

# Molekulární biologie

## 12. Programovaná buněčná smrt a molekulární podstata získané imunity

**Hlavní zdroje:**

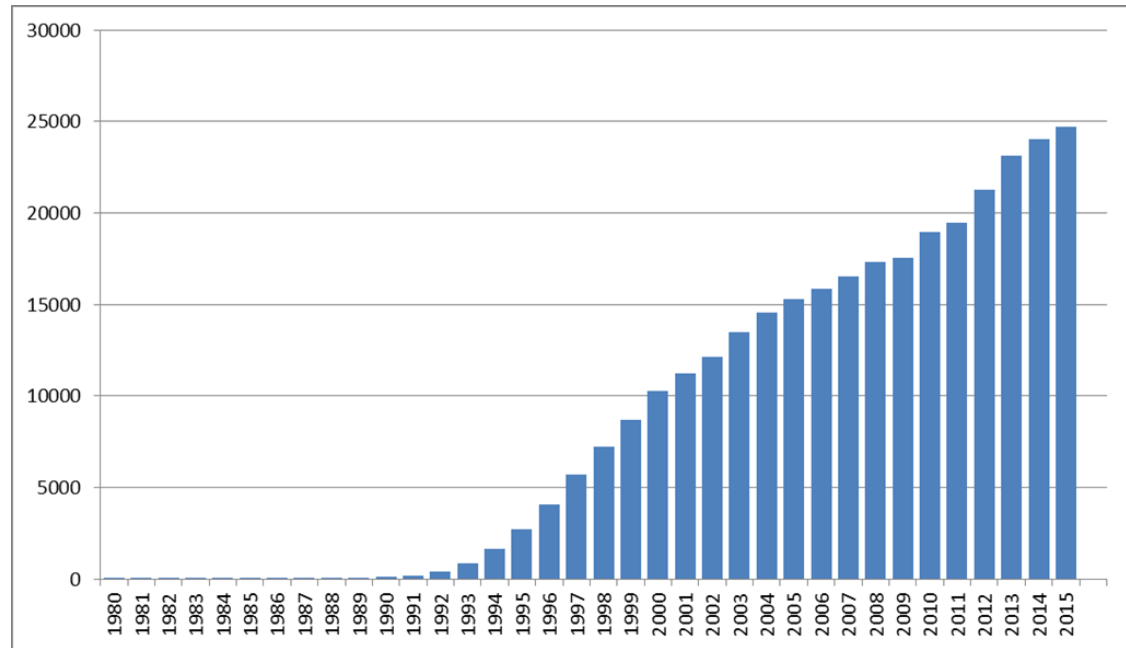
*S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4  
Masarykova Universita Brno  
ISBN 80-902562*

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

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

# Programovaná buněčná smrt = Apoptóza

- koncept apoptózy od 1950
- intenzivně zkoumána od 1990
- poruchy apoptózy hrají roli v různých nemocech, zejm. rakovině



Počet článku zkoumajících apoptózu (PubMed)

**Excesivní apoptóza**  
*např. dystrofie*



**Omezená apoptóza**  
*např. rakovina*

**Dystrofie** - degenerace tkáně z důvodu nemoci nebo špatné výživy

# Apoptóza - buněčná sebevražda

- nezbytná pro vývoj a homeostázi organismu
- pouze u mnohobuněčných organismů
- přísně regulovaný proces (na rozdíl od nekrózy – nefyziologické faktory)
- buněčný stres nebo signalizace od jiných buněk stimuluje pro-apoptotické signální dráhy
- tyto dráhy kaskádovitě aktivují proteázy zvané "kaspázy,, = efekторы apoptózy
- apoptotická buňka vykazuje charakteristické změny morfologie

Buněčný stres/  
Signalizace



pro-apoptotické  
signální dráhy

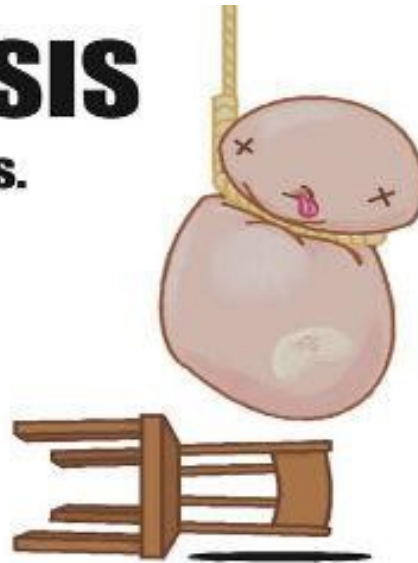


Kaspázy



APOPTOZA

**APOPTOSIS**  
Know the signs.



# Charakteristické morfologické znaky apoptózy

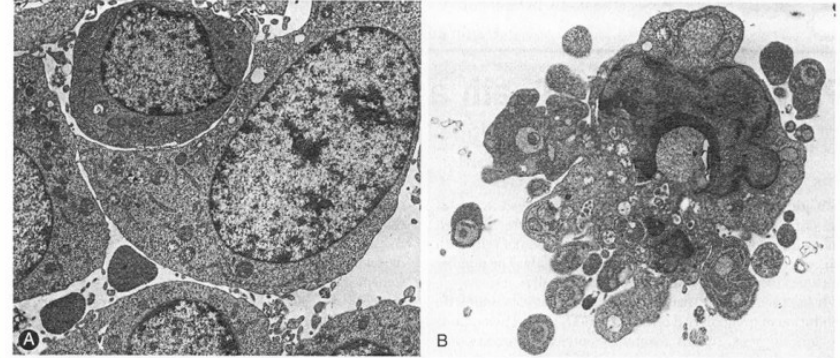
## 1. Blebbing

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

## myší fibroblast

A. v přítomnosti séra

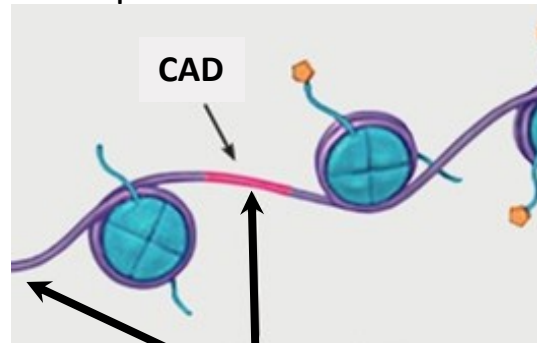
B. v nepřítomnosti séra



Zornig M, Baum W, et al. (2000) 19-40

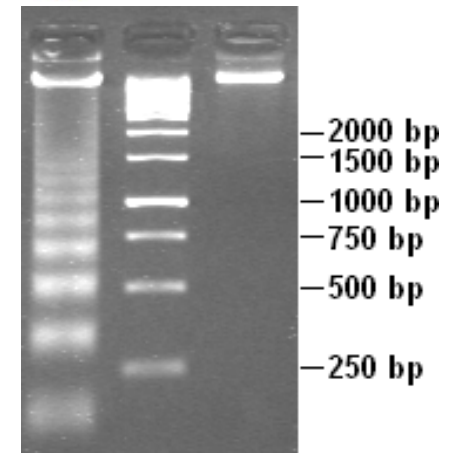
## 2. Fragmentace jádra

- 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

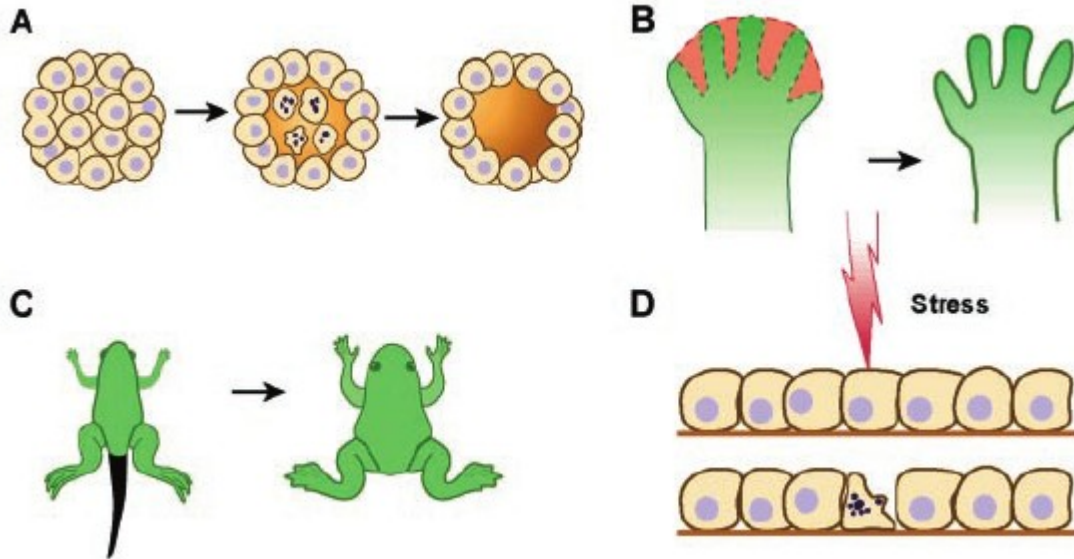
☹️ žebříček ☺️



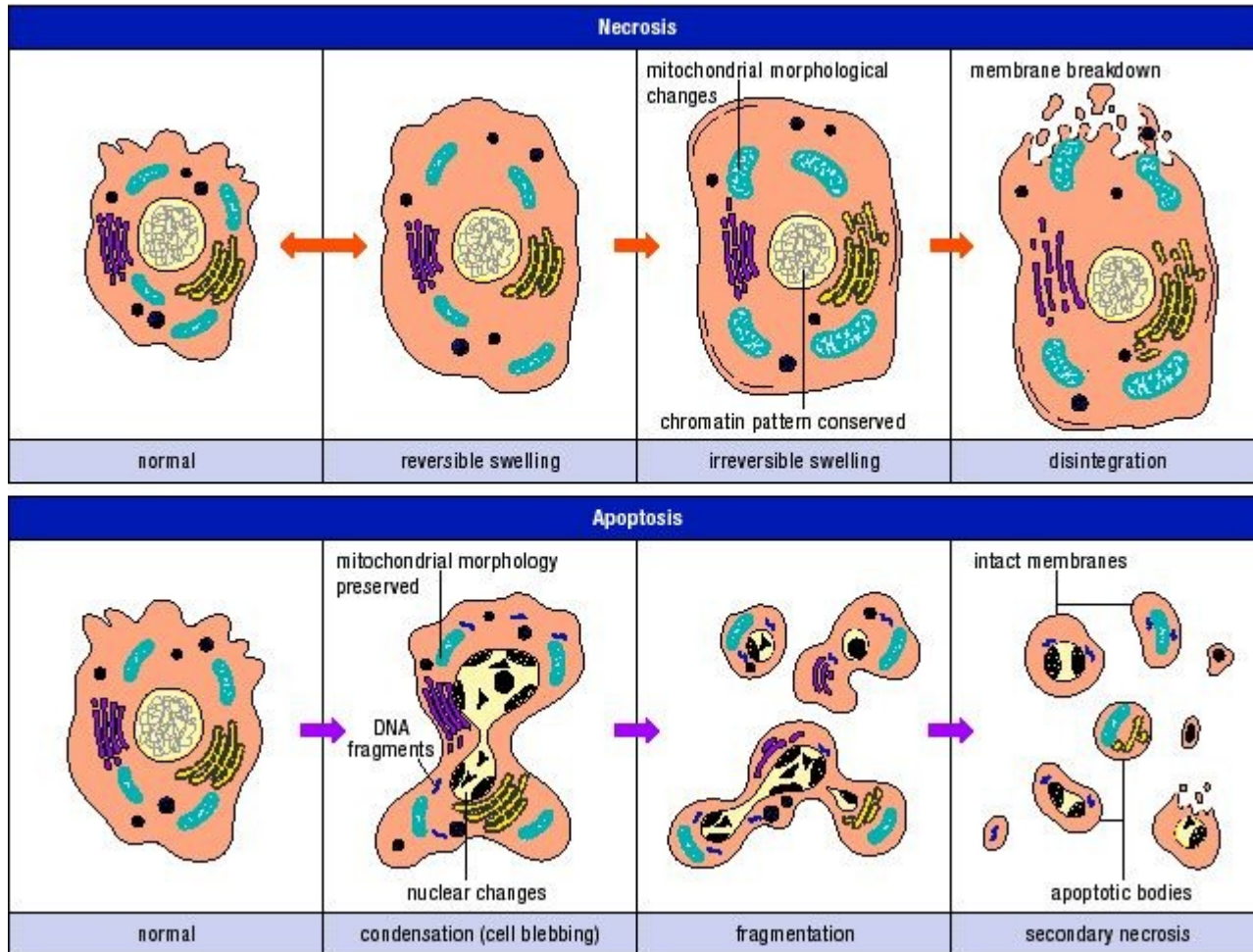
# Kdy probíhá apoptóza?

## 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)
- buňka ztratí kontakt s extracelulární matrix, tzv. anoikis (z řečtiny - bezdomovectví)
- buňka, která dostává signály smrti
- poškození DNA, které již neumí buňka opravit (D)



# Apoptóza vs. Nekróza



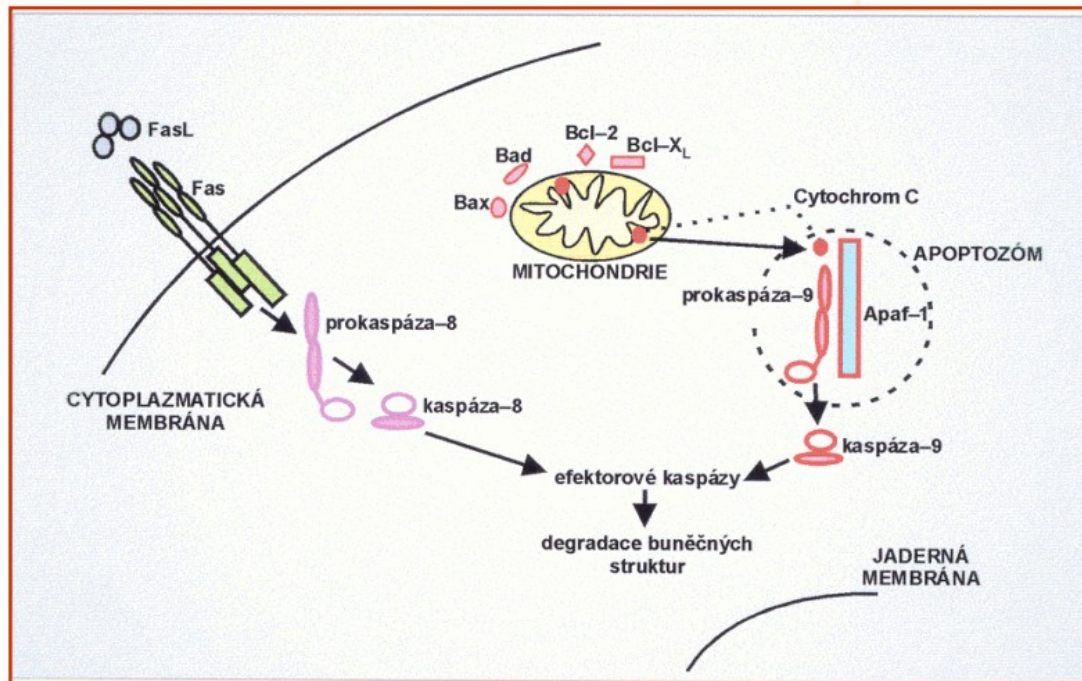
# Apoptóza může být indukována dvěma drahami

## 1. Vnitřní dráha (intrinsic pathway) - mitochondriální

- z důvodu buněčného stresu nebo DNA damage
- uvolnění proteinů (hl. Cytochrom C) z prostoru na membráně mitochondrií
- tvorba apoptozómu → proteolytické štěpní prokaspázy 9 na iniciační kaspázu 9





## 2. Vnější dráha (extrinsic pathway) - receptorová

- z důvodu vnější signalizace od ostatních buněk
- extracelulární ligandy (hl. TNF- $\alpha$  a Fas) se váží na tzv. death-receptory na povrchu buněk
- vzniká proapoptický signál → proteolytické štěpní prokaspázy 8 na iniciační kaspázu 8



# Metody detekce apoptózy

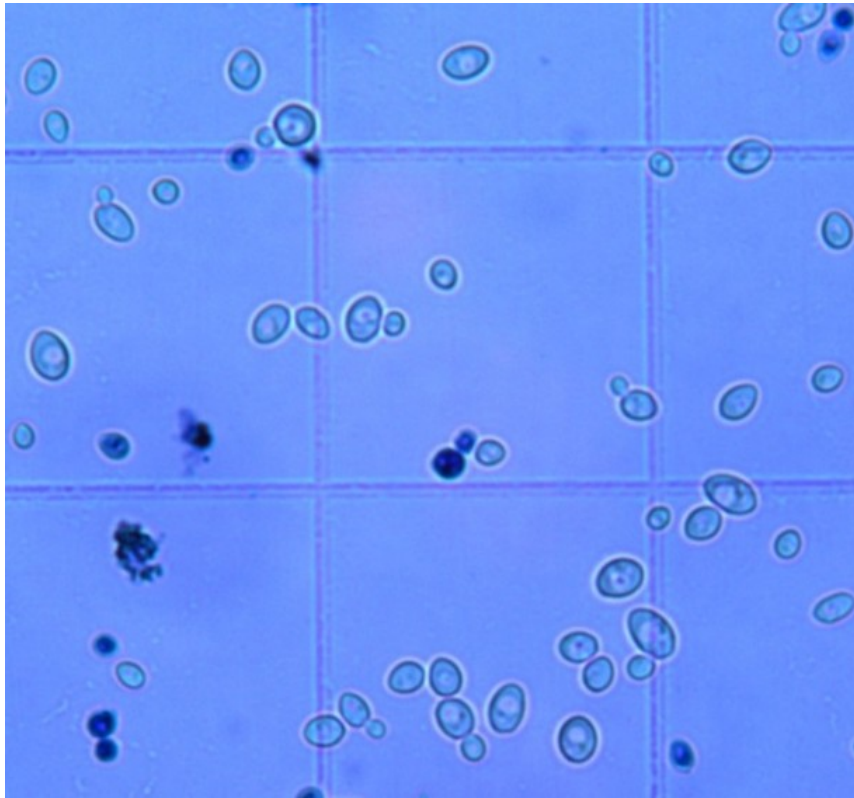
*např. při testování léčiv in vitro pomocí světelné mikroskopie – morfologické změny*

	Nic	Lék na leukemii
Zdravé erytrocyty		
Leukemické erytrocyty		



# 1. Barvení buněk Trypanovou modří

- proniká a barví pouze mrtvé buňky
  - počítání ve světelném mikroskopu na sklíčku s mřížkou
- nerozliší mezi apoptotickou a nekrotickou buňkou

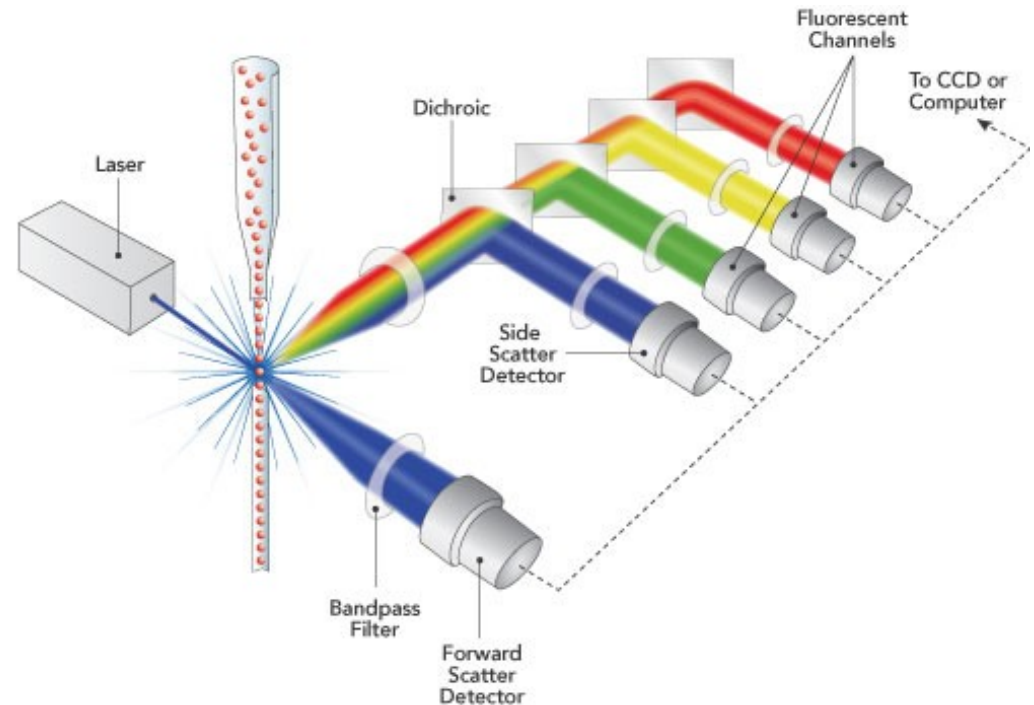
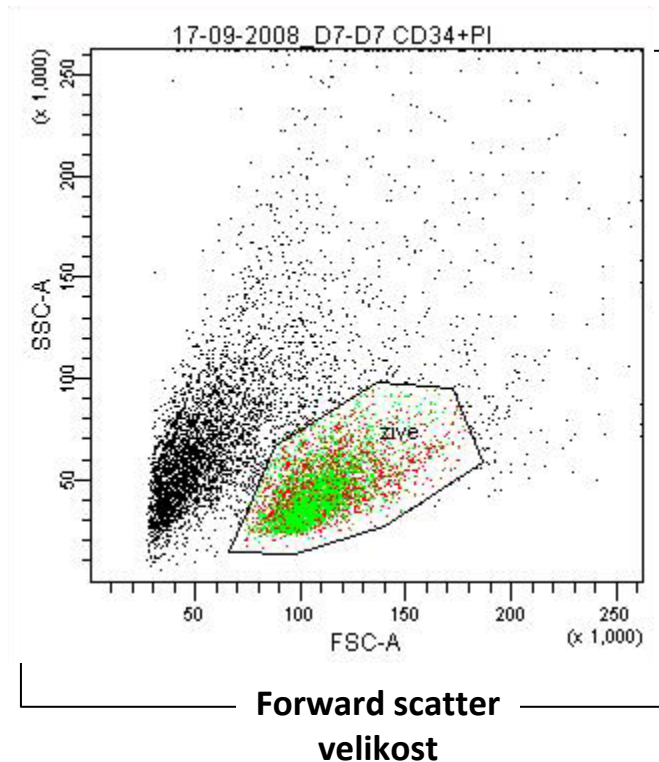


## 2. Průtoková cytometrie

Technika pro analýzu velkého množství buněk.

Na buňkách je možné analyzovat:

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

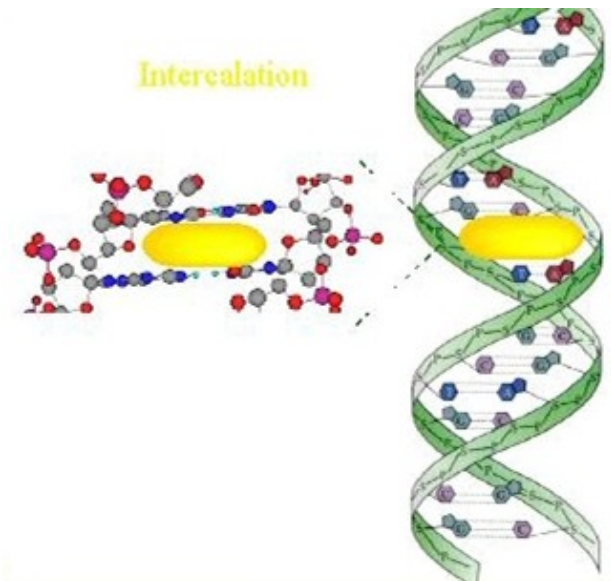
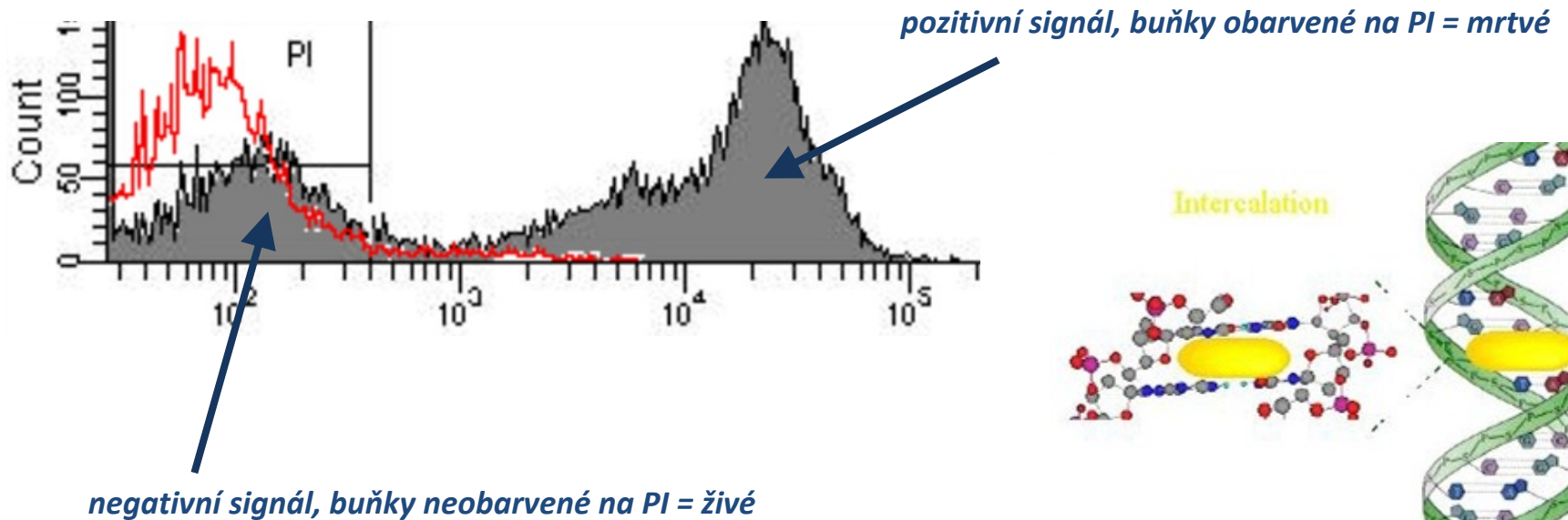


## 2. Flow cytometrie

### Detekce buněčné smrti pomocí DNA interkalátoru (např. propidium jodid PI; nebo DAPI)

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

#### Histogram barvení propidium jodidem



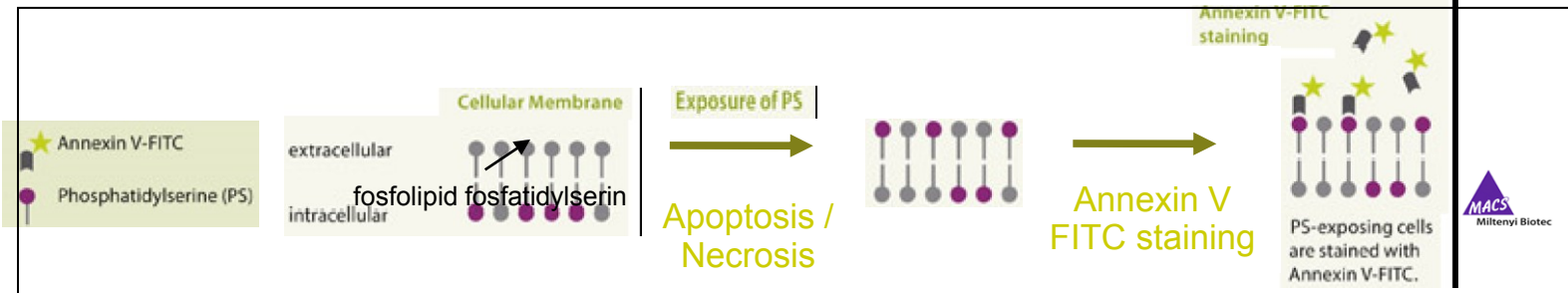
**interkalace** – vmezeření. I. do DNA – vmezeření určité látky mezi obě vlákna DNA

## 2. Flow cytometrie – translokace fosfatidylserinu (marker apoptózy)

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)

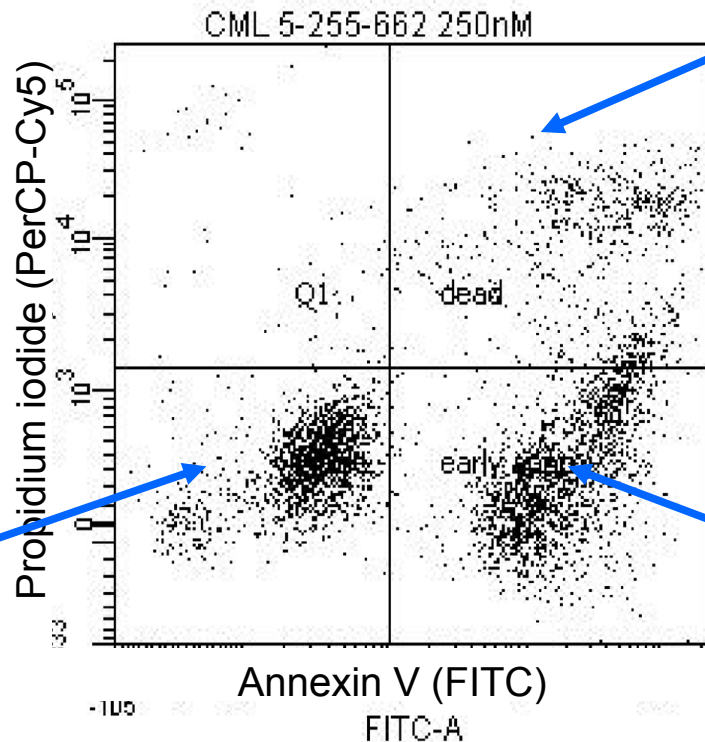
Annexin – protein s vysokou afinitou k fosfatidylserinu, který je translokován na povrch apoptických buněk, u nekrotických buněk se váže na fosfatidylserin z vnitřní strany



Annexin+PI-... časná apoptoza

Annexin+PI+... pozdní apoptoza/nekroza

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**
- **štěpení (pro)kaspázy**
- štěpený protein **PARP**

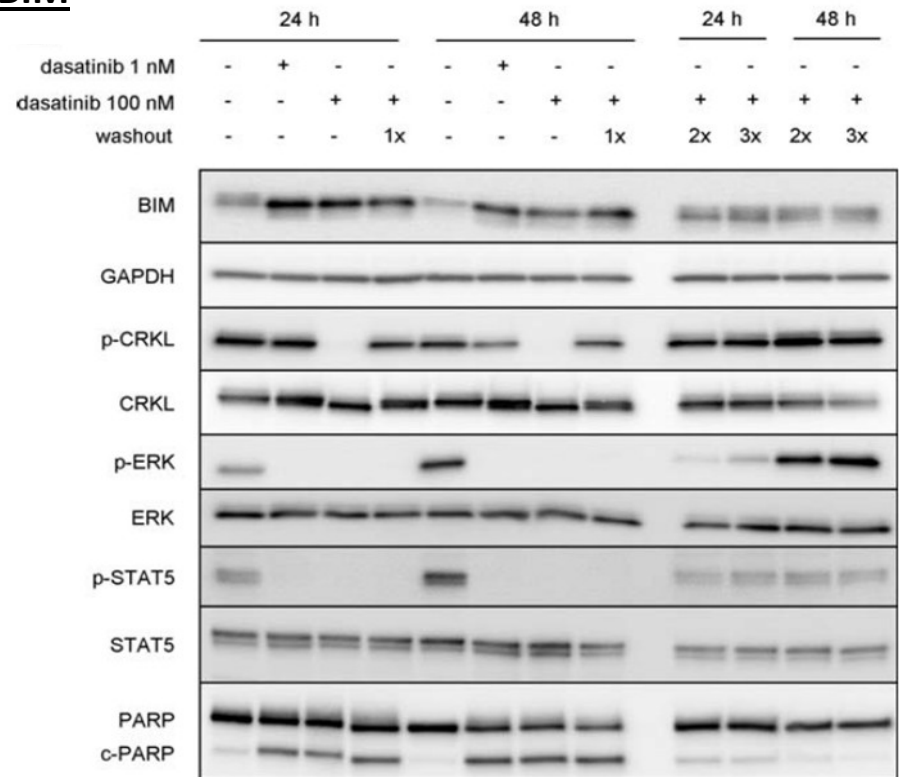
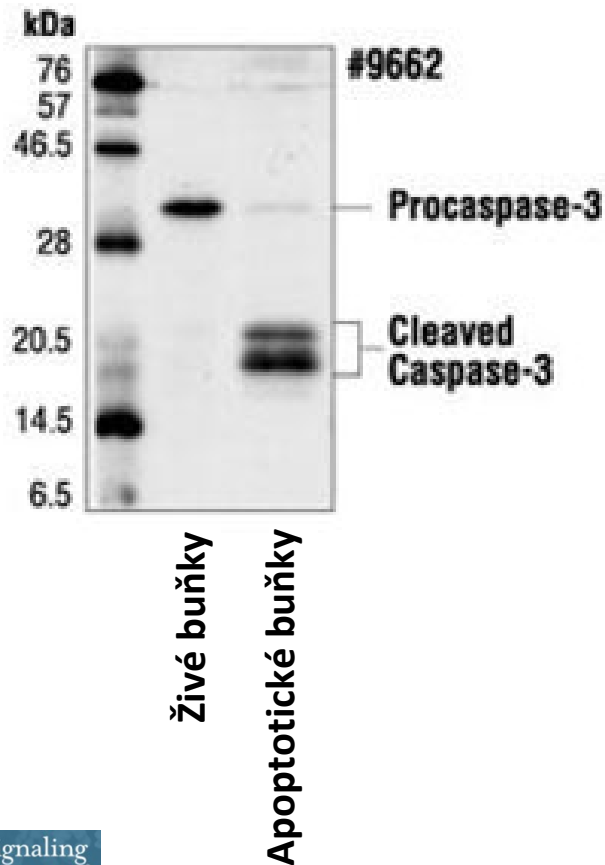


Figure 2. Effect of intermittent high-dose TKI treatment on signaling pathways in the K562 cell line. The cells were exposed to imatinib (A) or dasatinib (B) at a low dose continuously (2.5  $\mu$ M imatinib or 1 nM dasatinib), a high dose continuously (32.5  $\mu$ M imatinib or 100 nM dasatinib) or 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.

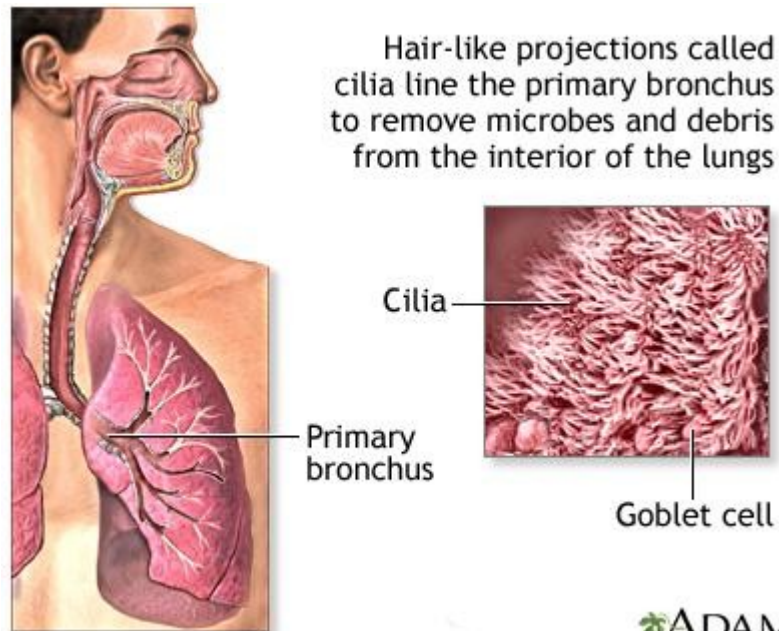
# **Molekulární podstata získané imunity**

# Imunitní systém

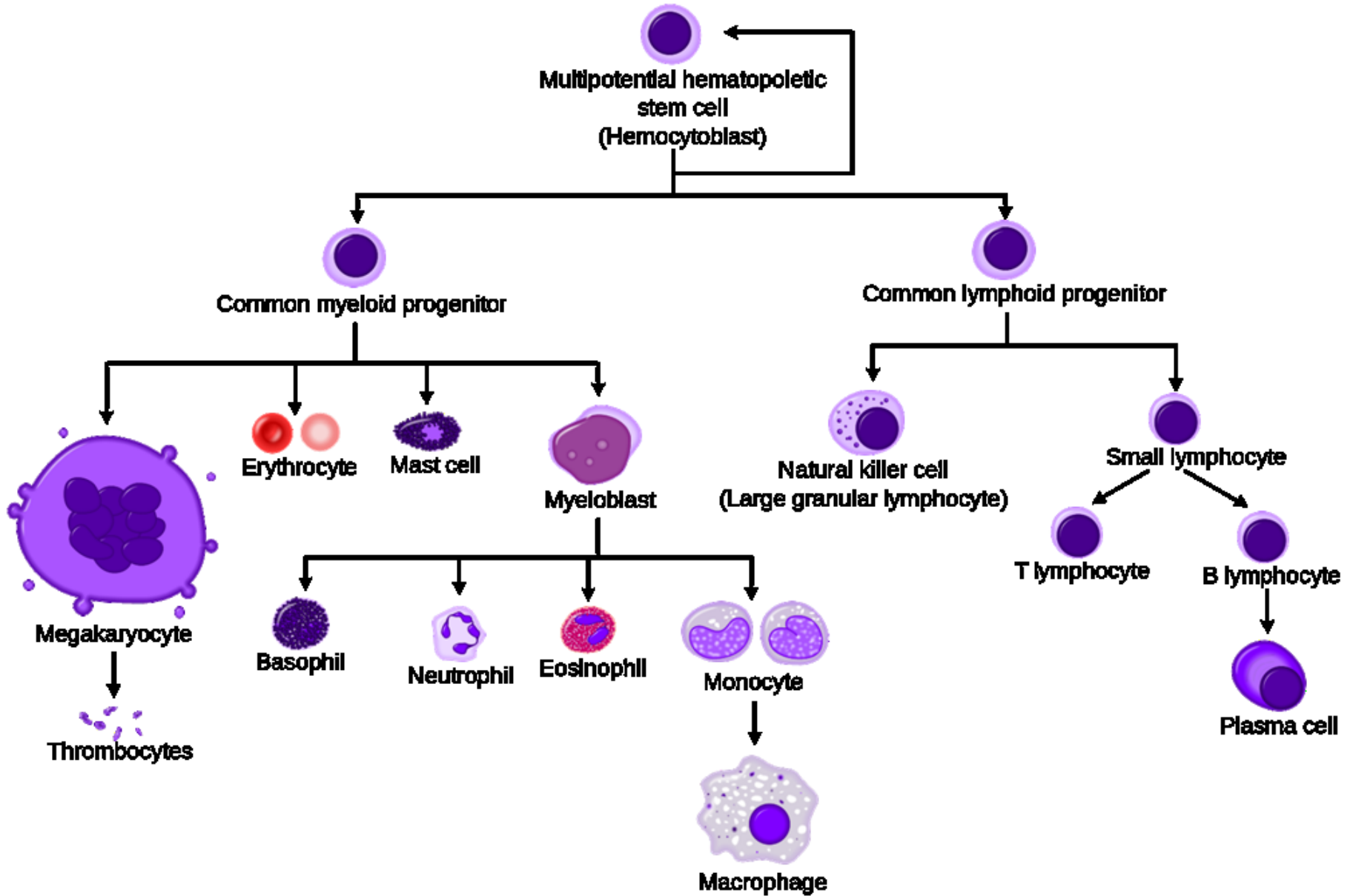
*Existuje fyzická, chemická a buněčná obrana proti invazi bakterií a virů*

## 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

- Vrozená imunitní odpověď, obecná odpověď na infekci patogenem
- Rychlá reakce pomocí které je vyvolán zánět

### Granulocyty

a) **Neutrofil** - **nejběžnější granulocyt (30-85%)**, 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)

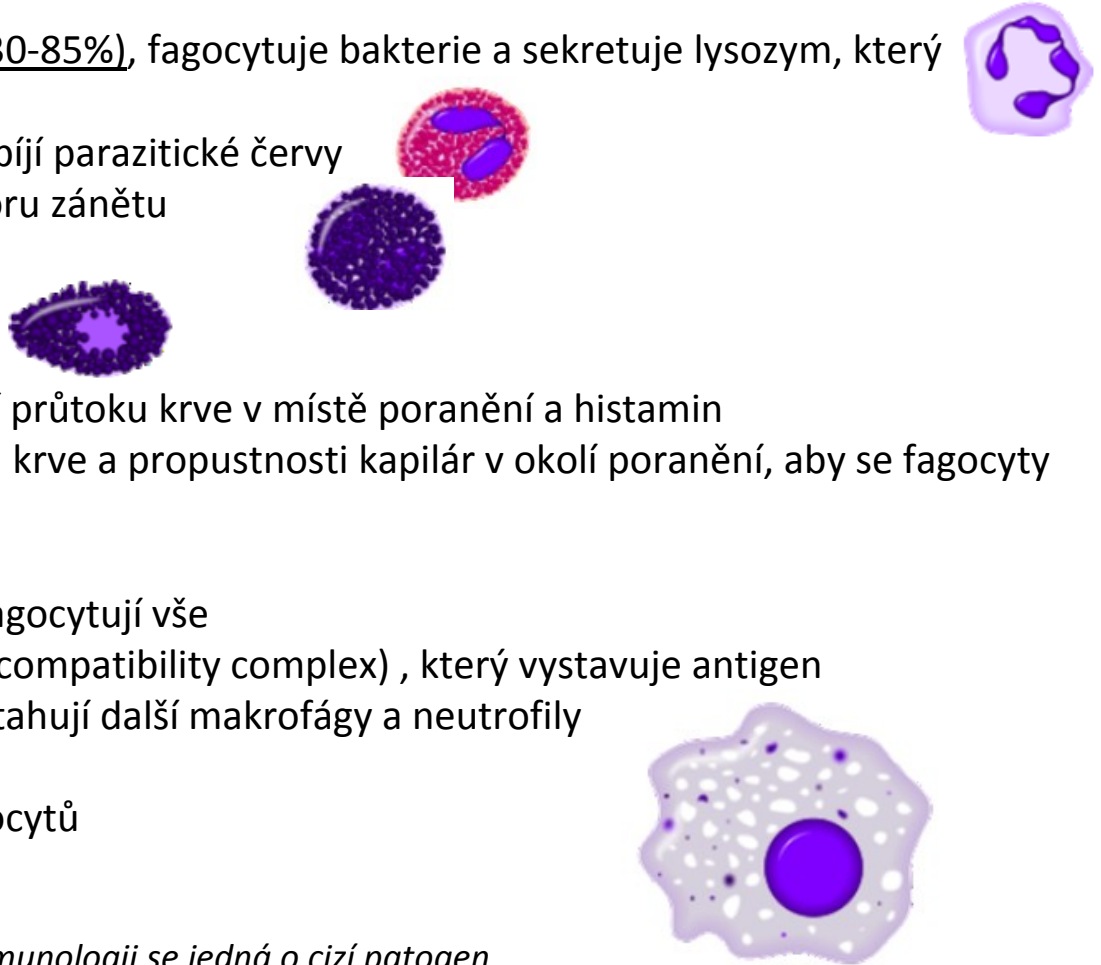
- vylučuje signály pro snížení průtoku krve v místě poranění a histamin
- signály pro zvýšení průtoku krve a propustnosti kapilár v okolí poranění, aby se fagocyty dostaly do místa poranění

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

- obsahují MHC (major histocompatibility complex) , který vystavuje antigen
- sekrece cytokinů, které přitahují další makrofágy a neutrofilly
- zvyšují teplotu
- v krvi kolují ve formě monocytů

*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), velká individuální genetická variabilita
- 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 (antigen prezentující buňkou)
- prezentovaný antigen je rozeznáván TCR-receptorem T-lymfocytů

## Typy MHC

### 1. MHC I (první třídy)

- prezentace **endogenních** peptidů: virový antigenní peptid či jinak vadní tělní buňky
- nacházejí se na většině jaderných buněk
- jsou rozeznávány **T<sub>C</sub>-lymfocyty**, které se aktivují k usmrcení podobných buněk

### 2. MHC II (druhé třídy)

- prezentace exogenních peptidů: peptidové fragmenty z **patogenů** fagocytovaných APC buňkou
- omezená exprese: dendritické buňky, B-lymfocyty, aktivované T-lymfocyty, makrofágy, endotelové buňky, epitelialne buňky.
- jsou rozeznávány pouze **T<sub>H</sub>-lymfocyty**

# Zánět

-faktory způsobující zánět: patogeny, trauma, teplota, toxiny...

-makroskopické projevy zápalu: calor (teplo), rubor (zrudnutí), tumor (otok), dolor (bolest), functio laesa (porucha funkce)

- **krevní destičky** vylučují srážlivé faktory

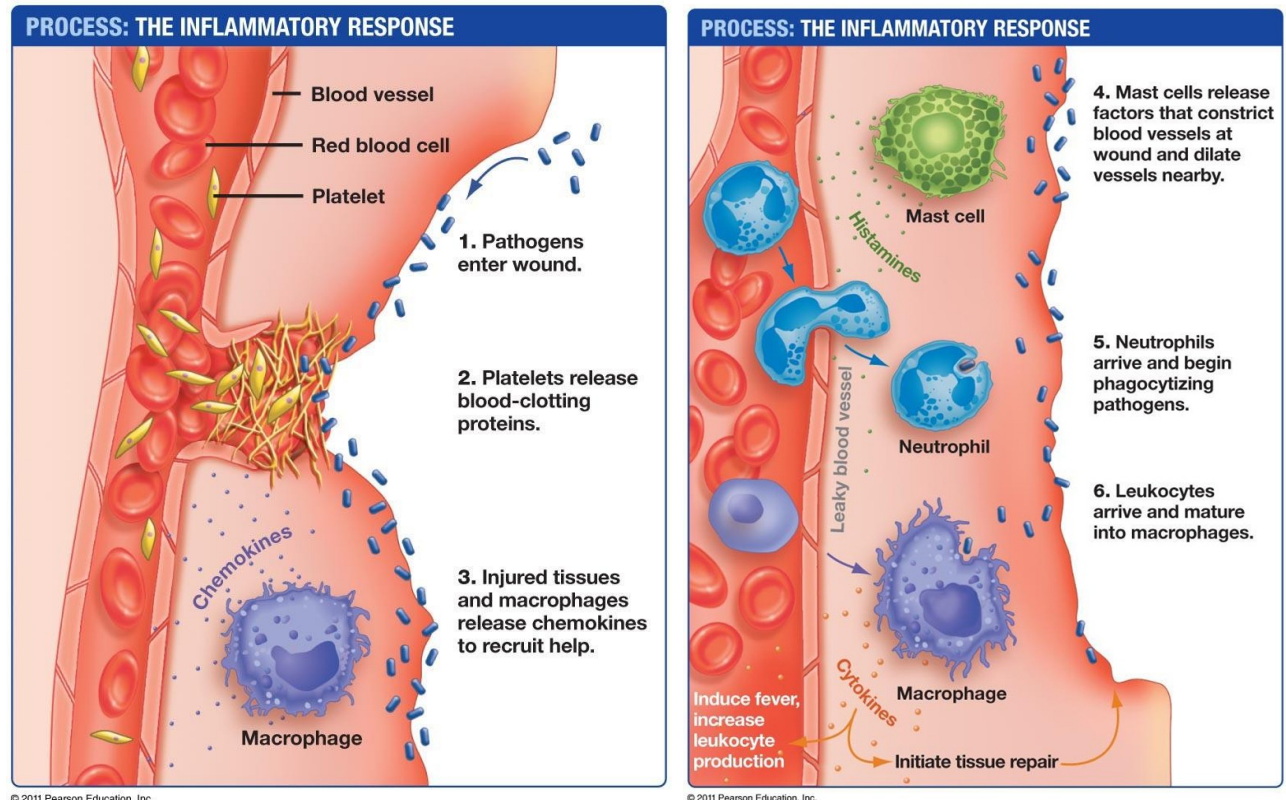
## (1) Makrofágy, (2) Neutrofil, (3) Mastocyty

- makrofágy a buňky poraněné tkáně vylučují cytokiny, které přivolávají pomoc

- změny ve stěnách kapilár umožňují průchod velkého množství leukocytů

- **mastocyty** indukují vazokonstrikci poraněných cév a vazodilataci okolních cév

- zvýšení teploty



# Imunitní systém

## 3. linie obrany - specifická imunitní odpověď

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

-adaptivní imunitní reakce – zúčastňují se humorální komponenty: protilátky a buněčné komponenty:

**lymfocyty** (patří mezi **agranulocyty** spolu s **monocyty**)

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

**T-lymfocyty** jsou tímto informovány o typu patogenu

- **Pomocné (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 a očkování

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:

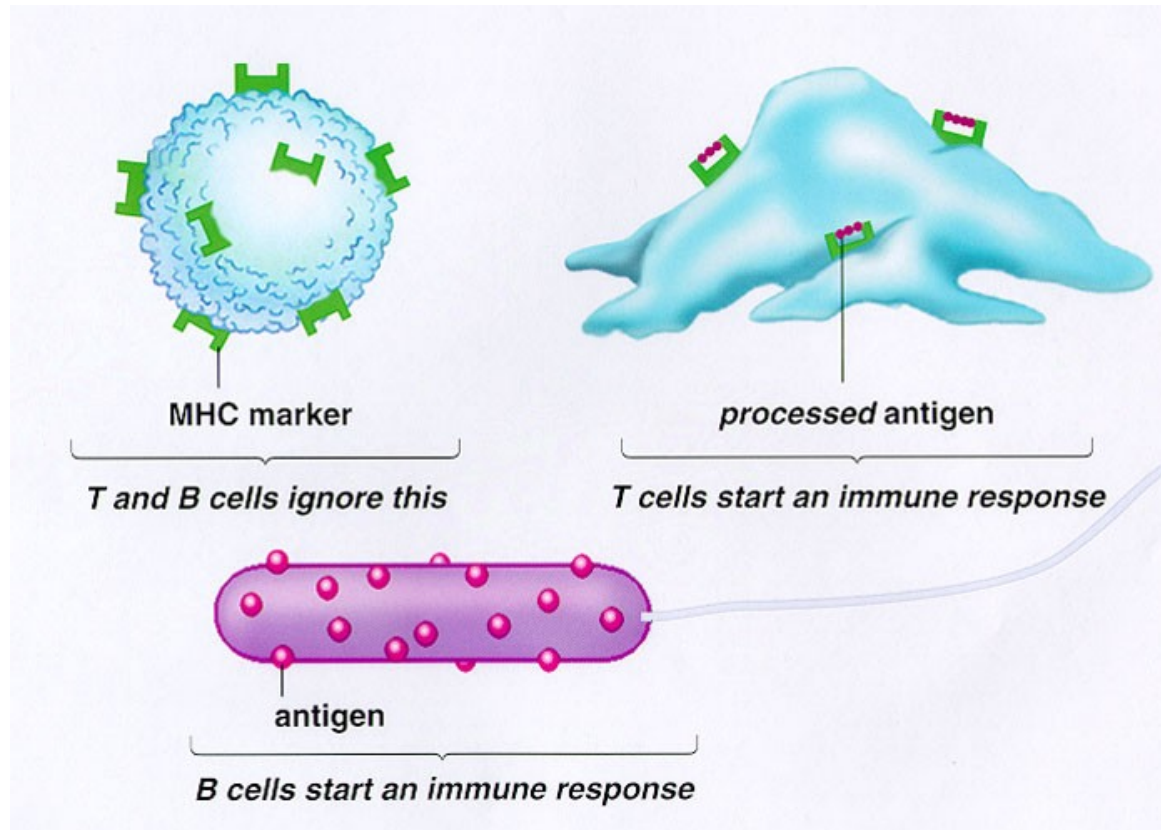
1. Rozeznání specifické cizí částice
2. Opakované buněčné dělení a vytvoření obrovské populace klonů lymfocytů
3. Diferenciace do subpopulací efektorových a paměťových buněk

# Imunitní systém

## 3. linie obrany - specifická imunitní odpověď

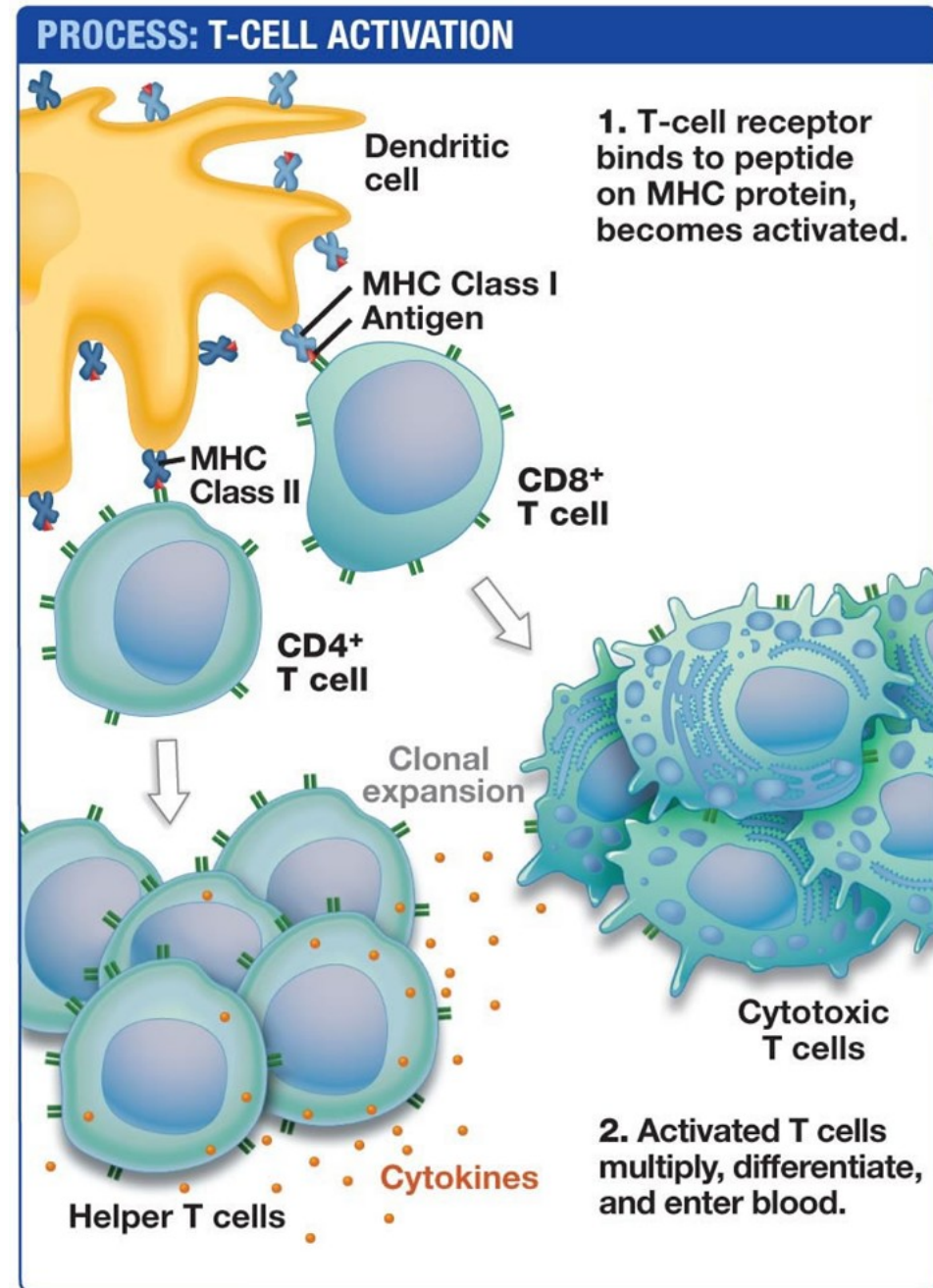
### Antigen-prezentující buňka

- 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)

- tvorba 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
- T lymfocyty ignorují buňky s prázdnými MHC antigeny, stejně jako volně plovoucí antigeny
- váží se však na antigeny, vystavené na povrchu APC v MHC komplexu
- vazba indukuje rapidní proliferaci do **efektorových** a **paměťových** buněk s receptorem pro daný antigen



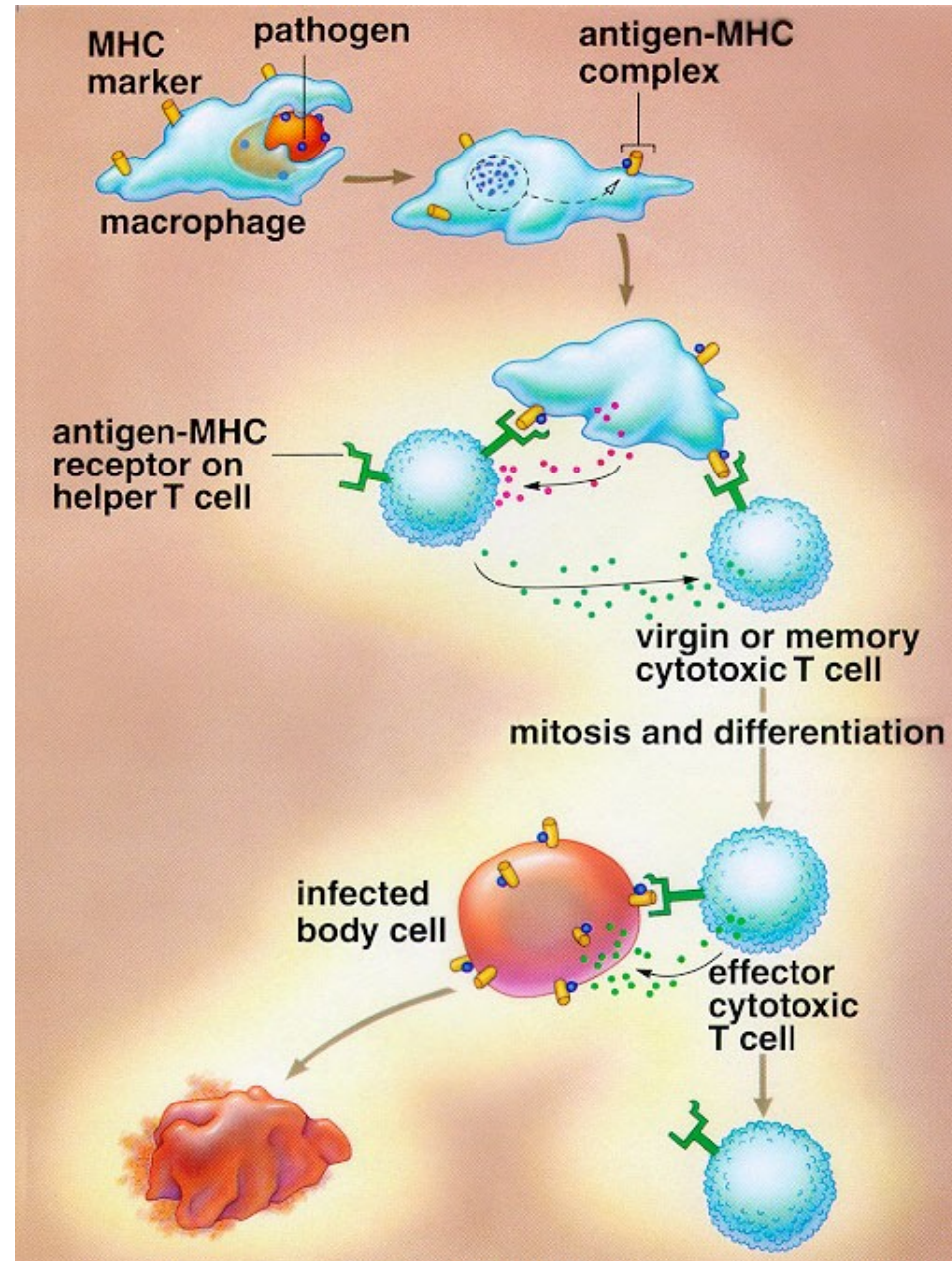
## T-lymfocyty (Thymocytes)

### 1. Efektorové T-helper lymfocyty (CD4)

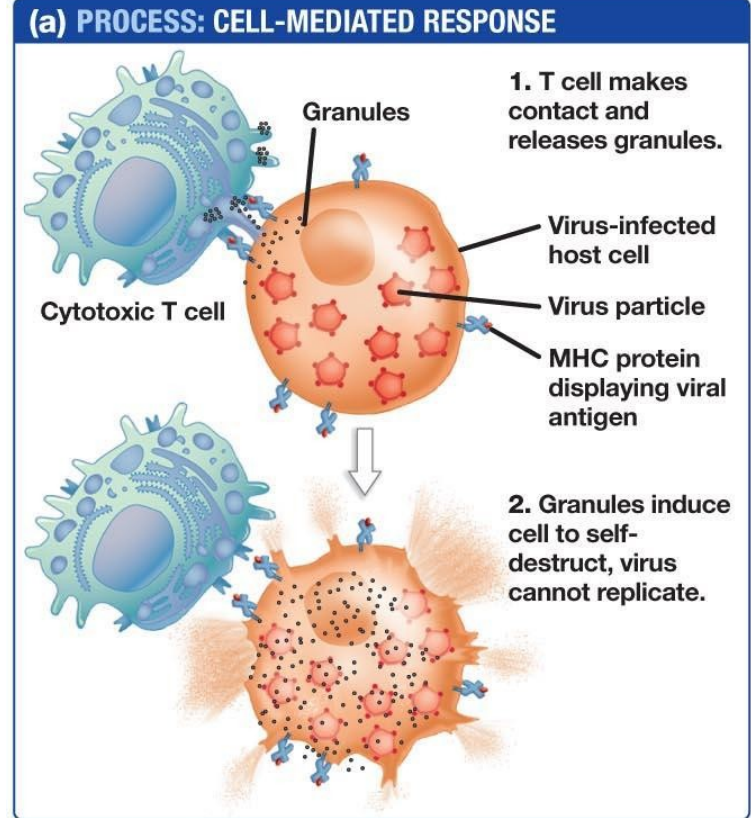
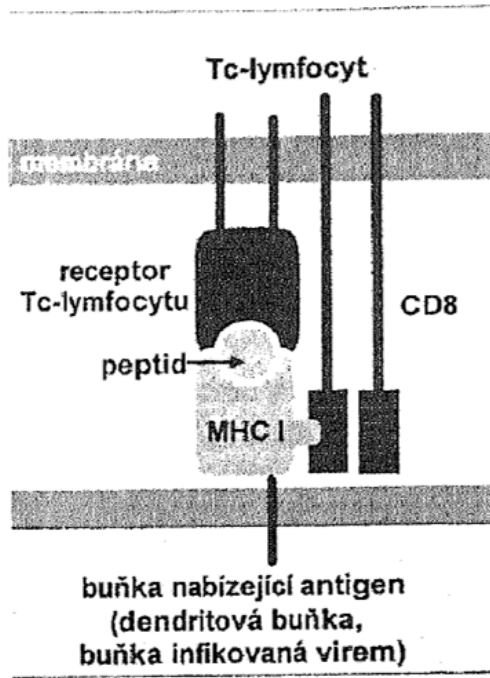
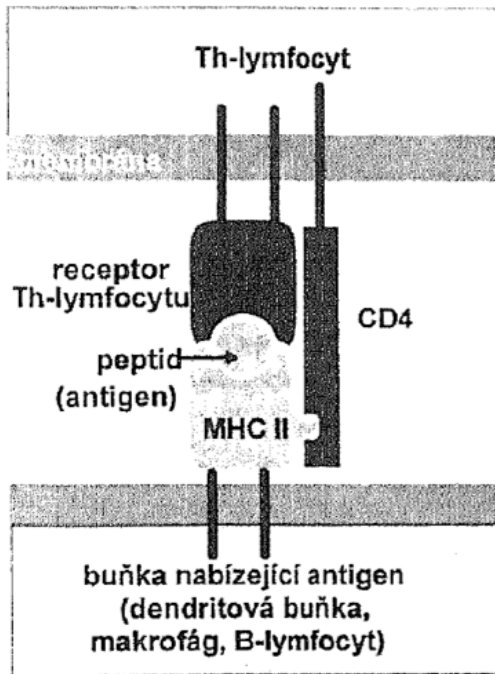
- sekretují interleukiny → stimulace dalších buněk
- na povrchu mají protein CD4, který se váže na MHC II molekuly

### 2. Efektorové cytotoxické T lymfocyty (CD8)

- rozpoznávají infikované či jinak vadné buňky a vyvolávají u nich APOPTOZU:
  - uvolnění cytotoxických látek (perforiny+gramzomy), které pronikají do cytoplasmy a spouští kaspázovou kaskádu
  - exprese povrchového proteinu Fas-ligand, který se váže na Fas-receptor
- na povrchu mají protein CD8, který se váže na MHC I molekuly





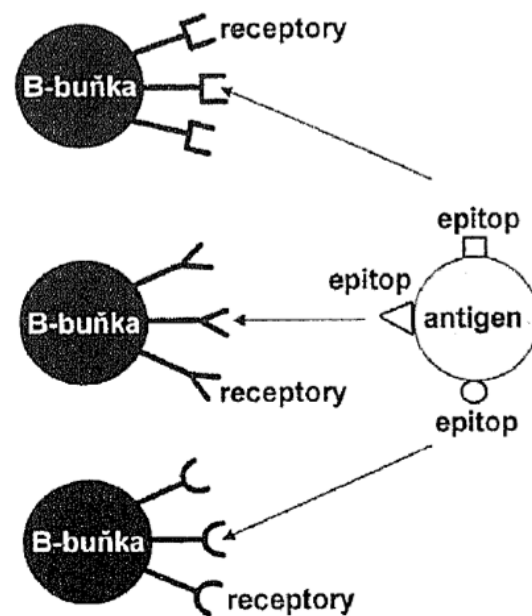


## B-lymfocyty

- prekurzory se tvoří v kostní dřeni u dospělých a játrech plodu
- B-lymfocyt produkuje jeden typ protilátky (synonymum imunoglobulin), které se uchytí na povrchu
- 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
- paměťové 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 determinanta** neboli **epitop**

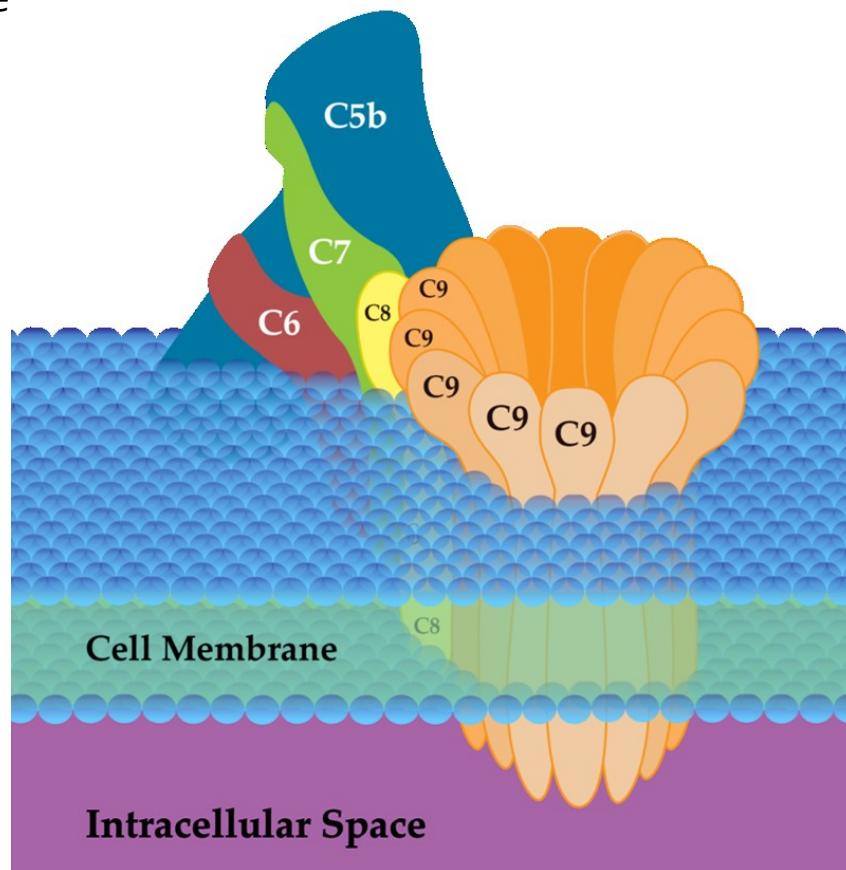


Obr. 320  
Vztah antigenních determinantů k jejich receptorům

## Komplement

*Imunitní mechanismus zvyšující (doplňující, komplementující) účinnost protilátek*

- Nespecifický (vrozený) a neadaptibilní
- soubor malých glykoproteinů (inaktivně prekurzory), tvořených v játrech a cirkulujících v krvi
- aktivace: imunokomplex (Ag+Ab), povrchy virů (lipopolysacharid G- bakterií, kyselina teichoová G+ bakterií), navázání MBP na manózu bakterií...
- po aktivaci dochází k proteolytickému štěpení jednotlivých složek komplementu (tzv. faktorů) atakuje membrány patogenů, ve kterých způsobuje póry (kanály) → lyze buňky



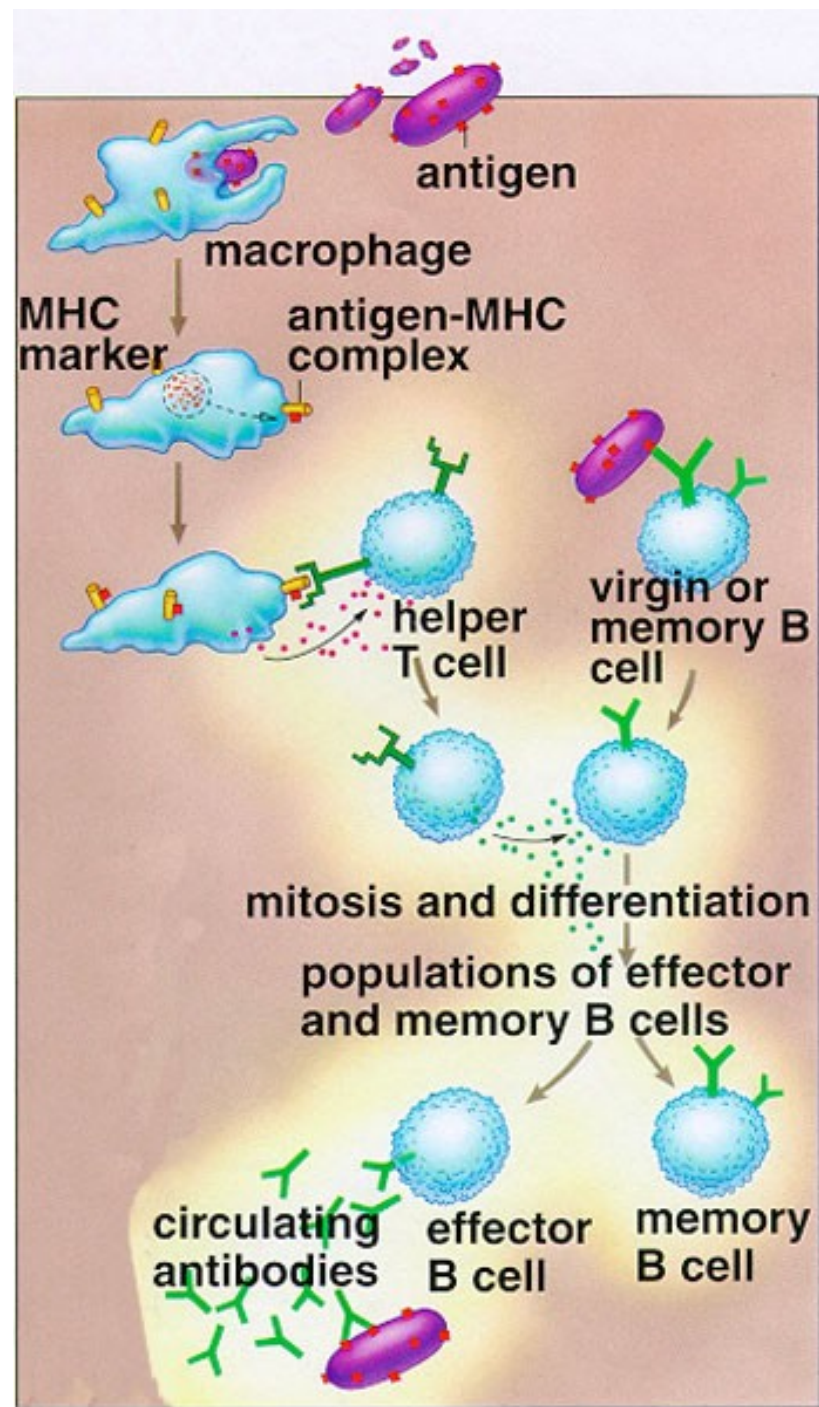
## Vlastnosti B-lymfocytů

1. Mají na 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. Nutno též potvrzení od TH

Navíc B-cell fungují jako APC. antigen je nabízen  $T_H$ -lymfocytům.

Neaktivuje se dokud nedostane "potvrzení" od T helper

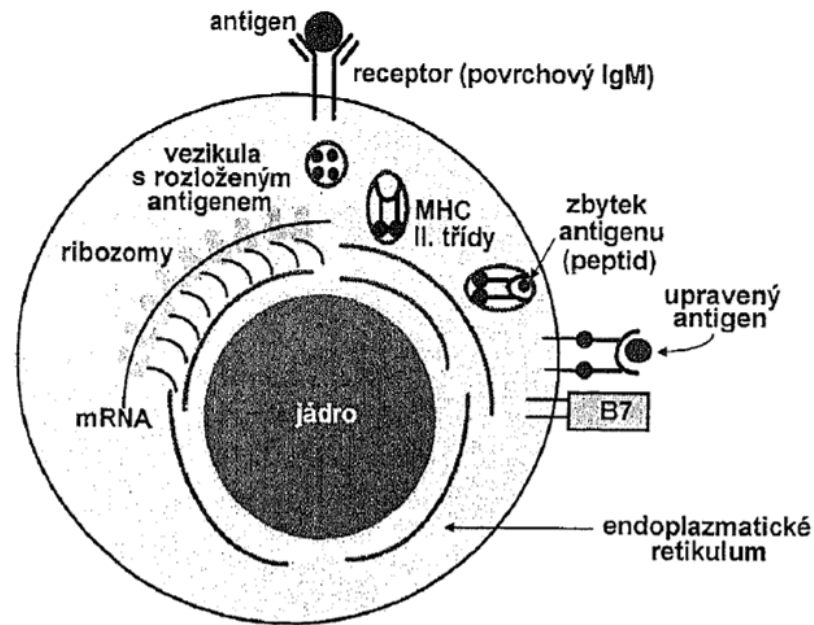


**Antigen-presenting cells (APC; buňky nabízející antigen)**  
**na povrchu vystavují antigen, který je rozeznáván T-lymfocyty**

Existují 3+1 typy APC buněk:

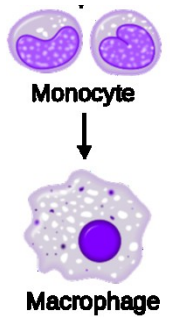
**1. B-lymfocyty**

- detekuje **volný antigen** pomocí receptoru (povrchový IgM)
- 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<sub>H</sub>-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<sub>H</sub>-lymfocyt** navíc produkuje interferon gamma (INF- $\gamma$ ) a tím se ještě víc aktivuje k pohlcování virů a bakterií
- makrofágy též produkuje cytotoxické proteiny
- v krvi se vyskytuje ve formě monocytu



## 3. Dendritické buňky

- schopné fagocytozy
- komplexy antigenů a **MHC I i MHC II**
- aktivují tedy jak **T<sub>H</sub>**- tak i **T<sub>C</sub>-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

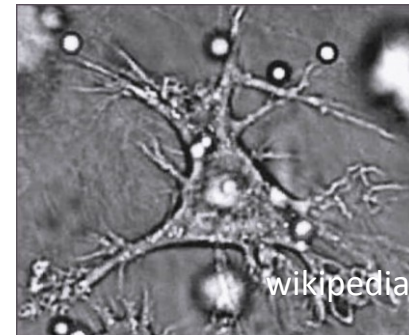
### b) Intersticiální dendritické buňky

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

### c) Proplétající se dendritické buňky

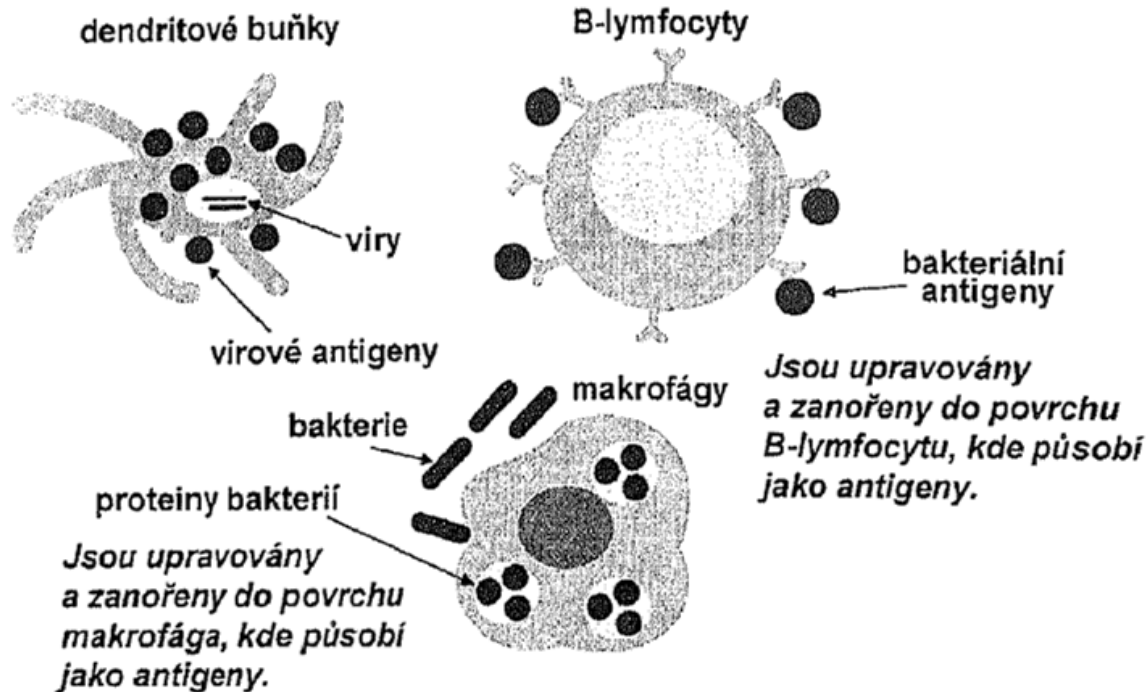
- v sekundárních lymfoidních orgánech spolu s T-lymfocyty

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



#### (4). Buňky infikované viry

- 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<sub>C</sub>-lymfocyty** a infikovaná buňka je zničena **apoptozou**

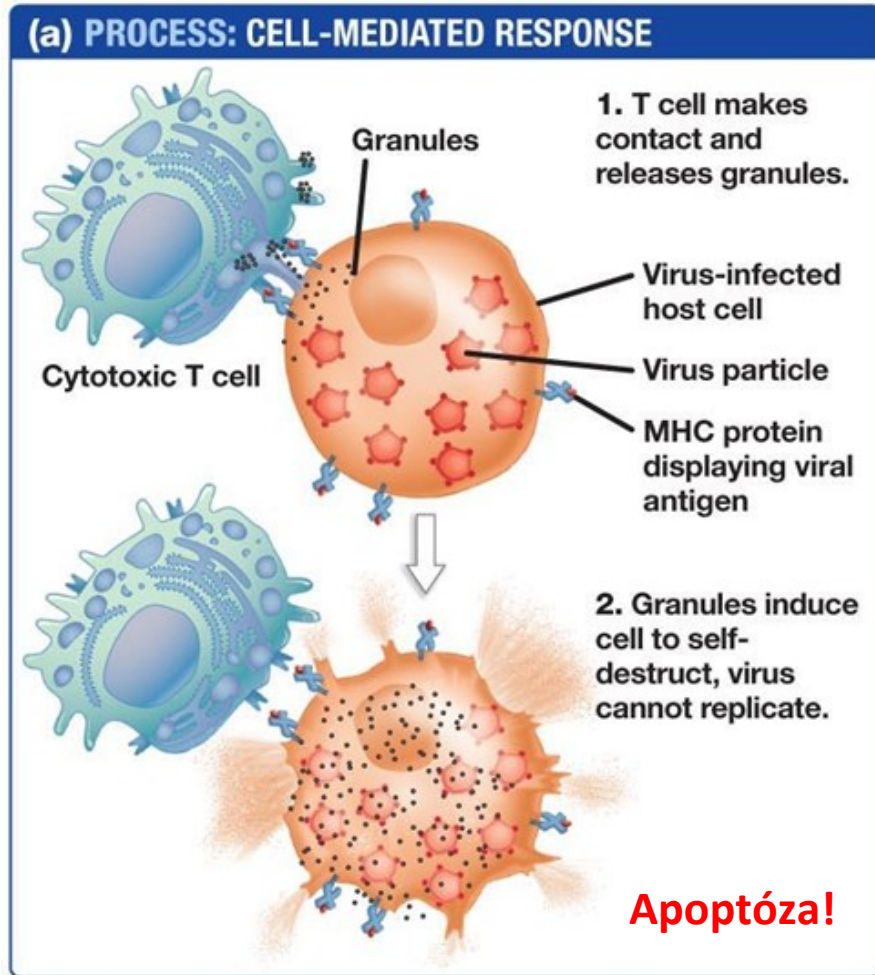


Obr. 322  
Buňky nabízející antigen

## a) Buněčná imunita

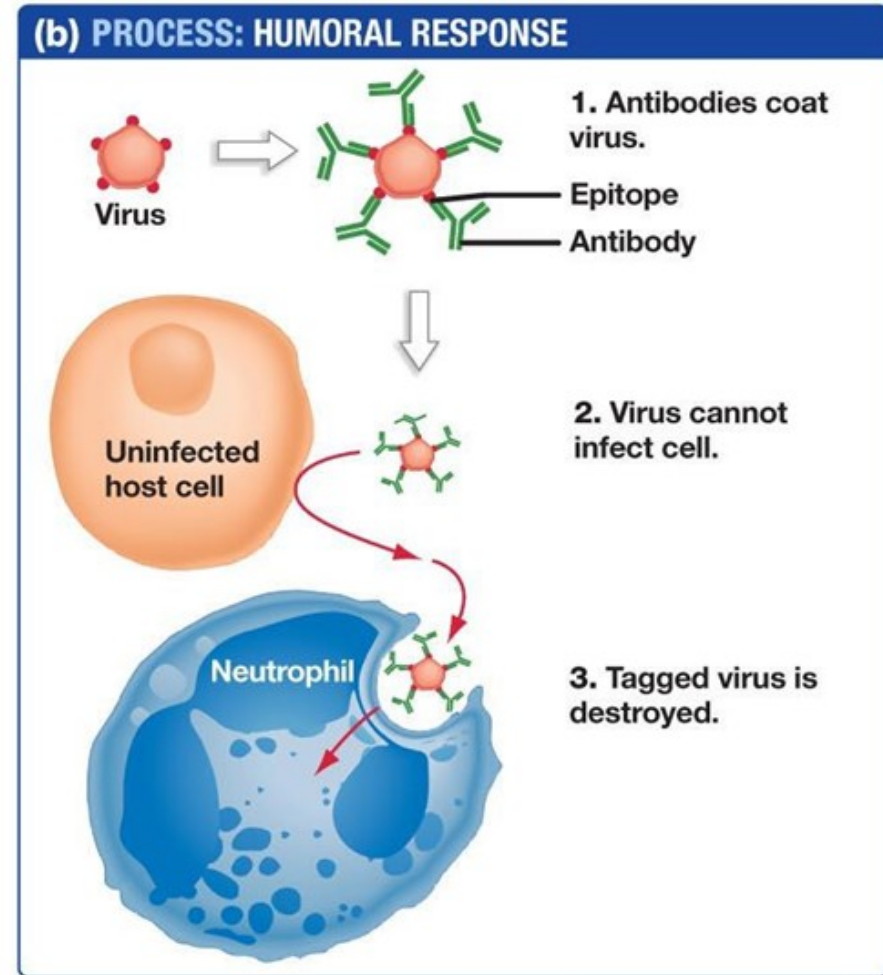
zprostředkovaná T-lymfocyty

- T<sub>C</sub> lymfocyty produkují Fas ligand a perforiny + granzymy → APOPTOZA



## b) Humorální imunita

zprostředkovaná specifickými protilátkami  
produkovanými B-lymfocyty do tělních tekutin  
komplement





## Imunoglobuliny (protilátky)

- vyskytují se **vázané** na povrchu B-lymfocytů nebo **volné** (IgM a IgD slouží jako receptor)
- volné protilátky označují patogen pro zničení fagocyty a komplementem
- obecná struktura protilátek je velmi podobná
- největší rozdíly jsou na N-koncové části (antigen-binding site), která je extrémně variabilní (V oblast)
- Variabilní úseky těžkého a lehkého řetězce vytvářejí vazebné místo → existence milionů jemně odlišných verzí protilátek
- klasifikace protilátek je založena na typu Fc fragmentu (těžkého řetězce)

### Imunoglobulinové třídy:

#### 1. IgA (2 typy)

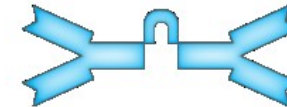
- hlavně na sliznicích (trávicí, dýchací..) a ve slinách, mléku...
- zabraňuje kolonizaci patogeny - vysoká denní produkce



Monomer  
IgD, IgE, IgG

#### 2. IgD (1 typ)

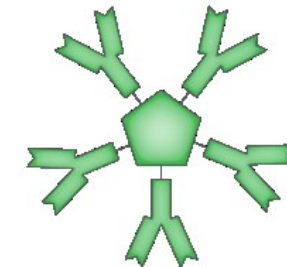
- antigenní receptor na B-lymfocytech - BCR (spolu s IgM)
- aktivuje bazofily a mastocyty k produkci antimikrobiálních faktorů



Dimer  
IgA

#### 3. IgE (1 typ)

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



Pentamer  
IgM

#### 4. IgG (4 typy)

- v krevním séru tvoří až 80% všech imunoglobulinů

#### 5. IgM (1 typ)

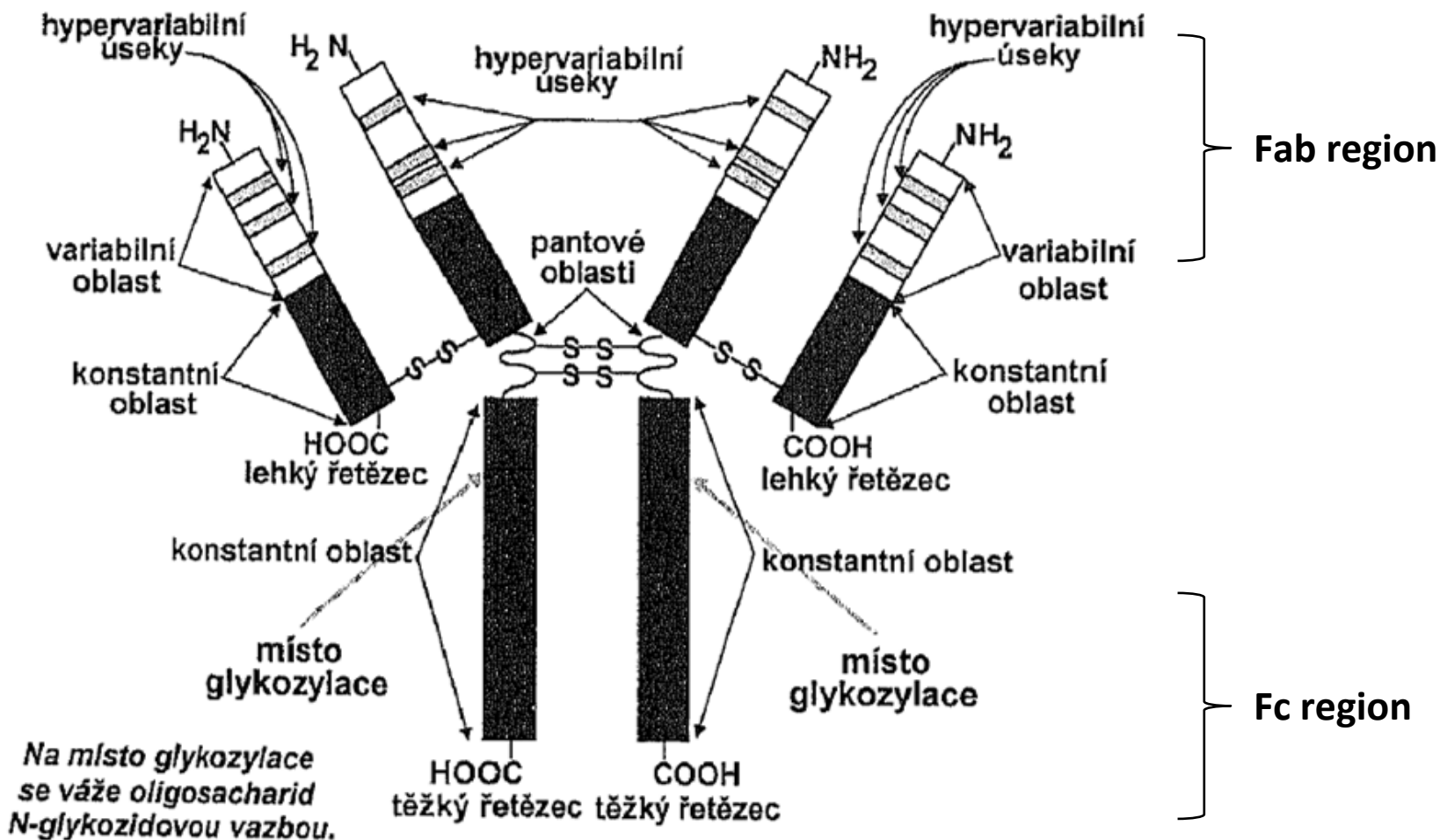
- vázán na membránu B-lymfocytů, kde působí jako receptor pro antigen - BCR
- nejúčinnější ve vazbě virových částic

# 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<sub>H</sub> pro těžký a C<sub>L</sub> pro lehký řetězec

## Variabilní oblast (V)

- úsek, v němž se imunoglobuliny příslušného typu liší
- V<sub>H</sub> pro těžký a V<sub>L</sub> pro lehký řetězec

## Hypervariabilní oblasti

- váží antigen
- značně proměnlivá primární struktura

## Pantová (hinge) oblast

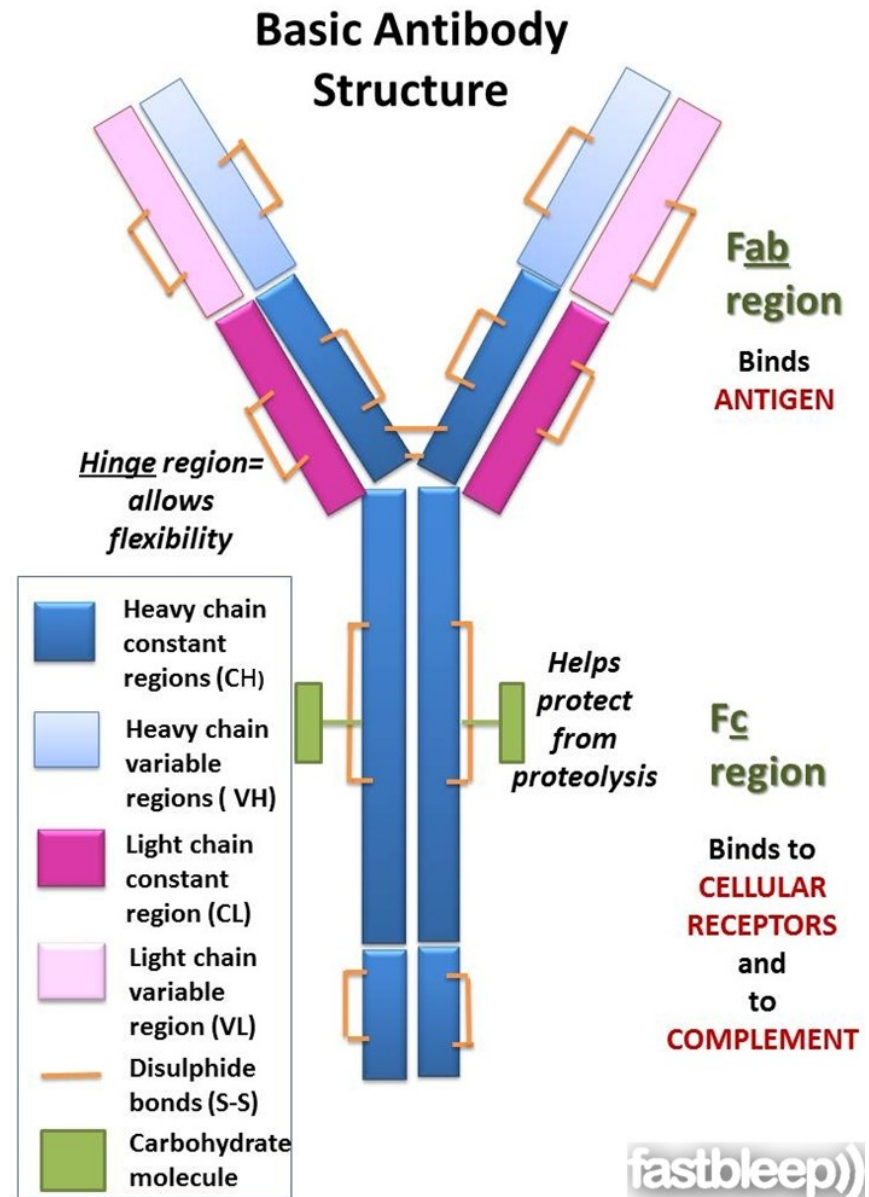
- ohebnost usnadňuje vazbu na antigen

## 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:  $\kappa$  (kappa) a  $\lambda$  (lambda)

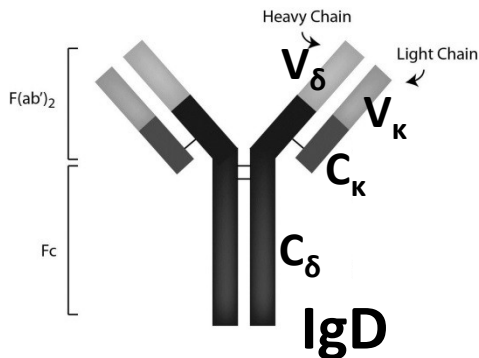
## Těžké řetězce

- 5 typů:  $\gamma$  (gamma),  $\alpha$  (alfa),  $\mu$  (mí),  $\delta$  (delta),  $\epsilon$  (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:

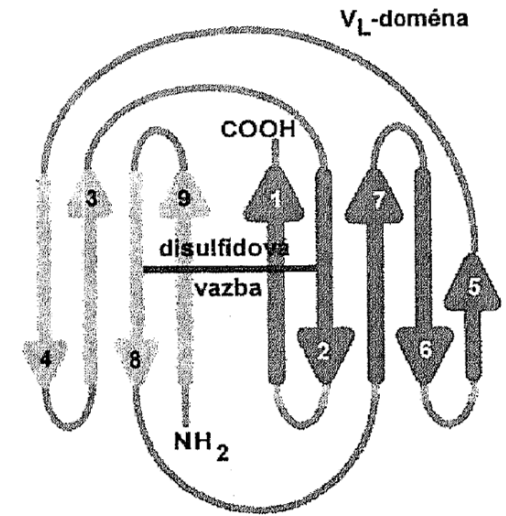


Klasifikace lidských imunoglobulinů

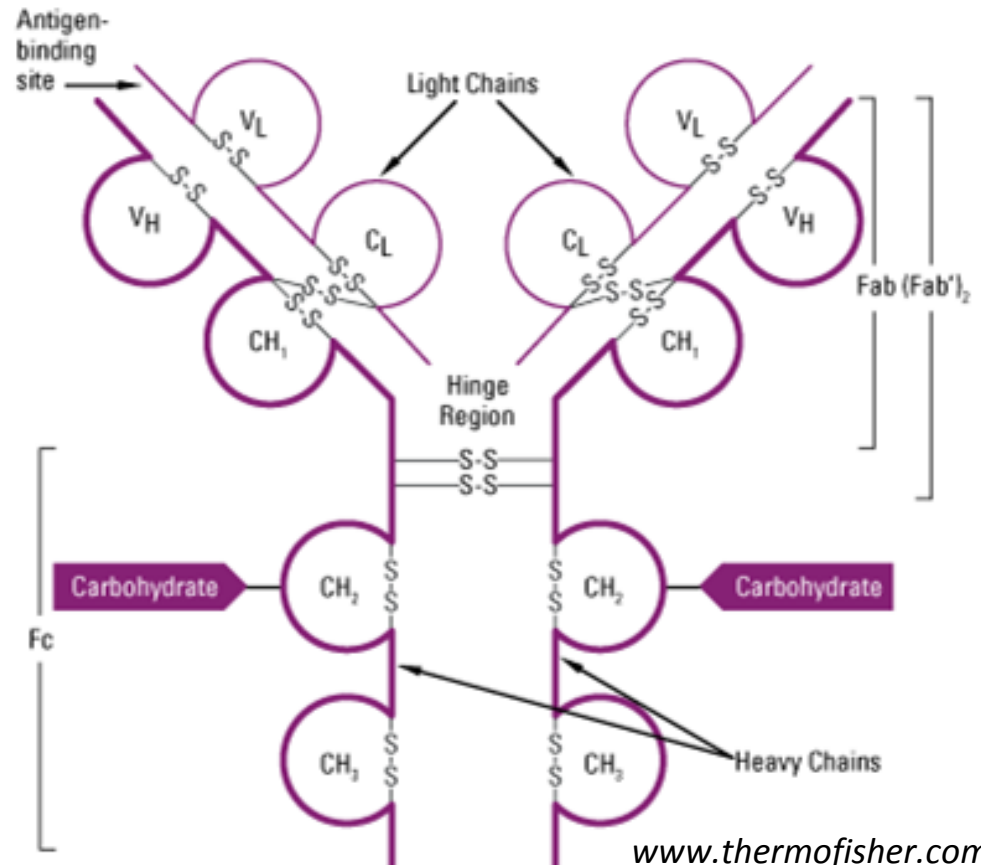
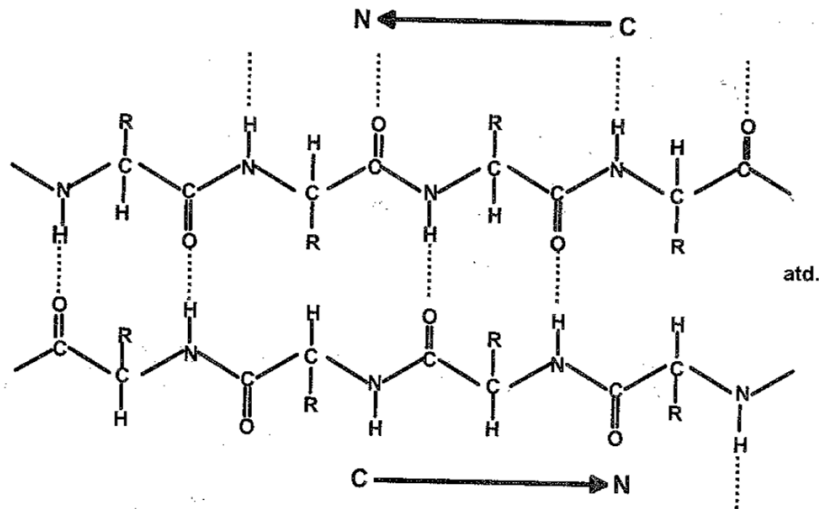
Třída	Podtřída	Lehký řetězec (L)	Těžký řetězec (H)	Celková molekulární hmotnost	Počet lehkých a těžkých řetězců v molekule	
IgG	IgG1	$\kappa$ nebo $\lambda$	$\gamma 1$	146 000	$L_2H_2$	
	IgG2		$\gamma 2$	146 000		
	IgG3		$\gamma 3$	165 000		
	IgG4		$\gamma 4$	146 000		
IgA	IgGA1		$\alpha 1$	160 000	160 000	$L_2H_2$ nebo $(L_2H_2)_2$
	IgGA2		$\alpha 2$			
IgM	IgGM		$\mu$	970 000		$(L_2H_2)_5$
IgD	-		$\delta$	184 000		$L_2H_2$
IgE	-		$\epsilon$	188 000		$L_2H_2$

# Imunoglobulinové domény

- skládají se z antiparalelních  $\beta$ -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  $\beta$ -skládaném listu.



# Molekulární podstata tvorby protilátek

*dědí se pouze subgeny (genové segmenty) pro tvorbu imunoglobulinů*

## VDJ rekombinace (přeskupování genových segmentů)

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

(V) ... variable

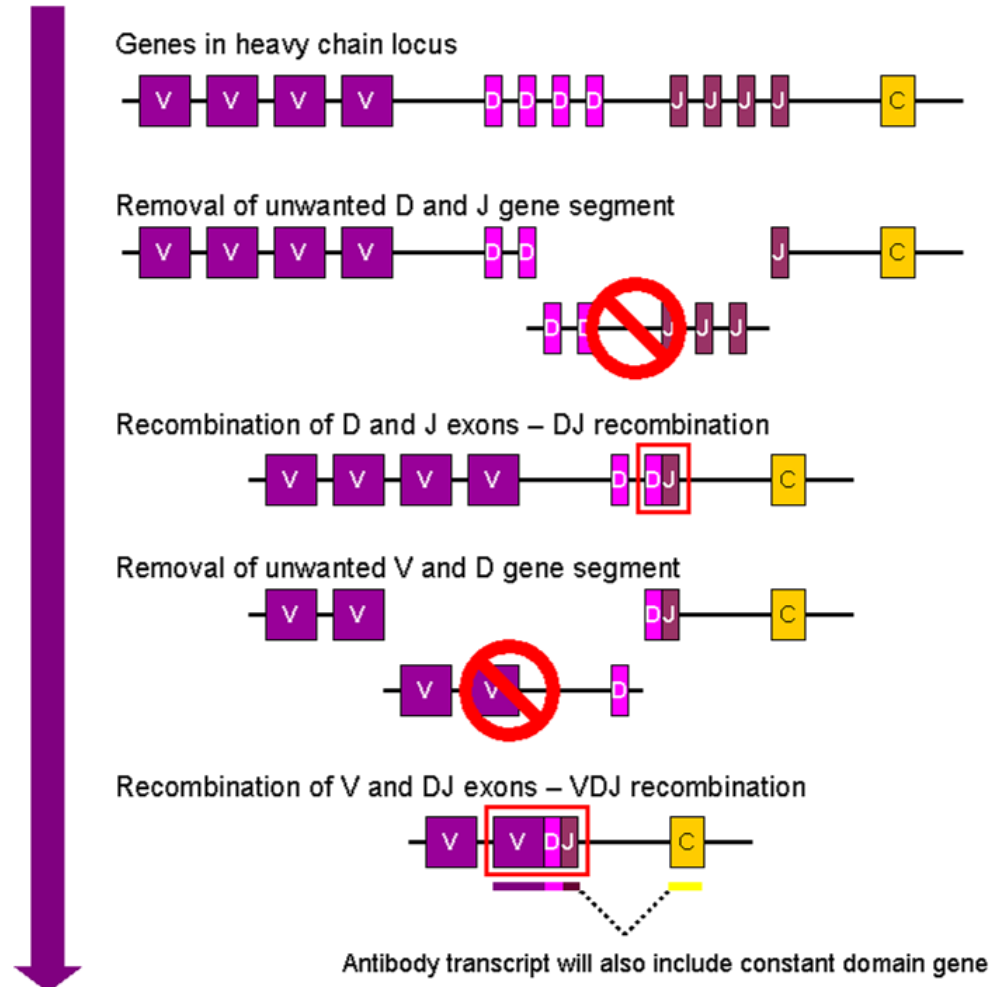
(D) ... diversity

(J) ... joining

**Cíl: vytvářet jedinečné protilátky,  
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 (5 subtypů za sebou)
2. pro lehký řetězec kappa ( $\kappa$ ): 2. chromosom
3. pro lehký řetězec lambda ( $\lambda$ ): 22. chromosom

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

## Germline configuration:



### (1) D to J recombination



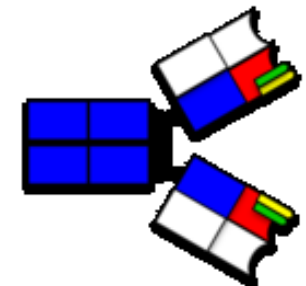
### (2) V to DJ recombination



### (3) Transcription & splicing

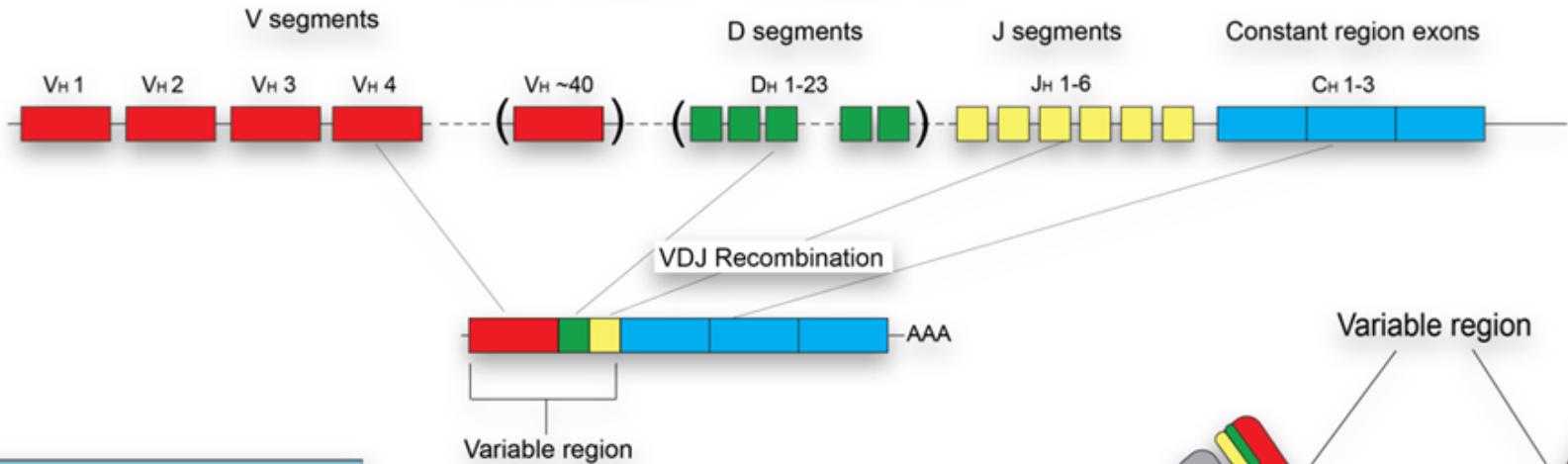


### (4) Translation & assembly

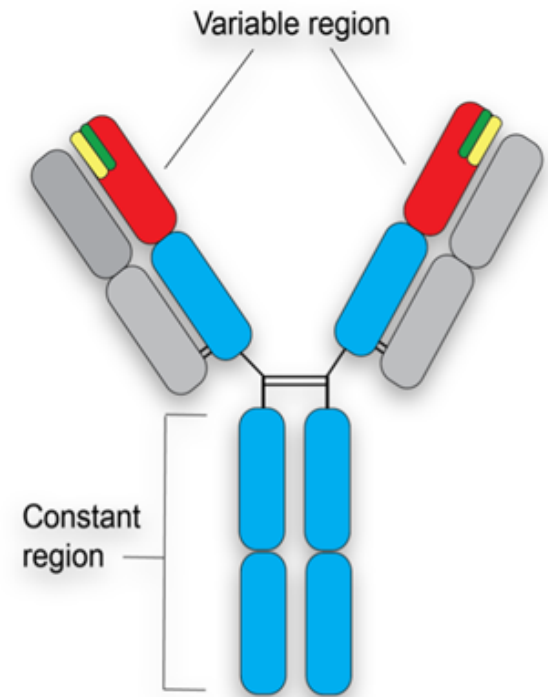
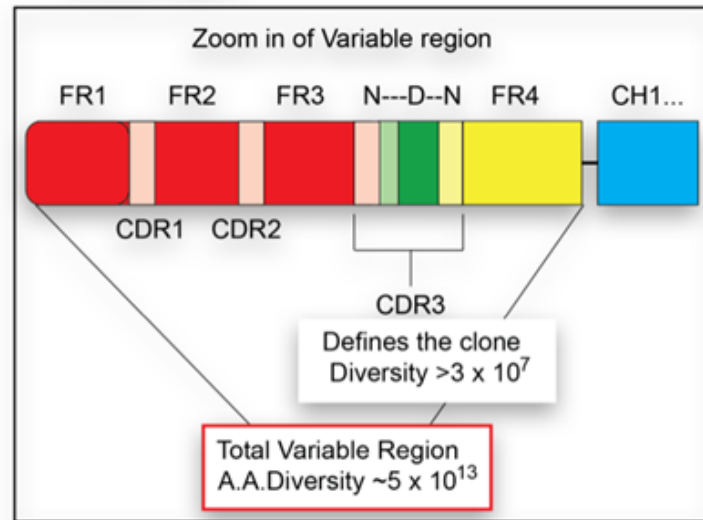


# VDJ rekombinace

Germline configuration of antibody gene locus



Number of functional gene segments in human immunoglobulin loci			
Segment	Light chains		Heavy chain
	$\kappa$	$\lambda$	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)

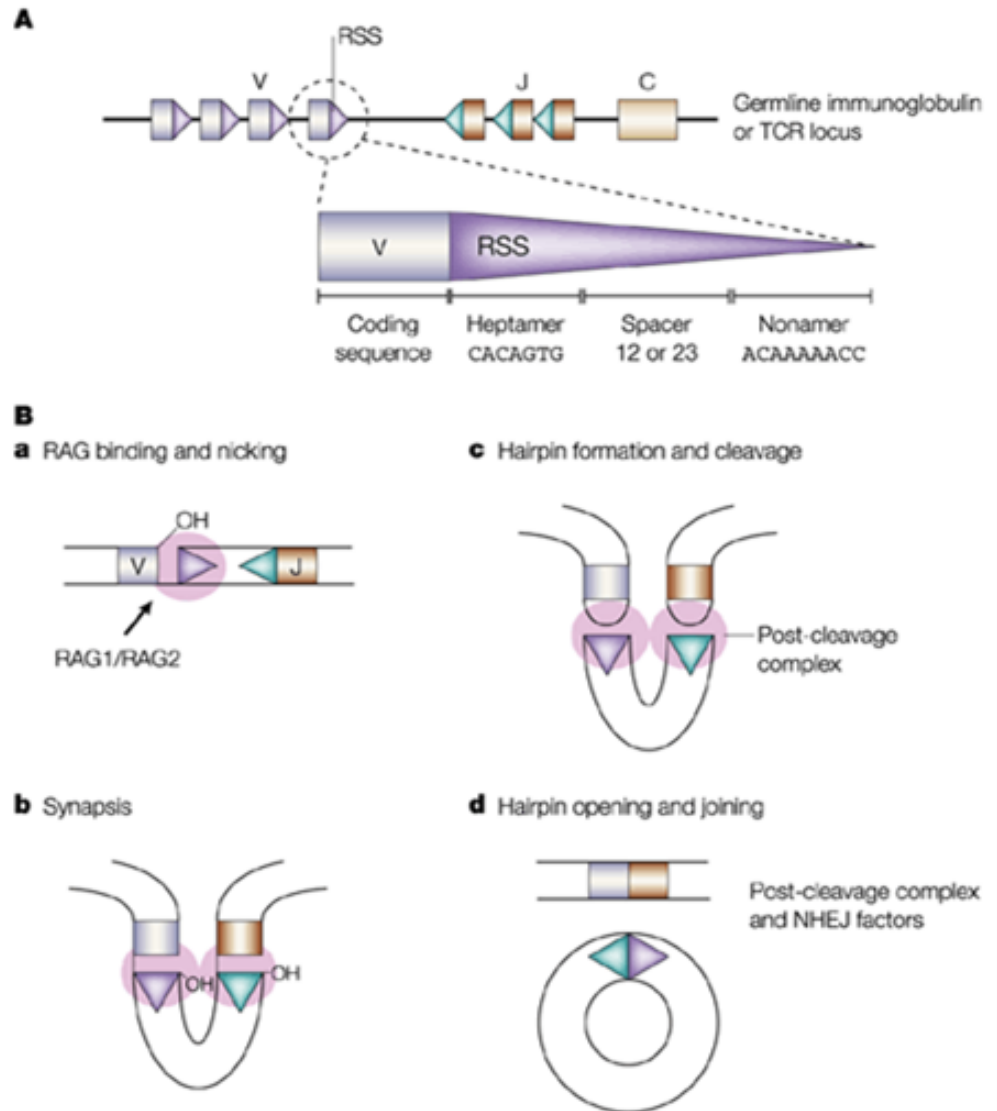
- označuje místo sestřihu (vazba RAG)

**RAG1/RAG2** (recombination-activating genes)

- enzymy katalyzující VDJ rekombinaci

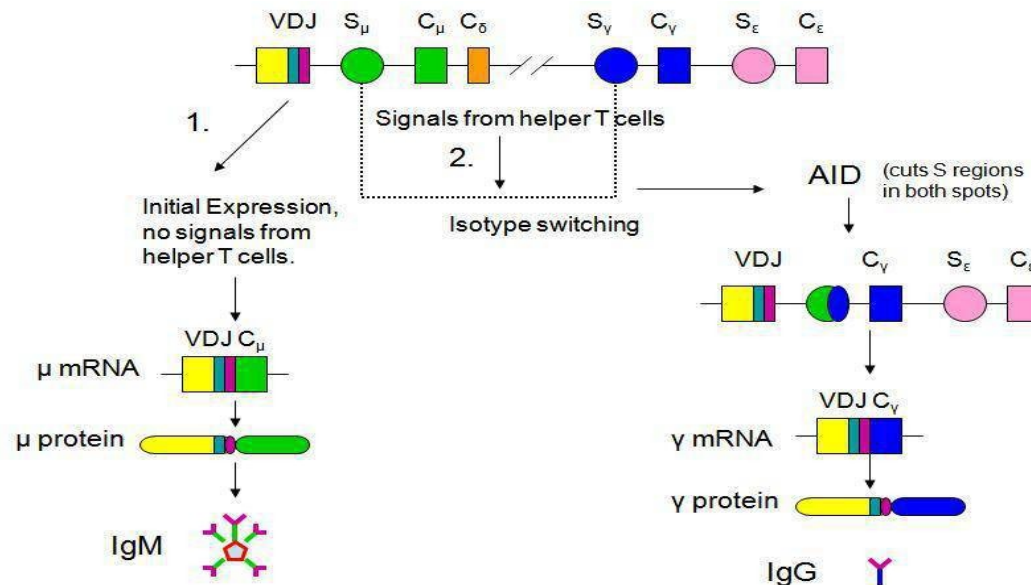
- vazba na RSS

- U dětí s funkční poruchou RAG1 a RAG2 → těžká imunodeficeience, nepřítomnost zralých T- a B-lymfocytů (nevytvoří se ani BCR a TCR)



## Přesmyk imunoglobulinových tříd (izotypový přesmyk)

- vznikají z původního pentamerního IgM ostatní druhy imunoglobulinů, především IgA a IgG
- **mění se tedy izotyp protilátky, ale její specifita zůstává stále stejná**
- dochází k němu tehdy, když je plasmocyt stimulován antigenem ve spolupráci s Th-lymfocyty, které produkují řadu cytokinů podporujících přesmyk
- IgM a IgD** se tvoří jako první, protože  $C_\mu$  a  $C_\delta$  následují na DNA hned za VDJ subgeny
- po VDJ rekombinaci následuje přesmyk tříd **z IgM do IgG, IgE nebo IgA**
- až po stimulaci antigenem v sekundárních lymfoidních orgánech za podpory  $T_H$  lymfocytů
- stejný úsek  $VDJ_H$  se připojí k subgenu  $C_\gamma$ ,  $C_\alpha$  nebo  $C_\epsilon$  za **delece  $C_\mu$  a  $C_\delta$**
- přesmyk tříd je řízen "signály přesmyku - S"

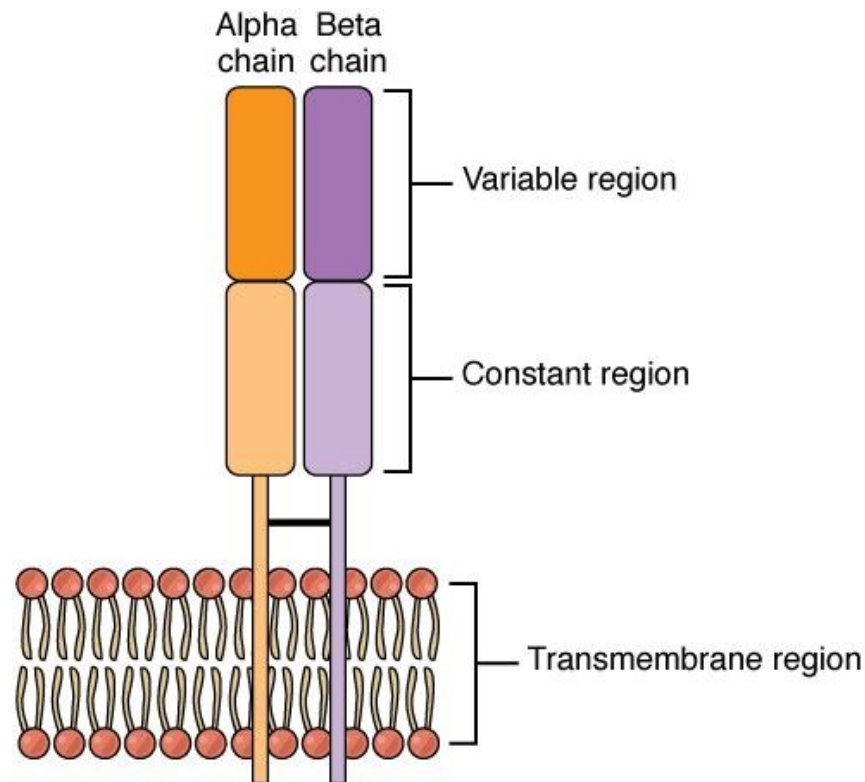


## Receptory T lymfocytů (TCR)

- u člověka má 95% T lymfocytů TCR receptor složený z  $\alpha$  (alfa) a  $\beta$  (beta) řetězce (cca 5% TCR je z řetězců gama a delta -  $\gamma/\delta$ )

- V, D a J segmenty v  $\beta$  řetězcích
- V a J segmenty v  $\alpha$  řetězcích

- přeskupování probíhá stejně jako u imunoglobulinů - vznik jedinečných receptorů

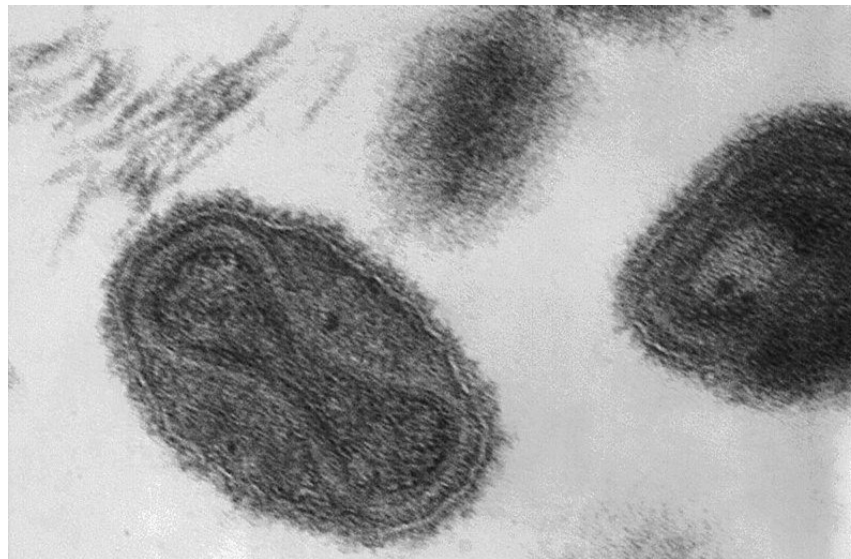
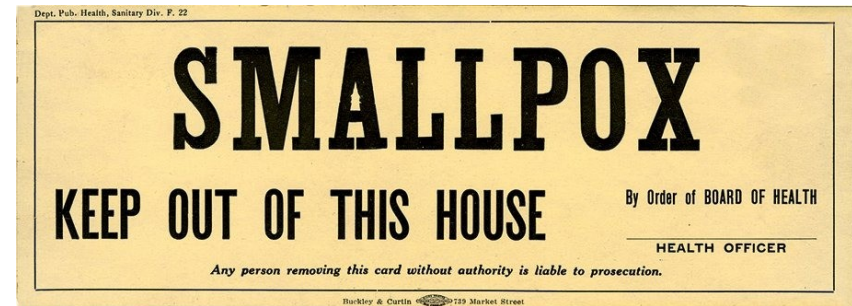


# Vakcinace (očkování)

tvorba paměťových lymfocytů po setkání s antigenem  
(větš. oslabený kmen nebo jeho část)

## 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 **1980** 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 (hrozba bioterorismu?)



Snímek viru z elektronového mikroskopu (wikipedia)

# Vakcinace (očkování)

## Edward Jenner (1749 - 1823)

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

