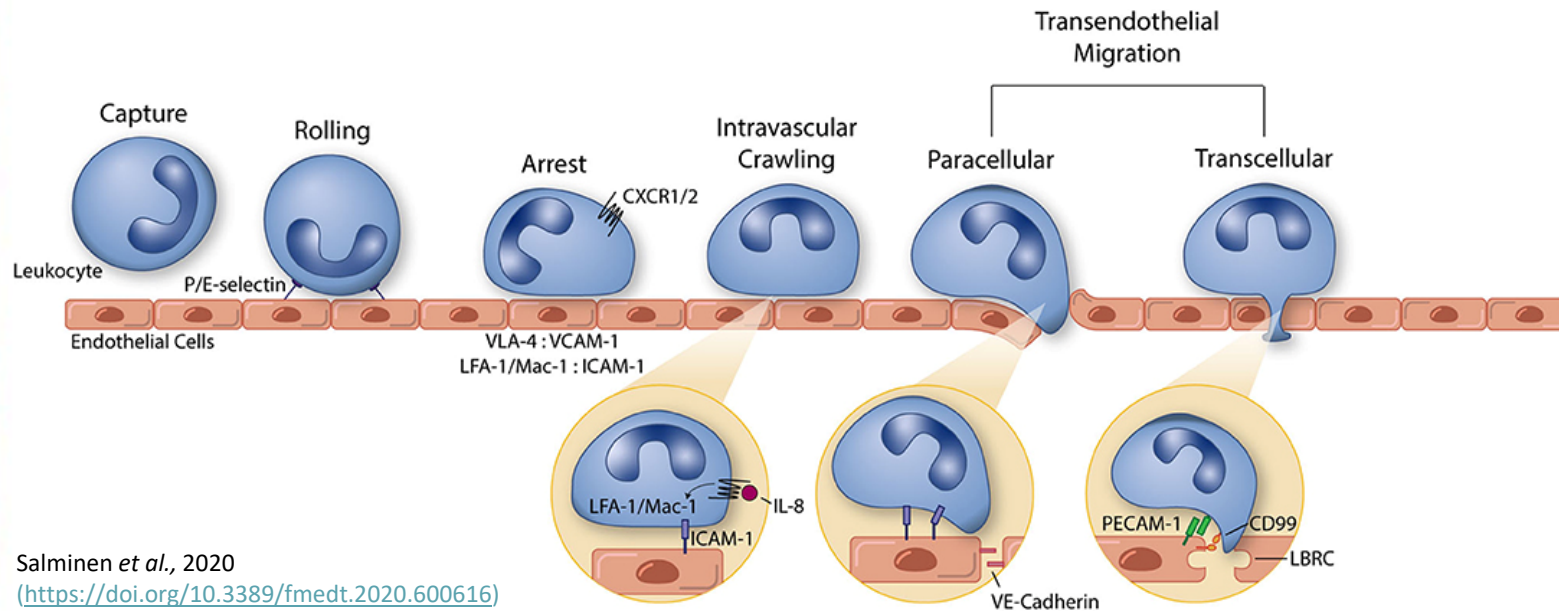
- Immunoglobulinové adhezní molekuly
 - Obsahují imunoglobulinové domény, homofilní i heterofilní interakce
 - Některé slouží jako ligandy integrinů.
 - Příklad: ICAMs (intercellular adhesion molecules), VCAM (vascular), NCAM (neural), PECAM (platelet endothelial)
- Selektiny
 - Váží sacharidové skupiny na površích jiných buněk
 - Konzervovaná extracelulární lektinová doména (**selektiny**), ovšem velmi rozdílné intracelulárně
 - Především na krevních buňkách a endotelu – například důležité při rolování lymfocytů po povrchu kapiláry
 - L (leukocyte), E-(epithelial), P-selektin (platelet)



Nature Reviews | Immunology

HOMING IMUNITNÍCH BUNĚK

- selektiny a integriny
- klidová fáze: občasné adheze PSGL-1 a P-selektinu (rolling, 40 $\mu\text{m/s}$)
- zánět:
 - rolling se zpomaluje kvůli expresi E-selektinu na buňkách endotelu (5 $\mu\text{m/s}$)
 - konformační změna LFA-1 (intermediate \rightarrow high affinity) – zastavení pohybu
 - hledání vhodného místa pro transmigraci (interakce Mac-1 a ICAM-1) a následná transmigrace paracelulární nebo transcelulární cestou (DIAPEDÉZA)



Salminen *et al.*, 2020

(<https://doi.org/10.3389/fmedt.2020.600616>)

ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY IMUNITNÍCH BUNĚK

1. Schopnost eliminace patogenu (granula, cytokiny, protilátky, přímý kontakt)
2. Schopnost imunitní tolerance vůči buňkám hostitelského organismu
3. Schopnost limitace imunitní odpovědi jenom po dobu přítomnosti patogenu
4. Schopnost migrace
5. Schopnost imunitní paměti (specifické pro adaptivní imunitní buňky)

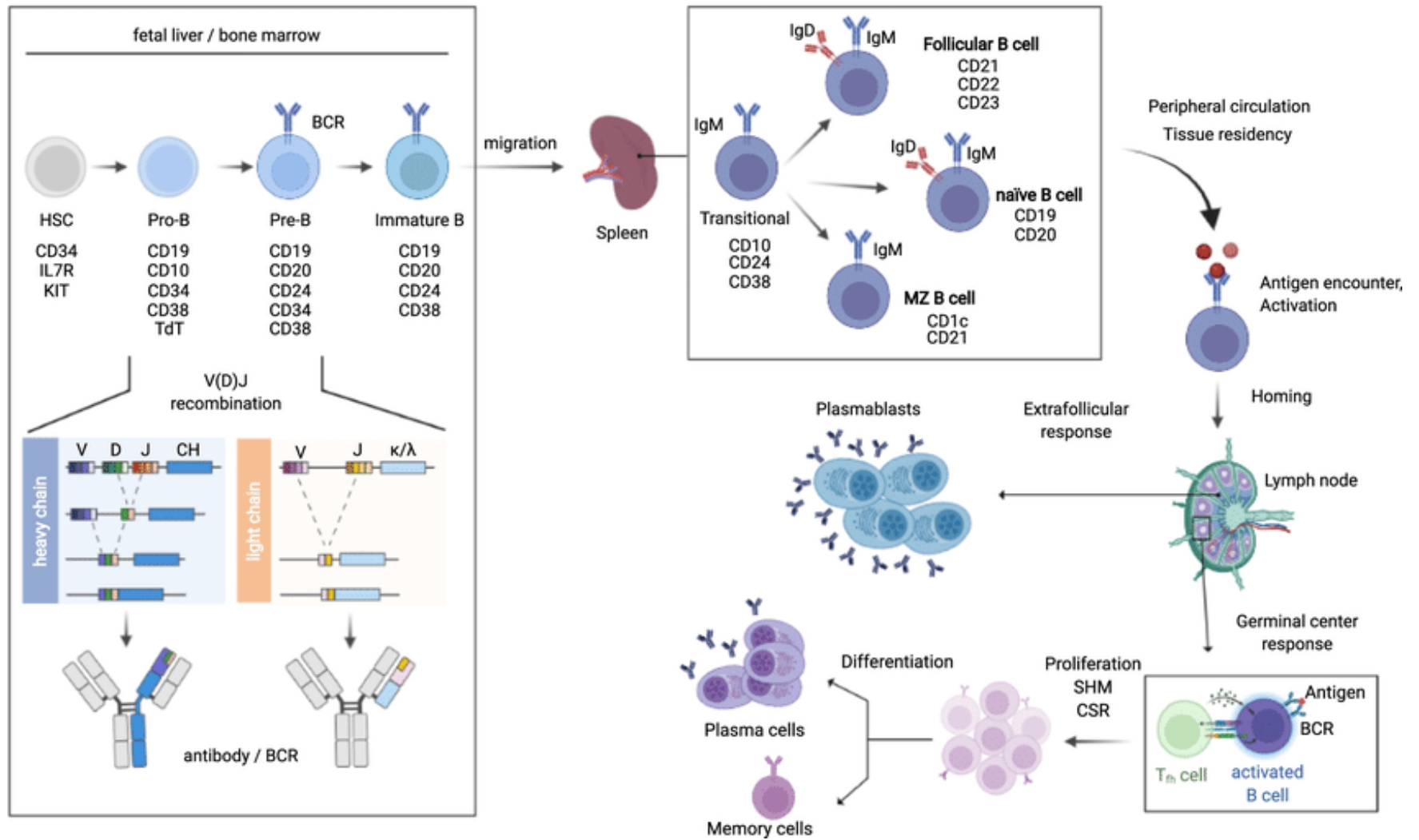
ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY IMUNITNÍCH BUNĚK

1. Schopnost eliminace patogenu (granula, cytokiny, protilátky, přímý kontakt)
2. Schopnost imunitní tolerance vůči buňkám hostitelského organismu
3. Schopnost limitace imunitní odpovědi jenom po dobu přítomnosti patogenu
4. Schopnost migrace
5. Schopnost imunitní paměti (specifické pro adaptivní imunitní buňky)

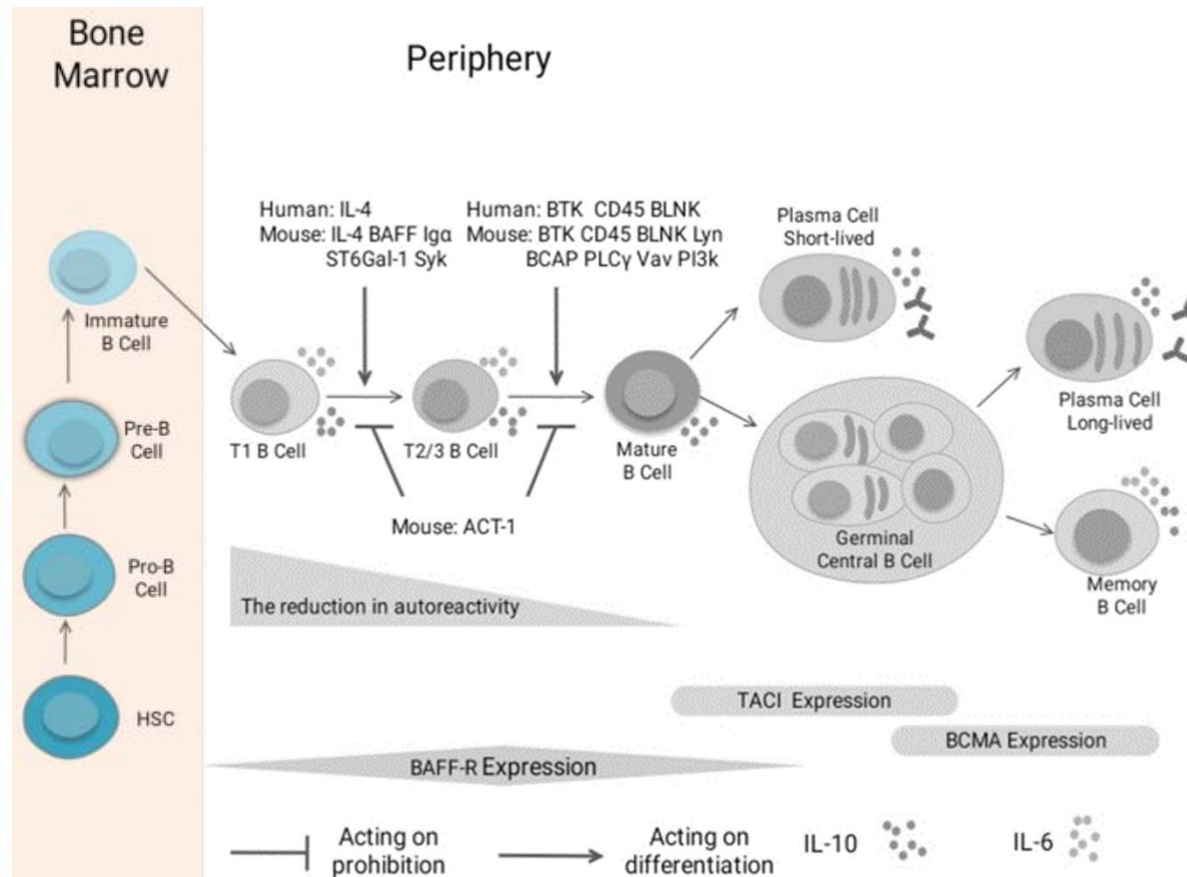
Tajemství adaptivní imunity

- Jak tělo vytvoří mechanismus, který umožní reagovat (útočit) i na to, co nikdy nepoznalo (tj. na cokoliv neznámého/nového), aniž by zároveň útočilo na cokoliv vlastního?
-

B- lymfocyty: BCR a protilátky



VÝVOJ B LYMFOCYTŮ – KOSTNÍ DŘEŇ



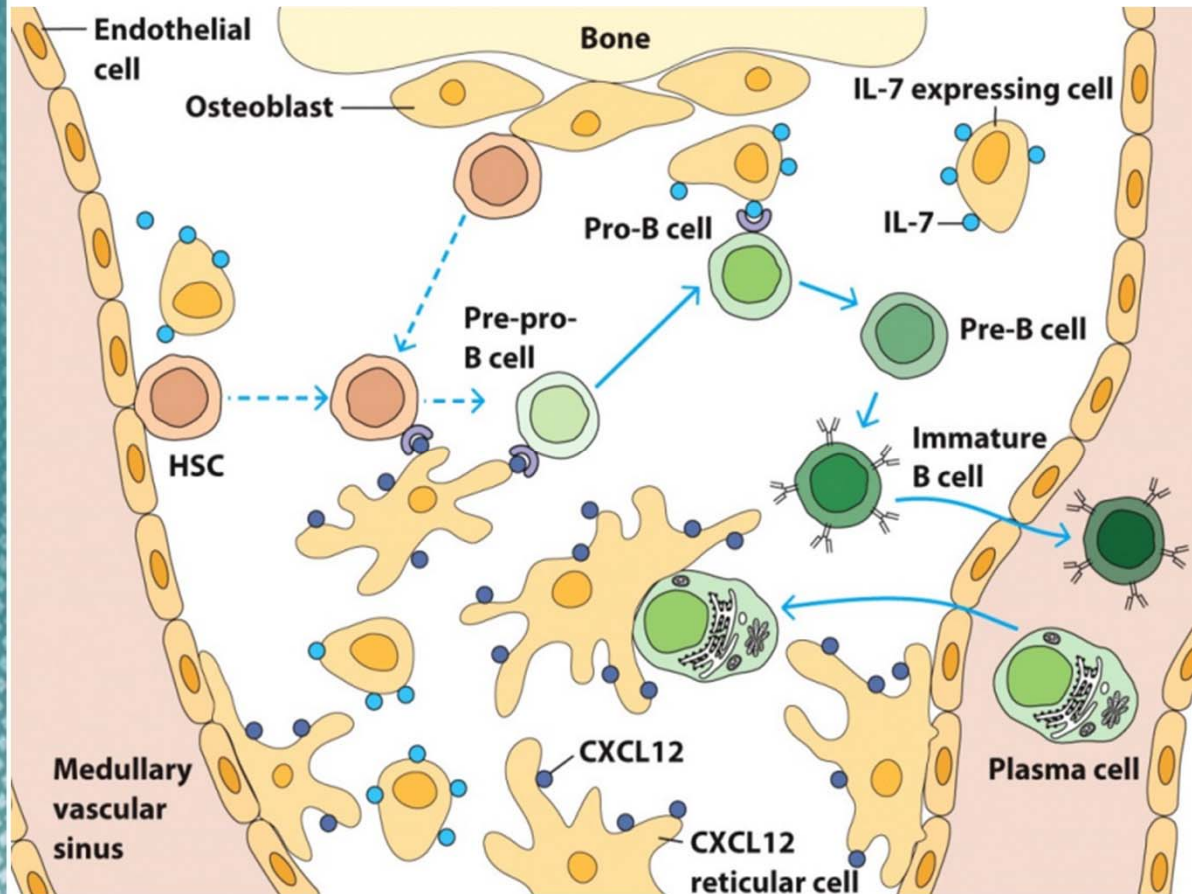
Zhou et al., 2020 (<https://doi.org/10.1186/s12967-020-02289-w>)

1. Pro-B buňky – probíhají přestavby na těžkém řetězci imunoglobulinů (Ig)
2. Pre-B buňky – probíhají přestavby na lehkém řetězci Ig
3. Nezralé (immature) B buňky – na povrchu mají exprimovaný IgM
4. Zralé (mature) B buňky – mají na povrchu IgM i IgD

V(D)J rekombinace

- zdroj heterogenity v repertoáru B buněk (10^{11} variant BCR)
- zodpovědná RAG1/2 rekombináza (dělá DSB na specifických sekvencích RSS v jednotlivých lokusech)
- spojení řetězců pomocí NHEJ

VÝVOJ B LYMFOCYTŮ – KOSTNÍ DŘEŇ (details, které není třeba znát)



Kuby Immunology, Seventh Edition, 2013

1. Hematopoietické kmenové buňky (HSCs) – důležitá CXCL12/CXCR4 dráha
2. Multipotentní progenitor (MPP)
3. Společný lymfoidní progenitor (CLP) – aktivace IKAROS, E2A, EBF1 a FOXO1
4. Pro-B buňky – dráha FLT3 + IL-7R (signály pro přežití a V(D)J rekombinaci) + SCF/c-Kit + TF PAX5
5. Pre-B buňky – dráha SCF/c-Kit (exprese genu pro c-Kit se ireverzibilně vypíná)
 - fáze velkých pre-BII buněk charakteristická velkým proliferativním potenciálem (přechodná aktivace Wnt signalizace)
 - první checkpoint – jediné buňky s produktivními přestavbami na těžkém řetězci Ig jsou selektovány dál
 - fáze malých pre-B buněk – pre-BCR je odstraněn z buněčného povrchu, probíhají přestavby na lehkých řetězcech Ig
6. Nezralé (immature) B buňky – důležitá signalizace přes RANKL

MECHANISMUS B BUNĚČNÉ TOLERANCE

1. Klonální delece

- po rozpoznání vlastního antigenu v BM dojde k vytvoření cross-linků na BCR, což vyšle signál do buňky
- buňka je skrz tento signál hnána do apoptózy

2. Změny B-buněčného receptoru

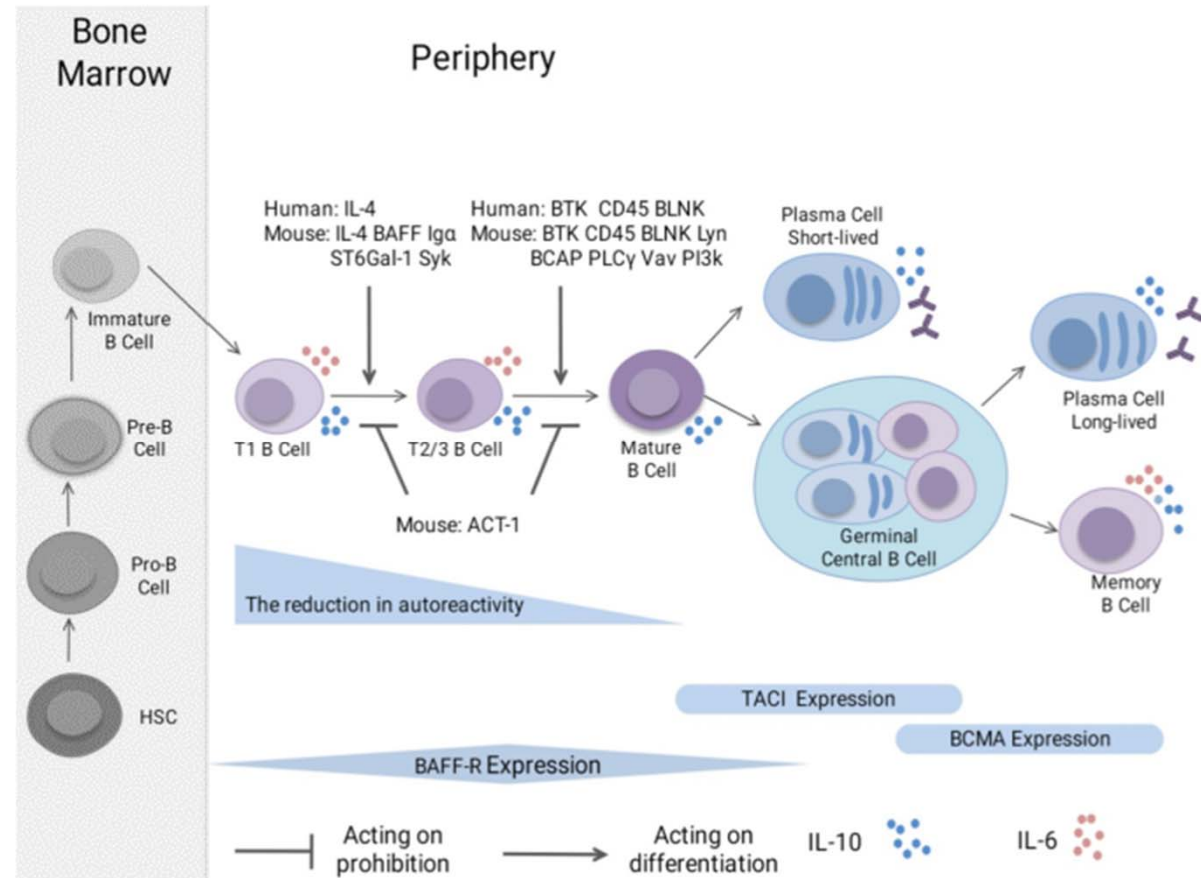
- alternativní cesta při vysoké afinitě BCR k vlastnímu antigenu
- B buňka si v reakci na signál z BCR reaktivuje RAG1/2 a spustí opětovně $V_L J_L$ rekombinaci
- výsledkem je odstranění původního, auto-reaktivního BCR, a exprese nového BCR

3. Anergie

- nastává v případě, že B buňka rozezná vlastní antigen s příliš nízkou afinitou
- dochází k snížení exprese BCR a utlumení BCR signalizace

VÝVOJ B LYMFOCYTŮ – PERIFERNÍ KREV

- Transitional B buňky
 - vývojové stádium s krátkým poločasem života
 - přechod mezi nezralými B buňkami kostní dřeně a zralými B buňkami periferní krve
 - pořad u nich probíhá intenzivní negativní selekce
 - **T1 B buňky** – vyplavují se z BM a migrují do sleziny
 - **T2 B buňky** – ve slezině zvýší expresi CD21, CD23 a IgD a schopnost cirkulace (pořád mají markery nezralých B buněk)
 - **T3 B buňky** – neproliferující, pokud nedojde k stimulaci BLNK, PLCγ anebo BAFF, se stávají anergické a jsou depletovány
- Zralé (naivní) B buňky
 - v krvi přežijí 7-8 týdnů, nedojde-li k aktivaci, jsou odstraněny



Zhou et al., 2020 (<https://doi.org/10.1186/s12967-020-02289-w>)

Aktivace B buněk v lymfatické uzlině

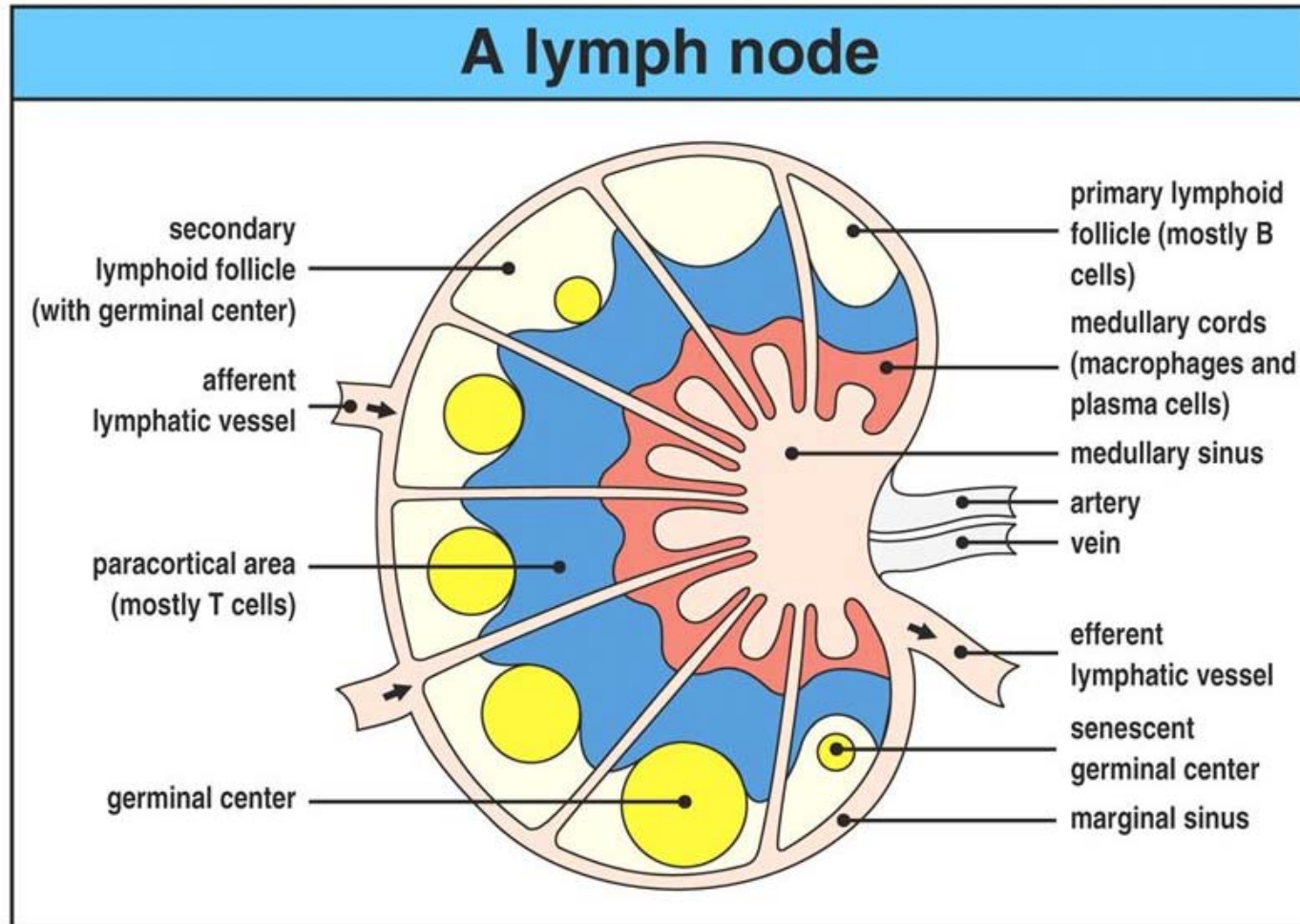
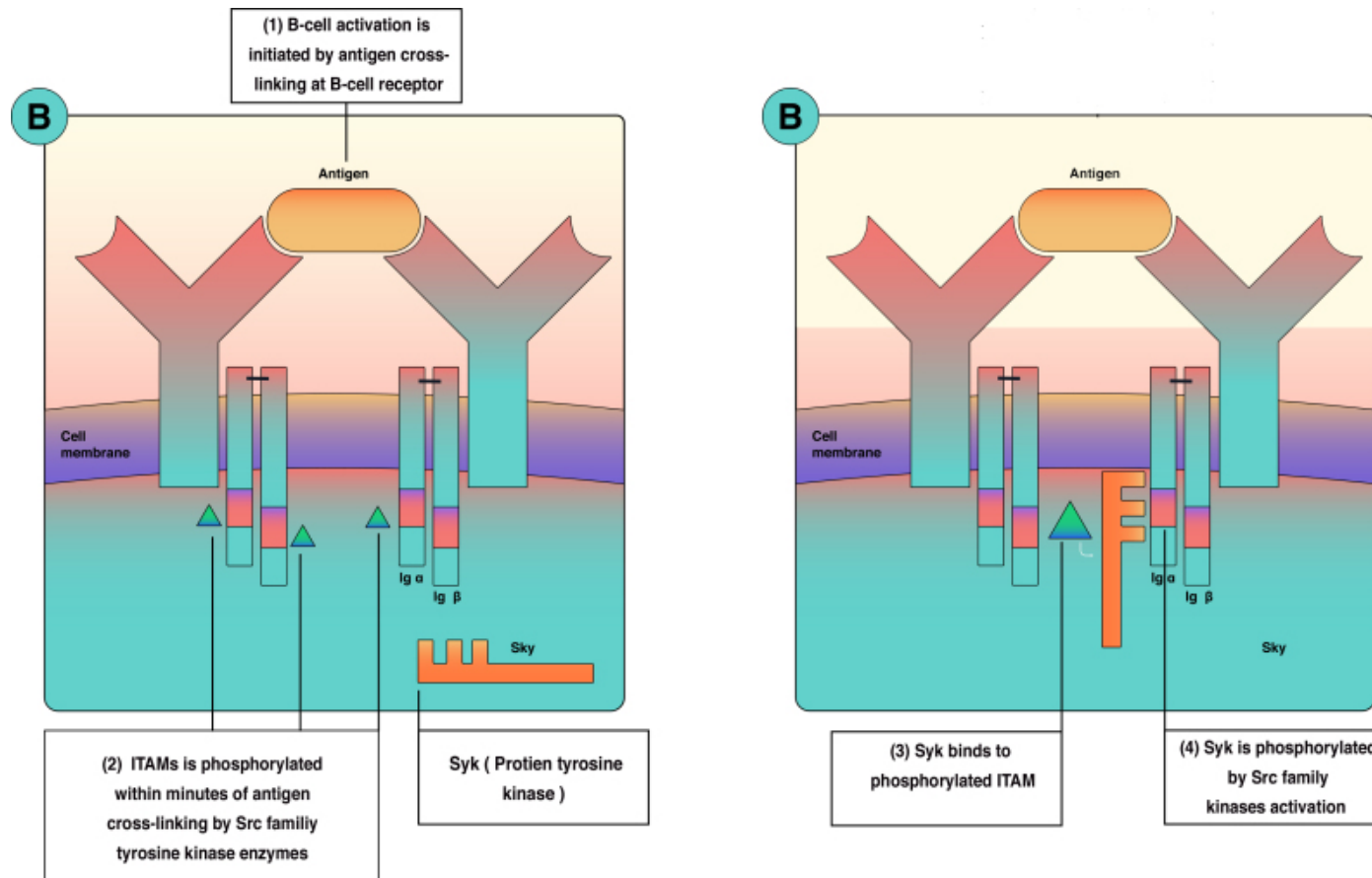


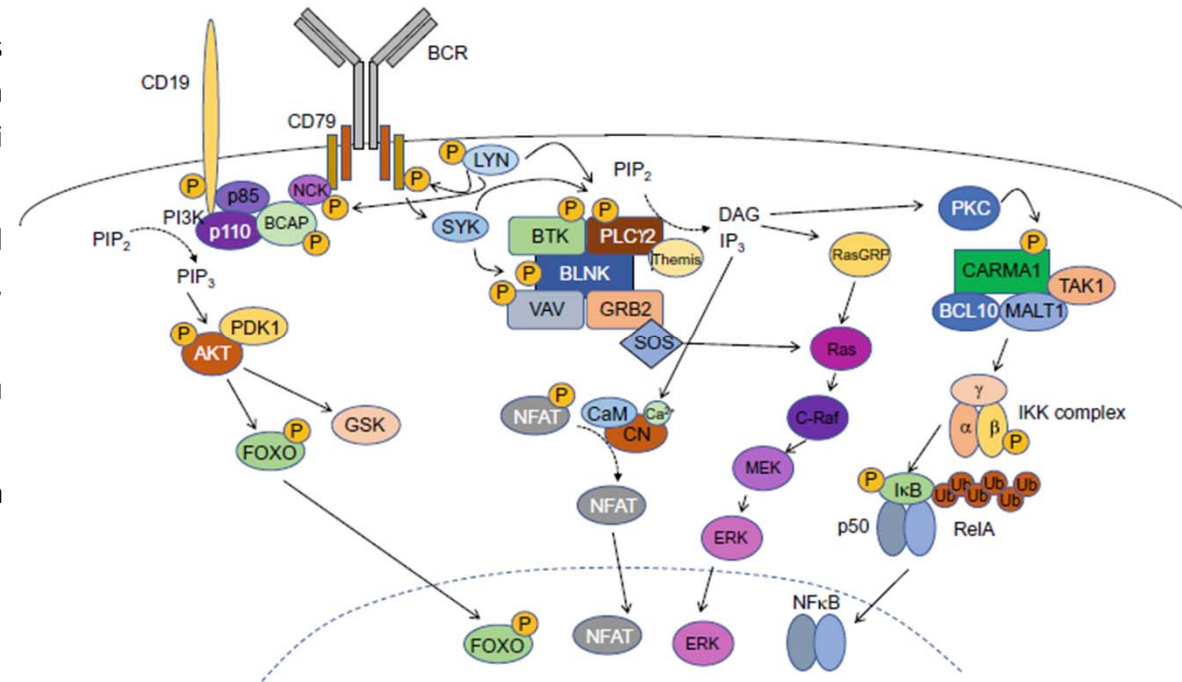
Figure 1-8 part 1 of 2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Aktivace B lymfocytů přes crosslink BCR



AKTIVACE B LYMFOCYTŮ

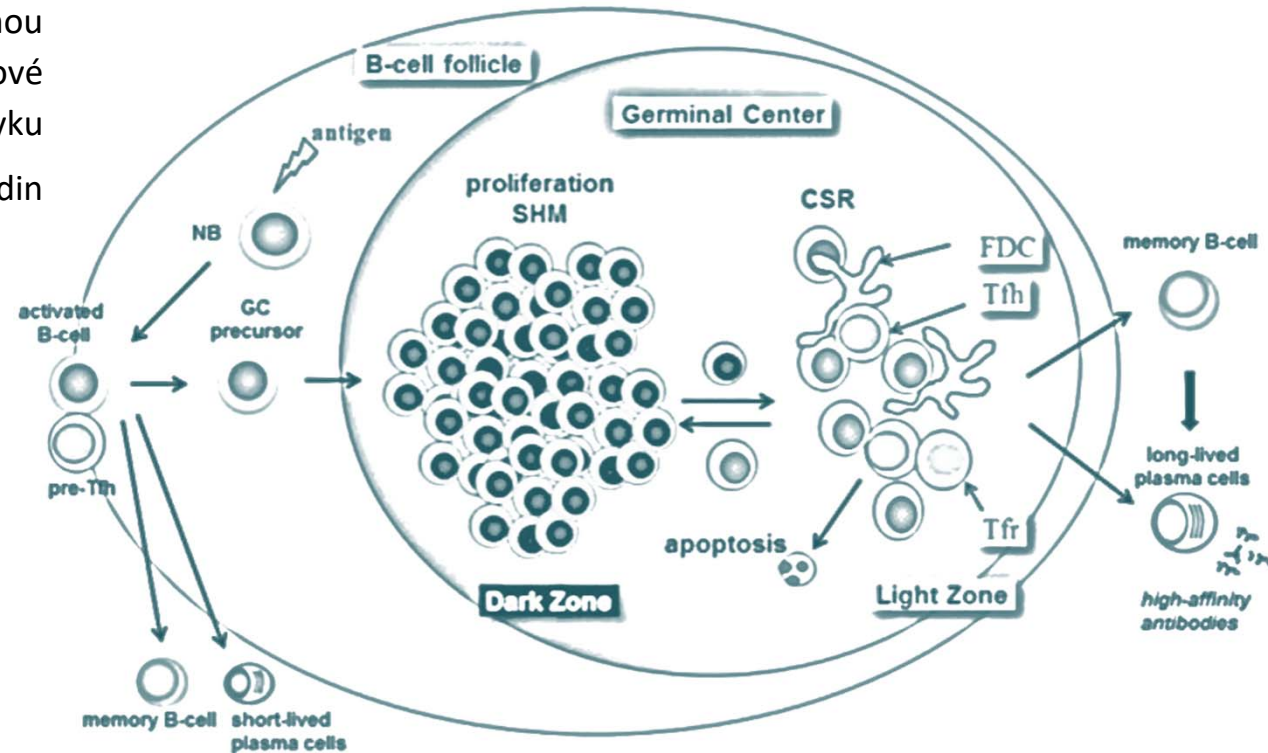
- dráha B-buněčného receptoru (BCR)
 - po rozpoznání antigenu se signál přeneše přes nekovalentně vázaný heterodimer CD79A a CD79B (vazba umožňuje jak signalizaci do cytosolu, tak internalizaci receptoru)
 - CD79 obsahuje tzv. ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) motivy, na které se vážou Src kinázy Lyn, Fyn a Blk
 - fosforylace tyrosinů na ITAM umožňuje vytvoření komplexu BLNK, což ústí v aktivaci BTK, PLC γ 2, GRB2 a VAV
 - následně dochází k aktivaci 4 drah, které zajišťují **přežití a indukují proliferaci**:
 1. vápenatá signalizace
 2. NF κ B dráha
 3. PI3K dráha
 4. MAPK dráha
 - po aktivaci B buňka migruje do lymfatické uzliny (spojené s výraznými přestavbami buněčného cytoskeletu), kde diferencuje do plasmatické anebo paměťové B buňky



Wang et al., 2020 (<https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1>)

REAKCE GERMINÁLNÍHO CENTRA

- B buňky zde exprimují aktivací-indukovanou deaminázu (AID), která deaminuje cytidinové zbytky na IgV a regionech izotypového přesmyku
- ~50 % buněk eliminovaných každých 6 hodin (pomocí represe BCL2 a BCL6)
- iniciace reakce GC
- vytvoření zón
- V GC se dějí 2 hlavní procesy:
 - somatická hypermutace (SHM) – v tmavé zóně
 - izotypový přesmyk (CSR) – ve světlé zóně



Wang et al., 2020 (<https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1>)

- T-independent antigen (not a peptide) – only IgM, not a memory cell
 - T-dependent antigen (= peptide) – isotypový přesmyk
-

SOMATICKÁ HYPERMUTACE (SHM) A CLASS-SWITCH REKOMBINACE (CSR)

SHM

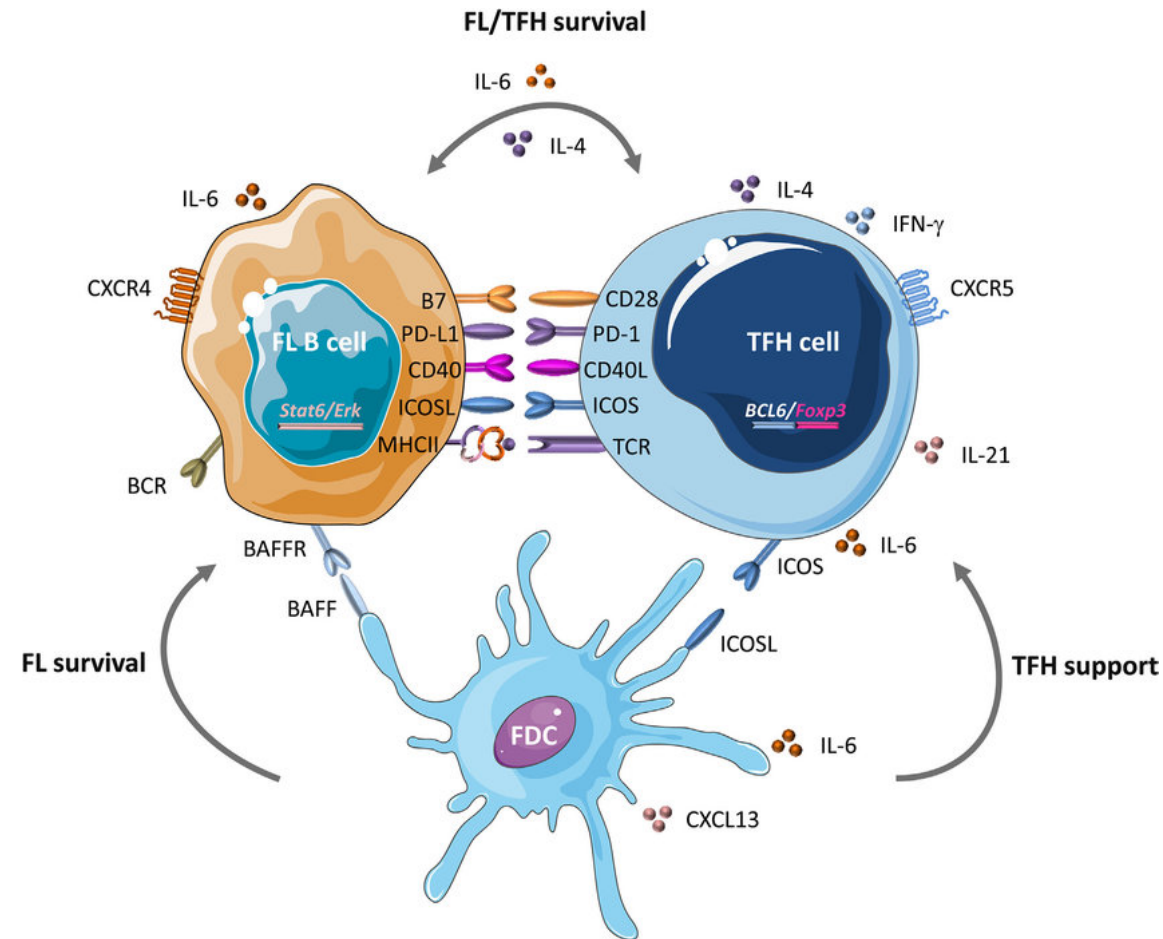
- mění se variabilní úseky těžkých i lehkých řetězců Ig
- produktem tohoto procesu jsou B buňky:
 1. s vyšší afinitou k antigenu
 2. s nižší afinitou k antigenu
 3. se stejnou afinitou k antigenu
- následně ve světlé zóně GC proběhne selekce B buněk s vyšší afinitou k antigenu a ty se pak dostávají do světlé zóny

CSR

- změna na úrovni DNA způsobující přepnutí z IgM/IgD na jinou třídu Ig (IgG, IgA, IgE)
- iniciace tohoto procesu je typicky závislá na Tfh buňkách
- mění se konstantní části těžkých řetězců beze změny variabilních částí
- ve výsledku původní V(D)J řetězec asociuje s novým C řetězcem (uplatňuje se DNA rekombinace následovaná NHEJ)
- regulační roli hrají cytokiny, např. IL-4

INTERAKCE S MIKROPROSTŘEDÍM GERMINÁLNÍHO CENTRA

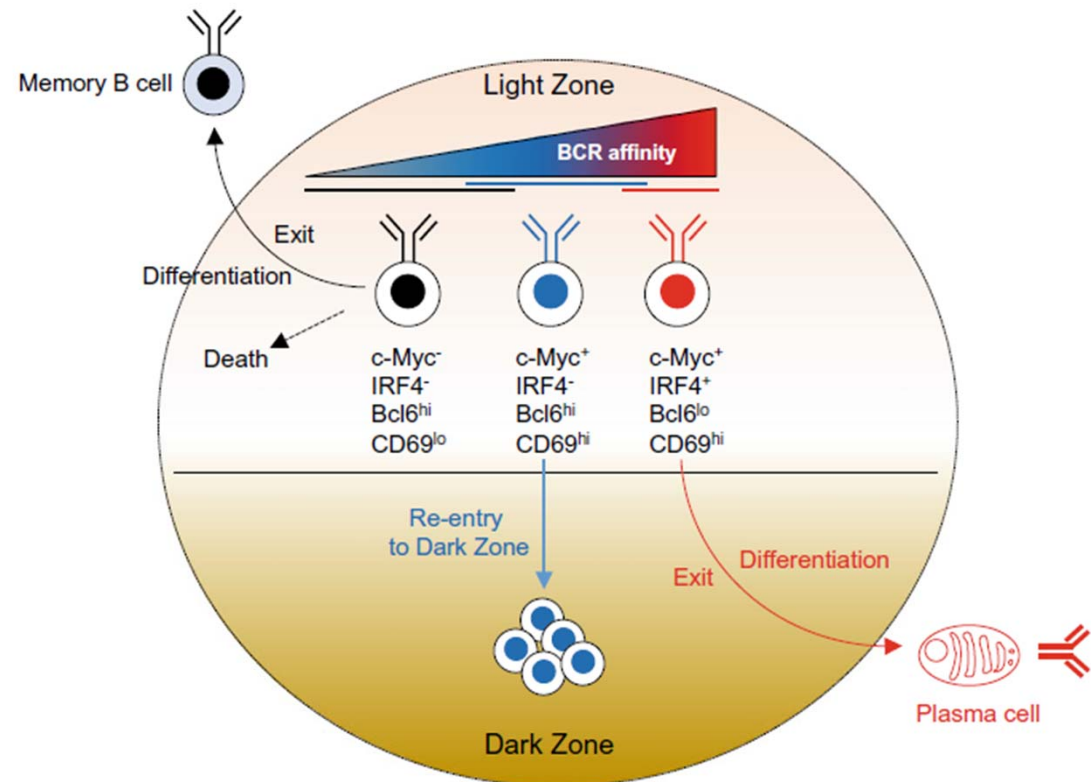
- signály Tfh (naivní Th buňky, které po aktivaci upregulovaly CXCR5 a migrovali do uzliny)
- důležitá signalizace přes CD40L/CD40 (CD40L na povrchu T buněk + CD40 upregulované na povrchu GC B buněk) – vede k aktivaci NFκB dráhy a c-Myc



Ochando and Braza, 2017 (<https://doi.org/10.18632/oncotarget.22788>)

DIFERENCIACE PLASMATICKÝCH BUNĚK

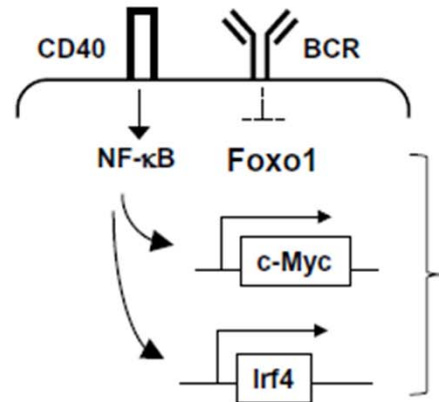
- závislost na afinitě BCR (vývoj směrem do GC B buněk, paměťových nebo plasmatických buněk)
- komitment do plasmatických buněk regulují IRF4 (signály pro přežití), Blimp1 (master regulator, inhibuje Pax5 a Bcl6, aktivuje IRF4 a transkripci Ig), CD69 a c-Myc (regulátor buněčného cyklu)
- důležité rozpoznání antigenu prezentovaného FDC v LZ (množství internalizovaných antigenů přímo úměrné pomoci Tfh buněk i aktivitě PI3K/Akt dráhy, která inhibuje regulátor DZ fenotypu, Foxo1)



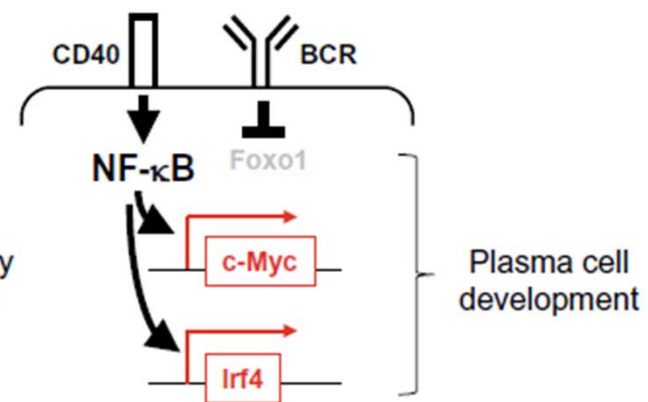
Wang *et al.*, 2020 (<https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1>)

DIFERENCIACE PLASMATICKÝCH BUNĚK

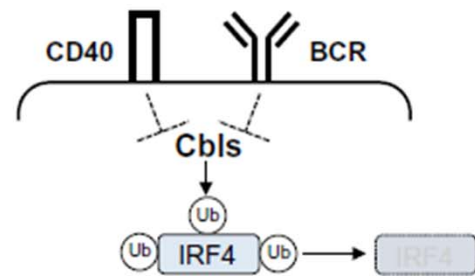
Intermediate BCR & CD40 signal



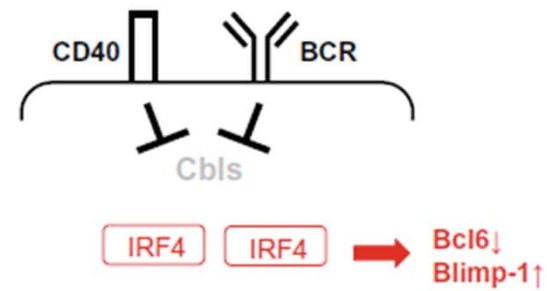
Strong BCR & CD40 signal



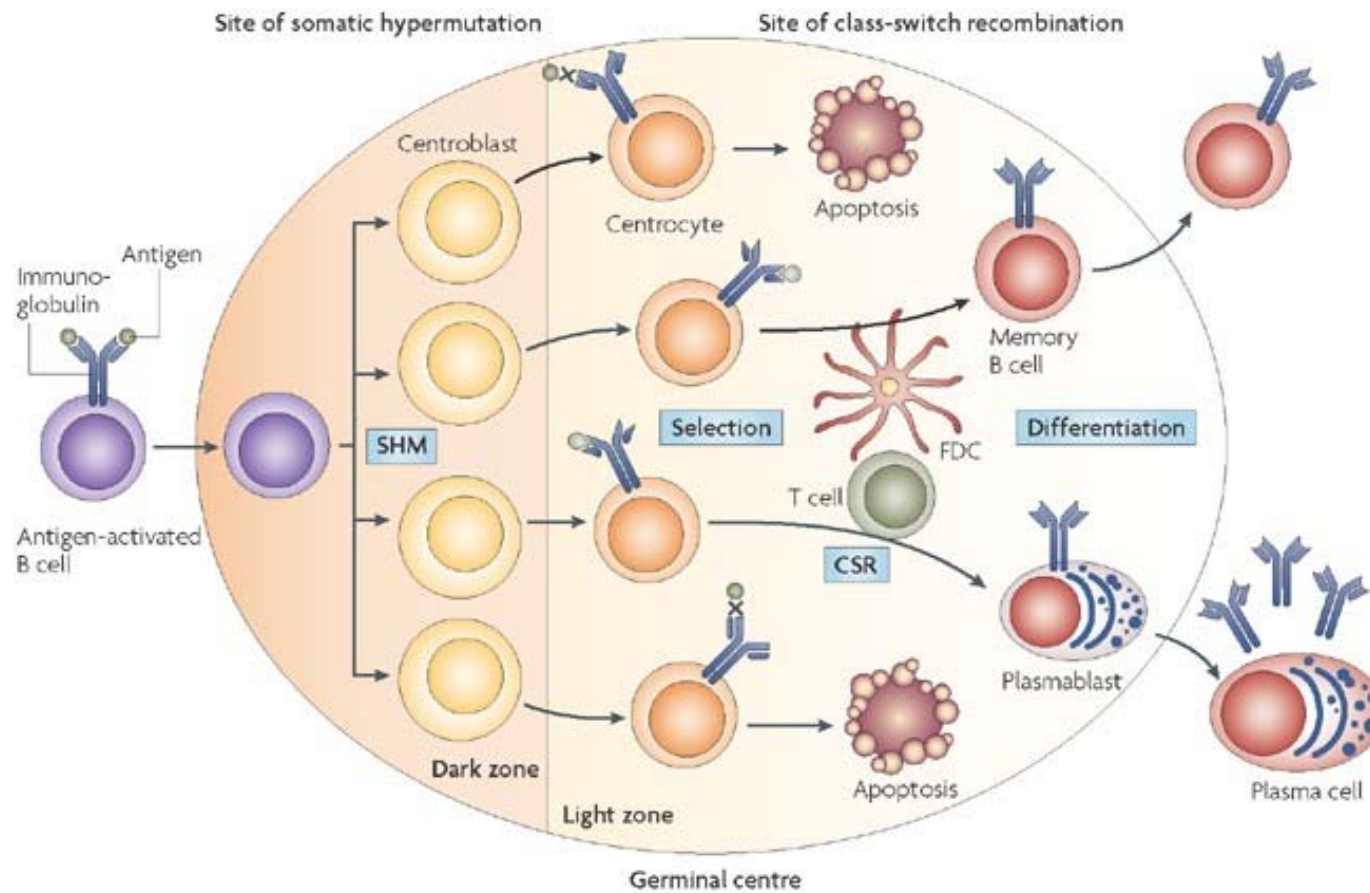
Intermediate BCR & CD40 signal



Strong BCR & CD40 signal



Shrnutí dění v germinálním centru:



Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy: [Ulf Klein](#) & [Riccardo Dalla-Favera](#)

- The germinal centre (GC) of lymphoid organs is the main structure where antigen-activated B cells diversify their immunoglobulin genes by somatic hypermutation (SHM) to generate high-affinity antibodies. Most of the cells also undergo class-switch recombination (CSR) to generate antibodies with specialized effector functions.
- The processes of SHM and CSR are associated with DNA-strand breaks. GC B cells use specialized mechanisms that allow for the activity of those DNA-modifying processes without inducing a DNA-damage response, foremost by inhibiting the p53-dependent and p53-independent responses.
- Centroblasts, which are GC B cells that undergo active SHM, are programmed to proliferate extremely rapidly and thereby generate a large number of immunoglobulin mutations in a short time from which high-affinity antibodies can be selected. Moreover, these cells have a pro-apoptotic programme that ensures the rapid elimination of B cells expressing newly generated antibodies with suboptimal binding characteristics.
- The transcription factor BCL-6 (B-cell lymphoma 6) is the master regulator of GC B-cell differentiation, as it mediates the repression of genes involved in negative cell cycle regulation as well as the inhibition of genes involved in B-cell activation, plasma-cell and memory B-cell differentiation, and in the response to genotoxic stress.
- GC B cells that produce high-affinity antibodies are selected to differentiate into plasma cells and memory B cells through specific gene expression changes that coordinately regulate proliferation, apoptosis and differentiation. Essential for these processes are several major transcriptional regulators that, besides BCL-6, include PAX5 (paired box protein 5), NF- κ B (nuclear factor- κ B), IRF4 (interferon-regulatory factor 4), BLIMP1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1), and XBP1 (X-box binding protein 1)
- Genes critically involved in the regulation of proliferation, apoptosis and differentiation during the GC response are occasionally dysregulated by genomic alterations — such as chromosomal translocations or aberrant SHM in regulatory regions — resulting from errors during antibody gene modifications. Therefore, the production of high-affinity antibodies comes at the risk of oncogenic transformation.

Detekce hypoxie a obnovení krevního zásobení

REAKCE TKÁNÍ NA ZMĚNY V DOSTUPNOSTI KYSLÍKU A REGULACE ANGIOGENEZE

- A. detekce nedostatku kyslíku - Hypoxia inducible factor (HIF)
- B. iniciace angiogeneze - vaskulární endoteliální růstový faktor VEGF/VEGFR
- C. buněčné mechanismy angiogeneze (role Notch a angiopoetinové signalizace)

THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE 2019

Illustrations: Niklas Elmehed



William G.
Kaelin Jr.

Sir Peter J.
Ratcliffe

Gregg L.
Semenza

“for their discoveries of how cells sense
and adapt to oxygen availability”

THE NOBEL ASSEMBLY AT KAROLINSKA INSTITUTET

HYPOXIE A HIF

- **Hypoxie:** snížený parciální tlak O₂ ve tkáni x normoxie

Table 1.

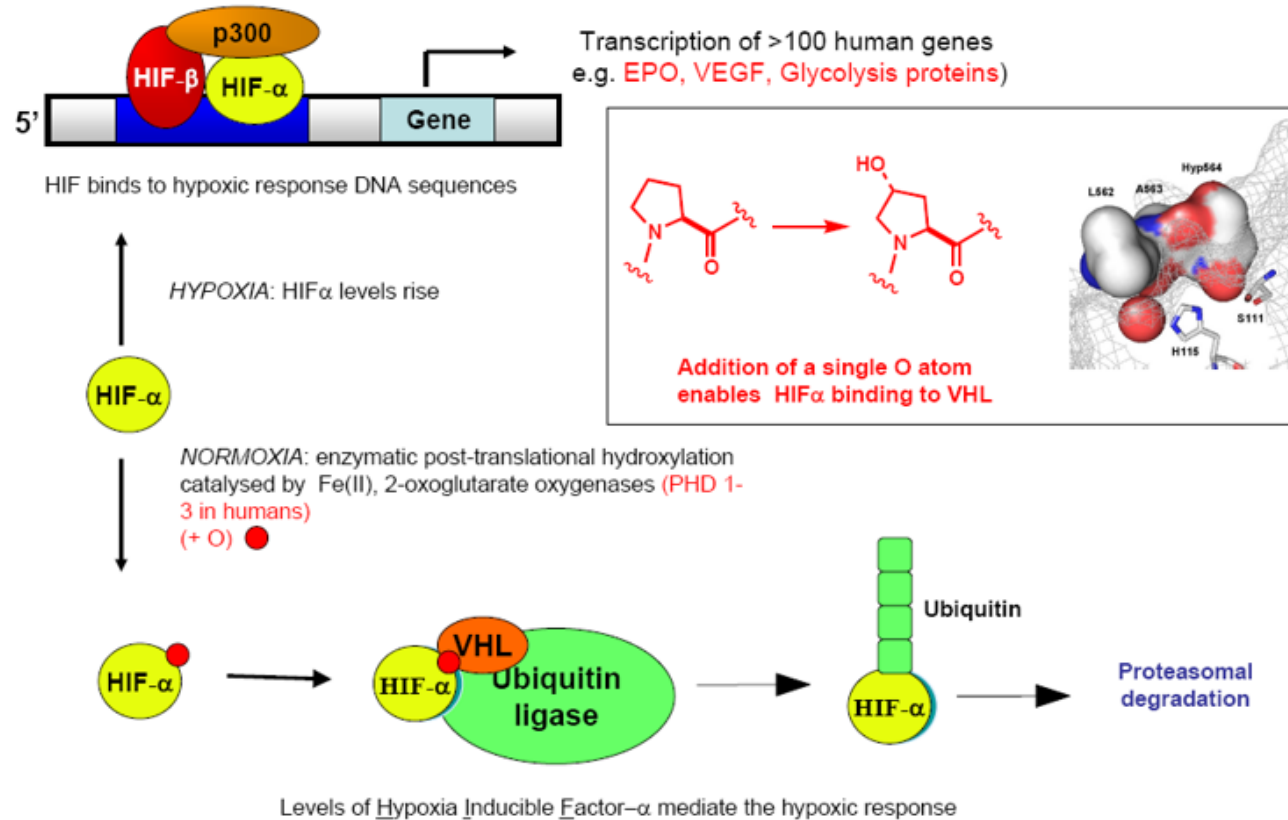
Approximate levels of oxygen in normal tissues and tumours

mmHg	% Oxygen ^a	Comment
760	100.0	Standard atmospheric pressure
160	21.0	Oxygen in air at normal atmospheric pressure
100	13.5	Inspired oxygen pO ₂ in alveoli; oxygen level affected by in/outflow of gases and water vapour
70	9.5	Arterial blood oxygen concentration
50	6.5	Approximate pO ₂ at venous end of circulation ¹²
Suggested definitions		
38	5.0	Physoxia: physiological oxygen level in peripheral tissues with an average of approximately 6% (ranging from approximately 7.5% to 4% depending on the tissue). For experimental studies, 5% is the proposed compromise since this is often used
15	2.0	Physiological hypoxia ^b — <i>i.e.</i> the lower level at which normal hypoxic responses are elicited (range: lower limit approximately 1%; upper limit possibly ≤5%)
8	1.0	Pathological hypoxia ^c : shows persistence of poor oxygenation suggesting disruption to normal homeostasis. Below this level pathological hypoxia applies
3	0.4	Radiobiological hypoxia: the oxygen level at which the cytotoxic effect of radiation is half maximal—illustrated in Figure 2

HYPOXIE A HIF

- O₂ se difuzí šíří asi na 150 μm
- **HIF** – Hypoxia-Inducible Factor:
 - Heterodimerický transkripční faktor aktivující geny obsahující v promotorové sekvenci HRE (Hypoxia response element)
 - Prozatím je známo (60 -100) genů regulovaných HIF, řada z nich reguluje odpověď na hypoxii (angiogeneze, proliferace, metabolismus glukózy, migrace, apoptóza, erytropoeza, metabolismus Fe)
 - Heterodimer sestává ze tří **α** podjednotek (HIF1α, 2α, 3α) a jedné podjednotky **β** (HIFβ=ARNT)
 - **α podjednotky jsou při normoxii silně labilní**, podjednotka β je na koncentraci O₂ nezávislá

HIF PŘI NORMOXII A HYPOXII – VÝZNAM HYDROXYLACE PROLINU

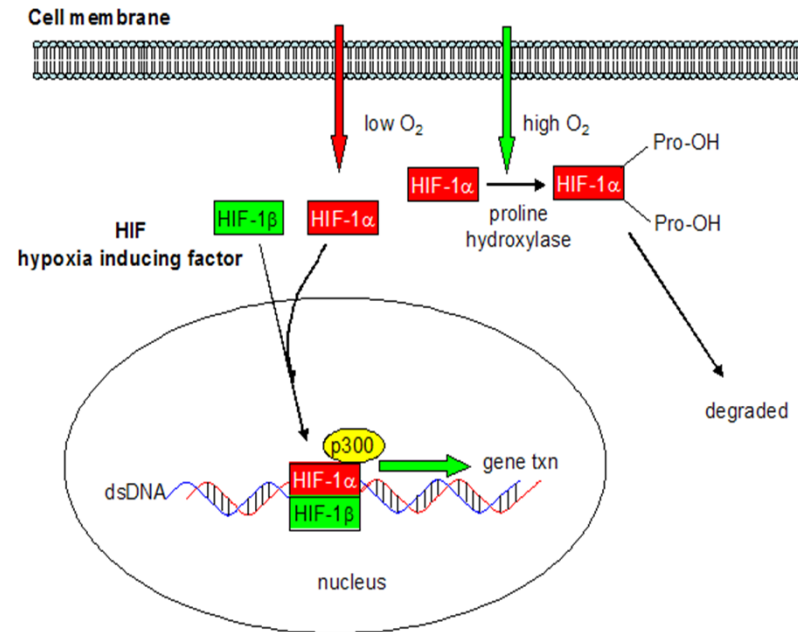


VHL (von Hippel-Lindau) - tumor supresorový gen

<http://www.chem.ox.ac.uk/oc/cjschofield/images/new-2.png>

MODELOVÉ ZMĚNY SPOJENÉ S HYPOXIÍ/HIF SYSTÉMEM

- embryonální vývoj
- angiogenese
- růst chrupavek
- krvetvorba – aktivace EPO genu

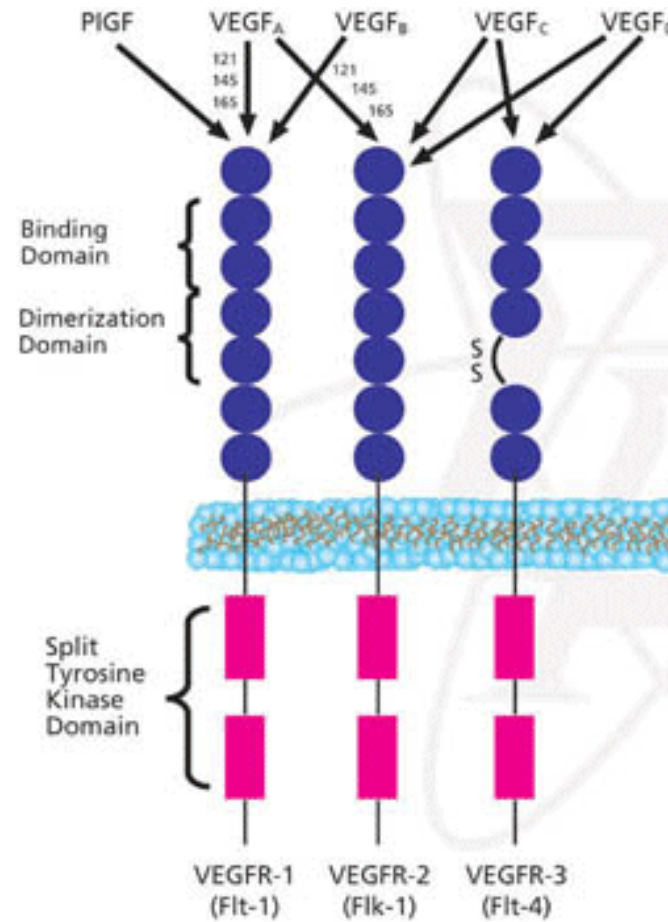


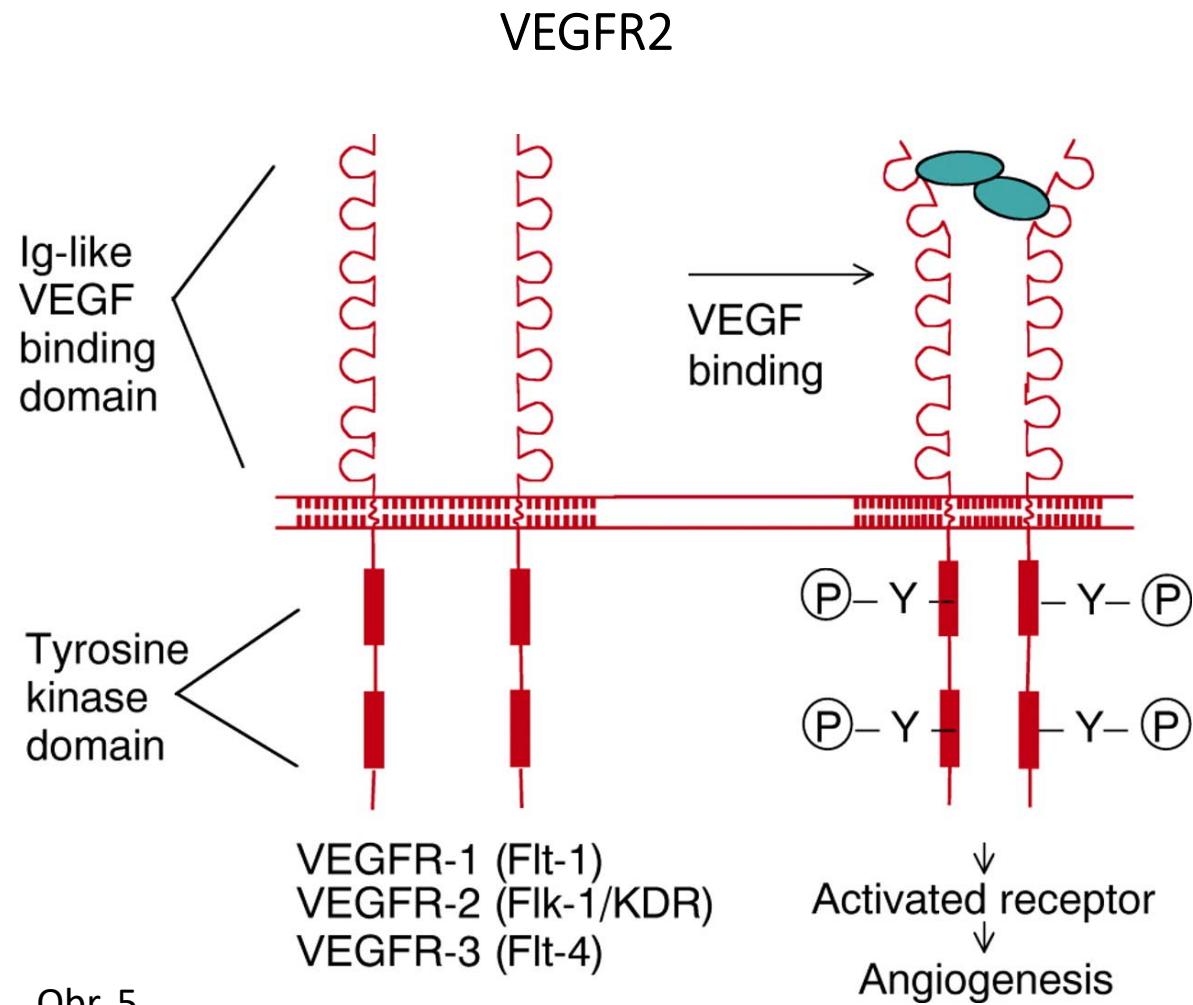
Genes upregulated:

- erythropoietin (induce RBC formation)
- glycolytic enzymes (needed if O₂ low)
- angiogenesis (new blood vessel growth)
- embryonic development
- placenta (for vascularization)
- macrophage and neutrophils (work in hypoxic wound conditions)

After: Science, 303, pg 1454 (2004)

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTORS (VEGF) A JEJICH RECEPTORY (VEGFR)





Obr. 5

VEGF/VEGFR VE VÝVOJI

- reguluje vznik a vývoj cévní soustavy
- master regulátor angiogeneze (vývoje cév)
- hypoxie (= nedostatek kyslíku) indukuje HIF (hypoxia-induced factor), který reguluje produkci VEGF.
- VEGF je schopen regulovat vznik de novo cév v hypoxické části embrya
 - podobný mechanismus se uplatňuje i při onkogenezi, kde VEGF podporuje prokrvení nádorů a tím podporuje jejich růst

SHRNUTÍ

- VEGF je **signální protein (ligand)** schopný indukovat genovou expresi
- Primárním cílem VEGF jsou **vaskulární ECs**
- VEGF přispívá k **zachování stávajících cév** a indukuje **vznik a růst cév nových**
- Významná role VEGF v **embryonálním vývoji** i v **nádorové transformaci**

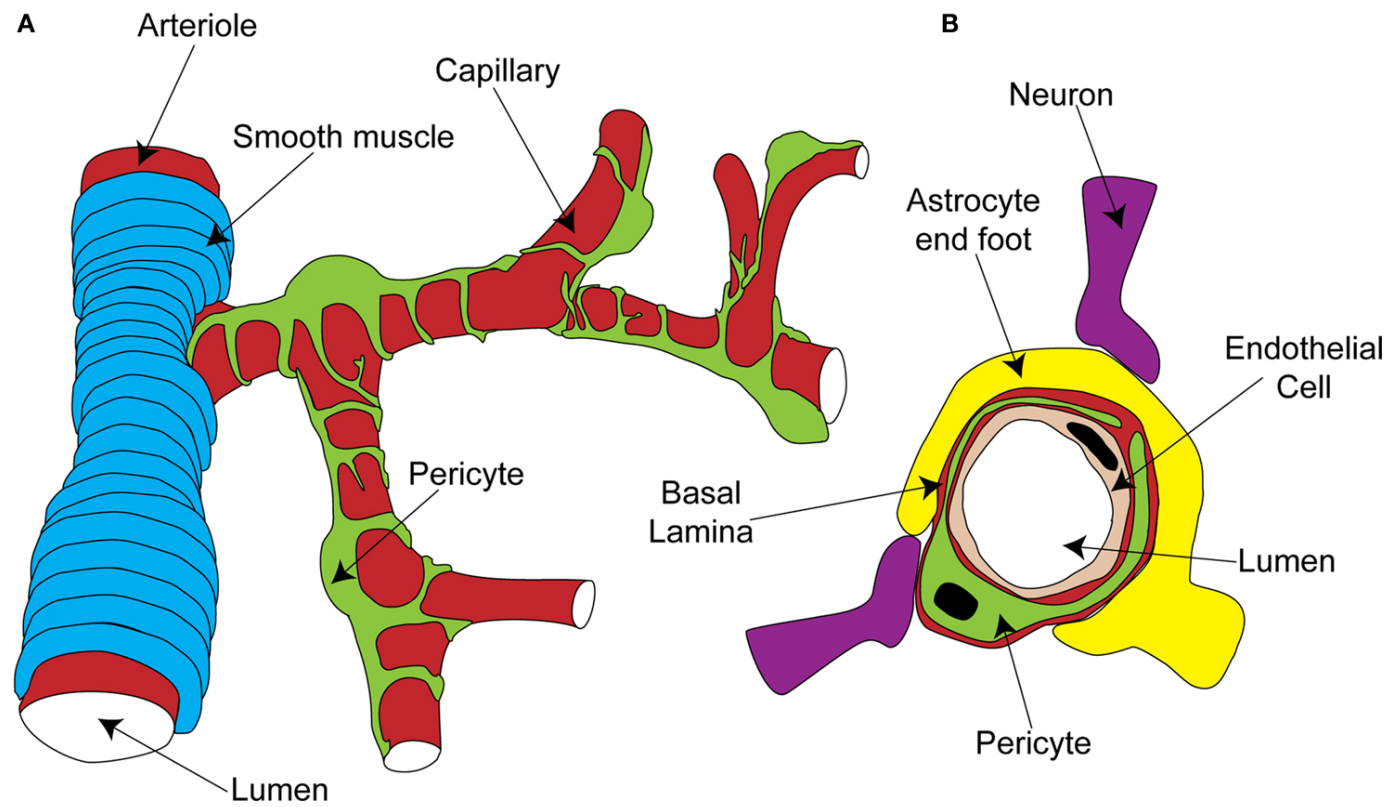


Proces	Úloha VEGF
Embryogeneze a časný postnatální vývoj	Nezbytný pro vznik krevních cév Delece jednoho genu VEGF je letální Nezbytný pro časný postnatální vývoj, zejména pro funkci ledvin
Růst kostí	Stimuluje invazi krevních cév, která je nutná pro trabekulární růst kostí Účinky inhibice VEGF jsou reversibilní pokud je hladina VEGF obnovena
Vyzrávání žlutého tělíska a angiogeneze v děloze	Stimuluje vyzrávání žlutého tělíska, které pak produkuje progesteron. Společné působení progesteronu a VEGF je nezbytné pro angiogenezi v děloze.
Hojení ran	Podílí se na vzniku nových cév v místě poranění

ANGIOGENEZE

- v embryogenezi
- iniciovaná:
 - poranění tkáně
 - menstruační cyklus
 - hypoxická tkáň
- sprouting x intususceptive (spliting)

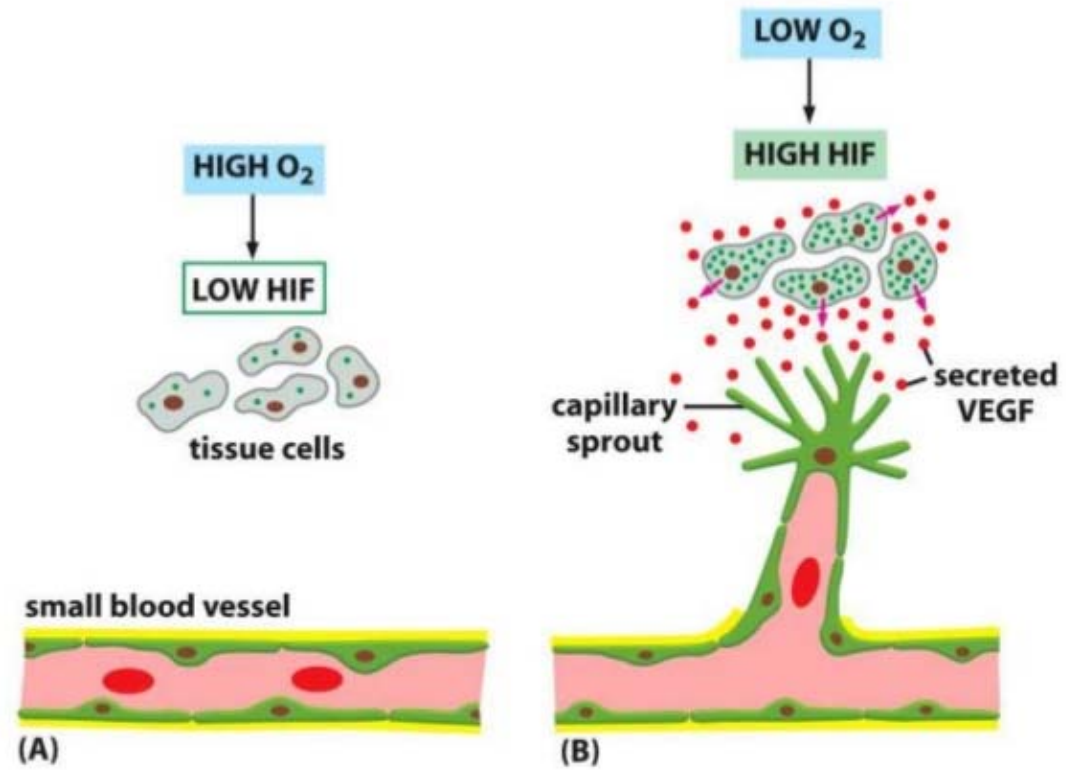
ANATOMIE CÉVY



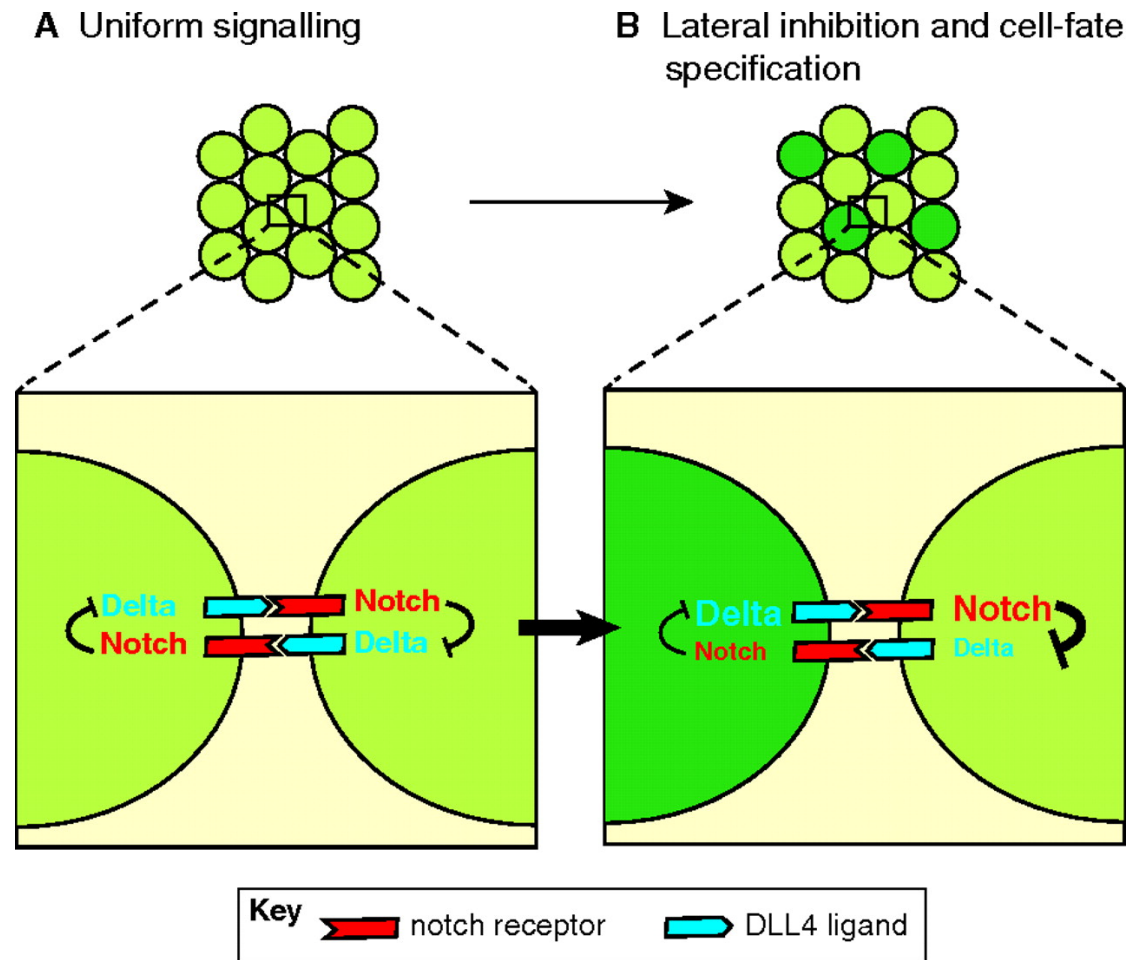
ZÁKLADNÍ FÁZE ANGIOGENEZE PO PORANĚNÍ (SPROUTING ANGIOGENEZE)

1. Dilatace cév (eNOS)
2. Kontrakce endotelu
3. „Tip-cell“ selekce (Notch signalizace)
4. Ustavení „stalk cell“ a jejich proliferace
5. Vakuolizace (vytvoření lumenu)
6. Spojení „výhonků“ (anastomóza)
7. Pericytární stabilizace

SPROUTING (KLÍČENÍ) CÉV

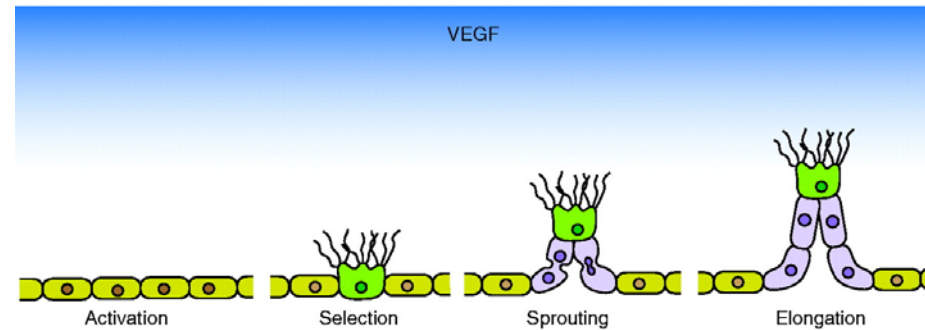


Obr. 2

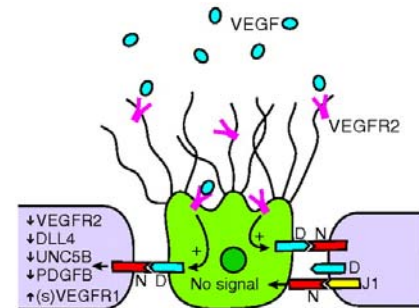


SPROUT INDUCTION.

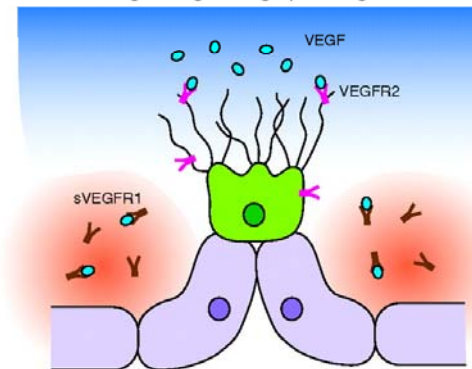
A Initiation of vessel formation



B VEGF-notch signalling during tip-cell selection

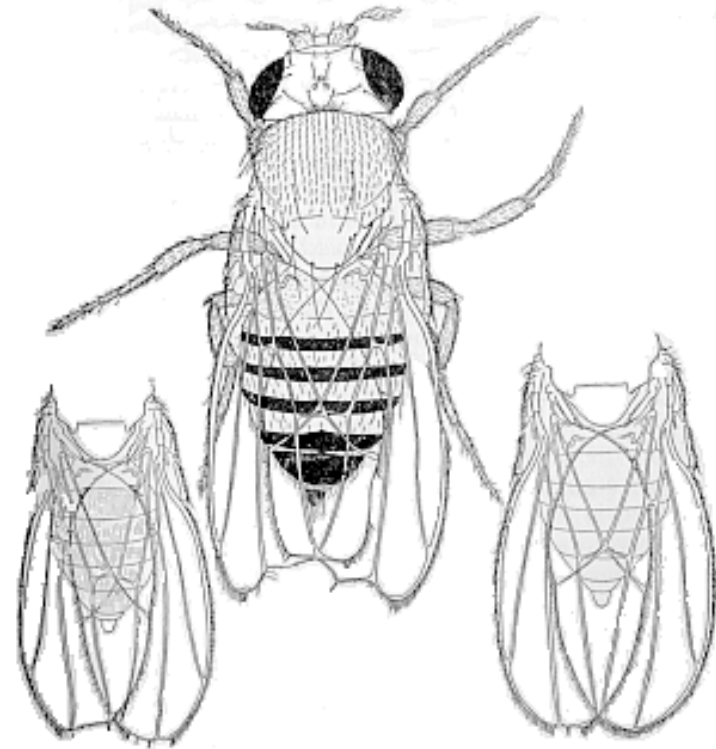


C VEGF signalling during sprouting

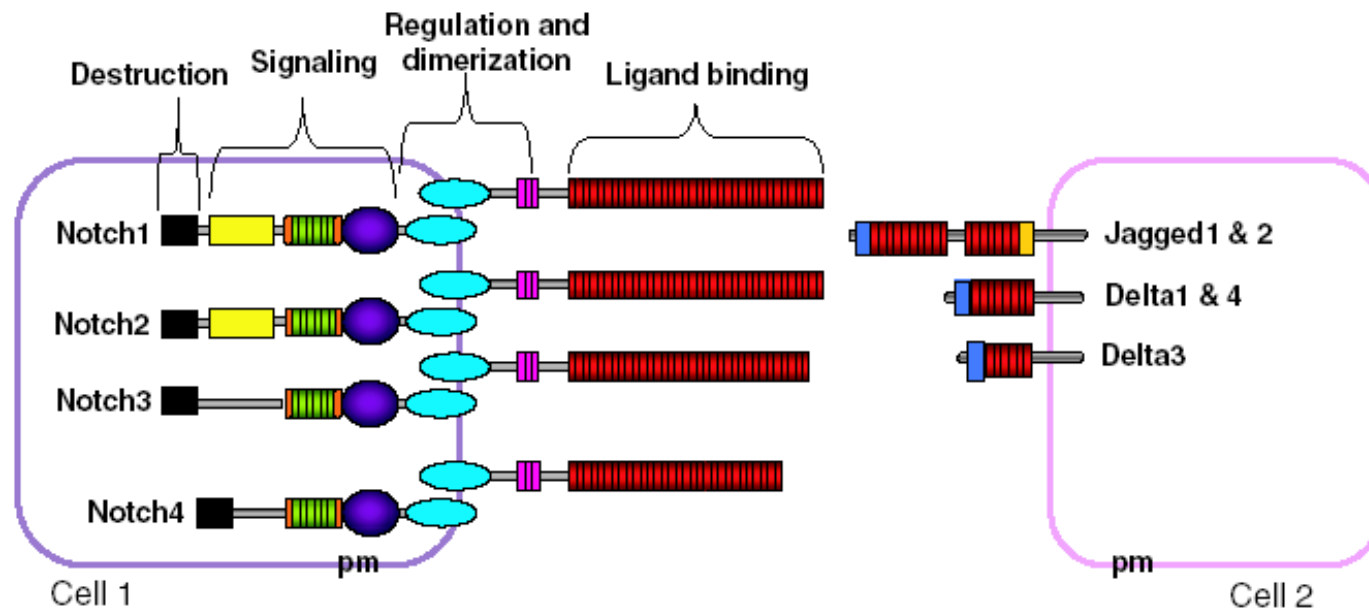


Signální dráha NOTCH

- Notch = zářez – podle prvního fenotypu octomilky se zářezy na křídlech (T.H. Morgan, 1919)



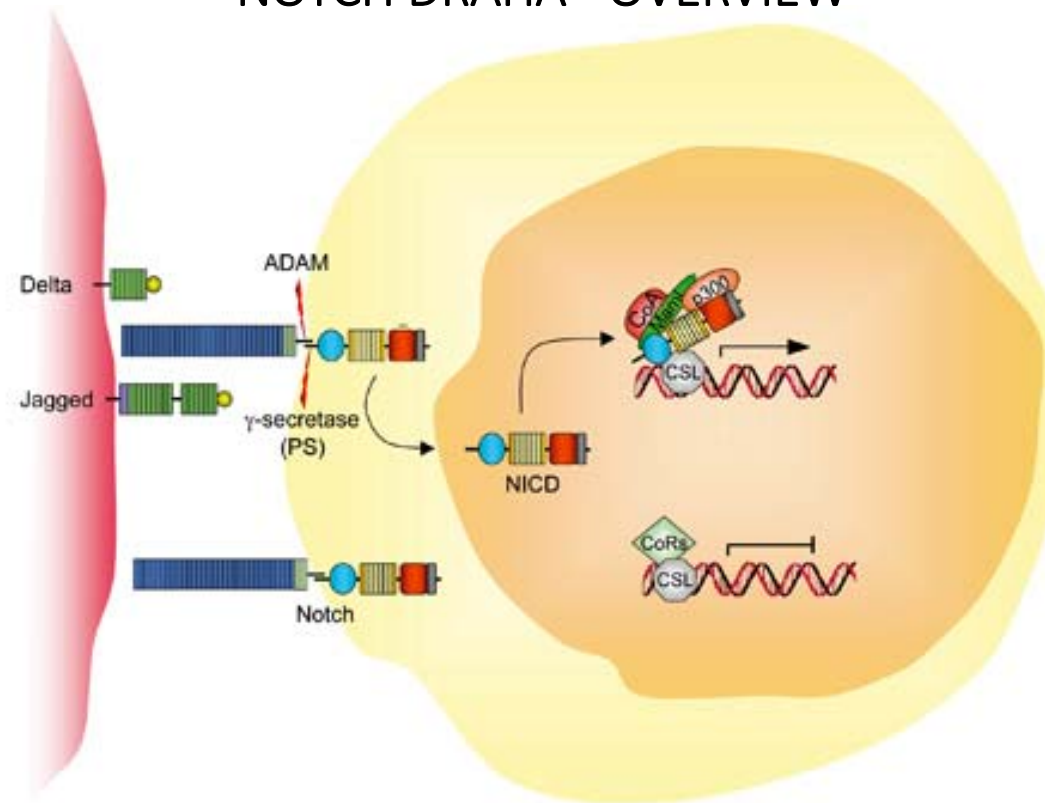
NOTCH



Transmembránové heterodimerické receptory Notch 1-4

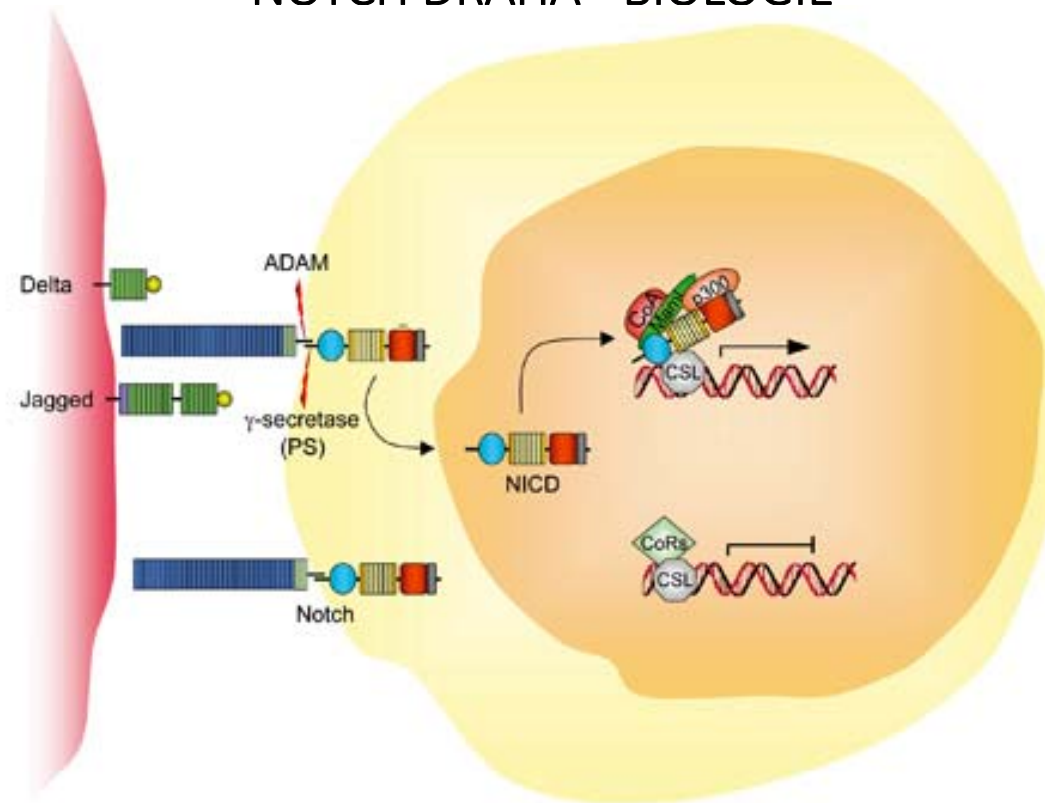
Notch ligandy Jagged a Delta – jsou vázány na buněčný povrch

NOTCH DRÁHA - OVERVIEW



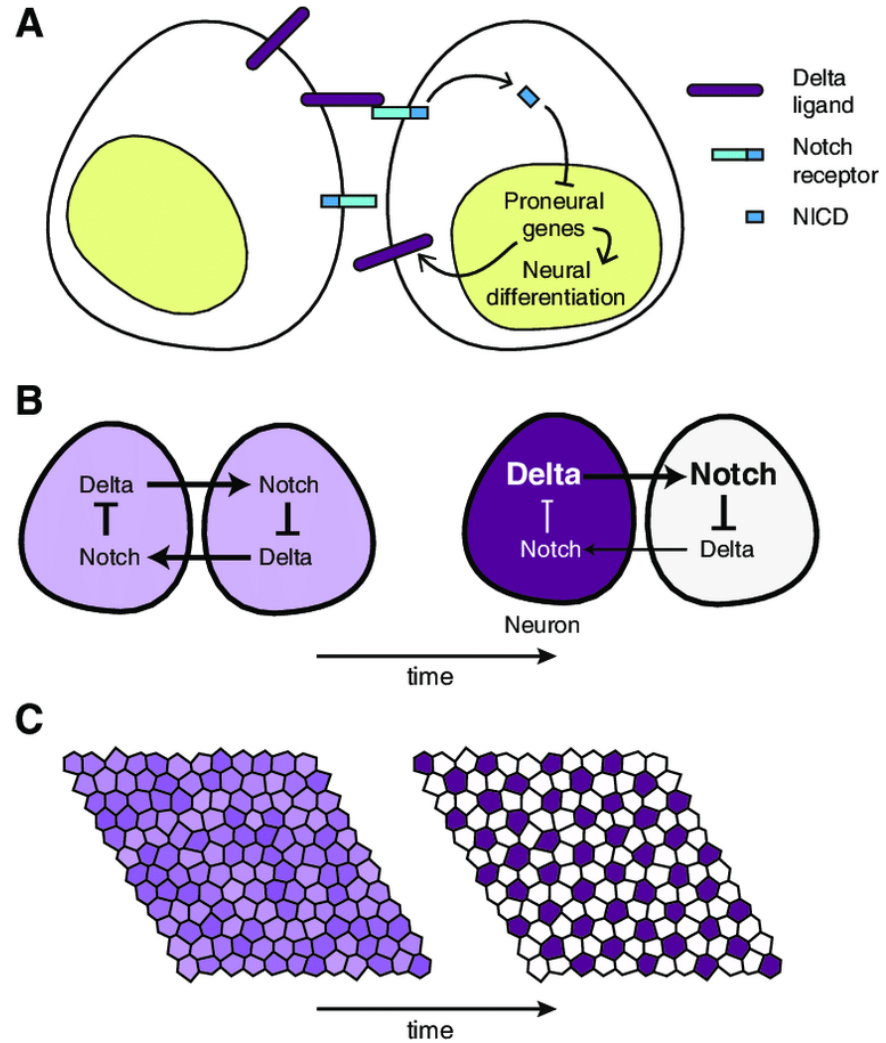
- Vazba ligandu Notch receptor aktivuje dvě proteázy (enzymy specificky štěpící protein)
- Proteázy jsou z rodiny ADAM a gamma-sekretáz
- Štěpení Notch těmito proteázami uvolňuje tzv. NICD (Notch intracellular domain), který se uvolňuje a do cytoplazmy a následně přesouvá do jádra
- NICD přímo interaguje s transkripčními faktory CBF1/Mastermind a spouští transkripci

NOTCH DRÁHA - BIOLOGIE



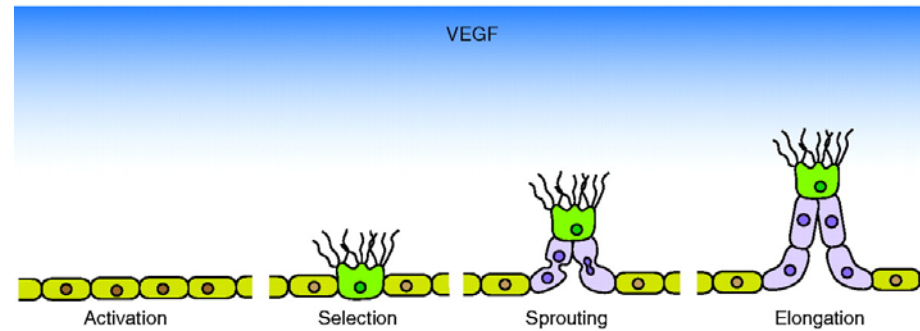
- Díky přímému působení má význam zejména při diferenciaci
- Typicky např. „Binary decisions“ a laterální inhibici
- Role v nikách kmenových buněk nebo při angiogenezi

LATERÁLNÍ INHIBICE PŮSOBENÍM NOTCH DRÁHY

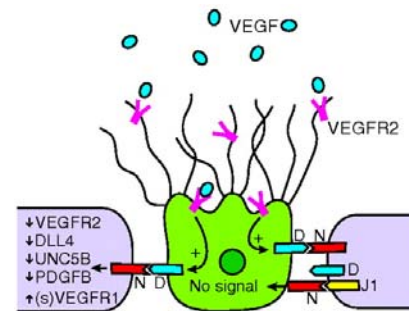


SPROUT INDUCTION.

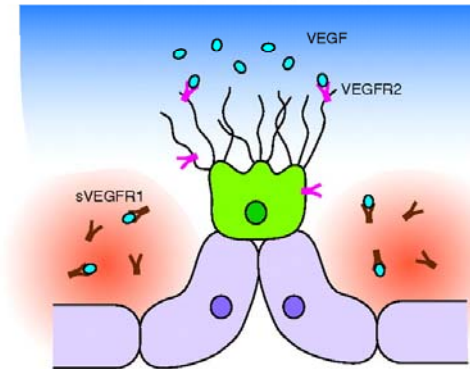
A Initiation of vessel formation

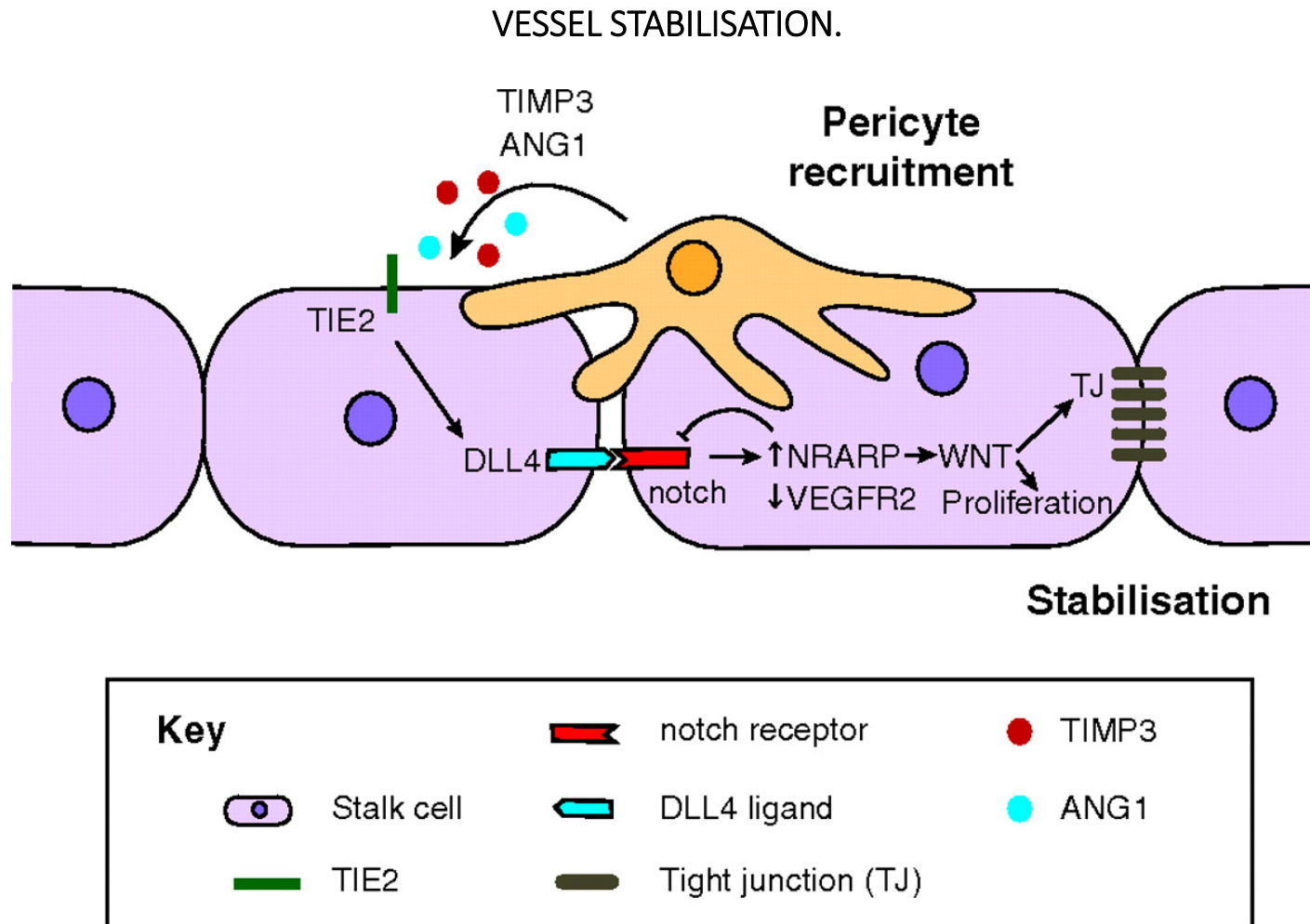


B VEGF-notch signalling during tip-cell selection

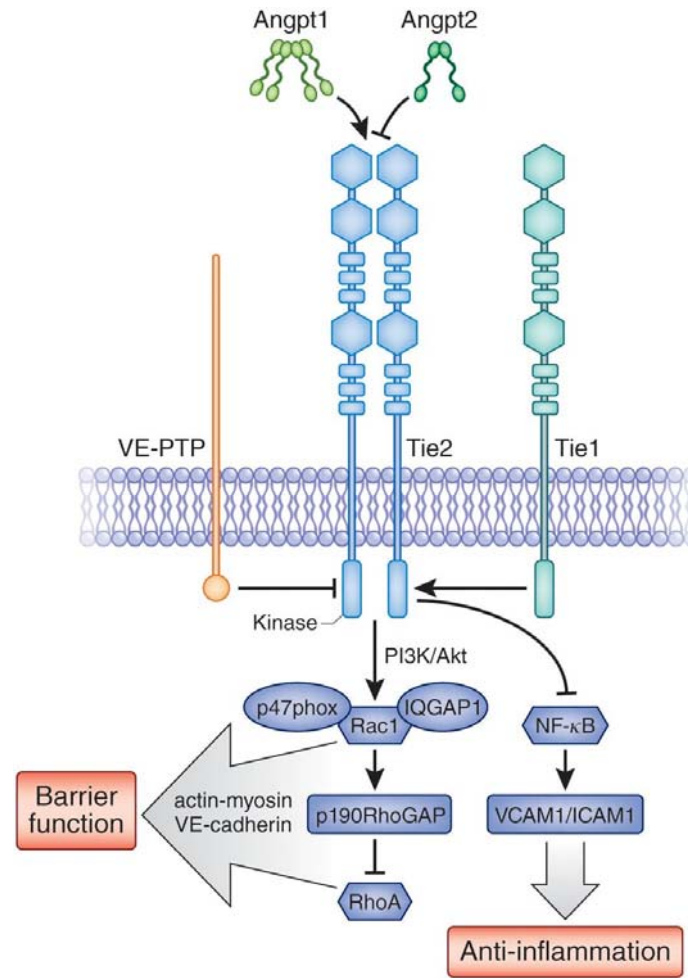


C VEGF signalling during sprouting





ANGIOPOETIN-TIE RTK SYSTÉM



CURRENT CONCEPTS OF ANASTOMOSIS.

