

# Imunitní systém

**Imunitní systém (IS)** - mechanismy zajišťující homeostázi organismu

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

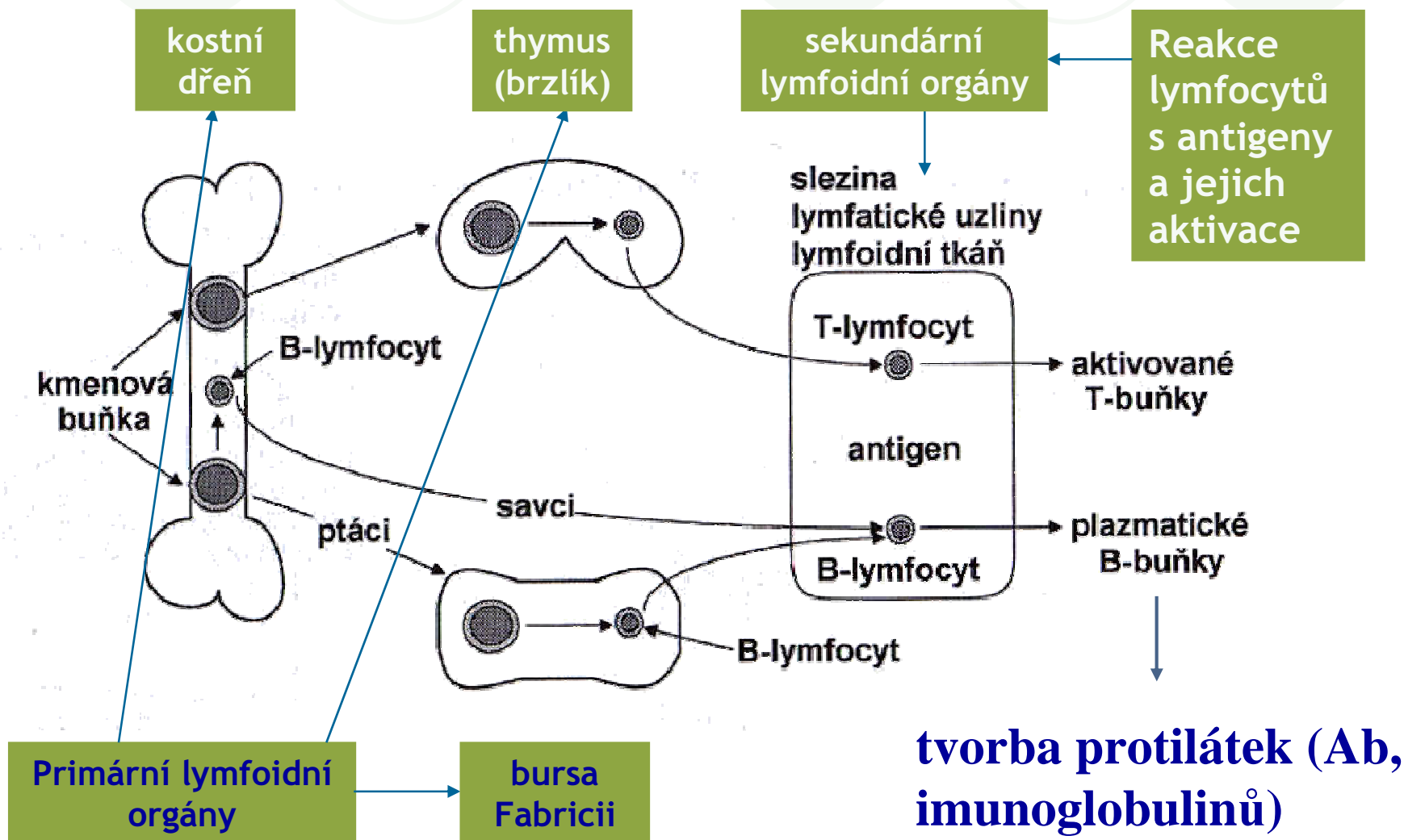
**Antigen** = jakákoliv substance vyvolávající imunitní odpověď

**Epitop** = část antigenu rozpoznávaná imunitními receptory

# Druhy imunity

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

# Vznik B-lymfocytů



# Klonální selekce - diferenciace B-lymfocytů

**Kmenová buňka**



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



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



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



**+ Ag**

**Plazmatické b. + paměťové b.** = primární odpověď

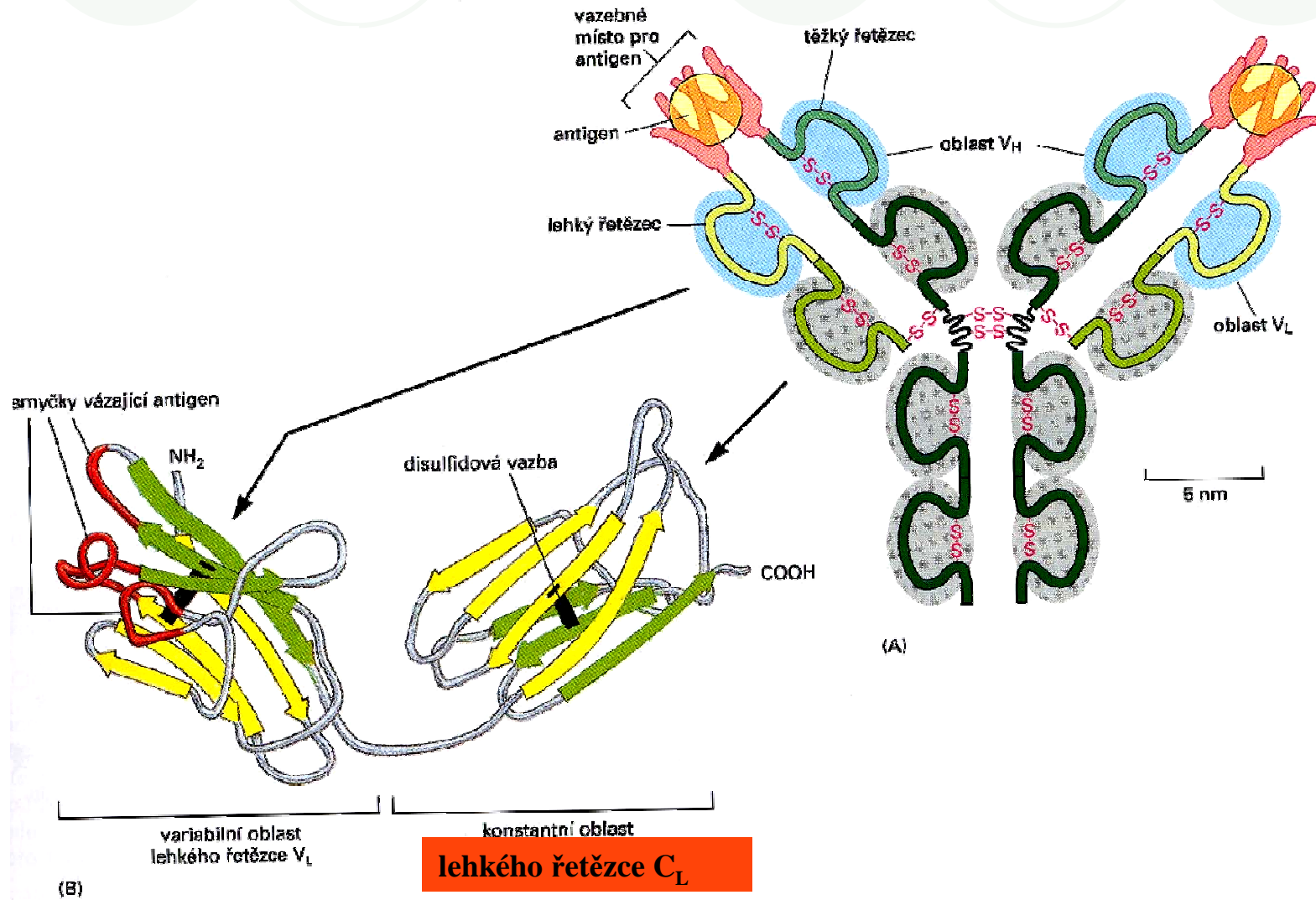
IgM, IgD  
sekretované  
(krátkodobě)

**+ antigen**

= sekundární odpověď

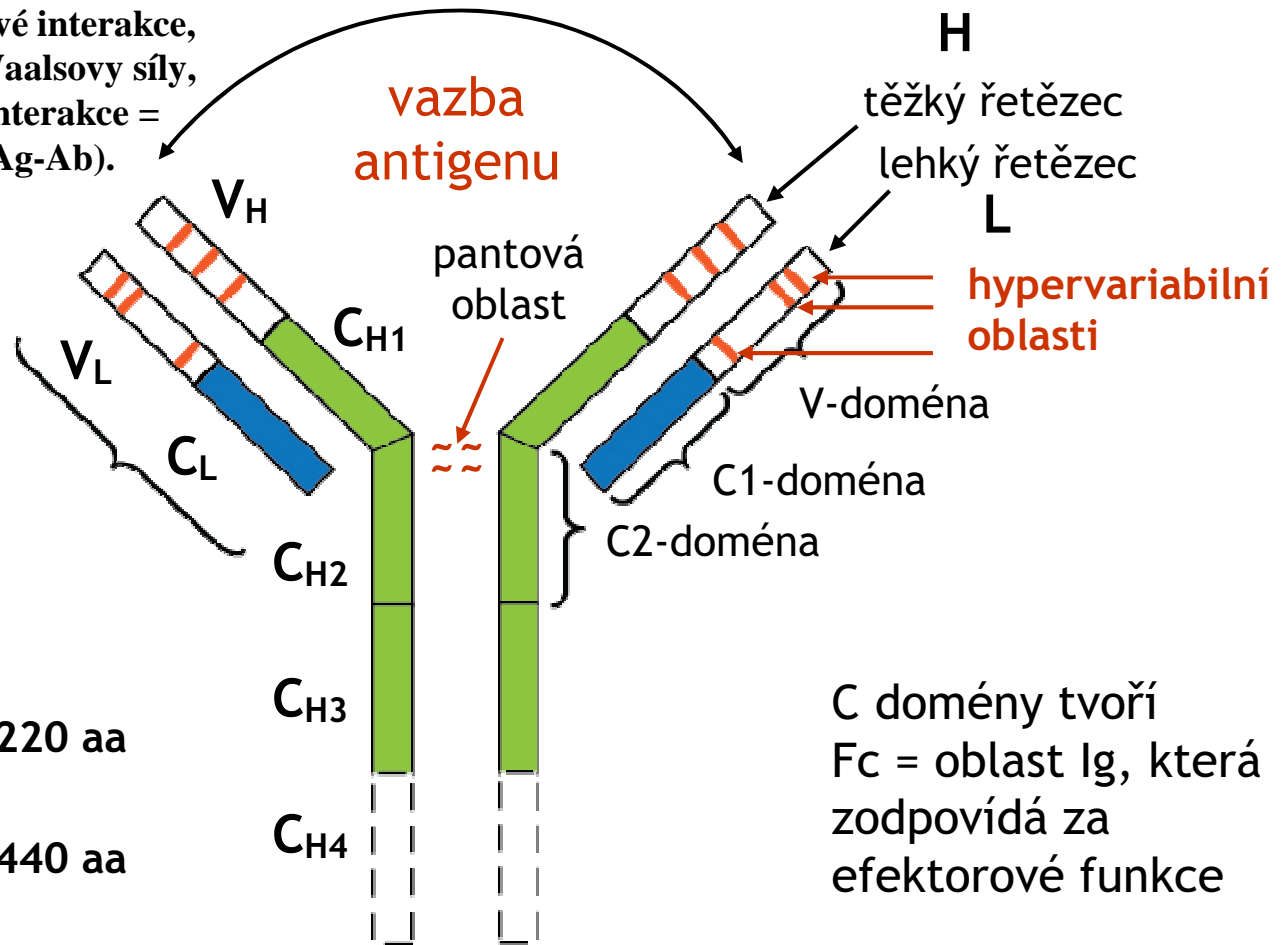
vysoká tvorba IgA, IgE, IgG

# Struktura imunoglobulinů



# Struktura protilátky

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



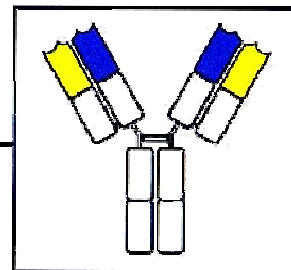
Lehký řetězec ~ 220 aa

Těžký řetězec ~ 440 aa

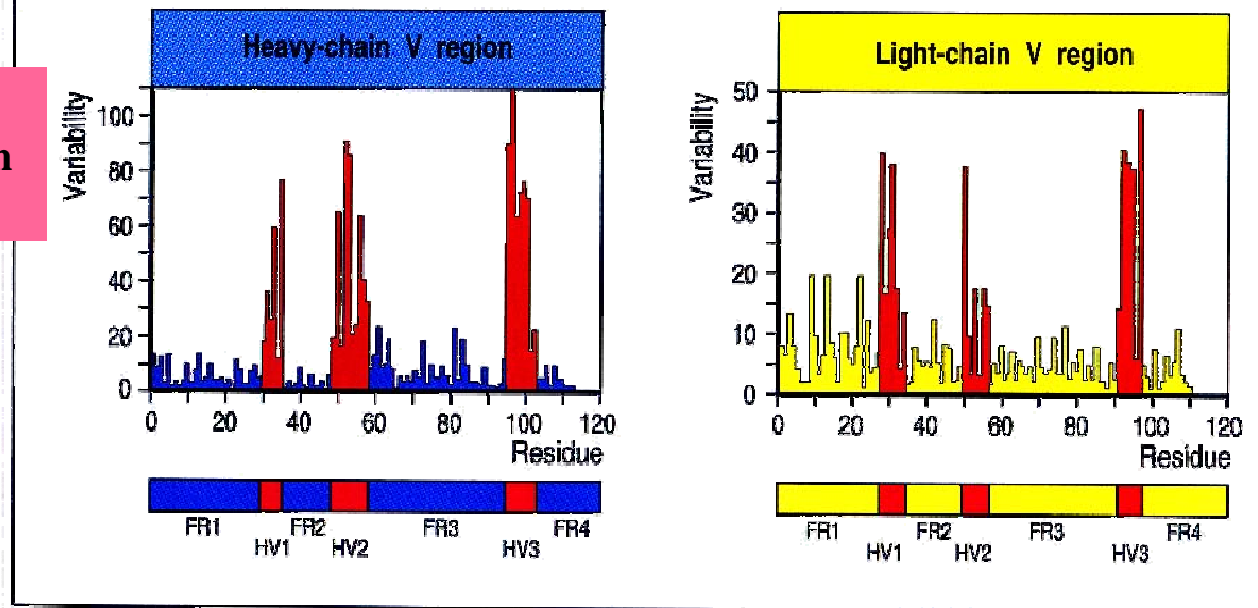
C domény tvoří Fc = oblast Ig, která zodpovídá za efektorové funkce

# Oblasti hypervariability ve variabilních doménách

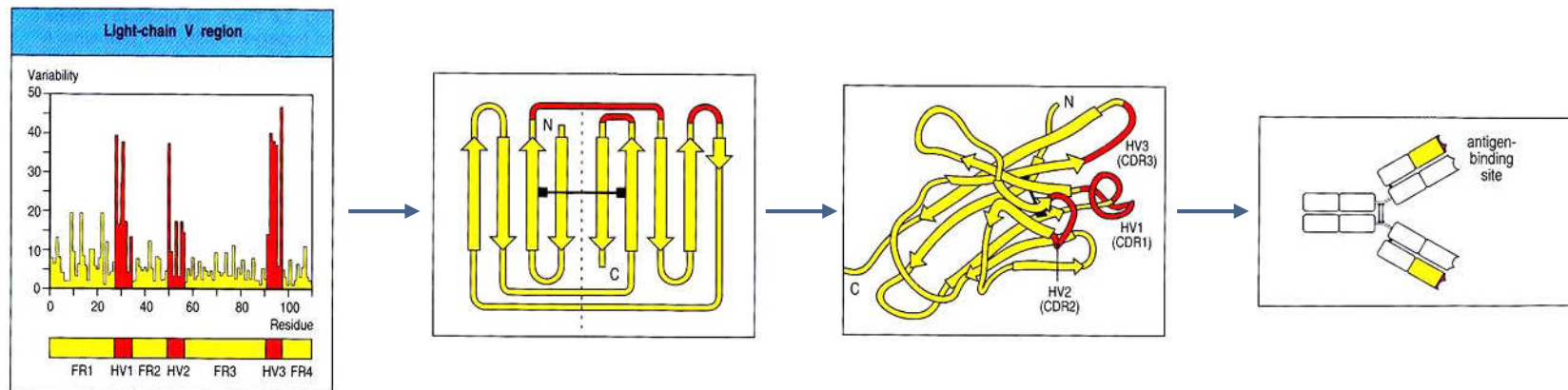
HV = hypervariabilní oblast;  
FR = „framework regions“



Frekvence  
výskytu různých  
aminokyselin



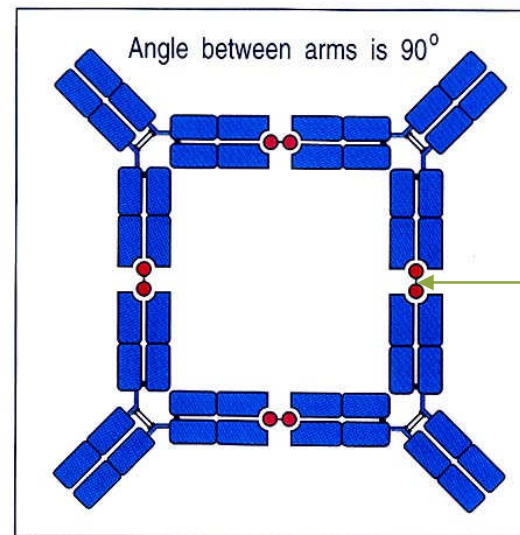
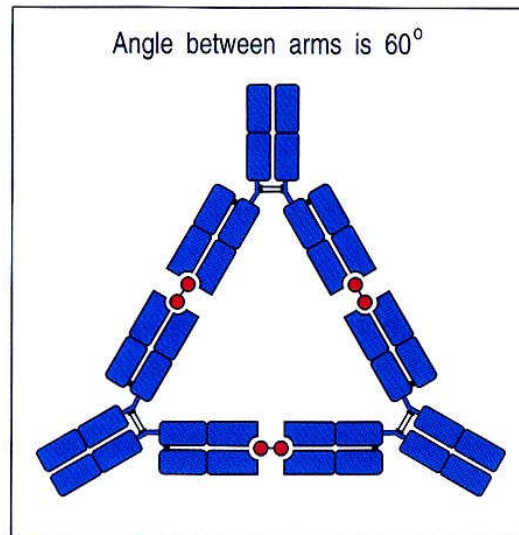
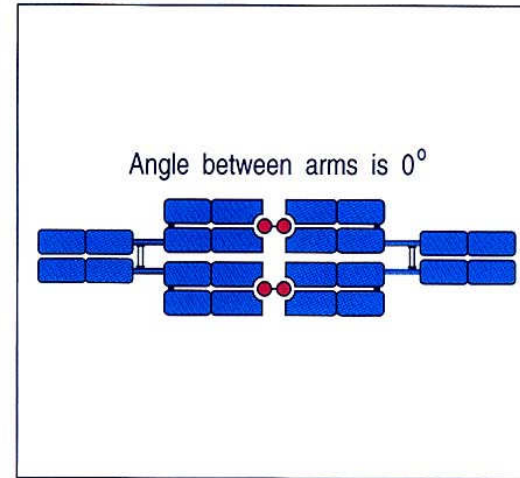
# Lokalizace hypervariabilních oblastí na lehkém řetězci Ig



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



# Interakce imunoglobulinů s antigeny



Antigen  
(dva hapteny)

# Typy imunoglobulinů a jejich funkce v organismu

Typy imunoglobulinů	Těžký řetězec	Funkce	Proporce
IgM	$\mu$	aktivuje komplement	5%
IgD	$\delta$	?	1%
IgG	$\gamma$	aktivuje komplement	80%
IgA	$\alpha$	součást slin a sekretů	14%
IgE	$\epsilon$	alergické reakce	<1%

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

# Klasifikace imunoglobulinových řetězců

V = variabilní oblast , C = konstantní oblast

## Lehké řetězce (light)

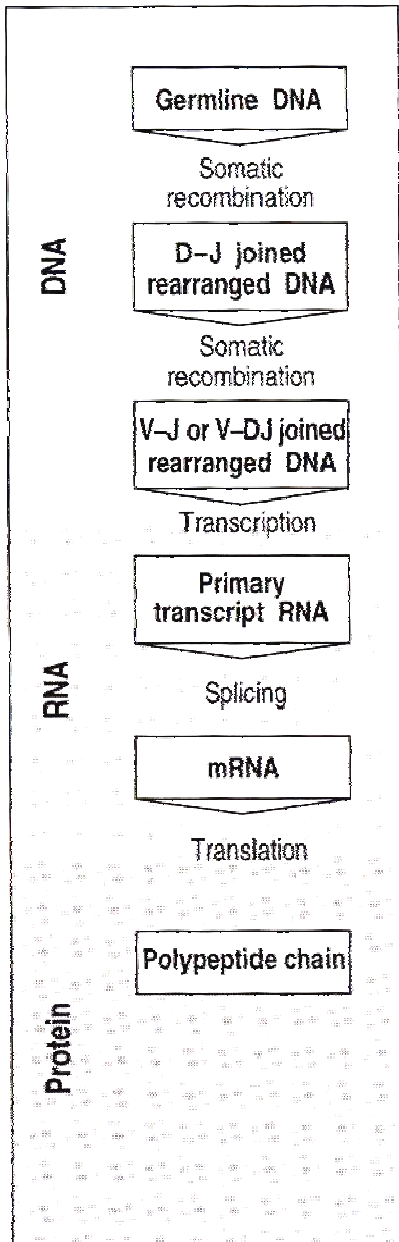
$V_L C_L$  .....  $V_K C_K$  nebo  $V_\lambda C_\lambda$  (tj. 2 typy lehkých řetězců)

## Těžké řetězce (heavy)

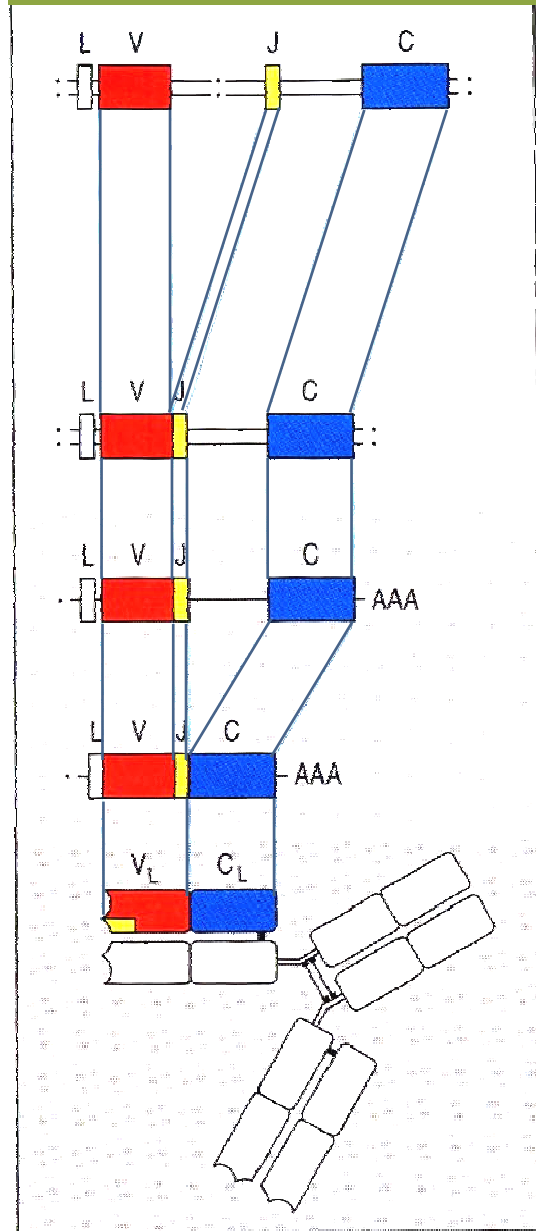
$V_H C_H$  .....  $V_H C_\mu$   $V_H C_\gamma$   $V_H C_\alpha$   $V_H C_\delta$   $V_H C_\epsilon$  (tj. 5 typů těžkých řetězců)

↓ ↓ ↓ ↓ ↓  
IgM IgG IgA IgD IgE (5 Ig tříd)

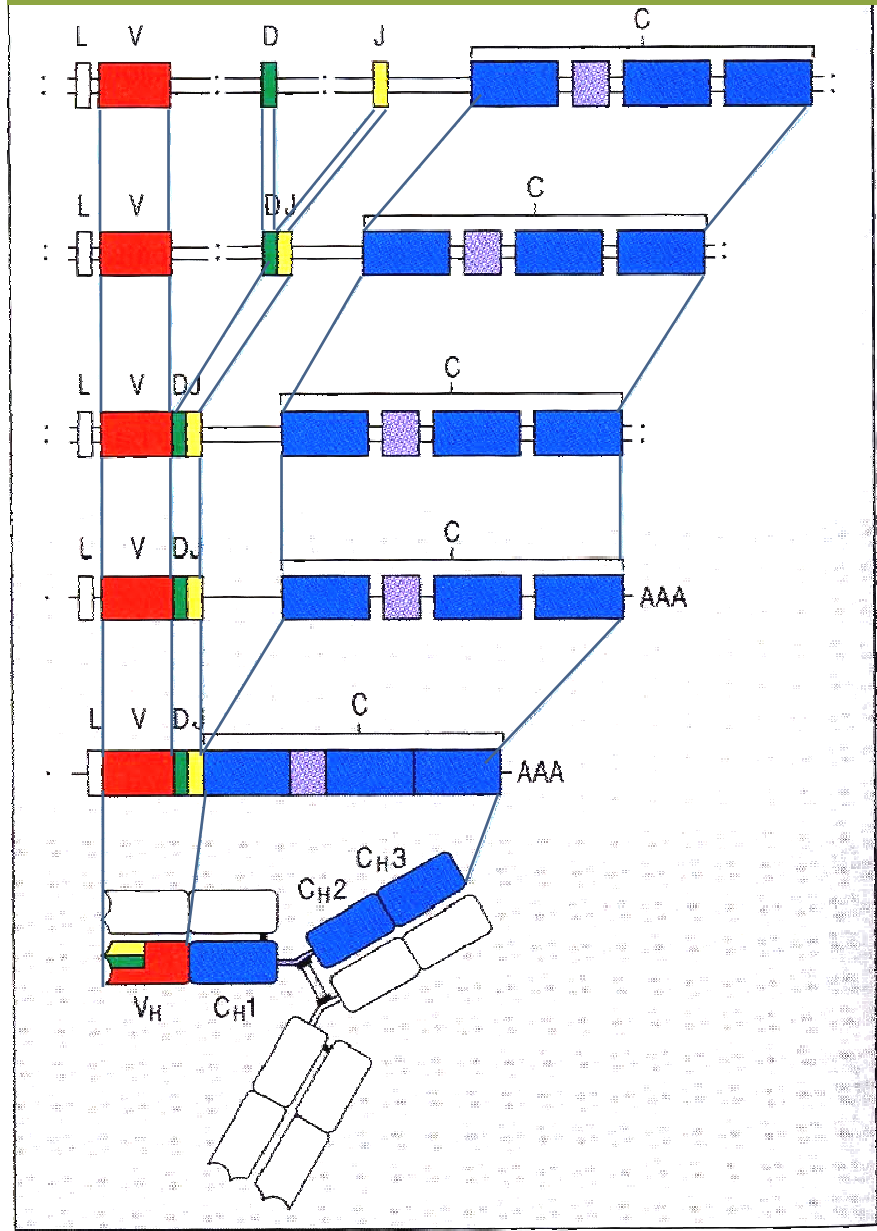
Skupina imunoglobulinů stejného typu těžkého řetězce tvoří imunoglobulinovou třídu



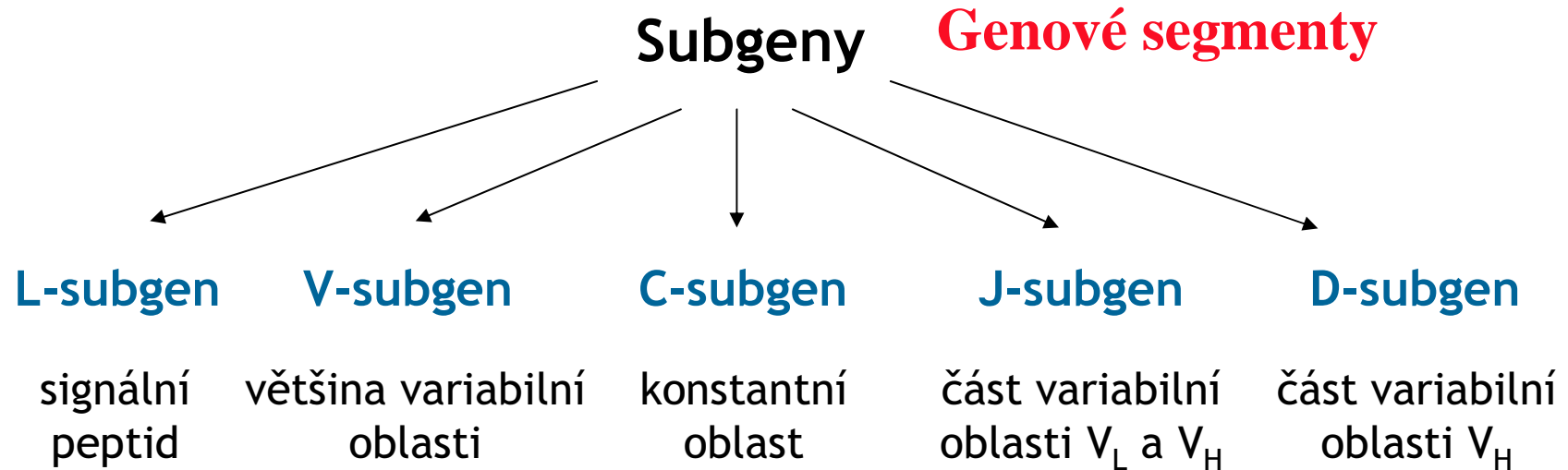
## Lehký řetězec



## Těžký řetězec



# Subgeny = úseky genů pro imunoglobuliny

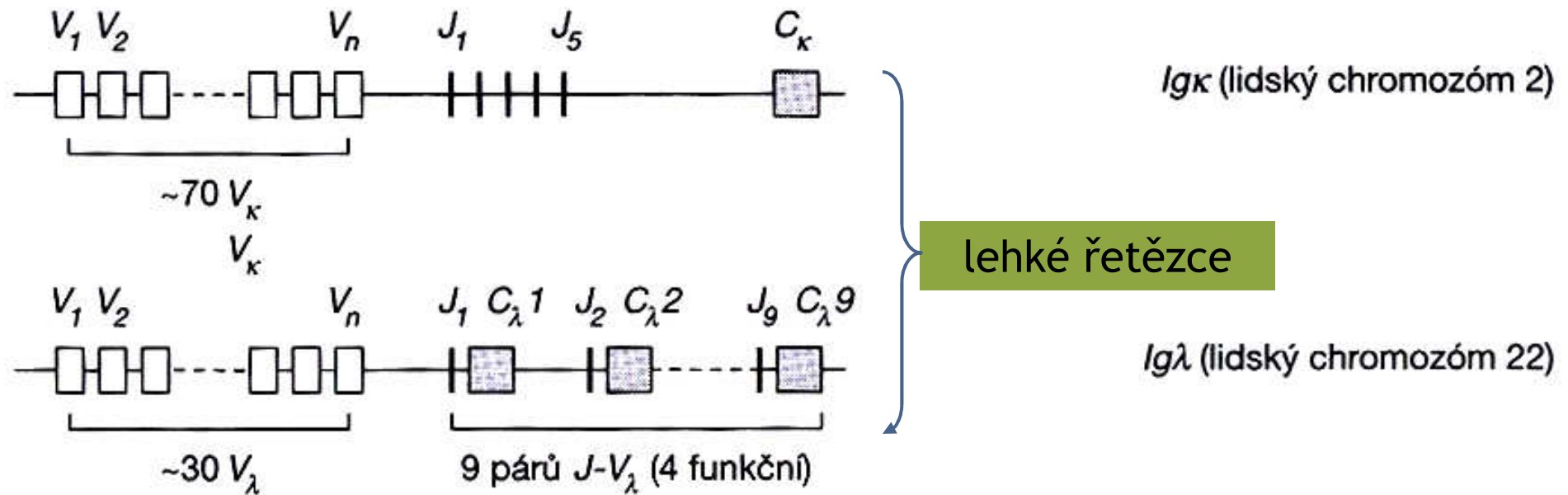
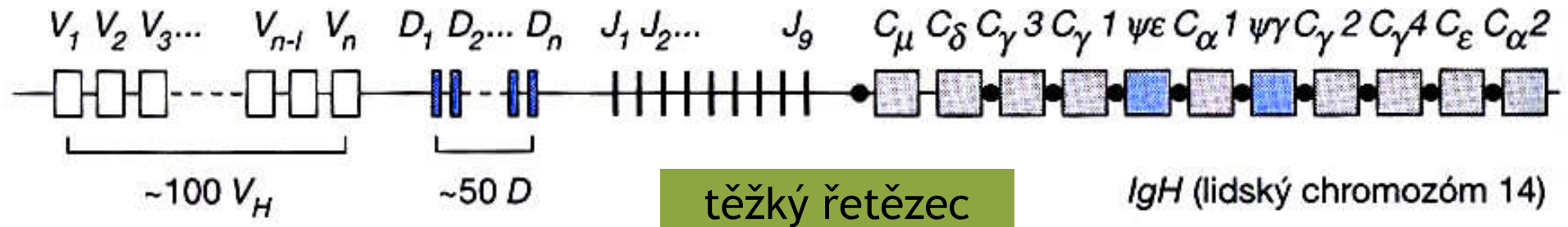


**Obecná sestava genů**

Geny pro lehké řetězce: L-VJC

Geny pro těžké řetězce: L-VDJC

# Organizace lidských genů kódujících imunoglobulinové řetězce



# Přeskupování subgenů a kombinace řetězců jako zdroj variability Ig

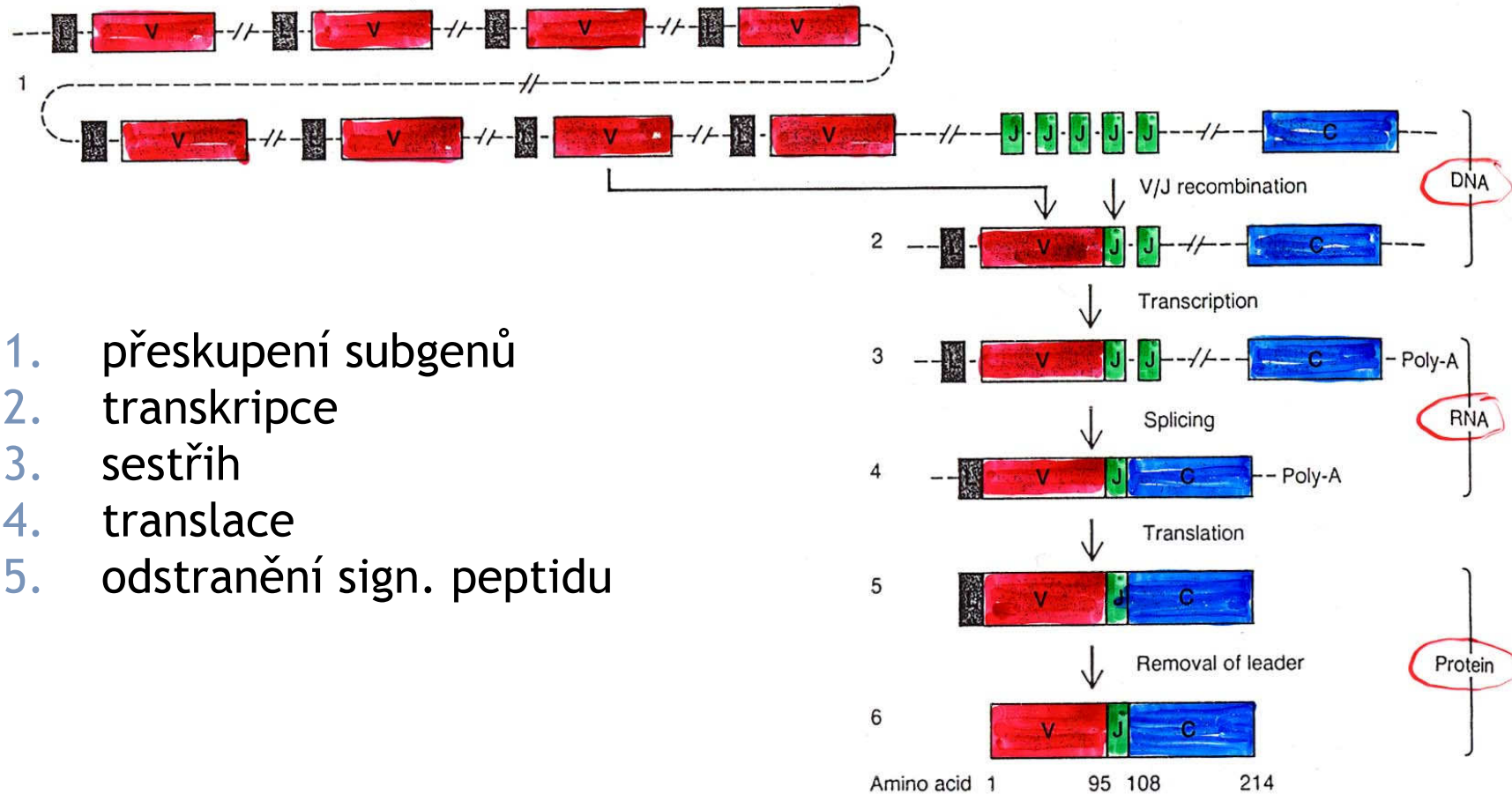
Lehký řetězec kappa: 250 V-subgenů + 4 J-subgeny + 1 C-subgen  
 **$250 \times 4 \times 1 = 1\,000$  kombinací (lehkých řetězců)**

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

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

*nahodilost kombinací - dvojčata*

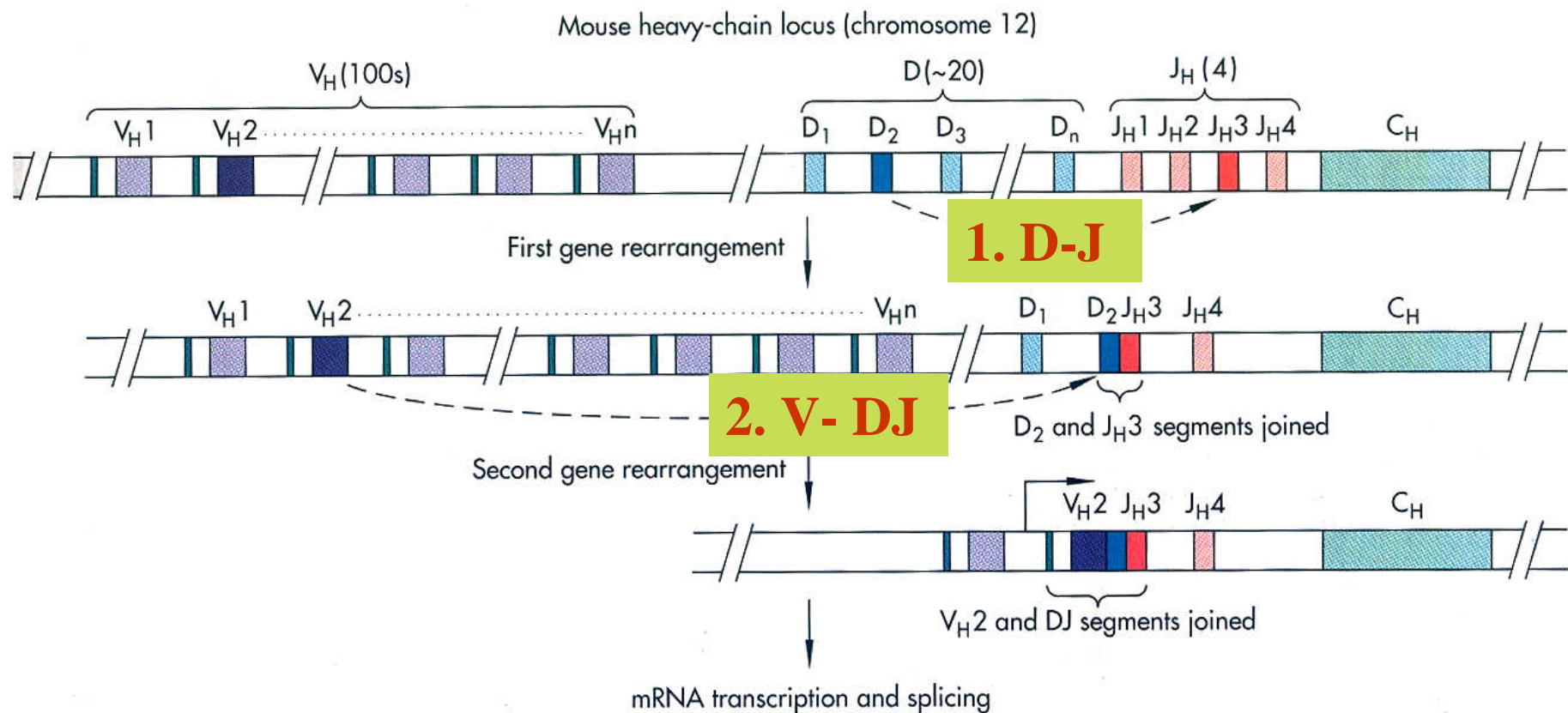
# Expresse genu pro lehký imunoglobulinový řetězec



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

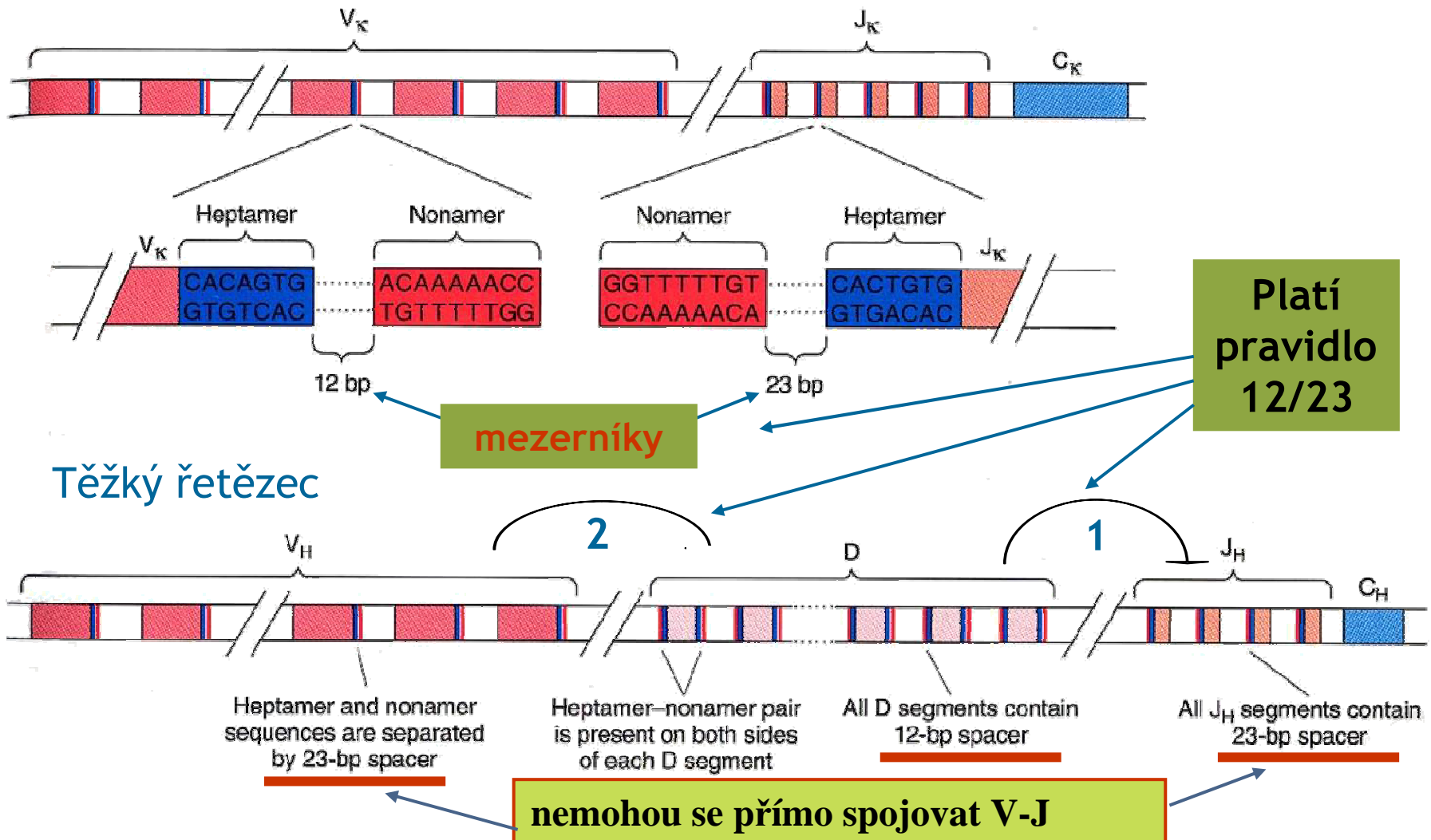


# Přeskupování subgenů pro těžký imunoglobulinový řetězec

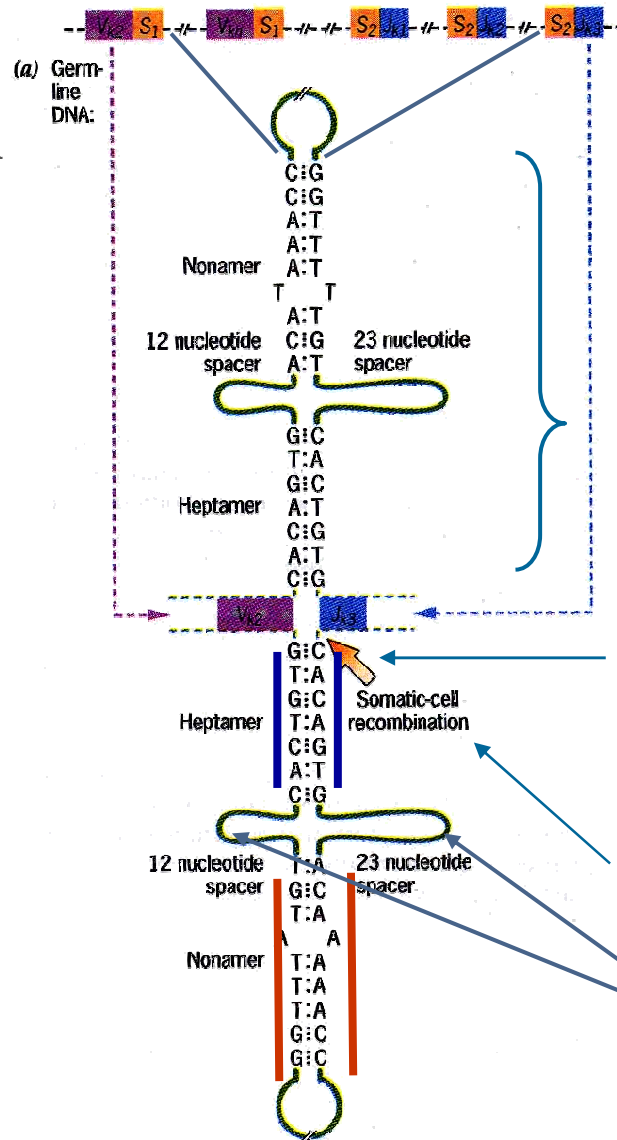


# Molekulární mechanismus přeskupování subgenů

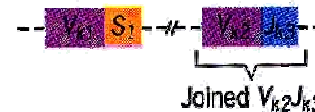
Lehký řetězec kappa v zárodečné linii



# Přeskupení subgenů procesem V-J somatické rekombinace



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



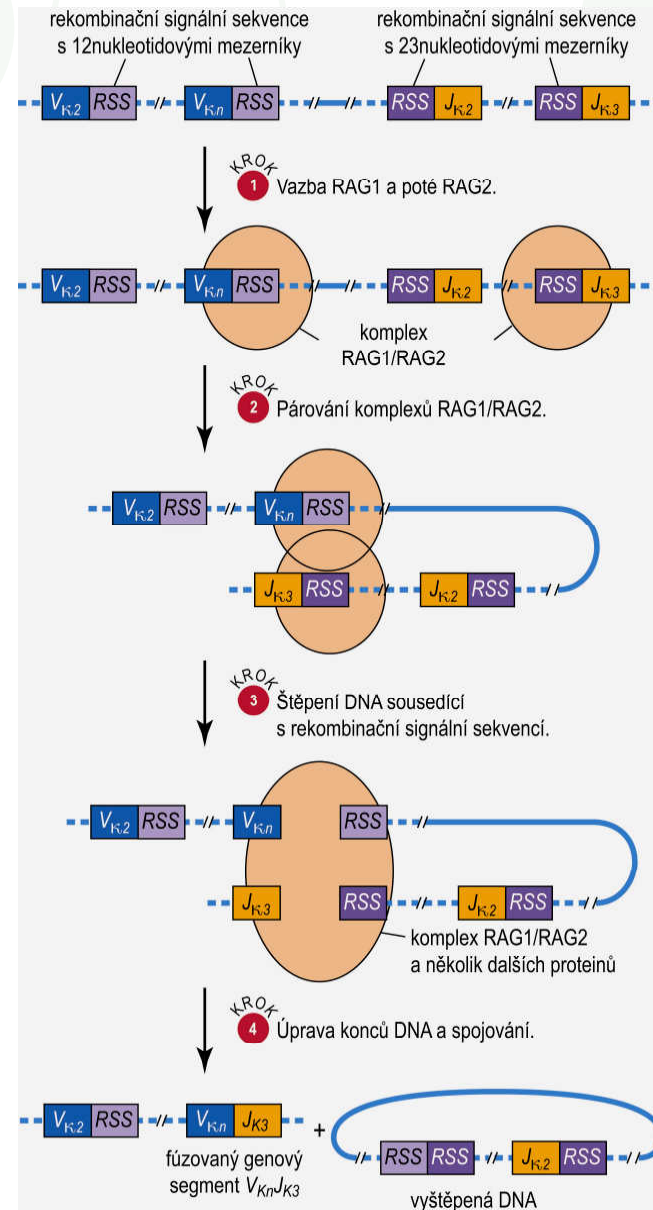
**Heptamer-mezerník-nonamer**  
= recombinational signal sequence (RSS)

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

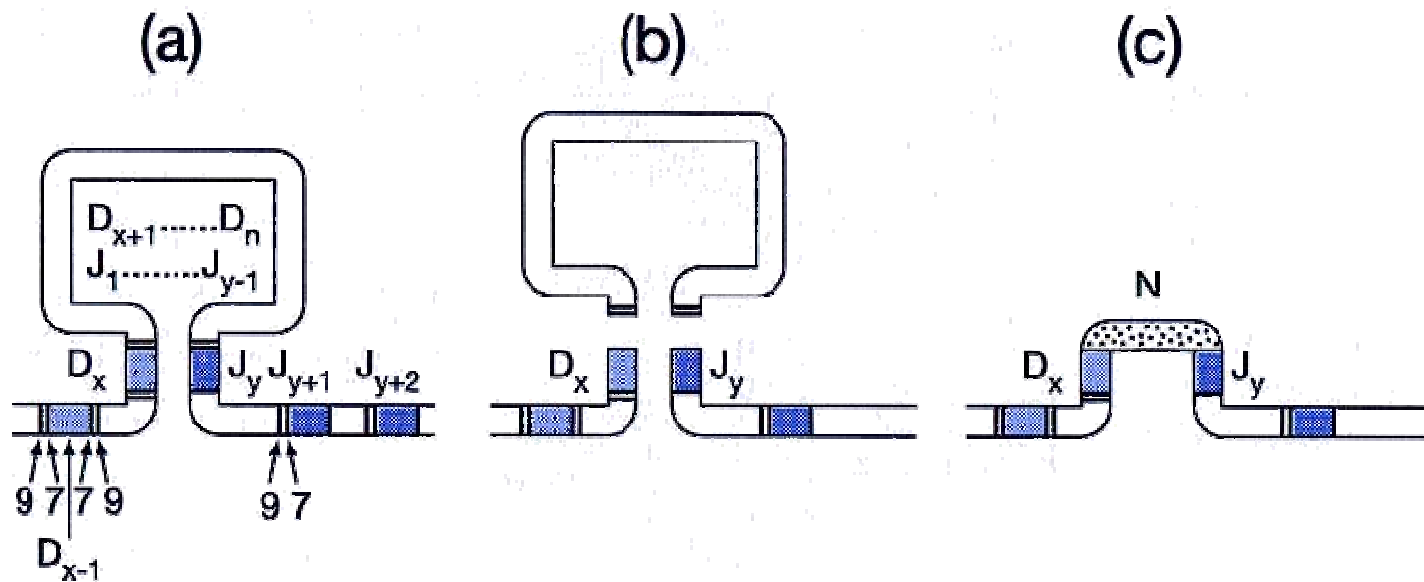
vznik nepřesných spojení

**12 a 23 bp mezerníky**

# Spojování genových segmentů J a V

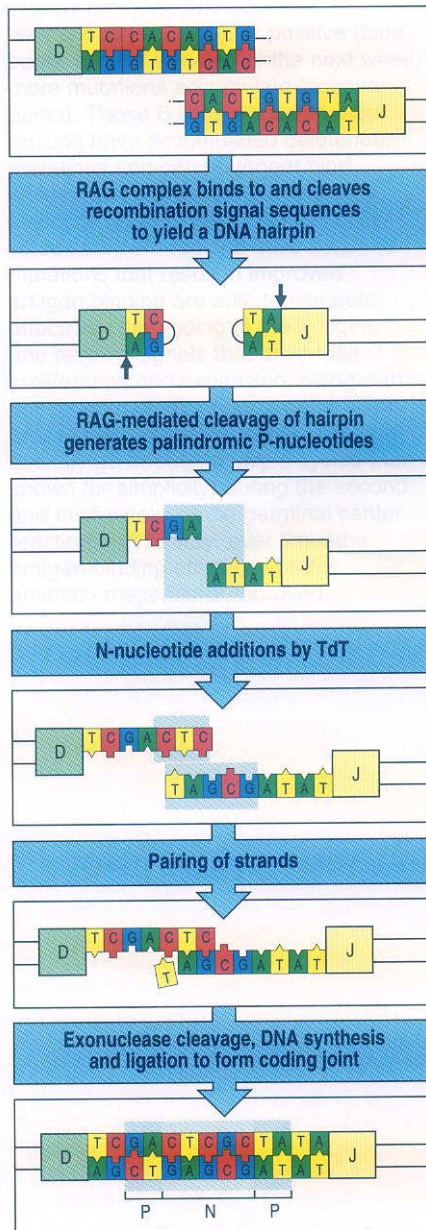


# Schematické znázornění vzniku nepřesných spojení mezi D a J



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

# Průběh spojování subgenů D a J – vznik variabilních spojení



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

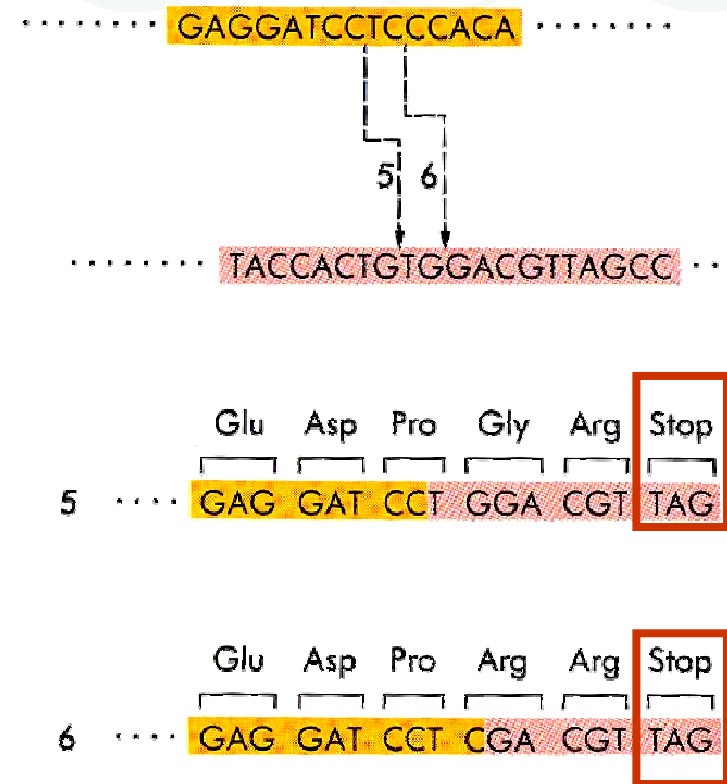
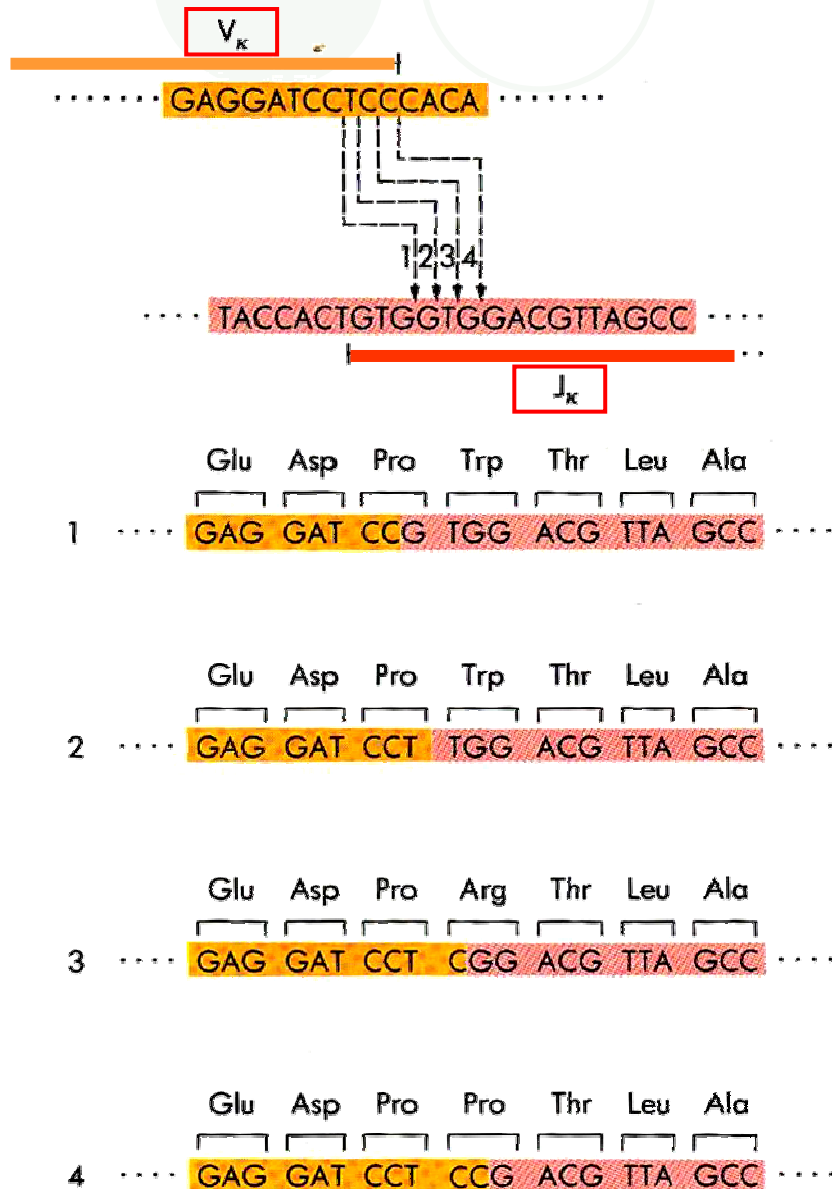
**Terminální deoxynukleotidyl transferáza připojuje náhodně nukleotidy (N) na konce jednořetězců**

**Nespárované nukleotidy jsou odstraněny exonukleázou a jsou nahrazeny reparační syntézou**

**P = palindromové nukleotidy tvořící vlásenku,**

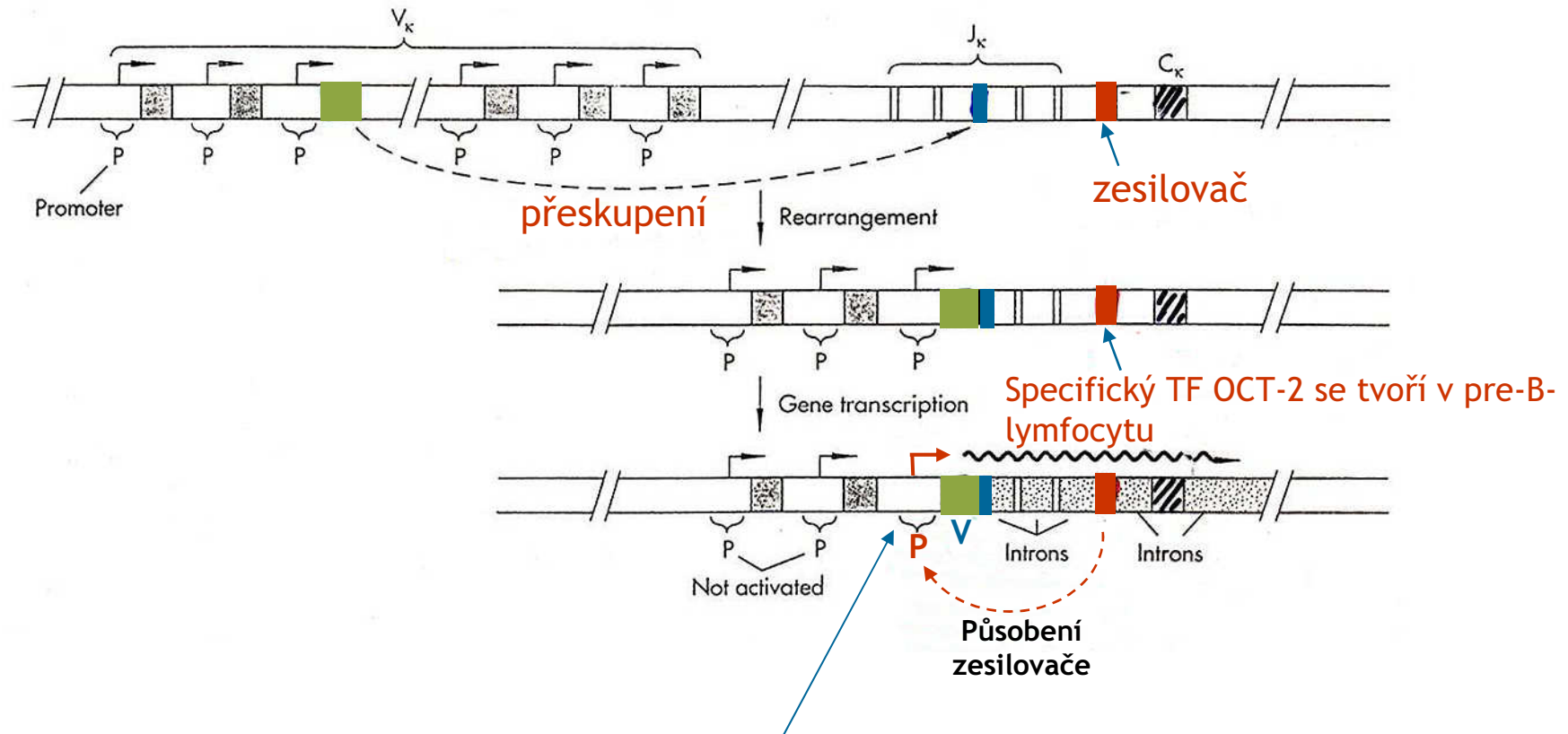
**N = „netemplátové“ nukleotidy**

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



**Produktivní  
a neproduktivní  
spojení**

# Aktivace transkripce po přeskupení subgenů



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



# Izotypový přesmyk

**Přesmyk tříd** = přechod Ig z jedné třídy do jiné  
Probíhá na úrovni těžkých řetězců

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

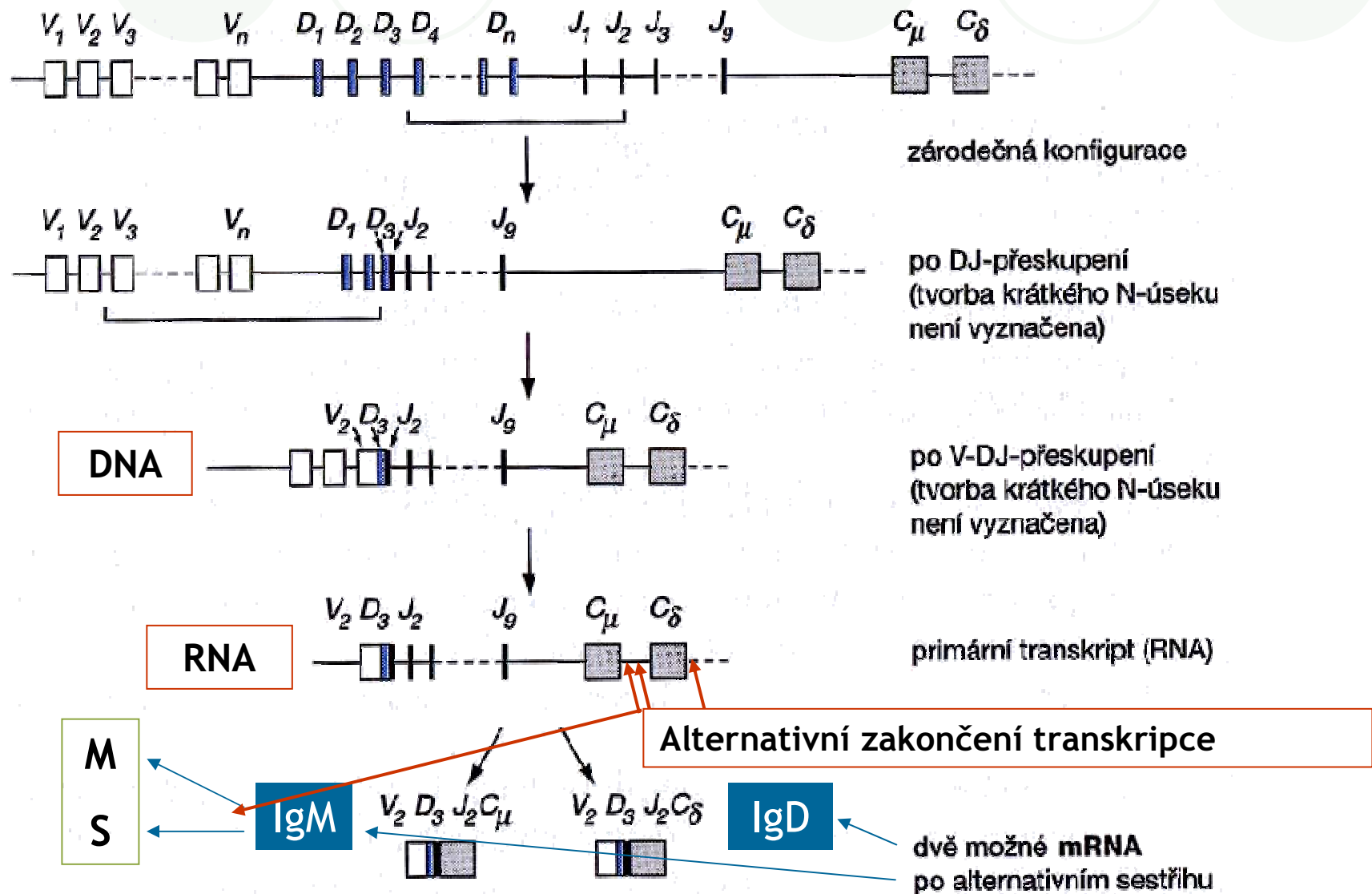
## A. Přesmyk na úrovni transkripce (úprava mRNA)

- přechod z IgM z membránového na sekretovaný
  - přechod z IgM na IgD
- přepis překrývajících se transkripčních jednotek ze stejného promotoru, končících různými polyadenylačními signály

## B. Přesmyk na úrovni DNA

- vytvořený exon L-VDJ<sub>H</sub> se připojuje k různým subgenům C po delecii mezi J a některými C
- přesmyk je řízen signály přesmyku (S) = sekvence na 5' konci C<sub>H</sub> subgenů za účasti enzymů

# Průběh přeskupování subgenů a alternativní sestřih hnRNA u těžkých řetězců



# Formy protilátek (imunoglobulinů)

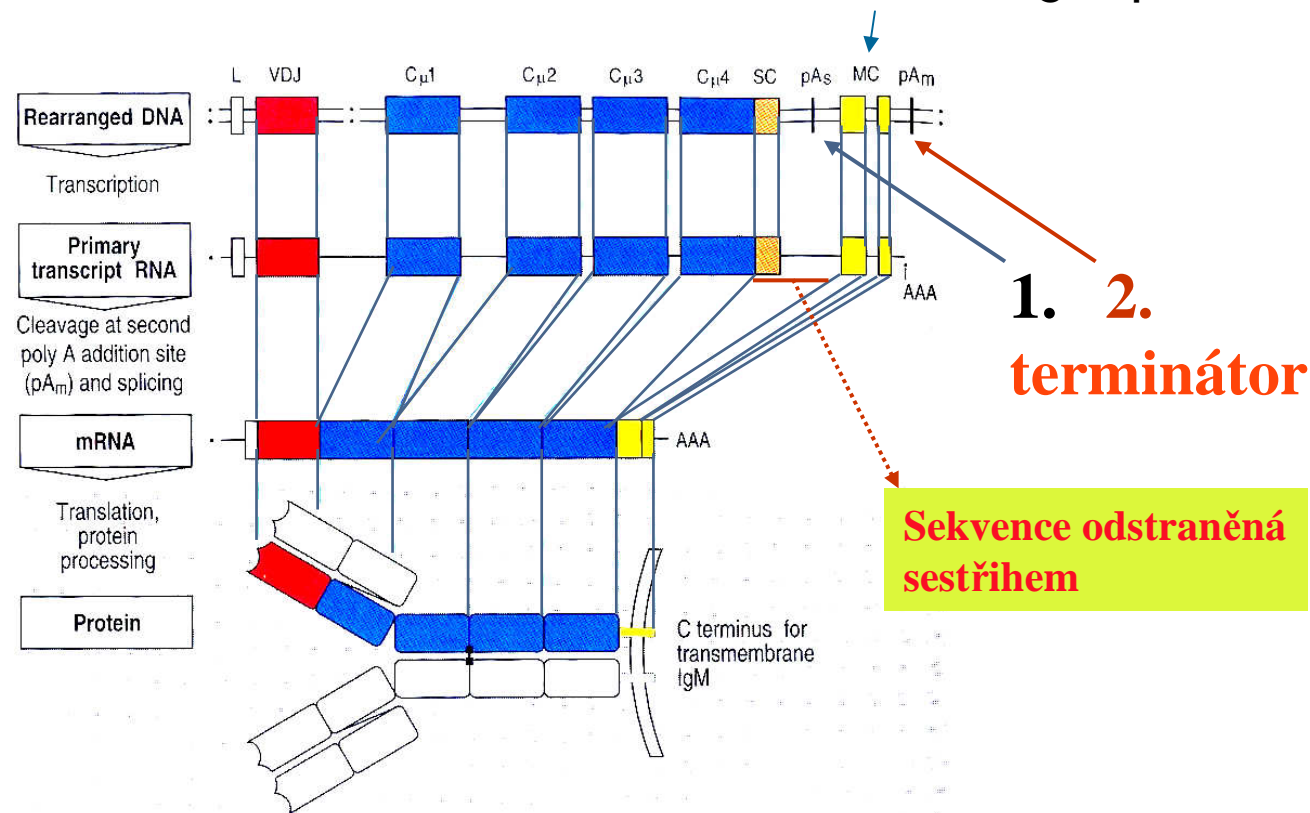
## Dvě formy protilátek (imunoglobulinů)

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

# Vznik membránové formy IgM

membránová forma

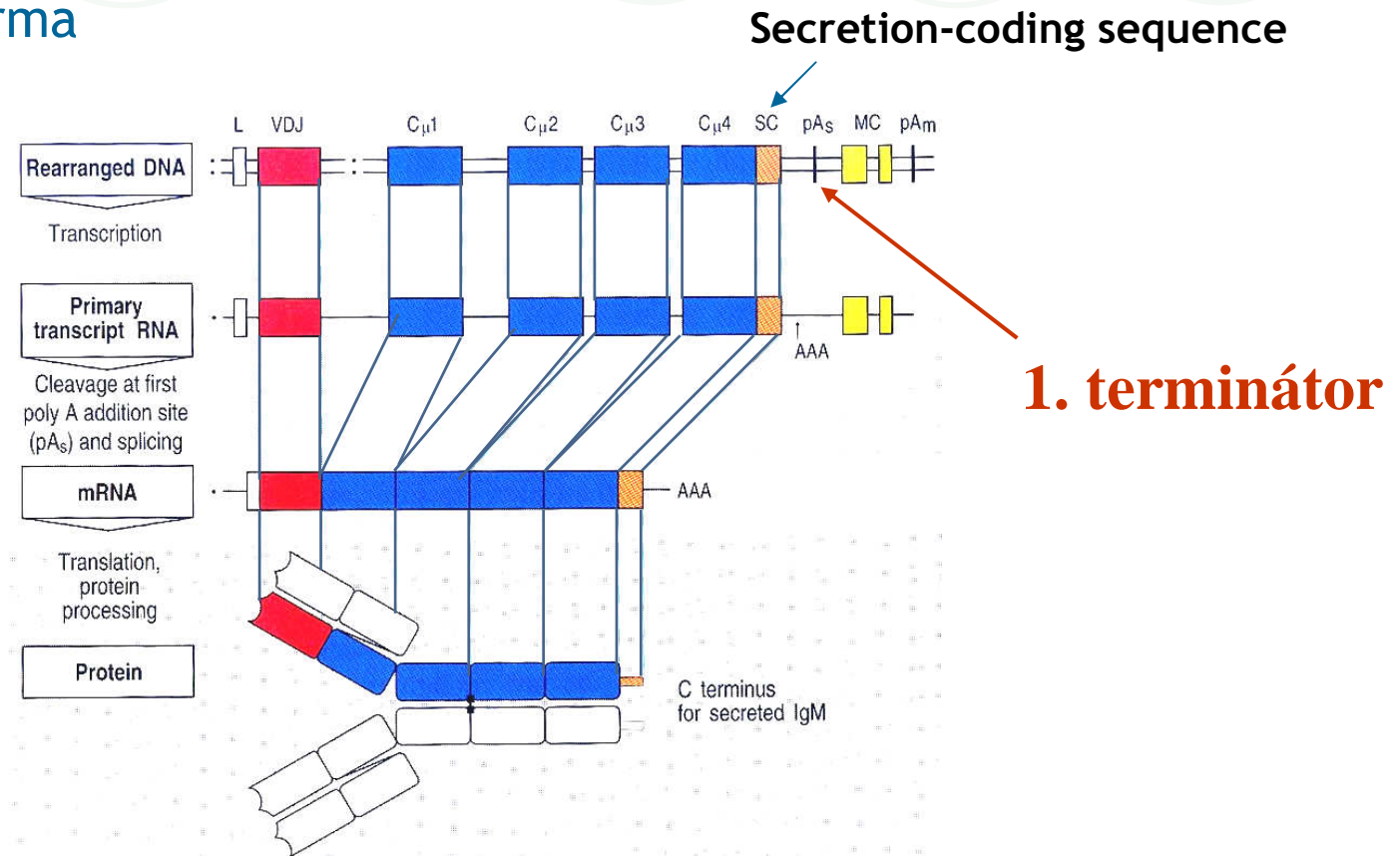
Membrane-coding sequence



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

# Vznik sekretované formy IgM

sekretovaná forma

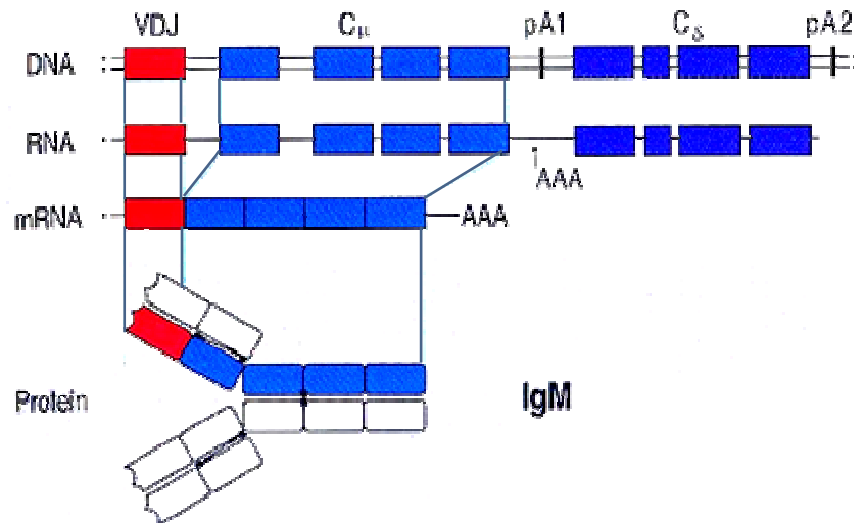


Transkripce končí na prvním terminátoru, vzniklý transkript neobsahuje část kódující hydrofobní aminokyseliny (MC) a vzniká protilátka, která se uvolňuje z buňky

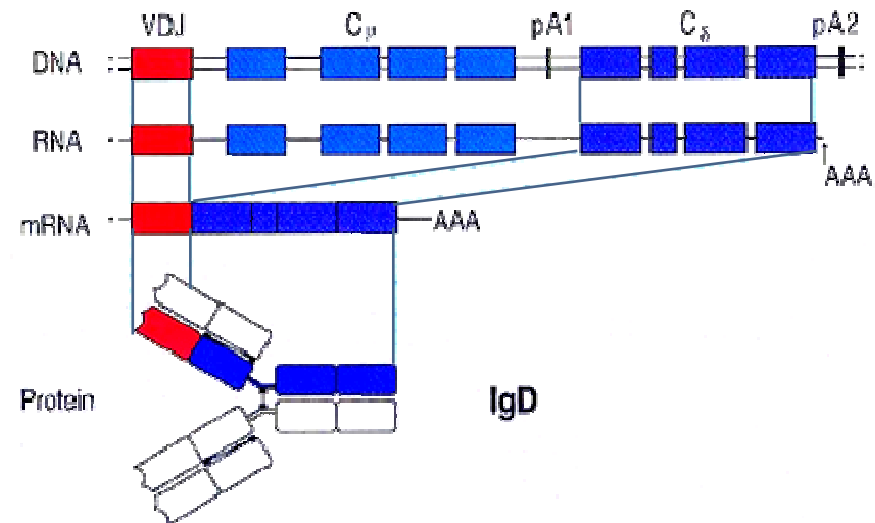
**Změnu v RNA transkriptu H-řetězce indukuje aktivace B buňky antigenem**

# Koexprese IgM a IgD regulovaná úpravou transkriptu

## Exprese IgM



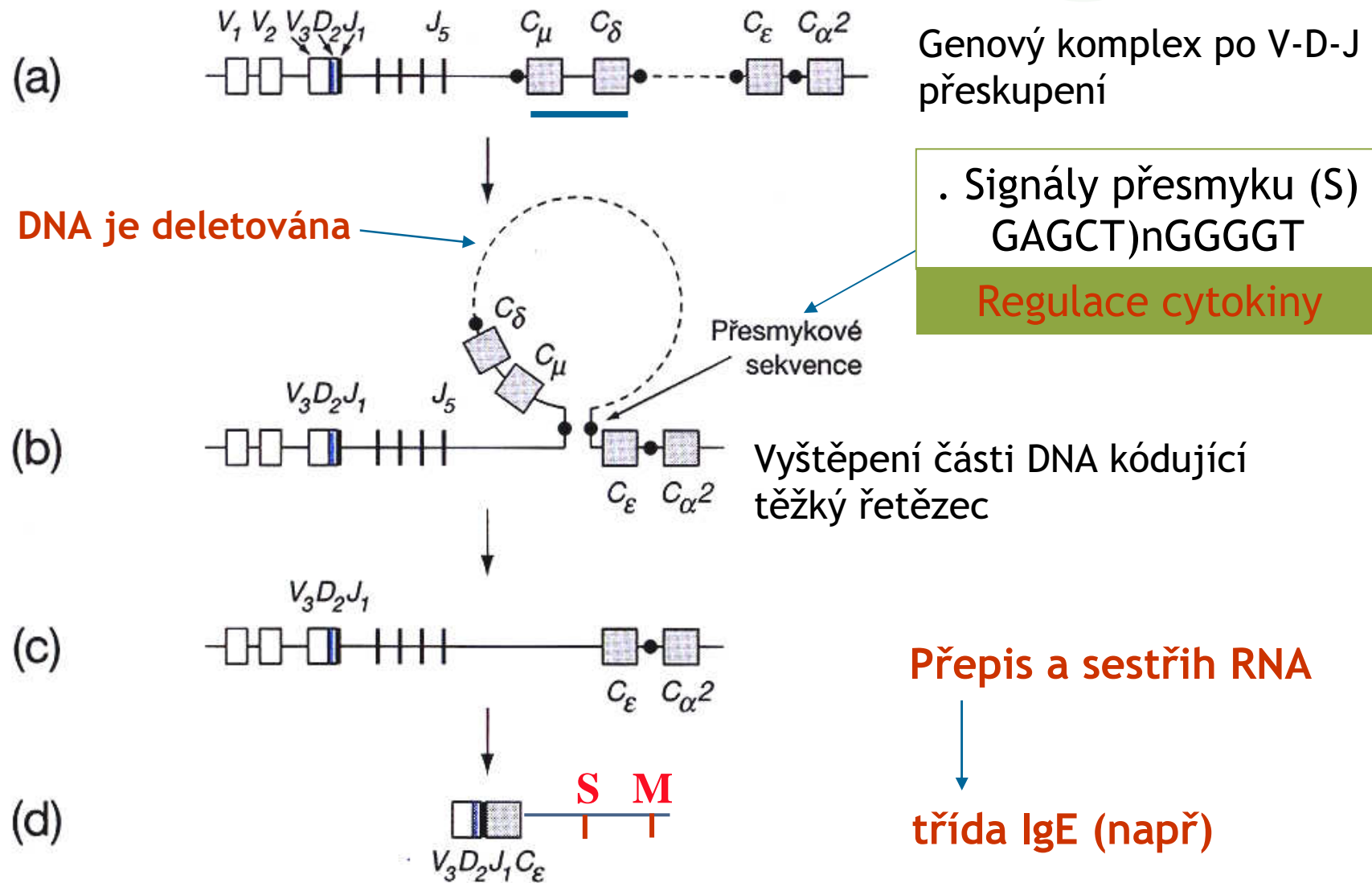
## Exprese IgD



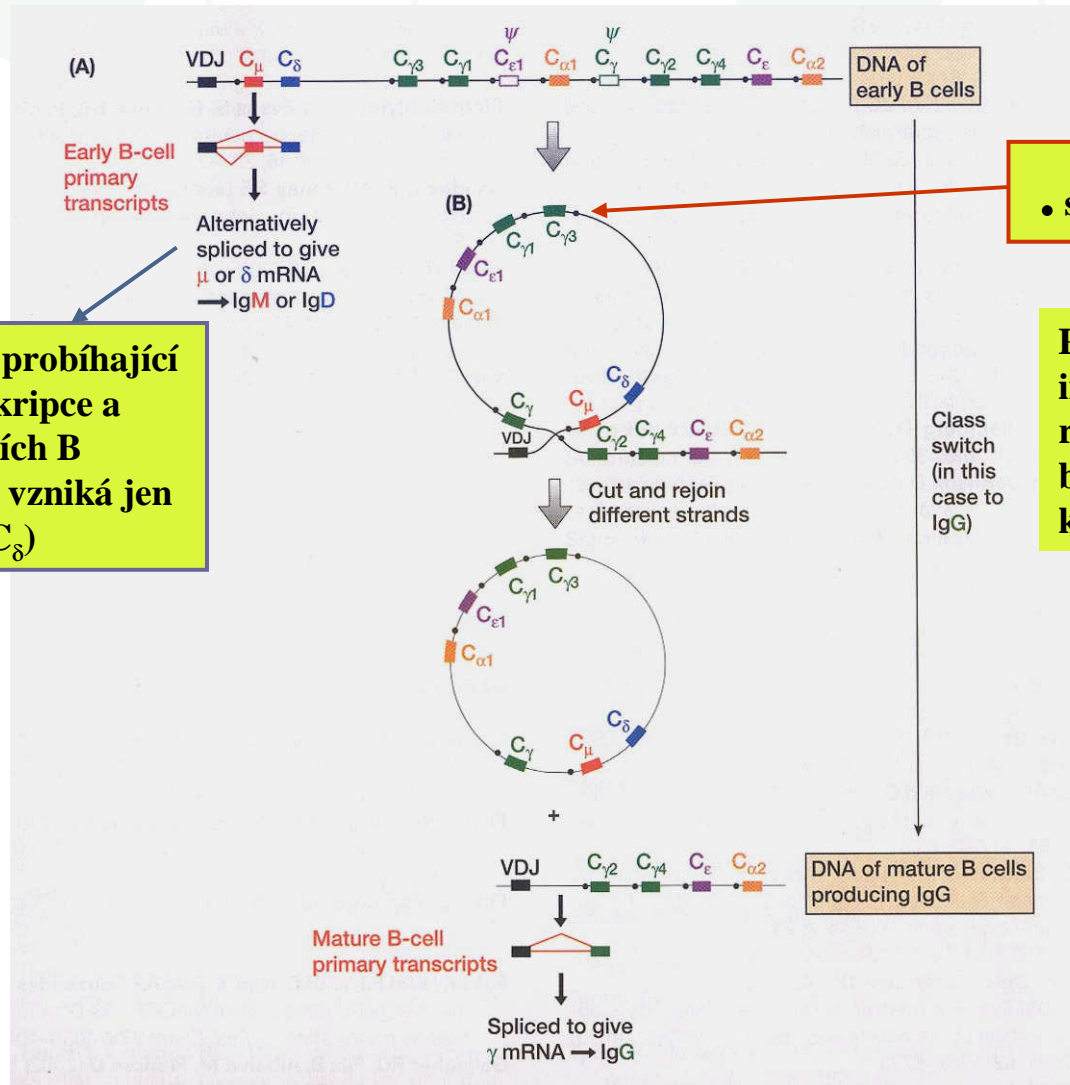
Ve zralých B-buňkách začíná transkripce na promotoru  $V_H$  a pokračuje přes exony  $C_\mu$  a  $C_\delta$ . Ukončení transkripce v pA1 a následný sestřih vede k tvorbě mRNA kódující těžký řetězec  $\mu$ , zatímco ukončení transkripce v pA2 a následný odlišný způsob sestřihu odstraní exony  $C_\mu$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

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

# Přesmyk tříd (izotypový přesmyk) při diferenciaci B lymfocytů



# Přesmyky tříd probíhající u těžkých řetězců



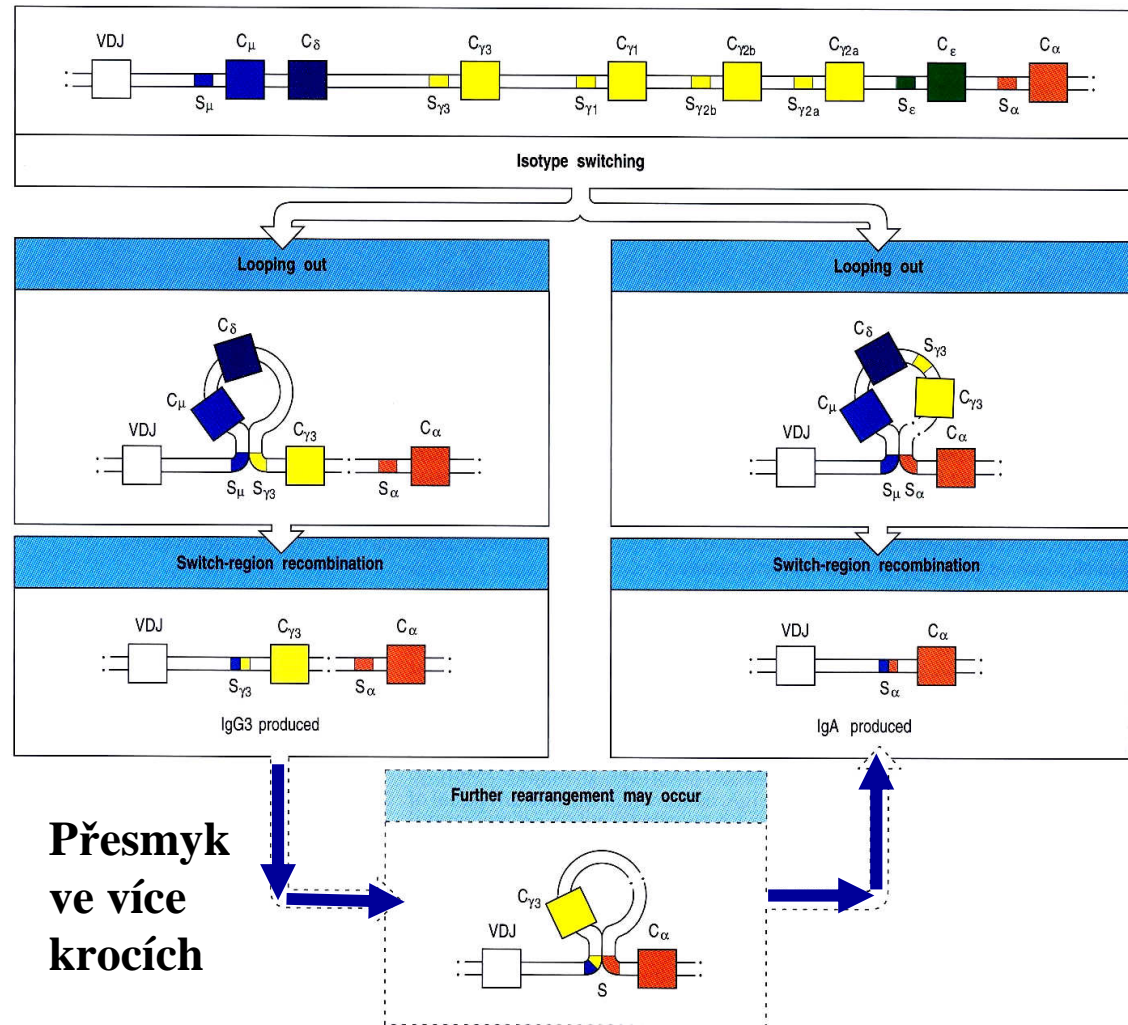
Časný přesmyk probíhající na úrovni transkripce a sestřihu u naivních B buněk (nejdříve vzniká jen C<sub>μ</sub>, později též C<sub>δ</sub>)

• signály přesmyku

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



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



Přesmyk v jednom kroku

Přesmyk ve více krocích

# Alelická a izotypová exkluze

## Alelická exkluze

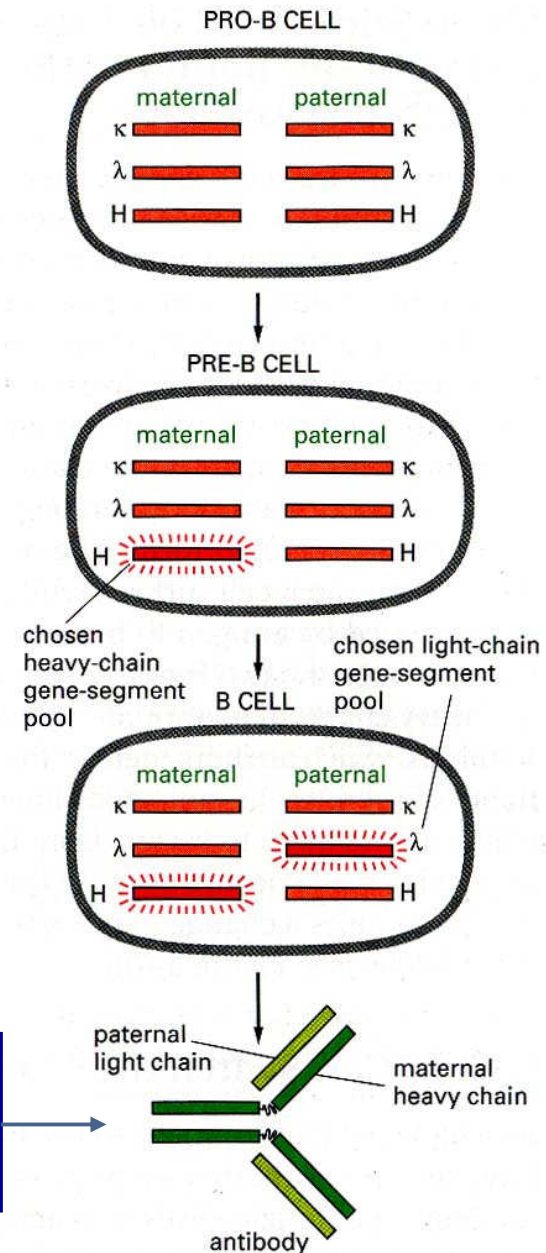
Během vývoje B-buňky jsou aktivovány pouze geny jednoho z rodičů (nejasný mechanismus)

## Izotypická exkluze

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

Výsledná buňka tvoří protilátku obsahující jedinečné vazebné místo pro antigen

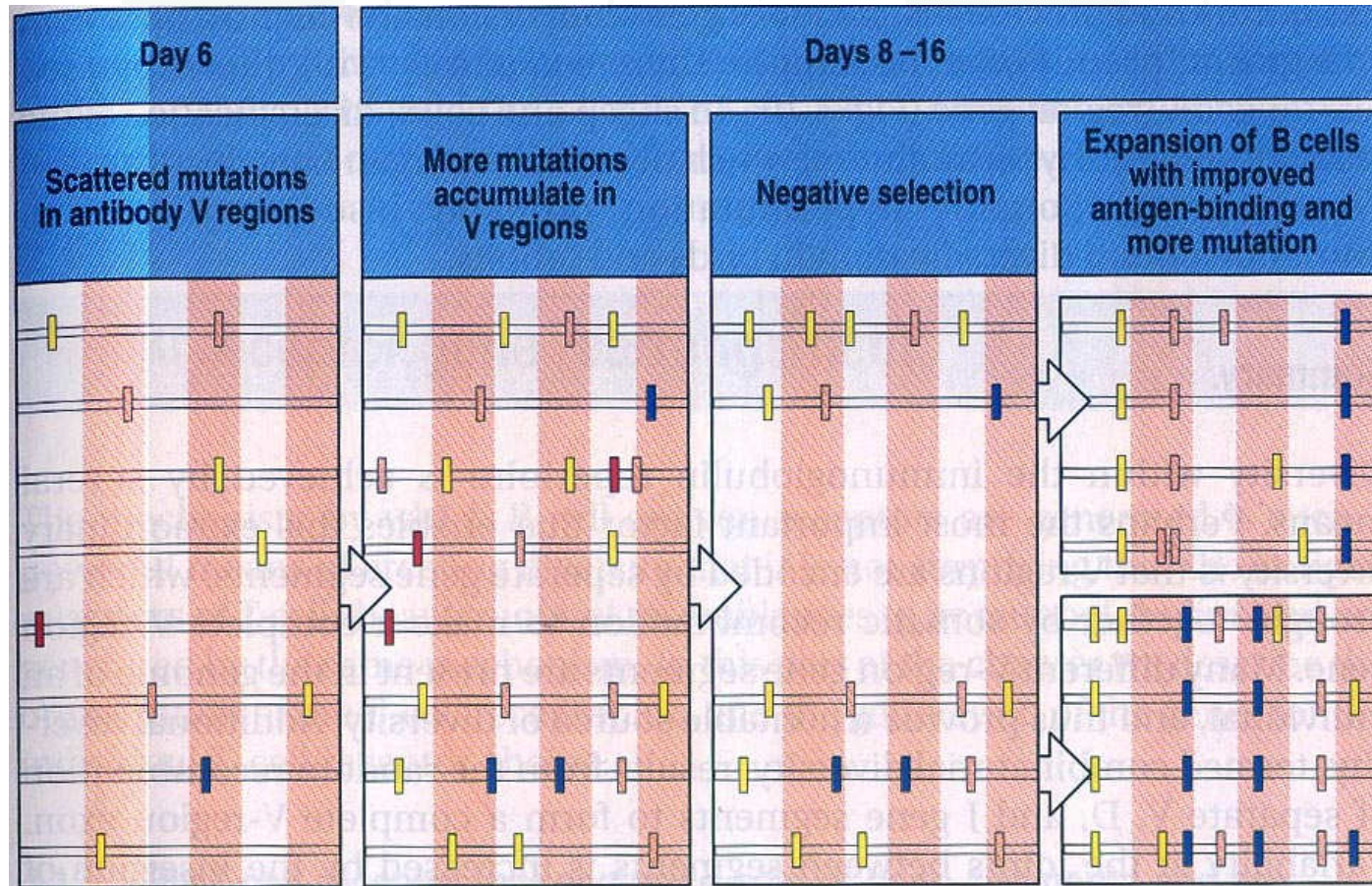
**Monospecifická  
protilátka**



# Časový průběh vytváření H- a L-řetězců protilátek

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

# Vznik somatických hypermutací v přeskupené variabilní oblasti imunoglobulinového řetězce



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

Deaminace cytozinu na uracil, pak reparace

# Příčina rozmanitosti protilátek

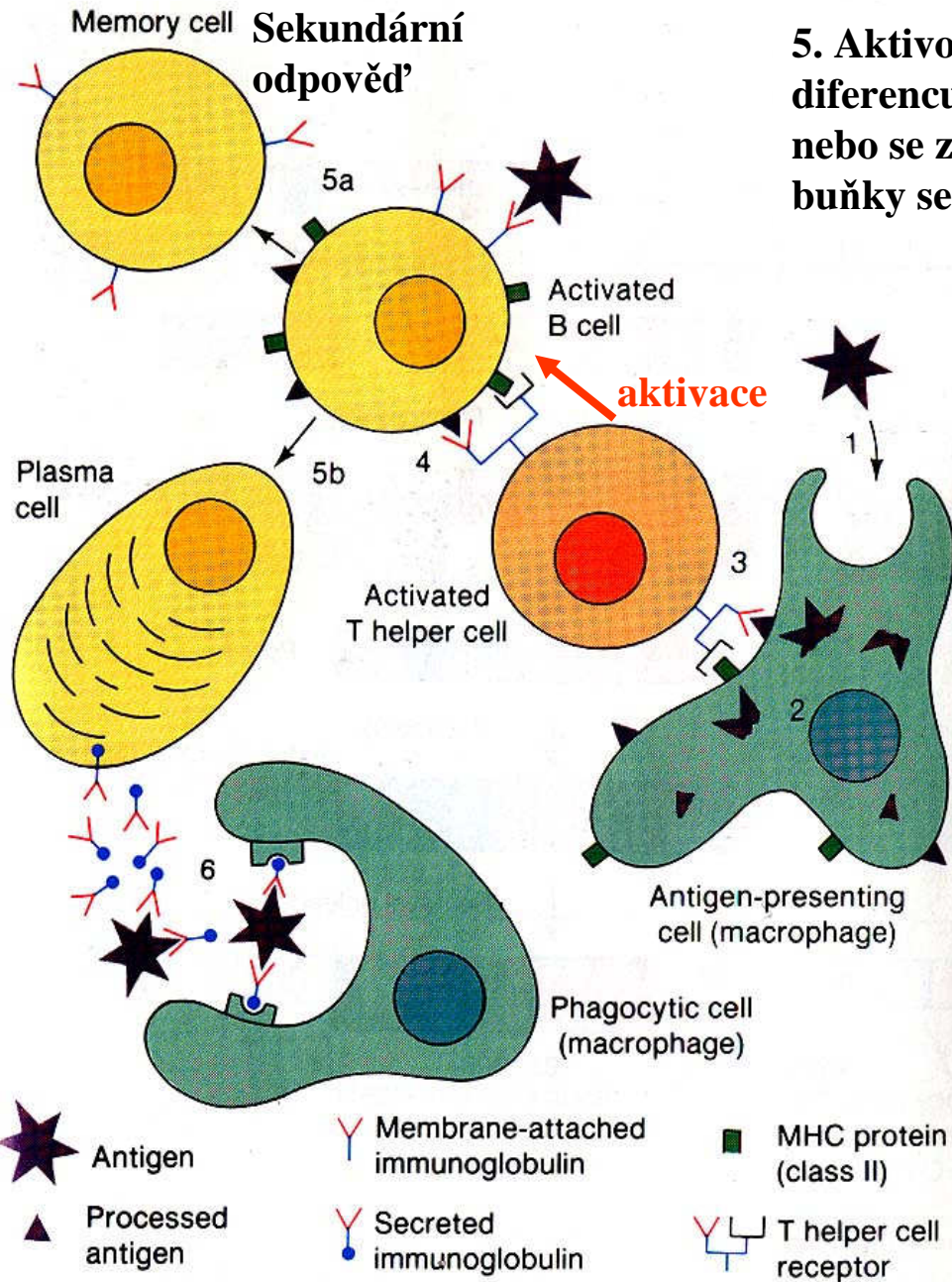


1. Přeskupování V-D-J-subgenů
2. Kombinace lehkých a těžkých řetězců
3. Nepřesná spojení V-J (V-D-J)
4. Somatické mutace v okolí V



# Humorální imunitní odpověď k infekci zprostředkovaná B-buňkami

**Vysoká frekvence mutací**



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

1. Makrofág pojme antigen

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

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

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

## **MHC-molekuly (glykoproteiny)**

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

### **Funkce MHC glykoproteinů**

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

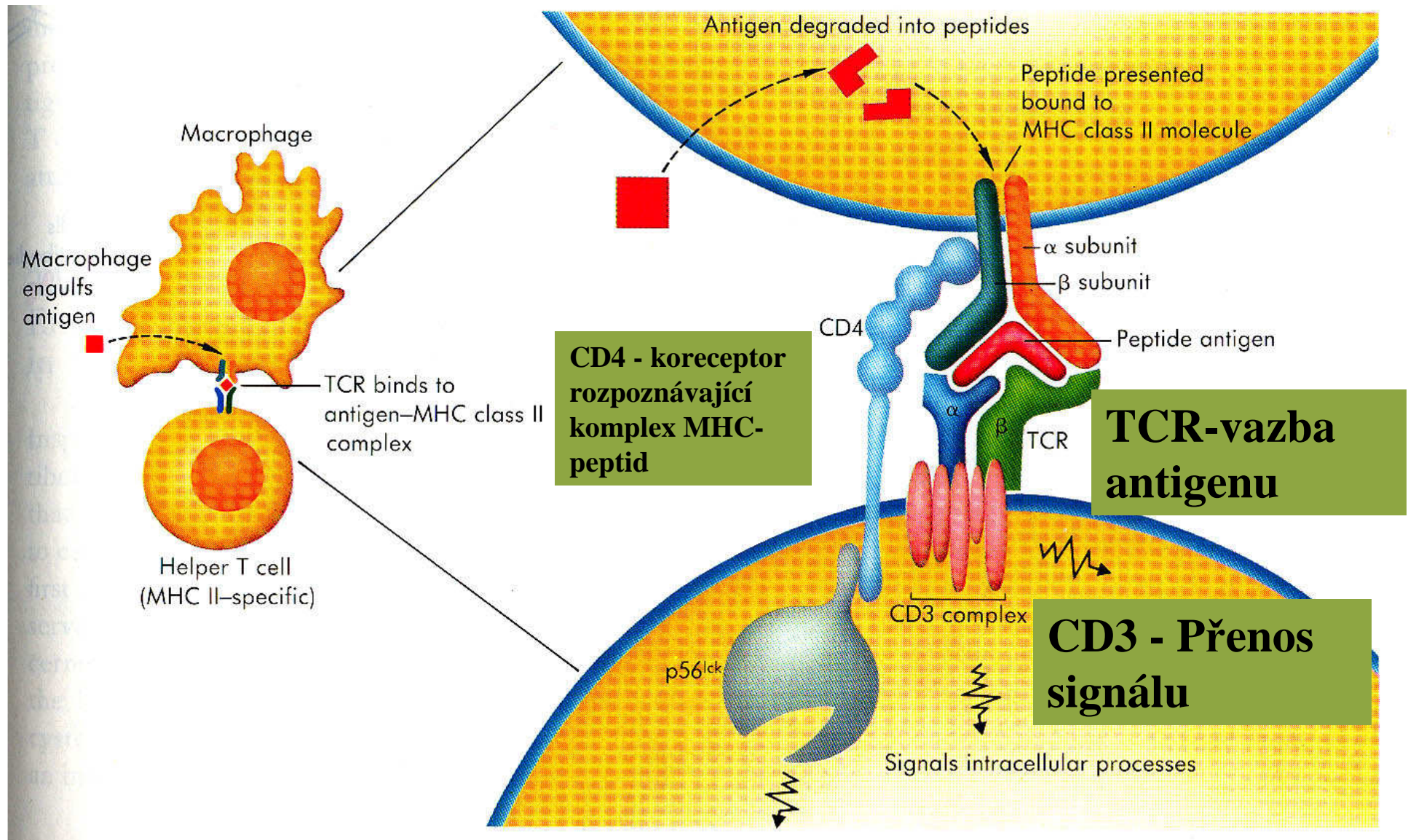
**MHC gp I - jsou na všech buňkách organismu: vazba peptidů produkovaných buňkou po odbourání struktur patogena (bakterie, viry)**

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

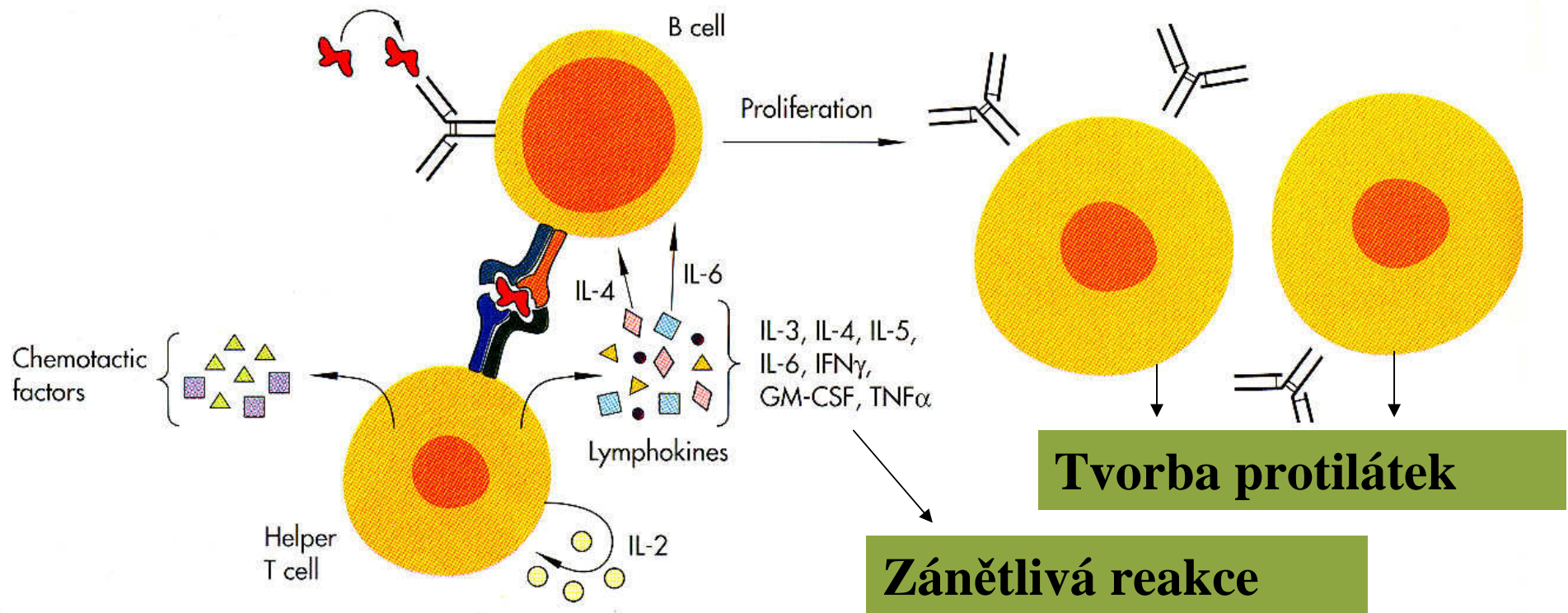


# Rozpoznání buněk infikovaných virem T-lymfocyty

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

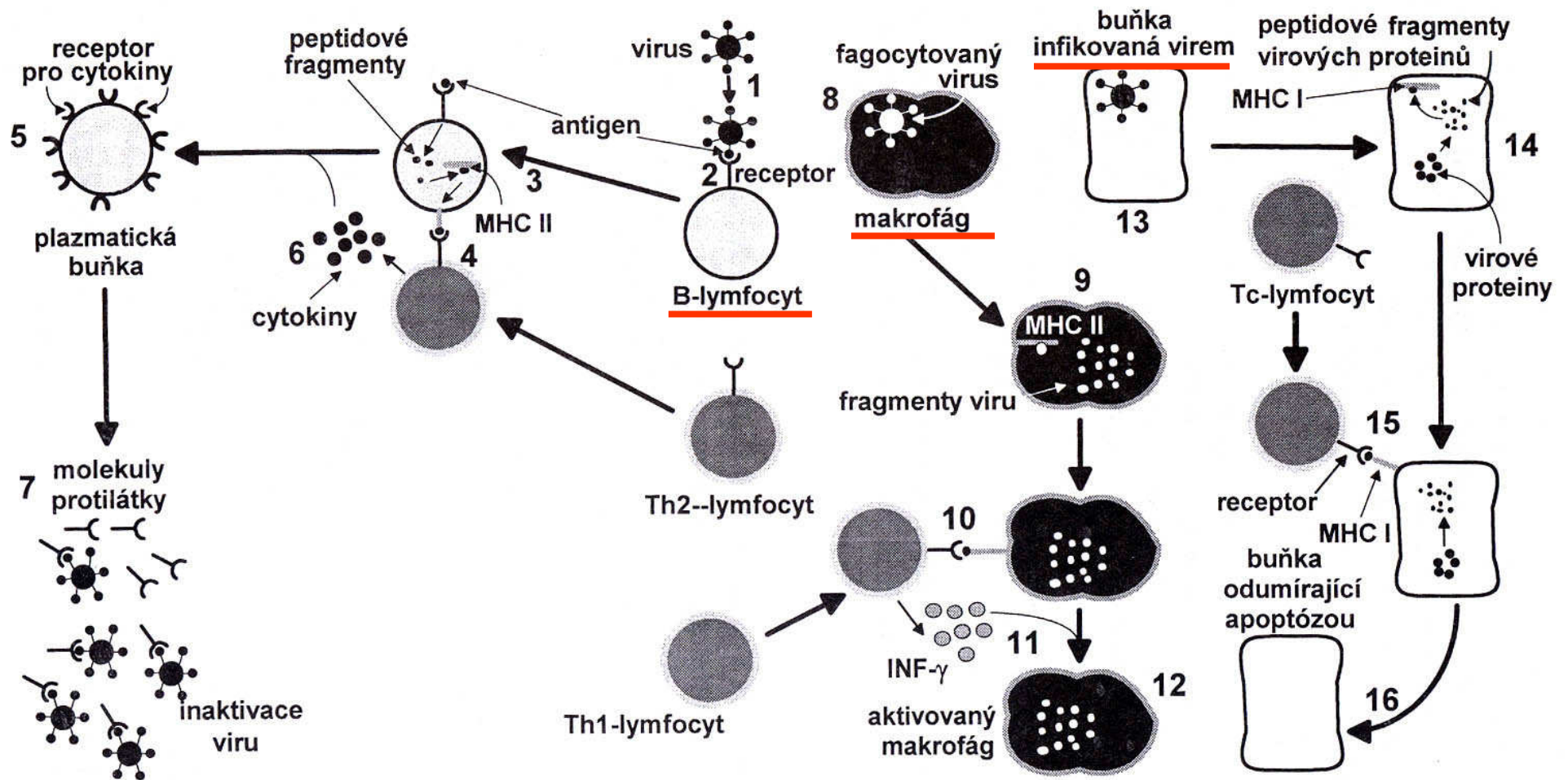


Po navázání T-buňky na B-lymfocyt prezentující antigen začíná T-buňky syntetizovat lymfokiny, které pak stimulují proliferaci jak T-buněk tak i B-lymfocytů, které se pak mění na plazmatické buňky vytvářejí velká množství protilátek



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

# Globální schema humorální a buněčné imunitní odpovědi



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

**Buněčná imunita - zprostředkovaná T-lymfocyty**

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

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

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