

Molekulární biologie

10. Programovaná buněčná smrt a molekulární podstata získané imunity

Osnova

1. Apoptóza
2. Vývoj a aktivace T- a B-lymfocytů
3. Imunoglobuliny, exprese BCR a TCR

Hlavní zdroje:

*S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4
Masarykova Universita Brno
ISBN 80-902562*

*M. Muller, Biology of Cells and Organisms
University of Illinois, Chicago*

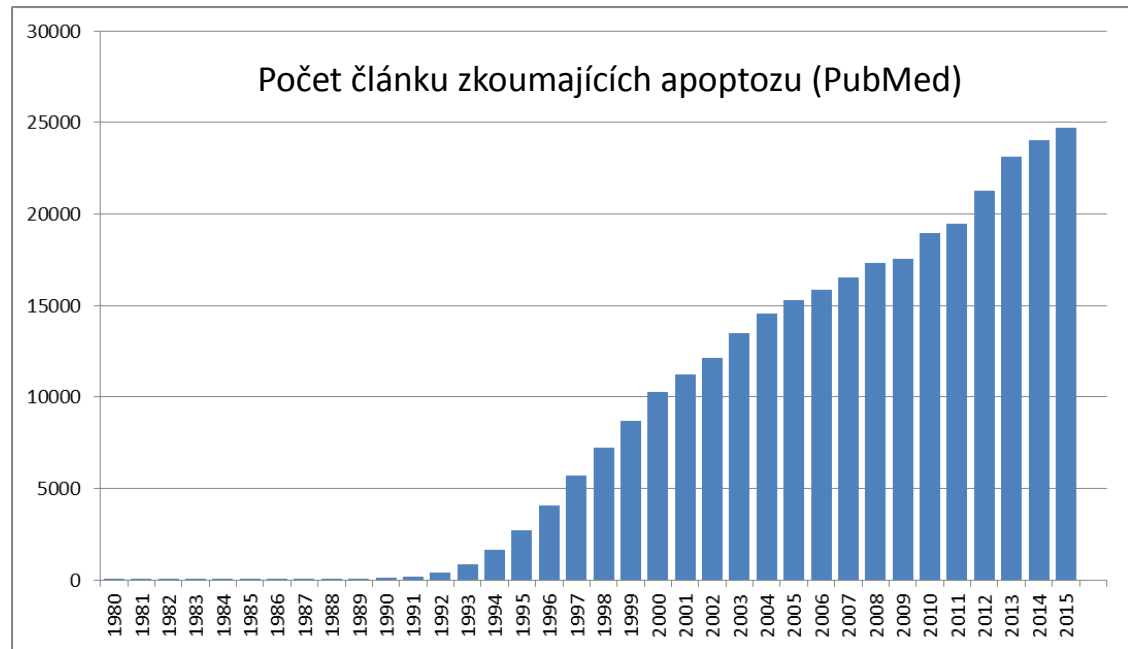
<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>

Apoptóza
programovaná buněčná smrt

Apoptóza

programovaná buněčná smrt

- koncept apoptozy od 1950s
- intenzivně zkoumána od 1990s
- poruchy apoptozy hrají roli v různých nemocech



Excesivní apoptóza
např. dystrofie



Omezená apoptóza
např. rakovina

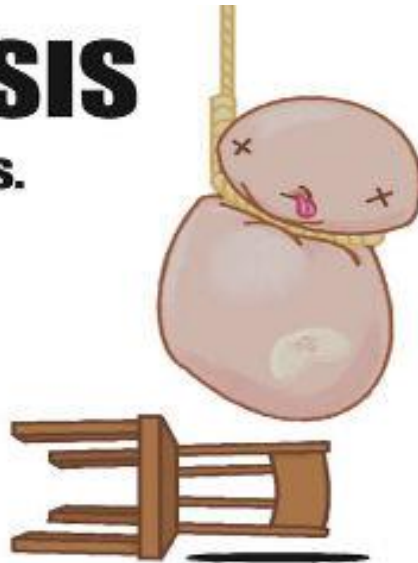
Dystrofie - degenerace tkáně z důvodu nemoci nebo špatné výživy

Apoptóza - programovaná buněčná smrt

- nezbytná pro vývoj a homeostázi organismu
- pouze u mnohobuněčných organismů
- přísně regulovaný proces (na rozdíl od nekrózy)

- buněčný stres stimuluje pro-apoptotické signální dráhy
- tyto dráhy aktivují proteázy zvané "kaspázy"
- kaspázy způsobují mitochondriální dysfunkci
- apoptotická buňka vykazuje charakteristické změny morfologie

APOPTOSIS
Know the signs.



Buněčný stres



pro-apoptotické
signální dráhy



Kaspázy



mitochondriální
dysfunkce

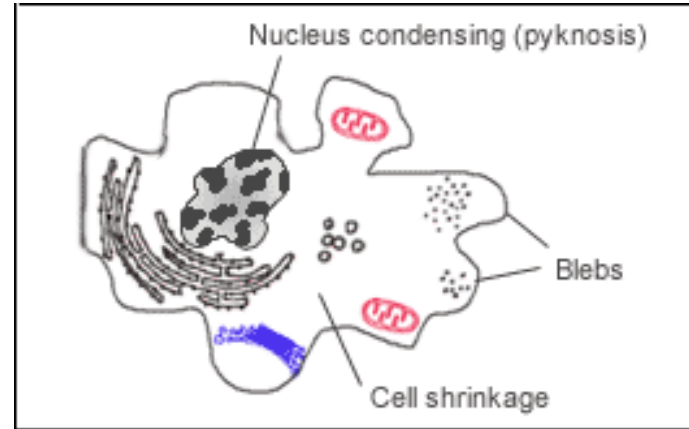


APOPTOZA

Charakteristické morfologické znaky apoptozy

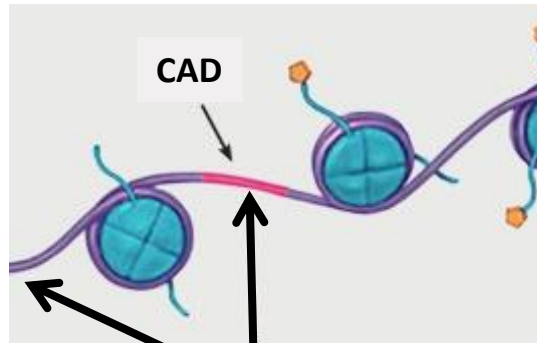
1. Blebbing

- nepravidelné záhyby cytoplazmatické membrány
- smršťování buňky (shrinkage)
- vznikají odpojení cytoskeletu od membrány
- degradace vnitřní struktury buňky
- vznik apoptotických tělísek

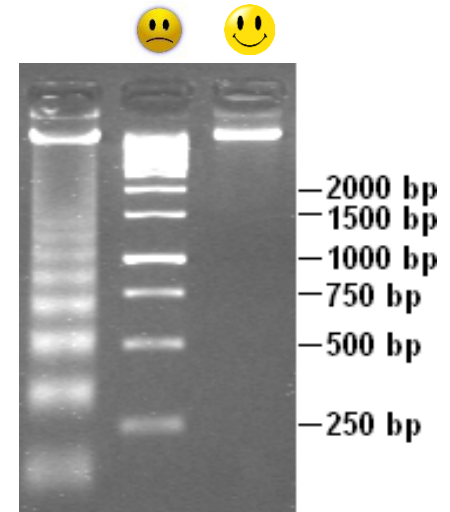


2. Fragmentace jádra

- Kaspáza 3 aktivuje endogenní endonukleázu - enzym CAD (Caspase-Activated DNase)
- štěpí chromatinovou DNA na fragmenty o délce cca 180bp
- na elektroforetickém gelu lze pozorovat 180bp fragmenty DNA a jejich násobky (360, 540...)
- 180bp je zhruba délka rozestupu histonů na DNA



místa štěpení CAD endonukleázou

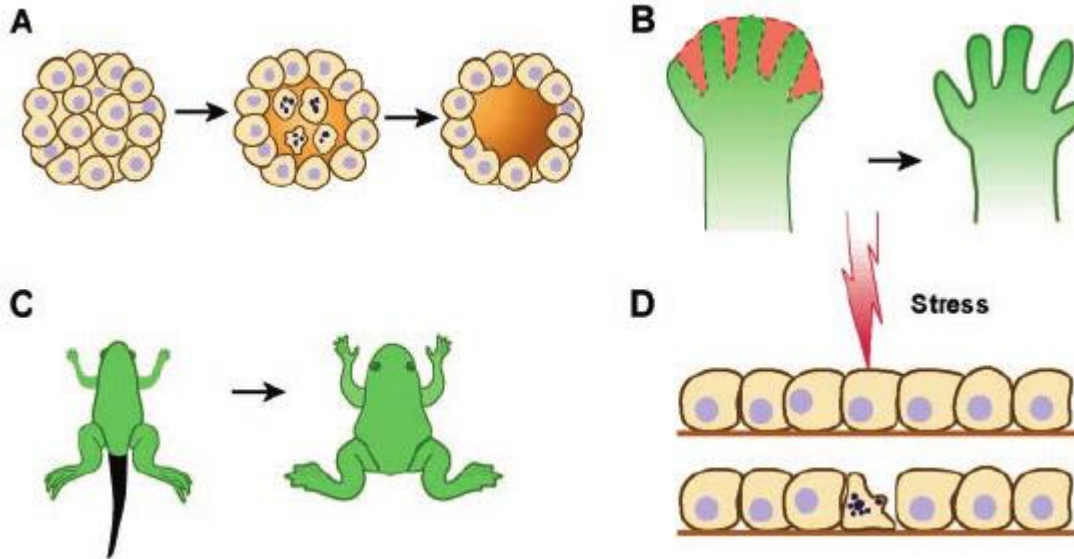


Pyknóza - ireverzibilní kondenzace chromatinu

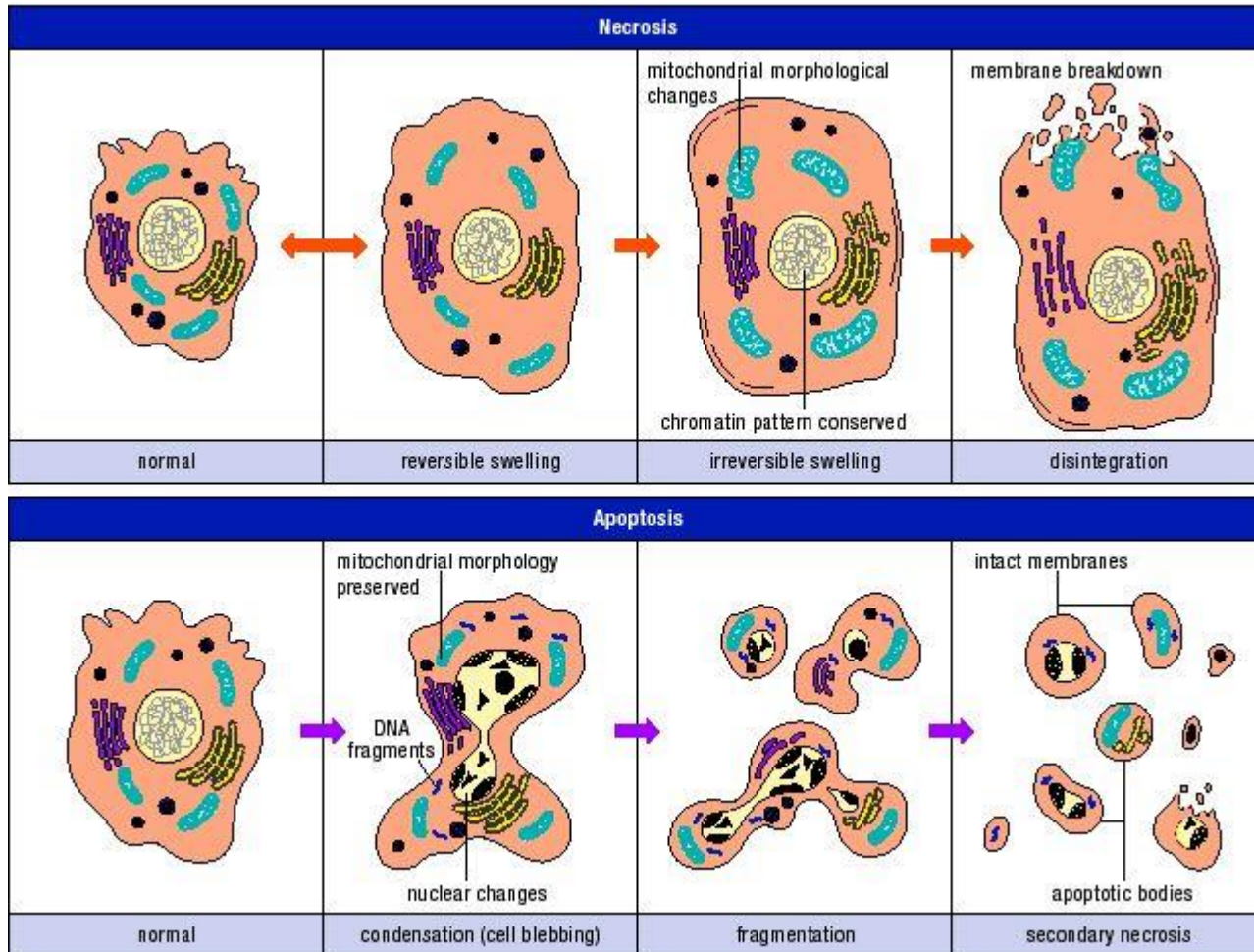
Kdy probíhá apoptóza

Příklady:

- zánik nadbytečných buněk v prenatálním období (u embrya, u plodu)
 - orgány se zakládají jako shluky buněk
 - duté orgány vznikají tak, že vnitřní buňky zaniknou apoptózou (A)
 - diferenciaci lidských prstů (B)
- zánik buněk ve tkáních - např. zánik **červených krvinek** po přibližně 80 dnech
- poškození DNA, které již neumí buňka opravit (D)



Apoptóza vs. Nekróza



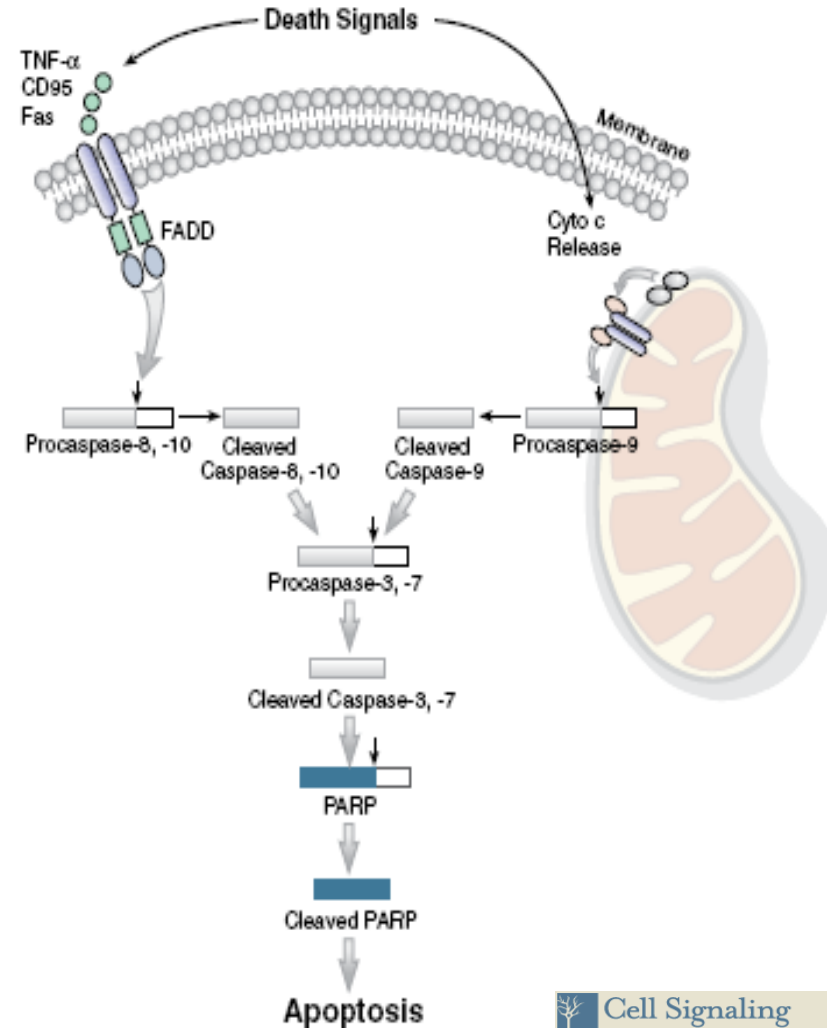
Apoptóza může být indukována dvěma drahami

1. Vnitřní dráha (intrinsic pathway; mitochondriální)

- z důvodu buněčného stresu nebo DNA damage
- uvolnění proteinů (hl. Cytochrom C) z prostoru na membráně mitochondrií

2. Vnější dráha (extrinsic pathway)

- z důvodu vnější signalizace od ostatních buněk
- extracelulární ligandy (hl. TNF- α a Fas) se váží na tzv. death-receptory na povrchu buněk
 - TNF- α produkují aktivované makrofágy
 - Fas ligand produkují T_C lymfocyty

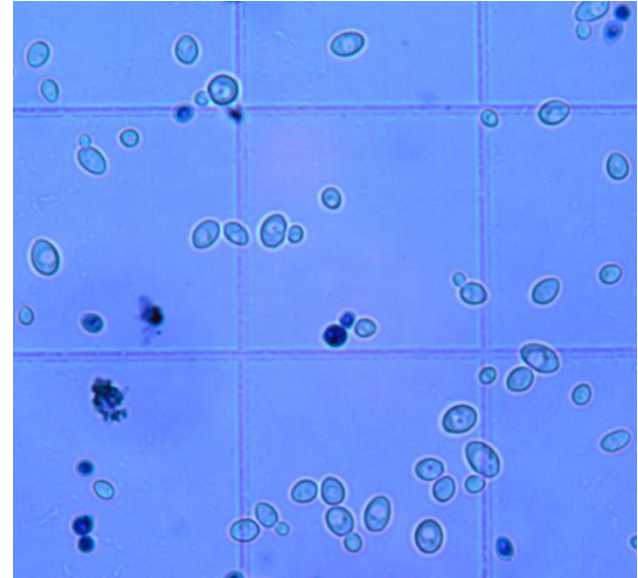


Metody detekce apoptózy

např. při testování léčiv in vitro

1. Barvení buněk trypanovou modří

- počítání ve světelném mikroskopu



2. Flow cytometrie

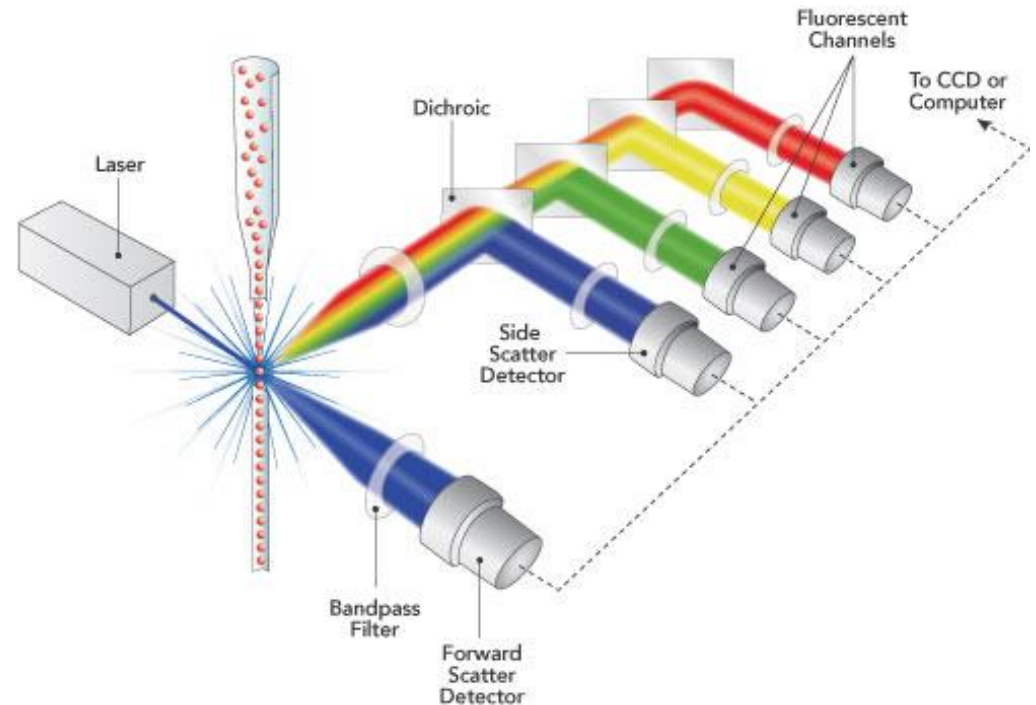
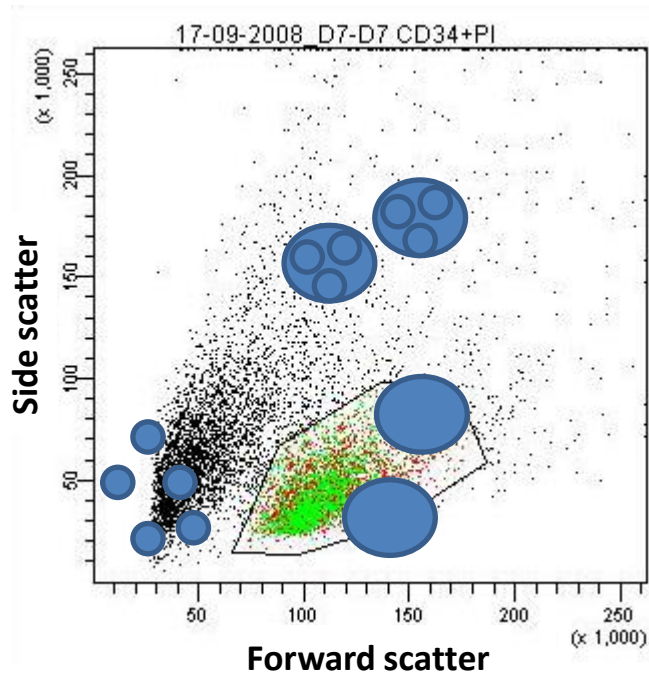
3. Western blotting

2. Flow cytometrie

Technika pro analýzu velkého množství buněk.

Na buňkách je možné rozlišit

- **velikost** (forward scatter)
- **tvar** (granularitu; side scatter)
- **fluorescenční barvičku** (propidium jodid; obdoba trypanové modři)
- expresi **povrchových proteinů** (protilátka proti povrchovým antigenům konjugovaná fluorochromem)
- expresi **intracelulárních proteinů** (buňky nutno usmrtit a permeabilizovat membránu)

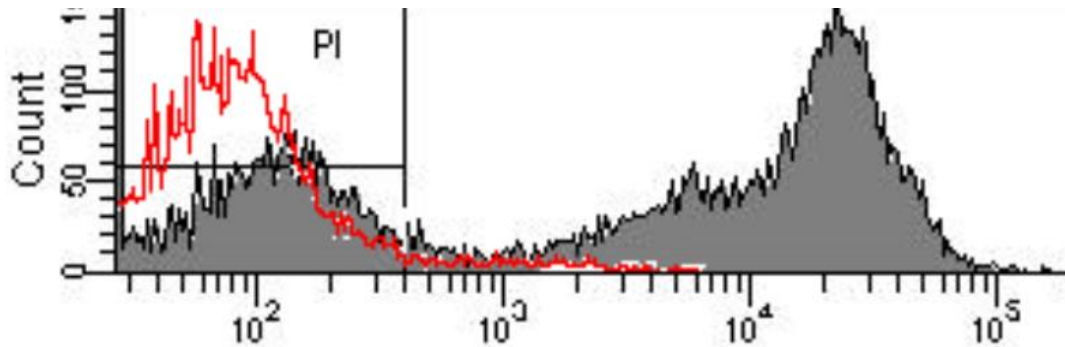


2. Flow cytometrie

Detekce buněčné smrti pomocí propidium jodidu (PI)

- PI- fluorescenční barvička, váží se na DNA
- podobně jako Trypanová modř proniká a barví pouze mrtvé buňky

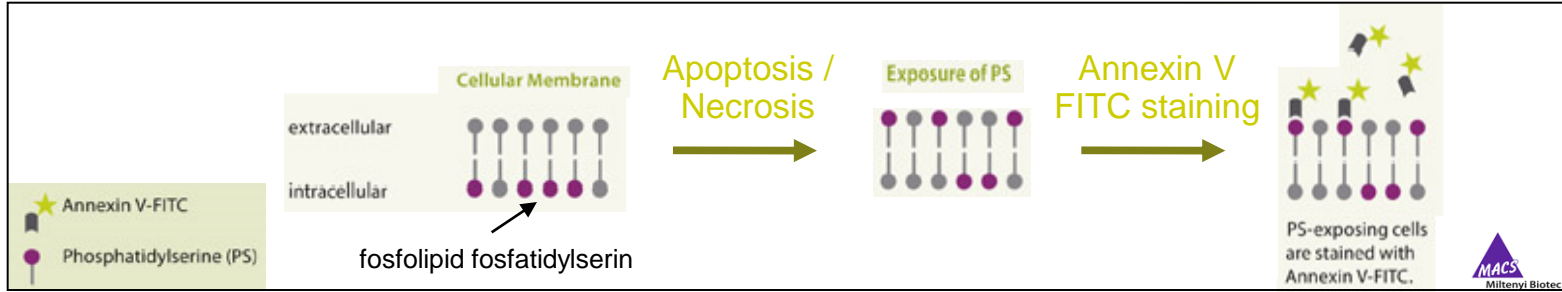
Histogram barvení propidium jodidem



2. Flow cytometrie

osa x: intenzita fluorescenčního signálu v kanálu FITC (buňky pozitivní na Annexin)

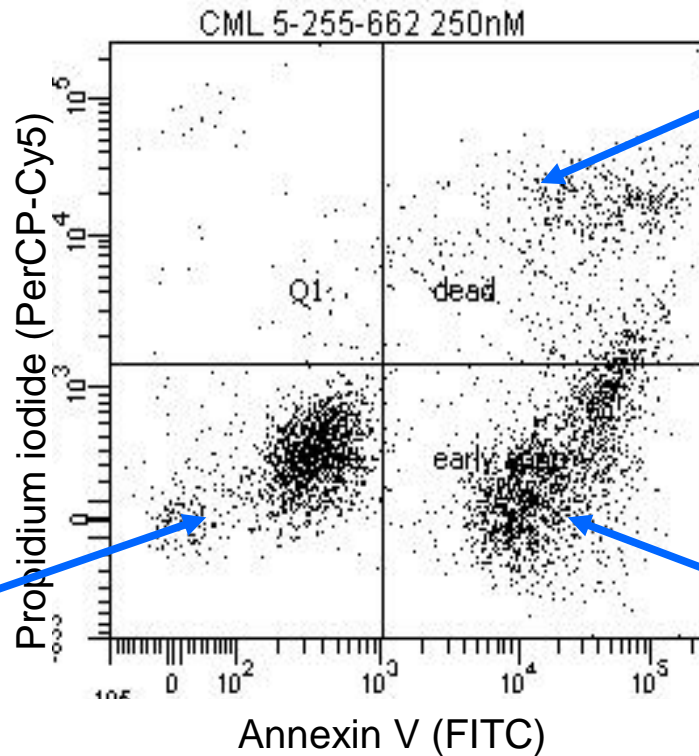
osa y: intenzita fluorescenčního signálu v kanálu PerCP-Cy5 (buňky pozitivní na Propidium jodid)



Annexin+... časná apoptoza

PI+... pozdní apoptoza

Viable cells



Late apoptotic or necrotic cells

Early apoptotic cells

3. Western blotting

- izolace celkového proteinu z buněk a rozdělení proteinů na polyakrylamidové gelu podle své velikosti.
- inkubace s protilátkou umožní zjistit, zda je daný protein ve vzorku přítomen a v jakém množství (oproti jinému vzorku na téže membráně - semikvantitativní metoda)
- příklady markerů apoptózy:
 - proapoptotický protein z rodiny Bcl-2: **BIM**
 - štěpený protein **PARP**

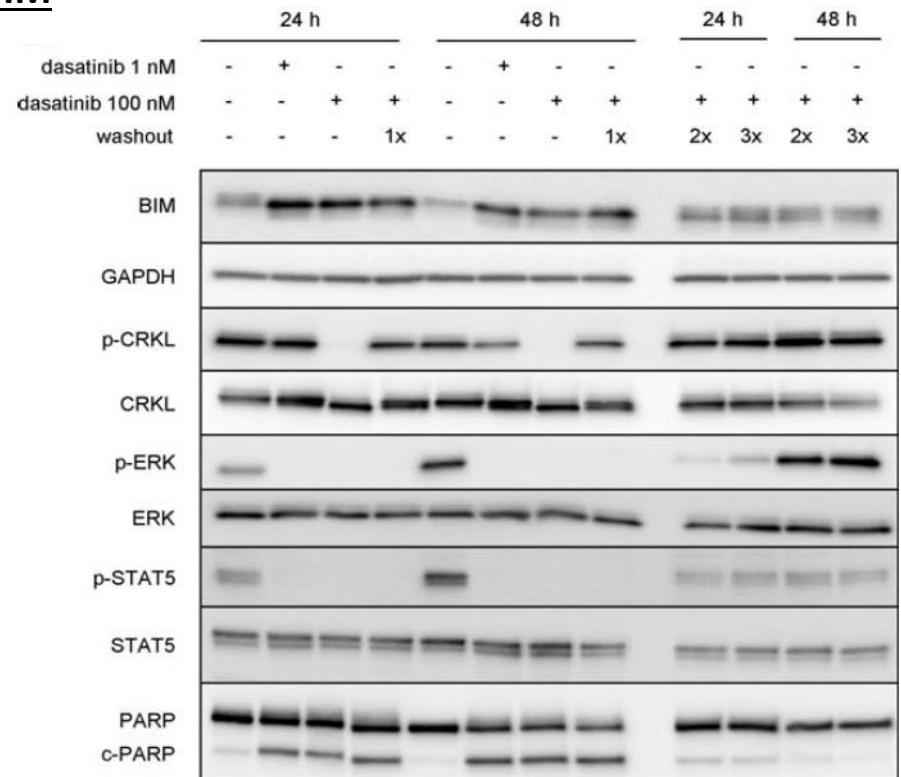


Figure 2. Effect of intermittent high-dose TKI treatment on signaling pathways in the K562 cell line. The cells were exposed to imatinib (A) or dasatinib (B) at a low dose continuously (2.5 μ M imatinib or 1 nM dasatinib), a high dose continuously (32.5 μ M imatinib or 100 nM dasatinib) or a high dose transiently (washout 1 \times , 2 \times , or 3 \times). The cells were then lysed and analyzed by Western blotting. The incubation time was 24 and 48 hr.

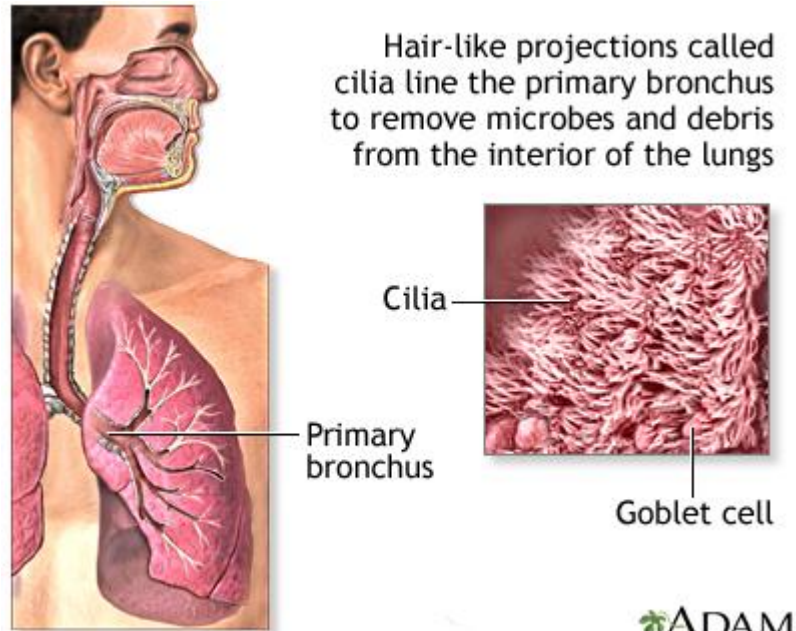
Imunitní systém

Imunitní systém

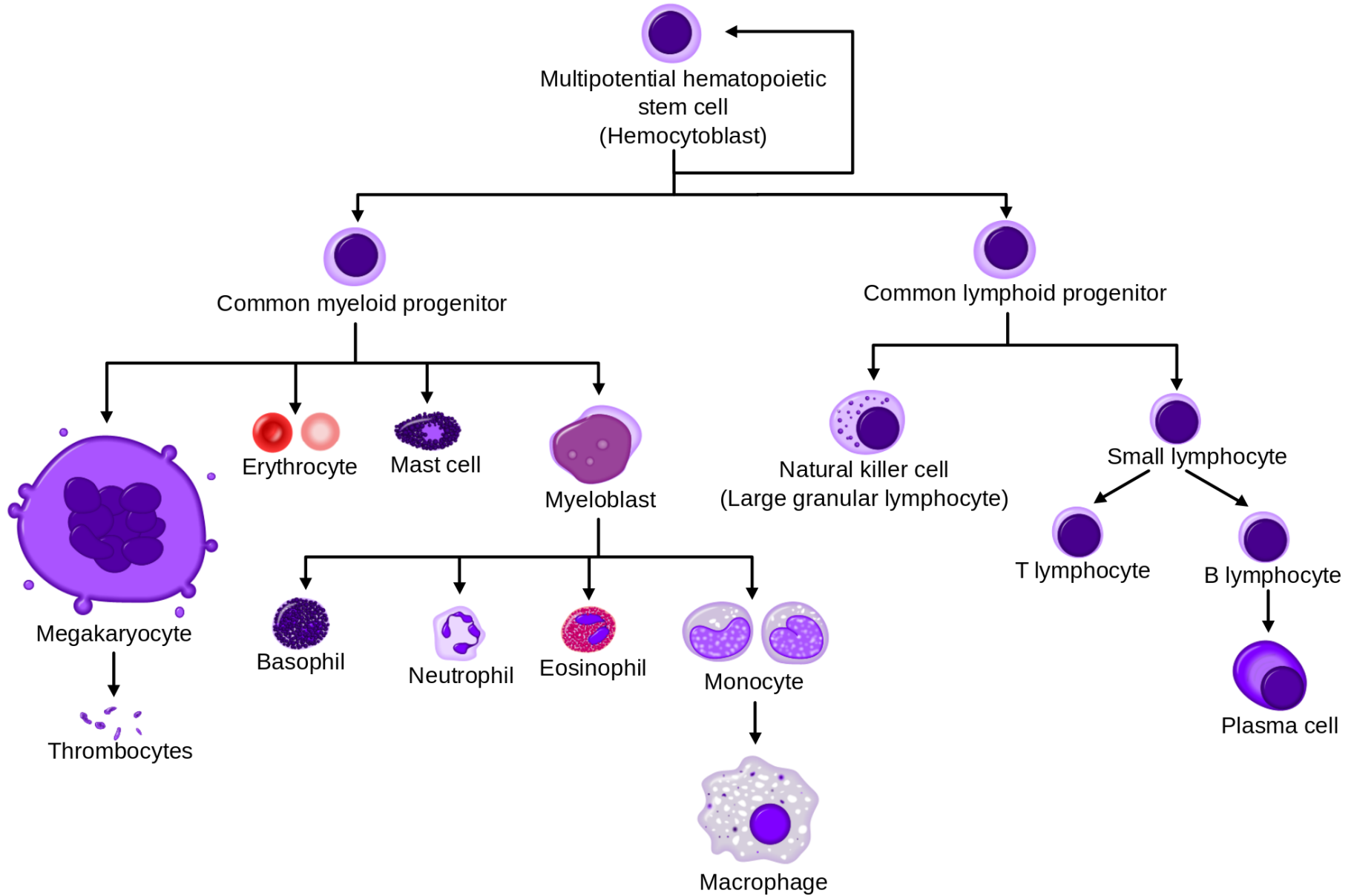
Existuje fyzická, chemická a buněčná obrana proti invazi bakterií a virů

1. linie obrany - fyzická a chemická

- a) kůže: vrstva mrtvých buněk - suchá a s nízkým pH
- b) sliznice: pokryty lysozymem - chemický rozklad bakterií
- c) cilie (řasinky): výběžky buněk, působí jako filtr a aktivně odstraňují patogeny



Hematopoéza (krvetvorba)



Imunitní systém

2. linie obrany - nespecifická imunitní odpověď

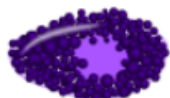
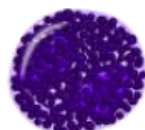
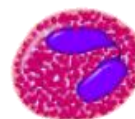
- obecná odpověď na infekci patogenem
- je vyvolán zánět

Granulocyty

a) **Neutrofil** - fagocytuje bakterie a sekretuje lysozym který degraduje bakteriální stěny

b) **Eosinofil** - vylučuje enzymy, které zabíjí parazitické červy

c) **Bazofil** - vylučuje histamin pro podporu zánětu

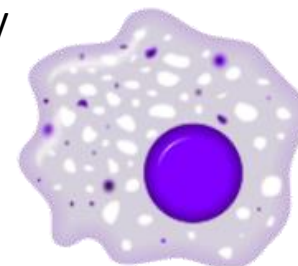


d) **Mastocyt** (mast cell; žírná buňka)

- vylučuje signály pro snížení průtoku krve v místě poranění
- signály pro zvýšení průtoku krve a propustnosti kapilár v okolí poranění, aby se fagocyty dostaly do místa poranění

e) **Makrofágy** - fagocyty (big eaters) - fagocytují vše

- obsahují MHC (major histocompatibility complex) , který vystavuje antigen
- sekrece cytokinů, které přitahují další makrofágy a neutrofilů
- zvyšují teplotu



Antigen: částice rozeznávaná protilátkou, v imunologii se jedná o cizí patogen

Protilátka: částice, která specificky rozeznává antigen a je rozeznávána lymfocyty

MHC-molekuly (proteiny)

- Major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)
- u lidí zvaný též HLA-komplex (human leukocyte antigen)
- soubor povrchových proteinů - posttranslačně glykozylované proteiny

Syntéza MHC

- během syntézy zachycují peptidy a fragmenty vzniklé odbouráváním cizorodých proteinů (antigenů) a zanořují je do povrchu buňky
- buňka se stává APC (buňkou nabízející antigen)
- antigen je rozeznáván TCR-receptorem T-lymfocytů

Typy MHC

1. MHC I (první třídy)

- vážou peptidy získané po zničení virem infikované či jinak vadné **tělní buňky**
- jsou rozeznávány T_C-lymfocyty, které se aktivují k usmrcení podobných buněk

2. MHC II (druhé třídy)

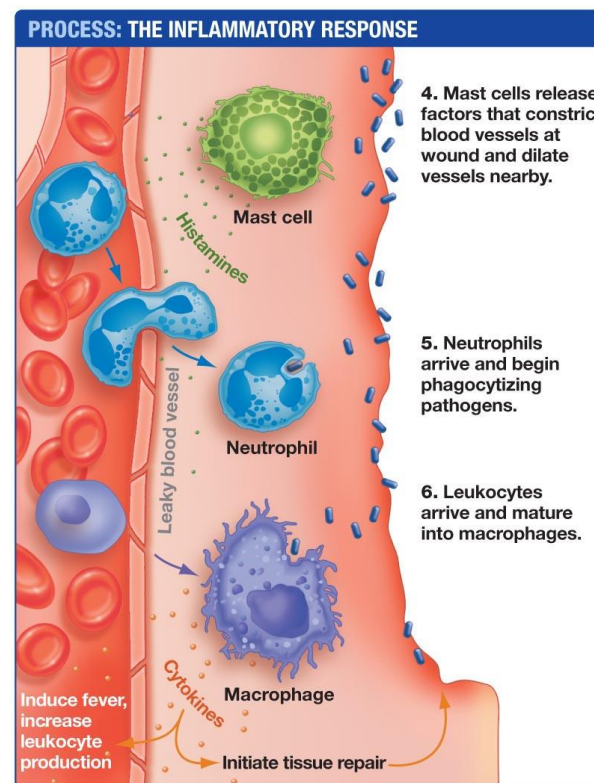
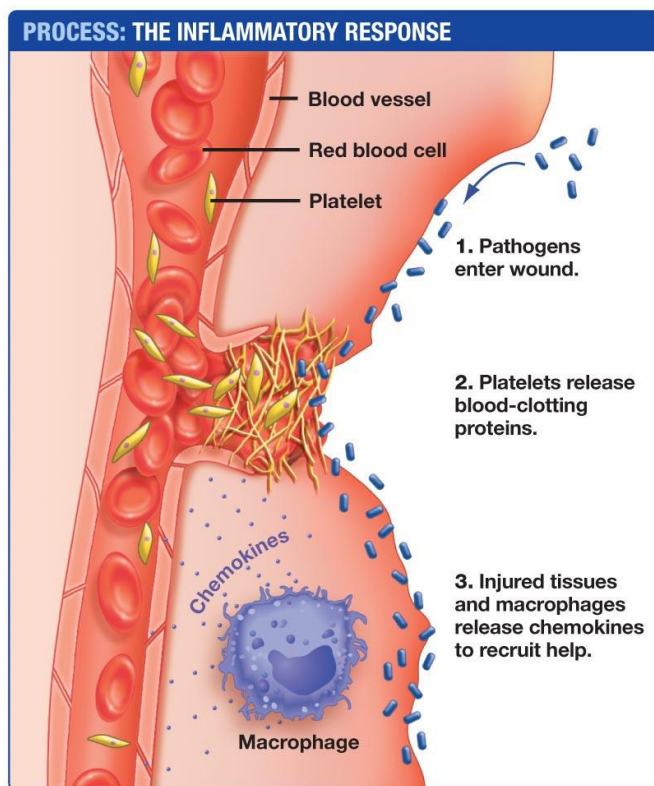
- vážou peptidové fragmenty z **patogenů** fagocytovaných APC buňkou
- jsou rozeznávány pouze T_H-lymfocyty

Záněť

- patogeny vstupují do místa poranění
- **krevní destičky** vylučují srážlivé faktory
- makrofágy a buňky poraněné tkáně vylučují cytokiny, které přivolávají pomoc
 - změny ve stěnách kapilár umožňují průchod bílých krvinek a tkáňového moku
 - mastocyty indukují vazokonstrikci poraněných cév a vazodilataci okolních cév
 - stimulace kostní dřeně k produkci dalších neutrofilů a makrofágů
 - přilákání dalších imunitních buněk do místa poranění
 - zvýšení teploty



[Video: Záněť](#)



Tkáňový mok (interstitial fluid): mezibuněčná tekutina v těle mnohobuněčných živočichů. Hlavní složka mimobuněčné tekutiny, do níž se také řadí krevní plazma a míza (lymfa), která se z moku tvoří.

Imunitní systém

3. linie obrany - specifická imunitní odpověď

- v případě, že první dvě linie obrany nestačí a infekce se šíří

APC buňky (např. makrofágy) vystavují na povrchu cizí antigeny (Antigen Presenting)

T-lymfocyty jsou tímto informovány o typu patogenu

- **Helper T lymfocyty (T_H)** aktivují jiné buňky

- **Cytotoxické T lymfocyty (T_C)** eliminují infikované a nádorové buňky

B lymfocyty a plasmatické buňky produkují protilátky (sekretují do krve nebo umísťují na buňky)

Aktivace T a B lymfocytů

Při styku s antigenem se lymfocyt zmnožuje a vzniká množství klonů se stejným antigenním receptorem

- nazýváme **klonální selekce** - základní koncept imunologie

Klonální selekcí lymfocytů vznikají dva typy buněk:

a) efektorové: krátká životnost, najdou a zničí patogen

- z B buněk → plasmatické - sekretují protilátky

- z T buněk →

- cytotoxické T lymfocyty

- helper T lymfocyty

b) paměťové: vznikají při primární infekci, nejsou aktivní, ale přetrvávají v těle a při další infekci stejným patogenem jsou rychle reaktivovány k mitóze (imunologická paměť)

Imunitní systém

3. linie obrany - specifická imunitní odpověď

- každý virus a bakterie má unikátní molekulární markery, které jej identifikují
- lymfocyty v těle rozeznávají:
 - vlastní antigeny - ty je nechávají klidnými
 - cizí antigeny - spouští mitotickou aktivitu (dělení)

Fáze:

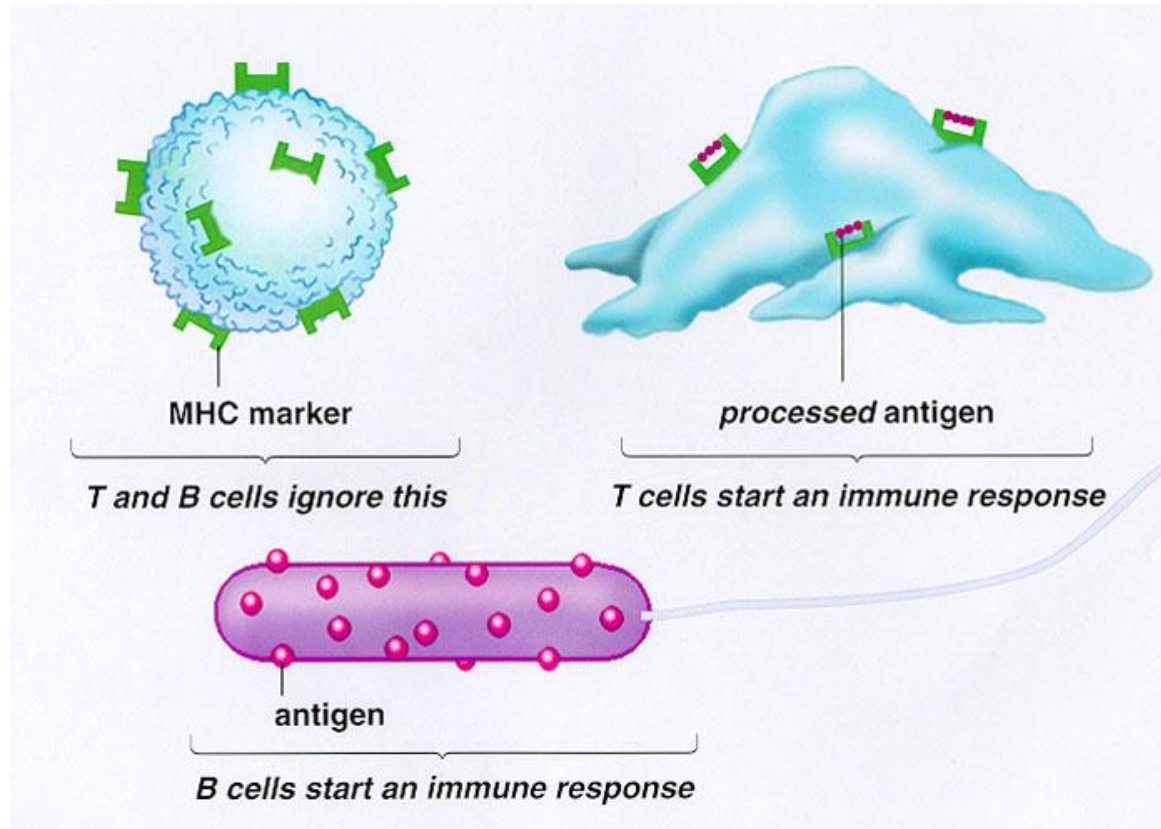
1. Rozeznání specifické cizí částice
2. Opakované buněčné dělení a vytvoření obrovské populace klonů lymfocytů
3. Diferenciace do subpopulací efektorových a paměťových buněk

Imunitní systém

3. linie obrany - specifická imunitní odpověď

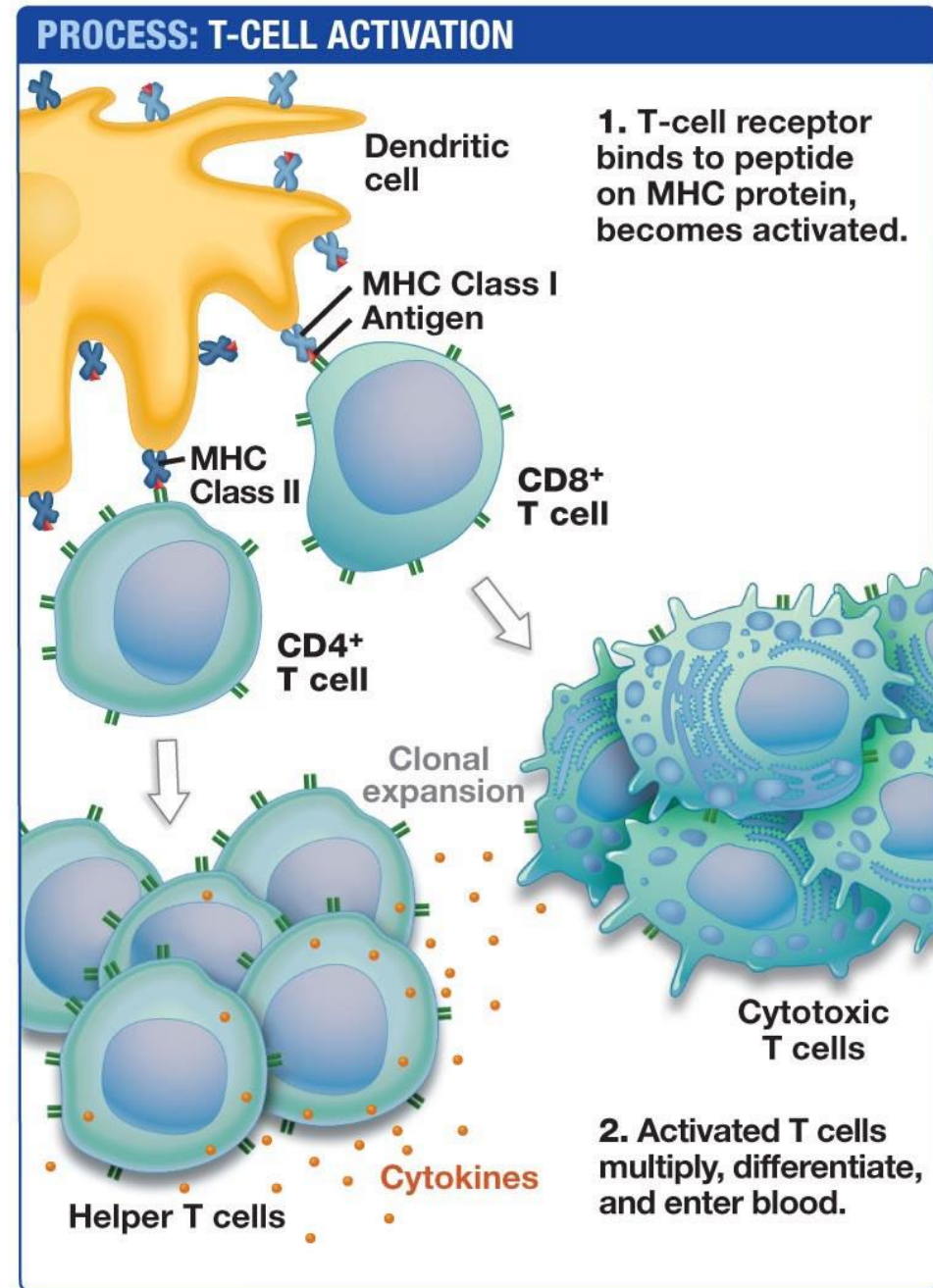
Antigen-prezentující buňka

- známe 3+1 typ APC: **makrofág, B-lymfocyt, dendritická buňka + buňka infikovaná virem**
- vystavují na svém povrchu antigeny
- např. makrofág pohltí bakterii a na svém povrchu vystaví její antigeny
- tyto antigeny jsou ve vazbě s MHC
- antigeny jsou rozeznávány lymfocyty



T-lymfocyty (Thymocytes; T-cells)

- líhnou se v kostní dřeni
- putují nezralé do brzlíku (thymus) kde diferencují a zrají
- v procesu zrání získávají markery CD4 (T-helper cells T_H) a CD8 (Cytotoxic T-cell T_C) a antigenně specifické receptory
- do krevního oběhu jsou uvolněny jako "virgin" T cells
- T lymfocyty ignorují buňky s prázdnými MHC antigeny, stejně jako volně plovoucí antigeny
- váží se však na antigeny, vystavené na povrchu makrofágů v MHC komplexu
- vazba indukuje rapidní proliferaci do **efektorových** a **paměťových** buněk s receptorem pro daný antigen



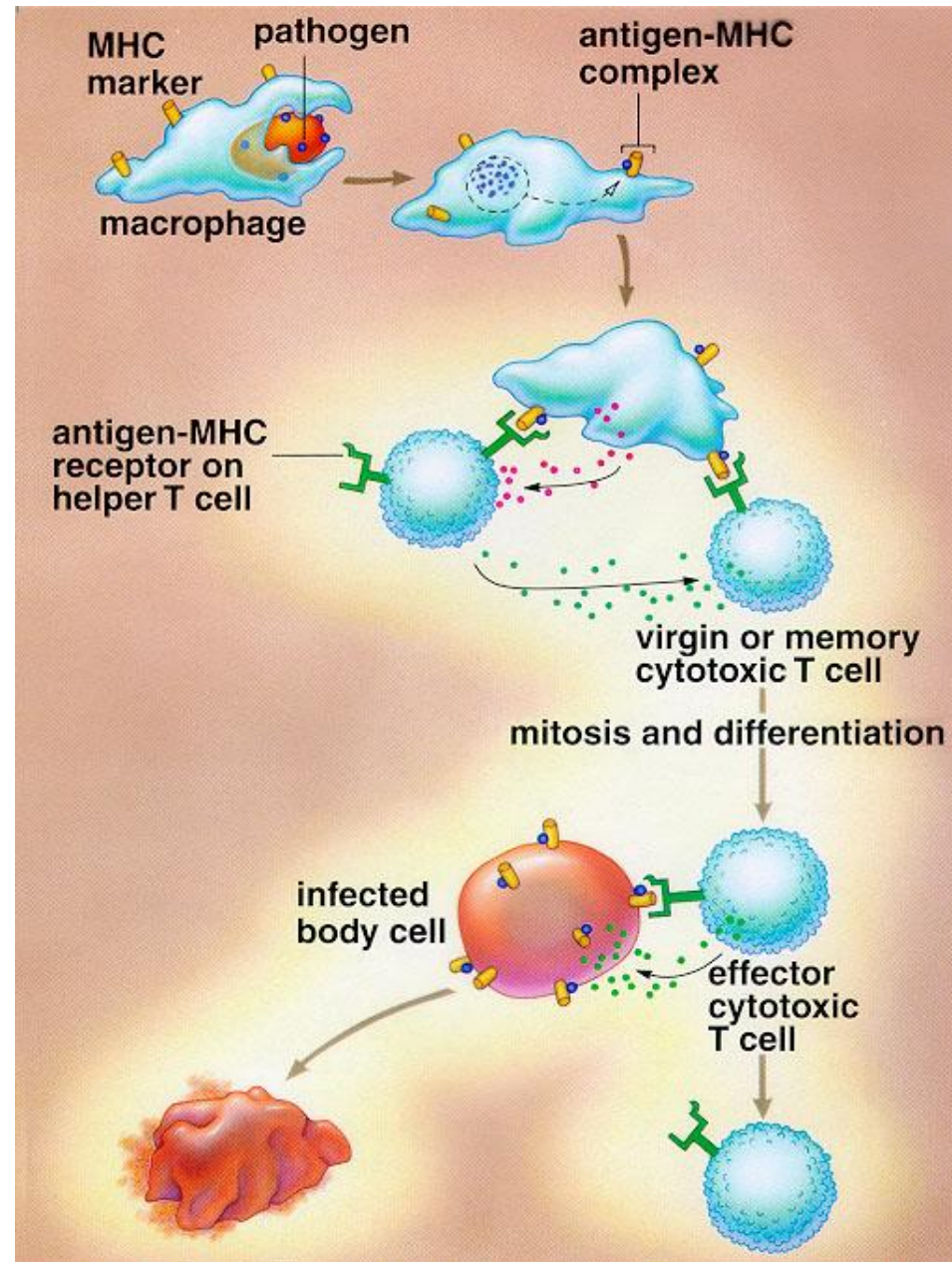
T-lymfocyty (Thymocytes)

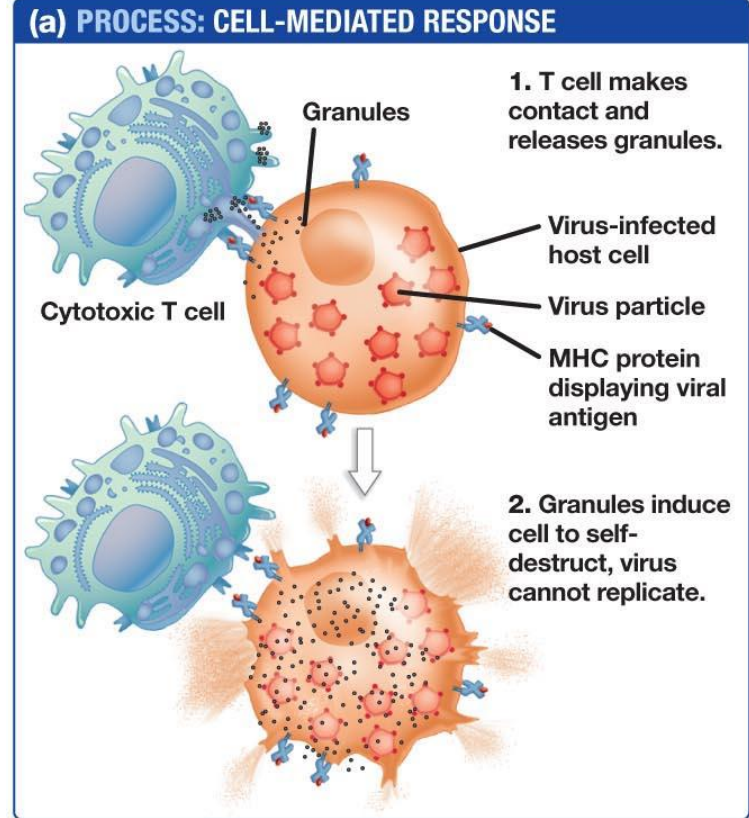
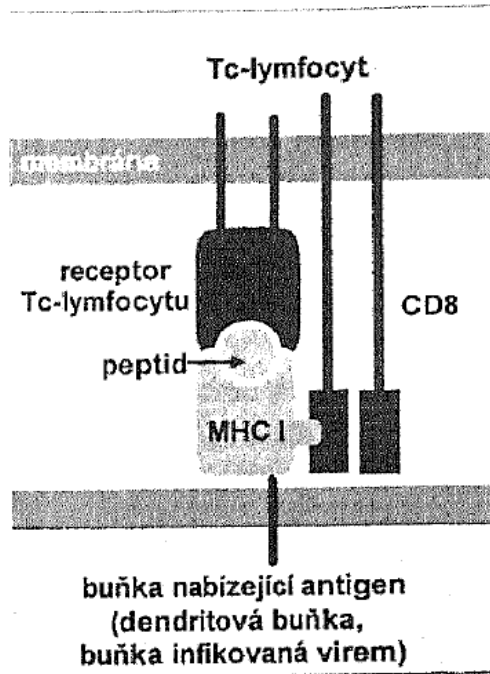
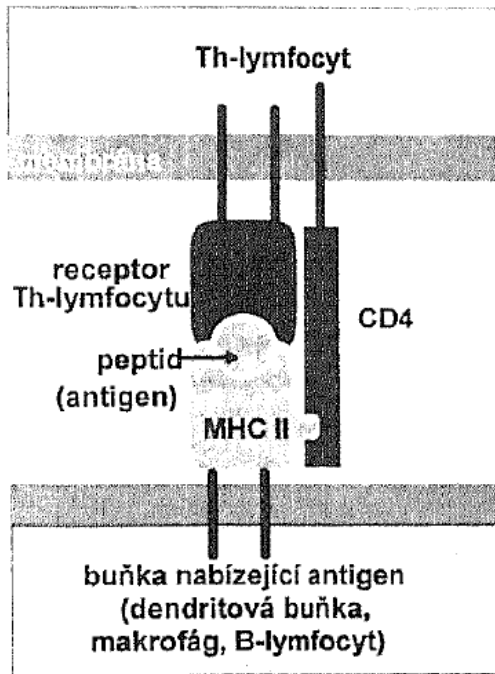
1. Efektorové T-helper lymfocyty (CD4)

- sekretují interleukiny → stimulace dalších T a B buněk
- na povrchu mají protein CD4, který se váže na MHC II molekuly
- T_H-lymfocyty dělíme na
 - a) T_H1 - aktivující makrofágy
 - b) T_H2 - aktivující B-lymfocyty

2. Efektorové cytotoxické T lymfocyty (CD8)

- rozpoznávají infikované či jinak vadné buňky a ničí je pomocí Fas ligandu, perforinů+granzymů → APOPTÓZA
- na povrchu mají protein CD8, který se váže na MHC I molekuly





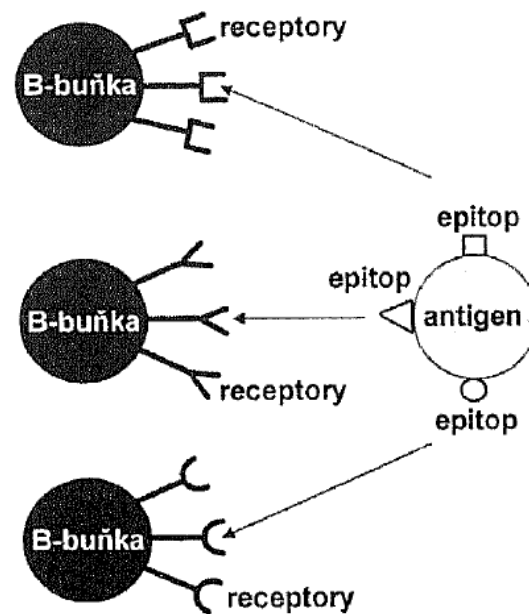
B-lymfocyty

- prekurzory se tvoří v kostní dřeni u dospělých a játrech plodu
- po dozrání syntetizují jeden typ protilátky
- "virgin" B cell produkuje protilátku (imunoglobulin), která se uchytil v membráně

- aby se B-lymfocyt začal dělit potřebuje:
 - kontakt se specifickým antigenem
 - aktivaci od T-helper lymfocytu, který už se s daným antigenem setkal na APC buňce (např. makrofágu)

- Po aktivaci diferencuje B-lymfocyt do efektorové buňky (= **plazmatická buňka**) a **paměťového B-lymfocytu**

- Plazmatická buňka produkuje masivní množství volných protilátek
- volné protilátky označují patogen pro zničení fagocyty a komplementem
- paměťová buňky zůstávají inaktivní během první infekce, ale při druhé infekci se aktivují mnohem rychleji než "virgin" B-lymfocyty
- nejmenší část antigenu schopná reakce s protilátkou nebo receptorem T-lymfocytu se nazývá **antigenní detriminanta** neboli **epitop**

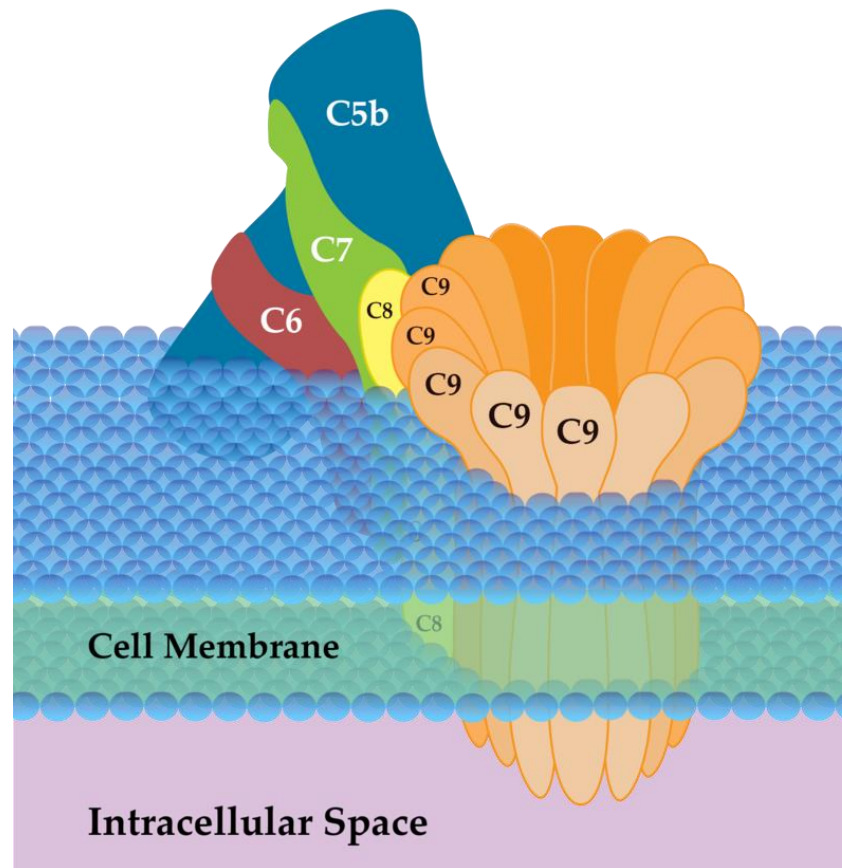


Obr. 320
Vztah antigenních determinantů k jejich receptorům

Komplement

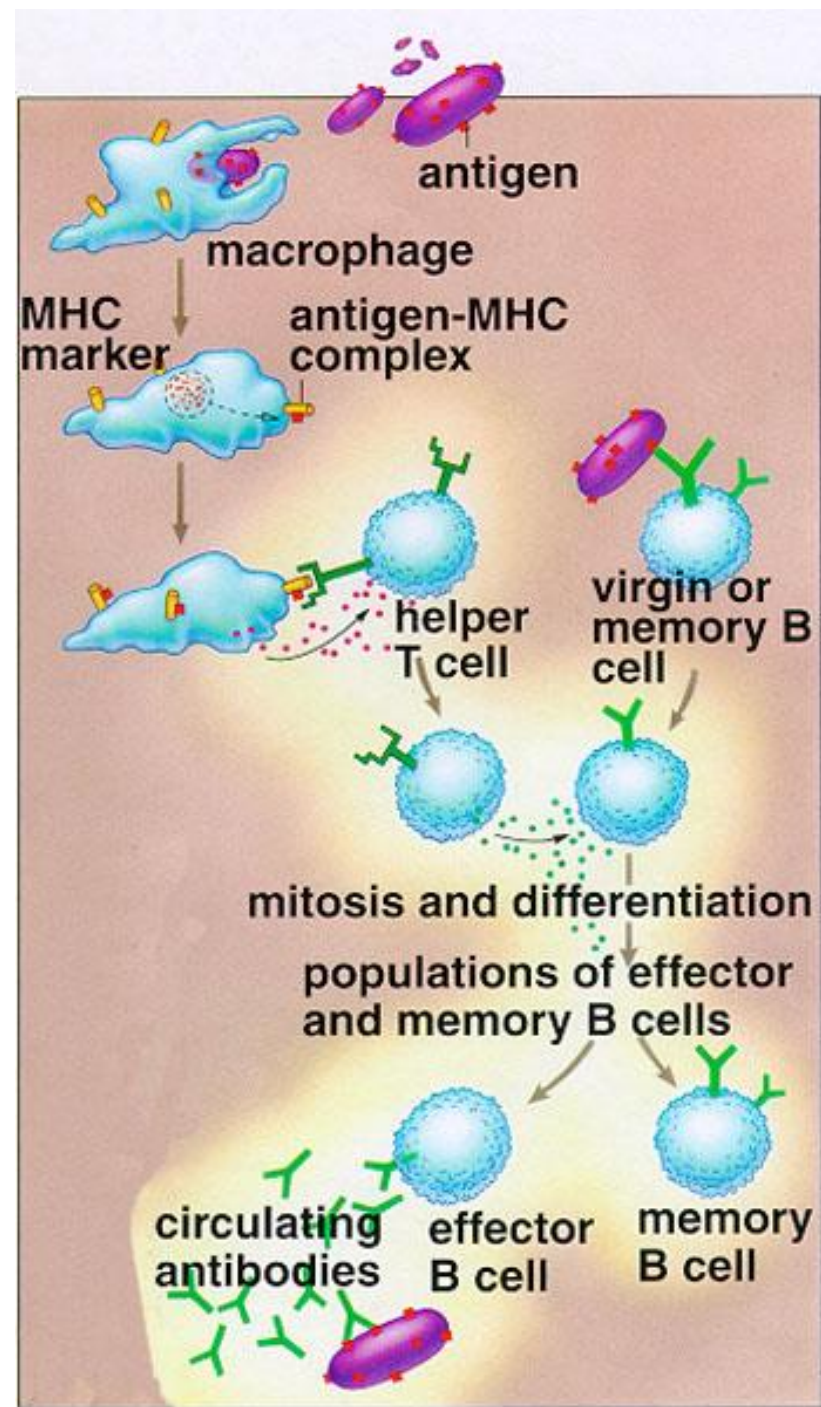
Imunitní mechanismus zvyšující (doplňující, komplementující) účinnost protilátek

- nespecifický a neadaptibilní
- soubor malých proteinů, tvořených v játrech a cirkulujících v krvi
- po aktivaci atakuje membrány patogenů, ve kterých způsobuje póry



Vlastnosti B-lymfocytů

- 1. Mají v povrchu receptor zachycující volný antigen.** Molekula protilátky (imunoglobulin) vázaná na membránu
- 2. B-lymfocyt se aktivuje k dělení a diferenciaci na plazmatickou buňku teprve po kontaktu s antigenem.** Do té doby je v klidu v G0 fázi.
- 3. Fungují jako APC.** Po vazbě antigenu se tento sdružuje s MHC II a je nabízen T_H-lymfocytům.



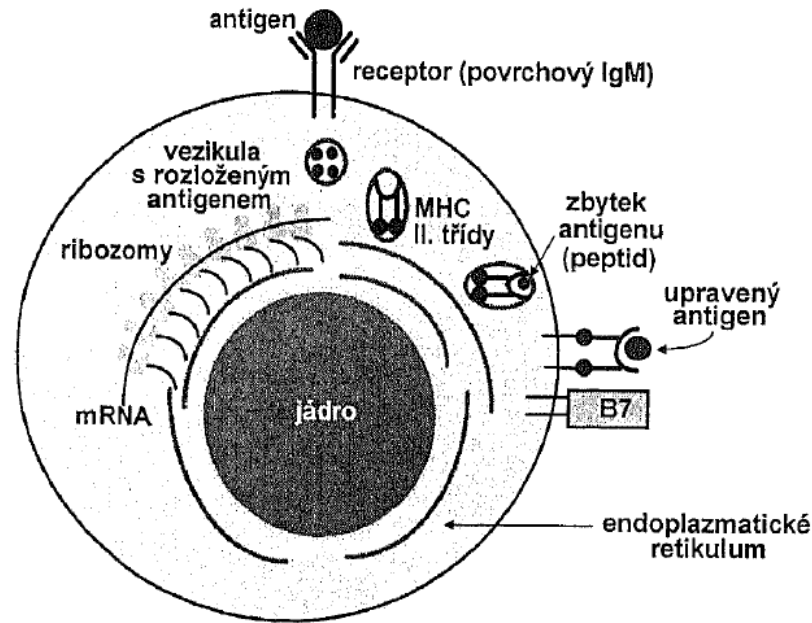
Antigen-presenting cells (APC; buňky nabízející antigen)

na povrchu vystavují antigen, který je rozeznáván T-lymfocyty

Existují 3+1 typy APC buněk:

1. B-lymfocyty

- volný antigen se váže na receptor B-lymfocytu
- endocytozou se antigen dostává do vezikuly, kde se rozkládá na peptidy
- na ribozomech se syntetizují **MHC II-molekuly**, které migrují do vezikuly a spojí se s peptidy
- komplex MHC II+peptid putuje k povrchu buňky, kde se vystavuje **T_H-lymfocytům**
- B-lymfocyty s antigeny se vyskytují v lymfoidních folikulách lymfatických uzlin



2. Makrofágy

- pohlcují bakterie a odbourávají jejich proteiny a vystavují v komplexu s **MHC II**
- vrozená (nespecifická) imunita
- na povrchu receptory pro různé složky mikrobiálních buněk
- rozptýleny po celém těle
 - lymfatické uzliny, plíce, játra, mozek...
 - mohou být i pohyblivé a přecházet mezi tkáněmi (amébovitý pohyb)
- po vazbě **T_H-lymfocyt** navíc produkuje interferon gamma (INF- γ) a tím se ještě víc aktivuje k pohlcování virů a bakterií
- makrofágy též produkují cytotoxické proteiny

3. Dendritické buňky

- schopné fagocytozy
- komplexy antigenů a MHC I i MHC II
- aktivují tedy jak **T_H**- tak i **T_C-lymfocyty**

Podle místa výskytu dělíme:

a) Langerhansovy buňky

- v pokožce a mukózních tkáních
- přijmou antigen a putují do lymfatických uzlin, kde diferencují na dendritické buňky a stimulují T-lymfocyty

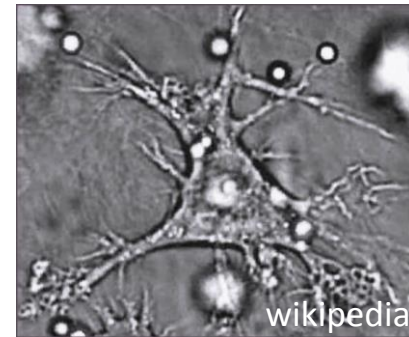
b) Intersticiální dendritické buňky

- osidlují většinu orgánů (srdce, játra, ledviny...)

c) Proplétající se dendritické buňky

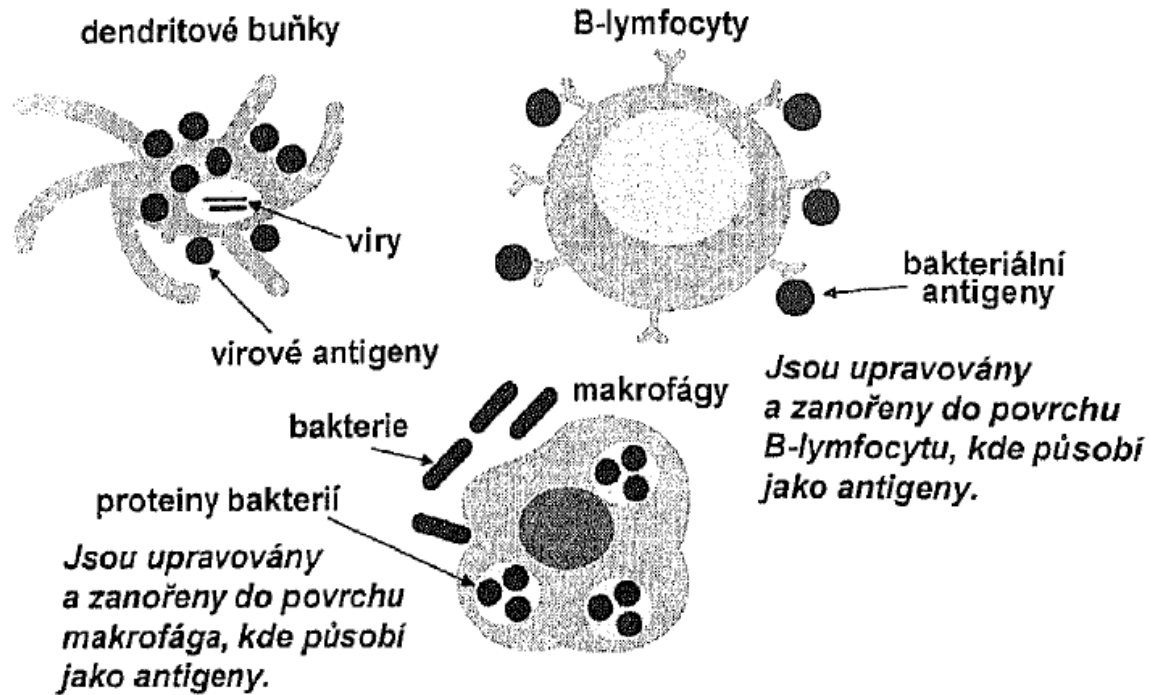
- v sekundárních lymfoidních orgánech spolu s T-lymfocyty

d) Cirkulující dendritické buňky - v krvi (0,1% krevních leukocytů)

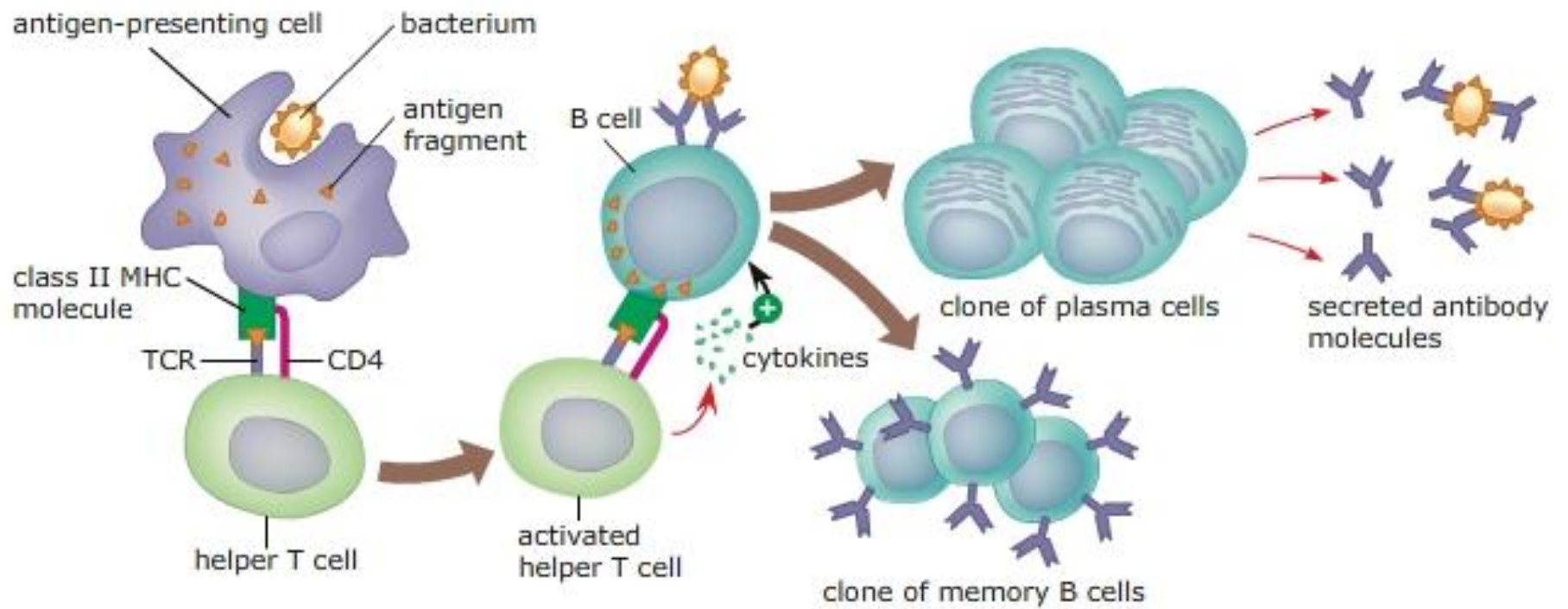


(4). Buňky infikované virem

- virus napadne tělní buňku a spustí svou replikaci a transkripci svých proteinů
- virové proteiny mohou být buňkou odbourány a vystaveny na povrchu v komplexu s **MHC I**
- **MHC I + virový antigen** je rozpoznáván **T_C-lymfocyty** a infikovaná buňka je zničena **apoptozou**



Obr. 322
Buňky nabízející antigen



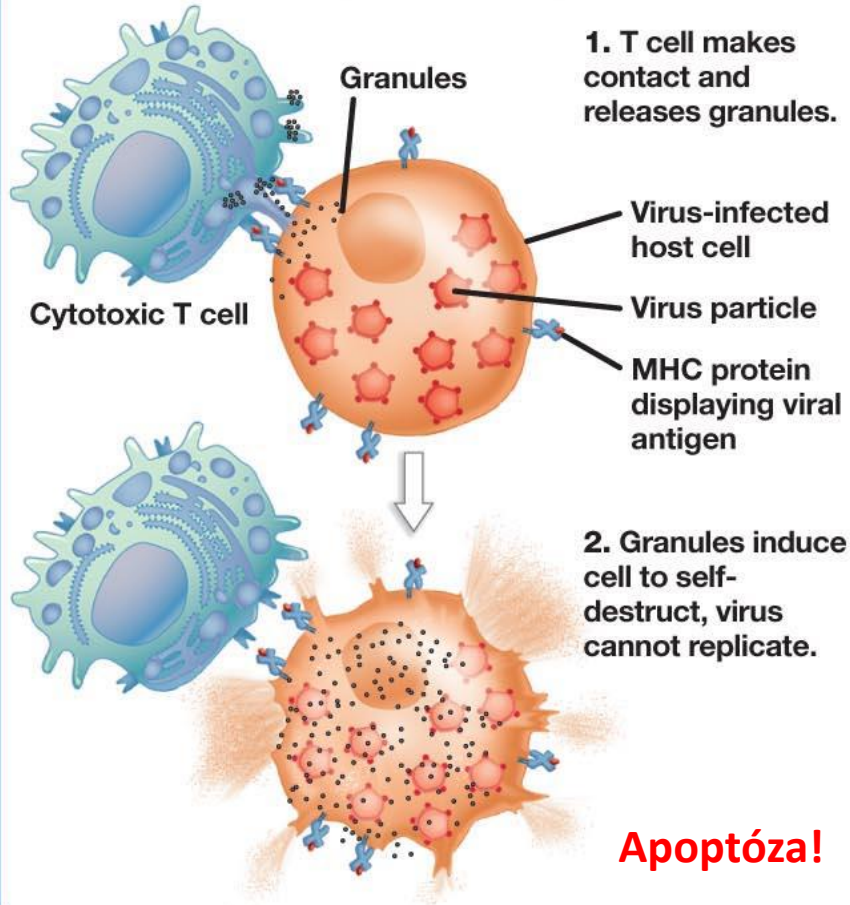
From *Biology* by Campbell and Reece © 2008 Pearson Education, Inc.

a) Buněčná imunita

zprostředkovaná T-lymfocyty

- T_C lymfocyty produkují Fas ligand a perforiny + granzymy → APOPTOZA

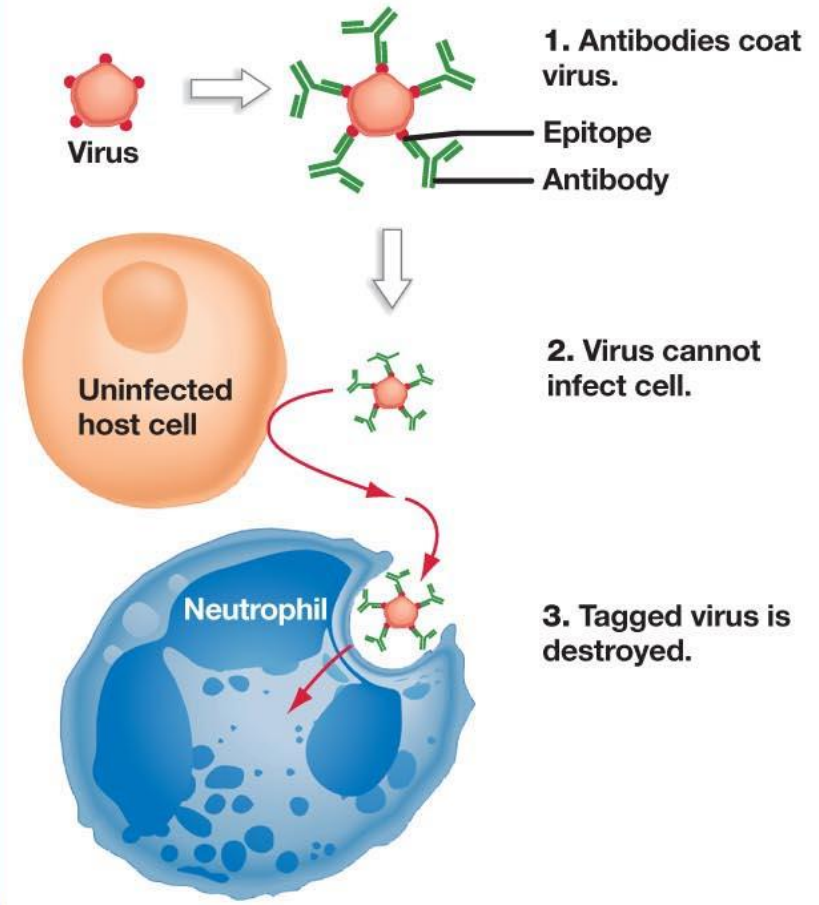
(a) PROCESS: CELL-MEDIATED RESPONSE



b) Humorální imunita

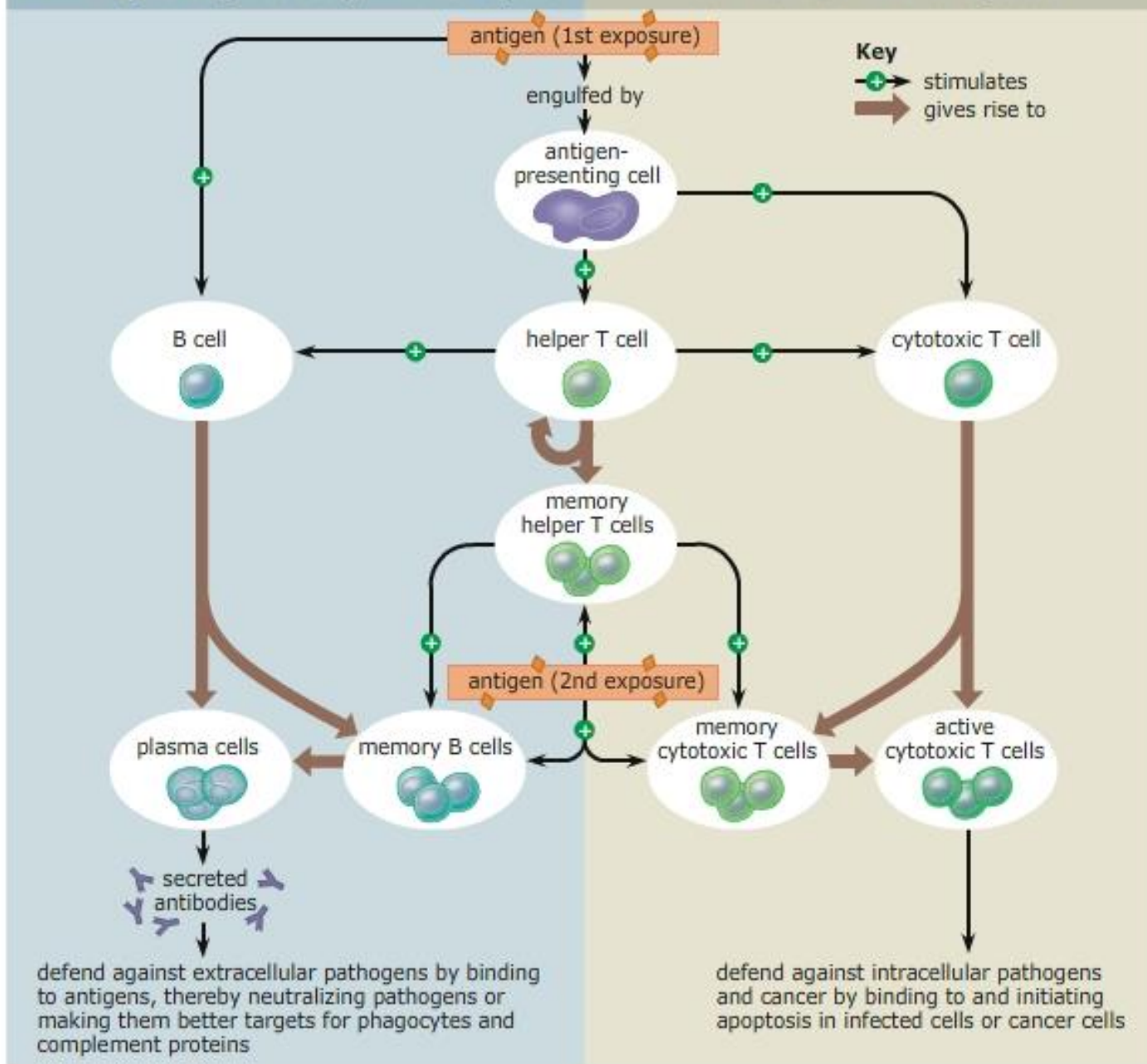
zprostředkovaná specifickými protilátkami
produkovanými B-lymfocyty do tělních tekutin

(b) PROCESS: HUMORAL RESPONSE



Humoral (antibody-mediated) immune response

Cell-mediated immune response



Imunoglobuliny (lidské protilátky)

- vyskytují se vázané na povrchu B-lymfocytů nebo volné
- volné protilátky označují patogen pro zničení fagocyty a komplementem
- obecná struktura protilátek je velmi podobná
- největší rozdíly jsou na špičce Fab regionu (antigen-binding site), která je extrémně variabilní
- to umožňuje existenci milionů jemně odlišných verzí protilátek
- klasifikace protilátek je založena na typu Fc fragmentu (těžkého řetězce)

Imunoglobulinové třídy:

1. IgA (2 typy)

- hlavně na sliznicích (trávicí, dýchací..) a ve slinách, mléku...
- zabraňuje kolonizaci patogeny - vysoká denní produkce

2. IgD (1 typ)

- antigenní receptor na B-lymfocytech - BCR (spolu s IgM)
- aktivuje bazofily a mastocyty k produkci antimikrobiálních faktorů

3. IgE (1 typ)

- váže se na alergeny
- aktivuje bazofily a mastocyty k produkci histaminu
- chrání před parazitickými červy

4. IgG (4 typy)

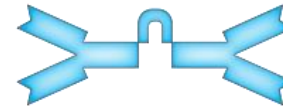
- v krevním séru tvoří až 80% všech imunoglobulinů

5. IgM (1 typ)

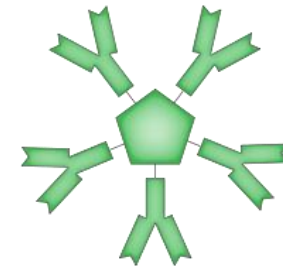
- vázán na membránu B-lymfocytů, kde působí jako receptor pro antigen - BCR
- nejúčinnější ve vazbě virových částic



Monomer
IgD, IgE, IgG



Dimer
IgA



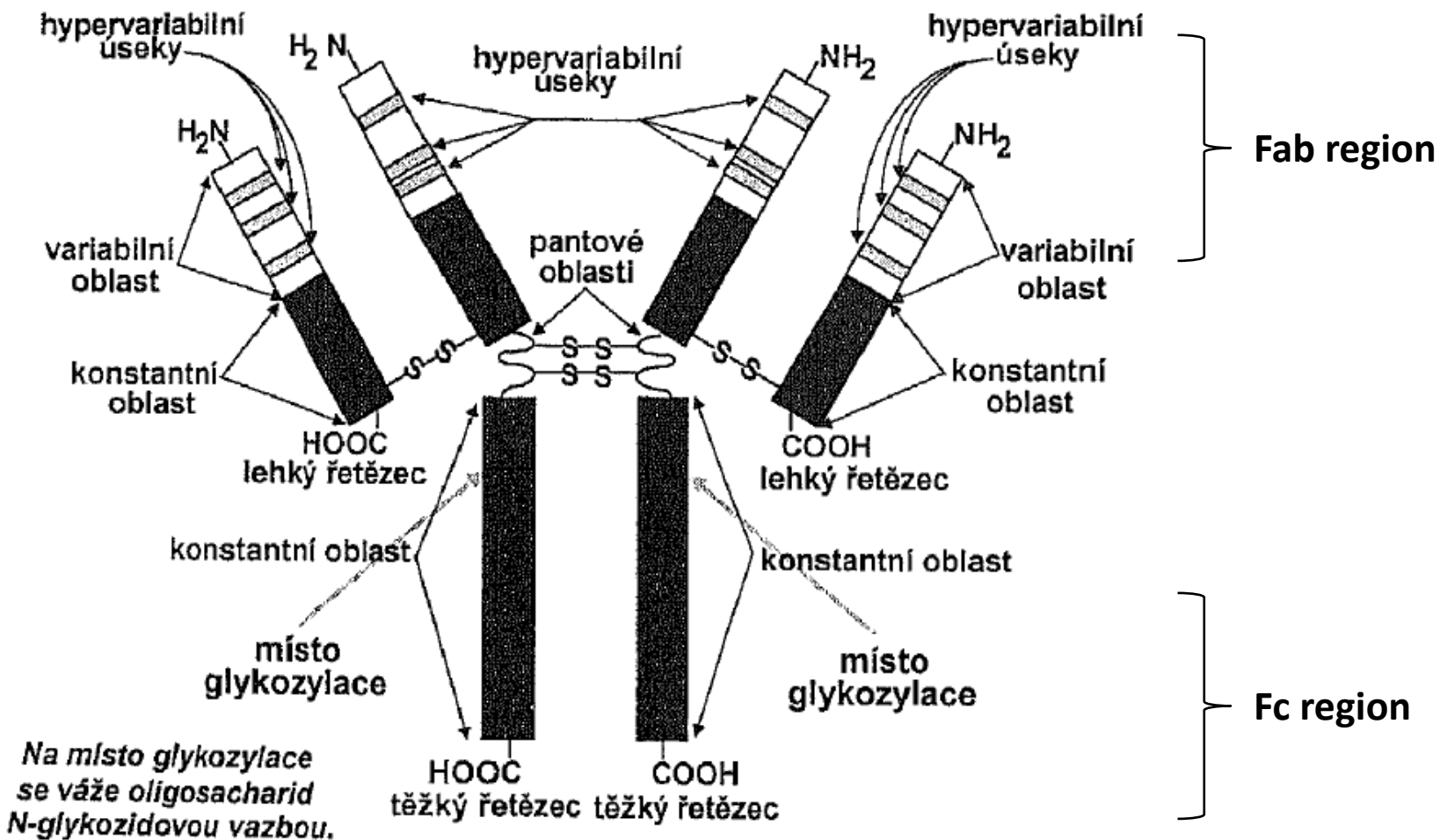
Pentamer
IgM

Imunoglobuliny (produkovány B-lymfocyty)

Protilátky patří do skupiny glykoproteinů, označovaných jako imunoglobuliny

Molekula imunoglobulinu je složena min. ze 4 polypeptidových řetězců

- 2x těžký (H) řetězec (cca 430 aminokyselin)
- 2x lehký (L) řetězec (cca 214 aminokyselin)



Imunoglobuliny

Konstantní oblast (C)

- relativně neměnná sekvence aminokyselin
- C_H pro těžký a C_L pro lehký řetězec

Variabilní oblast (V)

- úsek, v němž se imunoglobuliny příslušného typu liší
- V_H pro těžký a V_L pro lehký řetězec

Hypervariabilní oblasti

- váží antigen
- značně proměnlivá primární struktura

Pantová (hinge) oblast

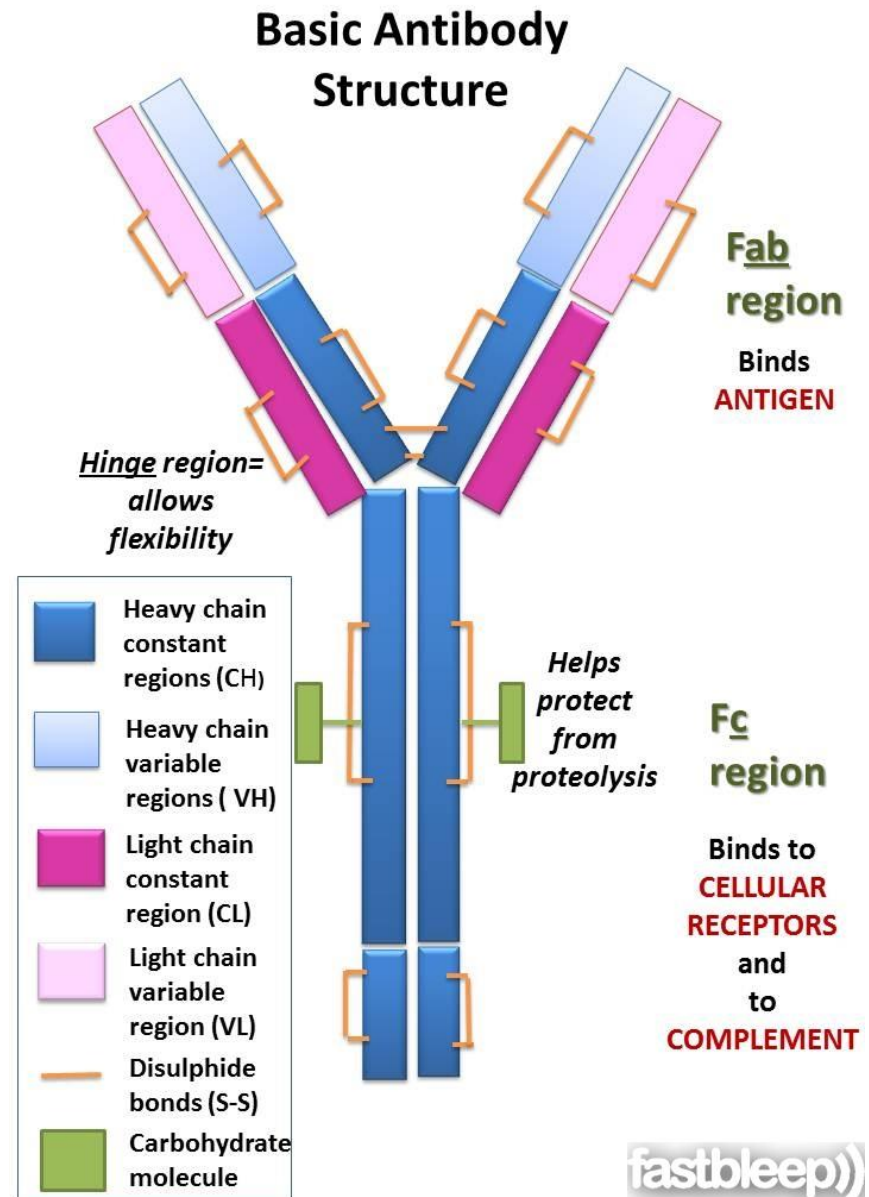
- ohebnost usnadňuje vazbu na antigen

Glykozylace

- připojení sacharidů N-glykozidovou vazbou
- na různých místech těžkého řetězce
- slouží k ochraně před proteolýzou

Domény

- lehký řetězec má 2 domény (C a V)
- těžký řetězec má jednu V a tři nebo čtyři C domény



Klasifikace lehkých a těžkých řetězců

Lehké řetězce

- 2 typy: κ (kappa) a λ (lambda)

Těžké řetězce

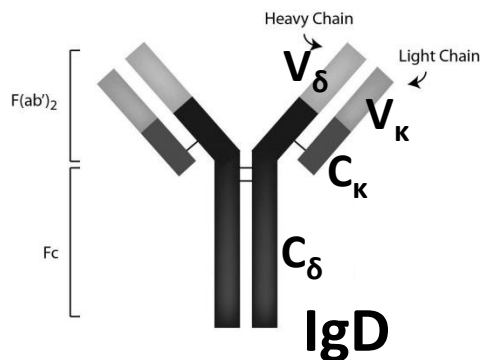
- 5 typů: γ (gamma), α (alfa), μ (mí), δ (delta), ϵ (epsilon)

- gamma má 4 podtypy a alfa má 2 podtypy

Klasifikace protilátek je založena na typu Fc fragmentu (těžkého řetězce)



indexy lze specifikovat, např. pro IgD:

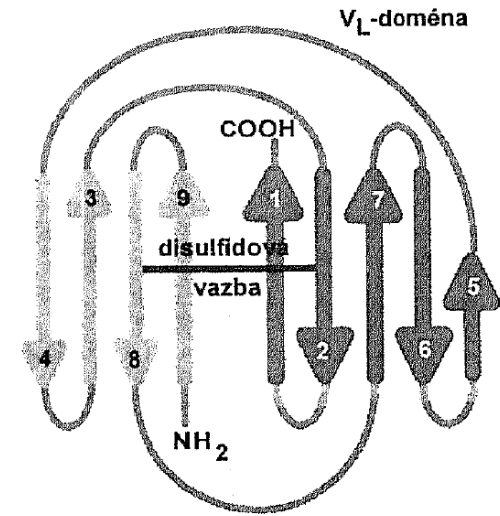


Klasifikace lidských imunoglobulinů

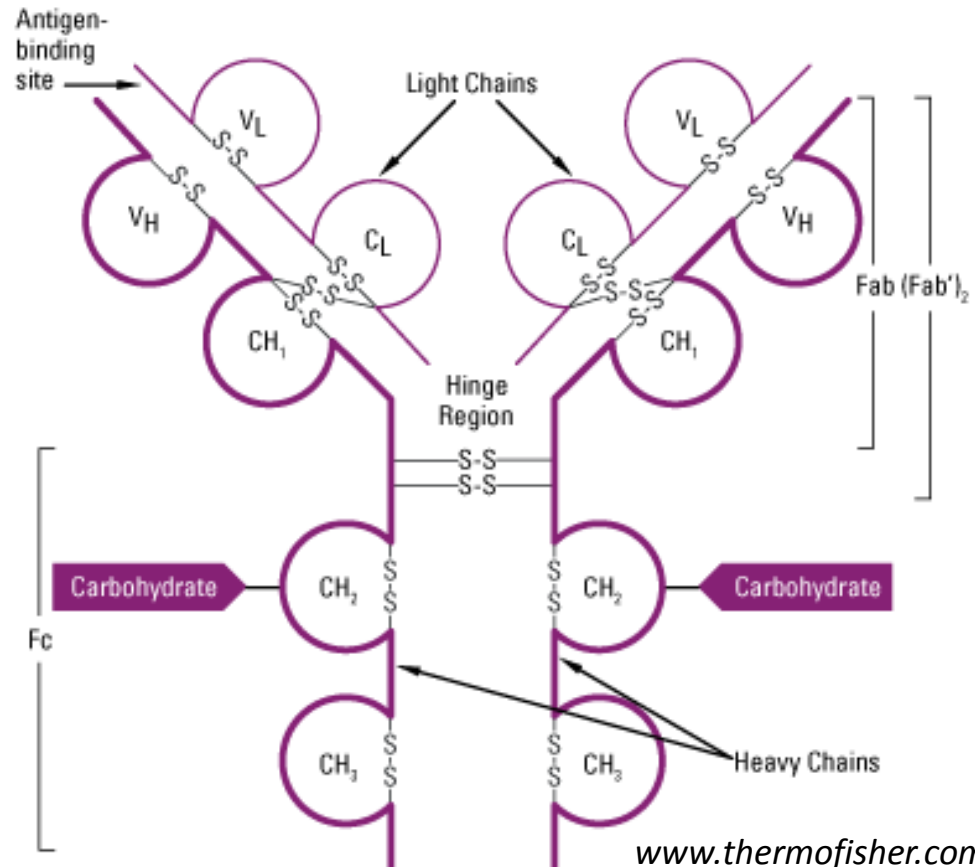
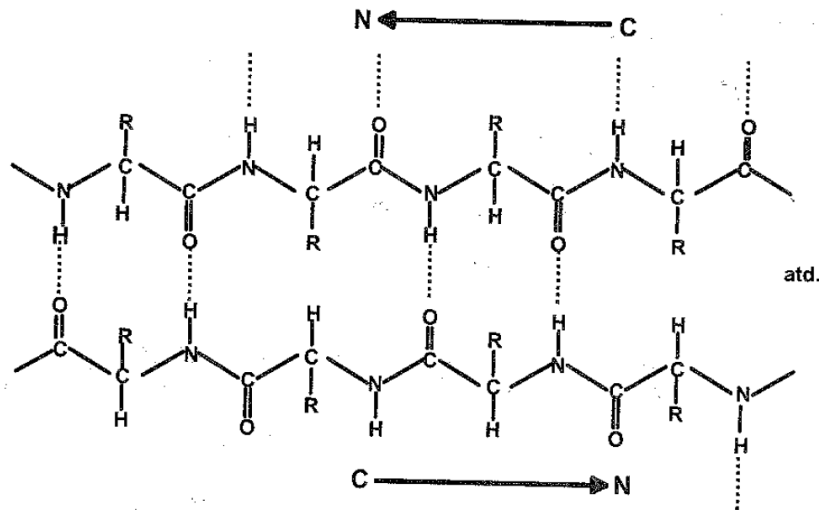
Třída	Podtřída	Lehký řetězec (L)	Těžký řetězec (H)	Celková molekul. hmotnost	Počet lehkých a těžkých řetězců v molekule
IgG	IgG1	κ nebo λ	$\gamma 1$	146 000	L_2H_2
	IgG2		$\gamma 2$	146 000	
	IgG3		$\gamma 3$	165 000	
	IgG4		$\gamma 4$	146 000	
IgA	IgGA1		$\alpha 1$	160 000	L_2H_2 nebo $(L_2H_2)_2$
	IgGA2		$\alpha 2$	160 000	
IgM	IgGM		μ	970 000	$(L_2H_2)_5$
IgD	-		δ	184 000	L_2H_2
IgE	-		ϵ	188 000	L_2H_2

Imunoglobulinové domény

- skládají se z antiparalelních β -skládaných listů spojených smyčkou
- struktura domény stabilizována vodíkovými vazbami (mezi $-NH$ a $-CO$)
- každá doména je navíc stabilizována disulfidovou vazbou
- antigen se váže na aminokyselinové zbytky (antigen binding site) v hypervariabilních úsecích
- při vazbě antigenu dochází ke změně konformace domény



Antiparalelní uspořádání polypeptidových řetězců v β -skládaném listu.



Molekulární podstata tvorby protilátek

dědí se pouze subgeny (genové segmenty) pro tvorbu imunoglobulinů

VDJ rekombinace (překupování genových segmentů)

- proces při kterém T a B lymfocyty náhodně sestavují různé genové segmenty
- k VDJ rekombinaci dochází na DNA buněk v průběhu jejich vývoje, před kontaktem s antigenem
- genové segmenty:

(V) ... variable

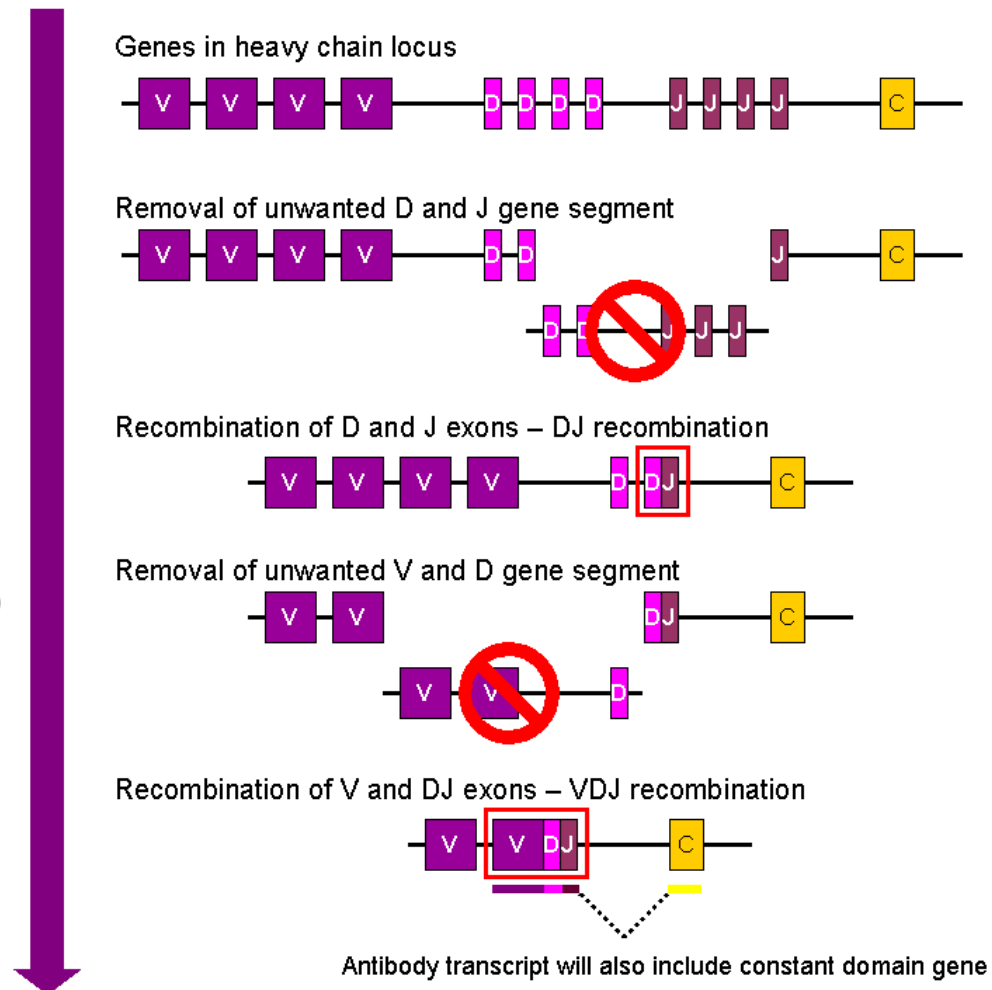
(D) ... diversity

(J) ... joining

Cíl: vytvářet jedinečné antigenní receptory, které společně dokáží rozeznat mnoho druhů antigenních molekul

U B-lymfocytů vznikají VDJ rekombinací imunoglobuliny (membránová - BCR - nebo volná forma)

U T-lymfocytů vznikají VDJ rekombinací T-cell receptory (TCR)



VDJ rekombinace

3 typy genů:

1. pro těžký řetězec: 14. chromosom
2. pro lehký řetězec kappa (κ): 2. chromosom
3. pro lehký řetězec lambda (λ): 22. chromosom

- kombinací vzniklých VDJ přesmykem může být u člověka až 10^{13}
- u genů pro lehké řetězce kappa a lambda chybí D segment

Germline configuration:



(1) D to J recombination



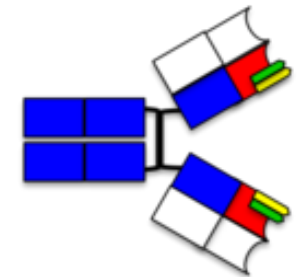
(2) V to DJ recombination



(3) Transcription & splicing

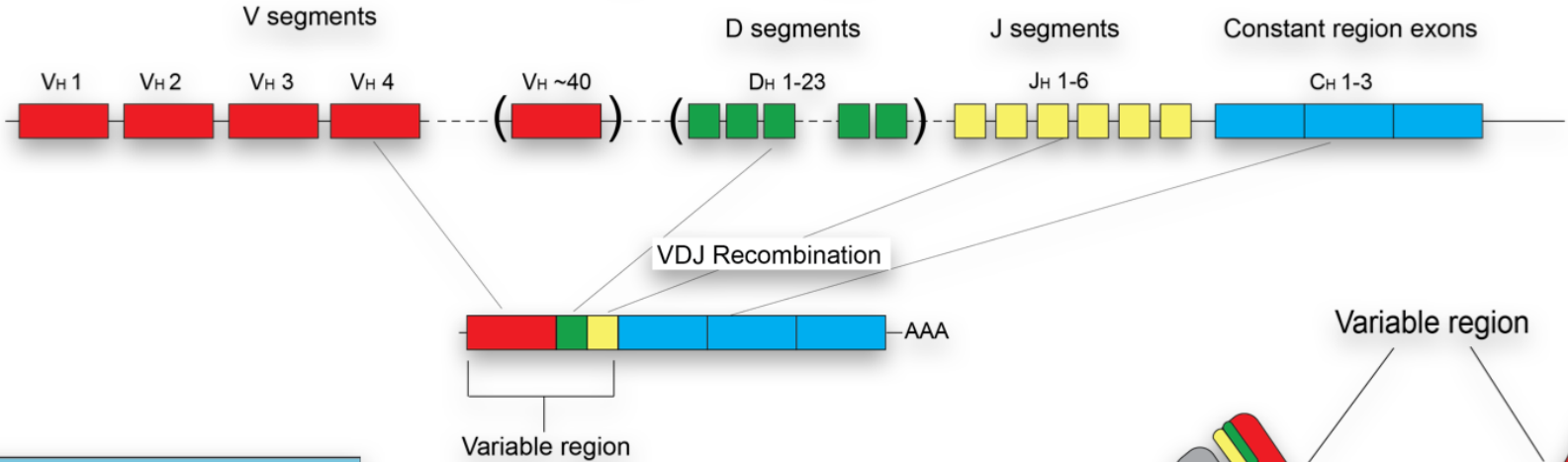


(4) Translation & assembly

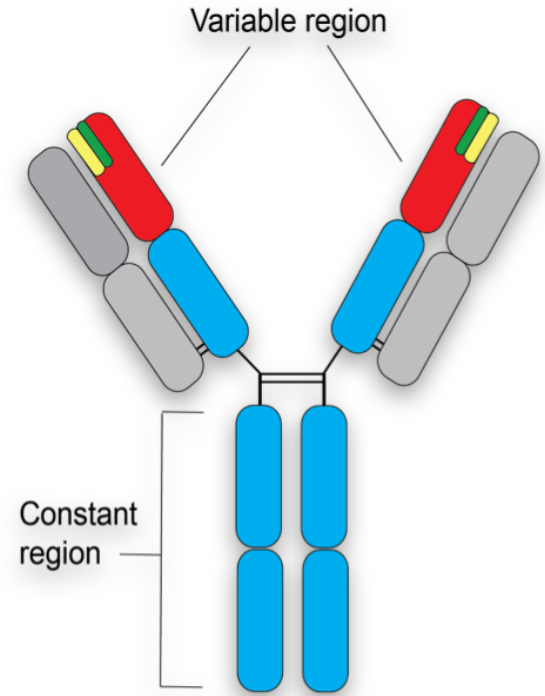
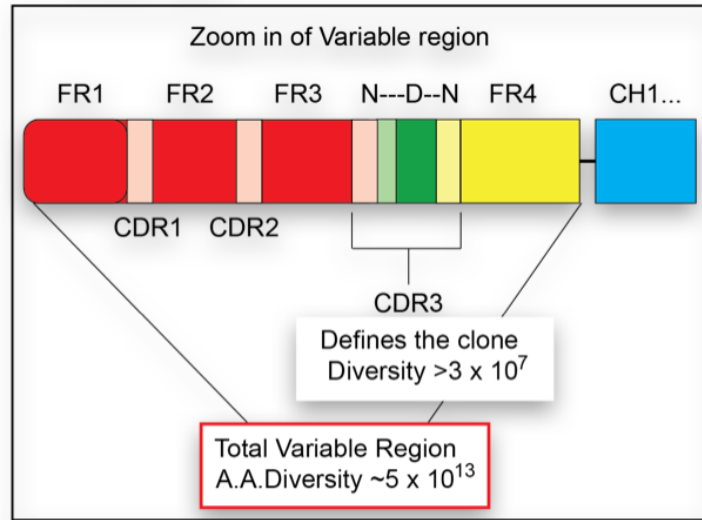


VDJ recombination

Germline configuration of antibody gene locus



Number of functional gene segments in human immunoglobulin loci			
Segment	Light chains		Heavy chain
	κ	λ	H
Variable (V)	34-38	29-33	38-46
Diversity (D)	0	0	23
Joining (J)	5	4-5	6
Constant (C)	1	4-5	9



Mechanismus VDJ rekombinace

probíhá pouze na DNA nezralých lymfocytů

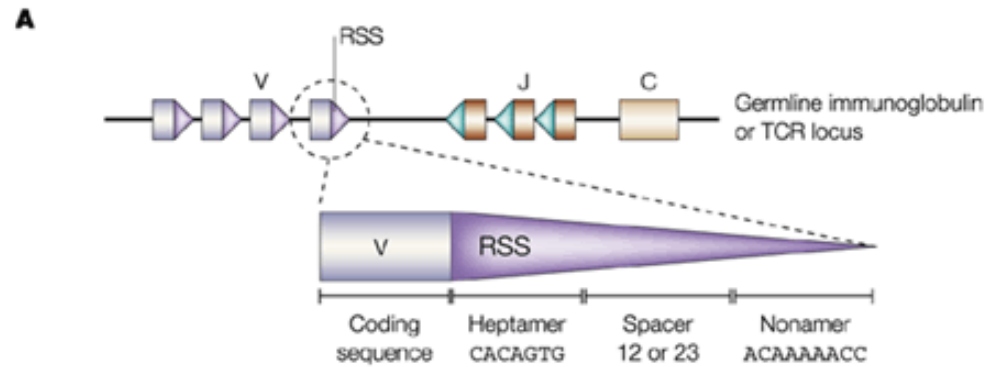
RSS (recombination signal sequence)

- označuje místo sestřihu (vazba RAG)

RAG1/RAG2 (recombination-activating genes)

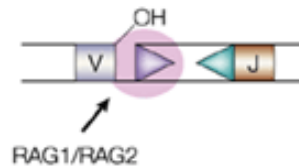
- enzymy katalyzující rekombinaci

- vazba na RSS

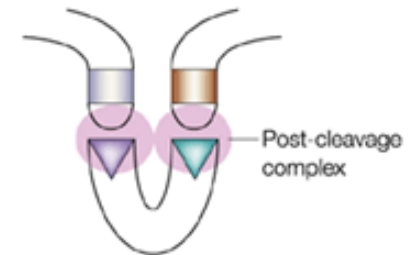


B

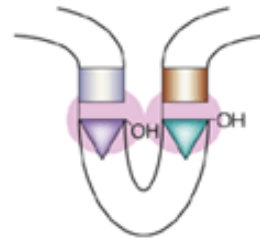
a RAG binding and nicking



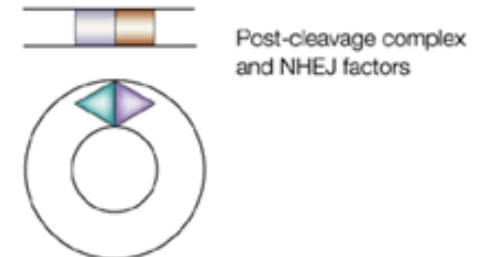
c Hairpin formation and cleavage



b Synapsis



d Hairpin opening and joining

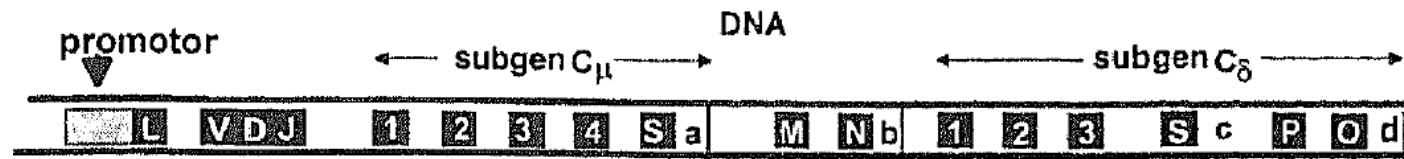


VDJ rekombinace ve vývoji B-lymfocyty

- subgeny V_H , D a J_H se přeskupují s C_μ
- v kombinaci s lehkým řetězcem (κ nebo λ) vzniká povrchový IgM
- stejným způsobem pak vzniká IgD (s C_δ)
- oba reagují na stejný (hypotetický) antigen
- obrovské kvanta typů protilátek se tvoří před kontaktem s antigeny



- IgM a IgD se tvoří jako první, protože C_μ a C_δ následují na DNA hned za VDJ subgeny

	Typ B-lymfocyty	Subgeny H-řetězců	Subgeny L-řetězců
Vývoj nezávislý na antigenu	Kmenová buňka		<i>Přeskupování ještě neprobíhá.</i>
	Raný proB-lymfocyt		<i>Přeskupování D-J.</i>
	Pozdní proB-lymfocyt		<i>Přeskupování V-DJ.</i>
	Velký preB-lymfocyt		<i>VDJ přeskupeno.</i>
	Malý preB-lymfocyt		<i>VDJ přeskupeno.</i>
	Nezralý B-lymfocyt		<i>VDJ přeskupeno. Tvoří se povrchový IgM.</i>
	Zralý B-lymfocyt (panenská B-buňka)		<i>VDJ přeskupeno. Tvoří se povrchový IgM a IgD.</i>
			Vývoj v kostní dřeni



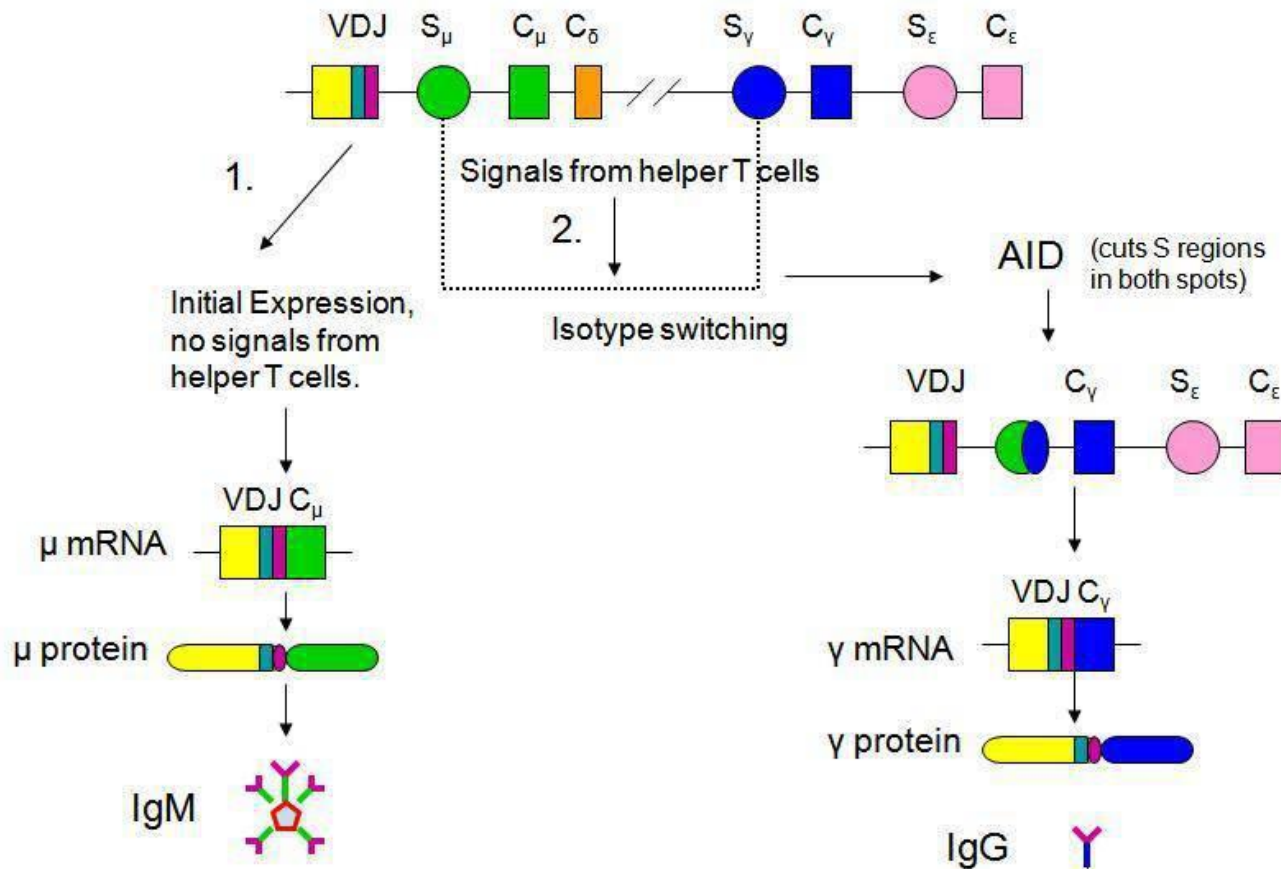
Přesmyk imunoglobulinových tříd

- po přeskupení subgenů může následovat přesmyk tříd z **IgM** do **IgG, IgE nebo IgA**
- až po stimulaci antigenem v sekundárních lymfoidních orgánech za podpory T_H lymfocytů

	Typ B-lymfocytu	Subgeny H-řetězcu	Subgeny L-řetězcu		
Vývoj závislý na antigenu	Paměťová B-buňka	IgD IgM 	Přesmyk na C _γ , C _α nebo C _ε Proto se mohou tvořit i receptory tříd IgG, IgA a IgE.	VJ přeskupeno. Somatická hypermutace.	Vývoj v sekundárních lymfoidních orgánech
	Plazmatická buňka	 IgG	Produkuje protilátky tříd IgM, IgD, IgG, IgA nebo IgE.	VJ přeskupeno. Přesmyk a alternativní sestřih vedou k sekretovaným řetězcům δ, γ, α nebo ε.	

Přesmyk imunoglobulinových tříd

- stejný úsek VDJ_H se připojí k subgenu C_γ, C_α nebo C_ε za **delece C_μ a C_δ**
- přesmyk tříd je řízen "signály přesmyku - S", regulační oblasti na koncích C-subgenů s výjimkou C_δ
- na S místa na DNA se váží enzymy katalyzující přesmyk

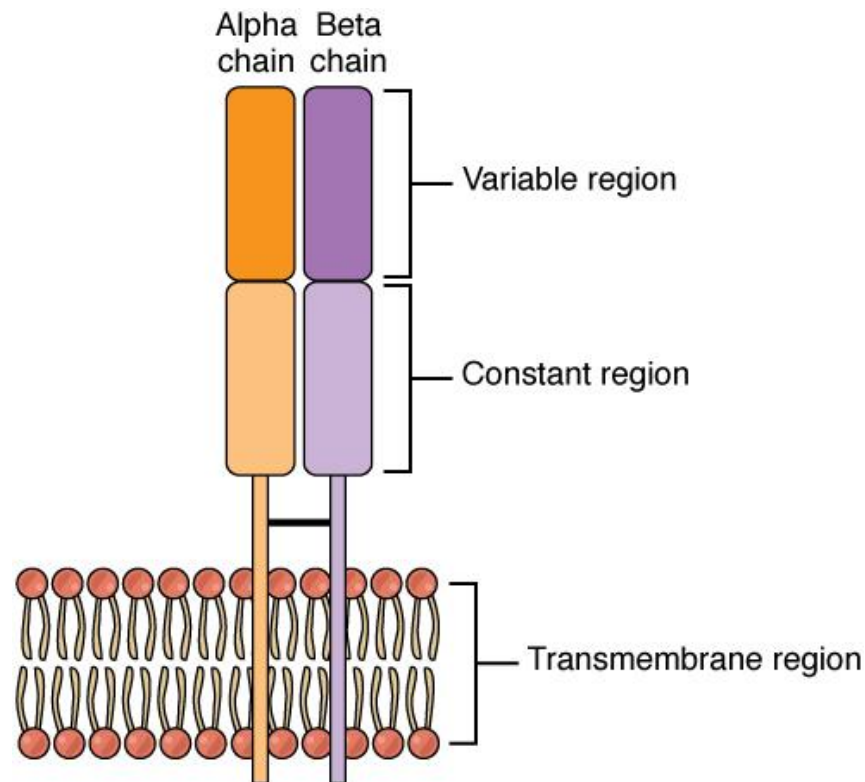


Receptory T lymfocytů (TCR)

- u člověka má 95% T lymfocytů TCR receptor složený z α (alfa) a β (beta) řetězce (cca 5% TCR je z řetězců gama a delta - γ/δ)

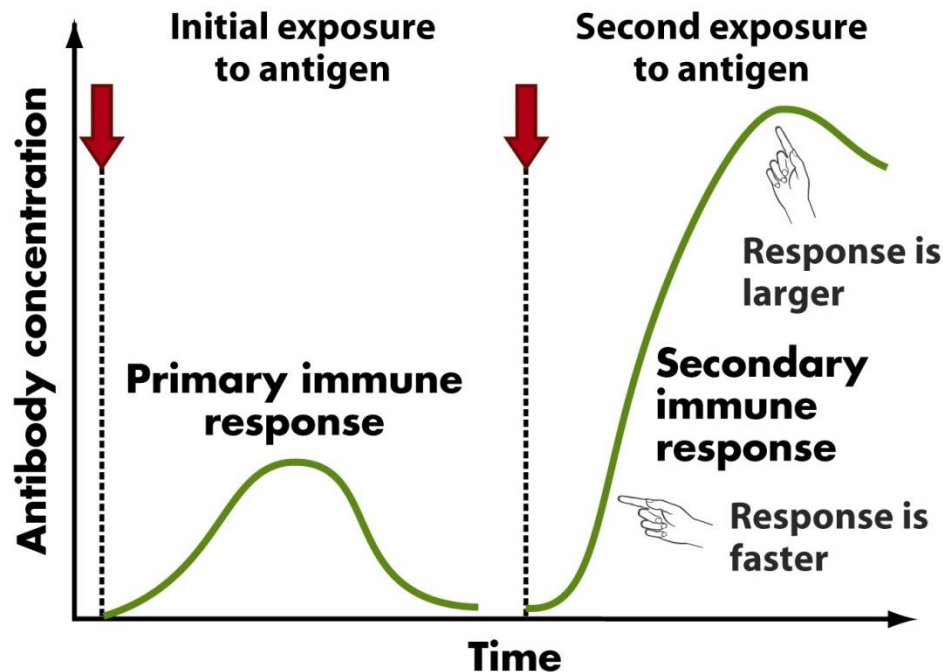
- V, D a J segmenty v β řetězcích
- V a J segmenty v α řetězcích

- přeskupování probíhá stejně jako u imunoglobulinů - vznik jedinečných receptorů



Souhrn imunitní reakce

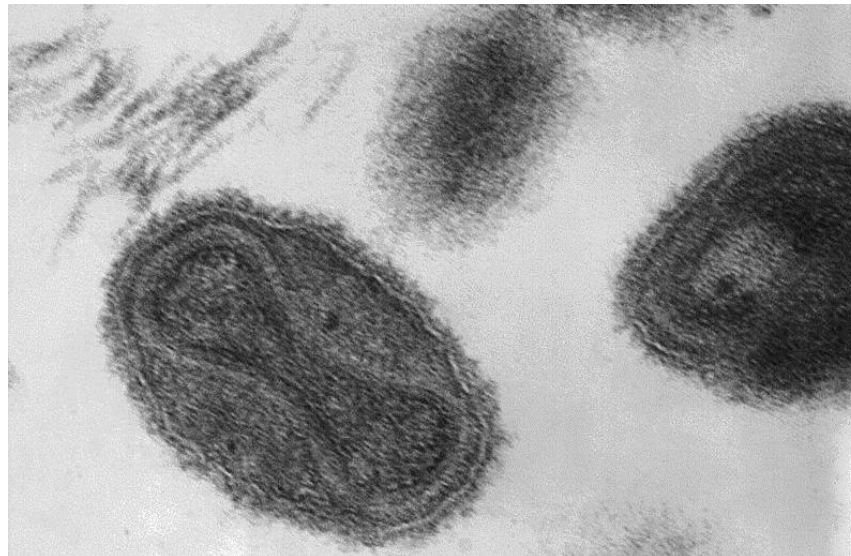
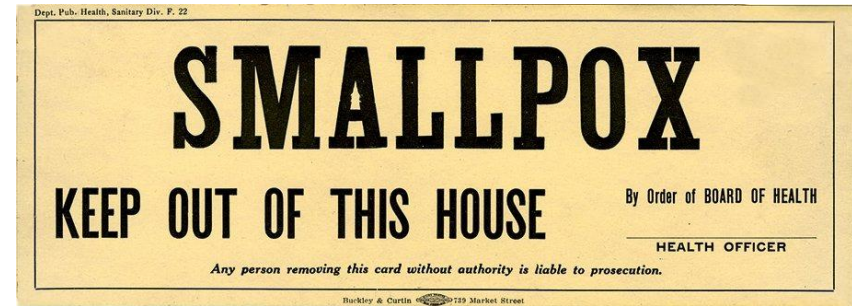
- Plazmatické buňky produkují téměř neomezené množství typů protilátek
 - Každá protilátka je specifická pro svůj antigen
 - imunitní odpověď se zintenzivňuje v průběhu infekce
 - imunitní odpověď se "zapamatuje" - při druhém kontaktu se stejným antigenem člověk neonemocní nebo se rychle zotaví - podstata očkování
-
- antigeny jsou rozpoznávány receptory na B a T buňkách
 - lymfocyty jsou aktivovány vazbou antigenu na receptor
 - Aktivované lymfocyty jsou klonovány - rychlé buněčné dělení
 - Lymfocyty přetrvávají ve formě paměťových buněk



Vakcinace (očkování)

Pravé neštovice (small pox)

- infekční nemoc způsobená virem *Variola major*
- mortalita 30-35%
- u lidí se pravděpodobně objevila 10 000 let před našim letopočtem
- má na svědomí přibližně 300-500 milionů mrtvých v 20. století
- bývala zodpovědná za asi 1/3 oslepnutí
- v roce **1979** ohlásila WHO úplné **vymýcení pravých neštovic** díky celosvětovému programu očkování
- v 80. letech bylo zastaveno rutinní očkování dětí ve všech zemích (70. léta v Evropě a USA)
- jediné známé vzorky viru zůstávají v laboratořích v Atlantě a v Moskvě



Snímek viru z elektronového mikroskopu (wikipedia)

Vakcinace (očkování)

Edward Jenner (1749 - 1823)

- doktor z Gloucestershire
- při epidemii pravých neštovic si všiml, že dojičky, které prodělali kravské neštovice ne onemocní
- provedl experiment:
 - odebral vzorek kravské neštovice z pacientky Sarah Nemesové
 - nakazil tímto 8-letého chlapce Jamese Phippse
 - po zotavení nakazil Jamese pravými neštovicemi - ne onemocněl
- očkování nepatentoval, aby mohli být léčeni bohatí i chudí

