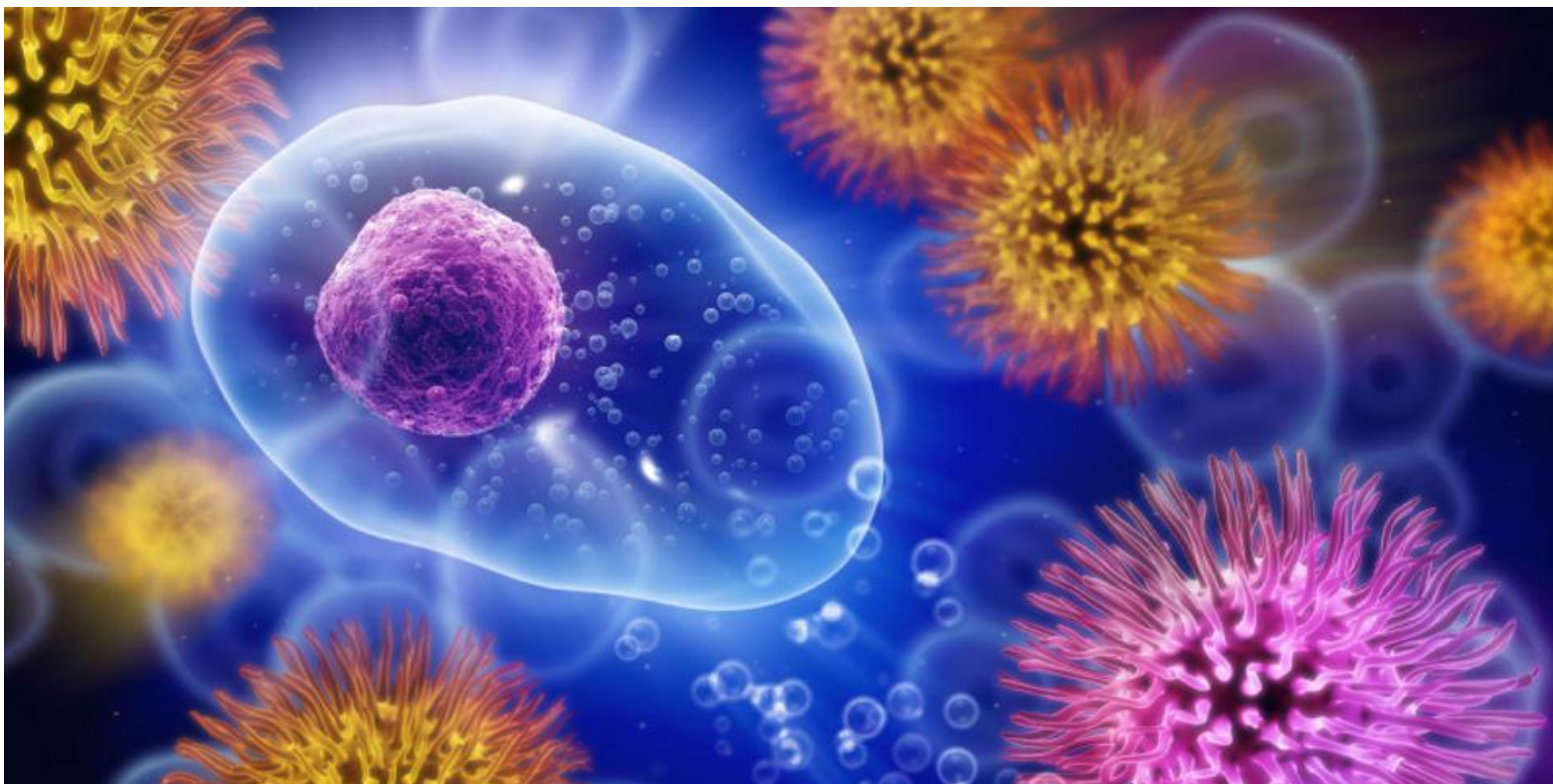
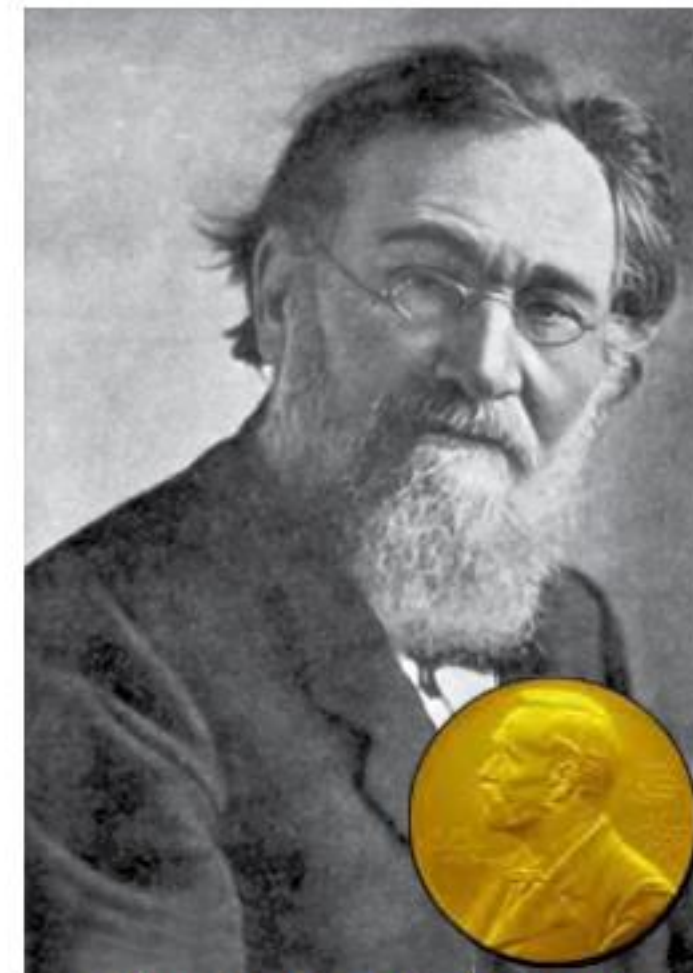
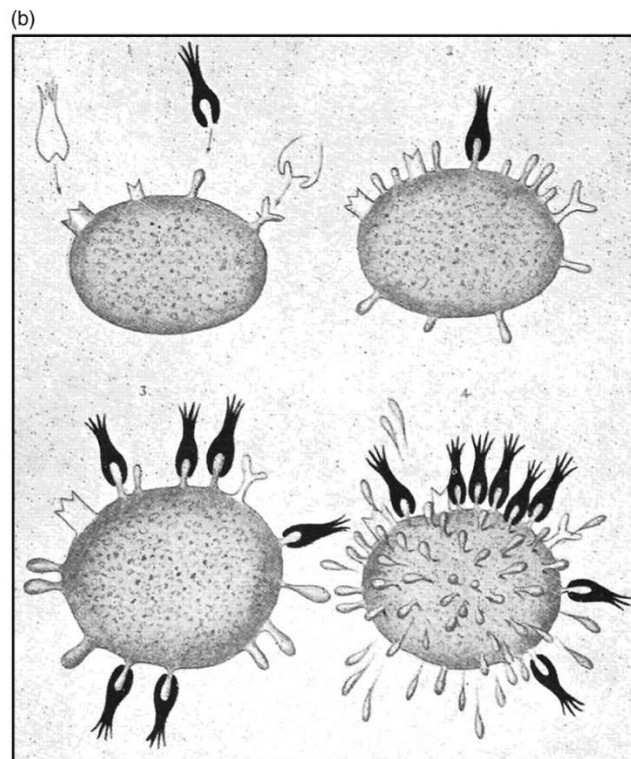
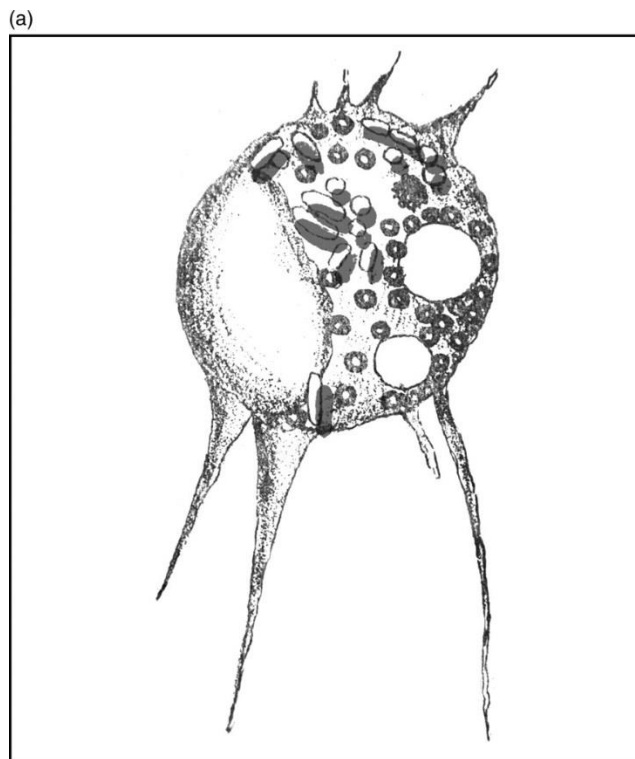


Protivirová imunita



Koncept imunity proti patogenům je znám po více než 100 let

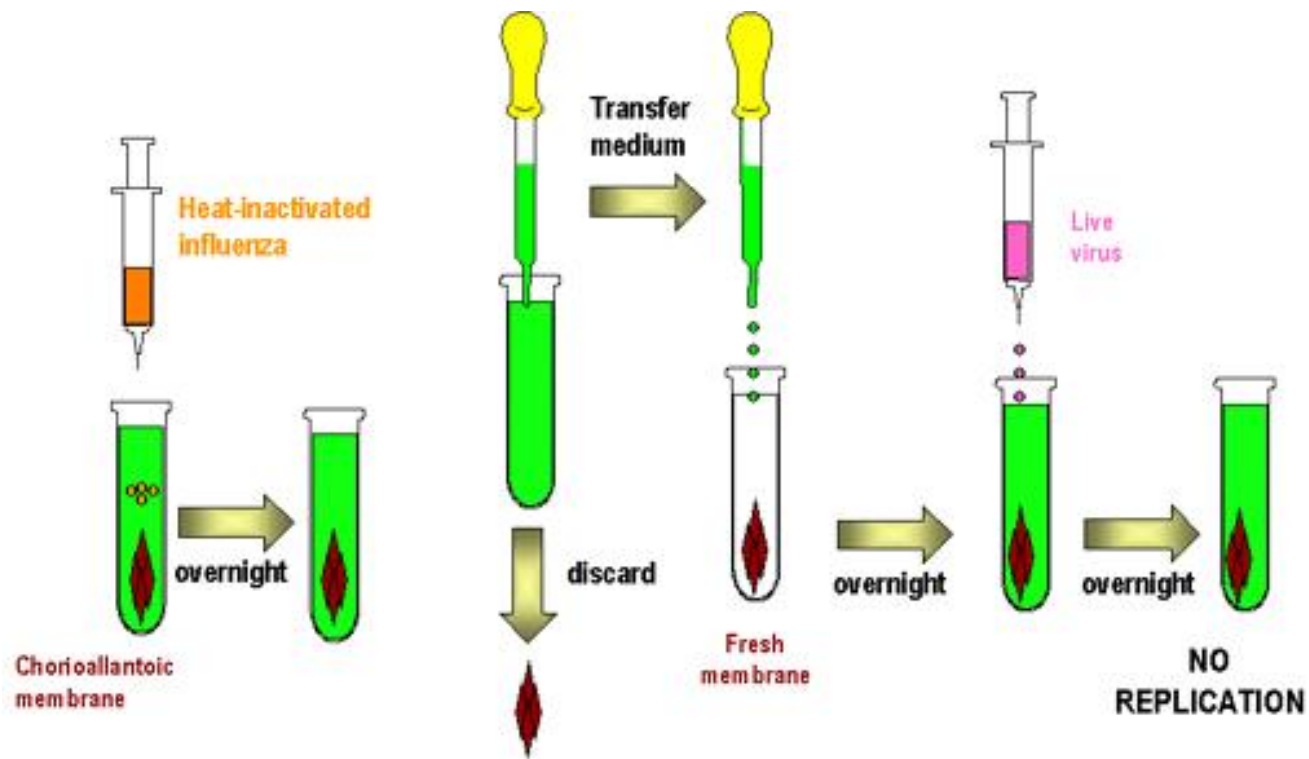
- rozpoznání schopnosti fagocytů zaútočit a zneškodnit invadující mikroby



**Ilya Ilyich Mechnikov
(Elie Metchnikoff)
(1845-1916)**

Interferony

- nejvýznamnější mechanismus široké obrany proti virové nákaze



The Discovery of Interferon

From Isaacs and Lindenmann, Proc. Roy Soc B, 1957

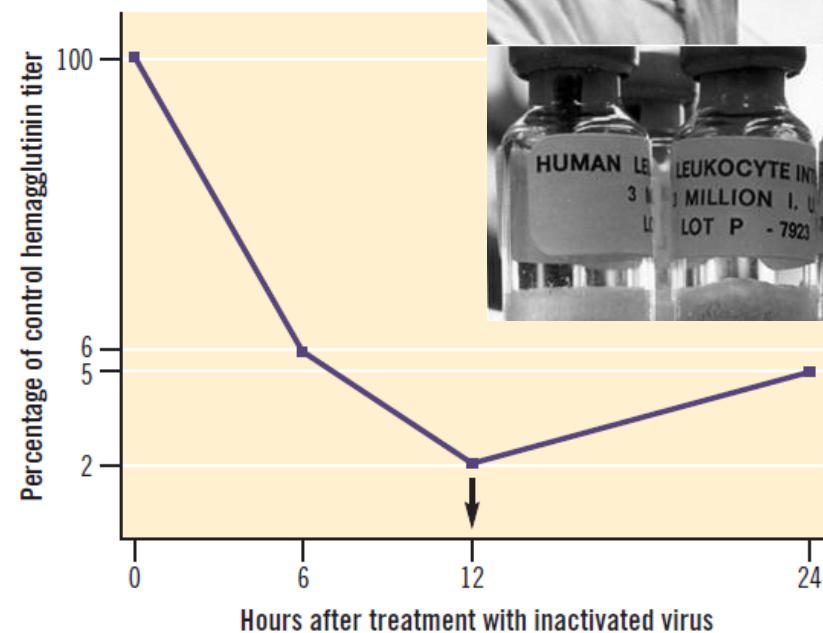
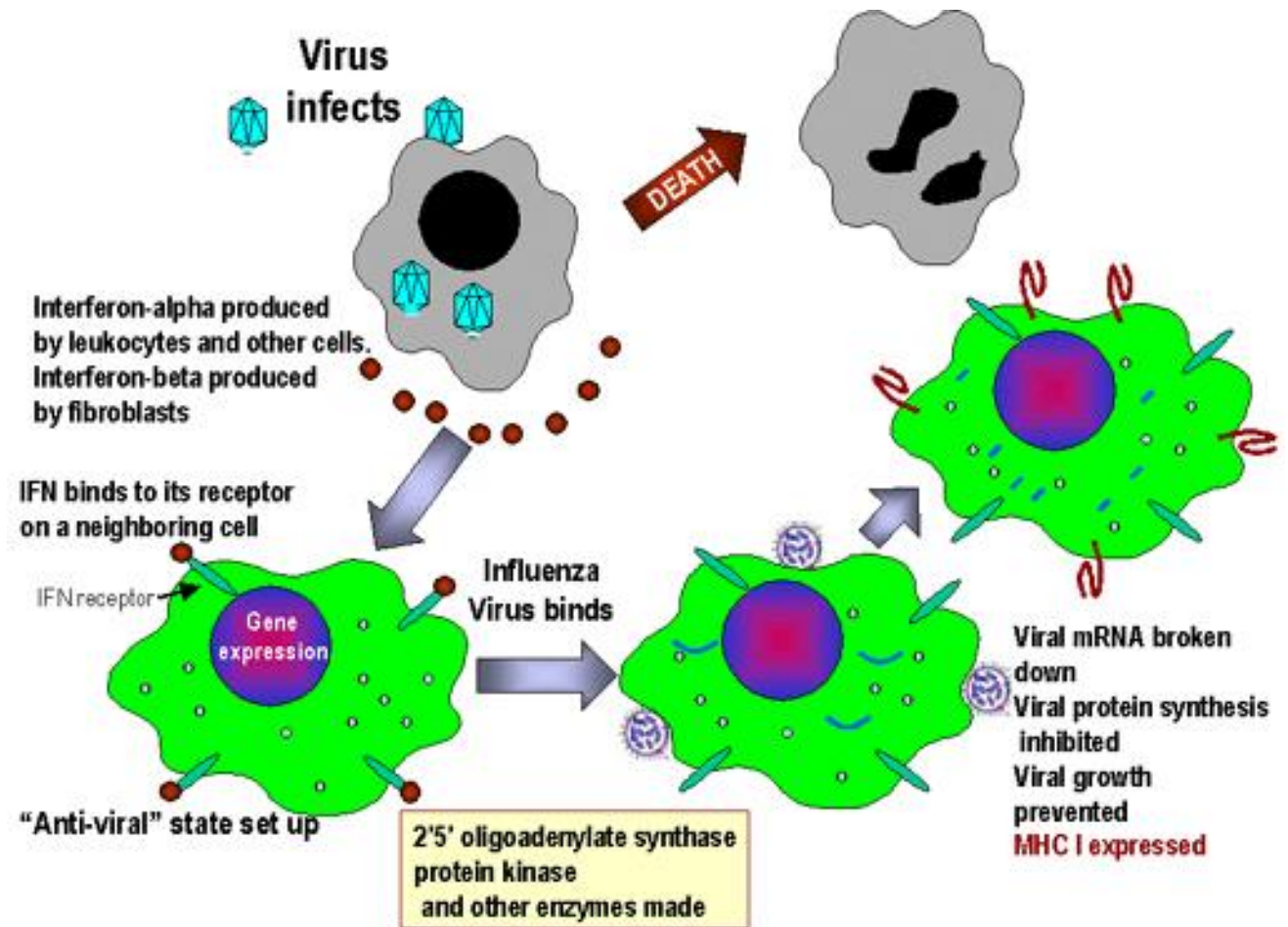


FIGURE 5.1 The discovery of interferon, an experiment showing the induction of interfering activity. Pieces of chorioallantoic membranes were exposed to heat-inactivated influenza virus and the membranes were removed after varying intervals. A fresh membrane was added to the medium, incubated for 24 hours, challenged with infective influenza virus and the medium was titrated 48 hours later for hemagglutinin activity. After Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. II. Some properties of interferon. *Proceedings of the Royal Society of London B* 1957, 147: 258–273, with permission.



- interferon je látka, která je syntetizovaná zejména jako odpověď na virovou infekci
- nemají přímý efekt – nastavují jen antivirový stav
- sekretovány a šířeny jednak lokálně, jednak mohou být šířeny v cirkulaci
- inhibice replikace virů a některých jiných mikroorganismů
- inhibice růstu a dělení buněk (nádory)
- stimulace buněk imunitního systému (aktivace makrofágů, lymfocytů, NK buněk a upregulace exprese MHC I molekul

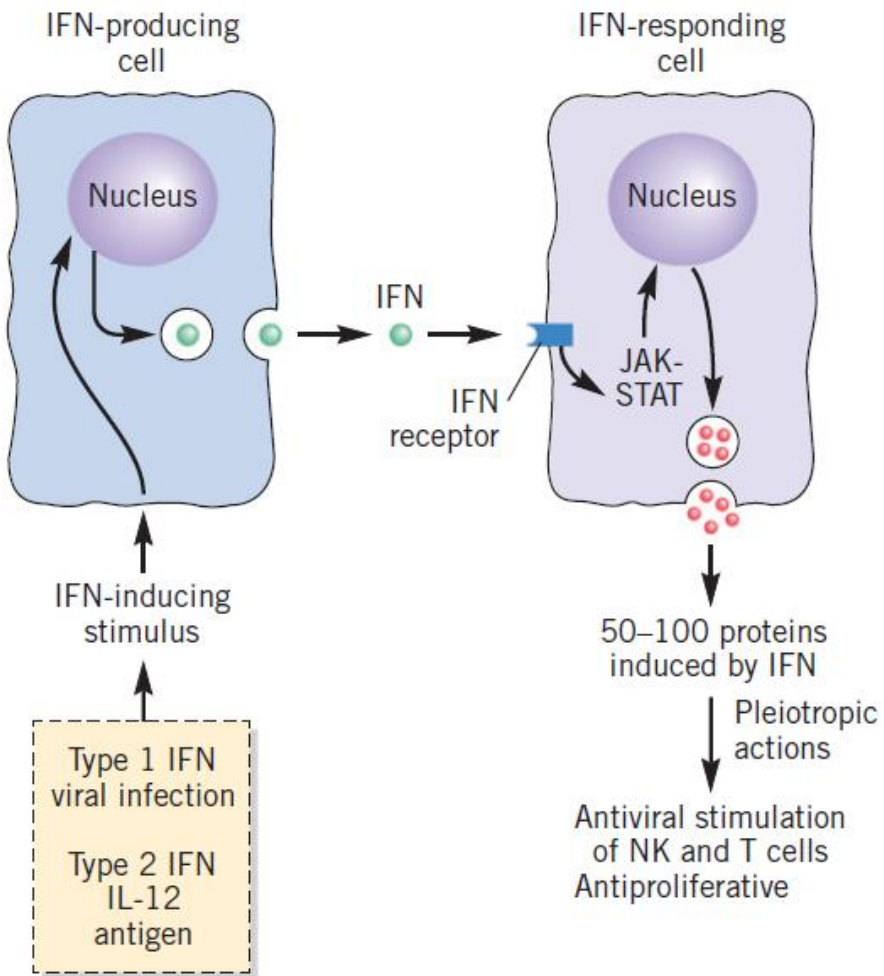


- interferony klasifikujeme jako typu 1 a 2
- INF 1 – nejdůležitější alfa a beta, produkovány všemi typy buněk po stimulaci
 - typickým induktorem je dsRNA (rozpoznává TLR3)
 - produkovány jako raná odezva na virovou infekci
- IFN 2 – produkt NK buněk a aktivovaných T lymfocytů

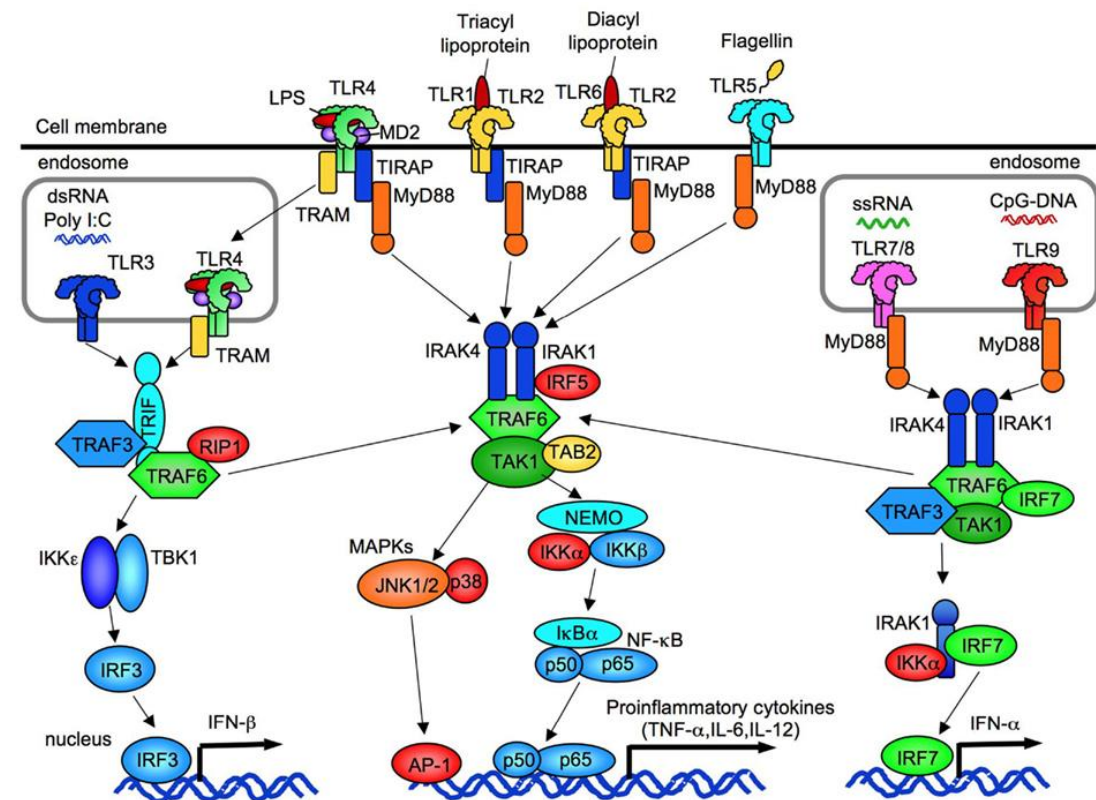
Type	Cell source	Stimulus	Class	No. of subtypes	Chromosome
Type 1	All cells	Virus infection, dsRNA	α	12	9
			β	1	9
			ϵ	1	9
			κ	1	9
			ω	1	9
Type 2	T lymphocytes NK cells	IL-12 antigen	γ	1	12

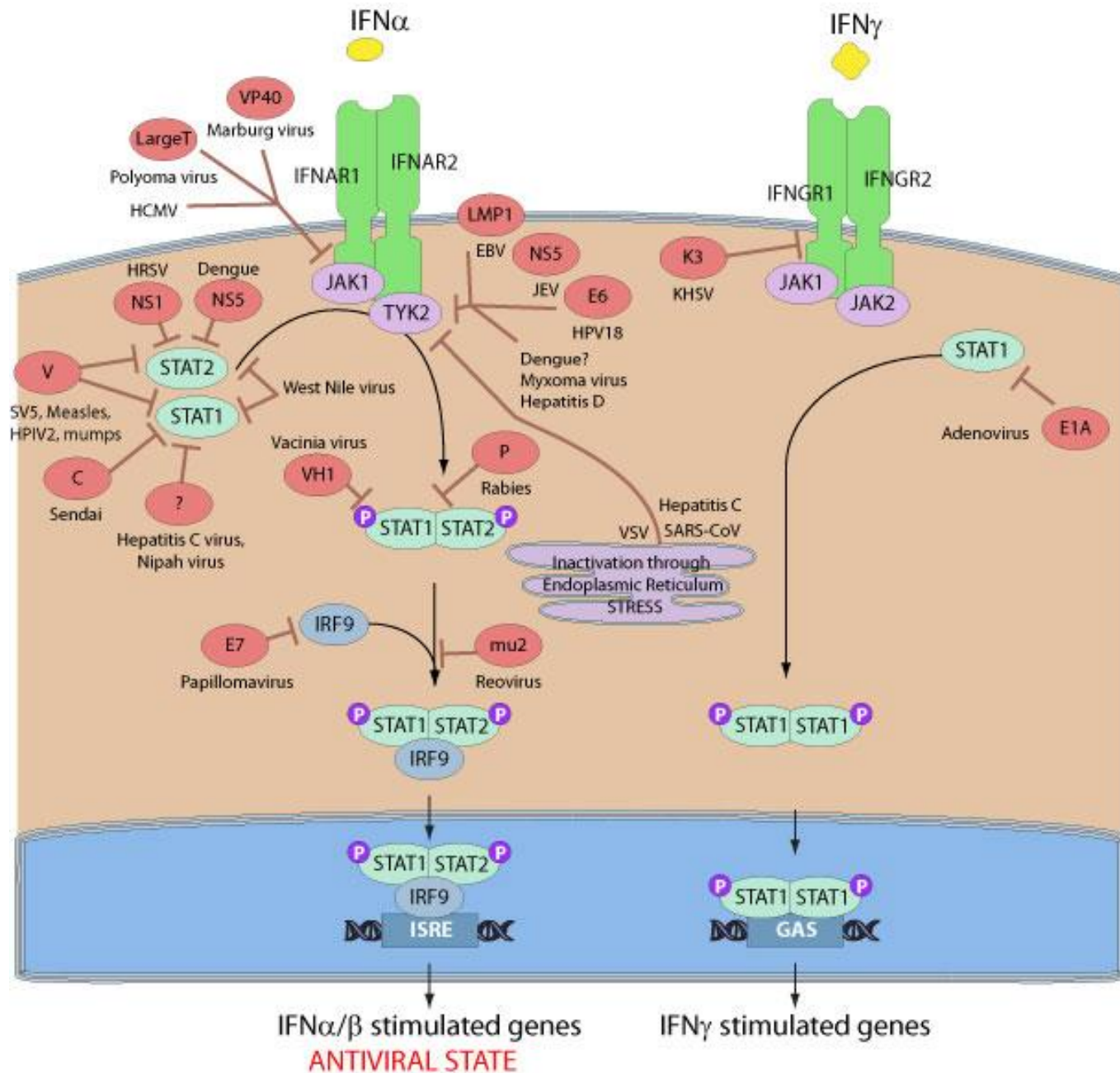
TABLE 5.3 The human interferons and some of their properties. Type 1 interferons are structurally unrelated to type 2 interferon. Type 1 interferons are typically secreted in response to viral infection, triggered by intracellular appearance of double-stranded RNA (dsRNA). Type 2 interferon is typically secreted by T lymphocytes and NK cells following stimulation by IL-12 which, in turn, is secreted by macrophages and dendritic cells in response to antigen presentation and activation. This table does not include the IFN-like interleukins

- receptory pro interferon přítomny na většině buněk; liší se receptory pro IFN 1 a 2
- receptory rozpoznávají jen IFN produkovaný daným živočišným druhem
- vazba IFN na receptor zahájí kaskádu dějů v hostitelské buňce, které zahrnují JAK-STAT dráhu



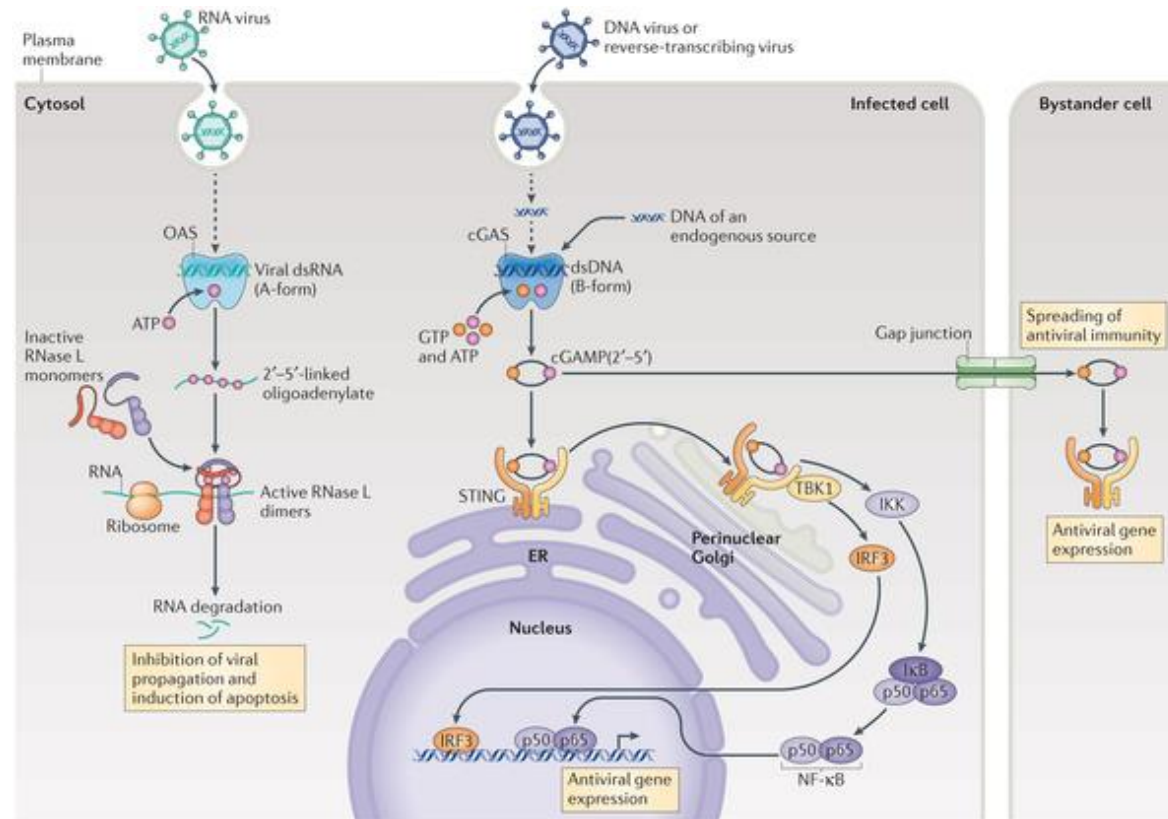
IFN má význam zejména v případě primární infekce; u sekundární infekce se spíše uplatní specifická imunita

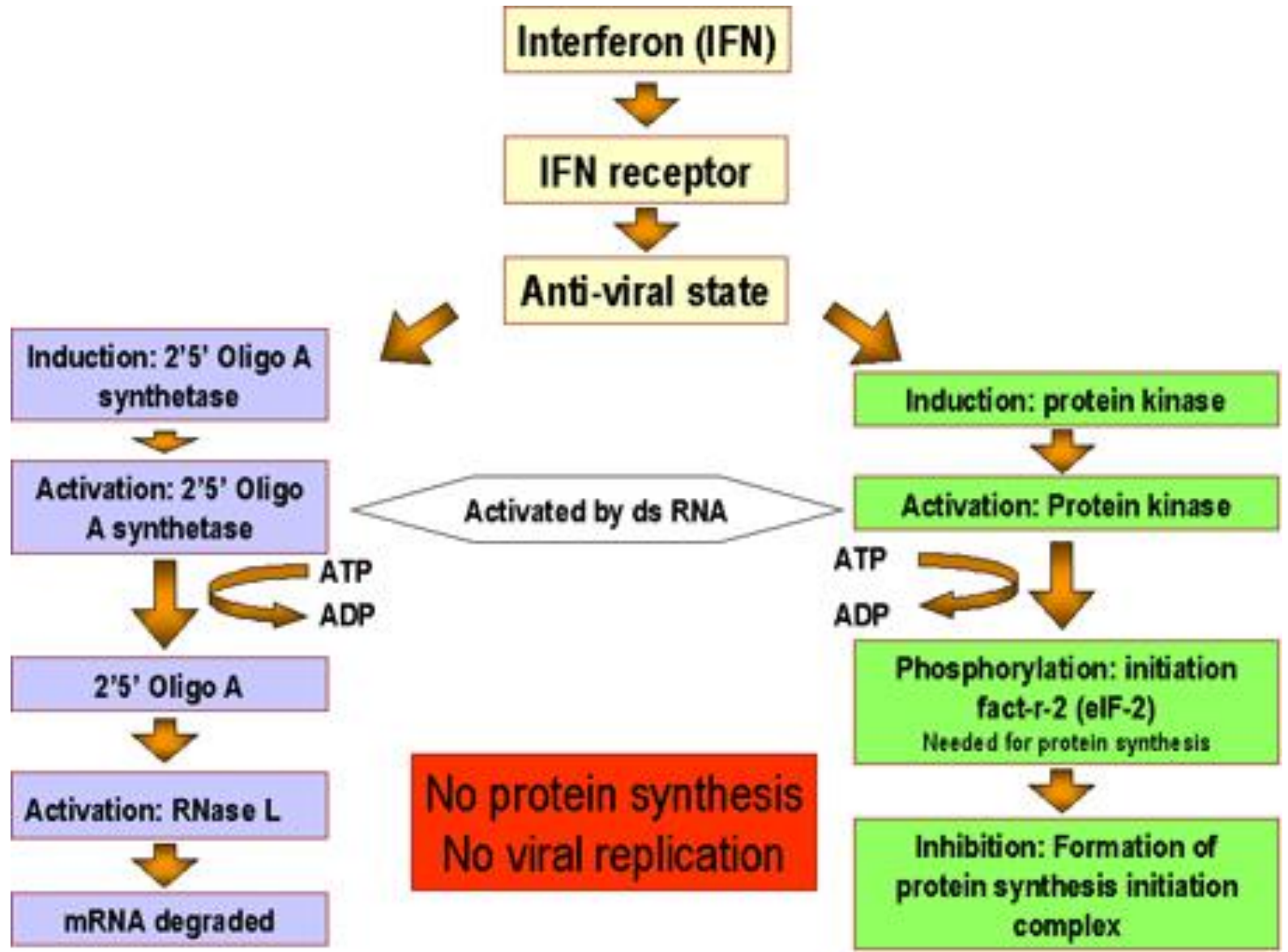




- intracelulární signální doména receptoru aktivuje JAK, která fosforyluje STAT
- fosforylovaný STAT migruje do jádra, kde zesílí transkripci vybraných genů
- celý děj probíhá v rámci minut
- řada virů vyvinula mechanismy, jak bránit indukci produkce interferonu
- různé imunomodulační vlastnosti interferonu: aktivace NK buněk, indukce IL-15 za účelem zvýšení aktivity NK buněk a T-lymfocytů, inhibice nespecifické proliferace T-lymfocytů, prodloužení přežívání T-lymfocytů, upregulace MHC I

- Přítomnost interferonů nepůsobí na adsorpci ani na průnik viru do buňky.
- Navázáním IFN na buněčný povrch je odstartována celá řada biochemických reakcí. V jejich průběhu je indukována exprese nejméně 3 enzymů: (2'-5' oligoadenylátsyntetáza, ribonukleáza L a 73K proteáza.
- Aktivovaná 2-5 oligoadenylát syntetáza katalyzuje syntézu neobvyklého oligonukleotidu z ATP. Oligonukleotid pak aktivuje endoribonukleázu čili RNázu L, která působí destruktivně na mRNA, což vede k inhibici syntézy virových bílkovin u buněk infikovaných virem.
- Po aktivaci 73K proteinkinázy dvouřetězcovou RNA dochází rovněž k inhibici syntézy bílkovin, avšak odlišnou cestou.





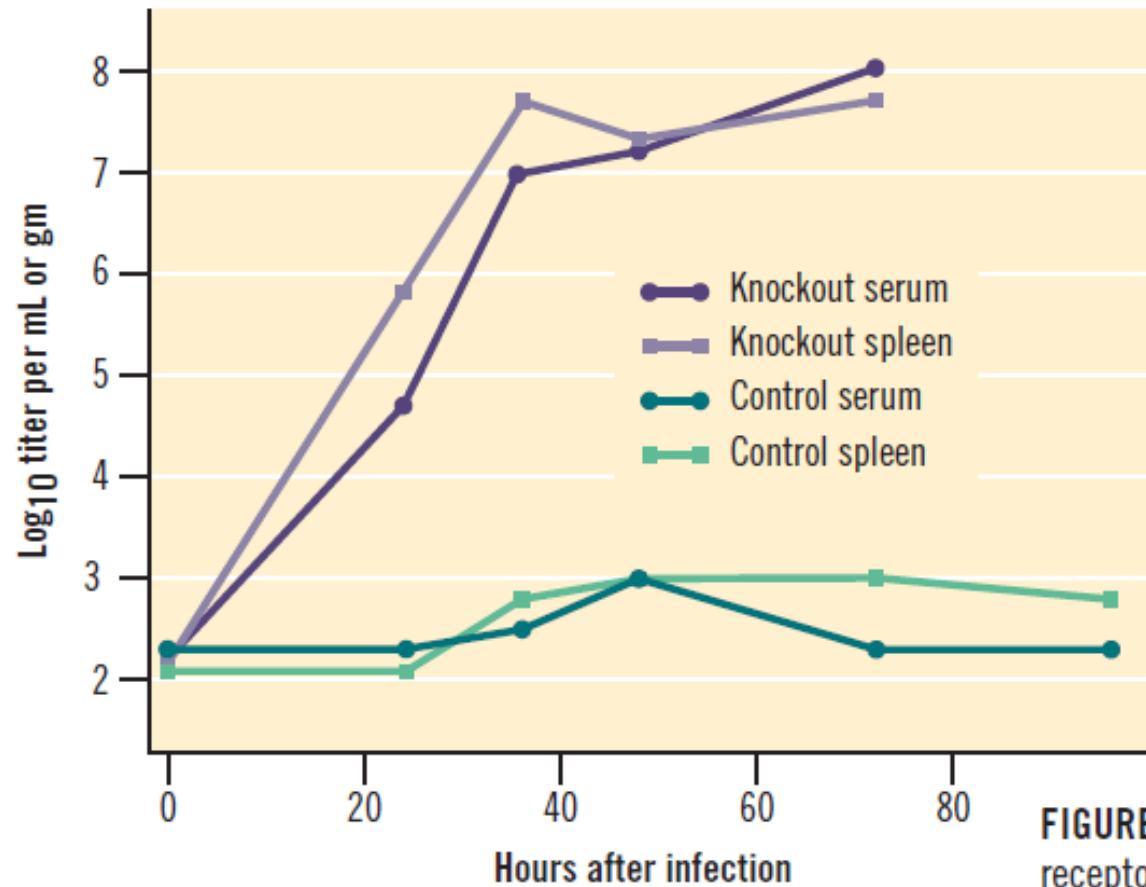
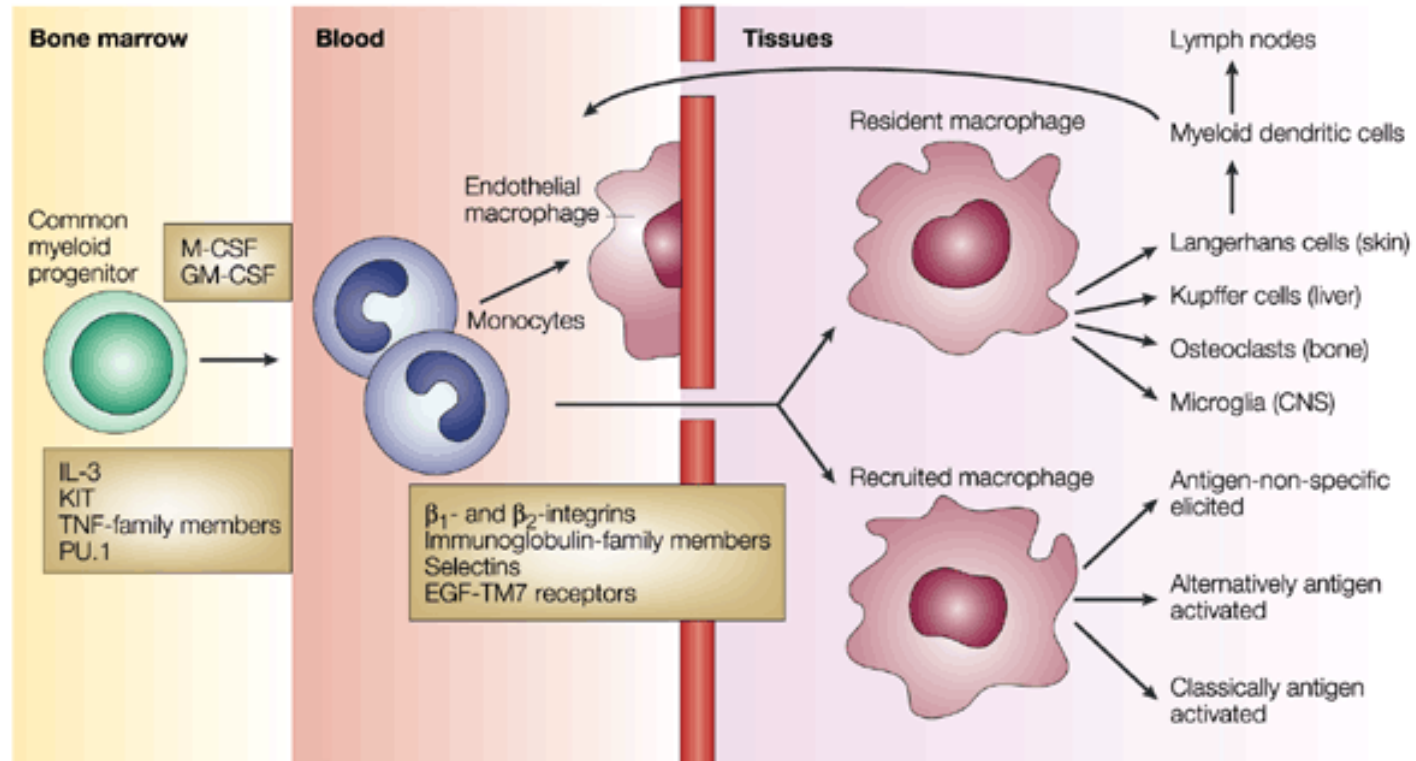


FIGURE 5.6 Enhanced susceptibility to Sindbis virus of mice lacking the receptor for type 1 IFN. Adult control mice (strain 129 Sv/Ev) and congenic knockout mice (strain 129 Ev/Sv $INF\alpha/\beta R^{-/-}$) were infected with 100 plaque-forming units by the subcutaneous route and followed for virus titer and illness. Sindbis virus replicated mainly in macrophages and dendritic cells in many tissues and susceptible mice died very rapidly, perhaps from an overwhelming 'cytokine storm'. After Ryman KD, Klimstra WB, Nguyen KB, Biron

Makrofágy

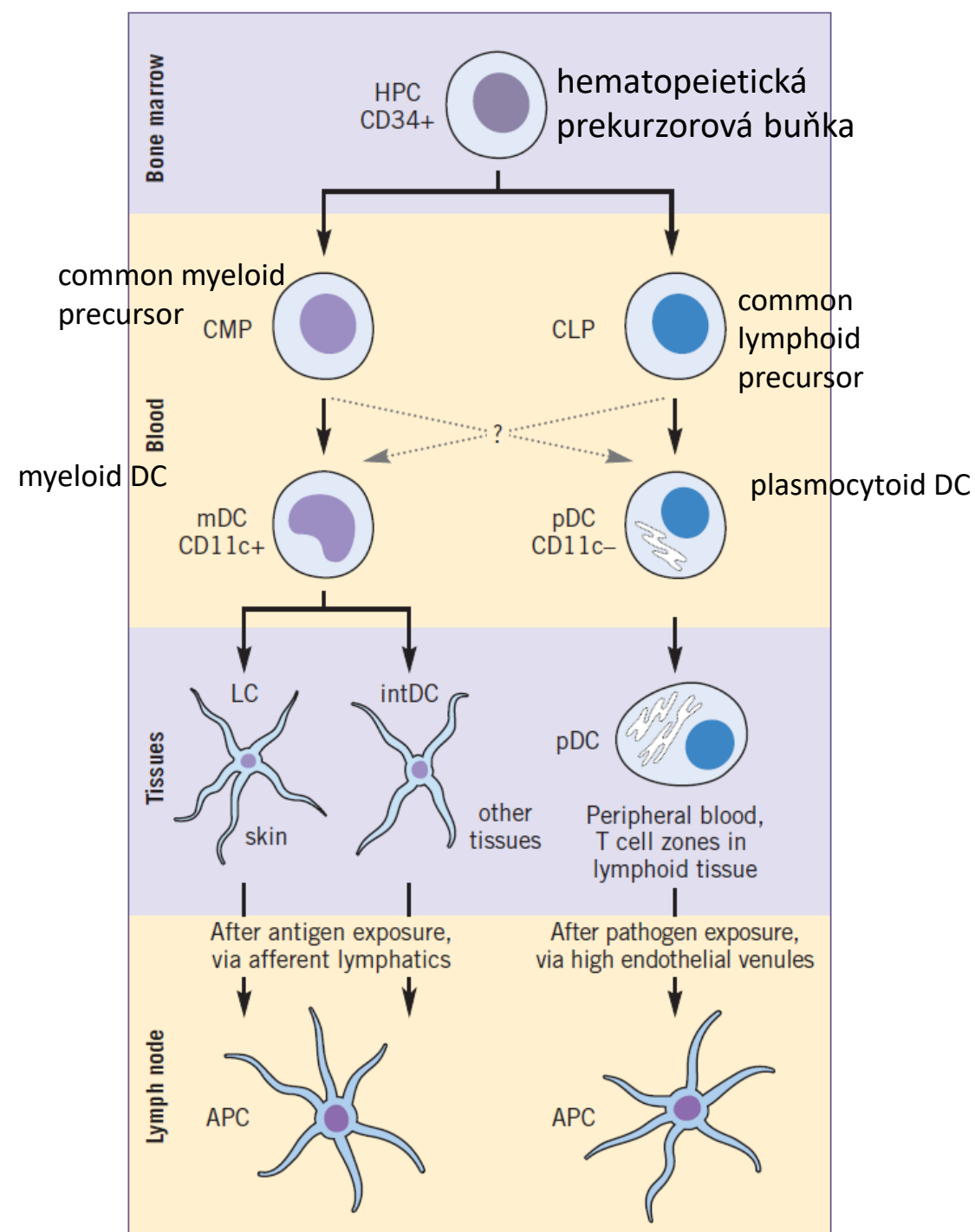
- fagocytární buňky, derivované z hematopietických prekurzorů v kostní dřeni
- do cirkulace se dostávají jako krevní monocyty; po vstupu do orgánů se z nich stávají tkáňové makrofágy



Dendritické buňky

- dendritické buňky sehrávají klíčovou úlohu v případě přirozené i získané imunity
- plamacytoidní dendritické buňky (pDC) se vyvíjejí z lymfoidních prekurzorů; cirkulují jako plasma-like buňky a poté migrují do lymfoidních tkání
- myeloidní dendritické buňky (mDC) – z monocytů v cirkulaci; CD11+ fenotyp; migrují do tkání, včetně lymfoidních, kde mění morfologii v klasicky dendritické buňky
 - dva podtypy: Langerhansovy buňky (LC) v kůži a intersticiální DC v dalších tkáních
- krevní monocyty po ošetření GM-CSF a IL-4 diferenciují na mDC

Všechny DC jsou efektivní ve vazbě antigenů; po aktivaci v periferních tkáních migrují do lymfatických tkání, kde se stávají efektivními antigen prezentujícími buňkami



Property	Dendritic cell type		
	Plasmacytoid	Myeloid	
		Langerhans	Interstitial
Drivers of differentiation from hematopoietic precursors	Flt3L, GM-CSF		GM-CSF, IL-4
Location	T cell zones of lymphoid tissues	Epidermis and dermis	Other tissues
Circulating surface markers	CD11c ⁻	CD11c ⁺	CD11c ⁺
Activation required for efficient antigen presentation	Yes	Yes	Yes
Toll-like receptors	TLR 1, 6, 7, 9, 10	TLR 1, 2, 3, 5, 8, 10	TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8
Activation inducers	Viral RNA, viral DNA, CD40L	Antigen, inflammation, CD40L	Antigen, inflammation, CD40L

NK buňky

- jsou velké lymfocyty, které lze rozpoznat díky cytoplasmatickým granulím
- granule obsahují perforin – vytváří póry v plasmatické membráně; a granzymy – proteiny, které mohou iniciovat apoptózu
- povrchové markery: low affinity Fc receptor, CD56+, CD3-
- NK buňky mají aktivační receptory (integriny a jiné molekuly na buněčném povrchu)
- „killer inhibitory receptors“ (KIRs) – pokud obsazeny, iniciují kaskádu dějů vedoucí k inhibici aktivačních cest
 - KIRs často rozpoznávají MHC I molekuly a brání lyzování normálních buněk
 - buňky, které mají snížené množství MHC I molekul (nádorové buňky, bb infikované některými viry) neaktivují KIRs a jsou pak předmětem lýzy
 - některé viry (zejm. velké DNA viry) vytvářejí podobné molekuly jako MHC I, aby zmátly NK buňky

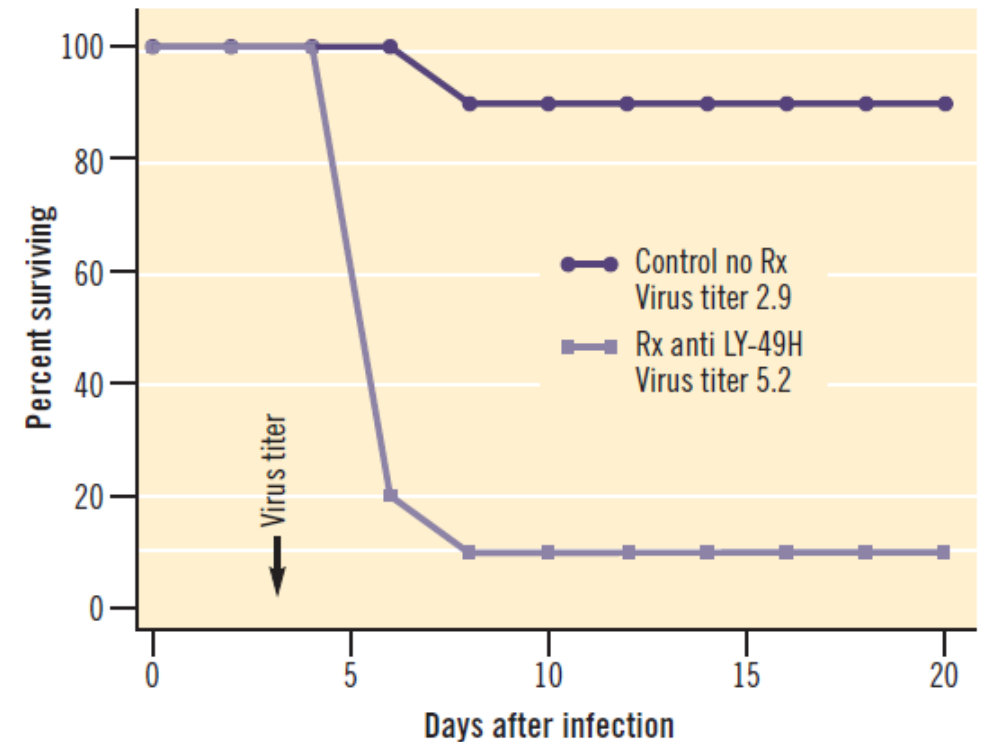
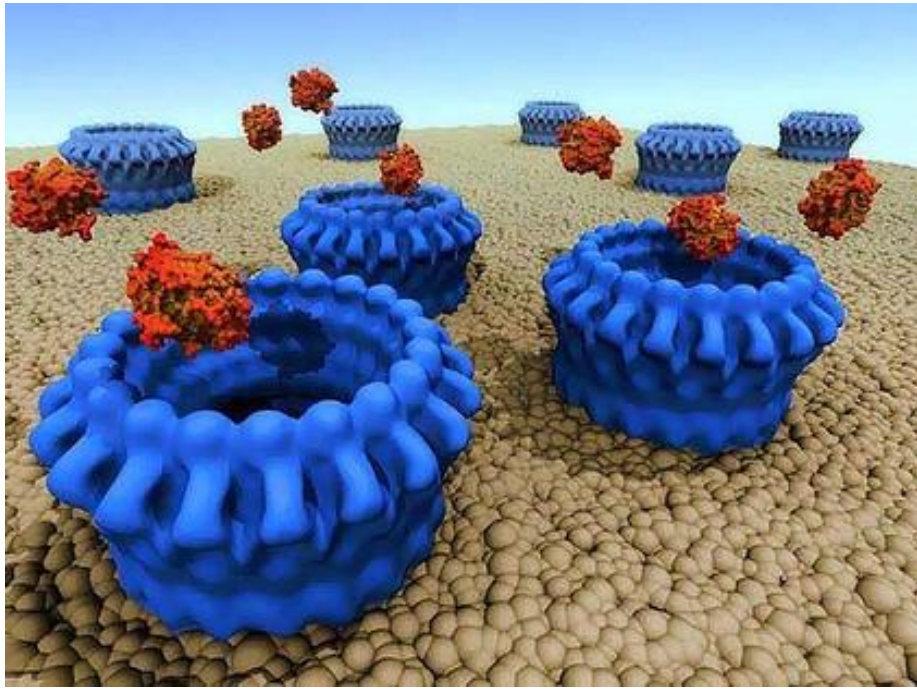
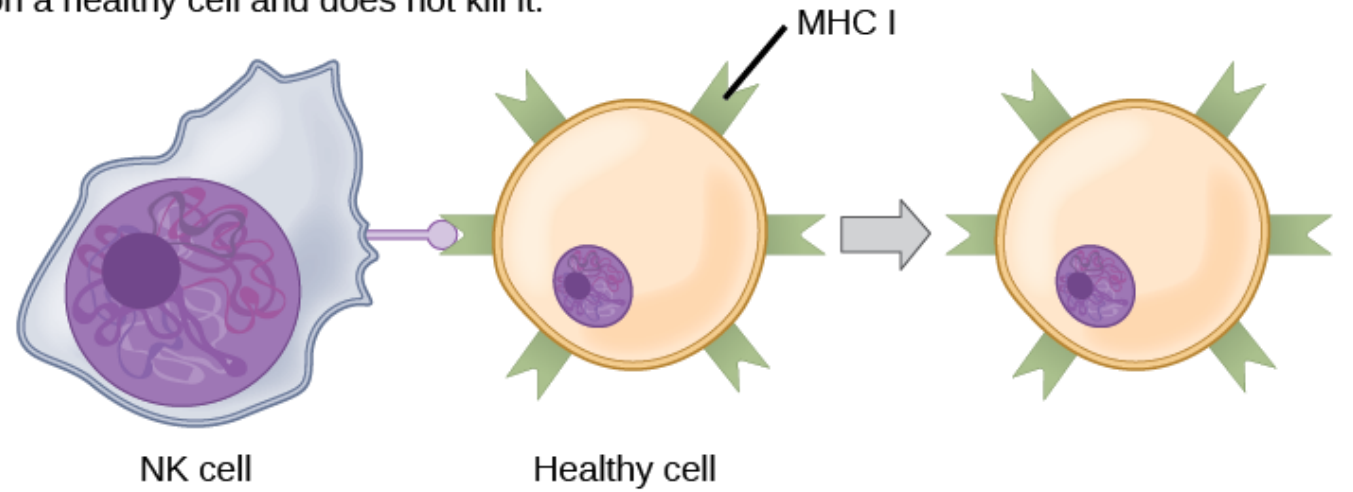


FIGURE 5.3 Depletion of NK cells renders mice more susceptible to an experimental infection. Mice were treated with a monoclonal antibody that was directed against an NK cell receptor, Ly-49H, and 2 days later were injected intraperitoneally with 10^5 PFU of murine cytomegalovirus. Mice were tested for virus titers (\log_{10} PFU per spleen 3 days after infection) or were followed for survival. After Brown MG, Dokun AO, Heusel JW *et al.* Vital involvement of a

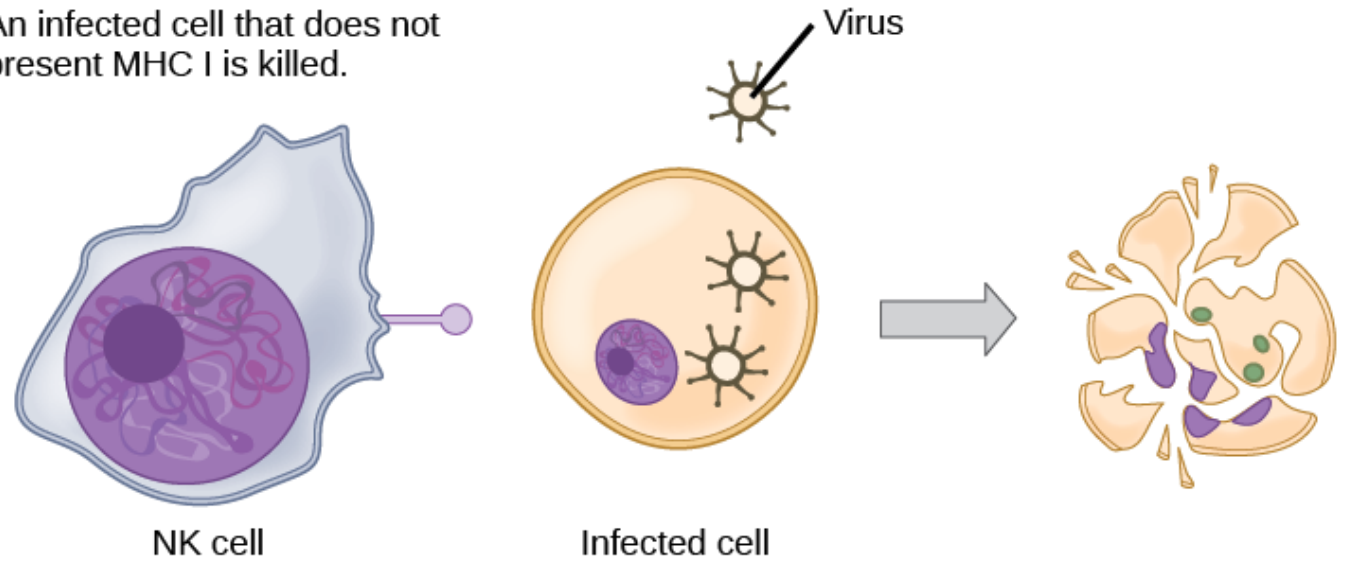
- NK buňky jsou obvykle aktivovány záhy po infekci
- aktivace např. IFN 1



A natural killer (NK) cell recognizes MHC I on a healthy cell and does not kill it.



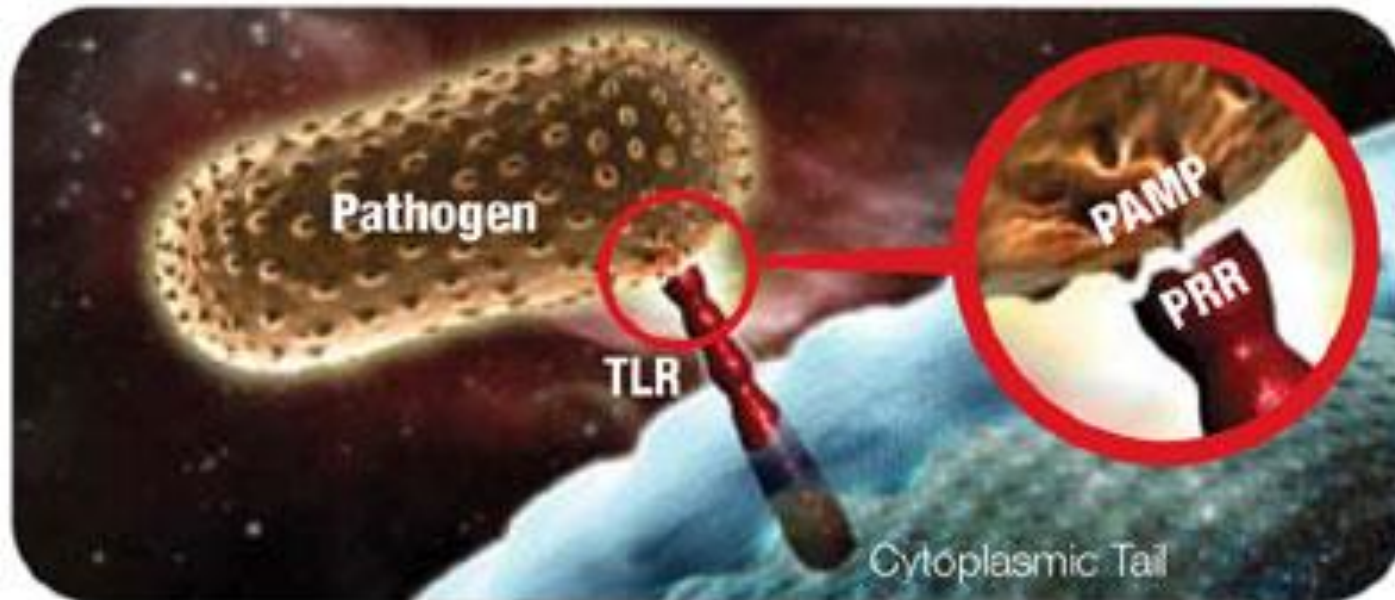
An infected cell that does not present MHC I is killed.



<http://www.youtube.com/watch?v=ZHffoSfNKw8>

Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) a pattern recognition receptors (PRRs)

- např. bakteriální stěna obsahuje lipopolysacharidy, lipoproteiny a peptidoglykany, které jsou přítomny jen u bakterií, ale ne u eukaryot; PAMPs jsou tedy patrně přítomny jen u mikroorganismů – receptory, které rozpoznávají PAMPs se označují jako PRRs
- jednu skupinu PRRs tvoří Toll-like receptory

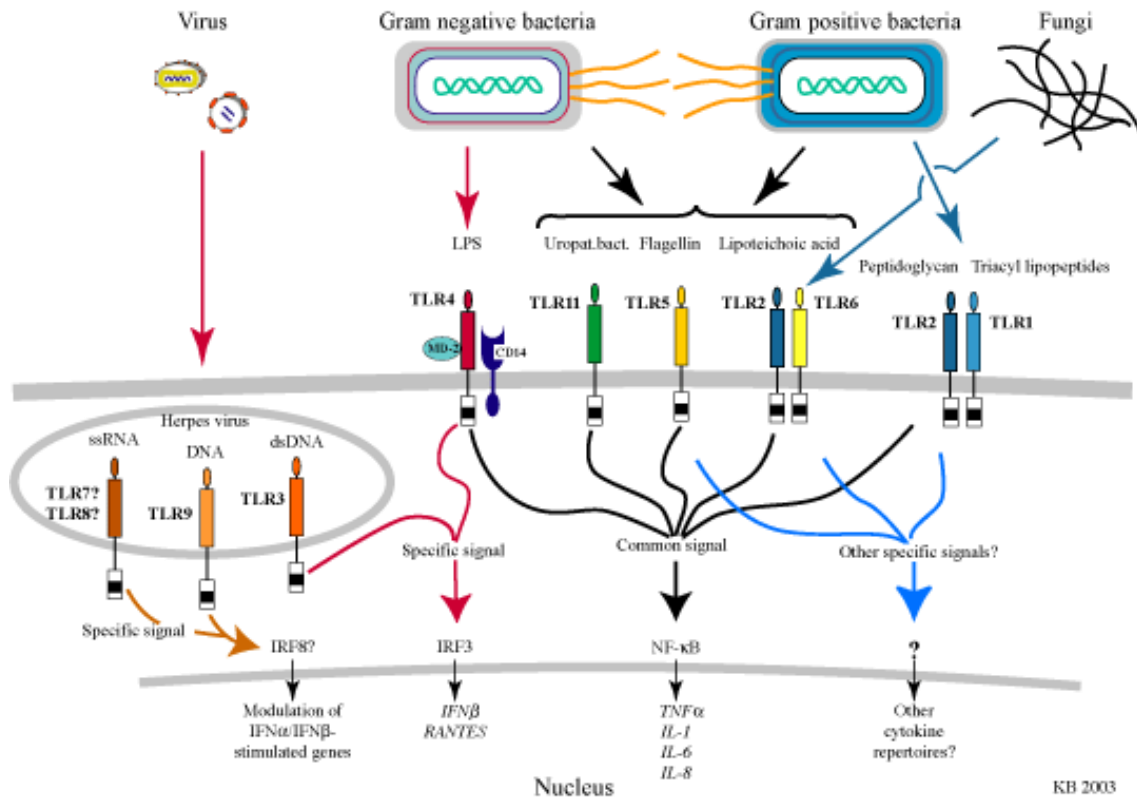


Toll-like receptory (TLRs)

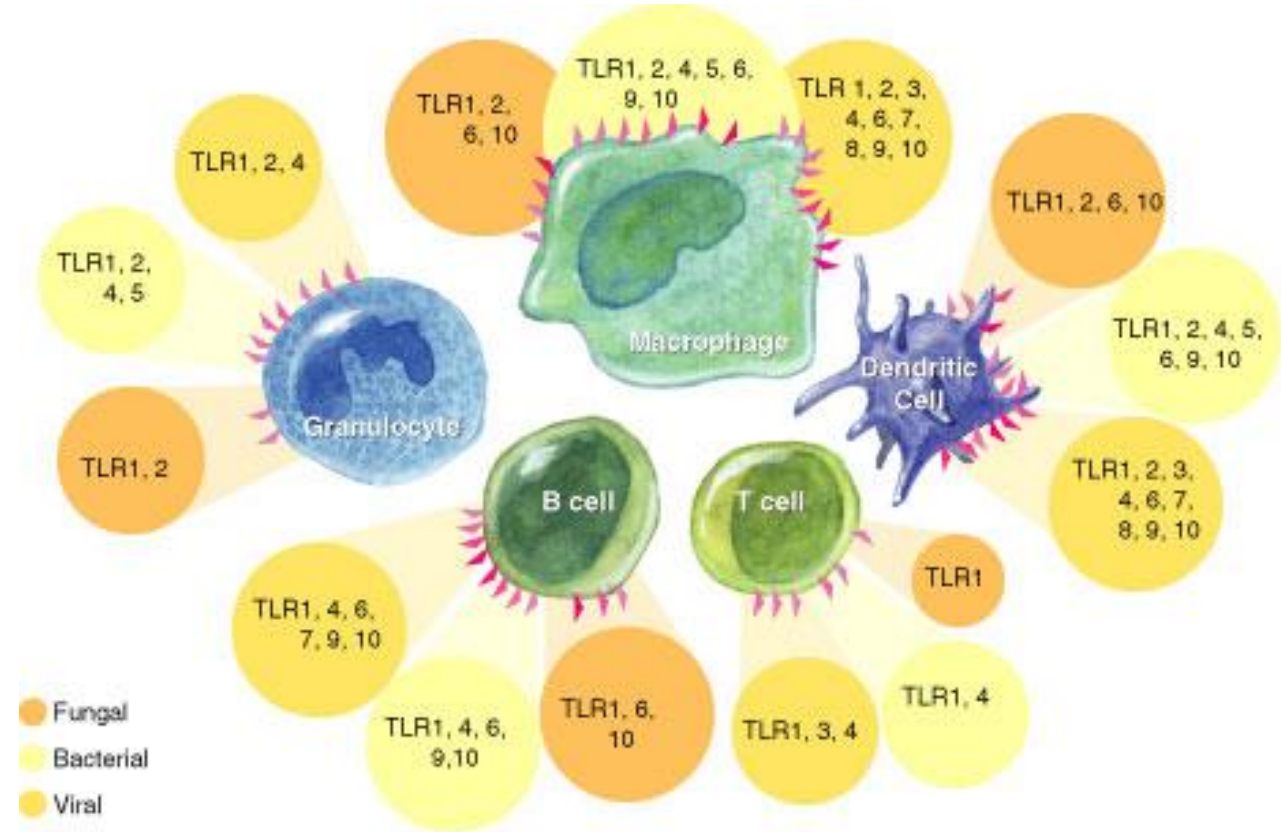
- sdílejí společné strukturní charakteristiky jako extracelulární doménu obsahující na leucin bohatá opakování a cytoplasmatickou doménu podobnou IL-1 receptoru
- některé TLR fungují v kooperaci s dalšími povrchovými molekulami
- různé signální dráhy, které ale většinou zahrnují společné komponenty jako myeloidní diferenciační faktor 88 (MyD88) a toll-interleukin receptor (TIR)
- jednotlivé TLR rozpoznávají specifické mikrobiální komponenty, které se nevyskytují v eukaryotických buňkách

TLR	Cellular localization	Viral ligands	Bacterial ligands
1	Plasma membrane		Lipoproteins, peptidoglycans
2	Plasma membrane	Envelope proteins	Lipoproteins, peptidoglycans
3	Endosomes	ds RNA	
4	Plasma membrane	Envelope proteins	Lipopolysaccharide
5	Plasma membrane		Flagellin
6	Plasma membrane		Lipoproteins, peptidoglycans
7	Endosomes	ssRNA	
8	Endosomes	ssRNA	
9	Endosomes	Unmethylated CpG	Unmethylated CpG
10	Plasma membrane	Unknown (2005)	Unknown (2005)
11	Plasma membrane		Uropathogenic bacteria

- případě virové infekce hrají významnou roli zejména TLR 3, 7 a 8
- TLR3 rozpoznává dsRNA (TLR3 je zejména na DC a po aktivaci vede k produkci IFN 1)
- TLR7 a 8 rozpoznávají ssRNA, včetně virové mRNA a genomy některých ssRNA virů



KB 2003

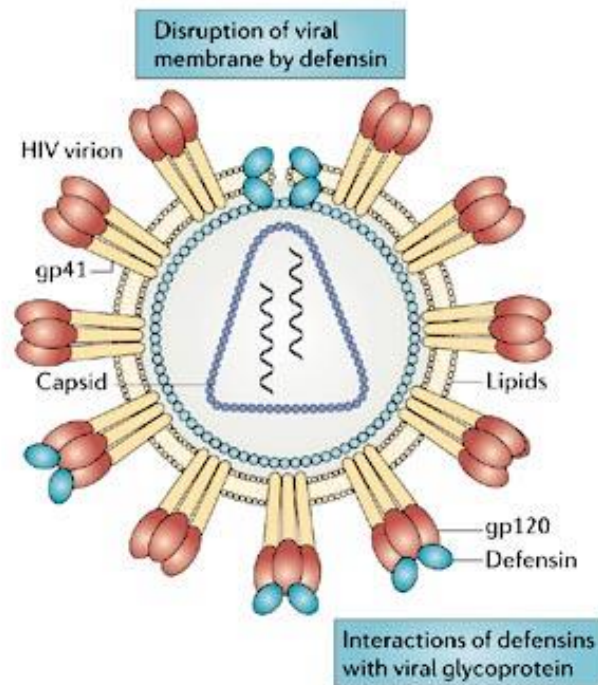


<http://www.youtube.com/watch?v=C7usozppy-o>

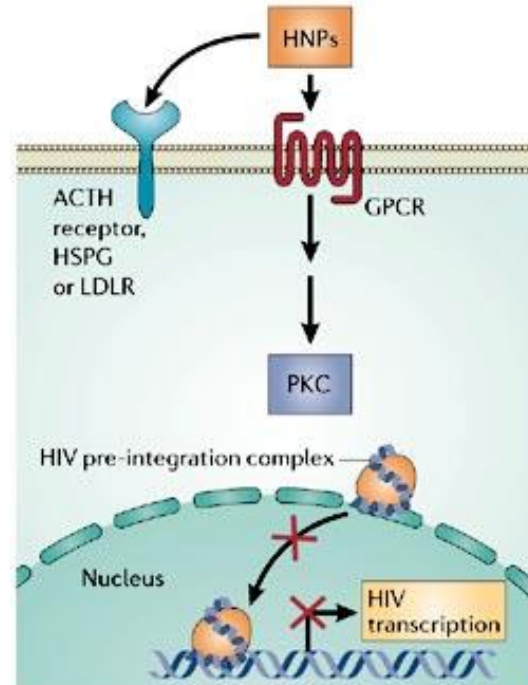
Defensiny

- mnohobuněčné organismy produkují „přirozené“ antimikrobiální peptidy, které poskytují obranu především proti bakteriím a houbám
- defensiny jsou jedny z nejznámějších antimikrobiálních peptidů
- některé defensiny například brání vstupu mnohých herpesvirů do buňky bráněním vazby na receptor nebo bloádou postvazebných procesů

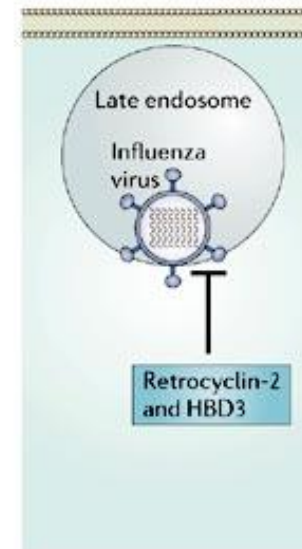
a Effect on the virion



b Effect on HIV-infected cell

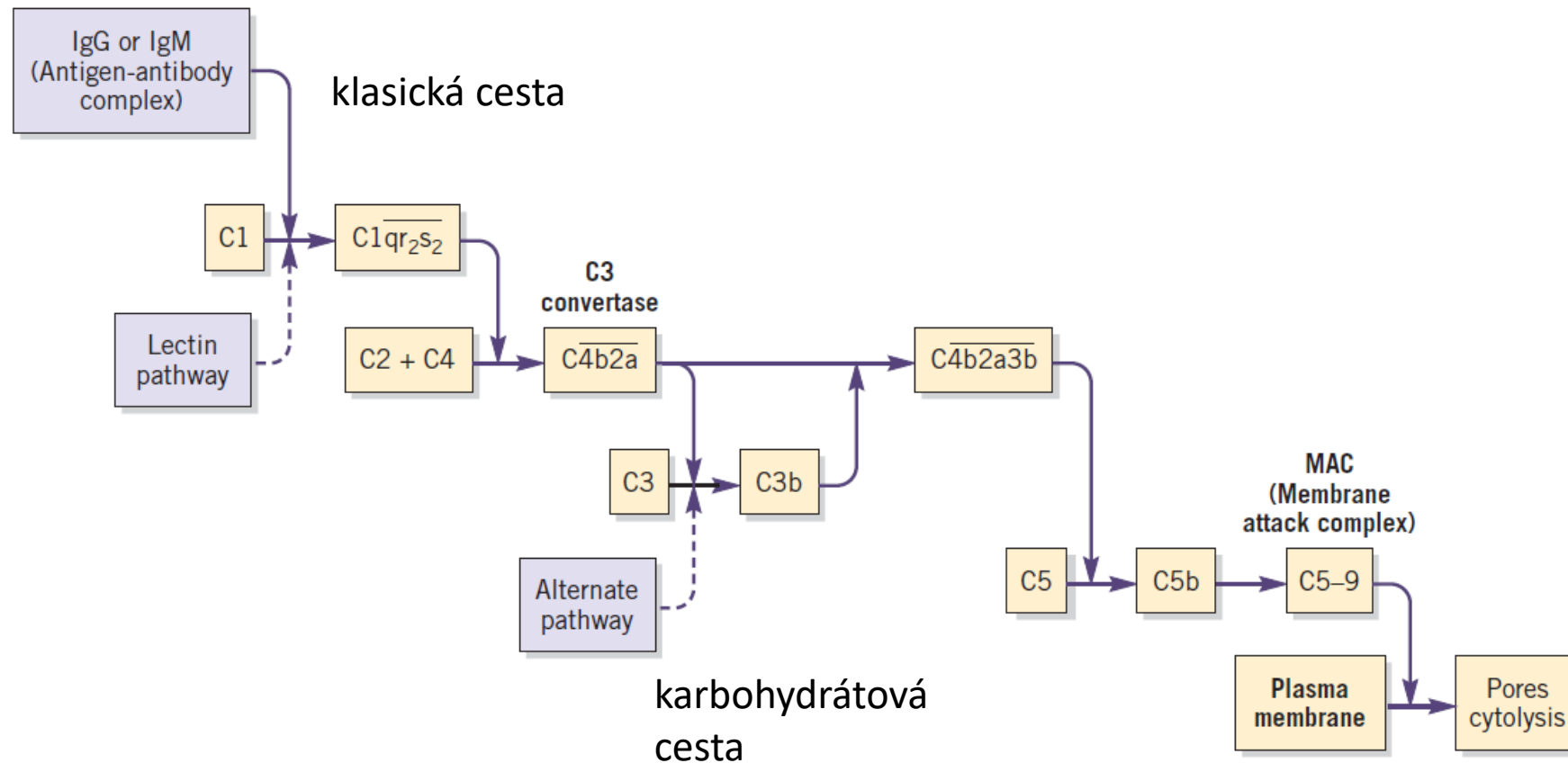


c Effect on influenza-virus-infected cell

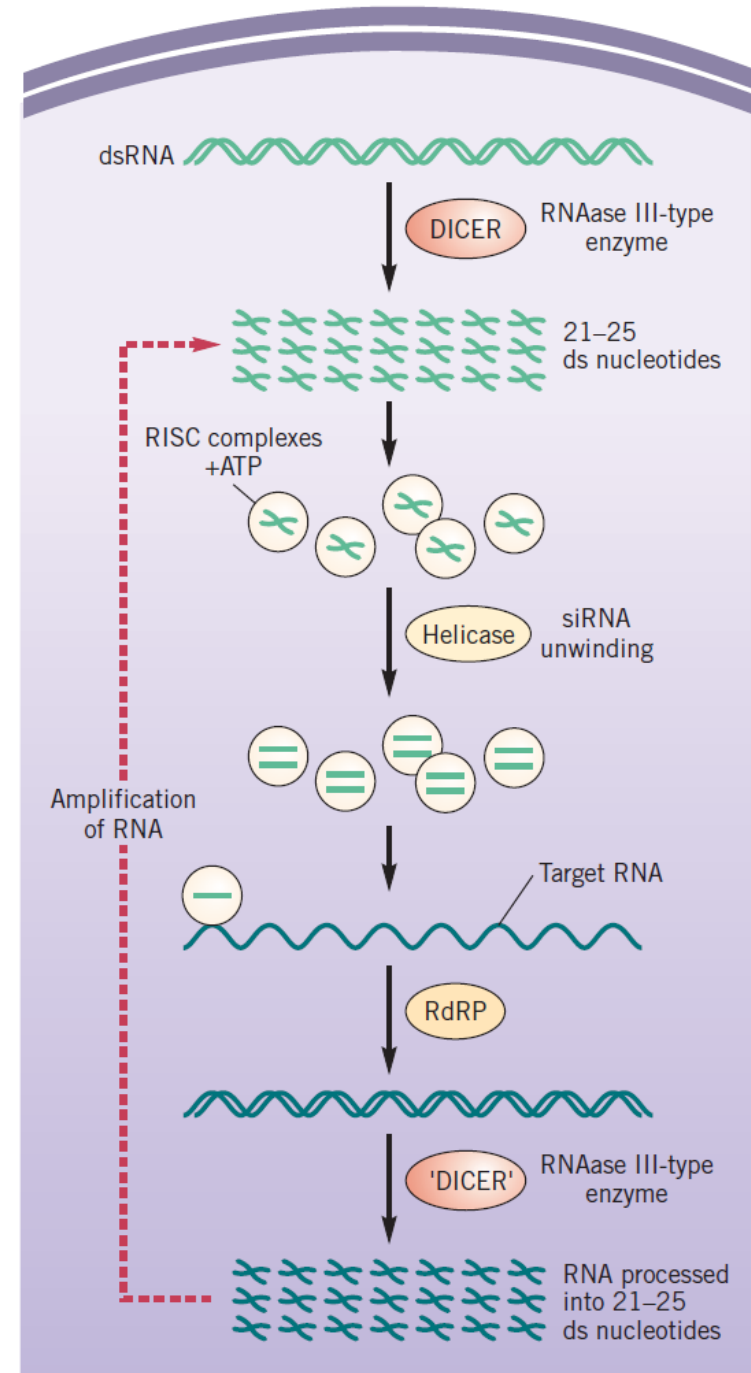
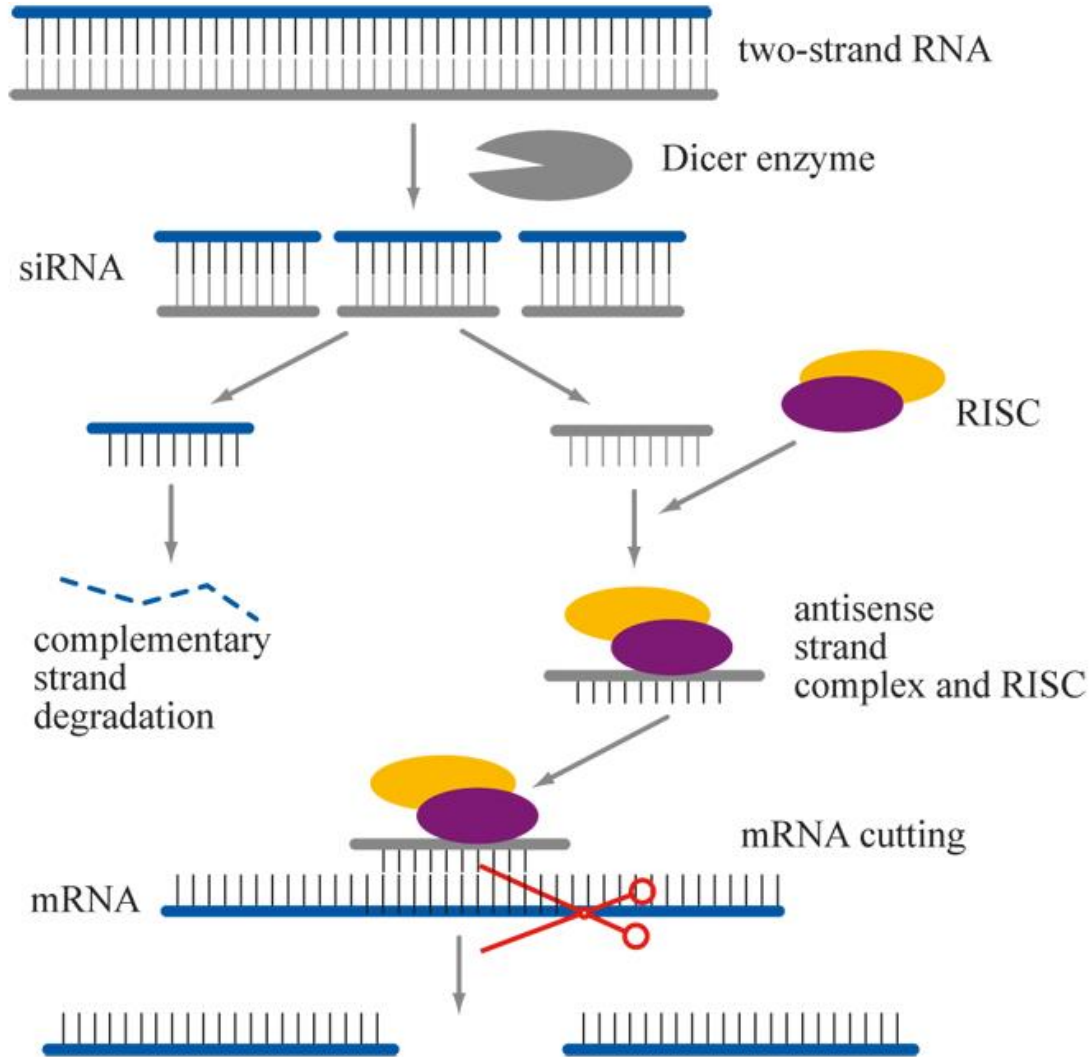


Komplement a přirozené protilátky

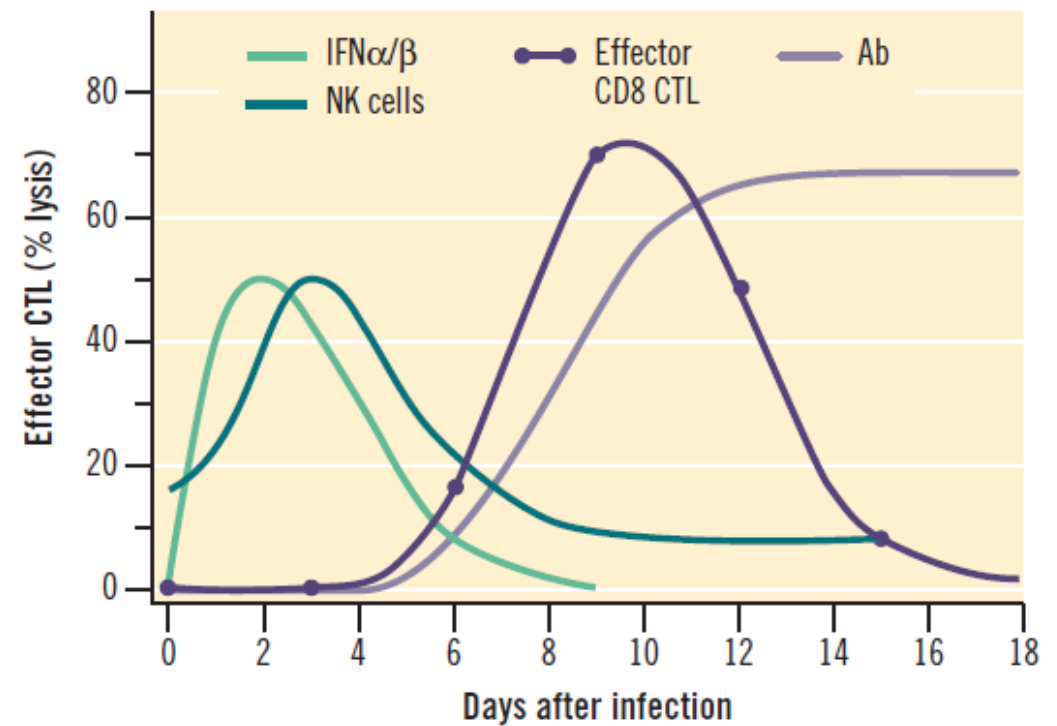
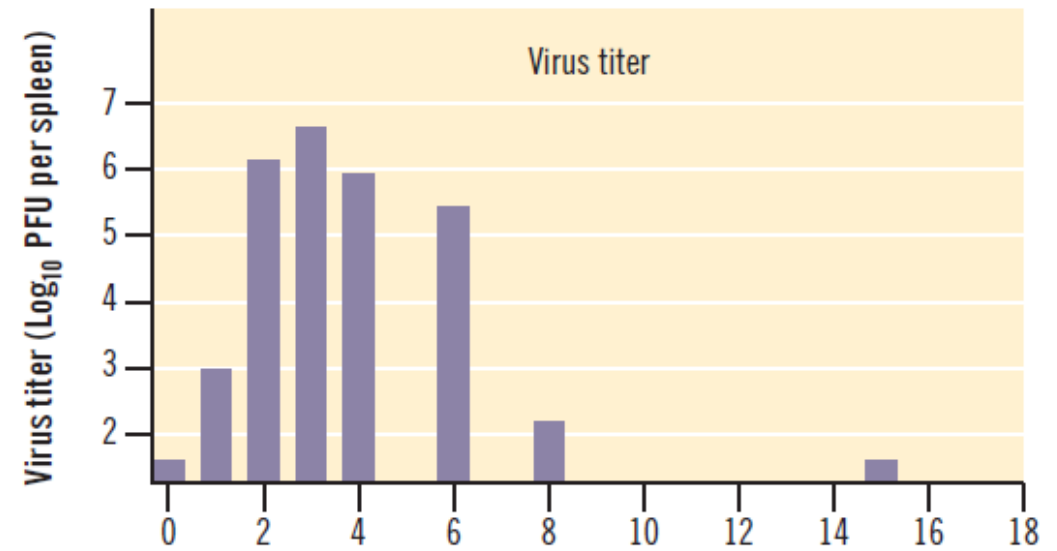
- sérum mnohých savců vykazuje antivirovou aktivitu, která může být dána aktivací komplementu nebo přítomností přirozených protilátek
- komplement sestává ze skupiny proteinů, které cirkulují v plasmě
- výsledkem aktivace komplementu je vytvoření kanálu v membráně vedoucí k lýze viru nebo jiného patogenu
- komplement je efektorovým mechanismem specifické imunitní odezvy, ale může fungovat i nespecificky (např. mnohé retroviry jsou lyzovány lidským komplementem i když nejsou přítomny specifické protilátky)



RNA interference



Property	Innate	Acquired
Specificity	Broad PAMP-based	Fine Epitope-based
Induction time	Hours	Days to months
Requires antigen processing	No	Yes
Involves clonal expansion	No	Yes
Responder cells	Macrophages, DCs, NK cells	CD4+, CD8+ T cells, B cells
Effector cells	DCs, NK cells	CD8+T cells (CD4+T cells)
Effector mechanisms	Phagocytosis, cytolysis by NK cells, chemotaxis, cytokines, chemokines	Antibodies, cytolysis, cytokines, chemokines
Memory and effector recall	No	Yes
Long-term persistence	No	Yes



Specifická imunita

- hlavní hráči: buňky imunitního systému B a T lymfocyty

	B cell response	T cell response	T cell response
Type of immunity	Humoral	Cellular	Cellular
Precursor (memory) cell	B lymphocyte	CD4+ precursor	CD8+ precursor
Effector cell	Plasma cell	CD4+ lymphocyte	CD8+ CTL
Mediator molecules	Immunoglobulins (Igs)	Cytokines	Perforins, granzymes, cytokines
Persistence of effectors	Yes	No	No
Anamnestic (memory) response	Yes	Yes	Yes

všechny typy lymfocytů jsou konstantně produkovány z prekurzorových kmenových buněk v kostní dřeni. Progenitorové buňky migrují z kostní dřene do thymu, kde podstoupí maturaci

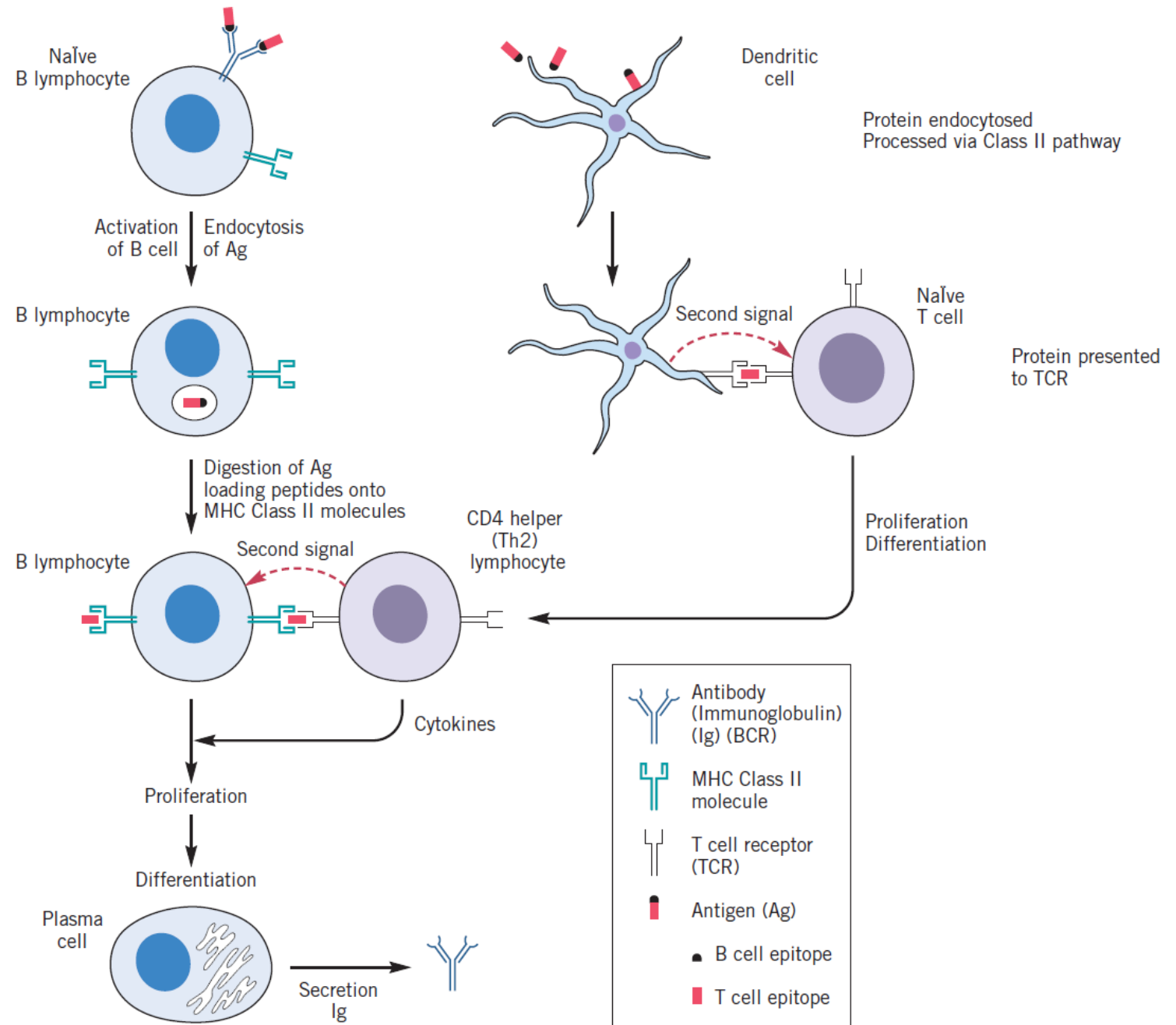
- z thymu: naivní T lymfocyty migrují do sleziny, lymfatických uzlin a určitých tkání jako kůže a sliznice
- B lymfocyty z kostní dřene migrují rovnou do lymfoidních tkání
- další důležití hráči: monocyty/makrofágy a dendritické buňky (profesionální antigen prezentující buňky)

- T-lymfocyty můžeme rozdělit na CD4 a CD8
- CD4+ T-lymfocyty nesou T receptor, který rozpoznává antigeny prezentované MHC II
- CD8+ T-lymfocyty nesou T receptor, který rozpoznává antigeny prezentované MHC I
- CD4+ lymfocyty fungují jako „helper“ lymfocyty a interagují s B lymfocyty nebo CD8 lymfocyty

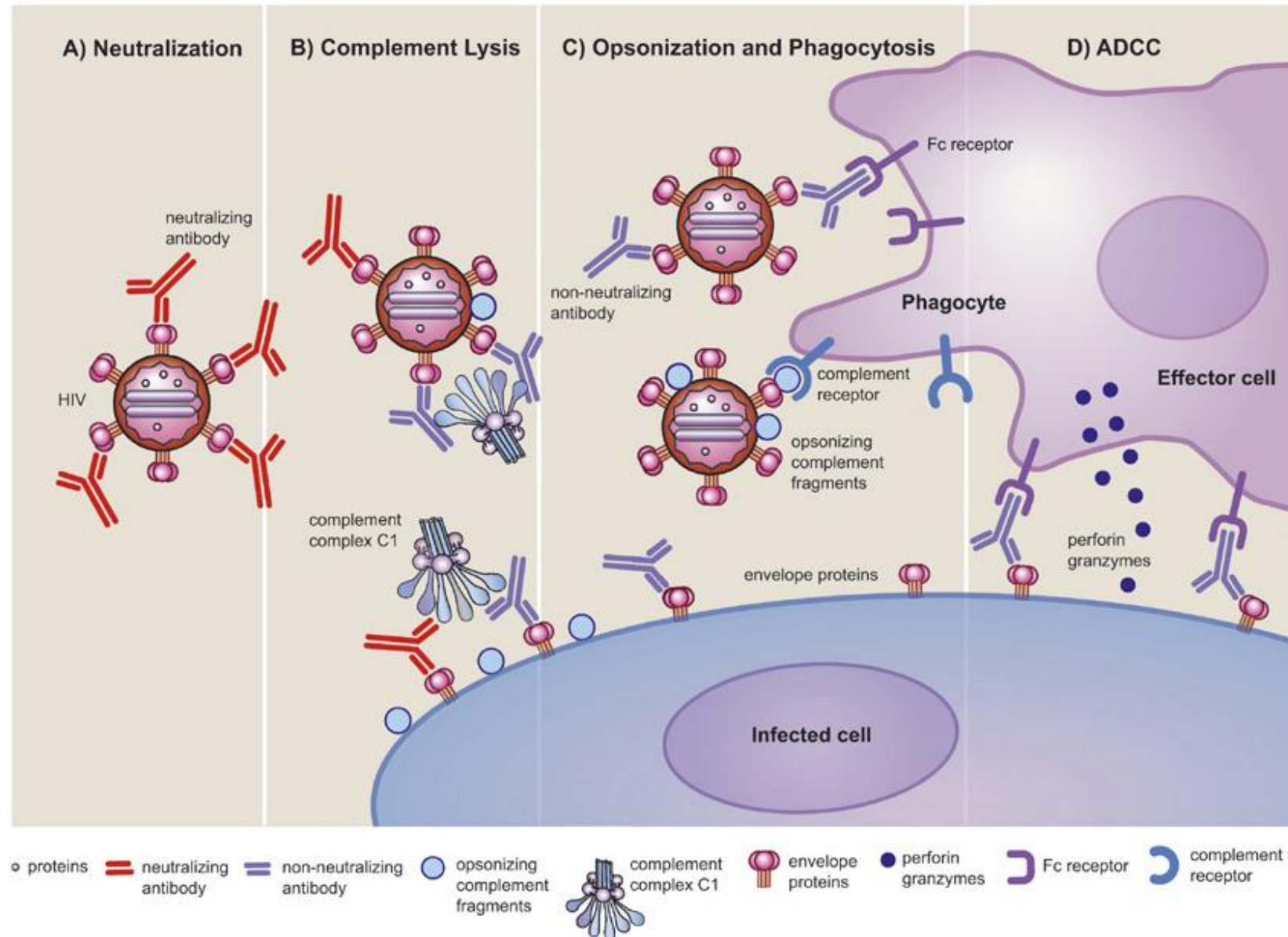
- CD4+ lymfocyty mohou být rozděleny na Th1 a Th2
 - Th1 sekretují velké množství IFN γ a IL-2 a řídí klonální expanzi CD8+ lymfocytů
 - Th2 sekretuje IL-4, IL-5 a IL-21 a řídí klonální expanzi B lymfocytů
- CD8+ lymfocyty jsou efektorové buňky; provádí lytický útok na buňky nesoucí cizí antigen s MHC I a produkují cytokiny, které mohou nalákat zánětlivé buňky

Indukce imunitní odezvy

- B buňka nese již Ig určité antigenní specifity, rozpozná tedy pouze konkrétní epitop
- mezitím antigen prezentující buňky (dendritické buňky a makrofágy) naváží ten stejný protein, endocytují, zpracují a vystaví pomocí MHC II
- CD4+ lymfocyty rozpoznají peptid prezentovaný MHC II, budou stimulovat B buňky produkcí cytokinů IL-4, IL-5 či IL-21
- maturované B buňky budou produkovat protilátky dané specifity

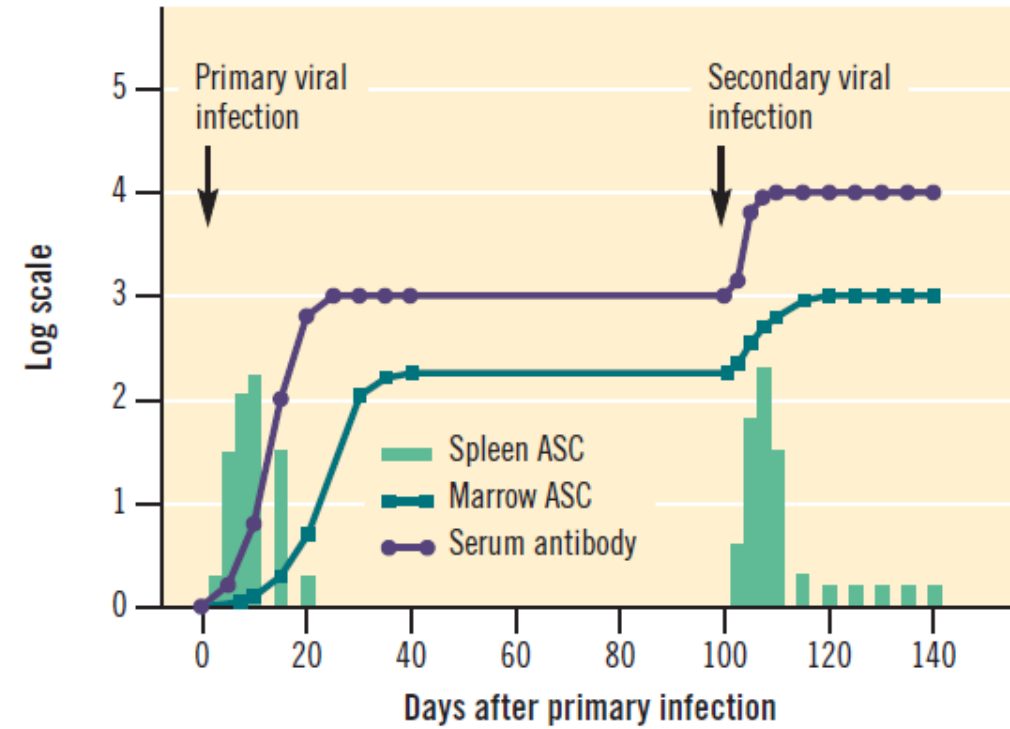
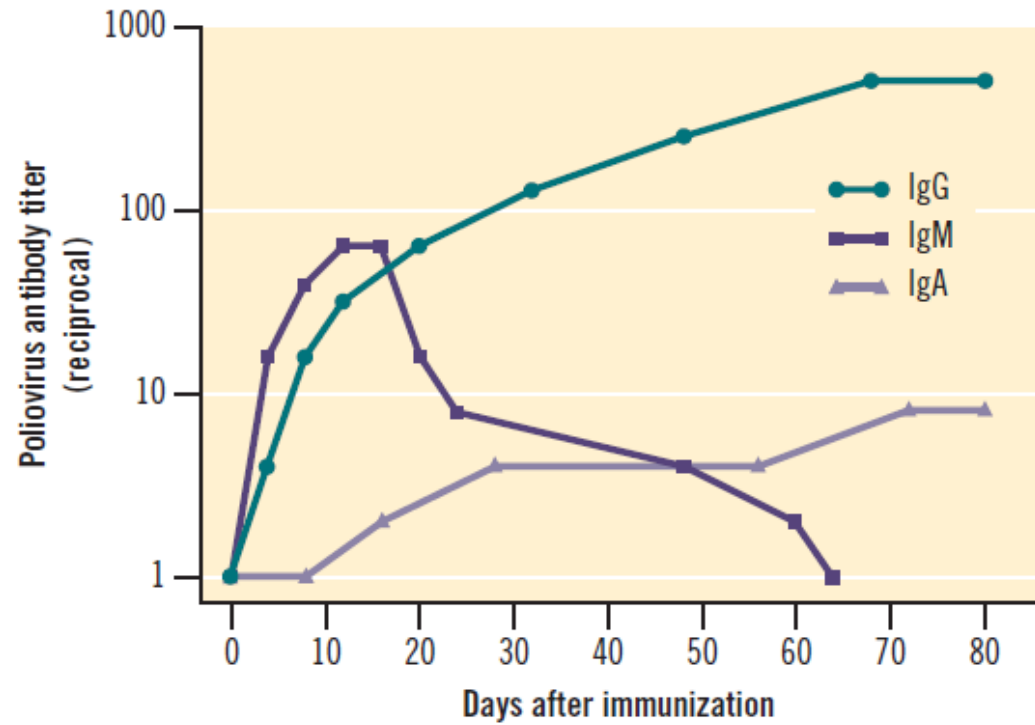


Efektorový účinek protilátek



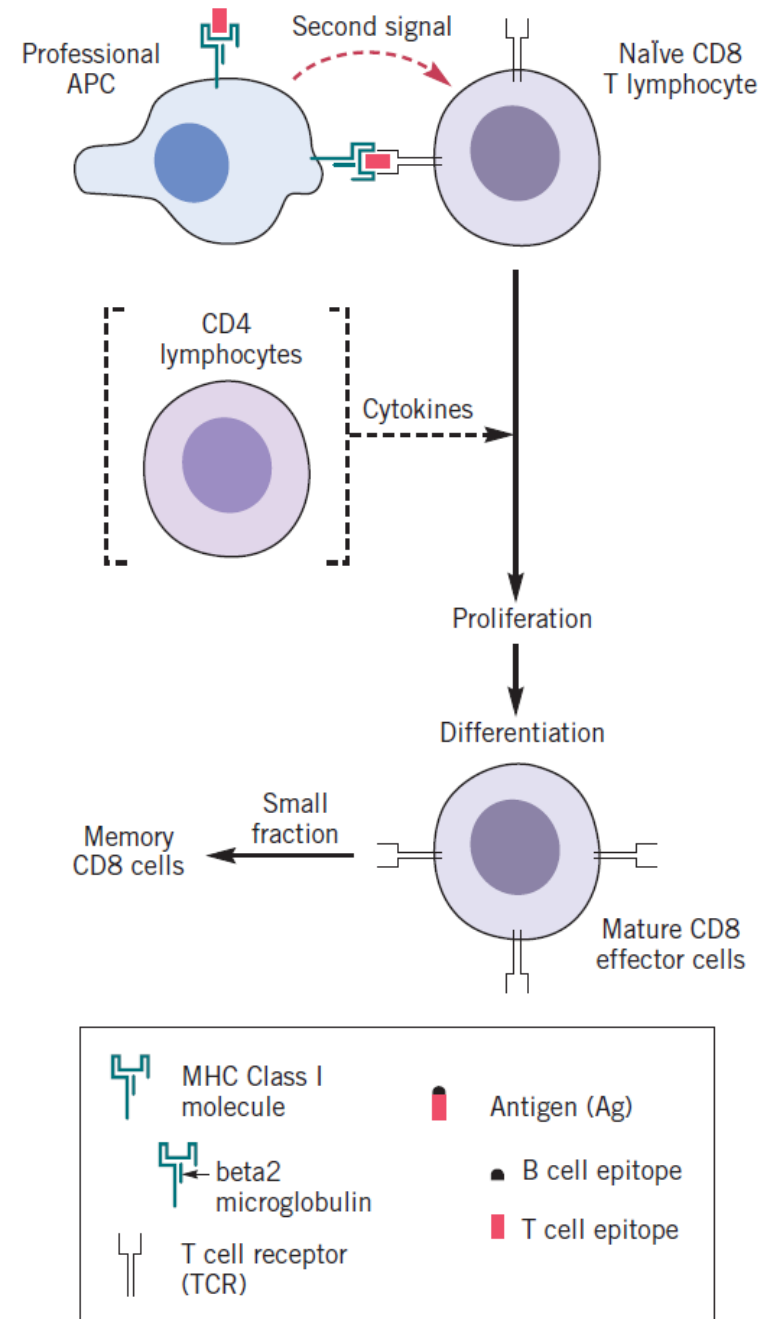
from M. Huber & A. Trkola (2007) *Journal of Internal Medicine*, 262(1)

Kinetika produkce protilátek



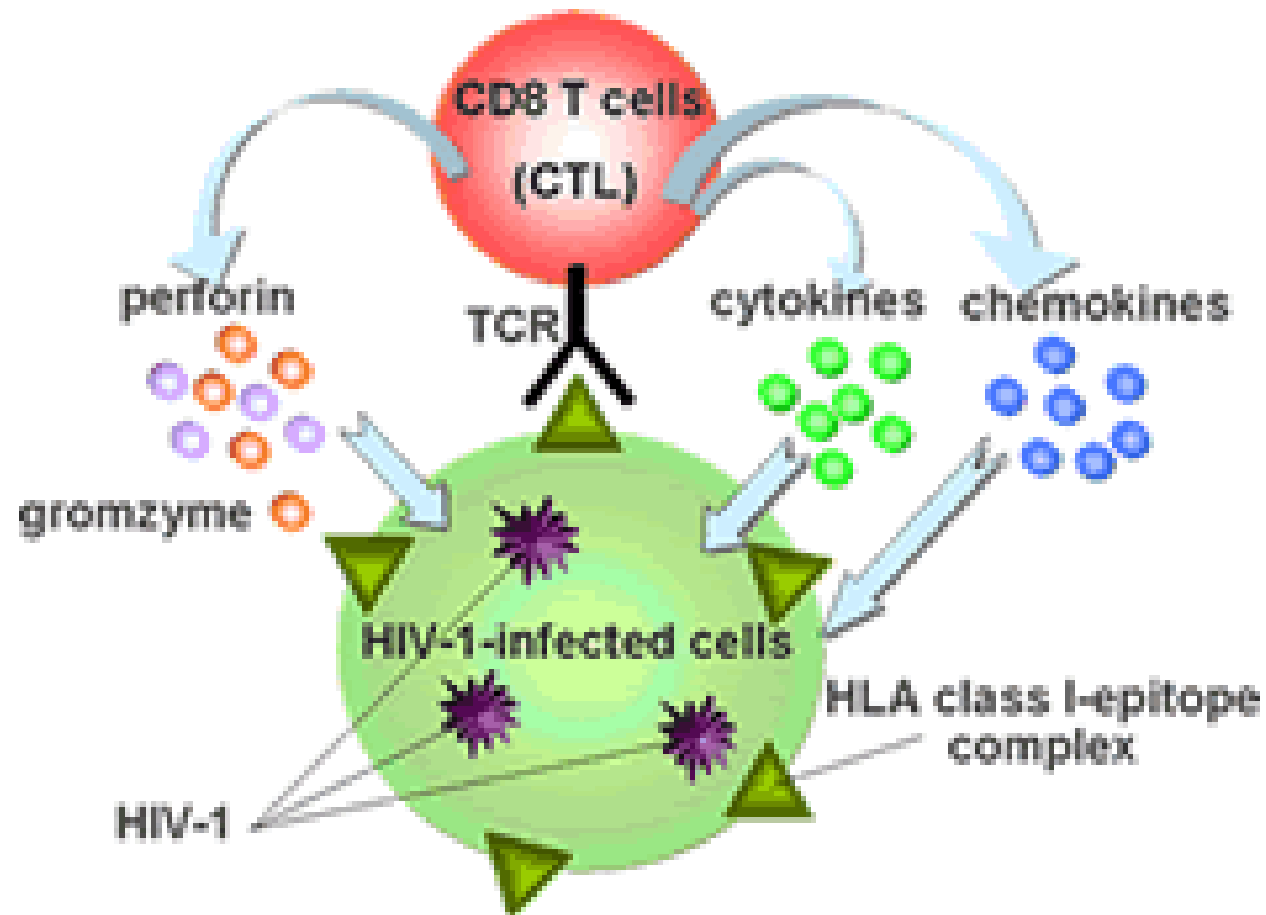
Indukce buněčné imunitní odezvy

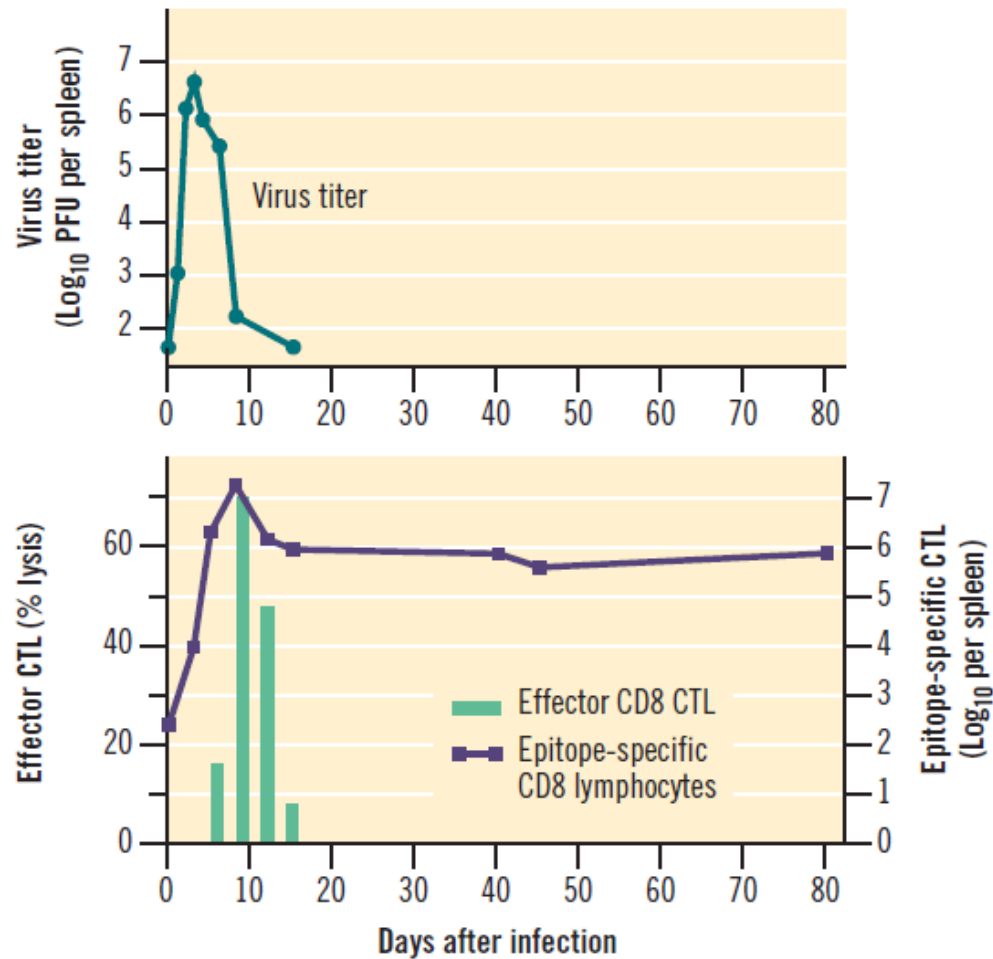
- antigen prezentující buňky vystaví antigen na MHC I; dendritické buňky migrují do spádové lymfatické uzliny
- v uzlině rozpoznáno CD8+ lymfocytem přes T-buněčný receptor
- pokud přijde druhý signál od dendritických buněk nebo CD4+ lymfocytů, nastane klonální expanze CD8+ lymfocytů a diferenciaci do podoby efektorových CD8+ lymfocytů



Efektorová funkce CD8+ lymfocytů

- CD8+ lymfocyty účinkují dvěma způsoby: cytolytickým útokem a sekrecí interleukinů a cytokinů
- v případě cytolytického efektu vylučují perforin a granzymy, které spouští apoptózu





- po skončení akutní fáze klesá množství CD8+ lymfocytů 10-100x, zbytek pak představují paměťové CD8+ T-lymfocyty (od efektorových se liší jinými povrchovými markery)

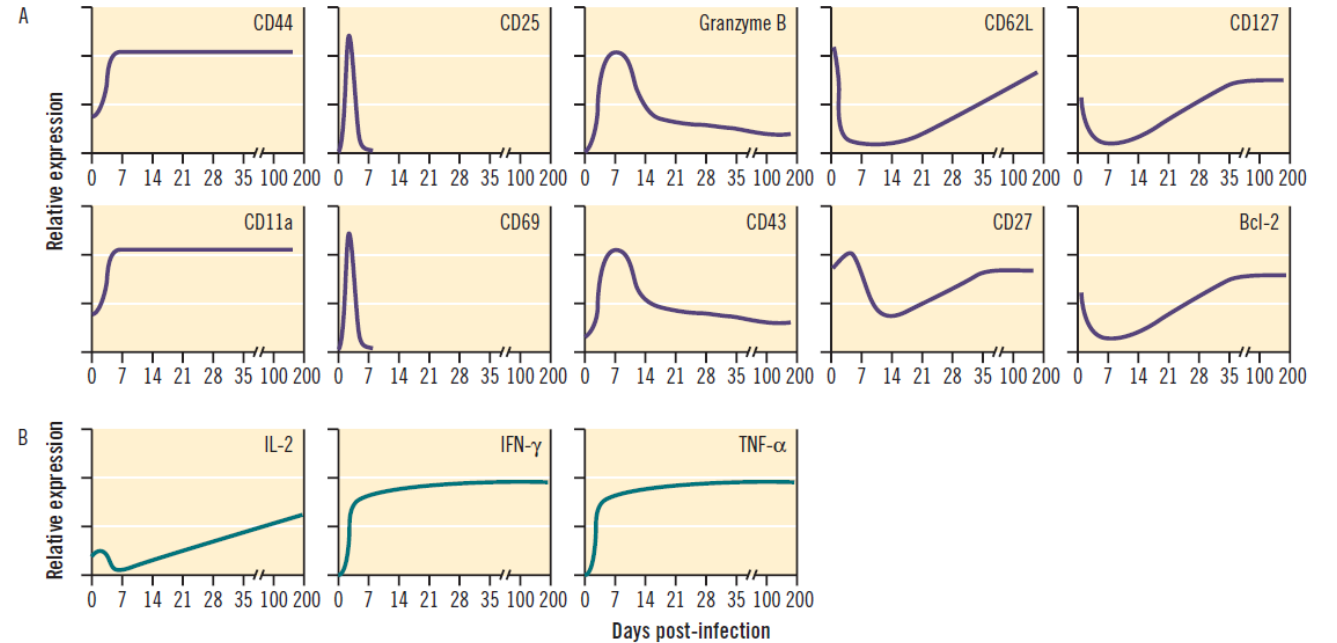


FIGURE 6.10 The conversion of CD8+ cells from effector to memory phenotype during and after acute viral infection. This graph shows CD8+ cells in the spleen of mice infected with LCMV, under conditions where the virus is cleared as in Figure 6.9. The upper panel (A) shows surface markers on CD8+ lymphocytes and the lower panel (B) shows expression of cytokines after 5 hours of in vitro antigen-specific stimulation of the same cells. Bcl-2: anti-apoptotic molecule; CD11a: adhesion molecule; CD25 part of IL-2 receptor; CD27: TNF receptor superfamily; D43: adhesion molecule; CD4+ 4: adhesion molecule; CD26L: lymph node homing receptor; CD69: signaling surface receptor; CD127: IL-7 receptor α chain. After Masopust D, Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. The role of programming in memory T-cell development. *Current Opinion in Immunology* 2004, 16: 217–225, with permission.

Shrnutí

- makrofágy, dendritické buňky a NK buňky jsou hlavní hráči přirozené imunity
- makrofágy a dendritické buňky nesou pattern recognition receptors
- významná úloha IFN a cytokinů při virové infekci
- specifická imunita má dva hlavní komponenty: protilátky a efektorové lymfocyty
- processing antigenu na MHC I a II molekulách
- B buňky, CD4 a CD8 lymfocyty
- imunologická paměť