

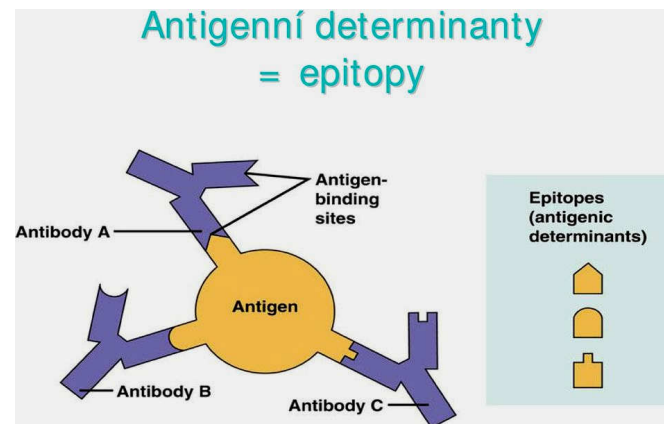
Imunitní systém

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 (obratlovci)

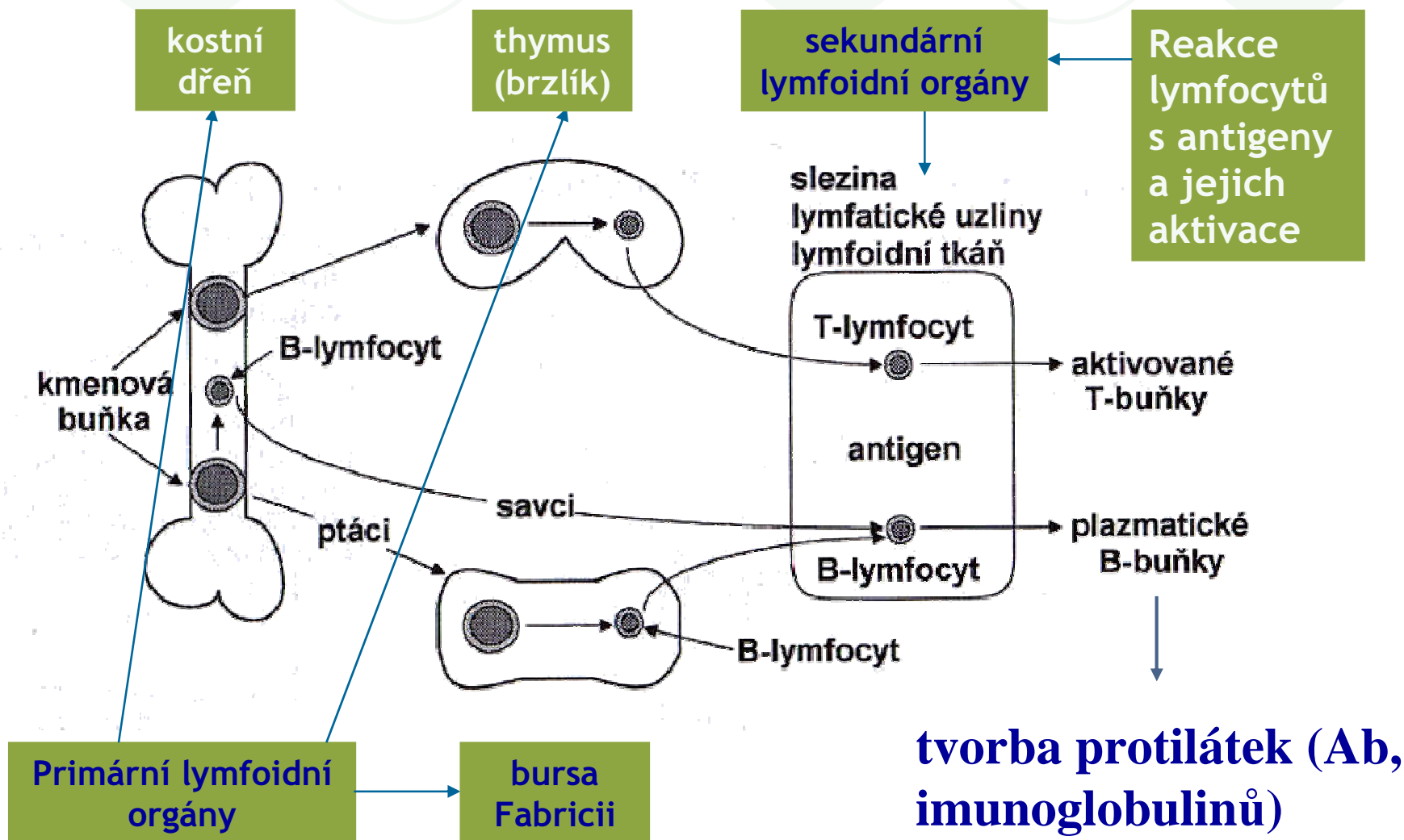
a) **nespecifická, přirozená (neadaptivní)** = vrozená, evolučně starší.
Nemá imunologickou paměť.

- 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 - diferenciacie 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

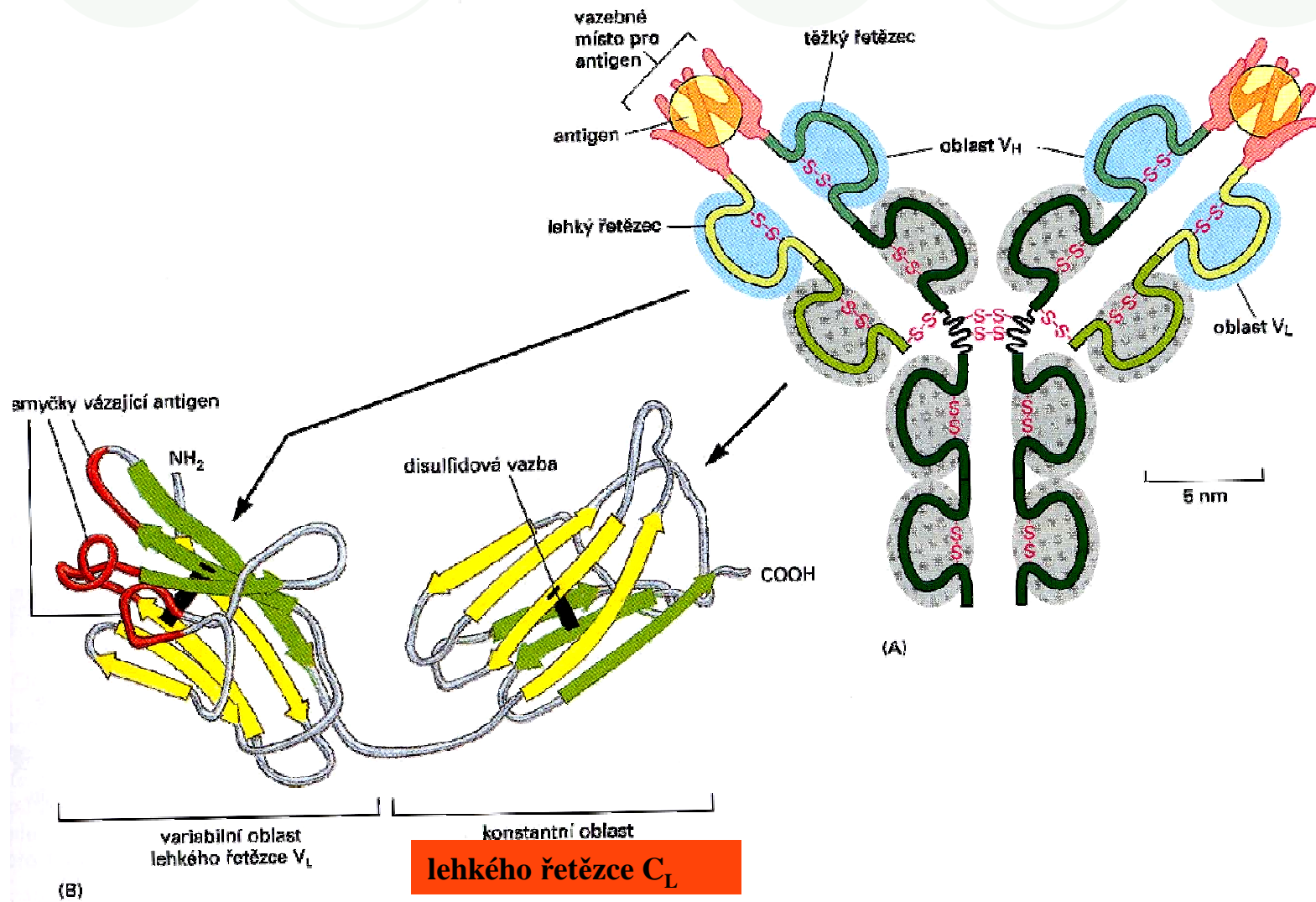
IgM, IgD
sekretované
(krátkodobě)

+ antigen

= sekundární odpověď

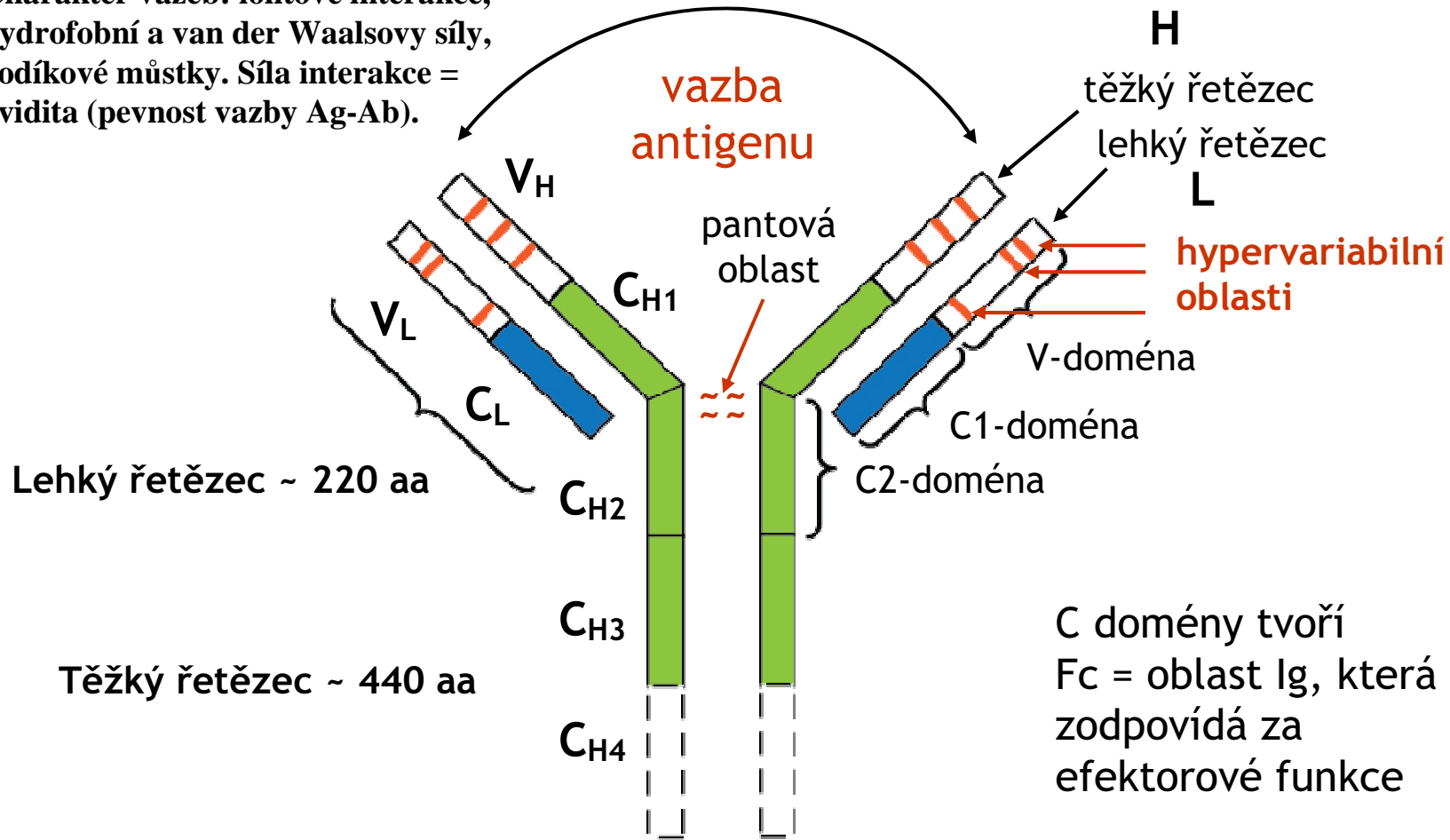
vysoká tvorba IgA, IgE, IgG

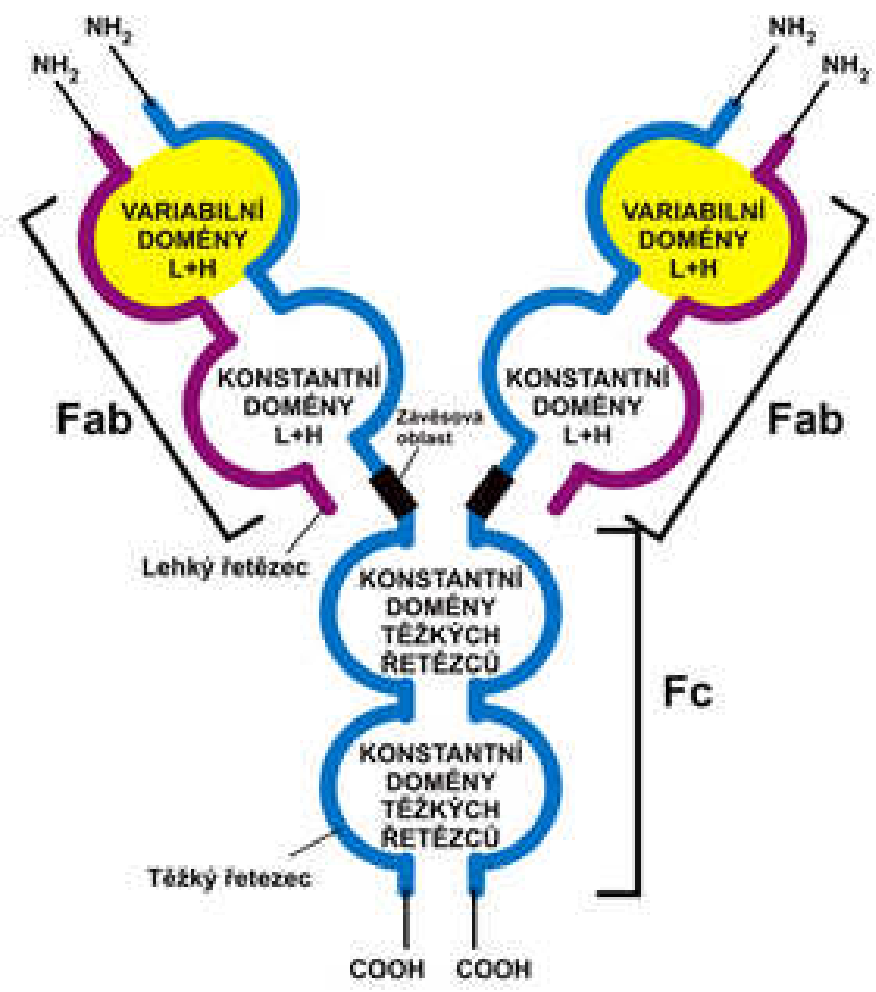
Struktura imunoglobulinů



Struktura protilátky

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

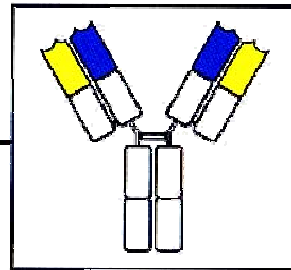




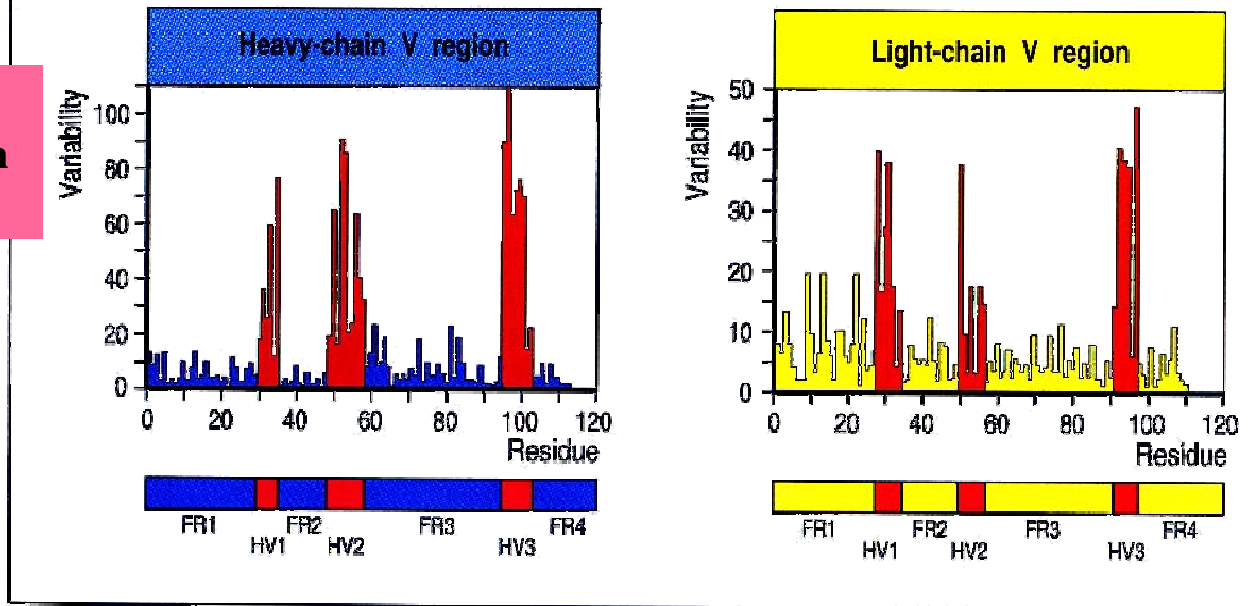
STRUKTURA MONOMERU IMUNOGLOBULINU

Oblasti hypervariability ve variabilních doménách

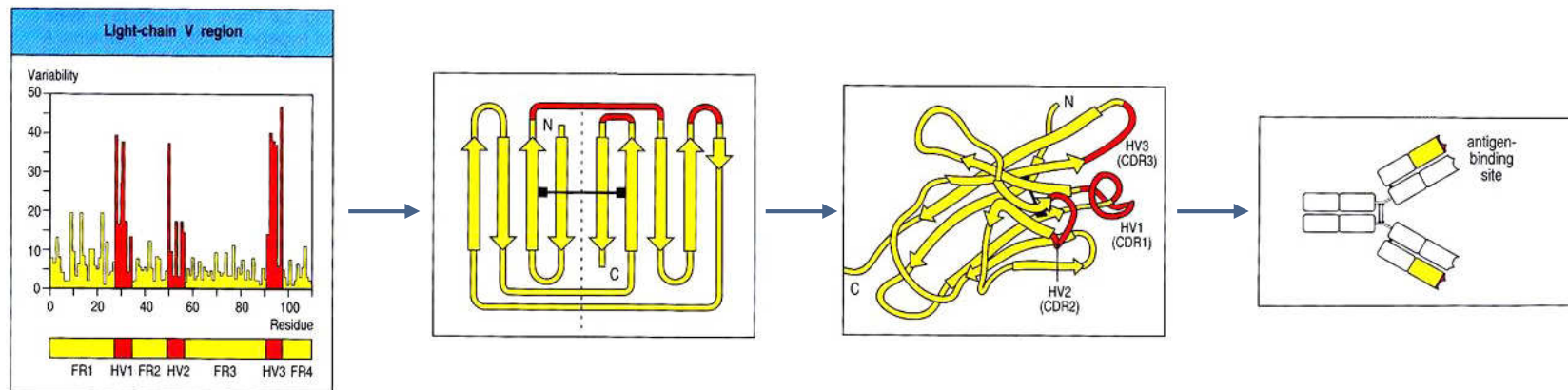
HV = hypervariabilní oblast;
FR = „framework regions“



Frekvence
výskytu různých
aminokyselin

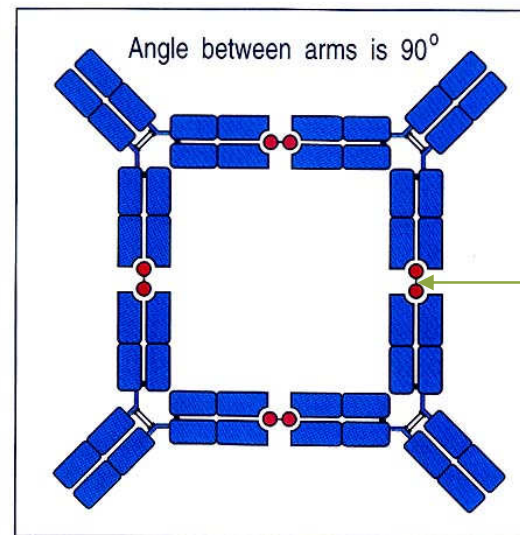
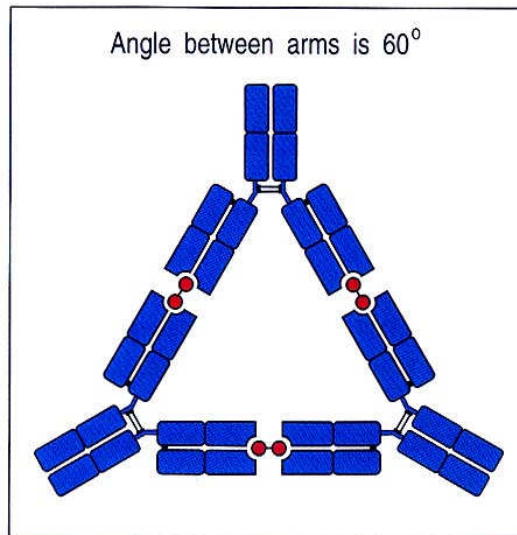
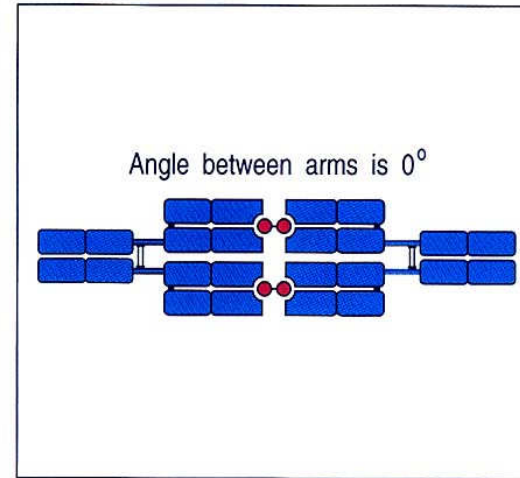


Lokalizace hypervariabilních oblastí na lehkém řetězci Ig



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

klasifikace podle typu těžkých řetězců

Typy imunoglobulinů	Těžký řetězec	Funkce	Proporce
IgM	μ	aktivuje komplement	5%
IgD	δ	Uvolňování histaminu, podíl na alergiích	1%
IgG	γ	aktivuje komplement	80%
IgA	α	součást slin a sekretů	14%
IgE	ϵ	alergické reakce	<1%

Komplement - systém sérových proteinů aktivovaných komplexy 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)

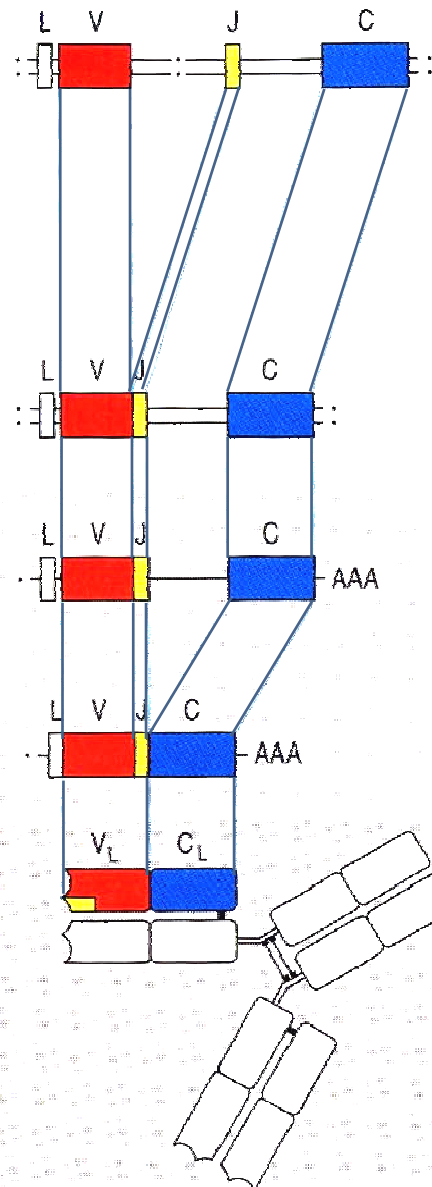
Těžké řetězce (heavy)

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

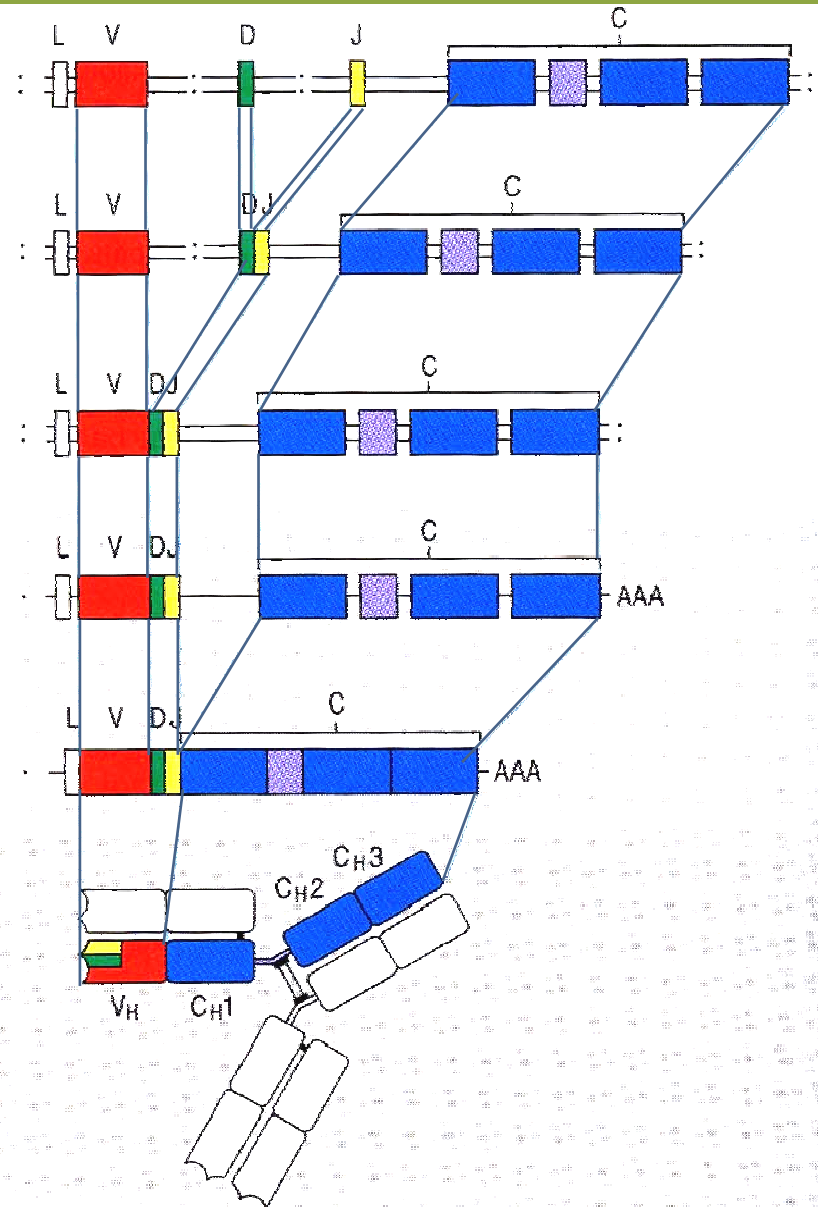
↓ ↓ ↓ ↓ ↓
IgM IgG IgA IgD IgE (5 Ig tříd)

Skupina imunoglobulinů stejného typu těžkého řetězce tvoří imunoglobulinovou třídu

Lehký řetězec



Těžký řetězec



DNA

RNA

Protein

Germline DNA

Somatic recombination

D-J joined rearranged DNA

Somatic recombination

V-J or V-DJ joined rearranged DNA

Transcription

Primary transcript RNA

Splicing

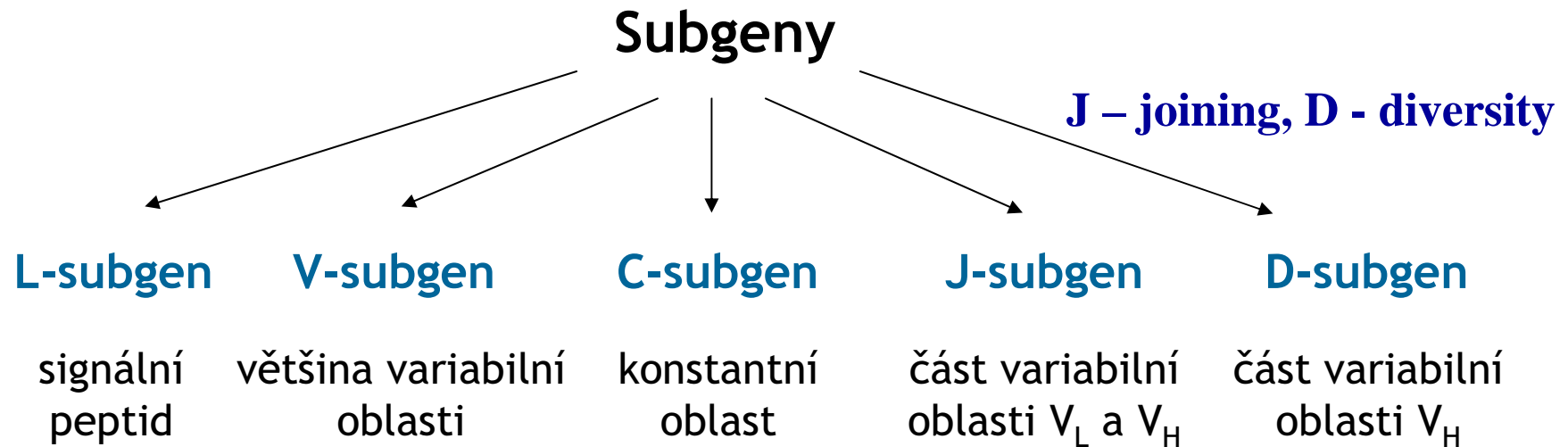
mRNA

Translation

Polypeptide chain

Subgeny = úseky genů pro imunoglobuliny

Genové segmenty

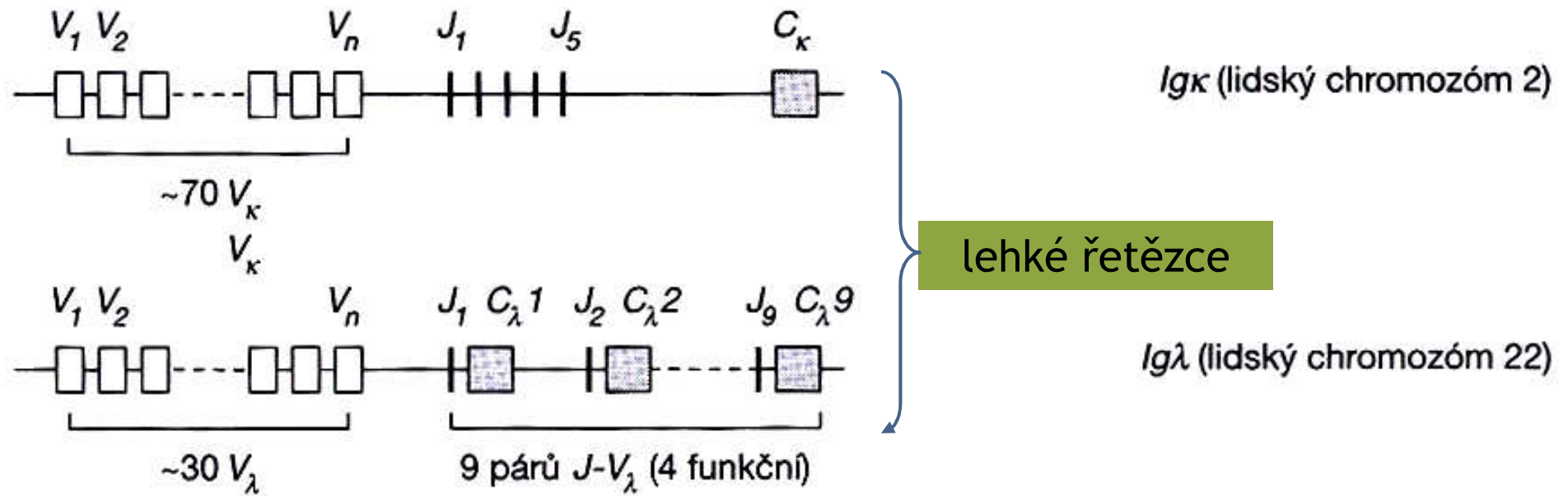
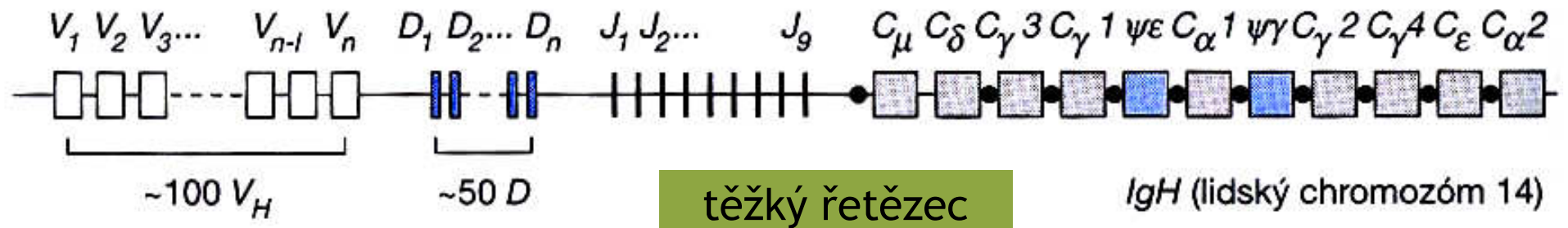


Obecná sestava genů

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

Procesy upravující geny pro tvorbu protilátek

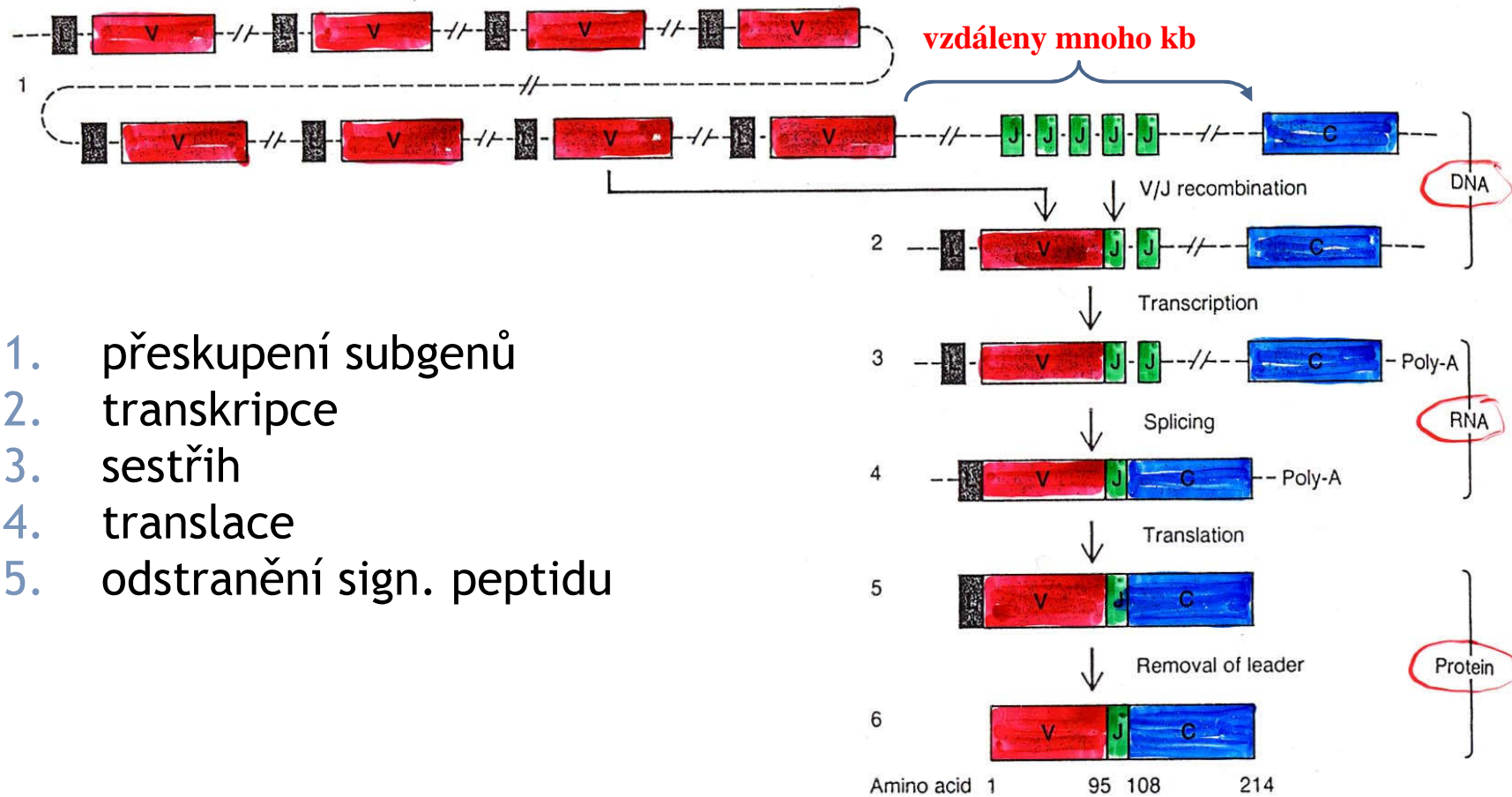
Změny na úrovni DNA: přeskupování subgenů

- a) kódujících variabilní oblasti (**V-J; V-D-J**) – dosažení vysoké vazebné specifity protilátky vůči antigenu
- b) kódujících konstantní oblasti (výběr C subgenů) – optimalizace efektorových funkcí

2. Změny na úrovni transkripce: **alternativní sestřih, alternativní zakončení transkripce**: přechod membránově vázané formy protilátky na sekretovanou, přechod IgM na IgG

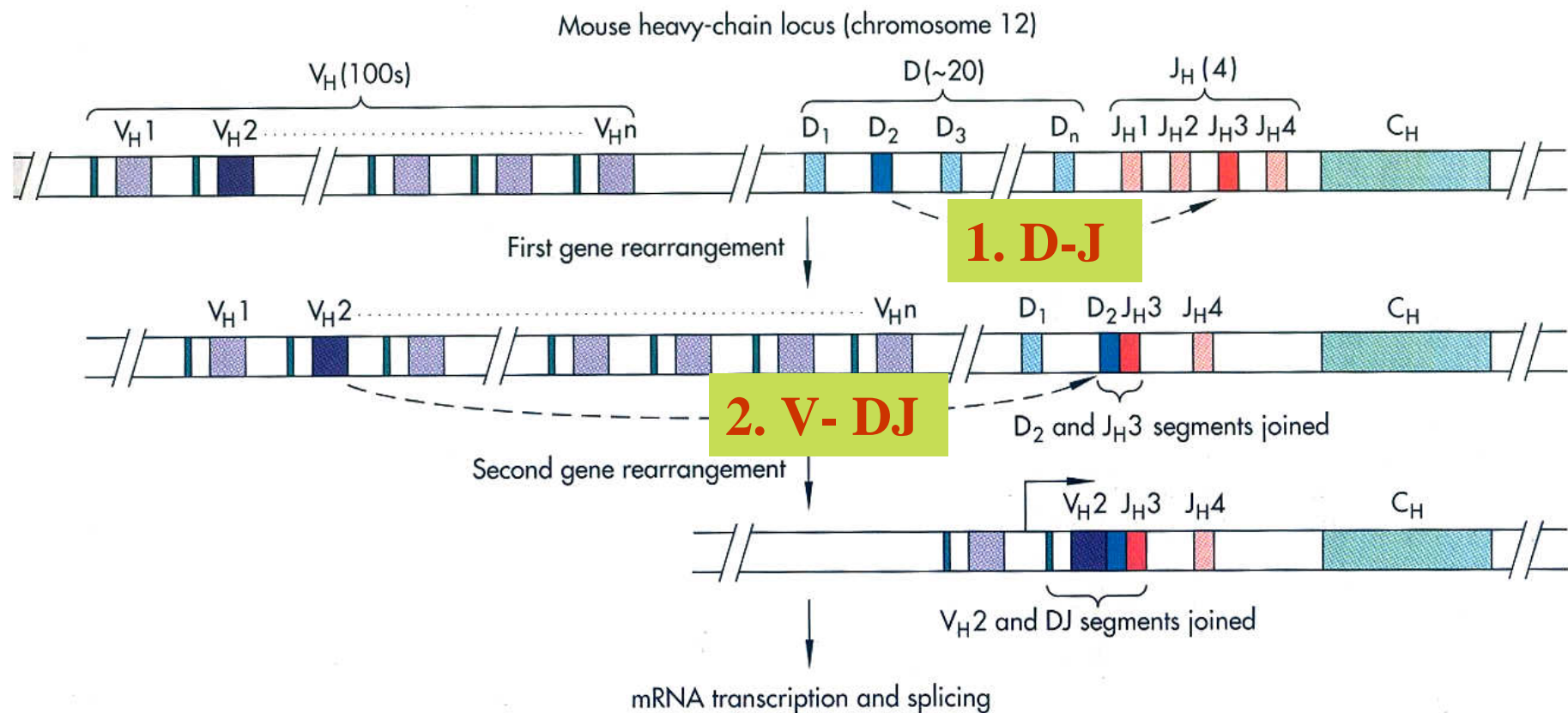
3. Aktivace rodičovských genů: **alelická a izotypová exkluze**

Expresse genu pro lehký imunoglobulinový řetězec



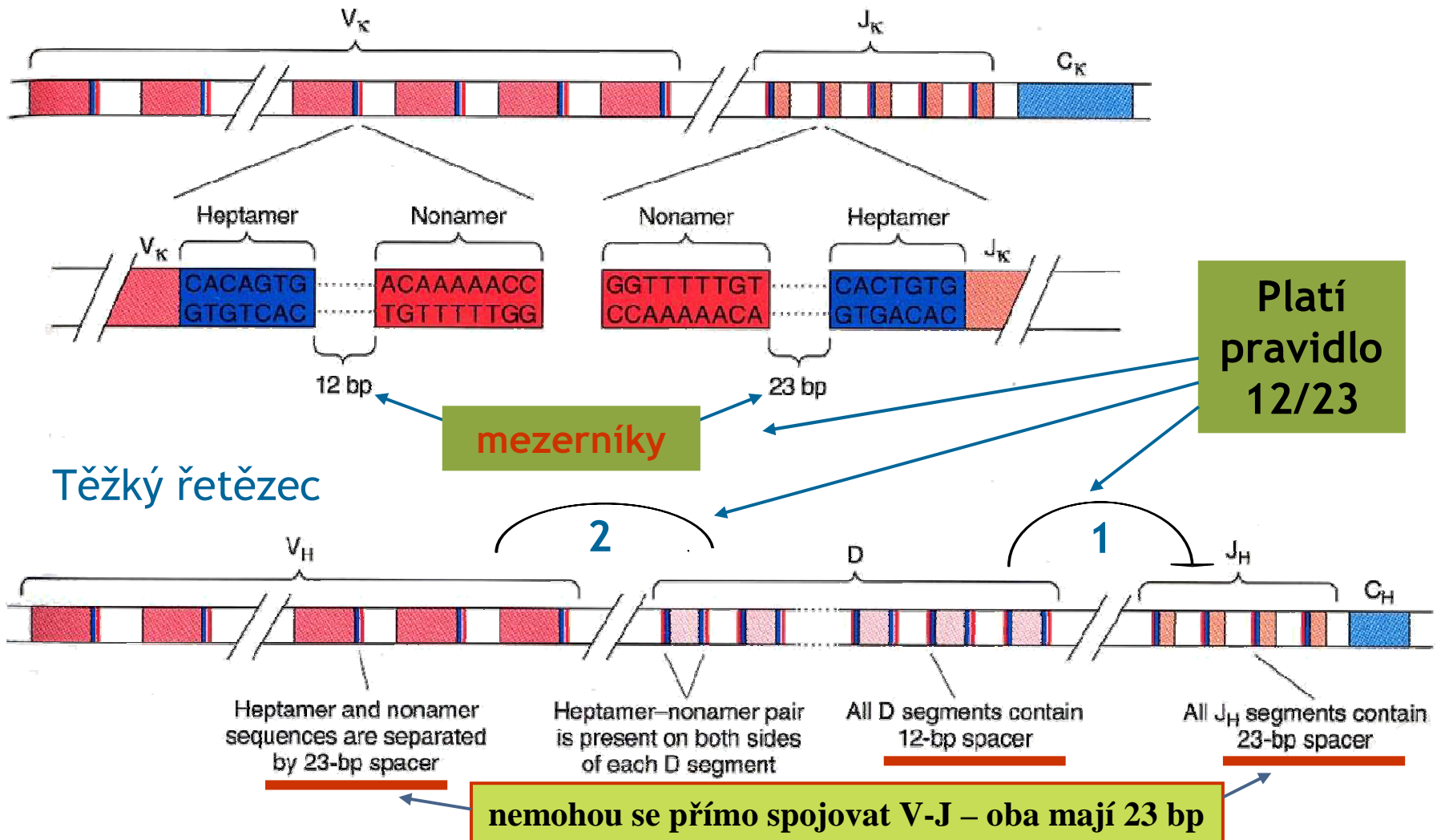
1. přeskupení subgenů
2. transkripce
3. sestřih
4. translace
5. odstranění sign. peptidu

Přeskupování subgenů pro těžký imunoglobulinový řetězec

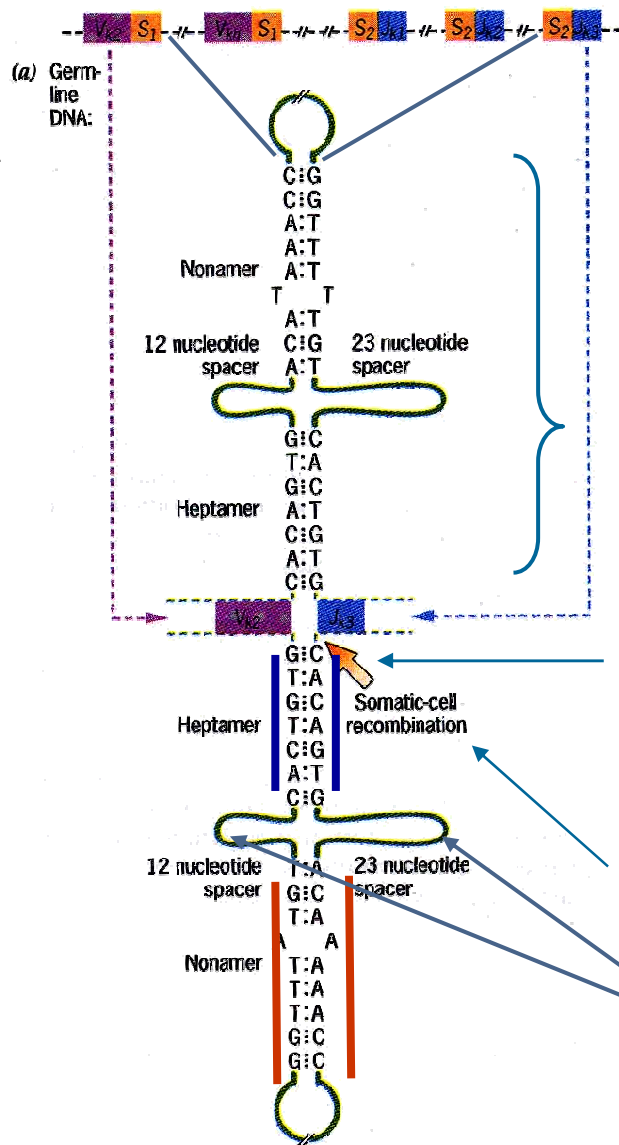


Molekulární mechanismus přeskupování subgenů

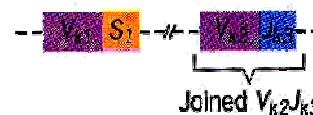
Lehký řetězec kappa v zárodečné linii



Přeskupení subgenů procesem V-J somatické rekombinace



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



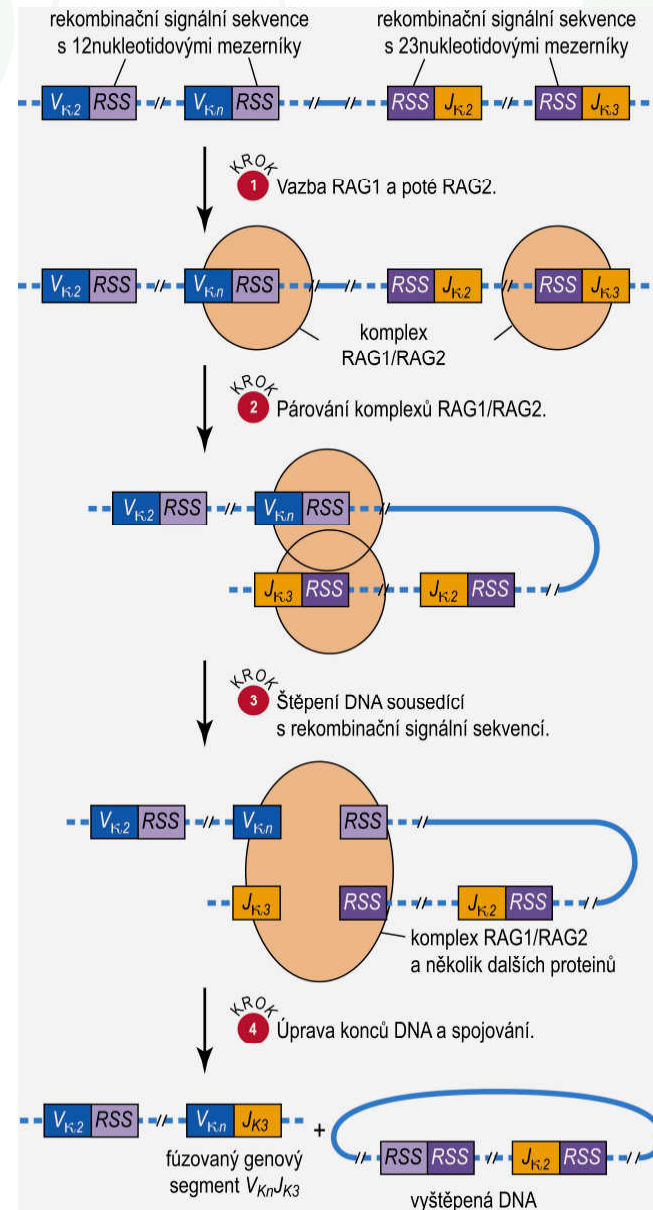
Heptamer-mezerník-nonamer
= recombination signal sequence (RSS)

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

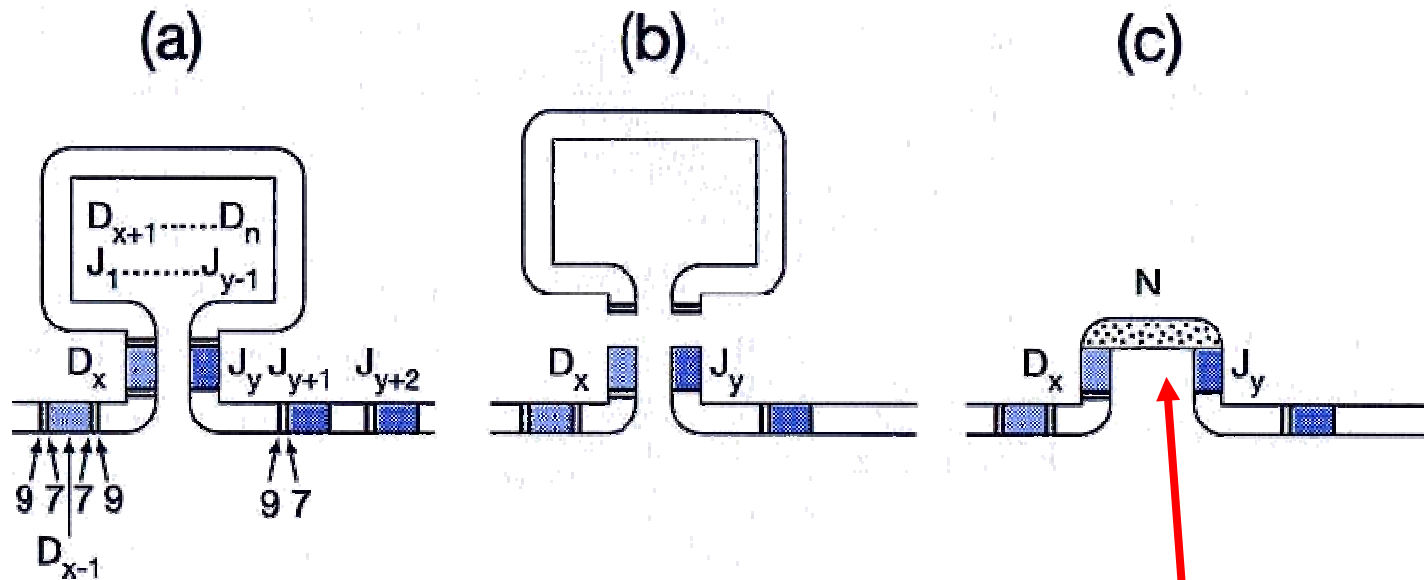
vznik nepřesných spojení

12 a 23 bp mezerníky

Spojování genových segmentů J a V

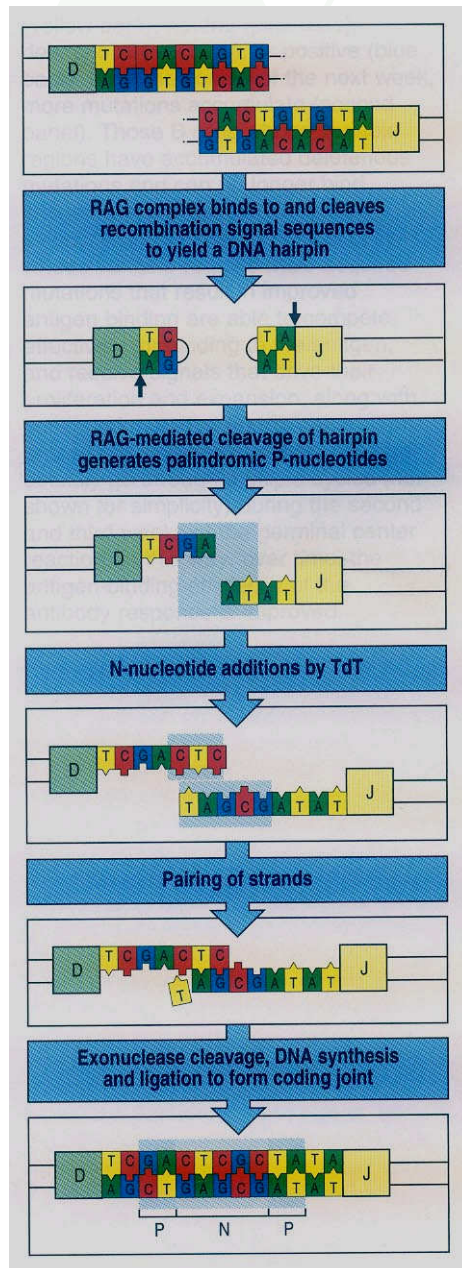


Schematické znázornění vzniku nepřesných spojení mezi D a J



- 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

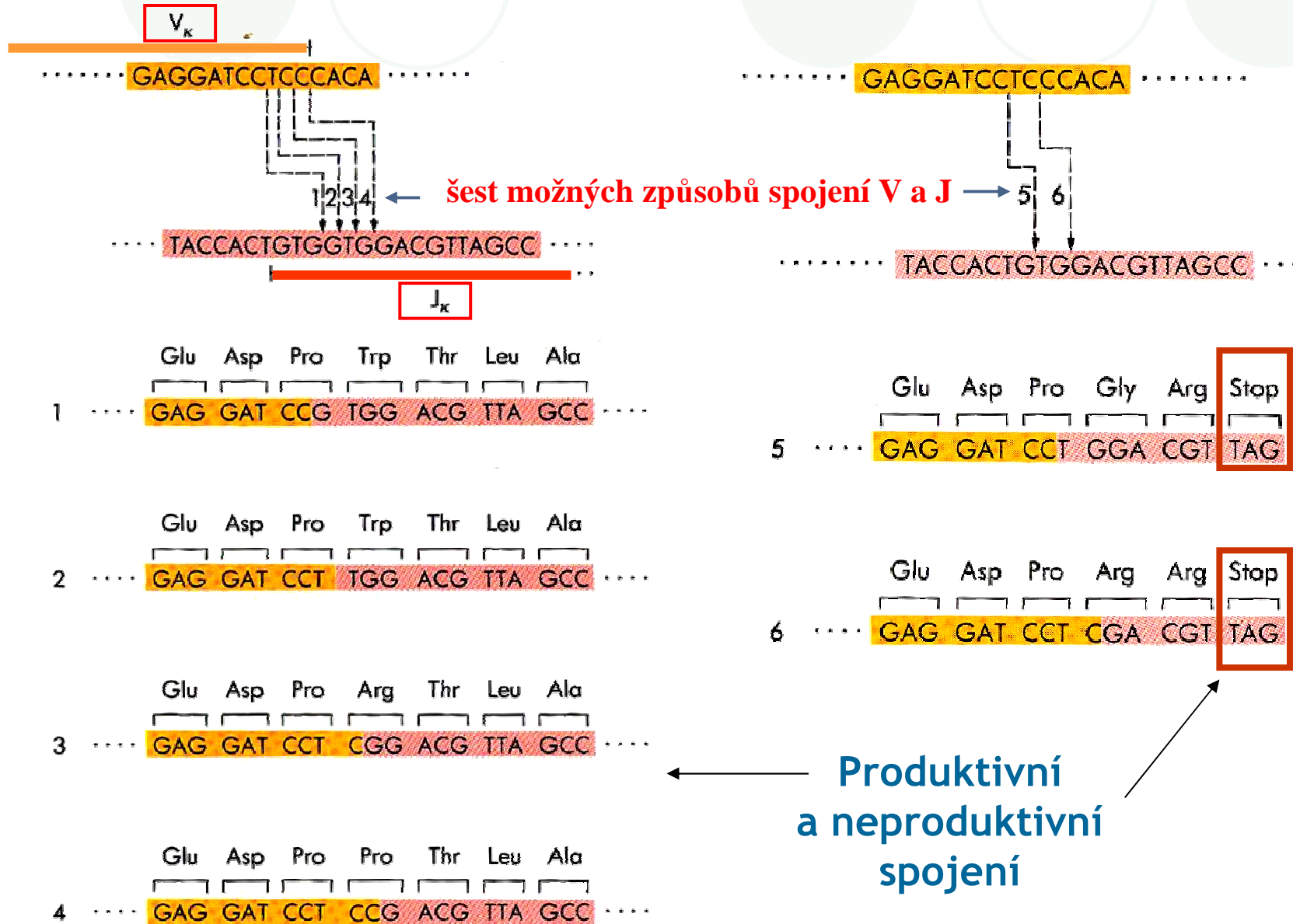
Terminální deoxynukleotidyl transferáza (TdT) připojuje náhodně nukleotidy (N) na konce jednořetězců

Nespárované nukleotidy jsou odstraněny exonukleázou a jsou nahrazeny reparační syntézou

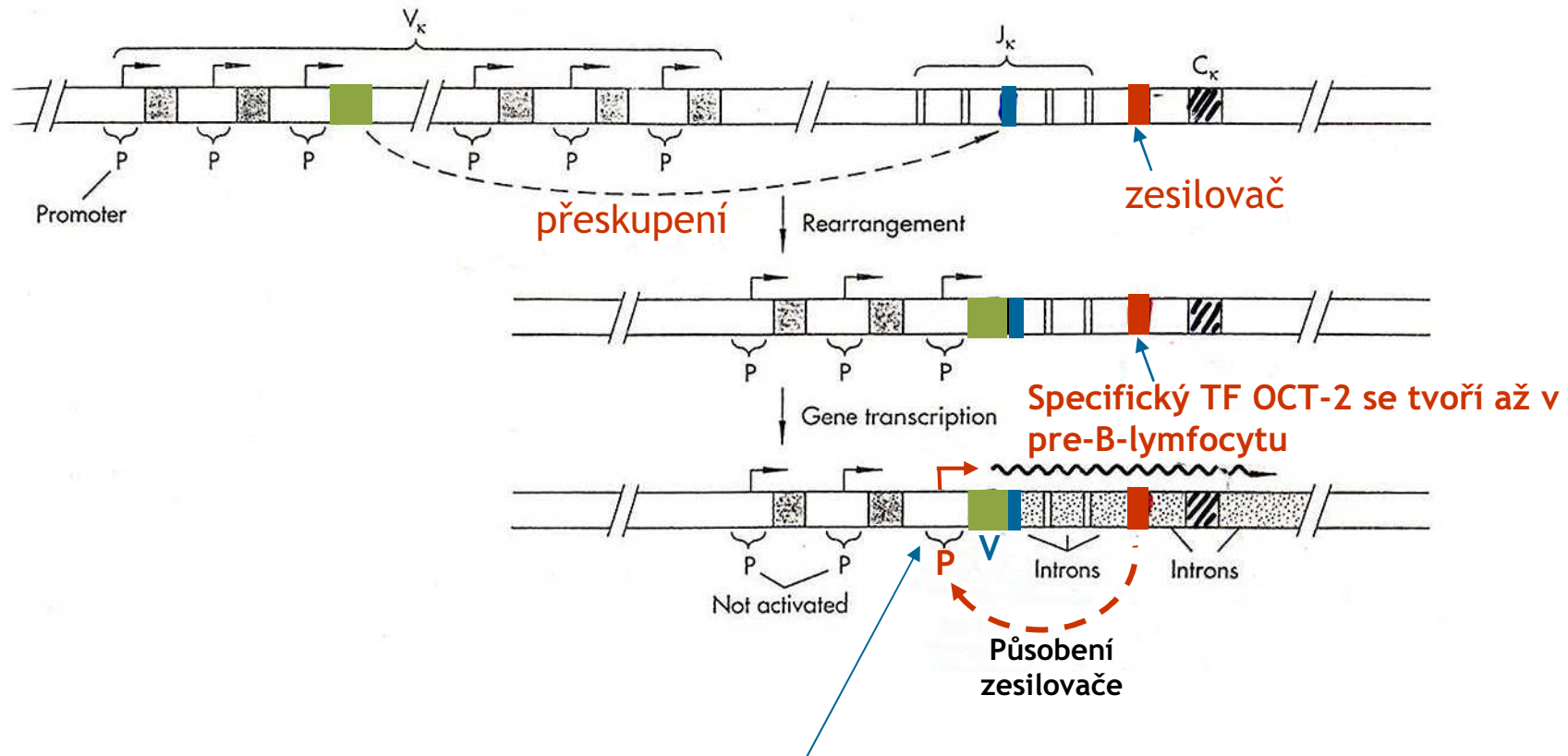
P = palindromové nukleotidy tvořící vlásenku,

N = „netemplátové“ nukleotidy

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



Aktivace transkripce po přeskupení subgenů



Transkripce probíhá jen z promotoru toho V subgenu, který je nejbližší 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 (terminátory)

B. Přesmyk na úrovni DNA

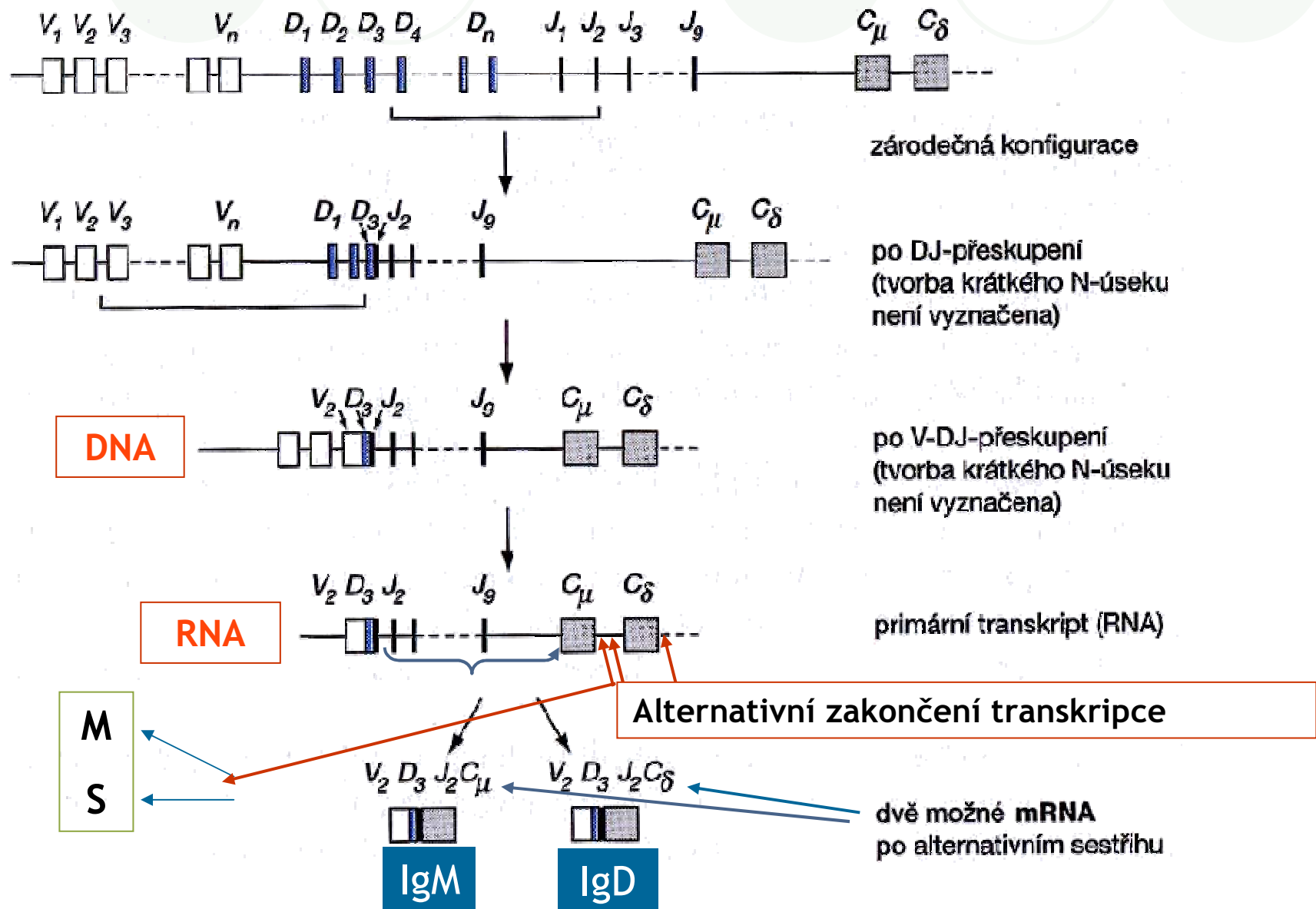
- vytvořený exon L-VDJ_H se připojuje k různým subgenům C po delecii sekvence mezi J a některými C
- přesmyk je řízen signály přesmyku (S) = sekvence na 5' konci C_H subgenů za účasti enzymů

Charakteristika izotypů lidských imunoglobulinů

Izotyp	M.h. (kDa)	Obsah v séru (g/l)	Lokalizace	Biologický poločas (dny)	Funkce
IgG	155	8–18	sérum, intersticiální tekutina	21	opsonizace; neutralizace; přestupuje placentu; sekundární odpověď
IgA	160–1000	0,9–3,5	sérum, slzy, sliny, povrch sliznic, mléko	6	ochrana sliznic, opsonizace
IgM	900	0,9–2,5	sérum, povrch B-buněk	6	aktivace komplementu; primární odpověď; receptor pro antigen
IgD	180	0,1	sérum, povrch B-buněk	3	receptor pro antigen
IgE	190	3×10^{-4}	sérum, intersticiální tekutina	2	ochrana proti parazitům

Převzato: Hořejší, Bartůňková 2002

Průběh přeskupování subgenů a alternativní sestřih hnRNA u těžkých řetězců - změny na úrovni transkripce



Formy protilátek (imunoglobulinů)

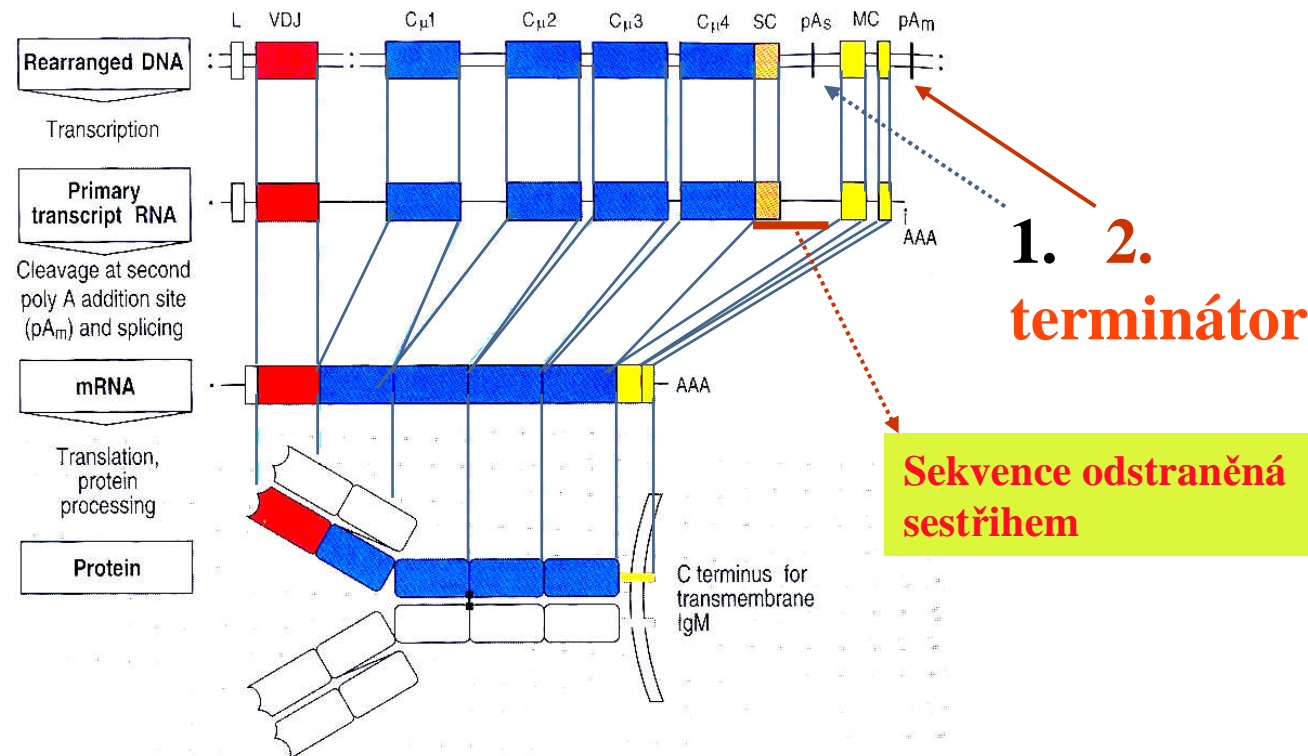
Dvě formy protilátek (imunoglobulinů)

- **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 MC -
sekvence určující zakotvení v
membráně

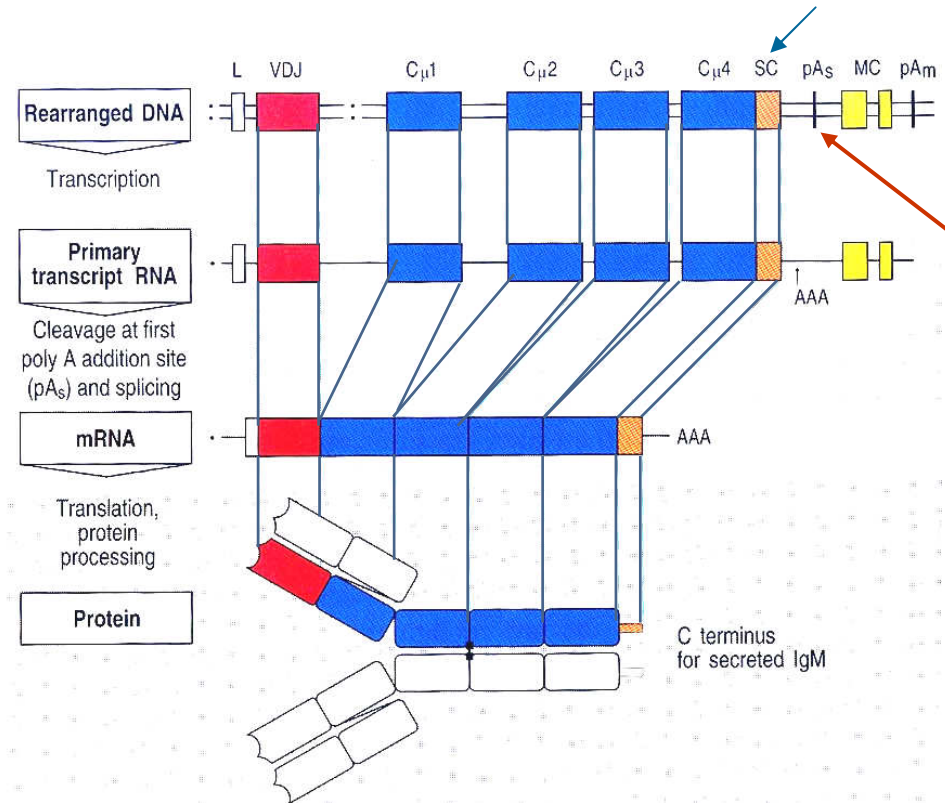


Transkripce končí na druhém (vzdálenějším) terminátoru a sestřihem je odstraněn úsek RNA kódující hydrofilní aminokyseliny (SC). Vytváří se protilátka IgM, která je ukotvena v membráně.

Vznik sekretované formy IgM

sekretovaná forma

Secretion-coding sequence
Sekvence určující uvolnění
protilátky z buňky

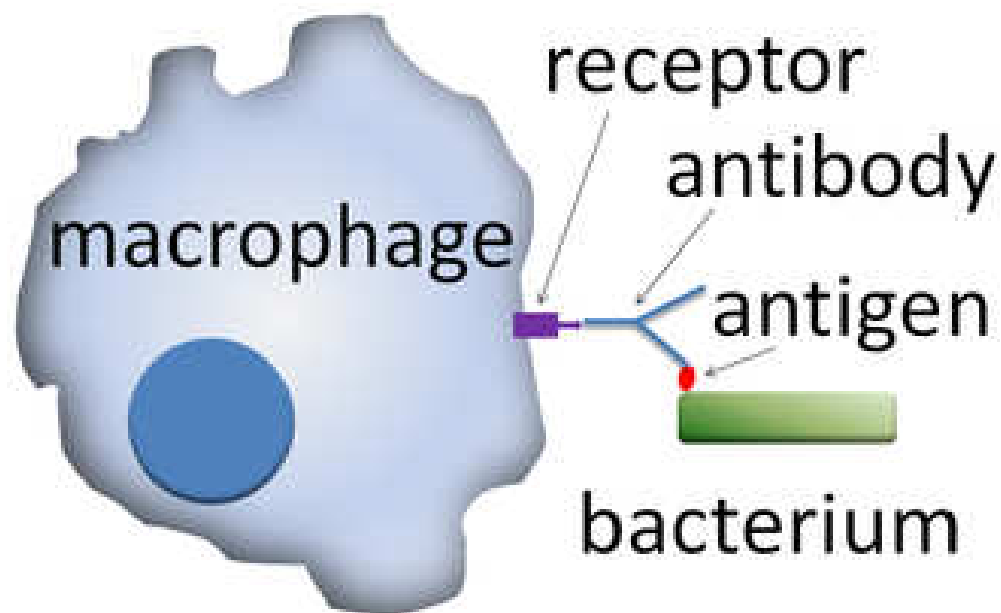


1. terminátor

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

Makrofág, který se pomocí svého Fc receptoru váže na protilátky, které opsonizují povrch bakterie

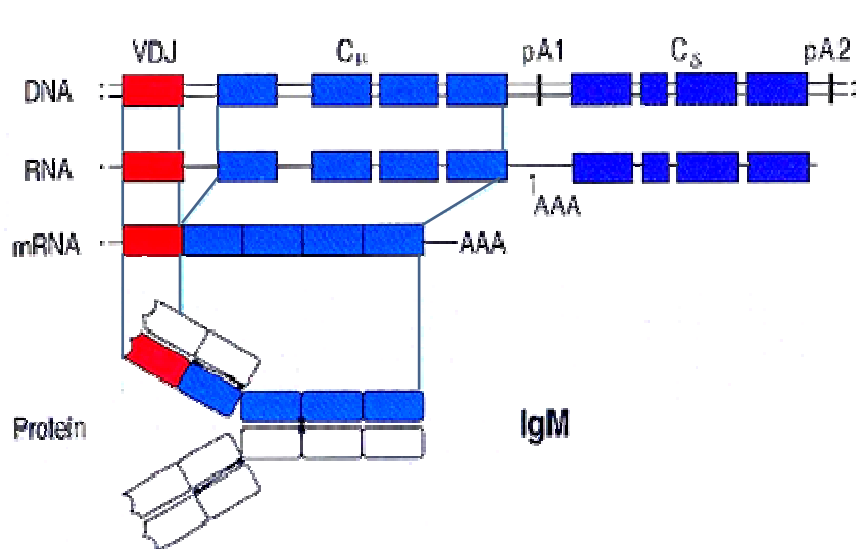


Opsonizace = navázání určitých látek na povrch antigenu, které navozuje jeho fagocytózu imunitními buňkami.

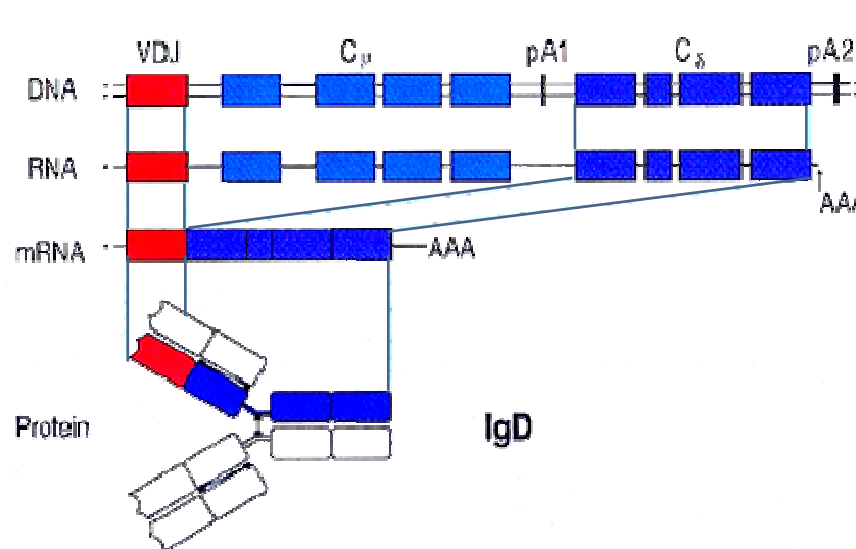
Opsoniny = látky, jež se vážou na povrch antigenů. Mezi nejčastější opsoniny patří protilátky a složky komplementu C

Koexprese IgM a IgD regulovaná úpravou transkriptu

Exprese IgM



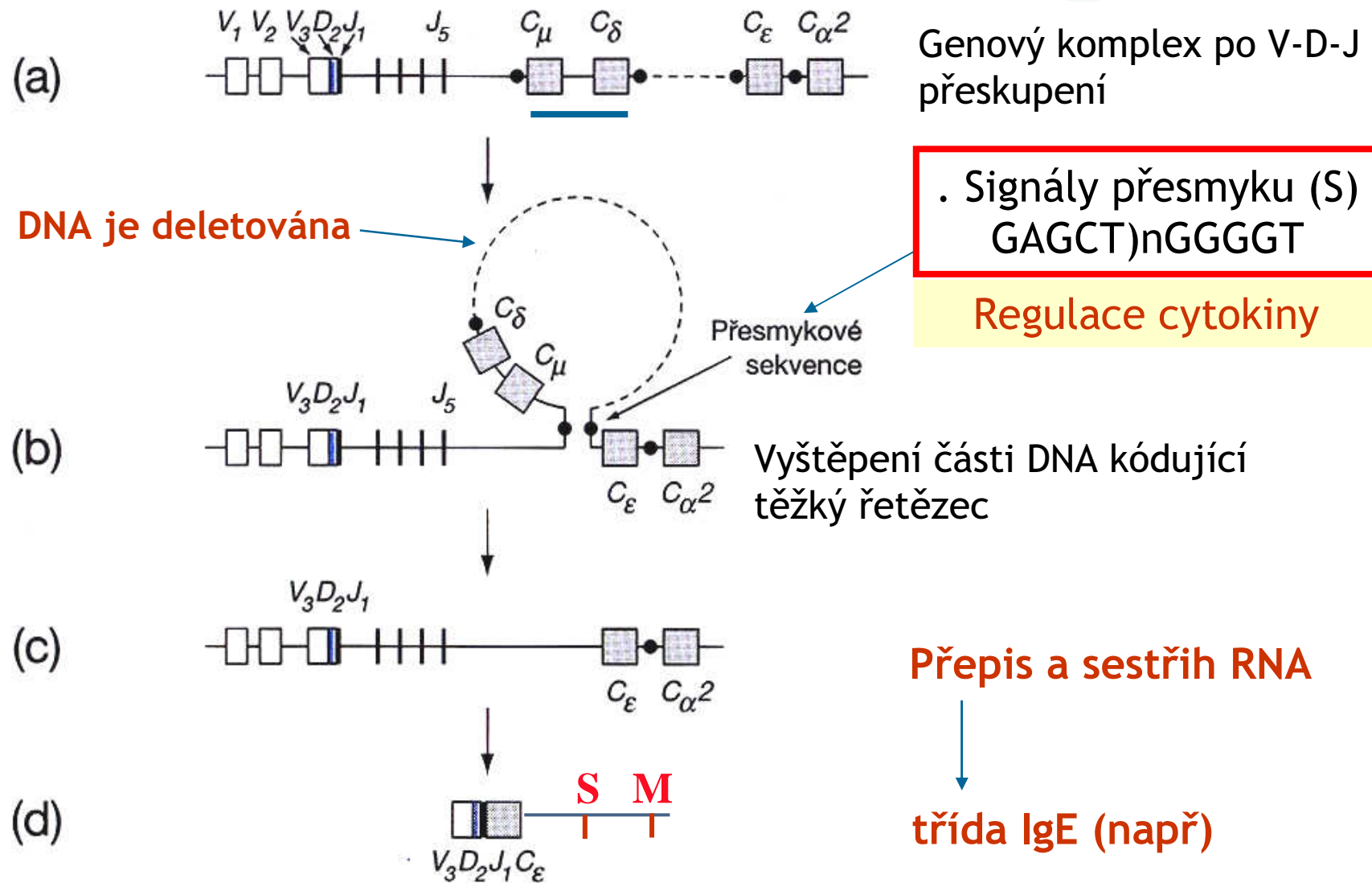
Exprese IgD



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

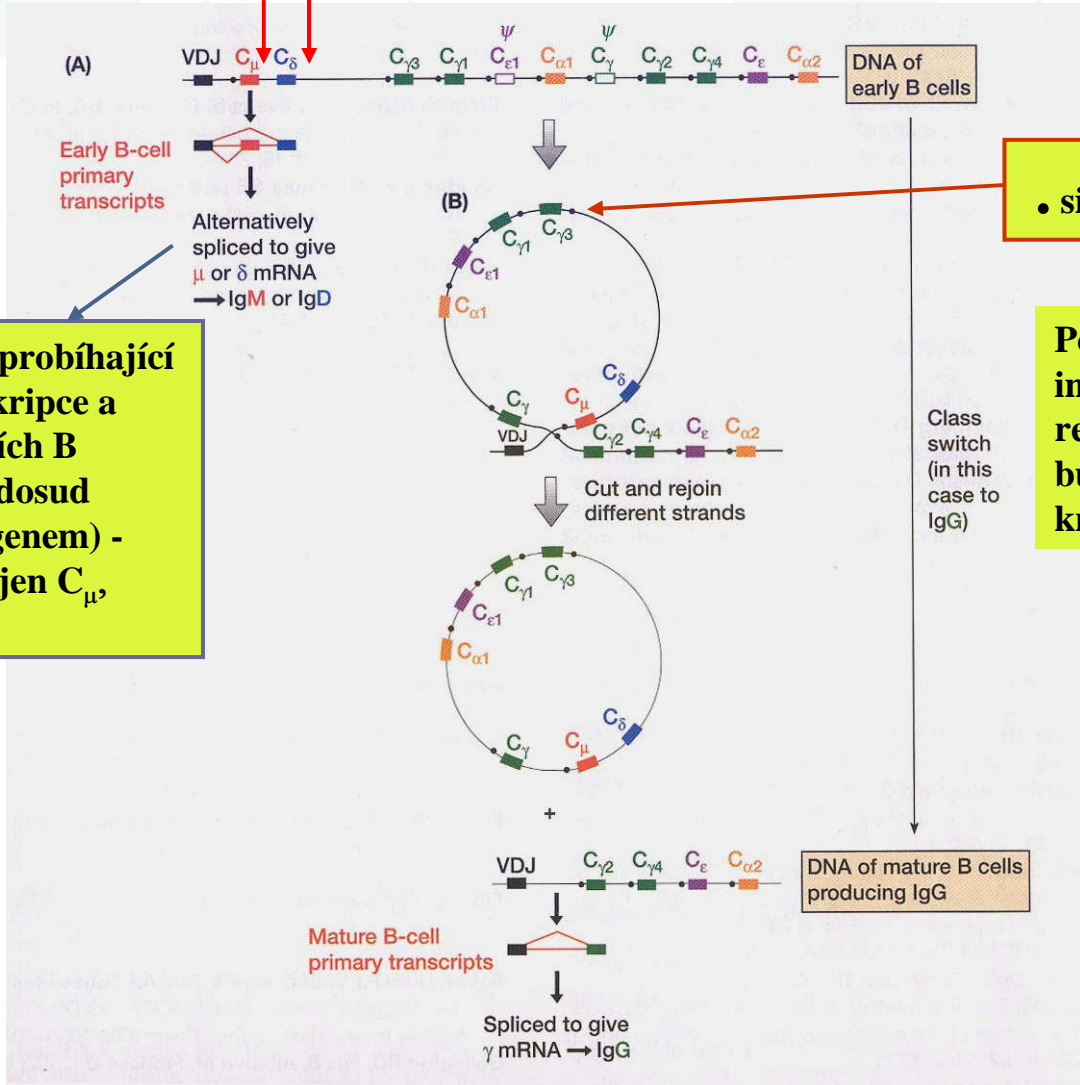
Oba způsoby transkripce mohou probíhat paralelně, takže v buňkách dochází k současné produkci IgM a IgD

Přesmyk tříd (izotypový přesmyk) při diferenciaci B lymfocytů



Přesmyky tříd probíhající u těžkých řetězců

chybí signál přesmyku

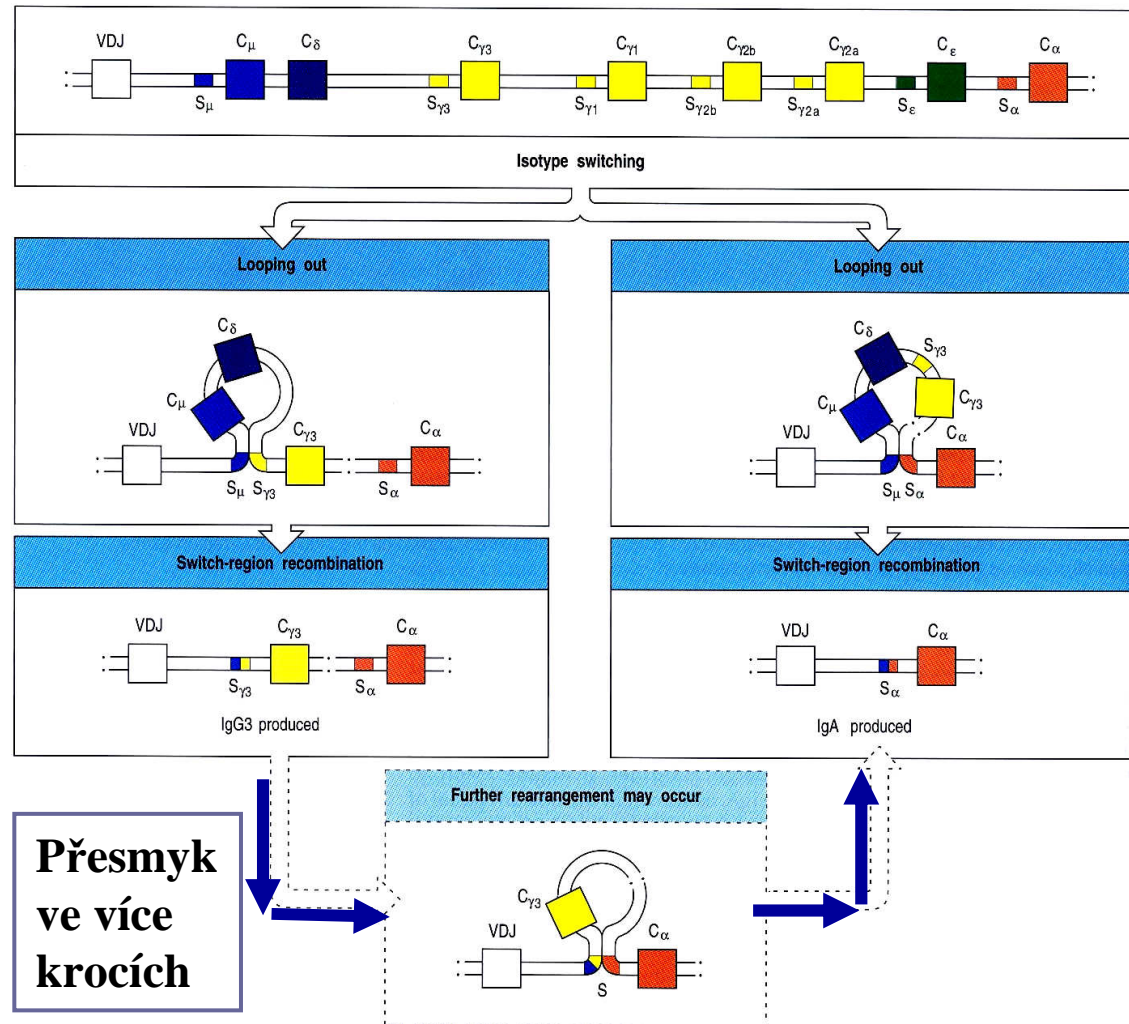


• signály přesmyku

Časný přesmyk probíhající na úrovni transkripce a sestřihu u naivních B buněk (které se dosud nesetkaly s antigenem) - nejdříve vzniká jen C_{μ} , později též C_{δ} .

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

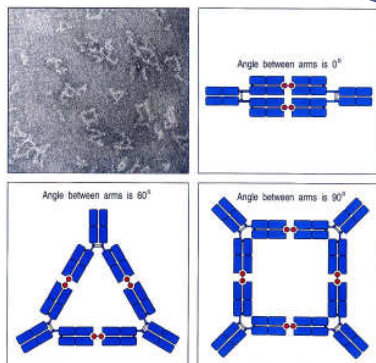
Alelická exkluze

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

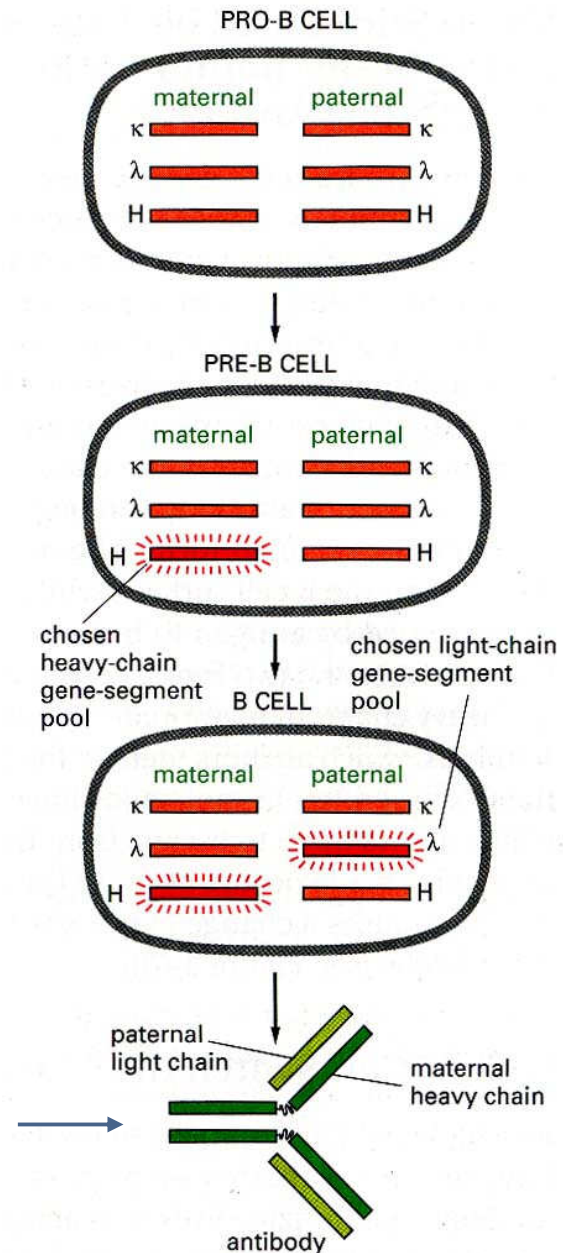
Izotypická exkluze

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

Výsledná buňka tvoří protilátku obsahující jedinečné vazebné místo pro antigen



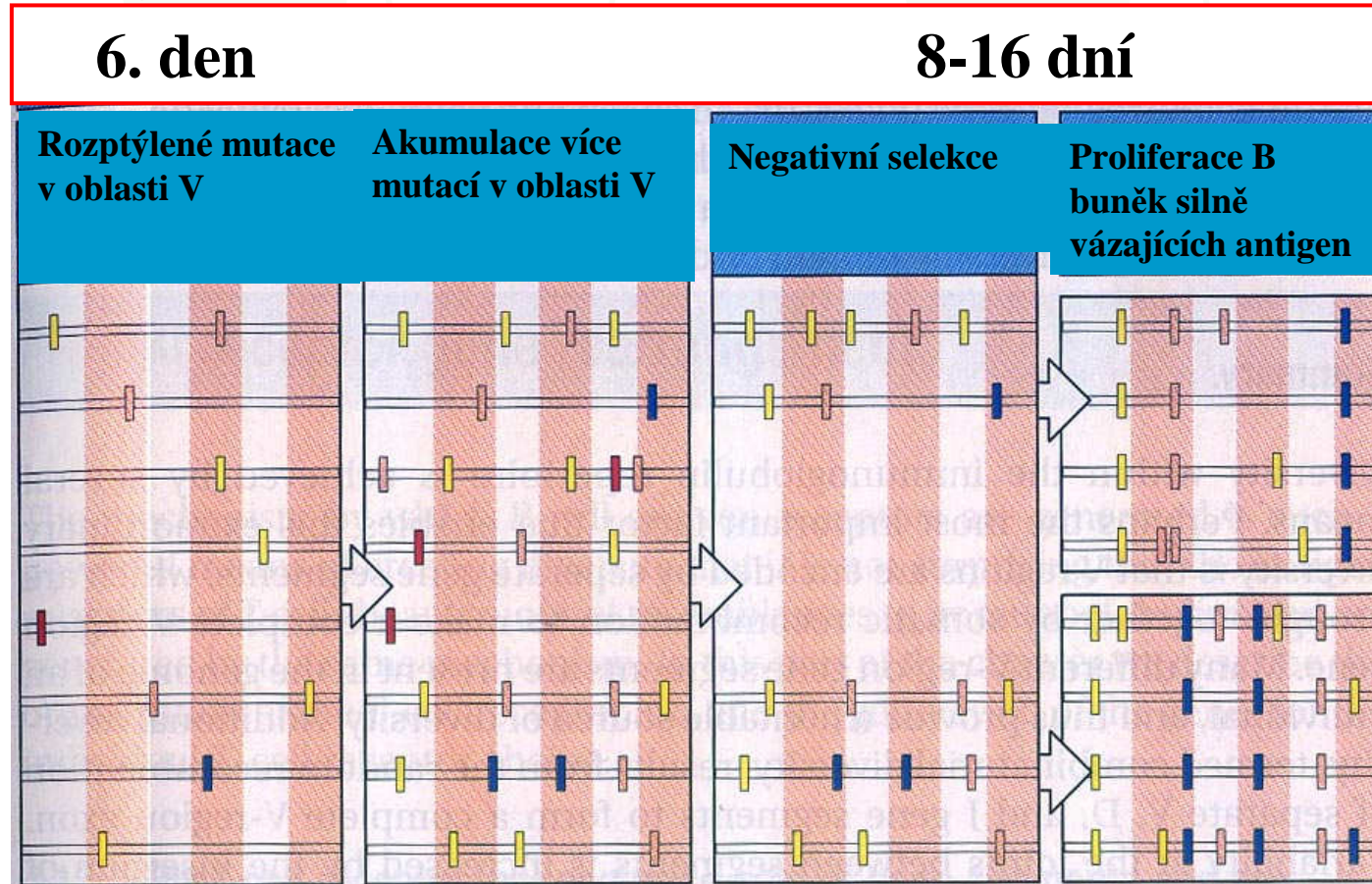
Monospecifická protilátka



Časový průběh vytváření H- a L-řetězců protilátek

1. Nejříve se v pre-B lymfocytu vytvoří těžký řetězec typu μ – 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 (ψ 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 řetězec typu κ . Pokud vznikne funkční L řetězec, zastaví se přeskupování druhé alely κ . Pokud ne, začnou se obdobně přeskupovat alely λ . 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 (**afinitní maturace**)



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

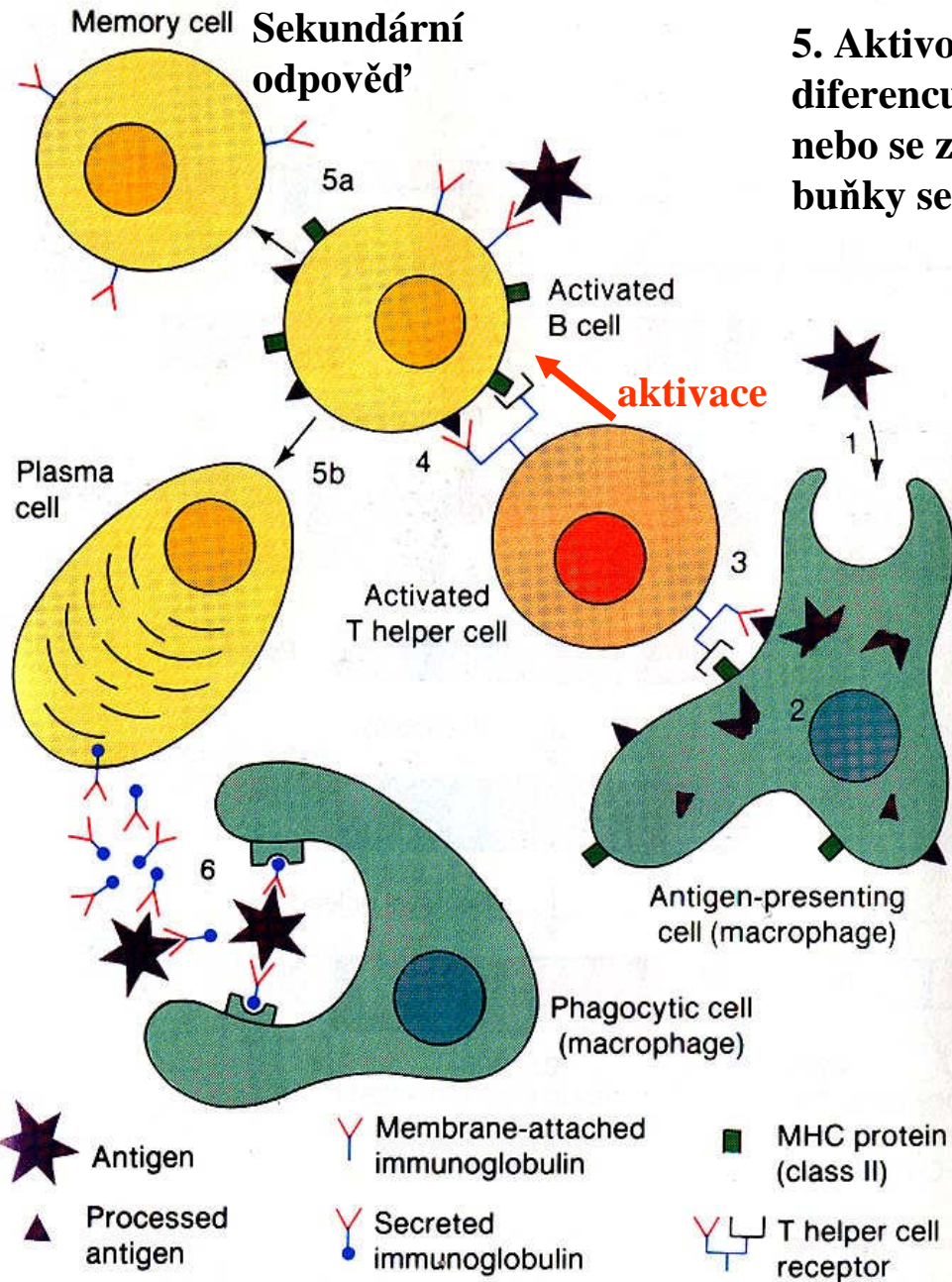
Deaminace cytozinu na uracil, pak reparace

Příčina rozmanitosti protilátek (specifita vazby antigenů)

- 1. Přeskupování V-D-J-subgenů - somatická rekombinace, náhodné spojování V, D a J**
- 2. Nepřesná spojení V-J (V-D-J) - delece, inserce, reparace v místech spojování subgenů**
- 3. Kombinace lehkých a těžkých řetězců - náhodný proces**
- 4. Somatické hypermutace v okolí V - vysoká frekvence mutací po styku zralého B-lymfocytu s antigenem**

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)

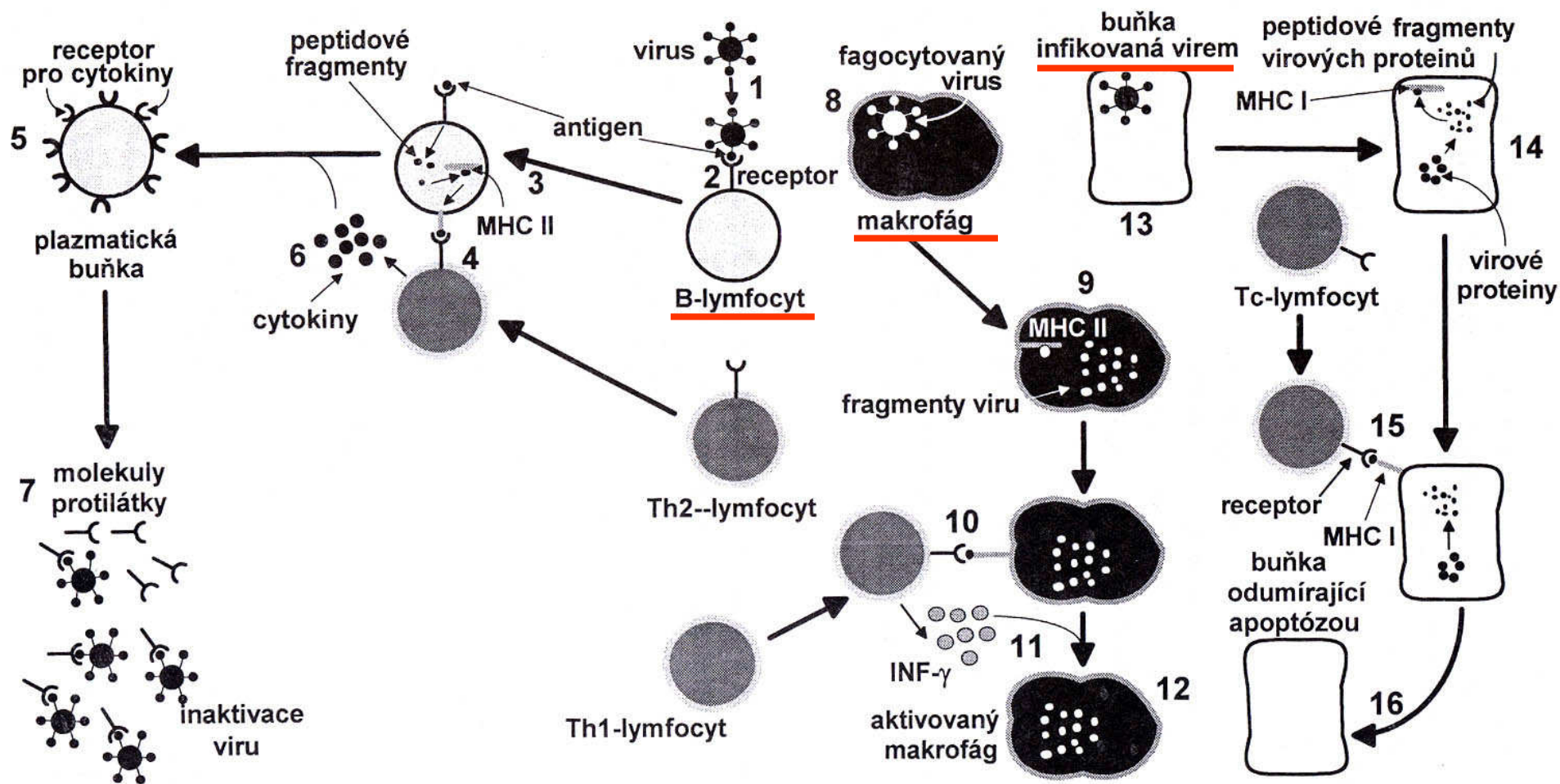
Funkce MHC glykoproteinů

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

Globální schema humorální a buněčné imunitní odpovědi

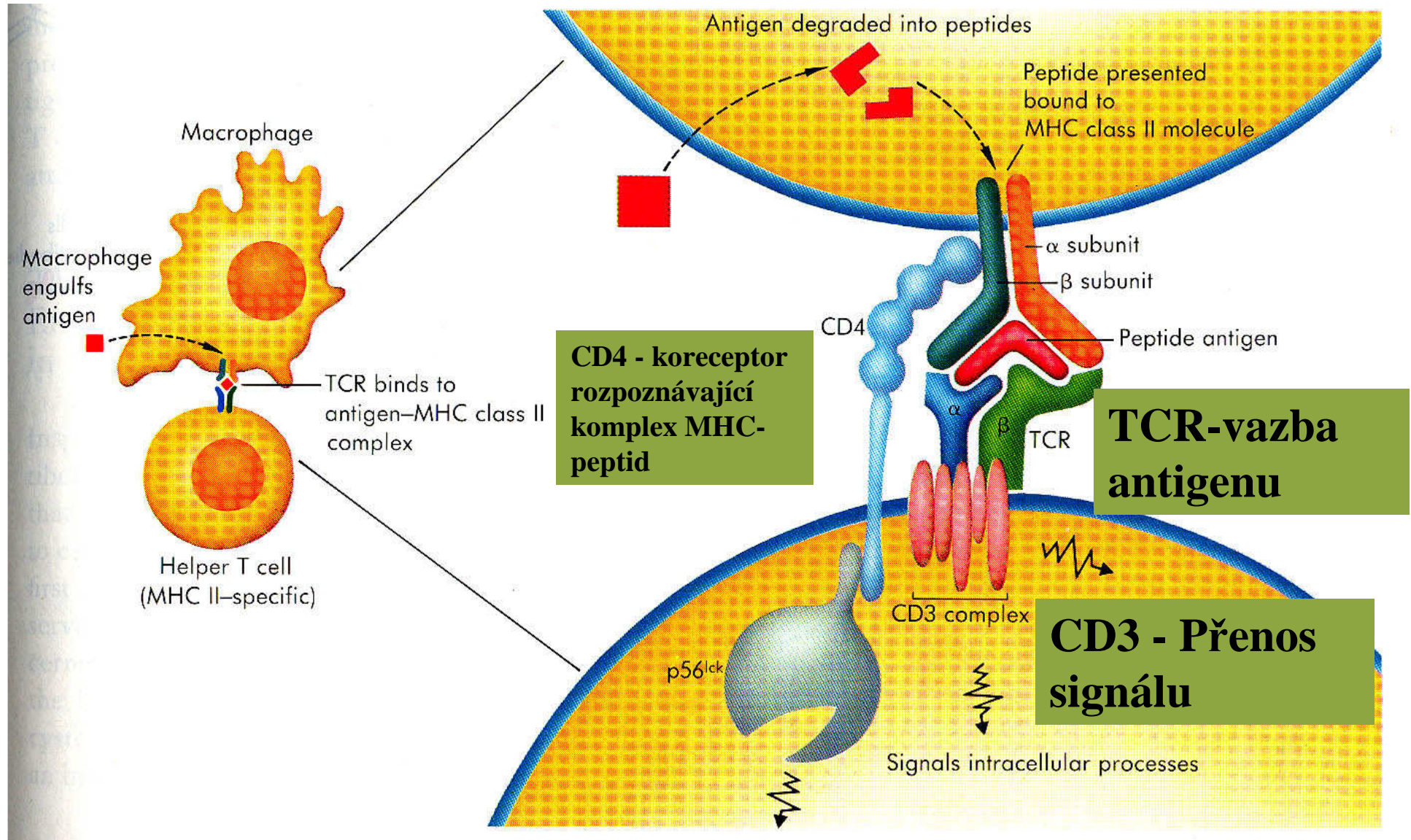


Humorální imunita - zprostředkovaná B-lymfocyty (3,5,7)

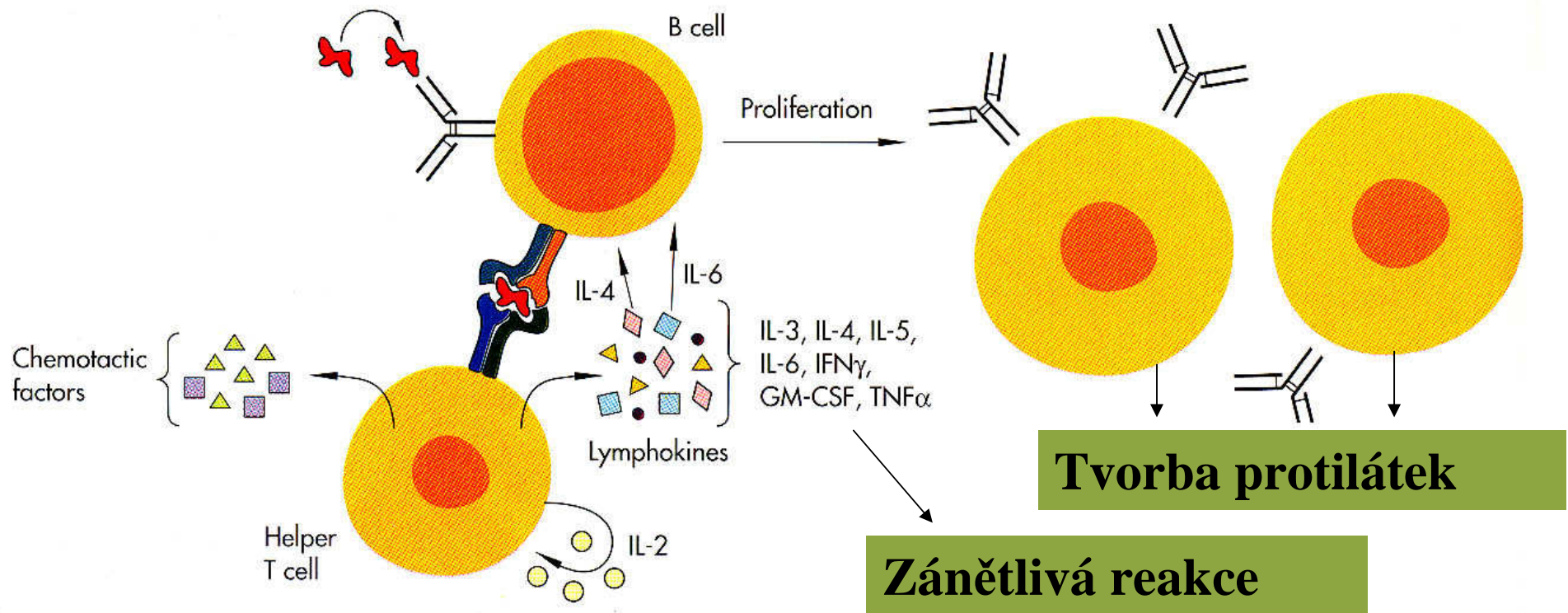
Buněčná imunita - zprostředkovaná T-lymfocyty

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 faktóir, IFN- interferon

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.

